

**ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ (IMBB)- ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ (FORTH)**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Γενετική ανάλυση ενδοκυττωτικών γονιδίων στην
σηματοδότηση Notch της *D.melanogaster***

ΚΥΡΙΑΚΗ ΚΑΝΑΚΟΥΣΑΚΗ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΧΡΗΣΤΟΣ ΔΕΛΙΔΑΚΗΣ

ΔΕΥΤΕΡΗ ΕΞΕΤΑΣΤΡΙΑ: ΜΑΡΙΑ ΜΟΝΑΣΤΗΡΙΩΤΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2006

Ευχαριστίες

Ξεκινώντας, θέλω να ευχαριστήσω τον Χρήστο Δελιδάκη που με εμπιστεύτηκε και μου έδωσε την ευκαιρία να δουλέψω στο εργαστήριο του. Έμαθα πολλά πράγματα κοντά του και αγάπησα αυτό που κάνω ώστε να θέλω να συνεχίσω και στο μέλλον. Για όλη τη βοήθεια και τη στήριξη, από την αρχή της Πτυχιακής μου μέχρι σήμερα....Ευχαριστώ πολύ.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης στην Χρυσούλα, που με μύησε στον κόσμο της Δροσόφιλας. Μπορεί τον τελευταίο χρόνο να ήταν μακριά, αλλά πάντα βοηθούσε κι έδινε συμβουλές όταν χρειαζόταν, και όσον αφορά στα πειράματα και γενικώς...

Ευχαριστώ πολύ τη Μαριάνθη, τη γειτόνισσα μου εντός και εκτός πάγκου, που ήταν πάντα πρόθυμη να με ακούσει και να με βοηθήσει, τόσο σε εργασιακό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Και δεν εννοώ μόνο τον τελευταίο χρόνο...

Ακόμα, ευχαριστώ την Ιωάννα που είχε τον τρόπο της να με κάνει να νιώθω καλύτερα όταν ήμουν (όπως συνήθως) αγχωμένη, την Κατερίνα για την συνεργασία μας, και όλα τα παιδιά του εργαστηρίου: Pawel, Kristina, John, Νίκο, Τάσο, Εύα, Μαρία και Βασίλη για το ευχάριστο κλίμα που δημιούργησαν στο εργαστήριο.

Επίσης, ευχαριστώ για την βοήθεια που μου προσφέρθηκε σε τεχνικό επίπεδο όλο αυτό το διάστημα που ήμουν στο εργαστήριο: το Γιάννη για τις ενέσεις στις μύγες, την κυρία Πόπη στο flyroom, την Στέλλα και την Κατερίνα στην κουζίνα, τον Αλέκο, και τον Γιώργο.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ τους φίλους μου, Νίκη και Χρήστο, για όλες τις καλές και κακές στιγμές που μοιραστήκαμε μαζί 6 χρόνια τώρα και που δεν έλειπαν ποτέ όταν τους χρειαζόμουν.

Θα μου λείψετε όλοι....

Περίληψη

Η σηματοδότηση Notch είναι ένας εξελικτικά συντηρημένος μηχανισμός που καθορίζει την κυτταρική τύχη κατά την ανάπτυξη πολλών ιστών. Η ενεργοποίηση της σηματοδότησης ξεκινά με την αλληλεπίδραση του διαμεμβρανικού υποδοχέα Notch με τους προσδέτες Delta και Serrate του γειτονικού κυττάρου, επίσης διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Προηγούμενα πειράματα έχουν δείξει ότι η ουβικουϊτινυλίωση των προσδετών και η επακόλουθη ενδοκυττάρωση τους είναι απαραίτητη για την αποστολή του σήματος Notch. Όμως, δεν είναι γνωστό με ποιο τρόπο η ενδοκυττάρωση των προσδετών εξυπηρετεί την σηματοδότηση. Στην παρούσα εργασία εξετάσαμε με γενετικές μεθόδους ποιοι πρωτεϊνικοί παράγοντες, γνωστοί για την συμμετοχή τους στα αρχικά στάδια του μηχανισμού ενδοκυττάρωσης, χρειάζονται για την αποστολή σήματος από το Delta. Από τους παράγοντες που εξετάστηκαν, η Αμφιφυσίνη και το Disabled δεν είναι απαραίτητοι για την αποστολή σήματος. Η πρωτεΐνη Eps15 φαίνεται επίσης να μην απαιτείται για την σηματοδότηση, αν και υπάρχει αμφιβολία αν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο που χρησιμοποιήθηκε είναι πλήρως ανενεργό, ενώ για την κλαθρίνη και την α-Ανταπτίνη δεν μπορέσαμε να φτάσουμε σε κάποιο αποτέλεσμα, καθώς οι μεταλλαγές τους παρουσιάζουν φαινότυπο κυτταρικής θνησιμότητας. Επίσης, η πρωτεόλυση της ενδοκυτταρικής περιοχής του Delta από την Πρεσενιλίνη δεν χρειάζεται για την αποστολή του σήματος και ελέγχεται αν η πρωτεόλυση του εξωκυττάρου τμήματος του Delta από το Kuzbanian θα έχει το ίδιο αποτέλεσμα. Τέλος, δημιουργήσαμε στελέχη μυγών στα οποία το ενδοκυττωτικό μονοπάτι σημαίνεται από μια GFP-ουβικουϊτίνη χιμαιρική πρωτεΐνη, και που στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθούν για να παρατηρηθεί η ενδοκυττωτική πορεία που ακολουθεί το Delta μέσα στο κύτταρο.

Abstract

Notch signaling is an evolutionarily conserved mechanism that determines cell fate during development of many tissues. Activation of signaling begins upon interaction of transmembrane Notch receptor with the transmembrane ligands Delta and Serrate of the neighboring cell. Previous experiments have shown that ubiquitination of ligands and their subsequent endocytosis is necessary for Notch signal sending. However, it is not known in what way ligand endocytosis facilitates signalling. In the present work we examined, using genetic approaches, which protein factors, known for their involvement at the initial stages of endocytosis mechanism, are required for signal sending by Delta. Among the tested factors, Amphiphysin and Disabled are not necessary for signal sending. Eps15 protein seems, also, not required for signaling, although there is doubt whether the mutated allele that was used was completely inactive, while for clathrin and α -Adaptin we could not get results, as their mutations exhibit a cell lethal phenotype. In addition, proteolytic cleavage of the intracellular part of Delta by Presenilin is not required for signal sending and it is being tested whether proteolytic cleavage of the extracellular part of Delta by Kuzbanian will give the same result. Finally, we constructed fly stocks in which the endocytic pathway is marked by a GFP-ubiquitin fusion protein, and which will be used in the future in order to observe the endocytic route that Delta follows in the cell.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εισαγωγή

Το μονοπάτι σηματοδότησης Notch στη <i>D. Melanogaster</i>σελ 1
Αλληλεπίδραση των προσδετών με τον υποδοχέα Notchσελ 2
Ουβικουΐτινυλίωση.....σελ 3
Neur και Mindbomb: Οι E3 λιγάσες ουβικουΐτίνης της σηματοδότησης Notch.....σελ 4
Ενδοκυττάρωση και διακίνηση μεμβρανικών πρωτεϊνών..σελ 5
Ο ρόλος της ενδοκυττάρωσης στην αποστολή σήματος Notch.....σελ 6
Σκοπός της εργασίας.....σελ 8

Υλικά και Μέθοδοι

Γονότυποι μυγών και μέθοδοι εκτοπικής έκφρασης.....σελ 9
Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις.....σελ 9
Κλωνοποίηση των pm-GFP-ubi ενθεμάτων σε πλασμιδιακούς φορείς Ract και PUASt.....σελ 11
Κλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα Ract.....σελ 11
Κλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα PUAStσελ 12
Δημιουργία διπλού μεταλλάγματος pm-GFP-ubiΔGG-I44A K48R.....σελ 13

Αποτελέσματα

Ο ρόλος της Αμφιφυσίνης στην αποστολή σήματος Notch.....σελ 15
Ο ρόλος του Disabled στην αποστολή σήματος Notchσελ 18
Ο ρόλος του Eps15 στην αποστολή σήματος Notchσελ 19
Ο ρόλος της Πρεσενιλίνης στην αποστολή σήματος Notchσελ 20
Άλλες πρωτεΐνες του μηχανισμού ενδοκυττάρωσης: α-Ανταπτίνη, Κλαθρίνη.....σελ 22
Σήμανση των ενδοκυττωτικών διαμερισμάτων: pm-GFP-ubi.....σελ 23

<u>Συζήτηση</u>σελ 26

<u>Βιβλιογραφία</u>σελ 30

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το Μονοπάτι σηματοδότησης Notch στη *D. melanogaster*

Η σηματοδότηση Notch είναι ένας εξελικτικά συντηρημένος μηχανισμός και συμμετέχει σε πολλές αναπτυξιακές διαδικασίες (πχ νευρογένεση, μυογένεση, ωογένεση κλπ). Η κυτταρική αλληλεπίδραση μέσω Notch έχει ως αποτέλεσμα τον καθορισμό της κυτταρικής τύχης.

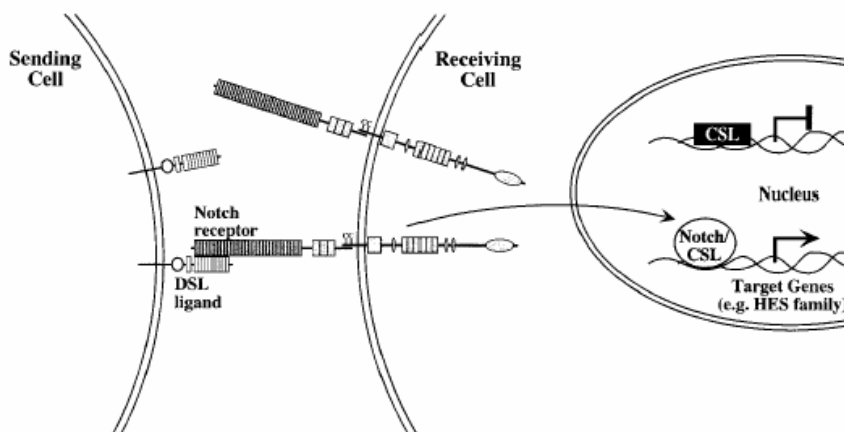
Ο υποδοχέας Notch είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη απλής διέλευσης. Πριν την τοποθέτηση του στη μεμβράνη και ενώ ακόμα βρίσκεται στο εκκριτικό μονοπάτι, ο υποδοχέας Notch πρωτεολύεται από μια Φουρίνη (S1 cleavage) και φτάνει στην κυτταρική επιφάνεια σαν ετεροδιμερές. Η εξωκυττάρια περιοχή του περιλαμβάνει 36 συνεχόμενες επαναλήψεις EGF και 3 επαναλήψεις Notch πλούσιες σε κυστεΐνη, ενώ η ενδοκυττάρια περιοχή περιλαμβάνει 6 συνεχόμενες επαναλήψεις αγκυρίνης, μια περιοχή πλούσια σε γλουταμίνη και μια αλληλουχία PEST (Artavanis-Tsakonas, 1999).

Μέσω των EGF επαναλήψεων, ο υποδοχέας Notch αλληλεπιδρά με τους προσδέτες DI και Ser (επίσης διαμεμβρανικές πρωτεΐνες απλής διέλευσης) του γειτονικού κυττάρου. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την πρωτεόλυση και απομάκρυνση της εξωκυττάριας περιοχής του υποδοχέα (S2 cleavage) από το Kuzbanian, μια ADAM μεταλλοπρωτεάση. Το υπόλοιπο μόριο του υποδοχέα που παραμένει συνδεδεμένο στη μεμβράνη, πρωτεολύεται σχεδόν αμέσως κοντά στην διαμεμβρανική περιοχή από την πρεσενιλίνη (S3 cleavage) κι έτσι απελευθερώνεται η ενδοκυττάρια περιοχή του υποδοχέα μέσα στο κύτταρο. Η διαλυτή πλέον ενδοκυττάρια περιοχή του Notch μπορεί να εισέλθει στον πυρήνα, όπου αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα Su(H) (Artavanis-Tsakonas, 1999; Baron, 2003).

Απουσία της ενδοκυττάριας περιοχής του Notch, ο μεταγραφικός παράγοντας Su(H) (Suppressor of Hairless) καταστέλλει τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων μέσω της στρατολόγησης μιας απατεκυλάσης ιστονών. Όταν όμως η ενδοκυττάρια περιοχή του Notch προσδεθεί στον Su(H), η απατεκυλάση απομακρύνεται και στη θέση της στρατολογούνται ακετυλάσες ιστονών και η πρωτεΐνη Mastermind, οπότε η μεταγραφή ενεργοποιείται (Baron, 2003). Η σηματοδότηση Notch σταματάει με την αποικοδόμηση της διαλυτής ενδοκυττάριας περιοχής του Notch.

