



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

Σχολή Θετικών Επιστημών
Τμήμα Βιολογίας
Τομέας Φυσιολογίας Ζώων
και Ανθρώπου

Μελέτη του ρόλου της ομάδας των Minibrain/DYRK κινασών στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος

Διδακτορική Διατριβή

Νικόλαος Κοκκοράκης

Βιολόγος, MSc

Αθήνα 2024



HELLENIC REPUBLIC
**National and Kapodistrian
University of Athens**
— EST. 1837 —

**School of Science
Department of Biology
Section of Animal and
Human Physiology**

**Study of the role of Minibrain/DYRK kinases group in the
development of the nervous system**

Doctoral Thesis

Nikolaos Kokkorakis

Biologist, MSc

Athens 2024

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του ΕΚΠΑ δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (ν. 5343/1932, άρθρο 202).

Το κείμενο της Διδακτορικής Διατριβής δεν αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

1. Δρ. Παπαζαφείρη Παναγιώτα (Επιβλέπουσα), Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
2. Δρ. Μάτσα Ρεβέκκα, Συνεργαζόμενη Ερευνήτρια, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ
3. Δρ. Γαϊτάνου Μαρία, Κύρια Ερευνήτρια, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. Δρ. Παπαζαφείρη Παναγιώτα (Επιβλέπουσα), Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
2. Δρ. Μάτσα Ρεβέκκα, Συνεργαζόμενη Ερευνήτρια, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ
3. Δρ. Γαϊτάνου Μαρία, Κύρια Ερευνήτρια, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ
4. Δρ. Εμμανουηλίδου Ευαγγελία, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ
5. Δρ. Ευθυμιόπουλος Σπυρίδων, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
6. Δρ. Θωμαΐδου Δήμητρα, Διευθύντρια Ερευνών, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ
7. Δρ. Στραβοπόδης Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού ενορχηστρώνεται από τις συντονισμένες δράσεις των μορφογόνων. Τέτοια μορφογόνα είναι η πρωτεΐνη Sonic hedgehog (Shh), η μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών (bone morphogenetic protein, BMP) και τα μόρια Wnt, τα οποία δρουν σχηματίζοντας κλίσεις συγκέντρωσης σε αντίθετες διευθύνσεις κατά μήκος του ραχιαίο-κοιλιακού άξονα του αναπτυσσόμενου νωτιαίου μυελού. Το μορφογόνο Shh είναι ένα μόριο-κλειδί για τον καθορισμό των νευρωνικών (neuronal) και γλοιακών (glial) γενεαλογιών (lineages) κατά την ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού. Το μορφογόνο Shh παράγεται αρχικά στη νωτοχορδή (notochord) και στη συνέχεια κατά τη διάρκεια της νευρογένεσης παράγεται από το εδαφιαίο πέταλο (floor plate). Το μόριο Shh ρυθμίζει τη συνδυαστική (combinatorial) έκφραση μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι είναι απαραίτητοι στον καθορισμό κάθε νευρωνικού τύπου οδηγώντας στο σχηματισμό πέντε διακριτών κοιλιακών περιοχών προγονικών κυττάρων (ventral progenitor domains) (p3, pMN, p2, p1, and p0) οι οποίες παρατάσσονται κατά μήκος του ραχιαίο-κοιλιακού άξονα του νωτιαίου μυελού. Στον αναπτυσσόμενο εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του κοτόπουλου, το οποίο αποτελεί ένα πρότυπο και εύκολα προσβάσιμο νευροαναπτυξιακό σύστημα μελέτης, το μορφογόνο Shh ελέγχει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των νευρικών προγονικών κυττάρων (neural progenitors) και την επιβίωσή τους, αφενός με τη διατήρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού τους και αφετέρου προλαμβάνοντας τον κυτταρικό θάνατο κατά την ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού.

Κατά την ανάπτυξη, μία σημαντική υπερ-οικογένεια κινασών είναι αυτή των κινασών DYRK, η οποία είναι εξελικτικά συντηρημένη και συμμετέχει σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια με ρόλους-κλειδιά στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της κυτταρικής ομοιόστασης. Η κινάση Dyrk1B (dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1B, κινάση διπλής ειδικότητας ρυθμιζόμενη από φωσφορυλίωση τυροσίνης 1B), επίσης γνωστή ως Mirk (minibrain-related kinase, κινάση σχετιζόμενη με τη Minibrain της *Drosophila melanogaster*) είναι μέλος της υπερ-οικογένειας κινασών DYRK.

Η κινάση Dyrk1B παίζει κρίσιμο ρόλο στη μυογένεση, τη σπερματογένεση, τη λιπογένεση, καθώς και εμπλέκεται στις ανθρώπινες ασθένειες, όπως είναι το μεταβολικό σύνδρομο και ο καρκίνος. Η κινάση Dyrk1B ασκεί τις λειτουργίες της δια μέσου των ρυθμιστικών της επιδράσεων στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στην κυτταρική επιβίωση, στην κυτταρική κινητικότητα, στη μεταγραφή και στη φλεγμονή. Επιπροσθέτως, η κινάση Dyrk1B αποτελεί κεντρικό διαμεσολαβητή (mediator) των σηματοδοτικών μονοπατιών Shh/Gli, PI3K/mTOR/AKT και RAF/MEK/ERK, όπως είναι κυρίως γνωστό από τα συστήματα μελέτης στον καρκίνο. Η κινάση Dyrk1B εκφράζεται φυσιολογικά σε υψηλά επίπεδα στον σκελετικό μυ και στους όρχεις, ενώ παρατηρείται αυξημένη έκφραση στον καρδιακό μυ και στον εγκέφαλο, συγκριτικά με άλλους ιστούς.

Από προηγούμενη μελέτη του Εργαστηρίου Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας – Βλαστικών Κυττάρων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, δείχθηκε για πρώτη φορά η συμμετοχή

της κινάσης Dyrk1B και στη νευρογένεση, καθώς δείχθηκε ότι εκφράζεται στον εγκέφαλο ποντικού και ότι επάγει *in vitro* την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο και τη νευρωνική διαφοροποίηση των κυττάρων Neuro2A. Γι' αυτό το λόγο, στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, στόχο αποτέλεσε αφενός η μελέτη της έκφρασης της κινάσης Dyrk1B στο ΚΝΣ του ποντικού και του κοτόπουλου και αφετέρου η διαλεύκανση της δράσης της *in vivo* κατά την ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού του εμβρύου του κοτόπουλου, με προσεγγίσεις 'προσθήκης' και 'απώλειας λειτουργίας' (*gain-and-loss-of-function approaches*).

Αρχικά, διερευνήθηκε το αναπτυξιακό πρότυπο έκφρασης της κινάσης Dyrk1B στο ΚΝΣ του ποντικού και του κοτόπουλου κατά την εμβρυογένεση, τη μεταγεννητική και ενήλικη ζωή μέσω *in situ* υβριδισμού (*in situ* hybridization, ISH) και ανοσοϊστοχημείας (immunohistochemistry, IHC). Συγκεκριμένα, μέσω ανοσοϊστοχημείας δείχθηκε ότι η κινάση Dyrk1B εκφράζεται στον αναπτυσσόμενο εμβρυϊκό εγκέφαλο του ποντικού ηλικίας E12.5, από το φλοιό και το αρχέγονο όργανο (primordium) του ιππόκαμπου και αργότερα στον εγκέφαλο μεταγεννητικής ηλικίας P7, από το φλοιό, το πρόσθιο μεταναστευτικό μονοπάτι (rostral migratory stream), τον ιππόκαμπο και την παρεγκεφαλίδα, από πολλαπλασιαζόμενα προγονικά κύτταρα και από ώριμους νευρώνες. Στον ενήλικο εγκέφαλο ποντικού εκφράζεται από τους φλοιικούς νευρώνες, τον ιππόκαμπο και την οδοντωτή έλικα (dentate gyrus). Συγκεκριμένα, στην οδοντωτή έλικα που αποτελεί μία περιοχή που επιτελείται η ενήλικη νευρογένεση (neurogenic niche), η έκφρασή της σηματοδοτεί όλα τα στάδια της ενήλικης νευρογένεσης.

Στη συνέχεια μέσω ανοσοϊστοχημείας και επιτόπιου (*in situ*) RNA υβριδισμού σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια του εμβρυϊκού νωτιαίου μυελού του ποντικού και του κοτόπουλου, δείχθηκε ότι πέραν της πρώιμης έκφρασής της στη νωτοχορδή και στο εδαφιαίο πέταλο, η κινάση Dyrk1B εκφράζεται και από τα πολλαπλασιαζόμενα νευρικά προγονικά κύτταρα της κοιλιακής ζώνης, καθώς και από τους διαφοροποιημένους μεταμιτωτικούς κινητικούς νευρώνες. Επιπλέον, δείχθηκε, με ανοσοαποτύπωση κατά Western (western blot, WB), ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της κινάσης Dyrk1B μειώνονται κατά την ανάπτυξη του ΚΝΣ του ποντικού και του κοτόπουλου.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν *in vivo* προσεγγίσεις, στον αναπτυσσόμενο νευρικό σωλήνα του εμβρύου του κοτόπουλου στο αναπτυξιακό στάδιο E2, όπως πειράματα 'προσθήκης λειτουργίας' (*gain-of-function*), με την εφαρμογή της *in ovo* μονόπλευρης ηλεκτροδιάτρησης με πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της κινάσης Dyrk1B (unilateral *in ovo* electroporation), καθώς και πειράματα 'απώλειας λειτουργίας' (*loss-of-function*) με τη χρήση του εκλεκτικού της αναστολέα AZ191. Διαπιστώθηκε ότι η κινάση Dyrk1B επηρεάζει αρνητικά τον πολλαπλασιασμό και θετικά τη νευρωνική διαφοροποίηση των νευρικών προγονικών κυττάρων στο στάδιο E4 και επάγει την απόπτωση ειδικά στην περιοχή των κινητικών νευρώνων. Ειδικότερα, η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B μειώνει τους αριθμούς των κοιλιακών προγονικών κυττάρων p2, pMN και p3, καθώς και των κινητικών νευρώνων και των ενδιάμεσων νευρώνων της περιοχής V2a, ενώ η φαρμακολογική αναστολή της ενεργότητας της ενδογενούς κινάσης Dyrk1B από τον εκλεκτικό της αναστολέα, AZ191 αυξάνει τους

αντίστοιχους κυτταρικούς πληθυσμούς.

Ο παρατηρούμενος έντονος κοιλιακός φαινότυπος που προκαλείται από την κινάση Dyrk1B, καθώς και το γεγονός ότι η ανάπτυξη της κοιλιακής περιοχής του νωτιαίου μυελού πραγματοποιείται υπό την ισχυρή επίδραση της κλίσης του μορφογόνου Shh, καθώς επίσης και η γνωστή εμπλοκή της κινάσης Dyrk1B στο σηματοδοτικό μονοπάτι Shh/Gli στον καρκίνο, οδήγησαν στη διερεύνηση της πιθανής εμπλοκής της στο μονοπάτι Shh/Gli και στη νευρογένεση. Πράγματι, μέσω ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε προϊόν αντίστροφης μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο (real-time RT-qPCR) και *in situ* υβριδισμού, δείχθηκε ότι η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B καταστέλλει τα επίπεδα mRNA του μορφογόνου Shh και των τελεστών του, Gli2 και Gli3. Επιλέχθηκαν προς μελέτη, οι τελεστές Gli2 και Gli3, καθώς στον κοιλιακό νευρικό σωλήνα ο κύριος ενεργοποιητής του Shh είναι ο τελεστής Gli2, ο οποίος σε συνεργασία με τον τελεστή Gli3, ρυθμίζει το κοιλιακό πρότυπο και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αντιθέτως, η μεταγραφή των Shh και των Gli2, Gli3 αυξάνεται με την αναστολή της κινάσης Dyrk1B μέσω του αναστολέα της, AZ191, ή μέσω του αγωνιστή του Smoothened (SMO), SAG, ο οποίος ενεργοποιεί καταρροικά το μονοπάτι Shh. Η χρήση του αγωνιστή SAG επιλέχθηκε για την επιβεβαίωση του πιθανού μηχανισμού δράσης της κινάσης Dyrk1B μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού Shh. Πράγματι, στα πειράματα 'διάσωσης φαινοτύπου' που πραγματοποιήθηκαν, δείχθηκε ότι ο αγωνιστής SAG αποκαθιστά τον διαμεσολαβούμενο από τη λειτουργία της κινάσης Dyrk1B έντονο κοιλιακό φαινότυπο.

Επιπροσθέτως, οι πληθυσμοί των κινητικών νευρώνων που επηρεάζονται από την κινάση Dyrk1B στο αναπτυξιακό στάδιο E4, μελετήθηκαν περαιτέρω στο μεταγενέστερο στάδιο E6, αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο οι κινητικοί νευρώνες έχουν ήδη οργανωθεί σε κινητικές στήλες (motor columns) και διαπιστώθηκε ότι η κινάση Dyrk1B επηρεάζει εκλεκτικά το μέγεθος της μεσαίας πλευρικής κινητικής στήλης (medial lateral motor column, LMCm), στην οποία και αποδείχθηκε η περιορισμένη έκφραση του Shh στην ηλικία αυτή.

Συμπερασματικά, στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής, αυτές οι παρατηρήσεις αποκαλύπτουν μία νέα ρυθμιστική λειτουργία της κινάσης Dyrk1B στην ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού του κοτόπουλου και προσθέτουν ευρύτερη γνώση για πρώτη φορά, όσον αφορά για την έκφρασή της στο ΚΝΣ και το ρόλο της στη νευρογένεση, καθώς μέχρι σήμερα δεν υπήρχαν άλλες αναφορές στη βιβλιογραφία. Η κινάση Dyrk1B εκφράζεται από πολλαπλασιαζόμενους νευροβλάστες και μεταμιτωτικούς νευρώνες, ενώ η έκφρασή της στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου στον εγκέφαλο του ποντικού σηματοδοτεί όλα τα στάδια της ενήλικης νευρογένεσης. Επίσης η έκφραση της είναι μειούμενη κατά την ανάπτυξη του ΚΝΣ του ποντικού και του κοτόπουλου, υποδεικνύοντας έναν σημαντικό ρόλο στην αρχή της νευρογένεσης. Όσον αφορά την ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού, ως πιθανός μηχανισμός δράσης της κινάσης Dyrk1B προτείνεται ότι η κινάση αυτή δρα άμεσα ή έμμεσα ως ένας ισχυρός μεταγραφικός καταστολέας του μορφογόνου Sonic hedgehog (Shh) και των τελεστών του, Gli2 και Gli3, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του εμβρυϊκού νωτιαίου μυελού του κοτόπουλου, ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο τους πληθυσμούς των κοιλιακών προγονικών

κυττάρων p2, pMN και p3 που βρίσκονται κάτω από την ισχυρή επιρροή της κλίσης συγκέντρωσης του μορφογόνου Shh. Ειδικότερα, η κινάση Dyrk1B ελέγχει τη δημιουργία και την επιβίωση των κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού (SpMNs), καθώς και την οργάνωση τους στην κινητική στήλη LMCm. Αυτά τα δεδομένα καθιστούν την κινάση Dyrk1B έναν πιθανό θεραπευτικό στόχο για τις ασθένειες των κινητικών νευρώνων, όπως η πλάγια αμυοτροφική σκλήρυνση (ALS).

ABSTRACT

Spinal cord (SC) development is orchestrated by coordinated actions of morphogens such as Sonic hedgehog (Shh), bone morphogenetic protein (BMP) and Wnt molecules that act by forming gradients in opposite directions along the dorsoventral axis of the developing SC. Shh is a key molecule for the specification of neuronal and glial cell lineages during SC development. Shh is produced initially by the notochord (NC), which acts as an organizing center, later during neurogenesis by floor plate. Shh regulates the combinatorial expression of a set of transcription factors that are necessary and sufficient to specify each neuronal subtype, resulting in the formation of five discrete ventral progenitor domains (p3, pMN, p2, p1, and p0) that are arrayed along the dorso-ventral axis of SC. In the chick SC, which is an easily accessible neurodevelopmental model for study, Shh controls cell cycle progression of neural progenitors and their survival by maintaining progenitor cell proliferation and preventing cell death during SC development.

During development, an important superfamily of kinases is that of DYRK kinases, which are evolutionarily conserved and participate in various signaling pathways with key roles in the control of cellular proliferation, differentiation, and homeostasis. Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1B (Dyrk1B), also known as minibrain-related kinase (Mirk) is a member of the DYRK kinase superfamily. Dyrk1B has a critical role in myogenesis, spermatogenesis, and adipogenesis, while it is implicated in human diseases, such as metabolic syndrome, and cancer. Dyrk1B exerts its functions through its regulatory effects on cell cycle progression, cell differentiation, cell survival, cell motility, transcription and inflammation. Moreover, Dyrk1B is a central mediator of the Shh/Gli, PI3K/mTOR/AKT and RAF/MEK/ERK signaling pathways, as is mainly known from studies in cancer. Dyrk1B is normally expressed at high levels in skeletal muscle and testis, while increased expression is observed in cardiac muscle and brain compared to other tissues.

A previous study of the Laboratory of Cellular and Molecular Neurobiology – Stem Cells of Hellenic Pasteur Institute showed for the first time the involvement of Dyrk1B in neurogenesis. Specifically, it was shown that Dyrk1B is expressed in the mouse brain and induces *in vitro* cell cycle exit and neuronal differentiation in Neuro2A cells. These observations suggest that Dyrk1B may have a similar role in cell cycle progression/exit and differentiation of neural progenitors during neurogenesis *in vivo*. To address this question, in the context of this PhD thesis, first it was investigated the expression of Dyrk1B in the CNS of mouse and chick during development and secondly were performed *in vivo gain-and-loss-of-function* approaches in order to elucidate the role of Dyrk1B kinase in the development of the spinal cord of the chick embryo.

Initially, it was investigated the developmental pattern of Dyrk1B expression in mouse and chick CNS during embryogenesis, postnatal and adult life through *in situ* hybridization (ISH) and immunohistochemistry (IHC). Specifically, it was shown, by using IHC, that Dyrk1B is expressed in the developing E12.5 embryonic mouse brain, in the cortex, and hippocampal primordium and later

in the postnatal P7 brain, in the cortex, the rostral migratory stream (RMS), the hippocampus and in the cerebellum, by proliferating progenitor cells and by mature neurons. In the adult mouse brain, Dyrk1B is expressed by cortical neurons, and by the hippocampus and the dentate gyrus. In particular, in the dentate gyrus which is a neurogenic niche of adult neurogenesis Dyrk1B expression marks all stages of adult neurogenesis. Furthermore, through ISH and IHC that were performed in distinct developmental stages of the embryonic mouse and chicken spinal cord it was shown that except for its early expression in the notochord and the floor plate, Dyrk1B is also expressed by the proliferating neural progenitors in the ventricular zone, as well as by the differentiated postmitotic motor neurons. In addition, it was shown, by Western blotting (WB), that Dyrk1B protein expression levels are decreased during CNS development of mouse and chick.

In order to elucidate Dyrk1B functional role *in vivo*, experimental approaches were performed in the developing neural tube of the chick embryo at the developmental stage E2, such as *gain-of-function* experiments, by applying unilateral *in ovo* electroporation with an expression plasmid of Dyrk1B, as well as *loss-of-function* experiments, by using Dyrk1B selective inhibitor, AZ191. Dyrk1B was found to affect negatively the proliferation of neural progenitors and positively their neuronal differentiation at E4 and induces apoptosis specifically in the motor neuron domain. Specifically, overexpression of Dyrk1B decreases the numbers of p2, pMN and p3 ventral progenitors, as well as of motor neurons, and V2a interneurons, while the pharmacological inhibition of endogenous Dyrk1B activity, by its selective inhibitor AZ191, increases the numbers of the corresponding cellular populations.

The observed pronounced ventral phenotype caused by Dyrk1B and the fact that ventral spinal cord development is strongly influenced by the Shh gradient, as well as the known Dyrk1B cross-talk with the Shh/Gli signaling pathway in cancer, led to the investigation of a possible involvement of Dyrk1B in the Shh/Gli pathway also in neurogenesis. Indeed, it was shown by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) and ISH that overexpression of Dyrk1B suppresses the mRNA levels of Shh and its effectors Gli2 and Gli3. Gli2 and Gli3 were chosen for study, as in the ventral neural tube the major activator of Shh is Gli2 and in cooperation with Gli3, it regulates the ventral patterning and the proliferation. In contrast, the transcription of Shh, Gli2, and Gli3 is increased upon the inhibition of Dyrk1B via its selective inhibitor AZ191 or via the Smoothed (SMO) agonist SAG which it activates downstream the Shh pathway. The use of the SAG agonist was chosen in order to confirm the potential mechanism of action of Dyrk1B through the Shh signaling pathway. Indeed, in the performed phenotype rescue experiments, the SAG agonist was shown to restore the Dyrk1B mediated pronounced ventral phenotype.

Moreover, the motor neuron populations, affected by Dyrk1B at the developmental stage E4, were furthermore studied at the later stage E6, at which motor neurons have already been organized into motor columns and it was found that Dyrk1B selectively affects the size of medial lateral motor

column (LMCm), in which was also demonstrated the Shh restricted expression at this developmental stage.

In conclusion, in the context of the present PhD thesis, these observations collectively reveal a novel regulatory function of Dyrk1B kinase in the chick spinal cord development and also contribute in a broader knowledge, for the first time, regarding Dyrk1B expression in the CNS and its role in neurogenesis, as until today there are no other references in the literature. Dyrk1B is expressed by proliferating neuroblasts and postmitotic neurons, while its expression in the dentate gyrus of the mouse brain marks all stages of adult neurogenesis. Also Dyrk1B expression is decreased during mouse and chick CNS development, indicating an important role in the first stages of neurogenesis.

Concerning spinal cord development, as a possible mechanism of action of Dyrk1B, it is proposed that this kinase acts directly or indirectly as a strong transcriptional repressor of Shh and of its effectors Gli2 and Gli3 during the development of the embryonic chick spinal cord, thereby regulating the populations of p2, pMN, and p3 ventral progenitors that are under the strong influence of the Sonic hedgehog (Shh) gradient. In particular, Dyrk1B kinase controls the generation and survival of spinal cord motor neurons (SpMNs) and their organization in the LMCm motor column. These data make Dyrk1B a potential therapeutic target for motor neuron diseases, such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS).

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Και να που έφτασα ως εδώ.. Αναλογιζόμενος όλη τη διαδρομή μου, τη γενικότερη, αλλά και αυτή εδώ, στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, άλλοτε μοναχική και άλλοτε πιο φωτεινή, μία σκέψη έρχεται: «Έκανες αυτό που ήθελες, το χρώσταγες σε σένα», φωνή εαυτού ή φωνή ενός αγαπημένου προσώπου μου. Η όλη πορεία κύλησε σαν αιωνιότητα που κλωθογύριζε σε δύσκολες στιγμές ή νερό που κύλησε και έφυγε μη περνώντας δεύτερη φορά, όπως και ο Ηράκλειτος θα συμφωνούσε. Από συνδυασμό γεγονότων, όπως όλα που κάπως έτσι γίνονται, βρέθηκα στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ να πραγματοποιώ αυτή την απαιτητική μελέτη. Και μέσα από αυτή τη μελέτη, έμαθα να ξεπερνάω τις αντοχές μου και να ανεβάζω τον πήχη. Σε αυτή την πορεία γεμάτη πειράματα και εξαγωγή χρήσιμης γνώσης, γεμάτη ανθρώπους, θέλω να ευχαριστήσω για διαφορετικούς λόγους ανθρώπους που η παρουσία τους αποτέλεσε καταλύτη αλλαγών της σκέψης μου και της πράξης μου.

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τη Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής, την επιβλέπουσα από το Τμήμα Βιολογίας Δρ. Παναγιώτα Παπαζαφείρη, τη Δρ. Ρεβέκκα Μάτσα που δημιούργησε το Εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας –Βλαστικών Κυττάρων που με φιλοξένησε αυτά όλα τα χρόνια, αλλά και τη Δρ. Μαρία Γαϊτάνου που με επέβλεψε επιστημονικά και ερευνητικά σε όλα τα βήματα αυτής της έρευνας στο οικείο εργαστήριο. Η συνεισφορά τους και οι συμβουλές τους ήταν πολύτιμες για την εξέλιξη αυτής της εργασίας αλλά και της επιστημονικής μου σκέψης. Ιδιαίτερη μνεία έχει κερδίσει η Δρ. Γαϊτάνου για την ιδιαίτερη προσέγγιση στον τρόπο επιστημονικής καθοδήγησης της οποίας τους καρπούς δρέπω με την ολοκλήρωση της διατριβής μου. Η συνεργασία μαζί της υπήρξε εμπνευστική. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Πάνο Πολίτη για τη συνεργασία μας, τις σημαντικές του συμβουλές και όλη την επιστημονική βοήθεια που προσέφερε, όπως και όλο το ευχάριστο κλίμα που δημιουργούσε σε κάθε μου πειραματική επίσκεψη στο Εργαστήριό του στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ).

Δεν θα μπορούσα να ξεχάσω τις Δρ. Μιμίκια Θωμαΐδου, Δρ. Έρα Ταουφίκ και Δρ. Φλωρεντία Παπαστεφανάκη για όλες τις επιστημονικές τους παρατηρήσεις και τη βοήθειά τους σε διάφορες πτυχές των πειραματικών διαδικασιών και τις γενικότερες συμβουλές τους. Πρέπει να ευχαριστήσω την Δρ. Παρή Κουτσουδάκη για τις όμορφες κουβέντες μας, όπως και την «Φύλακα» της Μονάδας Μικροσκοπίας Δρ. Ευαγγελία Ξύγγη, για όλη την πολύτιμη βοήθεια στις διάφορες διατάξεις της μικροσκοπίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Δρ. Κατερίνα Σέγκλια, για όλες εκείνες τις συμβουλές και κουβέντες, όλα αυτά τα χρόνια και το όμορφο κλίμα στο εργαστήριο. Σε αυτό το μήκος κύματος κινήθηκε και η Δρ. Νέλλη Προδρομίδου με την ιδιαίτερη αίσθηση του χιούμορ. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Κατερίνα Αραβαντινού-Φατώρου για όλες τις πολύ όμορφες κουβέντες που κάναμε, γειπνιάζοντας στα γραφεία και τους πάγκους μας. Ευχαριστώ, επίσης, την Δρ. Τζωρτζίνα Κουρούπη για την επιστημονική της βοήθειά τις διάφορες κουβέντες μας. Ξεχωριστή μνεία για την Δρ. Έλσα Παπαδημητρίου για όλες τις κουβέντες μας επί πολλών θεμάτων, που δημιούργησε μία

πολύ θετική νησίδα στην ερευνητική και μη καθημερινότητα. Δεν θα μπορούσα να μην αναφέρω τον Δρ. Πάνο Χανδρή για όλες εκείνες τις ενδιαφέρουσες επιστημονικές και μη κουβέντες μας αλλά και την, επίσης, ιδιαίτερη αίσθηση του χιούμορ που έχει.

Θα ήθελα, στη συνέχεια, να ευχαριστήσω πολύ, τα απερχόμενα μέλη του Εργαστηρίου, τον Δρ. Κωστή Τσιώρα που διαπρέπει πλέον στο εξωτερικό για τους λίγους μήνες συνύπαρξης στην αρχή της πορείας μου στο Εργαστήριο, την τότε μεταπτυχιακή φοιτήτρια, πλέον Διδάκτωρ, Κατερίνα Δούκα για τις επιστημονικές και μη κουβέντες μας, την τότε μεταπτυχιακή φοιτήτρια, πλέον Διδάκτωρ, Μαρία Χαραλάμπους, όπως και τις, πλέον Διδάκτορες, Ράνια Ζυγογιάννη και Νάσια Αντωνίου που συνυπήρξαμε για χρόνια στο Εργαστήριο, για όλες τις ενδιαφέρουσες κουβέντες μας. Πώς να ξεχάσω την Δρ. Νίκη Νίνου με την από χρόνια θετική ματιά και αισιοδοξία για τη ζωή; Την ευχαριστώ για όλη τη θετική ενέργεια που μοιράζει. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την συνάδελφο Υποψήφια Διδάκτωρ για χρόνια και τώρα πλέον Δρ. Ειρήνη Θάνου για όλες τις χρήσιμες και ενδιαφέρουσες κουβέντες μας. Δεν θα πρέπει να ξεχάσω τις συναδέλφους Υποψήφιες Διδάκτορες Ελισσάβη Ακριώτη και Μαίρη Μαργαρίτη, των οποίων η παρουσία δεν θα περνούσε απαρατήρητη. Τις ευχαριστώ για όλες τις κουβέντες μας και όλη τη βοήθειά τους προς εμένα όταν χρειαζόταν.

Η παρουσία πολλών επίσης συναδέλφων φοιτητών ήταν ευχάριστη και τους ευχαριστώ γι' αυτό και για την άψογη συνεργασία μας. Πρώτοι από αυτούς είναι η κ. Βάνα Ναλμπάντη, με την οποία συνεργαστήκαμε άψογα όλο τον καιρό που ήταν στην ομάδα της Δρος Γαϊτάνου, ως μεταπτυχιακή φοιτήτρια και πλέον απόφοιτη, και τον φοιτητή Διαμαντή Δεδούση, το έτερο μέλος της ομάδας, για όλη την ευχάριστη διάθεση που μπορούσε να δημιουργήσει. Ακόμη, για την άψογη συνεργασία μας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ολυμπία Αποκότου, Χριστίνα Πάσχου και Τάσο Κόλλια για την καλή συνύπαρξη και τις ωραίες κουβέντες μας στο Εργαστήριο. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την εξω-ιδρυματική συνάδελφο Μάγδα Χριστοπούλου για τις καίριες κουβέντες μας και τη δική της μοναδική οπτική.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και το Τμήμα Ζωϊκών Προτύπων Βιοϊατρικής Έρευνας (ΤΖΠΒΕ) του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ για τη συνδρομή τους κάθε φορά που χρειαζόταν. Τη Δρ. Ειρήνη Φραγκιαδάκη και τους άξιους ζωοκόμους Αργυρώ Λάππα, Αριάδνη Κάρλες, Άγγελο Βαγιωνά, Νίκο Βλαχογιάννη και Βασίλη Δήμο. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις Υπευθύνους καθαριότητας και αποστείρωσης επιστημονικού εξοπλισμού και παρασκευής θρεπτικών μέσων καλλιιεργειών κ. Μαρία Κανδρή και κ. Μυρσίνη Ακσαραφλού, διότι η παρουσία τους αν και διακριτική ήταν πάντα εκ των ων ουκ άνευ για την απρόσκοπτη λειτουργία των εργαστηρίων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, όπως την ορίζω εγώ, για όλο το χρονικό διάστημα που ήταν ενθαρρυντική, αλλά πιο πολύ από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς εκείνα τα πρόσωπα, τα οποία αυτές οι σελίδες δεν μπορούν να τα κρατήσουν και τα κρατάω μέσα μου. Που με αγάπησαν και τα αγάπησα και με στήριξαν και για τα οποία θα μπορούσε ένας ποιητής να πει:

Με μία Νότα
Η μουσική πρώτη
Αρχίνησε

Με μία Νότα
Και μία πεθυμιά
Μια
Άνοιξη να τραγούδα και
Να γεννιέται
Συνεχώς

Με μία Νότα
Ταξίδι της γνώσης
Και ζωής
Να δημιουργείται ξανά

Σ' ένα πεντάγραμμο
Όλη μου τη ζωή κοιτάω
Και ανεβαίνω...

Νικόλας Ελπινώτης
«Το κρυμμένο Σολ της καρδιάς μου»

***‘Φύσις κρύπτεσθαι φιλεῖ
Ἡράκλειτος***

...Στη μνήμη του πατέρα μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	9
ABSTRACT.....	13
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	17
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	23
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	26
/ABBREVIATIONS	26
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	31
A. Νευρικό σύστημα.....	31
A.1. Κυτταρικοί τύποι του νευρικού συστήματος.....	31
A.2. Ανάπτυξη του νευρικού συστήματος.....	31
A.3. Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και κυτταρική διαφοροποίηση.....	33
B. Η ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού	34
B.1. Εισαγωγικά	34
B.2. Το ραχιαίο-κοιλιακό πρότυπο του νωτιαίου μυελού των σπονδυλωτών	35
Γ. Γενικά στοιχεία για την οικογένεια των κινασών DYRK	48
Γ.1. Φυλογενετικές σχέσεις –Ταξινόμηση της οικογένειας των κινασών DYRK	48
Γ.2. Δομή και λειτουργία των κινασών DYRK	49
Γ.3. Αναστολείς της δράσης των κινασών DYRK	52
Δ. Η κινάση Mirk/Dyrk1B.....	55
Δ.1. Δομή της κινάσης Mirk/Dyrk1B.....	55
Δ.2. Η κυτταρική τοπολογία της κινάσης Dyrk1B.....	56
Δ.3. Ρύθμιση ενεργότητας της κινάσης Dyrk1B	56
Δ.4. Η κινάση Dyrk1B δρα κυρίως ως ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου	57
Δ.5. Ο ρόλος της κινάσης Dyrk1B στην κυτταρική επιβίωση	59
Δ.6. Ο ρόλος της κινάσης Dyrk1B στην καρκινογένεση	60
Δ.7. Η κινάση Dyrk1B στο μεταβολικό σύνδρομο.....	61
Δ.8. Ο ρόλος της κινάσης Dyrk1B στη φλεγμονή	62
Δ.9. Η κινάση Dyrk1B ρυθμίζει αρνητικά τον πολλαπλασιασμό των ανώριμων αρσενικών γεννητικών κυττάρων	62
Δ.10. Ο ρόλος της κινάσης Dyrk1B στη μυογένεση	63
Δ.11. Η κινάση Dyrk1B στη νευρογένεση.....	65
E. Η συμμετοχή της κινάσης Dyrk1B στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος	68
E.1. Η συμμετοχή της κινάσης Dyrk1B στη σηματοδότηση Sonic hedgehog (Shh)/Gli	68

E.2. Η κινάση Dyrk1B ενισχύει τη ‘μη κανονική’ σηματοδότηση Hedgehog (Hh) και καταστέλλει την ‘κανονική’ στον καρκίνο	71
E.3. Η κινάση Dyrk1B ρυθμίζει τη σηματοδότηση Shh και RAS–RAF–MEK στη λιπογεννητική διαφοροποίηση και την ομοιόσταση της γλυκόζης.....	74
E.4. Η κινάση Dyrk1B ρυθμίζει την επαγόμενη από τη σηματοδότηση Hh ακετυλίωση των μικροσωληνίσκων.....	75
E.5. Η κινάση Dyrk1B ρυθμίζει μέσω της σηματοδότησης MET/HGF την κυτταρική κινητικότητα	75
ΣΤ. Το έμβρυο του κοτόπουλου ως πρότυπο σύστημα για νευροαναπτυξιακές μελέτες.....	76
Z. Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής	81
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	83
2.1. Χημικά και άλλα διαλύματα γενικής χρήσης	83
2.2. Δείκτες μοριακών βαρών (ladders)	83
2.3. Kits	83
2.4. Πειραματόζωα.....	84
2.5. Κλωνοποίηση του 3’ τμήματος της κωδικής περιοχής του cDNA της κινάσης Dyrk1B του κοτόπουλου	84
2.6. Φορείς κλωνοποίησης – Πλασμίδια	85
2.7. Πειράματα ‘προσθήκης λειτουργίας’ – Μονόπλευρη <i>in ovo</i> ηλεκτροδιάτρηση	89
2.8. Πειράματα ‘απώλειας λειτουργίας’ και ‘διάσωσης φαινοτύπου’ <i>in ovo</i>	90
2.9. Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot, WB)	91
2.10. Καλλιέργεια νευρικών στελεχιαίων (βλαστικών) κυττάρων.....	92
2.11. Προετοιμασία ιστών.....	95
2.12. Ανοσοϊστοχημεία (immunohistochemistry, IHC)	95
2.13. Ανοσοκυτταροχημεία (immunocytochemistry, ICC)	96
2.14. <i>In situ</i> υβριδισμός (<i>In situ</i> hybridization, ISH)	97
2.15. Αντισώματα	99
2.16. Απομόνωση RNA, σύνθεση cDNA και ποσοτική RT-qPCR πραγματικού χρόνου	102
2.17. Στατιστική ανάλυση.....	103
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	104
3.1. Διερεύνηση του αναπτυξιακού προτύπου έκφρασης της κινάσης Dyrk1B στο ΚΝΣ των σπονδυλωτών	104
3.1.1. Η κινάση Dyrk1B εκφράζεται στον φλοιό, στον ιππόκαμπο και στην παρεγκεφαλίδα του αναπτυσσόμενου και του ενήλικου εγκεφάλου του ποντικού και σηματοδοτεί την ενήλικη νευρογένεση.....	105
3.1.2. Η κινάση Dyrk1B εκφράζεται στη νωτοχορδή, στο εδαφιαίο πέταλο, στα πολλαπλασιαζόμενα προγονικά κύτταρα στην κοιλιακή ζώνη και στους μεταμιτωτικούς κινητικούς νευρώνες στον αναπτυσσόμενο εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του ποντικού και του κοτόπουλου.....	110
3.2. <i>In vivo</i> μελέτη του λειτουργικού ρόλου της Dyrk1B στην ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού του κοτόπουλου – Πειράματα ‘προσθήκης λειτουργίας’	119

3.2.1. Η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B στο αναπτυξιακό στάδιο E2 προωθεί την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο και τη νευρωνική διαφοροποίηση στο στάδιο E4	121
3.2.2. Η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B προωθεί την απόπτωση ειδικά στην περιοχή των κινητικών νευρώνων και μειώνει τον αριθμό των κινητικών νευρώνων και των ενδιάμεσων νευρώνων της περιοχής V2a	124
3.2.3. Η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B στο αναπτυξιακό στάδιο E2 επηρεάζει το μόνο το κοιλιακό πρότυπο του εμβρυϊκού νωτιαίου μυελού του κοτόπουλου στο στάδιο E4	130
3.3. <i>In vivo</i> μελέτη του λειτουργικού ρόλου της Dyrk1B στην ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού του κοτόπουλου – Πειράματα ‘απώλειας λειτουργίας’	133
3.3.1. Ο εκλεκτικός αναστολέας AZ191 της κινάσης Dyrk1B αυξάνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό οδηγώντας σε αυξημένο αριθμό των κοιλιακών προγονικών κυττάρων p2, pMN, p3 καθώς και των κινητικών νευρώνων	133
3.3.2. Η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B στο αναπτυξιακό στάδιο E2 αντιστρέφει τον προκαλούμενο από τον αναστολέα AZ191 φαινότυπο στον εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του κοτόπουλου στο στάδιο E4	138
3.4. Διερεύνηση της πιθανής εμπλοκής της κινάσης Dyrk1B στο σηματοδοτικό μονοπάτι Sonic Hedgehog κατά την ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού του κοτόπουλου.....	143
3.4.1. Η κινάση Dyrk1B δρα ως καταστολέας της σηματοδότησης Sonic hedgehog στον εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του κοτόπουλου.....	143
3.4.2. Χορήγηση του αγωνιστή του Smoothed, SAG διασώζει τον προκαλούμενο από την υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B κοιλιακό φαινότυπο.....	150
3.4.3. Η κινάση Dyrk1B επηρεάζει το μέγεθος της κινητικής στήλης LMCm μέσω της σηματοδότησης Sonic hedgehog	155
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	163
4.1. Συμπεράσματα και συζήτηση	163
4.2. Μελλοντικοί Στόχοι	169
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	171
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1 - ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	190
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2 - ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΚΠΟΝΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	194

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ /ABBREVIATIONS

ΚΝΣ	κεντρικό νευρικό σύστημα
ΠΝΣ	περιφερικό κεντρικό σύστημα
AD	Alzheimer's disease, νόσος του Alzheimer
ALS	amyotrophic lateral sclerosis, πλάγια αμυοτροφική σκλήρυνση
AZ191	N-[2-Methoxy-4-(4-methyl-1-piperazinyl)phenyl]-4-(1-methyl-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-3-yl)-2-pyrimidinamine
BMPs	bone morphogenetic proteins, πρωτεΐνες μορφογένεσης των οστών
bp / kb	base pair, ζεύγος βάσεων / kilo base pair
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridine, 5-Βρώμο-2'-δεοξουριδίνη
CB	cerebellum, παρεγκεφαλίδα
CDKs	cyclin-dependent kinases, κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες
CDKis	cyclin-dependent kinases inhibitors, αναστολείς κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών
CDS	coding sequence or region, κωδική αλληλουχία ή περιοχή
Cend1	cell cycle exit and neuronal differentiation 1, παράγοντας εξόδου από τον κυτταρικό κύκλο και νευρωνικής διαφοροποίησης 1
cDNA	complementary DNA, συμπληρωματικό DNA
CTX	cortex, φλοιός
CTL	control, έλεγχος, πείραμα ελέγχου, 'μάρτυρας'
CREB	cAMP-response element binding protein, προσδένουσα πρωτεΐνη τις αλληλουχίες DNA αποκρινόμενες σε κυκλική AMP (cyclic AMP) CRE
D	dorsal, ραχιαίος
Da / kDa	Dalton, kilo Dalton, μονάδα μέτρησης μοριακού βάρους αμινοξέων /πρωτεϊνών
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
ddH₂O	double-distilled deionized H ₂ O, δις-απεσταγμένο και απιονισμένο νερό
DEPC	diethylpyrocarbonate, διαιθυλ-πυροανθρακικό
DIG	digoxigenin, διγοξιγενίνη

DIV	days <i>in vitro</i> , ημέρες <i>in vitro</i> (σε καλλιέργεια)
DG	dentate gyrus, οδοντωτή έλικα
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethyl-sulfoxide, διμεθυλο-σουλφοξειδίο
DNA	deoxyribonucleic acid, δεοξυ-ριβονουκλεϊκό οξύ
DNase	deoxyribonuclease, δεοξυριβονουκλεάση
DS	Down syndrome, σύνδρομο Down
DTT	dithiothreitol, διθειοθρεϊτόλη
E (embryonic) (day)	εμβρυϊκή (ημέρα)
ECL	enhanced chemiluminescence, ενισχυμένη χημειοφωταύγεια
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid, αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
EGF	epidermal growth factor, επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
FBS	fetal bovine serum, ορός εμβρύου βοδιού
FGFs	fibroblast growth factors, αυξητικοί παράγοντες των ινοβλαστών
FGF-2 / bFGF	fibroblast growth factor-2 ή basic fibroblast growth factor, (βασικός) αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών
FP	floor plate, εδαφιαίο πέταλο
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase /αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης
GFP	green fluorescent protein, πράσινη φθορίζουσα χρωστική
GL	granular layer, κοκκιώδης στιβάδα
GOF	<i>gain-of-function</i> , 'προσθήκη λειτουργίας'
h, r, m, c	human, rat, mouse, chick, ανθρώπου, αρουραίου, ποντικού, κοτόπουλου
HBSS	Hanks' balanced salt solution, ισορροπημένο αλατούχο διάλυμα Hank's
HDAC	histone deacetylase, αποακετυλάση των ιστονών
HEK293	human embryonic kidney 293 cells, ανθρώπινα εμβρυϊκά κύτταρα νεφρού 293
HH (stage)	Hamburger-Hamilton stage, στάδιο κατά Hamburger και Hamilton
HI	hippocampal primordium, αρχέγονο όργανο που θα αναπτυχθεί σε ιππόκαμπο
HMC	hypaxial motor column, υπαξονική κινητική στήλη
HRP	horseradish peroxidase, υπεροξειδάση του ραπανιού

ICC	immunocytochemistry, ανοσοκυτταροχημεία
IHC	immunohistochemistry, ανοσοϊστοχημεία
IN	interneuron, ενδιάμεσος νευρώνας (ή διανευρώνας)
IRES	internal ribosomal entry site, περιοχή εσωτερικής ριβοσωμικής εισαγωγής
ISH	(RNA) <i>in situ</i> hybridization, RNA <i>in situ</i> υβριδισμός
LB (medium)	Luria-Bertani Broth (medium), θρεπτικό υλικό καλλιέργειας βακτηρίων
LMC	lateral motor column, πλευρική κινητική στήλη
LMCI	lateral LMC, πλευρική LMC
LMCm	medial LMC, μεσαία LMC
LOF	<i>loss-of-function</i> , 'απώλεια λειτουργίας'
M	mitosis, μίτωση
MAPK	Mitogen-activated protein kinase, κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνο
Mirk/Dyrk1B	Minibrain-related kinase /dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1B σχετιζόμενη με τη Minibrain κινάση / κινάση διπλής ειδικότητας ρυθμιζόμενη από φωσφορυλίωση τυροσίνης 1B
MMC	median motor column, διάμεση κινητική στήλη
MNB	Minibrain (protein), πρωτεΐνη Minibrain
MN	motor neuron, κινητικός νευρώνας
mRNA	messenger RNA, αγγελιαφόρο RNA
MZ	mantle zone, ζώνη μανδύα
N / NC	notochord, νωτοχορδή
NDS	normal donkey serum, φυσιολογικός ορός γαϊδάρου
NE	neuroepithelial cells, νευροεπιθηλιακά κύτταρα
Neuro2A / N2A	mouse neuroblastoma cells, κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού
NLS	nuclear localization signal, σήμα πυρηνικού εντοπισμού
NPCs	neural progenitor cells, νευρικά προγονικά κύτταρα (προγεννήτορες)
n.s.	non-significant, μη σημαντικό
NSCs	neural stem cells, νευρικά στελεχιαία (βλαστικά) κύτταρα
OB	olfactory bulb, οσφρητικός λοβός.
OCT	optimal cutting temperature OCT, βέλτιστη θερμοκρασία κοπής
O-N	overnight, ολονύκτια

ORF	open reading frame, ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης
P (postnatal) (day)	μεταγεννητική (ημέρα)
p	progenitor, προγονικό κύτταρο, προγεννήτορας
PBS	phosphate buffered saline, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
PCR	polymerase chain reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PFA	paraformaldehyde, παραφορμαλδεΐδη
PGC	preganglionic motor columns, προγαγγλιακές κινητικές στήλες
pMN	MN progenitor, προγονικό κύτταρο του κινητικού νευρώνα
RA	retinoic acid, ρετινοϊκό οξύ
RanBPM	Ran-binding protein M, προσδένουσα Ran πρωτεΐνη
RF	roof plate, οροφιαίο πέταλο
RG	radial glial cells, ακτινωτά κύτταρα γλοίας
RMS	rostral migratory stream, πρόσθιο μεταναστευτικό μονοπάτι
RNA	ribonucleic acid, ριβονουκλεϊκό οξύ
RNAi	RNA interference, παρεμβολή RNA
RNase	ribonuclease, ριβονουκλεάση
RNAsin	RNase inhibitor, αναστολέας ριβονουκλεασών
rpm	revolutions per minute, στροφές ανά λεπτό
RT	room temperature, θερμοκρασία δωματίου
RT	reverse transcription, αντίστροφη μεταγραφή
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής
RT-qPCR	real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε προϊόν αντίστροφης μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο
S	synthesis or synthetic phase, συνθετική φάση ή φάση σύνθεσης
SAG	Smoothened agonist, 3-chloro-N-[(1r,4r)-4-(methylamino)cyclohexyl]-N-[3-(pyridin-4-yl)benzyl]benzo[b]thiophene-2-carboxamide
SC	spinal cord, νωτιαίος μυελός
SDS	sodium dodecyl sulfate, θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο
SDS-PAGE	SDS polyacrylamide gel electrophoresis, ηλεκτροφόρηση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS
SEM	Standard error of the mean, Τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής
Ser	serine, σερίνη

SGZ	subgranular zone, υποκοκκιώδης ζώνη
Shh / Hh	Sonic hedgehog / Hedgehog
shRNA	small hairpin RNA, μικρού μεγέθους RNA με μορφή φουρκέτας
spMNs	spinal MNs, νωτιαίοι κινητικοί νευρώνες
SSC	saline sodium citrate, αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού νατρίου
ster.	sterilized, αποστειρωμένος
SVZ	subventricular, υποκοιλιακή ζώνη (των πλευρικών κοιλιών)
TBS	Tris-buffered saline, αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα Tris
TBST	Tris-buffered saline with Tween 20 , αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα Tris με Tween 20
TE	Tris/EDTA buffer, ρυθμιστικό διάλυμα Tris/EDTA
Thr	threonine, θρεονίνη
TO-PRO-3	thiazole red, κόκκινο της θειαζόλης
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane, τρις(υδροξυμεθυλ)αμινομεθάνιο
Tyr	tyrosine, τυροσίνη
UV	Ultraviolet, υπεριώδης (ακτινοβολία)
V	ventral, κοιλιακός
VZ	ventricular zone, κοιλιακή ζώνη
WB	Western blot, ανοσοαποτύπωση κατά Western
Wnt (proteins)	πρωτεΐνες του Wingless-related integration site
WT	wild type, φυσικός (άγριος) τύπος

Μονάδες μέτρησης

Μεικτό σύστημα μονάδων που χρησιμοποιείται παγκοσμίως από τη διεθνή επιστημονική κοινότητα των βιοεπιστημών.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A. Νευρικό σύστημα

A.1. Κυτταρικοί τύποι του νευρικού συστήματος

Η πολυπλοκότητα του νευρικού συστήματος αντικατοπτρίζεται στην ποικιλία και την εξειδίκευση των κυττάρων που το συγκροτούν. Βάσει των χαρακτηριστικών και του ρόλου τους, τα κύτταρα του νευρικού συστήματος κατατάσσονται σε δύο κύριες κατηγορίες: α) στους **νευρώνες (neurons)** που αποτελούν το 10% των κυττάρων του ΚΝΣ και β) στα **κύτταρα γλοίας (glia) ή νευρογλοίας (neuroglia)** που υποστηρίζουν φυσιολογικά και μεταβολικά τους νευρώνες. Οι νευρώνες διαιρούνται λειτουργικά στους: 1) προσαγωγούς (afferent) (αισθητικοί νευρώνες, sensory neurons), 2) απαγωγούς νευρώνες (efferent) (κινητικοί νευρώνες, motor neurons, MNs) και 3) ενδιάμεσους νευρώνες (interneurons, INs), που είναι οι συνδετικοί νευρώνες (connecting neurons). Οι προσαγωγοί, μεταφέρουν πληροφορίες από τους ιστούς και τα όργανα στο ΚΝΣ, ενώ οι απαγωγοί άγουν ηλεκτρικές ώσεις από το ΚΝΣ προς την περιφέρεια στα εκτελεστικά κύτταρα. Τέλος, οι ενδιάμεσοι νευρώνες συνδέουν νευρώνες μέσα στο ΚΝΣ και αποτελούν την πολυπληθέστερη ομάδα. Για κάθε προσαγωγό νευρώνα που εισέρχεται στο ΚΝΣ, αντιστοιχούν 10 απαγωγοί και 200.000 ενδιάμεσοι νευρώνες. Οι βασικοί τύποι νευρογλοιακών κυττάρων είναι τέσσερις: 1) Τα **αστροκύτταρα (astrocytes)** και τα **ολιγοδενδροκύτταρα (oligodendrocytes)** που συνιστούν τη μακρογλοία και έχουν θρεπτικό και υποστηρικτικό ρόλο για τους νευρώνες, 3) η **μικρογλοία (microglia)** που είναι υπεύθυνη για τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος στο ΚΝΣ και 4) τα **κύτταρα Schwann** τα οποία είναι τα **νευρογλοιακά κύτταρα του περιφερικού νευρικού συστήματος (ΠΝΣ)**.

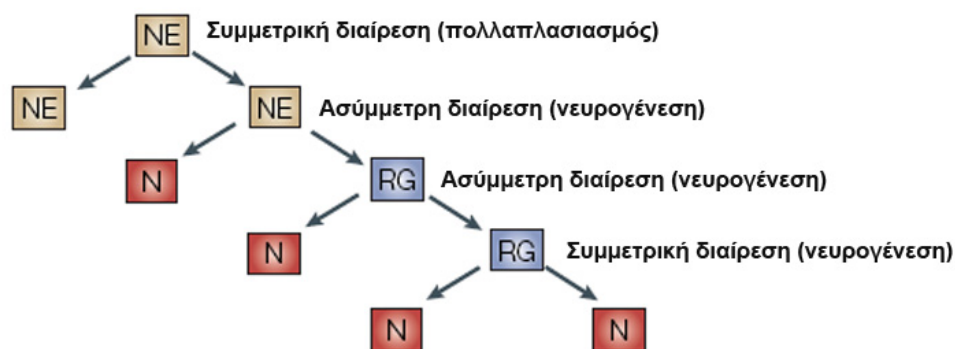
Τα κύρια μέρη από τα οποία αποτελείται το ΚΝΣ των θηλαστικών είναι: 1) ο **νωτιαίος μυελός (spinal cord)**, 2) το **εγκεφαλικό στέλεχος (brain stem)**, 3) η **παρεγκεφαλίδα (cerebellum)** και 4) ο **εγκέφαλος ή τελεγκέφαλος (cerebrum)**.

A.2. Ανάπτυξη του νευρικού συστήματος

Κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, τα νευρικά στελεχιαία / βλαστικά κυττάρια (neural stem cells, NSCs) [1] δίνουν γένεση σε όλους τους νευρώνες του ΚΝΣ και τους δύο τύπους μακρογλοιακών κυττάρων του ΚΝΣ. Τα βασικά κριτήρια για τη βλαστικότητα ενός κυττάρου είναι: η αυτοανανέωσή (self-renewal) του και η πλειοδυναμία (pluripotency) του, η ικανότητά του, δηλαδή, να δίνει γένεση σε ποικίλους κυτταρικούς τύπους. Η αυτοανανέωση των νευρικών προγονικών κυττάρων λαμβάνει χώρα είτε μέσω συμμετρικών διαιρέσεων απ' όπου προκύπτουν δύο πανομοιότυπα θυγατρικά κύτταρα, είτε μέσω ασύμμετρων διαιρέσεων απ' όπου προκύπτουν ένα

κύτταρο πανομοιότυπο με το μητρικό, ώστε να διατηρείται μία «δεξαμενή» (pool) αδιαφοροποίητων κυττάρων, και ένα δεύτερο διαφορετικού τύπου, πολλαπλασιαζόμενο πρόδρομο κύτταρο (precursor) συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου [2,3] (βλ. **Εικ. 1.1**).

Στο νευρικό σύστημα συγκεκριμένοι τύποι νευρώνων, διαφόρων ειδών, προέρχονται από κύτταρα που διαιρούνται τόπο- και χρόνο- ειδικά. Στα σπονδυλωτά, αυτό είναι εμφανές ιστολογικά από την αρχιτεκτονική των βασικών δομών του νευρικού συστήματος, όπου διαφορετικές κυτταρικές στιβάδες συνίστανται από κύτταρα διαφορετικής χρονικής προέλευσης, π.χ. στον εγκεφαλικό φλοιό, τα πιο πρώιμα κύτταρα εντοπίζονται σε βαθύτερα στρώματα και τα μεταγενέστερα σε πιο επιφανειακά.



Εικ. 1.1. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της νευρογένεσης. Τα νευροεπιθηλιακά κύτταρα (neuroepithelial cells, NE), πολλαπλασιάζονται μέσω συμμετρικών διαιρέσεων, αυξάνοντας τον αριθμό τους, ενώ μέσω ασύμμετρων διαιρέσεων δίνουν γένεση σε ακτινωτά κύτταρα γλοίας (radial glial cells, RG), ή νευρώνες (neurons, N) (Προσαρμοσμένο από [2]).

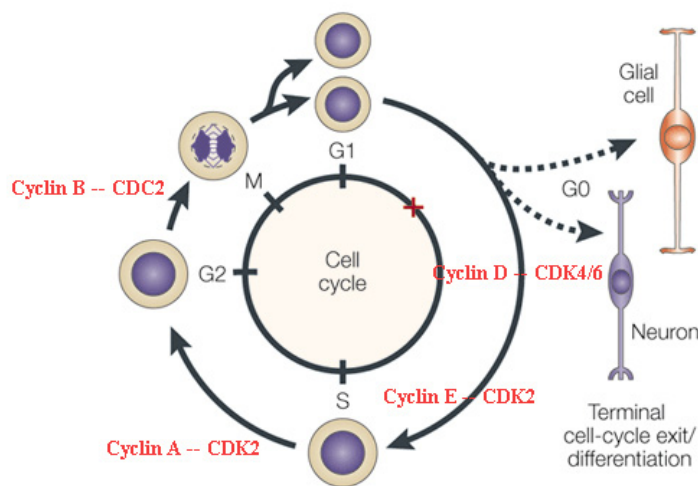
Διαφορετικές γενεαλογίες (lineages) καθορίζονται σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια ή μετά από ένα ορισμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων. Εντούτοις, οι κανόνες λήψης αποφάσεων για την πορεία των προγονικών νευρικών κυττάρων είναι περίπλοκοι. Η δέσμευση π.χ. ενός προγονικού κυττάρου είτε σε νευρωνικό πρόδρομο κύτταρο (neuronal precursor) είτε σε πρόδρομο κύτταρο γλοίας (glial precursor), μπορεί να καθορίζεται κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού του, ενώ η απόφαση για το λειτουργικό είδος του νευρώνα μπορεί να λαμβάνεται κατά τον τελευταίο κυτταρικό κύκλο, οπότε οδηγείται τελικά σε ένα διαφοροποιημένο μεταμιτωτικό (post-mitotic) νευρώνα. Υπάρχει άμεση αλληλεξάρτηση της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου με το μηχανισμό καθορισμού της μοίρας των κυττάρων (cell fate). Οι παράγοντες που ελέγχουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζουν τους παράγοντες του καθορισμού της κυτταρικής μοίρας και αντίστροφα. Κατά τον επικρατέστερο μηχανισμό, η νευρική διαφοροποίηση είναι προϊόν συνέργειας και των δύο διαδικασιών [4].

A.3. Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και κυτταρική διαφοροποίηση

Στους πολυκύτταρους οργανισμούς, η ακριβής ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης είναι καθοριστική για τη διαμόρφωση του μεγέθους και του σχήματος κάθε ιστού. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός ελέγχεται από μία πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών, σχηματίζοντας ένα πολύπλοκο δίκτυο, τα οποία επηρεάζονται τόσο από εξωκυτάρια σήματα σχετιζόμενα με την ταυτότητα και το πλήθος των γειτονικών κυττάρων όσο και από ενδοκυτάρια, σχετιζόμενα με το αναπτυξιακό πρότυπο του ίδιου κυττάρου. Ο κυτταρικός κύκλος διαθέτει δύο κενά (gaps) ή φάσεις, τις G1 και G2, που διαχωρίζουν τη φάση σύνθεσης του DNA (φάση S μεταξύ G1 και G2) από εκείνη της κυτταρικής διαίρεσης – μίτωσης / κυτταροκίνησης (φάση M μεταξύ G2 και G1) [5,6] (βλ. **Εικ. 1.2**).

Κατά την ανάπτυξη του ΚΝΣ, η ρύθμιση της λεπτής ισορροπίας προόδου/εξόδου και διαφοροποίησης των νευρικών προγονικών κυττάρων είναι απαραίτητη για τη γένεση του κατάλληλου αριθμού νευρώνων και νευρογλοίας τοπο- και χρονο- ειδικά. Οποιαδήποτε διαταραχή στη σειρά των αναπτυξιακών διεργασιών μεταβάλλει των αριθμό των νευρωνικών τύπων /υποτύπων, που προκύπτουν, επηρεάζει τη νευρωνική συνδεσιμότητα και μπορεί να οδηγήσει σε νευρολογικές δυσλειτουργίες [7,8]. Η έξοδος των κυττάρων από τον κύκλο προηγείται της διαφοροποίησής τους, με το συντονισμό των δύο αυτών διαδικασιών από ένα πλήθος παραγόντων, πολλοί εκ των οποίων καθορίζουν και τη γενεαλογία των νευρικών πρόδρομων κυττάρων [9]. Για τη διαφοροποίηση των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, η G1 αποτελεί την πιο κρίσιμη φάση του κύκλου, γιατί χαρακτηρίζεται από τις περισσότερες μεταβολές κατά την ανάπτυξη αλλά και γιατί εκεί λαμβάνεται η απόφαση για το αν τα κύτταρα θα εξακολουθήσουν να πολλαπλασιάζονται ή θα εισέλθουν στη φάση ηρεμίας (quiescent state) G0 [10]. Οι ρυθμιστές-κλειδιά της προόδου του κυτταρικού κύκλου επηρεάζουν την κυτταρική μοίρα και τη διαφοροποίηση και αντιστρόφως οι πρωτεΐνες που είναι καθοριστές και επαγωγείς της διαφοροποίησης ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο [11–13]. Η μετάβαση μεταξύ των φάσεων του κύκλου, διαμεσολαβείται από τα καλά χαρακτηρισμένα σύμπλοκα **κυκλινών (cyclins)** και **κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών** σερίνης (Ser) /θρεονίνης (Thr) (cyclin-dependent kinases, CDKs) καθώς και από τους αναστολείς αυτών (cyclin-dependent kinases inhibitors, CDKis), που στο σύνολό τους συνιστούν τους «ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου» (cell cycle regulators) [14] (βλ. **Εικ. 1.2**).

Πέραν των συμπλόκων κυκλινών, ως ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου δρουν και οι πρωτεϊνικές κινάσες DYRK (dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinases, κινάσες διπλής ειδικότητας ρυθμιζόμενες από φωσφορυλίωση τυροσίνης). Οι κινάσες DYRK αποτελούν μία εξελικτικά συντηρημένη οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών με ρόλους-κλειδιά στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης μίας ποικιλίας κυτταρικών τύπων [15], όπως θα δούμε παρακάτω αναλυτικά.



Nature Reviews | Neuroscience

Εικ. 1.2. Οι φάσεις του ευκαρυωτικού κυτταρικού κύκλου και τα βασικότερα ρυθμιστικά σύμπλοκα κυκλινών – κινασών σε καθεμία από αυτές. Ο κυτταρικός κύκλος χωρίζεται σε δύο φάσεις, τη μεσόφαση (interphase) και τη μίτωση (mitosis). Κατά την μεσόφαση γίνεται η προετοιμασία για την κυτταρική αύξηση για τη διαίρεση του πυρήνα (μίτωση) και του κυτταροπλάσματος (κυτταροκίνηση). Η σύνθεση του DNA λαμβάνει χώρα στην περιορισμένη χρονικά συνθετική (synthetic, S) φάση. Τα κενά (gaps) της μεσόφασης σηματοδοτούν τη μετάβαση μεταξύ της μίτωσης, S φάσης (G1) και μεταξύ του τέλους της S φάσης και της έναρξης της μίτωσης (G2). Το περιοριστικό σημείο ελέγχου λήψης απόφασης ολοκλήρωσης του κυτταρικού κύκλου, βρίσκεται εντός της φάσης G1 και ελέγχεται από τη δράση των συμπλόκων Cyclin D – CDK4 /6. Η G1 φάση θεωρείται κρίσιμη από αναπτυξιακής άποψης καθώς αποτελεί το χρονικό σημείο όπου τα προγονικά κύτταρα (progenitors) βγαίνουν από τον κυτταρικό κύκλο και διαφοροποιούνται π.χ. οι νευρώνες που έχουν υποστεί την τελική διαφοροποίηση (προσαρμοσμένο από [5]).

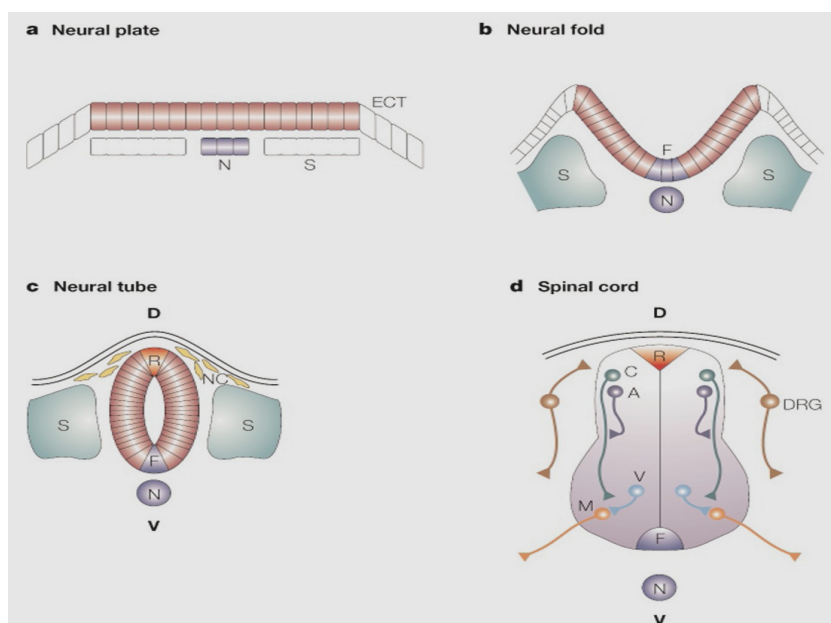
B. Η ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού

B.1. Εισαγωγικά

Η εμβρυϊκή ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού πραγματοποιείται σε τέσσερα διακριτά στάδια: **1)** Στο 1^ο στάδιο, της νευρικής πλάκας (neural plate), τα νεοσχηματισμένα νευρικά κύτταρα προσεγγίζονται πλευρικά από το επιδερμικό εξώδερμα (epidermal ectoderm, ECT). Τα κύτταρα της νωτοχορδής (notochord) βρίσκονται κάτω από τη μέση γραμμή της νευρικής πλάκας, ενώ το μεσόδερμα της τμηματικής πλάκας (segmental plate mesoderm) βρίσκεται κάτω από την πλευρική περιοχή της νευρικής πλάκας (βλ. **Εικ. 1.3a**). **2)** Στο 2^ο στάδιο, της νευρικής πτύχωσης (neural fold), **τα κύτταρα του εδαφιαίου πετάλου (floor plate, FP)** είναι εμφανή στην κοιλιακή μέση γραμμή καθώς και εκκινά η ανάπτυξη του σωμιτικού μεσοδέρματος (βλ. **Εικ. 1.3b**). **3)** Στο 3^ο στάδιο, του νευρικού σωλήνα

Εισαγωγή

(neural tube), τα κύτταρα του ραχιαίου πετάλου (dorsal plate) αρχίζουν να διαφοροποιούνται στη ραχιαία μέση γραμμή και τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας (neural crest cells) αρχίζουν να αποκολλώνται από το ραχιαίο νευρικό σωλήνα (βλ. **Εικ. 1.3c**). **4**) Στο 4^ο στάδιο, στον αναπτυσσόμενο πλέον νωτιαίο μυελό, διακριτές ομάδες από συνδεσμικούς (commissural) και συνδετικούς (association) νευρώνες διαφοροποιούνται στο ραχιαίο ήμισυ του νωτιαίου μυελού, ενώ οι **κινητικοί νευρώνες (motor neurons, MNs)** και οι **ενδιάμεσοι νευρώνες (interneurons, INs)** αναπτύσσονται στο κοιλιακό ήμισυ του νευρικού σωλήνα. Σε αυτό το στάδιο, νευρώνες των νωτιαίων γαγγλίων (dorsal root ganglion, DRG) διαφοροποιούνται από τα προγονικά κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας (neural crest progenitors) (βλ. **Εικ. 1.3d**) [16].



Εικ. 1.3. Τα τέσσερα στάδια της ανάπτυξης του νωτιαίου μυελού. **a.** Η νευρική πλάκα (neural plate) με το επιδερμικό εξώδερμα /ECT) και τα υποκείμενα σε αυτό κύτταρα της νωτοχορδής (N), όπως και το μεσόδερμα της τμηματικής πλάκας (S). **b.** Η νευρική πτύχωση (neural fold) της πλάκας με τα κύτταρα του εδαφιαίου πετάλου (F), όπως και οι σωμίτες (S). **c.** Στον νευρικό

σωλήνα (neural tube), το ραχιαίο τμήμα του συνεχίζει την ανάπτυξή του με τη διαφοροποίηση των κυττάρων του ραχιαίου πετάλου (R) και την αποκόλληση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας (NC). **d.** Στο διαμορφωμένο νωτιαίο μυελό σχηματίζονται διακριτές ομάδες νευρώνων, όπως συνδεσμικοί (C) και συνδετικοί (A) ραχιαίοι καθώς και κινητικοί (M) και κοιλιακοί ενδιάμεσοι νευρώνες (V) [16]. Απεικόνιση εγκάρσιας τομής, D: dorsal, V: ventral.

B.2. Το ραχιαίο-κοιλιακό πρότυπο του νωτιαίου μυελού των σπονδυλωτών

B.2.1. Η γενική ραχιαίο-κοιλιακή αρχιτεκτονική του νωτιαίου μυελού

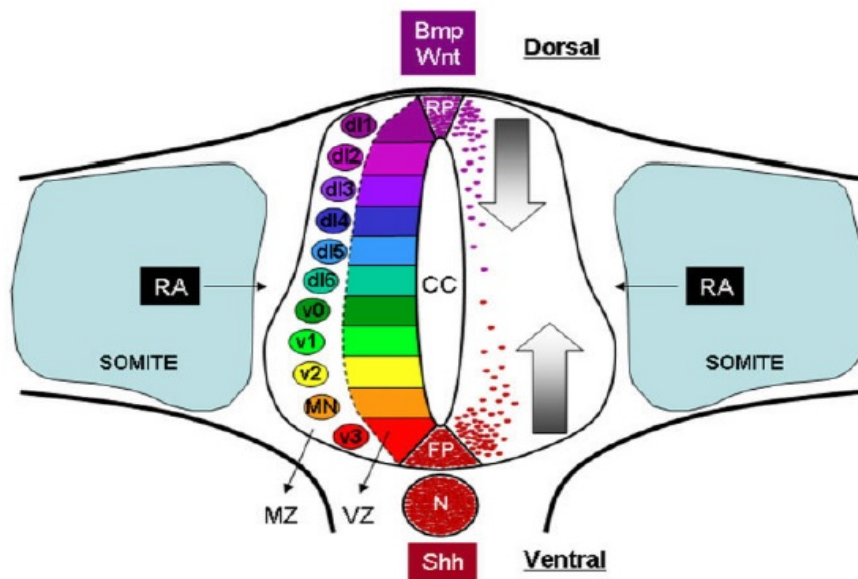
Ο νωτιαίος μυελός των σπονδυλωτών αποτελεί ένα τυπικό παράδειγμα δομής που διαμορφώνεται με πολύ συγκεκριμένο σχέδιο. Στην κοιλιακή του περιοχή αναπτύσσονται νευρώνες οι οποίοι ρυθμίζουν τον κινητικό έλεγχο, όπως οι **κινητικοί νευρώνες (motor neurons, MNs)** και **ενδιάμεσοι νευρώνες (interneurons, INs)**, ενώ στην ραχιαία του περιοχή ευρίσκονται νευρώνες

που ελέγχουν και οργανώνουν την αισθητηριακή πληροφορία. Η ραχιαίο-κοιλιακή οργάνωση εγκαθιδρύεται πρώιμα στην ανάπτυξη [16,17]. Ο πρώιμος αναπτυσσόμενος νωτιαίος μυελός αποτελείται από έναν απλό σωλήνα (νευρικός σωλήνας) του οποίου ο αυλός (lumen) ή κεντρικό κανάλι (central canal, **CC**) περιβάλλεται από ψευδο-στρωματοποιημένο στρώμα (pseudo-stratified layer) μιτωτικά ενεργών νευροεπιθηλιακών κυττάρων (neuroepithelial cells, **NE**) (βλ. **Εικ. 1.4**), το οποίο καλείται **κοιλιακή ζώνη** (ventricular zone, **VZ**). Τα νευροεπιθηλιακά κύτταρα λειτουργούν ως **νευρικά βλαστικά κύτταρα** (neural stem cells, **NSCs**) από τα οποία θα προκύψουν τα ενδιάμεσα **νευρικά προγονικά κύτταρα** (neural progenitors, **NPs**), και τα οποία στη συνέχεια θα διαφοροποιηθούν περαιτέρω, αρχικά σε νευρώνες και μετέπειτα, καθώς προχωράει η ανάπτυξη σε **κύτταρα γλοίας** (glia cells). Κατά τη φάση της διαφοροποίησης, οι μεταμιτωτικοί νευρώνες μεταναστεύουν και διανέμονται προς την πλευρική περιοχή η οποία ονομάζεται **ζώνη του μανδύα** (mantle zone, **MZ**) [16–19].

Η χρήση μοριακών δεικτών έχει επιτρέψει την ταυτοποίηση των υποτύπων των νευρικών προγονικών κυττάρων τα οποία και διατάσσονται κατά μήκος του ραχιαίο-κοιλιακού άξονα του νωτιαίου μυελού [17,19] (βλ. **Εικ. 1.4**). Η ταυτότητα του κάθε υποτύπου έχει καθορισθεί από έναν συνδυαστικό κώδικα (combinatorial code) μεταγραφικών παραγόντων [16–19]. Λόγω της απλής αρχιτεκτονικής και της δυνατότητας εύκολων χειρισμών, ο αναπτυσσόμενος νωτιαίος μυελός έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα ως μοντέλο μελέτης των μηχανισμών προτύπου (patterning) των ιστών.

B2.2. Τα εκκρινόμενα σηματοδοτικά μόρια

Το ραχιαίο-κοιλιακό πρότυπο (dorso-ventral patterning) του νωτιαίου μυελού προκύπτει από την δραστηριότητα διαφόρων εκκρινόμενων σηματοδοτικών μορίων-μορφογόνων τα οποία παρέχουν πληροφορίες σχετικές με τη θέση (positional information) στα νευρικά προγονικά κύτταρα, ρυθμίζοντας τη χωρική έκφραση (spatial expression) μεταγραφικών παραγόντων. Αυτά τα μόρια περιλαμβάνουν: **1)** Την πρωτεΐνη **Sonic hedgehog (Shh)**, η οποία εκκρίνεται από τη νωτοχορδή (notochord, **NC**) και το εδαφιαίο πέταλο (floor plate, **FP**), **2)** τις πρωτεΐνες του Wingless-related integration site (**Wnts**) και τις **πρωτεΐνες μορφογένεσης των οστών** (bone morphogenetic proteins, **BMPs**), οι οποίες εκκρίνονται ραχιαία από το οροφιαίο πέταλο (roof plate, **RP**), **3)** τους **αυξητικούς παράγοντες των ινοβλαστών** (fibroblast growth factors, **FGFs**) οι οποίοι εκκρίνονται από το ουριαίο μεσόδερμα (caudal mesoderm), και **4)** το **ρετινοϊκό οξύ** (Retinoic Acid, **RA**), το οποίο παράγεται από τους σωμίτες (somites) του παραξονικού μεσοδέρματος (paraxial mesoderm) που πλευρίζουν τον νευρικό σωλήνα.



Εικ. 1.4. Διάγραμμα μίας εγκάρσιας τομής του αναπτυσσόμενου νωτιαίου μυελού. Ο αυλός (lumen) του νευρικού σωλήνα ή κεντρικό κανάλι (central canal, **CC**) περιβάλλεται από ένα πολλαπλασιαζόμενων προγονικών κυττάρων, τη **κοιλιακή ζώνη** (ventricular zone, **VZ**). Αυτά τα προγονικά κύτταρα διαφοροποιούνται εν τέλει σε μεταμιτωτικούς νευρώνες οι οποίοι διανέμονται πλευρικά στη **ζώνη του μανδύα** (mantle zone, **MZ**). Διαφορετικοί υποτύποι των νευρωνικών προγονικών κυττάρων και οι αντίστοιχοί τους μεταμιτωτικοί τύποι διανέμονται με μία συγκεκριμένη τάξη κατά μήκος του ραχιαίο-κοιλιακού άξονα. Αυτό το πρότυπο εγκαθιδρύεται από τη δράση αντενεργούμενων διαβαθμίσεων του **Shh** εκκρινόμενης από τη νωτοχορδή (**N**) και το εδαφιαίο πέταλο (**FP**), και των μορίων **Wnt** και **BMP**, παραγόμενων από το ραχιαίου πέταλο (**RP**). Άλλα εξωκυτταρικά σηματοδοτικά μόρια τα οποία έχουν εμπλακεί στο ραχιαίο-κοιλιακό πρότυπο είναι το **ρετινοϊκό οξύ (RA)** προερχόμενο από τους γειτονικούς σωμίτες (από [17]).

Οι παράγοντες **FGF** πρέπει να μειορρυθμίζονται προτού η νευρική διαφοροποίηση λάβει χώρα. Το **ρετινοϊκό οξύ (RA)** είναι ένας επαγωγέας της νευρικής διαφοροποίησης και του προτύπου και είναι υπεύθυνο για τη μειορρύθμιση των παραγόντων **FGF**. Το μορφογόνο **Shh** είναι υπεύθυνο για την επαγωγή των κοιλιακών νευρικών κυτταρικών τύπων με **τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση**. Με **τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση** επάγονται και οι ραχιαίοι νευρικοί κυτταρικοί τύποι από τις πρωτεΐνες **BMP**. Κατά την πορεία της ανάπτυξης, το **ρετινοϊκό οξύ** χρησιμοποιείται δευτερογενώς καθορίζοντας τους υποτύπους κινητικών νευρώνων αλλά σε αυτή την περίπτωση παράγεται εντός του νευρικού σωλήνα από διαφοροποιούμενους κινητικούς νευρώνες. Αυτά τα τέσσερα σηματοδοτικά μόρια, επίσης, αλληλεπιδρούν το καθένα με το άλλο, γενικά με έναν ανασταλτικό τρόπο, δείχνοντας πόσο πολύπλοκες είναι αυτές οι αλληλεπιδράσεις κατά το ραχιαίο-κοιλιακό πρότυπο [17,19–21] (βλ. **Εικ. 1.4**). Επομένως, είναι γενικά αποδεκτό ότι οι κύριοι παράγοντες στη διαμόρφωση του ραχιαίο-κοιλιακού προτύπου του νωτιαίου μυελού είναι οι

αντίθετες και αντενεργούμενες διαβαθμίσεις συγκέντρωσης αφενός του μορφογόνου Shh, προερχόμενες από τις κοιλιακές περιοχές του νωτιαίου μυελού, καθώς και τα μόρια BMP και Wnt, παραγόμενες αντίστοιχα, από τις ραχιαίες περιοχές. Τουτέστιν, η σηματοδότηση BMP είναι μέγιστη στο ραχιαίο νωτιαίο μυελό, ο οποίος είναι εγγύτερα στη ράχη του εμβρύου, ενώ η σηματοδότηση Shh είναι μέγιστη στον κοιλιακό νωτιαίο μυελό που είναι εγγύτερα στην πρόσθια και κοιλιακή πλευρά του εμβρύου [17,19–21] (βλ. **Εικ. 1.4**).

B2.3. Η εκκρινόμενη πρωτεΐνη *Sonic hedgehog* (Shh) καθορίζει την ταυτότητα των κοιλιακών νευρωνικών υποτύπων στον νευρικό σωλήνα των σπονδυλωτών

Ο καθορισμός των κοιλιακών νευρωνικών υποτύπων (neuronal subtypes) στον νωτιαίο μυελό γίνεται εμφανής με την εμφάνιση διακριτών τύπων κυττάρων σε καθορισμένες θέσεις κατά μήκος της ραχιαίο-κοιλιακού άξονα του νευρικού σωλήνα (βλ. **Εικ. 1.3 – 1.5**) [16,18]. Η διαφοροποίηση των τριών κυρίων κοιλιακών κυτταρικών τύπων, ήτοι τα κύτταρα εδαφιαίου πετάλου, οι κινητικοί νευρώνες (motor neurons, MNs), όπως και 3) ενδιάμεσοι νευρώνες (interneurons, INs) οι οποίοι δημιουργούνται πιο ραχιαία, πυροδοτείται από σήματα που παρέχονται αρχικά από την αξονική μεσοδερμική κυτταρική ομάδα, τη νωτοχορδή (notochord, NC), η οποία δρα ως ένα κέντρο οργάνωσης, και αργότερα από τα ίδια τα κύτταρα του εδαφιαίου πετάλου (βλ. **Εικ. 1.3d**).

Καθώς το εδαφιαίο πέταλο χρησιμεύει ως δευτερεύουσα πηγή κοιλιακών επαγωγικών σημάτων και σχηματίζεται πριν από οποιονδήποτε τύπο νευρωνικού κυττάρου, υπήρξε ενδιαφέρον για το εάν οι μηχανισμοί που διέπουν τη διαφοροποίηση εδαφιαίου πετάλου είναι διαφορετικοί από εκείνους άλλων τύπων κοιλιακών κυττάρων. Οι κύριες δραστηριότητες σηματοδότησης της νωτοχορδής και του εδαφιαίου πετάλου διαμεσολαβούνται από το εκκρινόμενο Shh [16,22]. Ειδικότερα, το Shh παράγεται αρχικά από τη νωτοχορδή και αργότερα κατά τη νευρογένεση από το μεσαίο εδαφιαίο πέταλο (medial floor plate, MFP), ενώ τελικά, κατά τη διάρκεια της γλοιογένεσης, από το πλευρικό εδαφιαίο πέταλο (lateral floor plate, LFP) [21,23–26].

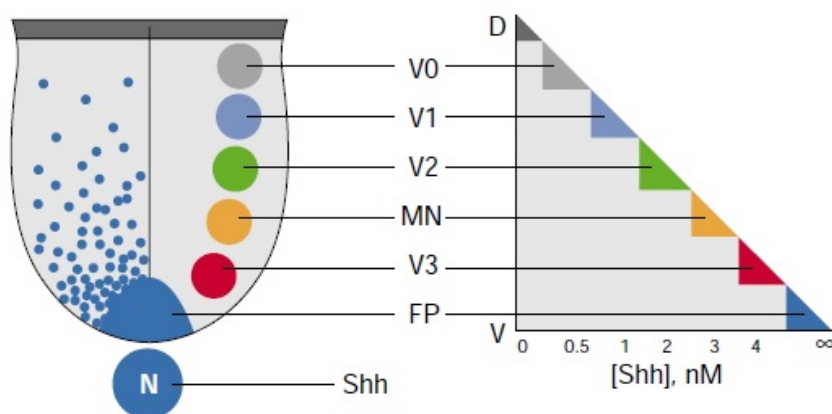
Η εκτοπική έκφραση του Shh *in vivo* και *in vitro* μπορεί να προκαλέσει τη διαφοροποίηση των κυττάρων του εδαφιαίου πετάλου, των κινητικών νευρώνων και των κοιλιακών ενδιάμεσων νευρώνων [16,27–29]. Αντίστροφα, η εξάλειψη της σηματοδότησης Shh από τη νωτοχορδή με αποκλεισμό αντισωμάτων (antibody blockade) *in vitro* [16,27–29] ή μέσω γονιδιακής στόχευσης σε ποντίκια [16,30], αποτρέπει τη διαφοροποίηση των κυττάρων του εδαφιαίου πετάλου, των κινητικών νευρώνων και των περισσότερων τάξεων κοιλιακών ενδιάμεσων νευρώνων [16,30,31]. Παρόλο που το μορφογόνο Shh μπορεί να επάγει όλους τους τύπους κοιλιακών κυττάρων, η δημιουργία ορισμένων συνόλων ενδιάμεσων νευρώνων στην πιο ραχιαία περιοχή του κοιλιακού νευρικού σωλήνα δεν εξαρτάται από τη σηματοδότηση Shh [16,31]. Αυτοί οι υπότυποι ενδιάμεσων νευρώνων μπορούν να επαχθούν από μια παράλληλη οδό σηματοδότησης που διαμεσολαβείται από ρετινοειδή που προέρχονται από το παραξονικό μεσόδερμα (paraxial mesoderm) και πιθανώς επίσης από κύτταρα νευρικής πλάκας [16,31]. Έτσι, η σηματοδότηση ρετινοειδούς φαίνεται να έχει

διαδοχικούς ρόλους στην ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού, επιβάλλοντας αρχικά την ταυτότητα του νωτιαίου μυελού και αργότερα προσδιορίζοντας την ταυτότητα ορισμένων από τους νευρώνες που τον αποτελούν.

B.2.4. Διαβαθμισμένη σηματοδότηση Shh

Προοδευτικές αλλαγές, στη συγκέντρωση Shh, δύο έως τρεις φορές, δημιουργούν πέντε μοριακά διακριτές κατηγορίες κοιλιακών νευρώνων από νευρικά προγονικά κύτταρα (neural progenitors) *in vitro* [16,18,32,33] (βλ. **Εικ. 1.5**). Επιπλέον, η θέση δημιουργίας καθεμιάς από αυτές τις νευρωνικές κατηγορίες *in vivo* προβλέπεται από τη συγκέντρωση του μορφογόνου Shh που απαιτείται για την επαγωγή τους *in vitro*. Οι νευρώνες που δημιουργούνται σε προοδευτικά πιο κοιλιακές περιοχές του νευρικού σωλήνα απαιτούν αντίστοιχα υψηλότερες συγκεντρώσεις του μορίου Shh για την επαγωγή τους [16,18,33] (βλ. **Εικ. 1.5**).

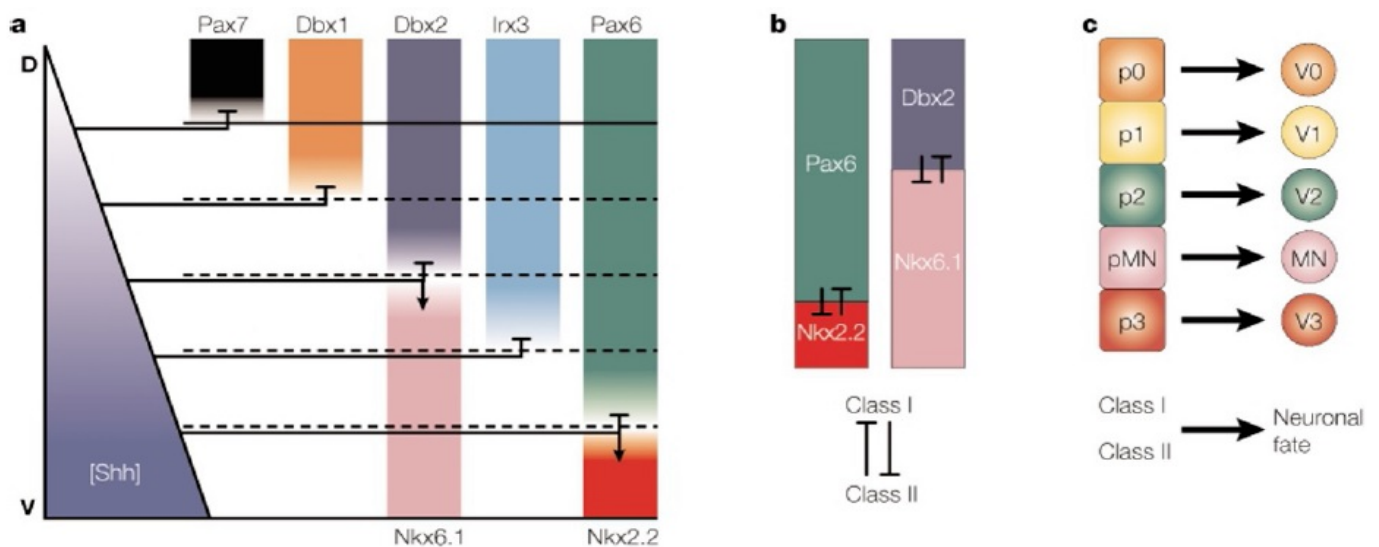
Όσον αφορά τον τρόπο με τον οποίο τα νευρικά προγονικά κύτταρα ερμηνεύουν τα διαβαθμισμένα σήματα Shh, μελέτες έδειξαν ότι μια ομάδα **πρωτεϊνών ομοιωτικής περιοχής (homeodomain proteins)** που εκφράζονται από κοιλιακά προγονικά κύτταρα δρουν ως ενδιάμεσοι παράγοντες στην ερμηνεία της διαβαθμισμένης σηματοδότησης Shh [16,31,34,35]. Αυτές οι πρωτεΐνες ομοιωτικής περιοχής μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες με βάση το πρότυπο έκφρασης και τον τρόπο ρύθμισης τους από το μόριο Shh [16,35] (βλ. **Εικ. 1.6a**). Η έκφραση κάθε πρωτεΐνης κατηγορίας I καταστέλλεται από το μόριο Shh σε ένα ξεχωριστό κατώφλι συγκέντρωσης Shh και, κατά συνέπεια τα κοιλιακά τους όρια έκφρασης οριοθετούν τις περιοχές των προγονικών κυττάρων (progenitor domains). Αντίθετα, η έκφραση κάθε πρωτεΐνης κατηγορίας II απαιτεί θετική σηματοδότηση Shh και επιτυγχάνεται σε ένα ξεχωριστό κατώφλι συγκέντρωσης Shh. Έτσι τα ραχιαία τους όρια οριοθετούν τις περιοχές των προγονικών κυττάρων (βλ. **Εικ. 1.6b**). Το πρότυπο της συνδυαστικής έκφρασης αυτών των δύο κατηγοριών **πρωτεϊνών ομοιωτικής περιοχής** καθορίζει πέντε βασικές περιοχές προγονικών κυττάρων εντός του κοιλιακού νευρικού σωλήνα (βλ. **Εικ. 1.6c**).



Εικ. 1.5. Η διαβαθμισμένη δραστηριότητα του μορφογόνου Shh και το πρότυπο του κοιλιακού νευρικού σωλήνα. Οι κοιλιακές περιοχές των προγονικών κυττάρων του νωτιαίου μυελού καθορίζονται από την συνδυαστική έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων η οποία ρυθμίζεται από τη κλίση συγκέντρωσης της πρωτεΐνης Shh (μπλε κουκίδες), η οποία και ελαττώνεται βαθμηδόν κατά το ραχιαίο-κοιλιακό άξονα, από το εδαφιαίο πέταλο (FP) προς τις πιο ραχιαίες. Οι πέντε διακριτοί νευρωνικοί υποτύποι που προκύπτουν από έναν ισοδύναμο αριθμό περιοχών προγονικών κυττάρων δημιουργούνται ως απόκριση στη κλίση συγκέντρωσης του μορφογόνου Shh και είναι οι τέσσερις τάξεις των κοιλιακών ενδιάμεσων νευρώνων V0-V3 (και οι αντίστοιχες ομώνυμες περιοχές που εδράζονται) και οι κινητικοί νευρώνες (MNs). Αριστερά διακρίνονται οι θέσεις αυτών των νευρωνικών υποτύπων και δεξιά απεικονίζεται το πρότυπο της νευρωνικής διαφοροποίησης των μοσχευμάτων της ενδιάμεσης νευρικής πλάκας (intermediate neural plate explants) τα οποία έχουν αυξηθεί σε διάφορες συγκεντρώσεις του αμινοτελικού τμήματος της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Shh (Shh-N). D, Ραχιαίος νευρικός σωλήνας, V, κοιλιακός νευρικός σωλήνας, N, νωτοχορδή. Όσο πιο ραχιαία είναι η θέση γένεσης του νευρωνικού υποτύπου, τόσο πιο μικρή είναι η συγκέντρωση του μορφογόνου Shh που απαιτείται για την επαγωγή του ίδιου νευρωνικού υποπληθυσμού *in vitro* (από [18]).

Άρα, η μετατροπή της βαθμίδωσης της εξωκυτταρικής σηματοδοτικής δραστηριότητας Shh σε διακριτούς προγονικούς τομείς επιτυγχάνεται από τις πρωτεΐνες της ομοιωτικής περιοχής μέσω επιλεκτικών διασταυρούμενων κατασταλτικών (cross-repressive) αλληλεπιδράσεων μεταξύ τα συμπληρωματικών ζευγών των πρωτεϊνών ομοιωτικής περιοχής τάξης I και τάξης II που εφάπτονται στο κοινό τους όριο, της περιοχής των προγονικών κυττάρων (βλ. **Εικ. 1.6b**) [16,35]. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις φαίνεται να έχουν τρεις κύριους στόχους. Αρχικά, εγκαθιδρύουν τις αρχικές ραχιαίο-κοιλιακές περιοχές έκφρασης των πρωτεϊνών τάξης I και τάξης II. Δεύτερον, εξασφαλίζουν την ύπαρξη αυστηρών ορίων μεταξύ των περιοχών των προγονικών κυττάρων. Τρίτον, βοηθούν

στην απαλλαγή των προγονικών κυττάρων από μία συνεχή σηματοδότηση Shh, παγιώνοντας, με αυτό τον τρόπο, την ταυτότητα της προγονικής περιοχής [16,35].



Εικ. 1.6. Οι τρεις φάσεις του κοιλιακού νευρικού προτύπου μεσολαβούμενου από Shh. **a.** Το μοροφογόνο Shh μεσολαβεί την καταστολή των πρωτεϊνών ομοιωτικής περιοχής τάξης I (Pax7, Dbx1, Dbx2, Irx3 and Pax6) σε διαφορετικό κατώφλιο συγκεντρώσεων και την επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών της τάξης II (Nkx6.1 and Nkx2.2) σε διαφορετικό κατώφλιο συγκεντρώσεων. Οι πρωτεΐνες της τάξης I και τάξης II οι οποίες συνορεύουν σε ένα κοινό όριο μεταξύ δύο περιοχών προγονικών κυττάρων (progenitor domain) έχουν παρόμοιο κατώφλιο συγκέντρωσης Shh για την καταστολή της πρωτεϊνικής έκφρασης της μίας και την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης της άλλης πρωτεΐνης. **b.** Τα ζεύγη των πρωτεϊνών ομοιωτικής περιοχής που συνορεύουν σε ένα κοινό όριο μεταξύ δύο περιοχών προγονικών κυττάρων (Pax6 και Nkx2.2, Dbx2 και Nkx6.1) καταστέλλουν την έκφραση η μία της άλλης. **c.** Η σχέση μεταξύ των περιοχών νευρικών προγονικών κυττάρων (p) και οι θέσεις στις οποίες οι μεταμιτωτικοί νευρώνες δημιουργούνται κατά μήκος του ραχιαίο-κοιλιακού άξονα του νωτιαίου μυελού (από [16]).

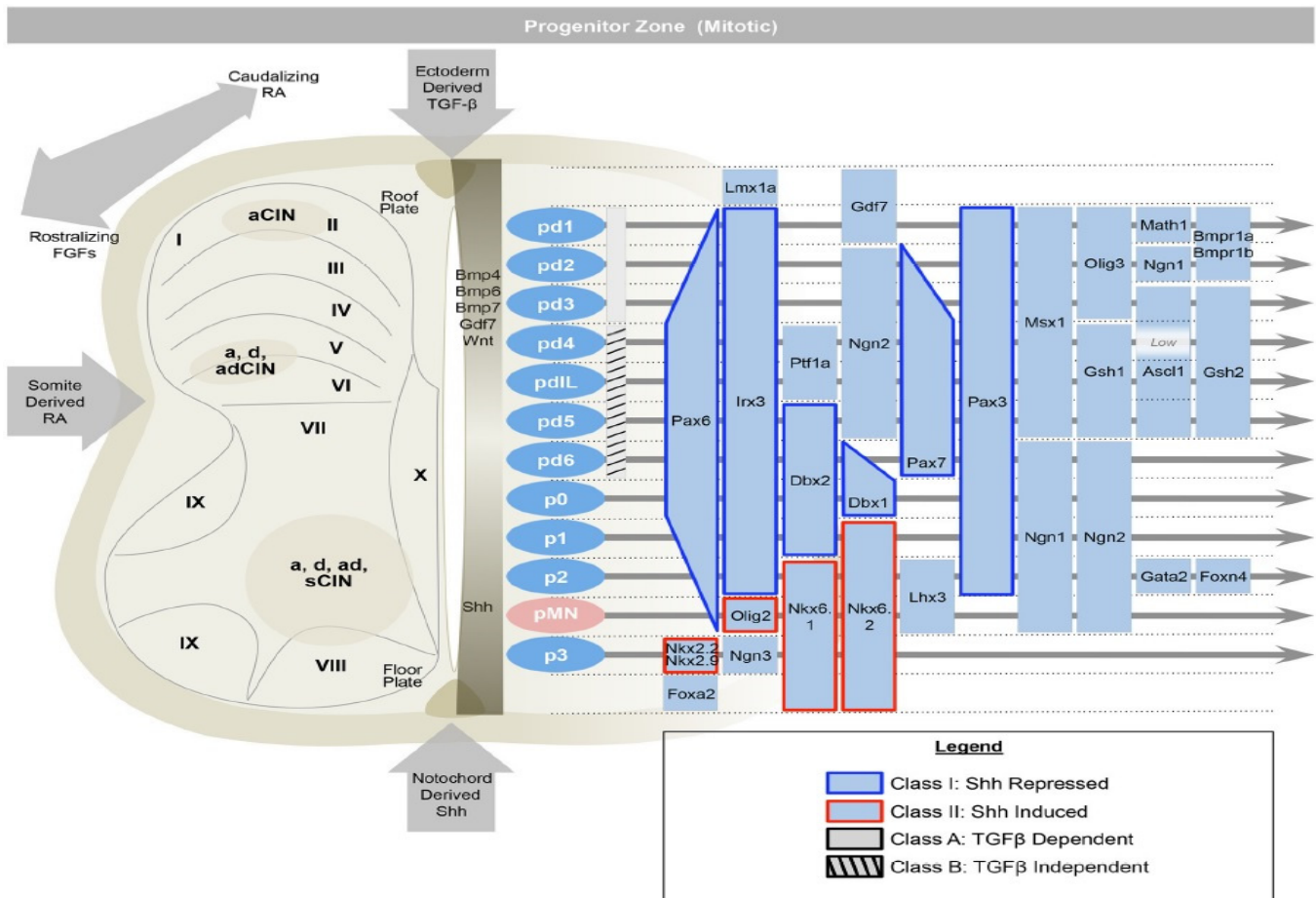
Ο κεντρικός ρόλος της διασταυρούμενης καταστολής μεταξύ των μεταγραφικών παραγόντων στο κοιλιακό νευρικό πρότυπο διαφαίνεται από την ύπαρξη παρόμοιων διεργασιών και σε άλλους νευρικούς και μη νευρικούς ιστούς. Για παράδειγμα, στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο, οι διασταυρούμενες κατασταλτικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών της ομοιωτικής περιοχής Pax6 και Pax2 βοηθούν στον καθορισμό του ορίου μεταξύ του διεγκεφάλου και μεσεγκεφάλου (diencephalic–midbrain boundary) [36], καθώς και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων Otx2 και Gbx2 καθορίζουν το όριο μεταξύ μεσεγκεφάλου και οπισθεγκεφάλου (midbrain–hindbrain boundary) [37]. Οι κεντρικές αρχές του κοιλιακού νευρικού προτύπου (ventral neural patterning) είναι παρόμοιες με αυτές που ενέχονται στην υποδιαίρεση του εμβρύου της *Drosophila* κατά μήκος του

προσθιοπίσθιου άξονα [38]. Έτσι, φαίνεται ότι οι διασταυρούμενες κατασταλτικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μεταγραφικών παραγόντων αποτελούν έναν επικρατή μηχανισμό για την τοπολογική κατανομή της κυτταρικής μοίρας (regional allocation of cell fate) ως απόκριση στα διαβαθμισμένα επαγωγικά σήματα [16].

B.2.5. Πρωτεΐνες ομοιωτικής περιοχής και καθορισμός νευρωνικής μοίρας

Οι πρωτεΐνες ομοιωτικής περιοχής που εκφράζονται από τα προγονικά κύτταρα καθορίζουν την ταυτότητα της κάθε τάξης μεταμιτωτικών νευρώνων που προκύπτουν από τις ξεχωριστές προγονικές περιοχές. Για παράδειγμα, η εσφαλμένη έκφραση (misexpression) των πρωτεϊνών ομοιωτικής περιοχής στο νευρικό σωλήνα του κοτόπουλου τροποποιεί τη μοίρα και τη θέση στην οποία δημιουργείται η κάθε τάξη των νευρώνων (βλ. **Εικ. 1.6c**) [16,35]. Αντιθέτως, έχουν βρεθεί «διακόπτες» στον καθορισμό της ταυτότητας της περιοχής των προγονικών κυττάρων και της νευρωνικής μοίρας στα ποντίκια, κατά τον οποίο οι διάφορες πρωτεΐνες ομοιωτικής περιοχής τάξης I και τάξης II μπορούν να απενεργοποιηθούν με γονιδιακή στόχευση (gene targeting) [16]. Αυτός ο μηχανισμός των ρυθμιζόμενων από το μορφογόνο Shh μεταγραφικών «καταρρακτών» που καθορίζουν τα νευρικά προγονικά κύτταρα μέσω εξειδικευμένων μονοπατιών της νευρογένεσης μπορεί να εξηγήσει, για παράδειγμα, πώς οι κινητικοί νευρώνες αποκτούν μία ταυτότητα διαφορετική από τους γειτονικούς ενδιάμεσους νευρώνες [35,39] (βλ. **Εικ. 1.6b**).

Επομένως, οι συνδυαστικές δράσεις των πρωτεϊνών ομοιωτικής περιοχής – μεταγραφικών παραγόντων, όπως λ.χ. Nkx6.1, Nkx2.2, Irx3, Dbx1, Dbx2, Pax6 και Olig2, των οποίων η συνδυαστική έκφραση χαρακτηρίζει τις διακριτές περιοχές των προγονικών κυττάρων των ενδιάμεσων νευρώνων p0, p1, p2 και p3, καθώς και των κινητικών νευρώνων pMN, καθορίζει τις αντίστοιχες περιοχές των μεταμιτωτικών υποτύπων ενδιάμεσων νευρώνων V0, V1, V2, και V3, όπως και των κινητικών νευρώνων MNs που θα προκύψουν από αυτούς τους προγόνους (βλ. **Εικ. 1.6b,c**, **Εικ. 1.7**).



Εικ. 1.7. Ο μοριακή ταυτότητα των νευρωνικών προγονικών κυτταρικών υποτύπων στον πρώιμο νωτιαίο μυελό του ποντικού (E9.5 – E11). Εγκαθιδρύονται 13 περιοχές προγονικών κυττάρων. Κοιλιακά, οι μεταγραφικοί παράγοντες της τάξης I καταστέλλονται από το μορφογόνο Shh (λ.χ. *Irx3*), ενώ η τάξη II επάγεται (λ.χ. *Olig2*). Παρομοίως, οι ραχιαίες περιοχές, *pd1* – *pd3* εξαρτώνται από τον TGFβ και τα *pd4* – *pd6* και *pdIL* είναι ανεξάρτητα της σηματοδότησης TGFβ. Καταγράφονται οι αντενεργούμενες επιδράσεις από Shh κοιλιακά, τα μέλη της οικογένειας TGFβ, προερχόμενο από το εξώδερμα, ραχιαία και το ρετινοϊκό οξύ (RA) από τους σωμαίτες πλευρικά (από [40], προσαρμοσμένο από [41]). Απεικόνιση εγκάρσιας τομής.

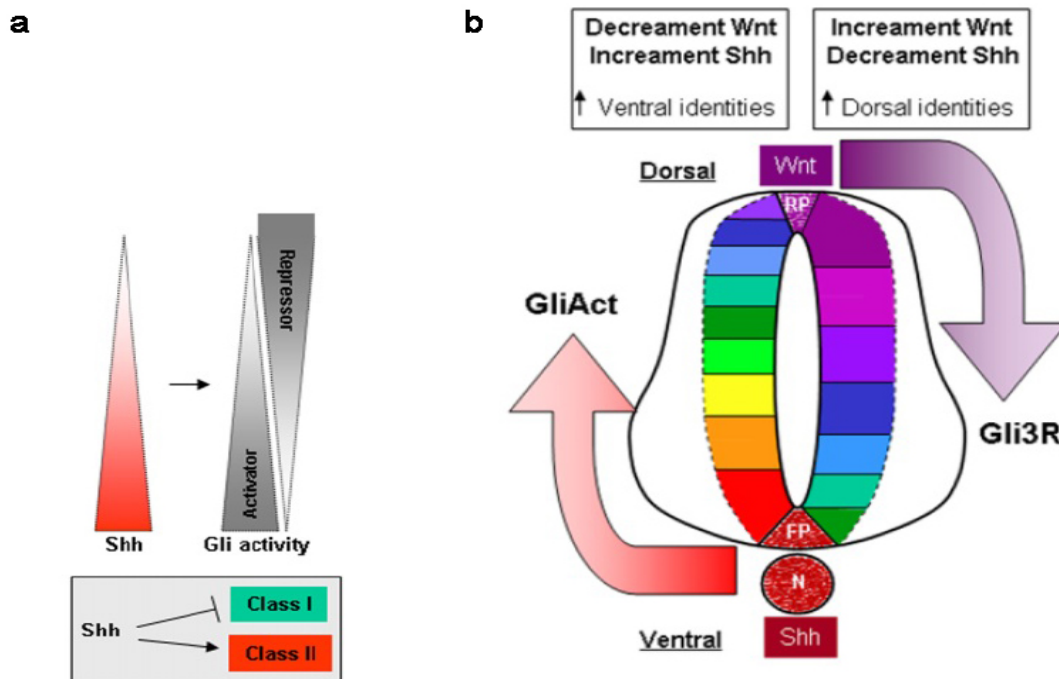
B2.6. Κατανώντας της διαβαθμισμένη σηματοδότηση Shh - Η οικογένεια των πρωτεϊνών Gli ως οι μεταγραφικοί μεσολαβητές του Shh

Ο πρωταρχικός ρόλος της διαβαθμισμένης σηματοδότησης Shh εστιάζεται στο πώς οι διαφορές στην εξωκυττάρια συγκέντρωση του μορφογόνου Shh ερμηνεύονται από κύτταρα τα οποία μπορούν να κατευθύνουν διαφορικές μεταγραφικές αποκρίσεις. Η διαβαθμισμένη σηματοδότηση του μορφογόνου Shh διαμεσολαβείται από τις πρωτεΐνες δακτύλων ψευδαργύρου (zinc-finger) της οικογένειας Gli, οι οποίες είναι γνωστοί μεταγραφικοί μεσολαβητές της σηματοδότησης Shh και οι οποίες συντονισμένα σχεδιάζουν το ραχιαίο-κοιλιακό άξονα του νωτιαίου μυελού. Η οικογένεια Gli αποτελείται από τις πρωτεΐνες στα χορδωτά Gli1, Gli2 και Gli3 οι οποίες εκφράζονται στο νωτιαίο

μυελό [42–44], και είναι ομόλογες με τον μεταγραφικό παράγοντα που περιέχει δάκτυλους ψευδαργύρου *Cubitus interruptus* (Ci) στη *Drosophila* [45].

Στη *Drosophila*, ο παράγοντας Ci είναι ρυθμιστής-κλειδί των γονιδίων-στόχων των μορίων Hedgehog (Hh) [46]. Ο παραγόντας Ci λειτουργεί και ως καταστολέας και ως ενεργοποιητής της μεταγραφής. Απουσία σηματοδότησης Hh ο παράγοντας Ci επεξεργάζεται πρωτεολυτικά οδηγούμενος στην ανενεργή μορφή του η οποία περιλαμβάνει την αμινο-τελική περιοχή και την περιοχή των δακτύλων ψευδαργύρου που προσδένεται στο DNA αλλά στερείται την καρβοξυ-τελική περιοχή [47,48]. Παρουσία σηματοδότησης Hh αυτή η αποκοπή παρεμποδίζεται οδηγώντας στη δημιουργία της πρωτεΐνης πλήρους μήκους που λειτουργεί ως μεταγραφικός ενεργοποιητής [46,49–51].

Όσον αφορά τα χορδωτά, τα στοιχεία δείχνουν ότι, σε αντίθεση με τον παράγοντα Ci, η πρωτεΐνη Gli1 δεν επεξεργάζεται πρωτεολυτικά και λειτουργεί μόνο ως μεταγραφικός ενεργοποιητής [43,44,52,53]. Τα δεδομένα αυτά έχουν οδηγήσει στην άποψη ότι η πρωτεΐνη Gli1 δεν είναι πιθανό να μεσολαβεί την πρώιμη άμεση απόκριση των κυττάρων στο Shh. Από την άλλη πλευρά, οι πρωτεΐνες Gli2 και Gli3 περιέχουν περιοχές τόσο καταστολής όσο και ενεργοποίησης στα αμινο- και καρβοξυ-τελικά τους άκρα, αντίστοιχα [52,54], αλλά, όσον αφορά την πρωτεΐνη Gli2 έχειδειχθεί ότι είναι πρωταρχικός ενεργοποιητής εξαρτώμενος από Hh [55–57]. Πειράματα παρεμπόδισης της συνολικής μεταγραφικής ενεργοποίησης χρησιμοποιώντας μία επικρατούσα (dominant) κατασταλτική μορφή της πρωτεΐνης Gli3 (Gli3R) οδήγησαν σε μία μετατόπιση από την κοιλιακή σε πιο ραχιαία περιοχή (ventral-to-dorsal shift), όσον αφορά την ταυτότητα των προγονικών κυττάρων και μία συνακόλουθη αποτυχία στη γένεση κινητικών νευρώνων και κοιλιακών ενδιάμεσων νευρώνων [58]. Αυτά τα δεδομένα σε συνδυασμό με την παρατήρηση ότι μόνο οι πιο κοιλιακές περιοχές του νευρικού σωλήνα διακόπτονται σε έμβρυα στα οποία απουσιάζει η Gli2 [55,56] δείχνουν την εξαρτώμενη από το περιεχόμενο διπλή λειτουργία της πρωτεΐνης Gli3, η οποία απουσία της σηματοδότησης Shh δρα ως καταστολέας (Gli3R), ενώ η λειτουργία της ως ενεργοποιητή – πλήρους μήκους – αποκαλύπτεται ως απόκριση στην παρουσία της σηματοδότησης Shh. Σε αυτό το μηχανισμό πρέπει να προστεθεί κι ο ανταγωνιστικός ρόλος της σηματοδότησης Wnt, λαμβάνοντας υπ' όψη και το εύρημα ότι η σηματοδότηση Wnt επηρεάζει επίσης τη δραστηριότητα της κατασταλτικής μορφής του Gli3 (Gli3R) [17,59] (βλ. **Εικ. 1.8b**).



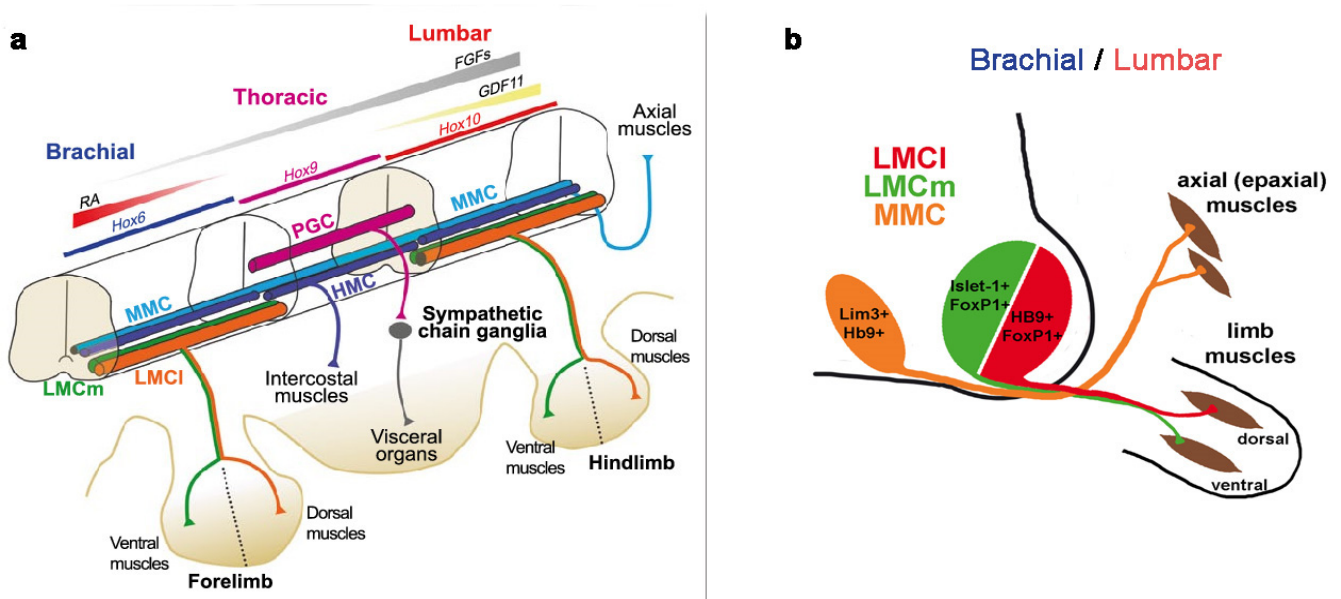
Εικ. 1.8. Η ρύθμιση των πρωτεϊνών Gli ως μεσολαβητών του μονοπατιού Shh και η διασταυρούμενη επίδραση του με το ανταγωνιστικό μονοπάτι Wnt. **a.** Η κλίση συγκέντρωσης του Shh που εγκαθιδρύεται στο νωτιαίο μυελό «μεταφράζεται» ως μία ενδοκυτταρική κλίση συγκέντρωσης της δραστηριότητας Gli. Η συνολική δραστηριότητα των Gli είναι το αποτέλεσμα του συνδυασμού των ενεργοποιητικών και των ανασταλτικών μορφών τους, οι οποίες προωθούνται ή αναστέλλονται από το μορφογόνο Shh, αντίστοιχα. **b.** Ενώ η κλίση συγκέντρωσης κοιλιακά προς ραχιαία του Shh προωθεί την απόκτηση των κοιλιακών ταυτοτήτων των νευρικών προγονικών κυττάρων, η δράση του Shh περιορίζεται από τη σηματοδότηση Wnt /β-catenin, από τις πρωτεΐνες Wnt1 και Wnt3a, που προέρχεται από τις ραχιαίες περιοχές του νωτιαίου μυελού, προωθώντας τις ραχιαίες ταυτότητες. Η σηματοδότηση Wnt /β-catenin περιορίζει τη δραστηριότητα Shh, ακόμη και στις πιο κοιλιακές περιοχές του νωτιαίου μυελού, εν μέρει μέσω άμεσης επαγωγής της έκφρασης της κατασταλτικής μορφής του Gli3 (Gli3R) που είναι κολοβή (truncated) στο καρβοξυτελικό της άκρο και αποτελεί έναν δυνητικό ανταγωνιστή του μονοπατιού Shh. Η έκταση των ραχιαίων και κοιλιακών περιοχών είναι το αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ των σημάτων Shh και Wnt /β-catenin. Χειρισμός αυτών των σηματοδοτικών μονοπατιών οδηγεί σε ραχαιοποίηση (dorsalisation) ή κοιλιακοποίηση (ventralisation) με προβλέσιμο τρόπο (από [17,59]). Απεικόνιση εγκάρσιας τομής.

Επομένως, η σηματοδότηση Shh στο νωτιαίο μυελό μεσολαβείται από επικαλυπτόμενες αλλά διακριτές λειτουργίες των πρωτεϊνών Gli2 και Gli3, και οι σχετικές τους συνεισφορές ποικίλουν κατά μήκος του κεφαλο-ουριαίου άξονα, ρυθμίζοντας το χωρικό πρότυπο (spatial patterning) και έχοντας και πολλαπλασιαστικούς ρόλους [60–62]. Η συνδυασμένη τους μεταγραφική δραστηριότητα οδηγεί σε μία διαβάθμιση μεταγραφικής ενεργοποίησης (+) στις κοιλιακές περιοχές και μία καταστολή (-)

στις ενδιάμεσες και ραχιαίες περιοχές [18] (βλ. **Εικ. 1.8a**). Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες Gli2 και Gli3 προσδιορίζουν, με θετικό τρόπο, τις κοιλιακές κυτταρικές μοίρες, το εδαφιαίο πέταλο, καθώς και τα προγονικά κύτταρα των ενδιάμεσων νευρώνων V3 και κινητικών νευρώνων [60–62]. Όσον αφορά την πρωτεΐνη Gli1, η έκφραση και ενεργοποίηση της εξαρτάται από τις πρωτεΐνες Gli2 και Gli3 [61].

B.2.7. Σχηματισμός των κινητικών στηλών στον αναπτυσσόμενο νωτιαίο μυελό

Στον αναπτυσσόμενο νωτιαίο μυελό και δη αυτόν των ποντικών, οι κινητικοί νευρώνες του νωτιαίου μυελού (spinal motor neurons, spMNs) αρχικά οργανώνονται σε επιμήκεις στήλες κατά μήκος του κεφαλο-ουριαίου άξονα του εμβρύου, τις επονομαζόμενες **κινητικές στήλες** (motor columns) οι οποίες νευρώνουν διακριτούς μυϊκούς στόχους κατά μήκος του σώματος [16,63–67] (βλ. **Εικ.1.9**). Όταν αυτή η οργάνωση των κινητικών στηλών εγκαθιδρυθεί, οι κινητικοί νευρώνες υποδιαιρούνται σε ακόμη μικρότερες ομάδες, τις **κινητικές δεξαμενές** (motor pools) οι οποίες και νευρώνουν τους μύες σε κάθε περιοχή – στόχο [16,64,68,69]. Επιπροσθέτως, οι κινητικές στήλες διακρίνονται από τη διαφορική και συνδυαστική έκφραση των πρωτεϊνών ομοιωτικής περιοχής LIM, των πρωτεϊνών Hox, καθώς και άλλων μεταγραφικών παραγόντων [64,70–72]. Η **διάμεση κινητική στήλη** (median motor column, **MMC**) νευρώνει αξονικούς (επαξονικούς, *eraxial*) μύες κατά μήκος ολόκληρου του κεφαλο-ουριαίου άξονα (βλ. **Εικ.1.9**). Η **πλευρική κινητική στήλη** (lateral motor column, **LMC**) νευρώνει τους μύες των άκρων βραχιόνιο (*brachial*) και οσφυϊκό (*lumbar*) επίπεδο. Οι κινητικοί νευρώνες της LMC υποδιαιρούνται, περαιτέρω, στους πληθυσμούς που αποτελούν την **μεσαία υπο-στήλη LMC (LMCm)** καθώς και αυτούς που αποτελούν την **πλευρική υπο-στήλη LMC (LMCl)** που νευρώνουν τους κοιλιακούς καμπτήρες (*flexor*) και ραχιαίους εκτείνοντες (*extensor*) μύες των άκρων, αντίστοιχα (βλ. **Εικ.1.9**). Η **υπαξονική κινητική στήλη** (*hyraxial motor column*, **HMC**) νευρώνει αναπνευστικούς μύες, περιλαμβανομένων του διαφράγματος, των μεσοπλευρίων μυών και των κοιλιακών μυών σε διάφορα επίπεδα του νωτιαίου μυελού. Τέλος, οι **προγαγγλιακές κινητικές στήλες** (*preganglionic motor columns*, **PGC**) νευρώνουν τα συμπαθητικά και παρασυμπαθητικά γάγγλια και είναι παρούσες μόνο στο θωρακικό (*thoracic*) και ιερό (*sacral*) επίπεδο (βλ. **Εικ.1.9**) [16,64,70,73–77]. Η γένεση αυτών των διαφορετικών υποτύπων κινητικών νευρώνων και η συνακόλουθη οργάνωσή τους σε κινητικά κυκλώματα (*motor circuits*) εξαρτάται από την έκφραση και τη λειτουργία των καθοριστών της κυτταρικής μοίρας (*cell fate determinants*) στους υπό διαφοροποίηση και στους μεταμιτωτικούς νευρώνες [64–67,70–72].



Εικ. 1.9. Τοπογραφική οργάνωση και μοριακοί δείκτες των κινητικών στηλών κατά μήκος του προσθιοπίσθιου άξονα του αναπτυσσόμενου νωτιαίου μυελού. a. Σχηματικό διάγραμμα της τρισδιάστατης κατανομής των κινητικών στηλών κατά τον κεφαλο-ουριαίο άξονα. Διαβαθμισμένα επίπεδα των μορφογόνων, κυρίως FGFs και RA, καθορίζουν τη χωρική έκφραση των παράλογων ομάδων Hox (Hox paralog groups) που σχηματίζουν το νωτιαίο μυελό στα τρία κύρια τμήματα, το **βραχιόνιο (brachial)**, το **θωρακικό (thoracic)** και το **οσφυϊκό (lumbar)**. Στο θωρακικό επίπεδο, οι κινητικοί νευρώνες κατανέμονται σε μία **διάμεση κινητική στήλη (median motor column, MMC)** η οποία νευρώνει τους αξονικούς (επαξονικούς, epaxial) μύες, μία **υπαξονική κινητική στήλη (hypaxial motor column, HMC)** που νευρώνει τους μεσοπλευρίους μύες και οι **προγαγγλιακές κινητικές στήλες (preganglionic motor columns, PGC)** που νευρώνουν τα συμπαθητικά και παρασυμπαθητικά γάγγλια και εκ των οποίων τα συμπαθητικά προβάλλουν στην αλυσίδα συμπαθητικών γαγγλίων που νευρώνει όργανα των σπλάχνων. Στο βραχιόνιο και οσφυϊκό επίπεδο, οι κινητικοί νευρώνες συγκεντρώνονται στην κινητική στήλη MMC και στην **πλευρική κινητική στήλη (lateral motor column, LMC)** που νευρώνει τους κινητικούς μύες. Η LMC υποδιαιρείται στη μεσαία (medial) υπο-στήλη (sub column) LMC (**LMCm**) καθώς και στην πλευρική (lateral) υπο-στήλη LMC (**LMCI**) που νευρώνουν τους κοιλιακούς καμπτήρες (flexor) και ραχιαίους εκτείνοντες (extensor) μύες των άκρων, αντίστοιχα (από [70]). **b.** Διάγραμμα εγκάρσιας τομής του βραχιονίου /οσφυϊκού επιπέδου του εμβρυϊκού νωτιαίου μυελού, τις κατευθύνσεις των αξονικών προβολών των κινητικών νευρώνων στους μυϊκούς στόχους, τις κινητικές στήλες που συγκροτούν αυτοί, καθώς και μοριακούς δείκτες που εκφράζουν (σχεδιασμός N. Κοκκοράκη βασισμένο σε [76,77]). FGFs: fibroblast growth factors, αυξητικοί παράγοντες των ινοβλαστών, RA: retinoic acid, ρετινοϊκό οξύ, GDF11: growth differentiation factor 11, αυξητικός παράγοντας διαφοροποίησης 11.

Γ. Γενικά στοιχεία για την οικογένεια των κινασών DYRK

Γ.1. Φυλογενετικές σχέσεις –Ταξινόμηση της οικογένειας των κινασών DYRK

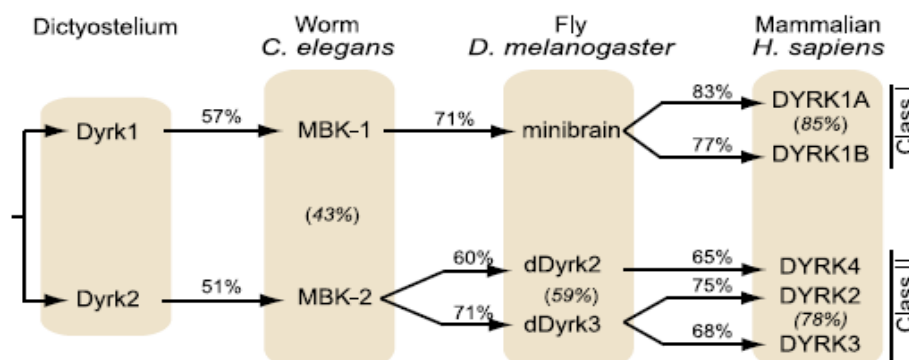
Η πρωτεϊνική κινάση Dyrk1B ανήκει στην οικογένεια των κινασών DYRK (dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinases, κινάσες διπλής ειδικότητας ρυθμιζόμενες από φωσφορυλίωση τυροσίνης), οι οποίες φωσφορυλιώνουν υποστρώματα, σε κατάλοιπα Ser και Thr και αυτοφωσφορυλιώνονται σε κατάλοιπα τυροσίνης (Tyr). Προκειμένου να επιτύχουν την καταλυτική τους ενεργότητα, οι κινάσες DYRK κατά τη διάρκεια της μετάφρασής τους αποκτούν μία ενδιάμεση παροδική μορφή με δυνατότητα φωσφορυλίωσης καταλοίπων Tyr και πραγματοποιούν ενδομοριακή αυτό-φωσφορυλίωση *in cis* στο κατάλοιπο της δεύτερης τυροσίνης ενός εξελικτικά συντηρημένου προτύπου Tyr/Tyr (YxY) το οποίο εντοπίζεται στον βρόγχο ενεργοποίησης (activation loop) τους, και επομένως αυτοενεργοποιούνται [78–80]. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας της μετάφρασης η ενδιάμεση μορφή της κινάσης χάνει την ειδικότητα φωσφορυλίωσης σε κατάλοιπα Tyr και πλέον η ενεργότητα κινάσης του μορίου περιορίζεται σε κατάλοιπα Ser/Thr [78–81].

Οι κινάσες DYRK, ανήκουν στην ομάδα των κινασών CMGC, ομάδα που περιλαμβάνει επίσης τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (cyclin dependent kinases, CDKs), τις ενεργοποιούμενες από μιτογόνα κινάσες (mitogen activated protein kinases, MAPK), την κινάση της συνθετάσης του γλυκογόνου 3 (glycogen synthase kinase 3, GSK3), τις CDK-like κινάσες, κινάσες πλούσιες σε κατάλοιπα Ser/Thr, τις cdc2-like κινάσες και τις RCK κινάσες [82]. Η οικογένεια των κινασών DYRK περιλαμβάνει τρεις υποοικογένειες: την υποοικογένεια επίσης ονομαζόμενη DYRK, τη HIPK (homeodomain-interacting protein kinases) και τη PRP4 (pre-mRNA processing protein 4 kinases). Η υποοικογένεια DYRK αποτελείται από τρεις ομάδες: την ομάδα των κινασών Yak, η οποία δεν συναντάται στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και τις ομάδες DYRK τάξης I και II. Οι κινάσες της υποοικογένειας DYRK είναι εξελικτικά καλά συντηρημένες και οι λειτουργίες τους σχετίζονται με τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, της κυτταροκίνησης και της κυτταρικής διαφοροποίησης [82].

Τα μέλη της υποοικογένειας DYRK που έχουν ταυτοποιηθεί στη *Drosophila melanogaster* είναι η κινάση MNB (Mini-brain) και οι κινάσες dDyrk2 και dDyrk3. Η κινάση MNB, που είναι και εξελικτικά εγγύτερη στις Dyrk1A και Dyrk1B των θηλαστικών, πήρε το όνομά της από τον φαινότυπο που προκαλούν στη μύγα οι μεταλλαγές του γονιδίου *mnb*. Έχει δειχθεί ότι το μεταλλαγμένο *mnb* προκαλεί ανωμαλίες στη διεύθυνση των νευροβλαστών στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο της λάρβας. Οι μύγες με φαινότυπο *mini-brain* έχουν σημαντικά μικρότερο μέγεθος οπτικών λοβών και ημισφαιρίων, γεγονός που υποδεικνύει ότι το γονίδιο *mnb* παίζει σημαντικό ρόλο στην μετα-εμβρυϊκή νευρογένεση. Οι μύγες αυτές παρουσιάζουν επίσης προβλήματα σε δοκιμασίες μνήμης-μάθησης αλλά και όρασης και όσφρησης [83].

Στα θηλαστικά υπάρχουν πέντε κύρια μέλη της οικογένειας των κινασών DYRK, οι κινάσες Dyrk1A, Dyrk1B, Dyrk2, Dyrk3 και Dyrk4 και είναι γνωστό ότι τα γονίδια που τις κωδικοποιούν έχουν

προέλθει από διπλασιασμό γονιδίων ο οποίος συνέβη κατά τη διάρκεια των τελευταίων περιόδων της εξέλιξης των Μεταζώων [82]. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις Dyrk1A και Dyrk1B είναι μεταξύ τους παράλογα όπως επίσης και αυτά που κωδικοποιούν τις Dyrk2, Dyrk3 και Dyrk4 (βλ. **Εικ.1.10**).

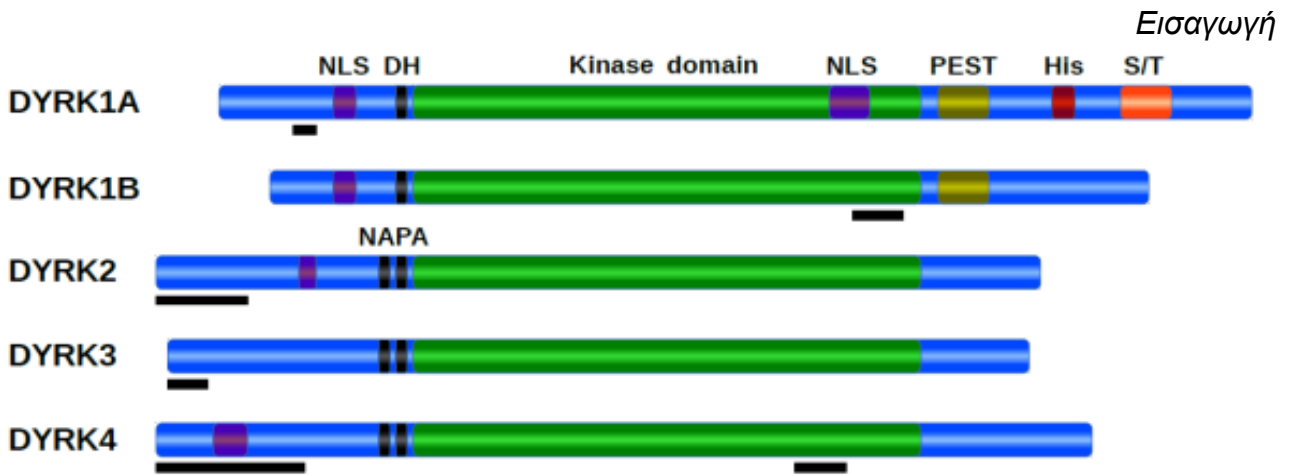


Εικόνα 1.10. Οι δύο κύριες ομάδες της υποοικογένειας των κινασών Dyrk που υπάρχουν στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Το ποσοστό ομοιότητας σε πρωτεϊνικό επίπεδο μεταξύ των ορθολόγων κινασών φαίνεται πάνω απ' τα βέλη, ενώ μεταξύ των παραλόγων φαίνεται στην παρένθεση. Μόνο η περιοχή (domain) της κινάσης συγκρίνεται (από [82]).

Γ.2. Δομή και λειτουργία των κινασών Dyrk

Γ.2.1. Πρωτεϊνική δομή των κινασών Dyrk

Οι πέντε κινάσες Dyrk των θηλαστικών, έχουν μία κοινή εξελικτικά συντηρημένη δομική περιοχή (domain) με ενεργότητα κινάσης, καθώς και μια κοινή αλληλουχία που ονομάζεται «**DH box**» (Dyrk homology box, πλαίσιο ομολογίας Dyrk) πριν το domain της κινάσης (βλ. **Εικ. 1.11**), το οποίο και υποστηρίζει την αυτοφωσφορυλίωση της συντηρημένης τυροσίνης κατά την ωρίμαση της καταλυτικής περιοχής [82,84]. Παρ' όλα αυτά, οι κινάσες αυτές παρουσιάζουν διαφορές στο μήκος του αμινοτελικού και του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης, καθώς επίσης και σε ό,τι αφορά την παρουσία ή μη, μίας αλληλουχίας πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal, NLS) και μιας αλληλουχίας που σχετίζεται με τη δυνατότητα αυτοφωσφορυλίωσης της Tyr (N-terminal autophosphorylation accessory region, NAPA motif). Οι κινάσες Dyrk της τάξης I (Dyrk1A και Dyrk1B) φέρουν την αλληλουχία NLS στο αμινοτελικό άκρο, και αλληλουχίες PEST στο καρβοξυτελικό άκρο, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές πρωτεϊνών με μικρή ενδοκυττάρια ημιζωή και αποτελούν πεπτιδικό σήμα για πρωτεϊνική αποικοδόμηση. Οι κινάσες Dyrk της τάξης II (Dyrk2, Dyrk3, Dyrk4) φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο την αλληλουχία NAPA [82,85,86].



Εικόνα 1.11. Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεϊνικής δομής της ομάδας των κινασών DYRK των θηλαστικών. Φαίνεται η εξελικτικά συντηρημένη περιοχή με ενεργότητα κινάσης (kinase), οι αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού (NLS) και το συντηρημένο DH-box σε όλα τα μέλη της υποοικογένειας (λεπτή μαύρη γραμμή). Ακόμη, απεικονίζεται η αλληλουχία PEST (στο καρβοξυτελικό άκρο μόνο της Dyrk1A και Dyrk1B - καφέ) και μία περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου πλούσια σε κατάλοιπα Ser και Thr (S/T region). Επίσης, απεικονίζονται οι περιοχές της πρωτεΐνης που επηρεάζονται από την εναλλακτική συρραφή (μάτισμα) (μαύρες οριζόντιες γραμμές) (προσαρμοσμένο από [82]).

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις κινάσες DYRK εδράζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα, τόσο στον άνθρωπο, όσο και στο ποντίκι, ποικίλουν σημαντικά σε μέγεθος και υπόκεινται σε εναλλακτική συρραφή (μάτισμα), με αποτέλεσμα μετάγραφα με διαφορετικά πρότυπα έκφρασης στους διάφορους ιστούς και σε πρωτεΐνες με λειτουργικές διαφορές [87].

Από όλες τις κινάσες της υποοικογένειας DYRK, η Dyrk1A είναι μία από τις πιο μελετημένες. Εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, και στον άνθρωπο και στο ποντίκι καθώς και εκφράζεται σε αφθονία στο νευρικό σύστημα συμμετέχοντας σε σημαντικές διαδικασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η νευρωνική διαφοροποίηση, η συναπτογένεση αλλά και ο κυτταρικός θάνατος [88]. Η κινάση Dyrk1B εκφράζεται και αυτή σε διάφορους ιστούς αλλά τα πρότυπα έκφρασής της διαφέρουν (βλ. παρακάτω). Οι κινάσες Dyrk2, Dyrk3 και Dyrk4 εκφράζονται κυρίως στους όρχεις [89].

Γ.2.2. Ο ρόλος των κινασών DYRK στις διάφορες κυτταρικές διεργασίες

Οι κινάσες της υποοικογένειας DYRK λαμβάνουν μέρος στη ρύθμιση αρκετών κυτταρικών διεργασιών από τη γονιδιακή έκφραση και διαφοροποίηση έως την ενδοκυττάρωση και την κυτταρική επιβίωση, καθώς κατέχουν κομβικό ρόλο σε πολλά κυτταρικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος ενώ αλληλεπιδρούν με πλήθος άλλων ρυθμιστικών μορίων και μεταγραφικών παραγόντων. Σε ορισμένες περιπτώσεις οι κινάσες DYRK δρουν ως **πρωταρχικές** (priming) **κινάσες** φωσφορυλιώνοντας

ορισμένα υποστρώματα ως προϋπόθεση για την περαιτέρω φωσφορυλίωσή τους από άλλες κινάσες [82,90], με τρεις μηχανισμούς δράσης, ανάλογα με το είδος της κινάσης για την οποία λειτουργούν ως πρωταρχικές καθώς και με τη θέση που φωσφορυλιώνουν: 1) **‘κλασσικές’ ή ‘μη κλασσικές’ πρωταρχικές της κινάσης GSK3**, και 2) ως **πρωταρχικές της κινάσης PLK**.

