

Για να ολοκληρωθεί αυτή η εργασία δεν ήταν αρκετή μόνο η δική μου προσπάθεια και πολλές ώρες δουλειάς μπροστά στον πάγκο. Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου Νίκο Μοσχονά, ο οποίος με εμπιστεύτηκε και παρακολούθησε την προσπάθεια αυτή σε κάθε της βήμα. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους καθηγητές κ. Χαλεπάκη και κ. Δελιδάκη για τις συμβουλές τους και τον καθηγητή κ. Γαλανόπουλο που βοήθησε στην πραγματοποίηση των πειραμάτων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Ευχαριστώ πολύ τον Ηλία Παυλόπουλο που ήταν πρόθυμος να με βοηθήσει όσες φορές και αν τον ενοχλούσα καθώς και τους υπόλοιπους φίλους και συναδέρφους Μαρία Κοκκινάκη, Λιλίκα Σαραφίδου, Αγγέλα Πασπαράκη, Σωτήρη Μπανάκο και τη Σοφία Βρόντου από το «αδερφό» εργαστήριο, οι οποίοι έκαναν την καθημερινότητα πιο ευχάριστη. Θέλω επίσης να ευχαριστήσω το Δημήτρη που με βοήθησε τόσο με «πρωτεϊνικές» συμβουλές όσο και με την υπομονή του αυτό τον απαιτητικό χρόνο που πέρασε. Τέλος ευχαριστώ πολύ τους φίλους μου, αυτούς που είναι κοντά και αυτούς που είναι μακριά και την οικογένειά μου που με στηρίζει σε όποια απόφαση και αν πάρω.

Λία

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>1-17</b>
1. Το γονίδιο <i>Neuralized</i> του ποντικού	1
2. Το γονίδιο <i>neuralized</i> στη <i>Drosophila</i>	5
3. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch	7
α. Ο υποδοχέας Notch	8
β. Οι δεσμευτές Delta/Serrate	10
γ. Οι δεσμευτές της οικογένειας DSL στα θηλαστικά	13
4. Σκοπός της εργασίας.	17
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>18-40</b>
<b>A. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ</b>	
1. Υδρολύση DNA με περιοριστικά ένζυμα.	18
2. Αλυσιδωτή αντίδραση DNA πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)	18
3. Έκλυση γραμμικών μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης.	19
4. Παρασκευή δεκτικών για μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> .	
Α. Δεκτικά κύτταρα για χημικό μετασχηματισμό	19
Β. Δεκτικά κύτταρα για μετασχηματισμό μεσω ηλεκτρικής εκκένωσης	20
5. Κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακό φορέα.	21
6. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> με θερμικό σοκ	22
7. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> με ηλεκτρική εκκένωση	
8. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης κυττάρων.	23
9. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας με τη χρήση κολώνας Qiagen.	25

10. Παροδική διαμόλυνση κυτταρικών σειρών με πλασμιδιακό DNA 27
11. Προετοιμασία διαμολυσμένων κυττάρων για παρατήρησή τους σε συνεστιακό μικροσκόπιο 28

## **B. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ**

1. Υπερέκφραση των πρωτεϊνών σε κύτταρα *E.coli* BL21 (DE3) 29
2. Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS – PAGE) 29
3. Απομόνωση διαλυτών GST χιμαιρικών πρωτεϊνών με πραγματοποίηση χρωματογραφίας συγγένειας με προσροφητή Glutathione Sepharose 4B
4. Απομόνωση των αδιάλυτων GST χιμαιρικών πρωτεϊνών από τα έγκλειστα σωματίδια (inclusion bodies) 31
5. Παραγωγή πολυκλωνικού αντιορού 32
6. Ανάλυση Western 32
7. Αρνητικός καθαρισμός συγγένειας αντισωμάτων πάνω σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 33

## **Γ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΕ ΕΜΒΡΥΑ ΠΟΝΤΙΚΟΥ**

### **I. In Situ υβριδοποίηση σε τομές κρυοστάτη**

1. Προετοιμασία ανιχνευτή mRNA με αντίδραση μεταγραφής in vitro 35
2. Επεξεργασία εμβρύων για τομές τους σε κρυοστάτη. 36
3. Υβριδοποίηση του ανιχνευτή με το mRNA στόχο πάνω στις τομές των εμβρύων. 36
4. Πλυσίματα μετά την υβριδοποίηση και ανοσολογική ανίχνευση με το αντίσωμα anti-DIG. 37
5. Πλυσίματα μετά την επώαση του αντισώματος anti-DIG και εμφάνιση του σήματος. 38
6. Παρατήρηση των εμβρύων στο μικροσκόπιο και φωτογράφιση 39

### **II. Ανοσοιστοχημική χρώση σε τομές κρυοστάτη 39**

1. Προετοιμασία των εμβρύων πριν την επώασή τους με τα αντισώματα 39
2. Επώαση με τα κατάλληλα αντισώματα και αντίδραση εμφάνισης 39

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 41-59**

### **1. Διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου της πρωτεΐνης *Neutralized* του ποντικού με την παρασκευή ειδικών πολυκλωνικών αντισωμάτων**

A. Υπερέκφραση τμημάτων της πρωτεΐνης *Neutralized* σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli* BL21 41

B. Καθαρισμός των πρωτεϊνικών τμημάτων που υπερεκφράστηκαν για τη χρησιμοποίησή τους ως αντιγόνα στην ανοσοποίηση κουνελιών 44

Γ. Ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος των αντισωμάτων 45

Δ. Έλεγχος των αντισωμάτων σε εκχυλίσματα ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών και εντοπισμός της πρωτεΐνης *Neutralized* σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές 48

E. Ανοσοιστοχημική χρώση σε τομές εμβρύου ποντικού 51

### **2. Συγκριτική μελέτη του προτύπου έκφρασης του γονιδίου *Neur1* με τους 4 ομόλογους δεσμευτές των υποδοχέων *Notch* *Delta – like 1*, *Delta – like 4*, *Jagged 1* και *Jagged 2* 53**

## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ 60-64**

1. Σύγκριτική μελέτη προτύπου έκφρασης 61

2. Υποκυτταρικό εντοπισμός 64

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 65-72**

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1. Το γονίδιο *neuralized* του ποντικού

Πολλοί μοριακοί μηχανισμοί που ελέγχουν την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος και τη νευρική λειτουργία είναι εξελικτικά συντηρημένοι (Chan and Jan, 1999). Ένα παράδειγμα αποτελεί ο μηχανισμός σηματοδότησης μέσω τον υποδοχέα *Notch*, ο οποίος λειτουργεί σε πολλές αναπτυξιακές διαδικασίες τόσο σε εμβρυικά στάδια όσο και στην ενήλικη ζωή και καθορίζει την κυτταρική μοίρα σε διάφορους οργανισμούς από το σκουλήκι και τη μύγα μέχρι τα θηλαστικά (Artavanis-Tsakonas et al., 1995). Το γονίδιο *neuralized* της *D.melanogaster* ανήκει όπως και το *Notch*, στην ομάδα των νευρογόνων γονιδίων, όπου δρα πριν ή κατά τη σηματοδότηση του υποδοχέα από το δεσμευτή του και ο ρόλος του είναι να περιορίζει τον αριθμό των πρόδρομων νευρικών κυττάρων και να καθορίζει την κυτταρική τύχη στα αισθητήρια όργανα και στον φωτουποδοχέα R8 (Boulianne et al., 1991; Price et al., 1993; Yeh et al., 2000; Lai and Rubin, 2001a).

Το ανθρώπινο ομόλογο *NEURL* ταυτοποιήθηκε και χαρτογραφήθηκε στην χρωμοσωμική περιοχή 10q25.1, όπου χρωμοσωμικές ανωμαλίες σχετίζονται συχνά με κακοήθη αστροκυττώματα, δηλαδή αστροκυτταρικούς όγκους του κεντρικού νευρικού συστήματος (Nakamura et al., 1998). Συγκρίνοντας τις αλληλουχίες των γονιδίων *Neuralized* στον άνθρωπο, τη *D.melanogaster* και το *C.elegans* παρατηρείται σημαντική ομολογία στην περιοχή C<sub>3</sub>H<sub>4</sub> δακτύλου ψευδαργύρου (RING), η οποία θεωρείται ότι συμμετέχει σε DNA, RNA και πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και χαρακτηρίζει μια μεγάλη ποικιλία ρυθμιστικών πρωτεϊνών. Γνωρίζοντας ότι το γονίδιο *neuralized* της *Drosophila* συμμετέχει στη διαδικασία της νευρογένεσης έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι

το ανθρώπινο ομόλογο μπορεί να συμμετέχει στον καθορισμό της κυτταρικής τύχης του ανθρώπινου νευρικού συστήματος (Nakamura et al., 1998).

Το γονίδιο *Neuralized* του ποντικού (*Neurl*) απομονώθηκε μετά από διερεύνηση βιβλιοθήκης cDNA από εγκέφαλο εμβρύου ποντικού E14.5 (Pavlopoulos et al., 2001a). Προέκυψε ένας κλώνος μεγέθους 2,433 bp στον οποίο βρέθηκε ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 1,710 bp ακολουθούμενο από 723 bp 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (UTR). Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται έχει μέγεθος 574 αμινοξέων και εμφανίζει 94% ταυτότητα με την ανθρώπινη και 33% ταυτότητα με τη δροσοφιλική. Παρά το γεγονός ότι τα μόρια παρουσιάζουν την ίδια δομική οργάνωση (Εικ.1) υπάρχει μια διαφορά 180 αμινοξέων μεταξύ του θηλαστικού και του δροσοφιλικού μορίου. Οι επιπλέον αλληλουχίες του δροσοφιλικού μορίου μπορεί να αντανάκλουν πρόσθετα λειτουργικά χαρακτηριστικά ή απλώς να συνδέουν παράπλευρες πολυπεπτιδικές περιοχές.

Με ανάλυση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας του *Neurl* χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SMART ([smart.embl-heidelberg.de/](http://smart.embl-heidelberg.de/)) ταυτοποιήθηκαν δύο εσωτερικές επαναλήψεις NEUZ με την ίδια διαδοχή στον άνθρωπο, στη *D.melanogaster* και το *C.elegans*. Η περιοχή NEUZ αναγνωρίστηκε πρώτη φορά σαν μια εσωτερική επανάληψη στο *NEURL* που χαρακτηρίζει το συγκεκριμένο γονίδιο (Nakamura et al., 1998). Πρόσφατα προέκυψαν δύο ακόμα πρωτεϊνικές ομάδες που περιέχουν τις περιοχές NEUZ. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει μια ανθρώπινη και μια δροσοφιλική πρωτεΐνη άγνωστης λειτουργίας (με 41% ταυτότητα μεταξύ τους) που έχουν 6 και 4 επαναλήψεις NEUZ αντίστοιχα αλλά δεν έχουν την περιοχή C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> δακτύλου ψευδαργύρου. Η δεύτερη ομάδα αποτελείται από δύο ομόλογες πρωτεΐνες των θηλαστικών (ανθρώπου και ποντικού) και μια δροσοφιλική που εμφανίζει 38% ταυτότητα με τις ομόλογες θηλαστικές. Οι πρωτεΐνες αυτές εκτός από μια NEUZ επανάληψη έχουν και την περιοχή SOCs (Suppressor of Cytokine Signalling) που εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Οι δύο αυτές πρωτεϊνικές ομάδες δεν εμφανίζουν άλλη αμινοξική ομοιότητα πέρα από τις επαναλήψεις NEUZ, υποδηλώνοντας ότι αυτές οι περιοχές αποτελούν μια καλά συντηρημένη πρωτεϊνική δομή και έτσι τα ορθόλογα γονίδια *Neuralized* μπορούν να θεωρηθούν πως ανήκουν σε μια NEUZ υπερ – οικογένεια γονιδίων NEUZ, λειτουργικά αποκλίνουσα, με μέλη τόσο στα ασπόνδυλα όσο και στα σπονδυλωτά.

Το γονίδιο *Neurl* του ποντικού χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 19, σε μια περιοχή συνταινική με το ανθρώπινο χρωμόσωμα 10q25.1 (Banfi et al., 1996) που σχετίζεται με αρκετές γενετικές ανωμαλίες του νευρικού συστήματος και αναπτυξιακές δυσμορφίες (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>). Η μελέτη της γενωμικής οργάνωσης του γονιδίου έδειξε ότι η κωδικοποιούσα αλληλουχία περιέχεται σε μια χρωμοσωμική περιοχή 21 Kb και αποτελείται από 6 εξόνια. Πειράματα ανάλυσης κατά Southern και ανάλυση της υπάρχουσας αλληλουχίας ανθρώπου και ποντικού έδειξαν ότι το γονίδιο *Neurl* είναι μοναδικό στο γονιδίωμα του ποντικού.

Η ανάλυση του προτύπου έκφρασης του ανθρώπινου *NEURL* έδειξε ότι το γονίδιο είναι μεταγραφικά ενεργό στον φυσιολογικό ανθρώπινο εγκέφαλο και σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα, σε ιστούς κακοήθους αστροκυττώματος (Nakamura et al., 1998). Η μελέτη του προτύπου έκφρασης του γονιδίου *Neurl* σε εμβρυικούς ιστούς ποντικού με υβριδοποίηση *in situ* το εντόπισε σε συγκεκριμένα σημεία και κυτταρικές στιβάδες των αναπτυσσόμενων οργάνων του εμβρύου (Pavlopoulos, 2001 & Κουτέλου Διπλωματική Εργασία 1998-1999). Σε ολόκληρα έμβρυα E10.5 και E12.5 παρατηρήθηκαν μετάγραφα του γονιδίου στα εκβλαστήματα των άκρων, στα ραχιαία γάγγλια και στο κεφάλι. Λεπτομερέστερη ανάλυση σε τομές εμβρύων E12.5, E13.5 και E18.5 έδειξαν έκφραση του γονιδίου σε νευρικούς ιστούς, όπως στην κοιλιακή (ventricular) ζώνη του μεσεγκεφάλου, στο επιθήλιο του χοριοειδούς πλέγματος, στο νευρικό σωλήνα, στο τρίδυμο νεύρο και σε αισθητήρια όργανα όπως είναι ο φακός και ο αμφιβληστροειδής του ματιού, το οσφρητικό επιθήλιο και τα επιθηλιακά κύτταρα των μουστακιών. Το *Neurl* εκφράζεται επίσης σε διακριτές κυτταρικές στιβάδες των εσωτερικών οργάνων όπως είναι τα βρογχιόλια του πνεύμονα, το παρέγχυμα του ήπατος, το βλεννώδες επιθήλιο του στομάχου, τα σπειράματα των νεφρών, το επιθήλιο του ουρογεννητικού πόρου, το επιθήλιο των άκρων. Επιπλέον με RT – PCR παρατηρήθηκε έκφραση του γονιδίου σε ενήλικο εγκέφαλο, όρχεις και ήπαρ, καθώς επίσης και σε εμβρυικά κύτταρα ποντικού NIH 3T3 και κύτταρα τερατοκαρκινώματος P19 (Pavlopoulos et al., 2001). Όμοια με το ποντίκι, υβριδοποίηση *in situ* σε ανθρώπινα έμβρυα έξι εβδομάδων έδειξε έκφραση του *NEURL* στο δέρμα, σε χόνδρινα μέρη του άκρου, του σπονδύλου και των πλευρών καθώς και στο παρέγχυμα του ήπατος, σε πνεύμονες και σε μύες (Kosher, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι μετάγραφα του *Neurl* εντοπίζονται και σε περιοχές του ενήλικου εγκεφάλου του ποντικού όπως ο εγκεφαλικός φλοιός, η παρεγκεφαλίδα, ο ιππόκαμπος, το νεοραβδωτό σώμα και η οδοντωτή έλικα (Ruan et al., 2001). Η καταστροφή του γονιδίου με ομόλογο ανασυνδυασμό σε εμβρυικά κύτταρα ποντικού οδήγησε στη γέννηση βιώσιμων ποντικών χωρίς μορφολογικές ανωμαλίες. Τα ποντίκια αυτά εμφανίζουν ελάττωμα στην διάκριση οσμών και ευαισθησία στην επίδραση της αιθανόλης στον κινητικό συντονισμό. Το γεγονός ότι η καταστροφή (knock out) του γονιδίου *Neurl* δεν επηρεάζει την ανάπτυξη του εμβρυικού νευρικού συστήματος μπορεί να οφείλεται στη μη ουσιαστική συμμετοχή του γονιδίου σε αυτή τη διαδικασία ή στην λειτουργική αποκατάσταση του από ένα άλλο γονίδιο με παρόμοιες λειτουργικές ιδιότητες.

Πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων COS – 7 (νεφρικά κύτταρα πιθήκου) με τη χρήση χιμαιρικών μορφών της πρωτεΐνης *Neurl* με πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) δείχνουν ότι η πρωτεΐνη εντοπίζεται υποκυτταρικά κοντά στην πλασματική μεμβράνη, αλλά και μέσα στο κυτταρόπλασμα σε στικτές δομές. Αντίστοιχα η δροσοφιλική πρωτεΐνη, σε πειράματα *in vivo* βρέθηκε να σχετίζεται με την πλασματική μεμβράνη και να συναντάται και σε στικτές δομές μέσα στο κύτταρο (Yeh, 2001). Προκαταρκτικά βιοχημικά πειράματα δείχνουν ότι η πρωτεΐνη *Neurl* σχετίζεται περιφερικά με την πλασματική μεμβράνη γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τη μη ανίχνευση πεπτιδίου -σήματος ή διαμεμβρανικής περιοχής (Pavlopoulos et al., 2001b). Ο υποκυτταρικός αυτός εντοπισμός μπορεί να σχετίζεται με τη λειτουργία των πρωτεϊνών με περιοχή  $C_3HC_4$  δάκτυλο ψευδαργύρου, οι οποίες παίζουν ρόλο στο σχηματισμό μεγάλων μακρομοριακών αθροισμάτων απαραίτητων για την πραγματοποίηση πολύπλοκων ενζυμικών διεργασιών (Borden et al., 2000).

**Εικ. 1:** (Πάνω) Νουκλεοτιδική και αμινοξική αλληλουχία του γονιδίου *neurl* του ποντικού και αντιστοίχιση με το ανθρώπινο και το δροσοφιλικό ομόλογο του. Τα όρια των εξονίων που παραμένουν κοινά μεταξύ των δύο γονιδίων των θηλαστικών υποδεικνύονται με βέλη (B). Οι περιοχές NEUZ του γονιδίου βρίσκονται μέσα σε πλαίσια. Η περιοχή του  $C_3HC_4$  δακτύλου



ψευδαργύρου βρίσκεται σε γκρι πλαίσιο. (Κάτω) Συγκριτική αναπαράσταση των πρωτεϊνών Neutralized του ποντικού και της δροσόφιλας. Η συνολική οργάνωση π.χ. στις περιοχές NEUZ (γκρι πλαίσια) και  $C_3HC_4$  δακτύλου ψευδαργύρου (μαύρο πλαίσιο) παραμένει η ίδια και οι επιπλέον πρωτεϊνικές περιοχές του δροσοφιλικού μορίου φαίνονται με ανοιχτά πλαίσια (Pavlopoulos et al., 2001a).



## 2. Το γονίδιο *neuralized* της *Drosophila melanogaster*

Το γονίδιο *neuralized* της *D. melanogaster* ανήκει στην ομάδα των νευρογόνων γονιδίων και μαζί με το γεγονός ότι το πρότυπο έκφρασής του συμπίπτει με πολλά σημεία δράσης του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch καθίσταται σαν ένα μώριο ιδιαίτερου ερευνητικού ενδιαφέροντος (Boulianne et al., 1991; Lehmann et al., 1983). Παρά το γεγονός ότι το *neu* σχετίζεται γενετικά με άλλα νευρογόνα γονίδια (de la Concha et al., 1988; Boulianne et al., 1991) ο ρόλος του μέσα στο μονοπάτι παραμένει ασαφής. Η αμινοξική αλληλουχία του αρχικά θεωρήθηκε ότι κωδικοποιεί μια πυρηνική πρωτεΐνη με ένα θεωρούμενο σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS), μια δομή έλικας – στροφής – έλικας, και μια περιοχή C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> δακτύλου ψευδαργύρου (RING: Really Interesting Gene) στο καρβοξυτελικό της άκρο (Boulianne et al., 1991; Price et al., 1993).

Μελέτες υβριδοποίησης *in situ* έδειξαν ότι το *neu* εκφράζεται ευρέως νωρίς στην εμβρυογένεση, αλλά στη συνέχεια περιορίζεται στην κοιλιακή νευρογόνα περιοχή και τελικά στους νευροβλάστες. Κατά το τρίτο στάδιο της προνύμφης το *neu* εκφράζεται στα προδρομα κύτταρα αισθητηρίων οργάνων που θα εξελιχθούν σε μακροχαίτες στον ενήλικο πίσω θώρακα (Boulianne et al., 1991). Με τη δημιουργία μιτωτικών κλώνων βρέθηκε ότι το *neu* είναι απαραίτητο για τον καθορισμό της επιδερμικής κυτταρικής τύχης στην προνευρική ομάδα, καθώς επίσης και για το σωστό διαχωρισμό των κυτταρικών τυχών στη γενεαλογία των αισθητηρίων οργάνων. Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η πρωτεΐνη Neu εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη πιστεύεται ότι το *neu* ρυθμίζει την αποτελεσματικότητα της νευρογόνου σηματοδότησης κατά την ανάπτυξη των αισθητηρίων οργάνων μέσα στην προνευρική ομάδα επηρεάζοντας την ικανότητα των κυττάρων να δέχονται ή να αναπαράγουν σήματα μέσω των Notch –Delta (Yeh et al., 2000).

Βιοχημικά πειράματα έδειξαν ότι μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας του γονιδίου *neu* προκαλούν μικρή αλλά σταθερή αύξηση της πρωτεΐνης Delta σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Η ποσοτική αύξηση της πρωτεΐνης μπορεί να είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης εξαιτίας ελλειπούς μετα – μεταφραστικής ρύθμισης του δεσμευτή. Όταν το γονίδιο *neu* υπερεκφράζεται μαζί με το *Delta* σε μία ευρεία περιοχή των αναπτυξιακών δίσκων προνύμφης παρατηρείται συνολική μείωση της πρωτεΐνης *Delta*. Εκτοπική έκφραση του γονιδίου *neu* προκαλεί έντονη αλλαγή του κυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης *Delta* από την κυτταρική μεμβράνη σε ενδοκυττωτικά κυστίδια, επιβεβαιώνοντας τη στενή σχέση μεταξύ *neu* και *Delta*. Το γονίδιο *neu* είναι επιπλέον ικανό να ενεργοποιεί τη σηματοδότηση μέσω *Delta* χωρίς να απαιτείται η παρουσία της περιοχής RING δακτύλου ψευδαργύρου, η οποία είναι ωστόσο απαραίτητη για την ενδοκύτωση του *Delta* (Pavlopoulos et al, 2001b).

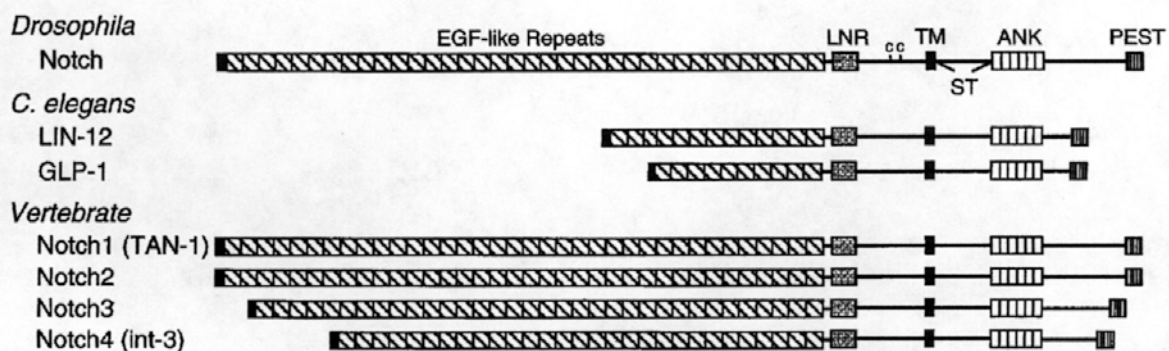
Το γονίδιο *neu* φάνηκε να παίζει ρόλο σε μερικές μόνο από τις κυτταρικές διαδικασίες που εξαρτώνται από το μονοπάτι Notch όπως η συμμετοχή του στην πλευρική αναστολή και των τριών βλαστικών στοιβάδων, στις επαγωγικές διαδικασίες σχηματισμού του μεσοδέρματος, σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του περιφερικού νευρικού συστήματος καθώς και στην πλευρική αναστολή του φωτούποδοχέα R8, όπου δρα αυτόνομα (Lai et al., 2001b). Η αυτονομία αυτή δεν παρατηρείται στην πλευρική αναστολή των φλεβών του φτερού ούτε στον καθορισμό του περιθωρίου του φτερού (Pavlopoulos et al, 2001b). Η εκτοπική έκφραση ωστόσο των πρωτεϊνών *Neu* και *NeuΔRF* (κατασκευή από την οποία απουσιάζει η περιοχή C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> δακτύλου ψευδαργύρου) φαίνεται να μπορεί να επιδρά σε μια μεγάλη ποικιλία διαδικασιών εξαρτωμένων από το Notch, οι οποίες απαιτούν ή δεν επηρεάζονται από το ενδογενές *neu*. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι το *neu* επηρεάζει τη λειτουργία ενός ή περισσότερων βασικών συντελεστών του μονοπατιού Notch (Lai et al., 2001a). Η περιοχή C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> δακτύλου ψευδαργύρου, η οποία έχει βρεθεί σε πολλές πρωτεΐνες που δεν σχετίζονται μεταξύ τους, εμφανίζει σύμφωνα με πρόσφατες παρατηρήσεις δράση λιγάσης ουβικουιτίνης (Joazeiro et al., 1999; Lorick et al., 1999). Ένας πιθανός στόχος ουβικουιτινίωσης του γονιδίου *neu* αποτελεί ο δεσμευτής *Delta*, ο οποίος φαίνεται να δρα μη αυτόνομα στο σηματοδοτικό μονοπάτι Notch, ωστόσο έχει δείχτει να παρεμβαίνει και αυτόνομα στην ικανότητα ενός κυττάρου να ενεργοποιείται από το μονοπάτι Notch (Jacobsen et al.,

1998). Η αποικοδόμηση του Delta από το Neu μπορεί στη συνέχεια να ενισχύει αυτόνομα την ικανότητα ενός κυττάρου να δέχεται σήμα και να ενεργοποιείται από το μονοπάτι Notch (Lai et al., 2001).

### 3. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch.

Η ανάπτυξη πολυκύτταρων οργανισμών κυριαρχείται από τη συνδυασμένη και διαδοχική δραστηριότητα γονιδίων, τα οποία βαθμιαία περιορίζουν το αναπτυξιακό δυναμικό κυτταρικών γενεαλογιών κατά τη διαφοροποίηση. Μεγάλης κλίμακας αναλύσεις μεταλλαγών στη δροσόφιλα έχουν οδηγήσει στον προσδιορισμό γενετικών μονοπατιών που ελέγχουν τη συγκρότηση ενός πολυκύτταρου οργανισμού από ένα - μονοκύτταρο- ωκύτταρο (Ingham et al., 1988).

