

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ – ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**&**

**ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ STOWERS**

**Διδακτορική Διατριβή**

**«Ο ρόλος της πρωτεΐνης Neuralized του ποντικού ως E3 λυγάζης  
ουβικουιτίνης στη ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch»**

**ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΚΟΥΤΕΛΟΥ**

**Ηράκλειο, Δεκέμβριος 2006**

**UNIVERSITY OF CRETE – SCHOOL OF SCIENCES AND  
ENGINEERING**

**DEPARTMENT OF BIOLOGY**

**&**

**STOWERS INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH**

**Ph.D Thesis**

**“The role of mouse Neuralized protein as an E3 ubiquitin  
ligase in Notch signaling pathway”**

**Evangelia Koutelou**

**Heraklio, December 2006**

### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

Ν. Κ. Μοσχονάς (Καθηγητής, Παν/μιο Πάτρας, Ιατρική Σχολή) (Υπεύθυνος Διατριβής)

Χ. Δελιδάκης (Αν. Καθηγητής) (Επιβλέπων Διατριβής)

Δ. Καραγωγέως (Αν. Καθηγήτρια, Παν/μιο Κρήτης, Ιατρική Σχολή)

### **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

Ν. Κ. Μοσχονάς (Καθηγητής, Παν/μιο Πάτρας, Ιατρική Σχολή)

Χ. Δελιδάκης (Αν. Καθηγητής)

Δ. Καραγωγέως (Αν. Καθηγήτρια, Παν/μιο Κρήτης, Ιατρική Σχολή)

Ι. Παπαματθαϊάκης (Καθηγητής)

Χ. Στουρνάρας (Καθηγητής, Παν/μιο Κρήτης, Ιατρική Σχολή)

Γ. Χαλεπάκης (Αν. Καθηγητής)

Δ. Καρδάσης (Επικ. Καθηγητής, Παν/μιο Κρήτης, Ιατρική Σχολή)

### **Όγδοο Μέλος**

J. W. Conaway (Καθηγήτρια, Παν/μιο Κάνσας, Ιατρική Σχολή-University of Kansas School of Medicine)

**Στη μητέρα μου**

**«Μπορούμε να γίνουμε η αλλαγή που θέλουμε να δούμε»**

**Μ. Γκάντι**

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	<b>vi</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>1</b>
Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch ρυθμίζει αποφάσεις μοίρας μεταξύ γειτονικών κυττάρων	1
Τα μόρια πρωταγωνιστές του σηματοδοτικού μονοπατιού	4
Ρύθμιση της σηματοδότησης μέσω ενδοκύττωσης	7
Ρύθμιση της μεταφοράς διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο από την ουβικουιτίνη	11
Ενδοκύττωση και ρύθμιση του μονοπατιού Notch	14
Ο ρόλος της ουβικουιτινιλίωσης στο σηματοδοτικό μονοπάτι Notch	19
Τα γονίδια <i>neur</i> και <i>mib1</i> της δροσόφιλα	22
Τα γονίδια <i>Neurl</i> και <i>Mind bomb</i> του ποντικού	24
Σκοπός της παρούσας διατριβής	30
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>32</b>
<b>DNA</b>	<b>32</b>
Κλωνοποίηση τεμαχίων DNA σε πλασμίδια	32
Βακτηριακά στελέχη	32
Τεμαχισμός μορίων DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού	33
Απομόνωση θραύσματος DNA από πήκτωμα αγαρόζης	33
Κατασκευή τυφλών άκρων σε γραμμικά μόρια DNA με προεξέχοντα 5' άκρα	33
Σύνδεση γραμμικών μορίων DNA (ligation)	33
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	34
Τεχνολογία κλωνοποίησης με τοπο-ισομεράση (TOPO TA cloning)	35
Εισαγωγή σχεδιασμένων μεταλλάξεων ( <i>in vitro</i> mutagenesis)	36
Μετασχηματισμός βακτηρίων με τη μέθοδο του θερμικού σοκ	37
Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων βακτηριακών κλώνων	38

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια	38
Ποσοτικοποίηση DNA με φασματοφωτομέτρηση	38
Αυτοματοποιημένη διαδικασία προσδιορισμού νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με PCR	38
<b>RNA</b>	<b>39</b>
<b>Πειράματα υβριδοποίησης <i>in situ</i> σε ολόκληρα έμβρυα ποντικού</b>	<b>39</b>
Προετοιμασία ανιχνευτή mRNA με αντίδραση μεταγραφής <i>in vitro</i>	39
Μονιμοποίηση και επεξεργασία των εμβρύων	40
Υβριδοποίηση του ανιχνευτή RNA με το mRNA-στόχο	40
Επόωση με το αντίσωμα anti-DIG-AP	41
Αντίδραση αποκάλυψης	41
<b>ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ</b>	<b>42</b>
<b>Ανάλυση και ανίχνευση πρωτεϊνών</b>	<b>42</b>
Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός πρωτεϊνικού εκχυλίσματος	42
Χρώση πρωτεϊνών με Coomassie brilliant blue R	43
Χρώση πρωτεϊνών με νιτρικό άργυρο	43
Ανάλυση ‘Western blot’	43
Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών μονιμοποιημένων σε μεμβράνες	43
Συν-ανοσοκατακρήμνιση (co-immunoprecipitation)	44
Υπολογισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης	45
<b>Συστήματα υπερέκφρασης πρωτεϊνών</b>	<b>45</b>
<i>Βακτήρια</i>	45
Βακτηριακά στελέχη	46
Θρεπτικά μέσα	46
Πλασμιδιακές κατασκευές σε φορείς pGEX και pET	46
Έκφραση πρωτεΐνης σε βακτήρια με επαγωγή	46
Καθαρισμός της υπερέκφρασμένης πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας	
Πέψη με θρομβίνη	48
<i>Κύτταρα εντόμων</i>	48
Θρεπτικά μέσα	49

