

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**IN VITRO ΚΑΙ IN VIVO ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ bHLH E(SPL)
ΣΕ ΣΤΟΧΟΥΣ DNA**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Α. ΚΟΥΜΠΑΝΑΚΗΣ

επιβλέπων καθηγητής: ΔΕΛΙΔΑΚΗΣ ΧΡΗΣΤΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2007

στους γονείς μου, Άρη και Σοφία
Στη Χάρη, τον Αριστομένη και το Φώτη
στον Τάσο, το Θάνο και τον Κώστα

Πρόλογος

Θυμάμαι πράγματα... έχω αυτό το κακό, είναι σαν να κάνω συλλογή την ίδια μου τη ζωή. Ανθρώπους, κουβέντες, στιγμές, αγγίγματα, τα πάντα. Έχω και μια τάση προς το μελοδραματισμό, που χρόνια προσπαθώ να την καταπολεμήσω. Ελπίζω απόψε να μην καταρακυλίσω, είναι και δημόσιο έγγραφο αυτό που κρατάτε.

Είναι δύσκολη η ώρα που πρέπει να διαλέξεις ανάμεσα από πράγματα, να πάρεις αποφάσεις. Κάποτε έκανα τις επιλογές μου από ένστικτο, λίγο παρορμητικά, λίγο βιαστικά. Νομίζω πώς από τότε που έκανα παιδιά άλλαξα λιγάκι, ίσως και να έγινα πιο συντηρητικός ή πιο προσεκτικός. Έφυγα από το εργαστήριο και από το Ηράκλειο πριν από τρία χρόνια. Δεν το μετάνιωσα, μόνο που χώρισα από ανθρώπους που αγάπησα κι εκτίμησα. Πώς μπορείς όμως να το αποφύγεις, πώς να κρατήσεις τους ανθρώπους κοντά σου έτσι όπως έγινε ο κόσμος, που μίκρυνε και μπερδεύτηκε ταυτόχρονα.

Χρωστάω πολλά στον επιβλέποντά μου, το Χρήστο Δελιδάκη. Τον εκτιμώ για το μυαλό του και την ενεργητικότητά του στη δουλειά, πιο πολύ όμως ως παράδειγμα ανθρώπου που δεν τα παρατάει ποτέ, που παλεύει για τα πάντα ως εκεί που δεν παίρνει άλλο. Νιώθω επίσης μεγάλη ευγνωμοσύνη στους άλλους δύο επιβλέποντες της τριμελούς μου επιτροπής, το Δημήτρη Τζαμαρία και το Γιώργο Μαυροθαλασσίτη, γιατί ασχολήθηκαν μαζί μου πολύ ουσιαστικά και είχαν ιδέες που αποδείχθηκαν κομβικές για την ολοκλήρωση της δουλειάς αυτής. Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής μου επιτροπής, τους Κ. Λούη, Χ. Σαββάκη, Μ. Κοκκινίδη, Δ. Καραγωγέως και Δ. Καρδάση, γιατί με δέχτηκαν, τρία χρόνια μετά την αποχώρησή μου από το ΙΤΕ, σαν να μην είχε περάσει ούτε μια μέρα, κάνοντας αυτές τις τελευταίες ημέρες πολύ ευχάριστες και πολύ δημιουργικές.

Η δουλειά αυτή δεν θα είχε ολοκληρωθεί χωρίς την καθοριστική συμβολή του Γ. Λειβαδάρα, ένας άνθρωπος πολύτιμος για όλη την ομάδα εντόμων. Ευχαριστώ επίσης τον Γ. Βρέντζο για όλη την αμέριστη βοήθειά του σχετικά με τις κυτταροκαλλιέργειες. Σίγουρα η ζωή δεν θα ήταν η ίδια στο εργαστήριο χωρίς την Στέλλα και την Κατερίνα Μιχελιδάκη, που η αγάπη και η τρυφερότητά τους ήταν μερικές φορές σωτήρια.

Στο εργαστήριο πέρασα χρόνια ολόκληρα κι έζησα μαζί με παιδιά χαρισματικά. Ο Νίκος, ακούραστος στη δουλειά και ταυτόχρονα ψυχούλα, ένας μοναδικός συνδυασμός. Η Χρυσούλα, η χαρά της ζωής προσωποποιημένη. Η Ιωάννα, περισσότερο λουλούδι παρά άνθρωπος. Ο Βασίλης, ταλαιπωρημένος και πιεσμένος, αλλά μόνιμη πηγή ζεστασιάς κι ενδιαφέροντος. Η Μαριάνθη, υποτίθεται μαθήτριά μου στην αρχή, μάλλον όμως εγώ ήμουν μαθητής της. Το πιο κοφτερό μυαλό και η πιο μεγάλη καρδιά που γνώρισα, έχει πολύ

μεγάλη συμμετοχή σε τούτη τη δουλειά, σε όλα τα επίπεδα. Μακάρι να κερδίσει αυτό που της αξίζει. Έμεινα πολλά χρόνια στο εργαστήριο και πέρασαν πολλοί αξιόλογοι άνθρωποι. Ο Παύλος, ο πρώτος μου δάσκαλος, και ο Πέτρος, ο Γιώργος, πιο πρόσφατα ο John και η Κατερίνα, που την ευχαριστώ για την πολύτιμη βοήθειά της σε τμήμα της δουλειάς που έγινε όσο έλειπα. Ο Μιχάλης και η Maura, υπέροχοι άνθρωποι που τους θαυμάζω, γιατί κάνουν όμορφη επιστήμη, ενώ ταυτόχρονα μεγαλώνουν τα παιδιά τους με όλη τη φροντίδα και τη στοργή που χρειάζεται. Η Μαρία, που πάντα ενδιαφέρονταν και πάντα βοηθούσε. Κι άλλοι πολλοί αγαπημένοι φίλοι, όπως ο Gareth, ο Παντελής, ο Μιχάλης, ο Αλέξανδρος, η Ειρήνη, άνθρωποι με τους οποίους δέθηκα και νιώθω περήφανος που τους γνώρισα.

Θέλω να αφιερώσω αυτή τη δουλειά στους γονείς μου, Άρη και Σοφία, γιατί έκαναν και κάνουν ακόμη ό,τι καλύτερο μπορούν για τα παιδιά τους, σε συνθήκες όχι πάντα εύκολες. Στην αγαπημένη μου Χάρη και στα παιδιά μας, Αριστομένη και Φώτη, που είναι το νόημα της ζωής μου. Και τέλος σε αυτούς που είναι κάτι παραπάνω από φίλοι, τον Τάσο, τον Θάνο και τον Κώστα, μερικές φορές νιώθω ότι είμαστε και οι τέσσερις μαζί ένας άνθρωπος.

Σας χαιρετώ!

Ηράκλειο, Ιούνιος 2007

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	-1-
Περίληψη	- 5 -
Summary	- 9 -
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	- 11 -
1.1 Διακυτταρική επικοινωνία- Πλευρικός και επαγωγικός καθορισμός	- 11 -
1.2 Η δημιουργία του ΚΝΣ στη δροσόφιλα	- 12
-	
1.2.1 1.3 Η δημιουργία του ΠΝΣ στη δροσόφιλα	- 15 -
1.3 Η οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων τύπου bHLH.	- 20
-	
1.3.1 Πρώτη ομάδα	- 23 -
1.3.2 Δεύτερη ομάδα	- 25 -
1.3.3 Τρίτη ομάδα	- 25 -
1.3.4 Τέταρτη ομάδα	- 26 -
1.3.5 Πέμπτη ομάδα	- 27 -
1.3.6 Έκτη ομάδα	- 27 -
1.3.7 Έβδομη ομάδα	- 28 -
1.4 Τα προνευρικά γονίδια στη δροσόφιλα και ο ρόλος τους κατά τη νευρογένεση	- 28 -
1.4.1 Οι προνευρικές πρωτεΐνες υπόκεινται σε θετική αυτορύθμιση	- 29 -
1.4.2 Λειτουργική εξειδίκευση των προνευρικών πρωτεϊνών	- 31 -
1.5 Οι πρωτεΐνες τύπου bHLH του γονιδιακού συμπλόκου <i>E(spl)</i> στη <i>Drosophila melanogaster</i>	- 33 -
1.5.1 Τα πρότυπα έκφρασης των γονιδίων <i>E(spl)</i> κατά την ανάπτυξη στη δροσόφιλα	- 34 -
1.5.2 Τα γονίδια του συμπλόκου <i>E(spl)</i> επάγονται μεταγραφικά από το μονοπάτι του N, αλλά και από τις προνευρικές πρωτεΐνες	- 36 -
1.5.3 Ο ρόλος των πρωτεϊνών <i>E(spl)</i> κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος στη μύγα	- 38 -
1.5.4 Οι μηχανισμοί δράσης και οι μεταγραφικοί στόχοι των πρωτεϊνών <i>E(spl)</i>	- 40 -

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.5.5	Λειτουργική εξειδίκευση και λειτουργικός πλεονασμός ανάμεσα στα μέλη του συμπλόκου	- 46 -
1.6	Τα ομόλογα των <i>E(spl)</i> στα θηλαστικά. Η οικογένεια HES	- 48 -
1.7	Σκοπός της εργασίας	- 50 -
2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	- 53 -
2.1	Βασικές τεχνικές Μοριακής Βιολογίας	- 53 -
2.2	Ηλεκτροφόρηση Υστέρησης Κινητικότητας (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)	- 54 -
2.3	Πρόσδεση πρωτεϊνών σε ακινητοποιημένο DNA	- 56 -
2.4	Υπολογισμός του συντελεστή διάστασης, Kd	- 57 -
2.5	Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν και κατασκευές	- 58 -
2.6	Δημιουργία και χειρισμός διαγονιδιακών στελεχών δροσόφιλας	- 61 -
2.7	Ιστοχημική ανίχνευση δραστικότητας β-γαλακτοσιδάσης	- 64 -
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	- 65 -
3.1	Μελέτη της πρόσδεσης των πρωτεϊνών bHLH της οικογένειας <i>E(spl)</i> στο DNA in vitro	- 65 -
3.1.1	Οι πρωτεΐνες <i>E(spl)</i> προσδένονται στο DNA με διακριτή συνάφεια	- 66 -
3.1.2	Οι πρωτεΐνες <i>E(spl)</i> προσδένονται με μεγαλύτερη συνάφεια σε θέσεις E _B σε σχέση με τις θέσεις E _C . Δεν υπάρχει προτίμηση για συγκεκριμένες θέσεις E _C in vitro.	- 68 -
3.1.3	Ετεροδιμερή μεταξύ των μελών της οικογένειας <i>E(spl)</i> προσδένονται στο DNA με διαφορετική συνάφεια	- 71 -
3.1.4	Υπολογισμός της συγγένειας πρόσδεσης.	- 74 -
3.1.5	Ο ρόλος των περιοχών bHLH και O στην πρόσδεση των <i>E(spl)</i>	- 76 -
3.2	Μελέτη της πρόσδεσης των πρωτεϊνών bHLH της οικογένειας <i>E(spl)</i> στο DNA in vivo	- 81 -
3.2.1	Ο ενισχυτής <i>vestigial quadrant (vgQ)</i>	- 82 -
3.2.2	Μόνο δύο από τις επτά πρωτεΐνες <i>E(spl)</i> μπορούν σε υπερέκφραση να καταστέλλουν τον ενισχυτή <i>vgQ</i>	- 84 -
3.2.3	Η καταστολή του <i>vgQ</i> από την <i>my</i> εξαρτάται από την πρόσδεση στο στοιχείο E _C	- 85 -
3.2.4	Η δημιουργία και η έκφραση των ενισχυτών <i>vgQ</i> μ1, μ2 και μ3	- 88 -
3.2.5	Οι πρωτεΐνες <i>E(spl)</i> έχουν τη δυνατότητα να καταστέλλουν τους τροποποιημένους ενισχυτές <i>vgQ</i> in vivo	- 92 -
3.2.6	Οι πρωτεΐνες <i>E(spl)VP16</i> ενεργοποιούν τους ενισχυτές <i>vgQ</i> μ1, μ2 και μ3, προσδεδεμένες άμεσα στο DNA	- 96 -

3.2.7	Οι περιβάλλουσες τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες του στοιχείου E _c δεν τροποποιούν την ειδικότητα πρόσδεσης των πρωτεϊνών E(spl) in vivo	- 99 -
3.3	Άμεση πρόσδεση στο DNA και μεταγραφική καταστολή από τις πρωτεΐνες E(spl) στα πλαίσια της νευρογένεσης.	- 103 -
3.3.1	Η συνεισφορά της άμεσης πρόσδεσης στο DNA, σε σχέση με την έμμεση στρατολόγηση μέσω διαπρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, για τη μεταγραφική καταστολή από τις E(spl)	- 104 -
3.3.2	Συνεργατική πρόσδεση στο DNA από σύμπλοκα E(spl) και Da/AS-C	- 110 -
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	- 117 -
4.1	Οι πρωτεΐνες E(spl) προσδένονται στο DNA με διακριτή συνάφεια	- 117 -
4.2	Η λειτουργική εξειδίκευση των πρωτεϊνών E(spl) σε σχέση με την πρόσδεση στο DNA	- 122 -
4.3	Ο ρόλος της περιοχής O	- 123 -
4.4	Συνεργατική πρόσδεση μεταξύ E(spl) και Da/AS-C σε γειτονικές θέσεις στο DNA	- 126 -
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	- 131 -

Περίληψη

Οι πρωτεΐνες τύπου basic helix-loop-helix (bHLH) παίζουν αποφασιστικό ρόλο σε πολλές αναπτυξιακές διαδικασίες σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνεται και ο καθορισμός των νευρικών κυττάρων κατά την ανάπτυξη του Κεντρικού και Περιφερικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ και ΠΝΣ αντίστοιχα) των μεταζώων. Στη δροσόφιλα, τα πρώτα στάδια της νευρογένεσης χαρακτηρίζονται από την έκφραση των πρωτεϊνών bHLH της υποοικογένειας AS-C (Achaete-Scute Complex), η οποία περιλαμβάνει μεταγραφικούς ενεργοποιητές που έχουν την ικανότητα να ετεροδιμερίζονται με την απανταχού εκφραζόμενη πρωτεΐνη Daughterless (Da), επίσης τύπου bHLH, και να ενεργοποιούν τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων, προσδεδεμένες σε ειδικές αλληλουχίες, τα λεγόμενα στοιχεία E_A. Η έκφραση των AS-C παρατηρείται αρχικά σε ομάδες κυττάρων, που καλούνται προνευρικοί συναθροισμοί. Σε μεταγενέστερα στάδια όμως η έκφρασή τους περιορίζεται σε ένα ή λίγα κύτταρα από κάθε συναθροισμό, τα οποία και διαφοροποιούνται τελικά σε νευροβλάστες. Ο περιορισμός της έκφρασης των AS-C οφείλεται στη δράση μιας ανταγωνιστικής ομάδας πρωτεϊνών bHLH, οι οποίες κωδικοποιούνται από το γονιδιακό σύμπλοκο Enhancer Of split [E(spl)-C], το οποίο περιλαμβάνει μεταγραφικούς καταστολείς τύπου bHLH, που έχουν την ικανότητα να προσδένονται ως ομοδιμερή σε ειδικές αλληλουχίες, όπως τα στοιχεία E_B, E_C και N. Οι πρωτεΐνες bHLH E(spl) ενεργοποιούνται άμεσα μεταγραφικά από το σηματοδοτικό μονοπάτι του Notch (N) και η έκφρασή τους έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της νευρικής τύχης στα κύτταρα των προνευρικών συναθροισμών που δέχονται το σήμα του N, τόσο στο ΚΝΣ όσο και στο ΠΝΣ της μύγας. Η ανταγωνιστική δράση των δύο ομάδων πρωτεϊνών έχει δείχθει ότι βασίζεται σε διαπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, με τις E(spl) να στρατολογούνται στις ρυθμιστικές περιοχές τόσο των ίδιων των γονιδίων AS-C (τα οποία υπόκεινται σε θετική αυτορύθμιση), όσο και πιθανότατα άλλων νευροειδικών γονιδίων, που αποτελούν κοινούς στόχους των δύο ομάδων πρωτεϊνών, μέσω αλληλεπίδρασης με τα σύμπλοκα των ενεργοποιητών Da/AS-C, τα οποία και προσδένονται άμεσα στο DNA, χωρίς να απαιτείται έτσι άμεση πρόσδεση εκ μέρους των E(spl). Εντούτοις, η επιβεβαιωμένη ικανότητα των E(spl) να προσδένονται άμεσα στο DNA και η παρουσία συντηρημένων θέσεων πρόσδεσης για τις E(spl) στις ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων-στόχων, μας ώθησαν να διερευνήσουμε καταρχάς σε μεγαλύτερο βάθος τις τυχόν ειδικές προτιμήσεις πρόσδεσης καθεμιάς από τις επτά bHLH πρωτεΐνες του συμπλόκου E(spl), αλλά και των ετεροδιμερών που είχαν δείχθει παλαιότερα ότι μπορούν να σχηματίζουν. Κατά δεύτερον, εξετάσαμε αν συγκεκριμένες αλληλουχίες πρόσδεσης μπορούν να επηρεάσουν τη στρατολόγηση και τη συνακόλουθη καταστολή από

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

τις E(spl) σε φυσικούς ενισχυτές στη μύγα. Τέλος, επιχειρήσαμε να διαλευκάνουμε το ρόλο που παίζει η άμεση πρόσδεση στο DNA, σε σχέση με την έμμεση στρατολόγηση από τα σύμπλοκα των ενεργοποιητών, για τη μεταγραφική καταστολή από τις E(spl), χρησιμοποιώντας για το σκοπό αυτό κατάλληλους, τεχνητούς ενισχυτές.

Επιβεβαιώσαμε έτσι αρχικά ότι οι επτά πρωτεΐνες bHLH E(spl) προσδένονται γενικά πολύ ισχυρότερα σε αλληλουχίες τύπου E_B, που ήταν γνωστό ότι αποτελούν τις καλύτερες δυνατές θέσεις πρόσδεσης, σε σχέση με αλληλουχίες τύπου E_C. Δείξαμε όμως επιπλέον ότι οι επτά πρωτεΐνες εμφανίζουν διακριτή συνάφεια πρόσδεσης, κάποιες δηλαδή προσδένονται ισχυρότερα από άλλες ως ομοδιμερή. Δείξαμε επίσης ότι συγκεκριμένα ετεροδιμερή μπορεί να έχουν ενισχυμένη ή μειωμένη συνάφεια πρόσδεσης σε σχέση με τα αντίστοιχα ομοδιμερή και υπολογίσαμε το συντελεστή διάστασης (Kd) για κάποια από τα σύμπλοκα. Η επίδραση του διμερισμού στην πρόσδεση των E(spl) φάνηκε να βασίζεται τόσο στην περιοχή HLH, όσο και στην περιοχή Orange (O), χαρακτηριστικά επίσης συντηρημένη μεταξύ των μελών της οικογένειας, γεγονός που υποδηλώνει ότι η περιοχή αυτή θα πρέπει να διαμεσολαβεί στην αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα *in vitro* υπέδειξαν ότι τα σύμπλοκα μεταξύ των E(spl) μπορούν να προσδένονται στις ίδιες θέσεις, διαφέρει όμως η ισχύς της πρόσδεσης. Στο *in vivo* σύστημα, επιβεβαιώθηκε ότι η ικανότητα καταστολής εκ μέρους των E(spl) βασίζεται στη διαφορετική ικανότητα πρόσδεσής τους στα διάφορα στοιχεία τύπου E_B και E_C. Φάνηκε όμως επίσης ότι οι εκατέρωθεν του στοιχείου E_{B/C} τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες, που είχαν δειχθεί παλαιότερα ότι είναι σημαντικές για την πρόσδεση των E(spl), μπορούν να επηρεάζουν αποφασιστικά την πρόσβασή τους στο DNA. Η άμεση πρόσδεση στο DNA φάνηκε τέλος να λειτουργεί σε συνδυασμό με την έμμεση στρατολόγηση από τους προσδεδμένους στο DNA ενεργοποιητές, καθώς η μεταγραφική καταστολή από τις E(spl) ενισχύεται όταν εμπλέκονται και οι δύο μηχανισμοί. Μάλιστα, η φυσική αλληλεπίδραση των E(spl) με τις Da/AS-C έδειξε να σταθεροποιεί την καθήλωση των πρωτεϊνών στο DNA. Τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούν να υποστηρίξουν ένα μοντέλο δράσης των E(spl), όπου η ικανότητά τους να επιφέρουν μεταγραφική καταστολή βασίζεται καταρχάς στη διαφορετική ικανότητά τους να συγκροτούν ομο- και ετεροδιμερή με διακριτές ικανότητες πρόσδεσης στο DNA, αλλά και διακριτές ικανότητες αλληλεπίδρασης με τους ενεργοποιητές Da/AS-C, όπως ήταν ήδη γνωστό. Η πρόσβασή τους στις ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων-στόχων φαίνεται να εξαρτάται τόσο από την άμεση πρόσδεση στο DNA, όσο και από την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με τους ενεργοποιητές, με τρόπο που εξαρτάται τόσο από τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες που εμπλέκονται κάθε φορά, όσο και από το είδος και τη σχετική θέση των ειδικών θέσεων πρόσδεσης για κάθε σύμπλοκο. Οι δύο μηχανισμοί μπορούν να συμβάλλουν σε μια σαφή, ακριβή μεταγραφική απόκριση, σε συνθήκες όπου χρειάζεται να ενσωματωθούν μηνύματα από διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια και η σχετική ποσότητα

(και πιθανόν ενεργότητα) των ρυθμιστικών πρωτεϊνών που εμπλέκονται υπόκεινται σε συνεχείς, μικρές ή μεγάλες, διακυμάνσεις.

Summary

The basic helix-loop-helix (bHLH) family of proteins plays important roles in many developmental processes in eukaryotes, including the determination of the Central and Peripheral Nervous System (CNS and PNS, respectively) in metazoa. Early neurogenesis in *Drosophila* is characterized by the expression of the genes of the Achaete-Scute Complex (AS-C), which encode bHLH transcriptional activators that can heterodimerize with the ubiquitous bHLH protein daughterless (Da), and activate transcription of target genes by direct binding onto specific DNA sequences, the so called E_A boxes. Expression of AS-C is initially observed in groups of cells called proneural clusters. In later stages however, AS-C expression is limited to one or few cells in each cluster, which will differentiate to become neuroblasts. The factors responsible for the limitation of AS-C expression are encoded by the Enhancer of split complex [E(spl)-C], which contains, among others, bHLH transcriptional repressors, that have the ability to bind as homodimers to specific DNA sequences, such as the E_B , E_C and N boxes. The bHLH E(spl) genes are transcriptionally activated by the Notch (N) signaling pathway and they act to repress neural fate in the cells of the proneural clusters that receive the N signal both in the CNS and the PNS of the fly. The antagonistic action of the two groups of proteins has been shown to be based on direct physical interactions, so that the E(spl) proteins are recruited on their targets via physical association with the activator complexes which are bound on DNA, without the need of direct DNA binding by E(spl) themselves. Their targets include the AS-C genes (which are positively autoregulated), and possibly other neuron-specific genes that are common targets for both groups. Nevertheless, the confirmed ability of E(spl) to bind DNA and the presence of conserved binding sites in the regulatory regions of their target genes prompted us to look more carefully at the binding preferences of E(spl) homodimers and heterodimers. Then, we asked whether particular binding sites on natural enhancers can affect recruitment on DNA and transcriptional repression conferred by E(spl). Finally, using appropriate artificial enhancers we tried to define the actual role of direct DNA binding versus recruitment by activators for transcriptional repression by E(spl).

Initially, we confirmed that the optimal binding site for E(spl) is the E_B and not the E_C box. However, we noticed that the seven proteins do not share the same affinity for DNA binding, that is some homodimers bind better than others on the same sites. We also showed that particular heterodimers can have altered DNA binding affinity with respect to homodimers and calculated the dissociation constant for some of the complexes. The dimerization among the seven proteins, which is an important prerequisite for DNA binding,

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

seemed to depend both on the HLH domain and the Orange domain, which is also conserved in the family. The in vivo results also showed that the seven proteins can bind on the same E_B and E_C sites, albeit not with the same strength. Moreover, we demonstrated that the trinucleotide sequences surrounding the core $E_{B/C}$ site, previously shown to be important for binding, can dramatically affect their access onto DNA. Finally, we showed that direct DNA binding by E(spl) can work in cooperation with recruitment by activators, as transcriptional repression by E(spl) is enhanced when both mechanisms are employed. In fact, physical interactions between E(spl) and Da/AS-C seemed to stabilize their binding on DNA. The above results support a model, where transcriptional repression by E(spl) depends on their differential ability to homo- and heterodimerize, but also on particular preferences for interaction with both DNA and Da/AS-C activators. Access to regulatory elements of target genes is achieved by both direct DNA binding and recruitment by activators, depending on the particular members of the two groups of proteins expressed but also on the presence and relative positions of binding sites for both complexes. The two mechanisms can contribute to a sharp, accurate transcriptional response, under conditions where the amount and, perhaps, the activity of the regulatory proteins involved continuously fluctuates, as a result of integration of signals from multiple signaling pathways.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Διακυτταρική επικοινωνία- Πλευρικός και επαγωγικός καθορισμός

Η ανάπτυξη των πολυκύτταρων οργανισμών, από το γονιμοποιημένο ωάριο ως το πλήρως ανεπτυγμένο άτομο, προϋποθέτει ότι γεγονότα όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση, η διαφοροποίηση και ο επιλεκτικός κυτταρικός θάνατος θα πρέπει να συντονιστούν με απόλυτη ακρίβεια. Η ποικιλία των μορφών, των δομών και των λειτουργιών των οργανισμών υπαινίσσονται όμως ότι οι διαδικασίες αυτές χαρακτηρίζονται ταυτόχρονα από εξαιρετική πλαστικότητα. Ο καθορισμός της αναπτυξιακής ταυτότητας των κυττάρων οφείλεται τόσο σε πρότυπα κυτταρικής γενεαλογίας, όπου τα κύτταρα κληρονομούν συγκεκριμένες ιδιότητες από τα προγονικά τους, όσο και σε γεγονότα διακυτταρικής επικοινωνίας μεταξύ γειτονικών και μη κυττάρων. Σε κάθε περίπτωση, τελική συνέπεια είναι η ρύθμιση της μεταγραφής. Καθώς όλα τα κύτταρα ενός πολυκύτταρου ευκαρυωτικού οργανισμού διαθέτουν το ίδιο γενετικό υλικό, αυτό που καθορίζει την ταυτότητα του κάθε κυττάρου είναι ουσιαστικά ποια γονίδια εκφράζει και πώς συντονίζεται η έκφραση αυτή. Οι πολυκύτταροι οργανισμοί έχουν αναπτύξει έναν, στην πραγματικότητα μικρό μα με εκπληκτική ευελιξία, αριθμό σηματοδοτικών μονοπατιών για να μπορούν τα κύτταρα να συνομιλούν μεταξύ τους, συντονίζοντας έτσι τις λειτουργίες τους. Τα σήματα αυτά καταλήγουν τελικά στον πυρήνα, όπου επιλεκτικά καταλύουν την ενεργοποίηση ή την καταστολή των γονιδίων. Αυτό είναι και το δεύτερο σημείο στο οποίο ξεδιπλώνεται όλη η πολυπλοκότητα και η μαγεία της ζωής. Οι μηχανισμοί της μεταγραφικής ρύθμισης χαρακτηρίζονται από εκπληκτική ακρίβεια και συντονισμό, σε συνδυασμό με εντυπωσιακή ποικιλία και ευρηματικότητα.

Η διακυτταρική επικοινωνία πραγματοποιείται μεταξύ ισοδύναμων, αρχικά, ή όχι κυττάρων ως προς το αναπτυξιακό τους δυναμικό, όπως αυτό καθορίζεται από την κυτταρική γενεαλογία. Αν τα κύτταρα είναι αρχικά ισοδύναμα μιλούμε για πλευρικό καθορισμό, ενώ η κυτταρική αλληλεπίδραση μεταξύ μη ισοδύναμων αναπτυξιακά κυττάρων καλείται επαγωγικός καθορισμός. Ένα παράδειγμα πλευρικού καθορισμού αποτελεί η ανάπτυξη του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) κατά την εμβρυογένεση, στη *Drosophila melanogaster*. Μία εκτοδερμική στοιβάδα ισοδύναμων αρχικά, κυττάρων στην κοιλιακή πλευρά του εμβρύου διαχωρίζεται σταδιακά σε δύο διακριτούς πληθυσμούς, τους

νευροβλάστες και τους επιδερμοβλάστες. Οι νευροβλάστες θα μεταναστεύσουν εσωτερικά για να δώσουν τους διαφοροποιημένους νευρώνες του ΚΝΣ, ενώ οι επιδερμοβλάστες θα παραμείνουν στην κοιλιακή επιφάνεια του εμβρύου για να δώσουν τις επιδερμικές δομές. Πειράματα που έγιναν κατά την ανάπτυξη του ΚΝΣ της ακρίδας έδειξαν ότι αν ένας από τους νευροβλάστες καταστραφεί με ακτίνα laser, ένα γειτονικό μη νευροβλαστικό κύτταρο θα πάρει τη θέση του. Η διακυτταρική επικοινωνία σε αυτήν την περίπτωση συνίσταται στο γεγονός ότι ο νευροβλάστης εκπέμπει ένα ανασταλτικό σήμα στα γειτονικά του κύτταρα, το οποίο παραλαμβάνεται από το διαμεμβρανικό υποδοχέα Notch (N), η ενεργοποίηση του οποίου καταστέλλει αυτόνομα τη νευρική τύχη στα κύτταρα αυτά. Έλλειψη του N ή άλλων παραγόντων που συμμετέχουν σε αυτήν την ανασταλτική διαδικασία οδηγεί σε παραγωγή υπεράριθμων νευροβλαστών με ταυτόχρονη έλλειψη επιδερμίδας, ένας φαινότυπος που καλείται νευρογόνος. Η ανάπτυξη του ΚΝΣ και κυρίως του ΠΝΣ (Περιφερειακό Νευρικό Σύστημα) της μύγας θα συζητηθεί εκτενέστερα πιο κάτω, καθώς οι μεταγραφικοί παράγοντες που διαμεσολαβούν το σήμα του N στον πυρήνα και οι μηχανισμοί λειτουργίας τους αποτελούν ουσιαστικά το αντικείμενο της διατριβής αυτής.

Ένα παράδειγμα επαγωγικής σηματοδότησης αποτελεί η δημιουργία του φωτοϋποδοχέα R7 κατά την ανάπτυξη του ματιού στη δροσόφιλα. Το κύτταρο που δέχεται το σήμα έχει τη δυνατότητα να διαφοροποιηθεί είτε σε R7 είτε σε ένα μη νευρικό, κωνοειδές κύτταρο. Στην περίπτωση αυτή το επαγωγικό σήμα εκπέμπεται από τον γειτονικό, ήδη καθορισμένο φωτοϋποδοχέα R8 και παραλαμβάνεται από τον διαμεμβρανικό υποδοχέα sevenless, ο οποίος έχει ενεργότητα κινάσης της τυροσίνης. Με παρόμοιο τρόπο γίνεται σταδιακά ο καθορισμός όλων των φωτοϋποδοχέων σε κάθε ομματίδιο.

1.2 Η δημιουργία του ΚΝΣ στη δροσόφιλα

Το πιο σημαντικό και πιο ενδιαφέρον ερώτημα για τη βιολογία της ανάπτυξης είναι με ποιο τρόπο τα, αρχικά αδιαφοροποίητα, εμβρυικά κύτταρα αποκτούν σταδιακά την αναπτυξιακή τους ταυτότητα. Πολλά από τα σχετικά δεδομένα έχουν προέλθει τις τελευταίες δεκαετίες μελετώντας την ανάπτυξη και διαφοροποίηση του νευρικού συστήματος της δροσόφιλας, όπως και πολλών άλλων οργανισμών. Ο βασικότερος λόγος, για τον οποίο το νευρικό σύστημα έχει αποτελέσει σημείο αναφοράς, είναι ότι πολυάριθμοι διακριτοί τύποι νευρώνων (και άλλων κυττάρων επικουρικού χαρακτήρα), προκύπτουν με στερεότυπο τρόπο από ομάδες ισοδύναμων αρχικά κυττάρων.

Το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα της μύγας (ΚΝΣ) αποτελείται από τον εγκέφαλο και τη νευρική χορδή. Τα κύτταρα που αποτελούν το ΚΝΣ προέρχονται από το λεγόμενο νευροεκτόδερμα, μια στοιβάδα κυττάρων που βρίσκονται πλευροκοιλιακά στο σώμα του

εμβρύου. Στο νευροεκτόδερμα δημιουργούνται ομάδες κυττάρων, που ονομάζονται ομάδες νευρικής ισοδυναμίας ή προνευρικοί συναθροισμοί. Κάθε μία από αυτές τις ομάδες εκφράζει ένα συγκεκριμένο γονίδιο, η έκφραση του οποίου καθιστά όλα τα κύτταρα μιας ομάδας ικανά (competent) να ακολουθήσουν τη νευρική μοίρα. Τα γονίδια που εκφράζονται στους προνευρικούς συναθροισμούς ανήκουν στα λεγόμενα προνευρικά γονίδια, όπως είναι τα *achaete (ac)*, *scute (sc)* και *lethal of scute (l'sc)*, όμως περιλαμβάνονται και άλλα, όπως τα *huckebein*, *runt* και *seven-up*. Για τη δράση των προνευρικών γονιδίων θα αναφερθούν περισσότερες λεπτομέρειες πιο κάτω. Προς το παρόν, αυτό που έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι πώς ο κάθε προνευρικός συναθροισμός εκφράζει τα συγκεκριμένα γονίδια και πώς από κάθε συναθροισμό παράγεται τελικά ένας και μόνο νευροβλάστης, ενώ τα υπόλοιπα κύτταρα γίνονται επιδερμικά.

Το πρότυπο στο νευροεκτόδερμα καθορίζεται από την έκφραση των γονιδίων χάσματος (gap genes) και κανόνα ζεύγους (pair-rule genes), τα οποία και εκφράζονται κατά μήκος του προσθοπίσθιου (ΠΟ) άξονα του εμβρύου, χωρίζοντάς το σε μεταμερίδια (segments). Στη συνέχεια, τα γονίδια πολικότητας μεταμεριδίου (segment polarity genes) δίνουν ταυτότητα και καθορίζουν τα μεταμερίδια (Akam, 1987). Οι νευροβλάστες που θα προκύψουν από κάθε μεταμερίδιο καθορίζονται ήδη σε ένα βαθμό από το ειδικά γονίδια πολικότητας μεταμεριδίου (π.χ. *wingless*, *gooseberry*, *engrailed*, *invected* κ.α.), που εκφράζονται στην περιοχή από όπου προκύπτουν (Bhat 1999). Ταυτόχρονα, ο καθορισμός του νωτοκοιλιακού (NK) άξονα του εμβρύου, από τα σηματοδοτικά μονοπάτια των NF-κΒ, BMP και EGFR, προσφέρει μία επιπλέον συνιστώσα στον αρχικό καθορισμό των νευροβλαστών. Κατά μήκος του NK άξονα ενεργοποιούνται τα τύπου homeodomain γονίδια *vnd*, *ind* και *msh*, που ονομάζονται γονίδια στήλης (Skeath 1998, vonOhlen and Doe 2000). Τελικά, σε κάθε προνευρικό συναθροισμό εκφράζεται ένας μοναδικός συνδυασμός από γονίδια πολικότητας μεταμεριδίου και γονίδια στήλης, με συνέπεια να εκφράζονται και διαφορετικά γονίδια-στόχοι, τα οποία καθορίζουν το ειδικό νευρικό δυναμικό του νευροβλάστη που θα προκύψει από κάθε προνευρικό συναθροισμό.

Αναφέρθηκε πιο πάνω ότι μόνο ένα από τα κύτταρα κάθε προνευρικού συναθροισμού διαφοροποιείται σε νευροβλάστη, ενώ τα υπόλοιπα γίνονται κύτταρα επιδερμίδας. Για τον καθορισμό του νευροβλάστη λαμβάνει χώρα ένας ειδικός τύπος διακυτταρικής επικοινωνίας, που καλείται πλευρική αναστολή (Artavanis-Tsakonas et al., 1995, Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Κομβικό ρόλο στη διαδικασία αυτή παίζει ο διαμεμβρανικός υποδοχέας Notch (N) και οι δεσμευτές του, Delta (DI) και Serrate (Ser). Αρχικά, όλα τα κύτταρα ενός συναθροισμού σηματοδοτούν μέσω των DI και/ή Ser στα γειτονικά τους, σε μια διαδικασία αμοιβαίας αναστολής. Το κύτταρο που επιλέγεται ως νευροβλάστης χαρακτηρίζεται από ενίσχυση της σηματοδοτικής ικανότητας, με αποτέλεσμα σε ένα μετέπειτα στάδιο να αποτελεί τον μοναδικό πομπό του σήματος, ενώ τα γειτονικά κύτταρα μετατρέπονται σε

δέκτες. Η ενεργοποίηση του N στα κύτταρα αυτά έχει ως συνέπεια μια σειρά από πρωτεολύσεις, οι οποίες απελευθερώνουν από την κυτταρική μεμβράνη το ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα (N^{IC}), το οποίο μεταναστεύει στον πυρήνα και ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων. Στόχοι του N αποτελούν, μεταξύ άλλων, τα γονίδια του συμπλόκου *Enhancer of split* [*E(spl)*], τα οποία είναι υπεύθυνα για την καταστολή των προνευρικών γονιδίων (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Με τον τρόπο αυτό, η έκφραση των προνευρικών γονιδίων περιορίζεται (και μάλιστα αυξάνεται) στο νευροβλάστη, ενώ μηδενίζεται σε όλα τα υπόλοιπα κύτταρα που έχουν δεχτεί το σήμα του N.

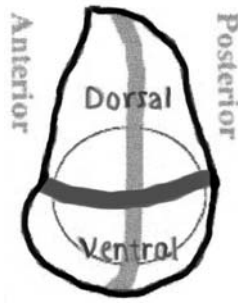
Οι νευροβλάστες στη συνέχεια αυξάνουν σε μέγεθος, μεταναστεύουν εσωτερικά και διαιρούνται, για να δημιουργήσουν τη νευρική χορδή και άλλες δομές του ΚΝΣ. Η μετανάστευση αυτή γίνεται σε πέντε διακριτά κύματα. Οι κυτταρικές διαιρέσεις των νευροβλαστών είναι ασύμμετρες και παράγουν ένα νέο νευροβλάστη κι ένα μητρικό κύτταρο γαγγλίου (Ganglion Mother Cell, GMC). Οι νευροβλάστες παραμένουν μιτωτικά ενεργοί και διαιρούνται επανειλημμένα, ενώ κάθε κύτταρο GMC διαιρείται μία μόνο φορά, παράγοντας μεταμιτωτικούς νευρώνες ή/και κύτταρα γλοίας (Chia and Yang 2002, Skeath and Thor 2003). Οι νευροβλάστες διαφέρουν επίσης από τα κύτταρα GMC καθώς έχουν μεγαλύτερο μέγεθος και είναι τοποθετημένοι προς την κορυφαία πλευρά, ενώ τα κύτταρα GMC βρίσκονται στη βασική πλευρά. Υπεύθυνη για τις ασύμμετρες διαιρέσεις του νευροβλάστη φαίνεται να είναι, σε κάποιο βαθμό τουλάχιστον, η πρωτεΐνη *prospero*, η οποία εντοπίζεται στη βασική πλευρά του νευροβλάστη και κατανέμεται αποκλειστικά στο κύτταρο GMC (Spana and Doe 1995, Hirata et al., 1995). Η *prospero* είναι υπεύθυνη για την καταστολή γονιδίων που επάγουν τον κυτταρικό κύκλο (Li and Vaessin 2000). Στην κυτταρική γενεαλογία του GMC παίζει ρόλο και πάλι το μονοπάτι του Notch, που σηματοδοτεί αποκλειστικά από το ένα θυγατρικό κύτταρο του GMC στο άλλο, προσδίδοντάς τους διαφορετικό κυτταρικό χαρακτήρα (Spana and Doe 1996, Skeath and Doe 1998).

Όλα τα κύτταρα του ΚΝΣ προέρχονται λοιπόν από τα κύτταρα GMC και διακρίνονται σε τρεις μεγάλες ομάδες: τους κινητικούς νευρώνες, τους ενδιάμεσους νευρώνες (που αντιπροσωπεύουν περίπου το 90% του συνόλου) και τα κύτταρα γλοίας. Στο εσωτερικό κάθε ομάδας κυττάρων διακρίνονται επιμέρους κατηγορίες, ανάλογα με τα ειδικά νευροπεπτίδια, τους νευροδιαβιβαστές και τα ιοντικά κανάλια που παράγουν. Αναφέραμε ήδη ότι η τελική ταυτότητα κάθε νευρώνα καθορίζεται ήδη από τη θέση του στο νευροεκτόδερμα και τον προνευρικό συναθροισμό από τον οποίο προέρχεται ο αντίστοιχος νευροβλάστης, μέσω των γονιδίων που ορίζουν τον ΠΟ και τον ΝΚ άξονα του εμβρύου. Η ταυτότητά τους όμως εξαρτάται από μία ακόμη παράμετρο. Κατά τις διαιρέσεις των νευροβλαστών και τη δημιουργία των κυττάρων GMC, συμβαίνει μία διαδοχική ενεργοποίηση και καταστολή γονιδίων (των *hunchback*, *kruppel*, *pdm*, *castor* και *grainyhead*) σε αυστηρά καθορισμένα χρονικά παράθυρα. Κάθε γονίδιο, με τη σειρά που

αναφέρθηκαν, ενεργοποιεί το επόμενο και καταστέλλει το μεθεπόμενο γονίδιο, εξασφαλίζοντας την αυστηρή χρονική ιεράρχηση της έκφρασής τους (Isshiki et al., 2001, Brody and Odenwald 2002). Μπορούμε να υποθέσουμε, αν και δεν είναι ακόμη γνωστό, ότι κάθε γονίδιο μπορεί και να καταστέλλεται από το επόμενο στη σειρά. Κάθε κύτταρο GMC λοιπόν, κατά τη στιγμή της δημιουργίας του, χαρακτηρίζεται από την έκφραση ενός από τα παραπάνω γονίδια, με την έκφραση αυτή να διατηρείται και στους νευρώνες και τα κύτταρα γλοίας που παράγονται από το συγκεκριμένο κύτταρο GMC, με τρόπο που είναι απαραίτητος για την εξειδίκευσή του. Καθώς οι νευροβλάστες μεταναστεύουν κατά κύματα, δημιουργούνται στοιβάδες κυττάρων GMC και νευρώνων, με τα κύτταρα που εκφράζουν το *hunchback* να βρίσκονται στη βασική πλευρά της νευρικής χορδής, τα κύτταρα που εκφράζουν *grainyhead* στην κορυφαία και ανάμεσά τους τα κύτταρα που εκφράζουν τα άλλα τρία γονίδια. Τελικά, σχεδόν κάθε κύτταρο GMC έχει τη δική του γενετική ταυτότητα, που εξαρτάται τόσο από τη θέση του αρχικού νευροβλάστη, όσο και από το χρόνο κατά τον οποίο μετανάστευσε για να πάρει τη θέση του στη νευρική χορδή (Skeath and Thor 2003).

1.2.1 1.3 Η δημιουργία του ΠΝΣ στη δροσόφιλα

Οι ενήλικες δομές του εντόμου προέρχονται από μονόστοιβα επιθήλια που διαφοροποιούνται κατά τα προνυμφικά στάδια ανάπτυξης και παίρνουν την τελική τους μορφή σταδιακά κατά την νυμφική περίοδο. Τα επιθήλια αυτά καλούνται αναπτυξιακοί δίσκοι και ο αρχικός καθορισμός των κυττάρων από τα οποία απαρτίζονται πραγματοποιείται κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Σταδιακά, κατά τα τρία προνυμφικά στάδια οι δίσκοι αυξάνουν σε μέγεθος και διαμερισματοποιούνται μέσω του σχηματισμού ορίων που δεν επιτρέπουν την ανάμιξη κυττάρων που ανήκουν σε διαφορετικά διαμερίσματα, και τα κύτταρα διαφοροποιούνται σε απόκριση επαγωγικών σημάτων μικρής ή μεγάλης εμβέλειας που παράγονται από αυτά ακριβώς τα όρια. Τα πιο γνωστά και τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα από αυτά τα μορφογόνα μόρια είναι το Hedgehog (Hh), το Decapentaplegic (Dpp), ομόλογο του TGFβ των θηλαστικών, και το Wingless, που ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των Wnt. Ο αναπτυξιακός δίσκος του φτερού λοιπόν διαμερισματοποιείται από το στάδιο του εμβρύου ακόμα σε εμπρόσθιο και οπίσθιο διαμέρισμα από την τύπου homeodomain πρωτεΐνη Engrailed, η οποία εκφράζεται στο στάδιο της προνύμφης μόνο στο οπίσθιο διαμέρισμα. Αντίστοιχα, στο νωτιαίο διαμέρισμα του δίσκου εκφράζεται η LIM-homeodomain πρωτεΐνη Apterous (Blair 1995).



ΕΙΚΟΝΑ 1-1 Σχηματική αναπαράσταση της διαμερισματοποίησης του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού της δροσόφιλας. Η περιοχή που βρίσκεται σε κύκλο θα δώσει το μελλοντικό φτερό, ενώ το υπόλοιπο τμήμα του νωτιαίου διαμερίσματος θα δώσει το ένα μισό του θώρακα.

Το ΠΝΣ της μύγας αποτελείται κυρίως από τις μηχανοαισθητήριες και χημειοαισθητήριες σμήριγγες, που καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας του ενήλικα ατόμου, καθώς και από τα χορδοτονικά όργανα και τους πολυδενδριτικούς νευρώνες (όργανα ισοροπίας και προσανατολισμού), οι οποίοι βρίσκονται στο εσωτερικό του σώματος. Οι σμήριγγες και τα χορδοτονικά όργανα μοιάζουν, με την έννοια ότι είναι σύνθετα όργανα που αποτελούνται από έναν νευρώνα με έναν μόνο δενδρίτη και έναν νευράξονα, που καταλήγει στο ΚΝΣ, και τρία ή περισσότερα ακόμη εξειδικευμένα κύτταρα, που υποστηρίζουν το όργανο. Στο θώρακα οι σμήριγγες διακρίνονται σε μακροχαίτες, οι οποίες είναι 13 σε κάθε μισό του θώρακα και αναπτύσσονται σε στερεότυπες θέσεις, και μικροχαίτες, που είναι μικρότερες σε μέγεθος και είναι ισοκατανεμημένες σε σειρές κατά μήκος του θώρακα. Οι σμήριγγες προέρχονται από μοναδιαία πρόδρομα κύτταρα στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού (ο οποίος δίνει και τον θώρακα), που καλούνται ΠΑΟ (Πρόδρομα Αισθητηρίου Οργάνου). Τα κύτταρα που δημιουργούν τις μακροχαίτες καθορίζονται κατά το όψιμο τρίτο προνυμφικό στάδιο, ενώ αυτά που δίνουν τις μικροχαίτες λίγο αργότερα, κατά τα πρώιμα νυμφικά στάδια (Cubas et al., 1991, Skeath and Carroll 1991).

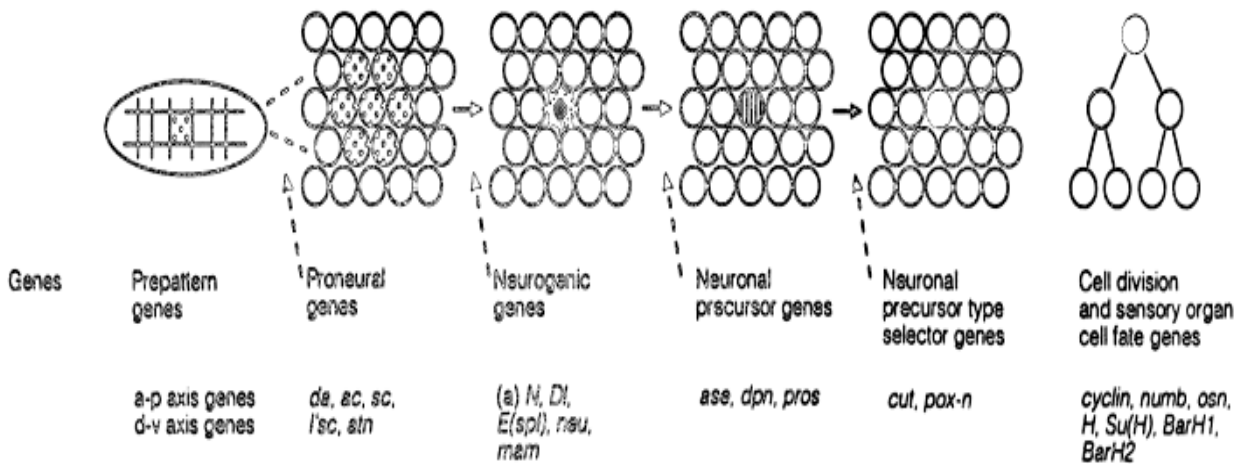
Τα ΠΑΟ προέρχονται από ομάδες κυττάρων που βρίσκονται σε καθορισμένες θέσεις στο δίσκο του φτερού, οι οποίες ονομάζονται επίσης προνευρικοί συναθροισμοί, όπως συμβαίνει και κατά την ανάπτυξη του ΚΝΣ, και εκφράζουν τις προνευρικές πρωτεΐνες *Ac* και *Sc*. Οι προνευρικοί συναθροισμοί δημιουργούνται κάτω από την επίδραση μιας σειράς παραγόντων, οι οποίοι ονομάζονται παράγοντες προσχηματισμού προτύπου (*prepattern*, Simpson 1996, Calleja et al., 2002). Κομβικό ρόλο φαίνεται να κατέχει στη διαδικασία του προσχηματισμού η πρωτεΐνη *rapier* (*rpr*), μεταγραφικός παράγοντας τύπου GATA, η οποία είναι και η μόνη που έχει δείχθει μέχρι σήμερα να ενεργοποιεί άμεσα τα *ac* και *sc*, προσδεδεμένη απευθείας σε αλληλουχίες-στόχους στο λεγόμενο νωτο-κεντρικό (*dorso-central*) ενισχυτή τους (Garcia-Garcia et al., 1999, Gomez-Skarmeta et al., 1995). Για την έκφραση του *rpr*, σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει το *dpp* (Sato and Saigo, 2000). Πρέπει να τονιστεί ότι οι ρυθμιστικές αλληλουχίες των *ac* και *sc* είναι ιδιαίτερα περίπλοκες κι

εκτείνονται σε μια απόσταση της τάξης των 100 Kbp. Σημαντικό ρόλο παίζουν επίσης τα γονίδια *caupolican* και *araucan*, που κωδικοποιούν πρωτεΐνες τύπου homeobox, από το γονιδιακό σύμπλοκο *iroquois* (*iro-C*, Leyns et al., 1996, Calleja et al., 2002). Τα γονίδια *iro-C* είναι και τα πρώτα που εκφράζονται στην πρόδρομη περιοχή του θώρακα στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού, όμως αργότερα καταστέλλονται στην κεντρική περιοχή του δίσκου από την *rhg*, η οποία δρα σε συνεργασία με την *Engrailed* και πρωτεΐνες από το γονιδιακό σύμπλοκο *bithorax* (Calleja et al., 2000). Έτσι, υπεύθυνα για την ενεργοποίηση των *ac* και *sc* είναι τελικά το *rhg* στην κεντρική περιοχή του δίσκου και οι *iro-C*, που παραμένουν μόνο πλευρικά και φαίνεται να ενεργοποιούν έμμεσα (Cavodeassi et al., 2001). Άλλοι παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο είναι οι πρωτεΐνες *Hairy* και *emc*, οι οποίες καταστέλλουν τα *ac* και *sc* σε περιοχές εκτός των προνευρικών συναθροισμών. Η πρωτεΐνη *Hairy*, που εντοπίζεται συμπληρωματικά με τις *Ac* και *Sc*, έχειδειχτεί ότι μπορεί να καταστέλλει την έκφραση των προνευρικών γονιδίων, όπως του *ac*, με ένα τρόπο που φαίνεται να εξαρτάται από την πρόσδεσή της στις ρυθμιστικές του περιοχές (Ohsako et al., 1994, Van Doren et al., 1994), ενώ η *emc* δημιουργεί με τις προνευρικές πρωτεΐνες ανενεργά ως προς την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA σύμπλοκα (Ellis et al., 1990, Van Doren et al., 1991, Van Doren et al., 1992). Για τον περιορισμό των προνευρικών συναθροισμών χρειάζεται επίσης η πρωτεΐνη *ush*, μεταγραφικός παράγοντας που περιέχει δακτυλίους ψευδαργύρου, η οποία όμως λειτουργεί αναστέλλοντας όχι τα *ac* και *sc*, αλλά το ίδιο το *rhg*, αλληλεπιδρώντας μαζί του σε πρωτεϊνικό επίπεδο (Haenlin et al., 1997).

Η επιλογή του ΠΑΟ βασίζεται και πάλι στο σηματοδοτικό μονοπάτι του *N* (Artavanis-Tsakonas et al., 1999, Artavanis-Tsakonas et al., 1995, Simpson 1990, Hartenstein and Posakony 1990). Πρέπει να τονιστεί ότι η έκφραση των *DI* και *N* κατά την επιλογή των ΠΑΟ φαίνεται ομοιογενής σε όλα τα κύτταρα κάθε συναθροισμού, τα οποία αποτελούν ταυτόχρονα πομπούς και δέκτες της σηματοδότησης *N*. Μικρές όμως διαφορές στα επίπεδα της έκφρασης ή της ενεργότητας των δύο μορίων, που μπορεί να είναι είτε στοχαστικές είτε να οφείλονται σε άλλους παράγοντες, έχουν τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζονται, έτσι ώστε ένα κύτταρο που δέχεται αυξημένη σηματοδότηση *N* να χάνει την ικανότητά του να σηματοδοτεί, ή να εξασθενεί σε σχέση με τα γειτονικά κύτταρα. Η διαφορά αυτή δεν οφείλεται σε μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης του δεσμευτή ή/και του υποδοχέα, καθώς έχειδειχτεί ότι για να επιτευχθεί σηματοδότηση δεν απαιτείται μεταγραφή του *DI* (Seugnet et al., 1997, Pitsouli and Delidakis 2005), εξαρτάται μάλλον από γεγονότα ενδοκύττωσης που τροποποιούν τη δυνατότητα των κυττάρων να σηματοδοτούν. Η διαφοροποίηση στα επίπεδα της σηματοδότησης μεταξύ των κυττάρων καταλήγει στο να δημιουργεί ένα κύτταρο που δρα αποκλειστικά ως πομπός του σήματος, όντας «αναισθητοποιημένο» στα ασθενέστερα σήματα που λαμβάνει από τα γειτονικά του, το οποίο επιλέγεται τελικά ως ΠΑΟ. Το κύτταρο αυτό θα εξακολουθήσει να συσσωρεύει τα πρωτεϊνικά προϊόντα των

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

προνευρικών γονιδίων, ενώ τα γειτονικά κύτταρα θα πάψουν σταδιακά να εκφράζουν τις προνευρικές πρωτεΐνες και θα διαφοροποιηθούν σε κύτταρα επιδερμίδας. Η ικανότητα του N να καταστέλλει τη νευρική τύχη και γενικά τη διαφοροποίηση σε ένα πληθυσμό ισοδύναμων αρχικά αναπτυξιακά κυττάρων ονομάζεται πλευρική αναστολή.

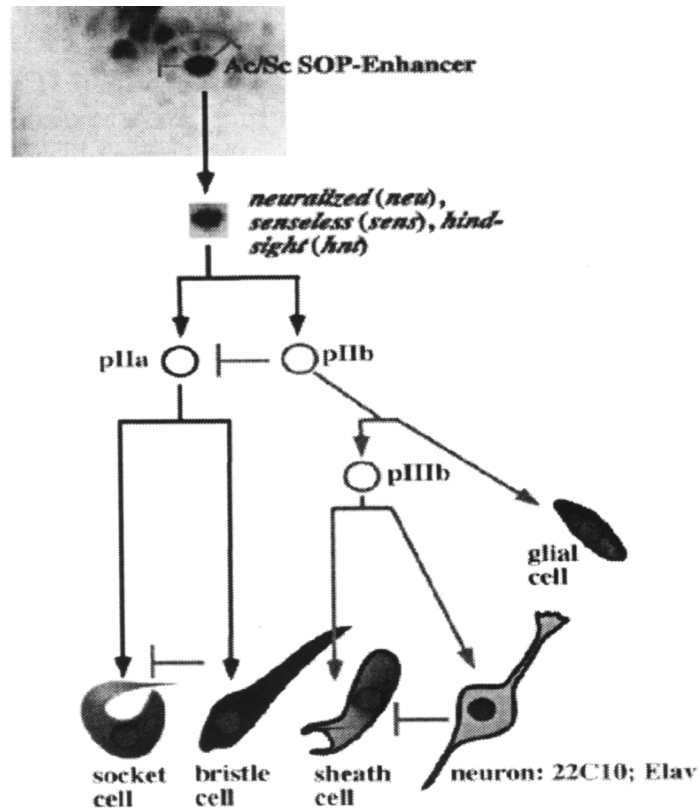


ΕΙΚΟΝΑ 1-2 Σχηματική αναπαράσταση των γεγονότων που μεσολαβούν, από τον καθορισμό των προνευρικών συναθροισμών μέχρι και τις κυτταρικές διαιρέσεις του κυττάρου ΠΑΟ, για τη δημιουργία των οργάνων του ΠΝΣ (από Jan and Jan, *The peripheral nervous system. The development of Drosophila melanogaster*, Martinez-Arias and Bate, 1993)

Ανοίγοντας μια παρένθεση, μία ανάλογη δράση του N έχει περιγραφεί και κατά τον καθορισμό των κυττάρων AC (anchor cell) και VU (ventral uterine cell) κατά την ανάπτυξη των γονάδων στο *C. elegans*. Ενώ τα περισσότερα κύτταρα στο σκουλήκι καθορίζονται με βάση τη γενεαλογία τους, ο καθορισμός των δύο αυτών κυττάρων βασίζεται στην επικοινωνία τους μέσω του N. Ενώ αρχικά η έκφραση των LIN-12 (το ένα από τα δύο ομόλογα του *N* στον καινοραβδίτη) και του LAG-2 (ομόλογο του *Dl*) είναι ομοιόμορφη, τυχαίες διακυμάνσεις στην έκφραση των δύο μορίων πολλαπλασιάζονται, με την ενεργοποίηση του υποδοχέα να επάγει αυτόνομα την ίδια του την έκφραση και να καταστέλλει την έκφραση του δεσμευτή, με τελικό αποτέλεσμα το ένα από τα δύο κύτταρα να εκφράζει αποκλειστικά το δεσμευτή και να διαφοροποιείται σε AC, ενώ το άλλο να εκφράζει μόνο τον υποδοχέα και να διαφοροποιείται σε VU (Greenwald 1998). Εδώ έχουμε ένα κλασικό παράδειγμα πλευρικού καθορισμού που βασίζεται σε μεταγραφική ανατροφοδότηση.

Μετά τον καθορισμό του ΠΑΟ, ακολουθεί μία κυτταρική διαίρεση που δημιουργεί τα κύτταρα pIIa και pIIb (Hartenstein and Posakony 1990). Το pIIa διαιρείται ακόμα μία φορά, δίνοντας το τριχογόνο κύτταρο (σμήριγγα) και το κύτταρο που θα δώσει τη θήκη της σμήριγγας. Λίγο αργότερα διαιρείται το κύτταρο pIIb, δίνοντας ένα τριτογενές κύτταρο pIIIb και ένα επικουρικό κύτταρο γλοίας. Τέλος, το κύτταρο pIIIb διαιρείται δίνοντας το νευρώνα

του οργάνου και το περίβλημα του νευρώνα (Modolell and Campuzano 1998). Αυτή η σειρά των ασύμμετρων διαιρέσεων αποτελεί ακόμα ένα παράδειγμα για το πώς χρησιμοποιείται το N σε αποφάσεις κυτταρικής γενεαλογίας. Η δημιουργία των τεσσάρων διαφορετικών κυτταρικών τύπων από ένα και μόνο προγονικό κύτταρο επιτυγχάνεται μέσω σηματοδότησης N (Zeng et al., 1998). Μετά τη διαίρεση του ΠΑΟ, το κύτταρο pIIb σηματοδοτεί μέσω του DI στο pIIa, αποτρέποντάς το από το να διαφοροποιηθεί και αυτό σε pIIb. Επίσης, το τριχογόνο κύτταρο σηματοδοτεί στο θηκογόνο μετά τη διαίρεση του pIIa, ενώ και ο νευρώνας σηματοδοτεί στο περίβλημα μετά τη διαίρεση του κυττάρου pIII. Αυτό σημαίνει ότι η έλλειψη του N μπορεί να οδηγήσει για παράδειγμα όλα τα κύτταρα να γίνουν νευρώνες (αν η έλλειψη προκύψει πριν την πρώτη διαίρεση του ΠΑΟ και μετά τον καθορισμό του), είτε σε δύο σμήριγγες χωρίς περίβλημα (αν γίνει αμέσως πριν τη διαίρεση του pIIa, Zeng et al., 1998). Το γεγονός ότι η σηματοδότηση σε αυτήν την περίπτωση είναι μονόδρομη οφείλεται στην πρωτεΐνη Numb, η οποία κατανέμεται ασύμμετρα μετά τη διαίρεση του ΠΑΟ και μπορεί αυτόνομα να καταστέλλει τη λήψη του σήματος από τον υποδοχέα. Η παρουσία της Numb λοιπόν στο τριχογόνο κύτταρο το «αναισθητοποιεί» στη N σηματοδότηση, όπως φαίνεται από το γεγονός ότι η έλλειψή της έχει τον ίδιο φαινότυπο με την υπερέκφραση του συστατικά ενεργού ενδοκυττάριου τμήματος του υποδοχέα, που είναι αυτός της έλλειψης σμήριγγας με ταυτόχρονη παρουσία δύο κυττάρων περιβλήματος (Frise et al., 1996, Guo et al., 1996). Πρέπει να σημειωθεί εδώ ότι η έλλειψη του N στο δίσκο του φτερού σε όψιμα προνυμφικά στάδια οδηγεί σε μύγες με φαλακρό θώρακα, καθώς επηρεάζεται αρχικά η πλευρική αναστολή και προκύπτουν υπεράριθμα κύτταρα ΠΑΟ σε κάθε προνευρικό συναθροισμό, τα οποία όμως στη συνέχεια διαφοροποιούνται όλα σε νευρώνες, αφού το N παίζει ρόλο και κατά τη διαίρεση και διαφοροποίηση του ΠΑΟ. Αντίθετα, η έλλειψη των πυρηνικών τελεστών του N, των πρωτεϊνών E(spl), συνοδεύεται από την υπερπαραγωγή σμηρίγγων στο θώρακα. Αυτό συμβαίνει επειδή και πάλι παράγονται υπεράριθμα κύτταρα ΠΑΟ, που όμως διαιρούνται και διαφοροποιούνται κανονικά, κάτι που δείχνει ότι οι πρωτεΐνες E(spl) απαιτούνται μόνο για την πλευρική αναστολή και όχι για τις επακόλουθες ασύμμετρες διαιρέσεις του ΠΑΟ. Η ιδιότητα αυτή των E(spl), να διαμεσολαβούν μερικές μόνο από τις δράσεις του N, θα αναλυθεί περισσότερο στη συνέχεια.



ΕΙΚΟΝΑ 1-3 Σχηματική αναπαράσταση των ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων του κυττάρου ΠΑΟ (από Koelzer and Klein, 2003).

1.3 Η οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων τύπου bHLH.

Το αντικείμενο της παρούσας διατριβής είναι οι πρωτεΐνες E(spl) και η λειτουργική τους εξειδίκευση. Θα εστιάσουμε κυρίως στις ικανότητες πρόσδεσής τους στο DNA, στις προτιμήσεις τους όσον αφορά το διμερισμό τους και θα διερευνήσουμε το ρόλο που παίζει η άμεση πρόσδεση στο DNA στη μεταγραφική καταστολή που επιφέρουν, τόσο στα πλαίσια της νευρογένεσης στη μύγα, όσο και γενικότερα. Για να γίνει σαφέστερο το πλαίσιο της προσπάθειας αυτής, είναι απαραίτητη μια εισαγωγή στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων τύπου bHLH, καθώς και μια εκτενέστερη ανάλυση σχετικά με το πώς επιτυγχάνεται ο καθορισμός της νευρικής τύχης τόσο στη δροσόφιλα όσο και στα θηλαστικά. Ο καθορισμός αυτός βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στον ανταγωνισμό δύο υποομάδων παραγόντων αυτού του τύπου, των προνευρικών πρωτεϊνών, που είναι μεταγραφικοί ενεργοποιητές και επάγουν τη νευρική τύχη, και των καταστολέων τύπου HES/E(spl).

