

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διδακτορική Διατριβή

*«Ο ρόλος των DSL πρωτεϊνών και των λιγασών ουβικουΐτινης Neuralized
και Mind bomb 1 στη σηματοδότηση Notch»*

Χρυσούλα Πιτσούλη

Ηράκλειο 2005

*...στον Αλέξανδρο,
τον πρώτο μου δάσκαλο στον πάγκο*

Ευχαριστώ...

Όταν τον Σεπτέμβρη του 1994 ήρθα στο Ηράκλειο για να σπουδάσω Βιολογία στο Πι Τσι Κεϊ ή Χάρβαρντ της Μεσογείου, δεν φανταζόμουν ότι θα έμενα σ' αυτή την πόλη για 11 ολόκληρα χρόνια! Κι όμως...

Τελειώνοντας το διδακτορικό θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τους ανθρώπους που ήταν εκεί για μένα όλο αυτό το διάστημα.

Ευχαριστώ τον Χρήστο Δελιδάκη γιατί ήταν πάντα ενθουσιώδης, με έκανε να αγαπήσω τα πειράματα «in vitro» και έμαθα πολλά από αυτόν.

Ευχαριστώ τα μέλη των εργαστηρίων Δελιδάκη/ Αβέρωφ γιατί η δουλειά γίνεται διασκεδαστική όταν βρίσκεσαι σε ευχάριστο και συνεργατικό περιβάλλον:

...τον Πέτρο και Παύλο για τις συμβουλές

...τον Κωστή, τον Νίκο και τον Τάσο που «μεγαλώσαμε μαζί»

...τον Βασίλη που μου χρωστάει ένα τραγουδάκι (ας όψεται η αεροπορία!)

...την Ιωάννα γιατί ήταν πάντα εκεί

...τον Μιχάλη και τη Μαυρα για το σπίτι, το γραφείο και όχι μόνο

...τη Μαρία για τις ενδιαφέρουσες συζητήσεις

...την Tijana, τη Θεοδώρα και τον Χάρη που έκαναν το εργαστήριο κεφάλτο

...τη Μαριάνθη για το κέφι της και το προτελευταίο slide

...τους μαθητές μου Κική, Μαρία, Γωγώ και Σπύρο για τα πειράματα που κάναμε μαζί

...και τους πολλούς μικρούς περαστικούς που φρεσκάρουν την ατμόσφαιρα

Ευχαριστώ επίσης

...το «Fly Room»: το Γιάννη, τον Αλέκο, τη Ντίνα και την κα Πόπη γιατί μου κράτησαν συντροφιά αμέτρητες ώρες μυγοδουλειάς

...τα μέλη των εργαστηρίων Σαββάκη, Λούη και Λουκέρη γιατί κάνουν το ισόγειο του IMBB πολύ ευχάριστο

... την Στέλλα και την Κατερίνα για την καλημέρα και το ενδιαφέρον τους

...όλους τους μαθητές μου στα stainings και στο confocal, γιατί μάθαινα κι εγώ δείχνοντάς τους

Ευχαριστώ τους φίλους μου, όπου κι αν βρίσκονται

Ευχαριστώ το Γιώργο για την υπομονή και την συμπαράσταση και την οικογένειά μου που συνεχίζει ν' αναρωτιέται γιατί «διαβάζω» ακόμη!

Ευχαριστώ την Επταμελή μου επιτροπή: Δ. Αλεξανδράκη, Δ. Καραγωγέως, Χ. Δελιδάκη, Χ. Λούη, Ι. Παπαματθαϊάκη, Χ. Σαββάκη και Ν. Ταβερναράκη, που ήρθαν αυγουσιάτικα να με ακούσουν.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Δ. Αλεξανδράκη που όταν της είπα ότι ενδιαφέρομαι στο τρίτο μου rotation να κάνω πειράματα in vivo και να βλέπω φαινοτύπους σε yeast ή Drosophila, μου είπε: «Πήγαινε στο Χρήστο, κι αν δεν σ' αρέσει ζαναέλα». Και πήγα...

Ευχαριστώ ακόμη όλους εσάς που θα διαβάσετε τα παραπάνω για την περιέργειά σας (κι εγώ το ίδιο κάνω...). Δείτε και το υπόλοιπο, θα σας αρέσει...

Να' στε όλοι καλά και να χαμογελάτε,

Χρυσούλα

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	σελ.1-2
Abstract.....	σελ.3-4
Εισαγωγή.....	σελ.5-35
1. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch.....	σελ.6
1.1. Ο υποδοχέας Notch.....	σελ.8
1.2. Οι δεσμευτές: Delta και Serrate	σελ.9
1.3. Άλλοι δεσμευτές του N (χωρίς DSL).....	σελ.10
2. Ρύθμιση της σηματοδότησης Notch.....	σελ.12
2.1. Η πρωτεόλυση στη σηματοδότηση Notch.....	σελ.12
2.1α. Ενδοκυττάρια πρωτεόλυση του Notch στο σύστημα Golgi.....	σελ.12
2.1β. Εξωκυττάρια πρωτεόλυση του Notch.....	σελ.12
2.1γ. Ενδομεμβρανική πρωτεόλυση του Notch.....	σελ.13
2.1δ. Πρωτεόλυση των δεσμευτών.....	σελ.13
2.2. Η γλυκοζυλίωση στη σηματοδότηση Notch.....	σελ.14
2.3. Ουβικουϊτινυλίωση και σηματοδότηση Notch.....	σελ.15
2.4. Ρυθμιστές της σηματοδότησης στον πυρήνα.....	σελ.15
3. Τρόποι χρήσης της σηματοδότησης Notch.....	σελ.17
3.1. Αποφάσεις γενεαλογίας.....	σελ.18
3.2. Αποφάσεις δημιουργίας ορίων.....	σελ.20
3.3. Πλευρική αναστολή.....	σελ.22
4. Ουβικουϊτινυλίωση.....	σελ.24
4.1. Δάκτυλος Zn-RING και ουβικουϊτίνη.....	σελ.25
5. Ενδοκύττωση μεμβρανικών πρωτεϊνών.....	σελ.26
5.1. Ουβικουϊτινυλίωση και Ενδοκύττωση.....	σελ.28
5.2. Ενδοκύττωση και σηματοδότηση Notch.....	σελ.28
6. Το γονίδιο <i>neuralized</i>	σελ.30
7. Το γονίδιο <i>mind bomb</i>	σελ.34
8. Στόχοι.....	σελ.35

Υλικά και Μέθοδοι	σελ.36-64
1. Πλασμιδιακές κατασκευές.....	σελ.37
2. Αντισώματα.....	σελ.37
3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	σελ.37
4. Παραγωγή αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης Neuralized.....	σελ.38
4α. Συνθήκες επαγωγής χιμαιρικής πρωτεΐνης His-Neur1050.....	σελ.38
4β. Συνθήκες καθαρισμού της χιμαιρικής πρωτεΐνης His-Neur1050.....	σελ.38
4β1. Καθαρισμός υπό φυσικές συνθήκες.....	σελ.38
4β2. Καθαρισμός υπό αποδιατακτικές συνθήκες.....	σελ.39
5. Ανοσοποιήσεις για παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων.....	σελ.40
6. Παροδική διαμόλυνση κυττάρων Δροσόφιλας S2.....	σελ.41
7. Ανάλυση Western.....	σελ.41
8. Ανοσοϊστοχημεία.....	σελ.42
8α. Μονιμοποίηση εμβρύων Δροσόφιλας.....	σελ.42
8β. Μονιμοποίηση προνυμφών Δροσόφιλας.....	σελ.42
8γ. Μονιμοποίηση νυμφών Δροσόφιλας.....	σελ.43
8γ1. Φτερά νυμφών.....	σελ.43
8γ2. Μάτια νυμφών.....	σελ.44
8γ3. Θώρακες νυμφών.....	σελ.44
8δ. Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις.....	σελ.45
8δ1. Χρώση για τις πρωτεΐνες E(spl) με το μονοκλωνικό αντίσωμα 323.....	σελ.46
8δ2. Χρώση για την πρωτεΐνη Achaete.....	σελ.46
8ε. Κυττάρων S2 σε καλλιέργεια.....	σελ.47
9. Μελέτη της ενδοκύττωσης σε ιστούς Δροσόφιλας.....	σελ.48
10. Συνανοσοκατακρήμνιση.....	σελ.49
11. Ανάλυση RNA.....	σελ.51
11.1. Εκχύλιση RNA και Αντίστροφη Μεταγραφή ακολουθούμενη από PCR.....	σελ.51
11.1α. Εκχύλιση RNA από προνύμφες Δροσόφιλας.....	σελ.51
11.1β. Αντίστροφη μεταγραφή και σύνθεση cDNA.....	σελ.51
11.1γ. Ανίχνευση του μεταγράφου του γονιδίου <i>mind bomb1</i>	σελ.52
11.2. Υβριδοποίηση <i>in situ</i> με RNA ανιχνευτή.....	σελ.53

12. Γενετική.....	σελ.54
12.1. Το σύστημα εκτοπικής έκφρασης <i>Gal4-UAS</i>	σελ.54
12.2. Το σύστημα μιτωτικών κλώνων <i>FLP/FRT</i>	σελ.55
12.3. Το σύστημα μιτωτικών κλώνων <i>MARCM</i>	σελ.56
13. Μικροσκοπία.....	σελ.59
Πίνακας 2.1 (Πρωτεύοντα Αντισώματα).....	σελ.60
Πίνακας 2.2 (Δευτερεύοντα Αντισώματα).....	σελ.63
Αποτελέσματα I	σελ.65-80
Η έκφραση του γονιδίου <i>neuralized</i> είναι πολύ δυναμική.....	σελ.66
Το γονίδιο <i>neuralized</i> επηρεάζει την ενδοκύττωση του δεσμευτή Delta.....	σελ.68
Το <i>neur</i> ελαττώνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης DI μετα-μεταγραφικά.....	σελ.74
Το <i>Neur</i> ενισχύει τη σηματοδότηση DI-N.....	σελ.75
Το <i>Neur</i> δρα μη-αυτόνομα κατά την πλευρική αναστολή.....	σελ.77
<i>Συμπερασματικά</i>	σελ.80
Αποτελέσματα II	σελ.81-105
Οι δύο δεσμευτές του Notch, Delta και Serrate, δρουν συνεργατικά κατά τη διαδικασία της πλευρικής αναστολής.....	σελ.82
Η πρωτεΐνη <i>Neuralized</i> είναι απαραίτητη για την πλευρική αναστολή και επηρεάζει τη δράση και των δύο δεσμευτών του N.....	σελ.87
Το <i>Neur</i> αλληλεπιδρά με το <i>Ser</i> και προκαλεί την ενδοκύττωσή του.....	σελ.89
Το <i>Mind bomb</i> δρα συνεργατικά με το <i>Neur</i> κατά την πλευρική αναστολή.....	σελ.94
Οι δύο λιγάσες ουβικουΐτινης <i>Mib</i> και <i>Neur</i> μπορούν να δράσουν η μία αντί της άλλης στην επαγωγή του περιθωρίου του φτερού.....	σελ.99
Οι δεσμευτές του N και οι λιγάσες ουβικουΐτινης τους παίζουν ρόλο στην πλευρική αναστολή των μικροχαιτών.....	σελ.102
<i>Συμπερασματικά</i>	σελ.105
Αποτελέσματα III	σελ.106-118
Ποιος είναι ο ρόλος του δακτύλου RING του <i>neur</i> ;.....	σελ.107

Το NeurΔRING εμποδίζει τη λήψη του σήματος παρουσία ενός από τους δεσμευτές του N, αλλά όχι απουσία τους.....	σελ.109
<i>Συμπερασματικά</i>	σελ.118
Αποτελέσματα IV	σελ.119-133
Κυτταρική διακίνηση των Neur και NeurΔRING.....	σελ.120
Το Neur επηρεάζει την διακίνηση του υποδοχέα Notch έμμεσα (μέσω των DSL δεσμευτών).....	σελ.127
Η παρεμπόδιση της ενδοκύττωσης των δεσμευτών οδηγεί σε συσσώρευση του DI στους προνευρικούς συναθροισμούς.....	σελ.130
<i>Συμπερασματικά</i>	σελ.133
Συζήτηση	σελ.134-149
1. Neutralized και Ενδοκύττωση.....	σελ.135
2. Πλευρική Αναστολή - Ο ρόλος των δεσμευτών του Notch.....	σελ.138
3. Ουβικουϊτινυλίωση και σηματοδότηση Notch.....	σελ.140
3.1. Η ουβικουϊτινυλίωση είναι απαραίτητη για την αποστολή του σήματος.....	σελ.140
3.2. Η ουβικουϊτινυλίωση είναι απαραίτητη για την λήψη του σήματος.....	σελ.144
4. Ο ρόλος του δακτύλου RING.....	σελ.146
5. Κυτταρική διακίνηση του DI και σηματοδότηση.....	σελ.148
6. Μελλοντικές προοπτικές.....	σελ.149
Αναφορές	σελ.150-160
Δημοσιεύσεις	σελ.161

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μονοπάτι διακυτταρικής σηματοδότησης μέσω του υποδοχέα Notch (N) αποτελεί έναν εξελικτικά συντηρημένο μηχανισμό, ο οποίος ενεργοποιείται σε πλειάδα κυτταρικών αποφάσεων σε όλα τα μετόζωα. Τόσο ο ίδιος ο υποδοχέας N, όσο και οι δεσμευτές του Delta (DI) και Serrate (Ser) είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες απλής διέλευσης. Η αλληλεπίδραση του εξωκυττάριου τμήματος του N με τους δεσμευτές του επάγει την πρωτεόλυση του υποδοχέα, η οποία απελευθερώνει το ενδοκυττάριο ενεργό τεμάχιο του (Nic). Το Nic μεταναστεύει στον πυρήνα του κυττάρου-δέκτη, στρατολογείται στους υποκινητές και λειτουργεί ως μεταγραφικός συνενεργοποιητής για τα γονίδια-στόχους του μονοπατιού. Για να επιτευχθεί η ενεργοποίηση του μονοπατιού με ακρίβεια στα διάφορα κύτταρα, εκτός από μεταγραφική ρύθμιση, τα διάφορα συστατικά του μονοπατιού υπόκεινται και σε μετα-μεταφραστική ρύθμιση, όπως πρωτεόλυση, γλυκοζυλίωση και ουβικουϊτινυλίωση. Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε στη Δροσόφιλα ο ρόλος των δεσμευτών του N, DI και Ser και των E3 λιγασών ουβικουϊτίνης Neuralized (Neur) Mind Bomb1 (Mib1) στη σηματοδότηση.

Στο πρώτο μέρος της εργασίας, μελετήθηκε το γονίδιο *neur*, το οποίο κωδικοποιεί μία E3 λιγάση ουβικουϊτίνης τύπου RING, αλλά ο ακριβής στόχος του κατά τη σηματοδότηση παρέμενε άγνωστος. Δείχθηκε ότι το Neur είναι μια μεμβρανική κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, η οποία στοχεύει το DI και προκαλεί την ενδοκύττωση και αποικοδόμησή του, με τρόπο που εξαρτάται από το μοτίβο RING. Σε μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας του *neur* εμποδίζεται η ενδοκύττωση του DI, ενώ σε εκτοπική έκφρασή του ενισχύεται η ενδοσωμική κατανομή του. Επιπλέον, το *neur* δρα μη αυτόνομα στη σηματοδότηση N (παίζει ρόλο στο κύτταρο που αποστέλλει το σήμα και όχι σε αυτό που το δέχεται) και ενισχύει τη σηματοδοτική ικανότητα του DI.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε ο ρόλος των δεσμευτών του N στην πλευρική αναστολή και δείχθηκε ότι το DI και το Ser δρουν συνεργατικά κατά την διαδικασία του καθορισμού των μακροχαιτών (σε αντίθεση με την μέχρι τώρα πεποίθηση ότι μόνο το DI είναι απαραίτητο) και η μεταγραφική τους ρύθμιση δεν είναι απαραίτητη. Επιπλέον, δείχθηκε ότι και οι δύο δεσμευτές του N χρειάζονται Neur για να δράσουν και το τελευταίο έχει την ίδια επίδραση και στα δύο μόρια: αλληλεπιδρά φυσικά και με τους δύο και προκαλεί την ενδοκύττωσή τους. Επιπλέον, χαρακτηρίσαμε μία νέα E3 λιγάση ουβικουϊτίνης, την Mind bomb1 (Mib1) για τους δεσμευτές του N. Δείξαμε ότι οι δύο λιγάσες ουβικουϊτίνης Neur και Mib1 έχουν μερικώς πλεονάζουσα

δράση στην πλευρική αναστολή. Στην επαγωγή του περιθωρίου του φτερού το Mib1 απαιτείται, επειδή το Neur δεν εκφράζεται παντού στο φτερό, αλλά μόνο στις προνευρικές περιοχές. Η ανάγκη για λιγάσες ουβικουΐτινης μας οδηγεί σε ένα μοντέλο, στο οποίο η ουβικουΐτινυλίωση και η ενδοκύττωση των δεσμευτών του N απαιτείται για σηματοδότηση.

Επίσης, στη συγκεκριμένη εργασία αναλύθηκε με μεγάλη λεπτομέρεια ο ρόλος του ελλειμματικού μορίου NeurΔR, από το οποίο απουσιάζει το RING μοτίβο, το οποίο είναι σημαντικό για τη δραστικότητα E3 λιγάσης. Το μόριο αυτό δεν έχει πάντοτε αρνητική δράση στη σηματοδότηση. Αντιθέτως, έχει την ικανότητα να προωθεί την αποστολή του σήματος, αλλά εμποδίζει τη λήψη του. Από τα παραπάνω μπορούμε να υποθέσουμε ότι το Neur μπορεί να έχει διπλό ρόλο, τόσο στην αποστολή, όσο και στη λήψη του σήματος (ελαττώνει τη cis-αρνητική δράση των δεσμευτών). Στην πρώτη του δράση (αποστολή), το NeurΔR συνεργάζεται με το Mib1, καθώς η αποστολή του σήματος αναστέλλεται πλήρως, όταν απουσιάζει το δεύτερο.

ABSTRACT

The Notch signaling pathway constitutes an evolutionarily conserved mechanism, which is activated during a variety of cell fate decisions in all metazoans. It revolves around the single-pass transmembrane Notch (N) receptor and its also transmembrane ligands, Delta (Dl) and Serrate (Ser). Following interaction of the extracellular domain of the receptor with the ligands, a proteolytic step is triggered, which leads to the release of the active intracellular part of the N receptor (Nic). Nic then travels to the nucleus, where it acts as a transcriptional co-activator and in association with other DNA binding factors activates transcription of target genes. Apart from transcription factors, a variety of proteins control the precise activation of the pathway in time and space post-transcriptionally; these include proteases, glycosyl-transferases and E3 ubiquitin ligases. In this work, the role of N ligands, Dl and Ser, as well as their two associated ubiquitin ligases, Neuralized (Neur) and Mind bomb1 (Mib1) was studied in N pathway activation in *Drosophila*.

The role of *neur* was studied first. Although the gene was cloned 25 years ago, the protein was characterized as a RING type E3 ubiquitin ligase only recently and its target remained unknown. We showed that Neur is a membrane associated intracellular protein, which targets the N ligand Dl for endocytosis and degradation in a RING dependent manner. In *neur* loss of function mutations, Dl endocytosis is blocked and the opposite is true when *neur* is ectopically expressed (increased endocytosis). Neur also enhances Dl signaling activity and acts non-autonomously (in the signal-emitting cell) during N signaling.

Then, the role of the two N ligands was studied during the process of lateral inhibition and it was shown that contrary to prior belief, Dl and Ser act synergistically during this process (it was thought that Dl was the sole active ligand there), and their transcriptional regulation is not important for this function. Both Dl and Ser need Neur in order to have full function during lateral inhibition and Neur physically associates with Ser and enhances its endocytosis and degradation (similar to its effects on Dl). Furthermore, we characterized Mib1, another RING type E3 ubiquitin ligase, which we showed that exhibits a redundant function with Neur during lateral inhibition. During wing margin development, Mib1 is required, because Neur is not expressed there. In the absence of both *neur* and *mib1* signaling is completely abolished, which points to a model in which ubiquitination and endocytosis of N ligands is a prerequisite for signaling.

The role of a truncated Neur Δ R molecule was also analyzed in detail. This lacks the active ubiquitin ligase domain and it was thought to exhibit a negative effect in signaling. We noticed that Neur Δ R is active in signal sending, but is inactive in signal reception. It can also rescue the highly neurogenic phenotype of *neur* loss of function mutations in embryos and adult bristles. This leads us to interesting results concerning the function of the wild type Neur protein; Neur might have a dual function during N signaling: it can activate signal sending in a RING independent manner and it can also allow cells to receive the N signal in a RING dependent manner (e.g. by reducing the cis-negative effect of the high concentration of ligands). Neur Δ R seems to functionally interact with Mib1 in order to exert its signal sending activity, because in the absence of *mib1*, signal sending is completely abolished.

Εισαγωγή

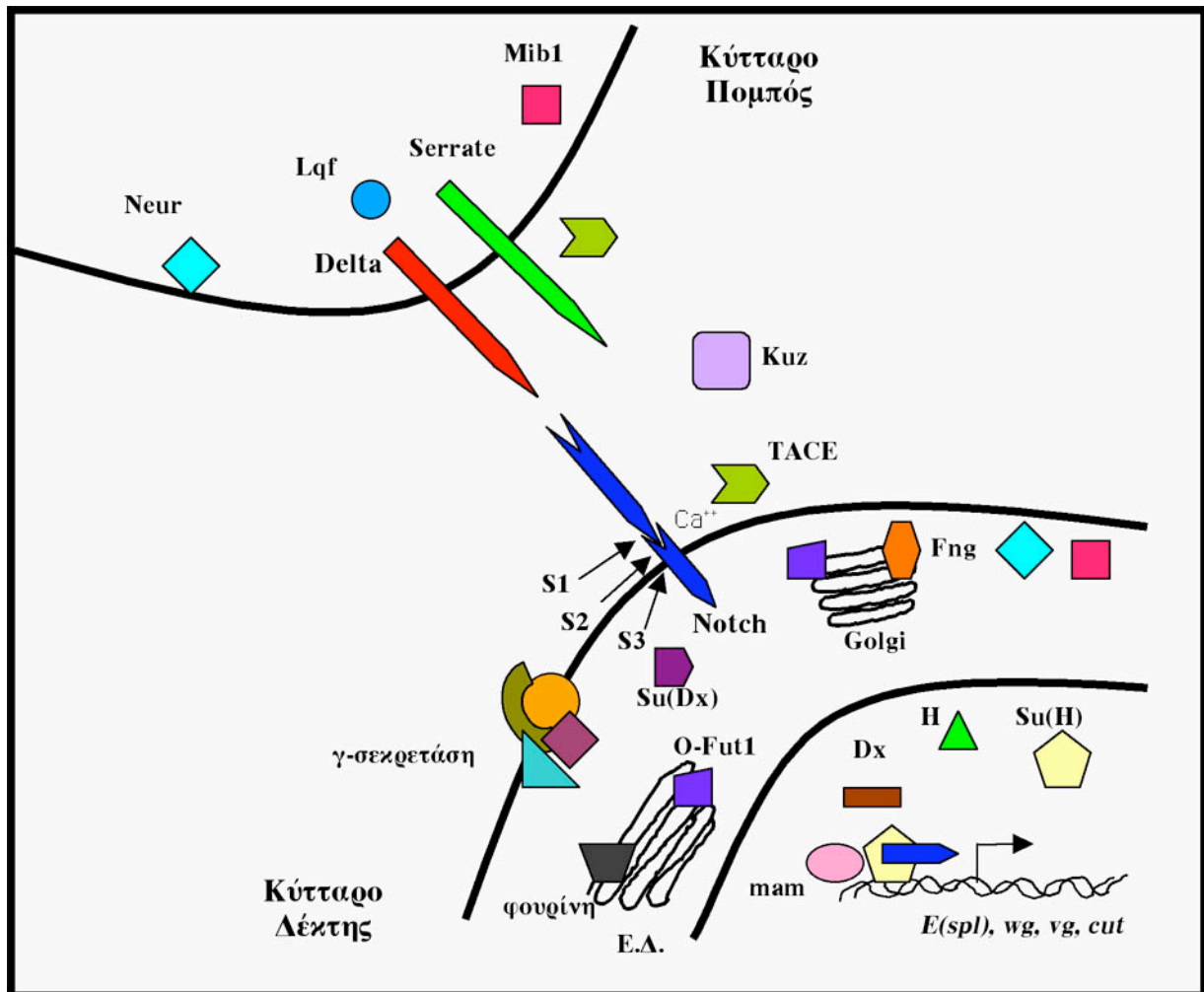
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η "κατασκευή" ενός πολυκύτταρου οργανισμού με χαρακτηριστικό σχήμα και μέγεθος από ένα κύτταρο, είναι το αποτέλεσμα της συντονισμένης δράσης γονιδίων, η οποία οδηγεί στον καθορισμό της αναπτυξιακής τύχης των κυττάρων που τον αποτελούν. Η "ενορχήστρωση" κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μετανάστευσης, αύξησης, διαφοροποίησης και θανάτου που επιτελείται με μεγάλη ακρίβεια, δημιουργεί ένα αρμονικό τελικό αποτέλεσμα. Εσωτερικοί, κυτταρικά αυτόνομοι παράγοντες, καθώς επίσης και μη αυτόνομοι, μικρού ή μεγάλου βεληνεκούς σήματα, κατευθύνουν τα κύτταρα προς συγκεκριμένα αναπτυξιακά μονοπάτια. Συχνά, ένας οργανισμός χρησιμοποιεί το ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι μέσα σε διαφορετικά κυτταρικά περιεχόμενα για να επιτύχει μοναδικούς αναπτυξιακούς στόχους. Ο τρόπος με τον οποίο εσωτερικά και εξωτερικά σήματα ενσωματώνονται κατά την οντογένεση του οργανισμού για να καθορίσουν κυτταρικές τύχες αποτελεί βασικό ερώτημα της αναπτυξιακής βιολογίας.

Για να μελετηθούν ερωτήματα ανάπτυξης και κυτταρικής σηματοδότησης χρησιμοποιούνται πειραματικά συστήματα-μοντέλα, όπως η Δροσόφιλα, *D.melanogaster*. Η Δροσόφιλα αποτελεί ένα πολύ εύχρηστο πειραματικό μοντέλο, καθώς η διατήρησή της είναι πολύ εύκολη και ο κύκλος ζωής της είναι σύντομος. Η αλληλουχία του γονιδιώματός της είναι γνωστή και επιπλέον, έχει μελετηθεί τόσο πολύ καλά γενετικά ώστε υπάρχουν πολλές χαρακτηρισμένες μεταλλαγές και συνεχώς αναπτύσσονται νέα εργαλεία για ευκολότερη γενετική. Πολλά από τα σηματοδοτικά μονοπάτια έχουν μελετηθεί εκτενώς στη Δροσόφιλα και παρουσιάζουν εξαιρετική συντήρηση με περιπλοκότερους οργανισμούς, όπως ο άνθρωπος. Τελευταία, η Δροσόφιλα έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται ως μοντέλο για την διαλεύκανση ανθρώπινων ασθενειών και καρκίνου. Στην συγκεκριμένη εργασία, η Δροσόφιλα χρησιμοποιείται ως μοντέλο για τη μελέτη διαδικασιών διακυτταρικής σηματοδότησης και νευρογένεσης.

1. ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ NOTCH

Η σηματοδότηση μέσω Notch είναι ένας συντηρημένος εξελικτικά μηχανισμός, ο οποίος χρησιμοποιείται από όλα τα μετόζωα για να ρυθμίζει κυτταρικές τύχες μέσω διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων. Σήματα που μεταδίδονται μέσω του υποδοχέα Notch, σε συνδυασμό και με άλλους κυτταρικούς παράγοντες, επηρεάζουν την διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση σε ποικίλα αναπτυξιακά στάδια (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Στην εικόνα 1.1 φαίνεται ένα γενικό σχήμα του μονοπατιού μετάδοσης σήματος μέσω του υποδοχέα Notch στην Δροσόφιλα και των διαφορετικών μορίων που συμμετέχουν σε αυτό.



Εικόνα 1.1: Το μονοπάτι μετάδοσης σήματος Notch

Στην εικόνα φαίνονται σχηματικά τα διάφορα μέρη που εμπλέκονται στη σηματοδότηση Notch. Τα δύο κύτταρα μεταξύ των οποίων γίνεται η σηματοδότηση, στην πραγματικότητα εκφράζουν τόσο μέρη υποδοχέα, όσο και δεσμευτή. Για λόγους απλούστευσης διαχωρίζονται στο σχήμα. Παράγοντες εξωκυττάριοι, κυτταροπλασματικοί (στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στο δίκτυο Golgi), μεμβρανικοί (γ-σεκρετάση/ πρεσενιλίνη) και πυρηνικοί ρυθμίζουν το μονοπάτι σε διαφορετικά επίπεδα (βλέπε "Εισαγωγή" για λεπτομέρειες). Κάποια από τα μέρη εμπλέκονται τόσο στην αποστολή όσο και στη λήψη του σήματος. Με S1, S2, S3 σημαίνονται οι διαφορετικές πρωτεολύσεις που υφίσταται ο υποδοχέας N μέχρι να ενεργοποιηθεί.

S1: πρωτεόλυση από την φουρίνη στο E.Δ.

S2: πρωτεόλυση από την TACE/ Kuz στον εξωκυττάριο χώρο

S3: πρωτεόλυση από το σύμπλοκο της γ-σεκρετάσης (πρεσενιλίνη) στην μεμβράνη

Η αλληλεπίδραση του N με τους δεσμευτές του οδηγεί στην S2 πρωτεόλυση, η οποία αφήνει ένα μικρό εξωκυττάριο τμήμα στον υποδοχέα, που τον μετατρέπει σε καλό υπόστρωμα για την ενδομεμβρανική πρωτεάση πρεσενιλίνη (Struhl and Adachi). Μετά από την S3 πρωτεόλυση, το ενδοκυττάριο τμήμα του N μεταναστεύει στον πυρήνα, όπου δρα ως συνενεργοποιητής και μαζί με το Su(H) ενεργοποιεί γονίδια-στόχους του μονοπατιού.

Συγκεκριμένα, εξωκυττάρια περιοχές του Notch (υποδοχέας) και των δεσμευτών του, Delta (Dl) ή Serrate (Ser), αλληλεπιδρούν και επιτυγχάνεται ενεργοποίηση του υποδοχέα. Ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης, το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα, Nic, αποκόπτεται και μεταναστεύει στον πυρήνα (Lieber et al., 1993), όπου βρίσκεται ο μεταγραφικός παράγοντας Suppressor of Hairless [Su(H)]. Το Su(H) προσδένεται σε ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων-στόχων του μονοπατιού όπως π.χ. κατά περίπτωση, το γονιδιακό σύμπλοκο *Enhancer of split* [*E(spl)*], το *wingless* (*wg*), *vestigial* (*vg*) και *cut* και μαζί με τον συνενεργοποιητή Nic ενεργοποιεί την έκφρασή τους (Artavanis-Tsakonas et al., 1995, Heitzler et al., 1996, Kopan and Turner, 1996).

1.1. Ο Υποδοχέας Notch

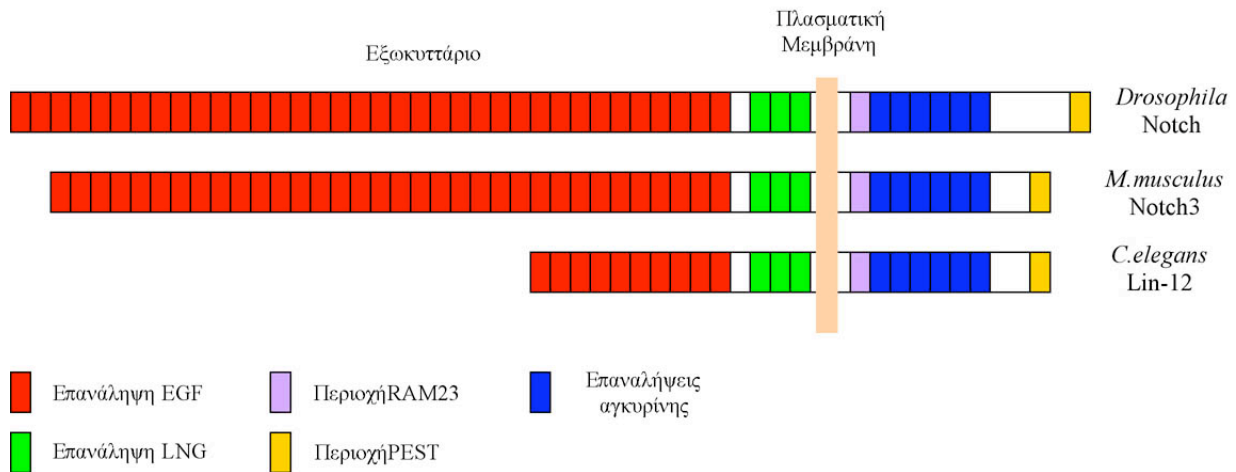
Το γονίδιο *Notch* της *D.melanogaster* ανακαλύφθηκε το 1916 από τον Morgan, αλλά η μοριακή του ανάλυση έγινε την δεκαετία του 1980 (Ramos et al., 1989, Simpson, 1998). Πήρε το όνομά του από τον φαινότυπο που προκαλεί η μερική έλλειψη λειτουργίας του (απλοανεπάρκεια), που οδηγεί σε κοψίματα στο περιθώριο των φτερών του ενήλικου εντόμου (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Περαιτέρω απώλεια λειτουργίας του γονιδίου δημιουργεί "νευρογόνο φαινότυπο" σε έμβρυα, δηλαδή κύτταρα που φυσιολογικά θα γίνονταν επιδερμικά, αλλάζουν αναπτυξιακή μοίρα και γίνονται νευρικά, οπότε το έμβρυο πεθαίνει από υπερπλασία του νευρικού συστήματος εις βάρος της επιδερμίδας (Artavanis-Tsakonas et al., 1999).

Το γονίδιο *Notch* κωδικοποιεί έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα απλής διέλευσης τύπου I μεγέθους 2704 αμινοξέων. Η μεγάλη εξωκυττάρια περιοχή του αποτελείται από 36 συνεχόμενες επαναλήψεις τύπου EGF (Epidermal Growth Factor) και τρεις επαναλήψεις πλούσιες σε κατάλοιπα κυστεΐνης που ονομάζονται επαναλήψεις Notch/Lin12. Στην ενδοκυττάρια περιοχή απαντούν έξι συνεχόμενες επαναλήψεις αγκυρίνης, μία αλληλουχία πλούσια σε γλουταμίνη (*opa*) και μία αλληλουχία PEST (Fleming, 1998, Artavanis-Tsakonas et al., 1999).

Οι επαναλήψεις EGF χρησιμεύουν για διαπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, σταθεροποιούν το μόριο και μερικές από αυτές αποτελούν υπόστρωμα για γλυκοζυλίωση. Συγκεκριμένα, οι επαναλήψεις EGF 11 και 12 είναι απαραίτητες για την αλληλεπίδραση του υποδοχέα με τους δεσμευτές του Delta και Serrate, όπως φάνηκε με πειράματα συγκόλλησης κυττάρων σε καλλιέργεια (Fehon et al., 1990, Rebay et al., 1991).

Το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα περιλαμβάνει δομικά χαρακτηριστικά που παίζουν σημαντικό ρόλο στην μετάδοση του σήματος και στην σταθερότητα της πρωτεΐνης (Fleming, 1998, Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Μέσω του τμήματος αυτού, ο υποδοχέας αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα Su(H) και με άλλα συστατικά της μεταγραφικής μηχανής, όπως

ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών και συνενεργοποιητές (Lai 2002). Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι περιλαμβάνει δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού, η τοποθέτησή του στον πυρήνα ανιχνεύεται σπάνια εξαιτίας της μεγάλης αστάθειας που παρουσιάζει η πρωτεΐνη (Struhl and Adachi, 1998).



Εικόνα 1.2: Η δομή του υποδοχέα Notch

Το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα Notch παρουσιάζει υψηλή συντήρηση κυρίως στις επαναλήψεις EGF. Ο αριθμός τους ποικίλλει και κυμαίνεται από 36 στο δροσοφιλικό ομόλογο και στο ανθρώπινο N1 μέχρι 10 στο Lin-12 του καινοραβδίτη. Άλλες χαρακτηριστικές επαναλήψεις των υποδοχέων N είναι οι επαναλήψεις LNG, οι οποίες είναι πλούσιες σε κατάλοιπα κυστεΐνης. Στην ενδοκυττάρια περιοχή απαντούν περιοχές RAM23, επαναλήψεις αγκυρίνης και μία αλληλουχία καρβοξυτελική αλληλουχία PEST, η οποία είναι σημαντική για την σταθερότητα της πρωτεΐνης.

1.2. Οι Δεσμευτές: *Delta* και *Serrate*

Οι δύο δεσμευτές του Notch, *DI* και *Ser* ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών DSL (από τις *Delta*, *Serrate* της Δροσόφιλας και *Lag-2* του καινοραβδίτη) και χαρακτηρίζονται από την περιοχή DSL μεγέθους 45 αμινοξέων στο εξωκυττάριο τμήμα τους. Το αμινοτελικό άκρο των πρωτεϊνών (το οποίο αξίζει να σημειωθεί ότι είναι και αρκετά ποικίλο εξελικτικά) μαζί με περιοχή DSL δημιουργούν τη δομή εκείνη που είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση με το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα N (Fleming, 1998).

Το *Delta* κωδικοποιεί μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη απλής διέλευσης μεγέθους 832 αμινοξέων. Χαρακτηρίζεται ως νευρογόνο γονίδιο, γιατί σε μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας του έχουμε υπερβολική ανάπτυξη του νευρικού συστήματος στο έμβρυο εις βάρος της επιδερμίδας, εξαιτίας ελλειπούς σηματοδότησης Notch (δεν γίνεται πλευρική αναστολή). Στην εξωκυττάρια πλευρά της πρωτεΐνης υπάρχουν τα εξής δομικά χαρακτηριστικά: ένα αμινοτελικό άκρο, η περιοχή DSL, μία σειρά από 9 συνεχείς επαναλήψεις EGF. Ακολουθεί μία

διαμεμβρανική περιοχή και μία ενδοκυττάρια περιοχή χωρίς σημαντική ομολογία με άλλες πρωτεΐνες.

Το *Serrate* κωδικοποιεί μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη απλής διέλευσης μεγέθους 1404 αμινοξέων. Δεν ανήκει στην κατηγορία των νευρογόνων γονιδίων, καθώς δεν εκφράζεται στις περιοχές που θα δώσουν το νευρικό σύστημα του εμβρύου (Speicher et al., 1994). Το εξωκυττάριο τμήμα της αποτελείται από ένα αμινοτελικό άκρο, την περιοχή DSL, μια σειρά από 14 επαναλήψεις EGF και μία περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα κυστεΐνης (μοναδική περιοχή σε δεσμευτές *Serrate*). Το ενδοκυττάριο τμήμα της δεν παρουσιάζει σημαντική ομολογία με άλλες πρωτεΐνες, αλλά είναι απαραίτητο για σηματοδότηση.

Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι οι δύο δεσμευτές του N δεν παρουσιάζουν καμία ομοιότητα στα ενδοκυττάρια τμήματά τους. Όμως και για τους δύο είναι σημαντικά για τη σηματοδότηση, καθώς ελλειμματικές μορφές τους χωρίς το ενδοκυττάριο τεμάχιο δρουν ως επικρατείς αρνητικές μεταλλάξεις (Sun and Artavanis-Tsakonas, 1997).

Κι ενώ στη Δροσόφιλα υπάρχουν μόνο δύο DSL δεσμευτές και ένα μόριο υποδοχέα N, στα θηλαστικά έχουν χαρακτηριστεί τέσσερα διαφορετικά μόρια N (N1-N4) και 5 διαφορετικοί DSL δεσμευτές των N υποδοχέων: οι τρεις από αυτούς μοιάζουν δομικά με το DI (DI1, 3 και 4 ή αλλιώς DI-like ή DII) και οι άλλοι δυο μοιάζουν με το Ser (Jagged1 και 2). Όλοι αλληλεπιδρούν μέσω του μοτίβου DSL με τις επαναλήψεις EGF του εξωκυττάριου τμήματος των υποδοχέων N.

1.3. Άλλοι δεσμευτές του N (χωρίς DSL)

Μέχρι πρόσφατα πιστευότο ότι το μοτίβο DSL χαρακτηρίζει τους δεσμευτές του N, καθώς μέσω αυτού επιτυγχάνεται η αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα. Ωστόσο, φαίνεται ότι και άλλα μόρια, χωρίς DSL, μπορούν να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση του N. Συγκεκριμένα, δείχθηκε ότι το N1 αλληλεπιδρά με ένα μεμβρανικό μόριο κυτταρικής συνάφειας που φέρει σύνδεσμο GPI, την F3 contactin. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι λειτουργική, έχει ως αποτέλεσμα την πρωτεόλυση του N1 από το σύμπλοκο της γ-σεκρετάσης (βλέπε παρακάτω) και την ενεργοποίηση της σηματοδότησης μέσω Deltex (Dx), η οποία οδηγεί στην διαφοροποίηση και ωρίμανση των ολιγοδενδροκυττάρων του νευρικού συστήματος (Cui et al., 2004, Hu et al., 2003).

Ένα άλλο μόριο που λειτουργεί ως δεσμευτής του N και ενεργοποιεί το μονοπάτι μέσω Dx, χωρίς όμως να έχει το χαρακτηριστικό DSL μοτίβο, είναι η πρωτεΐνη DNER (Delta/Notch-like EGF-related recceptor). Το μόριο αυτό χαρακτηρίστηκε στον ποντικό και μοιάζει πολύ με το DI1 όσο αφορά στην εξωκυττάρια δομή του, αλλά αλληλεπιδρά με το N1 με τις δύο αμινοτελικές

2. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ NOTCH

2.1. Η πρωτεόλυση στην σηματοδότηση Notch

Τα τελευταία χρόνια σειρά εργασιών έχει δείξει ότι ο υποδοχέας Notch, υφίσταται μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις μεταξύ των οποίων και πρωτεόλυση. Η πρωτεόλυση οδηγεί στον σχηματισμό διαφορετικών ισομορφών της πρωτεΐνης *in vivo*, οι οποίες εξυπηρετούν διαφορετικές λειτουργίες (Ye and Fortini, 2000).

α) Ενδοκυττάρια πρωτεόλυση του N στο σύστημα Golgi

Το πρώτο επίπεδο πρωτεόλυσης του εξωκυττάριου τμήματος του υποδοχέα N συμβαίνει στο δίκτυο trans-Golgi κατά την διάρκεια της σύνθεσης του ώριμου υποδοχέα (πρωτεόλυση S1). Μετά από αυτό, το ώριμο N θα εμφανιστεί στην κυτταρική μεμβράνη με τη μορφή ενός ετεροδιμερούς των δύο πρωτεολυτικών τεμαχίων, που συνδέονται μεταξύ τους με μία ιοντική γέφυρα ασβεστίου (Blaumueller et al., 1997). Αυτή η πρωτεόλυση επιτυγχάνεται με τη δράση μίας φουρίνης. Η φουρίνη είναι ένζυμο που μοιάζει με την πρωτεάση σαμπτυλυσίνη και πρωτεολύει πρωτεΐνες μέσω του κλασσικού εκκριτικού μονοπατιού (Logeat et al., 1998). Αν και τεκμηριωμένη σε κύτταρα θηλαστικών, στη Δροσόφιλα είναι αμφισβητούμενη η δράση της φουρίνης κατά την ωρίμανση του υποδοχέα N και πιστεύεται ότι το N στην μεμβράνη είναι πλήρους μήκους (Kidd and Lieber, 2002).

β) Εξωκυττάρια πρωτεόλυση του N

Όταν ο υποδοχέας Notch ενεργοποιηθεί από την πρόσδεση του δεσμευτή, επιτελείται μία επιπλέον πρωτεόλυση (πρωτεόλυση S2) από μία πρωτεάση τύπου ADAM (a disintegrin and metalloprotease family) (Brou et al., 2000, Mumm et al., 2000) στο εξωκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης (και μάλιστα πολύ κοντά στην προηγούμενη). Η δεύτερη αυτή πρωτεόλυση μετατρέπει το μόριο σε καλό υπόστρωμα της πρεσενιλίνης και είναι απαραίτητη για τη μεταγωγή του σήματος.

Έχει δειχθεί ότι η πρωτεάση TACE (TNF α -Converting Enzyme) τύπου ADAM17 επιτελεί την πρωτεόλυση S2 στα θηλαστικά (Brou et al., 2000, Mumm et al., 2000), ενώ στη Δροσόφιλα υπάρχει γονίδιο TACE με άγνωστη λειτουργία. Ωστόσο, έχει δειχθεί ότι το νευρογόνο γονίδιο *kuzbanian* (*kuz*) κωδικοποιεί μία εξωκυττάρια μεταλλοπρωτεάση τύπου ADAM10 (Koran and Cagan, 1997, Pan and Rubin, 1997), η οποία αλληλεπιδρά (Lieber et al., 2002) με το N και επηρεάζει την S2 πρωτεόλυσή του.

γ) Ενδομεμβρανική πρωτεόλυση του N

Η αποκοπή του εξωκυττάριου τμήματος του υποδοχέα N από την TACE, μετά από την αλληλεπίδραση με τον δεσμευτή, μετατρέπει το υπόλοιπο τμήμα της πρωτεΐνης σε καλό υπόστρωμα για το πρωτεολυτικό σύμπλοκο της γ-σεκρετάσης (πρωτεόλυση S3) (Struhl and Adachi, 2000, Fortini, 2002). Το τελευταίο έχει μέγεθος περίπου 250 kDa (ή ακόμη μεγαλύτερο) και η καταλυτική πρωτεολυτική του δράση προέρχεται από την πρεσενιλίνη. Η πρεσενιλίνη είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη 8πλής διέλευσης (με τα άκρα της προς την πλευρά του κυτταροπλάσματος), η οποία κυρίως εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στο Golgi και ένα μικρό ποσοστό της παρουσιάζεται στην πλασματική μεμβράνη (Ray et al., 1999, Ye and Fortini, 1998, Ye et al., 1999), όπου και δρα στο N. Αξίζει στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι μεταλλαγές στο γονίδιο της πρεσενιλίνης στη Δροσόφιλα οδηγούν σε νευρογόνο φαινότυπο σε έμβρυα, όπως και οι μεταλλαγές στο N.

Λεπτομερέστερη ανάλυση του συμπλόκου της γ-σεκρετάσης στη Δροσόφιλα και στον καινοραβδίτη αποκάλυψε την παρουσία της νικαστρίνης, μίας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης τύπου I, η οποία αλληλεπιδρά τόσο με την πρεσενιλίνη, όσο και με το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα N (Yu et al., 2000, Chen et al., 2001, Esler et al., 2002, Hu et al., 2002). Επιπλέον πρωτεΐνες του συμπλόκου είναι οι Aph-1 και Pen-2 (Goutte et al., 2002, Francis et al., 2002, De Strooper, 2003), οι οποίες είναι επίσης μεμβρανικές, αλλά δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμη ο ρόλος τους.

Μετά την τελευταία πρωτεόλυση, ελευθερώνεται το ενεργό ενδοκυττάριο τμήμα του Notch, Nic (N intracellular), το οποίο θα μετακινηθεί στον πυρήνα και θα χρησιμεύσει για ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων-στόχων του σηματοδοτικού μονοπατιού (Korpan et al., 1996, Chan and Jan, 1999, Struhl and Greenwald, 1999).

δ) Πρωτεόλυση των δεσμευτών

Σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από έμβρυα και προνύμφες *D. melanogaster*, η πρωτεΐνη Delta απαντάται σε τέσσερις ισομορφές, η μικρότερη εκ των οποίων αντιστοιχεί σε μία εκκρινόμενη ισομορφή που προκύπτει από πρωτεόλυση (Klueg et al., 1998). Η εν λόγω πρωτεόλυση πιστεύεται ότι επιτελείται από την εξωκυττάρια μεταλλοπρωτεάση Kuz (Qi et al., 1999), αλλά ο φυσιολογικός ρόλος του εκκρινόμενου DI παραμένει μέχρι στιγμής άγνωστος. Πρόσφατα δείχθηκε ότι το DI1 του ποντικού εκτός από την εξωκυττάρια πρωτεόλυση, υφίσταται και ενδομεμβρανική πρωτεόλυση από το σύμπλοκο της γ-σεκρετάσης (Six et al., 2003), όπως και ο υποδοχέας N, γεγονός που δημιουργεί νέα ερωτήματα σχετικά με το ρόλο του ενδοκυττάριου τμήματός του, το οποίο εντοπίζεται στον πυρήνα και φαίνεται να επηρεάζει τη μεταγραφή.

Εκτός από το Kuz, βρέθηκε στη Δροσόφιλα μία ακόμη πρωτεάση της οικογένειας ADAM10, η Kul (Kuz-like). Η εν λόγω δείχθηκε ότι *in vitro* έχει τη δυνατότητα να πρωτεολύει και τους δύο δεσμευτές του N, όπως το Kuz και η TACE (Sapir et al., 2005). *In vivo*, δείχθηκε ότι η Kul ρυθμίζει τα επίπεδα της πρωτεΐνης DI στα κύτταρα που δέχονται το σήμα N (πχ στα μεσοφλέβια διαστήματα στο φτερό της νύμφης της Δροσόφιλας).

2.2. Η γλυκοζυλίωση στη σηματοδότηση N

Μία σημαντική μεταμεταφραστική τροποποίηση για τη σηματοδότηση N είναι η γλυκοζυλίωση. Τόσο ο υποδοχέας N, όσο και οι δεσμευτές του είναι καλά υποστρώματα για γλυκοζυλίωση στις επαναλήψεις EGF του εξωκυττάριου τμήματός τους.

Η πρώτη γλυκόζυλ-τρανσφεράση που ενεπλάκει στη σηματοδότηση N είναι η πρωτεΐνη Fringe (Fng). Αυτή απαντάται σε δύο μορφές, μία κυτταροπλασματική ενδο-Golgi και μία εκκρινόμενη (Panin et al., 1997). Η ενδο-Golgi ισομορφή της Fng έχει δράση γλυκόζυλ-τρανσφεράσης και τροποποιεί τον υποδοχέα Notch, γλυκοζυλιώνοντας (με N-ακετυλογλυκοζαμίνη) τις επαναλήψεις EGF του εξωκυττάριου τμήματός του, με τρόπο τέτοιο ώστε να γίνεται ικανότερος να σηματοδοτήσει μέσω του DI (Irvine and Wieshaus, 1995, Irvine, 1999, Rauskolb et al., 1999, Bruckner et al., 2000). Το Fng για να δράσει πρέπει να εκφράζεται στο κύτταρο που λαμβάνει το σήμα και δίνει τη δυνατότητα σ'αυτό να βελτιώσει την ικανότητα πρόσδεσής του με το DI και όχι με το Ser (στην πραγματικότητα εμποδίζει τη σηματοδότηση μέσω Ser). Η δράση του Fng είναι περιορισμένη σε διαδικασίες καθορισμού ορίων, όπως το ραχαιοκοιλιακό όριο του φτερού και οι αρθρώσεις του ποδιού και όχι σε διαδικασίες όπως η πλευρική αναστολή (ίσως εξαιτίας του προτύπου έκφρασής του κατά την ανάπτυξη).

Πρόσφατα δείχθηκε ότι μία άλλη γλυκόζυλ-τρανσφεράση, η O-Fut1 ή Neurotic, είναι σημαντική για τη σηματοδότηση N και μάλιστα επηρεάζει και διαδικασίες ανεξάρτητες από τη δράση του Fng, όπως η πλευρική αναστολή και οι ασύμμετρες διαιρέσεις νευρικής γενεαλογίας (Okajima and Irvine, 2002; Okajima et al., 2003, Sasamura et al., 2003). Η πρωτεΐνη O-Fut1 εκφράζεται ομοιόμορφα κατά την ανάπτυξη και προσθέτει O-φουκόζη σε κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης των επαναλήψεων EGF του υποδοχέα N. Αυτή η τροποποίηση είναι απαραίτητη για να γίνει επιμήκυνση της αλυσίδας των σακχάρων από την δράση του Fng. Μάλιστα δείχθηκε ότι αν εμποδιστεί η O-φουκοζυλίωση στην επανάληψη EGF12 του υποδοχέα N (η οποία είναι σημαντική για την αλληλεπίδραση με τους δεσμευτές) η σηματοδότηση δεν μπορεί πλέον να ρυθμιστεί και το Ser ενεργοποιεί το N σε λάθος θέση και ανεξάρτητα από την παρουσία του Fng (Lei et al., 2003).

Πρόσφατα αποκαλύφθηκε ότι η O-Fut1 παίζει διπλό ρόλο κατά την ωρίμανση του υποδοχέα N: α) λειτουργεί ως chaperone στο ενδοπλασματικό δίκτυο, έτσι ώστε να επιτευχθεί η σωστή αναδίπλωση του N και β) στη συνέχεια δρα ως γλυκοζυλ-τρανσφεράση και τροποποιεί τον υποδοχέα στο δίκτυο Golgi (Okajima et al., 2005).

Μία επιπλέον παρατήρηση που κάνει την γλυκοζυλίωση ακόμη πιο σημαντική για τη σηματοδότηση N είναι ότι και οι δεσμευτές του N έχουν πιθανές θέσεις γλυκοζυλίωσης στις επαναλήψεις EGF. Τόσο το D1 όσο και το Ser μπορούν να γλυκοζυλιωθούν *in vitro* από O-Fut1 και Fng, αλλά ο ρόλος της εν λόγω τροποποίησης παραμένει άγνωστος (Panin et al., 2002).

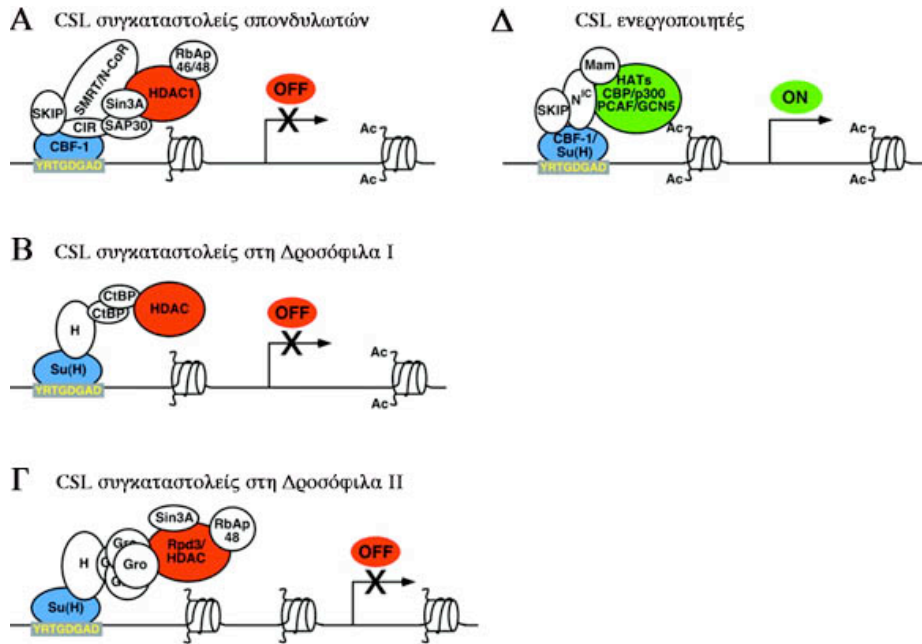
2.3. Ουβικουΐτινυλίωση και σηματοδότηση Notch

(βλέπε “Συζήτηση”)

2.4. Ρυθμιστές της σηματοδότησης στον πυρήνα

Το ενδοκυττάριο τεμάχιο του υποδοχέα N μετά την πρωτεόλυση από πρεσενιλίνη μεταφέρεται στον πυρήνα του κυττάρου και ενεργοποιεί γονίδια-στόχους. Στον πυρήνα το Nic λειτουργεί ως μεταγραφικός συνενεργοποιητής, δηλαδή δεν προσδένεται απευθείας στους υποκινητές των γονιδίων, αλλά μέσω κάποιου άλλου μεταγραφικού παράγοντα. Ο πλέον χαρακτηρισμένος τρόπος δράσης του N είναι μέσω των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας CSL (από τους CBF-1 των σπονδυλωτών, Su(H) της Δροσόφιλας και Lag-1 του νηματώδη) και αυτός αποτελεί το κλασσικό μονοπάτι ενεργοποίησης του N (Morel et al., 2001). Στα κύτταρα, όπου το N είναι ανενεργό, στη Δροσόφιλα, το Su(H) λειτουργεί ως καταστολέας μαζί με το Hairless (H) και άλλους συγκαταστολείς και τα γονίδια-στόχοι του N διατηρούνται σβησμένα (Barolo et al., 2002). Σε κύτταρα που το μονοπάτι ενεργοποιείται, το προσδεμένο στον υποκινητή Su(H) αλληλεπιδρά με το Nic και το Mastermind (Mam) και ξεκινά η ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων (Lai, 2002, Morel et al., 2001).

Εκτός όμως από το κλασσικό μονοπάτι ενεργοποίησης των κάτωθεν στόχων του N, έχει προταθεί ότι υπάρχουν περιπτώσεις, στις οποίες δεν μεσολαβεί το Su(H). Εκεί, το μονοπάτι ενεργοποιείται μέσω του Deltex (Dx), το οποίο αλληλεπιδρά με το Nic και οδηγεί σε μεταγραφική ενεργοποίηση με έναν άγνωστο μέχρι στιγμής τρόπο (Yamamoto et al., 2001, Ramain et al., 2001, Hori et al., 2004).



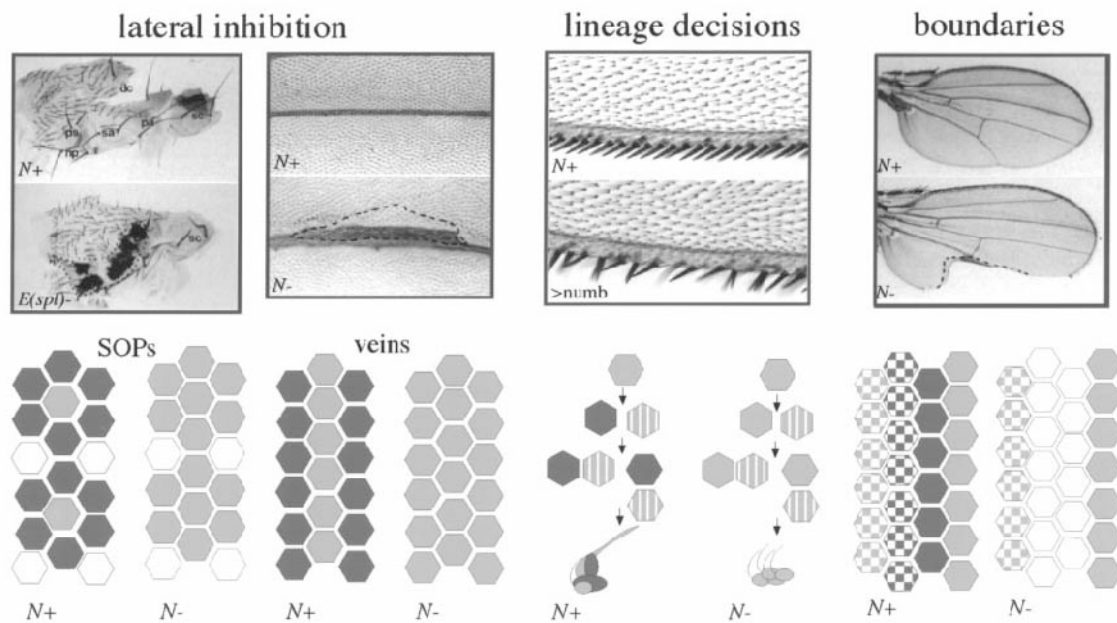
Εικόνα 1.4: Ενεργοποίηση του μονοπατιού N στον πυρήνα

A, B, Γ: Τα γονίδια-στόχοι του μονοπατιού N διατηρούνται “σβησμένα”, όταν απουσιάζει το ενδοκυττάριο τμήμα N^{ic} του υποδοχέα που δρα ως συνενεργοποιητής στον πυρήνα. Έχουν περιγραφεί διαφορετικά σύμπλοκα συγκαταστολέων (ένα στα σπονδυλωτά και δύο στη Δροσόφιλα), τα οποία αλληλεπιδρούν με τον μεταγραφικό παράγοντα της οικογένειας CBF και καταστέλλουν τη μεταγραφή. Όταν το N^{ic} εισέλθει στον πυρήνα, μετά την ενεργοποίηση του μονοπατιού, αλληλεπιδρά με τους CBF μεταγραφικούς παράγοντες και μαζί με το Mam προσελκύει συνενεργοποιητές και ακετυλοτρανσφεράσες που ενεργοποιούν τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του μονοπατιού. (τροποποιημένο από Lai, 2002)

3. ΤΡΟΠΟΙ ΧΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ NOTCH

Ο αριθμός των αναπτυξιακών διαδικασιών που απαιτούν σηματοδότηση μέσω *Notch* αυξάνεται ολοένα, οπότε είναι μάλλον αδύνατο να βρεθεί ένας ιστός για την ανάπτυξη του οποίου σε κάποιο στάδιο δεν απαιτείται η λειτουργία του εν λόγω μονοπατιού. Το σηματοδοτικό μονοπάτι *Notch* δρα και στα τρία βλαστικά στρώματα κατά την διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης της *D. melanogaster*, καθώς επίσης και στη γαμετική σειρά και στους αναπτυξιακούς δίσκους κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της προνύμφης και της νύμφης.

Υπάρχουν τρεις τρόποι με τους οποίους γίνεται χρήση του μονοπατιού N και ενδεικτικά παραδείγματα φαίνονται σχηματικά στην Εικόνα 1.5 (Muskavitch, 1994, Kimble and Simpson, 1997, Bray, 1998, Greenwald, 1998):

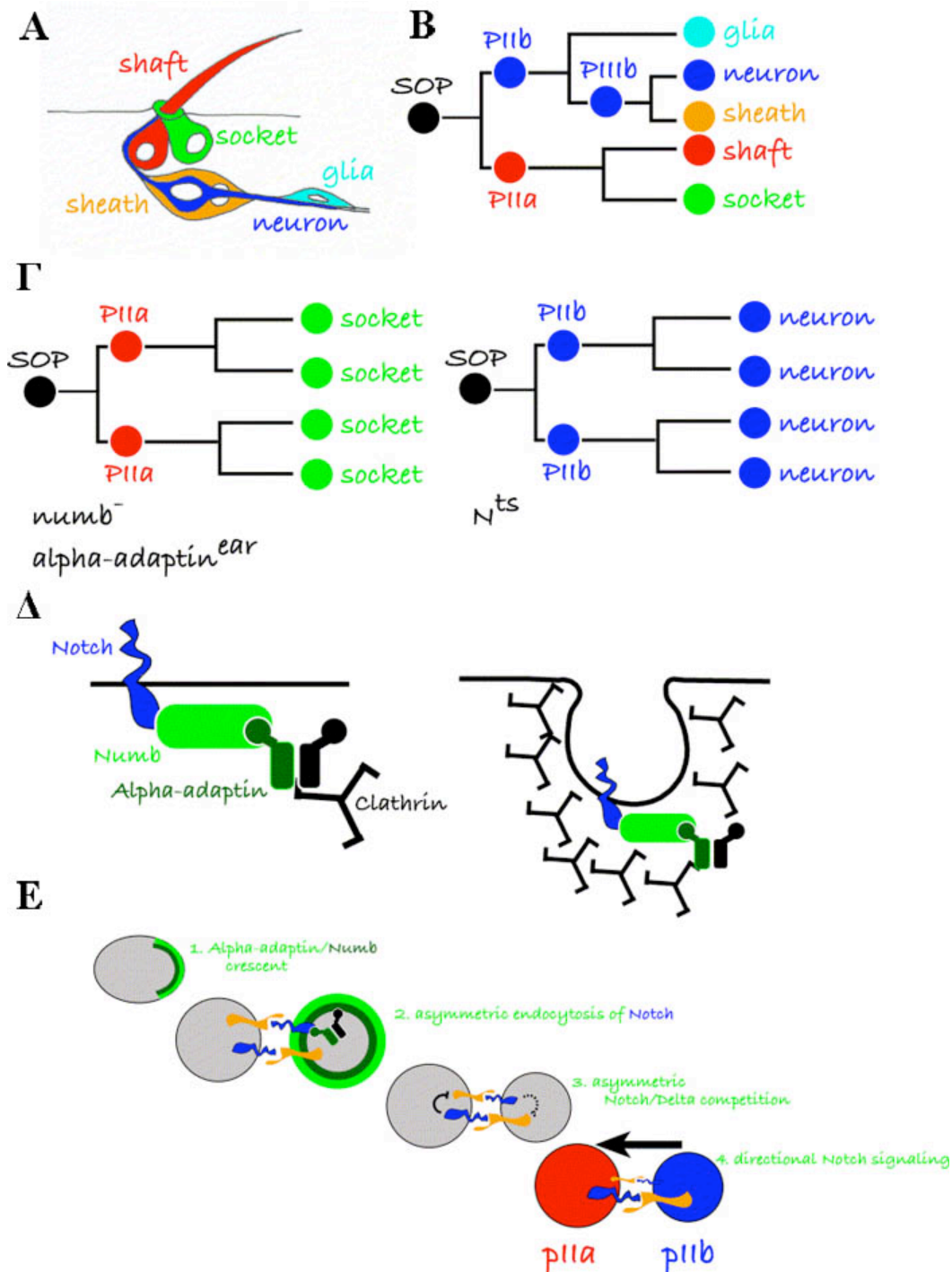


Εικόνα 1.5: Κυτταρικές αποφάσεις που απαιτούν σηματοδότηση N

Η πλευρική αναστολή (κατά τον καθορισμό των κυττάρων ΠΑΟ και κατά την ανάπτυξη των φλεβώσεων), οι αποφάσεις γενεαλογίας (κατά τη διαίρεση των κυττάρων ΠΑΟ) και η δημιουργία ορίων (το περιθώριο του φτερού) είναι οι τρεις τρόποι με τους οποίους χρησιμοποιείται το μονοπάτι N. Όταν το N απουσιάζει ανάλογα με την περίπτωση υπάρχει προβληματική ανάπτυξη.

3.1. Αποφάσεις γενεαλογίας

Στις ασύμμετρες διαιρέσεις των μυϊκών και νευρικών προδρόμων, η ενεργότητα του *Notch* σε ένα από τα δύο θυγατρικά κύτταρα τα οδηγεί στην απόκτηση διαφορετικής αναπτυξιακής τύχης. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση της διαίρεσης του κυττάρου ΠΑΟ (πρόδρομος αισθητηρίου οργάνου), οι ασύμμετρες διαιρέσεις και η μονόπλευρη ενεργοποίηση του μονοπατιού N τελικά θα δώσουν πέντε διαφορετικά κύτταρα (Εικ. 1.6): τη σμήριγγα (shaft), τη θήκη (socket), το γλοιακό κύτταρο (glia), το περίβλημα (sheath) και τον νευρώνα (neuron) (Gho et al., 1999). Όταν λείπει το *Notch*, δημιουργούνται μόνο νευρώνες. Αυτό συμβαίνει, γιατί η σηματοδότηση μέσω *Notch* απαιτείται σε δύο αποφάσεις γενεαλογίας. Καταρχήν, για να διακριθούν τα θυγατρικά κύτταρα Πα και Πβ του ΠΑΟ (αν δεν υπάρχει *Notch*, προκύπτουν μόνο κύτταρα Πβ) και στην συνέχεια για να καθοριστεί ότι το κύτταρο Πβ θα επιτρέψει σε έναν από τους απογόνους του να γίνει γλοιακό (Το κύτταρο Πβ δίνει δύο θυγατρικά κύτταρα: το γλοιακό και το κύτταρο Πββ, το οποίο με τη σειρά του θα διαιρεθεί ασύμμετρα και θα δώσει τον νευρώνα και το περίβλημα). Επιπλέον, το *Notch* απαιτείται για μία τρίτη απόφαση μεταξύ σμήριγγας και θήκης στους απογόνους του κυττάρου Πα (Εικ. 1.6B). Στα παραπάνω εμπλέκεται η ασύμμετρη κληρονόμηση της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης Numb. Η εν λόγω αλληλεπιδρά με το *Notch* και ανταγωνίζεται την ενεργοποίηση της σηματοδότησης. Έτσι, στο θυγατρικό κύτταρο, όπου δεν υπάρχει Numb, το *Notch* είναι λειτουργικό, παρά το γεγονός ότι ο δεσμευτής του εκφράζεται και στα δύο κύτταρα και στα γειτονικά τους (όπως συμβαίνει στους νευροβλάστες). Το Numb είναι μία πρωτεΐνη του ενδοσώματος, που αλληλεπιδρά με την α -Adaptin και κατ'επέκταση με την κλαθρίνη (Santolini et al., 2000, Berdnik et al., 2002), καθώς επίσης και με την διαμεμβρανική πρωτεΐνη Sanpodo (Spdo, O'Connor-Giles et al., 2003). Στο κύτταρο που αποστέλλει το σήμα (κύτταρο Πβ), το Numb σε συνεργασία με την α -Adaptin (Hutterer and Knoblich, 2005) εμποδίζει την τοποθέτηση του Spdo στην πλασματική μεμβράνη, ευνοώντας την ενδοκύττωσή του. Αντίθετα, στο κύτταρο όπου ενεργοποιείται το N (κύτταρο Πα), η πρωτεΐνη Spdo εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη. Για άγνωστο λόγο, οι πρωτεΐνες Numb και Spdo, αν και εκφράζονται ευρύτερα, δεν παίζουν ρόλο σε άλλες διαδικασίες, όπου εμπλέκεται το N.



Εικόνα 1.6: Ο ρόλος του N στις ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις του κυττάρου ΠΑΟ

(A) Το αισθητήριο όργανο (χαίτη) αποτελείται από πέντε κύτταρα: την τρίχα (shaft), τη θήκη (socket), το γλοιακό κύτταρο (glia), το στηρικτικό κύτταρο (sheath) και τον νευρώνα (neuron), τα οποία καθορίζονται από τρεις ασύμμετρες διαιρέσεις του κυττάρου ΠΑΟ (SOP). Το ΠΑΟ διαιρείται και δίνει τα pIIa και pIIb, τα οποία διαιρούνται και δίνουν τη θήκη και την τρίχα και το γλοιακό κύτταρο και το pIIIb, αντίστοιχα. Το pIIIb μετά από μία επιπλέον διαίρεση θα δώσει τον νευρώνα και το στηρικτικό κύτταρο (B). Σε μεταλλάξεις απόλειας λειτουργίας του N, όλα τα κύτταρα γίνονται νευρώνες (Δ), ενώ σε μεταλλάξεις απόλειας λειτουργίας του numb ή της α -adaptin, όλα τα κύτταρα γίνονται θήκη (Γ). Το Numb αλληλεπιδρά με το N και δημιουργεί μία γέφυρα με την α -Adaptin και την κλαθρίνη (E), οπότε προωθείται η ενδοκύττωση του N. Στο (E) φαίνεται η ασύμμετρη τοποθέτηση της πρωτεΐνης Numb στο κύτταρο ΠΑΟ και στους απογόνους του και κατ'επέκταση η κατεύθυνση της σηματοδότησης (από Gonzalez-Gaitan, 2003).

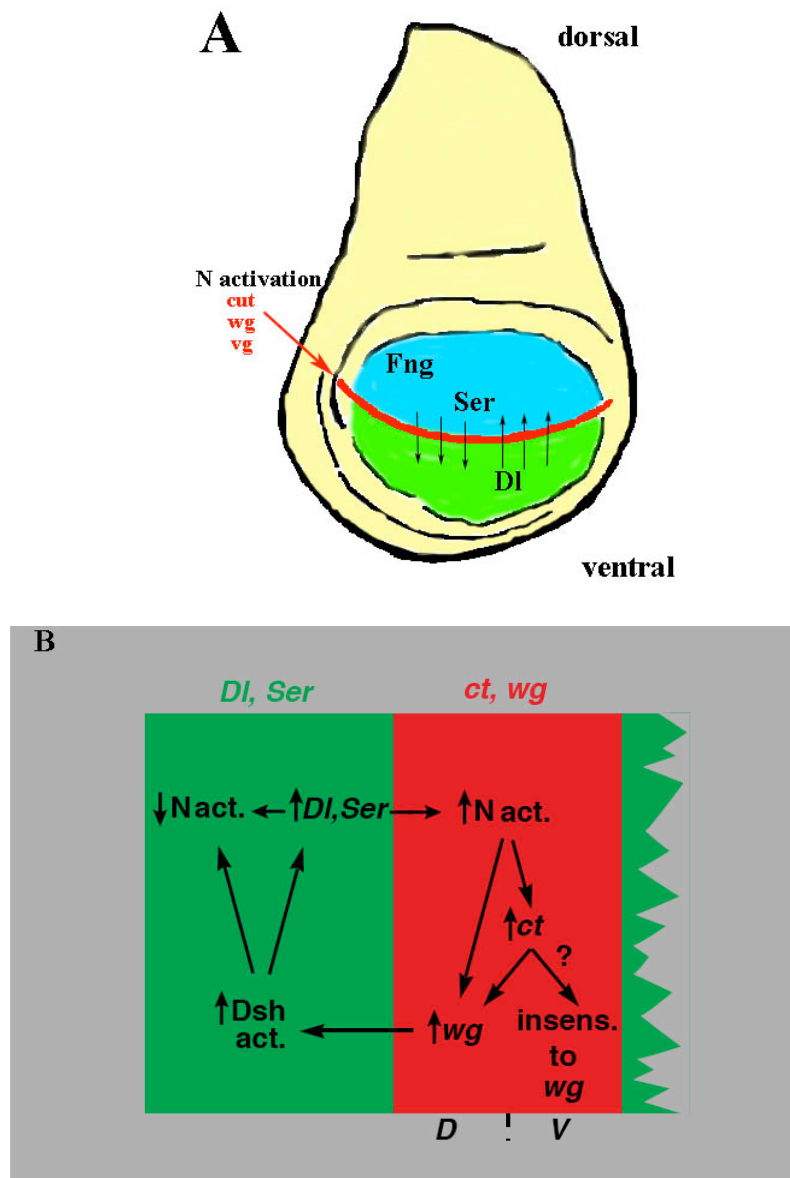
3.2. Αποφάσεις δημιουργίας ορίων

Το χαρακτηριστικότερο παράδειγμα της δράσης του *Notch* στην εγκαθίδρυση ορίων είναι το ραχαιοκοιλιακό όριο του δίσκου του φτερού της Δροσόφιλας. Στην περίπτωση αυτή, το *Notch* ενεργοποιείται στα κύτταρα που βρίσκονται μεταξύ δύο πεδίων κυττάρων: το ραχιαίο και το κοιλιακό πεδίο, και δρα ώστε να μην αναμιχθούν οι δύο πληθυσμοί. Ως αποτέλεσμα της δράσης του, τα κύτταρα του ορίου αποκτούν χαρακτηριστικά "οργανωτικού κέντρου", που είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση της αύξησης και του προτύπου του φτερού στον ραχαιοκοιλιακό άξονα. Για να ενεργοποιηθεί το *Notch* στο ραχαιοκοιλιακό όριο, τα κύτταρα της ραχιαίας πλευράς σηματοδοτούν στα κοιλιακά κύτταρα και το αντίστροφο (Εικ. 1.7Α).

Η διαφοροποίηση των ραχιαίων και κοιλιακών κυττάρων για σηματοδότηση επιτυγχάνεται με την βοήθεια και δράση της πρωτεΐνης Fng (Rauskolb et al., 1999), η οποία εκφράζεται στο ραχιαίο διαμέρισμα και εμποδίζει την ενεργοποίηση του Notch από Serrate (το οποίο απαντά επίσης στο ραχιαίο διαμέρισμα), αλλά ταυτόχρονα υποβοηθά την ενεργοποίηση του Notch από Delta (το οποίο εκφράζεται σε πιο ευρεία περιοχή, αλλά αρχικά ισχυρά στο κοιλιακό διαμέρισμα) (Irvine and Wieshaus, 1995, Irvine, 1999).

Ο τύπος αυτός δράσης του *Notch* έχει τελικά ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός οργανωτικού κέντρου στο ραχαιοκοιλιακό όριο μέσω της έκφρασης γονιδίων-στόχων (wg, vg, cut). Η σηματοδότηση σε αυτήν την περίπτωση ονομάζεται επαγωγική (inductive signaling). Επιπλέον, ένας θετικός μηχανισμός ανάδρασης ενεργοποιείται εκατέρωθεν του ορίου (Εικ. 1.7B), ο οποίος βοηθά την διατήρηση αυτού: τα κύτταρα που λαμβάνουν το σήμα και έχουν υψηλά επίπεδα ενεργού N, ενεργοποιούν με τη σειρά τους τα γειτονικά τους κύτταρα να παράγουν δεσμευτή (DI, Ser). Κατ'αυτό τον τρόπο εκατέρωθεν του ορίου εκφράζονται υψηλά επίπεδα δεσμευτών και με έναν θετικό μηχανισμό ανάδρασης βοηθούν στην διατήρηση του ορίου (de Celis and Bray, 1997, Micchelli et al., 1997).

Άλλα παραδείγματα συμμετοχής του *Notch* στην εγκαθίδρυση ορίων αποτελούν ο ισημερινός στο αναπτυσσόμενο μάτι του εντόμου και οι αρθρώσεις των αναπτυσσόμενων ποδιών (Cho and Choi, 1998, de Celis et al., 1998, Dominguez and de Celis, 1998).



Εικόνα 1.7: Ενεργοποίηση του N κατά τον καθορισμό ορίων

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού N στο ραχιαιοκοιλιακό όριο του φτερού της Δροσόφιλας φαίνεται στην εικόνα. Η κοιλιακά εκφραζόμενη γλυκοζυλτρανσφεράση Fng γλυκοζυλιώνει τις επαναλήψεις EGF του εξωκυττάριου τμήματος του υποδοχέα N. Ο γλυκοζυλιωμένος υποδοχέας αποτελεί καλό υπόστρωμα για αλληλεπίδραση με τον δεσμευτή DI και όχι με τον Ser. Η έκφραση του Ser στο κοιλιακό διαμέρισμα (μαζί με το Fng) επιτρέπει την σηματοδότηση μόνο προς το ραχιαίο διαμέρισμα, όπου δεν υπάρχει γλυκοζυλιωμένο N, ενώ το αντίθετο συμβαίνει με το DI, το οποίο σηματοδοτεί καλύτερα προς το κοιλιακό διαμέρισμα, όπου υπάρχει γλυκοζυλιωμένο N. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού μόνο σε μία λωρίδα κυττάρων στο ραχιαιοκοιλιακό όριο.

Τα κύτταρα που δέχονται το σήμα (κόκκινο) στο ραχιαιοκοιλιακό όριο, ενεργοποιούν *wg*, *vg*, *cut*. Στη συνέχεια, μέσω ενός μηχανισμού ανάδρασης και με τη βοήθεια του Wg, οι δεσμευτές ενεργοποιούνται μεταγραφικά εκατέρωθεν του ορίου (πράσινο) και τα ποσά τους αυξάνουν, ώστε να επανατροφοδοτούν την ενεργοποίηση του N στο ραχιαιοκοιλιακό όριο και να βοηθούν η διατήρησή του. Ο λόγος που οι δεσμευτές δεν ενεργοποιούν το N παράλληλα στην περιοχή έκφρασής τους είναι η αρνητική δράση τους in cis.

(dorsal: ραχιαίο, ventral: κοιλιακό)

3.3. Πλευρική αναστολή

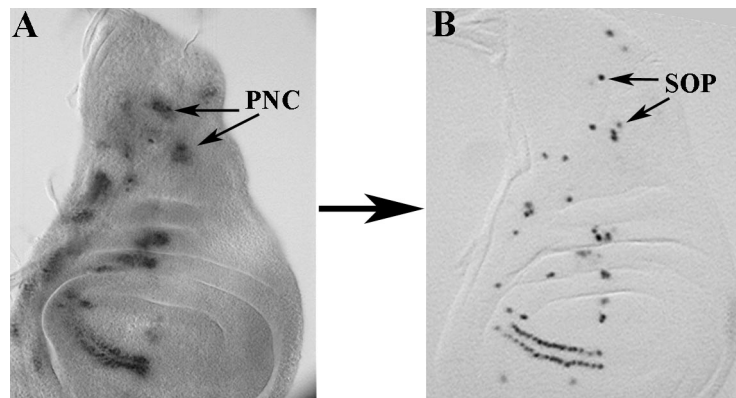
Το κλασικό μοντέλο για την πλευρική αναστολή εξηγεί πως ένα κύτταρο μπορεί να επιλεγεί από μία ομάδα ισοδύναμων πρόδρομων κυττάρων. Υπάρχουν πολλά παραδείγματα όπου το Notch επιτελεί πλευρική αναστολή.

Ένα πολύ καλά μελετημένο παράδειγμα στη Δροσόφιλα είναι η επιλογή του πρόδρομου κυττάρου των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων (ΠΑΟ). Κάθε ΠΑΟ δημιουργείται από μία ομάδα ισοδύναμων πρόδρομων προνευρικών κυττάρων και αν η σηματοδότηση μέσω Notch είναι μη λειτουργική πολλά κύτταρα αποκτούν την αναπτυξιακή τύχη του ΠΑΟ. Τα ισοδύναμα αυτά κύτταρα ορίζουν τον προνευρικό συναθροισμό (Proneural Cluster: PNC) και εκφράζουν τις προνευρικές πρωτεΐνες του συμπλόκου Achaete-Scute (ASc Complex), οι οποίες ενεργοποιούν την έκφραση των δεσμευτών του N. Σύμφωνα με το παραπάνω μοντέλο, όλα τα κύτταρα αρχικά εκφράζουν τόσο δεσμευτή όσο και υποδοχέα και έχουν την ικανότητα να σηματοδοτούν το ένα στο άλλο (Εικ. 1.8). Όμως, μια μικρή διαφορά που δημιουργείται μεταξύ των κυττάρων κάποια χρονική στιγμή ενισχύεται και γίνεται μόνιμη μέσω ενός μηχανισμού ανάδρασης. Έχει προταθεί ότι η μεταγραφική ρύθμιση του *Dl* από το N είναι η βάση της πλευρικής αναστολής (βλέπε “Αποτελέσματα” για νέο μοντέλο, που αντιτίθεται στο παραπάνω): αν το *N* ενεργοποιηθεί λίγο περισσότερο σε κάποιο κύτταρο, τα επίπεδα του *Dl* σε αυτό θα ελαττωθούν εξαιτίας της μεταγραφικής καταστολής από τις πρωτεΐνες του συμπλόκου E(spl) (Cubas et al., 1991, Culi and Modolell, 1998), και θα γίνει λιγότερο ικανό να σηματοδοτήσει στα γειτονικά του. Εφόσον το *N* σε αυτήν την περίπτωση έχει ανασταλτικό αποτέλεσμα στην κυτταρική τύχη, το μεμονωμένο κύτταρο που θα επιλεγεί ως η πηγή του σήματος είναι το μόνο που θα γλιτώσει από την αναστολή (Heitzler and Simpson, 1991, Koran and Turner, 1996, Heitzler et al., 1996).

Το παραπάνω μοντέλο εξηγεί ικανοποιητικά την δημιουργία ομοιόμορφα κατανομημένων δομών από ένα πεδίο, όπως η δημιουργία των νευροβλαστών στο έμβρυο, των μικροχαιτών στον θώρακα της *D.melanogaster* και ο καθορισμός των μυοβλαστών. Όμως, υπάρχουν πολλά παραδείγματα πλευρικής αναστολής, όπου η επιλογή των προδρόμων δεν είναι εντελώς τυχαία. Στην περίπτωση αυτή εμπίπτουν οι μακροχάιτες του εντόμου, που πάντα βρίσκονται στις ίδιες θέσεις (Εικ. 1.9) και η ανάπτυξη των φλεβώσεων του φτερού.

Στην περίπτωση των φλεβώσεων του φτερού, η ασυμμετρία προέρχεται από την αρχική τοποθέτηση των μορίων των δεσμευτών και του υποδοχέα σε διαφορετικούς γειτονικούς πληθυσμούς κυττάρων (Εικ. 1.5). Συγκεκριμένα, οι δεσμευτές εκφράζονται στις περιοχές των φλεβώσεων και το N στα μεσοφλέβια διαστήματα. Αυτή η διάταξη έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού στα σημεία όπου κύτταρα που εκφράζουν δεσμευτή γειτνιάζουν

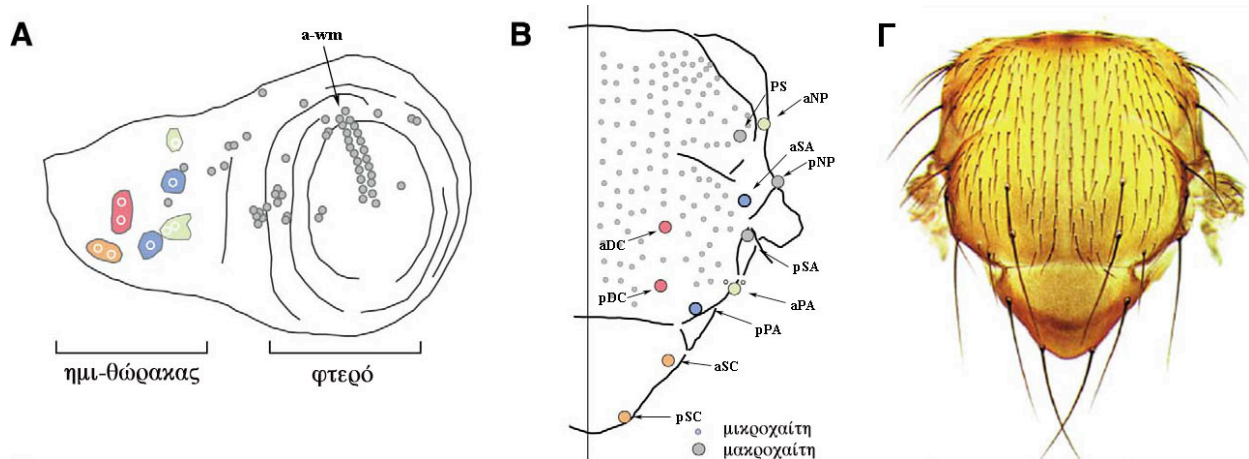
με κύτταρα που εκφράζουν υποδοχέα. Στη συνέχεια, μέσω μηχανισμού θετικής ανάδρασης η διαφοροποίηση των κυττάρων εγκαθιδρύεται (Huppert et al., 1997).



Εικόνα 1.8: Πλευρική αναστολή κατά τον καθορισμό των κυττάρων ΠΑΟ

Τα κύτταρα των προνευρικών συναθροισμών του δίσκου του φτερού της Δροσόφιλας είναι αρχικά ισοδύναμα και εκφράζουν την προνευρική πρωτεΐνη Ac (A). Το κύτταρο που τελικά αποκτά την τύχη του ΠΑΟ εκφράζει μεγαλύτερα ποσά προνευρικών πρωτεϊνών και ακολούθως εκφράζει Neur (B).

(PNC: Proneural Cluster, προνευρικός συναθροισμός, SOP: Sensory organ precursor, ΠΑΟ)



Εικόνα 1.9: Πλευρική αναστολή στο φτερό και στο θώρακα

(A) Σχηματική απεικόνιση των κυττάρων ΠΑΟ του δίσκου του φτερού σε προνύμφη Δροσόφιλας τρίτου σταδίου. Φαίνονται οι περιοχές που θα δώσουν τις μακροχαίτες του θώρακα και του εμπρόσθιου περιθωρίου του φτερού.

(B) Σχηματική απεικόνιση του θώρακα νύμφης/ενηλίκου Δροσόφιλας. Κάθε κύκλος αντιστοιχεί σε αισθητήριο όργανο (μικροχαίτες και μακροχαίτες). Οι μακροχαίτες απεικονίζονται με τα ίδια χρώματα στα A και B.

(Gamma) Θώρακας ενηλίκου ατόμου Δροσόφιλας, όπου φαίνεται η διάταξη των αισθητηρίων οργάνων.

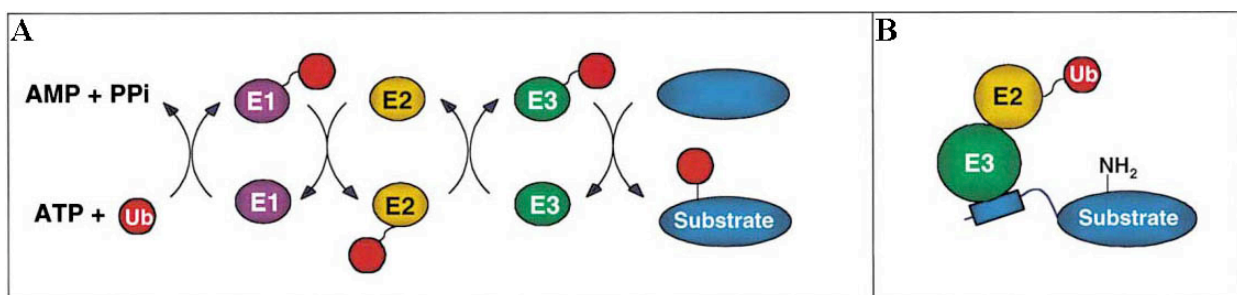
SC: scutelar, DC: dorsocentral, PA: postalar, NP: notopleural, SA: supra-alar, PS: presutural

a: anterior, p: posterior, a-wm: anterior wing margin

4. ΟΥΒΙΚΟΥΪΤΙΝΥΛΙΩΣΗ

Η ουβικουΐτινη είναι ένα εξαιρετικά συντηρημένο πολυπεπτίδιο μεγέθους 76 αμινοξέων, που παίζει ρόλο σε μία πλειάδα κυτταρικών διαδικασιών. Για ιστορικούς λόγους, η ουβικουΐτινη συσχετίζεται άμεσα με την αποικοδόμηση πρωτεϊνών, οι οποίες είναι μη λειτουργικές ή μεταλλαγμένες ή έχουν περιορισμένο χρόνο ζωής, όπως π.χ κυκλίνες και μεταγραφικοί παράγοντες. Αυτό επιτυγχάνεται καθώς το πολυπεπτίδιο της ουβικουΐτινης λειτουργεί ως σινιάλο αναγνώρισης από το πρωτεάσωμα 26S, όπου επιτελείται η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών (Hershko and Ciechanover, 1998, Hicke, 1999, Ciechanover et al., 2000). Εκτός από κυτταροπλασματικούς και πυρηνικούς παράγοντες, κι άλλες πρωτεΐνες ρυθμίζονται μέσω ουβικουΐτινυλίωσης: πχ πρωτεΐνες του ενδοπλασματικού δικτύου, που δεν έχουν αναδιπλωθεί σωστά, ουβικουΐτινυλιώνονται, μεταφέρονται στο πρωτεάσωμα και αποικοδομούνται στο κυτταρόπλασμα ή στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης.