Αν και ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων παρέχουν το «σχέδιο δράσης» για το συνολικό πρότυπο σχεδιασμού του σώματος, ο προσδιορισμός των μεμονωμένων κυτταρικών τυχών μέσα σε ένα ιστό θεωρείται ότι καθορίζεται από σταθερά μοτίβα κυτταρικής γενεαλογίας και ρυθμιστικά γεγονότα που εξαρτώνται από τοπικές κυτταρικές αλληλεπιδράσεις. Τέτοιες ρυθμιστικές αλληλεπιδράσεις μπορεί να συμβαίνουν μεταξύ κυττάρων που είναι αρχικά ισοδύναμα (πλευρική αναστολή) ή μη ισοδύναμα (επαγωγική σηματοδότηση) και οδηγούν σε αλλαγές της ενδοκυττάριας φυσιολογίας σε απόκριση εξωκυττάριας σημάτων (Artavanis – Tsakonas et al., 1995).



Εικ. 2: Σχηματική αναπαράσταση των υποδοχέων της πρωτεϊνικής οικογένειας Notch. Τα μέλη της οικογένειας έχουν την ίδια συνολική οργάνωση στα συντηρημένα δομικά μοτίβα. Οι

εξωκυττάριας περιοχές περιέχουν πολλαπλές (10 έως 36) επαναλήψεις EGF, που σχετίζονται με τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα, επαναλήψεις LIN-12/Notch (LNR) πλούσιες σε κυστεΐνες. Μετά τη διαμεμβρανική περιοχή (TM) ακολουθούν αλληλουχίες που είναι απαραίτητες για την αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες όπως Su(H)/ CBF1/ LAG-1, 6 επαναλήψεις αγκυρίνης (ANK) και μια περιοχή πλούσια σε προλίνη, γλουταμικό, σερίνη και θρεονίνη (PEST) (Weinmaster, 1997).

## α. Ο υποδοχέας Notch

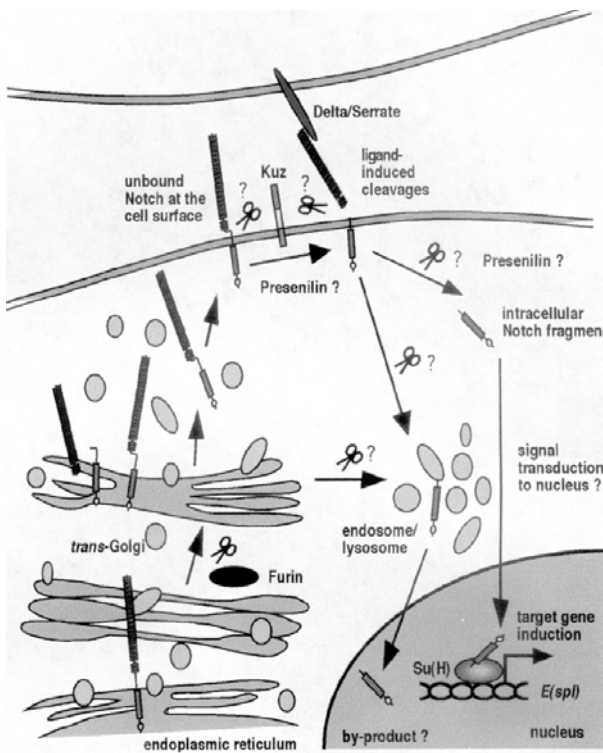
Ένα από τα σηματοδοτικά μονοπάτια που παίζουν κεντρικό ρόλο στον προσδιορισμό της κυτταρικής τύχης, που συμβαίνει μέσω των τοπικών κυτταρικών αλληλεπιδράσεων σε μια πληθώρα ιστών και οργανισμών είναι το μονοπάτι του Notch (Artavanis-Tsakonas et al., 1995). Αυτό το εξελικτικά συντηρημένο μονοπάτι μεσολαβείται από τον διαμεμβρανικό υποδοχέα που κωδικοποιείται από το γονίδιο *Notch* της *D.melanogaster* καθώς και από τα θηλαστικά ομόλογά του, όπως επίσης και από τις σχετικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια του *C. elegans lin-12* και *glp -1* (Greenwald et al., 1994). Η δράση του Notch εμφανίζει πλειοτροπική φύση και λειτουργική αναγκαιότητα κατά την ανάπτυξη διάφορων ειδών. Οι πρωτεΐνες Notch έχουν βρεθεί να λειτουργούν και στους δύο τύπους κυτταρικών αλληλεπιδράσεων, τόσο στην πλευρική αναστολή όσο και στην επαγωγική σηματοδότηση.

Ένας τυπικός υποδοχέας Notch αποτελεί μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη (single-pass), της οποίας η εξωκυττάρια και η ενδοκυττάρια περιοχή αποτελούν λειτουργικά διακριτές μονάδες (Rebay et al., 1993). Η εξωκυττάρια περιοχή χαρακτηρίζεται κυρίως από τις διαδοχικές επαναλήψεις του επιδερμικού παράγοντα αύξησης (Epidermal Growth Factor like Repeats), των οποίων ο αριθμός ποικίλει από 10 στο *glp -1* του *C.elegans* έως 36 στη δροσόφιλα και στα Notch1 και Notch2 ομόλογα των σπονδυλωτών, ενώ 34 το Notch3 και 29 το Notch4 (Weinmaster et al., 1997). Η κύρια λειτουργία της εξωκυττάριας περιοχής φαίνεται να είναι η αλληλεπίδραση με τους δεσμευτές (ligands). Συγκεκριμένα στη δροσόφιλα οι επαναλήψεις EGF 11 και 12 του Notch είναι ικανές και αναγκαίες για την συσσωμάτωση κυτταρικών καλλιιεργειών που εκφράζουν τους δεσμευτές του Notch, Delta ή Serrate (Fleming, 1998). Οι υπόλοιπες επαναλήψεις EGF μπορεί να τροποποιούν τη δράση του Notch επάγωντας ή καταστέλλοντας την αλληλεπίδραση με τους δεσμευτές ή επηρεάζοντας τη σταθερότητα της ίδιας της πρωτεΐνης Notch (Lieber et al., 1993).

Ένα δεύτερο χαρακτηριστικό μοτίβο της εξωκυττάριας περιοχής είναι επαναλήψεις πλούσιες σε κυστεΐνες (Lin-12/Notch), που συναντώνται σε όλα τα ομόλογα του Notch και κρίνονται αναγκαίες για τη διατήρηση της σταθερότητας της εξωκυττάριας περιοχής τους (Fleming, 1998).

Μεταξύ των επαναλήψεων Lin-12/Notch και της διαμεμβρανικής περιοχής υπάρχουν θέσεις πρωτεολυτικής επεξεργασίας της πρωτεΐνης. Το πρώτο στάδιο πρωτεόλυσης παρατηρείται στο trans – Golgi διαμέρισμα, ώστε ο υποδοχέας να φτάνει στην κυτταρική μεμβράνη σαν διμερές. Το γεγονός πραγματοποιείται με τη δράση μιας φουρίνης (furin – like convertase) (Blaumueller et al., 1997; Logeat et al., 1998). Ένα δεύτερο πρωτεολυτικό γεγονός παρατηρείται στην εξωκυττάρια περιοχή του Notch, το οποίο πυροδοτείται από την αλληλεπίδραση με τον δεσμευτή. Η πρωτεόλυση αυτή πραγματοποιείται από μία πρωτεάση τύπου TACE (TNFα – converting enzyme) (Brou et al., 2000) και μετατρέπει το μόριο σε πολύ καλό υπόστρωμα πρεσενιλίνης, η οποία πρωτεολύει τον υποδοχέα στο ενδοκυττάριο τμήμα του, πολύ κοντά στη διαμεμβρανική περιοχή (Ray et al., 1999; Ye et al., 1999). Το ενδοκυττάριο αυτό τμήμα μετακινείται στον πυρήνα και οδηγεί στην ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του σηματοδοτικού μονοπατιού (Chan et al., 1998; Kopan et al., 1996, Struhl et al., 1999).

Η ενδοκυττάρια περιοχή των διάφορων υποδοχέων Notch περιέχει τρία επιπλέον αναγνωρίσιμα μοτίβα που επηρεάζουν τη λειτουργία τους. Έξι επαναλήψεις αγκυρίνης, μια περιοχή πλούσια σε γλουταμίνες (opa) και μια αλληλουχία PEST φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάδοση του σήματος μέσα στο κύτταρο. Η απόσταση μεταξύ των επαναλήψεων αγκυρίνης και της αλληλουχίας PEST ποικίλει στους διάφορους υποδοχείς, γεγονός που μπορεί να αντανακλά ρυθμιστικές αλληλεπιδράσεις των υποδοχέων με διαφορετικές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες (Artavanis et al., 1999; Fleming, 1998).



**Εικ. 3: Πρωτεολυτικά γεγονότα που αφορούν την ωρίμανση υποδοχέα Notch και την ενδοκυττάρια σηματοδότηση.** Μετά την σύνθεσή του, ο υποδοχέας Notch πρωτεολύεται στην εξωκυττάρια περιοχή του από πρωτεάση φουρίνης μέσα στο *trans*-Golgi. Το ετεροδιμερές που σχηματίζεται πρωτεολύεται περαιτέρω από το μέλος της οικογένειας ADAM disintegrin – metalloprotease TACE, του οποίου η δράση είναι πιθανόν εξαρτημένη από την αλληλεπίδραση του Notch με το δεσμευτή του. Ακολουθεί ένα τρίτο πρωτεολυτικό γεγονός κοντά στην διαμεμβρανική περιοχή (εσωτερικά) του Notch το οποίο θεωρείται ανάλογο με την πρωτεόλυση της ανθρώπινης πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς από μια  $\gamma$ -secretase. Αυτό το πρωτεολυτικό βήμα απελευθερώνει την ενδοκυττάρια περιοχή του υποδοχέα, η οποία μετακινείται μέσα στον πυρήνα και επάγει την έκφραση γονοιδίων στόχων όπως το σύμπλοκο *Enhancer of split* (Ye and Fortini, 2000) .

### β. Οι δεσμευτές Delta/Serrate

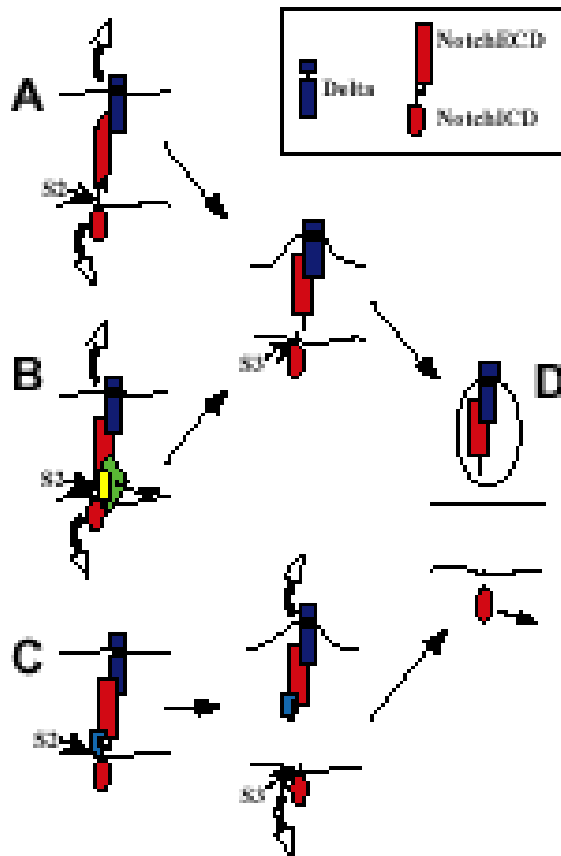
Οι δεσμευτές που προσδένονται και ενεργοποιούν τους υποδοχείς Notch ανήκουν στην οικογένεια DSL (Delta – Serrate – Lag-2), η οποία επίσης χαρακτηρίζεται από την παρουσία επαναλήψεων EGF στην εξωκυττάρια περιοχή τους, αλλά και από το μοτίβο DSL. Οι δεσμευτές Delta και Serrate της δροσόφιλα εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης και φαίνεται να ρυθμίζουν διαφορετικές αναπτυξιακές αποφάσεις μέσω της ενεργοποίησης του ίδιου Notch υποδοχέα. Οι δύο δεσμευτές Delta και Serrate μοιάζουν δομικά μεταξύ τους, αλλά διαφέρουν σημαντικά στον αριθμό επαναλήψεων EGF καθώς και στην παρουσία μιας περιοχής πλούσιας σε κυστεΐνες που χαρακτηρίζει το Serrate και απουσιάζει από το Delta. Η λειτουργία αυτής της περιοχής δεν είναι ακόμα γνωστή, αλλά πιστεύεται ότι μπορεί να ευθύνεται για μεταφορά κυτταρικών αποκρίσεων στο σηματοδοτικό μονοπάτι Notch διαφορετικών από αυτές που μεσολαβούνται από τον δεσμευτή Delta (Fleming, 1998).

Πρόσφατες παρατηρήσεις δείχνουν ότι ολόκληρο το εξωκυττάριο τμήμα του Delta βρίσκεται στο υπερκείμενο καλλιέργειας δροσοφιλικών κυττάρων που εκφράζουν Delta (Klug et al., 1998). Το τμήμα αυτό φαίνεται να είναι προϊόν πρωτεόλυσης από την



μεταλλοπρωτεάση kuzbanian και είναι ικανό να προσδεθεί στον υποδοχέα Notch και να δράσει σαν αγωνιστής (Qi et al., 1999).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει το πολύπλοκο μοτίβο υποκυτταρικού εντοπισμού του Delta, το οποίο έχει ανιχνευθεί τόσο στην κυτταρική μεμβράνη όσο και σε ενδοκυττάρια κυστίδια κατά τη διάρκεια διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων. Το μοτίβο αυτό παρατηρείται στο νευρογόνο εκτόδερμα, στο μεσόδερμα και στο οπίσθιο μεσέντερο των εμβρύων, στους νευροβλάστες της προνύμφης και στους αναπτυσσόμενους φωτοϋποδοχείς (Kooch et al., 1993). Η χρονική σειρά της αρχικής συγκέντρωσης του Delta στη μεμβράνη και η απομάκρυνση που ακολουθεί υποδηλώνει ότι η μετακίνηση των κυστιδίων αντανακλά ενδοκύττωση του Delta που το οδηγεί σε υποκυτταρικά διαμερίσματα αποικοδόμησης και όχι σύνθεσης, επεξεργασίας και εξόδου από το κύτταρο. Έχει παρατηρηθεί ότι τα Delta και Notch εντοπίζονται μαζί σε κυστίδια κοντά στην κορυφαία πλευρά του κυττάρου (sub apical), ενώ κυστίδια που περιέχουν μόνο Delta βρίσκονται στη βασική πλευρά. Η αλληλεπίδραση των Delta και Notch στην επιφάνεια των κυττάρων παράγει την απαραίτητη πληροφορία για την εξειδίκευση των κυτταρικών τυχών και η σηματοδότηση από αυτό το σύμπλοκο στη συνέχεια ίσως ρυθμίζεται αρνητικά μέσω της ενδοκύττωσης του συμπλόκου από την επιφάνεια του κυττάρου. Η παρουσία πολλαπλών κυστιδίων μόνο με Delta δείχνει ότι το σύμπλοκο υποδοχέα – δεσμευτή αποσυνδέεται πολύ γρήγορα (Kooch et al., 1993).

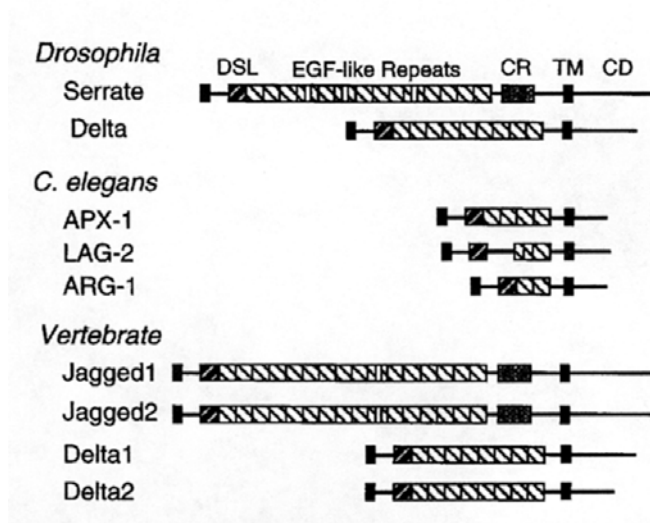


**Εικ. 4 : Η ενδοκύττωση του Delta και του Notch είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του υποδοχέα Notch.** (A) Η ενδοκύττωση του συμπλόκου Notch/Delta οδηγεί σε μια αλλαγή στερεοδιάταξης του υποδοχέα που επιτρέπει πρόσβαση στο ένζυμο για να πραγματοποιήσει το δεύτερο πρωτεολυτικό βήμα (S2). (B) Η ενδοκύττωση του συμπλόκου Notch/Delta τροποποιεί την αλληλεπίδραση του υποδοχέα Notch με άλλες πρωτεΐνες και αποκαλύπτεται η δεύτερη θέση πρωτεόλυσης S2. (C) Μετά την δεύτερη πρωτεόλυση η ενδοκύττωση απαιτείται για να απομακρυνθεί το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα και οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με αυτό το τμήμα, ώστε να αναιρεθεί η καταστολή του τρίτου πρωτεολυτικού βήματος (S3). Το τελευταίο βήμα για καθένα από τους μηχανισμούς αφορά τη μεταφορά του ενδοκυττάριου Notch στον πυρήνα, όπου επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων στόχων (Parks et al., 2000).

Ο συνεντοπισμός των Delta και Notch μέσα στα κυστίδια και συγκεκριμένα η ενδοκύττωση του εξωκυττάριου τμήματος του υποδοχέα καθώς αλληλεπιδρά με το δεσμευτή φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην περαιτέρω μετάδοση του σήματος. Αυτό συμβαίνει γιατί με την απομάκρυνση του εξωκυττάριου τμήματος του Notch δρα η

πρεσενιλίνη στο ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα και τον απελευθερώνει ώστε να κινηθεί προς τον πυρήνα για την ενεργοποίηση γονιδίων στόχων. Το εξωκυττάριο τμήμα του Notch να έχει μια ανασταλτική λειτουργία στη διαδικασία της σηματοδότησης και η trans-ενδοκύττωση του υποδοχέα μπορεί να απομακρύνει αυτή την αναστολή (Struhl and Adachi, 2000). Βλάβη στην ενδοκύττωση κυττάρων που εκφράζουν Delta οδηγεί σε μείωση της trans-ενδοκύττωσης του Notch και της σηματοδότησης που εξαρτάται από το Delta σε κύτταρα που εκφράζουν Notch (Parks et al., 2000).

Η επικάλυψη μεταξύ των μοριακών μηχανισμών της ενδοκύττωσης και της σηματοδότησης αντιπροσωπεύει έναν αποτελεσματικό μηχανισμό μέσω του οποίου οι υποδοχείς μπορούν να ελέγχουν τόσο την εξέλιξη του σηματοδοτικού μονοπατιού όσο και τη δική τους μοίρα. Η ενδοκύττωση φαίνεται να εμπλέκεται πλέον στην έναρξη και στη διάδοση του σήματος και κατά συνέπεια να παίζει σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό, την κυτταρική επιβίωση, την εμβρυογένεση και τον προσδιορισμό της κυτταρικής μοίρας (Di Fiore et al., 2001).



**Εικ. 5: Σχηματική ανάπαράσταση των δεσμευτών του Notch της οικογένειας DSL.** Τα μέλη της οικογένειας έχουν την ίδια συνολική διάταξη των συντηρημένων περιοχών τους. Οι εξωκυττάριας περιοχές των δεσμευτών έχουν πολλαπλές (2 έως 16) επαναλήψεις EGF, αλλά οι ομόλογες πρωτεΐνες με το Serrate (Serrate, Jagged1, jagged2) έχουν ενθέματα μεταξύ των EGF επαναλήψεων και η πρωτεΐνη LAG-2 έχει δύο μισές EGF επαναλήψεις. Επιπλέον οι ομόλογες πρωτεΐνες με το Serrate εμφανίζουν και μια περιοχή (CR) πλούσια σε κυστεΐνες ανάμεσα στις επαναλήψεις EGF και τη διαμεμβρανική περιοχή (TM) (Weinmaster, 1997).

### γ. Οι δεσμευτές της οικογένειας DSL στα θηλαστικά

Πέντε γονίδια που κωδικοποιούν δεσμευτές για την οικογένεια υποδοχέων Notch έχουν κλωνοποιηθεί στα θηλαστικά : το *Jagged 1* (Lindsell et al., 1995), το *Jagged 2*

(Shawber et al., 1996), το *Delta-like 1* (Bettenhausen et al., 1995), το *Delta-like 3* (Dunwoodie et al., 1997) και το *Delta-like 4* (Shutter et al., 2000). Όλοι οι δεσμευτές της οικογένειας Notch είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που περιέχουν στην εξωκυττάρια περιοχή τους πολλαπλές επαναλήψεις όμοιες με EGF καθώς και ένα δεύτερο συντηρημένο μοτίβο DSL, το οποίο είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα Notch (Henderson et al., 1994; Muskavitch et al., 1994). Δύο από τους δεσμευτές, οι *Jagged 1* και *Jagged 2*, φαίνεται να ενεργοποιούν τον υποδοχέα Notch 1 σε κύτταρα θηλαστικών (Lindsell et al., 1995; Luo et al., 1997).

Το γονίδιο *Jagged 1* εμφανίζει ένα δυναμικό και πολύπλοκο πρότυπο έκφρασης κατά την εμβρυική ανάπτυξη. Στα πρώτα εμβρυικά στάδια (E8.5-E9.5) παρατηρείται έκφραση του στην περιοχή μεταξύ του πρώτου και δεύτερου βραγχιακού τόξου, στο ακουστικό κυστίδιο, στον πρόνεφρο και στους σωμίτες. Κατά τη νευρογένεση παρατηρείται έκφραση του στην κοιλιακή περιοχή της τέταρτης κοιλίας του εγκεφάλου, στον αναπτυσσόμενο μεσεγκέφαλο, στον τελεγκέφαλο και στα ραχιαία γάγγλια. Μελετώντας τα εσωτερικά όργανα παρατηρείται έκφραση στο επιθήλιο των εσπειραμένων σωληναρίων των νεφρών σε έμβρυο E10.5, ενώ σε E13.5 – E15.5 η έκφραση παρατηρείται στα σπειράματα και όχι στο μεσέγχυμα του αναπτυσσόμενου νεφρού. Μετάγραφα παρατηρούνται στο μεσέγχυμα που περιβάλλει το επιθηλιακό εκβλάστημα της αναπτυσσόμενης χοληδόχου κύστης, καθώς και στο παρέγχυμα και όχι στο επιθήλιο του πνεύμονα. Στο θυλάκιο του μουστακιού παρατηρείται αρχικά έκφραση στο επιθήλιο σε έμβρυο E12.5 και στη συνέχεια και στο μεσέγχυμα που περιβάλλει το θυλάκιο σε έμβρυο E14.5. Στις υπερώιες πτυχές η έκφραση εντοπίζεται στο επιθήλιο και στο μεσέγχυμα, στο πάγκρεας μόνο στο επιθήλιο και στους όρχεις μόνο στο μεσέγχυμα. Το παραπάνω πρότυπο έκφρασης υποδηλώνει ότι το γονίδιο *Jagged 1* ρυθμίζεται από μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση σημάτων μεταξύ επιθηλίου και μεσεγγύματος. Επιπλέον η έκφραση του γονιδίου *Jagged 1* επικαλύπτεται με την έκφραση των γονιδίων *Notch*, αλλά δεν ταυτίζεται πλήρως με κανένα από αυτά δείχνοντας ότι ο δεσμευτής *Jagged 1* θα μπορούσε να αλληλεπιδρά με οποιονδήποτε από τους υποδοχείς (Mitsiadis et al., 1997).

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο *Jagged 1* προκαλούν το σύνδρομο Alagille, μια αυτοσωμική επικρατή κληρονομική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από νεογνικό ίκτερο και έλλειψη των διαηπατικών χοληφόρων πόρων

και εμπλέκουν το μονοπάτι Notch στις διαδικασίες ανάπτυξης του καρδιαγγειακού συστήματος (Loomes et al., 1999; Xue et al., 1999). Περαιτέρω γνωρίσματα που χαρακτηρίζουν την ασθένεια είναι καρδιακή ανεπάρκεια, σκελετικά ελαττώματα, οφθαλμολογικές ανωμαλίες και ιδιότυπη εμφάνιση προσώπου (Li et al., 1997).

Το γονίδιο *Jagged 2* εκφράζεται στο επιφανειακό εκτόδερμα των βραγχιακών τόξων και στην κορυφαία εκτοδερμική ακρολοφία του αναπτυσσόμενου άκρου σε έμβρυο E9.5. Η έκφραση του γονιδίου σε έμβρυα E12.5 αυξάνεται στους διαφοροποιημένους νευρώνες του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος και στον αναπτυσσόμενο αμφιβληστροειδή. Εκτός από το νευρικό σύστημα το γονίδιο *Jagged 2* εκφράζεται και στα θυλάκια των μουστακιών, στα εκβλαστήματα των δοντιών, στο θύμο, στο στομάχι και στον υπογνάθιο αδένα, η ανάπτυξη των οποίων ελέγχεται από αλληλεπιδράσεις επιθηλίου- μεσεγχύματος (Valsecchi et al., 1997). Σε έμβρυα μεγαλύτερων σταδίων (E13.5-E15.5) μετάγραφα του γονιδίου εντοπίζονται σε παρασπονδυλικά αγγεία, σε ραχιαία γάγγλια, στο στοματοφαρυγγικό επιθήλιο και στους μύες της γλώσσας (Luo et al., 1997). Το γονίδιο *Jagged 2* συνεκφράζεται με τον υποδοχέα Notch 1 στην κορυφαία εκτοδερμική ακρολοφία υποδηλώνοντας κάποιο ρόλο αυτού του ζεύγους υποδοχέα – δεσμευτή στην ανάπτυξη των άκρων. Συνέκφραση των δύο αυτών γονιδίων παρατηρείται και στο θύμο, όπου ο δεσμευτής μπορεί να επάγει τη σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα Notch 1, ώστε να καθοριστεί η τύχη των T λεμφοκυττάρων (Shawber et al., 1997).

Η μελέτη της λειτουργίας του γονιδίου *Jagged 2* με την δημιουργία στοχευμένης μεταλλαγής που απομακρύνει την περιοχή DSL (απαραίτητη για την αλληλεπίδραση του δεσμευτή με τον υποδοχέα) έδειξε ότι τα μεταλλαγμένα έμβρυα έχουν κρανιοπροσωπικές ανωμαλίες, λανθασμένη διαφοροποίηση της γδ γενεαλογίας των T λεμφοκυττάρων, αλλοιωμένη μορφολογία του θύμου και συνδακτυλία των άνω και κάτω άκρων. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η μεσολάβηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch μέσω του δεσμευτή *Jagged 2* είναι απαραίτητη κατά την ανάπτυξη των άκρων, του θύμου και του κρανίου του ποντικού (Jiang et al., 1998).