Οι πρωτεΐνες τύπου bHLH (basic-helix-loop-helix) αποτελούν μια από τις πλέον ευάριθμες οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων και απαντούν σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα. Χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός μοτίβου που απαρτίζεται από δύο αμφιπαθικές α-έλικες, οι οποίες

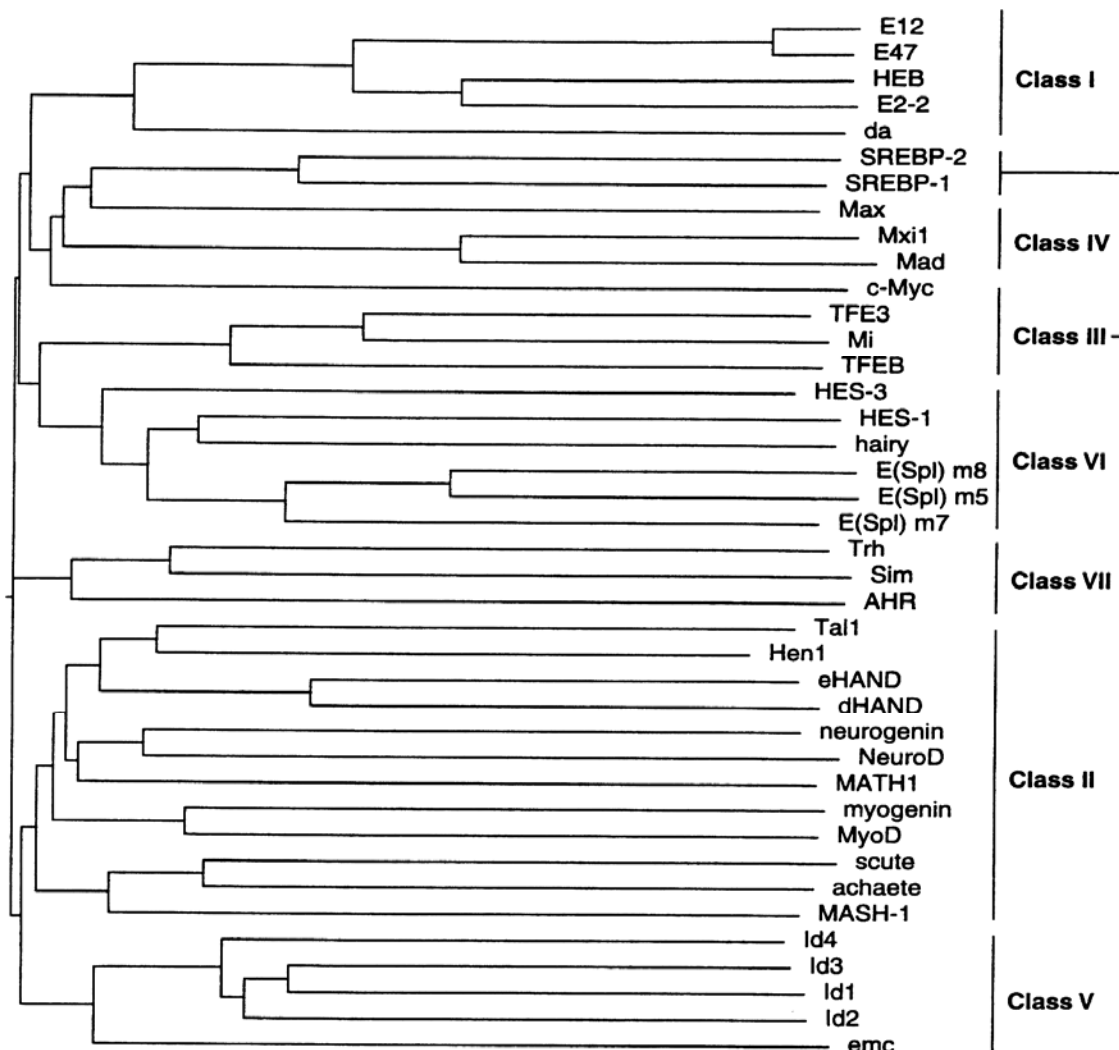
διαχωρίζονται από μία θηλιά μεταβλητού μήκους. Οι έλικες αυτές διαμεσολαμβάνουν το διμερισμό μεταξύ των παραγόντων τύπου bHLH και καθορίζουν την ειδικότητα αυτών των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Οι πρωτεΐνες τύπου bHLH δρουν αποκλειστικά ως ομο- ή ετεροδιμερή. Η βασική περιοχή βρίσκεται αμέσως πριν από τις δύο έλικες, και είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση σε καθορισμένες θέσεις στο DNA, τις χαρακτηριστικές εξανουκλεοτιδικές αλληλουχίες τύπου E (E boxes, Dang et al., 1992). Ένα τυπικό στοιχείο E αποτελείται από την αλληλουχία CANNTG και διακρίνεται σε διάφορους επιμέρους τύπους, όπως τους E_A (CAGC/GTG) και E_B (CACGTG). Υπάρχουν όμως και μη κανονικές αλληλουχίες τύπου E όπου επίσης προσδένονται συγκεκριμένες κατηγορίες παραγόντων bHLH, όπως, για παράδειγμα, οι αλληλουχίες τύπου E_C (CACGCG) και N (CACG/AAG) (Murre et al., 1989b, Massari and Murre 2000).

Οι μεταγραφικοί παράγοντες τύπου bHLH παίζουν κομβικό ρόλο σε μια πληθώρα αναπτυξιακών διαδικασιών σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Στα φυτά, όπου η οικογένεια φαίνεται να είναι τόσο πολυάριθμη όσο και στα θηλαστικά, έχειδειχθεί ότι σχετίζονται με τη βιοσύνθεση χρωστικών, τη διαφοροποίηση του τριχώματος και τη σηματοδότηση μέσω του φυτοχρώματος B, που επάγεται από το φως (Heim et al., 2003, Sakamoto et al., 2001, Payne et al., 2000, Ni et al., 1998, Martinez-Garcia et al., 2000). Στο σακχαρομύκητα ελέγχουν μεταβολικές διεργασίες όπως η βιοσύνθεση των φωσφολιπιδίων, η πρόσληψη φωσφόρου και η βιοσύνθεση της μεθειονίνης (Cai and Davis 1990, Hoshizaki et al., 1990, Nikoloff et al., 1992). Στον καινοραβδίτη παίζουν ρόλο στο σχηματισμό των οργάνων ζευγαρώματος των αρσενικών, στη διαφοροποίηση του νευρικού συστήματος κ.α. (Zhao and Emmons 1995, Portman and Emmons 2000). Στη δροσόφιλα η δράση τους σχετίζεται με την κυτταρική αύξηση, την ανάπτυξη και διαφοροποίηση του νευρικού και μυϊκού συστήματος, τον φυλοκαθορισμό κ.α. (Parkhurst and Meneely 1994, Molkentin and Olson 1996, Jan and Jan 1994). Στα θηλαστικά ρυθμίζουν ζωτικές κυτταρικές λειτουργίες όπως η κυτταρική αύξηση και η απόπτωση, καθώς και τη διαφοροποίηση συστημάτων όπως το νευρικό, το αιμοποιητικό, το ανοσοποιητικό, το στηρικτικό κι ακόμα την ανάπτυξη και λειτουργία οργάνων όπως το πάγκρεας, η καρδιά και τα αγγεία κ.α. (Facchini and Penn 1998, Olson 1990, Weintraub et al., 1991, Venuti and Cserjesi 1996, Puri and Sartorelli 2000, Bertrand et al., 2002, Brunet and Ghysen 1999, Fischer and Gessler 2003, Mukherjee et al., 1992, Amati et al., 1993). Αποτελούν μία από τις πλέον αρχέγονες ομάδες πρωτεϊνών, με τα ποικίλα δομικά χαρακτηριστικά και τις αναρίθμητες λειτουργίες που έχουν αποκτήσει με το πέρασμα του χρόνου να αποτελούν άριστο υπόστρωμα για εξελικτικές μελέτες.

Κατά τα τελευταία 15 χρόνια έχει συσσωρευτεί μεγάλος όγκος δεδομένων που αφορά τις αναπτυξιακές διαδικασίες που συμμετέχουν, τα δομικά χαρακτηριστικά και τους μηχανισμούς που χρησιμοποιούν οι πρωτεΐνες τύπου bHLH σε σχέση με τη ρύθμιση της

μεταγραφής. Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα σύγχρονα προγράμματα αλληλούχισης και ανάλυσης γονιδιωμάτων προσφέρουν τη δυνατότητα για γρήγορη και μαζική ανακάλυψη νέων γονιδίων και πιθανών πρωτεϊνικών προϊόντων από διάφορους οργανισμούς, έγινε επιτακτική η ανάγκη υποκατηγοριοποίησης της οικογένειας, προκειμένου να διευκολυνθεί η μελέτη σχετικά με τις διαδικασίες που παίζουν ρόλο και τους μηχανισμούς όπου εμπλέκονται τόσο τα νέα, όσο και τα ήδη γνωστά μέλη της οικογένειας. Μια πιο εκτεταμένη αναφορά κρίνεται λοιπόν απαραίτητη, προκειμένου να γίνει σαφέστερο το πλαίσιο και να οριοθετηθούν οι στόχοι αυτής της διατριβής.

Μία πρώτη προσπάθεια κατηγοριοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων τύπου bHLH έγινε από τους (Atchley and Fitch, 1997) και αντανakλά τις φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των πρωτεϊνών, που καθορίστηκαν με βάση τρία κριτήρια: την ειδικότητα πρόσδεσης στο DNA, τη συντήρηση αμινοξέων σε καθορισμένες θέσεις στη βασική περιοχή και την ύπαρξη ή μη του μοτίβου «φερμουάρ λευκίνης» (leucine zipper, LZ), το οποίο απαντά σε πολλά μέλη τις οικογένειας και θεωρείται ότι διαμεσολαβεί σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, καθορίζοντας την ειδικότητα αυτών των αλληλεπιδράσεων. Η μελέτη όμως αυτή κατέληξε στο σχηματισμό τεσσάρων υποοικογενειών που όμως παρουσιάζουν αρκετή ετερογένεια όσον αφορά τις δομικές και λειτουργικές ομοιότητες μεταξύ των μελών κάθε ομάδας και δεν θα αναλυθεί περισσότερο. Οι (Massari and Murre, 2000) από την άλλη, βασίστηκαν κυρίως στα πρότυπα έκφρασης, τις ικανότητες διμερισμού και την ειδικότητα πρόσδεσης στο DNA και κατέληξαν στην κατηγοριοποίηση των πρωτεϊνών τύπου bHLH σε επτά ομάδες αρκετά καλά συγκροτημένες, η παρουσίαση των οποίων θα συνοψίσει ικανοποιητικά το εύρος των λειτουργιών και των διαδικασιών όπου εμπλέκονται οι παράγοντες αυτοί.



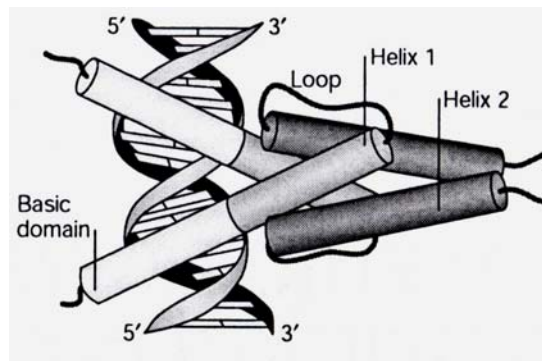
ΕΙΚΟΝΑ 1-4 Η ταξινόμηση των πρωτεϊνών της οικογένειας bHLH των μεταζώων σε ομάδες, κατά τους (Massari and Murre, 2002).

1.3.1 Πρώτη ομάδα

Στην ομάδα αυτή ανήκουν πρωτεΐνες με ευρύ πρότυπο έκφρασης, όπως οι θηλαστικές HEB, E2-2, E12 και E47 (οι δύο τελευταίες προκύπτουν από το γονίδιο E2A με εναλλακτικό μάτισμα) και η ομόλογή τους Daughterless (Da) από τη δροσόφιλα. Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν σε μερικές περιπτώσεις να σχηματίζουν ομοδιμερή που προσδένονται στο DNA, κυρίως όμως δρουν ως ετεροδιμερή με τις πρωτεΐνες της δεύτερης ομάδας (βλέπε παρακάτω), η έκφραση των οποίων είναι ιστοειδική (Murre et al., 1989a, Engel and Murre 2001). Η πρόσδεση των διμερών αυτών γίνεται αποκλειστικά σε αλληλουχίες τύπου E_A (CAGC/GTG). Κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι το ομοδιμερές της E47 προσδεμένο στην αλληλουχία CAGGTG σχηματίζει μία παράλληλη δέσμη αποτελούμενη από τις τέσσερις α-έλικες, με τη βασική περιοχή να έρχεται σε επαφή με τη μεγάλη αύλακα του DNA.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Με το DNA έρχονται σε επαφή επιπλέον αμινοξέα από τη θηλιά και τη δεύτερη έλικα. Με τον ίδιο γενικό τρόπο, όπως φαίνεται και στην εικόνα 1-6, προσδένονται και οι υπόλοιπες bHLH, για όσες από αυτές έχουν υπάρξει ανάλογες μελέτες. Ο διμερισμός επιτυγχάνεται μέσω δεσμών van der Waals μεταξύ συντηρημένων υδρόφοβων αμινοξέων στην περιοχή HLH, καθώς και με δεσμούς υδρογόνου. Το διμερές καθλώνεται στο κέντρο της αλληλουχίας πρόσδεσης, με κάθε μονομερές να έρχεται σε επαφή είτε με το ένα μισό αυτής (CAC) είτε με το άλλο (CTG) με ασύμμετρο τρόπο κυρίως μέσω δεσμών υδρογόνου, αλλά και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Ένα κατάλοιπο γλουταμικού οξέος στη βασική περιοχή κάθε μονομερούς φαίνεται να είναι πολύ σημαντικό για την καθήλωση στο DNA, ενώ μία παρακείμενη αργινίνη φαίνεται να σταθεροποιεί την πρόσδεση, ερχόμενη σε επαφή τόσο με τις αζωτούχες βάσεις όσο και με τον σακχαροφωσφορικό σκελετό (Ellenberger et al., 1994). Πρέπει να τονιστεί ότι τα δύο αυτά αμινοξέα είναι συντηρημένα στις περισσότερες πρωτεΐνες τύπου bHLH, γεγονός που ενισχύει την πεποίθηση ότι είναι σημαντικά για την πρόσδεση στο DNA.



ΕΙΚΟΝΑ 1-5 Σχηματική αναπαράσταση της πρόσδεσης ενός διμερούς bHLH στο DNA. Οι τέσσερις παράλληλες έλικες σχηματίζουν μια δέσμη, ενώ οι βασικές περιοχές (αλλά και αμινοξέα από τη δεύτερη έλικα και τη θηλιά) έρχονται σε επαφή με το DNA (από Bertrand et al., 2002).

Ετεροδιμερή των πρωτεϊνών τύπου E με παράγοντες της δεύτερης ομάδας παίζουν σημαντικό ρόλο κατά τη νευρογένεση και τη μυογένεση τόσο στη δροσόφιλα, όσο και στα θηλαστικά. Επιπλέον, σημαντικός είναι ο ρόλος τους και σε άλλες διαδικασίες, όπως είναι η ανάπτυξη του παγκρέατος στα θηλαστικά και ο φυλοκαθορισμός στη δροσόφιλα, ενώ ομοδιμερή E12 και E47 είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των T και B λεμφοκυττάρων, αλλά και γενικότερα για τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι αποκλειστικά μεταγραφικοί ενεργοποιητές, ενώ οι δύο περιοχές AD1 και AD2 στο αμινοτελικό άκρο των E12 και E47 έχει δείχτεί ότι είναι απαραίτητες για τη μεταγραφική ενεργοποίηση τόσο σε κύτταρα θηλαστικών όσο και στο σακχαρομύκητα (Aronheim et al., 1993, Massari et al., 1996, Quong et al., 1993). Οι ίδιες πρωτεΐνες μπορούν να αλληλεπιδρούν μέσω της περιοχής bHLH με τον παράγοντα p300 (Eckner et al., 1996), καθώς και με το σύμπλοκο SAGA μέσω της περιοχής AD1. Η τελευταία

αλληλεπίδραση είναι απαραίτητη για μεταγραφική ενεργοποίηση στο σακχαρομύκητα (Massari et al., 1999). Φαίνεται λοιπόν ότι η στρατολόγηση παραγόντων με δράση ακετυλοτρανσφεράσης ιστονών (HAT) είναι μια βασική στρατηγική που ακολουθούν οι παράγοντες τύπου E προκειμένου να επιφέρουν μεταγραφική ενεργοποίηση.

1.3.2 Δεύτερη ομάδα

Περιλαμβάνει πρωτεΐνες με εξειδικευμένη έκφραση σε συγκεκριμένους ιστούς, όπως είναι οι μυοειδικές πρωτεΐνες MyoD και myogenin, οι νευροειδικές πρωτεΐνες Mash, Atonal και NeuroD/BETA2, καθώς και οι παράγοντες από το γονιδιακό σύμπλοκο *achaete-scute* της μύγας (Massari and Murre 2000, Puri and Sartorelli 2000, Bertrand et al., 2002). Η δράση των παραπάνω παραγόντων έχει να κάνει τόσο με τον αρχικό καθορισμό των μυοβλαστών και νευροβλαστών, όσο και με την τελική τους διαφοροποίηση. Οι πρωτεΐνες αυτές δρουν αποκλειστικά ως ετεροδιμερή με τις ευρείας έκφρασης πρωτεΐνες τύπου E της πρώτης ομάδας, προσδενόμενες σε αλληλουχίες τύπου E_A. Τα ετεροδιμερή αυτά είναι κατά κανόνα μεταγραφικοί ενεργοποιητές κι έχειδειχτεί ότι η MyoD μπορεί να αλληλεπιδρά με p300/CBP καθώς και με PCAF και να τροποποιεί έτσι τη δομή της χρωματίνης (Eckner et al., 1996, Puri et al., 1997, Gerber et al., 1997). Αξίζει να σημειωθεί ότι μέλη της ομάδας αυτής, όπως η ογκοπρωτεΐνη Tal1, η ABF-1, που εκφράζεται σε ενεργοποιημένα B- λεμφοκύτταρα, ο αναστολέας της μυογένεσης Mist και η πρωτεΐνη Twist, που αναστέλλει τη μυϊκή και τη νευρική τύχη, μπορούν να δράσουν και ως μεταγραφικοί καταστολείς ως ετεροδιμερή με τις πρωτεΐνες E12/E47, χωρίς να είναι γνωστό με ποιο μηχανισμό επιτυγχάνεται αυτό (Lemerrier et al., 1998, Massari et al., 1998, Park and Sun 1998, Hamamori et al., 1997, Spicer et al., 1996). Ειδικά για την πρωτεΐνη Twist είναι γνωστό ότι μπορεί να αλληλεπιδρά τόσο με την E47 όσο και με τους μυοειδικούς παράγοντες MyoD, Myf5, MRF4 και myogenin, δημιουργώντας με αυτές ανενεργά σύμπλοκα. Επιπλέον έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με p300 και PCAF, αναστέλλοντας την ενζυμική τους δράση ακετυλοτρανσφεράσης (Hamamori et al., 1997, Spicer et al., 1996, Hamamori et al., 1999).

1.3.3 Τρίτη ομάδα

Σε αυτήν την υποοικογένεια περιλαμβάνονται οι πρωτεΐνες που φέρουν την περιοχή LZ δίπλα από την περιοχή bHLH, η οποία, όπως και η HLH, συνεισφέρει στο διμερισμό. Εδώ ανήκουν η Myc και οι συγγενείς πρωτεΐνες, καθώς και οι TFE3, SREBP-1 και 2 και Mi (Massari and Murre 2000). Ο ρόλος των πρωτεϊνών αυτών είναι γνωστός σε σχέση με την ογκογένεση, την απόπτωση και τη διαφοροποίηση (Facchini and Penn 1998, Henriksson

and Luscher 1996). Η c-Myc έχει δειχτεί ότι αλληλεπιδρά μέσω της περιοχής LZ με πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, όπως το SWI-SNF (Cheng et al., 1999), καθώς και με την πρωτεΐνη TRRAP μέσω του αμινικού της άκρου. Η TRRAP αποτελεί μέλος των συμπλόκων PCAF και hGCN5, τα οποία έχουν δραστικότητα HAT (McMahon et al., 1998). Επιπλέον, ετεροδιμερή Myc/Max είναι γνωστό ότι προσδένονται σε αλληλουχίες τύπου E_B (CACGTG) ενεργοποιώντας τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων που φέρουν αυτές τις αλληλουχίες στις ρυθμιστικές τους περιοχές (Murre et al., 1994). Αξίζει όμως να σημειωθεί ότι η Myc έχει και κατασταλτική δράση σε γονίδια που μπλοκάρουν τον κυτταρικό κύκλο, που επιτυγχάνεται με δύο τουλάχιστον τρόπους: μέσω ετεροδιμερισμού με τη Max και πρόσδεσης στις αλληλουχίες Inr (στοιχείο έναρξης της μεταγραφής), γεγονός που οδηγεί στην αναστολή της δράσης του μεταγραφικού ενεργοποιητή Miz-1 ή και άλλων, καθώς και μέσω αλληλεπίδρασης με τον παράγοντα Sp1 τον οποίο και αναστέλλει, χωρίς να χρειάζεται ετεροδιμερισμός με Max και πρόσδεση στο DNA (Gartel and Shchors 2003).

Οι παράγοντες SREBP-1 και 2 απελευθερώνονται από τη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου, όπου εδρεύουν ως διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, από μία πρωτεάση που επάγεται από χοληστερόλη και μεταναστεύουν στον πυρήνα, όπου σε συνεργασία με τον παράγοντα Sp1 ενεργοποιούν τη μεταγραφή του υποδοχέα λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (low density). Και σε αυτήν την περίπτωση απαιτείται η παρουσία συμπλόκων με ενεργότητα HAT (Brown and Goldstein 1997, Naar et al., 1998).

1.3.4 Τέταρτη ομάδα

Σε αυτήν την ομάδα ανήκουν πρωτεΐνες που επίσης φέρουν την περιοχή LZ και παίζουν ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και την κυτταρική διαφοροποίηση, όπως οι Mad, Max, Mxi και άλλες, που μπορούν γενικά να ετεροδιμερίζονται τόσο μεταξύ τους, δρώντας ως μεταγραφικοί καταστολείς, όσο και με την Myc, οπότε και δρουν ως ενεργοποιητές. Το ομοδιμερές Max/Max προσδένεται στο DNA σχηματίζοντας μία αριστερόστροφη δέσμη αποτελούμενη από τις τέσσερις α-έλικες, ενώ στο διμερισμό συμμετέχει και η περιοχή LZ. Οι δύο βασικές περιοχές καθλώνονται στη μεγάλη αύλακα του DNA αλληλεπιδρώντας κυρίως με δεσμούς υδρογόνου τόσο με τις βάσεις, όσο και με το σακχαροφωσφορικό σκελετό (Ferre D'Amare et al., 1993). Με παρόμοιο τρόπο αναλύθηκε και η πρόσδεση των ετεροδιμερών Myc/Max και Mad/Max στην ίδια αλληλουχία. Διαπιστώθηκε ότι η πρόσδεση επιτυγχάνεται βασικά με τον ίδιο συμμετρικό τρόπο, με τις διαφορές μεταξύ των τριών συμπλόκων να εντοπίζονται κυρίως στη διαμόρφωση των περιοχών LZ, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτή είναι που προσφέρει την ειδικότητα στα σύμπλοκα που σχηματίζονται. Αξιοσημείωτο είναι

επίσης ότι το ετεροδιμερές Myc/Max βρέθηκε να προσδένεται ως ετεροτετραμερές, με τις τέσσερις περιοχές LZ να έχουν ανά δύο αντιπαράλληλη τοποθέτηση (Nair and Burlay, 2003). Όσον αφορά τη μεταγραφική καταστολή που επιφέρουν τα διμερή της ομάδας αυτής, είναι γνωστό ότι η Mad μπορεί να αλληλεπιδρά με τους μεταγραφικούς συγκαταστολείς mSin3A και mSin3B, οι οποίοι απαντούν σε σύμπλοκα μαζί με άλλους συγκαταστολείς, όπως οι N-CoR και HDAC, που έχουν ενεργότητα απακευλάσης ιστονών (Ayer et al., 1995, Schreiber-Argus et al., 1995, Heinz et al., 1997).

1.3.5 Πέμπτη ομάδα

Εδώ ανήκουν οι θηλαστικές πρωτεΐνες Id και η ομόλογή τους Epc από τη δροσόφιλα, που χαρακτηρίζονται από την έλλειψη της βασικής περιοχής. Οι πρωτεΐνες αυτές δρουν με ανασταλτικό τρόπο στις πρωτεΐνες των ομάδων 1 και 2, δημιουργώντας μαζί τους ετεροδιμερή που δεν μπορούν να προσδεθούν στο DNA. Ο ρόλος τους στην αναστολή της μυϊκής και νευρικής τύχης είναι αρκετά καλά χαρακτηρισμένος, τόσο στη δροσόφιλα όσο και στα θηλαστικά (Lyden et al., 1999, Engel and Murre 2001, Jogi et al., 2002, Van Doren et al., 1991, Van Doren et al., 1992).

1.3.6 Έκτη ομάδα

Σε αυτήν την ομάδα περιλαμβάνονται οι πρωτεΐνες Deadpan, Hairy καθώς και οι επτά πρωτεΐνες τύπου bHLH από το γονιδιακό σύμπλοκο *Enhancer of split* [*E(spl)*] της δροσόφιλας, οι ομόλογές τους HES από τα θηλαστικά και μια σειρά από άλλες συγγενείς δομικά πρωτεΐνες, όπως οι Hey, ESR, Her, Stra13 και άλλες, από διάφορους οργανισμούς (Davis and Turner 2001, Fisher and Caudy 1998a, Iso et al., 2003, Kageyama and Nakanishi 1997). Τα μέλη της ομάδας αυτής χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη δύο επιπλέον α-ελίκων καρβοξυτελικά της περιοχής bHLH, οι οποίες απαρτίζουν τη λεγόμενη πορτοκαλί περιοχή (Orange, O), καθώς και από το καρβοξυτελικό τετραπεπτιδίο WRPW, το οποίο είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση με το γενικό συγκαταστολέα Groucho/TLE (Paroush et al., 1994, Fisher and Caudy 1998b). Ένα επιπλέον γνώρισμα που τις διαφοροποιεί από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες bHLH είναι η ύπαρξη ενός συντηρημένου καταλοίπου προλίνης σε καθορισμένη θέση στη βασική περιοχή. Τα μέλη της οικογένειας αυτής παίζουν ρυθμιστικό ρόλο σε μια σειρά από αναπτυξιακές διαδικασίες όπως η νευρογένεση και η σωματογένεση στα θηλαστικά, η μεταμεριδίωση, η δημιουργία του ΚΝΣ και ΠΝΣ και ο καθορισμός του φύλου στη δροσόφιλα κλπ. Αποτελούν μεταγραφικούς καταστολείς που φαίνεται ότι μπορούν να δρουν τόσο μέσω άμεσης πρόσδεσης στο DNA σε αλληλουχίες τύπου E_B, E_C

και N και συνακόλουθης στρατολόγησης μεταγραφικών συγκαταστολέων, όσο και μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με παράγοντες της πρώτης και δεύτερης ομάδας.

1.3.7 Έβδομη ομάδα

Σε αυτήν περιλαμβάνονται πρωτεΐνες που φέρουν την περιοχή PAS καρβοξυτελικά της bHLH, όπως οι AHR και Arnt από τα θηλαστικά, οι Single-Minded και Period από τη δροσόφιλα κ.α. (Massari and Murre 2000). Η περιοχή PAS μαζί με την HLH είναι υπεύθυνη για πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, καθώς οι πρωτεΐνες αυτού του τύπου δρουν κυρίως ως ετεροδιμερή. Τα μέλη αυτής της οικογένειας εμπλέκονται σε μια πληθώρα διαδικασιών, όπως η ρύθμιση των κερκαδιανών ρυθμών και η ανάπτυξη του ΚΝΣ, της τραχείας και των σιελογόνων αδένων στη δροσόφιλα, η απόκριση σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου και η λειτουργία των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών στα θηλαστικά κ.α. Λειτουργούν τόσο ως μεταγραφικοί ενεργοποιητές όσο και ως καταστολείς, προσδεδεμένες σε ρυθμιστικά στοιχεία διαφορετικά από τα E boxes, των οποίων ο πυρήνας είναι πεντανουκλεοτιδικός (Crews 1998, Hankinson 1995)

1.4 Τα προνευρικά γονίδια στη δροσόφιλα και ο ρόλος τους κατά τη νευρογένεση

Αναφέρθηκε ήδη ότι η ανάπτυξη του ΚΝΣ της μύγας ξεκινάει κατά τα εμβρυϊκά στάδια, όπου κύτταρα από το κοιλιακό εκτόδερμα του εμβρύου εκφράζουν τα λεγόμενα προνευρικά γονίδια και συγκεκριμένα τα *achaete* (*Ac*), *scute* (*Sc*) και *lethal of scute* (*L'sc*). Τα τρία αυτά γονίδια μαζί με το *asense* (*Ase*) βρίσκονται στο λεγόμενο *Achaete-Scute Complex* (*AS-C*) και θεωρούνται αναγκαία και ικανά για τη διαφοροποίηση των κυττάρων του νευρικού συστήματος της μύγας. Η ανακάλυψη των τεσσάρων πρωτεϊνών (*Ac*, *Sc*, *L'sc*, *Ase*) του γονιδιακού συμπλόκου *AS-C* βασίστηκε σε γενετικές ελλείψεις που οδηγούσαν σε απώλεια αισθητηρίων οργάνων στα ενήλικα άτομα, ενώ ήταν και από τις πρώτες, μαζί με τις *Myc*, *Da* και *MyoD* στις οποίες βασίστηκε η μελέτη του μοτίβου bHLH και μελετήθηκε η σημασία του για το διμερισμό και την πρόσδεση στο DNA (Garcia-Bellido 1979, Gonzalez et al., 1989, Vilares and Cabrera 1987, Skeath and Carroll 1991, Murre et al., 1989a, Murre et al., 1989b).

Η έλλειψή τους συνοδεύεται από εκτεταμένη απώλεια νευρικού ιστού, ενώ η εκτοπική έκφρασή τους από νευρική υπερπλασία. Η δράση τους θεωρείται τουλάχιστον μερικώς πλεονάζουσα, καθώς μπορούν να αλληλοαντικαθίστανται σε σχέση με την προαγωγή της

νευρικής μοίρας, όμως τα πρότυπα έκφρασής τους υποδηλώνουν ότι επιτελούν και διαφορετικές λειτουργίες σε κανονικές συνθήκες, όπως θα γίνει σαφές λίγο παρακάτω. Στα προνευρικά γονίδια ανήκει επιπλέον και το *atonal* (*ato*), που βρίσκεται σε διαφορετική θέση στο γονιδίωμα και η έκφρασή του εντοπίζεται στους προνευρικούς συναθροισμούς που θα δώσουν τα χορδοτονικά όργανα, καθώς και στον αναπτυξιακό δίσκο του ματιού, για τον καθορισμό των φωτοϋποδοχέων. Στο ΚΝΣ δεν έχει προνευρική δράση, με την έννοια ότι εκφράζεται στους νευροβλάστες μετά τον καθορισμό τους (Simpson 1990, Jan and Jan 1994, Jimenez and Modolell 1993, Jarman et al., 1993b, Bertrand et al., 2002). Το γονίδιο *ato* κλωνοποιήθηκε λίγο αργότερα και φαίνεται να είναι πιο απομακρυσμένο από τα τέσσερα του συμπλόκου, καθώς στην περιοχή bHLH η αμινοξική ταυτότητα μεταξύ του *ato* και των μελών του AS-C φτάνει το 45%, ενώ μεταξύ των μελών του συμπλόκου αγγίζει το 70% (Jarman et al., 1993b). Δύο επιπλέον προνευρικά γονίδια που ανακαλύφθηκαν στη συνέχεια, τα *amos* και *cato* εμφανίζονται περισσότερο όμοια δομικά με το *ato* (Goulding et al., 2000a, Goulding et al., 2000b). Το *amos* είναι υπεύθυνο για τον καθορισμό των οσφρητικών υποδοχέων και των πολυδενδριτικών νευρώνων του ΠΝΣ (Goulding et al., 2000a, Huang et al., 2000), ενώ το *cato*, το τρίτο μέλος της υποοικογένειας του *ato* στη μύγα, δεν έχει προνευρική δράση, αλλά εκφράζεται σε κύτταρα του ΠΝΣ μετά την επιλογή τους, όπως και το *ase* (Goulding et al., 2000b).

Όλες οι παραπάνω πρωτεΐνες ανήκουν στη δεύτερη ομάδα μεταγραφικών παραγόντων τύπου bHLH (βλέπε Εισαγωγή, παράγραφος 1.3.2) και λειτουργούν ως ετεροδιμερή με την πρωτεΐνη Daughterless (Da), που ανήκει στην πρώτη ομάδα Τα ετεροδιμερή προσδένονται σε αλληλουχίες τύπου E_A (βλέπε Εισαγωγή, παράγραφος 1.3.2) και ενεργοποιούν τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων, που φέρουν αυτά τα στοιχεία στις ρυθμιστικές τους περιοχές.

1.4.1 Οι προνευρικές πρωτεΐνες υπόκεινται σε θετική αυτορύθμιση

Οι προνευρικές πρωτεΐνες δρουν αποκλειστικά ως ετεροδιμερή με την πρωτεΐνη Da και έχουν την ικανότητα να προσδένονται σε αλληλουχίες τύπου E_A (CAGC/GTG). Πρόσδεση ομοδιμερών μεταξύ οποιωνδήποτε προνευρικών πρωτεϊνών δεν έχει αναφερθεί, ενώ η Da έχει κάποια μικρή ικανότητα πρόσδεσης σε E_A ως ομοδιμερές. Οι υποκινητές νευροειδικών γονιδίων περιέχουν πολλαπλές τέτοιες θέσεις πρόσδεσης, όπως και οι ρυθμιστικές περιοχές των ίδιων των προνευρικών γονιδίων. Για παράδειγμα, ένα τμήμα DNA μήκους 900 bp αμέσως άνωθεν από την κωδική περιοχή του γονιδίου *ac* περιέχει τρεις επαναλήψεις του στοιχείου E_A (καθώς και μία αλληλουχία τύπου E_C, ο ρόλος της οποίας θα συζητηθεί αργότερα), που μπορεί να οδηγεί την έκφραση ενός γονιδίου-μάρτυρα, όπως της β-γαλακτοσιδάσης, στους προνευρικούς συναθροισμούς, όπου εκφράζεται και φυσιολογικά το

ac. Επιπλέον, πειράματα παροδικής διαμόλυνσης στη δροσοφιλική κυτταρική σειρά S2 έδειξαν ότι ετεροδιμερή Da/Sc και Da/Ac μπορούν να ενεργοποιούν ένα πλασμίδιο αναφοράς που περιέχει το γονίδιο *luc* υπό τον έλεγχο του 900 bp υποκινητή, με τρόπο που εξαρτάται απόλυτα από την παρουσία των άθικτων, αλλά όχι μεταλλαγμένων, στοιχείων E_A . Πρόσδεση των ίδιων ετεροδιμερών στα συγκεκριμένα στοιχεία αποδείχτηκε και *in vitro*, σε πειράματα υστέρησης κινητικότητας (Cabrerá and Alonso 1991, Ohsako et al., 1994, Van Doren et al., 1994, Van Doren et al., 1992). Είναι σαφές λοιπόν ότι οι προνευρικές πρωτεΐνες έχουν τη δυνατότητα να ρυθμίζουν θετικά την ίδια την έκφρασή τους, προσδεδεμένες σε στοιχεία E_A του υποκινητή τους, γεγονός που φαίνεται να ενισχύει το νευρικό δυναμικό κυττάρων που έχουν επιλεχθεί να διαφοροποιηθούν ως νευροβλάστες. Μάλιστα, η έκφραση της ίδιας ρυθμιστικής αλληλουχίας φαίνεται να περιορίζεται σταδιακά ειδικά στο κύτταρο ΠΑΟ, τουλάχιστον για τα κύτταρα που θα δώσουν τις μικροχαίτες του θώρακα (Modolell 1997, Pi et al., 2001).

Ένα επιπλέον παράδειγμα υποδεικνύει ότι η συσσώρευση των προνευρικών πρωτεϊνών ειδικά στο κύτταρο που επιλέγεται ως ΠΑΟ διαμεσολαβείται από ενισχυτές στις ρυθμιστικές περιοχές τους, οι οποίες υπόκεινται σε θετική αυτορύθμιση. Στην 5' ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου *sc* απομονώθηκε ένα τμήμα DNA μήκους 356 bp, το οποίο μπορεί να κατευθύνει την έκφραση του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης αποκλειστικά στα κύτταρα ΠΑΟ (Culi and Modolell 1998). Το τμήμα αυτό περιέχει τρεις αλληλουχίες πρόσδεσης προνευρικών πρωτεϊνών (στοιχεία E_A), μία θέση πρόσδεσης για τις πρωτεΐνες $E(spl)$ τύπου E_C , καθώς και δύο άλλες κατηγορίες στοιχείων πρόσδεσης, τα λεγόμενα στοιχεία α (που προσομοιάζουν με τις αλληλουχίες πρόσδεσης παραγόντων τύπου NF-κB) σε τρία αντίγραφα και τα στοιχεία β επίσης σε τρία αντίγραφα, τα οποία δεν είναι γνωστό τι είδους παράγοντες θα μπορούσαν να προσδένουν. Τα δύο από τα τρία στοιχεία E_A φαίνεται ότι είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση του ενισχυτή, καθώς η μεταλλαγή τους οδηγούσε σε απώλεια της έκφρασής του. Τα ίδια αυτά στοιχεία μπορούσαν να προσδένονται από ετεροδιμερή Da/Sc *in vitro*. Για τον περιορισμό της έκφρασης αποκλειστικά στα κύτταρα ΠΑΟ υπεύθυνα φαίνεται να είναι τα στοιχεία α, που προφανώς διαμεσολαβούν κάποια κατασταλτική δράση στα κύτταρα των προνευρικών συναθροισμών, εκτός από τα κύτταρα ΠΑΟ. Αυτό διαπιστώνεται από το γεγονός ότι ένας τεχνητός ενισχυτής που αποτελείται αποκλειστικά από πολυμερισμένα στοιχεία E_A οδηγεί την έκφραση σε όλα τα κύτταρα των προνευρικών συναθροισμών, αν όμως συμπεριληφθούν και στοιχεία τύπου α η έκφραση γίνεται ειδική για τα κύτταρα ΠΑΟ. Για την καταστολή του ενισχυτή SMC παίζουν ρόλο οι μεταγραφικοί καταστολείς του συμπλόκου $E(spl)$, που επάγονται από N/Su(H) στα κύτταρα των προνευρικών συναθροισμών εκτός από αυτά που επιλέγονται ως νευροβλάστες, παρόλο που η μεταλλαγή του στοιχείου E_C δεν οδήγησε σε αποκαταστολή του ενισχυτή. Αν τα στοιχεία τύπου α ή β

διαμεσολαβούν με κάποιο, άγνωστο προς το παρόν, τρόπο για την καταστολή που επιφέρουν οι πρωτεΐνες E(spl) μένει να διερευνηθεί (Culi and Modolell 1998).

1.4.2 Λειτουργική εξειδίκευση των προνευρικών πρωτεϊνών

Μελέτες έλλειψης λειτουργίας (Loss Of Function, LOF) βασισμένες στο φαινότυπο που συνοδεύει γενετικές ελλείψεις των προνευρικών γονιδίων, καθώς και κέρδους λειτουργίας (Gain Of Function, GOF) βασισμένες στην εκτοπική έκφρασή τους αποκάλυψαν ότι υπάρχει λειτουργική εξειδίκευση μεταξύ των μελών των προνευρικών πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, η έλλειψη των γονιδίων *ac* και *sc* οδηγεί σε έλλειψη των εξωτερικών μηχανοαισθητηρίων και χημειοαισθητηρίων οργάνων, που απαρτίζουν και το μεγαλύτερο μέρος από το ΠΝΣ της μύγας, καθώς και υποομάδων νευροβλαστών του ΚΝΣ (Cubas et al., 1991, Garcia-Bellido 1979, Garcia-Bellido and Santamaria 1978, Dominquez and Campuzano 1993). Η δράση των δύο αυτών γονιδίων μπορεί λοιπόν να χαρακτηριστεί πλεονάζουσα. Από την άλλη, το γονίδιο *l'sc* φαίνεται να είναι υπεύθυνο αποκλειστικά για το ΚΝΣ. Έκφρασή του δεν παρατηρείται στους αναπτυξιακούς δίσκους, παρά μόνο στο ΚΝΣ, και η έλλειψή του οδηγεί σε εκτεταμένη έλλειψη νευρώνων και κάποια ανωμαλία στο πρότυπο μετανάστευσής τους (Jimenez and Campos-Ortega 1990, Martin-Bermudo et al., 1991). Πάντως και τα τρία αυτά γονίδια εκφράζονται αρχικά σε πληθυσμούς κυττάρων, το νευρικό δυναμικό των οποίων περιορίζεται σταδιακά από το μηχανισμό της πλευρικής αναστολής μέσω του μονοπατιού του N, που περιορίζει και την έκφρασή τους αποκλειστικά στα κύτταρα που καθορίζονται ως νευροβλάστες. Τα κύτταρα αυτά εξακολουθούν να συσσωρεύουν τα προϊόντα των προνευρικών γονιδίων, ενώ αργότερα η έκφρασή τους παύει να ανιχνεύεται, δίνοντας τη θέση της σε γονίδια που παίζουν ρόλο στην τελική διαφοροποίηση των νευρώνων, καθώς και σε νευροειδικά γονίδια. Το τέταρτο γονίδιο που συναπαρτίζει το AS-C, το *ase*, εκφράζεται στο ΚΝΣ και ΠΝΣ στους νευροβλάστες που έχουν ήδη επιλεγθεί, παίζοντας ρόλο στη σωστή διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων και όχι στην επιλογή τους (Jarman et al., 1993a, Dominguez and Campuzano 1993). Πρέπει να σημειωθεί όμως ότι η εκτοπική έκφραση οποιουδήποτε από τα τέσσερα γονίδια οδηγεί σε υπερπαραγωγή αισθητηρίων οργάνων με ταυτόχρονη απώλεια επιδερμικού ιστού, γεγονός που υποδηλώνει ότι έχουν όλες την εγγενή δυνατότητα να επάγουν τη νευρική τύχη, προφανώς επάγοντας γονίδια που σχετίζονται με τη νευρική διαφοροποίηση (Dominguez and Campuzano 1993, Rodriguez et al., 1990).

Το γονίδιο *ato* παίζει αποκλειστικό ρόλο στον καθορισμό των χορδοτονικών οργάνων, που αποτελούν τα όργανα ισορροπίας της μύγας. Επίσης, είναι το μόνο από τα προνευρικά γονίδια υπεύθυνο για τον καθορισμό των φωτούποδοχέων στον αναπτυξιακό δίσκο του

ματιού, ενώ παίζει ρόλο και στην επιλογή κάποιων από τους οσφρητικούς και πολυδενδρικούς νευρώνες του ΠΝΣ. Ο ρόλος του στο ΚΝΣ είναι διαφορετικός, καθώς εκφράζεται σε υποπληθυσμούς νευροβλαστών μετά τον αρχικό τους καθορισμό και η έλλειψή του δεν οδηγεί σε νευρική υποπλασία, αλλά σε ανωμαλίες στην επέκταση και διακλάδωση των νευραξόνων (Jarman et al., 1993b, Jarman et al., 1994, Hassan et al., 2000). Το γονίδιο *amos*, που αναφέραμε ήδη ότι σχετίζεται δομικά περισσότερο με το *ato* παρά με τα μέλη του AS-C, είναι υπεύθυνο για τον καθορισμό των οσφρητικών υποδοχέων και των πολυδενδρικών νευρώνων του ΠΝΣ (Goulding et al., 2000a, Huang et al., 2000), ενώ το *cato* εκφράζεται σε κύτταρα του ΠΝΣ μετά την επιλογή τους, όπως και το *ase* (Goulding et al., 2000b).

Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι πειράματα υπερέκφρασης των προνευρικών γονιδίων αποκάλυψαν ότι οι δύο υποοικογένειες (AS-C και *ato*) χαρακτηρίζονται από διαφορετικό αναπτυξιακό δυναμικό, όσον αφορά το είδος των οργάνων του ΠΝΣ που μπορούν να επάγουν εκτοπικά. Έτσι, ενώ η υπερέκφραση μελών του AS-C οδηγεί σε υπερπαραγωγή σμηρίγγων, η αντίστοιχη των *ato* και των σχετικών με αυτό γονιδίων προκαλεί την εκτοπική εμφάνιση χορδοτονικών οργάνων και οσφρητικών και πολυδενδρικών νευρώνων (Jarman et al., 1993b, Goulding et al., 2000a, Chien et al., 1996). Αυτό σημαίνει ότι τα γονίδια αυτά δεν παίζουν ρόλο μόνο στην επιλογή των πρόδρομων κυττάρων του νευρικού συστήματος, αλλά παρέχουν και πληροφορίες σχετικά με την περαιτέρω διαφοροποίηση και εξειδίκευσή τους. Εδώ πρέπει να γίνει μία ακόμη ενδιαφέρουσα επισήμανση. Η μελέτη χιμαιρικών πρωτεϊνών, που προήλθαν από ανταλλαγή τμημάτων μεταξύ των πρωτεϊνών Sc και Ato, καθώς επίσης και η πρόβλεψη της δομής του συμπλόκου του ετεροδιμερούς Da/Ato προσδεδμένο στο DNA, αποκάλυψαν ότι το μεγαλύτερο μέρος αυτής της λειτουργικής εξειδίκευσης θα πρέπει να οφείλεται σε διαπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις με άλλους παράγοντες, που συμμετέχουν στον καθορισμό και τη διαφοροποίηση ειδικών υποκατηγοριών νευρώνων και περιφερειακών οργάνων. Για παράδειγμα, βρέθηκε ότι τα εννέα από τα δέκα αμινοξέα που έρχονται σε άμεση επαφή με το DNA (τόσο με τις ομάδες των αζωτούχων βάσεων όσο και με το σακχαροφωσφορικό σκελετό), είναι συντηρημένα σε όλες τις προνευρικές πρωτεΐνες (Chien et al., 1996, Jarman and Ahmed 1998, Bertrand et al., 2002). Η ανάλυση των ρυθμιστικών περιοχών γονιδίων-στόχων των προνευρικών πρωτεϊνών κατέδειξε από την άλλη ότι γονίδια που εκφράζονται σε συγκεκριμένες υποπεριοχές των ΠΝΣ και ΚΝΣ χαρακτηρίζονται από την παρουσία στοιχείων E_A με ειδική και συγκεκριμένη σε κάθε περίπτωση αλληλουχία. Είναι γνωστό ότι ετεροδιμερή Da/Ato προσδένονται ισχυρά σε διαφορετικά στοιχεία E σε σχέση με αυτά που προτιμούν τα Da/Sc. Σύμπλοκα Da/Sc προσδένονται κατά προτίμηση σε αλληλουχίες GCAGC/GTGG/T, ενώ τα Da/Ato προσδένονται σε A/TCAT/GGTGT (Powell et al., 2004). Μάλιστα, τα Sc και Ato βρέθηκαν να ρυθμίζουν την έκφραση ενός από τους στόχους τους με

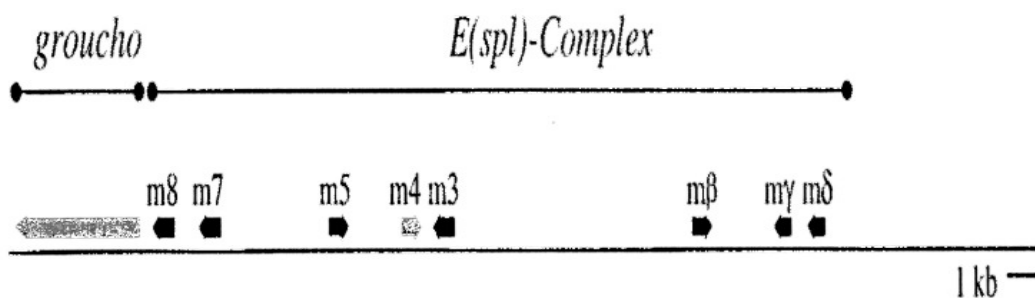
τρόπο που εξαρτάται από την πρόσδεσή τους σε τέτοιου είδους αλληλουχίες (Powell et al., 2004). Φαίνεται λοιπόν ότι η λειτουργική εξειδίκευση των προνευρικών πρωτεϊνών μπορεί να εξαρτάται σε ένα βαθμό από την πρόσδεσή τους σε διαφορετικά στοιχεία τύπου E στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων-στόχων.

1.5 Οι πρωτεΐνες τύπου bHLH του γονιδιακού συμπλόκου *E(spl)* στη *Drosophila melanogaster*

Οι επτά μεταγραφικοί παράγοντες τύπου bHLH που κωδικοποιούνται από το γονιδιακό σύμπλοκο *E(spl)* στη δροσόφιλα (*mβ*, *mγ*, *mδ*, *m3*, *m5*, *m7* και *m8*) ανήκουν στην έκτη υποοικογένεια των πρωτεϊνών bHLH (Delidakis and Artavanis-Tsakonas 1992, Knust et al., 1992, Klambt et al., 1989, Massari and Murre 2000). Από τη δροσόφιλα, στην ίδια υποοικογένεια ανήκουν οι δομικά συγγενείς με τις *E(spl)* πρωτεΐνες Hairy, Deadpan, Hey και Her, καθώς και οι Side και Stich, που αποτελούν πιο απομακρυσμένη υποομάδα (Fisher and Caudy 1998a, Rushlow et al., 1989, Bier et al., 1992). Το σύμπλοκο *E(spl)* περιλαμβάνει ακόμη έξι πρωτεΐνες, τέσσερις από τις οποίες (οι *m4*, *m2*, *m6* και *ma*) ανήκουν στην οικογένεια των παραγόντων τύπου Bearded, οι οποίες επίσης παίζουν ρόλο στο μονοπάτι του N (Leviten et al., 1997, Lai et al., 2000a, Lai et al., 2000b, Apidianakis et al., 1999, Leviten and Posakony 1996), ενώ μία ακόμη, η *m1*, φαίνεται να μην έχει σχέση με το N και αποτελεί πιθανόν ένα αναστολέα πρωτεασών τύπου Kazal (Nellesen et al., 1999, Wurmbach et al., 1999). Τα γονίδια *ma*, *m4*, *m6* και *m2* φαίνονται επίσης να επάγονται από τη σηματοδότηση N (Wurmbach et al., 1999). Το δέκατο τρίτο γονίδιο που συναπαρτίζει το σύμπλοκο κωδικοποιεί το μεταγραφικό συγκαταστολέα Groucho (Gro), ο οποίος συνεργάζεται με πληθώρα καταστολέων, μεταξύ αυτών και οι πρωτεΐνες bHLH *E(spl)* (Fisher and Caudy 1998b, Parkhurst 1998).

Οι bHLH πρωτεΐνες του συμπλόκου *E(spl)* εμφανίζουν μια σειρά από εξαιρετικά συντηρημένα δομικά χαρακτηριστικά. Για παράδειγμα, φέρουν ένα κατάλοιπο προλίνης σε καθορισμένη θέση στη βασική τους περιοχή. Η προλίνη αυτή είχε προταθεί αρχικά ότι αποτρέπει την πρόσδεση στο DNA (Benezra et al., 1990, Jones et al., 1990), όμως έχει πλέον αποδειχθεί ότι οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής μπορούν να προσδένονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες τύπου E, όπως οι E_B , E_C και N (Ohsako et al., 1994, Van Doren et al., 1994, Jennings et al., 1999, Tietze et al., 1992, Sasai et al., 1992, Oellers et al., 1994). Αν και η μεταλλαγή της προλίνης αυτής σε θρεονίνη ή ασπαραγίνη δεν αποτρέπει την πρόσδεση στο DNA (Oellers et al., 1994), είναι πολύ πιθανό να παίζει ρόλο στην προτίμηση που δείχνουν τα διμερή μεταξύ των μελών της οικογένειας για συγκεκριμένες αλληλουχίες πρόσδεσης (Ohsako et al., 1994, Van Doren et al., 1994). Επιπλέον, καρβοξυτελικά της

περιοχής bHLH φέρουν τη λεγόμενη περιοχή Orange, που απαρτίζεται από δύο επιπλέον αμφιπαθικές α-έλικες. Η περιοχή αυτή, παρότι η λειτουργία της είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστη, φαίνεται να μεσολαβεί σε διαπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, επηρεάζοντας την ικανότητα ομο- και ετεροδιμερισμού ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας, αλλά και με παράγοντες έξω από αυτήν, παρέχοντας μια βάση για λειτουργική εξειδίκευση (Dawson et al., 1995, Giebel and Campos-Ortega 1997, Jafar-Nejad et al., 2003, Nakatani et al., 2004). Τέλος, στο καρβοξυτελικό άκρο χαρακτηρίζονται από την παρουσία του τετραπεπτιδίου WRPW, μέσω του οποίου αλληλεπιδρούν με το γενικό και παντού εκφραζόμενο συγκαταστολέα Gro (Paroush et al., 1994, Alifragis et al., 1997).



ΕΙΚΟΝΑ 1-6 Το γονιδιακό σύμπλοκο *E(spl)* της δροσόφιλας (από de Celis et al., 1996).

1.5.1 Τα πρότυπα έκφρασης των γονιδίων *E(spl)* κατά την ανάπτυξη στη δροσόφιλα

Κατά την ανάπτυξη του ΚΝΣ σε πρώιμα εμβρυϊκά στάδια και τα επτά γονίδια εκφράζονται σε αδρές γραμμές με τον ίδιο τρόπο, δηλαδή στο κοιλιακό νευροεκτόδερμα, στα κύτταρα των προνευρικών συναθροισμών που θα γίνουν επιδερμικά (Knust et al., 1992). Η m3 είναι η μόνη που παρέχεται μητρικά, ενώ ζυγωτική έκφραση των m5, m7 και m8 ανιχνεύεται πρώτα, κατά την αρχή της γαστριδίωσης (Knust et al., 1992, Jennings et al., 1994). Εντούτοις, με υβριδοποίηση in situ ανιχνεύτηκαν διαφορές στα πρότυπα έκφρασης, κυρίως σε μεταγενέστερα στάδια, προς την ολοκλήρωση της εμβρυογένεσης (Wech et al., 1999). Πιο συγκεκριμένα, οι mγ, mδ, m7, και m3 εκφράζονται στη μέση γραμμή του εμβρύου, ενώ η m7 ανιχνεύεται εκεί μέχρι τη συμπύκνωση των νευρώνων και το σχηματισμό της νευρικής χορδής. Οι m5, m8, mγ και λιγότερο η mδ εντοπίζονται και στον εγκέφαλο. Από την άλλη, οι mβ, m3 και m7 ανιχνεύονται σε περιοχές από όπου θα προέλθουν τα όργανα του ΠΝΣ, καθώς και σε δομές με μεσοδερμική προέλευση. Μεσοδερμική έκφραση εντοπίζεται λίγο πολύ με διακριτό τρόπο και για τα υπόλοιπα γονίδια (Wech et al., 1999). Από τα παραπάνω αποτελέσματα, προκύπτουν δύο βασικά συμπεράσματα. Πρώτον, το γεγονός ότι δεν ανιχνεύτηκε κάποιος ιστός ή ομάδα κυττάρων που να εκφράζει μόνο ένα από τα επτά

γονίδια ίσως να εξηγεί την αδυναμία να απομονωθούν μεταλλαγές που να επηρεάζουν μόνο ένα από τα μέλη του συμπλόκου. Φαίνεται ότι στα διάφορα αναπτυξιακά πλαίσια, η συμμετοχή πολλαπλών μελών του συμπλόκου καθιστά τη δράση τους λειτουργικά πλεονάζουσα, ή έστω επιτρέπει κάποιου είδους ανταλλαξιμότητα. Δεύτερον, είναι σαφές ότι στην ενεργοποίησή τους δε μπορεί να εμπλέκεται αποκλειστικά το N/Su(H). Ενώ όλα τα γονίδια bHLH του συμπλόκου (και τα περισσότερα από τα μη-bHLH) φαίνεται να εξαρτούν την έκφρασή τους από τις θέσεις πρόσδεσης για Su(H) που φέρουν στις ρυθμιστικές τους αλληλουχίες (αλλά και από τις προνευρικές πρωτεΐνες, όπως θα φανεί αργότερα), η διαφορική τους έκφραση υπονοεί ότι και άλλοι παράγοντες θα πρέπει να ενέχονται στη ρύθμισή τους. Έχει υποστηριχθεί ότι θέσεις πρόσδεσης με διαφορετική συνάφεια για τους ενεργοποιητές θα μπορούσαν να οδηγούν σε διαφορική έκφραση των επτά γονιδίων (Nellesen et al., 1999), όμως εντοπίζονται και σε περιοχές όπου δεν υπάρχει ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μηχανισμού του N, όπως για παράδειγμα σε περιοχές του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού που θα δώσουν το μελλοντικό θώρακα, ούτε σχετίζονται με τη νευρογένεση και τη δράση των προνευρικών πρωτεϊνών. Στη μεταγραφική ρύθμιση όμως των *E(spl)* θα επανέλθουμε λίγο παρακάτω με περισσότερα δεδομένα.

Η έκφρασή τους στους αναπτυξιακούς δίσκους κατά την προνυμφική ανάπτυξη του εντόμου εμφανίζει περισσότερη ετερογένεια. Σε γενικές γραμμές, το *m7* και το *m8* εκφράζονται σε όλους τους προνευρικούς συναθροισμούς που θα δώσουν τις σμήριγγες στους αναπτυξιακούς δίσκους του φτερού και του ποδιού, ενώ το *mγ* και το *mδ* μόνο σε κάποια υποσύνολα αυτών. Το *mβ* φαίνεται να έχει ευρύτερη και γενική έκφραση στο δίσκο του φτερού, όπου χαρακτηριστικά εντοπίζεται σε λωρίδες κατά μήκος του νωτοκοιλιακού άξονα του δίσκου και άλλες που διαπερνούν το NK σύνορο και αντιστοιχούν στις περιοχές μεταξύ των μελλοντικών φλεβώσεων του φτερού. Επίσης ανιχνεύεται σε δακτυλίους στο δίσκο του ποδιού, που αντιστοιχούν στις αρθρώσεις των μελλοντικών μεταμερών του οργάνου στο ενήλικο άτομο (de Celis et al., 1996, Jennings et al., 1995). Στο δίσκο του φτερού, έκφραση κάποιων (*mγ*, *m8* και *mβ*) παρατηρείται στο NK σύνορο. Στον αναπτυξιακό δίσκο του ματιού το *m8* εκφράζεται σε μια λεπτή λωρίδα κυττάρων εκατέρωθεν της μορφογενετικής αύλακας (MA), ενώ τα *mβ*, *mγ*, *mδ* και *m7* εντοπίζονται σε ομάδες κυττάρων πίσω από τη MA, όπου και πραγματοποιείται η διαφοροποίηση των φωτοϋποδοχέων (de Celis et al., 1996).

Το γονίδιο *m5* δε φαίνεται να εκφράζεται στους αναπτυξιακούς δίσκους, ενώ χαμηλή έκφραση του *m3* παρατηρήθηκε μόνο σε ένα υποσύνολο των προνευρικών συναθροισμών στο δίσκο του φτερού (de Celis et al., 1996).

1.5.2 Τα γονίδια του συμπλόκου *E(spl)* επάγονται μεταγραφικά από το μονοπάτι του *N*, αλλά και από τις προνευρικές πρωτεΐνες

Μεταλλαγές έλλειψης του *N* και του *Su(H)* είναι γνωστό ότι συνοδεύονται από έλλειψη της έκφρασης των γονιδίων bHLH του συμπλόκου *E(spl)*. Επιπλέον, εκτοπική έκφραση της ενδοκυττάριας μορφής του *N* προκαλεί και αντίστοιχη εκτοπική ενεργοποίηση των *E(spl)* (Bailey and Posakony 1995, Lecourtois and Schweisguth 1995, de Celis et al., 1996, Eastman et al., 1997, Jennings et al., 1994). Θετικό ρόλο στη ρύθμισή τους παίζουν όμως και οι προνευρικές πρωτεΐνες, καθώς στις ρυθμιστικές τους περιοχές υπάρχουν θέσεις πρόσδεσης τύπου E_A , που είναι απαραίτητες για την επαγωγή της έκφρασής τους στους προνευρικούς συναθροισμούς *in vivo* (Kramatschek and Campos-Ortega 1994, Oellers et al., 1994, Singson et al., 1994, Bailey and Posakony 1995). Πρόσδεση *Su(H)*, όπως και *Da/AS-C* σε στοιχεία από τους υποκινητές διαφόρων γονιδίων *E(spl)* έχει δειχτεί και *in vitro* (Bailey and Posakony 1995, Lecourtois and Schweisguth 1995, Singson et al., 1994). Είναι γνωστό ότι η *Su(H)*, σε συνθήκες όπου το *N* δεν είναι ενεργό, εξακολουθεί να είναι προσδεμένη σε ρυθμιστικές περιοχές των *E(spl)*, όπου και συμπεριφέρεται ως ενεργός καταστολέας, στρατολογώντας τους συγκαταστολείς *gro* και *CtBP*, μέσω της πρωτεΐνης *Hairless*. Με την ενεργοποίηση του *N* από το *DI*, το N^{IC} μεταναστεύει στον πυρήνα και αλληλεπιδρά με *Su(H)*, ενεργοποιώντας άμεσα τα γονίδια *E(spl)* (Castro et al., 2005). Η διπλή αυτή δράση του *Su(H)* εξασφαλίζει ότι τα γονίδια *E(spl)* δεν θα ενεργοποιηθούν στο κύτταρο ΠΑΟ από την παρουσία των *Da/AS-C*. Ενεργοποίηση από *Da/AS-C* και *N/Su(H)* έχει δειχτεί και σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών και δροσόφιλας, χρησιμοποιώντας σε πλασμίδια αναφοράς το γονίδιο *luc* υπό τον έλεγχο των υποκινητών διαφόρων γονιδίων *E(spl)*. Εντυπωσιακή είναι η διαπίστωση ότι η παρουσία *Da/AS-C* ταυτόχρονα με *N/Su(H)* οδηγεί σε συνεργατική ενεργοποίηση αυτών των υποκινητών τόσο στη μύγα, όσο και σε κυτταρικές σειρές (Cooper et al., 2000).

Έχει προταθεί ότι παρακείμενα γονίδια του γενετικού τόπου μπορεί να μοιράζονται κοινές ρυθμιστικές περιοχές (de Celis et al., 1996, Cooper et al., 2000). Η υπόθεση αυτή βασίζεται κυρίως στην παρατήρηση ότι, πολύ συχνά, γονίδια που βρίσκονται κοντά στο σύμπλοκο, όπως τα *mg* και *mδ* ή τα *m7* και *m8*, βρίσκονται να συνεκφράζονται σε διάφορες αναπτυξιακές διαδικασίες και ενισχύεται από το γεγονός ότι οι ρυθμιστικές περιοχές μεταξύ των γονιδίων του συμπλόκου είναι σχετικά μικρές, κυμαινόμενες μεταξύ περίπου 500 και 1000 bp. Μια πιο αναλυτική όμως προσέγγιση του θέματος, αποκάλυψε ότι οι 5' άνωθεν περιοχές όλων των γονιδίων που εξετάστηκαν μπορούσαν να οδηγήσουν την έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης στις θέσεις όπου τα αντίστοιχα γονίδια εκφράζονται φυσιολογικά. Οι περιοχές αυτές βρέθηκαν όλες να περιέχουν θέσεις πρόσδεσης για *Su(H)*, καθώς και στοιχεία τύπου E_A , όπου προσδένονται οι ενεργοποιητές *Da/AS-C*, όπως και αλληλουχίες

τύπου E_C και N, για πιθανή αρνητική αυτορύθμιση (Nellesen et al., 1999). Τα παραπάνω δεδομένα συνηγορούν με έμφαση στο ότι η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων $E(spl)$ θα πρέπει να πραγματοποιείται ανεξάρτητα. Επιπλέον, σε ένα άλλο είδος δροσόφιλας, τη *Drosophila hydei*, οι παραπάνω αλληλουχίες πρόσδεσης βρέθηκαν συντηρημένες (με εξαίρεση κάποια στοιχεία τύπου N).

Παραμένει ανοιχτό πάντως το ερώτημα πώς εξειδικεύεται η έκφραση των γονιδίων του συμπλόκου. Από τη στιγμή που όλα φαίνεται να εξαρτούν την έκφρασή τους από δύο κατηγορίες μεταγραφικών συμπλόκων ενεργοποίησης, τα N/Su(H) και Da/AS-C, θα μπορούσε κάποιος να υποθέσει ότι υπάρχουν θέσεις πρόσδεσης διαφορετικής συνάφειας για τους ενεργοποιητές και διαφορετικά κατώφλια απόκρισης που πρέπει να ξεπεραστούν, και ότι η έκφραση των ενεργοποιητών εμφανίζει μικρές κατά τόπους διακυμάνσεις, που οδηγούν σε επιλεκτική ενεργοποίηση στόχων. Από την άλλη, τα γονίδια του γενετικού τόπου $E(spl)$ εκφράζονται και σε περιοχές όπου δεν εκφράζονται οι προνευρικές πρωτεΐνες και δεν ενεργοποιείται το N, ενώ και η εκτοπική έκφραση του συστατικά ενεργούς υποδοχέα δεν οδηγεί σε απανταχού ενεργοποίησή τους (Cooper et al., 2000). Αυτό σημαίνει ότι και άλλοι, άγνωστοι ως τώρα παράγοντες συμμετέχουν στη μεταγραφική τους ρύθμιση, υπόθεση που ενισχύεται από το γεγονός ότι στη *D. hydei* βρέθηκαν πολύ καλά συντηρημένες περιοχές στους υποκινητές των $E(spl)$ που δεν περιλαμβάνουν τις θέσεις πρόσδεσης που αναφέρθηκαν πιο πάνω (Nellesen et al., 1999). Τίποτα τέλος δεν αποκλείει να υπάρχουν επιπρόσθετοι ενισχυτές σε πιο απομακρυσμένες περιοχές, που δεν έχουν μελετηθεί ακόμα.