Τα γονίδια των οποίων η μεταγραφή ενεργοποιείται από το Notch είναι, μεταξύ άλλων, τα *E(spl)* (Enhancer of split) γονίδια. Αυτά κωδικοποιούν bHLH (basic Helix-Loop-Helix) πρωτεΐνες που με τη σειρά τους ρυθμίζουν την έκφραση άλλων γονιδίων. Στην περίπτωση των προνευρικών συναθροισμών, οι πρωτεΐνες E(spl), σε συνεργασία με την πρωτεΐνη Groucho, καταστέλλουν τη λειτουργία των προνευρικών πρωτεϊνών Achaete-Scute, οι οποίες είναι επίσης bHLH πρωτεΐνες και προωθούν τη νευρική τύχη των κυττάρων (Artavanis-Tsakonas, 1999).

Core Notch Signaling Pathway



Αλληλεπίδραση των προσδετών με τον υποδοχέα Notch

Για να ενεργοποιηθεί ο υποδοχέας Notch θα πρέπει να αλληλεπιδράσει με έναν από τους προσδέτες του Delta και Serrate. Η αλληλεπίδραση γίνεται μέσω της DSL περιοχής των προσδετών και των EGF επαναλήψεων του Notch. Όμως, για να οδηγήσει η αλληλεπίδραση αυτή στην αποστολή σήματος πρέπει να υπάρχουν ορισμένες προϋποθέσεις, καθώς δεν είναι όλα τα σύμπλοκα του Notch με τους προσδέτες του ενεργά.

Η αλληλεπίδραση των προσδετών με τον υποδοχέα Notch στο ίδιο κύτταρο δεν οδηγεί σε σηματοδότηση. Μάλιστα στην περίπτωση αυτή, οι προσδέτες δεσμεύουν το Notch σε ανενεργά σύμπλοκα ανταγωνιζόμενοι τις «σωστές» αλληλεπιδράσεις του Notch με τους προσδέτες των διπλανών κυττάρων (cis inhibition) και παρεμποδίζουν την λήψη σήματος (Jacobsen et al, 1998) Το φαινόμενο αυτό είναι έντονο όταν η ποσότητα των προσδετών

του κυττάρου είναι πολύ υψηλή (υπερέκφραση προσδετών) Εικάζεται ότι κατά το cis inhibition οι EGF επαναλήψεις του Notch στις οποίες προσδένονται οι προσδέτες είναι διαφορετικές από αυτές στις οποίες προσδένονται κατά την ενεργοποίηση της σηματοδότησης.

Επίσης, η αλληλεπίδραση των προσδετών από τους οποίους λείπει το ενδοκυττάριο τμήμα, με το τον υποδοχέα Notch δεν οδηγεί σε σηματοδότηση, καθώς πειράματα έχουν δείξει ότι η εκκρινόμενη μορφή του Delta που παράγεται με πρωτεόλυση του εξωκυττάρου τμήματος του δρα ανταγωνιστικά ως προς τη σηματοδότηση (Mishra-Gorur et al, 2002). Για την αποστολή του σήματος, λοιπόν, χρειάζεται και το ενδοκυττάριο τμήμα των προσδετών, κι αυτό γιατί το ενδοκυττάριο τμήμα είναι απαραίτητο για την ουβικουΐτινυλίωση και την επακόλουθη ενδοκυττάρωση των προσδετών (βλ. παρακάτω)

Ουβικουΐτινυλίωση

Η ουβικουΐτίνη είναι ένα πεπτίδιο 76 αμινοξέων που συνδέεται με ομοιοπολικό δεσμό σε πρωτεΐνες μέσω μιας σειράς ενζύμων. Αρχικά, η ουβικουΐτίνη συνδέεται μέσω ενός θειοεστέρα υψηλής ενέργειας με το ένζυμο E1 κι έτσι η ουβικουΐτίνη ενεργοποιείται. Η ενεργοποιημένη ουβικουΐτίνη μεταφέρεται στο ένζυμο E2 και τελικά, μέσω μιας E3 λιγάσης ουβικουΐτίνης, προσδένεται σε κατάλοιπα λυσίνης της πρωτεΐνης-στόχου. Για την πρόσδεση χρησιμοποιείται το τελικό (76ο) κατάλοιπο γλυκίνης του μορίου της ουβικουΐτίνης. Η διαδικασία μπορεί να συνεχιστεί με την προσθήκη και δεύτερου μορίου ουβικουΐτίνης σε κατάλοιπα λυσίνης, στη θέση 48 ή 63 της ήδη υπάρχουσας ουβικουΐτίνης κλπ.

Η πολύ-ουβικουΐτινυλίωση των πρωτεϊνών συνήθως έχει σαν συνέπεια τη στόχευση τους στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση. Η μόνο-ουβικουΐτινυλίωση των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών έχειδειχθεί ότι μπορεί να λειτουργεί ως σήμα για την ενδοκυττάρωση τους (Haglund et al., 2003). Η E3 λιγάση ουβικουΐτίνης αναγνωρίζει ειδικά το υπόστρωμα το οποίο θα ουβικουΐτινυλιωθεί και μπορεί να αλληλεπιδρά μαζί του άμεσα ή μέσω άλλων πρωτεϊνών. Επίσης, συχνά οι E3 λιγάσες ουβικουΐτίνης έχουν τη δυνατότητα της αυτό-ουβικουΐτινυλίωσης και ρυθμίζουν έτσι και τη δική τους αποικοδόμηση.

Neur και Minbomb: Οι E3 λιγάσες ουβικουΐνης της σηματοδότησης Notch

Το γονίδιο *neuralized* ανακαλύφθηκε εξ αίτιας της νευρικής υπερτροφίας που προκαλεί η απώλεια λειτουργίας του, όπως συμβαίνει και με πολλά άλλα γονίδια του μονοπατιού Notch: *Notch*, *Delta*, τα γονίδια *E(spl)* και το *mastermind*. Η πρωτεΐνη *Neuralized* αποτελείται από 754 αμινοξέα. Στο μόριο της πρωτεΐνης περιλαμβάνονται δυο περιοχές NHR (Neuralized Homology Regions), αρκετά συντηρημένες στα μόρια *Neur*, και μια περιοχή C₃HC₄ RING finger που δεσμεύει Zn²⁺ κοντά στο καρβοξυτελικό της άκρο (Price et al., 1993).

Αρχικά η πρωτεΐνη *Neur* θεωρήθηκε λανθασμένα ότι είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας (Boulianne et al., 1991, Price et al., 1993). Αργότερα διαπιστώθηκε ότι η *Neur* είναι μια περιφερική μεμβρανική πρωτεΐνη (Pavlopoulos et al., 2001; Yeh et al., 2001). Και ότι έχει ενεργότητα E3 λιγάσης ουβικουΐνης για την οποία είναι υπεύθυνη η RING περιοχή (Lai et al., 2001; Yeh et al., 2001). Μάλιστα, παρατηρήθηκε ότι σε ενδογενή και εκτοπική έκφραση του *Neur* η πρωτεΐνη *DI* ενδοκυττάρωνεται (Lai et al., 2001; Pavlopoulos et al., 2001), οπότε αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη *Neur* προκαλεί την ουβικουΐνυλίωση του *Delta* στην κυτταρική μεμβράνη και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ενδοκυττάρωση του *Delta*.

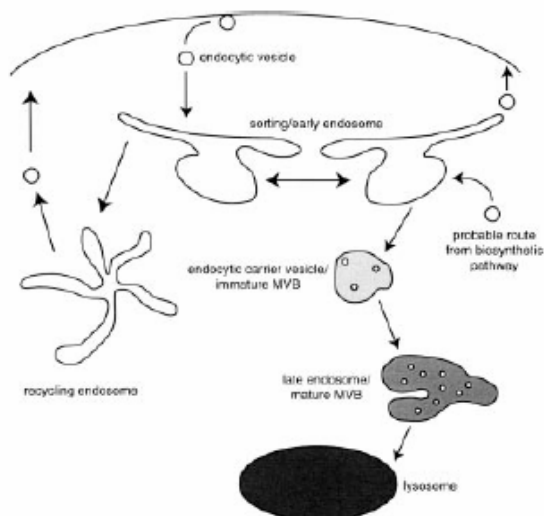
Πρόσφατα ανακαλύφθηκε στο zebrafish μια άλλη μια E3 λιγάση ουβικουΐνης που σχετίζεται με την σηματοδότηση Notch, η πρωτεΐνη *Mind bomb*. Μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας του γονιδίου *mind bomb* έχουν σαν αποτέλεσμα νευρική υπερτροφία. Όπως και η πρωτεΐνη *Neur*, το *Mind bomb* μπορεί να προκαλέσει ενδοκύττάρωση της πρωτεΐνης *DI* και ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch (Itoh et al., 2003). Στη Δροσόφιλα, μια από τις δυο ομόλογες πρωτεΐνες του *Mind bomb* (*Mind bomb1* ή *Mib1*) προκαλεί την ενδοκυττάρωση των *Delta* και *Serrate*, είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του Notch σε κύτταρα που δεν εκφράζουν *Neur* (πχ. ραχιαίο-κοιλιακό όριο φτερού) και μπορεί να υποκαταστήσει τη *Neur* και να υποκατασταθεί από αυτήν (Le Borgne et al, 2005, Pitsouli and Delidakis, 2005, Lai et al, 2005, Wang and Struhl, 2005).

Παρόλες τις ομοιότητες στην λειτουργία, οι πρωτεΐνες Mind bomb1 και Neur δεν έχουν όμοιες αλληλουχίες, εκτός από την περιοχή RING Zn που είναι χαρακτηριστική για τις E3 λιγάσες ουβικουΐτινης, και ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες. Είναι, όμως, και οι δύο ικανές να προκαλέσουν ουβικουΐτινυλίωση και ενδοκυττάρωση των Delta και Serrate.

Ενδοκυττάρωση και διακίνηση μεμβρανικών πρωτεϊνών

Η ενδοκυττάρωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών σε ορισμένες περιπτώσεις ξεκινά με την ουβικουΐτινυλίωση. Τα ουβικουΐτινυλιωμένα κατάλοιπα λυσίνης των πρωτεϊνών αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες-adaptors όπως η Lqf (ομόλογη της epsin των θηλαστικών) και η Eps15 που έχουν μοτίβα UIM (Ubiquitin Interacting Motif). Στη συνέχεια, σχηματίζεται το πρωτεϊνικό κάλυμμα που περιβάλλει το ενδοκυττρωτικό κυστίδιο (κλαθρίνη που προσδένεται μέσω του AP2 και άλλων βοηθητικών πρωτεϊνών, όπως η Lqf και η Eps15). Το κυστίδιο αποκόπτεται από την πλασματική μεμβράνη με τη βοήθεια της πρωτεΐνης Shbire (δυναμίνη στα θηλαστικά) και συντήκεται με τα πρώιμα ενδοσώματα (χαρακτηρίζονται από την παρουσία Rab5 GTPase).

Στα πρώιμα ενδοσώματα γίνεται διαλογή των ενδοκυττρωμένων πρωτεϊνών: κάποιες από αυτές θα μεταφερθούν στα ενδοσώματα ανακύκλωσης και από αυτά ξανά στη μεμβράνη, ενώ κάποιες άλλες θα μεταφερθούν σε όψιμα ενδοσώματα. Στα όψιμα ενδοσώματα, η πρωτεΐνη Hrs

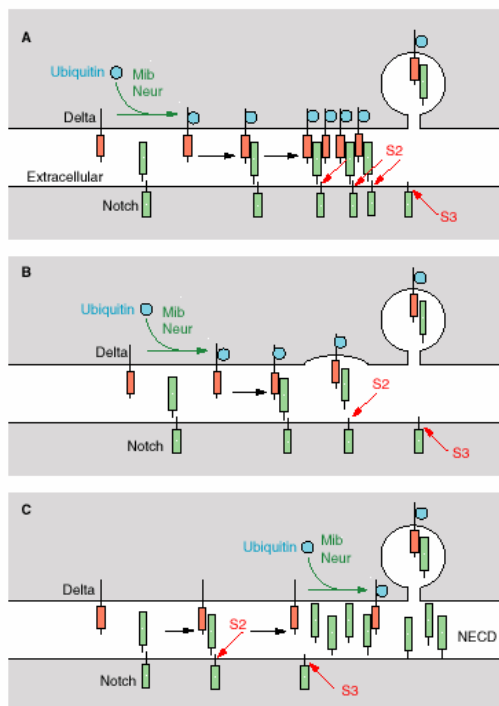


που μπορεί να αναγνωρίζει και να προσδένει ουβικουΐτινυλιωμένες πρωτεΐνες, τις στοχεύει σε ειδικά σύμπλοκα (ESCRT I, II, III) που τελικά τις ενσωματώνουν σε μικρότερα κυστίδια σχηματίζοντας πολύ-κυστιδιακά σωμάτια (MVB multi vesicular bodies). Τα κυστίδια αυτά συντήκονται στη συνέχεια με λυσοσώματα και το περιεχόμενό τους αποικοδομείται.