Η ουβικουΐτινη συνδέεται ομοιοπολικά με το υπόστρωμα και ένας πεπτιδικός δεσμός δημιουργείται μεταξύ της καρβοξυτελικής γλυκίνης αυτής με την ε-αμινομάδα καταλοίπων λυσίνης του υποστρώματος. Η ουβικουΐτινυλίωση των πρωτεϊνών απαιτεί την δράση δύο ή τριών ενζύμων. Αρχικά, η ουβικουΐτινη ενεργοποιείται με την δημιουργία ενός θειεστρικού δεσμού υψηλής ενέργειας με κατάλοιπο κυστεΐνης ενός ενεργοποιητικού ενζύμου (E1). Στην συνέχεια, η ουβικουΐτινη μεταφέρεται σε κυστεΐνη ενός συζευκτικού ενζύμου (E2) και μετά ακολουθεί η πρόσδεση με την πρωτεΐνη-υπόστρωμα, που επιτελείται με την αρωγή μίας πρωτεϊνικής λιγάσης (E3). Συνήθως γίνεται πολυουβικουΐτινυλίωση των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων με χρήση του καταλοίπου K48 της ουβικουΐτινης, που καταλήγει σε αποικοδόμησή τους στο πρωτεάσωμα (Ciechanover et al., 2000).



Εικόνα 1.10: Μηχανισμός της ουβικουΐτινυλίωσης.

Η διαδικασία της πρόσδεσης ενός μορίου ουβικουΐτινης σε μία πρωτεΐνη-υπόστρωμα είναι μία διαδικασία τριών σταδίων. Σε πρώτη φάση, η ουβικουΐτινη ενεργοποιείται με την πρόσδεση σε κατάλοιπο κυστεΐνης του ενεργοποιητικού ενζύμου E1 (δημιουργία θειεστρικού δεσμού υψηλής ενέργειας). Στη συνέχεια, μεταφέρεται σε κυστεΐνη του συζευκτικού ενζύμου E2 και ακολούθως γίνεται η πρόσδεση στην πρωτεΐνη-υπόστρωμα με τη βοήθεια του ενζύμου E3. Η πρωτεϊνική λιγάση E3 μπορεί είτε να προσδένεται με την ουβικουΐτινη και να τη μεταφέρει στο υπόστρωμα (A), είτε να λειτουργεί ως γέφυρα αλληλεπιδρώντας με το υπόστρωμα και με την E2 (B). Η E3 είναι το ένζυμο που δίνει την ειδικότητα στη διαδικασία.

4.1. Δάκτυλος Zn-Ring και ουβικουΐτινη

Ο δάκτυλος RING (πήρε το όνομα του από την ανθρώπινη πρωτεΐνη RING1: Really Interesting New Gene, στην οποία πρωτοεντοπίστηκε) είναι ένα μικρό πρωτεϊνικό μοτίβο που προσδένει ψευδάργυρο και απαντάται σε πολλές δομικά διαφορετικές πρωτεΐνες ευκαρυωτών (δεν υπάρχει σε προκαρύωτες), που εμπλέκονται σε ποικιλία διαδικασιών και στις οποίες αρχικά δεν είχε αποδοθεί κάποια κοινή λειτουργία. Η δυσκολία ήταν ακόμα μεγαλύτερη, καθώς πρωτεΐνες με RING εντοπίζονταν τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα και η βιοχημεία τους είναι δύσκολη καθώς έχουν την τάση να δημιουργούν συσσωματώματα (Borden, 2000).

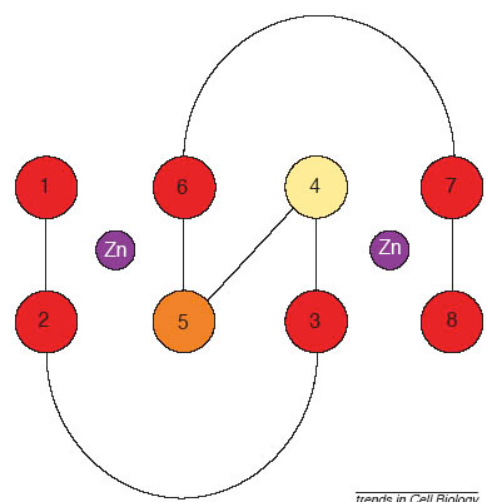
Η συντηρημένη αμινοξική αλληλουχία που ορίζει τον δάκτυλο ψευδαργύρου RING είναι η εξής: CysX₂CysX₉₋₃₉CysX₁₋₃HisX₂₋₃Cys/HisX₂CysX₄₋₄₈CysX₂Cys.

Υπάρχουν όμως και παραλλαγές, οι οποίες κυρίως αφορούν τα κατάλοιπα κυστεΐνης και ιστιδίνης που προσδένουν το μέταλλο. Συνήθως, ο δάκτυλος εντοπίζεται στο αμινοτελικό ή καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης.

Νεότερες μελέτες δείχνουν ότι ο δάκτυλος RING μπορεί να αλληλεπιδρά με συζευκτικά ένζυμα ουβικουΐτινης E2, να προωθεί ουβικουΐτινυλίωση και να λειτουργεί ως πρωτεϊνική λιγάση E3 (Freemont, 2000). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα πρωτεΐνης με RING, η οποία παίζει ρόλο πρωτεϊνικής λιγάσης E3, είναι το *cbl-2*, το οποίο ρυθμίζει την σηματοδότηση μέσω μεμβρανικών υποδοχέων τυροσίνης, όπως αυτοί των EGF, PDGF και CSF-1 (Joazeiro et al., 1999, Joazeiro and Weissman, 2000).

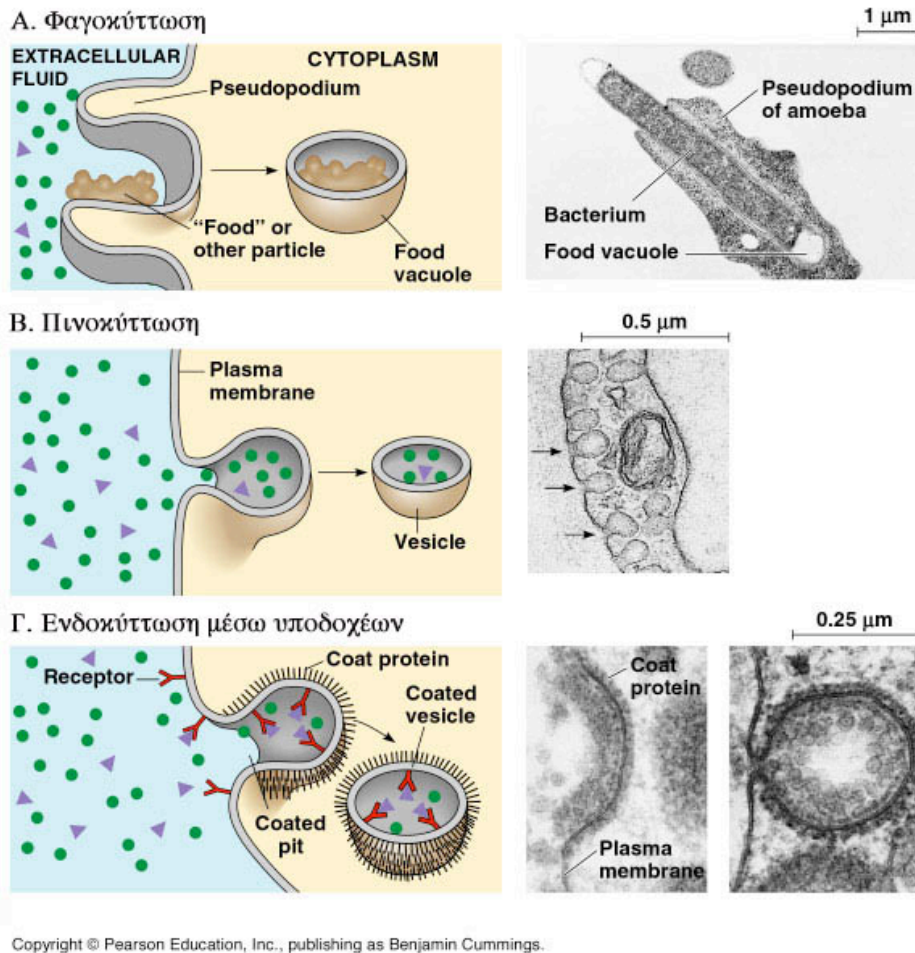
Εικόνα 1.11: Η δομή του δακτύλου Zn-RING

Τα αριθμημένα αμινοξέα είναι αυτά που συντονίζουν τα άτομα του ψευδάργυρου (με μοβ). Το κίτρινο (4) αντιστοιχεί σε ιστιδίνη, ενώ τα υπόλοιπα (1-3 και 5-8) είναι κυστεΐνες σε δακτύλους τύπου C3HC4.



5. ΕΝΔΟΚΥΤΤΩΣΗ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η ενδοκύττωση είναι ο μηχανισμός της ενσωμάτωσης μορίων από το εξωκυττάριο περιβάλλον μέσα στο κύτταρο και διακρίνεται σε τρεις τύπους ανάλογα με το μέγεθος και το είδος των μορίων που ενσωματώνονται (Εικ. 1.12)



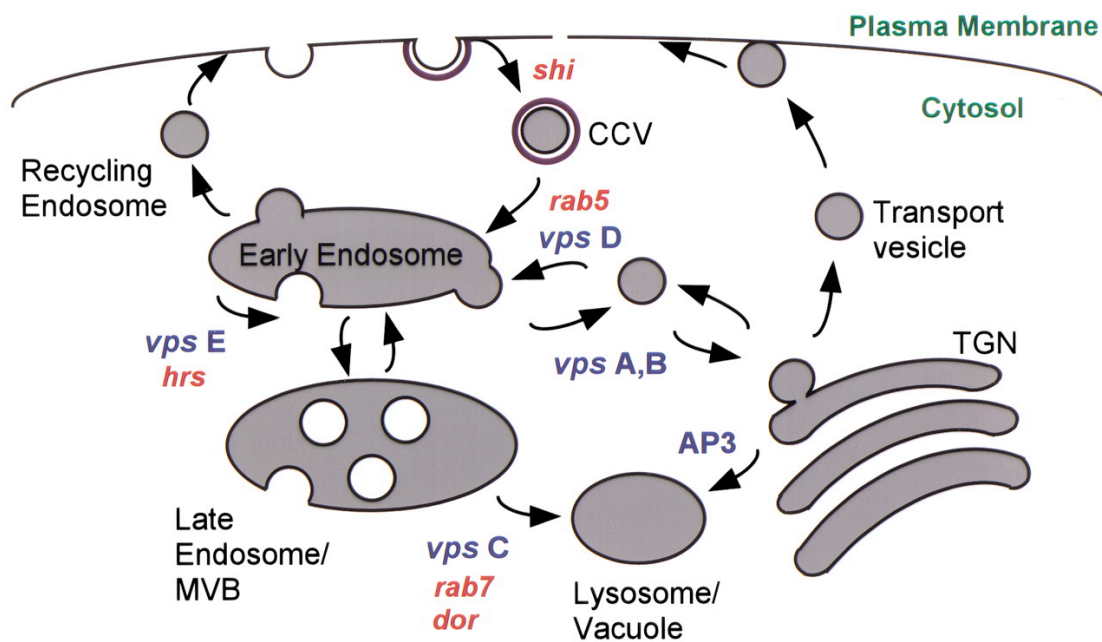
Εικόνα 1.12: Ενδοκύττωση

Η ενδοκύττωση διακρίνεται σε τρεις τύπους: Α) φαγοκύττωση, οπότε μεγάλου μεγέθους μόρια (τροφή) ή ακόμη και μικροοργανισμοί ενδοκυττώνονται, Β) Πινοκύττωση, οπότε μικρομόρια εισέρχονται μέσα στο κύτταρο και Γ) ενδοκύττωση μέσω μεμβρανικών υποδοχέων, οπότε τα μόρια που ενδοκυττώνονται αναγνωρίζονται από επιφανειακούς υποδοχείς, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με την κλαθρίνη.

Η σηματοδότηση από πολλούς επιφανειακούς υποδοχείς είναι στενά συνδεδεμένη με μεμβρανική διακίνηση. Για πολλά χρόνια πιστεύετο ότι η ενδοκύττωση των υποδοχέων σχετίζεται με την απενεργοποίηση του μονοπατιού και την αποικοδόμηση. Πράγματι η ενδοκύττωση ρυθμίζει τα επίπεδα υποδοχέων και διαμεμβρανικών δεσμευτών και μπορεί επίσης να οδηγήσει σε λυσοσωμική καταστροφή τους. Την τελευταία δεκαετία εντατική έρευνα έχει δείξει ότι η ενδοκύττωση και κυτταρική διακίνηση των μεμβρανικών υποδοχέων και των δεσμευτών τους μπορεί να οδηγήσει σε σηματοδοτική ενεργοποίηση, είτε γιατί με τον τρόπο

αυτό ο υποδοχέας φτάνει σε κάποιο κυτταρικό διαμέρισμα για να αλληλεπιδράσει με τα μόρια που θα μεταφέρουν το σήμα είτε γιατί οι δεσμευτές μπορούν να ενεργοποιηθούν και να διακινηθούν μεταξύ των κυττάρων.

Το μονοπάτι της ενδοκύττωσης για μεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως έχει διαμορφωθεί μέχρι σήμερα φαίνεται σχηματικά στην εικόνα 1.13 και περιγράφεται συνοπτικά παρακάτω.



Εικόνα 1.13: Ενδοκύττωση μεμβρανικών πρωτεϊνών

Στην εικόνα φαίνονται σχηματικά τα μόρια που εμπλέκονται στην ενδοκύττωση μεμβρανικών πρωτεϊνών και οι διαφορετικές πορείες που ακολουθούνται μετά την ενσωμάτωση. Με κόκκινο και με μπλε σημειώνονται οι πρωτεΐνες της Δροσόφιλας και του σακχαρομύκητα, αντίστοιχα, που συμμετέχουν στη διαδικασία.

Μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη στοχεύεται για ενδοκύττωση, αν έχει κάποιο σήμα πχ. ένα μόριο ουβικουϊτίνης σε κάποιο κατάλοιπο λυσίνης του ενδοκυτταρικού της τμήματος (δες 5.1). Η εν λόγω πρωτεΐνη θα αλληλεπιδράσει στη συνέχεια με τον ενδοκυττωτικό μηχανισμό και θα δημιουργηθεί το πρώτο καλυμμένο εγκόλπωμα (coated pit), το οποίο καλύπτεται από κλαθρίνη. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια της GTPάσης δυναμίνης (*shibire* στη Δροσόφιλα) θα δημιουργηθεί το καλυμμένο με κλαθρίνη κυστίδιο (coated vesicle). Από το πρώτο ενδόσωμα και με τη δράση σειράς GTPασών που χρειάζονται για την δημιουργία των οψιμότερων ενδοσωμικών κυστιδίων, η πρωτεΐνη θα φτάσει το πολυκυστιδιακό σωματίο (MVB: Multi Vesicular Body). Στα διαμερίσματα αυτού, η πρωτεΐνη θα τροποποιηθεί και θα οδηγηθεί στο λυσόσωμα (για αποικοδόμηση) ή στο ανακυκλωτικό ενδόσωμα (για επαναφορά στην πλασματική μεμβράνη). Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες δεν αποικοδομούνται στο πρωτεάσωμα.

5.1. Ουβικουϊτινυλίωση και Ενδοκύττωση

Η ουβικουϊτίνη δεν στοχεύει μόνο κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, αλλά και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως είναι οι υποδοχείς εξωκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών. Σ' αυτήν την περίπτωση όμως, οι πρωτεΐνες οδηγούνται στο λυσόσωμα για αποικοδόμηση. Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι εκτός από σινιάλο για ενδοκύττωση, η ουβικουϊτινυλίωση χρησιμοποιείται από τα κύτταρα και για την στόχευση στο κατάλληλο υποκυτταρικό διαμέρισμα, πχ έχειδειχθεί ότι ουβικουϊτινυλιωμένες πρωτεΐνες στοχεύονται σε διαφορετικά μετά-ενδοσωμικά κυστίδια, όπως τα πολυκυστιδιακά σωματίδια και μάλιστα σε διαφορετικά διαμερίσματα αυτών (Hicke and Dunn, 2003).

Ο ρόλος της ουβικουϊτινυλίωσης πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης άρχισε να διαλευκάνεται την τελευταία πενταετία. Έχει βρεθεί ότι η πρόσδεση της ουβικουϊτίνης σε έναν μεμβρανικό υποδοχέα δεν οδηγεί απαραίτητα σε αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα, αλλά σε ενδοκύττωση αυτού (Hicke, 1999). Η συσχέτιση ουβικουϊτινυλίωσης πρωτεϊνών και ενδοκύττωσης προήλθε από πειράματα στον *Sacchromyces cerevisiae*, όπου ένας διαμεμβρανικός μεταφορέας πεπτιδίων, ο STE6, παρουσιαζόταν ως μία κλίμακα ισομορφών υψηλού μοριακού βάρους σε μεταλλαγμένα στελέχη, τα οποία δεν είχαν την ικανότητα να επιτελούν ενδοκύττωση. Αποδείχθηκε ότι οι ισομορφές αυτές του μεταφορέα STE6 ήταν ουβικουϊτινυλιωμένες.

Με την πάροδο των χρόνων όλο και μεγαλύτερος αριθμός πρωτεϊνών που υφίστανται ρύθμιση μέσω ουβικουϊτινυλίωσης γίνεται γνωστός και όσο περνάει ο καιρός γνωρίζουμε όλο και περισσότερα ένζυμα που συμμετέχουν στη διαδικασία. Τα ευκαρυωτικά γονιδιώματα κωδικοποιούν μία ή μερικές E1. Υπάρχουν αρκετές E2, τουλάχιστον 11 στον *S. cerevisiae* και πάνω από 20 έχουν εντοπιστεί στα θηλαστικά. Ωστόσο, η ποικιλία και ο αριθμός των πρωτεϊνών που ρυθμίζονται με ουβικουϊτινυλίωση, προβλέπει ότι υπάρχουν πολλές E3 λιγάσες (Joazeiro and Weissman, 2000, Jackson et al., 2000).

5.2. Ενδοκύττωση και σηματοδότηση N

Όπως έγινε φανερό από τα κεφάλαια 1 και 2, η σηματοδότηση από τον μεμβρανικό υποδοχέα N ρυθμίζεται σε πολλά επίπεδα. Η πρώτη ένδειξη ότι η ενδοκύττωση παίζει ρόλο κλειδί στο σηματοδοτικό μονοπάτι N ήρθε με την ανάλυση της θερμοευαίσθητης μεταλλαγής *shibire*, η οποία κωδικοποιεί τη GTPase δυναμίνη και είναι απαραίτητη για την αποκοπή των καλυμμένων με κλαθρίνη κυστιδίων του πρώιμου ενδοσώματος. Έμβρυα που φέρουν την εν λόγω μεταλλαγή, όταν αναπτυχθούν στην περιοριστική θερμοκρασία παρουσιάζουν νευρογόνο φαινότυπο (Poodyry, 1990). Παρά το γεγονός ότι τα καλυμμένα εγκολπώματα σχηματίζονται

κανονικά σε αυτό το μετάλλαγμα, δεν καταφέρνουν να αποκοπούν και να δημιουργήσουν τα καλυμμένα κυστίδια. Κι ενώ η συσχέτιση της λειτουργίας του μονοπατιού N με την ενδοκύττωση είναι προφανής, ανάλυση μιτωτικών κλώνων απώλειας λειτουργίας της δυναμίνης δεν αποσαφήνισε αν η ενδοκύττωση είναι απαραίτητη για το κύτταρο που αποστέλλει ή δέχεται το σήμα: φαίνεται ότι η ενδοκύττωση είναι απαραίτητη και στα δύο κύτταρα (Seugnet et al., 1997).

Επιπλέον, εκτός από την παρουσία διακριτών ισομορφών της πρωτεΐνης Delta σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (Klueg et al., 1998), παρουσιάζεται ποικιλομορφία και στον κυτταρικό εντοπισμό αυτής σε έμβρυα και προνύμφες *D.melanogaster*. Παρά το γεγονός ότι η λειτουργική για σηματοδότηση πρωτεΐνη D1, εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη, όπου αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα της στο γειτονικό κύτταρο, έχει εντοπιστεί και κάποια μορφή της στο κυτταρόπλασμα συσσωρευμένη μέσα σε ενδοκυττωτικά κυστίδια (Klueg et al., 1998, Klueg and Muskavitch, 1999, Parks et al., 2000). Επειδή η παρουσία των κυστιδίων συμπίπτει χρονικά με περιόδους σηματοδότησης (Kooch et al., 1993) μπορεί να υποθεθεί ότι το κυστιδιακό D1 προέρχεται από ενδοκύττωση που ρυθμίζει τα επίπεδα της ενεργούς μεμβρανικής πρωτεΐνης. Επιπλέον, με πειράματα παροδικών διαμολύνσεων και συγκόλληση κυττάρων σε καλλιέργεια, δείχθηκε ότι το D1 (πλήρους μεγέθους) ενδοκυττώνεται σε κύτταρα που εκφράζουν Notch (και η διαδικασία αυτή δεν απαιτεί την παρουσία του ενδοκυττάριου τμήματος του δεσμευτή) και ο υποδοχέας με τη σειρά του εντοπίζεται μέσα στο κυτταρόπλασμα κυττάρων που εκφράζουν D1 (Klueg et al., 1998). Ο εντοπισμός του D1 μαζί με το Notch μέσα σε ενδοκυττωτικά κυστίδια έχει συσχετισθεί με περαιτέρω ενεργοποίηση του μονοπατιού. Η απομάκρυνση του εξωκυττάριου τμήματος του υποδοχέα από την κυτταρική μεμβράνη (ίσως μετά από αλληλεπίδραση με το D1 και ενδοκύττωση) είναι απαραίτητη για την πρωτεόλυση από το σύμπλοκο της γ-σεκρετάσης και την μετακίνηση του ενεργού ενδοκυττάριου τμήματος του υποδοχέα, Nic, στον πυρήνα (Parks et al., 2000).

6. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *neuralized*

Το γονίδιο *neuralized* (*neur*) της *D. melanogaster* κλωνοποιήθηκε πριν από δύο περίπου δεκαετίες ως ένα από τα έξι ζυγωτικά νευρογόνα γονίδια [*Notch* (*N*), *Delta* (*DI*), *Enhancer of split* [*E(spl)*], *neuralized* (*neur*), *mastermind* (*mam*) και *big brain* (*bib*)], των οποίων η δράση απαιτείται για να λάβει χώρα η N-εξαρτώμενη πλευρική αναστολή στο έμβρυο. Χαρτογραφείται στην θέση 85C στο δεξί σκέλος του 3ου χρωμοσώματος. Το cDNA του έχει μέγεθος περίπου 4kb και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που αποτελείται από 754 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 83kDa, και ο ρόλος στην ανάπτυξη του εντόμου ήταν μέχρι πρόσφατα άγνωστος (Εικ. 1.14).

Το γονίδιο κλωνοποιήθηκε δύο ανεξάρτητες φορές (Boulianne et al., 1993, Price et al., 1993) και το πρότυπο έκφρασης του μεταγράφου του εντοπίστηκε με την τεχνική *in situ*. Απαντά σε δύο μετάγραφα 4.1 και 3.7kb, που προκύπτουν από διαφορετική χρήση σημάτων πολυαδενυλιώσης και δύο εναλλακτικών 5' εξονίων (Price et al., 1993, Δελιδάκης Χ. και Μπαούσης Β., αδημοσίευτα αποτελέσματα) και παρουσιάζουν ισχυρότερη έκφραση στις ώρες 3-9 της εμβρυογένεσης της *D. melanogaster*. Εκφράζεται σε πλειάδα κυτταρικών ομάδων κατά την εμβρυογένεση και κατά την ανάπτυξη του εντόμου στα στάδια της προνύμφης.

Εν περιλήψει, κατά την διάρκεια της εμβρυογένεσης, το *neur* εκφράζεται στο εκτόδερμα και στο μεσόδερμα/μεσεκτόδερμα. Κατά την διάρκεια της έντονης έκφρασης (3-9 ώρες της εμβρυογένεσης), το μετάγραφο του εντοπίζεται σε επιδερμικά κύτταρα και νευροβλάστες. Η έκφραση αυτή συμπίπτει με την περίοδο που γίνεται ο διαχωρισμός νευροβλαστών και προδρόμων των αισθητηρίων οργάνων (Boulianne et al., 1993, Price et al., 1993) και η έκφραση του *neur* στους νευροβλάστες παραμένει. Η σημασία του *neur* κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη του εντόμου υποδεικνύεται από τον ισχυρά νευρογόνο φανότυπο που εκδηλώνεται κατά την έλλειψη του γονιδίου.

Το *neur* απαιτείται και κατά την ανάπτυξη του περιφερικού νευρικού συστήματος του ενηλίκου. Συγκεκριμένα, σε αναπτυξιακούς δίσκους του φτερού, το *neur* εκφράζεται σε όλα τα πρόδρομα κύτταρα των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων (μακροχαίτες/ μικροχαίτες του θώρακα και των κοιλιακών και ραχιαίων αισθητηρίων οργάνων του περιθωρίου του φτερού). Επιπλέον, εκφράζεται στις πρόδρομες φλεβώσεις του φτερού κατά το νυμφικό στάδιο, αλλά δεν απαιτείται εκεί (βλέπε “Αποτελέσματα” Εικ. 3.1).

Στους αναπτυξιακούς δίσκους του ποδιού, το μετάγραφο του ενεργοποιείται εκτός από τα κύτταρα ΠΑΟ και σε συναθροισμούς κυττάρων που θα δώσουν τα χορδοτονικά όργανα, καθώς επίσης και στις αρθρώσεις του ποδιού (βλέπε “Αποτελέσματα” Εικ. 3.1). Σε δίσκους αντέννας προηγείται της δημιουργίας του οργάνου Johnston. Στον δίσκο του ματιού εκφράζεται ισχυρά σε όλα τα διαφοροποιούμενα κύτταρα στο οπίσθιο τμήμα της μορφογενετικής αύλακας και

ασθενέστερα στους “ενδιάμεσους προνευρικούς συναθροισμούς” μπροστά από τη μορφογενετική αύλακα (Boulianne et al., 1993).

Τα δομικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης Neuralized, που προκύπτουν από *in silico* μελέτη φαίνονται σχηματικά στην εικόνα 1.14, και είναι τα ακόλουθα:

- Μία αλληλουχία δακτύλου Zn-RING τύπου C₃HC₄ στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου στην θέση 701-742aa (Price et al., 1993).
- Δύο εσωτερικές επαναλήψεις στις θέσεις 109-250aa και 371-513aa (επαναλήψεις *neuZ*), οι οποίες δεν παρουσιάζουν ομολογία με αλληλουχίες άλλων γνωστών πρωτεϊνικών μορίων, αλλά είναι αρκετά συντηρημένες ανάμεσα στα ομόλογα *neur* (Yeh et al., 2001).

Εκτός από το *neur* της *D.melanogaster*, έχουν κλωνοποιηθεί ομόλογα του γονιδίου σε άλλα έντομα, τόσο της οικογένειας των Drosophilidae όσο και στο κουνούπι *Anopheles gambiae*, στη μέλισσα *Apis mellifera* και επιπλέον, στον άνθρωπο (Nakamura et al., 1998), στον ποντικό (Pavlopoulos et al., 2002) και στον νηματώδη *C.elegans* (Wilson et al., 1994). Η μεγαλύτερη ομολογία ανάμεσα στο *neur* της *D.melanogaster* και στα ομόλογά του παρουσιάζεται στην περιοχή που χαρακτηρίζεται από το πρωτεϊνικό πρότυπο του RING.

Η έκφραση του ομολόγου στον ποντικό συμπίπτει, όπως και στη Δροσόφιλα, με περιοχές ενεργοποίησης του μονοπατιού N (Pavlopoulos et al., 2002). Απενεργοποίηση του γονιδίου στον ποντικό (knock-out) -από δύο διαφορετικά εργαστήρια- οδήγησε σε πλειοτροπικούς φαινοτύπους, όπως ευαισθησία στην αιθανόλη (Ruan et al., 2001) και βλάβη στην κινητικότητα του σπέρματος (Vollrath et al., 2001), οι οποίοι υποδηλώνουν ότι υπάρχουν δύο ομόλογα του γονιδίου *neur* στον εν λόγω οργανισμό.

Ο δάκτυλος Zn-RING του γονιδίου *neur* της *D. melanogaster* παρουσιάζει υψηλή συντήρηση μεταξύ των ομολόγων του σε άλλα είδη και του γονιδίου *cbl-2* των θηλαστικών, άρα υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να λειτουργεί και το *neur*, ως λιγάση ουβικουϊτίνης E3, ρυθμίζοντας τα επίπεδα του υποδοχέα N ή των δεσμευτών του DI και Ser στην επιφάνεια των κυττάρων ή την ενδοκύττωση των παραπάνω.

```

1    MGLSDIPANY MQGSHPHLTL HPQQQHQNQ QHLQHLQQMQ QLHNAMPTPA
51   QQAAQVLAME SNELLMSTKD KLSSKKMHL LKKIKKRFGL VRRSPSSCPG
101  PNNLPPLQFH SVHGDNIRIS RDGTLARRFE SFCRAITFSA RPVRINERIC
151  VKFAEISNNW NGGIRFGFTS NDPVTLEGLT PKYACPDLTN RPGFWAKALH
201  EQYCEKDNIL YYYVNGAGDV IYGINNEEKV VILTGIDTRS LLWTVIDIYG
251  NCTGIEFLDS RIYMYQQQPA AIPMATVPAQ QQQMPQPAAN ASSALNSHHP
301  HQQSRRLPG HTAAIEHDLE RHVMPSLQSL HLAGNGGSA SVEQAAIAHD
351  LANGLPLRY NANGRLIPVP FHNTKGRNVR LSQDRFVASR TESDFCQGYV
401  FTARPIRIGE KLIVQVLKTE QMYVGALALG ITSCNPAMLQ PNDLPNDSDF
451  LLDRPEYWVW SKDIAAAPQR GDEIAFFVAP NGEVSISKNN GPAVVVMHVD
501  QSLQLWAFLD VYGSTQSLRM FRQQLPNMVA YPSQPQVNVN ASSSACNAA
551  STSRMLPMTE SMSSLNAGAT AKLLHPSQL SVAQSTSTLA SAGGVNGSRM
601  ISMPNSGDIL QIQPNGGTV LNVNLPASS SHDINGQLAA RPTATVTSSG
651  VLAGACSSGT LISTTSSQYI EQPIANSTNN AANKWKDSL S DQQSTDSSAE
701  CTICYENPID SVLYMCGHMC MCYDCAIEQW RGVGGGQCPL CRAVIRDVIR
751  TYTT

```



Εικόνα 1.14: Η πρωτεΐνη Neuralized

Η πρωτεΐνη Neuralized αποτελείται από 754 αμινοξέα. Τα δομικά χαρακτηριστικά της είναι δύο αλληλουχίες/επαναλήψεις NEUZ (κόκκινο), οι οποίες είναι συντηρημένες στα ομόλογά της και ένα καρβοξυτελικός δάκτυλος Zn-RING (μπλε), ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη δραστηριότητά της. Με πράσινο φαίνονται δύο περιοχές πλούσιες σε όξινα αμινοξέα (ορα), οι οποίες ίσως παίζουν ρόλο σε διαπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Με μαύρη υπογράμμιση σημειώνεται η περιοχή που δεν είναι συντηρημένη στα θηλαστικά.

Με γενετικά πειράματα αλληλεπιδράσεων δείχθηκε ότι το *neur* αλληλεπιδρά με άλλα νευρογόνα γονίδια (de la Concha et al., 1988), αλλά ο ακριβής του ρόλος στη σηματοδότηση παρέμενε μέχρι πρόσφατα άγνωστος. Αρχικά θεωρήθηκε μεταγραφικός παράγοντας που δρα στον πυρήνα των κυττάρων που εκφράζεται (Boulianne et al., 1993). Σημαντικό ρόλο σε αυτήν την υπόθεση έπαιξε ο εντοπισμός ενός πιθανού μοτίβου πυρηνικού εντοπισμού και ενός άλλου που φέρει ομοιότητα με μοτίβο πρόσδεσης στο DNA (homeodomain-like). Ωστόσο, πειράματα κυτταρικού εντοπισμού χημεικής πρωτεΐνης Neur με επίτοπο myc μετά από υπερέκφρασή της σε προνευρικούς συναθροισμούς σε αναπτυξιακούς δίσκους φτερού, με χρήση της κατάλληλης διαγονιδιακής σειράς οδηγού (*sca-Gal4*), δείχνουν ότι ο επίτοπος, και κατ'επέκταση η πρωτεΐνη, εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη (Yeh et al., 2000).

Επιπλέον, πειράματα κυτταρικού εντοπισμού με χρήση χημικών μορφών της πρωτεΐνης Neur με GFP σε παροδικές διαμολύνσεις κυττάρων Cos-7 σε καλλιέργεια, δείχνουν ότι ο φθορισμός εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη και σε ένα διαμέρισμα γύρω από τον πυρήνα, κάτι που υποδεικνύει ότι ο εντοπισμός είναι σε κάποιο ευρύ κυτταρικό διαμερίσμα-οργανίδιο, πχ το ενδοπλασματικό δίκτυο. Επιπροσθέτως, με κλασμάτωση διαμερισμάτων από κύτταρα που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη, δείχθηκε ότι το Neur είναι μία μεμβρανική πρωτεΐνη, όχι όμως διαμεμβρανική, η οποία μπορεί να εκλουσθεί από το μεμβρανικό κλάσμα με υψηλό pH (Παυλόπουλος, Η., διδακτορική διατριβή).

Εκτός από τις γενετικές αλληλεπιδράσεις, παρατηρείται και συσχέτιση της έκφρασης του γονιδίου *neur* με πεδία και αναπτυξιακά στάδια έντονης σηματοδότησης *Notch*. Συγκεκριμένα, το *neur* εκφράζεται στο εμβρυϊκό μεσόδερμα (Boulianne et al., 1993), στο εμβρυϊκό νευροεκτόδερμα (Boulianne et al., 1993), στα πρόδρομα των αισθητηρίων οργάνων στην προνύμφη (Huang et al., 1991, Boulianne et al., 1993) και στις περιοχές που θα δώσουν τις φλεβώσεις των φτερών στην νύμφη (βλέπε Αποτελέσματα I). Σε όλες τις παραπάνω θέσεις το σηματοδοτικό μονοπάτι λειτουργεί μέσω ενεργοποίησης του συμπλόκου καταστολέων *E(spl)*, εκτός από την πρώτη περίπτωση, όπου εκτός από *E(spl)* χρησιμοποιείται και *single-minded (sim)* (Morel and Schweisguth, 2000).

Πρόσφατα δείχθηκε ότι το *neur* απαιτείται για τον καθορισμό της αναπτυξιακής τύχης των επιδερμικών κυττάρων στους προνευρικούς συναθροισμούς. Με την δημιουργία μιτωτικών κλώνων απώλειας λειτουργίας του γονιδίου από δύο διαφορετικά εργαστήρια (Yeh et al., 2000, Lai and Rubin, 2001a) και δείχθηκε ότι όταν οι κλώνοι αυτοί συμπέσουν με προνευρικές περιοχές, οδηγούν σε υπεραριθμία προδρόμων αισθητηρίων οργάνων (ΠΑΟ). Η απώλεια λειτουργίας του *neur* προκαλεί φαινοτύπους παρόμοιους με αυτούς που προκύπτουν σε περιπτώσεις κλώνων απώλειας λειτουργίας των *N* και *Dl*, υποδεικνύοντας ότι το *neur* απαιτείται

για τον σωστό καθορισμό της κυτταρικής τύχης στην γενεαλογία του αισθητηρίου οργάνου και ενισχύοντας την υπόθεση ότι η δράση του επιτυγχάνεται μέσω *N* και *DI*. Επιπλέον, δείχθηκε ότι το *neur* παίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες κυτταρικές αποφάσεις κατά την ανάπτυξη του ματιού (Lai and Rubin, 2001b).

Η παρουσία του μοτίβου RING στην πρωτεΐνη Neur οδήγησε τους Yeh et al. (2001) να ελέγξουν αν έχει δραστικότητα E3 λιγάσης ουβικουΐτινης. Χρησιμοποιώντας ένα *in vitro* σύστημα και χημεικές ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες έδειξαν ότι το Neur έχει την ικανότητα να ουβικουΐτινυλιώνει πρωτεΐνες, εφόσον υπάρχουν στο διάλυμα ένζυμα E1 (ενεργοποιητικό) και E2 (συζευκτικό) και η δραστικότητά του αυτή είναι απολύτως εξαρτώμενη από την παρουσία του δακτύλου RING (Yeh et al., 2001). Ωστόσο, το πραγματικό υπόστρωμα της E3 λιγάσης ουβικουΐτινης Neur *in vivo* δεν ανακαλύφθηκε.

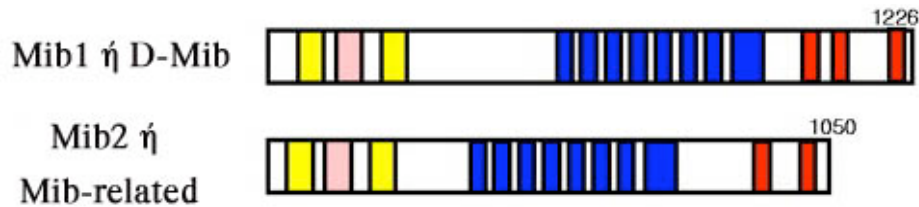
7. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *mind bomb*

Πριν από δύο περίπου χρόνια και μετά από τον χαρακτηρισμό του *neur* από εμάς και άλλους (Yeh et al., 2000, Pavlopoulos et al., 2001, Yeh et al., 2001, Lai and Rubin, 2001a, Lai and Rubin, 2001b), κλωνοποιήθηκε στο zebrafish μία νέα E3 RING λιγάση ουβικουΐτινης, η οποία ονομάστηκε Mind bomb εξαιτίας του φαινότυπου της μεταλλαγής της (η μεταλλαγή είχε χαρακτηριστεί νωρίτερα, αλλά δεν είχε κλωνοποιηθεί το γονίδιο). Η εν λόγω πρωτεΐνη έχει αρκετά δομικά χαρακτηριστικές περιοχές, όπως δύο μοτίβα Herc2/mib, δύο επαναλήψεις *mib*, επτά επαναλήψεις αγκυρίνης, τρεις δακτύλους RING, εκ των οποίων μόνο ο τρίτος έχει τη χαρακτηριστική δομή του πρότυπου RING. Το Mind bomb δείχθηκε ότι παίζει σημαντικό ρόλο στο μονοπάτι μετάδοσης σήματος *N* και συγκεκριμένα, αλληλεπιδρά με το *zDI* και οδηγεί στην ουβικουΐτινυλίωση και ενδοκύττωσή του δεσμευτή (Itoh et al., 2003, Chen and Corliss, 2004).

Πολύ πρόσφατα χαρακτηρίστηκαν στον ποντικό δύο γονίδια που αντιστοιχούν σε ομόλογα του *mind bomb*, το ομόλογό του, *zmib1*, και ένα παράλογο γονίδιο, το *zmib2* (skeletrophin). Τα δύο αυτά γονίδια φαίνεται να έχουν παρόμοια δράση, παρά τις δομικές διαφορές τους: παίζουν ρόλο E3 λιγάσης ουβικουΐτινης, δράση που εξαρτάται από την παρουσία του καρβοξυτελικού δακτύλου RING, αλληλεπιδρούν με τους δεσμευτές *DI* και *Jag1* και οδηγούν στην ουβικουΐτινυλίωση και ενδοκύττωσή τους (Koo et al., 2005a, Koo et al., 2005b, Takeuchi et al., 2005, Barsi et al., 2005).

Από *in silico* μελέτη παρατηρήσαμε ότι στη Δροσόφιλα υπάρχουν δύο γονίδια που φέρουν ομοιότητες με το *zmib*, τα *mib1* και *mib2*, τα οποία δεν είχαν μέχρι πρόσφατα χαρακτηριστεί (Εικ. 1.15 και βλέπε “Αποτελέσματα II” και “Συζήτηση”). Από αυτά το *mib1* φέρει μεγαλύτερη ομοιότητα με το *zmib* και εκφράζεται σε διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς από το *mib2*,

η έκφραση του οποίου περιορίζεται κυρίως στο μυϊκό σύστημα (in situ, Flybase). Τα δύο γονίδια ενδέχεται να επιτελούν παρόμοιες λειτουργίες στη Δροσόφιλα, όπως και στον ποντικό, σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια και κυτταρικές αποφάσεις.



Εικόνα 1.15: Η δομή των δύο ομολόγων του Mind bomb στη Δροσόφιλα

Από τα δύο, το πιο κοντινό ομόλογο με την πρωτεΐνη από το zebrafish είναι το Mib1. Με διαφορετικά χρώματα σημειώνονται τα δομικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών, οι επαναλήψεις Mib/Herc2 (κίτρινο), ο δάκτυλος Zn ZZ (ροζ), οι επαναλήψεις αγκυρίνης (μπλε) και οι δάκτυλοι Zn-RING (κόκκινο).

8. ΣΤΟΧΟΙ

Τα τελευταία χρόνια εντατική έρευνα διεξάγεται για την ανακάλυψη νέων μορίων που παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στην σωστή χωροχρονική ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης Notch. Ολοένα και περισσότερες πρωτεΐνες που διεξάγουν πολύ λεπτή ρύθμιση ανακαλύπτονται και τοποθετούνται στην περίπλοκη πλέον εικόνα του μονοπατιού N. Ωστόσο, πολλά αναπάντητα ερωτήματα παραμένουν, όπως πχ πως καθορίζεται το κύτταρο ΠΑΟ;

Κατά τη διάρκεια της παρούσας διατριβής μας απασχόλησαν τα ακόλουθα ερωτήματα:

- Ποιος είναι ο ρόλος του νευρογόνου γονιδίου *neur* της Δροσόφιλας στο μηχανισμό της διακυτταρικής σηματοδότησης N;
- Ποιος είναι ο ρόλος των δύο δεσμευτών του N, D1 και Ser, στην διαδικασία της πλευρικής αναστολής κατά την ανάπτυξη των αισθητηρίων οργάνων του θώρακα της Δροσόφιλας;
- Είναι απαραίτητη η ουβικουϊτινυλίωση και η ενδοκύττωση για τη σηματοδότηση N; Μελετήθηκε ο ρόλος των E3 λιγασών ουβικουϊτίνης Neur και Mib1 σε διαφορετικές κυτταρικές αποφάσεις.
- Ποιος είναι ο ρόλος του μοτίβου RING του Neur στη σηματοδότηση;
- Τι αλλάζει στην κυτταρική διακίνηση του δεσμευτή D1 στα κύτταρα ΠΑΟ, όταν παρεμποδιστεί η ενδοκύττωση;

Υλικά και Μέθοδοι

ΥΛΙΚΑ και ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Πλασμιδιακές κατασκευές

pUAST-EGFP-neur

Για την κατασκευή του *pUAST-EGFP-neur*, οι πρώτες 430 βάσεις του γονιδίου *neur* ανακτήθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) από το πλασμίδιο *pBS-neur* με χρήση εκκινητών με τις κατάλληλες θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων (υπογραμμισμένα):

5'-GCTCTAGACTCGAGGTCTATCGGATA-3' και

5'-CGGGATCCCAATCCAAAGCGCT-3'.

Το προϊόν της αντίδρασης PCR κλωνοποιήθηκε ως τεμάχιο με άκρα *XbaI/PstI* στον *pBS-neur*, ο οποίος είχε προηγουμένως υποστεί πέψη με τα ίδια ένζυμα. Από το παραπάνω πλασμίδιο απομονώθηκε η κωδική αλληλουχία του *neur* μετά από πέψη με *XhoI* και κλωνοποιήθηκε στο σωστό πλαίσιο ανάγνωσης καρβοξυτελικά της EGFP στον *pUAST-EGFP*. Ο *pUAST-EGFP* κατασκευάστηκε μετά από κλωνοποίηση της κωδικής αλληλουχίας της EGFP, η οποία προήλθε από τον φορέα *pEGFP-C1* (Clontech) ως ένα *NotI/XbaI* τεμάχιο στον *pUAST*

pUAST-DIV5His

Το πλασμίδιο *pUAST-DIV5His* προήλθε από ένα τεμάχιο *EcoRI/DraI* της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου *DI*, το οποίο φέρει δύο καρβοξυτελικά τοποθετημένους επίτοπους V5/ 6xHis και προέρχεται από το *pIZ-DIV5His* (M.Rand). Αυτό κλωνοποιήθηκε σε *EcoRI - XhoI* (μετά από Klenow fill-in) θέσεις του *pUAST*

2. Αντισώματα

Τα πρωτεύοντα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοϊστοχημικές χρώσεις και για Westerns περιγράφονται στον Πίνακα 2.1. Τα δευτερεύοντα αντισώματα φαίνονται στον Πίνακα 2.2.

3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA έγινε με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης ακολουθούμενη είτε από καθαρισμό με PEG ή με χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής (Qiagen, Nucleobond ή Merlin).

4. Παραγωγή αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης Neutralized

4α. Συνθήκες επαγωγής χμιαϊκής πρωτεΐνης His-Neur1050

- Μετασηματισμός επιδεικτικών κυττάρων BL21(DE3)pLys με το πλασμίδιο pRSET-Neur1050 (Κόλλιας Σ., Πτυχιική εργασία) και επιλογή θετικών κλώνων σε LB+ αμικικιλίνη + χλωραμφαινικόλη.
- Καλλιέργεια μίας αποικίας σε 5ml LB+ αμικικιλίνη + χλωραμφαινικόλη για 16 ώρες στους 37⁰C με ανακίνηση.
- Αραίωση της παραπάνω καλά μεγαλωμένης καλλιέργειας 1:50 σε 300ml LB+ αμικικιλίνη + χλωραμφαινικόλη.
- Επώαση με ανακίνηση στους 37⁰C έως ότου η OD₆₀₀ να φτάσει 0.6 – 0.8.
- Επαγωγή με προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 0.5mM.
- Επώαση με ανακίνηση στους 25⁰C για 5 ώρες (έως και 16 ώρες) για παραγωγή της πρωτεΐνης.
- Συλλογή της κυτταρικού ιζήματος με φυγοκέντρωση στις 3000rpm για 15 λεπτά και φύλαξη στους -80⁰C μέχρι τον καθαρισμό.

Συνιστάται κάθε φορά που θέλουμε να εκφράσουμε την πρωτεΐνη σε κύτταρα BL21(DE3)pLys να χρησιμοποιούμε φρέσκο μετασηματισμό, καθώς τα εν λόγω κύτταρα είναι ιδιαιτέρως ευαίσθητα.

Το παραπάνω πρωτόκολλο επαγωγής της πρωτεΐνης His-Neur1050 δεν είναι αποδοτικό αν αντί για 300ml, χρησιμοποιηθούν καλλιέργειες 500ml ή 1lt.

Είναι σημαντικό η O/N καλλιέργεια να είναι καλά μεγαλωμένη, γιατί διαφορετικά μετά την αραίωση τα κύτταρα αργούν πολύ να μεγαλώσουν.

Είναι σημαντικό οι κωνικές φιάλες και οι δοκιμαστικοί σωλήνες που χρησιμοποιούνται για τις καλλιέργειες να είναι καθαροί και να μην έχουν ίχνη απορρυπαντικού (γιατί ευνοείται η λύση των κυττάρων).

4β. Συνθήκες καθαρισμού της χμιαϊκής πρωτεΐνης His-Neur1050

Αφού διαπιστώθηκε η διαλυτότητα της υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης His-Neur1050, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο Qiaexpressionist (Qiagen) για καθαρισμό πρωτεϊνών με φυσικές και αποδιατακτικές συνθήκες για το διαλυτό και το αδιάλυτο κλάσμα αντίστοιχα.

1. Καθαρισμός υπό φυσικές συνθήκες

- Το κυτταρικό ίζημα από καλλιέργεια επαγωγής 300ml ξεπαγώνεται σε πάγο και σε αυτό προστίθενται 5ml ανά γραμμάριο διαλύματος λύσης (50mM NaH₂PO₄, pH 8.0, 300mM NaCl). Επαναιώρηση των κυττάρων και συνεχής διατήρηση στον πάγο.
- Προσθήκη λυσοζύμης σε τελική συγκέντρωση 1mg/ml και επώαση στον πάγο για 30 λεπτά.
- Λύση των κυττάρων με υπερήχους στον πάγο.
- Φυγοκέντρωση στις 10000g για 30 λεπτά στους 4⁰C, ώστε να απομακρυνθεί το κυτταρικό υπόλειμμα. Διατήρηση υπερκειμένου (στους -80⁰C μέχρι τον καθαρισμό), το οποίο αντιστοιχεί στο διαλυτό κλάσμα των κυττάρων.

- Προσθήκη 1ml υλικού χρωματογραφίας συγγένειας Ni-NTA (Qiagen) για κάθε 10ml καθαρού εκχυλίσματος. Ήπια ανάδευση στους 4⁰C για τουλάχιστον μία ώρα.
- Εκχύλισμα και χρωματογραφικό υλικό φορτώνονται σε στήλη με φίλτρο στο κάτω μέρος της και στρόφιγγα (για άνοιγμα και κλείσιμο). Η στρόφιγγα αφήνεται κλειστή για τόση ώρα ώστε τα Ni-NTA σφαιρίδια να πακεταριστούν.
- Άνοιγμα στρόφιγγας για να αρχίσει να ρέει το εκχύλισμα που δεν προσδέθηκε στα σφαιρίδια.
- Πλύση των σφαιριδίων δύο φορές με 5ml διάλυμα πλύσης (50mM NaH₂PO₄, pH 8.0, 300mM NaCl), ώστε να απομακρυνθούν πρωτεΐνες που έχουν προσδεθεί στα σφαιρίδια μη ειδικά.
- Έκλουση της His-Neur1050 με διάλυμα έκλουσης (50mM NaH₂PO₄, pH 8.0, 300mM NaCl, 250mM ιμιδαζόλιο), 0.5ml ανά κλάσμα για τουλάχιστον πέντε.
- Η επιτυχία του καθαρισμού ελέγχεται σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης 10%.

2. Καθαρισμός υπό αποδιατακτικές συνθήκες

- Το κυτταρικό ίζημα από καλλιέργεια επαγωγής 300ml ξεπαγώνεται σε πάγο για περίπου 15 λεπτά και σε αυτό προστίθενται 5ml ανά γραμμάριο διαλύματος λύσης B (8M ουρία, 0.1M NaH₂PO₄, 0.01M Tris-Cl, pH 8.0). Επαναιώρηση των κυττάρων και συνεχής διατήρηση στον πάγο.
- Ανάδευση των κυττάρων σε θερμοκρασία δωματίου (σε μαγνητικό αναδευτήρα), ώστε να επιτευχθεί η λύση (περίπου μία ώρα).
- Φυγοκέντρηση στις 10000g για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να απομακρυνθεί το κυτταρικό υπόλειμμα. Διατήρηση υπερκειμένου.
- Προσθήκη 1ml υλικού χρωματογραφίας συγγένειας Ni-NTA για κάθε 10ml καθαρού εκχυλίσματος. Ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον μία ώρα.
- Εκχύλισμα και χρωματογραφικό υλικό φορτώνονται σε στήλη με φίλτρο στο κάτω μέρος της και στρόφιγγα (για άνοιγμα και κλείσιμο). Η στρόφιγγα αφήνεται κλειστή για τόση ώρα ώστε τα Ni-NTA σφαιρίδια να πακεταριστούν.
- Άνοιγμα στρόφιγγας για να αρχίσει να ρέει το εκχύλισμα που δεν προσδέθηκε στα σφαιρίδια.
- Πλύση των σφαιριδίων δύο φορές με 5ml διάλυμα πλύσης C (8M ουρία, 0.1M NaH₂PO₄, 0.01M Tris-Cl, pH 6.3), ώστε να απομακρυνθούν πρωτεΐνες που έχουν προσδεθεί στα σφαιρίδια μη ειδικά.
- Έκλουση της His-Neur1050 με διάλυμα έκλουσης E (8M ουρία, 0.1M NaH₂PO₄, 0.01M Tris-Cl, pH 4.5), 0.5ml ανά κλάσμα για τουλάχιστον πέντε (η πρωτεΐνη His-Neur1050 δεν εκλύεται σε διάλυμα έκλουσης D, το οποίο έχει pH 5.9). Τα απομονωμένα κλάσματα διατηρούνται στους 4⁰C.
- Η επιτυχία του καθαρισμού ελέγχεται σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης 10%.

5. Ανοσοποιήσεις για παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων

Για την παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων χρησιμοποιήθηκαν κουνέλια (Davids Biotechnologie) και ποντίκια (IMBB), τα οποία ενέθηκαν με διάλυμα που περιείχε την κατάλληλη ποσότητα πρωτεΐνης His-Neur1050.

Για την ανοσοποίηση των κουνελιών χρησιμοποιήθηκε πρωτεΐνη καθαρισμένη υπό αποδιατακτικές συνθήκες (100μg/ ανοσοποίηση). Μετά από τρεις υπενθυμιστικές ενέσεις ελέγχθηκε ο ορός και αφού διαπιστώθηκε ότι μπορεί να αναγνωρίζει το αντιγόνο (καθαρισμένη πρωτεΐνη και υπερεκφρασμένη σε έμβρυα Δροσόφιλας ή αναπτυσσικούς δίσκους), το ζώο θυσιάστηκε. Ο ορός στη συνέχεια υποβλήθηκε σε χρωματογραφία συγγένειας για να αυξηθεί η καθαρότητά του. Το R-anti-neur1050 αντίσωμα χρησιμοποιείται σε ανάλυση Western σε συγκέντρωση 1:3000-1:5000 (δίνει και μη ειδικές ζώνες κυρίως σε υψηλά μοριακά βάρη), σε ανοσοκατακρήμνισεις 1:100 και σε ανοσοϊστοχημεία 1:1000 (αναγνωρίζει μόνο υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη και σπάνια ενδογενή).

Για την ανοσοποίηση των ποντικών χρησιμοποιήθηκαν θηλυκά ζώα τριών περίπου μηνών. Υπέστησαν ανοσοποίηση με υποδόρια ένεση ενός μίγματος πρωτεΐνης (10-50μg αποδιαταγμένης ή φυσικής His-Neur1050/ ανοσοποίηση) και ανοσοενισχυτικού: η πρώτη με Freund's complete και οι επόμενες/ υπενθυμιστικές με Freund's incomplete. Μετά την πρώτη ένεση, οι επαναληπτικές γίνονταν κάθε τρεις περίπου εβδομάδες και σε όλες τις περιπτώσεις το ποσό του αντιγόνου που χρησιμοποιήθηκε ήταν 50μg ανά ανοσοποίηση. Ο ορός των ζώων ελέγχονταν για την ικανότητά του να αναγνωρίζει το αντιγόνο 13-14 μέρες μετά την ανοσοποίηση. Χρειάστηκαν πέντε υπενθυμιστικές ενέσεις για να μπορέσουμε να παρατηρήσουμε ικανοποιητική απόκριση σε Western και ανοσοϊστοχημεία, μετά από τις οποίες τα ζώα θυσιάστηκαν. Και τα τρία ζώα που ανοσοποιήθηκαν έδωσαν ορό ικανό να αναγνωρίζει το αντιγόνο σε καθαρή μορφή ή σε υπερέκφραση. Στα δύο που χρησιμοποιήθηκε η αποδιαταγμένη πρωτεΐνη, η απόκριση ήταν καλύτερη και κατέστη δυνατή η αντίχνευση του αντιγόνου σε αγρίου τύπου ιστό. Τα M-anti-Neur1050 αντισώματα χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις 1:2000 για ανάλυση Western και 1:500- 1:1000 για ανοσοϊστοχημεία (προτείνεται προσρόφηση του ορού σε έμβρυα δροσόφιλας πριν τη χρήση).

Στον πίνακα φαίνεται η χρήση των πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης Neur

	Ανάλυση Western	Ανοσοκατακρήμνιση	Ανοσοϊστοχημεία
Rabbit-anti-Neur1050	1:5000	1:100	1:1000-1:2000
Mouse-anti-Neur1050	1:2000	1:200	1:500-1:1000

6. Παροδική διαμόλυνση κυττάρων Δροσόφιλας S2

Για την έκφραση των διαφόρων πρωτεϊνών σε κυτταροκαλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν παροδικές διαμολύνσεις με τη μέθοδο της δημιουργίας ιζήματος φωσφορικού ασβεστίου. Για την έκφραση των πρωτεϊνών DI, DIΔC και Ser χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pIZ-DIV5His, pIZ-DIΔC-V5His και pMt-Sermyc αντίστοιχα. Για την έκφραση των πρωτεϊνών Neur και NeurΔR χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pUAST-neur ή pUAST-EGFPneur και pUAST-neurΔRGFP, αντίστοιχα παρουσία του πλασμιδίου pMt-Gal4 και η διαμόλυνση ακολουθήθηκε από την επαγωγή με 0.7mM CuSO₄ (stock 70mM CuSO₄). Τα κύτταρα συλλέχθηκαν μετά από επαγωγή 16 ωρών.

Πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν σε παροδικές διαμολύνσεις:

pIZ-DIV5His (M. Rand), pIZ-DIΔC-V5His (M. Rand), pMt-Sermyc (R. Fleming), pUAST-neur (Pavlopoulos E.), pUAST-EGFPneur (βλέπε παραπάνω), pUAST-neurΔRGFP (Pavlopoulos E.), pMt-Notch (Artavanis-Tsakonas S.), pUAST-NotchIC (Artavanis-Tsakonas S.), pMt-NotchRICN (Artavanis-Tsakonas S.), pMt-NotchΔECN (Artavanis-Tsakonas S.).

7. Ανάλυση Western

Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προερχόμενα από διάφορες διαδικασίες (π.χ. από κύτταρα σε καλλιέργεια, από προνύμφες ή έμβρυα Δροσόφιλας) ηλεκτροφορούνται σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης της κατάλληλης πυκνότητας, ανάλογα με τα μεγέθη των πρωτεϊνών που θέλουμε να ανιχνεύσουμε. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε 1x διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1x διάλυμα ηλεκτροφόρησης: 25mM Tris, 192mM glycine, 0.1% SDS) στα 100V μέχρι η χρωστική να φτάσει στη διαχωριστική φάση και μέχρι τα 200V στη συνέχεια.

Μετά την ηλεκτροφόρηση, ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Protran) με τη χρήση κατάλληλης συσκευής (BioRad), η οποία γίνεται στους 4⁰C στα 100V για μία ώρα σε διάλυμα μεταφοράς (1x διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς: 25mM Tris, 192mM glycine, 0.01% SDS, 20% methanol). Οι πρωτεΐνες εξαιτίας του αρνητικού φορτίου τους (λόγω του SDS) μεταφέρονται προς τον θετικό πόλο. Η επιτυχία της μεταφοράς διαπιστώνεται με τη χρώση των πρωτεϊνών πάνω στη μεμβράνη με διάλυμα PonceauS. Ακολουθεί επώαση με διάλυμα PBST (1x PBS, 0.05% Tween-20) με 5% άπαχο γάλα (Regilait ή Carnation) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με ανακίνηση. Η επώαση με το πρωτεΐν αντίσωμα γίνεται για περίπου 14 ώρες στους 4⁰C με ανακίνηση. Ακολουθούν 3 πλύσεις με ανακίνηση των 10 λεπτών με διάλυμα PBST και επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με HRP, στην κατάλληλη αραιώση σε διάλυμα PBST με 5% άπαχο γάλα για 2-3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με ανακίνηση. Ακολουθούν 3 πλύσεις με PBST και εμφάνιση με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας και απεικόνιση σε φιλμ.

8. Ανοσοϊστοχημεία

8α. Μονιμοποίηση Εμβρύων Δροσόφιλας

- Συλλογή εμβρύων Δροσόφιλας του κατάλληλου αναπτυξιακού σταδίου.
- Αποχοριοποίηση με 50% χλωρίνη για 1-2 λεπτά.
- Μονιμοποίηση σε 1:1 διάλυμα 4% φορμαλδεΰδης/ 1x PEM: n- επτάνιο για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ισχυρή ανακίνηση (Το επτάνιο δημιουργεί ρωγμές στην βιτελική μεμβράνη του εμβρύου και έτσι το διάλυμα στερέωσης της φορμαλδεΰδης τη διαπερνά).
- Αποβιτελινοποίηση: απομάκρυνση της υδατικής φάσης (κάτω φάση), προσθήκη ίσου όγκου μεθανόλης* και πολύ ισχυρή ανάδευση για ένα λεπτό. Τα έμβρυα βυθίζονται.
- Απομάκρυνση υπερκειμένου και πλύση με μεθανόλη ακόμη 3 φορές (ώστε να απομακρυνθεί απολύτως το επτάνιο). Τα έμβρυα σε αυτή τη φάση μπορούν να διατηρηθούν για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα στους -20°C .
- Απομάκρυνση μεθανόλης και σταδιακή ενυδάτωση σε PT (1x PBS, 0.2% Triton X-100). Το διάλυμα PT προστίθεται στάγδην και ακολουθεί επανάληψη της πλύσης. Τα έμβρυα είναι έτοιμα είτε για χρώση με αντισώματα, είτε για προσρόφηση (preadsorption) αντισωμάτων.

*Χωρίς αποβιτελινοποίηση, είναι αδύνατη η χρήση αντισωμάτων, γιατί δεν μπορούν να εισχωρήσουν στους ιστούς του εμβρύου. Η μεθανόλη ωστόσο καταστρέφει τον φθορισμό που προέρχεται από την Πράσινη Φθορίζουσα Πρωτεΐνη (GFP), καθώς επίσης και την ενεργότητα της γαλακτοσιδάσης. Στην πρώτη περίπτωση είτε χρησιμοποιείται αντίσωμα για τον εντοπισμό της GFP ή τα έμβρυα αποβιτελινοποιούνται με το χέρι. Στην περίπτωση της γαλακτοσιδάσης, αν δεν χρησιμοποιηθεί αντίσωμα για την ανίχνευσή της, η ενζυμική Xgal χρώση μπορεί να γίνει χωρίς αποβιτελινοποίηση.

2x PEM: 200mM Pipes, 2mM EGTA, 2mM MgCl₂ και ρύθμιση pH στο 6.9 με KOH, φιλτράρισμα και διατήρηση στους 4°C

10x PBS: 1.3M NaCl, 0.07M Na₂HPO₄, 0.03M NaH₂PO₄

8β. Μονιμοποίηση Προνυμφών Δροσόφιλας

- Συλλογή προνυμφών Δροσόφιλας (διάφορα στάδια) σε 1x PBS (1x PBS: 130mM NaCl, 70mM Na₂HPO₄, 30mM NaH₂PO₄) και ανατομία αυτών σε διάστημα λιγότερο των 20 λεπτών. Μετά την ανατομία οι προνύμφες διατηρούνται στον πάγο, ώστε να αποφεύγεται η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών.
- Στερέωση σε διάλυμα 4% φορμαλδεΰδης/ 1x PEM για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς ανακίνηση.
- Απομάκρυνση διαλύματος στερέωσης. Τρεις σύντομες πλύσεις με 1x PBS. Οι ιστοί είναι τώρα έτοιμοι για ανοσοϊστοχημεία.

Ο παραπάνω τρόπος μονιμοποίησης χρησιμοποιήθηκε για την πλειονότητα των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων. Οι εξαιρέσεις για τα αντισώματα α-E(spl) 323 και α-Achaete περιγράφονται παρακάτω.

8γ. Μονιμοποίηση Νυμφών Δροσόφιλας

1. Φτερά νυμφών

(α) Οι χειρισμοί για την μονιμοποίηση των φτερών μέχρι το στάδιο των 8 ωρών μετά την «άσπρη νύμφη» (8hr APF: After Puparium Formation) είναι ίδιοι με αυτούς που χρησιμοποιούνται για τις προνύμφες. Η θήκη της νύμφης τρυπιέται με τη λαβίδα ανατομίας πολύ κοντά στο εμπρόσθιο άκρο (στο σημείο που αρχίζει η μεταμεριδίωση της θήκης) και το οπίσθιο μέρος απομακρύνεται. Τα φτερά εντοπίζονται στα πλάγια του σώματος και αποκαλύπτονται μετά την ανατομία. Ακολουθεί μονιμοποίηση.

(β) Από τις 10 μέχρι τις 15 ώρες του σταδίου της νύμφης είναι αδύνατη η ανατομία των φτερών για ανοσοϊστοχημεία (η Xgal χρώση μπορεί να πραγματοποιηθεί), καθώς έχει δημιουργηθεί μία λεπτή μεμβράνη που καλύπτει όλα τα εσωτερικά όργανα της νύμφης, η οποία δεν μπορεί να απομακρυνθεί ακόμα και μετά από στερέωση.

(γ) Για την μονιμοποίηση φτερών νύμφης 18, 24 και 30 ώρες APF ακολουθείται η εξής διαδικασία (το στάδιο των 18hr APF είναι το πιο δύσκολο):

- Συλλογή νυμφών στο στάδιο της «άσπρης» νύμφης (0 ώρες APF) και διατήρηση σε δοχείο με υγρασία (πίατο petri με βρεγμένο σφουγγαράκι) μέχρι να φτάσουν στο κατάλληλο αναπτυξιακό στάδιο.
- Τοποθέτηση νυμφών σε πιάτο με σιλικόνη (Sylgard 184 silicone elastomer kit, Dow Corning) σε σταγόνα με 1x PBS. Σε αυτό το πιάτο γίνεται όλη η διαδικασία.
- Προσεκτική απομάκρυνση της νυμφικής θήκης με λαβίδες ανατομίας μέσα στο 1x PBS. Με τη μία λαβίδα (όχι πολύ μυτερή) στηρίζουμε το οπίσθιο άκρο της νυμφικής θήκης και με την άλλη (πιο λεπτή) απομακρύνουμε προσεκτικά τη θήκη από την εμπρόσθια πλευρά. (Αν με κακό χειρισμό προκληθεί τραυματισμός του σώματος της νύμφης τα κοκκία λίπους που το γεμίζουν καταστρέφουν τα διάφορα όργανα και πρώτα από όλα τα φτερά, καθώς εισχωρούν μέσα από την άρθρωση. Ένας χειρισμός που βοηθάει στην εκτόνωση είναι η προσεκτική απομάκρυνση του ακραίου εμπρόσθιου τμήματος της νυμφικής θήκης και η διάτρηση της κεφαλής της νύμφης. Μετά από αυτό είναι εύκολη η απομάκρυνση του ζώου από τη θήκη).
- Μονιμοποίηση για 30 λεπτά σε σταγόνα με διάλυμα 4% φορμαλδεΰδης/ 1x PEM σε θερμοκρασία δωματίου. Το στάδιο αυτό είναι απαραίτητο για να μπορέσει η λεπτή μεμβράνη που καλύπτει το σώμα της νύμφης να αποκολληθεί και να είναι ορατή.
- Απομάκρυνση της λεπτής μεμβράνης που καλύπτει το σώμα της νύμφης από τα φτερά με λαβίδα. Συνέχεια της μονιμοποίησης των φτερών για τουλάχιστον 20 λεπτά. Αν δεν απομακρυνθεί η μεμβράνη δεν είναι δυνατή η χρώση με αντισώματα. (Η Xgal χρώση είναι εφικτή χωρίς της απομάκρυνση της μεμβράνης).
- Μεταφορά των φτερών σε σταγόνα με 1x PBS και πλύση (Η μεταφορά γίνεται με κίτρινο κομμένο ακρορύγχιο, το οποίο έχει καλυφθεί με πυκνό διάλυμα BSA ή NGS, ώστε τα φτερά να μην κολλήσουν σε αυτό). Επανάληψη της πλύσης 2 φορές.

- Μεταφορά σε σωληνάκι 2ml και ανοσοϊστοχημεία (Όταν χειριζόμαστε τόσο μικρούς ιστούς, περιμένουμε τη βύθισή τους ανάμεσα στα διάφορα στάδια της χρώσης).

2. *Μάτια νυμφών*

- Νύμφες του επιθυμητού αναπτυξιακού σταδίου (κυρίως μετά τις 15 ώρες APF, οπότε ο αμφιβληστροειδής είναι επίπεδος πάνω από τον σφαιρικό οπτικό λοβό. Στις 6-10 ώρες APF οι δίσκοι των ματιών είναι προσκολλημένοι στους οπτικούς λοβούς και δημιουργούν έναν κυβοειδή σχηματισμό-ίσως είναι δύσκολο να βαφούν) τοποθετούνται σε 1x PBS σε μικρό πιάτο με σιλικόνη (15mm) και εκεί ανατέμνονται και μονιμοποιούνται.
- Με τη χρήση λεπτών βελόνων (insect pins) οι νύμφες καρφιστώνονται στο ύψος του θώρακα (με μία λαβίδα κρατάμε τη βελόνα και με την άλλη στηρίζουμε την νύμφη) στη σιλικόνη με την ραχιαία πλευρά (την λιγότερο επίπεδη) προς τα πάνω (συνήθως γυρίζουν προς την κατεύθυνση αυτή).
- Απομάκρυνση του εμπρόσθιου τμήματος της νυμφικής θήκης τραβώντας με τη λαβίδα (συνήθως με τον τρόπο αυτό αφαιρείται η θήκη μέχρι το σημείο που βρίσκεται η βελόνα).
- Προσθήκη 1x PBS στο πιατάκι. Με ψαλίδι ανατομίας αποκόπτεται η άκρη του κεφαλιού της νύμφης (ουσιαστικά αφαιρείται η μεμβράνη που καλύπτει το ζώο σε αυτό το στάδιο).
- Με πιπέτα pasteur τραβάμε και αφήνουμε γρήγορα το PBS μπροστά από κάθε κεφάλι, ώστε οι οπτικοί λοβοί του εγκεφάλου μαζί με τον αμφιβληστροειδή να απομακρυνθούν από το υπόλοιπο σώμα (ο αμφιβληστροειδής είναι στρογγυλός και συνδεδεμένος πάνω στον οπτικό λοβό).
- Σε άλλο πιατάκι έχει τοποθετηθεί διάλυμα στερέωσης 4% φορμαλδεΰδη/ 1x PEM. Με κίτρινο κομμένο ακρορύγχιο, το οποίο έχει προηγουμένως εμβαπτισθεί σε διάλυμα BSA ή NGS, οι ιστοί μεταφέρονται στο διάλυμα στερέωσης (σημαντικό: να πιπεταριστούν πολύ γρήγορα 2-3 φορές μέσα στη φορμαλδεΰδη για να διατηρήσουν το σχήμα τους) και αφήνονται για 20 λεπτά.
- Ακολουθούν 3 γρήγορες πλύσεις με 1x PBS και ανοσοϊστοχημεία.
- Ο αμφιβληστροειδής μετά τη χρώση απομακρύνεται από τον οπτικό λοβό απαλά με μία βελόνα tungsten ή κάκτου.

3. *Θώρακες νυμφών*

- Νύμφες του επιθυμητού αναπτυξιακού σταδίου (μετά τις 13 ώρες από την έναρξη του νυμφικού σταδίου, οπότε έχει επιτευχθεί η σύντηξη των δύο ημιθωρακίων. Πριν από αυτό το στάδιο χειριζόμαστε τους θώρακες όπως και στην προνύμφη) τοποθετούνται σε 1x PBS σε μικρό πιάτο με σιλικόνη (15mm) και εκεί ανατέμνονται και μονιμοποιούνται.
- Με τη χρήση λεπτών βελόνων (insect pins) οι νύμφες καρφιστώνονται στο ύψος της κοιλιάς (με μία λαβίδα κρατάμε τη βελόνα και με την άλλη στηρίζουμε την νύμφη) στη σιλικόνη με την κοιλιακή πλευρά (την πιο επίπεδη) προς τα πάνω (συνήθως γυρίζουν αντίθετα).

- Απομάκρυνση του εμπρόσθιου τμήματος της νυμφικής θήκης τραβώντας με τη λαβίδα (συνήθως με τον τρόπο αυτό αφαιρείται η θήκη μέχρι το σημείο που βρίσκεται η βελόνα).
- Με ψαλίδι ανατομίας αποκόπτεται το κεφάλι της νύμφης (είναι προφανές από την παρουσία των ματιών).
- Ο θώρακας στη συνέχεια κόβεται πλευρικά με ψαλίδι και απομακρύνεται το κοιλιακό τμήμα του.
- Για να είναι δυνατή η πρόσβαση των αντισωμάτων στον ιστό, καθαρίζεται προσεκτικά η λεπτή ραχιαία στοιβάδα από το λιπαρό σώμα και τους μύες που βρίσκονται συνδεδεμένοι σε αυτήν.
- Απομάκρυνση του 1x PBS και προσθήκη διαλύματος στερέωσης (4% φορμαλδεΐδη/ 1x PEM) στο πιατάκι με τους καρφιτωμένους θώρακες. Μονιμοποίηση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αποκοπή του θώρακα της νύμφης μέσα στο διάλυμα στερέωσης. Οι εν λόγω ιστοί επιπλέουν.
- Με κατάλληλη λούπα μεταφέρουμε τους θώρακες σε πιατάκι με 1x PBS μέσα σε μεταλλικό δίκτυο, ώστε να μην χαθούν. Απομάκρυνση του 1x PBS έξω από το δίκτυο και αλλαγή 2 φορές.
- Η ανοσοϊστοχημεία συνεχίζεται μέσα στο δίκτυο.

8δ. Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις

Μετά τη μονιμοποίηση των ιστών που περιγράφεται παραπάνω κατά περίπτωση, ακολουθεί ανοσοϊστοχημική χρώση, η οποία συνίσταται στην χρήση κατάλληλων αντισωμάτων για την ανίχνευση πρωτεϊνών πάνω στον ιστό. Συγκεκριμένα:

- Ο υπό μελέτη μονιμοποιημένος ιστός (έμβρυο, προνύμφη, νύμφη) επώάζεται σε διάλυμα PBT (1x PBS, 0.5% BSA, 0.2% TritonX-100) με ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα (σε αυτό το διάστημα οι μη ειδικές θέσεις πιθανής προσκόλλησης του αντισώματος παρεμποδίζονται από την αλβουμίνη και τα κύτταρα γίνονται διαπερατά με τη βοήθεια του απορρυπαντικού).
- Επώαση με το/τα πρωτεύοντα αντισώματα για περίπου 16 ώρες με ανακίνηση στους 4⁰C. Η αραίωση των αντισωμάτων γίνεται σε διάλυμα PBT και διαφέρει κατά περίπτωση (Πίνακας 2.1).
- Πλύση με διάλυμα PT (1x PBS, 0.2% TritonX-100) για 10 λεπτά με ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου. Επανάληψη 2 επιπλέον φορές.
- Επώαση με το/τα δευτερεύον/τα αντίσωμα για 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με ανακίνηση. Η αραίωση των αντισωμάτων γίνεται σύμφωνα με τον Πίνακα 2.2
- Πλύση με διάλυμα PT (1x PBS, 0.2% TritonX-100) για 10 λεπτά με ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου. Επανάληψη 2 επιπλέον φορές.
- Τοποθέτηση του ιστού που μας ενδιαφέρει μετά από ανατομία σε αντικειμενοφόρο σε μια σταγόνα γλυκερόλης 80%, αν η χρώση είναι χημική ή 0.5% n-propyl-gallate σε 80% γλυκερόλη ή vectashield (Vector) αν η χρώση είναι φθορίζουσα.

8δ1. Χρώση για τις πρωτεΐνες E(spl) με το μονοκλωνικό αντίσωμα 323

- Αμέσως μετά την ανατομία, η κάθε αναποδογυρισμένη προνύμφη τοποθετείται σε διάλυμα μονιμοποίησης (διάλυμα μονιμοποίησης: 4% FA, 1x EM or 1x PEM) στον πάγο. Συλλογή ιστών σε χρόνο μικρότερο από 20 λεπτά.
- Συνέχεια μονιμοποίησης σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά χωρίς ανάδευση.
- Τρεις γρήγορες πλύσεις με 1x PBS.
- Παρεμπόδιση μη ειδικών θέσεων με διάλυμα PBT (PBT: 1x PBS, 0.2% Triton, 0.5% BSA) για τουλάχιστον 30 λεπτά στους 4⁰C με ήπια ανακίνηση.
- Επώαση με το μονοκλωνικό αντίσωμα 323, το οποίο αραιώνεται σε 1:3 PBT, για ολόκληρη τη νύχτα στους 4⁰C με ήπια ανακίνηση.
- Δύο γρήγορες πλύσεις με παγωμένο PBT.
- Επώαση με το κατάλληλο δευτερεύον αντίσωμα, το οποίο αραιώνεται σε PBT, για 2 ώρες στους 4⁰C με ήπια ανακίνηση.
- Δύο γρήγορες πλύσεις με παγωμένο PBT.
- Εμφάνιση χρώσης ή όχι (αν πρόκειται για φθορίζον δεύτερο αντίσωμα) και τοποθέτηση ιστών σε αντικειμενοφόρο με γλυκερόλη για παρατήρηση.

Οι ιστοί πρέπει να τοποθετηθούν αμέσως μετά την ανατομία σε διάλυμα μονιμοποίησης σε πάγο. Αφού συλλεχθούν όλες οι προνύμφες, συνεχίζεται η μονιμοποίηση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά επιπλέον. Με το πρωτόκολλο αυτό οι αναπτυξιακοί δίσκοι γίνονται πιο σκληρούς από το πρωτόκολλο για το Ac (πιο ισχυρή μονιμοποίηση).

5x EM: 150mM Pipes pH 7.4, 800mM KCl, 200mM NaCl, 20mM EDTA, 5mM spermidine-HCl, 2mM spermine-HCl, 1% β-μερκαπτοαιθανόλη, φιλτράρισμα και διατήρηση στους 4⁰C

8δ2. Χρώση για την πρωτεΐνη Achaete

- Συλλογή των ιστών σε διάλυμα μονιμοποίησης για Achaete στον πάγο σε λιγότερο χρόνο από 20 λεπτά.
- Συνέχιση μονιμοποίησης χωρίς ανάδευση για επιπλέον μία ώρα στους 4⁰C (συνέχιση στον πάγο οδηγεί κακή μονιμοποίηση και πολύ μαλακούς ιστούς).
- Τρεις πλύσεις με 1x PBS στον πάγο.
- Παρεμπόδιση μη-ειδικών θέσεων με διάλυμα παρεμπόδισης για Achaete για τουλάχιστον 30 λεπτά στους 4⁰C με ήπια ανακίνηση.
- Επώαση για τουλάχιστον 16 ώρες με αντίσωμα α-Ac, το οποίο έχει αραιωθεί 1:10 σε διάλυμα παρεμπόδισης.
- Τρεις γρήγορες πλύσεις με κρύο διάλυμα πλύσης στον πάγο με ήπια ανάδευση.
- Επώαση με το δευτερεύον αντίσωμα αραιωμένο κατάλληλα (Goat-a-mouse HRP 1:250) σε διάλυμα πλύσης στους 4⁰C με ήπια ανακίνηση για 4-16 ώρες.
- Τρεις γρήγορες πλύσεις με κρύο διάλυμα πλύσης στον πάγο με ήπια ανάδευση.

- Εμφάνιση χημικής χρώσης και τοποθέτηση ιστών σε αντικειμενοφόρο με γλυκερόλη για παρατήρηση.

Διάλυμα μονιμοποίησης: 1xPEM, 1% Triton-X, 1% φορμαλδεΐδη

Διάλυμα παρεμπόδισης: 50mM Tris-Cl, pH 6.8, 150mM NaCl, 0.5% NP-40, 5% NGS, φιλτράρισμα και διατήρηση στους 4⁰C ή παρασκευή φρέσκου διαλύματος κάθε φορά (το NGS ευνοεί την ανάπτυξη βακτηρίων)

Διάλυμα πλύσης: 50mM Tris-Cl, pH 6.8, 150mM NaCl, 0.5% NP-40, 1% NGS, φιλτράρισμα και διατήρηση στους 4⁰C ή παρασκευή φρέσκου διαλύματος κάθε φορά

Διάλυμα εμφάνισης: 0.5mg/ml DAB, 1.5mM Ni⁺⁺/Co⁺⁺ σε διάλυμα πλύσης (για 1ml διαλύματος εμφάνισης: 50μl 10mg/ml DAB, 30μl 50 mM NiCl₂/CoCl₂ και 925μl διάλυμα πλύσης).

8ε. Κυττάρων S2 σε καλλιέργεια

- Αντικειμενοφόροι με ειδικές θέσεις καλύπτονται με 50μg/ ml πολυ-D-λυσίνη σε Tris-Cl pH 8.0: εμβαπτίζονται στο διάλυμα της λυσίνης για 30 λεπτά και στη συνέχεια αυτό αφαιρείται και αφήνεται να στεγνώσει για πολλές ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή για περίπου μισή ώρα στους 65⁰C.
- Σε κάθε θέση (πηγαδάκι) της αντικειμενοφόρου τοποθετούνται 30-40μl κυτταρικού εναιωρήματος (μετά από μία πλύση με 1x PBS) και τα κύτταρα αφήνονται να προσκολληθούν για περίπου 30 λεπτά σε πιατάκι με υγρασία (για να μην στεγνώσουν)
- Μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα 2% φορμαλδεΐδης σε 1x PBS (το εν λόγω προστίθεται στην αντικειμενοφόρο ανάμεσα και πάνω στις θέσεις που περιέχουν τα κύτταρα) σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.
- Αφαίρεση του διαλύματος μονιμοποίησης και ξέπλυμα 3 φορές με 1x PBS. Προσεκτικά, αφαιρείται η υγρασία ανάμεσα από τις θέσεις, όπου βρίσκονται τα κύτταρα.
- Προσθήκη του πρωτεύοντος αντισώματος, το οποίο αραιώνεται κατάλληλα σε διάλυμα PBT. Επώαση για 1- 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου σε πιατάκι με υγρασία (κορεσμένο σε υγρασία τρυβλίο πετρί!!!).
- 3 πλύσεις με 1x PBS.
- Επώαση με το κατάλληλο δευτερεύον αντίσωμα, το οποίο αραιώνεται σε διάλυμα PBT, σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα (αν το αντίσωμα που χρησιμοποιείται είναι φθορίζον, το τρυβλίο διατηρείται σε σκοτεινό μέρος).
- 3 πλύσεις με 1x PBS και προσθήκη 0.5% n-propyl-gallate σε 80% γλυκερόλη ή vectashield (Vector) και καλυπτρίδα.

9. Μελέτη της ενδοκύττωσης σε ιστούς προνύμφης Δροσόφιλας

- Ανατομία προνυμφών τρίτου σταδίου σε θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιιεργειών M3 με 10% FBS (Gibco) και τοποθέτησή τους σε θρεπτικό στον πάγο (όχι περισσότερο από 20 λεπτά).
- Επώαση σε θρεπτικό μέσο M3 (με 10% FBS) με 0.5mM έως 1mM FITC-Dextran ή Texas Red-Dextran (MW 3000, anionic, lysine fixable, Molecular Probes) σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10 λεπτά (pulse). Σε αυτό το χρονικό διάστημα η δεξτράνη προσκολλάται στην επιφάνεια των κυττάρων και αρχίζει να ενδοκυττώνεται. (Η δεξτράνη είναι ένα αδρανές πολυμερές που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη μεμβρανικών κινήσεων).
- Πλύση με θρεπτικό μέσο M3 (με 10% FBS) σε θερμοκρασία πάγου, πέντε φορές, από 2 λεπτά. Σε αυτό το στάδιο απομακρύνεται η περίσσεια της δεξτράνης που βρίσκεται έξω από τα κύτταρα.
- Επώαση σε θρεπτικό μέσο M3 (με 10% FBS) σε θερμοκρασία δωματίου για 0 (έλεγχος), 10 (πρώιμα ενδοκυττωτικά διαμερίσματα) ή 60 λεπτά (όψιμα ενδοκυττωτικά διαμερίσματα). (Chase) (Εναλλακτικά, για να μπορέσουμε να παρατηρήσουμε την ενδοκύττωση γενικά, χωρίς να εστιαστούμε σε συγκεκριμένο στάδιο μπορούμε να επώασουμε τους ιστούς για 20 λεπτά σε M3 με 10% FBS).
- Μονιμοποίηση σε 4% φορμαλδεΰδη/ 1x PEM για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Οι ιστοί είναι έτοιμοι για ανοσοϊστοχημεία με τα κατάλληλα αντισώματα.

10. Συνανοσοκατακρήμιση

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για να δειχθεί η αλληλεπίδραση ανάμεσα στην πρωτεΐνη Neur και σε άλλες που πιθανόν αλληλεπιδρούν ή βρίσκονται στο ίδιο πρωτεϊνικό σύμπλοκο με αυτήν, πχ. υποδοχέας Notch και οι δεσμευτές του Delta και Serrate.

Χρησιμοποιούνται πρωτεϊνικά εκχυλίσματα είτε από κύτταρα σε καλλιέργεια που έχουν διαμολυνθεί με τα κατάλληλα πλασμίδια είτε από προνύμφες Δροσόφιλας τρίτου σταδίου που υπερεκφράζουν τα υπό μελέτη γονίδια. Στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιούνται 5×10^6 διαμολυσμένα κύτταρα και στην δεύτερη τουλάχιστον 30 σύμπλοκα νευρικού συστήματος/ αναπτυξιακών δίσκων που υπερεκφράζουν τα γονίδια είτε κάτω από τον έλεγχο του *hsGal4* ή του *ombGal4*.

- 5×10^6 S2 διαμολυσμένα κύτταρα ξεπλένονται 2 φορές με 1x PBS και λύνονται σε 500μl διάλυμα λύσης* (300mM NaCl, 50mM Tris-Cl, pH8.0, 0.5% NP-40, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂ και αναστολείς πρωτεασών**) με τη μέθοδο της ψύξης (ξηρός πάγος/ αιθανόλη ή -80°C)/ θέρμανσης (37°C) για τρεις φορές.
- Φυγοκέντρηση στις 14000 στροφές, για 15 λεπτά στους 4°C . Διατήρηση υπερκειμένου. (Διατήρηση 5μl εκχυλίσματος για έλεγχο της ποσότητας των εκφρασμένων πρωτεϊνών).
- Προσθήκη αντισώματος (5μl Rabbit-anti-Neur1050) και επώαση στους 4°C με ανακίνηση σε «λούνα παρκ» για 3-4 ώρες. Σε αυτό το διάστημα το αντίσωμα προσδένεται στην πρωτεΐνη/ αντιγόνο.
- Προσθήκη 50μl σφαιριδίων protein A***, η οποία έχει προηγουμένως εξισορροπηθεί με διάλυμα λύσης NP-40 χωρίς αναστολείς πρωτεασών και επώαση στους 4°C με ανακίνηση σε «λούνα παρκ» για 3-4 ώρες.
- Φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές στους 4°C για 2 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκειμένου (τα σφαιρίδια, το αντίσωμα και το αντιγόνο μαζί με τις πρωτεΐνες που ενδεχομένως είναι στο σύμπλοκο κατακρημνίζονται).
- Πλύση με 1-1.5ml διάλυμα λύσης χωρίς αναστολείς πρωτεασών (ήπια ανάδευση και διατήρηση στον πάγο για λίγα λεπτά), φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές στους 4°C για 2 λεπτά και απομάκρυνση υπερκειμένου. Επανάληψη 2 φορές.
- Επαναιώρηση σφαιριδίων που φέρουν τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα σε 1x διάλυμα Laemmli και διατήρηση στους -80°C .

Όταν χρησιμοποιούνται προνύμφες ή έμβρυα Δροσόφιλας για συνανοσοκατακρήμιση, συλλέγονται σε 500μl διάλυμα λύσης (για τις προνύμφες μόνο το εμπρόσθιο μέρος του σώματος μετά από ανατομία και απομάκρυνση του εντέρου, των σιελογόνων αδένων και του λιπαρού σώματος – όταν χρησιμοποιούνται ολόκληρες οι προνύμφες το εκχύλισμα είναι πολύ βρώμικο), ομογενοποιούνται με μπλε ομογενοποιητή μέσα στο 1.5ml σωληνάκι και φυγοκεντρώνται για τουλάχιστον 30 λεπτά στις 14000 στροφές, στους 4°C .

*Άλλα διαλύματα λύσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

Διάλυμα λύσης NP-40: 150mM NaCl, 1% NP-40, 50mM Tris-Cl, pH 8.0, 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂ και αναστολείς πρωτεασών

Διάλυμα λύσης RIPA: 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Deoxycholate, 0.1% SDS, 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂ και αναστολείς πρωτεασών

**Αναστολείς πρωτεασών: 1μg/ml leupeptin, 1μg/ml aprotinin, 1μg/ml pepstatin, 100 μg/ml PMSF. Το PMSF προστίθεται μόνο αμέσως πριν τη λύση, γιατί είναι ασταθές σε υδατικό διάλυμα.