Το γονίδιο *Delta-like 1(Dll1)* απομονώθηκε στα θηλαστικά και με σύγκριση της αμινοξικής του αλληλουχίας με το δροσοφιλικό *Delta* έδειξε ότι σχετίζεται στενά με αυτό. Η έκφραση του γονιδίου εμφανίζεται παροδική κατά την γαστρίδωση και των πρώιμη οργανογένεση. Σε έμβρυα E7.5 έως E12.5 μετάγραφα εντοπίζονται στο

παραξονικό μεσόδερμα, που σχετίζεται άμεσα με τη σωματογένεση, και σε ομάδες κυττάρων του νευρικού συστήματος. Η έκφραση του *Dll1* στο νευρικό σύστημα και στο παραξονικό μεσόδερμα είναι αξιοσημείωτα όμοια με το γονίδιο *Notch 1* κάνοντας πιθανό τα κύτταρα αυτών των ιστών να επικοινωνούν μεταξύ τους με την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Notch 1 και Dll 1 (Bettenhausen et al., 1995). Σε ενήλικα ζώα το γονίδιο *Dll1* εκφράζεται στο αναπνευστικό επιθήλιο των πνευμόνων και στην καρδιά (Bettenhausen et al., 1995; Post et al., 2000). Σε έμβρυα E13.5 – 19.5 το γονίδιο *Dll1* εκφράζεται στους επιθηλιακούς αγωγούς διάφορων οργάνων όπως είναι ο νεφρός, ο πνεύμονας, το πάγκρεας και οι ορώδεις αδένες της ρινικής περιοχής. Στο νευρικό σύστημα μετάγραφα εντοπίζονται στο χοριοειδές πλέγμα, την κοιλιακή ζώνη του εγκεφαλικού φλοιού, στο μεσεγκέφαλο και στη γέφυρα καθώς και στα αισθητήρια όργανα όπως είναι ο αμφιβληστροειδής, το οσφρητικό επιθήλιο και το εσωτερικό αυτί. Έκφραση του γονιδίου παρατηρείται επίσης σε μυικά κύτταρα, στο ενδοθήλιο των αιμοφόρων αγγείων, στο δόντι και στις ρίζες των θυλακίων τριχών και μουστακίων (Beckers et al., 1999).

Το γονίδιο *Dll3* αποτελεί ένα ακόμα ομόλογο του δροσοφιλικού *Delta* στα θηλαστικά. Έχει παρατηρηθεί ότι μπορεί να εμποδίσει την πρωτογενή νευρογένεση όταν εκφράζεται εκτοπικά σε *Xenopus* υποδηλώνοντας ότι μπορεί να ενεργοποιήσει τον υποδοχέα Notch και επομένως αποτελεί λειτουργικό ομόλογο του δροσοφιλικού *Delta*. Προσεκτική μελέτη του προτύπου έκφρασης του *Dll3* αποκαλύπτει τρεις κύριες θέσεις όπου εμπλέκεται το γονίδιο, τη νευρογένεση, τη σωματογένεση και την παραγωγή ιστού από την πρωτογενή ράβδο και το εκβλάστημα της ουράς. Λεπτομερής ανάλυση των προτύπων έκφρασης των δύο δεσμευτών *Dll1* και *Dll3* με διπλή RNA υβριδοποίηση *in situ* αποκαλύπτει διαφορετικά σημεία έκφρασης, αλλά υπονοεί την κοινή τους δράση σε διαδικασίες όπως είναι η σωματογένεση (Dunwoodie et al., 1997).

Μεταλλαγές του γονιδίου *Dll3* συνδέονται με το φαινότυπο *rudgy* στα ποντίκια, που χαρακτηρίζεται από σοβαρές ανωμαλίες στους σπονδύλους και στις πλευρές των ενήλικων ατόμων. Ιστολογικές αναλύσεις δείχνουν ότι η μεταλλαγή *ru* εμποδίζει το σωστό σχηματισμό των μορφολογικών ορίων των σωματιών νωρίς στην ανάπτυξη και το σχηματισμό του κεφαλικού- ουριαίου ορίου μεταξύ των σωματιών (Kusumi et al., 1998). Μεταλλαγές στο ανθρώπινο ομόλογο *DLL3* προκαλούν φαινότυπο σπονδυλοπλευρικής

δυσοστέωσης, η οποία αφορά δυσμορφίες στο σκελετικό άξονα. Αυτές οι μεταλλάξεις είναι οι πρώτες που μελετώνται στα ανθρώπινα ομόλογα *DELTA* τονίζοντας τον καθοριστικό ρόλο του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch στο σχηματισμό του σκελετού των θηλαστικών (Bulman et al., 2000; Kusumi et al., 2001). Μελέτες στο πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *Dll3* στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα σε έμβρυα ποντικού E10.5 έδειξαν έντονη έκφραση στον μεσεγκέφαλο, τα ρομβικά χείλη, το κορυφαίο πέταλο του οπισθεγκεφάλου και ραχιαία κατά μήκος της σπονδυλικής στήλης (Kusumi et al., 2001).

Το πιο πρόσφατο μέλος της οικογένειας Delta που απομονώθηκε είναι το γονίδιο *Dll4* του οποίου η έκφραση είναι έντονη στο ενδοθήλιο των αγγείων. Εκτός από την αγγείωση οργάνων μετάγραφα του γονιδίου εντοπίστηκαν και στο νευρικό επιθήλιο, στο φλοιό των επινεφριδίων, στη σπλήνα στο θύμο και το μάτι, καθώς και στα σπειράματα των νεφρών και τα αγγεία των πνευμόνων (Shutter et al., 2000; Rao et al., 2000).

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Το γονίδιο *Neur1* λόγω του προτύπου έκφρασης και της ομολογίας του με το δροσοφιλικό γονίδιο φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές αναπτυξιακές διαδικασίες και η διερεύνηση του λειτουργικού του ρόλου θα δώσει σημαντικές πληροφορίες για τους μηχανισμούς ανάπτυξης των διάφορων ιστών καθώς και για τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις που πραγματοποιούνται κατά την διαφοροποίηση των κυττάρων.

Συνεχίζοντας την προσπάθεια λειτουργικής ανάλυσης του γονιδίου *Neur1* τέθηκαν δύο νέοι στόχοι, η συγκριτική ανάλυση του προτύπου έκφρασης του γονιδίου με τέσσερις δεσμευτές της οικογένειας DSL στα θηλαστικά και η διερεύνηση της υποκυτταρικής και ιστικής τοπογραφίας της πρωτεΐνης *Neur1* με τη χρήση αντισωμάτων

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## Α.ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Οι ακόλουθες πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν με βάση τα πρωτόκολλα των Sambrook et al., 1989, με μικρές τροποποιήσεις.

### 1. Υδρόλυση DNA με περιοριστικά ένζυμα.

Για να είναι δυνατή η κλωνοποίηση τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα είναι απαραίτητη η υδρόλυση του DNA με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα που δημιουργούν άκρα συμβατά με αυτά που έχουν επιλεγεί για το φορέα. Μετά την επιλογή των κατάλληλων ενζύμων, πραγματοποιείται η αντίδραση της υδρόλυσης με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος που παρατηρείται η μεγαλύτερη ενζυμική δράση και σε θερμοκρασία που υποδεικνύουν οι κατασκευάστριες εταιρείες. Είναι σημαντικό ο όγκος του ενζύμου να μην ξεπερνά το 1/10 του τελικού όγκου, γιατί η γλυκερόλη στην οποία διατηρείται το ένζυμο, σε μεγάλες συγκεντρώσεις μειώνει σημαντικά την ενεργότητα του.

### 2. Αλυσιδωτή αντίδραση DNA πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)

Μερικά από τα ενθέματα που χρησιμοποιήθηκαν για πλασμιδιακές κατασκευές προέκυψαν με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, με τη χρήση κατάλληλης μήτρας και δύο ολιγονουκλεοτιδίων – εκκινητών (primers) που υβριδοποιούνται εκατέρωθεν της αλληλουχίας DNA που επιθυμούμε να πολλαπλασιαστεί. Για να πραγματοποιηθεί μια τέτοια αντίδραση αναμιγνύονται τα εξής:

- 10 – 50 ngr κατάλληλης μήτρας DNA
- 1x BSA (Bovine Serum Albumin αρχικής συγκέντρωσης 1mg/ml)
- 1 mM dNTPs (10x : 10mM συνολική αρχική συγκέντρωση)
- 1x ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης Thermo Pol (1x: 10mM KCl, 20mM Tris – Cl pH 8.8, 10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Triton X-100)
- 0.3 – 0.5 units DNA πολυμεράσης Vent (NEB 2.000units/ml)



- 100 ngr από κάθε εκκινητή
- αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 20 μl.

Τα συστατικά θερμαίνονται για 5 λεπτά στους 94<sup>0</sup> C (αποδιάταξη) και στη συνέχεια υποβάλλονται σε 30 – 35 κύκλους, οι οποίοι περιλαμβάνουν διαδοχικά στάδια αποδιάταξης, υβριδοποίησης των εκκινητών στις αλληλουχίες στόχους της μήτρας και επιμήκυνσης των νέων αλυσίδων στους 72<sup>0</sup> C. Στο τρίτο στάδιο ακολουθεί η τελική επέκταση των ήδη υπάρχοντων αλυσίδων στους 72<sup>0</sup> C για 2 – 5 λεπτά.

Η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών στις αλληλουχίες στόχους της μήτρας υπολογίζεται από τον παρακάτω γενικό τύπο:

$$T_m = (G + C) \times 4 + (A + T) \times 2$$

### **3. Έκλουση γραμμικών μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης.**

Μετά την ηλεκτροφόρηση των υδρολυμένων μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης, απομονώνονται οι ζώνες που πρόκειται να κλωνοποιηθούν. Η έκλουση γίνεται με κατάλληλο εμπορικό kit της εταιρείας Qiagen (QIAEX II Agarose Gel Extraction, Cat. No 20021) με το οποίο επιτυγχάνεται δέσμευση των γραμμικών μορίων του DNA σε σφαιρίδια σιλκόνης ή γυαλιού σε υψηλή συγκέντρωση χαοτροπικού άλατος και σχετικά χαμηλό pH (pH 5-6).

Συγκεκριμένα τα κομμάτια της αγαρόζης που περιέχουν τα γραμμικά μόρια του DNA θερμαίνονται μέσα σε διάλυμα QX1, το οποίο περιέχει υψηλή συγκέντρωση χαοτροπικού άλατος και υδρολύει τους υδρογονοδεσμούς των σακχάρων στο πολυμερές της αγαρόζης, με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται το DNA και να δεσμεύεται από τα σφαιρίδια που έχουν προστεθεί στο μίγμα.

Τα σφαιρίδια με τα δεσμευμένα μόρια DNA ξεπλένονται με διάλυμα PE, το οποίο περιέχει αιθανόλη και απομακρύνει τα άλατα. Τελικά το DNA εκλύεται με διάλυμα το οποίο έχει χαμηλή συγκέντρωση άλατος και σχετικά υψηλό pH (pH 7-8), όπως νερό ή διάλυμα 10mM Tris, pH 8.0.

### **4. Παρασκευή δεκτικών για μετασηματισμό βακτηριακών κυττάρων *E. coli* DH5a.**

Δεκτικά για μετασχηματισμό χαρακτηρίζονται τα βακτηριακά κύτταρα τα οποία έχουν τροποποιηθεί κατάλληλα ώστε η κυτταρική τους μεμβράνη να γίνει περισσότερο διαπερατή στην εισχώρηση πλασμιδιακού DNA. Στην παρούσα εργασία για το μετασχηματισμό βακτηριακών στελεχών ακολουθήθηκαν δύο μεθόδοι η χημική και αυτή του μετασχηματισμού μέσω ηλεκτρικής εκκένωσης. Για κάθε μια από αυτές τις μεθόδους απαιτούνται και διαφορετικού τύπου δεκτικά βακτηριακά κύτταρα.

#### **A. Δεκτικά κύτταρα για χημικό μετασχηματισμό.**

- Επωάζουμε, 12-16 ώρες, καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων (DH5a ή BL21 DE3) σε 100ml LB, αναδεδυόμενη έντονα στους 37<sup>0</sup> C.
- Σε φλάσκα 1-2 λίτρων βάζουμε 50ml LB και τα μολύνουμε με 200μl από την παραπάνω καλλιέργεια. Επωάζουμε τα κύτταρα αναδεδυόμενα στους 37<sup>0</sup> C μέχρι η οπτική τους πυκνότητα στα 560nm να γίνει 0.450.
- Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα στους 4<sup>0</sup> C για 5 λεπτά, στις 2500 rpm.
- Επαναιωρούμε τα κύτταρα σε 20ml διάλυματος TFBI (100mM RbCl<sub>2</sub>, 50mM MnCl<sub>2</sub>, 30mM CH<sub>3</sub>COOK, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 87% γλυκερόλη, ρύθμιση του pH στο 5.8 με αραιό CH<sub>3</sub>COOK).
- Επωάζουμε για 20 λεπτά στον πάγο.
- Φυγοκεντρούμε ξανά στους 4<sup>0</sup> C για 5 λεπτά, στις 2500 rpm.
- Επαναιωρούμε τα βακτήρια σε 3ml διάλυματος TFBI (0.2% MOPS, 10mM RbCl<sub>2</sub>, 80mM CaCl<sub>2</sub>, 87% γλυκερόλη, ρύθμιση του pH στο 7.0 με NaOH 1M).
- Επωάζουμε για 10 λεπτά στον πάγο.
- Το βακτηριακό αιώρημα μοιράζεται σε κλάσματα των 300μl και διατηρείται στον πάγο.
- Τελικά αποθηκεύονται στους -80<sup>0</sup> C.

#### **B. Δεκτικά κύτταρα για μετασχηματισμό μέσω ηλεκτρικής**

##### **εκκένωσης.**

- Επωάζουμε, 12-16 ώρες, καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων (DH5a ή BL21 DE3) σε 50ml TYM (για 1lt διαλύματος : 20gr bacto-tryptone, 5gr bacro-yeast-

extract, 5.8gr NaCl, 2.5gr MgSO<sub>4</sub>, ρύθμιση του pH σε 7), αναδευόμενη έντονα στους 37<sup>0</sup> C.

- Σε φλάσκα δύο λίτρων βάζουμε 500ml TYM και τα μολύνουμε με 500μl από την παραπάνω καλλιέργεια. Επωάζουμε τα κύτταρα αναδευόμενα στους 37<sup>0</sup> C μέχρι η οπτική τους πυκνότητα στα 600nm να γίνει 0.650.
- Επωάζουμε για 20 λεπτά στον πάγο.
- Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα στους 4<sup>0</sup> C για 15 λεπτά, στις 4000 rpm.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε τα κύτταρα σε 500ml παγωμένου νερού.
- Φυγοκεντρούμε ξανά στους 4<sup>0</sup> C για 15 λεπτά, στις 4000 rpm.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε τα κύτταρα σε 250ml παγωμένου νερού.
- Φυγοκεντρούμε ξανά στους 4<sup>0</sup> C για 15 λεπτά, στις 4000 rpm.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε τα κύτταρα σε 50ml παγωμένου νερού.
- Φυγοκεντρούμε ξανά στους 4<sup>0</sup> C για 15 λεπτά, στις 4000 rpm.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε τα κύτταρα σε 10ml παγωμένου νερού.
- Φυγοκεντρούμε ξανά στους 4<sup>0</sup> C για 15 λεπτά, στις 4000 rpm.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε τα κύτταρα σε 1-1.5ml παγωμένου διαλύματος γλυκερόλης 10%.
- Το βακτηριακό αιώρημα μοιράζεται σε κλάσματα των 100μl και διατηρείται στον πάγο.
- Τελικά αποθηκεύονται στους -80<sup>0</sup> C.

Η ποιότητα των δεκτικών κυττάρων θεωρείται καλή όταν η απόδοσή τους είναι μεγαλύτερη από την ανάπτυξη 10<sup>6</sup> μετασχηματισμένων αποικιών / 1μg πλασμιδιακό DNA.

## **5. Κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακό φορέα.**

Για να πραγματοποιηθεί κλωνοποίηση ενός τμήματος DNA σε επιθυμητό πλασμιδιακό φορέα, γίνεται αντίδραση σύνδεσης (ligation) σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες ή στους 16<sup>0</sup>C για 12-16 ώρες, προσθέτοντας τα εξής :

- 50-80ng φορέα
- ποσότητα ενθέματος που καθορίζεται από την αναλογία μορίων του φορέα με το ένθεμα, λαμβάνοντας υπόψιν ότι για προεξέχοντα άκρα η ιδανική αναλογία μορίων ενθέματος : φορέα είναι 4 : 1, ενώ για λεία άκρα η ιδανική αναλογία μορίων ενθέματος : φορέα είναι 5-10 : 1
- 1x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης (10x : 0.5 M Tris, pH 7.4, 0.1M MgCl<sub>2</sub>, 0.1M DTT, 10mM spermidine, 10mM ATP, 1mg/ml BSA)
- 0.75μl BSA (Bovine Serum Albumin 10mg/ml)
- 0.75μl rATP (20mM)
- 1μl T4 DNA λιγάση (3-5 units)
- H<sub>2</sub>O μέχρι ο τελικός όγκος να γίνει 15μl

Στην περίπτωση που τα άκρα ενθέματος και φορέα δεν είναι συμπληρωματικά η αντίδραση σύνδεσης είναι αδύνατη και γι' αυτό προηγείται αντίδραση συμπλήρωσης των 5' προεξέχοντων άκρων με τη χρήση του μεγάλου ενζυμικού κλάσματος Klenow της πολυμεράσης I του DNA της *E. coli*. Το ένζυμο αυτό είναι ικανό να «γεμίζει» παρουσία δεσοξυ-ριβονουκλεοτιδίων τα 5' προεξέχοντα άκρα που δημιουργούν οι πέψεις πολλών περιοριστικών ενδονουκλεασών. Η αντίδραση γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 25 λεπτά παρουσία :

- 1 μg DNA
- 1x ρυθμιστικό διάλυμα (10x : 10mM Tris – HCl pH 7.5, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 7.5M DTT)
- 33μM δεοξυ-ριβονουκλεοτίδια (dNTPs 10mM)
- 1 unit ενζύμου (5 unit/μl)
- H<sub>2</sub>O μέχρι ο τελικός όγκος να γίνει 25μl

Τελικά η αντίδραση διακόπτεται με προσθήκη 1μl 0.5 M EDTA pH 8.0.

## 6. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E. coli* με θερμικό σοκ.

Για να ελεγχθεί η επιτυχία της αντίδρασης σύνδεσης, πραγματοποιείται μετασχηματισμός, με ένα μέρος των προϊόντων της αντίδρασης, δεκτικών κυττάρων *E.coli*. Συγκεκριμένα ακολουθούμε την εξής διαδικασία :

- Διατηρούμε τα δεκτικά κύτταρα για μικρό χρονικό διάστημα στον πάγο για να ξεπαγώσουν από τους  $-80^{\circ}\text{C}$  όπου φυλάσσονταν.
- Προσθέτουμε το ανασυνδυασμένο DNA στα κύτταρα (τα 7.5μl από τα 15μl του συνολικού όγκου).
- Αφήνουμε τα κύτταρα για 30 λεπτά στον πάγο.
- Ακολουθεί θερμικό σοκ των κυττάρων σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 42- $43^{\circ}\text{C}$  για 90 δευτερόλεπτα.
- Προσθέτουμε 800μl LB (Luria Bertani Medium) και τα επωάζουμε για 50 λεπτά στους  $37^{\circ}\text{C}$ .
- Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα για 5 λεπτά στις 3000 rpm.
- Απομακρύνουμε το περισσότερο υπερκείμενο και επαναιωρούμε τα κύτταρα σε ~100μl LB.
- Απλώνουμε τα κύτταρα σε τριβλίο που περιέχει LB και το κατάλληλο επιλεκτικό μέσο (αντιβιοτικό) ανάλογα με τον πλασμιδιακό φορέα που χρησιμοποιήθηκε.
- Επωάζουμε τα κύτταρα στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 16-20 ώρες.

#### 7. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E.coli* με ηλεκτρική εκκένωση.

- Διατηρούμε τα δεκτικά κύτταρα για μικρό χρονικό διάστημα στον πάγο για να ξεπαγώσουν από τους  $-80^{\circ}\text{C}$  όπου φυλάσσονταν.
- Προσθέτουμε το DNA στα κύτταρα.
- Εναλωθετούμε τα κύτταρα στην ειδική κυβέτα που φυλάσσονταν στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Με τη βοήθεια ειδικής συσκευής υποβάλουμε τα κύτταρα στιγμιαία σε ηλεκτρικό πεδίο 1800Volt.
- Προσθέτουμε 900μl παγωμένου LB (Luria Bertani Medium) και τα επωάζουμε για 90 λεπτά στους  $37^{\circ}\text{C}$ .
- Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα για 5 λεπτά στις 3000 rpm.

- Απομακρύνουμε το περισσότερο υπερκείμενο και επαναιωρούμε τα κύτταρα σε ~100μl LB.
- Απλώνουμε τα κύτταρα σε τριβλίο που περιέχει LB και το κατάλληλο επιλεκτικό μέσο (αντιβιοτικό) ανάλογα με τον πλασμιδιακό φορέα που χρησιμοποιήθηκε. Επωάζουμε τα κύτταρα στους 37<sup>0</sup> C για 16-20 ώρες.

### 8. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης κυττάρων.

Από τις μετασχηματισμένες βακτηριακές αποικίες απομονώνουμε μικρή ποσότητα DNA για να ελέγξουμε αν είναι επιτυχημένη η κλωνοποίηση του ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής :

- Ετοιμάζουμε καλλιέργειες σε 3ml LB με το κατάλληλο επιλεκτικό μέσο και τις επωάζουμε ολονύκτια στους 37<sup>0</sup> C.
- Μεταφέρουμε 1.5ml από τις καλλιέργειες σε eppendorfs και φυγοκεντρούμε τα κύτταρα στιγμιαία.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε τα κύτταρα σε 200μl διαλύματος I (Solution I) και τα αφήνουμε 5 λεπτά στον πάγο.
- Προσθέτουμε 400μl διαλύματος II (Solution II), αναδεύουμε προσεκτικά και επωάζουμε για 5 λεπτά στον πάγο.
- Προσθέτουμε 300μl διαλύματος III (Solution III), αναδεύουμε ήπια και επωάζουμε ξανά για 5 λεπτά στον πάγο.

	Συστατικά διαλυμάτων	
<b>Solution I</b>	25mM Tris-HCl 8.0 (1M)	pH 10mM EDTA (0.5M) pH 8.0
<b>Solution II</b>	0.2M NaOH (1M)	1% SDS (20%)
<b>Solution III</b>	30ml CH <sub>3</sub> COOK pH 5.2	5M 5.75ml CH <sub>3</sub> COOH

- Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα για 20 λεπτά στους 4<sup>0</sup>C στις 13.000 rpm.
- Μεταφέρουμε 800μl από το υπερκείμενο σε καθαρό erpendorf και το ξαναφυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στις ίδιες συνθήκες, ώστε να επιτύχουμε μεγαλύτερη καθαρότητα του DNA.
- Σε 700μl από το υπερκείμενο προσθέτουμε ίσο όγκο φαινόλη/ χλωροφόρμιο : ισοαμλική αλκοόλη (24:1), τα ανακατεύουμε ήπια και φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στις 13.000 rpm.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο (650-700μl) σε καθαρό erpendorf, προσθέτουμε ίσο όγκο χλωροφόρμιο : ισοαμλική αλκοόλη (24:1) και φυγοκεντρούμε στιγμιαία στις 13.000 rpm.
- Ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA με ίσο όγκο ισοπροπανόλη και επώαση στους -80<sup>0</sup> C για 5-10 λεπτά.
- Φυγοκεντρούμε για 20 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 13.000 rpm.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε το ίζημα του DNA με 70% αιθανόλη.
- Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά, στους 4<sup>0</sup> C, στις 13.000 rpm, απομακρύνουμε το υπερκείμενο και στεγνώνουμε το ίζημα στον αέρα.
- Τελικά επαναδιαλύουμε του DNA σε H<sub>2</sub>O ή T.E.

Για να ελέγξουμε αν στον πλασμιδιακό φορέα που χρησιμοποιήσαμε έχει κλωνοποιηθεί το επιθυμητό ένθεμα υδρολύουμε το ανασυνδυασμένο DNA με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα και μελετάμε το πρότυπο των ζωνών που προκύπτει.

## **9. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας με τη χρήση κολώνας Qiagen.**

Κάθε φορά που ήταν απαραίτητη η απομόνωση μεγάλης ποσότητας DNA από βακτηριακή καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε κολώνα Qiagen (tip 100 Cat. No 12145 ή tip 500 Cat. No 12165), με την οποία επιτυγχάνεται πολύ μεγαλύτερη αποδοτικότητα σε σχέση με την απόδοση της αλκαλικής λύσης και μεγαλύτερη καθαρότητα στο DNA που απομονώνεται. Η διαδικασία που ακολουθούμε είναι η εξής :

- Ετοιμάζουμε καλλιέργεια 50-100 LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό και τις επωάζουμε ολονύκτια στους 37<sup>0</sup> C με έντονη ανάδευση.
- Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα για 30 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 3000 rpm.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το ίζημα των κυττάρων σε 4ml διαλύματος P1.
- Προσθέτουμε 4ml διαλύματος P2, ανακατεύουμε μαλακά και αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- Προσθέτουμε 4ml κρύου διαλύματος P3, ανακατεύουμε ήπια και επωάζουμε στον πάγο για 15 λεπτά

<b>121 Συστατικά διαλυμάτων</b>				
<b>P1(20ml)</b>	25mM Tris-HCl pH 8.0 (1M)	10mM EDTA 8.0 (0.5M)	pH	100μg/μl Rnase A (10 mg/ml)
<b>P2(50ml)</b>	0.2M NaOH (1M)	1% SDS (20%)		–
<b>P3(50ml)</b>	30ml CH <sub>3</sub> COOK 5M pH 5.2	5.75 ml CH <sub>3</sub> COOH		–

- Το διάλυμα που προκύπτει διηθείται με τη χρήση υαλοβάμβακα, όπου συγκρατούνται τα στερεά κυτταρικά υπολείμματα.
- Το διάλυμα φυγοκεντρείται για 20 λεπτά στους 4<sup>0</sup> C, στις 10.000 rpm.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο σωλήνα και ξαναφυγοκεντρούμε στις ίδιες συνθήκες για 10 λεπτά.
- Διατηρούμε το υπερκείμενο της τελευταίας φυγοκέντρωσης στον πάγο και ταυτόχρονα εξισορροπούμε την κολώνα Qiagen προσθέτοντας 4ml διαλύματος QBT, το οποίο απομακρύνεται από την κολώνα με τη βαρύτητα.
- Προσθέτουμε στην κολώνα το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης και το αφήνουμε να αδειάσει με τη βαρύτητα, ενώ το πλασμιδιακό DNA συγκρατείται στην κολώνα.
- Ξεπλένουμε την κολώνα δύο φορές με 10ml διαλύματος QC.
- Εκλούουμε το DNA προσθέτοντας στην κολώνα 5ml διαλύματος QF



122 Συστατικά διαλυμάτων				
<b>QBT(100ml)</b>	750mM NaCl (5M)	50mM MOPS (1M) pH 7.0	15% αιθανόλη	0.15% Triton X -100
<b>QC(100ml)</b>	1M NaCl (5M)	50mM MOPS (1M) pH 7.0	15% αιθανόλη	–
<b>QF(100ml)</b>	1.25M NaCl (5M)	50 mM Tris- HCl (1M) pH 8.0	15% αιθανόλη	–

- Ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA με 0.7 του όγκου ισοπροπανόλη και φυγοκέντρωση για 30 λεπτά, στους 4<sup>0</sup> C, στις 10.000 rpm.
- Προσεκτικά αφαιρούμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε το ίζημα με 70% παγωμένη αιθανόλη.
- Φυγοκεντρούμε ξανά για 10 λεπτά, στους 4<sup>0</sup> C, στις 10.000 rpm, απομακρύνουμε το υπερκείμενο και στεγνώνουμε το ίζημα στον αέρα.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα DNA σε 100-200 μl H<sub>2</sub>O ή T.E.