Ο ρόλος της ενδοκυττάρωσης στην αποστολή σήματος Notch

Το γεγονός ότι η ενδοκυττάρωση παίζει ρόλο στη σηματοδότηση Notch είναι γνωστό από παλιά με πειράματα που έδειξαν ότι απαιτείται η ύπαρξη λειτουργικής δυναμίνης για την ενεργοποίηση του Notch (Seugnet et al., 1997). Οι τελευταίες ανακαλύψεις για τις E3 λιγάσες ουβικουϊνίνης Neur και Mindbomb1 έχουν καταστήσει σαφές ότι για να μπορέσουν οι προσδέτες να ενεργοποιήσουν τον υποδοχέα Notch θα πρέπει να ουβικουϊτινυλιωθούν και να ενδοκυτταρωθούν. Ακόμα όμως δεν έχει διευκρινιστεί με ποιο τρόπο θα μπορούσε η ενδοκυττάρωση των προσδετών να ενεργοποιεί τον υποδοχέα του διπλανού κυττάρου.

Έχει δειχθεί ότι η εξωκυττάρια περιοχή του Notch πρέπει να απομακρυνθεί από το υπόλοιπο μόριο του υποδοχέα για να γίνει η ενεργοποίησή του και ότι η DI ενδοκυτταρώνεται μαζί με την εξωκυττάρια περιοχή του Notch από το κύτταρο που σηματοδοτεί (Parks et al, 2000). Άρα, ως πιθανά μοντέλα που εξηγούν πως η ενδοκυττάρωση βοηθά στην ενεργοποίηση του υποδοχέα έχουν προταθεί τα παρακάτω (Le Borgne & Schweisguth, 2003):



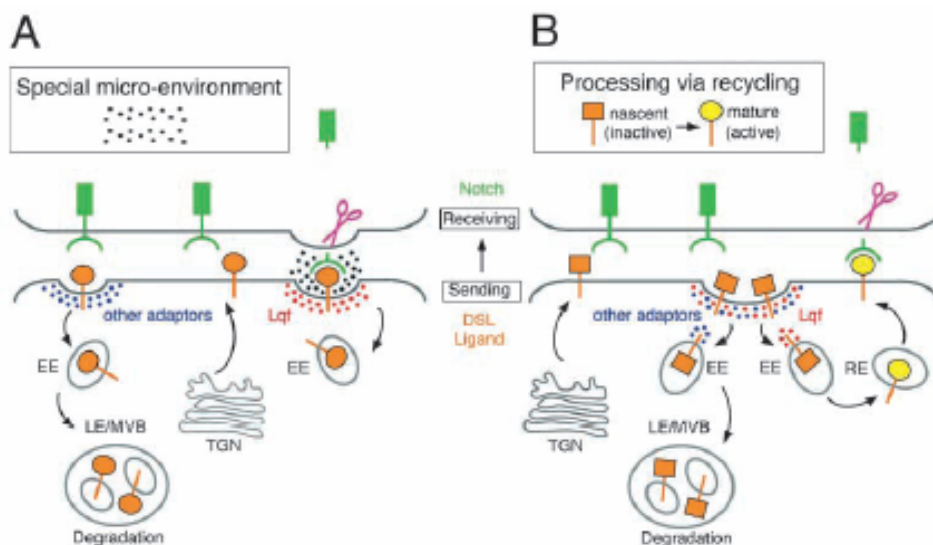
A) Η ουβικουϊτινυλίωση του DI από τις Neur και Mib1 οδηγεί στο συναθροισμό συμπλόκων DI-Notch που κάπως ευνοεί την πρωτεόλυση S2 της εξωκυττάριας περιοχής του Notch στο απέναντι κύτταρο. Η ενδοκυττάρωση απλώς δίνει τέλος στη σηματοδότηση αφαιρώντας τα πρωτεολυμένα εξωκυττάρια τμήματα. B) Η ουβικουϊτινυλίωση του DI και τα αρχικά βήματα της ενδοκυττάρωσης του οδηγεί μηχανικά στην αποκάλυψη της αλληλουχίας του υποδοχέα Notch που αναγνωρίζεται κατά την πρωτεόλυση S2.

Γ) Η πρωτεόλυση S2 του υποδοχέα Notch προηγείται της ενδοκυττάρωσης του DI και απλά χρησιμεύει για να απομακρύνει τις πρωτεολυμένες

εξωκυττάριας περιοχές του Notch που θα παρεμπόδιζαν την περαιτέρω σηματοδότηση δημιουργώντας ανενεργά σύμπλοκα με το DI.

Πρόσφατα αποτελέσματα έδειξαν ότι μια πρωτεΐνη που είναι γνωστή για την συμμετοχή της στην διαδικασία της ενδοκυττάρωσης, η Lqf (ομόλογη της epsin των θηλαστικών), είναι απαραίτητη για την αποστολή σήματος Notch, ενώ η ολική ενδοκυττάρωση του Delta δεν εμποδίζεται απουσία της (Wang, W. and Struhl, G. 2004). Άρα η ενδοκυττάρωση του Delta θα πρέπει να γίνει μέσω ενός συγκεκριμένου μηχανισμού και με τη συμμετοχή κάποιων ειδικών παραγόντων για να οδηγήσει στην σηματοδότηση.

Οπότε, τα μοντέλα που περιγράφηκαν παραπάνω διαμορφώνονται ως εξής για να συμπεριλάβουν τα νέα δεδομένα: A) Η πρωτεΐνη Lqf χρειάζεται για να οδηγήσει το ουβικουΐνιλιωμένο Delta σε ένα μεμβρανικό μικροπεριβάλλον, όπου θα έρθει σε γεινίαση με άλλους παράγοντες που θα βοηθήσουν στην ενδοκυττάρωση του, ευνοώντας παράλληλα την αλληλεπίδραση του με το Notch του απέναντι κυττάρου έτσι ώστε να ενεργοποιηθεί ο υποδοχέας μέσω της διαδικασίας αυτής (παραλλαγή των προηγούμενων μοντέλων A και B). Επίσης, διατυπώθηκε ένα διαφορετικό μοντέλο B) σύμφωνα με το οποίο η Lqf χρειάζεται για να οδηγήσει το ουβικουΐνιλιωμένο Delta σε συγκεκριμένα ενδοκυττάρια διαμερίσματα όπου θα ενεργοποιηθεί, ώστε μετά να ανακυκλωθεί στη μεμβράνη με την ενεργοποιημένη μορφή του και να σηματοδοτήσει το Notch (Wang, W. and Struhl, G. 2004).



Σκοπός της εργασίας

Στο πλαίσιο της αναζήτησης απάντησεων στα ερωτήματα ποιος είναι ο ρόλος της ενδοκυττάρωσης του Delta στην αποστολή του σήματος Notch, και ποια ενδοκυττωτική πορεία ακολουθεί το Delta μέσα στο κύτταρο, στην παρούσα εργασία θέσαμε τους παρακάτω στόχους.

1) να διερευνήσουμε με γενετικές μεθόδους ποιοι άλλοι πρωτεϊνικοί παράγοντες (εκτός από την Lqf) του μηχανισμού ενδοκυττάρωσης είναι απαραίτητοι για την αποστολή του σήματος Notch.

2) να δημιουργήσουμε εργαλεία που θα μας επιτρέπουν να παρακολουθήσουμε την διαδρομή του Delta στα ενδοκυττωτικά διαμερίσματα χωρίς να παρεμβαίνουμε στη διαδικασία αυτή.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Γονότυποι μυγών και μέθοδοι εκτοπικής έκφρασης

Για την εκτοπική έκφραση με το σύστημα Gal4-UAS (Brand and Perrimon, 1993) χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω στελέχη

ombG4	UASpmGFPubiΔGG ^{3m} και UASpmGFPubiΔGG I44A ^{10m}
ombG4; Amph ²⁶	Amph; UDIV5,UEGFPneur ^{18f5}
ombG4; Dab	UDIV5,UEGFPneur ^{1m2} ; Dab

Για την επαγωγή μπτωτικών κλώνων με ταυτόχρονη υπερέκφραση με το σύστημα MARCM (Lee and Luo, 2001) χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω στελέχη

FTG; U-γ; tubG80 FRT2A	UDIV5,UEGFPneur ^{1m2} ; Psn ²²⁷ FRT2A/ TM6B UDIV5,UEGFPneur ^{1m2} ; Psn ¹⁴³ FRT2A/ TM6B
FTG; tubG80 FRTG13	Eps15 FRTG13/ CyO
FTG; tubG80 FRT40A	Kuz ^{e29-4} FRT40A/ CyO

(FTG είναι συντόμευση για hsFLP, tubGal4, nuclear GFP)

Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις

- Γίνεται ανατομία των προνυμφών 3^{ου} σταδίου σε διάλυμα 1x PBS. Το πίσω μέρος απομακρύνεται και το εμπρόσθιο αναστρέφεται.
- Μονιμοποιούμε τους ιστούς σε διάλυμα 1x PEM / 4 % FA για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ξεπλένουμε με διάλυμα 1x PBS τρεις φορές
- Επωάζουμε τους ιστούς σε διάλυμα PBT (1x PBS, 0.2 % Triton, 0.5 % BSA) για 30 λεπτά - 1 ώρα με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επωάζουμε με το πρώτο αντίσωμα, το οποίο αραιώνεται σε διάλυμα PBT, για τουλάχιστον 16 ώρες με ανάδευση στους 4 ° C.
- Ξεπλένουμε τρεις φορές με διάλυμα PT (1x PBS, 0.2 % Triton) για 5-10 λεπτά με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια αντισώματος.
- Επωάζουμε με το δεύτερο αντίσωμα, το οποίο αραιώνεται σε διάλυμα PBT, για 1-2 ώρες με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Επειδή το αντίσωμα

είναι δεσμευμένο με φθορίζουσα ουσία, η επώαση και οι μετέπειτα πλύσεις γίνονται στο σκοτάδι.

- Ξεπλένουμε τρεις φορές με διάλυμα PT (1x PBS, 0.2 % Triton) για 5-10 λεπτά με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια αντισώματος.
- Οι αναπτυξιακοί δίσκοι ανατέμνονται από τον υπόλοιπο ιστό και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρο σε διάλυμα 80 % γλυκερόλης με 1 % w/v η-oryl-gallate. Στη συνέχεια τοποθετείται καλυπτρίδα και στερεώνεται με βερνίκι.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις είναι τα εξής:

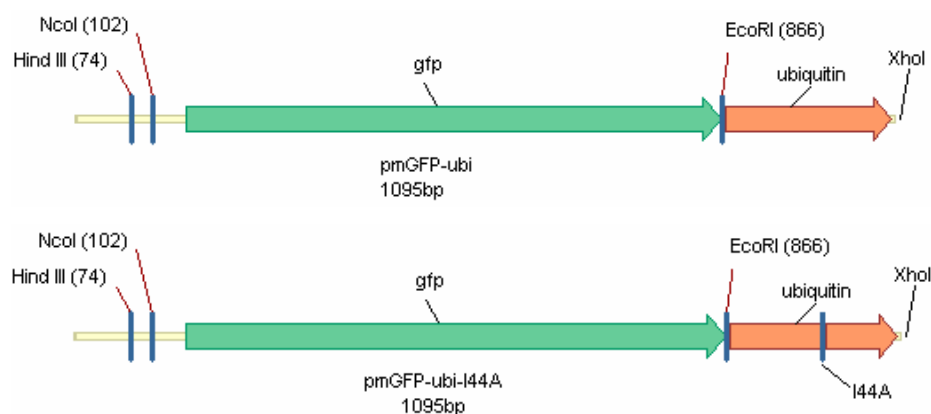
<u>Πρώτα αντισώματα</u>	<u>αραίωση</u>
M-α-wg	1: 50
GP-α-DI	1: 4000

<u>Δεύτερα αντισώματα</u>	
α-M A555 (κόκκινο)	1: 1000
α-GP A647 (μακρινό κόκκινο)	1: 500

Κλωνοποίηση των pm-GFP-ubi ενθεμάτων σε πλασμιδιακούς φορείς Ract και PUASt

Ξεκινήσαμε από δυο πλασμίδια που παραλάβαμε από το εργαστήριο του Pietro De Camilli τα οποία περιείχαν τα ενθέματα pm-GFP-ubiΔGG και pm-GFP-ubiΔGG-I44A κλωνοποιημένα στον φορέα pcDNA3 μεταξύ των περιοριστικών θέσεων BamHI και XhoI (Chen and De Camilli, 2005).

Μετά από αλληλούχηση των παραπάνω ενθεμάτων επιβεβαιώθηκαν τα επιμέρους κομμάτια DNA που περιέχονται σε αυτά: 1) μια αλληλουχία που κωδικοποιεί θέση προσθήκης λιπιδίων (**Palmitoylation, Myristoylation**) που ξεκινά κοντά στη θέση NcoI, 2) το γονίδιο για την GFP μέχρι τη θέση EcoRI και 3) το γονίδιο για την ουβικουΐνη (χωρίς τα δυο τελευταία κατάλοιπα γλυκίνης) μεταξύ των θέσεων EcoRI και XhoI. Η θέση BamHI δεν βρέθηκε άρα έχει καταστραφεί.