Πλασμιδιακές κατασκευές σε φορέα pBacPAK8	49
Παραγωγή του ανασυνδυσμένου ιού με συν – διαμόλυνση	50
Πολλαπλασιασμός του ανασυνδυσμένου ιού	51
Έκφραση και καθαρισμός της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης	51
<i>Κύτταρα θηλαστικών</i>	52
Κυτταρικές σειρές	52
Θρεπτικά μέσα	53
Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών με πλασμιδιακές κατασκευές	53
Μεταγωγή DNA σε κυτταρικές σειρές μετά από μόλυνση με ρετρο-ιούς	56
Ανίχνευση πρωτεΐνης σε κύτταρα θηλαστικών με <i>in situ</i> ανοσοφθορισμό	57
Απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών	59
<b>Δοκιμές ουβικουιτινιλίωσης <i>in vitro</i></b>	<b>59</b>
<b>Σύστημα δύο υβριδίων σακχαρομύκητα</b>	<b>60</b>
Στέλεχος <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PJ69-4a	60
Θρεπτικά μέσα	60
Πλασμιδιακές κατασκευές σε φορείς pGBT9 και pVP16	61
Μετασχηματισμός κυττάρων σακχαρομύκητα του στελέχους PJ69-4a και επιλογή των ανασυνδυσμένων αποικιών	61
Πειράματα αρνητικού ελέγχου	63
<b>Φασματοσκοπία Μάζας (Multi – Dimensional Protein Identification Technology)</b>	<b>63</b>
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>68</b>
<b>Η βιοχημική δράση της πρωτεΐνης Neu1 του ποντικού</b>	<b>68</b>
Η πρωτεΐνη Neu1 εμφανίζει ενεργότητα E3 λιγάσης ουβικουιτίνης <i>in vitro</i>	68
Η πρωτεΐνη Neu1 εμφανίζει ειδικότητα για το ένζυμο σύνδεσης ουβικουιτίνης UbcH5	71
Η πρωτεΐνη Neu1 αυτο-ουβικουιτινιλιώνεται <i>in vitro</i> και η δράση της ως E3 λιγάση	



ουβικουιτίνης εξαρτάται από τη δομική ακεραιότητα της περιοχής RING	72
Η πρωτεΐνη Neurl αλληλεπιδρά με την ενδοκυττάρια περιοχή του δεσμευτή JAG1 και την μονο-ουβικουιτινιλιώνει <i>in vitro</i>	75
<b>Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης Neurl</b>	<b>80</b>
Δημιουργία κυτταρικών σειρών που εκφράζουν σταθερά τις πρωτεΐνες Neurl και Mind Bomb του ποντικού	80
Ταυτοποίηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με F-Neurl και Neurl-F που εκφράζονται σταθερά σε κύτταρα HeLa με φασματοσκοπία μάζας (MudPIT)	83
Ταυτοποίηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με F-Neurl και Neurl-F που εκφράζονται σταθερά σε κύτταρα HEK293 FRT με φασματοσκοπία μάζας (MudPIT)	85
Δημιουργία κυτταρικών σειρών που εκφράζουν σταθερά τους δεσμευτές του Notch, Delta-like 1,3,4 και Jagged 1,2 του ποντικού	89
Υπερέκφραση του Neurl σε κυτταρική σειρά L (L cells) που εκφράζει σταθερά τους δεσμευτές JAG1 και JAG2 έχει σαν αποτέλεσμα σημαντική μείωση των επιπέδων των δεσμευτών στο κύτταρο, με πιθανή επαγωγή της αποικοδόμησής που εξαρτάται από το πρωτεάσωμα	91
Οι πρωτεΐνες JAG1-HA και JAG2-HA συσσωρεύονται μέσα σε κύτταρα Lcells που εκφράζουν σταθερά Neurl-F μετά από επεξεργασία των κυττάρων με αναστολέα του πρωτεασώματος	93
Οι πρωτεΐνες Neurl και Mib1 αλληλεπιδρούν με τους δεσμευτές JAG1 και JAG2 σε κύτταρα HEK293	94
Η πρωτεΐνη Neurl αλληλεπιδρά ισχυρότερα με το Dll1, ενώ το Mib1 με το Dll4	98
<b>Συγκριτική ανάλυση του προτύπου έκφρασης του γονιδίου Neurl και Mib1 με τους δεσμευτές του N σε αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης του ποντικού</b>	<b>99</b>
<b>Συσχέτιση δομής και λειτουργίας της πρωτεΐνης Neurl</b>	<b>106</b>
Η πρωτεΐνη Neurl είναι ασταθής μέσα στα κύτταρα και τα επίπεδά της αυξάνονται μετά από επεξεργασία των κυττάρων με αναστολέα του πρωτεασώματος	106
Η πρωτεΐνη Neurl στοχεύεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη πιθανόν μετά από μυριστοϋλίωσή της	108
Η στόχευση της πρωτεΐνης Neurl στην κυτταροπλασματική μεμβράνη εμποδίζεται από σημειακή μετάλλαξη του κατάλοιπου γλυκίνης (Gly2) σε αλανίνη και	