Επίσης, είναι γνωστός ο ρόλος των κινασών DYRK στη **ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης**, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τη ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα NFAT από τις Dyrk1A, Dyrk2 και Dyrk3, δρώντας ως αρνητικοί ρυθμιστές του, οδηγώντας τον στο κυτταρόπλασμα ύστερα από φωσφορυλίωσή του [82]. Άλλοι μεταγραφικοί στόχοι των κινασών DYRK αποτελούν οι τελεστές του σηματοδοτικού μονοπατιού Hedgehog (Hh) και δη του Sonic Hedgehog (Shh), οι πρωτεΐνες Gli. Συγκεκριμένα έχειδειχθεί η ενεργοποίηση του παράγοντα Gli1 από τη Dyrk1A και η απενεργοποίηση των παραγόντων Gli2 και Gli3 που οδηγούνται προς αποικοδόμηση από τη Dyrk2 [91]. Ο ρόλος της Dyrk1B στη ρύθμιση των παραγόντων Gli, που είναι πιο περίπλοκος και διπτός, θα αναλυθεί ειδικά παρακάτω. Στόχο ρύθμισης αποτελεί επίσης η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 από τις κινάσες Dyrk1A, Dyrk2 και Dyrk3 οι οποίες δρουν φωσφορυλιώνοντας διαφορετικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης, με διαφορετικές δράσεις. Για παράδειγμα η Dyrk1A δρα τόσο ως μόριο-ενεργοποιητής όσο και ως καταστολέας της p53 ανάλογα με το κυτταρικό περιβάλλον [92,93]. Επίσης, οι κινάσες DYRK σχετίζονται και με τις **τροποποιήσεις της χρωματίνης**, όπως η Dyrk1A έχει εντοπισθεί σε σύμπλοκα αναδόμησης της χρωματίνης SWI/SNF [94]. Σε καλλιέργειες μυοβλαστών έχειδειχθεί ότι η κινάση Dyrk1B φωσφορυλιώνει την αποακετυλάση ιστονών HDAC5 σε μια συντηρημένη θέση στην περιοχή του πυρηνικού εντοπισμού της και ελαττώνει την συγκέντρωσή της στον πυρήνα κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των μυοβλαστών [95]. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η κινάση Dyrk1B μπορεί να αλληλεπιδρά απευθείας με τροποποιητές της χρωματίνης με κρίσιμο ρόλο στη μεταγραφική ρύθμιση, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην ακετυλίωση των ιστονών, CBP (CREB Binding Protein, CREBBP, Προσδέουσα το CREB πρωτεΐνη), p300, p400, KAT8 και MSL3 [96,97]. Επιπροσθέτως, οι κινάσες DYRK σχετίζονται και με την **άμεση αλληλεπίδρασή τους με τη μεταγραφική συσκευή** και συγκεκριμένα την RNA πολυμεράση II (RNA polymerase II /RNAP II). Έχειδειχθεί ότι η Dyrk1A δρα ως μεταγραφικός ρυθμιστής και στρατολογείται στις περιοχές του εγγύς υποκινητή (proximal promoter regions) γονιδίων που σχετίζονται με την αύξηση και αναγνωρίζει το εξελικτικά συντηρημένο παλίνδρομο μοτίβο TCTCGCGAGA το οποίο οδηγεί στην εξαρτώμενη από την κινάση Dyrk1A ενεργοποίηση, μέσω της φωσφορυλίωσης της CTD (C-terminal domain, καρβοξυτελική δομική περιοχή) της RNAP II σε συγκεκριμένα κατάλοιπα σερίνης [98].

Ένας άλλος ρόλος των κινασών είναι ο ρόλος τους στην **κυτταρική επιβίωση**. Οι κινάσες Dyrk1A, Dyrk1B και Dyrk3 έχουν χαρακτηριστεί ως προστατευτικές έναντι της απόπτωσης, δρώντας σε διαφορετικούς στόχους το κάθε μέλος. Αντιθέτως, η κινάση Dyrk2 φαίνεται να προάγει την απόπτωση φωσφορυλιώνοντας την πυρηνική πρωτεΐνη p53 και προάγοντας την αποπτωτική της δράση [99]. Για παράδειγμα, η κινάση Dyrk1A έχει υπόστρωμα την κασπάση 9 [100,101] την οποία και παραμποδίζει ύστερα από φωσφορυλίωσή της κατά τη μεσόφαση [100] ή κατά την ανάπτυξη

[101]. Επίσης έχουν καταγραφεί αυξημένα επίπεδα Dyrk1A που φαίνεται ότι βοηθούν τα καρκινικά κύτταρα να επιβιώνουν [102]. Άλλος μηχανισμός της προώθησης της κυτταρικής επιβίωσης περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση του μέλους της ομάδας των υψηλά συντηρημένων NAD⁺-εξαρτώμενων αποακετυλασών πρωτεϊνών και /ή ADP ριβοζυλοτρανσφερασών **σιρτουινών** (sirtuins) SIRT1 από τις κινάσες Dyrk1A και Dyrk3 προάγοντας την αποακετυλίωση της p53 και την κυτταρική επιβίωση και παρεμποδίζοντας την κυτταρική απόπτωση [92]. Ο ρόλος της κινάσης **Dyrk1B** στην κυτταρική επιβίωση η δράση της εκδηλώνεται στη φάση G0 του κυτταρικού κύκλου και στη φυσιολογική κυτταρική διαφοροποίηση και στα καρκινικά κύτταρα, τα οποία εισέρχονται σε φάση ηρεμίας G0 (quiescent cells) προκειμένου να γίνει προσπάθεια επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA [103]. Αυτή η δράση της κινάσης Dyrk1B σχετίζεται με τη φωσφορυλίωση δύο αναστολέων των κινασών CDK, των p21^{Cip1} και p27^{Kip1} και την παρελκόμενη παρεμπόδιση από την πρωτεΐνη p27^{Kip1} της δράσης των προαποπτωτικών πρωτεϊνών (π.χ. η προκασπάση 3 και η Ask1) [104].

Οι κινάσες Dyrk1A, Dyrk1B και Dyrk3 παίζουν σημαντικό ρόλο στη **κυτταρική διαφοροποίηση** μίας ποικιλίας κυτταρικών τύπων [15]. Για παράδειγμα, οι κινάσες Dyrk1A και Dyrk1B λαμβάνουν μέρος και στη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών [105]. Επίσης, η κινάση Dyrk1A έχει σχετισθεί κυρίως με τη νευρωνική διαφοροποίηση, η κινάση Dyrk1B με τη διαφοροποίηση των μυοβλαστών, καθώς και σε μηχανισμούς διαφοροποίησης άλλων συστημάτων, όπως θα αναλυθούν παρακάτω, ενώ η κινάση Dyrk3 με τη διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων προωθώντας την επιβίωση των πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων [106]. Επιπροσθέτως, οι κινάσες Dyrk1A και Dyrk1B φαίνεται να σχετίζονται περισσότερο με τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, γεγονότα κατά τη μετάβαση G0→G1 [107], ενώ η κινάση Dyrk2 φαίνεται να έχει σχέση με τη φάση της μίτωσης δρώντας αρνητικά [108].

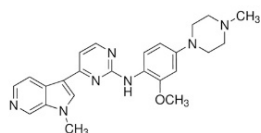
Γ.3. Αναστολείς της δράσης των κινασών Dyrk

Οι αναστολείς της δράσης των κινασών Dyrk ανήκουν επί το πλείστον στην κατηγορία των ανταγωνιστικών αναστολέων για ATP (adenosine triphosphate, τριφωσφορική αδενοσίνη) και είναι είτε φυσικής προέλευσης μόρια, είτε συνθετικά ανάλογά τους, ή και εξ ολοκλήρου καινούρια συνθετικά μόρια. Ένα από τα πιο καλά χαρακτηρισμένα μόρια-αναστολείς της δράσης των κινασών Dyrk και της μονοαμινοξειδάσης είναι η χαρμίνη (harmine), φυσικό αλκαλοειδές και παραγόμενη από τα φυτά *Banisteriopsis caapi* και *Peganum harmala* και είναι ένα μικρό μόριο [109]. Η χαρμίνη είναι ειδικός αναστολέας της δράσης των κινασών Dyrk αλληλεπιδρώντας και δημιουργώντας δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξικά κατάλοιπα της περιοχής πρόσδεσης του μορίου ATP. Έχει παραπλήσια εκλεκτικότητα για τις κινάσες Dyrk1A και Dyrk1B [109], ενώ για τις κινάσες Dyrk2 και Dyrk3 είναι 50 φορές μικρότερη η αποτελεσματικότητά της [82]. Άλλο φυσικό μόριο-αναστολέας της δράσης των κινασών Dyrk είναι η επιγαλλοκατεχίνη (epigallocatechin-gallate /EGCG), μια

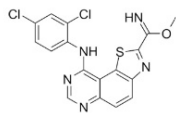
πολυφαινόλη με χαμηλή βιοδιαθεσιμότητά (πράσινο τσάι) αλλά και μεγάλη ετερογένεια στη δράση της κάτι το οποίο δεν τη καθιστά πολύ χρήσιμη πειραματικά.

Σε ό,τι αφορά συνθετικά μόρια-αναστολείς της δράσης των κινασών DYRK, υπάρχει μία ποικιλία μικρών μορίων όπως τα μόρια Purvalanol A, DMAT και TBB [109], το συνθετικό ανάλογο του αλκαλοειδούς Leucettamine B (θαλάσσιος σπόγγος *Leucetta microraphis*) leucettin L41 το οποίο αναστέλλει την ενεργότητα των κινασών Dyrk1A και Dyrk1B στον ίδιο βαθμό με τη χαρμίνη προσδεδεμένων και αυτών στην επικράτεια πρόσδεσης του μορίου ATP της κινάσης [110]. Άλλος αναστολέας είναι ο INDY τόσο για την κινάση Dyrk1A όσο και για την Dyrk1B με την απαίτηση λίγο μεγαλύτερης συγκέντρωσης για την κινάση Dyrk1A [111].

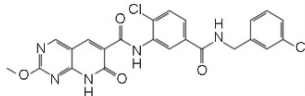
Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχουν συντεθεί ειδικοί αναστολείς για την Dyrk1B (βλ. **Εικ. 1.12**) εκ των οποίων αυτός που εμφανίζει τη μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για τη Dyrk1B έναντι άλλων κινασών DYRK είναι ο αναστολέας **AZ191** ο οποίος έχει 10 φορές μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για την Dyrk1B σε σχέση με την Dyrk1A [112,113] και ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στις πειραματικές προσεγγίσεις της παρούσας διατριβής (βλ. **Εικ. 1.12**). Ύστερα από την ανακάλυψή της, διάφορες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει τον AZ191 στοχεύοντας την Dyrk1B, κυρίως στην θεραπεία του καρκίνου, σε συνδυασμό ή όχι με αναστολείς άλλων κινασών και /ή προσεγγίσεις χήμειο- ή ραδιο- θεραπείας [113].



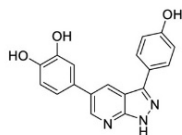
AZ191



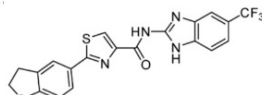
EHT5372



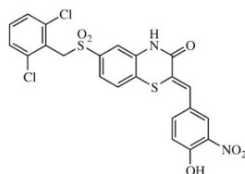
RO5454948



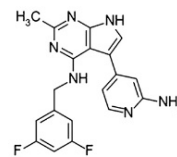
KS40008



DYRKi



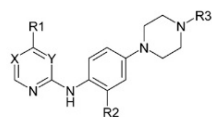
108600



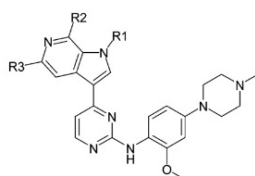
Pyrolopyrimidine Inhibitors
Compound 34 / VER-239353



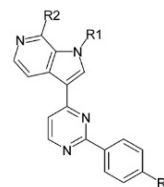
Azaindole



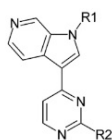
Anilino pyrimidine Inhibitors



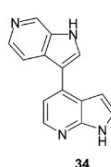
Methylated Azaindole Inhibitors



2-Phenylpyrimidine Inhibitors

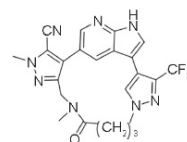
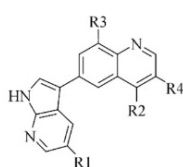


2-Alkylpyrimidine Inhibitors

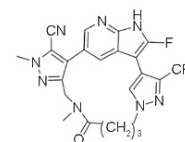


34

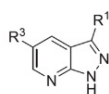
Azaindole-quinoline derivatives



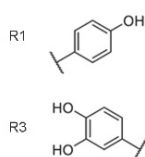
Macrocyclic Inhibitors
JH-XIV-68-3



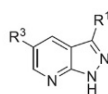
JH-XVII-10



8a-j

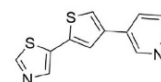


8h



9a R³ = 4-CH₃SO₂NHPh
9b,d R³ = 4-CH₃CONHPh
9c,e R³ = 4-NH₂CONHPh

1*H*-pyrazolo [3,4-*b*] pyridine derivatives



Lead-like 2,4-bisheterocyclic substituted thiophenes
Compound 48

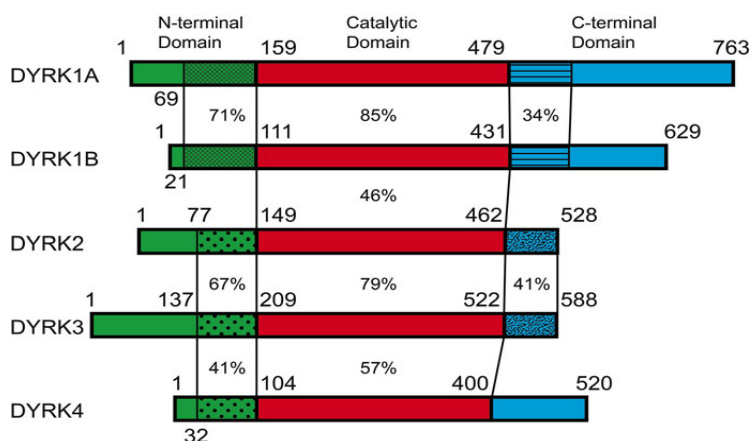
1.12. Χημικές δομές των αναστολέων της κινάσης Dyrk1B. Οι χημικές δομές γνωστών ειδικών αναστολέων της κινάσης Dyrk1B που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Διακρίνεται ο αναστολέας AZ191 ο οποίος παρουσιάζει τη μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για τη Dyrk1B (από [113]).

Δ. Η κινάση Mirk/Dyrk1B

Δ.1. Δομή της κινάσης Mirk/Dyrk1B

Το γονίδιο της κινάσης Dyrk1B, γνωστής και ως Mirk (Minibrain-related kinase, κινάση σχετιζόμενη με τη Minibrain), εδράζεται στο χρωμόσωμα 19, στον άνθρωπο, και περιλαμβάνει 11 εξώνια και 10 εσώνια [87] και παρουσιάζει υψηλή ομοιότητα με την κινάση Dyrk1A [89,114]. Η αμινοξική αλληλουχία της κινάσης Dyrk1B στην περιοχή με ενεργότητα κινάσης παρουσιάζει κατά μέσο όρο 56% ομοιότητα με την αντίστοιχη περιοχή των άλλων κινασών DYRK [83] και 85% με την κινάση Dyrk1A [115] (βλ. **Εικ. 1.13**), ωστόσο οι αλληλουχίες του αμινο- και καρβοξυ- τελικού άκρου δεν είναι συντηρημένες [83].

Έχουν ανιχνευθεί τρία εναλλακτικά μετάγραφα της κινάσης Dyrk1B με διαφορετικά πρότυπα έκφρασης και ενζυμικές ενεργότητες. Τα μετάγραφα *Dyrk1B* p-65 και *Dyrk1B* p-69 οδηγούν σε πιο ‘κοντή ισομορφή’ της πρωτεΐνης, ενώ το εναλλακτικό μετάγραφο *Dyrk1B* p-75, προκύπτει από επιμηκυσμένο πλαίσιο ανάγνωσης κατά 60 κωδικόνια και έτσι δημιουργείται η ‘επιμηκυσμένη ισομορφή’ της πρωτεΐνης [87]. Στο εναλλακτικό μετάγραφο *Dyrk1B* p-65 απουσιάζουν 40 αμινοξικά κατάλοιπα και ως εκ τούτου διαφέρει από το *Dyrk1B* p-69 στην καταλυτική περιοχή (domain), με αποτέλεσμα να μην παρουσιάζει ενεργότητα κινάσης *in vitro* και να μην περιέχει φωσφορυλιωμένη Tyr, όπως τα άλλα δύο εναλλακτικά μετάγραφα [87].



Εικόνα 1.13. Σχηματική αναπαράσταση των δομών της υποοικογένειας των κινασών DYRK. Φαίνονται οι αμινοξικές ομοιότητες των αμινο- και καρβοξυτελικών περιοχών, καθώς και της περιοχής με ενεργότητα κινάσης (από [115]).

Τα εναλλακτικά μετάγραφα *Dyrk1B* p-65 και *Dyrk1B* p-69 έχουν παρόμοια επίπεδα έκφρασης σε ιστούς ποντικών και πιο υψηλή έκφραση ανιχνεύεται στο σπλήνα, στους πνεύμονες, στον εγκέφαλο, στην ουροδόχο κύστη, στο στομάχι και στους όρχεις, ενώ το εναλλακτικό μετάγραφο *Dyrk1B* p-75 είναι αυτό που ανιχνεύεται ειδικά στον σκελετικό μυ και μάλιστα τα επίπεδά του αυξάνονται πολύ κατά τη διαφοροποίηση των μυοκυττάρων [83] καθώς και σε διαφοροποιημένες κυτταρικές σειρές, όπως η νευρωνική GT 1-7 και η λιποκυτταρική 3T3-L1 [87]. Υψηλά επίπεδα έκφρασης της Dyrk1B έχουν ανιχνευθεί σε καρκινικές κυτταρικές σειρές και σε όγκους παχέος εντέρου και πνεύμονα [116].

Δ.2. Η κυτταρική τοπολογία της κινάσης Dyrk1B

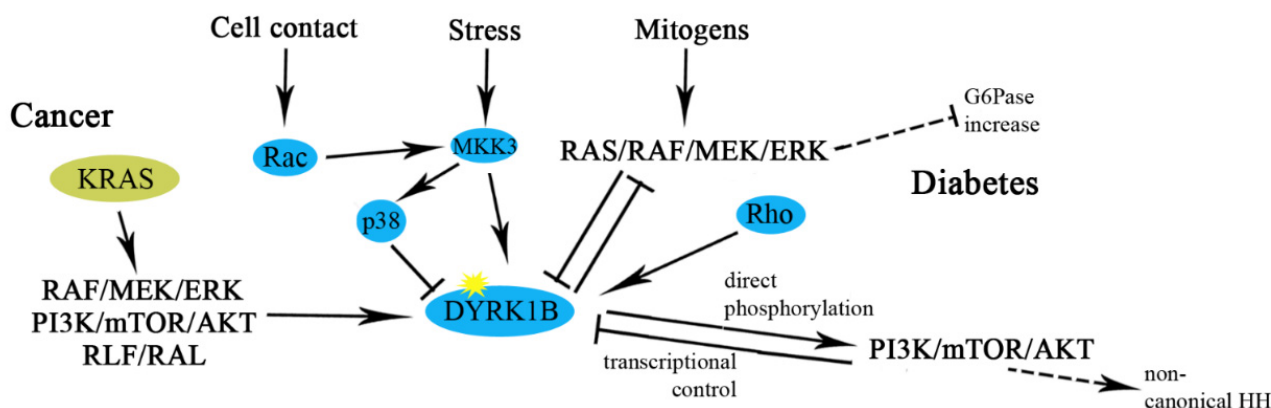
Η υποκυτταρική τοπολογία αποτελεί έναν τρόπο ρύθμισης της προσβασιμότητας στο υπόστρωμα για τις κινάσες DYRK. Για παράδειγμα, η υποκυτταρική τοπολογία της κινάσης Dyrk1A στον εγκέφαλο ενήλικου ποντικού ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των κυτταρικών τύπων και περιοχών. Σε κάποιες περιοχές η κινάση Dyrk1A εντοπίζεται στον πυρήνα, ενώ για την πλειονότητα των νευρώνων παρατηρείται κυτταροπλασματική τοπολογία [117,118], με αξιοσημείωτη εναπόθεσή της σε κάποιες νευρωνικές απολήξεις και συνάψεις στον ανθρώπινο εγκέφαλο [118]. Κυτταροπλασματική εναπόθεση της κινάσης Dyrk1A έχει βρεθεί και σε αστροκύτταρα, επενδυματικά και επιθηλιακά κύτταρα [118], με πιθανό ρόλο της στο κυτταρόπλασμα τη ρύθμιση της κυκλοφορίας των συναπτικών κυστιδίων (synaptic vesicle trafficking) [118,119]. Σε συμφωνία, επίσης άλλες μελέτες έχουν δείξει κυτταροπλασματικό εντοπισμό της κινάσης Dyrk1A σε νευρώνες κοτόπουλου, ποντικού και ανθρώπου [117–119] και γλοία ποντικού [117]. Σε αντίθεση, η κινάση Dyrk1B δείχνει μία επικρατέστερη πυρηνική χρώση σε διάφορες κυτταρικές σειρές, ενώ έχει κύρια κυτοσολική χρώση σε ανθρώπινες ενήλικες μυϊκές ίνες, στο ραβδομυοσάρκωμα και στα καρκινώματα του παγκρεατικού πόρου [82,103].

Δ.3. Ρύθμιση ενεργότητας της κινάσης Dyrk1B

Η κινάση Dyrk1B είναι ένας κύριος τροποποιητής της κυτταρικής δραστηριότητας και ως εκ τούτου υπόκειται σε αυστηρή ρύθμιση, σε μεταγραφικό, μεταφραστικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο, περιλαμβανομένων ενεργοποιητικών και απενεργοποιητικών φωσφορυλιώσεων που επιδρούν στην υποκυτταρική τοπολογία της κινάσης, στη συμμετοχή της σε διακριτές διαπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις με πλήθος συνδετών (ligands), καθώς και στην πρωτεϊνική της σταθερότητα [83].

Η ρύθμιση της έκφρασης και δραστηριότητας της κινάσης Dyrk1B έχει μελετηθεί σε μυοβλάστες και καρκινικές σειρές. Σε καλλιεργούμενους μυοβλάστες τα επίπεδα της κινάσης Dyrk1B ρυθμίζονται μέσω μεταγραφικών μηχανισμών που ελέγχονται από μικρές Rho GTPάσες όπως οι RhoA and Cdc42, και σε μικρότερο βαθμό από τη Rac1 [82,83,103,120] (βλ. **Εικ. 1.14**). Η κινάση Dyrk1B είναι επίσης κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνο και μάλιστα μειορρυθμιζόμενη από ενεργοποιημένες κινάσες ρυθμιζόμενες από εξωκυτάρια σήματα (extracellular signal-regulated kinases, ERKs) εμπλέκοντάς την στο σηματοδοτικό μονοπάτι MEK1–ERK [120]. Επίσης, σε συνθήκες έλλειψης μιτογόνου (mitogen deprivation) (π.χ. του ινσουλινο-ομοιάζοντος αυξητικού παράγοντα 1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) έχει παρατηρηθεί η αυξορρυθμισή [121] της δείχνοντας ότι είναι μία κινάση ενεργοποιούμενη από καταπόνηση (stress-activated kinase), αρνητικά ρυθμιζόμενη από το μονοπάτι RAS-MEK-ERK [122] (βλ. **Εικ. 1.14**). Αποσιώπηση της κινάσης Dyrk1B με knock-down σε ανθρώπινη καρκινική σειρά ωοθηκών οδήγησε σε αυξορρυθμιση του μονοπατιού c-Raf-MEK-ERK1/2 και συνακόλουθες αλλαγές στις πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου κυκλίνη D1 και p27^{Kip1} που ακολουθούνται από αυξημένο ρυθμό αύξησης και επανείσοδο των καρκινικών κυττάρων από τη

G1/G0 στη φάση S [123] (βλ. **Εικ. 1.14**). Επίσης, η κινάση Dyrk1B συναγωνίζεται με την ενεργοποιούμενη από καταπόνηση κινάση MAPK p38 για τον κοινό τους ενεργοποιητή τη MAPK κινάση MKK3 [120,122]. Μάλιστα έχει δειχθεί ότι η p38 μπορεί να παρεμποδίσει τη κινάση Dyrk1B, πιθανότατα όταν τα επίπεδά της είναι χαμηλά κατά την φάση S, αλλά όχι όταν αυτά είναι αυξημένα κατά τη μετάβαση G1/G0 [83,124] (βλ. **Εικ. 1.14**).



Εικ. 1.14. Η ρύθμιση της έκφρασης και ενεργότητας της κινάσης Dyrk1B. Η έκφραση και η ενεργότητα της κινάσης Dyrk1B ρυθμίζεται σε μεταγραφικό, μεταφραστικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Οι GTPάσες Rho (Rho GTPases) RhoA, Cdc42 και Rac1 προωθούν τη μεταγραφική αυξορρύθμιση της κινάσης Dyrk1B, ενώ μιτογόνα (mitogens) τη μειορρυθμίζουν μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού RAS/RAF/MEK/ERK. Υπό καθεστώς καταπόνησης (stress), η κινάση MKK3 ενεργοποιεί την κινάση Dyrk1B και την κινάση p38, ενώ η Dyrk1B διαχωρίζεται φυσικά και αναστέλλεται από την κινάση p38. Στον καρκίνο, η κινάση Dyrk1B εμπλέκεται σε μία πολύπλοκη διασταυρούμενη επίδραση (cross-talk) με το μονοπάτι Hedgehog (Hh). Το ογκογόνο μεταλλαγμένο RAS (KRAS) εκκινεί το ‘μη κανονικό’ (non-canonical) μονοπάτι Hh μέσω της ενεργοποίησης της Dyrk1B από έναν άγνωστο μηχανισμό ο οποίος εμπλέκει διάφορους τελεστές RAS, όπως οι RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT και RLF/RAL. Η κινάση Dyrk1B ενισχύει τη ‘μη κανονική’ σηματοδότηση Hh δια της προώθησης της σηματοδότησης PI3K/mTOR/AKT. Στο μεταβολικό σύνδρομο το οποίο συνοδεύεται από διαβήτη, η κινάση Dyrk1B εμπλέκεται στην ομοίωση της γλυκόζης, προωθώντας την έκφραση του ενζύμου-κλειδί της γλυκονογένεσης της φωσφατάσης της 6-γλυκόζης (G6pase), μέσω της αναστολής του μονοπατιού RAS–RAF–MEK. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδηλώνουν έμμεσους μηχανισμούς και τα αστέρια αναπαριστούν γεγονότα φωσφορλίωσης (από [125]).

Δ.4. Η κινάση Dyrk1B δρα κυρίως ως ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου

Οι δύο κύριες λειτουργίες της κινάσης Dyrk1B είναι η μετάβαση G1/G0 (G1/G0 transition) και η συνακόλουθη επαγωγή της εξόδου των κυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο στη φάση ηρεμίας G0

(quiescent state G0), όπως και η διατήρηση της κυτταρικής επιβίωσης [120,126,127]. Η κινάση Dyrk1B λειτουργεί ως κινάση ελέγχου στη G0 και τα επίπεδά της είναι εξαιρετικά αυξημένα στα μη πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, ακινητοποιημένα στη G0, όπως είναι οι στερημένοι από ορό (serum-starved) ινοβλάστες NIH3T3 [107]. Στους μυοβλάστες που διεξάγουν τελική διαφοροποίηση και έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της κινάσης Dyrk1B είναι 10 φορές υψηλότερα από εκείνα των πολλαπλασιαζόμενων και διατηρούνται υψηλά μετέπειτα στα ώριμα μυϊκά κύτταρα [120].

Επιπλέον, τα επίπεδα της κινάσης Dyrk1B ισχυρά αυξορρυθμίζονται στους ινοβλάστες NIH3T3 που βγεί από τον κυτταρικό κύκλο από την υπερέκφραση της πρωτεΐνης GAS1 (growth arrest specific 1) [128]. Σε συμφωνία, πειράματα έχουν δείξει ότι καταστολή της δράσης της Dyrk1B με τεχνολογία RNAi σε ινοβλάστες NIH3T3 και μυοβλάστες C2C12 σταματημένους στη φάση G0 επάγει την εκ νέου είσοδο στον κυτταρικό κύκλο, ενώ παροδική υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B κρατά το πολλαπλασιαζόμενο κύτταρο στη G0 [107,120,129]. Πέραν των παραπάνω κυττάρων, η κινάση Dyrk1B εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στους όρχεις στους οποίους ρυθμίζει αρνητικά τον πολλαπλασιασμό των ανώριμων αρσενικών αναπαραγωγικών κυττάρων [130]. Επίσης, η κινάση Dyrk1B αυξορρυθμίζεται ισχυρά σε συμπαγείς όγκους και καρκινικές κυτταρικές σειρές. Απαλοιφή (depletion) ή αναστολή (inhibition) της κινάσης Dyrk1B μπορεί να επάγει την επανείσοδο των καρκινικών κυττάρων σε φάση ηρεμίας, υποδηλώνοντας την αναγκαιότητα της κινάσης Dyrk1B να διατηρεί τα καρκινικά κύτταρα σε φάση ηρεμίας [131]. Η κινάση Dyrk1B προωθεί τη διατήρηση στη G0 των διαφοροποιούμενων μυοβλαστών, ινοβλαστών NIH3T3 και επιθηλιακών κυττάρων Mv1Lu με μετα-μεταφραστικούς μηχανισμούς [83]. Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από τη κινάση Dyrk1B επιτυγχάνεται αφενός μέσω της φωσφορυλίωσης των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου, όπως είναι οι ισομορφές της κυκλίνης D και του p27^{Kip1}, οδηγώντας στην αποσταθεροποίηση και την αποικοδόμησή τους, αντίστοιχα. Η παραπάνω διπλή δράση της κινάσης Dyrk1B φαίνεται να αποτελεί αναγκαία και ικανή συνθήκη για την έξοδο του κυττάρου από τον κυτταρικό κύκλο. Ειδικότερα, η κινάση Dyrk1B προσδένεται στη GSK3β, και αυτό το σύμπλοκο κινασών φωσφορυλιώνει την κυκλίνη D1 σε δύο γειτονικές συντηρημένες θέσεις ουβικιτίνωσης (ubiquitination), τη Thr288 από τη Dyrk1B και τη Thr286 από τη GSK3β, αντίστοιχα, αποσταθεροποιώντας και οδηγώντας τη κυκλίνη D1 σε αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα στο κυτταρόπλασμα [129,132]. Ακόμη, η κινάση Dyrk1B σταθεροποιεί τον αναστολέα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών p27^{Kip1} με φωσφορυλίωση στη Ser10. Η φωσφορυλίωση του αναστολέα p27^{Kip1} προλαμβάνει την κυτταροπλασματική του μετατόπιση και τη συνακόλουθη πρωτεασωμική του αποικοδόμηση [90,107,112,129]. Άλλος μηχανισμός των κινασών Dyrk1B και Dyrk1A για τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιείται μέσω του συμπλόκου DREAM, που αποτελείται από τις πρωτεΐνες MuvB, RB2, E2F4 και DP. Και οι δύο κινάσες ενεργοποιούν το σύμπλοκο DREAM φωσφορυλιώνοντας τη πρωτεΐνη LIN52, μία υπομονάδα της πρωτεΐνης MuvB στη Ser28 [133]. Το σύμπλοκο DREAM είναι ένας κύριος ενορχηστρωτής του κυτταρικού κύκλου και είναι ουσιώδης στη

διατήρηση της φάσης ηρεμίας [134]. Η πρωτεΐνη LIN52 ενδέχεται να περιλαμβάνεται σε μακροπρόθεσμη ρύθμιση της κυτταρικής μοίρας [131,135] (βλ. **Εικ. 1.15**). Επίσης, έχει δειχθεί ότι η έκφραση της κινάσης Dyrk1B στο σημείο G0 του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζεται και από τη Rho GTPάση RhoA καθώς επίσης και από την πρωτεΐνη Cdc42 ειδικά όταν το κύτταρο οδεύει προς διαφοροποίηση [120].

Δ.5. Ο ρόλος της κινάσης Dyrk1B στην κυτταρική επιβίωση

Η κινάση Dyrk1B εκτός από το να διαμεσολαβεί την παύση του κυτταρικού κύκλου και την ενεργοποίηση της μεταγραφής, έχει και αντι-αποπτωτικό ρόλο. Επομένως διαφαίνεται ο διπλός ρόλος της κινάσης Dyrk1B, αυτός της επαγωγής της παύσης του κυτταρικού κύκλου και της προώθησης της διαφοροποίησης αλλά και αυτός της διασφάλισης της κυτταρικής επιβίωσης, με την ιδιότητα της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης. Αυτή η θεώρηση επιβεβαιώνεται από πειράματα καταστολής (RNAi) της έκφρασης της κινάσης Dyrk1B σε διαφοροποιούμενους μυοβλάστες, με παρατηρούμενη σημαντική αύξηση των επιπέδων της κασπάσης 3 και ταυτόχρονη δραματική μείωση της επιβίωσης των μυοβλαστών της τάξης του 75% [126]. Έχει προταθεί ο μηχανισμός κατά τον οποίο η φωσφορυλίωση του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p21^{Cip1}, από την κινάση Dyrk1B, μέσα στην αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (NLS), στο κατάλοιπο Ser153, οδηγεί ένα μέρος του από τον πυρήνα, στον οποίο βρίσκεται, στο κυτταρόπλασμα, όπου αλληλεπιδρά με διάφορους προαποπτωτικούς παράγοντες όπως η προκασπάση 3 και η πρωτεΐνη ASK-1 (apoptosis signaling kinase-1) [126]. Ακόμη, έχει δειχθεί ότι ο αντι-αποπτωτικός ρόλος ξεκινά αμέσως μετά τη μεταφορά του αναστολέα p21^{Cip1} στο κυτταρόπλασμα [136,137] και φαίνεται ότι η επίδραση της Dyrk1B στην p21^{Cip1} είναι μέρος της διαδικασίας της διαφοροποίησης των μυοκυττάρων προωθώντας και την επιβίωση των μυοβλαστών κατά τη διάρκεια της μυογένεσης [126]. Ακόμη, έχει επιβεβαιωθεί ο αντι-αποπτωτικός ρόλος της κινάσης Dyrk1B, κατατάσσοντας την, μαζί με την Dyrk3, ανάμεσα στις 73 κινάσες με αντι-αποπτωτική δράση, αλλά παρ' όλα αυτά πρέπει να αποσαφηνιστούν οι μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων επιτελεί τη δράση της και το είδος και το πλήθος των μορίων-στόχων της [138].

Ένας δεύτερος μηχανισμός σε σχέση με τον ρόλο της κινάσης Dyrk1B στην κυτταρική επιβίωση, είναι αυτός της αντι-οξειδωτικής της λειτουργίας. Έχει βρεθεί ότι απαλοιφή της κινάσης Dyrk1B, μέσω παρεμβολής RNA (RNA interference, RNAi) ή φαρμακολογικής της αναστολής οδηγεί στη μείωση της κυτταρικής επιβίωσης και αύξηση της απόπτωσης σε πολλές καρκινικές σειρές [116,131,139–145], όπως και αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων δραστικών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) στον παγκρεατικό καρκίνο [146–148], στον καρκίνο των ωοθηκών [141,144,149], στον κολοορθικό (colorectal) καρκίνο [144,150], στο στοματικό ακανθοκυτταρικό (πλακώδες) καρκίνωμα (oral squamous cell carcinoma) [151] και στο οστεοσάρκωμα [152]. Η απαλοιφή της κινάσης Dyrk1B έχει δειχθεί ότι οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων ROS τα οποία και

συνοδεύονταν από βλάβη DNA (DNA damage), όπως υποδεικνύεται από τη φωσφορυλίωση της ιστόνης 2AX στη Ser139 από την κινάση RSK2 (ribosomal S6 kinase 2, ριβοσωμική S6 κινάση 2) [153], στον καρκίνο των ωοθηκών [131,141,144,149] και στον παγκρεατικό [146–148] καρκίνο. Επιπροσθέτως, η κινάση Dyrk1B αυξορρυθμίζει την έκφραση πολλών αντι-οξειδωτικών γονιδίων, όπως η φεροξειδάση (ferroxidase) και οι υπεροξειδικές δισμουτάσες 2 και 3 (superoxide dismutases 2 and 3, SOD2, SOD3) σε καρκινικές σειρές [131,144,146,154]. Επομένως, η απαλοιφή ή η φαρμακολογικά αναστολή ενός αντι-οξειδωτικού παράγοντα όπως είναι η Dyrk1B, αυξάνει τα ενδοκυττάρια επίπεδα των ROS και ως εκ τούτου ευαισθητοποιεί τα καρκινικά κύτταρα σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα που αυξάνουν τα επίπεδα ROS [140,154].

Ένας τρίτος μηχανισμός σε σχέση με τον ρόλο της Dyrk1B στην κυτταρική επιβίωση, περιλαμβάνει τον πυρηνικό αποκλεισμό και ως εκ τούτου την απενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NKX3.1 και των παραγόντων FOXO (forkhead box O, πλαίσιο forkhead O), FOXO1 και FOXO3A [123,131,155,156], που μεσολαβείται από τη φωσφορυλίωση μέσω της κινάσης Dyrk1B. Οι NKX3.1 και FOXO λειτουργούν ως καταστολείς όγκων σε μία ποικιλία καρκίνων αναστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προωθώντας την απόπτωση [156,157] (βλ. **Εικ. 1.15**).

Δ.6. Ο ρόλος της κινάσης Dyrk1B στην καρκινογένεση

Η κινάση Dyrk1B έχει ανιχνευθεί σε πολύ υψηλά επίπεδα σε συμπαγείς όγκους παχέος εντέρου, παγκρέατος, προστάτη, ωοθήκης, μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα και ραβδομυοσαρκώματος [103,116]. Στη διερεύνηση της σχέσης μεταξύ των αυξημένων επιπέδων της Dyrk1B στους όγκους και του ρόλου της στην καρκινογένεση έχει προταθεί ότι πιθανώς η επαγωγή της έκφρασης γονιδίων που προάγουν την παύση του κυτταρικού κύκλου και τη διαφοροποίηση, όπως είναι το γονίδιο *Dyrk1B*, αποτελεί αντισταθμιστικό μηχανισμό στον υπέρμετρο πολλαπλασιασμό που προκαλείται από την απορρύθμιση του καρκινικού κυττάρου. Ωστόσο, η παρατηρούμενη υπερίσχυση του αντι-αποπτωτικού ρόλου της κινάσης Dyrk1B, εν τέλει ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, αντί την αναχαίτισή του [126].

Ένα είδος κακοήθους νεοπλασίας, το ραβδομυοσάρκωμα (rhabdomyosarcoma, RMS), που δημιουργείται στα σκελετικά μυϊκά κύτταρα, αποτελεί ένα καλό παράδειγμα για τη μελέτη της λειτουργίας της κινάσης Dyrk1B κατά την καρκινογένεση, εφόσον η κινάση αυτή έχει κομβικό ρόλο στη διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών. Σύμφωνα με μία μελέτη [158] μια σειρά από μεταλλαγές που συμβαίνουν στα καρκινικά κύτταρα, με πιθανότερες αυτές που καθιστούν ανενεργή την p53, οδηγούν σε πολλαπλασιασμό της CDK4 και σε διαταραχές στη λειτουργία αναστολέων κυκλινοεξαρτώμενων κινασών, όπως 'απώλεια λειτουργίας' (*loss-of-function*) του αναστολέα p16^{Ink4} και χαμηλά επίπεδα του αναστολέα p21^{Cip1} [158]. Συνέπεια όλων αυτών των μεταλλαγών είναι να χαθεί το σημείο G0 του κυτταρικού κύκλου στους πολλαπλασιαζόμενους μυοβλάστες και ως εκ τούτου να παρεμποδίζεται ο ρόλος της κινάσης Dyrk1B ως μόριο-κλειδί για την παύση του

κυτταρικού κύκλου, χωρίς να επηρεάζεται ο αντι-αποπτωτικός της ρόλος [158]. Άλλωστε, έχει επιβεβαιωθεί η παραπάνω θεώρηση καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις όγκων η κινάση Dyrk1B εξέρχεται από τον πυρήνα, γεγονός που δεν της επιτρέπει πλέον να επάγει την παύση του κυτταρικού κύκλου [116,159].

Επίσης, είναι γνωστό ότι η κινάση Dyrk1B ρυθμίζει τη διατήρηση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (cancer stem cells, CSCs) υπό καθεστώς **υποξίας** (hypoxia) ή **νορμοξίας** (normoxia). Η βλαστικότητα (stemness) των βλαστικών κυττάρων εξαρτάται από την ισορροπία πολύπλοκων σημάτων στο μικροπεριβάλλον τους [160] και έχει δειχθεί ότι η υποξία αποτελεί κρίσιμο παράγοντα με θετική δράση στην επιβίωση και αυτό-ανανέωση των βλαστικών κυττάρων διαφόρων τύπων [160–162]. Οι μηχανισμοί διατήρησης των καρκινικών βλαστικών κυττάρων είναι κρίσιμοι για την εξέλιξη ενός όγκου [161]. Η υποξία ενισχύει την έκφραση /ενεργοποίηση των επαγόμενων από υποξία παραγόντων (hypoxia-inducible factors, HIFs) οι οποίοι συμμετέχουν στα καρκινικά κύτταρα κατά την εξέλιξη του καρκίνου προσδίδοντάς τους μία πιο επιθετική συμπεριφορά, ανθεκτικότητα στη θεραπεία και κακή πρόγνωση. Στο μηχανισμό συμμετέχουν οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF-1α and HIF-2α που είναι απαραίτητοι για τη διατήρηση των CSCs και η πρωτεΐνη ID2 [163]. Η κινάση Dyrk1B ρυθμίζει τη βλαστικότητα των CSCs σε καθεστώς νορμοξίας και υποξίας μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει το ένζυμο PHD1 (prolyl-hydroxylase, προπυλ-υδροξυλάση) που είναι αισθητήρας οξυγόνου. Κατά τη νορμοξία το ένζυμο PHD1 ενεργοποιεί φωσφορυλιώνοντας τη Dyrk1B η οποία απενεργοποιεί την πρωτεΐνη ID2 με φωσφορυλίωση στη Thr27 [163] εμποδίζοντας την αποσυγκρότηση του συμπλόκου ουβικιτίνης /λιγάσης (ubiquitin ligase complex) VCB-Cul2 προωθώντας την αποικοδόμηση του παράγοντα HIF2α [163]. Αντιθέτως, σε συνθήκες υποξίας οι PHD1 και Dyrk1B είναι απενεργοποιημένες οδηγώντας σε έναν μοριακό καταρράκτη που οδηγεί στην απενεργοποίηση της ουβικιτίνωσης του παράγοντα HIF2α και της συνακόλουθης αποικοδόμησης του [163]. Η σταθεροποίηση του παράγοντα HIF2α οδηγεί στη διατήρηση των CSCs, αυξάνει την επιθετικότητα των καρκινικών όγκων, όπως λ.χ. οι υποξικοί όγκοι του εγκεφάλου [163] (βλ. **Εικ. 1.15**).

Δ.7. Η κινάση Dyrk1B στο μεταβολικό σύνδρομο

Πέραν της εμπλοκής της κινάσης Dyrk1B στον καρκίνο, λίγα είναι γνωστά για τη συμμετοχή της σε άλλες ασθένειες. Μελέτες έχουν δείξει την εμπλοκή της κινάσης Dyrk1B στο μεταβολικό σύνδρομο κοιλιακής παχυσαρκίας (abdominal obesity metabolic syndrome, AOMS3) μέσω δύο μη νοηματικών της μεταλλαγών (missense mutations), τις H90P and R102C [164]. Το μεταβολικό σύνδρομο περιλαμβάνει ασθένεια στεφανιαίας αρτηρίας πρώιμης έναρξης (early-onset coronary artery disease), υπέρταση, παχυσαρκία και διαβήτη. Σε *in vitro* μελέτες υπερέκφραση των μεταλλαγών Dyrk1B-H90P ή Dyrk1B-R102C έχει οδηγήσει σε αυξημένη επαγωγή της φωσφατάσης της 6-

γλυκόζης (glucose-6-phosphatase, G6Pase), ένα ένζυμο της γλυκονεογένεσης, με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο [164]. Επιπλέον, η μεταλλαγή Dyrk1B-R102C ενισχύει την επίδραση της κινάσης Dyrk1B στην λιπογεννητική (adipogenic) διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων 3T3-L1 [164]. Φαίνεται, ότι τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα συμπεριφέρονται ως παραλλαγές της κινάσης Dyrk1B ‘προσθήκης λειτουργίας’ (*gain-of-function*) παρότι υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα [164]. Παρόλο που οι μεταλλαγές H90P και R102C εντοπίζονται στο αμινοτελικό άκρο της καταλυτικής περιοχής [114] φαίνεται ότι επηρεάζουν έμμεσα την αναγνώριση υποστρώματος και τη κατάλυση, επηρεάζοντας το DH-box έμμεσα μέσω του συμπλόκου μοριακών συνοδών (chaperons) HSP90 chaperone /CDC379 κατά την ωρίμαση της κινάσης Dyrk1B με την αυτοφωσφορλίωση στην τυροσίνη [114,165]. Αυτοί οι μηχανισμοί οδηγούν σε θερμοδυναμική δομική αστάθεια της καταλυτικής περιοχής και καθιστούν την κινάση επιρρεπή σε λανθασμένη πτύχωση επηρεάζοντας την ενδοκυττάρια της συσσωμάτωση [165]. Οι παραπάνω παρατηρήσεις σχετικά με τη συμμετοχή της διαφοροποιημένης λειτουργίας της κινάσης Dyrk1B στη λιπογένεση και ομοιόσταση της γλυκόζης είναι σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις ότι η υπερέκφραση των ομόλογων πρωτεϊνών Dyrk1A και Minibrain στα ποντίκια και στη *Drosophila*, αντίστοιχα, οδηγεί σε αύξηση της πρόσληψης τροφής, του βάρους και αντιστρόφως οι ανεπάρκεια αυτών οδηγεί σε μείωση του σωματικού βάρους [164,166] (βλ. **Εικ. 1.14, 1.15**).

Δ.8. Ο ρόλος της κινάσης Dyrk1B στη φλεγμονή

Έρευνες έχουν δείξει ότι η κινάση Dyrk1B εμπλέκεται και στους μηχανισμούς της φλεγμονής. Συγκεκριμένα, έχειδειχθεί ότι τα επίπεδα της κινάσης Dyrk1B αυξάνονται στα αστροκύτταρα του εγκεφάλου αρουραίου ύστερα από επαγωγή νευροφλεγμονής, επαγόμενης από λιποπολυσακχαρίτη (lipopolysaccharide, LPS). Ειδικότερα, η έρευνα έδειξε ότι η κινάση Dyrk1B πιθανόν παίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της ενεργοποίησης των αστροκυττάρων μέσω της αλληλεπίδρασής της με το φλεγμονώδη μεταγραφικό παράγοντα STAT3 [167]. Σε άλλη μελέτη δείχθηκε ότι η αναστολή της κινάσης Dyrk1B από την ανοσορυθμιστική ουσία mebendazole οδηγεί σε μεταβολή του φαινοτύπου των μακροφάγων THP-1 από τύπου M2 σε M1, οδηγώντας έτσι σε προφλεγμονώδη αντίδραση [168].

Δ.9. Η κινάση Dyrk1B ρυθμίζει αρνητικά τον πολλαπλασιασμό των ανώριμων αρσενικών γεννητικών κυττάρων

Η κινάση Dyrk1B επίσης εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα και στους όρχεις όπου ρυθμίζει αρνητικά τον πολλαπλασιασμό των ανώριμων γεννητικών κυττάρων μέσω ενός έμμεσου μηχανισμού που περιλαμβάνει την πρωτεΐνη Cirp (cold-inducible RNA-binding protein /προσδέουσα το RNA

πρωτεΐνη επαγόμενη από το κρύο) [130]. Στον ενήλικο ποντικό, η σπερματογένεση συντηρείται από τα βλαστικά κύτταρα της γεννητικής σειράς που είτε αυτό-ανανεώνονται μέσω μίτωσης είτε διαφοροποιούνται σε σπερματογόνια (spermatogonia), τα επονομαζόμενα 'αδιαφοροποίητα σπερματογόνια' ή σπερματογονικά βλαστικά κύτταρα (spermatogonial stem cells, SSCs) τα οποία στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε διαφοροποιούμενα σπερματογόνια που οδηγούνται εν τέλει σε μείωση [130,169,170]. Η πρωτεΐνη Cirp είναι μία πρωτεΐνη ψυχρής αποπληξίας (cold-shock protein) των θηλαστικών, ως απόκριση στην ήπια υποθερμία, κυτταρική καταπόνηση, όπως η ακτινοβόληση UV και η υποξία [171–173]. Η πρωτεΐνη Cirp, επίσης, καταστέλλει έμμεσα αυξητικά σήματα μέσω των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης- πρωτεΐνης ή πρωτεΐνης-RNA [130]. Σε απόκριση στην καταπόνηση, η πρωτεΐνη Cirp μετατοπίζεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και επηρεάζει την έκφραση των mRNAs – στόχων [174,175]. Η έκφρασή της στους όρχεις εξαρτάται από το στάδιο της διαφοροποίησης [176], με τα επίπεδά της να μειώνονται ως απόκριση στη ζέστη [130]. Έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη Cirp επιταχύνει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου από G0 σε G1, αλλά και, από G1 σε φάση S σε καλλιεργούμενους εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικού (mouse embryonic fibroblasts, MEFs). Η Cirp αλληλεπιδρά με τη Dyrk1B στον πυρήνα των αδιαφοροποίητων σπερματογονίων ώστε να προωθείται ο πολλαπλασιασμός τους και ως εκ τούτου να διατηρούνται [130]. Συγκεκριμένα, η Cirp προσδένεται στη Dyrk1B εμποδίζοντάς την να φωσφορυλιώσει τον αναστολέα p27^{Kip1} οδηγώντας την σε αποσταθεροποίηση, χωρίς να ισχύει το ίδιο για τη κυκλίνη D1 [130] (βλ. **Εικ. 1.15**).

Αυτά τα δεδομένα δείχνουν το ρόλο της πρωτεΐνης Cirp στη λεπτή ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου /εξόδου στα αδιαφοροποίητα σπερματογόνια, στους ινοβλάστες, αλλά και στα καρκινικά κύτταρα, καταστέλλοντας την κινάση Dyrk1B, και ρυθμίζοντας τα επίπεδα των ρυθμιστών p27^{Kip1} και κυκλίνης D1 [177].

Δ.10. Ο ρόλος της κινάσης Dyrk1B στη μυογένεση

Η κινάση Dyrk1B έχει υψηλή έκφραση στο διαφοροποιημένο σκελετικό μυ, υποδηλώνοντας ένα φυσιολογικό ρόλο στη μυϊκή ανάπτυξη και λειτουργία. Η Dyrk1B εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στους περισσότερους ιστούς, συμπεριλαμβανομένων και των μυοβλαστών, ενώ αυξάνεται κατακόρυφα η έκφραση τουλάχιστον 10 φορές όταν οι μυοβλάστες βαίνουν στην τελική διαφοροποίηση και διατηρούνται σε υψηλά επίπεδα στα ώριμα μυϊκά κύτταρα [84,120]. Σταθερή υπερέκφραση της Dyrk1B επιτρέπει στους μυοβλάστες να συντήκονται πιο γρήγορα όταν τοποθετούνται σε μέσο διαφοροποίησης. Η Dyrk1B ευνοεί τη σύντηξη των μυοβλαστών και τη συνακόλουθη έκφραση δεικτών διαφοροποίησης, όπως είναι η μυογενίνη (myogenin), τροπονίνη T (troponin T) και η βαρεία αλυσίδα της μυοσίνης (muscle myosin heavy chain), ενώ η απαλοιφή της με μικρό παρεμβαλλόμενο RNA (small interfering RNA, RNAi), προλαμβάνει τη σύντηξη των μυοβλαστών σε μυο-σωλήνες (myotubes) και αναστέλλει την επαγωγή των δεικτών διαφοροποίησης [120].

Επιπλέον, η επαγωγή της κινάσης Dyrk1B εντός των πρώτων 24 ωρών μυογεννητικής διαφοροποίησης (myogenic differentiation) επιτρέπει τη μεταγραφή της μυογενίνης, η οποία είναι μυογεννητικός ρυθμιστικός παράγοντας (myogenic regulatory factor, MRF). Μέσω έμμεσης ενεργοποίησης άλλου MRF, του MEF2 (myocyte-specific enhancer factor 2, μυοκυτταρο-ειδικός ενισχυτής – παράγοντας 2) [95]. Ειδικότερα, η κινάση Dyrk1B απελευθερώνει τον παράγοντα MEF2 από τις αποακετυλάσες των ιστονών τάξης II (class II histone deacetylases, HDACs) 5 και 7 και του καταστολέα MITR (MEF2-interacting transcriptional repressor, μεταγραφικός καταστολέας αλληλεπιδρών με MEF2), με δόσο- και κινάσο- εξαρτώμενο τρόπο. Αυτό γίνεται μέσω φωσφορυλίωσης των HDAC5 και HDAC7 σε συντηρημένο κατάλοιπο σερίνης εντοπιζόμενο στην αλληλουχία NLS, με αποτέλεσμα τη μειωμένη πυρηνική τους εναπόθεση οδηγώντας τις σε έξοδο από τον πυρήνα [95] (βλ. **Εικ. 1.15**).

Η ικανότητα της κινάσης Dyrk1B για την ενεργοποίηση της μεταγραφής της μυογενίνης διευκολύνει τη διαφοροποίηση των μυοβλαστών. Επιπροσθέτως, η κινάση Dyrk1B προωθεί τη διαφοροποίηση των μυοβλαστών επάγωντας την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο και αυξάνοντας την επιβίωση κατά τη διαφοροποίηση [95]. Επίσης, η Dyrk1B αυξάνει την επιβίωση του κυττάρων του ραβδομυοσαρκώματος [84,116,126]. Επιπροσθέτως, η επαγωγή και ενεργοποίηση της κινάσης Dyrk1B υπό συνθήκες καταπόνησης προτείνουν ότι η κινάση παίζει ένα ρόλο στην απόκριση στη μυϊκή βλάβη. Η Dyrk1B εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στα μυϊκά βλαστικά κύτταρα (muscle stem cells) τα οποία είναι σε φάση ηρεμίας ('satellite' cells, 'δορυφορικά' κύτταρα) και η έκφρασή της αυξάνεται όταν ενεργοποιούνται για να εισαχθούν στον κυτταρικό κύκλο και στη συνέχεια να διαφοροποιηθούν και συντηχθούν με μη τραυματισμένες μυϊκές ίνες προς διόρθωση της βλάβης [120,178]. Η κινάση Dyrk1B είναι απίθανο να παίζει κύριο ρόλο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη [87], αλλά φαίνεται να λειτουργεί περισσότερο κατά την επιδιόρθωση του φυσιολογικού σκελετικού μυός και ως παράγοντας επιβίωσης [116].

Οι αντι-αποπτωτικές λειτουργίες της κινάσης Dyrk1B στους διαφοροποιούμενους μυοβλάστες και σχετιζόμενα με μύες καρκινικά κύτταρα έχουν αναφερθεί παραπάνω, αλλά έχουν παρατηρηθεί στους σκελετικούς μυοβλάστες, όπου η κινάση Dyrk1B είναι πιο άφθονη. Η απαλοιφή της Dyrk1B με RNAi, παρεμποδίζει την επιβίωση των μυοβλαστών και αυξάνει την κασπάση 3 [126]. Αντιθέτως, η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B ελαττώνει την απόπτωση κατά τη μυϊκή διαφοροποίηση, ενώ η επικρατής αρνητική (dominant negative) Dyrk1B δεν έχει αντι-αποπτωτική δραστηριότητα [126]. Τα μυϊκά 'δορυφορικά' κύτταρα, πιστεύεται ότι σχηματίζουν μία σταθερή, αυτο-ανανεούμενη δεξαμενή βλαστικών κυττάρων στον ενήλικο μυ, ενώ η διακοπή της ρύθμισης της αύξησης και διαφοροποίησης τους υποτίθεται ότι οδηγεί στο σχηματισμό όγκου [158,179]. Είναι επίσης πιθανό ότι η κινάση Dyrk1B διευκολύνει την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων του ραβδομυοσαρκώματος καθιστώντας τη κινάση Dyrk1B ως ένα νέο θεραπευτικό στόχο αυτού του καρκίνου [116].

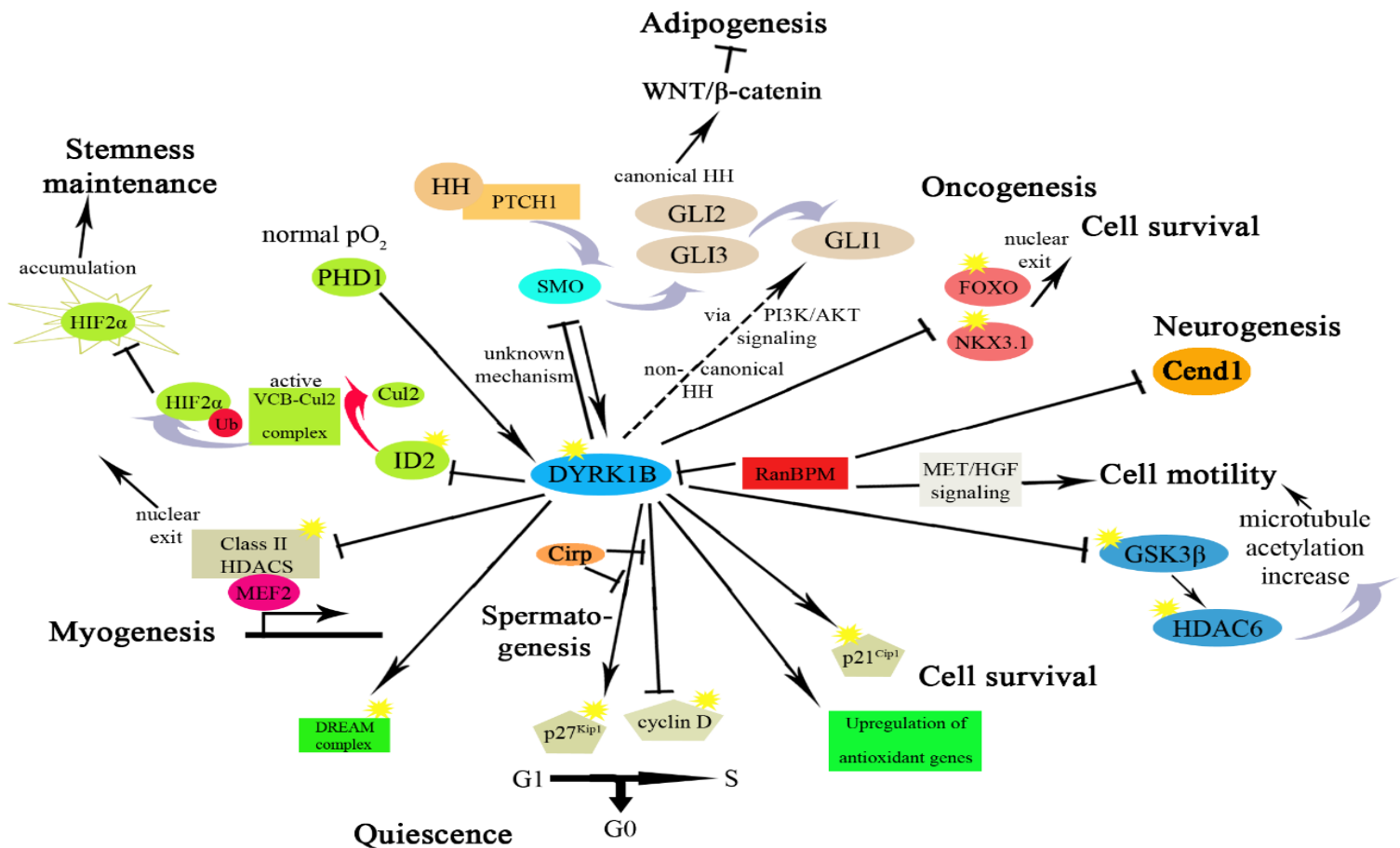
Δ.11. Η κινάση Dyrk1B στη νευρογένεση

Όσον αφορά τη νευρογένεση, το πιο καλά μελετημένο μέλος των κινασών DYRK είναι η κινάση Dyrk1A η οποία κατέχει σημαντικό ρόλο τόσο κατά την εμβρυϊκή όσο και κατά τη μετα-εμβρυϊκή ανάπτυξη. Μεταξύ άλλων, έχει δειχθεί η έκφραση της κινάσης Dyrk1A στους νευρίτες διαφοροποιούμενων νευρώνων σε έμβρυα κοτόπουλου [119]. Η *in vitro* υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1A ενισχύει το μονοπάτι σηματοδότησης RAS/MAPK και οδηγεί την κυτταρική σειρά PC12 (φαιοχρωμοκυττάρωμα του μυελού των επινεφριδίων του αρουραίου) προς νευρωνική διαφοροποίηση [15]. Επίσης, η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1A σε πρωτογενείς φλοιικούς νευρώνες ποντικού οδηγεί σε σημαντική μείωση της ανάπτυξης των δενδριτών αλλά και μείωση της πολυπλοκότητάς τους (αριθμός ακανθών κ.α.) [180], αποτέλεσμα που επιβεβαιώνεται και με άλλες προσεγγίσεις όπως με knockdown της κινάσης Dyrk1A ή με αναστολή της δράσης της με χρήση του μορίου-αναστολέα χαρμίνη. Μία εξήγηση αυτών των αντικρουόμενων αποτελεσμάτων είναι ότι κάθε αλλαγή που επηρεάζει ποσοτικά ή ποιοτικά την έκφραση της κινάσης Dyrk1A, εκατέρωθεν των φυσιολογικών επιπέδων της, έχει σημαντικές επιπτώσεις στον προγραμματισμό της διαφοροποίησης των πρόδρομων νευρικών κυττάρων. Μάλιστα, ο σημαντικός της ρόλος διαφαίνεται πιο έντονα λόγω της συσχέτισής της με την τρισωμία 21 και το σύνδρομο Down (DS), στα οποία συνεισφέρει με ένα εξαρτώμενο από τη γονιδιακή δόση τρόπο [119,181–184]. Αλλαγές στη γονιδιακή δόση εμποδίζουν τη σωστή ανάπτυξη του ΚΝΣ [119,185,186] και σχετίζεται με την παθοφυσιολογία του αυτισμού [90,183,187,188]. Επιπλέον, η κινάση Dyrk1A έχει συνδεθεί με τον πρώιμο νευροεκφυλισμό και τη νόσο του Alzheimer (Alzheimer's disease, AD) στο σύνδρομο Down, όπου προωθεί την υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Tau (tubulin associated unit, σχετιζόμενη με τουμπουλίνη μονάδα) και της πρωτεΐνης APP (amyloid precursor protein, πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς) [187,188]. Επιπρόσθετες μελέτες έχουν δείξει ότι οι μεταλλαγές της Dyrk1A, οι οποίες είναι 'απώλειας λειτουργίας' (*loss-of-function*), είναι υπεύθυνες για νοητική υστέρηση που συνοδεύεται από μικροκεφαλία, επιληψία και αυτισμό τα οποία και εντάσσονται στο σπάνιο σύνδρομο MRD7 (mental retardation, autosomal dominant 7, νοητική υστέρηση, αυτοσωμικό επικρατές 7) [184,186,188]. Επιπροσθέτως, η κινάση Dyrk1A σχετίζεται με το σύνδρομο WBS (William-Beuren syndrome) [84]. Έχουν ανιχνευθεί *de novo* μεταλλαγές της κινάσης Dyrk1A στις περιπτώσεις οικογενειών με σποραδικές διαταραχές του φάσματος του αυτισμού [186,188]. Ακόμη, ενδέχεται η συμμετοχή της κινάσης Dyrk1A και σε άλλες διεργασίες ή παθολογίες όπως είναι π.χ. η οστική ομοιοστάση ή η καρδιακή υπερτροφία, αντίστοιχα [82].

Όσον αφορά, όμως, την κινάση της Dyrk1B με τόσο μεγάλη δομική και λειτουργική ομοιότητα με την κινάση Dyrk1A, ο ρόλος της στη νευρογένεση παραμένει ασαφής. Η πρώτη βιβλιογραφική αναφορά για την έκφραση και την πιθανή εμπλοκή της κινάσης Dyrk1B στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος [132], προέρχεται από το οικείο Εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας – Βλαστικών κυττάρων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, όπως θα αναφερθεί αναλυτικότερα παρακάτω. Από αυτή τη προηγούμενη μελέτη έχει δειχθεί ότι η κινάση Dyrk1B εκφράζεται στον

ενήλικο εγκέφαλο ποντικού και σε πρωτογενή καλλιέργεια φλοιικών νευρώνων και αυτή η μελέτη αποτελεί την πρώτη απόπειρα διερεύνησης της λειτουργίας της Dyrk1B στο νευρικό σύστημα αξιοποιώντας το *in vitro* σύστημα των κυττάρων Neuro2A του νευροβλαστώματος του ποντικού που αποτελεί ένα κατάλληλο σύστημα για τη μελέτη της νευρωνικής ανάπτυξης *in vitro* [132]. Βρέθηκε ότι η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B στα κύτταρα Neuro2A επάγει την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο, προωθώντας την κυτταροπλασματική μετατόπιση της κυκλίνης D1 και την αποικοδόμησή της από το 26S πρωτεάσωμα [132]. Είναι άξιο μνείας ότι η παροδική υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B στα κύτταρα Neuro2A επίσης προωθεί τη νευρωνική διαφοροποίηση όπως υποδεικνύεται από την αύξηση του μέσου μήκους των νευριτών κατά 2 φορές και την έκφραση του νευρωνικού δείκτη βIII τουμπουλίνη (βIII-tubulin, κλώνος αντισώματος TuJ1), όταν τα κύτταρα Neuro2A ήταν υποκείμενα σε διαφοροποίηση από ρετινοϊκό οξύ [132]. Επιπροσθέτως, στα κύτταρα Neuro2A η εξαρτώμενη από την κινάση Dyrk1B μειορρύθμιση της κυκλίνης D1 αντιστράφηκε ύστερα από την αλληλεπίδραση της Dyrk1B με την αλληλεπιδρούσα της πρωτεΐνη-ικρίωμα (scaffold protein) RanBPM (Ran-binding protein M). Σημαντικής σημασίας είναι το γεγονός ότι η πρόσδεση της πρωτεΐνης RanBPM στην κινάση Dyrk1B σταθεροποιεί την κυκλίνη D1 στον πυρήνα και αυξάνει την ενσωμάτωση της 5-βρωμο-2'-δεοξυουριδίνης (5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU), η οποία χρησιμοποιείται ως δείκτης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ακόμη, βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη RanBPM διευκολύνει την πρωτεασωματική αποικοδόμηση της κινάσης Dyrk1B [132].

Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι οι τριμερείς (tripartite) λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της κινάσης Dyrk1B, της πρωτεΐνης RanBPM και της νευρο-ειδικής πρωτεΐνης Cend1 (cell cycle exit and neuronal differentiation 1, παράγοντας εξόδου από τον κυτταρικό κύκλο και νευρωνικής διαφοροποίησης 1), γνωστής και ως BM88, ρυθμίζουν την ισορροπία μεταξύ του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης στα κύτταρα Neuro2A, προτείνοντας ότι αυτές οι τρεις πρωτεΐνες παίζουν παρόμοιο ρόλο στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου /έξοδο των νευρικών βλαστικών κυττάρων /νευρικών προγονικών κυττάρων (neural stem cells /neural progenitor cells, NSCs/NPCs) κατά τη διάρκεια της νευρογένεσης [132,189] (βλ. **Εικ. 1.15**). Αυτό είναι σε συμφωνία με το γεγονός ότι και η πρωτεΐνη RanBPM και η κινάση Dyrk1B εκφράζονται από νευρωνικά πρόδρομα κύτταρα (neural precursors) παράλληλα με την πρωτεΐνη Cend1 [132,189].



Εικ. 1.15. Σύνοψη των κυριότερων γνωστών λειτουργιών της κινάσης Dyrk1B στην ανάπτυξη και στην ασθένεια. Η κινάση Dyrk1B επάγει την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο και προωθεί την ηρεμία (quiescence) (G0) σταθεροποιώντας των αναστολέα των κινασών CDK, $p27^{Kip1}$, και αποσταθεροποιεί την κυκλίνη D1 μέσω φωσφορυλίωσης. Ο αντιπολλαπλασιαστικός της ρόλος λαμβάνει χώρα στη μυογένεση (myogenesis), σπερματογένεση (spermatogenesis) με την αλληλεπίδραση με τη πρωτεΐνη Cirp, νευρογένεση (neurogenesis) και καρκίνο (cancer). Επιπρόσθετα, διατηρεί την ηρεμία με σταθεροποίηση του συμπλόκου DREAM, μέσω φωσφορυλίωσης υπομονάδας του. Στην ογκογένεση, η κινάση Dyrk1B επάγει την αποικοδόμηση του καταστολέα NKX3.1, ενώ μειώνει την δραστηριότητα των καταστολέων όγκων και των παραγόντων απόπτωσης FOXO οδηγώντας στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και ενίσχυση της ογκογόνου δραστηριότητας του παράγοντα Gli1. Η κινάση Dyrk1B βοηθά στην επιβίωση στη μυογένεση και στον καρκίνο μέσω φωσφορυλίωσης του αναστολέα $p21^{Cip1}$, και της αυξορρύθμισης αντι-οξειδωτικών γονιδίων. Η Dyrk1B ρυθμίζει τη βλαστικότητα (stemness) των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (CSCs) σε σχέση με τα επίπεδα οξυγόνου με την ενεργοποίησή της σε νορμοξία (normoxia) μέσω της πρωτεΐνης-αισθητήρα PHD1, και στη συνέχεια απενεργοποίηση της πρωτεΐνης ID2, έτσι ώστε το σύμπλοκο ουβικιτίνης λιγάσης (ubiquitin ligase complex) VCB-Cul2 να παραμένει ενεργό και να οδηγεί τον παράγοντα HIF2α προς αποικοδόμηση και την αντίθετη λειτουργία υπό υποξία με την ενεργοποίηση του παράγοντα HIF2α που οδηγεί τη διατήρηση των CSCs. Η κινάση Dyrk1B εμπλέκεται στη σηματοδότηση Hedgehog (Hh) με πολύπλοκο τρόπο,

αφενός αναστέλλοντας το ‘κανονικό’ (‘canonical’) μονοπάτι εκκινούμενο από SMO, και αφετέρου προωθεί το ‘μη κανονικό’ (‘non-canonical’) προωθώντας τη σταθερότητα της Gli1 μέσω του μονοπατιού PI3K-AKT. Στο μεταβολικό σύνδρομο (metabolic syndrome) η κινάση Dyrk1B αναστέλλει τη σηματοδότηση Shh και Wnt ενισχύοντας τη λιπογένεση. Στη μυογένεση, η κινάση Dyrk1B απενεργοποιεί της τάξης II αποακετυλάσες των ιστονών (Class II histone deacetylases, HDACs), οδηγώντας στην εξαρτώμενη από τον παράγοντα MEF2 μεταγραφή των μυογόνων γονιδίων. Στη νευρογένεση, οι τριμερείς λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της κινάσης Dyrk1B, της πρωτεΐνης RanBPM και της νευρο-ειδικής πρωτεΐνης Cend1 ρυθμίζουν την ισορροπία μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης. Μέσω της RanBPM, επίσης, και της σηματοδότησης MET/HGF η κινάση Dyrk1B παρεμποδίζει την κυτταρική κινητικότητα (cell motility). Τέλος, η κινάση Dyrk1B τροποποιεί έμμεσα τους μικροσωληνίσκους (microtubules) μέσω της φωσφορυλίωσης της GSK3β και συνακόλουθης ενεργοποίησης της αποακετυλάσης των ιστονών HDAC6 οδηγώντας στην αύξηση της ακετυλίωσης (acetylation) τους. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδηλώνουν έμμεσους μηχανισμούς και τα αστέρια αναπαριστούν γεγονότα φωσφορυλίωσης (από [125]).

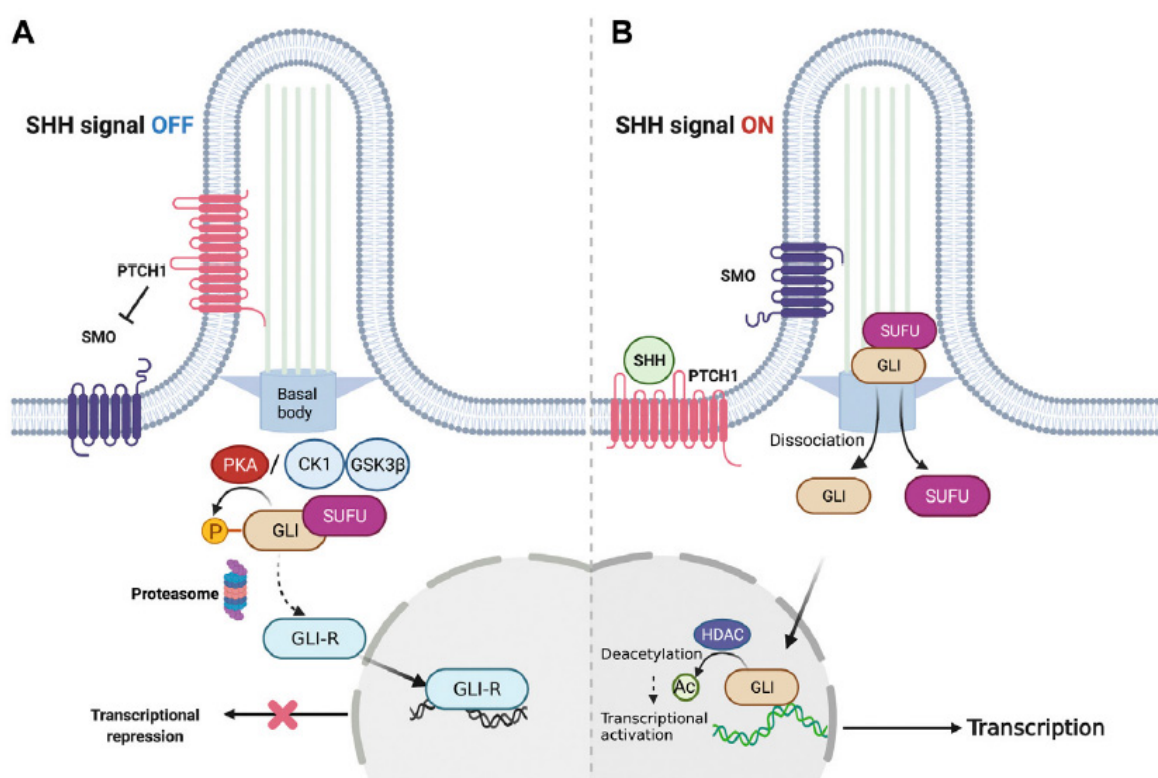
E. Η συμμετοχή της κινάσης Dyrk1B στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος

E.1. Η συμμετοχή της κινάσης Dyrk1B στη σηματοδότηση Sonic hedgehog (Shh)/Gli

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog (Hh), και δη το πιο καλά μελετημένο, Sonic hedgehog (Shh)/Gli είναι ένα ουσιώδες μονοπάτι κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη των θηλαστικών, το οποίο περιλαμβάνεται στο σωστό πρότυπο των ιστών (tissue patterning), στη διατήρηση των βλαστικών κυττάρων (stem cell maintenance) και στην κυτταρική διαφοροποίηση. Η σηματοδότηση Hh παίζει κρίσιμο ρόλο στην ογκογένεση και στην ανάπτυξη πολλών παιδιατρικών και ενήλικων κακοηθειών, όπως αυτών του παγκρέατος, των πνευμόνων, του προστάτη, του δέρματος και του εγκεφάλου [84,125,190–197].

Στον ‘κανονικό’ (‘canonical’) σηματοδοτικό καταρράκτη Hh και δη το Shh, απουσία του συνδέτη (ligand) Shh, ο υποδοχέας Patched (PTCH1, 2) μετατοπίζεται στο επονομαζόμενο πρωτογενές τριχίδιο (primary cilium) το οποίο αποτελεί ένα κυτταρικό διαμέρισμα που ομοιάζει με κεραία και καταστέλλει τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη Smoothed (SMO), μέλος της υπερ-οικογένειας των συζευγμένων με πρωτεΐνες G υποδοχέων (GPCR superfamily). Αυτό προκαλεί στις πρωτεΐνες Gli, που είναι μεταγραφικοί παράγοντες δακτύλων ψευδαργύρου (zinc fingers), να μείνουν συγκρατημένες από τον καταστολέα SUFU (Suppressor of Fused, καταστολέας της πρωτεΐνης Fused) ο οποίος διευκολύνει τη φωσφορυλίωσή τους από την κινάση PKA η οποία συνεργάζεται με την κινάση CK1 (Casein kinase 1, κινάση της καζεΐνης 1) και την κινάση GSK3β (glycogen synthase kinase 3, κινάση της συνθετάσης του γλυκογόνου 3β). Συνεπώς, οι πρωτεΐνες Gli υφίστανται

πρωτεόλυση, δια μέσου του πρωτεασώματος, ώστε να σχηματισθούν οι επεξεργασμένες, κατασταλτικές μορφές τους (repressor truncated forms, GliR) όπως οι πρωτεΐνες Gli2R και Gli3R, οι οποίες και θα καταστείλουν τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. Αντιθέτως, παρουσία του συνδέτη Shh, ο υποδοχέας Patched αναστέλλεται από την αλληλεπίδραση με το μορφογόνο Shh. Αυτό ενεργοποιεί την πρωτεΐνη SMO, επιτρέποντας τη μετατόπιση της στα τριχίδια (cilia). Ακολούθως, οι πρωτεΐνες Gli αποδεσμεύονται από τον καταστολέα SUFU ώστε να εισέλθουν στον κυτταρικό πυρήνα και να δράσουν με ολόκληρη τη μορφή τους ως ενεργοποιητές (GliA), όπως οι πρωτεΐνες Gli2A και Gli3A, και να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων της σηματοδότησης Hh/Gli, περιλαμβανομένου και του ογκογονιδίου Gli1 [57,198–203] (βλ. **Εικ. 1.16**). Οι μηχανισμοί που διέπουν το σηματοδοτικό μονοπάτι Hh έχουν μελετηθεί επισταμένως σε συστήματα καρκινογένεσης και δη σε σχέση με την συμμετοχή των κινασών, όπως διαφαίνεται παρακάτω, καθώς η διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών οι οποίοι καθορίζουν τα χαρακτηριστικά των κακοηθειών των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (cancer stem cells, CSCs) είναι μείζονος σημασίας.

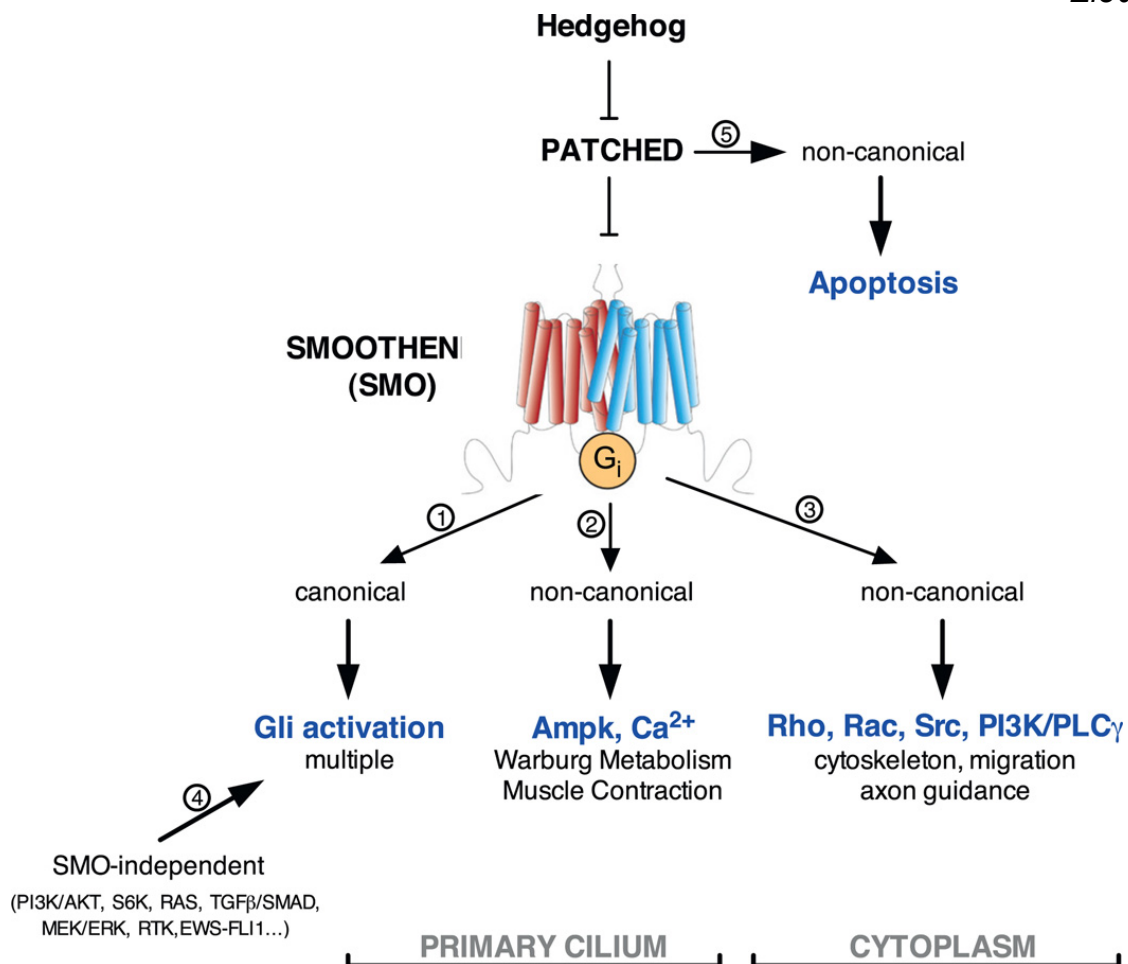


Εικόνα 1.16. Σύνοψη του ‘κανονικού’ σηματοδοτικού μονοπατιού Sonic hedgehog (Shh). (A) Αντιπροσωπευτικός σηματοδοτικός καταρράκτης όταν η σηματοδότηση Shh είναι ανενεργή (off). Απουσία του συνδέτη (ligand) Shh, ο υποδοχέας Patched (PTCH1) μετατοπίζεται στο πρωτογενές τριχίδιο (primary cilium) και καταστέλλει την πρωτεΐνη Smoothened (SMO). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες Gli να μείνουν συγκρατημένες από τον καταστολέα SUFU ο οποίος διευκολύνει τη φωσφορυλίωσή τους από τις κινάσες PKA, CK1 και GSK3β και τη μετέπειτα μερική πρωτεόλυσή τους. Συνεπώς, οι πρωτεΐνες Gli υφίστανται πρωτεόλυση, δια μέσου του πρωτεασώματος, ώστε να

σχηματισθούν οι κατασταλτικές μορφές τους (repressor forms, GliR), οι οποίες και θα καταστείλουν τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. **(B)** Αντιπροσωπευτικός σηματοδοτικός καταρράκτης όταν η σηματοδότηση Shh είναι ενεργή (on). Παρουσία του συνδέτη, ο υποδοχέας Patched αναστέλλεται από την αλληλεπίδραση με το μορφογόνο Shh. Αυτό ενεργοποιεί την πρωτεΐνη SMO, επιτρέποντας τη μετατόπιση της στα τριχίδια (cilia). Ακολούθως, οι πρωτεΐνες Gli αποδεσμεύονται από τον καταστολέα SUFU ώστε να εισέλθουν στον κυτταρικό πυρήνα και να δράσουν ως ενεργοποιητές (GliA) και να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων τους (από [204]).

Το κανονικό σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog (Hh) **(Εικ. 1.17)** ασκεί τη δράση του μέσω του δρόμου Hh-Patched-SMO ο οποίος οδηγεί στην ενεργοποίηση των τελεστών Gli. Το 'μη κανονικό' μονοπάτι **(Εικ. 1.17)** μπορεί να ασκήσει τη δράση του μέσω μηχανισμών που είναι ανεξάρτητοι της ενεργοποίησης των τελεστών Gli που οδηγούν σε διάφορους μεταβολικούς δρόμους ή σχετίζονται με τη σύσπασση των μυών (muscle contraction), τη διαμόρφωση του κυτταροσκελετού (cytoskeleton), την κυτταρική μετανάστευση (migration) και την αξονική καθοδήγηση (axon guidance). Ακόμη, ο 'μη κανονικός τρόπος' μπορεί να ασκήσει τη δράση του ανεξαρτήτως της πρωτεΐνης SMO μέσω της διασταυρούμενης επίδρασης (cross-talk) με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια (π.χ. PI3K, RAS, MEK-ERK) ή με άλλους μηχανισμούς, όπως αυτοί που οδηγούν σε απόπτωση **(Εικ. 1.17)** [205].

Οι μεταγραφικοί βρόγχοι ανατροφοδότησης (feedback loops) λαμβάνουν χώρα στη σηματοδότηση Hh εξυπηρετώντας τη λεπτή ρύθμιση (fine-tuning) ολόκληρου του συστήματος. Επιπρόσθετη τροποποίηση της σηματοδότησης Hh από διάφορες κινάσες, όπως οι κινάσες PKA, PKC, GRK2, MEK, ERK, AKT, S6K και GSK3β [206–215]. Τα καρκινικά κύτταρα λαμβάνουν το πλεονέκτημα τέτοιων μηχανισμών με 'μη κανονικό τρόπο' (non-canonical mode) σηματοδότησης, όπως είναι η ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων Gli με έναν ανεξάρτητο τρόπο από την πρόσδεση του συνδέτη Hh σε υποδοχέα [84,194,212,216,217]. Οι κινάσες των θηλαστικών Dyrk1A, Dyrk1B and Dyrk2 συμμετέχουν στη ρύθμιση της σηματοδότησης Hedgehog (Hh). Η κινάση Dyrk1A έχει το ρόλο του ενεργοποιητή στην πρωτεΐνη Gli1, προωθώντας την πυρηνική της μετατόπιση (nuclear translocation) [91,218] μέσω άμεσης φωσφορυλίωσης [219,220]. Επιπροσθέτως, η κινάση Dyrk1A έχει αρνητικό ρόλο επάγοντας την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης Gli1 μέσω ενός έμμεσου μηχανισμού ο οποίος εμπλέκει τον κυτταροσκελετό της ακτίνης και τους ρυθμιστές του [219]. Προφανώς, ο διπλός ρόλος της κινάσης Dyrk1A στην ρύθμιση της σηματοδότησης Hh πραγματοποιείται μέσω των αλληλεπιδράσεών της με διαφορετικά σύνολα πρωτεϊνικών εταίρων (protein partners) που έχουν αντίθετες επιδράσεις [215]. Από την άλλη μεριά, έχειδειχθεί ότι η κινάση Dyrk2 επιδρά αρνητικά στη σηματοδότηση Hh μέσω της άμεσης φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Gli2, επάγοντας την αποικοδόμησή της μέσω πρωτεασώματος [215,221].



Εικόνα 1.17. Σύνοψη των τρόπων λειτουργίας της σηματοδότησης Hedgehog (Hh). Το ‘κανονικό’ σηματοδοτικό μονοπάτι ασκεί τη δράση του μέσω του δρόμου Hh-Patched-SMO ο οποίος οδηγεί στην ενεργοποίηση των τελεστών Gli (1). Το ‘μη κανονικό’ μονοπάτι μπορεί να ασκήσει τη δράση του μέσω μηχανισμών που είναι ανεξάρτητοι της ενεργοποίησης των τελεστών Gli που οδηγούν σε διάφορους μεταβολικούς δρόμους ή σχετίζονται με τη σύσπαση των μυών (muscle contraction) (2) και τη διαμόρφωση του κυτταροσκελετού (cytoskeleton), την κυτταρική μετανάστευση (migration) και την αξονική καθοδήγηση (axon guidance) (3). Ακόμη, ο ‘μη κανονικός τρόπος’ μπορεί να ασκήσει τη δράση του ανεξαρτήτως της πρωτεΐνης SMO μέσω της διασταυρούμενης επίδρασης (cross-talk) με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια (π.χ. PI3K, RAS, MEK-ERK) (4) ή με άλλους μηχανισμούς (5), όπως αυτοί που οδηγούν σε απόπτωση (από [205]). Primary cilium: πρωτογενές τριχίδιο, cytoplasm: κυτταρόπλασμα.

E.2. Η κινάση Dyrk1B ενισχύει τη ‘μη κανονική’ σηματοδότηση Hedgehog (Hh) και καταστέλλει την ‘κανονική’ στον καρκίνο

Η κινάση Dyrk1B έχει έναν πολύπλοκο ρόλο στη ρύθμιση και τροποποίηση του μονοπατιού Hh. Η αλληλεπίδραση με το μονοπάτι Hh/Gli έχει διπλές και αντίθετες επιδράσεις. Από μελέτη σε συστήματα καρκινογένεσης, έχειδειχθεί ότι η κινάση Dyrk1B ενισχύει τη ‘μη κανονική’ σηματοδότηση

Η ενισχύοντας τη δραστηριότητα του τελεστή Gli1, ενώ η καταστολή της μειώνει την έκφραση του Gli1, τόσο στα καρκινικά κύτταρα που είναι ευαισθητοποιημένα όσο και σε αυτά που δεν είναι ευαισθητοποιημένα σε αναστολέα της πρωτεΐνης SMO, δείχνοντας ότι μπορεί να δράσει ως ένας κρίσιμος θετικός ρυθμιστής της σηματοδότησης Hh/Gli καταρροϊκά (downstream) της πρωτεΐνης SMO στον καρκίνο [197] (βλ. **Εικ. 1.15, 1.16**). Τα δεδομένα αυτών των ερευνών υποστηρίζουν τη χρήση των αναστολέων της Dyrk1B για τη θεραπεία καρκίνων εξαρτώμενων από Shh/Gli, αντί αυτών που αποτυγχάνουν να είναι αποδοτικοί προς αυτή την κατεύθυνση [197]. Επίσης, έρευνες έχουν δείξει το ρόλο της κινάσης Dyrk1B στην πρωτεϊνική σταθεροποίηση και πιο συγκεκριμένα των Gli1, Gli2 με, προς το παρόν ασαφή τρόπο, είτε μέσω άμεσης φωσφορυλίωσης, είτε έμμεσα με εναλλακτικούς μηχανισμούς [90,197].

E.2.1. Διασταυρούμενη επίδραση (Cross-talk) μεταξύ σηματοδότησης RAS και Shh

Έχει αναφερθεί μία ενδογενής, κυτταρικά αυτόνομη (cell-autonomous) συνέργεια (synergism) μεταξύ των ογκογονιδίων Ras και Gli κατά τη διάρκεια του σχηματισμού όγκων στα καρκινώματα του παγκρέατος, πνεύμονα και στο κόλον [190–192,194]. Η κινάση Dyrk1B μπορεί να καταστέλλει τη σηματοδότηση Shh αφενός παρεμποδίζοντας την πρωτεΐνη Gli2 η οποία λειτουργεί κυρίως ως ενεργοποιητής και αφετέρου προωθώντας το σχηματισμό της πρωτεΐνης Gli3R η οποία λειτουργεί ως καταστολέας [195]. Πιο ειδικά, ο Lauth και συνεργάτες του, μελετώντας τη **διασταυρούμενη επίδραση** (cross-talk) μεταξύ της σηματοδότησης Hh και RAS, βρήκαν ότι το ογκογονικό μετάλλαγμα (mutant) της πρωτεΐνης RAS (KRAS) ενεργεί ως: (i) ένας επαγωγέας της έκφρασης του μοροφογόνου Shh, (ii) δυνητικός αναστολέας του ‘κανονικού’ μονοπατιού (εκκινούμενου μέσω Hh-PTCH-SMO) και (iii) ένας τροποποιητής του ‘μη κανονικού’ μονοπατιού Hh (εκκινούμενου από TGFβ), μέσω της ενεργοποίησης της κινάσης Dyrk1B. Ως αποτέλεσμα, το μετάλλαγμα της πρωτεΐνης KRAS επάγει τη σηματοδότηση στα γειτονικά κύτταρα (παρακρινής επίδραση, paracrine effect), ενώ παράλληλα παρεμποδίζει τη σηματοδότηση Hh ενδογενώς (αυτοκρινής επίδραση, autocrine effect), εκκινώντας, έτσι, το ‘μη κανονικό’ μονοπάτι Hh, αυξάνοντας την έκφραση της κινάσης Dyrk1B, μέσω ενός άγνωστου μηχανισμού [195]. Η αυξημένη κινάση Dyrk1B καταστέλλει τον επαγόμενο από την πρωτεΐνη SMO καταρράκτη, αλλά είναι αναποτελεσματική σε κύτταρα που έχουν απωλέσει τον καταστολέα SUFU, μιμούμενη την επίδραση του μεταλλαγμένου KRAS. Οι Lauth et al. προτείνουν ότι το μετάλλαγμα KRAS παρεμποδίζει τη σηματοδότηση ανορροϊκά (upstream) του καταστολέα SUFU μέσω της κινάσης Dyrk1B ή η καταστολή του SMO είναι ανεξάρτητη του καταστολέα SUFU. Επιπροσθέτως, η κινάση Dyrk1B φαίνεται να μην είναι τόσο ισχυρή όσο το KRAS στην καταστολή της σηματοδότησης Hh, προτείνοντας ότι μέσω RAS ενεργοποιούνται και άλλοι, άγνωστοι, τελεστές επιπροσθέτως της Dyrk1B [195] (βλ. **Εικ. 1.15**).

Οι ακριβείς κατασταλτικοί μηχανισμοί ενεργοποιούμενοι από την πρωτεΐνη KRAS ενδέχεται να είναι πολύπλοκοι καθώς διάφοροι τελεστές του RAS, όπως οι RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT και RLF/RAL, απαιτούνται για μία πλήρη καταστολή (βλ. **Εικ. 1.14**). Η βιολογική σημασία της

καταστολής της σηματοδότησης Hh μέσω RAS με τη συμμετοχή της κινάσης Dyrk1B έχει επίσης σημασία καθώς η παρουσία του δικτύου RAS-Dyrk1B-Hh πιθανά έχει σημαντικές επιπτώσεις σε αναπτυξιακές διαταραχές προκαλούμενες από την ανώμαλη σηματοδότηση RAS, όπως το σύνδρομο Noonan, τα καρδιο-προσωπο-δερματικά σύνδρομα, όπως και το σύνδρομο Costello [222].

Συνοψίζοντας, η συμμετοχή της Dyrk1B ως κινάση-τελεστής της σηματοδότησης RAS η οποία δρα ως ένας ενδογενής, κυτταρικά εξαρτώμενος ρυθμιστής του μονοπατιού Shh αποκαλύπτει μία επιπλέον διάσταση στον λειτουργικό ρόλο της Dyrk1B και δη της συμμετοχής της στις διασταυρούμενες επιδράσεις της μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών. Ο ακριβής μηχανισμός της μετατόπισης από την αυτοκρινή στη παρακρινή σηματοδότηση σε σχέση με την εμπλοκή της Dyrk1B παραμένει προς διερεύνηση [195].

E.2.2. Διασταυρούμενη επίδραση (Cross-talk) μεταξύ σηματοδότησης PI3K/mTOR/AKT και Hh

Η παρατηρούμενη πρωτεϊνική σταθεροποίηση της πρωτεΐνης Gli1 κατά την υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B σε καρκινικές σειρές, παρεμποδίζοντας έτσι τη 'κανονική' σηματοδότηση εκκινούμενη από την πρωτεΐνη SMO, είναι πιο πιθανό να πραγματοποιείται μέσω του μονοπατιού της κινάσης AKT [214,215], το οποίο και ενεργοποιείται από τη Dyrk1B. Η κινάση AKT ακολούθως φωσφορυλιώνει και προστατεύει από πρωτεασωμική αποικοδόμηση τους μεταγραφικούς παράγοντες Gli [207,214,223] (βλ. **Εικ. 1.14, Εικ. 1.15**). Ο ακριβής μηχανισμός αυτής της φωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης παραμένει άγνωστος [214]. Επιπλέον, λόγω του ότι η κινάση Dyrk1B ενεργοποιεί το μονοπάτι PI3K/mTOR/AKT, το μονοπάτι Dyrk1B-Hh /Gli υπόκειται σε σημαντικό έλεγχο ανατροφοδότησης [214] (βλ. **Εικ. 1.14, Εικ. 1.15**). Σε συμφωνία, η ενεργοποίηση του μονοπατιού Hh μέσω της ενεργοποίησης από την πρωτεΐνη SMO οδηγεί σε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων, με άγνωστους μετα-μεταφραστικούς μηχανισμούς προτείνοντας την ικανότητα της σηματοδότησης να προκαλεί φωσφορυλίωση της AKT [214] (βλ. **Εικ. 1.15**). Επίσης, η φαρμακολογική αναστολή του μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR σε παγκρεατικές καρκινικές σειρές οδήγησε σε αυξορρύθμιση της κινάσης Dyrk1B, ενώ αντιθέτως σε ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού τα επίπεδα του mRNA της Dyrk1B μειώνονταν [144]. Εξαιτίας του γεγονότος ότι το μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR υπόκειται σε ισχυρή ρύθμιση αρνητικής ανατροφοδότησης, η φαρμακολογική αναστολή της Dyrk1B έχει ως αποτέλεσμα την αρχική αυξορρύθμιση της σηματοδότησης Hh, ακολουθούμενη από μειορρύθμιση της φωσφορυλίωσης AKT μειώνοντας τη σταθεροποίηση Gli [214]. Τα παραπάνω ευρήματα μπορούν να εξηγήσουν πολλές παρατηρούμενες αντίθετες επιδράσεις της Dyrk1B στη σηματοδότηση Hh/Gli στον καρκίνο υποστηρίζοντας ότι πολλές μελέτες παρουσιάζουν κάθε φορά μία διαφορετική όψη όλου του φάσματος της διασταυρούμενης επίδρασης [214]. Επιπροσθέτως, είναι ενδιαφέρουσα η σχέση των μεταλλαγών της κινάσης Dyrk1B στο μεταβολικό σύνδρομο, όσον αφορά τη σηματοδότηση PI3K [164,224,225]. Στη μυογένεση, η σηματοδότηση Hh ρυθμίζει την κυτταρική μοίρα των ενήλικων μυϊκών 'δορυφορικών' κυττάρων στα

θηλαστικά προωθώντας τον πολλαπλασιασμό αυτών, όπως και των μυοβλαστών C2C12, προλαμβάνοντας τη διαφοροποίησή τους σε πολύ-πυρηνικούς μυο-σωλήνες [179].

Συμπερασματικά, η κινάση Dyrk1B φαίνεται να έχει διπλό ρόλο στη ρύθμιση της σηματοδότησης Hh, καταστέλλοντας, από τη μία πλευρά, τη ‘κανονική’ σηματοδότηση [84] και από την άλλη πλευρά ενισχύοντας τη ‘μη κανονική’ σηματοδότηση και προωθώντας τη σταθερότητα της πρωτεΐνης Gli1 μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3K-AKT [195,197,207,214,226].

E.3. Η κινάση Dyrk1B ρυθμίζει τη σηματοδότηση Shh και RAS–RAF–MEK στη λιπογεννητική διαφοροποίηση και την ομοίωση της γλυκόζης

Ένα ακόμη παράδειγμα της εμπλοκής της κινάσης Dyrk1B με τη σηματοδότηση Shh αποτελεί το μεταβολικό σύνδρομο που αναλύθηκε παραπάνω, στο οποίο η Dyrk1B παίζει κεντρικό ρόλο και κατά τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (mesenchymal stem cells) σε λιποκύτταρα [164]. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Shh έχει ανασταλτική λειτουργία στη λιποκυτταρική διαφοροποίηση, συνήθως με την ανακατεύθυνση της κυτταρικής μοίρας σε οστεογεννητική (osteogenic) γενεαλογία [84,227–229]. Αντιθέτως, η κινάση Dyrk1B ευνοεί τη διαφοροποίηση σε λιποκύτταρα [164]. Η κινάση Dyrk1B αναστέλλει τη σηματοδότηση Shh [195], όπως αναλύθηκε παραπάνω, και η έκφρασή της αυξάνεται δραματικά κατά τη διάρκεια της λιπογεννητικής (adipogenic) διαφοροποίησης [87]. Επιπροσθέτως, έχει δείχθει ότι η αναστολή του μονοπατιού Shh οδηγεί σε μειωμένη έκφραση των πρωτεϊνών Wnt [230,231], οι οποίες είναι αρνητικοί ρυθμιστές της λιπογένεσης [232]. Έχει δείχθει ότι μελετώντας τις επιδράσεις της φυσιολογικής κινάσης Dyrk1B, της μεταλλαγής Dyrk1B-R102C και της αποσιώπησης (knockdown) της κινάσης Dyrk1B, σε συνδυασμό με ή χωρίς την αναστολή του Wnt (αναστολέας IBMX) κατά τη διάρκεια της λιπογεννητικής διαφοροποίησης των προ-λιποκυτταρικής σειράς (preadipocyte cell line) 3T3-L1, αποκάλυψε ότι η κινάση Dyrk1B αναστέλλει το μονοπάτι Shh, μέσω της μείωσης του τελεστή Gli2 και συνακόλουθη μείωση της σηματοδότησης Wnt με αποτέλεσμα την αυξημένη λιπογένεση [164] (βλ. **Εικ. 1.15**). Επίσης, δείχθηκε ότι η μεταλλαγή Dyrk1B-R102C παρουσιάζει ισχυρότερη επίδραση σε σχέση με τη φυσιολογική κινάση Dyrk1B στην καταστολή του Shh μέσω του τελεστή Gli2, αλλά και καταστέλλει τη σηματοδότηση Wnt, αποκαλύπτοντας τις ιδιότητές της ‘προσθήκης λειτουργίας’ (*gain-of-function*) [164]. Να τονιστεί, ότι η κινάση Dyrk1B είναι μία πρωτεΐνη-αισθητήρας που αναστέλλει το μονοπάτι RAS–RAF–MEK [127] και είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση της πρόσληψης γλυκόζης και γλυκόλυσης [233]. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού MEK οδηγεί στη μειωμένη έκφραση του γονιδίου του ενζύμου G6Pάση και το χαμηλότερο επίπεδο γλυκόζης ως αποτέλεσμα [234] (βλ. **Εικ. 1.14**).

E.4. Η κινάση Dyrk1B ρυθμίζει την επαγόμενη από τη σηματοδότηση Hh ακετυλίωση των μικροσωληνίσκων

Άλλος τρόπος με τον οποίο εξωκυττάριοι συνδέτες μπορούν να τροποποιούν ενδοκυττάρια συμβάντα ήρθε στο φως με το εύρημα ότι η Dyrk1B ρυθμίζει την επαγόμενη από το Hh ακετυλίωση των μικροσωληνίσκων (microtubules, MTs) (βλ. **Εικ. 1.15**). Η σηματοδότηση Hh επηρεάζει την ακετυλίωση των μικροσωληνίσκων στα κύτταρα των θηλαστικών [235]. Μέσω ενός μηχανισμού στον οποίο συμμετέχει η Dyrk1B, έχει δειχθεί *in vitro* στις σειρές NI3T3, HeLa και MEF ότι το μονοπάτι Hh αυξάνει τα επίπεδα της σχετιζόμενης με μικροσωληνίσκους ακετυλίωσης. Η κινάση Dyrk1B καταστέλλει, μέσω φωσφορυλίωσης στη Ser9, την ενζυμική δραστηριότητα της κύριας αποακετυλάσης των μικροσωληνίσκων, της αποακετυλάσης των ιστονών HDAC6, με αποτέλεσμα την αύξηση των ακετυλιωμένων μικροσωληνίσκων. Επομένως, μέσω της επαγωγής της κινάσης Dyrk1B, η σηματοδότηση Hh διευκολύνει τις εξαρτώμενες από μικροσωληνίσκους διεργασίες, όπως η ενδοκυττάρια μιτοχονδριακή μεταφορά, η πόλωση των μεσεγγυματικών κυττάρων ή καθοδηγούμενη κυτταρική μετανάστευση [235]. Αυτός ο μηχανισμός μπορεί να εξηγήσει το λόγο, για παράδειγμα, που τα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα που υπερεκφράζουν την κινάση Dyrk1B, παρουσιάζουν αντίσταση στον από-πολυμεριστικό παράγοντα Nocodazole [139].

E.5. Η κινάση Dyrk1B ρυθμίζει μέσω της σηματοδότησης MET/HGF την κυτταρική κινητικότητα

Πέραν του ρόλου της στην ρύθμιση της ακετυλίωσης των μικροσωληνίσκων μέσω Hh η Dyrk1B έχει επίσης βρεθεί να δρα ως αναστολέας της κυτταρικής κινητικότητας (cell motility) μέσω των αλληλεπιδράσεών της με το μονοπάτι του ηπατοκυτταρικού αυξητικού παράγοντα (hepatocyte growth factor, HGF) και του υποδοχέα του MET (MET/HGF) (βλ. **Εικ. 1.15**). Έχει βρεθεί *in vitro* ότι η κινάση Dyrk1B παίζει ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής κινητικότητας αντιτιθέμενη της δράσης της πρωτεΐνης προσαρμογέα (adaptor protein) RanBPM που συμμετέχει στο σηματοδοτικό καταρράκτη MET. Αφενός, ο υποδοχέας MET παίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινική διήθηση και κυτταρική μετανάστευση και αφετέρου η πρωτεΐνη RanBPM έχει βρεθεί ότι προσδένεται στην περιοχή ενεργότητας τυροσινικής κινάσης του υποδοχέα MET, ενισχύοντας τη καταρροϊκή σηματοδότησή του με αποτέλεσμα την αύξηση της καρκινικής διήθησης [236]. Έχει δειχθεί σε σειρά επιθηλιακών κυττάρων πνεύμονα από *mink* (Mv1Lu) ότι η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B αναστέλλει την μετανάστευση κυττάρων και τη διήθησή τους σε πειράματα τραύματος (wounding experiments), με τη δράση της να εξασθενεί παρουσία του παράγοντα HGF ή αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης RanBPM, οι οποίοι και οι δύο δρουν ως καταστολείς της δράσης της [237]. Σε αντίθεση, έχει αναφερθεί ο θετικός ρόλος της Dyrk1B στην κυτταρική κινητικότητα σε κύτταρα του λιποσαρκώματος [238]. Είναι επίσης πιθανό η παρατηρούμενη κινητικότητα επαγόμενη από το ογκογόνο KRAS να προέρχεται από τη δραστηριότητα της κινάσης Dyrk1B [239] της οποίας το γονίδιο είναι και ένα από

τα τέσσερα πιο 'προ-μεταναστευτικά' (promigratory), ευρισκόμενο σε μία σάρωση RNAi (RNAi screen) από κύτταρα του ωκυτταρικού καρκίνου [240].

Συνοψίζοντας, η διασταυρούμενη επίδραση μεταξύ της κινάσης Dyrk1B και της σηματοδότησης Hh και δH Shh, πρέπει να διαλευκανθεί περαιτέρω, από τη στιγμή που η λειτουργία της στο μονοπάτι αυτό εξαρτάται αφενός από τα επίπεδα έκφρασής της και αφετέρου από τον τρόπο λειτουργίας του μονοπατιού 'κανονικό' ή 'μη κανονικό'. Επίσης, από τα παραπάνω γίνεται έκδηλο ότι είναι πολύ πιθανό η Dyrk1B να ασκεί τη δράση της μέσω πολλών διασταυρούμενων επιδράσεων με σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία μπορούν να έχουν μεταξύ τους και ανταγωνιστικές δράσεις όπως π.χ. αυτών του Wnt και του Shh κατά τον καθορισμό του ραχιαίο-κοιλιακού άξονα του νωτιαίου μυελού, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, λαμβάνοντας υπ' όψη και το εύρημα ότι το Wnt επηρεάζει επίσης τη δραστηριότητα του τελεστή Gli3 και συγκεκριμένα της κατασταλτικής μορφής του Gli3R [17,59].

ΣΤ. Το έμβρυο του κοτόπουλου ως πρότυπο σύστημα για νευροαναπτυξιακές μελέτες

Το έμβρυο του κοτόπουλου αποτελεί ένα αρκετά καλό και ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα-μοντέλο για *in vivo* μελέτες μια και είναι αρκετά προσιτό για πειραματικούς χειρισμούς. Επιπλέον, προσφέρει το πλεονέκτημα του μεγάλου αριθμού πειραματοζώων (εμβρύων) σε μικρό χρονικό διάστημα και με πολύ χαμηλό κόστος συντήρησης. Παρακάτω παρατίθενται συνοπτικά τα κυριότερα σημεία της εμβρυϊκής ανάπτυξης του κοτόπουλου και δίνεται έμφαση σε ο,τι αφορά τη νευρογένεση στο νωτιαίο μυελό.

Η εμβρυϊκή ανάπτυξη του κοτόπουλου χωρίζεται σε δύο φάσεις: Την εντός ωαγωγού και την εκτός ωαγωγού (έξοδος του αυγού από τον ωαγωγό και εκκίνηση της επώασης). Τα **στάδια της εντός ωαγωγού ανάπτυξης** περιγράφονται στην ανάλυση κατά Eyal-Giladi και Kochav [241] (μέχρι το σχηματισμό υποβλάστης και τη δημιουργία της αρχέγονης γραμμής) είναι 10 (I – IX) με συνολική ανάπτυξη 20 ωρών (h) και αποτελούνται από τις 2 πρώτες περιόδους: Περίοδος Α – **Αυλάκωση** (Cleavage) (I – VI, ηλικία 10-11 h) και Περίοδος Β – **Σχηματισμός της διαφανούς περιοχής** (Area pellucida) (VII – X, ηλικία 20 h) τα οποία οδηγούν στη γέννηση του αυγού. Η τρίτη περίοδος (Περίοδος C) (XI – XIV) αφορούν το σχηματισμό της υποβλάστης (hyroblast) και της αρχέγονης γραμμής (primitive streak) τα οποία αφορούν πλέον το νεογέννητο αυγό του οποίου ξεκινά η επώαση στον ωαγωγό. Η εμφάνιση της αρχέγονης γραμμής (Στάδιο XIV) ταυτίζεται με το Στάδιο 2 κατά Hamburger και Hamilton (βλ. παρακάτω).

Μετά τη γέννηση του αυγού, στην εκτός ωαγωγού **επώαση**, παραλαμβάνονται τα αυγά και μεταφέρονται σε επωαστήρα θερμοκρασίας 37-38 °C και υγρασίας >60%, προσομοιάζοντας τη φυσική επώαση της όρνιθας, θεωρώντας τη στιγμή της τοποθέτησής τους στον επωαστήρα ως

ημέρα E0. Από εκεί και έπειτα τα **στάδια** της ανάπτυξης του εμβρύου κατά Hamburger και Hamilton [242,243] όπως φαίνονται και στην **Εικ. 1.18** είναι τα εξής:

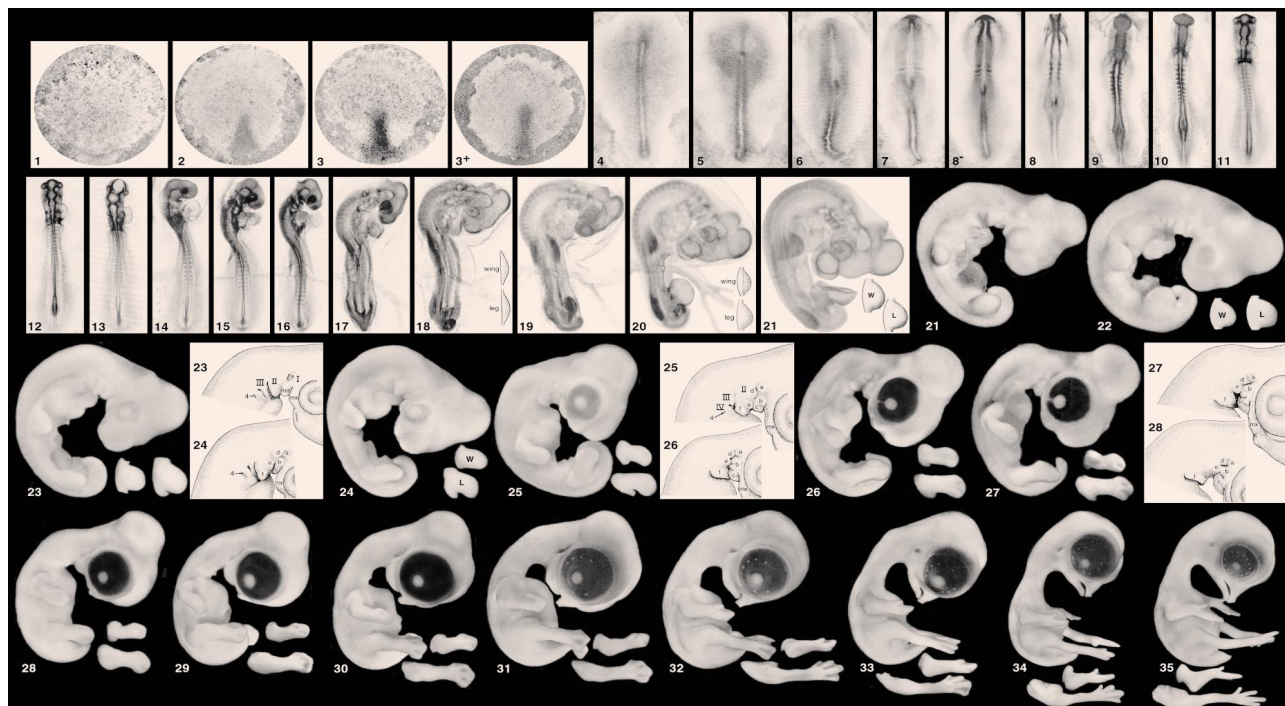
- **Στάδιο 1 (Προ-γραμμικό) (0-5 h επώασης):** Δε διακρίνεται ακόμα η αρχέγονη γραμμή.
- **Στάδιο 2 (Αρχική γραμμή) (6-7 h):** Η αρχέγονη γραμμή εμφανίζεται ως μικρή κωνική πάχυνση στο πίσω μέρος της διαφανούς περιοχής.
- **Στάδιο 3 (Μέση γραμμή) (12-13 h):** Η αρχέγονη γραμμή έχει φθάσει στο μέσον της διαφανούς περιοχής αλλά δεν έχει εμφανισθεί η αρχέγονη αύλακα. Εμφανίζεται το πρώτο ζεύγος σωματομερών εκατέρωθεν του πρόσθιου άκρου της αρχέγονης γραμμής. Μπροστά από την αρχέγονη γραμμή σχηματίζεται υπό μορφή σωματομερούς η προχορδική πλάκα.
- **Στάδιο 4 (Τελική γραμμή) (18-19 h):** Η αρχέγονη γραμμή καταλαμβάνει τα $\frac{3}{4}$ του μήκους της διαφανούς περιοχής, έχει αποκτήσει το μέγιστο μήκος της και φέρει αρχέγονο βοθρίο και κόμβο του Hensen εκατέρωθεν του τελευταίου εντοπίζεται το 2^ο ζεύγος σωματομερών.
- **Στάδιο 5 (Κεφαλική ή νωτοχορδική προβολή) (19-22 h):** Αρχίζει να φαίνεται η νωτοχορδική προβολή, πρόδρομος της νωτοχορδής, αλλά όχι ακόμα η κεφαλική πτυχή. Εκατέρωθεν του κόμβου Hensen σχηματίζεται το τρίτο ζεύγος σωματομερών.
- **Στάδιο 6 (Κεφαλική πτυχή) (23-25 h):** Αναδίπλωση των εμβρυϊκών μεμβρανών μπροστά και κάτω από την κεφαλική περιοχή.
- **Στάδιο 7 (στάδιο του ενός σωμαίτη) (25-26 h):** Το πρώτο ζεύγος σωματιών εμφανίζεται, καθώς και οι νευρικές πτυχές. Πίσω από τους σωμαίτες, το μεσόδερμα της μεταμερικής πλάκας είναι χωρισμένο σε 11 σωματομερή.
- **Στάδιο 8 (στάδιο τεσσάρων σωματιών) (26-29 h):** Οι νευρικές πτυχές αρχίζουν να κλείνουν ενώ εμφανίζονται οι πρώτες νησίδες αίματος.
- **Στάδιο 9 (στάδιο επτά σωματιών) (29-33 h):** Πίσω από τον τελευταίο σωμαίτη ακολουθούν πάντα 11 σωματομερή. Εμφανίζονται τα οπτικά κυστίδια και αρχίζουν να ενώνονται οι καρδιακοί σωλήνες.
- **Στάδιο 10 (στάδιο δέκα σωματιών) (33-38 h):** Υπάρχουν τρία πρωτογενή εγκεφαλικά κυστίδια, ενώ δεν έχει σχηματιστεί ακόμα ο οφθαλμικός μίσχος.
- **Στάδιο 11 (στάδιο 13 σωματιών) (40-45 h):** Στον οπισθεγκέφαλο διακρίνονται 5 νευρομέρη. Σχηματίζονται οι οφθαλμικοί μίσχοι και η καρδιά αναδιπλώνεται προς τα δεξιά.
- **Στάδιο 12 (στάδιο 16 σωματιών) (45-49 h, E2):** Εμφανίζεται ο τελεγκέφαλος. Τα ακουστικά βοθρία είναι βαθιά και η καρδιά έχει σχήμα “S”. Η κεφαλική πτυχή του αμνίου σκεπάζει τον τελεγκέφαλο.
- **Στάδιο 13 (στάδιο 19 σωματιών) (48-52 h, E2):** Η αμνιακή πτυχή καλύπτει το κεφάλι έως τον οπισθεγκέφαλο. Εμφανίζεται η κρανιακή κάμψη που γίνεται στο ύψος του μεσεγκέφαλου και είναι μόνιμη, ενώ η αυχενική κάμψη που γίνεται μεταξύ οπισθεγκέφαλου και πρόσθιου τμήματος του σώματος και είναι παροδική. Το κεφάλι στρέφεται προς τα δεξιά, ο τελεγκέφαλος μεγαλώνει,

η κρανιακή και η αυχενική κάμψη αποτελούν κοιλιακές κάμψεις του άξονα του σώματος οι οποίες δίδουν στο έμβρυο τη χαρακτηριστική κεκαμένη, σχήματος “C” μορφή του.

- **Στάδιο 14 (στάδιο 22 σωμιτών) (50-53 h, E2):** Η κρανιακή κάμψη είναι περίπου 90°, τα αορτικά τόξα 1 και 2 καθώς και οι βραγχιακές σχισμές 1 και 2 είναι εμφανείς. Αρχίζει η εγκόλπωση των οφθαλμικών κυστιδίων. Εμφανίζεται το ρινικό πλακώδες.
- **Στάδιο 15 (στάδιο 24-27 σωμιτών) (50-55 h):** Η κρανιακή κάμψη είναι μεγαλύτερη των 90°, εμφανίζεται το αορτικό τόξο 3 και η βραγχιακή σχισμή 3. Σχηματίζεται ο οφθαλμικός κάλυκας.
- **Στάδιο 16 (στάδιο 26-28 σωμιτών) (51-56 h):** Εμφανίζεται το φύτρο των προσθίων άκρων και της ουράς.
- **Στάδιο 17 (στάδιο 29-32 σωμιτών) (52-64 h):** Εμφανίζεται το φύτρο των πίσω άκρων, η επίφυση και τα ρινικά βοθρία.
- **Στάδιο 18 (στάδιο 30-36 σωμιτών) (65-69 h):** Το φύτρο των οπισθίων άκρων είναι λίγο μεγαλύτερο από το φύτρο των προσθίων άκρων. Το άμνιο είναι σχεδόν κλειστό, η αυχενική κάμψη είναι περίπου 90°, εμφανίζεται η αλλαντοΐς.
- **Στάδιο 19 (στάδιο 37-40 σωμιτών) (68-72 h, E3):** Η άνω και κάτω γναθικές προβολές είναι εμφανείς. Το μάτι δεν έχει ακόμα χρωστική. Σχηματίζεται το αλλαντοϊκό κυστίδιο.
- **Στάδιο 20 (στάδιο 40-43 σωμιτών) (70-72 h):** Ο κορμός είναι ευθύς και η αλλαντοΐς έχει φθάσει σε μέγεθος τον μετεγκέφαλο, το μάτι έχει λίγη χρωστική.
- **Στάδιο 21 (στάδιο 43-44 σωμιτών) [3,5 ημέρες (d) επώασης]:** Τα φύτρα των άκρων είναι ασύμμετρα και εκτείνονται προς τα πίσω. Η άνω γναθική προβολή είναι μεγαλύτερη από την κάτω και φθάνει στο μέσο του ματιού. Εμφανίζεται το τέταρτο αορτικό τόξο και η τέταρτη βραγχιακή σχισμή. Η αλλαντοΐς εκτείνεται προς το κεφάλι. Η χρωστική στο μάτι είναι εμφανής.
- **Στάδιο 22 (3,5 d):** Οι σωμίτες φτάνουν μέχρι το τέλος της ουράς.
- **Στάδιο 23 (3,5-4 d):** Τα φύτρα των φτερών και των ποδιών εκτείνονται τόσο σε μήκος όσο και σε πλάτος.
- **Στάδιο 24: (4 d, E4):** Τα φύτρα των φτερών και των ποδιών εκτείνονται περισσότερο σε μήκος παρά σε πλάτος.
- **Στάδια 25-35 (4,5 d έως 9 d):** Τα πόδια και οι φτερούγες γίνονται ευδιάκριτα, σχηματίζεται ο λαιμός και αρχίζουν να εμφανίζονται τα πούπουλα.
- **Στάδια 36-46 (10 d έως 21 d):** Τα νύχια είναι πλέον ευδιάκριτα στα άκρα των ποδιών. Σχηματίζονται τα βλέφαρα, ολοκληρώνεται ο σχηματισμός του ματιού (HH36-41). Ακολουθεί αύξηση του ράμφους (HH41-44) και η ολοκλήρωση της εμβρυϊκής ανάπτυξης χωρίς άλλη σημαντική αλλαγή περεταίρω (HH45-46) [242–244].

Στη συνέχεια αναφέρονται οι αναπτυξιακές διαδικασίες που διαμορφώνουν το ΚΝΣ του εμβρύου του κοτόπουλου, κυρίως αυτές που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των σταδίων HH12 – HH14 (E2) έως

HH24 (E4), αφού αυτό είναι το χρονικό «παράθυρο» στο οποίο πραγματοποιήθηκαν τα κύρια πειράματά της *in ovo* ηλεκτροδιάτρησης.



Εικόνα 1.18. Τα στάδια εμβρυϊκής ανάπτυξης του κοτόπουλου κατά Hamburger Hamilton (από [242,243]).

Κατά το στάδιο HH5 αρχίζει να σχηματίζεται η νωτοχορδική προβολή, η οποία είναι πρόδρομος της νωτοχορδής και είναι μία μάζα κυττάρων μεσοδερμικής προέλευσης που εντοπίζονται μπροστά από τον κόμβο του Hensen. Στα επόμενα στάδια ο κόμβος του Hensen υποχωρεί σταδιακά, εμφανίζεται η νωτοχορδή, μεσοδερμικής προέλευσης. Η νωτοχορδή επάγει στο υπερκείμενο εξώδερμα το σχηματισμό του νευρικού σωλήνα. Η ανάπτυξη του νευρικού σωλήνα στο κοτόπουλο, και εν γένει στα αμνιωτά, αρχίζει στο πρόσθιο τμήμα του σώματος και προχωρεί σταδιακά προς τα πίσω. Έτσι, ενώ ο νευρικός σωλήνας έχει κλείσει στο πρόσθιο τμήμα του εμβρύου, στο οπίσθιο μόλις αρχίζουν να εγείρονται οι νευρικές πτυχές. Στη συνέχεια ο νευρικός σωλήνας διαφοροποιείται σε προσεγκέφαλο (τελεγκέφαλο και διεγκέφαλο), μεσεγκέφαλο και ρομβεγκέφαλο (μετεγκέφαλο και μυελεγκέφαλο). Ο τελεγκέφαλος περαιτέρω θα σχηματίσει τους οσφρητικούς λοβούς του εγκεφάλου και τα ημισφαίρια. Ο διεγκέφαλος θα σχηματίσει τους οφθαλμικούς κάλυκες, τον επιθάλαμο – θάλαμο – υποθάλαμο. Ο μετεγκέφαλος δίδει την παρεγκεφαλίδα και ο μυελεγκέφαλος δίδει τον προμήκη μυελό. Μετά τον ρομβεγκέφαλο ακολουθεί ο νωτιαίος μυελός.

Τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας στην κεφαλική περιοχή δίδουν τις προαναφερθείσες δομές ενώ στο σώμα διαφοροποιούνται σε ραχιαία γάγγλια, συμπαθητικά γάγγλια, μυελό επινεφριδίων, εντερικά γάγγλια και χρωματοφόρα κύτταρα του δέρματος. Εκατέρωθεν της νωτοχορδής υπάρχει το

μεσόδερμα που διακρίνεται σε 3 περιοχές. Το μεσόδερμα που είναι ακριβώς δίπλα στη νωτοχορδή καλείται παραξονικό ή μεταμερικό και στη συνέχεια δίδει γένεση στα σωματομερή κατά σειρά από το κεφάλι προς τα πίσω. Οι άλλες δύο μεσοδερμικές περιοχές εκατέρωθεν της νωτιαίας χορδής είναι το ενδιάμεσο μεσόδερμα και το μεσόδερμα της πλευρικής πλάκας. Τα πρώτα επτά σωματομερή θα δώσουν κυρίως γραμμωτούς μύες της κεφαλής και ορισμένα κρανιακά οστά. Από το όγδοο σωματομερές και μετά, τα σωματομερή αποκτούν χαρακτηριστική σφαιροειδή δομή και σχηματίζουν τους σωμίτες. Τα κύτταρα των σωματιών μεταναστεύουν σε ορισμένες θέσεις, διαφοροποιούνται και δίδουν: τους μύες της πλάτης, των κοιλιακών τοιχωμάτων και των άκρων (μυοτόμος), τη δερμίδα (δερμοτόμος) και τον αξονικό σκελετό (σκληροτόμος) [245].

Η νευρική επαγωγή ξεκινά αρκετά νωρίς, όταν αρχίζει να αναπτύσσεται η κεφαλική ή νωτοχορδική προβολή, περίπου κατά το στάδιο HH5. Στο έμβρυο σταδίου HH14 έχει ξεκινήσει η μετανάστευση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας και τα κύτταρα αυτά βρίσκονται μεταξύ του νωτιαίου σωλήνα και του ραχιαίου τμήματος του μυοτόμου. Οι μυοτόμοι καταλήγουν στο νευρικό σωλήνα και τα κύτταρα του μυοτόμου συνδέονται με τα κύτταρα του νευρικού σωλήνα με κυτταροπλασματικές προεκβολές που δημιουργούν γύρω του και κάποιες φορές είναι σε επαφή με τη βασική μεμβράνη του.

Στο HH15 τα νευρικά βλαστικά κύτταρα είναι ορατά στην κοιλοπλευρική πλευρά του νευρικού σωλήνα. Σε αυτό το στάδιο εμφανίζονται τα ραχιαία και κοιλιακά γάγγλια [246]. Η πλειοψηφία των αναπτυσσόμενων νευρικών βλαστικών κυττάρων των γαγγλίων της ραχιαίας ρίζας έχουν γωνιώδες σχήμα, υποδηλώνοντας τον επικείμενο σχηματισμό νευραξόνων. Στο HH16 ο νωτιαίος σωλήνας αποτελείται από δύο διακριτές στοιβάδες, την επενδυματική στοιβάδα – η οποία επενδύει το νευρικό σωλήνα και περιέχει πολύ μεγάλο αριθμό μιτωτικών κυττάρων – και την περιθωριακή στοιβάδα, ενώ μέχρι το HH18 είναι ορατή και η στοιβάδα του μανδύα. Τα ραχιαία και κοιλιακά γάγγλια, ήδη από το HH16, είναι πλέον πολύ ευδιάκριτα και μάλιστα οι ρίζες των κοιλιακών γαγγλίων είναι μεγαλύτερες και περιέχουν περισσότερους νευράξονες από ότι οι ρίζες των ραχιαίων γαγγλίων. Άξονες κυττάρων από το γάγγλιο της ραχιαίας ρίζας ενώνονται με τα κύτταρα της κοιλιακής ρίζας σχηματίζοντας το νωτιαίο νεύρο. Εκτός των νευραξόνων και των αυξητικών κώνων των ραχιαίων και κοιλιακών γαγγλίων, νευράξονες εντοπίζονται και μέσα στο νωτιαίο σωλήνα. Ωστόσο την τέταρτη ημέρα της εμβρυϊκής ανάπτυξης (E4) δεν εντοπίζονται ακόμη κύτταρα Schwann παρά την E6, όπως και δεν ανιχνεύονται καθόλου κύτταρα της γλοίας.

Κατά τα στάδια HH18 – HH19 (E3) κάποιοι νευράξονες διεισδύουν στη βασική μεμβράνη του μυοτόμου και έρχονται σε άμεση επαφή με τα κύτταρα του μυοτόμου. Στο HH19 οι ρίζες των ραχιαίων γαγγλίων φαίνονται περισσότερο συμπυκνωμένες ενώ τα νωτιαία νεύρα είναι σαφώς μεγαλύτερα και πλέον κατευθύνονται προς τη δερμίδα [246]. Σε επόμενα στάδια της ανάπτυξης αρχίζει ο σχηματισμός των νωτιαίων νεύρων και μέχρι το HH34 (E8) έχουν σχηματιστεί 38 ζεύγη νωτιαίων νεύρων.

Ζ. Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής

Η ρύθμιση της εξόδου από τον κυτταρικό κύκλο των νευρικών προγονικών κυττάρων (neural progenitors) είναι κρίσιμη για την συνακόλουθη διαφοροποίησή τους τόπο- και χρόνο- ειδικά. Μεταξύ των μορίων-ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου συγκαταλέγονται και οι εξελικτικά συντηρημένες πρωτεϊνικές κινάσες DYRK που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες αναπτυξιακές διεργασίες [82].

Με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα του Εργαστηρίου Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας – Βλαστικών κυττάρων, η πρωτεϊνική κινάση Dyrk1B εκφράζεται στον εγκέφαλο του ενήλικου ποντικού και στους φλοιικούς νευρώνες σε καλλιέργεια και δείχθηκε ότι παίζει ρόλο στην έξοδο των κυττάρων Neuro2A από τον κυτταρικό κύκλο επάγοντας τη νευρωνική διαφοροποίησή τους [125,132,189]. Αυτές οι παρατηρήσεις προτείνουν έναν παρόμοιο ρόλο για την κινάση Dyrk1B στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου /έξοδο και στη διαφοροποίηση των νευρικών προγονικών κυττάρων (neural progenitors) κατά τη νευρογένεση *in vivo* [125,132,189]. Για να απαντηθεί αυτό το ερώτημα, στη παρούσα διδακτορική διατριβή αφενός διερευνήθηκε η έκφραση της κινάσης Dyrk1B κατά κύριο λόγο στον εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του κοτόπουλου και του ποντικού, και αφετέρου χρησιμοποιήθηκε ο πρώιμος εμβρυϊκός νευρικός σωλήνας του κοτόπουλου ως ένα πρότυπο σύστημα μελέτης *in vivo* του ρόλου της κινάσης Dyrk1B στη νευρογένεση. Ειδικότερα, η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο να είχε να απαντήσει σε δύο βιολογικά ερωτήματα:

A) Τη διερεύνηση του αναπτυξιακού προτύπου έκφρασης της κινάσης Dyrk1B στο ΚΝΣ των σπονδυλωτών κατά την εμβρυογένεση, τη μεταγεννητική και ενήλικη ζωή. Συγκεκριμένα, ο στόχος ήταν η διερεύνηση του αναπτυξιακού προτύπου έκφρασης της κινάσης Dyrk1B στο αναπτυσσόμενο ΚΝΣ του εμβρύου του κοτόπουλου και του ποντικού, καθώς και μεταγεννητικά έως το ώριμο άτομο στον ποντικό. Όσον αφορά στο κοτόπουλο, αν και μέχρι σήμερα, έχει σχεδόν ολοκληρωθεί η αλληλούχιση του γονιδιώματος του κοτόπουλου και έχει βρεθεί να υπάρχει το παράλογο γονίδιο *cDyrk1A*, η νουκλεοτιδική αλληλουχία του *cDyrk1B* δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί. Για το σκοπό αυτό εξετάστηκε κατ' αρχήν η ενδογενής έκφραση της κινάσης Dyrk1B και ακολουθήθηκε η κλωνοποίηση τμήματος του cDNA (complementary DNA, συμπληρωματικό DNA) του *cDyrk1B* του κοτόπουλου, καθώς και η συγκριτική διερεύνηση της έκφρασης των δύο συγγενικών πρωτεϊνών.

B) Τη διαλεύκανση της δράσης της κινάσης Dyrk1B κατά την ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού του εμβρύου του κοτόπουλου με *in vivo* προσεγγίσεις 'προσθήκης' και 'απώλειας λειτουργίας' (*gain-and-loss-of-function approaches*) και πειράματα 'διάσωσης φαινοτύπου' (*phenotype rescue experiments*), καθώς και προσδιορισμός των σηματοδοτικών μονοπατιών στα οποία εμπλέκεται η κινάση Dyrk1B στον αναπτυσσόμενο εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του κοτόπουλου.