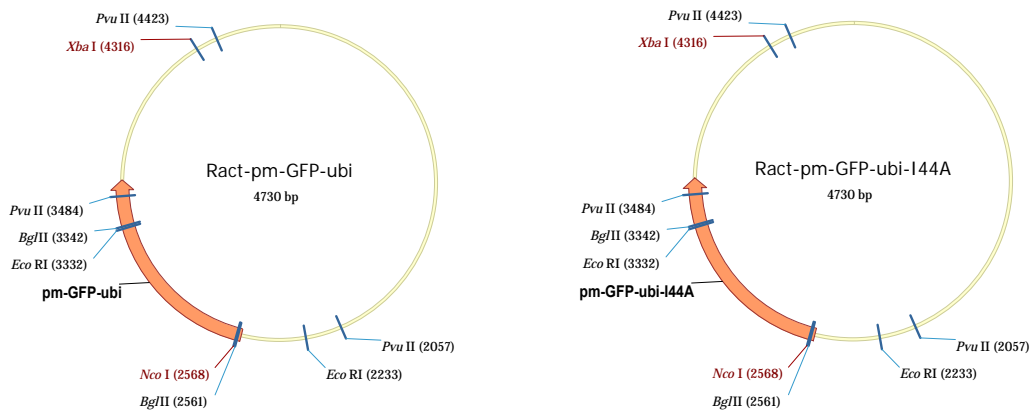


Αρχικά, απομονώσαμε τα ενθέματα από τον φορέα pcDNA3. Και για τα δυο πλασμίδια έγινε πέψη με HindIII και το γραμμικό κομμάτι DNA επωάσθηκε με Kleow πολυμεράση, ώστε τα άκρα που προέκυψαν από την πέψη να γίνουν λεία (blunt). Ακολούθησε πέψη με XhoI και το τμήμα DNA που περιείχε το ένθεμα απομονώθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Κλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα Ract

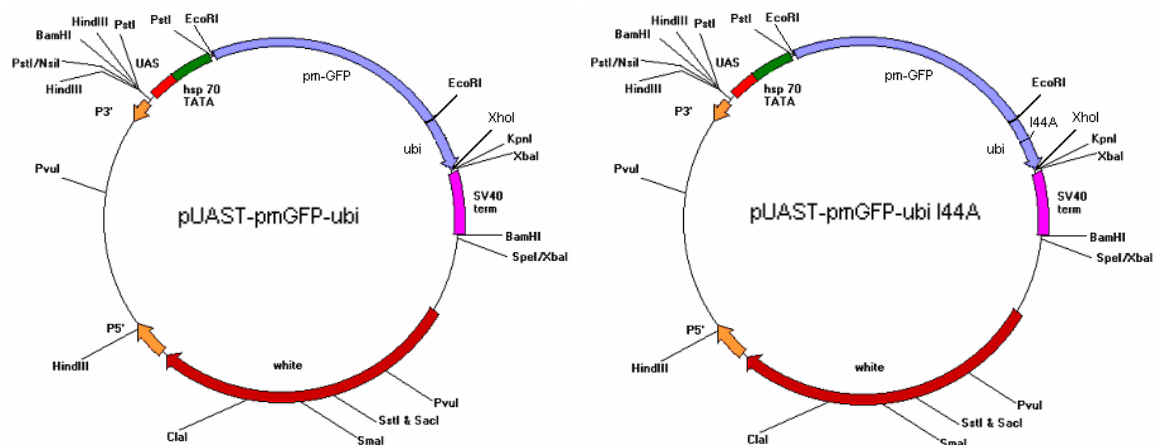
Έγινε πέψη του πλασμιδιακού φορέα Ract με BamHI και το γραμμικό κομμάτι DNA επωάσθηκε με Kleow πολυμεράση, ώστε τα άκρα που προέκυψαν από την πέψη να γίνουν λεία (blunt). Ακολούθησε πέψη με Sall και ακολούθησε καθαρισμός του φορέα με διαδοχικές εκχυλίσεις φαινόλης-χλωροφορμίου. Έπειτα έγινε συγκόλληση του φορέα με τα ενθέματα: μεταξύ

των προεξοχόντων άκρων που άφησαν τα ένζυμα Sall και XhoI (συμβατά άκρα), και μεταξύ των λείων άκρων που δημιούργησε η Klenow πολυμεράση.



Κλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα PUASt

Έγινε πέψη του πλασμιδιακού φορέα PUASt με BglIII και το γραμμικό κομμάτι DNA επώασθηκε με Klenow πολυμεράση, ώστε τα άκρα που προέκυψαν από την πέψη να γίνουν λεία (blunt). Ακολούθησε πέψη με XhoI και ακολούθησε καθαρισμός του φορέα με διαδοχικές εκχυλίσεις φαινόλης-χλωροφορμίου. Έπειτα έγινε συγκόλληση του φορέα με τα ενθέματα: μεταξύ των προεξοχόντων άκρων που άφησε η XhoI, και μεταξύ των λείων άκρων που δημιούργησε η Klenow πολυμεράση.



Τα πλασμίδια αυτά ενέθηκαν σε έμβρυα Δροσόφιλας για τη δημιουργία στελεχών υπερέκφρασης (UASpmGFP-ubiΔGG και UASpmGFP-ubiΔGG I44A).

Ανακτήσαμε τις εξής σειρές στα εξής χρωμοσώματα:

pm-GFP-ubiΔGG (15 σειρές)

2^ο Χρωμόσωμα (6 σειρές): 24b, 32k, 14a, 8a, 1k, 13k1

3^ο Χρωμόσωμα (9 σειρές): 3m, 17a, 7k, 13l2, 7m, 24, 33, 32m, 32k

pm-GFP-ubiΔGG-I44A (7 σειρές)

2^ο Χρωμόσωμα (2 σειρές): 10, 3m

3^ο Χρωμόσωμα (5 σειρές): 11, 7a, 10m, 5k, 3

Δημιουργία διπλού μεταλλάγματος pmGFP-ubiΔGG-I44A K48R

Το παραπάνω πλασμίδιο όπου το ένθεμα pmGFP-ubiΔGG-I44A είναι κλωνοποιημένο στον φορέα Ract χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την δημιουργία του μεταλλάγματος pmGFP-ubiΔGG-I44A-K48R. Για την δημιουργία της επιπλέον μεταλλαγής χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα αντιδραστήρια από την Stratagene (QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit).

Ala(44) Phe Ala Gly Arg Gln Leu Glu Asp Gly
Εκκινητής: 5'-GCC TTT GCA GGC AGG CAA CTG GAA GAT GGC-3'
Μήτρα DNA 5'-GCC TTT GCA GGC AAG CAG CTG GAA GAT GGC-3' PvuII
Ala(44) Phe Ala Gly Lys(48) Gln Leu Glu Asp Gly

Αντίδραση (25 μl)

2.5 μl Διάλυμα αντίδρασης 10x

100 ng Εκκινητή

50 ng Μήτρα ds DNA

1 μl dNTP mix

1 μl mix Ενζύμων

x μl H₂O

Πρόγραμμα PCR

1) 95°C για 1 min

2) 95°C για 1 min

55°C για 1 min

65°C για 2 min / kb πλασμιδίου

Επανάληψη του 2) για 30 κύκλους

Μετά την αντίδραση PCR ακολουθεί προσθήκη 1 μl DpnI και επώαση στους 37°C για 1 ώρα ώστε να γίνει πέψη του αρχικού ds DNA πλασμιδίου (parental DNA). Στη συνέχεια, 1.5 μl της αντίδρασης χρησιμοποιούνται για τον μετασχηματισμό ειδικών επιδεκτικών κυττάρων XL10-Gold (παρέχονται από το kit). Το προϊόν της αντίδρασης κοντά στη θέση της νέας μεταλλαγής (K48R) φέρει μια επιπλέον αλλαγή που καταστρέφει μια περιοριστική θέση PvuII.

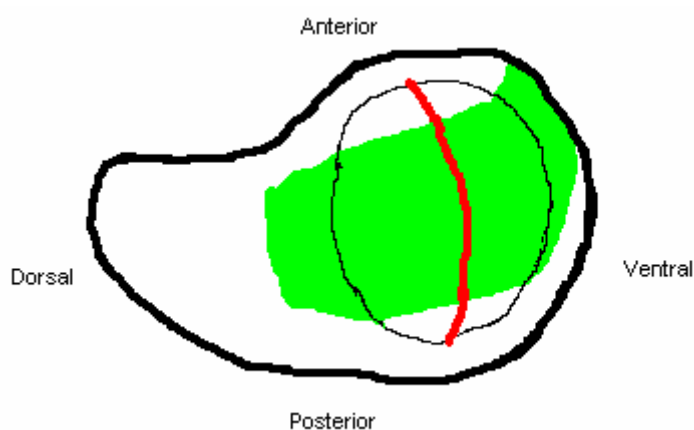
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο ρόλος της Αμφιφυσίνης στην αποστολή σήματος Notch

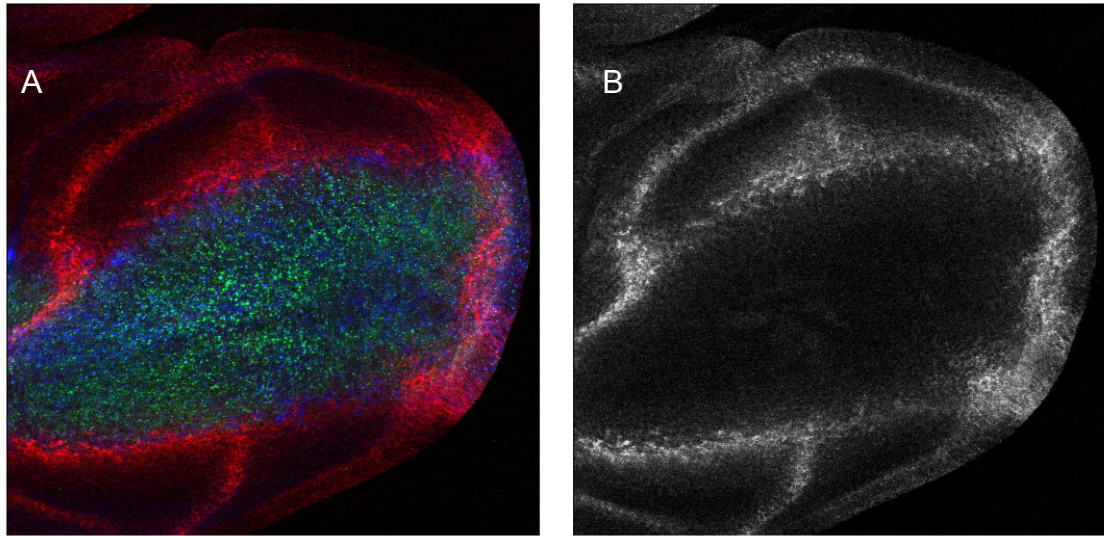
Η Αμφιφυσίνη είναι γνωστή ως μια βοηθητική πρωτεΐνη του μηχανισμού ενδοκυττάρωσης μέσω κλαθρίνης. Διαθέτει μια συντηρημένη αμινο-τελική περιοχή BAR (Bin/ Amphihphysin / Rvsp) που της επιτρέπει να αλληλεπιδρά με τη λιπιδική μεμβράνη. Στα θηλαστικά η Αμφιφυσίνη αλληλεπιδρά με την κλαθρίνη, την α-Ανταπίνη και την Δυναμίνη. Στη Δροσόφιλα αυτό δεν ισχύει και φαίνεται ότι βοηθά στην ενδοκυττάρωση οργανώνοντας μεμβρανικές μικρο-περιοχές πιθανότατα μέσω αλληλεπιδράσεων με τον κυτταροσκελετό ακτίνης (reviewed by Zhang, 2002).

Θέλοντας να ελέγξουμε αν η Αμφιφυσίνη χρειάζεται κατά την αποστολή του σήματος Notch, χρησιμοποιήσαμε ένα στέλεχος μυγών μεταλλαγμένο για το γονίδιο της αμφιφυσίνης. Τα άτομα στα οποία η Αμφιφυσίνη δεν είναι λειτουργική επιβιώνουν, άρα η πρωτεΐνη αυτή δεν είναι απαραίτητη για την ζωή. Σε αυτό το μεταλλαγμένο γενετικό υπόβαθρο έγινε εκτοπική έκφραση του προσδέτη Delta και της E3 λιγάσης ουβικουΐνης Neur και εξετάστηκε η ενεργοποίηση του υποδοχέα Notch στα γειτονικά κύτταρα. Η ενεργοποίηση του Notch ανιχνεύεται μέσω της έκφρασης της πρωτεΐνης Wingless.