συνεπάγεται αύξηση τη σταθερότητά της μέσα στο κύτταρο	111
Η πρωτεΐνη <i>Neur1</i> είναι φωσφορυλιωμένη και ουβικουτινιλιωμένη μέσα στα κύτταρα, ενώ η ουβικουτινιλιώσή της δεν εξαρτάται από την ενεργότητα της περιοχής RING	113
Υπερέκφραση των E3 λιγασών ουβικουτίνης <i>Neur1</i> και <i>Mib1</i> με τους δεσμευτές <i>Dll1</i> , <i>Dll4</i> , <i>JAG1</i> και <i>JAG2</i> σε κύτταρα HEK293T επάγει την αποικοδόμησή τους	115
Υπερέκφραση των μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης <i>Neur1</i> αναστέλλει την επαγωγή της αποικοδόμησης των δεσμευτών <i>Dll1</i> , <i>Dll4</i> , <i>JAG1</i> και <i>JAG2</i>	117
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>120</b>
<b>Ταυτοποίηση πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά το <i>Neur1</i> μετά από ανάλυση φασματοσκοπίας μάζας</b>	<b>122</b>
Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις	122
Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις	127
<b>Η δράση του <i>Neur1</i> σαν E3 λιγάση ουβικουτίνης <i>in vitro</i> και η ταυτοποίηση του δεσμευτή <i>Jagged1</i> σαν υπόστρωμά του</b>	<b>129</b>
<b>Η έκφραση του γονιδίου <i>Neur1</i> δεν συμπίπτει με την έκφραση των δεσμευτών του N στα πρώιμα εμβρυικά στάδια του ποντικού</b>	<b>133</b>
<b>Η επαγωγή της αποικοδόμησης των δεσμευτών <i>Jagged1</i>, 2 και <i>Dll1</i>, <i>Dll4</i> από την πρωτεΐνη <i>Neur1</i> μέσα στο κύτταρο</b>	<b>135</b>
<b>Η ρύθμιση της πρωτεΐνης <i>Neur1</i> του ποντικού μέσα στο κύτταρο</b>	<b>140</b>
<b>Η συμμετοχή της πρωτεΐνης <i>Neur1</i> του ποντικού στο σηματοδοτικό μονοπάτι N</b>	<b>143</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>145</b>

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Κάθε διδακτορική διατριβή ξεκινάει σαν ένα ταξίδι στο άγνωστο, αφού είναι αδύνατο να πιστέψεις όταν ξεκινάς ότι γνωρίζεις ακριβώς πού και πώς θα τελειώσει. Η δική μου διδακτορική διατριβή ήταν όμως ένα πραγματικό ταξίδι... Ξεκίνησε στο εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου υπό την επίβλεψη του κ. Μοσχονά, ο οποίος έδειξε μεγάλη υπομονή και έδωσε πολλές συμβουλές στα άτσαλα βήματα του ξεκινήματος. Η παρουσία της Μαρίας Κοκκινάκη, της Αγγέλας Πασπαράκη, της Σοφίας Βρόντου και του Ηλία Παυλόπουλου σε αυτά τα πρώτα χρόνια ήταν καταλυτική όχι μόνο για την επιστημονική καθοδήγηση που προσέφεραν, αλλά και για την αμέριστη συμπαράστασή τους.

Δύο χρόνια αργότερα η διδακτορική μου διατριβή συνεχίστηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας υπό την επίβλεψη της Joan Conaway στο ινστιτούτο ιατρικής έρευνας Stowers στο Kansas City. Ήταν ανέλπιστα τύχη για μένα να μου δοθεί η ευκαιρία να συνεργαστώ με διακεκριμένους επιστήμονες όπως οι Joan και Ron Conaway και παράλληλα μεγάλη ευτυχία να ανακαλύψω ότι παρά τα τόσα επιστημονικά επιτεύγματά τους και τους έντονους καθημερινούς ρυθμούς τους, είναι πάντα πρόθυμοι να προσφέρουν συμβουλές και βοήθεια σε κάθε δυσκολία που εμφανίζεται. Μέσα στο εργαστήριο θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη Chieri και το Shigeo Sato που ήταν οι πραγματικοί μου δάσκαλοι στα μυστικά του πάγκου, αλλά και οι πραγματικοί μου φίλοι μετά από κάθε μικρή ή μεγάλη απογοήτευση. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Tari Parmely, τον Yong Cai και την Jinji Jin για τη στήριξή τους και το συνεχές ενδιαφέρον τους για την πρόοδό μου, τόσο επιστημονική όσο και ανθρώπινη.

Για την ολοκλήρωση της διατριβής μου σημαντική ήταν η συμβολή του κ. Δελιδάκη και της κ. Καραγωγέως σαν μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, καθώς και των κ. Στουρνάρα, Παπαμααθαιάκη, Καρδάση και Χαλεπάκη που συμμετείχαν στην επταμελή εξεταστική επιτροπή. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Olivier Pourquie για τη φιλοξενία στο εργαστήριό του για ένα μέρος των πειραμάτων μου.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω το κοινωφελές ίδρυμα Προποντίδα για την τριετή υποτροφία που μου προσέφερε και για την στήριξη του στην απόφασή μου να ταξιδέψω στην Αμερική. Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου και το Δημήτρη για την αγάπη τους και την εμπιστοσύνη τους σε αυτή τη μακρόχρονη και επίπονη προσπάθεια.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το σηματοδικό μονοπάτι Notch (N) αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς διακυτταρικής επικοινωνίας και ρυθμίζει πληθώρα αναπτυξιακών διαδικασιών τόσο σε ασπόνδυλα όσο και σε σπονδυλωτά. Ανωμαλίες στη λειτουργία του σχετίζονται με μεγάλη ποικιλία αναπτυξιακών ελαττωμάτων και παθολογικών καταστάσεων, γεγονός που δείχνει την αναγκαιότητα αυστηρής ρύθμισης της μεταγωγής του σήματος. Πλήθωρα πρωτεϊνών έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί για την ικανότητά τους να ρυθμίζουν σε πολλαπλά επίπεδα τόσο τον υποδοχέα N όσο και τους δεσμευτές του, ενώ ένας καθοριστικός μηχανισμός ρύθμισης φαίνεται να είναι η απομάκρυνσή τους από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και η αποικοδόμησή τους. Η ρύθμιση της συγκέντρωσης του δεσμευτή και του υποδοχέα που φτάνει στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και ενεργοποιεί τη σηματοδότηση, αλλά και η εξασθένηση του σήματος με την απενεργοποίηση αυτών των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών φαίνεται να ρυθμίζεται μέσω της ουβικουιτινιλίωσης και της ενδοκύττωσής τους.