## 10. Παροδική διαμόλυνση κυτταρικών σειρών με πλασμιδιακό DNA.

Η παροδική διαμόλυνση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο συγκατακρήμνισης Ca<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> – DNA, όπου το DNA με μορφή κόκκων επικάθεται και εισχωρεί (ένα ποσοστό) στα κύτταρα. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για τα διάφορα πειράματα διαμόλυνσης είναι : επιθηλιακά κύτταρα νεφρού πιθήκου (COS-7), εμβρυικά κύτταρα ποντικού (NIH 3T3) και ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα τραχήλου (Hela). Το DNA αποκτά μορφή κόκκων γιατί περικλείεται μέσα σε Ca<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> και για να επιτευχθεί αυτό ετοιμάζουμε το εξής διάλυμα :

- Πλασμιδιακό- ανασυνδυασμένο DNA σε διάφορες ποσότητες (1 και 0.5 μg).
- Φορέας DNA (συνήθως salmon sperm DNA), ώστε η συνολική ποσότητα DNA να είναι 8μg.

- 125mM CaCl<sub>2</sub> (αρχικής συγκέντρωσης 2.5M), το οποίο παρέχει τα απαραίτητα ιόντα Ca<sup>++</sup>.
- H<sub>2</sub>O μέχρι ο τελικός όγκος να γίνει 150μl.

Ανακατεύουμε καλά και στη συνέχεια προσθέτουμε το διάλυμα HEBS 1x (αρχικό stock 2x : 0.28M NaCl, 0.05M Hepes acid, 1.5mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ρύθμιση pH σε 7.05 με NaOH 5N, για όγκο 1lt) σταγόνα σταγόνα, ώστε να αραιώνεται καλά και να μην δημιουργήσει ίζημα. Το διάλυμα HEBS παρέχει τα απαραίτητα PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> ιόντα, ενώ η τιμή του pH του είναι κρίσιμη για το σχηματισμό του λεπτόκοκκου ιζήματος και πρέπει να κυμαίνεται από 7.05 έως 7.12. Επιδιόρθωση το διάλυμα για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια το προσθέτουμε προσεκτικά στα πηγαδάκια που περιέχουν τα κύτταρα με το κατάλληλο θρεπτικό μέσο. Ακολουθεί ολονύκτια επώαση των κυττάρων στους 37<sup>0</sup> C και 5% CO<sub>2</sub>, ώστε να ενσωματώσουν το DNA και να το εκφράσουν.

Την επόμενη μέρα ξεπλένουμε τα κύτταρα με HBSS (ισότονο διάλυμα με pH 7.5) 1-2 φορές για να απομακρύνουμε τους κόκκους του DNA που δεν ενσωματώθηκαν και έχουν τοξική δράση για τα κύτταρα. Ανανεώνουμε επίσης το θρεπτικό μέσο και επιδιόρθωση τα κύτταρα ακόμη 24-48 ώρες πριν τα προετοιμάσουμε για μικροσκοπική παρατήρηση.

Πρέπει να σημειωθεί ότι όλες οι παραπάνω κυτταρικές σειρές επικάθονται στο τριβλίο και έτσι οι αλλαγές των διαλυμάτων γίνονται με προσοχή για να μην αποκολληθούν τα κύτταρα.

## **11. Προετοιμασία διαμολυσμένων κυττάρων για παρατήρησή τους σε συνεστιακό μικροσκόπιο.**

Τα διαμολυσμένα κύτταρα είναι δυνατό να παρατηρηθούν ζωντανά κάτω από το οπτικό μικροσκόπιο, είτε να μονιμοποιηθούν και να επεξεργαστούν κατάλληλα πριν τη μικροσκοπική παρατήρηση. Στη δεύτερη περίπτωση ακολουθούμε τα βήματα:

- Ξεπλένουμε τα κύτταρα 1-2 φορές με PBS 1x (10x : 0.4M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5M NaCl, για όγκο 1lt).
- Προσθέτουμε 4% φορμαλδεΰδη (FA), και τα αφήνουμε για 5 λεπτά να μονιμοποιηθούν.
- Ξεπλένουμε ξανά 2-3 φορές με PBS 1x και τα επωάζουμε με παρεμποδιστικό διάλυμα (blocking buffer 200ml: 20 ml PBS 10x, 4ml Triton 10%, 400μl MgCl<sub>2</sub> 1M, 2.2ml fish gelatin) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθεί επώαση με το πρωτεύον αντίσωμα, το οποίο αραιώνεται στο παρεμποδιστικό διάλυμα, για 2 – 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ξεπλένουμε 2 – 3 φορές με παρεμποδιστικό διάλυμα και τα επωάζουμε με το δευτερεύον αντίσωμα συζευγμένο με φθορίζουσα ουσία, αραιωμένο σε παρεμποδιστικό διάλυμα, για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ξεπλένουμε την περίσσεια από το δευτερογενές αντίσωμα 2 – 3 φορές με παρεμποδιστικό διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια πλένουμε 1 – 2 φορές με PBS 1x.
- Προσθέτουμε DAPI 1x (4,6 – διαμιδινο – 2 – φαινυλ – ινδόλη), 5 λεπτά. Το DAPI διαθέτει μια μπλε φθορίζουσα ομάδα που δένεται ειδικά στο DNA. για.
- Ξεπλένουμε 1-2 φορές με PBS 1x και διατηρούμε τελικά τα κύτταρα σε κατάλληλο υλικό στήριξης (mounting : 80% glycerol, 1% w/v n- propyl- gallate).

Τα κύτταρα είναι πλέον έτοιμα για παρατήρηση χρησιμοποιώντας συνεστιακό μικροσκόπιο τύπου Leica.

## **Β.ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ**

### **1. Υπερέκφραση των πρωτεϊνών σε κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3)**

Για να επιτύχουμε την υπερέκφραση μιας πρωτεΐνης έχουμε κλωνοποιήσει αρχικά το επιθυμητό κομμάτι DNA σε κατάλληλο φορέα έκφρασης (pGEX) και ακολουθεί μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* BL21 με αυτή την κατασκευή. Επωάζουμε ολονύκτια μια βακτηριακή αποικία σε 100 ml θρεπτικού μέσου που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό, στους 37<sup>0</sup>C. Χρησιμοποιούμε το 1/50 της ολονύκτιας καλλιέργειας για να εμβολιάσουμε νέα καλλιέργεια 100 ml και περιμένουμε μέχρι η O.D. των κυττάρων στα 600nm να γίνει ίση με 0.6 – 0.8. Προσθέτουμε στην καλλιέργεια 0.1 mM IPTG (αρχικής συγκέντρωσης 1M) και την επωάζουμε για επιπλέον 2-6 ώρες στους 30<sup>0</sup>C. Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα για 15 λεπτά στις 3500 rpm και αφού απομακρύνουμε το υπερκείμενο τα επαναδιαλύτοποιούμε σε αποδιατακτικό διάλυμα Laemmli (2x : 100mM Tris pH 6.8, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol, 10% β-mercaptethanol), αν πρόκειται να αναλυθούν οι πρωτεΐνες σε πήκτωμα SDS – ακρυλαμίδης και στη συνέχεια φυλάσσονται στους -20<sup>0</sup>C. Εναλλακτικά τα κύτταρα επαναιωρούνται και υφίστανται λύση σε κατάλληλο όγκο διαλύματος λύσης (50 ml: 5ml PBS 10x, 5ml Triton – X100 10%, 600μl PMSF 100mM, 100μl β- mercaptethanol) και με υπερήχους (sonication) για 10 δευτερόλεπτα, 3-4 φορές. Διαχωρίζουμε το υπερκείμενο από το ίζημα και ακολουθεί η διαδικασία καθαρισμού της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει με το κατάλληλο πρωτόκολλο. Σε όλα τα παραπάνω βήματα τα κύτταρα διατηρούνται αυστηρά στους 4 <sup>0</sup>C, ώστε να διαφυλαχθούν όσο το δυνατό καλύτερα οι πρωτεΐνες των κυττάρων από τη δράση πρωτεασών.

### **2. Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου (SDS – PAGE).**

Τα κύτταρα που έχουν επαναδιαλυτοποιηθεί σε διάλυμα Laemmli θερμαίνονται για 5 λεπτά στους 95 <sup>0</sup>C και φυγοκεντρούνται στιγμιαία. Το δείγμα φορτώνεται στο πήκτωμα

που έχει προετοιμαστεί και του οποίου η περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδη καθορίζεται από το μέγεθος των πρωτεϊνών που πρόκειται να διαχωριστούν. Η προετοιμασία των δύο τμημάτων του πηκτώματος (separeting – stacking) γίνεται με βάση των παρακάτω πίνακα :

	Separeting gel			Stacking gel	
<b>% acrylamid</b>	<u>10%</u>	<u>12.5%</u>	<u>15%</u>	<u>5%</u>	<u>% acrylamid</u>
<b>1.5M Tris pH 8.0</b>	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	0.38ml	1M Tris pH 6.8
<b>30% acryl/0.8% bis acrylamide</b>	3.3 ml	4 ml	5 ml	0.67ml	30% acryl/0.8% bis acrylamide
<b>SDS 20%</b>	0.05ml	0.05ml	0.05ml	0.015 ml	SDS 20%
<b>H<sub>2</sub>O</b>	4 ml	3.3 ml	2.3 ml	2.7 ml	H <sub>2</sub> O
<b>APS 10%</b>	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.03ml	APS 10%
<b>TEMED</b>	0.005ml	0.005ml	0.005ml	0.003ml	TEMED

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 35 – 45 mA για 1 ώρα περίπου. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα βάφεται με Coomassie Brilliant Blue (1lt: 0.25 gr Coomassie Brilliant blue R250, 100ml acetic acid, 900ml H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1), ενώ η απομάκρυνση της χρωστικής πραγματοποιείται με ολονύκτια ανάδευση σε διάλυμα 30% MeOH , 10% acetic acid. Το πήκτωμα διατηρείται αφού έχει αφυδατωθεί σε gel dryer.

### 3. Απομόνωση διαλυτών GST χμιαϊρικών πρωτεϊνών με πραγματοποίηση χρωματογραφίας συγγένειας με προσροφητή Glutathione Sepharose 4B.

Μετά την επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε κατάλληλο όγκο διαλύματος λύσης και αφού έχει πραγματοποιηθεί λύση με υπερήχους, το υπερκείμενο φορτώνεται σε προσροφητή Glutathione Sepharose 4B, ο οποίος έχει ήδη εξισορροπηθεί στο ίδιο διάλυμα λύσης (10 ml διάλυμα για κάθε 1 ml προσροφητή). Ακολουθεί επώαση του διαλυτού κυτταρικού εκχυλίσματος με τον προσροφητή για 2 ώρες υπό συνεχή ήπια ανάδευση. Το δείγμα στη συνέχεια, φυγοκεντρείται για 2 λεπτά στις 3000rpm και ο προσροφητής μαζί πλέον με τις προσδεδεμένες πρωτεΐνες ξεπλένεται με το διάλυμα λύσης με τον ίδιο τρόπο (10 ml διάλυμα για κάθε 1 ml προσροφητή). Όλα τα ενδιάμεσα

υπερκείμενα φυλάσσονται προκειμένου να ελεγχθούν στη συνέχεια με ηλεκτροφόρηση. Η έκλυση τελικά των προσδεδωμένων πρωτεϊνών πραγματοποιείται με προσθήκη διαλύματος έκλυσης (1 ml: 0.003 g Glutathione-H, 50mM Tris pH 8.0, 0.5mM PMSF). Η επώαση διαρκεί 20 λεπτά και επαναλαμβάνεται 3-4 φορές. Ακολούθησε ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης σε κάθε κλάσμα της έκλυσης με τη μέθοδο Bradford και τα δείγματα φυλάσσονταν στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **4. Απομόνωση των αδιάλυτων GST χιμαιρικών πρωτεϊνών από τα έγκλειστα σωματίδια (inclusions bodies).**

Για να απομονωθεί η μεγάλη ποσότητα πρωτεΐνης που βρίσκεται αδιάλυτη σε έγκλειστα σωματίδια πραγματοποιήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Φυγοκεντρούμε 250 – 300 ml καλλιέργειας κυττάρων που έχουν επαχθεί στις 3500rpm για 15 λεπτά
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα στο διάλυμα A ( 50mM Tris pH 7.9, 200 mM NaCl , 2mM EDTA, 100μg/ml PMSF, 1μM pepstatin , 1μM leupeptin) σε πάγο.
- Προσθέτουμε στερεή λυσοζύμη τελικής συγκέντρωσης 0.2 mg/ml και επωάζουμε στον πάγο για 20 λεπτά.
- Προσθέτουμε 1% Triton X-100 και επωάζουμε στον πάγο για 10 λεπτά.
- Ακολουθεί λύση με υπερήχους (sonication) 3 φορές για 15 δευτερόλεπτα χρησιμοποιώντας Vibra Cell Sonicator.
- Τοποθετούμε σε 2 corex 5 ml σουκρόζης 40% και πολύ προσεκτικά από πάνω προσθέτουμε το προϊόν της κυτταρόλυσης ώστε να μην αναμιχθούν οι δύο φάσεις.
- Φυγοκεντρούμε για 30 λεπτά στις 13.000rpm και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
- Ξεπλένουμε απαλά το τοιχώματα των corex με 1-2 ml διαλύματος TEN(50 ml: 10mM Tris pH 7.5, 1mM EDTA, 0.2M NaCl) ώστε να απομακρύνουμε τα υπολείμματα της σουκρόζης.
- Επαναδιαλυτοποιούμε προσεκτικά το ίζημα σε 2 ml διαλύματος TEN και μεταφέρουμε το δείγμα σε καθαρό σωλήνα για να γίνει νέα φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 3500rpm.

- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε στο ίζημα 8 ml διαλύματος εκχύλισης με ουρία (urea extraction buffer: 8M urea, 0.5 M NaCl, 0.5M Tris pH 7.9, 1mM EDTA, 30mM β - mercaptoethanol, 1 μM pepstatin, 1μM leupeptin)
- Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση μέχρι να επαναδιαλυτοποιηθεί η πελέτα, η οποία διατηρείται στον πάγο.
- Για την απομάκρυνση της ουρίας πραγματοποιούμε αρχικά διαπίδηση ολονύκτια σε διάλυμα B(2 lt: 50mM Tris pH 7.9, 0.5mM NaCl, 10% glycerol, 20 μg/ml PMSF) και στη συνέχεια μια αλλαγή διαλύματος με μείωση της συγκέντρωσης του PMSF (2μg/ml) με δύο ώρες επώαση.
- Τελικά απομακρύνουμε τα αδιάλυτα μέρη με φυγοκέντρωση 10 λεπτών στις 13.000rpm και το υπερκείμενο φυλάσσεται στους 4<sup>0</sup>C μέχρι να πραγματοποιηθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS – ακρυλαμίδης και απομόνωση της ζώνης με την πρωτεΐνη που θα δοθεί για ανοσοποίηση.

## **5. Παραγωγή πολυκλωνικού αντιορρού.**

Οι διαδικασίες της ανοσοποίησης, παραλαβής και χαρακτηρισμού του αντιορρού με ELISA, έγιναν σε συνεργασία με τη γερμανική εταιρία Davids Biotechnologie (email: Davids.Bio@T-online.de) και με τα μέλη του εργαστηρίου Εφαρμοσμένης Βιοχημείας και Ανοσολογίας του I.M.B.B.

Μέρος της καθαρής πρωτεΐνης, είτε σε μορφή διαλύματος (1mg/ ml) είτε σαν ζώνη που απομονώθηκε από πρωτεϊνικό πήκτωμα (1mg περίπου συνολικά), γαλακτωματοποιήθηκε με ίσο όγκο πλήρους ανοσοενισχυτικού του Freund σε όγκο 1 ml και ενέθηκε ενδοδερμικά σε ένα υγιές κουνέλι. Περαιτέρω αναμνηστικές – ενισχυτικές δόσεις του αντιγόνου (150 – 200μg η καθεμιά) σε γαλάκτωμα με ατελές ανοσοενισχυτικού του Freund χορηγήθηκαν με τον ίδιο τρόπο σε διαστήματα 4 εβδομάδων. Δοκιμαστικές αφαιμάξεις χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο του αντιορρού. Το αίμα επώαστηκε αρχικά για 1ώρα στους 37<sup>0</sup>C και για μερικές ώρες ακόμα στους 4<sup>0</sup>C για τη δημιουργία θρόμβου, ο οποίος διαχωρίστηκε από τον ορό με φυγοκέντρωση. Τα δείγματα των ορών φυλάχθηκαν στους 4<sup>0</sup>C, ενώ αφαιμάξη είχε πραγματοποιηθεί και πριν την ανοσοποίηση, ώστε να χρησιμοποιηθεί σαν ορός αναφοράς.

## **6. Ανάλυση Western.**

Αφού έχει ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, οι πρωτεΐνες του πηκτώματος μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (PROTRAN) με τη μέθοδο της υγρής ηλεκτρομεταφοράς (σε συσκευή BIORAD) και με ένταση 110mA ολονύκτια στους 4<sup>0</sup>C . Το διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς που χρησιμοποιείται αποτελείται από 0.25M Tris pH 8.3, 192mM glycine, 0,1% SDS, 20% MeOH.

Στη συνέχεια η μεμβράνη επώαζεται με διάλυμα 1x TBST (10x : 20mM Tris – HCl, 500mM NaCl, 0.1 % Tween-20) 5% w/v άπαχο γάλα σε σκόνη, σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 1 ώρα, για να εμποδιστούν οι μη ειδικές δέσεις πιθανής πρόσδεσης του αντισώματος. Ακολουθεί ολονύκτια επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα στους 4<sup>0</sup>C ή επώαση για 3-4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Το πρωτογενές αντίσωμα αραιώθηκε σε διάλυμα 1x TBST 5% w/v άπαχο γάλα σε σκόνη (το πολυκλωνικό αντίσωμα 130A χρησιμοποιείται σε αραιώση 1:2000 (Davids Biotech.), ενώ το 140B σε αραιώση 1: 200 (εργαστ. Ανοσολογίας I.M.B.B).

Η περίσσεια του πρωτογενούς αντισώματος απομακρύνεται με τρεις πλύσεις της μεμβράνης (5-10 λεπτών ) με διάλυμα 1x TBST. Ακολουθεί επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα GaR – HRP (Goat anti Rabbit Horse Radish Peroxidase), το οποίο αραιώνεται σε διάλυμα 1x TBST 5% w/v άπαχο γάλα σε σκόνη 1: 15.000 για 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η περίσσεια του δευτερογενούς αντισώματος απομακρύνεται με τρεις πλύσεις 5 λεπτών της μεμβράνης με 1x TBST και ακολουθεί εμφάνιση με χρήση του συστήματος της χημειοφωταύγειας SuperSignal της εταιρείας PIERCE σύμφωνα με τις οδηγίες της.

## **7. Αρνητικός καθαρισμός συγγένειας αντισωμάτων πάνω σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.**

Σε ένα πήκτωμα SDS – πολυακρυλαμίδης ηλεκτροφορείται σημαντική ποσότητα της πρωτεΐνης που αναγνωρίζουν τα αντισώματα (περίπου 30μg). Ακολουθεί μεταφορά της πρωτεΐνης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (PROTRAN) με τη μέθοδο της υγρής



ηλεκτρομεταφοράς (σε συσκευή BIORAD) και με ένταση 110mA ολονύκτια στους 4<sup>0</sup>C. Η μεμβράνη στη συνέχεια βάφεται με διάλυμα Ponceau (Sigma Cat. No P7767), ώστε να οριοθετηθεί η ζώνη που μας ενδιαφέρει, μετά ξεβάφεται με dH<sub>2</sub>O και η ζώνη κόβεται προσεκτικά, αφήνοντας ένα μικρό περιθώριο ασφαλείας. Η μεμβράνη επωάζεται σε παρεμποδιστικό διάλυμα (1x TBST 5% w/v άπαχο γάλα) για 30 λεπτά υπό ήπια ανάδευση. Αμέσως μετά τοποθετείται πάνω σε parafilm, και μέσα σε ένα θάλαμο κορεσμένο σε υδρατμούς. Πάνω στη μεμβράνη ρίχνουμε πολύ προσεκτικά τον ορό που θέλουμε να καθαρίσουμε (περίπου 400 μl) και επωάζουμε για 1-2 ώρες υπό πολύ ήπια ανάδευση ώστε ο ορός να παραμένει πάνω στη μεμβράνη. Τελικά απομακρύνουμε τον ορό από τη μεμβράνη και ελέγχουμε τον καθαρισμό με ανάλυση Western.

# Γ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΕ ΕΜΒΡΥΑ ΠΟΝΤΙΚΟΥ

Οι ακόλουθες πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν με βάση τα πρωτόκολλα των Henrique et al., 1995; Mitsiadis et al., 1995; Myat et al., 1996.

## I. *In Situ* ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΣΕ ΤΟΜΕΣ ΚΡΥΟΣΤΑΤΗ

### 1. Προετοιμασία ανιχνευτή mRNA με αντίδραση μεταγραφής *in vitro* .

Για να παρασκευαστεί ο ανιχνευτής RNA που είναι συμπληρωματικός με το mRNA του γονιδίου (antisense probe), καθώς και ο μη συμπληρωματικός ανιχνευτής (sense probe) που χρησιμεύει για έλεγχο του «θορύβου» αναμειγνύονται τα εξής:

- 1x ρυθμιστικό διάλυμα μεταγραφής (10x: 400mM Tris-HCl, pH 8.00, 60mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM διθειοθρεϊτόλη (DTT), 20mM σπερμιδίνη.)
- 1x DIG-RNA μίγμα σήμανσης (10x: 10mM ATP, 10mM CTP, 10mM GTP, 6.5mM UTP, 3.5mM DIG-11-UTP, pH 7.5)
- 2-3 units αναστολέα RNase (40u/10μl)
- πλασμιδιακό DNA, το οποίο έχει γραμμοποιηθεί με το κατάλληλο ένζυμο περιορισμού, για να χρησιμοποιηθεί σαν μήτρα στην αντίδραση μεταγραφής (1μg)
- 0.1 M DTT (προαιρετικά)
- 40 units T3 ή T7 RNA πολυμεράση (20 units/μl) για την παρασκευή του συμπληρωματικού και μη συμπληρωματικού ανιχνευτή αντίστοιχα (ανάλογα με τη θέση κλωνοποίησης του γονιδίου στο πλασμίδιο που διαθέτει τον υποκινητή για την T3 ή T7 πολυμεράση του RNA).
- DEPC-H<sub>2</sub>O μέχρι ο τελικός όγκος να φτάσει τα 20μl.

Ακολουθεί επώαση για 2 ώρες στους 37° C και στη συνέχεια προστίθεται 20 units DNase I για να καταστραφεί η μήτρα του DNA που θα μπορούσε να μειώσει το ποσοστό σύνδεσης του ανιχνευτή με το στόχο mRNA. Η επώαση με τη DNase I διαρκεί 15 λεπτά στους 37° C και στη συνέχεια σταματάμε την αντίδραση με 1 μl EDTA 0.5M, pH 8.00.

Προσθέτουμε 2.5 μl LiCl 4M και 75 μl απόλυτη αιθανόλη και βάζουμε το δείγμα για 2 ώρες στους -20° C (ή στους -80° C ολονύκτια). Εναλλακτικά του LiCl 4M για την κατακρήμνιση του RNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί οξικό αμμώνιο (NH<sub>4</sub>OAc) 3M, pH 5.2.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm στους 4° C για 15 λεπτά, ξέπλυμα με 70% αιθανόλη και νέα φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες για 5 λεπτά. Το ίζημα του RNA επαναδιαλύεται σε 100 μl DEPC-H<sub>2</sub>O ή T.E (αφού έχει εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη) και φυλάσσεται στους -20° C. Η ποσότητα και η ποιότητα του RNA ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση ενός μέρους του δείγματος σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2%

## **2. Επεξεργασία εμβρύων για τομές τους σε κρυοστάτη.**

Αμέσως μετά την απομάκρυνση τους από τη μήτρα του θηλυκού, τα εμβρύα τοποθετούνται σε διάλυμα παραφοлмаδεΐδης (PFA) 4%, όπου και παραμένουν για 12-24 ώρες στους 4° C για να μονιμοποιηθούν.

Αφού ξεπλυθούν 2-3 φορές από την παραφοлмаδεΐδη με 1x PBS, τοποθετούνται σε διάλυμα σουκρόζης 30% σε 1x PBS, όπου παραμένουν για 24 ώρες, στους 4° C, μέχρι να πέσουν στον πάτο του falcon (50 ml).

Στεγνώνουμε λίγο τα έμβρυα από τη σουκρόζη και τα τοποθετούμε σε μικρό πλαστικό καλούπι που περιέχει μέσο Polyfreeze – Tissue Freezing Medium (POLYSCIENCES INC. Cat. No 19636) ειδικό για τομές σε κρυοστάτη. Καλύπτουμε καλά όλο το έμβρυο με το διάλυμα αυτό και το βάζουμε στους -80° C μέχρι να στερεοποιηθεί, όπου και διατηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα. Εναλλακτικά του προαναφερθέντος μέσου μπορεί να χρησιμοποιηθεί διάλυμα 15% σουκρόζης και 7.5% ζελατίνης σε 1x PBS.

Μέσα στο στερεοποιημένο πλέον διάλυμα, τα έμβρυα είναι δυνατόν να κοπούν στον κρυοστάτη σε τομές πάχους 12-20μm. Οι τομές των εμβρύων συλλέγονται σε ειδικές αντικειμενοφόρους πλάκες Superfrost / Plus Lanes Porte- Objects (O. Kindler GmbH & Co) και διατηρούνται στους -80° C επίσης για μεγάλο χρονικό διάστημα.

### 3. Υβριδοποίηση του ανιχνευτή με το mRNA στόχο πάνω στις τομές των εμβρύων.

Βγάζουμε τις αντικειμενοφόρους με τις τομές από τους  $-80^{\circ}\text{C}$  και αφού τις απλώσουμε σε ένα αλουμινόχαρτο, τις αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 ώρες μέχρι να στεγνώσουν καλά. Χωρίς καμία άλλη επεξεργασία είναι έτοιμες να δεχτούν το μείγμα υβριδοποίησης.

Το μείγμα υβριδοποίησης δεν διαφέρει σε τίποτα από το μείγμα που χρησιμοποιείται στην υβριδοποίηση ολόκληρων εμβρύων. Σε 500μl μείγματος προσθέτουμε 0.5-1 μg ανιχνευτή και προθερμαίνουμε για 5 λεπτά στους  $65^{\circ}\text{C}$ . Πάνω σε κάθε αντικειμενοφόρο βάζουμε 70-100 μl από το μείγμα υβριδοποίησης και την καλύπτουμε με parafilm. Στη συνέχεια τις τοποθετούμε σε ένα κουτί με υγρό περιβάλλον φορμαμίδης και τις επωάζουμε ολονύκτια στους  $65^{\circ}\text{C}$ .

### 4. Πλύσιμα μετά την υβριδοποίηση και ανοσολογική ανίχνευση με το αντίσωμα anti-DIG.

Οι αντικειμενοφόροι τοποθετούνται σε κατάλληλα δοχεία και πλένονται αρχικά με διάλυμα I στους  $65^{\circ}\text{C}$  για 15 λεπτά. Ακολουθεί πλύσιμο με το διάλυμα II, 3 φορές, για 30 λεπτά, στους  $65^{\circ}\text{C}$  και τέλος με το διάλυμα III, 3 φορές, για 30 λεπτά, στους  $65^{\circ}\text{C}$ .