Ένα ακόμη σημείο ρύθμισης των πρωτεϊνών bHLH του συμπλόκου $E(spl)$ φαίνεται ότι λαμβάνει χώρα στο επίπεδο της σταθερότητας των μεταγράφων, αλλά και των ίδιων των πρωτεϊνών. Στις 3' αμετάφραστες περιοχές (3' UTR) των περισσότερων μεταγράφων του τόπου υπάρχουν συντηρημένες αλληλουχίες, που φαίνεται ότι επηρεάζουν αρνητικά τη συσσώρευση των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Πρόκειται για τα λεγόμενα στοιχεία Brd, GY, K, καθώς και τις αλληλουχίες CAAC (Leviton and Posakony 1996, Lai and Posakony 1998, Lai et al., 1998). Ειδικά για τα στοιχεία Brd, GY και K, έχει δειχθεί ότι αποτελούν στόχο για συγκεκριμένα είδη microRNAs (miRNAs, Stark et al., 2003, Lai et al., 2005). Μία μορφή του m8 από την οποία λείπουν αυτά τα στοιχεία έχει φαινότυπο κέρδους λειτουργίας (Lai et al., 1998). Οι πρωτεΐνες m5, m7 και m8 φέρουν στο καρβοξυτελικό τμήμα τους και τις αλληλουχίες αναγνώρισης και φωσφορυλίωσης από την κινάση καζεΐνης II (CKII), η οποία δείχθηκε ότι φωσφορυλιώνει ειδικά ένα μονομερές σερίνης εντός της αλληλουχίας αναγνώρισης (Trott et al., 2001). Ρύθμιση μέσω φωσφορυλίωσης έχει αναφερθεί και για την πρωτεΐνη HES1, ομόλογη των $E(spl)$ στα θηλαστικά (βλέπε Εισαγωγή, παράγραφος 1.6). Είναι αξιοσημείωτο ότι η θέση αναγνώρισης της CKII βρίσκεται πολύ κοντά σε χαρακτηριστικές αλληλουχίες PEST, που υπάρχουν επίσης στο καρβοξυτελικό τμήμα των πρωτεϊνών $E(spl)$. Οι αλληλουχίες PEST έχει δειχθεί ότι ενεργοποιούνται με φωσφορυλίωση

και είναι υπεύθυνες για την αποικοδόμηση πρωτεϊνών, όπως η NF-kB στα θηλαστικά και η συγγενής της Dorsal από τη δροσόφιλα (Packman et al., 1997, Israel 1997, Yamamoto et al., 2000). Υπάρχει λοιπόν μια ένδειξη ότι η φωσφορυλίωση από CKII μπορεί να ρυθμίζει αρνητικά τη λειτουργία των πρωτεϊνών E(spl). Πρέπει να αναφερθεί σε σχέση με αυτό ότι η μοναδική μεταλλαγή που έχει απομονωθεί στα γονίδια του τόπου αφορά μία έλλειψη, που περιλαμβάνει τα τελευταία 56 αμινοξέα της m8, η οποία και παρουσιάζει επικρατή αρνητικό φαινότυπο, με την έννοια ότι η εκτοπική της έκφραση προκαλεί παραγωγή υπεράριθμων αισθητηρίων οργάνων (Giebel and Campos-Ortega 1997). Καθώς η έλλειψη περιλαμβάνει αυτήν την πιθανή περιοχή υπεύθυνη για αποικοδόμηση, έχει προταθεί ότι ο αυξημένος χρόνος ημιζωής της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης μπορεί να συμβάλλει στην τιτλοδότηση και απομάκρυνση των ενδογενών πρωτεϊνών E(spl), οδηγώντας σε αποκαταστολή γονιδίων-στόχων, μιας και από την κουτσουρεμένη m8 απουσιάζει και το τετραπεπίδιο WRPW, που είναι απαραίτητο για την καταστολή (Trott et al., 2001).

1.5.3 Ο ρόλος των πρωτεϊνών E(spl) κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος στη μύγα

Μεταλλαγές έλλειψης του γονιδιακού συμπλόκου *E(spl)* έχουν ως αποτέλεσμα το θάνατο του εμβρύου, λόγω εκτεταμένης υπερτροφίας του νευρικού ιστού με ταυτόχρονη έλλειψη επιδερμίδας. Ο φαινότυπος αυτός είναι ταυτόσημος με αυτόν που χαρακτηρίζει την έλλειψη και άλλων παραγόντων που συμμετέχουν στη διαδικασία της πλευρικής αναστολής [N, DI, Su(H)] και καλείται νευρογόνος. Αντίστοιχη έλλειψη στους αναπτυξιακούς δίσκους συνοδεύεται από υπερπαραγωγή εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων, καθώς πολλαπλά κύτταρα επιλέγονται ως ΠΑΟ σε κάθε προνευρικό συναθροισμό. Αυτό υποδηλώνει ότι ο μηχανισμός της πλευρικής αναστολής δε λειτουργεί για την επιλογή του κυττάρου ΠΑΟ, όμως αφενός δεν δημιουργούνται σμήριγγες σε εκτοπικές θέσεις (εκτός προνευρικών συναθροισμών), αφετέρου οι ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις του ΠΑΟ πραγματοποιούνται κανονικά και τα όργανα έχουν τη φυσιολογική συγκρότηση. Παρόλο που έχουν παρατηρηθεί φαινότυποι διπλής σμήριγγας χωρίς θήκη, χαρακτηριστικό ανωμαλίας στη σηματοδότηση N κατά τη διαίρεση του ΠΑΟ (Tata and Hartley 1995), αυτό πρέπει να οφείλεται σε συγκόλληση τριχογόνων κυττάρων που έχουν προκύψει από κύτταρα ΠΑΟ που βρίσκονται πολύ κοντά και αδυνατούν να διαφοροποιηθούν σωστά, για μη ειδικούς μάλλον λόγους. Τα παραπάνω δεδομένα υποδηλώνουν ότι ο ρόλος των E(spl) περιορίζεται στην πλευρική αναστολή και δεν έχει να κάνει ούτε με τον καθορισμό των προνευρικών συναθροισμών (όπου εμπλέκεται το Hairy), ούτε με τις αποφάσεις που λαμβάνονται μέσω N κατά τις διαιρέσεις του κυττάρου ΠΑΟ.

Κάτι ανάλογο ισχύει και στον αναπτυξιακό δίσκο του ματιού. Μία αναγκαία παρένθεση θα ανοιχτεί εδώ, για να αναφερθεί ότι η διαφοροποίηση στο δίσκο του ματιού ξεκινάει κατά το τρίτο προνυμφικό στάδιο ως ένα κύμα από το οπίσθιο τμήμα του επιθηλίου που προχωρεί σταδιακά προς πιο εμπρόσθια τμήματα. Τα κύτταρα στο μέτωπο του κύματος, το οποίο αποτελεί ουσιαστικά τη MA, χαρακτηρίζονται από αλλαγές στο σχήμα και τη μορφή, καθώς μπλοκάρονται στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου και τροποποιούν τη γονιδιακή τους έκφραση. Ο συντονισμός των γεγονότων αυτών ρυθμίζεται από την εκκρινόμενη πρωτεΐνη Hedgehog (Hh), η οποία επάγει την έκφραση παραγόντων όπως του Dpp, που δρα επίσης ως μορφογόνο, όπως και το Hh, και του Ato, που αποτελεί και την προνευρική πρωτεΐνη υπεύθυνη για τον αρχικό καθορισμό των φωτοϋποδοχέων (Freeman 1997). Εδώ το *N* απαιτείται σε δύο σημεία. Αρχικά, πριν από τη διαφοροποίηση, απαιτείται προκειμένου να παράσχει ένα προνευρικό δυναμικό στα κύτταρα του επιθηλίου. Κλώνοι έλλειψης του *N* μπροστά από τη MA έχουν ως αποτέλεσμα την αδυναμία έκφρασης στη συνέχεια του *ato*. Πίσω από τη MA, κλώνοι του *N* δείχνουν τον κλασικό φαινότυπο έλλειψης πλευρικής αναστολής, με εκτεταμένη έκφραση του *ato* σε περισσότερα από το φυσιολογικό κύτταρα. Τα *E(spl)* απαιτούνται μόνο για τη δεύτερη διαδικασία και όχι για την πρώτη, την «προνευρική» λειτουργία του *N* (Ligoxygakis et al., 1998). Όσο ανακαλύπτονται νέες αναπτυξιακές διαδικασίες στις οποίες εμπλέκεται το *N*, τόσο γίνεται σαφέστερο ότι οι πρωτεΐνες bHLH του γονιδιακού συμπλόκου *E(spl)* συμμετέχουν μόνο σε ένα υποσύνολο των διαδικασιών αυτών.

Πρέπει επίσης να τονιστεί ότι η έκταση της νευρικής υπερτροφίας στο έμβρυο εξαρτάται από τον αριθμό των γονιδίων *E(spl)* που λείπουν. Γενικά, απαιτείται όπως φαίνεται η έλλειψη τουλάχιστον δύο ή τριών γονιδίων για να οδηγήσει σε διαταραχές της πλευρικής αναστολής (Delidakis et al., 1991, Preiss et al., 1988, Nagel et al., 2004). Από την άλλη πλευρά, η υπερέκφραση έστω και μοναδικών *E(spl)* στους αναπτυξιακούς δίσκους οδηγεί σε έλλειψη των οργάνων του ΠΝΣ στο θώρακα και τα ενήλικα όργανα. Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις δείχνουν ότι η έλλειψη αυτή συνοδεύεται και από έλλειψη έκφρασης μοριακών μαρτύρων ειδικών για τα κύτταρα ΠΑΟ (Tata and Hartley 1995, Nakao and Campos-Ortega 1996, de Celis et al., 1996, Giebel and Campos-Ortega 1997, Skeath and Carroll 1992). Τα πρότυπα έκφρασής τους υποδηλώνουν σαφώς ότι έχουν και άλλες δράσεις, π.χ. στο μεσόδερμα, ενώ το *mb* έχει δείχθει ότι χρειάζεται για το σχηματισμό των φλεβώσεων του φτερού (de Celis et al., 1997). Πάντως, η πιο καλά χαρακτηρισμένη δράση τους είναι η ισχυρή αναστολή της νευρικής τύχης στα πρόδρομα των νευρικών κυττάρων, τόσο στο ΚΝΣ όσο και στο ΠΝΣ της μύγας.

1.5.4 Οι μηχανισμοί δράσης και οι μεταγραφικοί στόχοι των πρωτεϊνών E(spl)

1.5.4.1 Αναστολή της δράσης των προνευρικών πρωτεϊνών μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.

Με μία προσέγγιση που βασίστηκε στο σύστημα των δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα, δείχθηκε ότι οι περισσότερες πρωτεΐνες της οικογένειας E(spl) μπορούν να αλληλεπιδρούν με τις προνευρικές πρωτεΐνες Ac, Sc και Ato ή/και με τη Da, με συγκεκριμένες προτιμήσεις. Έτσι, οι mγ, m7 και mβ βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν και με τις προνευρικές πρωτεΐνες και με τη Da, οι m5 και m8 μόνο με τη Da, η m3 μόνο με τις προνευρικές και η mδ με καμία από αυτές (Alifragis et al., 1997, βλέπε εικόνα 4-2). Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην πρόταση ότι οι πρωτεΐνες E(spl) μπορούν να δρουν σχηματίζοντας ετεροδιμερή με τους ενεργοποιητές και αποτρέποντας την πρόσδεσή τους στο DNA, όπως οι πρωτεΐνες emc και Id από την πέμπτη ομάδα παραγόντων τύπου bHLH. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι κάποιες από τις πρωτεΐνες E(spl), όπως για παράδειγμα οι m7 και mγ, μπορούν να καταστείλουν στην κυτταρική σειρά S2 τον 900 bp υποκινητή του *ac*, ακόμα και όταν το μοναδικό στοιχείο E_c που περιέχει μεταλλαχθεί. Αξιοσημείωτο είναι ότι η mδ βρέθηκε να καταστέλλει τον ίδιο υποκινητή μόνο παρουσία της αγρίου τύπου θέσης πρόσδεσης E_c , σε συμφωνία με το ότι δεν μπορεί να αλληλεπιδρά σε πρωτεϊνικό επίπεδο με τους ενεργοποιητές (Giagtzoglou et al., 2003). Εκτός από αυτό, εκτοπική έκφραση στη μύγα μορφών των m7 και mγ που φέρουν δύο σημειακές μεταλλαγές στη βασική τους περιοχή που αποτρέπουν την πρόσδεσή τους στο DNA (mγKNEQ και m7KNEQ, Ma et al., 1994, Jimenez and Ish-Horowicz 1997), εξακολουθούν να προκαλούν έλλειψη αισθητηρίων οργάνων (Giagtzoglou et al., 2003). Επιπλέον, δείχθηκε ότι η υπερέκφραση μιας μορφής της m8 από την οποία έλειπε η περιοχή bHLH, εξακολουθούσε να καταστέλλει τη δημιουργία υπεράριθμων σμηρίγγων που προκαλεί η αντίστοιχη εκτοπική έκφραση της *l'sc* (Giebel and Campos-Ortega, 1997). Αυτό σημαίνει ότι για την καταστολή της νευρικής τύχης, η βασική περιοχή που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση στο DNA δεν είναι απαραίτητη. Αντίθετα, απαραίτητες αποδείχθηκαν η περιοχή Orange και το τετραπεπτίδιο WRPW, που στρατολογεί τον συγκαταστολέα Gro (Giebel and Campos-Ortega, 1997).

Αυτό το μοντέλο δράσης απορίφθηκε πάντως από την παρατήρηση της συμπεριφοράς μίας τεχνητής μορφής της m7, όπου η καρβοξυτελική της περιοχή, που περιλαμβάνει και την περιοχή αλληλεπίδρασης με το Gro, έχει αντικατασταθεί από το μικρό ενεργοποιητικό πεππίδιο VP16 (m7VP16). Η πρωτεΐνη αυτή, όταν εκφραστεί εκτοπικά, επάγει την έκφραση των προνευρικών γονιδίων και δίνει υπεράριθμες σμηρίγγες (Jimenez and Ish-Horowicz, 1997). Φαίνεται δηλαδή ότι η χιμαιρική αυτή πρωτεΐνη έχει πρόσβαση σε ρυθμιστικά στοιχεία-στόχους και δε λειτουργεί όπως οι bHLH πρωτεΐνες της πέμπτης ομάδας, αλλά επάγει σε μεταγραφικό επίπεδο τα προνευρικά γονίδια, τα οποία προφανώς στην αγρίου τύπου της

μορφή θα πρέπει να καταστέλλει. Αυτού του τύπου η μεταγραφική καταστολή είναι σαφής στην περίπτωση της πρωτεΐνης Hairy, που έχει δειχθεί ότι μπορεί να καταστέλλει τον 900 bp υποκινητή του *ac in vivo* με τρόπο άμεσα εξαρτώμενο από το στοιχείο E_C που περιέχει (Ohsako et al., 1994, Van Doren et al., 1994). Παρόμοια δράση έχει δειχθεί και για την *mδ*, ενώ οι υπόλοιπες $E(spl)$ μπορούν να καταστέλλουν τον ίδιο ενισχυτή και απουσία του συγκεκριμένου στοιχείου E_C (Π. Αλιφραγκής, Διδακτορική Διατριβή).

1.5.4.2 Καταστολή μέσω άμεσης πρόσδεσης στο DNA.

Τα παραπάνω δεδομένα φάνηκαν να βρίσκονται σε αναντιστοιχία με την καλά χαρακτηρισμένη ικανότητά των πρωτεϊνών $E(spl)$ bHLH να προσδένονται σε καθορισμένες αλληλουχίες τύπου E *in vitro*. Πειράματα επιλογής τυχαίων ολιγονουκλεοτιδίων, που βασίζονται στην πρόσδεση πρωτεϊνών σε ολιγονουκλεοτίδια σε επαναλαμβανόμενους κύκλους, με ενδιάμεσα στάδια πολλαπλασιασμού των επιλεγμένων αλληλουχιών μέσω PCR, αποδείχθηκαν ιδιαίτερα χρήσιμα για την αποσαφήνιση της ειδικότητας πρόσδεσης των παραγόντων $E(spl)$ στο DNA (Jennings et al., 1999, Ohsako et al., 1994, Van Doren et al., 1994). Βρέθηκε έτσι ότι η πρωτεΐνη Hairy προσδένεται κατά προτίμηση σε αλληλουχίες τύπου E_C (CACGCG), μπορεί όμως να προσδένεται και σε αλληλουχίες τύπου E_B (CACGTG), καθώς και N (CACG/AAG), με πολύ μικρότερη όμως συνάφεια (Ohsako et al., 1994, Van Doren et al., 1994). Αντίστοιχες δοκιμασίες για τις πρωτεΐνες $E(spl)$ αποκάλυψαν ισχυρή προτίμηση για αλληλουχίες E_B . Μάλιστα η επιλογή έδειξε επίσης ισχυρή προτίμηση όσον αφορά και τα τρία νουκλεοτίδια εκατέρωθεν του στοιχείου E_B . Αποκαλύφθηκε έτσι ότι η βέλτιστη θέση πρόσδεσης για τους παράγοντες $E(spl)$ είναι ένα δωδεκανουκλεοτίδιο με αλληλουχία TGGCACGTGC/TC/TA, που ονομάστηκε στοιχείο ESE (Enhancer of split E box), στον πυρήνα του οποίου βρίσκεται ένα στοιχείο E_B (Jennings et al., 1999). Μπορούν όμως να προσδένονται και σε αλληλουχίες τύπου E_C και N , αν και λιγότερο ισχυρά (Tietze et al., 1992, Ohsako et al., 1994, Van Doren et al., 1994, Jennings et al., 1999, Oellers et al., 1994, Culi and Modolell 1998). Έχει προταθεί ότι η χαρακτηριστική προλίνη στη βασική περιοχή των μελών της οικογένειας τις καθιστά ικανές να προσδένονται κατά προτίμηση σε μη κανονικά στοιχεία E , όπως είναι τα E_C και N (Ohsako et al., 1994, Van Doren et al., 1994). Οι μελέτες αυτές βασίστηκαν κυρίως στην πρωτεΐνη Hairy, όμως οι πρωτεΐνες του συμπλόκου $E(spl)$ διαφέρουν από την Hairy στα επτά από τα δέκα αμινοξέα της βασικής περιοχής. Κρυσταλλογραφικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η ειδικότητα για τα στοιχεία E_B σχετίζεται με ένα κατάλοιπο αργινίνης, που έρχεται σε επαφή με το κεντρικό G της θέσης πρόσδεσης (Ferre D'Amare et al., 1993). Επίσης, το γεγονός ότι οι τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες εκατέρωθεν του στοιχείου E αποτελούν σημαντικό μέρος του συμπλόκου DNA-πρωτεϊνών δεν αποκαλύπτεται για πρώτη φορά. Κρυσταλλογραφικές μελέτες άλλων

πρωτεϊνών bHLH δείχνουν επαφές με ομάδες των αζωτούχων βάσεων εκτός του πυρήνα της αλληλουχίας E (Ellenberger et al., 1994, Ferre D'Amare et al., 1993), ενώ και η αλληλουχία πρόσδεσης που επιλέγει το Hairy αφορά και τα δύο νουκλεοτίδια εκατέρωθεν του στοιχείου E_C (Van Doren et al., 1994). Δυστυχώς, μέχρι σήμερα δεν έχουν υπάρξει κρυσταλλογραφικές μελέτες για τις πρωτεΐνες E(spl), που θα αποκάλυπταν τον ακριβή τρόπο με τον οποίο έρχονται σε επαφή με το DNA. Είναι τέλος πιθανόν οι πρωτεΐνες E(spl) να προσδένονται και σε άλλες, μη ταυτοποιημένες μέχρι τώρα θέσεις. Χαρακτηριστικά, η m8 σε πειράματα προστασίας από πέψη με DNAση in vitro φάνηκε να προστατεύει ένα τμήμα από τον ενισχυτή SMC (βλέπε παράγραφο 1.4.1) μεγέθους 40 bp, που δεν περιλαμβάνει κανένα στοιχείο E_C , E_B ή N (Culi and Modolell 1998).

Μέχρι τώρα πάντως δεν έχει αποδειχθεί ότι η άμεση πρόσδεση σε ειδικές αλληλουχίες που φέρουν τα γονίδια-στόχοι είναι απαραίτητη για την καταστολή in vivo. Πέρα από τα δεδομένα που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο, έχει δειχτεί ότι ο ενισχυτής SMC υπόκειται σε αρνητική ρύθμιση από τις E(spl) στα κύτταρα των προνευρικών συναθροισμών κατά τη διαδικασία της πλευρικής αναστολής, η μεταλλαγή όμως του μοναδικού στοιχείου E_C που φέρει δεν οδηγεί σε αποκαταστολή, ούτε επηρεάζει το πρότυπο έκφρασης του στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού (Culi and Modolell 1998). Στη συγκεκριμένη περίπτωση βέβαια δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την περίπτωση της άμεσης πρόσδεσης, καθώς υπάρχει τουλάχιστον μία μη τυπική θέση πρόσδεσης μήκους 40 ζ.β. για την m8 και ίσως και άλλες E(spl) στο συγκεκριμένο ρυθμιστικό στοιχείο.

1.5.4.3 Στρατολόγηση στο DNA από άλλους παράγοντες.

Το παράδοξο για το πώς τελικά δρουν οι πρωτεΐνες E(spl) bHLH άρχισε να ξεδιαλύνεται πρόσφατα. Αναφέρθηκε στην παράγραφο 4.1 ότι ένας συνθετικός ενισχυτής που αποτελείται αποκλειστικά από στοιχεία E_A , ο οποίος ονομάζεται EE4, μπορεί να κατευθύνει την έκφραση του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης στους προνευρικούς συναθροισμούς στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού. Υπεύθυνα για την ενεργοποίηση είναι τα ετεροδιμερή Da/Ac και Da/Sc (Culi and Modolell 1998). Βρέθηκε όμως ότι η υπερέκφραση των γονιδίων E(spl) μπορούσε να καταστείλει τον ενισχυτή, παρότι αυτός δε φέρει θέσεις πρόσδεσης για τις πρωτεΐνες E(spl). Επιπλέον, η υπερέκφραση των ενεργοποιητικών μορφών των E(spl), που φέρουν καρβοξυτελικά το πεπτιδίο VP16, βρέθηκε ότι ενεργοποιεί εκτοπικά τον EE4 (Giagtzoglou et al., 2003). Η αρχική υπόθεση που μπορεί να κάνει κανείς είναι ότι η υπερέκφραση των E(spl), ή των ενεργοποιητικών μορφών τους, επιφέρει τη μεταγραφική καταστολή ή ενεργοποίηση αντίστοιχα των ενδογενών προνευρικών γονιδίων Ac και Sc, με τα ετεροδιμερή που σχηματίζουν τα προϊόντα τους με το Da να είναι στη συνέχεια υπεύθυνα για την τελική έκφραση του ενισχυτή. Πράγματι, σε γενετικό υπόβαθρο όπου απουσιάζει

ολόκληρο το γονιδιακό σύμπλοκο AS-C, οι πρωτεΐνες mγVP16 και m7VP16 αδυνατούσαν να επάγουν τη β-γαλακτοσιδάση υπό τον έλεγχο του ίδιου τεχνητού ενισχυτή (Giagtzoglou et al., 2003). Η εναλλακτική ερμηνεία είναι ότι, με δεδομένο ότι τα μέλη της οικογένειας των E(spl) αλληλεπιδρούν με τους προνευρικούς παράγοντες, γίνεται στρατολόγηση των E(spl) στο DNA από τα σύμπλοκα Da/AS-C. Προκειμένου να διερευνηθεί αυτή η υπόθεση, έγινε ταυτόχρονη υπερέκφραση m7, mγ ή mδ μαζί με Sc. Πρέπει να σημειωθεί εδώ ότι εκτοπική έκφραση Sc οδηγεί σε αντίστοιχη εκτοπική έκφραση του ενισχυτή EE4. Το αποτέλεσμα ήταν ότι οι m7 και mγ, αλλά όχι η mδ (που δεν αλληλεπιδρά με Da και Sc), εξακολουθούσαν να καταστέλλουν τον ενισχυτή, παρά την παρουσία Sc, που παρέχεται εξωγενώς και συνεπώς η ρύθμιση της έκφρασής του είναι απολύτως ανεξάρτητη από αυτές. Αυτό σημαίνει ότι η ρύθμιση πραγματοποιείται μετά από τη μεταγραφή του Sc. Ταυτόχρονη υπερέκφραση mγVP16 ή m7VP16 (αλλά όχι και mδVP16) μαζί με Sc έδειξε να ενεργοποιεί ακόμη περισσότερο τον EE4, γεγονός που σημαίνει ότι οι πρωτεΐνες αυτές θα πρέπει, εφόσον ενεργοποιούν, να έρχονται σε επαφή με το DNA. Ένα ακόμη στοιχείο που ενισχύει την υπόθεση ότι οι E(spl) καταστέλλουν προσδεδεμένες έμμεσα στο DNA μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τις προνευρικές πρωτεΐνες, είναι ότι η υπερέκφραση των mγκNEQ και m7KNEQ, που δεν μπορούν να προσδεθούν στο DNA λόγω μεταλλαγών που φέρουν στη βασική τους περιοχή, εξακολουθεί να καταστέλλει τον ενισχυτή EE4, τόσο απουσία όσο και παρουσία εξωγενούς Sc. Αντίστοιχα οι mγκNEQVP16 και m7KNEQVP16 ενεργοποιούν τον ενισχυτή (Giagtzoglou et al., 2003). Αξίζει να σημειωθεί εδώ ότι η υπερέκφραση των mγκNEQVP16 και m7KNEQVP16 ενεργοποιεί τον ενισχυτή μόνο στις περιοχές των προνευρικών συναθροισμών, όπου υπάρχουν ενδογενείς πρωτεΐνες Ac και Sc, ενώ αντίστοιχη υπερέκφραση των mγVP16 και m7VP16 οδηγεί σε πιο ευρεία ενεργοποίηση, προφανώς επειδή μόνο οι τελευταίες έχουν την επιπλέον δυνατότητα να επάγουν μεταγραφικά τα ενδογενή ac και sc σε εκτοπικές θέσεις (Giagtzoglou et al., 2003). Φαίνεται λοιπόν ότι οι πρωτεΐνες E(spl) δρουν ως καταστολείς προσδεδεμένοι στο DNA και δεν αποτελούν απλούς αναστολείς της πρόσδεσης των ενεργοποιητών. Η πρόσβασή τους στο DNA όμως επιτυγχάνεται με δύο τρόπους: είτε με άμεση πρόσδεση σε στοιχεία τύπου E_B, E_C και N, είτε μέσω φυσικής αλληλεπίδρασης με τους προσδεδεμένους στο DNA ενεργοποιητές. Θα παρουσίαζε ενδιαφέρον να διερευνηθεί το ενδεχόμενο να μεταχειρίζονται και τους δύο τρόπους, σε ρυθμιστικά στοιχεία που φέρουν γειτονικές θέσεις πρόσδεσης και για τις δύο ομάδες πρωτεϊνών, με στόχο τη μεγιστοποίηση της κατασταλτικής τους δράσης.

Μία άλλη παράμετρος της δράσης τους αναδεικνύεται από το γεγονός ότι η υπερέκφραση των mγVP16, m7VP16 και mδVP16 προκαλεί εκτοπικά αισθητήρια όργανα ακόμα και σε γενετικό υπόβαθρο όπου απουσιάζει ολόκληρο το γονιδιακό σύμπλοκο AS, κάτι που υποδεικνύει ότι θα πρέπει να μπορούν να ενεργοποιούν και γονίδια που λειτουργούν μετά τα προνευρικά (Giagtzoglou et al., 2003, Jimenez and Ish-Horowich 1997, Nakao and

Campos-Ortega 1996). Υποστηρικτικό αυτής της υπόθεσης είναι ότι οι πρωτεΐνες myKNEQVP16 και m7KNEQVP16 αδυνατούν να επάγουν εκτοπικές σμήριγγες στο ίδιο γενετικό υπόβαθρο έλλειψης των AS, κάτι που μπορούν να κάνουν αν οι μύγες φέρουν κανονικά το σύμπλοκο (Giagtzoglou et al., 2003). Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στόχος των E(spl) δεν είναι μόνο τα προνευρικά γονίδια, αλλά και γονίδια αποκρινόμενα σε αυτά, για την καταστολή των οποίων απαιτείται άμεση πρόσδεση των E(spl) στο DNA. Οι ρυθμιστικές αλληλουχίες γονιδίων-στόχων των Da/AS-C, όπως είναι τα *ase*, *scratch (scrt)*, *sens* και άλλα, περιέχουν αλληλουχίες πρόσδεσης τύπου E_A, αλλά και στοιχεία E_B, E_C και N, όπου μπορούν να προσδένονται οι E(spl). Μπορεί λοιπόν να υποθέσει κανείς ότι οι προνευρικές και οι πρωτεΐνες E(spl) έχουν κοινά γονίδια-στόχους, με τις πρώτες να ενεργοποιούν και τις δεύτερες να καταστέλλουν γονίδια υπεύθυνα για τη σωστή διαφοροποίηση των πρόδρομων νευρικών κυττάρων.

1.5.4.4 Ο ρόλος των περιοχών O και WRPW.

Ένα ενδιαφέρον ερώτημα που προκύπτει σε αυτό το σημείο είναι ποια ή ποιες από τις συντηρημένες περιοχές των πρωτεϊνών E(spl) είναι απαραίτητες για την πρόσδεση στα γονίδια-στόχους και για μεταγραφική καταστολή. Τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν παραπάνω υποδηλώνουν ότι η άμεση πρόσδεση στο DNA, σε κάποιες τουλάχιστον περιπτώσεις ρυθμιστικών στοιχείων-στόχων, δεν είναι απαραίτητη προϋπόθεση για μεταγραφική καταστολή. Αντίθετα, το τετραπεπτιδίο WRPW απαιτείται τόσο για την καταστολή του ενισχυτή EE4 όσο και για την καταστολή των εκτοπικών σμηρίγγων που προκαλεί η υπερέκφραση l'sc (Giagtzoglou et al., 2003, Giebel and Campos-Ortega, 1997). Η περιοχή αυτή είναι ικανή και αναγκαία για την αλληλεπίδραση με το Gro (Paroush et al., 1994, Alifragis et al., 1997), που αποτελεί μεταγραφικό συγκαταστολέα με γενικευμένη έκφραση στη δροσόφιλα (Fisher and Caudy 1998b, Parkhurst 1998). Η πρωτεΐνη Gro δεν έχει ικανότητα πρόσδεσης στο DNA, αλληλεπιδρά όμως με DNA προσδεδόμενους παράγοντες κι έχει δειχθεί ότι μπορεί να αλληλεπιδρά με την Rpd3, στρατολογώντας έτσι σύμπλοκα με δράση απακετυλάσης των ιστονών (Chen et al., 1999). Έλλειψη του *gro* έχει τον ίδιο φαινότυπο με την έλλειψη των E(spl) στη νευρογένεση, δηλαδή υπερπλασία νευρικού ιστού και σχηματισμό υπεράριθμων αισθητηρίων οργάνων. Είναι πάντως πιθανό ο Gro να μην είναι ο μόνος παράγοντας που διαμεσολαβεί την καταστολή από E(spl). Το Hairy έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά μέσω της καρβοξυτελικής του περιοχής με την πρωτεΐνη CtBP, με την οποία βρέθηκε να αλληλεπιδρά και το mδ (Poortinga et al., 1998). Έλλειψη του CtBP, που μπορεί να δρα ανάλογα με την περίπτωση και ως συγκαταστολέας και ως συνενεργοποιητής, επηρεάζει τη δημιουργία των αισθητηρίων οργάνων του ΠΝΣ (Poortinga et al., 1998). Το Hairy επίσης αλληλεπιδρά μέσω της βασικής του περιοχής με τον

παράγοντα Sir2, που έχει δράση απακετυλάσης ιστονών (Rosenberg and Parkhurst, 2002). Μάλιστα, σε μία πρόσφατη προσπάθεια ταυτοποίησης μεταγραφικών στόχων του Hairy, βρέθηκε ότι κατά την πρόσδεσή του στο DNA στρατολογεί κυρίως τους δύο παραπάνω παράγοντες και όχι το Gro (Bianchi-Frias et al., 2004).

Η περιοχή Orange (O) έχει προταθεί ότι προσφέρει λειτουργική εξειδίκευση, διαμεσολαβώντας μάλλον σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις τόσο μεταξύ των μελών της οικογένειας, όσο και με άλλους παράγοντες. Αυτό έχει δειχθεί με αρκετά πειστικό τρόπο κυρίως για τα θηλαστικά ομόλογα των *E(spl)*, όπως θα δούμε λίγο παρακάτω, αλλά και για τις πρωτεΐνες της δροσόφιλας. Ένα παράδειγμα προσφέρεται από μελέτες που αφορούν το ρόλο των πρωτεϊνών που μας απασχολούν κατά τον καθορισμό του φύλου. Κατά την πρώιμη εμβρυογένεση, ετεροδιμερή Da/Sc ενεργοποιούν το γονίδιο *sex lethal (Sxl)* μόνο στα θηλυκά άτομα, καθώς το *sc* βρίσκεται στο χρωμόσωμα X και στα θηλυκά υπάρχει σε διπλάσια ποσότητα σε σχέση με τα αρσενικά (Parkhurst and Meneely, 1994). Υπερέκφραση *sc* βρέθηκε ότι είναι θνησιγόνος για τα αρσενικά, κάτι που αναστέλλεται με ταυτόχρονη υπερέκφραση *hairy*, αλλά όχι *m8*. Για την εξουδετέρωση αυτή του Sc από το Hairy απαιτείται τόσο η βασική και η περιοχή HLH, όσο και η περιοχή O, όχι όμως και το τετραπεπτιδίο WRPW, πιθανόν επειδή στρατολογείται κάποιος άλλος συγκαταστολέας. Με πειράματα ανταλλαγής περιοχών μεταξύ του Hairy και του *m8*, φάνηκε ότι η ειδικότητα σε αυτήν την περίπτωση εδράζεται στην περιοχή O (Dawson et al., 1995). Το γεγονός ότι μια χιμαιρική πρωτεΐνη αποτελούμενη από την περιοχή bHLH του *m8* και την περιοχή O του Hairy συμπεριφέρεται σε αυτήν τη διαδικασία όπως η αγρίου τύπου πρωτεΐνη Hairy, δείχνει ότι η ειδικότητα του Hairy έχει να κάνει με ειδικές αλληλεπιδράσεις στις οποίες παίζει ρόλο η περιοχή O.

Η ίδια περιοχή φάνηκε ότι είναι υπεύθυνη και για την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη Senseless (Sens), μεταγραφικός παράγοντας με δακτυλίου ψευδαργύρου που παίζει ρόλο κατά την περιφερική νευρογένεση στη μύγα. Το *sens* είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη του ΠΝΣ και συμμετέχει σε ένα κύκλωμα όπου, ενώ επάγεται αρχικά από Da/AS-C, στη συνέχεια ενισχύει την έκφρασή τους στα κύτταρα ΠΑΟ (Nolo et al., 2000). Το ενδιαφέρον με τον παράγοντα αυτόν είναι ότι φάνηκε να δρα τόσο ως μεταγραφικός ενεργοποιητής, επάγοντας μάλιστα με συνεργατικό τρόπο με τα Da/AS-C τη μεταγραφή του υποκινητή του *ac*, όσο και ως καταστολέας, με ένα τρόπο που εξαρτάται από την απευθείας πρόσδεσή του στο DNA (Jafar-Nejad et al., 2003). Με το Sens φάνηκαν να αλληλεπιδρούν και οι *m5*, *m7* και *m8*, με την τελευταία να δείχνει ανταγωνιστική δράση με το Sens όσον αφορά τη ρύθμιση του υποκινητή του *ac* τόσο σε κύτταρα S2, όσο και στη μύγα (Jafar-Nejad et al., 2003).

Αξίζει επιπλέον να σημειωθεί ότι η χαρτογράφηση των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών E(spl) με τις προνευρικές και την Da αποκάλυψε ότι για την αλληλεπίδραση της m7 με την Sc απαιτούνται τα πρώτα 80 αμινοξέα της m7, που συμπεριλαμβάνουν την περιοχή bHLH, και τα τελευταία 25 αμινοξέα της Sc, που δεν περιλαμβάνουν την bHLH, αποτελούν όμως την περιοχή που είναι υπεύθυνη για μεταγραφική ενεργοποίηση (Giagtzoglou et al., 2005). Η αλληλεπίδραση της m8 με την Da από την άλλη, πραγματοποιείται μέσω της περιοχής O της m8 και φαίνεται επίσης να μην χρειάζεται την περιοχή bHLH της Da, αλλά την αμινοτελική περιοχή, που κι αυτή είναι υπεύθυνη για μεταγραφική ενεργοποίηση (Ιωάννα Ζαρίφη, προσωπική επικοινωνία). Φαίνεται λοιπόν ότι οι πρωτεΐνες που καθορίζουν τη νευρική τύχη στη μύγα εμπλέκονται σε εκτεταμένα δίκτυα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, όπου δεν έχουμε απλούς διμερισμούς μέσω των περιοχών HLH όπως κάποιος θα υπέθετε αρχικά, με το τελικό αποτέλεσμα να εξαρτάται κατά περίπτωση από τη σχετική συγκεντρωση των διαφόρων παραγόντων και τη δυνατότητα συγκρότησης πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων όπου διάφορες περιοχές των πρωτεϊνών συμμετέχουν και στρατολογούνται με διαφορετικούς τρόπους.

1.5.4.5 Ανταγωνισμός με τις προνευρικές πρωτεΐνες για κοινές θέσεις πρόσδεσης στο DNA.

Έχει επίσης προταθεί ότι οι E(spl) μπορεί να ανταγωνίζονται με τους ενεργοποιητές Da/AS-C για κοινές θέσεις πρόσδεσης στο DNA. Έχει ήδη αναφερθεί ότι οι δύο αυτές ανταγωνιστικές ομάδες πρωτεϊνών προσδένονται σε διαφορετικές αλληλουχίες. Έχει όμως ενδιαφέρον η διαπίστωση ότι ένας συνθετικός ενισχυτής που αποτελείται από πολυμερισμένα στοιχεία E_A που φέρουν εκατέρωθεν τις ιδανικές τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες του στοιχείου ESE, μπορεί να προσδέσει και τις πρωτεΐνες E(spl). Αυτό δείχθηκε τόσο *in vitro*, με πειράματα υστέρησης κινητικότητας, όσο και *in vivo*, όπου η έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης, υπό τον έλεγχο ενός τέτοιου ενισχυτή, εμφανίστηκε να μειώνεται σε συνθήκες υπερέκφρασης των E(spl) (Jennings et al., 1999). Το ίδιο ισχύει και αντίστροφα, δηλαδή παρατηρήθηκε πρόσδεση των προνευρικών πρωτεϊνών σε στοιχεία E_B που έφεραν τις ίδιες εκατέρωθεν αλληλουχίες (που προφανώς είναι και για αυτές οι ιδανικές). Ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η αναζήτηση για τέτοιου είδους αλληλουχίες-στόχους στο γονιδίωμα της μύγας.

1.5.5 Λειτουργική εξειδίκευση και λειτουργικός πλεονασμός ανάμεσα στα μέλη του συμπλόκου

Αναφέρθηκε προηγουμένως ότι η έκταση της νευρικής υπερτροφίας που προκαλεί η έλλειψη των γονιδίων bHLH του γονιδιακού συμπλόκου E(spl) είναι ανάλογη με τον αριθμό

των γονιδίων που λείπουν. Γενικά, η έλλειψη ενός μόνο γονιδίου δεν έχει φαινότυπο και μόνο εκτεταμένες ελλείψεις του τόπου, που συμπεριλαμβάνουν από δύο και πάνω γονίδια, έχουν νευρογόνο φαινότυπο (Delidakis et al., 1991, Preiss et al., 1988, Ziemer et al., 1988, Schrons et al., 1992, Nagel et al., 2004). Σε συμφωνία με την παραπάνω ένδειξη για λειτουργικό πλεονασμό, δεν έχει καταστεί δυνατή η απομόνωση σημειακών μεταλλαγών για κανένα γονίδιο του συμπλόκου. Το γεγονός ότι συνήθως τα γονίδια *E(spl)* εκφράζονται στους διάφορους αναπτυξιακούς τόπους και χρόνους σε υποομάδες των δύο ή περισσότερων γονιδίων, συνηγορεί στην παραπάνω άποψη και εξηγεί μερικώς την έλλειψη φαινοτύπου που συνοδεύει την έλλειψη μοναδιαίων γονιδίων του συμπλόκου. Από την άλλη, σε ένα άλλο είδος δροσόφιλας, τη *Drosophila hydei*, ολόκληρο το σύμπλοκο βρέθηκε αξιοσημείωτα συντηρημένο (Maier et al., 1993), αν και δε συμβαίνει το ίδιο και σε άλλα, πιο απομακρυσμένα από τις δροσοφιλίδες δίπτερα. Στον ανωφερή π.χ., υπάρχει μόνο ένα γονίδιο *E(spl)*, που μοιάζει περισσότερο με το *mβ* (Schlatter and Maier, 2005). Φαίνεται δηλαδή ότι ο διπλασιασμός που δημιούργησε τα πολλαπλά μέλη του συμπλόκου είναι εξελικτικά πολύ πρόσφατος. Επίσης, ενώ η εκτοπική έκφραση καθενός από τα επτά γονίδια στους αναπτυξιακούς δίσκους κάτω από τον έλεγχο ισχυρών ενισχυτών οδηγεί σε παρόμοιας έκτασης έλλειψη αισθητηρίων οργάνων, αντίστοιχη υπερέκφραση κάτω από πιο ήπιους ενισχυτές αποκαλύπτει διαφορές σε σχέση με τη δυνατότητά τους να επηρεάζουν διάφορες αναπτυξιακές διαδικασίες. Πιο συγκεκριμένα, τα *m8* και *m7* εμφανίστηκαν ως τα πλέον αποτελεσματικά ως προς την εξάλειψη των μακροχαιτών και μικροχαιτών του θώρακα, καθώς και των σμηρίγγων στο περιθώριο του φτερού. Τα *mγ* και *mβ* κατέστειλαν πιο αποτελεσματικά τις φλεβώσεις του φτερού, ενώ το *mδ* ήταν το μοναδικό, μαζί με το *m7*, που όμως ήταν πολύ πιο ασθενές, που μπορούσε να καταστέλλει την έκφραση του *ato* και τη διαφοροποίηση των φωτοϋποδοχέων του ματιού. Εντυπωσιακή αποδείχθηκε η διαπίστωση ότι, ενώ η υπερέκφραση των *mγ* και *mδ* μπορούσε να σώσει την έλλειψη ιστού στο περιθώριο του φτερού που οφείλονταν σε έλλειψη του *N*, αντίστοιχη υπερέκφραση των *m8* και *m7* ενίσχυε αυτόν το φαινότυπο, μια αναπάντεχη δράση, για το μηχανισμό της οποίας τίποτα ως τώρα δεν είναι γνωστό (Ligoxygakis et al., 1999). Τα παραπάνω δεδομένα υποδηλώνουν ότι οι πρωτεΐνες bHLH του *E(spl)-C* πρέπει να παίζουν εξειδικευμένο ρόλο στις διάφορες αναπτυξιακές διαδικασίες που επηρεάζουν. Αυτό έγινε περισσότερο σαφές μετά τη διαπίστωση ότι μεταξύ των μελών της οικογένειας bHLH *E(spl)* υπάρχει διακριτή ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τις προνευρικές πρωτεΐνες και με την *Da* (Alifragis et al., 1997, βλέπε εικόνα 4-2). Οι ιδιαίτερες αυτές ικανότητες για διαπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις με τα ανταγωνιστικά σύμπλοκα των ενεργοποιητών φαίνεται να είναι σημαντικές για την καταστολή της μεταγραφής που επάγεται από *Da/Sc* (Giagtzoglou et al., 2005). Μέχρι τώρα δεν έχουν φανεί διαφοροποιήσεις στην ικανότητά τους να προσδένονται στο DNA, κάτι που επίσης θα υπογράμιζε τη λειτουργική τους εξειδίκευση. Επίσης, απομένει να διερευνηθεί ο

μηχανισμός τον οποίο χρησιμοποιούν σε άλλες διαδικασίες πέραν της νευρογένεσης, όπως π.χ. ο καθορισμός των φλεβώσεων στον αναπτυσσόμενο δίσκο του φτερού (de Celis et al., 1997, de Celis and Garcia-Bellido 1994, Garcia-Bellido and de Celis 1992).

Με βάση όλα τα παραπάνω πάντως, μπορούμε να διατυπώσουμε μια υπόθεση σχετικά με το γιατί η φυσική επιλογή διατηρεί στη δροσόφιλα επτά πρωτεΐνες με παρόμοια δομή και βιοχημικές ιδιότητες, που επιπλέον εμφανίζονται με επικαλυπτόμενα πρότυπα έκφρασης και μερική λειτουργική ανταλλαξιμότητα. Η πλειοτροπικότητα των δράσεων του *N*, πολλές από τις οποίες διαμεσολαβούν τα γονίδια του *E(spl)-C*, προφανώς απαιτεί τη διάθεση πολλών γονιδίων-στόχων, με ρυθμιστικές περιοχές που να επιτρέπουν δυναμικότητα στην έκφραση και ικανότητα ενσωμάτωσης σημάτων και από άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια. Κάτι τέτοιο θα ήταν εξαιρετικά δύσκολο να επιτευχθεί από ένα και μόνο γονίδιο, καθώς θα απαιτούνταν εξαιρετικά εκτεταμένες και περίπλοκες ρυθμιστικές περιοχές, αλλά και δομικά χαρακτηριστικά τέτοια, που θα του επέτρεπαν να επηρεάζει τη λειτουργία πολλαπλών γονιδίων-στόχων με εξειδικευμένο τρόπο. Το γεγονός ότι καμία ίσως από τις πρωτεΐνες bHLH του συμπλόκου δε φαίνεται να σχετίζεται με κάποια αποκλειστική λειτουργία, πιθανόν υποδηλώνει απλώς ότι ο χρόνος διπλασιασμού που δημιουργήσε τα πολλαπλά γονίδια του τύπου δεν ήταν εξελικτικά αρκετός για να αποκτήσουν απολύτως διακριτές δράσεις.

1.6 Τα ομόλογα των *E(spl)* στα θηλαστικά. Η οικογένεια HES

Η νευρογένεση στα θηλαστικά περιλαμβάνει τρεις διαδοχικές διαδικασίες: τον αρχικό πολλαπλασιασμό των πρόδρομων των νευρικών κυττάρων, τη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων και τη γλοιογένεση (Schuurmans and Guillemot 2002). Η αρχή γίνεται με τις νευρικές πτυχώσεις από τη ραχιαία πλευρά του εμβρύου να συγκλίνουν και να συντήκονται, σχηματίζοντας το νευρικό σωλήνα, ο οποίος αποτελείται από μία στοιβάδα κυττάρων που διαιρούνται συνεχώς. Τα κύτταρα που διαφοροποιούνται σε πρώιμους νευρώνες σταματούν τον κυτταρικό κύκλο και μεταναστεύουν σε πιο εξωτερικά στρώματα, με τα πλέον διαφοροποιημένα κύτταρα να βρίσκονται περιφερειακά, ενώ τα πιο αδιαφοροποίητα σε πιο εσωτερικές στοιβάδες. Σε αυτήν τη διαδικασία, τα κύτταρα που εξέρχονται του κυτταρικού κύκλου εκφράζουν τους δεσμευτές του Notch, Delta και Jagged, οι οποίοι ενεργοποιούν το *N* στα γειτονικά τους πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, όπου και επάγονται μέλη της οικογένειας HES, μεταγραφικοί παράγοντες τύπου bHLH ομόλογοι των *E(spl)* της δροσόφιλας. Ο ρόλος των πρωτεϊνών HES, σε αυτήν τη φάση τουλάχιστον, είναι η καταστολή παραγόντων που επάγουν τη νευρική τύχη και η διατήρηση των κυττάρων του νευροεκτοδέρματος σε μιτωτικά ενεργή, αδιαφοροποίητη κατάσταση (Kageyama and Ohtsuka 1999).

Μέχρι σήμερα έχουν κλωνοποιηθεί επτά γονίδια *HES* στα θηλαστικά (*HES 1,2,3,4,5,6* και *7*). Τα πρότυπα έκφρασής τους, αλλά και λειτουργικές μελέτες, έχουν δείξει ότι συμμετέχουν σε μια πληθώρα αναπτυξιακών διαδικασιών εκτός από τη νευρογένεση, όπως η μυογένεση, η σωματογένεση, η ανάπτυξη του παγκρέατος, του αμφιβληστροειδούς χιτώνα κ.α. Με εξαίρεση το *HES6*, θεωρούνται άμεσοι μεταγραφικοί στόχοι του μονοπατιού του N και αποτελούν τους πυρηνικούς τελεστές του σε πολλές αναπτυξιακές διαδικασίες. Κατά τη νευρογένεση, τα *HES1* και *HES5* φαίνεται να είναι οι κύριοι διαμεσολαβητές του σήματος του N για την καταστολή της νευρικής τύχης (Ohtsuka et al., 1999). Το ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα N, μαζί με το CBF1, ομόλογο του Su(H), έχει δειχθεί ότι είναι άμεσα υπεύθυνα για την ενεργοποίηση τουλάχιστον των *HES1*, *HES5* και *HES7* σε πειράματα παροδικών διαμολύνσεων σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών (Jarriault et al., 1995, Nishimura et al., 1998, Besscho et al., 2001). Τα *HES1* και *HES5* μπορούν να αυτοκαταστέλλονται, προσδενόμενα σε αλληλουχίες τύπου E_C και N, που βρίσκονται στους υποκινητές τους (Takebayashi et al., 1994, Ishibashi et al., 1995). Η έλλειψη του *HES1* έχει ως συνέπεια την αύξηση της έκφρασης του *Mash1* και την πρώιμη διαφοροποίηση των νευρώνων, με αποτέλεσμα τη μείωση του τελικού αριθμού τους (Ishibashi et al., 1995). Η έλλειψή του στο μάτι, εκτός από πρώιμη διαφοροποίηση συνοδεύεται και από αλλοίωση της αναλογίας με την οποία προκύπτουν οι διάφοροι τύποι κυττάρων (Tomita et al., 1996). Υπερέκφραση του *HES1* προκαλεί έλλειψη διαφοροποίησης και μετανάστευσης από το νευρικό σωλήνα (Ishibashi et al., 1994, Bao and Cepko 1997).

Οι πρωτεΐνες *HES* είναι μεταγραφικοί καταστολείς, που έχουν τη δυνατότητα να προσδένονται σε αλληλουχίες τύπου E_B , E_C και N (Sasai et al., 1992, Ishibashi et al., 1993, Akazawa et al., 1992), καταστέλλοντας τη μεταγραφή με τρόπο εξαρτώμενο από την αλληλεπίδραση με τους γενικούς συγκαταστολείς TLE, ομόλογους του Gro της μύγας, για την οποία αλληλεπίδραση απαιτείται το καρβοξυτελικό τετραπεπτιδίο WRPW (Grbavec and Stifani, 1996). Η *HES1* μπορεί επίσης να αναστέλλει τη νευρογένεση και μυογένεση σχηματίζοντας ανενεργά ετεροδιμερή με τους παράγοντες *Mash1* και *MyoD* αντίστοιχα, αλλά και με τις πρωτεΐνες *E12/47*, ομόλογες της *Da* στα θηλαστικά, που αποτελούν τους λειτουργικούς συνεργάτες τους (Sasai et al., 1992, Castella et al., 1999). Η δράση του *HES1* αναστέλλεται από το *HES6*, το οποίο δεν προσδένεται στο DNA, αλληλεπιδρά όμως με το *HES1* και το εμποδίζει να προσδεθεί, ενώ το εμποδίζει επιπλέον να αλληλεπιδράσει με TLE και επάγει την πρωτεόλυσή του (Bae et al., 2000). Η πρόσδεση του *HES1* στο DNA αναστέλλεται επίσης από φωσφορυλίωση από την PKC, που πραγματοποιείται μετά από ενεργοποίηση των κυττάρων PC12 από NGF (Strom et al., 1997). Η υπερέκφραση του *HES1* στην ίδια κυτταρική σειρά μπλοκάρει τη νευρική τους διαφοροποίηση από NGF, δράση για την οποία απαιτείται πρόσδεση στο DNA καθώς και η περιοχή O, αλλά όχι το WRPW (Castella et al., 2000). Αυτό σημαίνει ότι σε αυτή τη διαδικασία η περιοχή O είναι

υπεύθυνη για πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις είτε με άγνωστους συγκαταστολείς, είτε με τα ενεργοποιητικά σύμπλοκα που συμπεριλαμβάνουν επίσης πρωτεΐνες τύπου bHLH. Βλέπουμε λοιπόν ότι, όπως και οι ομόλογες πρωτεΐνες στη μύγα, έτσι και οι πρωτεΐνες HES μπορούν να χρησιμοποιούν πολλαπλούς μηχανισμούς για την καταστολή γονιδίων-στόχων. Πάντως, πολύ λίγα πράγματα είναι γνωστά σχετικά με το ποιοι είναι αυτοί οι μεταγραφικοί στόχοι των HES. Αναφέρθηκε πιο πάνω ότι στόχοι είναι καταρχάς τα ίδια τα γονίδια *HES*, αλλά και το *Mash1*, το οποίο καταστέλλεται μεταγραφικά από το HES1, που προσδένεται άμεσα στον υποκινητή του (Chen et al., 1997). Άλλους πιθανούς στόχους του HES1 αποτελούν τα γονίδια *CD4*, *p21^{WAF}* και *acid α -glucosidase* (Yan et al., 2001, Kim and Siu 1998).

Οι πρωτεΐνες HES απέχουν, όσον αφορά την ομολογία τους σε αμινοξικό επίπεδο, εξίσου από τις πρωτεΐνες Hairy και E(spl) της δροσόφιλας. Αντίθετα επίσης από τις E(spl), τα γονίδια HES δε βρίσκονται οργανωμένα σε σύμπλοκο, όπως είναι π.χ. τα Hox. Εντούτοις, η λειτουργία τους, σε κάποιες τουλάχιστον περιπτώσεις, παρουσιάζει αξιοσημείωτη ομοιότητα. Και οι δύο ομάδες πρωτεϊνών, HES και E(spl), αποτελούν αναστολείς της νευρικής μοίρας και εξαρτώνται για την ενεργοποίησή τους από το μονοπάτι του N. Επιπλέον, μπορούν να ανταγωνίζονται τις πρωτεΐνες που προωθούν τη νευρική τύχη τόσο στο επίπεδο της μεταγραφής, όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Βλέπουμε ότι μια σειρά από χαρακτηριστικά δηλαδή, όπως η αντινευρική τους δράση και η σχέση τους με το N, θα πρέπει να είναι εξελικτικά αρχαία. Οι ιδιότητες αυτές δεν εξαρτώνται από τη θέση τους στο γονιδίωμα (καθώς η μία ομάδα είναι οργανωμένη σε σύμπλοκο και η άλλη όχι), ενώ δεν έχει επηρεαστεί η ικανότητά τους να αποκτούν επιπλέον δράσεις και να εμπλέκονται και σε άλλες διαδικασίες πέραν της νευρογένεσης, με το πέρασμα του εξελικτικού χρόνου.

1.7 Σκοπός της εργασίας

Η παρούσα διδακτορική διατριβή επικεντρώνεται στη μελέτη της απευθείας πρόσδεσης των πρωτεϊνών E(spl) στο DNA, διερευνώντας τόσο τα γενικά βιοχημικά χαρακτηριστικά αυτής της αλληλεπίδρασης, όσο και το ρόλο που αυτή παίζει στα πλαίσια της μεταγραφικής καταστολής που επιφέρει από τις E(spl). Πρέπει να τονιστεί ότι σε όλες τις σχετικές εργασίες που αναφέρθηκαν μέχρι τώρα, οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της πρόσδεσης των E(spl) στο DNA παρήχθησαν από βακτήρια (Tietze et al., 1992, Ohsako et al., 1994, Van Doren et al., 1994, Jennings et al., 1999, Oellers et al., 1994, Culi and Modolell 1998). Ευκαρυωτικές πρωτεΐνες είτε δε δοκιμάστηκαν ποτέ, είτε απέτυχαν να προσδεθούν in vitro. Αυτό σημαίνει ότι η ειδικότητα και οι προτιμήσεις πρόσδεσης που διαπιστώθηκαν σε αυτές τις δοκιμασίες θα μπορούσαν να είναι διαφορετικές στις συνθήκες

που επικρατούν στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Επίσης, δεν έχουν φανεί διαφορές μεταξύ των μελών της οικογένειας όσον αφορά την προτίμηση για συγκεκριμένες αλληλουχίες ή τη σχετική ισχύ με την οποία προσδένονται σε αυτές. Ακόμη, έχει μελετηθεί η πρόσδεση αποκλειστικά ομοδιμερών, με μοναδική εξαίρεση το ετεροδιμερές m5/m8, που φάνηκε ότι μπορεί να προσδένεται σε στοιχεία τύπου N (Oellers et al., 1994). Από τη στιγμή που γνωρίζουμε ότι σχεδόν όλα τα ετεροδιμερή μεταξύ των πρωτεϊνών E(spl) μπορούν να σχηματιστούν (Alifragis et al., 1997), θα ήταν εξαιρετικά ενδιαφέρον να μελετηθεί αν οι προτιμήσεις αυτές ισχύουν και για συγκεκριμένα ετεροδιμερή. Δεν έχουν γίνει επίσης ποσοτικές προσεγγίσεις, επομένως δεν έχουμε ενδείξεις για την κινητική πρόσδεσης και τη σχετική συνάφεια με την οποία προσδένονται στις διάφορες αλληλουχίες. Τέλος, δε γνωρίζουμε σε ποιο βαθμό η απευθείας πρόσδεση στο DNA στις ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων-στόχων είναι ουσιαστικά απαραίτητη προκειμένου να επιφέρουν μεταγραφική καταστολή. Τέτοιου είδους ζητήματα προσπαθήσαμε να προσεγγίσουμε.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βασικές τεχνικές Μοριακής Βιολογίας

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης, όπως περιγράφεται από τους (Sambrook et al., 1989). Εναλλακτικά, όταν το πλασμιδιακό DNA επρόκειτο να υποβληθεί σε αλληλούχιση (sequencing), επιλέγονταν η μέθοδος Merlin (http://130.15.90.245/methods/merlin_miniprep.html).

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα χρησιμοποιήθηκαν στήλες ιοντοανταλλαγής Qiagen και Nucleobond, σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών.

Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για όλες τις κλωνοποιήσεις ήταν το DH5a. Τα υγρά και στερεά θρεπτικά μέσα που απαιτήθηκαν, καθώς και η προετοιμασία και χρήση δεκτικών κυττάρων, βασίστηκαν στα πρωτόκολλα που περιγράφονται από τους (Sambrook et al., 1989, Ausubel et al., 2001).

Οι τεχνικές κλωνοποίησης και οι ηλεκτροφορήσεις DNA και πρωτεϊνών (SDS-PAGE) βασίστηκαν στα πρωτόκολλα που περιγράφονται από τους (Sambrook et al., 1989, Ausubel et al., 2001).

Τα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από τις εταιρίες Sigma, Merck, Difco, GibcoBRL, Dynal και biomol.

Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από την εταιρία MWG και από το εργαστήριο Μικροχημείας του IMBB.

Η αλληλούχιση τμημάτων DNA έγινε από το εργαστήριο Μικροχημείας και το εργαστήριο Γονιδιωματικής του IMBB.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα περιοριστικά και τροποποιητικά ένζυμα για το χειρισμό του DNA προήλθαν από τις εταιρίες Minotech, New England Biolabs, Stratagene, Promega, Fermentas και Boehringer και χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών.

Τα ραδιοσημασμένα νουκλεοτίδια α [³²P]dATP και α [³²P]dCTP προήλθαν από την εταιρία Amersham. Το ραδιενεργά σημασμένο αμινοξύ L-[³⁵S]-met, προήλθε από την εταιρία Isotop.

Για τη δημιουργία των τροποποιημένων μορφών του ενισχυτή vgQ (mut, μ 1, μ 2, μ 3 και μ 4), όπως και για τη δημιουργία της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης mgKNEQ χρησιμοποιήθηκε το kit Gene Editor της Promega, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας. Η κατασκευή των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών m7NTEK, m7SA και m7TNHQ έγινε από τον Ν. Γιαγτζόγλου και περιγράφεται αναλυτικά στους (Giagtzoglou et al., 2003, Giagtzoglou et al., 2005).

Η σύνθεση των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα υστέρησης κινητικότητας έγινε χρησιμοποιώντας το kit T_NT/T7 Coupled Reticulocyte Lysate System της Promega, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας. Σε όλες τις περιπτώσεις τα cDNA των γονιδίων, όπως και οι μεταλλαγμένες μορφές τους, κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pRSET (Invitrogen), με την έκφρασή τους να κατευθύνεται από τον υποκινητή T7. Όλες οι πρωτεΐνες βρίσκονται με αυτόν τον τρόπο σε σύζευξη με τον επίτοπο 6XHis, ο οποίος βρίσκεται αμινοτελικά της υπό έκφραση πρωτεΐνης. Σε κάποιες περιπτώσεις (κυρίως για την επιβεβαίωση αποτελεσμάτων) χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή κάποιων πρωτεϊνών και ο πλασμιδιακός φορέας pBluescript(KS)II (Stratagene), που επίσης φέρει τον υποκινητή T7.

Η παραγωγή και ο καθαρισμός της mg (και πάλι από τον φορέα pRSET) έγινε επίσης και από βακτηριακά κύτταρα BL21pLys χρησιμοποιώντας μη αποδιατακτικές συνθήκες για τη λύση των κυττάρων και στήλη ιόντων νικελίου για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης, όπως περιγράφεται στο αντίστοιχο πρωτόκολλο της εταιρίας Qiagen.

2.2 Ηλεκτροφόρηση Υστέρησης Κινητικότητας (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)

Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο, ώστε να διαθέτουν μονόκλωνα 5' προεξέχοντα άκρα, τα οποία μπορούν να γίνουν δίκλωνα

χρησιμοποιώντας το κλάσμα Klenow της DNA πολυμεράσης και ραδιενεργά σημασμένα νουκλεοτίδια. Οι αντιδράσεις σήμανσης έγιναν ως εξής:

200 ng δίκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο

1X NEB EcoPol buffer

100 μ M dTTP

100 μ M dGTP

100 ng/ μ l BSA

2,5 μ l α [³²P]dATP

2,5 μ l α [³²P]dCTP

1 μ l Klenow

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 25 μ l. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Κατόπιν προστίθεται 1 μ l 2mM dNTPs και η αντίδραση συνεχίζεται για 10 ακόμη λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να εξασφαλίσουμε ότι δεν υπάρχουν μονόκλινα άκρα στο ολιγονουκλεοτίδιό μας. Ο όγκος στη συνέχεια ρυθμίζεται με 1XTE στα 100 μ l και ακολουθούν δύο διαδοχικοί καθαρισμοί από στήλη Sephadex G50. Η ειδική ενεργότητα και η ποιότητα της σήμανσης ελέγχεται με μετρητή υγρού σπινθηριστή (Beckman LS1701). Το σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο φυλάσσεται στους -20°C.