Δύο πρωτεΐνες που παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση των δεσμευτών Delta και Serrate είναι οι E3 λιγάσες ουβικουιτίνης Neuralized (Neur) και Mind Bomb (Mib1). Η ανάλυση της λειτουργίας των πρωτεϊνών αυτών τόσο στη δροσόφιλα όσο και στα σπονδυλωτά (*Xenopus laevis* και *Danio rerio*), έχει δώσει σημαντικές πληροφορίες για τον καθοριστικό ρόλο της ουβικουιτινιλίωσης στη ρύθμιση της ενδοκύττωσης και αποικοδόμησης των δεσμευτών. Η προσπάθεια κατανόησης αυτών των γεγονότων σε ολοένα μεγαλύτερη λεπτομέρεια αποκαλύπτει την πολυπλοκότητα του μηχανισμού ρύθμισης της σηματοδότησης N στο χρόνο και στο χώρο. Παρά το γεγονός ότι η λειτουργία της πρωτεΐνης Mib1 του ποντικού φαίνεται να ρυθμίζει τη σηματοδότηση N, η συμμετοχή της πρωτεΐνης Neuralized-like (Neur1) σε αντίστοιχες διαδικασίες δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί.

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής αρχικά δείξαμε την δράση του Neur1 ως E3 λιγάση ουβικουιτίνης και ότι αυτή εξαρτάται από τη περιοχή RING της πρωτεΐνης. Το Neur1 μονο-ουβικουιτιλιώνει ειδικά το Jagged1 *in vitro*, ενώ οι υπόλοιποι δεσμευτές του Notch δεν φαίνεται να αποτελούν άμεσα υποστρώματα της πρωτεΐνης. Παράλληλα, δείξαμε την δυνατότητα του Neur1 να επάγει την αποικοδόμηση των

Jagged1, 2 και Dll1, Dll4 μετά από ταυτόχρονη υπερέκφρασή τους σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν τις πρώτες σημαντικές πληροφορίες για τη συμμετοχή της πρωτεΐνης Neurl στη ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού N των θηλαστικών.

Στη συνέχεια, με ανάλυση φασματοσκοπίας μάζας σε πρωτεϊνικά κλάσματα κυτταρικών σειρών μόνιμης υπερέκφρασης του Neurl, επιβεβαιώσαμε την αλληλεπίδραση του με πρωτεΐνες που προηγουμένως είχαν προσδιοριστεί με το σύστημα δύο υβριδίων του σακχαρομύκητα, ενώ ταυτοποιήσαμε επιπλέον πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που υποδηλώνουν πιθανή μυριστουλίωση της πρωτεΐνης και τη συμμετοχή της σε πολλαπλές κυτταρικές διαδικασίες, όπως ακριβώς είχε προταθεί από το εργαστήριό μας σε προηγούμενες μελέτες.

Ακόμη, δείξαμε ότι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του Neurl συσχετίζονται με τη ενδοκυττάρια τοπογραφία και τη λειτουργία του. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον το ότι τα ενδοκυττάρια επίπεδα της πρωτεΐνης φαίνεται να ρυθμίζονται μέσω ουβικουιτινιλίωσης όπως και ότι η στόχευσή της στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, εξαρτάται από τη πιθανή μυριστουλίωση της. Σημειακές μεταλλαγές που εμποδίζουν αυτές τις δύο τροποποιήσεις, φαίνεται να αναστέλλουν την ικανότητα του Neurl να επάγει την αποικοδόμηση των δεσμευτών του N υποδηλώνοντας πιθανή συσχέτιση της ρύθμισης της λειτουργίας της πρωτεΐνης με τη θέση της στη μεμβράνη του κυττάρου. Τέλος δείξαμε ότι η συμβολή του Neurl στην αποικοδόμηση των δεσμευτών του N δεν φαίνεται να απαιτεί τη μεταξύ τους άμεση αλληλεπίδραση, σε αντίθεση με την αλληλεπίδραση με το Jagged1 που είναι άμεση και απαιτεί την επανάληψη NEUZ2. Αυτό επιβεβαιώνει την πρόβλεψη ότι οι επαναλήψεις NEUZ ευθύνονται για πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και στην περίπτωση του Neurl, αναγνωρίζουν την πρωτεΐνη-στόχο για ουβικουιτινιλίωση. Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι η πρωτεΐνη Neurl του ποντικού μέσω της δράσης της ως E3 λιγάση ουβικουιτίνης ρυθμίζει άμεσα ή έμμεσα την ουβικουιτινιλίωση των δεσμευτών του Notch συμμετέχοντας έτσι στο σηματοδοτικό μονοπάτι N.