<i>Αρχικό stock</i>	<i>Διάλυμα I</i>	<i>Διάλυμα II</i>	<i>Διάλυμα III</i>
<b>Formamide 100%</b>	50% (200ml)	50% (200ml)	50% (200ml)
<b>SSC 20x</b>	5x (100ml)	1x (20ml)	0.1x (2ml)
<b>Tween-20 100%</b>	0.1% (0.4ml)	0.1% (0.4ml)	0.1% (0.4ml)
<b>Συν. (με dH<sub>2</sub>O)</b>	400ml	400ml	400ml

Τα γυάλινα μπανάκια διατηρούνται σε συνεχή ήπια κίνηση όσο διαρκούν τα πλύσιμα των τομών στα παραπάνω διαλύματα που σκοπό έχουν την απομάκρυνση των μη υβριδοποιημένων μορίων του ανιχνευτή mRNA για μείωση του θορύβου.

Ακολουθεί πλύσιμο των τομών με διάλυμα MABT 1x (ή B1) (5x: 100mM μαλαϊκό οξύ, pH 7.50 με NaOH, 150mM NaCl, 0.1% Tween-20) μία φορά μέσα στα γυάλινα μπανάκια σε θερμοκρασία δωματίου και δύο φορές ακόμα, αφού όμως έχουμε

τοποθετήσει τις αντικειμενοφόρους σε οριζόντια θέση μέσα σε μεταλλική θήκη, ώστε να μειώσουμε το ποσοστό αποκόλλησης των ιστών. Σε αυτή τη θέση προσθέτουμε 500 μl MABT 1χ πάνω σε κάθε πλάκα και την αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.

Στη συνέχεια τα έμβρυα πλένονται με διάλυμα MABT 1χ που περιέχει 10% NGS (Normal Goat Serum), το οποίο καλύπτει τους ιστούς του εμβρύου εμποδίζοντας τη μη ειδική σύνδεση του αντισώματος. Η επώαση διαρκεί 1-2 ώρες, ενώ σε χωριστό διάλυμα MABT 1χ με 10% NGS (ή B2) προσθέτουμε το αντίσωμα anti-DIG (1/500 σε 5-10 ml διαλύματος ανάλογα με τον αριθμό των πλακών), ώστε κατά τη διάρκεια της επώασης να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης του αντισώματος.

Αντικαθιστούμε το διάλυμα MABT 1χ με 10% NGS (ή B2) με αυτό που περιέχει και το αντίσωμα και επωάζουμε τα έμβρυα για 2-4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή ολονύκτια στους 4° C. Καλύπτουμε τις αντικειμενοφόρους με parafilm.

## **5. Πλυσίματα μετά την επώαση του αντισώματος anti-DIG και εμφάνιση του σήματος.**

Μετά την επώαση των τομών με το αντίσωμα γίνονται πλυσίματα με διάλυμα MABT 1χ σε θερμοκρασία δωματίου, μία φορά μέσα σε γυάλινα μπανάκια και δύο φορές ακόμα για 30 λεπτά σε οριζόντια θέση προσθέτοντας 500 μl διαλύματος σε κάθε πλάκα.

Ακολουθεί πλύσιμο των τομών με διάλυμα NTMT (ή B3) (1χ: 100mM NaCl, 100mM Tris-HCl, pH 9.5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Tween-20) 2-3 φορές σε θερμοκρασία δωματίου, διατηρώντας τις πλάκες σε οριζόντια θέση. Αντικαθιστούμε το διάλυμα NTMT με το διάλυμα της αντίδρασης αποκάλυψης (B4), το οποίο έχει προετοιμαστεί με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται στην υβριδοποίηση ολόκληρων εμβρύων. Προσθέτουμε 100 μl διαλύματος B4 σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα, τις καλύπτουμε με καλυπτρίδες και επωάζουμε 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή ολονύκτια στους 4° C. Αν το σήμα παραμένει αμυδρό μετά από 12-16 ώρες ξεπλένουμε τις πλάκες με διάλυμα B3 1-2 φορές, σε οριζόντια θέση, και ανανεώνουμε το διάλυμα B4 της αντίδρασης αποκάλυψης, επωάζοντας για 24-48 ακόμα ώρες στους 4° C.

Σταματάμε την αντίδραση αποκάλυψης όποτε κρίνουμε ικανοποιητικό το σήμα, ξεπλένοντας τις τομές 1-2 φορές με διάλυμα PBT 1x και στη συνέχεια διατηρούμε τις αντικειμενοφόρους καλύπτοντας τες με καλυπτρίδες όπου έχουμε προσθέσει μικρή ποσότητα Aquamount improved (BDH Laboratory Cat. No 362262H), το οποίο είναι διαλυτό στο νερό. Αφήνουμε τις αντικειμενοφόρους όλη τη νύχτα στην απαγωγό για να στεγνώσουν καλά και στη συνέχεια τις φυλάσσουμε σε θερμοκρασία δωματίου.

## **6. Παρατήρηση των εμβρύων στο μικροσκόπιο και φωτογράφιση.**

Τα παρασκευάσματα των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο τύπου Leica με διερχόμενο φως και οπτικά Nomarski. Η λήψη των φωτογραφιών έγινε με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή προσαρμοσμένη στο μικροσκόπιο, τύπου Spot και η επεξεργασία των φωτογραφιών έγινε με την χρήση του προγράμματος Adobe Photoshop 5.0.

## **II. ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΧΡΩΣΗ ΣΕ ΤΟΜΕΣ ΚΡΥΟΣΤΑΤΗ**

Οι παρακάτω πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιούνται με βάση των οδηγιών που δίνονται στο VECTASTAIN *Elite* ABC kit της εταιρείας Vector Laboratories.

### **1. Προετοιμασία των εμβρύων πριν την επώασή τους με τα αντισώματα.**

Βγάζουμε τις κρυοτομές από τους  $-20^{\circ}\text{C}$  και τις αφήνουμε να στεγνώσουν από την υγρασία για 30 λεπτά. Δημιουργούμε υδρόφοβα άκρα γύρω από κάθε αντικειμενοφόρο με το ειδικό πινέλο Dacopen. Αφήνουμε τις αντικειμενοφόρους να στεγνώσουν 30 λεπτά. Ακολουθεί μεταμονιμοποίηση των τομών με επώαση των αντικειμενοφόρων σε ακετόνη για 5 min. Ξεπλένουμε αμέσως (έτσι ώστε να μην συνεχίζει να δρά η ακετόνη) με 1x PBT (PBS+ 0.1% Triton για 10 λεπτά) σε μπανάκι (1-3 φορές). Ακολουθεί απενεργοποίηση της δραστηριότητας της ενδογενούς περοξειδάσης με επώασή τους σε 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  και 50% μεθανόλη 50% PBS για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. (Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται στο σκοτάδι λόγω της φωτοευσθησίας του  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Ξεπλένουμε καλά με 1x PBT( 3 φορές για 10 λεπτά) για να απαλλαχθούμε από το  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

## 2. Επώαση με τα κατάλληλα αντισώματα και αντίδραση εμφάνισης.

Επώαζουμε τις τομές σε 1χ PBS που περιέχει 1% BSA και 0.1% Triton (το παραπάνω διάλυμα φιλτράρεται και φυλάσσεται στο ψυγείο) τουλάχιστον για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (blocking). Στη συνέχεια επώαζουμε με το πρωτεύον αντίσωμα ολονύκτια στους 4° C. Το διάλυμα στο οποίο αραιώνεται το πρωτεύον αντίσωμα είναι 1χ PBS που περιέχει 0.1% BSA και 0.1% Triton. Ακολουθεί καλό ξέπλυμα με 1χ PBT 3 φορές για 10 λεπτά. Επώαζουμε τις τομές με το δευτερεύον αντίσωμα (biotinylated Antibody) είτε σε διάλυμα που περιέχει 0.1% BSA και 0.1% Triton για δύο ώρες τουλάχιστον (το παραπάνω διάλυμα φιλτράρεται και φυλάσσεται στο ψυγείο) είτε σε διάλυμα που περιέχει 1χ PBS και normal blocking serum. Ακολουθεί καλό ξέπλυμα με 1χ PBT 3 φορές για 10 λεπτά.

Επίσης σ' αυτό το διάστημα προετοιμάζεται το σύμπλοκο Αβιδίνης Βιοτίνης (στη βιοτίνη είναι προσδεμένο το ένζυμο της περοξειδάσης). Ο χρόνος επώασης για τη δημιουργία του συμπλόκου είναι τουλάχιστον μισή ώρα και ο σχηματισμός του πραγματοποιείται στο σκοτάδι. Το σύμπλοκο Αβιδίνης Βιοτίνης προστίθεται στις τομές, οι οποίες αφήνονται να επωαστούν για μισή ώρα τουλάχιστον σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι. Ακολουθεί καλό ξέπλυμα με 1χ PBT 3 φορές για 10 λεπτά. Σ' αυτό το διάστημα γίνεται η προετοιμασία για τη δημιουργία του χρωμογόνου που θα χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό της περοξειδάσης στις τομές. Το χρωμογόνο το οποίο χρησιμοποιείται είναι το DAB (diaminobenzidine tetrahydrochloride). Συγκεκριμένα σε 5ml H<sub>2</sub>O προσθέτουμε 2 σταγόνες Buffer Stock Solution, 4 σταγόνες DAB Stock Solution και 2 σταγόνες Hydrogen Peroxide Solution (όλα τα παραπάνω διαλύματα περιέχονται στο DAB SUBSTRATE KIT FOR PEROXIDASE). Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται στο σκοτάδι. Οι τομές επώάζονται με DAB στο σκοτάδι για κατάλληλο χρονικό διάστημα συνήθως 2 - 10 λεπτά. Η διαδικασία της χρώσης σταματάει με ξέπλυμα με 1χ PBT. Ακολουθούν τρία δεκάλεπτα πλυσίματα με 1χ PBT. Τέλος οι τομές αφυδατώνται, περνώντας διαδοχικά από διαλύματα 70, 95, 100% αιθανόλης (5 λεπτά παραμονή σε κάθε διάλυμα), εμβαπτίζονται σε ξυλένιο (τουλάχιστον μισή ώρα) και καλύπτονται με Entellan.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ NEURALIZED ΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΙΔΙΚΩΝ ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.

#### **A. Υπερέκφραση τμημάτων της πρωτεΐνης NEURALIZED σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli* BL21.**

Για να χαρακτηριστεί το γονίδιο *neuralized* του ποντικού και να αποδοθεί η λειτουργία της πρωτεΐνης, κρίθηκε απαραίτητη η παρασκευή πολυκλωνικών αντισωμάτων ενάντια στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Τα αντισώματα αυτά μπορούν να θεωρηθούν πολύτιμο εργαλείο για τους στόχους αυτής της εργασίας, αλλά και μελλοντικά για τον χαρακτηρισμό της φυσικής (ενδογενούς) πρωτεΐνης, τον εντοπισμό της σε κυτταρικό επίπεδο και για τον χαρακτηρισμό των κυτταρικών τύπων που την εκφράζουν, καθώς και την ανάλυση της αλληλεπίδρασής της με άλλες πρωτεΐνες.

Για την παρασκευή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Neur1 κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGEX-4T-2 δύο περιοχές του cDNA του *Neuralized*. Προηγούμενες επανηλημένες προσπάθειες έκφρασης ολόκληρης της πρωτεΐνης δεν απέδωσαν τα αναμενόμενα, ίσως λόγω τοξικότητας του ολόκληρου μορίου στα βακτηριακά κύτταρα ή λόγω μεροληψίας στη χρήση κωδικονίων. Οι περιοχές αυτές κωδικοποιούν για 132 και 137 αμινοξέα αντίστοιχα και εντοπίζονται στο cDNA του *neuralized*, η πρώτη στη θέση 1005 – 1400 bp και η δεύτερη στη θέση 423 – 836 bp. Δηλαδή όσον αφορά την αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης τα ενθέματα αυτά εντοπίζονται στο 335 – 467 αμινοξύ το πρώτο και στο 141 – 278 αμινοξύ το δεύτερο. Για να κλωνοποιηθούν τα ενθέματα αυτά στον κατάλληλο φορέα πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών, οι οποίοι σχεδιάστηκαν να έχουν στα άκρα τους περιοριστικές θέσεις που είναι συμβατές με αυτές του πλασμιδιακού φορέα.

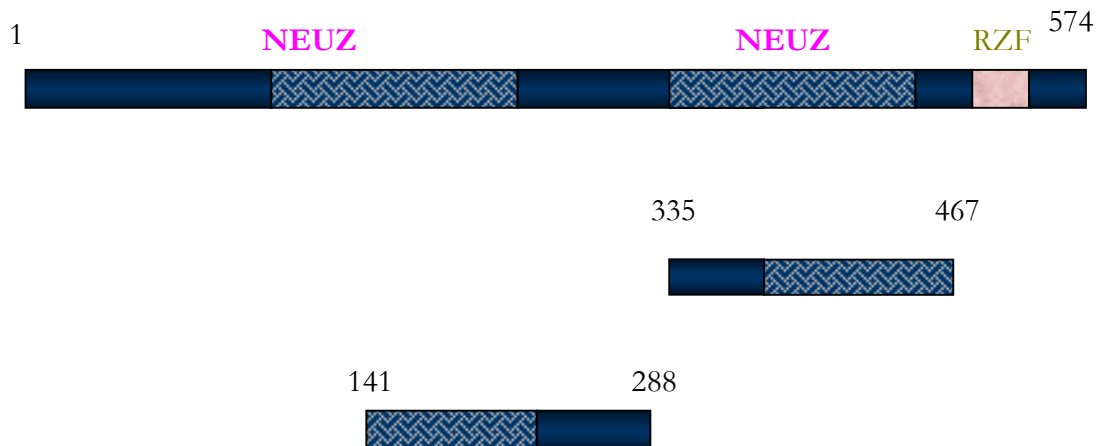
Το πρώτο ένθεμα παράχθηκε με τη χρήση των παρακάτω εκκινητών:

5' – CGG GAT CCC GCG AGA CCA TCT TCA TCA AGG – 3' (forward)



5' – CCC TCG AGG GGG AGT GGA GGC AGG TGA G – 3' (reverse)

και στο προϊόν της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε πέψη με *Bam*HI και *Xho*I, όπως ακριβώς και στον πλασμιδιακό φορέα. Για το δεύτερο ένθεμα χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές: 5' – CGC GGA TCC CGC GCC TGC CCT GAC CTG – 3' (forward) 5' – CCG CTC GAG CGG TTG AGC GAG TTC TGC GG – 3' (reverse) και ακολούθησε πέψη με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα.

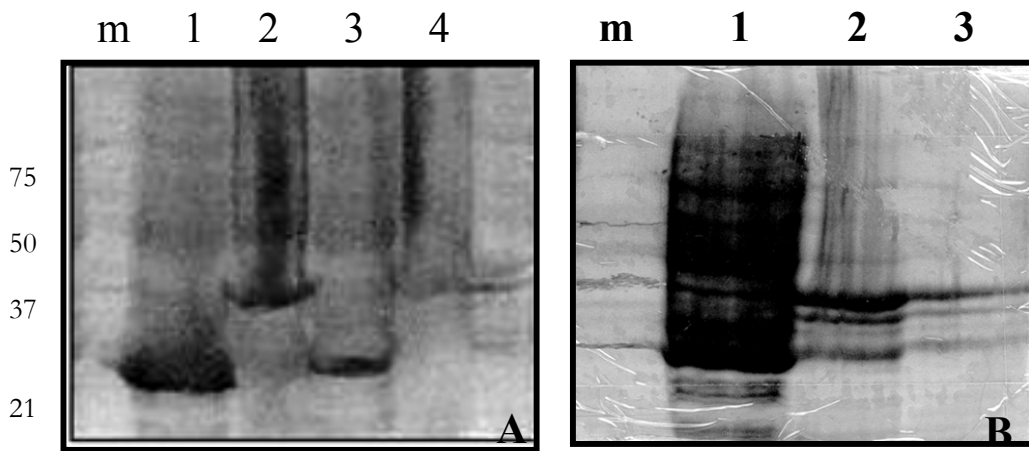


**Εικ. 6: Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης Neuralized του ποντικού.** Τα δύο τμήματα που φαίνονται χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή των αντισωμάτων γιατί περιέχουν ομάδες αμινοξέων με υψηλό δείκτη αντιγονικότητας. Οι περιοχές NEUZ της πρωτεΐνης φαίνονται με γκρι, ενώ η περιοχή RING δακτύλου ψευδαργύρου με ροζ. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε αμινοξικές θέσεις.

Οι παραπάνω πρωτεϊνικές περιοχές επιλέχθηκαν έτσι ώστε να μην περιέχουν το μοτίβο δακτύλου ψευδαργύρου (Ring Zinc Finger) γιατί η επαγωγή των βακτηριακών κυττάρων που περιείχαν αυτό το τμήμα της πρωτεΐνης δεν ήταν επιτυχής και επιπλέον να εμφανίζουν υψηλό δείκτη αντιγονικότητας, ο οποίος προκύπτει από την αμινοξική αλληλουχία με την εφαρμογή του προγράμματος ANTIGENICITY PLOT ([www.embl-heidelberg.de/~toldo/JaMBW/3/1/7/](http://www.embl-heidelberg.de/~toldo/JaMBW/3/1/7/)), σημειωτέον ότι όσο υψηλότερος είναι ο δείκτης

αντιγονικότητας μιας ομάδας αμινοξέων, τόσο μεγαλύτερη είναι η εξειδίκευση των αντισωμάτων που θα παραχθούν για τους συγκεκριμένους επιτόπους.

Μετά την εισαγωγή των παραπάνω πλασμιδιακών κατασκευών σε κύτταρα *E.coli* BL21, ακολούθησε επαγωγή της υπερέκφρασης των ζητουμένων πρωτεϊνών και έλεγχος της επαγωγής με ηλεκτροφόρηση των βακτηριακών εκχυλισμάτων σε πήκτωμα SDS – ακρυλαμίδης. Η επιβεβαίωση ότι οι πρωτεΐνες που υπερεκφράζονται είναι οι επιθυμητές έγινε με τον έλεγχο του μεγέθους τους με τον κατάλληλο πρωτεϊνικό μάρτυρα, όσο και από την απουσία αυτών των πρωτεϊνών από το εκχύλισμα των ίδιων κυττάρων όταν σε αυτά υπήρχε μόνο ο φορέας χωρίς το ένθεμα. Στην Εικ. 7 φαίνονται τα πηκτώματα SDS – ακρυλαμίδης που περιγράφονται παραπάνω με τις πρωτεΐνες που έχουν επαχθεί.



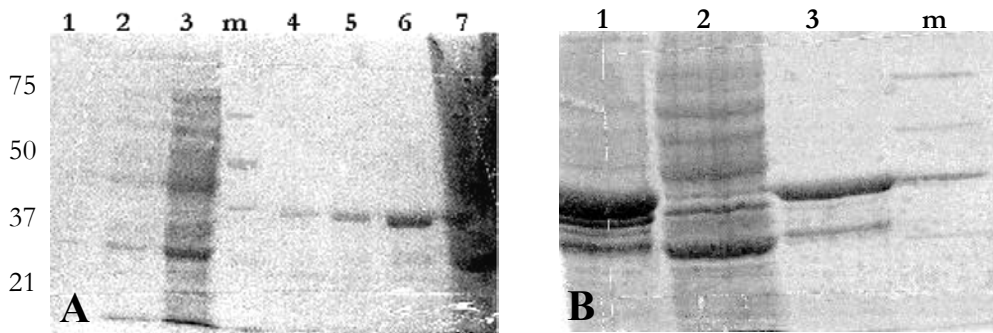
**Εικ.7: Αναλυτικό πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης με βακτηριακά εκχυλίσματα.. (A)** Επαγωγή του πρωτεϊνικού τμήματος **130A** (132 αα) σε βακτηριακά κύτταρα 1. Υπερκείμενο βακτηριακών εκχυλισμάτων όπου έχει επαχθεί η έκφραση μόνο της πρωτεΐνης GST. 2. Υπερκείμενο βακτηριακών εκχυλισμάτων όπου έχει επαχθεί η έκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης Neur1 - GST. 3. Ίζημα βακτηριακών εκχυλισμάτων όπου έχει επαχθεί η έκφραση της πρωτεΐνης GST. 4. Ίζημα βακτηριακών εκχυλισμάτων όπου έχει επαχθεί η έκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης Neur1 – GST. **(B)** Επαγωγή του πρωτεϊνικού τμήματος **140B** (137 αα) σε βακτηριακά κύτταρα 1. Υπερκείμενο βακτηριακών εκχυλισμάτων όπου έχει επαχθεί η έκφραση μόνο της πρωτεΐνης GST. 2. Ίζημα βακτηριακών εκχυλισμάτων όπου έχει επαχθεί η έκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης Neur1 - GST. 3. Υπερκείμενο βακτηριακών εκχυλισμάτων όπου έχει επαχθεί η έκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης Neur1 – GST. m ο πρωτεϊνικός μάρτυρας.

## **B. Καθαρισμός των πρωτεϊνικών τμημάτων που υπερεκφράστηκαν για τη χρησιμοποίησή τους ως αντιγόνα στην ανοσοποίηση κουνελιών.**

Τα πολυπεπίδια Neur1 που υπερεκφράστηκαν απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν από τις ενδογενείς βακτηριακές πρωτεΐνες ακολουθώντας δύο διαφορετικές διαδικασίες. Για την πρώτη πρωτεΐνη των 132 αμινοξέων (130A) παρατηρήθηκε ότι το μεγαλύτερο μέρος της βρίσκεται διαλυτό στο υπερκείμενο των βακτηριακών εκχυλισμάτων και έτσι επιλέχθηκε η απομόνωσή της με τη χρήση του προσροφητή Glutathione Sepharose 4B, στον οποίο προσδένονται ειδικά οι GST χμαιρικές πρωτεΐνες και στη συνέχεια εκλύονται με τη χρήση ανηγμένης γλουταθειόνης. Όλα τα στάδια της πρόσδεσης και της έκλυσης της πρωτεΐνης 130A αναλύθηκαν σε πήκτωμα SDS – ακρυλαμίδης όπως φαίνεται στην Εικ. 9. Η καθαρισμένη πρωτεΐνη ποσοτικοποιήθηκε και στάλθηκε για ανοσοποίηση στην εταιρεία Davids Biotechnologie (email: [Davids.Bio@T-online.de](mailto:Davids.Bio@T-online.de)).

Η δεύτερη πρωτεΐνη των 137 αμινοξέων (140B) βρέθηκε περισσότερο συγκεντρωμένη στο ίζημα των βακτηριακών εκχυλισμάτων και για να καθαριστεί ακολουθήθηκε διαδικασία απομόνωσής της από τα έγκλειστα σωματίδια με τη χρήση ουρίας. Μετά την απομάκρυνση της ουρίας με διαπίδυση, η καθαρισμένη πρωτεΐνη αποκόπηκε από πρωτεϊνικό πήκτωμα και χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοποίηση ενός δεύτερου κουνελιού.

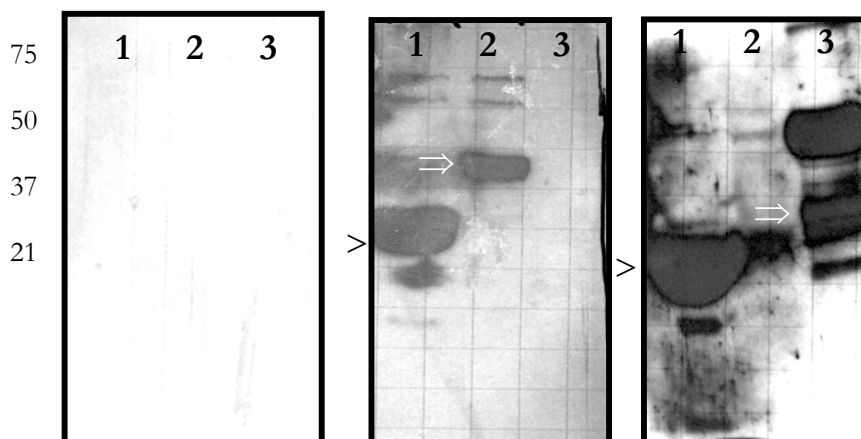
Στην εικ. 8 φαίνονται τα στάδια καθαρισμού της δεύτερης πρωτεΐνης και η πρωτεϊνική ζώνη που τελικά αποκόπηκε.



**Εικ. 8 : Ανάλυση πηκτώματος SDS – πολυακρυλαμίδης μετά των καθαρισμό των πρωτεϊνικών τμημάτων. (A)** Καθαρισμός του πρωτεϊνικού τμήματος 130A με τη χρήση προσροφητή Glutathione Sepharose 4B. 1 – 3. Υπερκείμενα των διαδοχικών πλυσιμάτων του προσροφητή όπου φαίνονται οι πρωτεΐνες που δεν προσδέθηκαν σε αυτόν. (πρώτο ξέπλυμα η διαδρομή 3). 4 – 6. Τα διαδοχικά κλάσματα που συλλέχθηκαν μετά την έκλουση της πρωτεΐνης από τον προσροφητή (πρώτο κλάσμα η διαδρομή 6). 7 Το υπερκείμενο που συλλέχθηκε αμέσως μετά την επώαση των βακτηριακών εκχυλισμάτων με τον προσροφητή. **(B)** Καθαρισμός του πρωτεϊνικού τμήματος 140B από έγκλειστα σωματίδια. 1. Μέρος του δείγματος πριν την προσθήκη ουρίας. 2. Το υπερκείμενο που συλλέχθηκε μετά τη φυγοκέντρηση του δείγματος με 40% σουκρόζη. 3. Μέρος του δείγματος μετά την διαπίδηση, όπου η έντονη ζώνη είναι αυτή που κόπηκε από το πήκτωμα και χρησιμοποιήθηκε για ανοσοποίηση. m ο πρωτεϊνικός μάρτυρας

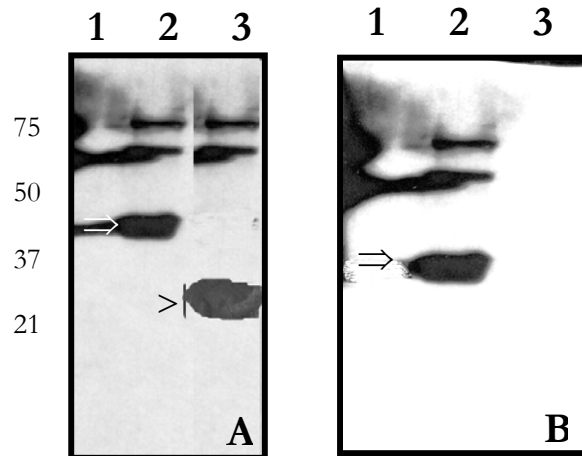
### Γ. Ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος των αντισωμάτων

Για να ελεγχθεί αρχικά η ικανότητα των πολυκλωνικών αντισωμάτων που παράχθηκαν να αναγνωρίζουν τα τμήματα της πρωτεΐνης Neurl έγινε ανάλυση Western με τη χρήση βακτηριακών εκχυλισμάτων κυττάρων *E.coli* BL21, στα οποία έχουν υπερεκφραστεί τα τμήματα της πρωτεΐνης. Ως αρνητικός έλεγχος χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα βακτηρίων που φέρουν μόνο τον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T-2 που εκφράζει την πρωτεΐνη GST. Οι μεμβράνες επώαστηκαν με ορό από τα 2 κουνέλια, καθώς και με ορό από τα κουνέλια πριν την ανοσοποίηση (preimmune). Το αντίσωμα για την πρώτη πρωτεΐνη αραιώθηκε 2000 φορές (όπως και ο ορός πριν την ανοσοποίηση), ενώ για τη δεύτερη πρωτεΐνη 140B αραιώθηκε 200 φορές (βάσει παρατηρήσεων από τα πρώτα πιλοτικά πειράματα Western που είχαν πραγματοποιηθεί) (Εικ.9).