Η πρωτεΐνη Wingless εκφράζεται φυσιολογικά σε δυο σειρές κυττάρων στο ραχιαίο-κοιλιακό όριο του δίσκου του φτερού (η κόκκινη γραμμή στο παρακάτω σχήμα) ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του Notch. Η εκτοπική



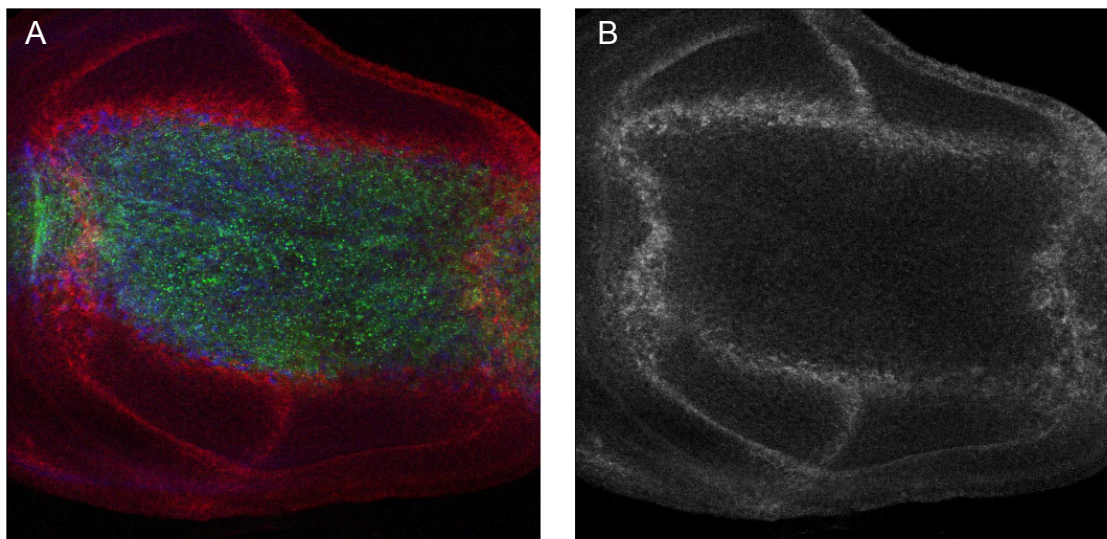
έκφραση του Delta και Neur κάτω από τον έλεγχο του ενισχυτή omb (πράσινη περιοχή στο διπλανό σχήμα) σε wt γενετικό υπόβαθρο έχει τον παρακάτω φαινότυπο (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Εκτοπική έκφραση των Delta και Neur με ombG4 σε wt γενετικό υπόβαθρο
Χρώσεις: EGFP-Neur, α-Delta (μπλε), α-Wg (κόκκινο)

Όπως φαίνεται παραπάνω, τα κύτταρα που βρίσκονται εκατέρωθεν της εκτοπικής έκφρασης των Delta και Neur λαμβάνουν σήμα από το Delta και η ενεργοποίηση του Notch και στα δυο διαμερίσματα, ραχιαίο και κοιλιακό, οδηγεί στην έκφραση του Wingless. Αντίθετα, η έκφραση του Wingless στο όριο των διαμερισμάτων (κάθετη κόκκινη γραμμή) σβήνει στην περιοχή της εκτοπικής έκφρασης. Αυτό συμβαίνει γιατί η ενεργοποίηση του Notch στα κύτταρα που υπερεκφράζουν Delta παρεμποδίζεται από τα υψηλά επίπεδα του προσδέτη, καθώς το Delta δεσμεύει τον υποδοχέα Notch σε ανενεργά σύμπλοκα ανταγωνιζόμενο τις «σωστές» αλληλεπιδράσεις του Notch με το Delta των διπλανών κυττάρων (cis inhibition).

Το ίδιο πείραμα εκτοπικής έκφραση του Delta και Neur σε γενετικό υπόβαθρο *amr^h -/-* έχει όμοια αποτελέσματα (Εικόνα 2).

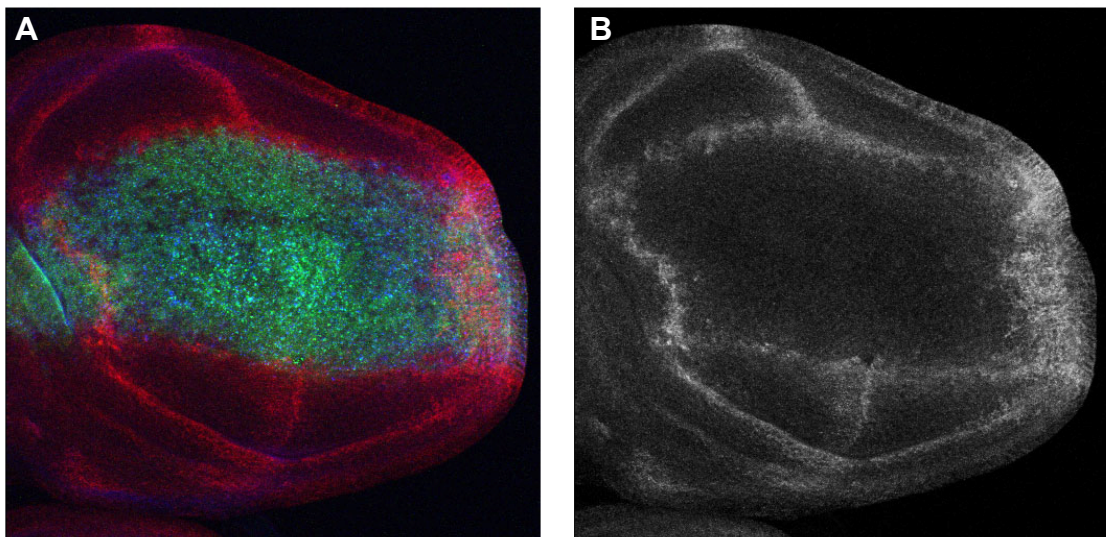


Εικόνα 2. Εκτοπική έκφραση των Delta και Neur με ombG4 σε γενετικό υπόβαθρο *amr^h -/-*
Χρώσεις: EGFP-Neur, α-Delta (μπλε), α-Wg (κόκκινο)

Σε συνθήκες απώλειας λειτουργίας της Αμφιφυσίνης το Delta μπορεί να ενδοκυτταρώνεται (βλ dots Εικ2) και να ενεργοποιεί τον υποδοχέα Notch στα γειτονικά κύτταρα. Η παρεμπόδιση της σηματοδότησης στα κύτταρα της υπερέκφρασης (cis inhibition) επίσης δεν μεταβάλλεται. Αυτό σημαίνει ότι η Αμφιφυσίνη δεν είναι απαραίτητη ούτε για την ενδοκυττάρωση του Delta, ούτε για την αποστολή σήματος Notch. Άλλωστε, πειράματα έχουν δείξει ότι και στα θηλαστικά και στη Δροσόφιλα η Αμφιφυσίνη δεν έχει καθοριστικό ρόλο στην ενδοκυττάρωση μέσω κλαθρίνης και μάλλον συμβάλει στην κινητική της διαδικασίας (reviewed by Zhang, 2002).

Ο ρόλος του Disabled στην αποστολή σήματος Notch

Η πρωτεΐνη Disabled χαρακτηρίζεται από την περιοχή αναγνώρισης φωσφοτυροσινών που διαθέτει. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη προσαρμογέα (adaptor) που μπορεί να προσδένεται στην ενδοκυττάρια περιοχή μεμβρανικών υποδοχέων σε φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης, όπως η πρωτεΐνη Numb. Για να ελέγξουμε την πιθανότητα το Disabled να λειτουργεί ως adaptor για τους προσδέτες του Notch κατά την επιλογή του φορτίου που θα ενδοκυτταρωθεί, προχωρήσαμε στο αντίστοιχο πείραμα με αυτό που περιγράφηκε παραπάνω για την Αμφιφυσίνη. Το μεταλλαγμένο στέλεχος όπου το γονίδιο του Disabled είναι μη λειτουργικό μπορεί να επιβιώνει σε ομοζυγωτία, άρα ούτε το Disabled είναι απαραίτητο για τη ζωή.



Εικόνα 3. Εκτοπική έκφραση των Delta και Neur με ombG4 σε γενετικό υπόβαθρο *dab -/-*
Χρώσεις: EGFP-Neur, α -Delta (μπλε), α -Wg (κόκκινο)

Όπως και στην περίπτωση της Αμφιφυσίνης, σε συνθήκες απώλειας λειτουργίας του Disabled το Delta μπορεί να ενδοκυτταρώνεται (βλ dots Εικ3) και να ενεργοποιεί τον υποδοχέα Notch στα γειτονικά κύτταρα. Αυτό σημαίνει ότι το Disabled δεν είναι απαραίτητο για την ενδοκυττάρωση του Delta, ούτε για την αποστολή σήματος Notch.

Ο ρόλος του Eps15 στην αποστολή σήματος Notch

Μια άλλη πρωτεΐνη που συμμετέχει στο μηχανισμό ενδοκυττάρωσης είναι η Eps15. Η πρωτεΐνη αυτή, όπως και η Lqf (η ομόλογη της epsin στη Δροσόφιλα) διαθέτει ένα μοτίβο αναγνώρισης και πρόσδεσης ουβικουϊτίνιλιωμένων πρωτεϊνών UIM (Ubiquitin Interacting Motif). Επίσης, διαθέτει μια περιοχή EH (Epsin Homology region) που επιτρέπει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ άλλων πρωτεϊνών. Η Eps15 αλληλεπιδρά με την Lqf και την α -Ανταπτίνη.

Εφόσον είναι γνωστό ότι η Lqf είναι απαραίτητη για την αποστολή του σήματος Notch από το Delta (Wang and Struhl, 2004), είναι πιθανό και η πρωτεΐνη Eps15 που αλληλεπιδρά και συνεργάζεται με την Lqf, να είναι απαραίτητη για την σηματοδότηση. Για να ελέγξουμε αυτήν την πιθανότητα χρησιμοποιήσαμε ένα στέλεχος μυγών στο οποίο το γονίδιο της Eps15 είναι απενεργοποιημένο λόγω της ένθεσης ενός μεταθετού στοιχείου (P element) στο 5' UTR, λίγο πριν το ATG. Τα ομόζυγα άτομα του στελέχους αυτού κατά κύριο λόγο δεν επιβιώνουν μέχρι το στάδιο του ενήλικου με εξαίρεση ένα μικρό ποσοστό ατόμων σε κάθε γενιά.

Μετά από επαγωγή μιτωτικών κλώνων για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο του Eps15 με ταυτόχρονη έκφραση GFP για την σήμανση των κλώνων στο δίσκο του φτερού, διαπιστώθηκε ότι οι κλώνοι που διασχίζουν το ραχιαίο-κοιλιακό όριο και εκτείνονται και στα δυο διαμερίσματα δεν επηρεάζουν την έκφραση του Wingless στο ραχιαίο-κοιλιακό όριο (data not shown). Συνεπώς, τα κύτταρα με μεταλλαγμένο Eps15 εξακολουθούν να έχουν την δυνατότητα αποστολής σήματος Notch, διαφορετικά θα υπήρχαν κύτταρα κεντρικά στον κλώνο που δεν θα εξέφραζαν Wingless γιατί θα ήταν περικυκλωμένα από μεταλλαγμένα κύτταρα που δεν θα μπορούσαν να τα σηματοδοτήσουν αποτελεσματικά.

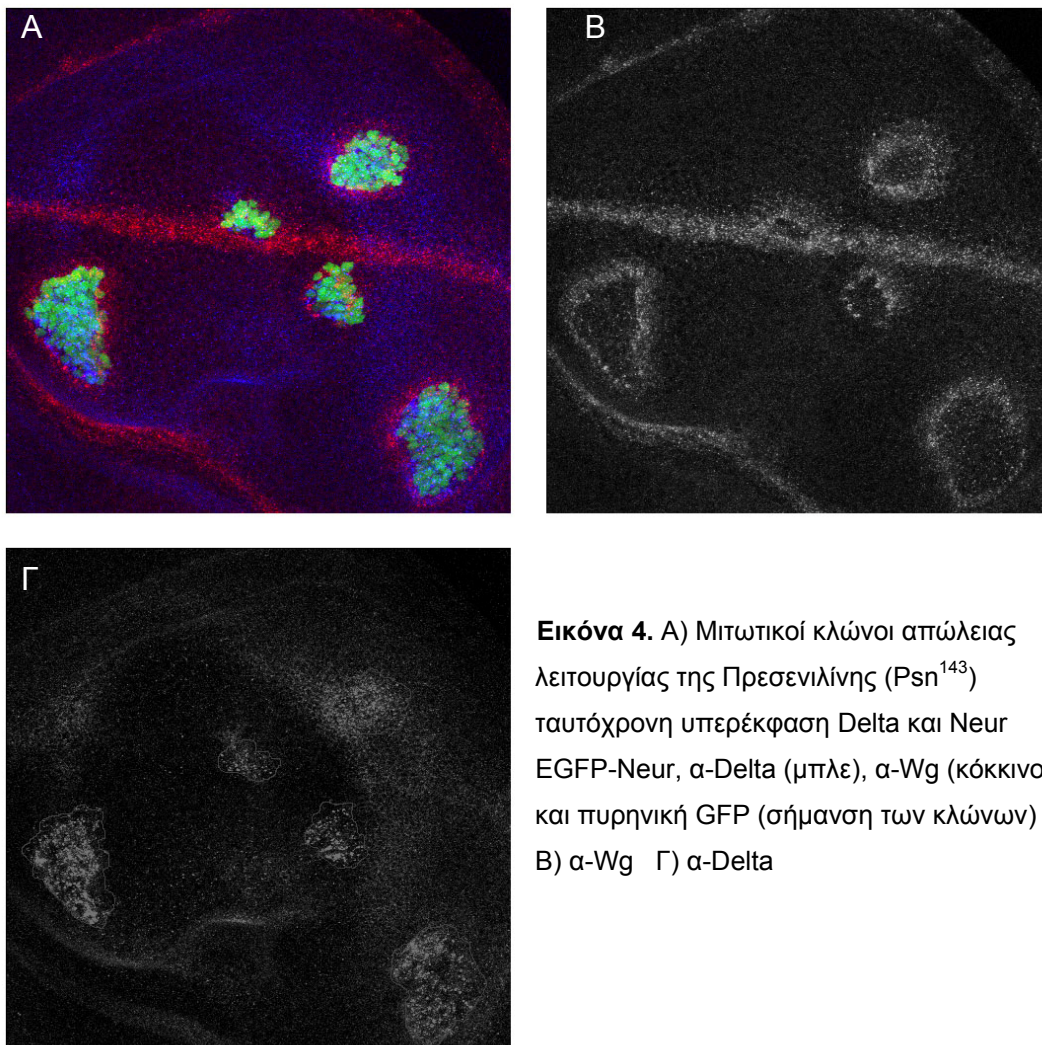
Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι η Eps15 δεν είναι απαραίτητη για την αποστολή σήματος Notch μέσω του Delta και η λειτουργία της πρωτεΐνης Lqf επαρκεί για την σηματοδότηση. Υπάρχει όμως το ενδεχόμενο το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο του γονιδίου της Eps15 που χρησιμοποιήθηκε να μην είναι πλήρως ανενεργό και να παράγονται μετάγραφα που μεταφράζονται

σωστά, εφόσον η ένθεση δεν βρίσκεται στην μεταφραζόμενη περιοχή, και ίσως για αυτό κάποια ομόζυγα άτομα καταφέρνουν να επιβιώσουν.