## ABSTRACT

Notch (N) signaling constitutes an evolutionary conserved mechanism that mediates cell-cell interactions in many different cellular contexts in development. Consistent with its profound and widespread roles across a range of tissues, its dysfunction results in a tremendous variety of developmental defects and adult pathologies. A great variety of regulatory proteins have been found to interact with Notch and its ligands and control signaling at multiple levels. More recent advances have highlighted that ubiquitination and endocytosis followed by endosomal sorting of both the receptor and its ligands is an essential mechanism by which Notch-mediated signaling is regulated.

Two E3 ubiquitin ligases in *Drosophila*, Neuralized (Neur) and Mind Bomb (Mib1) have been shown to play a crucial role in the regulation of Delta and Serrate protein levels. The functional analysis of these two proteins both in invertebrates and vertebrates has provided the first evidence for the role of ubiquitination in the regulation of endocytosis and degradation of Notch ligands. Intensive work from numerous laboratories has been done in order to clarify the multiple regulatory steps of ubiquitination and endocytosis that are mediated by those two ubiquitin ligases, revealing in parallel the complexity of N signaling fine-tuning in time and space. Mouse homologue of Mib1 protein is known to interact with N ligands and regulate their signaling activity, whereas mouse Neuralized-like (Neurl) protein contribution in N signaling regulation had not been elucidated.

In an effort to understand the function of mouse Neurl protein we first investigated its role as an E3 ubiquitin ligase. We showed that Neurl acts as an E3 ubiquitin ligase *in vitro* and its activity depends on a functional RING domain that resides at the C-terminal of the protein. Neurl specifically mono-ubiquitinates the intracellular domain of Jagged1 *in vitro*, whereas Dll1, Dll4 and Jag2 do not act as substrates for Neurl-dependent ubiquitination. However, Neurl overexpression in cells enhances the degradation of all Notch ligands that contain lysine residues in their intracellular domain.

In parallel to our biochemical approach, we used the powerful tool of multidimensional protein identification technology (MudPIT) to identify proteins Neurl interacts with, after analysis of cell lines that stably express Flag-tagged Neurl. We were able to verify the interaction of Neurl with NuMA1, a large nuclear protein required for spindle organization during mitosis that our lab had previously identified as a strong Neurl interactor with the use of yeast-two-hybrid system.

We also provided evidence for multiple Neurl post-translational modifications that seem to tightly regulate the protein's function. More specifically, we showed that Neurl is targeted to the plasma membrane after its putative myristoylation and it gets rapidly degraded possibly via the proteasome. Point mutations that abolish its myristoylation and the functionality of its RING domain severely impair Neurl-dependent degradation of the Notch ligands Dll1, Dll4, Jag1 and Jag2, demonstrating the importance of these modifications in the regulation of Neurl function. Despite the regulatory effects of Neurl on all four N ligands, we were able to identify the direct interaction of Neurl only with Jag1, which is specifically mediated by NEUZ2 repeat. These results suggest that mouse Neurl can either directly or indirectly enhance the ubiquitination and subsequent degradation of N ligands, providing the first evidence for Neurl regulatory role in mammalian Notch pathway.





# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

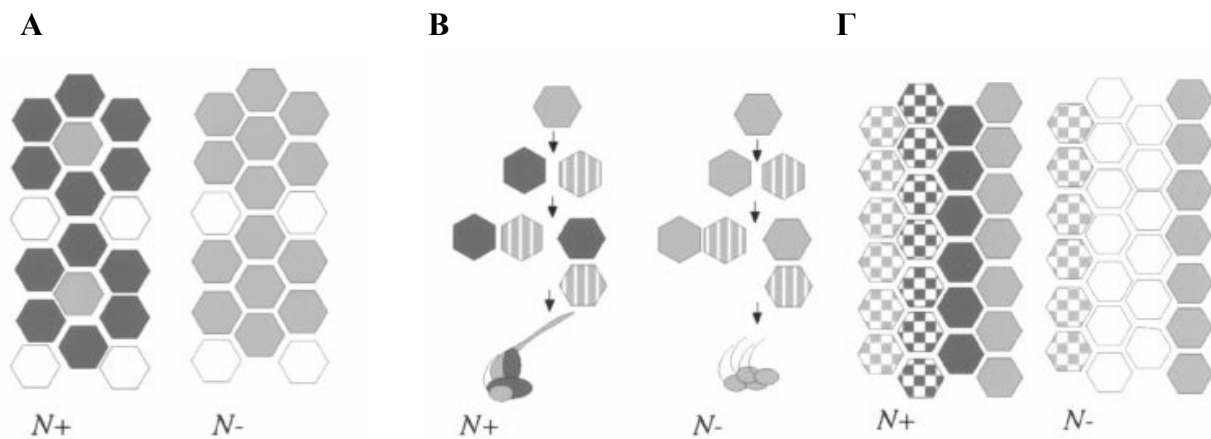
Πώς από ένα και μόνο αρχικό κύτταρο μπορεί να δημιουργηθεί ένας πολύπλοκος πολυκύτταρος οργανισμός; Αυτή είναι μία από τις θεμελιώδεις ερωτήσεις που διαχρονικά συναρπάζει τους αναπτυξιακούς βιολόγους εδώ και χρόνια. Ένας καθοριστικός παράγοντας κατά την αναπτυξιακή πορεία ενός πολυκύτταρου οργανισμού είναι η ικανότητά του να σχηματίζει αναπτυξιακά πρότυπα (patterns). Ο σχηματισμός προτύπων εξασφαλίζεται με μοριακούς μηχανισμούς διακυτταρικής σηματοδότησης που επιτρέπουν στα κύτταρα να καθορίζουν διαφορετικές αναπτυξιακές μοίρες. Ένας πρωταγωνιστικός μηχανισμός στον έλεγχο της διακυτταρικής επικοινωνίας είναι το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch.