Το κατάλληλο διάλυμα για κάθε συνανοσοκατακρήμνιση εξαρτάται από τη φύση των πρωτεϊνών που επιθυμούμε να μελετήσουμε. Ένα καλό ξεκίνημα είναι να χρησιμοποιήσουμε κάποιο απορρυπαντικό και κάποιο αλάτι κατά περίπτωση. Το ποιο διάλυμα λύσης είναι το ιδανικό, καθορίζεται από το κάθε πείραμα. (Δες “Using antibodies” Κεφ. 7, σελ. 223 και “Antibodies” Κεφ. 11, σελ. 421)

***Η επιλογή για την φύση των σφαιριδίων (protein A ή protein G) που θα χρησιμοποιηθούν για την ανοσοκατακρήμνιση είναι άμεσα εξαρτώμενη από το αντίσωμα που επιθυμούμε να κατακρημνίσουμε. Γενικά, τα αντισώματα που έχουν παρασκευαστεί σε κουνέλια αναγνωρίζονται από protein A, ενώ τα ποντικίσια αντισώματα αναγνωρίζονται είτε από protein A ή protein G, ανάλογα με τον ισότυπό τους (Βλέπε “Using antibodies”, Κεφ. 7, σελ. 245)

11. Ανάλυση RNA

11.1. Εκχύλιση RNA και Αντίστροφη Μεταγραφή ακολουθούμενη από PCR

α. Εκχύλιση RNA από πονύμφες Δροσόφιλας

Όταν δουλεύουμε με RNA, αποστειρώνουμε δύο φορές τα διάφορα πλαστικά (σωληνάκια erpendorf, και ακρορύγχια) και πλένουμε καλά με απορρυπαντικό τους μπλε ομογενοποιητές, που θα χρησιμοποιηθούν. Επιπλέον, χρησιμοποιούμε ακρορύγχια με φίλτρο για να χειριζόμαστε ένζυμα και ρυθμιστικά διαλύματα, ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα μόλυνσης με RNases.

- Ομογενοποίηση ιστού (5-10 πονύμφες Δροσόφιλας 3ου σταδίου ή 20-30 σύμπλοκα νευρικού συστήματος και αναπτυξιακών δίσκων ή 20-40 δίσκοι φτερού) σε 1ml Trizol (Invitrogen) με μπλε ομογενοποιητή που εφαρμόζει σε σωληνάκι erpendorf. Μέχρι να συλλεχθεί όλο το απαιτούμενο δείγμα μπορούμε να παγώσουμε σε υγρό άζωτο ή ξηρό πάγο/ αιθανόλη.
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά (ή διατήρηση στους -80°C για περίπου ένα μήνα).
- Προσθήκη 200μl χλωροφόρμιο ανά ml Trizol. Δυνατό ανακάτεμα για 15-20 δευτερόλεπτα.
- Φυγοκέντρηση στις 12000g για 15 λεπτά στους 4°C .
- Διατήρηση υπερκειμένου και προσθήκη 0.5ml αιθανόλης ανά ml Trizol. Ανακάτεμα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση στις 12000g για 15 λεπτά στους 4°C .
- Διατήρηση ιζήματος και πλύση με 70% αιθανόλη (σε αυτό το στάδιο το RNA μπορεί να διατηρηθεί για περίπου μία εβδομάδα στους 4°C). Στέγνωμα στον αέρα.
- Επαναδιάλυση ιζήματος που περιέχει το RNA σε καθαρό νερό.

Αν οι εκκινητές που θα χρησιμοποιηθούν για την τελική ανίχνευση των μεταγράφων που μας ενδιαφέρουν δεν περιλαμβάνουν περιοχή ιντρονίου, θα πρέπει να ακολουθήσει αντίδραση απομάκρυνσης του γενωμικού DNA με τη χρήση DNase. (Η μόλυνση με γενωμικό DNA είναι πολύ συχνή με την παραπάνω μέθοδο παρασκευής RNA).

Για 20μg συνολικού RNA σε αντίδραση 50μl χρησιμοποιούνται:

10μl 5x DNaseI ρυθμιστικό διάλυμα (Roche)

1μl DNaseI (1Unit, Roche)

Η αντίδραση επώαζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Ακολουθεί εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο (οι φυγοκεντρήσεις και η διατήρηση των δειγμάτων από το στάδιο αυτό και μετά είναι στους 4°C ή σε πάγο) και κατακρήμνιση με αιθανόλη και οξικό νάτριο. Η ποσοτικοποίηση του RNA γίνεται με φωτομέτρηση.

β. Αντίστροφη μεταγραφή και σύνθεση cDNA

Σε αντίδραση 20μl χρησιμοποιούνται 5μg ολικού RNA.

- Ανάμιξη 250ng τυχαίων εκκινητών με 5μg ολικού RNA και 1μl από μίγμα 10mM dNTPs (10mM από καθένα dATP, dGTP, dCTP dTTP) σε τελικό όγκο 13μl.

- Θέρμανση της αντίδρασης στους 65⁰C για 5 λεπτά και επώαση στον πάγο για τουλάχιστον 1 λεπτό.
- Σύντομη φυγοκέντρηση και προσθήκη στο ίδιο σωληνάκι 4μl 5x ρυθμιστικό διάλυμα σύνθεσης (Invitrogen), 1μl 0.1M DTT και 1μl αντίστροφης μεταγραφάσης Superscript III (200 units/ μl, Invitrogen).
- Ανάμιξη και επώαση στους 25⁰C για 5 λεπτά (όταν χρησιμοποιούνται τυχαίοι εξαμερείς εκκινητές).
- Επώαση στους 50⁰C για 1 ώρα. (Αν χρησιμοποιείται ειδικός εκκινητής ή αν το RNA έχει δευτεροταγείς δομές, η αντίδραση μπορεί να επωαστεί στους 55⁰C).
- Απενεργοποίηση της αντίδρασης με θέρμανση στους 70⁰C για 15 λεπτά.
- Το cDNA είναι τώρα έτοιμο για αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. (Αν το τελικό προϊόν που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε είναι μεγαλύτερο από 1kb, είναι χρήσιμη η απομάκρυνση του υβριδίου RNA/ cDNA με τη χρήση της RNaseH: προσθήκη 1μl (2units) και επώαση για 20 λεπτά στους 37⁰C).

γ. Ανίχνευση του μεταγράφου του γονιδίου *mind bomb1*

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκε για να ανιχνευθεί το μετάγραφο του *mind bomb1 (mib1)* χρησιμοποιώντας ως μήτρα cDNA από σύμπλοκα νευρικού συστήματος/ αναπτυξιακών δίσκων προνύμφης Δροσόφιλας τρίτου σταδίου. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση είναι:

FOR1: 5'-ATGTCTTGTGCGGCCACCCT-3' και

REV: 5'-GCACGCGGCCGATCTTTC-3'

2μl cDNA (1/10 αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής)

1μl εκκινητή FOR1 (20pmole/ μl)

1μl εκκινητή REV (20pmole/ μl)

5μl 2mM dNTPs

5μl 10x ρυθμιστικό διάλυμα Taq πολυμεράσης (+MgCl₂)

0.5μl Taq πολυμεράση (2.5 units)

35.5μl H₂O

Η αντίδραση γίνεται με το ακόλουθο πρόγραμμα:

94⁰C για 5 λεπτά: αρχική αποδιάταξη

94⁰C για 1 λεπτό: αποδιάταξη

64⁰C για 1 λεπτό: annealing

72⁰C για 1.5 λεπτό: επιμήκυνση

72⁰C για 10 λεπτά: τελική επιμήκυνση

} για 35 κύκλους

Καθώς δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση του μεταγράφου του *mib1* στην παραπάνω αντίδραση, το προϊόν αυτής χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για «φωλιασμένο» PCR, με ζεύγος εκκινητών:

FOR2: 5'-TTCCCTTCCCGGTGGCAC-3' και

REV: 5'-GCACGCGGCCGATCTTTC-3'

Το 1/25 από την αρχική αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα στο πρόγραμμα που περιγράφεται παραπάνω.

Με τον τρόπο αυτό ανιχνεύθηκε η παρουσία του μεταγράφου του γονιδίου *mib1* σε αγρίου τύπου προνύμφες και αποδείχθηκε ότι το γονίδιο δεν εκφράζεται σε μεταλλαγή *mib1*^{EY9780} (Εικ. 3.16E).

Ως αντίδραση ελέγχου για την ποιότητα του cDNA, χρησιμοποιήθηκε PCR με εκκινητές που ανιχνεύουν την παρουσία του μεταγράφου της α -τουμπουλίνης84B.

94⁰C για 5 λεπτά: αρχική αποδιάταξη

94⁰C για 1 λεπτό: αποδιάταξη

50⁰C για 1 λεπτό: annealing

72⁰C για 0.5 λεπτό: επιμήκυνση

72⁰C για 10 λεπτά: τελική επιμήκυνση

για 25 κύκλους

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις είναι σχεδιασμένοι έτσι ώστε να διατρέχουν ένα ιντρόνιο, οπότε μπορεί να διακριθεί από τη διαφορά στο μέγεθος η ζώνη που αντιστοιχεί στο cDNA από πιθανή ζώνη προερχόμενη από γενωμικό DNA.

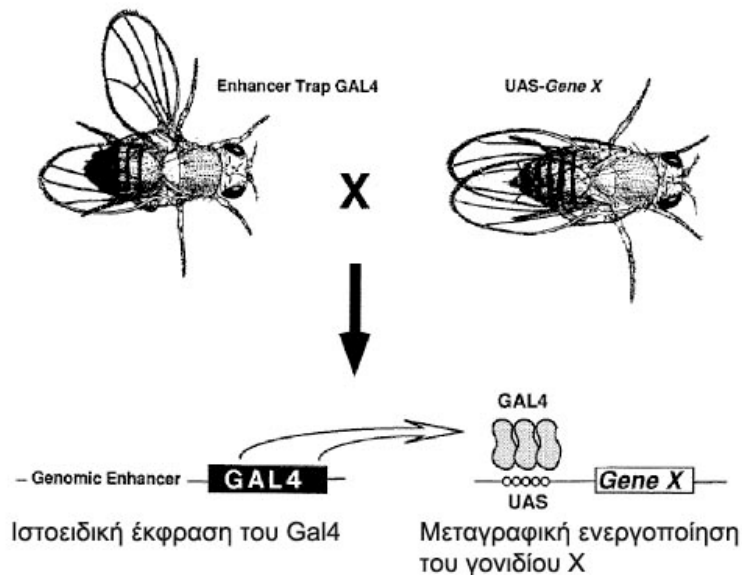
11.2. Υβριδοποίηση in situ με RNA ανιχνευτή

RNA ανιχνευτές που αντιστοιχούν στην κωδική (πείραμα ελέγχου) και αντικωδική αλληλουχία του δευτέρου εξονίου του *mib1* (Κανακουσάκη Κ., Πτυχιακή εργασία) σημασμένοι με Digoxigenin-UTP (Roche) παρασκευάστηκαν (με το cDNA Synthesis Kit της Stratagene). Η υβριδοποίηση in situ για την ανίχνευση μεταγράφων του *mib1* σε έμβρυα και προνύμφες Δροσόφιλας πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Tautz and Pfeifle 1989 με μικρές παραλλαγές.

12. Γενετική

Το σύστημα εκτοπικής έκφρασης Gal4-UAS (Brand and Perrimon, 1993)

Ο ενεργοποιητής Gal4 χρησιμοποιείται για να οδηγήσει την έκφραση διαγονιδίων που φέρουν ρυθμιστική αλληλουχία UAS. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η εκτοπική έκφραση διαγονιδίων σε συγκεκριμένο χωροχρονικό πρότυπο, ανάλογα με τη σειρά Gal4 που χρησιμοποιείται (Εικ. 2.1).



Εικόνα 2.1. Το σύστημα εκτοπικής έκφρασης Gal4-UAS

Ο ενεργοποιητής Gal4 βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο ενός ιστοειδικού υποκινητή και το διαγονίδιο UAS εκφράζεται μεταγραφικά μόνο στο ειδικό πρότυπο του ενεργοποιητή Gal4.

Στελέχη Δροσόφιλας που χρησιμοποιήθηκαν:

Gal4 σειρές:

C253-Gal4 (Flybase: *P{GawB}C253*)

hs-sev-Gal4 (Flybase: *P{GAL4-Hsp70.sev}2*)

dpp-Gal4^{40C6} (Flybase: *P{GAL4-dpp.blk1}40C.6*)

act>CD2stop>Gal4 (Flybase: *P[GAL4-Act5C(FRT.CD2).P]S*)

neurGal4

UAS σειρές:

UAS-srcGFP¹⁰ (Flybase: *P{UAS-Src-GFP(S65T/I167T)}*)

UAS-fng^{22c} (Flybase: *P{UAS-fng.K}*)

UAS-Dl^{B41} (Flybase: *P{UAS-Dl.L}*)

UAS-Sermyc^{IC} (Flybase: *P{UAS-Ser.G}?*)

UAS-neur (Flybase: *P{UAS-neur.P}*)

UAS-neurΔRING-GFP (Flybase: *P{UAS-neur.DeltaRING::EGFP}*)

UAS-DIV5His (this work)

UAS-EGFP-neur (this work)

UAS-lacZ

UAS-EGFP

UAS-shiDN

LacZ σειρές

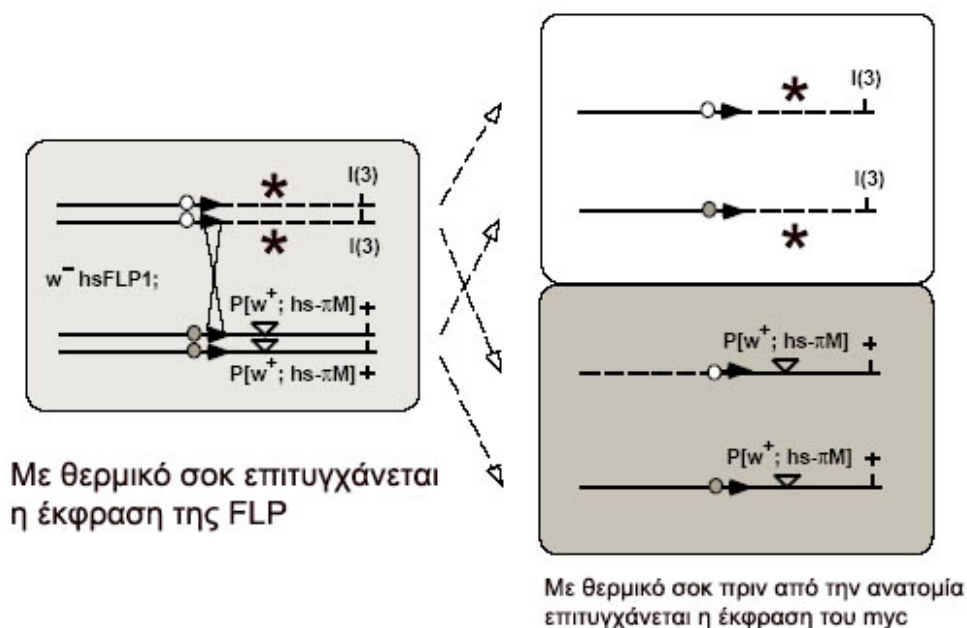
neur^{A101}-lacZ

N-lacZ

Dl-lacZ

Το σύστημα μιτωτικών κλώνων FLP/FRT

Με τη χρήση ενός ενζύμου (Flipase) που έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει και να ανασυνδυάζει συγκεκριμένες αλληλουχίες (Flipase Recognition Targets) επιτυγχάνεται στη Δροσόφιλα μιτωτικός ανασυνδυασμός. Η φλιπάση βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο θερμοενεργοποιούμενου (heat-shock) υποκινητή και αφού εκφραστεί, ανασυνδυάζει σε τυχαία κύτταρα τα FRT. Με το τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η δημιουργία κλώνων κυττάρων που φέρουν μία μεταλλαγή (πχ ενός θνησιγόνου γονιδίου) σε ομοζυγωτία (Xu and Rubin, 1993). Εικ. 2.2



Εικόνα 2.2: Το σύστημα μιτωτικών κλώνων FLP/FRT.

Το ετερόζυγο άτομο φέρει τη μεταλλαγή του γονιδίου που επιθυμούμε να μελετήσουμε (*) δίπλα σε ένα FRT (αυτό επιτυγχάνεται με μειωτικό ανασυνδυασμό) και το ομόλογο χρωμόσωμα φέρει ένα γονίδιο-μάρτυρα (πχ *πMyc* ή *GFP*) δίπλα στο αντίστοιχο FRT. Ο ανασυνδυασμός ανάμεσα στα FRT επιτυγχάνεται με την FLP, η οποία βρίσκεται υπό τον έλεγχο θερμοεπαγόμενου υποκινητή. Τελικά, σε τυχαίες θέσεις στον ετερόζυγο ιστό, προκύπτουν δύο κύτταρα, ένα από αυτά φέρει τη μεταλλαγή σε ομοζυγωτία (και δεν έχει τον μάρτυρα: κλώνος) και ένα άλλο που φέρει δύο αντίγραφα του μάρτυρα (twin spot).

Συμβατικοί FLP/ FRT μιτωτικοί κλώνοι προέκυψαν από τις παρακάτω διασταυρώσεις:

$y w hsFLP/w; FRT82B neur^1/FRT82B hsGFP$ ή $FRT82B arm-lacZ$

$y w hsFLP/w; FRT82B Df^{rev10}/FRT82B hsGFP$

$y w hsFLP/w; FRT82B P[gro^+] Df(3R)b32.2/FRT82B hsGFP$

Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις οι προνύμφες υφίστανται 1 ώρα θερμικό σοκ στους 37.5°C και αφήνονται για 1.5-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (για την έκφραση της *hsGFP*) πριν την ανατομία.

$y w^a N^{5419} FRT18A/FM7 \times UbiGFP FRT18A; hsFLP^3/TM6B$

$y w hsFLP^{122}; UbiGFP FRT2A/TM6B \times y w; mib^{EY9780} FRT2A/TM6B$

$y w hsFLP^{122}; mib1^{EY9780} FRT82B UbiGFP/TM6B \times y w; mib^{EY9780} FRT82B neur^1/TM6B$

$y w hsFLP^{122}; mib1^{EY9780} FRT82B UbiGFP/TM6B \times y w; mib^{EY9780} FRT82B Df^{rev10}/TM6B$

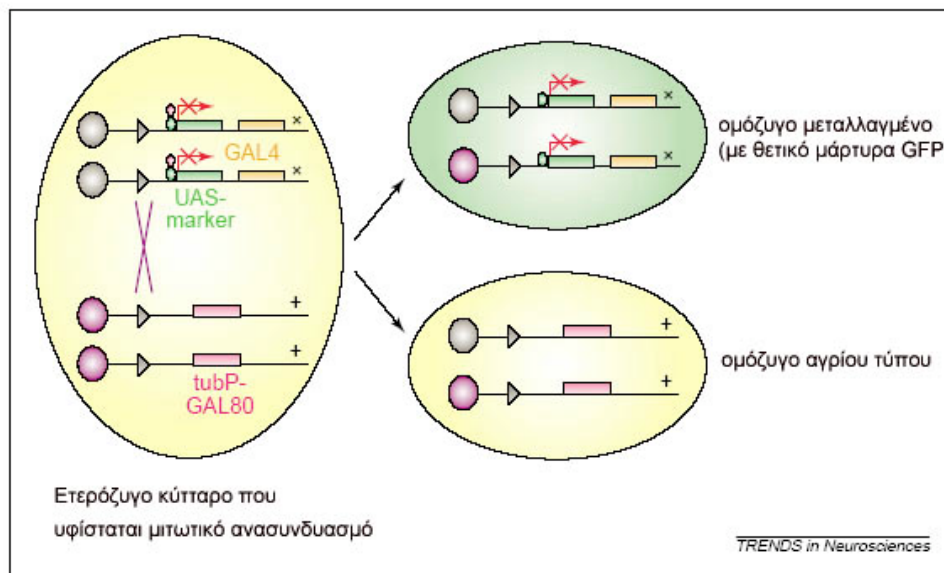
$y w hsFLP^{122}; mib1^{EY9780} FRT82B UbiGFP/TM6B \times y w; mib^{EY9780} FRT82B Ser^{RX106}/TM6B$

$y w hsFLP^{122}; mib1^{EY9780} FRT82B UbiGFP/TM6B \times y w; mib^{EY9780} FRT82B Df(3R)b32.2/TM6B$

$y w hsFLP^{122}; mib1^{EY9780} FRT82B UbiGFP/TM6B \times y w; mib^{EY9780} FRT82B neur^1/TM6B$

Το σύστημα μιτωτικών κλώνων με ταυτόχρονη υπερέκφραση *FLP/FRT/Gal4/Gal80*

Το σύστημα αυτό είναι συνδυασμός των μιτωτικών κλώνων *FLP-FRT* και του συστήματος εκτοπικής έκφρασης *Gal4-UAS* (MARCM: Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker). Ο καταστολέας του *Gal4*, *Gal80*, χρησιμοποιείται για να κρατάει “σβησμένο” το *UAS* διαγονίδιο. Στα κύτταρα των κλώνων με την ομόζυγη επιθυμητή μεταλλαγή, που δεν έχουν τον *Gal80* καταστολέα, επιτρέπεται η έκφραση του διαγονιδίου (Lee and Luo, 2001).



Εικόνα 2.3: Το σύστημα MARCM

Το ετερόζυγο για τη μεταλλαγή μητρικό κύτταρο φέρει ταυτόχρονα τον ενεργοποιητή *Gal4* και τον καταστολέα του *Gal80*, καθώς επίσης και το διαγονίδιο *UAS* που επιθυμούμε να υπερεκφράσουμε. Εξαιτίας της παρουσίας του καταστολέα, παρεμποδίζεται η έκφραση του *Gal4* και κατ'έκταση του διαγονιδίου *UAS*. Όταν γίνει ο μιτωτικός ανασυνδυασμός, ο καταστολέας *Gal80* διαχωρίζεται από το κύτταρο που φέρει τη μεταλλαγή, οπότε στο ομόζυγο μεταλλαγμένο κύτταρο εκφράζεται ο ενεργοποιητής *Gal4* και το διαγονίδιο *UAS*. Οι κλώνοι αυτοί μπορούν να σημανθούν θετικά από την έκφραση ενός διαγονιδίου *UAS-GFP*.

Για μιτωτικούς κλώνους MARCM στο 3R, $y w hsFLP^{122} tubGal4 UAS-GFP-6xnl5; FRT82B tubGal80/ TM6B$ θηλυκές διασταυρώθηκαν με αρσενικά με τους ακόλουθους γονότυπους:

$w; FRT82B Df^{rev10} e Ser^{RX106}/TM6B$
 $w; FRT82B Df^{rev10}/TM6B$
 $w; FRT82B e Ser^{RX106}/TM6B$
 $w; FRT82B neur^1 cu/TM6B$
 $w; FRT82B neur^1 cu Df^{rev10}/TM6B$
 $w; FRT82B neur^1 cu e Ser^{RX106}/TM6B$
 $w; FRT82B Df(3R)b32.2/TM6B$
 $w; FRT82B neur^1 cu e Df(3R)b32.2/TM6B$

$w; UAS-Df^{B41}; FRT82B Df^{rev10} e Ser^{RX106}/T(2;3)SM5;TM6B$
 $w; UAS-Sermyc^{1C}; FRT82B Df^{rev10} e Ser^{RX106}/T(2;3)SM5;TM6B$
 $w; UAS-fng^{22C}; FRT82B Df^{rev10}/T(2;3)SM5;TM6B$
 $w; UAS-Sermyc^{1C}; FRT82B Df^{rev10}/T(2;3)SM5;TM6B$
 $w; UAS-neur^{27.1}; FRT82B Df^{rev10}/T(2-3)SM5;TM6B$
 $w; UAS-neur^{27.1}; FRT82B e Ser^{RX106}/T(2;3) SM5;TM6B$
 $w; UAS-Df^{B41}; FRT82B hs\pi myc/T(2;3) SM5;TM6B$
 $w; UAS-Sermyc^{1C}; FRT82B hs\pi myc/T(2;3) SM5;TM6B$
 $w; UAS-fng^{22C}; FRT82B hs\pi myc/T(2;3) SM5;TM6B$
 $w; UAS-DIV5; FRT82B hs\pi myc/T(2;3) SM5;TM6B$
 $w; UAS-DIV5 UAS-EGFP-neur^{1m2}; FRT82B hs\pi myc/T(2;3) SM5;TM6B$
 $w; UAS-DIV5 UAS-neur\Delta R^{8A}; FRT82B hs\pi myc/T(2;3) SM5;TM6B$

Για μιτωτικούς κλώνους MARCM στο 3L, $y w hsFLP^{122} tubGal4 UAS-GFP-6xnl5; UAS-y^+; tubG80 FRT2A/ TM6B$ θηλυκές διασταυρώθηκαν με αρσενικά με τους ακόλουθους γονότυπους:

$yw; lqf FRT2A/TM6B$
 $yw; mib^{EY9780} FRT2A/TM6B$
 $w; UAS-DIV5; mib^{EY9780} FRT2A/T(2;3) SM5;TM6B$
 $w; UAS-Sermyc^{1C}; mib^{EY9780} FRT2A/T(2;3) SM5;TM6B$
 $w; UAS-DIV5 UAS-EGFP-neur^{1m2}; mib^{EY9780} FRT2A/T(2;3) SM5;TM6B$
 $w; UAS-Sermyc^{1C} UAS-EGFP-neur^{1m2}; mib^{EY9780} FRT2A/T(2;3) SM5;TM6B$
 $w; UAS-DIV5 UAS-neur\Delta R^{8A}; mib^{EY9780} FRT2A/T(2;3) SM5;TM6B$

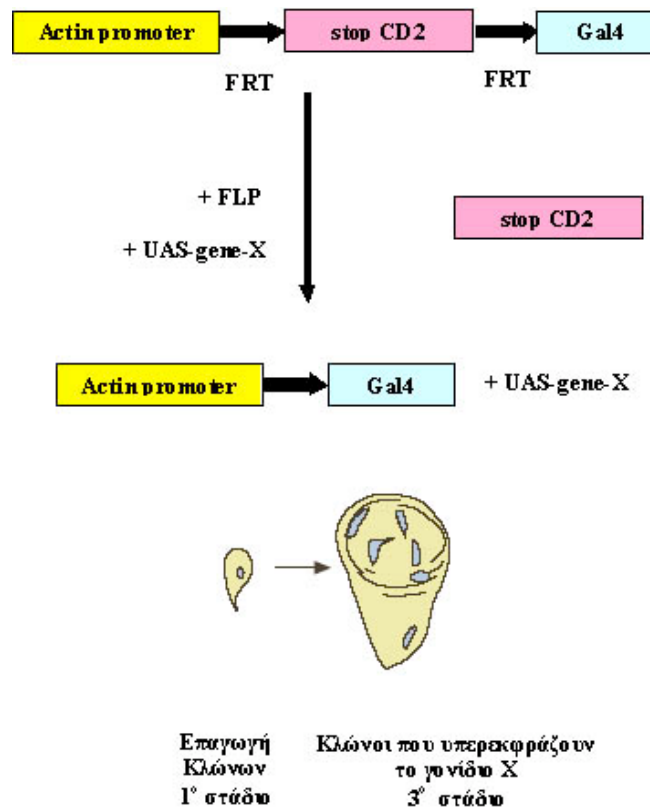
Για την δημιουργία *mibI*⁻ μιτωτικών κλώνων δίπλα σε μία περιοχή που υπερεκφράζει DI, προνύμφες Δροσόφιλας με τον ακόλουθο γονότυπο υπέστησαν χρώση: *y w hsFLP¹²²/+; ptcGal4/ UAS-DI^{B41}; UbiGFP FRT2A/ mib^{EY9780} FRT2A*

Για την δημιουργία μιτωτικών κλώνων υπερέκφρασης (de Celis and Bray, 1997, Εικ. 2.4), προνύμφες Δροσόφιλας με τον ακόλουθο γονότυπο υπέστησαν χρώση:

y w hsFLP¹²²/+; UAS-EGFP-neur^{1m2}/+; act>CD2stop>Gal4/+

y w hsFLP¹²²/+; UAS -neur^{27.1}/+; act>CD2stop>Gal4/+

y w hsFLP¹²²/+; UAS-neurΔRING-GFP^{08A}/+; act>CD2stop>Gal4/+



Εικόνα 2.4: Μιτωτικοί κλώνοι υπερέκφρασης (FLP-out)

Στο μητρικό κύτταρο, τα FRT τοποθετούνται in cis μεταξύ ενός ομοιόμορφα εκφραζόμενου υποκινητή και του ενεργοποιητή Gal4, οπότε το Gal4 δεν εκφράζεται. Όταν γίνει ανασυνδυασμός από την FLP, το Gal4 έρχεται στον έλεγχο του υποκινητή της ακτίνης και επιτρέπεται η έκφραση του διαγονιδίου UAS μέσα στο κύτταρο. Οι κλώνοι μαρκάρονται στην προνύμφη είτε από την παρουσία ενός διαγονιδίου UAS-GFP ή από την απουσία του μάρτυρα CD2.

Οι μιτωτικοί κλώνοι επήχθησαν σε προνύμφες Δροσόφιλας πρώτου ή δευτέρου σταδίου με θερμικό σοκ στους 37.5⁰C για 1hr, εκτός από την περίπτωση των κλώνων υπερέκφρασης, οπότε θερμικό σοκ 20 min ήταν αρκετό.

13. Μικροσκοπία

Οι φωτογραφίες ορατού φωτός ελήφθησαν σε μικροσκόπιο Leica Diaplan με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή (Spot).

Η φωτογράφιση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων με φθορίζοντα αντισώματα έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS ή BioRad με χρήση του κατάλληλου λέιζερ για κάθε χρωστική.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.1: Πρωτεύοντα Αντισώματα και χρήση τους

Αντίσωμα	Αραίωση για Western	Αραίωση για Ανοσο-ϊστοχημεία	Προέλευση	Ειδικότητα
m-a-DI C594.9B/ or 202	1:10000 χωρίς αναγωγικούς παράγοντες/ βράσιμο	1:5000 λειτουργικό χωρίς απορρυπαντικό για εξωκυττάρια χρώση 4% FA/ 1x PEM	SAT	Εξωκυττάρια περιοχή της πρωτεΐνης DI (αντιγόνο: 190-833aa) της Δροσόφιλας/ αναγνωρίζει τις EGF επαναλήψεις 4-5 (MATM) (Qi et al., 1999)
m-a-N C17.9C6	1:5000	1:1000 4% FA/ 1x PEM	SAT	Ενδοκυττάρια περιοχή του υποδοχέα N της Δροσόφιλας (Fehon et al., 1990)
m-a-N C458.2H	1:1000 χωρίς αναγωγικούς παράγοντες/ βράσιμο	1:100 λειτουργικό χωρίς απορρυπαντικό για εξωκυττάρια χρώση 4% FA/ 1x PEM	DSHB	Εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα N (επαναλήψεις EGF 12-20) της Δροσόφιλας (Diederich et al., 1994)
m-a-FasIII 7G10	δεν δουλεύει/ ούτε σε IP	1:100 λειτουργικό χωρίς απορρυπαντικό για εξωκυττάρια χρώση 4% FA/ 1x PEM	DSHB	Εξωκυττάρια περιοχή της Fasciclin III της Δροσόφιλας / μάρτυρας της κορυφαίας περιοχής των επιθηλιακών κυττάρων (Patel et al., 1987)
m-a-Arm N2 7A1		1:50 4% FA/ 1x PEM	DSHB	Πρωτεΐνη Armadillo (670-725aa αμινοτελικό τεμάχιο) της Δροσόφιλας/ μάρτυρας της κορυφαίας και πλάγιας επιφάνειας των επιθηλιακών κυττάρων (Riggleman et al., 1990)
m-a-Crb Cq4		1:5 4% FA/ 1x PEM	DSHB	Πρωτεΐνη Crumbs (737-1703aa) της Δροσόφιλας / μάρτυρας της κορυφαίας περιοχής των επιθηλιακών κυττάρων (Tepass et al., 1990)
m-a-b-Tubulin E7	1:1000 δεν δουλεύει χωρίς βρασμό		DSHB	β-τουμπουλίνη Chu et al. (1987). First Int. Symp. Cytosk. Dev. 8: 140-142
m-a-Neur	1:2000	1:500 (preadsorb)	X (βλέπε σελ.39)	Πρωτεΐνη Neuralized (11-230aa) της Δροσόφιλας/ σημαίνει τα κύτταρα ΠΑΟ/ μεμβρανική χρώση
m-a-Myc 9E10	1:1000	1:500 4% FA/ 1x PEM σύντομες πλύσεις	DSHB	Επίτοπος myc (ανθρώπινη c-myc 408-432aa) (Evan et al., 1985)
m-a-E(spl) 323	1:30	1:3 4% FA/ 1x EM συλλογή στο διάλυμα σε πάγο κατά την ανατομία	S. Bray	Πρωτεΐνες του συμπλόκου E(spl) της Δροσόφιλας/ σημαίνει τα κύτταρα του προνευρικού συναθροισμού εκτός από τα κύτταρα ΠΑΟ (Jennings, et al, 1994)

m-a-V5	1:5000	1:500	Invitrogen (R960-25)	Επίτοπος V5 (GKPIPNPLLGLDST) (Southern et al., 1991)
m-a-Gro	1:100	1:10 4% FA/ 1x PEM σύντομες πλύσεις	XD	Πρωτεΐνη Groucho της Δροσόφιλας/ εκφράζεται ομοιόμορφα/ πυρηνική χρώση (Delidakis et al., 1991)
m-a-Ac		1:100 ειδικός τρόπος μονιμοποίησης για Achaete	DSHB	Πρωτεΐνη Achaete της Δροσόφιλας/ σημαίνει τα κύτταρα του προνευρικού συναθροισμού (Skeath and Carroll, 1991)
m-a-β'Gal	1:5000	1:1000 4% FA/ 1x PEM	Promega	β-γαλακτοσιδάση της <i>E. coli</i>
m-a-Wg 4D4		1:50 4% FA/ 1x PEM	DSHB	Πρωτεΐνη Wingless της Δροσόφιλας/ σημαίνει τα κύτταρα του ραχιαοκοιλιακού ορίου του φτερού/ κυτταροπλασματική χρώση (Brook and Cohen, 1996)
m-a-Cut 2B10		1:100 4% FA/ 1x PEM		Πρωτεΐνη Cut της Δροσόφιλας (1616-1736aa)/ σημαίνει τα κύτταρα του ραχιαοκοιλιακού ορίου του φτερού και τα cone cells στο μάτι/ πυρηνική χρώση (Blochlinger et al., 1990)
m-a-Ubi 10C2.2	1:100 (boil blot in H ₂ O for 10min)	1:10 4% FA/ 1x PEM	Abcam	Ουβικουΐτινη
gp-a-Dl 581	1:10000	1:4000 4% FA/ 1x PEM	MATM	Εξωκυττάρια περιοχή της πρωτεΐνης Dl της Δροσόφιλας (Huppert et al., 1997)
gp-a-Sens		1:1000 (preadsorb) 4% FA/ 1x PEM	H. Bellen	Πρωτεΐνη Senseless της Δροσόφιλας/ χρησιμοποιείται ως μάρτυρας για τα κύτταρα ΠΑΟ και για τους φωτοϋποδοχείς R8 (Nolo et al., 2000)
gp-a-Hrs		1:1000 4% FA/ 1x PEM	H. Bellen	Πρωτεΐνη Hrs της Δροσόφιλας/ σημαίνει τα πολυκυστιδικά σωμάτια (MVBs) του ενδοκυττωτικού μονοπατιού (Lloyd et al., 2002)
R-a-Ase		1:500 (preadsorb) 4% FA/ 1x PEM	A. Jarman	Πρωτεΐνη Asense (C-ter) της Δροσόφιλας/ σημαίνει τα κύτταρα ΠΑΟ (Brand et al., 1993)
R-a-Ser 98-6	1:10000	1:1000 (preadsorb)	MATM	Πρωτεΐνη Serrate της Δροσόφιλας (642-1023aa,

		4% FA/ 1x PEM		εξωκυττάριο τμήμα) (Klug and Muskavitch, 1999)
R-a-Neur	1:3000	1:1000 4% FA/ 1x PEM	X (βλέπε σελ.39)	Πρωτεΐνη Neutralized της Δροσόφιλας (3-230aa)
R-a-Myc	1:100	1:5000 4% FA/ 1x PEM σύντομες πλύσεις	Santa Cruz	Επίτοπος myc
R-a-Rab5		1:50 4% FA/ 1x PEM	M. Gonzalez- Gaitan	Πρωτεΐνη Rab5 της Δροσόφιλας/ σημαίνει τα πρώιμα ενδοκυττωτικά κυστίδια (αδημοσίευτο)
R-a-GFP		1:1000 4% FA/ 1x PEM	Mol. Probes	Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη
R-a-GFP	1:300000	1:100000 4% FA/ 1x PEM	G. Sianidis	Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη
R-a-β'Gal	1:10000	1:500 (preadsorb) 4% FA/ 1x PEM	Cappel	β-γαλακτοσιδάση της <i>E. coli</i>
R-a-Ubi	1:1000 (boil blot for 10min in H ₂ O)		Chemicon	Ουβικουΐτινη
rat-a-Rab11		1:2000 4% FA/ 1x PEM	B. Cohen	Πρωτεΐνη Rab11 της Δροσόφιλας/ σημαίνει τα κυστίδια της ανακύκλωσης στο ενδόσωμα (Dollar et al., 2002)
G-a-Ser	1:500		Santa Cruz	Πεπτίδιο που αντιστοιχεί στην ενδοκυττάρια περιοχή του Ser της Δροσόφιλας (dR-14: sc-15739)

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.2: Δευτερεύοντα Αντισώματα και χρωστικές

Αντίσωμα	Αραίωση		Προσρόφηση	Προέλευση
<i>Αντισώματα συνδεδεμένα με Υπεροξειδάση (HRP)</i>				
	WB	Staining		
donkey-anti-mouse IgG HRP	1:10000	1:250	όχι	Jackson Immunoresearch 715-035-150
goat-anti-rabbit-HRP	1:20000	1:500	όχι	Jackson Immunoresearch
goat-anti-rat-HRP	1:5000	1:250	όχι	Jackson Immunoresearch
goat-anti-guiney pig IgG HRP	1:20000	1:500	όχι	Jackson Immunoresearch
anti-Goat-HRP	1:5000			Santa Cruz
<i>Αντισώματα συνδεδεμένα με Αλκαλική Φωσφατάση (AP)</i>				
goat-anti-mouse-AP	-	1:250	όχι	Jackson Immunoresearch
goat-anti-rabbit-AP	-	1:250	όχι	Jackson Immunoresearch
<i>Αντισώματα συνδεδεμένα με φθορίζουσα χρωστική (fluorophore)</i>				
goat-anti-mouse IgG FITC (πράσινο)	-	1:250 ασθενές	1:25 χρήση 1:10	Jackson Immunoresearch
goat-anti-mouse IgG TRITC (κόκκινο)	-	1:250 ασθενές	όχι	Jackson Immunoresearch
goat-anti-mouse IgG Alexa 555 (κόκκινο)	-	1:1500	1:20 χρήση 1:50-1:100	Molecular Probes A-21424
goat-anti-mouse IgG Alexa 568 (κόκκινο)	-	1:1000	1:20 χρήση 1:50	Molecular Probes A-11031
goat-anti-mouse IgG Cy5 (μακρινό κόκκινο)	-	1:250 αναγνωρίζει και rat!	όχι	Jackson Immunoresearch
goat-anti-mouse IgG Alexa 647 (μακρινό κόκκινο)	-	1:1000	όχι	Molecular Probes A-21236
goat-anti-rabbit IgG FITC (πράσινο)	-	1:250 ασθενές	όχι	Jackson Immunoresearch
goat-anti-rabbit IgG Alexa 488 (πράσινο)	-	1:1000	1:20 χρήση 1:50	Molecular Probes A-11034
goat-anti-rabbit IgG Cy3 (κόκκινο)	-	1:2000	1:20 χρήση 1:50	Jackson Immunoresearch
donkey-anti-rabbit IgG Cy5 (μακρινό κόκκινο)	-	1:250	όχι	Jackson Immunoresearch 711-175-152
goat-anti-rat IgG Alexa 555 (κόκκινο)	-	1:1000	όχι	Molecular Probes A-21434

goat-anti-guinea pig IgG Alexa 488 (πράσινο)	-	1:2000	1:20 χρήση 1:100	Molecular Probes A-11073
goat-anti-guinea pig Cy3 (κόκκινο)	-	1:800	όχι	Jackson Immunoresearch
goat-anti-guinea pig Alexa 647 (μακρινό κόκκινο)	-	1:500	όχι	Molecular Probes A-21450
<i>Διάφορες χρωστικές</i>				
propidium iodide	-	1:1000	stock 10mg/ml	
Topro-3	-	1:1000	stock 1mM in DMSO	Molecular Probes T-3605
Dapi	-	1:1000	stock 100μg/ml	
Phalloidin-FITC	-	1:1000		Sigma
Texas Red Dextran	-	0.5-1mM	stock 100mg/ml (ή 33mM)	Molecular Probes D-3328
FITC Dextran	-	0.5-1mM	stock 100mg/ml (ή 33mM)	Molecular Probes D-3306

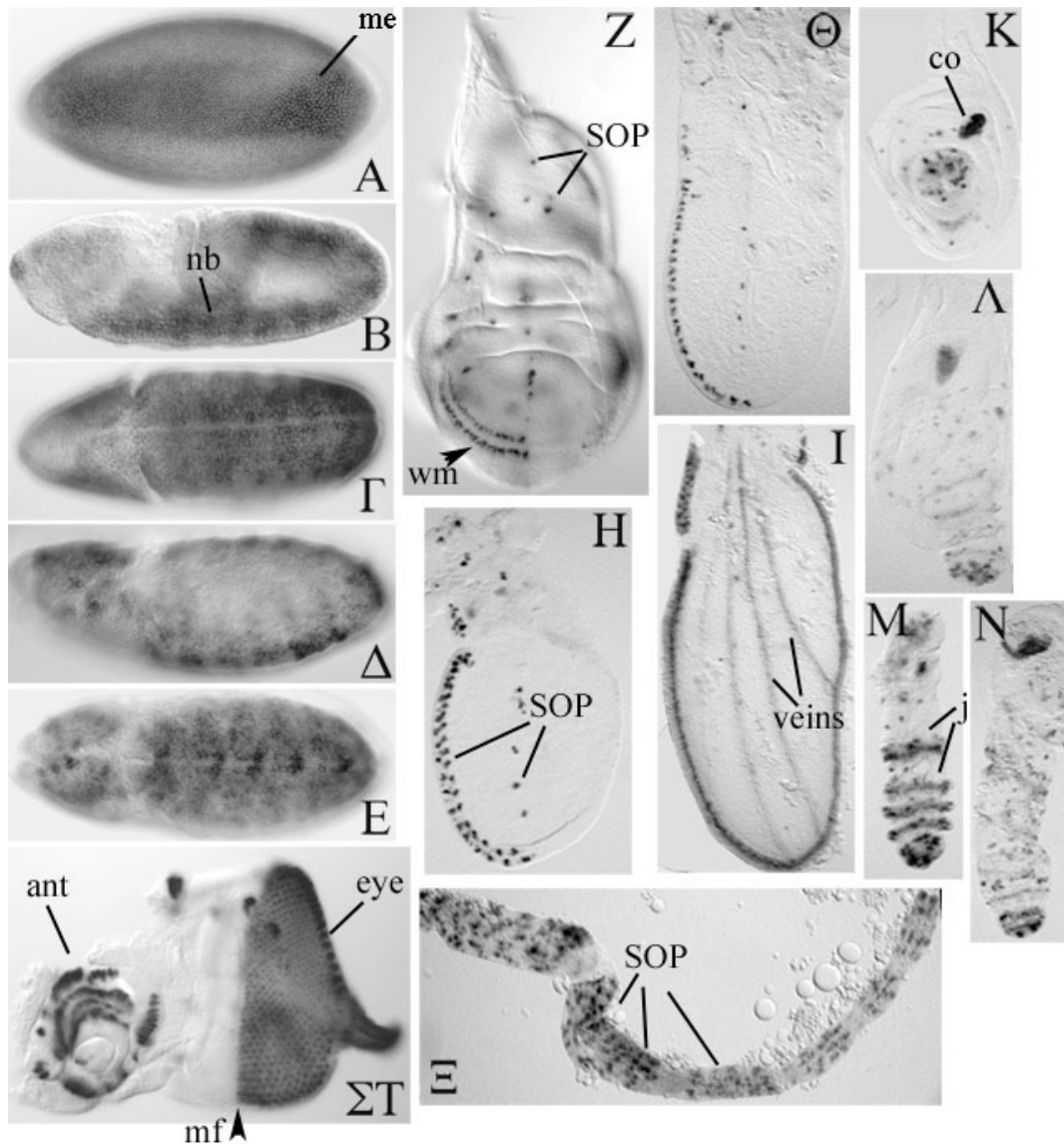
Αποτελέσματα Ι

«Η πρωτεΐνη Neur της Δροσόφιλας εμπλέκεται στην ενδοκύττωση και σηματοδότηση από τον δεσμευτή του Notch, Delta»

Η έκφραση του γονιδίου *neuralized* είναι πολύ δυναμική

Το γονίδιο *neur* εκφράζεται σε ένα πολύ δυναμικό πρότυπο κατά την ανάπτυξη της Δροσόφιλας, το οποίο συμπίπτει με περιοχές ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού N. Η αναπτυξιακή μελέτη της έκφρασης του *neur* κατέστη δυνατή με τη χρήση υβριδοποίησης *in situ* (Boulianne et al., 1991; Price et al., 1993), μίας παγίδας ενισχυτή *neur^{A101}-lacZ* (Huang et al., 1991), όπου η κωδική περιοχή της γαλακτοσιδάσης έχει εντεθεί στον εγγύ υποκινητή του γονιδίου *neur* και μίας σειράς οδηγού *neur-Gal4^{A101}* (Jhaveri et al., 2000), η οποία προέκυψε μετά από γονιδιακή μετατροπή της προαναφερθείσας παγίδας ενισχυτή. Μερικά από τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 3.1.

Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης το *neur* εκφράζεται κατά την ανάπτυξη του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) στο κοιλιακό εκτόδερμα και εντονότερα σε νευροβλάστες και στη συνέχεια στο περιφερικό νευρικό σύστημα (Εικ. 3.1A-E, υβριδοποίηση *in situ*, Flybase). Κατά το προνυμφικό στάδιο, η έκφρασή του είναι επίσης δυναμική στους διάφορους αναπτυξιακούς δίσκους: στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού (Εικ. 3.1Z) και του ποδιού της προνύμφης (Εικ. 3.1K) εκφράζεται σε πρόδρομους αισθητηρίων οργάνων (κύτταρα ΠΑΟ), που θα δώσουν τις μακροχαίτες του θώρακα, τα καμπανιφόρμια αισθητήρια του φτερού και τα χορδοτονικά όργανα του ποδιού, αντίστοιχα. Στον αναπτυξιακό δίσκο του ματιού, η έκφραση του *neur* εντοπίζεται στο τμήμα της κεραίας (σε κύτταρα ΠΑΟ) και σε όλα τα διαφοροποιούμενα κύτταρα πίσω από το μορφογενετικό αυλάκι, τα οποία αντιστοιχούν σε πρόδρομους των φωτοϋποδοχέων (Εικ. 3.1ΣΤ). Κατά το νυμφικό στάδιο, η έκφραση του *neur* συνεχίζεται στα κύτταρα ΠΑΟ του φτερού (και στους απογόνους τους Εικ. 3.1H-I), στον θώρακα της νύμφης από όπου θα προκύψουν οι μικροχαίτες του θώρακα του ενήλικου (δεν δείχνεται), στους φωτοϋποδοχείς και σε άλλα κύτταρα του αμφιβληστροειδή (δεν δείχνεται). Επιπλέον, το *neur* εκφράζεται στους προδρόμους των φλεβώσεων του φτερού σχετικά αργά κατά το νυμφικό στάδιο (Εικ. 3.1I) και στις αρθρώσεις του ποδιού της νύμφης (Εικ. 3.1M,N). Σε όλες τις προαναφερθείσες θέσεις ενεργοποιείται το σηματοδοτικό μονοπάτι N.



Εικόνα 3.1: Το δυναμικό πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *neuralized*

A-E) Έμβρυα τα οποία έχουν υποστεί υβριδοποίηση *in situ* με ανιχνευτή για το γονίδιο *neur*. A) στάδιο 5, B, Γ) στάδιο 9 (εγκάρσια και ραχιαία όψη εμβρύου) και Δ, E) στάδιο 11 (εγκάρσια και ραχιαία όψη εμβρύου).

ΣΤ, Ζ) Αναπτυξιακοί δίσκοι ματιού και φτερού προνύμφης τρίτου σταδίου, αντίστοιχα, με γονότυπο *neur-Gal4^{A101}; UAS-lacZ*.

Η-Ξ) Έκφραση παγίδας ενισχυτή *neur^{A101}-lacZ* σε διαφορετικούς αναπτυξιακούς δίσκους και στάδια. Η-Ι:

φτερό νύμφης 6, 8, 24 ωρών αντίστοιχα, Κ-Ξ: πόδι: Κ) αναπτυξιακός δίσκος ποδιού προνύμφης τρίτου σταδίου και Λ-Ξ) πόδι νύμφης 2, 6, 8, 24 ωρών αντίστοιχα.

me: μεσόδερμα, co: χορδοτονικό όργανο, veins: φλεβώσεις, ant: κεραία, eye: μάτι, mf: μορφογενετικό αυλάκι, wm: περιθώριο φτερού, SOP: κύτταρο ΠΑΟ και οι απόγονοί του, j: άρθρωση, nb: νευροβλάστες

Το γονίδιο *neuralized* επηρεάζει την ενδοκύττωση του δεσμευτή Delta

Ο δεσμευτής του Notch, Delta, είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία απαντάται είτε στην κορυφαία επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων, είτε σε κυτταροπλασματικά κυστίδια, τα οποία εντοπίζονται σε διάφορα επίπεδα στα κύτταρα και έχειδειχθεί ότι αντιστοιχούν σε ενδοσώματα. Παρατηρήσαμε ότι η έκφραση του γονιδίου *neur* συμπίπτει με περιοχές/ ιστούς όπου η πρωτεΐνη DI είναι ενδοκυττωμένη. Αυτό ισχύει για το εμβρυϊκό μεσόδερμα της Δροσόφιλας (Kooh et al., 1993), για τον δίσκο του ματιού του τρίτου σταδίου της προνύμφης (Εικ. 3.2Α), για τον θώρακα της νύμφης (οπότε διαφοροποιούνται οι πρόδρομοι των μικροχαιτών) και για τις φλεβώσεις του φτερού κατά το νυμφικό στάδιο (Εικ. 3.2Ε, ΣΤ). Στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού της προνύμφης τρίτου σταδίου, η έκφραση του *neur* περιορίζεται μόνο στα κύτταρα ΠΑΟ με αποτέλεσμα στον υπόλοιπο ιστό η έκφραση του DI να είναι κυρίως μεμβρανική (Εικ. 3.2Β, Γ). Όμως, στα ίδια τα κύτταρα ΠΑΟ, η πρωτεΐνη DI απομακρύνεται από την κορυφαία πλασματική μεμβράνη και ενδοκυττώνεται (Εικ. 3.2Δ). Οι περιοχές του δίσκου του φτερού της προνύμφης που θα δώσουν τις φλεβώσεις του φτερού του ενήλικου δεν εκφράζουν *neur* στο τρίτο προνυμφικό στάδιο (Εικ. 3.2Γ). Η έναρξη της έκφρασής του στις 24 ώρες από τη στιγμή της δημιουργίας της νύμφης (24 hrs APF: After Puparium Formation) συμπίπτει με την αλλαγή της υποκυτταρικής τοποθέτησης του DI και την μετακίνηση της πρωτεΐνης από την πλασματική μεμβράνη σε ενδοσώματα (Εικ. 3.2Ε, ΣΤ).

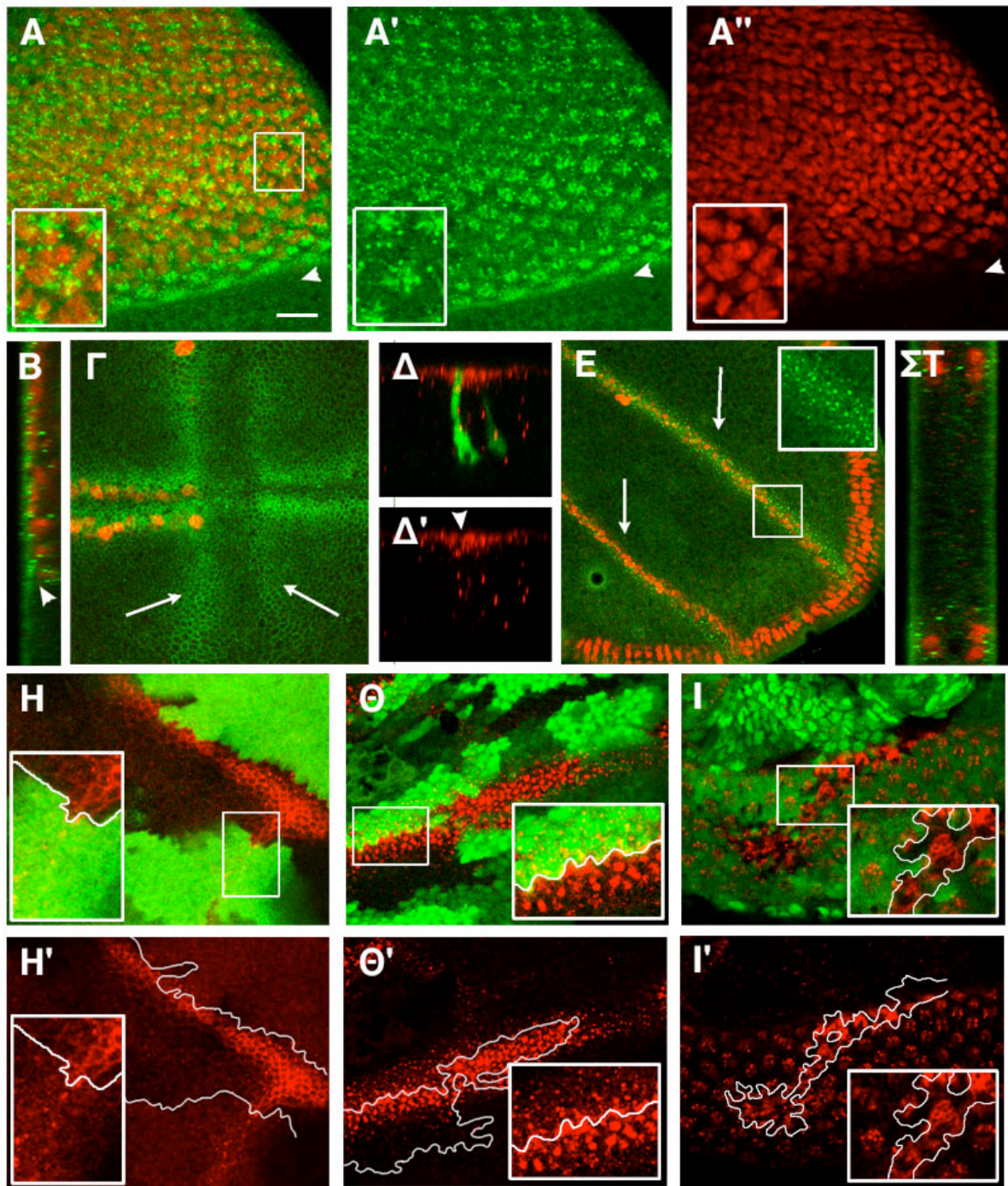
Για να μπορέσουμε να πιστοποιήσουμε την εμπλοκή του Neur στην ενδοκύττωση της πρωτεΐνης Delta, μελετήσαμε τον φαινότυπο της απώλειας λειτουργίας του γονιδίου. Κατασκευάσαμε μιτωτικούς κλώνους ομόζυγους για την μεταλλαγή *neur*¹ σε δίσκους ματιού προνύμφης τρίτου σταδίου και σε φτερά νύμφης 30 ωρών και μελετήσαμε την υποκυτταρική τοποθέτηση του δεσμευτή του N (Εικ. 3.2Η, Ι). Παρατηρήσαμε ότι ο κυστιδιακός εντοπισμός του DI απουσιάζει ενώ η πρωτεΐνη συσσωρεύεται στην κορυφαία επιφάνεια του επιθηλίου περιγράφοντας την πλασματική μεμβράνη. Σε πείραμα ελέγχου μελετήθηκε ο φαινότυπος μιτωτικών κλώνων, όπου απουσιάζει το γονιδιακό σύμπλοκο *E(spl)*, το οποίο εμπλέκεται στην διαδικασία της πλευρικής αναστολής και δρα κάτωθεν του ενεργοποιημένου N (Εικ. 3.2Θ). Στην περίπτωση αυτή, παρατηρήθηκε ποσοτική συσσώρευση της πρωτεΐνης DI, αλλά η υποκυτταρική της τοποθέτηση παρέμεινε αμετάβλητη. Συνεπώς, η απώλεια λειτουργίας του *neur* οδηγεί στην παρεμπόδιση της ενδοκύττωσης του DI.

Για να δούμε αν η παρουσία της πρωτεΐνης Neur και η ενδοκύττωση του δεσμευτή DI έχουν αιτιακή σχέση, μελετήσαμε το αποτέλεσμα της εκτοπικής έκφρασης του *neur* (με το σύστημα εκτοπικής έκφρασης *Gal4-UAS*) σε αναπτυξιακούς δίσκους φτερού προνύμφης

Δροσόφιλας τρίτου σταδίου (Εικ. 3.3Α-Δ). Η υπερέκφραση του γονιδίου *neur* οδήγησε, όπως ανεμένετο, σε δραματική μετατόπιση του D1 από την κορυφαία επιφάνεια των κυττάρων του δίσκου σε ενδοκυττάρια συσσωματώματα. Η απώλεια του μεμβρανικού D1 πιστοποιήθηκε ότι δεν είναι μεταγραφικό αποτέλεσμα, καθώς η εκτοπική υπερέκφραση του *neur* δεν επηρέασε την ενεργοποίηση ενός γονιδίου αναφοράς *Dl-lacZ*. Επιπλέον, η δράση του *neur* ήταν προφανής ακόμη και μετά από την έκφραση ενός διαγονιδίου *UAS-Dl* μαζί με το *UAS-neur*. Ενώ σε απλή υπερέκφραση του *Dl*, η χρώση για την πρωτεΐνη εστιαζόταν στην κορυφαία πλασματική μεμβράνη, όταν συνεκφραζόταν και το *neur* παρατηρήθηκε μία δραματική αλλαγή της υποκυτταρικής τοποθέτησης του D1 από τη μεμβράνη σε ενδοκυτταρικά κυστίδια (Εικ. 3.3Ε-Ζ). Για να μελετήσουμε την φύση των εν λόγω κυστιδίων, χρησιμοποιήσαμε πειράματα ενσωμάτωσης φθορίζουσας δεξτράνης (Εικ. 3.3Η), η οποία είναι αδρανής/μεγαλομοριακή και εισέρχεται στα κύτταρα μέσω του ενδοκυτταρικού μονοπατιού (βλέπε “Υλικά και Μέθοδοι”). Από τα πειράματα αυτά, αποδείχθηκε ότι οι εν λόγω κυστιδιακοί σχηματισμοί αντιστοιχούν σε ενδοσώματα, τόσο πρόιμα, όσο και όψιμα.

Για να πιστοποιηθεί ότι το Neur δρα ειδικά στην πρωτεΐνη D1 και δεν επηρεάζει γενικά ολόκληρο τον μηχανισμό της ενδοκύττωσης, μελετήθηκε η υποκυτταρική τοποθέτηση πρωτεϊνών που εντοπίζονται στην κορυφαία επιφάνεια των κυττάρων όπως FasciclinIII (Εικ. 3.3Η) και Armadillo (δεν δείχνεται). Οι πρωτεΐνες αυτές συνεχίζουν να ανιχνεύονται στην κορυφαία πλευρά των επιθηλιακών κυττάρων, παρά την υπερέκφραση του *neur*. Συνεπώς, η έκφραση του *neur* οδηγεί στην ειδική ενδοκύττωση του δεσμευτή του N, D1.

Μία επίσης σημαντική παρατήρηση που έγινε από το πείραμα της εκτοπικής υπερέκφρασης είναι ότι το Neur ευνοεί την συν-ενδοκύττωση της πρωτεΐνης D1 με το εξωκυττάριο τεμάχιο του υποδοχέα N στο κύτταρο που υπερεκφράζει τον δεσμευτή και το *neur*. Σε περιοχές όπου δεν εκφράζεται το *neur*, η χρώση για τον εξωκυττάριο επίτοπο του N είναι μεμβρανική, ενώ η εκτοπική έκφραση του *neur* οδηγεί σε συνεντοπισμό του ανοσοφθορισμού που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη D1 και στον εξωκυττάριο επίτοπο του N (Εικ. 3.3Β''-Δ'). Επίσης, πρέπει να σημειωθεί ότι το αποτέλεσμα αυτό στο N είναι μετα-μεταγραφικό, καθώς η υπερέκφραση του *neur* δεν επηρεάζει την έκφραση μίας παγίδας ενισχυτή *N-lacZ*.



Εικόνα 3.2: Το *neur* είναι απαραίτητο για την ενδοκύττωση του Delta

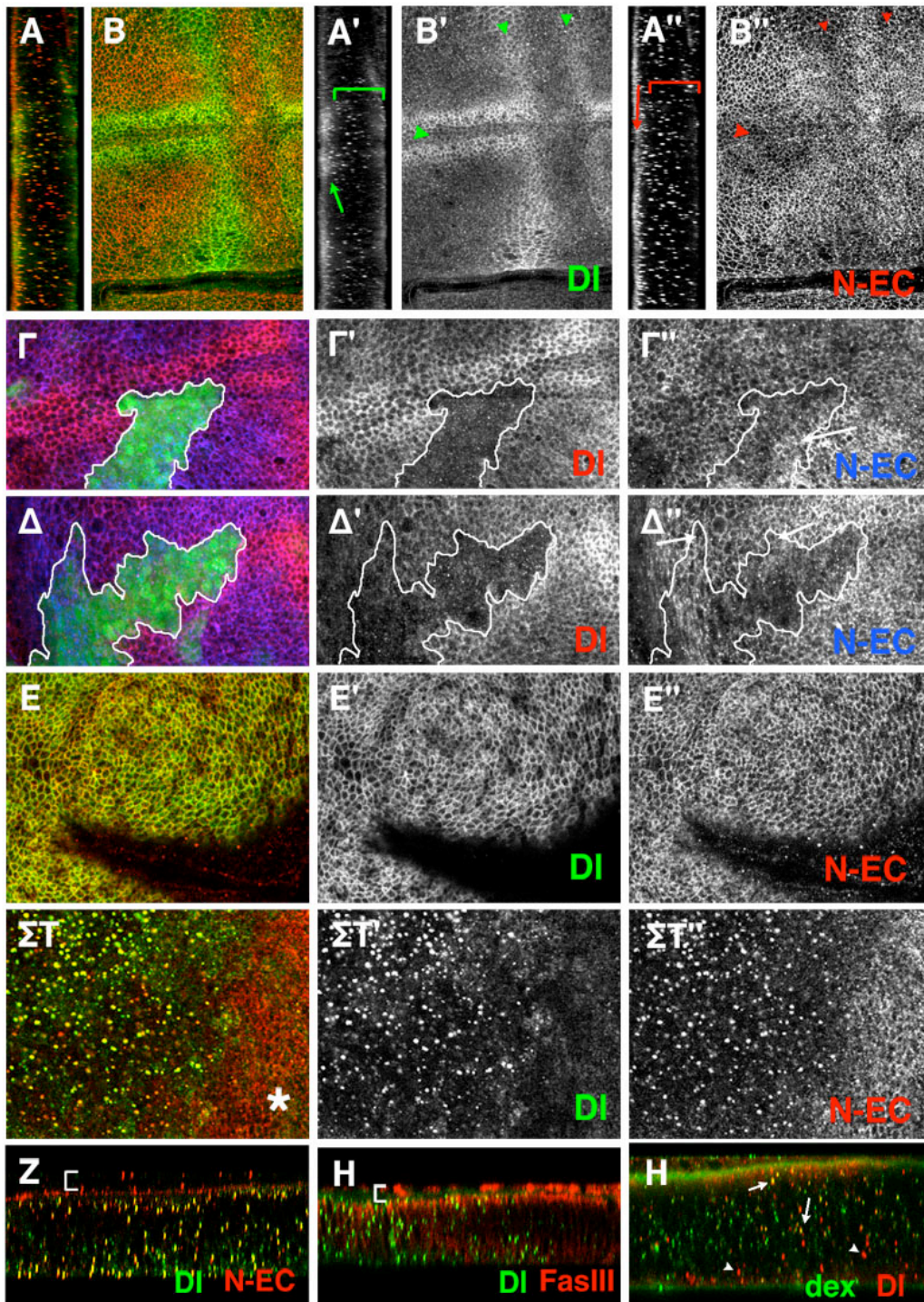
A-Γ, E, ΣΤ: Ανοσοϊστοχημική χρώση για την πρωτεΐνη D1 (με πράσινο χρώμα) και πυρηνική χρώση για την β-γαλακτοσιδάση (κόκκινο) από την παγίδα του ενισχυτή *neur^{A101}-lacZ*. Δ: το πράσινο αντιστοιχεί σε κυτταροπλασματική EGFP, η οποία εκφράζεται ως διαγονίδιο UAS κάτω από τον έλεγχο του *neur-Gal4* και το κόκκινο αντιστοιχεί σε χρώση για D1. Κλίμακα: 10μm σε A-Δ και ΣΤ και 20μm σε E και 14μm σε H-I
 A) Αναπτυξιακός δίσκος ματιού προνύμφης τρίτου σταδίου (το οπίσθιο τμήμα του δίσκου προς τα πάνω) και B) εγκάρσια τομή του (η κορυφαία επιφάνεια προς τα αριστερά). Η πρωτεΐνη D1 εντοπίζεται σε κυστίδια. Το μορφογενετικό αυλάκι σημειώνεται με βέλος. Γ) Αναπτυξιακός δίσκος φτερού προνύμφης τρίτου σταδίου (εμπρόσθιο προς τα αριστερά και ραχιαίο προς τα πάνω). Η πρωτεΐνη D1 εντοπίζεται στην κορυφαία επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων, τόσο στο ραχιαιοκοιλιακό όριο (το εμπρόσθιο τμήμα του σημειώνεται από την έκφραση του *neur^{A101}-lacZ*), όσο και στους προδρόμους των φλεβώσεων του φτερού (βέλη). Δ) Εγκάρσια τομή κυττάρων ΠΑΟ από το περιθώριο του δίσκου του φτερού προνύμφης τρίτου σταδίου (μαρκάρονται με

κυτταροπλασματική EGFP). Με κόκκινο φαίνεται η πρωτεΐνη D1 και η κορυφαία επιφάνεια των κυττάρων είναι πάνω. Παρατηρούμε ότι η χρώση για D1 απουσιάζει από την κορυφαία επιφάνεια του κυττάρου ΠΑΟ (βέλος στο Δ'), ενώ ενδοκυτταρικά κυστίδια είναι παρόντα. Ε) Φτερό νύμφης 30 ωρών. Η παγίδα ενισχυτή *neur^{Δ101}-lacZ* μαρκάρει το περιθώριο του φτερού και τις φλεβώσεις. Στο στάδιο αυτό η πρωτεΐνη D1 έχει σταματήσει να εκφράζεται στο περιθώριο του φτερού, αλλά στις φλεβώσεις είναι κυστιδιακή και δεν υπάρχει καθόλου στην κορυφαία επιφάνεια των κυττάρων, όπως φαίνεται στην εγκάρσια τομή (ΣΤ). Σε αντίθεση με το μονόστιβο επιθήλιο στο (Β), στο στάδιο της νύμφης το φτερό αποτελείται από δύο επιθηλιακές στιβάδες, την κοιλιακή και τη ραχιαία, οι οποίες έχουν συγκολληθεί με τις βασικές πλευρές τους προς το εσωτερικό.

Η-Ι: Η απουσία της β-γαλακτοσιδάσης (πράσινο στο Η) ή της GFP (πράσινο στα Θ, Ι) μαρκάρει τον μεταλλαγμένο ιστό. Με κόκκινο φαίνεται χρώση για την πρωτεΐνη D1.

Η) Μιτωτικός κλώνος *neur⁻* σε φλέβωση φτερού νύμφης 30 ωρών. Η πρωτεΐνη D1 παρουσιάζει μεμβρανικό εντοπισμό στον μεταλλαγμένο ιστό, ενώ στον αγρίου τύπου ιστό είναι κυστιδιακή. Θ) Μιτωτικός κλώνος *E(spl)⁻* σε φλέβωση φτερού νύμφης 30 ωρών. Η πρωτεΐνη D1 παρουσιάζει κυστιδιακό εντοπισμό στον μεταλλαγμένο ιστό, παρά το γεγονός ότι τα επίπεδά της ανεβαίνουν (πιθανώς εξαιτίας της απουσίας της κατασταλτικής δράσης των *E(spl)*).

Ι) Μιτωτικοί κλώνοι *neur⁻* σε αναπτυξιακό δίσκο ματιού προνύμφης τρίτου σταδίου. Παρά το γεγονός ότι το D1 ενδοκυττώνεται στον αγρίου τύπου ιστό, σε μεταλλαγμένες περιοχές είναι περικυτταρικό/ μεμβρανικό. Τα ένθετα αντιστοιχούν σε μεγενθώσεις των σημειωμένων τετραγώνων.



Εικόνα 3.3: Εκτοπικά εκφρασμένο Neur οδηγεί στην ενδοκύτωση του DI

A, B: Αναπτυξιακός δίσκος φτερού προνύμφης τρίτου σταδίου με χρώση για την πρωτεΐνη DI (πράσινο κανάλι- φαίνεται χωριστά στα A' και B') και για τον εξωκυττάριο επίτοπο του υποδοχέα N, N-EC (κόκκινο κανάλι- φαίνεται μόνο του στα A'', B'').

A) Εγκάρσια τομή στο ραχαιοκοιλιακό όριο του φτερού (μέση) και μίας γειτονικής φλέβωσης (κάτω). Η κορυφαία επιφάνεια φαίνεται αριστερά. Τόσο το DI, όσο και το N-EC εντοπίζονται στην κορυφαία επιφάνεια του δίσκου (βέλη στα A', A'') και σε ενδοκυτταρικά κυστίδια (αγκύλες στα A', A''). Σε περιοχές έκφρασης του DI, οι πρωτεΐνες DI και N συνεντοπίζονται τόσο στην κορυφαία επιφάνεια της μεμβράνης, όσο και σε κυστίδια (κίτρινο στο A).

Β) Επιμήκης τομή του δίσκου, όπου φαίνονται τα πρότυπα έκφρασης των D1 και N. Στο ραχαιοκοιλιακό όριο του δίσκου (μεγάλο βέλος) και στους προδρόμους των φλεβώσεων (μικρά βέλη), τα επίπεδα του N είναι ελαττωμένα εξαιτίας της μεταγραφικής ρύθμισής του.

Γ, Δ) Μιτωτικοί κλώνοι υπερέκφρασης (FLP-out) του *neur*, οι οποίοι μαρκάρονται από την συνέκφραση ενός διαγονιδίου *UAS-GFP* (πράσινο). Οι πρωτείνες D1 (κόκκινο, Γ', Δ') και N-EC (μπλε, Γ'', Δ'') εντοπίζονται με ανοσοϊστοχημεία. Η υπερέκφραση του *neur* οδηγεί σε ενδοκύτωση του D1 και του N-EC, όταν ο κλώνος διατρέχει μία περιοχή ισχυρής έκφρασης του δεσμευτή (μεγάλο βέλος) και φαίνεται ως απώλεια της κορυφαίας έκφρασής τους. Ωστόσο, τα επίπεδα του N-EC μένουν ανεπηρέαστα από την υπερέκφραση σε περιοχές όπου δεν εκφράζεται το D1 (μικρά βέλη).

Ε) Λεπτομέρεια δίσκου φτερού με γονότυπο *ombGal4; UAS-D1*. Τόσο το εκτοπικό D1 (πράσινο, Ε'), όσο και το ενδογενές N-EC (κόκκινο, Ε'') εντοπίζονται στην κορυφαία επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης του επιθηλίου.

ΣΤ) Λεπτομέρεια δίσκου φτερού με γονότυπο *ombGal4; UAS-D1 UAS-neur*. Το εκτοπικό D1 (πράσινο, ΣΤ') και το ενδογενές N-EC (κόκκινο, ΣΤ'') συνεντοπίζονται σε ενδοκυτταρικά κυστίδια (κίτρινο στο ΣΤ) και απουσιάζουν από την κορυφαία επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης. Ο αστερίσκος δείχνει αγρίου τύπου κύτταρα του επιθηλίου (έξω από την περιοχή της υπερέκφρασης), όπου το N-EC είναι μεμβρανικό (και δεν συνεντοπίζεται με D1), για σύγκριση.

Ζ) Εγκάρσια τομή δίσκου φτερού με γονότυπο *ombGal4; UAS-D1 UAS-neur* (η κορυφαία επιφάνεια πάνω), με χρώση για D1 (πράσινο) και N-EC (κόκκινο). Η αγκύλη μαρκάρει την περιποδιακή μεμβράνη (που βρίσκεται πάνω από το επιθήλιο του δίσκου), όπου υπάρχει N-EC, αλλά όχι D1. Είναι χαρακτηριστικό ότι τα D1 και N συνεντοπίζονται σε πολύ μεγάλο βαθμό στην περιοχή της υπερέκφρασης, σε όλο το βάθος του επιθηλίου (κίτρινο).

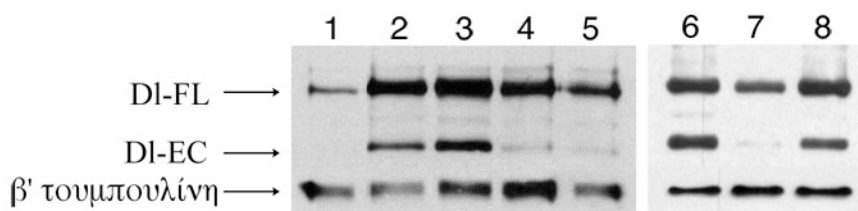
Η) Εγκάρσια τομή δίσκου φτερού με γονότυπο *ombGal4; UAS-D1 UAS-neur* (η κορυφαία επιφάνεια πάνω), με χρώση για D1 (πράσινο) και Fasciclin III (κόκκινο). Η FasIII εκφράζεται ομοιόμορφα και μαρκάρει την κορυφαία επιφάνεια του επιθηλίου και της περιποδιακής μεμβράνης (αγκύλες) του δίσκου του φτερού. Ενώ το D1 ενδοκυττώνεται μέσα στην περιοχή της υπερέκφρασης (αριστερό μισό), η FasIII δεν ενδοκυττώνεται.

Θ) Εγκάρσια τομή δίσκου φτερού με γονότυπο *ombGal4; UAS-D1 UAS-neur* (η κορυφαία επιφάνεια πάνω), ο οποίος έχει επωαστεί με φθορίζουσα δεξτράνη (πράσινο), ώστε να μαρκαριστούν τα πρώιμα ενδοσώματα (άμεση μονιμοποίηση μετά από επώαση με τη δεξτράνη για 10 λεπτά) και χρώση για D1 (κόκκινο). Πολλά από τα κυστίδια του D1 περιέχουν δεξτράνη (βέλη), γεγονός που σημαίνει ότι είναι στο ενδόσωμα. Άλλα D1 κυστίδια δεν συμπίπτουν με δεξτράνη (μικρά βέλη)- αυτά, τα κυρίως τοποθετημένα στην βασική επιφάνεια του επιθηλίου κυστίδια, συμπίπτουν με δεξτράνη μετά από 1 ώρα και φαίνεται να αντιστοιχούν σε όψιμο ενδόσωμα.

Το *neur* ελαττώνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης DI μετα-μεταγραφικά

Αφού παρατηρήσαμε ότι η πρωτεΐνη Neur προκαλεί την ενδοκύττωση τόσο της DI όσο και του N, αναρωτηθήκαμε αν αυτό μπορεί να συνοδεύεται από κάποια αλλαγή στο συνολικό ποσό των εν λόγω πρωτεϊνών ή στο πρότυπο της πρωτεόλυσής τους. Η πρωτεΐνη DI (όταν ανιχνεύεται με αντίσωμα που αναγνωρίζει το εξωκυττάριο τμήμα της) απαντά σε δύο κύριες ισομορφές, μία πλήρους μήκους και μία μικρότερη που αντιστοιχεί σε ένα εξωκυττάριο κομμένο τεμάχιο. Σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προνυμφών τρίτου σταδίου, η πλήρους μήκους ισομορφή κυριαρχεί, ενώ το εξωκυττάριο τεμάχιο απαντά σε περίπου 10 φορές μικρότερη ποσότητα. Η δράση του Neur μελετήθηκε με υπερέκφραση με χρήση της σειράς οδηγού *ombGal4* (η οποία οδηγεί την έκφραση των διαγονιδίων σε ένα ευρύ πρότυπο στο φτερό) σε δίσκους φτερού προνύμφης τρίτου σταδίου. Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προερχόμενα από αναπτυξιακούς δίσκους που υπερεκφράζουν *UAS-DI* και *UAS-GFP* (για εξισορρόπηση της δόσης του ενεργοποιητή Gal4) συγκρίθηκαν με άλλα που εκφράζουν *UAS-DI* και *UAS-neur*. Αφού το DI εκφράζεται εκτοπικά κάτω από ανεξάρτητο υποκινητή, οι παρατηρήσεις μας στην έκφραση της πρωτεΐνης αφορούν μετα-μεταγραφικά αποτελέσματα. Παρατηρήθηκε ότι το συνολικό ποσό της πρωτεΐνης DI ελαττώθηκε περίπου κατά 3 φορές παρουσία του Neur. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι ενώ το «κομμένο» DI αντιστοιχεί στο ένα τρίτο του συνολικού ποσού της πρωτεΐνης σε *ombG; UAS-DI; UAS-GFP* δίσκους, η ποσότητά του πέφτει στο ένα δέκατο παρουσία του *UAS-neur*. Συνεπώς, το Neur επηρεάζει τα επίπεδα του δεσμευτή DI μετα-μεταγραφικά και ελαττώνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης με προτίμηση στην «κομμένη» ισομορφή. Για να δούμε αν ο δάκτυλος RING του Neur είναι σημαντικός για την πρωτεόλυση της πρωτεΐνης DI, χρησιμοποιήθηκε στο ίδιο πείραμα μία κατασκευή *UAS-neurΔRING-GFP*. Όταν ελέγχθηκαν εκχυλίσματα προνυμφών Δροσόφιλας που υπερεκφράζουν *ombG; UAS-DI; UAS-neurΔRING-GFP* φάνηκε ότι ο δάκτυλος RING είναι απαραίτητος για την δράση του Neur στην πρωτεόλυση του δεσμευτή DI (Εικ. 3.4, λωρίδες 6-8). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι μετά από την ενδοκύττωση του δεσμευτή, ακολουθεί αποικοδόμησή του εξαρτώμενη από τον δάκτυλο RING του Neur. Για εξισορρόπηση της συνολικής ποσότητας της πρωτεΐνης μετρήθηκε το ποσό της β-τουμπουλίνης (Εικ. 3.4).

Ενώ το Neur οδηγεί στην ελάττωση των επιπέδων του DI, δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική αλλαγή στα επίπεδα ή στο πρωτεολυτικό πρότυπο του υποδοχέα N. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο αντισώματα: ένα που αναγνωρίζει το ενδοκυττάριο και ένα που αναγνωρίζει το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα (δεν δείχνεται).



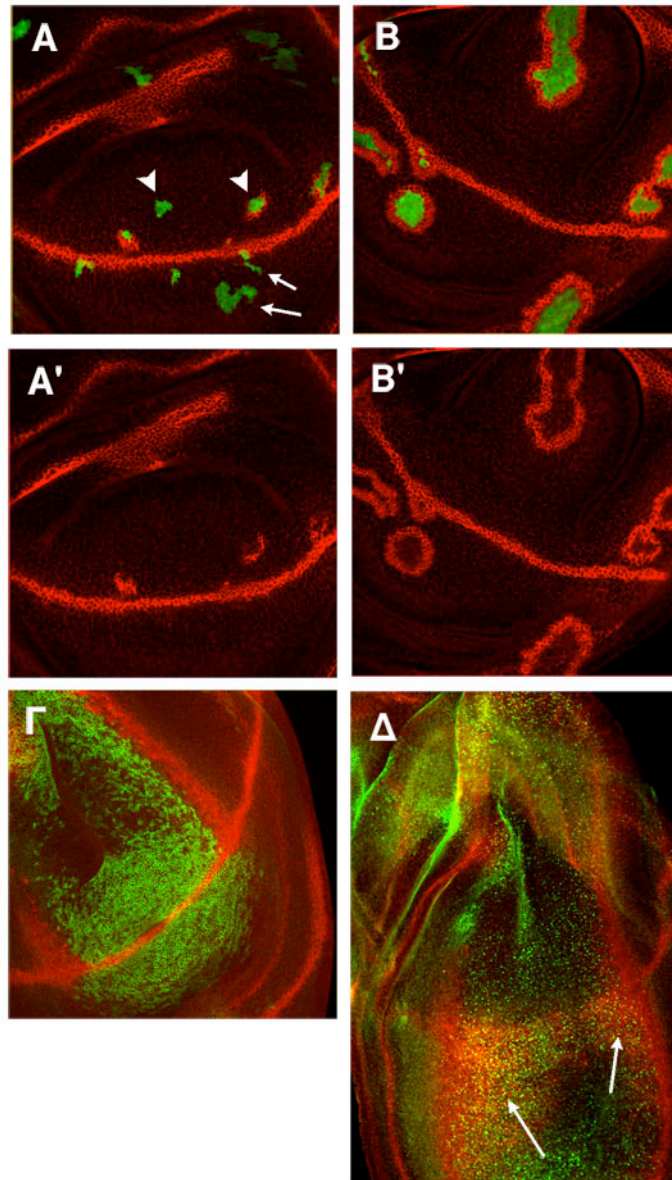
Εικόνα 3.4: Η έκφραση του *neur* ελαττώνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης DI

Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από αναπτυξιακούς δίσκους φτερού προνύμφης τρίτου σταδίου αναλύθηκαν με western για τα επίπεδα της πρωτεΐνης DI και της β-τουμπουλίνης (για έλεγχο της ποσότητας). Η πρωτεΐνη DI απαντά σε δύο ισομορφές: μία πλήρους μήκους, την DI-FL και μία προερχόμενη από εξοκυττάρια πέψη, την DI-EC. Τα δείγματα 1-5 προέρχονται από ένα πείραμα και τα 6-8 από άλλο.

Δίσκοι φτερού προνύμφης τρίτου σταδίου 1) αγρίου τύπου, 2, 3) *ombGal4; UAS-DI UAS-GFP*, 4,5,7) *ombGal4; UAS-DI UAS-neur*, 6) *ombGal4; UAS-DI*, 8) *ombGal4; UAS-DI UAS-neurΔRING-GFP*

Το *Neur* ενισχύει τη σηματοδότηση DI-N

Αφού το *Neur* επηρεάζει τόσο δραματικά την ενδοκυττάρωση και την πρωτεόλυση του δεσμευτή DI, προκύπτει η ερώτηση του τι συμβαίνει με την σηματοδοτική ικανότητα του δεσμευτή. Ένας ιστός που είναι πολύ κατάλληλος για την μελέτη της ενεργοποίησης του μονοπατιού N είναι ο αναπτυξιακός δίσκος του φτερού της προνύμφης της Δροσόφιλας και συγκεκριμένα το τμήμα αυτού από όπου θα προκύψει το φτερό του ενηλικού ατόμου (wing pouch). Στο δίσκο του φτερού, το μονοπάτι N ενεργοποιείται σε μία λεπτή γραμμή που καθορίζει το ραχαιοκοιλιακό όριο του. Η ενεργοποίηση του N προκύπτει από την συντονισμένη δράση των δύο δεσμευτών του εκατέρωθεν του ορίου και έχει ως τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων του N, όπως το *wg*, *vg*, *cut* και *E(spl)*. Επιπλέον, ο υποδοχέας N είναι διαφορεικά γλυκοζυλιωμένος στο ραχιαίο και στο κοιλιακό διαμέρισμα και αυτό τον κάνει να αποκρίνεται στο DI στην ραχιαία πλευρά και στο Ser στην κοιλιακή πλευρά. Μελετήσαμε μιτωτικούς κλώνους υπερέκφρασης του DI μόνου του ή παρουσία *neur* για την επαγωγή γονιδίων-στόχων του N (συγκεκριμένα *wg*) στο ραχιαίο και στο κοιλιακό διαμέρισμα του δίσκου του φτερού. Κλώνοι κυττάρων που υπερεκφράζουν DI ενεργοποιούν εκτοπικά το μονοπάτι N στο ραχιαίο διαμέρισμα του δίσκου, όπου το γλυκοζυλιωμένο N ευνοεί τη σηματοδότηση μέσω DI. Μάλιστα η εκτοπική ενεργοποίηση μειώνεται όσο ο κλώνος απομακρύνεται από το ραχαιοκοιλιακό όριο. Εντούτοις, κλώνοι κυττάρων που υπερεκφράζουν *DI+neur* οδηγούν σε ενεργοποίηση του N μονοπατιού τόσο στο ραχιαίο όσο και στο κοιλιακό διαμέρισμα του δίσκου και πολύ μακριά από τη θέση της ενδογενούς ενεργοποίησης του N. Εκτός από την πολύ καλή μη-αυτόνομη ενεργοποίηση του μονοπατιού από το DI παρουσία του *Neur*, παρατηρήθηκε ότι το *neur* ελαττώνει το cis-αρνητικό αποτέλεσμα της υπερέκφρασης στον κλώνο και *wg* εκφράζεται και στα κύτταρα που υπερεκφράζουν.



Εικόνα 3.5: Υπερέκφραση του *neur* και σηματοδότηση N

A, B): Μιτωτικοί κλώνοι υπερέκφρασης *Dl* (A) και *Dl+neur* (B) ελέγχονται για επαγωγή του Wg (κόκκινο), το οποίο χρησιμοποιείται ως μάρτυρας της ενεργότητας του μονοπατιού N. Ταυτόχρονη έκφραση ενός διαγονιδίου *UAS-GFP* μαρκάρει τους κλώνους και στις δύο περιπτώσεις. Παρατηρούμε ότι στο A οι κλώνοι που εντοπίζονται στο κοιλιακό διαμέρισμα, καθώς και οι ραχιαίοι μακριά από το ραχιαιοκοιλιακό όριο, δεν επάγουν Wg. Αντίθετα, στο B το Wg ενεργοποιείται σε όλους τους κλώνους που υπερεκφράζουν *Dl+neur*. Η ίδια αύξηση της ενεργοποίησης παρατηρήθηκε από υπερέκφραση *Dl+neur* χωρίς *UAS-GFP*, γεγονός που αποδεικνύει ότι δεν πρόκειται για πρόβλημα εξαιτίας της δόσης των *UAS*.

Γ) Αναπτυξιακός δίσκος φτερού προνύμφης τρίτου σταδίου με γονότυπο *ombGal4; UAS-Dl UAS-GFP* με χρώση για Wg (κόκκινο) και Dl (πράσινο).

Δ) Αναπτυξιακός δίσκος φτερού προνύμφης τρίτου σταδίου με γονότυπο *ombGal4; UAS-Dl UAS-neur* με χρώση για Wg (κόκκινο) και Dl (πράσινο).

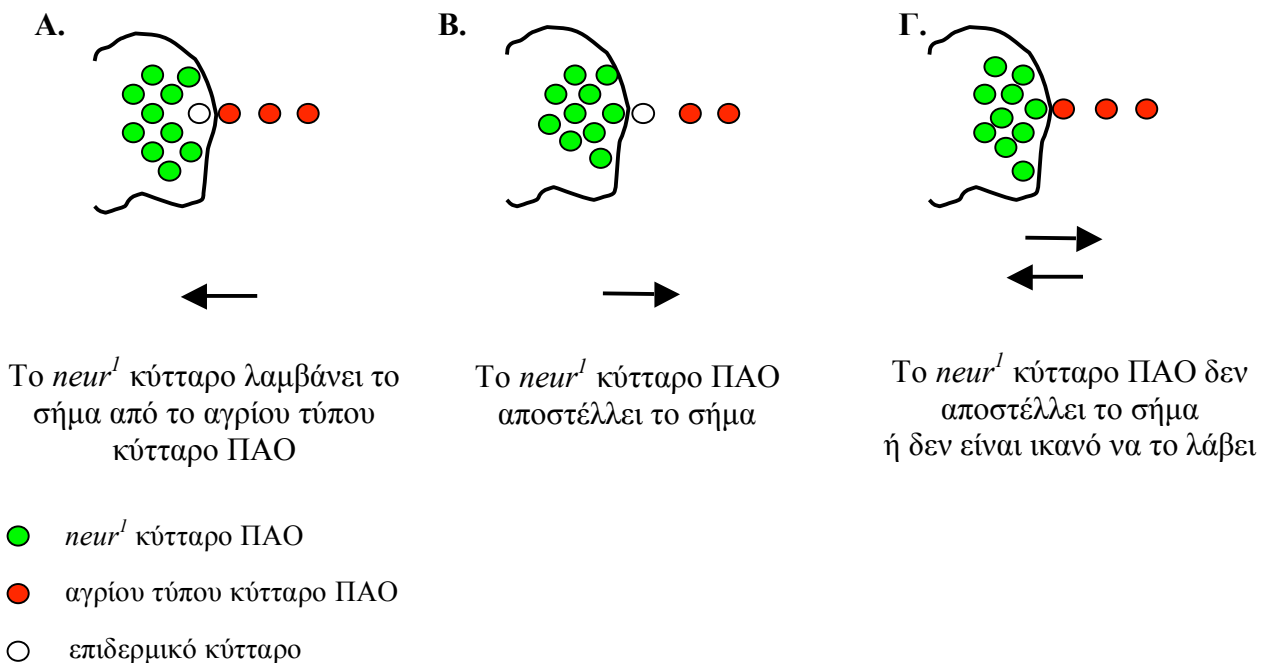
Στο Γ το Wg ενεργοποιείται αποκλειστικά στο ραχιαίο διαμέρισμα και μόνο έξω από την περιοχή της υπερέκφρασης, ενώ στο Δ η ενεργοποίηση γίνεται και στα δύο διαμερίσματα και τόσο έξω (μη αυτόνομα), όσο και μέσα (αυτόνομα) στην περιοχή της υπερέκφρασης (βέλη). Σημειώνεται ότι η χρώση για Dl στο Δ είναι ασθενέστερη από το Γ, εξαιτίας της έντονης ενδοκύττασης και αποικοδόμησης παρουσία *Neur*. Επιπλέον, το Δ παρουσιάζει αυξημένο μέγεθος (Το Δ αντιστοιχεί στο 67% της μεγέθυνσης των Α-Γ).