Η προσέγγιση ‘προσθήκης λειτουργίας’ (*gain-of-function*) οδηγεί στην υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B στον αναπτυσσόμενο νωτιαίο μυελό του εμβρύου του κοτόπουλου, και πραγματοποιείται μέσω μονόπλευρης *in ovo* ηλεκτροδιάτρησης (*unilateral in ovo electroporation*), ενώ η προσέγγιση ‘απώλειας λειτουργίας’ οδηγεί στη αναστολή της ενδογενούς ενζυμικής ενεργότητας της κινάσης Dyrk1B μέσω της χορήγησης ειδικού εκλεκτικού αναστολέα της, AZ191. Επιλέχθηκε το αναπτυξιακό χρονικό «παράθυρο» E2 (μεταξύ HH12 και HH13) έως E4 (HH24) επί το πλείστον ή για κάποιες αναλύσεις έως το αναπτυξιακό στάδιο E6 (HH29), με βάση παρόμοιες μελέτες από διάφορες ερευνητικές ομάδες [77,247–251]. Τα χρονικά διαστήματα αυτά κρίθηκαν κατάλληλα καθώς αντιστοιχούν σε ένα αρκετά πρώιμο σημείο ανάπτυξης το οποίο προσφέρεται για μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού αλλά και της νευρογένεσης, η οποία βρίσκεται στην αρχή της. Ταυτόχρονα, τα έμβρυα στο αρχικό αναπτυξιακό στάδιο E2 είναι αρκετά ανεπτυγμένα ώστε να είναι επιτυχής, από τεχνικής απόψεως, η έγχυση του πλασμιδιακού DNA και ώστε να καταφέρουν να επιβιώσουν μετά την καταπόνηση (*stress*) της ηλεκτροδιάτρησης ή της έγχυσης του εκλεκτικού αναστολέα της Dyrk1B, AZ191, στα πειράματα ‘προσθήκης’ ή ‘απώλειας λειτουργίας’, αντίστοιχα, καθώς συνδυαστικά στα πειράματα ‘διάσωσης φαινοτύπου’. Στις σελίδες που ακολουθούν παρουσιάζεται και αναλύεται η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε και οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και τα προκύψαντα αποτελέσματα και συμπεράσματα από τη μελέτη αυτή.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Χημικά και άλλα διαλύματα γενικής χρήσης

- Για όλα τα διαλύματα χρησιμοποιήθηκε δις-απεσταγμένο και απιονισμένο H₂O (double-distilled deionized H₂O, ddH₂O), το οποίο, στη συνέχεια, καθαρίστηκε επιπλέον απ' το σύστημα Milli-Q (M) Direct 8 (Millipore) και ήταν υπερκάθαρο H₂O Τύπου 1 (mQ H₂O). Το mQ H₂O θεωρείται ότι είναι RNase-free, αλλά όπου χρειαζόταν ακολουθούσε επιπλέον κατεργασία του με DEPC (diethyl pyrocarbonate) για την απενεργοποίηση των RNασών (RNases) (DEPC H₂O). Επίσης, όπου χρειαζόταν ακολουθούσε υγρή αποστείρωση σε κλίβανο για 20 min, υπό πίεση 15 lb/in² ή φιλτράρισμα μέσα από φίλτρα διάμετρου πόρου 0,2 μm (Sterile Acrodisc, Gelman).
- Για τις τεχνικές Μοριακής Βιολογίας χρησιμοποιήθηκαν κοινά χημικά αναλυτικού βαθμού (B.D.H., Merck, Promega, Sigma – Aldrich, AppliChem, Scharlau, Fluka, κ.λπ.), καθώς και χημικά υψηλού βαθμού καθαρότητας 99 % απαλλαγμένα από RNases και DNases.
- PBS (phosphate buffered saline, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7.4, 1X): Για πειράματα *in vivo* ή *in vitro* από την εταιρεία Biosera. Για όλες τις υπόλοιπες εφαρμογές, παρασκευάστηκε ως εξής: 14 mM NaCl, 0,8 mM Na₂HPO₄ (.12H₂O), 0,3 mM KCl και 0.15 mM KH₂PO₄.

2.2. Δείκτες μοριακών βαρών (ladders)

- Στις ηλεκτροφορήσεις DNA χρησιμοποιήθηκαν δείκτες μοριακών βαρών DNA του 1kb και των 100 bp (New England Biolabs).
- Στις ηλεκτροφορήσεις πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ο προχρωματισμένος πρωτεϊνικός δείκτης μοριακών βαρών 10 – 180 kDa PageRuler (Thermo Scientific).

2.3. Kits

- Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκαν τα εξής: NucleoSpin Plasmid (Miniprep), NucleoBond Xtra Maxi Kit της Macherey-Nagel.
- Για τον καθαρισμό τμημάτων DNA, προϊόντων PCR χρησιμοποιήθηκε το PCR clean-up kit της Macherey-Nagel.
- Για τον καθαρισμό του DNA από παρασκευαστικά πηκτώματα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Gel extraction kit της Macherey-Nagel.

2.4. Πειραματόζωα

Έμβρυα όρνιθας (κοτόπουλου): Χρησιμοποιήθηκαν γονιμοποιημένα αυγά όρνιθας (*Gallus gallus*) ημέρας (E0), που επωάστηκαν στον εξοπλισμό του εργαστηρίου, σε οριζόντια θέση στους 37 °C, σε καθεστώς υγρασίας >60-90%, μέχρι τα επιθυμητά αναπτυξιακά στάδια κατά Hamburger and Hamilton (HH) για τα πειράματα 'προσθήκης' και 'απώλειας λειτουργίας' (*gain-and-loss-of-function*, GOF – LOF), καθώς και πειράματα 'διάσωσης φαινοτύπου' (*phenotype rescue*). Για όλα τα πειράματα τα έμβρυα άρχισαν να χρησιμοποιούνται σε ηλικία 2 ημερών (E2) και προήλθαν από τοπικό προμηθευτή (εταιρία «Πίνδος»).

Ποντίκια: Τα ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την έρευνα ήταν του στελέχους C57BL/6J. Οι χειρισμοί τους πραγματοποιήθηκαν σε αυστηρή συμφωνία με την ορθή πρακτική ζώων, όπως ορίζεται από τους σχετικούς Ευρωπαϊκούς και Ελληνικούς Φορείς Ευζωίας Ζώων, που βασίζονται στις αρχές των 3+1Rs (replacement, reduction, refinement and respect /αντικατάσταση, μείωση, βελτίωση και σεβασμός). Ειδικότερα, όλες οι διαδικασίες είναι σύμφωνες με τους Ευρωπαϊκούς και Εθνικούς νόμους για τη χρήση ζώων εργαστηρίου (Ευρωπαϊκή Οδηγία 2010/63/EU και Ελληνική Νομοθεσία, Π.Δ. 56/2013), σύμφωνα με τις συστάσεις της FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations, Ομοσπονδία Ευρωπαϊκών Επιστημονικών Ενώσεων για τα Ζώα Εργαστηρίου) για την ευθανασία και σύμφωνα με τον Οδηγό για τη Φροντίδα και Χρήση των Ζώων Εργαστηρίου των Εθνικών Ινστιτούτων Υγείας.

2.5. Κλωνοποίηση του 3' τμήματος της κωδικής περιοχής του cDNA της κινάσης Dyrk1B του κοτόπουλου

Προκειμένου να κλωνοποιηθεί το συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA) της κινάσης Dyrk1B του κοτόπουλου, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση με το εργαλείο BLAST (Basic Local Alignment Search Tool /Βασικό Εργαλείο Ανεύρεσης Τοπικής Ευθυγράμμισης) ώστε να αναγνωρισθούν κλώνοι EST (Expressed sequence tag, Σηματοδότης εκφραζόμενης αλληλουχίας) που αντιστοιχούν στο γονίδιο *cDyrk1B*, με τη χρήση των δεδομένων EST του BBSRC (*ChickESTweb* <http://www.chick.manchester.ac.uk/>). Εντοπίστηκαν 2 κλώνοι EST: 1) 603108058F1 cloneID='ChEST50c16' και 2) 603209321F1 cloneID='ChEST186i5', αλλά κανένας δεν περιείχε όλο το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame, ORF) αλλά ούτε το 3' άκρο της κωδικής περιοχής (coding sequence or region, CDS) του *cDyrk1B* η οποία είναι διαφορετική από το 3' άκρο της κωδικής περιοχής του παράλογου γονιδίου *cDyrk1A*. Αυτή η διαφορά είναι μεγάλης σπουδαιότητας προκειμένου να είναι δυνατή η διάκριση της έκφρασης mRNA μεταξύ της κινάσης

Dyrk1B και της Dyrk1A. Τα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames, ORFs) των ορθόλογων γονιδίων *Dyrk1B* του ανθρώπου, του ποντικού και του αρουραίου παρουσιάζουν υψηλή ομοιότητα, όπως 92,64% μεταξύ ανθρώπου και ποντικού, 93,17% μεταξύ ανθρώπου και αρουραίου και 96,72% μεταξύ ποντικού και αρουραίου. Εκμεταλλευόμενοι την υψηλή ομοιότητα μεταξύ των κωδικών αλληλουχιών του γονιδίου *Dyrk1B* ανάμεσα στα διάφορα είδη, έγινε σύνθεση και χρήση των εκκινητών (primers), οι οποίοι αντιστοιχούν στο 3' άκρο της κωδικής περιοχής του cDNA της Dyrk1B του ποντικού (*mDyrk1B*) προκειμένου να κλωνοποιηθεί το 3' άκρο της κωδικής περιοχής του cDNA του γονιδίου *Dyrk1B* του κοτόπουλου, εφαρμόζοντας αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) (βλ. παρακάτω) σε ολικό RNA το οποίο έχει εξαχθεί μέσω της μεθόδου της φαινόλης /χλωροφόρμιου (TRIzol reagent, Ambion /Life Technologies) (βλ. παρακάτω) από νωτιαίο μυελό (spinal cord, SC) εμβρύων κοτόπουλου ηλικίας E4. Για την κλωνοποίηση χρησιμοποιήθηκαν ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες oligo (dT) και οι εκκινητές FOR2D1B: 5'-CCCAAGCTTCCGTTGCCTTGGACGACC-3' και REV2D1B: 5'-CCGGAATTCTCATGAGCTGGCTGCTGTGC-3' (με έντονη σήμανση οι περιοχές περιορισμού για τη HindIII και EcoRI, αντίστοιχα) και υψηλής πιστότητας DNA πολυμεράση (Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, New England Biolabs). Με αυτό τον τρόπο κλωνοποιήθηκε τμήμα που αντιστοιχεί στο 3' άκρο της κωδικής περιοχής του cDNA, μεγέθους 253 bp, το οποίο υποκλωνοποιήθηκε ανάμεσα στις θέσεις περιορισμού του πλασμιδιακού φορέα pBluescript II KS (-) (Stratagene) (βλ. παρακάτω) και στη συνέχεια υποβλήθηκε σε αλληλούχιση DNA κατά Sanger (Sanger Sequencing). Η αλληλούχιση αποκάλυψε ότι το τμήμα cDNA των 253 bp αντιστοιχεί στο 3' άκρο της CDS του *cDyrk1B* και παρουσιάζει 100% με την αντίστοιχη περιοχή του ορθόλογου γονιδίου του ποντικού, 96,05% με την αντίστοιχη περιοχή του αρουραίου και 90,91% με την αντίστοιχη περιοχή του ανθρώπου (βλ. **Αποτελέσματα Εικ. 3.8**).

2.6. Φορείς κλωνοποίησης – Πλασμίδια

Για τα πειράματα μονόπλευρης *in ovo* ηλεκτροδιάτρησης (unilateral *in ovo* electroporation) (βλ. παρακάτω), χρησιμοποιήθηκε ο φορέας έκφρασης ευκαρυωτικών pCAGGS με linker B (LB) mDyrk1B-IRES-NLS-GFP, αναφερόμενος εξεξής ως: pCAG-mDyrk1B-IRES-NLS-GFP, που αποτελεί έναν δισιστρονικό (bicistronic) φορέα έκφρασης, ο οποίος συνεκφράζει την κωδική αλληλουχία του cDNA της Dyrk1B του ποντικού (*mDyrk1B*) και την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescent protein, GFP), καθώς και την αλληλουχία πυρηνικής στόχευσης NLS (nuclear localization signal, NLS). Η κωδική αλληλουχία του cDNA της Dyrk1B του ποντικού (*mDyrk1B*), μήκους 1890 bp, προήλθε από τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης θηλαστικών pCMV-Sport6 (4396 bp), στον οποίο έχει κλωνοποιηθεί ολόκληρο το cDNA, της κινάσης Dyrk1B του ποντικού μήκους 2549bp (αριθμός καταχώρησης GenBank: BC019545.1, cDNA clone MGC:25681 IMAGE:4511845)

ανάμεσα στις περιοριστικές θέσεις 5'-Sall – NotI-3', (**Εικ. 2.1A**). Αυτό επιτεύχθηκε με εφαρμογή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) με χρήση DNA πολυμεράσης υψηλής πιστότητας (Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, New England Biolabs), χρησιμοποιώντας ως DNA μήτρα (DNA template) τον πλασμιδιακό φορέα pCMV-Sport6-Dyrk1B και τους εκκινητές D1BFOR1: 5'-CTAG**CTAGCGCC**ACCATGGCCGTCCACCA-3' και D1BREV2: 5'-CCG**ATATCT**CATGAGCTGGCTGCTGTGCTCTGG-3' (με έντονη σήμανση οι περιοχές περιορισμού για τη NheI και EcoRV, αντίστοιχα). Στη συνέχεια, η παραγόμενη με PCR, κωδική αλληλουχία της Dyrk1B του ποντικού, μήκους 1890 bp, υποκλωνοποιήθηκε ανάμεσα στις θέσεις περιορισμού 5'-Nhe I και EcoRV-3' του φορέα pCAG-IRES-NLS-GFP (ευγενική προσφορά από τον κ. Π.Κ. Πολίτη, ΙΙΒΕΑΑ) (μεγέθους 6.2 kb) (**Εικ. 2.1B**).

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων του επιτόπιου RNA υβριδισμού (RNA *in situ* hybridization, ISH) και την παραγωγή κατάλληλων ιχνηθετών RNA (riboprobes), χρησιμοποιήθηκε το 3' τμήμα της κωδικής περιοχής του cDNA της Dyrk1B του κοτόπουλου, μήκους 253 bp και το 3' τμήμα της κωδικής περιοχής του cDNA της Dyrk1B του ποντικού, μήκους 396 bp, τα οποία και υποκλωνοποιήθηκαν και τα δύο ανάμεσα στις θέσεις περιορισμού 5'-HindIII και EcoRI-3' του πλασμιδιακού φορέα pBluescript II KS (-) (Stratagene) (2961 bp) (**Εικ. 2.2**). Για την υποκλωνοποίηση του 3' τμήματος της κωδικής περιοχής του cDNA της Dyrk1B του ποντικού, μήκους 396 bp, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές FOR3D1B: 5'-CCCA**AGCTT** GACTGTGAGATGAACAGCC-3' και REV2D1B: 5'-CCG**GAATTC**CATGAGCTGGCTGCTGTGC-3' (με έντονη σήμανση οι περιοχές περιορισμού για τη HindIII και EcoRI, αντίστοιχα) και υψηλής πιστότητας πολυμεράση (Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, New England Biolabs).

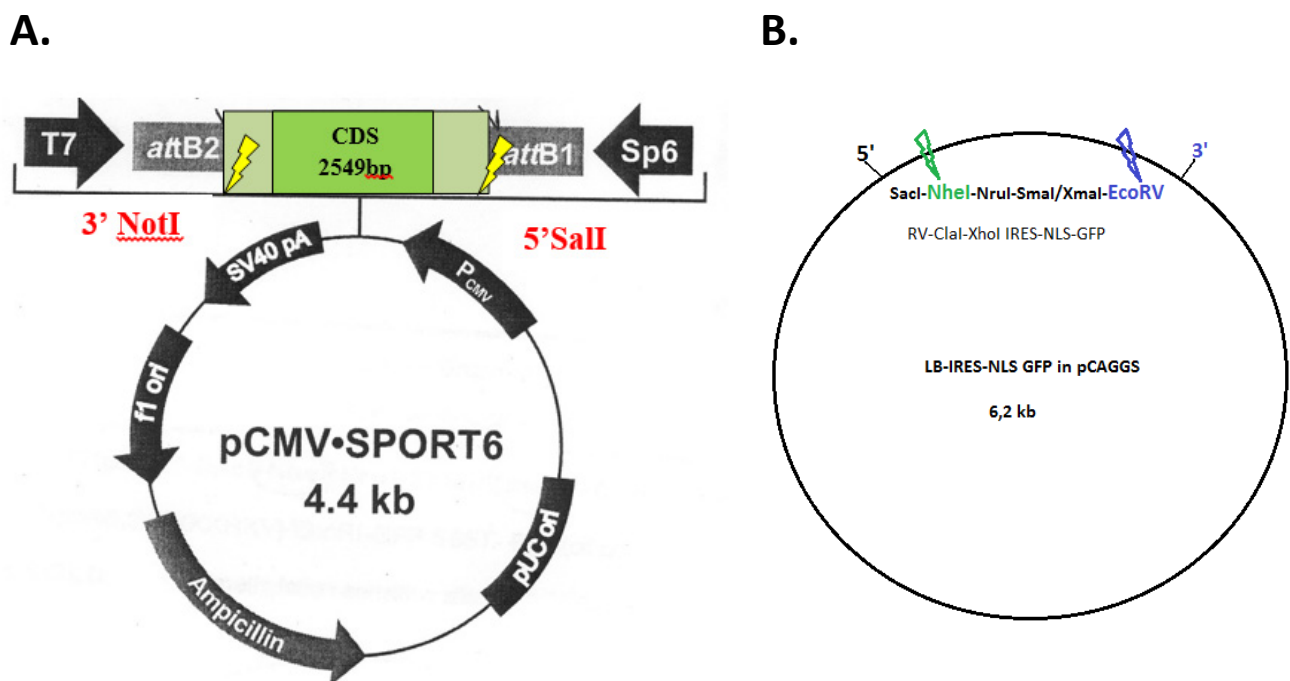
Για τους ιχνηθέτες RNA της πρωτεΐνης Sonic Hedgehog του ποντικού (mShh), κλωνοποιήθηκε ένα τμήμα του cDNA της, μήκους 498 bp το οποίο αντιστοιχεί στο 5' άκρο της κωδικής αλληλουχίας του cDNA του γονιδίου *mShh*, εφαρμόζοντας PCR με υψηλής πιστότητας πολυμεράση (Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, New England Biolabs) και εκκινητές mSHHFOR: 5'-CCCA**AGCTT**GCCAGCGGCAGATAT-3' και mSHHREV: 5'-CGG**GAATTC**GTCTTCCACCAGCTTG-3' (με έντονη σήμανση οι περιοχές περιορισμού για τη HindIII και EcoRI, αντίστοιχα), χρησιμοποιώντας ως DNA μήτρα (DNA template) τον πλασμιδιακό φορέα pCMV6-Entry-mShh το οποίο περιέχει ολόκληρο το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame, ORF) του γονιδίου *mShh*, φέρει επίτοπο-ετικέτα Myc-DDK (Myc-DDK-tagged) και εκφράζει επίσης την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP (Mouse Sonic hedgehog NM_009170, ORIGENE, MG227201) (7.9 kb) (**Εικ. 2.3**). Το προϊόν της PCR μήκους 498 bp, υποκλωνοποιήθηκε στη συνέχεια στις θέσεις περιορισμού HindIII και EcoRI του πλασμιδίου pBluescript II KS (-) (Stratagene).

Όλα τα πλασμίδια φέρουν το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη, γεγονός που καθιστά εύκολη την ανίχνευση και τη σωστή επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων. Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή

(New England Biolabs). Όλοι οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση DNA κατά Sanger για επιβεβαίωση της ορθότητας της κάθε ένθεσης καθώς και της πιστότητας αντιγραφής της DNA πολυμεράσης (εταιρεία Eurofins Genomics AT, Βιέννη, Αυστρία).

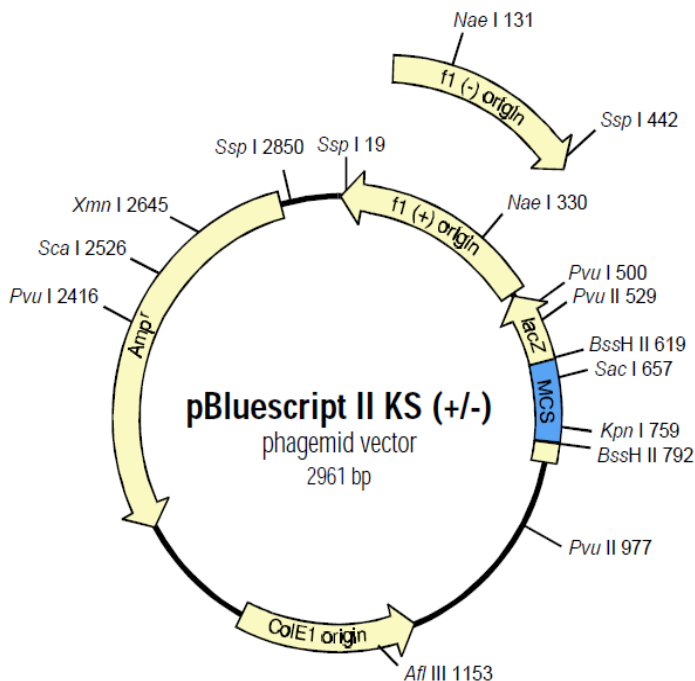
Όλες οι μέθοδοι και τεχνικές μοριακής κλωνοποίησης, απομόνωσης και ανάλυσης νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών που εφαρμόστηκαν προέρχονται από το τρίτομο έργο των Sambrook, J., Fritsch, E. R., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press [252], εκτός αν αναφέρεται αλλιώς.

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για την εισαγωγή και τον πολλαπλασιασμό του πλασμιδιακού DNA ήταν καλλιέργειες XL10-Gold υπερδεκτικών κυττάρων (*E. coli*) (Stratagene). Ως υλικό για την υγρή καλλιέργεια τους χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο υλικό καλλιέργειας Luria – Bertani Broth (LB). Το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν αμπικιλίνη (amp) (Bristol). Για την καλλιέργειά τους σε τρυβλία Petri χρησιμοποιήθηκε το υλικό Bacto-Agar (Difco & BBL). Για την πέψη μορίων DNA με περιοριστικά ένζυμα (ενδονουκλεάσες), απλές ή υψηλής πιστότητας (high fidelity), ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή (New England Biolabs). Πραγματοποιήθηκαν διπλές πέψεις τόσο των πλασμιδιακών φορέων όσο και των προς υποκλωνοποίηση υποψηφίων ενθεμάτων (inserts) ή απλές για τη γραμμικοποίηση (linearization) των φορέων, για *in vitro* μεταγραφή για τη σύνθεση στη συνέχεια των ιχνηθετών RNA (riboprobes). Άλλα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η T4 λιγάση (Roche) και η αλκαλική φωσφατάση ορού (Alkaline Phosphatase of Serum / SAP) rAPid (Promega).

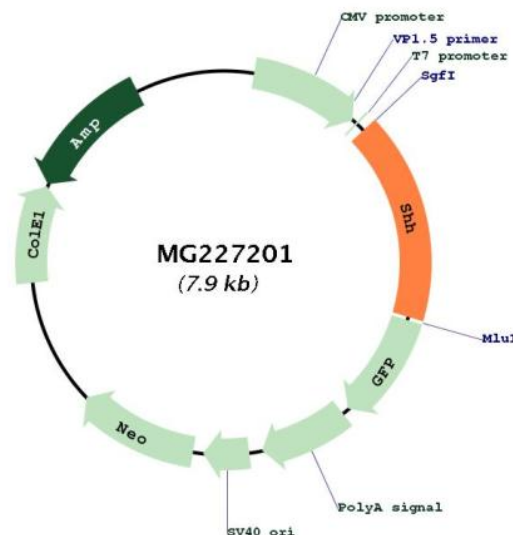


Εικόνα 2.1. Οι χάρτες των πλασμιδιακών φορέων **A. pCMV-Sport6** (μεγέθους 4396 bp) στο οποίο έχει κλωνοποιηθεί, ανάμεσα στις περιοριστικές θέσεις 5'-Sall – NotI-3', το cDNA της κινάσης Dyrk1B του ποντικού (2549bp, GenBank: BC019545.1, cDNA clone MGC:25681 IMAGE:4511845)

(U.K. Human Genome Mapping Project Resource Centre, Hinxton, Cambridge, U.K.) και **B. pCAG-IRES-NLS-GFP** (μεγέθους 6.2 kb) στον οποίο υποκλωνοποιήθηκε η κωδική περιοχή (coding sequence or region, CDS) του γονιδίου *mDyrk1B* (1890 bp) ανάμεσα στις θέσεις περιορισμού 5'-Nhe I και EcoRV-3'.



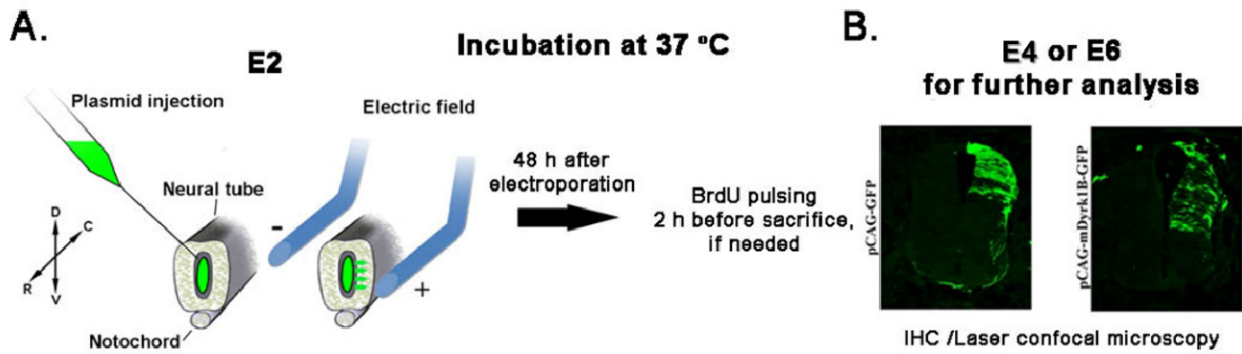
Εικόνα 2.2. Το πλασμίδιο **pBluescript II KS (-)** (Stratagene) (**2961 bp**). Η κλωνοποίηση των ενθεμάτων που αντιστοιχούν στο 3' άκρο της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου *cDyrk1B* (253 bp), στο 3' άκρο της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου *mDyrk1B* (396 bp) και στο 5' άκρο της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου *mShh* (498 bp) έγινε μεταξύ των θέσεων περιορισμού 5'-HindIII και EcoRI-3', της περιοχής πολυσυνδέσμου κλωνοποίησης. (MCS, multiple cloning site).



Εικόνα 2.3. Ο χάρτης του πλασμιδίου **MG227201 (7.9 kb)**. Το πλασμίδιο που περιέχει ολόκληρο το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) του γονιδίου *mShh* με σήμανση Myc-DDK (Myc-DDK-tagged) και με έκφραση της πρωτεΐνης-μάρτυρα GFP (Mouse Sonic hedgehog NM_009170, ORIGENE, MR227201).

2.7. Πειράματα ‘προσθήκης λειτουργίας’ – Μονόπλευρη *in ovo* ηλεκτροδιάτρηση

Τα πειράματα ‘προσθήκης λειτουργίας’ (*gain-of-function*, GOF) πραγματοποιήθηκαν εφαρμόζοντας μονόπλευρη *in ovo* ηλεκτροδιάτρηση (*unilateral in ovo electroporation*) του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης pCAG-mDyrk1B-IRES-NLS-GFP ή του pCAG-IRES-NLS-GFP ως φορέα ελέγχου (*control*), στον αναπτυσσόμενο νευρικό σωλήνα /νωτιαίο μυελό (SC) του εμβρύου του κοτόπουλου, όπως έχει προηγουμένως περιγραφεί [247,248,250]. Συνοπτικά, έμβρυα κοτόπουλου αναπτυξιακού σταδίου HH 12–14 (E2) ενέθηκαν με διάλυμα πλασμιδιακού DNA στον αυλό (*lumen*) του κεντρικού καναλιού (*central canal*) του νευρικού σωλήνα και ύστερα υποβλήθηκαν σε μονόπλευρη *in ovo* ηλεκτροδιάτρηση. Τα πλασμίδια για την ηλεκτροδιάτρηση χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 2-2,5 μg/μl σε TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) περιέχοντας 0,05% (w/v) Fast Green (Sigma) για μακροσκοπική σήμανση του διαλύματος. 1-2 μl του διαλύματος του εκάστοτε πλασμιδίου ενέθηκαν μέσα στον αυλό του κεντρικού καναλιού του νωτιαίου μυελού με γυάλινο μικροτριχοειδές (*microcapillary*) το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μικροσιφώνιο (*pipette*), μέσω ελαστικού σωλήνα με επιστόμιο (*mouth pipetting*). Τα μικρο-ηλεκτρόδια, κατασκευασμένα από λευκόχρυσο (πλατίνα), τοποθετήθηκαν σε απόσταση ~4 mm μεταξύ τους και τοποθετήθηκαν απαλά επάνω στον λεκιθικό ασκό (*vitelline membrane*) ο οποίος περιβάλλει τον νευρικό σωλήνα, έτσι ώστε ένα εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο διατρέχοντας το μεσο-πλευρικό επίπεδο (*medio-lateral plane*) του νευρικού σωλήνα να κατευθύνει το αρνητικά φορτισμένο DNA στα κύτταρα μόνο στη μία πλευρά του νευρικού σωλήνα. Τα έμβρυα δέχθηκαν 5 παλμούς (*pulses*) των 50 msec έκαστος με μεσοδιάστημα (*interval*) των 950 msec στα 25 V, χρησιμοποιώντας έναν ηλεκτροδιατηρήτη τετραγωνικού κύματος (*square wave electroporator*) (BTX Harvard Apparatus ECM 830) (Εικ. 2.4). Τα έμβρυα συλλέχθηκαν στις ημέρες E4 ή E6 και επεξεργάστηκαν για ανοσοϊστοχημεία (*immunohistochemistry*, IHC), RNA *in situ* υβριδισμό (RNA *in situ* hybridization, ISH), ανάλυση με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot analysis, WB) ή ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράση σε προϊόν αντίστροφης μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο (*real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-qPCR). Για τις μελέτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού με σήμανση 5-Βρώμο-2'-δεοξουριδίνης (5-Bromo-2'-deoxyuridine, BrdU), τα έμβρυα δέχθηκαν 20 μl BrdU (Acros Organics) (1 mg/ml, σε 1X PBS) στην κορυφή τους, στάγδην, με μικροσιφώνιο, 2 h προτού θυσιασθούν. Κατά την εφαρμογή των παραπάνω διαδικασιών, χρησιμοποιήθηκε ως αντιμικροβιακό διάλυμα 1X PBS στο οποίο έχει προστεθεί 1% (v/v) πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (*penicillin-streptomycin*, Pen/Strep) (SIGMA).



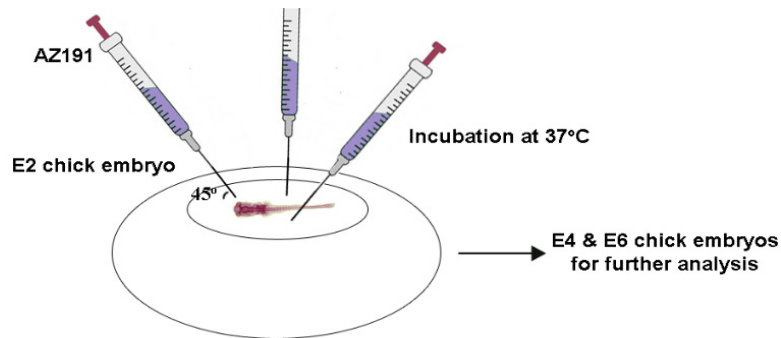
Εικόνα 2.4. Η διαδικασία της μονόπλευρης *in vivo* ηλεκτροδιάτρησης. **A.** Απεικονίζεται το στάδιο της έγχυσης του διαλύματος του πλασμιδιακού DNA, χρωματισμένου με Fast Green, στον αυλό (lumen) του αναπτυσσόμενου νευρικού σωλήνα του εμβρύου του κοτόπουλου ηλικίας E2, στη συνέχεια η ηλεκτροδιάτρηση, με εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου, που ωθεί το αρνητικά φορτισμένο DNA προς τη μία πλευρά του νευρικού σωλήνα και 48 h (αναπτυξιακό στάδιο E4) ή 96 h (αναπτυξιακό στάδιο E6) μετά την ηλεκτροδιάτρηση, εφαρμογή των πρωτοκόλλων της ανοσοϊστοχημείας για περαιτέρω ανάλυση μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας (confocal microscopy), RT-qPCR ή ανοσοαποτύπωσης κατά Western, αναλόγως. Για την περίπτωση μελέτης του πολλαπλασιασμού μέσω της ανάλυσης της ενσωμάτωσης του BrdU, ακολουθεί ένας ‘παλμός’ 2 h προτού τα ζώα θυσιαστούν (σχεδιασμός N. Κοκκοράκη).

2.8. Πειράματα ‘απώλειας λειτουργίας’ και ‘διάσωσης φαινοτύπου’ *in vivo*

Τα πειράματα ‘απώλειας λειτουργίας’ (*loss-of-function*, LOF) πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του εκλεκτικού αναστολέα AZ191 της ενεργότητας κινάσης της Dyrk1B (Cayman). Ειδικότερα, 600 µg του αναστολέα AZ191, διαλυμένα σε DMSO (dimethyl-sulfoxide, διμεθυλο-σουλφοξειδίο), ενέθηκαν με μία σύριγγα ινσουλίνης 29G, στα έμβρυα κοτόπουλου, διαμοιρασμένα σε τρία σημεία, υπό γωνία 45° (**Εικ. 2.5**), δια μέσου τριών μικρών τρυπών που έγιναν στους λεκιθικούς ασκούς, με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε ολόκληρο το έμβρυο να εκτεθεί στην ουσία. Ο αναστολέας AZ191 ενέθηκε σε συνολικό όγκο 1 ml, με προσθήκη αποστειρωμένου διαλύματος 1X PBS (χωρίς CaCl₂ and MgCl₂, Gibco) στο οποίο έχει προστεθεί 1% (v/v) πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης (penicillin-streptomycin, Pen/Strep) (SIGMA).

Ομοίως, τα πειράματα της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού Shh, πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του αγωνιστή της πρωτεΐνης Smoothened (SMO), SAG (Abcam). Ειδικότερα, 1 µg του αγωνιστή SAG [253], προηγουμένως διαλυμένο σε DMSO, ενέθηκε με σύριγγα ινσουλίνης 29G, σε έμβρυα κοτόπουλου E2, όπως περιγράφηκε παραπάνω για τον αναστολέα AZ191.

Τα πειράματα 'διάσωσης φαινοτύπου' πραγματοποιήθηκαν με χορήγηση είτε του αναστολέα AZ191 ή του αγωνιστή SAG, 2h μετά την μονόπλευρη *in ovo* ηλεκτροδιάτρηση προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η καταπόνηση (stress), προκληθείσα στα έμβρυα λόγω των διαδικασιών.



Εικόνα 2.5. Η διαδικασία που εφαρμόστηκε για την έγχυση ουσιών, όπως είναι ο αναστολέας της κινάσης *Dyrk1B*, AZ191, για τα πειράματα 'απώλειας λειτουργίας'. Πραγματοποιούνται 3 διαδοχικές ενέσεις του διαλύματος που περιέχει τον αναστολέα σε διαφορετικά σημεία, μέσα στη λέκιθο, υπό γωνία 45°, σε εγγύτητα με το έμβρυο του κοτόπουλου ηλικίας E2. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την έγχυση του αγωνιστή του *Smoothed*, SAG, στα πειράματα ενεργοποίησης της σηματοδότησης *Shh*. Η περαιτέρω ανάλυση έγινε 48 h (αναπτυξιακό στάδιο E4) ή 96 h (αναπτυξιακό στάδιο E6) μετά την ηλεκτροδιάτρηση με εφαρμογή των πρωτοκόλλων της ανοσοϊστοχημείας για περαιτέρω ανάλυση μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας (confocal microscopy), RT-qPCR ή ανοσοαποτύπωσης κατά Western, αναλόγως (σχεδιασμός Ν. Κοκκοράκη).

2.9. Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot, WB)

Ομογενοποιήματα από εγκεφάλους και νωτιαίους μυελούς από κοτόπουλα και ποντικούς διαφόρων αναπτυξιακών σταδίων ετοιμάστηκαν σε αναλογία 1:10 σε παγωμένο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (ice cold lysis buffer) το οποίο περιέχει: 10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0,1% (w/v) SDS, 0,5% (w/v) δεοξυ-χολικού άλατος (sodium deoxycholate), μείγμα αναστολέων πρωτεασών (protease inhibitor cocktail set I, Calbiochem/Merck) και αναστολείς φωσφατασών (phosphatase inhibitors PhosSTOP, Roche Life Science). Τα ομογενοποιήματα των ιστών αφέθηκαν να λυθούν στους 4 °C σε έναν περιστρεφόμενο κύλινδρο για πλαστικούς σωλήνες αντιδράσεων (tube roller), για 4-6 h. Στη συνέχεια τα ομογενοποιήματα φυγοκεντρήθηκαν στα 1300 g στους 4 °C για 5 min, και στη συνέχεια συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα. Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω μίας τροποποιημένης χημικής δοκιμής κατά Lowry, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (DC Protein assay from Bio-Rad).

Οι πρωτεΐνες προς διερεύνηση διαχωρίστηκαν μέσω ηλεκτροφόρησης πηκτώματος πολυακρυλαμίδης, 10% ή 12% (w/v), υπό αποδιατακτικές συνθήκες παρουσία SDS (sodium dodecyl sulfate, θειικό δωδεκυλικό νάτριο) (SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE). Στη συνέχεια, οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Porablot nitrocellulose, Macheray-Nagel). Η κάλυψη των μη ειδικών θέσεων (blocking) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διαλύματος 5% αποβουτυρωμένου γάλακτος (non-fat milk, Regilait milk powder) σε ρυθμιστικό διάλυμα TBST το οποίο περιέχει: 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20, για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου (room temperature, RT), ακολουθούμενη από ολονύκτια (overnight, O-N) επώαση στους 4 °C, με τα πρωτογενή αντισώματα (primary antibodies) (βλ. **Πιν.1**). Η επώαση με τα κατάλληλα δευτερογενή αντισώματα (secondary antibodies) συζευγμένα με HRP (HRP-conjugated) (βλ. **Πιν.2**) πραγματοποιήθηκε για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου. Τα πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα διαλύθηκαν σε 2,5% (w/v) αποβουτηρωμένο γάλα σε TBST. Μετά την επώαση των δεύτερων αντισωμάτων ακολούθησαν 3 πλύσεις των 5 min έκαστη σε TBST. Οι πρωτεϊνικές ζώνες ανιχνεύθηκαν μέσω υποστρώματος ενισχυμένης χημειοφωταύγιας (enhanced chemiluminescence substrate, ECL) που περιέχει: 1,25 mM Luminol, 198 μM Coumaric acid και 0,0096% (v/v) H₂O₂ σε 50 mM Tris-HCl pH 8.8. Η χημειοφωταύγια αποτυπώθηκε σε φιλμ αυτοραδιογραφίας (X-Ray) (Ultra Cruz 13 cm x 18 cm, Kodak) και η εμφάνιση έγινε με υγρά εμφάνισης XR developer και XR fixer της Kodak.

Η πυκνομετρική ανάλυση (densitometric analysis) των πρωτεϊνικών ζωνών και η κανονικοποίησή τους σε σχέση με μία πρωτεΐνη αναφοράς που χρησιμοποιείται για έλεγχο φόρτωσης (protein loading control), β-tubulin ή την πρωτεΐνη GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης), πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού ImageJ (NIH) (RRID:SCR_003070). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν 3 φορές (n=3), εκτός εάν αναφέρεται διαφορετικά, χρησιμοποιώντας πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (protein lysates) προερχόμενα από 3 ζώα τα οποία αντιστοιχούν στην κάθε πειραματική ομάδα. Τα ποσοτικά δεδομένα αποτυπώνονται ως μέσες τιμές και οι γραμμές σφαλμάτων (error bars) αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (Standard error of the mean, SEM).

2.10. Καλλιέργεια νευρικών στελεχιαίων (βλαστικών) κυττάρων

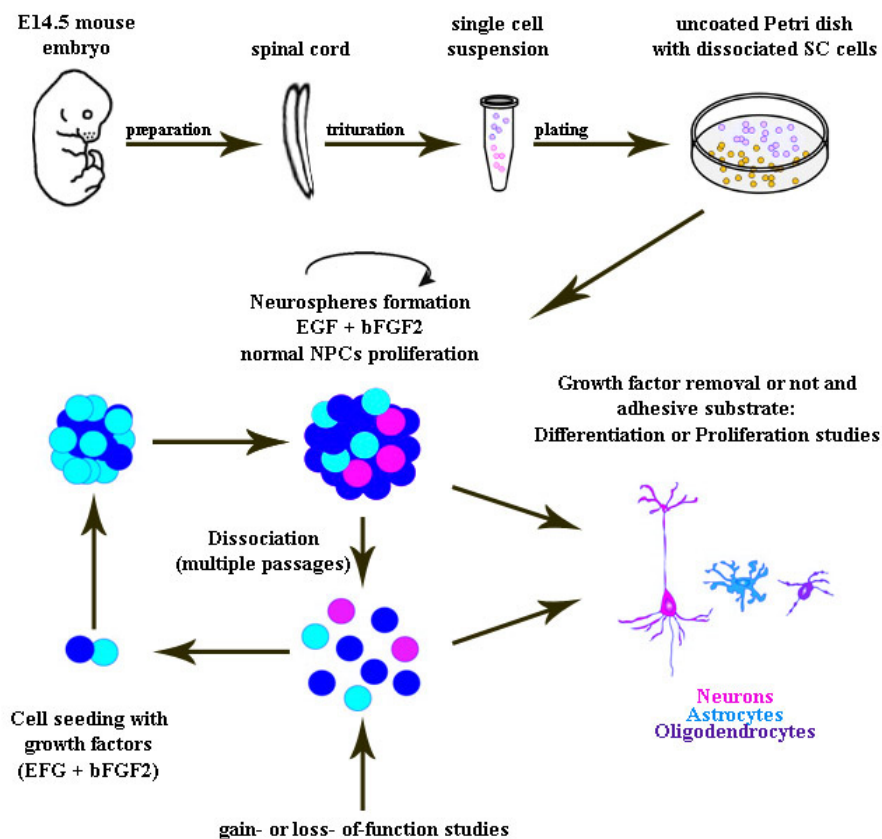
Προκειμένου να διερευνηθεί η έκφραση της κινάσης Dyrk1B στον εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του ποντικού, μία προσέγγιση που ακολουθήθηκε ήταν η καλλιέργεια νευρικών στελεχιαίων (βλαστικών) κυττάρων (neural stem cells, NSCs) προερχόμενων από αναπτυσσόμενους νωτιαίους μυελούς εμβρύων ποντικών (**Εικ. 2.6**).

1. Το πρωτόκολλο εφαρμόστηκε όπως έχει προηγουμένως περιγραφεί [248,254], με κάποιες τροποποιήσεις. Αρχικά πραγματοποιείται εξαγωγή των νωτιαίων μυελών από έμβρυα ποντικών

ηλικίας E14.5, οι οποίοι στη συνέχεια φυλάσσονται σε παγωμένο 1X PBS και ακολουθεί μεταφορά τους σε παγωμένο ρυθμιστικό διάλυμα HBSS 1X που περιέχει CaCl_2 και MgCl_2 (Gibco). Ακολουθεί απομάκρυνση του διαλύματος HBSS και τοποθέτηση του ιστού σε θρεπτικό διάλυμα DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) με 4,5 g/L D-γλυκόζη (Gibco) με 1% (v/v) πενικιλίνη (100 units/ml) και στρεπτομυκίνη (100 µg/ml) (Pen/Strep) (SIGMA), χωρίς ορό FBS (fetal bovine serum, ορός εμβρύου βοδιού) (Gibco).

2. Ακολουθεί η μηχανική κονιοποίηση (trituration) του ιστού για τον διαχωρισμό (dissociation) των κυττάρων με γυάλινα μικροσιφώνια (πιπέττες) Pasteur τα οποία έχουν κατεργασθεί με φλόγα για τη ρύθμιση της διαμέτρου των άκρων έγχυσης τους με 3 διαδοχικές διαφορετικές διαμέτρους, με διαδοχική χρησιμοποίηση τους από την μεγαλύτερη προς την μικρότερη. Η διαδικασία αυτή ολοκληρώνεται μετά από 10 επαναλήψεις επαναροφήσεων (up and down) ή έως ότου το εναιώρημα να καταστεί ομοιογενές. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται διοχέτευση του εναιωρήματος από ηθμό διαμέτρου πόρων 70 µm για κατακράτηση χονδροειδών σωματιδίων-θραυσμάτων (debris). Να τονισθεί ότι για την εξαγωγή των NSCs επεξεργάστηκαν μαζί νωπιαίοι μυελοί προερχόμενοι από 10 έμβρυα.

3. Το προκύψαν εναιώρημα φυγοκεντρείται στις 830 rpm /5 min, σε θερμοκρασία δωματίου (RT) και αφού απορριφθεί το υπερκείμενο, πραγματοποιείται αναδιάλυση του ιζήματος στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας, χωρίς ορό, το οποίο περιέχει σε αναλογία 1:1 DMEM με 4,5 g/L D-γλυκόζη και F-12 (Gibco), με Pen/Strep, πηγή L-γλουταμίνης (glutamax 1X) (Gibco), συμπλήρωμα B-27 (1 ml/50 ml medium) (Gibco), ινσουλίνη (20 µg/ml) (Gibco), ανασυνδυασμένο ανθρώπινο βασικό αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών (recombinant human basic fibroblast growth factor, bFGF – 20 ng/ml) (R&D Systems) και επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (epidermal growth factor, EGF – 20 ng/ml) (R&D Systems).



Εικόνα 2.6. Σχηματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου της καλλιέργειας νευρικών βλαστικών κυττάρων και του σχηματισμού νευροσφαιρών. Παρουσιάζονται συνοπτικά τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την παραγωγή νευροσφαιρών προερχόμενων από νωτιαίους μυελούς εμβρύων ποντικού ηλικίας E14.5 για τη περεταίρω χρήση τους. Αρχικά απομόνωση του νωτιαίου μυελού (spinal cord), κονιοποίηση του (trituration) και επίστρωση (plating) μονήρων κυττάρων (single cells) σε τρυβλία (dishes). Ακολουθεί η ανάπτυξη νευροσφαιρών σε θρεπτικό με τους κατάλληλους νευροτροφικούς παράγοντες (EGF, bFGF) και περεταίρω χρήση τους δυναμικά για άλλες εφαρμογές, όπως μελέτες GOF ή LOF και /ή η διαφοροποίηση των μονήρων νευρικών βλαστικών κυττάρων (σχεδιασμός N. Κοκκοράκη).

Πέρασμα (passage) κυτταροκαλλιιεργειών: Το πέρασμα πραγματοποιείται κάθε 5-7 ημέρες. Οι αναπτυσσόμενες αιωρούμενες (floating) νευρόσφαιρες, αφού συλλεχθούν με φυγοκέντρηση στις 830 rpm /7 min, σε θερμοκρασία δωματίου, υπόκεινται σε κατεργασία με 0,5% (w/v) θρυψίνη (trypsin) /EDTA (Gibco) στους 37 °C, 3-5 min, με συνακόλουθη την ενζυμική απενεργοποίησή της με 1 ml θρεπτικού διαλύματος DMEM/Pen/Step/FBS. Ακολουθεί ήπια κονιοποίηση των κυττάρων με γυάλινα μικροσιφώνια Pasteur κατεργασμένα σε φλόγα (βλ. παραπάνω) και φυγοκέντρηση, 830 rpm /5 min, σε θερμοκρασία δωματίου, για συλλογή του ιζήματος το οποίο και επαναδιαλύεται σε φρέσκο

θρεπτικό υλικό καλλιέργειας. Έγιναν 3 περάσματα κυττάρων προτού χρησιμοποιηθούν περαιτέρω για την ανοσοκυτταροχημική ανάλυση (immunocytochemistry, ICC).

Επίστρωση νευροσφαιρών σε καλυπτρίδες για ανάλυση ICC: Μετά το 3^ο πέρασμα επιστρώνονται $6-7 \times 10^4$ κύτταρα ανά φρεάτιο σε πλάκες 24 φρεατίων (24-well plates). Την 9η ημέρα καλλιέργειας (*Days in vitro*, DIV) (θεωρώντας ως την ημέρα στρωσίματος των κατεργασμένων με τρυψίνη κυττάρων ως DIV0) οι νευρόσφαιρες μεταφέρονται πάνω σε κυκλικές καλυπτρίδες διαμέτρου 10 mm, επιστρωμένες με πολύ-l-λυσίνη (poly-l-lysine, PLL, 100 µg/mL) (SIGMA) ώστε να αγκιστρωθούν μαζί με 100 µl του θρεπτικού υλικού NSC, σε φρεάτια πλακών 24 φρεατίων. Επώάζονται για 24 h στους 37 °C /5% CO₂. Την DIV10 μονιμοποιούνται με επώαση σε διάλυμα PFA (paraformaldehyde, παραφορμαλδεΰδη) 4% (w/v) για 20 min. Ακολουθούν 3 πλύσεις με διάλυμα 1X PBS και στη συνέχεια ακολουθείται το πρωτόκολλο της ανοσοκυτταροχημείας (ICC).

2.11. Προετοιμασία ιστών

Τα έμβρυα κοτόπουλου και ποντικού συλλέχθηκαν και μονιμοποιήθηκαν O/N στους 4 °C με 4% (w/v) PFA σε διάλυμα 1X PBS pH 7.4. Ενήλικα έγγυα ποντίκια υποβλήθηκαν σε ευθανασία με εισπνοή περίσσειας ισοφλουρανίου (isoflurane) και σε διακαρδιακή διάχυση (transcardial perfusion) με διάλυμα 1X PBS και στη συνέχεια με διάλυμα 4% (w/v) PFA. Οι απομονωμένοι εγκεφαλοι και νωτιαίοι μυελοί από έμβρυα κοτόπουλου ή ποντικού στη συνέχεια πλύθηκαν 3 φορές με διάλυμα 1X PBS και ακολούθησε το πρωτόκολλο της κρυοπροστασίας τους για 16 h μέχρι 2 d, στους 4 °C, σε διάλυμα 20% (w/v) σακχαρόζης (σουκρόζη, sucrose) σε 1X PBS για τα έμβρυα κοτόπουλου ή 30% για τους ιστούς ποντικών, αντίστοιχα, έως ότου επέλθει οσμωτική ισορροπία. Οι ιστοί στη συνέχεια εγκλείστηκαν σε υλικό για τη βέλτιστη θερμοκρασία κοπής (optimal cutting temperature, OCT, VWR Chemicals), ψύχθηκαν τουλάχιστον στους -22 °C, κόπηκαν με πάχος 20 µm σε κρυοστάτη (Leica CM1900) και επεξεργάστηκαν για ανοσολογικές χρώσεις (immunostaining) ή RNA *in situ* υβριδισμό (RNA *in situ* hybridization, ISH). Σειριακές τομές τοποθετήθηκαν σε παρακείμενες αντικειμενοφόρους πλάκες (adjacent slides) επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο ανοσοϊστοχημεία (IHC) ή *in situ* hybridization (ISH) στο ίδιο κεφαλο-ουριαίο επίπεδο (rostral-caudal level).

2.12. Ανοσοϊστοχημεία (immunohistochemistry, IHC)

Οι κρυοτομές εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού του κοτόπουλου και του ποντικού υποβλήθηκαν σε διαδικασία ανάκτησης-αποκάλυψης αντιγονικών επιτόπων (antigen retrieval) με τη

διαμεσολάβηση θέρμανσης. Αυτό πραγματοποιήθηκε με την επώαση των αντικειμενοφόρων πλακών σε 10 mM διαλύματος κιτρικού νατρίου (sodium citrate) pH 6.0 για 30 min στους 70 °C. Ύστερα από την πλύση των πλακών με τις κρουτομές 3 φορές για 10 min με 1X PBS, αυτές υποβλήθηκαν σε κάλυψη των μη ειδικών θέσεων (blocking) με 5% (w/v) φυσιολογικό ορό γαϊδάρου (normal donkey serum, NDS) που περιέχει: 0,1% (v/v) Triton X-100 σε διάλυμα 1X PBS για τους ιστούς κοτόπουλου ή 0,2% (v/v) για τους ιστούς ποντικού, αντίστοιχα, για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Τα πρωτογενή αντισώματα (βλ. **Πιν.1**) διαλύθηκαν σε διάλυμα 2,5% NDS που περιέχει: 0,05% (v/v) Triton X-100 σε 1X PBS, για τους ιστούς κοτόπουλου ή 0,1% (v/v) για τους ιστούς ποντικού και οι κρουτομές επωάστηκαν O-N στους 4 °C. Κατόπιν, οι κρουτομές επωάστηκαν με τα κατάλληλα δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με φθοριοχρώματα 488 nm, 546 (ή 543 ή 555) nm και 647 nm (βλ. **Πιν.2**) για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου. Οι πυρήνες των κυττάρων σημάνθηκαν με TO-PRO-3 και /ή Hoechst (Molecular Probes, Invitrogen). Τα προς εξέταση δείγματα στις αντικειμενοφόρους πλάκες εγκλείονται με τις καλυπτρίδες με το διάλυμα του αντιδραστήριου MOWIOL 488 (Calbiochem), το οποίο και παρασκευάζεται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Οι ψηφιακές εικόνες της IHC ελήφθησαν πραγματοποιώντας συνεστιακή μικροσκοπία με τη χρήση των συνεστιακών μικροσκοπιών Leica TCS SP5II και Leica TCS SP8 και οι εικόνες αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό ImageJ (NIH) (RRID:SCR_003070). Όπου χρειάστηκε στατιστική ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε με τη χρήση τουλάχιστον n=12 τομών, οι οποίες ελήφθησαν από 4 ζώα που αντιστοιχούν σε κάθε πειραματική ομάδα. Η κανονικοποίηση των αριθμών κυττάρων έγινε σε σχέση με τα συνολικά GFP⁺ κύτταρα ή το συνολικό αριθμό πυρήνων. Τα ποσοτικά δεδομένα αποτυπώνονται ως μέσες τιμές και οι γραμμές σφαλμάτων (error bars) αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (Standard error of the mean, SEM).

2.13. Ανοσοκυτταροχημεία (immunocytochemistry, ICC)

Ύστερα από την μονιμοποίηση με διάλυμα 4% (w/v) PFA σε 1X PBS pH 7.4. και πλύση με διάλυμα 1X PBS των κυκλικών καλυπτρίδων στις οποίες έχουν αγκιστρωθεί οι αναπτυσσόμενες νευρόσφαιρες, αυτές υποβλήθηκαν σε κάλυψη των μη ειδικών θέσεων (blocking) με 5% φυσιολογικό ορό γαϊδάρου (normal donkey serum, NDS) που περιέχει: 0,1% (v/v) Triton X-100 σε 1X PBS, για 30 min μέχρι 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Τα πρωτογενή αντισώματα (βλ. **Πιν.1**) διαλύθηκαν σε διάλυμα 2,5% NDS που περιέχει: 0,05% (v/v) Triton X-100 σε 1X PBS, και οι καλυπτρίδες επωάστηκαν O-N στους 4 °C. Κατόπιν, οι καλυπτρίδες επωάστηκαν με τα κατάλληλα δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με φθοριοχρώματα 488 nm, 546 (ή 543 ή 555) nm και 647 nm (βλ. **Πιν.2**) για 1-2 h σε θερμοκρασία δωματίου. Οι πυρήνες των κυττάρων σημάνθηκαν με DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) το οποίο περιεχόταν σε ειδικό υλικό εγκλεισμού (EverBrite Hardset Mounting

Medium with DAPI, Biotium, 23004), το οποίο και χρησιμοποιήθηκε για τον εγκλεισμό των καλυπτρίδων και των αντικειμενοφόρων πλακών με τα προς εξέταση δείγματα.

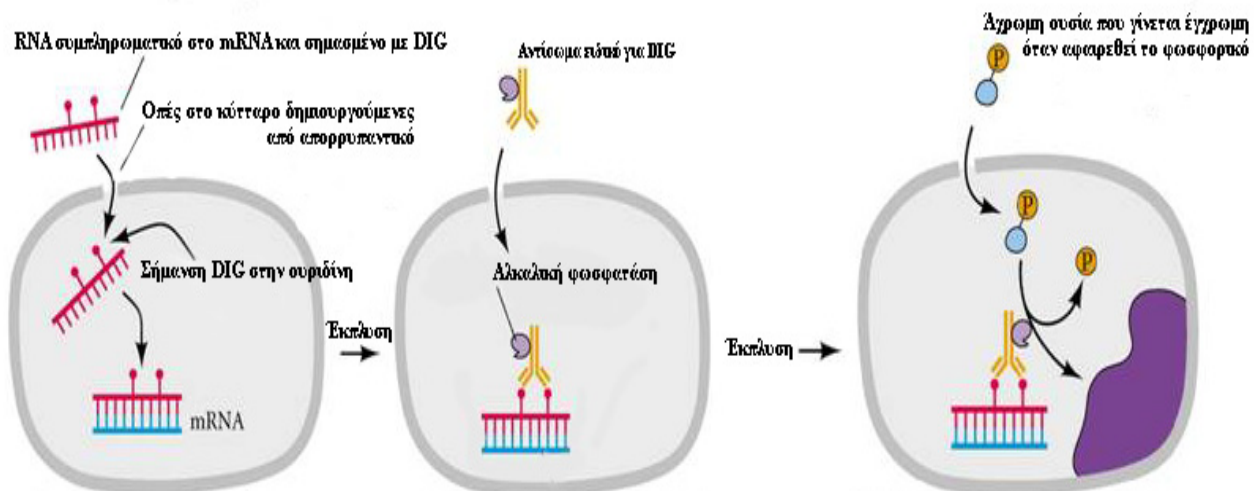
Οι ψηφιακές εικόνες της IHC ελήφθησαν πραγματοποιώντας συνεστιακή μικροσκοπία με τη χρήση του συνεστιακού μικροσκοπίου Leica TCS SP8 και οι εικόνες αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό ImageJ (NIH) (RRID:SCR_003070).

2.14. *In situ* υβριδισμός (*In situ* hybridization, ISH)

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις μονιμοποιημένες σε 4% (w/v) PFA κρυστομές επώασθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα προ-υβριδισμού (pre-hybridization buffer) που περιέχει: 50% απιονισμένη φορμαμίδη (deionized formamide), 5X ρυθμιστικό διάλυμα SSC, 5X διάλυμα Denhardt's (50X, Invitrogen), 250 µg/ml t-RNA ζύμης (Roche Life Science), and 500 µg DNA σπέρματος ψαριού (fish sperm DNA) (Roche Life Science) σε ένα θάλαμο με υγρασία που περιείχε: 5X SSC για 3-4 h στους 65 °C. Το διάλυμα 20X SSC (pH 7.0) που παρασκευάζεται ως απόθεμα (stock) περιέχει: 3 M NaCl και 341,78 mM κιτρικό νάτριο. Ο μη ραδιενεργός *in situ* υβριδισμός (*in situ* hybridization, ISH) πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού (hybridization buffer) το οποίο είναι το ίδιο σε σύσταση με το διάλυμα προ-υβριδισμού περιέχοντας επιπλέον ιχνηθέτες RNA (riboprobes) σημασμένους με το μόριο DIG (digoxygenin, διγοξινείνη) (**Εικ. 2.7**). Το διάλυμα υβριδισμού που περιέχει τον ιχνηθέτη RNA πριν χρησιμοποιηθεί, είχε επωασθεί στους 85 °C για 5 min για την αποδιάταξη (denaturation) των μορίων RNA. Ο υβριδισμός πραγματοποιήθηκε στους 65 °C O-N. Την επομένη ημέρα, οι πλάκες πλένονται με διάλυμα 0,2X SSC για 2 φορές επί 30 min στους 65 °C, 0,2X SSC για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (RT) και με το ρυθμιστικό διάλυμα B1 (0,1 M Tris /HCl, pH 7.5 and 0,15 M NaCl) για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η κάλυψη των μη ειδικών θέσεων (blocking) στις τομές πραγματοποιήθηκε με το διάλυμα B1 που περιείχε 10% (w/v) φυσιολογικό ορό γαϊδάρου (normal donkey serum, NDS) για 1 h, σε θερμοκρασία δωματίου, προτού αυτές επωασθούν με το αντίσωμα έναντι του μορίου DIG, συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση (anti-DIG alkaline phosphatase – AP conjugate) (βλ. Τμήμα «Αντισώματα», και **Πιν.1** και **Πιν.2**) σε διάλυμα B1 που περιείχε, επίσης, 1% (w/v) NDS, στους 4° C O-N. Την επόμενη ημέρα, οι πλάκες πλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα B1 για 2 φορές επί 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (RT) και ύστερα με το B3 (0,1 M Tris /HCl, pH 7.5, 0,1 M NaCl, and 50 mM MgCl₂) για 2 φορές επί 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, οι πλάκες επώασθηκαν με το ρυθμιστικό διάλυμα της αλκαλικής φωσφατάσης (AP) (100 mM Tris /HCl, pH 9.5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20 και 1 mM levamisole) για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανάπτυξη της χρωματικής αντίδρασης άρχισε με την προσθήκη διαλυματος AP στο οποίο είχαν προστεθεί 10 µl/ml NBT/BCIP (Roche Life Science) και από την οποία θα παραγόταν ως τελικό προϊόν η αδιάλυτη μπλε-μωβ χρωστική NBT formazan. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου

για διάφορες ώρες έως Ο/Ν. Η χρωματική αντίδραση διακόπηκε πλένοντας τις αντικειμενοφόρους πλάκες με 1X PBS. Στη συνέχεια οι τομές εγκλείονται με το υλικό DPX (Sigma-Aldrich). Οι ψηφιακές φωτογραφίες αποκτήθηκαν πραγματοποιώντας μικροσκοπία διαδιδόμενου φωτεινού πεδίου (transmitted light-bright field microscopy). Στα μικροσκόπια ZEISS Axiovert 200 (ZEISS) και Leica TCS SP8 (LEICA microsystems). Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες από αναπαράγόμενα αποτελέσματα.

Η σύνθεση των ιχνηθετών RNA από το αντίστοιχα πλασμίδια pBluescript II KS (βλ. παραπάνω) και η σήμανσή τους με το μόριο DIG πραγματοποιήθηκε όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως [247,248,250] και επιπλέον με τη χρήση του DIG RNA labeling mix 10X (Roche) και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Επίσης, για τη σύνθεση ιχνηθετών χρησιμοποιήθηκαν DTT (dithiothreitol, διθειοθρεϊτόλη) (Promega), ο αναστολέας RNAsών RNasin (Roche) και οι T3 και T7 RNA πολυμεράσες (Promega) με το ρυθμιστικό διάλυμα Transcription Optimized 5X Buffer (Promega), καθώς και DNase I (RNase-free) (Clontech TaKaRa). Ως ιχνηθέτες για κάθε mRNA προς διερεύνηση χρησιμοποιούνται οι αντι-νοηματικές (anti-sense) αλληλουχίες, ενώ η νοηματικές (sense) έχουν χρησιμοποιηθεί μόνο για έλεγχο (control).



Εικόνα 2.7. Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής του RNA επιτόπιου (*in situ*) υβριδισμού σε ένα κύτταρο του προς μελέτη ιστού. (Προσαρμοσμένο από: Ιστοσελίδα του Rice University, Institute of Biosciences and Bioengineering, url: http://www.bioc.rice.edu/bios576/gene_exp/Lane1.html, ημερομηνία: 9/2016).

2.15. Αντισώματα

Όλα τα πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται παρακάτω στους **Πιν.1** και **Πιν.2**, αντίστοιχα

Πίνακας 1. Πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία						
No	Όνομα πρωτεΐνης έναντι της οποίας παράχθηκε	Ξενιστής & Κλωνικότητα	Εφαρμογή & Αραίωση	Παρασκευαστής	No καταλόγου	RRID
1	β-tubulin (H-235)	κουνέλι πολυκλωνικό	WB/ 1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-9104	AB_2241191
2	βIII-tubulin (TuJ1 clone)	ποντικός μονοκλωνικό	IHC/1:500	BioLegend	801202	AB_10063408
3	5'Bromo-2'deoxyuridine (BrdU) (Bu20A)	ποντικός μονοκλωνικό	IHC/1:200	Santa Cruz Biotechnology	sc-20045	AB_626767
4	Chx10	πρόβατο πολυκλωνικό	IHC/1:250	Millipore	AB9016	AB_2216009
5	Cleaved Caspase 3 (Asp175) (Casp3)	κουνέλι πολυκλωνικό	IHC/1:200	Cell Signaling Technology	9661	AB_2341188
6	Digoxigenin (DIG) alkaline phosphatase (AP) conjugate	πρόβατο πολυκλωνικό	ISH/1:1000	Roche	11093274910	AB_514497
7	Doublecortin (DCX) (N-19)	κατσίκα πολυκλωνικό	IHC/1:50	Santa Cruz Biotechnology	sc-8067	AB_2088491
8	Dyrk1A	κουνέλι πολυκλωνικό	IHC/1:100	Cell Signaling Technology	2771	AB_915851
9	Dyrk1B	κουνέλι μονοκλωνικό	WB/ 1:1000 IHC/1:100, ICC/1:50	Abcam	ab124960	AB_10972162
10	FOXA2 [HNF-3β (M-20)]	ποντικός μονοκλωνικό	WB/ 1:500	Santa Cruz Biotechnology	sc-365062	AB_1124660
11	FOXA2 [HNF-3β (M-20)]	κατσίκα πολυκλωνικό	IHC/1:50	Santa Cruz Biotechnology	sc-6554	AB_2262810
12	FoxP1 (C-terminal)	κουνέλι πολυκλωνικό	IHC/1:100	Abcam	ab227788	---
13	GAPDH (G-9)	ποντικός μονοκλωνικό	WB/ 1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-365062	AB_10847862
14	GFAP	ποντικός μονοκλωνικό	IHC/1:300 ICC/1:100	Sigma-Aldrich	G3893	AB_477010
15	GFP	κοτόπουλο πολυκλωνικό	IHC/1:500	Thermo Fisher Scientific	A10262	AB_2534023
16	GFP	κοτόπουλο πολυκλωνικό	IHC/1:600	Abcam	ab13970	AB_300798
17	GLI3	κουνέλι πολυκλωνικό	WB/ 1:1000	Novus Biologicals	NBP2-29627	---
18	HB9/MNR2	ποντικός μονοκλωνικό	IHC/1:50	DSHB	81.5C10	AB_2145209
19	Islet1/2	ποντικός μονοκλωνικό	IHC/1:50	DSHB	39.4D5	AB_2314683
20	Ki-67	κατσίκα πολυκλωνικό	sc-7846	Santa Cruz Biotechnology	sc-7846	AB_2142374
21	Lim3 (Lhx3)	κουνέλι πολυκλωνικό	IHC/1:250	Thermo Fisher Scientific	PA1-29491	AB_2135675
22	Nestin	ποντικός μονοκλωνικό	IHC/1:100 ICC/1:50	Millipore	MAB353	AB_94911

23	Nestin	κοτόπουλο πολυκλωνικό	ICC/1:100	Novus Biologicals	NB100-1604	AB_2282642
24	NeuN	ποντικός μονοκλωνικό	IHC/1:300	Millipore	MAB377	AB_2298772
25	Nkx2.2	κουνέλι πολυκλωνικό	WB/ 1:1000	Abcam	ab272915	AB_3083753
26	Nkx2.2	ποντικός μονοκλωνικό	IHC/1:50	DSHB	74.5A5	AB_531794
27	Nkx6.1	ποντικός μονοκλωνικό	IHC/1:50	DSHB	F55A10	AB_532378
28	Olig2	κουνέλι πολυκλωνικό	IHC/1:200	Millipore	AB9610	AB_570666
29	Pax3	ποντικός μονοκλωνικό	IHC/1:50	DSHB	---	AB_528426
30	phospho-Histone H3 (Ser10) (PH3)	κουνέλι πολυκλωνικό	IHC/1:200	Millipore	06-570	AB_310177
31	Shh	ποντικός μονοκλωνικό	IHC/1:50	DSHB	5E1	AB_528466
32	Sox2 (Y-17)	κατσίκα πολυκλωνικό	IHC/1:200 ICC/1:100	Santa Cruz Biotechnology	sc-17320	AB_2286684

Πίνακας 2. Δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία

No	Ζώο έναντι του οποίου παράχθηκε /σύζευγμα	Ξενιστής & Κλωνικότητα	Εφαρμογή & Αραίωση	Παρασκευαστής	No καταλόγου	RRID
1	κοτόπουλο Alexa-Fluor 488	γάιδαρος πολυκλωνικό	IHC/ 1:500	Jackson ImmunoResearch Labs	703-545-155	AB_2340375
2	κουνέλι CF488A	γάιδαρος πολυκλωνικό	IHC/ 1:500	Biotium	20015	AB_10559669
3	κουνέλι CF555	γάιδαρος πολυκλωνικό	IHC/ 1:500	Biotium	20038	AB_10558011
4	κουνέλι Alexa-Fluor 647	γάιδαρος πολυκλωνικό	IHC/ 1:500	Thermo Fisher Scientific	A-31573	AB_2536183
5	ποντικός CF488A	γάιδαρος πολυκλωνικό	IHC/ 1:500	Biotium	20014	AB_10561327
6	ποντικός CF543	γάιδαρος πολυκλωνικό	IHC/ 1:500	Biotium	20305	AB_2923245
7	ποντικός Alexa-Fluor 647	γάιδαρος πολυκλωνικό	IHC/ 1:500	Thermo Fisher Scientific	A-31571	AB_162542
9	κατσίκα Alexa-Fluor 546	γάιδαρος πολυκλωνικό	IHC/ 1:500	Thermo Fisher Scientific	A-11056	AB_2534103
10	κατσίκα Alexa-Fluor 647	γάιδαρος πολυκλωνικό	IHC/ 1:500	Thermo Fisher Scientific	A-21447	AB_2535864
11	πρόβατο Cy3	γάιδαρος πολυκλωνικό	IHC/ 1:500	Jackson ImmunoResearch Labs	713-165-147	AB_2315778
12	κουνέλι HRP	γάιδαρος πολυκλωνικό	WB/1:5000	Chemicon	AP182P	AB_92591
13	ποντικός HRP	γάιδαρος πολυκλωνικό	WB/1:2000	Chemicon	AP192P	AB_92658

2.16. Απομόνωση RNA, σύνθεση cDNA και ποσοτική RT-qPCR πραγματικού χρόνου

Το ολικό RNA που εξάχθηκε από το νωτιαίο μυελό (spinal cord, SC) εμβρύων κοτόπουλου ηλικίας E4 μέσω της μεθόδου της φαινόλης /χλωροφόρμιου (TRIzol reagent, Ambion /Life Technologies) και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, επώασθηκε στη συνέχεια με DNase I (Takara Bio) για την αποικοδόμηση του υπολειπόμενου DNA στο απομονωθέν κλάσμα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Χρησιμοποιήθηκε 1 µg ολικού RNA για τη σύνθεση cDNA χρησιμοποιώντας το σύστημα αντίστροφης μεταγραφής ImProm-II Reverse Transcription System (Promega) και ως εκκινητές τα ολιγομερή oligo (dT) (Clontech TaKaRa kit), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η ανάλυση μέσω της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε προϊόν αντίστροφης μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο (real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR) πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα Mini-Opticon Real-Time PCR System (Bio-Rad, Cat No CFD-3120) χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (Kapa Biosystems), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ανάλυση της σχετικής γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta C_t}$ και χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς την πρωτεΐνη GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης). Η ανάλυση RT-qPCR πραγματικού χρόνου εφαρμόστηκε σε 3 ανεξάρτητα πειράματα (n=3), χρησιμοποιώντας ομαδοποιημένα mRNAs (mRNA pools) από 3 έμβρυα κοτόπουλου που αντιστοιχούν σε κάθε πειραματική ομάδα, και σε επιπλέον τεχνικά τριπλότυπα (triplicates). Τα δεδομένα της σχετικής γονιδιακής έκφρασης παρουσιάστηκαν ως η μέση τιμή των τριπλότυπων τιμών, οι οποίες αποκτήθηκαν από τα 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι γραμμές σφαλμάτων (error bars) αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (Standard error of the mean, SEM). Οι εκκινητές (primers) οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: FOR cSHH: 5'-CAAAGCAGAAACTCAGTGGCA-3' και REV cSHH: 5'-TGACGTAGAAGAGCTTTCGGG-3', FOR cGLI3: 5'-GCATGTGCCTTCTGCCTTATCTAG-3' και REV cGLI3: 5'-GGTCAAAGCTGTGATCAGATAGGG-3', FOR cGLI2: 5'-TGGCACAAGGAGTGCCGCAG-3' and REV cGLI2: 5'-GTACGTCACGGGGTTGATGGG-3' FOR cGAPDH: 5'-TCGGAGTCAACGGATTTGGC-3' και REV cGAPDH: 5'-GCCCATTTGATGTTGCTGGG-3'.

2.17. Στατιστική ανάλυση

Πριν την ανάλυση, η κανονικότητα (normality) των τιμών διαπιστώθηκε με το τεστ δοκιμασίας κανονικότητας Shapiro–Wilk (Shapiro–Wilk normality test), χρησιμοποιώντας το λογισμικό IBM SPSS Statistics for Windows Version 20.0 (RRID:SCR_019096). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση t-test άνισης διακύμανσης διπλής ουράς (two-tailed Unequal variance t-test, Welch t-test), ώστε να εκτιμηθεί η σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ 2 πειραματικών ομάδων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως οι μέσες τιμές των πειραμάτων που περιγράφηκαν παραπάνω σε κάθε τμήμα των «Υλικών και Μεθόδων» ± το τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (Standard error of the mean, SEM). Τιμές πιθανότητας $p \leq 0,05$ θεωρούνται ως στατιστικά σημαντικές (*, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Microsoft Excel 2013 (RRID:SCR_016137).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Διερεύνηση του αναπτυξιακού προτύπου έκφρασης της κινάσης Dyrk1B στο ΚΝΣ των σπονδυλωτών

Η επίτευξη του πρώτου στόχου της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση του αναπτυξιακού προτύπου έκφρασης της κινάσης Dyrk1B στο ΚΝΣ των σπονδυλωτών κατά την εμβρυογένεση, τη μεταγεννητική και ενήλικη ζωή, καθώς δεν είχε μελετηθεί πρωτύτερα η έκφραση της στο ΚΝΣ. Συγκεκριμένα, στόχος ήταν η διερεύνηση του αναπτυξιακού προτύπου έκφρασης της κινάσης Dyrk1B στο αναπτυσσόμενο ΚΝΣ του εμβρύου του ποντικού και του κοτόπουλου, καθώς και μεταγεννητικά έως το ώριμο άτομο στον ποντικό.

Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε, αρχικά, ανοσοϊστοχημική ανάλυση (immunohistochemistry, IHC) στον εμβρυϊκό εγκέφαλο ποντικού εμβρυϊκής ηλικίας E12.5, στον εγκέφαλο ποντικού μεταγεννητικής ηλικίας P7 και στον εγκέφαλο του ενήλικου ποντικού, με περαιτέρω ανάλυση στον ιππόκαμπο και την οδοντωτή έλικα, η οποία είναι νευρογεννητικός θώκος (neurogenic niche) όπου επιτελείται η ενήλικη νευρογένεση.

Στη συνέχεια, καθώς το κύριο σύστημα μελέτης της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι ο αναπτυσσόμενος εμβρυϊκός νωτιαίος μυελός (νευρικός σωλήνας) του κοτόπουλου, διερευνήθηκε, αρχικά, το αναπτυξιακό πρότυπο έκφρασης της κινάσης Dyrk1B στον αναπτυσσόμενο νωτιαίο μυελό του ποντικού, αρχικά σε καλλιέργεια νευροσφαιρών (neurospheres) προερχόμενη από εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό εμβρύου ποντικού ηλικίας E14.5 και στη συνέχεια στον αναπτυσσόμενο εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό ποντικού ηλικιών E9.5, E12.5 και E16.5, καλύπτοντας την αρχή και το πέρας της εμβρυϊκής νευρογένεσης. Επίσης, πραγματοποιήθηκε συμπληρωματική ανάλυση μέσω επιτόπιου RNA υβριδισμού (RNA *in situ* hybridization, ISH).

Στη συνέχεια, ακολούθησε ανάλυση του αναπτυξιακού προτύπου έκφρασης της κινάσης Dyrk1B στον αναπτυσσόμενο εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του κοτόπουλου. Καθώς, μέχρι σήμερα δεν έχει ολοκληρωθεί η αλληλούχιση του γονιδιώματος του κοτόπουλου και δεν έχει προσδιορισθεί η αλληλουχία του γονιδίου *cDyrk1B*, ακολούθησε κλωνοποίηση τμήματος της αλληλουχίας του cDNA του γονιδίου *cDyrk1B*, σύνθεση ειδικού ιχνηθέτη RNA και πραγματοποίηση επιτόπιου RNA υβριδισμού (RNA *in situ* hybridization). Τα προς ανάλυση αναπτυξιακά στάδια του εμβρυϊκού νωτιαίου μυελού του κοτόπουλου ήταν E3, E4 και E6 καλύπτοντας την αρχή της εμβρυϊκής νευρογένεσης και πιο όψιμα στάδιά της.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη του αναπτυξιακού προτύπου έκφρασης της κινάσης Dyrk1B μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western blot, WB) στο αναπτυσσόμενο εμβρυϊκό, καθώς και στο αναπτυσσόμενο εμβρυϊκό και μεταγεννητικό ΚΝΣ του κοτόπουλου και ποντικού, αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα της μελέτης του αναπτυξιακού προτύπου έκφρασης της κινάσης Dyrk1B αναφέρονται αναλυτικά παρακάτω.

3.1.1. Η κινάση Dyrk1B εκφράζεται στον φλοιό, στον ιππόκαμπο και στην παρεγκεφαλίδα του αναπτυσσόμενου και του ενήλικου εγκεφάλου του ποντικού και σηματοδοτεί την ενήλικη νευρογένεση

Η διερεύνηση του αναπτυξιακού προτύπου έκφρασης της κινάσης Dyrk1B πραγματοποιήθηκε αρχικά στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο ποντικού, στο εμβρυϊκό στάδιο (embryonic stage) E12.5 και σε μεταγεννητικό στάδιο (postnatal stage) P7, καθώς και στον ενήλικο εγκέφαλο, στη συνέχεια, μέσω ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης (immunohistochemistry, IHC) σε κρουτομές του εγκεφάλου του ποντικού. Παρατηρήθηκε ότι στο στάδιο E12.5 η κινάση Dyrk1B εκφράζεται ευρέως από τον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο (**Εικ. 3.1A**) με πιο έντονη την έκφρασή της από τους νευρώνες θετικούς για TuJ1 (β-III tubulin, β-III τουμπουλίνη, κλώνος αντισώματος TuJ1) στο φλοιό (CTX) (**Εικ. 3.1D**) και τα προγονικά κύτταρα θετικά για Nestin (νεστίνη) (**Εικ. 3.1B**) και GFAP (glial fibrillary acidic protein, γλοιακή ινώδης όξινη πρωτεΐνη) (**Εικ. 3.1C**) στην περιοχή του αρχέγονου οργάνου που θα αναπτυχθεί σε ιππόκαμπο (hippocampal primordium, HI).

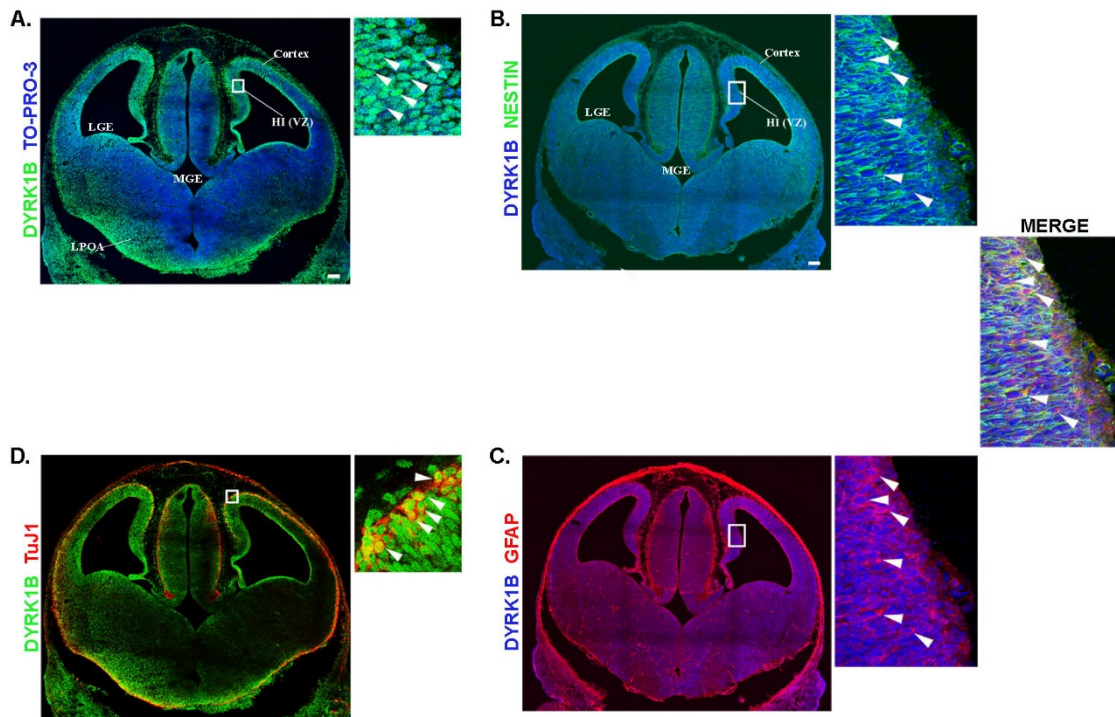
Στον εγκέφαλο του μεταγεννητικού σταδίου P7, η Dyrk1B εκφράζεται από νευρικά προγονικά κύτταρα θετικά για την πρωτεΐνη GFAP και το μεταγραφικό παράγοντα Sox2 (SRV-box transcription factor 2, μεταγραφικός παράγοντας 2 του πλαισίου SRY) (GFAP⁺/Sox2⁺), όπως και από μεταμιτωτικούς νευρώνες θετικούς για το αντιγόνο NeuN (neuronal nuclear antigen, νευρωνικό πυρηνικό αντιγόνο) (NeuN⁺) στο φλοιό (**Εικ. 3.2**). Επίσης, βρέθηκε ότι η κινάση Dyrk1B εκφράζεται έντονα από τα προγονικά κύτταρα GFAP⁺ /Sox2⁺ του πρόσθιου μεταναστευτικού μονοπατιού (rostral migratory stream, RMS) (**Εικ. 3.2**). Επιπροσθέτως, η Dyrk1B έχει ευρεία έκφραση στον ιππόκαμπο (hippocampus, HP) και στην οδοντωτή έλικα (dentate gyrus, DG), όπου εκφράζεται από προγονικά κύτταρα GFAP⁺ /Sox2⁺, καθώς και από μεταμιτωτικούς νευρώνες NeuN⁺ (**Εικ. 3.2**).

Στον εγκέφαλο ενήλικου ποντικού, 3 μηνών, η κινάση Dyrk1B εκφράζεται από εκτεταμένα από το φλοιό και από τον ιππόκαμπο και την οδοντωτή έλικα (**Εικ. 3.3A-C**). Συγκεκριμένα, στο φλοιό εκφράζεται από ώριμους νευρώνες TuJ1⁺ (**Εικ. 3.3B**). Για συγκριτικούς λόγους, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική διερεύνηση του προτύπου έκφρασης της κινάσης Dyrk1A που κωδικοποιείται από το παράλογο γονίδιο της Dyrk1B στον ενήλικο εγκέφαλο ποντικού. Δείχθηκε ότι η έκφραση της κινάσης Dyrk1A είναι επίσης εκτεταμένη στο φλοιό από ώριμους νευρώνες TuJ1⁺ (**Εικ. 3.3D**) και από τον ιππόκαμπο και την οδοντωτή έλικα (**Εικ. 3.3E**). Παρατηρήθηκε ότι η χρώση της κινάσης Dyrk1B είναι πυρηνική, καθώς αποτελεί μία πυρηνική κινάση, ενώ η χρώση της Dyrk1A είναι κυτταροπλασματική.

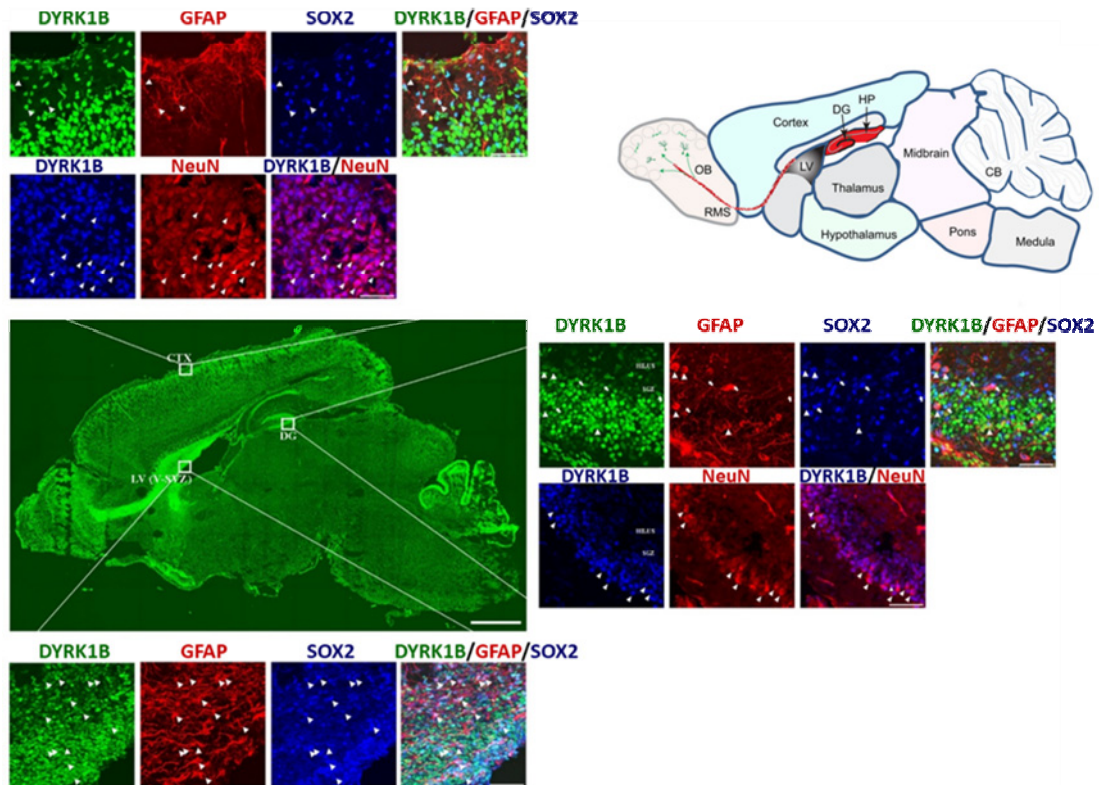
Διερευνήθηκε περαιτέρω η εκτεταμένη έκφραση της κινάσης Dyrk1B στον ιππόκαμπο του ενήλικου ποντικού (3 μηνών) και διαπιστώθηκε ότι εκφράζεται από την οδοντωτή έλικα, της οποίας η υποκοκκιώδης ζώνη (subgranular zone, SGZ) αποτελεί μία περιοχή όπου διατηρείται η

νευρογένεση (νευρογεννητική ζώνη, neurogenic zone) και κατά την ενήλικη ζωή [255]. Άλλη νευρογεννητική περιοχή του ενήλικου εγκεφάλου αποτελεί η υποκοιλιακή ζώνη (subventricular zone, SVZ) των πλευρικών κοιλιών [256]. Συγκεκριμένα, δείχθηκε ότι η κινάση Dyrk1B εκφράζεται από τα νευρικά προγονικά κύτταρα Τύπου 1 και Τύπου 2a (Type-1 /-2a) που είναι διπλά θετικά GFAP⁺ /Sox2⁺ (**Εικ. 3.4A**), τα νευρικά προγονικά κύτταρα Τύπου 2b (Type-2b), που είναι διπλά θετικά για Nestin (νεστίνη) και DCX (doublecortin, διπλοκορτίνη), Nestin⁺ /DCX⁺ στη ζώνη SGZ (**Εικ. 3.4B**), καθώς και μεταμιτωτικούς νευρώνες που εκφράζουν το δείκτη CR (calretinin, καλρετινίνη) (CR neurons) διπλά θετικών για NeuN και DCX (NeuN⁺ /DCX⁺) (**Εικ. 3.4C**) στην κοκκιώδη στιβάδα (granular layer, GL) [257].

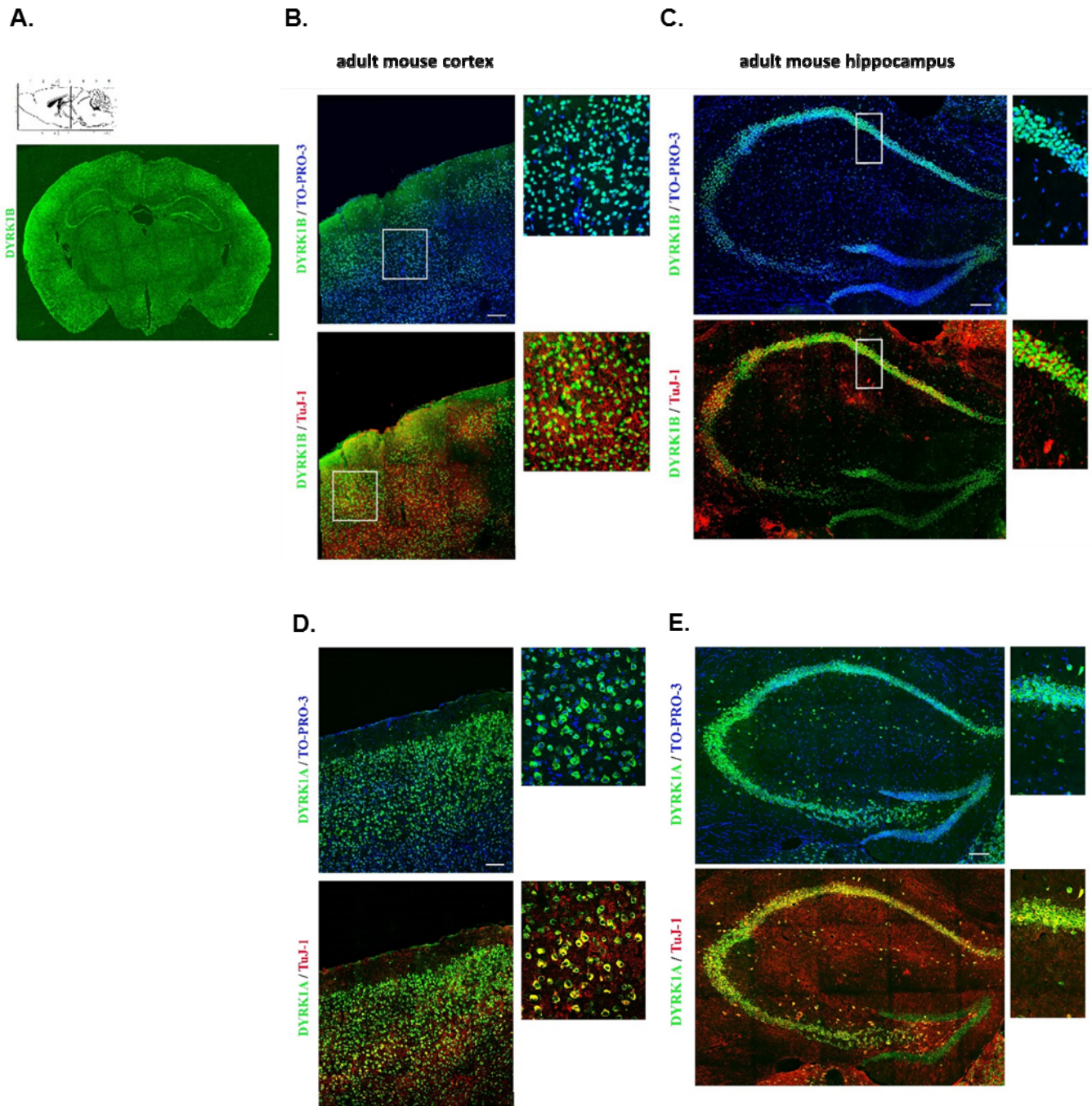
Ως συμπέρασμα, η κινάση Dyrk1B σηματοδοτεί τόσο την εμβρυϊκή, όσο και τη μεταγεννητική, δευτερογενή νευρογένεση, καθώς και την ενήλικη νευρογένεση, εκφραζόμενη από τα νευρικά βλαστικά /προγονικά κύτταρα (neural stem cells, neural precursor cells, NSCs/NPCs) και τους ώριμους μεταμιτωτικούς νευρώνες.



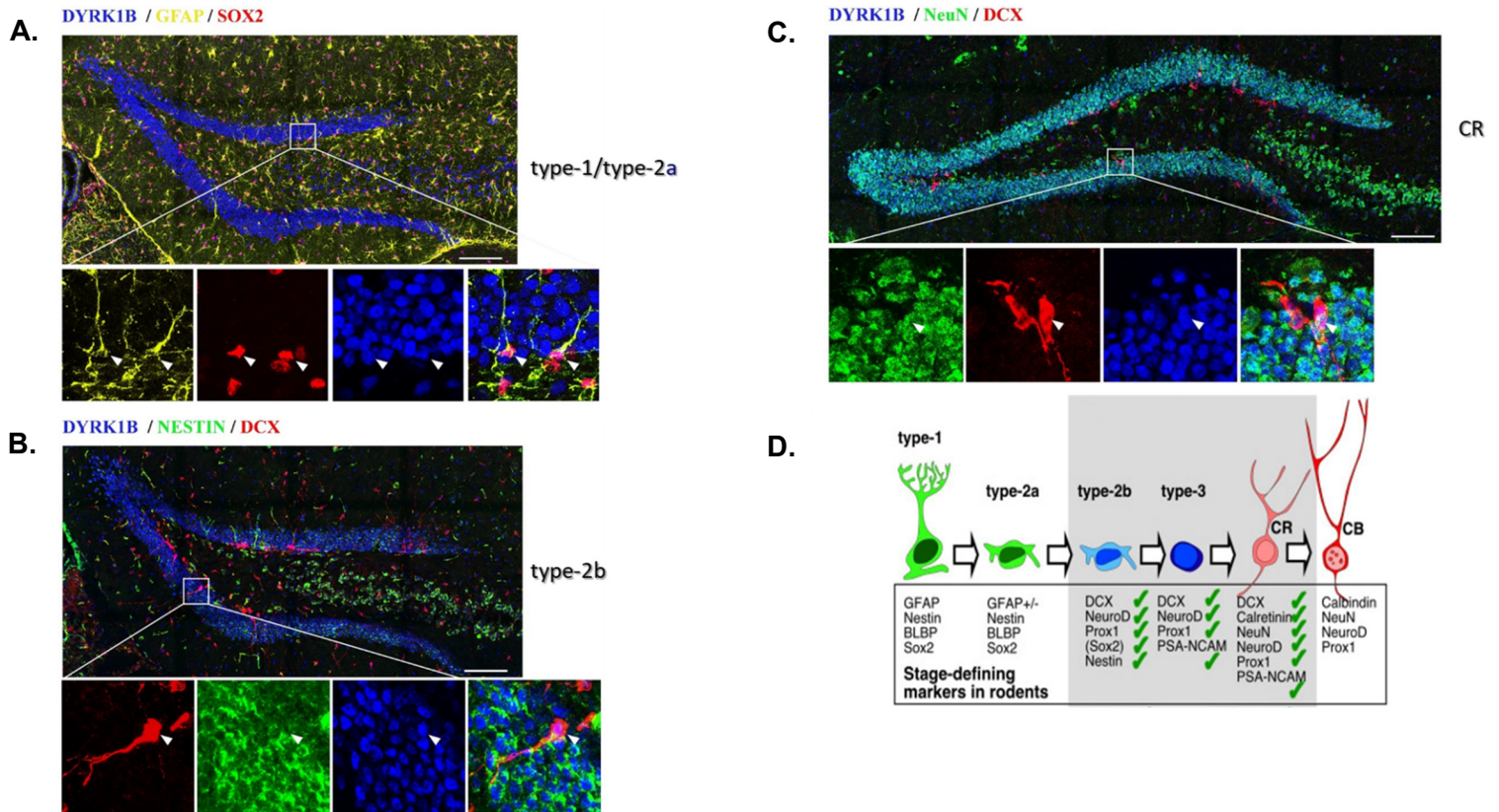
Εικόνα 3.1. Η έκφραση της Dyrk1B στον εμβρυϊκό εγκέφαλο ποντικού. Η κινάση Dyrk1B εκφράζεται ευρέως στον εμβρυϊκό εγκέφαλο ποντικού ηλικίας E12.5 (**A**), από νευρικά βλαστικά κύτταρα (neural stem cells, NSCs) (Dyrk1B⁺/Nestin⁺ και Dyrk1B⁺/GFAP⁺ κύτταρα) τα οποία υποδεικνύονται από λευκές κεφαλές βελών (**B, D**), καθώς και από νεογέννητους νευρώνες (Dyrk1B⁺/TuJ1⁺ κύτταρα) (κεφαλές βελών) (**C**). Η έκφραση της κινάσης Dyrk1B είναι πιο έντονη στο νευροεπιθήλιο του ιππόκαμπου (hippocampal neuroepithelium, primordium, HI) και στην πλευρική προ-οπτική περιοχή (lateral preoptic area, LPOA). Εγκάρσιες τομές. Ράβδοι κλίμακας (scale bars): 100 μm. (MGE: medial ganglionic eminence, έσω γαγγλιακή προεξοχή, LGE: lateral ganglionic eminence, πλευρική γαγγλιακή προεξοχή).



Εικόνα 3.2. Η έκφραση της κινάσης *Dyrk1B* στον εγκέφαλο ποντικού μεταγεννητικής ηλικίας P7. Η κινάση *Dyrk1B* εκφράζεται έντονα σε δύο νευρογεννητικούς θώκους (neurogenic niches) της δευτερογενούς νευρογένεσης, στην οδοντωτή έλικα (dentate gyrus, DG) και κατά μήκος της οδού που διατρέχει την υποκοιλιακή ζώνη (subventricular zone, SVZ), το πρόσθιο μεταναστευτικό μονοπάτι (rostral migratory stream, RMS) και τον οσφρητικό λοβό (olfactory bulb, OB) (SVZ-RMS-OB). Η κινάση *Dyrk1B* εκφράζεται από τα νευρικά βλαστικά κύτταρα (neural stem cells, NSCs) ($Dyrk1B^+/GFAP^+/SOX2^+$) και από τους μεταμιτωτικούς νευρώνες ($Dyrk1B^+/NeuN^+$) στο φλοιό cortex (CTX) (**πάνω πλαίσιο**). Παρατηρείται έντονη χρώση της κινάσης *Dyrk1B* στην οδοντωτή έλικα (DG), όπου εκφράζεται από νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs) ($Dyrk1B^+/GFAP^+/SOX2^+$) και από μεταμιτωτικούς νευρώνες ($Dyrk1B^+/NeuN^+$) (**δεξιό πλαίσιο**), καθώς και από τα NSCs στην υποκοιλιακή ζώνη (SVZ) ($Dyrk1B^+/GFAP^+/SOX2^+$) (**κάτω πλαίσιο**). Τα βέλη και οι κεφαλές βελών δείχνουν κύτταρα τα οποία συνεκφράζουν τις αναφερόμενες πρωτεΐνες. Επιμήκης τομή. Ράβδοι κλίμακας (scale bars): 1000 μm (ολόκληρη τομή), 50 μm (μεγεθύνσεις). Στη σχηματική αναπαράσταση (προσαρμοσμένη από [256]) του ενήλικου εγκεφάλου παρουσιάζονται, με κόκκινο χρώμα, οι οριοθετημένες περιοχές στις οποίες συντελείται η δευτερογενής νευρογένεση, η οδοντωτή έλικα (DG) στο σχηματισμό του ιππόκαμπου (hippocampal formation, HP), η υποκοιλιακή ζώνη (SVZ) που κείται στις πλευρικές κοιλίες (lateral ventricles, LV) και το πρόσθιο μεταναστευτικό μονοπάτι (RMS) μέχρι τον οσφρητικό λοβό (OB). Σημειωτέον, η κινάση *Dyrk1B* εκφράζεται, επίσης, έντονα στην παρεγκεφαλίδα (cerebellum, CB).



Εικόνα 3.3. Η έκφραση της κινάσης Dyrk1B στον ενήλικο εγκέφαλο ποντικού. Η κινάση Dyrk1B εκφράζεται ευρέως από ώριμους νευρώνες (TuJ1⁺) στον ενήλικο φλοιό (**A,B**) και πιο έντονα στον ιππόκαμπο (hippocampus, HP) και στην οδοντωτή έλικα (dentate gyrus, DG) (**B**). Επίσης, η έκφραση της κινάσης Dyrk1A είναι επίσης εκτεταμένη στο φλοιό από ώριμους νευρώνες (TuJ1⁺) (**3D**) και από τον ιππόκαμπο (**3E**). Η χρώση της κινάσης Dyrk1B είναι πυρηνική, καθώς αποτελεί μία πυρηνική κινάση, ενώ η χρώση της Dyrk1A είναι κυτταροπλασματική. Εγκάρσιες τομές. Ράβδοι κλίμακας (scale bars): 100 μm . TO-PRO-3: Χρώση πυρήνων.



Εικόνα 3.4. Η κινάση Dyrk1B σηματοδοτεί την ενήλικη νευρογένεση στον ιππόκαμπο του ποντικού. Η κινάση Dyrk1B εκφράζεται σε όλη τη νευρωνική γενεαλογία, από τα νευρικά βλαστικά /προγονικά κύτταρα (neural stem cells, neural precursor cells, NSCs/NPCs) μέχρι τους μεταμιτωτικούς νευρώνες στο νευρογεννητικό θώκο (neurogenic niche) της οδοντωτής έλικας (dentate gyrus, DG) του ιππόκαμπου. Η κινάση Dyrk1B εκφράζεται από τα νευρικά προγονικά κύτταρα Τύπου 1 και Τύπου 2a (Type-1 /-2a) GFAP⁺ /Sox2⁺ (**3.4A**), τα νευρικά προγονικά κύτταρα (NSCs) Τύπου 2b (Type-2b) θετικά για Nestin (νεστίνη) και DCX (doublecortin, διπλοκορτίνη) Nestin⁺ /DCX⁺ στην υποκοκκιώδη ζώνη (subgranular zone, SGZ) (**3.4B**), καθώς και μεταμιτωτικούς νευρώνες που εκφράζουν το δείκτη CR (calretinin καλρετινίνη) (CR neurons) NeuN⁺ /DCX⁺ (**3.4C**) στην κοκκιώδη στιβάδα (granular layer, GL) [257]. Παρατίθεται σχηματική αναπαράσταση των πρωτεϊνών-δεικτών έκφρασης οι οποίοι καθορίζουν την ενήλικη νευρογένεση (προσαρμοσμένο από [257]) (**3.4D**). Εγκάρσιες τομές. Ράβδοι κλίμακας (scale bars): 100 μm.

3.1.2. Η κινάση Dyrk1B εκφράζεται στη νωτοχορδή, στο εδαφιαίο πέταλο, στα πολλαπλασιαζόμενα προγονικά κύτταρα στην κοιλιακή ζώνη και στους μεταμιτωτικούς κινητικούς νευρώνες στον αναπτυσσόμενο εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του ποντικού και του κοτόπουλου

Στη συνέχεια, καθώς το κύριο σύστημα μελέτης της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι ο αναπτυσσόμενος εμβρυϊκός νωτιαίος μυελός (νευρικός σωλήνας) του κοτόπουλου, διερευνήθηκε, αρχικά, μέσω ανοσοϊστοχημείας (immunohistochemistry, IHC), το αναπτυξιακό πρότυπο έκφρασης της κινάσης Dyrk1B στον αναπτυσσόμενο νωτιαίο μυελό του ποντικού, αρχικά σε καλλιέργεια νευροσφαιρών προερχόμενη από εμβρυϊκά νευρικά βλαστικά κύτταρα ηλικίας E14.5 και στη συνέχεια στον αναπτυσσόμενο νωτιαίο μυελό εμβρύου ποντικού ηλικιών E9.5, E12.5 και E16.5, καλύπτοντας την αρχή και το πέρας της εμβρυϊκής νευρογένεσης. Επίσης, πραγματοποιήθηκε και ανάλυση μέσω επιτόπιου RNA υβριδισμού (RNA *in situ* hybridization).

Αρχικά, διερευνήθηκε, μέσω ανοσοϊστοχημείας (IHC), η έκφραση της κινάσης Dyrk1B σε καλλιέργεια νευροσφαιρών (neurospheres) προερχόμενη από νευρικά βλαστικά κύτταρα (neural stem cells, NSCs) απομονωμένα από νωτιαίο μυελό εμβρύων ποντικού ηλικίας E14.5. Δείχθηκε ότι η κινάση Dyrk1B εκφράζεται από βλαστοκύτταρα θετικά για το μεταγραφικό παράγοντα Sox2 (SRX-box transcription factor 2, μεταγραφικός παράγοντας 2 του πλαισίου SRY) και την πρωτεΐνη GFAP (glial fibrillary acidic protein, γλοιακή ινώδης όξινη πρωτεΐνη) (Sox2⁺ /GFAP⁺), θετικά για Nestin (νεστίνη) και το δείκτη Ki-67 (marker of proliferation Kiel 67, δείκτης του πολλαπλασιασμού Kiel 67) (Nestin⁺ /Ki-67⁺) και θετικά για τη Nestin και την πρωτεΐνη GFAP (Nestin⁺ /GFAP⁺) (**Εικ. 3.5**).

Στη συνέχεια, ακολούθησε, μέσω ανοσοϊστοχημείας (IHC), σε εγκάρσιες κρυστομές, η διερεύνηση του προτύπου έκφρασης της κινάσης Dyrk1B στον εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του ποντικού, ηλικιών E9.5, E12.5 και E16.5. Η ηλικία E9.5 επιλέχθηκε διότι αντιστοιχεί στην αρχή της εμβρυϊκής νευρογένεσης στον ποντικό, ενώ η E16.5 αντιστοιχεί σε όψιμο στάδιο της. Παρατηρήθηκε ότι στην ηλικία E9.5 η κινάση Dyrk1B παρουσιάζει ευρεία έκφραση σε όλο τον νωτιαίο μυελό (**Εικ. 3.6**), ενώ στις ηλικίες E12.5 και E16.5, η κινάση Dyrk1B εντοπίζεται κυρίως στο εδαφιαίο πέταλο (floor plate, FP), στα πολλαπλασιαζόμενα προγονικά κύτταρα Sox2⁺ της κοιλιακής ζώνης (ventricular zone, VZ), στους μεταμιτωτικούς νευρώνες TuJ1⁺ (β-III tubulin, β-III τουμπουλίνη) και στους κινητικούς νευρώνες οι οποίοι είναι θετικοί για τον μεταγραφικό παράγοντα Islet1/2 (Islet 1/2⁺) (**Εικ. 3.7A,B**).

Προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω η έκφραση της κινάσης Dyrk1B στο αναπτυσσόμενο νωτιαίο μυελό του εμβρύου του ποντικού, ακολούθησε ανάλυση της έκφρασης του mRNA της κινάσης Dyrk1B μέσω RNA *in situ* υβριδισμού (RNA *in situ* hybridization) σε εγκάρσιες κρυστομές του εμβρυϊκού νωτιαίου μυελού του ποντικού. Για την εφαρμογή του RNA *in situ* υβριδισμού στον εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του ποντικού ηλικίας E12.5 και E16.5, χρησιμοποιήθηκε ένας ειδικός ιχνηθέτης RNA (riboprobe), ο οποίος συντέθηκε γι' αυτό τον σκοπό, μέσω μεταγραφής *in vitro*. Για το σκοπό αυτό, αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές (primers) οι οποίοι σχεδιάστηκαν βάσει της γνωστής αλληλουχίας του γονιδίου *Dyrk1B* του ποντικού (*mDyrk1B*), για την ενίσχυση του τμήματος

μήκους 396 bp το οποίο αντιστοιχεί στο 3' άκρο της κωδικής περιοχής ή αλληλουχίας (coding sequence or region, CDS) (**Εικ. 3.8A**) του cDNA του γονιδίου *mDyrk1B* η οποία ήταν κλωνοποιημένη στο φορέα έκφρασης θηλαστικών pCMV-Sport6 (4396 bp) (2549 bp, GenBank: BC019545.1, cDNA clone MGC:25681 IMAGE:4511845) (U.K. Human Genome Mapping Project Resource Centre, Hinxton, Cambridge, U.K.). Στη συνέχεια, αυτή η περιοχή μήκους 396 bp υποκλωνοποιήθηκε στον φορέα έκφρασης pBluescript II KS (-) (Stratagene) και ακολούθησε η σύνθεση του ιχνηθέτη RNA μέσω μεταγραφής *in vitro*. Αυτό το τμήμα το οποίο αντιστοιχεί στο 3' άκρο της κωδικής περιοχής (CDS) του cDNA του γονιδίου *mDyrk1B* είναι διαφορετική από την αντίστοιχη του παράλογου γονιδίου που κωδικοποιεί την κινάση Dyrk1A και εξασφαλίζει την ειδικότητα του παραγόμενου ιχνηθέτη RNA για την κινάση Dyrk1B (**Εικ. 3.8A**).

Η εφαρμογή του RNA *in situ* υβριδισμού (ISH) στον εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του ποντικού, έδειξε ότι το mRNA της κινάσης Dyrk1B εκφράζεται από την κοιλιακή ζώνη (ventricular zone, VZ) και από την περιοχή των κινητικών νευρώνων (motor neuron domain, MN) στη ζώνη του μανδύα (mantle zone, MZ) (**Εικ. 3.7A,B**), ευρήματα τα οποία επιβεβαιώνουν τα αντίστοιχα που προέκυψαν από την ανοσοϊστοχημική ανάλυση (IHC).

Στη συνέχεια, αφού δείχθηκε ότι η κινάση Dyrk1B εκφράζεται στο αναπτυσσόμενο ΚΝΣ του ποντικού και εκφράζεται από τα νευρικά βλαστικά και προγονικά κύτταρα (NSCs/NPCs) και τους μεταμιτωτικούς νευρώνες του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού, ακολούθησε η διερεύνηση του προτύπου έκφρασης της κινάσης Dyrk1B στον εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του κοτόπουλου ηλικιών E3, E4 και E6. Η ηλικία E3 επιλέχθηκε γιατί αντιστοιχεί στην αρχή της εμβρυϊκής νευρογένεσης στο κοτόπουλο, η ηλικία E4 γιατί σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο πραγματοποιήθηκαν οι *in vivo* μελέτες και η ηλικία E6 γιατί αντιστοιχεί σε πιο ώριμο στάδιο της νευρογένεσης. Η ανάλυση του αναπτυξιακού προτύπου έκφρασης της κινάσης Dyrk1B του κοτόπουλου πραγματοποιήθηκε αποκλειστικά μέσω RNA *in situ* υβριδισμού (RNA *in situ* hybridization) σε εγκάρσιες κρουτομές, καθώς τα εμπορικά διαθέσιμα αντισώματα έναντι της κινάσης Dyrk1B δεν αναγνωρίζουν την ορθόλογη πρωτεΐνη του κοτόπουλου σε εφαρμογές ανοσοϊστοχημείας.

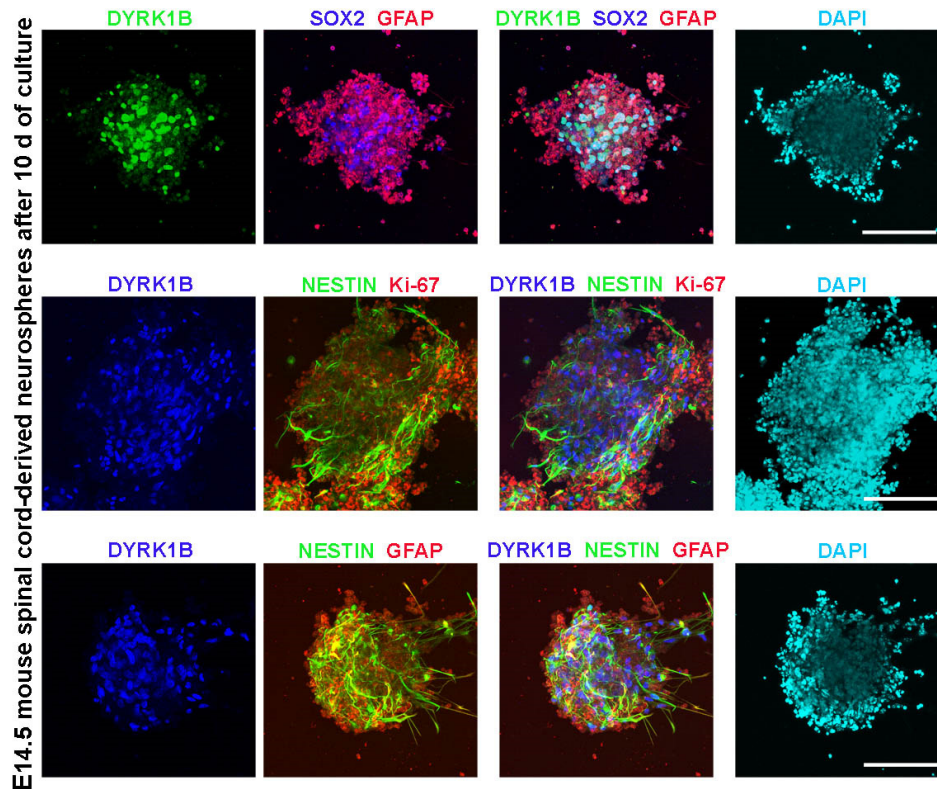
Καθώς, η αλληλούχηση του γονιδιώματος του κοτόπουλου δεν έχει ολοκληρωθεί και η αλληλουχία του γονιδίου *cDyrk1B* δεν είναι γνωστή, αξιοποιήθηκε η υψηλή ομοιότητα μεταξύ των αλληλουχιών CDS του γονιδίου *Dyrk1B* ανάμεσα στα διάφορα είδη, για τη σύνθεση και χρήση των εκκινητών (primers), οι οποίοι αντιστοιχούν στο 3' άκρο της αλληλουχίας της κωδικής περιοχής του cDNA του γονιδίου *Dyrk1B* του ποντικού (*mDyrk1B*) προκειμένου να κλωνοποιηθεί το 3' άκρο της κωδικής περιοχής του *Dyrk1B* του κοτόπουλου (*cDyrk1B*), εφαρμόζοντας αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) σε ολικό RNA το οποίο είχε απομονωθεί από νωτιαίο μυελό εμβρύων κοτόπουλου ηλικίας E4. Το τμήμα cDNA μήκους 253 bp το οποίο και κλωνοποιήθηκε αντιστοιχεί στο 3' άκρο της κωδικής περιοχής του γονιδίου *cDyrk1B* και παρουσιάζει 100% ομοιότητα με την αντίστοιχη περιοχή του ορθόλογου γονιδίου του ποντικού (*mDyrk1B*), 96,05% με την αντίστοιχη περιοχή του αρουραίου (*rDyrk1B*) και

90,91% με την αντίστοιχη περιοχή του ανθρώπου (*hDyrk1B*) (**Εικ. 3.8B**). Σημειωτέον, αυτή η περιοχή δεν φέρει καμμία ομολογία με την αντίστοιχη περιοχή του cDNA του γονιδίου *Dyrk1A* του κοτόπουλου (*cDyrk1A*) που είναι γνωστή (**Εικ. 3.8A**). Στη συνέχεια, αυτό το τμήμα του cDNA κλωνοποιήθηκε στον φορέα έκφρασης pBluescript II KS (-) (Stratagene) και ακολούθησε η σύνθεση του ιχνηθέτη RNA μέσω *in vitro* μεταγραφής.

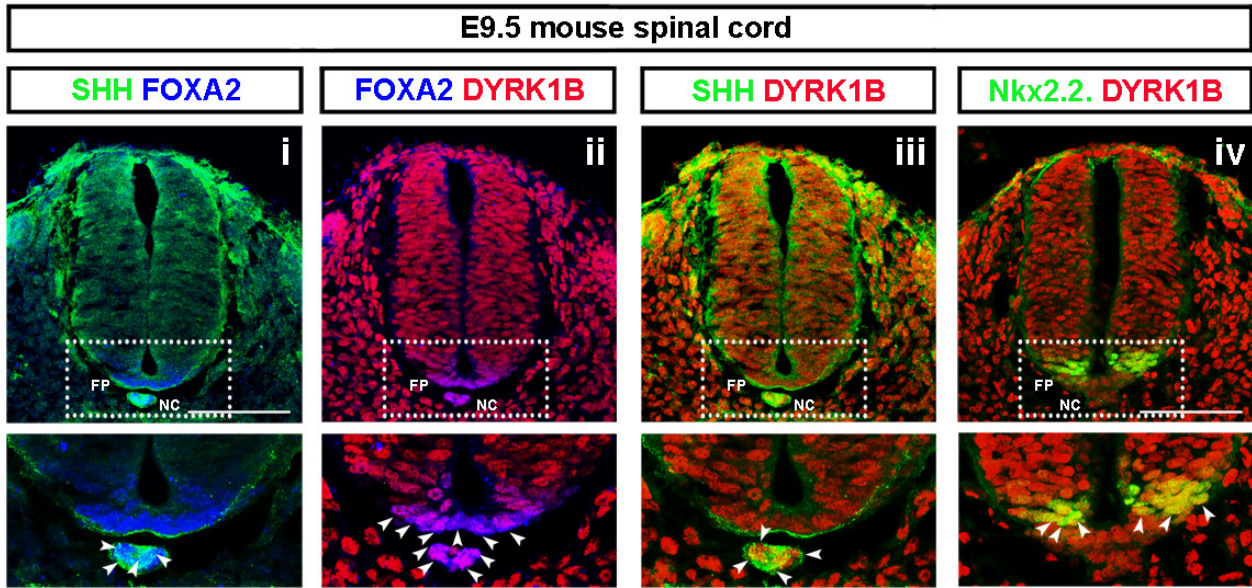
Η εφαρμογή του RNA *in situ* υβριδισμού στον εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του κοτόπουλου, έδειξε ότι στο πρώιμο στάδιο της ανάπτυξης του νωτιαίου μυελού (E3), το mRNA της *Dyrk1B* εκφράζεται ευρέως στα νευροεπιθηλιακά προγονικά κύτταρα (neuroepithelial progenitors, NPs) και έχει έντονη έκφραση στη νωτοχορδή, όπως δείχτηκε στο αντίστοιχο αναπτυξιακό στάδιο E9.5 του ποντικού. Στα μεταγενέστερα στάδια (E4 και E6) η έκφρασή του mRNA της κινάσης *Dyrk1B* είναι πιο εμφανής στο εδαφιαίο πέταλο (FP) και στη ζώνη του μανδύα (mantle zone, MZ) όπου εντοπίζονται οι νευρώνες, καθώς και στην κοιλιακή ζώνη (VZ) όπου το mRNA της κινάσης *Dyrk1B* εκφράζεται από τα πολλαπλασιαζόμενα νευρικά προγονικά κύτταρα (neural progenitors) (**Εικ. 3.7C**).

Επιπροσθέτως, για την περαιτέρω διερεύνηση του αναπτυξιακού προτύπου έκφρασης της κινάσης *Dyrk1B* στο αναπτυσσόμενο ΚΝΣ του κοτόπουλου και ποντικού πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot, WB), χρησιμοποιώντας ένα ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της κινάσης *Dyrk1B* σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (protein lysates) προερχόμενα από διάφορα αναπτυξιακά στάδια, καλύπτοντας την περίοδο της εμβρυϊκής νευρογένεσης και όσον αφορά το ΚΝΣ του ποντικού και μεταγεννητικές ηλικίες (**Εικ. 3.9**). Δείχθηκε ότι η πρωτεϊνική έκφραση της κινάσης *Dyrk1B* ήταν παρούσα σε όλα τα στάδια, μειούμενη με το χρόνο (**Εικ. 3.9**).

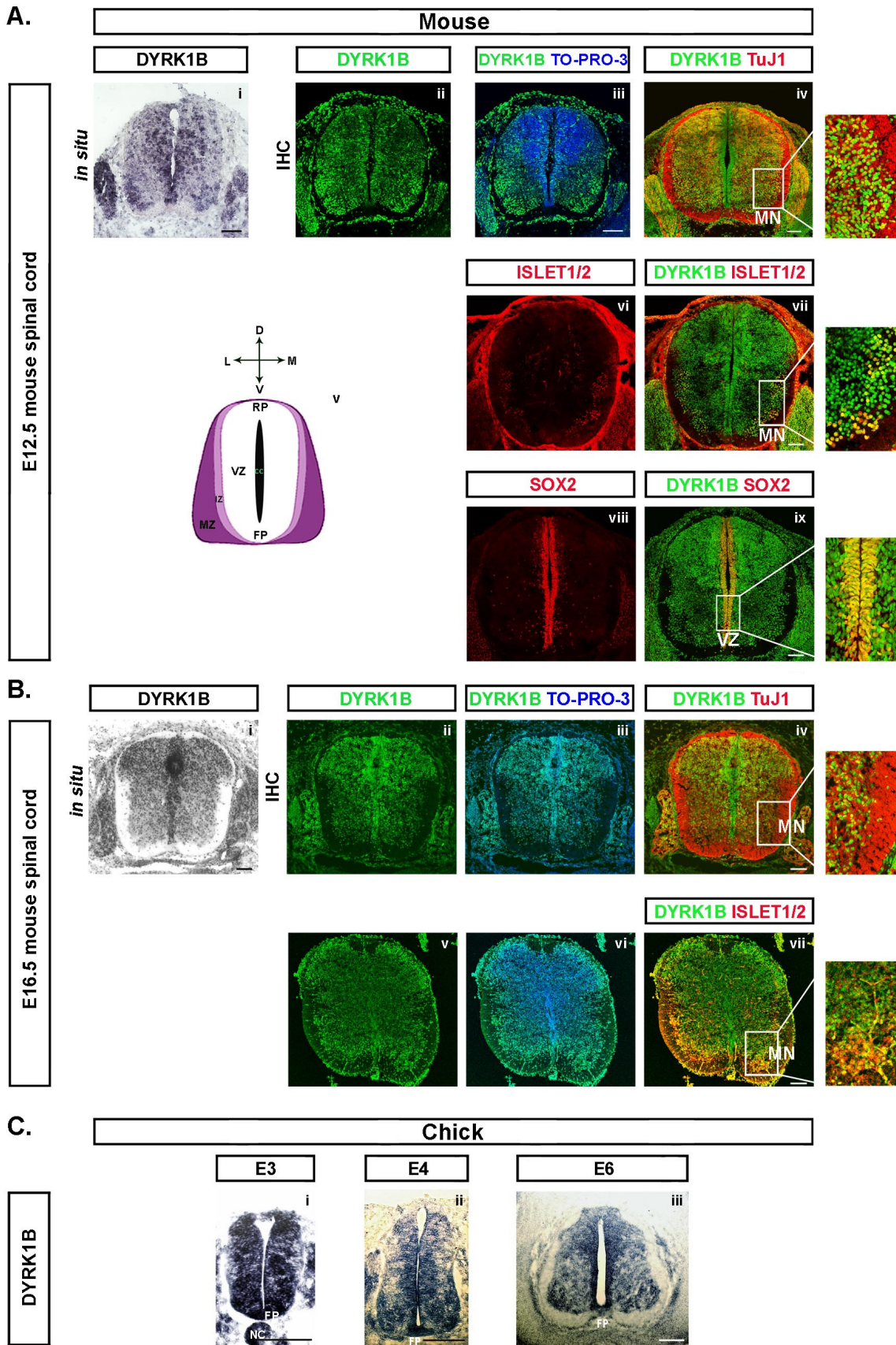
Ως συμπέρασμα, η διερεύνηση του αναπτυξιακού προτύπου έκφρασης της κινάσης *Dyrk1B* αποκάλυψε ότι η κινάση εκφράζεται καθ' όλη την εμβρυϊκή ανάπτυξη του ΚΝΣ του ποντικού και του κοτόπουλου, από τον εγκέφαλο και από το νωτιαίο μυελό. Η κινάση *Dyrk1B* εκφράζεται από τα πολλαπλασιαζόμενα νευρικά βλαστικά /προγονικά κύτταρα (neural stem cells, neural precursor cells, NSCs/NPCs) και τους μεταμιτωτικούς νευρώνες του εγκεφάλου, σημαίνοντας την δευτερογενή νευρογένεση η οποία επιτελείται στο νευρογεννητικό θώκο της οδοντωτής έλικας (dentate gyrus, DG), αλλά και από τα νευρικά βλαστικά /προγονικά κύτταρα (NSCs/NPCs) και τους μεταμιτωτικούς νευρώνες του αναπτυσσόμενου νωτιαίου μυελού και δη αυτούς της περιοχής των κινητικών νευρώνων (MN domain). Δείχθηκε, επίσης, ότι τα επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης της κινάσης *Dyrk1B* μειώνονται με το χρόνο.



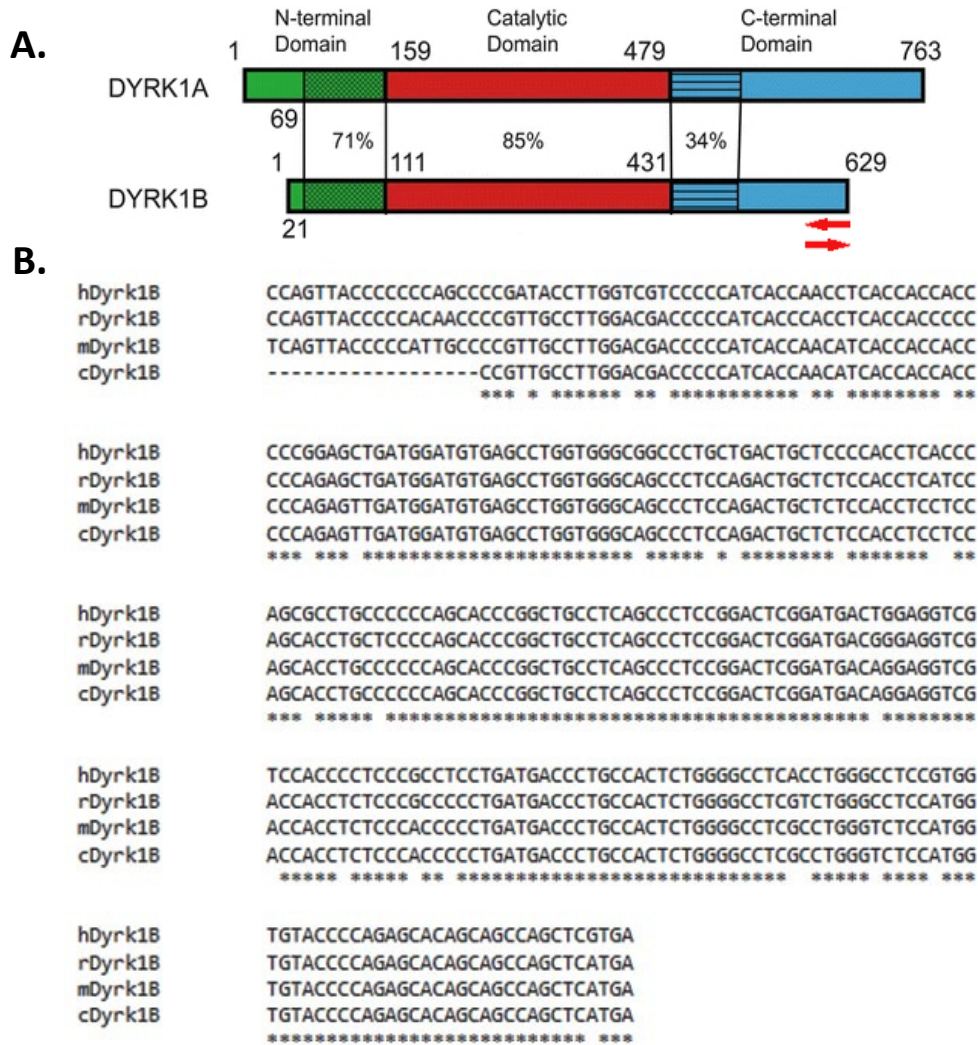
Εικόνα 3.5. Η έκφραση της κινάσης *Dyrk1B* σε καλλιέργεια νευροσφαιρών προερχόμενη από νευρικά βλαστικά κύτταρα απομονωμένα από νωτιαίο μυελό εμβρύων ποντικού αναπτυξιακού σταδίου **E14.5**. Η κινάση *Dyrk1B* εκφράζεται από νευρικά βλαστικά κύτταρα (neural stem cells, NSCs), θετικά για το μεταγραφικό παράγοντα *Sox2* και την πρωτεΐνη *GFAP* (*Sox2*⁺/*GFAP*⁺), θετικά για τους δείκτες *Nestin* (νεστίνη) και *Ki-67* (*Nestin*⁺/*Ki-67*⁺) και θετικά για το δείκτη *Nestin* και την πρωτεΐνη *GFAP* (*Nestin*⁺/*GFAP*⁺). Ράβδοι κλίμακας (scale bars): 100 μm .



Εικόνα 3.6. Η έκφραση της κινάσης *Dyrk1B*, του μορφογόνου *Shh* και των μεταγραφικών παραγόντων *FoxA2* και *Nkx2.2* στον εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του ποντικού ηλικίας **E9.5**. Η συνέκφραση της κινάσης *Dyrk1B* με το μορφογόνο *Shh* και με τον μεταγραφικό παράγοντα *FoxA2* είναι εμφανής στη νωτοχορδή (notochord, NC) και στο εδαφιαίο πέταλο (floor plate, FP) (i-iii), όπως και η συνέκφραση της κινάσης *Dyrk1B* με το μεταγραφικό παράγοντα *Nkx2.2* είναι εμφανής στην περιοχή των προγονικών κυττάρων (progenitors) p3 (iv). Ράβδοι κλίμακας (scale bars): 100 μ m. Οι τομές του νωτιαίου μυελού αντιστοιχούν στο επίπεδο των προσθίων άκρων (forelimb level).

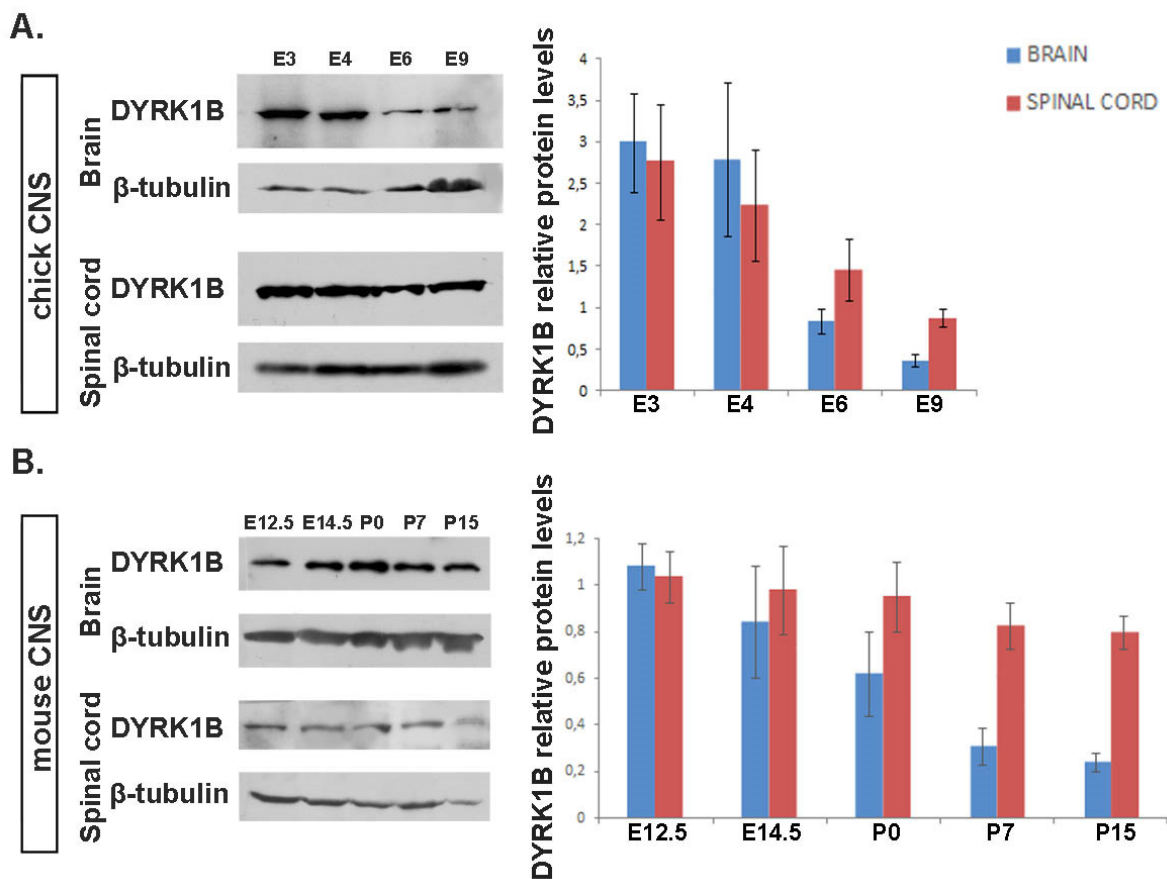


Εικόνα 3.7. Η έκφραση της κινάσης Dyrk1B στο νωτιαίο μυελό του ποντικού και του κοτόπουλου. Α. Η έκφραση της κινάσης Dyrk1B ανιχνεύεται στο νωτιαίο μυελό του ποντικού ηλικίας E12.5 (η οποία αντιστοιχεί στο αναπτυξιακό στάδιο E4 του κοτόπουλου) σε επίπεδο mRNA, μέσω επιτόπιου RNA υβριδισμού (RNA *in situ* hybridization, ISH) (i) και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, μέσω ανοσοϊστοχημείας (immunohistochemistry, IHC) (ii, iii), όπου η κινάση Dyrk1B εκφράζεται από TuJ1⁺ (β-III tubulin, β-III τουμπουλίνη) μεταμιτωτικούς νευρώνες της ζώνης του μανδύα (mantle zone, MZ) (iv) και από Islet1/2⁺ κινητικούς νευρώνες (motor neurons, MNs) (vi, vii), καθώς και από Sox2⁺ πολλαπλασιαζόμενα προγονικά κύτταρα στην κοιλιακή ζώνη (ventricular zone, VZ) (viii, ix). Οι περιοχές του νωτιαίου μυελού απεικονίζονται στο σχήμα αριστερά (v). **Β.** Στο νωτιαίο μυελό ηλικίας E16.5, η κινάση Dyrk1B εκφράζεται ευρέως στη φαιά ουσία και στη κοιλιακή ζώνη (VZ) (i-vii), τόσο σε επίπεδο mRNA (i) όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο (ii-iii). Επίσης, παρουσιάζεται η συνέκφραση της κινάσης Dyrk1B στους TuJ1⁺ μεταμιτωτικούς νευρώνες (iv) και Islet1/2⁺ κινητικούς νευρώνες (MNs) (vii). **Γ.** Παρόμοια έκφραση της κινάσης Dyrk1B παρατηρείται στον εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του κοτόπουλου σε επίπεδο mRNA, όπου το mRNA της κινάσης Dyrk1B εκφράζεται κυρίως από τη νωτοχορδή (notochord, NC) στο στάδιο E3, το εδαφιαίο πέταλο (floor plate, FP), τα πολλαπλασιαζόμενα προγονικά κύτταρα στην κοιλιακή ζώνη (VZ) και από κινητικούς νευρώνες (MNs) στη ζώνη του μανδύα (MZ) στο στάδιο E4 και από τους κινητικούς νευρώνες (MNs) στο στάδιο E6, όπως αποκαλύφθηκε μέσω RNA *in situ* υβριδισμού σε εγκάρσιες τομές νωτιαίου μυελού από το βραχιόνιο (brachial) επίπεδο. Η ευρεία έκφραση του mRNA της κινάσης Dyrk1B που παρατηρείται στο αναπτυξιακό στάδιο E3 (i) σταδιακά περιορίζεται στην περιοχή της κοιλιακής ζώνης (VZ) η οποία είναι παρακείμενη στο κεντρικό κανάλι (central canal, CC) και αργότερα στην περιοχή των κινητικών νευρώνων (motor neuron domain, MN) στα στάδια E4 και E6 (ii-iii). Ράβδοι κλίμακας (scale bars): 100 μm. TO-PRO-3: Χρώση πυρήνων.