## **Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch ρυθμίζει αποφάσεις μοίρας μεταξύ γειτονικών κυττάρων**

Η ανάπτυξη των πολυκύτταρων οργανισμών ελέγχεται από τη συνδυαστική και διαδοχική έκφραση γονιδίων που σταδιακά περιορίζουν το αναπτυξιακό δυναμικό γενεαλογίων κυττάρων και τα οδηγούν σε διαφοροποίηση. Η έκφραση πολλών τέτοιων γονιδίων ρυθμίζεται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ αρχικά ισοδύναμων ή μη ισοδύναμων ομάδων κυττάρων. Μεταξύ ισοδύναμων ομάδων κυττάρων ένα μόνο κύτταρο ή μια υποομάδα από αυτά μπορεί να ξεχωρίσει από τα περιβάλλοντα κύτταρα με ένα μηχανισμό που είναι γνωστός ως πλευρική αναστολή (lateral inhibition). Τυχαίες ταλαντώσεις στη σηματοδοτική ενεργότητα των γειτονικών κυττάρων μέσα στον αρχικό

ισοδύναμο πληθυσμό μπορεί να ενισχύονται στη μία πλευρά και να παρεμποδίζονται στην άλλη (Εικ.1Α). Από τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα πλευρικής αναστολής είναι ο διαχωρισμός νευρικών και επιδερμικών πρόδρομων κυττάρων στο κοιλιακό εκτόδερμα του εμβρύου της δροσόφιλας και ο σχηματισμός του κυττάρου αγκυροβόλησης και του κοιλιακού πρόδρομου κυττάρου της μήτρας στις γονάδες του νηματώδη (Greenwald, 1998).

Κάθε πρόδρομο νευρικό κύτταρο προέρχεται από ένα σύνολο ισοδύναμων κυττάρων που έχουν το νευρικό αναπτυξιακό δυναμικό και σε περίπτωση απώλειας λειτουργίας του μονοπατιού Notch πάρα πολλά πρόδρομα κύτταρα αποκτούν τη νευρική μοίρα (νευρική υπερπλασία). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, όλα τα πρόδρομα κύτταρα μπορούν να εκφράζουν τον υποδοχέα ή το δεσμευτή και να σηματοδοτούν το ένα το άλλο. Παρατηρούνται ωστόσο σε κάποιο σημείο μικρές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης του δεσμευτή ή του υποδοχέα μεταξύ κυττάρων, οι οποίες ενισχύονται και μονιμοποιούνται από ανάδρομους ρυθμιστικούς μηχανισμούς (Greenwald, 1998).



**Εικ. 1: Διαφορετικοί μηχανισμοί σηματοδότησης Notch.** **Α.** Σχηματική απεικόνιση του μοντέλου της πλευρικής αναστολής όπου ένα κύτταρο αποκτά την πρόδρομη νευρική μοίρα (νευροβλάστης: γκρι) και επάγει τη σηματοδότηση Notch στα γειτονικά του, τα οποία αποκτούν επιδερμική μοίρα (επιδερμοβλάστες: μαύρα). Απώλεια λειτουργίας του Notch έχει σαν αποτέλεσμα όλα τα πρόδρομα κύτταρα να αποκτούν τη νευρική μοίρα (νευρική υπερπλασία). **Β.** Καθορισμός αποφάσεων κυτταρικής γενεαλογίας μέσω σηματοδότησης Notch. Σε κάθε κυτταρική διαίρεση η σηματοδότηση Notch ενεργοποιείται στο ένα από τα δύο θυγατρικά κύτταρα (μαύρα) με αποτέλεσμα να σχηματίζονται τέσσερις τύποι κυττάρων που συμμετέχουν στο σχηματισμό της σμήριγγας (και ένα γλοιακό κύτταρο). Απώλεια λειτουργίας του Notch έχει σαν αποτέλεσμα όλα τα κύτταρα να γίνονται νευρικά. Τα κύτταρα με ραβδώσεις εκφράζουν Numb και Neur, τα οποία διαχωρίζονται ασύμμετρα στο θυγατρικό κύτταρο όπου δεν ενεργοποιείται το Notch. **Γ.** Δημιουργία του ραχιαιο-κοιλιακού περιθωρίου του φτερού μέσω επαγωγικής σηματοδότησης Notch. Η σηματοδότηση Notch ενεργοποιείται κατά μήκος του περιθωρίου του φτερού και είναι απαραίτητη για τη δημιουργία δύο διακριτών κυτταρικών πληθυσμών. Η παρουσία της πρωτεΐνης Fringe στα ραχιαία κύτταρα (τετραγωνίδια) είναι καθοριστική για να αναστέλεται την ενεργοποίηση του Notch από το Serrate στο ραχιαίο διαμερίσμα και να εξασφαλίζεται η ενεργοποίηση από το Delta. Σε απώλεια λειτουργίας του Notch ο σχηματισμός του περιθωρίου του φτερού διαταράσσεται (Bray, 1998).