Για τις αντιδράσεις πρόσδεσης, κατάλληλη ποσότητα σημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου (1000 με 20.000 cpm, ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος) επωάζεται στον πάγο για 20 λεπτά με 2 μ l από την αντίδραση σύνθεσης της πρωτεΐνης ή των πρωτεϊνών που ελέγχονται, στο εξής διάλυμα, το οποίο παρασκευάζεται κάθε φορά φρέσκο:

20 mM HEPES pH 7,9

100 mM KCl

5% γλυκερόλη

2 mM MgCl₂

2mM spermidine

1mM DTT

1mM PMSF

10 ng/ μ l poly dI-dC (Amersham, χρησιμοποιείται για τον ανταγωνισμό της μη ειδικής πρόσδεσης)

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης πρόσδεσης είναι 20 μ l. Όπου απαιτείται ανταγωνισμός από κρύα, μη σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια, αυτά προστίθενται είτε πριν το σημασμένο

ολιγονουκλεοτίδιο, είτε ταυτόχρονα με αυτό. Οι αντιδράσεις πρόσδεσης ηλεκτροφορούνται αμέσως μετά το πέρας των 20 λεπτών σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (29:1), της οποίας η τελική συγκέντρωση είναι 4-6%, ανάλογα με το μέγεθος των συμπλόκων που θέλει κανείς να διαχωρίσει. Το πήκτωμα παρασκευάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα 1XTGE (25 mM Tris, 192 mM glycine, 1mM EDTA) και η ακρυλαμίδα πολυμερίζεται σε θερμοκρασία δωματίου παρουσία TEMED (40μl/100ml) και APS (600μl10%/100ml). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται επίσης σε 1XTGE σε ψυχρό θάλαμο 4°C για 2 ώρες και 45 λεπτά, υπό τάση 200V, με συνέπεια η ένταση του ρεύματος να κυμαίνεται μεταξύ 30-50mA. Στη συνέχεια το πήκτωμα αφυδατώνεται υπό κενό και εκτίθεται για αυτοραδιογραφία. Η εμφάνιση γίνεται είτε συμβατικά, σε εμφανιστικό μηχάνημα Agfa Curix 60, είτε σε phosphorimager (Molecular Dynamics Storm 840), αν πρόκειται να ποσοτικοποιηθεί η ένταση των ζωνών

2.3 Πρόσδεση πρωτεϊνών σε ακινητοποιημένο DNA

50 μl διαλύματος μαγνητικών σφαιριδίων συνδεδεμένα με στρεπταβιδίνη πλένονται τρεις φορές με 2XB&W buffer (2M NaCl, 10 mM Tris pH 7,5, 1mM EDTA) και κατόπιν επωάζονται σε RT με 100 pmol βιοτινυλιωμένου ολιγονουκλεοτιδίου, που περιέχει μία θέση πρόσδεσης E_A σε 1XB&W buffer. Μετά από τρεις πλύσεις με 1XB&W buffer για να απομακρυνθεί το DNA που δεν έχει δεσμευτεί στα σφαιρίδια, ακολουθεί επώαση για δύο ώρες στους 4°C με ήπια ανάδευση για να αποφευχθεί η μη ειδική πρόσδεση πρωτεϊνών, σε διάλυμα που περιέχει 20 mM Hepes pH 7,9, 150 mM KCl, 5% γλυκερόλη, 2 mM MgCl₂, 2 mM spermidine, 2,5 μg/ml BSA, 1 μg/ml θρυμματισμένο με υπέρηχους DNA από σπέρμα σολωμού, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, σε τελικό όγκο 100 μl. Κατόπιν προστίθενται σε κάθε αντίδραση 20 μl πρωτεΐνης (ή μείγματος πρωτεϊνών), που είχαν παραχθεί in vitro και ραδιοσημανθεί με ³⁵S-μεθειονίνη. Οι πρωτεΐνες επωάζονται με το ακινητοποιημένο DNA σε τελικό όγκο 50 μl στο ίδιο διάλυμα που περιγράφηκε πιο πάνω για δύο ώρες στους 4°C με ήπια ανάδευση. Μετά το τέλος της επώασης τα σφαιρίδια πλένονται πέντε φορές με το ίδιο διάλυμα για να αποπλυθούν οι τυχόν μη ειδικά προσδεδεμένες πρωτεΐνες και τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε 12% SDS-PAGE. Το πήκτωμα, αφού μονιμοποιηθεί σε διάλυμα 50% μεθανόλης/10% οξικού οξέος, αφυδατώνεται υπό κενό, εκτίθεται για αυτοραδιογραφία κι εμφανίζεται σε phosphorimager (Molecular Dynamics Storm 840).

2.4 Υπολογισμός του συντελεστή διάστασης, K_d

Αν συμβολίσουμε με P την πρωτεΐνη μας, D το DNA και DP το σύμπλοκο που σχηματίζεται μεταξύ τους, η αντίδραση πρόσδεσης έχει την απλή μορφή $P+D \leftrightarrow DP$ (1). Η συνολική πρωτεΐνη P_T είναι το άθροισμα της προσδεμένης και της ελεύθερης ($P_T=P+DP$, 2) και το συνολικό DNA D_T το άθροισμα του ελεύθερου και του δεσμευμένου στην πρωτεΐνη ($D_T=D+DP$, 3). Ως γνωστόν, ο συντελεστής K_d δίνεται από τη σχέση $K_d=P \cdot D/DP$ (4).

Ο λόγος όμως D/DP μπορεί να μετρηθεί σε phosphorimager, οπότε για ευκολία ορίζουμε το λόγο αυτό ως $1/X$ σε μία αρχική αντίδραση πρόσδεσης χωρίς κρύο ανταγωνιστικό DNA και $1/Y$ σε μία άλλη αντίδραση παρουσία κρύου ανταγωνιστή. Έτσι, η εξίσωση 4 απουσία ανταγωνιστικού DNA γίνεται $K_d=P/X \Rightarrow P=XK_d$ (5), ενώ μετά την προσθήκη του κρύου DNA έχουμε $K_d=P/Y \Rightarrow P=YK_d$ (6).

Αν στο πείραμά μας χρησιμοποιήσουμε πολύ μικρή ποσότητα σημασμένου DNA, μία με δύο τάξεις μεγέθους χαμηλότερη από το K_d , τότε το DNA είναι περιοριστικός παράγοντας για την πρόσδεση. Στα πειράματά μας η συγκέντρωση του σημασμένου DNA ήταν $10^{-11}M$, ενώ προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν ότι ο συντελεστής K_d θα πρέπει να κυμαίνεται γύρω στο $5 \times 10^{-8}M$. Σε αυτές τις συνθήκες, η περισσότερη πρωτεΐνη θα πρέπει να βρίσκεται ελεύθερη, μπορούμε δηλαδή να θεωρήσουμε ότι $P_T=P$ (το DP είναι πολύ χαμηλότερο από το P στην εξίσωση 2), οπότε η εξίσωση (5) γίνεται $P_T=XK_d$ (7).

Για να επιτευχθεί ανταγωνισμός όταν το σημασμένο DNA είναι πολύ χαμηλότερο από το K_d , η ποσότητα του κρύου, ανταγωνιστικού DNA θα πρέπει να είναι υψηλότερη από το συντελεστή (στα πειράματά μας, επιτεύχθηκε ικανοποιητικός ανταγωνισμός σε συγκεντρώσεις κρύου DNA της τάξης των $10^{-8}M$). Έτσι, η ποσότητα του συνολικού DNA σε αντιδράσεις ανταγωνισμού πρακτικά ισούται με την ποσότητα του ανταγωνιστή, η οποία είναι φυσικά γνωστή (την έχουμε ονομάσει D_T). Έτσι, για αντιδράσεις πρόσδεσης μετά την προσθήκη του κρύου DNA, αντικαθιστώντας στην εξίσωση 2 από τις 6 και 7 προκύπτει ότι $XK_d=YK_d+DP \Rightarrow DP=K_d(X-Y)$, (8), οπότε τώρα η εξίσωση 3 γίνεται $D_T=D+K_d(X-Y)$ (9).

Η εξίσωση 4 μπορεί να εκφραστεί ως $D=K_d \cdot DP/P$, οπότε αντικαθιστώντας το DP από την 8 και το P από την 6 έχουμε $D=K_d(X-Y)/Y$ (10). Με αντικατάσταση του D τώρα στην εξίσωση 9, προκύπτει ότι

$$D_T=K_d(X-Y)/Y+K_d(X-Y) \Rightarrow D_T=K_dX/Y-K_d+K_dX-K_dY \Rightarrow D_T=K_d(X/Y+X-Y-1) \Rightarrow K_d= D_T/(X/Y+X-Y-1) \quad (11).$$

Όμως D_T είναι η συγκέντρωση του κρύου DNA, που είναι φυσικά γνωστή, ενώ και οι λόγοι X και Y , πριν και μετά την προσθήκη του κρύου DNA, μπορούν να μετρηθούν.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η παραπάνω μέθοδος προέρχεται από τους Carey M. and Smale ST., Transcriptional Regulation in Eukaryotes: Concepts, Strategies, and Techniques. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000, σελίδες 264-265.

2.5 Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν και κατασκευές

Για τα πειράματα υστέρησης κινητικότητας χρησιμοποιήθηκαν τα εξής ολιγονουκλεοτίδια (επισημαίνονται τα στοιχεία E που περιέχουν):

E_B1 5' TGTCTGTGGCCACGTGCTAATG 3'

E_B2 5' TGGCATTAGCCACGTGCCCACAG 3'

E_A1 5' TCGACTCACGCAGGTGGGATCC 3'

E_A2 5' TCGAGGATCCCACCTGCCTGAG 3'

E_C(vgQ)1 5' TGTCCATGCCCGCGTGCCTTTT 3'

E_C(vgQ)2 5' GGGAAAAGGCCACGCGCATGG 3'

E_C(SMC)1 5' GATCCTATGCCCACGCGTCGACT 3'

E_C(SMC)2 5' CTAGAGTCGACCGCGTGGCATAG 3'

E_C(AcPro)1 5' TCGACGCCGGCCACGCGACAGGC 3'

E_C(AcPro)2 5' TCGAGCCTGTCGCGTGCCGGCG 3'

E_{B/A}1 5' GTTGCATGGCCACGTGCCAGTTATCCACATACCACCTGCCAGGATGT 3'

E_{B/A}2 5' TGACATCCTCGCCAGGTGTATGTGGATAACTGGCCACGTGCCATGCA 3'

Για τη δημιουργία των τροποποιημένων ενισχυτών vgQ χρησιμοποιήθηκαν τα εξής ολιγονουκλεοτίδια (επισημαίνονται τα στοιχεία E και οι μεταλλαγές που εισήχθηκαν):

vgQ(mut) 5' GGGATGCCATGCCGAATTCCITTTTTTTCC 3'

vgQ(μ1) 5' GGGATGCCATGCCACGTGCCITTTTTTTCC 3'

vgQ(μ2) 5' GGGATGCCATGCGCGTGCCATTTTTTTCC 3'

vgQ(μ3) 5' GGGATGCCATGGCACGTGCCATTTTTTTCC 3'

vgQ(μ4) 5' GGGATGCCACGACGCGTGCATTTTTTTCC 3'

Για την κατασκευή των συνθετικών ενισχυτών (E_C2E_A)₃ και (E_B2E_A)₃ χρησιμοποιήθηκαν τα εξής ολιγονουκλεοτίδια (επισημαίνονται τα στοιχεία E που περιέχουν):

E2Bi

5'GATCCTTGACCACGTGCCAAGAAGACTAAATACCACCTGCGAGCTAAATACACCTGCA 3'

E2Bii

5'GATCTGCAGGTGTATTTAGCTCGCAGGTGTATTTAGTTCTTGGCCACGTGTCAAG 3'

Ec2Ea:1

5'GATCCTCGACGCGTGGCAAGAAGACTAAATACCACCTGCGAGCTAAATACACCTGCA3'

Ec2Ea:2

5'GATCTGCAGGTGTATTTAGCTCGCAGGTGTATTTAGTTCTTGCCCACGCGTCGAG 3'

Ο πολυμερισμός των παραπάνω ολιγονουκλεοτιδίων βασίζεται στο γεγονός ότι τα άκρα τους φέρουν αλληλουχίες για τις ενδονουκλεάσες περιορισμού BglIII και BamHI. Τα άκρα που δημιουργούν αυτές οι ενδονουκλεάσες είναι συμβατά για σύνδεση, όμως η νέα θέση που δημιουργείται δεν αναγνωρίζεται από καμία από τις δύο ενδονουκλεάσες. Έτσι, μπορεί να επιτευχθεί σύνδεση πολλαπλών αντιγράφων του ολιγονουκλεοτιδίου με σταθερό προσανατολισμό BamHI → BglIII, καθώς κάθε άλλη διάταξη δημιουργεί θέσεις αναγνώρισης για κάποια από τις δύο ενδονουκλεάσες, οι οποίες και προστίθενται στην αντίδραση σύνδεσης.

Για την κατασκευή του ενισχυτή $E_C-(2E_A)_4$ χρησιμοποιήθηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια $E_C(SMC)1$ και $E_C(SMC)2$ που δίνονται πιο πάνω, τα οποία αφού αναδιατάχθηκαν κλωνοποιήθηκαν σε θέση BamHI μπροστά από μια τετραπλή επανάληψη ενός ολιγονουκλεοτιδίου, το οποίο περιέχει δύο στοιχεία E_A (προσφορά εργαστηρίου J. Modolell).

Για την κατασκευή των χιμαιρικών πρωτεϊνών GAD και DAG χρησιμοποιήθηκαν τα εξής ολιγονουκλεοτίδια (με την κάθετο επισημαίνεται το σημείο που διαχωρίζει τις αλληλουχίες που προέρχονται από τα δύο γονίδια mg και md , αποτελώντας έτσι το σημείο σύνδεσης μεταξύ τους στις χιμαιρικές πρωτεΐνες που δημιουργήθηκαν):

mgamma5 5' GCAGATCTCACAAAATGTCGTCGCTA 3'

mdelta5 5' GCAGATCTACACAATGGCCGTTTCAGG 3'

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

GAD13 5' GCCCGAAATTTGTC / CGCCGGAGTCAAGC 3'

GAD25 5' GCTTGACTCCGGCG / GACAAATTTCTGGGC 3'

DAGF 5' ACCAAGTTAACCTG / GAGGGCTTCCGTTC 3'

DAGR 5' GAACGGAAGCCCTC / CAGGTAACTTGGT 3'

3bHLH Εκφυλισμένο (degenerate) ολιγονουκλεοτίδιο, που υβριδοποιείται με το 3' άκρο της κωδικής αλυσίδας όλων των γονιδίων *bHLH E(spl)*. Υπενθυμίζεται ότι όλες οι πρωτεΐνες καταλήγουν καρβοξυτελικά στο τετραπεπτίδιο WRPW.

Η κατασκευή της GAD έγινε ως εξής: Μέσω αντίδρασης PCR (χρησιμοποιώντας υψηλής πιστότητας Taq πολυμεράση) πολλαπλασιάστηκε ένα τμήμα του γονιδίου *mg*, το οποίο αντιστοιχεί στα αμινοξέα 1-90 και περιλαμβάνει την περιοχή bHLH του *mg*, μέχρι το σημείο που ξεκινά, όπως πιστεύεται, η περιοχή O. Για το τμήμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια *mg*gamma5 και GAD13, το οποίο στο 5' άκρο του φέρει ένα μικρό τμήμα από την περιοχή O του γονιδίου *mδ*, που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 91-95. Ομοίως, χρησιμοποιώντας τα ολιγονουκλεοτίδια GAD25 και 3bHLH (που υβριδοποιείται στο 3' άκρο της κωδικής αλυσίδας και των επτά γονιδίων) πολλαπλασιάστηκε με PCR ένα τμήμα του *mδ*, που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 91-173, το οποίο περιλαμβάνει την περιοχή O και το καρβοξυτελικό μέρος της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Το ολιγονουκλεοτίδιο GAD25 επίσης περιλαμβάνει στο 5' άκρο ένα μικρό τμήμα του *mg*, που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 86-90 της πρωτεΐνης *mg* και είναι πλήρως συμπληρωματικό με το GAD13. Τα προϊόντα των δύο αντιδράσεων καθαρίστηκαν και αναμίχθηκαν σε μία τρίτη αντίδραση PCR, όπου μετά την αποδιάταξη οι αλληλουχίες που ήταν συμπληρωματικές μεταξύ των δύο τμημάτων υβριδοποιήθηκαν και λειτούργησαν ως πρωταρχικά τμήματα. Έτσι, έγινε επιμήκυνση αρχικά για τρεις κύκλους και στη συνέχεια προστέθηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια *mg*gamma5 και 3bHLH για να πολλαπλασιάσουν το υβριδικό μεταξύ των *mg* και *mδ* τμήμα DNA που προέκυψε.

Με ανάλογο τρόπο επιτεύχθηκε και η κατασκευή της DAG, όπου τα ολιγονουκλεοτίδια *mdelta5* και DAGR χρησιμοποιήθηκαν για να πολλαπλασιάσουν το τμήμα του *mδ* που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 1-90, ενώ τα DAGF και 3bHLH πολλαπλασίασαν το τμήμα του *mg* που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 91-205.

Για την κατασκευή της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης *mgKNEQ* χρησιμοποιήθηκε το εξής ολιγονουκλεοτίδιο (επισημαίνονται τα μεταλλαγμένα νουκλεοτίδια):

mgKNEQ 5' ACCGCAAC**CG**TGATGAAGCCCATGCTG**CG**CAGAGGAA 3'

2.6 Δημιουργία και χειρισμός διαγονιδιακών στελεχών δροσόφιλας

Όλα τα στελέχη δροσόφιλας που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία καλλιεργούνται σύμφωνα με γνωστά πρωτόκολλα (Ashburner 1989).

Τα διαγονιδιακά στελέχη UAS που κατασκευάστηκαν για τις ανάγκες της εργασίας αυτής, βασίστηκαν στην κλωνοποίηση του αντίστοιχου cDNA στον πλασμιδιακό φορέα pUAST (Brand and Perimon, 1993). Οι ενέσεις του πλασμιδίου έγιναν στο στέλεχος yw^{67c23} από τον Γ. Λειβαδάρα. Υπενθυμίζεται ότι στον φορέα pUAST το ένθεμα εισάγεται ανάμεσα στα άκρα του μεταθετού στοιχείου P, όπου βρίσκεται και το γονίδιο αναφοράς *mini-white*. Για την ένθεση απαιτείται η παρουσία ενεργούς τρανσποζάσης P, που παράγεται από το πλασμιδιοδότη Δ2→3, το οποίο και ενύεται επίσης. Τα ενήλικα άτομα που φέρουν ενθέσεις του πλασμιδίου επιλέγονται με βάση τη χρώση που παρατηρείται στους οφθαλμούς λόγω της ένθεσης του *mini-white* και διασταυρώνονται με κατάλληλα στελέχη εξισορρόπησης. Με αυτόν τον τρόπο επιλέγονται στελέχη που φέρουν μόνο μία ή συνδεδεμένες στο ίδιο χρωμόσωμα ενθέσεις, οι οποίες και διατηρούνται σταθερές σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία με χρωμοσώματα εξισορρόπησης. Τα χρωμοσώματα αυτά φέρουν επιπλέον γονίδια-μορφολογικούς δείκτες, τα οποία καθιστούν εύκολη τη διάκρισή τους.

Τα στελέχη LacZ που δημιουργήθηκαν βασίστηκαν στην κλωνοποίηση των υπό μελέτη ενισχυτών στον πλασμιδιακό φορέα pHZ50pL. Το πλασμίδιο αυτό φέρει ανάμεσα στα άκρα του στοιχείου P το γονίδιο *LacZ* υπό τον έλεγχο ενός ελάχιστου υποκινητή, άνωθεν του οποίου κλωνοποιείται η υπό μελέτη ρυθμιστική αλληλουχία. Ως μάρτυρας αναφοράς για την ταυτοποίηση των ενθέσεων χρησιμοποιείται το γονίδιο *rosy+* (*ry+*). Οι ενέσεις γίνονται στο στέλεχος $cnry^{506}$ και η επιλογή των διαγονιδιακών ζώων βασίζεται στην αλλαγή του χρώματος των οφθαλμών από έντονο κόκκινο σε ανοικτό πορτοκαλί, εξαιτίας της ένθεσης του *ry+*. Και πάλι ακολουθούν διασταυρώσεις χαρτογράφησης και σταθερής διατήρησης των ενθέσεων σε ομόζυγη ή ετερόζυγη κατάσταση.

Η εκτοπική έκφραση των διαφόρων γονιδίων βασίστηκε στο σύστημα GAL4-UAS (Brand and Perimon, 1993). Συνοπτικά, ο μεταγραφικός ενεργοποιητής GAL4 του σακχαρομύκητα τίθεται υπό τον έλεγχο ενός ειδικά εκφραζόμενου τοπικά και χρονικά ενισχυτή και διατηρείται ως στέλεχος-οδηγός. Το γονίδιο που υπερεκφράζεται τίθεται υπό τον έλεγχο ενός ασθενούς ελάχιστου υποκινητή, μπροστά από τον οποίο έχουν κλωνοποιηθεί πέντε επαναλήψεις της αλληλουχίας UAS (Upstream Activating Sequence), αποτελώντας έτσι ένα στέλεχος UAS. Με τη διασταύρωση των δύο στελεχών, ο παράγοντας GAL4 προσδένεται στις αλληλουχίες UAS και ενεργοποιεί, με το πρότυπο φυσικά του ενισχυτή που οδηγεί τη δική του έκφραση. Μέχρι σήμερα έχει αναπτυχθεί πληθώρα στελεχών GAL4, γεγονός που κάνει το συγκεκριμένο σύστημα ένα από τα πλέον πολύτιμα εργαλεία για γενετική ανάλυση στη μύγα.

Τα στελέχη GAL4 που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν τα εξής:

-enGAL4. Εμφανίζει το πρότυπο του ενδογενούς γονιδίου *engrailed (en)*, το οποίο εκφράζεται σε όλο το οπίσθιο διαμέρισμα του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού.

-apGAL4. Εκφράζεται σύμφωνα με το πρότυπο του γονιδίου *apterous (ap)*, το οποίο απαντά σε όλο το νωτιαίο διαμέρισμα του δίσκου του φτερού.

-ombGAL4. Εμφανίζεται με το πρότυπο του γονιδίου *optomotor blind (omb)*, το οποίο εκφράζεται στην κεντρική περιοχή εκατέρωθεν του ΠΟ άξονα του δίσκου του φτερού, με την έκφρασή του να εξασθενεί σταδιακά όσο απομακρύνεται από αυτό.

-rhGAL4. Εκφράζεται στο πρότυπο του γονιδίου *rannier (rh)*, το οποίο ενεργοποιείται στο νωτιαίο τμήμα του δίσκου του φτερού, στην περιοχή που θα δώσει το μελλοντικό ημιθώρακα. Σε προνύμφες τρίτου σταδίου η περιοχή αυτή αποτελεί το άπω νωτιαίο τμήμα του δίσκου, το οποίο ορίζεται από τα κύτταρα ΠΑΟ που θα δώσουν τις νωτιαιοκεντρικές (dorsocentrals) σμήριγγες.

Όλα τα στελέχη GAL4 προέρχονται από το Bloomington Stock Center.

Τα στελέχη UAS που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν τα εξής:

-UASmδ (προέλευση Χ.Δ.)

-UASmγ (προέλευση Χ.Δ.)

-UASmβ (προσφορά εργαστηρίου S.Bray)

-UASm7 (προσφορά εργαστηρίου S.Bray)

-UASm3 (προέλευση Χ.Δ.)

-UASm5 (προέλευση Χ.Δ.)

-UASm8 (προσφορά εργαστηρίου J.Campos-Ortega)

-UASm7KNEQ (προσφορά εργαστηρίου D.Ish-Horovicz. Φέρει τις σημειακές μεταλλαγές K15→N και E22→Q, που καταργούν την ικανότητά του να προσδένεται στο DNA.)

-UASmγKNEQ (κατασκευή K.K. Φέρει τις σημειακές μεταλλαγές K17→N και E24→Q, που καταργούν την ικανότητά του να προσδένεται στο DNA.)

-UASm7KNEQVP16 (προσφορά εργαστηρίου D.Ish-Horovicz. Φέρει τις σημειακές μεταλλαγές K15→N και E22→Q, ενώ μετά το S143 της m7 φέρει την περιοχή 412-490 του ιικού ενεργοποιητή VP16.)

-UASmγKNEQVP16 (κατασκευή K.K. Φέρει τις σημειακές μεταλλαγές K17→N και E24→Q, ενώ μετά το R154 της mγ φέρει την περιοχή 412-490 του ιικού ενεργοποιητή VP16.)

- UASm7ΔORVP16 (κατασκευή Ν.Γιατζόγλου)
- UASGAD (κατασκευή Κ.Κ., βλέπε παραπάνω)
- UASDAG (κατασκευή Κ.Κ., βλέπε παραπάνω)
- UASmγΔC (κατασκευή Κ.Κ. Τροποποιημένη μορφή της mγ, που αποτελείται από τα αμινοξέα 1-157.)
- UASsc (προσφορά εργαστηρίου J.Modolell)
- UASmδVP16 (κατασκευή Ν.Γιατζόγλου)
- UASm8VP16 (κατασκευή Ι. Ζαρίφη)
- UASmβVP16 (προσφορά εργαστηρίου S.Bray)
- UASm7VP16 (προσφορά εργαστηρίου D.Ish-Horovicz)
- UASmγVP16 (κατασκευή Κ.Κ. Μετά το R154 της mγ φέρει την περιοχή 412-490 του ιικού ενεργοποιητή VP16.)

Τα στελέχη LacZ που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν τα εξής:

- vgQ lacZ (προέλευση SAT)
- vgQ lacZ(mut) (κατασκευή Κ.Κ.)
- vgQ lacZ(μ1) (κατασκευή Κ.Κ.)
- vgQ lacZ(μ2) (κατασκευή Κ.Κ.)
- vgQ lacZ(μ3) (κατασκευή Κ.Κ.)
- vgQ lacZ(μ4) (κατασκευή Κ.Κ.)
- E_C-(2E_A)₄ lacZ (κατασκευή Μ.Κηπαράκη και Κ.Κ.)
- (E_C2E_A)₃ lacZ (κατασκευή Μ.Κηπαράκη και Κ.Κ.)
- (E_C2E_A)₄ lacZ (κατασκευή Μ.Κηπαράκη και Κ.Κ.)
- (E_B2E_A)₃ lacZ (κατασκευή Μ.Κηπαράκη και Κ.Κ.)

Τα πρότυπα έκφρασης των παραπάνω ενισχυτών περιγράφονται αναλυτικά στο κεφάλαιο «Αποτελέσματα».

Τα στελέχη εξισορρόπησης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν τα εξής:

- yw;CyO/ScO (φέρει το 2^ο χρωμόσωμα εξισορρόπησης CyO)
- yw;TM3/TM6B (φέρει τα 3^α χρωμοσώματα εξισορρόπησης TM3 και TM6B)
- CyO/BcEIp;ry (φέρει το 2^ο χρωμόσωμα εξισορρόπησης CyO)

-cn;TM3,ry^{KK}Sb/D (φέρει το 3^ο χρωμόσωμα εξισορρόπησης TM3)

2.7 Ιστοχημική ανίχνευση δραστικότητας β-γαλακτοσιδάσης

Για την ανίχνευση της δραστικότητας της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία παράγεται από το γονίδιο *LacZ*, σε αναπτυξιακούς δίσκους του φτερού δροσόφιλας, ακολουθείται σε γενικές γραμμές η εξής διαδικασία:

Η ανατομία περιπλανώμενων προνυμφών τρίτου σταδίου γίνεται σε διάλυμα 1XPBS (130 mM NaCl, 70 mM Na₂HPO₄, 30 mM NaH₂PO₄). Αφού απομακρυνθούν οι δίσκοι του φτερού (η συλλογή τους δεν πρέπει να διαρκέσει περισσότερο από 20 λεπτά), μονιμοποιούνται για 10 λεπτά σε διάλυμα 1% γλουταραλδεϋδης σε 1XPBS σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν τρία γρήγορα πλυσίματα με 1XPBS και ακολουθεί η αντίδραση χρώσης, η οποία πραγματοποιείται στο εξής διάλυμα:

10mM NaPO₄ pH 7,2

150mM NaCl

1mM MgCl₂

3mM K₄[FeII(CN)₆]

3mM K₄[FeIII(CN)₆]

0,3% Triton X-100

Στο παραπάνω διάλυμα γίνεται προσθήκη X-gal σε τελική συγκέντρωση 0,2% (20μl 5% ανά 500 μl διαλύματος χρώσης).

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε σκοτεινό θάλαμο στους 37°C για όσο χρόνο κρίνεται απαραίτητο. Η αντίδραση τερματίζεται μεταφέροντας τους δίσκους σε διάλυμα 1XPBS και ακολουθεί η τοποθέτηση των δίσκων σε αντικειμενοφόρο πλάκα σε διάλυμα 80% γλυκερόλης σε 1XPBS και άμεση φωτογράφιση, για να αποφευχθεί η διάχυση της χρώσης. Η φωτογράφιση των αναπτυξιακών δίσκων έγινε με κάμερα Spot χρησιμοποιώντας φίλτρο Nomarski.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΠΡΩΤΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Μελέτη της πρόσδεσης των πρωτεϊνών bHLH της οικογένειας E(spl) στο DNA in vitro

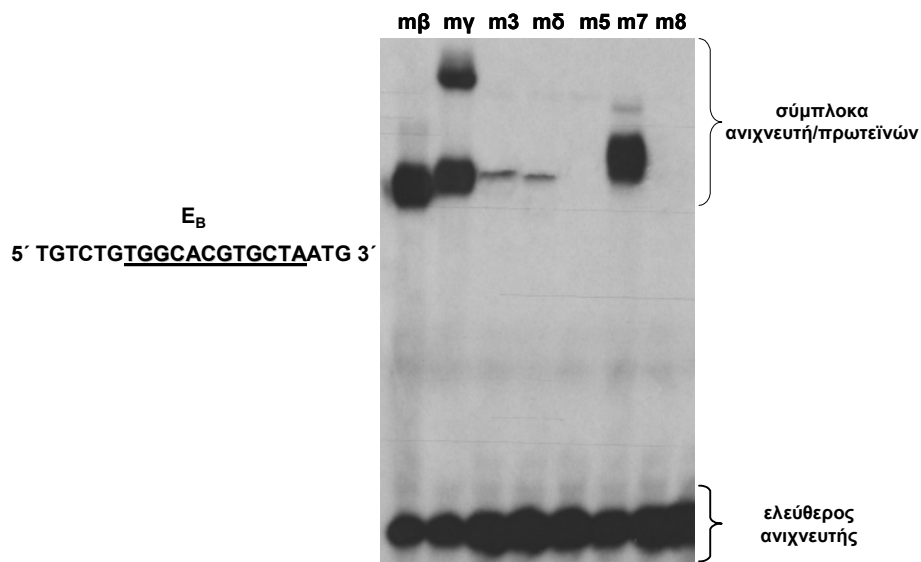
Ο έλεγχος της πρόσδεσης στο DNA των πρωτεϊνών E(spl) έγινε αρχικά in vitro με πειράματα υστέρησης κινητικότητας. Ραδιενεργά σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια που περιείχαν τις υπό μελέτη θέσεις πρόσδεσης επωάζονταν με τις πρωτεΐνες στον πάγο και κατόπιν ηλεκτροφορούσαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες. Οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν παράγονταν in vitro με τη βοήθεια συζευγμένου συστήματος μεταγραφής-μετάφρασης από δικτυοκύτταρα κουνελιού. Πρέπει να σημειωθεί ότι σε προηγούμενες εργασίες που αφορούσαν την πρόσδεση των E(spl) είχαν χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά πρωτεΐνες που είχαν παραχθεί σε βακτηριακά κύτταρα, είχαν καθαριστεί κατά κανόνα κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες και στη συνέχεια είχαν επαναδιαταχθεί. Σε μία σειρά πειραμάτων (βλέπε εικόνα 3-20) δοκιμάστηκε και η πρωτεΐνη my, που είχε παραχθεί σε βακτηριακά κύτταρα και είχε εκχυλιστεί κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες, όμως η ενεργότητά της όσον αφορά την πρόσδεση στο DNA αποδείχθηκε σημαντικά χαμηλότερη. Το γεγονός αυτό θα πρέπει πιθανόν να αποδοθεί στο ότι το μεγαλύτερο μέρος της καθαρής πρωτεΐνης αδυνατεί στις συγκεκριμένες συνθήκες να αποκτήσει τη φυσιολογική τριτοταγή δομή, όπως αυτή επιτυγχάνεται in vivo. Στην παρούσα εργασία οι πρωτεΐνες μας παράγονται in vitro σε σαφώς μικρότερες

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

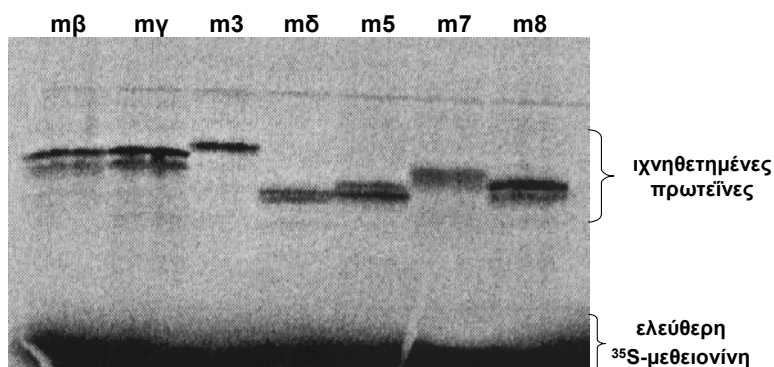
ποσότητες σε σχέση με τις αντίστοιχες βακτηριακές. Η χρήση όμως κυτταρικού εκχυλίσματος από ευκαρυωτικά κύτταρα πιστεύουμε ότι αποτελεί μια καλή προσέγγιση στις *in vivo* συνθήκες, εφόσον παράγονται πρωτεΐνες με σημαντικά μεγαλύτερη ενεργότητα πρόσδεσης στο DNA σε σχέση με τις βακτηριακές.

3.1.1 Οι πρωτεΐνες E(spl) προσδένονται στο DNA με διακριτή συνάφεια

Αρχικά διαπιστώθηκε ότι οι επτά πρωτεΐνες μπορούν σε αδρές γραμμές να ομαδοποιηθούν σε τρεις κατηγορίες, όσον αφορά την ικανότητα πρόσδεσής τους σε αλληλουχίες τύπου E_B (TGGCACGTGCCA). Οι πρωτεΐνες mβ, mγ και m7 βρέθηκαν να προσδένονται ως ομοδιμερή στο στοιχείο E_B πολύ πιο ισχυρά από τις mδ και m3, ενώ οι m5 και m8 προσδένονται ακόμη πιο αδύναμα (εικόνα 3-1). Αυτό έρχεται καταρχάς σε αντιδιαστολή με προηγούμενες μελέτες (Jennings et al., 1999), που έδειξαν ότι και οι επτά πρωτεΐνες προσδένονται στο DNA με πολύ παρόμοια, αν όχι την ίδια συνάφεια. Οι διαφορές που εντοπίζονται στην πρόσδεση δεν οφείλονται σε διαφοροποίηση στις ποσότητες των πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνταν σε κάθε αντίδραση. Στις συγκεκριμένες αντιδράσεις χρησιμοποιούνταν συστηματικά 2μl από κάθε αντίδραση σύνθεσης για κάθε πρωτεΐνη. Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών έγινε με δύο τρόπους. Αρχικά, ίσες ποσότητες από κάθε αντίδραση, όπου χρησιμοποιήθηκε μεθειονίνη σημασμένη με S³⁵ για την ιχνηθέτηση των πρωτεϊνών, ηλεκτροφορήθηκαν σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE). Μετά από αυτοραδιογραφία, διαπιστώσαμε έτσι ότι όλες οι πρωτεΐνες συντίθενται σε παρόμοιες ποσότητες, ενώ δεν ανιχνεύονται θραύσματα (εικόνα 3-2). Επίσης, εκμεταλλευόμενοι το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες μας είναι αμινοτελικά σημασμένες με τον επίτοπο 6XHis, αφού τις καθάρισαμε με χρωματογραφία συγγένειας, στη συνέχεια τις ποσοτικοποιήσαμε μετά από χρώση αργύρου σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, χρησιμοποιώντας ως πρότυπο γνωστές συγκεντρώσεις BSA (αδημοσίευτα αποτελέσματα). Συστηματικά οι αντιδράσεις μας φάνηκαν να αποδίδουν περίπου 2ng πρωτεΐνη ανά μl αντίδρασης. Με αυτόν τον τρόπο δεν μπορεί να ελεγχθεί φυσικά το ποσοστό της ενεργού πρωτεΐνης σε κάθε αντίδραση, δεν υπάρχει όμως κανένας λόγος να υποθέσουμε ότι το ποσοστό λειτουργικής πρωτεΐνης είναι διαφορετικό στις διαφορετικές αντιδράσεις.



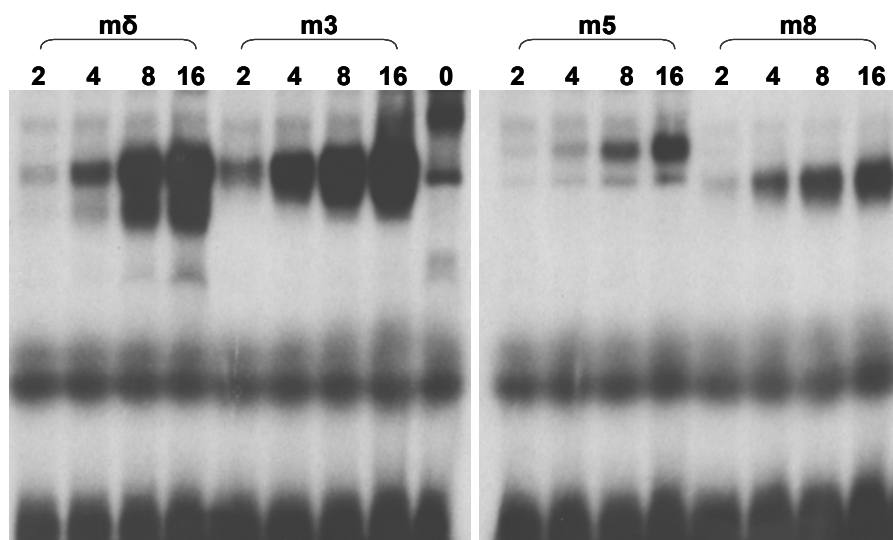
ΕΙΚΟΝΑ 3-1 Πρόσδεση των επτά πρωτεϊνών E(spl) ως ομοδιμερή σε σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο, που περιέχει μία θέση πρόσδεσης E_B. Δε γνωρίζουμε τι αντιπροσωπεύει το σύμπλοκο υψηλού μοριακού βάρους που εμφανίζεται στη διαδρομή της mγ, αν και παρόμοια συμπεριφορά (δηλαδή εμφάνιση πολλαπλών ζωνών σε μία αντίδραση πρόσδεσης) είναι αρκετά συνηθισμένη, ακόμα και για τις πρωτεΐνες E(spl) (Jennings et al., 1999).



ΕΙΚΟΝΑ 3-2 Οι επτά πρωτεΐνες E(spl) συντέθηκαν in vitro παρουσία ραδιενεργής μεθειονίνης. Ίση ποσότητα από κάθε αντίδραση σύνθεσης έχει ηλεκτροφορηθεί κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες. Οι μικρές διαφορές που παρατηρούνται στην ισχύ του σήματος θα πρέπει μάλλον να αποδωθούν στο διαφορετικό αριθμό καταλοίπων μεθειονίνης που περιέχει κάθε πρωτεΐνη. Για παράδειγμα, η m8 περιέχει 13 κατάλοιπα μεθειονίνης ενώ η m7 μόνο 7.

Χρησιμοποιώντας αυξανόμενες ποσότητες από τις τέσσερις πρωτεΐνες που προσδένονται λιγότερο ισχυρά, διαπιστώνεται για όλες πρόσδεση, που ισχυροποιείται όσο αυξάνεται η ποσότητα της πρωτεΐνης που ελέγχεται (εικόνα 3-3). Αυτό σημαίνει ότι οι πρωτεΐνες mδ, m3, m5 και m8 έχουν την ικανότητα να προσδένονται σε θέσεις E_B, λιγότερο όμως ισχυρά από τις mβ, mγ και m7.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

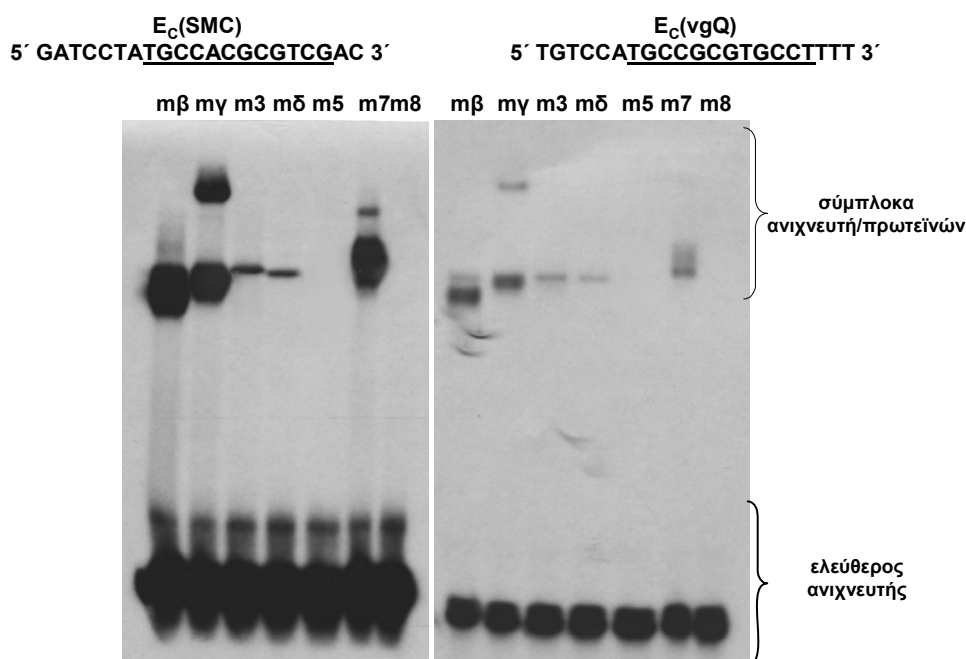


ΕΙΚΟΝΑ 3-3 Πρόσδεση αυξανόμενων ποσοτήτων των πρωτεϊνών mδ, m3, m5 και m8 σε σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο E_B. Οι σχετικές ποσότητες αναφέρονται στα μl από κάθε αντίδραση σύνθεσης, που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε διαδρομή. 1μl περιέχει περίπου 2ng πρωτεΐνη. Η διαδρομή 0 αντιστοιχεί σε 16 μl από μία αντίδραση σύνθεσης ελέγχου, όπου δεν έχει προστεθεί κανένα πλασμίδιο έκφρασης, περιέχει επομένως μόνο το κυτταρικό εκχύλισμα που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση των πρωτεϊνών μας.

3.1.2 Οι πρωτεΐνες E(spl) προσδένονται με μεγαλύτερη συνάφεια σε θέσεις E_B σε σχέση με τις θέσεις E_C. Δεν υπάρχει προτίμηση για συγκεκριμένες θέσεις E_C in vitro.

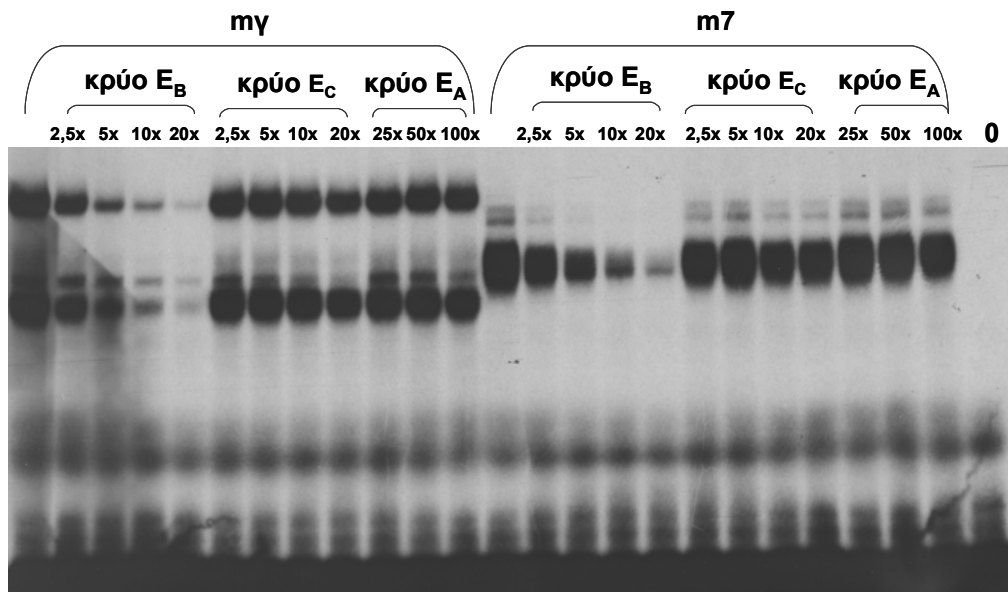
Στη συνέχεια ελέγχθηκε η πρόσδεση των επτά πρωτεϊνών σε σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια που περιείχαν θέσεις πρόσδεσης E_C. Ο πυρήνας των θέσεων αυτών είναι το εξανουκλεοτίδιο CACGCG, με διαφορετικές όμως εκατέρωθεν τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Οι τρεις θέσεις E_C που επιλέχθηκαν προέρχονται από τον 900 bp υποκινητή του *ac*, τον ενισχυτή SMC του γονιδίου *sc* και τον ενισχυτή Quadrant του *vestigial* (βλέπε Εισαγωγή, παράγραφοι 1.5.5.1 και 1.5.5.2 και Αποτελέσματα, παράγραφος 3.2.1). Τα πρότυπα έκφρασης, αλλά και λειτουργικές μελέτες στη μύγα υποδηλώνουν ότι στα τρία αυτά στοιχεία θα πρέπει να προσδένονται οι πρωτεΐνες Hairy, m7/m8 και mβ/mγ/m8 αντίστοιχα. Πρόκειται λοιπόν για τρία ρυθμιστικά στοιχεία που φαίνεται in vivo να μπορούν να στρατολογήσουν μέλη της οικογένειας των bHLH E(spl), επιλέχθηκαν επομένως για να αποκαλύψουν αν έχουν την ικανότητα να προσδένουν και in vitro επιλεκτικά συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από τα πειράματα αυτά ήταν ότι καταρχάς οι πρωτεΐνες E(spl) προσδένονται και στα τρία στοιχεία με τον ίδιο τρόπο, όπως και στο στοιχείο E_B, όμως πολύ λιγότερο ισχυρά (εικόνα 3-4, όπου φαίνεται η πρόσδεση των E(spl) σε δύο από τα προαναφερθέντα στοιχεία E_C). Η εικόνα που πήραμε ήταν όμοια με την 3-1. Και πάλι οι mβ, mγ και m7 έδειξαν να προσδένονται ισχυρότερα από τις υπόλοιπες

τέσσερις, αν και η πρόσδεση ήταν πολύ ασθενέστερη σε σχέση με την πρόσδεση στη θέση E_B. Αυτό φαίνεται στις εικόνες 3-5 και 3-6, όπου γίνεται ανταγωνισμός της πρόσδεσης των mβ, mγ και m7 σε σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο E_B, χρησιμοποιώντας περίσσεια μη σημασμένων στοιχείων E_B, E_C και E_A. Υπενθυμίζεται ότι σε θέσεις E_A είναι γνωστό ότι προσδένονται ετεροδιμερή Da/AS-C, αλλά όχι οι E(spl). Φαίνεται ότι τα στοιχεία E_C και E_A αδυνατούν να ανταγωνιστούν την πρόσδεση των E(spl) σε E_B, ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις (20 και 100X σε σχέση με το σημασμένο E_B αντίστοιχα), αν και σε περίσσεια 20X κρύου ολιγονουκλεοτιδίου E_C αρχίζει να εμφανίζεται κάποιος βαθμός ανταγωνισμού.

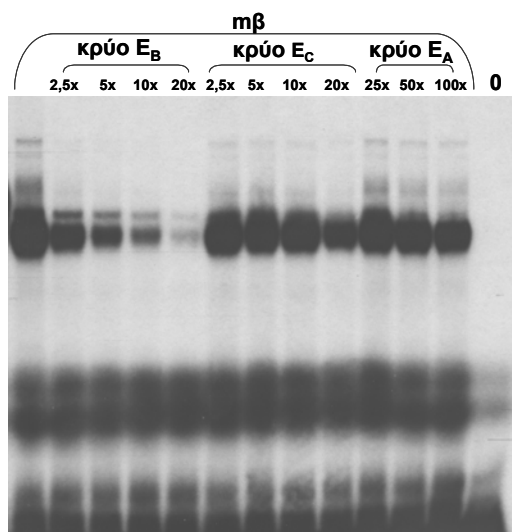


ΕΙΚΟΝΑ 3-4 Πρόσδεση των επτά bHLH E(spl) πρωτεϊνών στα στοιχεία E_C(SMC) και E_C(vgQ). Η εικόνα που εμφανίζεται είναι ουσιαστικά η ίδια, όπως και στα στοιχεία E_B, όπως φαίνεται στην εικόνα 3-2. Δεν πρέπει να ληφθεί υπόψιν η διαφορά στην ένταση των σημάτων ανάμεσα στις δύο σειρές αντιδράσεων πρόσδεσης, καθώς αυτή οφείλεται απλώς στην αυξημένη ειδική ενεργότητα του ανιχνευτή DNA και στον παρατεταμένο χρόνο έκθεσης της αυτοραδιογραφίας για το στοιχείο E_C(SMC) σε σχέση με το E_C(vgQ). Όμοια ήταν και η εικόνα που προέκυψε κατά τη δοκιμασία πρόσδεσης των E(spl) στο ολιγονουκλεοτίδιο E_C(Ac-Pro).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



ΕΙΚΟΝΑ 3-5 Ανταγωνισμός της πρόσδεσης των ομοδιμερών mγ και m7 σε σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο E_B, με αυξανόμενες συγκεντρώσεις μη σημασμένων (κρύων) ολιγονουκλεοτιδίων E_B, E_C και E_A. Η σχετική περίσσεια του ανταγωνιστικού ολιγονουκλεοτιδίου αναφέρεται σε κάθε διαδρομή. Η διαδρομή 0 περιέχει μόνο το κυτταρικό εκχύλισμα που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση των πρωτεϊνών μας.



ΕΙΚΟΝΑ 3-6 Ανταγωνισμός της πρόσδεσης της mβ ως ομοδιμερές σε σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο E_B, με αυξανόμενες συγκεντρώσεις μη σημασμένων (κρύων) ολιγονουκλεοτιδίων E_B, E_C και E_A. Η σχετική περίσσεια του ανταγωνιστικού ολιγονουκλεοτιδίου αναφέρεται σε κάθε διαδρομή. Η διαδρομή 0 περιέχει μόνο το κυτταρικό εκχύλισμα που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση των πρωτεϊνών μας.

Καμία προτίμηση για συγκεκριμένη θέση E_C δε φάνηκε για καμία από τις πρωτεΐνες. Αυτό υποδηλώνει ότι, με βάση τουλάχιστον τις συγκεκριμένες συνθήκες in vitro, η όποια λειτουργική εξειδίκευση των επτά πρωτεϊνών δεν βασίζεται σε επιλεκτική πρόσδεσή τους σε συγκεκριμένες και ιδιαίτερες για κάθε μία θέσεις πρόσδεσης στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων που καταστέλλουν.

3.1.3 Ετεροδιμερή μεταξύ των μελών της οικογένειας E(spl) προσδένονται στο DNA με διαφορετική συνάφεια

Ο έλεγχος της πρόσδεσης των ετεροδιμερών έγινε χρησιμοποιώντας πρωτεΐνες που συντέθηκαν ταυτόχρονα στην ίδια αντίδραση, κάτι που επιτρέπεται από το σύστημα σύνθεσης που χρησιμοποιείται. Ίσες ποσότητες από τα πλασμίδια έκφρασης χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις αντιδράσεις σύνθεσης και οι σχετικές ποσότητες των πρωτεϊνών που παράγονταν ελέγχονταν σε κάθε περίπτωση. Όλες οι πρωτεΐνες παράγονταν σε συγκρίσιμες ποσότητες, όπως διαπιστώθηκε μετά από ιχνηθέτηση με ραδιενεργή S^{35} -μεθειονίνη και συνακόλουθη ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία. Τα ίδια πειράματα υστέρησης κινητικότητας πραγματοποιήθηκαν και με πρωτεΐνες που παράχθηκαν σε διαφορετικές αντιδράσεις και επωάστηκαν μαζί στον πάγο για 20 λεπτά πριν από την πρόσδεση στο DNA, με τα αποτελέσματα να είναι ακριβώς τα ίδια. Σε κάθε περίπτωση, τελικά χρησιμοποιούνταν ίσες ποσότητες από τις πρωτεΐνες που ελέγχονταν.

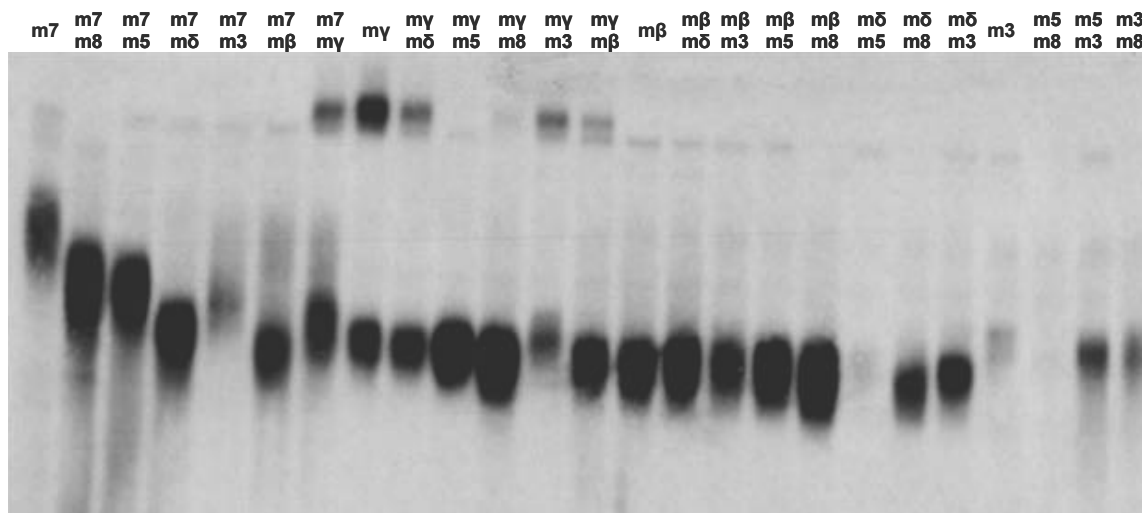
Όπως φαίνεται στην εικόνα 3-7, μονές ζώνες ανιχνεύονται σε όλες τις διαδρομές, γεγονός που σημαίνει ότι, όπως είχε φανεί και σε προηγούμενες εργασίες, όλα τα μέλη της οικογένειας μπορούν να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, με ορισμένα ετεροδιμερή να προτιμούνται σε σχέση με τα ομοδιμερή. Το γεγονός ότι πρόκειται για πραγματικά ετεροδιμερή είναι προφανές, καθώς τα διάφορα σύμπλοκα βρίσκονται σε διαφορετική απόσταση από το μέτωπο του πηκτώματος. Φυσικά, ο διμερισμός μεταξύ των μελών της οικογένειας δεν μπορεί να ελεγχθεί άμεσα με βάση τα παρόντα πειράματα, όμως κάποιες ενδείξεις μπορούν να προκύψουν έμμεσα σε σχέση με την πρόσδεση στο DNA. Μπορεί να φαίνεται παράδοξο ότι ανιχνεύονται αποκλειστικά οι ζώνες που αντιστοιχούν σε ετεροδιμερή ενώ απουσιάζουν οι ζώνες των ομοδιμερών, όμως αυτό έχει παρατηρηθεί και σε άλλες σχετικές εργασίες. Τα ετεροδιμερή HES1-HERP (ομόλογη της Hey στα θηλαστικά) εκδηλώνουν αυξημένη ικανότητα πρόσδεσης και διαφορετικές προτιμήσεις για αλληλουχίες τύπου E σε σχέση με τα ομοδιμερή (Iso et al., 2001). Επίσης, τα ετεροδιμερή της XHRT1, ομόλογης των HERP στο *Xenopus*, με τις Xhairyl και 2b προτιμούνται σαφώς από τα αντίστοιχα ομοδιμερή και έχουν αισθητά αυξημένη ικανότητα πρόσδεσης (Taelman et al., 2004). Μια πιθανή εξήγηση για τις παραπάνω παρατηρήσεις είναι ότι μέσω των ετεροδιμερών επιτυγχάνεται πιο εκτεταμένος και συνάμα πιο λεπτός έλεγχος στη μεταγραφή γονιδίων-στόχων, ειδικά αν τα ετεροδιμερή έχουν διαφορετική ειδικότητα πρόσδεσης σε σχέση με τα ομοδιμερή.

Αυτό που παρατηρήσαμε είναι ότι η m7 γενικά προτιμά να ετεροδιμερίζεται (εφόσον η παρουσία οποιασδήποτε από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες εξαφανίζει τη χαρακτηριστική ζώνη του ομοδιμερούς m7), με την πρόσδεσή της να ενισχύεται από τις mδ, m5 και m8. Από την

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

άλλη πλευρά, η $m\gamma$ μάλλον σχηματίζει κατά προτίμηση ομοδιμερή, με εξαίρεση τον ισχυρό διμερισμό της με τις $m5$ και $m8$. Σχετικά με τα ετεροδιμερή της $m\beta$ με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες, είναι δύσκολο να εξαχθούν συμπεράσματα, καθώς όλα τα σύμπλοκα μετακινούνται στο πήκτωμα με όμοια ταχύτητα, αν και η ισχύς των διμερών της με τις $m\delta$, $m8$ και $m5$ φαίνεται αυξημένη. Μπορεί όμως και να μη σχηματίζονται ετεροδιμερή, με εξαίρεση ίσως το διμερές $m7/m\beta$. Όσον αφορά την $m\delta$, φαίνεται να προσδένεται ισχυρά μόνο ως ετεροδιμερές με τις $m8$, $m3$ και $m7$. Τονίζεται ότι οι πρωτεΐνες $m5$ και $m8$, όπως και οι $m\delta$ και $m3$, στις συνθήκες του συγκεκριμένου πειράματος δίνουν σχεδόν μη ανιχνεύσιμα σύμπλοκα ως ομοδιμερή. Διαπιστώνεται όμως μια γενική ικανότητα των $m5$ και $m8$ να ενισχύουν την πρόσδεση των $m\gamma$, $m7$ και $m3$, ίσως και της $m\beta$. Η $m8$, αλλά όχι η $m5$, ενισχύει επίσης την πρόσδεση της $m\delta$. Από την άλλη, η πρωτεΐνη $m3$ φαίνεται να δυσχεραίνει την πρόσδεση της $m7$ και της $m\gamma$, ενώ εμφανίζεται να ενισχύεται ως ετεροδιμερές με τις $m5$, $m8$ και ιδίως με την $m\delta$. Αυτό μπορεί να ερμηνευτεί αν υποθέσει κανείς ότι τα ετεροδιμερή $m7/m3$ και $m\gamma/m3$ ευνοούνται σε σχέση με τα αντίστοιχα ομοδιμερή, όμως δεν προσδένονται το ίδιο καλά στο DNA. Η εναλλακτική υπόθεση είναι ότι τα συγκεκριμένα ετεροδιμερή δεν σχηματίζονται αποτελεσματικά, οπότε η μείωση στην ένταση των ζωνών που παρατηρούνται οφείλεται στην μειωμένη ποσότητα των ομοδιμερών.

Τα παραπάνω αποτελέσματα, που συνοψίζονται στην εικόνα 3-8, μπορούν να ερμηνευτούν στη βάση της διαφορετικής ικανότητας συγκρότησης ομο- και ετεροδιμερών, ταυτόχρονα όμως πρέπει να συνυπολογίσουμε ότι για να επιτευχθεί αποτελεσματική πρόσδεση απαιτείται ένας ιδιαίτερος συνδυασμός βασικών περιοχών. Αυτός μπορεί π.χ. να είναι οι βασικές περιοχές της $m\delta$ και της $m3$, αλλά όχι ένας συνδυασμός από δύο βασικές περιοχές της $m\delta$ ή δύο βασικές περιοχές της $m3$. Το συμπέρασμα πάντως που προέκυψε είναι ότι σαφώς υπάρχουν διακριτές προτιμήσεις για συγκεκριμένα διμερή ως προς την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA, που μπορεί να σημαίνει ότι η αποτελεσματικότητα στην κατασταλτική δράση των διαφόρων μελών της οικογένειας ίσως εξαρτάται από την ταυτόχρονη παρουσία τους ως ετεροδιμερή με άλλα μέλη στα ίδια ρυθμιστικά στοιχεία των γονιδίων-στόχων, τουλάχιστον στο μέτρο που η καταστολή εξαρτάται από την άμεση πρόσδεση στο DNA.



ΕΙΚΟΝΑ 3-7 Πρόσδεση των επτά πρωτεϊνών E(spl) ως ομο- και ετεροδιμερή σε σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο, που περιέχει μία θέση πρόσδεσης E_B. Στην εικόνα δεν φαίνονται τα ομοδιμερή των mδ, m5 και m8, που στις συνθήκες του συγκεκριμένου πειράματος δίνουν πολύ αδύναμα ή μη ανιχνεύσιμα συμπλοκα. Η ζώνη του ελεύθερου σημασμένου DNA δε φαίνεται, καθώς, για να διακριθεί η κινητικότητα των διαφόρων συμπλόκων, η ηλεκτροφόρηση στο συγκεκριμένο πείραμα διήρκεσε διπλάσιο από το συνήθη χρόνο (5, 5 ώρες), με αποτέλεσμα να έχει διαφύγει ο ελεύθερος ανιχνευτής.

	mβ	mγ	m7	m3	mδ	m5	m8
mβ	+++	+++ ^ó	+++	NE(mβ)	NE(mβ)	↗(mβ)	↗(mβ)
mγ		+++	+++ ^ó	↘(mγ)	NE ^ó (mγ)	↗	↗
m7			+++	↘(mγ)	↗	↗	↗
m3				++	↗	↗	↗
mδ					++	NE(mδ)	↗
m5						+	NE
m8							+

ΕΙΚΟΝΑ 3-8 Πρόσδεση των ομο- και ετεροδιμερών πρωτεϊνών E(spl) στο στοιχείο E_B. Τα σύμβολα (+) υποδηλώνουν την ικανότητα πρόσδεσης των ομο- και ετεροδιμερών, ενώ τα σύμβολα (↘) και (↗) σημαίνουν μείωση και αύξηση σε σχέση με τα αντίστοιχα ομοδιμερή, ή με το ομοδιμερές που αναφέρεται σε παρένθεση. Το σύμβολο (ó) υποδηλώνει την εξασθένηση του μεγαλομοριακού συμπλόκου που δίνει η mγ. Το σύμβολο (NE, no effect) σημαίνει ότι η συμπεριφορά του ετεροδιμερούς είναι όμοια με αυτήν του ομοδιμερούς που αναφέρεται στην παρένθεση, οπότε είναι δύσκολο να αποσαφηνιστεί αν σχηματίζεται ετεροδιμερές και αν προσδένεται διακριτά από τα αντίστοιχα ομοδιμερή στο DNA. Οι πρωτεΐνες m5 και m8 ενισχύουν την πρόσδεση των mγ και m7, που είναι οι δύο από τις τρεις πρωτεΐνες (η τρίτη είναι η mβ) που προσδένονται πιο ισχυρά και ως ομοδιμερή. Η m3 φαίνεται να εξασθενεί την πρόσδεση των mγ και m7, ενώ ενισχύει την πρόσδεση των mδ, m5 και m8. Η mβ πιθανόν σχηματίζει μόνο ομοδιμερή. Τέλος,

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

φαίνεται να μη σχηματίζεται το ετεροδιμερές $m\gamma/m\delta$, ενώ το διμερές $m\delta/m\delta$ προσδένεται και αυτό ισχυρότερα από τα δύο ομοδιμερή.

3.1.4 Υπολογισμός της συγγένειας πρόσδεσης.

Για να αποκτήσουμε μια εικόνα όσον αφορά τη σχετική ισχύ με την οποία οι πρωτεΐνες $E(spl)$ προσδένονται στο DNA, αποφασίσαμε να υπολογίσουμε τον συντελεστή διάστασης, K_d , με τον οποίο κάποια από τα διμερή μας προσδένονται σε θέσεις E_B . Είναι γενικά παραδεκτό ότι μια τυπική αντίδραση πρωτεΐνης-DNA γίνεται με έναν συντελεστή K_d της τάξης των $10^{-9}M$. Θελήσαμε έτσι να ελέγξουμε αν η πρόσδεση που παρατηρούμε *in vitro* στα πειράματά μας μπορεί να θεωρηθεί αξιόπιστη στα πλαίσια αυτά. Κάποιοι περιορισμοί που τίθενται στο σύστημά μας είναι οι ακόλουθοι: Πρώτον, δεν ήταν δυνατόν να ελέγξουμε την πρόσδεση όλων των διμερών μεταξύ των μελών της οικογένειας, περιοριστήκαμε έτσι στον υπολογισμό του συντελεστή K_d μόνο για κάποια διμερή που φάνηκαν να προσδένονται ισχυρά, συγκεκριμένα τα $m\beta/m\beta$, $m7/m7$ και $m7/m8$. Δεύτερον, η πρόσδεση των $E(spl)$ σε στοιχεία E_C ήταν πιο αδύναμη σε σχέση με την αντίστοιχη σε E_B , όπως φάνηκε από τα προηγούμενα πειράματα, και δεν επιχειρήθηκε να μετρηθεί ο αντίστοιχος συντελεστής διάστασης, ο οποίος αναμένεται να είναι υψηλότερος. Τέλος, βασικό πρόβλημα είναι η μικρή σχετικά ποσότητα με την οποία παράγονται οι πρωτεΐνες μας στο *in vitro* σύστημα μεταγραφής-μετάφρασης που χρησιμοποιούμε. Μια τυπική αντίδραση σύνθεσης φάνηκε να παράγει συστηματικά περίπου 2ng πρωτεΐνης/μl, όπως υπολογίστηκε μετά από χρωματογραφικό καθαρισμό συγγένειας και χρώση αργύρου.