Εικόνα 3.8. Κλωνοποίηση του 3' άκρου της κωδικής περιοχής του cDNA της κινάσης Dyrk1B του κοτόπουλου και στοίχιση αλληλουχιών (sequence alignment) αυτής της περιοχής ανάμεσα στα είδη. Α. Σχηματική αναπαράσταση των γνωστών δομών των κινάσεων Dyrk1A και Dyrk1B στα θηλαστικά. Παρατίθεται συγκριτική σχηματική αναπαράσταση ανάμεσα στις κινάσες Dyrk1A (763 aa) και Dyrk1B (629 αμινοξέα) του ποντικού. Οι κινάσες που κωδικοποιούνται από παράλογα μεταξύ τους γονίδια Dyrk1A και Dyrk1B του ποντικού εμφανίζουν 85% ομολογία στην καταλυτική περιοχή τους, 71% ομολογία σε ένα τμήμα του αμινοτελικού τους άκρου και 34% ομολογία σε ένα τμήμα του καρβοξυτελικού τους άκρου. Στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο τους υπάρχουν τμήματα που δεν φέρουν καμία ομοιότητα μεταξύ τους όπως φαίνεται στο σχήμα. Βασισμένοι σε αυτό σχεδιάστηκαν εκκινητές στο 3' άκρο της κινάσης Dyrk1B του ποντικού, για τη συνθεση ειδικών ιχνηθετών RNA (riboprobes) που χρησιμοποιήθηκαν σε RNA επιτόπιους υβριδισμούς καθώς και για την κλωνοποίηση 3' τμήματος της κωδικής περιοχής του cDNA της Dyrk1B του κοτόπουλου. Το σχήμα **A είναι προσαρμοσμένο από [115]. **B. Κλωνοποίηση του 3' άκρου της κωδικής περιοχής του cDNA της κινάσης Dyrk1B του κοτόπουλου και στοίχιση αλληλουχιών (sequence alignment) ανάμεσα στα είδη.** Καθώς δεν ήταν γνωστή η αλληλουχία του cDNA του γονιδίου *Dyrk1B* του κοτόπουλου (*cDyrk1B*), πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση ενός**

τμήματος cDNA μεγέθους 253 bp το οποίο αντιστοιχεί στο 3' άκρο της κωδικής περιοχής του cDNA του γονιδίου της κινάσης Dyrk1B του κοτόπουλου (*cDyrk1B*) (A, κόκκινα βέλη), μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) μετά από απομόνωση ολικού RNA από νωτιαίο μυελό κοτόπουλου ηλικίας E4. Με κόκκινα βέλη παριστάνεται το χρησιμοποιούμενο ζεύγος ιχνηθετών σχεδιασμένο βάσει της αντίστοιχης αλληλουχίας του ποντικού η οποία είναι γνωστή και σε μεγάλο βαθμό συντηρημένη μεταξύ των ειδών. Σημειωτέον, αυτό το κλωνοποιημένο τμήμα cDNA δεν παρουσιάζει καμία ομολογία με το αντίστοιχο cDNA του γονιδίου *Dyrk1A* του κοτόπουλου (*cDyrk1A*). Η στοίχιση αλληλουχιών, με τον αλγόριθμο EMBL-EBI MUSCLE (multiple sequences alignment tool), έδειξε ότι η 3' κωδική περιοχή (coding sequence, CDS) του ομόλογου γονιδίου του κοτόπουλου (chick, *cDyrk1B*) παρουσιάζει 100% ομοιότητα με την αντίστοιχη του ποντικού (mouse, *mDyrk1B*), 96,05% με αυτή του αρουραίου (rat, *rDyrk1B*) και 90,91% με την αντίστοιχη του ανθρώπου (*hDyrk1B*), αντίστοιχα.



Εικόνα 3.9. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της κινάσης Dyrk1B μειώνονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του ΚΝΣ του κοτόπουλου και ποντικού. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του ΚΝΣ, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της κινάσης Dyrk1B μειώνονται στο αναπτυσσόμενο εγκέφαλο και νωτιαίο μυελό του κοτόπουλου και του ποντικού, μεταξύ των εμβρυϊκών σταδίων E3 με E9, για το κοτόπουλο (A), και E12.5 με E14.5, καθώς και μεταξύ των μεταγεννητικών σταδίων P0

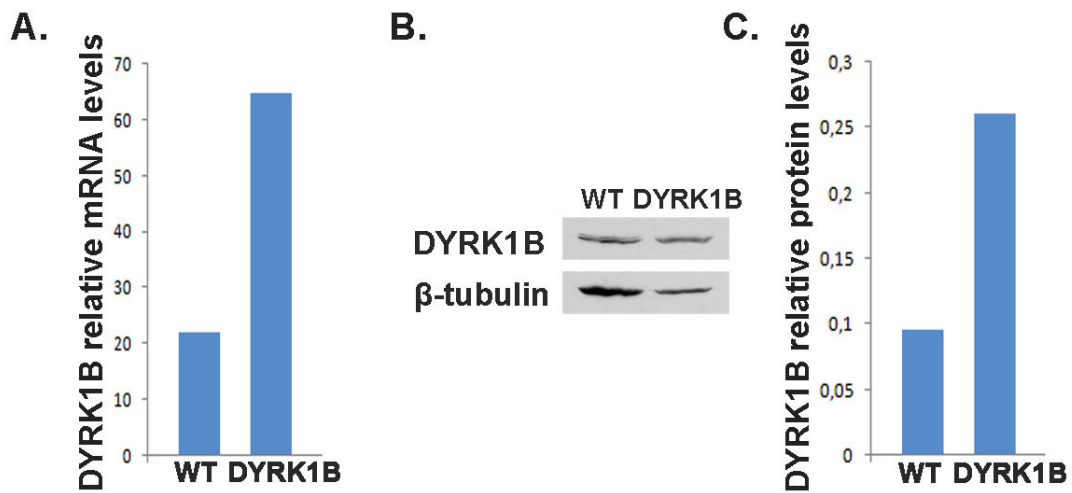
με P15, για τον ποντικό (**B**), όπως αποκαλύφθηκε μέσω ανάλυσης με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot, WB). Η ποσοτικοποίηση με πυκνομετρική ανάλυση (densitometric analysis) και κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης της κινάσης Dyrk1B παρουσιάζονται σε σχέση με την πρωτεΐνη αναφοράς β τουμπουλίνη (β -tubulin), που χρησιμοποιείται για έλεγχο φόρτωσης (protein loading control), χρησιμοποιώντας το λογισμικό ImageJ. Γραμμές σφάλματος (error bars): Τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (standard error of the mean, SEM).

3.2. *In vivo* μελέτη του λειτουργικού ρόλου της Dyrk1B στην ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού του κοτόπουλου – Πειράματα ‘προσθήκης λειτουργίας’

Προκειμένου να διαλευκανθεί ο ρόλος της κινάσης Dyrk1B κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο σύστημα μελέτης ο αναπτυσσόμενος νωτιαίος μυελός (νευρικός σωλήνας) του εμβρύου της κοτόπουλου. Για αυτό το σκοπό, πραγματοποιήθηκαν *in vivo* πειράματα ‘προσθήκης λειτουργίας’ (*gain-of-function*, GOF) και ‘απώλειας λειτουργίας’ (*loss-of-function*, LOF), καθώς και πειράματα ‘διάσωσης φαινοτύπου’ (*phenotype rescue* experiments).

Εφαρμόστηκε αρχικά μονόπλευρη *in ovo* ηλεκτροδιάτρηση (unilateral *in ovo* electroporation) στο νωτιαίο μυελό του εμβρύου του κοτόπουλου αναπτυξιακού σταδίου E2, προκειμένου να υπερεκφραστεί η κινάση Dyrk1B του ποντικού (mDyrk1B). Αυτό επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας τον δισιστρονικό (bicistronic) φορέα έκφρασης pGAG-mDyrk1B-IRES-NLS-GFP (πειραματικά έμβρυα Dyrk1B/GFP) ή τον φορέα ελέγχου (control) pGAG-IRES-NLS-GFP (έμβρυα ελέγχου GFP). Οι παραπάνω φορείς επιτρέπουν την έκφραση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (green fluorescent protein, GFP) ως μοριακό μάρτυρα (molecular marker) στα επιμολυσμένα (transfected) κύτταρα. Για την παραγωγή του φορέα έκφρασης κλωνοποιήθηκε η κωδική περιοχή (coding sequence or region, CDS) του cDNA του γονιδίου *Dyrk1B* του ποντικού (*mDyrk1B*) αξιοποιώντας τον υψηλό βαθμό ομοιότητας ανάμεσα στα είδη, καθώς το αντίστοιχο γονίδιο του κοτόπουλου (*cDyrk1B*) δεν έχει ακόμη αλληλουχηθεί. 48 h μετά την ηλεκτροδιάτρηση, στο αναπτυξιακό στάδιο E4, διαπιστώθηκε, μέσω ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε προϊόν αντίστροφης μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο (real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR), αύξηση 3 φορές στα επίπεδα του mRNA της κινάσης Dyrk1B και, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western blot, WB), 2,7 φορές αύξηση στα πρωτεϊνικά επίπεδα (**Εικ. 3.10**), αντίστοιχα, σε σύγκριση με τον νωτιαίο μυελό ελέγχου φυσικού τύπου (wild type, WT), ο οποίος δεν υπέστη ηλεκτροδιάτρηση.

Ακολούθησαν πειράματα μονόπλευρης *in ovo* ηλεκτροδιάτρησης στον εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του κοτόπουλου E2 και κατόπιν ανοσοϊστοχημική ανάλυση (IHC) στο E4.



Εικ. 3.10. Μονόπλευρη *in ovo* ηλεκτροδιάτρηση της κινάσης Dyrk1B στο αναπτυξιακό στάδιο E2 και ανάλυση στο στάδιο E4. A. Η εξαναγκασμένη (forced) έκφραση της κινάσης Dyrk1B οδήγησε σε αύξηση 3,0 φορές των επιπέδων mRNA, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα του νωτιαίου μυελού ελέγχου φυσικού τύπου (wild type, WT), όπως προσδιορίστηκε από RT-qPCR πραγματικού χρόνου. **B, C.** Αναλόγως, αύξηση της τάξης των 2,7 φορές της πρωτεΐνης Dyrk1B προσδιορίστηκε μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western blot, WB). Η ποσοτικοποίηση και κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της κινάσης Dyrk1B πραγματοποιήθηκε σε σχέση με την πρωτεΐνη αναφοράς β τουμπουλίνη (β -tubulin) χρησιμοποιώντας το λογισμικό ImageJ. Τα δεδομένα προέκυψαν από ένα πείραμα. Το συνολικό mRNA και τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (lysates) προήλθαν από μία 'δεξαμενή' (pool) 3 εμβρυϊκών νωτιαίων μυελών κοτόπουλου, σε κάθε περίπτωση.

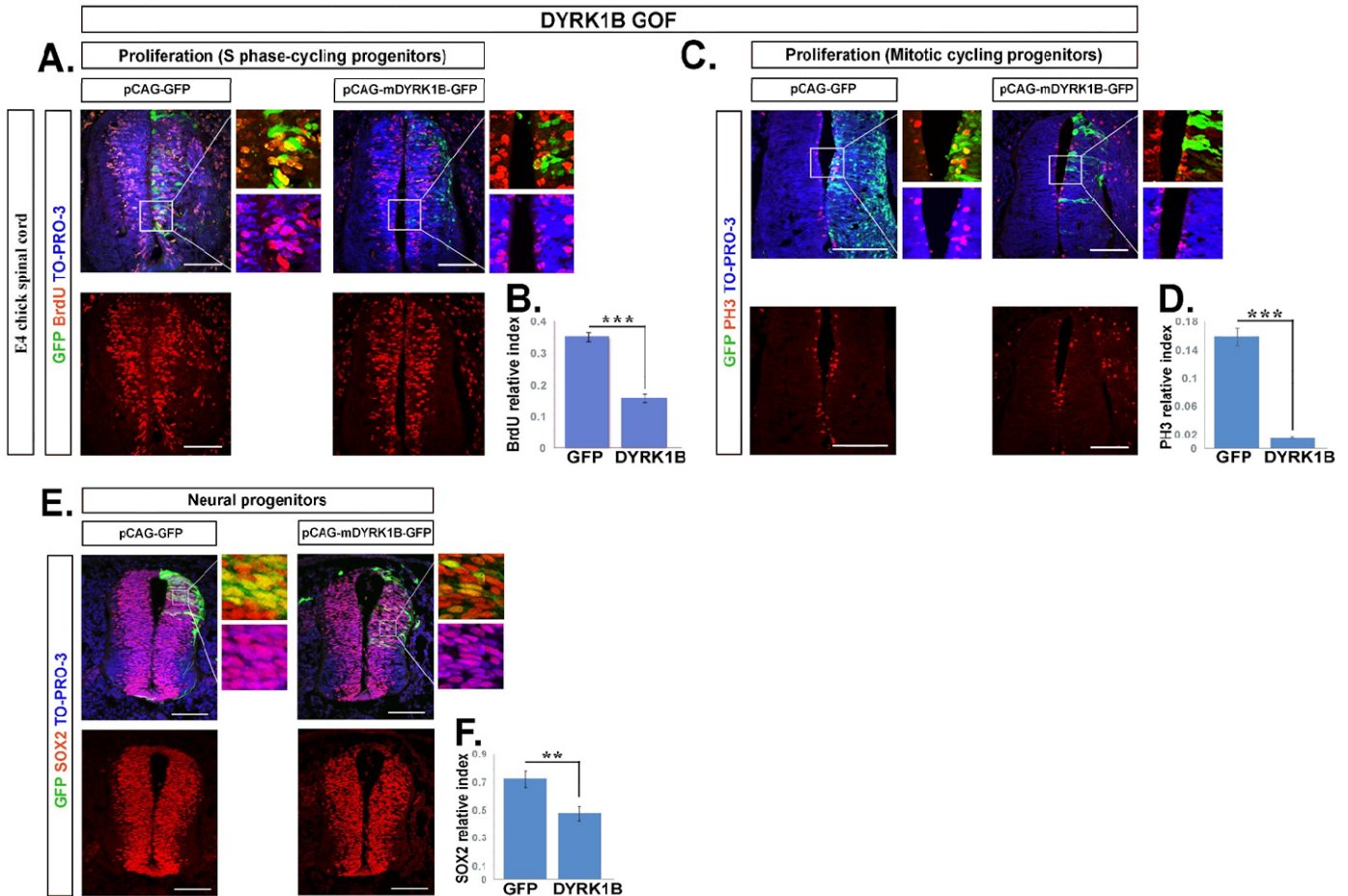
3.2.1. Η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B στο αναπτυξιακό στάδιο E2 προωθεί την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο και τη νευρωνική διαφοροποίηση στο στάδιο E4

Δεδομένου ότι έχει δειχθεί από προηγούμενες μελέτες ότι η κινάση Dyrk1B δρα ως μία κινάση σημείου ελέγχου του κυτταρικού κύκλου G0 (G0-checkpoint kinase), η οποία προωθεί την έξοδο από αυτόν [83] και την τελική διαφοροποίηση των πολλαπλασιαζόμενων μυοβλαστών [95,120,126], των ανώριμων αρσενικών γεννητικών κυττάρων [130], καθώς και των κυττάρων νευροβλαστώματος ποντικού [132], κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η επίδραση της υπερέκφρασης της κινάσης mDyrk1B στον κυτταρικό κύκλο στο αναπτυσσόμενο νευρικό σωλήνα του εμβρύου του κοτόπουλου. Για τον εντοπισμό των πολλαπλασιαζόμενων προγονικών κυττάρων στην φάση S, πραγματοποιήθηκε 'παλμός' διάρκειας 2 h (2-h pulse) με ένα ανάλογο θυμιδίνης, την 5-βρωμο-2'-δεοξουριδίνη (5-Bromo-2'-deoxyuridine, BrdU), προτού θυσιασθούν τα ηλεκτροδιατρηθέντα (electroporated) έμβρυα. Ακολούθησε ανοσοϊστοχημεία (immunohistochemistry, IHC) και συνεστιακή μικροσκοπία (confocal microscopy) σε εγκάρσιες κρυστομές του νωτιαίου μυελού, οι οποίες αντιστοιχούσαν στο βραχιόνιο επίπεδο (brachial level). Παρατηρήθηκε μείωση 2,22 φορές \pm 0,20 (***) $p \leq 0.001$, n=18 τομές από 5 έμβρυα) του σχετικού δείκτη (relative index) της ενσωμάτωσης BrdU στα πειραματικά έμβρυα Dyrk1B/GFP συγκρινόμενα με τα έμβρυα ελέγχου GFP (**Εικ. 3.11A,B**). Ως σχετικός δείκτης ορίζεται ως ο λόγος των διπλά θετικών κυττάρων BrdU⁺/GFP⁺ προς το σύνολο των κυττάρων GFP⁺.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε δραματική μείωση 10,16 φορές \pm 0,98 (***) $p \leq 0.001$, n=18 τομές από 5 έμβρυα) στο σχετικό δείκτη της PH3 (phospho-histone H3, φωσφο-ιστόνη H3) των μιτωτικών κυττάρων (**Εικ. 3.11C,D**). Συνακόλουθα, παρατηρήθηκε μείωση του σχετικού δείκτη για το μεταγραφικό παράγοντα που χαρακτηρίζει την αυτοανανέωση (self-renewal) και πλειοδυναμία (pluripotency) των νευρικών πρόδρομων κυττάρων (neural precursors) Sox2 (SRY-box transcription factor 2, μεταγραφικός παράγοντας 2 του πλαισίου SRY) κατά 1,53 φορές \pm 0,16 (***) $p \leq 0.01$, n=18 τομές από 4 έμβρυα) (**Εικ. 3.11E,F**).

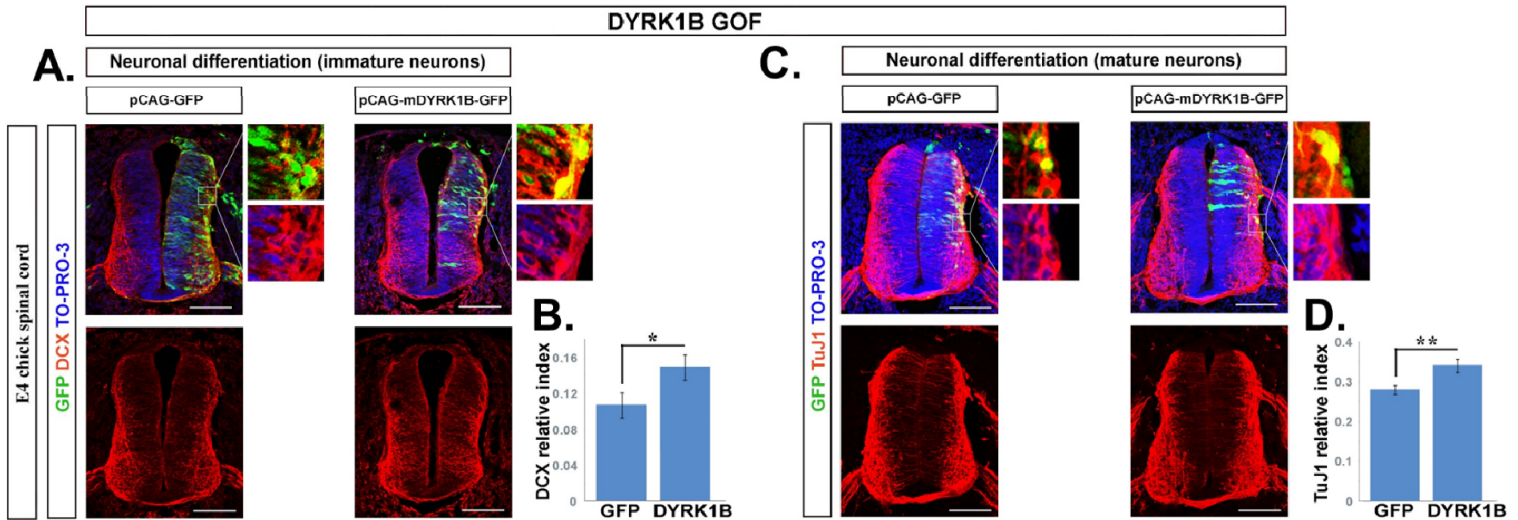
Στη συνέχεια, εξακριβώθηκε κατά πόσο η κινάση Dyrk1B έχει επίδραση στη νευρωνική διαφοροποίηση. Βρέθηκε ότι στα πειραματικά έμβρυα Dyrk1B/GFP ο σχετικός δείκτης των ανώριμων νευρώνων για τον πρώιμο νευρωνικό δείκτη DCX (doublecortin, διπλοκορτίνη) αυξήθηκε κατά 1,39 φορές \pm 0,13 (* $p \leq 0.05$, n=13 τομές από 4 έμβρυα), σε σύγκριση με τα έμβρυα ελέγχου GFP (**Εικ. 3.12A,B**). Ομοίως, ο σχετικός δείκτης των πιο ώριμων νευρώνων για το νευρωνικό δείκτη TuJ1 (β -III tubulin, β III τουμπουλίνη) αυξήθηκε κατά 1,22 φορές \pm 0,06 (***) $p \leq 0.01$, n=24 τομές από 4 έμβρυα), σε σύγκριση με τα έμβρυα ελέγχου GFP (**Εικ. 3.12C,D**).

Συνεπώς, τα δεδομένα αυτά επιδεικνύουν ότι η εξαναγκασμένη (forced) έκφραση της κινάσης Dyrk1B προωθεί την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο και τη νευρωνική διαφοροποίηση των πολλαπλασιαζόμενων πρόδρομων κυττάρων (precursors).



Εικόνα 3.11. Η υπερέκφραση της κινάσης *Dyrk1B* στο αναπτυξιακό στάδιο E2 προωθεί την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο στο στάδιο E4. Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις σε νωτιαίο μυελό εμβρύων κοτόπουλου τα οποία έχουν υποστεί μονόπλευρη *in ovo* ηλεκτροδιάτρηση στο στάδιο E2 και ανάλυση που έγινε στο στάδιο E4. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με υπολογισμό του σχετικού δείκτη ο οποίος αντιστοιχεί στο λόγο των διπλών θετικών κυττάρων GFP⁺/εκάστοτε ειδικό δείκτη⁺ προς το σύνολο των GFP⁺ κυττάρων. **A, B.** Τα ηλεκτροδιατρηθέντα με *Dyrk1B*⁺/GFP⁺ πολλαπλασιαζόμενα προγονικά κύτταρα τα οποία ενσωμάτωσαν το δείκτη της φάσης του κυτταρικού κύλου S, 5-Βρωμο-2'-δεοξουριδίνη (5-Bromo-2'-deoxyuridine, BrdU) μειώθηκαν σημαντικά κατά 2,22 φορές ± 0,20 ($p \leq 0.001$, $n=18$ τομές από 5 έμβρυα), σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κύτταρα στα έμβρυα ελέγχου GFP. **C, D.** Ομοίως, ο σχετικός δείκτης των *Dyrk1B*⁺/GFP⁺ πολλαπλασιαζόμενων προγονικών κυττάρων τα οποία συνεκφράζουν το μιτωτικό δείκτη PH3 (phospho-histone H3, φωσφο-ιστόνη H3) παρουσίασαν δραματική μείωση κατά 10,16 φορές ± 0,98 ($p \leq 0.001$, $n=18$ τομές από 5 έμβρυα), σε σύγκριση με τα GFP⁺/PH3⁺ κύτταρα στα έμβρυα ελέγχου GFP. **E, F.** Σημαντική μείωση κατά 1,53 φορές ± 0,16 ($p \leq 0.01$, $n=18$ τομές από 4 έμβρυα) παρατηρήθηκε στο σχετικό δείκτη των κυττάρων που εκφράζουν το δείκτη αυτοανανέωσης και πλειοδυναμίας (self-renewal and pluripotency marker) Sox2 (SRY-box transcription factor 2, μεταγραφικός παράγοντας 2 του πλαισίου SRY), σε σύγκριση με τα έμβρυα ελέγχου GFP. Ράβδοι κλίμακας (scale bars): 100 μm . TO-PRO-3: Χρώση πυρήνων. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως

Μέση τιμή \pm Τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (standard error of the mean, SEM), * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; ns, non-significant, μη σημαντικό (two-tailed Unequal variance t-test). Οι τομές του νωπιαίου μυελού αντιστοιχούν στο βραχιόνιο (brachial) επίπεδο.



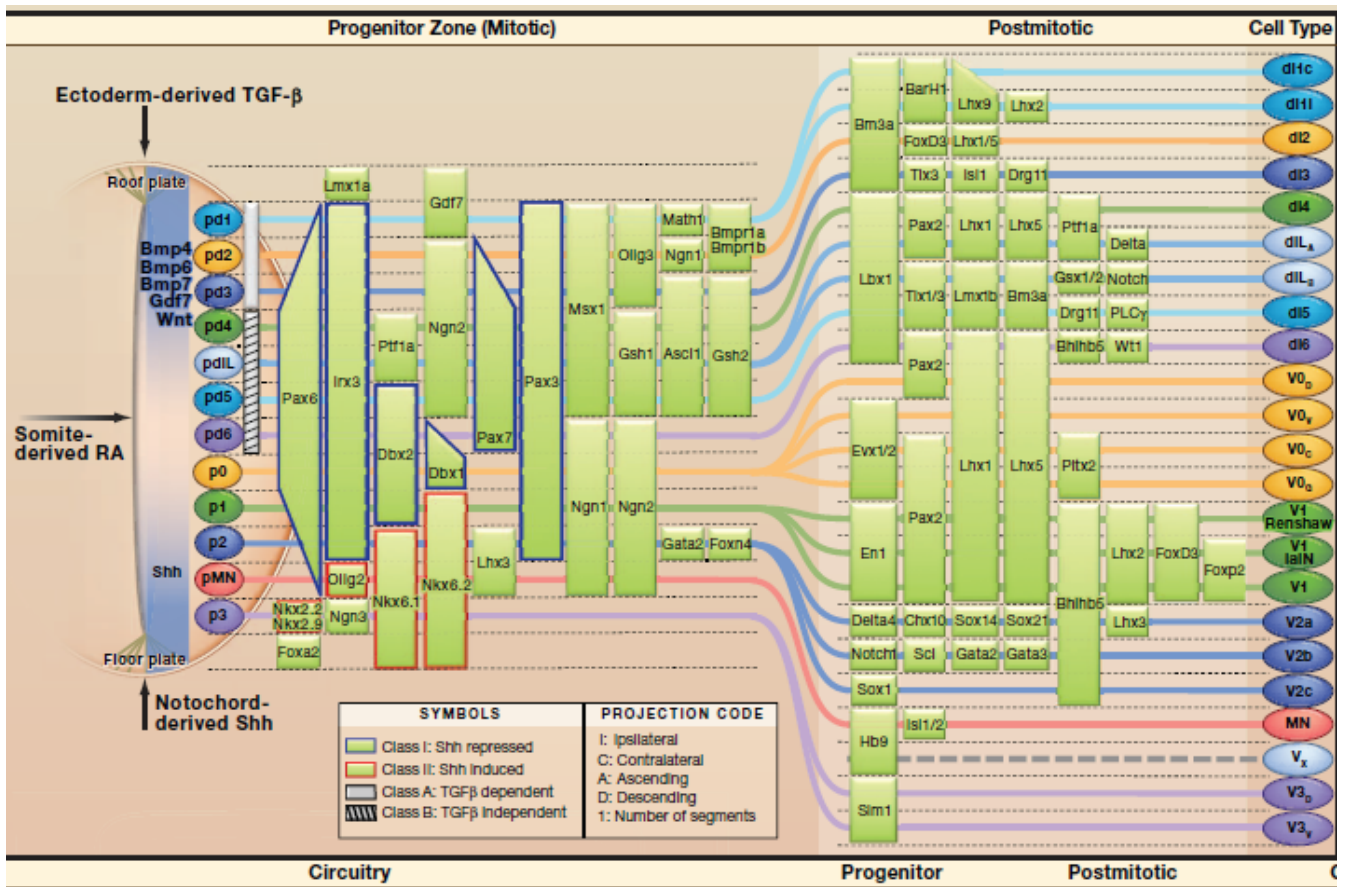
Εικόνα 3.12. Η υπερέκφραση της κινάσης *Dyrk1B* στο αναπτυξιακό στάδιο E2 προωθεί τη νευρωνική διαφοροποίηση στο E4. **A, B.** Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις σε νωπιαίο μυελό εμβρύων κοτόπουλου τα οποία έχουν υποστεί μονόπλευρη *in ovo* ηλεκτροδιάτρηση στο στάδιο E2 και ανάλυση που έγινε στο στάδιο E4. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με υπολογισμό του σχετικού δείκτη ο οποίος αντιστοιχεί στο λόγο των διπλών θετικών κυττάρων GFP⁺ /εκάστοτε ειδικό δείκτη⁺ προς το σύνολο των GFP⁺ κυττάρων. **A, B.** Ο σχετικός δείκτης των ηλεκτροδιατρηθέντων με *Dyrk1B*⁺/GFP⁺ κυττάρων τα οποία συνεκφράζουν το δείκτη DCX (doublecortin, διπλοκορτίνη) αυξάνεται κατά 1,39 φορές \pm 0,13 ($p \leq 0.05$, $n=13$ τομές από 4 έμβρυα) σε σύγκριση με τα ηλεκτροδιατρηθέντα με GFP έμβρυα ελέγχου. **C, D.** Ο σχετικός δείκτης των ηλεκτροδιατρηθέντων με *Dyrk1B*⁺/GFP⁺ κυττάρων τα οποία συνεκφράζουν TuJ1 (βIII-tubulin, βIII τουμπουλίνη) αυξάνεται κατά 1,22 φορές \pm 0,06 ($p \leq 0.01$, $n=24$ τομές από 4 έμβρυα) σε σύγκριση με τα GFP⁺ κύτταρα στα έμβρυα ελέγχου. Ράβδοι κλίμακας (scale bars): 100 μ m. TO-PRO-3: Χρώση πυρήνων. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως Μέση τιμή \pm Τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (standard error of the mean, SEM), * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; ns, non-significant, μη σημαντικό (two-tailed Unequal variance t-test). Οι τομές του νωπιαίου μυελού αντιστοιχούν στο βραχιόνιο (brachial) επίπεδο.

3.2.2. Η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B προωθεί την απόπτωση ειδικά στην περιοχή των κινητικών νευρώνων και μειώνει τον αριθμό των κινητικών νευρώνων και των ενδιάμεσων νευρώνων της περιοχής V2a

Καθώς είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι η Dyrk1B έχει έναν αντι-αποπτωτικό ρόλο [83] στη μυογένεση [126] και τον καρκίνο [121,143,154,239], διερευνήθηκε εάν έχει παρόμοια λειτουργία στον αναπτυσσόμενο νωτιαίο μυελό του κοτόπουλου. Είναι γνωστό ότι η απόπτωση των κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού (spinal motor neurons, SpMNs) (Σχ. 1) λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του νωτιαίου μυελού σε διακριτά αναπτυξιακά στάδια, κατά μήκος του προσθιο-οπίσθιου άξονα (rostral-caudal axis) του νωτιαίου μυελού [258–260]. Συγκεκριμένα, στο νευρικό σωλήνα του εμβρύου του κοτόπουλου ηλικίας E4 η απόπτωση συμβαίνει φυσιολογικά στο βραχιόνιο επίπεδο (brachial level), όπου και ο τελικός αριθμός των κινητικών νευρώνων (motor neurons, MNs) σταθεροποιείται στο μεταγενέστερο στάδιο E15 [259]. Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B έχει επίδραση στην απόπτωση των κινητικών νευρώνων, συγκρίθηκε η έκφραση της ενεργοποιημένης Caspase-3 (κασπάση 3) στην ηλεκτροδιατρηθείσα πλευρά του νωτιαίου μυελού σε σχέση με την μη ηλεκτροδιατρηθείσα στα πειραματικά έμβρυα Dyrk1B/GFP και στα έμβρυα ελέγχου GFP. Αρχικά, διαπιστώθηκε ότι και στις δύο πειραματικές ομάδες η απόπτωση ήταν περιορισμένη στην περιοχή των κινητικών νευρώνων (motor neuron domain, MN), το οποίο και βρίσκεται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία. Απροσδόκητα, το ποσοστό των Casp3⁺/Islet1/2⁺ κυττάρων προς το σύνολο των πυρήνων αυξήθηκε κατά 102,74% ± 17,02 (**p<0.001, n=12 τομές από 4 έμβρυα) στην ηλεκτροδιατρηθείσα πλευρά των εμβρύων Dyrk1B/GFP, συγκρινόμενη με την αντίθετη (contralateral) μη ηλεκτροδιατρηθείσα πλευρά, ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των αντίστοιχων δύο πλευρών του νωτιαίου μυελού στα έμβρυα ελέγχου GFP (Εικ. 3.13A,B). Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B προωθεί την απόπτωση στην περιοχή των κινητικών νευρώνων (motor neuron domain, MN), διαφορετικά από τον προηγουμένως περιγραφόμενο αντι-αποπτωτικό ρόλο της Dyrk1B, προτείνοντας ότι η λειτουργία της κινάσης Dyrk1B στην κυτταρική επιβίωση και απόπτωση εξαρτάται από τον ιστό και /ή το γενικότερο πλαίσιο (tissue- and /or context-dependent).

Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση της κινάσης Dyrk1B στην περιοχή των κινητικών νευρώνων (MN), έγινε αμφίπλευρη σύγκριση των Olig2⁺ προγονικών κυττάρων των κινητικών νευρώνων (motor neuron progenitors, pMN) στα πειραματικά έμβρυα Dyrk1B/GFP και στα έμβρυα ελέγχου GFP. Η ποσοτικοποίηση σε αυτή την περίπτωση και εφεξής έγινε με τη μέτρηση του συνολικού αριθμού των θετικών κυττάρων για κάθε επιλεγμένο δείκτη και κανονικοποίηση (normalization) ως προς τον αριθμό των συνολικών κυτταρικών πυρήνων και εκφράστηκε ως ποσοστό. Εκτιμήθηκε ότι το ποσοστό των Olig2⁺ προγονικών κυττάρων των κινητικών νευρώνων στην ηλεκτροδιατρηθείσα πλευρά των πειραματικών εμβρύων Dyrk1B/GFP μειώθηκε κατά 25,12% ± 3,11 (**p<0.001, n= 17 τομές από 4 έμβρυα) σε σύγκριση με τη μη ηλεκτροδιατρηθείσα πλευρά,

ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των αντιστοιχών δύο πλευρών στα έμβρυα ελέγχου GFP (Εικ. 3.13C,D).

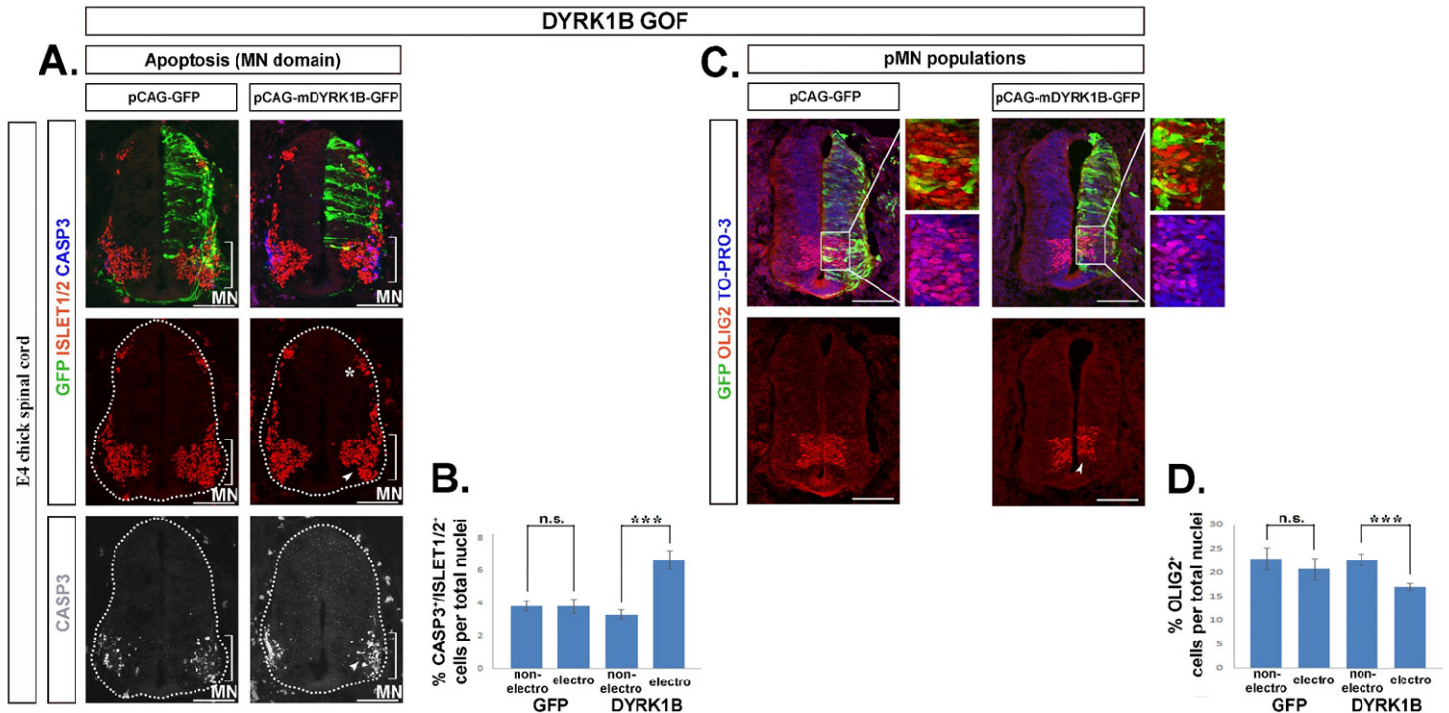


Σχήμα 1. Η κυτταρική οργάνωση του νωτιαίου μυελού. Απεικονίζονται οι περιοχές των προγονικών κυττάρων (progenitors) τα οποία θα δώσουν γένεση στους διάφορους τύπους μεταμιτωτικών νευρώνων κατά μήκος του ραχιαίο-κοιλιακού άξονα που διακρίνονται σε ενδιάμεσους νευρώνες (interneurons, INs) και κινητικούς νευρώνες (motor neurons, MNs) οι οποίοι εντοπίζονται στην κοιλιακή περιοχή του νωτιαίου μυελού. Κάθε περιοχή χαρακτηρίζεται από την έκφραση συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων, των οποίων η έκφραση επάγεται από τα μορφογόνα Shh, BMPs (bone morphogenetic proteins, μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών), τα μόρια Wnt και TGF-β που σχηματίζουν κλίση συγκέντρωσης κατά μήκος του ραχιαίο-κοιλιακού άξονα του νωτιαίου μυελού, καθώς και από το ρετινοϊκό οξύ (retinoic acid, RA) που παράγεται από τους σωματίτες. Ανάμεσα στους διάφορους τύπους προγονικών κυττάρων διακρίνονται κοιλιακά οι περιοχές των προγονικών κυττάρων p0, p1, p2, p3 τα οποία και θα δώσουν γένεση στους κοιλιακούς ενδιάμεσους νευρώνες των περιοχών V1, V2 (V2a, V2b, V2c), αλλά και V3 (V3₀ και V3_v). Επίσης, διακρίνεται κοιλιακά η περιοχή των προγονικών κυττάρων τα οποία θα δώσουν γένεση στους κινητικούς νευρώνες (pMNs), αλλά και η περιοχή των μεταμιτωτικών κινητικών νευρώνων (MNs) (προσαρμοσμένο από [41]).

Σε συμφωνία, το ποσοστό των κινητικών νευρώνων (MNs) θετικών για το μεταγραφικό παράγοντα ομοιωτικής αλληλουχίας (homeobox) Hb9 (Homeobox protein 9, Πρωτεΐνη ομοιωτικής αλληλουχίας 9), η οποία εκφράζεται στους πρώιμους και όψιμους μεταμιτωτικούς κινητικούς νευρώνες ^[71], μειώθηκε κατά 20,33% ± 1,67 (**p≤0.001, n=17 τομές από 4 έμβρυα) στην ηλεκτροδιατρηθείσα πλευρά των εμβρύων Dyrk1B/GFP σε σχέση με τη μη ηλεκτροδιατρηθείσα, ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δύο αντίστοιχων πλευρών των εμβρύων ελέγχου GFP (**Εικ. 3.14A,B**). Επιπροσθέτως, το ποσοστό των Islet1/2⁺ μεταμιτωτικών ώριμων κινητικών νευρώνων επίσης μειώθηκε κατά 16,25% ± 3,60 (**p≤0.01, n= 15 τομές από 4 έμβρυα) στην ηλεκτροδιατρηθείσα πλευρά των πειραματικών εμβρύων Dyrk1B/GFP σε σχέση με τη μη ηλεκτροδιατρηθείσα, ενώ, επίσης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δύο αντίστοιχων πλευρών των εμβρύων ελέγχου GFP (**Εικ. 3.14C,D**). Σημειωτέον, η επίδραση της εξαναγκασμένης έκφρασης της Dyrk1B στη μείωση των προγονικών κυττάρων των κινητικών νευρώνων (pMNs) (**Σχ. 1**) και των κινητικών νευρώνων (MNs) ήταν πιο εμφανής όταν η ηλεκτροδιάτρηση Dyrk1B/GFP έφτανε τα πιο κοιλιακά τμήματα του νωτιαίου μυελού, όπως αποκαλύπτεται από την απώλεια των Olig2⁺, Hb9⁺ και Islet1/2⁺ κυττάρων (βλέπε κεφαλές βελών στην **Εικ. 3.13C, 3.14A,C**, αντίστοιχα).

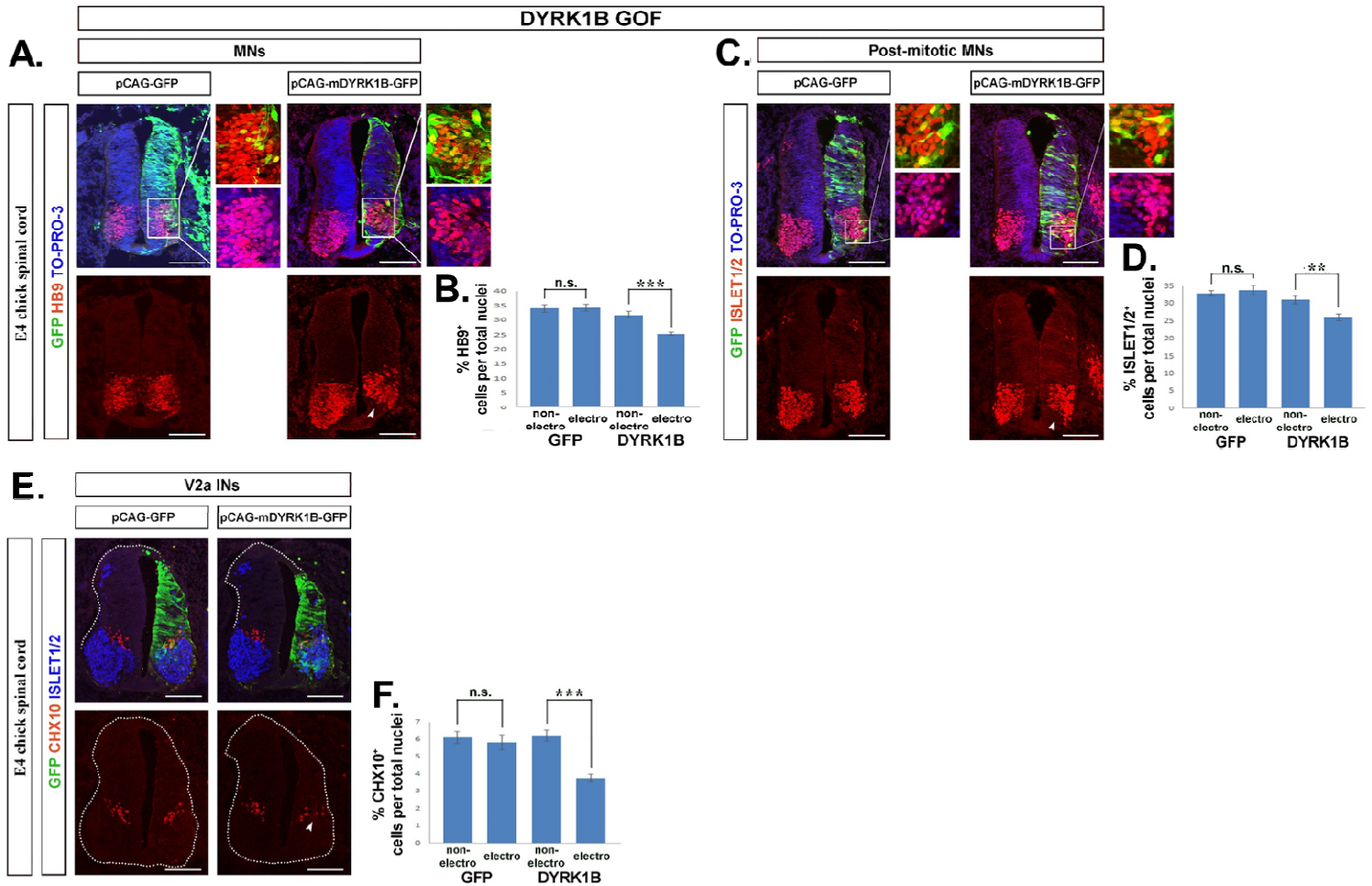
Ένας επιπρόσθετος παρατηρούμενος κοιλιακός φαινότυπος συσχετίσθηκε με τον αριθμό των ενδιάμεσων νευρώνων (interneurons, INs) της περιοχής V2a (**Σχ. 1**), οι οποίοι εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα Chx10 (Homeodomain-containing homolog 10, Ομόλογο 10 περιέχον ομοιωτική περιοχή). Βρέθηκε ότι στην ηλεκτροδιατρηθείσα πλευρά των πειραματικών εμβρύων Dyrk1B/GFP, το ποσοστό των Chx10⁺ ενδιάμεσων νευρώνων μειώθηκε κατά 39,33% ± 3,85 (**p≤0.001, n=20 τομές από 4 έμβρυα) σε σύγκριση με την μη ηλεκτροδιατρηθείσα πλευρά, ενώ, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δύο αντίστοιχων πλευρών των εμβρύων ελέγχου GFP (**Εικ. 3.14E,F**).

Τα δεδομένα αυτά προτείνουν ότι η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B προωθεί την απόπτωση στην περιοχή των κινητικών νευρώνων (motor neuron domain, MN) και μειώνει τους αριθμούς των προγονικών κυττάρων των κινητικών νευρώνων (motor neuron progenitors, pMN), των κινητικών νευρώνων (motor neuron, MNs) και των ενδιάμεσων νευρώνων (interneurons, INs) της περιοχής V2a. Εξάλλου η μείωση των παραπάνω πληθυσμών μπορεί να οφείλεται επιπλέον και στην πρόωρη έξοδο των πολλαπλασιαζόμενων προγονικών κυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο.



Εικόνα 3.13. Η υπερέκφραση της κινάσης *Dyrk1B* στο αναπτυξιακό στάδιο E2 προωθεί την απόπτωση στην περιοχή των κινητικών νευρώνων και μειώνει τον αριθμό των *Olig2⁺* προγονικών κυττάρων των κινητικών νευρώνων στο στάδιο E4. Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις σε νωτιαίο μυελό εμβρύων κοτόπουλου τα οποία έχουν υποστεί μονόπλευρη *in ovo* ηλεκτροδιάτρηση στο στάδιο E2 και ανάλυση που έγινε στο στάδιο E4. Η ποσοτικοποίηση έγινε με τη μέτρηση του συνολικού αριθμού των θετικών κυττάρων για κάθε επιλεγμένο δείκτη και κανονικοποίηση (normalization) ως προς τον αριθμό των συνολικών κυτταρικών πυρήνων και εκφράστηκε ως ποσοστό. Οι συγκρίσεις έγιναν μεταξύ της μη ηλεκτροδιατρηθείσας και ηλεκτροδιατρηθείσας πλευράς για κάθε περίπτωση. **A, B.** Ο κανονικοποιημένος αριθμός των *Casp3⁺/Islet1/2⁺* κυττάρων στην περιοχή των κινητικών νευρώνων (motor neuron domain, MN) (κεφαλές βελών) αυξάνεται κατά $102,74\% \pm 17,02$ ($p \leq 0.001$, $n=12$ τομές από 4 έμβρυα) στην ηλεκτροδιατρηθείσα με *Dyrk1B/GFP* πλευρά του νωτιαίου μυελού, σε σύγκριση με τη μη ηλεκτροδιατρηθείσα πλευρά. Ο αστερίσκος καταδεικνύει τους *Islet1⁺* ραχιαίους μεταμιτωτικούς ενδιάμεσους νευρώνες (interneurons, INs) της περιοχής dl3, οι οποίοι προέρχονται από τα προγονικά κύτταρα rd3, οι οποίοι δεν παρουσιάζουν διαφορές μετά την υπερέκφραση της κινάσης *Dyrk1B*. **C, D.** Η υπερέκφραση της κινάσης *Dyrk1B* οδηγεί σε μειωμένο αριθμό των *Olig2⁺* προγονικών κυττάρων των κινητικών νευρώνων (pMNs) (κεφαλή βέλους) κατά $25,12\% \pm 3,11$ ($p \leq 0.001$, $n=17$ τομές από 4 έμβρυα), σε σχέση με τη μη ηλεκτροδιατρηθείσα πλευρά του νωτιαίου μυελού στα πειραματικά έμβρυα *Dyrk1B/GFP*. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δύο πλευρών στα ηλεκτροδιατρηθέντα με *GFP* έμβρυα ελέγχου, σε όλες τις περιπτώσεις. Ράβδοι κλίμακας (scale bars): 100 μm . TO-PRO-3: Χρώση πυρήνων. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως Μέση τιμή \pm Τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (standard

error of the mean, SEM), * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; ns, non-significant, μη σημαντικό (two-tailed Unequal variance t-test). Οι τομές του νωτιαίου μυελού αντιστοιχούν στο βραχιόνιο (brachial) επίπεδο.



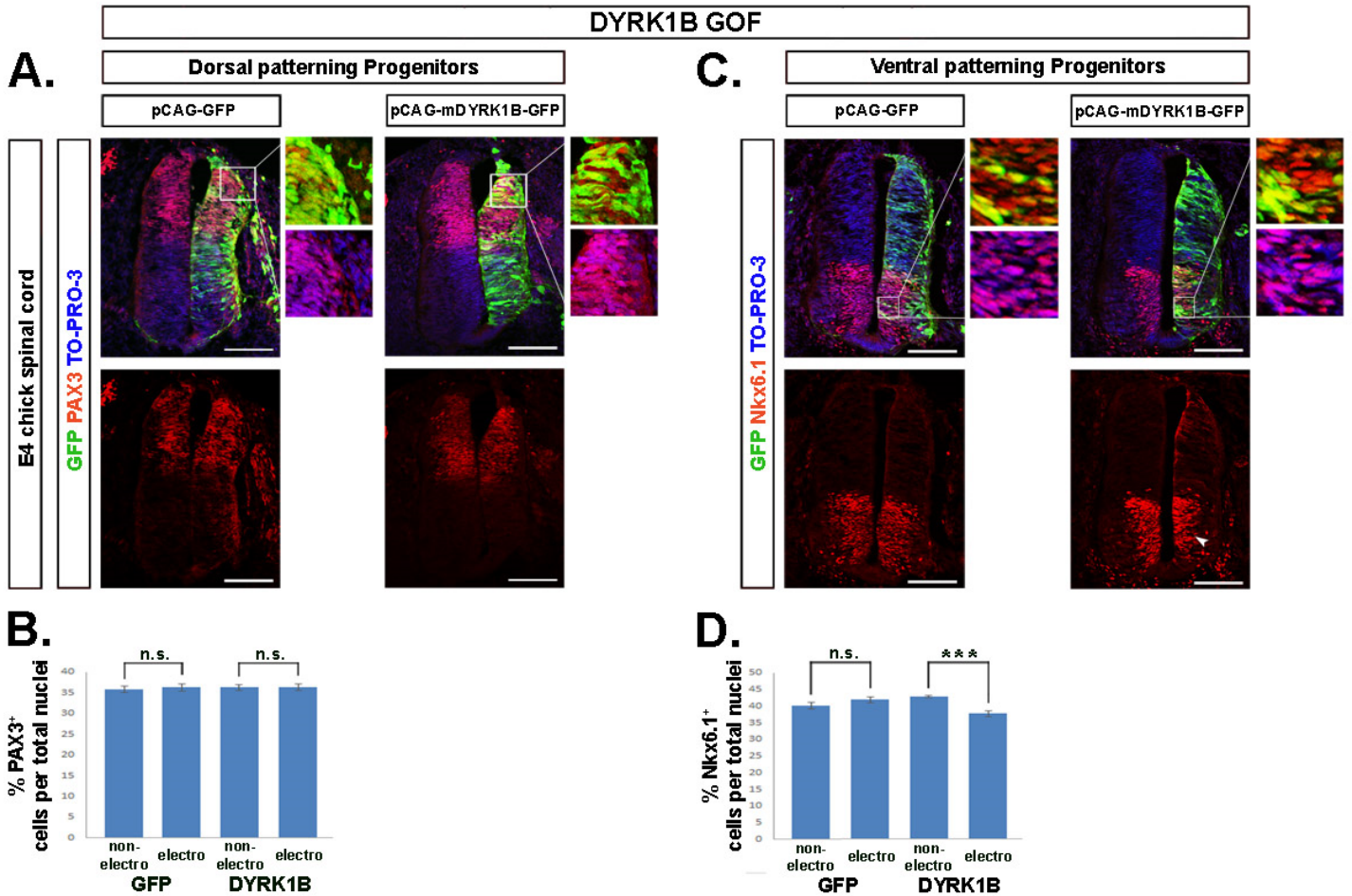
Εικόνα 3.14. Η υπερέκφραση της κινάσης *Dyrk1B* στο αναπτυξιακό στάδιο E2 μειώνει τον αριθμό των HB9⁺ και *Islet1/2*⁺ κινητικών νευρώνων καθώς και τον αριθμό των ενδιάμεσων νευρώνων της περιοχής V2a στο στάδιο E4. Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις σε νωτιαίο μυελό εμβρύων κοτόπουλου τα οποία έχουν υποστεί μονόπλευρη *in ovo* ηλεκτροδιάτρηση στο στάδιο E2 και ανάλυση που έγινε στο στάδιο E4. Η ποσοτικοποίηση έγινε με τη μέτρηση του συνολικού αριθμού των θετικών κυττάρων για κάθε επιλεγμένο δείκτη και κανονικοποίηση (normalization) ως προς τον αριθμό των συνολικών κυτταρικών πυρήνων και εκφράστηκε ως ποσοστό. Οι συγκρίσεις έγιναν μεταξύ της μη ηλεκτροδιατρηθείσας και ηλεκτροδιατρηθείσας πλευράς για κάθε περίπτωση. **A, B.** Η υπερέκφραση της κινάσης *Dyrk1B* οδηγεί σε μειωμένο αριθμό HB9⁺ κινητικών νευρώνων (motor neurons, MNs) (κεφαλή βέλους) κατά 20,33% ± 1,67 ($p \leq 0.001$, $n=17$ τομές από 4 έμβρυα), στο **C, D**, μειωμένο αριθμό των *Islet1/2*⁺ MNs (κεφαλή βέλους) κατά 16,25% ± 3,60 ($p \leq 0.01$, $n=15$ τομές από 4 έμβρυα), καθώς και στο **E, F**, μειωμένο αριθμό των Chx10⁺ ενδιάμεσων νευρώνων (interneurons, INs) της περιοχής V2a (κεφαλή βέλους) κατά 39,33% ± 3,85 ($p \leq 0.001$, $n=20$ τομές από 4 έμβρυα). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δύο πλευρών στα ηλεκτροδιατρηθέντα

με GFP έμβρυα ελέγχου, σε όλες τις περιπτώσεις. Ράβδοι κλίμακας (scale bars): 100 μm . TO-PRO-3: Χρώση πυρήνων. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως Μέση τιμή \pm Τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (standard error of the mean, SEM), * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; ns, non-significant, μη σημαντικό (two-tailed Unequal variance t-test). Οι τομές του νωτιαίου μυελού αντιστοιχούν στο βραχιόνιο (brachial) επίπεδο.

3.2.3. Η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B στο αναπτυξιακό στάδιο E2 επηρεάζει το μόνο το κοιλιακό πρότυπο του εμβρυϊκού νωτιαίου μυελού του κοτόπουλου στο στάδιο E4

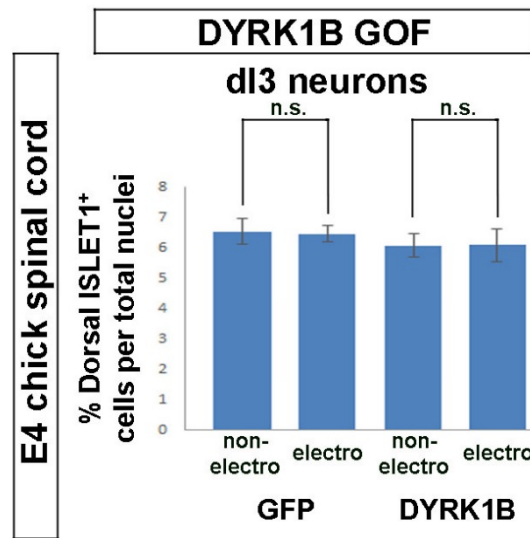
Με τα μέχρι στιγμής δεδομένα, αν και η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B μέσω της ηλεκτροφόρησης διατρέχει όλο το ραχιαίο-κοιλιακό άξονα (dorso-ventral axis) του αναπτυσσόμενου νωτιαίου μυελού του κοτόπουλου, η επίδρασή της εντοπίζεται μόνον κοιλιακά. Για το λόγο αυτό, εξετάσθηκε επιπροσθέτως εάν η Dyrk1B επηρεάζει το ραχιαίο-κοιλιακό πρότυπο (dorso-ventral patterning) του νωτιαίου μυελού. Αυτό επιτεύχθηκε με την εξέταση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Pax3 (Paired box 3, συζευγμένο πλαίσιο 3), ο οποίος εκφράζεται στα ραχιαία προγονικά κύτταρα (**Σχ. 1**) και της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα ομοιωτικής αλληλουχίας (homeodomain transcription factor) Nkx6.1, ο οποίος σηματοδοτεί τα κοιλιακά προγονικά κύτταρα (**Σχ. 1**) και ανήκει στους μεταγραφικούς παράγοντες Τάξης II (Class II), οι οποίοι επάγονται από το μορφογόνο Sonic hedgehog (Shh) [35,40]. Βρέθηκε ότι το ποσοστό των Pax3⁺ κυττάρων δεν επηρεάσθηκε στην ηλεκτροδιατηρηθείσα σε σχέση με τη μη ηλεκτροδιατηρηθείσα πλευρά των πειραματικών εμβρύων Dyrk1B/GFP αλλά και των εμβρύων ελέγχου GFP (**Εικ. 3.15A,B**). Από την άλλη πλευρά, το ποσοστό των Nkx6.1⁺ κυττάρων μειώθηκε κατά 12,18% ± 2,10 (***) p ≤ 0.001, n = 20 τομές από 4 έμβρυα) στα πειραματικά έμβρυα Dyrk1B/GFP (**Εικ. 3.15C,D**), ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές αμφίπλευρα στα έμβρυα ελέγχου GFP. Προκειμένου να επαληθευθεί ότι το ραχιαίο πρότυπο δεν επηρεάζεται από την υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B, εκτιμήθηκε το ποσοστό των Islet1⁺ ραχιαίων μεταμιτωτικών ενδιάμεσων νευρώνων (interneurons, INs) της περιοχής dl3 (υποδεικνυόμενων από έναν αστερίσκο στην **Εικ. 3.13A**). Οι ενδιάμεσοι νευρώνες dl3 προέρχονται από τα προγονικά κύτταρα της ραχιαίας περιοχής rd3 (**Σχ. 1**) και δείχθηκε ότι ο αριθμός τους δεν μεταβάλλεται όταν συγκρίνονται αμφίπλευρα οι νωτιαίοι μυελοί των πειραματικών εμβρύων Dyrk1B/GFP καθώς και των εμβρύων ελέγχου GFP (**Εικ. 3.16**).

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα δεδομένα μαζί, αυτά υποδεικνύουν ότι η υπερέκφραση της Dyrk1B δεν επηρεάζει το ραχιαίο πρότυπο του νωτιαίου μυελού, αλλά μόνο το κοιλιακό. Για αυτό το λόγο, η μελέτη επικεντρώθηκε στη συνέχεια στην κοιλιακή περιοχή του νωτιαίου μυελού και ειδικότερα στις περιοχές p2, pMN και p3 (**Σχ. 1**).



Εικόνα 3.15. Η υπερέκφραση της κινάσης *Dyrk1B* στο αναπτυξιακό στάδιο E2 επηρεάζει το κοιλιακό πρότυπο του εμβρυϊκού νωτιαίου μυελού του κοτόπουλου στο στάδιο E4. Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις σε νωτιαίο μυελό εμβρύων κοτόπουλου τα οποία έχουν υποστεί μονόπλευρη *in ovo* ηλεκτροδιάτρηση στο στάδιο E2 και ανάλυση που έγινε στο στάδιο E4. Η ποσοτικοποίηση έγινε με τη μέτρηση του συνολικού αριθμού των θετικών κυττάρων για κάθε επιλεγμένο δείκτη και κανονικοποίηση (normalization) ως προς τον αριθμό των συνολικών κυτταρικών πυρήνων και εκφράστηκε ως ποσοστό. Οι συγκρίσεις έγιναν μεταξύ της μη ηλεκτροδιατρηθείσας και ηλεκτροδιατρηθείσας πλευράς για κάθε περίπτωση. **A, B.** Η υπερέκφραση της κινάσης *Dyrk1B* δεν επηρεάζει το ραχιαίο πρότυπο του νωτιαίου μυελού, καθώς τα *Pax3*⁺ κύτταρα ραχιαία δεν επηρεάζονται στην ηλεκτροδιατρηθείσα πλευρά των πειραματικών εμβρύων *Dyrk1B*/GFP ($p > 0.05$, $n = 20$ τομές από 4 έμβρυα) όταν ο αριθμός τους συγκρίνεται με τον αντίστοιχο της έναντι πλευράς (contralateral side). **C, D.** αντίθετα, η υπερέκφραση της κινάσης *Dyrk1B* μειώνει τον αριθμό των *Nkx6.1*⁺ κυττάρων κοιλιακά (κεφαλή βέλους) κατά $12,18\% \pm 2,10$ ($p \leq 0.001$, $n = 20$ τομές από 4 έμβρυα), σε σύγκριση με την μη ηλεκτροδιατρηθείσα πλευρά του νωτιαίου μυελού, ενώ δεν παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των δύο πλευρών στα έμβρυα ελέγχου GFP. Ράβδοι κλίμακας (scale bars): 100 μm . TO-PRO-3: Χρώση πυρήνων. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως Μέση τιμή \pm Τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (standard error of the mean, SEM), * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$;

ns, non-significant, μη σημαντικό (two-tailed Unequal variance t-test). Οι τομές του νωτιαίου μυελού αντιστοιχούν στο βραχιόνιο (brachial) επίπεδο.



Εικόνα 3.16. Η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B στο νωτιαίο μυελό του κοτόπουλου αναπτυξιακού σταδίου E2 δεν επηρεάζει το ραχιαίο πρότυπο στο στάδιο E4. Η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B δεν επηρέασε τον κανονικοποιημένο αριθμό των Islet1⁺ ραχιαίων ενδιάμεσων νευρώνων (interneurons, INs) της περιοχής dl3 (η κανονικοποίηση έγινε ως προς τους συνολικούς πυρήνες), όταν συγκρίθηκε ο νωτιαίος μυελός ετερόπλευρα στα ηλεκτροδιατηρηθέντα με Dyrk1B/GFP πειραματικά έμβρυα. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ετερόπλευρα στα ηλεκτροδιατηρηθέντα με GFP έμβρυα ελέγχου ($p > 0.05$, $n = 12$ τομές από 4 έμβρυα). Οι Islet1⁺ ραχιαίοι ενδιάμεσοι νευρώνες (interneurons, INs) της περιοχής dl3 υποδεικνύονται με έναν αστερίσκο στην **Εικ. 3.13A**). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως Μέση τιμή \pm Τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής, standard error of the mean, SEM), * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; ns, non-significant, μη σημαντικό (two-tailed Unequal variance t-test).

3.3. *In vivo* μελέτη του λειτουργικού ρόλου της Dyrk1B στην ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού του κοτόπουλου – Πειράματα ‘απώλειας λειτουργίας’

3.3.1. Ο εκλεκτικός αναστολέας AZ191 της κινάσης Dyrk1B αυξάνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό οδηγώντας σε αυξημένο αριθμό των κοιλιακών προγονικών κυττάρων p2, pMN, p3 καθώς και των κινητικών νευρώνων

Τα πειράματα ‘προσθήκης λειτουργίας’ (*gain-of-function*, GOF) έδειξαν ότι η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B προωθεί την απόπτωση στην περιοχή των κινητικών νευρώνων (motor neuron domain, MN) και μειώνει τους αριθμούς των προγονικών κυττάρων των κινητικών νευρώνων (motor neuron progenitors, pMNs), των κινητικών νευρώνων (motor neuron, MNs) και των ενδιάμεσων νευρώνων (interneurons, INs) της περιοχής V2a. Επιπροσθέτως, η μείωση των παραπάνω πληθυσμών ενδεχομένως να οφείλεται επιπλέον και στην πρόωρη έξοδο των πολλαπλασιαζόμενων προγονικών κυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο. Γι’ αυτούς τους λόγους και για την περαιτέρω διερεύνηση της λειτουργίας της κινάσης Dyrk1B στην ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ‘απώλειας λειτουργίας’ (*loss-of-function*, LOF) πραγματοποιώντας φαρμακολογική αναστολή της ενεργότητας της ενδογενούς κινάσης Dyrk1B του κοτόπουλου, με τη χρήση του μικρού μορίου AZ191, που αποτελεί εκλεκτικό αναστολέα της κινάσης Dyrk1B [112,238]. Στα έμβρυα κοτόπουλου χορηγήθηκαν 600 μ g AZ191, μέσω ένεσης, στο αναπτυξιακό στάδιο E2 και 48 h αργότερα, στο στάδιο E4, αναλύθηκε η επίδραση της αναστολής της ενδογενούς κινάσης Dyrk1B. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με σύγκριση των πειραματικών εμβρύων που έχουν κατεργασθεί με τον αναστολέα AZ191 σε σχέση με τα κατεργασμένα έμβρυα με DMSO (dimethylsulfoxide, διμεθυλο-σουλφοξειδίο) (vehicle, ‘όχημα’) ή με τα μη κατεργασμένα έμβρυα φυσικού τύπου (wild type, WT), τα οποία αποτελούν τα έμβρυα ελέγχου. Η ποσοτικοποίηση έγινε με τη μέτρηση του συνολικού αριθμού των θετικών κυττάρων για κάθε επιλεγμένο δείκτη και κανονικοποίηση (normalization) ως προς τον αριθμό των συνολικών κυτταρικών πυρήνων και εκφράστηκε ως ποσοστό.

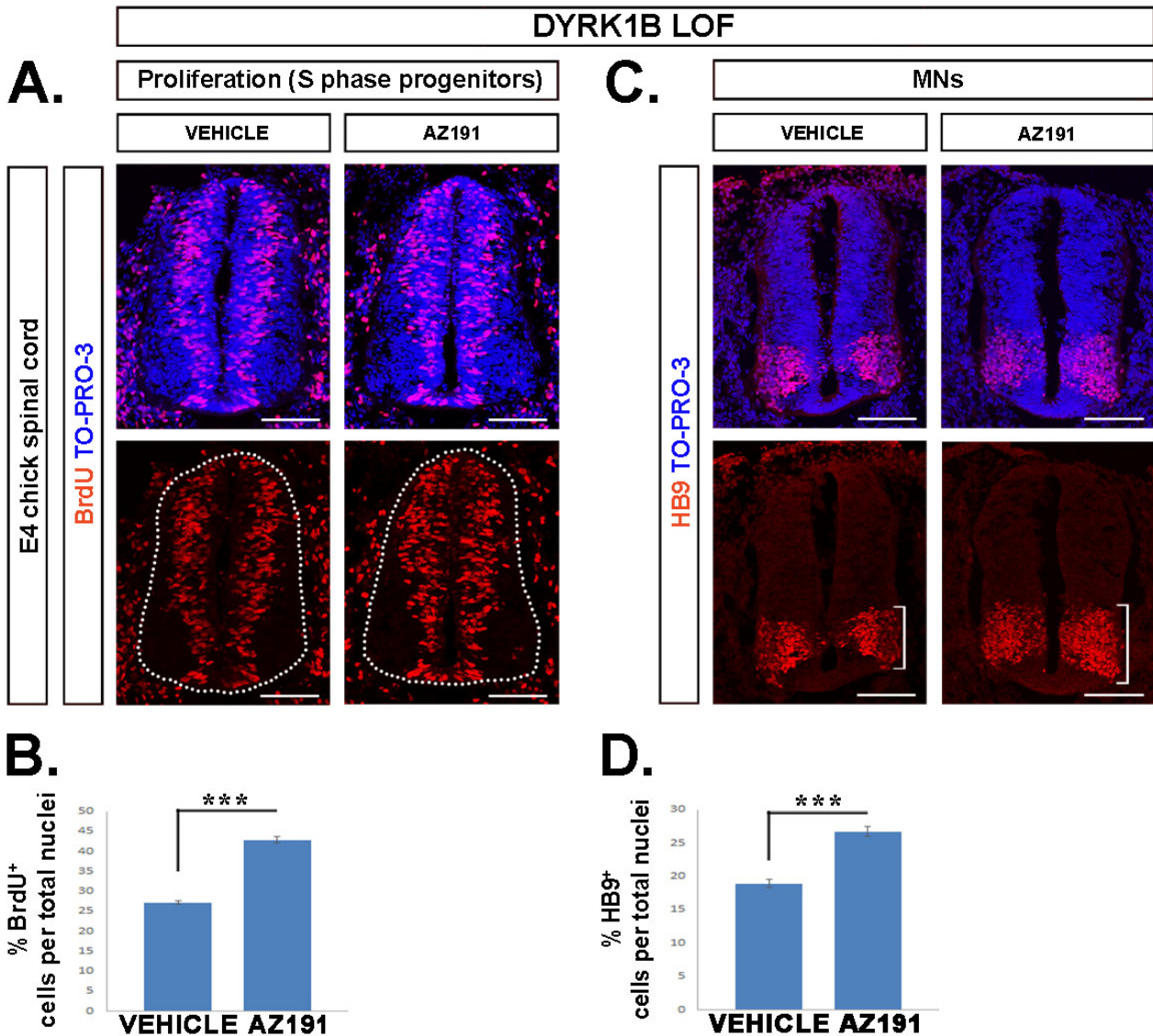
Πρώτα, ελέγχθηκε η επίδραση του αναστολέα AZ191 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με τη μέτρηση του συνολικού αριθμού των πολλαπλασιαζόμενων BrdU⁺ κυττάρων, ευρισκόμενων στη φάση S, ύστερα από έναν ‘παλμό’ 2 h (2-h pulse) προτού οι ιστοί συλλεχθούν προς ανάλυση. Το ποσοστό των BrdU⁺ κυττάρων στα έμβρυα κατεργασμένα με AZ191 αυξήθηκε κατά $57,51\% \pm 3,05$ (***) $p \leq 0.001$, n=22 τομές από 4 έμβρυα), σε σύγκριση με τα έμβρυα ελέγχου (‘όχημα’, DMSO) (**Εικ. 3.17A,B**). Σε συμφωνία, το αντίστοιχο ποσοστό των PH3⁺ κυττάρων επίσης αυξήθηκε κατά $48,32 \pm 10,69$ (***) $p \leq 0.01$, n=12 τομές από 4 έμβρυα) (**Εικ. 3.19A,B**). Ιδιαίτερως, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στους πληθυσμούς BrdU⁺ κυττάρων (δεν παρουσιάζονται δεδομένα) και PH3⁺ κυττάρων

(**Εικ. 3.19A,B**), μεταξύ των εμβρύων ελέγχου κατεργασμένων με DMSO και των μη κατεργασμένων (untreated) εμβρύων φυσικού τύπου (WT).

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η επίδραση του αναστολέα AZ191 στα κοιλιακά προγονικά κύτταρα p2, από τα οποία θα προέλθουν οι ενδιάμεσοι νευρώνες των περιοχών V2a, V2b, V2c, στα προγονικά κύτταρα των κινητικών νευρώνων, pMNs τα οποία θα δώσουν γένεση στους κινητικούς νευρώνες MNs, και στα προγονικά κύτταρα p3 από τα οποία θα προκύψουν οι ενδιάμεσοι νευρώνες της περιοχής V3. Στα πειραματικά έμβρυα που είναι κατεργασμένα με τον αναστολέα AZ191 τα ποσοστά των προγονικών κυττάρων p2 (Nkx6.1⁺/Olig2⁻), pMN (Nkx6.1⁺/Olig2⁺) και p3 (Nkx6.1⁺/Olig2⁻) αυξήθηκαν κατά 32,57% ± 9,86% (**p≤0.01, n=23 τομές από 4 έμβρυα), 31,90% ± 4,89 (**p≤0.001, n=23 τομές από 4 έμβρυα) και κατά 61,25% ± 23,75 (*p≤0.05, n=23 τομές από 4 έμβρυα), αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα έμβρυα ελέγχου ('όχημα', DMSO) (**Εικ. 3.18**).

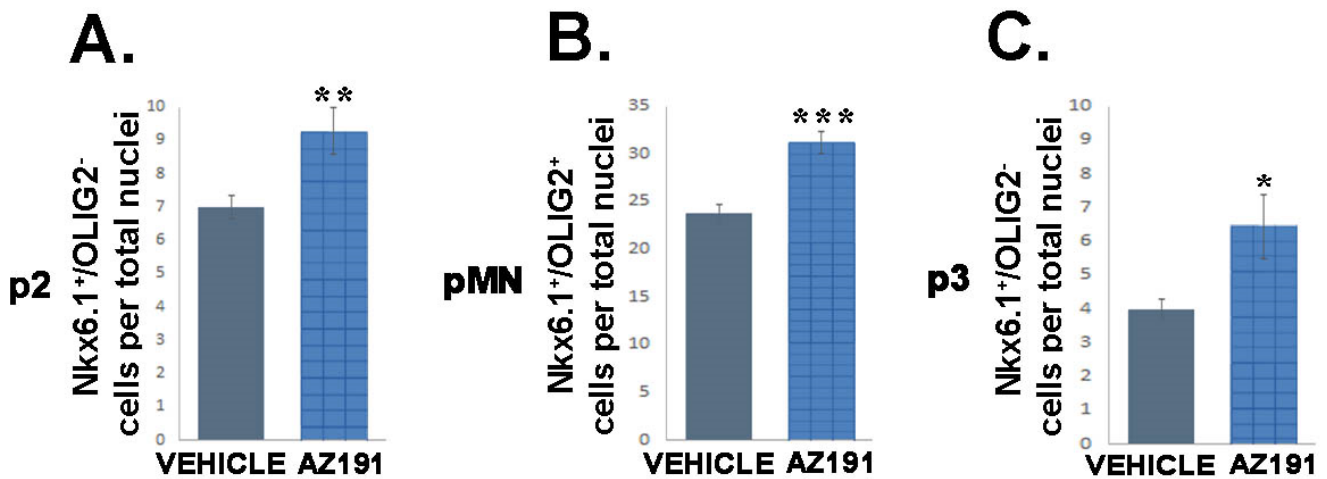
Περαιτέρω, διερευνήθηκε η επίδραση του αναστολέα AZ191 στον αριθμό των κινητικών νευρώνων, MNs. Αφενός, στα κατεργασμένα έμβρυα με τον αναστολέα AZ191 το ποσοστό των Islet1/2⁺ κινητικών νευρώνων (MNs) αυξήθηκε κατά 33,12% ± 6,86 (**p≤0.001, n=14 τομές από 4 έμβρυα) σε σχέση με τα έμβρυα ελέγχου φυσικού τύπου (WT) (**Εικ. 3.20A,B**). Επίσης, το ποσοστό των Hb9⁺ πρώιμων και όψιμων κινητικών νευρώνων αυξήθηκε κατά 41,26% ± 4,07 (**p≤0.001, n=17 τομές από 4 έμβρυα) (**Εικ. 3.17C,D**), σε σύγκριση με τα έμβρυα ελέγχου ('όχημα', DMSO). Σε όλες τις περιπτώσεις, τα έμβρυα ελέγχου κατεργασμένα με DMSO δεν έδειξαν διαφορές σε σύγκριση με τα μη κατεργασμένα έμβρυα φυσικού τύπου (WT).

Τα παραπάνω δεδομένα προτείνουν ότι η αναστολή δραστηριότητας της ενδογενούς κινάσης Dyrk1B αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των νευρωνικών προγονικών κυττάρων (neuroglial progenitors) και οδηγεί σε αυξημένους πληθυσμούς των προγονικών κυττάρων p2, pMN, p3 καθώς και των κινητικών νευρώνων MNs.



Εικόνα 3.17. Η χορήγηση του αναστολέα AZ191 στο αναπτυξιακό στάδιο E2 αυξάνει τον αριθμό των πολλαπλασιαζόμενων προγονικών κυττάρων οδηγώντας σε αύξηση των κινητικών νευρώνων στο στάδιο E4. Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις σε νωτιαίο μυελό εμβρύων κοτόπουλου αναπτυξιακού σταδίου E4 στα οποία έχει χορηγηθεί ο αναστολέας της κινάσης Dyrk1B AZ191 (600 μg) στο στάδιο E2. Η ποσοτικοποίηση έγινε με τη μέτρηση του συνολικού αριθμού των θετικών κυττάρων για κάθε επιλεγμένο δείκτη και κανονικοποίηση (normalization) ως προς τον αριθμό των συνολικών κυτταρικών πυρήνων και εκφράστηκε ως ποσοστό. Οι συγκρίσεις έγιναν μεταξύ των πειραματικών εμβρύων κατεργασμένων με τον αναστολέα AZ191 και των εμβρύων ελέγχου (vehicle, 'όχημα', DMSO), για κάθε περίπτωση. **A, B.** Αναστολή της ενεργότητας της ενδογενούς κινάσης Dyrk1B μέσω της χορήγησης του αναστολέα AZ191 στο νωτιαίο μυελό ηλικίας E2 οδηγεί σε αυξημένο αριθμό BrdU⁺ πολλαπλασιαζόμενων προγονικών κυττάρων κατά $57,51\% \pm 3,05$ ($p \leq 0.001$, $n=22$ τομές από 4 έμβρυα) καθώς και στο **C, D** αυξημένο αριθμό HB9⁺ μεταμιτωτικών κινητικών νευρώνων (MNs) κατά $41,26\% \pm 4,07$ ($p \leq 0.001$, $n=17$ τομές από 4 έμβρυα), σε σύγκριση με τα έμβρυα ελέγχου (vehicle, 'όχημα', DMSO). Ράβδοι κλίμακας (scale bars): 100 μm. TO-PRO-3:

Χρώση πυρήνων. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως Μέση τιμή \pm Τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (standard error of the mean, SEM), * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; ns, non-significant, μη σημαντικό (two-tailed Unequal variance t-test). Οι τομές του νωτιαίου μυελού αντιστοιχούν στο βραχιόνιο (brachial) επίπεδο.



Εικόνα 3.18. Η χορήγηση του αναστολέα AZ191 στο αναπτυξιακό στάδιο E2 οδηγεί στην αύξηση του αριθμού των κοιλιακών προγονικών κυττάρων στις περιοχές p2, pMN και p3 στον εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του κοτόπουλου σταδίου E4. Οι μετρήσεις έχουν προκύψει από ανοσοϊστοχημική ανάλυση σε νωτιαίο μυελό εμβρύων κοτόπουλου αναπτυξιακού σταδίου E4 στα οποία έχει χορηγηθεί ο αναστολέας της κινάσης Dyrk1B AZ191 (600 μg) στο στάδιο E2. Η ποσοτικοποίηση έγινε με τη μέτρηση του συνολικού αριθμού των θετικών κυττάρων για κάθε επιλεγμένο δείκτη και κανονικοποίηση (normalization) ως προς τον αριθμό των συνολικών κυτταρικών πυρήνων και εκφράστηκε ως ποσοστό. Οι συγκρίσεις έγιναν μεταξύ των πειραματικών εμβρύων κατεργασμένων με τον αναστολέα AZ191 και των εμβρύων ελέγχου (vehicle, 'όχημα', DMSO), για κάθε περίπτωση. Η χορήγηση του αναστολέα AZ191 στο E2 οδηγεί στην αύξηση του κανονικοποιημένου προς συνολικούς πυρήνες αριθμού των **A.** προγονικών κυττάρων p2 (Nkx6.1+/Olig2⁻) κατά 32,57% ± 9,86 (p<0.01, n=23 τομές από 4 έμβρυα), **B.** προγονικών κυττάρων pMN (Nkx6.1+/Olig2⁺) κατά 31,90% ± 4,89 (p<0.001, n=23 τομές από 4 έμβρυα) και **C.** προγονικών κυττάρων p3 (Nkx6.1+/Olig2⁻) κατά 61,25% ± 23,75 (p<0.05, n=23 τομές από 4 έμβρυα). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως Μέση τιμή ± Τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (standard error of the mean, SEM), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; ns, non-significant, μη σημαντικό (two-tailed Unequal variance t-test).

3.3.2. Η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B στο αναπτυξιακό στάδιο E2 αντιστρέφει τον προκαλούμενο από τον αναστολέα AZ191 φαινότυπο στον εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του κοτόπουλου στο στάδιο E4

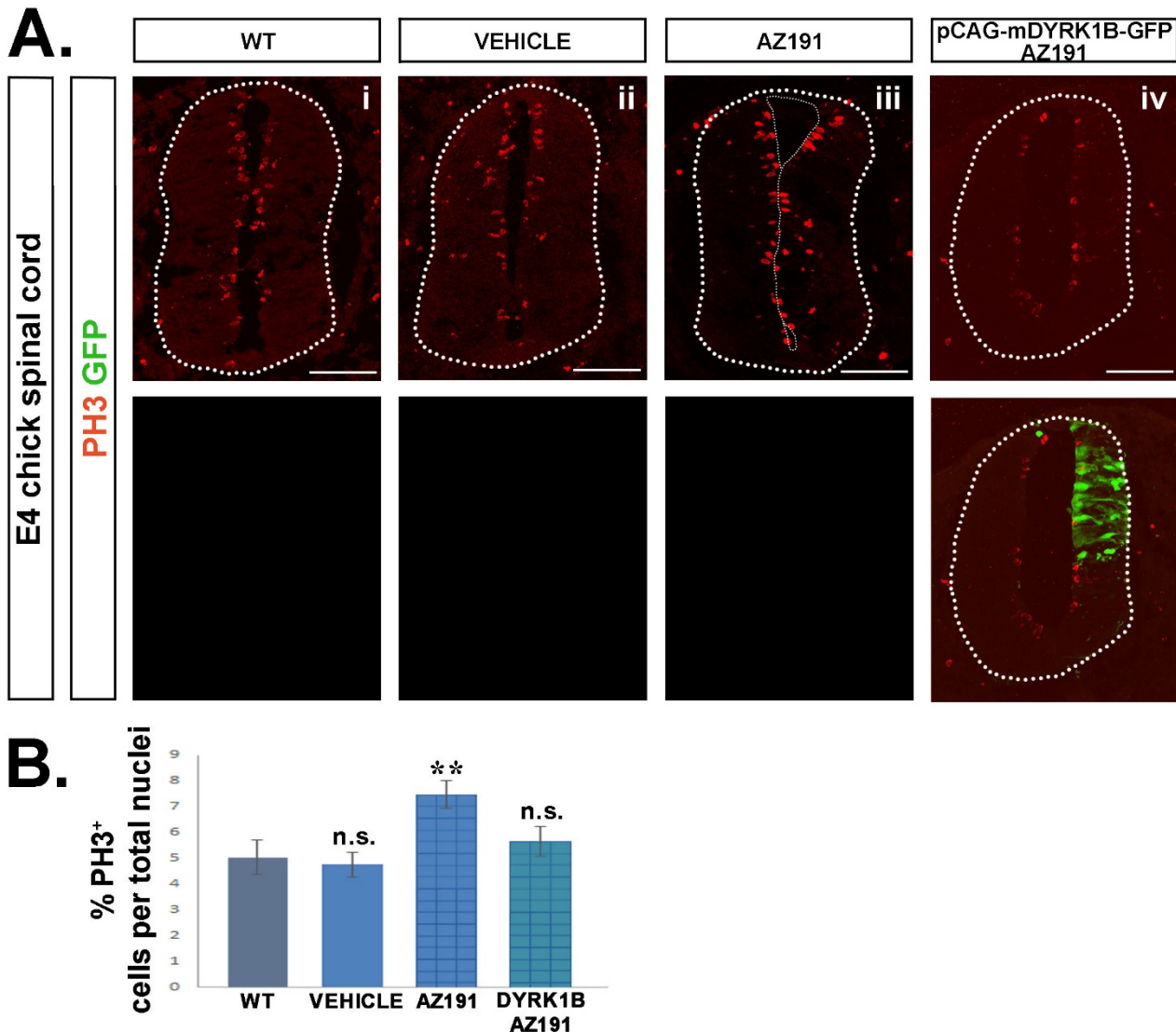
Τα παραπάνω δεδομένα έδειξαν ότι η αναστολή δραστηριότητας της ενδογενούς κινάσης Dyrk1B, από τον εκλεκτικό αναστολέα AZ191, αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των νευρωνικών προγονικών κυττάρων (neuronal progenitors) και οδηγεί σε αυξημένους αριθμούς των προγονικών κυττάρων p2, pMN, p3 καθώς και των κινητικών νευρώνων MNs. Επομένως, προκειμένου να ελεγχθεί η ειδικότητα του αναστολέα AZ191 για την ενεργότητα κινάσης της Dyrk1B, πραγματοποιήθηκαν μηχανιστικά πειράματα 'διάσωσης φαινοτύπου' (mechanistic *phenotype rescue* experiments). Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε μονόπλευρη *in ovo* ηλεκτροδιάτρηση με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGAG-mDyrk1B-IRES-NLS-GFP σε έμβρυα κοτόπουλου ηλικίας E2 (πειραματικά έμβρυα Dyrk1B/GFP), ακολουθούμενη από χορήγηση με ένεση 600 μg του αναστολέα AZ191, 2h αργότερα. Τα έμβρυα αυτά (Dyrk1B/GFP/AZ191) συγκρίθηκαν με έμβρυα μη κατεργασμένα έμβρυα ελέγχου φυσικού τύπου (wild type, WT), έμβρυα ελέγχου κατεργασμένα με DMSO (vehicle, όχημα) και έμβρυα κατεργασμένα μόνο με τον αναστολέα AZ191 (AZ191). Συγκεκριμένα εξετάστηκαν όλες οι παραπάνω πειραματικές συνθήκες στον πολλαπλασιασμό με χρήση του δείκτη PH3, καθώς και στην επίδρασή τους στον πληθυσμό των κινητικών νευρώνων (MNs) με χρήση του δείκτη Islet1/2. Η ποσοτικοποίηση έγινε με τη μέτρηση του συνολικού αριθμού των θετικών κυττάρων για κάθε επιλεγμένο δείκτη και κανονικοποίηση (normalization) ως προς τον αριθμό των συνολικών κυτταρικών πυρήνων και εκφράστηκε ως ποσοστό.

Δείχθηκε ότι η αύξηση των PH3⁺ μιτωτικών κυττάρων της κοιλιακής ζώνης (VZ) κατά 48,32% ± 10,69 (**p≤0.01, n=12 τομές από 4 έμβρυα) που παρατηρήθηκε παρουσία του αναστολέα AZ191 διασώθηκε με την ταυτόχρονη ηλεκτροδιάτρηση και υπερέκφραση της Dyrk1B/GFP (**Εικ. 3.19**). Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές μεταξύ των μη κατεργασμένων εμβρύων ελέγχου (WT) και των εμβρύων ελέγχου κατεργασμένων με DMSO (vehicle, όχημα), ενώ στα κατεργασμένα με τον αναστολέα AZ191 έμβρυα το ποσοστό των PH3⁺ κυττάρων αυξήθηκε, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Αυτή η επίδραση προερχόμενη από τον αναστολέα AZ191 αποκαταστάθηκε από την ηλεκτροδιάτρηση και υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B/GFP (**Εικ. 3.19B**).

Ομοίως, η διαμεσολαβούμενη από τον αναστολέα AZ191 αύξηση των Islet1/2⁺ κινητικών νευρώνων (MNs) (**Εικ. 3.20B**), κατά 33,12% ± 6,86 (***)p≤0.001, n=14 τομές από 4 έμβρυα), επίσης, αποκαταστάθηκε στα φυσιολογικά επίπεδα ύστερα από την υπερέκφραση της Dyrk1B/GFP (**Εικ. 3.20B**). Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στο ποσοστό των Islet1/2⁺ μεταμιτωτικών κινητικών νευρώνων (MNs) μεταξύ των εμβρύων ελέγχου φυσικού τύπου (WT) και των κατεργασμένων με DMSO εμβρύων (vehicle, όχημα).

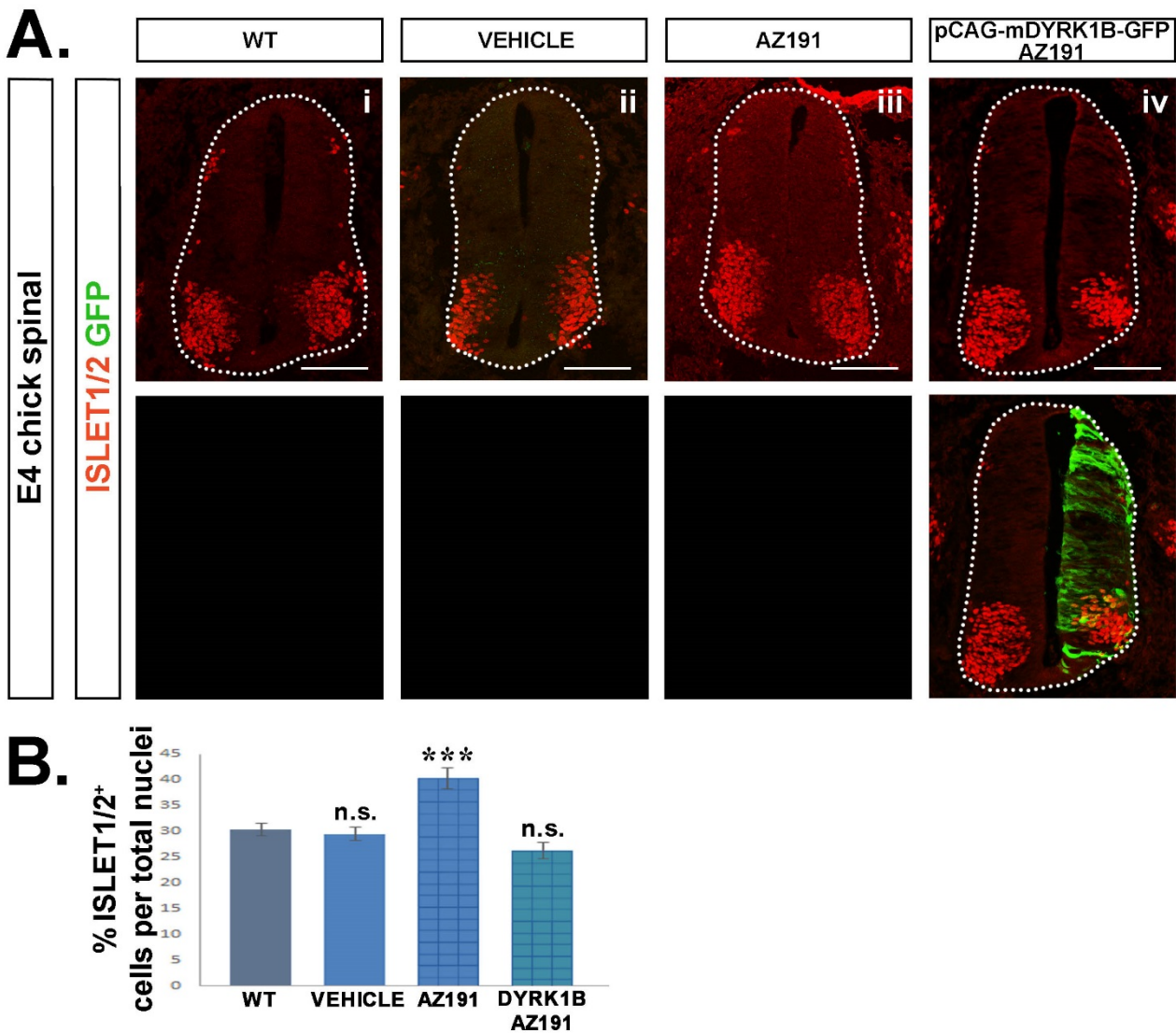
Συνεπώς, τα παραπάνω δεδομένα επιβεβαίωσαν την εκλεκτικότητα του χρησιμοποιούμενου αναστολέα AZ191 ως προς την κινάση Dyrk1B, καθώς ανέστρεψαν και διέσωσαν τον προκαλούμενο

φαινότυπο από την υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B στον εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του κοτόπουλου.



Εικόνα 3.19. Μηχανιστικά πειράματα ‘διάσωσης φαινοτύπου’. Η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B στο αναπτυξιακό στάδιο E2 αντιστρέφει τον προκαλούμενο από τον αναστολέα AZ191 φαινότυπο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στο στάδιο E4. Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις σε νωτιαίο μυελό εμβρύων κοτόπουλου αναπτυξιακού σταδίου E4 τα οποία έχουν ηλεκτροδιατηρηθεί με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGAG-mDyrk1B-IRES-NLS-GFP ή /και στα οποία έχει χορηγηθεί ο αναστολέας της κινάσης Dyrk1B, AZ191 (600 μg) στο στάδιο E2. Η ποσοτικοποίηση έγινε με τη μέτρηση του συνολικού αριθμού των θετικών κυττάρων για κάθε επιλεγμένο δείκτη και κανονικοποίηση (normalization) ως προς τον αριθμό των συνολικών κυτταρικών πυρήνων και εκφράστηκε ως ποσοστό. Οι συγκρίσεις έγιναν μεταξύ της μιας πλευράς των εμβρύων της κάθε πειραματικής περίπτωσης ως προς τη μια πλευρά των μη κατεργασμένων (untreated) εμβρύων φυσικού τύπου (wild type, WT). **A.** Στα μηχανιστικά πειράματα ‘διάσωσης φαινοτύπου’ (mechanistic

phenotype rescue experiments), ο αναστολέας AZ191 χορηγήθηκε σε έμβρυα κοτόπουλου ηλικίας E2, 2h μετά τη μονόπλευρη *in ovo* ηλεκτροδιάτρηση με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGAG-mDyrk1B-IRES-NLS-GFP και ο αριθμός των PH3⁺ μιτωτικών προγονικών κυττάρων τα οποία εντοπίζονται στην κοιλιακή ζώνη (ventricular zone, VZ) μετρήθηκε και συγκρίθηκε με τα PH3⁺ προγονικά κύτταρα στα έμβρυα ελέγχου φυσικού τύπου (WT). Ομοίως, τα κατεργασμένα έμβρυα ελέγχου μόνο με DMSO (vehicle, όχημα) ή μόνο με AZ191 αναλύθηκαν και συγκρίθηκαν με τα έμβρυα ελέγχου φυσικού τύπου (WT). **B.** Η ποσοτικοποίηση δείχνει ότι η αύξηση στον αριθμό των PH3⁺ κυττάρων κατά 48,32% ± 10,69 (p≤0.01, n=12 τομές από 4 έμβρυα) η οποία παρατηρήθηκε μετά από χορήγηση του αναστολέα AZ191 (**Aiii**), επανήλθε στα επίπεδα φυσικού τύπου (WT) (**Ai**) από τη ταυτόχρονη ηλεκτροδιάτρηση του πλασμιδίου pGAG-mDyrk1B-IRES-NLS-GFP (**Aiv**). Επίσης, τα PH3⁺ κύτταρα στα κατεργασμένα έμβρυα ελέγχου με DMSO (vehicle, όχημα) (**Aii**) δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές συγκρινόμενα με τα έμβρυα φυσικού τύπου (WT) (**Ai**). Ράβδοι κλίμακας (scale bars): 100 μm. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως Μέση τιμή ± Τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (standard error of the mean, SEM), *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001; ns, non-significant, μη σημαντικό (two-tailed Unequal variance t-test). Οι τομές του νωτιαίου μυελού αντιστοιχούν στο βραχιόνιο (brachial) επίπεδο.



Εικόνα 3.20. Μηχανιστικά πειράματα ‘διάσωσης φαινοτύπου’. Η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B στο αναπτυξιακό στάδιο E2 αντιστρέφει τον προκαλούμενο από τον αναστολέα AZ191 φαινότυπο στους *Islet1/2⁺* κινητικούς νευρώνες στο στάδιο E4. Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις σε νωτιαίο μυελό εμβρύων κοτόπουλου αναπτυξιακού σταδίου E4 τα οποία έχουν ηλεκτροδιατρηθεί με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGAG-mDyrk1B-IRES-NLS-GFP ή /και στα οποία έχει χορηγηθεί ο αναστολέας της κινάσης Dyrk1B, AZ191 (600 μg) στο στάδιο E2. Η ποσοτικοποίηση έγινε με τη μέτρηση του συνολικού αριθμού των θετικών κυττάρων για κάθε επιλεγμένο δείκτη και κανονικοποίηση (normalization) ως προς τον αριθμό των συνολικών κυτταρικών πυρήνων και εκφράστηκε ως ποσοστό. Οι συγκρίσεις έγιναν μεταξύ της μιας πλευράς των εμβρύων της κάθε πειραματικής περίπτωσης ως προς τη μια πλευρά των μη κατεργασμένων (untreated) εμβρύων φυσικού τύπου (wild type, WT). **A.** Στα μηχανιστικά πειράματα ‘διάσωσης φαινοτύπου’, ο αναστολέας AZ191 χορηγήθηκε σε έμβρυα κοτόπουλου ηλικίας E2, 2h μετά τη μονόπλευρη *in ovo* ηλεκτροδιάτρηση με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGAG-mDyrk1B-IRES-NLS-GFP και ο αριθμός των *Islet1/2⁺* κινητικών νευρώνων (MNs) μετρήθηκε και συγκρίθηκε σε σχέση με τα έμβρυα φυσικού τύπου (WT). **B.** Ο αυξημένος αριθμός των *Islet1/2⁺* κινητικών

νευρώνων (MNs) κατά $33,12\% \pm 6,86$ ($p \leq 0.001$, $n=14$ τομές από 4 έμβρυα), ο οποίος παρατηρήθηκε μετά από χορήγηση του αναστολέα AZ191 (**Aiii**), διασώθηκε πλήρως από την υπερέκφραση της Dyrk1B/GFP (**Aiv**). Επίσης, οι Islet1/2⁺ κινητικοί νευρώνες (MNs) στα κατεργασμένα με DMSO έμβρυα ελέγχου (vehicle, όχημα) (**Aii**) δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές συγκρινόμενα με τα έμβρυα φυσικού τύπου (WT) (**Ai**). Ράβδοι κλίμακας (scale bars): 100 μm. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως Μέση τιμή \pm Τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (standard error of the mean, SEM), * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; ns, non-significant, μη σημαντικό (two-tailed Unequal variance t-test). Οι τομές του νωτιαίου μυελού αντιστοιχούν στο βραχιόνιο (brachial) επίπεδο.

3.4. Διερεύνηση της πιθανής εμπλοκής της κινάσης Dyrk1B στο σηματοδοτικό μονοπάτι Sonic hedgehog κατά την ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού του κοτόπουλου

Είναι γνωστό ότι κατά την ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού των χορδωτών, η πρωτεΐνη Sonic hedgehog (Shh) επιτελεί σημαντικό ρόλο ως μορφογόνο, το οποίο καθορίζει το κοιλιακό πρότυπο με την κλίση συγκέντρωσής της κατά μήκος του ραχιαίο-κοιλιακού άξονα (dorso-ventral axis). Συγκεκριμένα, το μορφογόνο Shh το οποίο παράγεται αρχικά από τη νωτοχορδή (notochord, NC) και μετέπειτα από το μεσαίο εδαφιαίο πέταλο (medial floor plate, MFP) και αργότερα από το πλευρικό εδαφιαίο πέταλο (lateral floor plate, LFP) σχηματίζει μία κλίση [21,23–26,261] μέσω της οποίας καθορίζονται οι διακριτές περιοχές προγονικών κυττάρων (progenitor domains) στον αναπτυσσόμενο νωτιαίο μυελό, με τον έλεγχο της έκφρασης των ειδικών μεταγραφικών παραγόντων (Σχ. 1) ομοιωτικής αλληλουχίας (homeodomain) και βασικής έλικας-θηλειάς-έλικας (basic helix-loop-helix /bHLH) [16,21,23,35,40,262].

Συνεπώς, ο παρατηρούμενος από τη δράση της κινάσης Dyrk1B έντονος κοιλιακός φαινότυπος, σε συνδυασμό με την ήδη γνωστή από τη βιβλιογραφία εμπλοκή της Dyrk1B στη σηματοδότηση Sonic hedgehog (Shh), κατά κύριο λόγο σε συστήματα καρκινογένεσης [84,125,195,197,207,214,226,235], οδήγησε στη συνέχεια στη διερεύνηση της πιθανής εμπλοκής της κινάσης Dyrk1B στη σηματοδότηση Shh κατά την ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού του εμβρύου του κοτόπουλου.

3.4.1. Η κινάση Dyrk1B δρα ως καταστολέας της σηματοδότησης Sonic hedgehog στον εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του κοτόπουλου

Για τον έλεγχο της υπόθεσης της συμμετοχής της κινάσης Dyrk1B στη σηματοδότηση Shh στον αναπτυσσόμενο εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του κοτόπουλου, πραγματοποιήθηκε ανάλυση RT-qPCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση των επιπέδων mRNA του μορφογόνου Shh και των τελεστών του Gli2 και Gli3, ύστερα από την υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B, μέσω μονόπλευρης *in ovo* ηλεκτροδιάτρησης (unilateral *in ovo* electroporation) που πραγματοποιήθηκε στον νωτιαίο μυελό αναπτυξιακού σταδίου E2 και περαιτέρω ανάλυση στο στάδιο E4.

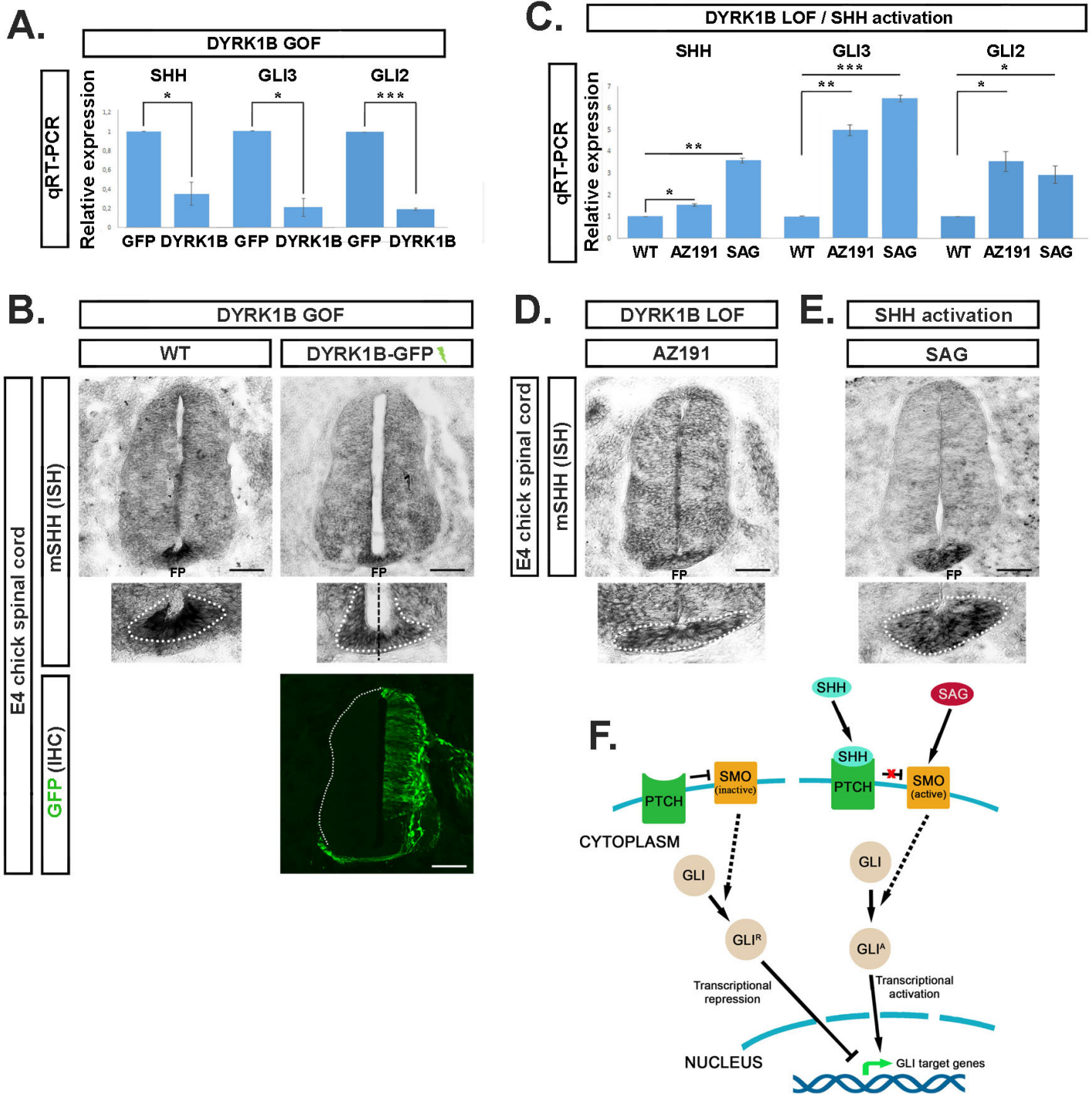
Δείχθηκε ότι η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B (πειράματα 'προσθήκης λειτουργίας', *gain-of-function*, GOF) οδήγησε σε σημαντική μειορρύθμιση (downregulation) των επιπέδων έκφρασης του mRNA του μορφογόνου Shh κατά 2,86 φορές \pm 0,99 (* $p \leq 0.05$, $n=3$ ανεξάρτητα πειράματα), των επιπέδων mRNA του τελεστή Gli2 κατά 5,28 φορές \pm 0,31 (** $p \leq 0.001$, $n=3$ ανεξάρτητα πειράματα) και των επιπέδων mRNA του τελεστή Gli3 κατά 4,76 φορές \pm 0,61 (* $p \leq 0.05$, $n=3$ ανεξάρτητα πειράματα), σε σύγκριση με τα έμβρυα ελέγχου GFP (Εικ. 3.21A). Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκε RNA *in situ* υβριδισμός (RNA *in situ* hybridization, ISH) για την ανίχνευση της έκφρασης του mRNA του μορφογόνου Shh στα πειραματικά έμβρυα ηλεκτροδιατρηθέντα με τον

πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGAG-mDyrk1B-IRES-NLS-GFP σε σύγκριση με τα έμβρυα ελέγχου φυσικού τύπου (WT). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της RT-qPCR πραγματικού χρόνου, η έκφραση του mRNA του μορφογόνου Shh στο εδαφιαίο πέταλο (FP) μειώθηκε στην ηλεκτροδιατρηθείσα με Dyrk1B/GFP πλευρά σε σχέση με την μη ηλεκτροδιατρηθείσα πλευρά του νωτιαίου μυελού των ίδιων εμβρύων αλλά και σε σχέση με το νωτιαίο μυελό εμβρύων φυσικού τύπου (WT) (**Εικ. 3.21B**).

Από την άλλη πλευρά, στα πειραματικά έμβρυα, στα οποία χορηγήθηκαν 600 μg του εκλεκτικού αναστολέα AZ191 της κινάσης Dyrk1B (πειράματα 'απώλειας λειτουργίας', *loss-of-function*, LOF), τα επίπεδα mRNA του μορφογόνου Shh και των τελεστών Gli2 και Gli3 αυξήθηκαν κατά 1,52 φορές \pm 0,06 (* $p \leq 0.05$, n=3 ανεξάρτητα πειράματα), κατά 3,54 φορές \pm 0,47 (* $p \leq 0.05$, n=3 ανεξάρτητα πειράματα) και κατά 4,85 φορές \pm 0,25 (** $p \leq 0.01$, n=3 ανεξάρτητα πειράματα), αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα έμβρυα ελέγχου φυσικού τύπου (WT) (**Εικ. 3.21C**), όπως εκτιμήθηκε από τη RT-qPCR πραγματικού χρόνου. Η αύξηση των επιπέδων mRNA του μορφογόνου Shh επιβεβαιώθηκε περαιτέρω από RNA *in situ* υβριδισμό, όπου παρατηρείται αύξησή του στο εδαφιαίο πέταλο (FP) των πειραματικών εμβρύων, κατεργασμένων με τον αναστολέα AZ191 (**Εικ. 3.21D**) σε σύγκριση με τα έμβρυα ελέγχου φυσικού τύπου (WT) (**Εικ. 3.21B**). Συνεπώς, αυτά τα δεδομένα προτείνουν την αλληλεπίδραση της κινάσης Dyrk1B με το σηματοδοτικό μονοπάτι Shh/Gli και στον αναπτυσσόμενο εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του κοτόπουλου και την αναδεικνύουν ως καταστολέα της μεταγραφής των γονιδίων *Shh*, *Gli2* και *Gli3*.

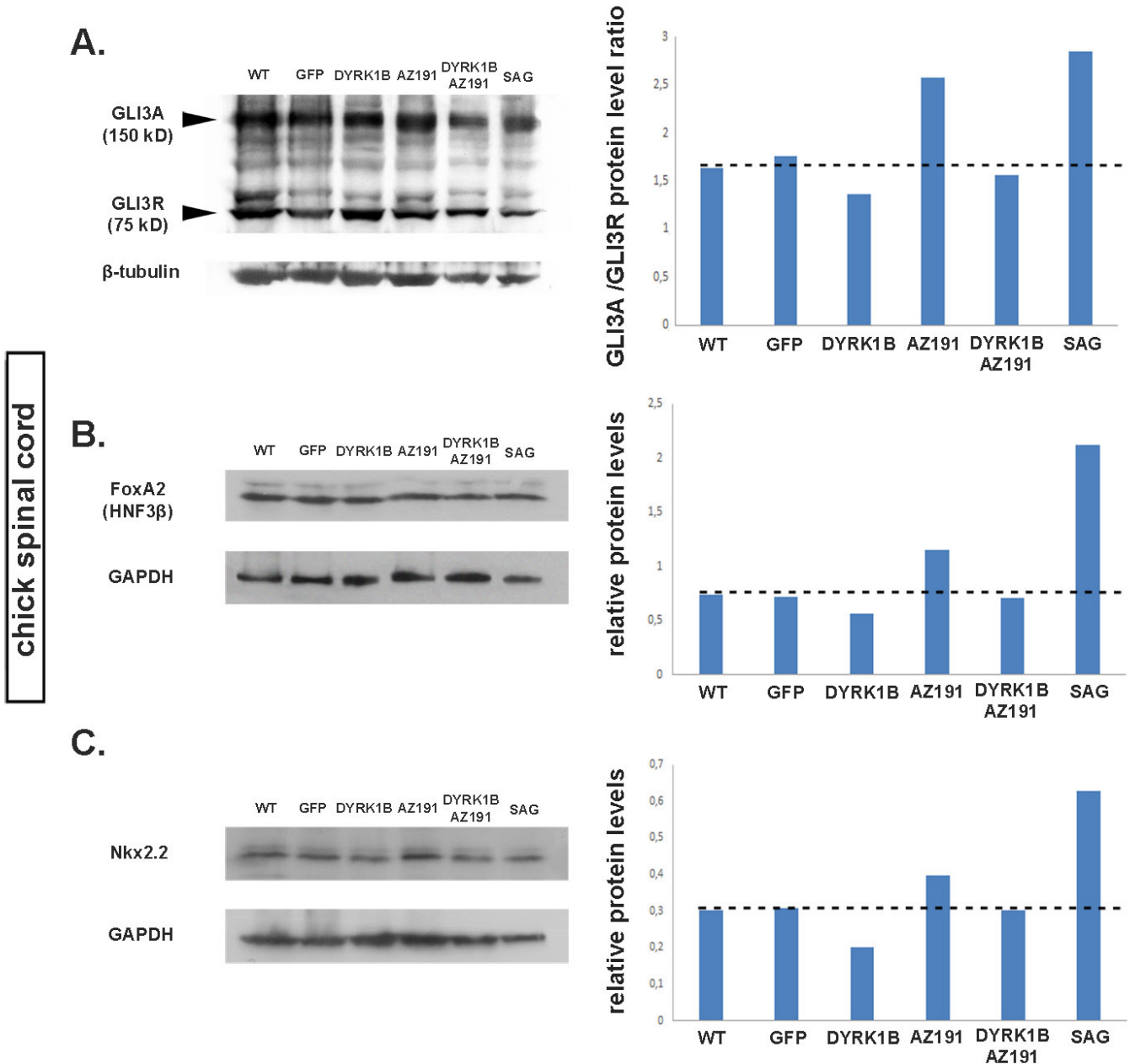
Δεδομένου ότι η κινάση Dyrk1B βρέθηκε να ρυθμίζει τη σηματοδότηση Shh/Gli, στη συνέχεια κρίθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί αν η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Shh θα μπορούσε να διασώσει τον προκαλούμενο από την υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B κοιλιακό φαινότυπο με σκοπό τη διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης της κινάσης Dyrk1B. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού Shh πραγματοποιήθηκε στο επίπεδο του υποδοχέα Smoothened (SMO), ο οποίος επάγει καταρροϊκά την ενεργή μορφή των μεταγραφικών τελεστών Gli (GliA) (**Εικ. 3.21F**). Για το σκοπό αυτό, 1 μg του αγωνιστή Smoothened (Smoothened agonist, SAG) χορηγήθηκε σε έμβρυα κοτόπουλου αναπτυξιακού σταδίου E2 και η επίδρασή του στη σηματοδότηση Shh εξετάστηκε στο στάδιο E4. Παρατηρήθηκε ένας θετικός βρόγχος ανατροφοδότησης (positive feedback loop) σε μεταγραφικό επίπεδο στην έκφραση του mRNA του μορφογόνου Shh και των τελεστών Gli2 και Gli3, ο οποίος επάχθηκε από την ενεργοποίηση του Smoothened μέσω SAG. Αυτή η θετική ανατροφοδότηση έγινε έκδηλη με την αύξηση των επιπέδων mRNA των μορίων Shh, Gli2 και Gli3 κατά 3,54 φορές \pm 0,11 (** $p \leq 0.01$, n=3 ανεξάρτητα πειράματα), κατά 2,92 φορές \pm 0,41 (* $p \leq 0.05$, n=3 ανεξάρτητα πειράματα) και κατά 6,30 φορές \pm 0,12 (** $p \leq 0.001$, n=3 ανεξάρτητα πειράματα), αντίστοιχα, όπως εκτιμήθηκε από τη RT-qPCR πραγματικού χρόνου (**Εικ. 3.21C**). Επίσης, εφαρμόζοντας RNA *in situ* υβριδισμό (ISH), επιβεβαιώθηκε η αυξημένη έκφραση mRNA του Shh στο εδαφιαίο πέταλο (FP) των κατεργασμένων με τον αγωνιστή SAG εμβρύων (**Εικ. 3.21E**).

Επίσης, συμπληρωματικά με τα ευρήματα που αφορούν τα επίπεδα mRNA, παρατηρήθηκε παρόμοια τάση μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western (WB), δείχνοντας ότι η υπερέκφραση ή η απώλεια λειτουργίας της κινάσης Dyrk1B, καθώς και η χορήγηση του αγωνιστή SAG, επηρεάζουν το ισοζύγιο Gli3A/Gli3R της ενεργοποιητικής μορφής του τελεστή Gli3 (Gli3A, ολόκληρη πρωτεΐνη) προς την κατασταλτική μορφή της πρωτεΐνης Gli3 (Gli3R, μικρότερη μορφή - κολοβή, truncated) (**Εικ. 3.22A**), αλλά και την έκφραση των πρώιμα αποκρινόμενων (early responding) και εγγύτερων στόχων (proximal targets) της σηματοδότησης Shh, που είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες FoxA2 (Forkhead Box A2, Πλαίσιο Forkhead A2) και Nkx2.2 (NK2 Homeobox 2, Ομοιωτική αλληλουχία 2 του NK2), ενώ στα πειράματα 'διάσωσης φαινοτύπου' (*phenotype rescue*) αυτές οι πρωτεΐνες φαίνεται να αποκαθίστανται στα επίπεδα ελέγχου, σε σύγκριση με τα ακατέργαστα (untreated) έμβρυα ελέγχου φυσικού τύπου (WT) (**Εικ. 3.22B,C**).



Εικόνα 3.21. Η κινάση *Dyrk1B* δρα ως μεταγραφικός καταστολέας των γονιδίων *Shh*, *Gli2* και *Gli3* στον εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του κοτόπουλου. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε νωτιαίο μυελό εμβρύων κοτόπουλου αναπτυξιακού σταδίου E4 τα οποία έχουν υποστεί είτε ηλεκτροδιάτρηση με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGAG-mDyrk1B-IRES-NLS-GFP ή τους έχει χορηγηθεί ο εκλεκτικός αναστολέας της κινάσης *Dyrk1B* AZ191 (600 μg) ή ο αγωνιστής της πρωτεΐνης *Smoothened* (SMO) SAG (1μg) που ενεργοποιεί καταρροϊκά (down-stream) τη σηματοδότηση *Shh* στο στάδιο E2. **A.** Η υπερέκφραση της κινάσης *Dyrk1B* (πειράματα ‘προσθήκης λειτουργίας’, *gain-of-function*, GOF) στο E2 μείωσε στο E4 τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του

μορφογόνου Shh και των τελεστών Gli2 και Gli3 κατά 2,86 φορές \pm 0,99 ($p \leq 0.05$, $n=3$ ανεξάρτητα πειράματα), κατά 5,28 φορές \pm 0,31 ($p \leq 0.001$, $n=3$ ανεξάρτητα πειράματα), και κατά 4,76 φορές \pm 0,61 ($p \leq 0.05$, $n=3$ ανεξάρτητα πειράματα), αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα έμβρυα ελέγχου GFP, όπως προσδιορίστηκε από την ανάλυση μέσω RT-qPCR πραγματικού χρόνου. **B.** Σε συμφωνία, ο RNA *in situ* υβριδισμός (*in situ* hybridization, ISH) δείχνει ότι η έκφραση του mRNA του μορφογόνου Shh μειώνεται στο εδαφιαίο πέταλο (floor plate, FP) της ηλεκτροδιατρηθείσας πλευράς στα ηλεκτροδιατρηθέντα Dyrk1B/GFP έμβρυα σε σύγκριση με τη μη ηλεκτροδιατρηθείσα πλευρά των ίδιων εμβρύων, καθώς και σε σύγκριση με τα έμβρυα ελέγχου φυσικού τύπου (wild type, WT). **C.** Αντιστρόφως, η αναστολή της ενεργότητας της ενδογενούς κινάσης Dyrk1B από τον αναστολέα AZ191 (πειράματα 'απώλειας λειτουργίας', *loss-of-function*, LOF) οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης του mRNA του μορφογόνου Shh και των τελεστών Gli2 και Gli3 κατά 1,52 φορές \pm 0,06 ($p \leq 0.05$, $n=3$ ανεξάρτητα πειράματα), κατά 3,54 φορές \pm 0,47 ($p \leq 0.05$, $n=3$ ανεξάρτητα πειράματα) και 4,85 φορές \pm 0,25 ($p \leq 0.01$, $n=3$ ανεξάρτητα πειράματα), αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα έμβρυα ελέγχου φυσικού τύπου (WT), όπως προσδιορίστηκε από την ανάλυση μέσω RT-qPCR πραγματικού χρόνου. Ομοίως, η ενεργοποίηση του μονοπατιού Shh στο επίπεδο της πρωτεΐνης Smoothened (SMO), από τον αγωνιστή αυτής, το μόριο SAG (Smoothened agonist), αύξησε τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του μορφογόνου Shh και των τελεστών του Gli2 και Gli3 στα πειραματικά έμβρυα, κατεργασμένα με τον αγωνιστή SAG, κατά 3,54 φορές \pm 0,11 ($p \leq 0.01$, $n=3$ ανεξάρτητα πειράματα), κατά 2,92 φορές \pm 0,41 ($p \leq 0.05$, $n=3$ ανεξάρτητα πειράματα) και κατά 6,30 φορές \pm 0,12 ($p \leq 0.001$, $n=3$ ανεξάρτητα πειράματα), αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα έμβρυα ελέγχου φυσικού τύπου (WT), όπως προσδιορίστηκε από την ανάλυση μέσω RT-qPCR πραγματικού χρόνου. **D, E.** Σε συμφωνία, τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του μορφογόνου Shh αυξήθηκαν στο εδαφιαίο πέταλο (FP) στα πειραματικά έμβρυα, κατεργασμένα με τον αναστολέα AZ191 και με τον αγωνιστή SAG, σε σύγκριση με τα έμβρυα ελέγχου φυσικού τύπου (WT), όπως προσδιορίστηκε μέσω RNA *in situ* υβριδισμού (ISH). Ράβδοι κλίμακας (scale bars): 100 μ m. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως Μέση τιμή \pm Τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (standard error of the mean, SEM), * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; ns, non-significant, μη σημαντικό (two-tailed Unequal variance t-test). Οι τομές του νωτιαίου μυελού αντιστοιχούν στο βραχιόνιο (brachial) επίπεδο. **F.** Σχηματική αναπαράσταση του κανονικού σηματοδοτικού μονοπατιού Sonic hedgehog (Shh). Το Smoothened (SMO) αποκαταστέλλεται ύστερα από την πρόσδεση του συνδέτη (ligand) Shh στον υποδοχέα του Patched (PTCH), επάγοντας την είσοδο των ενεργών μορφών των τελεστών Gli (GliA) στον πυρήνα του κυττάρου, όπου και δρουν ως μεταγραφικοί ενεργοποιητές των γονιδίων-στόχων τους. Η ενεργοποίηση της σηματοδότησης Shh μπορεί να γίνει και καταρροϊκά του Shh με την ενεργοποίηση του Smoothened (SMO) από τον αγωνιστή αυτού SAG, οδηγώντας και πάλι στην ενεργή μορφή των τελεστών Gli (GliA) και στην επακόλουθη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων των τελεστών Gli.



Εικόνα 3.22. Η κινάση *Dyrk1B* επηρεάζει το ισοζύγιο *Gli3A/Gli3R* και την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων *FoxA2* και *Nkx2.2*. Η ανάλυση μέσω μέσων ανοσοαποτύπωσης κατά Western (WB) και η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (protein lysates), τα οποία προήλθαν από νωτιαίο μυελό εμβρύων αναπτυξιακού σταδίου E4 τα οποία είχαν υποστεί ηλεκτροδιάρθρωση και υπερέκφραση της *Dyrk1B*, ή /και φαρμακολογική αναστολή της ενεργότητας της ενδογενούς κινάσης με τη χρήση του αναστολέα AZ191 (600 μg) ή ενεργοποίηση της σηματοδότησης *Shh* με τη χρήση του αγωνιστή SAG (1 μg) στο E2. Τα δείγματα αποτελούν 'δεξαμενές' (pools) των 3 εμβρύων κοτόπουλου, για κάθε πειραματική συνθήκη, όπως υποδηλώνεται. **A.** Το ισοζύγιο (ratio) της ενεργοποιητικής μορφής του *Gli3* (*Gli3* activator form, *Gli3A*) προς την κατασταλτική μορφή του *Gli3* (*Gli3* repressor form, *Gli3R*) (*Gli3A/Gli3R* ratio),

προσδιορίστηκε ύστερα από κανονικοποίηση της κάθε μορφής του Gli3 σε σχέση με την πρωτεΐνη αναφοράς β τουμπουλίνη (β -tubulin) και όλες οι περιπτώσεις συγκρίθηκαν με το δείγμα ελέγχου φυσικού τύπου (WT). Η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B οδήγησε σε μείωση του ισοζυγίου Gli3A/Gli3R κατά 1,20 φορές, ενώ στα κατεργασμένα έμβρυα με τον αναστολέα AZ191 ή τον αγωνιστή SAG παρατηρήθηκε αύξηση του ισοζυγίου κατά 1,57 φορές και 1,74 φορές, αντίστοιχα. Στα ηλεκτροδιατρηθέντα με Dyrk1B/GFP έμβρυα που έχουν κατεργασθεί και με τον αναστολέα AZ191 ('διάσωση φαινοτύπου'), το ισοζύγιο Gli3A/Gli3R είχε πρακτικά αποκατασταθεί στα επίπεδα του δείγματος ελέγχου φυσικού τύπου (WT) αλλά και των ηλεκτροδιατρηθέντων με GFP εμβρύων.

B. Η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B οδήγησε στη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα FoxA2, κανονικοποιημένων προς την πρωτεΐνη αναφοράς GAPDH, κατά 1,32 φορές, ενώ στα κατεργασμένα έμβρυα με τον αναστολέα AZ191 ή τον αγωνιστή SAG η έκφραση του παράγοντα FoxA2 αυξήθηκε κατά 1,55 φορές και κατά 2,86 φορές αντίστοιχα, σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου φυσικού τύπου (WT). Στα ηλεκτροδιατρηθέντα με Dyrk1B/GFP έμβρυα που έχουν κατεργασθεί και με τον αναστολέα AZ191 ('διάσωση φαινοτύπου'), η έκφραση του παράγοντα FoxA2 αποκαταστάθηκε στα επίπεδα που αντιστοιχούν στα έμβρυα ελέγχου φυσικού τύπου (WT).

C. Η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B οδήγησε στη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα Nkx2.2, κανονικοποιημένων προς την πρωτεΐνη αναφοράς GAPDH, κατά 1,50 φορές, ενώ στα κατεργασμένα έμβρυα με τον αναστολέα AZ191 ή τον αγωνιστή SAG ο παράγοντας Nkx2.2 αυξήθηκε κατά 1,33 φορές και κατά 2,10 φορές, αντίστοιχα, σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου φυσικού τύπου (WT). Στα ηλεκτροδιατρηθέντα με Dyrk1B/GFP έμβρυα που έχουν κατεργασθεί και με τον αναστολέα AZ191 ('διάσωση φαινοτύπου'), η έκφραση του παράγοντα Nkx2.2 ήταν παρόμοια με την αντίστοιχη των δειγμάτων των εμβρύων ελέγχου φυσικού τύπου (WT) και GFP. Τα δεδομένα προέκυψαν από ένα πείραμα. Η ποσοτικοποίηση και κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού ImageJ.

3.4.2. Χορήγηση του αγωνιστή του Smoothened, SAG διασώζει τον προκαλούμενο από την υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B κοιλιακό φαινότυπο

Στη συνέχεια, έγινε έλεγχος εάν η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης SMO από τον αγωνιστή SAG θα μπορούσε να διασώσει τον κοιλιακό φαινότυπο στα έμβρυα Dyrk1B/GFP. Για το σκοπό αυτό, χορηγήθηκε 1 μg αγωνιστή SAG στα έμβρυα κοτόπουλου αναπτυξιακού σταδίου E2, 2h μετά τη μονόπλευρη *in ovo* ηλεκτροδιάτρηση με πλασμίδια έκφρασης Dyrk1B/GFP ή ελέγχου GFP. Ύστερα, ακολούθησε ανάλυση στο στάδιο E4 της επίδρασης της χορήγησης του αγωνιστή SAG είτε μόνου του είτε μετά από ηλεκτροδιάτρηση με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGAG-mDyrk1B-IRES-NLS-GFP. Ως έμβρυα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν τα έμβρυα φυσικού τύπου (WT) και τα ηλεκτροδιατρηθέντα έμβρυα με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGAG-IRES-NLS-GFP. Δεδομένου ότι το μορφογόνο Shh είναι ένας κύριος ρυθμιστής του κοιλιακού προτύπου του νωτιαίου μυελού, εξετάστηκε ο αριθμός των προγονικών κυττάρων p2, pMN και p3 τα οποία χαρακτηρίζουν τις διακριτές ομώνυμες κοιλιακές περιοχές (ventral domains) που θα δώσουν γένεση στους ενδιάμεσους νευρώνες (interneurons, INs) της περιοχής V2, τους κινητικούς νευρώνες (motor neurons, MNs) και τους ενδιάμεσους νευρώνες (interneurons, INs) της περιοχής V3 αντίστοιχα (**Εικ. 3.23A**). Ο διαχωρισμός των ορίων της κάθε κοιλιακής περιοχής έγινε με τη χρήση διπλής ανοσολογικής χρώσης για τους μεταγραφικούς παράγοντες Nkx6.1 και Olig2. Η Nkx6.1 εκφράζεται από τις περιοχές p2, pMN και p3, ενώ η έκφραση του παράγοντα Olig2 σηματοδοτεί μόνο την περιοχή pMN (**Σχ. 1** και **Εικ. 3.23Ai-vi**). Η ποσοτικοποίηση έγινε με τη μέτρηση του συνολικού αριθμού των θετικών κυττάρων για κάθε επιλεγμένο δείκτη και κανονικοποίηση (normalization) ως προς τον αριθμό των συνολικών κυτταρικών πυρήνων και εκφράστηκε ως ποσοστό. Οι συγκρίσεις έγιναν μεταξύ της μίας πλευράς των εμβρύων της κάθε πειραματικής περίπτωσης ως προς τη μία πλευρά των μη κατεργασμένων (untreated) εμβρύων ελέγχου φυσικού τύπου (WT). Σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν επιβεβαιώθηκε ότι ο αγωνιστής SAG αντιστρέφει τον επαγόμενο από την υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B κοιλιακό φαινότυπο.