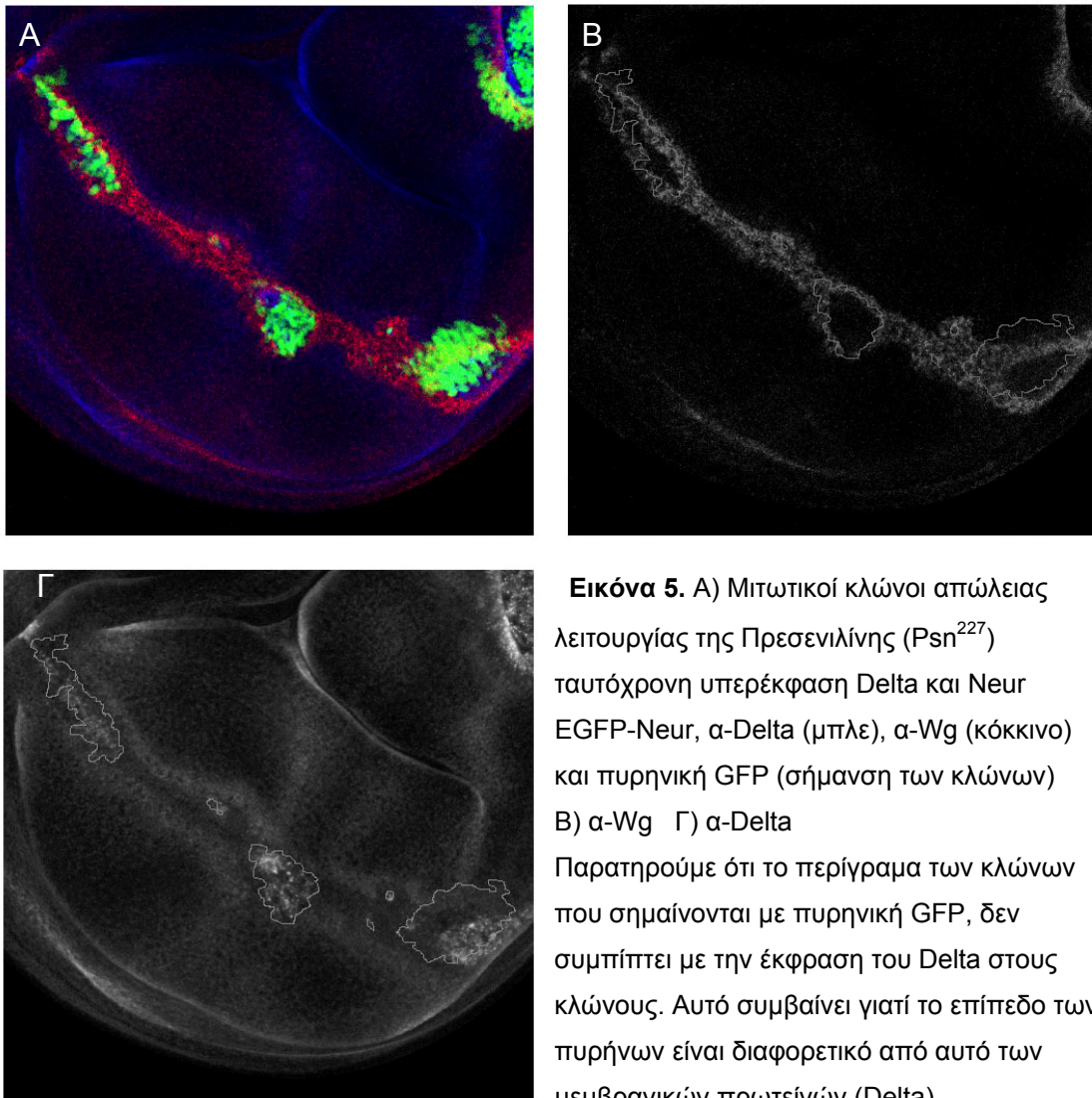
Ο ρόλος της Πρεσενιλίνης στην αποστολή σήματος Notch

Η πρεσενιλίνη είναι μέρος του συμπλόκου της γ-σεκρετάσης η οποία είναι υπεύθυνη για την S3 πρωτεόλυση του Notch που απελευθερώνει την ενδοκυττάρια περιοχή. Εκτός όμως από το Notch, πρωτεόλυση υφίσταται και το Delta και μάλιστα έχειδειχτεί ότι τα ίδια ένζυμα που δρουν στον υποδοχέα Notch (Kuz και γ-σεκρετάση) είναι υπεύθυνα και για την πρωτεόλυση του Delta στην εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια περιοχή του αντίστοιχα (Six et al, 2003). Ο ρόλος της πρωτεόλυσης του Delta δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί.

Για να ελέγξουμε αν η πρωτεόλυση του Delta από την πρεσενιλίνη χρειάζεται για την αποστολή του σήματος Notch, έγινε επαγωγή μιτωτικών κλώνων απώλειας λειτουργίας της πρεσενιλίνης (2 διαφορετικά αλληλόμορφα) με ταυτόχρονη υπερέκφραση Delta και Neur και ανιχνεύθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης Wingless με χρήση αντισώματος.



Εικόνα 4. A) Μιτωτικοί κλώνοι απώλειας λειτουργίας της Πρεσενιλίνης (Psn^{143}) ταυτόχρονη υπερέκφραση Delta και Neur EGFP-Neur, α -Delta (μπλε), α -Wg (κόκκινο) και πυρηνική GFP (σήμανση των κλώνων) B) α -Wg Γ) α -Delta



Εικόνα 5. Α) Μιτωτικοί κλώνοι απώλειας λειτουργίας της Πρεσενιλίνης (Psn^{227}) ταυτόχρονη υπερέκφραση Delta και Neur EGFP-Neur, α -Delta (μπλε), α -Wg (κόκκινο) και πυρηνική GFP (σήμανση των κλώνων) Β) α -Wg Γ) α -Delta Παρατηρούμε ότι το περίγραμμα των κλώνων που σημαίνονται με πυρηνική GFP, δεν συμπίπτει με την έκφραση του Delta στους κλώνους. Αυτό συμβαίνει γιατί το επίπεδο των πυρήνων είναι διαφορετικό από αυτό των μεμβρανικών πρωτεϊνών (Delta).

Όπως φαίνεται στις Εικόνες 4 και 5, οι μιτωτικοί κλώνοι που διαπερνούν το ραχιαίο-κοιλιακό όριο διακόπτουν την έκφραση του Wingless. Αυτό συμβαίνει γιατί χωρίς την πρεσενιλίνη το Notch δεν μπορεί να ενεργοποιηθεί. Θα μπορούσε να οφείλεται και στα υψηλά επίπεδα του Delta (cis inhibition) αλλά και σε μιτωτικούς κλώνους απώλειας λειτουργίας της πρεσενιλίνης χωρίς ταυτόχρονη υπερέκφραση ο φαινότυπος παραμένει ίδιος.

Επίσης, παρατηρούμε ότι στα γειτονικά κύτταρα γύρω από τους κλώνους υπάρχει εκτοπική έκφραση του Wingless και μέσα στους κλώνους το Delta βρίσκεται σε κηλίδες (dots). Άρα το υπερεκφρασμένο Delta μπορεί να ενδοκυττάρωνεται και να σηματοδοτεί αποτελεσματικά απουσία της πρεσενιλίνης. Συνεπώς, η πρωτεόλυση του ενδοκυττάριου τμήματος του Delta δεν χρειάζεται για την διαδικασία ενδοκυττάρωσης του, ούτε για την

αποστολή του σήματος Notch. Βέβαια, κάποιοι αμφισβητούν ότι η πρεσενιλίνη είναι το υπεύθυνο ένζυμο για την πρωτεόλυση αυτή (Delwig et al., 2006).

Το ερώτημα αν η πρωτεόλυση του εξωκυττάριου τμήματος του Delta από το Kuzbanian έχει κάποιο ρόλο στην αποστολή του σήματος Notch αναμένεται να απαντηθεί σύντομα (πειράματα σε εξέλιξη), αν και προηγούμενα πειράματα έχουν δείξει ότι η εκκρινόμενη μορφή του Delta παράγεται με τον τρόπο αυτό δρα ανταγωνιστικά ως προς τη σηματοδότηση και μάλλον εξυπηρετεί στην απενεργοποίηση του προσδέτη (Mishra-Gorur et al, 2002).

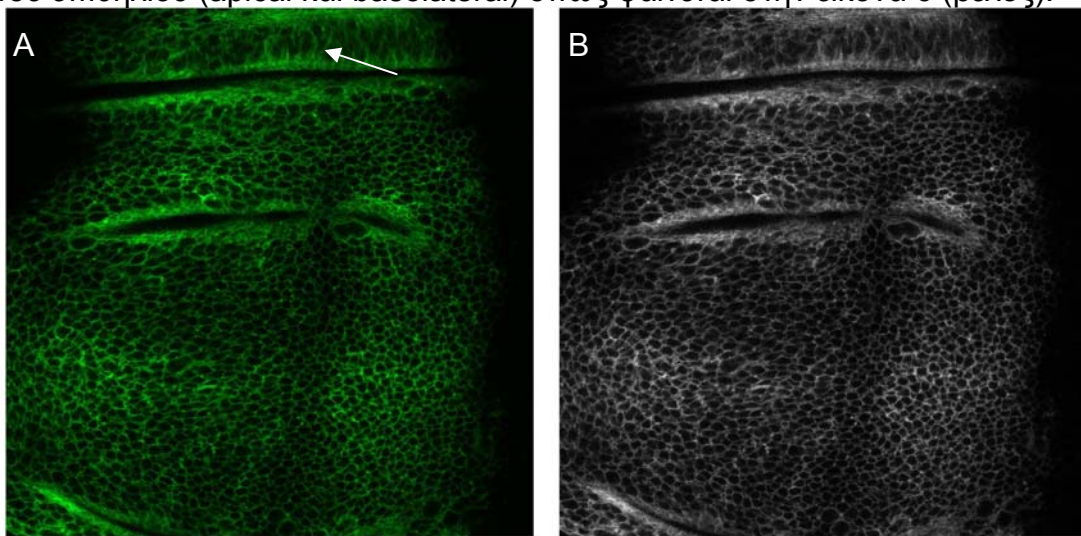
Άλλες πρωτεΐνες του μηχανισμού ενδοκυττάρωσης: α-Ανταπίνη, Κλαθρίνη

Δυο βασικές πρωτεΐνες στην διαδικασία ενδοκυττάρωσης μέσω κλαθρίνης είναι η α-Ανταπίνη, μέρος του συμπλόκου AP2 που μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση φορτίου-καλύμματος κλαθρίνης, και η βαριά αλυσίδα της κλαθρίνης που δημιουργεί μαζί με την ελαφριά αλυσίδα το δομικό λίθο (3 βαριές αλυσίδες και 3 ελαφριές) του καλύμματος της κλαθρίνης. Επειδή αποτελεί σημαντικό ερώτημα αν η ενδοκυττάρωση του Delta κατά τη σηματοδότηση γίνεται μέσω κλαθρίνης ή μέσω άλλου μηχανισμού, επιλέξαμε να απαντήσουμε ευθέως στο ερώτημα αυτό χρησιμοποιώντας μεταλλαγμένα στελέχη μυγών για τις πρωτεΐνες αυτές για να ελέγξουμε αν μπορεί να γίνει σηματοδότηση μέσω του Delta όταν κάποια από αυτές δεν λειτουργεί. Δυστυχώς αυτό δεν έγινε λόγω τεχνικών δυσκολιών καθώς οι πρωτεΐνες αυτές είναι ζωτικής σημασίας για τα κύτταρα και οι μιτωτικοί κλώνοι δεν επιβιώνουν.