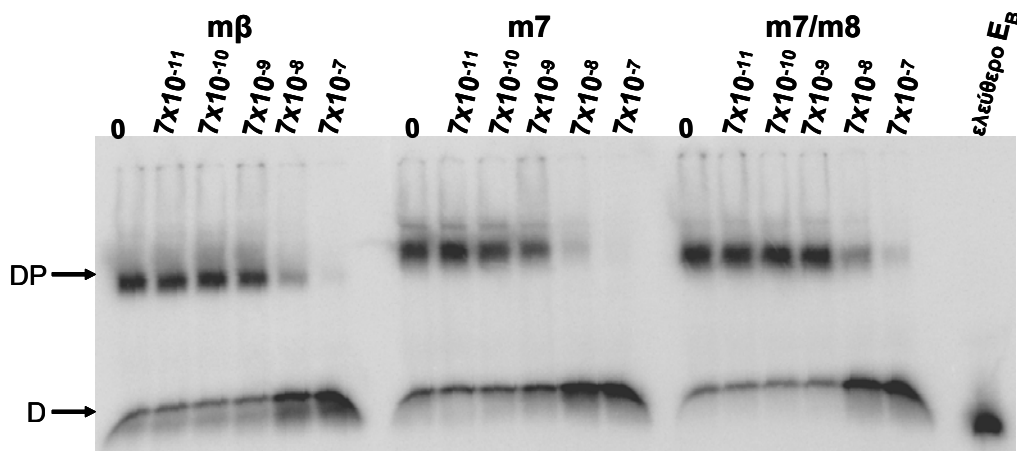
Ο συντελεστής K_d ορίζεται γενικά ως ο λόγος D^*P/DP , όπου D είναι η συγκέντρωση του ελεύθερου, μη δεσμευμένου DNA, P η συγκέντρωση της ελεύθερης πρωτεΐνης και DP η συγκέντρωση του συμπλόκου. Ο πιο απλός τρόπος για τον υπολογισμό του, είναι η πραγματοποίηση μιας αντίδρασης πρόσδεσης, όπου η μισή ποσότητα DNA είναι προσδεδεμένη στην πρωτεΐνη και η άλλη μισή ελεύθερη, οπότε στην περίπτωση αυτή η συγκέντρωση P της πρωτεΐνης ισούται με τον K_d . Αυτό επιτυγχάνεται με μια σειρά αντιδράσεων, όπου χρησιμοποιείται αυξανόμενη ποσότητα πρωτεΐνης, ενώ οι υπόλοιποι παράγοντες μένουν αμετάβλητοι. Σε πρωταρχικά πειράματα λοιπόν, τα διμερή μας φάνηκαν να προσδένονται με έναν συντελεστή διάστασης της τάξης των $5 \times 10^{-8}M$. Το πρόβλημα με τη μέθοδο αυτή όμως είναι ότι δε λαμβάνεται υπόψη το ποσοστό της πρωτεΐνης που είναι βιολογικά ενεργή, ικανή να προσδένεται στο DNA, κάτι που οδηγεί σε σημαντική υπερεκτίμηση του πραγματικού συντελεστή διάστασης. Γενικότερα, το γεγονός ότι για τον υπολογισμό του συντελεστή K_d εξαρτάται κανείς από τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης, καθιστά την προσέγγιση αρκετά επισφαλής. Για το λόγο αυτό, αποφασίσαμε να ακολουθήσουμε μια διαδικασία, στην οποία ο συντελεστής K_d υπολογίζεται με βάση τη

συγκέντρωση μη σημασμένου ολιγονουκλεοτιδικού ανταγωνιστή, σε συνδυασμό με την αναλογία του δεσμευμένου προς το ελεύθερο DNA πριν και μετά την προσθήκη του κρού ανταγωνιστή, χωρίς να εξαρτάται καθόλου από τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Ο ακριβής τρόπος με τον οποίο γίνεται ο υπολογισμός αυτός, που βασίζεται σε μια σειρά από απλές μαθηματικές εξισώσεις, περιγράφεται στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι». Σε αυτό το σημείο, αυτό που πρέπει να αναφερθεί είναι ότι βασική προϋπόθεση για να ακολουθήσει κανείς αυτή τη μέθοδο είναι να χρησιμοποιήσει μικρή αρχική ποσότητα σημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου (τουλάχιστον μία με δύο τάξεις μεγέθους χαμηλότερη από τον εκτιμώμενο συντελεστή K_d με βάση την προηγούμενη προσέγγιση), το οποίο προφανώς πρέπει να είναι ραδιοσημασμένο με εξαιρετικά υψηλή ειδική ενεργότητα. Το ραδιοσημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο οφείλει να αποτελεί παράγοντα «εν ανεπαρκεία» στο συγκεκριμένο πείραμα. Επιπλέον, απαιτείται πολύ καλή ποσοτικοποίηση του μη σημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου, που χρησιμοποιείται ως ανταγωνιστής. Στα πειράματά μας η συγκέντρωση του σημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου ήταν 10^{-11} M, ενώ η συγκέντρωση των πρωτεϊνών (ως διμερή) ήταν περίπου 10^{-8} M.

Στην εικόνα 3-9 φαίνεται ο ανταγωνισμός στην πρόσδεση διμερών mβ/mβ, m7/m7 και m7/m8 σε ραδιοσημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο E_B, από αυξανόμενες συγκεντρώσεις του ίδιου κρού, μη σημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου σε ένα τυπικό πείραμα. Αφού ποσοτικοποιήσαμε την ένταση των ζωνών που εμφανίστηκαν, προχωρήσαμε στον υπολογισμό του λόγου D/DP σε κάθε αντίδραση και, με βάση την εξίσωση 11 που περιγράφεται στο «Υλικά και Μέθοδοι», οι συντελεστές K_d υπολογίστηκαν ως εξής: Για το mβ/mβ 7×10^{-9} M, για το m7/m7 4×10^{-9} M και για το m7/m8 6×10^{-9} M. Οι συντελεστές αυτοί επιβεβαιώθηκαν με πολύ μικρή απόκλιση σε τρία ανεξάρτητα πειράματα. Ένα πρώτο συμπέρασμα που μπορεί να προκύψει από τις τιμές αυτές είναι ότι, τουλάχιστον για τις πρωτεΐνες m7 και m8, που χρησιμοποιήσαμε για τον υπολογισμό του K_d , η πρόσδεση που παρατηρήσαμε σε στοιχειομετρικές συνθήκες θα πρέπει να αντανakλά κυρίως την ικανότητα διμερισμού των πρωτεϊνών και λιγότερο τη συνάφεια προς το DNA. Το γεγονός δηλαδή ότι το ετεροδιμερές m7/m8 φάνηκε να προσδένεται ισχυρότερα από το ομοδιμερές m7 (βλέπε εικόνα 3-7), ενώ ο συντελεστής K_d του m7/m8 είναι λίγο υψηλότερος από αυτόν του m7, σημαίνει ότι η ενίσχυση που παρατηρούμε στην πρόσδεση οφείλεται κατά κύριο λόγο σε αυξημένη ικανότητα διμερισμού μεταξύ των m7 και m8, σε σχέση με τον ομοδιμερισμό m7/m7 και, πολύ περισσότερο, m8/m8. Γενικότερα πάντως, φαίνεται ότι η πρόσδεση τουλάχιστον των τριών παραπάνω συμπλόκων συμβαίνει με συνάφεια τυπική για παρόμοιου τύπου αλληλεπιδράσεις. Επιβεβαιώνεται έτσι ότι η πρόσδεση που παρατηρούμε *in vitro* είναι αρκετά ισχυρή, ώστε να μπορεί να αποτελεί πραγματικό μηχανισμό για την πρόσβαση σε ρυθμιστικά στοιχεία γονιδίων-στόχων των πρωτεϊνών E(spl) *in vivo*.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Προφανώς, η σχετική συνάφεια πρόσδεσης διμερών όπως τα m5/m5 ή m8/m8 σε θέσεις E_B αναμένεται χαμηλότερη, όπως επίσης και γενικότερα η πρόσδεση των E(spl) σε θέσεις E_C.



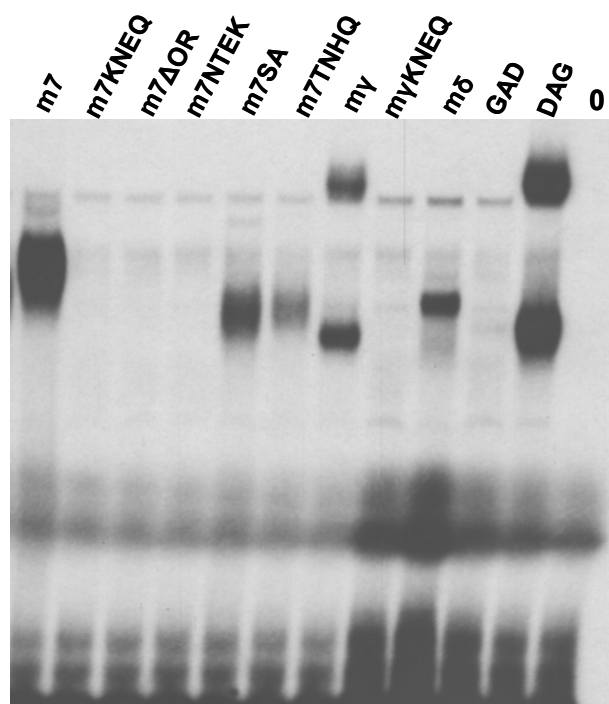
ΕΙΚΟΝΑ 3-9 Ανταγωνισμός της πρόσδεσης των διμερών mβ/mβ, m7/m7 και m7/m8 σε σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο E_B, με αυξανόμενες συγκεντρώσεις μη σημασμένου (κρύου) ολιγονουκλεοτιδίου E_B. Η συγκέντρωση (M) του κρύου ολιγονουκλεοτιδίου αναφέρεται σε κάθε διαδρομή. Η τελευταία διαδρομή περιέχει μόνο το σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο. Ο υπολογισμός του συντελεστή διάστασης K_d βασίστηκε στη σχετική ποσότητα του ελεύθερου (D) και του δεσμευμένου (DP) σημασμένου E_B, συγκρίνοντας την πρώτη και την πέμπτη διαδρομή για κάθε διμερές που ελέγχθηκε.

3.1.5 Ο ρόλος των περιοχών bHLH και O στην πρόσδεση των E(spl)

Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της πρόσδεσης των ετεροδιμερών, μας προέτρεψαν για μία σειρά πειραμάτων, με σκοπό να ελεγχθεί ο ρόλος των περιοχών bHLH και O στην πρόσδεση των πρωτεϊνών E(spl) στο DNA. Ο ρόλος της περιοχής bHLH είναι καλά μελετημένος σε προηγούμενες εργασίες. Είναι πλέον γνωστό ότι η βασική περιοχή έρχεται σε άμεση επαφή με το DNA, ενώ η περιοχή HLH διαμεσολαβεί το διμερισμό των πρωτεϊνών. Για την περιοχή O, που περιλαμβάνει δύο επιπλέον αμφιπαθικές α-έλικες, πιστεύεται ότι αποτελεί επίσης περιοχή που διαμεσολαβεί διαπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, κάτι που όμως δεν έχει αποδειχθεί για τις E(spl) (Dawson et al., 1995, Jafar-Nejad et al., 2003, Nakatani et al., 2004, Taelman et al., 2004).

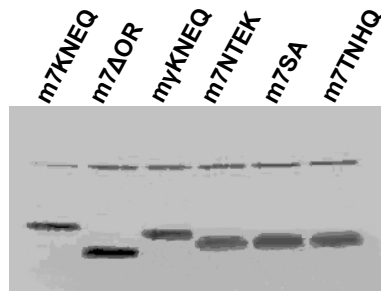
Στην εικόνα 3-10 φαίνεται ότι δύο μεταλλαγές (K→N και E→Q) σε δύο συντηρημένα αμινοξέα στη βασική περιοχή των πρωτεϊνών m7 και mγ, τις καθιστούν ανίκανες, όπως ήταν αναμενόμενο, να προσδεθούν στο στοιχείο E_B in vitro, ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις, όπως φαίνεται στην εικόνα 3-12. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός ότι μία μεταλλαγμένη μορφή της m7, από την οποία απουσιάζει η περιοχή O (m7ΔOR), επίσης αδυνατεί να προσδεθεί στο DNA, γεγονός που υποδηλώνει πιθανότατα ότι η έλλειψη αυτής της περιοχής αποτρέπει το σχηματισμό διμερών, ικανών να προσδεθούν στο DNA. Προς

επιβεβαίωση του παραπάνω ισχυρισμού, διαπιστώθηκε ότι δύο σημειακές μεταλλαγές στην περιοχή O (N92→T και E93→K) επίσης καταργούν την πρόσδεση της m7. Δύο άλλες μορφές της m7 που φέρουν επίσης σημειακές μεταλλαγές στην περιοχή O, οι m7SA (S95→A) και m7TNHQ (T114→N και H115→Q) φαίνεται να προσδένονται λιγότερο ισχυρά από ότι η αγρίου τύπου πρωτεΐνη m7. Πρέπει να σημειωθεί στο σημείο αυτό ότι όλες οι μορφές της m7 που φέρουν τις συγκεκριμένες σημειακές μεταλλαγές που αναφέρονται εδώ, είναι λειτουργικές όσον αφορά μια σειρά από *in vitro*, αλλά και *in vivo* δοκιμασίες, όπως είναι η αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες Da και Sc, η μεταγραφική καταστολή γονιδίων αναφοράς κλπ (Giagtzoglou et al., 2005, Ιωάννα Ζαρίφη, προσωπικές παρατηρήσεις). Στην εικόνα 3-11 βλέπουμε επίσης ότι οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες παράγονται σε συγκρίσιμες ποσότητες, όπως φαίνεται μετά από ιχνηθέτησή τους με ραδιενεργή ³⁵S-μεθειονίνη. Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι η περιοχή O παίζει έναν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο, πιθανώς όχι άμεσα για την πρόσδεση στο DNA αλλά μάλλον ευνοώντας τον διμερισμό των πρωτεϊνών.

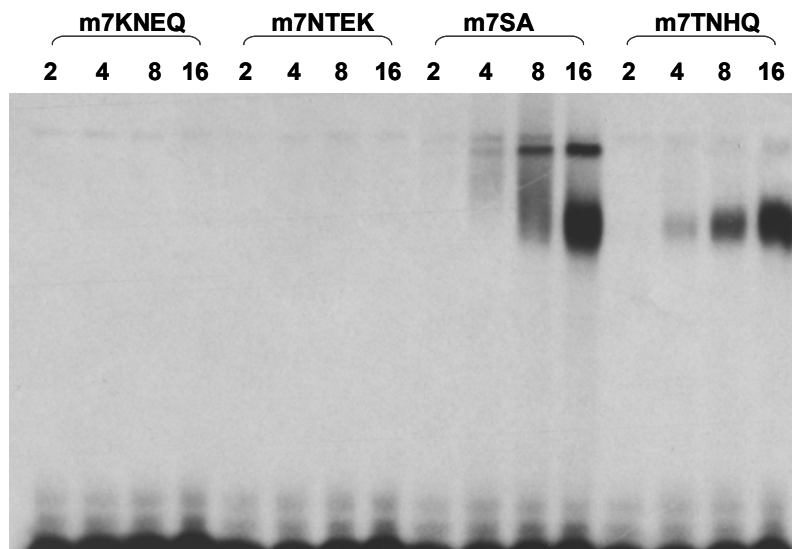


ΕΙΚΟΝΑ 3-10 Πρόσδεση των πρωτεϊνών E(spl) και των μεταλλαγμένων μορφών τους ως ομοδιμερή σε σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο E₈, όπως υποδεικνύεται σε κάθε διαδρομή. Για την πρωτεΐνη mδ έχει χρησιμοποιηθεί τετραπλάσια ποσότητα σε σχέση με τις υπόλοιπες (8 μl από την αντίδραση σύνθεσης έναντι 2 για όλες τις υπόλοιπες), προκειμένου να δώσει ανιχνεύσιμο σύμπλοκο στις συνθήκες του συγκεκριμένου πειράματος. Η διαδρομή 0 περιέχει μόνο το κυτταρικό εκχύλισμα που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση των πρωτεϊνών μας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



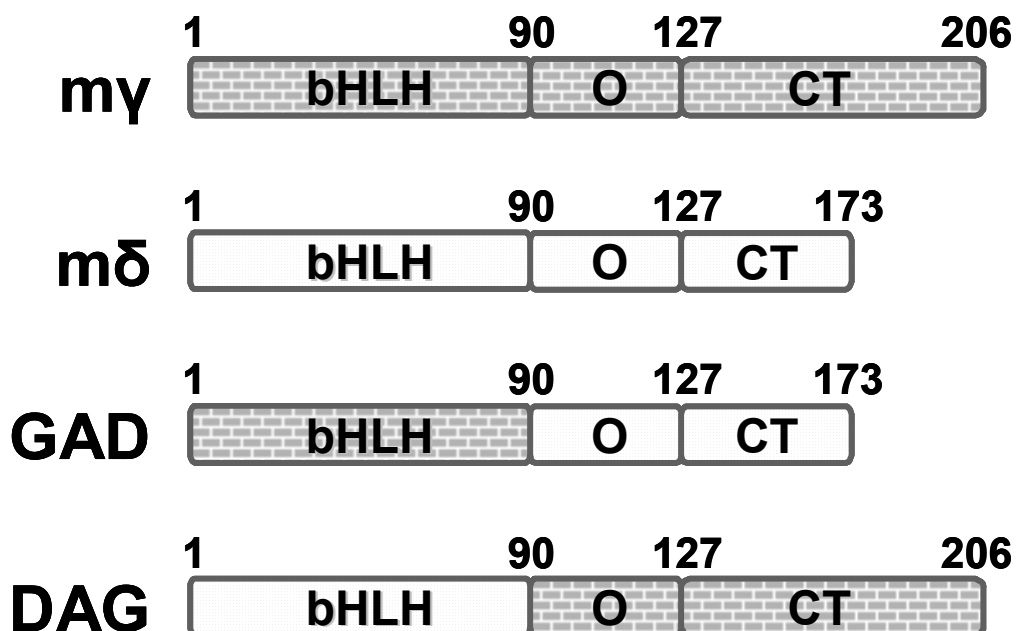
ΕΙΚΟΝΑ 3-11 Ποσοτικοποίηση των μεταλλαγμένων μορφών των πρωτεϊνών mγ και m7. Οι πρωτεΐνες συντέθηκαν *in vitro* παρουσία ραδιενεργής μεθειονίνης. Ίση ποσότητα από κάθε αντίδραση σύνθεσης έχει ηλεκτροφορηθεί κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες.



ΕΙΚΟΝΑ 3-1 Πρόσδεση αυξανόμενων ποσοτήτων των μεταλλαγμένων μορφών της m7 σε σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο E_B. Οι σχετικές ποσότητες αναφέρονται στα μl από κάθε αντίδραση σύνθεσης, που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε διαδρομή. 2 μl από την αγρίου τύπου m7, στις συνθήκες του συγκεκριμένου πειράματος, θα έδινε πολύ καλά ανιχνεύσιμο σύμπλοκο, ανάλογο με αυτό που εμφανίζεται με 16 μl της πρωτεΐνης m7SA.

Ο ρόλος της περιοχής O στο διμερισμό και στη συνακόλουθη πρόσδεση στο DNA διερευνήθηκε με έναν ακόμη τρόπο. Δημιουργήθηκαν χιμαιρικές πρωτεΐνες αποτελούμενες από τμήματα των πρωτεϊνών mγ και mδ. Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη που ονομάστηκε GAD αποτελείται αμινοτελικά από την περιοχή bHLH της mγ, ενώ καρβοξυτελικά φέρει τμήμα της mδ, από την περιοχή O και πέρα. Η πρωτεΐνη DAG αποτελεί ένα αντίστροφο υβρίδιο μεταξύ των δύο, αποτελούμενη από την περιοχή bHLH της mδ και την περιοχή O της mγ (βλέπε εικόνα 3-13). Οι δύο πρωτεΐνες είναι λειτουργικές *in vivo*, καθώς μπορούν να καταστέλλουν μια σειρά από γονίδια αναφοράς τόσο στη μύγα, όσο και στη δροσοφιλική κυτταρική σειρά S2 (Κ.Κ., προσωπικές παρατηρήσεις). Η πρόσδεση των δύο χιμαιρικών πρωτεϊνών ως ομοδιμερή φαίνεται στην εικόνα 3-10. Είναι σαφές ότι η πρόσδεση της GAD, που φέρει τη βασική περιοχή της mγ, δεν προσομοιάζει την πρόσδεση της mγ. Από την

άλλη, η πρόσδεση της DAG, που φέρει τη βασική περιοχή της mδ, μοιάζει με αυτήν της mγ. Υπενθυμίζεται ότι η mγ προσδένεται ως ομοδιμερές πολύ ισχυρότερα από ότι η mδ. Φαίνεται λοιπόν ότι αποφασιστικός παράγοντας για την ισχύ της πρόσδεσης στο DNA αποτελεί η ικανότητα διμερισμού για τα μέλη της οικογένειας E(spl). Το γεγονός ότι η πρωτεΐνη DAG προσδένεται ισχυρά ενώ η GAD όχι, υποδηλώνει ότι ο λόγος που η mδ προσδένεται λιγότερο ισχυρά από την mγ δεν είναι ίσως η άμεση συνάφεια της βασικής περιοχής προς τη θέση πρόσδεσης, όσο κυρίως η ικανότητα να ομοδιμερίζεται, ασφαλώς μέσω και της περιοχής O, ως προαπαιτούμενο για τη δημιουργία λειτουργικών διμερών για την πρόσδεση στο DNA. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται επίσης από το γεγονός ότι ετεροδιμερή της mδ με τις m7, m8 και m3 προσδένονται πολύ ισχυρότερα από το ομοδιμερές mδ/mδ, κάτι που θα ήταν αδύνατον αν η βασική περιοχή της mδ χαρακτηρίζονταν γενικά από χαμηλή συνάφεια για τα στοιχεία E_B.

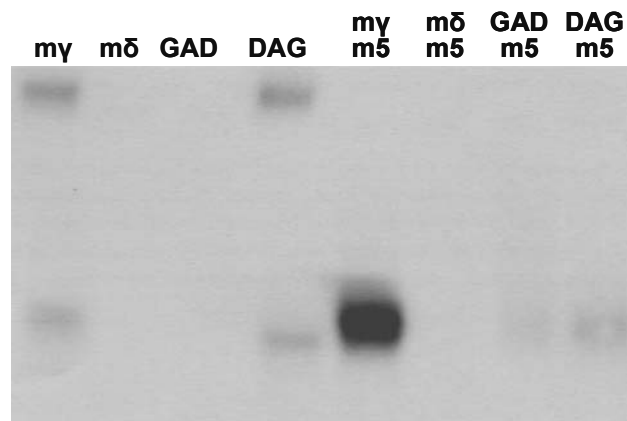


ΕΙΚΟΝΑ 3-2 Σχηματική αναπαράσταση των χιμαιρικών πρωτεϊνών GAD και DAG. Το μέγεθος των περιοχών bHLH και O είναι ακριβώς το ίδιο για τις πρωτεΐνες mγ και mδ (90 και 37 αμινοξέα αντίστοιχα), διαφέρει όμως η καρβοξυτελική περιοχή (CT), η οποία ούτως ή άλλως δεν είναι συντηρημένη ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας.

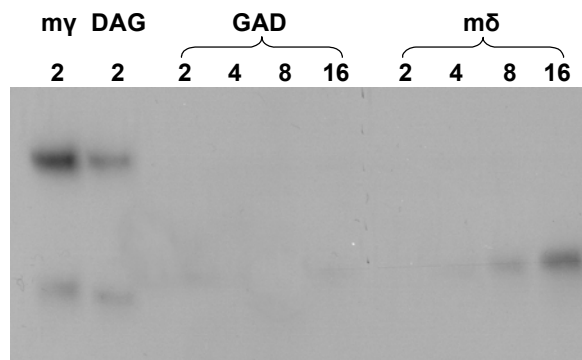
Στην εικόνα 3-7 φαίνεται ότι η mγ, αλλά όχι η mδ, μπορεί να προσδένεται ισχυρά σε θέσεις E_B ως ετεροδιμερές με την πρωτεΐνη m5. Ελέγχθηκε λοιπόν αν αυτή η ιδιότητα διατηρείται και για τις GAD και DAG. Φαίνεται ότι η ικανότητα να σχηματίζουν διμερή με την m5 με ικανότητα ισχυρής πρόσδεσης στο DNA δεν διατηρείται για καμία από τις δύο χιμαιρικές πρωτεΐνες (εικόνα 3-14). Το ετεροδιμερές GAD/m5 ίσως δε σχηματίζεται ικανοποιητικά, λόγω της παρουσίας της περιοχής O της mδ, αν και παρατηρούμε ελαφρώς ισχυρότερη πρόσδεση σε σχέση με το mδ/m5, ίσως λόγω της παρουσίας της περιοχής HLH

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

της $m\gamma$. Πάντως, το αντίστοιχο ετεροδιμερές $m\gamma/m5$, που περιέχει τον ίδιο συνδυασμό περιοχών bHLH, προσδένεται ισχυρά. Το ετεροδιμερές DAG/ $m5$ είτε δεν δημιουργείται (λόγω της περιοχής HLH της $m\delta$), είτε η ικανότητα πρόσδεσής του είναι φτωχή, καθώς περιέχει τις βασικές περιοχές των $m5$ και $m\delta$, που είναι από τις πλέον ανενεργές πρωτεΐνες, όσον αφορά την πρόσδεσή τους ως ομοδιμερή. Και αυτό όμως προσδένεται λίγο ισχυρότερα από το $m\delta/m5$, ίσως λόγω της παρουσίας της περιοχής O της $m\gamma$. Πρέπει να σημειωθεί πάντως ότι η πρωτεΐνη GAD προσδένεται γενικά πιο αδύναμα από την $m\delta$, όπως φαίνεται στην εικόνα 3-15. Συνεπώς, για το σχηματισμό διμερών με ισχυρή ικανότητα πρόσδεσης στο DNA απαιτείται συνδυασμένη δράση των περιοχών bHLH και O.



ΕΙΚΟΝΑ 3-3 Πρόσδεση των $m\gamma$ και $m\delta$, όπως και των χιμαιρικών μορφών τους, ως ομοδιμερή και ετεροδιμερή με την $m5$ σε σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο E_B , όπως υποδεικνύεται σε κάθε διαδρομή. 2 μ l από κάθε αντίδραση σύνθεσης έχουν χρησιμοποιηθεί σε κάθε δοκιμασία πρόσδεσης, με τα ετεροδιμερή να έχουν συντεθεί μαζί σε κοινή σύνθεση.



ΕΙΚΟΝΑ 3-4 Πρόσδεση αυξανόμενων ποσοτήτων των πρωτεϊνών GAD και $m\delta$ σε σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο E_B . Οι σχετικές ποσότητες αναφέρονται στα μ l από κάθε αντίδραση σύνθεσης, που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε αντίδραση πρόσδεσης. 1 μ l περιέχει περίπου 2ng πρωτεΐνη. Παρατηρούμε ότι η GAD έχει μικρότερη συνάφεια πρόσδεσης από την $m\delta$ και προσδένεται πολύ αδύναμα, ακόμη και όταν χρησιμοποιείται σε μεγάλες ποσότητες.

ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΡΟΣ

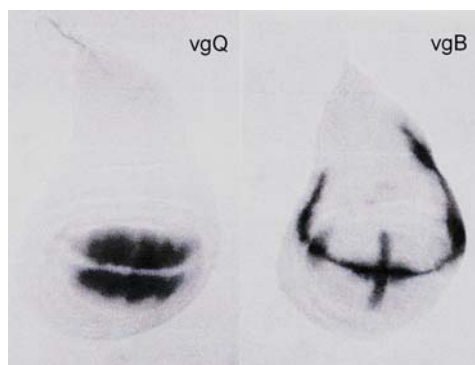
3.2 Μελέτη της πρόσδεσης των πρωτεϊνών bHLH της οικογένειας E(spl) στο DNA in vivo

Ο ρόλος των πρωτεϊνών bHLH της οικογένειας E(spl) είναι γενικά γνωστός όσον αφορά την καταστολή της νευρικής τύχης στα πλαίσια της ανάπτυξης του ΚΝΣ και ΠΝΣ της δροσόφιλας, όπως και για τον καθορισμό των φλεβώσεων του φτερού. Εντούτοις, πολλές λεπτομέρειες για το μηχανισμό με τον οποίο επιφέρουν μεταγραφική καταστολή παραμένουν άγνωστες. Βασικό ερώτημα αποτελεί ο βιολογικός ρόλος και η συνεισφορά της άμεσης πρόσδεσης στο DNA για τη στρατολόγηση σε ενισχυτές-στόχους, σε συνδυασμό με την καλά χαρακτηρισμένη ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν φυσικά με ενεργοποιητές όταν οι τελευταίοι είναι προσδεδεμένοι στο DNA. Στην προηγούμενη ενότητα αποτελεσμάτων αποδείχθηκε ότι και οι επτά πρωτεΐνες μπορούν να προσδένονται σε καθορισμένες αλληλουχίες ως ομο- και ετεροδιμερή, επομένως θα πρέπει να διερευνηθεί και κατά πόσο η πρόσδεση στο DNA αποτελεί πραγματικό μηχανισμό δράσης in vivo. Ένα ακόμη ουσιαστικό ζήτημα αποτελεί το ερώτημα περί λειτουργικής εξειδίκευσης ή πλεονασμού ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, έχει ήδη αποσαφηνιστεί ότι οι επτά πρωτεΐνες προσδένονται στα στοιχεία $E_{B/C}$ με διακριτή συνάφεια ως ομο- και ετεροδιμερή. Αυτό φαίνεται να οφείλεται τόσο στην ιδιότητά τους να σχηματίζουν διμερή με συγκεκριμένες προτιμήσεις, όσο και σε εγγενή διαφοροποίηση στην ικανότητα πρόσδεσης σε αλληλουχίες-στόχους. Έχει επίσης διαφανεί ότι μεμονωμένες πρωτεΐνες δεν επιδεικνύουν προτίμηση για συγκεκριμένα στοιχεία τύπου E_C in vitro, όλες δηλαδή προσδένονται στα ίδια στοιχεία, αλλά με διαφορετική συνάφεια. Για την περαιτέρω διερεύνηση και αξιολόγηση των παραπάνω δεδομένων in vivo, αναπτύξαμε ένα σύστημα για τη μελέτη της ειδικότητας πρόσδεσης, αλλά και του ρόλου που παίζει η άμεση πρόσδεση στο DNA για τη μεταγραφική καταστολή από τις πρωτεΐνες E(spl).

3.2.1 Ο ενισχυτής *vestigial quadrant* (vgQ)

Το γονίδιο *vestigial* (*vg*) εκφράζεται αποκλειστικά στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού και θεωρείται κρίσιμο για την ανάπτυξη των φτερών της δροσόφιλας. Η έλλειψή του προκαλεί απώλεια ιστού, βασικά λόγω αδυναμίας των κυττάρων του φτερού να πολλαπλασιαστούν. Η εκτοπική του έκφραση σε άλλους αναπτυξιακούς δίσκους κατά τα προνομφικά στάδια της μύγας οδηγεί σε σχηματισμό εκτοπικών κυττάρων φτερού. Η πρωτεΐνη *vestigial* (*Vg*) δεν εμφανίζει ομόλογες σε άλλους οργανισμούς και αποτελεί μεταγραφικό συνενεργοποιητή. Λειτουργεί ως σύμπλοκο με την πρωτεΐνη *Scalloped* (*Sd*), η οποία έχει την ικανότητα να προσδένεται στο DNA, παρέχοντας έτσι πρόσβαση στην *Vg* για την ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων (Bray, 1999).

Το *vg* εκφράζεται κατά το τρίτο προνομφικό στάδιο σε όλα τα κύτταρα του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού που προορίζονται να δώσουν το μελλοντικό φτερό, όχι όμως και στα κύτταρα που αντιστοιχούν στο μελλοντικό θώρακα. Η έκφρασή του βασίζεται σε δύο ενισχυτές. Ο ενισχυτής *vestigial Boundary* (*vgB*) βρίσκεται στο δεύτερο ιντρόνιο του γονιδίου και εκφράζεται αρχικά κατά το δεύτερο προνομφικό στάδιο κυρίως κατά μήκος του NK συνόρου, ενώ μικρή έκφραση παρατηρείται και εκατέρωθεν του προσθοπίσθιου (ΠΟ) άξονα, κοντά στο NK σύνορο (εικόνα 3-16). Η έκφραση του ενισχυτή *vgB* εξαρτάται άμεσα από το μονοπάτι του *N*, καθώς φέρει μία θέση πρόσδεσης για *Su(H)* απαραίτητη για την ενεργοποίηση (Williams et al., 1994, Kim et al., 1996). Η έκφραση του ενισχυτή *Quadrant*, *vgQ*, ο οποίος βρίσκεται στο τέταρτο ιντρόνιο του γονιδίου, ξεκινά αργότερα, στο πρώιμο τρίτο προνομφικό στάδιο, από τα κύτταρα που βρίσκονται κοντά στο σημείο τομής των δύο αξόνων (NK και ΠΟ). Προοδευτικά και μέχρι το τέλος του τρίτου προνομφικού σταδίου η έκφρασή του εξαπλώνεται σε ολόκληρη την περιοχή του δίσκου που θα δώσει το μελλοντικό φτερό, αποκλείεται όμως από τα κύτταρα του NK συνόρου, ενώ και κατά μήκος του ΠΟ άξονα η έκφρασή του είναι ελαφρώς μειωμένη (Kim et al., 1996, εικόνα 3-16). Για την έκφραση του ενισχυτή *vgQ* είναι υπεύθυνα σήματα που προέρχονται από πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια. Έχει δειχθεί ότι η δροσοφιλική πρωτεΐνη *Mad*, που αποτελεί τον πυρηνικό τελεστή του *Dpp*, προσδένεται στον ενισχυτή και είναι απαραίτητη για την ενεργοποίησή του (Kim et al., 1997). Επίσης απαιτείται το σηματοδοτικό μονοπάτι του *Wg*, του EGF καθώς και η πρωτεΐνη *drifter* (*Dfr*), μεταγραφικός παράγοντας τύπου POU-homeodomain, που επίσης προσδένεται άμεσα στον ενισχυτή (Certel et al., 2000, Nagaraj et al., 1999, Kim et al., 1996, Zecca et al., 1996). Επιπλέον, απαραίτητη είναι μια θετική ανατροφοδότηση από το ίδιο το σύμπλοκο *Vg/Sd* (Halder et al., 1998, Paymard-Rigal et al., 1998, Simmonds et al., 1998). Για την έλλειψη έκφρασης του ενισχυτή στα κύτταρα του NK συνόρου, έχει προταθεί ότι υπεύθυνη είναι η έλλειψη του παράγοντα *Dfr*, ο οποίος απουσιάζει στην περιοχή αυτή (Certel et al., 2000).



ΕΙΚΟΝΑ 3-5 Τα πρότυπα έκφρασης των ενισχυτών *vgQ* και *vgB* στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού κατά το όψιμο τρίτο προνυμφικό στάδιο (από Ligoxygakis et al., 1999).

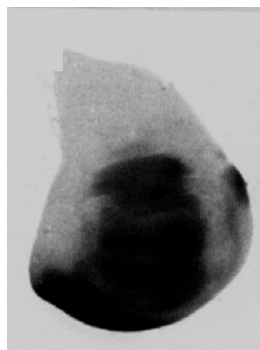
Η πρώτη ένδειξη για συμμετοχή του μονοπατιού του *N* στη μεταγραφική ρύθμιση του ενισχυτή *vgQ* προήλθε από τη χρήση θερμοευαίσθητων μεταλλαγών του *N*, που οδήγησαν σε αποκαταστολή του ενισχυτή στο NK σύνορο. Ο ρόλος του *N* στη δημιουργία του NK συνόρου του φτερού είναι καλά μελετημένος. Επιπλέον, η εκτοπική έκφραση κάποιων από τα μέλη της οικογένειας των γονιδίων bHLH του συμπλόκου *E(spl)*, συγκεκριμένα των *m3* και *my*, τα οποία εκφράζονται στο NK σύνορο σε απόκριση του *N*, βρέθηκε να οδηγεί σε καταστολή του ενισχυτή (Ligoxygakis et al., 1999). Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι ο ενισχυτής φέρει μία πιθανή θέση πρόσδεσης E_C (aggCACGCGgca) για τις πρωτεΐνες *E(spl)*, τα παραπάνω δεδομένα μας παρακίνησαν να διερευνήσουμε το ρόλο που παίζουν οι πρωτεΐνες *E(spl)* στη μεταγραφική ρύθμιση του *vgQ*, με έμφαση στο κατά πόσο η άμεση, απευθείας πρόσδεση στο DNA είναι υπεύθυνη για τη συγκεκριμένη δράση. Στα πλαίσια της προσπάθειας αυτής, καταρχάς δημιουργήθηκαν μιτωτικοί κλώνοι από τους οποίους απουσίαζε ολόκληρο το γονιδιακό σύμπλοκο *E(spl)*. Όταν οι κλώνοι αυτοί διέρχονταν ή εφάπτονταν με το NK σύνορο, δεν παρατηρήθηκε αποκαταστολή του ενισχυτή στα κύτταρα του συνόρου (Κ.Κ., προσωπικές παρατηρήσεις). Επιπλέον, η μεταλλαγή του μοναδικού στοιχείου E_C του ενισχυτή, με τρόπο που το καθιστά μη λειτουργικό, δεν επηρεάζει το χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης του ενισχυτή (εικόνα 3-19). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι πιθανότατα, όπως έχει ήδη δειχθεί, υπεύθυνη για την έλλειψη έκφρασης του *vgQ* στο NK σύνορο πρέπει να θεωρηθεί η έλλειψη του ενεργοποιητή *Dfr* και όχι η παρουσία των καταστολέων *E(spl)*. Ίσως οι παράγοντες *E(spl)* να αποτελούν απλά μια ασφαλιστική δικλείδα που αποτρέπει την έκφραση του ενισχυτή στην περιοχή αυτή, κάτι τέτοιο όμως είναι δύσκολο να αποδειχθεί. Εντούτοις, το γεγονός ότι η εκτοπική έκφραση ορισμένων πρωτεϊνών *E(spl)* οδηγεί σε καταστολή, μας ώθησε να χρησιμοποιήσουμε τον ενισχυτή *VgQ* ως ένα τεχνητό σύστημα μελέτης του ρόλου που παίζει η άμεση πρόσδεση στο DNA για την καταστολή από τις πρωτεΐνες *E(spl)*. Σε πρώτη φάση, έγινε προσπάθεια να διερευνηθεί αν η καταστολή του ενισχυτή, που παρατηρείται σε συνθήκες υπερέκφρασης των *E(spl)*, εξαρτάται από την άμεση πρόσδεση στο στοιχείο E_C που αυτός φέρει. Αν αυτό

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

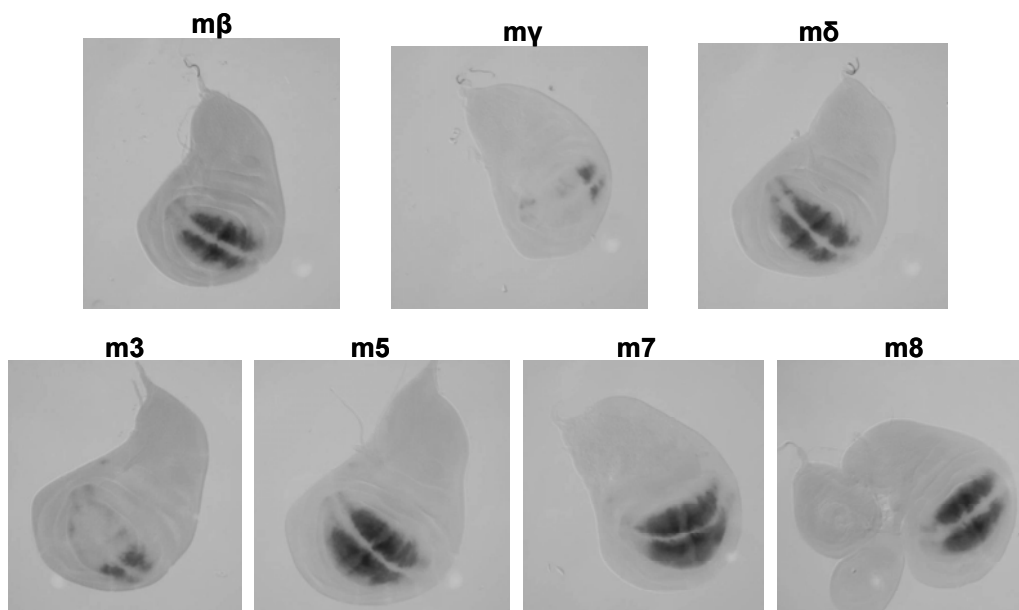
ισχύει, μπορούν να αποσαφηνιστούν πλέον *in vivo* οι προϋποθέσεις που οδηγούν σε ειδική πρόσδεση από κάποια από τα μέλη της οικογένειας και όχι από άλλα. Πρέπει να τονιστεί ότι είναι ουσιαστικά η πρώτη φορά που μία συγκεκριμένη θέση πρόσδεσης φαίνεται να παίζει ρόλο για τη μεταγραφική καταστολή από τις E(spl) *in vivo*, έστω και σε συνθήκες υπερέκφρασης (Culi and Modolell 1998, Giagtzoglou et al., 2003, Giebel and Campos-Ortega 1997). Επιπλέον, είναι σημαντικό το γεγονός ότι όλες οι μέχρι τώρα μελέτες σχετικά με το μηχανισμό δράσης από τις E(spl) αφορούσαν τη λειτουργία τους στα πλαίσια της ανάπτυξης του νευρικού συστήματος στη μύγα. Από την άλλη πλευρά, ο ενισχυτής *vgQ* αποτελεί ένα σύστημα μελέτης απολύτως ανεξάρτητο από τη νευρογένεση, επομένως προσφέρεται η δυνατότητα να προσεγγίσουμε το ρόλο της πρόσδεσης στο DNA για την καταστολή από E(spl) *in vivo* χωρίς να εμπλέκονται οι προνευρικοί παράγοντες, οι οποίοι καθιστούν τα αποτελέσματα άλλων, παρόμοιων εργασιών πιο πολύπλοκα και, μερικές φορές, ασαφή.

3.2.2 Μόνο δύο από τις επτά πρωτεΐνες E(spl) μπορούν σε υπερέκφραση να καταστέλλουν τον ενισχυτή *vgQ*

Χρησιμοποιώντας το σύστημα GAL4-UAS (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι), υπερεκφράσαμε εκτοπικά στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού κάθε μία από τις επτά πρωτεΐνες E(spl), ελέγχοντας μάλιστα και διαφορετικές, ανεξάρτητες διαγονιδιακές σειρές για κάθε UAS-E(spl). Η μεταγραφική ενεργότητα του ενισχυτή *vgQ* προσδιορίζεται από μια απλή αντίδραση χρώσης β-γαλακτοσιδάσης, καθώς υπό τον έλεγχο του ενισχυτή τέθηκε το γονίδιο LacZ (*vgQ*-LacZ). Επιβεβαιώσαμε έτσι τα αποτελέσματα από τους (Ligoxygakis et al., 1999) ότι μόνο οι πρωτεΐνες E(spl)*mγ* και *m3* έχουν την ικανότητα να καταστέλλουν τον *vgQ* (εικόνα 3-18).



ΕΙΚΟΝΑ 3-6 Η περιοχή έκφρασης του οδηγού *omb*-GAL4, που χρησιμοποιήθηκε σε πολλά από τα πειράματα υπερέκφρασης.



ΕΙΚΟΝΑ 3-7 Υπερέκφραση των επτά πρωτεϊνών E(spl) στο δίσκο του φτερού σε προνύμφες τρίτου σταδίου υπό τον έλεγχο του οδηγού omb-GAL4. Καταστολή του ενισχυτή vgQ παρατηρείται μόνο από τις mγ και m3. Η διάρκεια της αντίδρασης χρώσης ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 15 λεπτά.

Η προτίμηση που παρατηρείται *in vivo* διαφέρει από την αντίστοιχη που είδαμε *in vitro*, χρησιμοποιώντας ως σημασμένο ανιχνευτή την ίδια θέση πρόσδεσης E_C που περιέχει ο ενισχυτής vgQ. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3-4, οι πρωτεΐνες που προσδέθηκαν πιο ισχυρά στην ίδια θέση *in vitro* ήταν οι mβ, mγ και m7, ενώ *in vivo* φαίνεται να καταστέλλουν μόνο οι mγ και m3, πρέπει λοιπόν να διερευνηθεί κατά πόσον η καταστολή που παρατηρείται στον ενισχυτή vgQ εξαρτάται από την πρόσδεση στο συγκεκριμένο στοιχείο ή όχι.

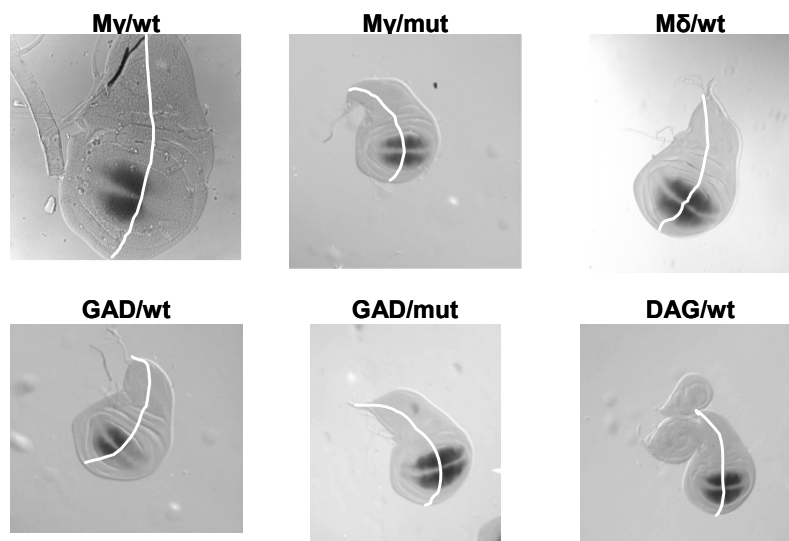
3.2.3 Η καταστολή του vgQ από την mγ εξαρτάται από την πρόσδεση στο στοιχείο E_C

Για μια αρχική διερεύνηση του ρόλου που παίζει το στοιχείο E_C στην καταστολή που επιφέρει η mγ, δημιουργήθηκε, όπως αναφέρθηκε ήδη πιο πάνω, μία μεταλλαγμένη μορφή του ενισχυτή vgQ, στην οποία τρία από τα έξι νουκλεοτίδια του πυρήνα του στοιχείου E_C έχουν αντικατασταθεί, καταστρέφοντάς το (βλέπε εικόνα 3-22). Στην εικόνα 3-19 φαίνεται ότι ο μεταλλαγμένος ενισχυτής vgQ(mut) δεν είναι πλέον καταστάσιμος από την mγ. Αυτό υποδηλώνει ότι για την καταστολή από mγ είναι απαραίτητη η παρουσία του συγκεκριμένου στοιχείου.

Για να χαρτογραφήσουμε την περιοχή της mγ που είναι υπεύθυνη για την καταστολή, χρησιμοποιήσαμε τις χιμαιρικές πρωτεΐνες GAD και DAG που περιγράφηκαν παραπάνω (βλέπε Αποτελέσματα, παράγραφο 3.1.5). Εφόσον η mγ μπορεί να καταστέλλει τον vgQ ενώ

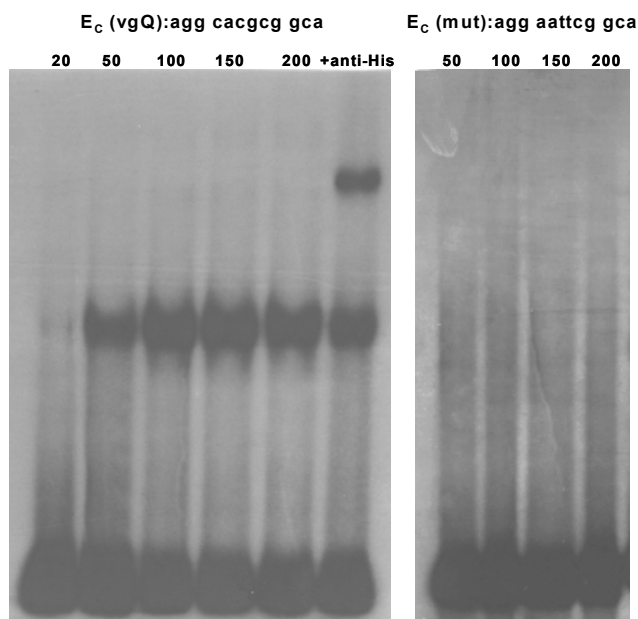
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

η *mδ* όχι, η υπερέκφραση των GAD και DAG μπορεί να υποδείξει σε πρώτη φάση την περιοχή της *mg* που είναι υπεύθυνη για την καταστολή. Στην εικόνα 3-19 φαίνεται λοιπόν ότι η GAD μπορεί να καταστέλλει τον *vgQ* εξίσου καλά, όσο και η *mg*, ενώ η DAG όχι. Αυτό σημαίνει καταρχάς ότι υπεύθυνη για την καταστολή πρέπει να θεωρηθεί η περιοχή *bHLH*, που περιλαμβάνει την βασική περιοχή, η οποία έρχεται σε επαφή με το DNA. Είναι αξιοσημείωτη η παρατήρηση ότι στο *in vivo* σύστημα η GAD μιμείται τη δράση της *mg*, ενώ στα πειράματα πρόσδεσης *in vitro* η ίδια πρωτεΐνη φάνηκε να μη μπορεί να προσδεθεί το ίδιο αποτελεσματικά, προσομοιάζοντας περισσότερο στη δράση της *mδ*. Αυτό υποδηλώνει ότι πιθανότατα εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες, που υποβοηθούν ή σταθεροποιούν την πρόσδεση από τις *E(spl)* στο συγκεκριμένο ενισχυτή.



ΕΙΚΟΝΑ 3-8 Υπερέκφραση των πρωτεϊνών, όπως υποδηλώνεται σε κάθε εικόνα, στο δίσκο του φτερού υπό τον έλεγχο του οδηγού *en-GAL4*, ο οποίος κατευθύνει την έκφραση του *GAL4* σε όλο το οπίσθιο διαμέρισμα του φτερού, το οποίο διαχωρίζεται με μία γραμμή από το εμπρόσθιο τμήμα σε όλες τις εικόνες (βλέπε και εικόνα 1-1). Η διάρκεια της αντίδρασης χρώσης ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 15 λεπτά. Παρατηρούμε ότι ο μεταλλαγμένος ενισχυτής (*mut*), στον οποίο έχει καταστραφεί η θέση πρόσδεσης *E_C*, εκφράζεται όπως και ο αγρίου τύπου (*wt*) και δεν καταστέλλεται πλέον από την *mg*. Παρατηρούμε επίσης ότι ο αγρίου τύπου ενισχυτής μπορεί να καταστέλλεται από την GAD, αλλά όχι από την DAG.

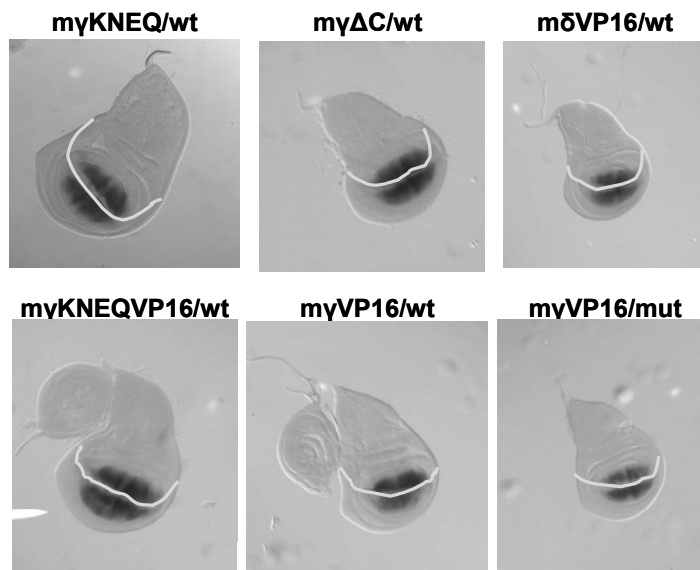
Για να ελέγξουμε αν υπάρχει πρόσδεση εκ μέρους των *E(spl)* και σε άλλες, μη κανονικές θέσεις πέραν του συγκεκριμένου στοιχείου *E_C*, αποφασίσαμε να ελέγξουμε την πρόσδεση της *mg* *in vitro* σε τμήμα του ενισχυτή, με άθικτη ή μεταλλαγμένη τη θέση *E_C*. Σε πειράματα υστέρησης κινητικότητας, η πρωτεΐνη *mg* παραγόμενη από βακτηριακά κύτταρα μπορεί να προσδένεται σε ένα ραδιοσημασμένο τμήμα 150 bp του ενισχυτή, όταν αυτό περιλαμβάνει το άθικτο στοιχείο *E_C*, αλλά όχι τη μεταλλαγμένη μορφή του (εικόνα 3-20).



ΕΙΚΟΝΑ 3-20 Πρόσδεση αυξανόμενης ποσότητας της βακτηριακά παραγόμενης *mg* ως ομοδιμερές σε ραδιοσημασμένο τμήμα του ενισχυτή *vgQ* μήκους 150 bp, στο μέσο περίπου του οποίου βρίσκεται το στοιχείο E_c . Το ίδιο τμήμα DNA χρησιμοποιήθηκε επίσης με μεταλλαγμένη τη θέση E_c για να ελεγχθεί η πρόσδεση της *mg*. Σε κάθε διαδρομή αναφέρεται η ποσότητα της πρωτεΐνης σε ng. Η πρωτεΐνη φέρει αμινοτελικά τον επίτοπο 6XHis και στην τελευταία διαδρομή έχει προστεθεί αντίσωμα anti-His, μετά την επώαση της *mg* με το DNA. Παρατηρούμε πρόσδεση μόνο παρουσία της φυσιολογικής θέσης πρόσδεσης, αλλά όχι της μεταλλαγμένης.

Για την περαιτέρω ισχυροποίηση του δεδομένου ότι η καταστολή του *vgQ* από την *mg* εξαρτάται από την πρόσδεση της πρωτεΐνης στο στοιχείο E_c που φέρει ο ενισχυτής, υπερεκφράσαμε τη μεταλλαγμένη μορφή της *mg* (*mgKNEQ*), που έχει δείχθει ότι αδυνατεί να προσδεθεί στο DNA (Jimenez and Ish-Horowitz, 1997 και βλέπε Αποτελέσματα, παράγραφος 3.1.5), η οποία αποδείχθηκε ανίκανη να καταστείλει τον ενισχυτή (εικόνα 3-21). Επιπλέον, το γεγονός ότι η πρωτεΐνη *mgVP16* (η οποία λειτουργεί ως μεταγραφικός ενεργοποιητής, βλέπε Εισαγωγή, παράγραφος 1.5.5.3) μπορεί να υπερενεργοποιεί τον ενισχυτή, σημαίνει ότι η καταστολή που επιφέρει η *mg* πραγματοποιείται άμεσα και όχι έμμεσα, απομακρύνοντας λόγω χάρη κάποιους ενεργοποιητές από το DNA. Σε αυτήν την περίπτωση, θα περιμέναμε την *mgVP16* να έχει επίσης κατασταλτική δράση, όπως και η αγρίου τύπου *mg*. Σε συμφωνία με αυτό, η ενεργοποιητική μορφή της *mg* που όμως δεν μπορεί να προσδεθεί στο DNA (*mgKNEQVP16*) αδυνατεί να ενεργοποιήσει τον ενισχυτή (εικόνα 3-21). Τέλος, δείξαμε ότι για την καταστολή από *mg* είναι απαραίτητος ο γενικός συγκαταστολέας *gro*, καθώς μία μορφή της *mg*, η *mgΔC*, από την οποία απουσιάζει το καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης, που περιλαμβάνει την περιοχή *WRPW*, υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με το *gro*, αδυνατεί να καταστείλει τον ενισχυτή (εικόνα 3-21). Αυτό επίσης υποδηλώνει ότι πρόκειται για περίπτωση άμεσης καταστολής, που βασίζεται στην στρατολόγηση του *gro* στον ενισχυτή.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



ΕΙΚΟΝΑ 3-21 Υπερέκφραση των μεταλλαγμένων μορφών των *my* και *mδ* στο δίσκο του φτερού, υπό τον έλεγχο του οδηγού *ap-GAL4*, ο οποίος οδηγεί την έκφραση του *GAL4* στο νωτιαίο διαμέρισμα του δίσκου, το οποίο διαχωρίζεται με μία γραμμή από το κοιλιακό διαμέρισμα σε όλες τις εικόνες (βλέπε και εικόνα 1-1). Η διάρκεια της αντίδρασης χρώσης ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 15 λεπτά. Παρατηρούμε ότι η *myVP16* μπορεί να ενεργοποιεί τον αγρίου τύπου (*wt*), αλλά όχι τον μεταλλαγμένο (*mut*) ενισχυτή. Οι πρωτεΐνες *mδVP16* και *myKNEQVP16*, που δεν μπορούν να προσδεθούν στον ενισχυτή, αδυνατούν να τον ενεργοποιήσουν. Η πρωτεΐνη *myΔC* μπορεί να προσδεθεί, όμως αδυνατεί να στρατολογήσει το *gro*, που είναι απαραίτητο για την καταστολή.

3.2.4 Η δημιουργία και η έκφραση των ενισχυτών *vgQ* μ 1, μ 2 και μ 3

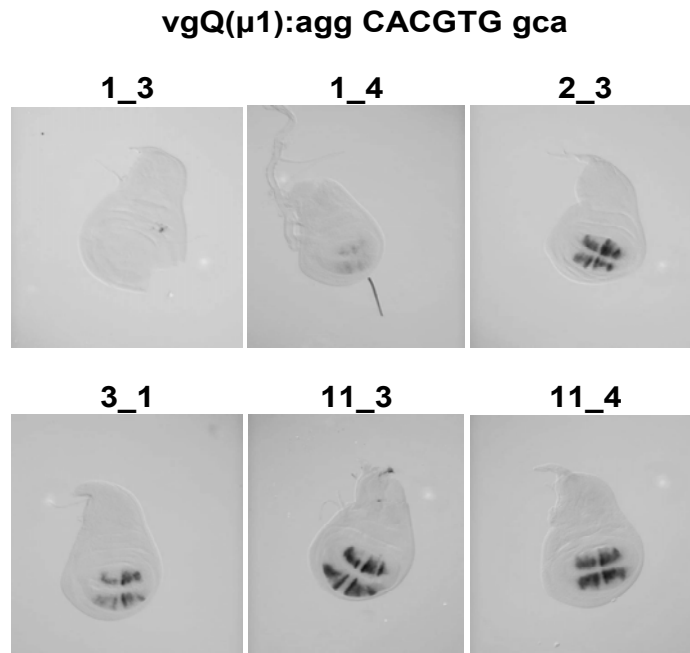
Προκειμένου να διερευνήσουμε την ειδικότητα πρόσδεσης από τις πρωτεΐνες *E(spl)* *in vitro*, κατασκευάσαμε με κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση μια σειρά από τροποποιημένους ενισχυτές *vgQ*, που διέφεραν μεταξύ τους αποκλειστικά στη μοναδική θέση πρόσδεσης για τις *E(spl)*. Πιο συγκεκριμένα, δημιουργήσαμε τρεις διαφορετικές μορφές του ενισχυτή, μελετώντας το ρόλο που παίζει τόσο ο πυρήνας του στοιχείου *E*, όσο και τα τρία νουκλεοτίδια εκατέρωθεν, η αλληλουχία των οποίων φαίνεται να είναι σημαντική για την πρόσδεση. Στην εικόνα 3-22 φαίνονται όλες οι διαφορετικές μορφές του ενισχυτή που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Σκοπός ήταν στο σημείο αυτό, αφενός να ελέγξουμε αν τα χαρακτηριστικά της πρόσδεσης που παρατηρήσαμε *in vitro* επαληθεύονται και *in vivo*, αφετέρου να εντοπίσουμε τις απαιτήσεις που έχουν οι επτά πρωτεΐνες *E(spl)* ως προς τις τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες που περιβάλλουν τον πυρήνα του στοιχείου *E*.

vgQ (αγρίου τύπου, wt)	→	agg CACGCG gca
vgQ (μεταλλαγμένος, mut)	→	agg AATTCG gca
vgQ μ1 (πυρήνας E _B , αρχικές περιβάλλουσες τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες)	→	agg CACGTG gca
vgQ μ2 (αρχικός πυρήνας E _C , ιδανικές περιβάλλουσες τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες)	→	tgg CACGCG cca
vgQ μ3 (πυρήνας E _B , ιδανικές περιβάλλουσες τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες)	→	tgg CACGTG cca
vgQ μ4 (στοιχείο E _C από τον ενισχυτή SMC)	→	tgc CACGCG tgc

ΕΙΚΟΝΑ 3-9 Αναφορά όλων των μορφών του ενισχυτή *vgQ* που χρησιμοποιήθηκαν, οι οποίοι διαφέρουν αποκλειστικά στο μοναδικό στοιχείο E που περιέχουν και στις εκατέρωθεν αυτού τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες.

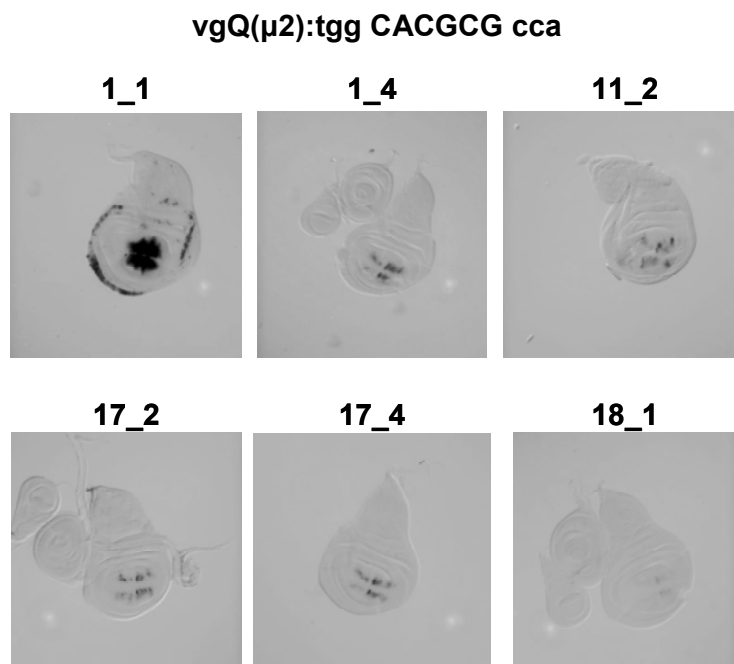
Στον ενισχυτή *vgQ*(μ1) το στοιχείο E_C έχει μετατραπεί σε E_B, διατηρώντας όμως τις αρχικές εκατέρωθεν τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες (aggCACGTGgca). Ο ενισχυτής *vgQ*(μ2) φέρει τον πυρήνα του στοιχείου E_C, το οποίο πλαισιώνεται από τις ιδανικές τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες (tggCACGCGcca), όπως αυτές προσδιορίστηκαν από τους (Jennings et al., 1999). Τέλος, ο ενισχυτής *vgQ*(μ3) φέρει ένα τέλειο δωδεκανουκλεοτιδικό παλίνδρομο, το λεγόμενο στοιχείο ESE (tggCACGTGcca), το οποίο αποτελεί τη θεωρητικά βέλτιστη θέση πρόσδεσης για E(spl) (Jennings et al., 1999). Οι τρεις ενισχυτές κλωνοποιήθηκαν μπροστά από το γονίδιο αναφοράς LacZ και στη συνέχεια οι πλασμιδιακές κατασκευές χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία διαγονιδιακών μυγών.

Όλες οι ανεξάρτητες διαγονιδιακές σειρές που προέκυψαν ελέγχθηκαν αρχικά ως προς το πρότυπο έκφρασης των τριών ενισχυτών σε γενετικό υπόβαθρο αγρίου τύπου, χωρίς ταυτόχρονη υπερέκφραση των *E(spl)*. Για τον ενισχυτή *vgQ*(μ1), παρατηρήσαμε ότι η έκφραση των τεσσάρων από τις συνολικά έξι ανεξάρτητες ενθέσεις ήταν πανομοιότυπη όσον αφορά στο χωροειδικό πρότυπο με αυτήν του αγρίου τύπου ενισχυτή, αλλά πολύ ασθενέστερη ποσοτικά από αυτόν. Δυό ενθέσεις έδειξαν ακόμη ασθενέστερη ή και μηδενική έκφραση (εικόνα 3-23).



ΕΙΚΟΝΑ 3-10 Έκφραση των ανεξάρτητων σειρών του ενισχυτή vgQ(μ1). Η διάρκεια της χρώσης β-γαλακτοσιδάσης ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 6 ώρες.