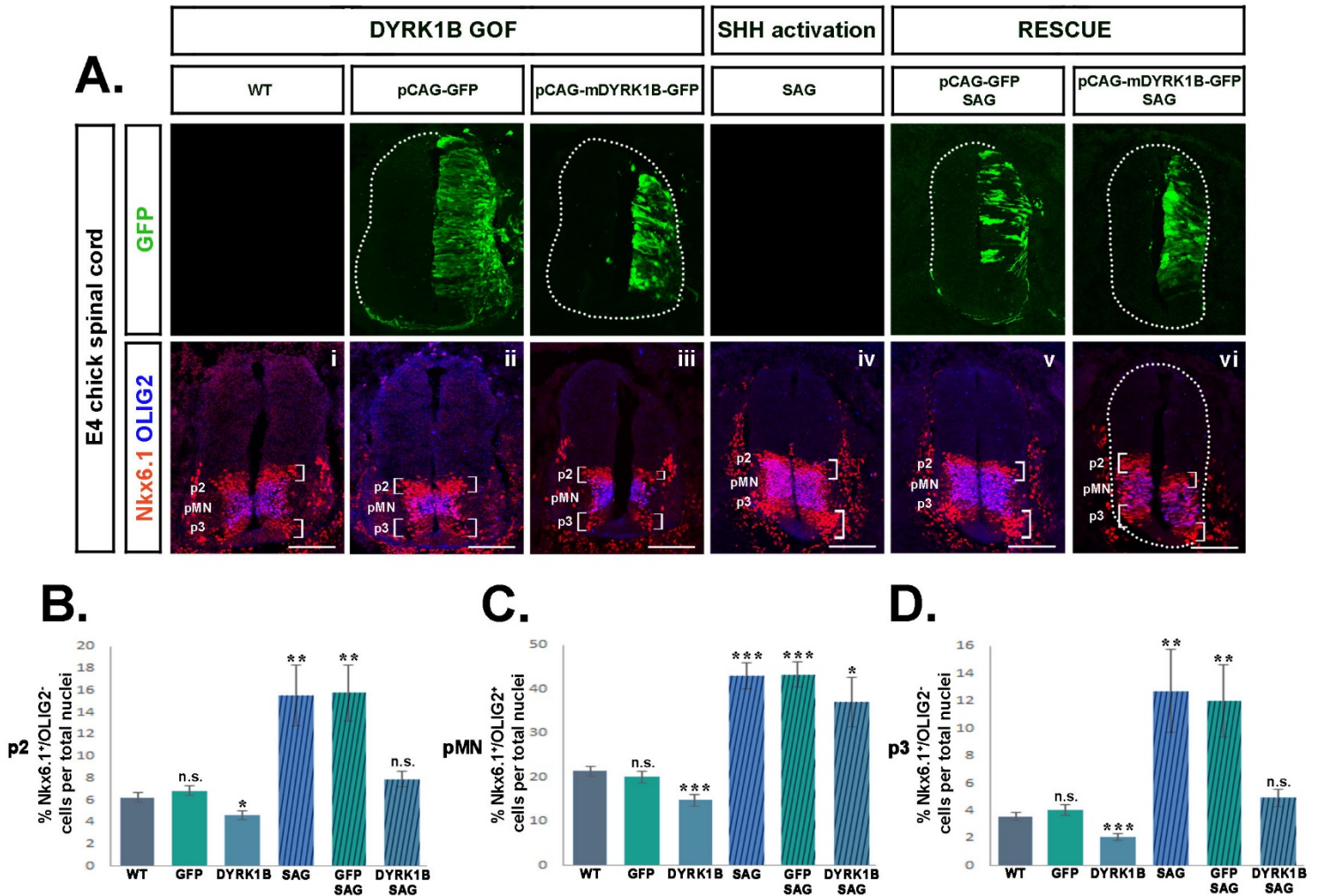
Ειδικότερα, το ποσοστό των προγονικών κυττάρων p2 μειώθηκε κατά 25,88% ± 6,87 (***) $p \leq 0.001$, n=15 τομές από 4 έμβρυα) στα έμβρυα Dyrk1B/GFP και, αντιστρόφως, αυξήθηκε κατά 148,24% ± 43,93 (**) $p \leq 0.01$, n=15 τομές από 4 έμβρυα) στα έμβρυα που ήταν κατεργασμένα μόνο με SAG, σε σύγκριση με τα έμβρυα ελέγχου φυσικού τύπου (WT) (**Εικ. 3.23B**). Στα πειράματα 'διάσωσης φαινοτύπου' (*phenotype rescue*), στα οποία η ηλεκτροδιάτρηση Dyrk1B/GFP ακολούθησε από χορήγηση του αγωνιστή SAG, ο αγωνιστής SAG ήταν επαρκής να αποκαταστήσει τον πληθυσμό των προγονικών κυττάρων p2 στα επίπεδα ελέγχου φυσικού τύπου (WT) (**Εικ. 3.23B**). Ακόμη, στα έμβρυα ελέγχου GFP, ο πληθυσμός των προγονικών κυττάρων p2 ήταν παρόμοιος με αυτόν των εμβρύων ελέγχου φυσικού τύπου (WT), ενώ στα έμβρυα GFP που κατεργάστηκαν στη συνέχεια με τον αγωνιστή SAG το ποσοστό των προγονικών κυττάρων p2

αυξήθηκε κατά $151,76\% \pm 40,89$ (** $p \leq 0.01$, $n=15$ τομές από 4 έμβρυα), μία αύξηση παρόμοια με την παρατηρούμενη των εμβρύων κατεργασμένων με SAG (**Εικ. 3.23B**).

Με παρόμοιο τρόπο, το ποσοστό των προγονικών κυττάρων p3, το οποίο μειώθηκε κατά $41,39\% \pm 7,50$ (** $p \leq 0.001$, $n=15$ τομές από 4 έμβρυα) στα έμβρυα Dyrk1B/GFP, αποκαταστάθηκε στα επίπεδα ελέγχου φυσικού τύπου (WT) ύστερα από χορήγηση SAG, στα πειράματα 'διάσωσης φαινοτύπου' (**Εικ. 3.23D**). Συγχρόνως, στα έμβρυα που είχαν κατεργασθεί μόνο με SAG, τα προγονικά κύτταρα p3 αυξήθηκαν δραματικά κατά $253,89\% \pm 84,17$ (** $p \leq 0.01$, $n=15$ τομές από 4 έμβρυα) (**Εικ. 3.23D**). Επιπροσθέτως, στα έμβρυα ελέγχου GFP, ο πληθυσμός p3 ήταν παρόμοιος με τον αντίστοιχο φυσικού τύπου (WT), ενώ στα έμβρυα GFP τα οποία στη συνέχεια κατεργάστηκαν με SAG το ποσοστό των προγονικών κυττάρων p3 αυξήθηκε κατά $232,78 \pm 73,33$ (** $p \leq 0.01$, $n=15$ τομές από 4 έμβρυα), μία αύξηση συγκρίσιμη με την παρατηρούμενη των εμβρύων κατεργασμένων μόνο με SAG (**Εικ. 3.23D**).

Τέλος, το ποσοστό των προγονικών κυττάρων των κινητικών νευρώνων, pMN το οποίο μειώθηκε κατά $30,47\% \pm 6,07$ (** $p \leq 0.001$, $n=15$ τομές από 4 έμβρυα) στα έμβρυα Dyrk1B/GFP, αυξήθηκε στην επιπλέον κατεργασία με χορήγηση του αγωνιστή SAG κατά $73,79\% \pm 26,17$, σε σύγκριση με τα έμβρυα ελέγχου φυσικού τύπου (WT) (* $p \leq 0.05$, $n=15$ τομές από 4 έμβρυα). Αυτό το αποτέλεσμα υποδηλώνει ότι δεν κατέστη δυνατή η πλήρης διάσωση του πληθυσμού των προγονικών κυττάρων pMN με την επαναφορά του πληθυσμού στα επίπεδα φυσικού τύπου (WT) και ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού Shh μέσω του αγωνιστή SAG επικράτησε έναντι της υπερέκφρασης της κινάσης Dyrk1B μέσω της ηλεκτροδιάτρησης. Επιπλέον, το ποσοστό των προγονικών κυττάρων pMN αυξήθηκε κατά $100,93\% \pm 13,46$ (** $p \leq 0.001$, $n=15$ τομές από 4 έμβρυα) στα έμβρυα τα οποία ήταν κατεργασμένα μόνο με SAG σε σχέση με αντίστοιχο των εμβρύων ελέγχου φυσικού τύπου (WT) (**Εικ. 3.23C**). Επίσης, στα έμβρυα ελέγχου GFP, ο πληθυσμός των προγονικών κυττάρων pMN ήταν παρόμοιος με τον αντίστοιχο ελέγχου φυσικού τύπου (WT), ενώ στα έμβρυα GFP τα οποία στη συνέχεια κατεργάστηκαν με SAG το ποσοστό των προγονικών κυττάρων pMN αυξήθηκε σε παρόμοια επίπεδα με αυτό των κατεργασμένων εμβρύων μόνο με SAG, κατά $102,20\% \pm 13,50$ (** $p \leq 0.001$, $n=15$ τομές από 4 έμβρυα) (**Εικ. 3.23C**).

Επομένως, τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού Sonic hedgehog (Shh) αποκαθιστά τον προκαλούμενο από την υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B κοιλιακό φαινότυπο, καθώς και ότι η δράση της κινάσης Dyrk1B στη ρύθμιση των πληθυσμών των προγονικών κυττάρων p2, pMN και p3 διαμεσολαβείται μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού Sonic Hedgehog (Shh).



Εικόνα 3.23. Ο αγωνιστής του Smoothened, SAG, διασώζει τον προκαλούμενο από την υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B κοιλιακό φαινότυπο. Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις σε νωτιαίο μυελό εμβρύων κοτόπουλου αναπτυξιακού σταδίου E4 τα οποία έχουν ηλεκτροδιατηρηθεί με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGAG-mDyrk1B-IRES-NLS-GFP ή με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGAG-IRES-NLS-GFP ή/και στα οποία έχει χορηγηθεί ο αγωνιστής SAG (1 μg) στο στάδιο E2. Η ποσοτικοποίηση έγινε με τη μέτρηση του συνολικού αριθμού των θετικών κυττάρων για κάθε επιλεγμένο δείκτη και κανονικοποίηση (normalization) ως προς τον αριθμό των συνολικών κυτταρικών πυρήνων και εκφράστηκε ως ποσοστό. Οι συγκρίσεις έγιναν μεταξύ της μίας πλευράς των εμβρύων της κάθε πειραματικής περίπτωσης ως προς τη μία πλευρά των μη κατεργασμένων (untreated) εμβρύων ελέγχου φυσικού τύπου (WT).

A. Η επίδραση της χορήγησης του αγωνιστή SAG μόνου του ή ύστερα από την ηλεκτροδιάτρηση με τα πλασμίδια έκφρασης pGAG-mDyrk1B-IRES-NLS-GFP ή pGAG-IRES-NLS-GFP στον αριθμό των κοιλιακών προγονικών κυττάρων p2, pMN και p3. Πάνω πλαίσιο: Ο ανοσοφθορισμός της GFP καταδεικνύει την έκταση της ηλεκτροδιάτρησης σε κάθε περίπτωση. Κάτω πλαίσιο: Οι περιοχές p2, pMN και p3 διακρίνονται από τη διπλή ανοσολογική χρώση για τους μεταγραφικούς παράγοντες

Nkx6.1 και Olig2, όπως αναφέρεται. Ο παράγοντας Nkx6.1 εκφράζεται από τις περιοχές p2, pMN και p3, ενώ ο Olig2 σηματοδοτεί αποκλειστικά την περιοχή pMN.

B. Η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B (πειράματα 'προσθήκης' λειτουργίας, *gain-of-function*, GOF) οδήγησε σε μειωμένο αριθμό προγονικών κυττάρων p2 (Nkx6.1⁺/Olig2⁻ άνωθι κυτταρικός πληθυσμός) κατά 25,88% ± 6,87 (p≤0.001, n=15 τομές από 4 έμβρυα) (**Aiii**), ενώ η χορήγηση του αγωνιστή SAG οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των προγονικών κυττάρων p2 κατά 148,24% ± 43,93 (p≤0.01, n=15 τομές από 4 έμβρυα) (**Aiv**), και με τις δύο περιπτώσεις να συγκρίνονται με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των εμβρύων ελέγχου φυσικού τύπου (wild type, WT) (**Ai**). Η χορήγηση του αγωνιστή SAG (**Avi**) στα έμβρυα Dyrk1B/GFP αποκαθιστά πλήρως τον αριθμό των προγονικών κυττάρων p2 στα φυσιολογικά επίπεδα φυσικού τύπου (WT). Επιπλέον, στα έμβρυα GFP ο πληθυσμός p2 (**Aii**) ήταν παρόμοιος με τον αντίστοιχο πληθυσμό φυσικού τύπου (WT) (**Ai**), ενώ στα έμβρυα GFP τα οποία, στη συνέχεια, κατεργάσθηκαν με τον αγωνιστή SAG (**Av**) ο αριθμός των προγονικών κυττάρων p2 αυξήθηκε κατά 151,76% ± 40,89 (p≤ 0.01, n=15 τομές από 4 έμβρυα).

C. Η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B (πειράματα 'προσθήκης λειτουργίας', *gain-of-function*, GOF) οδήγησε στη μείωση του αριθμού των προγονικών κυττάρων pMN (κυτταρικός πληθυσμός Olig2⁺) κατά 30,47% ± 6,07 (p≤0.001 n=15 τομές από 4 έμβρυα) (**Aiii**), ενώ η χορήγηση του SAG οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των προγονικών κυττάρων pMN κατά 100,93% ± 13,46 (p≤0.001, n=15 τομέα από 4 έμβρυα) (**Aiv**), και με τις δύο περιπτώσεις να συγκρίνονται με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των εμβρύων ελέγχου φυσικού τύπου (WT) (**Ai**). Η χορήγηση του αγωνιστή SAG στα έμβρυα Dyrk1B/GFP (**Avi**) οδήγησε σε αυξημένο αριθμό προγονικών κυττάρων pMN κατά 73,79% ± 26,17 (p≤0.05, n=15 τομές από 4 έμβρυα) σε σύγκριση με τον αντίστοιχο πληθυσμό φυσικού τύπου (WT) (**Ai**). Επιπροσθέτως, στα έμβρυα GFP ο πληθυσμός pMN (**Aii**) ήταν παρόμοιος με τον αντίστοιχο πληθυσμό φυσικού τύπου (WT) (**Ai**), ενώ στα έμβρυα GFP τα οποία, στη συνέχεια, κατεργάσθηκαν με τον αγωνιστή SAG (**Av**) ο αριθμός των προγονικών κυττάρων pMN αυξήθηκε κατά 102,20% ± 13,50 (p≤ 0.001, n=15 τομές από 4 έμβρυα).

D. Η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B (πειράματα 'προσθήκης λειτουργίας', *gain-of-function*, GOF) οδήγησε σε μειωμένο αριθμό προγονικών κυττάρων p3 (Nkx6.1⁺/Olig2⁻ κάτωθι κυτταρικός πληθυσμός) κατά 41,39% ± 7,50 (p≤0.001, n=15 τομές από 4 έμβρυα) (**Aiii**), ενώ η χορήγηση του αγωνιστή SAG οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των προγονικών κυττάρων p3 κατά 253,89% ± 84,17 (p≤0.01, n=15 τομές από 4 έμβρυα) (**Aiv**), και με τις δύο περιπτώσεις να συγκρίνονται με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των εμβρύων ελέγχου φυσικού τύπου (WT) (**Ai**). Η χορήγηση του αγωνιστή SAG στα έμβρυα Dyrk1B/GFP (**Avi**) δεν οδήγησε σε σημαντικές διαφορές στον πληθυσμό p3 σε σύγκριση με τον αντίστοιχο πληθυσμό ελέγχου φυσικού τύπου (WT) (**Ai**). Επιπλέον, στα έμβρυα GFP ο πληθυσμός p3 (**Aii**) ήταν παρόμοιος με τον αντίστοιχο πληθυσμό φυσικού τύπου (WT) (**Ai**), ενώ στα έμβρυα GFP τα οποία, στη συνέχεια, κατεργάσθηκαν με τον αγωνιστή SAG (**Avi**) ο αριθμός των προγονικών κυττάρων p3 αυξήθηκε κατά 232,78% ± 73,33 (p≤ 0.01, n=15 τομές από 4 έμβρυα). Ράβδοι κλίμακας (scale bars): 100 μm. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως Μέση τιμή ±

Τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (standard error of the mean, SEM), * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; ns, non-significant, μη σημαντικό (two-tailed Unequal variance t-test). Οι τομές του νωτιαίου μυελού αντιστοιχούν στο βραχιόνιο (brachial) επίπεδο.

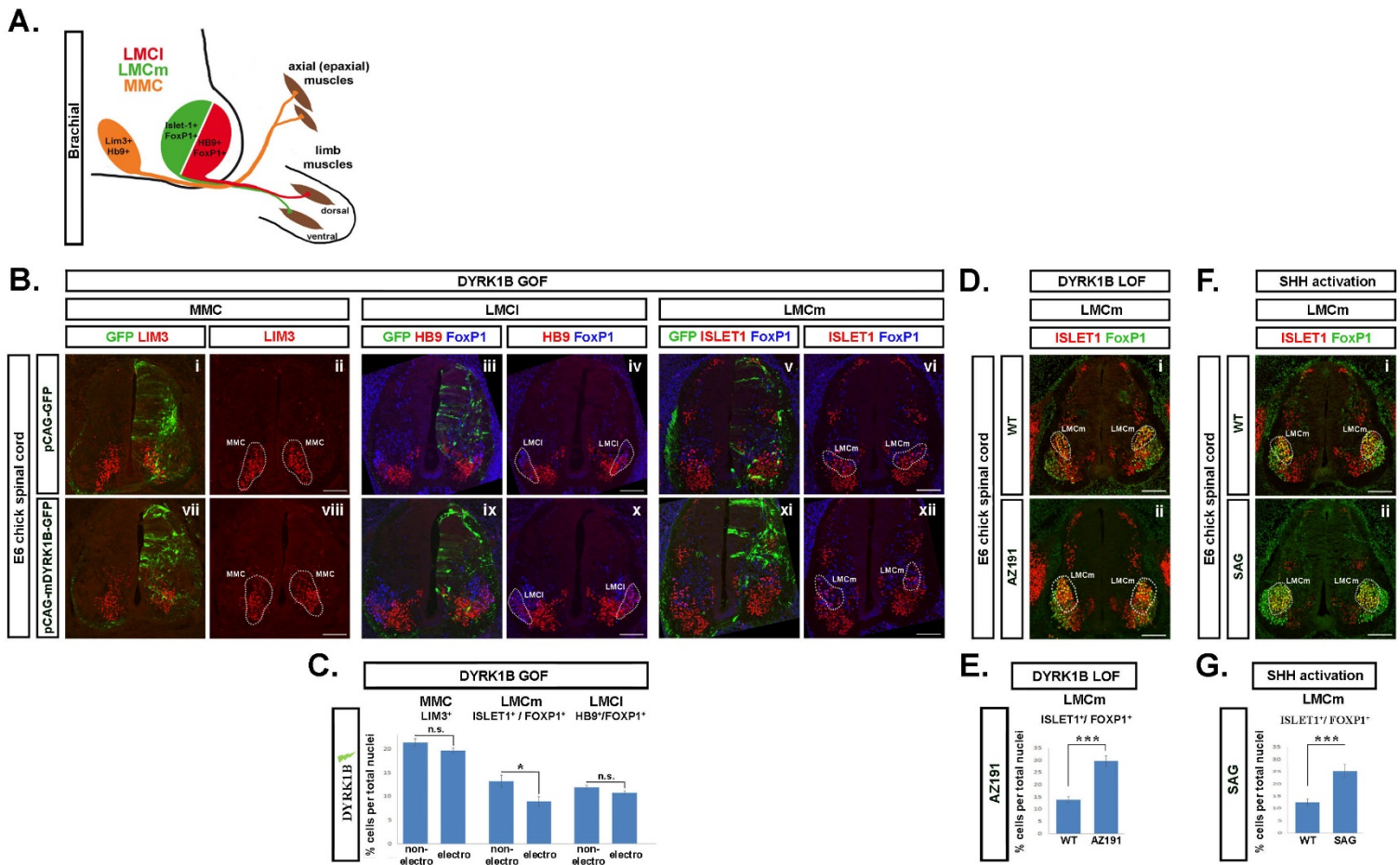
3.4.3. Η κινάση Dyrk1B επηρεάζει το μέγεθος της κινητικής στήλης LMCm μέσω της σηματοδότησης Sonic hedgehog

Οι κινητικοί νευρώνες του νωτιαίου μυελού (spinal MNs /SpMNs), κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, οργανώνονται σε τέσσερις κινητικές στήλες (motor columns), οι οποίες διατρέχουν τον κεφαλο-ουριαίο άξονα του νωτιαίου μυελού, τη διάμεση κινητική στήλη (median motor column, MMC), την πλευρική κινητική στήλη (lateral motor column, LMC), την υπαξονική κινητική στήλη (hypaxial motor column, HMC) και την προγαγγλιακή κινητική στήλη (preganglionic motor column, PGC). Η πλευρική κινητική στήλη (LMC) υποδιαιρείται στο βραχιόνιο (brachial) και οσφυϊκό (lumbar) επίπεδο του νωτιαίου μυελού σε μεσαία υπο-στήλη (sub column) LMC (LMCm) και σε πλευρική υπο-στήλη LMC (LMCl) οι οποίες νευρώνουν τους μύες των άκρων κοιλιακά και ραχιαία, αντίστοιχα [71,75,260,263–266] (**Εικ. 3.24A**). Καθώς τα παραπάνω δεδομένα έχουν καταδείξει ότι η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B στο αναπτυξιακό στάδιο E2 οδηγεί στη μείωση των Olig2⁺ προγονικών κυττάρων των κινητικών νευρώνων (pMNs) καθώς και των Hb9⁺ και Islet1/2⁺ κινητικών νευρώνων (MNs) στο στάδιο E4, ήταν εύλογο το ερώτημα εάν η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B έχει κάποια επίδραση στην οργάνωση των κινητικών νευρώνων σε στήλες (columnar organization), σε ένα μεταγενέστερο αναπτυξιακό στάδιο όταν οι κινητικές στήλες έχουν ήδη σχηματισθεί. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν ανοσολογικές χρώσεις σε κρουτομές νωτιαίου μυελού ηλικίας E6, οι οποίες αντιστοιχούσαν στο βραχιόνιο επίπεδο, για μεταγραφικούς παράγοντες που χαρακτηρίζουν κάθε κινητική στήλη. Η ποσοτικοποίηση έγινε με τη μέτρηση του συνολικού αριθμού των θετικών κυττάρων για κάθε επιλεγμένο δείκτη και κανονικοποίηση (normalization) ως προς τον αριθμό των συνολικών κυτταρικών πυρήνων και εκφράστηκε ως ποσοστό. Απροσδόκητα, βρέθηκε ότι η απώλεια των κινητικών νευρώνων (MNs) που παρατηρήθηκε στο αναπτυξιακό στάδιο E4 αντανάκλωσε, στο στάδιο E6, επιλεκτικά στους κινητικούς νευρώνες της στήλης LMCm (Foxp1⁺/Islet1⁺), οι οποίοι μειώθηκαν κατά 32,05% ± 7,48% (*p ≤ 0.05, n = 23 τομές από 4 έμβρυα), (**Εικ. 3.24Bvi, xii, Εικ. 3.24C**). Σε αντίθεση, οι κινητικοί νευρώνες της στήλης LMCl (Foxp1⁺/Hb9⁺) (**Εικ. 3.24Biv, x, Εικ. 3.24C**) και της στήλης MMC (Lim3⁺/Hb9⁺) (**Εικ. 3.24Bii, viii, Εικ. 3.24C**) δεν επηρεάστηκαν από την υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B (**Εικ. 3.24C**).

Αντιστρόφως, η χορήγηση 600 μg του αναστολέα AZ191 στο αναπτυξιακό στάδιο E2 είχε ως αποτέλεσμα τον αντίθετο φαινότυπο στο στάδιο E6, με αυξημένο ποσοστό των κινητικών νευρώνων της στήλης LMCm κατά 113,49% ± 15,49 (**p ≤ 0.001, n = 19 τομές από 4 έμβρυα) (**Εικ. 3.24D,E**), σε σύγκριση με τα έμβρυα WT. Ομοίως, η ενεργοποίηση του μονοπατιού Shh χορηγώντας 1 μg του αγωνιστή του Smoothed SAG στο στάδιο E2 οδήγησε σε παραπλήσιο φαινότυπο με τον προκαλούμενο από τον αναστολέα AZ191, στο E6, και αύξησε το ποσοστό των κινητικών νευρώνων της στήλης LMCm κατά 101,43% ± 22,04 (**p ≤ 0.001, n = 19 τομές από 4 έμβρυα) (**Εικ. 3.24F,G**). Σημειωτέον, ούτε ο αναστολέας AZ191 (**Εικ. 3.25A,B**) ούτε ο αγωνιστής SAG (**Εικ. 3.25C,D**) είχαν κάποια επίδραση στους κινητικούς νευρώνες των στηλών LMCl και MMC.

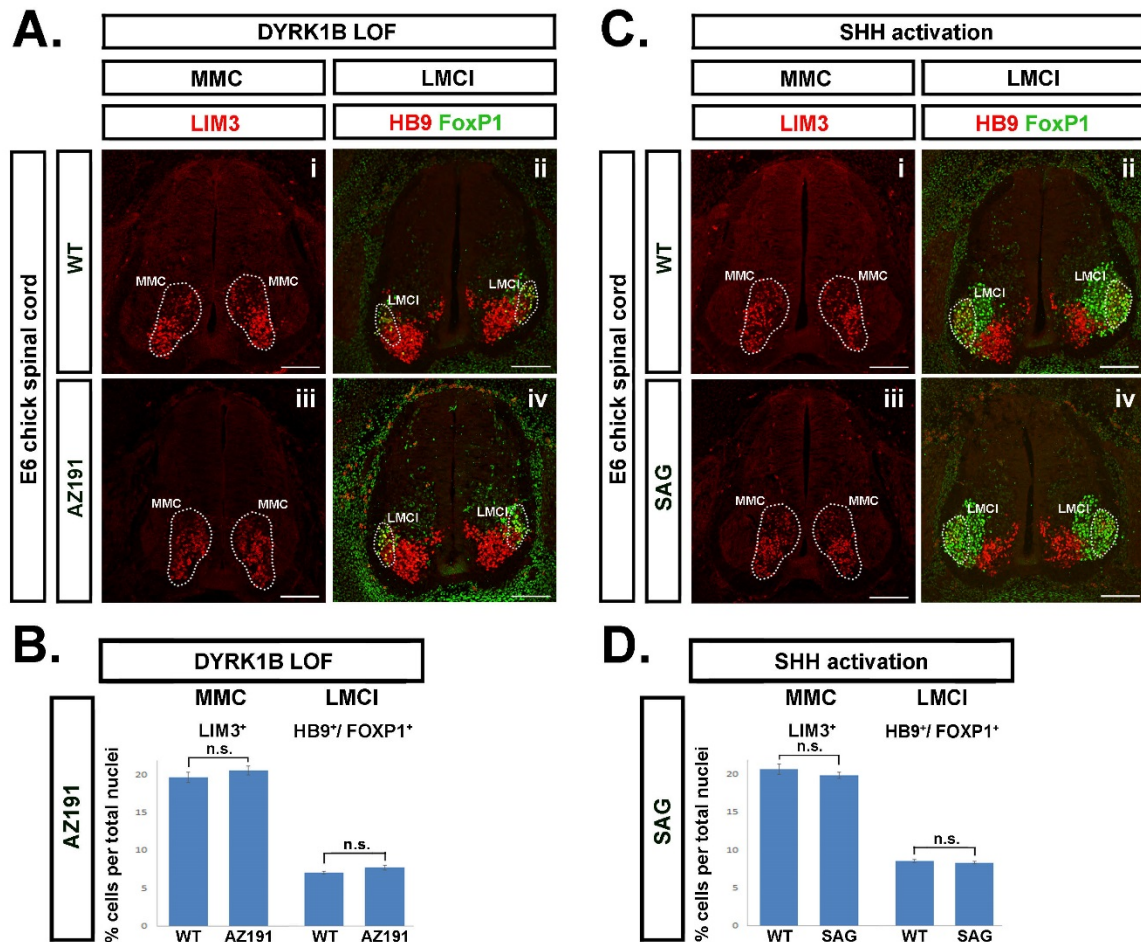
Όλα τα παραπάνω δεδομένα μαζί προτείνουν ότι η κινάση Dyrk1B είναι κρίσιμη για τον έλεγχο των κοιλιακών προγονικών κυττάρων ρυθμίζοντας τα μεταγραφικά επίπεδα του μορφογόνου Shh και των τελεστών του Gli2 και Gli3 επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο τη γένεση των κινητικών νευρώνων (MNs). Επίσης, η κινάση Dyrk1B φαίνεται να είναι ζωτικής σημασίας για τον καθορισμό του υποτύπου των κινητικών νευρώνων (MNs) της στήλης LMCm, κατά πάσα πιθανότητα μέσω του ίδιου μονοπατιού.

Είναι γνωστό από μια άλλη μελέτη, ότι το μορφογόνο Shh εκφράζεται από τους κινητικούς νευρώνες στο βραχιόνιο και οσφυϊκό επίπεδο κατά τη διάρκεια της εγκαθίδρυσης των κινητικών σπηλών και είναι απαραίτητο για το σωστό σχηματισμό της στήλης LMC [77]. Συνεπώς, στη συνέχεια εξετάστηκε η έκφραση του mRNA της Dyrk1B και του Shh μέσω RNA *in situ* υβριδισμού (ISH) σε εγκάρσιες κρουτομές που αντιστοιχούσαν στο βραχιόνιο επίπεδο του νωτιαίου μυελού κοτόπουλου εμβρυϊκής ηλικίας E6. Παρατηρήθηκε ότι ενώ το mRNA της κινάσης Dyrk1B εκφράζεται σε ολόκληρη την περιοχή των κινητικών νευρώνων, η έκφραση του mRNA του Shh εντοπίζεται αποκλειστικά στην περιοχή της κινητικής στήλης LMCm στο αναπτυξιακό στάδιο E6 (**Εικ. 3.26A,B**), εξηγώντας έτσι την επιλεκτική δράση της κινάσης Dyrk1B στην κινητική στήλη LMCm. Επιπρόσθετη, ανοσοϊστοχημική ανάλυση (immunohistochemistry, IHC) σε εγκάρσιες κρουτομές που αντιστοιχούσαν στο βραχιόνιο επίπεδο του νωτιαίου μυελού ποντικού εμβρυϊκής ηλικίας E14.5 (αντίστοιχη ηλικία του E6 στο κοτόπουλο) έδειξε τον συνεντοπισμό της κινάσης Dyrk1B με τους μεταγραφικούς παράγοντες-δείκτες των κινητικών νευρώνων της LMCm, Islet1/2⁺ και Foxp1⁺, (**Εικ. 3.26C**) καθώς και τον συνεντοπισμό της Dyrk1B με το μορφογόνο Shh στην κινητική στήλη LMCm και στο εδαφιαίο πέταλο (floor plate, FP) (**Εικ. 3.26D**). Όλα τα παραπάνω δεδομένα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι η κινάση Dyrk1B ελέγχει την ανάπτυξη του κοιλιακού προτύπου του νωτιαίου μυελού μέσω της σηματοδότησης Sonic hedgehog.



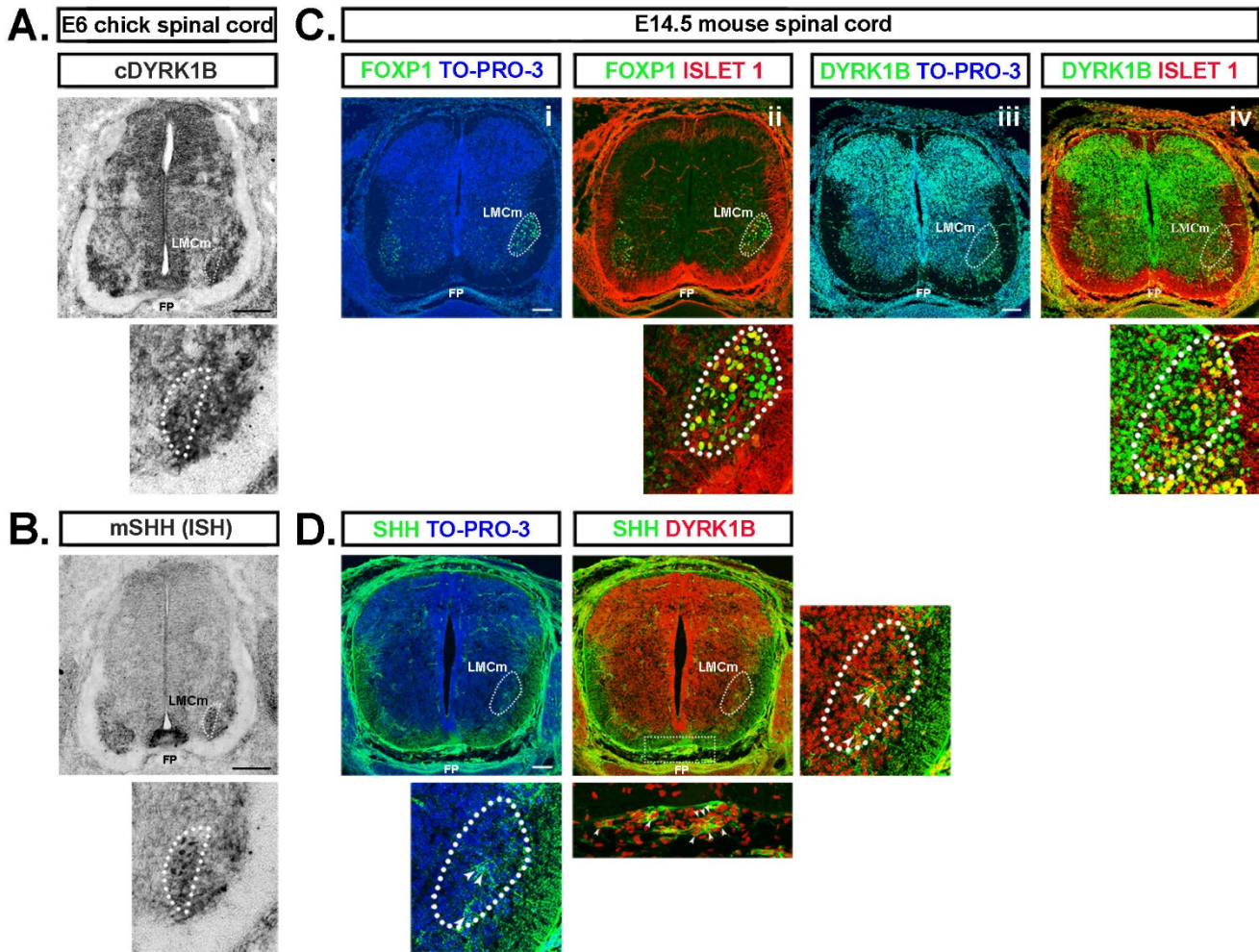
Εικόνα 3.24. Η κινάση Dyrk1B επηρεάζει τον αριθμό των κινητικών νευρώνων της κινητικής στήλης LMCm στον εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του κοτόπουλου ηλικίας E6. Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις σε νωτιαίο μυελό εμβρύων κοτόπουλου τα οποία έχουν υποστεί μονόπλευρη *in ovo* ηλεκτροδιάτρηση στο στάδιο E2 ή φαρμακολογική αναστολή της ενδογενούς κινάσης Dyrk1B μέσω του αναστολέα AZ191 (600 μg) ή ενεργοποίηση της σηματοδότησης Shh μέσω του αγωνιστή SAG του Smoothened (SMO) (1 μg) και ανάλυση που έγινε στο στάδιο E6. Η ποσοτικοποίηση έγινε με τη μέτρηση του συνολικού αριθμού των θετικών κυττάρων για κάθε επιλεγμένο δείκτη και κανονικοποίηση (normalization) ως προς τον αριθμό των συνολικών κυτταρικών πυρήνων και εκφράστηκε ως ποσοστό. Οι συγκρίσεις, στα πειράματα υπερέκφρασης (GOF), έγιναν μεταξύ της ηλεκτροδιατρηθείσας και της μη ηλεκτροδιατρηθείσας πλευράς για κάθε πειραματική συνθήκη και στην περίπτωση της χορήγησης AZ191 ή SAG η σύγκριση έγινε με τα μη κατεργασμένα έμβρυα φυσικού τύπου (WT). **A.** Ανατομικός χάρτης των κινητικών στηλών και των περιφερικών τους στόχων στο βραχιόνιο (brachial) επίπεδο του νωτιαίου μυελού του κοτόπουλου ηλικίας E6. **B, C.** Η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B (πειράματα ‘προσθήκης λειτουργίας’, *gain-of-function*, GOF) στο E2 μείωσε επιλεκτικά στο στάδιο E6, τον αριθμό των κινητικών νευρώνων (MNs) της στήλης LMCm (Foxp1⁺/Islet1⁺) (**Axi, xii**) κατά 32,05% ± 7,48 (p≤0.05, n=23 τομές από 4 έμβρυα), ενώ δεν παρατηρήθηκε επίδραση στους κινητικούς νευρώνες των στηλών LMCI (HB9⁺/Foxp1⁺) (**Aix, x**) και MMC (Lim3⁺) (**Avii, viii**). Στα έμβρυα ελέγχου GFP, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στους

κινητικούς νευρώνες των στηλών LMCm LMCI και MMC (**Ai-vi**) μεταξύ των δύο πλευρών του νωτιαίου μυελού. **D, E.** Η χορήγηση του αναστολέα AZ191 στο E2 (πειράματα 'απώλειας λειτουργίας', loss-of-function, LOF) οδήγησε στο E6 στον αντίθετο φαινότυπο, αυξάνοντας ειδικά τον αριθμό των κινητικών νευρώνων της στήλης LMCm (Foxp1⁺/Islet1⁺) (**Di-ii**) κατά 113,49% ± 15,49 (p≤0.001, n=19 τομές από 4 έμβρυα) σε σύγκριση με τον αντίστοιχο πληθυσμό στα έμβρυα ελέγχου φυσικού τύπου (wild-type, WT). **F, G.** Παρομοίως, η χορήγηση του αγωνιστή του SAG στο E2 οδήγησε στο E6 σε αύξηση του αριθμού των κινητικών νευρώνων της στήλης LMCm (**Fi-ii**) κατά 101,43% ± 22,04 (p≤0.001, n=19 τομές από 4 έμβρυα) σε σύγκριση με τον αντίστοιχο πληθυσμό ελέγχου φυσικού τύπου (WT). Σημειωτέον, η χορήγηση του αναστολέα AZ191 και του αγωνιστή SAG δεν είχε καμία επίδραση στους κινητικούς νευρώνες των στηλών MMC και LMCI (**Eικ. 3.25**). Ράβδοι κλίμακας (scale bars): 100 μm. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως Μέση τιμή ± Τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (standard error of the mean, SEM), *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001; ns, non-significant, μη σημαντικό (two-tailed Unequal variance t-test). Οι τομές του νωτιαίου μυελού αντιστοιχούν στο βραχιόνιο (brachial) επίπεδο.



Εικόνα 3.25. Η χορήγηση του εκλεκτικού αναστολέα AZ191 της κινάσης *Dyrk1B* και του αγωνιστή SAG του *Smoothened* (SMO) δεν επηρεάζει τους κινητικούς νευρώνες των κινητικών στηλών MMC και LMCI στον εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του κοτόπουλου ηλικίας E6. Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις σε νωτιαίο μυελό εμβρύων κοτόπουλου τα οποία έχουν υποστεί μονόπλευρη *in ovo* ηλεκτροδιάτρηση στο στάδιο E2 ή φαρμακολογική αναστολή μέσω του αναστολέα AZ191 (600 μg) ή ενεργοποίηση της σηματοδότησης Shh μέσω του αγωνιστή SAG (1 μg) και ανάλυση που έγινε στο στάδιο E6. Η ποσοτικοποίηση έγινε με τη μέτρηση του συνολικού αριθμού των θετικών κυττάρων για κάθε επιλεγμένο δείκτη και κανονικοποίηση (normalization) ως προς τον αριθμό των συνολικών κυτταρικών πυρήνων και εκφράστηκε ως ποσοστό. Οι συγκρίσεις έγιναν με τα μη κατεργασμένα έμβρυα φυσικού τύπου (WT). **A, B.** Η αναστολή της ενεργότητας της ενδογενούς κινάσης *Dyrk1B*, μέσω της χορήγησης του αναστολέα AZ191 στο αναπτυξιακό στάδιο E2 (πειράματα 'απώλειας λειτουργίας', loss-of-function, LOF), δεν επηρέασε τον αριθμό των κινητικών νευρώνων (MNs) της στήλης MMC (Lim3⁺) (**Ai, iii**) ($p > 0.05$, $n = 19$ τομές από 4 έμβρυα), ούτε τον αριθμό των κινητικών νευρώνων της στήλης LMCI (HB9⁺/Foxp1⁺) (**Aii, iv**) ($p > 0.05$, $n = 19$ τομές από 4 έμβρυα) στο στάδιο E6, σε σύγκριση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των εμβρύων ελέγχου φυσικού τύπου (WT). **C, D.** Παρομοίως, δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση όταν επήλθε ενεργοποίηση του μονοπατιού Shh, μέσω της χορήγησης του αγωνιστή SAG στο στάδιο E2, στον

αριθμό των κινητικών νευρώνων της στήλης MMC (Lim3⁺) **(Ci, iii)** ($p > 0.05$, $n = 19$ τομές από 4 έμβρυα) ή τον αριθμό των κινητικών νευρώνων της στήλης LMCI (HB9⁺/Foxp1⁺) **(Cii, iv)** ($p > 0.05$, $n = 19$ τομές από 4 έμβρυα) στο στάδιο E6. Ράβδοι κλίμακας (scale bars): 100 μm . Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως Μέση τιμή \pm Τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (standard error of the mean, SEM), * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; ns, non-significant, μη σημαντικό (two-tailed Unequal variance t-test). Οι τομές του νωτιαίου μυελού αντιστοιχούν στο βραχιόνιο (brachial) επίπεδο.



Εικόνα 3.26. Το μορφογόνο *Shh* και η κινάση *Dyrk1B* συνεκφράζονται από τους κινητικούς νευρώνες της κινητικής στήλης LMCm και από το εδαφιαίο πέταλο στον εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό. Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις σε νωτιαίο μυελό εμβρύων κοτόπουλου ηλικίας E6 και ποντικού ηλικίας E14.5. **A, B.** Στον νωτιαίο μυελό κοτόπουλου εμβρυϊκής ηλικίας E6, το mRNA της κινάσης *Dyrk1B* εκφράζεται σε όλη την περιοχή των κινητικών νευρώνων (motor neuron domain, MN) συμπεριλαμβανομένων και των κινητικών νευρώνων (MNs) της στήλης LMCm (απεικονίζονται με λευκές διάστικτες γραμμές), ενώ η έκφραση του mRNA του μορφογόνου *Shh* περιορίζεται στους κινητικούς νευρώνες της στήλης LMCm (λευκές διάστικτες γραμμές), όπως αποκαλύπτεται από RNA *in situ* υβριδισμό (ISH) σε εγκάρσιες τομές του νωτιαίου, οι οποίες αντιστοιχούν στο βραχιόνιο επίπεδο. Έντονο σήμα ανιχνεύθηκε, επίσης, για το mRNA της κινάσης *Dyrk1B* και του μορφογόνου *Shh* στο εδαφιαίο πέταλο (FP). Ο RNA *in situ* υβριδισμός για τα μόρια mRNA των *Dyrk1B* και *Shh* πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τους αντίστοιχους ιχνηθέτες RNA (riboprobes), οι οποίοι είχαν συντεθεί γι' αυτό το σκοπό. **C.** Στον εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του ποντικού ηλικίας E14.5 (ο οποίος αντιστοιχεί στην ηλικία E6 στο κοτόπουλο), η κινάση *Dyrk1B* εκφράζεται από τους κινητικούς νευρώνες (MNs) της στήλης LMCm (*Foxp1*⁺/*Islet1*⁺), όπως αποκαλύπτεται από την ανοσοϊστοχημεία (immunohistochemistry /IHC). **D.** Στον νωτιαίο μυελό του ποντικού ηλικίας E14.5, το μορφογόνο *Shh*

και η κινάση Dyrk1B συνεκφράζονται από κύτταρα του εδαφιαίου πετάλου (FP) και της περιοχής LMCm (όπως υποδεικνύεται από κεφαλές βελών στην μεγέθυνση). Ράβδοι κλίμακας (scale bars): 100 μm. Οι τομές του νωτιαίου μυελού αντιστοιχούν στο βραχιόνιο (brachial) επίπεδο.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Συμπεράσματα και συζήτηση

Σε αυτή τη μελέτη αποκαλύφθηκε ένας νέος ρόλος της κινάσης Mirk/Dyrk1B στην ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού. Από τη βιβλιογραφία ήταν γνωστός ο κύριος ρόλος της κινάσης Dyrk1B ως επαγωγέα της εξόδου των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο [83,90,125,267] κατά τη μυογένεση [95,120,126], τη σπερματογένεση [130], στα κύτταρα του νευροβλαστώματος ποντικού [132] και στον καρκίνο [103,121,131,239]. Η Dyrk1B δρα στον κυτταρικό κύκλο μέσω της φωσφορυλίωσης της κυκλίνης D1 (cyclin D1) [125,129,132,189,267] και της p27^{Kip1} [107], οδηγώντας στην αποικοδόμηση της πρώτης και τη σταθεροποίηση της δεύτερης, αντίστοιχα. Επίσης, η κινάση Dyrk1B δρα στον κυτταρικό κύκλο ενεργοποιώντας μαζί με την Dyrk1A το σύμπλοκο DREAM το οποίο είναι θεμελιώδες για τη διατήρηση της φάσης ηρεμίας (quiescent state) [133,134,268]. Ωστόσο, ο ρόλος της κινάσης Dyrk1B στην νευρογένεση δεν ήταν γνωστός και τα πρώτα σχετικά ευρήματα προέκυψαν από προηγούμενη μελέτη του οικείου Εργαστηρίου Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας – Βλαστικών κυττάρων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ σχετικά με τη λειτουργία της Dyrk1B στα κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού Neuro2A [125,132,189]. Ειδικότερα, δείχθηκε ότι η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B στα κύτταρα Neuro2A προωθούν την έξοδο τους από τον κυτταρικό κύκλο και τη νευρωνική διαφοροποίησή τους, μέσω της φωσφορυλίωσης της κυκλίνης D1, που ακολουθείται από την κυτταροπλασματική της μετατόπιση και την ακόλουθη αποικοδόμηση της από το 26S πρωτεάσωμα. Αυτή η αρνητική επίδραση στον κυτταρικό κύκλο αντιστρέφεται από το συνεργατικό μόριο που αλληλεπιδρά με την κινάση Dyrk1B, την πρωτεΐνη-ικρίωμα (scaffolding protein) RanBPM [132].

Για τους παραπάνω λόγους, κρίθηκε σκόπιμο να διαλευκανθεί ο ρόλος της κινάσης Dyrk1B *in vivo* κατά την ανάπτυξη του ΚΝΣ. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η διερεύνηση του αναπτυξιακού προτύπου έκφρασης της κινάσης Dyrk1B στο ΚΝΣ του ποντικού και του κοτόπουλου. Δείχθηκε ότι η κινάση Dyrk1B εκφράζεται καθ' όλη την εμβρυϊκή ανάπτυξη του ΚΝΣ του ποντικού και του κοτόπουλου, από τον εγκέφαλο και από το νωτιαίο μυελό. Όσον αφορά τον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο, δείχθηκε ότι η κινάση Dyrk1B εκφράζεται από τα πολλαπλασιαζόμενα νευρικά βλαστικά /προγονικά κύτταρα (neural stem cells, neural precursor cells, NSCs/NPCs) και τους μεταμιτωτικούς νευρώνες του εγκεφάλου του ποντικού, σημαίνοντας την δευτερογενή νευρογένεση η οποία επιτελείται στο νευρογεννητικό θώκο της οδοντωτής έλικας (dentate gyrus, DG). Όσον αφορά τον αναπτυσσόμενο νωτιαίο μυελό του ποντικού και του κοτόπουλου, δείχθηκε ότι η κινάση Dyrk1B εκφράζεται από τη νωτοχορδή (notochord, NC), το εδαφιαίο πέταλο (floor plate, FP), τα πολλαπλασιαζόμενα προγονικά κύτταρα νευρικά βλαστικά /προγονικά κύτταρα στην κοιλιακή ζώνη (ventricular zone, VZ) και από τους μεταμιτωτικούς νευρώνες, συμπεριλαμβανομένων των κινητικών

νευρώνων (motor neurons, MNs). Δείχθηκε, επίσης, ότι τα επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης της κινάσης Dyrk1B, η οποία ήταν παρούσα καθ'όλη την νευρογένεση του ΚΝΣ του ποντικού και του κοτόπουλου και την, επιπλέον εξεταζόμενη, μεταγεννητική του ποντικού, μειώνονται με το χρόνο.

Στη συνέχεια, για τη διαλεύκανση του ρόλου της κινάσης Dyrk1B *in vivo*, ακολούθησαν *in vivo* λειτουργικές μελέτες με εφαρμογή *in ovo* πειραμάτων 'προσθήκης' και 'απώλειας λειτουργίας' (*gain-and-loss-of-function*) όπως και 'διάσωσης φαινοτύπου' (*phenotype rescue*) στον αναπτυσσόμενο νωτιαίο μυελό (νευρικό σωλήνα) του εμβρύου του κοτόπουλου το οποίο αποτελεί το πρότυπο σύστημα μελέτης της παρούσας μελέτης. Δείχθηκε ότι η εκτοπική υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B προωθεί την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο και τη νευρωνική διαφοροποίηση. Αυτές οι παρατηρήσεις είναι σε συμφωνία με τη γνωστή κύρια λειτουργία της Dyrk1B, ως ενός αρνητικού ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου [83,90,125,267] κατά τη μυογένεση [95,120,126], τη σπερματογένεση [130], στα κύτταρα του νευροβλαστώματος ποντικού Neuro2A [132] και στον καρκίνο [103,121,131,239]. Επίσης, τα δεδομένα αυτής της μελέτης είναι επίσης σε συμφωνία με προηγούμενα ευρήματα του Εργαστηρίου Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας – Βλαστικών κυττάρων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ σχετικά με τη λειτουργία της Dyrk1B στα νευρικά Neuro2A κύτταρα [125,132,189], όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Επιπλέον, η παρούσα μελέτη αποκαλύπτει καινοφανή ευρήματα τα οποία υποδεικνύουν ότι η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B στον εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του κοτόπουλου προωθεί την απόπτωση ειδικά στην περιοχή των κινητικών νευρώνων (motor neuron domain, MN). Η αυξημένη απόπτωση στην περιοχή των κινητικών νευρώνων σε συνδυασμό με την πρόωρη έξοδο των πολλαπλασιαζόμενων νευροβλαστών από τον κυτταρικό κύκλο οδήγησε σε μειωμένους αριθμούς των κοιλιακών προγονικών κυττάρων p2, pMN και p3 και κατά συνέπεια σε μειωμένους αριθμούς μεταμιτωτικών ενδιάμεσων νευρώνων (interneurons, INs) και κινητικών νευρώνων (motor neurons, MNs), αντίστοιχα. Επιπλέον, η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B έχει αντίκτυπο στους κινητικούς νευρώνες της κινητικής στήλης LMCm στο E6, μειώνοντας τον πληθυσμό τους. Αντιστρόφως, η αναστολή της ενεργότητας της ενδογενούς κινάσης Dyrk1B, από τον εκλεκτικό της αναστολέα AZ191, οδήγησε σε αυξημένο πολλαπλασιασμό και αυξημένους πληθυσμούς των προγονικών κυττάρων p2, pMN και p3, από τα οποία θα προκύψουν οι ενδιάμεσοι νευρώνες της περιοχής V2, οι κινητικοί νευρώνες και οι ενδιάμεσοι νευρώνες της περιοχής V3, καθώς οδήγησε και σε αυξημένους πληθυσμούς των Hb9⁺ και Islet1/2⁺ κινητικών νευρώνων. Επιπροσθέτως, η αναστολή της ενεργότητας της ενδογενούς Dyrk1B με το μικρό μόριο AZ191 οδήγησε σε μεταγενέστερο στάδιο σε αυξημένους πληθυσμούς των κινητικών νευρώνων της κινητικής στήλης LMCm. Παρότι προηγούμενες μελέτες στη μυογένεση [126] και στον καρκίνο [121,143,154,239] έχουν αναφέρει έναν αντιαποπτωτικό ρόλο για την κινάση Dyrk1B, σε αυτή τη μελέτη παρατηρήθηκε ότι η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B αυξάνει τη φυσιολογικά επιτελούμενη απόπτωση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του νωτιαίου μυελού, προτείνοντας ότι η λειτουργία της στην κυτταρική επιβίωση είναι εξαρτώμενη από τον ιστό και /ή το γενικότερο πλαίσιο (tissue- and /or context-dependent). Επιπλέον,

η επαγόμενη από την κινάση Dyrk1B απόπτωση στην περιοχή των κινητικών νευρώνων, όπως και η ισχυρή επίδραση της στον κοιλιακό φαινότυπο υποδεικνύουν ότι πιθανώς έχει σχέση με τη σηματοδότηση Sonic hedgehog (Shh), καθώς το μορφογόνο Shh είναι κρίσιμο για την κυτταρική επιβίωση των κοιλιακών προγονικών κυττάρων και κινητικών νευρώνων [24–26,261,269]. Ακόμα στην παρούσα μελέτη, δείχθηκε ότι η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B μειώνει τον αριθμό των Nkx6.1⁺ κοιλιακών προγονικών κυττάρων, ενώ δεν επηρεάζει τον αριθμούς των ραχιαίων Pax3⁺ προγονικών κυττάρων ή τον αριθμό των ραχιαίων Islet1⁺ ενδιάμεσων νευρώνων της περιοχής dl3. Αυτός ο ισχυρός κοιλιακός φαινότυπος προκαλούμενος από την κινάση Dyrk1B υποστήριξε περαιτέρω την εμπλοκή της με τη σηματοδότηση Shh/Gli.

Όντως, σε αυτή τη μελέτη αποδεικνύεται ότι η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B καταστέλλει τη σηματοδότηση Shh με τη μείωση των επιπέδων mRNA του μορφογόνου Shh και των τελεστών του Gli2 και Gli3. Σε συνέπεια με τα παραπάνω, δείχθηκε ότι η φαρμακολογική αναστολή της ενδογενούς κινάσης Dyrk1B, από τον αναστολέα AZ191, οδήγησε σε αυξημένη μεταγραφή των γονιδίων *Shh*, *Gli2* και *Gli3*. Η σηματοδότηση του Shh διαμεσολαβείται από τις αλληλοεπικαλυπτόμενες αλλά διακριτές λειτουργίες των μεταγραφικών παραγόντων Gli. Οι πρωτεΐνες Gli2 και Gli3 επεξεργάζονται πρωτεολυτικά απουσία του Shh, δρώντας ως μεταγραφικοί καταστολείς, ενώ η πρωτεΐνη Gli1 όχι, δρώντας μόνο ως μεταγραφικός ενεργοποιητής [18,43,44]. Στον κοιλιακό νευρικό σωλήνα, ο τελεστής Gli2 είναι ο πρωταρχικός ενεργοποιητής του μονοπατιού Shh [55–57] και σε συνεργασία με τον τελεστή Gli3 ρυθμίζει το κοιλιακό πρότυπο και τον πολλαπλασιασμό [60–62]. Τα δεδομένα αυτά είναι σε συμφωνία με άλλες μελέτες οι οποίες έχουν δείξει την εμπλοκή της κινάσης Dyrk1B στο κανονικό (canonical) και μη κανονικό (non-canonical) μονοπάτι Shh σε πολλούς καρκίνους [195,197,214,235]. Ειδικότερα, η κινάση Dyrk1B έχει βρεθεί να παρεμποδίζει τη κανονική σηματοδότηση Shh και να ενεργοποιεί τη μη κανονική σηματοδότηση Shh δια μέσου του μονοπατιού mTOR/AKT [214]. Επιπλέον, ο Lauth και οι συνεργάτες του έχουν αναφέρει ότι η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B στα κύτταρα NIH3T3 παρεμποδίζει την εκκινούμενη από την πρωτεΐνη SMO σηματοδότηση αναρροϊκά (upstream) του καταστολέα SUFU (Suppressor of Fused homolog, Καταστολέας του ομολόγου της πρωτεΐνης Fused) [195]. Επιπροσθέτως, η υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B στην κυτταρική σειρά παγκρεατικού καρκίνου Panc1 ενισχύει την πρωτεϊνική σταθερότητα της πρωτεΐνης Gli1 προλαμβάνοντας την πρωτεασωματική της αποικοδόμηση [214], ενώ η φαρμακολογική αναστολή της κινάσης Dyrk1B έχει ως αποτέλεσμα την αυξορρύθμιση (up-regulation) της σηματοδότησης Shh [214].

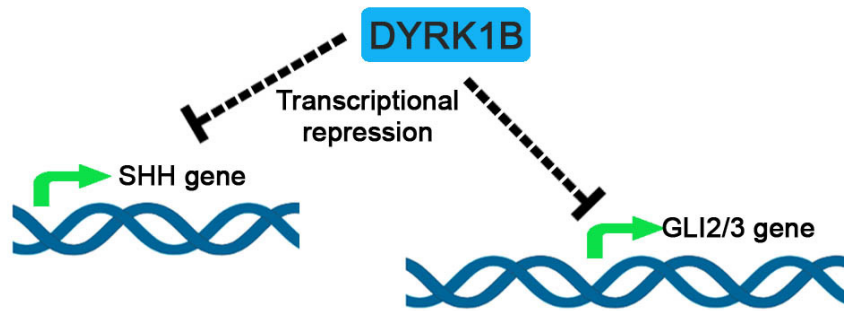
Σε συμφωνία με τα παραπάνω, στα *in ovo* πειράματα 'διάσωσης φαινοτύπου' δείχθηκε ότι το μονοπάτι Shh μέσω της χρήσης του αγωνιστή SAG του SMO, αντιστρέφει την επίδραση της κινάσης Dyrk1B στον κοιλιακό φαινότυπο, αποκαθιστώντας τον αριθμό των προγονικών κυττάρων p2, pMN και p3. Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης είναι σε συμφωνία με τη λειτουργία του Shh κατά την ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού. Η πρωτεΐνη Shh, αρχικά εκκρινόμενη από τη νωτοχορδή (NC) και μετέπειτα από το εδαφιαίο πέταλο (FP), δρα ως ένα μεγάλης εμβέλειας διαβαθμιζόμενο μορφογόνο

(graded morphogen), το οποίο ελέγχει το κοιλιακό πρότυπο του νωτιαίου μυελού [21,24–26,261,269], καθώς και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και την επιβίωση των προγονικών κυττάρων [24–26,261,269]. Εκτοπική έκφραση ή ενεργοποίηση του μονοπατιού Shh οδηγεί σε υπερπολλαπλασιασμό των κοιλιακών προγονικών κυττάρων [261,269] και, αντιστρόφως, αναστολή της σηματοδότησης του Shh οδηγεί σε μειωμένο πολλαπλασιασμό και επιβίωση των κοιλιακών προγονικών κυττάρων [30,261,270,271]. Επομένως, η επίδραση της κινάσης Dyrk1B στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επιβίωση των κοιλιακών προγονικών κυττάρων p2, pMN και p3 θα μπορούσε, επίσης, να εξηγηθεί από την εμπλοκή της στη σηματοδότηση Shh. Σε συμφωνία, τα δεδομένα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι και ο αγωνιστής SAG και ο αναστολέας AZ191 είναι ικανοί να ενεργοποιήσουν το μονοπάτι Shh, όπως υποδεικνύεται από την ενισχυμένη έκφραση των γονιδίων των πρωτεϊνών Shh Gli2 και Gli3, και από την αυξημένη έκφραση των πρώιμα αποκρινόμενων και εγγύτερων στόχων (proximal targets) του μορφογόνου Shh, που είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες FoxA2 και Nkx2.2 [26,251]. Επίσης, η χορήγηση του αναστολέα AZ191 οδηγούν σε υπερπολλαπλασιασμό των προγονικών κυττάρων p2, pMN και p3 και σε αυξημένο αριθμό κινητικών νευρώνων στο αναπτυξιακό στάδιο E4 αλλά και στο στάδιο E6 στη σχηματισμένη πλέον κινητική στήλη LMCm. Είναι ενδιαφέρον ότι η εκτεταμένη απώλεια των κινητικών νευρώνων που παρατηρήθηκε στον ηλεκτροδιατηρηθέντα νωτιαίο μυελό του κοτόπουλου σταδίου E4, η οποία αντανακλάται εκλεκτικά στο στάδιο E6 ως μειωμένος αριθμός κινητικών νευρώνων της στήλης LMCm, θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός ότι το μορφογόνο Shh συνεκφράζεται αποκλειστικά με την κινάση Dyrk1B από τους κινητικούς νευρώνες στη στήλη LMCm στο βραχιόνιο επίπεδο του νωτιαίου μυελού του κοτόπουλου σταδίου E6. Η αποκλειστική έκφραση του μορφογόνου Shh από τους κινητικούς νευρώνες της στήλης LMCm έχει αναφερθεί σε προηγούμενη μελέτη από τον Nam και τους συνεργάτες του, όπου βρέθηκε ότι το μορφογόνο Shh είναι κρίσιμο για τον προσδιορισμό της στήλης LMCm [77]. Επομένως, τα ευρήματα αυτής της μελέτης είναι σε συμφωνία με τις παραπάνω παρατηρήσεις [77].

Τα δεδομένα της παρούσας διατριβής προτείνουν ότι η κινάση Dyrk1B δρα άμεσα ή έμμεσα ως μεταγραφικός καταστολέας (transcriptional repressor) των γονιδίων *Shh*, *Gli2* και *Gli3* στον εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του κοτόπουλου. Καθώς η κινάση Dyrk1B εντοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου είναι πιθανό να δρα στη μεταγραφική συσκευή η οποία ελέγχει τη γονιδιακή έκφραση των *Shh*, *Gli2* και *Gli3*. Από προηγούμενες μελέτες είχε δειχθεί ότι η κινάση Dyrk1B αλληλεπιδρά με τις αποακετυλάσες των ιστονών Τάξης II (class II histone deacetylases, HDACs) στην ανάπτυξη του σκελετικού μυός [95]. Χαρακτηριστικά, έχει αναφερθεί ότι η κινάση Dyrk1B μάλλον αλληλεπιδρά άμεσα με τροποποιητές χρωματίνης που έχουν κρίσιμους ρόλους στη μεταγραφική ρύθμιση, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών CBP (CREBBP), p300, p400, KAT8, MSL3 και HDAC5 [96,97]. Μία πιθανή υπόθεση θα μπορούσε να είναι ότι η κινάση Dyrk1B αλληλεπιδρά, φυσικά ή λειτουργικά, με μεταγραφικούς παράγοντες που ελέγχουν τη μεταγραφή του *Shh*, όπως είναι ο παράγοντας FoxA2 και πιθανώς ο παράγοντας Arx, ή με παράγοντες αναδιαμόρφωσης της

χρωματίνης (chromatin remodeling factors), οδηγώντας σε τροποποιήσεις της γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων *Shh*, *Gli2* και *Gli3* (Εικ. 3.27). Δεδομένου ότι το μορφογόνο *Shh* αρχικά εκκρίνεται από τη νωτοχορδή και επάγει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *FoxA2* στο εδαφιαίο πέταλο, ο οποίος με τη σειρά του επάγει την έκφραση του μορφογόνου *Shh* και το *Shh* στη συνέχεια επάγει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *Nkx2.2* [26,251]. Συνεπώς, τα παραπάνω ευρήματα επιτρέπουν την υπόθεση ενός μοριακού μηχανισμού, μέσω του οποίου η κινάση *Dyrk1B* στρατολογείται σε ρυθμιστικές αλληλουχίες DNA των γονιδίων *Shh*, *Gli2* και *Gli3*, και τροποποιεί τη δραστηριότητα των σχετιζόμενων με χρωματίνη συμπλόκων, ώστε να καταστείλει τη μεταγραφή τους. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι η κινάση *Dyrk1B* είναι πυρηνική, σε αντίθεση με την κινάση που κωδικοποιείται από το παράλογο γονίδιο, την *Dyrk1A* που είναι κυτταροπλασματική. Παρ' όλα αυτά, δεν μπορεί να αποκλεισθεί η πιθανότητα ενός έμμεσου μηχανισμού ρύθμισης των γονιδίων *Shh*, *Gli2* και *Gli3*, *FoxA2* και *Nkx2.2* από την κινάση *Dyrk1B*. Επιπλέον, δεν μπορεί να αποκλεισθεί ότι η *Dyrk1B* μπορεί να έχει επιπρόσθετες μη κυτταρικά αυτόνομες (non-cell autonomous) λειτουργίες. Εναλλακτικά, για παράδειγμα, η επίδραση της κινάσης *Dyrk1B* στην έκφραση του γονιδίου *Gli3* θα μπορούσε επίσης να διαμεσολαβείται μέσω του μονοπατιού *Wnt/β-catenin*, καθώς η σηματοδότηση *Wnt* έχει βρεθεί να ελέγχει την έκφραση του τελεστή *Gli3* και συνεπώς την κυτταρική μοίρα των κοιλιακών προγονικών κυττάρων [17,59]. Επομένως, ο ακριβής μηχανισμός της λειτουργίας της κινάσης *Dyrk1B* στη μεταγραφή των γονιδίων *Shh*, *Gli2* και *Gli3* θα διερευνηθεί περαιτέρω στο μέλλον.

Συμπερασματικά, στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, δείχθηκε ότι η κινάση *Dyrk1B* είναι ένας κύριος ρυθμιστής ο οποίος ελέγχει την ισορροπία μεταξύ της προόδου του κυτταρικού κύκλου και της διαφοροποίησης κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού του κοτόπουλου. Επιπροσθέτως, αποκαλύφθηκε ένας νέος ρόλος για την κινάση *Dyrk1B* στον έλεγχο του αριθμού των κοιλιακών προγονικών κυττάρων, καθώς και στην οργάνωση σε στήλες των κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού (SpMNs) μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης *Shh*.



Εικόνα 3.27. Σχηματική αναπαράσταση της επίδρασης της κινάσης *Dyrk1B* στη μεταγραφή του μορφογόνου *Shh* και των τελεστών του *Gli2* και *Gli3*. Η κινάση *Dyrk1B* δρα ως μεταγραφικός καταστολέας της μεταγραφής των γονιδίων *Shh*, *Gli2* και *Gli3* μέσω ενός, μέχρις στιγμής, άγνωστου μηχανισμού. Δεδομένου ότι η *Dyrk1B* είναι μία πυρηνική κινάση, είναι πιθανό να δρα άμεσα ή έμμεσα στη μεταγραφική συσκευή των γονιδίων *Shh*, *Gli2* και *Gli3*, αλληλεπιδρώντας με μεταγραφικούς παράγοντες ή /και με παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (chromatin remodeling factors), οδηγώντας σε τροποποιήσεις της γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων *Shh*, *Gli2* και *Gli3*.

4.2. Μελλοντικοί Στόχοι

Τα προηγούμενα χρόνια διάφορες μελέτες έχουν αναδείξει τους κύριους ρόλους της κινάσης Dyrk1B [125], η οποία παίζει κρίσιμο ρόλο στη μυογένεση [95,120,126], τη σπερματογένεση [130], τη λιπογένεση [164,165,224,272], καθώς και εμπλέκεται στις ανθρώπινες ασθένειες, όπως είναι το μεταβολικό σύνδρομο [164,165,224,272] και ο καρκίνος [121,127,131,143,145,149,154,239,273]. Η κινάση Dyrk1B ασκεί τις λειτουργίες της δια μέσου των ρυθμιστικών της επιδράσεων στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στην κυτταρική επιβίωση, στην κυτταρική κινητικότητα, στη μεταγραφή [83,90] και στη φλεγμονή [167,168].

Όμως πέραν της εκτεταμένης έρευνας για τη λειτουργία της κινάσης Dyrk1B κυρίως στα προαναφερόμενα συστήματα, από προηγούμενη μελέτη του Εργαστηρίου Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας – Βλαστικών κυττάρων δείχθηκε για πρώτη φορά η συμμετοχή της κινάσης Dyrk1B και στη νευρογένεση *in vitro* [125,132,189]. Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, διενεργήθηκε η διαλεύκανση της δράσης της κινάσης Dyrk1B *in vivo* κατά την ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού του εμβρύου του κοτόπουλου και δείχθηκε ότι η κινάση Dyrk1B αποτελεί έναν κύριο ρυθμιστή της ισορροπίας μεταξύ της προόδου του κυτταρικού κύκλου και της διαφοροποίησης κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού. Συγκεκριμένα, αποκαλύφθηκε ένας νέος ρόλος για την κινάση Dyrk1B στον έλεγχο του αριθμού των κοιλιακών προγονικών κυττάρων και νευρωνικών υποτύπων, όπως είναι οι ενδιάμεσοι νευρώνες της περιοχής V2a και οι κινητικοί νευρώνες του νωτιαίου μυελού (spinal MNs, SpMNs), ρυθμίζοντας τη γένεση και την επιβίωσή τους αλλά και την οργάνωσή των τελευταίων στη κινητική στήλη LMCm, που νευρώνει κοιλιακά τους μύες των άκρων, μέσω αλληλεπίδρασης με το σηματοδοτικό μονοπάτι Sonic hedgehog.

Δεδομένου της ισχυρής επίδρασης της κινάσης Dyrk1B στους κινητικούς νευρώνες του νωτιαίου μυελού, αναπτύχθηκε ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την πιθανή εμπλοκή της κινάσης αυτής στην Πλάγια Αμυοτροφική Σκλήρυνση (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS), η οποία αποτελεί μία θανατηφόρα νευροεκφυλιστική ασθένεια και χαρακτηρίζεται από την απώλεια των κινητικών νευρώνων στον εγκέφαλο και στο νωτιαίο μυελό [274]. Σημειωτέον, ότι οι κινητικοί νευρώνες του νωτιαίου μυελού και ενδιάμεσοι νευρώνες της περιοχής V2a επηρεάζονται αρχικά στο νωτιαίο μυελό των διαγονιδιακών ποντικών που φέρουν τη μεταλλαγή SOD1^{G93A}, τα οποία αποτελούν ζωικό πρότυπο (μοντέλο) μελέτης της ασθένειας ALS [275], ενώ έχει αναφερθεί κι η απορρύθμιση της σηματοδότησης Shh στην ALS [276]. Επομένως, ένας επόμενος στόχος είναι η διερεύνηση του ρόλου της κινάσης Dyrk1B στην ALS. Για τη διερεύνηση της λειτουργίας της κινάσης Dyrk1B στην ALS, θα χρησιμοποιηθεί το ζωικό πρότυπο των διαγονιδιακών ποντικών SOD1^{G93A}. Για τον σκοπό αυτό έχει ήδη αναπτυχθεί ένα πρωτόκολλο πρωτογενούς καλλιέργειας εμπλουτισμένης σε κινητικούς νευρώνες του νωτιαίου μυελού, προερχόμενης από E12.5 εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό ποντικών SOD1^{G93A}. Τα πρώτα αποτελέσματα, μάλιστα, έχουν δείξει ότι αυτοί οι κινητικοί νευρώνες παρουσιάζουν σημαντικά πιο βραχείς και κατακερματισμένους άξονες σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου φυσικού τύπου (WT), υποδεικνύοντας μία πρώιμη αξονοπάθεια. Επίσης η φαρμακολογική αναστολή της κινάσης Dyrk1B

με τον εκλεκτικό της αναστολέα AZ191 οδήγησε στην αύξηση του μήκους των αξόνων τόσο των κινητικών νευρώνων ελέγχου φυσικού τύπου (WT) όσο και των πειραματικών SOD1^{G93A} κινητικών νευρώνων, οδηγώντας στην διάσωση του παθολογικού φαινοτύπου. Επιπροσθέτως, ο αναστολέας AZ191 μείωσε την απόπτωση των SOD1^{G93A} κινητικών νευρώνων, προτείνοντας μία νευροτροφική και αντι-αποπτωτική επίδραση (αδημοσίευτα αποτελέσματα εργαστηρίου, Κοκκοράκης, Ναλμπάντη και συνεργάτες, 2024), η οποία έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής

Ακόμη, στον οσφυϊκό νωτιαίο μυελό των ποντικών SOD1^{G93A} μεταγεννητικής ηλικίας P140 (τελικό στάδιο της ασθένειας), όπου η νευροφλεγμονή (neuroinflammation) είναι εμφανής, η κινάση Dyrk1B εκφράζεται από έναν αυξημένο αριθμό αστροκυττάρων και μικρογλοίας, εμπλέκοντας την κινάση Dyrk1B και στους μηχανισμούς νευροφλεγμονής. Τα μέχρι τώρα αρχικά πειραματικά δεδομένα καθιστούν την κινάση Dyrk1B ως έναν πιθανό φαρμακολογικό στόχο στην ασθένεια ALS. Περαιτέρω μελλοντική διερεύνηση του ρόλου της κινάσης Dyrk1B στην ασθένεια ALS θα στοχεύει τη μελέτη της σηματοδότησης Shh/Gli στις πρωτογενείς καλλιέργειες κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού SOD1^{G93A}, ύστερα από υπερέκφραση της κινάσης Dyrk1B, μέσω του λεντι-ϊικού φορέα έκφρασης 223-LV-CMV-Dyrk1B-IRES-GFP, ο οποίος έχει ήδη παραχθεί γι' αυτό τον σκοπό και εκφράζει την κωδική περιοχή του γονιδίου της κινάσης Dyrk1B του ποντικού *mDyrk1B* (αδημοσίευτα αποτελέσματα εργαστηρίου, Κοκκοράκης και συνεργάτες, 2024), ή ύστερα από αναστολή της κινάσης Dyrk1B μέσω του μικρού μορίου AZ191 ή/και κατάλληλων shRNAs. Άλλος στόχος είναι η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης της κινάσης Dyrk1B στον οσφυϊκό νωτιαίο μυελό των ποντικών SOD1^{G93A} κατά την εξέλιξη της ALS. Επίσης, στόχο αποτελεί η διαλεύκανση του ρόλου της κινάσης Dyrk1B ως διαμεσολαβητή της νευροφλεγμονής στην ALS.

Ένας άλλος μελλοντικός στόχος είναι ο προσδιορισμός των γονιδιωματικών ρυθμιστικών αλληλουχιών DNA στις οποίες προσδένεται άμεσα ή έμμεσα στη κινάση Dyrk1B και ως εκ τούτου ο προσδιορισμός των γονιδίων-στόχων της κινάσης Dyrk1B, μέσω συγκριτικής ανάλυσης ChIP-seq (chromatin immunoprecipitation sequencing, αλληλούχιση μετά από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης), σε διαγονιδιακούς ποντικούς SOD1^{G93A} σε σύγκριση με τους ποντικούς φυσικού τύπου (WT). Με την ίδια προσέγγιση μπορεί να πραγματοποιηθεί η διερεύνηση πιθανών επιγενετικών αλλαγών που προκαλούνται από την κινάση Dyrk1B, αποκαλύπτοντας αλληλεπιδράσεις της κινάσης Dyrk1B με ιστόνες, παράγοντες αναδιαμόρφωσης χρωματίνης [96,97] και παράγοντες μεταγραφής [82] στην υγεία και την ασθένεια ALS. Στα ίδια πλαίσια, άλλο μελλοντικό στόχο αποτελεί η συγκριτική πρωτεωμική ανάλυση για τη διερεύνηση του δικτύου αλληλεπιδράσεων της κινάσης Dyrk1B (Dyrk1B interactome) στον υγιή και νευροεκφυλισμένο νωτιαίο μυελό στους διαγονιδιακούς ποντικούς SOD1^{G93A} σε σύγκριση με τους ποντικούς φυσικού τύπου (WT).

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ellis, P.; Fagan, B.M.; Magness, S.T.; Hutton, S.; Taranova, O.; Hayashi, S.; McMahon, A.; Rao, M.; Pevny, L. SOX2, a Persistent Marker for Multipotential Neural Stem Cells Derived from Embryonic Stem Cells, the Embryo or the Adult. *Dev. Neurosci.* **2004**, *26*, 148–165, doi:10.1159/000082134.
2. Götz, M.; Huttner, W.B. The Cell Biology of Neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 777–788.
3. Salomoni, P.; Calegari, F. Cell Cycle Control of Mammalian Neural Stem Cells: Putting a Speed Limit on G1. *Trends Cell Biol.* **2010**, *20*, 233–243, doi:10.1016/J.TCB.2010.01.006.
4. Ohnuma, S.I.; Philpott, A.; Harris, W.A. Cell Cycle and Cell Fate in the Nervous System. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2001**, *11*, 66–73.
5. Dyer, M.A.; Cepko, C.L. Regulating Proliferation during Retinal Development. *Nat. Rev. Neurosci.* **2001**, *2*, 333–342, doi:10.1038/35072555.
6. Kaldis, P.; Richardson, H.E. When Cell Cycle Meets Development. *Development* **2012**, *139*, 225–230, doi:10.1242/DEV.073288.
7. Cremisi, F.; Philpott, A.; Ohnuma, S.I. Cell Cycle and Cell Fate Interactions in Neural Development. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2003**, *13*, 26–33, doi:10.1016/S0959-4388(03)00005-9.
8. Ohnuma, S.I.; Harris, W.A. Neurogenesis and the Cell Cycle. *Neuron* **2003**, *40*, 199–208.
9. Hindley, C.; Philpott, A. Co-Ordination of Cell Cycle and Differentiation in the Developing Nervous System. *Biochem. J.* **2012**, *444*, 375, doi:10.1042/BJ20112040.
10. Blomen, V.A.; Boonstra, J. Cell Fate Determination during G1 Phase Progression. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 3084–3104, doi:10.1007/S00018-007-7271-Z.
11. Nguyen, L.; Besson, A.; Roberts, J.M.; Guillemot, F. Coupling Cell Cycle Exit, Neuronal Differentiation and Migration in Cortical Neurogenesis. *Cell Cycle* **2006**, *5*, 2314–2318.
12. Politis, P.K.; Thomaidou, D.; Matsas, R. Coordination of Cell Cycle Exit and Differentiation of Neuronal Progenitors. *Cell Cycle* **2008**, *7*, 691–697.
13. Pitto, L.; Cremisi, F. Timing Neurogenesis by Cell Cycle? *Cell Cycle* **2010**, *9*, 434–435.
14. Donjerkovic, D.; Scott, D.W. Regulation of the G1 Phase of the Mammalian Cell Cycle. *Cell Res.* **2000**, *10*, 1–16, doi:10.1038/SJ.CR.7290031.
15. Yabut, O.; Domogauer, J.; D'Arcangelo, G. Dyrk1A Overexpression Inhibits Proliferation and Induces Premature Neuronal Differentiation of Neural Progenitor Cells. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 4004–4014, doi:10.1523/JNEUROSCI.4711-09.2010.
16. Jessell, T.M. Neuronal Specification in the Spinal Cord: Inductive Signals and Transcriptional Codes. *Nat. Rev. Genet.* **2000**, *1*, 20–29.
17. Ulloa, F.; Martí, E. Wnt Won the War: Antagonistic Role of Wnt over Shh Controls Dorso-Ventral Patterning of the Vertebrate Neural Tube. *Dev. Dyn.* **2010**, *239*, 69–76, doi:10.1002/DVDY.22058.
18. Jacob, J.; Briscoe, J. Gli Proteins and the Control of Spinal-Cord Patterning. *EMBO Rep.* **2003**, *4*, 761, doi:10.1038/SJ.EMBOR.EMBOR896.
19. Wilson, L.; Maden, M. The Mechanisms of Dorsoventral Patterning in the Vertebrate Neural Tube. *Dev. Biol.* **2005**, *282*, 1–13, doi:10.1016/J.YDBIO.2005.02.027.

20. Lewis, K.E. How Do Genes Regulate Simple Behaviours? Understanding How Different Neurons in the Vertebrate Spinal Cord Are Genetically Specified. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2006**, *361*, 45, doi:10.1098/RSTB.2005.1778.
21. Dessaud, E.; McMahon, A.P.; Briscoe, J. Pattern Formation in the Vertebrate Neural Tube: A Sonic Hedgehog Morphogen-Regulated Transcriptional Network. *Development* **2008**, *135*, 2489–2503, doi:10.1242/DEV.009324.
22. Patten, I.; Placzek, M. The Role of Sonic Hedgehog in Neural Tube Patterning. *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 1695–1708, doi:10.1007/PL00000652.
23. Briscoe, J.; Ericson, J. Specification of Neuronal Fates in the Ventral Neural Tube. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2001**, *11*, 43–49, doi:10.1016/S0959-4388(00)00172-0.
24. Yu, K.; McGlynn, S.; Matise, M.P. Floor Plate-Derived Sonic Hedgehog Regulates Glial and Ependymal Cell Fates in the Developing Spinal Cord. *Development* **2013**, *140*, 1594–1604, doi:10.1242/DEV.090845.
25. Al Oustah, A.; Danesin, C.; Khouri-Farah, N.; Farreny, M.A.; Escalas, N.; Cochard, P.; Glise, B.; Soula, C. Dynamics of Sonic Hedgehog Signaling in the Ventral Spinal Cord Are Controlled by Intrinsic Changes in Source Cells Requiring Sulfatase 1. *Development* **2014**, *141*, 1392–1403, doi:10.1242/DEV.101717.
26. Danesin, C.; Soula, C. Moving the Shh Source over Time: What Impact on Neural Cell Diversification in the Developing Spinal Cord? *J. Dev. Biol.* **2017**, *5*, doi:10.3390/JDB5020004.
27. Marti, E.; Bumcrot, D.A.; Takada, R.; McMahon, A.P. Requirement of 19K Form of Sonic Hedgehog for Induction of Distinct Ventral Cell Types in CNS Explants. *Nature* **1995**, *375*, 322–325, doi:10.1038/375322A0.
28. Roelink, H.; Porter, J.A.; Chiang, C.; Tanabe, Y.; Chang, D.T.; Beachy, P.A.; Jessell, T.M. Floor Plate and Motor Neuron Induction by Different Concentrations of the Amino-Terminal Cleavage Product of Sonic Hedgehog Autoproteolysis. *Cell* **1995**, *81*, 445–455, doi:10.1016/0092-8674(95)90397-6.
29. Ericson, J.; Morton, S.; Kawakami, A.; Roelink, H.; Jessell, T.M. Two Critical Periods of Sonic Hedgehog Signaling Required for the Specification of Motor Neuron Identity. *Cell* **1996**, *87*, 661–673, doi:10.1016/S0092-8674(00)81386-0.
30. Chiang, C.; Litingtung, Y.; Lee, E.; Young, K.E.; Corden, J.L.; Westphal, H.; Beachy, P.A. Cyclopia and Defective Axial Patterning in Mice Lacking Sonic Hedgehog Gene Function. *Nature* **1996**, *383*, 407–413, doi:10.1038/383407A0.
31. Pierani, A.; Brenner-Morton, S.; Chiang, C.; Jessell, T.M. A Sonic Hedgehog-Independent, Retinoid-Activated Pathway of Neurogenesis in the Ventral Spinal Cord. *Cell* **1999**, *97*, 903–915, doi:10.1016/S0092-8674(00)80802-8.
32. Ericson, J.; Rashbass, P.; Schedl, A.; Brenner-Morton, S.; Kawakami, A.; Van Heyningen, V.; Jessell, T.M.; Briscoe, J. Pax6 Controls Progenitor Cell Identity and Neuronal Fate in Response to Graded Shh Signaling. *Cell* **1997**, *90*, 169–180, doi:10.1016/S0092-8674(00)80323-2.
33. Ericson, J.; Briscoe, J.; Rashbass, P.; Van Heyningen, V.; Jessell, T.M. Graded Sonic Hedgehog Signaling and the Specification of Cell Fate in the Ventral Neural Tube. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1997**, *62*, 451–466, doi:10.1101/SQB.1997.062.01.053.
34. Briscoe, J.; Sussel, L.; Serup, P.; Hartigan-O'Connor, D.; Jessell, T.M.; Rubenstein, J.L.R.; Ericson, J.

- Homeobox Gene Nkx2.2 and Specification of Neuronal Identity by Graded Sonic Hedgehog Signalling. *Nature* **1999**, *398*, 622–627, doi:10.1038/19315.
35. Briscoe, J.; Pierani, A.; Jessell, T.M.; Ericson, J. A Homeodomain Protein Code Specifies Progenitor Cell Identity and Neuronal Fate in the Ventral Neural Tube. *Cell* **2000**, *101*, 435–445, doi:10.1016/S0092-8674(00)80853-3.
 36. Matsunaga, E.; Araki, I.; Nakamura, H. Pax6 Defines the Di-Mesencephalic Boundary by Repressing En1 and Pax2. *Development* **2000**, *127*, 2357–2365, doi:10.1242/DEV.127.11.2357.
 37. Simeone, A. Positioning the Isthmic Organizer: Where Otx2 and Gbx2 Meet. *Trends Genet.* **2000**, *16*, 237–240, doi:10.1016/S0168-9525(00)02000-X.
 38. Lawrence, P.A.; Struhl, G. Morphogens, Compartments, and Pattern: Lessons from Drosophila? *Cell* **1996**, *85*, 951–961, doi:10.1016/S0092-8674(00)81297-0.
 39. Tanabe, Y.; William, C.; Jessell, T.M. Specification of Motor Neuron Identity by the MNR2 Homeodomain Protein. *Cell* **1998**, *95*, 67–80, doi:10.1016/S0092-8674(00)81783-3.
 40. Lu, D.C.; Niu, T.; Alaynick, W.A. Molecular and Cellular Development of Spinal Cord Locomotor Circuitry. *Front. Mol. Neurosci.* **2015**, *8*, doi:10.3389/FNMOL.2015.00025.
 41. Alaynick, W.A.; Jessell, T.M.; Pfaff, S.L. SnapShot: Spinal Cord Development. *Cell* **2011**, *146*.
 42. Hui, C.C.; Slusarski, D.; Platt, K.A.; Holmgren, R.; Joyner, A.L. Expression of Three Mouse Homologs of the Drosophila Segment Polarity Gene Cubitus Interruptus, Gli, Gli-2, and Gli-3, in Ectoderm- and Mesoderm-Derived Tissues Suggests Multiple Roles during Postimplantation Development. *Dev. Biol.* **1994**, *162*, 402–413, doi:10.1006/DBIO.1994.1097.
 43. Lee, J.; Platt, K.A.; Censullo, P.; Ruiz I Altaba, A. Gli1 Is a Target of Sonic Hedgehog That Induces Ventral Neural Tube Development. *Development* **1997**, *124*, 2537–2552, doi:10.1242/DEV.124.13.2537.
 44. Altaba, A.R. i Combinatorial Gli Gene Function in Floor Plate and Neuronal Inductions by Sonic Hedgehog. *Development* **1998**, *125*, 2203–2212, doi:10.1242/DEV.125.12.2203.
 45. Ingham, P.W.; McMahon, A.P. Hedgehog Signaling in Animal Development: Paradigms and Principles. *Genes Dev.* **2001**, *15*, 3059–3087.
 46. Méthot, N.; Basler, K. Hedgehog Controls Limb Development by Regulating the Activities of Distinct Transcriptional Activator and Repressor Forms of Cubitus Interruptus. *Cell* **1999**, *96*, 819–831, doi:10.1016/S0092-8674(00)80592-9.
 47. Aza-Blanc, P.; Ramírez- Weber, F.A.; Laget, M.P.; Schwartz, C.; Kornberg, T.B. Proteolysis That Is Inhibited by Hedgehog Targets Cubitus Interruptus Protein to the Nucleus and Converts It to a Repressor. *Cell* **1997**, *89*, 1043–1053, doi:10.1016/S0092-8674(00)80292-5.
 48. Robbins, D.J.; Nybakken, K.E.; Kobayashi, R.; Sisson, J.C.; Bishop, J.M.; Théron, P.P. Hedgehog Elicits Signal Transduction by Means of a Large Complex Containing the Kinesin-Related Protein Costal2. *Cell* **1997**, *90*, 225–234, doi:10.1016/S0092-8674(00)80331-1.
 49. Ohlmeyer, J.T.; Kalderon, D. Hedgehog Stimulates Maturation of Cubitus Interruptus into a Labile Transcriptional Activator. *Nature* **1998**, *396*, 749–753, doi:10.1038/25533.
 50. Jia, J.; Amanai, K.; Wang, G.; Tang, J.; Wang, B.; Jiang, J. Shaggy/GSK3 Antagonizes Hedgehog Signalling by Regulating Cubitus Interruptus. *Nature* **2002**, *416*, 548–552, doi:10.1038/NATURE733.
 51. Price, M.A.; Kalderon, D. Proteolysis of the Hedgehog Signaling Effector Cubitus Interruptus Requires

- Phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase 3 and Casein Kinase 1. *Cell* **2002**, *108*, 823–835, doi:10.1016/S0092-8674(02)00664-5.
52. Dai, P.; Akimaru, H.; Tanaka, Y.; Maekawa, T.; Nakafuku, M.; Ishii, S. Sonic Hedgehog-Induced Activation of the Gli1 Promoter Is Mediated by GLI3. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 8143–8152, doi:10.1074/JBC.274.12.8143.
53. Park, H.L.; Bai, C.; Platt, K.A.; Matisse, M.P.; Beeghly, A.; Hui, C.C.; Nakashima, M.; Joyner, A.L. Mouse Gli1 Mutants Are Viable but Have Defects in SHH Signaling in Combination with a Gli2 Mutation. *Development* **2000**, *127*, 1593–1605, doi:10.1242/DEV.127.8.1593.
54. Sasaki, H.; Nishizaki, Y.; Hui, C.C.; Nakafuku, M.; Kondoh, H. Regulation of Gli2 and Gli3 Activities by an Amino-Terminal Repression Domain: Implication of Gli2 and Gli3 as Primary Mediators of Shh Signaling. *Development* **1999**, *126*, 3915–3924, doi:10.1242/DEV.126.17.3915.
55. Ding, Q.; Motoyama, J.; Gasca, S.; Mo, R.; Sasaki, H.; Rossant, J.; Hui, C.C. Diminished Sonic Hedgehog Signaling and Lack of Floor Plate Differentiation in Gli2 Mutant Mice. *Development* **1998**, *125*, 2533–2543, doi:10.1242/DEV.125.14.2533.
56. Matisse, M.P.; Epstein, D.J.; Park, H.L.; Platt, K.A.; Joyner, A.L. Gli2 Is Required for Induction of Floor Plate and Adjacent Cells, but Not Most Ventral Neurons in the Mouse Central Nervous System. *Development* **1998**, *125*, 2759–2770, doi:10.1242/DEV.125.15.2759.
57. Hui, C.C.; Angers, S. Gli Proteins in Development and Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2011**, *27*, 513–537, doi:10.1146/ANNUREV-CELLBIO-092910-154048.
58. Persson, M.; Stamatakis, D.; Welscher, P. Te; Andersson, E.; Böse, J.; Rütther, U.; Ericson, J.; Briscoe, J. Dorsal-Ventral Patterning of the Spinal Cord Requires Gli3 Transcriptional Repressor Activity. *Genes Dev.* **2002**, *16*, 2865–2878, doi:10.1101/GAD.243402.
59. Alvarez-Medina, R.; Cayuso, J.; Okubo, T.; Takada, S.; Martí, E. Wnt Canonical Pathway Restricts Graded Shh/Gli Patterning Activity through the Regulation of Gli3 Expression. *Development* **2008**, *135*, 237–247, doi:10.1242/DEV.012054.
60. Motoyama, J.; Milenkovic, L.; Iwama, M.; Shikata, Y.; Scott, M.P.; Hui, C.C. Differential Requirement for Gli2 and Gli3 in Ventral Neural Cell Fate Specification. *Dev. Biol.* **2003**, *259*, 150–161, doi:10.1016/S0012-1606(03)00159-3.
61. Bai, C.B.; Stephen, D.; Joyner, A.L. All Mouse Ventral Spinal Cord Patterning by Hedgehog Is Gli Dependent and Involves an Activator Function of Gli3. *Dev. Cell* **2004**, *6*, 103–115, doi:10.1016/S1534-5807(03)00394-0.
62. Lei, Q.; Zelman, A.K.; Kuang, E.; Li, S.; Matisse, M.P. Transduction of Graded Hedgehog Signaling by a Combination of Gli2 and Gli3 Activator Functions in the Developing Spinal Cord. *Development* **2004**, *131*, 3593–3604, doi:10.1242/dev.01230.
63. Landmesser, L. The Distribution of Motoneurons Supplying Chick Hind Limb Muscles. *J. Physiol.* **1978**, *284*, 371–389, doi:10.1113/JPHYSIOL.1978.SP012545.
64. Rousso, D.L.; Gaber, Z.B.; Wellik, D.; Morrisey, E.E.; Novitsch, B.G. Coordinated Actions of the Forkhead Protein Foxp1 and Hox Proteins in the Columnar Organization of Spinal Motor Neurons. *Neuron* **2008**, *59*, 226, doi:10.1016/J.NEURON.2008.06.025.
65. di Sanguinetto, S.A.D.T.; Dasen, J.S.; Arber, S. Transcriptional Mechanisms Controlling Motor Neuron Diversity and Connectivity. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2008**, *18*, 36–43, doi:10.1016/J.CONB.2008.04.002.

66. Kanning, K.C.; Kaplan, A.; Henderson, C.E. Motor Neuron Diversity in Development and Disease. *Annu. Rev. Neurosci.* **2010**, *33*, 409–440, doi:10.1146/ANNUREV.NEURO.051508.135722.
67. Butler, S.J.; Bronner, M.E. From Classical to Current: Analyzing Peripheral Nervous System and Spinal Cord Lineage and Fate. *Dev. Biol.* **2015**, *398*, 135, doi:10.1016/J.YDBIO.2014.09.033.
68. Romanes, G.J. THE MOTOR POOLS OF THE SPINAL CORD. *Prog. Brain Res.* **1964**, *11*, 93–119, doi:10.1016/S0079-6123(08)64045-5.
69. Dasen, J.S.; Tice, B.C.; Brenner-Morton, S.; Jessell, T.M. A Hox Regulatory Network Establishes Motor Neuron Pool Identity and Target-Muscle Connectivity. *Cell* **2005**, *123*, 477–491, doi:10.1016/J.CELL.2005.09.009.
70. Francius, C.; Clotman, F. Generating Spinal Motor Neuron Diversity: A Long Quest for Neuronal Identity. *Cell. Mol. Life Sci.* **2014**, *71*, 813–829, doi:10.1007/S00018-013-1398-X.
71. Davis-Dusenbery, B.N.; Williams, L.A.; Klim, J.R.; Eggen, K. How to Make Spinal Motor Neurons. *Dev.* **2014**, *141*, 491–501, doi:10.1242/dev.097410.
72. Dasen, J.S.; De Camilli, A.; Wang, B.; Tucker, P.W.; Jessell, T.M. Hox Repertoires for Motor Neuron Diversity and Connectivity Gated by a Single Accessory Factor, FoxP1. *Cell* **2008**, *134*, 304–316, doi:10.1016/j.cell.2008.06.019.
73. Shirasaki, R.; Pfaff, S.L. Transcriptional Codes and the Control of Neuronal Identity. *Annu. Rev. Neurosci.* **2002**, *25*, 251–281, doi:10.1146/ANNUREV.NEURO.25.112701.142916.
74. Price, S.R.; Briscoe, J. The Generation and Diversification of Spinal Motor Neurons: Signals and Responses. *Mech. Dev.* **2004**, *121*, 1103–1115, doi:10.1016/j.mod.2004.04.019.
75. Stifani, N. Motor Neurons and the Generation of Spinal Motor Neuron Diversity. *Front. Cell. Neurosci.* **2014**, *8*, 293.
76. Adams, K.L.; Rousso, D.L.; Umbach, J.A.; Novitch, B.G. Foxp1-Mediated Programming of Limb-Innervating Motor Neurons from Mouse and Human Embryonic Stem Cells. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 1–16, doi:10.1038/ncomms7778.
77. Nam, H.; Jeon, S.; An, H.; Yoo, J.; Lee, H.J.; Lee, S.K.; Lee, S. Critical Roles of ARHGAP36 as a Signal Transduction Mediator of Shh Pathway in Lateral Motor Columnar Specification. *Elife* **2019**, *8*, doi:10.7554/ELIFE.46683.
78. Kassis, S.; Melhuish, T.; Annan, R.S.; Chen, S.L.; Cee, J.C.; Livi, G.P.; Creasy, C.L. *Saccharomyces Cerevisiae* Yak1p Protein Kinase Autophosphorylates on Tyrosine Residues and Phosphorylates Myelin Basic Protein on a C-Terminal Serine Residue. *Biochem. J.* **2000**, *348*, 263, doi:10.1042/0264-6021:3480263.
79. Bähler, J.; Nurse, P. Fission Yeast Pom1p Kinase Activity Is Cell Cycle Regulated and Essential for Cellular Symmetry during Growth and Division. *EMBO J.* **2001**, *20*, 1064, doi:10.1093/EMBOJ/20.5.1064.
80. Lochhead, P.A.; Sibbet, G.; Morrice, N.; Cleghon, V. Activation-Loop Autophosphorylation Is Mediated by a Novel Transitional Intermediate Form of DYRKs. *Cell* **2005**, *121*, 925–936, doi:10.1016/j.cell.2005.03.034.
81. Walte, A.; Rüben, K.; Birner-Gruenberger, R.; Preisinger, C.; Bamberg-Lemper, S.; Hiltz, N.; Bracher, F.; Becker, W. Mechanism of Dual Specificity Kinase Activity of DYRK1A. *FEBS J.* **2013**, *280*, 4495–4511, doi:10.1111/FEBS.12411.

82. Aranda, S.; Laguna, A.; Luna, S. de la DYRK Family of Protein Kinases: Evolutionary Relationships, Biochemical Properties, and Functional Roles. *FASEB J.* **2011**, *25*, 449–462, doi:10.1096/fj.10-165837.
83. Mercer, S.E.; Friedman, E. Mirk/Dyrk1B: A Multifunctional Dual-Specificity Kinase Involved in Growth Arrest, Differentiation, and Cell Survival. *Cell Biochem. Biophys.* **2006**, *45*, 303–315.
84. Singh, R.; Lauth, M. Emerging Roles of DYRK Kinases in Embryogenesis and Hedgehog Pathway Control. *J. Dev. Biol.* **2017**, *5*.
85. Han, J.; Miranda-Saavedra, D.; Luebbering, N.; Singh, A.; Sibbet, G.; Ferguson, M.A.J.; Cleghon, V. Deep Evolutionary Conservation of an Intramolecular Protein Kinase Activation Mechanism. *PLoS One* **2012**, *7*, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0029702.
86. Soundararajan, M.; Roos, A.K.; Savitsky, P.; Filippakopoulos, P.; Kettenbach, A.N.; Olsen, J. V.; Gerber, S.A.; Eswaran, J.; Knapp, S.; Elkins, J.M. Structures of down Syndrome Kinases, DYRKs, Reveal Mechanisms of Kinase Activation and Substrate Recognition. *Structure* **2013**, *21*, 986–996, doi:10.1016/j.str.2013.03.012.
87. Leder, S.; Czajkowska, H.; Maenz, B.; De Graaf, K.; Barthel, A.; Joost, H.G.; Becker, W. Alternative Splicing Variants of Dual Specificity Tyrosine Phosphorylated and Regulated Kinase 1B Exhibit Distinct Patterns of Expression and Functional Properties. *Biochem. J.* **2003**, *372*, 881–888, doi:10.1042/BJ20030182.
88. Tejedor, F.J.; Hämmeler, B. MNB/DYRK1A as a Multiple Regulator of Neuronal Development. *FEBS J.* **2011**, *278*, 223–235.
89. Becker, W.; Weber, Y.; Wetzel, K.; Eirmbter, K.; Tejedor, F.J.; Joost, H.G. Sequence Characteristics, Subcellular Localization, and Substrate Specificity of DYRK-Related Kinases, a Novel Family of Dual Specificity Protein Kinases. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 25893–25902, doi:10.1074/jbc.273.40.25893.
90. Becker, W. Emerging Role of DYRK Family Protein Kinases as Regulators of Protein Stability in Cell Cycle Control. *Cell Cycle* **2012**, *11*, 3389–3394.
91. Mao, J.; Maye, P.; Kogerman, P.; Tejedor, F.J.; Toftgard, R.; Xie, W.; Wu, G.; Wu, D. Regulation of Gli1 Transcriptional Activity in the Nucleus by Dyrk1. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 35156–35161, doi:10.1074/jbc.M206743200.
92. Guo, X.; Williams, J.G.; Schug, T.T.; Li, X. DYRK1A and DYRK3 Promote Cell Survival through Phosphorylation and Activation of SIRT1. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 13223–13232, doi:10.1074/JBC.M110.102574.
93. Park, J.; Oh, Y.; Yoo, L.; Jung, M.S.; Song, W.J.; Lee, S.H.; Seo, H.; Chung, K.C. Dyrk1A Phosphorylates P53 and Inhibits Proliferation of Embryonic Neuronal Cells. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 31895–31906, doi:10.1074/JBC.M110.147520.
94. Lepagnol-Bestel, A.M.; Zvara, A.; Maussion, G.; Quignon, F.; Ngimbous, B.; Ramoz, N.; Imbeaud, S.; Loe-Mie, Y.; Benihoud, K.; Agier, N.; et al. DYRK1A Interacts with the REST/NRSF-SWI/SNF Chromatin Remodelling Complex to Deregulate Gene Clusters Involved in the Neuronal Phenotypic Traits of Down Syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **2009**, *18*, 1405–1414, doi:10.1093/HMG/DDP047.
95. Deng, X.; Ewton, D.Z.; Mercer, S.E.; Friedman, E. Mirk/Dyrk1B Decreases the Nuclear Accumulation of Class II Histone Deacetylases during Skeletal Muscle Differentiation. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 4894–4905, doi:10.1074/jbc.M411894200.
96. Varjosalo, M.; Keskitalo, S.; VanDrogen, A.; Nurkkala, H.; Vichalkovski, A.; Aebersold, R.; Gstaiger, M.

- The Protein Interaction Landscape of the Human CMGC Kinase Group. *Cell Rep.* **2013**, *3*, 1306–1320, doi:10.1016/J.CELREP.2013.03.027.
97. Buljan, M.; Ciuffa, R.; van Drogen, A.; Vichalkovski, A.; Mehnert, M.; Rosenberger, G.; Lee, S.; Varjosalo, M.; Pernas, L.E.; Spegg, V.; et al. Kinase Interaction Network Expands Functional and Disease Roles of Human Kinases. *Mol. Cell* **2020**, *79*, 504-520.e9, doi:10.1016/J.MOLCEL.2020.07.001.
98. Vona, C.D.; Bezdan, D.; Islam, A.B.M.M.K.; Salichs, E.; López-Bigas, N.; Ossowski, S.; Luna, S.D.L. Chromatin-Wide Profiling of DYRK1A Reveals a Role as a Gene-Specific RNA Polymerase II CTD Kinase. *Mol. Cell* **2015**, *57*, 506–520, doi:10.1016/J.MOLCEL.2014.12.026.
99. Taira, N.; Nihira, K.; Yamaguchi, T.; Miki, Y.; Yoshida, K. DYRK2 Is Targeted to the Nucleus and Controls P53 via Ser46 Phosphorylation in the Apoptotic Response to DNA Damage. *Mol. Cell* **2007**, *25*, 725–738, doi:10.1016/j.molcel.2007.02.007.
100. Seifert, A.; Allan, L.A.; Clarke, P.R. DYRK1A Phosphorylates Caspase 9 at an Inhibitory Site and Is Potently Inhibited in Human Cells by Harmine. *FEBS J.* **2008**, *275*, 6268–6280, doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06751.x.
101. Laguna, A.; Aranda, S.; Barallobre, M.J.; Barhoum, R.; Fernández, E.; Fotaki, V.; Delabar, J.M.; de la Luna, S.; de la Villa, P.; Arbonés, M.L. The Protein Kinase DYRK1A Regulates Caspase-9-Mediated Apoptosis during Retina Development. *Dev. Cell* **2008**, *15*, 841–853, doi:10.1016/j.devcel.2008.10.014.
102. Chang, H.S.; Lin, C.H.; Yang, C.H.; Yen, M.S.; Lai, C.R.; Chen, Y.R.; Liang, Y.J.; Yu, W.C.Y. Increased Expression of Dyrk1a in HPV16 Immortalized Keratinocytes Enable Evasion of Apoptosis. *Int. J. Cancer* **2007**, *120*, 2377–2385, doi:10.1002/ijc.22573.
103. Friedman, E. Mirk/Dyrk1B in Cancer. *J. Cell. Biochem.* **2007**, *102*, 274–279.
104. Janumyan, Y.; Cui, Q.; Yan, L.; Sansam, C.G.; Valentin, M.; Yang, E. G0 Function of BCL2 and BCL-XL Requires BAX, BAK, and P27 Phosphorylation by Mirk, Revealing a Novel Role of BAX and BAK in Quiescence Regulation. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 34108–34120, doi:10.1074/JBC.M806294200.
105. Lee, Y.; Ha, J.; Kim, H.J.; Kim, Y.S.; Chang, E.J.; Song, W.J.; Kim, H.H. Negative Feedback Inhibition of NFATc1 by DYRK1A Regulates Bone Homeostasis. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 33343–33351, doi:10.1074/JBC.M109.042234.
106. Li, K.; Zhao, S.; Karur, V.; Wojchowski, D.M. DYRK3 Activation, Engagement of Protein Kinase A/CAMP Response Element-Binding Protein, and Modulation of Progenitor Cell Survival. **2002**, *277*, 47052–47060.
107. Deng, X.; Mercer, S.E.; Shah, S.; Ewton, D.Z.; Friedman, E. The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor P27Kip1 Is Stabilized in G0 by Mirk/Dyrk1B Kinase. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 22498–22504, doi:10.1074/jbc.M400479200.
108. Maddika, S.; Chen, J. Protein Kinase DYRK2 Is a Scaffold That Facilitates Assembly of an E3 Ligase. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11*, 409–419, doi:10.1038/NCB1848.
109. Becker, W.; Sippl, W. Activation, Regulation, and Inhibition of DYRK1A. *FEBS J.* **2011**, *278*, 246–256, doi:10.1111/J.1742-4658.2010.07956.X.
110. Tahtouh, T.; Elkins, J.M.; Filippakopoulos, P.; Soundararajan, M.; Burgy, G.; Durieu, E.; Cochet, C.; Schmid, R.S.; Lo, D.C.; Delhommel, F.; et al. Selectivity, Cocrystal Structures, and Neuroprotective Properties of Leucettines, a Family of Protein Kinase Inhibitors Derived from the Marine Sponge

- Alkaloid Leucettamine B. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9312–9330, doi:10.1021/JM301034U.
111. Pozo, N.; Zahonero, C.; Fernández, P.; Liñares, J.M.; Ayuso, A.; Hagiwara, M.; Pérez, A.; Ricoy, J.R.; Hernández-Lain, A.; Sepúlveda, J.M.; et al. Inhibition of DYRK1A Destabilizes EGFR and Reduces EGFR-Dependent Glioblastoma Growth. *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 2475–2487, doi:10.1172/JCI63623.
112. Ashford, A.L.; Oxley, D.; Kettle, J.; Hudson, K.; Guichard, S.; Cook, S.J.; Lochhead, P.A. A Novel DYRK1B Inhibitor AZ191 Demonstrates That DYRK1B Acts Independently of GSK3B to Phosphorylate Cyclin D1 at Thr286, Not Thr 288. *Biochem. J.* **2014**, *457*, 43–56, doi:10.1042/BJ20130461.
113. Kokkorakis, N.; Zouridakis, M.; Gaitanou, M. Mirk/Dyrk1B Kinase Inhibitors in Targeted Cancer Therapy. *Pharm. 2024, Vol. 16, Page 528* **2024**, *16*, 528, doi:10.3390/PHARMACEUTICS16040528.
114. Becker, W.; Joost, H.G. Structural and Functional Characteristics of Dyrk, a Novel Subfamily of Protein Kinases with Dual Specificity. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1999**, *62*, 1–17, doi:10.1016/s0079-6603(08)60503-6.
115. Miyata, Y. CK2 Inhibitors and the DYRK Family Protein Kinases. *Protein Kinase CK2 Cell. Funct. Norm. Dis. States* **2015**, *12*, 341–359, doi:10.1007/978-3-319-14544-0_19/FIGURES/3.
116. Mercer, S.E.; Ewton, D.Z.; Shah, S.; Naqvi, A.; Friedman, E. Mirk/Dyrk1b Mediates Cell Survival in Rhabdomyosarcomas. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 5143–5150, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1539.
117. Martí, E.; Altafaj, X.; Dierssen, M.; De La Luna, S.; Fotaki, V.; Alvarez, M.; Pérez-Riba, M.; Ferrer, I.; Estivill, X. Dyrk1A Expression Pattern Supports Specific Roles of This Kinase in the Adult Central Nervous System. *Brain Res.* **2003**, *964*, 250–263, doi:10.1016/S0006-8993(02)04069-6.
118. Wegiel, J.; Kuchna, I.; Nowicki, K.; Frackowiak, J.; Dowjat, K.; Silverman, W.P.; Reisberg, B.; Deleon, M.; Wisniewski, T.; Adayev, T.; et al. Cell Type- and Brain Structure-Specific Patterns of Distribution of Minibrain Kinase in Human Brain. *Brain Res.* **2004**, *1010*, 69–80, doi:10.1016/j.brainres.2004.03.008.
119. Hämmerle, B.; Carnicero, A.; Elizalde, C.; Ceron, J.; Martínez, S.; Tejedor, F.J. Expression Patterns and Subcellular Localization of the Down Syndrome Candidate Protein MNB/DYRK1A Suggest a Role in Late Neuronal Differentiation. *Eur. J. Neurosci.* **2003**, *17*, 2277–2286, doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02665.x.
120. Deng, X.; Ewton, D.Z.; Pawlikowski, B.; Maimone, M.; Friedman, E. Mirk/Dyrk1B Is a Rho-Induced Kinase Active in Skeletal Muscle Differentiation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 41347–41354, doi:10.1074/jbc.M306780200.
121. Lee, K.; Deng, X.; Friedman, E. Mirk Protein Kinase Is a Mitogen-Activated Protein Kinase Substrate That Mediates Survival of Colon Cancer Cells. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 3631–3637.
122. Lim, S.; Jin, K.; Friedman, E. Mirk Protein Kinase Is Activated by MKK3 and Functions as a Transcriptional Activator of HNF1 α . *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 25040–25046, doi:10.1074/jbc.M203257200.
123. Gao, J.; Zhao, Y.; Lv, Y.; Chen, Y.; Wei, B.; Tian, J.; Yang, Z.; Kong, F.; Pang, J.; Liu, J.; et al. Mirk/Dyrk1B Mediates G0/G1 to S Phase Cell Cycle Progression and Cell Survival Involving MAPK/ERK Signaling in Human Cancer Cells. *Cancer Cell Int.* **2013**, *13*, 2, doi:10.1186/1475-2867-13-2.
124. Lim, S.; Zou, Y.; Friedman, E. The Transcriptional Activator Mirk/Dyrk1B Is Sequestered by P38 α/β MAP Kinase. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 49438–49445, doi:10.1074/jbc.M206840200.
125. Kokkorakis, N.; Gaitanou, M. Minibrain-Related Kinase/Dual-Specificity Tyrosine-Regulated Kinase 1B

- Implication in Stem/Cancer Stem Cells Biology. *World J. Stem Cells* **2020**, *12*, 1553, doi:10.4252/WJSC.V12.I12.1553.
126. Mercer, S.E.; Ewton, D.Z.; Deng, X.; Lim, S.; Mazur, T.R.; Friedman, E. Mirk/Dyrk1B Mediates Survival during the Differentiation of C2C12 Myoblasts. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 25788–25801, doi:10.1074/jbc.M413594200.
127. Friedman, E. Mirk/Dyrk1B Kinase in Ovarian Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 5560–5575.
128. Pérez-Sánchez, G.; Jiménez, A.; Quezada-Ramírez, M.A.; Estudillo, E.; Ayala-Sarmiento, A.E.; Mendoza-Hernández, G.; Hernández-Soto, J.; Hernández-Hernández, F.C.; Cázares-Raga, F.E.; Segovia, J. Annexin A1, Annexin A2, and Dyrk 1B Are Upregulated during GAS1-Induced Cell Cycle Arrest. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 4166–4182, doi:10.1002/JCP.26226.
129. Zou, Y.; Ewton, D.Z.; Deng, X.; Mercer, S.E.; Friedman, E. Mirk/Dyrk1B Kinase Destabilizes Cyclin D1 by Phosphorylation at Threonine 288. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 27790–27798, doi:10.1074/jbc.M403042200.
130. Masuda, T.; Itoh, K.; Higashitsuji, H.; Higashitsuji, H.; Nakazawa, N.; Sakurai, T.; Liu, Y.; Tokuchi, H.; Fujita, T.; Zhao, Y.; et al. Cold-Inducible RNA-Binding Protein (Cirp) Interacts with Dyrk1b/Mirk and Promotes Proliferation of Immature Male Germ Cells in Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 10885–10890, doi:10.1073/pnas.1121524109.
131. Becker, W. A Wake-up Call to Quiescent Cancer Cells – Potential Use of DYRK1B Inhibitors in Cancer Therapy. *FEBS J.* **2018**, *285*, 1203–1211.
132. Tsiaras, K.; Papastefanaki, F.; Politis, P.K.; Matsas, R.; Gaitanou, M. Functional Interactions between BM88/Cend1, Ran-Binding Protein M and Dyrk1B Kinase Affect Cyclin D1 Levels and Cell Cycle Progression/Exit in Mouse. *PLoS One* **2013**, *8*, e82172, doi:10.1371/journal.pone.0082172.
133. Litovchick, L.; Florens, L.A.; Swanson, S.K.; Washburn, M.P.; Decaprio, J.A. DYRK1A Protein Kinase Promotes Quiescence and Senescence through DREAM Complex Assembly. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 801–813, doi:10.1101/gad.2034211.
134. Sadasivam, S.; DeCaprio, J.A. The DREAM Complex: Master Coordinator of Cell Cycle-Dependent Gene Expression. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 585–595.
135. Chen, J.; Liu, H.; Liu, J.; Qi, J.; Wei, B.; Yang, J.; Liang, H.; Chen, Y.; Chen, J.; Wu, Y.; et al. H3K9 Methylation Is a Barrier during Somatic Cell Reprogramming into iPSCs. *Nat. Genet.* **2013**, *45*, 34–42, doi:10.1038/ng.2491.
136. Asada, M.; Yamada, T.; Ichijo, H.; Delia, D.; Miyazono, K.; Fukumuro, K.; Mizutani, S. Apoptosis Inhibitory Activity of Cytoplasmic P21(Cip1/WAF1) in Monocytic Differentiation. *EMBO J.* **1999**, *18*, 1223–1234, doi:10.1093/emboj/18.5.1223.
137. Zhou, B.P.; Liao, Y.; Xia, W.; Spohn, B.; Lee, M.H.; Hung, M.C. Cytoplasmic Localization of P21 CIP1/WAF1 by Akt-Induced Phosphorylation in HER-2/Neu-Overexpressing Cells. *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3*, 245–252, doi:10.1038/35060032.
138. MacKeigan, J.P.; Murphy, L.O.; Blenis, J. Sensitized RNAi Screen of Human Kinases and Phosphatases Identifies New Regulators of Apoptosis and Chemoresistance. *Nat. Cell Biol.* **2005**, *7*, 591–600, doi:10.1038/ncb1258.
139. Deng, X.; Ewton, D.Z.; Li, S.; Naqvi, A.; Mercer, S.E.; Landas, S.; Friedman, E. The Kinase Mirk/Dyrk1B Mediates Cell Survival in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 4149–4158,

- doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3089.
140. Gao, J.; Zheng, Z.; Rawal, B.; Schell, M.J.; Bepler, G.; Haura, E.B. Mirk/Dyrk1B, a Novel Therapeutic Target, Mediates Cell Survival in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Cancer Biol. Ther.* **2009**, *8*, 1671–1679, doi:10.4161/cbt.8.17.9322.
 141. Hu, J.; Friedman, E. Depleting Mirk Kinase Increases Cisplatin Toxicity in Ovarian Cancer Cells. *Genes Cancer* **2010**, *1*, 803–811, doi:10.1177/1947601910377644.
 142. Yang, C.; Ji, D.; Weinstein, E.J.; Choy, E.; Hornicek, F.J.; Wood, K.B.; Liu, X.; Mankin, H.; Duan, Z. The Kinase Mirk Is a Potential Therapeutic Target in Osteosarcoma. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 552–558, doi:10.1093/carcin/bgp330.
 143. Gao, J.; Yang, X.; Yin, P.; Hu, W.; Liao, H.; Miao, Z.; Pan, C.; Li, N. The Involvement of FoxO in Cell Survival and Chemosensitivity Mediated by Mirk/Dyrk1B in Ovarian Cancer. *Int. J. Oncol.* **2012**, *40*, 1203–1209, doi:10.3892/ijo.2011.1293.
 144. Deng, X.; Hu, J.; Ewton, D.Z.; Friedman, E. Mirk/Dyrk1B Kinase Is Upregulated Following Inhibition of MTOR. *Carcinogenesis* **2014**, *35*, 1968–1976, doi:10.1093/carcin/bgu058.
 145. Chen, Y.; Wang, S.; He, Z.; Sun, F.; Huang, Y.; Ni, Q.; Wang, H.; Wang, Y.; Cheng, C. Dyrk1B Overexpression Is Associated with Breast Cancer Growth and a Poor Prognosis. *Hum. Pathol.* **2017**, *66*, 48–58, doi:10.1016/j.humpath.2017.02.033.
 146. Deng, X.; Ewton, D.Z.; Friedman, E. Mirk Dyrk1B Maintains the Viability of Quiescent Pancreatic Cancer Cells by Reducing Levels of Reactive Oxygen Species. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 3317–3324, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2903.
 147. Ewton, D.Z.; Hu, J.; Vilenchik, M.; Deng, X.; Luk, K.C.; Polonskaia, A.; Hoffman, A.F.; Zipf, K.; Boylan, J.F.; Friedman, E.A. Inactivation of Mirk/Dyrk1b Kinase Targets Quiescent Pancreatic Cancer Cells. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10*, 2104–2114, doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0498.
 148. Deng, X.; Friedman, E. Mirk Kinase Inhibition Blocks the in Vivo Growth of Pancreatic Cancer Cells. *Genes and Cancer* **2014**, *5*, 337–347, doi:10.18632/genesandcancer.29.
 149. Hu, J.; Deng, H.; Friedman, E.A. Ovarian Cancer Cells, Not Normal Cells, Are Damaged by Mirk/Dyrk1B Kinase Inhibition. *Int. J. Cancer* **2013**, *132*, 2258–2269, doi:10.1002/ijc.27917.
 150. Beckers, C.; Vasilikos, L.; Sanchez Fernandez, A.; Moor, L.; Pruschy, M. Targeting the Survival Kinase DYRK1B: A Novel Approach to Overcome Radiotherapy-Related Treatment Resistance. *Radiother. Oncol.* **2023**, *190*, doi:10.1016/J.RADONC.2023.110039.
 151. Saluja, T.S.; Kumar, V.; Agrawal, M.; Tripathi, A.; Meher, R.K.; Srivastava, K.; Gupta, A.; Singh, A.; Chaturvedi, A.; Singh, S.K. Mitochondrial Stress-Mediated Targeting of Quiescent Cancer Stem Cells in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Manag. Res.* **2020**, *12*, 4519–4530, doi:10.2147/CMAR.S252292.
 152. Schmitt, C.; Kail, D.; Mariano, M.; Empting, M.; Weber, N.; Paul, T.; Hartmann, R.W.; Engel, M. Design and Synthesis of a Library of Lead-like 2,4-Bisheterocyclic Substituted Thiophenes as Selective Dyrk/Clk Inhibitors. *PLoS One* **2014**, *9*, 87851, doi:10.1371/journal.pone.0087851.
 153. Zhu, F.; Zykova, T.A.; Peng, C.; Zhang, J.; Cho, Y.Y.; Zheng, D.; Yao, K.; Ma, W.Y.; Lau, A.T.Y.; Bode, A.M.; et al. Phosphorylation of H2AX at Ser139 and a New Phosphorylation Site Ser16 by RSK2 Decreases H2AX Ubiquitination and Inhibits Cell Transformation. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 393–403, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2012.

154. Hu, J.; Nakhla, H.; Friedman, E. Transient Arrest in a Quiescent State Allows Ovarian Cancer Cells to Survive Suboptimal Growth Conditions and Is Mediated by Both Mirk/Dyrk1b and P130/RB2. *Int. J. Cancer* **2011**, *129*, 307–318, doi:10.1002/ijc.25692.
155. Woods, Y.L.; Rena, G.; Morrice, N.; Barthel, A.; Becker, W.; Shaodong, G.; Unterman, T.G.; Cohen, P. The Kinase DYRK1A Phosphorylates the Transcription Factor FKHR at Ser329 in Vitro, a Novel in Vivo Phosphorylation Site. *Biochem. J.* **2001**, *355*, 597–607, doi:10.1042/bj3550597.
156. Powell, C.E.; Hatcher, J.M.; Jiang, J.; Vatsan, P.S.; Che, J.; Gray, N.S. Selective Macrocyclic Inhibitors of DYRK1A/B. *ACS Med. Chem. Lett.* **2022**, *13*, 577–585, doi:10.1021/ACSMEDCHEMLETT.1C00630/SUPPL_FILE/ML1C00630_SI_001.PDF.
157. Fu, Z.; Tindall, D.J. FOXOs, Cancer and Regulation of Apoptosis. *Oncogene* **2008**, *27*, 2312–2319.
158. Merlino, G.; Helman, L.J. Rhabdomyosarcoma - Working out the Pathways. *Oncogene* **1999**, *18*, 5340–5348, doi:10.1038/sj.onc.1203038.
159. Jin, K.; Ewton, D.Z.; Park, S.; Hu, J.; Friedman, E. Mirk Regulates the Exit of Colon Cancer Cells from Quiescence. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 22916–22925, doi:10.1074/jbc.M109.035519.
160. Mohyeldin, A.; Garzón-Muvdi, T.; Quiñones-Hinojosa, A. Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche. *Cell Stem Cell* **2010**, *7*, 150–161.
161. Mimeault, M.; Batra, S.K. Hypoxia-Inducing Factors as Master Regulators of Stemness Properties and Altered Metabolism of Cancer- and Metastasis-Initiating Cells. *J. Cell. Mol. Med.* **2013**, *17*, 30–54, doi:10.1111/jcmm.12004.
162. Zhou, Y.; Fan, W.; Xiao, Y. The Effect of Hypoxia on the Stemness and Differentiation Capacity of PDLc and DPC. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 890675, doi:10.1155/2014/890675.
163. Lee, S.B.; Frattini, V.; Bansal, M.; Castano, A.M.; Sherman, D.; Hutchinson, K.; Bruce, J.N.; Califano, A.; Liu, G.; Cardozo, T.; et al. An ID2-Dependent Mechanism for VHL Inactivation in Cancer. *Nature* **2016**, *529*, 172–177, doi:10.1038/nature16475.
164. Keramati, A.R.; Fathzadeh, M.; Go, G.W.; Singh, R.; Choi, M.; Faramarzi, S.; Mane, S.; Kasaei, M.; Sarajzadeh-Fard, K.; Hwa, J.; et al. A Form of the Metabolic Syndrome Associated with Mutations in DYRK1B. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *370*, 1909–1919, doi:10.1056/NEJMoa1301824.
165. Abu Jhaisha, S.; Widowati, E.W.; Kii, I.; Sonamoto, R.; Knapp, S.; Papadopoulos, C.; Becker, W. DYRK1B Mutations Associated with Metabolic Syndrome Impair the Chaperone-Dependent Maturation of the Kinase Domain. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6420, doi:10.1038/s41598-017-06874-w.
166. Hong, S.H.; Lee, K.S.; Kwak, S.J.; Kim, A.K.; Bai, H.; Jung, M.S.; Kwon, O.Y.; Song, W.J.; Tatar, M.; Yu, K. Minibrain/Dyrk1a Regulates Food Intake through the Sir2-FOXO-SNPF/NPY Pathway in Drosophila and Mammals. *PLoS Genet.* **2012**, *8*, doi:10.1371/journal.pgen.1002857.
167. He, M.; Gu, J.; Zhu, J.; Wang, X.; Wang, C.; Duan, C.; Ni, Y.; Lu, X.; Li, J. Up-Regulation of Dyrk1b Promote Astrocyte Activation Following Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation. *Neuropeptides* **2018**, *69*, 76–83, doi:10.1016/J.NPEP.2018.04.008.
168. Blom, K.; Rubin, J.; Berglund, M.; Jarvius, M.; Lenhammar, L.; Parrow, V.; Andersson, C.; Loskog, A.; Fryknäs, M.; Nygren, P.; et al. Mebendazole-Induced M1 Polarisation of THP-1 Macrophages May Involve DYRK1B Inhibition. *BMC Res. Notes* **2019**, *12*, doi:10.1186/S13104-019-4273-5.
169. Oatley, J.M.; Brinster, R.L. Spermatogonial Stem Cells. In *Methods in Enzymology*; Academic Press Inc., **2006**; Vol. 419, pp. 259–282.

170. Nakagawa, T.; Sharma, M.; Nabeshima, Y.I.; Braun, R.E.; Yoshida, S. Functional Hierarchy and Reversibility within the Murine Spermatogenic Stem Cell Compartment. *Science (80-.)*. **2010**, *328*, 62–67, doi:10.1126/science.1182868.
171. Fujita, J. Cold Shock Response in Mammalian Cells. In Proceedings of the Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology; **1999**; Vol. 1, pp. 243–255.
172. Yang, C.; Carrier, F. The UV-Inducible RNA-Binding Protein A18 (A18 HnRNP) Plays a Protective Role in the Genotoxic Stress Response. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 47277–47284, doi:10.1074/jbc.M105396200.
173. Wellmann, S.; Bühner, C.; Moderegger, E.; Zelmer, A.; Kirschner, R.; Koehne, P.; Fujita, J.; Seeger, K. Oxygen-Regulated Expression of the RNA-Binding Proteins RBM3 and CIRP by a HIF-1-Independent Mechanism. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 1785–1794, doi:10.1242/jcs.01026.
174. Yang, R.; Weber, D.J.; Carrier, F. Post-Transcriptional Regulation of Thioredoxin by the Stress Inducible Heterogenous Ribonucleoprotein A18. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 1224–1236, doi:10.1093/nar/gkj519.
175. De Leeuw, F.; Zhang, T.; Wauquier, C.; Huez, G.; Kruys, V.; Gueydan, C. The Cold-Inducible RNA-Binding Protein Migrates from the Nucleus to Cytoplasmic Stress Granules by a Methylation-Dependent Mechanism and Acts as a Translational Repressor. *Exp. Cell Res.* **2007**, *313*, 4130–4144, doi:10.1016/j.yexcr.2007.09.017.
176. Nishiyama, H.; Danno, S.; Kaneko, Y.; Itoh, K.; Yokoi, H.; Fukumoto, M.; Okuno, H.; Millán, J.L.; Matsuda, T.; Yoshida, O.; et al. Decreased Expression of Cold-Inducible RNA-Binding Protein (CIRP) in Male Germ Cells at Elevated Temperature. *Am. J. Pathol.* **1998**, *152*, 289–296, doi:10.1097/00005392-199904020-00373.
177. Leonart, M.E. A New Generation of Proto-Oncogenes: Cold-Inducible RNA Binding Proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **2010**, *1805*, 43–52.
178. Yin, H.; Price, F.; Rudnicki, M.A. Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. *Physiol. Rev.* **2013**, *93*, 23–67, doi:10.1152/physrev.00043.2011.
179. Koleva, M.; Kappler, R.; Vogler, M.; Herwig, A.; Fulda, S.; Hahn, H. Pleiotropic Effects of Sonic Hedgehog on Muscle Satellite Cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 1863–1870.
180. Scales, T.M.E.; Lin, S.; Kraus, M.; Goold, R.G.; Gordon-Weeks, P.R. Nonprimed and DYRK1A-Primed GSK3 Beta-Phosphorylation Sites on MAP1B Regulate Microtubule Dynamics in Growing Axons. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 2424–2435, doi:10.1242/JCS.040162.
181. Hämmerle, B.; Elizalde, C.; Galceran, J.; Becker, W.; Tejedor, F.J. The MNB/DYRK1A Protein Kinase: Neurobiological Functions and Down Syndrome Implications. *J. Neural Transm. Suppl.* **2003**, 129–137.
182. Park, J.; Song, W.J.; Chung, K.C. Function and Regulation of Dyrk1A: Towards Understanding Down Syndrome. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 3235–3240.
183. Soppa, U.; Schumacher, J.; Ortiz, V.F.; Pasqualon, T.; Tejedor, F.J.; Becker, W. The Down Syndrome-Related Protein Kinase DYRK1A Phosphorylates P27(Kip1) and Cyclin D1 and Induces Cell Cycle Exit and Neuronal Differentiation. *Cell Cycle* **2014**, *13*, 2084–2100, doi:10.4161/CC.29104.
184. Duchon, A.; Herault, Y. DYRK1A, a Dosage-Sensitive Gene Involved in Neurodevelopmental Disorders, Is a Target for Drug Development in down Syndrome. *Front. Behav. Neurosci.* **2016**, *10*, 104.

185. Tejedor, F.; Zhu, X.R.; Kaltenbach, E.; Ackermann, A.; Baumann, A.; Canal, I.; Heisenberg, M.; Fischbach, K.F.; Pongs, O. Minibrain: A New Protein Kinase Family Involved in Postembryonic Neurogenesis in *Drosophila*. *Neuron* **1995**, *14*, 287–301, doi:10.1016/0896-6273(95)90286-4.
186. Arbones, M.L.; Thomazeau, A.; Nakano-Kobayashi, A.; Hagiwara, M.; Delabar, J.M. DYRK1A and Cognition: A Lifelong Relationship. *Pharmacol. Ther.* **2019**, *194*, 199–221.
187. Wegiel, J.; Gong, C.X.; Hwang, Y.W. The Role of DYRK1A in Neurodegenerative Diseases. *FEBS J.* **2011**, *278*, 236–245.
188. Soppa, U.; Becker, W. DYRK Protein Kinases. *Curr. Biol.* **2015**, *25*, R488–R489.
189. Gaitanou, M.; Segkria, K.; Matsas, R. CEND1, a Story with Many Tales: From Regulation of Cell Cycle Progression/Exit of Neural Stem Cells to Brain Structure and Function. *Stem Cells Int.* **2019**, *2019*, doi:10.1155/2019/2054783.
190. Watkins, D.N.; Berman, D.M.; Burkholder, S.G.; Wang, B.; Beachy, P.A.; Baylin, S.B. Hedgehog Signalling within Airway Epithelial Progenitors and in Small-Cell Lung Cancer. *Nature* **2003**, *422*, 313–317, doi:10.1038/nature01493.
191. Berman, D.M.; Karhadkar, S.S.; Maitra, A.; De Oca, R.M.; Gerstenblith, M.R.; Briggs, K.; Parker, A.R.; Shimada, Y.; Eshleman, J.R.; Watkins, D.N.; et al. Widespread Requirement for Hedgehog Ligand Stimulation in Growth of Digestive Tract Tumours. *Nature* **2003**, *425*, 846–851, doi:10.1038/nature01972.
192. Thayer, S.P.; Di Magliano, M.P.; Heiser, P.W.; Nielsen, C.M.; Roberts, D.J.; Lauwers, G.Y.; Qi, Y.P.; Gysin, S.; Fernández-del Castillo, C.; Yajnik, V.; et al. Hedgehog Is an Early and Late Mediator of Pancreatic Cancer Tumorigenesis. *Nature* **2003**, *425*, 851–856, doi:10.1038/nature02009.
193. Rubin, L.L.; de Sauvage, F.J. Targeting the Hedgehog Pathway in Cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 1026–1033.
194. Stecca, B.; Mas, C.; Clement, V.; Zbinden, M.; Correa, R.; Piguet, V.; Beermann, F.; Ruiz I Altaba, A. Melanomas Require HEDGEHOG-GLI Signaling Regulated by Interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT Pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 5895–5900, doi:10.1073/pnas.0700776104.
195. Lauth, M.; Bergström, Å.; Shimokawa, T.; Tostar, U.; Jin, Q.; Fendrich, V.; Guerra, C.; Barbacid, M.; Toftgård, R. DYRK1B-Dependent Autocrine-to-Paracrine Shift of Hedgehog Signaling by Mutant RAS. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 718–725, doi:10.1038/nsmb.1833.
196. Briscoe, J.; Théron, P.P. The Mechanisms of Hedgehog Signalling and Its Roles in Development and Disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2013**, *14*, 418–431.
197. Gruber, W.; Hutzinger, M.; Elmer, D.P.; Parigger, T.; Sternberg, C.; Cegielski, L.; Zaja, M.; Leban, J.; Michel, S.; Hamm, S.; et al. DYRK1B as Therapeutic Target in Hedgehog/GLI-Dependent Cancer Cells with Smoothed Inhibitor Resistance. *Oncotarget* **2016**, *7*, 7134–7148, doi:10.18632/oncotarget.6910.
198. Ingham, P.W.; Nakano, Y.; Seger, C. Mechanisms and Functions of Hedgehog Signalling across the Metazoa. *Nat. Rev. Genet.* **2011**, *12*, 393–406.
199. Aberger, F.; Ruiz i Altaba, A. Context-Dependent Signal Integration by the GLI Code: The Oncogenic Load, Pathways, Modifiers and Implications for Cancer Therapy. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2014**, *33*, 93–104.

200. Ramsbottom, S.A.; Pownall, M.E. Regulation of Hedgehog Signalling inside and Outside the Cell. *J. Dev. Biol.* **2016**, *4*.
201. Belgacem, Y.H.; Hamilton, A.M.; Shim, S.; Spencer, K.A.; Borodinsky, L.N. The Many Hats of Sonic Hedgehog Signaling in Nervous System Development and Disease. *J. Dev. Biol.* **2016**, *4*.
202. Fernandes-Silva, H.; Correia-Pinto, J.; Moura, R.S. Canonical Sonic Hedgehog Signaling in Early Lung Development. *J. Dev. Biol.* **2017**, *5*.
203. Pandit, T.; Ogden, S.K. Contributions of Noncanonical Smoothed Signaling during Embryonic Development. *J. Dev. Biol.* **2017**, *5*.
204. Wang, W.; Shiraiishi, R.; Kawauchi, D. Sonic Hedgehog Signaling in Cerebellar Development and Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, *10*, 1–13, doi:10.3389/fcell.2022.864035.
205. Egan, R.J.; et al Canonical and Non-Canonical Hedgehog Signalling and the Control of Metabolism. *Behav. Brain Res.* **2009**, *205*, 38–44, doi:10.1016/j.semcd.2014.05.007.Canonical.
206. Wang, B.; Fallon, J.F.; Beachy, P.A. Hedgehog-Regulated Processing of Gli3 Produces an Anterior/Posterior Repressor Gradient in the Developing Vertebrate Limb. *Cell* **2000**, *100*, 423–434, doi:10.1016/S0092-8674(00)80678-9.
207. Riobó, N.A.; Lu, K.; Ai, X.; Haines, G.M.; Emerson, C.P. Phosphoinositide 3-Kinase and Akt Are Essential for Sonic Hedgehog Signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 4505–4510, doi:10.1073/pnas.0504337103.
208. Di Magliano, M.P.; Sekine, S.; Ermilov, A.; Ferris, J.; Dlugosz, A.A.; Hebrok, M. Hedgehog/Ras Interactions Regulate Early Stages of Pancreatic Cancer. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 3161–3173, doi:10.1101/gad.1470806.
209. Morton, J.P.; Mongeau, M.E.; Klimstra, D.S.; Morris, J.P.; Yie, C.L.; Kawaguchi, Y.; Wright, C.V.E.; Hebrok, M.; Lewis, B.C. Sonic Hedgehog Acts at Multiple Stages during Pancreatic Tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 5103–5108, doi:10.1073/pnas.0701158104.
210. Lauth, M.; Bergström, Å.; Toftgård, R. Phorbol Esters Inhibit the Hedgehog Signalling Pathway Downstream of Suppressor of Fused, but Upstream of Gli. *Oncogene* **2007**, *26*, 5163–5168, doi:10.1038/sj.onc.1210321.
211. Chen, Y.; Yue, S.; Xie, L.; Pu, X.H.; Jin, T.; Cheng, S.Y. Dual Phosphorylation of Suppressor of Fused (Sufu) by PKA and GSK3 β Regulates Its Stability and Localization in the Primary Cilium. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 13502–13511, doi:10.1074/jbc.M110.217604.
212. Wang, Y.; Ding, Q.; Yen, C.J.; Xia, W.; Izzo, J.G.; Lang, J.Y.; Li, C.W.; Hsu, J.L.; Miller, S.A.; Wang, X.; et al. The Crosstalk of MTOR/S6K1 and Hedgehog Pathways. *Cancer Cell* **2012**, *21*, 374–387, doi:10.1016/j.ccr.2011.12.028.
213. Klein, C.; Zwick, A.; Kissel, S.; Forster, C.U.; Pfeifer, D.; Follo, M.; Illert, A.L.; Decker, S.; Benkler, T.; Pahl, H.; et al. Ptch2 Loss Drives Myeloproliferation and Myeloproliferative Neoplasm Progression. *J. Exp. Med.* **2016**, *213*, 273–290, doi:10.1084/jem.20150556.
214. Singh, R.; Dhanyamraju, P.K.; Lauth, M. DYRK1B Blocks Canonical and Promotes Non-Canonical Hedgehog Signaling through Activation of the MTOR/AKT Pathway. *Oncotarget* **2017**, *8*, 833–845, doi:10.18632/oncotarget.13662.
215. Montagnani, V.; Stecca, B. Role of Protein Kinases in Hedgehog Pathway Control and Implications for Cancer Therapy. *Cancers (Basel)*. **2019**, *11*.