Το *Neur* δρα μη-αυτόνομα κατά την πλευρική αναστολή

Αφού το *neur* φαίνεται να επηρεάζει την δράση του *Dl*, είναι λογικό ότι σε μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας του επηρεάζεται η διαδικασία της πλευρικής αναστολής, γεγονός που ήταν γνωστό για την εμβρυογένεση και τοποθέτησε το *neur* στην κατηγορία των νευρογόνων γονιδίων. Εφόσον όμως το *neur* επηρεάζει τον δεσμευτή του *N* και όχι τον υποδοχέα καθεαυτό περιμένουμε ο φαινότυπος της απώλειας λειτουργίας του να είναι κυτταρικά μη-αυτόνομος. Ωστόσο, υπάρχουν αναφορές που υποστηρίζουν την αυτόνομη δράση του *neur*. Με σκοπό να διευκρινίσουμε το παράδοξο της αυτόνομης ή όχι δράσης του κατασκευάσαμε μιτωτικούς κλώνους απώλειας λειτουργίας του *neur* στο εμπρόσθιο ραχιαιοκοιλιακό όριο του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού της προνύμφης τρίτου σταδίου. Στην περιοχή αυτή το μονοπάτι σηματοδότησης *N* οδηγεί στην ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων του γονιδιακού συμπλόκου *E(spl)*. Με τη χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος 323 ανιχνεύονται 5 από τις πρωτεΐνες του εν λόγω συμπλόκου. Παρατηρήσαμε ότι σε κλώνους *neur¹* η έκφραση των *E(spl)* καταστέλλεται, εκτός από μία σειρά κυττάρων στα όρια του κλώνου, γεγονός που σημαίνει ότι τα εν λόγω συνεχίζουν να δέχονται το σήμα του *N* (Εικ. 3.7Α).

Για να μπορέσουμε να διαπιστώσουμε αν η απώλεια του *neur* επηρεάζει την αποστολή ή τη λήψη του σήματος μελετήσαμε κλώνους απώλειας λειτουργίας του στο εμπρόσθιο περιθώριο του φτερού της προνύμφης. Στην περιοχή αυτή του αναπτυξιακού δίσκου διαφοροποιούνται τα αισθητήρια όργανα (μακροχαίτες) του εμπρόσθιου περιθωρίου του ενήλικου φτερού από δύο επιμήκεις προνευρικούς συναθροισμούς. Τα κύτταρα ΠΑΟ που διαφοροποιούνται σε αυτές τις θέσεις χαρακτηρίζονται από την έκφραση μεταγραφικού παράγοντα *Asense*. Μελετήσαμε την τοποθέτηση των κυττάρων ΠΑΟ στα όρια *neur¹* κλώνων. Εν πρώτοις, πρέπει να σημειωθεί ότι οι *neur¹* κλώνοι παρουσιάζουν νευρογόνο φαινότυπο, δηλαδή αντί για ένα κύτταρο ΠΑΟ, περισσότερα αποκτούν την νευρική τύχη όταν απουσιάζει το γονίδιο. Αν η απώλεια του *neur* επηρεάζει την αποστολή του σήματος και όχι την λήψη του, περιμένουμε αγρίου τύπου κύτταρα ΠΑΟ στα όρια του κλώνου να εμποδίζουν τα *neur¹* κύτταρα να αποκτήσουν τη νευρική τύχη και να εκφράσουν *Ase* (κανένα πρόβλημα στην λήψη του σήματος). Η διάταξη αυτή (αγρίου τύπου ΠΑΟ δίπλα σε επιδερμικό κύτταρο *neur¹*) παρατηρήθηκε σε 60% των περιπτώσεων (“μη αυτόνομη”). Η αντίστροφη διάταξη (*neur¹* ΠΑΟ δίπλα σε αγρίου τύπου επιδερμικό) παρατηρήθηκε στο 18% των κλώνων. Το υπόλοιπο 23% αντιστοιχεί σε ζευγάρια αγρίου τύπου και *neur¹* κυττάρων ΠΑΟ, διάταξη που μπορεί να ερμηνευτεί τόσο ως αδυναμία αποστολής (ανινακότητα των *neur¹* κυττάρων να αναστείλουν τα γειτονικά τους αγρίου τύπου κύτταρα), όσο και ως

αδυναμία λήψης του σήματος (ανικανότητα των *neur¹* κυττάρων να δεχτούν το σήμα από τα αγρίου τύπου κύτταρα). Η τοποθέτηση των κυττάρων ΠΑΟ μελετήθηκε και στα όρια μιτωτικών κλώνων *Dl*, ως πείραμα ελέγχου για ένα φαινότυπο μη αυτονομίας. Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν ήταν παρόμοια με την περίπτωση των *neur¹* κλώνων: 83% μη αυτόνομη διάταξη, 14% αυτόνομη διάταξη και σχεδόν καθόλου ζευγάρια κυττάρων ΠΑΟ. Το γεγονός ότι η μη-αυτονομία είναι περισσότερο έντονη σε *Dl* κλώνους μπορεί να οφείλεται στο ότι τα *Dl* κύτταρα έχουν ένα εγγενές μειονέκτημα ως προς την αποστολή του σήματος, οπότε μπορούν να κατασταλούν άμεσα από τα αγρίου τύπου γειτονικά κύτταρα, κάτι το οποίο δεν συμβαίνει στα *neur¹* κύτταρα, όπου το γονίδιο εκφράζεται και δρα αργότερα.

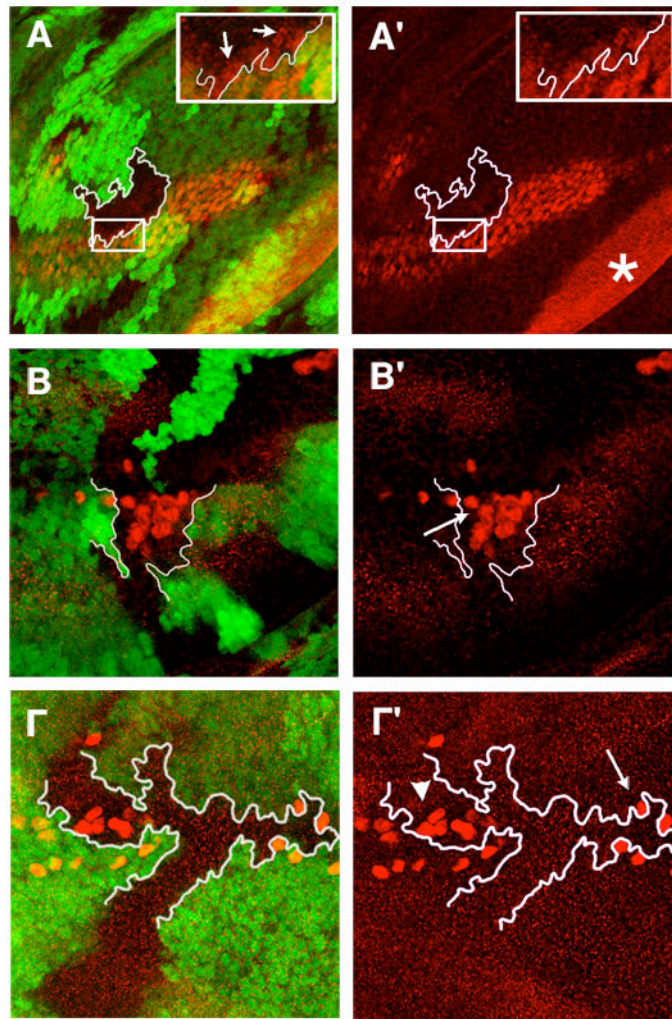


Δ.

Γονότυπος	% μη αυτόνομο	% αυτόνομο	% ζευγάρια	Σύνολο
<i>neur¹</i>	60	18	23	40
<i>Dl^{rev10}</i>	83	14	3	35

Εικόνα 3.6: Σχηματική αεικόνιση της πλευρικής αναστολής στα όρια κλώνων με πρόβλημα στην αποστολή ή τη λήψη του σήματος

Οι κλώνοι που μελετάμε ελέγχονται για την διάταξη των κυττάρων ΠΑΟ στα όρια τους. Α) Όταν αγρίου τύπου κύτταρο ΠΑΟ δεν επιτρέπει τον καθορισμό μεταλλαγμένου κυττάρου ΠΑΟ μέσα στον κλώνο, τα κύτταρα του κλώνου είναι ικανά να δεχτούν σήμα. Β) Όταν μεταλλαγμένο κύτταρο ΠΑΟ εμποδίζει τον καθορισμό αγρίου τύπου ΠΑΟ έξω από τον κλώνο, το μεταλλαγμένο κύτταρο μπορεί να αποστείλει το σήμα. Γ) Όταν παρατηρούνται ζευγάρια μεταλλαγμένων και αγρίου τύπου κυττάρων ΠΑΟ, τότε είτε υπάρχει πρόβλημα στην αποστολή ή στη λήψη του σήματος από τα μεταλλαγμένα κύτταρα. Δ) Ο πίνακας δείχνει τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση *Dl* και *neur¹* κλώνων.



Εικόνα 3.7: Το *neur* επηρεάζει την αποστολή του σήματος N και όχι τη λήψη του

A) Μιτωτικός κλώνος *neur⁻* στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού προνύμφης τρίτου σταδίου μαρκάρεται από την έλλειψη της GFP. Ανοσοϊστοχημική χρώση (κόκκινο) για τις πρωτεΐνες του συμπλόκου E(spl), οι οποίες χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες της ενεργοποίησης του μονοπατιού N στο εμπρόσθιο περιθώριο του φτερού. Παρά το γεγονός ότι τα κύτταρα του κλώνου γενικά χάνουν την έκφραση των εν λόγω πρωτεϊνών, σε μία σειρά κυττάρων μέσα από τα όρια του κλώνου (σε προνευρική περιοχή), υπάρχει ανοσοανίχνευση των πρωτεϊνών αυτών. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα *neur⁻* κύτταρα του κλώνου μπορούν να δέχονται σήμα προερχόμενο από τα εξωτερικά αγρίου τύπου κύτταρα (φαίνεται καλύτερα στη μεγένθυση). Με αστερίσκο υποδηλώνεται μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος.

B) Μιτωτικοί κλώνοι *neur⁻* στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού προνύμφης τρίτου σταδίου μαρκάρονται από την έλλειψη της GFP. Ανοσοϊστοχημική χρώση (κόκκινο) για την πρωτεΐνη Ase, η οποία μαρκάρει τα κύτταρα ΠΑΟ. Τα μεταλλαγμένα *neur⁻* κύτταρα στα όρια του κλώνου καταστέλλονται από τα γειτονικά τους αγρίου τύπου κύτταρα και δεν εκφράζουν Ase (βέλος). Επιπλέον, παρατηρείται νευρογόνος φαινότυπος καθώς περισσότερα κύτταρα αποκτούν τη νευρική τύχη.

Γ) Μιτωτικοί κλώνοι *Df* στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού προνύμφης τρίτου σταδίου μαρκάρονται από την έλλειψη της GFP. Ανοσοϊστοχημική χρώση (κόκκινο) για την πρωτεΐνη Ase, η οποία μαρκάρει τα κύτταρα ΠΑΟ. Εκεί που ο κλώνος διασχίζει το ραχαιοκοιλιακό όριο δεν υπάρχουν κύτταρα ΠΑΟ, καθώς διακόπτεται η ακεραιότητα του ιστού εξαιτίας του ρόλου του *Df* στον καθορισμό του περιθωρίου του φτερού. Ωστόσο, όταν ο κλώνος βρίσκεται ραχιαία, περισσότερα κύτταρα ΠΑΟ εμφανίζονται (κεφαλή βέλους), όπως και στο B. Στον συγκεκριμένο κλώνο, το πιο εμπρόσθια τοποθετημένο μεταλλαγμένο κύτταρο ΠΑΟ βρίσκεται δίπλα σε ένα αγρίου τύπου μη-ΠΑΟ, μία διάταξη που θα ήταν συμβατή με αυτόνομη δράση του *Df*. Σε ένα άλλο σημείο του κλώνου (βέλος) τα αγρίου τύπου κύτταρα ΠΑΟ έχουν πλήρως καταστείλει τη νευρική τύχη μέσα στον *Df* κλώνο (μη αυτόνομη διάταξη).

Σε όλες τις εικόνες το εμπρόσθιο τμήμα του δίσκου φαίνεται αριστερά και το ραχιαίο πάνω.

Συμπερασματικά...

Από την εργασία που περιγράφεται παραπάνω δείχθηκε ότι:

- Το Neur είναι μία πρωτεΐνη που επηρεάζει την ενδοκύττωση και τα επίπεδα του δεσμευτή του N, D1 στη Δροσόφιλα.
- Το Neur ενισχύει τη σηματοδοτική ικανότητα του D1.
- Το Neur δρα μη αυτόνομα κατά την πλευρική αναστολή (ευνοεί την αποστολή του σήματος).
- Ο δάκτυλος RING του Neur είναι απαραίτητος για την ικανότητα της πρωτεΐνης να ενδοκυττώνει και να ελαττώνει τα επίπεδα του D1 (Εικ. 3.4, διαδρομή 8), αλλά δεν χρειάζεται για την αποστολή του σήματος. (Η. Παυλόπουλος, ΔΔ, βλέπε και παρακάτω)

Την ίδια περίοδο που ολοκληρώθηκε το παραπάνω τμήμα της παρούσας διατριβής (Pavlopoulos, Pitsouli et al., 2001), δημοσιεύθηκαν τρεις ακόμη εργασίες από τα εργαστήρια της G. Boulianne, του G. Rubin και του C. Kintner (Yeh et al., 2001, Lai et al., 2001, Deblandre et al., 2001), οι οποίες επίσης ασχολήθηκαν με τη μελέτη της δράσης του Neur, στη Δροσόφιλα (οι δύο πρώτες) και στο βάτραχο (η τρίτη). Σε αυτές τις εργασίες δείχθηκε με πειράματα in vitro ότι το Neur είναι μία E3 λιγάση ουβικουΐτινης και η δράση της αυτή εξαρτάται από την παρουσία ενός ακέραιου μοτίβου RING. Επιπλέον, και σε συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα, δείχθηκε ότι το Neur ενεργοποιείται κατά την ενδοκύττωση της πρωτεΐνης D1 και επίσης βρίσκεται στο ίδιο φυσικό σύμπλοκο με αυτήν (πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης).

Αποτελέσματα II

«Ο ρόλος των πρωτεϊνών DSL και των λιγασών ουβικουΐτινης Neuralized και Mind Bomb1 στη σηματοδότηση Notch»

Οι δύο δεσμευτές του Notch, Delta και Serrate, δρουν συνεργατικά κατά τη διαδικασία της πλευρικής αναστολής

Νωρίς κατά της ανάπτυξη του φτερού της Δροσόφιλας, οι δύο δεσμευτές του N, D1 και Ser, εκφράζονται δυναμικά σε διαφορετικά/ συμπληρωματικά πρότυπα στον αναπτυξιακό δίσκου του φτερού της προνύμφης. Συγκεκριμένα, η έκφραση του Ser περιορίζεται στο ραχιαίο διαμέρισμα, ενώ η έκφραση του D1 εντοπίζεται κυρίως κοιλιακά. Αυτή η διαφορική έκφραση των δεσμευτών σε συνδυασμό με την γλυκοζυλίωση ή όχι του υποδοχέα N από την γλυκοζυλ-τρανσφεράση Fringe (στο ραχιαίο και στο κοιλιακό διαμέρισμα αντίστοιχα) έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού N σε μια λεπτή γραμμή στο ραχιαιοκοιλιακό σύνορο του δίσκου του φτερού. Κατά το τρίτο στάδιο της προνύμφης, οι δύο δεσμευτές του N εκφράζονται σε ένα πρότυπο πολύ παρόμοιο (Εικ. 3.8): εκατέρωθεν του ραχιαιοκοιλιακού συνόρου του φτερού (με το Ser να παρουσιάζει μεγαλύτερη έμφαση στην ραχιαία πλευρά του δίσκου), κατά μήκος των περιοχών που θα δώσουν τις φλεβώσεις του φτερού και στην εμπρόσθια περιοχή του θωρακικού τμήματος του δίσκου (ειδικά στην περιοχή του θωρακικού τμήματος η πρωτεΐνη Ser φαίνεται να εντοπίζεται λίγο πιο πίσω από την D1). Τότε λαμβάνει χώρα η πλευρική αναστολή που θα καθορίσει τα κύτταρα ΠΑΟ (πρόδρομα αισθητηρίων οργάνων) των μακροχαιτών (αισθητήρια όργανα του ενήλικου). Οι δύο δεσμευτές του N εντοπίζονται τόσο στην κορυφαία επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων όσο και σε ενδοκυτταρικά κυστίδια. Ο κυστιδιακός εντοπισμός του Ser είναι εντονότερος από αυτόν του D1. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τόσο το D1, όσο και το Ser φαίνεται να απουσιάζουν από την κορυφαία επιφάνεια των κυττάρων ΠΑΟ (Εικ. 3.8, Γ', Γ'' και Εικ. 3.14).

Μέχρι σήμερα πιστεύεται ότι η πλευρική αναστολή κατά τον καθορισμό των κυττάρων ΠΑΟ επιτυγχάνεται αποκλειστικά μέσω της δράσης του δεσμευτή D1. Μήπως όμως και η πρωτεΐνη Ser παίζει κάποιο ρόλο; Έχειδειχθεί ότι οι δύο δεσμευτές του N μπορούν να δράσουν ο ένας αντί του άλλου τόσο κατά την εμβρυογένεση (Gu et al., 1995), όσο και κατά την σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα N κατά την διαδικασία των ασύμμετρων διαιρέσεων του κυττάρου ΠΑΟ (Zeng et al, 1998). Μήπως και κατά την διαδικασία του καθορισμού των κυττάρων ΠΑΟ γίνεται κάτι παρόμοιο;

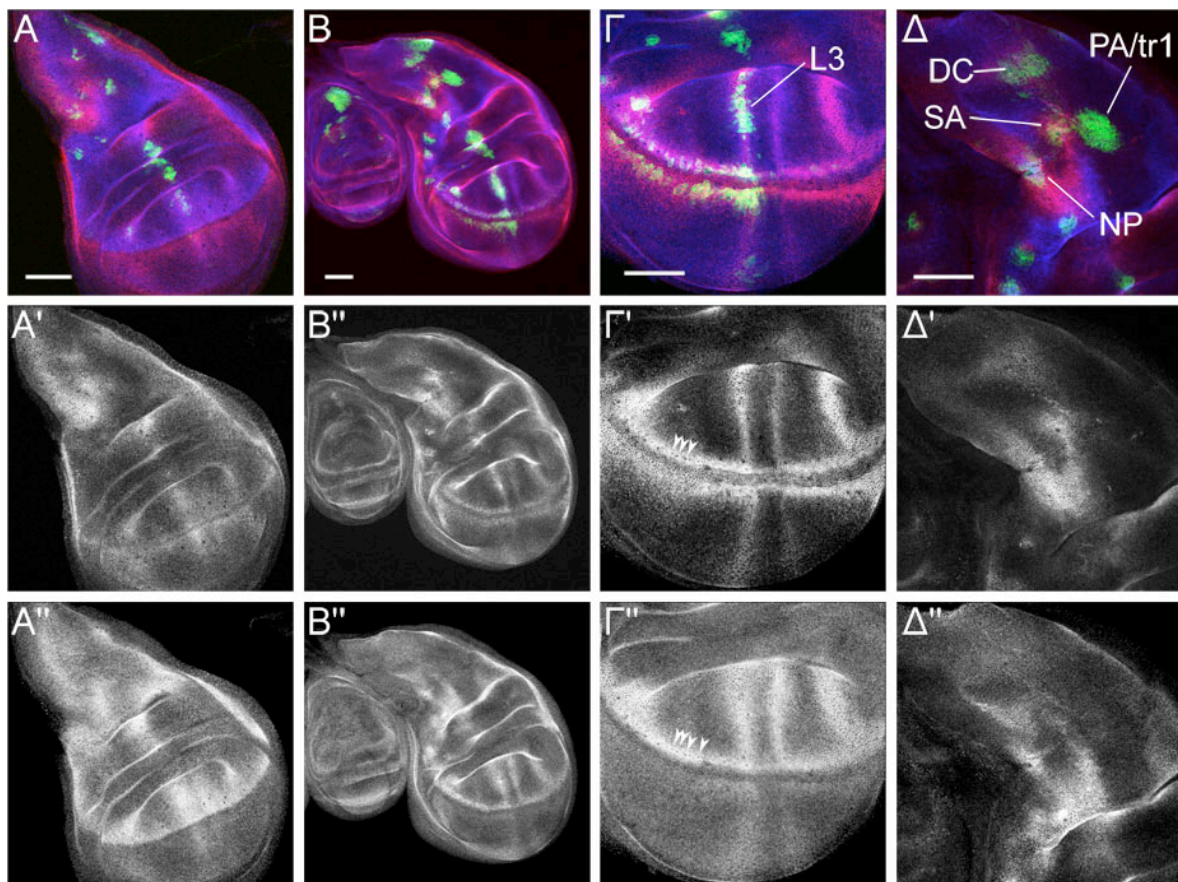
Για να δούμε αν η πρωτεΐνη Ser παίζει ρόλο στην πλευρική αναστολή κατά τον καθορισμό των κυττάρων ΠΑΟ των μακροχαιτών της Δροσόφιλας, μελετήσαμε μιτωτικούς κλώνους απώλειας λειτουργίας του υποδοχέα N και των δεσμευτών του (Πίνακας 3.1), οι οποίοι έχουν επαχθεί στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού της προνύμφης και επικαλύπτονται με προνευρικούς συναθροισμούς. Εστιαστήκαμε στην περιοχή του δίσκου

του φτερού που αντιστοιχεί στον θώρακα, όπου 9 κύτταρα ΠΑΟ θα καθοριστούν σε ένα καλά χαρακτηρισμένο πρότυπο και θα δώσουν αντίστοιχες μακροχαίτες στον θώρακα του ενήλικου ατόμου (Εικ. 1.9). Χρησιμοποιήσαμε την πρωτεΐνη Sens ως μάρτυρα των κυττάρων ΠΑΟ. Η πρώτη ένδειξη ότι και το Ser παίζει ρόλο στην πλευρική αναστολή κατά των καθορισμό των εν λόγω κυττάρων προήλθε από την σύγκριση του φαινοτύπου των *DI* (παρουσία μόνο του Ser) με τους διπλούς *DI Ser⁻* και τους *N* κλώνους (Πίνακας 3.1). Συγκεκριμένα, οι κλώνοι *DI* παρουσιάζουν κυρίως ασθενή νευρογόνο φαινότυπο (2-4 κύτταρα ΠΑΟ αντί του ενός) και σε περίπου 40% των περιπτώσεων είναι αγρίου τύπου (1 μόνο κύτταρο ΠΑΟ μέσα στον κλώνο). Αντίθετα, οι κλώνοι από τους οποίους απουσιάζουν και οι δύο δεσμευτές παρουσιάζουν ισχυρά νευρογόνο φαινότυπο (περισσότερα από 10 κύτταρα αντί του ενός) και μοιάζουν με τον φαινότυπο των κλώνων από τους οποίους απουσιάζει ο υποδοχέας N.

Για να επιβεβαιώσουμε ότι ο φαινότυπος των διπλών κλώνων *DI Ser⁻* πραγματικά σχετίζεται με την έλλειψη του Ser και δεν είναι τυχαίο γεγονός (πχ γενετικό υπόβαθρο του στελέχους) καταφύγαμε στην τεχνητή απομάκρυνση του λειτουργικού Ser σε *DI* κλώνους οι οποίοι ταυτόχρονα υπερεκφράζουν τη γλυκοζυλ-τρανσφεράση του N, Fringe (*DI+ UAS-fng*, χρησιμοποιώντας το σύστημα MARCM, Εικ. 3.9E), Στους κλώνους αυτούς, το ενδογενές Ser καθίσταται ανενεργό, καθώς δεν μπορεί να σηματοδοτήσει στον γλυκοσυλιωμένο από Fringe υποδοχέα N και ο ασθενής νευρογόνος φαινότυπος των *DI* κλώνων μετατρέπεται σε ισχυρό, όπως αυτόν των *DI Ser* κλώνων. Σε πείραμα ελέγχου, όπου υπερεκφράστηκε το διαγονίδιο UAS-fng σε κλώνους με *tubGal4*, δεν παρατηρήθηκε κανένα πρόβλημα στην πλευρική αναστολή των κυττάρων ΠΑΟ. Με τις παραπάνω δύο προσεγγίσεις, διαπιστώσαμε ότι η έλλειψη του δεσμευτή Ser ενισχύει τον νευρογόνο φαινότυπο της έλλειψης του DI, οπότε φαίνεται ότι και το Ser συμμετέχει στην διαδικασία της πλευρικής αναστολής, παρά το γεγονός ότι σε *Ser⁻* κλώνους το DI μπορεί να τα καταφέρει από μόνο του.

Γιατί όμως η συνεισφορά των δύο δεσμευτών του N είναι διαφορετική κατά την πλευρική αναστολή; Ποιοτική ή ποσοτική είναι η διαφορά στα δύο μόρια; Παρατηρήσαμε ότι ο ασθενής *DI* νευρογόνος φαινότυπος αποκαθίσταται πλήρως μετά από υπερέκφραση ενός διαγονιδίου *UAS-Ser* με *tubGal4* μέσα στον κλώνο. Συνεπώς, η αύξηση της ποσότητας του Ser είναι αρκετή για να διασωθεί η απώλεια του DI. Φαίνεται λοιπόν ότι στην φυσιολογική κατάσταση, ο δεσμευτής DI εκφράζεται σε επαρκή επίπεδα, ενώ ο Ser σε χαμηλότερα από τα αναγκαία. Για να δούμε αν οι διαφορές των δύο δεσμευτών είναι ποσοτικές, δημιουργήσαμε μιτωτικούς κλώνους *DI Ser*, στους οποίους εκφράσαμε DI και Ser ως διαγονίδια *UAS* με *tubGal4* (Πίνακας 3.1 και Εικ. 3.10A, B). Παρατηρήσαμε ότι και

τα δύο μπορούν να αποκαταστήσουν πλήρως τον φαινότυπο της έλλειψης των δεσμευτών *Df Ser*, όταν εκφραστούν ομοιόμορφα στον προνευρικό συναθροισμό (τα επίπεδα της υπερέκφρασης ήταν 2-3 φορές παραπάνω από τα φυσιολογικά επίπεδα της ενδογενούς έκφρασής τους, Εικ. 3.10Γ, Δ). Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι η μεταγραφική ρύθμιση των δεσμευτών δεν είναι απαραίτητη για την πλευρική αναστολή, σε αντίθεση με την μέχρι σήμερα άποψη (Heitzler and Simpson, 1991) και συνεπώς κάποιος άλλος παράγοντας είναι αυτός που παίζει καθοριστικό ρόλο στην εγκαθίδρυση της ασυμμετρίας στον προνευρικό συναθροισμό.



Εικόνα 3.8: Πρότυπο έκφρασης των *Df* και *Ser* σε αναπτυξιακούς δίσκους φτερού προνόμφης

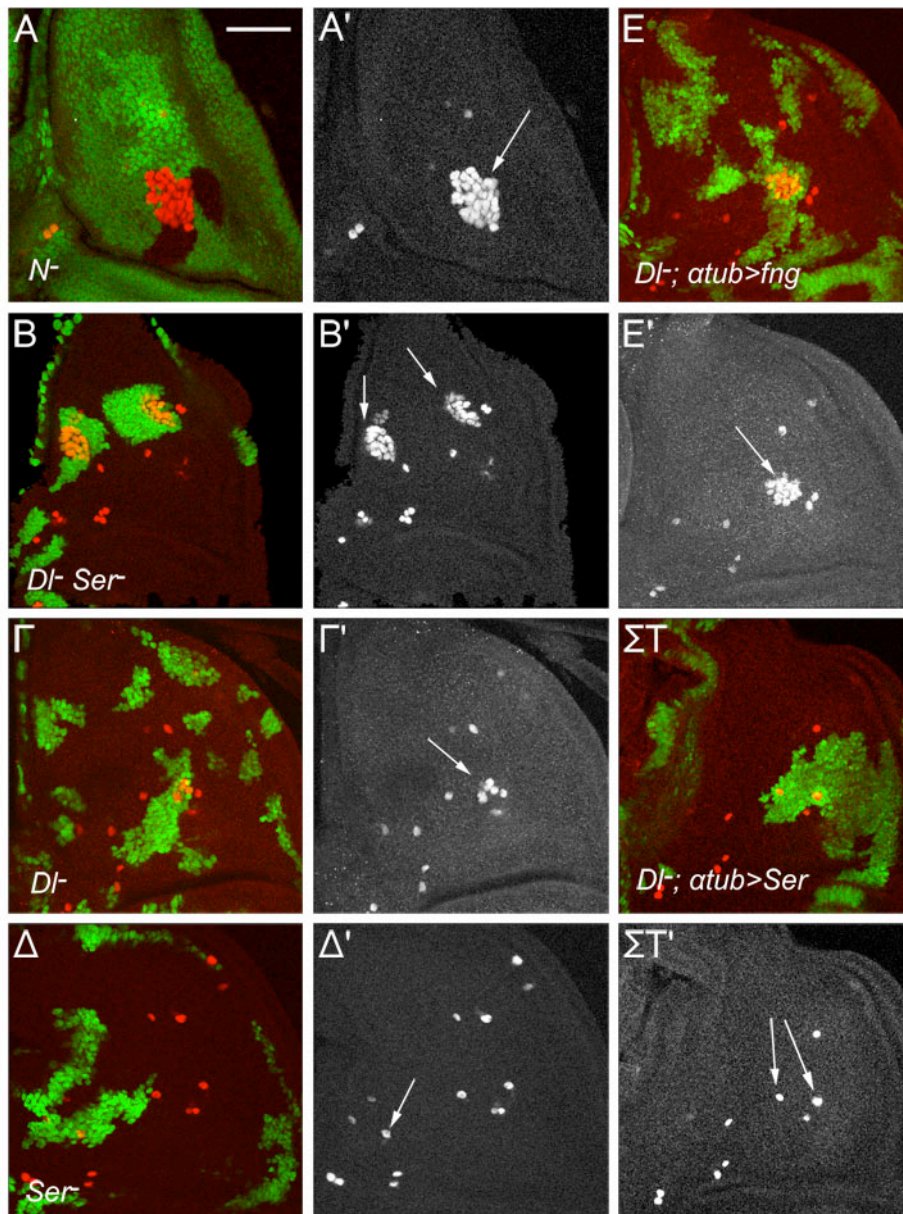
Αναπτυξιακοί δίσκοι με γονότυπο *253Gal4; UAS-srcEGFP* (Η μεμβρανική EGFP -πράσινο - μαρκάρει τα κύτταρα του προνευρικού συναθροισμού) υφίστανται ανοσοϊστοχημεία για το *Df* (κόκκινο) και για το *Ser* (μπλε). Όλοι οι δίσκοι τοποθετούνται με το ραχιαίο διαμέρισμα προς τα πάνω και το εμπρόσθιο προς τα αριστερά. Γραμμή μεγέθους: 40μm. Α'-Δ' αντιστοιχούν στο κανάλι του *Df* και Α''-Δ'' αντιστοιχούν στο κανάλι του *Ser* για τα Α-Δ αντίστοιχα.

Α) Μέσο τρίτου σταδίου: πολλοί προνευρικοί συναθροισμοί δεν έχουν ακόμη σχηματιστεί και το *Ser* (Α'') περιορίζεται στο κοιλιακό διαμέρισμα.

Β-Δ) Τέλος τρίτου σταδίου (δίσκος ποδιού στα αριστερά στο Β).

Γ) Λεπτομέρεια της περιοχής του δίσκου, από όπου θα προκύψει το φτερό. Τα βέλη μαρκάρουν τα κύτταρα ΠΑΟ (έλλειψη *Df*, *Ser* από τη πλασματική μεμβράνη)

Δ) Λεπτομέρεια της περιοχής του δίσκου, από όπου θα προκύψει ο θώρακας. Οι προνευρικοί συναθροισμοί σημειώνονται με το όνομά τους (DC, SA, PA/tr1, NP).

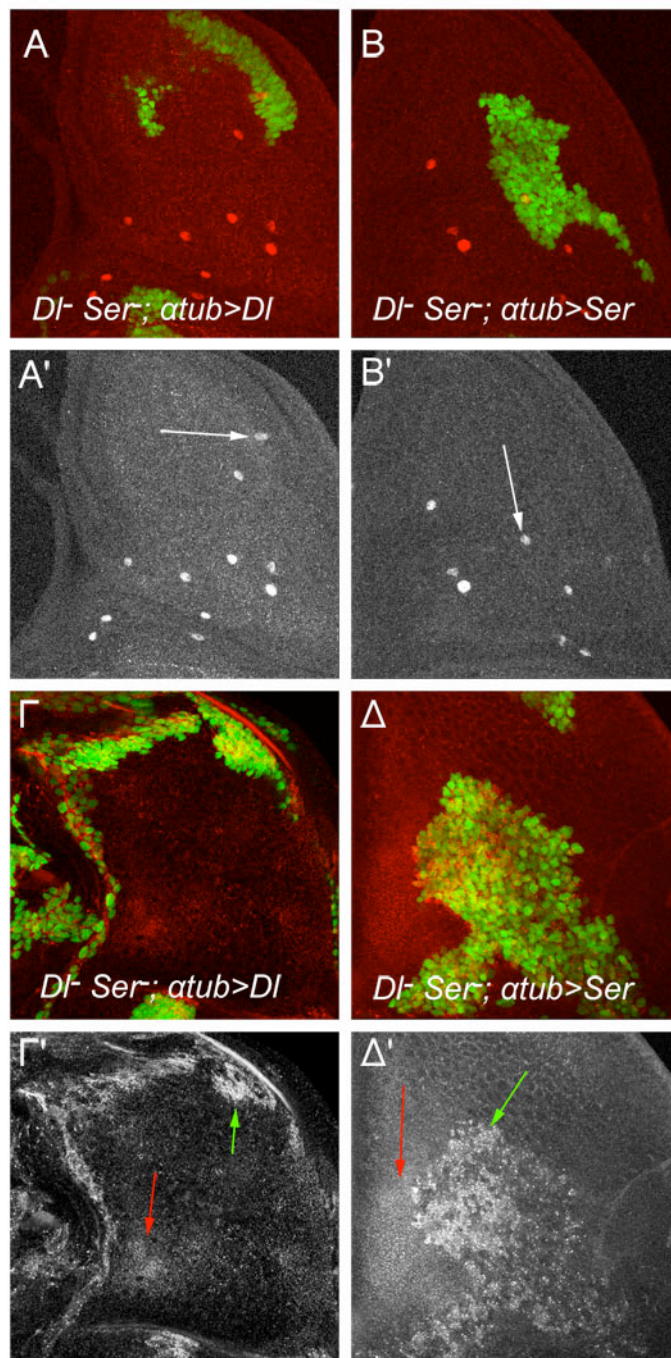


Εικόνα 3.9: Πλευρική αναστολή σε μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας του N και των δεμευτών του.

Μιτωτικοί κλώνοι σε προνημφικά ημιθωράκια τρίτου σταδίου μαρκάρονται από την έλλειψη (A) ή από την παρουσία (B-ΣΤ) της GFP. Όλοι έχουν υποστεί χρώση για την πρωτεΐνη Sens (κόκκινο), η οποία μαρκάρει τα κύτταρα ΠΑΟ. Όλα τα ημιθωράκια είναι τοποθετημένα με την εμπρόσθια πλευρά προς τα αριστερά και την εγγύς πάνω. Η γραμμή μεγέθους είναι 40μm.

Τα Α'-ΣΤ' αντιστοιχούν στο κόκκινο κανάλι των Α-ΣΤ αντίστοιχα και τα βέλη σημειώνουν τους μεταλλαγμένους προνευρικούς συναθροισμούς.

Γονότυποι μιτωτικών κλώνων: A) *N*⁻, B) *DI*⁻ *Ser*⁻, Γ) *DI*⁻, Δ) *Ser*⁻, E) *DI*⁻ + *UAS-fng*, ΣΤ) *DI*⁻ + *UAS-Ser*.



Εικόνα 3.10: Η μεταγραφική ρύθμιση των δεσμευτών του N δεν είναι απαραίτητη για την πλευρική αναστολή.

Προνυμφικά ημιθωράκια τρίτου σταδίου που φέρουν μιτωτικούς κλώνους *DI⁺Ser⁻*, οι οποίοι ταυτόχρονα υπερεκφράζουν *UAS-DI* (A, Γ) ή *UAS-Ser* (B, Δ). Η παρουσία της GFP μαρκάρει τους κλώνους.

A, B) Το κόκκινο αντιστοιχεί σε χρώση για Sens (και φαίνεται μόνο του στα A' και B'). Μοναδικά κύτταρα ΠΑΟ εμφανίζονται μέσα στον μεταλλαγμένο ιστό.

Γ) Το κόκκινο αντιστοιχεί σε χρώση για την πρωτεΐνη DI (φαίνεται μόνο του στο Γ')

Δ) Το κόκκινο αντιστοιχεί σε χρώση για την πρωτεΐνη Ser (φαίνεται μόνο του στο Δ')

Από ανάλυση πυκνότητας χρώσης παρατηρούμε ότι η υπερέκφραση αντιστοιχεί σε 2-3 φορές περισσότερη πρωτεΐνη από τα ενδογενή επίπεδα (η σύγκριση έγινε με βάση περιοχές έντονης έκφρασης των δεσμευτών-βέλη)

Η πρωτεΐνη *Neutralized* είναι απαραίτητη για την πλευρική αναστολή και επηρεάζει τη δράση και των δύο δεσμευτών του N

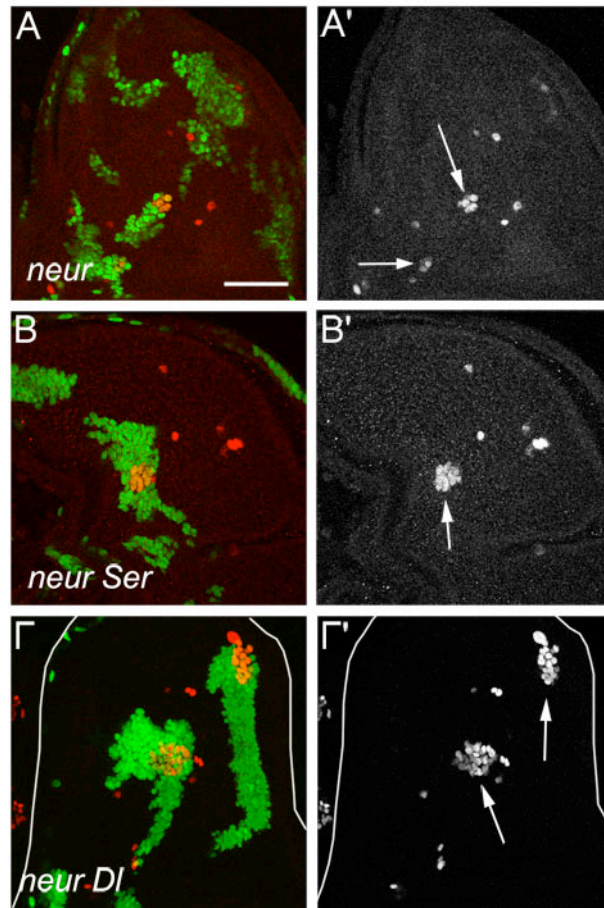
Όταν τα κύτταρα του προνευρικού συναθροισμού δεν εκφράζουν *Neur* (*neur*- κλώνοι), η διαδικασία της πλευρικής αναστολής αποτυγχάνει στο 100% των περιπτώσεων, γεγονός που αποδεικνύει ότι το γονίδιο είναι απαραίτητο για την εν λόγω διαδικασία. Γνωρίζουμε ότι το *neur* επηρεάζει την ενδοκυττάρωση και την δραστικότητα της πρωτεΐνης *Dl* (Αποτελέσματα, μέρος Α'). Αφού και ο δεσμευτής *Ser* παίζει ρόλο στην πλευρική αναστολή, μήπως και αυτός επηρεάζεται από το *neur*;

Για να μελετήσουμε τις πιθανές λειτουργικές σχέσεις των δεσμευτών του N με το *neur*, δημιουργήσαμε διπλούς μιτωτικούς κλώνους *neur⁻ Dl* (παρόν μόνο το *Ser*) και *neur⁻ Ser⁻* (παρόν μόνο το *Dl*) και ελέγξαμε αν ο φαινότυπος στην πλευρική αναστολή που προκαλείται από την απώλεια καθενός δεσμευτή διαφέρει/ χειροτερεύει όταν απουσιάζει το *neur* (Εικ. 3.11, Πίνακας 3.1). Παρατηρήσαμε ότι ο φαινότυπος των *neur⁻ Ser⁻* είναι χειρότερος από αυτόν των *Ser⁻* κλώνων, επιβεβαιώνοντας το γεγονός ότι όταν το *Dl* δρα απουσία του *Neur* δεν υποστηρίζει επαρκώς την πλευρική αναστολή. Επίσης, ο φαινότυπος των *neur⁻ Dl* είναι χειρότερος από αυτόν των *Dl* κλώνων, γεγονός που υποδεικνύει ότι και το *Ser* χρειάζεται την αρωγή του *Neur* για να βοηθήσει στην πλευρική αναστολή (παρά το γεγονός ότι τα καταφέρνει χειρότερα από το *Dl*). Άρα το *neur* φαίνεται να είναι σημαντικό τόσο για τη δράση του *Dl* όσο και του *Ser* στη διαδικασία της πλευρικής αναστολής στο δίσκο του φτερού.

Συγκρίνοντας τον φαινότυπο των *neur⁻* και των διπλών *neur⁻ Dl* και *neur⁻ Ser⁻* κλώνων παρατηρούμε ότι οι *neur⁻* παρουσιάζουν πιο ασθενή νευρογόνο φαινότυπο από τους διπλούς κλώνους (οι *neur⁻* είναι λίγο πιο ισχυροί από τους *Dl*). Στην πραγματικότητα, ο φαινότυπος των διπλών *neur⁻ Dl* και *neur⁻ Ser⁻* κλώνων μοιάζει σε σοβαρότητα με τους διπλούς κλώνους *Dl Ser⁻*. Από αυτή τη σύγκριση προκύπτει ότι ο κάθε δεσμευτής του N διατηρεί κάποια δραστικότητα απουσία του *neur* και οι δύο δεσμευτές μαζί (*Dl+Ser*) μπορούν να καταφέρουν μερικώς πλευρική αναστολή δρώντας αθροιστικά σε απλούς *neur⁻* κλώνους (δες παρακάτω).

Κατά τη διάρκεια της παραπάνω εργασίας, προσπαθήσαμε να κατασκευάσουμε μία τριπλή μεταλλαγή *neur⁻ Dl Ser⁻*, με σκοπό να μελετήσουμε το φαινότυπό της στην πλευρική αναστολή. Αυτό κατέστη αδύνατον, καθώς τα *neur⁻ + +/ + Dl Ser⁻* ετερόζυγα άτομα πεθαίνουν. Τα άτομα αυτά πεθαίνουν σε εμβρυϊκό στάδιο/ προνύμφη πρώτου σταδίου με πολύπλοκο φαινότυπο, που περιλαμβάνει προβλήματα στην κατασκευή της κεφαλής, που προσομοιάζουν τον φαινότυπο ομόζυγων μεταλλαγών του *Ser*. Ο συνθετικός αυτός θνησιγόνος φαινότυπος αποδεικνύει επίσης ότι το *Neur* μπορεί να δράσει και στους δύο

δεσμευτές του N στην εμβρυογένεση, σε μία άλλη διαδικασία εκτός από την πλευρική αναστολή των μακροχαιτών. Η μείωση της δόσης του *neur* είναι αρκετή για να αποκαλύψει ένα επικρατές αποτέλεσμα της απώλειας των δύο δεσμευτών, αλλά όχι του καθενός χωριστά, καθώς *neur⁻/ Df* και *neur⁻/ Ser* ετερόζυγα άτομα είναι φυσιολογικά.



Εικόνα 3.11: Ο ρόλος του *neur* στην πλευρική αναστολή

Μιτωτικοί κλώνοι σε προνομικά ημιθωράκια τρίτου σταδίου μαρκάρονται από την παρουσία της GFP. Όλοι οι δίσκοι έχουν υποστεί χρώση για την πρωτεΐνη Sens (κόκκινο), η οποία μαρκάρει τα κύτταρα ΠΑΟ. Όλα τα ημιθωράκια είναι τοποθετημένα με την εμπρόσθια πλευρά προς τα αριστερά και την εγγύς πάνω. Η γραμμή μεγέθους είναι 40μm.

Τα Α'-Γ' αντιστοιχούν στο κόκκινο κανάλι των Α-Γ αντίστοιχα και τα βέλη σημειώνουν τους μεταλλαγμένους προνευρικούς συναθροισμούς.

Γονότυποι μιτωτικών κλώνων: Α) *neur⁻*, Β) *neur⁻ Ser⁻*, Γ) *neur⁻ Df*.

Το Neur αλληλεπιδρά με το Ser και προκαλεί την ενδοκύττωσή του

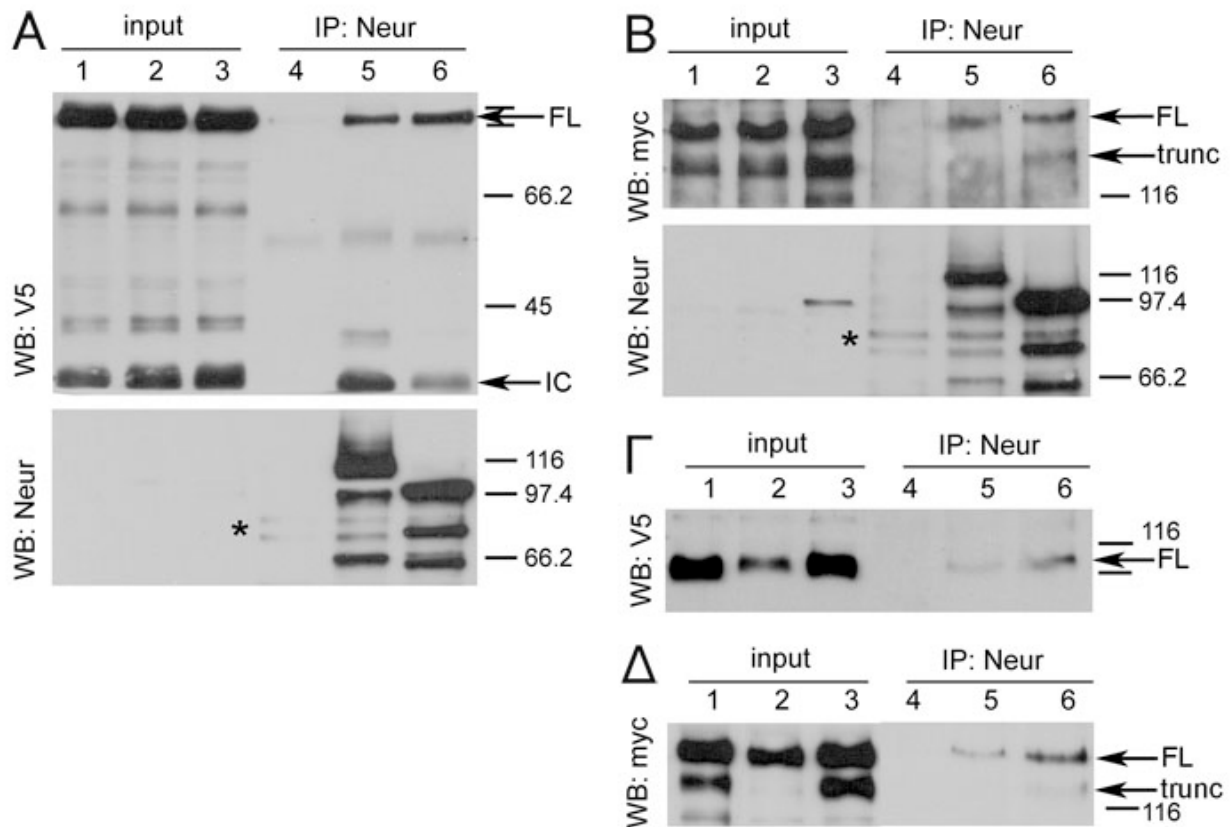
Αφού το Neur επηρεάζει την δράση του Ser κατά την πλευρική αναστολή, ελέγξαμε αν το πρώτο επηρεάζει την ενδοκύττωση και υποκυτταρική τοποθέτηση του δεσμευτή και αν οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν, όπως συμβαίνει με το DI. Χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης για να μπορέσουμε να δούμε αν οι δύο πρωτεΐνες βρίσκονται στο ίδιο σύμπλοκο (Εικ. 3.12B, Δ). Ως πείραμα ελέγχου χρησιμοποιήσαμε την ίδια τεχνική για να ανιχνεύσουμε την φυσική αλληλεπίδραση του Neur με τον δεσμευτή DI, η οποία είναι γνωστή (Εικ. 3.12A, Γ). Διαμολυσμένα S2 κυττάρα με τα κατάλληλα πλασμίδια (για τους δεσμευτές του N: DI-V5, Ser-myc και για το Neur: EGFP-Neur NeurΔRING-GFP), καθώς επίσης και προνύμφες τρίτου σταδίου που υπερεκφράζουν τα κατάλληλα γονίδια (με τους ίδιους επίτοπους όπως στην κυτταρική σειρά, αλλά εκφρασμένα ως διαγονίδια *UAS* κάτω από *HsGal4* και θερμικό σοκ), χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων. Η πρωτεΐνη Neur ανοσοκατακρημνίστηκε με ορρό Rabbit-anti-Neur1050 (βλέπε “Υλικά και Μέθοδοι”) και μαζί με αυτήν ήρθαν και οι δεσμευτές του N. Η ειδικότητα της ανοσοκατακρήμνισης ελέγχθηκε, όταν το ίδιο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε για να κατακρημνίσει κάποια άσχετη υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη σε κύτταρα (πχ. Groucho, β-γαλακτοσιδάση), αλλά δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση σε αυτές τις περιπτώσεις. Όταν χρησιμοποιήθηκε το ελλειμματικό NeurΔR στο παραπάνω πείραμα φάνηκε ότι το μοτίβο RING (μοτίβο λιγάσης ουβικουΐτινης) δεν είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση με τους δεσμευτές του N. Φαίνεται λοιπόν, ότι Neur και Ser αλληλεπιδρούν φυσικά, όπως ακριβώς συμβαίνει και με την πρωτεΐνη DI και για αυτήν την αλληλεπίδραση δεν είναι απαραίτητο το μοτίβο RING του Neur. Το γεγονός ότι το ποσοστό της συν-ανοσοκατακρήμνισης είναι μικρό (1%) αποτελεί ένδειξη ότι η σύνδεση των δύο πρωτεϊνών είναι παροδική. Σε αυτό συνηγορεί το γεγονός ότι δεν εντοπίστηκε άμεση αλληλεπίδραση του Neur και τμημάτων του με τα ενδοκυττάρια τμήματα των δεσμευτών με το σύστημα των δύο υβριδίων στον σακχαρομύκητα (B. Μπαούσης, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Όπως το DI έτσι και το Ser εντοπίζεται τόσο στην πλασματική μεμβράνη, όσο και σε ενδοκυτταρικά κυστίδια είτε σε ενδογενή κατάσταση, είτε όταν υπερεκφράζεται σε επιθηλιακά κύτταρα (με το σύστημα *UAS-Gal4*). Όταν ένα διαγονίδιο *UAS-neur* υπερεκφραστεί στα κύτταρα αυτά, παρατηρείται μία δραματική αλλαγή στην υποκυτταρική τοποθέτηση της πρωτεΐνης Ser: ο εντοπισμός της στην κορυφαία επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης εξαφανίζεται (Εικ. 3.13). Τα ενδοκυτταρικά κυστίδια του ενδογενούς Ser δεν επηρεάζονται από την υπερέκφραση του Neur, ενώ τα υπερεκφρασμένα κυστίδια πολλαπλασιάζονται (κάτι που σημαίνει ότι δεν γίνεται πλήρης αποικοδόμηση της πρωτεΐνης

και υπάρχει αρκετή συσσώρευση – ίσως και κατά την σύνθεσή της). Επειδή το διαγονίδιο *UAS-neur* είναι συντηγμένο με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, μπορούμε να παρακολουθήσουμε και την κυτταρική κατανομή του *Neur*. Παρατηρούμε ότι το *Neur* είναι μεμβρανική πρωτεΐνη και συνεντοπίζεται με το συνυπερεκφρασμένο *Ser* σε συσσωματώματα πολύ κοντά στην μεμβράνη (Εικ. 3.13B, Δ). Όταν αντί για το πλήρους μήκους *Neur* μελετήσουμε το ελλειμματικό *NeurΔR*, παρατηρούμε ότι η ενδοκύττωση του δεσμευτή *Ser* παρεμποδίζεται. Παρατηρούμε ότι η επίδραση του *Neur* στο *Ser* είναι ίδια με αυτή στο *DI*.

Συμπερασματικά, θα λέγαμε ότι η αλληλεπίδραση *Neur/ Ser* είναι ανεξάρτητη από την παρουσία του δακτύλου *RING* του *Neur*, ενώ η ενδοκυττάρωση απαιτεί την παρουσία αυτού του μοτίβου.

Μήπως όμως η ενδοκύττωση του *Ser* είναι ένα έμμεσο αποτέλεσμα της ενδοκύττωσης του *DI* (με δεδομένο ότι οι δύο πρωτεΐνες εκφράζονται σε πολύ παρόμοιο πρότυπο κατά την ανάπτυξη της προνύμφης); Για να απαντήσουμε στην παραπάνω ερώτηση κατασκευάσαμε μιτωτικούς κλώνους με το σύστημα *MARCM*, οι οποίοι εκφράζουν σε ενδογενή επίπεδα τον ένα από τους δύο δεσμευτές μαζί με *neur* εκφρασμένο ως διαγονίδιο *UAS* κάτω από τον έλεγχο του *tubGal4*, δηλ *DI+ UAS-neur* και *Ser+ UAS-neur* (Εικ. 3.14). Παρατηρήσαμε ότι και στις δύο περιπτώσεις ο υπάρχον δεσμευτής (*Ser* και *DI* αντίστοιχα) ενδοκυττώνεται εξαιτίας του εκτοπικά εκφρασμένου *neur*. (Σε απλούς κλώνους των δεσμευτών δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στην ποσότητα ή υποκυτταρική τοποθέτηση του άλλου δεσμευτή). Συνεπώς, το *Neur* δρα ανεξάρτητα στον κάθε δεσμευτή.

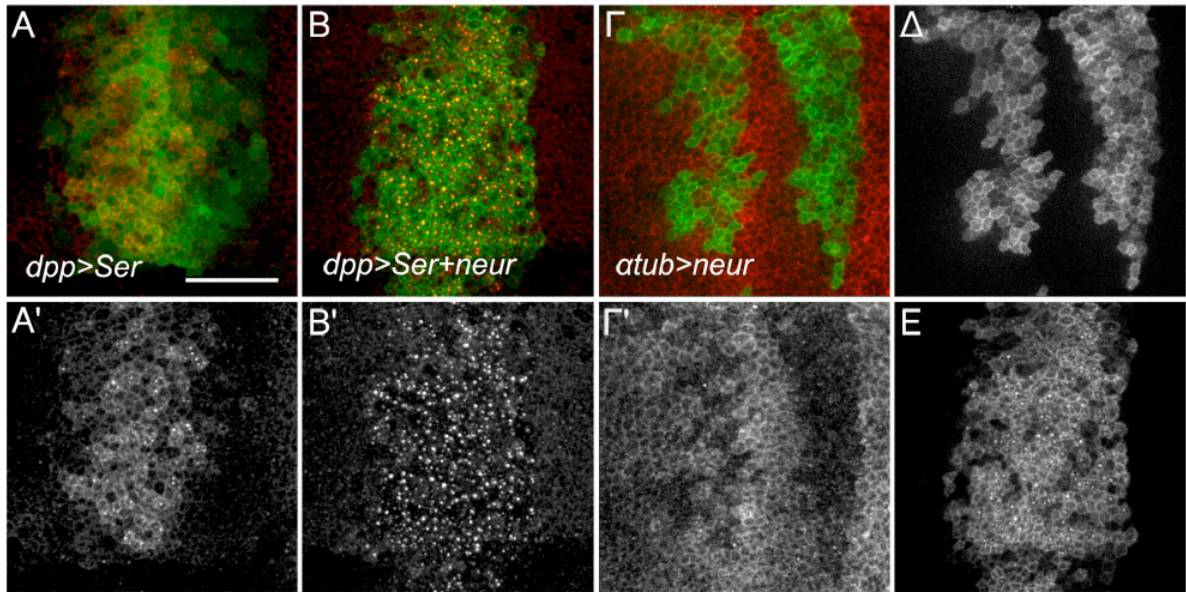


Εικόνα 3.12: Το Neur αλληλεπιδρά με τους δεσμευτές του N

A, B: Ανοσοκατακρήνισεις από παροδικά διαμολυσμένα κύτταρα S2, τα οποία εκφράζουν Dl (A) ή Ser (B) μόνο (διαδρομές 1, 4), και EGFP-neur (διαδρομές 2, 5) ή NeurΔR-GFP (διαδρομές 3, 6). Διαδρομές 1-3: κυτταρικό εκχύλισμα (1/100 του συνόλου). Διαδρομές 4-6: ανοσοκατακρήνιση με anti-Neur αντίσωμα. Οι δεσμευτές του N ανιχνεύθηκαν μετά από western με τη χρήση αντισωμάτων έναντι των επιτόπων που φέρουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο (V5 για το Dl στο A και myc για το Ser στο B). Η πρωτεΐνη Neur ανιχνεύθηκε στα ίδια στρώματα με το ίδιο αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε και στην ανοσοκατακρήνιση.

Γ, Δ: Ανοσοκατακρήνισεις με anti-Neur από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προερχόμενα από σύμπλοκα αναπτυξιακών δίσκων/ ΚΝΣ προνυμφών τρίτου σταδίου. Γ) *hs-Gal4; UAS-Dl-V5* μαζί με κάποιο άλλο διαγονίδιο: κανένα (διαδρομές 1, 4), *UAS-EGFP-neur* (διαδρομές 2, 5) και *UAS-neurΔR-GFP* (διαδρομές 3, 6). Δ) *hs-Gal4; UAS-Ser-myc* μαζί με κάποιο άλλο διαγονίδιο, όπως στο Γ. Οι δεσμευτές του N ανιχνεύθηκαν, όπως και στα A, B.

Στη διαδρομή 4 σε όλες τις εικόνες (δεν εκφράζεται Neur) και καμία DSL πρωτεΐνη δεν φαίνεται να συνανοσοκατακρήνιζεται με anti-Neur (δείγμα ελέγχου). Στις διαδρομές 5 και 6 το EGFP-neur και το NeurΔR-GFP αντίστοιχα, ανοσοκατακρήνιζουν το Dl και το Ser. Το ενδογενές Neur στα S2 φαίνεται σαν μία διπλέτα στα A και B (αστερίσκοι). Στα δεξιά κάθε εικόνας φαίνονται τα μοριακά βάρη σε kDa.



Εικόνα 3.13: Το Neur επάγει την ενδοκύττωση του Ser

Λεπτομέρειες αναπτυξιακών δίσκων φτερού προνύμφης τρίτου σταδίου: το εμπρόσθιο διαμέρισμα φαίνεται αριστερά, το ραχιαίο πάνω και το ραχιοκοιλιακό όριο βρίσκεται στο κάτω μέρος της κάθε φωτογραφίας. Η γραμμή μεγέθους είναι 20μm.

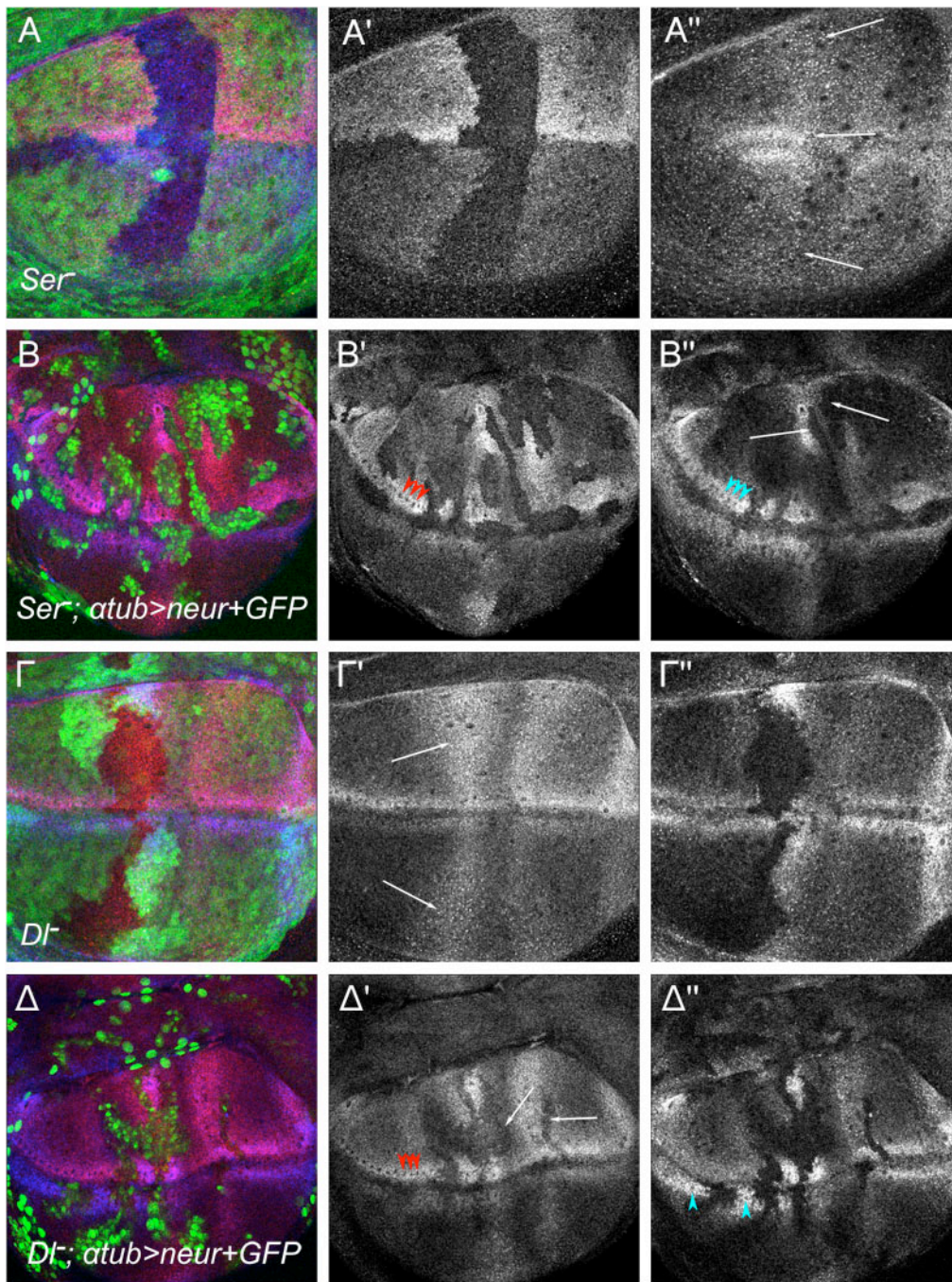
A) *ptc-Gal4; UAS-Ser; UAS-GFP*

B) *ptc-Gal4; UAS-Ser; UAS-EGFP-neur*

Η GFP (πράσινο) μαρκάρει την περιοχή της υπερέκφρασης και το Ser (κόκκινο) φαίνεται χωριστά στα A' και B'. Το Neur προκαλεί την μετακίνηση του Ser από την μεμβράνη (περικυτταρική χρώση) σε ενδοκυτταρικά κυστίδια.

Γ) Μιτωτικοί κλώνοι υπερέκφρασης του Neur (*act-Gal4; UAS-EGFP-neur*) προκαλούν την απομάκρυνση του ενδογενούς Ser από την κορυφαία πλευρά της πλασματικής μεμβράνης.

Δ, E) Το πράσινο κανάλι (EGFP-neur) των Γ και B, αντίστοιχα. Το EGFP-neur βρίσκεται στην κορυφαία επιφάνεια, όταν δεν υπερεκφράζεται το Ser. Όταν όμως υπάρχει υπερέκφραση του δεσμευτή, το EGFP-neur εντοπίζεται επιπλέον σε κυστιδιακές δομές και συνεντοπίζεται με το Ser (κίτρινο στο B). Όλες οι φωτογραφίες είναι προβολές των πρώτων 1.5-2μm του επιθηλίου του δίσκου του φτερού.



Εικόνα 3.14: Το Neur επηρεάζει την ενδοκύττωση των *Dl* και *Ser* ανεξάρτητα

Μιτωτικοί κλώνοι για έλεγχο της έκφρασης των δεσμευτών του N. Όλοι οι αναπτυξιακοί δίσκοι του φτερού είναι τοποθετημένοι με το εμπρόσθιο διαμέρισμα στα αριστερά και το κοιλιακό κάτω. Με κόκκινο και μπλε φαίνεται χρώση για τις πρωτεΐνες *Ser* (φαίνεται μόνο του στα A'-Δ') και *Dl* (φαίνεται μόνο του στα A''-Δ''), αντίστοιχα.

A, Γ) Μιτωτικοί κλώνοι απώλειας λειτουργίας του *Ser* και *Dl* αντίστοιχα, οι οποίοι μαρκάρονται από την απουσία της GFP. Παρατηρούμε ότι η έλλειψη καθενός από τους δύο δεσμευτές του N χωριστά, δεν επηρεάζει την έκφραση του άλλου (βέλη στα A'', Γ'/ στην περιοχή του ραχαιοκοιλιακού ορίου υπάρχει επίδραση στο A'', καθώς η έλλειψη του *Ser* καταστρέφει την δομή του- εμπρόσθιο τμήμα)

B, Δ) Μιτωτικοί κλώνοι απώλειας λειτουργίας του *Ser* και *Dl* αντίστοιχα, οι οποίοι ταυτόχρονα εκφράζουν *neur*. Ο μεταλλαγμένος ιστός μαρκάρεται από την παρουσία πυρηνικής GFP. Στους κλώνους παρατηρείται πτώση των επιπέδων των δεσμευτών του N, εξαιτίας της παρουσίας του *UAS-neur*, το οποίο οδηγεί στην ενδοκύττωσή τους (B'', Δ').

Με έγχρωμα βελόνια (B', Δ', Δ'') σημειώνονται μερικά από τα κύτταρα ΠΑΟ, τα οποία ξεχωρίζουν από την έλλειψη της κορυφιαίας χρώσης για τους δεσμευτές.

Το Mind bomb δρα συνεργατικά με το Neur κατά την πλευρική αναστολή

Όπως προαναφέρθηκε, έλλειψη του *neur* σε μιτωτικούς κλώνους οδηγεί σε νευρογόνο φαινότυπο με διεισδυτικότητα 100%. Ο φαινότυπος των *neur⁻* κλώνων όμως δεν είναι εξαιρετικά ισχυρός (όπως οι *Df Ser⁻* κλώνοι), παρά το γεγονός ότι το *neur* φαίνεται να είναι αναγκαίο για την πλευρική αναστολή και επηρεάζει και τους δύο δεσμευτές. Αφού το *neur* είναι απαραίτητο για την πλευρική αναστολή, γιατί ο φαινότυπος της απώλειας λειτουργίας του δεν είναι πανομοιότυπος με την απώλεια των δύο δεσμευτών ή του υποδοχέα; Θα μπορούσε (α) το αλληλόμορφο του *neur* που χρησιμοποιούμε να μην είναι αμορφικό, ή (β) να υπάρχει επαρκής δραστηριότητα των δεσμευτών απουσία *neur*, ή (γ) να υπάρχει μία άλλη πρωτεΐνη που δρα μαζί με το *neur* σε αυτή τη διαδικασία.

Ανάλυση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων που προέρχονται από έμβρυα ομόζυγα για την μεταλλαγή *neur¹* μας έδειξε ότι υπάρχει πρωτεΐνη Neur σε αυτά (δεν δείχνεται). Συνεπώς, η μεταλλαγή, η οποία προέρχεται από μεταλλαξιγένεση με EMS και δεν αλλάζει την ποσότητα ή το πρότυπο ζωνών της πρωτεΐνης Neur, είναι σημειακή. Δεν χαρακτηρίσαμε περαιτέρω μοριακά την μεταλλαγή, αλλά είδαμε ότι ο φαινότυπος των ομόζυγων *neur¹/neur¹* εμβρύων είναι ισχυρά νευρογόνος κατά την εμβρυογένεση και μοιάζει σε ισχύ με τον φαινότυπο της πλήρους έλλειψης του υποδοχέα N ή του δεσμευτή του Df (Το Ser δεν εκφράζεται στο αναπτυξιακό στάδιο της νευρογένεσης του εμβρύου εκφράζεται αργότερα κατά την ανάπτυξη των κεφαλικών εξαρτημάτων και την μεταμεριδίωση (Speicher et al., 1994; Wiелlette and McGinnis, 1999). Οπότε, σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο φαίνεται ότι η πλευρική αναστολή των νευροβλαστών του εμβρύου απαιτεί την παρουσία του *neur*.

Τι συμβαίνει όμως στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού; Πριν από περίπου δύο χρόνια κλωνοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε στο zebrafish μία Zn-RING E3 λιγάση ουβικουϊτίνης, το Mind bomb (Mib). Το Mib αλληλεπιδρά με το zDf και οδηγεί στην ενδοκύττωση και στην αποικοδόμησή του με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή του (Chen and Corliss, 2004; Itoh et al., 2003). Με in silico προσέγγιση (BLAST), παρατηρήσαμε ότι στη Δροσόφιλα υπάρχουν δύο ομόλογα του *mib*, που δεν έχουν μελετηθεί ακόμη: *CG5841* και *CG17492* και τα αποκαλούμε *mib1* και *mib2*, αντίστοιχα. Το πιο συγγενές με το ομόλογο στο zebrafish είναι το *CG5841* (Εικ. 3.15). In situ υβριδοποίηση σε έμβρυα Δροσόφιλας, έδειξε ότι το *mib1* εκφράζεται σε λωρίδες στο εμβρυϊκό στάδιο 9-10 και ομοιόμορφα στους αναπτυξιακούς δίσκους του φτερού (Εικ. 3.16Α-Δ, Κανακουσάκη Κ, Πτυχιακή εργασία), ενώ το *mib2* εντοπίζεται κυρίως σε μεσοδερμικής προέλευσης κύτταρα στα έμβρυα (δεν δείχνεται).

Για να μελετήσουμε τον φαινότυπο της απώλειας λειτουργίας του *mib1*, ελέγξαμε για την πιθανή ύπαρξη μεταλλαγών στην συγκεκριμένη χρωμοσωμική περιοχή (χρωμόσωμα 3L).

Παρατηρήσαμε ότι το Gene Disruption Project (BDGP), έχει δημιουργήσει την ένθεση EY9780 (Bellen et al., 2004), η οποία προέρχεται από την ενσωμάτωση ενός στοιχείου P στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (5' UTR) του γονιδίου *mib1*, 97 βάσεις πριν από το κωδικόνιο έναρξης. Είδαμε ότι μύγες ομόζυγες για το EY9780 επιβιώνουν μέχρι το στάδιο της νύμφης και συχνά φτάνουν μέχρι σχεδόν το ενήλικο, χωρίς όμως να εκκολάπτονται. Με απομάκρυνση της νυμφικής θήκης από τις παραπάνω παρατηρήσαμε ότι τα ενήλικα δεν έχουν φτερά, τα μάτια τους είναι πολύ μικρά ή ανύπαρκτα, τα πόδια τους είναι κοντά και παρουσιάζουν προβλήματα στην πυκνότητα των μικροχαιτών τους (βλέπε επίσης (Lai et al., 2005; Le Borgne et al., 2005). Για να πιστοποιήσουμε ότι οι παραπάνω φαινότυποι οφείλονται στην έλλειψη λειτουργίας του γονιδίου *mib1*, ελέγξαμε αν εκφράζεται το εν λόγω γονίδιο με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με ειδικούς εκκινητές σε μήτρα cDNA που προέρχεται από RNA ομόζυγων προνυμφών (RT-PCR). Παρά το γεγονός ότι σε αγρίου τύπου προνύμφες, ανιχνεύθηκε το μετάγραφο του *mib1* (μετά από «φωλιασμένο» PCR), σε ομόζυγες EY9780, δεν ανιχνεύθηκε (Εικ. 3.16E) κι έτσι πιστοποιήθηκε ότι η ένθεση EY9780 αντιστοιχεί σε μεταλλαγή απώλειας λειτουργίας του γονιδίου *mib1*, την οποία ονομάζουμε *mib1^{EY9780}*. Επιπλέον, ακριβής απόσχιση του μεταθετού στοιχείου P από το στέλεχος EY9780, οδήγησε σε αναστροφή του φαινότυπου στον άγριο τύπο.

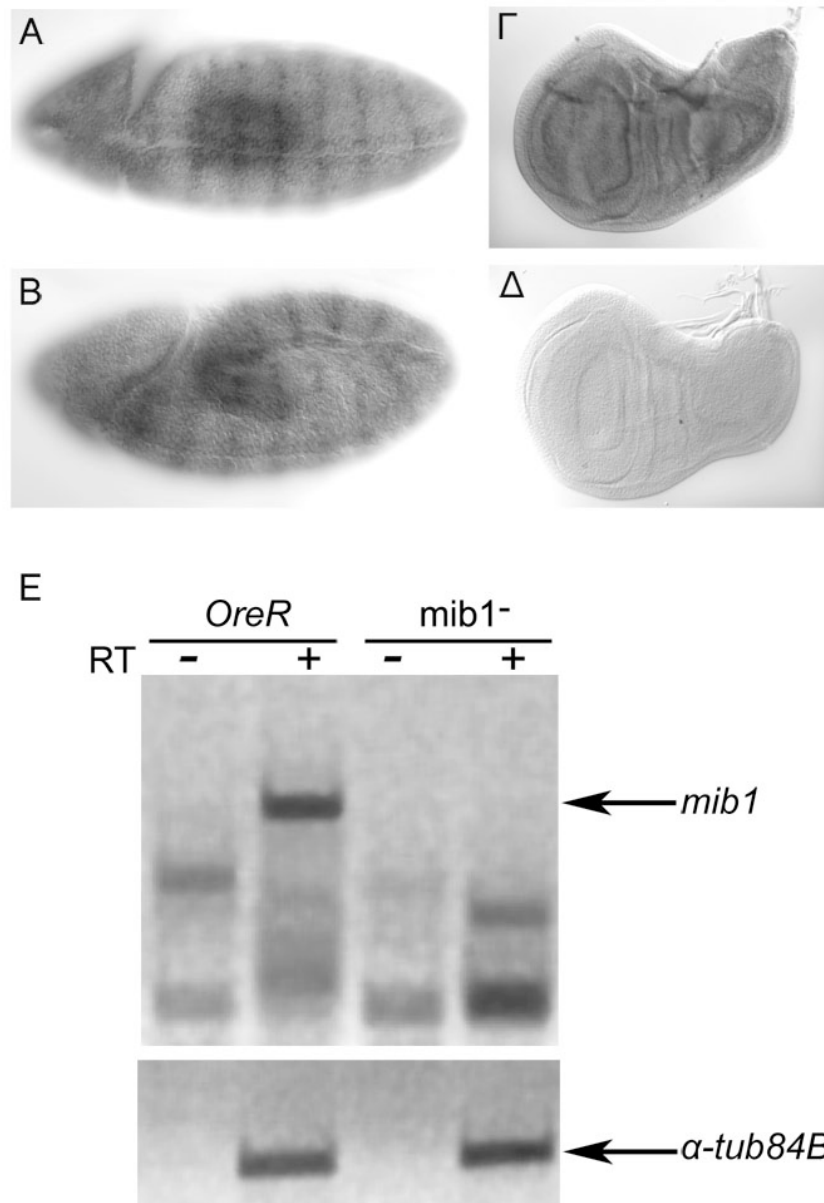
Στη συνέχεια, μελετήσαμε μιτωτικούς κλώνους *mib1^{EY9780}* και είδαμε ότι η πλευρική αναστολή κατά τον καθορισμό των ΠΑΟ των μακροχαιτών δεν επηρεάζεται, όταν απουσιάζει το *mib1*. Όταν όμως δημιουργήσαμε διπλούς κλώνους *mib1^{neur}* (επάγοντας μιτωτικούς κλώνους του *neur* σε γενετικό υπόβαθρο *mib1^{EY9780}*), ο φαινότυπος τους έγινε ισχυρά νευρογόνο, χειρότερος από τον *neur* φαινότυπο και προσομοιάζε των φαινότυπο της έλλειψης και των δύο δεσμευτών του N (Εικ. 3.17 και Πίνακας 3.1). Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι οι δύο E3 λιγάσες ουβικουϊτίνης έχουν συνεργατική δράση κατά τη διαδικασία της πλευρικής αναστολής.

Γνωρίζοντας ότι και οι δύο δεσμευτές του N παίζουν ρόλο στην πλευρική αναστολή και επηρεάζονται από το Neur, μελετήσαμε την επιμέρους επίδραση του Mib1 στους δύο διαφορετικούς δεσμευτές. Δημιουργήσαμε διπλούς κλώνους *mib1^{Dl}* και *mib1^{Ser}* και μελετήσαμε τον φαινότυπό τους στην πλευρική αναστολή. Παρατηρήσαμε ότι οι *mib1^{Ser}* έχουν αγρίου τύπου φαινότυπο, ενώ οι *mib1^{Dl}* έχουν νευρογόνο φαινότυπο, χειρότερο από τον *Dl*, αλλά καλύτερο από την πλήρη έλλειψη των δεσμευτών του N (Πίνακας 3.1). Φαίνεται λοιπόν, ότι το *Dl* μαζί με το Neur (*mib1^{Ser}*) είναι ικανά να κάνουν τέλεια πλευρική αναστολή, ενώ το *Ser* χρειάζεται τόσο το Neur (*mib1^{Dl}*) όσο και το Mib1 (*neur^{Dl}*) για πλήρη δράση.

D. r. Mib:	8	RUMMEGUGARVIRGPDWGWKQDGGEGHUGTURSFESEEUUUUWDNGTAANYRCSGAYD	67
D. m. Mib1:	102	R MEGUGARVIRGPDWGWK QDGGEGHUGTUR+FESEEUUUUWDNGTAANYRC+GAYD	161
D. r. Mib:	68	VRILDSAPTGIKHDGTMCDTCRQQPIIGIRWKAECTNYDLCTTCYHGDKHHLRHRFYRI	127
D. m. Mib1:	162	+RILDSAPTGIKHDGTMCDTCRQQPI GIRWKAEC NYDLC+ CYHGDKHHLRHRFYRI	221
D. r. Mib:	128	TTPGSEVLLSERRKSKKITARGIFAGGRUVRGVDWQWEDQDGGGRRGKUTEIQDWSAA	187
D. m. Mib1:	222	TTPGER +LE RRSKKE+ ARGIF GRUVRGVDWQWEDQDGG GRRGKUTEIQDWS+A	281
D. r. Mib:	188	SPHSAAYULWDNGAKQLYRUGFEGMSDLKCVQDAKGGTFYRDHCPULGEQNGWRMPGGLQ	247
D. m. Mib1:	282	SP SAAYU+WDNG+KMLYRUGFEGM+DLK V DAKG YRDH P+LGE + P G Q	341
D. r. Mib:	248	IGDLVNIDLBLEIVQSLQHGCGWTDGMFETLTTTGTVCGIDEDHDIVUQYPSGNRWTFM	307
D. m. Mib1:	342	IGDV +DLBLEIVQSLQHGCGWTDGMFE L+ G V GIDEDHDIVU YSGNRWTFM	401
D. r. Mib:	308	PAULTKANVRSGEVAAGAEQSSQFMVGDVUICYDIDRIKLLQRGHGEWAEMMLPTLG	367
D. m. Mib1:	402	PAULTK S A E F UGD+U+IC D++ IK+LQRGHGEWA+AM TLG	452
D. r. Mib:	368	KVGRUQQIYSDSCLKVEUCGTSWTYMPAAVTKVAPA-----GSAVTNASGERLSQLLKKL	422
D. m. Mib1:	453	K+GRUQQ+Y D+DLKVEU TSWTYMP AV KVA + A S ERLS +LKKL	512
D. r. Mib:	423	FETQESGDINEELUKAAAANGDLAKVEDIL-----KRPDUVUNGQCAGHTAM	468
D. m. Mib1:	513	FE SGD EE UKAAAANG A+ E+ L PDU+UNG AGHTA+	572
D. r. Mib:	469	QAASQNGHVDVLEKLLKHSVDLEAEDKDGDRAVHHA+FGDEGSVIEVLRHG+GADLNARNK	528
D. m. Mib1:	573	QAASQNGH+U+++LL+H+UD+E EDKDGDRAVHHA+FGDE +VIE+L + GADLNARNK	632
D. r. Mib:	529	RRQTPLHIAVWKGHLQVVKTLLDGCHPBLQDSEGDTPLHDAISKRDMDL SULLAGAD	588
D. m. Mib1:	633	RRQT LHI AVWKGHL VVKTL L GCHP BLQDSEGDTPLHDAISK+ D+ML S+LL+ GAD	692
D. r. Mib:	589	VTITMNNNGFNALRHAALRGNPSAMRULLSKLPRPWIUDEKDDGYTALHLAALNHRVEVA	648
D. m. Mib1:	693	+T+ MNNNGFNALRHAAL+GNPSAM+LL+K RPWIU+EKDDGYTALHLAALNHRVE+A	752
D. r. Mib:	649	ELLVHQGNANLDVQMNQQTALHLAVERQHTQIVRLLVRAEAKLDVQDKDGDTPLEALR	708
D. m. Mib1:	753	ELLVH G AN+D QMN QTALHLAVERQH QIU+LLU+ A L++ DKDGDTPLEALR	812
D. r. Mib:	709	HHTLSQLRQLQDMQDVSUVEPWEPKNTLIMGLGTQGAEKKAASIACTLAANGADLTIR	768
D. m. Mib1:	813	HHTLSQL+QLQD++ K L+MGL KK++ASIACTLAANGADLT++	861
D. r. Mib:	769	NKKGQSPDLDCPDP SLCKALAKCHKEK-----TSGQVGRSPSLNSMNE-	812
D. m. Mib1:	862	N+K Q+PLDLCDDP+LCK L KC+ E+ +S + + S SLN ++	921
D. r. Mib:	813	-----TLEECMVCSDMKRDITL	828
D. m. Mib1:	922	+L+EC+UCSD KRDT+	981
D. r. Mib:	829	FGPCGHIATCSLCSFVKKKCLCKEQVQSRKIEECVUCSDKKAAMVFPQCGHMCACENC	888
D. m. Mib1:	982	F PCGH++ C C+PRVKKCLIC+E V SR KI+EC+UCSD++AMV F+PCGHM ACE+C	1041
D. r. Mib:	889	ASLMKKCVQCRAMVERRTFVLCGGGKMGEDAT-----DDE-----	924
D. m. Mib1:	1042	++LMEKCV CR ++ F LCCGG G + DD	1101
D. r. Mib:	925	--DLTGGSNM-----AGGSQDLLQPMN-LALSWSGMI PALQRDKD----NTMUN-	968
D. m. Mib1:	1102	+ +G S +M AG S L MN LA + +S M+ L + +MUN	1161
D. r. Mib:	969	---ADVQKLQQQLQDIKEQTMCPVCLDRKNNIFMCGHGTCCQLCGDRMSEPCIRKAIER	1025
D. m. Mib1:	1162	DVQKL+QQLQDIKEQTMCPVUC DR+KNN+I+CGHGTCC+CGD++ CPICRK +E+	1221
D. r. Mib:	1026	RILLY 1030	
D. m. Mib1:	1222	RILL+ RILLF 1226	

Εικόνα 3.15: Το γονίδιο *mib1* της Δροσόφιας είναι ομόλογο του *mib* του zebrafish

Σύγκριση αλληλουχιών του γονιδίου *mib* του *D. rerio* και της *D. melanogaster* με το πρόγραμμα BLAST. Γκρι επαναλήψεις M-H (*mib*/Herc2); μοβ: δάκτυλος ZZ-zinc; πράσινο: επαναλήψεις Mib; κόκκινο: επαναλήψεις ακκυρίνης; μπλε: δάκτυλοι RING, από τους οποίους οι δύο πρώτοι είναι άτυποι.

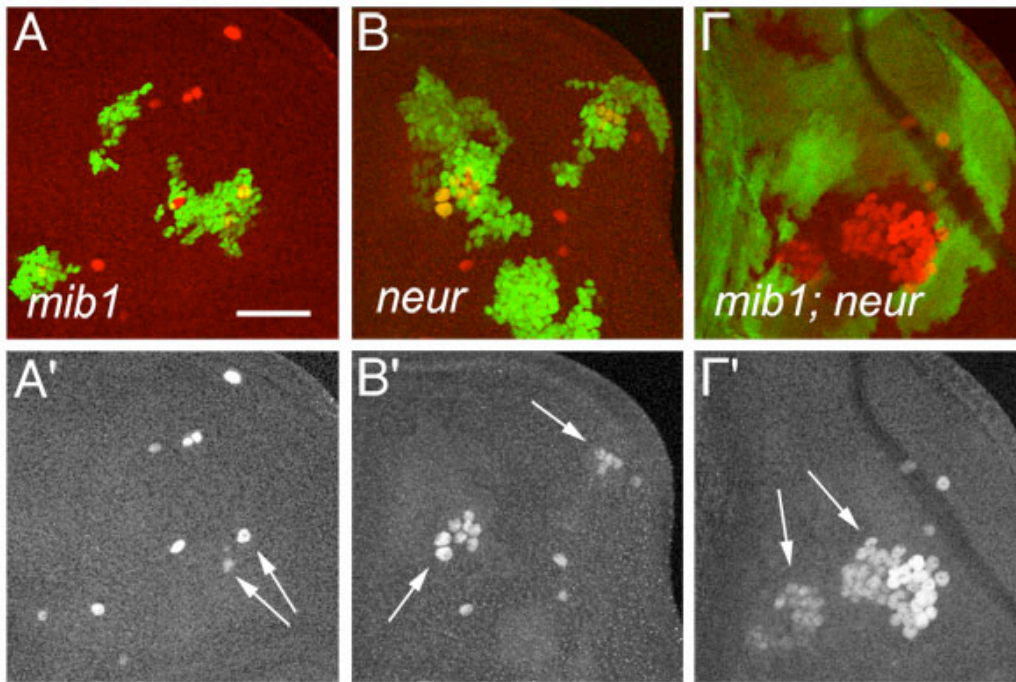


Εικόνα 3.16: Έκφραση του *mib1* στη Δροσόφιλα

A, B) Υβριδοποίηση *in situ* σε αγρίου τύπου έμβρυα Δροσόφιλας με (antisense) ανιχνευτή που αντιστοιχεί στο δεύτερο εξώνιο της κωδικής αλληλουχίας του *mib1*.

Γ, Δ) Υβριδοποίηση *in situ* σε αγρίου τύπου αναπτυξιακούς δίσκους φτερού προνύμφης τρίτου σταδίου με antisense και sense ανιχνευτή για το *mib1*, αντίστοιχα.

Ε) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με μήτρα cDNA προερχόμενο από Oregon R (αγρίου τύπου) και ομόζυγες *mib1*^{EY9780} προνύμφες τρίτου σταδίου (σύμπλοκα ΚΝΣ/ αναπτυξιακών δίσκων). Διαφορετικά ζευγάρια εκκινητών χρησιμοποιούνται με το ίδιο cDNA για την ανίχνευση του *mib1* και της α -τουμπουλίνης. RT-: αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής χωρίς ένζυμο (χωρίς cDNA), RT+: αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής με ένζυμο (με cDNA).



Εικόνα 3.17: Ο ρόλος του *neur* και του *mib1* στην πλευρική αναστολή

Μιτωτικοί κλώνοι σε προνυμφικά ημιθωράκια τρίτου σταδίου μαρκάρονται από την παρουσία (A, B) ή την απουσία (Γ) της GFP. Όλοι οι δίσκοι έχουν υποστεί χρώση για την πρωτεΐνη Sens (κόκκινο), η οποία μαρκάρει τα κύτταρα ΠΑΟ. Όλα τα ημιθωράκια είναι τοποθετημένα με την εμπρόσθια πλευρά προς τα αριστερά και την εγγύς πάνω. Η γραμμή μεγέθους είναι 40μm.

Τα Α'-Γ' αντιστοιχούν στο κόκκινο κανάλι των Α-Γ αντίστοιχα και τα βέλη σημειώνουν τους μεταλλαγμένους προνευρικούς συναθροισμούς.

Γονότυποι μιτωτικών κλώνων: Α) *mib1⁻*, Β) *neur⁻*, Γ) *mib1⁻neur⁻*.