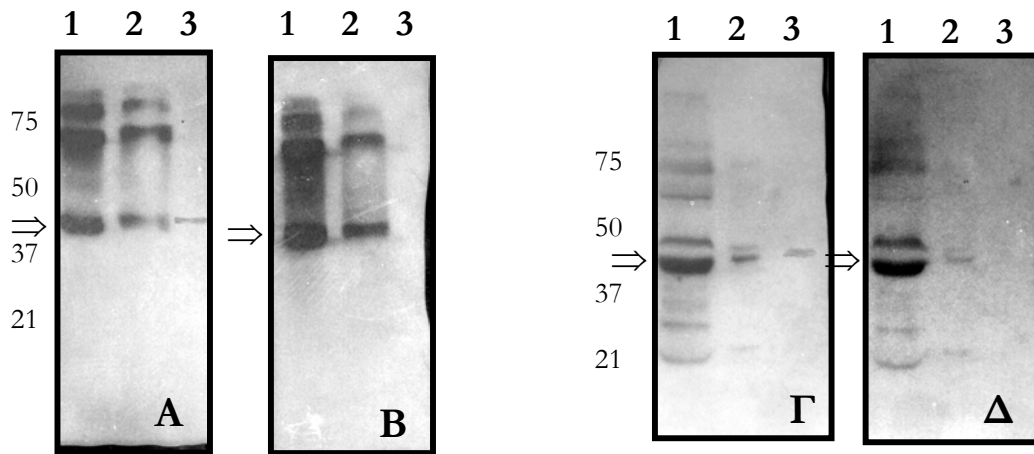
**Εικ. 9: Ανάλυση Western για τον έλεγχο της εξειδίκευσης των αντισωμάτων. (Α)** Επώαση με τον ορό πριν την ανοσοποίηση (preimmune) (αραίωση 1:2000) 1. Εκχυλίσματα βακτηριακών κυττάρων που έχουν επαχθεί να εκφράζουν την πρωτεΐνη GST (>). 2. Εκχυλίσματα βακτηριακών κυττάρων που έχουν επαχθεί για να εκφράζουν τη χιμαιρική Neur1 – GST. 3. Εκχυλίσματα βακτηριακών κυττάρων μη μετασχηματισμένα. **(Β)** Επώαση με τον ορό 130A (αραίωση 1:2000). Τα 1,2,3, δείγματα είναι όμοια με Α. **(Γ)** Επώαση με τον ορό 140B (αραίωση 1:200). 1. Εκχυλίσματα βακτηριακών κυττάρων που έχουν επαχθεί να εκφράζουν την πρωτεΐνη GST 2. . Εκχυλίσματα βακτηριακών κυττάρων μη μετασχηματισμένα 3. Εκχυλίσματα βακτηριακών κυττάρων που έχουν επαχθεί για να εκφράζουν τη χιμαιρική Neur1 – GST (⇒).

Παρατηρήθηκε ότι ο ορός δεν αναγνωρίζει πριν την ανοσοποίηση τα πρωτεϊνικά τμήματα, ενώ τα αντισώματα αναγνωρίζουν τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά τμήματα με ικανοποιητική εξειδίκευση. Είναι εμφανές ότι ο ορός για το 130A εμφανίζει πολύ μικρότερο «θόρυβο» από τον ορό για το 140B, ο οποίος αναγνωρίζει έντονα και κάποιες άλλες πρωτεΐνες εκτός από τα πρωτεϊνικά τμήματα που έχουν επαχθεί. Τα αντισώματα αναγνωρίζουν εξίσου καλά και την πρωτεΐνη GST, γεγονός που αναμενόταν αφού σαν αντιγόνο χρησιμοποιήθηκαν οι χιμαιρικές πρωτεΐνες GST – NEURALIZED. Για να εμπλουτίσουμε τον ορό σε αντισώματα κατά της πρωτεΐνης NEURALIZED, ακολουθήσαμε τη διαδικασία αρνητικού καθαρισμού συγγένειας πάνω σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η διαδικασία ελέγχθηκε με ανάλυση Western και παρατηρήθηκε εντονότατη διαφορά στην αναγνώριση της πρωτεΐνης GST από τον ορό πριν και μετά τον καθαρισμό. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο καθαρισμός έγινε μόνο στο αντίσωμα για το τμήμα 130A (Εικ.10).



**Εικ. 10: Αρνητικός καθαρισμός συγγένειας του αντισώματος 130A σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. (Α)** Επώαση με τον ορό 130A (αραίωση 1: 1000) πριν τον καθαρισμό του. 1. Εκχύλισμα βακτηριακών κυττάρων μη μετασηματισμένων (παρατηρήθηκε μικρή ανάμειξη των δειγμάτων 1,2). 2. Εκχύλισμα βακτηριακών κυττάρων που έχουν επαχθεί για έκφραση της χμιαϊρικής πρωτεΐνης NeurI – GST ( $\Rightarrow$ ). 3. Εκχύλισμα βακτηριακών κυττάρων που εκφράζουν μόνο την πρωτεΐνη GST ( $>$ ). **(Β)** Επώαση με τον ορό 130A (αραίωση 1:1000) μετά τον αρνητικό καθαρισμό συγγένειας. Τα δείγματα 1,2,3 είναι όμοια με **(Α)**.

Για να προσδιορίσουμε την ευαισθησία των αντισωμάτων χρησιμοποιήσαμε ποσοτικοποιημένα βακτηριακά εκχυλίσματα ώστε να χρησιμοποιηθούν 5000ng, 500ng και 50ng συνολικής πρωτεΐνης. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικές αραιώσεις των πρωτοταγών αντισωμάτων (1:2000 και 1:3000 για το 130A και 1:200 και 1:300 για το 140B). Παρατηρούμε ότι τα αντισώματα αναγνωρίζουν ακόμα και πολύ μικρές ποσότητες μέχρι και 50ng συνολικής πρωτεΐνης στις μικρότερες αραιώσεις, γεγονός που υποδηλώνει την ικανοποιητική τους εξειδίκευση.



**Εικ. 11: Έλεγχος της ευαισθησίας των αντισωμάτων με διαδοχικές αραιώσεις βακτηριακών εκχυλισμάτων. (Α) και (Β)** Επώαση με τον ορό 130A (αραίωση 1:2000 και 1 : 3000 αντίστοιχα). **(Γ) και (Δ)** Επώαση με τον ορό 140B (αραίωση 1:200 και 1:300 αντίστοιχα). 1, 2, 3 Εκχυλίσματα βακτηριακών κυττάρων που έχουν επαχθεί για έκφραση της χμιαϊρικής πρωτεΐνης NeurI – GST ( $\Rightarrow$ ) (το τμήμα 130A για τα Α και Β, το τμήμα 140B για τα Γ και Δ) με συνολική ποσότητα πρωτεϊνών 5000ng, 500 ng και 50 ng αντίστοιχα.

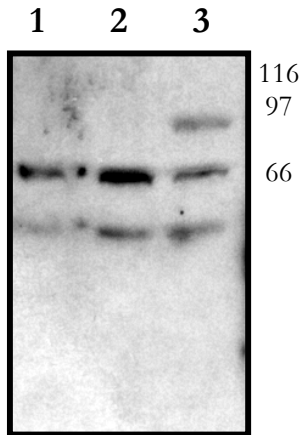
**Δ. Έλεγχος των αντισωμάτων σε εκχυλίσματα ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών και εντοπισμός της πρωτεΐνης NEURALIZED σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές.**

Για να επαληθευτεί η εξειδίκευση των αντισωμάτων που παράχθηκαν, πραγματοποιήθηκε ανάλυση Western σε ευκαρυωτικά κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με πλασμίδια που οδηγούσαν στην έκφραση πρωτεΐνης Neu1l διαφορετικών μεγεθών (πρωτεΐνη ολικού μεγέθους 574 αα – ευγενική προσφορά από τη Μαρία Κοκκινάκη - ή χμιαϊρική πρωτεΐνη Neu1l/GFP συνολικού μεγέθους 812αα). Η αναγνώριση αυτών των διαφορετικών μεγεθών επιβεβαιώνει την ειδικότητα των αντισωμάτων. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν COS – 7 ( νεφρικά κύτταρα πιθήκου) και NIH 3T3 (εμβρυικά κύτταρα ποντικού). Η ανάλυση Western στα κύτταρα COS – 7 έδειξε:

α) η πρωτεΐνη ανιχνεύεται σε μη διαμολυσμένα κύτταρα, άρα υπάρχει ενδογενώς και σε αυτή την κυτταρική σειρά. Εκτός όμως από τη ζώνη στο μέγεθος που αναμένεται (περίπου 65 kD), υπάρχει και μια δεύτερη ζώνη μικρότερου μεγέθους (Εικ.12).

β) στα διαμολυσμένα κύτταρα με κατασκευή που οδηγεί σε έκφραση πρωτεΐνης αγρίου τύπου, η ζώνη που παρατηρείται έχει μεγαλύτερη ένταση, αφού συμπίπτει με το μέγεθος της ενδογενούς πρωτεΐνης.

γ) στα διαμολυσμένα κύτταρα που εκφράζουν χμιαϊρική πρωτεΐνη Neu1l/GFP, ανιχνεύεται από το αντίσωμα μια ζώνη μεγαλύτερου μεγέθους καθώς και η ενδογενής πρωτεΐνη και η μικρότερη που παρατηρείται και στα άλλα δείγματα. Πρέπει να τονίσουμε ότι το ποσοστό διαμόλυνσης σε αυτή την κυτταρική σειρά είναι αρκετά υψηλό (φτάνει μέχρι και 20 %) για αυτό παρατηρούμε και μεγάλη ακρίβεια στην ένταση των διάφορων ζωνών που ανιχνεύουν τα αντισώματα. Η ζώνη μικρότερου μεγέθους που παρατηρήθηκε (περίπου 45 Kd) είναι πιθανόν κάποιο άλλο αντιγόνο που το αντίσωμα αναγνωρίζει μη ειδικά. Αναζητήσαμε παράλληλα και την ύπαρξη εναλλακτικών μεταγράφων σε βάσεις δεδομένων ESTs ποντικού και ανθρώπου και εντοπίσαμε ένα εναλλακτικό μετάγραφο στον ποντικό με τα τρία πρώτα μόνο εξόνια (από τα έξι που έχει συνολικά το γονίδιο Neu1l του ποντικού) και ένα δεύτερο εναλλακτικό μετάγραφο στο ανθρώπινο γονίδιο, τα ανοιχτά πλαίσια διαβάσματος των οποίων δεν αντιστοιχούσαν σε πρωτεΐνη μεγέθους ανάλογου με αυτό που παρατηρούμε.

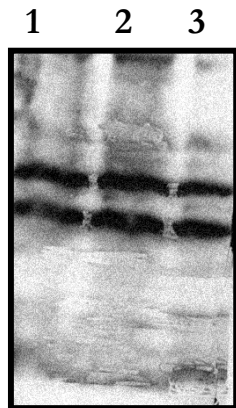


**Εικ. 12: Έλεγχος της εξειδίκευσης των αντισωμάτων σε ευκαρυωτικά κτταρικά εκχύλισματα (COS-7).** Επώαση με τον ορό για το τμήμα 130A (αραίωση 1: 1000) 1. Εκχύλισμα ευκαρυωτικών κυττάρων μη διαμολυσμένων (παρατηρούμε ενδigenή πρωτεΐνη Neu1l μεγέθους 65 KD περίπου). 2. Εκχύλισμα ευκαρυωτικών κυττάρων διαμολυσμένων με κατασκευή που οδηγεί σε έκφραση πρωτεΐνης Neu1l αγρίου τύπου. 3. Εκχύλισμα ευκαρυωτικών κυττάρων διαμολυσμένων με κατασκευή που οδηγεί σε έκφραση της χμαιρικής πρωτεΐνης Neu1l – GFP.

Επίσης η ανάλυση Western στα κύτταρα NIH 3T3 έδειξε: α) επαληθεύεται η ύπαρξη ενδογενούς πρωτεΐνης, η οποία ανιχνεύεται από το αντίσωμα σε μη διαμολυσμένα κύτταρα, ενώ παρατηρείται και σε αυτά τα κύτταρα η ζώνη μικρότερου μεγέθους.

β) στα διαμολυσμένα κύτταρα με κατασκευή που οδηγεί σε έκφραση πρωτεΐνης συνολικού μεγέθους, παρατηρούμε ζώνες αντίστοιχου μεγέθους, ενώ

γ) στα διαμολυσμένα κύτταρα που εκφράζουν την χμαιρική πρωτεΐνη Neu1l/GFP, δεν ανιχνεύεται από το αντίσωμα η ζώνη μεγαλύτερου μεγέθους γεγονός που μπορεί να οφείλεται στο πολύ χαμηλότερο ποσοστό διαμολυνσης αυτής της κυτταρικής σειράς (1 – 2 %) (εικ.13).

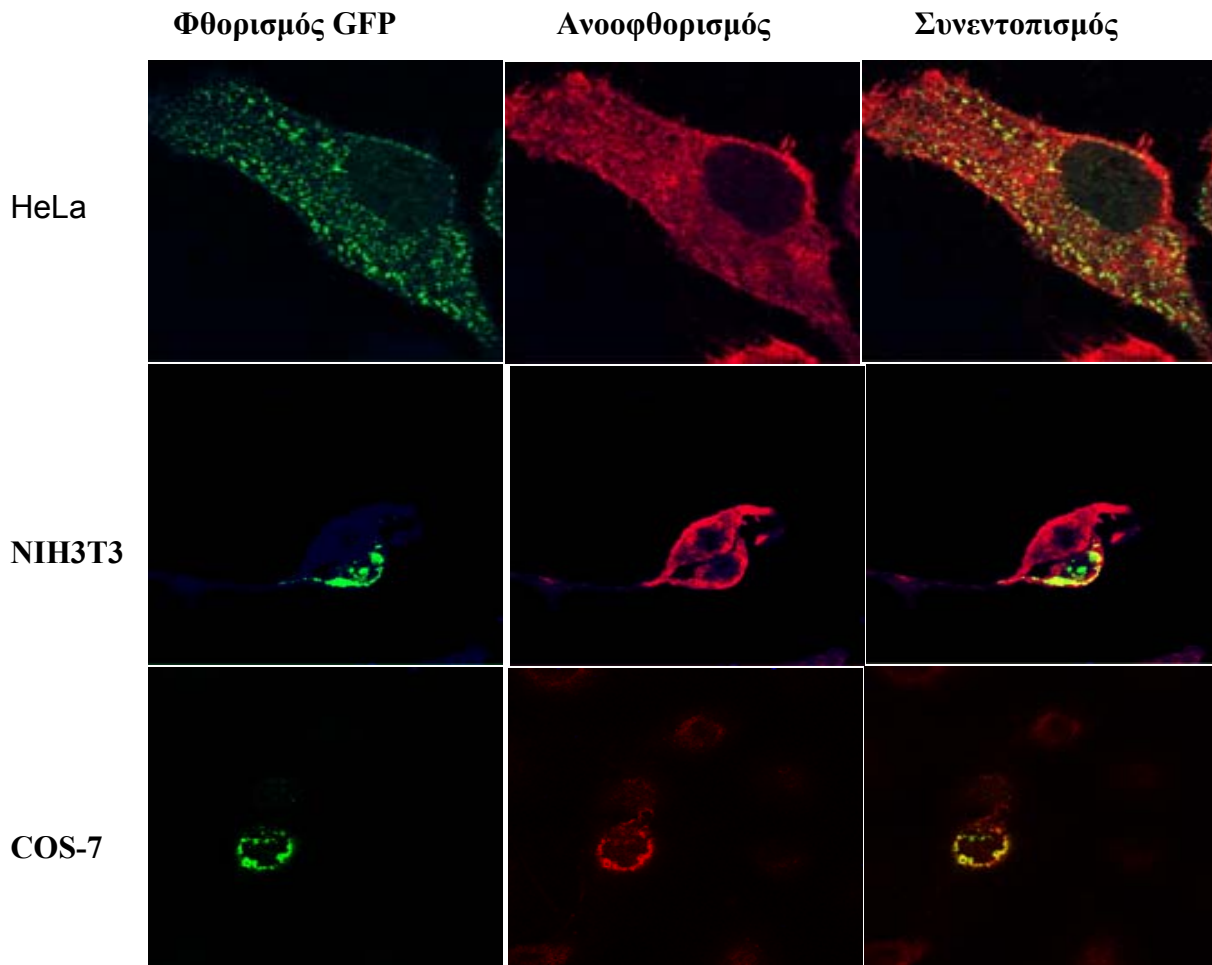


**Εικ. 13: Έλεγχος της εξειδίκευσης των αντισωμάτων σε ευκαρυωτικά κυτταρικά εκχύλισματα (NIH 3T3).** Επώαση με τον ορό για το τμήμα 130A (αραίωση 1: 1000) 1. Εκχύλισμα ευκαρυωτικών κυττάρων μη διαμολυσμένων (παρατηρούμε ενδογενή πρωτεΐνη Neu1l μεγέθους 65 KD περίπου). 2. Εκχύλισμα ευκαρυωτικών κυττάρων διαμολυσμένων με κατασκευή που οδηγεί σε έκφραση πρωτεΐνης Neu1l αγρίου τύπου. 3. Εκχύλισμα ευκαρυωτικών κυττάρων διαμολυσμένων με κατασκευή που οδηγεί σε έκφραση της χμαιρικής πρωτεΐνης Neu1l – GFP.

Τα αντισώματα στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ανοσοφθορισμού σε τρεις διαφορετικές κυτταρικές σειρές COS-7, NIH 3T3 και HeLa (ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα τραχήλου μήτρας), όπου τα κύτταρα είχαν ήδη διαμολυνθεί με



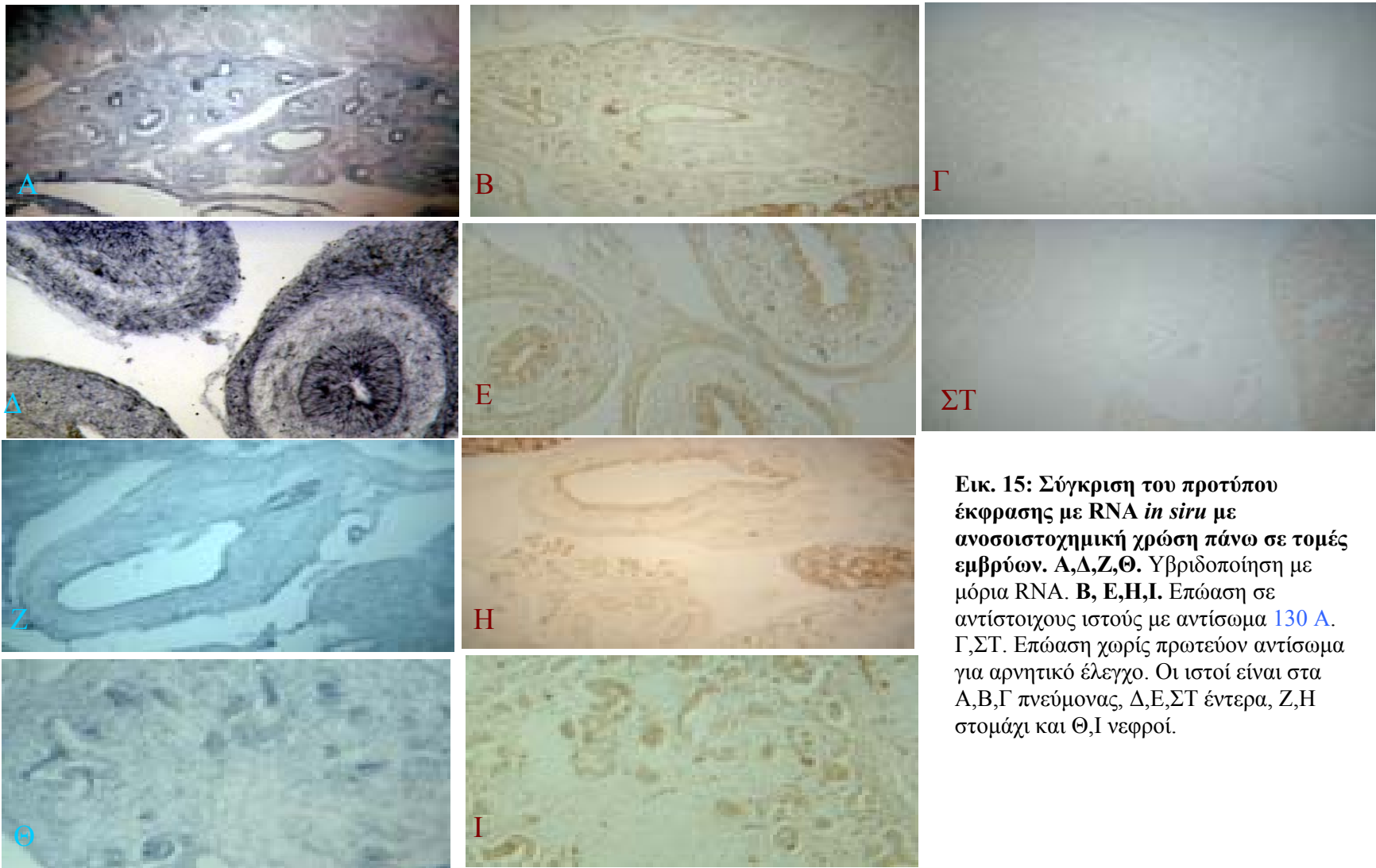
κατασκευή που οδηγεί στην έκφραση χιμαιρικής πρωτεΐνης Neurl/GFP. Παρατήρηση των κυττάρων σε συνεστιακό μικροσκόπιο έδειξε την ενδογενή πρωτεΐνη να εντοπίζεται σε όλο το κυτταρόπλασμα αλλά όχι στον πυρήνα, όπως συμβαίνει και με την εξωγενή πρωτεΐνη, η οποία όμως εμφανίζει ένα διάστικτο πρότυπο μέσα στο κύτταρο. Η χρώση πάντως με το αντίσωμα ταυτιζόταν με τα σημεία φθορισμού της GFP και μάλιστα η ένταση της χρώσης με το αντίσωμα είναι μεγαλύτερη στα σημεία όπου συσσωρεύεται η εξωγενής πρωτεΐνη (Εικ. 14).



**Εικ. 14:** Υποκυτταρικός εντοπισμός της ενδογενούς πρωτεΐνης Neurl με τη χρήση του πολυκλωνικού αντισώματος 130 A και παρατήρηση σε κυτταρικές σειρές. Α, Β, Γ Κύτταρα HeLa διαμολυσμένα με κατασκευή που οδηγεί σε έκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης Neurl – GFP. Δ, Ε, ΣΤ. Κύτταρα NIH 3T3 διαμολυσμένα με κατασκευή που οδηγεί σε έκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης Neurl – GFP. Ζ, Η, Θ. Κύτταρα COS- 7 διαμολυσμένα με κατασκευή που οδηγεί σε έκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης Neurl – GFP.

### **Ε. Ανοσοϊστοχημική χρώση σε τομές σε εμβρύου ποντικού.**

Για τη σύγκριση του προτύπου έκφρασης του γονιδίου *Neur1*, που προέκυψε με τη χρήση ανιχνευτών RNA (*in situ*) και τον εντοπισμό της πρωτεΐνης σε διάφορους ιστούς, πραγματοποιήθηκε επώαση του αντισώματος 130A σε τομές εμβρύου ποντικού από κρουστάτη και παρατήρησή τους σε οπτικό μικροσκόπιο. Οι ιστοί που επιλέχθηκαν, πνεύμονας, νεφρό, στομάχι, έντερο, είναι ενδεικτικοί για την έκφραση του γονιδίου και παρουσιάζουν χαρακτηριστικό πρότυπο. Όπως παρατηρούμε υπάρχει πλήρης ταύτιση του προτύπου έκφρασης ανεξάρτητα από τον τρόπο ανίχνευσης. Η εξειδίκευση του αντισώματος 130A επιβεβαιώνεται και σε ιστούς χωρίς να υπάρχει καθόλου θόρυβος. Η πρωτεΐνη *Neur1* εντοπίζεται στους ιστούς και στα κύτταρα όπου εκφράζεται το γονίδιο, πράγμα που δείχνει ότι η πρωτεΐνη δεν μεταφέρεται μέσω της κυκλοφορίας. Αυτό επιβεβαιώνει την αρχική πρόβλεψη μη ύπαρξης δομικών στοιχείων που να οδηγούν σε έκκριση της πρωτεΐνης.



**Εικ. 15:** Σύγκριση του προτύπου έκφρασης με RNA *in situ* με ανοσοιστοχημική χρώση πάνω σε τομές εμβρύων. **A,Δ,Z,Θ.** Υβριδοποίηση με μόρια RNA. **B, E,H,I.** Επώαση σε αντίστοιχους ιστούς με αντίσωμα 130 A. **Γ,ΣΤ.** Επώαση χωρίς πρωτεΐον αντίσωμα για αρνητικό έλεγχο. Οι ιστοί είναι στα **A,B,Γ** πνεύμονας, **Δ,E,ΣΤ** έντερα, **Z,H** στομάχι και **Θ,I** νεφροί.

## 2. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *Neurl* ΜΕ ΤΟΥΣ 4 ΟΜΟΛΟΓΟΥΣ ΔΕΣΜΕΥΤΕΣ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ NOTCH *DELTA - LIKE 1, DELTA - LIKE 4, JAGGED 1 ΚΑΙ JAGGED 2*.

Το γονίδιο *Neurl* του ποντικού εμφανίζεται ενεργό από τα πρώτα εμβρυικά στάδια σε διάφορους ιστούς (κυρίως επιθηλιακούς), σε ποικίλα εσωτερικά όργανα, στο σκελετικό σύστημα, στο νευρικό σύστημα και σε αισθητήρια όργανα. Η συμμετοχή του δροσοφιλικού ομόλογου στο σηματοδοτικό μονοπάτι *Notch* μας ώθησε να μελετήσουμε συγκριτικά το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *Neurl* με τους δεσμευτές του σηματοδοτικού μονοπατιού. Στα θηλαστικά έχουν απομονωθεί τρία ομόλογα του δεσμευτή Delta, τα *Dll1*, *Dll3* και *Dll4*, ενώ για το δεσμευτή *Serrate* έχουν απομονωθεί δύο ομόλογα τα *Jagged 1* και *Jagged 2*.

Η σύγκριση του προτύπου έκφρασης έγινε σε έμβρυα αναπτυξιακών σταδίων από E10.5 έως E14.5. Για να παραχθούν οι κατάλληλοι ανιχνευτές για κάθε διαφορετικό δεσμευτή χρησιμοποιήθηκαν οι διαθέσιμοι κλώνοι I.M.A.G.E (<http://image.llnl.gov>) για τα γονίδια *Dll1*, *Dll4*, *Jagged 1* και *Jagged 2*. Συγκεκριμένα ο κλώνος του *Dll1* (#948947) περιείχε την αλληλουχία 1726 – 2299 bp, ο κλώνος του *Dll4* (#832357) την αλληλουχία 2992 – 3384 bp, ο κλώνος του *Jagged 1* (#1195272) την αλληλουχία 3685 - 3971 bp και ο κλώνος του *Jagged 2* (#3156268) την αλληλουχία 2504 – 2886 bp. Η πιστότητα των κλώνων στην αντίδραση της *in vitro* μεταγραφής για την δημιουργία των μορίων RNA, ελέγχθηκαν με αντίδραση αλληλούχισης των ενθεμάτων.