Όσον αφορά τον ενισχυτή vgQ(μ2), προέκυψαν επίσης έξι ανεξάρτητες διαγονιδιακές σειρές, τα επίπεδα της έκφρασης των οποίων ήταν ακόμη χαμηλότερα από αυτά των ενισχυτών vgQ(μ1), αν και δεν έχει αλλοιωθεί η χωροειδικότητα της έκφρασης. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3-24, πέντε από τις έξι ενθέσεις εμφανίζουν πολύ χαμηλή ή και καθόλου έκφραση και μόνο η σειρά vgQ(μ2)1_1 φαίνεται να εκφράζεται ισχυρά με το γνωστό πρότυπο. Και σε αυτή τη σειρά πάντως η ενεργοποίηση του ενισχυτή επιτυγχάνεται με δυσκολία, καθώς η έκφρασή του περιορίζεται πιο κεντρικά στο χώρο του φτερού σε σχέση με τον αγρίου τύπου ενισχυτή. Αυτό υποδηλώνει ότι απαιτείται μεγαλύτερη συγκέντρωση των ενεργοποιητικών σημάτων που προέρχονται από το NK και το ΠΟ σύνορο του δίσκου του φτερού, τα οποία είναι γνωστό ότι είναι απαραίτητα για την έκφραση του ενισχυτή (Kim et al., 1996, Kim et al., 1997).

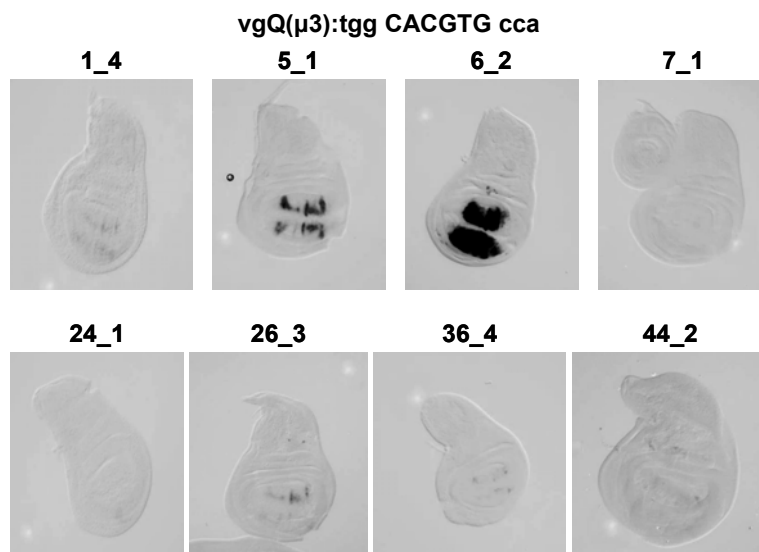


ΕΙΚΟΝΑ 3-11 Έκφραση των ανεξάρτητων σειρών του ενισχυτή *vgQ(μ2)*. Η διάρκεια της χρώσης β-γαλακτοσιδάσης ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 6 ώρες.

Ακόμα χαμηλότερη έως μηδενική έκφραση παρατηρήσαμε για τους ενισχυτές *vgQ(μ3)*, όπου δημιουργήσαμε οκτώ ανεξάρτητες διαγονιδιακές σειρές, η έκφραση των οποίων φαίνεται στην εικόνα 3-25. Παρατηρούμε ότι οι περισσότεροι ενισχυτές είναι σχεδόν πλήρως κατασταλμένοι, με εξαίρεση τους 6_2 και 5_1, με τον τελευταίο να εκφράζεται σχετικά αδύναμα. Ειδικά ο ενισχυτής 6_2 διαφέρει αισθητά από τους υπόλοιπους και η ισχυρή του έκφραση πιθανότατα οφείλεται σε παγίδευση κάποιου ενισχυτή στην περιοχή της ένθεσης. Σε κάθε περίπτωση πάντως, η έκφραση των ενισχυτών περιορίζεται στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού, στην περιοχή που θα δώσει το μελλοντικό φτερό. Η αδυναμία έκφρασης στις περισσότερες ενθέσεις των τριών ενισχυτών, και κυρίως των *vgQ(μ2)* και *vgQ(μ3)*, θα πρέπει μάλλον να αποδοθεί στην ύπαρξη ενός άγνωστου ισχυρού καταστολέα, ο οποίος προσδένεται σε θέσεις E_B και E_C , καταστέλλοντας τη μεταγραφή από ρυθμιστικές περιοχές που περιέχουν τέτοια στοιχεία. Το ίδιο φαινόμενο, της αδυναμίας έκφρασης ρυθμιστικών στοιχείων όταν αυτά περιέχουν θέσεις πρόσδεσης E_B , έχει παρατηρηθεί ξανά σε τουλάχιστον τρεις ακόμη ανεξάρτητες περιπτώσεις. Ο ενισχυτής *GbeB1* περιέχει, εκτός από θέσεις E_B , επιπλέον θέσεις πρόσδεσης για τον απανταχού εκφραζόμενο στο δίσκο του φτερού ενεργοποιητή *Grainyhead*, η έκφρασή του όμως στο δίσκο του φτερού σε αγρίου τύπου γενετικό υπόβαθρο είναι μηδενική (Jennings et al., 1999). Ομοίως, ενώ το γονίδιο αναφοράς *lacZ*, όταν αυτό τεθεί υπό τον έλεγχο πολλαπλών στοιχείων E_A , εκφράζεται στους προνευρικούς συναθροισμούς ενεργοποιούμενο από διμερή *Da/AS-C*, η συνύπαρξή του με στοιχεία E_B μηδενίζει την έκφραση αυτή (βλέπε παρακάτω, παράγραφος 3.3.1). Επιπλέον, σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης στη δροσοφιλική κυτταρική σειρά *S2*, παρατηρήθηκε

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

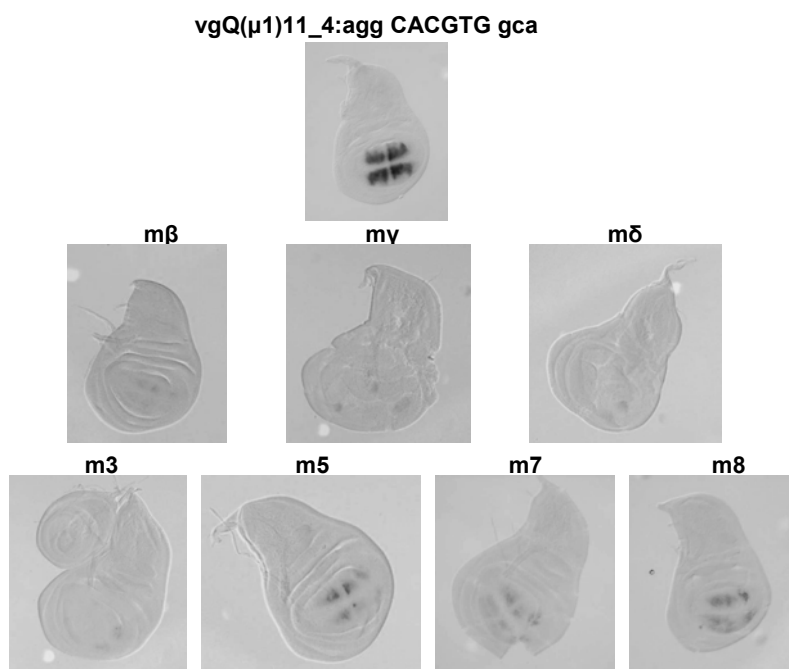
ότι η έκφραση πλασμιδίων αναφοράς, που περιέχουν διάφορους βασικούς υποκινητές οι οποίοι εκφράζονται σε μέτρια ή υψηλά επίπεδα, μηδενίζεται όταν συμπεριλαμβάνονται στοιχεία E_B (Κ.Κ., προσωπικές παρατηρήσεις). Για την ταυτότητα του παράγοντα που είναι υπεύθυνος για τις παραπάνω περιπτώσεις καταστολής (αν δεχτούμε ότι πρόκειται για τον ίδιο παράγοντα) μόνο υποθέσεις μπορούμε να κάνουμε, καθώς η ταυτοποίησή του ήταν έξω από τα πλαίσια αυτής της εργασίας. Δεν αποκλείεται να πρόκειται για τις ίδιες τις πρωτεΐνες $E(spl)$, από τη στιγμή που κάποιες από αυτές, όπως η $m\beta$, έχουν ευρεία έκφραση στο δίσκο του φτερού. Μπορεί όμως να είναι υπεύθυνοι και άλλοι, ανεξάρτητοι παράγοντες.



ΕΙΚΟΝΑ 3-12 Έκφραση των ανεξάρτητων σειρών του ενισχυτή $vgQ(\mu 3)$. Η διάρκεια της χρώσης β -γαλακτοσιδάσης ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 6 ώρες, εκτός από τον ενισχυτή 6_2 , που βάφτηκε μόνο για 15 λεπτά.

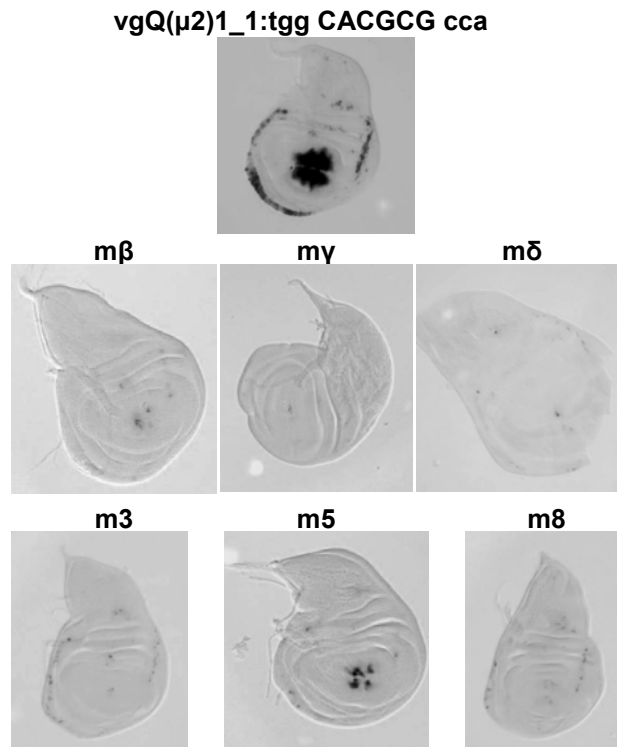
3.2.5 Οι πρωτεΐνες $E(spl)$ έχουν τη δυνατότητα να καταστέλλουν τους τροποποιημένους ενισχυτές vgQ in vivo

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η έκφραση των τροποποιημένων ενισχυτών σε συνθήκες εκτοπικής έκφρασης των γονιδίων $bHLH E(spl)$ στο δίσκο του φτερού, χρησιμοποιώντας το σύστημα GAL4-UAS. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3-26, και οι επτά πρωτεΐνες μπορούν να καταστέλλουν τον ενισχυτή $vgQ(\mu 1)11_4$, με τις $m\beta$, $m\gamma$, $m\delta$ και $m3$ να επιφέρουν κατάπι ισχυρότερη καταστολή. Την ίδια καταστολή παρατηρήσαμε και για τον ενισχυτή $vgQ(\mu 1)11_3$, ο οποίος επίσης ελέγχθηκε.



ΕΙΚΟΝΑ 3-13 Υπερέκφραση των πρωτεϊνών E(spl) υπό τον έλεγχο του οδηγού omb-GAL4. Παρατηρούμε ότι όλες μπορούν να καταστέλλουν τον ενισχυτή vgQ(μ1)11_4, ο οποίος φέρει ένα στοιχείο E_B που περιβάλλεται από τις αρχικές, μη ιδανικές τρινουκλεοτιδικές εκατέρωθεν αλληλουχίες. Η διάρκεια της χρώσης β-γαλακτοσιδάσης ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 6 ώρες.

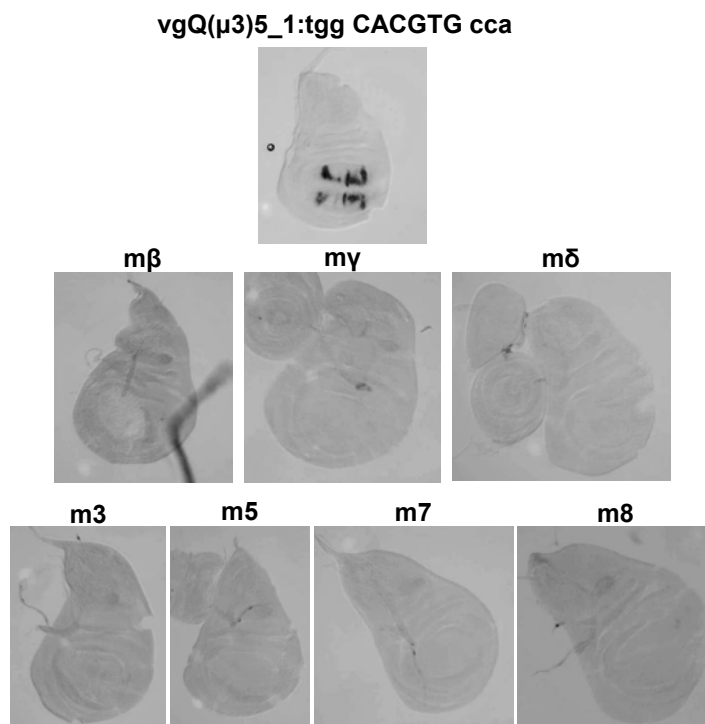
Το ίδιο αποτέλεσμα είχε και η υπερέκφραση των E(spl) στον ενισχυτή vgQ(μ2)1_1 (εικόνα 3-27). Μάλιστα, ενώ η συγκεκριμένη ένθεση του ενισχυτή εκφράζεται ιδιαίτερα ισχυρά σε συνθήκες αγρίου τύπου, η καταστολή που παρατηρήσαμε από όλες τις πρωτεΐνες E(spl) ήταν συγκριτικά ισχυρότερη από αυτήν που παρατηρήθηκε για τον ενισχυτή vgQ(μ1)11_4, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες που περιβάλλουν τον πυρήνα του στοιχείου E είναι καθοριστικές, ίσως ακόμη περισσότερο και από τον ίδιο τον πυρήνα, για τη συνάφεια της πρόσδεσης. Η πρωτεΐνη m5 αποτελεί, όπως φαίνεται, τον πιο αδύναμο καταστολέα.



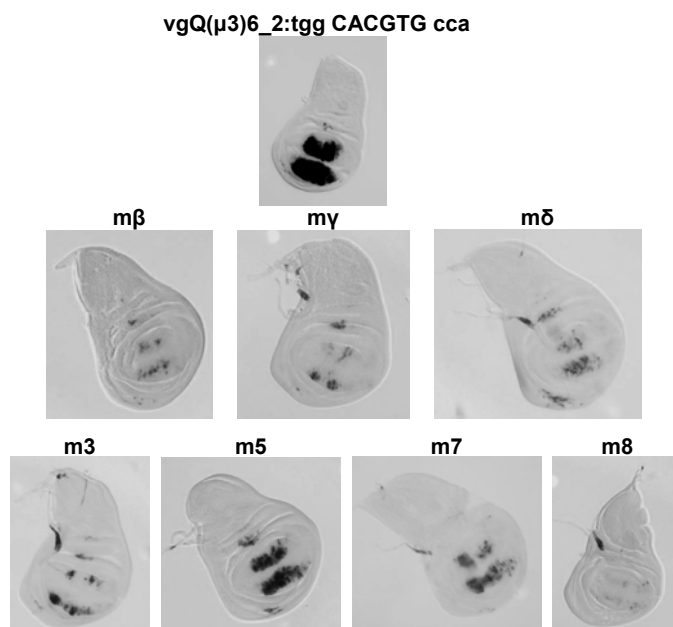
ΕΙΚΟΝΑ 3-14 Υπερέκφραση των πρωτεϊνών E(spl) υπό τον έλεγχο του οδηγού omb-GAL4. Παρατηρούμε ότι όλες (με πιο αδύναμη την m5) μπορούν να καταστέλλουν τον ενισχυτή vgQ(μ2)1_1, ο οποίος φέρει ένα στοιχείο E_c που περιβάλλεται από ιδανικές τρινουκλεοτιδικές εκατέρωθεν αλληλουχίες. Πλήρης καταστολή παρατηρήθηκε και από την m7, που απουσιάζει από τη συγκεκριμένη εικόνα. Η διάρκεια της χρώσης β-γαλακτοσιδάσης ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 6 ώρες.

Όλες οι πρωτεΐνες βρέθηκαν να καταστέλλουν τον ενισχυτή vgQ(μ3)5_1, τα επίπεδα έκφρασης όμως του οποίου είναι ούτως ή άλλως χαμηλά (εικόνα 3-28). Για το λόγο αυτό, ελέγχθηκε και η καταστολή που επιφέρεται από τις E(spl) στον ενισχυτή vgQ(μ3)6_2, ο οποίος εμφανίζει ασυνήθιστα υψηλά επίπεδα έκφρασης, σε σχέση με όλους τους άλλους ενισχυτές. Κι εδώ παρατηρήθηκε καταστολή από όλες τις E(spl), με τις m5 και m7 να εμφανίζονται σχετικά πιο αδύναμες (εικόνα 3-29).

Τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων μπορούν να συνοψιστούν ως εξής. Καταρχάς, και οι επτά πρωτεΐνες E(spl) μπορούν να καταστέλλουν τη μεταγραφή, τόσο ενδογενώς όσο και κατόπιν υπερέκφρασης, με τρόπο που εξαρτάται από την πρόσδεση σε καθορισμένες θέσεις στις ρυθμιστικές αλληλουχίες-στόχους. Υπάρχει δηλαδή για όλες η δυνατότητα άμεσης, εξαρτώμενης από την απευθείας πρόσδεση στο DNA καταστολής. Επίσης, επιβεβαιώνεται ότι τα στοιχεία E_B αποτελούν ισχυρότερες θέσεις πρόσδεσης σε σχέση με τα στοιχεία E_C, όπως είχαμε δείξει και *in vitro*, ενώ εξίσου σημαντική ενίσχυση στην παρατηρούμενη πρόσδεση επιφέρει η βελτιστοποίηση των τρινουκλεοτιδικών αλληλουχιών που περιβάλλουν το κυρίως στοιχείο.



ΕΙΚΟΝΑ 3-15 Υπερέκφραση των πρωτεϊνών E(spl) υπό τον έλεγχο του οδηγού omb-GAL4. Παρατηρούμε ότι όλες μπορούν να καταστέλλουν τον ενισχυτή vgQ(μ3)5_1, ο οποίος φέρει ένα στοιχείο E_B που περιβάλλεται από ιδανικές τρινουκλεοτιδικές εκατέρωθεν αλληλουχίες (στοιχείο ESE). Η διάρκεια της χρώσης β-γαλακτοσιδάσης ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 6 ώρες.

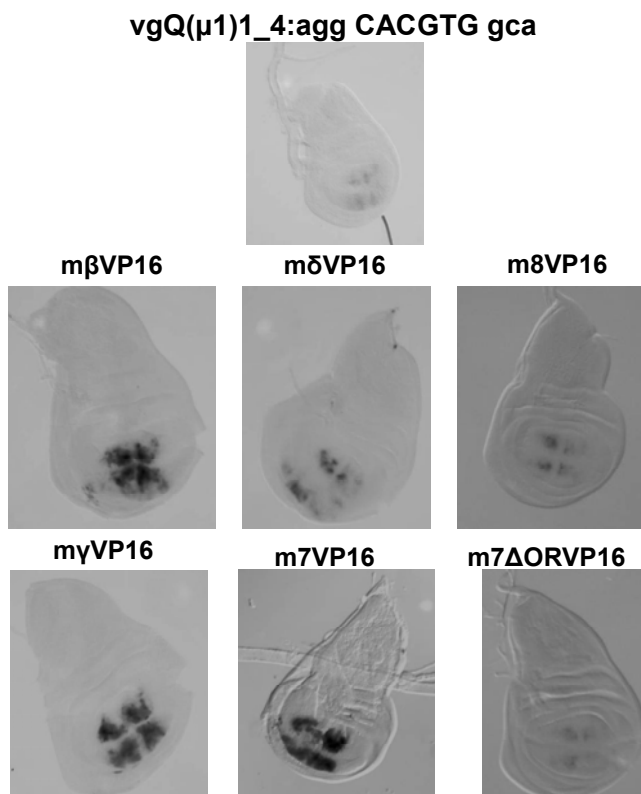


ΕΙΚΟΝΑ 3-16 Υπερέκφραση των πρωτεϊνών E(spl) υπό τον έλεγχο του οδηγού omb-GAL4. Παρατηρούμε ότι όλες (με πιο αδύναμη την m5) μπορούν να καταστέλλουν τον ενισχυτή vgQ(μ3)6_2, ο οποίος φέρει ένα στοιχείο E_B που περιβάλλεται από ιδανικές τρινουκλεοτιδικές εκατέρωθεν αλληλουχίες (στοιχείο ESE). Η διάρκεια της χρώσης β-γαλακτοσιδάσης ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 15 λεπτά.

3.2.6 Οι πρωτεΐνες E(spl)VP16 ενεργοποιούν τους ενισχυτές vgQ μ1, μ2 και μ3, προσδενόμενες άμεσα στο DNA

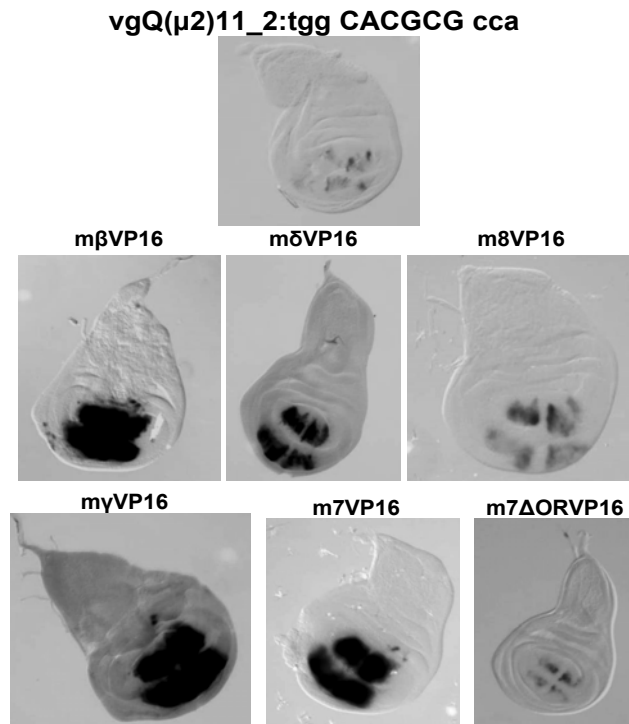
Είδαμε προηγουμένως ότι τα επίπεδα έκφρασης των περισσότερων τροποποιημένων ενισχυτών vgQ μ2 και μ3 ήταν ιδιαίτερα χαμηλά σε γενετικό υπόβαθρο αγρίου τύπου, γεγονός που, όπως ήδη συζητήθηκε, θα πρέπει μάλλον να αποδοθεί στη δράση κάποιου, απανταχού εκφραζόμενου στο δίσκο του φτερού, καταστολέα. Δε θα πρέπει λοιπόν να παραβλέψουμε το ενδεχόμενο, οι ενθέσεις των ενισχυτών στις ανεξάρτητες διαγονιδιακές σειρές που επιλέξαμε, δηλαδή τις μ1 11_4, μ2 1_1, μ3 6_2 και μ3 5_1, καθώς προφανώς έπρεπε να έχουν σχετικά υψηλά ενδογενή επίπεδα έκφρασης για να μπορούν να υποβληθούν σε δοκιμασίες καταστολής, να μην είναι στην πραγματικότητα τυχαίες και αντιπροσωπευτικές. Από τη στιγμή που οι περισσότερες ενθέσεις των τριών μορφών του ενισχυτή έχουν χαμηλή ή και μηδενική έκφραση, αποφασίσαμε να ελέγξουμε αν οι μορφές των E(spl), που φέρουν καρβοξυτελικά τον ιικό ενεργοποιητή VP16, έχουν τη δυνατότητα να προσδένονται στα στοιχεία E των ενισχυτών και να τους ενεργοποιούν. Για το σκοπό αυτό, επιλέξαμε σειρές με χαμηλή έκφραση, που αποτελούν και την πλειοψηφία, και μελετήσαμε την επίπτωση που είχε η εκτοπική έκφραση των E(spl)VP16, από τις οποίες πέντε από τις επτά ήταν διαθέσιμες.

Στην εικόνα 3-30 φαίνεται ότι οι πρωτεΐνες mβVP16, m7VP16 και mγVP16 μπορούν να ενεργοποιούν τον ενισχυτή vgQ(μ1)1_4, ενώ οι mδVP16 και m8VP16 επιφέρουν πολύ πιο αδύναμη ενεργοποίηση. Η διαφοροποίηση στην ισχύ της ενεργοποίησης δεν μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι οι mδVP16 και m8VP16 είναι γενικά χειρότεροι ενεργοποιητές, καθώς μπορούν να ενεργοποιούν το ίδιο καλά, όπως και οι υπόλοιπες τρεις, τον ενισχυτή GbeB1 (Νίκος Γιαγτζόγλου, Ιωάννα Ζαρίφη και Κ.Κ., προσωπικές παρατηρήσεις). Επιπλέον, η πρωτεΐνη m7ΔORVP16, από την οποία απουσιάζει η περιοχή O, δεν μπορεί να ενεργοποιήσει τον ενισχυτή vgQ(μ1)1_4. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα αποτελέσματα από τα πειράματα υστέρησης κινητικότητας *in vitro*, όπου είχαμε δει ότι η περιοχή O είναι απαραίτητη για την πρόσδεση, προφανώς γιατί είναι απαραίτητη για τον ομοδιμερισμό μεταξύ των πρωτεϊνών E(spl). Πρέπει να σημειωθεί ότι στις δοκιμασίες πρόσδεσης *in vitro* η περιοχή O αποδείχθηκε σημαντική, πιθανόν επειδή διαμεσολαβεί στο διμερισμό. Η πρωτεΐνη m7ΔORVP16 έχει πάντως την ικανότητα να ενεργοποιεί τον ενισχυτή GbeB1, αν και σε σημαντικά μειωμένο βαθμό σε σχέση με την m7VP16 (Ν. Γιαγτζόγλου, προσωπική επικοινωνία), γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να επιτυγχάνεται διμερισμός σε κάποιο βαθμό, ακόμα και απουσία της περιοχής O, εξαιτίας της παρουσίας της περιοχής HLH.



ΕΙΚΟΝΑ 3-30 Οι χιμαιρικές μορφές των πρωτεϊνών E(spl) υπερεκφράστηκαν υπό τον έλεγχο του οδηγού omb-GAL4. Παρατηρούμε ότι μόνο οι mβVP16, m7VP16 και mγVP16 μπορούν να επιφέρουν ισχυρή ενεργοποίηση του ενισχυτή vgQ(μ1)1_4. Η διάρκεια της χρώσης β-γαλακτοσιδάσης ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 1 ώρα, εκτός από την αντίδραση ελέγχου, σε συνθήκες αγρίου τύπου, που έγινε για έξι ώρες.

Η ίδια εικόνα παρουσιάστηκε και όταν ελέγξαμε την έκφραση του ενισχυτή vgQ(μ2)11_2 (εικόνα 3-31). Και πάλι οι ίδιες τρεις πρωτεΐνες επέφεραν ισχυρή ενεργοποίηση, η οποία φάνηκε να εξαρτάται τόσο από το διμερισμό, όσο και από τη δυνατότητα άμεσης πρόσδεσης στο στοιχείο E. Στην περίπτωση αυτή, η ενεργοποίηση που επέφερε η mδVP16 ήταν αρκετά αξιόλογη. Η m7ΔORVP16 έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί, αν και σε χαμηλά επίπεδα. Αξιοσημείωτο είναι επίσης ότι η ενεργοποίηση του ενισχυτή vgQ(μ2)11_2 είναι γενικά υψηλότερη από την αντίστοιχη που παρατηρήσαμε για τον vgQ(μ1)1_4, κάτι που για άλλη μία φορά υπογραμμίζει το ρόλο που παίζουν οι εκατέρωθεν του κυρίως στοιχείου E τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες για την πρόσδεση από τις E(spl).

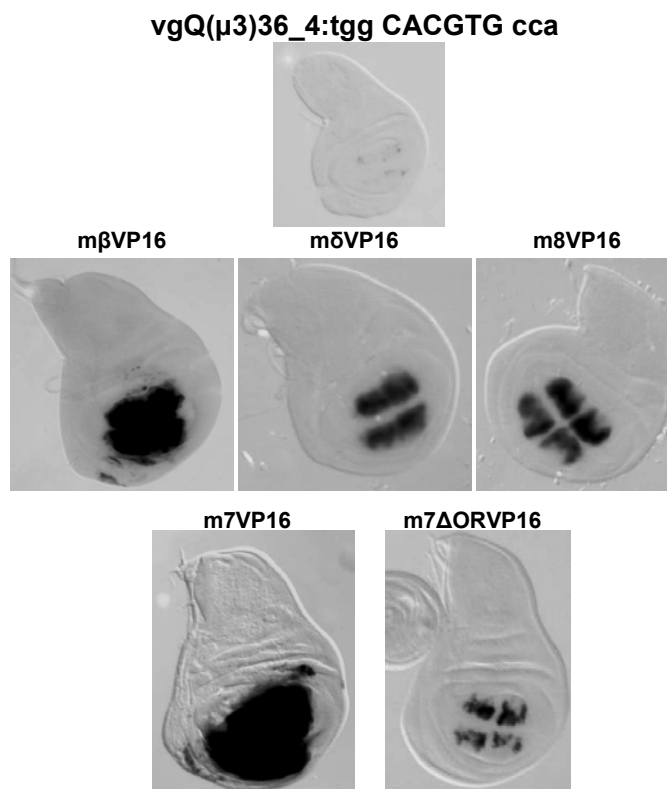


ΕΙΚΟΝΑ 3-31 Οι χιμαιρικές μορφές των πρωτεϊνών E(spl) υπερεκφράστηκαν υπό τον έλεγχο του οδηγού omb-GAL4. Παρατηρούμε ότι οι mβVP16, m7VP16 και mγVP16 μπορούν να επιφέρουν ισχυρή ενεργοποίηση του ενισχυτή vgQ(μ2)11_2, ενώ η mδVP16 ενεργοποιεί ασθενέστερα και η m8VP16 ακόμα πιο ασθενώς. Η διάρκεια της χρώσης β-γαλακτοσιδάσης ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 1 ώρα, εκτός από την αντίδραση ελέγχου, σε συνθήκες αγρίου τύπου, που έγινε για έξι ώρες.

Τέλος, με παρόμοιο τρόπο έδρασαν οι E(spl)VP16 στον ενισχυτή vgQ(μ3)36_4 (εικόνα 3-32). Η επίδραση της mγVP16 δεν ήταν δυνατόν να ελεγχθεί, καθώς η διασταύρωση για κάποιο λόγο δεν έδινε βιώσιμες προνύμφες. Εδώ, η ενεργοποίηση που επέφεραν οι mδVP16 και m8VP16 ήταν υψηλότερη σε σχέση με τους άλλους δύο ενισχυτές, κάτι που πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι το στοιχείο ESE, που αυτός περιέχει, αποτελεί την καλύτερη δυνατή θέση πρόσδεσης. Φάνηκε επίσης ισχυρότερη ενεργοποίηση από την m7ΔORVP16 σε σχέση με τους δύο προηγούμενους ενισχυτές, γεγονός που πρέπει να αποδοθεί στη βελτιστοποίηση της θέσης πρόσδεσης και στη μερική ικανότητα διμερισμού της m7 μέσω της περιοχής HLH, παρά την απουσία της περιοχής O.

Συμπερασματικά, αποδεικνύεται ότι η σταδιακή βελτιστοποίηση της θέσης πρόσδεσης για τις πρωτεΐνες E(spl) έχει πράγματι ως αποτέλεσμα την ισχυροποίηση της πρόσδεσης και τη συνακόλουθη βελτίωση της καταστολής, ή της ενεργοποίησης, στην περίπτωση των E(spl)VP16, που αυτές επιφέρουν. Φαίνεται δε ότι σημαντικότερο ρόλο παίζουν τα έξι ζεύγη βάσεων εκατέρωθεν του κυρίως στοιχείου E σε σχέση με το ίδιο το στοιχείο, αφού ένα στοιχείο E_C με βέλτιστες τέτοιες αλληλουχίες προκαλεί ισχυρότερη καταστολή από ένα στοιχείο E_B με μη ιδανικές περιβάλλουσες αλληλουχίες. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα από τις δοκιμασίες ενεργοποίησης έχουν κατά τη γνώμη μας ιδιαίτερη

βαρύτητα, καθώς οι περισσότεροι ενισχυτές που εντέθηκαν στο γονιδίωμα της μύγας έδειξαν χαμηλή ενδογενή έκφραση και είναι αυτοί ακριβώς που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμασίες αυτές. Επιβεβαιώθηκε έτσι και *in vivo* η μειωμένη συνάφεια πρόσδεσης των ομοδιμερών mδ και m8 σε σχέση με τις mβ, mγ και m7, που είχαμε παρατηρήσει και *in vitro*.



ΕΙΚΟΝΑ 3-17 Οι χιμαιρικές μορφές των πρωτεϊνών E(spl) υπερεκφράστηκαν υπό τον έλεγχο του οδηγού omb-GAL4. Παρατηρούμε ότι οι mβVP16 και m7VP16 μπορούν να επιφέρουν ισχυρή ενεργοποίηση του ενισχυτή vgQ(μ3)36_4, ενώ οι mδVP16 και m8VP16 ενεργοποιούν πιο ασθενώς. Η διάρκεια της χρώσης β-γαλακτοσιδάσης ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 1 ώρα, εκτός από την αντίδραση ελέγχου, σε συνθήκες αγρίου τύπου, που έγινε για έξι ώρες.

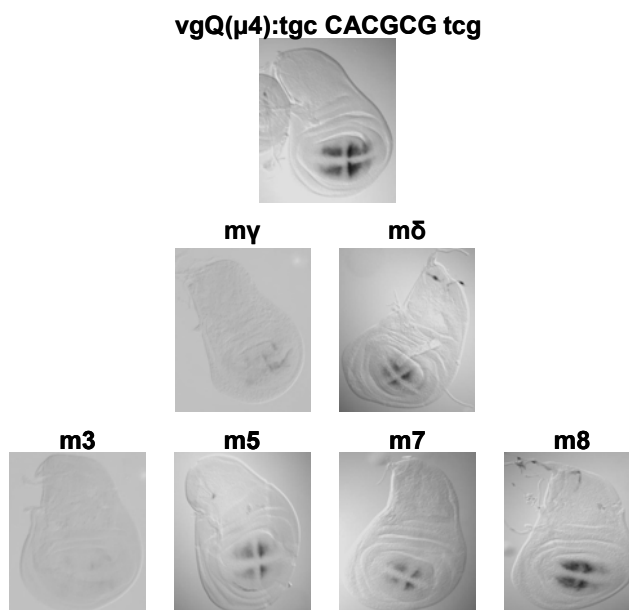
3.2.7 Οι περιβάλλουσες τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες του στοιχείου E_C δεν τροποποιούν την ειδικότητα πρόσδεσης των πρωτεϊνών E(spl) *in vivo*

Σε πειράματα υστέρησης κινητικότητας παρατηρήσαμε ότι η πρόσδεση των πρωτεϊνών E(spl) σε στοιχεία E_C, που φέρουν διαφορετικές περιβάλλουσες τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες, δε φάνηκε να εξαρτάται από τις αλληλουχίες αυτές. Το γενικό συμπέρασμα ήταν ότι οι επτά πρωτεΐνες προσδένονται στα ίδια στοιχεία, όμως με διαφορετική συνάφεια. Για να ελέγξουμε αυτό το αποτέλεσμα και *in vivo*, δημιουργήσαμε μία ακόμη μορφή του ενισχυτή, τον ενισχυτή vgQ(μ4), στον οποίο ο πυρήνας του στοιχείου E_C έχει παραμείνει αμετάβλητος, έχουν όμως τροποποιηθεί τα τρία ζεύγη βάσεων εκατέρωθεν, έτσι ώστε να

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

δημιουργείται μία θέση E_C πανομοιότυπη με αυτήν που απαντά στον ενισχυτή SMC (tgcCACGCGtgc). Υπενθυμίζεται ότι ο συγκεκριμένος ενισχυτής θεωρείται υπεύθυνος για την έκφραση του γονιδίου *sc* στα κύτταρα των προνευρικών συναθροισμών που επιλέγονται ως νευροβλάστες (Culi and Modollell, 1998). Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι για την καταστολή της νευρικής τύχης στα υπόλοιπα κύτταρα κάθε προνευρικού συναθροισμού στο δίσκο του φτερού, κυρίως υπεύθυνες θα πρέπει μάλλον να θεωρηθούν οι πρωτεΐνες $m7$ και $m8$, καθώς είναι οι μόνες από τις $E(spl)$ που εκφράζονται σε όλους τους προνευρικούς συναθροισμούς. Θελήσαμε έτσι να διερευνήσουμε ακόμη μια φορά την πιθανότητα συγκεκριμένα μέλη της οικογένειας $E(spl)$ να προσδένονται σε διαφορετικά στοιχεία E_C in vivo, καθώς αυτό θα αποτελούσε μια ελκυστική υπόθεση για την ερμηνεία της λειτουργικής εξειδίκευσης ανάμεσα στις επτά πρωτεΐνες.

Ατυχώς, από τη συγκεκριμένη προσπάθεια δημιουργίας διαγονιδιακών μυγών προέκυψε μόνο μία ένθεση του ενισχυτή, η έκφραση της οποίας φαίνεται στην εικόνα 3-33. Αν η μία και μοναδική αυτή ένθεση μπορεί να θεωρηθεί αντιπροσωπευτική, παρατηρούμε ότι το γνωστό πρότυπο έκφρασης διατηρείται και για τον ενισχυτή $vgQ(\mu4)$, ο οποίος εκφράζεται ισχυρότερα από τους ενισχυτές $\mu1$, $\mu2$ και $\mu3$. Όταν υπερεκφράσαμε στη συνέχεια τις πρωτεΐνες $E(spl)$, το αποτέλεσμα που προέκυψε ήταν ότι η ειδικότητα καταστολής σε σχέση με τον αγρίου τύπου ενισχυτή δεν τροποποιήθηκε σημαντικά (εικόνα 3-33). Ο ενισχυτής $vgQ(\mu4)$, που φέρει το ίδιο στοιχείο E_C με αλλαγμένες μόνο τις περιβάλλουσες τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες, εξακολουθεί να καταστέλλεται ισχυρά μόνο από τις $m7$ και $m8$. Όσον αφορά τις υπόλοιπες τέσσερις, παρατηρήθηκε πολύ ασθενής καταστολή από τις $m7$, $m5$ και $m\delta$ και μηδενική καταστολή από τις $m8$ και $m\beta$. Υπενθυμίζεται ότι και ο αρχικός ενισχυτής vgQ καταστέλλεται μόνο από τις $m7$ και $m8$. Φαίνεται λοιπόν ότι η τροποποίηση των τρινουκλεοτιδικών αλληλουχιών που περιβάλλουν τον πυρήνα του στοιχείου E_C δεν επηρέασε την απόκριση του ενισχυτή στα διαφορετικά μέλη της οικογένειας $E(spl)$. Οι συγκεκριμένες αλληλουχίες εκατέρωθεν του κυρίως στοιχείου δε φάνηκαν να σχετίζονται με αυξημένη ικανότητα πρόσδεσης και καταστολής ειδικά εκ μέρους των $m7$ και $m8$. Αυτό ήταν σε κάποιο βαθμό αναμενόμενο, καθώς η άμεση πρόσδεση στον ενισχυτή SMC, από τον οποίο υπενθυμίζεται ότι «δανειστήκαμε» τις αλληλουχίες αυτές, ήταν γνωστό ότι είναι μη απαραίτητη για την καταστολή που επιφέρουν οι παραπάνω πρωτεΐνες στον ενισχυτή (Culi and Modollell 1998, Giagtzoglou et al., 2003).



ΕΙΚΟΝΑ 3-18 Υπερέκφραση των πρωτεϊνών E(spl) υπό τον έλεγχο του οδηγού omb-GAL4. Στην κορυφή της εικόνας φαίνεται το πρότυπο έκφρασης του ενισχυτή vgQ(μ4) σε γενετικό υπόβαθρο αγρίου τύπου, ο οποίος φέρει ένα στοιχείο E_C με διαφορετικές εκατέρωθεν τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες από αυτό του αρχικού ενισχυτή. Η διάρκεια της χρώσης β-γαλακτοσιδάσης ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 3 ώρες. Παρατηρούμε ότι διατηρείται η ικανότητα ισχυρής καταστολής μόνο από τις mγ και m3. Οι mδ, m5 και m7 καταστέλλουν αδύναμα, ενώ η m8 δε φαίνεται να καταστέλλει. Η mβ, που απουσιάζει από την εικόνα, επίσης αδυνατεί να καταστείλλει.

Συνοψίζοντας, θα πρέπει να γίνουν οι εξής παρατηρήσεις: Καταρχάς, τα αποτελέσματα από την ανάλυση *in vivo*, που μόλις παρουσιάστηκαν, είναι σε συμφωνία, σε γενικές γραμμές, με τα αντίστοιχα από την ανάλυση *in vitro* που προηγήθηκε. Επιβεβαιώθηκε ότι οι πρωτεΐνες E(spl) προσδένονται γενικά πολύ ισχυρότερα σε θέσεις E_B από ότι σε θέσεις E_C. Επίσης, διαπιστώθηκε και από την ανάλυση *in vivo* ότι δεν προσδένονται όλες με την ίδια συνάφεια. Οι mβ και mγ, για παράδειγμα, φάνηκαν να προσδένονται ισχυρά και στα δύο συστήματα μελέτης, ενώ οι m5 και m8 αδύναμα. Τέλος, η σχετική πρόσδεση των επτά πρωτεϊνών *in vivo* δεν φάνηκε να επηρεάστηκε από τις περιβάλλουσες το στοιχείο E_C τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες.

Παραμένει εντούτοις μία αναντιστοιχία, ανάμεσα στην πρόσδεση που παρατηρήσαμε *in vivo* στους ενισχυτές vgQ(wt) και vgQ(μ4) (βλέπε εικόνες 3-18 και 3-33) και στην αντίστοιχη πρόσδεση από τα πειράματα *in vitro* (βλέπε εικόνα 3-4). Αυτή αφορά κυρίως στην πρωτεΐνη E(spl)m3, η οποία φαίνεται να καταστέλλει τους δύο ενισχυτές προσδεδεμένη στο στοιχείο E_C που περιέχουν, ενώ δε φάνηκε να προσδένεται ισχυρά σε σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια που περιέχουν τις ίδιες ακριβώς θέσεις πρόσδεσης *in vitro*. Το ίδιο πρόβλημα, αλλά αντίστροφα, εμφανίζεται και για τις m7 και mβ, οι οποίες, ενώ προσδένονται ισχυρά στα συγκεκριμένα στοιχεία E_C *in vitro*, αδυνατούν να καταστείλουν τους δύο ενισχυτές *in vivo*. Για να εξηγήσουμε το παραπάνω παράδοξο, θα πρέπει να στρέψουμε την προσοχή μας στο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

γεγονός ότι ο ενισχυτής vgQ είναι ιδιαίτερα σύνθετος και η ρύθμισή του εξαρτάται από πληθώρα μεταγραφικών παραγόντων, που συν-ενσωματώνουν μηνύματα από πολλά και διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια ταυτόχρονα (Certel et al., 2000, Nagaraj et al., 1999, Kim et al., 1996, Zecca et al., 1996). Το γεγονός ότι για κανέναν από τους τροποποιημένους ενισχυτές που κατασκευάσαμε δεν αλλοιώθηκε το χωροειδικό και χρονοειδικό πρότυπο έκφρασης, υποδηλώνει την ακρίβεια και τη συμπαγή τελικά λειτουργία όλων αυτών των ανεξάρτητων παραγόντων, προκειμένου να παραχθεί σαφής μεταγραφική απόκριση. Στα πλαίσια λοιπόν ενός ιδιαίτερα πολύπλοκου και σύνθετου φυσικού ενισχυτή, η πρόσβαση των E(spl) μπορεί να τροποποιείται από την παρουσία άλλων, γνωστών και άγνωστων, πρωτεϊνικών συμπλόκων, με τρόπο που να ξεπερνά την επίπτωση που θα είχε στη μεταγραφική ενεργότητα του ενισχυτή η απλή πρόσδεσή τους σε ένα στοιχείο E. Έτσι, η ικανότητα ή όχι καταστολής των ενισχυτών vgQ(wt) και vgQ(μ4) μπορεί σε αυτήν την περίπτωση να επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τις πολύπλοκες διαπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στους φυσικούς ενισχυτές. Θα πρέπει λοιπόν να αξιολογήσουμε τα αποτελέσματα από την ανάλυση in vitro απλώς ως αφετηρία, ένα γενικό πλαίσιο για την κατανόηση των βιοχημικών χαρακτηριστικών των E(spl). Ο ακριβής τρόπος δράσης τους όμως και οι συγκεκριμένοι μηχανισμοί που εμπλέκονται σε μία διαδικασία μεταγραφικής ρύθμισης in vivo εξαρτώνται αναπόφευκτα από τις ειδικές συνθήκες που επικρατούν σε κάθε περίπτωση.

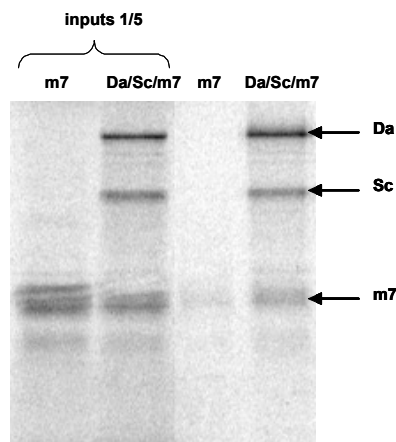
ΤΡΙΤΟ ΜΕΡΟΣ

3.3 Άμεση πρόσδεση στο DNA και μεταγραφική καταστολή από τις πρωτεΐνες E(spl) στα πλαίσια της νευρογένεσης.

Αναφέρθηκε στην Εισαγωγή (παράγραφος 1.5.5.3) ότι οι πρωτεΐνες m7 και mγ μπορούν να καταστέλλουν την έκφραση τεχνητών ενισχυτών, αποτελούμενων από πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης E_A, χωρίς να προσδένονται απευθείας στα στοιχεία E_A, αλλά βασιζόμενες στην αλληλεπίδρασή τους με τα διμερή Da/AS-C, τα οποία και ενεργοποιούν προσδενόμενα στις θέσεις αυτές (Giagtzoglou et al., 2003). Η φυσική αυτή αλληλεπίδραση δείχτηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας και *in vitro*. Η πρωτεΐνη m7 μπορεί να καθλώνεται σε ακινητοποιημένο ολιγονουκλεοτίδιο E_A μόνο με την ταυτόχρονη παρουσία, αλλά όχι απουσία συμπλόκου Da/Sc, που είναι εκείνο που άμεσα προσδένεται στο στοιχείο E_A (εικόνα 3-34). Από τα μέχρι τώρα αποτελέσματα όμως έχει φανεί ότι οι πρωτεΐνες E(spl) έχουν τη δυνατότητα να προσδένονται σε καθορισμένες θέσεις στο DNA, καταστέλλοντας έτσι τη μεταγραφή από ρυθμιστικές αλληλουχίες που περιέχουν τέτοιες θέσεις πρόσδεσης. Από άλλες εργασίες έχουν υπάρξει επίσης έμμεσες ενδείξεις ότι η άμεση πρόσδεση στο DNA είναι απαραίτητη, σε κάποιες τουλάχιστον περιπτώσεις. Για παράδειγμα, η εκτοπική έκφραση της m7VP16 οδηγεί σε ευρύτερη ενεργοποίηση των προαναφερθέντων ενισχυτών E_A σε σχέση με την αντίστοιχη υπερέκφραση της m7KNEQVP16, πιθανότατα επειδή η m7VP16, αλλά όχι η m7KNEQVP16, μπορεί να προσδένεται στις ρυθμιστικές περιοχές των ενδογενών προνευρικών γονιδίων και να τα ενεργοποιεί. Επίσης, σε γενετικό υπόβαθρο όπου απουσιάζει ολόκληρο το γονιδιακό σύμπλοκο AS-C, η υπερέκφραση των m7VP16 και mγVP16, αλλά όχι των αντίστοιχων m7KNEQVP16 και mγKNEQVP16, μπορεί να επάγει το σχηματισμό σμηρίγγων, με τρόπο που προφανώς εξαρτάται από την πρόσδεση σε ρυθμιστικά στοιχεία γονιδίων-στόχων των προνευρικών, που είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία των συγκεκριμένων αισθητηρίων οργάνων (Giagtzoglou et al., 2003). Αξίζει να τονιστεί στο σημείο αυτό ότι κατά τον καθορισμό των κυττάρων ΠΑΟ, γονίδια-στόχοι τόσο των Da/AS-C όσο και των E(spl), όπως είναι π.χ. τα *ase*, *dpr*, *neur* και άλλα, φέρουν όλα

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

τόσο θέσεις πρόσδεσης E_A για τα σύμπλοκα Da/AS-C όσο και θέσεις $E_{C/B}$ για τις E(spl), πολλές φορές σε στενή γειτονία μεταξύ τους (Culi and Modolell, 1998, Ohsako et al., 1994, Van Doren et al., 1994, Jarman et al., 1993a). Το ερώτημα επομένως που τίθεται είναι αν οι πρωτεΐνες E(spl) χρησιμοποιούν τη δυνατότητα που έχουν να προσδένονται στο DNA για την καταστολή των μεταγραφικών τους στόχων στα πλαίσια της νευρογένεσης, ή αν εξαρτώνται αποκλειστικά από τη φυσική αλληλεπίδρασή τους με τους ενεργοποιητές Da και Sc. Έτσι, μια πιο άμεση προσέγγιση κρίθηκε απαραίτητη, προκειμένου να διερευνηθεί επιπλέον και η σχετική συνεισφορά των δύο μηχανισμών, ή ακόμη και η ενδεχόμενη συνεργασία τους για αποτελεσματική μεταγραφική καταστολή εκ μέρους των E(spl).

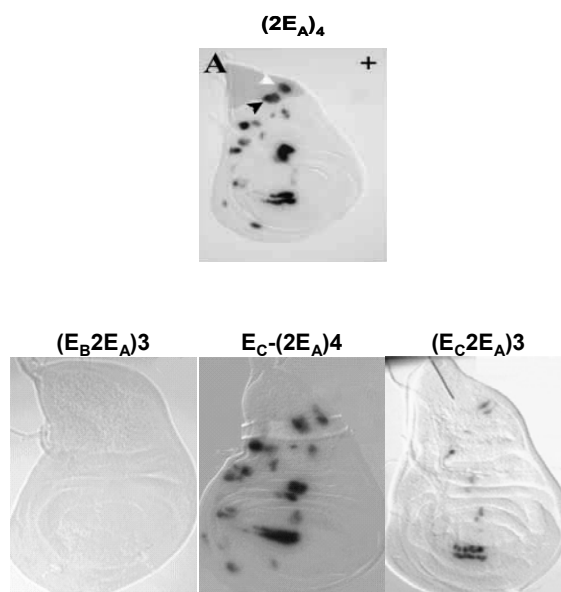


ΕΙΚΟΝΑ 3-19 Πρόσδεση των πρωτεϊνών Da, Sc και m7 σε ακινητοποιημένο σε μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης ολιγονουκλεοτίδιο E_A , το οποίο είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με βιοτίνη. Στην περίπτωση όπου χρησιμοποιούνται και οι τρεις πρωτεΐνες μαζί, αυτές έχουν συντεθεί ταυτόχρονα στην ίδια αντίδραση μεταγραφής-μετάφρασης *in vitro*. Παρατηρούμε ότι η m7 καθλώνεται στη θέση πρόσδεσης E_A μόνο παρουσία του συμπλόκου Da/Sc. Η m7, όπως και όλες οι υπόλοιπες πρωτεΐνες bHLH E(spl), δεν προσδένεται σε θέσεις E_A , επομένως η πρόσδεσή της είναι έμμεση και οφείλεται στη φυσική αλληλεπίδρασή της με τους άμεσα προσδεδεμένους στη θέση αυτή ενεργοποιητές.

3.3.1 Η συνεισφορά της άμεσης πρόσδεσης στο DNA, σε σχέση με την έμμεση στρατολόγηση μέσω διαπρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, για τη μεταγραφική καταστολή από τις E(spl)

Αναφέρθηκε πιο πάνω ότι ένας τεχνητός ενισχυτής, αποτελούμενος από οκτώ θέσεις πρόσδεσης E_A , μπορεί να κατευθύνει την έκφραση του γονιδίου αναφοράς lacZ σε όλα τα κύτταρα των προνευρικών συναθροισμών στο δίσκο του φτερού (ενισχυτής EE4 ή $(2E_A)_4$, όπως θα τον μετονομάσουμε εδώ, Giagtzoglou et al., 2003). Αυτό σημαίνει ότι, παρότι σε όλα αυτά τα κύτταρα, με εξαίρεση το κύτταρο ΠΑΟ που διαφοροποιείται σε νευροβλάστη, υπάρχει έκφραση των γονιδίων E(spl), η παρουσία τους εκεί και η φυσική τους αλληλεπίδραση με τους ενεργοποιητές δεν είναι αρκετή για να καταστείλει τον ενισχυτή, αν

και η υπερέκφραση των $m\gamma$ και $m7$ μπορεί να τον καταστέλλει. Κατασκευάσαμε λοιπόν έναν τεχνητό ενισχυτή, όπου μπροστά από τις οκτώ θέσεις E_A τοποθετήσαμε μία θέση πρόσδεσης E_C [ενισχυτής $E_C-(2E_A)4$]. Υπενθυμίζεται ότι όλες οι πρωτεΐνες $E(spl)$ μπορούν να προσδένονται σε θέσεις E_C , αν και με χαμηλότερη συνάφεια από αυτήν που έχουν για θέσεις E_B . Η έκφραση του ενισχυτή αυτού ήταν πανομοιότυπη με του αρχικού. Αυτό σημαίνει ότι η παρουσία μίας και μόνης θέσης πρόσδεσης E_C μπροστά από οκτώ θέσεις πρόσδεσης E_A δεν είναι αρκετή για να περιορίσει την έκφραση του ενισχυτή στα μοναδικά κύτταρα των συναθροισμών, που θα διαφοροποιηθούν σε κύτταρα ΠΑΟ. Όταν όμως κατασκευάσαμε μία άλλη μορφή του ενισχυτή, που αποτελείτο από τρεις επαναλήψεις ενός ολιγονουκλεοτιδίου, το οποίο περιέχει μία θέση πρόσδεσης E_C μπροστά από δύο θέσεις E_A [ενισχυτής $(E_C2E_A)3$], παρατηρήσαμε ότι οι επιπλέον θέσεις E_C , που περιέχει ο συγκεκριμένος ενισχυτής, μπορούσαν να περιορίσουν την έκφραση του γονιδίου αναφοράς αποκλειστικά στα κύτταρα ΠΑΟ (εικόνα 3-35). Πρέπει να τονιστεί ότι η τροποποίηση της έκφρασης του ενισχυτή δεν οφείλεται στην ελάττωση του αριθμού των στοιχείων E_A (έξι έναντι οκτώ), καθώς ακριβώς την ίδια έκφραση είχε και ο τετραμελής ενισχυτής $(E_C2E_A)4$, που επίσης αναλύθηκε. Επομένως, η παρουσία θέσεων πρόσδεσης για τις $E(spl)$ είναι σημαντική για την καταστολή της μεταγραφής. Ομοίως, ένας τεχνητός ενισχυτής $(E_B2E_A)3$, που αποτελείται από τρεις επαναλήψεις ενός ολιγονουκλεοτιδίου που περιέχει μία θέση E_B μπροστά από δύο θέσεις E_A , εμφάνιζε μηδενική ενδογενή έκφραση, ακόμη και στα κύτταρα ΠΑΟ, ακόμη και μετά από πολύωρη χρώση. Έχει αναφερθεί προηγουμένως η ιδιότητα των στοιχείων E_B να στρατολογούν στο δίσκο του φτερού κάποιον άγνωστο παράγοντα με ισχυρή κατασταλτική δράση (βλέπε Αποτελέσματα, παράγραφος 3.2.4).

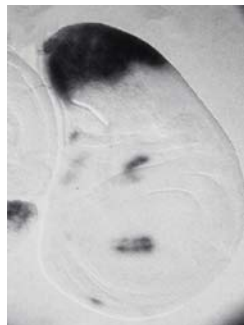


ΕΙΚΟΝΑ 3-20 Παρατηρούμε τα ενδογενή πρότυπα έκφρασης των τριών συνθετικών ενισχυτών που περιέχουν θέσεις πρόσδεσης για τις πρωτεΐνες $E(spl)$, σε σχέση με τον αρχικό ενισχυτή (που περιέχει αποκλειστικά θέσεις πρόσδεσης για τις $AS-C/Da$), σε γενετικό υπόβαθρο αγρίου τύπου. Η αντίδραση χρώσης για τον

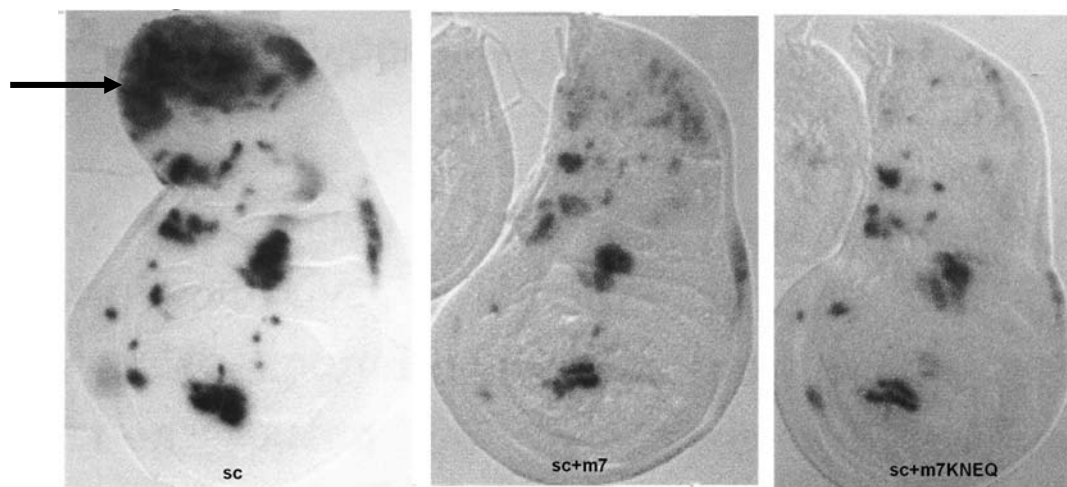
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ενισχυτή (E_B2E_A)₃ ήταν περίπου 12 ώρες, ενώ για τους άλλους δύο 1 ώρα. Η εικόνα του ενισχυτή ($2E_A$)₄ προέρχεται από τους (Giagtzoglu et al., 2003).

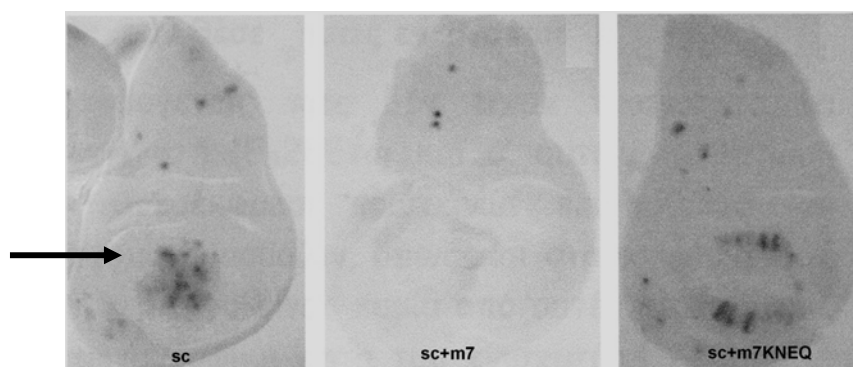
Ορισμένες σημαντικές παρατηρήσεις πρέπει ακόμη να γίνουν σε αυτό το σημείο. Η εκτοπική έκφραση τόσο της αγρίου τύπου m7 όσο και της m7KNEQ φάνηκε να καταστέλλει τον ενισχυτή $E_C(2E_A)_4$ το ίδιο καλά (Μαριάνθη Κηπαράκη και Κ.Κ., προσωπικές παρατηρήσεις). Αυτό συμβαίνει ακόμα και όταν, ταυτόχρονα με τις παραπάνω πρωτεΐνες, υπερεκφράζεται και η πρωτεΐνη sc (εικόνα 3-37), ξεπερνώντας έτσι τυχόν μεταγραφική καταστολή των ενδογενών ac και sc από τις υπερεκφραζόμενες E(spl). Όταν υπερεκφράσαμε όμως τη sc μαζί με m7 ή με m7KNEQ, η καταστολή που επέφερε η m7 στον ενισχυτή (E_C2E_A)₃ ήταν ισχυρότερη από την καταστολή της m7KNEQ στον ίδιο ενισχυτή, πάντα παρουσία sc (εικόνα 3-38). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί, αν υποθέσουμε ότι η πρώτη στρατολογείται στον ενισχυτή (E_C2E_A)₃ τόσο μέσω άμεσης πρόσδεσης στις θέσεις E_C , όσο και μέσω της φυσικής αλληλεπίδρασής της με την sc, ενώ η m7KNEQ μόνο με τον δεύτερο τρόπο. Ο λόγος που αυτό δε συμβαίνει με τον ενισχυτή $E_C(2E_A)_4$ είναι πιθανότατα ότι το ένα και μοναδικό στοιχείο E_C που περιέχει, σε συνδυασμό με οκτώ θέσεις πρόσδεσης E_A για τις Da/AS-C, έχει πολύ μικρότερη συνεισφορά στη στρατολόγηση της m7 στον ενισχυτή, σε σύγκριση με τα τρία στοιχεία E_C που περιέχει ο (E_C2E_A)₃, μαζί βέβαια με έξι στοιχεία E_A . Στον $E_C(2E_A)_4$ λοιπόν η στρατολόγησή της m7, όπως και της m7KNEQ φαίνεται να γίνεται σχεδόν αποκλειστικά μέσω αλληλεπίδρασης με τους ενεργοποιητές, ενώ στον (E_C2E_A)₃ η στρατολόγηση της m7 γίνεται επιπλέον και μέσω απευθείας πρόσδεσης στα στοιχεία E_C , κάτι που δε γίνεται στην περίπτωση της m7KNEQ.



ΕΙΚΟΝΑ 3-21 Η περιοχή έκφρασης του οδηγού rh-GAL4, που χρησιμοποιήθηκε σε πολλά από τα πειράματα υπερέκφρασης.

$E_C(2E_A)4$ 

ΕΙΚΟΝΑ 3-22 Υπερέκφραση των πρωτεϊνών που αναφέρονται, υπό τον έλεγχο του οδηγού rh-GAL4 (βλέπε εικόνα 3-36). Παρατηρούμε ότι οι πρωτεΐνες m7 και m7KNEQ έχουν στον ίδιο βαθμό την ικανότητα να καταργούν την ενεργοποίηση που επιφέρει στον ενισχυτή $E_C(2E_A)4$ η υπερέκφραση του sc.

 $(E_C2E_A)3$ 

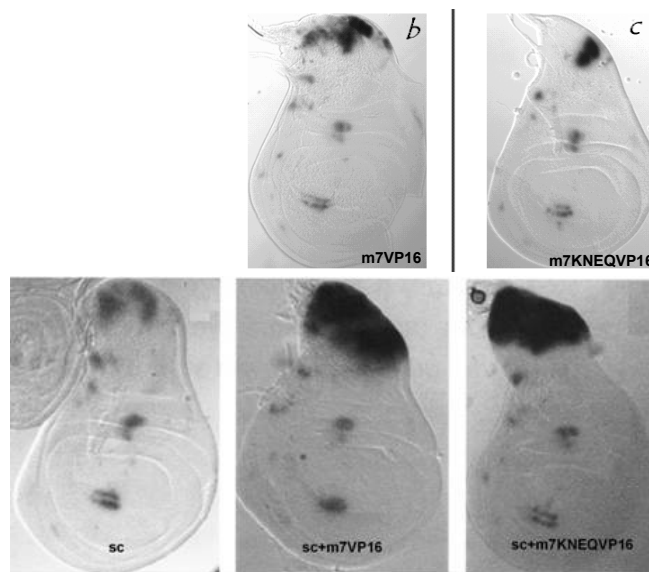
ΕΙΚΟΝΑ 3-23 Υπερέκφραση των πρωτεϊνών που αναφέρονται, υπό τον έλεγχο του οδηγού omb-GAL4 (βλέπε εικόνα 3-17). Παρατηρούμε ότι η m7 είναι πιο αποτελεσματική από την m7KNEQ στην καταστολή της ενεργοποίησης που επιφέρει στον ενισχυτή $(E_C2E_A)3$ η υπερέκφραση του sc. Χρησιμοποιήθηκε ο οδηγός omb-GAL4, επειδή στην περιοχή rhG η Sc αδυνατεί, για κάποιον άγνωστο λόγο, να ενεργοποιήσει τον ενισχυτή.