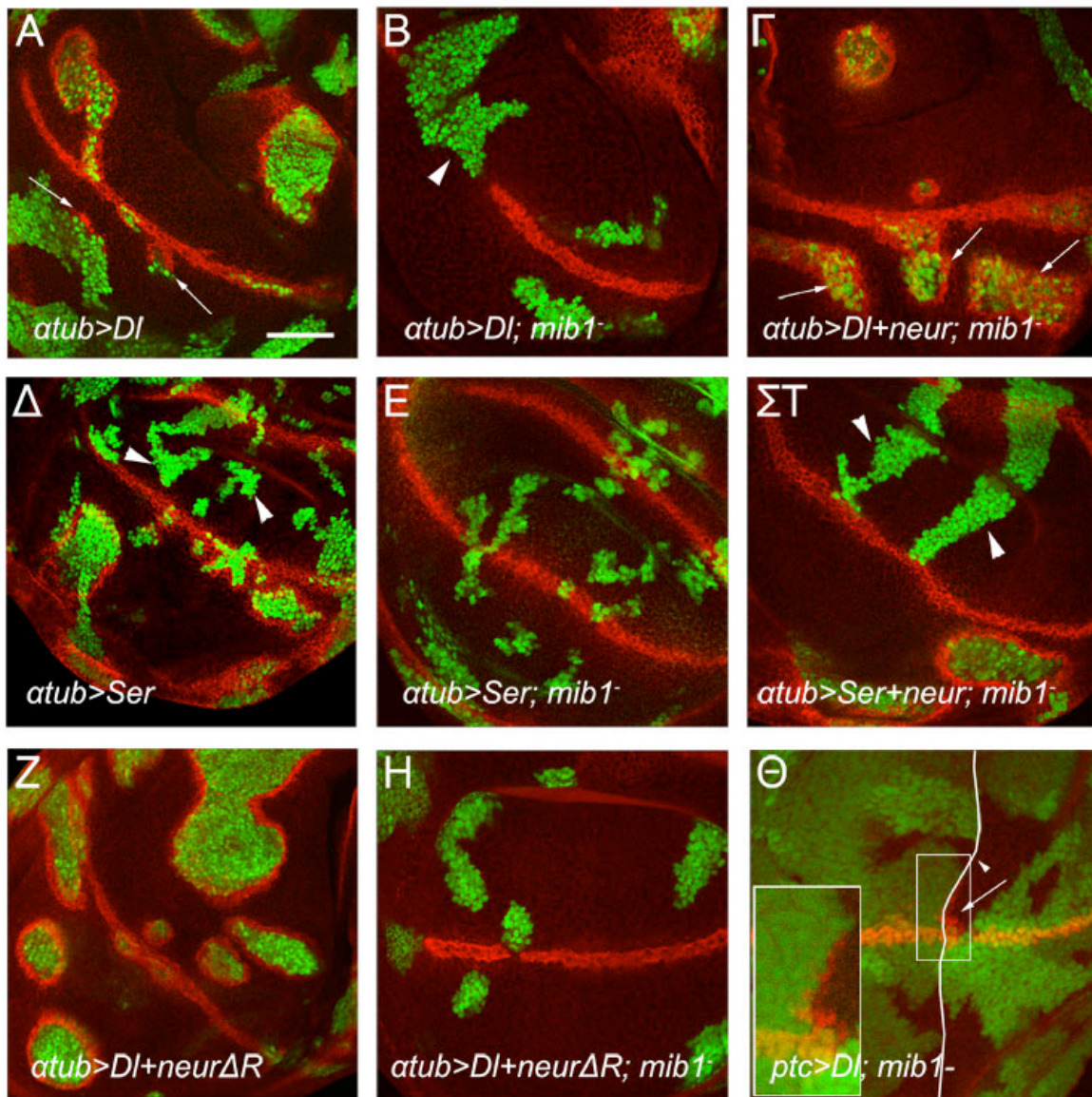
Οι δύο λιγάσες ουβικουΐτινης Mib και Neur μπορούν να δράσουν η μία αντί της άλλης στην επαγωγή του περιθωρίου του φτερού

Το γονίδιο *mib1* εκφράζεται ομοιόμορφα στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού της προνύμφης, ενώ το *neur* εκφράζεται μόνο στα κύτταρα ΠΑΟ, αλλά φαίνεται ότι και τα δύο συνεισφέρουν για να επιτευχθεί η πλευρική αναστολή στον προνευρικό συναθροισμό. Μπορούν όμως να δράσουν και σε άλλες διαδικασίες υποκαθιστώντας το ένα το άλλο; Μία τέτοια διαδικασία που μελετήσαμε είναι η επαγωγή του περιθωρίου φτερού. Τόσο το *Dl* όσο και το *Ser* μπορούν να ενεργοποιήσουν το σηματοδοτικό μονοπάτι N, όταν εκφραστούν εκτοπικά στον δίσκο του φτερού (Εικ. 3.18Α, Δ). Συγκεκριμένα, εκτοπική έκφραση του *Dl* οδηγεί σε ενεργοποίηση του μονοπατιού (επαγωγή γονιδίων *wg*, *wg* και *cut*) κυρίως στην ραχιαία πλευρά του δίσκου του φτερού, ενώ η εκτοπική έκφραση του *Ser* ενεργοποιεί το μονοπάτι αποκλειστικά στην κοιλιακή πλευρά του δίσκου (Doherty et al., 1996; Micchelli et al., 1997). Τι συμβαίνει όμως αν δεν υπάρχει *mib1*; Ενώ η έλλειψη του *neur* δεν έχει καμία επίδραση στην ενεργοποίηση του μονοπατιού N στο περιθώριο του φτερού (γιατί δεν εκφράζεται σε αυτή τη θέση), η έλλειψη του *mib1* οδηγεί σε απώλεια της έκφρασης γονιδίων-στόχων του N, όπως το *wg* (σε μιτωτικούς κλώνους ή όπως είναι φανερό από τον φαινότυπο των ομόζυγων *mib1^{EY9780}* ατόμων που δεν έχουν φτερά). Παρατηρήσαμε ότι σε κλώνους κυττάρων από όπου απουσιάζει το *mib1*, εκτοπικά εκφρασμένο *Dl* ή *Ser* δεν μπορεί να σηματοδοτήσει και να ενεργοποιήσει γονίδια μάρτυρες (Εικ. 3.18Β, Ε). Αντιθέτως, η δράση του *mib1* φαίνεται να μην απαιτείται για την λήψη του σήματος, καθώς κλώνοι *mib1* μπορούν να δέχονται σήμα N και να εκφράζουν *wg*, όταν βρίσκονται δίπλα σε μία περιοχή που υπερεκφράζει *Dl* (εικ. 3.18Θ).

Αν στους *mib1* κλώνους εκφράσουμε μαζί με τον δεσμευτή του N (*Dl* ή *Ser*) και το *Neur*, επανέρχεται η σηματοδοτική δραστηριότητά τους (Εικ. 3.18Γ, ΣΤ). Φαίνεται λοιπόν ότι η ουβικουΐτινυλίωση και η ενδοκυττάρωση (από *Mib1* ή *Neur*) είναι σημαντικές για την σηματοδοτική ενεργοποίηση. Το γεγονός ότι το *Neur* μπορεί να υποκαταστήσει τη δράση του *Mib1* σε αυτή τη διαδικασία, ενισχύει το γεγονός ότι οι δύο Ε3 λιγάσες ουβικουΐτινης έχουν παρόμοια δράση και επηρεάζουν και τους δύο δεσμευτές του N, *Dl* και *Ser*.

Ο μηχανισμός με τον οποίο οι Ε3 λιγάσες ουβικουΐτινης *Neur* και *Mib1* ενισχύουν τη σηματοδοτική ικανότητα των δεσμευτών του N, δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί. Μία πιθανή υπόθεση είναι ότι η σηματοδότηση γίνεται μετά από την ουβικουΐτινυλίωση των ενδοκυττάρων τμημάτων των δεσμευτών, η οποία τους οδηγεί σε ενδοκύτωση. Αυτή η υπόθεση ενισχύεται και από την ανάγκη για *Epsin*, μία πρωτεΐνη μεσολαβητή για ουβικουΐτινυλιωμένες πρωτεΐνες, ειδική για την αποστολή του σήματος από τους δεσμευτές

του N και όχι για τη λήψη του σήματος (Overstreet et al., 2004; Wang and Struhl, 2004). Είχαμε παρατηρήσει πρωτίτερα, ότι το ελλειμματικό μόριο NeurΔRING, από το οποίο απουσιάζει ο δάκτυλος RING (και άρα χάνει την δραστικότητα λιγάσης ουβικουΐνης), είναι ικανό να ενισχύσει τη σηματοδότηση από το εκτοπικά εκφρασμένο D1 (Pavlopoulos, et al 2001 και Εικ. 3.18Z). Το γεγονός αυτό έμοιαζε παράδοξο, καθώς η έλλειψη ουβικουΐτινυλίωσης και κατ' επέκταση ενδοκυττώσης, θα αναμένετο να εμποδίζει την αποστολή του σήματος. Όπως προαναφέρθηκε, το Mib1 εκφράζεται ομοιόμορφα στον δίσκο του φτερού, μήπως η δράση αυτής της λιγάσης βοηθάει το ελλειμματικό NeurΔRING να δράσει; Μελετώντας *mib1* κλώνους που εκφράζουν το NeurΔRING, παρατηρούμε ότι και σε αυτήν την περίπτωση εμποδίζεται η σηματοδότηση από το D1 (Εικ. 3.18H). Συνεπώς, η ενεργοποίηση της σηματοδότησης από το NeurΔRING σε αγρίου τύπου γενετικό υπόβαθρο, επιτυγχάνεται μέσω της δράσης του Mib1. Φαίνεται ότι για να ενεργοποιηθεί η σηματοδότηση από το D1, απαιτείται ουβικουΐτινυλίωση, αλλά το γιατί το NeurΔRING συνεχίζει να έχει ενεργότητα σε αυτή την περίπτωση παραμένει ένα ανοιχτό ερώτημα.



Εικόνα 3.18: Η σηματοδότηση των *Dl* και *Ser* στο φτερό χρειάζεται ουβικουΐτινυλίωση

Σε όλες τις εικόνες το κοιλιακό διαμέρισμα είναι κάτω. Η γραμμή μεγέθους είναι 40μm εκτός από τα Δ και Ζ που είναι 60μm.

A-H: Με κόκκινο ανιχνεύεται η πρωτεΐνη Wg σε αναπτυξιακούς δίσκους φτερού προνύμφης τρίτου σταδίου. Οι μιτωτικοί κλώνοι μαρκάρονται από την παρουσία της GFP (πράσινο).

A, B) Κλώνοι υπερέκφρασης του *Dl* σε αγρίου τύπου και σε *mib1⁻* γενετικό υπόβαθρο: η δραστικότητα του *Dl* στην αποστολή του σήματος εξαφανίζεται απουσία *mib1*.

Δ, E) Κλώνοι υπερέκφρασης του *Ser* σε αγρίου τύπου και σε *mib1⁻* γενετικό υπόβαθρο: η δραστικότητα του *Ser* στην αποστολή του σήματος εξαφανίζεται απουσία *mib1*.

Γ, ΣΤ) Κλώνοι υπερέκφρασης των *Dl* (Γ) και *Ser* (ΣΤ) μαζί με *UAS-neur* σε γενετικό υπόβαθρο *mib1⁻*: η σηματοδοτική ικανότητα των δεσμευτών του N ανακτάται παρουσία *Neur* και ουβικουΐτινυλίωσης.

Z, H) Κλώνοι υπερέκφρασης του *Dl* μαζί με *UAS-neurΔRING* σε αγρίου τύπου (Z) και σε *mib1⁻* γενετικό υπόβαθρο (H): παρουσία *mib1* ενεργοποιείται εκτοπικά το N και επάγεται Wg, τόσο κοιλιακά όσο και ραχιαία, σε αντίθεση με την απουσία του *mib1*, οπότε η σηματοδότηση αναστέλλεται εντελώς.

I) Με κόκκινο φαίνεται χρώση για *Cut*. Οι *mib1⁻* κλώνοι μαρκάρονται από την έλλειψη της GFP. Σε αυτόν τον αναπτυξιακό δίσκο, εκφράζεται *UAS-Dl* κάτω από τον έλεγχο του *ptcGal4* (κατά μήκος του προσθιοπίσθιου ορίου- λευκή γραμμή). Στα κύτταρα που βρίσκονται πίσω από την περιοχή της υπερέκφρασης (δεξιά της λευκής γραμμής) εκτοπικό *Cut* εντοπίζεται μέσα στα κύτταρα του *mib1⁻* κλώνου (βέλος), γεγονός που αποδεικνύει ότι τα κύτταρα αυτά μπορούν να δεχτούν το σήμα του N. Ενώ *mib1⁻* κύτταρα που βρίσκονται στην εμπρόσθια πλευρά δεν εκφράζουν *Cut* (βελάκι) καθώς δεν μπορούν να αποστείλουν το σήμα.

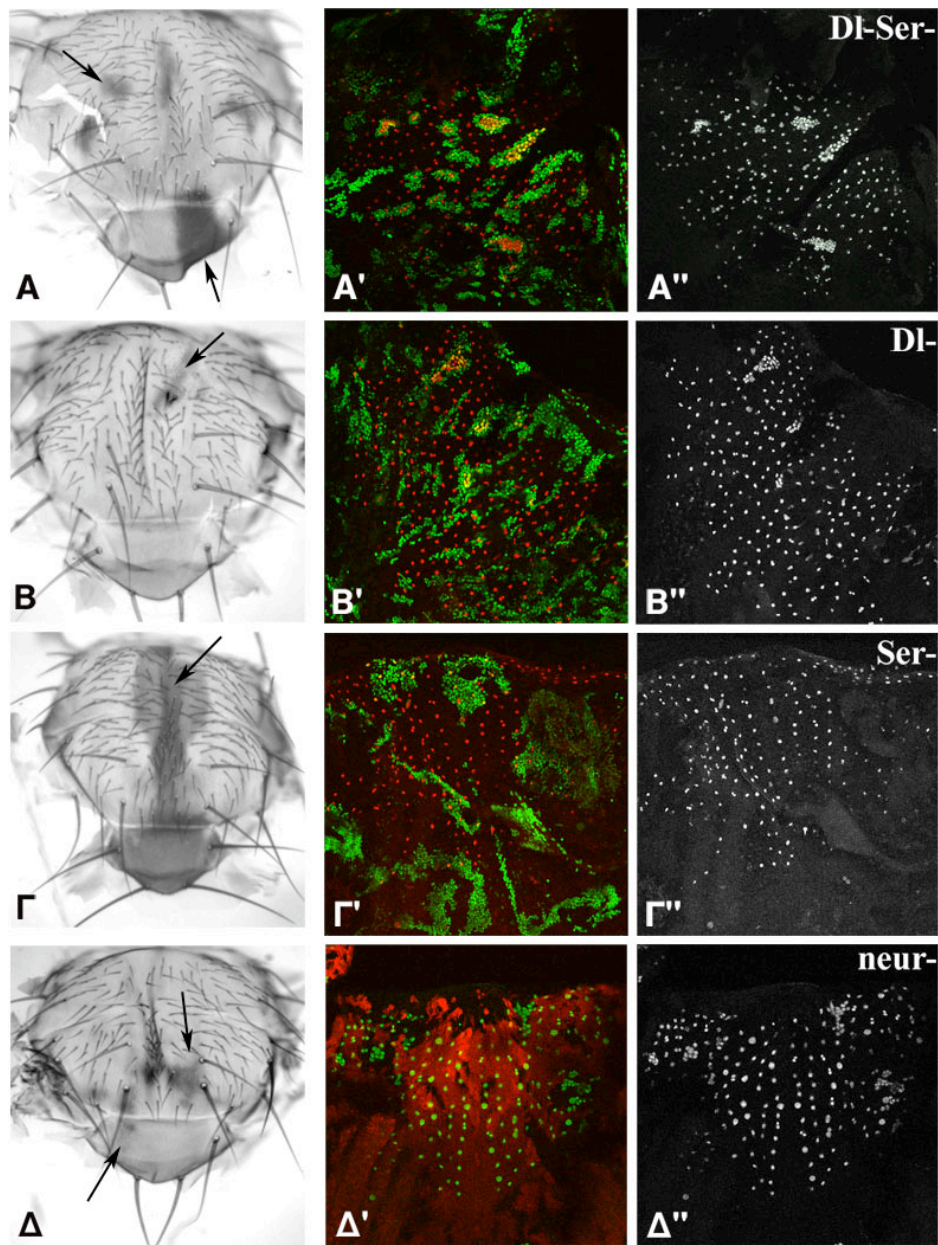
Οι δεσμευτές του N και οι λιγάσες ουβικουΐτινης τους παίζουν ρόλο στην πλευρική αναστολή των μικροχαιτών

Τα κύτταρα ΠΑΟ των μικροχαιτών του θώρακα της Δροσόφιλας καθορίζονται από μία διαδικασία πλευρικής αναστολής, όπου συμμετέχει το μονοπάτι σηματοδότησης N, κατά τη διάρκεια του σταδίου της νύμφης. Η εν λόγω διαδικασία διαφέρει από τον καθορισμό των μακροχαιτών γιατί οι προνευρικές πρωτεΐνες εκφράζονται σε λωρίδες στο νυμφικό θώρακα και από αυτές τις λωρίδες προκύπτουν τα κύτταρα που εκφράζουν *Dl* και στη συνέχεια τα κύτταρα ΠΑΟ, τα οποία εκφράζουν *Ase*, *Sens* και *Neur*. Μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας του N, των δεσμευτών του και του *neur* επηρεάζουν αυτή τη διαδικασία και δίνουν υπεραριθμία κυττάρων ΠΑΟ και απώλεια μικροχαιτών στα ενήλικα άτομα, ως αποτέλεσμα του νευρογόνου φαινότυπου και της λάθος σηματοδότησης κατά την διαίρεση του κυττάρου ΠΑΟ (Εικ.1.5, 1.6).

Για να δούμε με μοριακούς δείκτες (χρώση για *Sens*) τον φαινότυπο κατά τον καθορισμό των κυττάρων ΠΑΟ των μικροχαιτών, μελετήσαμε μιτωτικούς κλώνους σε θώρακες νυμφών 15 ωρών, οπότε τα κύτταρα αυτά καθορίζονται. Οι εν λόγω είτε ήταν μεταλλαγμένοι για τους δεσμευτές του N ή για το *neur*. Παρατηρήσαμε ότι οι κλώνοι από τους οποίους απουσιάζουν και οι δύο δεσμευτές του N (*Dl Ser*) εμφανίζουν πολύ ισχυρό νευρογόνο φαινότυπο (Εικ.3.19Α), ο οποίος καταλήγει σε γυμνή επιδερμίδα στο ενήλικο, καθώς τα κύτταρα μετατρέπονται σε νευρώνες (απώλεια σηματοδότησης N). Όπως συμβαίνει και στην περίπτωση των μακροχαιτών, η έλλειψη του *Ser* δεν έχει καμία επίδραση στην πλευρική αναστολή των μικροχαιτών: οι *Ser* κλώνοι διαφοροποιούν μικροχαιτές κανονικά (Εικ. 3.19Γ). Αντιθέτως, οι *Dl* κλώνοι παρουσιάζουν ισχυρό νευρογόνο φαινότυπο με πολλά κύτταρα ΠΑΟ. Τα κύτταρα αυτά δεν διαφοροποιούνται φυσιολογικά με αποτέλεσμα στα ενήλικα ο φαινότυπος να είναι γυμνή επιδερμίδα, όπου στο κέντρο της υπάρχουν μικροχαιτές (Εικ. 3.19Β). Η σύγκριση του φαινότυπου αυτού με αυτόν των *Dl Ser* οδήγησε στην αποκάλυψη της συμμετοχής του *Ser* στις μετέπειτα διαιρέσεις των κυττάρων ΠΑΟ (Zeng, et al, 1998). Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι η πρωτεΐνη *Dl* εκφράζεται κατά το νυμφικό στάδιο (15 ώρες APF) και μάλιστα εντοπίζεται σε κυστίδια στους προνευρικούς συναθροισμούς (δεν δείχνεται, Parks et al., 1997), ενώ δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση του *Ser* σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο.

Οι *neur* κλώνοι είναι επίσης ισχυρά νευρογόνοι στο θώρακα της νύμφης (Εικ. 3.19Δ), αλλά λιγότερο από τους *Dl Ser*. Μία πιθανή εξήγηση για αυτό είναι η παρουσία του *mibI*. Έλλειψη του τελευταίου δεν έχει φαινότυπο στην πλευρική αναστολή των μακροχαιτών, παρά μόνο όταν ταυτόχρονα απουσιάζει το *neur* (Εικ. 3.17Γ) και επιπλέον, ομόζυγα *mibI*

άτομα εμφανίζουν αυξημένη πυκνότητα μικροχαιτών σε ενήλικα. Ο ενήλικος φαινότυπος της απώλειας του *neur* είναι απώλεια μικροχαιτών, γιατί όλα τα εκτοπικά κύτταρα ΠΑΟ μετατρέπονται σε νευρώνες. Αυτό οφείλεται στην συνεισφορά του *neur* στις ασύμμετρες διαρρέσεις του ΠΑΟ (Le Borgne and Schweisguth, 2003).



Εικόνα 3.19: Πλευρική αναστολή στις μικροχαιτές

A-Δ: Μιτωτικοί κλώνοι απώλειας λειτουργίας των δεσμευτών του N και του *neur* σε θώρακες ενηλίκων ατόμων μαρκαρισμένοι από την υπερέκφραση ενός διαγονιδίου *UAS-y⁺* μέσα στον κλώνο, που δίνει σκουρότερο χρώμα εξωσκελετού. Με βέλη σημειώνονται χαρακτηριστικοί κλώνοι.

A'-Δ': Μιτωτικοί κλώνοι απώλειας λειτουργίας των δεσμευτών του N και του *neur* σε θώρακες νυμφών 15 ωρών (οπότε έχει γίνει ο καθορισμός των κυττάρων ΠΑΟ των μικροχαιτών). Οι κλώνοι μαρκάρονται από την παρουσία της GFP (A'-Γ') και από την απουσία της χρώσης για β-γαλακτοσιδάση (έλλειψη κόκκινου στο Δ'). Τα κύτταρα ΠΑΟ σημαίνονται με χρώση για την πρωτεΐνη Sens (κόκκινο στα A'-Γ' και πράσινο στο Δ').

A''-Δ'': Φαίνεται μόνο το κανάλι με τη χρώση του Sens.

Γονότυπος μιτωτικών κλώνων: A) *DI Ser⁻*, B) *DI*, Γ) *Ser⁻*, Δ) *neur⁻*.

Πίνακας 3.1: Προβλήματα πλευρικής αναστολής σε θώρακες προνυμφών τρίτου σταδίου

Γονότυπος ^β	ισχυρός ^α	μέτριος ^α	ασθενής ^α	α.τ. ^α	Σ
<i>N⁵⁴¹⁹</i>	44.5	26	26	3.5	27
<i>Dl^{rev10} Ser^{RX106}</i>	70.5	21.5	6	2	51
<i>Dl^{rev10}</i>	11	11	41	37	27
<i>Ser^{RX106}</i>	0	0	0	100	24
<i>Dl^{rev10} + UAS-fng^{22c}</i>	47	12.5	28	12.5	32
<i>Dl^{rev10} Ser^{RX106} + UAS-Dl^{B41}</i>	0	8.5	0	91.5	24
<i>Dl^{rev10} Ser^{RX106} + UAS-Ser^{IC}</i>	0	0	26	74	23
<i>Dl^{rev10} + UAS-Ser^{IC}</i>	0	0	0	100	14
<i>UAS-fng^{22c}</i>	0	0	0	100	11
<i>UAS-Dl^{B41}</i>	0	0	0	100	20
<i>UAS-Ser^{IC}</i>	0	0	0	100	42
<i>neur^I</i>	11	33.5	48	7.5	27
<i>neur^I Dl^{rev10}</i>	50	35	15	0	20
<i>neur^I Ser^{RX106}</i>	33.5	47	19.5	0	36
<i>mibI^{EY9780}</i>	0	0	0	100	18
<i>mibI^{EY9780} neur^I γ</i>	82.5	17.5	0	0	17
<i>mibI^{EY9780} Dl^{rev10} γ</i>	40	45	5	10	20
<i>kuz⁵⁴¹⁹</i>	24	21.5	38	16.5	42
<i>E(spl)gro^{b32.2}</i>	39	34	22	5	41

Μόνο κλώνοι σε προνύμφες τρίτου σταδίου μελετήθηκαν (θέσεις κυττάρων ΠΑΟ: aSC, pSC, aDC, pDC, aPA, tr1, aSA, aNP, rNP, δεξ Εικ. 1.9 για ορολογία). Σ: συνολικός αριθμός θέσεων κυττάρων ΠΑΟ που μελετήθηκαν. Δεν παρατηρήθηκε καμία διαφοροποίηση στις ποικίλες θέσεις στον αναπτυξιακό δίσκο και για το λόγο αυτό ομαδοποιήθηκαν τα αποτελέσματα για την στατιστική ανάλυση. Κάποιοι κλώνοι διέσχισαν προνευρικές περιοχές, αντί να τις περιλαμβάνουν πλήρως και για τον λόγο αυτό διαπιστώνονται σε κάποιες περιπτώσεις ασθενείς φαινότυποι σε γονότυπους που εμποδίζουν πλήρως την πλευρική αναστολή (πχ. *N⁵⁴¹⁹* and *Dl^{rev10} Ser^{RX106}*). Επιπλέον, οι *N⁵⁴¹⁹* κλώνοι παρουσίαζαν ένα αυξητικό μειονέκτημα κι έτσι κάποιοι μικροί κλώνοι (2-7 κυττάρων), ενώ αποτελούνταν μόνο από κύτταρα ΠΑΟ, μοιάζουν ασθενείς/ μέτριοι. Κανένας άλλος γονότυπος δεν παρουσίασε πρόβλημα κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Οι p-values που αναφέρονται στο κείμενο, αντιστοιχούν σε συγκρίσεις ανά ζεύγη με την μέθοδο του χ^2 .

(α) % ποσοστά θέσεων κυττάρων ΠΑΟ που τοποθετούνται στις ακόλουθες κατηγορίες

α.τ: 1 κύτταρο ΠΑΟ

ασθενής: >1, <4 κύτταρα ΠΑΟ

μέτριος: ≥4, <8 κύτταρα ΠΑΟ

ισχυρός: ≥8 κύτταρα ΠΑΟ

(β) Ο γονότυπος αντιστοιχεί σε ομόζυγους για τη μεταλλαγή μιτωτικούς κλώνους. Τα διαγονίδια *UAS* εκφράζονται μόνο μέσα στους μεταλλαγμένους κλώνους με τη χρήση του *atub-Gal4*.

(γ) Οι διπλοί συνδυασμοί με τη μεταλλαγή *mibI^{EY9780}* δημιουργήθηκαν ως μιτωτικοί κλώνοι της άλλης μεταλλαγής (*neur^I*, *Dl^{rev10}* ή *Ser^{RX106}*) σε ένα ομοίμορφο *mibI^{EY9780}* γενετικό υπόβαθρο.

Συμπερασματικά...

Από την εργασία που περιγράφηκε στις παραπάνω σελίδες διευκρινίστηκαν τα ακόλουθα

- Οι δύο δεσμευτές του N, DI και Ser, δρουν συνεργατικά κατά τη διαδικασία της πλευρικής αναστολής και η μεταγραφική ρύθμισή τους δεν είναι απαραίτητη.
- Η λιγάση ουβικουΐτινης Neur είναι απαραίτητη για την πλευρική αναστολή και επηρεάζει τη δράση και των δύο δεσμευτών του N.
- Το Neur βρίσκεται στο ίδιο φυσικό σύμπλοκο με το Ser και προκαλεί την ενδοκύττωσή του (όπως συμβαίνει και με το DI). Ο δάκτυλος RING του Neur είναι απαραίτητος για την ενδοκύττωση, αλλά όχι για την αλληλεπίδραση με τους δεσμευτές.
- Το Mib1 είναι μια E3 λιγάση ουβικουΐτινης που δρα συνεργατικά με το Neur κατά την πλευρική αναστολή και έχει πλεονάζουσα δράση με αυτό στην αποστολή του σήματος (τόσο στην πλευρική αναστολή, όσο και στην επαγωγή του περιθωρίου του φτερού).
- Η ουβικουΐτινυλίωση από Mib1 και Neur είναι απαραίτητη για την αποστολή του σήματος τόσο του DI όσο και του Ser.

Αποτελέσματα ΙΙΙ

«Ο ρόλος του δάκτυλου RING της E3 λιγάσης ουβικουϊτίνης Neuralized»

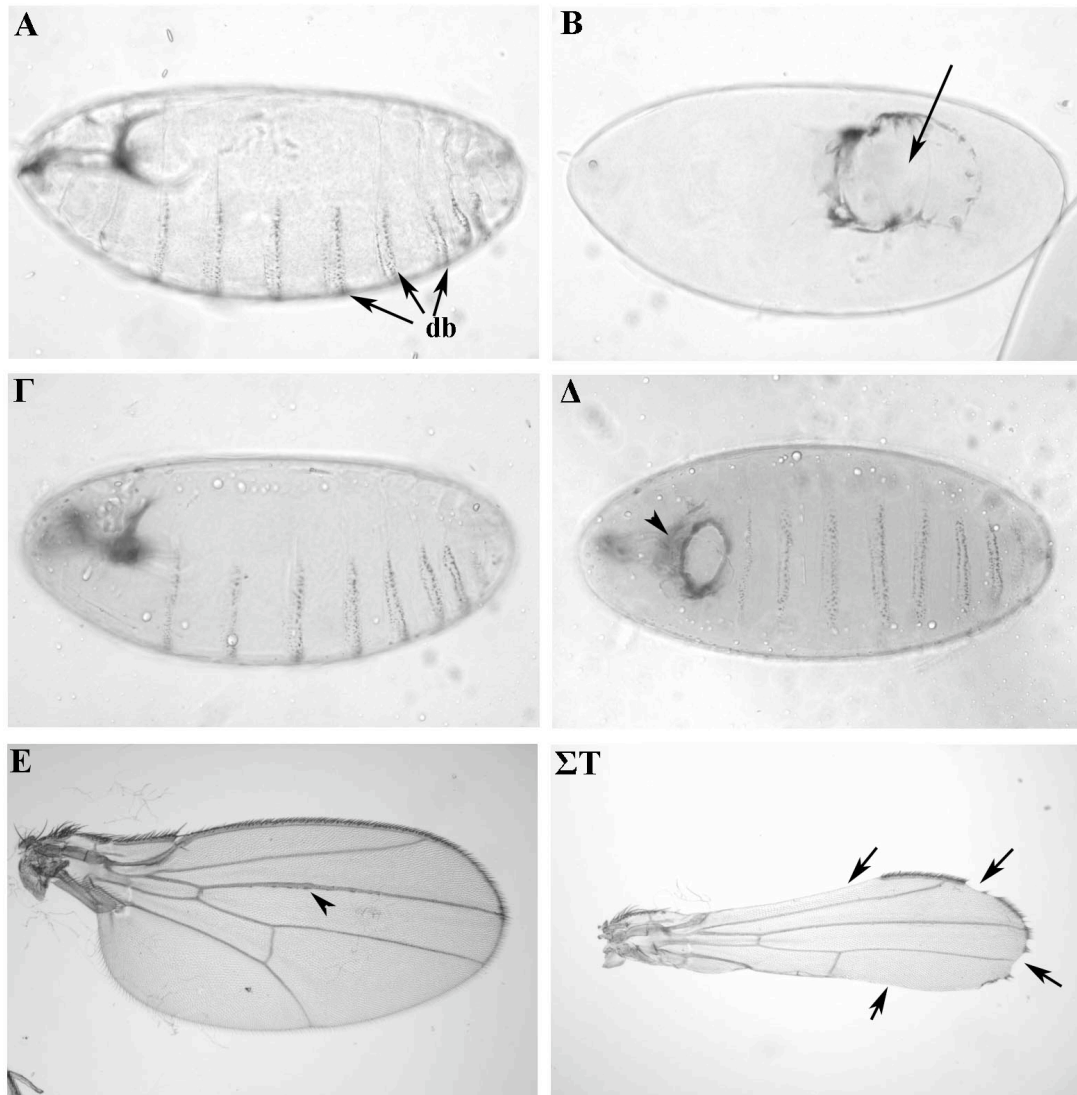
Ποιος είναι ο ρόλος του δακτύλου RING του *neur*;

Το γεγονός ότι το N ενεργοποιείται σε εκτοπική συνέκφραση των *NeurΔR* και *DI*, όπως εξάλλου συμβαίνει και με το πλήρους μήκους *Neur* μόριο, υποδεικνύει ότι το *NeurΔR* έχει θετικό ρόλο στη σηματοδότηση (Pavlopoulos et al., 2001, Εικ. 3.18Z). Η διαπίστωση αυτή έρχεται σε αντίθεση με δεδομένα άλλων εργαστηρίων, που υποστηρίζουν ότι το ελλειμματικό αυτό μόριο είναι επικρατές αρνητικό όσον αφορά στη σηματοδότηση (Lai et al., 2001; Yeh et al., 2001). Εφόσον βέβαια το *Neur* είναι μια E3 λιγάση ουβικουΐνης και η δραστηριότητά της στηρίζεται στην παρουσία του μοτίβου RING, η αρνητική δράση της εν λόγω πρωτεΐνης θα ήταν αναμενόμενη. Μήπως όμως το *NeurΔR* έχει κάποια επιπλέον δράση και μπορεί να μας αποκαλύψει κάποια λειτουργία της φυσιολογικής πρωτεΐνης;

Μελετήσαμε με λεπτομέρεια τη δράση του ελλειμματικού μορίου *NeurΔR* και παρατηρήσαμε ότι τα κύτταρα που το εκφράζουν (μαζί με *DI*) μπορούν να αποστείλουν το σήμα, αλλά δεν μπορούν να το λάβουν, όπως συμβαίνει με το αγρίου τύπου *Neur* (Εικ. 3.5Δ). Φαίνεται λοιπόν ότι το *Neur* επιτρέπει τη λήψη του σήματος (ίσως μειώνοντας το αρνητικό αποτέλεσμα της υπερέκφρασης του δεσμευτή (de Celis et al., 1996; Micchelli et al., 1997), λόγω ενδοκύττωσης/ αποικοδόμησης), ενώ το ελλειμματικό δεν μπορεί να κάνει το ίδιο.

Επιπλέον, αν το *NeurΔR* εκφραστεί κάτω από τον έλεγχο της *neur-Gal4* σειράς σε έμβρυα από τα οποία απουσιάζει το ενδογενές *neur* και παρουσιάζουν νευρογόνο φαινότυπο (έλλειψη επιδερμικών κυττάρων), προκαλεί τη διάσωση του φαινοτύπου και την ανάκτηση της επιδερμίδας, όπως ακριβώς συμβαίνει με το αγρίου τύπου *Neur* (Εικ. 3.20Α-Δ). Η δράση αυτή δεν μπορεί να δικαιολογηθεί αν το *NeurΔR* έχει αρνητική δράση.

Η αρνητική δράση του *NeurΔR* στη σηματοδότηση N φάνηκε από την εκτοπική έκφραση του διαγονιδίου με σειρές *Gal4* που ενεργοποιούνται στο φτερό και προκαλούν κοψίματα, όπως συμβαίνει σε απώλεια σηματοδότησης N. Ωστόσο, όταν το *NeurΔR* εκφραστεί με σειρά που ενεργοποιείται εκατέρωθεν του ραχαιοκοιλιακού ορίου (στα κύτταρα που αποστέλλουν το σήμα), σώζει τον φαινότυπο του περιθωρίου του φτερού. Το αντίθετο συμβαίνει, όταν η έκφρασή του περιορίζεται σε κύτταρα που λαμβάνουν το σήμα (στο ραχαιοκοιλιακό όριο καθεαυτό) (Εικ. 3.20Ε-ΣΤ). Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η αρνητική δράση του *NeurΔR* εκδηλώνεται μόνο όταν αυτό εκφράζεται σε κύτταρα που δέχονται το σήμα N και ίσως ο δάκτυλος RING να μην είναι απαραίτητος για την αποστολή του σήματος.



Εικόνα 3.20: Το *NeurΔRING* δεν επηρεάζει την αποστολή, αλλά εμποδίζει τη λήψη του σήματος N

Η υπερέκφραση του ελλειμματικού *NeurΔRING* “σώζει” μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας του *neur* σε έμβρυα Δροσόφιλας, όπως κάνει και το αγρίου τύπου διαγονίδιο.

Οι γονότυποι των εμβρύων είναι Α: *UAS-neur/+; neur¹/neurGal4*, το οποίο σώζεται πλήρως και ομοιάζει με αγρίου τύπου έμβρυο (τα επιδερμικές προέλευσης denticle belts φαίνονται στην κοιλιακή επιφάνεια της επιδερμίδας), Β: *neurGal4/neurGal4*, το οποίο παρουσιάζει νευρογόνο φαινότυπο και ένα μικρό μόνο τμήμα της επιδερμίδας του διαφοροποιείται (βέλος), ενώ το υπόλοιπο είναι νευρώνες, Γ και Δ: *UAS-neurΔRING/+; neur¹/neurGal4*, τα οποία παρουσιάζουν διάσωση του νευρογόνου φαινοτύπου (το Γ έχει διασωθεί πλήρως, ενώ το Δ έχει μία τρύπα (κεφαλή βέλους) στην περιοχή της κεφαλής).

Η υπερέκφραση του διαγονιδίου *UAS-neurΔRING* δεν έχει καμία επίδραση στην ανάπτυξη του περιθωρίου του φτερού, όταν γίνεται σε κύτταρα που αποστέλλουν το σήμα του N (πχ με τη σειρά οδηγό *C179Gal4*, που ενεργοποιείται εκατέρωθεν του ραχιαιοκοιλιακού ορίου). Ωστόσο, η υπερέκφραση του στα κύτταρα που λαμβάνουν το σήμα (πχ με την σειρά οδηγό *vgGal4*, που ενεργοποιείται πάνω στο ραχιαιοκοιλιακό όριο), δημιουργεί προβλήματα (“κοψίματα”- βέλη) στην ανάπτυξη του περιθωρίου.

Οι γονότυποι των φτερών είναι Ε: *C179Gal4; UAS-neurΔRING*, ΣΤ: *vgGal4; UAS-neurΔRING*

Η κεφαλή βέλους στο Ε δείχνει τα αισθητήρια όργανα της φλέβωσης L3 τα οποία παρουσιάζουν νευρογόνο φαινότυπο εξαιτίας της υπερέκφρασης του *UAS-neurΔRING*.

db: denticle belts

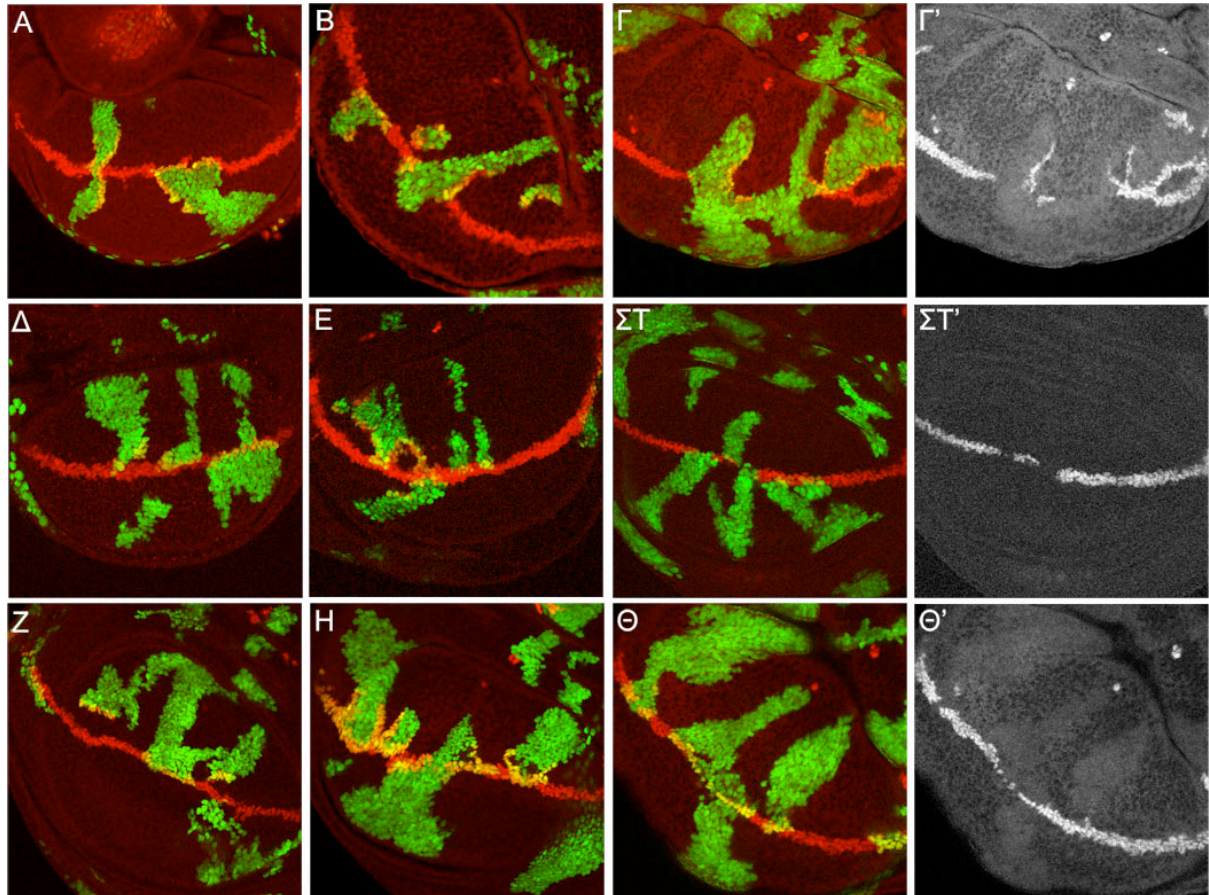
Το *neurΔRING* εμποδίζει τη λήψη του σήματος παρουσία ενός από τους δεσμευτές του N, αλλά όχι απουσία τους

Είναι γνωστό ότι η σηματοδότηση N ενεργοποιείται σε περιοχές όπου κύτταρα που εκφράζουν υψηλά ποσά των δεσμευτών έρχονται σε γειτνίαση με κύτταρα τα οποία τους εκφράζουν σε χαμηλότερα ποσά. Σε αυτή την περίπτωση η αποστολή του σήματος γίνεται από την περιοχή υψηλής έκφρασης δεσμευτή προς την περιοχή χαμηλής έκφρασης. Αυτό συμβαίνει γιατί στα κύτταρα που εκφράζουν υψηλά επίπεδα δεσμευτών παρεμποδίζεται η λήψη του σήματος εξαιτίας της *cis* αρνητικής δράσης τους (de Celis and Bray, 1997, Micchelli et al., 1997). Για τον λόγο αυτό, όταν επαχθούν μιτωτικοί κλώνοι απώλειας λειτουργίας του καθενός ή και των δύο δεσμευτών του N, συχνά υπάρχει εκτοπική ενεργοποίηση του μονοπατιού μέσα στον κλώνο, στο όριο με την αγρίου τύπου περιοχή. Στο φτερό αυτή η ενεργοποίηση ανιχνεύεται από την εκτοπική έκφραση των γονιδίων-στόχων *cut* και *wg* (Micchelli et al., 1997). Το γεγονός ότι τα κύτταρα μέσα στον κλώνο «ανάβουν» το *cut* υποδεικνύει ότι είναι ικανά να δεχτούν το σήμα N και να ενεργοποιήσουν τον υποδοχέα. Αν το ελλειμματικό μόριο *neurΔRING* εμποδίζει τη λήψη του σήματος N, είτε επηρεάζοντας κάποιον από τους δεσμευτές, είτε επηρεάζοντας τον ίδιο τον υποδοχέα, θα περιμέναμε να μην ενεργοποιείται το γονίδιο *cut* μέσα σε κλώνους μεταλλαγμένους για *Dl* ή/ και *Ser*.

Για να μελετήσουμε την δράση του *neurΔRING* στην λήψη του σήματος, κατασκευάσαμε και μελετήσαμε μιτωτικούς κλώνους με τη μέθοδο MARCM (Υλικά και Μέθοδοι), οι οποίοι φέρουν την επιθυμητή μεταλλαγή σε ομοζυγωτία και ταυτόχρονα μπορούν να εκφράζουν το διαγονίδιο που μας ενδιαφέρει (Εικ. 3.21).

Όπως ήταν γνωστό, μιτωτικοί κλώνοι *Dl⁻Ser⁻* παρουσιάζουν εκτοπική ενεργοποίηση του μονοπατιού στα όριά τους (Micchelli et al., 1997). Συγκεκριμένα, η απώλεια και των δύο δεσμευτών του N οδηγεί στην αυτόνομη ενεργοποίηση του μονοπατιού μέσα στους κλώνους και στο ραχιαίο και στο κοιλιακό διαμέρισμα του δίσκου του φτερού (Πίνακας 3.2 και Εικ. 3.21A). Τόσο η έλλειψη του *Ser* όσο και η έλλειψη του *Dl* οδηγεί σε ενεργοποίηση του *cut* κυρίως στο ραχιαίο διαμέρισμα και λιγότερο στο κοιλιακό. Όταν στους παραπάνω κλώνους υπερεκφραστεί το διαγονίδιο *UAS-neur*, η λήψη του σήματος και η ενεργοποίηση του *cut* γίνεται κανονικά μέσα στους κλώνους (ίσως και καλύτερα από το αναμενόμενο) και στους τρεις διαφορετικούς γονοτύπους (Εικ. 3.21B, E, H), αλλά όταν το ελλειμματικό *UAS-neurΔR* εκφραστεί μέσα σ' αυτούς, αποτρέπει εντελώς η λήψη του σήματος και η ενεργοποίηση του *cut* σε *Dl* και ελαττώνεται σημαντικά σε *Ser⁻* κλώνους (Εικ. 3.21ΣΤ, Θ). Αντίθετα, σε πλήρη έλλειψη των δεσμευτών, το *UAS-neurΔR* επιτρέπει την λήψη του σήματος (Εικ. 3.21Γ). Από το πείραμα αυτό συμπεραίνουμε ότι ο δάκτυλος RING του *neur* παίζει

σημαντικό ρόλο στην λήψη του σήματος εφόσον ένας από τους δύο δεσμευτές του N είναι παρόντας. Άρα, το *neur* φαίνεται να παίζει ρόλο και στην αποστολή και στη λήψη του σήματος N: η πρώτη δράση του είναι ανεξάρτητη από τον δάκτυλο RING, ενώ η δεύτερη είναι εξαρτώμενη από αυτό το μοτίβο.



Εικόνα 3.21: Το ελλειμματικό *UAS-neurΔRING* εμποδίζει την λήψη του σήματος παρουσία ενός από τους δύο δεσμευτές του N.

Αναπτυξιακοί δίσκοι φτερού προνύμφης τρίτου σταδίου, στους οποίους έχουν δημιουργηθεί μιτωτικοί κλώνοι με τη μέθοδο MARCM και σημαίνονται θετικά από την παρουσία πυρηνικής GFP. Με κόκκινο φαίνεται ανοσοϊστοχημική χρώση για τον μεταγραφικό παράγοντα Cut. Μιτωτικοί κλώνοι A) *DfSer^{-/-}*, B) *DfSer^{-/+} UAS-neur*, Γ) *DfSer^{-/+} UAS-neurΔR*, Δ) *DfI*, E) *DfI + UAS-neur*, ΣΤ) *DfI + UAS-neurΔR*, Z) *Ser^{-/-}*, H) *Ser^{-/+} UAS-neur*, Θ) *Ser^{-/+} UAS-neurΔR*. Στις εικόνες Γ', ΣΤ' και Θ' φαίνεται μόνο το κόκκινο κανάλι των Γ, ΣΤ, Θ αντίστοιχα. Παρατηρούμε ότι απουσία των δεσμευτών του N, το *NeurΔR* δεν εμποδίζει τη λήψη του σήματος και το Cut εκφράζεται στα όρια των κλώνων (Γ, Γ'), ενώ παρουσία είτε *DfI* (Θ, Θ') είτε *Ser* (ΣΤ, ΣΤ'), το *NeurΔR* εμποδίζει την έκφραση του Cut.

Πίνακας 3.2: Εκτοπική ενεργοποίηση του *cut* σε μεταλλαγμένους μιτωτικούς κλώνους για τους δεσμευτές του Notch. Η δράση του *neuralized*.

Εκτοπική ενεργοποίηση <i>cut</i>				
Γονότυπος ^α	ραχιαίοι ^β	κοιλιακοί ^β	διασχίζοντες ^β	ακαθόριστοι ^β
<i>Dl^{rev10} Ser^{RX106}</i>	95.5 (26)	65.2 (26)	100 (4)	50 (6)
<i>Dl^{rev10} Ser^{RX106}+ UAS-<i>neur</i>^{27.1}</i>	95.5 (26)	69.6 (24)	100 (6)	64.3 (14)
<i>Dl^{rev10} Ser^{RX106}+ UAS-<i>neur</i>Δ^{R^{8A}}</i>	100 (16)	50 (16)	100 (4)	50 (4)
<i>Dl^{rev10}</i>	30 (20)	8.3 (12)	20 (6)	0 (0)
<i>Dl^{rev10}+ UAS-<i>neur</i>^{27.1}</i>	63 (27)	32 (22)	40 (5)	0 (1)
<i>Dl^{rev10}+ UAS-<i>neur</i>Δ^{R^{8A}}</i>	0 (10)	0 (17)	0 (10)	0 (1)
<i>Ser^{RX106}</i>	61.1 (50)	4.3 (35)	71.4 (7)	0 (3)
<i>Ser^{RX106}+ UAS-<i>neur</i>^{27.1}</i>	100 (39)	80 (31)	100 (11)	0 (2)
<i>Ser^{RX106}+ UAS-<i>neur</i>Δ^{R^{8A}}</i>	23.8 (29)	25 (15)	9.1 (11)	0 (11)
<i>UAS-<i>neur</i>^{27.1}</i>	15.4 (24)	0 (18)	44.4 (9)	0 (0)
<i>UAS-<i>neur</i>Δ^{R^{8A}}</i>	10.8 (67)	17.1 (61)	0 (7)	0 (4)

(α) Ο γονότυπος αντιστοιχεί σε ομόζυγους για τη μεταλλαγή μιτωτικούς κλώνους. Τα διαγονίδια *UAS* εκφράζονται μόνο μέσα στους μεταλλαγμένους κλώνους με τη χρήση του *atub-Gal4*.

(β) % ποσοστά κλώνων στην περιοχή που θα δώσει το φτερό, οι οποίοι παρουσιάζουν εκτοπική ενεργοποίηση του γονιδίου *cut* εντός των ορίων τους (και κάποιες φορές και εκτός) στο ραχιαίο και στο κοιλιακό διαμέρισμα του δίσκου του φτερού σε προνύμφες τρίτου σταδίου. Οι διασχίζοντες κλώνοι είναι μεγάλοι κλώνοι που διαπερνούν το ραχαιοκοιλιακό όριο, ενώ οι ακαθόριστοι είναι αυτοί που δεν κατέστη δυνατή η ένταξή τους σε κάποια από τις παραπάνω κατηγορίες. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις αντιστοιχούν στον συνολικό αριθμό των κλώνων που μελετήθηκαν σε κάθε περίπτωση.

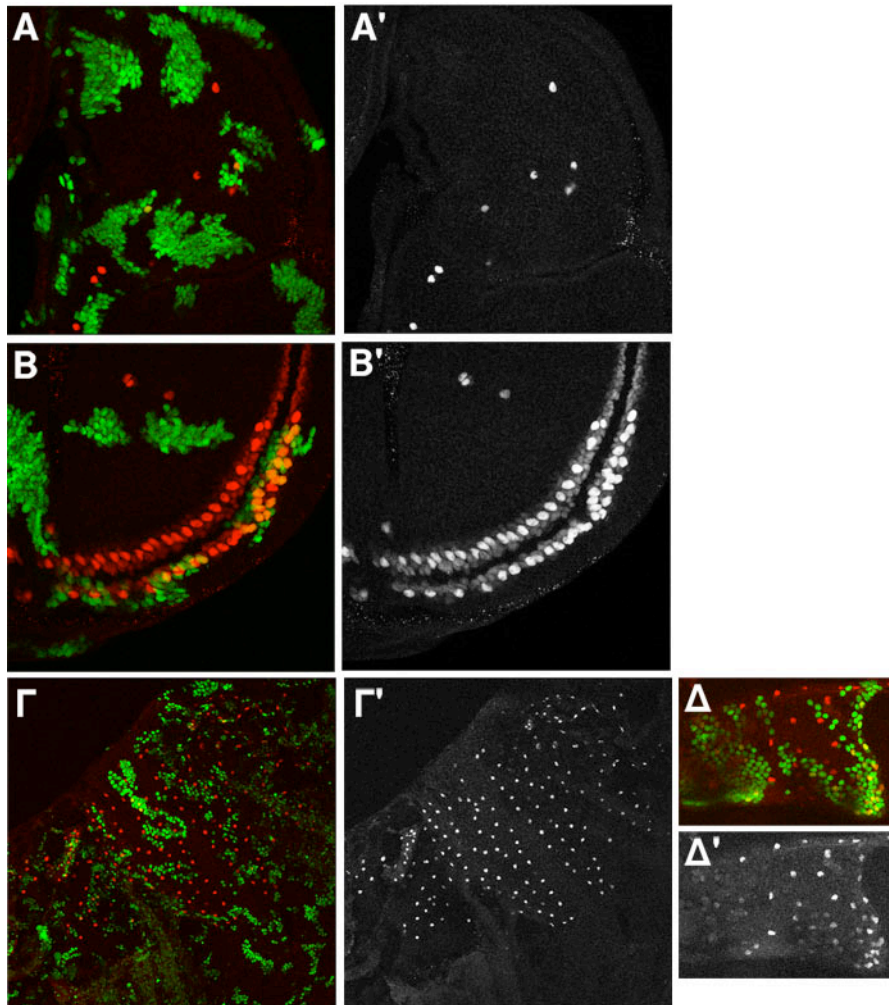
Από τα παραπάνω κατανοήσαμε καλύτερα τη δράση του *neur* σε σχέση με τους δεσμευτές του σε ένα πείραμα εκτοπικής επαγωγής περιθωρίου του φτερού. Τι συμβαίνει όμως στην περίπτωση της πλευρικής αναστολής, όπου το *neur* ενεργοποιείται στην φυσιολογική κατάσταση; Αν αφαιρέσουμε το *neur* από τα κύτταρα που φυσιολογικά το εκφράζουν, η πλευρική αναστολή κατά τον καθορισμό των μακροχαιτών του θώρακα (Εικ.3.7B, 3.11A, 3.22A) είναι αδύνατον να επιτευχθεί. Το ίδιο ισχύει και κατά τον καθορισμό των μακροχαιτών του περιθωρίου του φτερού κατά το τρίτο στάδιο της προνύμφης (Εικ. 3.17), αλλά και για τις μικροχαιτές του θώρακα που καθορίζονται στο στάδιο της νύμφης (Εικ. 3.18Δ).

Είναι ωστόσο το *neur* ο παράγοντας που δημιουργεί την ασυμμετρία στον προνευρικό συναθροισμό των ισοδύναμων κυττάρων και μετατρέπει ένα από αυτά σε κύτταρο ΠΑΟ; Για να απαντήσουμε στο παραπάνω ερώτημα δημιουργήσαμε μιτωτικούς κλώνους από όπου απουσιάζει το ενδογενές *neur*, αλλά ταυτόχρονα εκφράζουν ένα διαγονίδιο *UAS-*neur** ομοιόμορφα με *atubGal4* (MARCM) (Πίνακας 3.2). Παρατηρήσαμε ότι υπάρχει διάσωση του *neur* φαινοτύπου μόνο στην περίπτωση των ΠΑΟ των μακροχαιτών του θώρακα και όχι

στις άλλες περιπτώσεις (Εικ. 3.22). Αυτό που είναι ενδιαφέρον στην περίπτωση των μικροχαιτών (Εικ. 3.22Γ, Δ) είναι ότι ναι μεν οι κλώνοι δεν είναι απόλυτα αγρίου τύπου, αλλά δεν είναι και ισχυρά νευρογόνοι- μοιάζουν μάλιστα να επιτελούν μερικώς πλευρική αναστολή, καθώς δεν παρατηρούμε εκτοπικά κύτταρα ΠΑΟ να βρίσκονται σε επαφή μεταξύ τους (αντίθετα με τον φαινότυπο της έλλειψης του *neur*). Επιπλέον, η εκτοπική έκφραση του διαγονιδίου σε αγρίου τύπου γενετικό υπόβαθρο δεν προκαλεί καμία βλάβη στην πλευρική αναστολή (Εικ. 3.23Β). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι ίσως το *neur* να εκφράζεται σε περισσότερα από ένα κύτταρα στον προνευρικό συναθροισμό και να συμμετέχει τόσο στην αποστολή, όσο και στη λήψη του σήματος μέχρι ένα τελικά κύτταρο να «ξεχωρίσει» και να αποκτήσει τη νευρική τύχη. Και ίσως διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια να εμπλέκονται στον καθορισμό των κυττάρων ΠΑΟ σε διαφορετικές διαδικασίες πλευρικής αναστολής.

Όταν με τον ίδιο τρόπο εκφράσαμε σε κλώνους *neur* το ελλειμματικό μόριο *neurΔRING* δεν επιτεύχθηκε διάσωση του φαινοτύπου. Αντίθετα, σε όλες τις προαναφερθείσες διαδικασίες ο φαινότυπος ήταν νευρογόνος και ίσως χειρότερος από τον φαινότυπο έλλειψης του γονιδίου (Εικ. 3.23Ε). Επιπλέον, σε πείραμα ελέγχου, όπου το διαγονίδιο εκφράστηκε σε αγρίου τύπου γενετικό υπόβαθρο, ο φαινότυπος ήταν και πάλι νευρογόνος (Εικ. 3.23Γ, επικρατής αρνητική δράση στην πλευρική αναστολή).

Ως συμπληρωματικό πείραμα και για να δούμε αν η έκφραση του *neur* ή του ελλειμματικού μορίου *neurΔRING* είναι επαρκής για την πλευρική αναστολή χρησιμοποιήσαμε μια διάταξη, όπου δημιουργήσαμε κλώνους μερικής απώλειας λειτουργίας του *neur* (ασθενέστερο αλληλόμορφο, παγίδα ενισχυτή η οποία εκφράζεται ως *Gal4* στο σωστό πρότυπο έκφρασης του γονιδίου, δηλ, στα κύτταρα ΠΑΟ) και ταυτόχρονα υπερεκφράσαμε το αγρίου τύπου ή το ελλειμματικό μόριο μόνο στο σωστό πρότυπο έκφρασης του γονιδίου (Εικ.3.23ΣΤ-Η). Παρατηρήσαμε ότι τόσο το αγρίου τύπου (Εικ.3.23Ζ), όσο και το ελλειμματικό μόριο (Εικ.3.23Η) είναι ικανά να σώσουν τον νευρογόνο φαινότυπο (Εικ.3.23ΣΤ), όταν εκφράζονται στο κύτταρο που αποστέλλει το σήμα του Ν (κύτταρο ΠΑΟ). Συνεπώς, η λειτουργικότητα του δάκτυλου RING της πρωτεΐνης δεν είναι απαραίτητη για την αποστολή του σήματος. Είναι όμως για τη λήψη, όπως έγινε προφανές από το προηγούμενο πείραμα της δοκιμής διάσωσης με ομοιόμορφη υπερέκφραση. Μήπως το Neur εκφράζεται σε περισσότερα από ένα κύτταρα, αλλά σε χαμηλά ποσά, και για το λόγο αυτό δεν είναι δυνατή η ανίχνευσή του; Αυτή είναι μία ερώτηση που παραμένει ακόμη αναπάντητη, καθώς η μέθοδοι εντοπισμού της πρωτεΐνης Neur (αντίσωμα) δεν μας έχουν οδηγήσει σε ξεκάθαρα αποτελέσματα (ίσως γιατί η ποσότητα του Neur είναι πολύ μικρή ούτως ή άλλως στα κύτταρα.)



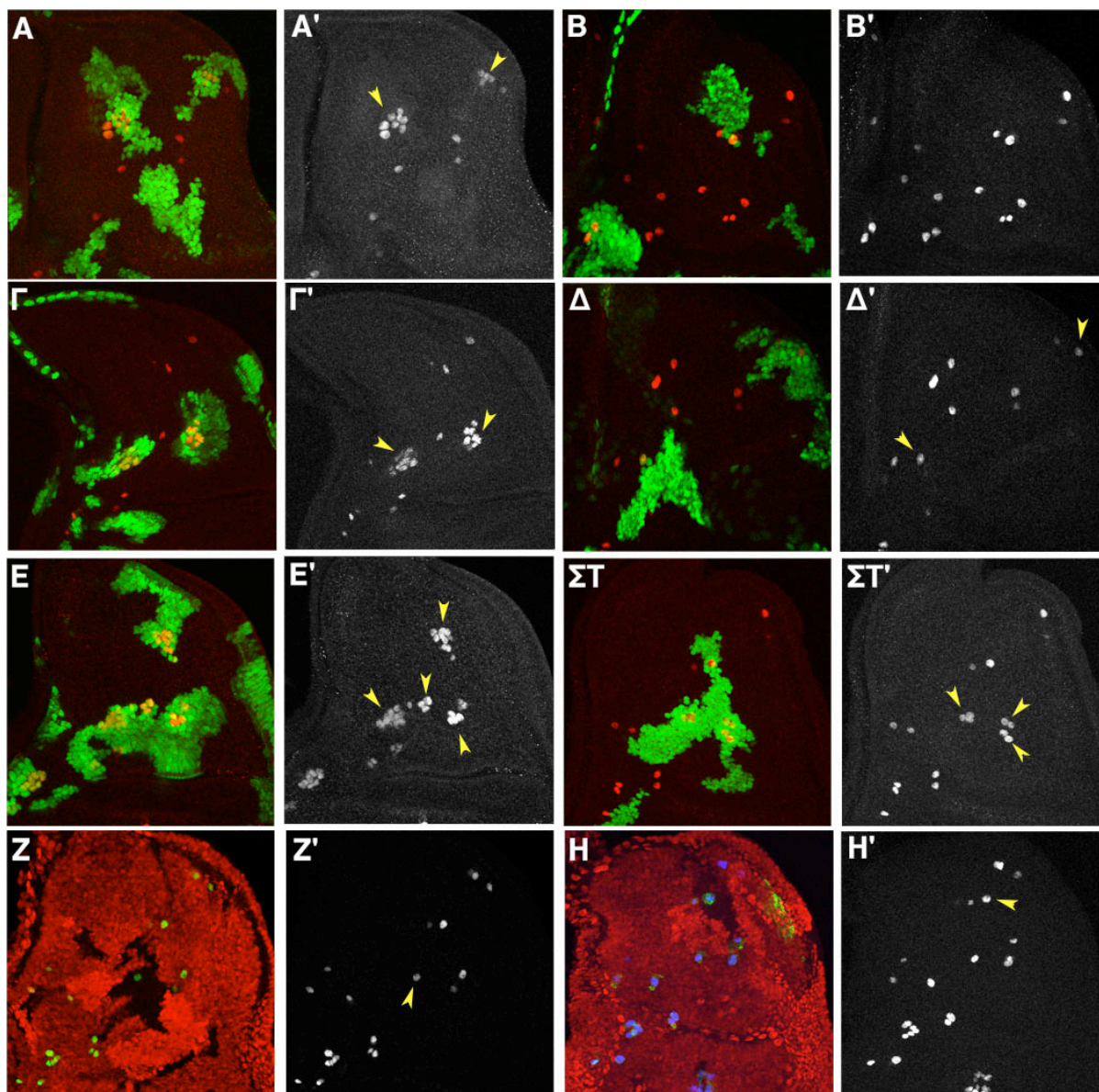
Εικόνα 3.22: Η ομοιόμορφη έκφραση του *neur* στον προνευρικό συναθροισμό δεν είναι αρκετή (κατά περίπτωση)

Μιτωτικοί κλώνοι, με τη μέθοδο MARCM, με γονότυπο *neur¹+ UAS-neur*, όπου το διαγονίδιο εκφράζεται ομοιόμορφα κάτω από τον έλεγχο του *α-tub-Gal4*. Τα μεταλλαγμένα κύτταρα μαρκάρονται από την παρουσία ομοιόμορφα εκφρασμένης GFP (πράσινο). Με κόκκινο φαίνεται ανοσοϊστοχημική χρώση για την πρωτεΐνη Sens, η οποία σημαίνει τα κύτταρα ΠΑΟ. Στα Α'-Δ' φαίνεται μόνο το κόκκινο κανάλι και με βέλη σημειώνονται κάποιοι κλώνοι.

Α) Ημιθώρακιο προνύμφης τρίτου σταδίου (εμπρόσθιο προς τα αριστερά και εγγύς πάνω), όπου καθορίζονται τα κύτταρα ΠΑΟ των μακροχαιτών του θώρακα.

Β) Αναπτυξιακός δίσκος φτερού προνύμφης τρίτου σταδίου- εμπρόσθιο περιθώριο του φτερού, όπου καθορίζονται δύο σειρές κυττάρων ΠΑΟ των μακροχαιτών του περιθωρίου.

Γ, Δ) Θώρακας νύμφης 15 ωρών, οπότε καθορίζονται τα κύτταρα ΠΑΟ των μικροχαιτών του θώρακα. Το Δ αντιστοιχεί σε μεγαλύτερη μεγέθυνση κλώνων όπως στο Γ.



Εικόνα 3.23: Διάσωση του *neur^r* φαινότυπου των μακροχαιτών

Ημιθωράκια προνυμφών τρίτου σταδίου, που φέρουν μιτωτικούς κλώνους και σημασμένα κύτταρα ΠΑΟ. Σε όλες τις φωτογραφίες το εμπρόσθιο τμήμα του ημιθωρακίου βρίσκεται στα αριστερά και το εγγύς πάνω.

A-ΣΤ: Οι μιτωτικοί κλώνοι μαρκάρονται από την παρουσία της GFP (πράσινο) και η χρώση για Sens (κόκκινο) μαρκάρει τα κύτταρα ΠΑΟ. Οι κλώνοι γίνονται με το σύστημα MARCM και τα διαγονίδια εκφράζονται ομοιόμορφα υπό τον έλεγχο του *a-tub-Gal4*.

Z, H: Οι μιτωτικοί κλώνοι είναι συμβατικοί και μαρκάρονται από την απουσία της χρώσης για *myc* (έλλειψη κόκκινου). Στην περίπτωση αυτή εκμεταλλευόμαστε το *neur-Gal4^{A101}*, έτσι ώστε να κατασκευάσουμε κλώνους απώλειας λειτουργίας του *neur* και ταυτόχρονα να εκφράζουμε τα διαγονίδια μόνο στα κύτταρα ΠΑΟ. Το Sens φαίνεται πράσινο στο Z και μπλε στο H (εδώ πράσινο είναι το *NeurΔR-GFP*).

A'-H': Μόνο το κανάλι του Sens, ώστε να φαίνονται τα κύτταρα ΠΑΟ. Με βέλη σημειώνονται οι μεταλλαγμένοι προνευρικοί συναθροισμοί.

Γονότυπος μιτωτικών κλώνων: A) *neur^r*, B) *UAS-neur*, Γ) *UAS-neurΔR-GFP*, Δ) *neur^r+ UAS-neur*, E) *neur^r+ UAS-neurΔR-GFP*, ΣΤ) *neur-Gal4^{A101}*, Ζ) *neur-Gal4^{A101}+ UAS-neur*, Η) *neur-Gal4^{A101}+ UAS-neurΔR-GFP*.

Εφόσον η αγρίου τύπου έκφραση του *neur* περιορίζεται σε κύτταρα ΠΑΟ και η τεχνητή έκφραση διαγονιδίων *neur* ή *neurΔR* στα κύτταρα ΠΑΟ μπορεί να “σώσει” τον νευρογόνο φαινότυπο της έλλειψης του γονιδίου, διερωτηθήκαμε αν το *neur* είναι ένας παράγοντας καθοριστής της νευρικής τύχης του ΠΑΟ. Αν είναι, αναμένεται η εκτοπική έκφρασή του να οδηγεί σε εκτοπικά κύτταρα ΠΑΟ. Για να απαντήσουμε στο παραπάνω ερώτημα, δημιουργήσαμε και μελετήσαμε μιτωτικούς κλώνους υπερέκφρασης των διαγονιδίων *neur* και *neurΔR* μεγέθους ενός κυττάρου στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού της Δροσόφιλας (Εικ. 3.24). Παρατηρήσαμε ότι τόσο σε αγρίου τύπου γενετικό υπόβαθρο (Εικ. 3.24A, B, Δ, E), όσο και σε *Hairy wing (Hw)/ hs-Dl* (Εικ. 3.24ΣΤ, Η) γενετικό υπόβαθρο (χαμηλή υπερέκφραση των προνευρικών γονιδίων του συμπλόκου ASc και ομοιόμορφη έκφραση του δεσμευτή *Dl* μετά από θερμικό σοκ), οι εν λόγω κλώνοι δεν οδηγούν σε εκτοπικά κύτταρα ΠΑΟ. Μόνο στις προνευρικές περιοχές του εμπρόσθιου περιθώριου του φτερού παρατηρούνται μερικά εκτοπικά κύτταρα ΠΑΟ.

Ποιος είναι όμως ο παράγοντας που προκαλεί την ασυμμετρία στον προνευρικό συναθροισμό και “καθορίζει” την αναπτυξιακή τύχη του κύτταρου ΠΑΟ; Από προηγούμενα πειράματα (Εικ. 3.11, Πίνακες 3.1 και 3.2) δείχθηκε ότι το *neur* είναι απαραίτητο για την πλευρική αναστολή: μήπως όμως η αναγκαιότητα για το εν λόγω σχετίζεται με την λειτουργική ενίσχυση των δεσμευτών και θα μπορούσε η υπερέκφρασή τους να αναιρεί την ανάγκη για *neur*; Μελέτη μιτωτικών κλώνων από τους οποίους απουσιάζει το *neur* και ταυτόχρονα υπερεκφράζουν δεσμευτές *DSL* έδειξε ότι οι δεσμευτές δεν είναι ικανοί να “σώσουν” τον *neur*⁻ νευρογόνο φαινότυπο (Πίνακας 3.2), γεγονός που ενισχύει την υπόθεση ότι το *neur* είναι απαραίτητο για την πλευρική αναστολή.

Επιπλέον, τόσο η έκφραση του *neur* (Huang et al., 1991, Boulianne et al., 1991, Price et al., 1993), όσο και του *Dl* (Schweisguth and Posakony, 1994) έχει δειχθεί ότι ρυθμίζονται μεταγραφικά στους προνευρικούς συναθροισμούς. Μήπως η μεταγραφική ρύθμιση είτε του *neur*, είτε του *Dl* είναι αρκετή για την πλευρική αναστολή των μακροχαιτών; Για να απαντήσουμε σε αυτό το ερώτημα, κατασκευάσαμε και μελετήσαμε διπλούς μιτωτικούς κλώνους *neur⁻Dl*, οι οποίοι εκφράζουν ομοιόμορφα διαγονίδια *UAS-Dl* και *UAS-neur* κάτω από τον έλεγχο του *α-tubGal4* (Πίνακας 3.3). Με την ομοιόμορφη υπερέκφραση και των δύο διαγονιδίων επιτυγχάνεται η πλήρης διάσωση του ισχυρά νευρογόνου *neur⁻Dl* φαινότυπου, γεγονός που αποδεικνύει ότι παρότι υπάρχει, η μεταγραφική ρύθμιση των *neur* και *Dl* δεν είναι καθοριστική για την πλευρική αναστολή.

Πίνακας 3.3: Η δράση του *neur* στην πλευρική αναστολή

Γονότυπος ^α	ισχυρός ^α	μέτριος ^α	ασθενής ^α	α.τ. ^α	Σ
<i>UAS-neur</i> ^{27.1 β}	0	0	7	93	14
<i>UAS-neurΔR</i> ^{08A β}	28	40	24	8	25
<i>neur</i> ^{1 β}	11	33.5	48	7.5	27
<i>neur</i> ¹ + <i>UAS-neur</i> ^{27.1 β}	0	0	9.7	90.3	31
<i>neur</i> ¹ + <i>UAS-neurΔR</i> ^{08A β}	26	35	26	13	54
<i>neurGal4</i> ^β	0	19	55	26	31
<i>neurGal4</i> + <i>UAS-neur</i> ^{27.1 γ}	0	0	0	100	21
<i>neurGal4</i> + <i>UAS-neurΔR</i> ^{08A γ}	0	0	15	85	30
<i>neur</i> ¹ <i>Dl</i> ^{rev10} + <i>UAS-neur</i> ^{1m2 β}	38	38	10	14	29
<i>neur</i> ¹ <i>Dl</i> ^{rev10} + <i>UAS-DIV5</i> ^β	29.5	29.5	23.5	17.5	17
<i>neur</i> ¹ <i>Dl</i> ^{rev10} + <i>UAS-neur</i> ^{1m2} , <i>UAS-DIV5</i> ^β	0	0	0	100	19
<i>neur</i> ¹ + <i>UAS-Dl</i> ^{b41 β}	0	26	35	39	23
<i>neur</i> ¹ + <i>UAS-Ser</i> ^{1C β}	34	43	11.5	11.5	44
<i>neur</i> ¹ + <i>UAS-fng</i> ^{22c β}	5	10.5	37	47.5	19

Μόνο κλώνοι σε προνύμφες τρίτου σταδίου μελετήθηκαν (θέσεις κυττάρων ΠΑΟ: aSC, pSC, aDC, pDC, aPA, tr1, aSA, aNP, pNP, δες Εικ. 1.9 για ορολογία). Σ: συνολικός αριθμός θέσεων κυττάρων ΠΑΟ που μελετήθηκαν.

(α) % ποσοστά θέσεων κυττάρων ΠΑΟ που τοποθετούνται στις ακόλουθες κατηγορίες

α.τ: 1 κύτταρο ΠΑΟ

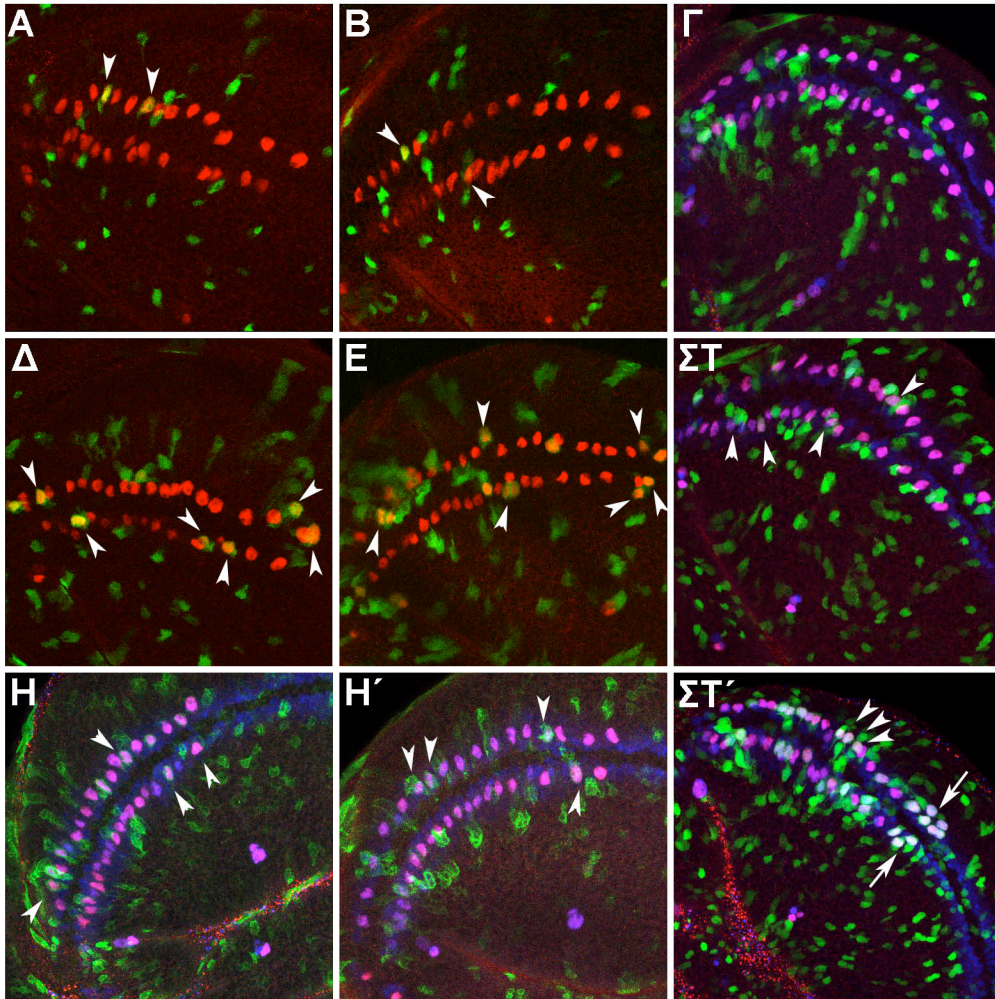
ασθενής: >1, <4 κύτταρα ΠΑΟ

μέτριος: ≥4, <8 κύτταρα ΠΑΟ

ισχυρός: ≥8 κύτταρα ΠΑΟ

(β) Ο γονότυπος αντιστοιχεί σε ομόζυγους για τη μεταλλαγή μιτωτικούς κλώνους. Τα διαγονίδια *UAS* εκφράζονται μόνο μέσα στους μεταλλαγμένους κλώνους με τη χρήση του *atub-Gal4*.

(γ) Ο γονότυπος αντιστοιχεί σε ομόζυγους για τη μεταλλαγή *neurGal4* κλώνους, οι οποίοι υπερεκφράζουν τα διαγονίδια κάτω από τον έλεγχο του ίδιου του *neurGal4*, δηλ μόνο σε μικρό αριθμό κυττάρων που αντιστοιχούν στα ΠΑΟ.



Εικόνα 3.24: Η έκφραση του *neur* δεν επαρκεί για τον καθορισμό των κυττάρων ΠΑΟ

Μιτωτικοί κλώνοι υπερέκφρασης μοναδιαίων κυττάρων, οι οποίοι υπερέκφραζουν μόνο GFP (Γ) και *neur* (Α, Β, ΣΤ, ΣΤ') ή *neurΔR* (Δ, Ε, Η, Η') κάτω από τον έλεγχο του *actGal4*, είτε σε αγρίου τύπου γενετικό υπόβαθρο (Α-Δ), είτε σε *Hairy wing* (Hw) γενετικό υπόβαθρο με ταυτόχρονη ενεργοποίηση ενός *hs-Dl* διαγονιδίου (Γ-ΣΤ). Οι τελευταίοι υπερέκφραζουν εκτοπικά τα προνευρικά γονίδια του συμπλόκου ASc και ταυτόχρονα εκφράζουν *Dl* ομοιόμορφα μετά από θερμικό σοκ. Με κεφαλή βέλους σημειώνονται εκτοπικά κύτταρα ΠΑΟ, τα οποία δημιουργούνται εξαιτίας της εκτοπικής υπερέκφρασης των διαγονιδίων *UAS-neur* και *UAS-neurΔR*. Όταν υπερέκφράζεται μόνο η GFP δεν παρατηρούνται εκτοπικά κύτταρα ΠΑΟ. Με βέλη σημειώνονται στο ΣΤ' ομάδες εκτοπικών κυττάρων ΠΑΟ.

Το γεγονός ότι εκτοπικά ΠΑΟ δεν δημιουργούνται σε κάθε θέση που υπερέκφραζονται τα *neur* διαγονίδια (ακόμα όταν ενεργοποιούνται οι προνευρικές και το *Dl*), υποδηλώνει ότι το εν λόγω δεν επαρκεί για τον καθορισμό τους.

Συμπερασματικά...

Τα συμπεράσματα που εξάγονται από την παραπάνω εργασία είναι τα ακόλουθα

- Το ελλειμματικό NeurΔRING, παρουσία Mind bomb, ποτέ δεν εμποδίζει την αποστολή του σήματος N, αλλά εμποδίζει τη λήψη του.
- Στο ραχαιοκοιλιακό όριο του φτερού, το NeurΔRING αποτρέπει τη λήψη του σήματος N με τρόπο που εξαρτάται από την παρουσία των δεσμευτών DSL.
- Η μεταγραφική ρύθμιση του *neur* δεν είναι απαραίτητη για να επιτευχθεί η πλευρική αναστολή κατά τον καθορισμό των μακροχαιτών του θώρακα, αλλά απαιτείται κατά τον καθορισμό των μακροχαιτών του περιθωρίου του φτερού και των μικροχαιτών του θώρακα.
- Παρά το γεγονός ότι υπάρχει, η μεταγραφική ρύθμιση των *neur* και *Dl* δεν είναι απαραίτητη για την πλευρική αναστολή.

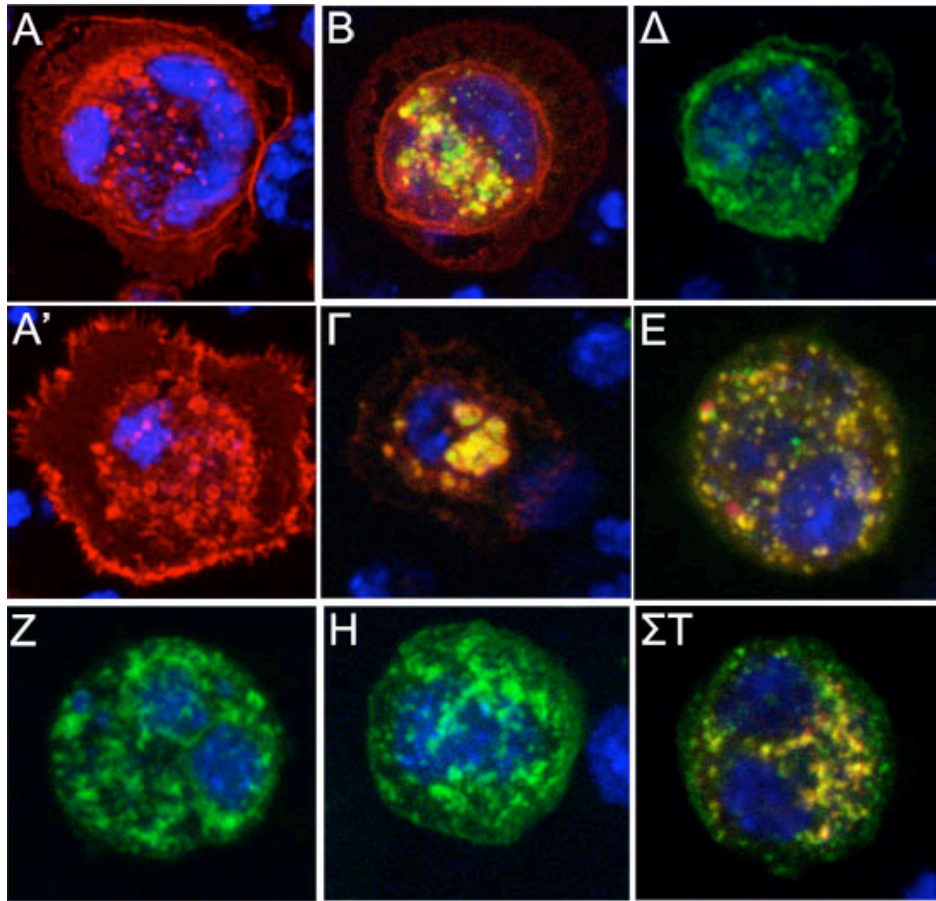
Αποτελέσματα IV

«Κυτταρική διακίνηση του Neuralized σε σχέση με τις πρωτεΐνες DSL και τον υποδοχέα Notch»

Κυτταρική διακίνηση των Neur και NeurΔRING

Η Neur είναι μία ενδοκυτταρική μεμβρανική πρωτεΐνη (όχι όμως διαμεμβρανική, καθώς μπορεί να απομακρυνθεί από τη μεμβράνη με χρήση υψηλού pH) (Pavlopoulos et al., 2001). Σε ποιο όμως μεμβρανικό κυτταρικό διαμέρισμα εντοπίζεται; Υπάρχει συνεντοπισμός με τους δεσμευτές D1 και Ser ή με τον ίδιο τον υποδοχέα N; Για να απαντήσουμε την παραπάνω ερώτηση μελετήσαμε χμαιοτικές πρωτεΐνες Neur με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, και παρασκευάσαμε αντισώματα που αναγνωρίζουν την Neur (βλέπε “Υλικά και Μέθοδοι”). Η μελέτη της υποκυτταρικής τοποθέτησης έγινε σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, που έχουν διαφορετικές ιδιότητες, όπως κύτταρα S2 σε καλλιέργεια, κύτταρα του εντέρου (τυφλά εντέρου: gastric caeca), νεφροκύτταρα (κύτταρα garland) και επιθηλιακά κύτταρα των αναπτυξιακών δίσκων.

Τα κύτταρα S2 αποτελούν την περισσότερο χρησιμοποιούμενη κυτταρική σειρά Δροσόφιλας. Προέρχονται από εμβρυϊκή αιμόλεμφο και μάλλον αντιστοιχούν σε αιμοκύτταρα. Σημαντικό είναι ότι δεν εκφράζουν ενδογενώς δεσμευτές του N, ούτε τον ίδιο τον υποδοχέα, οπότε μπορούμε να εκφράσουμε εμείς ό,τι επιθυμούμε με κατάλληλα πλασμίδια και παροδικές διαμολύνσεις. Με παροδικές διαμολύνσεις εκφράσαμε σε αυτά τα κύτταρα τους δεσμευτές του N και τα δύο διαφορετικά μόρια Neur (Εικ. 3.25). Δεν παρατηρήσαμε σημαντικές διαφορές στην κυτταρική διακίνηση των δεσμευτών στις διαφορετικές διαμολύνσεις (παρουσία ή απουσία Neur και NeurΔR), ενδεχομένως γιατί τα S2 εκφράζουν ενδογενώς *neur* (B. Μπαούσης, RT PCR) και *mib1* (από τα εν λόγω κλωνοποιήθηκε το cDNA του *mib1*). Πάντως, παρά το γεγονός ότι η υποκυτταρική τοποθέτηση των δεσμευτών δεν επηρεάζεται σημαντικά, φαίνεται έντονος συνεντοπισμός των δεσμευτών τόσο με το EGFP-Neur (Εικ. 3.25B, E), όσο και με το ελλειμματικό NeurΔR-GFP (Εικ. 3.25Γ, ΣΤ). Ένα επίσης σημαντικό αποτέλεσμα που προέκυψε από την παραπάνω μελέτη είναι ότι και οι δύο χμαιοτικές «πράσινες» πρωτεΐνες παρουσιάζουν έντονη κινητικότητα σε ζωντανά κύτταρα σε καλλιέργεια. Επιπρόσθετα, όταν καταστρέψουμε τον φθορισμό τους με έντονη ακτινοβολία λείζερ (FRAP, Fluorescence Recovery After Photobleaching), παρατηρούμε πολύ γρήγορη επαναφορά του φθορισμού (μέσα σε λίγα λεπτά). Το γεγονός αυτό αποδεικνύει (παρά το ότι δεν έχουμε χαρακτηρίσει ακόμη την φύση των κυστιδίων) ότι το Neur είναι μία πρωτεΐνη με δυναμική διακίνηση και οι πρωτεΐνες που στοχεύει ταξιδεύουν γρήγορα μέσα στο κύτταρο.



Εικόνα 3.25: Υποκυτταρική τοποθέτηση των D1, Ser και Neur σε κύτταρα S2

A, A', B, Γ: Χρώση για την πρωτεΐνη D1 (κόκκινο)

Δ, E, ΣΤ: Χρώση για την πρωτεΐνη Ser (κόκκινο)

B, E, Z: Με πράσινο φαίνεται το EGFP-neur

Γ, H, ΣΤ: Με πράσινο φαίνεται το NeurΔR-GFP

Σε όλες τις φωτογραφίες το μπλε μαρκάρει τους πυρήνες (topro3).

Οι χρώσεις έγιναν μετά από παροδικές διαμολύνσεις των κυττάρων με τα κατάλληλα πλασμίδια.

A, A') Έκφραση του D1,

B) Έκφραση των D1 και EGFP-neur,

Γ) Έκφραση των D1 και NeurΔR-GFP,

Δ) Έκφραση του Ser,

E) Έκφραση των Ser και EGFP-neur,

ΣΤ) Έκφραση των Ser και NeurΔR-GFP,

Z) Έκφραση του EGFP-neur,

H) Έκφραση του NeurΔR-GFP

Τα garland κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν γιατί προσομοιάζουν με νεφροκύτταρα και παρουσιάζουν έντονη διακίνηση κυστιδίων του ενδοκυττωτικού και ανακυκλωτικού συστήματος. Επίσης, εκφράζουν διάφορες πρωτεΐνες-μάρτυρες των μονοπατιών αυτών ενδογενώς (Kosaka and Ikeda, 1983). Στα εν λόγω κύτταρα παρατηρήσαμε έντονη διαφοροποίηση στην υποκυτταρική τοποθέτηση των δύο διαφορετικών χιμαιρικών μορίων (πλήρους μήκους και ελλειμματικού). Συγκεκριμένα, το EGFP-Neur εντοπίζεται σε μεγάλο αριθμό κυστιδίων ποικίλου σχήματος μέσα στο κύτταρο (Εικ. 3.26B, H), ενώ το ελλειμματικό NeurΔR-GFP περιορίζεται στην πλασματική μεμβράνη (Εικ. 3.26E, I) των κυττάρων (εντοπίζονται και κάποια ενδοκυτταρικά μόρια, τα οποία ίσως είναι μόρια αμέσως μετά τη σύνθεση). Επιπλέον, με live μικροσκοπία παρατηρήθηκε κινητικότητα των μορίων και σε αυτόν τον κυτταρικό τύπο, όπως και στην κυτταρική σειρά S2.