Η σηματοδότηση Notch καθορίζει τη νευρική ή μυική μοίρα στη γενεαλογία των απογόνων των πρόδρομων νευρικών και μυικών κυττάρων, με ένα μηχανισμό που θεωρείται ανάλογος της πλευρικής αναστολής (Bray, 1998). Από το πρόδρομο κύτταρο των αισθητηρίων οργάνων (Sensory Organ Precursor: SOP) προκύπτουν πέντε τύποι κυττάρων, το στέλεχος (shaft), το φατνίο (socket), το έλυτρο (sheath), ο νευρώνας και ένα γλοιακό κύτταρο (Lai & Orgogozo, 2004). Σε απώλεια λειτουργίας του Notch παρατηρείται μόνο ο σχηματισμός του νευρικού κυττάρου γιατί η σηματοδότηση Notch είναι απαραίτητη για το διαχωρισμό των δύο διαδοχικών γενεαλογιών, αφού σε κάθε κυτταρική διαίρεση το Notch ενεργοποιείται στο ένα θυγατρικό κύτταρο και όχι στο άλλο (Εικ. 1B). Για να παρατηρηθεί αυτή η ασυμμετρία είναι απαραίτητες πρωτεΐνες, όπως το Numb και το Neur, οι οποίες φαίνεται να δρουν ανταγωνιστικά ως προς τη δράση του υποδοχέα (Numb) και να ενισχύουν τη σηματοδοτική ικανότητα του δεσμευτή (Neur), συντελώντας με αυτό τον τρόπο στον καθορισμό της κυτταρικής μοίρας (Lai & Orgogozo, 2004).

Ένας διαφορετικός μηχανισμός ρύθμισης της σηματοδότησης, γνωστός σαν επαγωγική σηματοδότηση (inductive signaling/lateral induction), παρατηρείται σε μη ισοδύναμες ομάδες κυττάρων. Σε αυτή την περίπτωση, το κύτταρο πομπός και το κύτταρο δέκτης έχουν ήδη διαφορετικές ιδιότητες, που κυρίως εντοπίζονται στην διαφορετική έκφραση υποδοχέων και δεσμευτών της σηματοδότησης. Κάτω από αυτές τις συνθήκες η περιορισμένη έκφραση συγκεκριμένου υποδοχέα και δεσμευτή και το χρονικό πλαίσιο της διακυτταρικής επικοινωνίας μπορεί να αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες ρύθμισης της επαγωγικής σηματοδότησης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της επαγωγικής σηματοδότησης Notch είναι η δημιουργία του ραχιαίο-κοιλιακού περιθωρίου του φτερού της δροσόφιλα (Εικ. 1Γ). Καθώς ένα πρόδρομο κύτταρο βαίνει προς τελικά στάδια διαφοροποίησης, είναι πιθανό να υπόκειται σε πληθώρα τοπικών αλληλεπιδράσεων, που περιλαμβάνουν και τους δύο μηχανισμούς σηματοδότησης ταυτόχρονα ή διαδοχικά (Artavanis-Tsakonas et al., 1995).

Γενετικά πειράματα στη δροσόφιλα δείχνουν ότι η φυσιολογική αναπτυξιακή πορεία είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στη 'δοσολογία' των γονιδίων (gene dosage) των *Notch* και *Delta*, υποδηλώνοντας ότι η ποσότητα του δεσμευτή και του υποδοχέα που

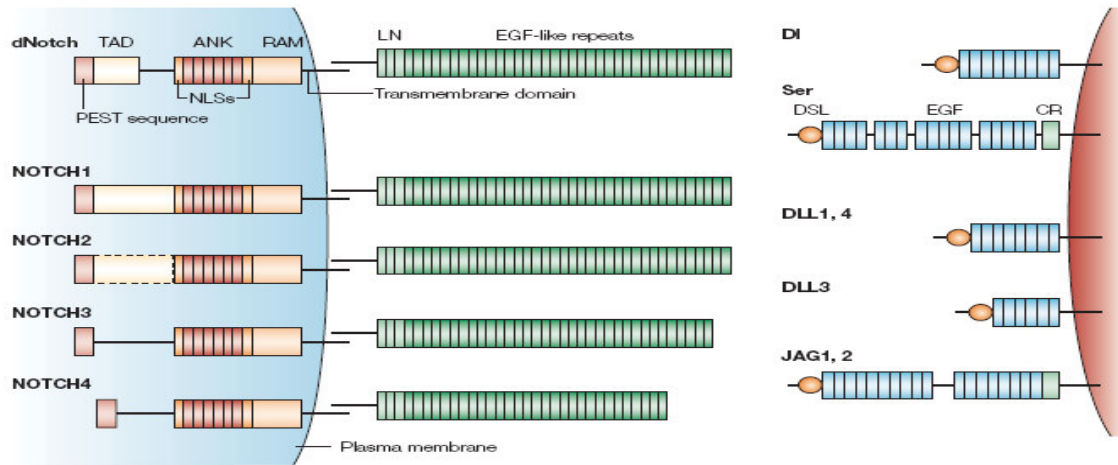
φτάνει στην κυτταρική επιφάνεια είναι μια πάρα πολύ σημαντική, και κατά συνέπεια, πολύ αυστηρά ρυθμιζόμενη παράμετρος της σηματοδότησης μέσω Notch (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Είναι αναμενόμενο επομένως οποιοδήποτε γονίδιο επηρεάζει, άμεσα ή έμμεσα, την ωρίμανση, την μετακίνηση μέσα στο κύτταρο ή την αποικοδόμηση του υποδοχέα και των δεσμευτών του, να αποτελεί δραστικό ρυθμιστή του σήματος.