Η στρατολόγηση των $E(spl)$ στους παραπάνω ενισχυτές μελετήθηκε χρησιμοποιώντας τις χιμαιρικές μορφές των $E(spl)$, που φέρουν την περιοχή ενεργοποίησης VP16. Όπως αναμένονταν, η εκτοπική έκφραση των πρωτεϊνών m7VP16 και m7KNEQVP16 είχε ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των ενισχυτών $E_C(2E_A)4$ και $(E_C2E_A)3$ (εικόνες 3-39 και 3-40). Το γεγονός ότι η m7VP16 προκαλεί ευρύτερης έκτασης ενεργοποίηση, οφείλεται στην ικανότητά της να ενεργοποιεί εκτοπικά τις ενδογενείς προνευρικές πρωτεΐνες, πιθανότατα

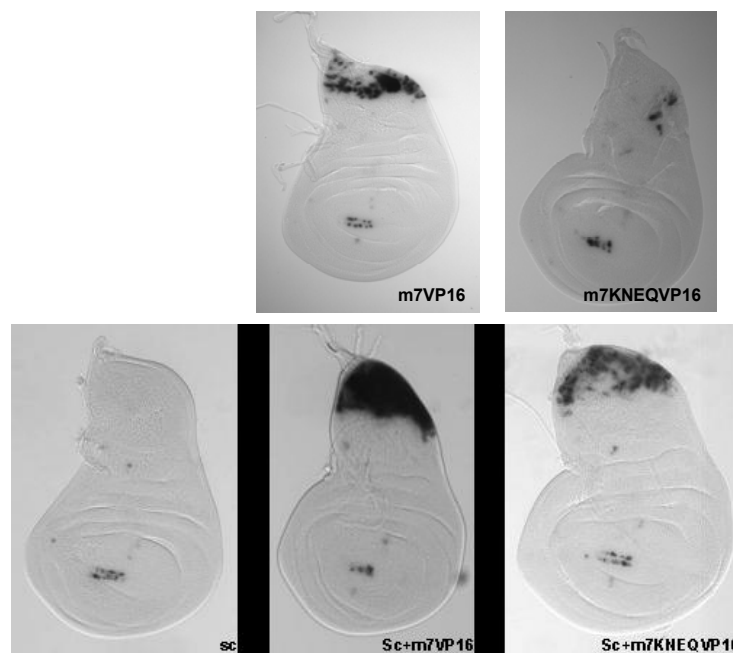
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

μέσω άμεσης πρόσδεσης στις ρυθμιστικές τους περιοχές, ικανότητα που δεν έχει η m7KNEQVP16. Όταν όμως υπερέκφρασαμε τις δύο πρωτεΐνες μαζί με sc, οπότε προσπερνούμε την επίδραση που έχει στην έκφραση του ενισχυτή μας η ενεργοποίηση των ενδογενών προνευρικών πρωτεϊνών, το αποτέλεσμα ήταν ότι και οι δύο μπορούσαν να ενεργοποιούν τον ενισχυτή $E_C(2E_A)4$ απανταχού στην περιοχή όπου κατευθύνουμε την έκφρασή τους (εικόνα 3-39). Αυτό σημαίνει ότι η στρατολόγησή τους στον ενισχυτή μέσω του sc ήταν παρόμοιας ισχύος. Στον ενισχυτή (E_C2E_A)3 όμως, η ταυτόχρονη υπερέκφραση sc και m7VP16 επέφερε πολύ ισχυρότερη ενεργοποίηση σε σχέση με την αντίστοιχη υπερέκφραση των sc και m7KNEQVP16 (εικόνα 3-40). Και πάλι, η εξήγηση θα πρέπει να προκύψει με βάση το γεγονός ότι η m7VP16 στρατολογείται στον ενισχυτή τόσο με άμεση πρόσδεση όσο και μέσω αλληλεπίδρασης με τους ενεργοποιητές, ενώ η m7KNEQVP16 μόνο με το δεύτερο τρόπο.

$E_C(2E_A)4$



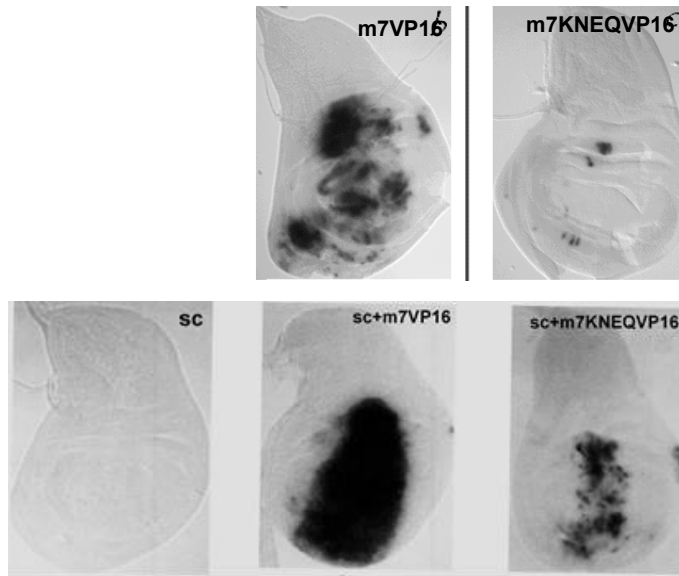
ΕΙΚΟΝΑ 3-24 Υπερέκφραση των πρωτεϊνών που αναφέρονται, υπό τον έλεγχο του οδηγού $\rho n-GAL4$ (βλέπε εικόνα 3-36). Παρατηρούμε ότι οι πρωτεΐνες m7VP16 και m7KNEQVP16 έχουν στον ίδιο βαθμό την ικανότητα να ενεργοποιούν σε συνεργασία με το sc τον ενισχυτή $E_C(2E_A)4$.

(E_C2E_A)₃

ΕΙΚΟΝΑ 3-40 Υπερέκφραση των πρωτεϊνών που αναφέρονται, υπό τον έλεγχο του οδηγού *rn-GAL4* (βλέπε εικόνα 3-36). Παρατηρούμε ότι η *m7VP16* είναι πιο αποτελεσματική από την *m7KNEQVP16* στην ενεργοποίηση του ενισχυτή (E_C2E_A)₃ σε συνεργασία με το *sc*.

Τα ίδια αποτελέσματα προέκυψαν και κατά τη μελέτη της έκφρασης του παρόμοιου ενισχυτή (E_B2E_A)₃. Στην εικόνα 3-35 φαίνεται ότι η έκφραση του ενισχυτή αυτού σε γενετικό υπόβαθρο αγρίου τύπου είναι μηδενική. Και πάλι όμως, η ταυτόχρονη εκτοπική έκφραση *sc* και *m7VP16* οδηγεί σε ισχυρότερη ενεργοποίηση, σε σχέση με την αντίστοιχη ταυτόχρονη υπερέκφραση *sc* και *m7KNEQVP16* (εικόνα 3-41).

Από τη μελέτη των ενισχυτών E_C-(2E_A)₄, (E_C2E_A)₃ και (E_B2E_A)₃, προέκυψε ένα ακόμη ενδιαφέρον εύρημα. Η επίδραση της απευθείας πρόσδεσης σε θέσεις E_{C/B} για τη μεταγραφική καταστολή από τις E(*spl*), φάνηκε να ενισχύεται από τη φυσική παρουσία στον ίδιο ενισχυτή των ενεργοποιητικών συμπλόκων Da/Sc. Με άλλα λόγια, οι πρωτεΐνες E(*spl*) δεν συνδέονταν ισχυρά *in vivo* σε θέσεις E_{C/B}, παρά μόνο όταν υπήρχε και κάποια διαπρωτεϊνική αλληλεπίδραση με τους ενεργοποιητές για να σταθεροποιήσει την πρόσδεση. Αυτό το ενδεχόμενο αποφασίσαμε να διερευνήσουμε και *in vitro* στη συνέχεια.

(E_B2E_A)₃

ΕΙΚΟΝΑ 3-41 Υπερέκφραση των πρωτεϊνών που αναφέρονται, υπό τον έλεγχο του οδηγού omb-GAL4 (βλέπε εικόνα 3-17). Παρατηρούμε ότι η m7VP16 είναι πιο αποτελεσματική από την m7KNEQVP16 στην ενεργοποίηση του ενισχυτή (E_B2E_A)₃ σε συνεργασία με το sc.

3.3.2 Συνεργατική πρόσδεση στο DNA από σύμπλοκα E(spl) και Da/AS-C

Στη σειρά των πειραμάτων που περιγράφηκε παραπάνω, εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι η ταυτόχρονη υπερέκφραση sc και m7VP16 προκαλεί πολύ ισχυρότερη ενεργοποίηση των ενισχυτών (E_C2E_A)₃ και (E_B2E_A)₃ σε σχέση με την ενεργοποίηση που προκαλεί η εκτοπική έκφραση καθεμιάς από τις παραπάνω πρωτεΐνες ξεχωριστά, σαφώς όχι απλώς αθροιστική. Όπως φαίνεται, αυτό δεν παρατηρείται όταν υπερεκφράζονται ταυτόχρονα οι sc και m7KNEQVP16, όπου η ενεργοποίηση είναι πολύ ασθενέστερη. Το ερώτημα λοιπόν που τίθεται είναι αν υπάρχει συνεργατική πρόσδεση από διμερή E(spl) και Da/AS-C, όταν αυτά είναι προσδεμένα σε γειτονικές θέσεις στο DNA, όπως μπορεί να συμβαίνει σε μια σειρά από κοινά γονίδια-στόχους, που φέρουν θέσεις πρόσδεσης και για τις δύο οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων, κατά τον καθορισμό των κυτάρων ΠΑΟ (Culi and Modolell, 1998, Ohsako et al., 1994, Van Doren et al., 1994, Jarman et al., 1993a). Το ερώτημα αυτό προσπαθήσαμε να προσεγγίσουμε *in vitro*, χρησιμοποιώντας ολιγονουκλεοτίδια που περιλαμβάνουν θέσεις πρόσδεσης και για τις δύο κατηγορίες συμπλόκων.

Το ολιγονουκλεοτίδιο E_{B/A} περιλαμβάνει ένα στοιχείο E_B κι ένα στοιχείο E_A, τα οποία απέχουν μεταξύ τους 9 ζεύγη βάσεων. Η επιλογή της απόστασης ήταν στη φάση αυτή τυχαία. Αποφασίσαμε αρχικά να ελέγξουμε τυχόν συνεργατικότητα στην πρόσδεση μεταξύ

των ετεροδιμερών Da/Sc και m7/m8, το οποίο επιλέξαμε γιατί φάνηκε να προσδένεται σε στοιχεία E_B ιδιαίτερα ισχυρά (βλέπε εικόνα 3-7). Είναι επίσης γνωστό ότι η m7 μπορεί να αλληλεπιδρά και με τους δύο ενεργοποιητές, ενώ η m8 μπορεί να αλληλεπιδρά μόνο με την Da (Alifragis et al., 1997). Ο σκοπός ήταν να επιτύχουμε σε κάποιο βαθμό ταυτόχρονη πρόσδεση από τις τέσσερις πρωτεΐνες στο σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο, οπότε και θα περιμέναμε τρεις ζώνες κατά την ηλεκτροφόρηση. Στη συνέχεια μπορεί να γίνει ανταγωνισμός με μη σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια, για να αποκαλυφθούν διαφορές στην κινητική πρόσδεσης μεταξύ των ετεροδιμερών Da/Sc και m7/m8 και του «ετεροτετραμερούς» Da/Sc/m7/m8.

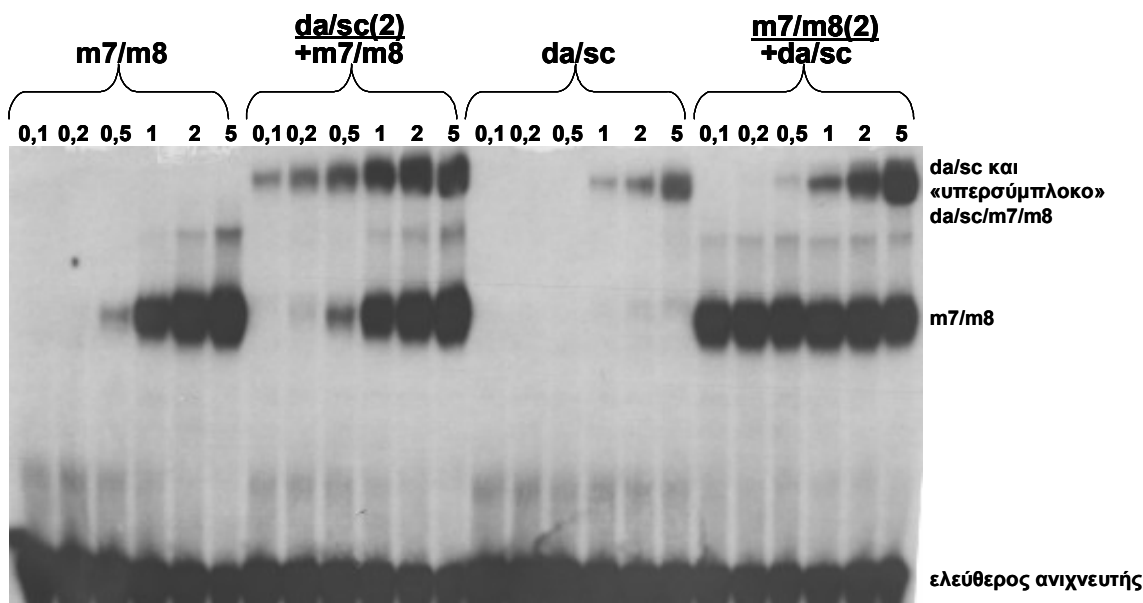
Σε αρχικά πειράματα, αυτό που διαπιστώσαμε όταν χρησιμοποιήσαμε στην ίδια αντίδραση πρόσδεσης στο E_{B/A} και τα δύο σύμπλοκα, Da/Sc και m7/m8, ήταν ότι εμφανίζονταν και πάλι δύο μόνο ζώνες, μία υψηλού μοριακού βάρους, που αντιστοιχεί στο Da/Sc προσδεμένο στο στοιχείο E_A, και μία χαμηλού μοριακού βάρους, που αντιστοιχεί στο m7/m8 προσδεμένο στο στοιχείο E_B (βλέπε και εικόνες 3-42 και 3-43). Οι εναλλακτικές ερμηνείες που δώσαμε αρχικά για το φαινόμενο αυτό ήταν οι εξής: α) Τα δύο σύμπλοκα δεν προσδένονται ταυτόχρονα στο ίδιο ολιγονουκλεοτίδιο. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι τα δύο στοιχεία, E_A και E_B είναι σε τέτοια απόσταση μεταξύ τους, που δεν επιτρέπει ταυτόχρονη πρόσδεση από τις τέσσερις πρωτεΐνες. Λύση σε αυτήν την περίπτωση θα ήταν ο σχεδιασμός εναλλακτικών ολιγονουκλεοτιδίων, με διαφορετικές αποστάσεις μεταξύ των δύο θέσεων πρόσδεσης. β) Το «ετεροτετραμερές» σύμπλοκο σχηματίζεται, αλλά είτε είναι ασταθές, οπότε δεν είναι ανιχνεύσιμο στις παρούσες συνθήκες, είτε είναι μεγάλου μοριακού βάρους και το πήκτωμα που χρησιμοποιείται δεν είναι προσβάσιμο σε αυτό. Σε κάθε περίπτωση, για τον έλεγχο της υπόθεσης αυτής απαιτείται πειραματισμός με τις συνθήκες του πειράματος. γ) Μία από τις δύο ζώνες που εμφανίζονται είναι στην πραγματικότητα «διπλή», δηλαδή αντιστοιχεί σε δύο ανεξάρτητα σύμπλοκα. Θα μπορούσε, για παράδειγμα, η ζώνη υψηλού μοριακού βάρους να αντιστοιχεί τόσο στο Da/Sc προσδεμένο στο στοιχείο E_A, όσο και στο Da/Sc/m7/m8, προσδεμένο και στις δύο θέσεις. Το διμερές Da/Sc έχει πολύ μεγαλύτερο μοριακό βάρος σε σχέση με το m7/m8, οπότε αυτό είναι που καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την κινητική του συμπλόκου κατά την ηλεκτροφόρηση. Το γεγονός επίσης ότι η ηλεκτροφόρηση γίνεται κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες σημαίνει ότι δεν μπορεί να γίνει άμεση συσχέτιση ανάμεσα στο μοριακό βάρος των συμπλόκων και στην κινητική με την οποία διαχωρίζονται. Στην περίπτωση αυτή θα μπορούσε η χρήση διαφορετικού πηκτώματος ή/και διαφορετικών συνθηκών ηλεκτροφόρησης να διαχωρίσει τα διαφορετικά σύμπλοκα.

Για την κατασκευή πηκτωμάτων με διαφορετική αναλυτική ικανότητα, χρησιμοποιήσαμε διαφορετικές αναλογίες μεταξύ ακρυλαμίδης και bis-ακρυλαμίδης (39:1, 49:1, 59:1, 79:1), παράγοντας που μεταβάλλει το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος, σε συνδυασμό με

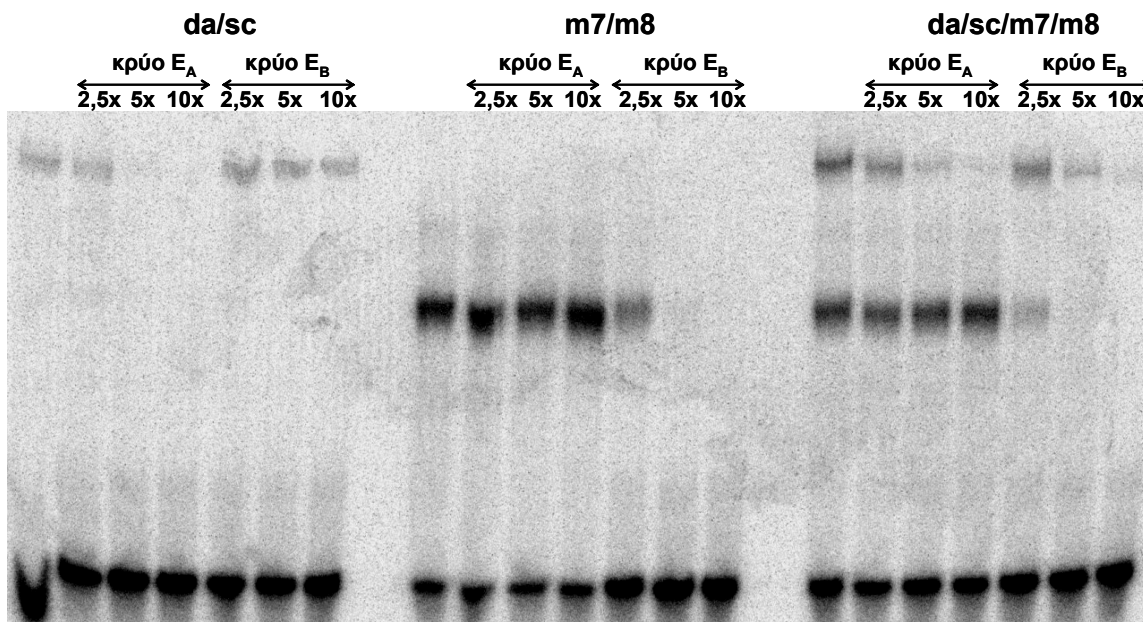
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

διαφορετικές τιμές ιοντικής ισχύος (0,25, 0,5, 1 και 2X TBE, TAE και TGE) και διαφορετικές συνθήκες ηλεκτροφόρησης (όσον αφορά την ηλεκτρική τάση, τη θερμοκρασία και το χρόνο). Σε κάθε περίπτωση, η εικόνα που πήραμε δε μεταβλήθηκε.

Πριν προχωρήσουμε σε επανασχεδιασμό του ολιγονουκλεοτιδίου όμως, ελέγξαμε ξανά την τρίτη υπόθεση με έναν πιο έμμεσο τρόπο. Καταρχάς, χρησιμοποιήσαμε σε μια σειρά από αντιδράσεις σταθερή ποσότητα από το διμερές Da/Sc σε συνδυασμό με αυξανόμενες ποσότητες m7/m8 (όπως και το αντίστροφο). Κατά την προσθήκη αυξανόμενης ποσότητας m7/m8 σε μια σταθερή ποσότητα Da/Sc, το αποτέλεσμα ήταν μια προοδευτική αύξηση της έντασης της χαμηλής ζώνης όπως αναμένονταν, αλλά και αντίστοιχη αύξηση στην ένταση της ζώνης υψηλού μοριακού βάρους (εικόνα 3-42). Αυτό αποτέλεσε την πρώτη ένδειξη ότι η πάνω ζώνη θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει, εκτός από το διμερές Da/Sc, και το τετραμερές σύμπλοκο Da/Sc/m7/m8. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι η ενίσχυση που παρατηρείται στην πρόσδεση του συμπλόκου Da/Sc από το σύμπλοκο m7/m8, γίνεται ακόμη και από πολύ χαμηλές ποσότητες του τελευταίου, της τάξης των 0,2 μl, που δεν αρκούν για να δώσουν ανιχνεύσιμο σύμπλοκο m7/m8 με το στοιχείο E_B (στην εικόνα 3-42, σύγκρινε τις διαδρομές 2, 7 και 8). Η υπόθεση αυτή ενισχύεται ακόμη περισσότερο από το γεγονός ότι η ένταση της ζώνης υψηλού μοριακού βάρους μειώνεται, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση μη σημασμένου ανταγωνιστικού ολιγονουκλεοτιδίου E_B (όπως φυσικά και E_A, εικόνα 3-43). Έχει προταθεί ότι σύμπλοκα Da/AS-C μπορούν να προσδένονται σε στοιχεία ESE, δηλαδή σε θέσεις πρόσδεσης E_B που περιβάλλονται από τις ιδανικές τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες, όπως είναι και το στοιχείο E_B που χρησιμοποιείται στο συγκεκριμένο πείραμα (Jennings et al., 1999 και βλέπε Εισαγωγή, παράγραφος 1.5.4.5). Αυτή η παρατήρηση δεν επιβεβαιώθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, δηλαδή δεν ανιχνεύτηκε πρόσδεση από Da/Sc σε στοιχεία E_B στις συνθήκες που πραγματοποιήθηκαν τα δικά μας πειράματα. Αυτό φαίνεται και στην εικόνα 3-43 (σύγκρινε διαδρομές 1, 5, 6 και 7), όπου φαίνεται ότι κρύο ολιγονουκλεοτίδιο E_B αδυνατεί να ανταγωνιστεί την πρόσδεση των Da/Sc σε σημασμένο E_{B/A}. Όμως, όταν το ετεροτετραμερές σύμπλοκο Da/Sc/m7/m8 είναι προσδεμένο σε E_{B/A} (υποθέτουμε ότι αυτό περιλαμβάνεται στη ζώνη υψηλού μοριακού βάρους στις διαδρομές 15-21 στην εικόνα 3-43), προσθήκη κρύου, ανταγωνιστικού E_B αποτρέπει την πρόσδεση τόσο του ετεροτετραμερούς, όσο και του ετεροδιμερούς Da/Sc, όπως φαίνεται συγκρίνοντας τις διαδρομές 15, 19, 20 και 21. Δεν αποκλείεται λοιπόν να υπάρχει κάποια χαμηλού βαθμού πρόσδεση των Da/Sc σε θέσεις E_B. Με βάση πάντως τα παραπάνω αποτελέσματα και παρότι δεν κατορθώσαμε τελικά να διαχωρίσουμε το σύμπλοκο Da/Sc από το Da/Sc/m7/m8 στο ολιγονουκλεοτίδιό μας, αποφασίσαμε να ελέγξουμε την πιθανότητα να υπάρχει συνεργατική πρόσδεση ανάμεσα στα σύμπλοκα των ενεργοποιητών και των καταστολέων, όταν αυτά βρίσκονται προσδεμένα ταυτόχρονα σε γειτονικές θέσεις στο DNA.



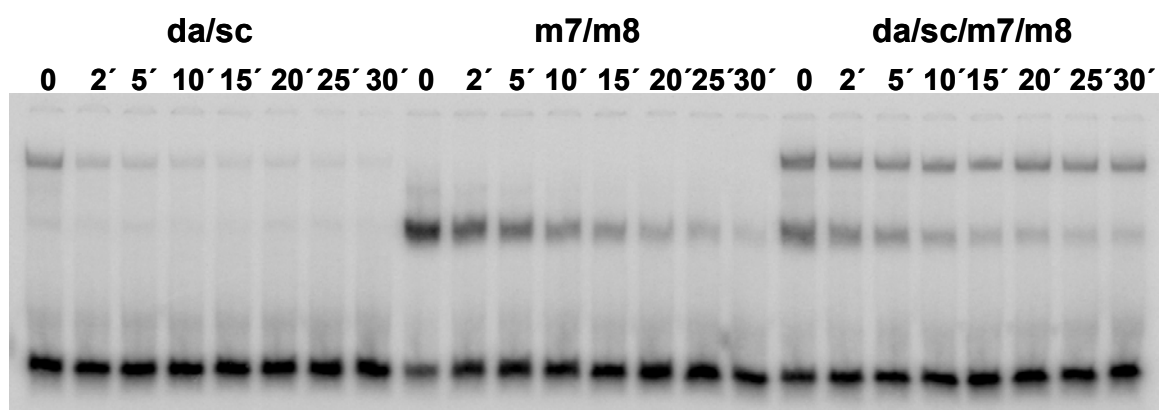
ΕΙΚΟΝΑ 3—42 Πρόσδεση αυξανόμενων ποσοτήτων m7/m8 και da/sc, απουσία και παρουσία σταθερής ποσότητας da/sc και m7/m8 (2 μl) αντίστοιχα, σε σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο E_{B/A}. Οι σχετικές ποσότητες από τα διμερή που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται σε κάθε διαδρομή. Όπου χρειάζονταν, οι πρωτεΐνες m7/m8 αναμιγνύονταν με τις da/sc κι επωάζονταν μαζί για 20 λεπτά στον πάγο πριν από την προσθήκη του DNA. Η ενίσχυση της ζώνης υψηλού μοριακού βάρους από το σύμπλοκο m7/m8 επιτυγχάνεται ακόμη και από πολύ χαμηλές ποσότητες του τελευταίου, που δεν αρκούν για να δώσουν ανιχνεύσιμη πρόσδεση m7/m8 σε E_B, όπως φαίνεται στη διαδρομή 8.



ΕΙΚΟΝΑ 3—43 Ανταγωνισμός της πρόσδεσης των πρωτεϊνών που αναφέρονται σε σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο E_{B/A}, με αυξανόμενες συγκεντρώσεις μη σημασμένων (κρύων) ολιγονουκλεοτιδίων E_A και E_B. Σε κάθε αντίδραση πρόσδεσης χρησιμοποιήθηκαν 2 μl από κάθε αντίδραση σύνθεσης των πρωτεϊνών, οι οποίες συντέθηκαν μαζί και όχι σε ξεχωριστές αντιδράσεις. Η σχετική περίσσεια του ανταγωνιστικού ολιγονουκλεοτιδίου αναφέρεται σε κάθε διαδρομή.

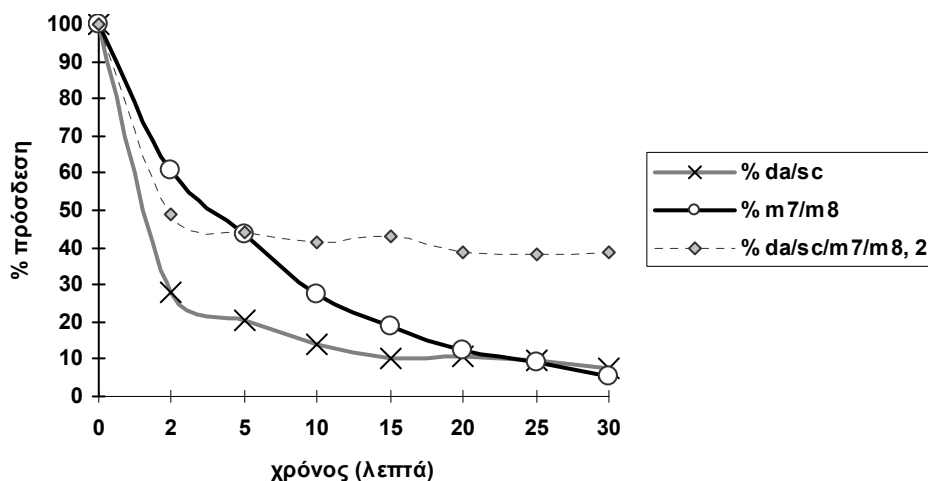
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε μεγάλη περίσσεια (50X) από το ίδιο κρύο, μη σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο $E_{B/A}$, για να ανταγωνιστούμε την πρόσδεση των συμπλόκων Da/Sc, m7/m8 και Da/Sc/m7/m8 στο σημασμένο $E_{B/A}$ σε μια σειρά από αντιδράσεις, όπου διαφοροποιούνταν μόνο ο χρόνος επώασης με το κρύο ολιγονουκλεοτίδιο. Στα μέχρι τώρα πειράματα ανταγωνισμού που παρουσιάστηκαν, η προσθήκη του κρύου, ανταγωνιστικού DNA γίνονταν στην αρχή της επώασης, ταυτόχρονα με το σημασμένο DNA. Στο συγκεκριμένο πείραμα, ο χρόνος επώασης με το σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο ήταν 30 λεπτά σε όλες τις αντιδράσεις, μετά το πέρας των οποίων γίνονταν επώαση με το κρύο, για χρόνους από 0 έως 30 λεπτά. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 3-44.



ΕΙΚΟΝΑ 3—44 Ανταγωνισμός της πρόσδεσης των πρωτεϊνών που αναφέρονται σε σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο $E_{B/A}$, με 50X περίσσεια μη σημασμένου (κρύου) ολιγονουκλεοτιδίου $E_{B/A}$. Σε κάθε αντίδραση πρόσδεσης χρησιμοποιήθηκαν 2 μl από κάθε αντίδραση σύνθεσης των πρωτεϊνών, οι οποίες συντέθηκαν μαζί και όχι σε ξεχωριστές αντιδράσεις. Ο χρόνος επώασης με το κρύο ολιγονουκλεοτίδιο αναφέρεται σε κάθε διαδρομή.

Στην εικόνα 3-44 φαίνεται ότι υπάρχει πολύ αποτελεσματικότερος ανταγωνισμός από το μη σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο στην πρόσδεση των Da/Sc και m7/m8, σε σχέση με το Da/Sc/m7/m8. Τη διαφορά αυτή στην κινητική αποσύνδεσης ποσοτικοποιήσαμε στη συνέχεια ως εξής: Αφού μετρήσαμε την ένταση των ζωνών που εμφανίζονται, εκφράσαμε τα σύμπλοκα σε κάθε αντίδραση ανταγωνισμού ως ποσοστό του συμπλόκου που εμφανίζεται στην πρώτη αντίδραση κάθε σειράς, όπου δεν έχει προστεθεί κρύο ολιγονουκλεοτίδιο, επομένως αντιπροσωπεύει το 100% της πρόσδεσης για κάθε σύμπλοκο. Τα αποτελέσματα από αυτήν την προσέγγιση φαίνονται στην εικόνα 3-45.



ΕΙΚΟΝΑ 3-45 Γραφική απεικόνιση της συνεργατικής πρόσδεσης των ετεροδιμερών Da/Sc και m7/m8, όταν είναι προσδεμένα σε γειτονικές θέσεις στο DNA. Η φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ τους αυξάνει την κινητική σταθερότητα του συμπλόκου, γεγονός που αποδεικνύεται από τη σχετικά ισχυρή ταυτόχρονη πρόσδεση των δύο ετεροδιμερών ακόμη και σε μεγάλους χρόνους ανταγωνισμού, συγκρίνοντας με την αντίστοιχη πρόσδεση καθενός από αυτά ανεξάρτητα του άλλου.

Όπως φαίνεται, όταν τα δύο σύμπλοκα, Da/Sc και m7/m8 είναι ταυτόχρονα προσδεμένα σε γειτονικές θέσεις, η μεταξύ τους αλληλεπίδραση φαίνεται να σταθεροποιεί την πρόσδεσή τους στο DNA, τουλάχιστον *in vitro*. Στο σημείο αυτό πρέπει να γίνουν τρεις σημαντικές παρατηρήσεις. Πρώτον, ο ανταγωνισμός στην πρόσδεση του «ετεροτετραμερούς» Da/Sc/m7/m8 γίνεται ταυτόχρονα και με τους δύο κύριους ανταγωνιστές E_A και E_B , δηλαδή ανταγωνιζόμαστε τόσο την πρόσδεση του Da/Sc σε E_A όσο και την πρόσδεση του m7/m8 σε E_B . Δεύτερον, υπάρχει κάποιος βαθμός υπερεκτίμησης της σχετικής συνάφειας πρόσδεσης του «ετεροτετραμερούς», καθώς η ζώνη του συμπίπτει με αυτήν του διμερούς Da/Sc σε E_A , που πάντως είναι χαμηλής έντασης, ακόμη και για μικρούς χρόνους ανταγωνισμού. Τρίτον, παρόμοια τυχόν συνεργατική πρόσδεση στο ίδιο ολιγονουκλεοτίδιο ελέγχθηκε και για τα ετεροδιμερή Da/Sc και mδ/m3. Προηγούμενη εργασία είχε δείξει ότι η m3 μπορεί να αλληλεπιδρά μόνο με Sc, ενώ η mδ με κανέναν από τους δύο παράγοντες (Alifragis et al., 1997). Σε αυτήν τη σειρά των πειραμάτων, δεν αποδείχθηκε ισχυρότερη πρόσδεση για κανένα από τα δύο σύμπλοκα παρουσία του άλλου, όταν δηλαδή είναι ταυτόχρονα προσδεμένα στο ίδιο ολιγονουκλεοτίδιο (Κ.Κ., προσωπικές παρατηρήσεις). Αυτό ενισχύει την πιθανότητα η συνεργατική πρόσδεση που παρατηρήσαμε για τα διμερή Da/Sc και m7/m8 να είναι πραγματική, και όχι κάποιο μη ειδικό, τυχαίο προϊόν των πειραματικών συνθηκών.

Συνοψίζοντας, το αποτέλεσμα που προέκυψε θα μπορούσε να σημαίνει ότι, προκειμένου οι πρωτεΐνες $E(spl)$ να ενισχύσουν την κατασταλτική τους δράση, εκμεταλλεύονται την

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ικανότητά τους να προσδένονται στο DNA σε συνδυασμό με τη δυνατότητά τους να αλληλεπιδρούν με τους προσδεμένους στο DNA ενεργοποιητές.

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ακριβής μηχανισμός τον οποίο χρησιμοποιούν οι πρωτεΐνες bHLH της οικογένειας E(spl) για την στρατολόγηση σε γονίδια-στόχους και τη συνακόλουθη καταστολή της μεταγραφής δεν είναι γνωστός. Ενώ είναι μέχρι τώρα σαφές ότι οι πρωτεΐνες E(spl) έχουν τη δυνατότητα να προσδένονται στο DNA σε καθορισμένες θέσεις, η συσχέτιση αυτής τους της ιδιότητας με γεγονότα που έχουν να κάνουν με την καταστολή της νευρικής τύχης είναι ελλιπής. Για παράδειγμα, στον ενισχυτή SMC και στον 900 bp υποκινητή του *ac* υπάρχει μία θέση πρόσδεσης E_C, η μεταλλαγή της οποίας όμως δεν οδηγεί σε αποκαταστολή (Culi and Modolell 1998, Π. Αλιφραγκής, Διδακτορική Διατριβή). Από την άλλη, μια σειρά από ισχυρά δεδομένα υπέδειξαν ότι οι πρωτεΐνες E(spl), έχοντας τη δυνατότητα να αλληλεπιδρούν φυσικά με τους προνευρικούς παράγοντες Da/AS-C, μπορούν να στρατολογούνται στους στόχους τους μέσω ακριβώς της αλληλεπίδρασης αυτής, χωρίς να είναι αναγκαία η άμεση πρόσδεσή τους στο DNA (Giagtzoglou et al., 2003). Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν μια, καταρχήν, όσο το δυνατόν πιο αναλυτική διερεύνηση των βιοχημικών χαρακτηριστικών της πρόσδεσης των E(spl) στο DNA και, κατά δεύτερον, μια προσέγγιση στο ερώτημα εάν και σε ποιο βαθμό η άμεση πρόσδεση στο DNA είναι απαραίτητη για τη δράση τους ως μεταγραφικοί καταστολείς. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν υποδηλώνουν ότι η όποια λειτουργική εξειδίκευση ανάμεσα στις επτά πρωτεΐνες, όπως αυτή είχε αποκαλυφθεί από προηγούμενες εργασίες, μπορεί να τεθεί σε μία επιπλέον βάση, που δεν είναι άλλη από τη διακριτή ικανότητά τους να δημιουργούν ομο- και ετεροδιμερή, με διαφορεική συνάφεια πρόσδεσης στο DNA. Δείξαμε επιπλέον ότι, για την κατασταλτική τους δράση στα πλαίσια της πλευρικής αναστολής, μπορεί να εξαρτώνται, πέρα από την καλά επιβεβαιωμένη φυσική τους στρατολόγηση από τους ενεργοποιητές, και από άμεση πρόσδεση στο DNA, με τους δύο μηχανισμούς να μην αλληλοαποκλείονται, αλλά μάλλον να χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα για να μεγιστοποιήσουν την κατασταλτική τους ικανότητα.

4.1 Οι πρωτεΐνες E(spl) προσδένονται στο DNA με διακριτή συνάφεια

Σε προηγούμενες μελέτες είχεδειχθεί ότι οι επτά πρωτεΐνες E(spl) προσδένονται σε θέσεις πρόσδεσης E_B (CACGTG) ή E_C (CACGCG) με παρόμοια, αν όχι την ίδια ισχύ, ενώ σε άλλες περιπτώσεις βρέθηκαν να προσδένονται σημαντικά ισχυρότερα σε θέσεις E_B από ότι

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

σε E_C (Tietze et al., 1992, Ohsako et al., 1994, Van Doren et al., 1994, Jennings et al., 1999, Oellers et al., 1994, Culi and Modolell 1998). Στην περίπτωση μας, επιβεβαιώνεται ότι τα στοιχεία E_B αποτελούν σαφώς ισχυρότερες θέσεις πρόσδεσης, διαπιστώσαμε όμως επιπλέον ότι οι E(spl) μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις ομάδες, με βάση τη συνάφεια πρόσδεσής τους in vitro. Στη μία ομάδα μπορούμε να κατατάξουμε τις πρωτεΐνες που προσδένονται ισχυρά ως ομοδιμερή, δηλαδή τις mβ, mγ και m7. Στη δεύτερη ομάδα ανήκουν αυτές που προσδένονται αδύναμα, δηλαδή οι m5 και m8. Τέλος, σε μια τρίτη, ανεξάρτητη ομάδα, θα πρέπει να τοποθετήσουμε τις mδ και m3, που βρέθηκαν να προσδένονται λίγο ισχυρότερα από τις m5 και m8. Είναι σημαντικό ότι όλες έχουν την ικανότητα να προσδένονται στο DNA, τόσο in vivo όσο και in vitro, αλλά όχι το ίδιο ισχυρά. Η πρόσδεση που παρατηρούμε αντανακλά τόσο την ικανότητα διμερισμού, όσο και τη συνάφεια προς το DNA. Το γεγονός ότι το ομοδιμερές m7 προσδεδεμένο στο DNA έχει μικρότερο συντελεστή διάσπασης από το ετεροδιμερές m7/m8, ενώ το τελευταίο φαίνεται να προσδένεται ισχυρότερα (βλέπε εικόνα 3-9), υποδηλώνει ότι αποφασιστικός παράγοντας είναι ο διμερισμός και όχι η ισχύς πρόσδεσης στο DNA αυτή καθαυτή. Πιστεύουμε ότι οι συγκεκριμένες ειδικότητες πρόσδεσης βασίζονται στη δομή των επτά πρωτεϊνών και την αμινοξική ομοιότητα που επιδεικνύουν. Η σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας μεταξύ τους, όπως φαίνεται στην εικόνα 4-1, δείχνει ότι οι mβ, mγ και m7 σχηματίζουν μια ομάδα με υψηλότερο βαθμό αμινοξικής ομοιότητας σε σχέση με τις υπόλοιπες, ενώ και οι m5 και m8 μοιράζονται μεγαλύτερο αριθμό κοινών αμινοξέων.

	βασική περιοχή	έλικα 1	θηλιά
m8MeYtTKTQiYq	KVtKPMLEKRRARMNKCLDnLKTIVAE	lr...GDd
m7matkyEMSKTYQYR	KVMKPILEKRRARINKCLDELKDIMAE	CvaQtGD.
m5	napqsnsttFVSKTQhYl	KVtKPILEKRRARMNKCLDnLKTIVAE	fq...GDd
m3mVmEMSKTYQYR	KVMKPILEKRRARINKCLDDLKDIMVE	CLtQEGEH
mβmvlemEMSKTYQYR	KVMKPILEKRRARINKCLDELKDIMVE	CLtQEGEH
mγ	...ms slqmsEMSKTYQYR	KVMKPILEKRRARINKCLDELKDIMV	atLesEGEH
mδ	...mavzqqrFMTKTQhYR	KVtKPILEKRRARMNlyLDELKDLIVD	tMdaqGEq

έλικα 2

m8	GILRMDKAEMLEsaViFMRqQKtpKkVaceeq.....S.LP1
m7	A..KFEKADILEVTVqHLRKLKESKkhvpan.....PE
m5	AILRMDKAEMLEAaLVFMRKQvnlqQAp.....VSP1Pm
m3	.VTRLEKADILELTVdHMRKIKQrggLSlqgvvagvgsPptststahv
mβ	.ITRLEKADILELTVeHMKKLRaQQLrLssvtgg.VSPsaDpklsia
mγ	.VTRLEKADILELTVtHLqKMKQQRQhkrasgdes.LTPA
mδ	.VSKLEKADILELTVnYLKaQqQRvAnpq.....SPPDqvn1

περιοχή 0

m8	DSFKnGYMNAVNEVSRVMASTPGMSVDLGKSVMTHLGrvykNLQQfneacsaadfiq
m7	qSFRAGYI RAANEVSRALASLP rVdVaFGTTLMTHLGmRLNQLeQpmeqppqavntpl
m5	DSFKnGYMNAVSEISRVMAC TPAMSV DVGKTVMTHLGvefQrMLQadqvctsvtst
m3	ESFRSGYVHAAcqITqVLLcTqq. TdEIGRKIMkFLStRLieLQtqllqqqqqqqhqq
mβ	ESFRAGYVHAANEVSKtLaavPGVSVDLGTqLMSHLGhRLNyLQvrvpslp_gvplq
mγ	EGFRSGYIHAVNEVSRsLScLPGMnVsLGTqLMTHLGqRLNQLQpaekevlpv_apl
mδ	DKFRAGYtQAayEVSHIFSTVPLdLkFGThLMkqLGhqLkdMkQeeeiidmaeepv
m8	nsmdcssmdka.....pLSPASSGYhSDcDspptpqpmaq...LWRPW* (179)
m7	sivcgsssssstyssasscssISPVSSGYaSDnEsllqisspgq....VWRPW* (186)
m5	pr.....pLSPASSGYhSDnEdsqsaaspkpveetMWRPW* (178)
m3	riqssgrlafpllggygpaaaaaaisysfltskdelidvtsvdgnalsetasvssqeqgasepVWRPW* (224)
mβ	apvedqamvtpppsecdtlesgrcspapseeasstsgpMWRPW* (195)
mγ	ianrcaysvpispissyagspnsntsstshsllttidvtkmeddsedeenVWRPW* (206)
mδ	nladqkrkskpreedi hhgeeVWRPW* (173)

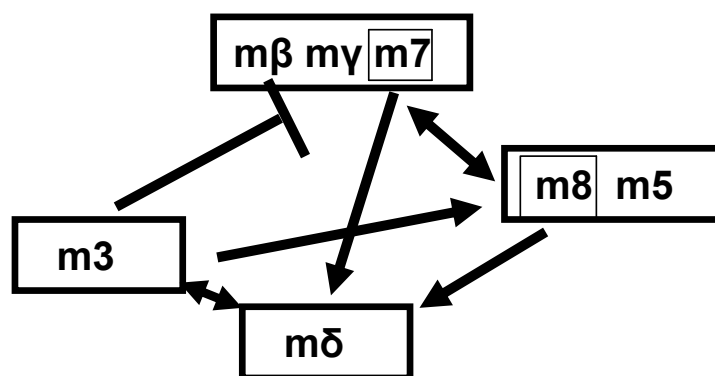
ΕΙΚΟΝΑ 4-1 Σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών των επτά πρωτεϊνών bHLH E(spl)

Θα πρέπει στο σημείο αυτό να τονιστεί ότι όλες οι προηγούμενες παρόμοιες μελέτες βασίστηκαν σε βακτηριακά παραγόμενες πρωτεΐνες. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, καταβλήθηκε πολύ μεγάλη προσπάθεια για τον χαρακτηρισμό της πρόσδεσης από πρωτεΐνες E(spl) που να έχουν παραχθεί από ευκαρυωτικά κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, παρήχθησαν μια σειρά από ολικά και πυρηνικά εκχυλίσματα από κύτταρα διαφόρων σειρών δροσόφιλας και θηλαστικών, παροδικά διαμολυσμένα με κατάλληλα πλασμίδια έκφρασης των πρωτεϊνών μας. Σε καμία περίπτωση όμως δεν παρατηρήσαμε ειδικές ζώνες συμπλόκων με σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια E_B και E_C σε πειράματα υστέρησης κινητικότητας, διαφορετικές από αυτές που έδιναν αντίστοιχα εκχυλίσματα ελέγχου. Επίσης παράχθηκαν ολικά εκχυλίσματα από έμβρυα, αλλά και προνύμφες δροσόφιλας, όπου υπερεκφράζονταν οι πρωτεΐνες E(spl) με βάση το σύστημα GAL4-UAS, και πάλι χωρίς αποτέλεσμα. Σε όλες τις παραπάνω προσπάθειες, πρέπει να τονιστεί ότι οι πρωτεΐνες E(spl) ανιχνεύονταν από το ειδικό αντίσωμα mAb323, που έχουμε στη διάθεσή μας, σε Western blot και μάλιστα σε μεγάλες ποσότητες, ανάλογα και με τον τρόπο καθαρισμού. Επομένως, το πρόβλημα δεν ήταν ότι δεν παράγονταν οι πρωτεΐνες μας, αλλά ότι ήταν αδρανείς ως προς την πρόσδεση στο DNA. Παρά τις κάθε είδους προσπάθειες για τη βελτιστοποίηση των βιοχημικών συνθηκών στις αντιδράσεις πρόσδεσης και τις συνθήκες της ηλεκτροφόρησης, το αποτέλεσμα ήταν το ίδιο. Δε μπορούμε να ξέρουμε για ποιο λόγο ήταν αδύνατη η παραγωγή ευκαρυωτικών πρωτεϊνών E(spl) με ικανότητα in vitro πρόσδεσης στο DNA. Πιθανόν να είναι απαραίτητες κάποιου είδους μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, στις

οποίες δεν είχαν πρόσβαση οι εκτοπικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες, οι οποίες εντούτοις είναι ενεργές σε μια σειρά από δοκιμασίες μεταγραφικής ρύθμισης τόσο σε κυτταρικές σειρές, όσο και στη μύγα. Οι πρωτεΐνες E(spl) που παράγονται από βακτηριακά κύτταρα διαθέτουν ενεργότητα πρόσδεσης, όπως φαίνεται και στην παρούσα εργασία. Βακτηριακά παραγόμενη mg μπορεί να προσδένεται *in vitro* σε ένα τμήμα του ενισχυτή vgQ, όταν αυτό περιέχει την αγρίου τύπου, αλλά όχι τη μεταλλαγμένη θέση πρόσδεσης E_c (βλέπε εικόνα 3-20). Όμως, απαιτήθηκε πολύ μεγαλύτερη, περίπου δεκαπλάσια, ποσότητα πρωτεΐνης για να επιτευχθεί πρόσδεση στο σημασμένο DNA, σε σχέση με την ίδια πρωτεΐνη από σύνθεση *in vitro*. Προφανώς, η πρωτεΐνη που παράγεται από βακτήρια είναι στο μεγαλύτερο μέρος της ανενεργή, πιθανότατα εξαιτίας της αδυναμίας της να αποκτήσει την κατάλληλη τριτοταγή διαμόρφωση στο βακτηριακό περιβάλλον, πολύ δε περισσότερο αν χρειαστεί να καθαριστεί κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες. Η σύνθεση των πρωτεϊνών E(spl) *in vitro* πιστεύουμε ότι πλεονεκτεί σε σχέση με την παραγωγή τους σε βακτήρια, καθώς δεν μεσολαβούν στάδια αποδιάταξης και επαναδιάταξης της παραγόμενης πρωτεΐνης. Επιπλέον, τα ευκαρυωτικά εκχυλίσματα από ερυθροκύτταρα κουνελιού που χρησιμοποιήθηκαν, εμπεριέχουν παράγοντες (μοριακούς συνοδούς), που υποβοηθούν ειδικά τις πρωτεΐνες bHLH να αποκτήσουν την κατάλληλη διαμόρφωση (Thayer and Weintraub, 1993, Shue and Kohtz, 1994). Τέλος, οι αντιδράσεις σύνθεσης έδειξαν ιδιαίτερα αξιόλογη επαναληψιμότητα και αξιοπιστία ως προς την παραγωγή των διαφόρων πρωτεϊνών, η ποσοτικοποίηση των οποίων ήταν εύκολη και ακριβής. Πιστεύουμε έτσι ότι μικρές διαφορές στην ειδικότητα και τη συνάφεια πρόσδεσης που αποκαλύφθηκαν εδώ και δεν είχαν φανεί σε προηγούμενες εργασίες, είναι συνέπεια του αυξημένου βαθμού ελέγχου σε μια σειρά από ποσοτικές και ποιοτικές παραμέτρους, που προσέφερε το συγκεκριμένο σύστημα. Το γεγονός ότι οι bHLH E(spl) φάνηκε να προσδένονται στις ίδιες θέσεις με παρόμοια συνάφεια σε προηγούμενη εργασία (Jennings et al., 1999), μπορεί να οφείλεται στο ότι χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές ποσότητες πρωτεϊνών ή διέφερε το ποσοστό της λειτουργικής πρωτεΐνης, ανάλογα με τη μέθοδο παραγωγής και καθαρισμού.

Ο έλεγχος της πρόσδεσης των ομο- και ετεροδιμερών οδήγησε σε μια σειρά από ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις. Για παράδειγμα, η ομάδα των πρωτεϊνών που προσδένονται ισχυρά ως ομοδιμερή (mβ, mg, m7) προσδένονται επίσης ισχυρά ως ετεροδιμερή με τις m5 και m8, που είναι οι πλέον αδύναμα προσδενόμενες ως ομοδιμερή από τις E(spl), με κάποιο τρόπο δηλαδή οι παράγοντες της πρώτης ομάδας ενισχύουν την ικανότητα πρόσδεσης της δεύτερης. Οι παράγοντες της πρώτης ομάδας ετεροδιμερίζονται μεταξύ τους, αλλά προσδένονται με ίση ή και μικρότερη συνάφεια σε σχέση με τα αντίστοιχα ομοδιμερή. Φάνηκε επίσης ότι η m3 έχει αρνητική επίδραση στην πρόσδεση των παραγόντων της πρώτης ομάδας, ενώ η mδ δε φαίνεται να τους επηρεάζει σημαντικά. Τα παραπάνω δεδομένα οδηγούν στην υπόθεση ότι μεταξύ των πρωτεϊνών E(spl) μπορεί να συγκροτείται

ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων, που σαφώς θα πρέπει να συσχετιστεί με τα πρότυπα έκφρασής τους, το οποίο μπορεί να τροποποιεί την ικανότητα πρόσδεσής τους στο DNA και τη συνακόλουθη κατασταλτική δράση τους στη μεταγραφή γονιδίων-στόχων. Στην εικόνα 4-2 γίνεται μια σχηματική αναπαράσταση ενός τέτοιου δικτύου, με βάση την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA των ομο- και ετεροδιμερών μεταξύ των E(spl). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές και τα ετεροδιμερή που τελικά σχηματίζονται θα μπορούσαν να υπόκεινται σε κάποιου είδους ρύθμιση. Για παράδειγμα, είναι γνωστό ότι στους προνευρικούς συναθροισμούς στο δίσκο του φτερού, αλλά και του ποδιού, εκφράζονται κυρίως τα γονίδια *m7* και *m8*, με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες να σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές με ιδιαίτερα ισχυρή ικανότητα πρόσδεσης, γεγονός που πιθανότατα ενισχύει την ικανότητά τους για καταστολή της νευρικής τύχης στα κύτταρα αυτά. Επίσης, το γεγονός ότι η *m5* αποδείχθηκε η πλέον αδύναμη από τις E(spl) όταν υπερεκφράστηκε σε διάφορα αναπτυξιακά πλαίσια, όπως και το ότι δεν της έχει αποδοθεί ακόμη κάποιος συγκεκριμένος ρόλος, ίσως αντιπροσωπεύει τελικά τη φτωχή ικανότητά της να προσδένεται ως ομοδιμερές στο DNA (Ligoxygakis et al., 1999). Τέλος, η γενικά χαμηλή έκφραση της *m3* στους αναπτυξιακούς δίσκους μπορεί να ευνοεί τη δράση των E(spl) στα πλαίσια της πλευρικής αναστολής, καθώς φάνηκε να δημιουργεί ετεροδιμερή με τις υπόλοιπες με μικρή συνάφεια πρόσδεσης.



ΕΙΚΟΝΑ 4-2 Οι επτά πρωτεΐνες E(spl) μπορούν να διακριθούν σε τρεις ομάδες, ανάλογα με την ικανότητά τους να προσδένονται στο DNA ως ομοδιμερή. Οι *m3* και *mδ* προσδένονται με ενδιάμεση ισχύ, οι *mβ*, *mγ* και *m7* ισχυρά, ενώ οι *m8* και *m5* είναι οι πιο αδύναμες. Στο σχήμα φαίνονται επίσης οι ενδιαφέρουσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μελών διαφορετικών ομάδων, που τροποποιούν τη σχετική συνάφεια πρόσδεσης. Για παράδειγμα, η *m3* μειώνει την πρόσδεση των *mβ*, *mγ* και *m7* ενώ αυξάνει την πρόσδεση των υπολοίπων. Οι *m8* και *m5* αλληλοενισχύονται με τις *mβ*, *mγ* και *m7*, ενώ η *mδ* ενισχύεται από τις *m8*, *m3* και *m7*.

4.2 Η λειτουργική εξειδίκευση των πρωτεϊνών E(spl) σε σχέση με την πρόσδεση στο DNA

Σχετικά με τη λειτουργική εξειδίκευση ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας, έχουν γίνει διάφορες υποθέσεις. Ένα από τα πλέον ελκυστικά σενάρια θα ήταν μια πιθανή συσχέτιση των ειδικών θέσεων πρόσδεσης στις ρυθμιστικές περιοχές των μεταγραφικών στόχων των E(spl), με ταυτόχρονη προτίμηση συγκεκριμένων μελών της οικογένειας για τις θέσεις αυτές. Θα μπορούσαν, για παράδειγμα, γονίδια-στόχοι να προσελκύουν διαφορετικές πρωτεΐνες E(spl), στο μέτρο που αυτές θα έδειχναν προτίμηση για συγκεκριμένες αλληλουχίες τύπου E_C. Κάτι τέτοιο δεν επαληθεύτηκε στα δικά μας πειράματα. Οι πρωτεΐνες E(spl) φάνηκαν να προσδένονται *in vitro* με την ίδια σχετική μεταξύ τους εξειδίκευση σε διάφορα στοιχεία E_C. Οι διαφορές στις εκατέρωθεν τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες, εφόσον αυτές διαφοροποιούνται από τις ιδανικές, φάνηκαν να επηρεάζουν την πρόσδεση με τον ίδιο τρόπο για όλα τα ομοδιμερή. Εξακολουθούμε να μην γνωρίζουμε πάντως για ποιο λόγο οι ενισχυτές vgQ(wt) και vgQ(μ4) καταστέλλονται *in vivo* μόνο από τις mγ και m3, μία κατάσταση που δεν παρατηρείται και *in vitro*. Πιθανόν αυτή η διαφοροποίηση στην ικανότητα πρόσδεσης να εξαρτάται από το μικροπεριβάλλον του ενισχυτή που εξετάζεται κάθε φορά και να μην είναι δυνατόν να αναπαραχθεί *in vitro*. Με άλλα λόγια, τα διάφορα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που είναι συνδεδεμένα με τον ενισχυτή και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν ή να καθορίζουν, άγνωστο σε ποιο βαθμό, τη στρατολόγηση των E(spl), με τρόπο πάντως που καθορίζεται από τις ειδικές θέσεις πρόσδεσης και τη σχετική απόσταση μεταξύ τους. Επομένως, στη βάση των αποτελεσμάτων αυτών, προκρίνουμε την υπόθεση ότι η όποια λειτουργική εξειδίκευση βασίζεται στη σχετική ικανότητά τους να προσδένονται στις ίδιες δυνητικά θέσεις ως ομο- ή ετεροδιμερή, η οποία όμως μπορεί να υπόκειται σε ρύθμιση από το μικροπεριβάλλον του συγκεκριμένου κάθε φορά ενισχυτή. Παρότι λοιπόν δε μπορεί να γίνει άμεση, απλή συσχέτιση ανάμεσα σε συγκεκριμένες θέσεις πρόσδεσης τύπου E_C και σε δεδομένες προτιμήσεις εκ μέρους των πρωτεϊνών E(spl) για επιμέρους τέτοιες θέσεις, είναι σαφές ότι τα τρία νουκλεοτίδια που περιβάλλουν εκατέρωθεν τον κυρίως πυρήνα του στοιχείου E παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο για την πρόσδεση από E(spl). Είναι χαρακτηριστικό ότι παρατηρείται καλύτερη πρόσδεση από E(spl) σε στοιχεία E_C με ιδανικές περιβάλλουσες αλληλουχίες, σε σχέση με αντίστοιχα στοιχεία E_B με μη ιδανικές τέτοιες αλληλουχίες, όπως φαίνεται από την καταστολή που επιφέρουν οι E(spl) *in vivo* στους ενισχυτές vgQ (μ1) και (μ2). Δε μπορεί όμως να στοιχειοθετηθεί από την προσέγγιση *in vitro* και να προεξοφληθεί ότι κάποιες από τις E(spl) απαιτούν συγκεκριμένες, ειδικές τέτοιες εκατέρωθεν των στοιχείων E αλληλουχίες.

Ένα γεγονός που σε πρώτη προσέγγιση μπορεί να θεωρηθεί παράδοξο στο σημείο αυτό, είναι το εξής. Ενώ οι πρωτεΐνες E(spl) προσδένονται σε στοιχεία E_B ισχυρότερα από ότι σε

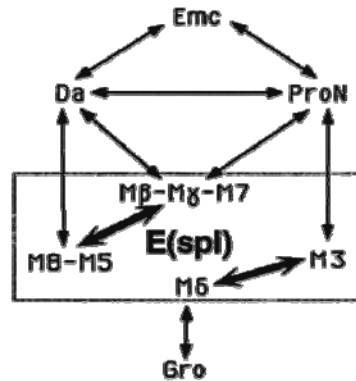
στοιχεία E_C , εντούτοις οι περισσότεροι ενισχυτές που αποτελούν τους καλά χαρακτηρισμένους μεταγραφικούς τους στόχους φέρουν κυρίως θέσεις E_C και όχι E_B . Πιστεύουμε ότι αυτό οφείλεται στην, επιβεβαιωμένη σε περισσότερες από μία περιπτώσεις, ιδιότητα των στοιχείων E_B να στρατολογούν κάποιον άγνωστο για μας, ισχυρό καταστολέα, ο οποίος απαντά τουλάχιστον στην κυτταρική σειρά S2, αλλά και στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού (βλέπε Αποτελέσματα, παράγραφοι 3.2.4 και 3.3.1). Η ειδική ή μη πρόσδεση του καταστολέα αυτού σε τυχόν στοιχεία E_B τέτοιων ρυθμιστικών περιοχών, όπως είναι π.χ. ο 900 bp υποκινητής του *ac* και ο ενισχυτής SMC του *sc*, θα μπορούσε να καταργήσει την ιδιαίτερη δυναμική των ενισχυτών αυτών στην ικανότητά τους να αποκρίνονται σε μικρές διακυμάνσεις της συγκέντρωσης των προνευρικών πρωτεϊνών και των πρωτεϊνών $E(spl)$, στα πλαίσια του ανταγωνισμού τους για τον καθορισμό της νευρικής τύχης. Δεν πρέπει επίσης να αγνοηθεί το γεγονός ότι τα στοιχεία E_B αποτελούν καλά χαρακτηρισμένους στόχους για την οικογένεια των πρωτεϊνών *Myc/Max*, οι οποίες έχουν ιδιαίτερα ευρύ πρότυπο έκφρασης κατά την ανάπτυξη και χρησιμοποιούνται και στη μύγα, όπως και στα θηλαστικά, για τον συντονισμό της κυτταρικής αύξησης με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

4.3 Ο ρόλος της περιοχής O

Προηγούμενη εκτεταμένη μελέτη από τους (Alifragis et al., 1997) είχε ρίξει φως στην ικανότητα που έχουν οι πρωτεΐνες $E(spl)$ να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, αλλά και με μέλη της οικογένειας των προνευρικών πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής συνοψίζονται στην εικόνα 4-3, όπου παρουσιάζεται ένα πιθανό τέτοιο δίκτυο αλληλεπιδράσεων, βασισμένο σε δοκιμασίες αλληλεπίδρασης στο σακχαρομύκητα με τη μέθοδο των δύο υβριδίων. Καταρχάς, πιστεύουμε ότι παρουσιάζεται γενικά αξιόλογη ομοιότητα με την εικόνα 4-2, όπου φαίνεται ένα παρόμοιο δίκτυο, βασισμένο από την παρούσα εργασία στην ικανότητα των πρωτεϊνών $E(spl)$ να προσδένονται στο DNA. Πρέπει να σημειωθεί ότι, παρότι στο σύστημα των δύο υβριδίων ανιχνεύτηκε ικανότητα ισχυρής αλληλεπίδρασης μεταξύ των $m\delta$ και $m5$, το συγκεκριμένο ετεροδιμερές δε φάνηκε ικανό για ισχυρή πρόσδεση στο DNA. Επιπλέον, τα ισχυρά ετεροδιμερή της $m\beta$ με τις $m5$ και $m8$, όπως αποκαλύφθηκαν με το σύστημα του σακχαρομύκητα, δε μπορούμε να αποσαφηνίσουμε αν έχουν αξιόλογη ικανότητα πρόσδεσης στο DNA, καθώς οι αντίστοιχες ζώνες που παρατηρήθηκαν στα *in vitro* πειράματα εμφάνιζαν την ίδια κινητικότητα με αυτήν του ομοδιμερούς $m\beta$ (βλέπε εικόνα 3-7). Με το σύστημα των δύο υβριδίων δε στάθηκε δυνατό, για μια σειρά από τεχνικούς λόγους, να χαρακτηριστεί με σαφήνεια η ικανότητα ομοδιμερισμού ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας. Με εξαίρεση πάντως τις παραπάνω μικρές διαφοροποιήσεις, υπάρχει πλήρης συμφωνία ανάμεσα στα αποτελέσματα των δύο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

προσεγγίσεων. Είναι εύλογη και προφανής η διαπίστωση λοιπόν, ότι η ικανότητα αλληλεπίδρασης μεταξύ των μελών της οικογένειας είναι προαπαιτούμενο για την πρόσδεση στο DNA.



ΕΙΚΟΝΑ 4-3 Δίκτυο αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών E(spl) μεταξύ τους, αλλά και με τις προνευρικές πρωτεΐνες, καθώς και με την da, όπως αποκαλύφθηκε χρησιμοποιώντας το σύστημα των δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα (από Aligragis et al., 1997). Με τη μέθοδο αυτή παρατηρήθηκαν ισχυρές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των mβ, mγ και m7 με τις m8 και m5, καθώς και μεταξύ των mδ και m3. Οι ίδιες αλληλεπιδράσεις αποδείχθηκαν ισχυρές και ως προς την πρόσδεση στο DNA, όπως φάνηκε εδώ. Ενδιαφέρον είναι επίσης το γεγονός ότι η ομάδα των E(spl) που προσδένεται πιο ισχυρά στο DNA (mβ, mγ και m7) είναι και αυτές με που αλληλεπιδρούν ευρύτερα σε πρωτεϊνικό επίπεδο με τους ενεργοποιητές.