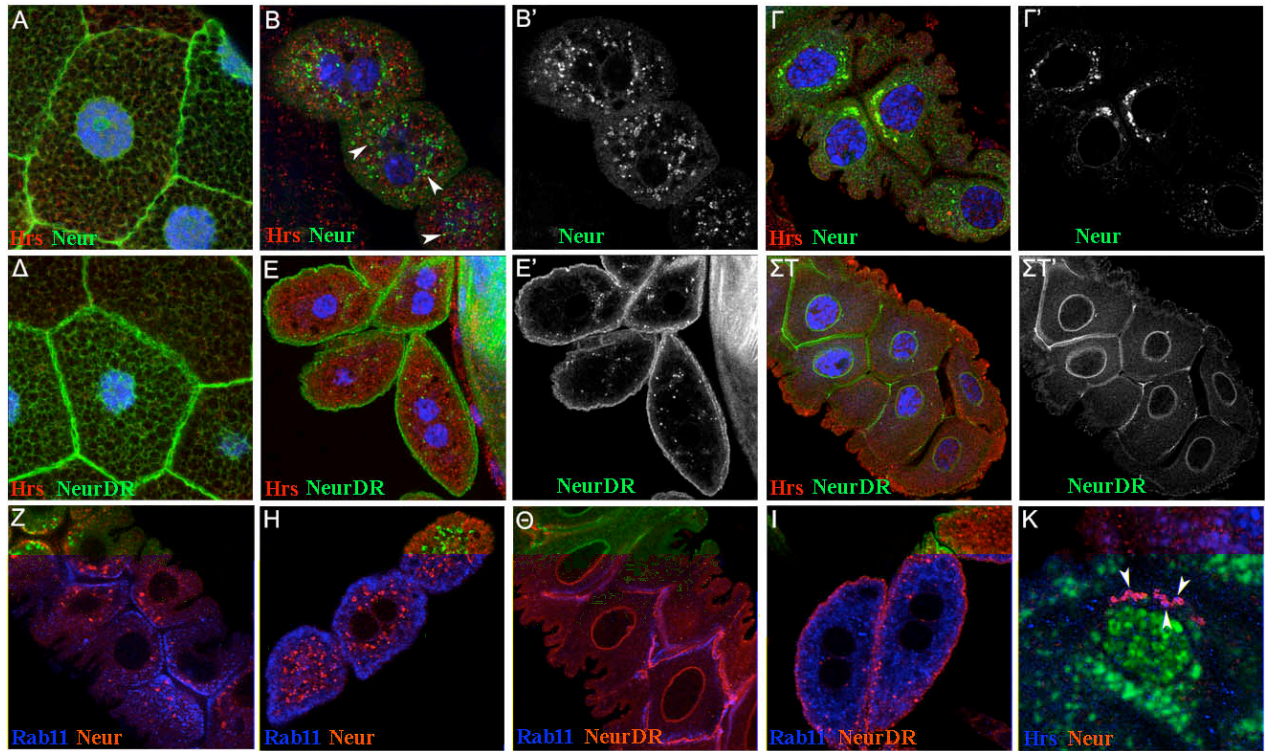
Τα κυστίδια του EGFP-Neur δεν φαίνεται να συνεντοπίζονται με διαφορετικούς μάρτυρες ενδοκυτταρικών διαμερισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν (α -Rab5 για το πρώιμο ενδόσωμα, α -Rab11 για το ανακυκλωτικό ενδόσωμα). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός, ότι τα κυστίδια που περιέχουν EGFP-Neur φαίνεται να συνεντοπίζονται ή να βρίσκονται γύρω από τα Hrs+ κυστίδια, σαν να τα «αγκαλιάζουν» (Εικ.3.26B, K). Το α -Hrs σημαίνει τα πολυκυστιδιακά σωμάτια (MVBs: Multi Vesicular Bodies), όπου γίνεται η διαλογή ουβικουϊτινυλιωμένων πρωτεϊνών μετά την ενδοκύτωση, ώστε κάποιες να στοχευθούν προς το λυσόσωμα για αποικοδόμηση και άλλες να επιστρέψουν στην πλασματική μεμβράνη μετά από ανακύκλωση (Lloyd et al., 2002). Ίσως το Neur να μεταφέρει τις πρωτεΐνες-στόχους του μετά την ουβικουϊτινυλίωση σε κάποιο όψιμο ενδοκυττωτικό διαμέρισμα που έχει Hrs. Ωστόσο, παραμένει το ερώτημα, αν υπάρχει DI, Ser ή N σε αυτά τα κυστίδια, καθώς τα κύτταρα garland δεν εκφράζουν ενδογενώς τα DI και Ser (το N δεν έχει ελεγχθεί).

Για να δούμε αν στα κύτταρα garland υπάρχει συνεντοπισμός του Neur με τους δεσμευτές DI, Ser και τον ίδιο τον υποδοχέα N συνεκφράσαμε στα κύτταρα αυτά ανά δύο τα γονίδια με *UAS* και τη χρήση της σειράς οδηγού *hs-Gal4* και μελετήσαμε την διακίνηση των πρωτεϊνών με ανοσοϊστοχημικές χρώσεις για τα DI, Ser και N και με τη χρήση της GFP για τα Neur και NeurΔR (Εικ. 3.27). Παρατηρήσαμε ότι η υποκυτταρική τοποθέτηση του N δεν αλλάζει παρουσία των δύο διαφορετικών ισομορφών του Neur και η χρώση τόσο για τον ενδοκυττάριο (Nic, δεν δείχνεται), όσο και για τον εξωκυττάριο (Nec, Εικ 3.27A-Γ) επίτοπο του N είναι έντονη πέριξ του πυρήνα των κυττάρων. Ο δεσμευτής DI επίσης δεν αλλάζει τοποθέτηση παρουσία Neur, αλλά παρατηρείται αρκετός συνεντοπισμός με το Neur σε ενδοκυτταρικά

κυστίδια και με το ελλειμματικό NeurΔR στην πλασματική μεμβράνη χωρίς όμως να εμποδίζεται η ενδοκυτταρική τοποθέτηση του δεσμευτή (Εικ. 3.27Z-Θ). Αντίθετα, εντυπωσιακή είναι η αλλαγή της υποκυτταρικής τοποθέτησης του Ser (Εικ. 3.27Δ-ΣΤ) παρουσία του ελλειμματικού NeurΔR: ενώ μόνο του το Ser ή παρουσία Neur εμφανίζεται κυρίως μεμβρανικό και στην δεύτερη περίπτωση να συμπίπτει αρκετά με το Neur, παρουσία NeurΔR μετατοπίζεται έντονα προς το εσωτερικό του κυττάρου και συνεντοπίζεται με το NeurΔR, το οποίο επίσης αποκτά έντονο κυτταροπλασματικό εντοπισμό (Εικ. 3.27ΣΤ). Δεν έχει ωστόσο ακόμη χαρακτηριστεί η ταυτότητα του εν λόγω κυτταρικού διαμερίσματος.

Πρέπει να σημειωθεί ότι τα κύτταρα *garland* εκφράζουν ενδογενώς το γονίδιο *neur* (παρά το γεγονός ότι η παγίδα ενισχυτή *neurGal4* δεν ενεργοποιείται στα κύτταρα αυτά), καθώς με ανοσοϊστοχημική χρώση κατέστη δυνατή η ανίχνευσή του με το αντίσωμα R-a-Neur1050 (δεν δείχνεται). Ίσως για αυτόν τον λόγο, δεν παρατηρείται κάποια αλλαγή στην υποκυτταρική τοποθέτηση των δεσμευτών του N μετά από υπερέκφραση του *UAS-neur*.

Τα επιθηλιακά κύτταρα (κυρίως του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού) επιλέχθηκαν, γιατί είναι αυτά που μελετάμε όταν ερευνούμε τους μηχανισμούς της διακυτταρικής σηματοδότησης κατά την ανάπτυξη της Δροσόφιλας (σε αυτήν την εργασία). Τα κύτταρα αυτά αποτελούν ένα μονόστιβο επιθήλιο με συγκεκριμένη πολικότητα, όπου οι διάφορες πρωτεΐνες και σηματοδοτικά μόρια εντοπίζονται σε χαρακτηριστικά και διακριτά διαμερίσματα. Σε επιθηλιακά κύτταρα του δίσκου φτερού παρατηρείται κυρίως μεμβρανικός εντοπισμός και των δύο χημικών πρωτεϊνών EGFP-Neur και NeurΔR-GFP, με την δεύτερη να παρουσιάζει εντονότερο φθορισμό. Όταν τα χημικά μόρια υπερεκφράζονται σε αγρίου τύπου γενετικό υπόβαθρο παρατηρείται πτώση των επιπέδων των δεσμευτών παρουσία EGFP-Neur, ενώ παρουσία NeurΔR-GFP οι δεσμευτές διατηρούνται στη μεμβράνη και συνεντοπίζονται με το NeurΔR-GFP (Εικ. 3.3, 3.13, 3.14, 3.24).



Εικόνα 3.26: Υποκυτταρική τοποθέτηση της πρωτεΐνης Neur και του ελλειμματικού NeurΔRING σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους

A, Δ: Επιθηλιακά κύτταρα του σιελογόνου αδένου προνύμφης τρίτου σταδίου

B, E, H, I: Νεφροκύτταρα προνύμφης τρίτου σταδίου (κύτταρα garland)

Γ, ΣΤ, Z, Θ, K: Τυφλά του εντέρου προνύμφης τρίτου σταδίου (gastric caeca)

Σε όλες τις περιπτώσεις τα διαγονίδια εκφράστηκαν με τη σειρά οδηγό *hs-Gal4* και η υπερέκφραση επιτεύχθηκε μετά από θερμικό σοκ και διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 8 ώρες μετά το σοκ. Με μπλε (topro3) μαρκάρονται οι πυρήνες σε όλες τις φωτογραφίες.

A-Γ και Z, H, K: Έκφραση του χιμαιρικού μορίου *UAS-EGFP-neur* σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους.

Δ-ΣΤ, Θ, I: Έκφραση του χιμαιρικού μορίου *UAS-neurΔRING-GFP* σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους.

B', Γ': πράσινο κανάλι των B, Γ (*UAS-EGFP-neur*)

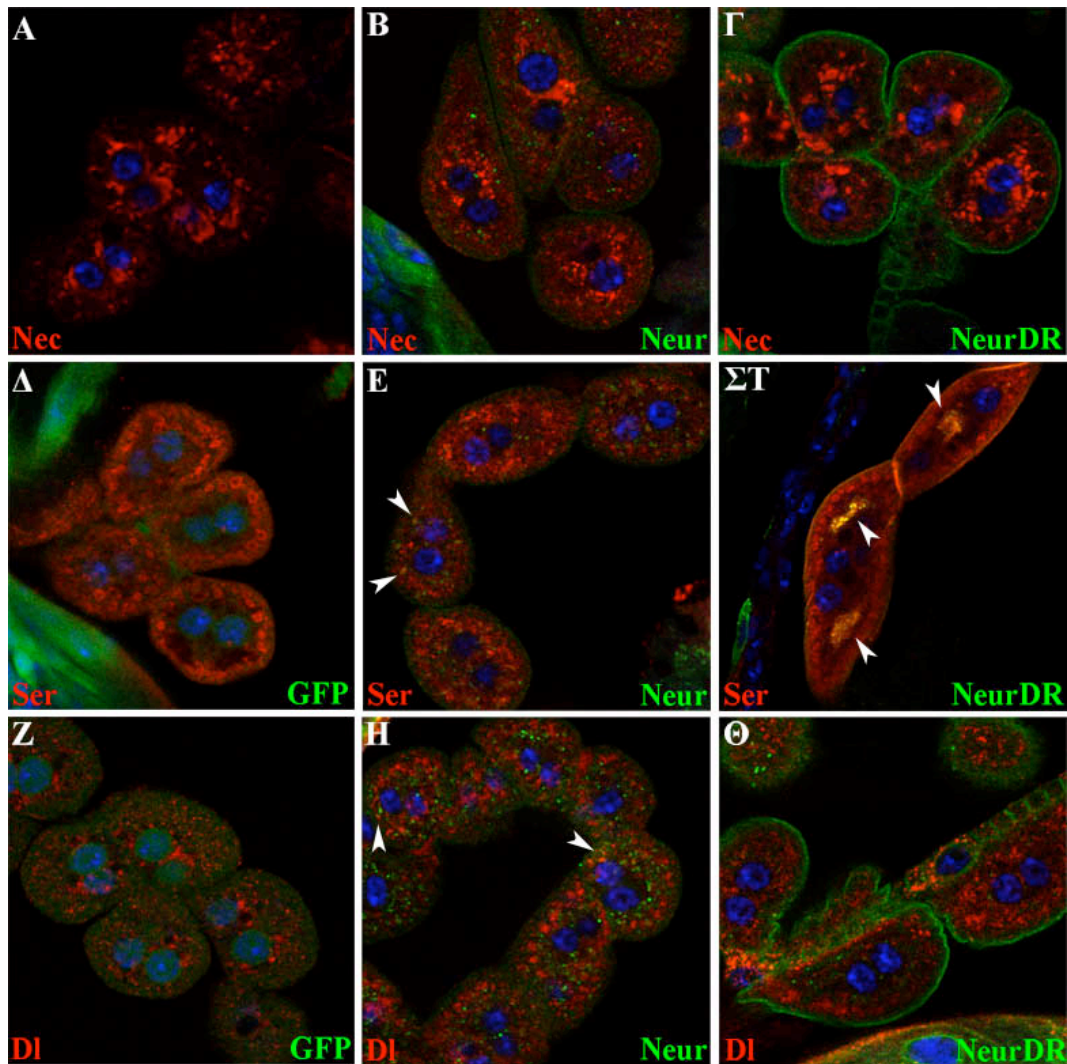
E', ΣΤ': πράσινο κανάλι των E και ΣΤ (*UAS-neurΔRING-GFP*)

A-ΣΤ, K: Με κόκκινο σημαίνονται τα πολυκυστιδιακά σωμάτια (MVBs) του όψιμου ενδοσώματος με χρήση αντισώματος που αναγνωρίζει την πρωτεΐνη Hrs.

Z-I: Με κόκκινο σημαίνεται το ανακυκλωτικό ενδόσωμα με χρήση αντισώματος που αναγνωρίζει την πρωτεΐνη Rab11.

Ενώ στα επιθηλιακά κύτταρα του σιελογόνου αδένου δεν παρατηρείται καμία διαφορά στην υποκυτταρική τοποθέτηση των δύο πρωτεϊνών (A, B), υπάρχουν πολύ εντυπωσιακές διαφορές στην τοποθέτηση στα νεφροκύτταρα και στα κύτταρα των τυφλών του εντέρου: το EGFP-neur φαίνεται να βρίσκεται σε κάποιο ενδοκυτταρικό διαμέρισμα (B, Γ), ενώ το ελλειμματικό NeurΔRING-GFP είναι κυρίως εντοπισμένο στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων (E, ΣΤ).

Το EGFP-neur συνεντοπίζεται με τα πολυκυστιδιακά σωμάτια (βέλη στα B, Γ, K), αλλά όχι με το ανακυκλωτικό ενδόσωμα (Z, H), ενώ το NeurΔRING-GFP είναι κυρίως μεμβρανικό (E, ΣΤ, Θ, I).



Εικόνα 3.27: Κυτταρική διακίνηση του Neur σε σχέση με το N και τους δεσμευτές του.

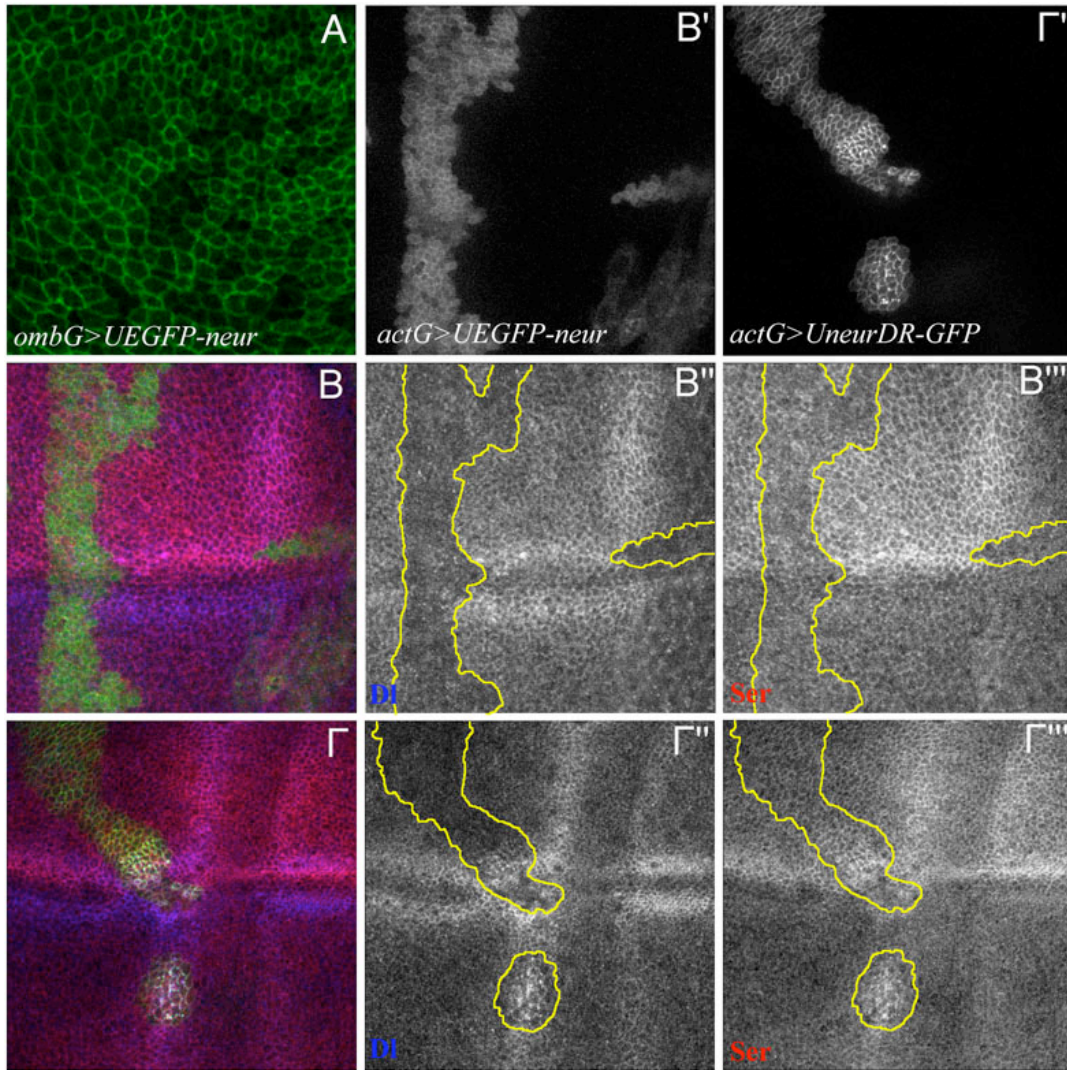
Σε όλες τις φωτογραφίες φαίνονται garland κύτταρα προνύμφης τρίτου σταδίου που υπερεκφράζουν κάτω από τον έλεγχο της *hs-Gal4* διαφορετικά διαγονίδια *UAS*. Με πράσινο φαίνεται η υπερεκφρασμένη GFP (Δ, Ζ), το EGFP-*neur* (Β, Ε, Η) και *neurΔR-GFP* (Γ, ΣΤ, Θ) και με κόκκινο χρώση για την εξωκυττάρια περιοχή του N (Α-Γ), για την ενδοκυττάρια περιοχή του Ser (Δ-ΣΤ) και για την εξωκυττάρια περιοχή του DI (Ζ-Η).

Α, Β, Γ) Υπερέκφραση του *UAS-N* μόνο, με *UAS-EGFP-Neur* και με *UAS-neurΔR-GFP*, αντίστοιχα.

Δ, Ε, ΣΤ) Υπερέκφραση του *UAS-Ser* με *UAS-GFP*, με *UAS-EGFP-Neur* και με *UAS-neurΔR-GFP*, αντίστοιχα.

Ζ, Η, Θ) Υπερέκφραση του *UAS-DIV5* με *UAS-GFP*, με *UAS-EGFP-Neur* και με *UAS-neurΔR-GFP*, αντίστοιχα.

Οι κεφαλές βέλους σημειώνουν ενδεικτικές θέσεις συνεντοπισμού των υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών. Με μπλε φαίνεται πυρηνική χρώση με *torp3*.



Εικόνα 3.28: Η πρωτεΐνη Neur εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων και επηρεάζει την υποκυτταρική τοποθέτηση των δεσμευτών του N.

Σε όλες τις φωτογραφίες φαίνονται αναπτυξιακοί δίσκοι φτερού τρίτου σταδίου (εμπρόσθιο τμήμα προς τα αριστερά και κοιλιακό κάτω).

A, B: Εκτοπική έκφραση του EGFP-Neur στην περιοχή του φτερού με *omb-Gal4* και σε μιτωτικούς κλώνους, αντίστοιχα, Γ: Εκτοπική έκφραση του NeurΔR-GFP σε μιτωτικούς κλώνους. Με κίτρινο σημειώνονται οι κλώνοι στα B'', B''', Γ'' και Γ''' για ευκολία.

A, B') Η χμαιρική πρωτεΐνη EGFP-Neur παρουσιάζει μεμβρανική τοποθέτηση στην κορυφαία επιφάνεια του επιθηλίου (A), ενώ φαίνεται να έχει και κάποια κυτταροπλασματική χρώση είτε σε κυστίδια, είτε ομοιόμορφη.

Γ') Η χμαιρική πρωτεΐνη NeurΔR-GFP έχει έντονη χρώση και είναι περισσότερο περιορισμένη στην κορυφαία πλασματική μεμβράνη, όπου σχηματίζει συσσωματώματα.

B) Μιτωτικοί κλώνοι εκτοπικής έκφρασης του EGFP-Neur και χρώση για D1 (μπλε, B'') και Ser (κόκκινο, B''').

Γ) Μιτωτικοί κλώνοι εκτοπικής έκφρασης του NeurΔR-GFP και χρώση για D1 (μπλε, Γ'') και Ser (κόκκινο, Γ''').

Το EGFP-Neur οδηγεί σε πτώση των επιπέδων των δεσμευτών, ενώ το NeurΔR-GFP συγκρατεί τους δεσμευτές του N στην μεμβράνη σε συσσωματώματα σε σύμπλοκο με τον εαυτό του (λευκό στο Γ).

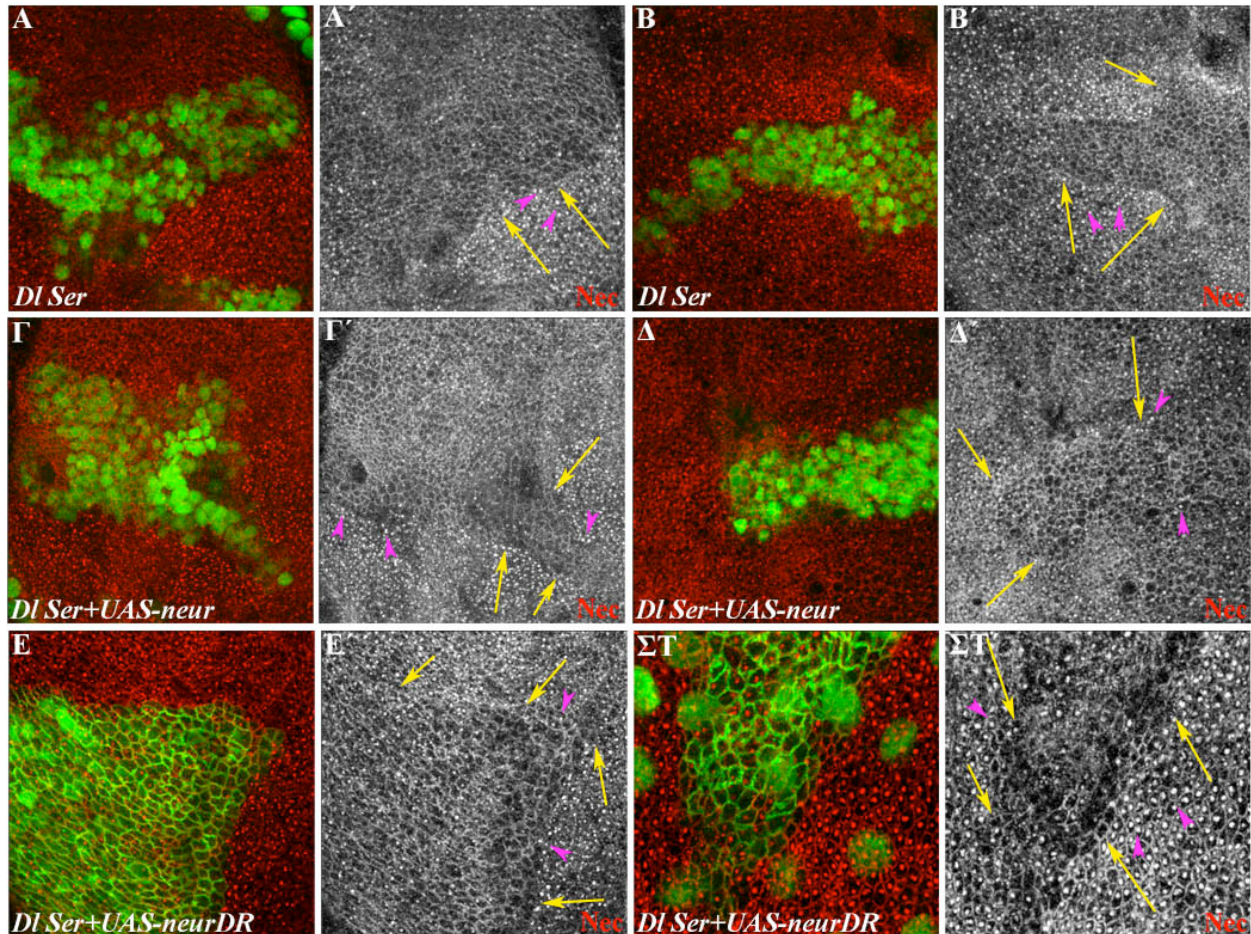
Το Neur επηρεάζει την διακίνηση του υποδοχέα Notch έμμεσα (μέσω των DSL δεσμευτών)

Κατά την διάρκεια της παραπάνω εργασίας αποδείξαμε ότι η E3 λιγάση ουβικουιτίνης Neur έχει την ικανότητα να προκαλεί την ενδοκυττώση των δεσμευτών DI και Ser του υποδοχέα N (Εικ. 3.2, 3.3, 3.13) και μάλιστα ανεξάρτητα (Εικ. 3.14). Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι το Neur είναι ικανό να ενδοκυττώνει τόσο το DI, όσο και το Ser ακόμα και απουσία Mib1 (δεν δείχνεται). Επιπλέον, παρατηρήσαμε ότι η υποκυτταρική τοποθέτηση του υποδοχέα N (και μάλιστα του εξωκυττάριου επιτόπου του) επηρεάζεται από το Neur μόνο σε περιοχές όπου υπάρχει ενδογενώς ή υπερεκφράζεται DI (Εικ. 3.3). Η υπερέκφραση του ελλειμματικού μορίου NeurΔR, η οποία οδηγεί σε συσσώρευση των δεσμευτών στην κορυφαία επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης (Εικ. 3.28, Κανακουσάκη Κ, Πτυχιακή Εργασία), έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του υποκυτταρικού εντοπισμού του εξωκυττάριου επιτόπου του υποδοχέα N. Συγκεκριμένα, το Nec αντί να εκφράζεται ομοιόμορφα στην κορυφαία επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης και σε ενδοκυτταρικά κυστίδια, εντοπίζεται στην μεμβράνη σε συσσωματώματα, τα οποία παρουσιάζουν καλό συνεντοπισμό με το NeurΔR (Εικ. 3.30B). Είναι αυτή η δράση του Neur άμεσο αποτέλεσμα της υπερέκφρασης στον υποδοχέα;

Για να απαντήσουμε στο παραπάνω ερώτημα, δημιουργήσαμε και μελετήσαμε μιτωτικούς κλώνους από τους οποίους απουσιάζουν οι δεσμευτές *DI/Ser* ή/ και υπερεκφράζουν είτε *UAS-neur* ή *UAS-neurΔR*. Παρατηρήσαμε ότι η απουσία των δεσμευτών έχει ως αποτέλεσμα την πτώση των επιπέδων του Nec στα κύτταρα του κλώνου (Εικ. 3.29A, B) και κυρίως των ενδοκυτταρικών συσσωματωμάτων αυτού (η ομοιόμορφη μεμβρανική χρώση διατηρείται), τα οποία μπορούμε να υποθέσουμε ότι είναι εξαρτώμενα από την παρουσία των DI και Ser. Αν στους κλώνους αυτούς υπερεκφραστεί *UAS-neur* (Εικ. 3.29Γ, Δ) ή *UAS-neurΔR* (Εικ. 3.29E, ΣΤ), καμία αλλαγή δεν παρατηρείται στον εντοπισμό του Nec και η μεμβρανική του χρώση παραμένει ομοιόμορφη. Συνεπώς, η επίδραση του Neur/ NeurΔR στον υποδοχέα είναι έμμεση και επιτελείται μέσω των δεσμευτών DSL.

Ο φαινότυπος που παρουσιάζει το Nec μετά από υπερέκφραση του NeurΔR, παρατηρείται και σε άλλες περιπτώσεις που οι δεσμευτές υπερεκφράζονται στην πλασματική μεμβράνη (Εικ. 3.30), όπως σε μιτωτικούς κλώνους *mibI*⁻ (Εικ. 3.30A), *mibI*⁻ + *UAS-neurΔR* (Εικ. 3.30E), *mibI*⁻ + *UAS-DI UAS-neurΔR* (Εικ. 3.30Δ, ΣΤ), *mibI*⁻ + *UAS-DI* (Εικ. 3.30Γ) ανεξάρτητα της παρουσίας του NeurΔR. Η συσσώρευση του Nec στην πλασματική μεμβράνη σε συσσωματώματα είναι το κύριο χαρακτηριστικό των παραπάνω γονοτύπων. Τα εν λόγω συσσωματώματα μοιάζουν να δημιουργούν ένα κενό γύρω από τον μεταλλαγμένο ιστό, σαν μία σειρά κυττάρων γύρω από τον

κλώνο να έχει χάσει το Nec και αυτό να “τραβιέται” in trans από τα κύτταρα του κλώνου που υπερεκφράζουν τον δεσμευτή. Η πιθανότητα αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι στα όρια του κλώνου πάνω στην πλασματική μεμβράνη (και μέσα στον κλώνο) το Nec συνεντοπίζεται ισχυρά με τον εξωκυττάριο επίτοπο του DI (Εικ. 3.30Γ, Δ, ΣΤ).



Εικόνα 3.29: Η πρωτεΐνη Neur δρα έμμεσα στον υποδοχέα N, μέσω των δεσμευτών DSL

Με πυρηνική GFP μαρκάρονται μιτωτικοί κλώνοι των δεσμευτών *DI Ser* (A, B), που υπερεκφράζουν *neur* (Γ, Δ) ή το ελλειμματικό *neurΔR* (E, ΣΤ).

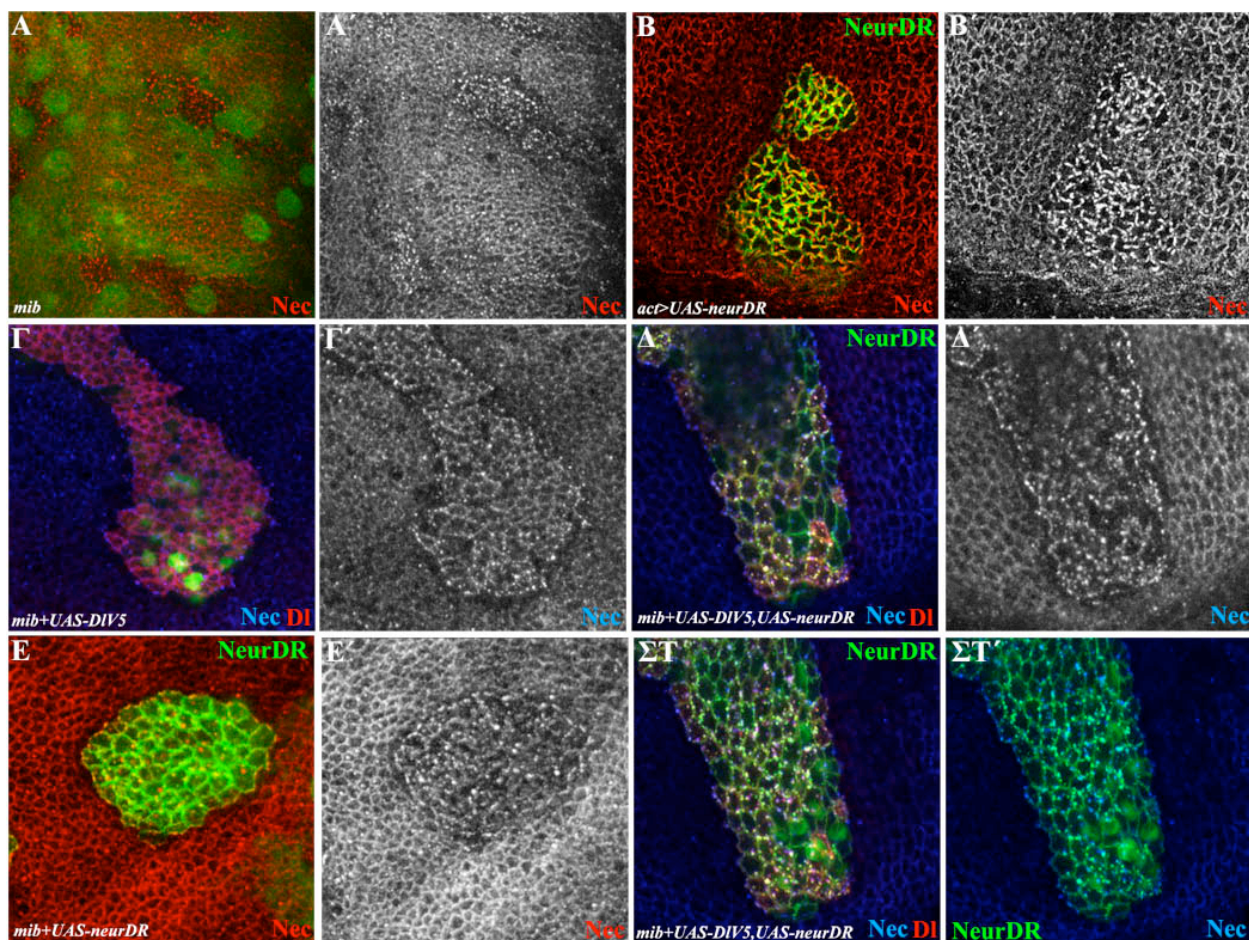
Στις εικόνες A'-ΣΤ' φαίνεται χωριστά το κόκκινο κανάλι των A-ΣΤ αντίστοιχα.

Τα κίτρινα βέλη (A'-ΣΤ') υποδεικνύουν τα όρια των κλώνων, όπου παρατηρείται διαφορά στην υποκυτταρική τοποθέτηση του Nec.

Στα E και ΣΤ το μεμβρανικό πράσινο είναι το NeurΔRING-GFP.

Στο ΣΤ η μεγέθυνση είναι περίπου διπλάσια από ό,τι στα A-E.

Έλλειψη των δεσμευτών του N (A, B, κλώνοι *DI Ser*), οδηγεί σε πτώση των επιπέδων του υποδοχέα μέσα στους κλώνους (κυρίως ελλατώνεται το N που εντοπίζεται μέσα στα κύτταρα ως συσσωματώματα - ενδεικτικά σημειώνονται με ροζ κεφαλές βέλους). Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρείται όταν μέσα στους κλώνους αυτούς υπερεκφραστεί το *neur* (Γ, Δ), είτε το ελλειμματικό *neurΔR* (E, ΣΤ).



Εικόνα 3.30: Η υπερέκφραση των δεσμευτών του N οδηγεί στην δημιουργία συσσωματωμάτων του Nec

Μιτωτικοί κλώνοι σε δίσκους φτερού προνύμφης Δροσόφιλας τρίτου σταδίου, οι οποίοι ελέγχονται για την υποκυτταρική τοποθέτηση του υποδοχέα N με ένα αντίσωμα που αναγνωρίζει τον εξωκυττάριο επίτοπο της πρωτεΐνης (Nec).

Στο A οι κλώνοι μαρκάρονται από την απουσία της ομοιόμορφα εκφραζόμενης UbiGFP, ενώ στα B-ΣΤ, οι κλώνοι μαρκάρονται θετικά από την παρουσία είτε του NeurDR (μεμβρανική GFP, B) ή από πυρηνική GFP (Γ) ή και από τα δύο (Δ-ΣΤ).

(A) κλώνοι *mib1*, (B) κλώνοι υπερέκφρασης *UAS-neurDR* (υπό τον έλεγχο του *actGal4*), (Γ) κλώνοι *mib1* που υπερεκφράζουν *UAS-DIV5*, (Δ και ΣΤ) κλώνοι *mib1* που υπερεκφράζουν *UAS-DIV5*, *UAS-neurDR* με το Δ να αντιστοιχεί σε πιο κορυφαίες τομές, (E) κλώνοι *mib1* που υπερεκφράζουν *UAS-neurDR*.

Στα A, B και E το κόκκινο κανάλι αντιστοιχεί σε χρώση για Nec, ενώ το μπλε κανάλι αντιστοιχεί στο Nec στα Γ, Δ και ΣΤ. Το κόκκινο στα Γ, Δ και ΣΤ δείχνει το υπερεκφρασμένο DI.

Στα A'-E' φαίνεται μόνο το κανάλι του Nec, ενώ οι κλώνοι δεν σημειώνονται, αλλά είναι προφανείς από την διαφορά στην υποκυτταρική τοποθέτηση του Nec. Από μία σειρά κυττάρων έξω από τους κλώνους μοιάζει να απουσιάζει το Nec (σκιά), ενώ η χρώση του φαίνεται να εντοπίζεται σε συσσωματώματα πάνω ή πολύ κοντά στην πλασματική μεμβράνη. Το Nec συμπίπτει με μεμβράνη και κατ' επέκταση με NeurDR (B, E) χωρίς όμως να είναι πανομοιότυπο το σχήμα των Nec και NeurDR συσσωματωμάτων. Αντίθετα, όταν συνυπερεκφράζεται ο δεσμευτής DI (Γ, Δ, ΣΤ) όλες οι πρωτεΐνες Nec, DI και/ή NeurDR συνεντοπίζονται (μοβ στα Γ και άσπρο στα Δ, ΣΤ).

Και κάτι επιπλέον...

Αξίζει στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι η υπερέκφραση του *Ser* στον δίσκο του φτερού (με *ombGal4* ή *dppGal4*, δεν δείχνεται) έχει ως αποτέλεσμα την πτώση των επιπέδων του Nec (και το ίδιο ισχύει όταν συνυπερεκφράζεται μαζί με *Ser*, *neur* ή *neurDR*), γεγονός το οποίο δεν παρατηρείται πχ στους κλώνους της εικόνας A (όπου το *Ser* υπερεκφράζεται σε μεγάλο βαθμό). Στους παραπάνω κλώνους ίσως το αποτέλεσμα να είναι εξαρτώμενο της απουσίας του *mib1* (και στην περίπτωση του Γ, στην αλληλεπίδραση του NeurDR με το Mib1, η οποία δεν έχει ακόμη ελεγχθεί), η οποία επιτρέπει την συσσώρευση του Nec στη μεμβράνη, έστω και παρουσία *Ser*.

Η παρεμπόδιση της ενδοκύττωσης των δεσμευτών οδηγεί σε συσσώρευση του D1 στους προνευρικούς συναθροισμούς

Στα φυσιολογικά κύτταρα των προνευρικών συναθροισμών, η πρωτεΐνη D1 εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη και σε ενδοσωμικά κυστίδια. Εξαιτίας της παρουσίας του *neur* στα κύτταρα ΠΑΟ απομακρύνεται από την κορυφαία επιφάνεια της μεμβράνης των κυττάρων αυτών (Εικ. 3.2Γ, 3.8). Επιπλέον, μελέτες των De Joussineau et al. έδειξαν ότι στα κύτταρα ΠΑΟ η πρωτεΐνη D1 εντοπίζεται σε ψευδοπόδια σε διάφορα επίπεδα του επιθηλίου και στην βασική επιφάνεια αυτού και με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται πλευρική αναστολή σε πιο μακρινή απόσταση (De Joussineau et al., 2003). Παρατηρήσαμε ότι σε ταυτόχρονη έλλειψη των *mib1* και *neur* (κλώνοι *mib1⁻neur⁻*) ο νευρογόνος φαινότυπος των προνευρικών συναθροισμών συνοδεύεται από σημαντική συσσώρευση της πρωτεΐνης D1 στα εκτοπικά κύτταρα ΠΑΟ, σε όλο το βάθος του επιθηλίου και κυρίως στη βασική επιφάνειά του (Εικ. 3.31Α-Γ). Η συσσώρευση αυτή δεν παρατηρείται σε κλώνους που εντοπίζονται σε μη προνευρικές περιοχές. Επιπλέον, τα επίπεδα της πρωτεΐνης D1 φαίνονται ανεπηρέαστα σε απλούς *mib1* ή *neur* κλώνους (δεν δείχνεται). Αντίθετα, ο άλλος δεσμευτής του N, το Ser, φαίνεται να επηρεάζεται μόνο από την έλλειψη του *mib1* (Le Borgne et al., 2005b, Lai et al., 2005), οπότε και τα επίπεδα του αυξάνονται στην πλασματική μεμβράνη, αλλά δεν αλλάζει περαιτέρω η υποκυτταρική του τοποθέτηση σε διπλούς *mib1⁻neur⁻* κλώνους σε προνευρικούς συναθροισμούς (Εικ. 3.31Α-Γ). Φαίνεται λοιπόν, ότι η ουβικουΐτινυλίωση και η ενδοκύττωση της πρωτεΐνης D1 καθορίζει τον κυτταρικό εντοπισμό της. Εκτός από τις δύο λιγάσες ουβικουΐτίνης και η εψίνη (στη Δροσόφιλα *liquid facets: lqf*) είναι σημαντική για την αποστολή του σήματος N: σε μιτωτικούς κλώνους *lqf* εμποδίζεται η σηματοδότηση και παρατηρείται νευρογόνος φαινότυπος σε προνευρικούς συναθροισμούς (Overstreet et al., 2004, Tian et al., 2004, Wang and Struhl, 2004). Μελετήσαμε την υποκυτταρική τοποθέτηση της πρωτεΐνης D1 σε *lqf* νευρογόνους συναθροισμούς και παρατηρήσαμε ότι και σε αυτήν την περίπτωση το D1 συσσωρεύεται στην βασική πλευρά του επιθηλίου (δεν δείχνεται). Συνεπώς, η ουβικουΐτινυλίωση και ενδοκύττωση μέσω εψίνης είναι σημαντικές για την πλευρική αναστολή και τη φυσιολογική τοποθέτηση του δεσμευτή D1 στον προνευρικό συναθροισμό.

Αν εμποδίσουμε την ενδοκύττωση με άλλον τρόπο μέσα στον προνευρικό συναθροισμό, αλλάζει ο εντοπισμός της πρωτεΐνης D1; Για να αποτρέψουμε την ενδοκύττωση στους προνευρικούς συναθροισμούς, υπερεκφράσαμε μία επικρατή αρνητική μεταλλαγή της δυναμίνης, *UAS-shiDN*, μόνο στους προνευρικούς συναθροισμούς με τη χρήση της σειράς 253-

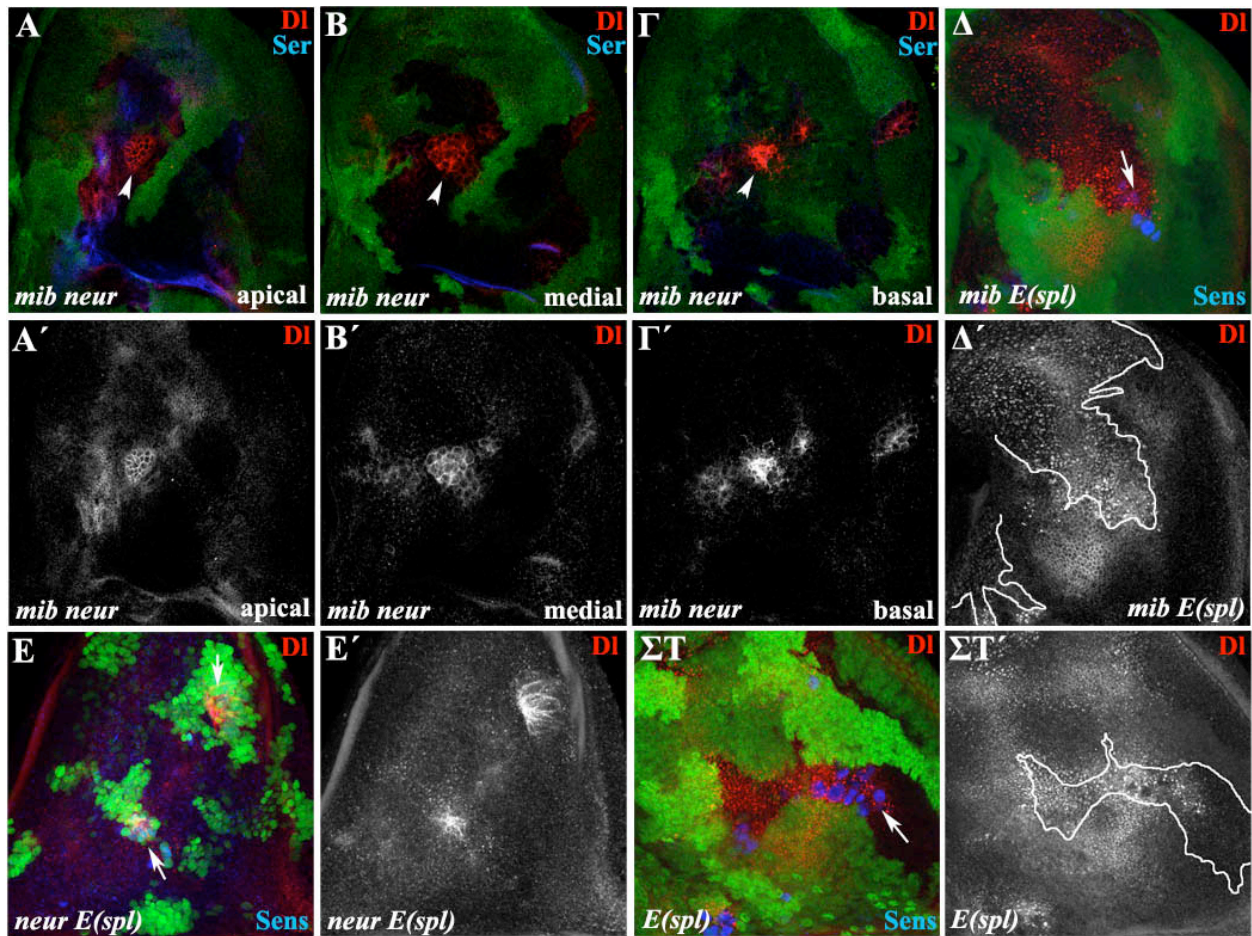
Gal4. Παρατηρήσαμε ότι οι συναθροισμοί αυτοί αποκτούν νευρογόνο φαινότυπο (παρεμπόδιση της σηματοδότησης N) και η πρωτεΐνη DI συσσωρεύεται στην βασική επιφάνεια των κυττάρων. Το ίδιο συμβαίνει αν υπερέκφρασουμε με *253-Gal4* την ελλειμματική μορφή του *neur*, *UAS-neur Δ R*, η οποία φαίνεται να εμποδίζει την ενδοκύττωση του DI (δεν δείχνεται). Παρατηρήσαμε ότι η παρεμπόδιση της ουβικουΐτινυλίωσης/ ενδοκύττωσης οδηγεί σε απώλεια σηματοδότησης, η οποία συνοδεύεται από συσσώρευση της πρωτεΐνης DI, τόσο στην κορυφαία, όσο και στην βασική πλευρά των εκτοπικών κυττάρων ΠΑΟ. Ο ρόλος αυτής της συσσώρευσης του DI δεν είναι γνωστός.

Επιπλέον, η υπερέκφραση σε κλώνους ενός *UAS-DI* διαγονιδίου, δεν οδηγεί σε παρόμοιο φαινότυπο συσσώρευσης σε καμία περιοχή του δίσκου (ούτε σε προνευρικές περιοχές, οι οποίες σημειώνεται ότι δεν παρουσιάζουν νευρογόνο φαινότυπο, Πίνακας 3.1), οπότε δεν είναι απλώς αποτέλεσμα υπερπαραγωγής του DI, αλλά ένα φαινόμενο σχετικό ίσως με τα κύτταρα ΠΑΟ. Μήπως η συσσώρευση της πρωτεΐνης DI είναι απλώς το αποτέλεσμα του νευρογόνου φαινότυπου και της υπεραριθμίας κυττάρων ΠΑΟ;

Ελέγξαμε την πιθανότητα ο υποκυτταρικός εντοπισμός του DI να είναι το αποτέλεσμα του νευρογόνου φαινότυπου (πχ συσσώρευση του DI λόγω υπερέκφρασής του σε κύτταρα ΠΑΟ). Για τον λόγο αυτό δημιουργήσαμε και μελετήσαμε μιτωτικούς κλώνους απώλειας λειτουργίας του γονιδιακού συμπλόκου *E(spl)*, οι οποίοι είναι ισχυρά νευρογόνοι, όταν διασχίζουν προνευρικές περιοχές, καθώς τα μεταλλαγμένα κύτταρα ενώ λαμβάνουν σήμα N, δεν είναι ικανά να το “μεταφράσουν”. Παρατηρήσαμε ότι τα κύτταρα αυτά δεν συσσωρεύουν την πρωτεΐνη DI στην βασική μεμβράνη τους, άρα ο φαινότυπος αυτός δεν σχετίζεται με την υπεραριθμία των κυττάρων ΠΑΟ (Εικ. 3.31Δ). Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι οι εν λόγω κλώνοι παρουσιάζουν υπερέκφραση της πρωτεΐνης DI όχι μόνο στις προνευρικές περιοχές, αλλά και σε όλο τον υπόλοιπο δίσκο του φτερού. (Μήπως αυτό οφείλεται στην απουσία εκτός από των άλλων και των *E(spl)* *m4*, *mα*, *m6*, τα οποία αλληλεπιδρούν με *Neur* και *DI*;))

Για να μελετήσουμε ξεχωριστά την συνεισφορά των *neur* και *mib1* σε αυτόν τον εντοπισμό της πρωτεΐνης DI, δημιουργήσαμε μιτωτικούς κλώνους απώλειας λειτουργίας του γονιδιακού συμπλόκου *E(spl)*, οι οποίοι ταυτόχρονα είναι *neur⁻* ή *mib1⁻* (*mib1⁻E(spl)⁻* και *neur⁻E(spl)⁻*, αντίστοιχα) και έχουν ισχυρό νευρογόνο φαινότυπο εξαιτίας της έλλειψης των *E(spl)*. Παρατηρήσαμε ότι οι διπλοί *neur⁻E(spl)⁻* κλώνοι παρουσιάζουν τον φαινότυπο της συσσώρευσης του δεσμευτή DI στην βασική επιφάνεια των εκτοπικών κυττάρων ΠΑΟ (Εικ. 3.31E), ενώ οι *mib1⁻E(spl)⁻* δεν διαφέρουν καθόλου από τους *E(spl)* (Εικ. 3.31ΣΤ). Φαίνεται

λοιπόν ότι η παρουσία του *neur* στους προνευρικούς συναθροισμούς είναι σημαντική για την φυσιολογική υποκυτταρική τοποθέτηση του δεσμευτή DI και την αποστολή του σήματος.



Εικόνα 3.31: Η πρωτεΐνη Neur είναι απαραίτητη για την σωστή υποκυτταρική τοποθέτηση του δεσμευτή DI στα κύτταρα ΠΑΟ.

Στις φωτογραφίες φαίνονται μιτωτικοί κλώνοι σε ημιθωράκια προνευρών τρίτου σταδίου. Όλοι οι αναπτυξιακοί δίσκοι είναι τοποθετημένοι με το εμπρόσθιο τδιαμέρισμα προς τα αριστερά και το εγγύς πάνω. Α-Δ, ΣΤ: οι κλώνοι μαρκάρονται από την απουσία της GFP, Ε: οι κλώνοι μαρκάρονται από την παρουσία της GFP. Δ-ΣΤ: Με κόκκινο φαίνεται χρώση για DI (μόνο το κόκκινο κανάλι στα Δ'-ΣΤ') και με μπλε χρώση για Sens, που μαρκάρει τα κύτταρα ΠΑΟ και δείχνει τον νευρογόνο φαινότυπο.

Α-Γ) μονές οπτικές τομές *mibI⁻ neur⁻* κλώνου, στην κορυφαία, μέση και βασική επιφάνεια του επιθηλίου του δίσκου, αντίστοιχα. Με κόκκινο φαίνεται χρώση για DI (Α'-Γ' μόνο το κόκκινο κανάλι) και με μπλε χρώση για Ser. Η μεταλλαγμένη περιοχή περιλαμβάνει τον προνευρικό συναθροισμό της PPA/tr1 (βέλος).

Δ) Μιτωτικός κλώνος *mibI⁻ E(spl)⁻* στην περιοχή του προνευρικού συναθροισμού της PPA (βέλος).

Ε) Μιτωτικοί κλώνοι *neur⁻ E(spl)⁻* σε προνευρικές περιοχές (SC, PPA, βέλη).

ΣΤ) Μιτωτικοί κλώνοι *E(spl)⁻* σε προνευρικές περιοχές (PPA/tr1, βέλος).

Συμπερασματικά...

- Η υποκυτταρική τοποθέτηση των Neur και NeurΔRING διαφέρει ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο που εξετάζεται: στα επιθηλιακά κύτταρα και σε κύτταρα S2 δεν υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση των δύο μορίων, ενώ σε κύτταρα που χαρακτηρίζονται από έντονη ενδοκύττωση (garland και gastric caecae) το Neur εντοπίζεται σε μεμβρανικά και ενδοκυτταρικά διαμερίσματα ενώ το NeurΔRING περιορίζεται στη μεμβράνη.
- Ο μόνος μάρτυρας που δείχνει συσχέτιση με το Neur είναι το Hrs που μαρκάρει πρωτεΐνες των πολυκυστιδιακών σωματίων.
- Στα κύτταρα garland και S2 οι δεσμευτές του N συνεντοπίζονται με το Neur, αλλά αυτό δεν συμβαίνει στον ίδιο τον υποδοχέα.
- Η πρωτεΐνη Neur (και ΔR) επιδρά στην υποκυτταρική τοποθέτηση του υποδοχέα N μόνο μέσω των δεσμευτών DSL.
- Η παρεμπόδιση της ενδοκύττωσης του Delta οδηγεί σε νευρογόνο φαινότυπο και συσσώρευση της πρωτεΐνης στην βασική επιφάνεια των κυττάρων ΠΑΟ. Η παρουσία του Neur είναι σημαντική για να αποφευχθεί αυτή η συσσώρευση.

Συζήτηση

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η σηματοδότηση μέσω του διαμεμβρανικού υποδοχέα N ενεργοποιείται σε πλειάδα κυτταρικών αποφάσεων και οδηγεί στην διαφοροποίηση ποικιλίας κυτταρικών τύπων. Στην παραπάνω εργασία έγινε μία προσπάθεια διαλεύκανσης του ρόλου της ουβικουϊτινυλίωσης και της ενδοκύττωσης στο πολύ σημαντικό αυτό μονοπάτι διακυτταρικής σηματοδότησης. Η προσέγγισή μας και τα μόρια που μελετήσαμε αφορούν κυρίως το κύτταρο, το οποίο αποστέλλει το σήμα και θα ενεργοποιήσει τον υποδοχέα N στο γειτονικό του. Ωστόσο, παρόμοια ρύθμιση φαίνεται ότι συμβαίνει και στο κύτταρο που δέχεται το σήμα N και ενεργοποιεί τα κάτωθεν στοιχεία του μονοπατιού. Στη συνέχεια, συζητούνται τα βασικά πορίσματα της έρευνάς μας και συσχετίζονται με αποτελέσματα άλλων ομάδων που προέκυψαν πρόσφατα.

1. Neutralized και Ενδοκύττωση

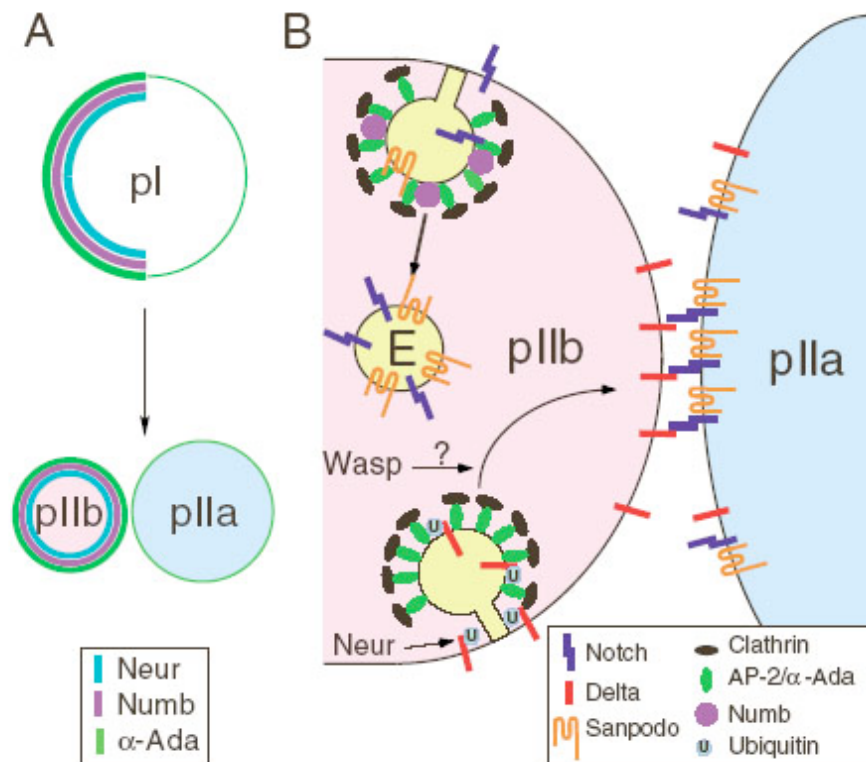
Παρά το γεγονός ότι ο φαινότυπος της έλλειψης του γονιδίου *neur* ήταν γνωστός από τα μέσα της δεκαετίας του 80 (de la Concha et al., 1988) και η κλωνοποίηση του έγινε στις αρχές της δεκαετίας του 90 (Boulianne et al., 1991; Price et al., 1993), η λειτουργία του παρέμενε άγνωστη μέχρι πολύ πρόσφατα (Deblandre et al., 2001; Kramer, 2001; Lai et al., 2001; Lai and Rubin, 2001a; Lai and Rubin, 2001b; Le Borgne and Schweisguth, 2003; Pavlopoulos et al., 2001; Yeh et al., 2001; Yeh et al., 2000). Η έκφραση του *neur* στα κύτταρα που αποστέλλουν το σήμα N και κατά συνέπεια εκφράζουν τους δεσμευτές του (νευροβλάστες, κύτταρα ΠΑΟ, πρόδρομες φλεβώσεις του φτερού), οδήγησε στην υπόθεση ότι μπορεί να εμπλέκεται στη ρύθμιση του μονοπατιού επηρεάζοντας τους τελευταίους, πχ το DI, ή κάποια μόρια που ρυθμίζουν την έκφρασή τους. Σημαντική ώθηση στην διαλεύκανση του ρόλου του *neur* αποτέλεσε ο χαρακτηρισμός του καρβοξυτελικού μοτίβου RING που φέρει. Ενώ μέχρι πρότινος, πιστεύετο ότι αυτό το μοτίβο παίζει ρόλο σε μεταγραφική ενεργοποίηση, στα τέλη του 90 δείχθηκε ότι απαντάται πολύ συχνά σε πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο E3 λιγάσης ουβικουϊτίνης (Borden, 2000; Freemont, 2000; Joazeiro and Weissman, 2000). Τα εν λόγω ένζυμα είναι αυτά που δίνουν την εξειδίκευση στη διαδικασία της ουβικουϊτινυλίωσης και πολύ συχνά αλληλεπιδρούν με το υπόστρωμα που πρόκειται να ουβικουϊτινυλιωθεί (Ciechanover et al., 2000; Hershko and Ciechanover, 1998; Hicke, 1999). Από την εργασία των Yeh et al δείχθηκε ότι η πρωτεΐνη Neur έχει δραστηριότητα E3 λιγάσης ουβικουϊτίνης: παρουσία ενζύμων E1 και E2 έχει την ικανότητα να ουβικουϊτινυλιώνει πρωτεΐνες in vitro και η δραστηριότητά της εξαφανίζεται όταν απομακρυνθεί ο δάκτυλος Zn-RING (Yeh et al., 2001). Επιπλέον, δείχθηκε

ότι το *Neur* είναι μία πρωτεΐνη μεμβρανική (με υπερέκφραση χμιαϊρικής πρωτεΐνης σε ιστούς Δροσόφιλας) και κι έτσι αποκλείστηκε η θεωρία του μεταγραφικού παράγοντα (που είχε στηριχτεί στην παρουσία του σήματος πυρηνικού εντοπισμού και του άγνωστου τότε Zn-RING-Finger).

Από τις εργασίες των Lai et al και Yeh et al, οι οποίοι μελέτησαν μιτωτικούς κλώνους απώλειας λειτουργίας του γονιδίου, δείχθηκε ότι το *neur* δίνει στα ενήλικα φαινοτύπους που προσομοιάζουν με απώλεια του N, συμπεράναν ότι δρα αυτόνομα στη σηματοδότηση N κατά τη διαδικασία της πλευρικής αναστολής (Lai and Rubin, 2001a; Yeh et al., 2000) και υπέθεσαν ότι ο στόχος της δράσης του είναι ο ίδιος ο υποδοχέας N και όχι οι δεσμευτές του. Μελετώντας μοριακούς μάρτυρες της ενεργοποίησης του μονοπατιού N, παρατηρήσαμε ότι η δράση του *neur* είναι μη αυτόνομη (Pavlopoulos et al., 2001). Συγκεκριμένα, μέσα στα όρια των κλώνων από τους οποίους απουσιάζει το γονίδιο, γονίδια μάρτυρες της ενεργοποίησης του μονοπατιού, όπως τα *E(spl)* εκφράζονται σε μία σειρά κυττάρων, τα οποία έχουν την ικανότητα να δέχονται το σήμα. Αντιθέτως, η αποστολή του σήματος είναι προβληματική και μοιάζει με τον φαινότυπο της έλλειψης του δεσμευτή DI, παρά του υποδοχέα N.

Η έλλειψη του *neur* εμποδίζει την ενδοκύττωση του δεσμευτή DI σε περιοχές που αυτός είναι ενδοκυττωμένος και η εκτοπική υπερέκφρασή του ευνοεί την ενδοκύττωση, ακόμη και του υπερεκφρασμένου δεσμευτή-γεγονός που υποδεικνύει ότι η δράση του είναι μετα-μεταγραφική. Επιπλέον, τα επίπεδα της πρωτεΐνης ελαττώνονται παρουσία του *neur* και μάλιστα αυτό εξαρτάται από την ικανότητα ουβικουϊτινυλίωσης. Αντιθέτως, ο υποδοχέας N δεν επηρεάζεται, ούτε όσον αφορά την ενδοκύττωση (μόνο όταν υπάρχει DI παρατηρείται συν-ενδοκύττωση των δύο), ούτε όσον αφορά στην αποικοδόμηση (Pavlopoulos et al., 2001).

Η μη αυτονομία της δράσης του *neur* επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια, όταν οι Le Borgne 2003 (Le Borgne and Schweisguth, 2003) έδειξαν τη δράση του στις αποφάσεις γενεαλογίας μετά τον καθορισμό του κυττάρου ΠΑΟ. Στην εν λόγω διαδικασία, η πρωτεΐνη *Neur* τοποθετείται ασύμμετρα στο κύτταρο ΠΑΟ και στη συνέχεια κληροδοτείται στο κύτταρο που θα είναι ο αποστολέας του σήματος στις μετέπειτα κυτταρικές διαιρέσεις κατά την ανάπτυξη του αισθητηρίου οργάνου (Εικ. 4.1). Με τον τρόπο αυτό και με τη δράση του *Numb* (Berdnik et al., 2002; Santolini et al., 2000) στο ίδιο κύτταρο (που μπλοκάρει τη λήψη του σήματος N), εξασφαλίζεται η μονόπλευρη κατεύθυνση της σηματοδότησης.



Εικόνα 4.1: Ασύμμετρη διαίρεση του κυττάρου ΠΑΟ

A) Η ασύμμετρη διαίρεση του κυττάρου ΠΑΟ (pI) επιτυγχάνεται εξαιτίας της ασύμμετρης τοποθέτησης και κληροδότησης των Neur, Numb και α-Adaptin. Στη Δροσόφιλα, τα παραπάνω κληροδοτούνται στο κύτταρο pIIb και χρειάζονται ακόμη και για την επόμενη διαίρεσή του. Στο κύτταρο που τα φέρει εμποδίζεται η ενεργοποίηση του μονοπατιού.

B) Στο pIIb η αλληλεπίδραση του Numb με την α-Adaptin έχει υποτεθεί ότι προωθεί την ενδοκύττωση μέσω κλαθρίνης του N ή του Sanpodo και την τοποθέτησή τους στο ενδόσωμα. Το Neur προσδένεται στο DI, το ουβικουΐτυνιλιώνει και προωθεί την ενδοκύττωση του στο κύτταρο pIIb. Η ενδοκύττωση του οδηγεί σε ενεργοποίηση του N στο κύτταρο pIIa.

2. Πλευρική Αναστολή - Ο ρόλος των δεσμευτών του Notch

Μέχρι πρόσφατα η διαδικασία της πλευρικής αναστολής στη Δροσόφιλα πιστεύετο ότι επιτελείται αποκλειστικά μέσω του δεσμευτή Delta (Heitzler and Simpson, 1991; Zeng et al., 1998). Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε από τη μελέτη εμβρυϊκών φαινοτύπων και μιτωτικών κλώνων σε ενήλικα άτομα. Στο έμβρυο, το *Ser* δεν εκφράζεται κατά τη διάρκεια της γένεσης των νευροβλαστών (στάδιο 9-10) (Wielllette and McGinnis, 1999), οπότε το *Dl* επιτελεί την πλευρική αναστολή και η έλλειψή του έχει ισχυρό νευρογόνο φαινότυπο, παρόμοιο με αυτόν της έλλειψης του υποδοχέα *N*. Τεχνητή έκφραση του *Ser* σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο μπορεί να υποκαταστήσει την έλλειψη του *Dl* (Gu et al., 1995), γεγονός που συμφωνεί με τα δικά μας αποτελέσματα στον θώρακα, όπου και οι δύο δεσμευτές του *N* εκφράζονται φυσιολογικά.

Ο λόγος για τον οποίο δεν έγινε προφανής η συνεισφορά του *Ser* στην πλευρική αναστολή των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων ήταν ότι οι φαινότυποι των μιτωτικών κλώνων μελετήθηκαν σε ενήλικα άτομα. Οι *Dl Ser⁻* κλώνοι, από τους οποίους απουσιάζουν και οι δύο δεσμευτές του Notch, έχουν γυμνή επιδερμίδα, ενώ οι *Dl* κλώνοι παρουσιάζουν πολλαπλασιασμό αισθητηρίων οργάνων (Heitzler and Simpson, 1991, βλέπε και Εικ. 3.19). Και οι δύο φαινότυποι προκύπτουν από ελλιπή σηματοδότηση *N* κατά την πλευρική αναστολή. Αυτή η τελευταία παρατήρηση οδήγησε στην υπόθεση ότι το *Dl* από μόνο του μπορεί να επιτελέσει κανονικά πλευρική αναστολή, ενώ το *Ser* είναι απαραίτητο για τις μετέπειτα διαιρέσεις του κυττάρου ΠΑΟ (Zeng et al., 1998). Μελετώντας μοριακούς μάρτυρες διαφοροποίησης των κυττάρων ΠΑΟ, όπως το *Sens* μπορέσαμε να εξάγουμε συμπεράσματα για τη συνεισφορά του *Ser* στον καθορισμό των κυττάρων ΠΑΟ καθεαυτών. Από την παραπάνω εργασία φαίνεται ότι και το *Ser* συνεισφέρει στον καθορισμό των κυττάρων ΠΑΟ, γιατί αν αφαιρέσουμε τη δράση του, ο φαινότυπος της έλλειψης του *Dl* γίνεται πολύ ισχυρότερος (*Dl Ser⁻*, *Dl+ UAS-fng*, Εικ. 3.9).

Συνεπώς, και οι δύο δεσμευτές του *N* είναι απαραίτητοι για τη φυσιολογική πλευρική αναστολή κατά τον καθορισμό των μακροχαιτών του θώρακα της Δροσόφιας. Το *Dl* είναι ικανό να φέρει σε πέρας τη διαδικασία, ακόμη και απουσία του *Ser* (*Ser⁻* κλώνοι είναι αγρίου τύπου), ενώ το τελευταίο τα καταφέρνει λιγότερο καλά απουσία του *Dl* (ο φαινότυπος των *Dl* κλώνων είναι νευρογόνος- ηπιότερος από την απόλυτη έλλειψη των δεσμευτών ή του ίδιου του υποδοχέα- αλλά σε περίπου 40% των περιπτώσεων γίνεται πλευρική αναστολή και το κύτταρο ΠΑΟ καθορίζεται κανονικά).

Ένα πολύ σημαντικό συμπέρασμα που εξήχθη από αυτή την εργασία, είναι ότι και οι δύο δεσμευτές του N μπορούν να επιτελέσουν πλευρική αναστολή κατά τον καθορισμό των μακροχαιτών, αν εκφραστούν σε ικανοποιητικά υψηλά επίπεδα (κλώνοι *DI¹Ser⁺+UAS-DI*, *+UAS-Ser*) ομοιόμορφα στον προνευρικό συναθροισμό των ισοδύναμων κυττάρων. Οπότε, η μεταγραφική ρύθμισή τους δεν είναι απαραίτητη, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με την μέχρι τώρα πεποίθηση ότι η μεταγραφική ρύθμιση του DI στο κύτταρο ΠΑΟ είναι σημαντική για την πλευρική αναστολή (Heitzler and Simpson, 1991, Koelzer and Klein, 2003; Schweisguth and Posakony, 1994). Αντιθέτως, μετα-μεταγραφικά υπάρχει ρύθμιση των δεσμευτών του N, η οποία ενδεχομένως παίζει ρόλο στην σωστή σηματοδοτική ενεργοποίηση. Ίσως η μεταγραφική ρύθμιση κάποιου άλλου μορίου πχ της λιγάσης ουβικουϊτίνης Neur (το Mib1 δεν είναι πολύ πιθανό να ρυθμίζεται μεταγραφικά στα κύτταρα ΠΑΟ, γιατί εκφράζεται ομοιόμορφα στο επιθήλιο) να είναι απαραίτητη, ώστε να επιτυγχάνεται η πλευρική αναστολή.

Μήπως λοιπόν η χωροχρονική ρύθμιση της πλευρικής αναστολής στον προνευρικό συναθροισμό είναι αποτέλεσμα της μεταγραφικής ρύθμισης του *neur*; Από το πείραμα της εικόνας 3.20 φαίνεται ότι η ομοιόμορφη έκφραση του *neur* στον προνευρικό συναθροισμό παρουσιάζει ποικιλομορφία φαινοτύπων ανάλογα με την ακριβή διαδικασία η οποία μελετάται: α) στην περίπτωση των μακροχαιτών, το κύτταρο ΠΑΟ γεννιέται κανονικά (παρατηρήθηκε μικρότερο μήκος της μακροχαιτής στο ενήλικο, σαν να καθορίστηκε με καθυστέρηση από τον προνευρικό συναθροισμό (Huang et al., 1991), αλλά δεν μελετήθηκε ο φαινότυπος αυτός με χρήση μοριακών μαρτύρων στον αναπτυξιακό δίσκο της προνύμφης), β) στις μικροχαιτές δεν “σώζεται” πλήρως ο ισχυρά νευρογόνος φαινότυπος της απώλειας του γονιδίου, αλλά υπάρχει βελτιωμένη εικόνα όσον αφορά στην πλευρική αναστολή (ακατάστατες μικροχαιτές καθορίζονται, αλλά μπορούν να σηματοδοτούν στα γύρω τους κύτταρα, όπως φαίνεται από το γεγονός ότι τα κύτταρα ΠΑΟ που διατηρούν αποστάσεις το ένα από το άλλο) και γ) στις μακροχαιτές του εμπρόσθιου περιθωρίου του φτερού η ομοιόμορφη έκφραση του διαγονιδίου δεν καταφέρνει να σώσει τον νευρογόνο φαινότυπο.

Όπως φάνηκε, τα σημαντικότερα μόρια για την επιτυχή πλευρική αναστολή των μακροχαιτών είναι ο δεσμευτής DI και η λιγάση ουβικουϊτίνης Neur: ελλείπει και των δύο, η πλευρική αναστολή είναι αδύνατη (ισχυρός νευρογόνος φαινότυπος) και όταν το κάθε μόριο απουσιάζει μεμονωμένα, η διαδικασία γίνεται με μικρή επιτυχία (μέτριος νευρογόνος φαινότυπος). Μία πιθανότητα που θα μπορούσε να εξηγήσει το συνδυαστικό αυτό αποτέλεσμα, θα ήταν η ανάγκη για διπλή μεταγραφική ρύθμιση: τόσο του δεσμευτή DI όσο και της λιγάσης

Neur. Με τον τρόπο αυτό, θα υπήρχε μια δικλείδα ασφαλείας για τη διαδικασία που θα εξασφάλιζε την σωστή ενεργοποίηση του μονοπατιού μόνο στα πρόδρομα κύτταρα των αισθητηρίων οργάνων. Ο έλεγχος της παραπάνω υπόθεσης έγινε πειραματικά με διπλούς *neur* *Df* μιτωτικούς κλώνους, οι οποίοι υπερεκφράζουν ομοιόμορφα *neur* μαζί με *Df* ως διαγονίδια (Πίνακας 3.3). Η πλευρική αναστολή των μακροχαιτών γίνεται κανονικά στην περίπτωση αυτή, γεγονός που υποδεικνύει ότι κάποιος άλλος παράγοντας είναι υπεύθυνος για αυτήν την ασυμμετρία. Η αναζήτηση αυτού θα αποτελέσει ενδιαφέρον ερώτημα για το μέλλον.

3. Ουβικουϊτινυλίωση και σηματοδότηση Notch

Από την πληροφορία που έχει προκύψει το τελευταίο διάστημα φαίνεται ότι η ρύθμιση του μονοπατιού N με ουβικουϊτινυλίωση παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία του. Επηρεάζει την αποστολή και τη λήψη του σήματος N και διαφορετικές λιγάσες ουβικουϊτίνης χρησιμοποιούνται σε κάθε περίπτωση (Lai, 2002; Le Borgne et al., 2005a). Παρακάτω, συζητούνται θέματα που προέκυψαν τόσο από την συγκεκριμένη εργασία, όσο και από εργασίες άλλων σχετικά με το θέμα. Στην Εικόνα 4.3 φαίνονται διαγραμματικά οι περισσότερες E3 λιγάσες ουβικουϊτίνης που στοχεύουν είτε τον ίδιο τον υποδοχέα N, είτε τους δεσμευτές του.

3.1. Η ουβικουϊτινυλίωση είναι απαραίτητη για την αποστολή του σήματος

Η ρόλος του *neur* στη διαδικασία της πλευρικής αναστολής ήταν από χρόνια γνωστός (Lehman et al., 1983). Στη συγκεκριμένη εργασία αποκαλύφθηκε η δράση μίας ακόμη λιγάσας ουβικουϊτίνης, της Mib1, σε αυτή τη διαδικασία. Το ομόλογο του *mib1* στο zebrafish παίζει ρόλο στην πλευρική αναστολή (Bingham et al., 2003; Chen and Corliss, 2004; Itoh et al., 2003), αλλά η δράση του δροσοφιλικού μορίου ήταν μέχρι πρότινος άγνωστη. Δείξαμε ότι το Mib1 έχει πλεονάζουσα δράση με το Neur. Η έλλειψη και των δύο λιγασών ουβικουϊτίνης *neur* και *mib1* οδηγεί σε νευρογόνο φαινότυπο τέτοιας έντασης, όσο και η απόλυτη έλλειψη των δεσμευτών ή του ίδιου του υποδοχέα N. Συνεπώς και τα δύο μόρια είναι απαραίτητα για την πλευρική αναστολή, ώστε οι δεσμευτές του N να έχουν πλήρη λειτουργικότητα. Επιπλέον, ενώ το *neur* εκφράζεται σε περιορισμένο αριθμό κυττάρων στο δίσκο του φτερού (ΠΑΟ), η έκφραση του *mib* είναι πιο ευρεία και από τον φαινότυπο της έλλειψης λειτουργίας του (Lai et al., 2005; Le Borgne et al., 2005b) (ανύπαρκτα φτερά και μάτια, κοντά πόδια) φαίνεται ότι δρα και σε

διαδικασίες που δεν απαιτούν *neur*. Επιπλέον, η παρουσία του *mib2* στη Δροσόφιλα ίσως σημαίνει ότι και άλλες λιγάσες ουβικουϊτίνης παίζουν ρόλο σε διάφορες θέσεις ενεργοποίησης του μονοπατιού N.

Πριν τον χαρακτηρισμό του *mib1*, είχε υποτεθεί ότι οι DSL πρωτεΐνες μπορούν να δράσουν χωρίς ουβικουϊτινυλίωση και ότι το *neur* απλώς βοηθούσε τη δράση του *DI*. Δείξαμε ότι τόσο στην πλευρική αναστολή, όσο και στην επαγωγή του περιθωρίου του φτερού, οι DSL πρωτεΐνες δεν μπορούν να δράσουν απουσία ουβικουϊτινυλίωσης (Pitsouli and Delidakis, 2005). Στην περίπτωση του περιθωρίου του φτερού, το *mib1* είναι απαραίτητο, γιατί το *neur* δεν εκφράζεται. Σε *mib1* κλώνους διακόπτεται η δημιουργία το περιθωρίου και ακόμη και μετά από υπερέκφραση κανένας από τους δύο δεσμευτές του N δεν μπορεί να δράσει. Η δραστηριότητα των DSL πρωτεϊνών επανέρχεται, αν στους κλώνους εκφραστεί *neur*, γεγονός που αποδεικνύει την πλεονάζουσα δράση των δύο μορίων και την απαίτηση για ουβικουϊτινυλίωση στην αποστολή του σήματος (στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Wang and Struhl, 2005).

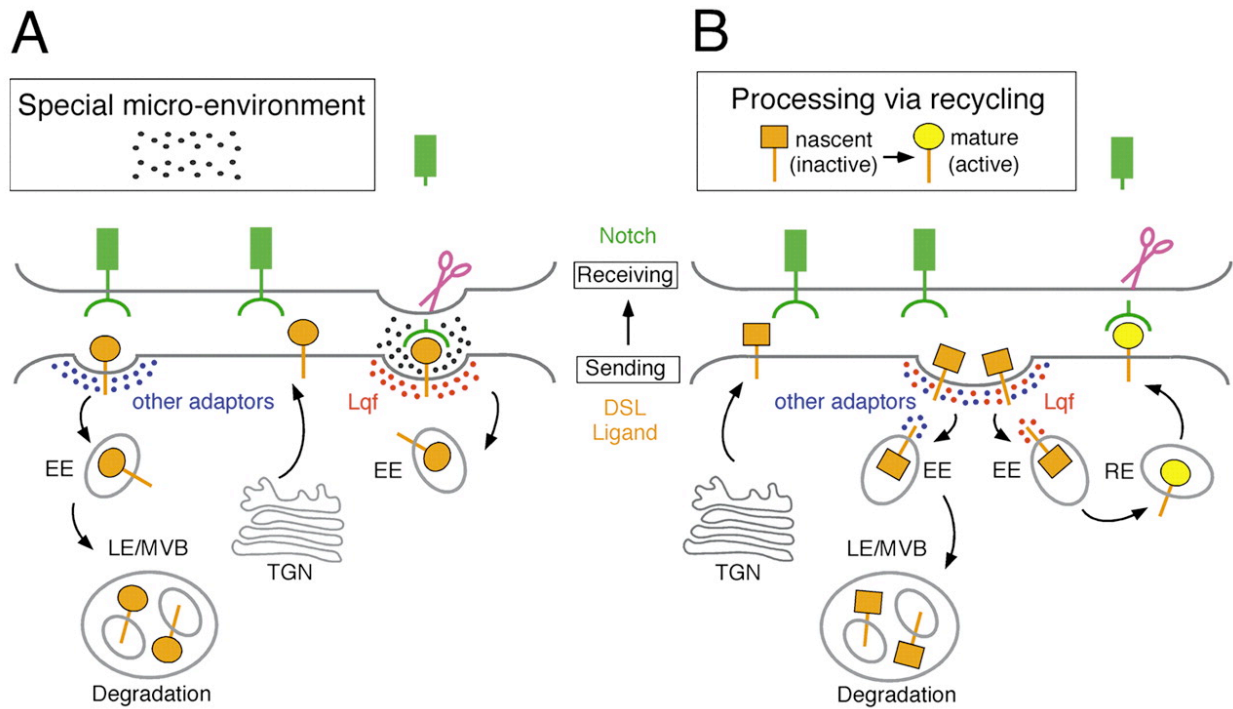
Η ανάγκη για ουβικουϊτινυλίωση συμφωνεί με την πολύ πρόσφατη αποκάλυψη του ρόλου της εψίνης *liquid facets (lqf)* στην αποστολή του σήματος N (Overstreet et al., 2004; Tian et al., 2004; Wang and Struhl, 2004). Η *Lqf* έχει δύο μοτίβα UIM (Μοτίβα αλληλεπίδρασης με ουβικουϊτίνη: Ubiquitin Interacting Motifs), τα οποία χρησιμεύουν για την στρατολόγηση φορτίου σε καλυμμένα με κλαθρίνη εγκολλώματα (Polo et al., 2002; Wendland, 2002). Μιτωτικοί κλώνοι *lqf*, οι οποίοι υπερεκφράζουν *UAS-DI* ή *UAS-Ser* δεν είναι ικανοί να αποστείλουν το σήμα και να ενεργοποιήσουν γονίδια-στόχους, όπως το *cut*, στον δίσκο του φτερού. Αντιθέτως, η λήψη του σήματος γίνεται κανονικά, καθώς οι *lqf* κλώνοι είναι ικανοί να ενεργοποιήσουν *cut* στα όριά τους, όταν βρίσκονται δίπλα από κλώνους που υπερεκφράζουν τους δεσμευτές.

Η εψίνη αναγνωρίζει μονο-ουβικουϊτινυλιωμένα μόρια στην πλασματική μεμβράνη και συνεπώς η δράση της έπεται της δράσης των λιγασών ουβικουϊτίνης (Wang and Struhl, 2005). Επιπλέον, όταν ελέγχθηκαν χμαιρικά μόρια *DI*, τα οποία έχουν κάποιο άλλο ενδοκυττάριο τμήμα, που αντιστοιχεί είτε στον LDLR (DI^{LDLR}), είτε σε κάποιο τυχαίο πεπτίδιο R^+ (DI^{R^+}) και μπορούν να ενδοκυττωθούν με ανεξάρτητο μηχανισμό από *neur* και *mib1* δείχθηκε ότι είναι δραστηρικά στη σηματοδότηση σε αγρίου τύπου γενετικό υπόβαθρο (επαγωγή εκτοπικού *cut* στον δίσκο του φτερού). Και τα δύο χμαιρικά μόρια ενδοκυττώνονται, ενώ μόνο το δεύτερο περιέχει κατάλοιπα λυσίνης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θέσεις για ουβικουϊτινυλίωση και όταν μεταλλαγούν, η ενεργότητά τους καταστρέφεται (δεν επάγεται *cut*). Επιπλέον, ενώ το DI^{R^+} δεν

είναι ικανό να σηματοδοτήσει απουσία εψίνης (χρειάζεται η εψίνη για να αναγνωριστεί η ουβικουϊτινυλιωμένη ισομορφή), το DI^{DLR} δρα ανεξάρτητα από την εψίνη, καθώς ενδοκυττώνεται, αλλά δεν ουβικουϊτινυλιώνεται. Συνεπώς, η ενδοκύττωση είναι σημαντική για τη σηματοδότηση με όποιον τρόπο κι αν επιτυγχάνεται, αλλά η ουβικουϊτινυλίωση είναι απαραίτητη για την εξαρτώμενη από εψίνη σηματοδότηση (Wang and Struhl, 2004).

Η ουβικουϊτινυλίωση και ενδοκύττωση των DSL δεσμευτών που είναι απαραίτητη για τη σηματοδότηση N και στη Δροσόφιλα επιτυγχάνεται μέσω των *neur* και *mib1*. Τα τελευταία δρουν στα ενδοκυττάρια τμήματα των δεσμευτών και είναι απαραίτητα για την σηματοδότηση N. Επίσης, κλώνοι οι οποίοι υπερεκφράζουν DI^{R+} σε *mib⁻* γενετικό υπόβαθρο διατηρούν την ικανότητά τους να ενεργοποιούν τη σηματοδότηση, γεγονός που αποδεικνύει για ακόμη μία φορά ότι η ουβικουϊτινυλίωση/ ενδοκύττωση είναι απαραίτητη για σηματοδότηση (Wang and Struhl, 2005).

Τα δύο πιθανά μοντέλα (Εικ. 4.2) για την αποστολή του σήματος, που ενσωματώνουν όλη την πληροφορία που έχει προκύψει τους τελευταίους μήνες για την αποστολή του σήματος N, είναι τα εξής: α) οι DSL πρωτεΐνες ενεργοποιούνται μέσω ουβικουϊτινυλίωσης στην πλασματική μεμβράνη (πχ δημιουργούνται ενεργά συσσωματώματα των δεσμευτών πάνω στη μεμβράνη του κυττάρου που αποστέλλει το σήμα), αλληλεπιδρούν με το εξωκυττάριο τμήμα του N του απέναντι κυττάρου και στη συνέχεια ενδοκυττώνονται ή β) οι DSL πρωτεΐνες χρειάζονται ουβικουϊτινυλίωση για να ενδοκυττωθούν και να ενεργοποιηθούν σε ένα ενδοκυττάριο διαμέρισμα, ενώ στη συνέχεια με μία διαδικασία ανακύκλωσης επανέρχονται ως ενεργοποιημένα μόρια στην επιφάνεια του κυττάρου, όπου θα αλληλεπιδράσουν με το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα N.



Εικόνα 4.2: Μοντέλα ενεργοποίησης του μονοπατιού N

Δύο πιθανά μοντέλα δείχνονται, τα οποία διαφέρουν ως προς τη χρονική στιγμή που ενεργοποιείται το N, είτε (A) σε πρώιμα ενδοκυττωτικά γεγονότα που οδηγούν στην συσσώρευση του δεσμευτή σε ειδικές θέσεις στην μεμβράνη, είτε (B) σε μία μεταγενέστερη ενεργοποίηση που εξαρτάται από ανακύκλωση ενεργών μορίων του δεσμευτή στην πλασματική μεμβράνη (B). Και στα δύο μοντέλα η ουβικουιτίνυλίωση από Neur και Mib1 λειτουργεί ως σήμα για μία διαδικασία ενδοκύττωσης και η δράση της εμίνης είναι απαραίτητη για τα μεταγενέστερα στάδια που οδηγούν στην ενεργοποίηση του δεσμευτή για την αποστολή του σήματος.









3.2. Η ουβικουϊτινυλίωση είναι απαραίτητη για την λήψη του σήματος

Η ανάγκη για ενδοκύττωση όχι μόνο κατά την αποστολή, αλλά και κατά τη λήψη του σήματος N φάνηκε από τον χαρακτηρισμό της μεταλλαγής *shibire* (Seugnet et al., 1997), αλλά η συσχέτιση με ουβικουϊτινυλίωση έγινε πριν από περίπου ένα χρόνο. Τότε δείχθηκε ότι για να ενεργοποιηθεί ο υποδοχέας N με πρωτεόλυση από την γ -σεκρετάση, πρέπει να μονοουβικουϊτινυλιωθεί από μία άγνωστη για την ώρα λιγάση ουβικουϊτίνης (Gupta-Rossi et al., 2004). Η τροποποίηση αυτή οδηγεί σε ενδοκύττωση του υποδοχέα και πιστεύεται ότι η πρωτεόλυση από πρεσενιλίνη γίνεται σε κάποιο ενδοκυττάριο διαμέρισμα. Ωστόσο, αυτό το μοντέλο δεν έχει ακόμη αποδειχθεί.

Η πρώτη E3 λιγάση ουβικουϊτίνης που ανακαλύφθηκε ότι στοχεύει το N είναι η Deltex (Dx), η οποία αλληλεπιδρά με το N και χρειάζεται για τη σηματοδοτική ενεργοποίησή του κατά έναν τρόπο μάλιστα ανεξάρτητο από την παρουσία των δεσμευτών και του Su(H). Πρόσφατα δείχθηκε ότι το Dx είναι απαραίτητο για την ενδοκύττωση του υποδοχέα N και την μετακίνησή του σε ένα διαμέρισμα θετικό για Rab11, δηλαδή σε κυστίδια ανακύκλωσης (Hori et al., 2004; Wilkin et al., 2004), αλλά ακόμη δεν έχει γίνει σαφής ο ρόλος της εν λόγω τροποποίησης *in vivo*.

Πολύ πρόσφατα χαρακτηρίστηκαν δύο ακόμη E3 λιγάσες ουβικουϊτίνης που στοχεύουν το N, η Suppressor of Deltex [Su(Dx) στη Δροσόφιλα ή Itch/AIP4 στα θηλαστικά] και η Nedd4. Και οι δύο φαίνεται ότι χρησιμεύουν για την διαλογή και στόχευση του N από το πρώιμο ενδόσωμα σε ένα διαμέρισμα θετικό για Rab7, δηλαδή όψιμο ενδόσωμα, όπου ο υποδοχέας πρωτεολύεται, ώστε να ρυθμιστούν τα επίπεδά του (Sakata et al., 2004; Wilkin et al., 2004). Η δράση τους στη σηματοδότηση είναι αρνητική και μάλλον απαιτούνται για να διατηρούνται τα επίπεδα του N χαμηλά, ώστε να μην υπάρχει τυχαία ενεργοποίηση λόγω βασικής ανεξάρτητης από δεσμευτές ενεργότητας.