Οι ανιχνευτές RNA, σημασμένοι με μόρια digoxigenin, των διαφορετικών γονιδίων που παράχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα *in situ* υβριδοποίησης σε τομές του ίδιου αναπτυξιακού σταδίου για κάθε όργανο που μελετήθηκε. Η σύγκριση περιλάμβανε το νευρικό σύστημα (τμήματα του εγκεφάλου, του νωτιαίου μυελού, τα ραχιαία γάγγλια (dorsal root ganglia), αισθητήρια όργανα, αλλά και εσωτερικά όργανα.

Το γονίδιο *Dll 1* εκφράζεται στο νευροεπιθήλιο του φλοιού του προσθεγκεφάλου (εικ. 16 H), ενώ το *Dll 4* εμφανίζει έντονη έκφραση στην εγκόλπωση του χοριοειδούς πλέγματος (εικ. 16 Θ). Μετάγραφα του *Jagged 1* και *2* εντοπίζονται στο νευροεπιθήλιο του προσθεγκεφάλου με εντονότερη έκφραση στο τελικό πέταλο (εικ.

16 ΣΤ, Ζ), ενώ η έκφραση του *neuralized* είναι εντονότερη στο τοίχωμα του διεγκεφάλου (εικ. 16 Ι),. Στον οπισθεγέφαλο το γονίδιο *Dll 1* εκφράζεται κατά μήκος της κοιλιακής περιοχής (ventricular) (εικ. 16 Γ), ενώ η έκφραση του *Dll 4* στην κοιλιακή περιοχή φτάνει μέχρι τη μεθόρια αύλακα (εικ. 16 Δ). Η έκφραση του *Jagged 1* είναι έντονη στην κοιλιακή περιοχή ενώ απουσιάζει από το εδαφιαίο πέταλο (εικ. 16 Α), αντίθετα η έκφραση του *Jagged 2* είναι εντονότερη στο εδαφιαίο πέταλο (εικ. 16 Β). Η έκφραση του *Neuralized* παρατηρείται στην κοιλιακή περιοχή, αλλά και στο εδαφιαίο πέταλο (εικ. 16 Ε).

Στο νωτιαίο μυελό το *Dll 1* εκφράζεται έντονα στην κοιλιακή περιοχή (εικ. 16 Μ), ενώ το *Dll 4* εμφανίζει έντονη έκφραση στην επενδυματική στοιβάδα (εικ. 16 Ν),. Η έκφραση του *Jagged 1* παρατηρείται σε δύο εντονότερες ζώνες κάθετα στην κοιλιακή περιοχή (εικ. 16 Κ), ενώ το *Jagged 2* εμφανίζει εντονότερη έκφραση στα δύο βασικά πέταλα (εικ. 16 Λ). Το γονίδιο *neuralized* εκφράζεται στο νευροεπιθήλιο του νωτιαίου μυελού και εντονότερα κατά μήκος της επενδυματικής στοιβάδας (εικ. 16 Ξ),. Η έκφραση στα ραχιαία γάγγλια είναι έντονη και στα πέντε γονίδια που μελετήσαμε (εικ. 16 Ο, Π, Ρ, Σ, Τ).

Στον αναπτυσσόμενο οφθαλμό το γονίδιο *Dll1* εκφράζεται στην κεντρική περιοχή του αμφιβληστροειδούς χιτώνα και στα πρόσθια επιθηλιακά κύτταρα του φακού (εικ. 17 Η). Η έκφραση του γονιδίου *Dll4* απουσιάζει από τον αμφιβληστροειδή, αλλά παρουσιάζεται έντονη στα διαφοροποιημένα κρυσταλλικά κύτταρα του φακού (εικ. 17 Θ). Το γονίδιο *Jagged 1* εκφράζεται κυρίως στην ισημερινή ζώνη του φακού, όπου πραγματοποιείται η επιμήκυνση των κρυσταλλικών κυττάρων (εικ. 17 ΣΤ), ενώ το γονίδιο *Jagged 2* εκφράζεται σε μια ευρύτερη περιοχή του αμφιβληστροειδούς και στο χαρακτηριστικό κυβοειδές επιθήλιο των πρόσθιων φακικών κυττάρων (εικ. 17Ζ). Μετάγραφα του γονιδίου *Neurl* εντοπίζονται διάσπαρτα στον αμφιβληστροειδή και σε κύτταρα του φακού κατά την πορεία της διαφοροποίησής τους σε κρυσταλλικά (εικ. 17Κ).

Στο οσφρητικό επιθήλιο παρατηρούμε ότι τα γονίδια *Jagged 1* και *Dll 4* εκφράζονται στην εσωτερική πλευρά του αυλού του επιθηλίου (εικ. 17 Α, Δ), ενώ το *Dll 1* στην βασική πλευρά του επιθηλίου (εικ. 17 Γ). Τα γονίδια *Neurl* και *Jagged 2* εμφανίζουν μια ευρύτερη περιοχή έκφρασης στο οσφρητικό επιθήλιο (εικ. 17 Β, Ε). Στα σημεία ανάπτυξης των μουστακίων του ποντικού παρατηρούμε έκφραση των γονιδίων *Dll 1* και *Neurl* στη ρίζα της αναπτυσσόμενης τρίχας (dermal papilla) (εικ.

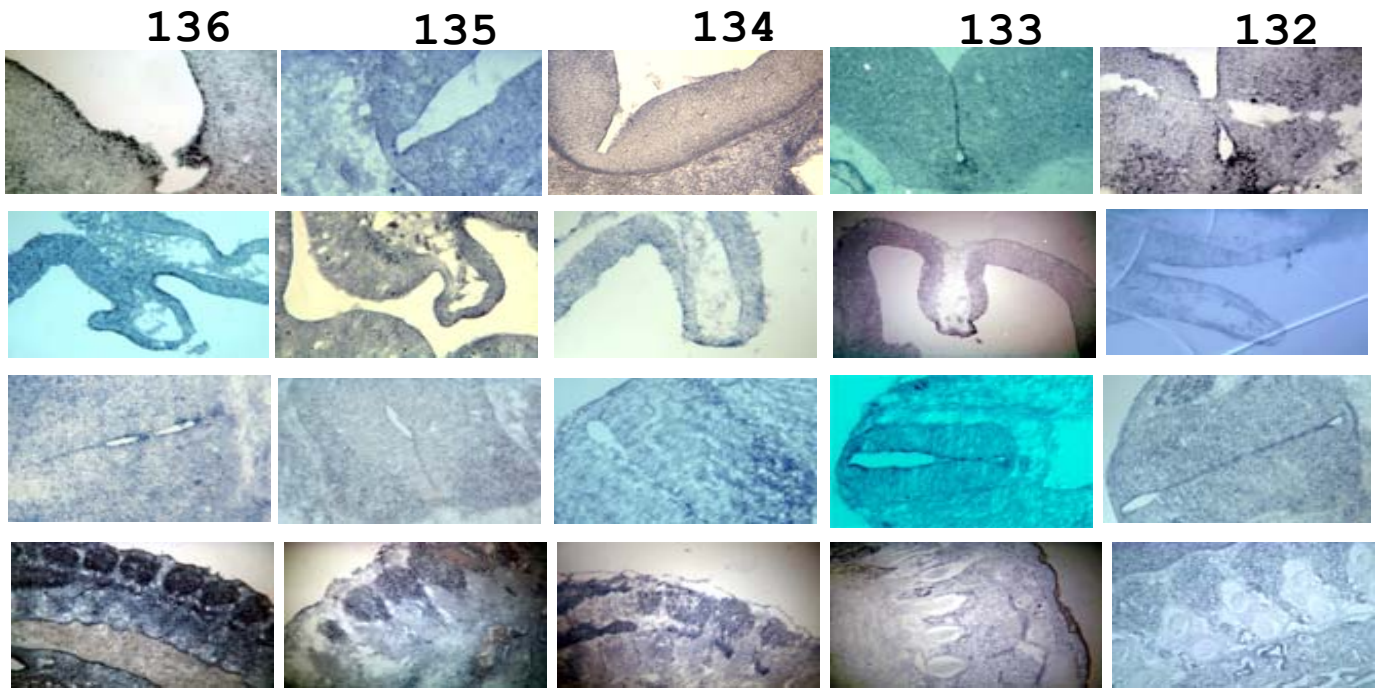
17 M, Ξ), ενώ τα γονίδια *Jagged 1* και *Jagged 2* εκφράζονται έντονα στο βλαστικό επιθήλιο του μουστακιού (εικ. 17 K, Λ).

Σε μια εγκάρσια τομή στο επίπεδο του λαιμού σε έμβρυο E14.5 παρατηρούμε έντονη έκφραση του *Jagged 1* στο ενδοθήλιο των καρωτίδων και άλλων αρτηριών και στους λοβούς του θυροειδούς, ενώ πολύ χαμηλότερη ένταση στο επιθήλιο του οισοφάγου (παρατηρείται μόνο στην βλεννογόνο στοιβάδα) και του λάρυγγα (εικ. 18 A). Το γονίδιο *Jagged 2* εκφράζεται έντονα στο επιθήλιο του οισοφάγου και του λάρυγγα και σε χαμηλότερα επίπεδα στο θυροειδή και στο ενδοθήλιο των αρτηριών (εικ. 18 B). Το γονίδιο *Dll 1* εμφανίζει έντονη έκφραση στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αρτηριών και αμυδρότερη έκφραση στο βλεννογόνο επιθήλιο του οισοφάγου και του λάρυγγα (εικ. 18 Γ). Μετάγραφα του γονιδίου *Dll 4* εντοπίζονται κυρίως στα ενδοθήλια των καρωτίδων, αλλά και σε χαμηλότερα επίπεδα στο βλεννογόνο επιθήλιο του λάρυγγα και του οισοφάγου (εικ. 18 Δ). Το γονίδιο *Neurl* εκφράζεται εντονότερα στο βλεννογόνο επιθήλιο του λάρυγγα και στον οισοφάγο, αλλά και στη μυική στοιβάδα. Έντονη έκφραση παρατηρείται στα θυλάκια των λοβών του θυροειδούς καθώς και σε ενδοθηλιακά κύτταρα των καρωτίδων (εικ. 18 E).

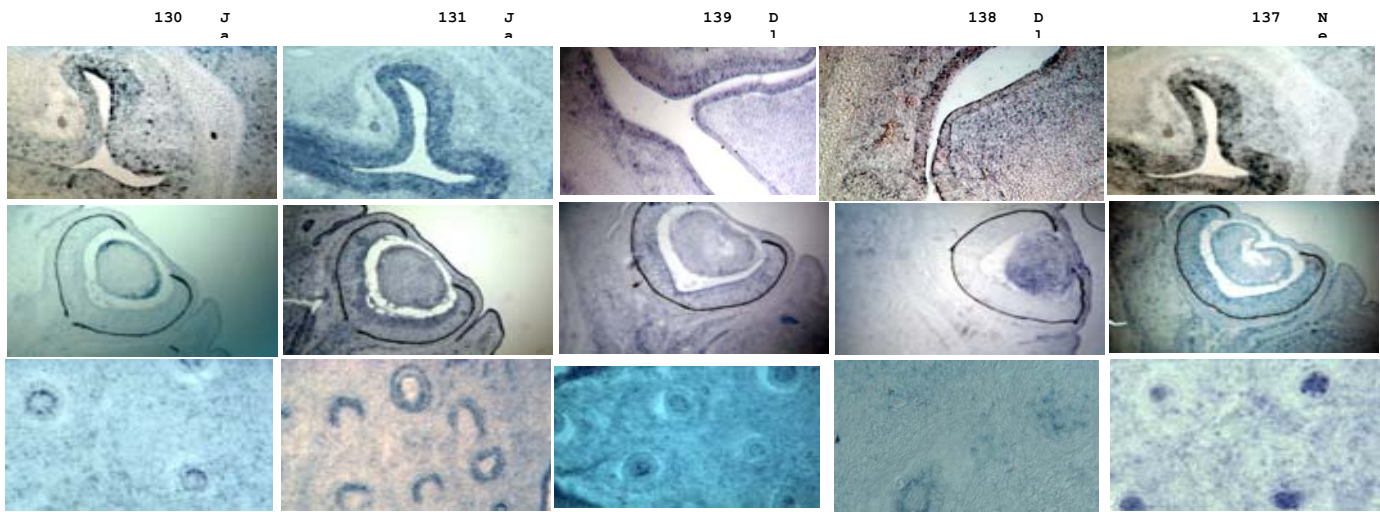
Συνεχίζοντας την παρατήρηση των εσωτερικών οργάνων βλέπουμε έκφραση του γονιδίου *Jagged 1* τόσο στο παρέγχυμα του ανατυσσόμενου πνεύμονα (E13.5) όσο και εσωτερικά στο επιθήλιο των βρόγχων και βρογχιολίων (εικ. 18 ΣΤ), ενώ το γονίδιο *Jagged 2* εκφράζεται μόνο στο επιθήλιο των βρόγχων και όχι στο παρέγχυμα (εικ. 18 Ζ). Μετάγραφα του γονιδίου *Dll 1* παρατηρούνται στο επιθήλιο των βρόγχων (εικ. 18 Η), ενώ το *Dll 4* παρατηρείται στις διακλαδώσεις της πνευμονικής αρτηρίας και σε χαμηλότερα επίπεδα στο επιθήλιο των βρόγχων (εικ. 18 Θ). Η έκφραση του *Neurl* εντοπίζεται μόνο στο επιθήλιο των βρόγχων και των βρογχιολίων (εικ. 18 Ι).

Στα νεφρά (E13.5) η έκφραση των γονιδίων *Jagged 1*, *Jagged 2* και *Neurl* είναι κοινή στα εσπειραμένα σωληνάρια και στα σπειράματα (εικ. 18 Ο, Π, Τ), ενώ το γονίδιο *Dll 1* εκφράζεται μόνο στα εσπειραμένα σωληνάρια (εικ. 18 Ρ) και το γονίδιο *Dll 4* μόνο στα σπειράματα (εικ. 18 Σ). Στο εμβρυικό στομάχι (E14.5) το γονίδιο *Neuralized* εκφράζεται έντονα στην εσωτερική στοιβάδα του βλεννογόνου επιθηλίου (εικ. 18 Ξ), όπως και το γονίδιο *Dll 4* (αλλά σε χαμηλότερα επίπεδα) (εικ. 18 Ν), ενώ το γονίδιο *Dll 1* εκφράζεται στη μυική στοιβάδα (εικ. 18 Μ). Τα γονίδια *Jagged 1* και *Jagged 2* φαίνεται να εκφράζονται σε όλο το βλεννογόνο επιθήλιο του στομάχου (εικ. 18 Κ, Λ).

Από τα παραπάνω είναι φανερό ότι παρατηρείται συνέκφραση του γονιδίου *Neurl* με κάποιον από τους δεσμευτές, ενώ σε πολλούς από τους αναπτυσσόμενους ιστούς το πρότυπο έκφρασης κάποιων δεσμευτών δεν συμπίπτει με το *Neurl*.

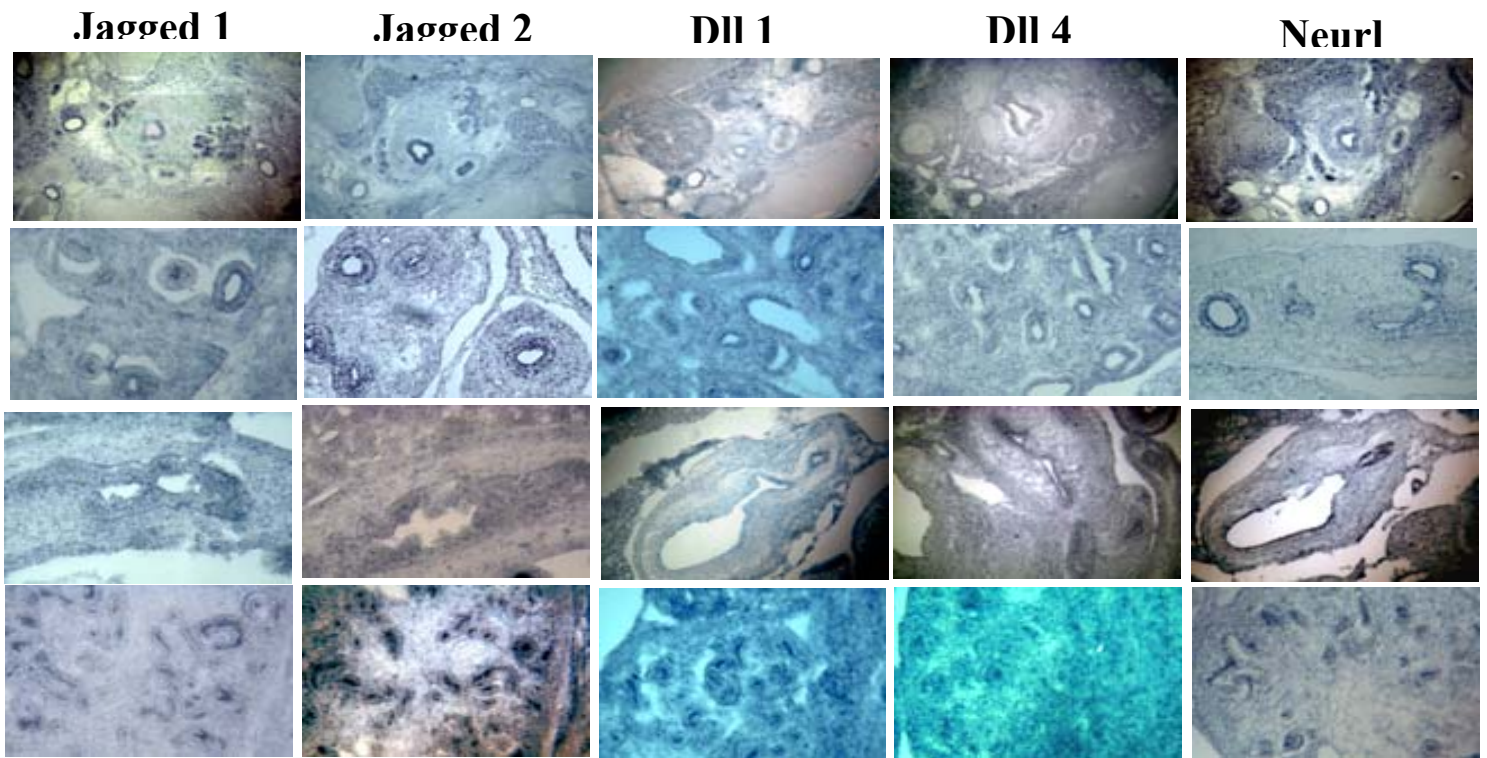


**Εικ. 16:** Σύγκριση του προτύπου έκφρασης του γονιδίου *Neurl* με τα πρότυπα έκφρασης των τεσσάρων δεσμευτών του Notch *Jagged 1*, *Jagged 2*, *Delta-like 1*, *Delta-like 4*. Α, Β, Γ, Δ, Ε. Σύγκριση του προτύπου έκφρασης σε εγκάρσια τομή οπισθεγκεφάλου εμβρύου ποντικού E11.5 fp: floor plate (εδαφιαίο πέταλο). ΣΤ, Ζ, Η, Θ, Ι. Σύνκοιση προτύπου έκφρασης σε εγκάρσια τομή προσθεγκεφάλου εμβρύου E11.5 lt: lamina terminalis



**Εικ. 17:** Σύγκριση του προτύπου έκφρασης του γονιδίου *Neurl* με τα πρότυπα έκφρασης των τεσσάρων δεσμευτών του Notch *Jagged 1*, *Jagged 2*, *Delta-like 1*, *Delta-like 4* σε αισθητήρια όργανα. Α, Β, Γ, Δ, Ε. Σύγκριση του προτύπου έκφρασης σε εγκάρσια τομή οσφρητικού επιθηλίου εμβρύου ποντικού E14.5 oe: olfactory epithelium (οσφρητικό επιθήλιο). ΣΤ, Ζ, Η, Θ, Ι. Σύγκριση προτύπου έκφρασης σε επιμήκη τομή οφθαλμού εμβρύου E14.5 r: retina (αμφιβληστροειδής) le: lens epithelium (επιθήλιο φακού) cc: crystal cells (κρυσταλλικά κύτταρα φακού). Κ, Λ, Μ, Ν, Ξ. Σύγκριση προτύπου έκφρασης σε επιμήκη τομή κεφαλιού εμβρύου E14.5, όπου φαίνονται τα εκβλαστήματα των αισθητηρίων τριχών του ποντικού ge: germinative epithelium (βλαστικό επιθήλιο), dp: dermal papilla (θηλές της δερμίδας).





**Εικ. 18:** Σύγκριση του προτύπου έκφρασης του γονιδίου *Neurl* με τα πρότυπα έκφρασης των τεσσάρων δεσμευτών του Notch *Jagged 1*, *Jagged 2*, *Delta-like 1*, *Delta-like 4*. Α, Β, Γ, Δ, Ε. Σύγκριση του προτύπου έκφρασης σε εγκάρσια τομή στο ύψος της τραχείας εμβρύου ποντικού E14.5 oe: oesophagus (οισοφάγος), la: larynx (λάρυγγας), tl: thyroid lobe (θυροειδής), ca: carotid artery (καρωτίδα). ΣΤ, Ζ, Η, Θ, Ι. Σύγκριση προτύπου έκφρασης σε επιμήκη τομή πνεύμονα εμβρύου E13.5 be: bronchial epithelium (βρογχιακό επιθήλιο), pa: pulmonary artery (πνευμονική αρτηρία). Κ, Λ, Μ, Ν, Ξ. Σύγκριση προτύπου έκφρασης σε επιμήκη τομή στομάχου εμβρύου E13.5 me: mucosa epithelium (βλεννογόνο επιθήλιο). Ο, Π, Ρ, Σ, Τ. Σύγκριση προτύπου έκφρασης σε επιμήκη τομή νεφρού εμβρύου E13.5 t: tubule (εσπειραμένο σωληνάριο), g: glomerulus (σπείραμα).

# ΣΥΖΗΤΗΣΗ

## 1. Συγκριτική μελέτη προτύπου έκφρασης

Η πρωτεΐνη *Neurl* ανήκει στην υπερικογένεια πρωτεϊνών NEUZ, μια ομάδα πρωτεϊνών με άγνωστο προς το παρόν λειτουργικό ρόλο, που χαρακτηρίζονται από την παρουσία σε ένα ή πολλαπλά αντίγραφα των ομώνυμων εσωτερικών επαναλήψεων. Το κοινό χαρακτηριστικό των ορθόλογων πρωτεϊνών *neuralized* εκτός από τις επαναλήψεις NEUZ, είναι το μοτίβο RING, το οποίο διαφοροποιεί την οικογένεια των πρωτεϊνών *Neuralized* από τις άλλες ομάδες της υπερικογένειας NEUZ. Το μοτίβο RING φαίνεται ότι ενέχεται στον σχηματισμό υπερμοριακών πρωτεϊνικών συμπλόκων και σχετίζεται με ενδοκύττωση μεμβρανικών μορίων και πρωτεόλυση τους στο λυσόσωμα ή πιθανόν, ανακύκλωση τους. Στα πλαίσια της διερεύνησης του λειτουργικού ρόλου του γονιδίου *Neurl*, προσδιορίσαμε το πρότυπο έκφρασης του κατά την εμβρυική ανάπτυξη του ποντικού συγκριτικά με αυτό των γονιδίων *Jagged1*, *Jagged2*, *Delta-like1* και *Delta-like4*, και μελετήσαμε με αντισώματα, την υποκυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης *Neurl*.

Η έκφραση του δροσοφιλικού γονιδίου *neu* συμπίπτει με τις θέσεις και τον χρόνο ενεργοποίησης του μονοπατιού διακυτταρικής σηματοδότησης Notch κατά τη διάρκεια της εμβρυικής, προνυμφικής και νυμφικής ανάπτυξης (Boulianne et al., 1991). Το *neu* εκφράζεται κατά τη νευρογένεση και στα πρόδρομα αισθητήρια όργανα της *Drosophila*. Η βιοχημική και η κυτταρική μελέτη του γονιδίου δείχνει ότι ενεργοποιεί την ενδοκύττωση του *Delta* και ακολούθως ενισχύει τη σηματοδότηση του μέσω του υποδοχέα Notch. Στα σπονδυλωτά όπως και στη δροσόφιλα, ο έλεγχος της νευρογένεσης σε σχέση με τη σηματοδότηση Notch έχει μελετηθεί εκτεταμένα και αποτελεί ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα μηχανισμού σηματοδότησης. Στο νευρικό σωλήνα οι νευρώνες παράγονται από διαιρούμενα πρόδρομα κύτταρα των οποίων τα κυτταρικά σώματα απλώνονται σε μια ζώνη πολλαπλασιασμού κοντά στον αυλό του νευρικού σωλήνα. Όταν τα πρόδρομα κύτταρα διαιρούνται, τα θυγατρικά επιλέγουν ή να παραμείνουν στην ζώνη πολλαπλασιασμού ή να διαφοροποιηθούν σε νευρώνες. Στην δεύτερη περίπτωση τα κύτταρα σταματούν να διαιρούνται και μεταναστεύουν στην ζώνη του μανδύα του νευροεπιθηλίου όπου και διαφοροποιούνται.

Το ορθόλογο γονίδιο *Neurl* του ποντικού είναι ενεργό σε πρώιμα εμβρυικά στάδια στο νευρικό ιστό, σε αισθητήρια όργανα, στο σκελετικό και μυϊκό σύστημα

και σε μια σειρά από εσωτερικά όργανα. Είναι γνωστό ότι οι παράγοντες που συμμετέχουν στο μονοπάτι Notch εμφανίζουν δυναμικά και εξειδικευμένα πρότυπα έκφρασης κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος (Beatus et al., 1998). Στο ποντίκι και οι τέσσερις Notch υποδοχείς εκφράζονται σε συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) και η έκφραση τους σχετίζεται με αδιαφοροποίητα κύτταρα του ΚΝΣ ενώ η έκφραση των δεσμευτών στο αναπτυσσόμενο ΚΝΣ είναι πιο πολύπλοκη (de la Pompa et al., 1997, del Amo et al., 1992, Lardelli et al., 1994, Lindsell et al., 1996, Reamme et al., 1992, Weinmaster et al., 1992). Ειδικότερα, από πειράματα προσδιορισμού της έκφρασης του *Delta1* (*Dll1*), συμπεραίνεται ότι υπάρχουν κοινές περιοχές έκφρασης με το γονίδιο *Neurl*. Έτσι, θεωρήσαμε χρήσιμη την συστηματική διερεύνηση του προτύπου έκφρασης των ομόλογων θηλαστικών δεσμευτών Delta/Serrate σε σύγκριση με το πρότυπο του γονιδίου *Neurl*.