Σήμανση των ενδοκυττωτικών διαμερισμάτων: pmGFPubi

Για τη διερεύνηση της ενδοκυτταρικής πορείας που ακολουθεί το Delta κατά την ενδοκυττάρωση, εκτός από γενετικές μεθόδους όπου χρησιμοποιούμε μεταλλαγές οι οποίες απενεργοποιούν στοιχεία της ενδοκυττωτικής μηχανής, είναι χρήσιμο να δημιουργηθούν εργαλεία που θα μας επιτρέψουν να παρατηρήσουμε την κυτταρική τοποθέτηση του Delta σε συνθήκες σηματοδότησης και μη. Ως ένα τέτοιο εργαλείο μπορεί να χρησιμοποιηθεί η pmGFPubiΔGG.

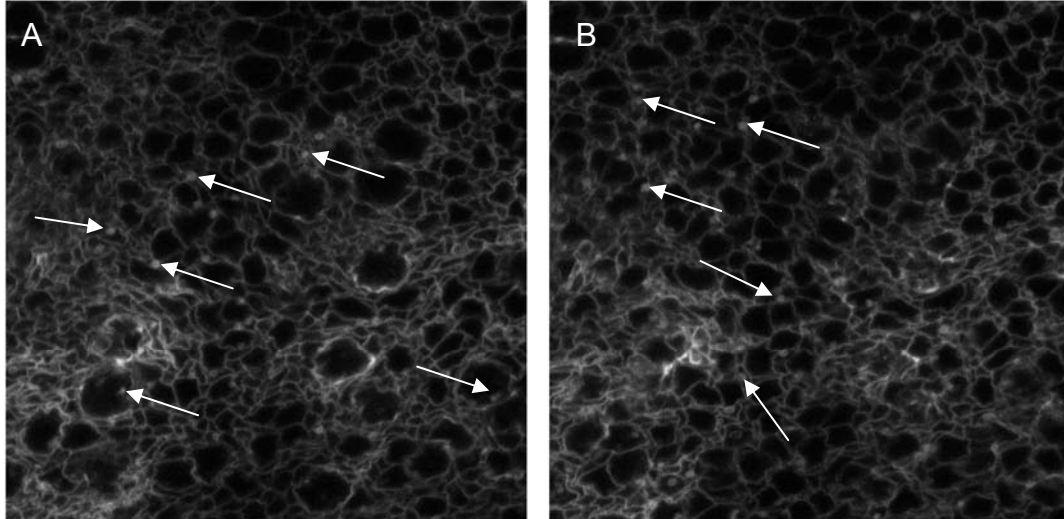
Πρόκειται για μια GFP που διαθέτει στο αμινοτελικό της άκρο μια σειρά αμινοξέων που δημιουργούν θέσεις για προσθήκη λιπιδίων (**P**almitoylation, **M**yrystoylation) και της επιτρέπουν να ενσωματώνεται στη μεμβράνη. (Chen and De Camilli, 2005). Η προσθήκη των λιπιδίων έχει σαν αποτέλεσμα η GFP να εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη σε όλη την κυτταρική επιφάνεια του επιθηλίου (apical και basolateral) όπως φαίνεται στην εικόνα 6 (βέλος).



Εικόνα 6. Εκτοπική έκφραση της pmGFPubiΔGG με ombG4

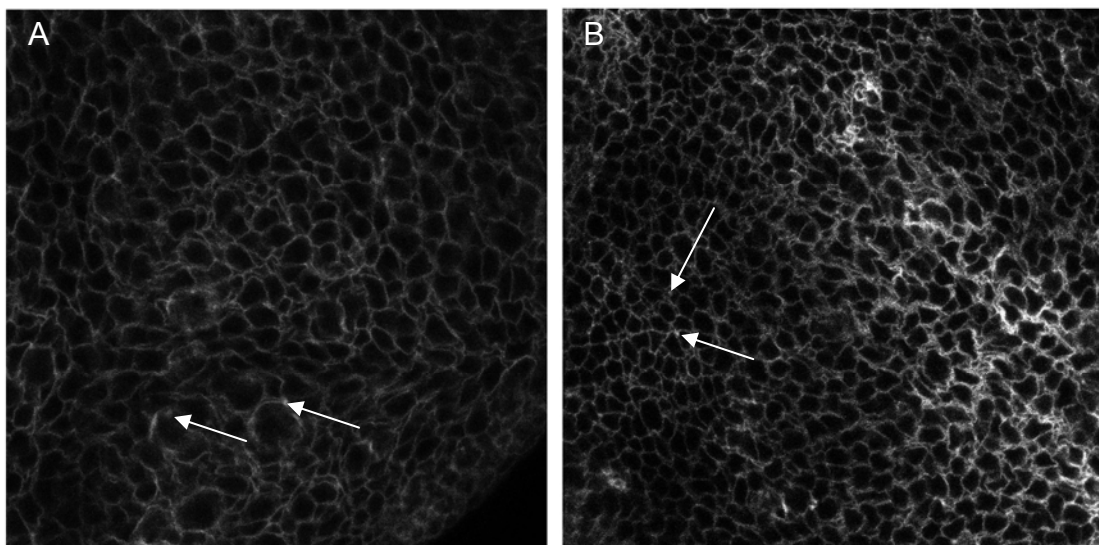
Επίσης, στο καρβοξυτελικό άκρο της GFP υπάρχει ένα μόριο ουβικουΐτινης χωρίς τα δυο τελευταία κατάλοιπα γλυκίνης (ubiΔGG), ώστε να μην χρησιμοποιείται σαν υπόστρωμα για ουβικουΐτινίωση άλλων πρωτεϊνών (Chen and De Camilli, 2005). Λόγω της ουβικουΐτινης, η GFP μπορεί να ενδοκυτταρώνεται και να μεταφέρεται στα ενδοσώματα ακολουθώντας την πορεία που παίρνουν οι ουβικουΐτινιλιωμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες. Όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα, η GFP εντοπίζεται σε μεγάλες κυκλικές κηλίδες (βλ. βέλη) που προφανώς αντιπροσωπεύουν ενδοσώματα. Τα ενδοσώματα αυτά εντοπίζονται στην apical και sub-apical περιοχή των

κυττάρων και σε μεγαλύτερο βάθος κοντά την βασική πλευρά εξαφανίζονται (όπως παρατηρήθηκε από τις διαφορετικές οπτικές τομές σε όλο το ύψος- z άξονα των επιθηλιακών κυττάρων). Επίσης, βρίσκονται κυρίως κοντά στην πλασματική μεμβράνη και λιγότερο συχνά στο εσωτερικό των κυττάρων.



Εικόνα 7. Εκτοπική έκφραση της pmGFPubiΔGG με ombG4 A) βάθος 9μm από την apical πλευρά B) βάθος 12μm από την apical πλευρά

Για να διαπιστώσουμε ότι η ενδοκυττάρωση της GFP οφείλεται στο μόριο της ουβικουΐνης που φέρει, χρησιμοποιήθηκε μια μεταλλαγμένη μορφή της pmGFPubiΔGG στην οποία η Ισολευκίνη 44 της ουβικουΐνης έχει αντικατασταθεί από Αλανίνη (pmGFPubiΔGG-I44A). Η Ισολευκίνη αυτή είναι πολύ σημαντική για την αναγνώριση της ουβικουΐνης από μοτίβα UIM των πρωτεϊνών (adaptors) που επιλέγουν το φορτίο για την ενδοκυττάρωση. Η μεταλλαγμένη GFP δεν θα πρέπει να ενδοκυτταρώνεται.



Εικόνα 8. Εκτοπική έκφραση της pmGFPubiΔGG I44A με ombG4 A) βάθος 9μm από την apical πλευρά B) βάθος 12μm από την apical πλευρά

Όπως φαίνεται στην εικόνα 8, στην περίπτωση της pmGFPubiΔGG I44A η GFP εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων αλλά οι κηλίδες (dots) στις οποίες συγκεντρώνεται είναι πολύ λιγότερες σε σύγκριση με την μη μεταλλαγμένη GFP (εικ 7). Άρα πράγματι η αλλαγή στην Ισολευκίνη 44 εμποδίζει την ενδοκυττάρωση και την μεταφορά της GFP στα ενδοσώματα, αλλά δεν την εξαλείφει πλήρως.

Μια πιθανή αιτία ίσως είναι ότι η μεταλλαγμένη ουβικουΐτίνη γίνεται στόχος προσθήκης επιπλέον μορίων ουβικουΐτίνης που επειδή δεν έχουν αλλαγμένη την Ισολευκίνη 44 μπορούν να αναγνωρίζονται και ως αποτέλεσμα να προκαλείται η ενδοκυττάρωση της GFP. Για να αποφύγουμε ένα τέτοιο ενδεχόμενο δημιουργήθηκε μια διπλά μεταλλαγμένη μορφή της GFP, η pmGFPubiΔGG I44A K48R. Η Λυσίνη 48 είναι το κατάλοιπο της ουβικουΐτίνης που χρησιμοποιείται για την προσθήκη άλλων μορίων ουβικουΐτίνης και η αλλαγή της σε Αργινίνη θα αποτρέψει την περαιτέρω ουβικουΐτινίωση. Η διπλά μεταλλαγμένη GFP δεν έχει εντεθεί ακόμα σε μύγες.

Μια άλλη εξήγηση για την μερική ενδοκυττάρωση της pmGFPubiΔGG I44A είναι ότι η εισαγωγή της σε ενδοσώματα γίνεται τυχαία και όχι ειδικά λόγω της ουβικουΐτίνης που φέρει, και ίσως τα ενδοσώματα αυτά να είναι διαφορετικά από αυτά στα οποία οδηγούνται οι ουβικουΐτινιλιωμένες πρωτεΐνες.

Στη συνέχεια, θα ελεγχθεί αν το ενδοκυττωμένο Delta συνεντοπίζεται με τα ενδοσώματα στα οποία βρίσκεται η GFP και ποιοι άλλοι γνωστοί μάρτυρες ενδοκυτταρικών διαμερισμάτων βρίσκονται στα ενδοσώματα αυτά (πχ. Hrs), για να διαπιστώσουμε αν είναι πρώιμα ή όψιμα (πειράματα σε εξέλιξη).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια έχει καταβληθεί μεγάλη προσπάθεια από πολλές επιστημονικές ομάδες για την κατανόηση του μηχανισμού με τον οποίο η ενδοκυττάρωση των προσδετών του Notch εξυπηρετεί την ενεργοποίηση του υποδοχέα και την αποστολή του σήματος.

Η δουλειά των Wang και Struhl (Wang and Struhl, 2004) έδειξε ότι μια πρωτεΐνη που είναι γνωστή για την συμμετοχή της στην διαδικασία της ενδοκυττάρωσης, η Lqf (ομόλογη της *epsin* των θηλαστικών), είναι απαραίτητη για την αποστολή σήματος Notch, αλλά η ενδοκυττάρωση του Delta δεν εμποδίζεται απουσία της. Επομένως, η ενδοκυττάρωση του Delta δεν είναι από μόνη της επαρκής για την αποστολή σήματος. Θα πρέπει να γίνει μέσω ενός συγκεκριμένου μηχανισμού και με τη συμμετοχή κάποιων ειδικών παραγόντων για να οδηγήσει στην σηματοδότηση. Επίσης, πρόσφατα βρέθηκε ότι και η *auxilin*, μια πρωτεΐνη που συμμετέχει στην διαδικασία της ενδοκυττάρωσης αλλά η λειτουργία της δεν είναι ακόμα ξεκάθαρη (υπάρχουν ενδείξεις για την συμμετοχή της στο σχηματισμό των κυστιδίων σε συνεργασία με τη δυναμίνη αλλά και για την λειτουργία της στην απομάκρυνση του καλύμματος κλαθρίνης μετά το σχηματισμό του κυστιδίου), χρειάζεται για την αποστολή σήματος Notch και την ενδοκυττάρωση του Delta (Hagedorn et al, 2006).

Θέλοντας να διερευνήσουμε ποιοι άλλοι πρωτεϊνικοί παράγοντες του μηχανισμού ενδοκυττάρωσης είναι απαραίτητοι για την αποστολή του σήματος Notch, επιλέξαμε να εξετάσουμε μερικές πρωτεΐνες που είναι γνωστές για τη δράση τους στα αρχικά στάδια της διαδικασίας ενδοκυττάρωσης στα κύτταρα (σχηματισμός κυστιδίου και επιλογή φορτίου για ενδοκυττάρωση).