216. Buonamici, S.; Williams, J.; Morrissey, M.; Wang, A.; Guo, R.; Vattay, A.; Hsiao, K.; Yuan, J.; Green, J.; Ospina, B.; et al. Interfering with Resistance to Smoothed Antagonists by Inhibition of the PI3K Pathway in Medulloblastoma. *Sci. Transl. Med.* **2010**, *2*, 51ra70, doi:10.1126/scitranslmed.3001599.
217. Kebenko, M.; Drenckhan, A.; Gros, S.J.; Jücker, M.; Grabinski, N.; Ewald, F.; Grottke, A.; Schultze, A.; Izbicki, J.R.; Bokemeyer, C.; et al. ErbB2 Signaling Activates the Hedgehog Pathway via PI3K-Akt in Human Esophageal Adenocarcinoma: Identification of Novel Targets for Concerted Therapy Concepts. *Cell. Signal.* **2015**, *27*, 373–381, doi:10.1016/j.cellsig.2014.11.022.
218. Shimokawa, T.; Tostar, U.; Lauth, M.; Palaniswamy, R.; Kasper, M.; Toftgård, R.; Zaphiropoulos, P.G. Novel Human Glioma-Associated Oncogene 1 (GLI1) Splice Variants Reveal Distinct Mechanisms in the Terminal Transduction of the Hedgehog Signal. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 14345–14354, doi:10.1074/jbc.M800299200.
219. Schneider, P.; Miguel Bayo-Fina, J.; Singh, R.; Kumar Dhanyamraju, P.; Holz, P.; Baier, A.; Fendrich, V.; Ramaswamy, A.; Baumeister, S.; Martinez, E.D.; et al. Identification of a Novel Actin-Dependent Signal Transducing Module Allows for the Targeted Degradation of GLI1. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, doi:10.1038/ncomms9023.
220. Ehe, B.K.; Lamson, D.R.; Tarpley, M.; Onyenwoke, R.U.; Graves, L.M.; Williams, K.P. Identification of a DYRK1A-Mediated Phosphorylation Site within the Nuclear Localization Sequence of the Hedgehog Transcription Factor GLI1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *491*, 767–772, doi:10.1016/j.bbrc.2017.07.107.
221. Varjosalo, M.; Björklund, M.; Cheng, F.; Syvänen, H.; Kivioja, T.; Kilpinen, S.; Sun, Z.; Kallioniemi, O.; Stunnenberg, H.G.; He, W.W.; et al. Application of Active and Kinase-Deficient Kinome Collection for Identification of Kinases Regulating Hedgehog Signaling. *Cell* **2008**, *133*, 537–548, doi:10.1016/j.cell.2008.02.047.
222. Schubbert, S.; Shannon, K.; Bollag, G. Hyperactive Ras in Developmental Disorders and Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 295–308.
223. Shi, Y.; Chen, J.; Karner, C.M.; Long, F. Hedgehog Signaling Activates a Positive Feedback Mechanism Involving Insulin-like Growth Factors to Induce Osteoblast Differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, 4678–4683, doi:10.1073/pnas.1502301112.
224. Hickmott, J. DYRK1B Variant Linked to Autosomal Dominant Metabolic Syndrome. *Clin. Genet.* **2015**, *87*, 30–31, doi:10.1111/cge.12477.
225. Ortega-Molina, A.; Lopez-Guadamillas, E.; Mattison, J.A.; Mitchell, S.J.; Muñoz-Martin, M.; Iglesias, G.; Gutierrez, V.M.; Vaughan, K.L.; Szarowicz, M.D.; González-García, I.; et al. Pharmacological Inhibition of PI3K Reduces Adiposity and Metabolic Syndrome in Obese Mice and Rhesus Monkeys. *Cell Metab.* **2015**, *21*, 558–570, doi:10.1016/j.cmet.2015.02.017.
226. Kern, D.; Regl, G.; Hofbauer, S.W.; Altenhofer, P.; Achatz, G.; Dlugosz, A.; Schnidar, H.; Greil, R.; Hartmann, T.N.; Aberger, F. Hedgehog/GLI and PI3K Signaling in the Initiation and Maintenance of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Oncogene* **2015**, *34*, 5341–5351, doi:10.1038/onc.2014.450.
227. Hoa, T.K.; Basseri, B.; Shouhed, D.; Richardson, J.; Tetradis, S.; Hahn, T.J.; Parhami, F. Oxysterols Regulate Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: Pro-Bone and Anti-Fat. *J. Bone Miner. Res.* **2004**, *19*, 830–840, doi:10.1359/JBMR.040115.
228. Johnson, J.S.; Meliton, V.; Kim, W.K.; Lee, K.B.; Wang, J.C.; Nguyen, K.; Yoo, D.; Jung, M.E.; Atti, E.;

- Tetradis, S.; et al. Novel Oxysterols Have Pro-Osteogenic and Anti-Adipogenic Effects in Vitro and Induce Spinal Fusion in Vivo. *J. Cell. Biochem.* **2011**, *112*, 1673–1684, doi:10.1002/jcb.23082.
229. Nosavanh, L.G.; Yu, D.H.; Jaehnig, E.J.; Tong, Q.; Shen, L.; Chen, M.H. Cell-Autonomous Activation of Hedgehog Signaling Inhibits Brown Adipose Tissue Development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, 5069–5074, doi:10.1073/pnas.1420978112.
230. Borycki, A.G.; Brown, A.M.C.; Emerson, C.P. Shh and Wnt Signaling Pathways Converge to Control Gli Gene Activation in Avian Somites. *Development* **2000**, *127*, 2075–2087.
231. Shi, Y.; Long, F. Hedgehog Signaling via Gli2 Prevents Obesity Induced by High-Fat Diet in Adult Mice. *Elife* **2017**, *6*, doi:10.7554/eLife.31649.
232. Christodoulides, C.; Lagathu, C.; Sethi, J.K.; Vidal-Puig, A. Adipogenesis and WNT Signalling. *Trends Endocrinol. Metab.* **2009**, *20*, 16–24.
233. Yun, J.; Rago, C.; Cheong, I.; Pagliarini, R.; Angenendt, P.; Rajagopalan, H.; Schmidt, K.; Willson, J.K.V.; Markowitz, S.; Zhou, S.; et al. Glucose Deprivation Contributes to the Development of KRAS Pathway Mutations in Tumor Cells. *Science (80-.)*. **2009**, *325*, 1555–1559, doi:10.1126/science.1174229.
234. Feng, B.; Jiao, P.; Yang, Z.; Xu, H. MEK/ERK Pathway Mediates Insulin-Promoted Degradation of MKP-3 Protein in Liver Cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2012**, *361*, 116–123, doi:10.1016/j.mce.2012.03.025.
235. Singh, R.; Holz, P.S.; Roth, K.; Hupfer, A.; Meissner, W.; Müller, R.; Buchholz, M.; Gress, T.M.; Elsässer, H.P.; Jacob, R.; et al. DYRK1B Regulates Hedgehog-Induced Microtubule Acetylation. *Cell. Mol. Life Sci.* **2019**, *76*, 193–207, doi:10.1007/s00018-018-2942-5.
236. Wang, D.; Li, Z.; Messing, E.M.; Wu, G. Activation of Ras/Erk Pathway by a Novel MET-Interacting Protein RanBPM. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 36216–36222, doi:10.1074/jbc.M205111200.
237. Zou, Y.; Lim, S.; Lee, K.; Deng, X.; Friedman, E. Serine/Threonine Kinase Mirk/Dyrk1B Is an Inhibitor of Epithelial Cell Migration and Is Negatively Regulated by the Met Adaptor Ran-Binding Protein M. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 49573–49581, doi:10.1074/jbc.M307556200.
238. Chen, H.; Shen, J.; Choy, E.; Hornicek, F.J.; Shan, A.; Duan, Z. Targeting DYRK1B Suppresses the Proliferation and Migration of Liposarcoma Cells. *Oncotarget* **2018**, *9*, 13154–13166, doi:10.18632/oncotarget.22743.
239. Jin, K.; Park, S.; Ewton, D.Z.; Friedman, E. The Survival Kinase Mirk/Dyrk1B Is a Downstream Effector of Oncogenic K-Ras in Pancreatic Cancer. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 7247–7255, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4099.
240. Collins, C.S.; Hong, J.; Sapinoso, L.; Zhou, Y.; Liu, Z.; Micklash, K.; Schultz, P.G.; Hampton, G.M. A Small Interfering RNA Screen for Modulators of Tumor Cell Motility Identifies MAP4K4 as a Promigratory Kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 3775–3780, doi:10.1073/pnas.0600040103.
241. Eyal-Giladi, H.; Kochav, S. From Cleavage to Primitive Streak Formation: A Complementary Normal Table and a New Look at the First Stages of the Development of the Chick. I. General Morphology. *Dev. Biol.* **1976**, *49*, 321–337, doi:10.1016/0012-1606(76)90178-0.
242. Hamburger, V.; Hamilton, H.L. A Series of Normal Stages in the Development of the Chick Embryo. *J. Morphol.* **1951**, *88*, 49–92, doi:10.1002/JMOR.1050880104.

243. Hamburger, V.; Hamilton, H.L. A Series of Normal Stages in the Development of the Chick Embryo. 1951. *Dev. Dyn.* **1992**, *195*, 231–272, doi:10.1002/AJA.1001950404.
244. Ruth Bellairs; Mark Osmond *Atlas of Chick Embryo*; Academic Press is an Imprint of Elsevier, **2014**; ISBN 9780123849519.
245. Kousoulakos, S. *Introduction To Developmental Biology and Histology*; First.; Parisianos S.A.: Athens, **2007**; ISBN 9789603943129.
246. King, E.D.; Munger, B.L. Myotome and Early Neurogenesis in Chick Embryos. *Anat. Rec.* **1990**, *228*, 191–210, doi:10.1002/AR.1092280211.
247. Politis, P.K.; Rohrer, H.; Matsas, R. Expression Pattern of BM88 in the Developing Nervous System of the Chick and Mouse Embryo. *Gene Expr. Patterns* **2007**, *7*, 165–177, doi:10.1016/j.modgep.2006.06.007.
248. Politis, P.K.; Makri, G.; Thomaidou, D.; Geissen, M.; Rohrer, H.; Matsas, R. BM88/CEND1 Coordinates Cell Cycle Exit and Differentiation of Neuronal Precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 17861–17866, doi:10.1073/pnas.0610973104.
249. Lukaszewicz, A.I.; Anderson, D.J. Cyclin D1 Promotes Neurogenesis in the Developing Spinal Cord in a Cell Cycle-Independent Manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 11632–11637, doi:10.1073/PNAS.1106230108/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201106230SI.PDF.
250. Kaltezioti, V.; Antoniou, D.; Stergiopoulos, A.; Rozani, I.; Rohrer, H.; Politis, P.K. Prox1 Regulates Olig2 Expression to Modulate Binary Fate Decisions in Spinal Cord Neurons. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 15816–15831, doi:10.1523/JNEUROSCI.1865-14.2014.
251. Cho, G.; Lim, Y.; Cho, I.T.; Simonet, J.C.; Golden, J.A. Arx Together with FoxA2, Regulates Shh Floor Plate Expression. *Dev. Biol.* **2014**, *393*, 137–148, doi:10.1016/J.YDBIO.2014.06.012.
252. Sambrook, J, Fritsch, E.F. Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, **1989**; ISBN 0-87969-309-6.
253. Johnson, E.J.; Neely, D.M.; Dunn, I.C.; Davey, M.G. Direct Functional Consequences of ZRS Enhancer Mutation Combine with Secondary Long Range SHH Signalling Effects to Cause Preaxial Polydactyly. *Dev. Biol.* **2014**, *392*, 209, doi:10.1016/J.YDBIO.2014.05.025.
254. Kaltezioti, V.; Kouroupi, G.; Oikonomaki, M.; Mantouvalou, E.; Stergiopoulos, A.; Charonis, A.; Rohrer, H.; Matsas, R.; Politis, P.K. Prox1 Regulates the Notch1-Mediated Inhibition of Neurogenesis. *PLoS Biol.* **2010**, *8*, 1000565, doi:10.1371/JOURNAL.PBIO.1000565.
255. Kempermann, G.; Song, H.; Gage, F.H. Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2015**, *7*, a018812, doi:10.1101/CSHPERSPECT.A018812.
256. Ming, G. li; Song, H. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron* **2011**, *70*, 687, doi:10.1016/J.NEURON.2011.05.001.
257. Knoth, R.; Singec, I.; Ditter, M.; Pantazis, G.; Capetian, P.; Meyer, R.P.; Horvat, V.; Volk, B.; Kempermann, G. Murine Features of Neurogenesis in the Human Hippocampus across the Lifespan from 0 to 100 Years. *PLoS One* **2010**, *5*, e8809, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0008809.
258. Oppenheim, R.W.; Homma, S.; Marti, E.; Prevet, D.; Wang, S.; Yaginuma, H.; McMahon, A.P. Modulation of Early but Not Later Stages of Programmed Cell Death in Embryonic Avian Spinal Cord by Sonic Hedgehog. *Mol. Cell. Neurosci.* **1999**, *13*, 348–361, doi:10.1006/MCNE.1999.0755.
259. Yamamoto, Y.; Henderson, C.E. Patterns of Programmed Cell Death in Populations of Developing

- Spinal Motoneurons in Chicken, Mouse, and Rat. *Dev. Biol.* **1999**, *214*, 60–71, doi:10.1006/DBIO.1999.9413.
260. Mukaigasa, K.; Sakuma, C.; Okada, T.; Homma, S.; Shimada, T.; Nishiyama, K.; Sato, N.; Yaginuma, H. Motor Neurons with Limb-Innervating Character in the Cervical Spinal Cord Are Sculpted by Apoptosis Based on the Hox Code in Chick Embryo. *Development* **2017**, *144*, 4645–4657, doi:10.1242/DEV.158873.
261. Cayuso, J.; Ulloa, F.; Cox, B.; Briscoe, J.; Marti, E. The Sonic Hedgehog Pathway Independently Controls the Patterning, Proliferation and Survival of Neuroepithelial Cells by Regulating Gli Activity. *Development* **2006**, *133*, 517–528, doi:10.1242/DEV.02228.
262. Briscoe, J.; Novitch, B.G. *Regulatory Pathways Linking Progenitor Patterning, Cell Fates and Neurogenesis in the Ventral Neural Tube*; **2008**; Vol. 363;.
263. Sockanathan, S.; Perlmann, T.; Jessell, T.M. Retinoid Receptor Signaling in Postmitotic Motor Neurons Regulates Rostrocaudal Positional Identity and Axonal Projection Pattern. *Neuron* **2003**, *40*, 97–111, doi:10.1016/S0896-6273(03)00532-4.
264. Sockanathan, S. Towards Cracking the Code: LIM Protein Complexes in the Spinal Cord. *Trends Neurosci.* **2003**, *26*, 57–59, doi:10.1016/S0166-2236(02)00029-2.
265. Novitch, B.G.; Wichterle, H.; Jessell, T.M.; Sockanathan, S. A Requirement for Retinoic Acid-Mediated Transcriptional Activation in Ventral Neural Patterning and Motor Neuron Specification. *Neuron* **2003**, *40*, 81–95, doi:10.1016/j.neuron.2003.08.006.
266. Ji, S.J.; Zhuang, B.Q.; Falco, C.; Schneider, A.; Schuster-Gossler, K.; Gossler, A.; Sockanathan, S. Mesodermal and Neuronal Retinoids Regulate the Induction and Maintenance of Limb Innervating Spinal Motor Neurons. *Dev. Biol.* **2006**, *297*, 249–261, doi:10.1016/J.YDBIO.2006.05.015.
267. Zhou, N.; Yuan, S.; Wang, R.; Zhang, W.; Chen, J.J. Role of Dual Specificity Tyrosine-Phosphorylation-Regulated Kinase 1B (Dyrk1B) in S-Phase Entry of HPV E7 Expressing Cells from Quiescence. *Oncotarget* **2015**, *6*, 30745–30761, doi:10.18632/oncotarget.5222.
268. Wang, P.; Karakose, E.; Argmann, C.; Wang, H.; Balev, M.; Brody, R.I.; Rivas, H.G.; Liu, X.; Wood, O.; Liu, H.; et al. Disrupting the DREAM Complex Enables Proliferation of Adult Human Pancreatic β Cells. *J. Clin. Invest.* **2022**, *132*, doi:10.1172/JCI1157086.
269. Ribes, V.; Balaskas, N.; Sasai, N.; Cruz, C.; Dessaud, E.; Cayuso, J.; Tozer, S.; Yang, L.L.; Novitch, B.; Marti, E.; et al. Distinct Sonic Hedgehog Signaling Dynamics Specify Floor Plate and Ventral Neuronal Progenitors in the Vertebrate Neural Tube. *Genes Dev.* **2010**, *24*, 1186, doi:10.1101/GAD.559910.
270. Litingtung, Y.; Chiang, C. Specification of Ventral Neuron Types Is Mediated by an Antagonistic Interaction between Shh and Gli3. *Nat. Neurosci.* **2000**, *3*, 979–985, doi:10.1038/79916.
271. Wijgerde, M.; McMahon, J.A.; Rule, M.; McMahon, A.P. A Direct Requirement for Hedgehog Signaling for Normal Specification of All Ventral Progenitor Domains in the Presumptive Mammalian Spinal Cord. *Genes Dev.* **2002**, *16*, 2849, doi:10.1101/GAD.1025702.
272. Armanmehr, A.; Jafari Khamirani, H.; Zoghi, S.; Dianatpour, M. Analysis of DYRK1B, PPARG, and CEBPB Expression Patterns in Adipose-Derived Stem Cells from Patients Carrying DYRK1B R102C and Healthy Individuals During Adipogenesis. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **2022**, *20*, 576–583, doi:10.1089/MET.2021.0140.

273. Davis, S.J.; Sheppard, K.E.; Pearson, R.B.; Campbell, I.G.; Goringe, K.L.; Simpson, K.J. Functional Analysis of Genes in Regions Commonly Amplified in High-Grade Serous and Endometrioid Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 1411–1421, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3433.
274. Rowland, L.P.; Shneider, N.A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *344*, 1688–1700, doi:10.1056/NEJM200105313442207.
275. Salamatina, A.; Yang, J.H.; Brenner-Morton, S.; Bikoff, J.B.; Fang, L.; Kintner, C.R.; Jessell, T.M.; Sweeney, L.B. Differential Loss of Spinal Interneurons in a Mouse Model of ALS. *Neuroscience* **2020**, *450*, 81–95, doi:10.1016/J.NEUROSCIENCE.2020.08.011.
276. Drannik, A.; Martin, J.; Peterson, R.; Ma, X.; Jiang, F.; Turnbull, J. Cerebrospinal Fluid from Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis Inhibits Sonic Hedgehog Function. *PLoS One* **2017**, *12*, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0171668.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

<p>Νικόλαος Κοκκοράκης</p>	<p>Υποψήφιος Διδάκτωρ, Εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας – Βλαστικών Κυττάρων, Τμήμα Νευροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα, Ελλάδα</p>
<p>Τηλ.: (+30) 2106478837 e-mail: nkokkorakis@pasteur.gr</p>	

ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

6/2021 – Σήμερα:

Ειδικός Τεχνικός Επιστήμονας στο Εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας – Βλαστικών Κυττάρων, Τμήμα Νευροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, στην Ερευνητική ομάδα της Δρ. Μ. Γαϊτάνου.

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

12/2016 – Σήμερα:

Εκπόνηση της Διδακτορικής Διατριβής: "Μελέτη του ρόλου της ομάδας των **Minibrain/DYRK** κινασών στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος". Επιβλέπουσα: Δρ. Μαρία Γαϊτάνου, Κύρια Ερευνήτρια, Εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας-Βλαστικών Κυττάρων, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ.

9/2021:

1st Advanced School of the European Society for Neurochemistry (ESN) /International Society for Neurochemistry (ISN) "From Neurodegeneration to Neural Carcinogenesis: Mechanisms and Common Biologies", Biomedical Research Foundation of Academy of Athens (BRFAA), Athens, Greece.

11/2016:

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών (διετές) στη "Μοριακή Ιατρική" (κατεύθυνση Νευροβιολογίας), Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ. Βαθμός Πτυχίου «Άριστα».

4/2011:

Πτυχίο Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ. Βαθμός Πτυχίου «Λίαν Καλώς».

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Kokkorakis, N., Nalmpanti, A., Zagoraiou, L., Matsas, R. and Gaitanou, M. (2023). "Dyrk1B kinase is involved in neuroinflammation in SOD1^{G93A} mice". *In preparation*

2. Kokkorakis, N., Douka, K., Nalmpanti, A., Politis, P.K., Zagoraiou, L., Matsas, R. and Gaitanou, M. (2023) "Mirk/Dyrk1B controls ventral spinal cord development via Shh pathway". *Cell. Mol. Life Sci.* **81(1):70**. doi: 10.1007/s00018-023-05097-9 (IF: 8.0)

3. Kokkorakis, N., Zouridakis, M. and Gaitanou, M. (2024) "Mirk/Dyrk1B Kinase Inhibitors in Targeted Cancer Therapy". *Pharmaceutics.* **16(4):528**. doi: 10.3390/pharmaceutics16040528 (IF: 5.4).

4. Kokkorakis, N. and Gaitanou M. (2020) "Minibrain-related kinase/dual-specificity tyrosine-regulated kinase 1B implication in stem/cancer stem cells biology". *World J Stem*

Cells.12(12):1553-1575. doi: 10.4252/wjsc.v12.i12.1553. PMID: 33505600; PMCID: PMC7789127. (IF: 5.247)

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΘΝΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- Nalmpanti., A., **Kokkorakis, N.**, Zagoraiou, L., Matsas, R. and Gaitanou, M. (2024) "Mirk/Dyrk1B kinase is involved in neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis". **Poster presentation, 7th Congress of the Hellenic Society of Gene Therapy and Regenerative Medicine (HSGTRM)**, 24-26/5/2024, Aristotle University Research Dissemination Center, Thessaloniki, Greece.
- **Kokkorakis, N.**, Douka, K., Nalmpanti., V., Politis, P.K., Zagoraiou, L., Matsas, R. and Gaitanou, M. (2023) "Mirk/Dyrk1B kinase controls ventral spinal cord development via Shh pathway". Poster presentation, **30th Meeting of the Hellenic Society for Neuroscience (HSfN)**, 24-26/10/2023, National Centre for Scientific Research "Demokritos", Athens, Greece.
- Nalmpanti, V., **Kokkorakis, N.**, Zagoraiou, L., Matsas, R. and Gaitanou, M. (2023). "Dyrk1B kinase is involved in neuroinflammation in SOD1^{G93A} mice". Poster presentation, **30th Meeting of the Hellenic Society for Neuroscience (HSfN)**, 24-26/10/2023, National Centre for Scientific Research "Demokritos", Athens, Greece.
- Nalmpanti, V., **Kokkorakis, N.**, Zagoraiou, L., Matsas, R. and Gaitanou, M. (2023). "Dyrk1B kinase is involved in neuroinflammation in SOD1^{G93A} mice". Poster presentation, **6th Day Conference of Postgraduates and Postdoctoral researchers of Hellenic Pasteur Institute**, 4/10/2023, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece.
- **Kokkorakis, N.**, Douka, K., Politis, P.K., Zagoraiou, L., Matsas, R. and Gaitanou, M. (2023) "Mirk/Dyrk1B kinase controls ventral spinal cord development via Sonic Hedgehog pathway". Oral presentation, **6th Day Conference of Postgraduates and Postdoctoral researchers of Hellenic Pasteur Institute**, 4/10/2023, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece.
- **Kokkorakis, N.**, Politis, P.K., Nalbadi, V., Zagoraiou, L., Matsas, R. and Gaitanou, M. (2023) "Mirk/Dyrk1B kinase controls the generation and columnar organization of spinal motor neurons via Sonic hedgehog pathway". **Poster presentation, 6th Congress of the Hellenic Society of Gene Therapy and Regenerative Medicine (HSGTRM)**, 26-28/5/2023, Cotsen Hall, Athens, Greece.
- **Kokkorakis, N.**, Politis, P.K., Zagoraiou, L., Matsas, R. and Gaitanou, M. (2022) "Mirk/Dyrk1B kinase controls the generation and columnar organization of spinal motor neurons in the embryonic chick spinal cord via Sonic hedgehog pathway". **Poster presentation, 32nd Annual NECTAR Meeting of the Network for European CNS Transplantation and Restoration**, 24-26/10/2022, Cotsen Hall, Athens, Greece.
- **Kokkorakis, N.**, Politis, P.K., Matsas, R. and Gaitanou, M. (2022) "A novel function for Mirk/Dyrk1B kinase in the columnar organization of medial lateral motor neurons in the embryonic chick spinal cord". **Poster presentation, Federation of European Neuroscience Societies (FENS) FORUM 2022**, 09-13/07/2022, Paris Expo Porte de Versailles, Paris, France
- **Kokkorakis, N.**, Politis, P.K., Stathourou, M., Matsas, R. and Gaitanou, M. (2021) "Mirk/Dyrk1B minibrain kinase overexpression alters lateral columnar organization of motor neurons in the embryonic chick spinal cord". Poster presentation, **29th Meeting of the Hellenic Society for Neuroscience (HSfN)**, 08-10/10/2021, Thessaloniki, Greece (virtual). **Βραβείο καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης (poster)**.
- **Kokkorakis, N.**, Politis, P.K., Stathourou, M., Matsas, R. and Gaitanou, M. (2021) "Mirk/Dyrk1B minibrain kinase alters the lateral motor column of motor neurons in the embryonic chick spinal cord". Poster presentation, **1st Advanced School of the European Society for Neurochemistry (ESN) / International Society for Neurochemistry (ISN) "From Neurodegeneration to Neural Carcinogenesis: Mechanisms and Common Biologies"**, 19-26/09/2021, Biomedical Research Foundation of Academy of Athens (BRFAA), Athens, Greece.
- **Kokkorakis, N.**, Politis, P.K., Masouti, E., Matsas, R. and Gaitanou, M. (2019) "Mirk/Dyrk1B minibrain kinase induces cell cycle exit and neuronal differentiation *in vitro* and *in vivo* and marks

embryonic and adult neurogenesis". Poster presentation, **28th Meeting of the Hellenic Society for Neuroscience (HSfN)**, 04-06/10/2019, Foundation for Research and Technology - Hellas (FORTH), Heraklion, Crete, Greece.

- **Kokkorakis, N.**, Politis, P.K., Masouti, E., Matsas, R. and Gaitanou, M. (2019) "Mirk/Dyrk1B minibrain kinase induces cell cycle exit and neuronal differentiation *in vitro* and *in vivo* and marks embryonic and adult neurogenesis". **Blitz (flash) talk and Poster presentation, Federation of European Neuroscience Societies (FENS) Regional Meeting (FRM)**, 10-13/07/2019, Crowne Plaza, Belgrade, Serbia.
- **Kokkorakis, N.**, Politis, P.K., Matsas, R. and Gaitanou, M. (2019) "Mirk/Dyrk1B induces cell cycle exit and neuronal differentiation *in vitro* and *in vivo* and marks embryonic and adult neurogenesis". **Poster presentation, European Molecular Biology Laboratory (EMBL) Course "Genome Engineering: CRISPR/Cas"**, 17-22/03/2019, EMBL Heidelberg, Germany.
- **Kokkorakis, N.**, Politis, P.K., Matsas, R. and Gaitanou, M. (2018) "Mirk/Dyrk1B induces cell cycle exit and neuronal differentiation *in vivo* and marks hippocampal adult neurogenesis". **Poster presentation, 4th Day Conference of Postgraduates and Postdoctoral researchers of Hellenic Pasteur Institute**, 27/09/2018, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece. **Βραβείο καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης (poster).**
- **Kokkorakis, N.**, Politis, P.K., Matsas, R. and Gaitanou, M. (2018) "Mirk/Dyrk1B is a novel dual inducer of cell cycle exit and neuronal differentiation *in vivo*". **Poster presentation, International scientific meeting of young researchers of Pasteur Institute (Paris) and Hellenic Pasteur Institute (Athens) "YouPI-StaPa Joint retreat"**, 21-23/6/2018, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece.
- **Kokkorakis, N.**, Politis, P.K., Matsas, R. and Gaitanou, M. (2017) "Mirk/Dyrk1B kinase induces cell cycle exit and differentiation of neural progenitors in early embryonic chick spinal cord". **Poster presentation, 27th Meeting of the Hellenic Society for Neuroscience (HSfN)**, 08-10/12/2017, Department of Medicine, School of Health Sciences, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece.
- **Kokkorakis, N.**, Politis, P.K., Matsas, R. and Gaitanou, M. (2017) "Mirk/Dyrk1B kinase induces cell cycle exit and differentiation of neural progenitors in early embryonic chick spinal cord". **Oral presentation, 5th Young Scientists Forum of HSBMB**, 09/11/2017 and **Poster presentation, 68th Congress of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB)**, 10-12/11/2017, Eugenides Foundation, Athens, Greece.
- **Kokkorakis, N.**, Politis, P.K., Matsas, R. and Gaitanou, M. (2017) "Mirk/Dyrk1B kinase induces cell cycle exit and differentiation of neural progenitors in early embryonic chick spinal cord". Poster presentation, **3rd Day Conference of Postgraduates and Postdoctoral researchers of Hellenic Pasteur Institute**, 28/09/2017, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece.
- **Kokkorakis, N.**, Politis, P.K., Matsas, R. and Gaitanou, M. (2017) "Mirk/Dyrk1B kinase is a novel dual function molecule inducing cell cycle exit and neuronal differentiation in the embryonic chick spinal cord". **Oral presentation, International Conference "Dyrk1A, related kinases and human disease"**, 28/03/2017-01/04/2017, Saint-Malo, France.
- **Kokkorakis, N.**, Politis, P.K., Douka, K., Matsas, R. and Gaitanou, M. (2016) "Mirk/Dyrk1B kinase is a novel cell cycle regulator of neuronal progenitors in the embryonic chick spinal cord". Poster presentation, **2nd Day Conference of Postgraduates and Postdoctoral researchers of Hellenic Pasteur Institute**, 29/09/2016, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece.

ΒΡΑΒΕΙΑ - ΔΙΑΚΡΙΞΕΙΣ

Δύο Βραβεία καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης (poster), όπως αναφέρονται παραπάνω.

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

Υποτροφίες Διδακτορικών Σπουδών: Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ (01/01/2017-30/06/2017), Επιχειρησιακό Πρόγραμμα "Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα, Καινοτομία" (ΕΣΠΑ 2014-2020) (29/11/2017-28/03/2019), TOLERANZIA (01/04/2019-31/03/2020), Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, καταπίστευμα Nostos Foundation (15/06/2020- 14/06/2021).

ΑΛΛΕΣ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ

- **2/2023 – Σήμερα:** Υπεύθυνος επιστημονικού περιεχομένου της ιστοσελίδας και των κοινωνικών δικτύων της Ελληνικής Εταιρείας Γονιδιακής Θεραπείας και Αναγεννητικής Ιατρικής (ΕΕΓΘΑΙ), Αθήνα, Ελλάδα.
- **Μέλος Επιστημονικών Εταιρειών:** Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (ΕΕΒΜΒ), Ελληνική Εταιρεία Νευροεπιστημών (ΕΕΝ), Ελληνική Εταιρεία Γονιδιακής Θεραπείας και Αναγεννητικής Ιατρικής (ΕΕΓΘΑΙ), Ελληνική Εταιρεία Βιοϊατρικής Έρευνας Ζώων Εργαστηρίου (ΕΕΒΕΖΕ).

**ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ
ΕΚΠΟΝΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**



Mirk/Dyrk1B controls ventral spinal cord development via Shh pathway

N. Kokkorakis^{1,2} · K. Douka¹ · A. Nalmpanti^{1,3} · P. K. Politis^{4,5} · L. Zagoraiou⁵ · R. Matsas¹ · M. Gaitanou¹

Received: 14 July 2023 / Revised: 14 December 2023 / Accepted: 17 December 2023
© The Author(s) 2024

Abstract

Cross-talk between Mirk/Dyrk1B kinase and Sonic hedgehog (Shh)/Gli pathway affects physiology and pathology. Here, we reveal a novel role for Dyrk1B in regulating ventral progenitor and neuron subtypes in the embryonic chick spinal cord (SC) via the Shh pathway. Using *in ovo gain-and-loss-of-function* approaches at E2, we report that Dyrk1B affects the proliferation and differentiation of neuronal progenitors at E4 and impacts on apoptosis specifically in the motor neuron (MN) domain. Especially, Dyrk1B overexpression decreases the numbers of ventral progenitors, MNs, and V2a interneurons, while the pharmacological inhibition of endogenous Dyrk1B kinase activity by AZ191 administration increases the numbers of ventral progenitors and MNs. Mechanistically, Dyrk1B overexpression suppresses Shh, Gli2 and Gli3 mRNA levels, while conversely, Shh, Gli2 and Gli3 transcription is increased in the presence of Dyrk1B inhibitor AZ191 or Smoothened agonist SAG. Most importantly, *in phenotype rescue* experiments, SAG restores the Dyrk1B-mediated dysregulation of ventral progenitors. Further at E6, Dyrk1B affects selectively the medial lateral motor neuron column (LMCm), consistent with the expression of Shh in this region. Collectively, these observations reveal a novel regulatory function of Dyrk1B kinase in suppressing the Shh/Gli pathway and thus affecting ventral subtypes in the developing spinal cord. These data render Dyrk1B a possible therapeutic target for motor neuron diseases.

Keywords Chick neural tube · Ventral progenitor domains · Neuronal subtypes · Apoptosis · Motor neurons · Dyrk1B

Abbreviations

Shh	Sonic Hedgehog	MNs	Motor neurons
SMO	Smoothened	INs	Interneurons
SAG	Smoothened agonist	SpMNs	Spinal motor neurons
NC	Notochord	MN domain	Motor neuron domain
FP	Floor plate	pMNs	Motor neurons progenitors
SC	Spinal cord	VZ	Ventricular zone
		MZ	Mantle zone
		CC	Central canal
		NPCs	Neural progenitor cells
		CNS	Central nervous system
		M&M	Materials and methods

✉ M. Gaitanou
mgaitanou@pasteur.gr

- ¹ Laboratory of Cellular and Molecular Neurobiology-Stem Cells, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece
- ² Division of Animal and Human Physiology, Department of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece
- ³ Athens International Master's Programme in Neurosciences, Department of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece
- ⁴ Center of Basic Research, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, Athens, Greece
- ⁵ School of Medicine, European University Cyprus, Nicosia, Cyprus

Introduction

Spinal cord (SC) development is orchestrated by coordinated actions of morphogens such as Sonic hedgehog (Shh), bone morphogenetic protein (BMP) and Wnt molecules that act by forming gradients in opposite directions along the dorso-ventral axis of the developing SC [1–5]. Shh is a key molecule for the specification of neuronal and glial cell lineages during SC development. Shh is produced initially by the

notochord (NC), which acts as an organizing center, later during neurogenesis by the medial floor plate (MFP), and finally, during gliogenesis, by the lateral floor plate (LFP) [3, 6–9]. Shh regulates the combinatorial expression of a set of transcription factors that are necessary and sufficient to specify each neuronal subtype, resulting in the formation of five discrete ventral progenitor domains (p3, pMN, p2, p1, and p0) that are arrayed along the dorso-ventral axis of SC [2, 6]. In the chick SC, Shh controls cell cycle progression of neural progenitors and their survival by maintaining progenitor cell proliferation and preventing cell death during SC development [9–11].

Dyrk1B kinase (also referred to as MIRK; minibrain-related kinase) belongs to the DYRK kinase family (for dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation-regulated kinases) comprising proline-directed kinases that phosphorylate tyrosine, serine and threonine amino acid residues [12–17]. DYRKs acquire their catalytic activity during their translation by intramolecular auto-phosphorylation at the second tyrosine residue located at the conserved YxY motif of their activation loop [17]. In particular, the intramolecular auto-phosphorylation of DYRKs is supported by a characteristic sequence motif, the DYRK homology box (known as the DH box), which is located at the N-terminal of their catalytic domain [15, 17]. Dyrk1B is normally expressed at high levels in skeletal muscle and testis with increased relative expression in cardiac muscle and brain compared to other tissues [18–20]. During development Dyrk1B has a critical role in myogenesis [21–23], spermatogenesis [24] and adipogenesis [25–28], while it is implicated in human diseases, such as metabolic syndrome [25–28], and tumor progression promoting survival and chemoresistance in cancer cells [29–38]. Dyrk1B mainly acts as a negative regulator of cell cycle progression via destabilization of cyclin D1 [16, 20, 38–46] and as a prosurvival factor [20, 22, 29, 33, 41, 47–49]. Moreover, Dyrk1B acts as central mediator of Sonic hedgehog/Gli [44, 50–54], PI3K/mTOR/AKT [44, 52, 54] and RAF/MEK/ERK [41, 55] signaling pathways in development and disease.

In contrast to its extensively studied pathophysiological role in several organ systems, Dyrk1B function in the nervous system remains unexplored. Dyrk1B is closely related to the Dyrk1A gene, while minibrain (MNB) is their orthologous gene in *Drosophila* named according to the brain phenotype of mutant flies [15, 56, 57]. Mutation of MNB causes abnormal arrangement of neuroblasts in the larval brain, resulting in smaller optic lobes and brain hemispheres, suggesting that MNB is crucial for proper neuroblast proliferation during neurogenesis [15, 56, 57]. Notably, the minibrain phenotype in mutant flies is associated with behavioral deficits in learning, memory, visual and olfactory tasks [15, 56, 57]. Although the role of Dyrk1A in neurogenesis is well documented [57–63],

the function of its closely related kinase, Dyrk1B, in CNS development remains elusive. In a previous study we obtained first evidence that Dyrk1B may be implicated in neurogenesis [42–44]. We have shown that Dyrk1B promotes cell cycle exit and neuronal differentiation in mouse neuroblastoma cells via cyclin D1 cytoplasmic relocation and proteasomal degradation [42, 43]. This function is counteracted by binding to the scaffolding protein RanBPM, which facilitates Dyrk1B proteasomal turnover [42]. These observations suggest that Dyrk1B may have a similar role in cell cycle progression/exit and differentiation of neural progenitors during neurogenesis *in vivo* [42–44]. To address this question, here we investigated the expression of Dyrk1B in the embryonic chick and mouse SC and used the early chick neural tube as a model system to explore the role of Dyrk1B in neurogenesis. We found that Dyrk1B is expressed in the notochord (NC) and floor plate (FP), as well as in cycling progenitors of the ventricular zone (VZ) and in neurons. Using *in ovo gain-and-loss-of-function* and *phenotype rescue* approaches in the E2 chick SC and subsequent analysis at E4 and E6 we uncovered a novel role for Dyrk1B kinase during spinal cord development, in controlling the numbers of ventral progenitor and neuron subtypes, as well as in the columnar organization of spinal motor neurons (MNs) via the Sonic hedgehog/Gli pathway.

Materials and methods

Cloning of chick Dyrk1B partial cDNA

To clone chick Dyrk1B cDNA we performed BLAST searches to identify EST clones corresponding to cDyrk1B using BBSRC chicken EST data (<http://www.chick.manchester.ac.uk/>).

We detected two EST clones: 603108058F1 cloneID = ‘ChEST50c16’ and 603209321F1 cloneID = ‘ChEST186i5’, but neither contained the whole reading frame nor the 3’-end of coding region of cDyrk1B that is highly different from the 3’-end of the coding region of its paralogous gene Dyrk1A. This was critical to distinguish Dyrk1B from Dyrk1A mRNA expression. Open reading frames of human, mouse and rat Dyrk1B orthologs display high similarity, as 92.64% between human and mouse, 93.17% between human and rat, and 96.72% between mouse and rat. Taking advantage of the high similarity between Dyrk1B coding regions among species, we then used primers corresponding to the 3’-end of mouse Dyrk1B coding region, in order to clone the 3’-end of chick Dyrk1B coding region by applying RT-PCR in total RNA isolated with Trizol from E4 chick SC. For cloning we used oligo dT and the primers FOR2D1B: 5’-CCCAAGCTTCCGTTGCCCTGGACGACC-3’ and REV2D1B: 5’-CCGGAATTCTCA

TGAGCTGGCTGCTGTGC-3' and Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, M0491). We cloned a cDNA fragment of 253 bp, which then was subcloned into the Hind III and EcoRI restriction sites of pBluescript II KS (-) (Stratagene) plasmid and then subjected to Sanger Sequencing. This revealed that the 253 bp cDNA fragment corresponds to the 3'-end of cDyrk1B coding region and displays 100% similarity with mouse, 96.05% with rat and 90.91% with human Dyrk1B, respectively (Fig.S1).

Plasmids

For electroporation experiments, we used a bicistronic expression vector pCAG-mDyrk1B-IRES-NLS-GFP, co-expressing mDyrk1B coding region and nuclear targeted GFP. mDyrk1B coding region was obtained by applying PCR with Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, M0491) in pCMV-SPORT6 plasmid containing mDyrk1B full length cDNA (clone: BC019545, IMAGE: 4511845) and primers D1BFOR1: 5'-CTAGCTAGCGCC ACCATGGCCGTCACCA-3' and D1BREV2: 5'-CCG ATATCTCATGAGCTGGCTGCTGTGCTCTGG-3'. The cDNA fragment of 1890 bp that corresponds to the whole coding region of mDyrk1B, was then subcloned into Nhe I and EcoR V restriction sites of the pCAG-IRES-NLS-GFP empty vector. All clones were subjected to Sanger Sequencing analysis for verification. For in situ hybridization (ISH) experiments, we used a cDNA fragment of 253 bp corresponding to the 3'-coding region of cDyrk1B cDNA, a cDNA fragment of 396 bp corresponding to the 3'-coding region of mDyrk1B cDNA, both of them subcloned into the Hind III and EcoRI restriction sites of pBluescript II KS plasmid (Stratagene). For Sonic Hedgehog riboprobes, we cloned a cDNA fragment of 498 bp corresponding to the 5'-coding region of mSHH by applying PCR with Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, M0491) in pCMV6-Entry plasmid, containing mShh coding region Myc-DDK-tagged (Mouse Sonic hedgehog NM_009170, ORIGENE, MR227201), and primers mSHHFOR: 5'-CCC AAGCTTGCCAGCGGCAGATAT-3' and mSHHREV: 5'-CGGGAATTCGTCCTTCACCAGCTTG-3'. The PCR product of 498 bp, was then subcloned into the Hind III and EcoRI restriction sites of pBluescript II KS plasmid (Stratagene) and then subjected to Sanger Sequencing analysis for verification.

Chicks

Chicken eggs, provided by a local supplier, were incubated horizontally at 37 °C, with > 60–90% humidity until the desired Hamburger and Hamilton (HH) developmental stages for *gain-and-loss-of-function* and *phenotype rescue* experiments.

Mice

C57BL/6 J mice were handled in strict accordance with good animal practice, as defined by the relevant European and Greek animal welfare bodies, based on 3 + 1R: Replacement, Reduction, Refinement and Respect. Specifically, all procedures complied to the European and National Laws for Laboratory Animal Use (Directive 2010/63/EU and Greek Law, PD 56/2013), according to FELASA recommendations for euthanasia and the Guide for Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health.

Unilateral *in ovo* electroporation

Gain-of-function experiments (*GOF*) were performed by applying unilateral *in ovo* electroporation of pCAG-mDyrk1B-IRES-NLS-GFP or pCAG-IRES-NLS-GFP vector as control, in the developing chick neural tube as previously described [64–66]. Briefly, chick embryos at HH 12–14 (E2) were injected with plasmid DNA solution into the lumen of the central canal of the neural tube and then subjected to unilateral electroporation. Plasmids for electroporation were used at concentration of 2–2.5 µg/µl in TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) containing 0.05% Fast Green (Sigma F7252). A few microliters of plasmid solution were injected with a glass microcapillary pipette into the lumen of the SC central canal by mouth pipetting. The microelectrodes made of platinum were spaced ~4 mm apart and gently placed in lateral position against the vitelline membrane surrounding the neural tube such that an applied electric current across the medio-lateral plane of the neural tube drove the negatively charged DNA into the cells on only the one side of the neural tube. Chick embryos were pulsed 5 times each for 50 ms with an interval of 950 ms at 25 V, by using a square wave electroporator (BTX Harvard Apparatus ECM 830). The embryos were harvested at E4 or at E6 and were prepared for immunohistochemistry (IHC), RNA in situ hybridization (ISH), Western blot analysis (WB) or qRT-PCR. For BrdU-labeling, chick embryos received 20 µl BrdU (1 mg/ml) on top of each embryo, dropwise with a pipette, 2 h before sacrifice.

Loss-of-function (LOF) and *phenotype rescue in ovo* experiments

Loss-of-function (LOF) experiments, were performed by using the Dyrk1B-selective inhibitor AZ191 (Cayman No. 17693). Specifically, 600 µg of AZ191 previously dissolved in DMSO, were injected with an insulin 29G syringe, at E2 chick embryos at three points, with a 45-degree angle via three small holes made in the vitelline membranes, in such a way that the entire embryo was surrounded with the compound. AZ191 was injected in a total volume of

1 ml, by adding sterile PBS (without CaCl_2 and MgCl_2 , Gibco, Cat No 10010-015), and supplemented with 1% (v/v) penicillin–streptomycin (SIGMA, P4333). Similarly, activation of Shh pathway was performed by using the Smoothed agonist, SAG (Abcam, ab142160). Specifically, 1 μg of SAG [67], previously dissolved in DMSO, was injected with an insulin 29G syringe, at E2 chick embryos as described above for AZ191. *Phenotype rescue* experiments were performed by administration of either AZ191 or SAG, 2 h after unilateral *in ovo* electroporation in order to minimize the stress inflicted on the embryos.

Western blot (WB)

Chick and mouse brain and SC homogenates derived from several developmental stages, were prepared in a ratio 1:10 in ice cold lysis buffer containing: 10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, protease inhibitor cocktail set I (Calbiochem/Merck Cat No 539131) phosphatase inhibitors (PhosSTOP, Roche Life Science, Cat No 04906837 001). Tissues homogenates were lysed at 4 °C in a tube roller for 4–6 h. Then, homogenates were centrifuged at $1300\times g$ at 4 °C for 5 min, and supernatants were collected. Protein concentration was estimated by a modified Lowry assay (DC Protein assay from Bio-Rad). Proteins were separated by 10% or 12% SDS-PAGE electrophoresis and transferred onto Porablot nitrocellulose (Macherey-Nagel, Cat No 741280). Blocking was performed in 5% non-fat milk in TBST containing 10 mM Tris–HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, for 1 h at room temperature (RT), followed by overnight incubation with primary antibodies. Incubation with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies was performed for 2 h at RT. Primary and secondary antibodies were diluted in 2.5% non-fat milk in TBST and three washes were performed in TBST. Protein bands were detected by the enhanced chemiluminescence substrate (ECL) containing: 1.25 mM Luminol, 198 μM Coumaric acid, and 0.0096% H_2O_2 in 50 mM Tris–HCl pH 8.8. Densitometric analysis of protein bands and normalization relative to β -tubulin or GAPDH was performed using ImageJ software (NIH) (RRID:SCR_003070). All experiments were performed three times ($n = 3$), unless otherwise noted, by using protein lysates derived from pools of 3 animals corresponding to each experimental group. Quantitative data are mean values and error bars represent SEM.

Tissue preparation

Chick and mouse embryos were harvested and fixed overnight at 4 °C with 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4. Adult pregnant

mice were euthanized by isoflurane inhalation and perfused transcardially with PBS and then 4% PFA. Chick or mouse dissected SCs were then washed in PBS, cryoprotected for 16 h to 2 days at 4 °C with 20% sucrose in PBS for chick or 30% sucrose for mouse tissues, respectively, until osmotic equilibrium occurred. Tissues were then mounted in OCT (VWR Chemicals, Cat No 361603E), frozen and cryosectioned at 20 μm , and processed for immunostaining or RNA in situ hybridization (ISH). Serial sections placed on adjacent slides to allow for IHC or ISH at the same rostro-caudal level.

Immunohistochemistry (IHC)

Cryosections of chick and mouse SC were subjected to antigen retrieval for heat-mediated epitope unmasking by incubating the slides in 10 mM Sodium citrate pH 6.0 for 30 min at 70 °C. After washing the slides 3 times for 10 min each, with 1X PBS, the slides of cryosections were blocked with 5% normal donkey serum (NDS) containing 0.1% v/v Triton X-100 in PBS for chick tissues or 0.2% v/v for mouse tissues respectively, for 1 h at RT. Primary antibodies were diluted in 2.5% NDS containing 0.05% v/v Triton X-100 in PBS, for chick tissues or 0.1% v/v for mouse tissues and tissue cryosections were incubated overnight at 4 °C, while cryosections were incubated with the appropriate secondary antibodies Alexa-Fluor 488, Alexa-Fluor 546 and Alexa-Fluor 647 (Invitrogen/ThermoFisher Scientific) for 2 h at RT. Cell nuclei labeled with TOPRO-3 and /or Hoechst (Molecular Probes, Invitrogen Cat No 33258). Slides were mounted with MOWIOL 488 Reagent (Calbiochem, Cat No 475904). Digital images were acquired by performing confocal microscopy using Leica TCS SP5II and Leica TCS SP8 confocal microscopes and images were analyzed using ImageJ software (NIH) (RRID:SCR_003070). Statistical analysis was performed by using at least $n = 12$ sections obtained from 4 animals corresponding to each experimental group. Normalization of cell numbers was performed to GFP^+ cells or to total cell nuclei. Quantitative data were presented as mean values and error bars correspond to standard error of the mean (SEM).

In situ hybridization (ISH)

Slides with 4% PFA-fixed cryosections were incubated with pre-hybridization buffer containing: 50% deionized formamide, 5X SSC buffer, 5X Denhardt's solution (Invitrogen, Cat No 750018), 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ yeast t-RNA (Roche Life Science, Cat No 10109223001), and 500 μg fish sperm DNA (Roche Life Science, Cat No 11467140001) in a humidified chamber containing: 5X SSC for 3–4 h at 65 °C. Non-radioactive in situ hybridization (ISH) was performed in the hybridization buffer, which is same with

the pre-hybridization buffer containing plus the DIG-labeled riboprobe. Hybridization buffer containing the DIG-labeled riboprobe before used was previously incubated at 85 °C for 5 min for denaturation of riboprobes. Preparations for DIG-labeled probes were carried out as previously described [64–66]. On the following day, slides were washed with 0.2X SSC for 2×30 min at 65 °C, 0.2X SSC for 5 min at RT, with B1 buffer (0.1 M Tris /HCl, pH 7.5 and 0.15 M NaCl) for 5 min at RT. Sections were blocked with B1 supplemented with 10% normal donkey serum (NDS) for 1 h, at RT, before incubating in an anti-DIG alkaline phosphatase (AP) conjugate (see Antibodies section) in B1 buffer supplemented with 1% NDS at 4 °C. On the following day, slides were washed with B1 buffer for 2X5 min at RT, with B3 buffer (0.1 M Tris/HCl, pH 7.5, 0.1 M NaCl, and 50 mM MgCl₂) for 2X5 min at RT. Slides were then incubated with AP buffer (100 mM Tris /HCl, pH 9.5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.1% Tween-20, and 1 mM levamisole) for 10 min at RT. Color reaction development started by adding AP buffer containing 10 µl/ml NBT/BCIP (Roche Life Science, Cat No 11681451001). The reaction was performed in the dark at RT for several hours to overnight. Color reaction was stopped by washing slides with PBS. After washing, sections were mounted in DPX mounting (Sigma-Aldrich, Cat No 06522). Digital images were acquired by performing transmitted light-bright field microscopy in ZEISS Axiovert 200 (ZEISS) and Leica TCS SP8 (LEICA microsystems) microscopes. Representative images from reproducible results were presented.

Antibodies

All primary and secondary antibodies used are listed in Supplementary Table 1 and 2, respectively.

RNA isolation, cDNA synthesis and real-time qRT-PCR

Total RNA was extracted from E4 chick SC, using Trizol Reagent (Ambion/Life Technologies, Cat No 15596-018) and then was incubated with DNase I (Takara Bio, Cat No 2270A). 1 µg of total RNA was used for first strand cDNA synthesis by using the ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, Cat No A3800) and oligo dT primer, according to the manufacturer's instructions. Real-time qRT-PCR analysis was carried out in a Mini-Opticon Real-Time PCR System (Bio-Rad, Cat No CFD-3120) using KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (Kapa Biosystems, KK4602) according to the manufacturer's instructions. The analysis of relative gene expression was performed with 2^{-ΔΔCt} Method, by using the chick housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (cGAPDH) as an internal reference. Real-time qRT-PCR analysis was

carried out in three independent experiments (n = 3), by using mRNA pools of 3 chick embryos corresponding to each experimental group in technical triplicates. Relative gene expression data were presented as the mean of triplicate values obtained from three independent experiments. Error bars represent SEM. Primer sets used were: FOR cSHH: 5'-CAAAGCAGAAACTCAGTGGCA-3' and REV cSHH: 5'-TGACGTAGAAGAGCTTTCGGG-3', FOR cGLI3: 5'-GCATGTGCCTTCTGCCTTATCTAG-3' and REV cGLI3: 5'-GGTCAAAGCTGTGATCAGATAGGG-3', FOR cGLI2: 5'-TGGCACAAGGAGTGCCGCAG-3' and REV cGLI2: 5'-GTACGTCACGGGGTTGATGGG-3' FOR cGAPDH: 5'-TCGGAGTCAACGGATTTGGC-3' and REV cGAPDH: 5'-GCCCATTTGATGTTGCTGGG-3'.

Statistical analysis

Before analysis, the normality of values was verified with the Shapiro–Wilk normality test using IBM SPSS Statistics for Windows Version 20.0 (RRID:SCR_019096). Statistical analysis was performed using two-tailed Unequal variance t test (Welch t test) to assess the significance of differences between two groups. The results are shown as mean values of experiments described above in each M&M section ± Standard error of the mean (SEM). Probability values $p \leq 0.05$ were considered as statistically significant (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$). All analyses were performed using Microsoft Excel 2013 (RRID:SCR_016137).

Results

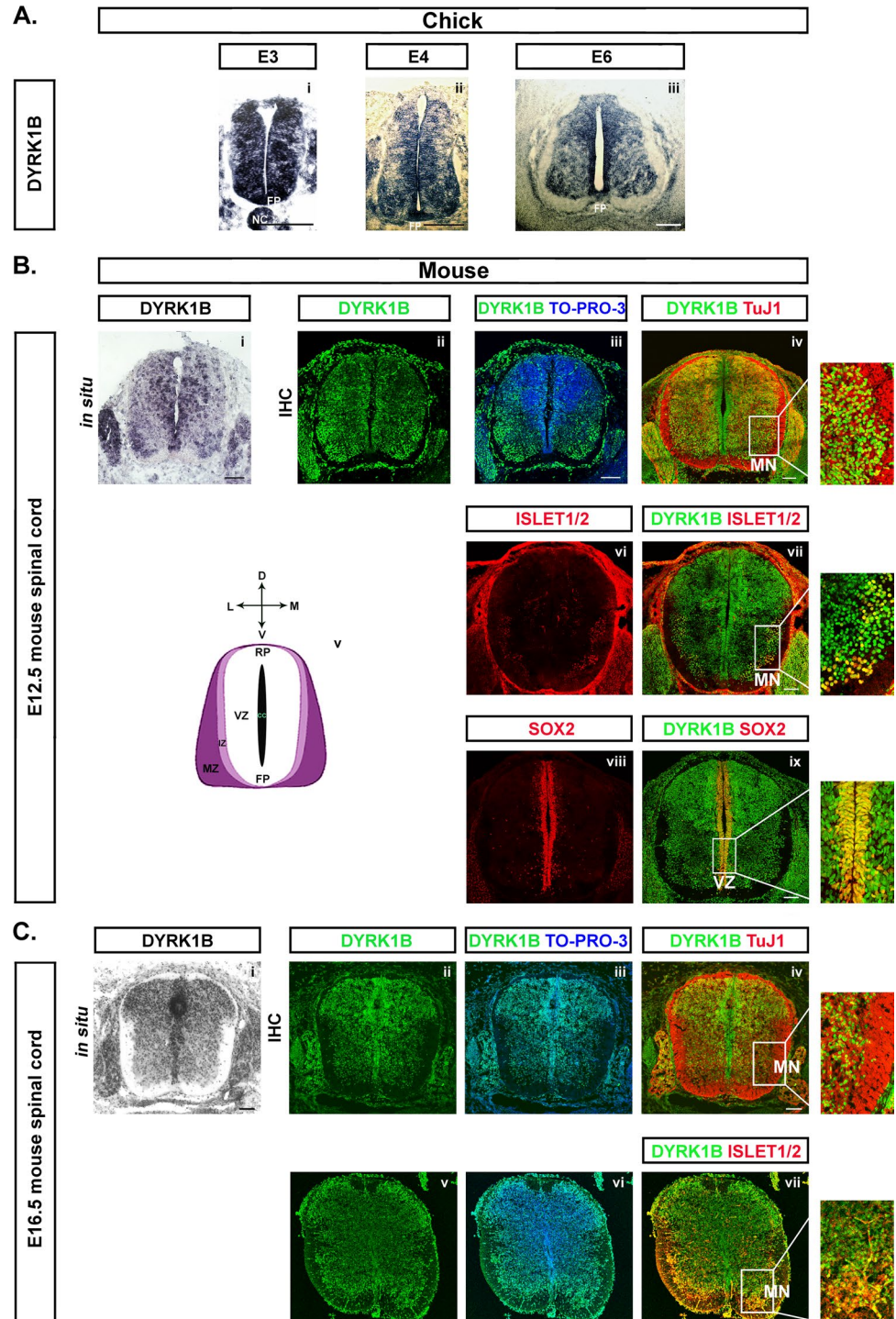
Dyrk1B is expressed in the notochord, floor plate, proliferating progenitors in the ventricular zone and post-mitotic motor neurons in chick and mouse spinal cord

To establish the time-course of Dyrk1B expression in the developing chick and mouse CNS we performed Western blot analysis, using a specific monoclonal anti-Dyrk1B antibody on chick and mouse brain and SC protein lysates derived from different developmental stages, as indicated (Fig. S2). Dyrk1B protein expression was evident at all stages, declining over time. To further investigate Dyrk1B gene expression, we proceeded to RNA in situ hybridization (ISH) and immunohistochemical (IHC) analysis in transverse sections of chick and mouse SC using a 253 bp riboprobe corresponding to the 3'-end of cDyrk1B coding region that displays 100% identity with the corresponding 3' region of mDyrk1B (Fig. S1). At early stages of chick spinal cord development (E3) Dyrk1B is ubiquitously expressed in neuroepithelial progenitors. At later

stages (E4 and E6) though its expression is more evident in the floor plate (FP) and mantle zone (MZ) where neurons reside, as well as in the ventricular zone (VZ), where *Dyrk1B* is expressed in cycling neural progenitors (Fig. 1A). In mouse SC, *Dyrk1B* gene expression was analyzed at E12.5 and E16.5, by ISH using a 396 bp riboprobe

corresponding to the 3'-end of m*Dyrk1B* coding region, and by IHC at E12.5 and E16.5 (Fig. 1B, C). Again, at E9.5 *Dyrk1B* displays a broad expression throughout the SC (Fig. S3), while at E12.5 and E16.5, *Dyrk1B* expression is mainly detected in the FP, cycling Sox2⁺ progenitors of the VZ, TuJ1⁺ postmitotic neurons and in Islet1/2⁺ MNs (Fig. 1B, C).

Fig. 1 *Dyrk1B* expression in chick and mouse spinal cord. **A** *Dyrk1B* mRNA is mainly expressed in embryonic chick spinal cord by notochord (NC), floor plate (FP), cycling progenitors in the ventricular zone (VZ) and by motor neurons (MNs) in the mantle zone (MZ), as revealed by in situ hybridization (ISH) on transverse brachial spinal cord sections. The abundant *Dyrk1B* mRNA expression observed at E3 (i) is gradually restricted to the VZ area adjacent to the central canal (CC) and in the MN domain at E4 and E6 (ii–iii). **B** Similar *Dyrk1B* expression is observed in E12.5 mouse spinal cord (corresponding to E4 of chick) both at the mRNA (i) and protein levels (ii, iii), where *Dyrk1B* is expressed by TuJ1⁺ post-mitotic neurons of MZ (iv) and by Islet1/2⁺ MNs (vi, vii), as well as by Sox2⁺ cycling progenitors in VZ (viii, ix). Spinal cord domains are depicted in the scheme left (v). **C** At E16.5 mouse spinal cord, *Dyrk1B* is abundantly expressed in the grey matter and the VZ (i–vii), both at mRNA (i) and protein levels (ii–iii), *Dyrk1B* co-expression is shown in TuJ1⁺ post-mitotic neurons (iv) and Islet1/2⁺ MNs (vii). Scale bars: 100 μ m. TO-PRO-3: nuclei staining



Dyrk1B overexpression promotes cell cycle exit and neuronal differentiation

To investigate the role of Dyrk1B in SC development, we applied unilateral *in ovo* electroporation at E2 chick SC in order to overexpress mDyrk1B, using the bicistronic expression vector pGAG-mDyrk1B-IRES-NLS-GFP (Dyrk1B/GFP embryos) or the control vector pGAG-IRES-NLS-GFP (GFP embryos), allowing both to use the GFP reporter gene as marker for transfected cells. 48 h after Dyrk1B/GFP electroporation, we confirmed a 3.0-fold increase in Dyrk1B mRNA and a 2.7-fold increase in protein levels (Fig. S4), respectively, by comparison to wild-type SC.

Since Dyrk1B has been previously shown to act as a G0-checkpoint kinase that promotes cell cycle exit [20] and terminal differentiation of proliferating myoblasts [21–23], immature male germ cells [24], and mouse neuroblastoma cells [42], we investigated the effect of mDyrk1B overexpression on the cell cycle. To detect cycling progenitors in S-phase, we performed a 2-h pulse with the thymidine analog 5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdU) before sacrifice of electroporated embryos, followed by IHC and confocal microscopy on transverse cryosections of SC at the brachial level. We observed a 2.22-fold \pm 0.20 reduction ($***p \leq 0.001$, $n = 18$ sections from 5 embryos) in the fraction of BrdU⁺/GFP⁺ cells over total GFP⁺ cells (relative index) in Dyrk1B/GFP embryos compared to control GFP embryos (Fig. 2A, B). Moreover, we noted a dramatic decrease by 10.16-fold \pm 0.98 ($***p \leq 0.001$, $n = 18$ sections from 5 embryos) in the relative index of phosphohistone H3 (PH3) mitotic cells (Fig. 2C, D), with a concomitant 1.53-fold \pm 0.16 ($**p \leq 0.01$, $n = 18$ sections from 4 embryos) decrease in the relative index of cells expressing the neural precursor marker Sox2 (Fig. 2E, F). Next we examined the effect of Dyrk1B overexpression in neuronal differentiation. We found that in Dyrk1B/GFP embryos the relative index of GFP⁺ cells co-expressing the early neuronal marker doublecortin (DCX) was increased by 1.39-fold \pm 0.13 ($*p \leq 0.05$, $n = 13$ sections from 4 embryos), as compared to GFP controls (Fig. 2G, H). Similarly, the index of the pan-neuronal marker β III-tubulin (TuJ1) cells was increased by 1.22-fold \pm 0.06 ($**p \leq 0.01$, $n = 24$ sections from 4 embryos), compared to GFP embryos (Fig. 2I, J). Thus, our data demonstrate that forced Dyrk1B expression promotes cell cycle exit and neuronal differentiation of proliferating precursors.

Dyrk1B overexpression promotes apoptosis specifically in the motor neuron domain and decreases the number of motor neurons and V2a interneurons

As Dyrk1B has been previously shown to have an anti-apoptotic role [20] in myogenesis [22] and cancer [29, 30, 32, 33], we investigated if it has a similar function

in the developing chick SC. Apoptosis of spinal MNs occurs during SC development at discrete developmental stages, along the rostrocaudal axis of the SC [68–70]. At E4 chick neural tube apoptosis occurs physiologically in the MN domain at the brachial level where the final number of MNs is stabilized at E15 [69]. To address if Dyrk1B overexpression has an effect on MN apoptosis, we compared the expression of activated Caspase-3 in the electroporated versus the non-electroporated side of SC in experimental and control embryos. First, we observed that in both groups, apoptosis was restricted in the MN domain in line with previous findings. Unexpectedly though, the percentage of Casp3⁺/Islet1/2⁺ cells over total nuclei was increased by 102.74% \pm 17.02 ($***p \leq 0.001$, $n = 12$ sections from 4 embryos) in the electroporated side of Dyrk1B/GFP embryos, compared to the contralateral side, while no significant differences were observed between the two sides of the SC in GFP embryos (Fig. 3A, B). Our data indicate that Dyrk1B overexpression promotes apoptosis in the MN domain, unlike the previously noted anti-apoptotic role of Dyrk1B, suggesting that Dyrk1B function on cell survival and apoptosis is tissue- and/or context-dependent.

To further investigate the effect of Dyrk1B on the MN domain, we compared bilaterally the Olig2⁺ MN progenitors in Dyrk1B/GFP and control GFP embryos. All quantifications in this and following sections were made by counting marker⁺ cells normalized over total nuclei and given as percentages. We estimated that the percentage of Olig2⁺ MN progenitors in the electroporated side of Dyrk1B/GFP embryos was reduced by 25.12% \pm 3.11 ($***p \leq 0.001$, $n = 17$ sections from 4 embryos) as compared to the non-electroporated side, while no significant differences were observed bilaterally in the SC of GFP embryos (Fig. 3C, D). In agreement, the percentage of MNs positive for the homeobox transcription factor Hb9, which is expressed in newborn and late postmitotic MNs [71] was reduced by 20.33% \pm 1.67 ($***p \leq 0.001$, $n = 17$ sections from 4 embryos) at the Dyrk1B/GFP electroporated side compared to the non-electroporated side, while no significant differences were observed between the two sides of control GFP embryos (Fig. 3E, F). Moreover, the percentage of Islet1/2⁺ postmitotic MNs was also reduced by 16.25% \pm 3.60 ($**p \leq 0.01$, $n = 15$ sections from 4 embryos) at the Dyrk1B/GFP electroporated side compared to the non-electroporated side, whereas no such differences were observed in GFP embryos (Fig. 3G, H). Markedly, the effect of forced Dyrk1B expression on the reduction of MN progenitors and MNs was most pronounced when Dyrk1B/GFP electroporation reached the most ventral parts of the SC, as revealed by the loss of Olig2⁺, Hb9⁺ and Islet1/2⁺ cells (see arrowheads in Fig. 3C, E, G).

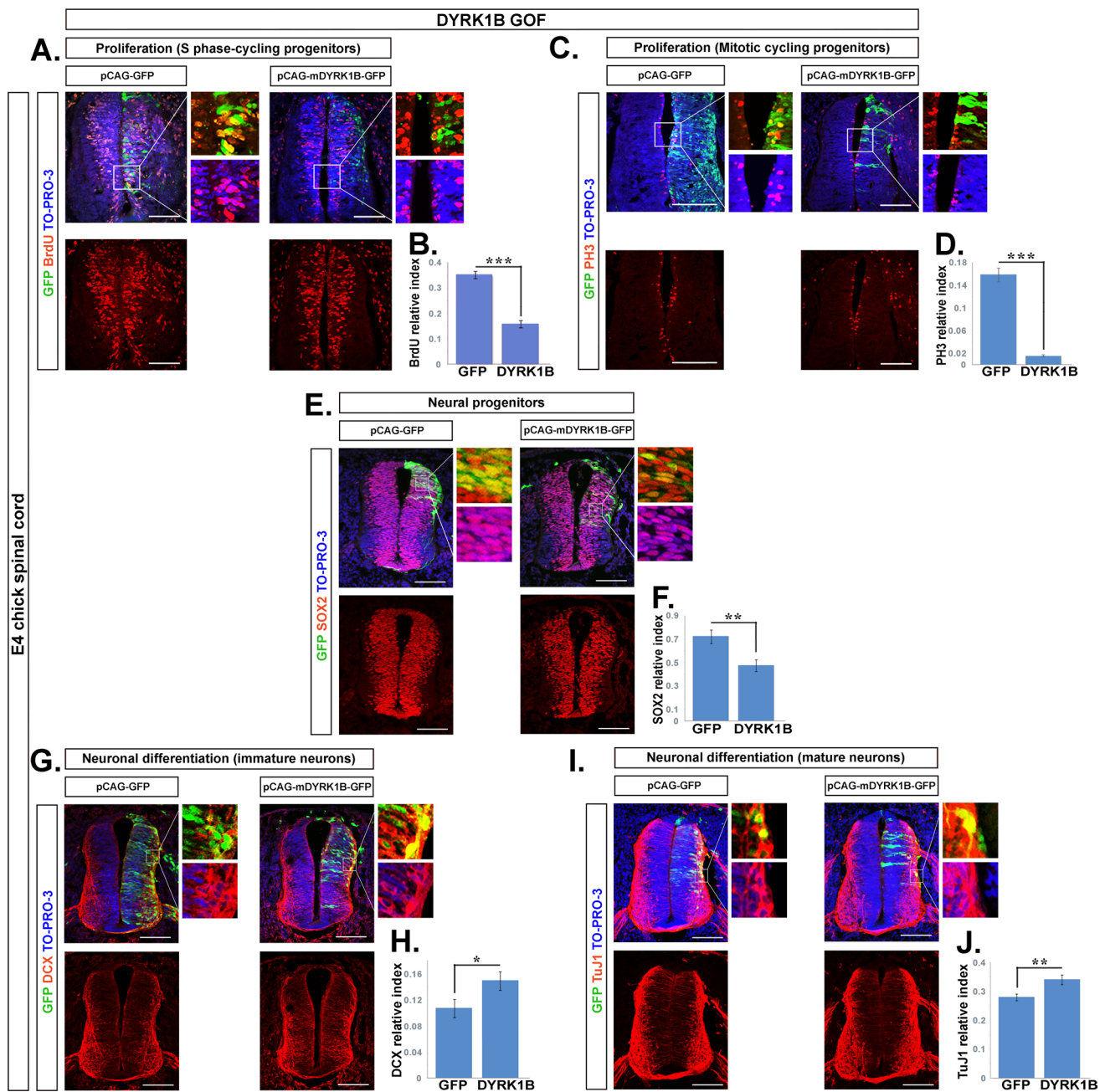


Fig. 2 Dyk1B overexpression at E2 promotes at E4 cell cycle exit and neuronal differentiation. **A, B** Dyk1B⁺/GFP⁺ electroporated cycling progenitors co-expressing the S-phase marker BrdU were significantly reduced by 2.22 ± 0.20 -fold ($p \leq 0.001$, $n = 18$ sections from 5 embryos), compared to control. **C, D** Similarly, the relative index of Dyk1B⁺/GFP⁺ cycling progenitors co-expressing the mitotic marker PH3 showed a dramatic decrease by 10.16 ± 0.98 -fold ($p \leq 0.001$, $n = 18$ sections from 5 embryos), compared to GFP⁺/PH3⁺ cells in control embryos. **E, F** Significant reduction by 1.53 -fold ± 0.16 ($p \leq 0.01$, $n = 18$ sections from 4 embryos) in the relative index of cells expressing the pluripotency marker Sox2, compared to control embryos. **G, H** The relative index of electroporated Dyk1B⁺

GFP⁺ cells co-expressing Doublecortin (DCX) is increased by 1.39 -fold ± 0.13 ($p \leq 0.05$, $n = 13$ sections from 4 embryos) compared to GFP-electroporated embryos. **I, J** The relative index of electroporated Dyk1B⁺/GFP⁺ cells co-expressing β III-tubulin (TuJ1) is increased by 1.22 -fold ± 0.06 ($p \leq 0.01$, $n = 24$ sections from 4 embryos) compared to GFP⁺ cells in control embryos. Analysis was performed by calculation of the relative index corresponding to the ratio of the number of double positive cells GFP⁺/specific marker⁺ to total GFP⁺ cells. Scale bars: 100 μ m. TO-PRO-3: nuclei staining. Data are mean \pm SEM, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; ns, non-significant (two-tailed Unequal variance t test). Spinal cord sections correspond to the brachial level

An additional ventral phenotype was associated with the number of V2a interneurons (INs) expressing the transcription factor Chx10. On the Dyrk1B/GFP electroporated side, the percentage of Chx10⁺ interneurons was reduced by $39.33\% \pm 3.85$ (**p ≤ 0.001, n = 20 sections from 4 embryos) compared to the non-electroporated side, while no significant differences were observed in GFP embryos (Fig. 3I, J). Our data suggest that Dyrk1B overexpression promotes apoptosis in the MN domain and decreases the numbers of pMNs, MNs, and V2a interneurons.

Dyrk1B overexpression affects the ventral patterning of embryonic chick spinal cord

Next we addressed if Dyrk1B affects SC dorsoventral patterning by examining the expression of the paired-box transcription factor Pax3, which is expressed in dorsal progenitors, along with the expression of the homeodomain transcription factor Nkx6.1, which marks ventral progenitors and belongs to Class II transcription factors induced by Shh [71, 72]. We found that the percentage of Pax3⁺ cells was not affected in the Dyrk1B/GFP-electroporated side of E4 embryos when compared to the contralateral side (Fig. 4A, B). At the same time, the percentage of Nkx6.1⁺ cells was reduced by $12.18\% \pm 2.10$ (**p ≤ 0.001, n = 20 sections from 4 embryos), (Fig. 4C, D), while no significant differences were observed bilaterally in control GFP embryos. To further verify that dorsal patterning is not affected by Dyrk1B, we estimated the percentage of dI3 Islet1⁺ post-mitotic neurons (indicated by an asterisk in Fig. 3A) derived from pd3 progenitors dorsally, and found that they were not different when compared to the contralateral side (Fig. S5). Taken together, our data indicate that Dyrk1B overexpression does not affect dorsal patterning while it influences ventral SC patterning.

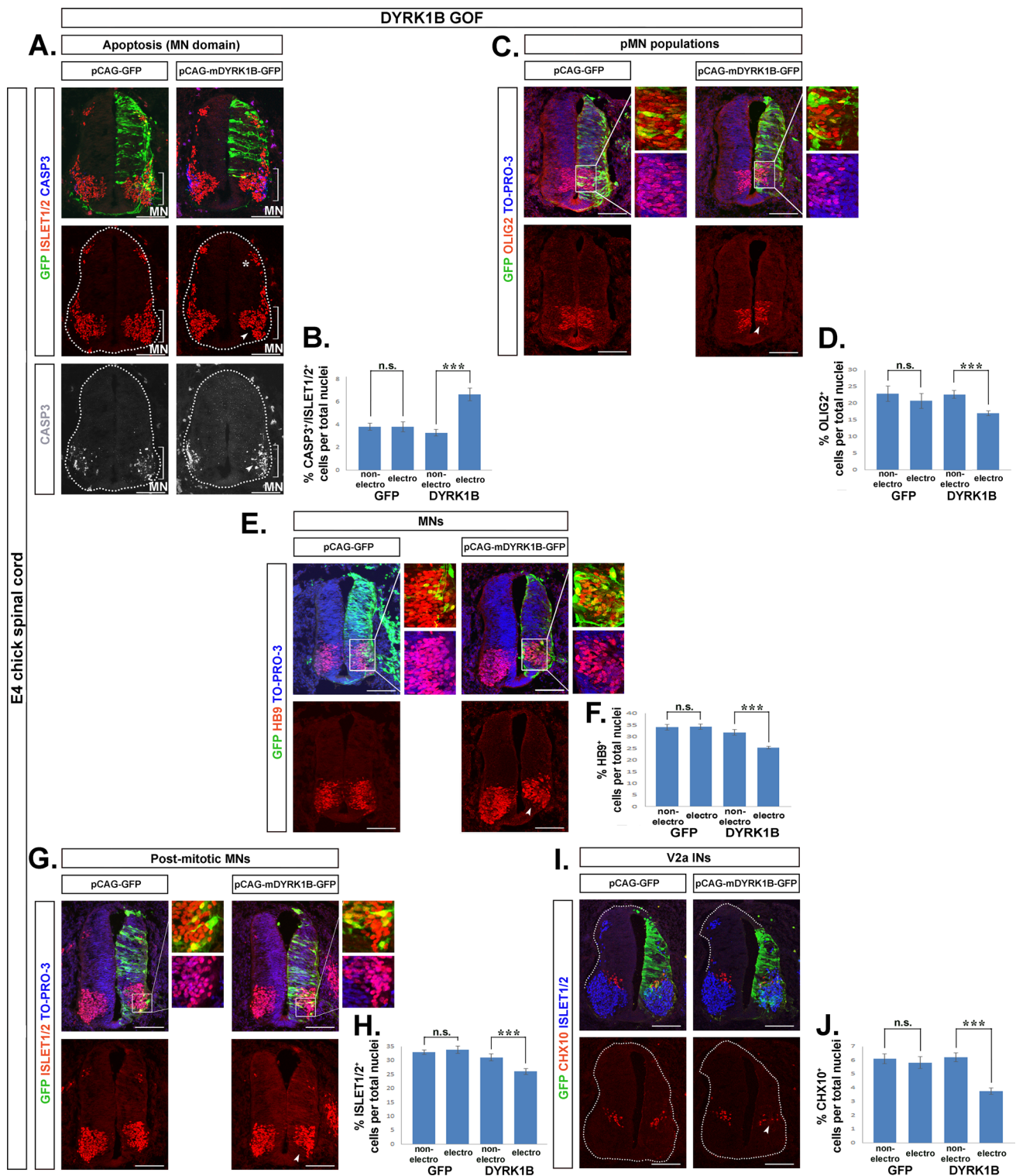
AZ191 increases the proliferation of ventral progenitors resulting in increased number of motor neurons

To confirm Dyrk1B function in SC development, we performed *loss-of-function experiments* by applying pharmacological inhibition of the endogenous Dyrk1B kinase activity using AZ191, a potent small molecule inhibitor that selectively inhibits Dyrk1B [73, 74]. Chick embryos were injected with AZ191 at E2 and 48 h later the effect of pharmacological inhibition of endogenous Dyrk1B was analyzed by comparing AZ191-treated to control DMSO-treated embryos (vehicle). First, we investigated the effect of AZ191 on cellular proliferation by assessing the total number of BrdU⁺ cells following a 2-h BrdU pulse. The percentage of BrdU⁺ cells in AZ191-treated embryos was

increased by $57.51\% \pm 3.05$ (**p ≤ 0.001, n = 22 sections from 4 embryos), compared to DMSO-treated embryos (Fig. 5A, B). In accordance, the percentage of PH3⁺ cells was also increased by 48.32 ± 10.69 (**p ≤ 0.01, n = 12 sections from 4 embryos) (Fig. 6A, B). Notably, no differences were observed in BrdU⁺ (data not shown) and PH3⁺ cells (Fig. 6A, B), between DMSO-treated and wild-type (wt) chick embryos. Next, we investigated the effect of AZ191 on ventral progenitors p2, pMN and p3. In AZ191-treated embryos the percentages of p2 (Nkx6.1⁺/Olig2⁻), pMN (Nkx6.1⁺/Olig2⁺) and p3 (Nkx6.1⁺/Olig2⁻) progenitors were increased by $32.57\% \pm 9.86\%$ (**p ≤ 0.01, n = 23 sections from 4 embryos), $31.90\% \pm 4.89$ (**p ≤ 0.001, n = 23 sections from 4 embryos) and by 61.25 ± 23.75 (*p ≤ 0.05, n = 23 sections from 4 embryos) respectively, compared to DMSO-treated embryos (Fig. S6). Furthermore, we investigated the effect of AZ191 on the MN domain. In AZ191-treated embryos the percentage of Islet1/2⁺ MNs over total nuclei was increased by $33.12\% \pm 6.86$ (**p ≤ 0.001, n = 14 sections from 4 embryos) (Fig. 7A, B) and the percentage of Hb9⁺ early and late MNs was increased by $41.26\% \pm 4.07$ (**p ≤ 0.001, n = 17 sections from 4 embryos) (Fig. 5C, D), when compared to DMSO-treated embryos. In all cases DMSO-treated embryos showed no differences when compared with wt embryos. Our data suggest that inhibition of endogenous Dyrk1B increases the proliferation of neuronal progenitors, which in the ventral spinal cord results in increased numbers of p2, pMN, p3 progenitors and MNs (Hb9⁺ and Islet1/2⁺ cells).

Dyrk1B overexpression reverses the phenotype of AZ191 in the embryonic chick spinal cord

To confirm the specificity of AZ191 inhibitor for Dyrk1B kinase activity, we performed *mechanistic phenotype rescue* experiments. To this end, E2 chick embryos were subjected to *unilateral in ovo* Dyrk1B/GFP electroporation followed 2 h later by AZ191 injection, and were compared to embryos treated with DMSO-vehicle or AZ191 only. Notably, the increase in PH3⁺ cells observed in the presence of AZ191, was rescued by concurrent electroporation of Dyrk1B/GFP (Fig. 6). In particular, no significant differences in PH3⁺ cells were observed between wild-type or vehicle-treated embryos, while in AZ191-treated embryos the percentage of PH3⁺ cells was increased by 48.32 ± 10.69 (**p ≤ 0.01, n = 12 sections from 4 embryos), as previously discussed. This effect was restored by Dyrk1B/GFP electroporation (Fig. 6B). Similarly, the AZ191-mediated increase in the percentage of Islet1/2⁺ MNs by $33.12\% \pm 6.86$ (**p ≤ 0.001, n = 14 sections from 4 embryos), was also restored upon Dyrk1B/GFP electroporation (Fig. 7B). Notably, no significant differences were observed in the percentage of Islet1/2⁺



post-mitotic MNs between wild-type or vehicle-treated embryos.

Dyrk1B kinase is a suppressor of Sonic Hedgehog signaling in the embryonic chick spinal cord

Shh produced initially by the notochord (NC) and later by medial (MFP) and lateral floor plate (LFP), forms a gradient [3, 6–10] that patterns the ventral neural tube into

Fig. 3 Dyrk1B overexpression promotes apoptosis in the motor neuron domain and decreases the number of pMNs, motor neurons and V2a interneurons. **A, B** The ratio of Casp3⁺/Islet1/2⁺ cells over total nuclei in the MN domain (arrowheads) is increased by 102.74% ± 17.02 ($p \leq 0.001$, $n = 12$ sections from 4 embryos) in the Dyrk1B/GFP electroporated side of the SC when compared with the contralateral non-electroporated side. The asterisk points to dorsal dI3 Islet1/2⁺ post-mitotic neurons derived from pd3 progenitors that show no differences upon Dyrk1B overexpression. **C, D** Dyrk1B overexpression results in decreased Olig2⁺ MN progenitors (arrowhead) by 25.12% ± 3.11 ($p \leq 0.001$, $n = 17$ sections from 4 embryos), compared to the contralateral non-electroporated SC side in Dyrk1B/GFP embryos. **E, F** Similarly, Dyrk1B overexpression results in decreased number of HB9⁺ MNs (arrowhead) by 20.33% ± 1.67 ($p \leq 0.001$, $n = 17$ sections from 4 embryos), and in **(G, H)**, decreased number of Islet1/2⁺ MNs (arrowhead) by 16.25% ± 3.60 ($p \leq 0.01$, $n = 15$ sections from 4 embryos), as well as in **(I, J)**, decreased number of Chx10⁺ V2a interneurons (INs) (arrowhead) by 39.33% ± 3.85 ($p \leq 0.001$, $n = 20$ sections from 4 embryos). No differences between the two sides were observed in control GFP-electroporated embryos in all cases. Cell numbers are normalized to total cell nuclei. Scale bars: 100 μm. TO-PRO-3: nuclei staining. Data are mean ± SEM, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; ns, non-significant (two-tailed Unequal variance t test). Spinal cord sections correspond to the brachial level

distinct progenitor domains, by controlling the expression of specific homeodomain and basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors [2, 3, 5, 6, 71, 72].

A close regulatory link between Dyrk1B kinase and Shh/Gli signaling has been previously demonstrated in cancer [44, 50–53]. Thus, we speculated the involvement of Dyrk1B in Shh/Gli signaling given that Dyrk1B overexpression has a pronounced effect in ventral SC. To test our hypothesis, we performed real-time qRT-PCR analysis to estimate Shh, Gli2 and Gli3 mRNA levels upon forced expression of Dyrk1B and observed a significant downregulation of Shh mRNA expression levels by 2.86-fold ± 0.99 (* $p \leq 0.05$, $n = 3$ independent experiments), of Gli2 mRNA levels by 5.28-fold ± 0.31 (*** $p \leq 0.001$, $n = 3$ independent experiments) and of Gli3 mRNA levels by 4.76-fold ± 0.61 (* $p \leq 0.05$, $n = 3$ independent experiments), as compared to GFP embryos (Fig. 8A). Furthermore, we performed ISH for detecting Shh mRNA expression in wild-type and Dyrk1B/GFP embryos. In agreement with the real-time qRT-PCR results, the expression of Shh mRNA in the FP was reduced at the Dyrk1B/GFP-electroporated side when compared with the contralateral side and with wild-type SC (Fig. 8B). On the other hand, in AZ191-treated embryos, Shh, Gli2 and Gli3 mRNA levels were increased by 1.52-fold ± 0.06 (* $p \leq 0.05$, $n = 3$ independent experiments), by 3.54-fold ± 0.47 (* $p \leq 0.05$, $n = 3$ independent experiments) and by 4.85-fold ± 0.25 (** $p \leq 0.01$, $n = 3$ independent experiments) respectively, when compared to wild-type (Fig. 8C), as estimated by qRT-PCR. The increase in Shh mRNA levels

was furthermore confirmed by ISH (Fig. 8D). This data suggests interception of Dyrk1B and Shh/Gli signaling pathways.

Administration of SAG rescues the ventral phenotype of Dyrk1B overexpression

To further investigate the interference of Dyrk1B in Shh/Gli signaling, we proceeded to activate the Shh pathway at the level of Smoothed, which induces downstream Gli transcriptional effectors (Fig. 8F). For this purpose, 1 μg of Smoothed agonist (SAG) was administered at E2 embryos, and its effect was examined on Shh signaling at E4. We observed a transcriptional positive feedback loop in Shh, Gli2 and Gli3 mRNA expression, induced by Smoothed activation with SAG, which resulted in increased Shh, Gli2 and Gli3 mRNA levels by 3.54-fold ± 0.11 (** $p \leq 0.01$, $n = 3$ independent experiments), by 2.92-fold ± 0.41 (* $p \leq 0.05$, $n = 3$ independent experiments) and by 6.30-fold ± 0.12 (*** $p \leq 0.001$, $n = 3$ independent experiments), respectively, as determined by qRT-PCR (Fig. 8C). Moreover, by performing ISH, we confirmed the increased Shh mRNA expression in the FP of SAG-treated embryos (Fig. 8E). As before with mRNA levels, we also observed a similar trend by Western blot, showing that Dyrk1B overexpression or loss of function, as well as SAG treatment, affect the ratio of activator to repressor Gli3 (Gli3A/Gli3R) protein forms and the expression of the early responding proximal targets of Shh signaling, FoxA2 and Nkx2.2, while in *phenotype rescue* experiments these proteins seem to be restored to control levels (Fig.S7). Next we tested whether activation of SMO by SAG could rescue the phenotype in Dyrk1B/GFP embryos. For this purpose, 1 μg SAG was administered at E2 chick embryos 2 h after unilateral *in ovo* electroporation with Dyrk1B/GFP or GFP expression plasmids. Then, we analyzed at E4 the effect of SAG administration either alone or together with Dyrk1B/GFP electroporation. GFP and wild-type embryos served as additional controls. Since Shh is a master regulator of ventral SC patterning, we examined the number of p3, pMN and p2 progenitors characterizing distinct ventral domains (Fig. 9A). We distinguished their boundaries using double immunostaining for Nkx6.1 and Olig2 transcription factors. Nkx6.1 is expressed by p3, pMN and p2 domains, while Olig2 expression marks only the pMN domain (Fig. 9Ai–vi). In all cases examined, we attested that SAG reversed the phenotype induced by forced Dyrk1B expression.

In particular, the percentage of p2 progenitors over total nuclei was decreased by 25.88% ± 6.87 (* $p \leq 0.05$, $n = 15$ sections from 4 embryos) in Dyrk1B/GFP embryos and, conversely, was increased by 148.24% ± 43.93 (** $p \leq 0.01$, $n = 15$ sections from 4 embryos) in SAG only-treated embryos, compared to wild-type embryos (Fig. 9B). In

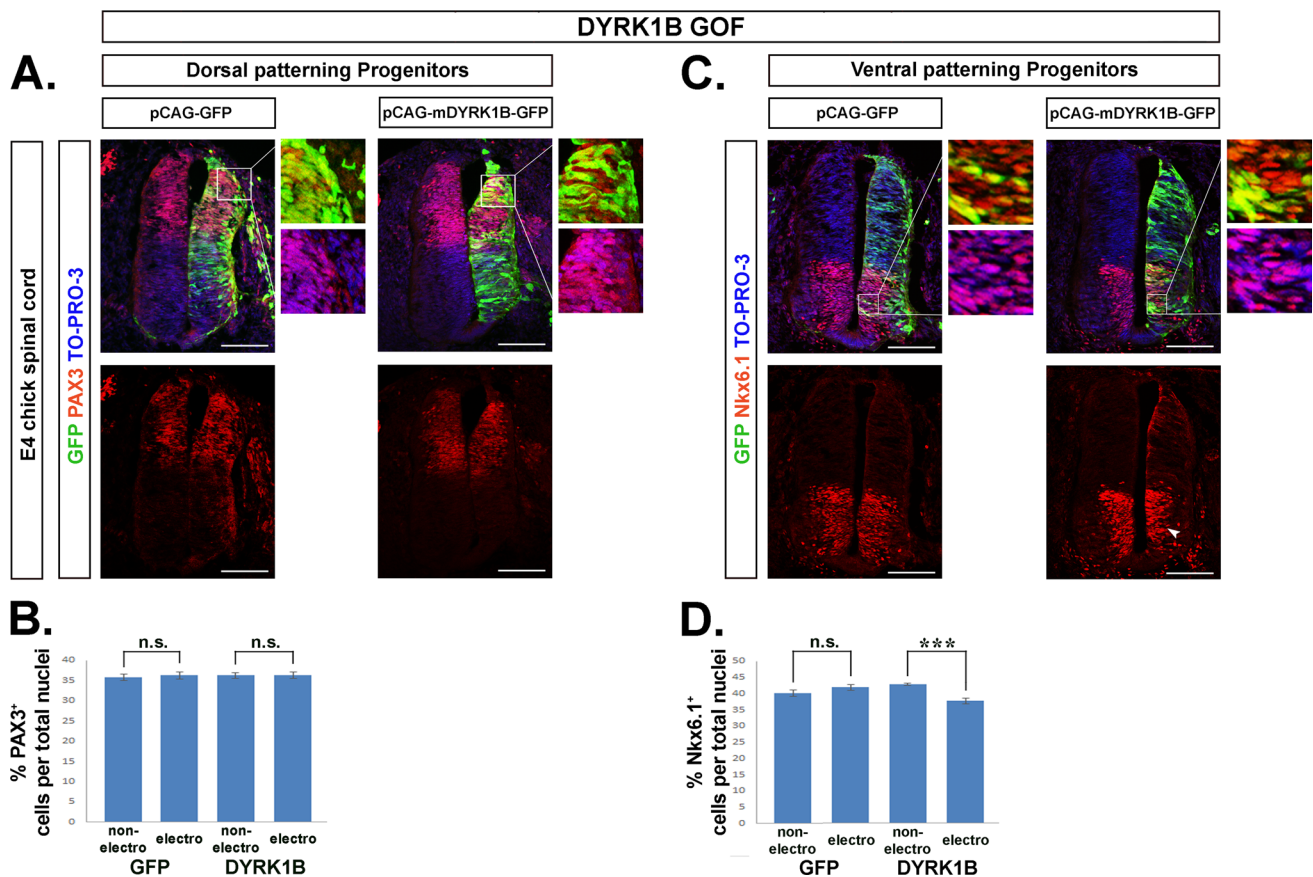


Fig. 4 Dyrk1B overexpression affects the ventral patterning of embryonic chick spinal cord. **A, B** Dyrk1B overexpression does not affect dorsal patterning of spinal cord, as Pax3⁺ cells dorsally are not affected in the electroporated side of Dyrk1B/GFP embryos ($p > 0.05$, $n = 20$ sections from 4 embryos) when their number compared to the contralateral side. **C, D** In contrast, Dyrk1B overexpression reduces the number of Nkx6.1⁺ cells ventrally (arrowhead) by $12.18\% \pm 2.10$

($p \leq 0.001$, $n = 20$ sections from 4 embryos) as compared to the non-electroporated contralateral SC side, while no differences are observed between the two sides in control GFP embryos. Cell numbers are normalized to total cell nuclei. Scale bars: 100 μm . TO-PRO-3: nuclei staining. Data are mean \pm SEM, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; ns, non-significant (two-tailed Unequal variance t test). Spinal cord sections correspond to the brachial level

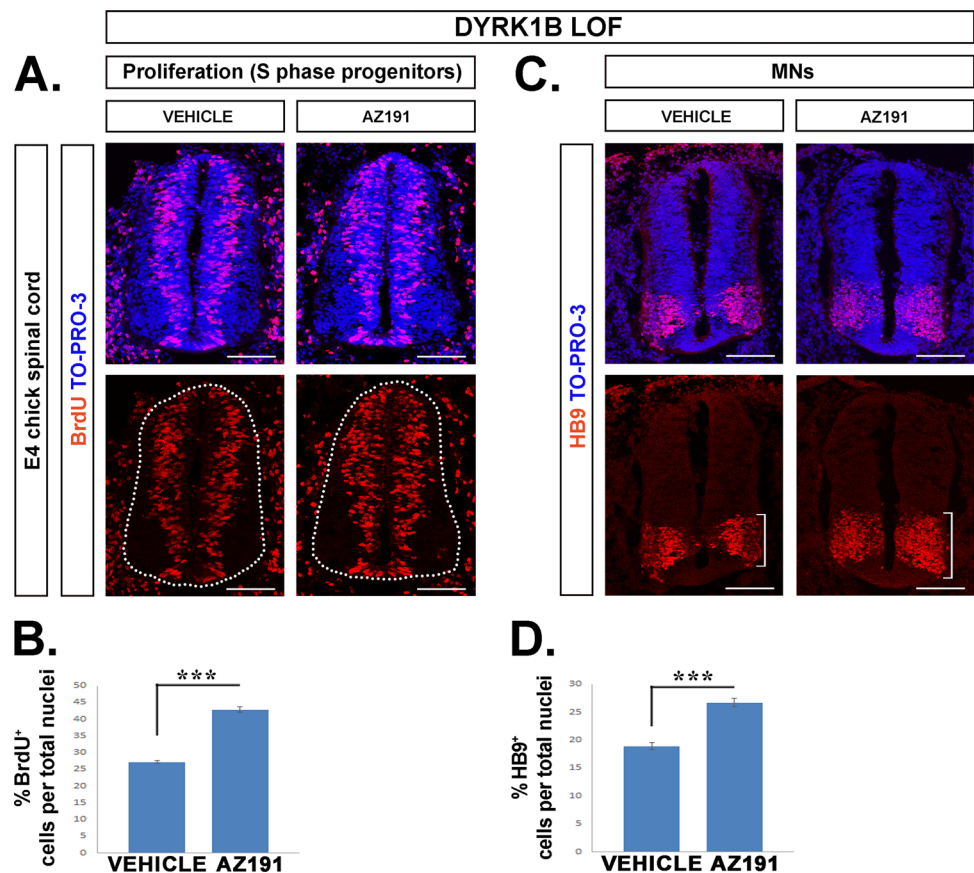
phenotype rescue experiments, in which Dyrk1B/GFP electroporation was followed by SAG, SAG was sufficient to restore the p2 population to wt levels (Fig. 9B). Notably, in control GFP embryos the p2 progenitor population was as in wt, while in GFP embryos that were treated with SAG, the percentage of p2 progenitors was increased by $151.76\% \pm 40.89$ (** $p \leq 0.01$, $n = 15$ sections from 4 embryos), similarly to wt (Fig. 9B).

Likewise, the percentage of p3 progenitors that was decreased by $41.39\% \pm 7.50$ (** $p \leq 0.001$, $n = 15$ sections from 4 embryos) in Dyrk1B/GFP embryos, was restored at wt levels after administration of SAG (Fig. 9D). At the same time, in SAG only-treated embryos p3 progenitors were increased dramatically by $253.89\% \pm 84.17$ (** $p \leq 0.01$, $n = 15$ sections from 4 embryos) (Fig. 9D). Additionally, in control GFP embryos, the p3 population was similar to wild-type, while in GFP embryos that were

treated with SAG, the percentage of p3 progenitors was increased by 232.78 ± 73.33 (** $p \leq 0.01$, $n = 15$ sections from 4 embryos) (Fig. 9D).

Finally, the percentage of pMN progenitors that was decreased by $30.47\% \pm 6.07$ (** $p \leq 0.001$, $n = 15$ sections from 4 embryos) in Dyrk1B/GFP embryos, was increased by SAG treatment even further than wt levels, by $73.79\% \pm 26.17$ relatively to wt (* $p \leq 0.05$, $n = 15$ sections from 4 embryos). In addition, the percentage of pMN progenitors was increased by $100.93\% \pm 13.46$ (** $p \leq 0.001$, $n = 15$ sections from 4 embryos) relatively to wt in SAG only-treated embryos (Fig. 9C). Notably, in control GFP embryos the pMN population was similar to wild-type, while in GFP embryos treated with SAG, the normalized number of pMN progenitors was increased to similar levels as with SAG alone, by $102.20\% \pm 13.50$ (** $p \leq 0.001$, $n = 15$ sections from 4 embryos) (Fig. 9C).

Fig. 5 AZ191 increases the number of cycling progenitors resulting in increased motor neurons. **A, B** Inhibition of endogenous Dyrk1B kinase activity by administration of AZ191 inhibitor in the E2 spinal cord, results in increased number of BrdU⁺ cycling progenitors by $57.51\% \pm 3.05$ ($p \leq 0.001$, $n = 22$ sections from 4 embryos) as well as in **C, D** increased number of HB9⁺ post-mitotic MNs by $41.26\% \pm 4.07$ ($p \leq 0.001$, $n = 17$ sections from 4 embryos), when compared to control embryos treated with vehicle (DMSO) only. Cell numbers are normalized to total cell nuclei. Scale bars: 100 μ m. TO-PRO-3: nuclei staining. Data are mean \pm SEM, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; ns, non-significant (two-tailed Unequal variance t test). Spinal cord sections correspond to the brachial level



Thus, our data demonstrate that activation of the Shh pathway restores the phenotype of Dyrk1B overexpression.

Dyrk1B affects the size of LMCm via Sonic hedgehog signaling

Spinal MNs are organized into four motor columns extending along the rostrocaudal axis of SC, the median (MMC), lateral (LMC), hypaxial (HMC), and preganglionic motor columns (PGC). LMC MNs subdivide at the brachial and lumbar levels of SC into medial LMC (LMCm) and lateral LMC (LMCl) columns that innervate the muscle limbs ventrally and dorsally, respectively [70, 75–80] (Fig. 10A). Having demonstrated that Dyrk1B overexpression promotes the reduction of Olig2⁺ pMNs as well as of Hb9⁺ and Islet1/2⁺ MNs, we asked whether the forced expression of Dyrk1B has an effect on the columnar organization of MNs at a later developmental stage when motor columns have been formed. To this end, we performed immunostainings at E6 SC cryosections corresponding to the brachial level, for transcription factors characterizing each motor column. Surprisingly, we observed that the loss of MNs at E4, was selectively reflected in LMCm (Foxp1⁺/Islet1⁺) MNs, which were reduced by $32.05\% \pm 7.48\%$ (* $p \leq 0.05$, $n = 23$ sections from 4 embryos), (Fig. 10Bvi, xii, Fig. 10C). In contrast,

LMCl (Foxp1⁺/Hb9⁺) MNs (Fig. 10Biv, x, C) and MMC (Lim3⁺/Hb9⁺) MNs (Fig. 10Bii, viii, C) were not affected by Dyrk1B overexpression (Fig. 10C). All cell numbers are normalized to total cell nuclei.

Conversely, AZ191 administration resulted in the opposite phenotype with increased percentage of LMCm MNs by $113.49\% \pm 15.49$ (** $p \leq 0.001$, $n = 19$ sections from 4 embryos) (Fig. 10D, E), compared to wild-type embryos. Interestingly, activation of the Shh pathway using SAG, phenocopied the effect of AZ191 and increased the percentage of LMCm MNs by $101.43\% \pm 22.04$ (** $p \leq 0.001$, $n = 19$ sections from 4 embryos) (Fig. 10F, G). Neither AZ191 (Fig. S8A, S8B) nor SAG (Fig. S8C, S8D) had any effect on LMCl and MMC MNs. Together, our data suggest that Dyrk1B is critical for the control of ventral progenitors by regulating Shh, Gli2 and Gli3 transcriptional levels thereby affecting the generation of MNs, and appears also vital for LMCm MN subtype specification, presumably via the same pathway.

Indeed, Shh is expressed by MNs at brachial and lumbar levels when motor columnar identities are established and is required for proper LMC formation [81]. Therefore, we investigated Dyrk1B and Shh mRNA expression by ISH in transverse cryosections from the brachial level of E6 chick and E14.5 mouse SC. This showed that Shh mRNA is

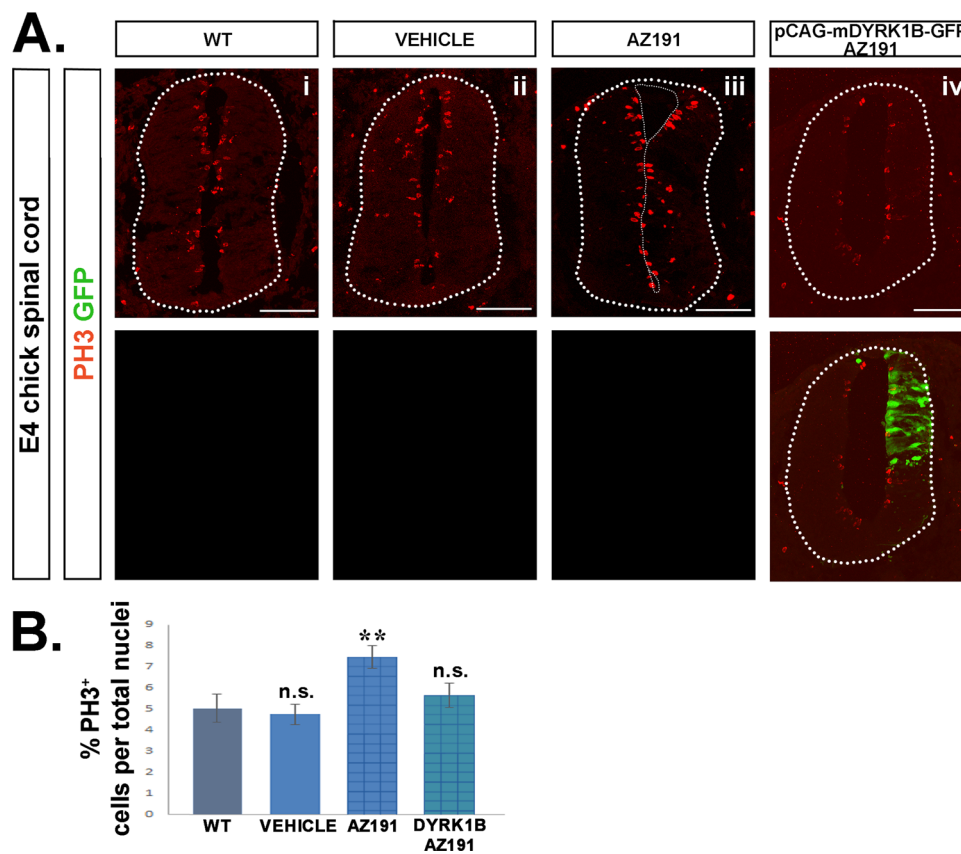


Fig. 6 Dyrk1B electroporation reverses the phenotype of AZ191 inhibitor in cellular proliferation. **A** In *mechanistic phenotype rescue* experiments, AZ191 inhibitor was administered at E2 chick embryos 2 h after unilateral *in ovo* Dyrk1B/GFP electroporation, and the number of PH3⁺ mitotic progenitors located in the ventricular zone (VZ) was measured and compared to PH3⁺ progenitors in wild-type. Similarly, vehicle-only or AZ191-only treated embryos were analyzed and compared to wild-type. **B** Quantification shows that the increase in the number of PH3⁺ cells by $48.32\% \pm 10.69$ ($p \leq 0.01$,

$n=12$ sections from 4 embryos) observed in the presence of AZ191 (Aiii), is reversed to wild-type levels (Ai) by concurrent electroporation of Dyrk1B/GFP plasmid (Aiv). Notably, PH3⁺ cells in DMSO-treated embryos (vehicle) (Aii) display non-significant differences as compared to wild-type (Ai). Cell numbers are normalized to total cell nuclei. Scale bars: 100 μm . Data are mean \pm SEM, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; ns, non-significant (two-tailed Unequal variance t-test). Spinal cord sections correspond to the brachial level

co-expressed with Dyrk1B in FP and LMCm MNs (Fig. 11). Thus, the selective effect of Dyrk1B in LMCm motor column, could be explained by its repressive action on endogenous Shh expression in LMCm MNs.

Discussion

In this study we revealed a novel role for Mirk/Dyrk1B kinase in SC development, by applying *in ovo gain-and-loss-of-function* and *phenotype rescue* experiments in the chick embryo. We found that Dyrk1B is expressed by NC, FP, proliferating progenitors in VZ and by post-mitotic neurons, including MNs. We showed that ectopic overexpression of Dyrk1B promotes cell cycle exit and neuronal differentiation. These observations are in accordance with Dyrk1B main known function, as a negative

cell cycle regulator [16, 20, 44, 45] during myogenesis [21–23], spermatogenesis [24], in mouse neuroblastoma cells [42] and cancer [29–31, 38]. Dyrk1B acts on the cell cycle by phosphorylating cyclin D1 [40, 42–45] and p27^{Kip1} [39], leading to their degradation and stability, respectively, and by activating together with Dyrk1A, the DREAM complex, which is essential for maintaining the quiescent state [82–84]. Our data in this study are also in accordance with our previous findings, concerning Dyrk1B function in neural cells [42–44]. Specifically, we have demonstrated that Dyrk1B overexpression in mouse neuroblastoma cells promotes cell cycle exit and neuronal differentiation by phosphorylating cyclin D1, followed by its cytoplasmic relocation and subsequent degradation by the 26S proteasome. This negative effect on cell cycle progression is reversed by Dyrk1B interacting partner, the scaffolding protein RanBPM [42].

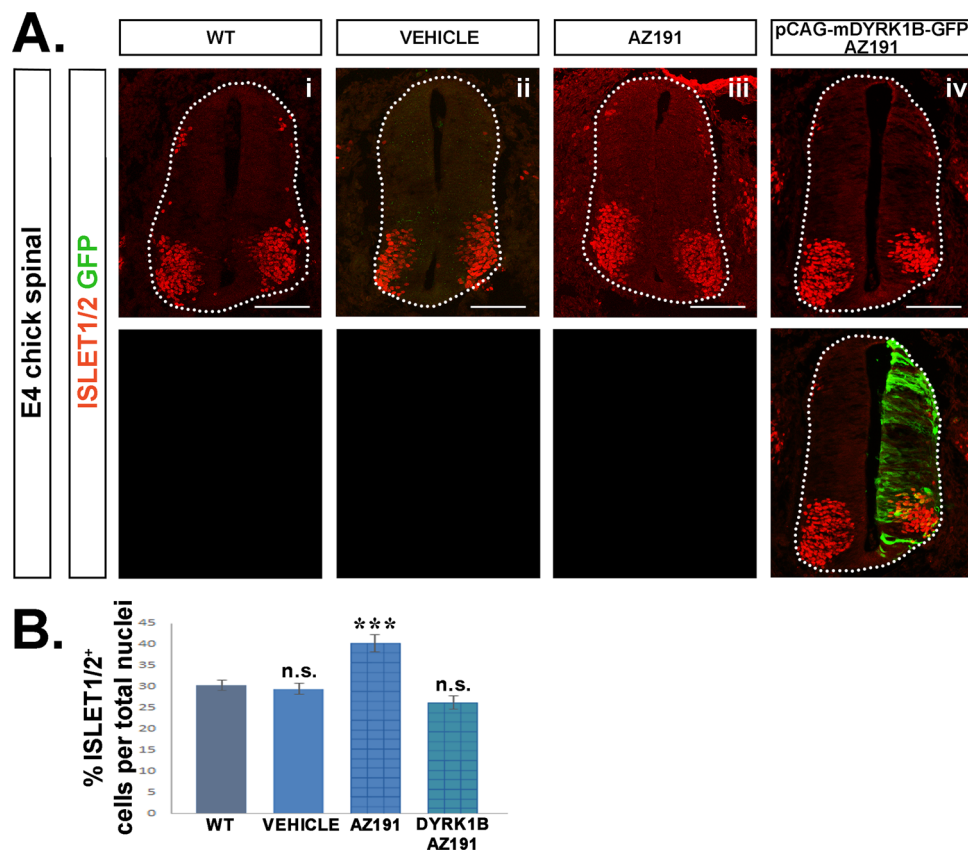


Fig. 7 Dyrk1B overexpression reverses the phenotype of AZ191 in motor neurons. **A** In mechanistic phenotype rescue experiments, AZ191 inhibitor was administered at E2 chick embryos 2 h after unilateral *in ovo* Dyrk1B/GFP electroporation, and the number of Islet1/2⁺ MNs was measured and compared to Islet1/2⁺ MNs in wild-type. **B** The increased number of Islet1/2⁺ MNs by 33.12 ± 6.86 ($p \leq 0.001$, $n = 14$ sections from 4 embryos), observed in the presence

of AZ191 (Aiii), was completely rescued by Dyrk1B electroporation (Aiv). Notably, Islet1/2⁺ MNs in DMSO-treated embryos (vehicle) (Aii) display non-significant differences as compared to wild-type (Ai). Cell numbers are normalized to total cell nuclei. Scale bars: 100 μ m. Data are mean \pm SEM, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; ns, non-significant (two-tailed Unequal variance t-test). Spinal cord sections correspond to the brachial level

Of interest, our present study reveals novel findings indicating that Dyrk1B overexpression in embryonic chick SC promotes apoptosis specifically in the MN domain. Increased apoptosis in the MN domain combined with premature cell cycle exit, resulted in decreased number of p2, pMN and p3 ventral progenitors and consequently reduced post-mitotic INs and MNs, respectively. Conversely, inhibition of endogenous Dyrk1B activity, by AZ191 selective inhibitor, resulted in increased proliferation and increased p2, pMN, and p3 progenitors as well as increased Hb9⁺ and Islet1/2⁺ MNs and at a later stage increased LMCm MNs. Although previous studies in myogenesis [22] and cancer [29, 30, 32, 33] have reported an anti-apoptotic role for Dyrk1B, here we observed that Dyrk1B overexpression increases the naturally occurring apoptosis during SC development in the MN domain, suggesting that Dyrk1B function in cell survival is tissue- and/or context-dependent. In addition, Dyrk1B-induced apoptosis in the MN domain, as well as its powerful ventral

phenotype, indicated that it may be related to compromised Shh signaling, as Shh is crucial for cell survival of ventral progenitors and MNs [7–11]. Moreover, we have demonstrated that Dyrk1B overexpression decreases the number of Nkx6.1⁺ cells ventrally, while it does not affect the number of Pax3⁺ progenitor cells, or the number of dl3 Islet1⁺ neurons dorsally. This robust ventral phenotype of Dyrk1B further supports its interference with Shh/Gli signaling.

Indeed, here we provide evidence that Dyrk1B overexpression inhibits Shh signaling, by decreasing Shh, Gli2 and Gli3 mRNA levels. Consistently, we also showed that the pharmacological inhibition of endogenous Dyrk1B, by AZ191 resulted in increased transcription of the Shh, Gli2 and Gli3 genes. Shh signaling is mediated by overlapping but distinct functions of Gli transcription factors. Gli2 and Gli3 are proteolytically processed in the absence of Shh, acting as transcriptional repressors, while Gli1 is not, acting only as transcriptional activator [85–87]. In the ventral

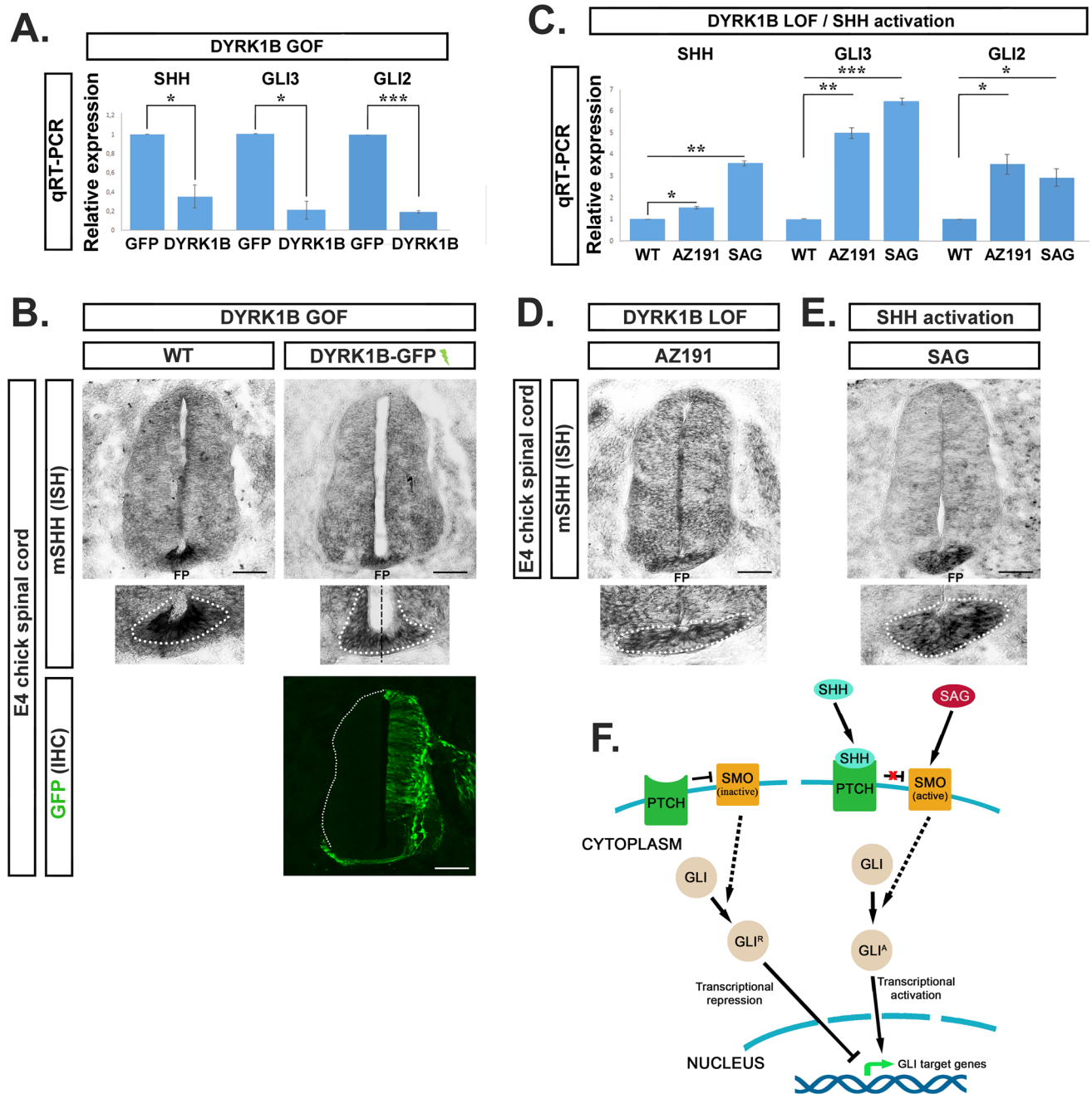


Fig. 8 DyRK1B acts as transcriptional suppressor of Shh, Gli2 and Gli3 in the embryonic chick spinal cord. **A** DyRK1B overexpression (GOF) at E2 reduced at E4 Shh, Gli2 and Gli3 mRNA expression levels by 2.86-fold \pm 0.99 ($p \leq 0.05$, $n = 3$ independent experiments), by 5.28-fold \pm 0.31 ($p \leq 0.001$, $n = 3$ independent experiments), and by 4.76-fold \pm 0.61 ($p \leq 0.05$, $n = 3$ independent experiments) respectively, relatively to control GFP embryos, as determined by qRT-PCR analysis **B** In agreement, in situ hybridization (ISH) shows that Shh mRNA expression is decreased at the floor plate (FP) of the electroporated side in DyRK1B/GFP embryos compared to the non-electroporated side, as well as to wild-type embryos. **C** Conversely, inhibition of endogenous DyRK1B kinase activity by AZ191 (LOF) results in increased Shh, Gli2 and Gli3 mRNA expression levels by 1.52-fold \pm 0.06 ($p \leq 0.05$, $n = 3$ independent experiments), by 3.54-fold \pm 0.47 ($p \leq 0.05$, $n = 3$ independent experiments) and 4.85-fold \pm 0.25 ($p \leq 0.01$, $n = 3$ independent experiments) respectively,

relatively to wild-type, as determined by qRT-PCR analysis. Similarly, activation of Shh pathway at the level of Smoothed (SMO), by the agonist SAG increased Shh, Gli2 and Gli3 mRNA expression levels in SAG-treated embryos by 3.54-fold \pm 0.11 ($p \leq 0.01$, $n = 3$ independent experiments), by 2.92-fold \pm 0.41 ($p \leq 0.05$, $n = 3$ independent experiments) and 6.30-fold \pm 0.12 ($p \leq 0.001$, $n = 3$ independent experiments) respectively, compared to wild-type, as revealed by qRT-PCR analysis. **D**, **E** In agreement, Shh mRNA expression levels were increased at the FP in AZ191 and SAG-treated embryos compared to wild-type, as revealed by ISH. Scale bars: 100 μ m. Data are mean \pm SEM, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; ns, non-significant (two-tailed Unequal variance t-test). Spinal cord sections correspond to the brachial level. **F** Schematic representation of canonical Shh signaling pathway. SMO is activated upon SHH binding to PTCH or directly by SAG, resulting in transcriptional activation of GLI target genes

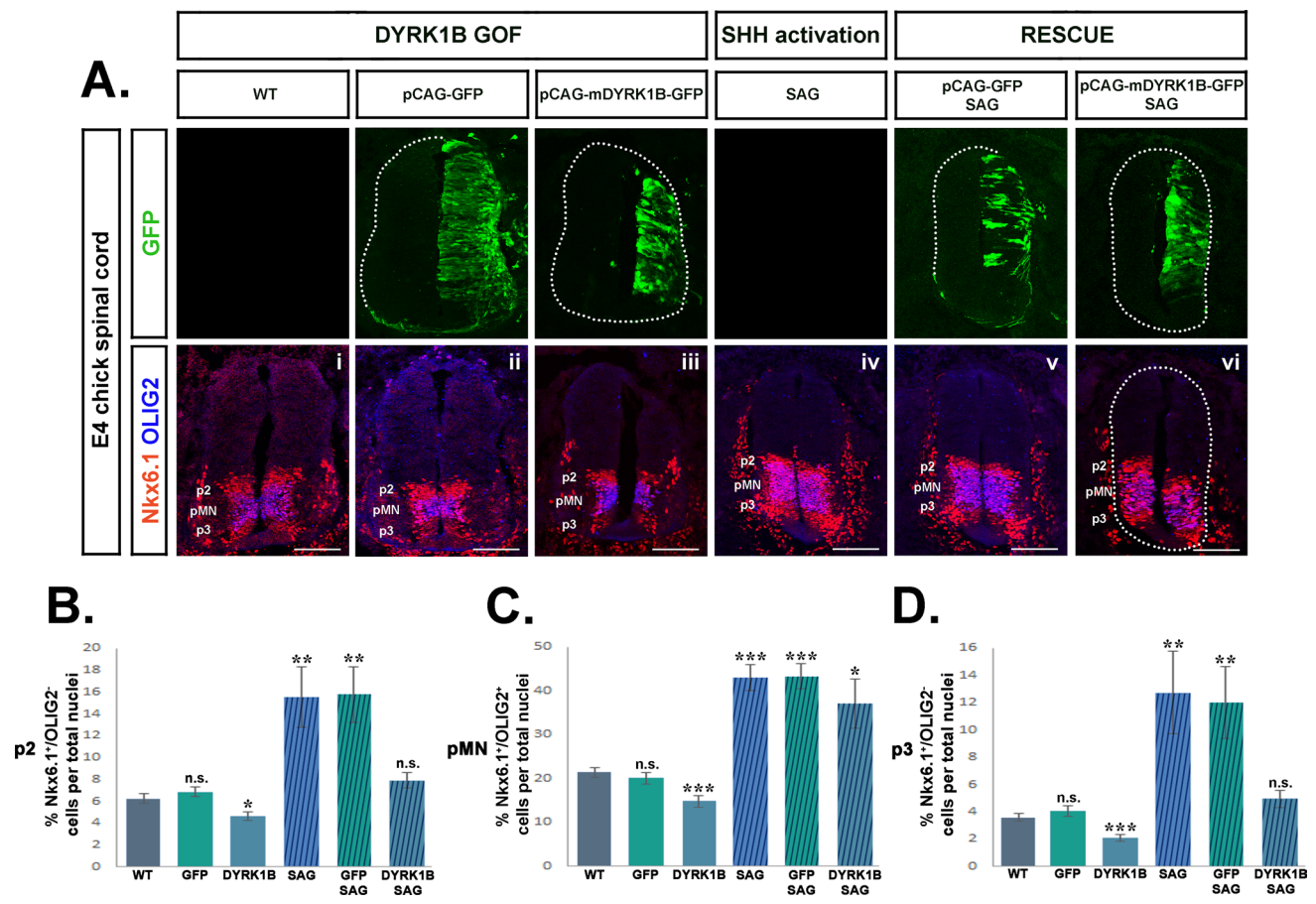


Fig. 9 SAG rescues the ventral phenotype of Dyrk1B overexpression. **A** Effect of SAG administration alone or after concurrent electroporation with either Dyrk1B/GFP or GFP expression plasmids, on the number of p2, pMN and p3 ventral progenitors at E4. Upper panel: GFP immunofluorescence shows the extent of electroporation in each case. Lower panel: p2, pMN and p3 domains are distinguished by double immunofluorescence for Nkx6.1 and Olig2 transcription factors, as indicated. Nkx6.1 is expressed by p2, pMN and p3, while Olig2 marks exclusively the pMN domain. **B** Dyrk1B overexpression (GOF) results in reduced p2 progenitors (Nkx6.1⁺/Olig2⁻ upper cell population) by $25.88\% \pm 6.87$ ($p \leq 0.05$, $n = 15$ sections from 4 embryos) (Aiii), while SAG administration results in increased p2 progenitors by $148.24\% \pm 43.93$ ($p \leq 0.01$, $n = 15$ sections from 4 embryos) (Aiv), both compared to wild-type (Ai). SAG administration (Avi) in Dyrk1B/GFP embryos restored completely p2 progenitors at normal levels. Notably, in GFP embryos the p2 population (Aii) was similar to wild-type (Ai), while in GFP embryos that were subsequently treated with SAG (Av) p2 progenitors were increased by $151.76\% \pm 40.89$ ($p \leq 0.01$, $n = 15$ sections from 4 embryos). **C** Dyrk1B overexpression (GOF) resulted in reduced pMN progenitors (Olig2⁺ cell population) by $30.47\% \pm 6.07$ ($p \leq 0.001$, $n = 15$ sections from 4 embryos) (Aiii), and SAG administration resulted in increased pMN progenitors by $100.93\% \pm 13.46$ ($p \leq 0.001$, $n = 15$ sections from

4 embryos) (Aiv), both compared to wild-type (Ai). SAG administration in Dyrk1B/GFP embryos (Avi) resulted in increased pMN progenitors by $73.79\% \pm 26.17$ ($p \leq 0.05$, $n = 15$ sections from 4 embryos) compared to wild-type (Ai). Notably, in GFP embryos the pMN population (Aii) was similar to wild-type (Ai), while in GFP embryos that were subsequently treated SAG (Av) pMN progenitors were increased by $102.20\% \pm 13.50$ ($p \leq 0.001$, $n = 15$ sections from 4 embryos). **D** Dyrk1B overexpression (GOF) resulted in reduced p3 progenitors (Nkx6.1⁺/Olig2⁻ lower cell population) by $41.39\% \pm 7.50$ ($p \leq 0.001$, $n = 15$ sections from 4 embryos) (Aiii), SAG administration resulted in increased p3 progenitors by $253.89\% \pm 84.17$ ($p \leq 0.01$, $n = 15$ sections from 4 embryos) (Aiv), both compared to wild-type (Ai). SAG administration (Avi) in Dyrk1B/GFP embryos resulted in non-significant differences in the p3 population compared to wild-type (Ai). Notably, in GFP embryos the p3 population (Aii) was similar to wild-type (Ai), while in GFP embryos that were subsequently treated with SAG (Av), p3 progenitors were increased by $232.78\% \pm 73.33$ ($p \leq 0.01$, $n = 15$ sections from 4 embryos). Cell numbers are normalized to total cell nuclei. Scale bars: 100 μ m. Data are mean \pm SEM, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; ns, non-significant (two-tailed Unequal variance t test). Spinal cord sections correspond to the brachial level

neural tube Gli2 is the principal activator of Shh pathway [88–90] and in cooperation with Gli3 regulates ventral patterning and proliferation [91–93]. Our data are in agreement with other studies that have implicated Dyrk1B in canonical and non-canonical Shh pathway in many cancers [50–53].

Particularly, Dyrk1B was found to inhibit canonical Shh and to activate the non-canonical Shh signaling through mTOR/AKT pathway [52]. Moreover, Lauth and colleagues have reported that overexpression of Dyrk1B in NIH3T3 cells blocks SMO-initiated signaling upstream of Suppressor of

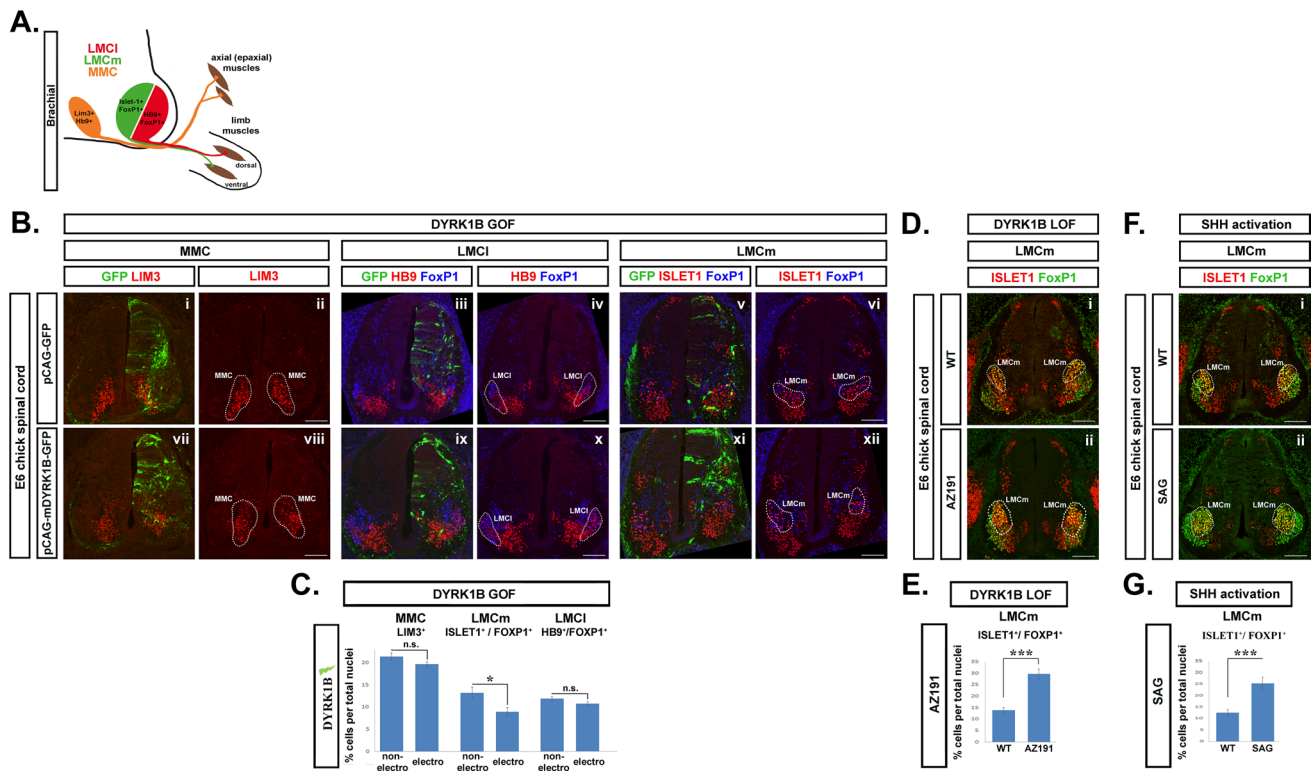


Fig. 10 Dyrk1B affects the number of LMCm motor neurons at E6 chick spinal cord. **A** Anatomical map of motor columns and their peripheral targets at the brachial level of E6 chick spinal cord. **B, C** Dyrk1B overexpression (GOF) at E2 reduced specifically at E6 the number of LMCm MNs (Foxp1⁺/Islet1⁺) (Axi, xii), 32.05% ± 7.48 (p ≤ 0.05, n = 23 sections from 4 embryos), while had no effect on LMCI (HB9⁺/Foxp1⁺) (Aix, x) and MMC (Lim3⁺) (Avii, viii) MNs. Comparisons were made between the electroporated vs the non-electroporated side in each case. In control GFP embryos no significant differences were observed in LMCm, LMCI and MMC MNs (Ai–vi) between the two sides of SC. **D, E** AZ191 administration at E2 (LOF), results in the opposite phenotype at E6, increasing

specifically the number of LMCm MNs (Foxp1⁺/Islet1⁺) (Di–ii) by 113.49% ± 15.49 (p ≤ 0.001, n = 19 sections from 4 embryos) compared to wild-type. **F, G** Similarly, SAG administration at E2, results at E6 in increased number of LMCm MNs (Fi–ii) by 101.43% ± 22.04 (p ≤ 0.001, n = 19 sections from 4 embryos) compared to wild-type. Notably, AZ191 and SAG administration had no effect on MMC and LMCI MNs (see Fig. S8). Cell numbers are normalized to total cell nuclei. Scale bars: 100 μm. Data are mean ± SEM, *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001; ns, non-significant (two-tailed Unequal variance t test). Spinal cord sections correspond to the brachial level

fused homolog SUFU [50]. In addition, overexpression of Dyrk1B in Panc1 cells enhances the protein stability of GLI1 by preventing its proteasomal degradation [52], while pharmacological inhibition of Dyrk1B results in up-regulation of Shh signaling [52].

In accordance, *in phenotype rescue in ovo* experiments, we demonstrated that activation of the Shh pathway with the use of SMO agonist, SAG, reverses the Dyrk1B effect on ventral phenotypes, by restoring the number of p2, pMN and p3 progenitors. Our data are in agreement with the function of Shh during SC development. Shh initially secreted from NC and later from FP, acts as a long-range graded morphogen that controls the ventral patterning of SC [6–11], as well as cell cycle progression and survival of ventral progenitors [7–11]. Ectopic expression or activation of Shh pathway results in hyper-proliferation of ventral

progenitors [10, 11] and conversely inhibition of Shh signaling, results in decreased proliferation and survival of ventral progenitors [10, 94–96]. Thus, the effect of Dyrk1B on cellular proliferation and survival of ventral progenitors p2, pMN and p3 could be also explained by its interference with Shh signaling. In good agreement, our data showed that both SAG and AZ191 are able to activate the Shh pathway, as indicated by enhanced expression of Shh, Gli2 and Gli3, and by increased expression of the early responding proximal Shh targets, FoxA2 and Nkx2.2 [9, 97]. Moreover, these treatments result in hyper-proliferation of p2, pMN and p3 progenitors and in increased number of MNs and of later-formed LMCm MNs. Interestingly, the extensive loss of MNs observed at E4 chick Dyrk1B-electroporated SC, which is selectively reflected at E6 in reduced number of LMCm MNs, could be explained by the fact that Shh is

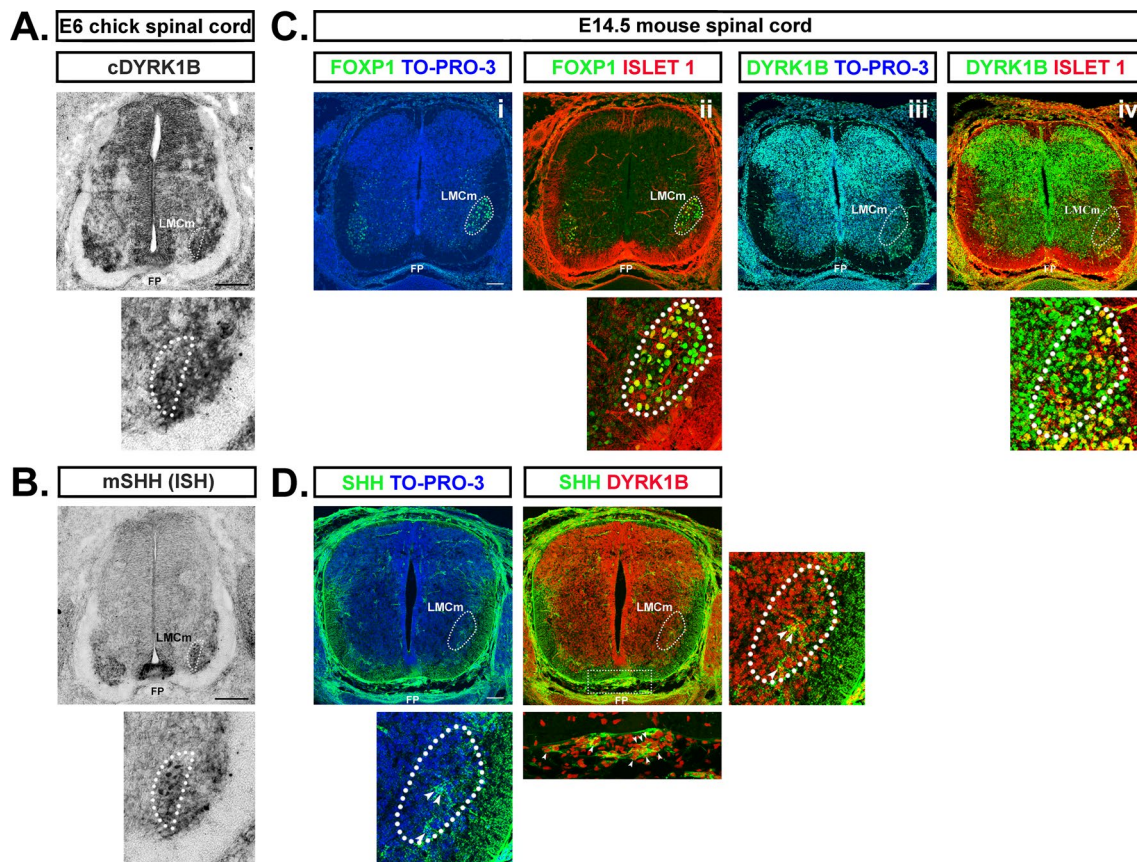


Fig. 11 Sonic Hedgehog and Dyrk1B are co-expressed by LMCm motor neurons and floor plate in the embryonic spinal cord. **A, B** At E6 chick spinal cord Dyrk1B mRNA is expressed in the whole MN domain including LMCm MNs (depicted by white dots), while Shh mRNA expression is restricted in LMCm MNs (depicted by white dots), as revealed by in situ hybridization (ISH) on transverse spinal cord brachial sections. Intense signal was also observed for Dyrk1B and Shh mRNA in the floor plate. ISH for Dyrk1B and Shh mRNAs

was performed using a chick Dyrk1B and a mouse Shh riboprobe, respectively. **C** At E14.5 mouse spinal cord (corresponds to E6 in chick), Dyrk1B is expressed by LMCm MNs ($Foxp1^+/Islet1^+$), as revealed by immunohistochemistry (IHC). **D** At E14.5 mouse spinal cord Shh and Dyrk1B are co-expressed by cells of the floor plate and LMCm region (indicated by arrowheads in the magnification). Scale bars: 100 μm . Spinal cord sections correspond to the brachial level

exclusively co-expressed with Dyrk1B, by LMCm MNs at the brachial level of E6 chick SC. Shh exclusive expression by LMCm MNs was reported in a previous study by Nam and colleagues, where Shh was found crucial for LMCm specification [81]. Therefore, our findings are in agreement with these observations [81].