Είναι γενικά παραδεκτό ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας bHLH χρησιμοποιούν, πιθανότατα χωρίς εξαιρέσεις, την περιοχή HLH προκειμένου να ομο- ή να ετεροδιμεριστούν με άλλες πρωτεΐνες bHLH. Επιπλέον συντηρημένες περιοχές έχει δείχθει ότι επίσης συμμετέχουν και ενισχύουν το διμερισμό, όπως για παράδειγμα η περιοχή LZ για τα μέλη της τρίτης και τέταρτης ομάδας, η περιοχή PAS για τα μέλη της έβδομης κ.ο.κ. (βλέπε Εισαγωγή, παράγραφοι 1.3.3, 1.3.4 και 1.3.7). Όσον αφορά τις πρωτεΐνες E(spl), δεν έχει γίνει ακόμη η άμεση διερεύνηση του τρόπου και των αναγκαίων συνθηκών για το διμερισμό τους. Τα αποτελέσματα της εργασίας μας έδειξαν ότι η περιοχή O, που αποτελείται από δύο αμφιπαθικές α-έλικες καρβοξυτελικά της περιοχής bHLH, παίζει αποφασιστικό ρόλο για την πρόσδεση στο DNA. Καθώς δεν υπάρχει κανένα δεδομένο που να συνηγορεί υπέρ της άποψης ότι η περιοχή O έχει άμεση επαφή με το DNA, η πιο εύλογη υπόθεση που μπορεί να κάνει κανείς είναι ότι η περιοχή O είναι απαραίτητη για τον ομο- και ετεροδιμερισμό μεταξύ των E(spl), δρώντας κατ' αναλογία με τις περιοχές LZ και PAS. Η έλλειψη της περιοχής O καταργεί την πρόσδεση της m7 in vitro ως ομοδιμερές, ενώ την ίδια περίπτωση έχουν και δύο αμινοξικές αντικαταστάσεις σε δύο συντηρημένα αμινοξέα της περιοχής (N92→T και E93→K). Αξίζει να σημειωθεί ότι η πρωτεΐνη m7NTEK δεν είναι γενικώς ανενεργή, καθώς είναι ικανή να καταργεί τη μεταγραφική ενεργοποίηση που επιφέρει το Sc σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης σε δροσοφιλικά κύτταρα S2

(Giagtzoglou et al., 2005), διατηρώντας την ικανότητα να αλληλεπιδρά μαζί του σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Η έλλειψη της περιοχής O μειώνει σημαντικά και την πρόσδεση της m7 in vivo, αν και δεν την καταργεί εντελώς, πιθανόν επειδή γίνεται σε κάποιο βαθμό διμερισμός μέσω των περιοχών HLH. Η κατασκευή των χιμαιρικών πρωτεϊνών GAD και DAG υπογράμμισε ακριβώς τη δραματική επίπτωση που έχει η περιοχή O στο διμερισμό μεταξύ των E(spl), καθώς η GAD ως ομοδιμερές φάνηκε να προσδένεται αδύναμα στο DNA in vitro, όπως και η mδ, ενώ η DAG ισχυρά, όπως η mγ. Πιστεύουμε ότι μία παράμετρος που μπορεί να παίζει αποφασιστικό ρόλο για τη λειτουργική εξειδίκευση μεταξύ των πρωτεϊνών E(spl), η οποία είχε αγνοηθεί μέχρι τώρα, αναδεικνύεται εδώ. Η παράμετρος αυτή δεν είναι άλλη από τη διαφορική ικανότητα των πρωτεϊνών E(spl) να διμερίζονται (όπως σαφώς υποδηλώνει η αναντιστοιχία στην πρόσδεση μεταξύ των GAD και mγ, αλλά και DAG και mδ), με τρόπο που φαίνεται να εξαρτάται από τις περιοχές HLH και O. Αυτό ακολούθως επηρεάζει τη σχετική ικανότητα των ομο- και ετεροδιμερών να προσδένονται σε καθορισμένες αλληλουχίες των ρυθμιστικών περιοχών των γονιδίων-στόχων. Ενισχύεται έτσι η άποψη που εκφράστηκε στην προηγούμενη παράγραφο, ότι η τελική λειτουργία των E(spl) όσον αφορά τη μεταγραφική καταστολή, τουλάχιστον στο μέτρο που αυτή εξαρτάται από την άμεση πρόσδεση στο DNA, ίσως να ρυθμίζεται αποφασιστικά από παράγοντες που διαμεσολαβούν για το διμερισμό τους, όπως φαίνεται να είναι η περιοχή O.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν πρόσφατα, αλλά και παλαιότερα δεδομένα, που υποδηλώνουν ότι η περιοχή O παίζει σημαντικό ρόλο για τις διαπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις στις οποίες εμπλέκονται οι πρωτεΐνες τύπου E(spl). Είναι γνωστό ότι η ειδικότητα του Hairy να καταστέλλει το φαινότυπο της υπερέκφρασης του Sc κατά την πρόωμη νευρογένεση, δηλαδή το θάνατο των αρσενικών ατόμων, χαρτογραφείται στην περιοχή O (Dawson et al., 1995). Δεδομένα του εργαστηρίου μας δείχνουν επίσης ότι το m8 έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με την ενεργοποιητική περιοχή του Da μέσω της περιοχής O (I. Ζαρίφη, προσωπική επικοινωνία). Με ανάλογο τρόπο και το m7 μπορεί να αλληλεπιδρά με την περιοχή ενεργοποίησης του Sc, μέσω όμως της περιοχής bHLH αυτή τη φορά (Giagtzoglou et al., 2005). Είναι σημαντικό ότι για την κατάργηση της ικανότητας ενεργοποίησης εκ μέρους των Da και Sc από τις m8 και m7 αντίστοιχα, οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις φαίνονται απαραίτητες. Η πρωτεΐνη Helt στον ποντικό, η οποία ανήκει στην υποοικογένεια Hey, βρέθηκε να αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες HES5 και Hey2, με την αλληλεπίδραση να διαμεσολαβείται αποκλειστικά μέσω των περιοχών O στην πρώτη περίπτωση και HLH στη δεύτερη. Η Helt βρέθηκε ότι ομοδιμερίζεται, με τρόπο που εξαρτάται από τις περιοχές O και HLH, το ενδιαφέρον όμως είναι ότι η αλληλεπιδράσεις γίνονται αποκλειστικά μέσω ομοειδών περιοχών, δηλαδή O-O και HLH-HLH. Ένα επιπλέον εύρημα από την ίδια εργασία είναι ότι σε μία αλληλεπίδραση μεταξύ Helt-Hey2, που διαμεσολαβείται όπως είπαμε μέσω της περιοχής HLH, η περιοχή O της Helt είναι ελεύθερη

και μπορεί να δράσει ως μοριακή γέφυρα, στρατολογώντας άλλες πρωτεΐνες (όπως μια μεταλλαγμένη μορφή της Helt από την οποία απουσιάζει η περιοχή HLH), διαμεσολαβώντας έτσι το σχηματισμό πολυπαραγοντικών συμπλόκων (Nakatani et al., 2004). Επίσης, η πρωτεΐνη XHRT1, ομόλογη της Hey στον Xenopus, αλληλεπιδρά με τις Xhair1 και Xhair2 με τρόπο που εξαρτάται από τις περιοχές bHLH και O, αλλά και τις καρβοξυτελικές περιοχές των τριών πρωτεϊνών (Taelman et al., 2004). Σε συνδυασμό και με τα αποτελέσματα από την παρούσα εργασία, γίνεται σαφές ότι η περιοχή O παίζει σημαντικό ρόλο στο διμερισμό των πρωτεϊνών bHLH, λειτουργώντας ως ένας επιπλέον παράγοντας επιλογής πρωτεϊνικών συνεργατών, πέρα από την περιοχή HLH. Καθώς υποδηλώνεται μάλιστα ότι οι περιοχές O και HLH μπορεί να χρησιμοποιούνται ανεξάρτητα από την ίδια πρωτεΐνη για την προσέλκυση διαφορετικών παραγόντων, αυτό θα έδινε τη δυνατότητα για οργάνωση πολυπρωτεϊνικών ρυθμιστικών συμπλόκων, με ικανότητα ενσωμάτωσης μηνυμάτων από πολλαπλές πηγές, με σκοπό τον όσο το δυνατόν πιο λεπτό και ταυτόχρονα δυναμικό έλεγχο της μεταγραφής.

4.4 Συνεργατική πρόσδεση μεταξύ E(spl) και Da/AS-C σε γειτονικές θέσεις στο DNA

Είναι γενικά παραδεκτό ότι η μεταγραφική απόκριση των φυσικών ενισχυτών εξαρτάται από πολύπλοκες και πολυδύναμες αλληλεπιδράσεις μεταξύ μεταγραφικών παραγόντων τόσο μεταξύ τους, όσο και με ειδικές θέσεις πρόσδεσης στο DNA. Η σχετική μάλιστα τοποθέτηση αυτών των θέσεων πρόσδεσης φαίνεται να παίζει αποφασιστικό ρόλο για το τελικό αποτέλεσμα. Η συγκρότηση του συμπλόκου εκείνου, για το οποίο έχει επικρατήσει ο όρος «ενισχυόσωμα» (enhanceosome, Merika and Thanos, 2001), αποτελεί κομβικό σημείο, όσον αφορά τελικά τη στρατολόγηση της βασικής μεταγραφικής μηχανής του κυττάρου για την έναρξη της μεταγραφής. Στα πλαίσια αυτά, πολλές φορές καθίσταται εξαιρετικά δύσκολη η αποσαφήνιση του ρόλου που παίζει κάποιος συγκεκριμένος παράγοντας και η σχετική συνεισφορά του στην όλη διαδικασία, καθώς η πολύπλευρη και πολυσύνθετη φύση των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μπορεί να αποκρύπτει ή να προσπερνά επιμέρους γεγονότα. Από αυτόν τον γενικό κανόνα δεν ξέφυγαν φυσικά οι πρωτεΐνες E(spl), καθώς ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο μπορούν να αναστέλλουν τη νευρική τύχη στα κύτταρα που λαμβάνουν το σήμα του N, στα πλαίσια της πλευρικής αναστολής, παραμένει ασαφής.

Εντούτοις, τα τελευταία χρόνια έχουν εξαχθεί πολύτιμες πληροφορίες, με βάση τη χρησιμοποίηση απλουστευμένων τεχνητών ενισχυτών, που έχουν τη δυνατότητα να αποκρίνονται στα διάφορα αναπτυξιακά πλαίσια, βασιζόμενοι στην ύπαρξη μικρού αριθμού θέσεων πρόσδεσης για συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες. Ο έλεγχος εκ μέρους

του ερευνητή του αριθμού και της σχετικής απόστασης των θέσεων αυτών, του προσφέρει ένα πολύτιμο εργαλείο για την διαλεύκανση των επιμέρους μηχανισμών που μπορεί να εκμεταλλεύεται κάθε μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση ή καταστολή του ενισχυτή. Για παράδειγμα, με αυτόν τον τρόπο αποδείχθηκε ότι η φυσική αλληλεπίδραση κάποιων από τις πρωτεΐνες E(spl) με τους προνευρικούς ενεργοποιητές, μπορεί να τις καθιστά ικανές να επιφέρουν μεταγραφική καταστολή, ακόμη και απουσία θέσεων πρόσδεσης για τις ίδιες (Giagtzoglou et al., 2003). Η πιστοποιημένη έτσι από προηγούμενες εργασίες ικανότητα των E(spl) να προσδένονται σε καθορισμένες αλληλουχίες στο DNA, αλλά και δεδομένα που έμμεσα υποδείκνυαν ότι κάτι τέτοιο πράγματι θα πρέπει να λαμβάνει χώρα σε κάποιες τουλάχιστον περιπτώσεις, δεν απαντά τελικά στο ερώτημα αν, σε δεδομένους φυσικούς ενισχυτές που είναι γνωστό ότι αποκρίνονται στις E(spl), η πρόσβασή τους βασίζεται σε διαπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις ή σε άμεση πρόσδεση στο DNA. Ένα βασικό σημείο προβληματισμού είναι το γεγονός ότι, ενώ τέτοιοι ενισχυτές περιέχουν θέσεις πρόσδεσης για τις E(spl), η αφαίρεση ή μεταλλαγή τους δε βρέθηκε να αλλοιώνει τα πρότυπα έκφρασής τους (Culi and Modolell, 1998, δεδομένα εργαστηρίου Χ. Δ.).

Στην παρούσα εργασία δείξαμε ότι πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης E_C έχουν την ικανότητα να περιορίζουν την έκφραση ενός τεχνητού ενισχυτή, αποτελούμενου αρχικά αποκλειστικά από πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης E_A , στο ένα και μοναδικό κύτταρο ΠΑΟ κάθε προνευρικού συναθροισμού στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού. Για την ερμηνεία του παραπάνω αποτελέσματος, πρέπει να λάβουμε υπόψη μας το γεγονός ότι, αν και κάποιες από τις E(spl), όπως οι m7 και m8, είναι παρούσες σε όλα τα κύτταρα ενός προνευρικού συναθροισμού εκτός από το ΠΑΟ κι έχουν αποδεδειγμένα την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τα προνευρικά σύμπλοκα Da/AS-C, αυτό δεν εμποδίζει τον ενισχυτή E_A να ενεργοποιείται από Da/AS-C στα κύτταρα αυτά. Η προσθήκη μίας και μόνης θέσης πρόσδεσης E_C μπροστά από οκτώ θέσεις E_A επίσης δεν κατάφερε να καταστείλει τον ενισχυτή στα πέραν του ΠΑΟ κύτταρα των προνευρικών συναθροισμών. Πιστεύουμε ότι τα σχετικά αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω ενισχύουν την υπόθεση ότι η άμεση πρόσδεση στο DNA αποτελεί αποφασιστικό παράγοντα, όσον αφορά τη δυνατότητα που έχουν οι E(spl) να καταστέλλουν γονίδια-στόχους στα πλαίσια της αναστολής της νευρικής τύχης.

Δεν πρέπει κανείς να παραβλέψει το γεγονός ότι, όπως φαίνεται στην εικόνα 4-2, ορισμένες μόνο από τις E(spl) έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τις προνευρικές πρωτεΐνες ή/και με την Da. Εντύπωση προκαλεί επίσης ότι, με βάση τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν εδώ, οι ίδιες πρωτεΐνες που έδειξαν να αλληλεπιδρούν ευρύτερα με τους προνευρικούς ενεργοποιητές (δηλαδή οι mβ, mγ και m7), ήταν και αυτές που βρέθηκαν να προσδένονται ισχυρότερα ως ομοδιμερή στο DNA. Με δεδομένο ότι σε διάφορα συστήματα μελέτης οι E(spl) βρέθηκε να στρατολογούνται στους μεταγραφικούς τους στόχους και με

τους δύο τρόπους, ελέγξαμε αν οι δύο μηχανισμοί χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα, με προφανή συνέπεια την αποτελεσματικότερη μεταγραφική ρύθμιση των στόχων αυτών. Το αποτέλεσμα ήταν ότι η αλληλεπίδραση των Da/Sc με τις m7/m8 ισχυροποιεί την πρόσδεσή τους στο DNA, όταν είναι ταυτόχρονα προσδεδεμένες σε γειτονικές θέσεις *in vitro*. Αξίζει να σημειωθεί ότι σχεδόν πάντα οι θέσεις πρόσδεσης για τις E(spl) γειτνιάζουν με αντίστοιχες θέσεις πρόσδεσης για τις προνευρικές πρωτεΐνες σε μια σειρά από ρυθμιστικά στοιχεία των κοινών τους μεταγραφικών στόχων (Culi and Modolell, 1998, Ohsako et al., 1994, Van Doren et al., 1994, Jarman et al., 1993a). Εξυφάνεται λοιπόν το ιδιαίτερα ενδιαφέρον σενάριο, η πρόσδεση των ενεργοποιητικών συμπλόκων Da/AS-C να ενισχύει την πρόσδεση των αντίστοιχων κατασταλτικών E(spl) και το αντίστροφο. Αυτό συνεπάγεται καταρχάς ένα προφανές πλεονέκτημα για τις δεύτερες στην κατασταλτική δράση τους επί των πρώτων. Μπορούμε όμως να επεκτείνουμε την υπόθεσή μας, θεωρώντας ότι αυτή η συνεργατικότητα καθιστά το ένα σύμπλοκο στην ουσία απαραίτητο για το άλλο. Θα μπορούσε δηλαδή μια αρχική παρουσία ενεργοποιητών ή καταστολέων σε έναν ενισχυτή, βασισμένη στην πρόσδεση στο DNA, να ενισχύεται μέσω διαπρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με τα ανταγωνιστικά σύμπλοκα, που βρίσκονται προσδεδεμένα σε γειτονικές θέσεις στο ίδιο στοιχείο. Το τελικό αποτέλεσμα σε κάθε περίπτωση θα είναι μια έντονη και ακριβής μεταγραφική απόκριση, που όμως βασίζεται σε μικρές διακυμάνσεις της συγκέντρωσης των δύο ανταγωνιζόμενων πρωτεϊνικών ομάδων. Τέτοιες διακυμάνσεις παρατηρούνται πράγματι στους προνευρικούς συναθροισμούς κατά τη διάρκεια της πλευρικής αναστολής για τον καθορισμό της νευρικής τύχης. Για παράδειγμα, τα επίπεδα της σηματοδότησης N αυξάνουν με την πάροδο του χρόνου στους προνευρικούς συναθροισμούς, επηρεάζοντας έτσι τα επίπεδα της μεταγραφής των γονιδίων bHLH. Η μεταγραφή των γονιδίων αυτών εξαρτάται επίσης και από τα ίδια τα προϊόντα τους, καθώς έχουμε θετική αυτορύθμιση για τις AS-C, αρνητική αυτορύθμιση για τις E(spl), ενεργοποίηση των E(spl) από τις AS-C και καταστολή των AS-C από τις E(spl). Ακόμη, ένας από τους πιθανούς στόχους της σηματοδότησης N φαίνεται να είναι η ενεργή αποικοδόμηση των προνευρικών πρωτεϊνών, οι οποίες ίσως σταθεροποιούνται από την ανταγωνιστική δράση της σηματοδότησης EGFR (M. Κηπαράκη, προσωπική επικοινωνία). Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι το τελικό αποτέλεσμα μιας μεταγραφικής ενεργοποίησης ή καταστολής κατά τη δημιουργία του νευρικού συστήματος προέρχεται από συνεχείς και δυναμικές διακυμάνσεις στην ποσότητα ή και στα επίπεδα ενεργότητας των δύο ανταγωνιζόμενων ομάδων πρωτεϊνών. Η ικανότητα πρόσδεσης λοιπόν στο DNA γονιδίων-στόχων μπορεί να παρέχει ένα επιπλέον σημείο ελέγχου αυτής της διαδικασίας, υπόθεση που ενισχύεται από τη διαπίστωση ότι οι θέσεις πρόσδεσης των E(spl) έχουν αυστηρά συντηρηθεί κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Το γεγονός ότι σε μεμονωμένους φυσικούς ενισχυτές δεν έχουν χαρακτηριστεί θέσεις πρόσδεσης που να είναι πραγματικά απαραίτητες για την καταστολή από E(spl) *in vivo*, μπορεί να σημαίνει απλώς

ότι δεν έχουν εντοπιστεί ακόμη όλες οι ρυθμιστικές αλληλουχίες-στόχοι. Άλλωστε πολλοί από τους στόχους τους παραμένουν άγνωστοι μέχρι σήμερα. Είναι σαφές πάντως ότι οι πρωτεΐνες E(spl) είναι απαραίτητες για τη σωστή ανάπτυξη των πρόδρομων των νευρικών κυττάρων και για να δράσουν θα πρέπει να στρατολογηθούν στα γονίδια-στόχους, είτε με άμεση πρόσδεση στο DNA είτε μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Ίσως η συνεργατική πρόσδεση τόσο στο DNA όσο και μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων να αποτελεί ένα αναγκαίο μηχανισμό που εξασφαλίζει έντονη μεταγραφική απόκριση σε συνθήκες στρες στη φύση και όχι στις εξιδανικευμένες συνθήκες του εργαστηρίου.

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Akam M. The molecular basis for metameric pattern in the Drosophila embryo. *Development*. 1987 Sep;101(1):1-22. Review.

Akazawa C, Sasai Y, Nakanishi S, Kageyama R. Molecular characterization of a rat negative regulator with a basic helix-loop-helix structure predominantly expressed in the developing nervous system. *J Biol Chem*. 1992 Oct 25;267(30):21879-1885.

Alifragis P, Poortinga G, Parkhurst SM, Delidakis C. A network of interacting transcriptional regulators involved in Drosophila neural fate specification revealed by the yeast two-hybrid system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Nov 25;94(24):13099-13104.

Amati B, Brooks MW, Levy N, Littlewood TD, Evan GI, Land H. Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. *Cell*. 1993 Jan 29;72(2):233-245.

Apidianakis Y, Nagel AC, Chalkiadaki A, Preiss A, Delidakis C. Overexpression of the m4 and malpha genes of the E(spl)-complex antagonizes notch mediated lateral inhibition. *Mech Dev*. 1999 Aug;86(1-2):39-50.

Aronheim A, Shiran R, Rosen A, Walker MD. The E2A gene product contains two separable and functionally distinct transcription activation domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Sep 1;90(17):8063-8067.

Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME. Notch signaling. *Science*. 1995 Apr 14; 268(5208):225-232. Review.

Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 1999 Apr 30;284(5415):770-776. Review.

Ashburner M. *A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Atchley WR, Fitch WM. A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 May 13;94(10):5172-176.

Ausubel FM, Brent R., Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

Ayer DE, Lawrence QA, Eisenman RN. Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3. *Cell*. 1995 Mar 10;80(5):767-776.

Bae S, Bessho Y, Hojo M, Kageyama R. The bHLH gene Hes6, an inhibitor of Hes1, promotes neuronal differentiation. *Development*. 2000 Jul;127(13):2933-2943.

Bailey AM, Posakony JW. Suppressor of hairless directly activates transcription of enhancer of split complex genes in response to Notch receptor activity. *Genes Dev*. 1995 Nov 1;9(21):2609-2622.

Bao ZZ, Cepko CL. The expression and function of Notch pathway genes in the developing rat eye. *J Neurosci*. 1997 Feb 15;17(4):1425-1434.

Benezra R, Davis RL, Lockshon D, Turner DL, Weintraub H. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell*. 1990 Apr 6;61(1):49-59.

Bertrand N, Castro DS, Guillemot F. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci*. 2002 Jul;3(7):517-530.

Bessho Y, Miyoshi G, Sakata R, Kageyama R. Hes7: a bHLH-type repressor gene regulated by Notch and expressed in the presomitic mesoderm. *Genes Cells*. 2001 Feb;6(2):175-185.

Bhat KM. Segment polarity genes in neuroblast formation and identity specification during *Drosophila* neurogenesis. *Bioessays*. 1999 Jun;21(6):472-485. Review

Bianchi-Frias D, Orian A, Delrow JJ, Vazquez J, Rosales-Nieves AE, Parkhurst SM. Hairy transcriptional repression targets and cofactor recruitment in *Drosophila*. *PLoS Biol*. 2004 Jul;2(7):E178.

Bier E, Vaessin H, Younger-Shepherd S, Jan LY, Jan YN. deadpan, an essential pan-neural gene in *Drosophila*, encodes a helix-loop-helix protein similar to the hairy gene product. *Genes Dev.* 1992 Nov;6(11):2137-2151.

Blair SS. Compartments and appendage development in *Drosophila*. *Bioessays.* 1995 Apr;17(4):299-309. Review.

Bray S. *Drosophila* development: Scalloped and Vestigial take wing. *Curr Biol.* 1999 Apr 8;9(7):R245-247. Review.

Brody T, Odenwald WF. Cellular diversity in the developing nervous system: a temporal view from *Drosophila*. *Development.* 2002 Aug;129(16):3763-3770. Review

Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.* 1997 May 2;89(3):331-340. Review

Brunet JF, Ghysen A. Deconstructing cell determination: proneural genes and neuronal identity. *Bioessays.* 1999 Apr;21(4):313-318.

Cabrera CV, Alonso MC. Transcriptional activation by heterodimers of the achaete-scute and daughterless gene products of *Drosophila*. *EMBO J.* 1991 Oct;10(10):2965-2973.

Cai M, Davis RW. Yeast centromere binding protein CBF1, of the helix-loop-helix protein family, is required for chromosome stability and methionine prototrophy. *Cell.* 1990 May 4;61(3):437-446

Calleja M, Herranz H, Estella C, Casal J, Lawrence P, Simpson P, Morata G. Generation of medial and lateral dorsal body domains by the pannier gene of *Drosophila*. *Development.* 2000 Sep;127(18):3971-3980.

Calleja M, Renaud O, Usui K, Pistillo D, Morata G, Simpson P. How to pattern an epithelium: lessons from achaete-scute regulation on the notum of *Drosophila*. *Gene.* 2002 Jun 12;292(1-2):1-12. Review.

Carey M, Smale ST. *Transcriptional Regulation in Eukaryotes: Concepts, Strategies, and Techniques.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.

Castella P, Sawai S, Nakao K, Wagner JA, Caudy M. HES-1 repression of differentiation and proliferation in PC12 cells: role for the helix 3-helix 4 domain in transcription repression. *Mol Cell Biol.* 2000 Aug;20(16):6170-6183.

Castro B, Barolo S, Bailey AM, Posakony JW. Lateral inhibition in proneural clusters: cis-regulatory logic and default repression by Suppressor of Hairless. *Development*. 2005 Aug;132(15):3333-3344.

Cavodeassi F, Modolell J, Gomez-Skarmeta JL. The Iroquois family of genes: from body building to neural patterning. *Development*. 2001 Aug;128(15):2847-2855. Review.

Certel K, Hudson A, Carroll SB, Johnson WA. Restricted patterning of vestigial expression in *Drosophila* wing imaginal discs requires synergistic activation by both Mad and the drifter POU domain transcription factor. *Development*. 2000 Jul;127(14):3173-3183.

Chen G, Fernandez J, Mische S, Courey AJ. A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev*. 1999 Sep 1;13(17):2218-2230.

Chen H, Thiagalingam A, Chopra H, Borges MW, Feder JN, Nelkin BD, Baylin SB, Ball DW. Conservation of the *Drosophila* lateral inhibition pathway in human lung cancer: a hairy-related protein (HES-1) directly represses achaete-scute homolog-1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 May 13;94(10):5355-5360.

Cheng SW, Davies KP, Yung E, Beltran RJ, Yu J, Kalpana GV. c-MYC interacts with INI1/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for transactivation function. *Nat Genet*. 1999 May;22(1):102-105.

Chia W, Yang X. Asymmetric division of *Drosophila* neural progenitors. *Curr Opin Genet Dev*. 2002 Aug;12(4):459-464. Review.

Chien CT, Hsiao CD, Jan LY, Jan YN. Neuronal type information encoded in the basic-helix-loop-helix domain of proneural genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 12;93(23):13239-13244.

Cooper MT, Tyler DM, Furriols M, Chalkiadaki A, Delidakis C, Bray S. Spatially restricted factors cooperate with notch in the regulation of Enhancer of split genes. *Dev Biol*. 2000 May 15;221(2):390-403.

Crews ST. Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev*. 1998 Mar 1;12(5):607-620. Review

Cubas P, de Celis JF, Campuzano S, Modolell J. Proneural clusters of achaete-scute expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc. *Genes Dev*. 1991 Jun;5(6):996-1008.

Culi J, Modolell J. Proneural gene self-stimulation in neural precursors: an essential mechanism for sense organ development that is regulated by Notch signaling. *Genes Dev.* 1998 Jul 1;12(13):2036-2047

Dang CV, Dolde C, Gillison ML, Kato GJ. Discrimination between related DNA sites by a single amino acid residue of Myc-related basic-helix-loop-helix proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Jan 15;89(2):599-602.

Davis RL, Turner DL. Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene.* 2001 Dec 20;20(58):8342-8357. Review.

Dawson SR, Turner DL, Weintraub H, Parkhurst SM. Specificity for the hairy/enhancer of split basic helix-loop-helix (bHLH) proteins maps outside the bHLH domain and suggests two separable modes of transcriptional repression. *Mol Cell Biol.* 1995 Dec;15(12):6923-6931.

de Celis JF, Bray S, Garcia-Bellido A. Notch signalling regulates veinlet expression and establishes boundaries between veins and interveins in the *Drosophila* wing. *Development.* 1997 May;124(10):1919-1928

de Celis JF, de Celis J, Ligoxygakis P, Preiss A, Delidakis C, Bray S. Functional relationships between Notch, Su(H) and the bHLH genes of the E(spl) complex: the E(spl) genes mediate only a subset of Notch activities during imaginal development. *Development.* 1996 Sep;122(9):2719-2728.

de Celis JF, Garcia-Bellido A. Roles of the Notch gene in *Drosophila* wing morphogenesis. *Mech Dev.* 1994 May;46(2):109-122.

Delidakis C, Artavanis-Tsakonas S. The Enhancer of split [E(spl)] locus of *Drosophila* encodes seven independent helix-loop-helix proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Sep 15;89(18):8731-8735.

Delidakis C, Preiss A, Hartley DA, Artavanis-Tsakonas S. Two genetically and molecularly distinct functions involved in early neurogenesis reside within the Enhancer of split locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 1991 Nov;129(3):803-823.

Dominguez M, Campuzano S. asense, a member of the *Drosophila* achaete-scute complex, is a proneural and neural differentiation gene. *EMBO J.* 1993 May;12(5):2049-2060.

Eastman DS, Slee R, Skoufos E, Bangalore L, Bray S, Delidakis C. Synergy between suppressor of Hairless and Notch in regulation of Enhancer of split m gamma and m delta expression. *Mol Cell Biol.* 1997 Sep;17(9):5620-5628.

Eckner R, Yao TP, Oldread E, Livingston DM. Interaction and functional collaboration of p300/CBP and bHLH proteins in muscle and B-cell differentiation. *Genes Dev.* 1996 Oct 1;10(19):2478-2490.

Ellenberger T, Fass D, Arnaud M, Harrison SC. Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes Dev.* 1994 Apr 15;8(8):970-980

Ellis HM, Spann DR, Posakony JW. extramacrochaetae, a negative regulator of sensory organ development in Drosophila, defines a new class of helix-loop-helix proteins. *Cell.* 1990 Apr 6;61(1):27-38.

Engel I, Murre C. The function of E- and Id proteins in lymphocyte development. *Nat Rev Immunol.* 2001 Dec;1(3):193-199. Review.

Facchini LM, Penn LZ. The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *FASEB J.* 1998 Jun;12(9):633-651. Review.

Ferre-D'Amare AR, Prendergast GC, Ziff EB, Burley SK. Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. *Nature.* 1993 May 6;363(6424):38-45.

Fischer A, Gessler M. Hey genes in cardiovascular development. *Trends Cardiovasc Med.* 2003 Aug;13(6):221-226. Review.

Fisher A, Caudy M (a). The function of hairy-related bHLH repressor proteins in cell fate decisions. *Bioessays.* 1998 Apr;20(4):298-306. Review

Fisher AL, Caudy M (b). Groucho proteins: transcriptional corepressors for specific subsets of DNA-binding transcription factors in vertebrates and invertebrates. *Genes Dev.* 1998 Jul 1;12(13):1931-1940. Review.

Freeman M. Cell determination strategies in the Drosophila eye. *Development.* 1997 Jan;124(2):261-270. Review.

Frise E, Knoblich JA, Younger-Shepherd S, Jan LY, Jan YN. The Drosophila Numb protein inhibits signaling of the Notch receptor during cell-cell interaction in sensory organ lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 15;93(21):11925-11932.

Garcia-Bellido A, de Celis JF. Developmental genetics of the venation pattern of Drosophila. *Annu Rev Genet.* 1992;26:277-304. Review

García-Bellido A. Genetic analysis of the achaete-scute system of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1979 91: 491-520.

García-Bellido A., Santamaria P. Developmental analysis of the achaete-scute system of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1978 88: 469-486.

Garcia-Garcia MJ, Romain P, Simpson P, Modolell J. Different contributions of *pannier* and *wingless* to the patterning of the dorsal mesothorax of *Drosophila*. *Development*. 1999 Aug;126(16):3523-3532.

Gartel AL, Shchors K. Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. *Exp Cell Res*. 2003 Feb 1;283(1):17-21. Review.

Gerber AN, Klesert TR, Bergstrom DA, Tapscott SJ. Two domains of MyoD mediate transcriptional activation of genes in repressive chromatin: a mechanism for lineage determination in myogenesis. *Genes Dev*. 1997 Feb 15;11(4):436-450.

Giagtzoglou N, Alifragis P, Koumbanakis KA, Delidakis C. Two modes of recruitment of E(spl) repressors onto target genes. *Development*. 2003 Jan;130(2):259-270.

Giagtzoglou N, Koumbanakis KA, Fullard J, Zarifi I, Delidakis C. Role of the Sc C terminus in transcriptional activation and E(spl) repressor recruitment. *J Biol Chem*. 2005 Jan 14;280(2):1299-1305.

Giebel B, Campos-Ortega JA. Functional dissection of the *Drosophila* enhancer of split protein, a suppressor of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jun 10;94(12):6250-6254.

Gomez-Skarmeta JL, Rodriguez I, Martinez C, Culi J, Ferres-Marco D, Beamonte D, Modolell J. Cis-regulation of *achaete* and *scute*: shared enhancer-like elements drive their coexpression in proneural clusters of the imaginal discs. *Genes Dev*. 1995 Aug 1;9(15):1869-1882.

Gonzalez F, Romani S, Cubas P, Modolell J, Campuzano S. Molecular analysis of the *asense* gene, a member of the *achaete-scute* complex of *Drosophila melanogaster*, and its novel role in optic lobe development. *EMBO J*. 1989 Dec 1;8(12):3553-3562.

Goulding SE, White NM, Jarman AP (b). *cato* encodes a basic helix-loop-helix transcription factor implicated in the correct differentiation of *Drosophila* sense organs. *Dev Biol*. 2000 May 1;221(1):120-131.

Goulding SE, zur Lage P, Jarman AP (a). *amos*, a proneural gene for *Drosophila* olfactory sense organs that is regulated by *lozenge*. *Neuron*. 2000 Jan;25(1):69-78

Grbavec D, Stifani S. Molecular interaction between TLE1 and the carboxyl-terminal domain of HES-1 containing the WRPW motif. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Jun 25;223(3):701-705.

Greenwald I. LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev.* 1998 Jun 15;12(12):1751-1762. Review.

Guo M, Jan LY, Jan YN. Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of Numb and Notch. *Neuron.* 1996 Jul;17(1):27-41

Haenlin M, Cubadda Y, Blondeau F, Heitzler P, Lutz Y, Simpson P, Romain P. Transcriptional activity of pannier is regulated negatively by heterodimerization of the GATA DNA-binding domain with a cofactor encoded by the u-shaped gene of *Drosophila*. *Genes Dev.* 1997 Nov 15;11(22):3096-3108.

Halder G, Polaczyk P, Kraus ME, Hudson A, Kim J, Laughon A, Carroll S. The Vestigial and Scalloped proteins act together to directly regulate wing-specific gene expression in *Drosophila*. *Genes Dev.* 1998 Dec 15;12(24):3900-3909.

Hamamori Y, Sartorelli V, Ogryzko V, Puri PL, Wu HY, Wang JY, Nakatani Y, Kedes L. Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and adenoviral oncoprotein E1A. *Cell.* 1999 Feb 5;96(3):405-413.

Hamamori Y, Wu HY, Sartorelli V, Kedes L. The basic domain of myogenic basic helix-loop-helix (bHLH) proteins is the novel target for direct inhibition by another bHLH protein, Twist. *Mol Cell Biol.* 1997 Nov;17(11):6563-6573.

Hankinson O. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1995;35:307-340. Review.

Hartenstein V, Posakony JW. A dual function of the Notch gene in *Drosophila* sensillum development. *Dev Biol.* 1990 Nov;142(1):13-30.

Hassan BA, Bermingham NA, He Y, Sun Y, Jan YN, Zoghbi HY, Bellen HJ. atonal regulates neurite arborization but does not act as a proneural gene in the *Drosophila* brain. *Neuron.* 2000 Mar;25(3):549-561.

Heim MA, Jakoby M, Werber M, Martin C, Weisshaar B, Bailey PC. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol Biol Evol.* 2003 May;20(5):735-747.

Heinzel T, Lavinsky RM, Mullen TM, Soderstrom M, Laherty CD, Torchia J, Yang WM, Brard G, Ngo SD, Davie JR, Seto E, Eisenman RN, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld

MG. A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature*. 1997 May 1;387(6628):43-48.

Heitzler P, Bourouis M, Ruel L, Carteret C, Simpson P. 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*. 1996 Jan;122(1):161-171.

Henriksson M, Luscher B. Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res*. 1996;68:109-182. Review.

Hirata J, Nakagoshi H, Nabeshima Y, Matsuzaki F. Asymmetric segregation of the homeodomain protein Prospero during *Drosophila* development. *Nature*. 1995 Oct 19;377(6550):627-630.

Hoshizaki DK, Hill JE, Henry SA. The *Saccharomyces cerevisiae* INO4 gene encodes a small, highly basic protein required for derepression of phospholipid biosynthetic enzymes. *J Biol Chem*. 1990 Mar 15;265(8):4736-4745.

Huang ML, Hsu CH, Chien CT. The proneural gene *amos* promotes multiple dendritic neuron formation in the *Drosophila* peripheral nervous system. *Neuron*. 2000 Jan;25(1):57-67.

Ishibashi M, Ang SL, Shiota K, Nakanishi S, Kageyama R, Guillemot F. Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes Dev*. 1995 Dec 15;9(24):3136-3148.

Ishibashi M, Moriyoshi K, Sasai Y, Shiota K, Nakanishi S, Kageyama R. Persistent expression of helix-loop-helix factor HES-1 prevents mammalian neural differentiation in the central nervous system. *EMBO J*. 1994 Apr 15;13(8):1799-1805.

Ishibashi M, Sasai Y, Nakanishi S, Kageyama R. Molecular characterization of HES-2, a mammalian helix-loop-helix factor structurally related to *Drosophila* hairy and Enhancer of split. *Eur J Biochem*. 1993 Aug 1;215(3):645-652.

Iso T, Kedes L, Hamamori Y. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol*. 2003 Mar;194(3):237-255. Review.

Iso T, Sartorelli V, Poizat C, Iezzi S, Wu HY, Chung G, Kedes L, Hamamori Y. HERP, a novel heterodimer partner of HES/E(spl) in Notch signaling. *Mol Cell Biol*. 2001 Sep;21(17):6080-6089.

Israel A. Signal transduction. IkappaB kinase all zipped up. *Nature*. 1997 Aug 7;388(6642):519-521.

Isshiki T, Pearson B, Holbrook S, Doe CQ. Drosophila neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny. *Cell*. 2001 Aug 24;106(4):511-521.

Jafar-Nejad H, Acar M, Nolo R, Lacin H, Pan H, Parkhurst SM, Bellen HJ. Senseless acts as a binary switch during sensory organ precursor selection. *Genes Dev*. 2003 Dec 1;17(23):2966-2978.

Jan YN, Jan LY. Neuronal cell fate specification in Drosophila. *Curr Opin Neurobiol*. 1994 Feb;4(1):8-13. Review.

Jarman AP, Ahmed I. The specificity of proneural genes in determining Drosophila sense organ identity. *Mech Dev*. 1998 Aug;76(1-2):117-125.

Jarman AP, Brand M, Jan LY, Jan YN (a). The regulation and function of the helix-loop-helix gene, *asense*, in Drosophila neural precursors. *Development*. 1993 Sep;119(1):19-29.

Jarman AP, Grau Y, Jan LY, Jan YN (b). *atonal* is a proneural gene that directs chordotonal organ formation in the Drosophila peripheral nervous system. *Cell*. 1993 Jul 2;73(7):1307-1321.

Jarman AP, Grell EH, Ackerman L, Jan LY, Jan YN. *Atonal* is the proneural gene for Drosophila photoreceptors. *Nature*. 1994 Jun 2;369(6479):398-400.

Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A. Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature*. 1995 Sep 28;377(6547):355-358.

Jennings B, de Celis J, Delidakis C, Preiss A, Bray S. Role of Notch and achaete-scute complex in the expression of Enhancer of split bHLH proteins. *Development* 1995 121: 3745-3752.

Jennings B, Preiss A, Delidakis C, Bray S. The Notch signalling pathway is required for Enhancer of split bHLH protein expression during neurogenesis in the Drosophila embryo. *Development*. 1994 Dec;120(12):3537-3548.

Jennings BH, Tyler DM, Bray SJ. Target specificities of Drosophila enhancer of split basic helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol*. 1999 Jul;19(7):4600-4610.

Jimenez F, Campos-Ortega JA. Defective neuroblast commitment in mutants of the achaete-scute complex and adjacent genes of *D. melanogaster*. *Neuron*. 1990 Jul;5(1):81-89.

Jimenez F, Modolell J. Neural fate specification in Drosophila. *Curr Opin Genet Dev*. 1993 Aug;3(4):626-632. Review.

Jimenez G, Ish-Horowicz D A chimeric enhancer-of-split transcriptional activator drives neural development and achaete-scute expression. *Mol Cell Biol.* 1997 Aug;17(8):4355-4362.

Jogi A, Persson P, Grynfeld A, Pahlman S, Axelson H. Modulation of basic helix-loop-helix transcription complex formation by Id proteins during neuronal differentiation. *J Biol Chem.* 2002 Mar 15;277(11):9118-9126.

Jones N. Transcriptional regulation by dimerization: two sides to an incestuous relationship. *Cell.* 1990 Apr 6;61(1):9-11. Review.

Kageyama R, Nakanishi S. Helix-loop-helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system. *Curr Opin Genet Dev.* 1997 Oct;7(5):659-665. Review.

Kageyama R, Ohtsuka T. The Notch-Hes pathway in mammalian neural development. *Cell Res.* 1999 Sep;9(3):179-188. Review

Kim HK, Siu G. The notch pathway intermediate HES-1 silences CD4 gene expression. *Mol Cell Biol.* 1998 Dec;18(12):7166-7175.

Kim J, Johnson K, Chen HJ, Carroll S, Laughon A. Drosophila Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic. *Nature.* 1997 Jul 17;388(6639):304-308.

Kim J, Sebring A, Esch JJ, Kraus ME, Vorwerk K, Magee J, Carroll SB. Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by Drosophila vestigial gene. *Nature.* 1996 Jul 11;382(6587):133-138.

Klamt C, Knust E, Tietze K, Campos-Ortega JA. Closely related transcripts encoded by the neurogenic gene complex enhancer of split of Drosophila melanogaster. *EMBO J.* 1989 Jan;8(1):203-210.

Knust E, Schrons H, Grawe F, Campos-Ortega JA. Seven genes of the Enhancer of split complex of Drosophila melanogaster encode helix-loop-helix proteins. *Genetics.* 1992 Oct;132(2):505-518.

Koelzer S, Klein T. A Notch-independent function of Suppressor of Hairless during the development of the bristle sensory organ precursor cell of Drosophila. *Development.* 2003 May;130(9):1973-1988.

Kramatschek B, Campos-Ortega JA. Neuroectodermal transcription of the Drosophila neurogenic genes E(spl) and HLH-m5 is regulated by proneural genes. *Development.* 1994 Apr;120(4):815-826.

Lai EC, Bodner R, Kavalier J, Freschi G, Posakony JW (a). Antagonism of notch signaling activity by members of a novel protein family encoded by the bearded and enhancer of split gene complexes. *Development*. 2000 Jan;127(2):291-306.

Lai EC, Bodner R, Posakony JW (b). The enhancer of split complex of *Drosophila* includes four Notch-regulated members of the bearded gene family. *Development*. 2000 Aug;127(16):3441-3455.

Lai EC, Burks C, Posakony JW. The K box, a conserved 3' UTR sequence motif, negatively regulates accumulation of enhancer of split complex transcripts. *Development*. 1998 Oct;125(20):4077-4088.

Lai EC, Posakony JW. Regulation of *Drosophila* neurogenesis by RNA:RNA duplexes? *Cell*. 1998 Jun 26;93(7):1103-1104.

Lai EC, Tam B, Rubin GM. Pervasive regulation of *Drosophila* Notch target genes by GY-box-, Brd-box-, and K-box-class microRNAs. *Genes Dev*. 2005 May 1;19(9):1067-1080.

Lai EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development*. 2004 Mar;131(5):965-973. Review.

Lecourtois M, Schweisguth F. The neurogenic suppressor of hairless DNA-binding protein mediates the transcriptional activation of the enhancer of split complex genes triggered by Notch signaling. *Genes Dev*. 1995 Nov 1;9(21):2598-2608.

Lemercier C, To RQ, Carrasco RA, Konieczny SF. The basic helix-loop-helix transcription factor Mist1 functions as a transcriptional repressor of myoD. *EMBO J*. 1998 Mar 2;17(5):1412-1422.

Leviten MW, Lai EC, Posakony JW. The *Drosophila* gene Bearded encodes a novel small protein and shares 3' UTR sequence motifs with multiple Enhancer of split complex genes. *Development*. 1997 Oct;124(20):4039-4051.

Leviten MW, Posakony JW. Gain-of-function alleles of Bearded interfere with alternative cell fate decisions in *Drosophila* adult sensory organ development. *Dev Biol*. 1996 Jun 15;176(2):264-283.

Leyns L, Gomez-Skarmeta JL, Dambly-Chaudiere C. iroquois: a prepattern gene that controls the formation of bristles on the thorax of *Drosophila*. *Mech Dev*. 1996 Sep;59(1):63-72.

Li L, Vaessin H. Pan-neural Prospero terminates cell proliferation during *Drosophila* neurogenesis. *Genes Dev*. 2000 Jan 15;14(2):147-151.

Ligoxygakis P, Bray SJ, Apidianakis Y, Delidakis C. Ectopic expression of individual E(spl) genes has differential effects on different cell fate decisions and underscores the biphasic requirement for notch activity in wing margin establishment in *Drosophila*. *Development*. 1999 May;126(10):2205-2214.

Ligoxygakis P, Yu SY, Delidakis C, Baker NE. A subset of notch functions during *Drosophila* eye development require Su(H) and the E(spl) gene complex. *Development*. 1998 Aug;125(15):2893-2900.

Lyden D, Young AZ, Zagzag D, Yan W, Gerald W, O'Reilly R, Bader BL, Hynes RO, Zhuang Y, Manova K, Benezra R. Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature*. 1999 Oct 14;401(6754):670-677.

Ma PC, Rould MA, Weintraub H, Pabo CO. Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell*. 1994 May 6;77(3):451-459.

Maier D, Marte BM, Schafer W, Yu Y, Preiss A. *Drosophila* evolution challenges postulated redundancy in the E(spl) gene complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jun 15;90(12):5464-5468.

Martin-Bermudo MD, Martinez C, Rodriguez A, Jimenez F. Distribution and function of the lethal of scute gene product during early neurogenesis in *Drosophila*. *Development*. 1991 Oct;113(2):445-454.

Martinez-Arias A, Bate M. *The Development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993.

Martinez-Garcia JF, Huq E, Quail PH. Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science*. 2000 May 5;288(5467):859-863.

Massari ME, Grant PA, Pray-Grant MG, Berger SL, Workman JL, Murre C. A conserved motif present in a class of helix-loop-helix proteins activates transcription by direct recruitment of the SAGA complex. *Mol Cell*. 1999 Jul;4(1):63-73

Massari ME, Jennings PA, Murre C. The AD1 transactivation domain of E2A contains a highly conserved helix which is required for its activity in both *Saccharomyces cerevisiae* and mammalian cells. *Mol Cell Biol*. 1996 Jan;16(1):121-129.

Massari ME, Murre C. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol*. 2000 Jan;20(2):429-440. Review.

Massari ME, Rivera RR, Volland JR, Quong MW, Breit TM, van Dongen JJ, de Smit O, Murre C. Characterization of ABF-1, a novel basic helix-loop-helix transcription factor expressed in activated B lymphocytes. *Mol Cell Biol.* 1998 Jun;18(6):3130-3139

McMahon SB, Van Buskirk HA, Dugan KA, Copeland TD, Cole MD. The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell.* 1998 Aug 7;94(3):363-374.

Merika M, Thanos D. Enhanceosomes. *Curr Opin Genet Dev.* 2001 Apr;11(2):205-208. Review.

Modolell J, Campuzano S. The achaete-scute complex as an integrating device. *Int J Dev Biol.* 1998;42(3):275-282. Review.

Modolell J. Patterning of the adult peripheral nervous system of *Drosophila*. *Perspect Dev Neurobiol.* 1997;4(4):285-296. Review.

Molkentin JD, Olson EN. Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Sep 3;93(18):9366-9373.

Mukherjee B, Morgenbesser SD, DePinho RA. Myc family oncoproteins function through a common pathway to transform normal cells in culture: cross-interference by Max and trans-acting dominant mutants. *Genes Dev.* 1992 Aug;6(8):1480-1492.

Murre C, Bain G, van Dijk MA, Engel I, Furnari BA, Massari ME, Matthews JR, Quong MW, Rivera RR, Stuiver MH. Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1994 Jun 21;1218(2):129-135. Review.

Murre C, McCaw PS, Baltimore D (a). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell.* 1989 Mar 10;56(5):777-783.

Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB (b). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell.* 1989 Aug 11;58(3):5375-44.

Naar AM, Beurang PA, Robinson KM, Oliner JD, Avizonis D, Scheek S, Zwicker J, Kadonaga JT, Tjian R. Chromatin, TAFs, and a novel multiprotein coactivator are required for synergistic activation by Sp1 and SREBP-1a in vitro. *Genes Dev.* 1998 Oct 1;12(19):3020-3031.

Nagaraj R, Pickup AT, Howes R, Moses K, Freeman M, Banerjee U. Role of the EGF receptor pathway in growth and patterning of the *Drosophila* wing through the regulation of vestigial. *Development*. 1999 Feb;126(5):975-985.

Nagel AC, Maier D, Krauss S, Mezger M, Preiss A. Neurogenic phenotypes induced by RNA interference with bHLH genes of the Enhancer of split complex of *Drosophila melanogaster*. *Genesis*. 2004 Jun;39(2):105-114.

Nair SK, Burley SK. X-ray structures of Myc-Max and Mad-Max recognizing DNA. Molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors. *Cell*. 2003 Jan 24;112(2):193-205.

Nakao K, Campos-Ortega JA. Persistent expression of genes of the enhancer of split complex suppresses neural development in *Drosophila*. *Neuron*. 1996 Feb;16(2):275-286.

Nakatani T, Mizuhara E, Minaki Y, Sakamoto Y, Ono Y. Helt, a novel basic-helix-loop-helix transcriptional repressor expressed in the developing central nervous system. *J Biol Chem*. 2004 Apr 16;279(16):16356-16367.

Nellesen DT, Lai EC, Posakony JW. Discrete enhancer elements mediate selective responsiveness of enhancer of split complex genes to common transcriptional activators. *Dev Biol*. 1999 Sep 1;213(1):33-53.

Ni M, Tepperman JM, Quail PH. PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell*. 1998 Nov 25;95(5):657-667.

Nikoloff DM, McGraw P, Henry SA. The INO2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a helix-loop-helix protein that is required for activation of phospholipid synthesis. *Nucleic Acids Res*. 1992 Jun 25;20(12):3253.

Nishimura M, Isaka F, Ishibashi M, Tomita K, Tsuda H, Nakanishi S, Kageyama R. Structure, chromosomal locus, and promoter of mouse *Hes2* gene, a homologue of *Drosophila* hairy and Enhancer of split. *Genomics*. 1998 Apr 1;49(1):69-75.

Nolo R, Abbott LA, Bellen HJ. Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in *Drosophila*. *Cell*. 2000 Aug 4;102(3):349-362.

Oellers N, Dehio M, Knust E. bHLH proteins encoded by the Enhancer of split complex of *Drosophila* negatively interfere with transcriptional activation mediated by proneural genes. *Mol Gen Genet*. 1994 Sep 1;244(5):465-473

Ohsako S, Hyer J, Panganiban G, Oliver I, Caudy M. Hairy function as a DNA-binding helix-loop-helix repressor of *Drosophila* sensory organ formation. *Genes Dev.* 1994 Nov 15;8(22):2743-2755.

Ohtsuka T, Ishibashi M, Gradwohl G, Nakanishi S, Guillemot F, Kageyama R. Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J.* 1999 Apr 15;18(8):2196-2207.

Olson EN. MyoD family: a paradigm for development? *Genes Dev.* 1990 Sep;4(9):1454-1461. Review.

Packman LC, Kubota K, Parker J, Gay NJ. Casein kinase II phosphorylates Ser468 in the PEST domain of the *Drosophila* IkappaB homologue cactus. *FEBS Lett.* 1997 Jan 2;400(1):45-50.

Panin VM, Papayannopoulos V, Wilson R, Irvine KD. Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature.* 1997 Jun 26;387(6636):908-912.

Park ST, Sun XH. The Tal1 oncoprotein inhibits E47-mediated transcription. Mechanism of inhibition. *J Biol Chem.* 1998 Mar 20;273(12):7030-7037.

Parkhurst SM, Meneely PM. Sex determination and dosage compensation: lessons from flies and worms. *Science.* 1994 May 13;264(5161):924-932.

Parkhurst SM. Groucho: making its Marx as a transcriptional co-repressor. *Trends Genet.* 1998 Apr;14(4):130-132. Review.

Paroush Z, Finley RL Jr, Kidd T, Wainwright SM, Ingham PW, Brent R, Ish-Horowicz D. Groucho is required for *Drosophila* neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins. *Cell.* 1994 Dec 2;79(5):805-815.

Paumard-Rigal S, Zider A, Vaudin P, Silber J. Specific interactions between vestigial and scalloped are required to promote wing tissue proliferation in *Drosophila melanogaster*. *Dev Genes Evol.* 1998 Oct;208(8):440-446.

Payne CT, Zhang F, Lloyd AM. GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with GL1 and TTG1. *Genetics.* 2000 Nov;156(3):1349-1362.

Pi H, Wu HJ, Chien CT. A dual function of phyllopod in *Drosophila* external sensory organ development: cell fate specification of sensory organ precursor and its progeny. *Development.* 2001 Jul;128(14):2699-2710.

Pitsouli C, Delidakis C. The interplay between DSL proteins and ubiquitin ligases in Notch signaling. *Development*. 2005 Sep;132(18):4041-4050.

Poortinga G, Watanabe M, Parkhurst SM. Drosophila CtBP: a Hairy-interacting protein required for embryonic segmentation and hairy-mediated transcriptional repression. *EMBO J*. 1998 Apr 1;17(7):2067-2078.

Portman DS, Emmons SW. The basic helix-loop-helix transcription factors LIN-32 and HLH-2 function together in multiple steps of a *C. elegans* neuronal sublineage. *Development*. 2000 Dec;127(24):5415-5426.

Powell LM, Zur Lage PI, Prentice DR, Senthinathan B, Jarman AP. The proneural proteins Atonal and Scute regulate neural target genes through different E-box binding sites. *Mol Cell Biol*. 2004 Nov;24(21):9517-9526.

Preiss A, Hartley DA, Artavanis-Tsakonas S. The molecular genetics of Enhancer of split, a gene required for embryonic neural development in *Drosophila*. *EMBO J*. 1988 Dec 1;7(12):3917-3927.

Puri PL, Sartorelli V, Yang XJ, Hamamori Y, Ogryzko VV, Howard BH, Kedes L, Wang JY, Graessmann A, Nakatani Y, Levrero M. Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Mol Cell*. 1997 Dec;1(1):35-45.

Puri PL, Sartorelli V. Regulation of muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications. *J Cell Physiol*. 2000 Nov;185(2):155-173. Review.

Quong MW, Massari ME, Zwart R, Murre C. A new transcriptional-activation motif restricted to a class of helix-loop-helix proteins is functionally conserved in both yeast and mammalian cells. *Mol Cell Biol*. 1993 Feb;13(2):792-800.

Rodriguez I, Hernandez R, Modolell J, Ruiz-Gomez M. Competence to develop sensory organs is temporally and spatially regulated in *Drosophila* epidermal primordia. *EMBO J*. 1990 Nov;9(11):3583-3592.

Rosenberg MI, Parkhurst SM. *Drosophila* Sir2 is required for heterochromatic silencing and by euchromatic Hairy/E(Spl) bHLH repressors in segmentation and sex determination. *Cell*. 2002 May 17;109(4):447-458.

Rushlow CA, Hogan A, Pinchin SM, Howe KM, Lardelli M, Ish-Horowicz D. The *Drosophila* hairy protein acts in both segmentation and bristle patterning and shows homology to N-myc. *EMBO J*. 1989 Oct;8(10):3095-3103.

Sakamoto W, Ohmori T, Kageyama K, Miyazaki C, Saito A, Murata M, Noda K, Maekawa M. The Purple leaf (PI) locus of rice: the PI(w) allele has a complex organization and includes two genes encoding basic helix-loop-helix proteins involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 2001 Sep;42(9):982-991.

Sambrook EF, Fritsch J, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Sasai Y, Kageyama R, Tagawa Y, Shigemoto R, Nakanishi S. Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to *Drosophila* hairy and Enhancer of split. *Genes Dev.* 1992 Dec;6(12B):2620-2634.

Sato M, Saigo K. Involvement of pannier and u-shaped in regulation of decapentaplegic-dependent wingless expression in developing *Drosophila notum*. *Mech Dev.* 2000 May;93(1-2):127-138.

Schlatter R, Maier D. The Enhancer of split and Achaete-Scute complexes of *Drosophilids* derived from simple ur-complexes preserved in mosquito and honeybee. *BMC Evol Biol.* 2005 Nov 17;5:67.

Schreiber-Agus N, Chin L, Chen K, Torres R, Rao G, Guida P, Skoultchi AI, DePinho RA. An amino-terminal domain of Mxi1 mediates anti-Myc oncogenic activity and interacts with a homolog of the yeast transcriptional repressor SIN3. *Cell.* 1995 Mar 10;80(5):777-786.

Schrons H, Knust E, Campos-Ortega JA. The Enhancer of split complex and adjacent genes in the 96F region of *Drosophila melanogaster* are required for segregation of neural and epidermal progenitor cells. *Genetics.* 1992 Oct;132(2):481-503.

Schuermans C, Guillemot F. Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. *Curr Opin Neurobiol.* 2002 Feb;12(1):26-34. Review.

Seugnet L, Simpson P, Haenlin M. Transcriptional regulation of Notch and Delta: requirement for neuroblast segregation in *Drosophila*. *Development.* 1997 May;124(10):2015-2025.

Shue G, Kohtz DS. Structural and functional aspects of basic helix-loop-helix protein folding by heat-shock protein 90. *J Biol Chem.* 1994 Jan 28;269(4):2707-2711.

Simmonds AJ, Liu X, Soanes KH, Krause HM, Irvine KD, Bell JB. Molecular interactions between Vestigial and Scalloped promote wing formation in *Drosophila*. *Genes Dev.* 1998 Dec 15;12(24):3815-3820.

Simpson P. A prepattern for sensory organs. *Drosophila development*. *Curr Biol*. 1996 Aug 1;6(8):948-950.

Simpson P. Notch and the choice of cell fate in *Drosophila* neuroepithelium. *Trends Genet*. 1990 Nov;6(11):343-345. Review.

Singson A, Leviten MW, Bang AG, Hua XH, Posakony JW. Direct downstream targets of proneural activators in the imaginal disc include genes involved in lateral inhibitory signaling. *Genes Dev*. 1994 Sep 1;8(17):2058-2071.

Skeath JB, Carroll SB. Regulation of achaete-scute gene expression and sensory organ pattern formation in the *Drosophila* wing. *Genes Dev*. 1991 Jun;5(6):984-995.

Skeath JB, Carroll SB. Regulation of proneural gene expression and cell fate during neuroblast segregation in the *Drosophila* embryo. *Development*. 1992 Apr;114(4):939-946.

Skeath JB, Doe CQ. Sanpodo and Notch act in opposition to Numb to distinguish sibling neuron fates in the *Drosophila* CNS. *Development*. 1998 May;125(10):1857-1865.

Skeath JB, Thor S. Genetic control of *Drosophila* nerve cord development. *Curr Opin Neurobiol*. 2003 Feb;13(1):8-15. Review

Skeath JB. The *Drosophila* EGF receptor controls the formation and specification of neuroblasts along the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* embryo. *Development*. 1998 Sep;125(17):3301-3312

Spana EP, Doe CQ. Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates. *Neuron*. 1996 Jul;17(1):21-26.

Spana EP, Doe CQ. The prospero transcription factor is asymmetrically localized to the cell cortex during neuroblast mitosis in *Drosophila*. *Development*. 1995 Oct;121(10):3187-3195.

Spicer DB, Rhee J, Cheung WL, Lassar AB. Inhibition of myogenic bHLH and MEF2 transcription factors by the bHLH protein Twist. *Science*. 1996 Jun 7;272(5267):1476-1480.

Stark A, Brennecke J, Russell RB, Cohen SM. Identification of *Drosophila* MicroRNA targets. *PLoS Biol*. 2003 Dec;1(3):E60.

Strom A, Castella P, Rockwood J, Wagner J, Caudy M. Mediation of NGF signaling by post-translational inhibition of HES-1, a basic helix-loop-helix repressor of neuronal differentiation. *Genes Dev*. 1997 Dec 1;11(23):3168-3181.

Taelman V, Van Wayenbergh R, Solter M, Pichon B, Pieler T, Christophe D, Bellefroid EJ. Sequences downstream of the bHLH domain of the *Xenopus* hairy-related

transcription factor-1 act as an extended dimerization domain that contributes to the selection of the partners. *Dev Biol.* 2004 Dec 1;276(1):47-63.

Takebayashi K, Sasai Y, Sakai Y, Watanabe T, Nakanishi S, Kageyama R. Structure, chromosomal locus, and promoter analysis of the gene encoding the mouse helix-loop-helix factor HES-1. Negative autoregulation through the multiple N box elements. *J Biol Chem.* 1994 Feb 18;269(7):5150-5156.

Tata F, Hartley DA. Inhibition of cell fate in *Drosophila* by Enhancer of split genes. *Mech Dev.* 1995 Jun;51(2-3):305-315.

Thayer MJ, Weintraub H. A cellular factor stimulates the DNA-binding activity of MyoD and E47. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Jul 15;90(14):6483-6487.

Tietze K, Oellers N, Knust E. Enhancer of splitD, a dominant mutation of *Drosophila*, and its use in the study of functional domains of a helix-loop-helix protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Jul 1;89(13):6152-6156.

Tomita K, Ishibashi M, Nakahara K, Ang SL, Nakanishi S, Guillemot F, Kageyama R. Mammalian hairy and Enhancer of split homolog 1 regulates differentiation of retinal neurons and is essential for eye morphogenesis. *Neuron.* 1996 Apr;16(4):723-734.

Trott RL, Kalive M, Paroush Z, Bidwai AP. *Drosophila melanogaster* casein kinase II interacts with and phosphorylates the basic helix-loop-helix proteins m5, m7, and m8 derived from the Enhancer of split complex. *J Biol Chem.* 2001 Jan 19;276(3):2159-2167.

Van Doren M, Bailey AM, Esnayra J, Ede K, Posakony JW. Negative regulation of proneural gene activity: hairy is a direct transcriptional repressor of achaete. *Genes Dev.* 1994 Nov 15;8(22):2729-2742.

Van Doren M, Ellis HM, Posakony JW. The *Drosophila* extramacrochaetae protein antagonizes sequence-specific DNA binding by daughterless/achaete-scute protein complexes. *Development.* 1991 Sep;113(1):245-255.

Van Doren M, Powell PA, Pasternak D, Singson A, Posakony JW. Spatial regulation of proneural gene activity: auto- and cross-activation of achaete is antagonized by extramacrochaetae. *Genes Dev.* 1992 Dec;6(12B):2592-2605.

Venuti JM, Cserjesi P. Molecular embryology of skeletal myogenesis. *Curr Top Dev Biol.* 1996;34:169-206. Review.

Villares R, Cabrera CV. The achaete-scute gene complex of *D. melanogaster*: conserved domains in a subset of genes required for neurogenesis and their homology to myc. *Cell.* 1987 Jul 31;50(3):415-424.

von Ohlen T, Doe CQ. Convergence of dorsal, dpp, and egfr signaling pathways subdivides the drosophila neuroectoderm into three dorsal-ventral columns. *Dev Biol.* 2000 Aug 15;224(2):362-372.

Wech I, Bray S, Delidakis C, Preiss A. Distinct expression patterns of different enhancer of split bHLH genes during embryogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Dev Genes Evol.* 1999 Jun;209(6):370-375.

Weintraub H, Dwarki VJ, Verma I, Davis R, Hollenberg S, Snider L, Lassar A, Tapscott SJ. Muscle-specific transcriptional activation by MyoD. *Genes Dev.* 1991 Aug;5(8):1377-1386.

Williams JA, Paddock SW, Vorwerk K, Carroll SB. Organization of wing formation and induction of a wing-patterning gene at the dorsal/ventral compartment boundary. *Nature.* 1994 Mar 24;368(6469):299-305.

Wurmbach E, Wech I, Preiss A. The Enhancer of split complex of *Drosophila melanogaster* harbors three classes of Notch responsive genes. *Mech Dev.* 1999 Feb;80(2):171-180.

Yamamoto Y, Yin MJ, Gaynor RB. IκappaB kinase alpha (IKKalpha) regulation of IKKbeta kinase activity. *Mol Cell Biol.* 2000 May;20(10):3655-3666.

Yan B, Heus J, Lu N, Nichols RC, Raben N, Plotz PH. Transcriptional regulation of the human acid alpha-glucosidase gene. Identification of a repressor element and its transcription factors Hes-1 and YY1. *J Biol Chem.* 2001 Jan 19;276(3):1789-1793.

Zecca M, Basler K, Struhl G. Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell.* 1996 Nov 29;87(5):833-844.

Zeng C, Younger-Shepherd S, Jan LY, Jan YN. Delta and Serrate are redundant Notch ligands required for asymmetric cell divisions within the *Drosophila* sensory organ lineage. *Genes Dev.* 1998 Apr 15;12(8):1086-1091.

Zhao C, Emmons SW. A transcription factor controlling development of peripheral sense organs in *C. elegans*. *Nature.* 1995 Jan 5;373(6509):74-78.

Ziemer A, Tietze K, Knust E, and Campos-Ortega JA. Genetic Analysis of Enhancer of split, a Locus Involved in Neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1988 119: 63-74.