Η ρύθμιση του N από ουβικουϊτινυλίωση είναι ένα πολύ ενδιαφέρον πεδίο και πολλά μένουν να ανακαλυφθούν ακόμη.

Δροσόφιλα	Θηλαστικά	Ρόλος στη σηματοδότηση Notch
Mib1 ή D-Mib  Mib2 ή Mib-related 	Mind-bomb Skeletrophin	Ουβικουτίνυλίωση και ενδοκύττωση DI και Ser Ενεργοποίηση της αποστολής του σήματος (Itoh et al, 2003, Chen et al, 2004, Lai et al, 2005, Le Borgne et al, 2005, Koo et al, 2005, Pitsouli and Delidakis, 2005) Αλληλεπιδρά με DI και Jag (Koo et al, 2005a, Tacheuchi et al, 2005)
Neuralized 	Neuralized 1-2	Ουβικουτίνυλίωση και ενδοκύττωση DI και Ser Ενεργοποίηση της αποστολής του σήματος (Yeh et al, 2001, Lai et al, 2001, Deblandre et al, 2001, Pavlopoulos et al, 2001, Le Borgne et al, 2005, Wang et al, 2005, Pitsouli and Delidakis, 2005)
Deltex 	Deltex 1-4	Ουβικουτίνυλίωση και ενδοκύττωση του N Στόχευση σε ένα διαμέρισμα που περιέχει Rab11 (Hori et al, 2004, Wilkin et al, 2004)
Su(dx)  Nedd4 	Itch/AIP4 Nedd4	Ουβικουτίνυλίωση και ενδοκύττωση του N Στόχευση σε ένα διαμέρισμα που περιέχει Rab7 Αποικοδόμηση στο λυσόσωμα (Qui et al, 2000, Sakata et al, 2004, Wilkin et al, 2004)
D-smurf 	Smurf	Άγνωστος
Cbl 	Cbl	Αλληλεπιδρά με το N1 και με AIP4/Itch Αποικοδόμηση του N1 στο λυσόσωμα (Jehn et al, 2002)



Εικόνα 4.3: Δομή και λειτουργία των λιγασών ουβικουτίνης που συμμετέχουν στη σηματοδότηση Notch

Στην εικόνα φαίνονται οι διαφορετικές E3 λιγασές, οι οποίες έχουν χαρακτηριστεί λιγότερο ή περισσότερο και τα ομόλογά τους στη Δροσόφιλα και στα σπονδυλωτά. Οι πρωτεΐνες αυτές εμπλέκονται στη σηματοδότηση N στοχεύοντας τον ίδιο τον υποδοχέα ή τους δεσμευτές του.

Τέσσερες οικογένειες E3 λιγασών ουβικουτίνης έχουν περιγραφεί: α) E3 με δάκτυλο RING, β) E3 με μοτίβο HECT, γ) E3 με μοτίβο F-box (τύπου SCF/Cullin) και δ) E3 με U-box

Στην εικόνα φαίνονται οι E3 λιγασές που εμπλέκονται στη σηματοδότηση N και ανήκουν στις δύο πρώτες οικογένειες.

Εκτός από τις E3 λιγασές ουβικουτίνης που παρουσιάζονται στον παραπάνω πίνακα, πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχει επίσης η Sel10/Ago, η οποία στοχεύει το N στον πυρήνα. Η εν λόγω ανήκει στην οικογένεια F-box.

4. Ο ρόλος του δακτύλου RING

Από την εργασία των Lai et al εξήχθη το συμπέρασμα ότι το ελλειμματικό μόριο *neurΔR* είναι επικρατές αρνητικό, καθώς η υπερέκφρασή του οδηγεί σε φαινοτύπους που μοιάζουν με απώλεια του σήματος N (κοψίματα στα φτερά, υπεραριθμία χαιτών στο θώρακα) (Lai and Rubin, 2001a).

Αντίθετα με τα παραπάνω, από τα αρχικά μας πειράματα (Παυλόπουλος Η., διδακτορική διατριβή) φάνηκε ότι η έλλειψη του δακτύλου RING του *Neur* δεν είναι αρνητική: τα κύτταρα που εκφράζουν το ελλειμματικό αυτό μόριο μπορούν να αποστείλουν το σήμα του D1 όπως και τα κύτταρα που εκφράζουν το πλήρους μήκους μόριο (Pavlopoulos et al., 2001). Επιπλέον, η έκφραση του ελλειμματικού *NeurΔR* είναι ικανή να “σώσει” το νευρογόνο φαινότυπο της έλλειψης του γονιδίου, τόσο στο έμβρυο, όσο και στα κύτταρα ΠΑΟ της προνύμφης, κάτι που δεν θα συνέβαινε αν είχε αρνητική δράση (Εικ. 3.20). Παρατηρήσαμε ότι το *NeurΔR* βλάπτει τη σηματοδότηση N, όταν εκφράζεται σε κύτταρα που δέχονται το σήμα (πχ στα κύτταρα του περιθωρίου του φτερού), ενώ ευνοεί αυτήν, όταν εκφράζεται στα κύτταρα-πομπούς (πχ εκατέρωθεν του ραχιαοκοιλιακού ορίου και στα κύτταρα ΠΑΟ). Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει ότι το *neur* έχει διπλό ρόλο: για την αποστολή του σήματος ο δάκτυλος RING δεν απαιτείται, ενώ για την λήψη είναι σημαντικός. Από τα πείραμα της Εικόνας 3.21 φαίνεται ότι η παρουσία ενός από τους δύο δεσμευτές του N είναι απαραίτητη για την παρεμπόδιση της λήψης του σήματος, γεγονός που παραπέμπει στην λειτουργική αλληλεπίδραση του δεσμευτή με το ελλειμματικό *NeurΔR* και τον υποδοχέα N (ίσως δημιουργούνται ανενεργά σύμπλοκα υποδοχέα-δεσμευτή *in cis* και έτσι εμποδίζεται η ενεργοποίηση του N/ σύμπλοκα που περιλαμβάνουν και τις τρεις πρωτεΐνες είναι παρόντα στην επιφάνεια των κυττάρων που τα εκφράζουν (Εικ. 3.28). Συνεπώς, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι το *neur* ελαττώνει την *cis*-αρνητική δράση των δεσμευτών, εξαιτίας της ικανότητάς του να προκαλεί την ουβικουιτινυλίωση και ενδοκύττωσή τους (στην Εικ. 3.5 φαίνεται μάλιστα η ελάττωση της αρνητικής δράσης του υψηλού D1 ως ενεργοποίηση του μονοπατιού μέσα στην περιοχή της υπερέκφρασης). Αντιθέτως, το ελλειμματικό *neurΔR* αυξάνει αυτήν την *cis*-αρνητική δράση των δεσμευτών και ενώ βοηθά στην αποστολή του σήματος N, εμποδίζει την λήψη του (και στην ενεργοποίηση του *wg/cut* στο φτερό και στην πλευρική αναστολή).

Παρά το γεγονός ότι δεν έχουμε καταφέρει να ανιχνεύσουμε την πρωτεΐνη *Neur* σε κύτταρα διαφορετικά από τα κύτταρα ΠΑΟ στον δίσκο του φτερού, υπάρχουν ενδείξεις ότι το γονίδιο μπορεί να εκφράζεται σε περισσότερα από ένα κύτταρα του προνευρικού συναθροισμού (Huang

et al. 1991, όπου δείχνεται ότι σε κάποιες περιπτώσεις η παγίδα ενισχυτή *neur*^{A101}-*lacZ* εκφράζεται σε δύο ή τρία “αναποφάσιστα” κύτταρα πριν από τον καθορισμό του ΠΑΟ). Επιπλέον, ο διπλός ρόλος του *neurΔR* στη σηματοδότηση αποτελεί μία ένδειξη για διπλό ρόλο του *neur* κατά την πλευρική αναστολή στα κύτταρα του προνευρικού συναθροισμού. Ένα μοντέλο, το οποίο θα μπορούσε να ισχύει για την πλευρική αναστολή είναι το ακόλουθο:

Κάποια κύτταρα του προνευρικού συναθροισμού μισο-οδεύουν προς την νευρική τύχη του ΠΑΟ (“προ-ΠΑΟ κύτταρα”). Σε αυτά ενεργοποιούνται τα *Dl* και *neur* μεταγραφικά εξαιτίας του χαμηλού σήματος *N* που δέχονται (το υψηλό *N* σήμα μπλοκάρει τα *Dl* και *neur*). Το υψηλό *Dl* στα προ-ΠΑΟ, εξαιτίας της *cis*-αρνητικής δράσης του, τα κάνει “αναίσθητα” στο *N* σήμα που δέχονται από τα γειτονικά τους, και συνεπώς διαφοροποιούνται περαιτέρω από τα υπόλοιπα κύτταρα του προνευρικού συναθροισμού. Το υψηλό *neur* βοηθάει αυτά τα κύτταρα να αποστέλλουν ακόμη πιο ισχυρό σήμα στα γειτονικά τους. Ωστόσο, και μεταξύ των προ-ΠΑΟ υπάρχει σηματοδότηση *N* (το υψηλό *Dl* τους μπλοκάρει το *N* in *cis*, αλλά ταυτόχρονα δέχονται και υψηλό *N* από έξω). Εξαιτίας του υψηλού *neur* που εκφράζουν, μετριάζεται η *cis*-αρνητική δράση του *Dl* στα προ-ΠΑΟ και επιτρέπεται η λήψη του σήματος. Έτσι τελικά, τα περισσότερα από αυτά δέχονται σήμα *N* σήμα και γίνονται επιδερμικά, ενώ μόνο ένα θα καταφέρει να ξεφύγει από την αναστολή και θα αποκτήσει τη νευρική τύχη του ΠΑΟ.

Όπως προαναφέρθηκε, η αποστολή του σήματος από DSL πρωτεΐνες απαιτεί την ουβικουϊτινυλίωση. Αυτό έγινε προφανές και από τους *mib1* κλώνους που εκφράζουν *Dl* και *ΔR*, οι οποίοι δεν είναι ικανοί να αποστείλουν το σήμα. Συνεπώς, η αποστολή του σήματος απαιτεί *mib1* ή *neur* και ο φαινότυπος της ενεργοποίησης της σηματοδότησης από το ελλειμματικό μόριο *NeurΔR* οφείλεται σε πιθανή αλληλεπίδραση των μορίων με το ενδογενώς εκφραζόμενο ομοιόμορφα *mib1*. Ίσως το *NeurΔR* ξεκινά μια διαδικασία και υποβοηθά το *mib1* στη σηματοδότηση. Πειράματα που θα μελετούν την πιθανή φυσική και λειτουργική αλληλεπίδραση των δύο λιγασών ουβικουϊτίνης θα ξεκαθαρίσουν τη σχέση τους.

5. Κυτταρική διακίνηση του DI και σηματοδότηση

Όταν η σηματοδότηση N παρεμποδίζεται μέσα στον προνευρικό συναθροισμό, το αποτέλεσμα είναι νευρογόνος φαινότυπος, δηλαδή υπεραριθμία κυττάρων ΠΑΟ σε σχέση με επιδερμικά. Ένας τέτοιος φαινότυπος μπορεί να προκύψει μέσα από διαφορετικές οδούς: είτε γιατί καταστρέφεται κάποιο από τα βασικά συστατικά του μονοπατιού, πχ υποδοχέας ή δεσμευτές, είτε γιατί καταστρέφεται κάποιο ρυθμιστικό μόριο και εμποδίζεται κάποια σημαντική λειτουργία στο μονοπάτι, πχ ενδοκύττωση.

Στα πλαίσια της εν λόγω εργασίας, παρατηρήθηκε ότι αν εμποδιστεί η ενδοκύττωση των δεσμευτών του N (*neur⁻mibI*, *UAS-neurΔR*, *UAS-shiDN*), εμποδίζεται και η φυσιολογική ενδοκυτταρική τοποθέτηση της πρωτεΐνης DI. Συγκεκριμένα, αντί η κατανομή της να είναι μεμβρανική και σε κυτταροπλασματικά κυστίδια, γίνεται πολύ έντονη (μεγαλύτερη ποσότητα) και εντοπίζεται σε ένα κυτταρικό διαμέρισμα στην βασική επιφάνεια των εκτοπικών κυττάρων ΠΑΟ (Εικ. 3.31) (αυτό δεν συμβαίνει σε άλλα κύτταρα του επιθηλίου). Μπορεί αυτός ο υποκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης DI στους προνευρικούς συναθροισμούς να μας δώσει κάποια πληροφορία σχετικά με την φυσιολογική κατάσταση στα κύτταρα ΠΑΟ;

Μελετώντας ισχυρά νευρογόνους μιτωτικούς κλώνους *E(spl)*, παρατηρήσαμε ότι η πρωτεΐνη DI αυξάνεται ποσοτικά (ακόμα και εκτός προνευρικών συναθροισμών), αλλά δεν τοποθετείται στην βασική επιφάνεια των εκτοπικών κυττάρων ΠΑΟ. Συνεπώς, ο νευρογόνος φαινότυπος και η τοποθέτηση του DI στη βασική επιφάνεια των ΠΑΟ δεν συσχετίζονται. Όταν όμως οι *E(spl)* κλώνοι είναι μεταλλαγμένοι είτε για *neur* είτε για *mibI*, παρατηρήσαμε ότι μόνο στην πρώτη περίπτωση το DI αλλάζει τοποθέτηση. Επιπλέον, γνωρίζουμε ότι το *Neur* είναι η σημαντικότερη E3 λιγάση για τον προνευρικό συναθροισμό και για την επιτυχή πλευρική αναστολή. Η δράση του έγκειται στην ενδοκύττωση του δεσμευτή και στην αποικοδόμησή του (χαμηλότερα επίπεδα και ενδοκυττωμένο DI στα κύτταρα ΠΑΟ). Όταν παρεμποδιστεί το *Neur* (είτε με μεταλλαγή είτε με την υπερέκφραση του ελλειμματικού *NeurΔR*), γίνεται συσσώρευση του DI στα εκτοπικά κύτταρα ΠΑΟ σε κάποιο ενδοκυτταρικό διαμέρισμα. Ίσως το *Neur* να ουβικουΐτινυλιώνει και να ενδοκυττώνει τον δεσμευτή και στη συνέχεια αυτός να έρχεται σε ένα άλλο υποκυτταρικό διαμέρισμα όπου θα ενεργοποιηθεί πριν παρουσιαστεί στην πλασματική μεμβράνη για να σηματοδοτήσει. Ο χαρακτηρισμός αυτού του διαμερίσματος παραμένει άγνωστος.

Αναφορές

Αναφορές

1. Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., and Fortini, M. E. (1995). Notch Signaling. *Science* 268, 225-232.
2. Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., and Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770-776.
3. Barolo, S., Stone, T., Bang, A.G., and Posakony, J.W. (2002). Default repression and Notch signaling: Hairless acts as an adaptor to recruit the corepressors Groucho and dCtBP to Suppressor of Hairless. *Genes Dev.* 16, 1964-76.
4. Barsi, J.C., Rajendra, R., Wu, J.I., and Artzt, K. (2005). Mind bomb1 is a ubiquitin ligase essential for mouse embryonic development and Notch signaling. *Mech Dev.* 122, 1106-17.
5. Bellen, H. J., Levis, R. W., Liao, G., He, Y., Carlson, J. W., Tsang, G., Evans-Holm, M., Hiesinger, P. R., Schulze, K. L., Rubin, G. M., et al. (2004). The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics* 167, 761-781.
6. Berdnik, D., Torok, T., Gonzalez-Gaitan, M., and Knoblich, J. A. (2002). The endocytic protein alpha-Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in *Drosophila*. *Dev Cell* 3, 221-231.
7. Bingham, S., Chaudhari, S., Vanderlaan, G., Itoh, M., Chitnis, A., and Chandrasekhar, A. (2003). Neurogenic phenotype of *mind bomb* mutants leads to severe patterning defects in the zebrafish hindbrain. *Dev Dyn* 228, 451-463.
8. Blaumueller, C. M., Qi, H., Zagouras, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1997). Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* 90, 281-291.
9. Blochlinger, K., Bodmer, R., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1990). Patterns of expression of Cut, a protein required for external sensory organ development in wild-type and *cut* mutant *Drosophila* embryos. *Genes Dev* 4, 1322-1331.
10. Borden, K. L. (2000). RING domains: master builders of molecular scaffolds? *J Mol Biol* 295, 1103-1112.
11. Boulianne, G. L., de la Concha, A., Campos-Ortega, J. A., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1991). The *Drosophila* neurogenic gene *neuralized* encodes a novel protein and is expressed in precursors of larval and adult neurons. *Embo J* 10, 2975-2983.
12. Boulianne, G. L., de la Concha, A., Campos-Ortega, J. A., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1993). The *Drosophila* neurogenic gene *neuralized* encodes a novel protein and is expressed in precursors of larval and adult neurons. *Embo J* 12, 2586.
13. Brand, A. H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
14. Brand, M., Jarman, A. P., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1993). *asense* is a *Drosophila* neural precursor gene and is capable of initiating sense organ formation. *Development* 119, 1-17.
15. Bray, S. (1998). Notch signalling in *Drosophila*: three ways to use a pathway. *Semin Cell Dev Biol* 9, 591-597.
16. Brook, W. J., and Cohen, S. M. (1996). Antagonistic interactions between *wingless* and *decapentaplegic* responsible for dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* Leg. *Science* 273, 1373-1377.
17. Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., Cumano, A., Roux, P., Black, R. A., and Israel, A. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* 5, 207-216.

18. Bruckner, K., Perez, L., Clausen, H., and Cohen, S. (2000). Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* 406, 411-415.
19. Chan, Y. M., and Jan, Y. N. (1999). Presenilins, processing of beta-amyloid precursor protein, and Notch signaling. *Neuron* 23, 201-204.
20. Chen, F., Yu, G., Arawaka, S., Nishimura, M., Kawarai, T., Yu, H., Tandon, A., Supala, A., Song, Y. Q., Rogaeva, E., *et al.* (2001). Nicastrin binds to membrane-tethered Notch. *Nat Cell Biol* 3, 751-754.
21. Chen, N., and Greenwald, I. (2004). The lateral signal for LIN-12/Notch in *C. elegans* vulval development comprises redundant secreted and transmembrane DSL proteins. *Dev Cell* 6, 183-92.
22. Chen, W., and Corliss, D. C. (2004). Three modules of zebrafish Mind bomb work cooperatively to promote Delta ubiquitination and endocytosis. *Dev Biol* 267, 361-373.
23. Cho, K. O., and Choi, K. W. (1998). Fringe is essential for mirror symmetry and morphogenesis in the *Drosophila* eye. *Nature* 396, 272-276.
24. Ciechanover, A., Orian, A., and Schwartz, A. L. (2000). The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: Mode of action and clinical implications. *J Cell Biochem* 77, 40-51.
25. Cubas, P., de Celis, J.-F., Campuzano, S., and Modolell, J. (1991). Proneural clusters of *achaete-scute* expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc. *Genes & Development* 5, 996-1008.
26. Cui, X. Y., Hu, Q. D., Tekaya, M., Shimoda, Y., Ang, B. T., Nie, D. Y., Sun, L., Hu, W. P., Karsak, M., Duka, T., *et al.* (2004). NB-3/Notch1 pathway via Deltex1 promotes neural progenitor cell differentiation into oligodendrocytes. *J Biol Chem* 279, 25858-25865.
27. Culi, J., and Modolell, J. (1998). Proneural gene self-stimulation in neural precursors: an essential mechanism for sense organ development that is regulated by Notch signaling. *Genes Dev* 12, 2036-2047.
28. de Celis, J. F., and Bray, S. (1997). Feed-back mechanisms affecting Notch activation at the dorsoventral boundary in the *Drosophila* wing. *Development* 124, 3241-3251.
29. de Celis, J. F., Bray, S., and Bellido, A. G. (1996). Activation and function of *Notch* at the dorsoventral boundary in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* 122, 359-369.
30. de Celis, J. F., Tyler, D. M., de Celis, J., and Bray, S. J. (1998). Notch signalling mediates segmentation of the *Drosophila* leg. *Development* 125, 4617-4626.
31. De Jossineau, C., Soule, J., Martin, M., Anguille, C., Montcourrier, P., and Alexandre, D. (2003). Delta-promoted filopodia mediate long-range lateral inhibition in *Drosophila*. *Nature* 426, 555-559.
32. de la Concha, A., Dietrich, U., Weigel, D., and Campos-Ortega, J. A. (1988). Functional interactions of neurogenic genes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 118, 499-508.
33. De Strooper, B. (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* 38, 9-12.
34. Deblandre, G. A., Lai, E. C., and Kintner, C. (2001). *Xenopus* Neuralized is a ubiquitin ligase that interacts with XDelta1 and regulates Notch signaling. *Dev Cell* 1, 795-806.
35. Delidakis, C., Preiss, A., Hartley, D. A., and Artavanis-Tsakonas, S. (1991). Two genetically and molecularly distinct functions involved in early neurogenesis reside

- within the *Enhancer of split* locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* *129*, 803-823.
36. Diederich, R. J., Matsuno, K., Hing, H., and Artavanis-Tsakonas, S. (1994). Cytosolic interaction between Deltex and Notch ankyrin repeats implicates Deltex in the Notch signaling pathway. *Development* *120*, 473-481.
 37. Doherty, D., Feger, G., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1996). Delta is a ventral to dorsal signal complementary to Serrate, another Notch ligand, in *Drosophila* wing formation. *Genes & Development* *10*, 421-434.
 38. Dollar, G., Struckhoff, E., Michaud, J., and Cohen, R. S. (2002). Rab11 polarization of the *Drosophila* oocyte: a novel link between membrane trafficking, microtubule organization, and oskar mRNA localization and translation. *Development* *129*, 517-526.
 39. Dominguez, M., and de Celis, J. F. (1998). A dorsal/ventral boundary established by Notch controls growth and polarity in the *Drosophila* eye. *Nature* *396*, 276-278.
 40. Eiraku, M., Tohgo, A., Ono, K., Kaneko, M., Fujishima, K., Hirano, T., and Kengaku, M. (2005). DNER acts as a neuron-specific Notch ligand during Bergmann glial development. *Nat Neurosci.* *8*, 873-880.
 41. Esler, W. P., Kimberly, W. T., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Diehl, T. S., Selkoe, D. J., and Wolfe, M. S. (2002). Activity-dependent isolation of the presenilin- gamma -secretase complex reveals nicastrin and a gamma substrate. *Proc Natl Acad Sci USA* *99*, 2720-2725.
 42. Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G., and Bishop, J. M. (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human *c-myc* proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* *5*, 3610-3616.
 43. Fehon, R. G., Kooh, P. J., Rebay, I., Regan, C. L., Xu, T., Muskavitch, M. A. T., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). Molecular Interactions between the Protein Products of the Neurogenic Loci *Notch* and *Delta*, Two EGF-Homologous Genes in *Drosophila*. *Cell* *61*, 523-534.
 44. Fleming, R. J. (1998). Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Semin Cell Dev Biol* *9*, 599-607.
 45. Fortini, M. E. (2002). Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* *3*, 673-684.
 46. Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D. A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M. C., *et al.* (2002). *aph-1* and *pen-2* are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell* *3*, 85-97.
 47. Freemont, P. S. (2000a). RING for destruction? *Curr Biol* *10*, R84-87.
 48. Freemont, P. S. (2000b). Ubiquitination: RING for destruction? *Current Biology* *10*, R84-R87.
 49. Gho, M., Bellaiche, Y., and Schweisguth, F. (1999). Revisiting the *Drosophila* microchaete lineage: a novel intrinsically asymmetric cell division generates a glial cell. *Development* *126*, 3573-3584.
 50. Gonzalez-Gaitan, M. (2003). Endocytic trafficking during *Drosophila* development. *Mech Dev.* *120*, 1265-82.
 51. Goutte, C., Tsunozaki, M., Hale, V. A., and Priess, J. R. (2002). APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* *99*, 775-779.
 52. Greenwald, I. (1998). LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev* *12*, 1751-1762.

53. Gu, Y., Hukriede, N. A., and Fleming, R. J. (1995). *Serrate* expression can functionally replace *Delta* activity during neuroblast segregation in the *Drosophila* embryo. *Development* *121*, 855-865.
54. Gupta-Rossi, N., Six, E., LeBail, O., Logeat, F., Chastagner, P., Olry, A., Israel, A., and Brou, C. (2004). Monoubiquitination and endocytosis direct gamma-secretase cleavage of activated Notch receptor. *J Cell Biol* *166*, 73-83.
55. Harlow, E., and Lane, D. (1988). *Antibodies, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, USA
56. Harlow, E., and Lane, D. (1999). *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA
57. Heitzler, P., Bourouis, M., Ruel, L., Carteret, C., and Simpson, P. (1996). Genes of the *Enhancer of split* and *achaete-scute* complexes are required for a regulatory loop between *Notch* and *Delta* during lateral signalling in *Drosophila*. *Development* *122*, 161-171.
58. Heitzler, P., and Simpson, P. (1991). The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*. *Cell* *64*, 1083-1092.
59. Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* *67*, 425-479.
60. Hicke, L. (1999). Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol* *9*, 107-112.
61. Hicke, L., and Dunn, R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. *19*, 141-72.
62. Hori, K., Fostier, M., Ito, M., Fuwa, T. J., Go, M. J., Okano, H., Baron, M., and Matsuno, K. (2004). *Drosophila* Deltex mediates suppressor of Hairless-independent and late-endosomal activation of Notch signaling. *Development* *131*, 5527-5537.
63. Hu, Q. D., Ang, B. T., Karsak, M., Hu, W. P., Cui, X. Y., Duka, T., Takeda, Y., Chia, W., Sankar, N., Ng, Y. K., *et al.* (2003). F3/contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation. *Cell* *115*, 163-175.
64. Hu, Y., Ye, Y., and Fortini, M. E. (2002). Nicastrin is required for gamma-secretase cleavage of the *Drosophila* Notch receptor. *Dev Cell* *2*, 69-78.
65. Huang, F., Dambly-Chaudiere, C., and Ghysen, A. (1991). The emergence of sense organs in the wing disc of *Drosophila*. *Development* *111*, 1087-1095.
66. Huppert, S. S., Jacobsen, T. L., and Muskavitch, M. A. (1997). Feedback regulation is central to Delta-Notch signalling required for *Drosophila* wing vein morphogenesis. *Development* *124*, 3283-3291.
67. Hutterer, A., and Knoblich, J.A. (2005). Numb and alpha-Adaptin regulate Sanpodo endocytosis to specify cell fate in *Drosophila* external sensory organs. *EMBO Rep.* *6*, 836-42.
68. Irvine, K., and Wieshaus, E. (1995). Fringe, a boundary specific signalling molecule, mediates interactions between dorsal and ventral cells during *Drosophila* wing development. *Cell* *79*, 595-606.
69. Irvine, K. D. (1999). Fringe, Notch, and making developmental boundaries. *Curr Opin Genet Dev* *9*, 434-441.
70. Itoh, M., Kim, C. H., Palardy, G., Oda, T., Jiang, Y. J., Maust, D., Yeo, S. Y., Lorick, K., Wright, G. J., Ariza-McNaughton, L., *et al.* (2003). Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Dev Cell* *4*, 67-82.
71. Jackson, P. K., Eldridge, A. G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J. Y., Kaiser, B. K., and Reimann, J. D. (2000). The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol* *10*, 429-439.

72. Jehn, B. M., Dittert, I., Beyer, S., von der Mark, K., and Bielke, W. (2002). c-Cbl binding and ubiquitin-dependent lysosomal degradation of membrane-associated Notch1. *J Biol Chem* *277*, 8033-8040.
73. Jennings, B., Preiss, A., Delidakis, C., and Bray, S. (1994). The Notch signalling pathway is required for *Enhancer of split* bHLH protein expression during neurogenesis in the *Drosophila* embryo. *Development* *120*, 3537-3548.
74. Jhaveri, D., Sen, A., Reddy, G. V., and Rodrigues, V. (2000). Sense organ identity in the *Drosophila* antenna is specified by the expression of the proneural gene *atonal*. *Mech Dev* *99*, 101-111.
75. Joazeiro, C. A., and Weissman, A. M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* *102*, 549-552.
76. Joazeiro, C. A., Wing, S. S., Huang, H., Levenson, J. D., Hunter, T., and Liu, Y. C. (1999). The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* *286*, 309-312.
77. Kidd, S., and Lieber, T. (2002). Furin cleavage is not a requirement for *Drosophila* Notch function. *Mech Dev* *115*, 41-51.
78. Kimble, J., and Simpson, P. (1997). The LIN-12/Notch signaling pathway and its regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* *13*, 333-361.
79. Klueg, K. M., and Muskavitch, M. A. (1999). Ligand-receptor interactions and trans-endocytosis of Delta, Serrate and Notch: members of the Notch signalling pathway in *Drosophila*. *J Cell Sci* *112 (Pt 19)*, 3289-3297.
80. Klueg, K. M., Parody, T. R., and Muskavitch, M. A. (1998). Complex proteolytic processing acts on Delta, a transmembrane ligand for Notch, during *Drosophila* development. *Mol Biol Cell* *9*, 1709-1723.
81. Koelzer, S., and Klein, T. (2003). A Notch-independent function of Suppressor of Hairless during the development of the bristle sensory organ precursor cell of *Drosophila*. *Development* *130*, 1973-1988.
82. Koo, B. K., Lim, H. S., Song, R., Yoon, M. J., Yoon, K. J., Moon, J. S., Kim, Y. W., Kwon, M. C., Yoo, K. W., Kong, M. P., *et al.* (2005a). Mind bomb 1 is essential for generating functional Notch ligands to activate Notch. *Development* *132*, 3459-3470.
83. Koo, B. K., Yoon, K. J., Yoo, K. W., Lim, H. S., Song, R., So, J. H., Kim, C. H., and Kong, Y. Y. (2005b). Mind bomb-2 is an E3 ligase for Notch ligand. *J Biol Chem* *280*, 22335-22342.
84. Kooh, P. J., Fehon, R. G., and Muskavitch, M. A. T. (1993). Implication of dynamic patterns of Delta and Notch expression for cellular interactions during *Drosophila* development. *Development* *117*, 493-507.
85. Kopan, R., and Cagan, R. (1997). Notch on the cutting edge. *Trends Genet* *13*, 465-467.
86. Kopan, R., Schroeter, E. H., Weintraub, H., and Nye, J. S. (1996). Signal transduction by activated mNotch: Importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain. *Proc Natl Acad Sci USA* *93*, 1683-1688.
87. Kopan, R., and Turner, D. L. (1996). The Notch pathway: democracy and aristocracy in the selection of cell fate. *Curr Opin Neurobiol* *6*, 594-601.
88. Kosaka, T., and Ikeda, K. (1983). Reversible blockage of membrane retrieval and endocytosis in the garland cell of the temperature-sensitive mutant of *Drosophila melanogaster*, *shibire^{ts1}*. *J Cell Biol* *97*, 499-507.
89. Kramer, H. (2001). Neuralized: regulating Notch by putting away Delta. *Dev Cell* *1*, 725-726.
90. Lai, E. C. (2002). Protein degradation: four E3s for the Notch pathway. *Curr Biol* *12*, R74-78.

91. Lai, E. C., Deblandre, G. A., Kintner, C., and Rubin, G. M. (2001). *Drosophila* Neuralized is a ubiquitin ligase that promotes the internalization and degradation of Delta. *Dev Cell* 1, 783-794.
92. Lai, E. C., Roegiers, F., Qin, X., Jan, Y. N., and Rubin, G. M. (2005). The ubiquitin ligase *Drosophila* Mind bomb promotes Notch signaling by regulating the localization and activity of Serrate and Delta. *Development* 132, 2319-2332.
93. Lai, E. C., and Rubin, G. M. (2001a). *neuralized* functions cell-autonomously to regulate a subset of Notch- dependent processes during adult *Drosophila* development. *Dev Biol* 231, 217-233.
94. Lai, E. C., and Rubin, G. M. (2001b). Neuralized is essential for a subset of Notch pathway-dependent cell fate decisions during *Drosophila* eye development. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 5637-5642.
95. Le Borgne, R., Bardin, A., and Schweisguth, F. (2005a). The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development* 132, 1751-1762.
96. Le Borgne, R., Remaud, S., Hamel, S., and Schweisguth, F. (2005b). Two distinct E3 ubiquitin ligases have complementary functions in the regulation of Delta and Serrate signaling in *Drosophila*. *PLoS Biol* 3, e96.
97. Le Borgne, R., and Schweisguth, F. (2003). Unequal segregation of Neuralized biases Notch activation during asymmetric cell division. *Dev Cell* 5, 139-148.
98. Lee, T., and Luo, L. (2001). Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development. *Trends Neurosci* 24, 251-254.
99. Lehman, R., Jimenez, F., Dietrich, U., and Campos-Ortega, J. A. (1983). On the phenotype and development of mutants of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Archives of Developmental Biology* 192, 62-74.
100. Lei, L., Xu, A., Panin, V.M., and Irvine, K.D. (2003). An O-fucose site in the ligand binding domain inhibits Notch activation. *Development*. 130, 6411-21.
101. Lieber, T., Kidd, S., Alcamo, E., Corbin, V., and Young, M. W. (1993). Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function of Notch in nuclei. *Genes Dev* 7, 1949-1965.
102. Lieber, T., Kidd, S., and Young, M. W. (2002). *kuzbanian*-mediated cleavage of *Drosophila* Notch. *Genes Dev* 16, 209-221.
103. Lloyd, T. E., Atkinson, R., Wu, M. N., Zhou, Y., Pennetta, G., and Bellen, H. J. (2002). Hrs regulates endosome membrane invagination and tyrosine kinase receptor signaling in *Drosophila*. *Cell* 108, 261-269.
104. Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N. G., and Israel, A. (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8108-8112.
105. Micchelli, C. A., Rulifson, E. J., and Blair, S. S. (1997). The function and regulation of *cut* expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate. *Development* 124, 1485-1495.
106. Morel, V., Lecourtois, M., Massiani, O., Maier, D., Preiss, A., and Schweisguth, F. (2001). Transcriptional repression by suppressor of hairless involves the binding of a hairless-dCtBP complex in *Drosophila*. *Curr Biol* 11, 789-792.
107. Morel, V., and Schweisguth, F. (2000). Repression by Suppressor of Hairless and activation by Notch are required to define a single row of *single-minded* expressing cells in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 14, 377-388.
108. Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Saxena, M. T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D. J., Ray, W. J., and Kopan, R. (2000). A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol Cell* 5, 197-206.

109. Muskavitch, M. A. T. (1994). Delta-Notch Signaling and *Drosophila* Cell Fate Choice. *Developmental Biology* 166, 415-430.
110. Nakamura, H., Yoshida, M., Tsuiki, H., Ito, K., Ueno, M., Nakao, M., Oka, K., Tada, M., Kochi, M., Kuratsu, J., *et al.* (1998). Identification of a human homolog of the *Drosophila neuralized* gene within the 10q25.1 malignant astrocytoma deletion region. *Oncogene* 16, 1009-1019.
111. Nolo, R., Abbott, L. A., and Bellen, H. J. (2000). Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in *Drosophila*. *Cell* 102, 349-362.
112. O'Connor-Giles, K.M., and Skeath, J.B. (2003). Numb inhibits membrane localization of Sanpodo, a four-pass transmembrane protein, to promote asymmetric divisions in *Drosophila*. *Dev Cell* 5, 231-43.
113. Okajima, T., and Irvine, K. D. (2002). Regulation of Notch signaling by O-linked fucose. *Cell* 111, 893-904.
114. Okajima, T., Xu, A., and Irvine, K. D. (2003). Modulation of Notch-ligand binding by protein O-fucosyltransferase 1 and Fringe. *J Biol Chem* 278, 42340-42345.
115. Okajima, T., Xu, A., Lei, L., and Irvine, K. D. (2005). Chaperone activity of protein O-fucosyltransferase 1 promotes notch receptor folding. *Science* 307, 1599-1603.
116. Overstreet, E., Fitch, E., and Fischer, J. A. (2004). Fat facets and Liquid facets promote Delta endocytosis and Delta signaling in the signaling cells. *Development* 131, 5355-5366.
117. Pan, D., and Rubin, G. M. (1997). Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell* 90, 271-280.
118. Panin, V. M., Papayannopoulos, V., Wilson, R., and Irvine, K. D. (1997). Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* 387, 908-912.
119. Panin, V. M., Shao, L., Lei, L., Moloney, D. J., Irvine, K. D., and Haltiwanger, R. S. (2002). Notch ligands are substrates for protein O-fucosyltransferase-1 and Fringe. *J Biol Chem* 277, 29945-29952.
120. Parks, A.L., Huppert, S.S. and Muskavitch, M.A. (1997). The dynamics of neurogenic signalling underlying bristle development in *Drosophila melanogaster*. *Mech Dev.* 63, 61-74.
121. Parks, A. L., Klueg, K. M., Stout, J. R., and Muskavitch, M. A. (2000). Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* 127, 1373-1385.
122. Patel, N. H., Snow, P. M., and Goodman, C. S. (1987). Characterization and cloning of fasciclin III: a glycoprotein expressed on a subset of neurons and axon pathways in *Drosophila*. *Cell* 48, 975-988.
123. Pavlopoulos, E., Pitsouli, C., Klueg, K. M., Muskavitch, M. A., Moschonas, N. K., and Delidakis, C. (2001). *neuralized* encodes a peripheral membrane protein involved in Delta signaling and endocytosis. *Dev Cell* 1, 807-816.
124. Polo, S., Sigismund, S., Faretta, M., Guidi, M., Capua, M. R., Bossi, G., Chen, H., De Camilli, P., and Di Fiore, P. P. (2002). A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* 416, 451-455.
125. Poodry, C. A. (1990). *shibire*, a neurogenic mutant of *Drosophila*. *Dev Biol* 138, 464-472.
126. Price, B. D., Chang, Z., Smith, R., Bockheim, S., and Laughon, A. (1993). The *Drosophila neuralized* gene encodes a C3HC4 zinc finger. *Embo J* 12, 2411-2418.

127. Qi, H., Rand, M. D., Wu, X., Sestan, N., Wang, W., Rakic, P., Xu, T., and Artavanis-Tsakonas, S. (1999). Processing of the Notch ligand Delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science* *283*, 91-94.
128. Qiu, L., Joazeiro, C., Fang, N., Wang, H. Y., Elly, C., Altman, Y., Fang, D., Hunter, T., and Liu, Y. C. (2000). Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a hec-type E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* *275*, 35734-35737.
129. Romain, P., Khechumian, K., Seugnet, L., Arbogast, N., Ackermann, C., and Heitzler, P. (2001). Novel Notch alleles reveal a Deltex-dependent pathway repressing neural fate. *Curr Biol* *11*, 1729-1738.
130. Ramos, R. G., Grimwade, B. G., Wharton, K. A., Scottgale, T. N., and Artavanis-Tsakonas, S. (1989). Physical and functional definition of the *Drosophila* Notch locus by P element transformation. *Genetics* *123*, 337-348.
131. Rauskolb, C., Correia, T., and Irvine, K. D. (1999). Fringe-dependent separation of dorsal and ventral cells in the *Drosophila* wing. *Nature* *401*, 476-480.
132. Rebay, I., Fleming, R. J., Fehon, R. G., Cherbas, L., Cherbas, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1991). Specific EGF Repeats of Notch Mediate Interactions with Delta and Serrate: Implications for Notch as a Multifunctional Receptor. *Cell* *67*, 687-699.
133. Riggleman, B., Schedl, P., and Wieschaus, E. (1990). Spatial expression of the *Drosophila* segment polarity gene armadillo is posttranscriptionally regulated by wingless. *Cell* *63*, 549-560.
134. Ruan, Y., Tecott, L., Jiang, M. M., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (2001). Ethanol hypersensitivity and olfactory discrimination defect in mice lacking a homolog of *Drosophila* neuralized. *Proc Natl Acad Sci USA* *98*, 9907-9912.
135. Sakata, T., Sakaguchi, H., Tsuda, L., Higashitani, A., Aigaki, T., Matsuno, K., and Hayashi, S. (2004). *Drosophila* Nedd4 regulates endocytosis of Notch and suppresses its ligand-independent activation. *Curr Biol* *14*, 2228-2236.
136. Santolini, E., Puri, C., Salcini, A. E., Gagliani, M. C., Pelicci, P. G., Tacchetti, C., and Di Fiore, P. P. (2000). Numb is an endocytic protein. *J Cell Biol* *151*, 1345-1352.
137. Sapir, A., Assa-Kunik, E., Tsruya, R., Schejter, E., and Shilo, B. Z. (2005). Unidirectional Notch signaling depends on continuous cleavage of Delta. *Development* *132*, 123-132.
138. Sasamura, T., Sasaki, N., Miyashita, F., Nakao, S., Ishikawa, H. O., Ito, M., Kitagawa, M., Harigaya, K., Spana, E., Bilder, D., *et al.* (2003). *neurotic*, a novel maternal neurogenic gene, encodes an O-fucosyltransferase that is essential for Notch-Delta interactions. *Development* *130*, 4785-4795.
139. Schweisguth, F., and Posakony, J. W. (1994). Antagonistic activities of *Suppressor of Hairless* and *Hairless* control alternative cell fates in the *Drosophila* adult epidermis. *Development* *120*, 1433-1441.
140. Seugnet, L., Simpson, P., and Haenlin, M. (1997). Requirement for dynamin during Notch signaling in *Drosophila* neurogenesis. *Dev Biol* *192*, 585-598.
141. Simpson, P. (1998). Introduction: Notch signalling and choice of cell fates in development. *Semin Cell Dev Biol* *9*, 581-582.
142. Six, E., Ndiaye, D., Laabi, Y., Brou, C., Gupta-Rossi, N., Israel, A., and Logeat, F. (2003). The Notch ligand Delta1 is sequentially cleaved by an ADAM protease and gamma-secretase. *Proc Natl Acad Sci USA* *100*, 7638-7643.
143. Skeath, J. B., and Carroll, S. B. (1991). Regulation of *achaete-scute* gene expression and sensory organ pattern formation in the *Drosophila* wing. *Gene Dev* *5*, 984-995.
144. Southern, J. A., Young, D. F., Heaney, F., Baumgartner, W. K., and Randall, R. E. (1991). Identification of an epitope on the P and V proteins of simian virus 5 that

- distinguishes between two isolates with different biological characteristics. *J Gen Virol* 72 (Pt 7), 1551-1557.
145. Speicher, S. A., Thomas, U., Hinz, U., and Knust, E. (1994). The *Serrate* locus of *Drosophila* and its role in morphogenesis of the wing imaginal discs: control of cell proliferation. *Development*, 535-544.
 146. Struhl, G., and Adachi, A. (1998). Nuclear access and action of *Notch* in vivo. *Cell* 93, 649-60.
 147. Struhl, G., and Adachi, A. (2000). Requirements for presenilin-dependent cleavage of Notch and other transmembrane proteins. *Mol Cell* 6, 625-636.
 148. Struhl, G., and Greenwald, I. (1999). Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* 398, 522-525.
 149. Sun, X., and Artavanis-Tsakonas, S. (1997). Secreted forms of DELTA and SERRATE define antagonists of Notch signaling in *Drosophila*. *Development* 124, 3439-3448.
 150. Takeuchi, T., Adachi, Y., and Ohtsuki, Y. (2005). Skeletrophin, a novel ubiquitin ligase to the intracellular region of Jagged-2, is aberrantly expressed in multiple myeloma. *Am J Pathol* 166, 1817-1826.
 151. Tepass, U., Theres, C., and Knust, E. (1990). *crumbs* encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell* 61, 787-799.
 152. Tian, X., Hansen, D., Schedl, T., and Skeath, J. B. (2004). Epsin potentiates Notch pathway activity in *Drosophila* and *C. elegans*. *Development* 131, 5807-5815.
 153. Vollrath, B., Pudney, J., Asa, S., Leder, P., and Fitzgerald, K. (2001). Isolation of a murine homologue of the *Drosophila neuralized* gene, a gene required for axonemal integrity in spermatozoa and terminal maturation of the mammary gland. *Mol Cell Biol* 21, 7481-7494.
 154. Wang, W., and Struhl, G. (2004). *Drosophila* Epsin mediates a select endocytic pathway that DSL ligands must enter to activate Notch. *Development* 131, 5367-5380.
 155. Wang, W., and Struhl, G. (2005). Distinct roles for Mind bomb, Neuralized and Epsin in mediating DSL endocytosis and signaling in *Drosophila*. *Development* 132, 2883-2894.
 156. Wendland, B. (2002). Epsins: adaptors in endocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 971-977.
 157. Wiellette, E. L., and McGinnis, W. (1999). *Hox* genes differentially regulate Serrate to generate segment-specific structures. *Development* 126, 1985-1995.
 158. Wilkin, M. B., Carbery, A. M., Fostier, M., Aslam, H., Mazaleyrat, S. L., Higgs, J., Myat, A., Evans, D. A., Cornell, M., and Baron, M. (2004). Regulation of Notch endosomal sorting and signaling by *Drosophila* Nedd4 family proteins. *Curr Biol* 14, 2237-2244.
 159. Wilson, R., Ainscough, R., Anderson, K., Baynes, C., Berks, M., Bonfield, J., Burton, J., Connell, M., Copsey, T., Cooper, J., and et al. (1994). 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature* 368, 32-38.
 160. Xu, T., and Rubin, G. M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* 117, 1223-1237.
 161. Yamamoto, N., Yamamoto, S., Inagaki, F., Kawaichi, M., Fukamizu, A., Kishi, N., Matsuno, K., Nakamura, K., Weinmaster, G., Okano, H., and Nakafuku, M. (2001). Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor. *J Biol Chem* 276, 45031-45040.

162. Ye, Y., and Fortini, M. E. (1998). Characterization of *Drosophila* Presenilin and its colocalization with Notch during development. *Mech Dev* 79, 199-211.
163. Ye, Y., and Fortini, M. E. (2000). Proteolysis and developmental signal transduction. *Semin Cell Dev Biol* 11, 211-221.
164. Ye, Y., Lukinova, N., and Fortini, M. E. (1999). Neurogenic phenotypes and altered Notch processing in *Drosophila* Presenilin mutants. *Nature* 398, 525-529.
165. Yeh, E., Dermer, M., Commisso, C., Zhou, L., McGlade, C. J., and Boulianne, G. L. (2001). Neuralized functions as an E3 ubiquitin ligase during *Drosophila* development. *Curr Biol* 11, 1675-1679.
166. Yeh, E., Zhou, L., Rudzik, N., and Boulianne, G. L. (2000). *neuralized* functions cell autonomously to regulate *Drosophila* sense organ development. *Embo J* 19, 4827-4837.
167. Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y. Q., Rogaeva, E., Chen, F., Kawarai, T., *et al.* (2000). Nicastrin modulates presenilin-mediated Notch/Glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* 407, 48-54.
168. Zeng, C., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1998). Delta and Serrate are redundant Notch ligands required for asymmetric cell divisions within the *Drosophila* sensory organ lineage. *Genes and Development* 12, 1086-1091.

Δημοσιεύσεις

neuralized Encodes a Peripheral Membrane Protein Involved in Delta Signaling and Endocytosis

Elias Pavlopoulos,^{1,2,6} Chrysoula Pitsouli,^{1,2,6}
Kristin M. Klueg,³ Marc A.T. Muskavitch,⁴
Nicholas K. Moschonas,^{1,2}
and Christos Delidakis^{1,2,5}

¹Institute of Molecular Biology and Biotechnology
Foundation for Research and Technology Hellas

²Department of Biology
University of Crete
711 10 Heraklion, Crete
Greece

³Department of Biology
Indiana University
Bloomington, Indiana 47405

⁴Biology Department
Boston College
Chestnut Hill, Massachusetts 02467

Summary

Activation of the Notch (N) receptor involves an intracellular proteolytic step triggered by shedding of the extracellular N domain (N-EC) upon ligand interaction. The ligand *DI* has been proposed to effect this N-EC shedding by transendocytosing the latter into the signal-emitting cell. We find that *DI* endocytosis and N signaling are greatly stimulated by expression of *neuralized* (*neur*). *neur* inactivation suppresses *DI* endocytosis, while its overexpression enhances *DI* endocytosis and Notch-dependent signaling. We show that *neur* encodes an intracellular peripheral membrane protein. Its C-terminal RING domain is necessary for *DI* accumulation in endosomes, but may be dispensable for *DI* signaling. The potent modulatory effect of *Neur* on *DI* activity makes *Neur* a candidate for establishing signaling asymmetries within cellular equivalence groups.

Introduction

Notch (N) signaling mediates a multitude of developmental processes in metazoans, most of which are related to cell fate acquisition. Although considerable progress has been made in elucidating the molecular mechanism of Notch signaling (reviewed in Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Mumm and Kopan, 2000), a number of puzzling questions remain. One concerns the spatial regulation of the signal. In *Drosophila*, the N receptor is relatively ubiquitously expressed. Its ligands, Delta (*DI*) and Serrate (*Ser*), though displaying more dynamic expression, are expressed in broad cellular ensembles (Kooch et al., 1993; Speicher et al., 1994). Only a subset of these cells receives the signal at any time, as reflected by the expression of transcriptional targets of N, such as *Enhancer of split* (*E(spl)*) or *vestigial* (*vg*). These observations raise the question of what it is that determines

which cells send and which receive signal (Baker, 2000). In the case of wing dorso-ventral (DV) boundary establishment, this can be accounted for in part by differential glycosylation of N by Fringe (Fng; Blair, 2000) and in part by a transcriptional threshold imposed on N target genes by the repressor Nubbin (Neumann and Cohen, 1998). In the case of lateral inhibition, it has been proposed that nascent neural/vein precursors upregulate *DI* transcription while repressing N and vice versa for their neighbors, making the former better signal emitters and the latter better signal receivers (Heitzler and Simpson, 1991). This reciprocal transcriptional regulation has been experimentally substantiated in the case of vein lateral inhibition (de Celis et al., 1997; Huppert et al., 1997), but not in proneural fields, where *DI* and N are simultaneously downregulated in the signal-emitting cell (Baker and Yu, 1998; Fehon et al., 1991; Kooch et al., 1993).

A second puzzling question regards the actual mechanism of N activation by its ligands. It has recently been shown that a crucial extracellular event during N activation is proteolysis close to the cell membrane followed by shedding of the large N extracellular domain (Brou et al., 2000; Rand et al., 2000; Struhl and Adachi, 2000). Ligand binding should somehow precipitate these events, but the mechanism remains unclear. A possible way to achieve ectodomain shedding has been proposed by Parks et al. (2000), who showed that *DI* can trigger transendocytosis of the N-EC, but not the N intracellular (N-IC), domain. Indeed, the role of endocytosis in N signaling has remained something of a mystery. A mutation in *shibire* (*shi*), the gene encoding the GTPase dynamin, which mediates pinching off of coated pits, phenocopies N mutations (Poodry, 1990). However, mosaic analysis has not been able to pinpoint whether *shi* is needed in the sending or the receiving cell; it seems to be required in both (Seugnet et al., 1997). This possibly reflects the pleiotropic roles of dynamin in membrane reorganization processes, including secretion from the Golgi (McNiven et al., 2000). From genetic studies it appears that *shi* is not required for the constitutive activity of dominant N truncations that lack the ectodomain, even if they are membrane tethered (Seugnet et al., 1997; Struhl and Adachi, 2000). This places the role of dynamin-mediated processes (including endocytosis) upstream of or during N extracellular cleavage and ectodomain shedding.

Our analysis of *neuralized* (*neur*), a classic Notch pathway ("neurogenic") gene, has revealed that it stimulates *DI* endocytosis. *neur* loss-of-function (*lof*) blocks Notch signaling during lateral inhibition and produces embryonic lethality with the same neurogenic phenotype as N *lof* mutations (Lehman et al., 1983). *neur* encodes a membrane-associated protein with two novel internal repeats and a C-terminal RING domain (Lai and Rubin, 2001; Price et al., 1993). We show that *Neur* can cause dramatic relocalization of *DI* from the cell membrane to intracellular vesicles and concomitantly enhance *DI* signaling to N. We discuss how *Neur* activity, coupled

⁵Correspondence: delidakis@imbb.forth.gr

⁶These authors contributed equally to this work.

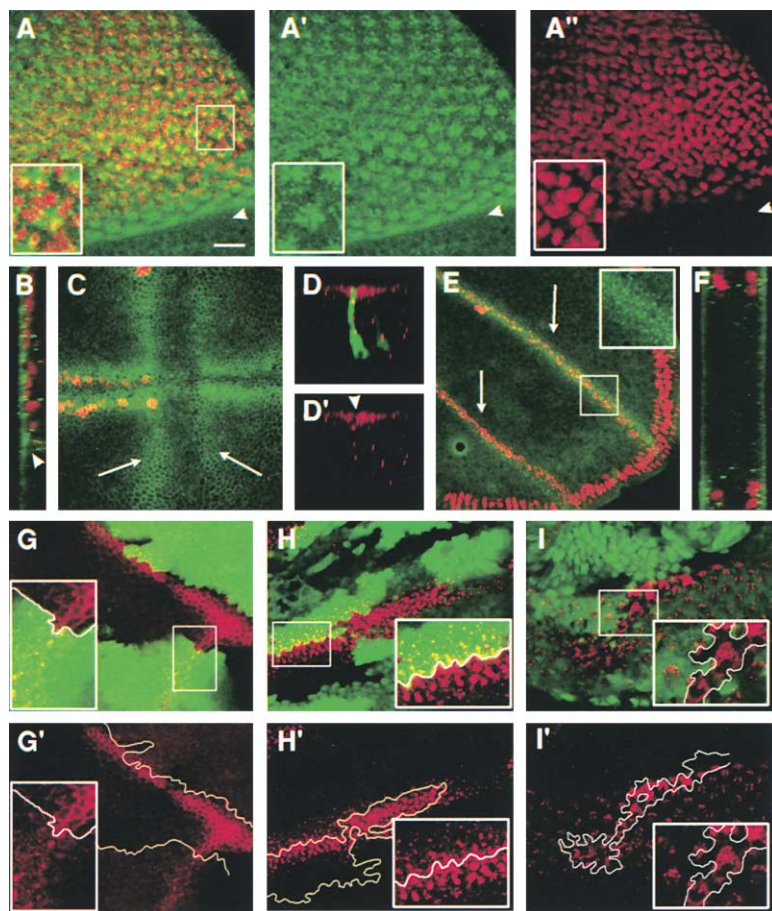


Figure 1. *neur* Is Required for DI Endocytosis
(A–C, E, and F) DI accumulation (green) in *Neur*-expressing cells (red), nuclear β -galactosidase from *neur^{A101}-lacZ* in eye and wing disks.

(D) DI accumulation (red) in SOPs (green cytoplasmic EGFP from *neur-Gal4;UAS-EGFP*). (A and B) Third instar eye disk ([A], posterior upward) and its corresponding cross-section ([B], apical left) display vesicular accumulation of DI. DI only (A'); β -galactosidase (*neur^{A101}-lacZ*) only (A'). The arrowhead indicates morphogenetic furrow.

(C) Third instar wt wing disk (anterior at left, dorsal upward). DI is pericellular both in the wing margin (anterior half marked by *neur^{A101}-lacZ*-positive SOPs) and in the vein primordia (arrows).

(D) Cross-section of third instar wing margin; apical is up. The apical aspect of the most intensely labeled SOP exhibits reduced DI (red) accumulation, more clearly evident as a gap (arrowhead) in D' (red channel only).

(E) Thirty hour APF pupal wing. *neur^{A101}-lacZ* marks the wing margin and the veins. At this stage, there is no DI immunoreactivity at the wing margin, but veins (arrows) contain vesicular DI. Inset: green channel only of boxed region at twice the magnification.

(F) The cross-section corresponding to (E) reveals vesicular DI accumulation and the absence of apical DI. Unlike the monolayer epithelium shown in (B), the pupal wing consists of two layers: the apposed dorsal and ventral wing blade epithelia. Apical sides are outward. (G–I) DI accumulation (red, shown separately in [G']–[I']) in mutant tissues, identified by the absence of β -galactosidase (green in [G]) or GFP (green in [H] and [I]).

(G) Thirty hour APF veins; *neur¹* clone. DI exhibits membrane localization in the mutant tissue.

(H) Thirty hour APF veins; *E(spl)³²²* clones. DI is still internalized in the mutant tissue. Note also increased DI expression, presumably due to relief of repression by *E(spl)*.

(I) Third instar eye disk; *neur* clones. As in (G), DI is distinctly pericellular within the clone.

The scale bars indicate 10 μ m in (A–D) and (F), 20 μ m in (E), and 14 μ m in (G–I).

Insets show corresponding boxed regions at twice the magnification.

with its documented preferential expression in signal-emitting cells (Boulianne et al., 1993; Huang et al., 1991), might generate asymmetries in N signaling.

Results

Neur Influences DI Subcellular Localization

DI, a transmembrane ligand of N, is found either on the apical side of the cell membrane or in more basally located intracellular particles that appear to be endocytic vesicles (Kooch et al., 1993). We noticed that increased DI internalization occurs in tissues that express *neur*, such as the invaginating embryonic mesoderm (Kooch et al., 1993). We found that this correlation holds in many tissues. In the third instar larval eye disk, *neur* is expressed in differentiating cells posterior to the furrow, in which DI accumulates in a number of large punctate structures (Parks et al., 1995; Figures 1A and 1B). In contrast, most third instar wing disk cells do not express *neur*, and DI displays a pronounced pericellular distribution with little intracellular staining (Figure 1C). The only wing disk cells that express *neur* are the sensory organ precursors (SOPs), which exhibit little or no

apical membrane DI (Kooch et al., 1993), and instead contain a number of intracellular puncta (Figure 1D). DI is also expressed in the wing proveins. In the third larval instar as well as during early pupal stages, provein cells do not express *neur* and exhibit pericellular DI (Figure 1C). From about 24 hr after puparium formation (APF), central provein cells express *neur^{A101}-lacZ*, and at the same time DI protein distribution switches to a vesicular pattern (Figures 1E and 1F; Huppert et al., 1997).

To determine whether this correlation between *neur* expression and DI internalization was causal, we assayed the localization of DI in a *neur* lof genetic background. *neur¹* clones were analyzed in late larval eyes and late pupal wings (30 hr APF), tissues in which DI is normally seen exclusively in internalized vesicles. Mutant cells displayed increased apical pericellular DI (Figures 1G and 1I) with only residual intracellular staining, suggesting a defect in internalization. As a control, we studied clones of a deficiency for the *E(spl)* locus, which is involved in lateral inhibition but acts downstream of the N signal. Unlike their *neur¹* counterparts, late pupal proveins bearing *E(spl)* null clones still internalized DI and displayed no pericellular immunoreactivity (Figure

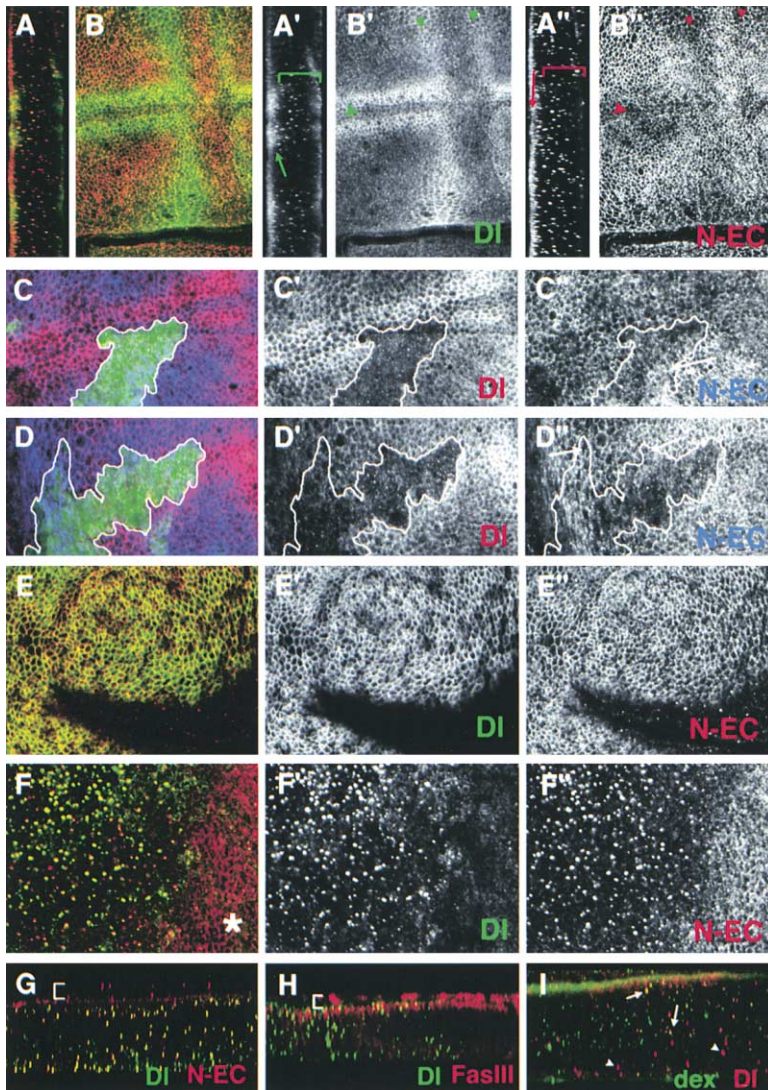


Figure 2. Ectopic Neur Stimulates DI Internalization

(A and B) DI (green, shown separately in [A'] and [B']) and N-EC (red, shown separately in [A''] and [B'']) accumulation in a wt wing disk. (A) Cross-section through the DV boundary (middle) and an adjacent vein (lower); apical is to the left. N and DI both exhibit apical localization (arrows in [A'] and [A'']), as well as accumulation in internalized vesicles (brackets in [A'] and [A'']). Within regions of DI expression, N and DI colocalize in the apical cell membrane and in vesicles (yellow vesicles in [A]).

(B) Horizontal section, showing the expression pattern of DI and N. Note lower levels of N at DV boundary (large arrowhead) and proveins (small arrowheads), due to transcriptional regulation.

(C and D) DI (red, shown separately in [C'] and [D']) and N-EC (blue, shown separately in [C''] and [D'']) in FLP-out clones of *neur* overexpression, marked by GFP (green). Neur overexpression overlapping a DI stripe at the wing margin (C) or provein (D) stimulates DI and N-EC internalization (seen in these apical slices as loss of apical pericellular staining). However, N pericellular accumulation is not altered in parts of the clones that do not overlap with DI stripes (arrows in [C'] and [D']). (E) Detail of an *omb-Gal4; UAS-DI* wing pouch. Both ectopic DI (green, [E']) and endogenous N-EC (red, [E'']) accumulate on the apical plasma membrane.

(F) Detail of an *omb-Gal4; UAS-DI UAS-neur* wing pouch. DI (green, [F']) and N-EC (red, [F'']) colocalize in intracellular vesicles (yellow in [F]) and are absent from the plasma membrane. For comparison, cells outside the *omb-Gal4* expression domain (asterisk) contain membrane N (and no DI).

(G) Cross-section of an *omb-Gal4; UAS-DI UAS-neur* disk (apical at top), stained as in (E) and (F). The bracket indicates the extent of the peripodial membrane which lies above the disk epithelium and expresses N, but no

DI. For the most part N and DI colocalize within large vesicles along the apical-basal axis of the epithelium (yellow).

(H) Cross-section of an *omb-Gal4; UAS-DI UAS-neur* wing pouch stained for DI (green) and FasIII (red). FasIII is ubiquitously expressed and marks a subapical domain on both the peripodial membrane (brackets) and the epithelium. Internalized DI vesicles within the *omb-Gal4* domain (left half) do not contain FasIII, implying that Neur does not stimulate FasIII internalization.

(I) Cross-section of an *omb-Gal4; UAS-DI UAS-neur* wing pouch that has been incubated with fluorescein-dextran (green) to mark early endocytic vesicles, and stained for DI (red). Many of the DI vesicles are marked with fluorescein-dextran (some indicated by arrows), suggestive of endocytic provenance. Other DI vesicles are dextran-negative (arrowheads); these more basally located structures do label with fluorescein-dextran after a 30–60 min chase (data not shown), suggesting that they belong to a later endosomal compartment.

1H). Similar effects on DI subcellular localization were observed in *neur¹* embryos (data not shown). It therefore appears that *neur* lof blocks DI internalization.

If Neur is needed to stimulate DI internalization, then ectopic expression of *neur* might induce DI relocation in tissues in which it normally resides on the plasma membrane, such as the wing disk (Figures 1C, 2A, and 2B). Indeed, ectopically expressing a *UAS-neur* transgene at uniform levels in clones of larval wing disk cells (using the FLP-out technique; see Experimental Procedures) resulted in DI internalization (Figures 2C and 2D). The apparent loss of pericellular DI was not transcriptional because *UAS-neur* had no effect on a *DI-lacZ* reporter (data not shown), while it induced DI internalization even when *DI* was ectopically coexpressed (Figures 2E and 2F).

While *UAS-DI* expression alone targeted the protein to the apical plasma membrane, virtually no DI immunoreactivity remained apical when *UAS-neur* was coexpressed. Instead, DI relocated to a multitude of vesicles found at various levels along the apical-basal axis (Figures 2F and 2G; see Supplemental Figure S1 [complementing Figure 2] at <http://www.developmentalcell.com/cgi/content/full/1/6/807/DC1>). That these belong to the endocytic compartment was confirmed by marking the latter with fluorescent dextran; dextran and DI immunoreactivity colocalized in early (Figure 2I) and late endosomes. Localization of Fasciclin III, an apical transmembrane protein that does not participate in N signaling, did not change upon *neur* overexpression (Figure 2H).

In regions within which *DI* and *N* are expressed, *neur*

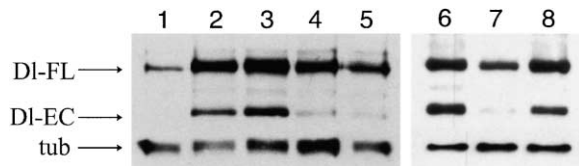


Figure 3. *neur* Expression Downregulates DI Protein Levels in Wing Disks

Wing disk extracts were analyzed by Western blot for DI protein and for β -tubulin (tub) as a loading control. DI-FL and DI-EC are the full-length and extracellular cleavage product, respectively. Lanes 1–5 are from one experiment and lanes 6–8 from another. Lane 1: wt; lanes 2 and 3: *omb-Gal4; UAS-DI UAS-GFP*; lanes 4, 5, and 7: *omb-Gal4; UAS-DI UAS-neur*; lane 6: *omb-Gal4; UAS-DI*; lane 8: *omb-Gal4; UAS-DI UAS-neur Δ RING-GFP*.

expression induced DI-N-EC cointernalization, consistent with formation of a DI-N-EC complex (Figures 2C and 2D). In regions within which *N* alone is expressed, *neur* expression did not affect N-EC subcellular localization (arrows in Figures 2C and 2D), suggesting that DI-N cointernalization in the former regions does not reflect a direct effect of *neur* on N. As observed for DI, the effect of *neur* on N is posttranscriptional because *UAS-neur* expression did not affect expression of an *N-lacZ* enhancer trap (data not shown). In wild-type wing disks and in disks expressing *UAS-DI* alone, the few internalized DI vesicles observed were positive for N-EC, while most N-EC immunoreactivity was at the membrane (where DI also resides) and in additional DI-negative vesicles (Figure 2A). In contrast, coexpression of *DI* and *neur* led to substantial internalization of endogenous N, with most N-EC immunoreactivity found colocalizing with the DI vesicles (Figure 2G; Supplemental Figure S1).

Neur Activity Decreases DI Protein Levels Posttranscriptionally

As *neur* appears to stimulate internalization of DI and N, we asked whether this might be accompanied by a change in the overall levels or the pattern of proteolytic processing of either protein. DI exists in two major isoforms, a full-length and an extracellularly cleaved one (Klug et al., 1998; Qi et al., 1999). In protein extracts of late larval wing disks, the full-length DI isoform predominated, with cleaved DI present at roughly 10-fold lower levels than full-length. The effect of *neur* was studied using *omb-Gal4* (broad wing pouch pattern) to overexpress *UAS-DI* with either a neutral second transgene, *UAS-GFP* (to keep the total dosage of *UAS* targets constant), or with *UAS-neur*. As *DI* is expressed from a heterologous promoter in these experiments, the effects observed must be posttranscriptional. Comparing *DI+neur* with *DI+GFP* expression revealed lower amounts of both DI isoforms (Figure 3) in the former case. From densitometry analysis, we concluded that the total DI levels were reduced by about 3-fold upon *DI-neur* coexpression. Furthermore, whereas cleaved DI accounted for about a third of the total DI protein in control *omb-Gal4; UAS-DI UAS-GFP* disks, its abundance dropped sharply upon coexpression of *neur*, to account for only one-tenth of the total DI protein. This implies that *neur* posttranscriptionally downregulates the levels of DI, especially of the cleaved isoform. This probably reflects

increased turnover of DI after internalization. The same samples of wing disks were analyzed for the presence of N isoforms using two antibodies, one against an extracellular and one against an intracellular epitope. No major changes in N levels were observed when *neur* was expressed (data not shown).

Neur Activity Stimulates DI-N Signaling

Given the dramatic effect of *neur* on DI levels and subcellular localization, we decided to study its effect on the ability of DI to signal. This can best be assayed in the larval wing pouch, where N signaling is known to induce a number of target genes including *vg*, *wingless* (*wg*), *cut* (*ct*), and *E(spl)* (Doherty et al., 1996). Furthermore, Notch is differentially glycosylated in the ventral versus dorsal wing compartments, making it preferentially responsive to DI dorsally and preferentially responsive to Ser ventrally (Blair, 2000). We expressed *UAS-DI* together with *UAS-GFP* (control) or with *UAS-neur* in *act>>Gal4* FLP-out clones and monitored expression of the downstream target gene product Wg (Figures 4A and 4B). The *DI+GFP* combination gave the expected result, namely Wg expression induced in cells adjacent to clone borders in a nonautonomous fashion. Only cells adjacent to dorsal clones showed Wg expression, with the magnitude of induction gradually dropping with increased distance from the DV boundary. In contrast, coexpression of *DI* with *neur* resulted in intense nonautonomous Wg induction adjacent to all wing pouch clones, regardless of compartment or distance from the DV boundary, suggesting that DI signaling had been intensified to overcome compartmental limitations. Similar results were obtained when *DI (+GFP or +neur)* was overexpressed under *omb-Gal4* control and various Notch target genes were assayed, such as *ct*, *E(spl)*, *vgBE-lacZ* (the DV boundary-specific enhancer of *vg*), and *wg* (Figures 4C and 4D; Supplemental Figures S2 and S3 [complementing Figure 4]; data not shown). In these experiments, we observed that, in addition to overcoming compartmental limitations, some Wg expression occurred within the *omb-Gal4* (DI) expression domain. As the inability of a cell to receive DI signal depends on its endogenous level of DI expression (Doherty et al., 1996; Jacobsen et al., 1998), the autonomous Wg activation observed within the *DI+neur* expression domain is probably due to the dramatic lowering of DI protein levels in those cells.

neur Exhibits Non-Cell-Autonomous Function during Lateral Inhibition

Given that *neur* enhances DI signaling capacity, it is not surprising that loss of *neur* compromises the process of lateral inhibition (Lehman et al., 1983). Because the direct effects we observe are on the ligand rather than the receptor of the N signal, we would predict that the defect in lateral inhibition would be non-cell autonomous; however, recent reports have suggested an autonomous role for *neur* (Lai and Rubin, 2001; Yeh et al., 2000). To address this apparent discrepancy, we examined the effects of *neur* lof clones on development of the chemosensory SOPs of the larval wing margin, which arise in a regularly spaced pattern from two contiguous proneural clusters during the third larval instar.

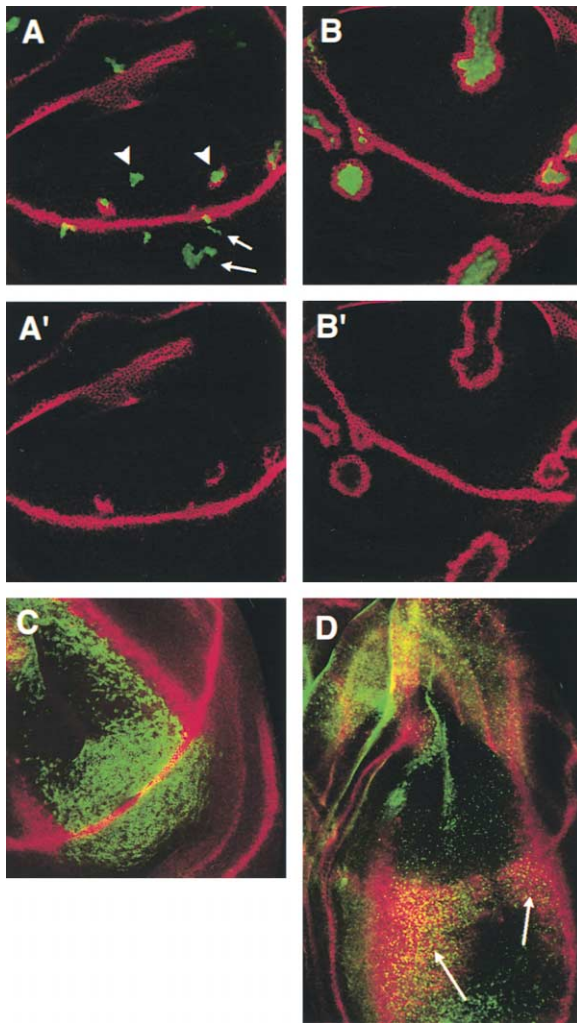


Figure 4. Effects of *neur* Overexpression on N Signaling
(A and B) Wing pouch FLP-out clones expressing *DI* (A) or *DI+neur* (B) are stained for Wg (red) as a read-out of N activity. GFP marks the clones.
(A) Ventral clones (arrows) or dorsal clones away from the DV boundary (arrowheads) do not turn on Wg, or do so only around part of the clone.
(B) In contrast, Wg is turned on by all *DI+neur*-expressing clones. The same increase in Wg expression was observed upon coexpression of *DI+neur* without *GFP*, showing that it is not an artifact due to *UAS* dosage.
(A' and B') Wg channel only.
(C) *omb-Gal4; UAS-DI UAS-GFP* wing disk stained for Wg (red) and DI (green).
(D) *omb-Gal4; UAS-DI UAS-neur* wing disk stained as in (C). Here the DI staining is faint and disperse due to increased internalization. Note that whereas in (C) there is no overlap between DI and Wg, in (D) there is substantial overlap in the V compartment (arrows). Also note the increased overgrowth: (D) is at 67% the magnification of (A–C).

We were able to focus on lateral inhibition because loss of *neur* does not affect wing margin establishment (Lai and Rubin, 2001; our unpublished observations). The *E(spl)* genes are direct transcriptional targets of N signaling during lateral inhibition. Using the mAb323, which detects five of the *E(spl)* bHLH proteins (Jennings et al.,

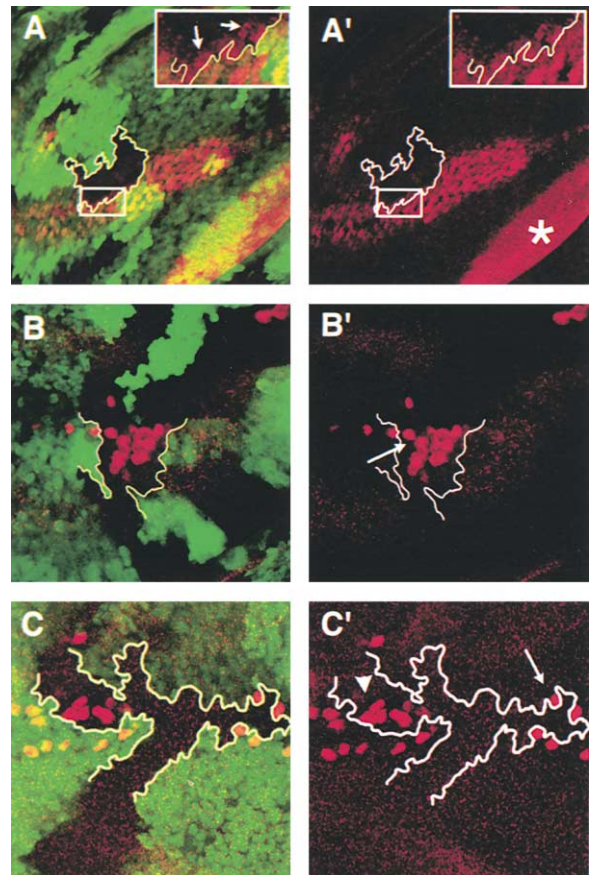


Figure 5. *neur*⁻ Affects Lateral Inhibition Nonautonomously
Mutant clones are analyzed in the third instar anterior wing margin; clones are marked by the absence of GFP (green).
(A) *neur*⁻ clone stained for *E(spl)* proteins (red, shown separately in [A']), as a read-out of N signaling. Although overall *E(spl)* protein accumulation is lost within the clone (outlined), mutant cells immediately adjacent to the clone boundary within the region of neural competence do express *E(spl)*. Inset shows higher magnification of boxed region; arrows point to some *neur*⁻ cells that express *E(spl)*. The asterisk indicates background staining.
(B and C) SOPs are visualized using anti-Ase (red, shown separately in [B'] and [C']).
(B) A *neur*⁻ clone that straddles the DV boundary is shown. Mutant cells immediately adjacent to the clone boundary can be inhibited from adopting the SOP fate, as they do not turn on Ase (arrow).
(C) *Dfrev10* clone stained for Ase; where the clone crosses the boundary, no SOPs are seen, as the wing margin organization is disrupted. However, when the clone is only in the dorsal compartment, overcommitment of SOPs is seen (arrowhead), as in a *neur*⁻ clone (B). In one part of the clone (arrow), the surrounding wt SOPs have completely inhibited SOP generation by the *DI*⁻ cells (nonautonomy). Elsewhere, a mutant SOP (arrowhead) is adjacent to wild-type non-SOP territory, an apparently autonomous arrangement. In all panels, anterior is left and dorsal is up.

1994), we observed overall loss of *E(spl)* within *neur*⁻ clones (Figure 5A), in agreement with a defect in lateral inhibition. Still, *E(spl)* expression was detected in *neur*⁻ cells, when the latter were adjacent to wild-type (wt) cells (Figure 5A). This implies that *neur*⁻ cells are not defective in receiving signals sent by wt cells.

To further investigate the ability of *neur*⁻ cells to receive N signal, we scored the disposition of SOPs (detected by Ase immunoreactivity; Brand et al., 1993)

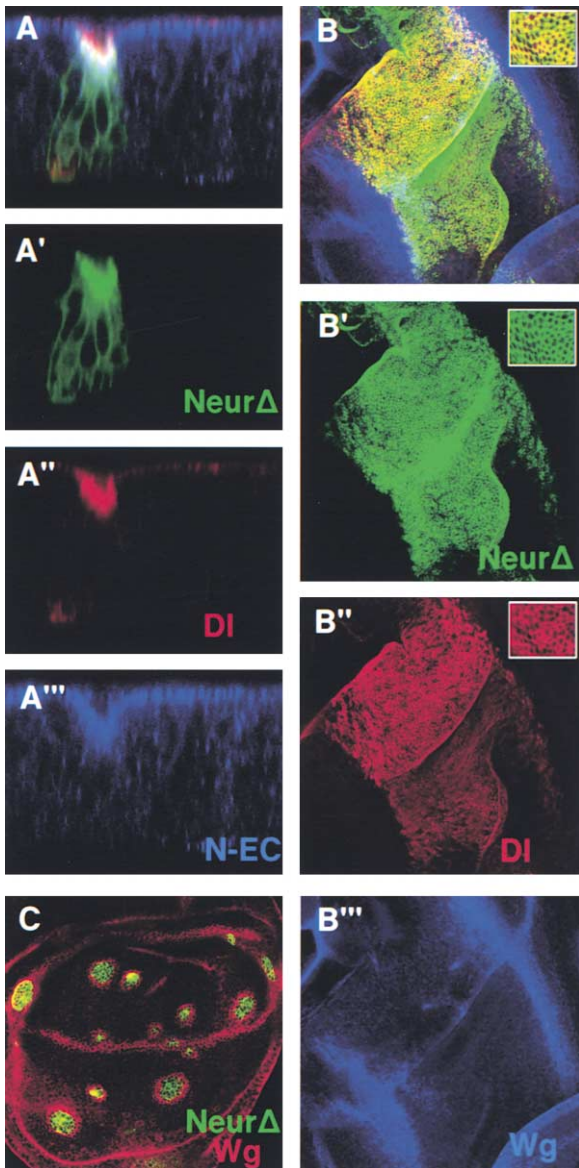


Figure 6. Effects of *Neur* Δ RING on DI Localization and Signaling
(A) FLP-out clone of *UAS-DI UAS-neur* Δ RING-GFP seen in cross-section (green, GFP; red, DI; blue, N-EC; shown separately in [A'], [A''], and [A'''], respectively). All three proteins accumulate at the apical plasma membrane, with *Neur* Δ RING-GFP showing some additional cytoplasmic localization (A').
(B) *omb-Gal4; UAS-DI UAS-neur* Δ RING-GFP third instar wing disk stained for DI (red, [B']) and Wg (blue, [B''']). *Neur* Δ RING-GFP (B'). N signaling is stimulated, as Wg expression (blue, [B''']) is induced in the ventral compartment (cf. Figure 4C). This induction is more spatially restricted than that caused by wt *Neur* (cf. Figure 4D).
(C) *act>>Gal4; UAS-DI UAS-neur* Δ RING-GFP FLP-out clones stained for Wg (red). Wg induction is induced (nonautonomously) in both dorsal and ventral compartments (cf. Figures 4A and 4B).

relative to clone borders. If loss of *neur* affected signal sending rather than receiving, we would expect to encounter *neur* $^{-}$ cells that are inhibited, that is, do not become SOPs, next to wt SOPs at clone borders. This nonautonomous arrangement was observed in 24 cases (60% of the clone borders scored; Figure 5B), whereas

the converse “autonomous” arrangement (wt non-SOP next to *neur* $^{-}$ SOP) was observed in only seven cases (18%). The remaining nine clone borders (23%) showed adjacent wt and *neur* $^{-}$ SOPs. These could be interpreted either as inability of the *neur* $^{-}$ SOP to send signal (thereby not inhibiting its neighboring wt cell) or its inability to receive signal (thereby not becoming laterally inhibited by the neighboring wt SOP). Scoring of *DI* $^{-}$ clone borders (Figure 5C), as a bona fide non-cell-autonomous control, yielded a predominance of the nonautonomous arrangement in agreement with Heitzler and Simpson (1991): 29 wt SOPs next to *DI* $^{-}$ non-SOPs (83% nonautonomous) versus five *DI* $^{-}$ SOPs next to wt non-SOPs (14% autonomous), and almost no pairs of wt mutant SOPs at the border (one case; 3%). *N* $^{-}$ clones, by contrast, produced the autonomous arrangement in 98% of clone borders (Heitzler and Simpson, 1991). Thus, *neur* $^{-}$ clones behave more like *DI* $^{-}$ clones than like *N* $^{-}$ clones, arguing for a nonautonomous action of *Neur*. The somewhat lower incidence of nonautonomy in *neur* $^{-}$ clones compared to *DI* $^{-}$ clones may be due to an early bias of *DI* $^{-}$ cells to become inhibited by their wt neighbors (Heitzler and Simpson, 1991). As this bias probably arises before onset of *neur* expression in the nascent SOP, it cannot be expected to occur in *neur* $^{-}$ clones.

The *Neur* RING Domain Is Required for DI Internalization but Is Dispensable for DI Signaling

Although the biochemical function of *Neur* remains to be elucidated, the protein contains a RING domain, which has been associated with E3 ubiquitin ligase activity in other proteins (Freemont, 2000). Because ubiquitination is known to regulate endocytic events (Di Fiore and De Camilli, 2001), we asked whether a mutant lacking the RING would be defective in stimulating DI internalization. We substituted the RING domain with a GFP moiety, in order to additionally monitor the localization of the protein. The tagged mutant protein accumulated at the apical plasma membrane (Figures 6A and 6B), which is where wt *Neur* has been reported to localize (Lai and Rubin, 2001; Yeh et al., 2000). This suggests that the RING is dispensable for membrane localization.

Despite the correct subcellular localization of *Neur* Δ RING-GFP, its coexpression with *UAS-DI* resulted in retention of DI at the apical membrane, comparable to that observed when expressing *UAS-DI* alone (Figures 6A and 6B). The RING domain is, therefore, required for DI internalization. The lack of internalization was accompanied by lack of turnover. Coexpression of *DI* and *neur* Δ RING-GFP led to accumulation of the full-length DI isoform to a level comparable to that associated with expression of *DI* alone, whereas accumulation of the cleaved isoform was reduced by about 50% (Figure 3). We next assessed Wg expression to determine the extent to which the mutant *Neur* was able to stimulate DI signaling. To our surprise, coexpression of DI with *Neur* Δ RING-GFP was still able to stimulate Wg expression in both compartments of the wing in a nonautonomous fashion (Figures 6B and 6C; Supplemental Figure S4 [complementing Figure 6]). The only difference between wt *Neur* and *Neur* Δ RING-GFP in this assay was

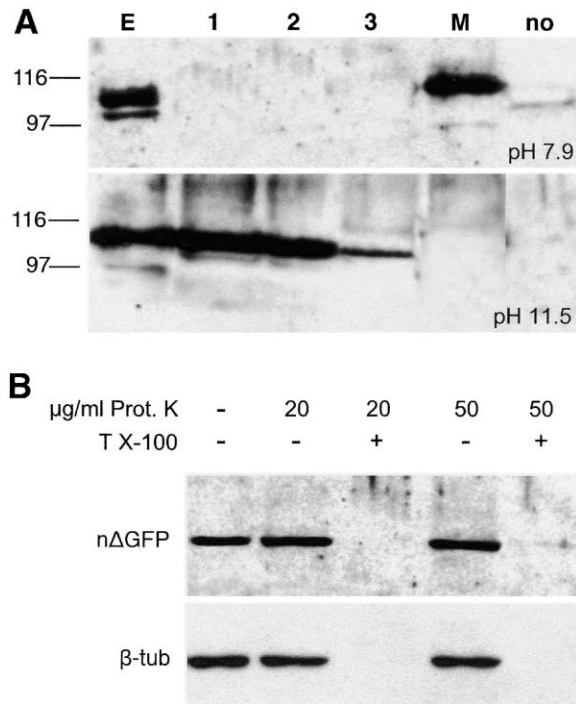


Figure 7. *Neur* Δ RING-GFP Is an Intracellular Peripheral Membrane Protein

(A) Subcellular fractionation of *hs-Gal4; UAS-neur* Δ RING-GFP larvae was performed after lysis in a hypotonic buffer (top panel) or by high pH (bottom panel). GFP is visualized by immunoblotting. Lane E: crude extract; lanes 1, 2, and 3: soluble fractions after successive washes; lane M: insoluble “membrane” fraction; lane no: no heat shock control crude extract.

(B) *Neur* Δ RING-GFP is protected from proteinase K digestion in intact tissue. Total extracts of *omb-Gal4; UAS-neur* Δ RING-GFP wing disks. Each sample was treated as indicated before lysis. Western blot with anti-GFP antibody (top panel) or with anti- β -tubulin antibody (bottom panel).

the inability of the latter to overcome the cis-dominant-negative effect of DI, when expressed under *omb-Gal4* (compare Figure 6B with Figure 4D).

***Neur* Δ RING-GFP Is an Intracellular Peripheral Membrane Protein**

As the *Neur* sequence does not contain any obvious signal peptide or transmembrane domain, we undertook a biochemical approach to determine the type of association *Neur* might have with the membrane. Extracts from larvae ubiquitously expressing *UAS-neur* Δ RING-GFP were fractionated by ultracentrifugation and the GFP-tagged *Neur* was detected by immunoblotting. Under mild extraction conditions, *Neur* Δ RING-GFP was found in the membrane fraction, consistent with histological observations. However, following extraction with high pH, which strips membranes of all but integral proteins (Fujiki et al., 1982), *Neur* Δ RING-GFP was detected exclusively in the cytosolic fraction, suggesting a peripheral association with the membrane (Figure 7A). This association must occur on the cytoplasmic face of the cell membrane, as *Neur* contains no signal peptide. To test this hypothesis, we isolated wing disks overexpressing *UAS-neur* Δ RING-GFP and subjected them to

proteinase K digestion before lysis and immunoblotting. The GFP (*Neur* Δ RING-GFP) immunoreactivity was resistant to the membrane-impermeable proteinase K, supporting the assignment to *Neur* of an intracellular location (Figure 7B). We believe that the wt *Neur* protein, which is known to associate with the membrane (Lai and Rubin, 2001; Yeh et al., 2000), will also have the same topology, because the RING domain should not act as a transmembrane domain.

Discussion

The importance of *neur* in N signaling has been realized ever since its identification, as its null embryonic phenotype is indistinguishable from that of *N* mutants (Lehman et al., 1983). Nonetheless, its position in the N pathway was heretofore unclear. Our analysis of *neur* loss of function (*lof*) and overexpression suggests a link between *neur* expression and DI signaling and endocytosis. Loss of *neur* diminishes DI endocytosis, whereas *neur* ectopic expression enhances DI endocytosis and turnover. While this manuscript was under review, a paper by Yeh et al. (2001) reported that *Neur* indeed has RING-dependent E3 ubiquitin ligase activity in vitro. Taken together, our data and those of Yeh et al. (2001) link DI endocytosis with ubiquitination, as originally hypothesized (see Results).

One caveat to our interpretation is that our static pictures of DI localization do not allow us to unambiguously conclude whether intracellular DI is endocytosed or blocked in its secretory trafficking. We favor the former hypothesis for three reasons: (1) intracellular DI often colocalizes with endocytosed fluorescent dextran; (2) if DI were retained in the endoplasmic reticulum or Golgi, it would not be available at the cell surface where signaling is taking place; yet, concomitant with increased endocytosis, *Neur* is able to stimulate DI signaling; and (3) wt *Neur* protein is found mostly at the plasma membrane (Lai and Rubin, 2001; Yeh et al., 2000), so it is more likely to affect endocytic events rather than steps in secretory processes.