Από τα συγκριτικά πειράματα ανάλυσης του προτύπου έκφρασης, το πρώτο συμπέρασμα είναι ότι η έκφραση του *Neurl* συμπίπτει με την έκφραση των δεσμευτών κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος του ποντικού, πράγμα που θα μπορούσε να ερμηνευτεί ως μια καλή ένδειξη για τη συμμετοχή του *Neurl* στο σηματοδοτικό μονοπάτι Notch των θηλαστικών. Έτσι, στον αναπτυσσόμενο προσεγέφαλο (E11.5) η έκφραση του γονιδίου *Neurl* συμπίπτει με την έκφραση των γονιδίων *Jagged 1* και *Jagged 2* τα οποία εκφράζονται στα τοιχώματα του διεγκεφάλου αλλά όμως και στο ακραίο πέταλο, απ' όπου απουσιάζουν μετάγραφα του *Neurl*. Στον οπισθεγέφαλο (E11.5) η έκφραση του *neurl* ταυτίζεται με την έκφραση και των τεσσάρων δεσμευτών κατά μήκος της κοιλιακής περιοχής (ventricular), όμως στο εδαφιαίο πέταλο όπου έχουμε έντονη έκφραση του *Neurl* υπάρχουν μετάγραφα των *Jagged 2* και *Dll 4* άλλα όχι των *Jagged 1* και *Dll 1*. Παρατηρούμε ότι η έκφραση του *Neurl* όπως και των τεσσάρων δεσμευτών σε αυτά τα στάδια είναι εντονότερη στις εσωτερικές στοιβάδες του αυλού του εγκεφάλου όπου συναντάμε αδιαφοροποίητα κύτταρα. Στο νωτιαίο μυελό το *Neurl* εκφράζεται εντονότερα κατά μήκος της επενδυματικής στοιβάδας, όπως και τα γονίδια *Jagged 1* και *Dll 4*, τα οποία όμως εντοπίζονται σε συγκεκριμένες ζώνες, ενώ τα γονίδια *Jagged 2* και *Dll 1* συμπίπτουν με χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του *Neurl* στην ευρύτερη περιοχή του νωτιαίου μυελού. Επιπλέον, στα ραχιαία γάγγλια εμβρύου E12.5, παρατηρείται έκφραση και των πέντε υπό μελέτη γονιδίων, δείχνοντας πιθανή συμμετοχή τους στην ανάπτυξη και του περιφερικού νευρικού συστήματος.

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι σε πολλά σημεία του αναπτυσσόμενου νευρικού συστήματος συμπίπτει η έκφραση του *Neurl* με κάποιων από τους τέσσερις δεσμευτές, χωρίς να υπάρχει κάποια «προτίμηση» σε έναν μόνο δεσμευτή. Παρατηρούμε επίσης ότι δύο από τους δεσμευτές (*Jagged 2* και *Dll 1*) εκφράζονται στην ζώνη του μανδύα του νωτιαίου μυελού όπου υπάρχουν διαφοροποιημένοι νευρώνες, γεγονός που δείχνει ότι τα γονίδια αυτά δεν εμπλέκονται στην νευρογένεση με τον ίδιο τρόπο με τους υπόλοιπους δεσμευτές DSL. Στον αναπτυσσόμενο οφθαλμό (E14.5) παρατηρείται έκφραση του γονιδίου *Neurl* σε μια ευρύτερη περιοχή του αμφιβληστροειδούς χιτώνα που περιλαμβάνει συγκεκριμένα σημεία έκφρασης των *Jagged 1, 2* και *Dll 1*, ενώ η έκφραση του δεν ταυτίζεται με το γονίδιο *Dll4* που βρίσκεται στα διαφοροποιημένα κύτταρα του φακού. Το εσωτερικό επιθήλιο περιέχει οσφρητικούς υποδοχείς και νευρικά πρόδρομα κύτταρα όπου και παρατηρούμε το *Neurl* να εκφράζεται σε όλο το επιθήλιο καλύπτοντας τα σημεία έκφρασης των τεσσάρων δεσμευτών.

Παρατηρώντας τα εσωτερικά όργανα βλέπουμε επίσης σε αρκετούς ιστούς η έκφραση του γονιδίου *Neurl* να είναι ευρύτερη και να περιλαμβάνει τα ειδικότερα σημεία έκφρασης των τεσσάρων δεσμευτών. Συγκεκριμένα η έκφραση του *Neurl* σε επιθηλιακά κύτταρα του νεφρού, του στομάχου και του πνεύμονα συμπίπτει σε πολλά σημεία με την έκφραση των δεσμευτών. Μεγαλύτερη ταύτιση παρατηρείται στην έκφραση του *Neurl* με τους δεσμευτές *Jagged 1* και *Dll 1* συγκρίνοντας τα αντίστοιχα εσωτερικά όργανα. Στους σωλήνες του πεπτικού συστήματος παρατηρείται έντονη έκφραση του *Neurl* και του *Jagged 1* στη βλεννογόνο και τη μυϊκή στοιβάδα καθώς επίσης και στο θυροειδή και χαμηλότερη έκφραση του *Dll 1* στα αντίστοιχα σημεία.

Είναι φανερό ότι η έκφραση του γονιδίου *Neurl* συμπίπτει σε πολλά σημεία με την έκφραση των τεσσάρων δεσμευτών του Notch. Η σύγκριση ξεκίνησε από το νευρικό σύστημα, επικεντρώνοντας την προσοχή σε μερικά χαρακτηριστικά σημεία, όπως είναι ο προσθεγέφαλος, ο οπισθεγέφαλος και ο νωτιαίος μυελός. Για να συμπεράνουμε με μεγαλύτερη ακρίβεια αν υπάρχει συνέκφραση των εν λόγω γονιδίων σε κυτταρικό επίπεδο, πρέπει να μελετηθούν συστηματικά και λεπτομερώς διαδοχικά στάδια ανάπτυξης ώστε να προσδιορισθεί και ποσοτικά το συγκριτικό πρότυπο έκφρασης των γονιδίων. Σημαντική πληροφορία θα προκύψει από τη διπλή υβριδοποίηση πάνω στην ίδια τομή με το αντίσωμα του *Neurl* και τους ανιχνευτές RNA των αντίστοιχων γονιδίων.

Η έκφραση του γονιδίου *Neurl* σε πολλαπλούς ιστούς και σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια κάνει δύσκολη την απόδοση σε αυτό μιας συγκεκριμένης λειτουργίας. Όπως έδειξαν πειράματα καταστροφής των παραπάνω γονιδίων, οι τέσσερις δεσμευτές που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση, φαίνεται να εμπλέκονται σε κάποια αναπτυξιακή διαδικασία όπως π.χ το *Dll 1* στη νευρογένεση και τη σωμιτογένεση (Bettenhausen, 1995), το *Dll 4* στην ανάπτυξη ενδοθηλιακών ιστών (Shutter, 2000), το *Jagged 1* στην ανάπτυξη του καρδιαγγειακού συστήματος (Xue, 1999) και το *Jagged 2* στην ανάπτυξη του σκελετού και των άκρων (Jiang, 1998). Πρόσφατη μελέτη όπου πραγματοποιήθηκε καταστροφή του γονιδίου *Neurl* σε ποντίκια έδειξε ότι επηρεάζονται διαδικασίες όπως η όσφρηση και ο συντονισμός των κινητήριων νευρώνων (Ruan, 2001). Η έκφραση του γονιδίου είναι έντονη στα αντίστοιχα σημεία του εγκεφάλου, αλλά μετάγραφα του παρατηρούνται και σε πολλά άλλα σημεία του αναπτυσσόμενου εμβρύου, τα οποία φαίνεται να μην επηρεάζονται από την καταστροφή του γονιδίου. Η πιθανότητα ύπαρξης ενός δεύτερου γονιδίου *Neurl* στο γονιδίωμα του ποντικού που λειτουργεί συμπληρωματικά με το πρώτο θα μπορούσε να δώσει μια εξήγηση για τον συγκεκριμένο φαινότυπο. Αυτή όμως η υπόθεση ύπαρξης δεύτερου γονιδίου *Neurl* δεν φαίνεται να ευσταθεί, όπως έδειξαν δικά μας πειράματα ανάλυσης κατά Southern και *in silico* ανάλυσης όλων των διαθέσιμων γενωμικών και cDNA αλληλουχιών του ανθρώπου και του ποντικού (Pavlopoulos et al., 2001). Ενδεχομένως, ο πλεονασμός στον βιολογικό ρόλο του *Neurl* να προέρχεται από την λειτουργία άλλων γονιδίων που δρουν συμπληρωματικά του *Neurl* και περιέχουν, π.χ. NEUZ επαναλήψεις ή/και μοτίβα RING. Βιοχημικές και γενετικές μελέτες είναι απαραίτητες για να αποδειχθεί εάν υπάρχει άμεση ή έμμεση αλληλεπίδραση του *Neurl* με τους εν λόγω δεσμευτές. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα είχε η υποκυτταρική ανίχνευση των τεσσάρων δεσμευτών και του *Neurl* στους διάφορους ιστούς που συνεκφράζονται καθώς και σε ποντίκια όπου έχει καταστραφεί το ενδογενές *Neurl*. Πάντως, άμεση ή ισχυρή αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης *Neurl* με ένα ή περισσότερους από τους δεσμευτές του Notch, δεν φαίνεται πολύ πιθανή, όπως έδειξαν πειράματα «δύο υβριδίων», διερεύνησης της αλληλεπίδρασης του *Neurl* με άλλες πρωτεΐνες (Κοκκινάκη, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

## 2. Υποκυτταρικός εντοπισμός

Προηγούμενη εργασία μας με πειράματα παροδικής διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων που εκφράζουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη *Neurl*/GFP έδειξε ότι η εξωγενής πρωτεΐνη εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, σε χαρακτηριστικές στικτές δομές που μοιάζουν με κυστίδια. Η ανάλυση του υποκυτταρικού εντοπισμού της ενδογενούς πρωτεΐνης με αντισώματα, επαλήθευσε την παρουσία της μέσα στο κυτταρόπλασμα σε αντίστοιχες στικτές δομές και την απουσία της από τον πυρήνα, γεγονός που επιβεβαιώνει τον αρχικό προσδιορισμό της τοπογραφίας της πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο και υποδηλώνει ότι η ύπαρξη της GFP στα χιμαιρικά ανασυνδυασμένα μόρια δεν επηρεάζει τον εντοπισμό της. Ο χαρακτηρισμός των κυστιδίων που παρατηρούνται με τη χρήση κατάλληλων κυτταρικών μαρτύρων αποτελεί μια σημαντική πληροφορία για την κατανόηση της λειτουργίας της πρωτεΐνης.

Ένα ποσοστό της ενδογενούς πρωτεΐνης παρατηρείται κοντά στην πλασματική μεμβράνη. Με βιοχημικά πειράματα σε ευκαρυωτικές κυτταρικές σειρές αποδείχτηκε η συσχέτιση της πρωτεΐνης με μεμβράνες (Παυλόπουλος, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Αυτό το αποτέλεσμα είναι επίσης σε συμφωνία με την προκαταρκτική παρατήρησή μας στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, της πρωτεΐνης *neuralized* της *Drosophila* στην εσωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης (Παυλόπουλος, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Η ανίχνευση της ενδογενούς πρωτεΐνης με τη χρήση των αντισωμάτων σε ευκαρυωτικά κύτταρα και η παρατήρησή τους σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι δυνατό να επιβεβαιώσει την συσχέτιση της πρωτεΐνης με την εσωτερική πλευρά των κυτταρικών μεμβρανών είτε πρόκειται για κυστίδια, είτε για την πλασματική μεμβράνη του κυττάρου.

Συμπερασματικά, παρατηρήσαμε ότι το γονίδιο *Neurl* του ποντικού συνεκφράζεται σε αρκετούς ιστούς και κυτταρικές στοιβάδες με κάποιον από τους ορθόλογους δεσμευτές *Delta/Serrate* των θηλαστικών, αλλά και απουσιάζει από άλλα σημεία έκφρασης των δεσμευτών. Οι πέντε δεσμευτές που συναντώνται στα θηλαστικά επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες και εκφράζονται σε διαφορετικούς ιστούς, αλληλεπιδρώντας με ένα ή περισσότερους από τους υποδοχείς *Notch*. Με αυτό τον τρόπο παρατηρείται εξειδίκευση του σηματοδοτικού μονοπατιού στις διάφορες αναπτυξιακές διεργασίες των θηλαστικών και επιτυγχάνεται ρύθμιση της σηματοδότησης σε πολλαπλά επίπεδα. Σε ένα από αυτά τα επίπεδα είναι δυνατό να λειτουργεί και το γονίδιο *Neurl*, το οποίο ενδέχεται να ρυθμίζει μετα-μεταφραστικά έναν ή περισσότερους από τους δεσμευτές στους κυτταρικούς πλυθτισμούς που αυτοί εμφανίζονται ενεργοί.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., Fortini, M.** (1995). Notch signaling. *Science* **268**, 225-232.
2. **Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., Lake, R.J.** (1999). Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science* **284**, 770-776.
3. **Banfi, S., Borsani, G., Rossi, E., Bernard, L., Guffanti, A., Rubboli, F., Martchitiello, A., Giglio, S., Coluccia, E., Zollo, M., Zuffardi, O., Ballabio, A.** (1996). Identification and mapping of human cDNAs homologous to *Drosophila* mutant genes through EST database searching. *Nature Genetics* **6**, 1745-1753.
4. **Beatus, P., Lendahl, U.** (1998). Notch and Neurogenesis. *Journal of Neuroscience Research* **54**, 125-136.
5. **Beckers, J., Clark, A., Wunsch, K., Hrabe De Angelis, M., Gossler, A.** (1999). Expression of the mouse Delta 1 gene during organogenesis and fetal development. *Mechanisms of Development* **84**, 165-168.
6. **Bettenhausen, B., Hrabe de Angelis, M., Simon, D., Guenet, J.L., Gossler, A.** (1995). Transient and restricted expression of *Dll1*, a murine gene closely related to *Drosophila Delta*. *Development* **121**, 2407-2418.
7. **Bluamueler, C. M., Qi, H., Zagouras, P., Artavanis-Tsakonas, S.,** (1997). Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* **90**, 271-280.
8. **Borden, K. L.** (2000). RING domains:master builders of molecular scaffolds? *J. Mol.Biol.* **295**, 1103-1112.
9. **Boulianne, G. L., de la Concha, A., Campos-Ortega, J.A., Jan, L.Y., Jan, Y.N.** (1991). The *Drosophila* neurogenic gene *neuralized* encodes a novel protein and is expressed in precursors of larval and adult neurons. *EMBO J.* **10**, 2975-2983.
10. **Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, A., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Black, R.A., Israel, A.** (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol.Cell* **5**, 207-216.
11. **Bulman, M. P., Kusumi, K., Frayling, T.M., McKeown, C., Garrett, C., Lander, E.S., Krumlauf, R., Hattersley, A.T., Ellard, S., Turnpenny,**

- P.D.** (2000). Mutations in the human *Delta* homologue, *DLL3*, cause axial skeletal defects in spondylocostal dysostosis. *Nature Genetics* **24**, 438-441.
12. **Chan, Y. M., Jan, Y.N.** (1998). Roles of proteolysis and trafficking in the Notch maturation and signal transduction. *Cell* **94**, 423-426.
  13. **Chan, Y. M., Jan, Y.N.** (1999). Conservation of neurogenic genes and mechanisms. *Current Opinion in Neurobiology* **9**, 582-588.
  14. **de la Concha, A., Dietrich, U., Weigel, D., Campos-Ortega, J.A.** (1988). Functional interactions of neurogenic genes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **118**, 499-508.
  15. **de la Pompa, J. S., Wakeham, A., Correia, K.M., Samper, E., Brown, S., Aguilera, R.J., Nakano, T., Honjo, T., Mak, T. W., Rossant, J., Conlon, R.A.** (1997). Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development* **124**, 1139-1148.
  16. **Dunwoodie, S. L., Henrique, D., Harrison, S.M., Bendington.** (1997). Mouse *Dll3*: A novel divergent *Delta* gene which may complement the function of other *Delta* homologues during early pattern formation in the mouse embryo. *Development* **124**, 3065-3076.
  17. **Fehon, R. G., Kooh, P.J., Rebay, I., Regan, C.L., Xu, Tian, Muskavitch, M.A.T., Artavanis-Tsakonas, S.** (1990). Molecular Interactions between the Protein Products of the Neurogenic Loci *Notch* and *Delta*, Two EGF-Homologous Genes in *Drosophila*. *Cell* **61**, 523-534.
  18. **Fleming, R.** (1998). Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Cell and Developmental Biology* **9**, 599-607.
  19. **Fleming, R. J., Purcell, K., Artavanis-Tsakonas, S.** (1997). The NOTCH receptor and its ligands. *trends in Cell Biology* **7**, 437-441.
  20. **Greenwald, I.** (1994). Structure/function studies of lin-12/Notch proteins. *Current Opinion in Genetics & Development* **4**, 556-562.
  21. **Hicke, L.** (1999). Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *trends in Cell Biology* **9**, 107-112.
  22. **Ingham, P. W.** (1988). The molecular genetics of embryonic pattern formation in *Drosophila*. *Nature* **335**, 25-34.
  23. **Jackson, P. K., Eldridge, A.G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J.Y., Kaiser, B.K., Reinmann, J.D.R.** (2000). The lore of the RINGs: substrate



recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *trends in Cell Biology* **10**, 429-439.

24. **Jacobsen, T. L., Brennan, K., Arias, A.M., Muskavitch, M.A.T.** (1998). Cis-interactions between Delta and Notch modulate neurogenic signalling in *Drosophila*. *Development* **125**, 4531-4540.
25. **Jiang, R., Lan, Y., Chapman, H.D., Shawber, C., Norton, C.R., Serreze, D.V., Weinmaster, G., Gridley, T.** (1998). Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged 2 mutant mice. *GENES & DEVELOPMENT* **12**, 1046-1057.
26. **Joazeiro, C., Weissman, A.M.** (2000). RING Finger Proteins: Mediators of ubiquitin Ligase Activity. *Cell* **102**, 549-552.
27. **Joazeiro, C., Wing, S., Huang, H.K., Levenson, J., Hunter, T., Liu, Y.C.** (1999). The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* **286**.
28. **Joutel, A., Tournier-Lasserre, E.** (1998). Notch signalling pathway and human diseases. *seminars in CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY* **9**, 619-625.
29. **Klug, K. M., Parody, T.R., Muskavitch, M.A.T.** (1998). Complex Proteolytic Processing Acts on Delta, a Transmembrane Ligand for Notch, during *Drosophila* Development. *Molecular Biology of the Cell* **9**, 1709-1723.
30. **Kooh, P. J., Fehon, R.G., Muskavitch, M.A.T.** (1993). Implications of dynamic patterns of Delta and Notch expression for cellular interactions during *Drosophila* development. *Development* **117**, 493-507.
31. **Kopan, R., Cagan, R.** (1997). Notch on the cutting edge. *Trends in Genetics* **13**, 465-467.
32. **Kopan, R., Schroeter, E.H., Weintraub, H., Nye, J.S. Turner, D.L.** (1996a). Signal transduction by activated mNotch: Importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain. *PNAS* **93**, 1683-1688.
33. **Kopan, R., Turner, D.L.** (1996b). The Notch pathway: democracy and aristocracy in the selection of cell fate. *Current Opinion in Neurobiology* **6**, 594-601.

34. **Kusumi, K., Dunwoodie, S.L., Krumlauf, R.** (2001). Dynamic expression patterns of the pudgy/spondylocostal dysostosis gene *Dll3* in the developing nervous system. *Mechanisms of Development* **100**, 141-144.
35. **Kusumi, K., Sun, E.S., Kerrebrock, A.W., Bronson, R.T., Chi, D-C., Bulotsky, M.S., Spencer, J.B., Birren, B.W., Frankel, W.N., Lander, E.S.** (1998). The mouse pudgy mutation disrupts *Delta* homologue *Dll3* and initiation of early somites boundaries. *Nature Genetics* **19**, 274-278.
36. **Lai, E. C., Rubin, G.M.** (2001a). *neuralized* functions cell-autonomously to regulate a subset of Notch-dependent processes during adult *Drosophila* development. *Dev. Biol.* **231**, 217-233.
37. **Lai, E. C., Rubin, G.M.** (2001b). *neuralized* is essential for a subset of Notch pathway-dependent cell fate decisions during *Drosophila* eye development. *PNAS* **98**, 5637-5642.
38. **Lawrence, P. A.** (1992). The making of a fly: Blackwell.
39. **Lehmann, R., Jimenez, F., Dietrich, U., Campos-Ortega, J.** (1983). On the phenotype and development of mutants of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **192**, 62-74.
40. **Lewis, J.** (1998). Notch signaling and the control of cell fate choices in vertebrates. *seminars in CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY* **9**, 583-589.
41. **Lieber, T., Kidd, S., Alcamo, E., Corbin, V., Young, M.W.** (1993). Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for Notch in nuclei. *GENES & DEVELOPMENT* **7**, 1949-1965.
42. **Lindsell, C. E., Shawber, C.J., Boulter, J., Weinmaster, G.** (1995). Jagged: A mammalian ligand that activates Notch1. *Cell* **80**, 909-917.
43. **Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N.G., Israel, A.** (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *PNAS* **95**, 8108-8112.
44. **Loomes, K. M., Underkoffler, L.A., Morabito, J., Gottlieb, S., Piccoli, D.A., Spinner, N.B., Baldwin, H.S., Oakey, R.J.** (1999). The expression of *Jagged 1* in the developing mammalian heart correlates with cardiovascular disease in Alagille syndrome. *Human Molecular Genetics* **8**, 2443-2449.

45. **Lorick, K. L., Jensen, J.P., Fang, S., Ong, A., Hatakeyama, S., Weissman, A.** (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *PNAS* **96**, 11364-11369.
46. **Luo, B., Aster, J.C., Hasserjian, R.P., Kuo, F., Sklar, J.** (1997). Isolation and functional analysis of a cDNA for Human *Jagged2*, a gene encoding a ligand for the Notch1 receptor. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 6057-6067.
47. **Mitsiadis, T., Henrique, D., Thesleff, I., Lendahl, U.** (1997). Mouse *Serrate-1* (*Jagged-1*): Expression in the developing tooth is regulated by epithelial-mesenchymal interactions and fibroblasts growth factor-4. *Development* **124**, 1473-1483.
48. **Mitsiadis, T., Lardelli, M., Thesleff, I., Lendahl, U.** (1995). Expression of Notch 1, 2, and 3 is regulated by epithelial-mesenchymal interactions and retinoic acid in the developing mouse tooth and associated with determination of ameloblast cell fate. *J. Cell Biol.* **130**, 407-418.
49. **Mumm, J. S., Kopan, R.** (2000). Notch Signaling: From the outside in. *Developmental Biology* **228**, 151-165.
50. **Muskavitch, M. A. T.** (1994). Delta-Notch Signaling and Drosophila Cell Fate Choice. *Developmental Biology* **166**, 415-430.
51. **Myat, A., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., Lewis, J.** (1996). A Chick Homologue of *Serrate* and Its Relationship with *Notch* and *Delta* Homologues during Central Neurogenesis. *Developmental Biology* **174**, 233-247.
52. **Nakamura, H., Yoshida, M., Tsuiki, H., Ito, K., Ueno, M., Nakao, M., Oka, K., Tada, M., Kochi, M., Kuratsu, J., Ushio, Y., Saya, H.** (1998). Identification of a human homolog of the *Drosophila neuralized* gene within the 10q25.1 malignant astrocytoma deletion region. *Oncogene* **16**.
53. **Nye, J. S., Kopan, R.** (1995). Vertebrate ligands for Notch. *Current Biology* **5**, 966-969.
54. **Parks, A. L., Klueg, K.M., Stout, J.R., Muskavitch, M.A.T.** (2000). Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* **127**, 1373-1385.
55. **Pavlopoulos, E., Kokkinaki, M., Koutelou, E., Mitsiadis, T., Prinos, P., Delidakis, C., Kilpatrick, M.W., Tsipouras, P., Moschonas, N.** (2001a). Cloning, chromosomal organization and expression analysis of *Neurl*, the

mouse homologue of *Drosophila melanogaster* *neuralized* gene. *BBA Gene structure and Expression* (in press).

56. **Pavlopoulos, E., Pitsouli, C., Klueg, K., Muskavitch, M.A.T., Moschonas, N., Delidakis, C.** (2001b). *neuralised* encodes a peripheral membrane protein involved in Delta signalling and endocytosis. *Developmental Cell* (submitted).
57. **Post, L., Ternet, M., Hogan, B.L.M.** (2000). Notch/Delta expression in the developing mouse lung. *Mechanisms of Development* **98**, 95-98.
58. **Price, B. D., Chang, Z., Smith, R., Bockheim, S., Laughon, A.** (1993). The *Drosophila* *neuralized* gene encodes a C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> zinc finger. *Dev. Biol.* **12**, 2411-2418.
59. **Qi, H., Rand, M.D., Wu, X., Sestan, N., Wang, W., Rakic, P., Xu, T., Artavanis-Tsakonas, S.** (1999). Processing of the Notch Ligand Delta by the Metalloprotease Kuzbanian. *Science* **283**, 91-94.
60. **Rao, P. K., Dorsch, M., Chickering, T., Zheng, G., Jiang, C., Goodearl, A., Kadesch, T., McCarthy, S.** (2000). Isolation and characterization of the Notch Ligand Delta4. *Experimental Cell Research* **260**, 379-386.
61. **Ray, W. J., Yao, M., Nowotny, P., Mumm, J., Zhang, W., Wu, J.Y., Kopan, R., Goate, A.M.** (1999). Evidence for a physical interaction between presenilin and Notch. *PNAS* **96**, 3263-3268.
62. **Rebay, I., Fehon, R.G., Artavanis-Tsakonas, S.** (1993). Specific truncations of *Drosophila* Notch define dominant activated and dominant negative forms of the receptor. *Cell* **74**, 319-329.
63. **Ruan, Y., Tecott, L., Jiang, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N.** (2001). Ethanol hypersensitivity and olfactory discrimination defect in mice lacking a homolog of *Drosophila* *neuralized*. *PNAS* **98**, 9907-9912.
64. **Sambrook, J., Maniatis, F.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*: Cold Spring Harbor, New York.
65. **Shawber, C., Boulter, J., Lindsell, C.E., Weinmaster, G.** (1996). Jagged 2: A Serrate-like gene expressed during rat embryogenesis. *Dev. Biol.* **180**, 370-376.
66. **Shutter, J. R., Scully, S., Fan, W., Richards, W., Kitajewski, J., Deblandre, G. A., Kintner, C. R., Stark, K. L.** (2000). *Dll4*, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *GENES & DEVELOPMENT* **14**, 1313-1318.

67. **Simpson, P.** (1997). Notch signalling in development: on equivalence groups and asymmetric developmental potential. *Current Opinion in Genetics & Development* **7**, 537-542.
68. **Struhl, G., Adachi, A.** (2000). Requirements for presenilin-dependent cleavage of Notch and other transmembrane proteins. *Mol. Cell* **6**, 625-636.
69. **Struhl, G., Greenwald, I.** (1999). Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* **398**, 522-525.
70. **Struhl, G., Greenwald, I.** (2001). Presenilin-mediated transmembrane cleavage is required for Notch signal transduction in *Drosophila*. *PNAS* **98**, 229-234.
71. **Valsecchi, V., Ghezzi, C., Ballabio, A., Rugarli, E.I.** (1997). Jagged 2: a putative Notch ligand expressed in the apical ectodermal and in sites of epithelial-mesenchymal interactions. *Mechanisms of Development* **69**, 203-207.
72. **Weinmaster, G.** (1997). The Ins and Outs of Notch Signaling. *Molecular and Cellular Neuroscience* **9**, 91-102.
73. **Weinmaster, G.** (1998). Notch signalling: direct or what? *Current Opinion in Genetics & Development* **8**, 436-442.
74. **Weinmaster, G.** (2000). Notch signal transduction: a real Rip and more. *Current Opinion in Genetics & Development* **10**, 363-369.
75. **Wilson, R., et al.** (1994). 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C.elegans*. *Nature* **368**, 32-38.
76. **Xue, Y., Gao, X., Lindsell, C.E., Norton, C.R., Chang, B., Hicks, C., Gendron-Maguire, M., Rand, E.B., Weinmaster, G., Gridley, T.** (1999). Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged 1. *Human Molecular Genetics* **8**, 723-730.
77. **Ye, Y., Fortini, M.E.** (2000). Proteolysis and developmental signal transduction. *Sem. Cell.Dev. Biol.* **11**, 211-221.
78. **Yeh, E., Zhou, L., Rudzik, N., Boulianne, G.L.** (2000). Neuralized functions cell autonomously to regulate *Drosophila* sense organ development. *EMBO J.* **19**, 4827-4837.