Our data suggest that Dyrk1B may act as transcriptional repressor of Shh, Gli2 and Gli3 in the embryonic chick SC. Since Dyrk1B is localized in the cell nucleus, it is likely to act on the transcriptional machinery that controls Shh, Gli2 and Gli3 gene expression. Previously, Dyrk1B was found to interact with class II histone deacetylases in skeletal muscle [23]. Notably, it has also been reported that Dyrk1B may directly interact with chromatin modifiers with critical roles in transcriptional regulation, including CBP (CREBBP),

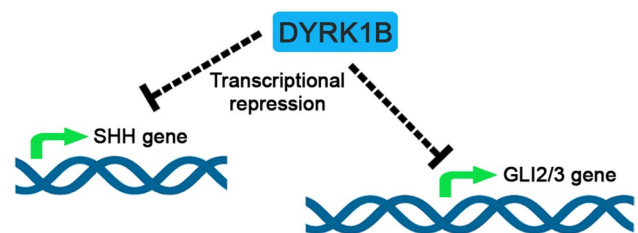


Fig. 12 Schematic representation of Dyrk1B effect on Shh, Gli2 and Gli3 transcription. Dyrk1B kinase acts as a potent transcriptional suppressor of Shh, Gli2 and Gli3 gene transcription via an as yet unknown mechanism. Since Dyrk1B is a nuclear kinase, it is likely to act directly or indirectly on the transcriptional machinery of Shh, Gli2 and Gli3 by interacting with transcription or/and chromatin remodeling factors, resulting in transcriptional alterations in gene expression of Shh, Gli2 and Gli3

p300, p400, KAT8, MSL3, and HDAC5 [98, 99]. A plausible scenario would be that Dyrk1B physically or functionally interacts with transcription factors, such as FoxA2 and possibly Arx for Shh, or chromatin remodeling factors, resulting in transcriptional alterations in gene expression of Shh, Gli2 and Gli3 (Fig. 12). Given that Shh initially secreted from the notochord induces the expression of FoxA2 in the floor plate which in turn induces Shh expression and that of its target gene Nkx2.2 [9, 97], Dyrk1B may interfere at this step of signal transduction. Thus, we envisage a molecular mechanism via which Dyrk1B is recruited over the regulatory DNA sequences of Shh, Gli2 and Gli3 genes, where it modifies the activity of the chromatin-associated complexes to suppress their expression. However, based on our observations, we cannot exclude the possibility of an indirect regulation of these genes by Dyrk1B. Further, we cannot exclude that Dyrk1B has additional non-cell autonomous functions. Alternatively, the effect of Dyrk1B on Gli3 expression may also be mediated through Wnt/ β -catenin pathway, as Wnt signaling was found to control Gli3 expression and consequently the cell fate of ventral progenitors [100, 101]. Therefore, the precise mechanism of Dyrk1B function on Shh, Gli2 and Gli3 gene transcription should be further investigated in the future.

In conclusion, we demonstrated that Dyrk1B is a major regulator controlling the balance between cell cycle progression and differentiation during SC development. Moreover, we revealed a novel role for Dyrk1B kinase in the control of the number of ventral progenitor and neuronal subtypes, as well as in the columnar organization of spinal motor neurons via the Sonic hedgehog/Gli pathway.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00018-023-05097-9>.

Acknowledgements We thank Dr. Evangelia Xingi, Light Microscopy Unit of HPI, for her helpful technical support in Confocal Imaging and the Animal House Facility Unit of HPI.

Author contributions Conceptualization: MG; Formal analysis: NK; Funding acquisition: MG; Investigation: NK, KD, AN; Methodology: NK, PKP, MG; Project administration: MG; Resources: RM, MG; Supervision: MG; Validation: NK, MG; Visualization: NK, RM, MG; Writing—original draft preparation: NK, MG; Writing—review and editing: PKP, LZ, RM, MG.

Funding Open access funding provided by HEAL-Link Greece. This work was supported by KRHPIS II (MIS 5002486), implemented under the «Action Strategic Development on the Research and Technological Sector» and Nostos Foundation.

Data availability All relevant data of this study are available within the article and its Supplementary Information files or from corresponding author on request.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval This is an observational study. The Ethics Committee of the Hellenic Pasteur Institute has confirmed that no ethical approval is required.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Edlund T, Jessell TM (1999) Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell* 96:211–224. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80561-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80561-9). (PMID: 9988216)
- Jessell TM (2000) Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* 1:20–29. <https://doi.org/10.1038/35049541>. (PMID: 11262869)
- Briscoe J, Ericson J (2001) Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr Opin Neurobiol* 11:43–49. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00172-0](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00172-0). (PMID: 11179871)
- Liu A, Niswander LA (2005) Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat Rev Neurosci* 6:945–954. <https://doi.org/10.1038/NRN1805>. (PMID: 16340955)
- Briscoe J, Novitsch BG (2008) Regulatory pathways linking progenitor patterning, cell fates and neurogenesis in the ventral neural tube. *Phil Trans R Soc B*. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.2012>. (PMID: 17282991)
- Dessaud E, McMahon AP, Briscoe J (2008) Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development* 135:2489–2503. <https://doi.org/10.1242/DEV.009324>. (PMID: 18621990)
- Yu K, McGlynn S, Matise MP (2013) Floor plate-derived sonic hedgehog regulates glial and ependymal cell fates in the developing spinal cord. *Development* 140:1594–1604. <https://doi.org/10.1242/DEV.090845>. (PMID: 23482494)
- Al Oustah A, Danesin C, Khouri-Farah N, Farreny MA, Escalas N, Cochard P, Glise B, Soula C (2014) Dynamics of sonic hedgehog signaling in the ventral spinal cord are controlled by intrinsic changes in source cells requiring sulfatase 1. *Development* 141:1392–1403. <https://doi.org/10.1242/DEV.101717>. (PMID: 24595292)
- Danesin C, Soula C (2017) Moving the Shh source over time: what impact on neural cell diversification in the developing spinal cord? *J Dev Biol*. <https://doi.org/10.3390/JDB5020004>. (PMID: 29615562)
- Cayuso J, Ulloa F, Cox B, Briscoe J, Marti E (2006) The Sonic hedgehog pathway independently controls the patterning,

- proliferation and survival of neuroepithelial cells by regulating Gli activity. *Development* 133:517–528. <https://doi.org/10.1242/DEV.02228>. (PMID: 16410413)
11. Ribes V, Balaskas N, Sasai N, Cruz C, Dessaud E, Cayuso J, Tozer S, Yang LL, Novitsch B, Marti E, Briscoe J (2010) Distinct Sonic Hedgehog signaling dynamics specify floor plate and ventral neuronal progenitors in the vertebrate neural tube. *Genes Dev* 24:1186. <https://doi.org/10.1101/GAD.559910>. (PMID: 20516201)
 12. Hanks SK, Hunter T (1995) The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 9:576–596. <https://doi.org/10.1096/FASEBJ.9.8.7768349>. (PMID: 7768349)
 13. Becker W, Joost HG (1999) Structural and functional characteristics of Dyrk, a novel subfamily of protein kinases with dual specificity. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 62:1–17. [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(08\)60503-6](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(08)60503-6). (PMID: 9932450)
 14. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912–1934. <https://doi.org/10.1126/science.1075762>. (PMID: 12471243)
 15. Aranda S, Laguna A, de la Luna S (2011) DYRK family of protein kinases: evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles. *FASEB J* 25:449–462. <https://doi.org/10.1096/fj.10-165837>. (PMID: 21048044)
 16. Becker W (2012) Emerging role of DYRK family protein kinases as regulators of protein stability in cell cycle control. *Cell Cycle* 11:3389–3394. <https://doi.org/10.4161/cc.21404>. (PMID: 22918246)
 17. Soppa U, Becker W (2015) DYRK protein kinases. *Curr Biol* 25:R488–R489. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.02.067>. (PMID: 26079075)
 18. Leder S, Weber Y, Altafaj X, Estivill X, Joost HG, Becker W (1999) Cloning and characterization of DYRK1B, a novel member of the DYRK family of protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 254:474–479. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9967>. (PMID: 9918863)
 19. Leder S, Czajkowska H, Maenz B, De Graaf K, Barthel A, Joost HG, Becker W (2003) Alternative splicing variants of dual specificity tyrosine phosphorylated and regulated kinase 1B exhibit distinct patterns of expression and functional properties. *Biochem J* 372:881–888. <https://doi.org/10.1042/BJ20030182>. (PMID: 12633499)
 20. Mercer SE, Friedman E (2006) Mirk/Dyrk1B: a multifunctional dual-specificity kinase involved in growth arrest, differentiation, and cell survival. *Cell Biochem Biophys* 45:303–315. <https://doi.org/10.1385/CBB:45:3:303>. (PMID: 16845176)
 21. Deng X, Ewton DZ, Pawlikowski B, Maimone M, Friedman E (2003) Mirk/dyrk1B is a rho-induced kinase active in skeletal muscle differentiation. *J Biol Chem* 278:41347–41354. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306780200>. (PMID: 12902328)
 22. Mercer SE, Ewton DZ, Deng X, Lim S, Mazur TR, Friedman E (2005) Mirk/Dyrk1B mediates survival during the differentiation of C2C12 myoblasts. *J Biol Chem* 280:25788–25801. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413594200>. (PMID: 15851482)
 23. Deng X, Ewton DZ, Mercer SE, Friedman E (2005) Mirk/dyrk1B decreases the nuclear accumulation of class II histone deacetylases during skeletal muscle differentiation. *J Biol Chem* 280:4894–4905. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411894200>. (PMID: 15546868)
 24. Masuda T, Itoh K, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Nakazawa N, Sakurai T, Liu Y, Tokuchi H, Fujita T, Zhao Y, Nishiyama H, Tanaka T, Fukumoto M, Ikawa M, Okabe M, Fujita J (2012) Cold-inducible RNA-binding protein (Cirp) interacts with Dyrk1b/Mirk and promotes proliferation of immature male germ cells in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:10885–10890. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121524109>. (PMID: 22711815)
 25. Keramati AR, Fathzadeh M, Go GW, Singh R, Choi M, Faramarzi S, Mane S, Kasaei M, Sarajzadeh-Fard K, Hwa J, Kidd KK, Babaee Bigi MA, Malekzadeh R, Hosseinian A, Babaei M, Lifton RP, Mani A (2014) A form of the metabolic syndrome associated with mutations in DYRK1B. *N Engl J Med* 370:1909–1919. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1301824>. (PMID: 24827035)
 26. Hickmott J (2015) DYRK1B variant linked to autosomal dominant metabolic syndrome. *Clin Genet* 87:30–31. <https://doi.org/10.1111/cge.12477>. (PMID: 25092113)
 27. Abu Jhaisha S, Widowati EW, Kii I, Sonamoto R, Knapp S, Papadopoulos C, Becker W (2017) DYRK1B mutations associated with metabolic syndrome impair the chaperone-dependent maturation of the kinase domain. *Sci Rep* 7:6420. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06874-w>. (PMID: 28743892)
 28. Armanmehr A, Jafari Khamirani H, Zoghi S, Dianatpour M (2022) Analysis of DYRK1B, PPARG, and CEBPB expression patterns in adipose-derived stem cells from patients carrying DYRK1B R102C and healthy individuals during adipogenesis. *Metab Syndr Relat Disord* 20:576–583. <https://doi.org/10.1089/MET.2021.0140>. (PMID: 36318489)
 29. Lee K, Deng X, Friedman E (2000) Mirk protein kinase is a mitogen-activated protein kinase substrate that mediates survival of colon cancer cells. *Cancer Res* 60:3631–3637 (PMID: 10910078)
 30. Jin K, Park S, Ewton DZ, Friedman E (2007) The survival kinase Mirk/Dyrk1B is a downstream effector of oncogenic K-ras in pancreatic cancer. *Cancer Res* 67:7247–7255. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4099>. (PMID: 17671193)
 31. Friedman E (2007) Mirk/Dyrk1B in cancer. *J Cell Biochem* 102:274–279. <https://doi.org/10.1002/jcb.21451>. (PMID: 17583556)
 32. Hu J, Nakhla H, Friedman E (2011) Transient arrest in a quiescent state allows ovarian cancer cells to survive suboptimal growth conditions and is mediated by both Mirk/dyrk1b and p130/RB2. *Int J Cancer* 129:307–318. <https://doi.org/10.1002/ijc.25692>. (PMID: 20857490)
 33. Gao J, Yang X, Yin P, Hu W, Liao H, Miao Z, Pan C, Li N (2012) The involvement of FoxO in cell survival and chemosensitivity mediated by Mirk/Dyrk1B in ovarian cancer. *Int J Oncol* 40:1203–1209. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1293>. (PMID: 22159921)
 34. Davis SJ, Sheppard KE, Pearson RB, Campbell IG, Goringe KL, Simpson KJ (2013) Functional analysis of genes in regions commonly amplified in high-grade serous and endometrioid ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 19:1411–1421. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3433>. (PMID: 23362323)
 35. Hu J, Deng H, Friedman EA (2013) Ovarian cancer cells, not normal cells, are damaged by Mirk/Dyrk1B kinase inhibition. *Int J Cancer* 132:2258–2269. <https://doi.org/10.1002/ijc.27917>. (PMID: 23114871)
 36. Friedman E (2013) Mirk/dyrk1B kinase in ovarian cancer. *Int J Mol Sci* 14:5560–5575. <https://doi.org/10.3390/ijms14035560>. (PMID: 23528858)
 37. Chen Y, Wang S, He Z, Sun F, Huang Y, Ni Q, Wang H, Wang Y, Cheng C (2017) Dyrk1B overexpression is associated with breast cancer growth and a poor prognosis. *Hum Pathol* 66:48–58. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.02.033>. (PMID: 28554575)
 38. Becker W (2018) A wake-up call to quiescent cancer cells—potential use of DYRK1B inhibitors in cancer therapy. *FEBS J* 285:1203–1211. <https://doi.org/10.1111/febs.14347>. (PMID: 29193696)

39. Deng X, Mercer SE, Shah S, Ewton DZ, Friedman E (2004) The cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is stabilized in G0 by Mirk/dyrk1B Kinase. *J Biol Chem* 279:22498–22504. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400479200>. (PMID: 15010468)
40. Zou Y, Ewton DZ, Deng X, Mercer SE, Friedman E (2004) Mirk/dyrk1B kinase destabilizes cyclin D1 by phosphorylation at threonine 288. *J Biol Chem* 279:27790–27798. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403042200>. (PMID: 15075324)
41. Gao J, Zhao Y, Lv Y, Chen Y, Wei B, Tian J, Yang Z, Kong F, Pang J, Liu J, Shi H (2013) Mirk/Dyrk1B mediates G0/G1 to S phase cell cycle progression and cell survival involving MAPK/ERK signaling in human cancer cells. *Cancer Cell Int* 13:2. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-13-2>. (PMID: 23311607)
42. Tsioras K, Papastefanaki F, Politis PK, Matsas R, Gaitanou M (2013) Functional interactions between BM88/Cend1, Ran-binding protein M and Dyrk1B kinase affect cyclin D1 levels and cell cycle progression/exit in mouse. *PLoS One* 8:e82172. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082172>. (PMID: 24312406)
43. Gaitanou M, Segklia K, Matsas R (2019) CEND1, a story with many tales: From regulation of cell cycle progression/exit of neural stem cells to brain structure and function. *Stem Cells Int*. <https://doi.org/10.1155/2019/2054783>. (PMID: 31191667)
44. Kokkorakis N, Gaitanou M (2020) Minibrain-related kinase/dual-specificity tyrosine-regulated kinase 1B implication in stem/cancer stem cells biology. *World J Stem Cells* 12:1553. <https://doi.org/10.4252/WJSC.V12.I12.1553>. (PMID: 33505600)
45. Zhou N, Yuan S, Wang R, Zhang W, Chen JJ (2015) Role of dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1B (Dyrk1B) in S-phase entry of HPV E7 expressing cells from quiescence. *Oncotarget* 6:30745–30761. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5222>. (PMID: 26307683)
46. Pérez-Sánchez G, Jiménez A, Quezada-Ramírez MA, Estudillo E, Ayala-Sarmiento AE, Mendoza-Hernández G, Hernández-Soto J, Hernández-Hernández FC, Cázares-Raga FE, Segovia J (2018) Annexin A1, Annexin A2, and Dyrk 1B are upregulated during GAS1-induced cell cycle arrest. *J Cell Physiol* 233:4166–4182. <https://doi.org/10.1002/JCP.26226>. (PMID: 29030970)
47. Mercer SE, Ewton DZ, Shah S, Naqvi A, Friedman E (2006) Mirk/Dyrk1b mediates cell survival in rhabdomyosarcomas. *Cancer Res* 66:5143–5150. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1539>. (PMID: 16707437)
48. Deng X, Ewton DZ, Li S, Naqvi A, Mercer SE, Landas S, Friedman E (2006) The kinase Mirk/Dyrk1B mediates cell survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res* 66:4149–4158. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3089>. (PMID: 16618736)
49. Hu J, Friedman E (2010) Depleting Mirk kinase increases cisplatin toxicity in ovarian cancer cells. *Genes Cancer* 1:803–811. <https://doi.org/10.1177/1947601910377644>. (PMID: 21113238)
50. Lauth M, Bergström Å, Shimokawa T, Tostar U, Jin Q, Fendrich V, Guerra C, Barbacid M, Toftgård R (2010) DYRK1B-dependent autocrine-to-paracrine shift of Hedgehog signaling by mutant RAS. *Nat Struct Mol Biol* 17:718–725. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1833>. (PMID: 20512148)
51. Gruber W, Hutzinger M, Elmer DP, Parigger T, Sternberg C, Cegielski L, Zaja M, Leban J, Michel S, Hamm S, Vitt D, Aberger F (2016) DYRK1B as therapeutic target in Hedgehog/GLI-dependent cancer cells with Smoothed inhibitor resistance. *Oncotarget* 7:7134–7148. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6910>. (PMID: 26784250)
52. Singh R, Dhanyamraju PK, Lauth M (2017) DYRK1B blocks canonical and promotes non-canonical Hedgehog signaling through activation of the mTOR/AKT pathway. *Oncotarget* 8:833–845. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13662>. (PMID: 27903983)
53. Singh R, Holz PS, Roth K, Hupfer A, Meissner W, Müller R, Buchholz M, Gress TM, Elsässer HP, Jacob R, Lauth M (2019) DYRK1B regulates Hedgehog-induced microtubule acetylation. *Cell Mol Life Sci* 76:193–207. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2942-5>. (PMID: 30317528)
54. Deng X, Hu J, Ewton DZ, Friedman E (2014) Mirk/dyrk1B kinase is upregulated following inhibition of mTOR. *Carcinogenesis* 35:1968–1976. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu058>. (PMID: 24590896)
55. Ashford AL, Dunkley TPJ, Cockerill M, Rowlinson RA, Baak LM, Gallo R, Balmanno K, Goodwin LM, Ward RA, Lochhead PA, Guichard S, Hudson K, Cook SJ (2016) Identification of DYRK1B as a substrate of ERK1/2 and characterisation of the kinase activity of DYRK1B mutants from cancer and metabolic syndrome. *Cell Mol Life Sci* 73:883–900. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2032-x>. (PMID: 26346493)
56. Tejedor F, Zhu XR, Kaltenbach E, Ackermann A, Baumann A, Canal I, Heisenberg M, Fischbach KF, Pongs O (1995) mini-brain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in Drosophila. *Neuron* 14:287–301. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90286-4](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90286-4). (PMID: 7857639)
57. Hämmerle B, Elizalde C, Galceran J, Becker W, Tejedor FJ (2003) The MNB/DYRK1A protein kinase: neurobiological functions and Down syndrome implications. *J Neural Transm Suppl*. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6721-2_11. (PMID: 15068245)
58. Hämmerle B, Carnicero A, Elizalde C, Ceron J, Martínez S, Tejedor FJ (2003) Expression patterns and subcellular localization of the Down syndrome candidate protein MNB/DYRK1A suggest a role in late neuronal differentiation. *Eur J Neurosci* 17:2277–2286. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02665.x>. (PMID: 12814361)
59. Martí E, Altafaj X, Dierssen M, De La Luna S, Fotaki V, Alvarez M, Pérez-Riba M, Ferrer I, Estivill X (2003) Dyrk1A expression pattern supports specific roles of this kinase in the adult central nervous system. *Brain Res* 964:250–263. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)04069-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)04069-6). (PMID: 12576186)
60. Park J, Song WJ, Chung KC (2009) Function and regulation of Dyrk1A: towards understanding Down syndrome. *Cell Mol Life Sci* 66:3235–3240. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0123-2>. (PMID: 19685005)
61. Wegiel J, Gong CX, Hwang YW (2011) The role of DYRK1A in neurodegenerative diseases. *FEBS J* 278:236–245. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07955.x>. (PMID: 21156028)
62. Soppa U, Schumacher J, Ortiz VF, Pasqualon T, Tejedor FJ, Becker W (2014) The Down syndrome-related protein kinase DYRK1A phosphorylates p27(Kip1) and Cyclin D1 and induces cell cycle exit and neuronal differentiation. *Cell Cycle* 13:2084–2100. <https://doi.org/10.4161/CC.29104>. (PMID: 24806449)
63. Arbones ML, Thomazeau A, Nakano-Kobayashi A, Hagiwara M, Delabar JM (2019) DYRK1A and cognition: a lifelong relationship. *Pharmacol Ther* 194:199–221. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.09.010>. (PMID: 30268771)
64. Politis PK, Rohrer H, Matsas R (2007) Expression pattern of BM88 in the developing nervous system of the chick and mouse embryo. *Gene Expr Patterns* 7:165–177. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2006.06.007>. (PMID: 16949349)
65. Politis PK, Makri G, Thomaidou D, Geissen M, Rohrer H, Matsas R (2007) BM88/CEND1 coordinates cell cycle exit and differentiation of neuronal precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:17861–17866. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610973104>. (PMID: 17971443)
66. Kaltezioti V, Antoniou D, Stergiopoulos A, Rozani I, Rohrer H, Politis PK (2014) Prox1 regulates Olig2 expression to modulate binary fate decisions in spinal cord neurons. *J Neurosci*

- 34:15816–15831. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1865-14.2014>. (PMID: 25411508)
67. Johnson EJ, Neely DM, Dunn IC, Davey MG (2014) Direct functional consequences of ZRS enhancer mutation combine with secondary long range SHH signalling effects to cause pre-axial polydactyly. *Dev Biol* 392:209. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.05.025>. (PMID: 24907417)
68. Oppenheim RW, Homma S, Marti E, Prevette D, Wang S, Yaginuma H, McMahon AP (1999) Modulation of early but not later stages of programmed cell death in embryonic avian spinal cord by sonic hedgehog. *Mol Cell Neurosci* 13:348–361. <https://doi.org/10.1006/MCNE.1999.0755>. (PMID: 10356297)
69. Yamamoto Y, Henderson CE (1999) Patterns of programmed cell death in populations of developing spinal motoneurons in chicken, mouse, and rat. *Dev Biol* 214:60–71. <https://doi.org/10.1006/DBIO.1999.9413>. (PMID: 10491257)
70. Mukaiyaga K, Sakuma C, Okada T, Homma S, Shimada T, Nishiyama K, Sato N, Yaginuma H (2017) Motor neurons with limb-innervating character in the cervical spinal cord are sculpted by apoptosis based on the Hox code in chick embryo. *Development* 144:4645–4657. <https://doi.org/10.1242/DEV.158873>. (PMID: 29061638)
71. Briscoe J, Pierani A, Jessell TM, Ericson J (2000) A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 101:435–445. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80853-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80853-3). (PMID: 10830170)
72. Lu DC, Niu T, Alaynick WA (2015) Molecular and cellular development of spinal cord locomotor circuitry. *Front Mol Neurosci*. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2015.00025>. (PMID: 26136656)
73. Ashford AL, Oxley D, Kettle J, Hudson K, Guichard S, Cook SJ, Lochhead PA (2014) A novel DYRK1B inhibitor AZ191 demonstrates that DYRK1B acts independently of GSK3B to phosphorylate cyclin D1 at Thr286, not Thr 288. *Biochem J* 457:43–56. <https://doi.org/10.1042/BJ20130461>. (PMID: 24134204)
74. Chen H, Shen J, Choy E, Hornicek FJ, Shan A, Duan Z (2018) Targeting DYRK1B suppresses the proliferation and migration of liposarcoma cells. *Oncotarget* 9:13154–13166. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22743>. (PMID: 29568347)
75. Davis-Dusenbery BN, Williams LA, Klim JR, Eggen K (2014) How to make spinal motor neurons. *Dev* 141:491–501. <https://doi.org/10.1242/dev.097410>. (PMID: 24449832)
76. Stifani N (2014) Motor neurons and the generation of spinal motor neuron diversity. *Front Cell Neurosci* 8:293. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00293>. (PMID: 25346659)
77. Sockanathan S, Perlmann T, Jessell TM (2003) Retinoid receptor signaling in postmitotic motor neurons regulates rostrocaudal positional identity and axonal projection pattern. *Neuron* 40:97–111. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00532-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00532-4). (PMID: 14527436)
78. Sockanathan S (2003) Towards cracking the code: LIM protein complexes in the spinal cord. *Trends Neurosci* 26:57–59. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)00029-2](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)00029-2). (PMID: 12536126)
79. Novitsch BG, Wichterle H, Jessell TM, Sockanathan S (2003) A requirement for retinoic acid-mediated transcriptional activation in ventral neural patterning and motor neuron specification. *Neuron* 40:81–95. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2003.08.006>. (PMID: 14527435)
80. Ji SJ, Zhuang BQ, Falco C, Schneider A, Schuster-Gossler K, Gossler A, Sockanathan S (2006) Mesodermal and neuronal retinoids regulate the induction and maintenance of limb innervating spinal motor neurons. *Dev Biol* 297:249–261. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.05.015>. (PMID: 16781703)
81. Nam H, Jeon S, An H, Yoo J, Lee HJ, Lee SK, Lee S (2019) Critical roles of ARHGAP36 as a signal transduction mediator of shh pathway in lateral motor columnar specification. *Elife*. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.46683>. (PMID: 31305241)
82. Litovchick L, Florens LA, Swanson SK, Washburn MP, Decaprio JA (2011) DYRK1A protein kinase promotes quiescence and senescence through DREAM complex assembly. *Genes Dev* 25:801–813. <https://doi.org/10.1101/gad.203421.1>. (PMID: 21498570)
83. Sadasivam S, DeCaprio JA (2013) The DREAM complex: master coordinator of cell cycle-dependent gene expression. *Nat Rev Cancer* 13:585–595. <https://doi.org/10.1038/nrc3556>. (PMID: 23842645)
84. Wang P, Karakose E, Argmann C, Wang H, Balev M, Brody RI, Rivas HG, Liu X, Wood O, Liu H, Choleva L, Hasson D, Bernstein E, Paulo JA, Scott DK, Lambertini L, DeCaprio JA, Stewart AF (2022) Disrupting the DREAM complex enables proliferation of adult human pancreatic β cells. *J Clin Invest*. <https://doi.org/10.1172/JCI157086>. (PMID: 35700053)
85. Lee J, Platt KA, Censullo P, Ruiz I, Altaba A (1997) Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* 124:2537–2552. <https://doi.org/10.1242/DEV.124.13.2537>. (PMID: 9216996)
86. Altaba AR (1998) Combinatorial Gli gene function in floor plate and neuronal inductions by Sonic hedgehog. *Development* 125:2203–2212. <https://doi.org/10.1242/DEV.125.12.2203>. (PMID: 9584120)
87. Jacob J, Briscoe J (2003) Gli proteins and the control of spinal-cord patterning. *EMBO Rep* 4:761. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOR.EMBOR896>. (PMID: 12897799)
88. Ding Q, Motoyama J, Gasca S, Mo R, Sasaki H, Rossant J, Hui CC (1998) Diminished Sonic hedgehog signaling and lack of floor plate differentiation in Gli2 mutant mice. *Development* 125:2533–2543. <https://doi.org/10.1242/DEV.125.14.2533>. (PMID: 9636069)
89. Matisse MP, Epstein DJ, Park HL, Platt KA, Joyner AL (1998) Gli2 is required for induction of floor plate and adjacent cells, but not most ventral neurons in the mouse central nervous system. *Development* 125:2759–2770. <https://doi.org/10.1242/DEV.125.15.2759>. (PMID: 9655799)
90. Hui CC, Angers S (2011) Gli proteins in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27:513–537. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-CELLBIO-092910-154048>. (PMID: 21801010)
91. Motoyama J, Milenkovic L, Iwama M, Shikata Y, Scott MP, Hui CC (2003) Differential requirement for Gli2 and Gli3 in ventral neural cell fate specification. *Dev Biol* 259:150–161. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00159-3](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00159-3). (PMID: 12812795)
92. Bai CB, Stephen D, Joyner AL (2004) All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves an activator function of Gli3. *Dev Cell* 6:103–115. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00394-0](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00394-0). (PMID: 14723851)
93. Lei Q, Zelman AK, Kuang E, Li S, Matisse MP (2004) Transduction of graded Hedgehog signaling by a combination of Gli2 and Gli3 activator functions in the developing spinal cord. *Development* 131:3593–3604. <https://doi.org/10.1242/dev.01230>. (PMID: 15215207)
94. Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383:407–413. <https://doi.org/10.1038/383407A0>. (PMID: 8837770)
95. Litingtung Y, Chiang C (2000) Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between Shh and Gli3. *Nat Neurosci* 3:979–985. <https://doi.org/10.1038/79916>. (PMID: 11017169)
96. Wijgerde M, McMahon JA, Rule M, McMahon AP (2002) A direct requirement for Hedgehog signaling for normal

- specification of all ventral progenitor domains in the presumptive mammalian spinal cord. *Genes Dev* 16:2849. <https://doi.org/10.1101/GAD.1025702>. (PMID: 12435628)
97. Cho G, Lim Y, Cho IT, Simonet JC, Golden JA (2014) Arx together with FoxA2, regulates Shh floor plate expression. *Dev Biol* 393:137–148. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2014.06.012>. (PMID: 24968361)
98. Varjosalo M, Keskitalo S, VanDrogen A, Nurkkala H, Vichalkovski A, Aebersold R, Gstaiger M (2013) The protein interaction landscape of the human CMGC kinase group. *Cell Rep* 3:1306–1320. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2013.03.027>. (PMID: 23602568)
99. Buljan M, Ciuffa R, van Drogen A, Vichalkovski A, Mehnert M, Rosenberger G, Lee S, Varjosalo M, Pernas LE, Spegg V, Snijder B, Aebersold R, Gstaiger M (2020) Kinase interaction network expands functional and disease roles of human kinases. *Mol Cell* 79:504–520.e9. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2020.07.001>. (PMID: 32707033)
100. Alvarez-Medina R, Cayuso J, Okubo T, Takada S, Martí E (2008) Wnt canonical pathway restricts graded Shh/Gli patterning activity through the regulation of Gli3 expression. *Development* 135:237–247. <https://doi.org/10.1242/DEV.012054>. (PMID: 18057099)
101. Ulloa F, Martí E (2010) Wnt won the war: antagonistic role of Wnt over Shh controls dorso-ventral patterning of the vertebrate neural tube. *Dev Dyn* 239:69–76. <https://doi.org/10.1002/DVDY.22058>. (PMID: 19681160)

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Review

Mirk/Dyrk1B Kinase Inhibitors in Targeted Cancer Therapy

Nikolaos Kokkorakis ^{1,2} , Marios Zouridakis ³  and Maria Gaitanou ^{1,*} 

¹ Laboratory of Cellular and Molecular Neurobiology-Stem Cells, Hellenic Pasteur Institute, 11521 Athens, Greece; nkokkorakis@pasteur.gr

² Division of Animal and Human Physiology, Department of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, 15784 Athens, Greece

³ Structural Neurobiology Research Group, Laboratory of Molecular Neurobiology and Immunology, Hellenic Pasteur Institute, 11521 Athens, Greece; mzouridakis@pasteur.gr

* Correspondence: mgaitanou@pasteur.gr

Abstract: During the last years, there has been an increased effort in the discovery of selective and potent kinase inhibitors for targeted cancer therapy. Kinase inhibitors exhibit less toxicity compared to conventional chemotherapy, and several have entered the market. Mirk/Dyrk1B kinase is a promising pharmacological target in cancer since it is overexpressed in many tumors, and its overexpression is correlated with patients' poor prognosis. Mirk/Dyrk1B acts as a negative cell cycle regulator, maintaining the survival of quiescent cancer cells and conferring their resistance to chemotherapies. Many studies have demonstrated the valuable therapeutic effect of Mirk/Dyrk1B inhibitors in cancer cell lines, mouse xenografts, and patient-derived 3D-organoids, providing a perspective for entering clinical trials. Since the majority of Mirk/Dyrk1B inhibitors target the highly conserved ATP-binding site, they exhibit off-target effects with other kinases, especially with the highly similar Dyrk1A. In this review, apart from summarizing the data establishing Dyrk1B as a therapeutic target in cancer, we highlight the most potent Mirk/Dyrk1B inhibitors recently reported. We also discuss the limitations and perspectives for the structure-based design of Mirk/Dyrk1B potent and highly selective inhibitors based on the accumulated structural data of Dyrk1A and the recent crystal structure of Dyrk1B with AZ191 inhibitor.

Keywords: Mirk/Dyrk1B kinase; cancer; cancer stem cells; quiescence; apoptosis; targeted cancer therapy; inhibitors; X-ray crystal structures



Citation: Kokkorakis, N.; Zouridakis, M.; Gaitanou, M. Mirk/Dyrk1B Kinase Inhibitors in Targeted Cancer Therapy. *Pharmaceutics* **2024**, *16*, 528. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16040528>

Academic Editors: Francesca Musumeci and Anna Carbone

Received: 24 February 2024

Revised: 8 April 2024

Accepted: 9 April 2024

Published: 11 April 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cancer therapies include surgery, chemotherapy, radiation, immunotherapy, hormone therapy, and targeted drug therapy. Targeted cancer therapy is directed against cancer-specific molecules and signaling pathways and thus has less non-specific toxicity compared to chemotherapy. Protein kinases are an important class of therapeutic targets for several human diseases, especially for human cancers because their dysregulation is implicated in tumorigenesis. Thus, exploring the role of oncogenic protein kinases has helped advances in cancer biology and led to targeted drug therapy and personalized medicine [1–4]. During the last years, there has been an increased effort in the discovery of selective and potent inhibitors for targeted cancer therapy, which benefit patients since they provide an improvement in tolerability compared to cytotoxic chemotherapies. The potential benefit of kinase inhibitors in cancer therapy depends on their high selectivity and potency against their targets, as well as on their pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) properties [5–8]. The discovery of oncogenic kinases and the complete mapping of the human kinome has increasingly pushed the research into the development of new anti-cancer drugs. Imatinib (STI571, Gleevec) was the first therapeutic protein kinase inhibitor that targets Bcr-Abl kinase in chronic myeloid leukemia (CML) [9]. Until 2018, there were 166 FDA-approved oncologic drugs, including small molecules, antibodies (mAbs), and

proteins. Notably, small molecules interacting with protein kinases represent 28% of this total in the major category [5]. In 2023, there were 72 FDA-approved inhibitors targeting different protein kinases for the treatment of neoplasms (57 against solid tumors such as breast, lung, and colon, 11 against non-solid tumors such as leukemia, and 4 against both solid and non-solid tumors) [7,8].

Several protein kinase inhibitors that have been approved by the FDA to date target Bcr-Abl kinases in chronic myeloid leukemia; epidermal growth factor receptors (EGFRs) in non-small cell lung and breast cancer; vascular endothelial growth factor receptors (VEGFRs) in renal cell carcinoma and hepatocellular carcinoma; B-Raf (BRAF) kinase in advanced metastatic melanoma; MEK kinases in BRAF V600E mutant metastatic melanoma; anaplastic lymphoma kinase (ALK) in lung adenocarcinoma; Bruton tyrosine kinase (BTK) in B cell malignancies and lymphoma; and JAK2 kinase, phosphoinositide 3-kinase (PI3K), and cyclin-dependent kinases 4/6 (CDK4/6) in metastatic breast cancer [6–8].

Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1B (Dyrk1B), also known as minibrain-related kinase (Mirk) is a member of the DYRK kinase family. DYRKs comprise a family of protein kinases involved in several signal transduction pathways critical for development and cell homeostasis. DYRKs belong to the CMGC group of proline-directed serine/threonine kinases that are characterized by their ability to phosphorylate tyrosine, serine, and threonine amino acid residues [10–12]. DYRKs acquire their catalytic activity, upon their auto-phosphorylation at the second tyrosine residue of a conserved YxY motif, located at their activation loop, losing their ability to phosphorylate tyrosine residues on their substrates, while retaining their Ser/Thr phosphorylation activity [11]. Especially, a characteristic sequence motif DYRK homology box (known as the DH box), which is located at the N-terminal of the catalytic domain, supports the auto-phosphorylation of the conserved tyrosine during the maturation of the catalytic domain [10,11]. DYRK family members have been found in all eukaryotes and constitute an evolutionarily conserved family of protein kinases, which are key players in the regulation of cell cycle and differentiation, transcription, protein stability, and apoptosis, through the phosphorylation of several target proteins [10,12,13]. The mammalian DYRK kinase family comprises five members: the Dyrk I class, which includes Dyrk1A and Dyrk1B, and the Dyrk II class, which includes Dyrk2, Dyrk3, and Dyrk4 [10–12]. Recently, Dyrk1A and Dyrk1B have been evaluated as therapeutic targets for neurodegenerative diseases [14] and cancer [15,16], respectively. The human *Dyrk1A* gene is located on chromosome 21 in the Down syndrome critical region and is associated with Down syndrome and neurodegenerative diseases [14,17], whereas the human *Dyrk1B* gene is located on chromosome 19q13.2, a region often amplified in ovarian and pancreatic cancer [18].

Dyrk1B plays a critical role in myogenesis [19–21], spermatogenesis [22], adipogenesis [23–26], and neurogenesis [27–30], and it is implicated in human diseases, such as metabolic syndrome [23–26] and cancer [16,18,31–37]. Dyrk1B exerts its functions through its regulatory effects on cell cycle progression, cell differentiation, cell survival, cell motility, transcription [12,13], and inflammation [38,39]. Moreover, Dyrk1B comprises a central mediator of Sonic hedgehog/Gli [29,40–43], PI3K/mTOR/AKT [42,44], and RAF/MEK/ERK [45,46] signaling pathways in cancer. Dyrk1B is normally expressed at high levels in skeletal muscle and testis, with increased relative expression in cardiac muscle and brain compared to other normal tissues [19,47]. Dyrk1B was found to be overexpressed in various solid tumors and cancer cell lines, acting as a G0/G1 checkpoint kinase [16,48], maintaining the quiescence of cancer cells [16,18] and their viability under normoxic or hypoxic conditions [18,49], and as a tumor survival factor [16,35,37,45,50,51], thus conferring chemoresistance in cancer cells [52]. In particular, Dyrk1B is highly expressed in colorectal [15,31,53], prostate [54–56], and lung cancer [45,50]; pancreatic ductal adenocarcinomas [32,57–60]; rhabdomyosarcomas [61]; osteosarcomas [62]; and liposarcomas [63]. In addition, overexpression of Dyrk1B has been reported in breast [37,64,65], ovarian [18,33,35,36], and cervical cancer [66] and in melanoma [67].

Recently, Dyrk1B has emerged as a novel therapeutic target for cancer. Here, we review the research that has demonstrated Dyrk1B to be a valuable therapeutic target in cancer, and we refer to efforts and recent advances in the field of medicinal chemistry aimed at generating potent and highly specific Dyrk1B inhibitors exhibiting eliminated off-target effects against other kinases and especially its closely related member Dyrk1A. Performed studies were mainly based on homology models due to the (until recently) unknown Dyrk1B crystal structure. Moreover, we refer to DYRK family structure and crystallography studies with emphasis on those of Dyrk1A. Remarkably, the Dyrk1B crystal structure in complex with its potent and specific inhibitor AZ191 was submitted to the Protein Data Bank (PDB Entry: 8C2Z) while this manuscript was under preparation.

2. Mirk/Dyrk1B Kinase Is an Emerging Therapeutic Target in Cancer

Conventional chemotherapy targets rapidly dividing cells by blocking essential phases of cell division, such as mitosis and DNA synthesis, or by taking advantage of the susceptibility of proliferating cells to genotoxic and metabolic stress. A significant portion of cancer cells exist in quiescence, a reversible non-dividing state that makes quiescent cancer cells resistant to chemotherapy. Thus, a strategy for quiescent cancer cells that are resistant to chemotherapy is to re-enter the cell cycle. The regulation of the cell cycle by Dyrk1B is mediated by the phosphorylation of cyclin D1 [27,28,48,68] and cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} [69] promoting their degradation and stability, respectively. Additional regulatory mechanisms of the cell cycle have been reported for Dyrk1A/B kinases through the DREAM complex. Dyrk1A/B kinases activate the DREAM complex by phosphorylating the MuvB subunit LIN52 at the Ser28 residue [16,70]. Given that cancer cells require active Dyrk1B kinase to remain in a G0 quiescent state, the pharmacological inhibition of Dyrk1B is a possible therapeutic strategy to overcome the chemo- and radio- resistance of quiescent cancer cells [59,66].

Moreover, Dyrk1B acts as a prosurvival factor in cancer. RNAi-mediated depletion of Dyrk1B or its pharmacological inhibition diminishes cell survival and induces apoptosis in many cancer cell lines [34,36,50,57,60,62], as reflected by the increased intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) [58,71] that are accompanied with DNA damage, indicated by phosphorylation of histone 2AX (H2AX) [72]. Moreover, Dyrk1B up-regulates the expression of several antioxidant genes, e.g., superoxide dismutases 2 and 3 (*SOD2*, *SOD3*) and ferroxidase in cancer cell lines [58,71]. The increased expression of antioxidant genes may be a mechanism of cancer cells to maintain higher ROS levels than normal cells and thus have increased sensitivity to further ROS accumulation. Hence, it has been proposed as a potential strategy for anticancer therapies targeting antioxidant mechanisms of cancer cells and the subsequent increase in intracellular cellular ROS levels [73].

Furthermore, Dyrk1B maintains the quiescence of cancer stem cells (CSCs) [74] and regulates their maintenance under normoxic or hypoxic conditions. In normoxia, oxygen-sensing prolyl-hydroxylase (PHD1) activates Dyrk1B, which inactivates ID2 protein by phosphorylating it at residue threonine 27 [49], making it unable to displace the VHL-associated protein Cullin-2 (Cul2) component from the VCB-Cul2 ubiquitin ligase complex. The active VCB-Cul2 ubiquitin ligase complex promotes the degradation of hypoxia-inducible factor HIF2 α that is required for the maintenance of cancer stem cells (CSCs) [49]. Conversely, hypoxic conditions lead to inactivated PHD1 and Dyrk1B, resulting in HIF2 α stabilization [49]. The HIF2 α stabilization facilitates CSC maintenance increasing the aggressiveness of human hypoxic brain tumors [49]. In glioblastoma cell lines, under hypoxic conditions, ID2 positively modulates HIF2 α activity. Conversely, under normoxic conditions, the elevated expression of Dyrk1B leads to HIF2 α destabilization, loss of glioma stemness, inhibition of tumor development, and a more favorable outcome for patients [49]. In addition, Dyrk1B cross-talks with the Hedgehog/Gli pathway, by inhibiting 'canonical' and enhancing 'non-canonical' Hh signaling, are implicated in cancer [40–42]. Dyrk1B functions and cross-talk with Hedgehog/Gli, PI3K/mTOR/AKT, and RAF/MEK/ERK signaling pathways implicated in cancer are summarized in Figures 1 and 2, respectively.

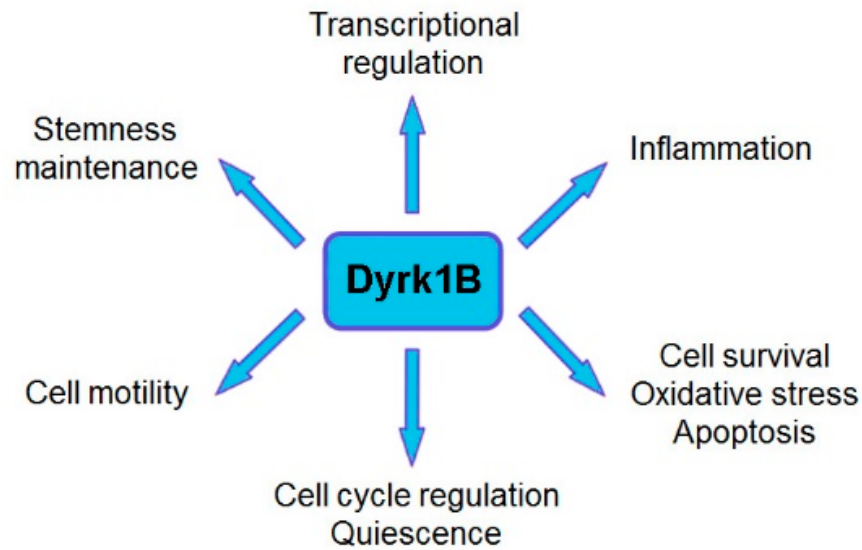


Figure 1. Summary of the major known functions of Dyrk1B. Dual-specificity tyrosine-regulated kinase 1B (Dyrk1B) plays a critical role in many biological processes in development and human disease, by regulating cell cycle progression/exit and quiescence, stemness maintenance, transcriptional regulation, cell motility, as well as cell survival, oxidative stress, and apoptosis.

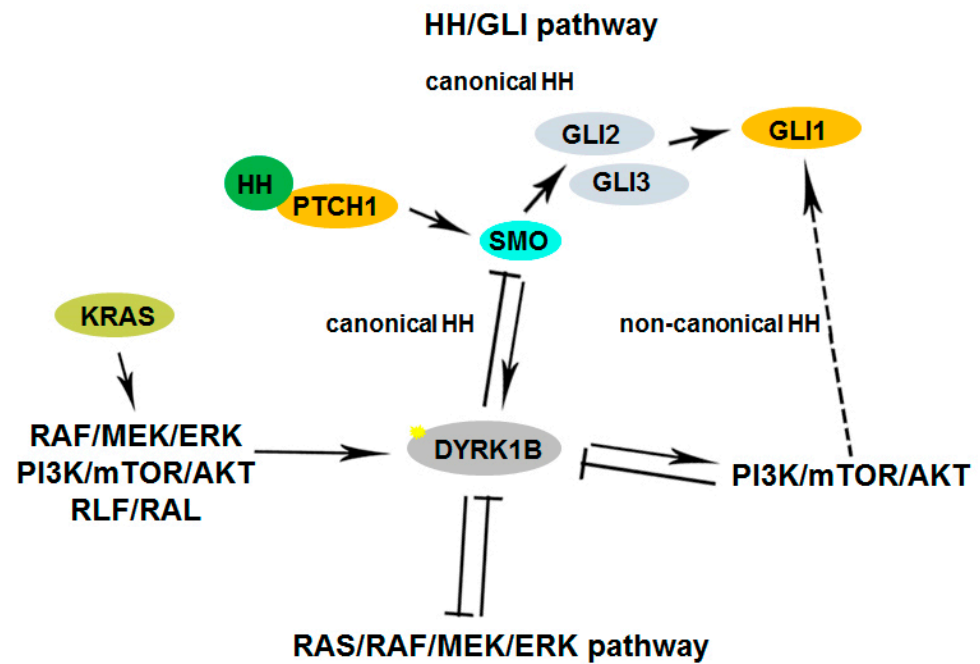


Figure 2. Cross-talk of Dyrk1B in signaling pathways in development and disease. Serum mitogens down-regulate Dyrk1B through the RAS/RAF/MEK/ERK signaling pathway. In turn, Dyrk1B is implicated in glucose homeostasis through the inhibition of the RAS–RAF–MEK pathway in metabolic syndrome which is accompanied by diabetes. In cancer, Dyrk1B is involved in a complex cross-talk with Hedgehog (Hh). Dyrk1B inhibits ‘canonical’ Hh signaling initiated by Smoothened, while it promotes ‘non-canonical’ Hh signaling and oncogenic Gli1 activity by promoting PI3K/mTOR/AKT signaling and PI3K–AKT-mediated stability of the Gli1 transcription factor. Conversely, activated AKT directly inhibits the expression of Dyrk1B. In cancer, oncogenic mutant RAS (KRAS) initiates the ‘non-canonical’ HH pathway through the activation of Dyrk1B, via an elusive mechanism, employing several RAS effectors such as RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT, and RLF/RAL. Dashed lines represent indirect mechanisms and yellow star represents phosphorylation HH: Hedgehog; ERK: Extracellular signal-regulated kinases; SMO: Smoothened.

3. Mirk/Dyrk1B Kinase Inhibitors

3.1. AZ191 Inhibitor

AZ191 was identified in a protein kinase drug discovery project of AstraZeneca among a set of 6-azaindoles and was found to exhibit potent and selective inhibition of Dyrk1B in a kinase-selectivity screening (Figure 3). In particular, AZ191 inhibited Dyrk1B kinase activity in a cell-free assay with an IC_{50} of 17 nM, displaying about 5- and 110-fold increased selectivity over Dyrk1A (IC_{50} of 88 nM) and Dyrk2 (IC_{50} of 1890 nM), respectively [68]. Following its discovery, several studies have used AZ191 in Dyrk1B targeted cancer therapy combined or not with other kinase inhibitors and/or chemo- and radio-therapy approaches [46,63,67,68,75–78].

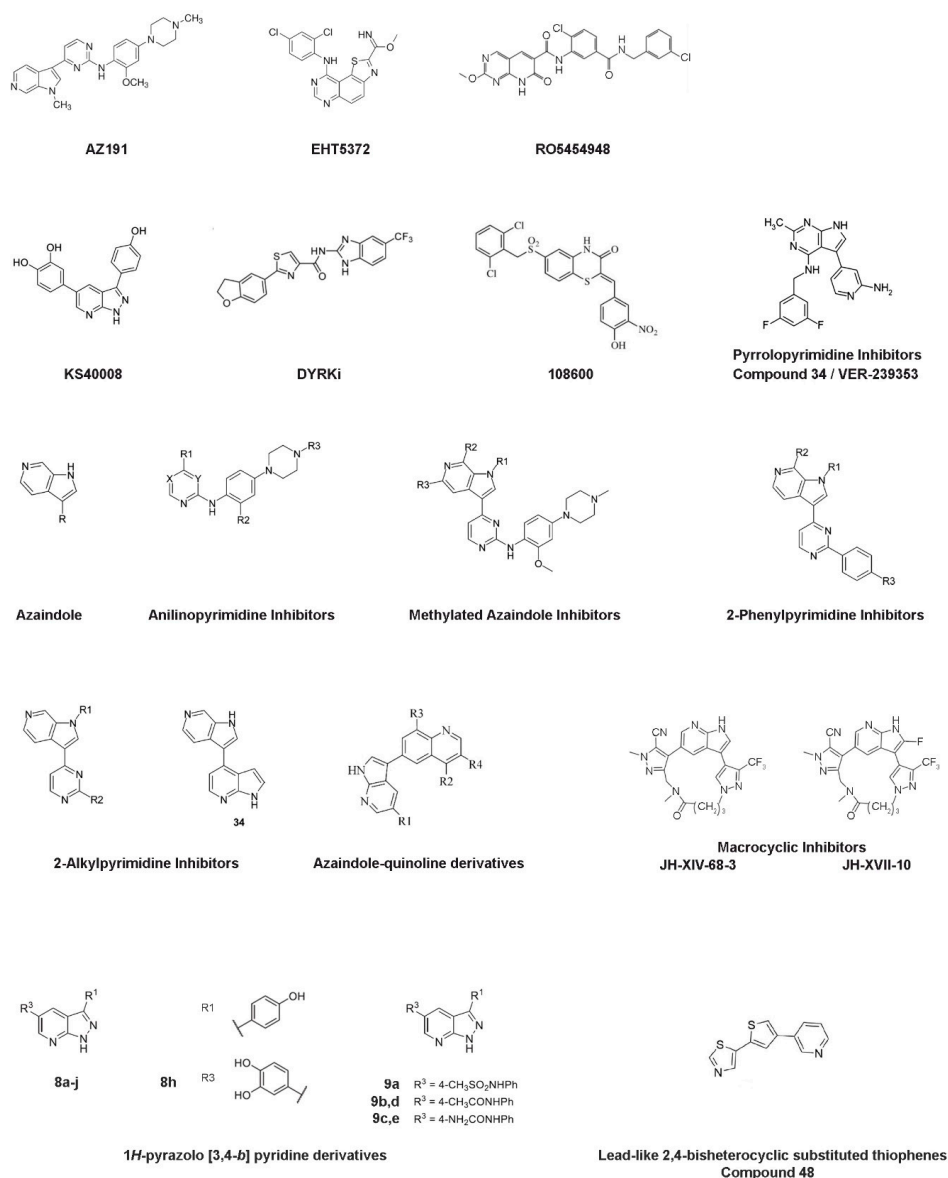


Figure 3. Chemical structures of the Mirk/Dyrk1B kinase inhibitors. Chemical structures of known Dyrk1B inhibitors that are referred to this review. Notably, the VER-239353 inhibitor (compound 34) that belongs to pyrrolopyrimidine inhibitors [79] is different from the compound 34 that belongs to 2-alkylpyrimidine inhibitors [80].

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is an aggressive invasive head–neck malignancy with a 5-year survival rate of <50%. It is associated with recurrence and metastasis. In a recent study [81] aiming to eliminate quiescent cancer stem cells (CSCs), a combinatorial

drug approach was applied in primary OSCC cultures derived from patients. In particular, Dyrk1B, topoisomerase II, and histone deacetylase were targeted with AZ191, mitoxantrone (MX), and mocetinostat (MO) inhibitors, respectively. The effect of double treatments by using AZ191 and MX or AZ191 and MO inhibitors, respectively, promoted cancer cells to exit the quiescence state. Moreover, combined co-treatments with AZ191/MX or AZ191/MO resulted in CSCs with decreased glutathione levels, increased ROS levels, increased DNA damage, and increased mitochondrial stress, as indicated by elevated levels of cytochrome c [81]. These results provide a combinatorial therapeutic approach to target and minimize the quiescence and viability of oral CSCs simultaneously [81].

Dyrk1B is highly expressed in triple-negative breast cancer (TNBC) and is essential for TNBC cell proliferation and mobility. TNBC patients exhibit high expression of Dyrk1B and poor survival. Also, Ccdc97 and Znf581 were positively correlated with Dyrk1B expression and might be involved in Dyrk1B-mediated tumor malignancy in patients with TNBC, suggesting Dyrk1B as a potential therapeutic target for TNBC. Silencing or inhibition of Dyrk1B by AZ191 decreased the viability of TNBC cells by arresting the cell cycle at the G1 phase and reducing metastatic characteristics, such as migration and invasion. These results support Dyrk1B as a potential target in TNBC therapy [65].

Liposarcoma is a soft tissue sarcoma accounting for 20% of all sarcoma cases. Conventional chemotherapeutic agents have limited efficacy in patients with liposarcoma. Higher Dyrk1B expression levels in liposarcoma are correlated with a poor prognosis. Dyrk1B silencing by RNA interference or Dyrk1B inhibition by AZ191 inhibitor suppressed tumor growth, decreased cell motility and migration, and induced apoptosis in the liposarcoma cell lines SW872 and SW982 [63]. In addition, combinatorial treatment of SW872 and SW982 cells with AZ191 and doxorubicin resulted in increased cytotoxicity as detected by MTT assay, suggesting that Dyrk1B inhibition enhances the anti-cancer effects of doxorubicin [63].

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most prevalent cancer without effective treatment. The proliferative and oncogenic trophinin-associated protein (TROAP) has an essential role in several malignancies such as prostate cancer, gastric cancer, colorectal cancer, and HCC [82–86]. TROAP dramatically drives HCC cell growth, increasing the malignant proliferation of HCC cells in vitro and in vivo, leading to poor survival of patients with HCC. TROAP exerts its oncogenic function in HCC through its interaction with Dyrk1B. TROAP switches Dyrk1B activity by direct bounding, resulting in the cytoplasmic translocation of Dyrk1B, thus promoting cell cycle progression via activation of Akt/GSK-3 β /Cyclin D1 signaling [75]. The mitigated TROAP effect was demonstrated in mouse xenografts with TROAP-overexpressing HCC cells by blocking Dyrk1B activity using AZ191. Moreover, AZ191 treatment enhanced the cytotoxic effect of the chemotherapy drug cisplatin in vivo. Combined treatment with cisplatin and the Dyrk1B inhibitor AZ191 effectively inhibited tumor growth in xenograft tumor assays in BALB/c nude mice injected with Hep3B or PLC8024 hepatocellular carcinoma cell lines [75]. Therefore, targeting Dyrk1B activity may be a promising therapeutic approach for HCC patients with high expression of TROAP.

Notably, synergistic effects of Dyrk1B inhibition combined with chemotherapy have been reported in tumor cell killing [44,53,63,75,81]. Dyrk1B inhibition combined with radiotherapy remains to be investigated. In a novel approach [77] aimed at overcoming radiotherapy-related treatment resistance by targeting Dyrk1B kinase activity, the specific Dyrk1B inhibitor AZ191 was used with ionizing radiation (IR) to enhance tumor cell killing under stress conditions in SW620 colorectal cancer cells. Under serum starvation and hypoxic conditions, Dyrk1B protein expression is upregulated in tumor cells, thereby mediating cell cycle arrest as a stress-survival mechanism. To investigate the relevance of Dyrk1B as a stress regulator combined with radiotherapy, colorectal cancer cells SW620 were irradiated under normal and serum starvation conditions with and without AZ191. Treatment with AZ191 resulted in reduced proliferative activity and clonogenicity of SW620 cells alone or in combination with IR, which correlated with DNA damage and increased ROS levels. In particular, AZ191 successfully targeted the hypoxic core of tumor spheroids, while IR preferentially targeted cancer cells under normoxia in the edge of the

spheroids. A combined treatment effect was also observed in colorectal carcinoma (CRC) organoids but not in healthy tissue-derived organoids [77]. Hence, the combined treatment of Dyrk1B inhibition and radiotherapy is a promising therapeutic strategy against colorectal cancer [77].

3.2. EHT5372 Inhibitor

Deregulation of PI3K/PTEN/Akt/mTOR signaling was observed in solid tumors and in pancreatic and ovarian cancer and plays a crucial role in drug resistance [42,44], indicating mTOR as an attractive drug target. mTOR inhibition alone is not sufficient for the treatment of pancreatic cancer. Inhibition of the mTOR pathway by its inhibitors RAD001, WYE354, or rapamycin resulted in increased Dyrk1B protein levels [44]. Similarly, increased Dyrk1B expression was observed by targeting Akt with AZD5363 or MK-2206 inhibitors. Thus, the pharmacological inhibition of Dyrk1B could be beneficial in cancer therapy targeting mTOR signaling. Indeed, the usage of Dyrk1B inhibitor EHT5372 (Figure 3) enhanced the toxicity of mTOR inhibitor RAD001 in pancreatic Panc1 and ovarian TOV21G, SKOV3, and OVCAR3 cancer cells [44]. Also, combined targeting of Dyrk1B and mTORC1/2, by using both AZ191 and KU-0063794 inhibitors, respectively, resulted in pronounced cytotoxicity in Panc1 cells [42].

Furthermore, *in vivo* studies revealed the beneficial effect of Dyrk1B pharmacological inhibition by the inhibitor EHT5372. In particular, Panc1 cells were injected subcutaneously in J:NU athymic mice, which were then subjected to intraperitoneal injection with the Dyrk1B inhibitor EHT5372. Administration of EHT5372 in the J:NU mice reduced the size of Panc1 pancreatic cancer xenografts in a dose-dependent manner, suggesting that EHT5372-induced apoptosis predominates the re-entry of cancer cells into the cell cycle. In agreement, *in vitro* treatment of Panc1 spheroid cells with 10 μ M EHT5372 induced apoptosis, resulting in a 13-fold decrease in spheroid size and increased the number of single cells. In addition, the intraperitoneal administration of the inhibitor EHT5372 in Pdx-1-cre LSL/KrasG12D/Ink4a/Arf null B6 mice, a mouse model of pancreatic cancer, resulted in maintenance of their viability for up to 8 weeks, whereas the control mice showed only 30% survival by 8 weeks. Moreover, when co-treated with Dyrk1B inhibitor EHT5372 and mTOR inhibitor RAD001, Pdx-1-cre LSL/KrasG12D/Ink4a/Arf null B6 mice remained viable for 8 weeks, as in the case of EHT5372 treatment alone, but the synergistic effect of co-administration of EHT5372 and RAD001 inhibitors resulted in a 30-fold reduction in pancreatic cancer size and in a reduced number of microscopic tumor foci by 2-fold compared to RAD001 alone [60].

3.3. RO5454948 Inhibitor

As mentioned above, Dyrk1B is implicated and highly expressed in pancreatic cancer. Previous studies have demonstrated that Dyrk1B protein levels are elevated up to 10-fold in quiescent G0 cancer cells and that Dyrk1B acts by several mechanisms to block cell proliferation and increase the expression of the antioxidant genes *SOD2* and *SOD3* resulting in reduced reactive oxygen species (ROS) levels and increased cell viability [58,71]. Targeting Dyrk1B activity by the compound A (hereafter named RO5454948 inhibitor, see Figure 3), identified from a Roche generic kinase inhibitor library, in the pancreatic cancer cell lines Panc1, SU86.86, and AsPc1 and in the colorectal cancer (CRC) cell line SW620 resulted in increased apoptosis, indicated by cleavage of the apoptotic proteins PARP and Caspase-3, and increased ROS levels. Moreover, DNA damage was observed upon Dyrk1B inhibition, as indicated by increased phosphorylation of the histone protein H2AX. In addition, Dyrk1B inhibition by RO5454948 sensitized the pancreatic cancer cell lines Panc1 and SU86.86 to gemcitabine, as well as the colorectal cancer cell line SW620 to cisplatin [59]. To estimate the potential off-target effect of the RO5454948 inhibitor against Dyrk1A, the closest relative member of Dyrk1B, two colon cancer cell lines were used; SW620 cells, which express both Dyrk1B and Dyrk1A, and HCT116 cells, which express only Dyrk1A, as controls for off-target effects of the RO5454948 inhibitor. Notably, no effect was observed

upon treatment of HCT116 cells with RO5454948, suggesting that the beneficial effect of RO5454948 in cancer cell lines is due to Dyrk1B inhibition and not to Dyrk1A [59].

Moreover, the *Dyrk1B* gene was found to be amplified or upregulated in approximately 75% of ovarian cancers [36]. Pharmacological inhibition of Dyrk1B with RO5454948 inhibitor in the ovarian cancer cell lines TOV21G, SKOV3, and OVCAR3 similarly resulted in a selective effect on G0-quiescent cancer cells by promoting cell cycle re-entry, increased apoptosis, ROS levels, and DNA damage [36].

3.4. KS40008 Inhibitor

Another study [87] demonstrated a novel mechanism connecting DyrK1A/B function with autophagy in cancer. In particular, a novel inhibitor for Dyrk1A/1B, named KS40008 (4-(3-(4-hydroxyphenyl)-1H-pyrazolo [3,4-*b*] pyridin-5-yl) benzene-1,2-diol) (Figure 3) showed potent cytotoxicity toward HCT116 and SW480 colorectal cancer cell lines, stimulated the metabolic reprogramming of HCT116 and SW480 cells by reducing mitochondrial respiration, and induced the mitochondrial and ER stress-dependent autophagy. Moreover, KS40008 displayed strong cytotoxicity to CRC organoids compared with the chemotherapeutic drug 5-FU [87].

3.5. DYRKi Inhibitor

Aberrant activation of Hh/Gli signaling was observed in several human cancers [88,89]. Targeting the Hh/Gli signaling with Smoothed (SMO) inhibitors showed remarkable therapeutic effects in patients with advanced and metastatic basal cell carcinoma [41]. Having identified Dyrk1B as a novel drug target for the inhibition of oncogenic Hh/Gli signaling, a Dyrk I class inhibitor, referred to as DYRKi (Figure 3), was used as a potent antagonist of Hh/Gli signaling. In particular, the DYRKi inhibitor efficiently repressed SMO-dependent Gli1 and SMO-independent Gli1 expression in human medulloblastoma cells (DAOY) [41]. Moreover, in vivo inhibition of Dyrk1B by DYRKi impaired the oncogenic growth of Panc1 and L3.6pl xenografts in Foxn1^{nu} nude mice [41].

3.6. 108600 Inhibitor

Triple negative breast cancer (TNBC) remains challenging because of heterogeneous responses to chemotherapy [90]. Limited response to chemotherapy is associated with a greater risk of metastatic progression. Breast cancer stem cells (BCSCs) consist of a chemotherapy-resistant subpopulation responsible for tumor initiation, progression, and metastases. Thus, high-risk patients would benefit from treatments that target chemotherapy-resistant TNBC and enhance chemosensitivity [90]. A novel multi-kinase inhibitor, 108600 (Figure 3), targets Dyrk1A/B, Dyrk2, CK2 α 1/ α 2, and TNIK kinases in a dose-dependent manner and exhibits beneficial effects on the TNBC BCSC sub-population. In vitro treatment of triple negative MDA-MB-231 cells and CTG1883 TNBC organoids with 108600 led to reduced growth of colony and mammosphere formation of BCSCs by inducing G2/M arrest and apoptosis. In vivo treatment with 108600 of female athymic (NCr-nu/nu) mice injected with MDA-MB-231 xenografts resulted in decreased tumor volumes [90]. In addition, administration of 108600 in tumor-bearing nod/scid/gamma (NSG) mice, injected with ductal carcinoma TNBC PDX (TM00098) cells, resulted in reduced tumors in vivo without adverse effects on the animals' body weights and exhibited beneficial effects in TNBC PDX tumor growth combined with paclitaxel chemotherapy. Thus, combinatory treatment with 108600 and chemotherapy suppresses the growth of pre-established TNBC metastases, providing supplemental support for the clinical translation of this inhibitor to clinical trials [90].

3.7. Pyrrolopyrimidine Inhibitors—VER-239353 Inhibitor (Compound 34)

By using fragment and structure-based discovery methods, Walmsley and colleagues [79] aimed to identify highly selective adenosine triphosphate (ATP) competitive inhibitors targeting Dyrk1A and Dyrk1B. Fragment-based discovery hits identified multiple series of pyrrolopyrimidine compounds, including the compound 34, [4-(4-[(3,5-Difluorophenyl)methyl] amino)-2-methyl-7H-pyrrolo-[2,3-*d*] pyrimidin-5-yl) pyridine-2-amine] (Figure 3). The

methyl group on the pyrrolopyrimidine of compound **34** was reported to be an important determinant of selectivity for Dyrk1A/Dyrk1B against other kinases. Compound **34**, named thereafter VER-239353 inhibitor, exhibits similar low nM potency against Dyrk1A and Dyrk1B, since Dyrk1A and Dyrk1B vary by only one amino acid in the ATP-binding pocket (Dyrk1B-Leu 192 instead of Dyrk1A-Met 240 at their hinge regions of the ATP-binding pocket; see Figure 4) and exhibits high selectivity versus Dyrk II class despite their similar ATP-binding sites. In particular, VER-239353 exhibits an IC₅₀ of 7 nM and 2.4 nM against Dyrk1A and Dyrk1B, respectively, and >30-fold selectivity versus Dyrk2 [79]. Human glioblastoma U87MG cells treated with VER-239353 exhibited increased expression of pRb, cyclin D1, and Dyrk1B, and increased the expression of p21 and p27 cell cycle inhibitors, resulting in G0 to G1 transition. According to that study [91], paradoxically, cell proliferation was inhibited by the induced re-expression of Dyrk1B inhibition, but the cell growth arrest induced in quiescent cells by Dyrk1A/B inhibition was reversible through the addition of growth-promoting factors. Furthermore, Dyrk1A/B inhibition by VER-239353 combined with CHK1 inhibition by VER-157932 induced DNA damage in U87MG multi-cellular spheroids. In vivo, VER-239353 inhibited the growth of U87MG glioblastoma xenografts in Crl:NU(NCr)-Foxn1nu mice [91].

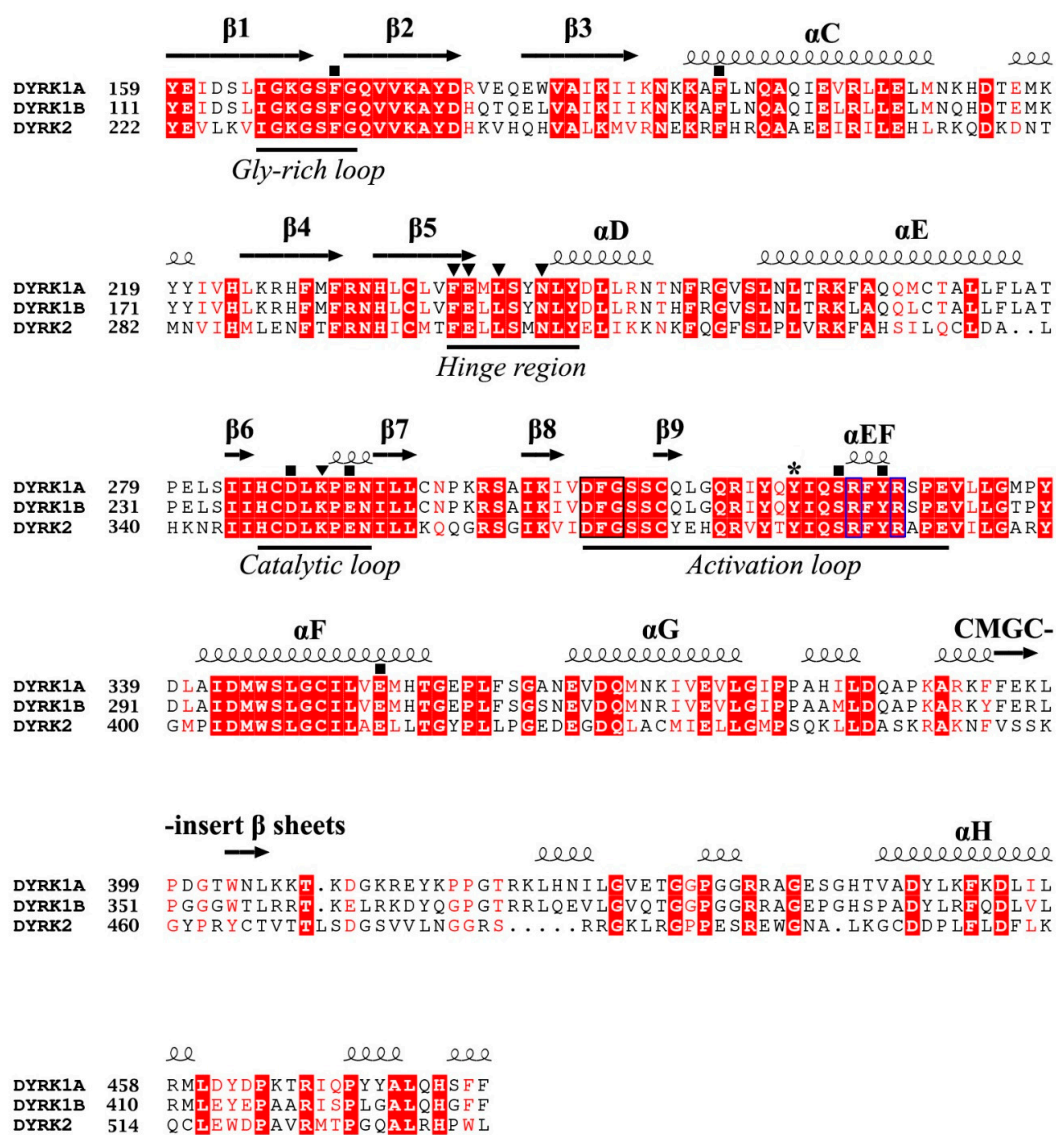


Figure 4. Sequence alignment of the kinase domains of human Dyrk1A (Uniprot: Q13627), Dyrk1B (Uniprot: Q9Y463), and Dyrk2 (Uniprot: Q92630) kinases. The main secondary structure elements

and characteristic functional loops/regions are shown. The auto-phosphorylation site on the activation loops of Dyrk1A and Dyrk1B is shown with an asterisk. Identical amino acid residues are highlighted in red and similar residues are shown in red letters. The Dyrk1A residues making critical (mostly polar) interactions with the bound ATP (see Section 4.2) are indicated with black boxes, whereas the residues interacting with a consensus peptide substrate (see Section 4.3) are indicated with inverted triangles. All of these residues are highly conserved in DYRKs, except Dyrk1A-Asn 244, which is replaced with an aspartic in Dyrk3 (Dyrk 3 and Dyrk 4 are not shown for simplicity). The conserved DFG motif of the activation loop is enclosed in a blue box and the conserved Arg residues interacting with the phosphorylated Tyr (shown with an asterisk) of the activation loop are enclosed in a black box (see Section 4.1). The sequence identity between kinase domains of Dyrk1A and Dyrk1B is 85%, whereas their identity with Dyrk2 is 45%.

3.8. Anilinopyrimidine, Methylated Azaindole, 2-Phenylpyrimidine, and 2-Alkylpyrimidine Inhibitors

In a study [80] aiming to develop potent Dyrk1B inhibitors for combined treatment with MEK inhibitors AZD6244 or AZD8330 in melanoma tumors, a set of potent, selective, and cellular active Dyrk1B inhibitors was developed through a combination of targeted screening and structure-based design, as synthetic derivatives of azaindole (compound 2). In particular, anilinopyrimidine inhibitors (compounds 12–18), methylated azaindole inhibitors (compounds 19–22), 2-phenylpyrimidine inhibitors (compounds 27–30), and 2-alkylpyrimidine inhibitors (compounds 31–34), were synthesized and subsequently tested for Dyrk1B inhibition, by using in vitro kinase assays, cell assays, kinase selectivity profiles, and in vivo bioavailability studies (Figure 3). Notably, compound 34 described in this study belongs to 2-alkylpyrimidines and is different from VER-239353 (also referred to as compound 34 [79]), as mentioned above (see Figure 3). All described compounds in this study showed increased Dyrk1B selectivity with IC_{50} values ranging from 1 nM (compound 14) to 98 nM (compound 27) as determined in cell-free assays. Compounds 19, 31, and 33 with Dyrk1B IC_{50} values of 3 nM, 7 nM, and 7 nM, respectively, were furthermore assessed for broader kinase selectivity in a diverse panel of 124 kinases at a concentration of 1 μ M, and compound 33 appeared to be the most selective of these, with no other kinases inhibited above the 50% level. Unfortunately, none of these three compounds, when tested in A375 melanoma cells in combination with the MEK inhibitor AZD6244, exhibited a significant increase in cell death compared to AZD6244 alone.

3.9. Azaindole-Quinoline-Based Inhibitors

Given that GSK3 β kinase constitutes a natural off-target in the design of selective Dyrk I class inhibitors, the selectivity over GSK3 β is one of the major objectives in the development of potent Dyrk1B inhibitors. Regarding this point of view, Szamborska-Gbur and colleagues [92] performed a detailed comparative structural analysis of ATP-binding sites between Dyrk1B and GSK3 β , and they identified key regions responsible for selectivity by building and optimizing a homology model taking advantage of comparative modeling and metadynamics simulations in the absence of the Dyrk1B structure at that time. By calculating the interaction energies between docked ligands in the ATP-binding sites of both kinases, they proposed amino acid residues responsible for potency and selectivity. Especially, three amino acid residues located in the ATP pocket of Dyrk1B, such as Phe 190, Val 258, and Glu 243, are crucial for the high affinity and selectivity of both compounds B and C series belonging to azaindole–quinoline derivatives (Figure 3). These findings support the design of potent and selective Dyrk1B inhibitors based on azaindole–quinoline derivatives.

3.10. Macrocyclic Inhibitors—JH-XVII-10 Inhibitor

Development of the first macrocyclic inhibitors of Dyrk1A/Dyrk1B was recently reported by Powell and colleagues [93]. Based on the JH-XIV-68-3 inhibitor (compound 3) that displays selectivity for Dyrk1A/Dyrk1B in biochemical and cellular assays, as well

as an antitumor efficacy in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cell lines, the derivative JH-XVII-10 inhibitor (compound **10**) was generated by the introduction of fluorine to block the 2-position of the azaindole, rendering the molecule resistant to aldehyde oxidase (AO) activity, in which the JH-XIV-68-3 inhibitor (compound **3**) is vulnerable (Figure 3). The JH-XIV-68-3 inhibitor showed an IC₅₀ value of 13 nM or 19 nM for Dyrk1A and Dyrk1B, respectively, while the JH-XVII-10 inhibitor has an IC₅₀ value of 3 nM or 5 nM for Dyrk1A and Dyrk1B, respectively. The JH-XIV-68-3 and JH-XVII-10 inhibitors were further tested for their selectivity in the HNSCC CAL27 and FaDu cell lines and showed a significant decrease in cell proliferation [93]. Thus, these novel scaffolds present a potential new avenue for therapeutic development targeting Dyrk I class in cancer, but they do not solve the problem of selectivity between Dyrk1A and Dyrk1B kinases.

3.11. 1*H*-pyrazolo [3,4-*b*] Pyridine Inhibitors—Compound **8h**

Park and colleagues [94] reported the synthesis of 1*H*-pyrazolo [3,4-*b*] pyridine derivatives as potent inhibitors of Dyrk1A/Dyrk1B. In particular, a set of diaryl 1*H*-pyrazolo [3,4-*b*] pyridine derivatives (compound series **8** and **9**) (Figure 3) showed excellent Dyrk1B inhibitory enzymatic activities with IC₅₀ values ranging between 3 and 287 nM. Among them, the 3-(4-hydroxyphenyl), 5-(3,4-dihydroxyphenyl)-1*H*-pyrazolo [3,4-*b*] pyridine inhibitor (compound **8h**), which exhibits the highest inhibition for Dyrk1B with IC₅₀ of 3 nM, showed remarkable cytotoxicity in the colon cancer cell lines RKO, HCT116, DLD-1, SW480, and SW620. In addition, treatment of SW480 and SW620 spheroids with 5 μM of compound **8h** for 10 days resulted in cell growth inhibitory effect. Moreover, compound **8h** showed a cytotoxic effect in patient-derived colon cancer organoids after 5 days of treatment, suggesting its potential medicinal value in colon cancer. However, it should be mentioned that all of the produced series of compounds **8** and **9** described in this study (Figure 3) also exhibit specificity for Dyrk1A to some extent.

3.12. Lead-Like 2,4-Bisheterocyclic Substituted Thiophenes Inhibitors—Compound **48**

In a study [95] aiming to discover novel inhibitors for Dyrk I class kinases, a library of lead-like 2,4-bisheterocyclic substituted thiophenes was screened, and the thiophene compound **48** (Figure 3) was identified as a potent and selective Dyrk1B inhibitor [95]. In particular, compound **48** exhibits IC₅₀ of 0.1 μM, 0.07 μM, and 0.04 μM for Dyrk1A, Dyrk1B, and Dyrk2 kinases, respectively. In a larger selectivity screen, only Clk1 and Clk4 were identified as additional off-targets of compound **48**. Treatment of the osteosarcoma cell line U2OS with thiophene compound **48** resulted in increased apoptosis and increased ROS levels [95].

3.13. In Silico Identification of Potent and Selective Dyrk1B Inhibitors

A previous study reported a novel multi-stage compound discovery algorithm, the QSAR algorithm, which aimed at the in silico identification of potent and selective Dyrk1B inhibitors from a large set of initial candidates [96]. The method used structure-based docking and ligand-based quantitative structure-activity relationship modeling based on known crystal structures of Dyrk1A. This approach resulted in the identification of small molecules that target Dyrk1B with high efficiency and specificity. In particular, the QSAR algorithm shortened the optimization cycle to only three iterations on subsets of size <10% each and reduced the required number of compounds to be synthesized by 70%.

4. DYRK Structure, Crystallography Studies, and Inhibitor Selectivity

To successfully design small compounds with potent inhibitory and highly specific functions, it is necessary to incorporate knowledge accumulated by X-ray crystal structures of DYRKs and homologous proteins. As previously mentioned, DYRKs constitute an evolutionarily conserved family of kinases comprising five members (Dyrk1A, Dyrk1B, Dyrk2, Dyrk3, and Dyrk4). Apart from their kinase domain, they have additional regulatory domains required for their function, localization, and inter-molecular interactions. Their

catalytic kinase domain follows the DYRK-characteristic homology (DH) box, comprising an N-terminal lobe (N-lobe) with five antiparallel β -strands and a conserved regulatory α C-helix, as well as a larger C-terminal (C-lobe) consisting of α -helices [97]. Their kinase domain is highly conserved as shown from the sequence alignment of human Dyrk1A and Dyrk1B with Dyrk2, with Dyrk1A sharing 85% identity with Dyrk1B, while both of these kinases present 45% identity with Dyrk2 (Figure 4). To date, many crystal structures of Dyrk1A in its complexes with several natural or synthetic inhibitors have been published (some of which are discussed below), facilitating drug design against Dyrk1A, whereas elucidation of the structure of Dyrk1B has been accomplished only very recently.

4.1. Overall Structure of the Kinase Domain of DYRKs and Activation Mechanism

The crystal structure of the ternary complex of Dyrk1A bound with an ATP-competitive inhibitor (DJM2005) and a consensus peptide substrate RARPTPALRE [98] showed that ATP binds at a specific region between the N- and C-lobes of the kinase domain, connected by a hinge region, called the ATP-pocket or cleft, whereas the substrate binding site is in close proximity to the ATP pocket, lying in a region flanked by their catalytic loop, α C helix, and activation loop (Figure 5A). The activation loop is located at the C-lobe (Figure 5A) extending from the conserved DFG motif (Asp 307, Phe 308, and Gly 309, Dyrk1A numbering) to the also conserved RFYRSPE sequence (Figure 4). As discussed previously, DYRKs rapidly auto-activate during their folding process by autophosphorylation on the second tyrosine residue of the conserved activation loop YxY motif (Tyr 321 of Dyrk1A or Tyr 273 of Dyrk1B) (Figures 4 and 5A) and subsequently abolish their tyrosine phosphorylation ability, while retaining only serine/threonine phosphorylation ability [99]. Phosphorylation of this conserved tyrosine leads to a “locked” re-orientation of the otherwise loose and flexible activation loop in such a way that the substrate binding site is formed, as is shown by the superposition of the activated Dyrk1A with the structure of the non-phosphorylated and inactivated human Abl kinase (Figure 5B).

In the literature [98,100], the active conformation of kinases is often referred to as “DFG-in” conformation, since the conserved Asp 307 in Dyrk1A (Asp 259 in Dyrk1B) is pointing inwards the catalytic cleft (Figure 5C), while “DFG-out” corresponds to their inactive state, where the “unlocked” activation loop occupies the cleft for substrate binding, as for example is shown for the inactive Abl kinase upon its superposition to the constitutively active Dyrk1A (Figure 5C). In the DFG-in motif, the aspartate forms contact with the phosphate groups of the bound ATP either directly, or through magnesium. The phenylalanine in DFG is responsible for the hydrophobic interaction with the α C-helix and the correct orientation of aspartate in the DFG motif. The locked, or otherwise activated, conformation of the activation loop is governed by polar interactions of the phosphorylated tyrosine with two highly conserved arginine residues, Arg 325 and Arg 328 (Dyrk1A numbering), located at the end of the activation loop (Figure 5D). Thus, in contrast to other kinases, mature DYRKs are always activated, and their overall structure is the same, regardless of the binding of ATP or substrate to them, as shown by the superposition of the crystal structure of the Apo-form (free-state) of Dyrk2 with the Dyrk1A with a bound ATP analogue (ADPNP) and a substrate peptide (Figure 5A).

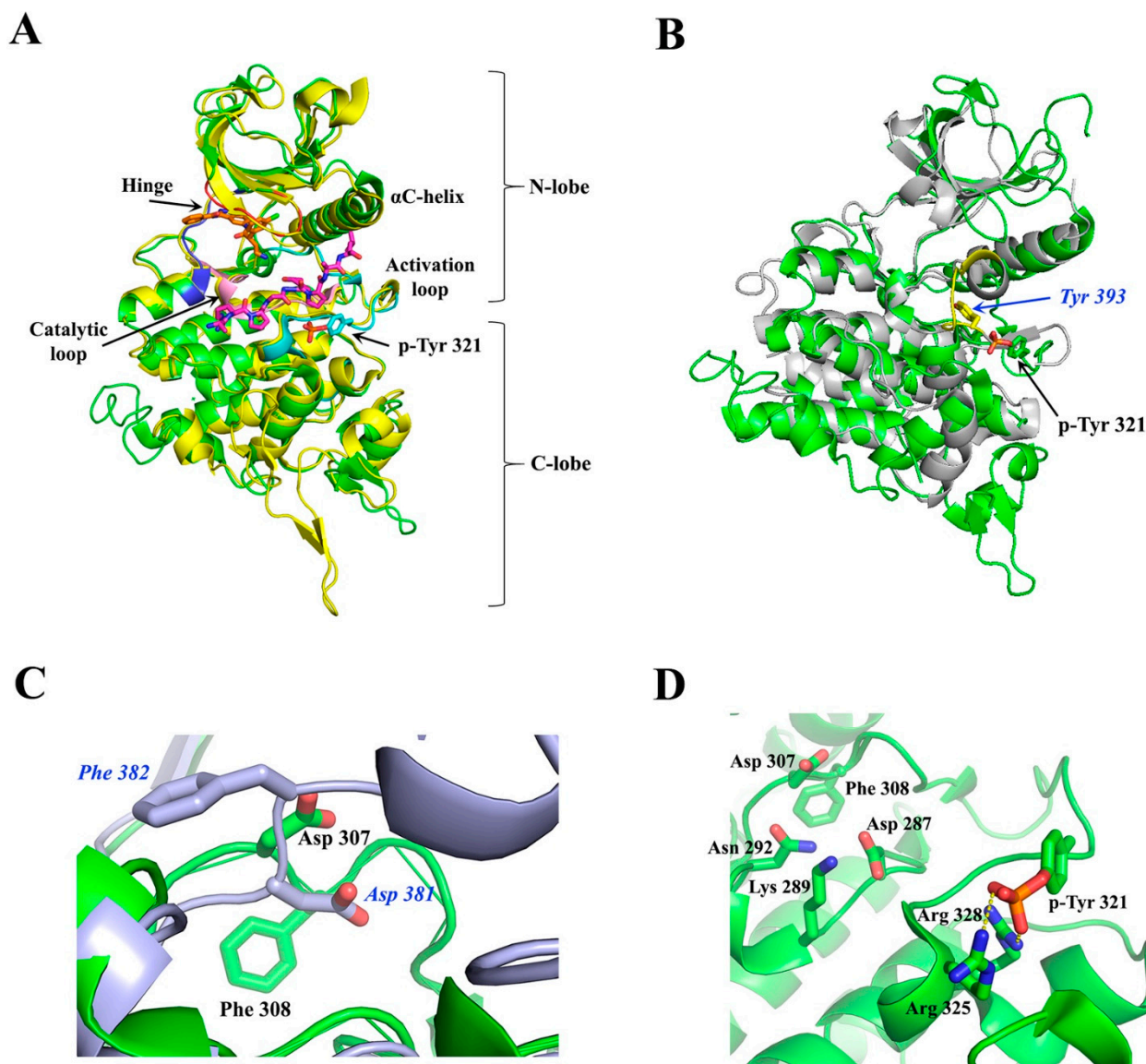


Figure 5. Structural comparisons of activated and non-activated homologous kinases. (A) Superposition of Dyrk1A (green) with Dyrk2 (yellow). Dyrk1A (PDB: 2WO6) [98] is in complex with the consensus substrate peptide RARPTPALRE (in magenta) and with the ATP inhibitor DJM2005 (in orange), whereas Dyrk2 is in its Apo-form (PDB: 3K2L) [98]. The hinge region and the activation and catalytic loops of Dyrk1A are colored dark blue, light blue, and pink, respectively. (B) Superposition of the activated Dyrk1A (PDB: 2WO6; green) with the corresponding inactivated Abl kinase domain (PDB: 2HYY; light grey) [100]. The autophosphorylated Tyr 321 (p-Tyr 321) of Dyrk1A and the equivalent non-phosphorylated Tyr 393 of Abl (in blue italics) are shown as sticks. The section of the activation loop of Abl, colored in yellow, adopts the “inactive conformation”, occupying the substrate binding cleft. (C) Close-up views of the DFG-in and DFG-out motifs in Dyrk1A (PDB: 2WO6; green) and Abl (PDB: 2HYY; light grey), respectively. Dyrk1A residues are shown in black, whereas Abl residues are in blue italics. (D) Close-up view of the activation loop and of the substrate binding cleft of Dyrk1A (PDB: 2WO6). The polar interactions between p-Tyr 321 and Arg residues 325 and 328, locking the activation loop in its “active conformation”, are shown. Also shown is the DFG-in conformation of Dyrk1A, where Asp 307 together with Asn 292 can co-ordinate Mg^{2+} for the hydrolysis of the bound ATP molecule, and the orientation of the catalytic Lys 289 which catalyzes the phosphoryl transfer reaction from the ATP to the substrate. Images were created with PyMOL 1.8.0.4 version.

4.2. ATP-Binding Site of DYRKs

Interestingly, the crystal structure of Dyrk1A with an ATP analogue (ADPNP) has also been solved [79], revealing the interactions of a bound ATP molecule with the ATP cleft. As shown in Figure 6A, the adenosine moiety of ADPNP is buried in a hydrophobic pocket with the phosphate backbone oriented towards the solution packed below the glycine-rich loop. The glycine-rich loop comprises a GxGxxG motif (G₁₆₆KGSFG in Dyrk1A and G₁₁₈KGSFG in Dyrk1B; see Figure 4), constituting a part of ATP pocket from the N-lobe. An important residue, located at the beginning of the hinge region in the ATP-pocket of DYRKs, is the so-called “gatekeeper” phenylalanine residue (Phe 238 in Dyrk1A and Phe 190 in Dyrk1B) which confers selectivity to inhibitors in DYRKs among other kinases (Figure 6A). The most critical residues making polar interactions with the bound ATP molecule (Figure 6A) are highly conserved in DYRKs (Figure 4), which makes it a challenge for the development of selective ATP-competitive inhibitors for a specific kinase. Of course, there are many other hydrophobic interactions with the bound ADPNP molecule (not shown in Figure 6A), which are also conferred by highly conserved hydrophobic residues from parts of the Gly-rich loop, the catalytic loop, and the hinge region that flanks the ATP pocket.

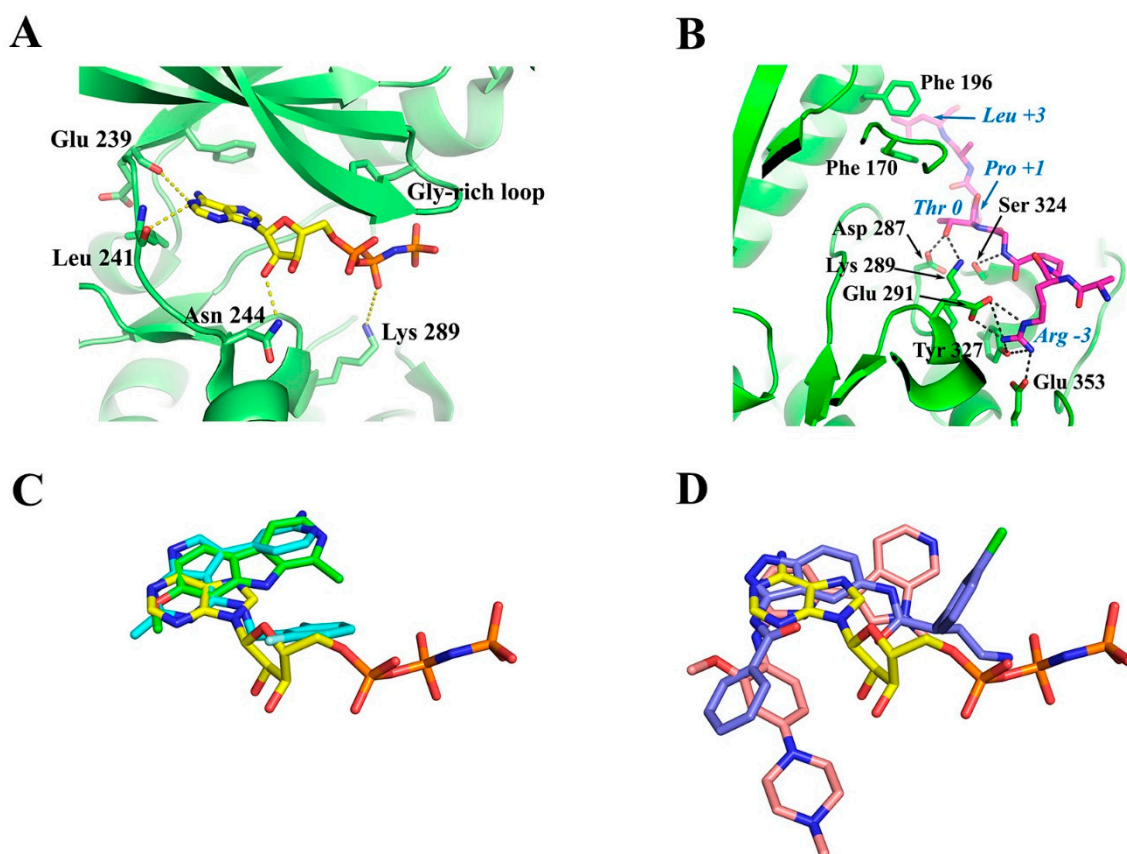


Figure 6. ATP- and substrate-binding sites of Dyrk1A. (A) Close-up view of ADPNP (ATP analogue) bound to the ATP-binding site of Dyrk1A (PDB: 7A4O) [79]. The polar interactions between Dyrk1A and ADPNP (stick representation) are only shown as dashed lines. (B) Close-up view of the interactions of the consensus substrate peptide RARPTPALRE with Dyrk1A (PDB: 2WO6) [98]. Polar interactions are shown as dashed lines. The Dyrk1A interacting residues are in black, whereas the residues of the peptide are in blue italics. The numbering of the peptide residues starts at 0 for the threonine residue which is due to phosphorylation. (C,D) Superposition of small (C) and large (D)

ATP-competitive inhibitors with ADPNP as in their crystal structures with Dyrk1A. The adenosine moiety of ADPNP is in yellow and its phosphate groups are in orange. In panel (C), the natural inhibitor harmine is shown in green (PDB: 3ANR) [97] and the VER-239353 inhibitor in cyan (PDB: 7A5N) [79]. In panel (D), the AZ191 inhibitor is shown in light pink (PDB: 8C3G) [101] and the DJM2005 inhibitor (PDB: 2VX3) [98] in deep blue. Images were created with PyMOL 1.8.0.4 version.

4.3. Substrate-Binding Site of DYRKs

The substrate binding site of DYRKs has also been revealed in detail as in the case of the crystal structure of the ternary complex of Dyrk1A with the consensus substrate peptide RARPT*PALRE (asterisk denotes the threonine residue to be phosphorylated) and the ATP-competitive inhibitor DJM2005 (PDB ID: 2WO6) [98]. This study showed that Dyrk1A phosphorylates substrates exclusively on Thr or Ser residues on peptides that have proline at the P+1 position (P denotes the phosphorylation site), explaining why DYRKs have been considered to be proline-directed kinases. However, the study also showed that preference for the P+1 site is not exclusively limited to proline, since some DYRKs can also accommodate small hydrophobic residues (e.g., Gly, Ala, Val) at this site. Another notable preference observed was arginine at position P−3 of the substrate, poised for occupying the C lobe electronegative pocket (interactions with Glu 291, Tyr 327, and Glu 353), as well Leu at P+3 making hydrophobic interactions with two highly conserved phenylalanine residues (Phe 170 and Phe 196) from the Gly-rich loop and the α C-helix (Figure 6B). Also, the hydroxyl group of the Thr residue of the peptide substrate, which is the target of phosphorylation (designated as Thr 0), was shown to form hydrogen bonds with the highly conserved Asp 287 and Lys 289 of the catalytic loop and with the invariant Ser 324 of the activating loop of Dyrk1A (Figure 6B).

As revealed by crystal structures of other GMGC kinases with bound ATP and Mg^{2+} or Mn^{2+} (e.g., cAMP-dependent protein kinase; PDB: 1ATP) [102], the conserved Asp 307 together with the invariant Asn 292 co-ordinates the divalent ion, while the transfer of the γ -phosphate group to the bound substrate is mediated by the catalytic Lys 289 which is in an optimal conformation by its interaction with Asp 287 (numbering is based on Dyrk1A). The spatial orientation of the critical Dyrk1A residues for catalysis of substrate phosphorylation is shown in the upper left part of Figure 5D. Taken together, the structural information accumulated by the crystal structures of DYRKs and some homologous kinases shows that apart from the ATP-binding site, the residues that govern substrate recognition (Figure 6B) are also highly conserved, as shown in the alignment among Dyrk1A, Dyrk1B, and Dyrk2 (Figure 4). Thus, development of specific inhibitors targeting the substrate binding site is also a very challenging task.

4.4. Development of Dyrk1A/B Inhibitors

To our knowledge, all reported active compounds to date with known crystal complexes with DYRKs target the ATP-binding site of DYRKs, despite the high similarity between them, based on limited subtle differences that occur at these sites to achieve selectivity. It should also be noted that when designing selective Dyrk1A/B inhibitors, natural off-targets of the GMGC family are also taken into account to avoid undesired side effects.

In general, kinase inhibitors are mainly classified into three types: Type I refers to ATP-competitive inhibitors that block the kinase through binding at its ATP-binding domain. Types II and III are non-ATP-competitive inhibitors and both bind to allosteric druggable pockets that are present in the DFG-out conformation. The difference between them is that type II inhibitors bind both to a part of the ATP-binding site and to the nearby allosteric pocket available in the inactive kinases, whereas type III inhibitors occupy exclusively the allosteric pocket [100,103–105]. Apparently, in the case of DYRKs, which are constitutively active (DFG-in conformation), the development of type I inhibitors has attracted the interest of the most researchers, leading to a plethora of highly potent Dyrk1A inhibitors, and in various cases to their crystal structures with Dyrk1A, as elegantly reviewed recently [106].

However, it has been shown that for constitutively active kinases such as DYRKs, a functional transitional intermediate exists during their translation with a probable different structure to that of the mature kinase, which is capable of autophosphorylation of the activation-loop tyrosine [99]. Moreover, this pioneering study showed that this transitional intermediate can be targeted by small molecules preventing its autophosphorylation. Interestingly, a selective inhibitor of the transitional-intermediate of Dyrk1A was then discovered, named FINDY [107], which inhibited the Dyrk1A folding process by preventing its autophosphorylation on Ser 97 with an IC_{50} value of 110 nM, whereas it did not affect Dyrk1B and Dyrk2. Whether the FINDY-targeted folding intermediate of Dyrk1A resembles an inactive DFG-out conformation of Dyrk1A remains to be answered.

During the last decade, following the first crystal structure of Dyrk1A with harmine [97], a potent natural Dyrk1A inhibitor with reported IC_{50} values in the range 30–80 nM [108,109], several studies have been published based on X-ray crystallography and sometimes in combination with NMR to identify the binding motifs of fragments; indeed some hits from such fragment screening analyses have been optimized to highly potent compounds for Dyrk1A and in some cases with enhanced selectivity against off-targets [110]. For example, through such structural approaches, novel harmine-derived or synthetic compounds with high selectivity on Dyrk1A/B were discovered, as well as new scaffolds for Dyrk1A/B inhibition, including biaryl compounds and imidazopyridine compounds [79,97,111–114]. One such promising compound discovered by fragment screening and X-ray crystallography is the VER-239353 inhibitor (Figure 6C), a highly selective, well-tolerated Dyrk1A/B inhibitor which was discussed in more detail above [79].

The common feature of these studies is that they all deal with ATP-competitive inhibitors binding to the canonical binding site, but occupying different volumes inside this site and in some cases introducing novel interactions with the cleft apart from those observed in ATP analogues (Figure 6C, D). In the absence, until very recently, of a crystal structure of Dyrk1B, homology models have been used to develop specific inhibitors for this kinase. Following such approaches, the design of some potent and selective azaindole-quinoline-based Dyrk1B inhibitors has been reported, as previously mentioned [92].

4.5. Dyrk1B Crystal Structure

Interestingly, while this review was under preparation, the first crystal structure of human Dyrk1B in its complex with the small ATP-competitive inhibitor AZ191 appeared (PDB ID: 8C2Z), together with the structure of a similar complex with the highly homologous Dyrk1A (PDB ID: 8C3G) (Figure 7A) [101]. As expected, due to the highly conserved ATP-binding pocket and the similar affinities of these kinases to AZ191 (discussed in Section 3.1), the binding motif of AZ191 to Dyrk1A and Dyrk1B is almost identical (Figure 7B), justifying the quite similar potencies for Dyrk1A and Dyrk1B as mentioned previously. However, these two binding sites differ only in one non-interacting residue at the hinge; instead of a Leu residue at position 192 in Dyrk1B, a larger Met residue exists in Dyrk1A at position 240, whose longer side-chain could come into closer proximity with the bound molecules. Therefore, appropriate modifications at the phenyl ring of AZ191 could lead to a modified molecule with enhanced selectivity between these highly similar kinases.

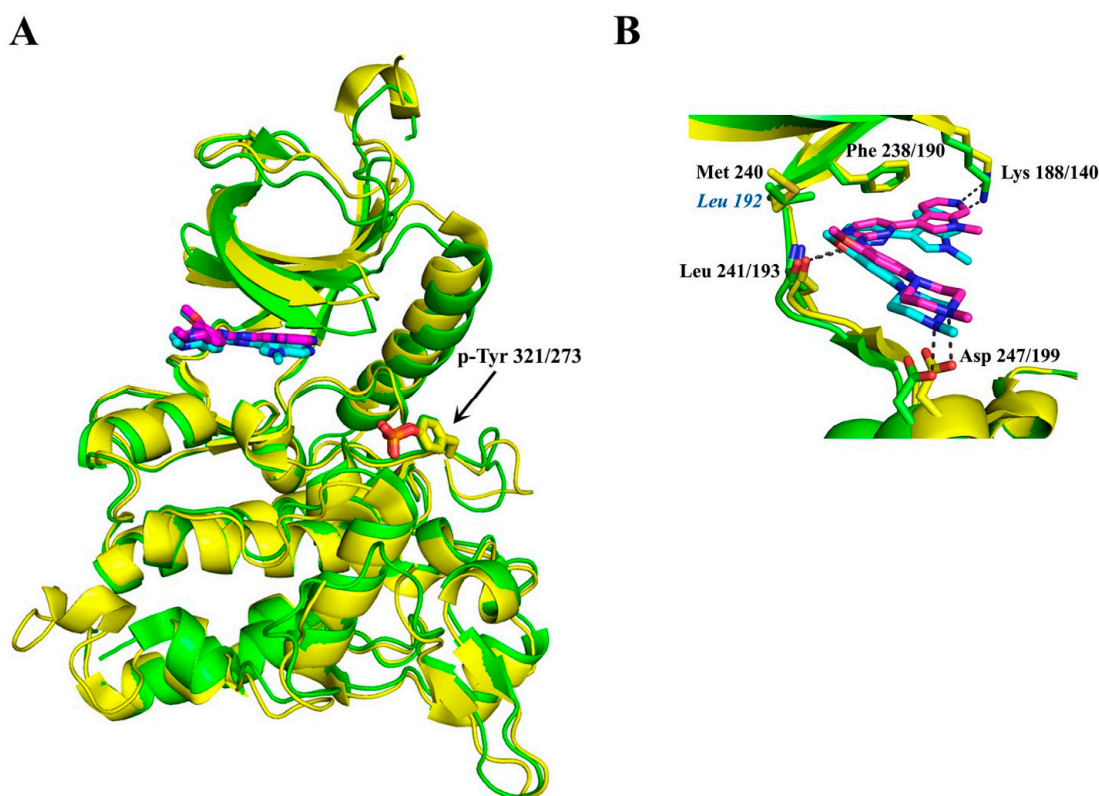


Figure 7. Structural comparison of Dyk1A and Dyrk1B kinase domains. (A) Superposition of the AZ191-bound kinase domains of Dyrk1A (yellow; 8C3G) and Dyrk1B (green; 8C2Z) [101]. The bound AZ191 is shown in magenta or cyan for Dyrk1A or Dyrk1B, respectively. The phosphorylated tyrosine residues 321 or 273 of Dyrk1A or Dyrk1B, respectively, are shown in sticks on their activation loops. (B) Close-up view of important and identical polar interactions between AZ191 and Dyrk1A or Dyrk1B. The only difference in the ATP-binding site of these kinase domains is one residue in the hinge region (Dyrk1B-Leu 192 instead of Dyrk1A-Met 240). Images were created with PyMOL 1.8.0.4 version.

4.6. Current Limitations and Future Perspectives in the Development of Dyrk1B Inhibitors

The ATP-binding site is highly conserved in DYRKs, making it a challenge for the development of selective ATP-competitive inhibitors for Dyrk1B. Moreover, amino acids that govern substrate recognition in Dyrk1A, Dyrk1B, and Dyrk2 kinases are also highly conserved, rendering the design of selective non-ATP-competitive inhibitors for Dyrk1B difficult as well. Another main limitation in the design of selective Dyrk1B inhibitors has been its unknown crystal structure. Remarkably, a crystallizable construct of Dyrk1B was reported recently, together with its crystal structure in its complex with AZ191 inhibitor [101]. Thus, fragment screening of libraries by using this Dyrk1B construct is now feasible to identify novel hits that could serve as a scaffold for the design of highly selective Dyrk1B inhibitors. Also, a good strategy would be the use of a crystallizable complex of Dyrk1B with an ATP analogue for performing in crystallo fragment screening to identify druggable pockets which could accommodate highly selective allosteric non-ATP-competitive inhibitors. In parallel, a series of modifications in already reported ATP-competitive inhibitors targeting Dyrk1B could lead to novel molecules with enhanced selectivity.

5. Conclusions

Mirk/Dyrk1B kinase is a negative regulator of the cell cycle maintaining the survival of quiescent cancer cells and conferring resistance to chemo- and radio-therapy approaches. Pharmacological inhibition of Dyrk1B leads quiescent cancer cells to re-enter the cell cycle, rendering them vulnerable to conventional cancer treatments, induces apoptosis in cancer

cells, and reduces tumor size in vitro and in vivo. As Dyrk1B has been established as a pharmacological target in cancer therapy, the discovery of Dyrk1B-specific and potent inhibitors has become even more desired and highly needed. Most of the Dyrk1B inhibitors reported to date are proven effective in cancer treatment, but still exhibit off-target effects on other GMGC or DYRK kinases, and mainly on Dyrk1A, the closest member of Dyrk1B. Interestingly, AZ191, EHT5372, DYRKi, 108600, and VER-239353 inhibitors exhibit clinical relevance, providing a perspective for entering clinical trials. Accumulating X-ray crystal structures of complexes of Dyrk1A with various inhibitors together with the recently accomplished elucidation of the crystal structure of Dyrk1B open the way for designing highly selective Dyrk1B inhibitors.

Author Contributions: N.K., M.Z. and M.G.: writing—original draft preparation; N.K., M.Z. and M.G.: writing—review and editing; M.G.: funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Funded by the General Secretariat for Research and Innovation under the action “National research network to elucidate the genetic basis of Alzheimer’s and Parkinson’s neurodegenerative diseases, detect reliable biomarkers, and develop innovative computational technologies and therapeutic strategies on the basis of precision medicine” TAA TAEDR-0535850—BrainPrecision [European Union (NextGenerationEU); National Recovery and Resilience Plan Greece 2.0].

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Dancey, J.; Sausville, E.A. Issues and Progress with Protein Kinase Inhibitors for Cancer Treatment. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 296–313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Arora, A.; Scholar, E.M. Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315*, 971–979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Grant, S.K. Therapeutic Protein Kinase Inhibitors. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 1163–1177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cohen, P.; Cross, D.; Jänne, P.A. Kinase Drug Discovery 20 Years after Imatinib. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2022**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Magalhaes, L.G.; Ferreira, L.L.G.; Andricopulo, A.D. Recent Advances and Perspectives in Cancer Drug Design. *An. Acad. Bras. Ciências* **2018**, *90*, 1233–1250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kannaiyan, R.; Mahadevan, D. A Comprehensive Review of Protein Kinase Inhibitors for Cancer Therapy. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2018**, *18*, 1249–1270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Roskoski, R. Properties of FDA-Approved Small Molecule Protein Kinase Inhibitors: A 2023 Update. *Pharmacol. Res.* **2023**, *187*, 106552. [[CrossRef](#)]
- Roskoski, R. Properties of FDA-Approved Small Molecule Protein Kinase Inhibitors: A 2024 Update. *Pharmacol. Res.* **2024**, *200*, 107059. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Valent, P. Imatinib-Resistant Chronic Myeloid Leukemia (CML): Current Concepts on Pathogenesis and New Emerging Pharmacologic Approaches. *Biologics* **2007**, *1*, 433.
- Aranda, S.; Laguna, A.; Luna, S. de la DYRK Family of Protein Kinases: Evolutionary Relationships, Biochemical Properties, and Functional Roles. *FASEB J.* **2011**, *25*, 449–462. [[CrossRef](#)]
- Soppa, U.; Becker, W. DYRK Protein Kinases. *Curr. Biol.* **2015**, *25*, R488–R489. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Becker, W. Emerging Role of DYRK Family Protein Kinases as Regulators of Protein Stability in Cell Cycle Control. *Cell Cycle* **2012**, *11*, 3389–3394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mercer, S.E.; Friedman, E. Mirk/Dyrk1B: A Multifunctional Dual-Specificity Kinase Involved in Growth Arrest, Differentiation, and Cell Survival. *Cell Biochem. Biophys.* **2006**, *45*, 303–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Arbones, M.L.; Thomazeau, A.; Nakano-Kobayashi, A.; Hagiwara, M.; Delabar, J.M. DYRK1A and Cognition: A Lifelong Relationship. *Pharmacol. Ther.* **2019**, *194*, 199–221. [[CrossRef](#)]
- Friedman, E. Mirk/Dyrk1B in Cancer. *J. Cell. Biochem.* **2007**, *102*, 274–279. [[CrossRef](#)]
- Becker, W. A Wake-up Call to Quiescent Cancer Cells—Potential Use of DYRK1B Inhibitors in Cancer Therapy. *FEBS J.* **2018**, *285*, 1203–1211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Park, J.; Song, W.J.; Chung, K.C. Function and Regulation of Dyrk1A: Towards Understanding Down Syndrome. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 3235–3240. [[CrossRef](#)]
- Friedman, E. Mirk/Dyrk1B Kinase in Ovarian Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 5560–5575. [[CrossRef](#)]
- Deng, X.; Ewton, D.Z.; Pawlikowski, B.; Maimone, M.; Friedman, E. Mirk/Dyrk1B Is a Rho-Induced Kinase Active in Skeletal Muscle Differentiation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 41347–41354. [[CrossRef](#)]
- Mercer, S.E.; Ewton, D.Z.; Deng, X.; Lim, S.; Mazur, T.R.; Friedman, E. Mirk/Dyrk1B Mediates Survival during the Differentiation of C2C12 Myoblasts. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 25788–25801. [[CrossRef](#)]

21. Deng, X.; Ewton, D.Z.; Mercer, S.E.; Friedman, E. Mirk/Dyrk1B Decreases the Nuclear Accumulation of Class II Histone Deacetylases during Skeletal Muscle Differentiation. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 4894–4905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Masuda, T.; Itoh, K.; Higashitsuji, H.; Higashitsuji, H.; Nakazawa, N.; Sakurai, T.; Liu, Y.; Tokuchi, H.; Fujita, T.; Zhao, Y.; et al. Cold-Inducible RNA-Binding Protein (Cirp) Interacts with Dyrk1b/Mirk and Promotes Proliferation of Immature Male Germ Cells in Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 10885–10890. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Keramati, A.R.; Fathzadeh, M.; Go, G.W.; Singh, R.; Choi, M.; Faramarzi, S.; Mane, S.; Kasaei, M.; Sarajzadeh-Fard, K.; Hwa, J.; et al. A Form of the Metabolic Syndrome Associated with Mutations in DYRK1B. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *370*, 1909–1919. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Hickmott, J. DYRK1B Variant Linked to Autosomal Dominant Metabolic Syndrome. *Clin. Genet.* **2015**, *87*, 30–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Abu Jhaisha, S.; Widowati, E.W.; Kii, I.; Sonamoto, R.; Knapp, S.; Papadopoulos, C.; Becker, W. DYRK1B Mutations Associated with Metabolic Syndrome Impair the Chaperone-Dependent Maturation of the Kinase Domain. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Armanmehr, A.; Jafari Khamirani, H.; Zoghi, S.; Dianatpour, M. Analysis of DYRK1B, PPARG, and CEBPB Expression Patterns in Adipose-Derived Stem Cells from Patients Carrying DYRK1B R102C and Healthy Individuals During Adipogenesis. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **2022**, *20*, 576–583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Tsioras, K.; Papastefanaki, F.; Politis, P.K.; Matsas, R.; Gaitanou, M. Functional Interactions between BM88/Cend1, Ran-Binding Protein M and Dyrk1B Kinase Affect Cyclin D1 Levels and Cell Cycle Progression/Exit in Mouse. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e82172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Gaitanou, M.; Segklia, K.; Matsas, R. CEND1, a Story with Many Tales: From Regulation of Cell Cycle Progression/Exit of Neural Stem Cells to Brain Structure and Function. *Stem Cells Int.* **2019**, *2019*, 2054783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Kokkorakis, N.; Gaitanou, M. Minibrain-Related Kinase/Dual-Specificity Tyrosine-Regulated Kinase 1B Implication in Stem/Cancer Stem Cells Biology. *World J. Stem Cells* **2020**, *12*, 1553. [[CrossRef](#)]
30. Kokkorakis, N.; Douka, K.; Nalmpanti, A.; Politis, P.K.; Zagoraïou, L.; Matsas, R.; Gaitanou, M. Mirk/Dyrk1B Controls Ventral Spinal Cord Development via Shh Pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* **2024**, *81*. [[CrossRef](#)]
31. Lee, K.; Deng, X.; Friedman, E. Mirk Protein Kinase Is a Mitogen-Activated Protein Kinase Substrate That Mediates Survival of Colon Cancer Cells. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 3631–3637.
32. Jin, K.; Park, S.; Ewton, D.Z.; Friedman, E. The Survival Kinase Mirk/Dyrk1B Is a Downstream Effector of Oncogenic K-Ras in Pancreatic Cancer. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 7247–7255. [[CrossRef](#)]
33. Hu, J.; Nakhla, H.; Friedman, E. Transient Arrest in a Quiescent State Allows Ovarian Cancer Cells to Survive Suboptimal Growth Conditions and Is Mediated by Both Mirk/Dyrk1b and P130/RB2. *Int. J. Cancer* **2011**, *129*, 307–318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Gao, J.; Yang, X.; Yin, P.; Hu, W.; Liao, H.; Miao, Z.; Pan, C.; Li, N. The Involvement of FoxO in Cell Survival and Chemosensitivity Mediated by Mirk/Dyrk1B in Ovarian Cancer. *Int. J. Oncol.* **2012**, *40*, 1203–1209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Davis, S.J.; Sheppard, K.E.; Pearson, R.B.; Campbell, I.G.; Gorringer, K.L.; Simpson, K.J. Functional Analysis of Genes in Regions Commonly Amplified in High-Grade Serous and Endometrioid Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 1411–1421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Hu, J.; Deng, H.; Friedman, E.A. Ovarian Cancer Cells, Not Normal Cells, Are Damaged by Mirk/Dyrk1B Kinase Inhibition. *Int. J. Cancer* **2013**, *132*, 2258–2269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Chen, Y.; Wang, S.; He, Z.; Sun, F.; Huang, Y.; Ni, Q.; Wang, H.; Wang, Y.; Cheng, C. Dyrk1B Overexpression Is Associated with Breast Cancer Growth and a Poor Prognosis. *Hum. Pathol.* **2017**, *66*, 48–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. He, M.; Gu, J.; Zhu, J.; Wang, X.; Wang, C.; Duan, C.; Ni, Y.; Lu, X.; Li, J. Up-Regulation of Dyrk1b Promote Astrocyte Activation Following Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation. *Neuropeptides* **2018**, *69*, 76–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Blom, K.; Rubin, J.; Berglund, M.; Jarvius, M.; Lenhammar, L.; Parrow, V.; Andersson, C.; Loskog, A.; Fryknäs, M.; Nygren, P.; et al. Mebendazole-Induced M1 Polarisation of THP-1 Macrophages May Involve DYRK1B Inhibition. *BMC Res. Notes* **2019**, *12*, 234. [[CrossRef](#)]
40. Lauth, M.; Bergström, Å.; Shimokawa, T.; Tostar, U.; Jin, Q.; Fendrich, V.; Guerra, C.; Barbacid, M.; Toftgård, R. DYRK1B-Dependent Autocrine-to-Paracrine Shift of Hedgehog Signaling by Mutant RAS. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 718–725. [[CrossRef](#)]
41. Gruber, W.; Hutzinger, M.; Elmer, D.P.; Parigger, T.; Sternberg, C.; Cegielski, L.; Zaja, M.; Leban, J.; Michel, S.; Hamm, S.; et al. DYRK1B as Therapeutic Target in Hedgehog/GLI-Dependent Cancer Cells with Smoothed Inhibitor Resistance. *Oncotarget* **2016**, *7*, 7134–7148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Singh, R.; Dhanyamraju, P.K.; Lauth, M. DYRK1B Blocks Canonical and Promotes Non-Canonical Hedgehog Signaling through Activation of the MTOR/AKT Pathway. *Oncotarget* **2017**, *8*, 833–845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Singh, R.; Holz, P.S.; Roth, K.; Hupfer, A.; Meissner, W.; Müller, R.; Buchholz, M.; Gress, T.M.; Elsässer, H.P.; Jacob, R.; et al. DYRK1B Regulates Hedgehog-Induced Microtubule Acetylation. *Cell. Mol. Life Sci.* **2019**, *76*, 193–207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Deng, X.; Hu, J.; Ewton, D.Z.; Friedman, E. Mirk/Dyrk1B Kinase Is Upregulated Following Inhibition of MTOR. *Carcinogenesis* **2014**, *35*, 1968–1976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Gao, J.; Zhao, Y.; Lv, Y.; Chen, Y.; Wei, B.; Tian, J.; Yang, Z.; Kong, F.; Pang, J.; Liu, J.; et al. Mirk/Dyrk1B Mediates G0/G1 to S Phase Cell Cycle Progression and Cell Survival Involving MAPK/ERK Signaling in Human Cancer Cells. *Cancer Cell Int.* **2013**, *13*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Ashford, A.L.; Dunkley, T.P.J.; Cockerill, M.; Rowlinson, R.A.; Baak, L.M.; Gallo, R.; Balmanno, K.; Goodwin, L.M.; Ward, R.A.; Lochhead, P.A.; et al. Identification of DYRK1B as a Substrate of ERK1/2 and Characterisation of the Kinase Activity of DYRK1B Mutants from Cancer and Metabolic Syndrome. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 883–900. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Leder, S.; Czajkowska, H.; Maenz, B.; De Graaf, K.; Barthel, A.; Joost, H.G.; Becker, W. Alternative Splicing Variants of Dual Specificity Tyrosine Phosphorylated and Regulated Kinase 1B Exhibit Distinct Patterns of Expression and Functional Properties. *Biochem. J.* **2003**, *372*, 881–888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Zou, Y.; Ewton, D.Z.; Deng, X.; Mercer, S.E.; Friedman, E. Mirk/Dyrk1B Kinase Destabilizes Cyclin D1 by Phosphorylation at Threonine 288. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 27790–27798. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Lee, S.B.; Frattini, V.; Bansal, M.; Castano, A.M.; Sherman, D.; Hutchinson, K.; Bruce, J.N.; Califano, A.; Liu, G.; Cardozo, T.; et al. An ID2-Dependent Mechanism for VHL Inactivation in Cancer. *Nature* **2016**, *529*, 172–177. [[CrossRef](#)]
50. Gao, J.; Zheng, Z.; Rawal, B.; Schell, M.J.; Bepler, G.; Haura, E.B. Mirk/Dyrk1B, a Novel Therapeutic Target, Mediates Cell Survival in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Cancer Biol. Ther.* **2009**, *8*, 1671–1679. [[CrossRef](#)]
51. Pérez-Sánchez, G.; Jiménez, A.; Quezada-Ramírez, M.A.; Estudillo, E.; Ayala-Sarmiento, A.E.; Mendoza-Hernández, G.; Hernández-Soto, J.; Hernández-Hernández, F.C.; Cázares-Raga, F.E.; Segovia, J. Annexin A1, Annexin A2, and Dyrk 1B Are Upregulated during GAS1-Induced Cell Cycle Arrest. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 4166–4182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. MacKeigan, J.P.; Murphy, L.O.; Blenis, J. Sensitized RNAi Screen of Human Kinases and Phosphatases Identifies New Regulators of Apoptosis and Chemoresistance. *Nat. Cell Biol.* **2005**, *7*, 591–600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Jin, K.; Ewton, D.Z.; Park, S.; Hu, J.; Friedman, E. Mirk Regulates the Exit of Colon Cancer Cells from Quiescence. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 22916–22925. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Song, L.N.; Silva, J.; Koller, A.; Rosenthal, A.; Chen, E.I.; Gelmann, E.P. The Tumor Suppressor NKX3.1 Is Targeted for Degradation by DYRK1B Kinase. *Mol. Cancer Res.* **2015**, *13*, 913–922. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Bowen, C.; Ostrowski, M.C.; Leone, G.; Gelmann, E.P. Loss of PTEN Accelerates NKX3.1 Degradation to Promote Prostate Cancer Progression. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 4124–4134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Bowen, C.; Shibata, M.; Zhang, H.; Bergren, S.K.; Shen, M.M.; Gelmann, E.P. CRISPR/Cas9-Mediated Point Mutation in Nkx3.1 Prolongs Protein Half-Life and Reverses Effects Nkx3.1 Allelic Loss. *Cancer Res.* **2020**, *80*, 4805–4814. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Deng, X.; Ewton, D.Z.; Li, S.; Naqvi, A.; Mercer, S.E.; Landas, S.; Friedman, E. The Kinase Mirk/Dyrk1B Mediates Cell Survival in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 4149–4158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Deng, X.; Ewton, D.Z.; Friedman, E. Mirk Dyrk1B Maintains the Viability of Quiescent Pancreatic Cancer Cells by Reducing Levels of Reactive Oxygen Species. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 3317–3324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Ewton, D.Z.; Hu, J.; Vilenchik, M.; Deng, X.; Luk, K.C.; Polonskaia, A.; Hoffman, A.F.; Zipf, K.; Boylan, J.F.; Friedman, E.A. Inactivation of Mirk/Dyrk1b Kinase Targets Quiescent Pancreatic Cancer Cells. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10*, 2104–2114. [[CrossRef](#)]
60. Deng, X.; Friedman, E. Mirk Kinase Inhibition Blocks the in Vivo Growth of Pancreatic Cancer Cells. *Genes Cancer* **2014**, *5*, 337–347. [[CrossRef](#)]
61. Mercer, S.E.; Ewton, D.Z.; Shah, S.; Naqvi, A.; Friedman, E. Mirk/Dyrk1b Mediates Cell Survival in Rhabdomyosarcomas. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 5143–5150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Yang, C.; Ji, D.; Weinstein, E.J.; Choy, E.; Hornicek, F.J.; Wood, K.B.; Liu, X.; Mankin, H.; Duan, Z. The Kinase Mirk Is a Potential Therapeutic Target in Osteosarcoma. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 552–558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Chen, H.; Shen, J.; Choy, E.; Hornicek, F.J.; Shan, A.; Duan, Z. Targeting DYRK1B Suppresses the Proliferation and Migration of Liposarcoma Cells. *Oncotarget* **2018**, *9*, 13154–13166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Tang, L.; Wang, Y.; Strom, A.; Gustafsson, J.A.; Guan, X. Lapatinib Induces P27Kip1-Dependent G1 Arrest through Both Transcriptional and Post-Translational Mechanisms. *Cell Cycle* **2013**, *12*, 2665–2674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Chang, C.C.; Chiu, C.C.; Liu, P.F.; Wu, C.H.; Tseng, Y.C.; Lee, C.H.; Shu, C.W. Kinome-Wide siRNA Screening Identifies DYRK1B as a Potential Therapeutic Target for Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Cancers* **2021**, *13*, 5779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Zhou, N.; Yuan, S.; Wang, R.; Zhang, W.; Chen, J.J. Role of Dual Specificity Tyrosine-Phosphorylation-Regulated Kinase 1B (Dyrk1B) in S-Phase Entry of HPV E7 Expressing Cells from Quiescence. *Oncotarget* **2015**, *6*, 30745–30761. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Li, Z.; Jiang, K.; Zhu, X.; Lin, G.; Song, F.; Zhao, Y.; Piao, Y.; Liu, J.; Cheng, W.; Bi, X.; et al. Encorafenib (LGX818), a Potent BRAF Inhibitor, Induces Senescence Accompanied by Autophagy in BRAFV600E Melanoma Cells. *Cancer Lett.* **2016**, *370*, 332–344. [[CrossRef](#)]
68. Ashford, A.L.; Oxley, D.; Kettle, J.; Hudson, K.; Guichard, S.; Cook, S.J.; Lochhead, P.A. A Novel DYRK1B Inhibitor AZ191 Demonstrates That DYRK1B Acts Independently of GSK3B to Phosphorylate Cyclin D1 at Thr286, Not Thr 288. *Biochem. J.* **2014**, *457*, 43–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Deng, X.; Mercer, S.E.; Shah, S.; Ewton, D.Z.; Friedman, E. The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor P27Kip1 Is Stabilized in G0 by Mirk/Dyrk1B Kinase. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 22498–22504. [[CrossRef](#)]
70. Litovchick, L.; Florens, L.A.; Swanson, S.K.; Washburn, M.P.; Decaprio, J.A. DYRK1A Protein Kinase Promotes Quiescence and Senescence through DREAM Complex Assembly. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 801–813. [[CrossRef](#)]

71. Hu, J.; Friedman, E. Depleting Mirk Kinase Increases Cisplatin Toxicity in Ovarian Cancer Cells. *Genes Cancer* **2010**, *1*, 803–811. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Zhu, F.; Zykova, T.A.; Peng, C.; Zhang, J.; Cho, Y.Y.; Zheng, D.; Yao, K.; Ma, W.Y.; Lau, A.T.Y.; Bode, A.M.; et al. Phosphorylation of H2AX at Ser139 and a New Phosphorylation Site Ser16 by RSK2 Decreases H2AX Ubiquitination and Inhibits Cell Transformation. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 393–403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Gorrini, C.; Harris, I.S.; Mak, T.W. Modulation of Oxidative Stress as an Anticancer Strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 931–947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Friedman, E. The Kinase Mirk/Dyrk1B: A Possible Therapeutic Target in Pancreatic Cancer. *Cancers* **2010**, *2*, 1492–1512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Li, L.; Wei, J.R.; Song, Y.; Fang, S.; Du, Y.; Li, Z.; Zeng, T.T.; Zhu, Y.H.; Li, Y.; Guan, X.Y. TROAP Switches DYRK1 Activity to Drive Hepatocellular Carcinoma Progression. *Cell Death Dis.* **2021**, *12*, 125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Hutterer, C.; Milbradt, J.; Hamilton, S.; Zaja, M.; Leban, J.; Henry, C.; Vitt, D.; Steingruber, M.; Sonntag, E.; Zeitträger, I.; et al. Inhibitors of Dual-Specificity Tyrosine Phosphorylation-Regulated Kinases (DYRK) Exert a Strong Anti-Herpesviral Activity. *Antiviral Res.* **2017**, *143*, 113–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Beckers, C.; Vasilikos, L.; Sanchez Fernandez, A.; Moor, L.; Pruschy, M. Targeting the Survival Kinase DYRK1B: A Novel Approach to Overcome Radiotherapy-Related Treatment Resistance. *Radiother. Oncol.* **2023**, *190*, 110039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Lin, J.; Zhang, P.; Pang, L.; Chen, J.; Sun, W.; Qi, W.; Lyu, Y.; Guan, H.; Gao, J. Expression and Clinical Significance of Dyrk1b in the Specimens and Cells of Cervical Lesions. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* **2016**, *51*, 40–45. [[CrossRef](#)]
79. Lee Walmsley, D.; Murray, J.B.; Dokurno, P.; Massey, A.J.; Benwell, K.; Fiumana, A.; Foloppe, N.; Ray, S.; Smith, J.; Surgenor, A.E.; et al. Fragment-Derived Selective Inhibitors of Dual-Specificity Kinases DYRK1A and DYRK1B. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 8971–8991. [[CrossRef](#)]
80. Kettle, J.G.; Ballard, P.; Bardelle, C.; Cockerill, M.; Colclough, N.; Critchlow, S.E.; Debreczeni, J.; Fairley, G.; Fillery, S.; Graham, M.A.; et al. Discovery and Optimization of a Novel Series of Dyrk1b Kinase Inhibitors to Explore a MEK Resistance Hypothesis. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2834–2844. [[CrossRef](#)]
81. Saluja, T.S.; Kumar, V.; Agrawal, M.; Tripathi, A.; Meher, R.K.; Srivastava, K.; Gupta, A.; Singh, A.; Chaturvedi, A.; Singh, S.K. Mitochondrial Stress-Mediated Targeting of Quiescent Cancer Stem Cells in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Manag. Res.* **2020**, *12*, 4519–4530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Ye, J.; Chu, C.; Chen, M.; Shi, Z.; Gan, S.; Qu, F.; Pan, X.; Yang, Q.; Tian, Y.; Wang, L.; et al. TROAP Regulates Prostate Cancer Progression via the WNT3/Survivin Signalling Pathways. *Oncol. Rep.* **2019**, *41*, 1169–1179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Jing, K.; Mao, Q.; Ma, P. Decreased Expression of TROAP Suppresses Cellular Proliferation, Migration and Invasion in Gastric Cancer. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *18*, 3020–3026. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Ye, X.; Lv, H. MicroRNA-519d-3p Inhibits Cell Proliferation and Migration by Targeting TROAP in Colorectal Cancer. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *105*, 879–886. [[CrossRef](#)]
85. Jiao, Y.; Li, Y.; Lu, Z.; Liu, Y. High Trophinin-Associated Protein Expression Is an Independent Predictor of Poor Survival in Liver Cancer. *Dig. Dis. Sci.* **2019**, *64*, 137–143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Hu, H.; Xu, L.; Chen, Y.; Luo, S.J.; Wu, Y.; Xu, S.H.; Liu, M.T.; Lin, F.; Mei, Y.; Yang, Q.; et al. The Upregulation of Trophinin-Associated Protein (TROAP) Predicts a Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *J. Cancer* **2019**, *10*, 957. [[CrossRef](#)]
87. Hwang, J.; Park, A.; Kim, C.; Yu, D.; Byun, H.; Ku, M.; Yang, J.; Kim, T.I.; Jeong, K.S.; Kim, K.Y.; et al. Suppression of DYRK1A/B Drives Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Autophagic Cell Death through Metabolic Reprogramming in Colorectal Cancer Cells. *Anticancer Res.* **2022**, *42*, 589–598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Skoda, A.M.; Simovic, D.; Karin, V.; Kardum, V.; Vranic, S.; Serman, L. The Role of the Hedgehog Signaling Pathway in Cancer: A Comprehensive Review. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* **2018**, *18*, 8–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Patel, T.N.; Dhanyamraju, P.K. Role of Aberrant Sonic Hedgehog Signaling Pathway in Cancers and Developmental Anomalies. *J. Biomed. Res.* **2022**, *36*, 1. [[CrossRef](#)]
90. Sato, K.; Padgaonkar, A.A.; Baker, S.J.; Cosenza, S.C.; Rechkoblit, O.; Subbiah, D.R.C.V.; Domingo-Domenech, J.; Bartkowski, A.; Port, E.R.; Aggarwal, A.K.; et al. Simultaneous CK2/TNIK/DYRK1 Inhibition by 108600 Suppresses Triple Negative Breast Cancer Stem Cells and Chemotherapy-Resistant Disease. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 4671. [[CrossRef](#)]
91. Massey, A.J.; Benwell, K.; Burbridge, M.; Kotschy, A.; Walmsley, D.L. Targeting DYRK1A/B Kinases to Modulate P21-Cyclin D1-P27 Signalling and Induce Anti-Tumour Activity in a Model of Human Glioblastoma. *J. Cell. Mol. Med.* **2021**, *25*, 10650–10662. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Szamborska-Gbur, A.; Rutkowska, E.; Dreas, A.; Frid, M.; Vilenchik, M.; Milik, M.; Brzózka, K.; Król, M. How to Design Potent and Selective DYRK1B Inhibitors? Molecular Modeling Study. *J. Mol. Model.* **2019**, *25*, 41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Powell, C.E.; Hatcher, J.M.; Jiang, J.; Vatsan, P.S.; Che, J.; Gray, N.S. Selective Macrocyclic Inhibitors of DYRK1A/B. *ACS Med. Chem. Lett.* **2022**, *13*, 577–585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Park, A.; Hwang, J.; Lee, J.Y.; Heo, E.J.; Na, Y.J.; Kang, S.; Jeong, K.S.; Kim, K.Y.; Shin, S.J.; Lee, H. Synthesis of Novel 1H-Pyrazolo[3,4-b] Pyridine Derivatives as DYRK 1A/1B Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2021**, *47*, 128226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Schmitt, C.; Kail, D.; Mariano, M.; Empting, M.; Weber, N.; Paul, T.; Hartmann, R.W.; Engel, M. Design and Synthesis of a Library of Lead-like 2,4-Bisheterocyclic Substituted Thiophenes as Selective Dyrk/Clk Inhibitors. *PLoS ONE* **2014**, *9*, 87851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

96. Alexandrov, V.; Vilenchik, M.; Kantidze, O.; Tsutskiridze, N.; Kharchilava, D.; Lhewa, P.; Shishkin, A.; Gankin, Y.; Kirpich, A. Novel Efficient Multistage Lead Optimization Pipeline Experimentally Validated for DYRK1B Selective Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 13784–13792. [[CrossRef](#)]
97. Ogawa, Y.; Nonaka, Y.; Goto, T.; Ohnishi, E.; Hiramatsu, T.; Kii, I.; Yoshida, M.; Ikura, T.; Onogi, H.; Shibuya, H.; et al. Development of a Novel Selective Inhibitor of the Down Syndrome-Related Kinase Dyrk1A. *Nat. Commun.* **2010**, *1*, 86. [[CrossRef](#)]
98. Soundararajan, M.; Roos, A.K.; Savitsky, P.; Filippakopoulos, P.; Kettenbach, A.N.; Olsen, J.V.; Gerber, S.A.; Eswaran, J.; Knapp, S.; Elkins, J.M. Structures of down Syndrome Kinases, DYRKs, Reveal Mechanisms of Kinase Activation and Substrate Recognition. *Structure* **2013**, *21*, 986–996. [[CrossRef](#)]
99. Lochhead, P.A.; Sibbet, G.; Morrice, N.; Cleghon, V. Activation-Loop Autophosphorylation Is Mediated by a Novel Transitional Intermediate Form of DYRKs. *Cell* **2005**, *121*, 925–936. [[CrossRef](#)]
100. Cowan-Jacob, S.W.; Fendrich, G.; Floersheimer, A.; Furet, P.; Liebetanz, J.; Rummel, G.; Rheinberger, P.; Centeleghe, M.; Fabbro, D.; Manley, P.W. Structural Biology Contributions to the Discovery of Drugs to Treat Chronic Myelogenous Leukaemia. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2007**, *63*, 80–93. [[CrossRef](#)]
101. Grygier, P.; Pustelny, K.; Menezes, F.; Jemiola-Rzeminska, M.; Suder, P.; Dubin, G.; Czarna, A. Structural Perspective on the Design of Selective DYRK1B Inhibitors. *bioRxiv* **2024**, preprint. [[CrossRef](#)]
102. Zheng, J.; Trafny, E.A.; Knighton, D.R.; Xuong, N.; Taylor, S.S.; Ten Eyck, L.F.; Sowadski, J.M. 2.2 A Refined Crystal Structure of the Catalytic Subunit of CAMP-Dependent Protein Kinase Complexed with MnATP and a Peptide Inhibitor. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **1993**, *49*, 362–365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Modugno, M.; Casale, E.; Soncini, C.; Rosettani, P.; Colombo, R.; Lupi, R.; Rusconi, L.; Fancelli, D.; Carpinelli, P.; Cameron, A.D.; et al. Crystal Structure of the T315I Abl Mutant in Complex with the Aurora Kinases Inhibitor PHA-739358. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 7987–7990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Zhang, J.; Adrián, F.J.; Jahnke, W.; Cowan-Jacob, S.W.; Li, A.G.; Iacob, R.E.; Sim, T.; Powers, J.; Dierks, C.; Sun, F.; et al. Targeting Bcr–Abl by Combining Allosteric with ATP-Binding-Site Inhibitors. *Nature* **2010**, *463*, 501–506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Umezawa, K.; Kii, I. Druggable Transient Pockets in Protein Kinases. *Molecules* **2021**, *26*, 651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Liu, T.; Wang, Y.; Wang, J.; Ren, C.; Chen, H.; Zhang, J. DYRK1A Inhibitors for Disease Therapy: Current Status and Perspectives. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *229*, 114062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Kii, I.; Sumida, Y.; Goto, T.; Sonamoto, R.; Okuno, Y.; Yoshida, S.; Kato-Sumida, T.; Koike, Y.; Abe, M.; Nonaka, Y.; et al. Selective Inhibition of the Kinase DYRK1A by Targeting Its Folding Process. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Bain, J.; Plater, L.; Elliott, M.; Shpiro, N.; Hastie, C.J.; Mclauchlan, H.; Klevernic, I.; Arthur, J.S.C.; Alessi, D.R.; Cohen, P. The Selectivity of Protein Kinase Inhibitors: A Further Update. *Biochem. J.* **2007**, *408*, 297–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Göckler, N.; Jofre, G.; Papadopoulos, C.; Soppa, U.; Tejedor, F.J.; Becker, W. Harmine Specifically Inhibits Protein Kinase DYRK1A and Interferes with Neurite Formation. *FEBS J.* **2009**, *276*, 6324–6337. [[CrossRef](#)]
110. Lindberg, M.F.; Meijer, L. Dual-Specificity, Tyrosine Phosphorylation-Regulated Kinases (DYRKs) and Cdc2-Like Kinases (CLKs) in Human Disease, an Overview. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6047. [[CrossRef](#)]
111. Rothweiler, U.; Stensen, W.; Brandsdal, B.O.; Isaksson, J.; Leeson, F.A.; Engh, R.A.; Svendsen, J.S.M. Probing the ATP-Binding Pocket of Protein Kinase DYRK1A with Benzothiazole Fragment Molecules. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 9814–9824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Czarna, A.; Wang, J.; Zelencova, D.; Liu, Y.; Deng, X.; Choi, H.G.; Zhang, T.; Zhou, W.; Chang, J.W.; Kildalsen, H.; et al. Novel Scaffolds for Dual Specificity Tyrosine-Phosphorylation-Regulated Kinase (DYRK1A) Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 7560–7572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Wurzlbauer, A.; Rüben, K.; Gürdal, E.; Chaikuad, A.; Knapp, S.; Sippl, W.; Becker, W.; Bracher, F. How to Separate Kinase Inhibition from Undesired Monoamine Oxidase A Inhibition-The Development of the DYRK1A Inhibitor AnnH75 from the Alkaloid Harmine. *Molecules* **2020**, *25*, 5962. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Weber, C.; Sipos, M.; Paczal, A.; Balint, B.; Kun, V.; Foloppe, N.; Dokurno, P.; Massey, A.J.; Walmsley, D.L.; Hubbard, R.E.; et al. Structure-Guided Discovery of Potent and Selective DYRK1A Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 6745–6764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Minibrain-related kinase/dual-specificity tyrosine-regulated kinase 1B implication in stem/cancer stem cells biology

Nikolaos Kokkorakis, Maria Gaitanou

ORCID number: Nikolaos Kokkorakis 0000-0002-8901-1237; Maria Gaitanou 0000-0002-0239-4467.