Μέσω των πειραμάτων που περιγράφονται στην παρούσα εργασία, διαπιστώσαμε ότι η Αμφιφυσίνη το Disabled και η Eps15 δεν είναι απαραίτητες για την αποστολή του σήματος μέσω Delta. Μπορεί να συμμετέχουν στην διαδικασία ενδοκυττάρωσης του Delta και τη σηματοδότηση αλλά δεν έχουν ρόλο-κλειδί στην διαδικασία και η απουσία τους συμπληρώνεται από τη λειτουργία άλλων πρωτεϊνών. Για την Eps15 υπάρχει μια αμφιβολία κατά πόσο ήταν ισχυρό το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο που χρησιμοποιήθηκε. Θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί απόσχιση του P element από το γονίδιο για να δημιουργηθεί έλλειψη στην

μεταφραζόμενη περιοχή και να επαναληφθεί το πείραμα με αυτό το αλληλόμορφο. Για τις πρωτεΐνες α-Ανταπτίνη και Βαριά Αλυσίδα Κλαθρίνης δεν μπορέσαμε να ελέγξουμε την αναγκαιότητα τους στην σηματοδότηση μέσω Delta λόγω τεχνικών προβλημάτων.

Επίσης, θελήσαμε να ελέγξουμε αν τα πρωτεολυμένα τμήματα του Delta έχουν κάποιο ρόλο στην αποστολή του σήματος. Η πρεσενιλίνη, που φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την πρωτεόλυση του ενδοκυττάριου τμήματος του Delta δεν είναι απαραίτητη για την σηματοδότηση μέσω Delta. Άρα η δημιουργία του ενδοκυττάριου τμήματος μετά από πρωτεόλυση δεν χρειάζεται για την αποστολή σήματος, εκτός αν δεν είναι η πρεσενιλίνη το ένζυμο που πραγματοποιεί την πρωτεόλυση (Delwig et al., 2006). Το αντίστοιχο πείραμα για το Kuzbanian που είναι υπεύθυνο για την πρωτεόλυση του εξωκυττάριου τμήματος του Delta είναι σε εξέλιξη.

Παράλληλα, θεωρήσαμε χρήσιμο στην διερεύνηση της ενδοκυττωτικής πορείας του Delta να δημιουργήσουμε εργαλεία που θα μας επιτρέπουν να παρακολουθήσουμε την διαδρομή του Delta στα ενδοκυττωτικά διαμερίσματα χωρίς να παρεμβαίνουμε στη διαδικασία αυτή. Για το λόγο αυτό δημιουργήθηκαν στελέχη μυγών που εκφράζουν κάτω από τον έλεγχο του Gal4 μια μεμβρανική GFP που φέρει ένα μόριο ουβικουΐτίνης (UAS pmGFPubiΔGG και UASpmGFPubiΔGG I44A για control) και μπορεί να ενδοκυτταρώνεται σημαίνοντας τα ενδοσώματα στα οποία συσσωρεύονται ουβικουΐτινιλιωμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες. Χρησιμοποιώντας τα στελέχη αυτά (αφού ελεγχθεί πρώτα αν το ενδοκυττωμένο Delta συνεντοπίζεται με τα ενδοσώματα στα οποία βρίσκεται η GFP) μπορούμε να σκιαγραφήσουμε την πορεία του Delta μέσα στο κύτταρο (σε τι ενδοσώματα βρίσκεται, αν πηγαίνει για αποικοδόμηση ή για ανακύκλωση) και τι αλλάζει στην πορεία αυτή όταν δεν γίνεται αποστολή σήματος (πχ Iqf^{-/-}).

Με τις δυο αυτές συμπληρωματικές προσεγγίσεις ίσως να καταφέρουμε με μελλοντικά πειράματα να διακρίνουμε ποιο από τα μοντέλα που έχουν προταθεί για το ρόλο της ενδοκυττάρωσης του Delta στην αποστολή του σήματος ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα. Αν δηλαδή η ενδοκυττάρωση των προσδετών βοηθά στα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα στη μεμβράνη (S2 πρωτεόλυση του Notch, συγκέντρωση των μορίων του προσδέτη τοπικά στη μεμβράνη κλπ) (Parks et al., 2000, Le Borgne & Schweisguth, 2003) ή αν

η ενδοκυττάρωση του Delta χρειάζεται για να ενεργοποιηθεί, ώστε μετά να ανακυκλωθεί στη μεμβράνη με την ενεργοποιημένη μορφή του και να σηματοδοτήσει το Notch (Wang and Struhl, 2004).

Βέβαια, παλαιότερα πειράματα στο εργαστήριο μας δείχνουν ότι μάλλον η σηματοδότηση περιλαμβάνει γεγονότα που λαμβάνουν χώρα κοντά στη μεμβράνη. Έχειδειχτεί ότι η ταυτόχρονη υπερέκφραση Delta και NeurΔR (ελλειμματική μορφή του Neur) στο φτερό εμποδίζει την ενδοκυττάρωση του Delta αλλά επιτρέπει στο Delta να σηματοδοτεί τα γειτονικά κύτταρα (Pavlopoulos et al, 2001) εφόσον υπάρχει το Mindbomb (Pitsouli and Delidakis, 2005). Επίσης, έχειδειχτεί ότι η υπερέκφραση NeurΔR στο φτερό προκαλεί την συσσώρευση του ενδογενούς Delta κοντά στη μεμβράνη (aggregates), αλλά επιτρέπει τα αρχικά στάδια της ενδοκυττάρωσης του (προφανώς λόγω παρουσίας Mindbomb), εφόσον με εξωκυττάρια χρώση (χωρίς απορρυπαντικό που ανοίγει τρύπες στην μεμβράνη) δεν ήταν δυνατόν να ανιχνευτεί το Delta (Κανακουσακη, Πτυχιακή εργασία). Δηλαδή, το NeurΔR παγιδεύει το Delta σε συσσωματώματα κάτω από την πλασματική μεμβράνη χωρίς να επιτρέπει τη συνέχιση της ενδοκυττάρωσης και αποικοδόμησης του, ούτε την επιστροφή του στη μεμβράνη αφού δεν ήταν δυνατόν να εντοπιστεί με εξωκυττάρια χρώση. Κι όμως, με βάση τα προηγούμενα, αυτό είναι αρκετό για την αποστολή σήματος. Άρα η διαδικασία σηματοδότησης είχε συντελεστεί στο ξεκίνημα της ενδοκυττάρωσης του Delta. Σαν συνέχεια των πειραμάτων αυτών εξετάζεται (πειράματα σε εξέλιξη) αν το Delta μπορεί να ενδοκυτταρώνεται (αν εντοπίζεται ή όχι με εξωκυττάρια χρώση) και αν σχηματίζει συσσωματώματα, σε μιτωτικούς κλώνους υπερέκφρασης NeurΔR όπου απουσιάζει το Mindbomb και εμποδίζεται η αποστολή του σήματος.

Αν η διαδικασία σηματοδότησης λαμβάνει χώρα κατά τα αρχικά στάδια της ενδοκυττάρωσης του Delta, τότε η Lqf χρειάζεται, όχι για να οδηγήσει το Delta σε ένα συγκεκριμένο ενδοκυτταρικό μονοπάτι όπου θα ενεργοποιηθεί κι έπειτα θα ανακυκλωθεί στη μεμβράνη (μοντέλο Wang and Struhl, 2004), αλλά για να οδηγήσει το Delta σε μεμβρανικές μικρο-περιοχές όπου θα έρθει σε γεινίαση με άλλους παράγοντες που θα βοηθήσουν στην ενδοκυττάρωση του διατηρώντας την αλληλεπίδραση του με το Notch του απέναντι κυττάρου έτσι ώστε να ενεργοποιηθεί ο υποδοχέας μέσω της διαδικασίας αυτής (εναλλακτικό μοντέλο της λειτουργίας του Lqf από τους Wang and Struhl,

2004). Αν κάτι τέτοιο ισχύει, τότε θα πρέπει να συνεχιστεί η αναζήτηση των παραγόντων αυτών στα αρχικά στάδια της ενδοκυττάρωσης όπως συνέβη με την παρούσα εργασία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M., Lake, R.** (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* Vol 284: 770-776.
- Baron, M.** (2003). An overview of the Notch signaling pathway. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 14: 113-119.
- Brand, A. and Perrimon, N.** (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118: 401-415
- Boulianne, G., de la Concha, A., Campos-Ortega J., Yeh Jan L., Nung Jan, Y.** (1991). The *Drosophila* neurogenic gene neuralized encodes a novel protein and is expressed in precursors of larval and adult neurons. *EMBO journal* 10, 2975-2983.
- Chen, H. and De Camilli, P.** (2005). The association of epsin with ubiquitinated cargo along the endocytotic pathway is negatively regulated by its interaction with clathrin. *PNAS* 102 (8): 2766-2771
- Delwig, A., Bland, C., Beem-Miller, M., Kimberly, P., Rand, M. D.** (2006) Endocytosis-independent mechanisms of Delta ligand proteolysis. *Experimental Cell Research* 312: 1345-1360
- Hagedorn, E. J., Bayraktar, J. L., Kandachar, V. R., Bai, T., Englert, D. M., and Chang, H. C.** (2006) *Drosophila melanogaster* auxilin regulates the internalization of Delta to control activity of the Notch signaling pathway. *JCB* 173 (3): 443-452.
- Haglund, K., Di Fiore, P.P., Dikic, I.** (2003). Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem Sci* 28: 598-603.
- Itoh, M., Kim, C.H., Palardy, G., Oda, T., Jiang, Y.J., Maust, D., Yeo, S.Y., Lorick, K., Wright, G.J., McNaughton, L.A., Weissman, A.M., Lewis, J., Chandrasekharappa, S.C., Chitnis, A.** (2003) Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Developmental Cell* 4, 67-82.
- Jacobsen, T.L., Brennan, K., Martinez-Arias, A. and Muskavitch, M.A.** (1998) Cis-interactions between Delta and Notch modulate neurogenic signalling in *Drosophila*. *Development* 125: 4531-4540

- Lai, E., Deblandre, G.A., Kinter, C., Rubin, G. M.** (2001). *Drosophila* neuralized is a ubiquitin ligase that promotes the internalization and degradation of Delta. *Developmental Cell* 1, 783-794.
- Lai, E., Roegiers, F., Qin, X., Jan, Y. N. and Rubin, G. M.** (2005). The ubiquitin ligase *Drosophila* Mind Bomb promotes Notch signaling by regulating the localization and activity of serrate and Delta. *Development* 132, 2319-2332.
- Le Borgne, R., Rемаud, S., Hamel, S., Schweisguth, F.** (2005). Two Distinct E3 Ubiquitin Ligases Have Complementary Functions in the Regulation of Delta and Serrate Signaling in *Drosophila*. *PLoS* 3(4): e96
- Le Borgne, R., Schweisguth, F.** (2003). Notch signaling: endocytosis makes Delta signal better. *Current Biology* 13: 273-275.
- Lee, T. and Luo, L.** (2001) Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development. *Trends Neurosci* 24: 251-254
- Mishra-Gorur, K., Rand, M. D., Perez-Villamil, B. and Artavanis-Tsakonas, S.** (2002) Down-regulation of Delta by proteolytic processing. *Journal of Cell Biology* 159 (2): 313-324
- Parks, A.L., Klueg, M., Stout, J.R., Muskavitch, M.A.T.** (2000). Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* 127: 1373-1385.
- Pavlopoulos, E., Pitsouli, C., Klueg, K., Muskavitch, M., Moschonas, N., Delidakis, C.** (2001). *neuralized* encodes a peripheral membrane protein involved in Delta signaling and endocytosis. *Developmental Cell* 1: 807-816.
- Pitsouli, C. and Delidakis, C.** (2005). The interplay between DSL proteins and ubiquitin ligases in Notch signaling. *Development* 132: 4041-4050
- Price, D., Chang, Z., Smith, R., Bockheim, S., Laughon, A.** (1993). The *Drosophila* neuralized gene encodes a C₃HC₄ zinc finger. *EMBO journal* 12, 2411-2418.
- Seugnet, L., Simpson, P., Haenlin, M.** (1997). Requirement for dynamin during Notch signaling in *Drosophila* neurogenesis. *Developmental Biology* 192, 585-598.
- Six, E., Ndiaye, D., Laabi, Y., Brou, C., Gupta-Rossi, N., Israel, A.** (2003) The Notch ligand Delta1 is sequentially cleaved by an ADAM protease and γ -secretase. *PNAS* 100 (13): 7638-7643

Wang, W. and Struhl, G. (2004) *Drosophila* Epsin mediates a select endocytic pathway that DSL ligands must enter to activate Notch. *Development* 131: 5367-5380

Wang, W. and Struhl, G. (2005) Distinct roles for Mind bomb, Neuralized and Epsin in mediating DSL endocytosis and signalling in *Drosophila*. *Development* 132: 2883-2894

Yeh, E., Dermer, M., Comisso, C., Zhou, L., McGlade, J., Boulianne, G. (2001). Neuralized functions as an E3 ubiquitin ligase during *Drosophila* development. *Current Biology* 11, 1675-1679.

Zhang, B. and Zehhof, A. (2002). Amphiphysins: Raising the BAR for synaptic vesicle Recycling and Membrane Dynamics. *Traffic* 3: 452-460