The nonautonomous effect of *neur*⁻ clones on lateral inhibition (Figure 5) favors a role for *Neur* in signal-emitting, rather than signal-receiving, cells. Such a function is consistent with the fact that *Neur* is an intracellular peripheral membrane protein expressed preferentially in the signal-emitting cells during lateral inhibition, such as the neuroblasts, SOPs, and central progenitor cells (Boulianne et al., 1993; Huang et al., 1991; this work). In agreement with a role for *Neur* in generating the DI signal, prior epistasis analysis showed that *neur* is required to express the embryonic neural suppression (“antineurogenic”) phenotype associated with ligand-dependent *N* gain-of-function (*gof*) mutants (Lieber et al., 1993). In the same study, *neur* was dispensable for the constitutive activity of ligand-independent N variants. Interestingly, some N variants that are DI independent are also *shi* (Dynamin) independent (Seugnet et al., 1997; Struhl and Adachi, 2000). Taken together, these data point to the involvement of *Neur* and Dynamin in processes upstream of (or parallel to) N activation by DI. Our implication of *Neur* in endocytic regulation suggests an important role for endocytosis in events leading

up to N activation (Parks et al., 2000; Seugnet et al., 1997).

If DI endocytosis and DI-N signaling are causally linked, then our analysis of the *Neur* Δ RING-GFP mutant poses a paradox: although *Neur* Δ RING-GFP does not detectably stimulate DI endocytic trafficking (or turnover), it retains the ability to enhance DI signaling. On the one hand, this could mean that the above model is wrong and endocytosis is simply a consequence of DI-N stimulation, rather than a prerequisite for DI signaling. Alternatively, the absence of detectable DI internalization upon coexpression of *Neur* Δ RING-GFP does not necessarily preclude the possibility that early endocytic events (e.g., recruitment of DI into coated pits) that are undetectable by light microscopy are initiated by *Neur* Δ RING-GFP. Such events might be sufficient to stimulate ligand-dependent N cleavage and activation. Ultrastructural analysis will be required to distinguish between these alternative models.

Removal of the *Neur* RING domain does seem to adversely affect its ability to stimulate N signaling in some contexts: in the study of Lai and Rubin (2001), *UAS-neur* Δ RING yielded phenotypes indicative of a negative effect on N signaling (tufted bristles, thick veins, and notched wings) with most *Gal4* driver lines, although in certain cases, positive effects were also observed (shaft to socket transformation). We have observed the same context-dependent variability with our *UAS-neur* Δ RING-GFP construct (data not shown), suggesting that these differences do not result from the presence of the GFP moiety but rather from the type of assay employed. In fact, we have shown that *Neur* Δ RING-GFP coexpressed with DI blocks N signaling within the *omb-Gal4* domain, where wt *Neur* and DI are able to induce *Wg*, even though the nonautonomous signaling (at the borders of the *omb-Gal4* domain or at the borders of FLP-out clones) appears unaffected by the RING deletion (Figures 6B and 6C). It is possible then that *Neur* Δ RING can exert negative effects on DI-N signaling in a cell-autonomous fashion and positive effects in a cell-non-autonomous fashion. The cell-autonomous block in N signaling could be due to the block in DI turnover and its accumulation at the apical membrane, because it has been proposed that high levels of DI may sequester N receptor molecules in unproductive cis complexes (Jacobsen et al., 1998).

Two major models for DI signaling have been put forward. In one, the active DI species is proposed to be the extracellularly cleaved, secreted DI-EC fragment (Qi et al., 1999), because it is produced by the metalloprotease Kuzbanian (Kuz), and the *kuz* lof phenotype is similar to the *N* lof phenotype (Rooke et al., 1996). In the other, binding of cell surface-tethered DI to N on the apposing cell has a dual impact: activating extracellular cleavage of Notch and mediating the transendocytosis into the signal-sending cell of N-EC complexed with DI (Parks et al., 2000). Our observations suggest that *Neur* could act intracellularly in the signal-sending cell to promote assembly of a productive DI-N complex and to trigger its endocytosis. Concomitantly with endocytosis, *Neur* leads to a drastic reduction in the levels of the DI-EC fragment (Figure 3), even as DI-N signaling is increased. It therefore appears unlikely that DI-EC is the active signal that stimulates N in the wing disk. This

leaves unanswered at present the question of why Kuz is needed for N signaling. Perhaps Kuz has pleiotropic activity and acts on some other protein(s) required for N activation, and Kuz-dependent DI cleavage is a secondary effect. Better characterization of the different DI isoforms, including their localization and trafficking, will be required to understand the detailed mechanism of DI-N activation.

Despite the proposed role of *Neur* to promote DI signaling, we also note that DI can signal in the absence of *Neur*, inasmuch as there are instances of DI signaling where *Neur* is not detectably expressed, such as from the germline to ovarian follicle cells (Lopez-Schier and St Johnston, 2001). In the experiments of Figures 4A and 4C, we indeed observed N target gene expression induced by DI in the absence of *neur*. To be certain, we monitored *neur*^{A101}-*lacZ* and showed that *UAS-DI* overexpression in the wing disk does not induce endogenous *neur* expression (data not shown). With the caveat that available detection methods may fail to detect low levels of *neur* expression, we propose that two types of DI signaling may exist: basal signaling that does not require *Neur* activity and high-intensity signaling that does. During neurogenesis, basal DI-N signaling probably takes place during early stages among all cells within proneural clusters, where DI and N are uniformly expressed but *Neur* is absent. Upon expression of *neur* by a nascent neural precursor, signaling becomes asymmetric, as the neighboring cells receive more intense signal even though DI and N levels have not changed. The absolute requirement for *neur* in neurogenesis suggests that basal "mutual" inhibition is insufficient to permanently block proneural protein activity. Indeed, the E(spl) bHLH Notch targets, which are the main antagonists of proneural proteins, are not expressed in *neur*⁻ embryos (Jennings et al., 1994) or clones (Figure 5A), suggesting that their expression may be induced only by intense *Neur*-dependent "lateral" inhibitory signaling.

We can extend our hypothesis to propose that *Neur* may be required more stringently in instances in which a novel asymmetry has to be imposed upon uniform basal N-DI signaling. *neur* is not required at the wing DV boundary (Lai and Rubin, 2001; our unpublished observations), where asymmetry is imposed by *Fringe* (Blair, 2000) or in the egg chamber, where asymmetry is imposed by expression of N and DI in distinct cells (Lopez-Schier and St Johnston, 2001). Similarly, *neur* is not essential during lateral inhibition within the provein. Despite its expression there and its dramatic effect on DI localization (Figure 1G), *neur* lof clones yield normal looking veins with only minor thickenings (Lai and Rubin, 2001; our unpublished observations). We believe that *neur* is not crucial for this process because wing patterning mechanisms place N and DI in different cells: DI expression is most intense within the central proveins and N expression is most intense within the lateral proveins (de Celis et al., 1997; Huppert et al., 1997).

Although the exact relationship between DI endocytosis and N activation remains to be resolved, our findings emphasize the importance of *Neur* for both of these processes. Given the complexity and pleiotropy of Notch signaling, alternative mechanisms of signal generation may be operative in different developmental contexts. The questions of whether this is so, and if so,

what mechanisms operate in which contexts, will be resolved by future work.

Experimental Procedures

Antibodies and Immunohistochemistry

For antibody staining, dissected larvae were fixed for 20 min at room temperature in PEM plus 4% formaldehyde. Pupal dissection and fixation was done as in Parks et al. (2000). To induce the *hs-GFP* marker, 1 hr of heat shock at 38°C and 1–1.5 hr recovery was done prior to dissection. DI was detected using mouse mAb C594.9B (Fehon et al., 1990) at 1:5,000 or guinea pig serum GP581 (Huppert et al., 1997) at 1:4,000, both directed against extracellular epitopes. N was detected using mouse mAb C458.2H (Diederich et al., 1994) supernatant at 1:100, also recognizing an extracellular epitope. Fasciclin III was detected using mAb 7G10 (Developmental Studies Hybridoma Bank; developed under the auspices of the NICHD and maintained by the University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City) supernatant at 1:500. For β -galactosidase, we used a rabbit antiserum from Cappel (1:10,000). mAbs against Ct (1:100), Wg (1:10), and E(spl) (1:3) were kindly provided by Karen Blochlinger (FHRCRC, Seattle), Stephen Cohen (EMBL, Heidelberg), and Sarah Bray (University of Cambridge, UK), respectively. Rabbit anti-Ase serum (1:1,000) was kindly provided by Andrew Jarman (University of Edinburgh). Fluorescent and HRP-coupled secondary antibodies were from Jackson Immunochemicals or Molecular Probes. They were preadsorbed and used at 1:200–1:1,000. Antibody incubations were done in PBS/0.2% Triton/0.5% BSA at 4°C for 4 hr to overnight. Fluorescent samples were observed using a Leica SP confocal microscope. Transmitted light images were obtained on a Leica Diaplan microscope.

Mosaic Analysis

Mitotic clones were induced using the *FLP-FRT* technique. Flies were raised at 25°C and *hsFLP* was induced by heat-shocking first to second instar larvae of the following genotypes for 1 hr at 38°C: (1) *y w hsFLP/ w; FRT82B neur¹ FRT82B hsGFP* or *FRT82B arm-lacZ*; (2) *y w hsFLP/ w; FRT82B D^{rev10} FRT82B hsGFP*; and (3) *y w hsFLP/ w; FRT82B P[gro⁺] Df(3R)b32.2/ FRT82B hsGFP*.

FRT82B stands for *P[neoFRT]82B* and *hsFLP* stands for *P[hsFLP]1*. All alleles and inserts shown above are described in FlyBase (<http://flybase.bio.indiana.edu>). The *FRT82B P[gro⁺] Df(3R)b32.2* chromosome (kindly provided by Pat Simpson) carries a *P[gro⁺]* transgene to complement the partial inactivation of *gro* by the deficiency for the *E(spl)* locus.

Constructs and Transgenic Lines

UAS-neur was constructed as follows: a Dral fragment was isolated corresponding to nucleotides 247–2637 of the *neur* cDNA (includes 30 bp of 5' UTR and 95 bp of 3' UTR) and cloned into the EcoRV site of pBluescript KSII+ (Stratagene) to generate pBNeur. A BamHI-KpnI (polylinker sites) fragment from pBNeur was isolated and cloned into pUAST cut with BglII and KpnI.

UAS-neur Δ RING-GFP was constructed as follows: a BamHI (polylinker)-HincII (*neur* cDNA nucleotide 2146) fragment was isolated from pBNeur and cloned into the pEGFP-N2 vector (Clontech) cut with BglII and SmaI, fusing the first 623 amino acids of Neur in-frame with *EGFP*. The chimeric *neur-EGFP* fragment was isolated from this plasmid by SmaI-NotI (polylinker sites) and cloned into pUAST cut with EcoRI/filled-in and NotI. Transgenic lines were generated in a *yw^{67c23}* background.

Other transgenes used were *P[ArB]neur^{A101} (neur^{A101}-lacZ)*, *P[ArB]D^{A326.2F3} (DI-lacZ)*, and *P[lacZ]N^{MLZ} (N-lacZ)*, all described in FlyBase. *UAS-DI* was kindly provided by Nick Baker (Albert Einstein College of Medicine, New York).

Targeted Gene Expression

The following *Gal4* drivers were used: *P[GAL4]b^{pmb}-Gal4, act>CD2>Gal4* (FlyBase: *P[GAL4-Act5C(FRT.CD2).P]S*), *P[GAL4]neur^{GAL4-A101}* (kindly provided by Veronica Rodrigues, Bombay), and *P[GAL4-Hsp70.sev]K25 (hs-Gal4)*. All crosses were performed at 25°C. For the FLP-out clones larvae carrying the *act>CD2>Gal4* line, *P[hsFLP]1* and a *UAS* transgene were heat-shocked for 30 min at

37°C to induce the clonal elimination of the *CD2* cassette by FLP-mediated intramolecular recombination between the two *FRT* sites (>). This juxtaposes the *Act5C* promoter to *Gal4* and drives *UAS* transgene expression at a low uniform level in all cells of the clone.

Endocytosis Assay

Dissected third instar larval disc complexes were incubated in 1 mM fluorescein-dextran/lysine-fixable, MW 3,000 (Molecular Probes) in M3 cell culture medium at 25°C for 10 min (pulse), and then washed five times in ice-cold M3 medium. After a variable chase period (0–60 min), they were fixed in PEM plus 4% formaldehyde. Dextran is taken up by endocytosis and marks progressively later endosomal compartments as the chase time is increased (Entchev et al., 2000).

Protein Analysis

For the DI Westerns, wing disks of the appropriate genotypes were collected in ice-cold PBS and subsequently extracted in a buffer consisting of 300 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 8.0), 0.5% NP-40, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, and protease inhibitors. Laemmli gels were run in the absence of reducing agents. DI was detected on a Western blot using mAb C594.9B at 1:10,000. N-EC was detected using the same conditions and the C458.2H mAb at 1:1,000. N-IC was detected using reducing conditions and the C17.9C6 mAb at 1:5,000 (Fehon et al., 1990). We used anti- β -tubulin mAb (Amersham) at 1:4,000 as a loading control. The HRP-coupled goat anti-mouse IgG (Jackson Immunochemicals) was used at 1:10,000 and the blots were developed using a chemiluminescent substrate (Pierce).

For the subcellular fractionation analysis, we used *hs-Gal4; UAS-neur Δ RING-GFP* third instar larval brain disk complexes. The larvae had been heat-shocked for 1 hr at 38°C to induce the transgene and returned to room temperature for 3 hr before dissection. To strip membranes from peripherally associated proteins, we homogenized the tissue in 100 mM Na₂CO₃ (pH 11.5) (Fujiki et al., 1982) in the presence of protease inhibitors. After a 45 min incubation at 4°C, we separated the membrane and cytosolic fractions by ultracentrifugation (68,000 rpm in TLA-120 rotor, Beckman ultracentrifuge). For mild lysis, we used the same procedure, changing the lysis buffer to a hypotonic one, 25 mM HEPES (pH 7.9), 1.5 mM MgCl₂, and 10 mM KCl. We detected the *neur Δ RING-GFP* protein by Western blot (as above) using rabbit anti-GFP (Invitrogen) at 1:5,000 and HRP-coupled goat anti-rabbit IgG (Jackson Immunochemicals) at 1:15,000.

For the proteinase K protection analysis, we collected 50 third instar wing disks from *omb-Gal4; UAS-neur Δ RING-GFP* animals and incubated them intact in various concentrations of proteinase K in PBS (10 min at 30°C). PMSF (3 mM) was added to stop the reaction, and the tissue was homogenized directly in 1 \times Laemmli sample buffer. The fusion protein and β -tubulin were detected by Western blot, as above.

Acknowledgments

The authors would like to thank the members of the Delidakis, Averof, and Moschonas labs for support and encouragement. We also thank Annette Parks for teaching CP pupal dissections, Matt Rand for help with Western conditions, Spyros Artavanis-Tsakonas and Allen Laughon for providing materials, Yannis Livadaras for embryo injections, Despina Stamataki for help with fly work, and Isabel Guerrero for help with the dextran endocytosis assay. Numerous other workers have kindly provided materials and are mentioned in the text. This work was funded by the EPETII program of the Greek General Secretariat for Research and Technology and IMBB intramural funds. M.A.T.M. and K.M.K. were funded by NIH grant GM33291 to M.A.T.M.

Received September 4, 2001; revised November 5, 2001.

References

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., and Lake, R.J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770–776.

- Baker, N.E. (2000). Notch signaling in the nervous system. Pieces still missing from the puzzle. *Bioessays* 22, 264–273.
- Baker, N.E., and Yu, S.Y. (1998). The R8-photoreceptor equivalence group in *Drosophila*: fate choice precedes regulated Delta transcription and is independent of Notch gene dose. *Mech. Dev.* 74, 3–14.
- Blair, S.S. (2000). Notch signaling: Fringe really is a glycosyltransferase. *Curr. Biol.* 10, R608–R612.
- Boulianne, G.L., de la Concha, A., Campos-Ortega, J.A., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1993). The *Drosophila* neurogenic gene neuralized encodes a novel protein and is expressed in precursors of larval and adult neurons. *EMBO J.* 12, 2586.
- Brand, M., Jarman, A.P., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1993). *asense* is a *Drosophila* neural precursor gene and is capable of initiating sense organ formation. *Development* 119, 1–17.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Black, R.A., and Israel, A. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol. Cell* 5, 207–216.
- de Celis, J.F., Bray, S., and Garcia-Bellido, A. (1997). Notch signalling regulates veinlet expression and establishes boundaries between veins and interveins in the *Drosophila* wing. *Development* 124, 1919–1928.
- Diederich, R.J., Matsuno, K., Hing, H., and Artavanis-Tsakonas, S. (1994). Cytosolic interaction between *deltex* and Notch ankyrin repeats implicates *deltex* in the Notch signaling pathway. *Development* 120, 473–481.
- Di Fiore, P.P., and De Camilli, P. (2001). Endocytosis and signaling. An inseparable partnership. *Cell* 106, 1–4.
- Doherty, D., Feger, G., Younger-Shepherd, S., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1996). Delta is a ventral to dorsal signal complementary to Serrate, another Notch ligand, in *Drosophila* wing formation. *Genes Dev.* 10, 421–434.
- Entchev, E.V., Schwabedissen, A., and Gonzalez-Gaitan, M. (2000). Gradient formation of the TGF-beta homolog Dpp. *Cell* 103, 981–991.
- Fehon, R.G., Kooh, P.J., Rebay, I., Regan, C.L., Xu, T., Muskavitch, M.A.T., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci *Notch* and *Delta*, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell* 61, 523–534.
- Fehon, R.G., Johansen, K., Rebay, I., and Artavanis-Tsakonas, S. (1991). Complex cellular and subcellular regulation of Notch expression during embryonic and imaginal development of *Drosophila*: implications for Notch function. *J. Cell Biol.* 113, 657–669.
- Freemont, P.S. (2000). Ubiquitination: RING for destruction? *Curr. Biol.* 10, R84–R87.
- Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S., and Lazarow, P.B. (1982). Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: applications to endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 93, 97–102.
- Heitzler, P., and Simpson, P. (1991). The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*. *Cell* 64, 1083–1092.
- Huang, F., Dambly-Chaudière, C., and Ghysen, A. (1991). The emergence of sense organs in the wing disc of *Drosophila*. *Development* 111, 1087–1095.
- Huppert, S.S., Jacobsen, T.L., and Muskavitch, M.A. (1997). Feedback regulation is central to Delta-Notch signalling required for *Drosophila* wing vein morphogenesis. *Development* 124, 3283–3291.
- Jacobsen, T.L., Brennan, K., Martinez-Arias, A., and Muskavitch, M.A. (1998). Cis-interactions between Delta and Notch modulate neurogenic signalling in *Drosophila*. *Development* 125, 4531–4540.
- Jennings, B., Preiss, A., Delidakis, C., and Bray, S. (1994). The Notch signalling pathway is required for *Enhancer of split* bHLH protein expression during neurogenesis in the *Drosophila* embryo. *Development* 120, 3537–3548.
- Clueg, K.M., Parody, T.R., and Muskavitch, M.A. (1998). Complex proteolytic processing acts on Delta, a transmembrane ligand for Notch, during *Drosophila* development. *Mol. Biol. Cell* 9, 1709–1723.
- Kooh, P.J., Fehon, R.G., and Muskavitch, M.A.T. (1993). Implication of dynamic patterns of Delta and Notch expression for cellular interactions during *Drosophila* development. *Development* 117, 493–507.
- Lai, E.C., and Rubin, G.M. (2001). *neuralized* functions cell-autonomously to regulate a subset of Notch-dependent processes during adult *Drosophila* development. *Dev. Biol.* 231, 217–233.
- Lehman, R., Jiménez, F., Dietrich, U., and Campos-Ortega, J.A. (1983). On the phenotype and development of mutants of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 192, 62–74.
- Lieber, T., Kidd, S., Alcamo, E., Corbin, V., and Young, M.W. (1993). Antineurogenic phenotypes induced by truncated *Notch* proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function of *Notch* in nuclei. *Genes Dev.* 7, 1949–1965.
- Lopez-Schier, H., and St Johnston, D. (2001). Delta signaling from the germ line controls the proliferation and differentiation of the somatic follicle cells during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev.* 15, 1393–1405.
- McNiven, M.A., Cao, H., Pitts, K.R., and Yoon, Y. (2000). The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places. *Trends Biochem. Sci.* 25, 115–120.
- Mumm, J.S., and Kopan, R. (2000). Notch signaling: from the outside in. *Dev. Biol.* 228, 151–165.
- Neumann, C.J., and Cohen, S.M. (1998). Boundary formation in *Drosophila* wing: Notch activity attenuated by the POU protein Nubbin. *Science* 281, 409–413.
- Parks, A.L., Turner, F.R., and Muskavitch, M.A. (1995). Relationships between complex Delta expression and the specification of retinal cell fates during *Drosophila* eye development. *Mech. Dev.* 50, 201–216.
- Parks, A.L., Klueg, K.M., Stout, J.R., and Muskavitch, M.A. (2000). Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* 127, 1373–1385.
- Poodry, C.A. (1990). *shibire*, a neurogenic mutant of *Drosophila*. *Dev. Biol.* 138, 464–472.
- Price, B.D., Chang, Z., Smith, R., Bockheim, S., and Laughon, A. (1993). The *Drosophila* neuralized gene encodes a C3HC4 zinc finger. *EMBO J.* 12, 2411–2418.
- Qi, H., Rand, M.D., Wu, X., Sestan, N., Wang, W., Rakic, P., Xu, T., and Artavanis-Tsakonas, S. (1999). Processing of the Notch ligand Delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science* 283, 91–94.
- Rand, M.D., Grimm, L.M., Artavanis-Tsakonas, S., Patriub, V., Blacklow, S.C., Sklar, J., and Aster, J.C. (2000). Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric notch receptors. *Mol. Cell Biol.* 20, 1825–1835.
- Rooke, J., Pan, D., Xu, T., and Rubin, G.M. (1996). KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in *Drosophila* neurogenesis. *Science* 273, 1227–1231.
- Seugnet, L., Simpson, P., and Haenlin, M. (1997). Requirement for dynamin during Notch signaling in *Drosophila* neurogenesis. *Dev. Biol.* 192, 585–598.
- Speicher, S.A., Thomas, U., Hinz, U., and Knust, E. (1994). The *Serrate* locus of *Drosophila* and its role in morphogenesis of the wing imaginal discs: control of cell proliferation. *Development* 120, 535–544.
- Struhl, G., and Adachi, A. (2000). Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Mol. Cell* 6, 625–636.
- Yeh, E., Zhou, L., Rudzik, N., and Boulianne, G.L. (2000). Neuralized functions cell autonomously to regulate *Drosophila* sense organ development. *EMBO J.* 19, 4827–4837.
- Yeh, E., Dermer, M., Commisso, C., Zhou, L., McGlade, C.J., and Boulianne, G.L. (2001). Neuralized functions as an E3 ubiquitin ligase during *Drosophila* development. *Curr. Biol.* 11, 1675–1679.

The interplay between DSL proteins and ubiquitin ligases in Notch signaling

Chrysoula Pitsouli^{1,2} and Christos Delidakis^{1,2,*}

¹Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology Hellas, Heraklion, Greece

²Department of Biology, University of Crete, Heraklion, Greece

*Author for correspondence (e-mail: delidakis@imbb.forth.gr)

Accepted 12 July 2005

Development 132, 4041–4050

Published by The Company of Biologists 2005

doi:10.1242/dev.01979

Summary

Lateral inhibition is a pattern refining process that generates single neural precursors from a field of equipotent cells and is mediated via Notch signaling. Of the two Notch ligands Delta and Serrate, only the former was thought to participate in this process. We now show that macrochaete lateral inhibition involves both Delta and Serrate. In this context, Serrate interacts with Neuralized, a ubiquitin ligase that was heretofore thought to act only on Delta. Neuralized physically associates with Serrate and stimulates its endocytosis and signaling activity. We also characterize a mutation in *mib1*, a *Drosophila* homolog of

mind bomb, another Delta-targeting ubiquitin ligase from zebrafish. Mib1 affects the signaling activity of Delta and Serrate in both lateral inhibition and wing dorsoventral boundary formation. Simultaneous absence of *neuralized* and *mib1* completely abolishes Notch signaling in both aforementioned contexts, making it likely that ubiquitination is a prerequisite for Delta/Serrate signaling.

Key words: *Drosophila*, DSL, Notch, *mind bomb*, *neuralized*, Lateral inhibition

Introduction

Notch signaling is a widely used cell-cell signaling pathway that modulates cell fate and function in a great number of processes at all developmental stages of metazoans (Lai, 2004; Schweisguth, 2004; Yoon and Gaiano, 2005). It revolves around the transmembrane receptor Notch and its transmembrane ligands, known as DSL proteins, from their characteristic extracellular Notch-binding domain – the Delta/Serrate/Lag-2 (DSL) domain. Ligand-receptor binding precipitates a series of proteolytic events culminating in the release of the intracellular domain of Notch from the plasma membrane and its subsequent import into the nucleus, where it acts as a transcriptional co-activator. A major question is how DSL protein-Notch interactions bring about activation of the receptor. A curious association between Notch activation and endocytosis has been noticed for some time (Seugnet et al., 1997a); recent work has started unraveling this connection and suggests that it is partly due to the stimulation of signaling by endocytosis of DSL proteins. A discovery that helped formulate this hypothesis was the existence of E3 ubiquitin ligases that ubiquitinate Delta (DI) proteins and simultaneously promote Delta endocytosis and signaling (Chen and Corliss, 2004; Deblandre et al., 2001; Itoh et al., 2003; Lai et al., 2001; Le Borgne and Schweisguth, 2003; Pavlopoulos et al., 2001; Yeh et al., 2001). Membrane protein ubiquitination can promote their endocytosis by association with endocytic adaptor proteins that recognize the ubiquitin moiety (Haglund et al., 2003). One such adaptor protein is epsin. The recent discovery that Liquid facets (Lqf), the *Drosophila* epsin, is needed for DSL protein function supports the hypothesis that DSL protein ubiquitination and endocytosis are crucial events

in signal emission (Overstreet et al., 2003; Overstreet et al., 2004; Wang and Struhl, 2004).

DSL proteins from insects and vertebrates can be classified into two categories, Delta (DI) and Serrate/Jagged (Ser/Jag), based on conserved structural features of their extracellular domains (Fleming, 1998). These two families have different expression patterns and consequently function in distinct Notch-dependent processes. Expression pattern differences, however, are not the sole distinguishing feature of DSL proteins; the two families appear to show strong preference for binding to differentially glycosylated forms of Notch receptors (Haines and Irvine, 2003; Okajima et al., 2003) – glycosylation of Notch by Fringe stimulates DI signaling, whereas it inhibits Ser signaling. In terms of intracellular regulation, ubiquitin ligases had been described only for DI proteins, until very recently (see below); yet, the need for Epsin in order for both DI and Ser to emit their signal (Wang and Struhl, 2004) implicates ubiquitination also in Ser function. Two different E3 Ub ligases seem to affect DI function: Neuralized (Neur) has been characterized in *Drosophila* (Lai et al., 2001; Pavlopoulos et al., 2001) and *Xenopus* (Deblandre et al., 2001); and Mind bomb (Mib) in zebrafish (Itoh et al., 2003). Both associate with DI triggering its endocytosis. Apart from a catalytic RING domain at their C termini; Neur and Mib display no further similarity. During the course of 2005 (while this paper was under review), one *Drosophila* homolog of Mib, which we call Mib1, was initially characterized by two groups, who showed that it interacts with both DI and Ser and variably affects their activity and endocytosis (Lai et al., 2005; Le Borgne et al., 2005). Vertebrate Mib homologs were also shown to associate with both DI and Jag family members (Koo et al., 2005a;

Takeuchi et al., 2005). However, these papers did not make it clear whether different Ub ligases show preference for association with different DSL proteins, nor whether DSL proteins absolutely require Ub ligases in order to signal.

The present work and recent work done independently by Wang and Struhl (Wang and Struhl, 2005) have addressed both of these issues. Wang and Struhl (Wang and Struhl, 2005) conclusively showed that Mib1 is necessary for signal sending by both Dl and Ser in wing dorsoventral boundary establishment, a well-characterized instance of Notch signaling. In that context, absence of Mib1 can be rescued by ectopic provision of Neur. We have corroborated their findings and have further tested the role of Dl, Ser, Neur and Mib1 in a different instance of Notch signaling, lateral inhibition of neural precursors (Bray, 1998; Skeath and Thor, 2003). Lateral inhibition was heretofore thought to depend solely on Dl and Neur (Lai and Rubin, 2001; Lehman et al., 1983), with no input from Ser or Mib1 (Lai et al., 2005; Zeng et al., 1998). By contrast, wing DV boundary establishment requires both Dl and Ser (Irvine and Vogt, 1997); it also requires Mib1 but not Neur (Lai et al., 2005; Lai and Rubin, 2001; Le Borgne et al., 2005; Wang and Struhl, 2005). Lack of requirement of a factor in any given process may well be a result of its expression pattern; this seems to be the case for *neur*, which is not broadly expressed in wing cells during DV boundary establishment. Similarly, during embryonic neuroblast lateral inhibition, *Ser* is not expressed, making the process solely *Dl* dependent (Gu et al., 1995). We have focused on adult macrochaete SOP lateral inhibition, which takes place in the wing disk at the third larval instar, where all *Dl*, *Ser*, *neur* and *mib1* are expressed. Contrary to expectations, we show that both Dl and Ser participate in this process in a partially redundant fashion, and the same holds true for Neur and Mib1. More importantly, we show that simultaneous removal of *neur* and *mib1* results in a complete block of lateral inhibition. Our results lead us to conclude that (1) Ub ligases are absolutely required for DSL protein function (at least in the present contexts) and (2) either Ub ligase can activate either DSL protein. Our work, taken together with other recent papers (Wang and Struhl, 2004; Lai et al., 2005; Le Borgne et al., 2005; Wang and Struhl, 2005), is strongly in favor of a ubiquitin/epsin-mediated endocytosis pathway playing an indispensable role in the emission of DSL-Notch signals.

Materials and methods

Plasmids and transgenics

pUAST-EGFP-*neur* is a fusion of EGFP at the N terminus of Neur, which was generated by fusing a PCR product (primers available upon request) of *neur* in frame with EGFP from pEGFP-C1 (Clontech). The fusion site is DELYK-SGLRSR-GLSDIPANY (EGFP-*polylinker*-Neur).

pUAST-DIV5His was generated by subcloning an *EcoRI/DraI* fragment containing the V5-tagged *Dl*-coding sequence from pIZ-DIV5His (Bland et al., 2003) into pUAST cut with *EcoRI-XhoI* (filled-in).

Antibodies and immunohistochemistry

Anti-Neur polyclonal antisera

pRSET-*neur*1050 was generated by cloning a PCR fragment encoding amino acids 11-360 of Neur in frame with the 6×His tag of the pRSET-C vector (Invitrogen). The fusion protein was expressed in *E.*

coli and purified with Ni²⁺-affinity chromatography under denaturing conditions (Qiagen). Rabbit antiserum production and affinity purification was carried out by Davids Biotechnology.

Other antibodies

Mouse anti-Delta mAb9B (Qi et al., 1999)

Rabbit anti-Serrate (Klug and Muskavitch, 1999)

Guinea pig anti-Senseless (Nolo et al., 2000)

Mouse anti-Cut (Blochliger et al., 1990)

Mouse anti-Wg [developed by S. M. Cohen; obtained from DSHB (The Developmental Studies Hybridoma Bank was developed under the auspices of the NICHD and is maintained by The University of Iowa, Department of Biological Sciences)]

Mouse anti-V5 (Invitrogen)

Mouse anti-Myc mAb9E10 (developed by J. M. Bishop; obtained from DSHB)

Fluorescent and HRP-labeled secondary antibodies were from Molecular Probes and Jackson ImmunoResearch, respectively. Immunohistochemistry was performed as described by Pavlopoulos et al. (Pavlopoulos et al., 2001).

Transient transfections and immunoprecipitation

Transient transfections of S2 cells were carried out with the calcium phosphate precipitation method. pIZ-DIV5His (Bland et al., 2003) and pRMHa3-Sermyc (gift of R. Fleming) were used to express Delta and Serrate, respectively. pUAST-EGFP-*neur* and pUAST-*neur*ΔR-GFP were used to express Neur or NeurΔR in conjunction with mt-Gal4 (inducible by Cu²⁺). Transfected cell lysate was used for immunoprecipitation with rabbit anti-Neur antiserum and protein A sepharose. One percent of the total extract was used as control (input). For larval immunoprecipitations, the lysate was prepared from 30 third-instar disk-CNS complexes.

Drosophila stocks

Gal4 lines

C253-Gal4 (FlyBase: P{GawB}C253)

hs-sev-Gal4 (FlyBase: P{GAL4-Hsp70.sev}2)

dpp-Gal4^{40C6} (FlyBase: P{GAL4-dpp.blk1}40C.6)

act>CD2stop>Gal4 (FlyBase: P{GAL4-Act5C(FRT.CD2).PJS})

UAS lines

UAS-*src*GFP¹⁰ (FlyBase: P{UAS-*src*-GFP(S65T/I167T)})

UAS-*fng*^{22c} (FlyBase: P{UAS-*fng*.K})

UAS-Dl^{B41} (FlyBase: P{UAS-Dl.L})

UAS-Sermyc^{IC} (FlyBase: P{UAS-Ser.G})

UAS-*neur* (FlyBase: P{UAS-*neur*.P})

UAS-*neur*ΔRING-GFP (FlyBase: P{UAS-*neur*.DeltaRING::EGFP})

UAS-DIV5His (this work)

UAS-EGFP-*neur* (this work)

Fly stocks were either obtained via the Bloomington and Szeged Stock Centers or generously provided by colleagues.

Mosaic analysis

All alleles used are described in FlyBase. Mosaics were induced during the first larval instar using the conventional FLP/FRT technique (Xu and Rubin, 1993) or the MARCM system (Lee and Luo, 2001). For cross details see Table S1 in the supplementary material.

Results

Note on nomenclature

We use '*mind bomb1*' and '*mind bomb2*' for the *Drosophila* homologs of zebrafish *mind bomb*. We favor this over the recently proposed alternative nomenclature *D-mib* and *D-mibl*

(Lai et al., 2005; Le Borgne et al., 2005), as it has been agreed not to use the prefix *D-* for *Drosophila* genes. The symbol *mib* already exists in the fly gene collection for the gene *miniature bristles* (FlyBase FBgn0002744), whereas *mib1* and *mib2* are available.

Both *DI* and *Ser* participate in lateral inhibition of macrochaete SOPs

To address the role of DSL proteins in lateral inhibition, we focused on the third instar notum, where nine SOPs arise in a well-defined pattern. We first confirmed that both *DI* and *Ser* are expressed within the proneural clusters giving rise to these SOPs, although the *DI* and *Ser* patterns are not entirely identical (see Fig. S1 in the supplementary material). To visualize SOPs we used the nuclear protein Senseless (Nolo et al., 2000) as a marker. By counting the number of SOPs per position in different mutant mosaic clones, we could conclude about the extent of the lateral inhibition defect. Our first indication that *DI* was not solely responsible for lateral inhibition in these regions was that *DI* clones showed a much weaker defect than either *N* clones or doubly mutant *DI Ser* clones (Fig. 1A-C; Table 1); the latter contained a lot more (typically more than 10) Senseless-positive cells per SOP position, whereas *DI* clones usually had two to four SOPs, and some were even wild-type in appearance (one SOP). Yet, *Ser* singly mutant clones did not affect SOP numbers (Fig. 1D). As the difference between our *DI* and *DI Ser* clones could conceivably be due to some background mutation(s) other than *Ser*, we sought an independent way to assay the role of *Ser*. One way to inactivate any *Ser* contribution in signaling is to overexpress *fringe*, as Fringe-modified Notch is refractory to *Ser* signaling. *DI; UAS-fringe* clones (using the very same *DI* chromosome, which gave a mild phenotype) were generated using the MARCM system, which inactivates one gene while simultaneously overexpressing another within the same clone. These clones displayed a significantly higher number of SOPs per cluster than *DI* alone (Fig. 1E, Table 1, $P < 0.05$). The control experiment of overexpressing *UAS-fringe* in a wild-type background produced no defect in SOP numbers. As two independent ways of blocking *Ser* activity enhanced the *DI* mutant phenotype, we conclude that in normal tissue *Ser* contributes to lateral inhibitory Notch signaling.

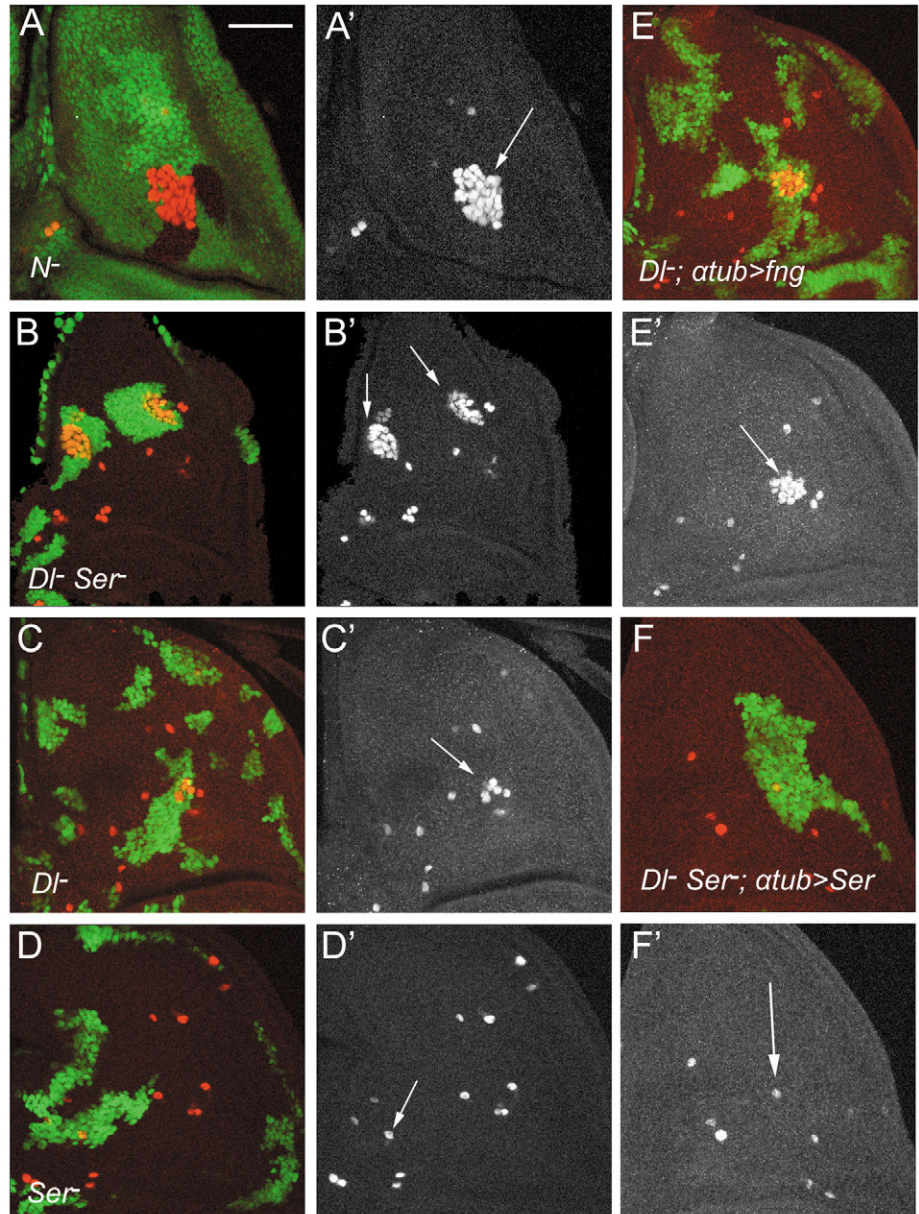


Fig. 1. *DI* and *Ser* act redundantly during lateral inhibition. Third instar notum are stained for Senseless (red), to visualize SOPs. Proximal is upwards, anterior is towards the left. Scale bar: 40 μ m. (A) *Notch* mutant cells marked by absence of GFP. (B-F) Mutant cells marked by presence of GFP. (A'-F') Red/Sens channels of A-F, respectively; mutant areas are indicated by arrows. (A) *N* or (B) *DI Ser* clones display a large number of clustered ectopic SOPs. This phenotype probably represents the complete loss of lateral inhibition. By contrast, (C) *DI* mutant clones show only a few ectopic SOPs and (D) *Ser* mutant clones appear wild type. (E) *DI* mutant clones simultaneously expressing *UAS-fringe* display a more severe phenotype than *DI* (C). (F) *DI Ser* mutant clones expressing *UAS-Ser* appear wild type.

From the previous experiment it appears that whereas *DI* is sufficient for lateral inhibition (*Ser*⁻), *Ser* is not (*DI*⁻). This could be due to qualitative differences in the signal produced by each ligand; alternatively, the ligands could be interchangeable, but their expression levels might make one more essential. We therefore sought to increase the levels of either ligand in order to ask whether at sufficiently high levels either one would carry out lateral inhibition independently of

Table 1. Lateral inhibition defects in third instar nota

Genotype*	Strong [†]	Moderate [†]	Weak [†]	Wild type [†]	<i>n</i>
<i>N⁵⁴¹⁹</i>	44.5	26	26	3.5	27
<i>Dl^{rev10} Ser^{RX106}</i>	70.5	21.5	6	2	51
<i>Dl^{rev10}</i>	11	11	41	37	27
<i>Ser^{RX106}</i>	0	0	0	100	24
<i>Dl^{rev10}+UAS-fng^{22c}</i>	47	12.5	28	12.5	32
<i>Dl^{rev10} Ser^{RX106}+UAS-Dl^{B41}</i>	0	8.5	0	91.5	24
<i>Dl^{rev10} Ser^{RX106}+UAS-Ser^{JC}</i>	0	0	26	74	23
<i>Dl^{rev10}+UAS-Ser^{JC}</i>	0	0	0	100	14
<i>UAS-fng^{22c}</i>	0	0	0	100	11
<i>UAS-Dl^{B41}</i>	0	0	0	100	20
<i>UAS-Ser^{JC}</i>	0	0	0	100	42
<i>neur¹</i>	11	33.5	48	7.5	27
<i>neur¹ Dl^{rev10}</i>	50	35	15	0	20
<i>neur¹ Ser^{RX106}</i>	33.5	47	19.5	0	36
<i>mib1^{EY9780}</i>	0	0	0	100	18
<i>mib1^{EY9780} neur¹‡</i>	82.5	17.5	0	0	17
<i>mib1^{EY9780} Dl^{rev10}‡</i>	40	45	5	10	20
<i>mib1^{EY9780} Ser^{RX106}‡</i>	0	0	0	100	24

Only clones in late larval nota were scored (SOP positions ASC, PSC, ADC, PDC, APA, tr1, PSA, ANP, PNP) (see Huang et al., 1991). *n*, number of SOP positions scored. No phenotypic preferences were seen depending on the specific SOP position. We therefore grouped all notum SOP positions for the statistical analysis. Some clones must have intersected proneural clusters (rather than wholly encompassing them) – these account for the rare occurrences of weak defects in genotypes known to completely abolish lateral inhibition (e.g. *N⁵⁴¹⁹* and *Dl^{rev10} Ser^{RX106}*). Additionally, *N⁵⁴¹⁹* clones had a partially penetrant growth defect; as a result some of the very small clones (two to seven cells) that were entirely composed of SOPs were placed in the weak/moderate categories – none of the other genotypes had any growth defects. *P*-values given in the text refer to pairwise comparisons using a χ -square test.

*Genotype refers to the homozygous genotype of mutant clones. *UAS* transgenes were expressed only within mutant clones using *atub-Gal4*.

[†]Shown are percentages of SOP positions falling in different categories, which were defined as follows: wild type, one SOP; weak, between one and four SOPs; moderate, between four and eight SOPs; strong, at least eight SOPs.

[‡]Double combinations with *mib1^{EY9780}* were generated as mosaic clones of the other allele (*neur¹*, *Dl^{rev10}* or *Ser^{RX106}*) in a uniform *mib1^{EY9780}* genetic background.

the other. This turned out true, as the excessive number of SOPs in *Dl Ser* clones could be rescued to the wild-type single SOP, when we provided uniform expression of either a *UAS-Dl* (Table 1) or a *UAS-Ser* transgene within the clone (Fig. 1F; Table 1). Furthermore, the milder excess-SOP phenotype of *Dl* clones could be rescued by a *UAS-Ser* transgene (Table 1), confirming that simply increasing the levels of Ser can compensate for the lack of Dl. As a control, clonal ubiquitous expression of *UAS-Dl* or *UAS-Ser* did not affect SOP number (Table 1), suggesting that the overexpression levels attained in these experiments were not so high as to result in cis-inactivation of Notch signaling (de Celis and Bray, 1997; Li and Baker, 2004; Micchelli et al., 1997). By image densitometry, we estimated the overexpression levels to be approximately two- to threefold (see Fig. S2A,B in the supplementary material) of the endogenous levels, using regions of strong endogenous expression as reference. In conclusion, it appears that Ser, as well as Dl, can sustain lateral inhibition alone, but endogenous levels of Ser are limiting, whereas Dl is in plentiful supply. An important corollary from this experiment is that transcriptional modulation of *Dl* (or *Ser*) is not a prerequisite for lateral inhibition, as we obtained a

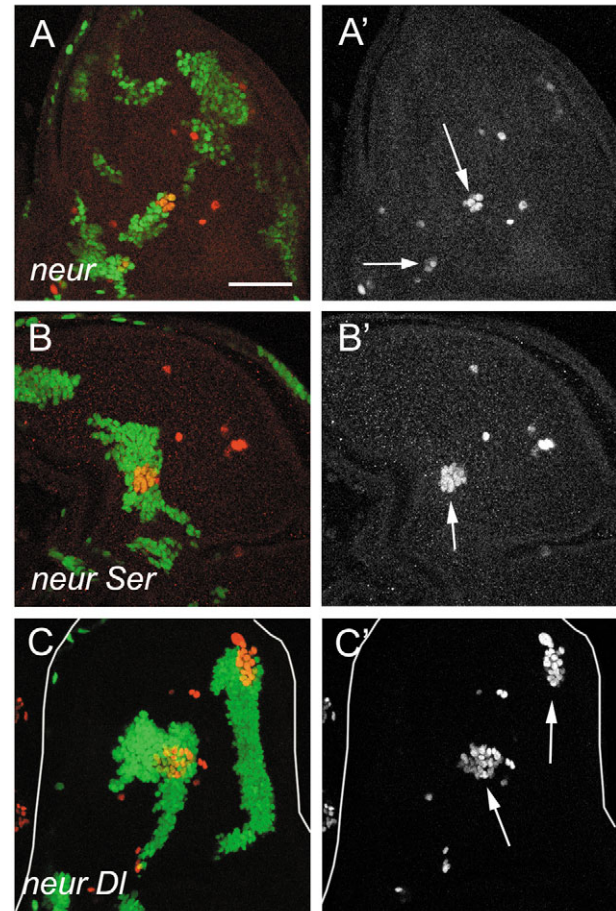


Fig. 2. *Neur* enhances *Dl* or *Ser* loss of function. (A–C) Nota stained for Senseless (red) to visualize SOPs; Sens channel shown separately in A'–C'. Mutant areas are indicated by arrows. Proximal is upwards, anterior is towards the left. Scale bar: 40 μ m. Mutant cells express GFP. (A) *neur* mutant clones display weak/moderate SOP overcommitment. By contrast, (B) *neur Ser* clones and (C) *neur Dl* clones display a much more severe SOP overcommitment. In C the outline of the notum is drawn.

wild-type phenotype with either ligand expressed uniformly via *atub-Gal4* (Fig. 1F, Table 1).

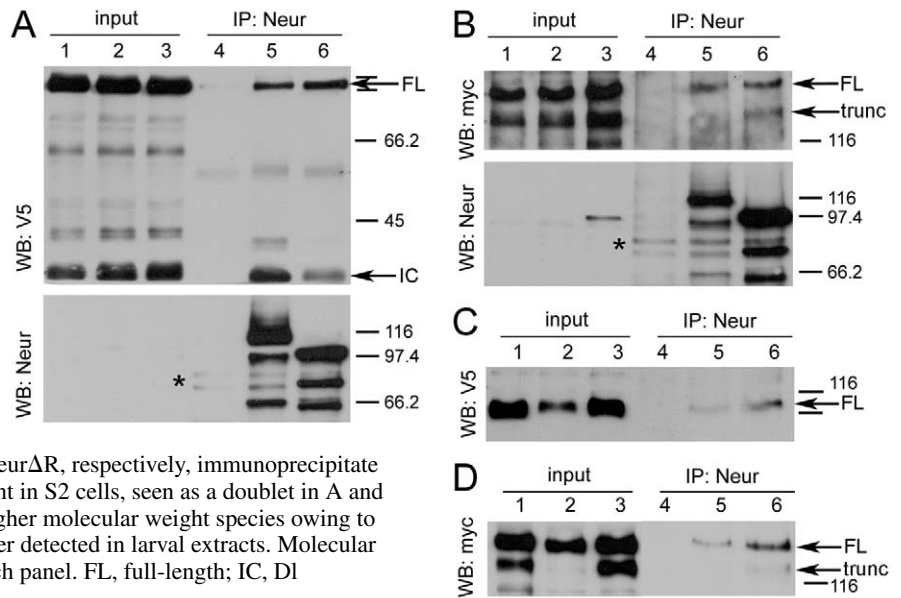
Neutralized modulates the activity of both *Dl* and *Ser* in lateral inhibition

We and others have previously shown that *Dl* activity is augmented by its association with Neutralized (Lai et al., 2001; Pavlopoulos et al., 2001). Any possible influence of *Neur* on *Ser* had so far remained an unanswered question. In fact, recent data has suggested that *Neur* may act primarily on *Dl*, whereas *Mib1* may act primarily on *Ser* (Le Borgne et al., 2005). We generated doubly mutant clones between *neur* and *Dl* or *Ser* to assess the ability of *neur* to modify the DSL mutant phenotype. In both cases, *neur* enhanced the phenotype (Fig. 2B,C; Table 1), suggesting that either *Dl* alone (in *Ser* clones) or *Ser* alone (in *Dl* clones) is more active in the presence than in the absence of *neur*⁺.

An interesting observation in this series of experiments was that in contrast to the severe phenotypes of *neur Dl* or *neur Ser* clones, *neur* clones displayed only a weak-moderate defect in

Fig. 3. Physical association between Neur and DSL proteins. (A,B) Immunoprecipitations from transfected S2 cells expressing V5-tagged DI (A) or myc-tagged Ser (B), along with nothing (lanes 1,4), EGFPneur (lanes 2,5) or neur Δ R-GFP (lanes 3,6). Lanes 1-3: cell extract (input). Lanes 4-6: anti-Neur immunoprecipitate.

(C,D) Immunoprecipitations from larval disk/CNS complexes. (C) *hs-Gal4; UAS-DI-V5* along with another *UAS* transgene as follows: nothing (lanes 1,4), *UAS-EGFPneur* (lanes 2,5) or *UAS-neur Δ R-GFP* (lanes 3,6). (D) *hs-Gal4; UAS-Ser-myc* plus another *UAS* transgene, as in C. In lanes 4 of all panels (no Neur expressed) no DSL protein is detected, showing the specificity of the immunoprecipitation. In lanes 5 and 6, Neur and Neur Δ R, respectively, immunoprecipitate both DI and Ser. Endogenous Neur protein is present in S2 cells, seen as a doublet in A and B (lane 4, asterisks). Transfected Neur produces higher molecular weight species owing to the GFP tags. Curiously the DI_{IC} fragment was never detected in larval extracts. Molecular mass standards are shown in kDa to the right of each panel. FL, full-length; IC, DI intracellular fragment; trunc, truncated Ser.



lateral inhibition (Fig. 2A), somewhat more severe than *DI* clones. We concluded that each ligand has residual activity in the absence of Neur, which we subsequently showed to be dependent on Mib1 (see below).

Neur associates with Ser and affects its subcellular localization

The fact that Ser activity seems to be influenced by Neur (Fig. 2) prompted us to investigate whether Neur can associate with Ser and modify its subcellular localization in an analogous manner to its effects on DI (Lai et al., 2001; Pavlopoulos et al., 2001). Association was assayed by co-immunoprecipitation. We used Schneider S2 cells or transgenic larval tissue, in both cases overexpressing epitope-tagged DSL protein and EGFP-tagged Neur. Immunoprecipitation of transfected S2 cell extracts using anti-Neur antiserum was able to specifically co-precipitate DI protein, as well as its intracellular proteolytic product (DI_{IC}), presumably cleaved extracellularly near the trans-membrane domain (Bland et al., 2003) (Fig. 3A,C). The Neur antiserum could similarly immunoprecipitate Ser (Fig. 3B,D). We were not able to detect a short Ser_{IC} fragment comparable with DI_{IC}; instead two major high molecular weight bands were obtained, one consistent with the predicted size for the FL protein and the other apparently lacking part of the extracellular domain (truncated Ser). When a Neur Δ R mutant was used, which lacks the RING domain, essentially the same results were obtained, suggesting that the RING domain is dispensable for association with DSL proteins. Negative controls were performed using *lacZ* or *groucho*: no β -galactosidase or Groucho was detected in the anti-Neur immunoprecipitates (data not shown). Even though association between either DSL protein and Neur was detected in both S2 cells and larval tissues, we were unable to observe any interactions between various fragments of Neur and the intracellular domains of DI or Ser in a yeast two-hybrid approach (V. Baoussis and C.D., unpublished).

Like DI, Ser is found both on the apical plasma membrane and in intracellular vesicles, both endogenously and when

overexpressed in wing disk cells (Fig. 4A,C). This changed dramatically when a *UAS-neur* transgene was co-expressed; Ser was cleared from the apical surface (Fig. 4B,C). The subapical intracellular aggregates were not affected in the case of endogenous Ser, but were greatly increased in the case of overexpressed Ser. Using an *EGFP* tagged *neur* transgene (which behaves identically to our untagged *UAS-neur*; data not shown), we showed that most of the subapical Ser-overexpressing aggregates also accumulated Neur, which additionally remained ubiquitously cortical, mostly on the apical side (Fig. 4B,E). This cortical localization is what is normally observed for Neur in the absence of co-overexpressed DSL ligand (Fig. 4C,D), suggesting that the large number of Ser-positive/Neur-positive intracellular aggregates probably appear because of impaired trafficking caused by Ser overexpression. This response of endogenous and overexpressed Ser to Neur is identical to what has been previously described for DI (Lai et al., 2001; Pavlopoulos et al., 2001). Using *DI* or *Ser* mutant backgrounds, we showed that Neur elicits endocytosis of each DSL protein independently of the presence of the other (see Fig. S3 in the supplementary material); this refutes the possibility that the effects of Neur on Ser are due to DI-Ser interactions.

Mind bomb1 acts redundantly with Neur in lateral inhibition

Despite its physical and functional association with both DSL proteins (Lai et al., 2001; Pavlopoulos et al., 2001) (this work), *neur* loss of function has only a mild lateral inhibition defect compared with *DI Ser* loss of function (Table 1, Fig. 2). This led us to conclude that there is substantial Neur-independent DSL activity. The characterization of *mind bomb* as a DI-targeting Ub ligase in zebrafish (Chen and Corliss, 2004; Itoh et al., 2003) made us wonder whether a possible *Drosophila* ortholog might be responsible for this activity. BLAST search identified two *Drosophila* genes with close similarity to zebrafish *mib*, *CG5841* and *CG17492*, which we henceforth call *mib1* and *mib2*, respectively. Of these, Mib1 has a better

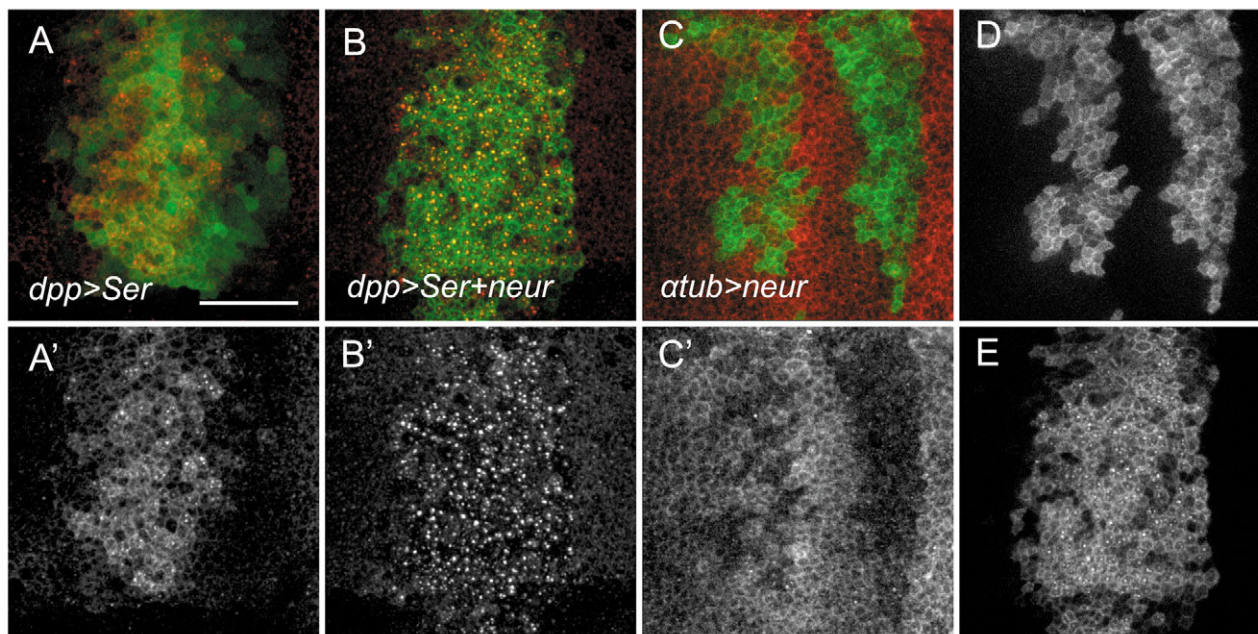


Fig. 4. Neur induces Ser endocytosis. Details of wing pouches are shown; anterior is towards the left, dorsal is upwards and the DV boundary is at the bottom of each panel. Scale bar: 20 μm . (A,B) *dpp-Gal4; UAS-Ser* with co-expression of *UAS-GFP* (A) or *UAS-EGFPneur* (B). GFP (green) marks the domain of overexpression and Ser (red) is shown separately in A' and B'. Neur causes loss of pericellular staining and an increase in intracellular aggregates in B. (C) Effects of mosaic expression of *UAS-EGFPneur* on endogenous Ser (red, C'). In cells expressing EGFPneur (green), apical Ser staining is lost. The detection sensitivity for Ser is increased in C compared with A,B to image endogenous Ser levels. (D,E) Green (EGFPneur) channels of C,B, respectively. EGFPneur is cortical with little punctate accumulation when no DSL protein is co-overexpressed (D); when Ser is co-overexpressed there is additional accumulation into punctate structures, which also contain Ser (yellow dots in B). All images are projections of the apical-most 1.5–2 μm of the wing epithelium.

similarity to zebrafish Mib. In situ hybridization to embryos revealed a segmentally repeated stripe pattern of *mib1* mRNA at stage 9–10, which disappears later, whereas third instar wing disks showed low ubiquitous expression (data not shown) (see also Le Borgne et al., 2005). The *Drosophila* gene disruption project (Bellen et al., 2004) has generated a P-element insertion, *EY9780*, which disrupts the *mib1* gene in the 5' UTR. *EY9780* homozygotes survive to pupal stage with a good percentage of pharate adult escapers. These have small, almost non-existent, eyes and wings, and short legs (data not shown) (Lai et al., 2005; Le Borgne et al., 2005). We could not detect any *mib1* mRNA in *EY9780* homozygotes by RT-PCR (data not shown). Based on this and on the fact that excision of the P-element reverted the lethality (data not shown), we concluded that this P-element represents a null allele of *mib1* and we designated it as *mib1^{EY9780}* [see also complementary evidence elsewhere (Lai et al., 2005; Le Borgne et al., 2005; Wang and Struhl, 2005)].

mib1^{EY9780} pharate adults showed a mild increase in microchaete density and only occasional macrochaete duplications (data not shown); therefore, loss of *mib1* does not particularly affect lateral inhibition. When, however, we induced *neur* mutant clones in a homozygous *mib1* background, we observed a large number of ectopic SOPs (Fig. 5), a phenotype much more severe than that of *neur* clones and indistinguishable from that of *N* or *DI Ser* clones (Table 1). It appears, therefore, that Neur and Mib1 have redundant roles in lateral

inhibition. We took advantage of our finding that macrochaete lateral inhibition can be carried out by each individual Notch ligand, to a certain extent at least (Fig. 1), to ask whether Mib1 affects one or both DSL proteins. A *mib1* background

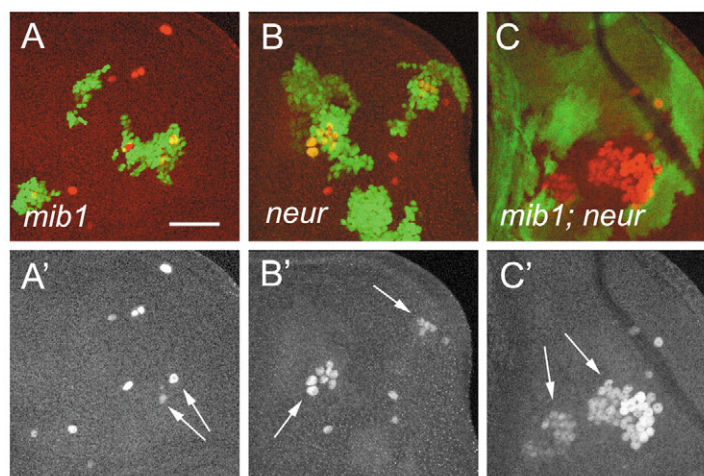


Fig. 5. *mib1* enhances the lateral inhibition phenotype of *neur*. (A–C) Notch stained for Sens (red, A'–C') to reveal SOPs. (A,B) Mutant clones marked by GFP expression; (C) mutant clones marked by GFP absence. Arrows indicate mutant areas. (A) *mib1^{EY9780}* clones do not produce supernumerary SOPs. (B) *neur¹* mutant clones show mild defects. (C) *neur¹* mutant clones in a *mib1^{EY9780}* background show severe hyperplasia of SOPs. Scale bar: 40 μm .

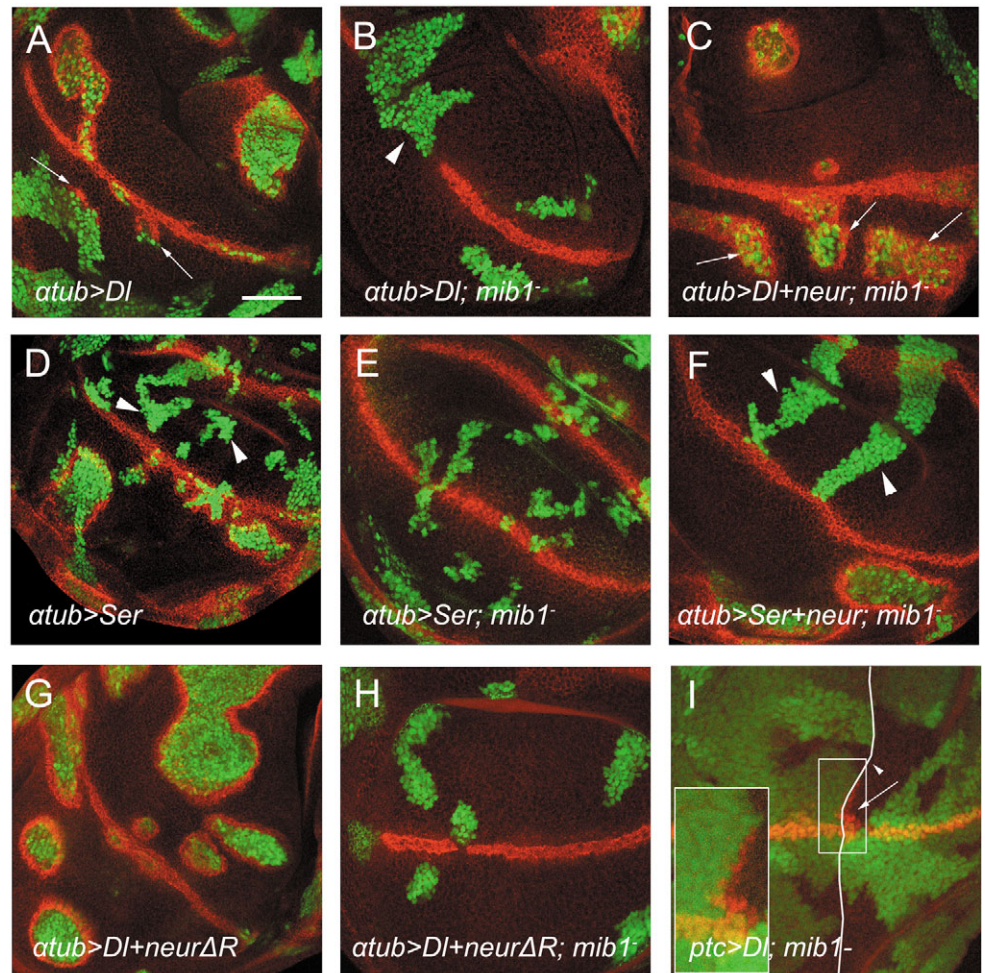
enhanced the phenotype of *Dl* clones ($P < 0.05$; Table 1), suggesting that *Ser* is less active when *Mib1* is removed. However, *Ser* clones in a *mib1* background appeared wild type. Therefore, *Dl* retains full activity in the presence of only *Neur*, whereas *Ser* requires both *Mib1* and *Neur* for full activity during lateral inhibition.

Mind bomb1 has similar activity to *Neur*

The enhancement of the *neur* phenotype by *mib1* may indicate that *Neur* and *Mib1* act in parallel and have similar molecular functions, or they could have distinct functions in the same pathway, as partial block of signal flow in two steps along a pathway can result in an enhanced phenotype (e.g. *neur Dl* versus either *neur* or *Dl*). To address *Neur*-*Mib1* interchangeability, we turned to wing DV boundary induction. When DSL proteins are expressed ectopically in the wing pouch, they induce ectopic Notch targets (e.g. *wg*) in a compartment-specific manner: *Dl* being active preferentially in the D compartment (Fig. 6A) and *Ser* being active exclusively

in the V compartment (Fig. 6D). In *mib1* clones, overexpressed DSL proteins were unable to induce ectopic *Wg* (Fig. 6B,E) – even endogenous *Wg* was abolished. Therefore, *Mib1* appears to be needed for signal emission by both DSL ligands in the wing pouch, where *neur* is not normally expressed. Reciprocally, *Mib1* appears dispensable for signal reception: *mib1*⁺ cells were able to express *Wg* when they abutted a *mib1*⁺ stripe of cells ectopically expressing *Dl* (Fig. 6I). When we co-expressed *Neur* with either DSL protein in *mib1* clones, the ligands regained their ability to induce *Wg* (Fig. 6C,F); in fact, *Dl* was hyperactivated, just as it is when co-expressed with *Neur* in a wild-type background (Pavlopoulos et al., 2001). Therefore, *Neur* can substitute for the lack of *Mib1* activity during wing DV boundary specification in agreement with recent reports (Le Borgne et al., 2005; Wang and Struhl, 2005). These experiments clearly show that each Ub ligase can activate DSL signaling alone (in the absence of the other ligase). This is consistent with the two Ub ligases having similar molecular functions, as has also been suggested by their

Fig. 6. *Dl* and *Ser* signaling in the wing pouch needs ubiquitin ligase activity. (A–H) *Wg* (red) in wing pouches carrying mutant clones marked by the expression of GFP (green). In all panels, ventral is downwards. Scale bar: 40 μ m; 60 μ m in D,G. (A,B) Clones overexpress *UAS-Dl* in a wild-type (A) or *mib1* (B) background. Whereas ectopic *Wg* is induced by dorsal and (less) by ventral (arrows) clones in A, no *Wg* induction is observed in B. The endogenous *Wg* stripe is abolished (arrowhead); this is also observed in *mib1* clones without *Dl* overexpression (data not shown). (C) *mib1* clones overexpressing *UAS-Dl* together with *UAS-neur* restore *Wg* induction; in fact *Dl* activity in the ventral compartment is enhanced (arrows, compare with A). (D,E) Clones overexpress *UAS-Ser* in a wild-type (D) or *mib1* (E) background. *Ser* induces *Wg* exclusively in the ventral compartment (D), but not when expressed in *mib1* cells (E). (F) *Ser* regains its activity to induce *Wg* in a *mib1* background, if it is co-expressed with *UAS-neur*. *Ser* cannot induce *Wg* in the dorsal compartment, irrespective of the presence of ubiquitin ligases (D,F; arrowheads), probably owing to high *Fng* levels. (G) Co-expression of *UAS-Dl* with *UAS-neur* ΔR in a wild-type background efficiently induces ectopic *Wg* in both compartments, indicative of increased *Dl* activity (compare with A). (H) This is abolished by loss of *mib1*. (I) Cut is imaged (red), which is a nuclear marker for the DV boundary. *mib1* mutant clones are marked by the absence of GFP. *UAS-Dl* is overexpressed via *ptc-Gal4*, which drives expression just anterior of the anteroposterior boundary (white line). In the cells posteriorly adjacent to this expression domain (to the right of the white line), ectopic Cut is detected within *mib1* cells if they abut anterior wild-type cells (arrow), but not if they abut mutant anterior cells (arrowhead). Inset shows an enlargement of the boxed area; the Cut-positive nuclei, which do not contain GFP appear red. The presence of these Cut-positive *mib1* mutant cells suggests that *mib1*⁺ is not needed for signal reception.



biochemical analysis (Deblandre et al., 2001; Itoh et al., 2003; Lai et al., 2001; Lai et al., 2005).

The mechanism via which Neur and Mib1 activate the DSL proteins has not been established; a likely hypothesis is that it involves one or more ubiquitination events, which target DI and Ser for endocytosis. This is supported by the need for Epsin, a ubiquitin-binding endocytic adaptor protein, specifically for Notch signal emission but not signal reception (Overstreet et al., 2004; Wang and Struhl, 2004). We had previously challenged the view that DI ubiquitination/endocytosis is necessary for its activity, as *Neur* Δ R, which has lost the ubiquitin ligase catalytic domain, could hyperactivate DI in a *wg* induction assay, behaving similarly to wild type *Neur* (Pavlopoulos et al., 2001). We assayed the ability of DI and *Neur* Δ R to induce *wg* when co-expressed in *mib1* clones (Fig. 6G,H). Unlike the high activity detected in wild-type background, this combination was completely inactive. The most likely explanation is that DI cannot signal if ubiquitination is abolished. A further conclusion is that *Neur*(Δ R) has some additional DI stimulatory activity (besides ubiquitination) that, however, can only be manifested when ubiquitination is feasible (in *mib1*⁺ cells; compare Fig. 6G with 6A); it remains to be discovered what the molecular basis for this activity is.

Discussion

The roles of DSL proteins in lateral inhibition

Until now, it was thought that lateral inhibition in notum SOPs was solely mediated via DI (Zeng et al., 1998) and that *DI* transcriptional upregulation in the nascent neural precursor was crucial for a DI-N negative feedback loop to establish the neural precursor fate within a group of equivalent cells (Heitzler and Simpson, 1991). Our data have refuted both of these models, as endogenous Ser has been shown to participate in lateral inhibition of macrochaete SOPs (Fig. 1) and either DI or Ser uniformly expressed is able to produce a wild-type pattern of macrochaetes (Fig. 1, Table 1). DI transcriptional upregulation in the absence of Notch signaling in proneural fields does occur (Koelzer and Klein, 2003; Schweisguth and Posakony, 1994), but this modulation does not appear to be a prerequisite for the specification of the wild-type neural precursor, at least in the case of macrochaetes (this work) and embryonic neuroblasts (Seugnet et al., 1997b). It is possible that the genetically detected N-DI negative feedback loop may reflect DI and N activity rather than transcription, although a transcriptional input has been documented (Heitzler et al., 1996). An exciting possibility, given the reliance of DSL activity on ubiquitin ligases, is that this feedback loop targets transcription of *neur*, rather than *DI*. *mib1* is an unlikely target as it shows no transcriptional modulation within proneural regions.

Ubiquitin ligases and DSL protein function

Although *Neur* was known to affect DI localization and function in some instances (Lai et al., 2001; Lai and Rubin, 2001; Le Borgne and Schweisguth, 2003; Pavlopoulos et al., 2001; Yeh et al., 2000), ubiquitin ligases were not considered as essential components of Notch signaling. The characterization of *Mib1* described here and in recent papers (Lai et al., 2005; Le Borgne et al., 2005; Wang and Struhl,

2005) points to a much more prominent role of these factors. *mib1* appears to be required in a large number of Notch-dependent processes where *neur* is not expressed, e.g. the wing DV boundary. The fact that *mib1 neur* double mutants appear to lose all ability to perform lateral inhibition (Fig. 5) strongly supports the hypothesis that Ub ligases may always be required for DI/Ser signaling. A comprehensive survey of Notch-dependent events with respect to *neur* and *mib1* will test this hypothesis and may uncover additional E3 ligases with this activity; *Mib2* represents a potential candidate.

The intimate relation between *Neur*/*Mib1* and DSL proteins is generally assayed in three ways: (1) physical association, (2) effects on DI/Ser endocytosis and (3) effects on DI/Ser signaling. All of these had been well documented for the *Neur*-DI combination (Lai et al., 2001; Pavlopoulos et al., 2001) and, more recently, for the *Mib1*-DI and *Mib1*-Ser combinations (Lai et al., 2005; Le Borgne et al., 2005; Wang and Struhl, 2005) (this work). In the present work we have added the final pair, *Neur*-Ser, using all of the above assays. The conclusion, stated simply, is that both *Neur* and *Mib1* associate with and affect the endocytosis and function of both DI and Ser.

Mechanism of DI/Ser signaling

Ubiquitination of transmembrane proteins tags them for endocytosis, using a complex of adaptors, including epsin, which carry ubiquitin recognition domains (Haglund et al., 2003). The simplest scenario for the role of *Neur*/*Mib1* in DI/Ser signaling would be that they attach ubiquitin to DI/Ser to trigger endocytosis. Signaling would ensue, either as a consequence of recruiting/clustering ubiquitinated DSL cargo to specialized plasma membrane domains conducive to signaling, or by more elaborate routes involving DSL protein recycling through the endocytic pathway as a prerequisite for their modification/activation (Wang and Struhl, 2004).

Alternatively, *Neur*/*Mib1* need not ubiquitinate the DSL proteins directly. In the ubiquitin-dependent endocytosis pathway, many of the adaptor proteins are themselves ubiquitinated, possibly favoring the formation of interconnected cargo-adaptor complexes (Polo et al., 2002); *Neur*/*Mib1* could have one or more of the adaptors, including themselves, as substrates. DSL protein chimaeras become *Mib1* independent if their intracellular domains are substituted with ones bearing alternative internalization motifs (Wang and Struhl, 2005). Of two such artificial *Mib1*-independent versions of DI, one is ubiquitination/epsin-independent (DI-LDL-receptor fusion), whereas the other (DI-random-peptide-R fusion) still curiously requires ubiquitination/epsin for activity (Wang and Struhl, 2004). Nothing is yet known about the native DI/Ser intracellular domains, other than the puzzling fact that they are neither similar nor evolutionarily conserved, despite apparent conservation of recognition by *Neur*/*Mib1*.

An even more puzzling observation in the light of our model is that some DSL proteins in *C. elegans* appear to be secreted (Chen and Greenwald, 2004). Secreted mutants of *Drosophila* DI and Ser act as Notch antagonists (Mishra-Gorur et al., 2002; Sun and Artavanis-Tsakonas, 1997), consistent with a requirement for endocytosis in DSL signaling. Even *C. elegans* LAG-2 (a transmembrane DSL) needs EPN-1 (epsin ortholog), in order to signal to GLP-1 (Notch-like) during germline differentiation (Tian et al., 2004), which is hard to reconcile with secreted DSL proteins. Apparently, ubiquitination/

endocytosis can be bypassed in some contexts, allowing secreted DSL proteins to signal via a yet unknown process.

Whatever the molecular details and variations turn out to be, we are quickly coming to realize that ubiquitination plays a prominent role in Notch signaling, in both sending and receiving cells. In the latter, Ub ligases downregulate Notch activity either at the membrane (Qiu et al., 2000; Sakata et al., 2004; Wilkin et al., 2004) or in the nucleus (Gupta-Rossi et al., 2001; Oberg et al., 2001; Wu et al., 2001). Besides downregulation, however, Notch ubiquitination is also needed for activation: ubiquitination apparently targets Notch to a compartment where it can be activated by γ -secretase cleavage (Gupta-Rossi et al., 2004). How two ubiquitination/trafficking events, activating DSL proteins in one cell and Notch in another, might be coordinated across the extracellular space is a mystery worth investigating in the future.

The authors thank Kiki Kanakousaki for help with staining and in situ, and Ioannis Livadaras and Giorgos Vrentzos for technical assistance. We also thank Gary Struhl, Sarah Bray, Matt Rand, Marc Muskavitch, Spyros Artavanis-Tsakonas, Hugo Bellen and Bob Fleming for generously providing flies and reagents. This work was funded in part by the Herakleitos program of the Greek Ministry for Education and by IMBB intramural funds.

Supplementary material

Supplementary material for this article is available at <http://dev.biologists.org/cgi/content/full/132/18/4041/DC1>

Note added in proof

Koo et al. (Koo et al., 2005b) have studied murine Mib1 and have come to a similar conclusion, namely that Mib1 associates with all Notch ligands (Dll1, Dll3, Dll4, Jag1 and Jag2) and is necessary for their activation.

References

- Bellen, H. J., Levis, R. W., Liao, G., He, Y., Carlson, J. W., Tsang, G., Evans-Holm, M., Hiesinger, P. R., Schulze, K. L., Rubin, G. M. et al. (2004). The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics* **167**, 761-781.
- Bland, C. E., Kimberly, P. and Rand, M. D. (2003). Notch-induced proteolysis and nuclear localization of the Delta ligand. *J. Biol. Chem.* **278**, 13607-13610.
- Blochlinger, K., Bodmer, R., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1990). Patterns of expression of Cut, a protein required for external sensory organ development in wild-type and *cut* mutant *Drosophila* embryos. *Genes Dev.* **4**, 1322-1331.
- Bray, S. (1998). Notch signalling in *Drosophila*: three ways to use a pathway. *Semin. Cell Dev. Biol.* **9**, 591-597.
- Chen, N. and Greenwald, I. (2004). The lateral signal for LIN-12/Notch in *C. elegans* vulval development comprises redundant secreted and transmembrane DSL proteins. *Dev. Cell* **6**, 183-192.
- Chen, W. and Corliss, D. C. (2004). Three modules of zebrafish Mind bomb work cooperatively to promote Delta ubiquitination and endocytosis. *Dev. Biol.* **267**, 361-373.
- de Celis, J. F. and Bray, S. (1997). Feed-back mechanisms affecting Notch activation at the dorsoventral boundary in the *Drosophila* wing. *Development* **124**, 3241-3251.
- Deblandre, G. A., Lai, E. C. and Kintner, C. (2001). *Xenopus* Neuralized is a ubiquitin ligase that interacts with XDeltal and regulates Notch signaling. *Dev. Cell* **1**, 795-806.
- Fleming, R. J. (1998). Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Semin. Cell Dev. Biol.* **9**, 599-607.
- Gu, Y., Hukriede, N. A. and Fleming, R. J. (1995). *Serrate* expression can functionally replace *Delta* activity during neuroblast segregation in the *Drosophila* embryo. *Development* **121**, 855-865.
- Gupta-Rossi, N., Le Bail, O., Gonen, H., Brou, C., Logeat, F., Six, E., Ciechanover, A. and Israel, A. (2001). Functional interaction between SEL-10, an F-box protein, and the nuclear form of activated Notch1 receptor. *J. Biol. Chem.* **276**, 34371-34378.
- Gupta-Rossi, N., Six, E., LeBail, O., Logeat, F., Chastagner, P., Olry, A., Israel, A. and Brou, C. (2004). Monoubiquitination and endocytosis direct gamma-secretase cleavage of activated Notch receptor. *J. Cell Biol.* **166**, 73-83.
- Haglund, K., Di Fiore, P. P. and Dikic, I. (2003). Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 598-603.
- Haines, N. and Irvine, K. D. (2003). Glycosylation regulates Notch signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 786-797.
- Heitzler, P. and Simpson, P. (1991). The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*. *Cell* **64**, 1083-1092.
- Heitzler, P., Bourouis, M., Ruel, L., Carteret, C. and Simpson, P. (1996). Genes of the *Enhancer of split* and *achaete-scute* complexes are required for a regulatory loop between *Notch* and *Delta* during lateral signalling in *Drosophila*. *Development* **122**, 161-171.
- Irvine, K. D. and Vogt, T. F. (1997). Dorsal-ventral signaling in limb development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 867-876.
- Itoh, M., Kim, C. H., Palardy, G., Oda, T., Jiang, Y. J., Maust, D., Yeo, S. Y., Lorick, K., Wright, G. J., Ariza-McNaughton, L. et al. (2003). Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Dev. Cell* **4**, 67-82.
- Klueg, K. M. and Muskavitch, M. A. (1999). Ligand-receptor interactions and trans-endocytosis of Delta, Serrate and Notch: members of the Notch signalling pathway in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* **112**, 3289-3297.
- Koelzer, S. and Klein, T. (2003). A Notch-independent function of Suppressor of Hairless during the development of the bristle sensory organ precursor cell of *Drosophila*. *Development* **130**, 1973-1988.
- Koo, B. K., Yoon, K. J., Yoo, K. W., Lim, H. S., Song, R., So, J. H., Kim, C. H. and Kong, Y. Y. (2005a). Mind bomb-2 is an E3 ligase for Notch ligand. *J. Biol. Chem.* **280**, 22335-22342.
- Koo, B.-K., Lim, H.-S., Song, R., Yoon, M.-J., Yoon, K.-J., Moon, J.-S., Kim, Y.-W., Kwon, M. c., Yoo, K. W., Kong, M.-P. et al. (2005b). Mind bomb 1 is essential for generating functional Notch ligands to activate Notch. *Development* **132**, 3459-3470.
- Lai, E. C. (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* **131**, 965-973.
- Lai, E. C. and Rubin, G. M. (2001). *neuralized* functions cell-autonomously to regulate a subset of Notch-dependent processes during adult *Drosophila* development. *Dev. Biol.* **231**, 217-233.
- Lai, E. C., Deblandre, G. A., Kintner, C. and Rubin, G. M. (2001). *Drosophila* Neuralized is a ubiquitin ligase that promotes the internalization and degradation of Delta. *Dev. Cell* **1**, 783-794.
- Lai, E. C., Roegiers, F., Qin, X., Jan, Y. N. and Rubin, G. M. (2005). The ubiquitin ligase *Drosophila* Mind bomb promotes Notch signaling by regulating the localization and activity of Serrate and Delta. *Development* **132**, 2319-2332.
- Le Borgne, R. and Schweisguth, F. (2003). Unequal segregation of Neuralized biases Notch activation during asymmetric cell division. *Dev. Cell* **5**, 139-148.
- Le Borgne, R., Rемаud, S., Hamel, S. and Schweisguth, F. (2005). Two distinct E3 ubiquitin ligases have complementary functions in the regulation of delta and serrate signaling in *Drosophila*. *PLoS Biol.* **3**, e96.
- Lee, T. and Luo, L. (2001). Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development. *Trends Neurosci.* **24**, 251-254.
- Lehman, R., Jimenez, F., Dietrich, U. and Campos-Ortega, J. A. (1983). On the phenotype and development of mutants of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Roux Arch. Dev. Biol.* **192**, 62-74.
- Li, Y. and Baker, N. E. (2004). The roles of cis-inactivation by Notch ligands and of *neuralized* during eye and bristle patterning in *Drosophila*. *BMC Dev. Biol.* **4**, 5.
- Micchelli, C. A., Rulifson, E. J. and Blair, S. S. (1997). The function and regulation of *cut* expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate. *Development* **124**, 1485-1495.
- Mishra-Gorur, K., Rand, M. D., Perez-Villamil, B. and Artavanis-Tsakonas, S. (2002). Down-regulation of Delta by proteolytic processing. *J. Cell Biol.* **159**, 313-324.
- Nolo, R., Abbott, L. A. and Bellen, H. J. (2000). Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in *Drosophila*. *Cell* **102**, 349-362.
- Oberg, C., Li, J., Pauley, A., Wolf, E., Gurney, M. and Lendahl, U. (2001).

- The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog. *J. Biol. Chem.* **276**, 35847-35853.
- Okajima, T., Xu, A. and Irvine, K. D.** (2003). Modulation of Notch-ligand binding by protein O-fucosyltransferase 1 and Fringe. *J. Biol. Chem.* **278**, 42340-42345.
- Overstreet, E., Chen, X., Wendland, B. and Fischer, J. A.** (2003). Either part of a *Drosophila* epsin protein, divided after the ENTH domain, functions in endocytosis of Delta in the developing eye. *Curr. Biol.* **13**, 854-860.
- Overstreet, E., Fitch, E. and Fischer, J. A.** (2004). Fat facets and Liquid facets promote Delta endocytosis and Delta signaling in the signaling cells. *Development* **131**, 5355-5366.
- Pavlopoulos, E., Pitsouli, C., Klueg, K. M., Muskavitch, M. A., Moschonas, N. K. and Delidakis, C.** (2001). *neuralized* encodes a peripheral membrane protein involved in Delta signaling and endocytosis. *Dev. Cell* **1**, 807-816.
- Polo, S., Sigismund, S., Faretta, M., Guidi, M., Capua, M. R., Bossi, G., Chen, H., De Camilli, P. and Di Fiore, P. P.** (2002). A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* **416**, 451-455.
- Qi, H., Rand, M. D., Wu, X., Sestan, N., Wang, W., Rakic, P., Xu, T. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1999). Processing of the Notch ligand Delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science* **283**, 91-94.
- Qiu, L., Joazeiro, C., Fang, N., Wang, H. Y., Elly, C., Altman, Y., Fang, D., Hunter, T. and Liu, Y. C.** (2000). Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a hect-type E3 ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* **275**, 35734-35737.
- Sakata, T., Sakaguchi, H., Tsuda, L., Higashitani, A., Aigaki, T., Matsuno, K. and Hayashi, S.** (2004). *Drosophila* Nedd4 regulates endocytosis of notch and suppresses its ligand-independent activation. *Curr. Biol.* **14**, 2228-2236.
- Schweisguth, F.** (2004). Notch signaling activity. *Curr. Biol.* **14**, R129-R138.
- Schweisguth, F. and Posakony, J. W.** (1994). Antagonistic activities of *Suppressor of Hairless* and *Hairless* control alternative cell fates in the *Drosophila* adult epidermis. *Development* **120**, 1433-1441.
- Seugnet, L., Simpson, P. and Haenlin, M.** (1997a). Requirement for dynamin during Notch signaling in *Drosophila* neurogenesis. *Dev. Biol.* **192**, 585-598.
- Seugnet, L., Simpson, P. and Haenlin, M.** (1997b). Transcriptional regulation of *Notch* and *Delta*: requirement for neuroblast segregation in *Drosophila*. *Development* **124**, 2015-2025.
- Skeath, J. B. and Thor, S.** (2003). Genetic control of *Drosophila* nerve cord development. *Curr. Opin. Neurobiol.* **13**, 8-15.
- Sun, X. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1997). Secreted forms of DELTA and SERRATE define antagonists of Notch signaling in *Drosophila*. *Development* **124**, 3439-3448.
- Takeuchi, T., Adachi, Y. and Ohtsuki, Y.** (2005). Skeletrophin, a novel ubiquitin ligase to the intracellular region of Jagged-2, is aberrantly expressed in multiple myeloma. *Am. J. Pathol.* **166**, 1817-1826.
- Tian, X., Hansen, D., Schedl, T. and Skeath, J. B.** (2004). Epsin potentiates Notch pathway activity in *Drosophila* and *C. elegans*. *Development* **131**, 5807-5815.
- Wang, W. and Struhl, G.** (2004). *Drosophila* Epsin mediates a select endocytic pathway that DSL ligands must enter to activate Notch. *Development* **131**, 5367-5380.
- Wang, W. and Struhl, G.** (2005). Distinct roles for Mind bomb, Neuralized and Epsin in mediating DSL endocytosis and signaling in *Drosophila*. *Development* **132**, 2883-2894.
- Wilkin, M. B., Carbery, A. M., Fostier, M., Aslam, H., Mazaleyra, S. L., Higgs, J., Myat, A., Evans, D. A., Cornell, M. and Baron, M.** (2004). Regulation of notch endosomal sorting and signaling by *Drosophila* Nedd4 family proteins. *Curr. Biol.* **14**, 2237-2244.
- Wu, G., Lyapina, S., Das, I., Li, J., Gurney, M., Pauley, A., Chui, I., Deshaies, R. J. and Kitajewski, J.** (2001). SEL-10 is an inhibitor of notch signaling that targets notch for ubiquitin-mediated protein degradation. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7403-7415.
- Xu, T. and Rubin, G. M.** (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-1237.
- Yeh, E., Zhou, L., Rudzik, N. and Boulianne, G. L.** (2000). *neuralized* functions cell autonomously to regulate *Drosophila* sense organ development. *EMBO J.* **19**, 4827-4837.
- Yeh, E., Dermer, M., Commisso, C., Zhou, L., McGlade, C. J. and Boulianne, G. L.** (2001). Neuralized functions as an E3 ubiquitin ligase during *Drosophila* development. *Curr. Biol.* **11**, 1675-1679.
- Yoon, K. and Gaiano, N.** (2005). Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat. Neurosci.* **8**, 709-715.
- Zeng, C., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1998). Delta and Serrate are redundant Notch ligands required for asymmetric cell divisions within the *Drosophila* sensory organ lineage. *Genes Dev.* **12**, 1086-1091.