Author contributions: Kokkorakis N and Gaitanou M wrote the manuscript; All authors reviewed, edited and approved the final manuscript.

Conflict-of-interest statement: The authors declare that they have no conflicts of interest.

Open-Access: This article is an open-access article that was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution NonCommercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Manuscript source: Invited manuscript

Specialty type: Cell and tissue engineering

Country/Territory of origin: Greece

Peer-review report's scientific

Nikolaos Kokkorakis, Maria Gaitanou, Laboratory of Cellular and Molecular Neurobiology-Stem Cells, Hellenic Pasteur Institute, Athens 11521, Greece

Corresponding author: Maria Gaitanou, BSc, PhD, Research Assistant Professor, Laboratory of Cellular and Molecular Neurobiology-Stem Cells, Hellenic Pasteur Institute, Vas. Sofias 127, Athens 11521, Greece. mgaitanou@pasteur.gr

Abstract

Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1B (DYRK1B), also known as minibrain-related kinase (MIRK) is one of the best functionally studied members of the DYRK kinase family. DYRKs comprise a family of protein kinases that are emerging modulators of signal transduction pathways, cell proliferation and differentiation, survival, and cell motility. DYRKs were found to participate in several signaling pathways critical for development and cell homeostasis. In this review, we focus on the DYRK1B protein kinase from a functional point of view concerning the signaling pathways through which DYRK1B exerts its cell type-dependent function in a positive or negative manner, in development and human diseases. In particular, we focus on the physiological role of DYRK1B in behavior of stem cells in myogenesis, adipogenesis, spermatogenesis and neurogenesis, as well as in its pathological implication in cancer and metabolic syndrome. Thus, understanding of the molecular mechanisms that regulate signaling pathways is of high importance. Recent studies have identified a close regulatory connection between DYRK1B and the hedgehog (HH) signaling pathway. Here, we aim to bring together what is known about the functional integration and cross-talk between DYRK1B and several signaling pathways, such as HH, RAS and PI3K/mTOR/AKT, as well as how this might affect cellular and molecular processes in development, physiology, and pathology. Thus, this review summarizes the major known functions of DYRK1B kinase, as well as the mechanisms by which DYRK1B exerts its functions in development and human diseases focusing on the homeostasis of stem and cancer stem cells.

Key Words: Dual-specificity tyrosine-regulated kinase 1B; Minibrain-related kinase; Stem cells; Cancer stem cells; Quiescence; Cell proliferation/differentiation; Cell survival; Cancer; Hedgehog

©The Author(s) 2020. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

quality classification

Grade A (Excellent): 0
 Grade B (Very good): B, B
 Grade C (Good): C, C
 Grade D (Fair): D
 Grade E (Poor): 0

Received: July 10, 2020

Peer-review started: July 10, 2020

First decision: September 17, 2020

Revised: September 29, 2020

Accepted: October 15, 2020

Article in press: October 15, 2020

Published online: December 26, 2020

P-Reviewer: Garg M, Grawish M, Li YH, Ventura C

S-Editor: Gao CC

L-Editor: Filipodia

P-Editor: Xing YX



Core Tip: Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1B (DYRK1B), also known as minibrain-related kinase (MIRK) is the well-studied member of the DYRK kinase family. DYRK1B is a key regulator of signaling pathways that control proliferation and differentiation, and is critical for developmental processes and cell homeostasis. In this review, we aim to bring together what is known about the functional integration and cross-talk between DYRK1B and several pathways, such as sonic hedgehog, RAS and PI3K/mTOR/AKT pathways and how this might affect the behavior of stem cells in development and disease, taking into consideration potent therapeutic interventions and approaches.

Citation: Kokkorakis N, Gaitanou M. Minibrain-related kinase/dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1B implication in stem/cancer stem cells biology. *World J Stem Cells* 2020; 12(12): 1553-1575

URL: <https://www.wjgnet.com/1948-0210/full/v12/i12/1553.htm>

DOI: <https://dx.doi.org/10.4252/wjsc.v12.i12.1553>

INTRODUCTION

Stem cells have the potential to self-renew and therefore to perpetuate their lineage, to give rise to progeny capable of differentiating into specialized diverse cell types^[1,2] interacting with environmental stimuli in order to maintain the balance between quiescence, proliferation, and restoration^[3,4]. All these properties are comprised in the term “stemness”. Specific stimuli induce the emergence of new stem cells, as cells that maintain the capacity to re-differentiate and return to an earliest state of development^[5-7]. Stem cells can be divided into two broad type categories: embryonic stem cells (ESCs), which are derived from the inner cell mass of the blastocyst and are pluripotent, maintaining the ability to differentiate into any cell type^[8-10] and adult (somatic) stem cells being present at niches in adult tissues^[11], which are multipotent, having the ability to differentiate into a limited number of cell lineages and therefore to enable the healing, growth, and replacement of cells that are lost each day of life^[10].

Although adult stem cells exhibit regenerating properties when participating in tissue homeostasis, cancer stem cells (CSCs) behave as their malignant counterparts. CSCs were first identified in the acute myeloid leukemia^[12,13] and are similar to normal stem cells, which have the ability of self-renewal and differentiation into other cell types^[12,14]. CSCs display stemness during cancer progression and through interaction with their environment^[15,16]. CSCs constitute a subpopulation of tumor bulk and are considered as the primary tumor-initiating cells. Tumor heterogeneity derived from CSCs and their progeny is considered as a major disadvantage of their roles in cancer therapies. However, scientific evidence from studies investigating the biology of CSCs, will open up new perspectives for the development of novel therapeutic interventions and elimination of cancer recurrence. Further studies have demonstrated that CSCs have a key role in resistance to cancer therapies, such as chemotherapy and radiation therapy, and increased risk of metastatic potential^[13,17].

DYRK kinases (for dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation-regulated kinases) comprise a family of protein kinases which are key regulators of signal transduction, cell proliferation, survival, and differentiation^[18]. DYRKs belong to the CMGC group of proline-directed serine/threonine kinases that are characterized by their ability to phosphorylate tyrosine, serine and threonine amino acid residues^[19-21]. To acquire their catalytic activity, DYRKs require phosphorylation at the second tyrosine residue of a conserved YxY motif, located at their activation loop; thus, DYRKs activate themselves during their translation by intramolecular auto-phosphorylation^[22]. In particular, a characteristic sequence motif DYRK homology box (known as the DH box), which is located at the N-terminal of the catalytic domain, supports the auto-phosphorylation of the conserved tyrosine during maturation of the catalytic domain^[18,21]. DYRK family members have been found in all eukaryotes and constitute an evolutionarily conserved family of protein kinases, which are key players in the regulation of cell cycle and differentiation, regulation of transcription, protein stability and apoptosis, through the phosphorylation of DYRK recognition sites in several target proteins^[21,23,24]. There are five members within the mammalian DYRK kinase family: Class I (or DYRK1 group), consisting of DYRK1A and DYRK1B; and Class II (or DYRK2 group), consisting of

DYRK2, DYRK3 and DYRK4^[18,21]. Notably, DYRK kinases act as priming kinases, phosphorylating a residue and allowing for additional phosphorylation of a second residue by a subsequent kinase^[21].

DYRK1B (also referred to as MIRK; minibrain-related kinase) is closely related to the *DYRK1A* gene, while *minibrain* (*mnb*) is their orthologous gene in *Drosophila*. The *mnb* gene was named according to the brain phenotype of the mutant flies^[21,25]. Disruption of *mnb* causes abnormal arrangement of neuroblasts in the outer proliferation layers of the larval brain, resulting in adult flies with smaller optic lobes and brain hemispheres, suggesting that *mnb* is required for proper proliferation of neuroblasts during larval development and that it plays an essential role during neurogenesis^[21,25,26]. These morphological alterations in mutant flies are associated with specific behavioral abnormalities in learning, memory, and visual and olfactory tasks^[21,25]. While DYRK1A plays a role in neuronal development^[27-34], DYRK1B has a critical role in skeletal muscle differentiation, in spermatogenesis and in cancer *via* its regulatory effects on cell cycle progression and differentiation, cell survival, motility, and transcription^[21,23,24]. Recently, we revealed a novel role for DYRK1B in neuronal development, as we will discuss below^[35] (Kokkorakis *et al.*, 2020 unpublished data).

Here, we will review DYRK1B physiological and pathological roles and its implication in stem/CSC biology, as well as DYRK1B cross-talk with major signaling pathways and the mechanisms by which DYRK1B exerts its function.

DYRK1B EXPRESSION, INTRACELLULAR LOCALIZATION, AND UPSTREAM REGULATION

DYRK1B is normally expressed at high levels in skeletal muscle and testis with increased relative expression in cardiac muscle and brain compared to other normal tissues^[24,36]. DYRK1B is overexpressed in various solid tumors and cancer cell lines, where it seems to act as a tumor survival factor^[24]. The human DYRK1B gene is located on chromosome 19q13.2, a region often amplified in ovarian and pancreatic cancer^[37-42]. DYRK1B is especially highly expressed in colon carcinoma^[36,43,44], prostate carcinoma^[24,45-47], lung cancer^[45], pancreatic ductal adenocarcinomas^[37,48-52], rhabdomyosarcomas^[53], osteosarcoma^[54], and liposarcoma^[55]. Also, overexpression of DYRK1B has been reported in breast cancer^[56-58], cervical cancer^[59,60], and melanoma^[61,62].

Leder and colleagues^[63] have characterized three splicing variants of mouse DYRK1B DYRK1B-p65, DYRK1B-p69 and DYRK1B-p75 with discrete expression patterns and enzymatic activities. DYRK1B-p65 and DYRK1B-p69 display similar expression patterns, where the highest expression of both isoforms has been detected in the murine spleen, lung, brain, bladder, stomach, and testis. In contrast, DYRK1B-p75 was observed specifically in skeletal muscle, as well as in the neuronal cell line GT1-7 and in differentiated adipocyte-like 3T3-L1 but not in non-differentiated 3T3-L1 preadipocyte cells^[63].

Notably, DYRK1B-p65 differs from DYRK1B-p69 by the absence of 40 amino acids within its catalytic domain, resulting in a lack of kinase activity^[63]. The amino acid sequence of the DYRK1B kinase domain is 56% identical with the other DYRK family kinases; however, the N- and C-termini are non-conserved^[24]. The functional domains in DYRK1B kinase are the DH box, located at the N-terminus of the catalytic domain and supporting auto-phosphorylation^[26,64,65], a bipartite nuclear localization signal (NLS) located at the non-conserved N-terminus, 11 canonical kinase subdomains followed by a proline, glutamate, serine, threonine (commonly known as PEST) sequence, considered to act as a degradation signal for rapidly metabolized proteins and as a consensus sequence for mitogen-activated protein kinases' (MAPKs) phosphorylation^[24,66].

In agreement, DYRK1B shows a predominant nuclear localization in various cell lines, whereas a major cytosolic staining is observed in adult human muscle fibers, rhabdomyosarcoma, and pancreatic ductal carcinomas^[21,43]. Our group has observed the nuclear localization of DYRK1B in all neuronal lineage precursors, as well as in post-mitotic neurons and glial cells of embryonic and postnatal mouse brain and spinal cord (Kokkorakis *et al.*, 2020 unpublished data). In mouse neuroblastoma Neuro2A cells, when DYRK1B is transiently expressed alone, it is localized into the nucleus, and when it is co-expressed with its interacting partner, the scaffolding protein RanBPM, DYRK1B is relocated and subsequently degraded in the cytoplasm^[35]. It has been proposed that the differential intracellular localization of DYRK1B is associated with its discrete roles, *e.g.*, in the nucleus as a negative regulator of cell cycle progression and in the cytosol as a prosurvival factor^[67-69].

DYRK1B kinase is subjected to a high degree of regulatory control at transcriptional, translational and post-translational level, *via* activating and inactivating phosphorylations that result in DYRK1B subcellular relocalization, protein stability, and in its participation in discrete protein-protein interactions^[24]. The regulation of DYRK1B expression and activity has been studied in myoblasts and in cancer cell lines. In cultured C2C12 myoblasts, mitogen deprivation increased DYRK1B protein levels through transcriptional mechanisms regulated by small Rho GTPases, RhoA and Cdc42, and by Rac1, but not by MyoD or Myf5^[24,70].

Additional studies have shown that DYRK1B is a mitogen-activated protein kinase, down-regulated by activated extracellular signal-regulated kinases (ERKs). It was shown that DYRK1B levels increased 20-fold when ERK activation was blocked by the MEK inhibitor PD98059 in colon carcinoma cell lines. PD98059 inhibitor also activated a DYRK1B promoter construct^[70]. Therefore, DYRK1B induction seems to require not only active Rho proteins but also the inhibition of the MEK1-ERK signaling pathway. In accordance, DYRK1B is strongly up-regulated under conditions of mitogen deprivation, *e.g.*, when insulin-like growth factor-1 (IGF-1) is eliminated in a colon carcinoma culture^[66], also suggesting that DYRK1B is a stress-activated kinase, negatively regulated by the RAS-MEK-ERK pathway^[71] (Figure 1). Moreover, knockdown of DYRK1B by small interfering RNA (commonly referred to as siRNA) performed in human ovarian cancer cell lines, led to up-regulated activation of c-Raf-MEK-ERK1/2 pathway and subsequent changes in cell cycle proteins, such as cyclin D1 and p27^{Kip1}, that are accompanied by increased growth rate and re-entering of cancer cells from the G1/G0 phase into the S phase of the cell cycle^[72]. The cell cycle transition could be blocked by MAPK/ERK inhibitor U0126 in a dose-dependent manner, suggesting that DYRK1B and the MAPK/ERK pathway inhibit each other^[42,72] (Figure 1).

In another study, it was found that DYRK1B competes with the stress-activated MAPK kinase p38 for their common activator, the MAPK kinase MKK3^[71]. DYRK1B is activated *in vivo* by MKK3, while p38 seems to be required for terminal muscle cell differentiation^[70]. C2C12 myoblasts expressing a MKK3 dominant negative failed to fuse into myotubes^[70]. The lack of MKK3 activity, by the usage of a MKK3 dominant negative, resulted in decreased expression of MyoD and myogenin that are transcriptional targets of DYRK1B and in blocked expression of the late differentiation markers troponin T, myosin heavy chain (commonly known as MHC), and the Cdk inhibitor p21^{Cip1}^[70]. In addition, p38 blocks DYRK1B transactivation of the transcription factor HNF1 α ^[24,73]. A possible mechanism concerning the *in vivo* interaction between p38 and DYRK1B was suggested from results of cell cycle synchronization experiments in NIH3T3 cells, where DYRK1B levels fluctuated within the cell cycle, whereas p38 levels remained stable, leading to speculation that endogenous p38 can block DYRK1B function, only when DYRK1B levels are low in S phase and not when DYRK1B levels are elevated during G1/G0 transition^[73] (Figure 1).

DYRK1B KINASE FUNCTIONS

DYRK1B is a multifunctional dual-specificity kinase involved in growth arrest, differentiation, and cell survival. The two major functions of DYRK1B are the G1/G0 transition and the subsequent growth arrest in a quiescent state (G0), as well as the maintenance of cell viability^[42,69,70]. DYRK1B function is implicated in myogenesis, during which myoblasts are differentiated into skeletal muscle cells^[69,70,74]. Moreover, DYRK1B participates in muscle regeneration after injury, promoting the activation of quiescent muscle stem cells, also known as satellite cells^[70]. In addition, DYRK1B is involved in fat cell differentiation, from adult mesenchymal stem cells^[75] to preadipocytes that differentiate into adipocytes during adipogenesis, and is linked to metabolic syndrome^[76]. Furthermore, DYRK1B negatively regulates proliferation of immature male germ cells of the seminiferous epithelium, also called spermatogonial stem cells^[77], during spermatogenesis^[78].

Recently, our studies revealed a novel role for DYRK1B in neurogenesis^[35] (Kokkorakis *et al.*, 2020 unpublished data). We have previously demonstrated that DYRK1B overexpression promotes cell cycle exit and neuronal differentiation in mouse neuroblastoma Neuro2A cells by phosphorylating cyclin D1, followed by its cytoplasmic relocation and its subsequent degradation by the 26S proteasome^[35]. We have also shown that the negative effect of DYRK1B in Neuro2A proliferation is reversed when DYRK1B is co-expressed with its interacting partner, the scaffolding protein RanBPM that inhibits DYRK1B function by facilitating its proteasomal

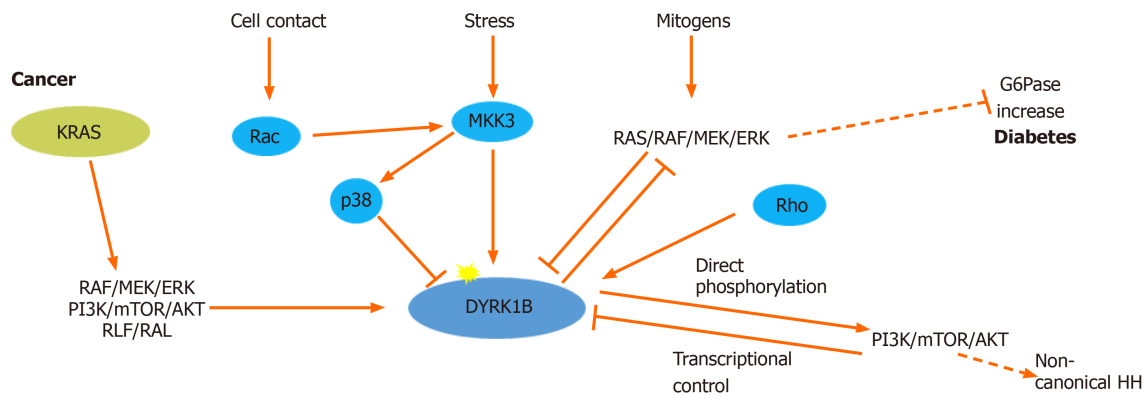


Figure 1 Regulation of dual-specificity tyrosine-regulated kinase 1B expression and activity. Dual-specificity tyrosine-regulated kinase 1B (DYRK1B) expression and activity is regulated at transcriptional, translational and post-translational level. Rho GTPases (RhoA, Cdc42 and Rac1) promote transcriptional up-regulation of DYRK1B, while serum mitogens down-regulate DYRK1B through RAS/RAF/MEK/extracellular signal-regulated kinases (ERK) signaling pathway. Under stress conditions, MKK3 activates DYRK1B and p38, while DYRK1B is physically sequestered and inhibited by p38. In cancer, DYRK1B is involved in a complex crosstalk with hedgehog (HH). Oncogenic mutant RAS (KRAS) initiates the non-canonical HH pathway through the activation of DYRK1B, via an unknown mechanism, employing several RAS effectors, such as: RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT and RLF/RAL. DYRK1B enhances non-canonical HH signaling by promoting PI3K/mTOR/AKT signaling. Conversely, activated AKT directly inhibits expression of DYRK1B. In metabolic syndrome, which is accompanied by diabetes, DYRK1B is implicated in glucose homeostasis, promoting the expression of the key gluconeogenic enzyme glucose-6-phosphatase (G6pase), through inhibition of the RAS–RAF–MEK pathway. Dashed lines represent indirect mechanisms and yellow stars represent phosphorylations. ERK: Extracellular signal-regulated kinases.

decay^[35]. In addition, we have demonstrated that the tripartite functional interactions between DYRK1B, RanBPM and the neuronal protein Cend1 (for cell cycle exit and neuronal differentiation 1; also known as BM88) regulate the balance between cellular proliferation and differentiation in Neuro2A cells, suggesting that the three proteins may also play a similar role in cell cycle progression/exit and differentiation of neural stem cells/neural progenitor cells (NSCs/NPCs) during neurogenesis^[35,79]. In agreement, we recently found that DYRK1B is expressed during central nervous system (CNS) development and marks all along the neuronal lineage (Kokkorakis *et al.*, 2020 unpublished data). We have also found that DYRK1B promotes *in vitro* and *in vivo* cell cycle exit and neuronal differentiation in neuronal precursors, suggesting a role in NSCs' differentiation (Kokkorakis *et al.*, 2020 unpublished data).

Notably, excepting its physiological roles, DYRK1B has a significant role in tumorigenesis and cancer progression^[43,52,80], as well as in the maintenance of stemness in CSCs^[81]. Below, we will describe in detail the known functions of DYRK1B kinase in various tissues and cell lines in health and in disease.

DYRK1B mainly acts as a cell cycle regulator

DYRK1B acts as a G0 checkpoint kinase and its levels are highly increased in G0-arrested non-dividing cells, such as serum-starved NIH3T3 fibroblasts^[82] and myoblasts, committing terminal differentiation through cell cycle exit^[70]. In cycling myoblasts, DYRK1B protein levels are very low, whereas they are increased at least 10-fold when myoblasts undergo terminal differentiation and are maintained high in the mature muscle cells^[70]. Moreover, DYRK1B levels are strongly up-regulated in NIH3T3 fibroblasts that are cell cycle arrested by overexpression of the growth arrest specific 1 GAS1 protein^[83]. In agreement, depletion of DYRK1B by RNA interference (RNAi) enables G0-arrested NIH3T3 fibroblasts and C2C12 myoblasts to re-enter the cell cycle, whereas transient overexpression of DYRK1B arrests dividing cells at G0^[70,82,84].

Except in fibroblasts and myoblasts, DYRK1B is highly expressed in testis, where it negatively regulates proliferation of immature male germ cells^[77]. In addition, DYRK1B is strongly up-regulated in solid tumors and carcinoma cell lines, as mentioned above. Depletion or inhibition of DYRK1B promotes cell cycle re-entry of quiescent cancer cells, indicating that DYRK1B is sufficient to maintain cancer cells in a quiescent state^[80]. DYRK1B promotes the maintenance of G0 arrest of differentiating non-transformed myoblasts, NIH3T3 fibroblasts and Mv1Lu epithelial cells by post-translational mechanisms^[24]. The regulation of cell cycle by DYRK1B is achieved by the phosphorylation of cell cycle regulators, such as cyclin D isoforms and p27^{Kip1}, leading to their degradation and stability, respectively. Especially, DYRK1B binds to GSK3 β , and this kinase complex phosphorylates cyclin D1 at two adjacent conserved ubiquitination sites as follows: DYRK1B at Thr288 and GSK3 β at Thr286, respectively, destabilizing and leading cyclin D1 to proteasomal degradation in the cytoplasm^[35,84].

Also, DYRK1B stabilizes the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p27^{Kip1} by phosphorylation at Ser10. Phosphorylation of p27^{Kip1} prevents its cytoplasmic translocation and its subsequent proteasomal degradation^[23,82,84,85].

The implication of DYRK1B and DYRK1A in the regulation of cell cycle occurs *via* an additional mechanism involving the DREAM complex which consists of MuvB, RB2, E2F4 and DP proteins. Both kinases activate the DREAM complex by phosphorylating LIN52, a subunit of MuvB at the Ser28 residue^[86]. The DREAM complex is a major coordinator of the cell cycle and is essential to maintain the quiescent state^[87]. LIN52 may be involved in long-term regulation of cell fate^[80,88] (Figure 2).

Prosurvival function of DYRK1B in myogenesis and cancer

In a large-scale RNAi screen using HeLa carcinoma cells, DYRK1B and DYRK3 have been identified as prosurvival kinases^[59]. In another study, Mercer and colleagues^[69] demonstrated that DYRK1B blocks apoptosis through phosphorylation of p21^{Cip1}, which occurs during the differentiation of C2C12 myoblasts. DYRK1B diminishes the extent of myoblast apoptosis through phosphorylation of p21^{Cip1} at the nuclear localization domain, resulting in its cytoplasmic relocation and rendering p21^{Cip1} unable to mediate cell cycle arrest^[68,69]. The DYRK1B-induced change in p21^{Cip1} intracellular localization accompanies myoblast differentiation. Endogenous p21^{Cip1} is localized exclusively to the nuclei of proliferating myoblasts, whereas it is relocated at the cytoplasm of post-mitotic multinucleated myotubes and adult human skeletal myofibers. The p21^{Cip1} cytoplasmic portion forms a physical complex with the apoptosis signal-regulating kinase 1 (known as ASK1), an upstream activator of the caspase cascade, which blocks apoptosis through the inhibition of caspase 3^[67,69]. In agreement, knockdown experiments of endogenous DYRK1B by RNAi in C2C12 myoblasts resulted in decreased myoblast survival by 75%, whereas transient overexpression of DYRK1B increased cell viability^[69].

Moreover, depletion of DYRK1B by RNAi or pharmacological inhibition of DYRK1B kinase activity impairs cell survival and induces apoptosis, in many cancer cell lines^[39,48,53,58,89]. This is concomitant with the increased intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) in pancreatic cancer^[49,50,52], ovarian cancer^[41,51,89], colon cancer^[51], and osteosarcoma^[90]. Increased ROS levels that followed DYRK1B depletion are accompanied with DNA damage, as indicated by phosphorylation of histone 2AX (known as H2AX) at Ser139 by ribosomal S6 kinase 2 (known as RSK2)^[91], in pancreatic^[49,50,52] and ovarian^[41,51,80,89] cancers. In addition, DYRK1B up-regulates expression of several antioxidant genes, *e.g.*, ferroxidase and superoxide dismutases 2 and 3 (known as SOD2 and SOD3 respectively) in cancer cell lines^[38,49,51,80]. The increased expression of antioxidant genes may be due to the fact that cancer cells maintain higher ROS levels than normal cells and might, thus, be more sensitive to further accumulation of ROS^[80,92]. It has been proposed that targeting of the antioxidant mechanisms of cancer cells and the subsequent increase in intracellular cellular ROS levels may be a potential strategy for anticancer therapies^[93]. Thus, depletion or pharmacological inhibition of DYRK1B will sensitize cancer cells to chemotherapeutic drugs, such as cisplatin, that increase ROS levels^[38,45].

A third mechanism concerning the role of DYRK1B in cell survival, except p21^{Cip1} intracellular distribution and regulation of ROS levels, includes the nuclear exclusion and subsequent inactivation of NKX3.1 and the forkhead box O (FOXO) transcription factors, FOXO1 and FOXO3A^[72,80,94], mediated by DYRK1B phosphorylation. NKX3.1 and FOXO factors act as tumor suppressors in several cancers by suppressing cell proliferation and promoting apoptosis^[95]. DYRK1B abolishment was shown to enhance nuclear translocation of FOXO1 and FOXO3A and increase apoptosis in ovarian cancer cells^[72,80] (Figure 2).

DYRK1B maintains quiescence in CSCs

In cancer tumors, there is a subpopulation of cells that possess stemness features. These CSCs, also known as the tumor-initiating cells, are cells capable of maintaining themselves *via* self-renewal and restoration^[96]. CSCs are responsible for tumor growth and metastasis, making them a prime target for efficient therapeutic interventions. However, CSCs are extremely resistant to current therapeutic approaches, implicating them as the main reason for cancer recurrence^[97]. Stem cells from various cancers have been reported to be often quiescent^[98]. The relative resistance of CSCs to chemo- and radio-therapies, both targeting dividing cells, is due to the ability of some CSCs to remain in a non-dividing quiescent state (G0)^[42,97,99]. A portion of pancreatic cancer cells out of the cell cycle may be post-mitotic, while other pancreatic cancer cells out of cell cycle seem to be in a quiescent, reversible G0 state, thus remaining resistant to drugs

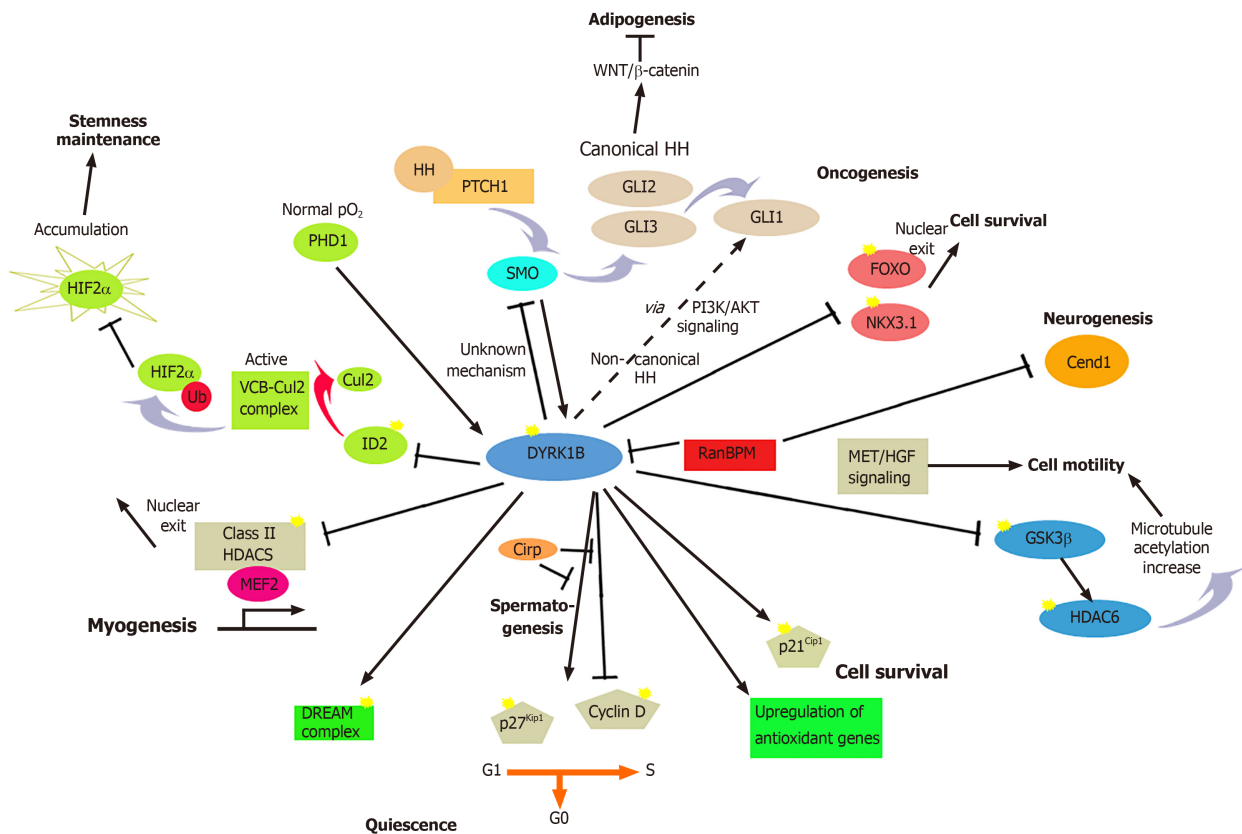


Figure 2 Summary of the major known functions of dual-specificity tyrosine-regulated kinase 1B in development and disease. Dual-specificity tyrosine-regulated kinase 1B (DYRK1B) plays a critical role in many biological processes in development and human diseases, regulating cell cycle progression/exit, differentiation, transcription, and cell survival and motility. DYRK1B facilitates growth arrest and promotes quiescence (G0) by stabilizing cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} and destabilizing cyclin D1, via phosphorylation. The anti-proliferative function of DYRK1B occurs in myogenesis, spermatogenesis, neurogenesis, and cancer. Moreover, DYRK1B maintains quiescence by stabilization of the DREAM complex via phosphorylation of LIN52, a subunit of MuvB in the complex. In oncogenesis, DYRK1B induces degradation of the tumor suppressor NKX3.1, while reducing the activity of tumor suppressors and apoptotic promoters of the forkhead box O (FOXO) family, resulting in survival of cancer cells and enhancement of oncogenic GLI1 activity. The prosurvival function of DYRK1B in myogenesis and cancer is mediated through phosphorylation of p21^{Cip1}, DYRK1B counteracts oxidative stress by reducing intracellular levels of oxygen reactive species (ROS) through the up-regulation of antioxidant genes. DYRK1B modulates stemness of cancer stem cells. In normoxia, oxygen-sensing prolyl-hydroxylase (PHD1) activates DYRK1B, which inactivates ID2, makes it unable to displace the Cul2 component from the VCB-Cul2 ubiquitin ligase complex, which remains active, promoting HIF2 α degradation. In hypoxia, PHD1 and DYRK1B are inactivated, leading to activated ID2 and resulting in HIF2 α accumulation that facilitates cancer stem cell maintenance. DYRK1B is involved in a complex cross-talk with hedgehog (HH). DYRK1B inhibits canonical HH signaling initiated by Smoothed (SMO), while it promotes non-canonical HH signaling by promoting PI3K-AKT-mediated stability of the GLI1 transcription factor. In metabolic syndrome, DYRK1B inhibits sonic hedgehog (SHH) and Wnt signaling, enhancing adipogenesis. In spermatogenesis, DYRK1B interacts with cold-inducible RNA-binding protein (Cirp), resulting in destabilization of p27^{Kip1} and cyclin D1 stabilization that promote cell cycle progression of undifferentiated spermatogonia. In myogenesis, DYRK1B inactivates Class II histone deacetylases (HDACs), resulting in myogenic regulatory factor (MEF) 2-dependent transcription of myogenic genes. In neurogenesis, tripartite functional interactions between DYRK1B, RanBPM and the neuronal protein Cend1 regulate the balance between cellular proliferation and differentiation. Increased levels of DYRK1B block cell motility through interaction with the adaptor protein RanBPM and Met/HGF signaling. DYRK1B modifies indirectly the microtubules, through phosphorylation of GSK3 β and subsequent inactivation of HDAC6, leading to increase of microtubules acetylation. Dashed lines represent indirect mechanisms and yellow stars represent phosphorylations. ERK: Extracellular signal-regulated kinases.

and able to repopulate the tumor^[11]. DYRK1B kinase could be of clinical relevance, since it is included among the factors which allow the survival of quiescent CSCs *in vivo*^[98]. As we have mentioned above, DYRK1B is highly expressed in several cancers and it was found to be amplified or hyperactive in ovarian and pancreatic cancers^[18,37,40]. Experimental data suggest that increased levels of DYRK1B are related to tumor development and poor outcome^[43]. Also, it is known that the orthologous DYRK1A kinase is implicated in cancer, with a partially similar role as that of DYRK1B^[100-109]. DYRK1B has been shown to confer on CSCs the ability to remain in a quiescent state, in such a way that when exposed to therapeutic agents/drugs (chemotherapy) or radiation (radiotherapy), making them chemo- and radio-resistant by controlling the balance between quiescence and apoptosis^[36,53,56,106,110]. Thus, the wake-up of quiescent CSCs may be achieved using DYRK1B pharmacological inhibitors, which could serve as potent drugs in cancer therapy^[43,80]. Moreover, DYRK1B may be used as a diagnostic marker and survival factor for various types of human cancer^[43].

DYRK1B regulates the maintenance of CSCs under hypoxia or normoxia

The stemness capacity of stem cells depends on the balance of complex signals in their microenvironment^[111]. It has been suggested^[111,112] that stem cells are localized in a microenvironment of low oxygen, indicating that hypoxia may be a critical factor for stem cell maintenance and that low oxygen tension in cell culture has positive effects on the survival and self-renewal of stem cells. Furthermore, a hypoxic microenvironment assists in maintaining the multipotency of ESCs^[113], the undifferentiated state of hematopoietic, mesenchymal and NSCs, and in the regulation of proliferation and cell-fate commitment^[111].

Recent advances in cancer research have indicated that mechanisms maintaining CSCs are crucial to tumor progression^[112]. Hypoxia is the most critical factor for the maintenance of stemness, as well as the enhanced expression/activation of hypoxia-inducible factors (HIFs), which frequently occurs in cancer cells during cancer progression. The enhanced expression and activation of HIFs is associated with the acquisition of cancer cells with a more malignant behavior, treatment resistance and poor outcome for cancer patients. HIF1 α and HIF2 α are transcription factors that act as key mediators of the adaptation of CSCs to oxygen and nutrient deprivation, during cancer progression, under normoxic and hypoxic conditions^[81]. Especially, the HIF2 α transcription factor is required for maintenance of CSCs.

Another protein that participates and promotes the cancer hallmarks, including CSC state, is the ID2 protein. However, the pathways that are engaged by ID2 or drive HIF2 α accumulation in CSCs still remain unclear^[81]. DYRK1B modulates stemness of CSCs through a mechanism taking place under normoxia or hypoxia conditions. In normoxia, oxygen-sensing prolyl-hydroxylase (PHD1) activates DYRK1B, which inactivates the ID2 protein by phosphorylation at Thr27^[81], making it unable to displace the VHL-associated protein cullin-2 (Cul2) component from the VCB-Cul2 ubiquitin ligase complex, which remains active and capable of promoting HIF2 α degradation^[81] (Figure 2). In contrast, in hypoxia conditions, PHD1 and DYRK1B are inactivated, leading to activated ID2^[81]. Then, the activated ID2 binds to the VHL ubiquitin ligase complex, displacing the Cul2 and subsequently impairing HIF2 α ubiquitination and degradation. Thus, HIF2 α stabilization facilitates CSC maintenance and increases the aggressiveness of human hypoxic brain tumors^[81]. In glioblastoma cell lines, under hypoxia conditions, ID2 positively modulates HIF2 α activity and, conversely, in normoxia conditions, the elevated expression of DYRK1A/1B phosphorylates ID2, promoting HIF2 α destabilization, inhibition of tumor growth, loss of glioma stemness and a more favorable prognosis for patients with glioblastoma^[81] (Figure 2).

MOLECULAR MECHANISMS OF DYRK1B FUNCTION IN DEVELOPMENT AND HUMAN DISEASES

As we have discussed above, DYRKs comprise a family of kinases which are key regulators of signal transduction, cell proliferation, survival, and differentiation^[18]. In particular, DYRK1B is a multifunctional dual-specificity kinase involved in cell cycle progression, differentiation and cell viability^[42,69,70], and plays key roles in a variety of physiological developmental processes during myogenesis^[69,70,74], spermatogenesis^[77], neurogenesis^[35] and cell motility^[55], as well as in as in human diseases, such as cancer^[24,36,39,41,50] and metabolic syndrome^[76].

Identification of molecular mechanisms that regulate signaling pathways, through which DYRK1B exerts aspects of its function, in a positive or negative manner, in development and human diseases, is therefore of great interest. Many studies have identified a close regulatory link between DYRK1B and the hedgehog (HH)/GLI signaling pathway, which is essential during development, stem cell maintenance and cell differentiation, and also plays a crucial role in development of many malignancies^[114-121]. Below, we will discuss in detail the functional integration and cross-talk between DYRK1B and the HH/GLI with other signaling pathways, such as RAS and PI3K/mTOR/AKT, and how this might affect cellular and molecular processes in development, physiology and pathology, focusing on the homeostasis of stem and CSCs, respectively.

DYRK1B implication in HH/GLI signaling in cancer

Elucidation of molecular mechanisms that determine the characteristics of malignancies of CSCs is of great importance. An essential signaling pathway during

mammalian embryonic development, involved in proper tissue patterning, stem cell maintenance and cell differentiation, is the HH/GLI signaling pathway, which also plays a crucial role in tumorigenesis, in development of many pediatric and adult malignancies, such as those of pancreas, lung, prostate, brain, and skin^[114-121]. The 'canonical' HH signaling cascade is initiated in the target cell by the HH ligand binding to the Patched receptor (PTCH1, 2), which is located at the primary cilium, functioning as an antenna-like cell compartment and relieving the repression of Smoothed (SMO) transmembrane protein, a member of the G protein-coupled receptor superfamily. Subsequently, SMO enters the primary cilium and initiates signaling by activating the zinc finger transcription factors, GLI2/3, which are released from Suppressor of Fused (SUFU), in order to translocate into the nucleus and initiate the transcription of HH/GLI target genes, including the *GLI1* oncogene. In the absence of HH ligand, the PTCH represses HH signaling by preventing SMO translocation to the primary cilium, resulting in the inactivation of the GLI effectors^[122-128] (Figure 2).

Transcriptional feedback loops take place in HH signaling in order to fine-tune the entire system. Additional modulation of HH signaling is achieved by several kinases, such as PKA, PKC, GRK2, MEK, ERK, AKT, S6K, and GSK3 β ^[129-138]. Cancer cells often take advantage of these mechanisms in non-canonical modes of signaling, such as HH ligand/receptor-independent activation of GLI transcription factors^[18,118,135,139,140]. The mammalian DYRK1A, DYRK1B and DYRK2 participate in the regulation of HH signaling. Notably, DYRK1A possesses an activating function on GLI1, promoting GLI1 nuclear translocation^[141,142] *via* its direct phosphorylation at Ser102/104/130/132 residues located at NLS^[143] and at Ser408^[144]. Moreover, DYRK1A exerts a negative function by inducing GLI1 degradation through an indirect mechanism that engages the actin cytoskeleton and its regulators^[145]. The dual role of DYRK1A in the regulation of HH signaling is probably due to its interactions with different sets of protein partners that have opposing effects^[138]. On the other hand, DYRK2 has been shown to negatively affect the HH pathway by directly phosphorylating GLI2 at two conserved serine residues, Ser385 and Ser1011, inducing its proteasomal decay^[138,145].

DYRK1B inhibits canonical HH signaling / cross-talk between RAS and HH signaling: DYRK1B has a complicated role in modulation of the HH pathway. A cell-autonomous synergism between RAS and GLI oncogenes during tumor formation in the pancreas, lung and colon carcinomas has been reported^[114-116,118]. DYRK1B can inhibit HH signaling by blocking GLI2, which mainly functions as an activator, and by promoting GLI3R formation, which mainly functions as a repressor^[119]. Specifically, Lauth and colleagues^[119], studying the cross-talk between RAS and HH signaling, found that oncogenic mutant RAS (KRAS) acts as: (1) an inducer of sonic hedgehog (SHH) expression; (2) a potent inhibitor of the canonical (HH-PTCH-SMO-initiated) HH pathway; and (3) a regulator of the non-canonical (TGF β -initiated) HH pathway *via* activation of DYRK1B. Consequently, mutant KRAS induces signaling to neighboring cells (paracrine effect), while at the same time inhibits HH signaling into the cells (autocrine effect), thereby initiating the non-canonical HH pathway by increasing DYRK1B expression through an unknown mechanism. Increased DYRK1B blocks the SMO-induced cascade but is ineffective in cells lacking SUFU, mimicking the effect of mutated KRAS (Figure 2). Lauth *et al.*^[119] suggest that mutant KRAS blocks signaling upstream of SUFU through DYRK1B or that the SMO inhibition is actually SUFU-dependent. Moreover, DYRK1B is not as effective as KRAS in the inhibition of HH signaling, suggesting that RAS also activates inhibitory unknown effectors in addition to DYRK1B.

The inhibitory mechanisms initiated by KRAS may be complex, as several RAS effectors, such as RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT and RLF/RAL, are required for full inhibition (Figure 1). Remarkably, DYRK1B kinase can be activated by several RAS effectors, such as Tiam/Rac1, MEK, PI3 kinase and possibly RAL-A^[37,119]. The biological significance of the RAS-mediated HH inhibition in cancer cells, with the participation of DYRK1B, could explain why high GLI1 levels are detrimental to normal but not to CSCs in the brain^[119,146]. Blocking autocrine in favor of paracrine HH signaling may enhance the survival of early CSCs. In addition, the presence of RAS-DYRK1B-HH regulatory network has an important impact in developmental disorders caused by aberrant RAS signaling, such as Noonan, cardio-facio-cutaneous and Costello syndromes^[147]. To summarize, the mutant RAS (*i.e.* KRAS) is a cell-autonomous negative regulator of the HH pathway, participating also in the paracrine HH signaling in lung and pancreatic cancers that have accumulated KRAS mutations. Thus, the mechanism of shift from autocrine towards paracrine signaling mechanisms involving the RAS effector kinase DYRK1B remains to be elucidated^[119].

DYRK1B enhances non-canonical HH signaling: DYRK1B has been shown to increase GLI1 activity, whereas DYRK1B inhibition down-regulates GLI1 expression^[121]. Gruber and colleagues^[121], using pancreatic adenocarcinoma (PANC-1) and Ewing sarcoma cell lines, identified DYRK1B as a critical positive regulator of HH/GLI signaling downstream of SMO (Figure 2). In the DAOY human medulloblastoma cells and mouse embryonic fibroblasts (MEFs) deficient in either PTCH or SUFU, the RNAi knockdown of DYRK1B or its pharmacological inhibition (*e.g.*, with harmine or DYRKi), resulted in remarkable repression of HH signaling and GLI1 expression. Notably, DYRKi inhibitor impairs SMO-dependent and SMO-independent oncogenic GLI activity. These results support the usage of DYRK1B inhibitors for the treatment of HH/GLI-associated cancers, instead of SMO inhibitors which have failed to be efficient for cancer therapy^[121]. Furthermore, the addition of the proteasome inhibitor bortezomib reversed the negative effect of DYRK1B inhibition, suggesting that DYRK1B prevents activated GLI1 and GLI2 forms from proteasomal degradation^[23,121]. The detailed mechanism of GLI1 and GLI2 protein stabilization by DYRK1B remains unclear, and whether stabilization of GLI1 and GLI2 involves direct phosphorylation by DYRK1B or depends on alternative indirect unknown mechanisms, will be further investigated.

DYRK1B regulates HH signaling/cross-talk between PI3K/mTOR/AKT and HH signaling both in positive and negative manners: Interaction of DYRK1B with the mammalian HH/GLI pathway has dual and opposing effects. On one hand, the ectopic expression of DYRK1B in NIH3T3 cells blocks canonical SMO-initiated signaling, *via* an elusive mechanism; on the other hand, overexpressed DYRK1B enhances the protein stability of GLI1, by preventing its proteasomal degradation. Stabilization of GLI1 is most likely executed through the AKT pathway^[137,138], which is activated by DYRK1B. AKT subsequently phosphorylates and protects GLI transcription factors from degradation^[130,137,148] (Figures 1 and 2). The exact mechanism of AKT stimulation by DYRK1B is currently unknown^[137]. In addition, because DYRK1B activates the PI3K/mTOR/AKT pathway, the DYRK1B-HH/GLI pathway is subjected to pronounced feedback control^[137] (Figures 1 and 2). In agreement, stimulation of the HH pathway by SMO activation increases DYRK1B protein levels, by unknown post-transcriptional mechanisms, suggesting the ability of HH signaling to stimulate AKT phosphorylation^[137] (Figure 2). In accordance, pharmacological inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway, performed in pancreatic cancer cell lines (Panc1, AsPc1, SU86.86, CAPAN2 and BxPc3), resulted in up-regulation of DYRK1B kinase and conversely when AKT signaling was activated the DYRK1B mRNA levels were reduced^[51].

The pharmacological inhibition of DYRK1B results in initial up-regulation of HH, followed by down-regulation of AKT phosphorylation, reducing GLI stabilization due to the fact that the PI3K/AKT/mTOR pathway is itself subjected to strong negative feedback regulation^[137]. It has been shown that short-term inhibition of DYRK1B by siRNA resulted in an enhancement of HH signaling, whereas long-term blockade of DYRK1B function by short-hairpin RNA resulted in suppression of GLI1 levels in Panc1 cells^[137]. Furthermore, the involvement of DYRK1B mutations in metabolic syndrome concerning PI3K signaling is intriguing^[76,149,150], as we will mention below. Summarizing, the crosstalk between DYRK1B and HH signaling has to be further elucidated, since the DYRK1B function related to the HH pathway is dependent on DYRK1B expression levels and canonical/non-canonical HH signaling.

DYRK1B regulates cell motility

DYRK1B kinase exerts its function in the regulation of cell motility *via* two discrete mechanisms: HH-induced microtubule (MT) acetylation and Met/ hepatocyte growth factor (HGF) signaling. DYRK1B, through HH signaling, facilitates MT-dependent processes, such as intracellular mitochondrial transport, mesenchymal cell polarization, and directed cell migration. HH signaling affects MT acetylation in mammalian cells^[151]. Using the NIH3T3, HeLa and MEF cell lines, it has been shown that HH pathway activity increases the levels of the MT-associated acetylation *via* a mechanism in which DYRK1B participates^[151]. GSK3 β is inhibited by its phosphorylation at Ser9 by DYRK1B, resulting in suppression of HDAC6 enzyme activity. The inhibition of HDAC6, that represents a major tubulin deacetylase, subsequently increases the levels of acetylated MTs. In summary, intercellular communication *via* HH signals can regulate the MT cytoskeleton and contribute to MT-dependent processes by altering the level of tubulin acetylation through DYRK1B activation^[151]. This could explain the reason that pancreatic cancer cells overexpressing

DYRK1B have shown resistance to the MT-depolymerizing agent Nocodazole^[48].

Except regulation of HH-induced microtubule acetylation, DYRK1B has also been shown to act as an inhibitor of cell motility through its interactions with the Met/HGF signaling pathway. In Mv1Lu mink lung epithelial cells, DYRK1B overexpression inhibited the migration of cells in wound experiments and their invasion through specific polycarbonate filters^[52]. Furthermore, the ability of DYRK1B to inhibit Mv1Lu cell migration was attenuated when cells were exposed to HGF or to elevated levels of transiently expressed RanBPM. RanBPM inhibited the kinase activity of DYRK1B. In addition, RanBPM and HGF inhibited the function of DYRK1B as a transcriptional co-activator. These findings suggest that DYRK1B plays a role in modulating cell migration through opposing the action of RanBPM, which is a Met signaling cascade adaptor protein. Met plays an important role in tumor cell invasion and cell migration. RanBPM has been reported to bind to the tyrosine kinase domain of the HGF receptor Met, enhance Met downstream signaling, and enhance HGF-induced A704 kidney carcinoma cell invasion, as a study has demonstrated^[53]. Moreover, *DYRK1B* was found to be one of the four most promigratory genes in the highly motile SKOV3 tumor cells by an RNAi screen of > 5200 genes^[54]. It is possible that motility induced by oncogenic KRAS was due to DYRK1B activity^[37]. In contrast, another study has shown that inhibition of DYRK1B suppresses the proliferation and migration of liposarcoma cells, indicating a positive role for DYRK1B in cell motility^[55]. In particular, DYRK1B targeting in liposarcoma cells, with small molecule inhibitor AZ191 or RNAi-mediated knockdown, results in reduction of proliferation, as well as in suppression of cell motility, induction of apoptosis, and sensitization of liposarcoma cells to chemotherapy drugs, indicating that DYRK1B could play a significant role in liposarcoma cell growth and proliferation motility^[55].

DYRK1B in metabolic syndrome

Except cancer, very little is known about the implication of DYRK1B in human diseases. Nevertheless, DYRK1B was found to be implicated in a rare autosomal-dominant form of metabolic syndrome, called abdominal obesity metabolic syndrome (or AOMS3) with its two missense mutations H90P and R102C. Affected individuals develop early-onset central obesity, diabetes, coronary artery disease, and hypertension^[76]. The overexpression of DYRK1B-H90P or DYRK1B-R102C mutations in HepG2 hepatoma cells resulted in increased induction of glucose-6-phosphatase (G6Pase), a gluconeogenic enzyme, in a dose-dependent manner^[76]. In addition, the DYRK1B-R102C mutation enhances the effect of DYRK1B on the adipogenic differentiation of 3T3-L1 preadipocytes^[76], as we will discuss below.

Cell-based assays have shown that the mutant alleles behave as gain-of-function variants of DYRK1B^[76], although the kinase activity of DYRK1B-R102C mutant was found to be reduced in *in vitro* assays, while the kinase activity of DYRK1B-H90P mutation has not yet been studied^[55]. It has been shown that H90P and R102C mutations are located at the N-terminal of DYRK1B catalytic domain^[26] and, thus, are unlikely to be directly involved in substrate recognition and catalysis^[65]. There is evidence that these mutations affect the DH box, not directly by interfering with the conformation of the catalytic domain, but by interfering with the HSP90 chaperone/CDC379 co-chaperone-mediated maturation of DYRK1B kinase by tyrosine autophosphorylation. This perturbs the conformational thermodynamic stability of the catalytic domain, which renders the kinase susceptible to misfolding and resulting in its intracellular aggregation^[65]. These findings, described above, point to a role for DYRK1B in adipogenesis and glucose homeostasis, providing a link between DYRK1B altered function and an inherited form of the metabolic syndrome. In agreement, the overexpression of DYRK1B homologues, DYRK1A and MNB in mice and *Drosophila*, respectively, leads to an increase in food uptake and body weight, and, conversely, their deficiencies are associated with loss of body weight^[76,156].

DYRK1B signaling in adipogenic transformation and glucose homeostasis: DYRK1B plays a central role in signaling pathways disrupted in metabolic syndrome, which is another example of cross-talk between DYRK1B and HH, which occurs during differentiation of mesenchymal stem cells into adipocytes^[76]. The HH pathway has an inhibitory function on adipocytic differentiation, involving redirecting cellular fate towards the osteogenic lineage^[18,157-159]. In contrast, DYRK1B favors differentiation into adipocytes^[76]. As we mentioned above, DYRK1B inhibits SHH signaling^[119] and its expression is increased dramatically during adipogenic differentiation^[63]. Also, it has been demonstrated that inhibition of the SHH pathway results in decreased expression of Wnt proteins^[160,161], which are negative regulators of adipogenesis^[162].

In a study by Keramati and colleagues^[76], elucidation of the mechanism of metabolic

syndrome was achieved by examining the effects of DYRK1B, DYRK1B-R102C and knockdown of DYRK1B during adipogenic differentiation of 3T3-L1 preadipocyte cells, using an adipogenic medium containing the Wnt inhibitor IBMX. This approach revealed that DYRK1B protein inhibits SHH through the reduction of the GLI2 effector and the subsequent reduction of Wnt signaling, resulting in enhanced adipogenesis^[76] (Figure 2). Moreover, the DYRK1B-R102C mutation exhibits a maximally strong effect, compared to DYRK1B, in the inhibition of SHH pathway *via* GLI2 effector. Additionally, DYRK1B-R102C mutation suppresses Wnt signaling, revealing its gain-of-function properties^[76]. Notably, DYRK1B is a nutrient-sensing protein that inhibits the RAS-RAF-MEK pathway^[42], which is responsible for the regulation of glucose uptake and glycolysis^[163]. It is known that activation of the MEK pathway results in decreased expression of the *G6Pase* gene and lowers glucose output^[164] (Figure 1).

DYRK1B in myogenesis

DYRK1B has strong expression in differentiated skeletal muscle, indicating a physiological role in muscle development and function. DYRK1B is expressed at low levels in most tissues, including dividing myoblasts, while is increased dramatically, at least 10-fold, when myoblasts undergo terminal differentiation and is maintained at elevated levels in mature muscle cells^[18,70]. Overexpression of DYRK1B facilitated myoblasts to fuse more rapidly when placed in differentiation medium. DYRK1B favors myoblast fusion and the subsequent expression of differentiation markers, such as myogenin, troponin T and muscle myosin heavy chain; while, its depletion, by siRNA, prevents myoblast fusion into myotubes and inhibits the induction of differentiation markers^[70].

Moreover, it is known that induction of DYRK1B within the initial 24 h of myogenic differentiation, enables the transcription of myogenin, which is a myogenic regulatory factor (MRF), through indirect activation of another MRF, the MEF2^[74]. More specifically, DYRK1B relieves MEF2 from HDAC5, HDAC7 and MITR (the MEF2-interacting transcriptional repressor), in a dose- and kinase-dependent manner, by phosphorylating the class II HDACs (HDAC5 and HDAC7), at a conserved serine residue located at the nuclear localization sequence, resulting in decreased nuclear accumulation of Class II HDACs and leading them to exit the nucleus^[74] (Figure 2).

The ability of DYRK1B to activate myogenin transcription facilitates myoblast differentiation. In addition, DYRK1B promotes myoblast differentiation by mediating cell cycle arrest of proliferating myoblasts and by increasing their survival during differentiation^[74]. Also, DYRK1B has been shown to increase the survival of rhabdomyosarcoma cells^[18,53,69]. The induction of DYRK1B under stress conditions suggests that DYRK1B could play a role in response to cellular injury. Skeletal muscle regeneration after injury is achieved by the activation of quiescent muscle stem cells (satellite cells), which enter the cell cycle and then differentiate and fuse with uninjured muscle fibers, in order to repair the damage^[165]. DYRK1B is expressed at low levels in muscle stem cells and its expression is increased when quiescent muscle stem cells are activated to re-enter the cell cycle^[70]. DYRK1B seems to be unimportant for muscle embryonic development, because DYRK1B knockout mice were viable for 18 d after conception, a crucial period for the development of skeletal muscle^[63]. Thus, DYRK1B seems to function more during the repair of normal skeletal muscle^[53]. Studies of DYRK1B in differentiating C2C12 myoblasts strongly suggest that DYRK1B functions as a survival factor, particularly during skeletal muscle regeneration^[53].

DYRK1B has anti-apoptotic functions in both differentiating myoblasts and muscle-related cancer cells, as mentioned above. The anti-apoptotic properties of DYRK1B are also observed in skeletal myoblasts, where DYRK1B is most abundant. A large portion (20%-30%) of cycling myoblasts are not able to differentiate and undergo apoptosis when deprived of mitogens. Depletion of DYRK1B by RNAi blocked myoblast survival and increased the activation of caspase-3^[69]. Moreover, overexpression of DYRK1B eliminated apoptosis during muscle differentiation, whereas overexpression of a DYRK1B dominant negative showed no anti-apoptotic activity^[69]. Muscle satellite cells constitute a self-renewing pool of stem cells in adult muscle, where they function in tissue growth and repair. Disruption of regulatory control between proliferation and differentiation of these cells results in tumor formation^[166]. Notably, although the precise cause of rhabdomyosarcoma is unknown, it has been suggested that cancer arises in 'satellite' stem cells^[75]. It is likely that DYRK1B also facilitates the survival of CSCs of rhabdomyosarcoma, thereby rendering DYRK1B as a novel therapeutic target in rhabdomyosarcoma^[53].

DYRK1B signaling in myogenesis: SHH regulates the cell fate of adult muscle satellite cells in mammals, promoting proliferation of satellite cells and of C2C12

myoblasts and preventing their differentiation into multinucleated myotubes^[166]. DYRK1B seems to have the opposite effect compared to SHH signaling, in muscle stem cells (satellite cells) as well as in C2C12 progenitors^[18]. It remains elusive if the influence of SHH or DYRK1B takes place at the same developmental stage. Experimental data suggest a primarily antagonistic relationship between these two pathways^[18]. On one hand, DYRK1B dampens SMO-induced HH signaling but, on the other hand, it promotes stability of the GLI1 effector *via* DYRK1B-induced stimulation of the PI3K-AKT pathway^[119,121,130,137,167] (Figure 2).

In agreement, other members of the DYRK/MNB/HIPK kinases family have been shown to regulate the transition from growth to differentiation, *e.g.*, the related kinase, Yak1, acts as a growth attenuator in response to stresses and nutrient conditions in yeast^[168] and the YakA kinase regulates stress responses in *Dictyostelium discoideum* in response to nutrient starvation^[169]. In this line, DYRK1B induction complements the observations in myoblast differentiation, as response to growth factor deprivation, as previously described.

DYRK1B in spermatogenesis

DYRK1B is also highly expressed, excepting skeletal muscle, in testis where it negatively regulates proliferation of immature male germ cells by an indirect mechanism^[77]. In adult mouse, spermatogenesis is maintained by germ-line stem cells that undergo mitosis and self-renew or differentiate into committed spermatogonia, which called undifferentiated spermatogonia^[170]. Undifferentiated spermatogonia or spermatogonial stem cells (SSCs)^[77,170] constitute less than 1% of total testicular cells and differentiate into differentiating spermatogonia, which will finally undergo meiosis^[171,172].

Cold-inducible RNA-binding protein (Cirp) is a cold-shock protein identified in mammals. It is induced in response only to mild hypothermia and is also induced by cellular stress, such as ultraviolet irradiation and hypoxia^[173-175]. In response to stress, Cirp migrates from the nucleus to the cytoplasm and affects expression of its target mRNAs^[176,177]. Cirp is expressed in the murine germ cells and its expression levels vary depending on the stage of differentiation^[178]. When mouse testis is exposed to heat stress, expression of Cirp is decreased, in response to the heat-induced testicular damage. Cirp-knockout (*cirp*^{-/-}) mice did not show gross abnormality or defect in fertility but did show significantly reduced number of undifferentiated spermatogonia and exhibited delayed recovery of spermatogenesis after treatment with busulfan, a cytotoxic agent^[77]. It was found that Cirp accelerates cell cycle progression from G0 to G1 as well as from G1 to S phase in cultured MEFs. Notably, in undifferentiated spermatogonia, Cirp and DYRK1B co-localized in the nucleus. The interaction between Cirp and DYRK1B is required to fully maintain the undifferentiated spermatogonia in mice, by promoting their proliferation^[77]. In particular, direct binding of Cirp to DYRK1B prevents DYRK1B binding to p27^{Kip1}, resulting in decreased phosphorylation and destabilization of p27^{Kip1} (Figure 2). In contrast, Cirp did not affect DYRK1B binding to cyclin D1 but inhibited phosphorylation of cyclin D1 by DYRK1B, resulting in cyclin D1 stabilization (Figure 2). In the spermatogonial GC-1spg cell line, suppression of Cirp expression resulted in increased levels of p27^{Kip1} and decreased levels of cyclin D1. Consistent changes in the protein levels of p27^{Kip1} and cyclin D1, as well as the percentage of cells in G0 phase, were observed in undifferentiated spermatogonia of *cirp*^{-/-} mice^[77].

Those findings demonstrated a physiological function of the mammalian cold-shock protein Cirp that explains partly why testis should be kept cool. Cirp fine-tunes cell-cycle progression/exit in undifferentiated spermatogonia, fibroblasts, and cancer cells^[179], by suppressing DYRK1B and modulating the protein levels of cell cycle regulators p27^{Kip1} and cyclin D1. Moreover, Cirp suppresses growth signals indirectly through discrete protein-protein and protein-RNA interactions, which depend on multiple factors, including cell types, stress, and conditions of cells^[77].

DYRK1B in neurogenesis

During development of the CNS, coordinated regulation of cell cycle progression/exit and differentiation of NSCs/NPCs is essential for the proper formation and function of the nervous system^[180-183]. During CNS development, NSCs undergo symmetric and asymmetric divisions and finally exit cell cycle and subsequently differentiate to obtain discrete neuronal identities^[182,184,185]. A number of studies have shown that key regulators of cell cycle progression can influence neural cell fate and differentiation program and reverse cell fate determinants and differentiation-inducing factors can regulate cell cycle progression^[186-189].

Many studies have shown that DYRK1A has an important role in neurogenesis. Hyperactivity or increased gene dosage (*e.g.*, in trisomy 21) of DYRK1A has been linked with abnormal brain development, neurodegeneration^[105], cognitive disabilities and early onset Alzheimer's disease in individuals with Down syndrome^[29,32,34,105,190]. Additional studies have shown that DYRK1A mutations, resulting in loss-of-function, are responsible for intellectual disabilities accompanied by microcephaly, epilepsy and autism, which are generally referred to as autosomal dominant mental retardation 7 syndrome (known as MRD7)^[22,33,34,191,192].

Although the role of DYRK1A in neurogenesis is well documented, the function of its closely related kinase, DYRK1B, in CNS development remains elusive. It is difficult to figure out the functional diversity between DYRK1A and DYRK1B, since the two molecules have been studied in discrete systems. Most of the studies of DYRK1A have been performed in models of neurogenesis, whereas most of the studies of DYRK1B have been performed in models of myogenesis^[69,70,74] and cancers^[24,36,39,41,50].

We have recently demonstrated that DYRK1B is expressed in the adult mouse brain and in cultured primary cortical neurons and we have first studied DYRK1B function in mouse neuroblastoma Neuro2A cells, a suitable model for studies of neuronal development. We found that DYRK1B overexpression in Neuro2A cells promotes cell cycle exit and neuronal differentiation, by promoting Cyclin D1 cytoplasmic relocation and its proteasomal degradation by 26S proteasome^[35,79]. It is worthy of note that transient overexpression of DYRK1B in Neuro2A cells also promotes neuronal differentiation, as indicated by the increase of the mean neurite length by 2-fold and by the expression of the neuronal marker, β III-tubulin, when Neuro2A cells were subjected to differentiation using retinoic acid^[35]. Further, in Neuro2A cells, DYRK1B-dependent down-regulation of Cyclin D1 was reversed following DYRK1B interaction with the scaffolding protein RanBPM. Interestingly, binding of RanBPM to DYRK1B stabilized Cyclin D1 in the nucleus and increased 5-bromo-2'-deoxyuridine (commonly known as BrdU) incorporation, which was used as a measure of cellular proliferation. Moreover, we have found that RanBPM facilitated DYRK1B proteasomal turnover^[35].

In addition, we have demonstrated that the tripartite functional interactions between DYRK1B, RanBPM and the neuronal protein Cend1 (termed for cell cycle exit and neuronal differentiation 1; also known as BM88) regulate the balance between cellular proliferation and differentiation in Neuro2A cells, suggesting that the three proteins may also play a similar role in cell cycle progression/exit and differentiation of NSCs/NPCs during neurogenesis^[35,79] (Figure 2). This is in agreement with the fact that both RanBPM and DYRK1B are expressed in neuronal precursors in parallel with Cend1^[35,79]. Recently, we have found that DYRK1B is expressed in embryonic chick and mouse brain and spinal cord, and is highly expressed by cycling NSCs, while DYRK1B expression marks all along the neuronal lineage, suggesting thus DYRK1B implication in proliferation and differentiation of NSCs (Kokkorakis *et al.*, 2020 unpublished data).

CONCLUSION

Stem cells exist in most tissues of the body at all stages of development, from early stages of embryogenesis all the way throughout adult life, with significant roles in patterning during embryogenesis and differentiation of all body tissues. In the adult life, mesenchymal stem cells have roles as repository cells that have the capacity to enable healing, growth and replacement of cells that are lost due to aging or trauma^[10]. CSCs are the mutated equivalents of normal stem cells that share similar characteristics with them, especially the capacity to give rise to all cell types that reside in a particular cancer. CSCs are thus tumorigenic, in contrast to other non-tumorigenic cancer cells. CSCs may generate tumors through the stem cell capacity of self-renewal and differentiation into multiple cell types. CSCs persist in tumors as a distinct population and cause recurrence and metastasis by giving rise to new tumors^[16].

Multiple factors that regulate the physical environments within stem cell niches can significantly influence cell fate decisions. Among these factors, DYRK kinases comprise a family of protein kinases that are highly evolutionarily conserved, from yeast to humans. DYRK kinases are emerging modulators of signal transduction, cell proliferation, survival, and differentiation^[18] and act as inducers of cell cycle exit and quiescence, as well as promote cell viability through their anti-apoptotic functions^[42]. The studies described herein have revealed that DYRK1B kinase is a multifunctional protein implicating several signaling pathways in development and in human diseases, regulating cell functions, such as cell proliferation, differentiation, cell

viability, motility and transcription. The mechanism under which DYRK1B exerts its function each time seems to be cell type- and context-dependent. DYRK1B is involved in cancer, metabolic syndrome, glucose homeostasis, survival, myogenesis, spermatogenesis, adipogenesis and neurogenesis, as we have recently shown^[55] (Kokkorakis *et al.*, 2020 unpublished data). Several of the studies described above have shown that DYRK1B is involved in various signaling pathways, such as HH, RAS and PI3K/mTOR/AKT, while HH comprises the major signaling pathway in which DYRK1B participates. DYRK1B seems to be not required for HH signaling, but it seems to act as a modulator involved in many HH-driven cascades during embryonic development.

DYRK1B has an important role in stem cell biology as is essential for the regulation of the balance between proliferation and differentiation of stem cells during myogenesis, spermatogenesis, and neurogenesis. In human cancers, DYRK1B is crucial for maintaining CSCs in a quiescence state, rendering them resistant to cancer chemo- and radio-therapies by controlling the balance between quiescence and apoptosis. Moreover, DYRK1B regulates the maintenance of CSCs under hypoxia by phosphorylation of the ID2 protein, resulting in the maintenance of stemness. Re-entering of quiescent CSCs into cell cycle may be achieved using DYRK1B pharmacological inhibitors, which may serve as valuable drugs in cancer therapy^[43,80]. Moreover, DYRK1B may be used as a diagnostic marker for various types of human cancer^[43].

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Matsas R for discussions and comments.

REFERENCES

- 1 **Weissman IL.** Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000; **100**: 157-168 [PMID: 10647940 DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81692-X]
- 2 **Wu J, Izpisua Belmonte JC.** Stem Cells: A Renaissance in Human Biology Research. *Cell* 2016; **165**: 1572-1585 [PMID: 27315475 DOI: 10.1016/j.cell.2016.05.043]
- 3 **Chen J, Liu H, Liu J, Qi J, Wei B, Yang J, Liang H, Chen Y, Chen J, Wu Y, Guo L, Zhu J, Zhao X, Peng T, Zhang Y, Chen S, Li X, Li D, Wang T, Pei D.** H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs. *Nat Genet* 2013; **45**: 34-42 [PMID: 23202127 DOI: 10.1038/ng.2491]
- 4 **Miles DC, de Vries NA, Gisler S, Liefink C, Akhtar W, Gogola E, Pawlitzky I, Hulsman D, Tanger E, Koppens M, Beijersbergen RL, van Lohuizen M.** TRIM28 is an Epigenetic Barrier to Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming. *Stem Cells* 2017; **35**: 147-157 [PMID: 27350605 DOI: 10.1002/stem.2453]
- 5 **Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S.** Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; **131**: 861-872 [PMID: 18035408 DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.019]
- 6 **Daniel MG, Pereira CF, Lemischka IR, Moore KA.** Making a Hematopoietic Stem Cell. *Trends Cell Biol* 2016; **26**: 202-214 [PMID: 26526106 DOI: 10.1016/j.tcb.2015.10.002]
- 7 **Wahlster L, Daley GQ.** Progress towards generation of human haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol* 2016; **18**: 1111-1117 [PMID: 27723718 DOI: 10.1038/ncb3419]
- 8 **Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM.** Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; **282**: 1145-1147 [PMID: 9804556 DOI: 10.1126/science.282.5391.1145]
- 9 **Nandoe Tewarie RS, Hurtado A, Bartels RH, Grotenhuis A, Oudega M.** Stem cell-based therapies for spinal cord injury. *J Spinal Cord Med* 2009; **32**: 105-114 [PMID: 19569457 DOI: 10.1016/B978-0-444-59544-7.00012-3]
- 10 **Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z.** Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther* 2019; **10**: 68 [PMID: 30808416 DOI: 10.1186/s13287-019-1165-5]
- 11 **Cheung TH, Rando TA.** Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; **14**: 329-340 [PMID: 23698583 DOI: 10.1038/nrm3591]
- 12 **Bonnet D, Dick JE.** Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; **3**: 730-737 [PMID: 9212098 DOI: 10.1038/nm0797-730]
- 13 **Kuşoğlu A, Biray Avcı Ç.** Cancer stem cells: A brief review of the current status. *Gene* 2019; **681**: 80-85 [PMID: 30268439 DOI: 10.1016/j.gene.2018.09.052]
- 14 **Ailles LE, Weissman IL.** Cancer stem cells in solid tumors. *Curr Opin Biotechnol* 2007; **18**: 460-466 [PMID: 18023337 DOI: 10.1016/j.copbio.2007.10.007]

- 15 **Aponte PM**, Caicedo A. Stemness in Cancer: Stem Cells, Cancer Stem Cells, and Their Microenvironment. *Stem Cells Int* 2017; **2017**: 5619472 [PMID: [28473858](#) DOI: [10.1155/2017/5619472](#)]
- 16 **Gulaia V**, Kumeiko V, Shved N, Cicinskas E, Rybtsov S, Ruzov A, Kagansky A. Molecular Mechanisms Governing the Stem Cell's Fate in Brain Cancer: Factors of Stemness and Quiescence. *Front Cell Neurosci* 2018; **12**: 388 [PMID: [30510501](#) DOI: [10.3389/fncel.2018.00388](#)]
- 17 **Clevers H**. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* 2011; **17**: 313-319 [PMID: [21386835](#) DOI: [10.1038/nm.2304](#)]
- 18 **Singh R**, Lauth M. Emerging Roles of DYRK Kinases in Embryogenesis and Hedgehog Pathway Control. *J Dev Biol* 2017; **5** [PMID: [29615569](#) DOI: [10.3390/jdb5040013](#)]
- 19 **Hanks SK**, Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 1995; **9**: 576-596 [PMID: [7768349](#) DOI: [10.1096/fasebj.9.8.7768349](#)]
- 20 **Manning G**, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 2002; **298**: 1912-1934 [PMID: [12471243](#) DOI: [10.1126/science.1075762](#)]
- 21 **Aranda S**, Laguna A, de la Luna S. DYRK family of protein kinases: evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles. *FASEB J* 2011; **25**: 449-462 [PMID: [21048044](#) DOI: [10.1096/fj.10-165837](#)]
- 22 **Soppa U**, Becker W. DYRK protein kinases. *Curr Biol* 2015; **25**: R488-R489 [PMID: [26079075](#) DOI: [10.1016/j.cub.2015.02.067](#)]
- 23 **Becker W**. Emerging role of DYRK family protein kinases as regulators of protein stability in cell cycle control. *Cell Cycle* 2012; **11**: 3389-3394 [PMID: [22918246](#) DOI: [10.4161/cc.21404](#)]
- 24 **Mercer SE**, Friedman E. Mirk/Dyrk1B: a multifunctional dual-specificity kinase involved in growth arrest, differentiation, and cell survival. *Cell Biochem Biophys* 2006; **45**: 303-315 [PMID: [16845176](#) DOI: [10.1385/CBB:45:3:303](#)]
- 25 **Tejedor F**, Zhu XR, Kaltenbach E, Ackermann A, Baumann A, Canal I, Heisenberg M, Fischbach KF, Pongs O. minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in Drosophila. *Neuron* 1995; **14**: 287-301 [PMID: [7857639](#) DOI: [10.1016/0896-6273\(95\)90286-4](#)]
- 26 **Becker W**, Joost HG. Structural and functional characteristics of Dyrk, a novel subfamily of protein kinases with dual specificity. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1999; **62**: 1-17 [PMID: [9932450](#) DOI: [10.1016/s0079-6603\(08\)60503-6](#)]
- 27 **Hämmerle B**, Elizalde C, Galceran J, Becker W, Tejedor FJ. The MNB/DYRK1A protein kinase: neurobiological functions and Down syndrome implications. *J Neural Transm Suppl* 2003; 129-137 [PMID: [15068245](#) DOI: [10.1007/978-3-7091-6721-2_11](#)]
- 28 **Martí E**, Altafaj X, Dierssen M, de la Luna S, Fotaki V, Alvarez M, Pérez-Riba M, Ferrer I, Estivill X. Dyrk1A expression pattern supports specific roles of this kinase in the adult central nervous system. *Brain Res* 2003; **964**: 250-263 [PMID: [12576186](#) DOI: [10.1016/S0006-8993\(02\)04069-6](#)]
- 29 **Hämmerle B**, Carnicero A, Elizalde C, Ceron J, Martínez S, Tejedor FJ. Expression patterns and subcellular localization of the Down syndrome candidate protein MNB/DYRK1A suggest a role in late neuronal differentiation. *Eur J Neurosci* 2003; **17**: 2277-2286 [PMID: [12814361](#) DOI: [10.1046/j.1460-9568.2003.02665.x](#)]
- 30 **Wegiel J**, Kuchna I, Nowicki K, Frackowiak J, Dowjat K, Silverman WP, Reisberg B, DeLeon M, Wisniewski T, Adayev T, Chen-Hwang MC, Hwang YW. Cell type- and brain structure-specific patterns of distribution of minibrain kinase in human brain. *Brain Res* 2004; **1010**: 69-80 [PMID: [15126119](#) DOI: [10.1016/j.brainres.2004.03.008](#)]
- 31 **Park J**, Song WJ, Chung KC. Function and regulation of Dyrk1A: towards understanding Down syndrome. *Cell Mol Life Sci* 2009; **66**: 3235-3240 [PMID: [19685005](#) DOI: [10.1007/s00018-009-0123-2](#)]
- 32 **Wegiel J**, Gong CX, Hwang YW. The role of DYRK1A in neurodegenerative diseases. *FEBS J* 2011; **278**: 236-245 [PMID: [21156028](#) DOI: [10.1111/j.1742-4658.2010.07955.x](#)]
- 33 **Soppa U**, Schumacher J, Florencio Ortiz V, Pasqualon T, Tejedor FJ, Becker W. The Down syndrome-related protein kinase DYRK1A phosphorylates p27(Kip1) and Cyclin D1 and induces cell cycle exit and neuronal differentiation. *Cell Cycle* 2014; **13**: 2084-2100 [PMID: [24806449](#) DOI: [10.4161/cc.29104](#)]
- 34 **Arbones ML**, Thomazeau A, Nakano-Kobayashi A, Hagiwara M, Delabar JM. DYRK1A and cognition: A lifelong relationship. *Pharmacol Ther* 2019; **194**: 199-221 [PMID: [30268771](#) DOI: [10.1016/j.pharmthera.2018.09.010](#)]
- 35 **Tsioras K**, Papastefanaki F, Politis PK, Matsas R, Gaitanou M. Functional Interactions between BM88/Cend1, Ran-binding protein M and Dyrk1B kinase affect cyclin D1 Levels and cell cycle progression/exit in mouse neuroblastoma cells. *PLoS One* 2013; **8**: e82172 [PMID: [24312406](#) DOI: [10.1371/journal.pone.0082172](#)]
- 36 **Lee K**, Deng X, Friedman E. Mirk protein kinase is a mitogen-activated protein kinase substrate that mediates survival of colon cancer cells. *Cancer Res* 2000; **60**: 3631-3637 [PMID: [10910078](#)]
- 37 **Jin K**, Park S, Ewton DZ, Friedman E. The survival kinase Mirk/Dyrk1B is a downstream effector of oncogenic K-ras in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2007; **67**: 7247-7255 [PMID: [17671193](#) DOI: [10.1158/0008-5472.CAN-06-4099](#)]
- 38 **Hu J**, Nakhla H, Friedman E. Transient arrest in a quiescent state allows ovarian cancer cells to survive suboptimal growth conditions and is mediated by both Mirk/dyrk1b and p130/RB2. *Int J*

- Cancer* 2011; **129**: 307-318 [PMID: 20857490 DOI: 10.1002/ijc.25692]
- 39 **Gao J**, Yang X, Yin P, Hu W, Liao H, Miao Z, Pan C, Li N. The involvement of FoxO in cell survival and chemosensitivity mediated by Mirk/Dyrk1B in ovarian cancer. *Int J Oncol* 2012; **40**: 1203-1209 [PMID: 22159921 DOI: 10.3892/ijo.2011.1293]
- 40 **Davis SJ**, Sheppard KE, Pearson RB, Campbell IG, Gorringer KL, Simpson KJ. Functional analysis of genes in regions commonly amplified in high-grade serous and endometrioid ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2013; **19**: 1411-1421 [PMID: 23362323 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3433]
- 41 **Hu J**, Deng H, Friedman EA. Ovarian cancer cells, not normal cells, are damaged by Mirk/Dyrk1B kinase inhibition. *Int J Cancer* 2013; **132**: 2258-2269 [PMID: 23114871 DOI: 10.1002/ijc.27917]
- 42 **Friedman E**. Mirk/dyrk1B Kinase in Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci* 2013; **14**: 5560-5575 [PMID: 23528858 DOI: 10.3390/ijms14035560]
- 43 **Friedman E**. Mirk/Dyrk1B in cancer. *J Cell Biochem* 2007; **102**: 274-279 [PMID: 17583556 DOI: 10.1002/jcb.21451]
- 44 **Jin K**, Ewton DZ, Park S, Hu J, Friedman E. Mirk regulates the exit of colon cancer cells from quiescence. *J Biol Chem* 2009; **284**: 22916-22925 [PMID: 19542220 DOI: 10.1074/jbc.M109.035519]
- 45 **Gao J**, Zheng Z, Rawal B, Schell MJ, Bepler G, Haura EB. Mirk/Dyrk1B, a novel therapeutic target, mediates cell survival in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2009; **8**: 1671-1679 [PMID: 19633423 DOI: 10.4161/cbt.8.17.9322]
- 46 **Song LN**, Silva J, Koller A, Rosenthal A, Chen EI, Gelmann EP. The Tumor Suppressor NKX3.1 Is Targeted for Degradation by DYRK1B Kinase. *Mol Cancer Res* 2015; **13**: 913-922 [PMID: 25777618 DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0680]
- 47 **Bowen C**, Ostrowski MC, Leone G, Gelmann EP. Loss of PTEN Accelerates NKX3.1 Degradation to Promote Prostate Cancer Progression. *Cancer Res* 2019; **79**: 4124-4134 [PMID: 31213464 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-4110]
- 48 **Deng X**, Ewton DZ, Li S, Naqvi A, Mercer SE, Landas S, Friedman E. The kinase Mirk/Dyrk1B mediates cell survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2006; **66**: 4149-4158 [PMID: 16618736 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3089]
- 49 **Deng X**, Ewton DZ, Friedman E. Mirk/Dyrk1B maintains the viability of quiescent pancreatic cancer cells by reducing levels of reactive oxygen species. *Cancer Res* 2009; **69**: 3317-3324 [PMID: 19351855 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2903]
- 50 **Ewton DZ**, Hu J, Vilenchik M, Deng X, Luk KC, Polonskaia A, Hoffman AF, Zipf K, Boylan JF, Friedman EA. Inactivation of mirk/dyrk1b kinase targets quiescent pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2011; **10**: 2104-2114 [PMID: 21878655 DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0498]
- 51 **Deng X**, Hu J, Ewton DZ, Friedman E. Mirk/dyrk1B kinase is upregulated following inhibition of mTOR. *Carcinogenesis* 2014; **35**: 1968-1976 [PMID: 24590896 DOI: 10.1093/carcin/bgu058]
- 52 **Deng X**, Friedman E. Mirk kinase inhibition blocks the *in vivo* growth of pancreatic cancer cells. *Genes Cancer* 2014; **5**: 337-347 [PMID: 25352950 DOI: 10.18632/genesandcancer.29]
- 53 **Mercer SE**, Ewton DZ, Shah S, Naqvi A, Friedman E. Mirk/Dyrk1b mediates cell survival in rhabdomyosarcomas. *Cancer Res* 2006; **66**: 5143-5150 [PMID: 16707437 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1539]
- 54 **Yang C**, Ji D, Weinstein EJ, Choy E, Hornicek FJ, Wood KB, Liu X, Mankin H, Duan Z. The kinase Mirk is a potential therapeutic target in osteosarcoma. *Carcinogenesis* 2010; **31**: 552-558 [PMID: 20042639 DOI: 10.1093/carcin/bgp330]
- 55 **Chen H**, Shen J, Choy E, Hornicek FJ, Shan A, Duan Z. Targeting DYRK1B suppresses the proliferation and migration of liposarcoma cells. *Oncotarget* 2018; **9**: 13154-13166 [PMID: 29568347 DOI: 10.18632/oncotarget.22743]
- 56 **Jin K**, Lim S, Mercer SE, Friedman E. The survival kinase Mirk/dyrk1B is activated through Rac1-MKK3 signaling. *J Biol Chem* 2005; **280**: 42097-42105 [PMID: 16257974 DOI: 10.1074/jbc.M507301200]
- 57 **Tang L**, Wang Y, Strom A, Gustafsson JÅ, Guan X. Lapatinib induces p27(Kip1)-dependent G₁ arrest through both transcriptional and post-translational mechanisms. *Cell Cycle* 2013; **12**: 2665-2674 [PMID: 23907131 DOI: 10.4161/cc.25728]
- 58 **Chen Y**, Wang S, He Z, Sun F, Huang Y, Ni Q, Wang H, Wang Y, Cheng C. Dyrk1B overexpression is associated with breast cancer growth and a poor prognosis. *Hum Pathol* 2017; **66**: 48-58 [PMID: 28554575 DOI: 10.1016/j.humpath.2017.02.033]
- 59 **MacKeigan JP**, Murphy LO, Blenis J. Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat Cell Biol* 2005; **7**: 591-600 [PMID: 15864305 DOI: 10.1038/ncb1258]
- 60 **Zhou N**, Yuan S, Wang R, Zhang W, Chen JJ. Role of dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1B (Dyrk1B) in S-phase entry of HPV E7 expressing cells from quiescence. *Oncotarget* 2015; **6**: 30745-30761 [PMID: 26307683 DOI: 10.18632/oncotarget.5222]
- 61 **Kettle JG**, Ballard P, Bardelle C, Cockerill M, Colclough N, Critchlow SE, Debreczeni J, Fairley G, Fillery S, Graham MA, Goodwin L, Guichard S, Hudson K, Ward RA, Whittaker D. Discovery and optimization of a novel series of Dyrk1B kinase inhibitors to explore a MEK resistance hypothesis. *J Med Chem* 2015; **58**: 2834-2844 [PMID: 25738750 DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00098]
- 62 **Li Z**, Jiang K, Zhu X, Lin G, Song F, Zhao Y, Piao Y, Liu J, Cheng W, Bi X, Gong P, Song Z, Meng S. Encorafenib (LGX818), a potent BRAF inhibitor, induces senescence accompanied by autophagy in BRAFV600E melanoma cells. *Cancer Lett* 2016; **370**: 332-344 [PMID: 26586345]

- DOI: [10.1016/j.canlet.2015.11.015](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.11.015)]
- 63 **Leder S**, Czajkowska H, Maenz B, De Graaf K, Barthel A, Joost HG, Becker W. Alternative splicing variants of dual specificity tyrosine phosphorylated and regulated kinase 1B exhibit distinct patterns of expression and functional properties. *Biochem J* 2003; **372**: 881-888 [PMID: [12633499](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12633499/) DOI: [10.1042/BJ20030182](https://doi.org/10.1042/BJ20030182)]
 - 64 **Kinstrie R**, Lochhead PA, Sibbet G, Morrice N, Cleghon V. dDYRK2 and Minibrain interact with the chromatin remodelling factors SNR1 and TRX. *Biochem J* 2006; **398**: 45-54 [PMID: [16671894](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16671894/) DOI: [10.1042/BJ20060159](https://doi.org/10.1042/BJ20060159)]
 - 65 **Abu Jhaisha S**, Widowati EW, Kii I, Sonamoto R, Knapp S, Papadopoulos C, Becker W. DYRK1B mutations associated with metabolic syndrome impair the chaperone-dependent maturation of the kinase domain. *Sci Rep* 2017; **7**: 6420 [PMID: [28743892](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28743892/) DOI: [10.1038/s41598-017-06874-w](https://doi.org/10.1038/s41598-017-06874-w)]
 - 66 **Leder S**, Weber Y, Altafaj X, Estivill X, Joost HG, Becker W. Cloning and characterization of DYRK1B, a novel member of the DYRK family of protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **254**: 474-479 [PMID: [9918863](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9918863/) DOI: [10.1006/bbrc.1998.9967](https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9967)]
 - 67 **Asada M**, Yamada T, Ichijo H, Delia D, Miyazono K, Fukumuro K, Mizutani S. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *EMBO J* 1999; **18**: 1223-1234 [PMID: [10064589](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10064589/) DOI: [10.1093/emboj/18.5.1223](https://doi.org/10.1093/emboj/18.5.1223)]
 - 68 **Zhou BP**, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* 2001; **3**: 245-252 [PMID: [11231573](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11231573/) DOI: [10.1038/35060032](https://doi.org/10.1038/35060032)]
 - 69 **Mercer SE**, Ewton DZ, Deng X, Lim S, Mazur TR, Friedman E. Mirk/Dyrk1B mediates survival during the differentiation of C2C12 myoblasts. *J Biol Chem* 2005; **280**: 25788-25801 [PMID: [15851482](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15851482/) DOI: [10.1074/jbc.M413594200](https://doi.org/10.1074/jbc.M413594200)]
 - 70 **Deng X**, Ewton DZ, Pawlikowski B, Maimone M, Friedman E. Mirk/dyrk1B is a Rho-induced kinase active in skeletal muscle differentiation. *J Biol Chem* 2003; **278**: 41347-41354 [PMID: [12902328](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12902328/) DOI: [10.1074/jbc.M306780200](https://doi.org/10.1074/jbc.M306780200)]
 - 71 **Lim S**, Jin K, Friedman E. Mirk protein kinase is activated by MKK3 and functions as a transcriptional activator of HNF1alpha. *J Biol Chem* 2002; **277**: 25040-25046 [PMID: [11980910](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11980910/) DOI: [10.1074/jbc.M203257200](https://doi.org/10.1074/jbc.M203257200)]
 - 72 **Gao J**, Zhao Y, Lv Y, Chen Y, Wei B, Tian J, Yang Z, Kong F, Pang J, Liu J, Shi H. Mirk/Dyrk1B mediates G0/G1 to S phase cell cycle progression and cell survival involving MAPK/ERK signaling in human cancer cells. *Cancer Cell Int* 2013; **13**: 2 [PMID: [23311607](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23311607/) DOI: [10.1186/1475-2867-13-2](https://doi.org/10.1186/1475-2867-13-2)]
 - 73 **Lim S**, Zou Y, Friedman E. The transcriptional activator Mirk/Dyrk1B is sequestered by p38alpha/beta MAP kinase. *J Biol Chem* 2002; **277**: 49438-49445 [PMID: [12384504](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12384504/) DOI: [10.1074/jbc.M206840200](https://doi.org/10.1074/jbc.M206840200)]
 - 74 **Deng X**, Ewton DZ, Mercer SE, Friedman E. Mirk/dyrk1B decreases the nuclear accumulation of class II histone deacetylases during skeletal muscle differentiation. *J Biol Chem* 2005; **280**: 4894-4905 [PMID: [15546868](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15546868/) DOI: [10.1074/jbc.M411894200](https://doi.org/10.1074/jbc.M411894200)]
 - 75 **Merlino G**, Helman LJ. Rhabdomyosarcoma--working out the pathways. *Oncogene* 1999; **18**: 5340-5348 [PMID: [10498887](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10498887/) DOI: [10.1038/sj.onc.1203038](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203038)]
 - 76 **Keramati AR**, Fathzadeh M, Go GW, Singh R, Choi M, Faramarzi S, Mane S, Kasaei M, Sarajzadeh-Fard K, Hwa J, Kidd KK, Babaei Bigi MA, Malekzadeh R, Hosseinian A, Babaei M, Lifton RP, Mani A. A form of the metabolic syndrome associated with mutations in DYRK1B. *N Engl J Med* 2014; **370**: 1909-1919 [PMID: [24827035](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24827035/) DOI: [10.1056/NEJMoal301824](https://doi.org/10.1056/NEJMoal301824)]
 - 77 **Masuda T**, Itoh K, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Nakazawa N, Sakurai T, Liu Y, Tokuchi H, Fujita T, Zhao Y, Nishiyama H, Tanaka T, Fukumoto M, Ikawa M, Okabe M, Fujita J. Cold-inducible RNA-binding protein (Cirp) interacts with Dyrk1b/Mirk and promotes proliferation of immature male germ cells in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; **109**: 10885-10890 [PMID: [22711815](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22711815/) DOI: [10.1073/pnas.1121524109](https://doi.org/10.1073/pnas.1121524109)]
 - 78 **Aponte PM**. Spermatogonial stem cells: Current biotechnological advances in reproduction and regenerative medicine. *World J Stem Cells* 2015; **7**: 669-680 [PMID: [26029339](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26029339/) DOI: [10.4252/wjsc.v7.i4.669](https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i4.669)]
 - 79 **Gaitanou M**, Segklia K, Matsas R. Cend1, a Story with Many Tales: From Regulation of Cell Cycle Progression/Exit of Neural Stem Cells to Brain Structure and Function. *Stem Cells Int* 2019; **2019**: 2054783 [PMID: [31191667](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31191667/) DOI: [10.1155/2019/2054783](https://doi.org/10.1155/2019/2054783)]
 - 80 **Becker W**. A wake-up call to quiescent cancer cells - potential use of DYRK1B inhibitors in cancer therapy. *FEBS J* 2018; **285**: 1203-1211 [PMID: [29193696](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29193696/) DOI: [10.1111/febs.14347](https://doi.org/10.1111/febs.14347)]
 - 81 **Lee SB**, Frattini V, Bansal M, Castano AM, Sherman D, Hutchinson K, Bruce JN, Califano A, Liu G, Cardozo T, Iavarone A, Lasorella A. An ID2-dependent mechanism for VHL inactivation in cancer. *Nature* 2016; **529**: 172-177 [PMID: [26735018](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26735018/) DOI: [10.1038/nature16475](https://doi.org/10.1038/nature16475)]
 - 82 **Deng X**, Mercer SE, Shah S, Ewton DZ, Friedman E. The cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is stabilized in G(0) by Mirk/dyrk1B kinase. *J Biol Chem* 2004; **279**: 22498-22504 [PMID: [15010468](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15010468/) DOI: [10.1074/jbc.M400479200](https://doi.org/10.1074/jbc.M400479200)]
 - 83 **Pérez-Sánchez G**, Jiménez A, Quezada-Ramírez MA, Estudillo E, Ayala-Sarmiento AE, Mendoza-Hernández G, Hernández-Soto J, Hernández-Hernández FC, Cázares-Raga FE, Segovia J. Annexin A1, Annexin A2, and Dyrk 1B are upregulated during GAS1-induced cell cycle arrest. *J Cell Physiol* 2018; **233**: 4166-4182 [PMID: [29030970](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29030970/) DOI: [10.1002/jcp.26226](https://doi.org/10.1002/jcp.26226)]
 - 84 **Zou Y**, Ewton DZ, Deng X, Mercer SE, Friedman E. Mirk/dyrk1B kinase destabilizes cyclin D1 by

- phosphorylation at threonine 288. *J Biol Chem* 2004; **279**: 27790-27798 [PMID: 15075324 DOI: 10.1074/jbc.M403042200]
- 85 **Ashford AL**, Oxley D, Kettle J, Hudson K, Guichard S, Cook SJ, Lochhead PA. A novel DYRK1B inhibitor AZ191 demonstrates that DYRK1B acts independently of GSK3 β to phosphorylate cyclin D1 at Thr(286), not Thr(288). *Biochem J* 2014; **457**: 43-56 [PMID: 24134204 DOI: 10.1042/BJ20130461]
- 86 **Litovchick L**, Florens LA, Swanson SK, Washburn MP, DeCaprio JA. DYRK1A protein kinase promotes quiescence and senescence through DREAM complex assembly. *Genes Dev* 2011; **25**: 801-813 [PMID: 21498570 DOI: 10.1101/gad.2034211]
- 87 **Sadasivam S**, DeCaprio JA. The DREAM complex: master coordinator of cell cycle-dependent gene expression. *Nat Rev Cancer* 2013; **13**: 585-595 [PMID: 23842645 DOI: 10.1038/nrc3556]
- 88 **Chen JY**, Lin JR, Tsai FC, Meyer T. Dosage of Dyrk1a shifts cells within a p21-cyclin D1 signaling map to control the decision to enter the cell cycle. *Mol Cell* 2013; **52**: 87-100 [PMID: 24119401 DOI: 10.1016/j.molcel.2013.09.009]
- 89 **Hu J**, Friedman E. Depleting Mirk Kinase Increases Cisplatin Toxicity in Ovarian Cancer Cells. *Genes Cancer* 2010; **1**: 803-811 [PMID: 21113238 DOI: 10.1177/1947601910377644]
- 90 **Schmitt C**, Kail D, Mariano M, Empting M, Weber N, Paul T, Hartmann RW, Engel M. Design and synthesis of a library of lead-like 2,4-bis(heterocyclic) substituted thiophenes as selective Dyrk/Clk inhibitors. *PLoS One* 2014; **9**: e87851 [PMID: 24676346 DOI: 10.1371/journal.pone.0087851]
- 91 **Zhu F**, Zykova TA, Peng C, Zhang J, Cho YY, Zheng D, Yao K, Ma WY, Lau AT, Bode AM, Dong Z. Phosphorylation of H2AX at Ser139 and a new phosphorylation site Ser16 by RSK2 decreases H2AX ubiquitination and inhibits cell transformation. *Cancer Res* 2011; **71**: 393-403 [PMID: 21224359 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2012]
- 92 **Trachootham D**, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* 2009; **8**: 579-591 [PMID: 19478820 DOI: 10.1038/nrd2803]
- 93 **Gorrini C**, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov* 2013; **12**: 931-947 [PMID: 24287781 DOI: 10.1038/nrd4002]
- 94 **Woods YL**, Rena G, Morrice N, Barthel A, Becker W, Guo S, Unterman TG, Cohen P. The kinase DYRK1A phosphorylates the transcription factor FKHR at Ser329 *in vitro*, a novel *in vivo* phosphorylation site. *Biochem J* 2001; **355**: 597-607 [PMID: 11311120 DOI: 10.1042/bj3550597]
- 95 **Fu Z**, Tindall DJ. FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene* 2008; **27**: 2312-2319 [PMID: 18391973 DOI: 10.1038/onc.2008.24]
- 96 **Phi LTH**, Sari IN, Yang YG, Lee SH, Jun N, Kim KS, Lee YK, Kwon HY. Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment. *Stem Cells Int* 2018; **2018**: 5416923 [PMID: 29681949 DOI: 10.1155/2018/5416923]
- 97 **Atashzar MR**, Baharlou R, Karami J, Abdollahi H, Rezaei R, Pourramezan F, Zoljalali Moghaddam SH. Cancer stem cells: A review from origin to therapeutic implications. *J Cell Physiol* 2020; **235**: 790-803 [PMID: 31286518 DOI: 10.1002/jcp.29044]
- 98 **Friedman E**. The Kinase Mirk/dyrk1B: A Possible Therapeutic Target in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)* 2010; **2**: 1492-1512 [PMID: 24281169 DOI: 10.3390/cancers2031492]
- 99 **Barnes DJ**, Melo JV. Primitive, quiescent and difficult to kill: the role of non-proliferating stem cells in chronic myeloid leukemia. *Cell Cycle* 2006; **5**: 2862-2866 [PMID: 17172863 DOI: 10.4161/cc.5.24.3573]
- 100 **Chang HS**, Lin CH, Yang CH, Yen MS, Lai CR, Chen YR, Liang YJ, Yu WC. Increased expression of Dyrk1a in HPV16 immortalized keratinocytes enable evasion of apoptosis. *Int J Cancer* 2007; **120**: 2377-2385 [PMID: 17294446 DOI: 10.1002/ijc.22573]
- 101 **Ionescu A**, Dufresne F, Gelbcke M, Jabin I, Kiss R, Lamoral-Theys D. DYRK1A kinase inhibitors with emphasis on cancer. *Mini Rev Med Chem* 2012; **12**: 1315-1329 [PMID: 23016545 DOI: 10.2174/13895575112091315]
- 102 **Pozo N**, Zahonero C, Fernández P, Liñares JM, Ayuso A, Hagiwara M, Pérez A, Ricoy JR, Hernández-Lain A, Sepúlveda JM, Sánchez-Gómez P. Inhibition of DYRK1A destabilizes EGFR and reduces EGFR-dependent glioblastoma growth. *J Clin Invest* 2013; **123**: 2475-2487 [PMID: 23635774 DOI: 10.1172/JCI63623]
- 103 **Liu Q**, Liu N, Zang S, Liu H, Wang P, Ji C, Sun X. Tumor suppressor DYRK1A effects on proliferation and chemoresistance of AML cells by downregulating c-Myc. *PLoS One* 2014; **9**: e98853 [PMID: 24901999 DOI: 10.1371/journal.pone.0098853]
- 104 **Fernández-Martínez P**, Zahonero C, Sánchez-Gómez P. DYRK1A: the double-edged kinase as a protagonist in cell growth and tumorigenesis. *Mol Cell Oncol* 2015; **2**: e970048 [PMID: 27308401 DOI: 10.4161/23723548.2014.970048]
- 105 **Abbassi R**, Johns TG, Kassiou M, Munoz L. DYRK1A in neurodegeneration and cancer: Molecular basis and clinical implications. *Pharmacol Ther* 2015; **151**: 87-98 [PMID: 25795597 DOI: 10.1016/j.pharmthera.2015.03.004]
- 106 **Radhakrishnan A**, Nanjappa V, Raja R, Sathe G, Puttamallesh VN, Jain AP, Pinto SM, Balaji SA, Chavan S, Sahasrabudhe NA, Mathur PP, Kumar MM, Prasad TS, Santosh V, Sukumar G, Califano JA, Rangarajan A, Sidransky D, Pandey A, Gowda H, Chatterjee A. A dual specificity kinase, DYRK1A, as a potential therapeutic target for head and neck squamous cell carcinoma. *Sci Rep* 2016; **6**: 36132 [PMID: 27796319 DOI: 10.1038/srep36132]
- 107 **Zou Y**, Yao S, Chen X, Liu D, Wang J, Yuan X, Rao J, Xiong H, Yu S, Yuan X, Zhu F, Hu G,

- Wang Y, Xiong H. LncRNA OIP5-AS1 regulates radioresistance by targeting DYRK1A through miR-369-3p in colorectal cancer cells. *Eur J Cell Biol* 2018; **97**: 369-378 [PMID: 29773344 DOI: 10.1016/j.ejcb.2018.04.005]
- 108 **Jarhad DB**, Mashelkar KK, Kim HR, Noh M, Jeong LS. Dual-Specificity Tyrosine Phosphorylation-Regulated Kinase 1A (DYRK1A) Inhibitors as Potential Therapeutics. *J Med Chem* 2018; **61**: 9791-9810 [PMID: 29985601 DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b00185]
- 109 **Luna J**, Boni J, Cuatrecasas M, Bofill-De Ros X, Núñez-Manchón E, Gironella M, Vaquero EC, Arbones ML, de la Luna S, Fillat C. DYRK1A modulates c-MET in pancreatic ductal adenocarcinoma to drive tumour growth. *Gut* 2019; **68**: 1465-1476 [PMID: 30343272 DOI: 10.1136/gutjnl-2018-316128]
- 110 **Szamborska-Gbur A**, Rutkowska E, Dreasa A, Frid M, Vilenchik M, Milik M, Brzózka K, Król M. How to design potent and selective DYRK1B inhibitors? *J Mol Model* 2019; **25**: 41 [PMID: 30673861 DOI: 10.1007/s00894-018-3921-3]
- 111 **Mohyeldin A**, Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 2010; **7**: 150-161 [PMID: 20682444 DOI: 10.1016/j.stem.2010.07.007]
- 112 **Mimeault M**, Batra SK. Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer- and metastasis-initiating cells. *J Cell Mol Med* 2013; **17**: 30-54 [PMID: 23301832 DOI: 10.1111/jcmm.12004]
- 113 **Zhou Y**, Fan W, Xiao Y. The effect of hypoxia on the stemness and differentiation capacity of PDLc and DPC. *Biomed Res Int* 2014; **2014**: 890675 [PMID: 24701587 DOI: 10.1155/2014/890675]
- 114 **Watkins DN**, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* 2003; **422**: 313-317 [PMID: 12629553 DOI: 10.1038/nature01493]
- 115 **Berman DM**, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN, Beachy PA. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* 2003; **425**: 846-851 [PMID: 14520411 DOI: 10.1038/nature01972]
- 116 **Thayer SP**, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernández-del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL, Hebrok M. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 2003; **425**: 851-856 [PMID: 14520413 DOI: 10.1038/nature02009]
- 117 **Rubin LL**, de Sauvage FJ. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006; **5**: 1026-1033 [PMID: 17139287 DOI: 10.1038/nrd2086]
- 118 **Stecca B**, Mas C, Clement V, Zbinden M, Correa R, Piguet V, Beermann F, Ruiz i Altaba A. Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 5895-5900 [PMID: 17392427 DOI: 10.1073/pnas.0700776104]
- 119 **Lauth M**, Bergström A, Shimokawa T, Tostar U, Jin Q, Fendrich V, Guerra C, Barbacid M, Toftgård R. DYRK1B-dependent autocrine-to-paracrine shift of Hedgehog signaling by mutant RAS. *Nat Struct Mol Biol* 2010; **17**: 718-725 [PMID: 20512148 DOI: 10.1038/nsmb.1833]
- 120 **Briscoe J**, Théron PP. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; **14**: 416-429 [PMID: 23719536 DOI: 10.1038/nrm3598]
- 121 **Gruber W**, Hutzinger M, Elmer DP, Parigger T, Sternberg C, Cegielski L, Zaja M, Leban J, Michel S, Hamm S, Vitt D, Aberger F. DYRK1B as therapeutic target in Hedgehog/GLI-dependent cancer cells with Smoothed inhibitor resistance. *Oncotarget* 2016; **7**: 7134-7148 [PMID: 26784250 DOI: 10.18632/oncotarget.6910]
- 122 **Ingham PW**, Nakano Y, Seger C. Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nat Rev Genet* 2011; **12**: 393-406 [PMID: 21502959 DOI: 10.1038/nrg2984]
- 123 **Hui CC**, Angers S. Gli proteins in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011; **27**: 513-537 [PMID: 21801010 DOI: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154048]
- 124 **Aberger F**, Ruiz i Altaba A. Context-dependent signal integration by the GLI code: the oncogenic load, pathways, modifiers and implications for cancer therapy. *Semin Cell Dev Biol* 2014; **33**: 93-104 [PMID: 24852887 DOI: 10.1016/j.semdb.2014.05.003]
- 125 **Ramsbottom SA**, Pownall ME. Regulation of Hedgehog Signalling Inside and Outside the Cell. *J Dev Biol* 2016; **4**: 23 [PMID: 27547735 DOI: 10.3390/jdb4030023]
- 126 **Belgacem YH**, Hamilton AM, Shim S, Spencer KA, Borodinsky LN. The Many Hats of Sonic Hedgehog Signaling in Nervous System Development and Disease. *J Dev Biol* 2016; **4** [PMID: 29615598 DOI: 10.3390/jdb4040035]
- 127 **Fernandes-Silva H**, Correia-Pinto J, Moura RS. Canonical Sonic Hedgehog Signaling in Early Lung Development. *J Dev Biol* 2017; **5** [PMID: 29615561 DOI: 10.3390/jdb5010003]
- 128 **Pandit T**, Ogden SK. Contributions of Noncanonical Smoothed Signaling During Embryonic Development. *J Dev Biol* 2017; **5** [PMID: 29399514 DOI: 10.3390/jdb5040011]
- 129 **Wang B**, Fallon JF, Beachy PA. Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* 2000; **100**: 423-434 [PMID: 10693759 DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80678-9]
- 130 **Riobó NA**, Lu K, Ai X, Haines GM, Emerson CP Jr. Phosphoinositide 3-kinase and Akt are essential for Sonic Hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 4505-4510 [PMID:

- 16537363 DOI: [10.1073/pnas.0504337103](https://doi.org/10.1073/pnas.0504337103)]
- 131 **Pasca di Magliano M**, Sekine S, Ermilov A, Ferris J, Dlugosz AA, Hebrok M. Hedgehog/Ras interactions regulate early stages of pancreatic cancer. *Genes Dev* 2006; **20**: 3161-3173 [PMID: [17114586](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17114586/) DOI: [10.1101/gad.1470806](https://doi.org/10.1101/gad.1470806)]
- 132 **Morton JP**, Mongeau ME, Klimstra DS, Morris JP, Lee YC, Kawaguchi Y, Wright CV, Hebrok M, Lewis BC. Sonic hedgehog acts at multiple stages during pancreatic tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 5103-5108 [PMID: [17372229](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17372229/) DOI: [10.1073/pnas.0701158104](https://doi.org/10.1073/pnas.0701158104)]
- 133 **Lauth M**, Bergström A, Toftgård R. Phorbol esters inhibit the Hedgehog signalling pathway downstream of Suppressor of Fused, but upstream of Gli. *Oncogene* 2007; **26**: 5163-5168 [PMID: [17310984](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17310984/) DOI: [10.1038/sj.onc.1210321](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210321)]
- 134 **Chen Y**, Yue S, Xie L, Pu XH, Jin T, Cheng SY. Dual Phosphorylation of suppressor of fused (Sufu) by PKA and GSK3beta regulates its stability and localization in the primary cilium. *J Biol Chem* 2011; **286**: 13502-13511 [PMID: [21317289](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21317289/) DOI: [10.1074/jbc.M110.217604](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.217604)]
- 135 **Wang Y**, Ding Q, Yen CJ, Xia W, Izzo JG, Lang JY, Li CW, Hsu JL, Miller SA, Wang X, Lee DF, Hsu JM, Huo L, Labaff AM, Liu D, Huang TH, Lai CC, Tsai FJ, Chang WC, Chen CH, Wu TT, Buttar NS, Wang KK, Wu Y, Wang H, Ajani J, Hung MC. The crosstalk of mTOR/S6K1 and Hedgehog pathways. *Cancer Cell* 2012; **21**: 374-387 [PMID: [22439934](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22439934/) DOI: [10.1016/j.ccr.2011.12.028](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.12.028)]
- 136 **Klein C**, Zwick A, Kissel S, Forster CU, Pfeifer D, Follo M, Illert AL, Decker S, Benkler T, Pahl H, Oostendorp RA, Aumann K, Duyster J, Dierks C. Ptc2 Loss drives myeloproliferation and myeloproliferative neoplasm progression. *J Exp Med* 2016; **213**: 273-290 [PMID: [26834157](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26834157/) DOI: [10.1084/jem.20150556](https://doi.org/10.1084/jem.20150556)]
- 137 **Singh R**, Dhanyamraju PK, Lauth M. DYRK1B blocks canonical and promotes non-canonical Hedgehog signaling through activation of the mTOR/AKT pathway. *Oncotarget* 2017; **8**: 833-845 [PMID: [27903983](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27903983/) DOI: [10.18632/oncotarget.13662](https://doi.org/10.18632/oncotarget.13662)]
- 138 **Montagnani V**, Stecca B. Role of Protein Kinases in Hedgehog Pathway Control and Implications for Cancer Therapy. *Cancers (Basel)* 2019; **11** [PMID: [30934935](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30934935/) DOI: [10.3390/cancers11040449](https://doi.org/10.3390/cancers11040449)]
- 139 **Buonamici S**, Williams J, Morrissey M, Wang A, Guo R, Vattay A, Hsiao K, Yuan J, Green J, Ospina B, Yu Q, Ostrom L, Fordjour P, Anderson DL, Monahan JE, Kelleher JF, Peukert S, Pan S, Wu X, Maira SM, García-Echeverría C, Briggs KJ, Watkins DN, Yao YM, Lengauer C, Warmuth M, Sellers WR, Dorsch M. Interfering with resistance to smoothened antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma. *Sci Transl Med* 2010; **2**: 51ra70 [PMID: [20881279](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20881279/) DOI: [10.1126/scitranslmed.3001599](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001599)]
- 140 **Kebenko M**, Drenckhan A, Gros SJ, Jücker M, Grabinski N, Ewald F, Grottke A, Schultze A, Izbicki JR, Bokemeyer C, Wellbrock J, Fiedler W. ErbB2 signaling activates the Hedgehog pathway via PI3K-Akt in human esophageal adenocarcinoma: identification of novel targets for concerted therapy concepts. *Cell Signal* 2015; **27**: 373-381 [PMID: [25435423](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25435423/) DOI: [10.1016/j.cellsig.2014.11.022](https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.11.022)]
- 141 **Mao J**, Maye P, Kogerman P, Tejedor FJ, Toftgård R, Xie W, Wu G, Wu D. Regulation of Gli1 transcriptional activity in the nucleus by Dyrk1. *J Biol Chem* 2002; **277**: 35156-35161 [PMID: [12138125](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12138125/) DOI: [10.1074/jbc.M206743200](https://doi.org/10.1074/jbc.M206743200)]
- 142 **Shimokawa T**, Tostar U, Lauth M, Palaniswamy R, Kasper M, Toftgård R, Zaphiropoulos PG. Novel human glioma-associated oncogene 1 (GLI1) splice variants reveal distinct mechanisms in the terminal transduction of the hedgehog signal. *J Biol Chem* 2008; **283**: 14345-14354 [PMID: [18378682](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18378682/) DOI: [10.1074/jbc.M800299200](https://doi.org/10.1074/jbc.M800299200)]
- 143 **Schneider P**, Bayo-Fina JM, Singh R, Kumar Dhanyamraju P, Holz P, Baier A, Fendrich V, Ramaswamy A, Baumeister S, Martinez ED, Lauth M. Identification of a novel actin-dependent signal transducing module allows for the targeted degradation of GLI1. *Nat Commun* 2015; **6**: 8023 [PMID: [26310823](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26310823/) DOI: [10.1038/ncomms9023](https://doi.org/10.1038/ncomms9023)]
- 144 **Ehe BK**, Lamson DR, Tarpley M, Onyenwoke RU, Graves LM, Williams KP. Identification of a DYRK1A-mediated phosphorylation site within the nuclear localization sequence of the hedgehog transcription factor GLI1. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; **491**: 767-772 [PMID: [28735864](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28735864/) DOI: [10.1016/j.bbrc.2017.07.107](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.07.107)]
- 145 **Varjosalo M**, Björklund M, Cheng F, Syvänen H, Kivioja T, Kilpinen S, Sun Z, Kallioniemi O, Stunnenberg HG, He WW, Ojala P, Taipale J. Application of active and kinase-deficient kinome collection for identification of kinases regulating hedgehog signaling. *Cell* 2008; **133**: 537-548 [PMID: [18455992](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18455992/) DOI: [10.1016/j.cell.2008.02.047](https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.047)]
- 146 **Galvin KE**, Ye H, Erstad DJ, Feddersen R, Wetmore C. Gli1 induces G2/M arrest and apoptosis in hippocampal but not tumor-derived neural stem cells. *Stem Cells* 2008; **26**: 1027-1036 [PMID: [18276799](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18276799/) DOI: [10.1634/stemcells.2007-0879](https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0879)]
- 147 **Schubbert S**, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; **7**: 295-308 [PMID: [17384584](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17384584/) DOI: [10.1038/nrc2109](https://doi.org/10.1038/nrc2109)]
- 148 **Shi Y**, Chen J, Karner CM, Long F. Hedgehog signaling activates a positive feedback mechanism involving insulin-like growth factors to induce osteoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; **112**: 4678-4683 [PMID: [25825734](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25825734/) DOI: [10.1073/pnas.1502301112](https://doi.org/10.1073/pnas.1502301112)]
- 149 **Hickmott J**. DYRK1B variant linked to autosomal dominant metabolic syndrome. *Clin Genet* 2015; **87**: 30-31 [PMID: [25092113](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25092113/) DOI: [10.1111/cge.12477](https://doi.org/10.1111/cge.12477)]
- 150 **Ortega-Molina A**, Lopez-Guadamillas E, Mattison JA, Mitchell SJ, Muñoz-Martín M, Iglesias G, Gutierrez VM, Vaughan KL, Szarowicz MD, González-García I, López M, Cebrián D, Martínez S,

- Pastor J, de Cabo R, Serrano M. Pharmacological inhibition of PI3K reduces adiposity and metabolic syndrome in obese mice and rhesus monkeys. *Cell Metab* 2015; **21**: 558-570 [PMID: [25817535](#) DOI: [10.1016/j.cmet.2015.02.017](#)]
- 151 **Singh R**, Holz PS, Roth K, Hupfer A, Meissner W, Müller R, Buchholz M, Gress TM, Elsässer HP, Jacob R, Lauth M. DYRK1B regulates Hedgehog-induced microtubule acetylation. *Cell Mol Life Sci* 2019; **76**: 193-207 [PMID: [30317528](#) DOI: [10.1007/s00018-018-2942-5](#)]
- 152 **Zou Y**, Lim S, Lee K, Deng X, Friedman E. Serine/threonine kinase Mirk/Dyrk1B is an inhibitor of epithelial cell migration and is negatively regulated by the Met adaptor Ran-binding protein M. *J Biol Chem* 2003; **278**: 49573-49581 [PMID: [14500717](#) DOI: [10.1074/jbc.M307556200](#)]
- 153 **Wang D**, Li Z, Messing EM, Wu G. Activation of Ras/Erk pathway by a novel MET-interacting protein RanBPM. *J Biol Chem* 2002; **277**: 36216-36222 [PMID: [12147692](#) DOI: [10.1074/jbc.M205111200](#)]
- 154 **Collins CS**, Hong J, Sapinoso L, Zhou Y, Liu Z, Micklash K, Schultz PG, Hampton GM. A small interfering RNA screen for modulators of tumor cell motility identifies MAP4K4 as a promigratory kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 3775-3780 [PMID: [16537454](#) DOI: [10.1073/pnas.0600040103](#)]
- 155 **Ashford AL**, Dunkley TP, Cockerill M, Rowlinson RA, Baak LM, Gallo R, Balmanno K, Goodwin LM, Ward RA, Lochhead PA, Guichard S, Hudson K, Cook SJ. Identification of DYRK1B as a substrate of ERK1/2 and characterisation of the kinase activity of DYRK1B mutants from cancer and metabolic syndrome. *Cell Mol Life Sci* 2016; **73**: 883-900 [PMID: [26346493](#) DOI: [10.1007/s00018-015-2032-x](#)]
- 156 **Hong SH**, Lee KS, Kwak SJ, Kim AK, Bai H, Jung MS, Kwon OY, Song WJ, Tatar M, Yu K. Minibrain/Dyrk1a regulates food intake through the Sir2-FOXO-sNPF/NPY pathway in Drosophila and mammals. *PLoS Genet* 2012; **8**: e1002857 [PMID: [22876196](#) DOI: [10.1371/journal.pgen.1002857](#)]
- 157 **Kha HT**, Basseri B, Shouhed D, Richardson J, Tetradis S, Hahn TJ, Parhami F. Oxysterols regulate differentiation of mesenchymal stem cells: pro-bone and anti-fat. *J Bone Miner Res* 2004; **19**: 830-840 [PMID: [15068507](#) DOI: [10.1359/JBMR.040115](#)]
- 158 **Johnson JS**, Meliton V, Kim WK, Lee KB, Wang JC, Nguyen K, Yoo D, Jung ME, Atti E, Tetradis S, Pereira RC, Magyar C, Nargizyan T, Hahn TJ, Farouz F, Thies S, Parhami F. Novel oxysterols have pro-osteogenic and anti-adipogenic effects *in vitro* and induce spinal fusion *in vivo*. *J Cell Biochem* 2011; **112**: 1673-1684 [PMID: [21503957](#) DOI: [10.1002/jcb.23082](#)]
- 159 **Nosavanh L**, Yu DH, Jaehnig EJ, Tong Q, Shen L, Chen MH. Cell-autonomous activation of Hedgehog signaling inhibits brown adipose tissue development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; **112**: 5069-5074 [PMID: [25848030](#) DOI: [10.1073/pnas.1420978112](#)]
- 160 **Borycki A**, Brown AM, Emerson CP Jr. Shh and Wnt signaling pathways converge to control Gli gene activation in avian somites. *Development* 2000; **127**: 2075-2087 [PMID: [10769232](#)]
- 161 **Shi Y**, Long F. Hedgehog signaling *via* Gli2 prevents obesity induced by high-fat diet in adult mice. *Elife* 2017; **6** [PMID: [29205155](#) DOI: [10.7554/eLife.31649](#)]
- 162 **Christodoulides C**, Lagathu C, Sethi JK, Vidal-Puig A. Adipogenesis and WNT signalling. *Trends Endocrinol Metab* 2009; **20**: 16-24 [PMID: [19008118](#) DOI: [10.1016/j.tem.2008.09.002](#)]
- 163 **Yun J**, Rago C, Cheong I, Pagliarini R, Angenendt P, Rajagopalan H, Schmidt K, Willson JK, Markowitz S, Zhou S, Diaz LA Jr, Velculescu VE, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N. Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells. *Science* 2009; **325**: 1555-1559 [PMID: [19661383](#) DOI: [10.1126/science.1174229](#)]
- 164 **Feng B**, Jiao P, Yang Z, Xu H. MEK/ERK pathway mediates insulin-promoted degradation of MKP-3 protein in liver cells. *Mol Cell Endocrinol* 2012; **361**: 116-123 [PMID: [22521266](#) DOI: [10.1016/j.mce.2012.03.025](#)]
- 165 **Yin H**, Price F, Rudnicki MA. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev* 2013; **93**: 23-67 [PMID: [23303905](#) DOI: [10.1152/physrev.00043.2011](#)]
- 166 **Koleva M**, Kappler R, Vogler M, Herwig A, Fulda S, Hahn H. Pleiotropic effects of sonic hedgehog on muscle satellite cells. *Cell Mol Life Sci* 2005; **62**: 1863-1870 [PMID: [16003493](#) DOI: [10.1007/s00018-005-5072-9](#)]
- 167 **Kern D**, Regl G, Hofbauer SW, Altenhofer P, Achatz G, Dlugosz A, Schnidar H, Greil R, Hartmann TN, Aberger F. Hedgehog/GLI and PI3K signaling in the initiation and maintenance of chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene* 2015; **34**: 5341-5351 [PMID: [25639866](#) DOI: [10.1038/onc.2014.450](#)]
- 168 **Garrett S**, Menold MM, Broach JR. The *Saccharomyces cerevisiae* YAK1 gene encodes a protein kinase that is induced by arrest early in the cell cycle. *Mol Cell Biol* 1991; **11**: 4045-4052 [PMID: [2072907](#) DOI: [10.1128/mcb.11.8.4045](#)]
- 169 **Taminato A**, Bagattini R, Gorjão R, Chen G, Kuspa A, Souza GM. Role for Yaka, cAMP, and protein kinase A in regulation of stress responses of Dictyostelium discoideum cells. *Mol Biol Cell* 2002; **13**: 2266-2275 [PMID: [12134067](#) DOI: [10.1091/mbc.01-11-0555](#)]
- 170 **Meistrich M**, van Beek M. Spermatogonial stem cells. In: Desjardins C, Ewing LL (Hrsg.). Cell and Molecular Biology of the Testis. New York: Oxford University Press, 1993: 266-295
- 171 **Oatley JM**, Brinster RL. Spermatogonial stem cells. *Methods Enzymol* 2006; **419**: 259-282 [PMID: [17141059](#) DOI: [10.1016/S0076-6879\(06\)19011-4](#)]
- 172 **Nakagawa T**, Sharma M, Nabeshima Y, Braun RE, Yoshida S. Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment. *Science* 2010; **328**: 62-67

- [PMID: 20299552 DOI: 10.1126/science.1182868]
- 173 **Fujita J.** Cold shock response in mammalian cells. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1999; **1**: 243-255 [PMID: 10943555]
- 174 **Yang C,** Carrier F. The UV-inducible RNA-binding protein A18 (A18 hnRNP) plays a protective role in the genotoxic stress response. *J Biol Chem* 2001; **276**: 47277-47284 [PMID: 11574538 DOI: 10.1074/jbc.M105396200]
- 175 **Wellmann S,** Bühler C, Moderegger E, Zelmer A, Kirschner R, Koehne P, Fujita J, Seeger K. Oxygen-regulated expression of the RNA-binding proteins RBM3 and CIRP by a HIF-1-independent mechanism. *J Cell Sci* 2004; **117**: 1785-1794 [PMID: 15075239 DOI: 10.1242/jcs.01026]
- 176 **Yang R,** Weber DJ, Carrier F. Post-transcriptional regulation of thioredoxin by the stress inducible heterogenous ribonucleoprotein A18. *Nucleic Acids Res* 2006; **34**: 1224-1236 [PMID: 16513844 DOI: 10.1093/nar/gkj519]
- 177 **De Leeuw F,** Zhang T, Wauquier C, Huez G, Krays V, Gueydan C. The cold-inducible RNA-binding protein migrates from the nucleus to cytoplasmic stress granules by a methylation-dependent mechanism and acts as a translational repressor. *Exp Cell Res* 2007; **313**: 4130-4144 [PMID: 17967451 DOI: 10.1016/j.yexcr.2007.09.017]
- 178 **Nishiyama H,** Danno S, Kaneko Y, Itoh K, Yokoi H, Fukumoto M, Okuno H, Millán JL, Matsuda T, Yoshida O, Fujita J. Decreased expression of cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) in male germ cells at elevated temperature. *Am J Pathol* 1998; **152**: 289-296 [PMID: 9422546 DOI: 10.1097/00005392-199904020-00373]
- 179 **Leonart ME.** A new generation of proto-oncogenes: cold-inducible RNA binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 2010; **1805**: 43-52 [PMID: 19900510 DOI: 10.1016/j.bbcan.2009.11.001]
- 180 **Jessell TM.** Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* 2000; **1**: 20-29 [PMID: 11262869 DOI: 10.1038/35049541]
- 181 **Marquardt T,** Pfaff SL. Cracking the transcriptional code for cell specification in the neural tube. *Cell* 2001; **106**: 651-654 [PMID: 11572771 DOI: 10.1016/s0092-8674(01)00499-8]
- 182 **Götz M,** Huttner WB. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; **6**: 777-788 [PMID: 16314867 DOI: 10.1038/nrm1739]
- 183 **Götz M,** Nakafuku M, Petrik D. Neurogenesis in the Developing and Adult Brain-Similarities and Key Differences. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2016; **8** [PMID: 27235475 DOI: 10.1101/cshperspect.a018853]
- 184 **Zhong W,** Chia W. Neurogenesis and asymmetric cell division. *Curr Opin Neurobiol* 2008; **18**: 4-11 [PMID: 18513950 DOI: 10.1016/j.conb.2008.05.002]
- 185 **Hardwick LJ,** Ali FR, Azzarelli R, Philpott A. Cell cycle regulation of proliferation vs differentiation in the central nervous system. *Cell Tissue Res* 2015; **359**: 187-200 [PMID: 24859217 DOI: 10.1007/s00441-014-1895-8]
- 186 **Ohnuma S,** Harris WA. Neurogenesis and the cell cycle. *Neuron* 2003; **40**: 199-208 [PMID: 14556704 DOI: 10.1016/S0896-6273(03)00632-9]
- 187 **Nguyen L,** Besson A, Roberts JM, Guillemot F. Coupling cell cycle exit, neuronal differentiation and migration in cortical neurogenesis. *Cell Cycle* 2006; **5**: 2314-2318 [PMID: 17102618 DOI: 10.4161/cc.5.20.3381]
- 188 **Politis PK,** Thomaidou D, Matsas R. Coordination of cell cycle exit and differentiation of neuronal progenitors. *Cell Cycle* 2008; **7**: 691-697 [PMID: 18239460 DOI: 10.4161/cc.7.6.5550]
- 189 **Pitto L,** Cremisi F. Timing neurogenesis by cell cycle? *Cell Cycle* 2010; **9**: 434-435 [PMID: 20090420 DOI: 10.4161/cc.9.3.10762]
- 190 **Altafaj X,** Dierssen M, Baamonde C, Martí E, Visa J, Guimera J, Oset M, González JR, Flórez J, Fillat C, Estivill X. Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 1915-1923 [PMID: 11555628 DOI: 10.1093/hmg/10.18.1915]
- 191 **Bronicki LM,** Redin C, Drunat S, Piton A, Lyons M, Passemard S, Baumann C, Faivre L, Thevenon J, Rivière JB, Isidor B, Gan G, Francannet C, Willems M, Gunel M, Jones JR, Gleeson JG, Mandel JL, Stevenson RE, Friez MJ, Aylsworth AS. Ten new cases further delineate the syndromic intellectual disability phenotype caused by mutations in DYRK1A. *Eur J Hum Genet* 2015; **23**: 1482-1487 [PMID: 25920557 DOI: 10.1038/ejhg.2015.29]
- 192 **Duchon A,** Hérault Y. DYRK1A, a Dosage-Sensitive Gene Involved in Neurodevelopmental Disorders, Is a Target for Drug Development in Down Syndrome. *Front Behav Neurosci* 2016; **10**: 104 [PMID: 27375444 DOI: 10.3389/fnbeh.2016.00104]



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7041 Koll Center Parkway, Suite 160, Pleasanton, CA 94566, USA
Telephone: +1-925-3991568
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
Help Desk: <https://www.f6publishing.com/helpdesk>
<https://www.wjgnet.com>