### **Τα μόρια πρωταγωνιστές του σηματοδοτικού μονοπατιού.**

Οι υποδοχείς της οικογένειας Notch (N) είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I (Εικ. 2) (Fleming et al, 1998). Μετά την πρόσδεση του δεσμευτή, ο υποδοχέας N υφίσταται μία σειρά από διαδοχικές πρωτεολυτικές πέψεις που έχουν σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση του ενδοκυττάριου τμήματος της πρωτεΐνης (Notch Intra-Cellular Domain, NICD). Το τμήμα αυτό αποτελεί την ενεργή μορφή του υποδοχέα και δρα στον πυρήνα ως μεταγραφικός συνενεργοποιητής. Τα νεοσυντιθέμενα μόρια N υφίστανται την πρώτη πέψη (S1) στο trans-Golgi δίκτυο από πρωτεάσες που ανήκουν στην οικογένεια των φουρινών (furins) (Logeat et al, 1998). Η επεξεργασία αυτή του υποδοχέα είναι απαραίτητη για τη σηματοδότηση στα θηλαστικά, αλλά φαίνεται να είναι επουσιώδης στις μύγες (Kidd et al, 2002). Το N φτάνει στην κυτταροπλασματική μεμβράνη σαν ετεροδιμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από την εξωκυττάρια περιοχή (Notch Extracellular Domain NECD) και από την ενδοκυττάρια περιοχή που είναι προσδεδεμένη στη μεμβράνη (Notch TransMembrane Domain NTM).

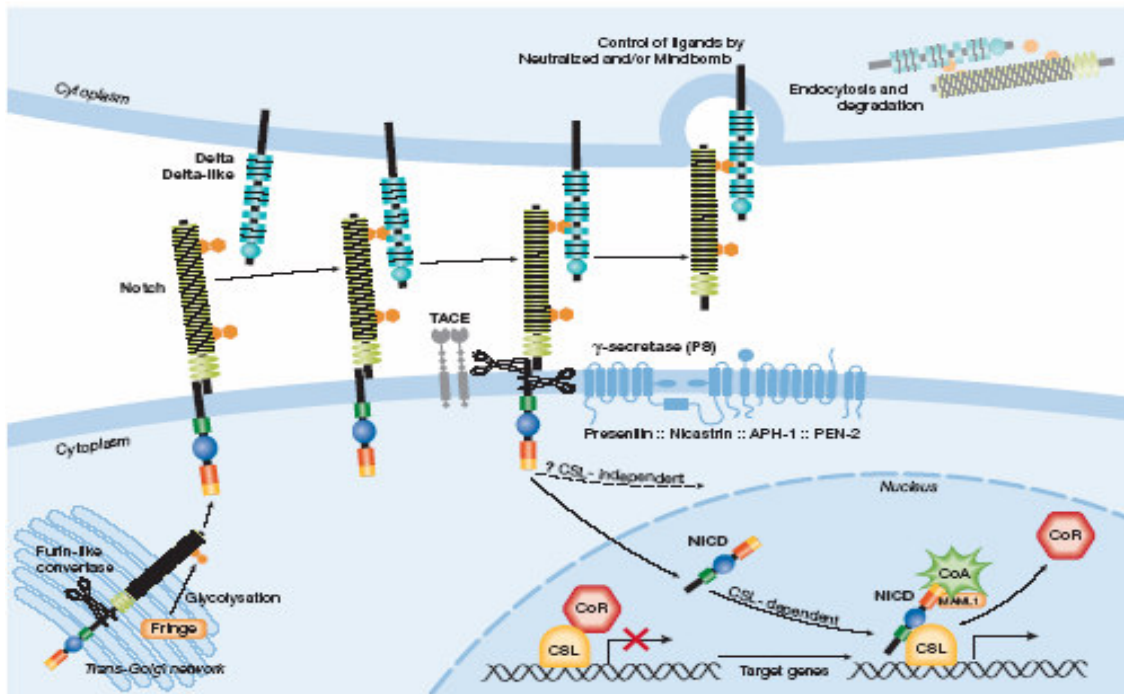
Οι δύο περιοχές είναι μη ομοιοπολικά συνδεδεμένες και η αλληλεπίδραση αυτή εξαρτάται από την παρουσία ιόντων  $Ca^{++}$  (Rand et al, 2000). Η ενεργοποίηση του υποδοχέα από το δεσμευτή καθιστά την διαμεμβρανική NTM περιοχή ευπαθή σε πέψη από εξωκυττάρια πρωτεάσες της οικογένειας ADAM/TACE/Kuzbanian στη θέση S2 (Brou et al, 2000, Mumm et al, 2000, Lieber et al, 2002). Η πέψη στη θέση S2 απελευθερώνει την εξωκυττάρια περιοχή του Notch και παράγει μια ενεργοποιημένη μορφή του που είναι προσδεδεμένη στη μεμβράνη και υφίσταται περαιτέρω πέψεις στις θέσεις S3 και S4, οι οποίες καταλύονται από την δράση  $\gamma$ -secretase του πρωτεϊνικού συμπλόκου Presenillin-Nicastrin-Aph1-Pen2 (Okochi et al, 2002, Schroeter et al, 1998,

Fortini 2001, De Strooper et al, 2003). Το ενδοκυττάριο τμήμα NICD που απελευθερώνεται εισέρχεται στον πυρήνα και σχηματίζει σύμπλοκο με την πρωτεΐνη



**Εικ. 2: Οι υποδοχείς Notch και οι δεσμευτές τους.** Στη δροσόφιλα υπάρχει ένας υποδοχέας N που αλληλεπιδρά με δύο διαμεμβρανικούς δεσμευτές DSL (Delta, Serrate). Στα θηλαστικά υπάρχουν 4 υποδοχείς N (Notch1-4) και 5 δεσμευτές (Jagged1 και 2 που είναι ομόλογοι με Serrate και Dll (Delta-like) 1,3,4 που είναι ομόλογοι με το Delta). Οι υποδοχείς N εμφανίζονται στην επιφάνεια του κυττάρου σαν ετεροδιμερή μόρια. Οι εξωκυττάριας περιοχές τους περιλαμβάνουν 29-36 επαναλήψεις EGR (Epidermal growth factor repeats) που σχετίζονται με την πρόσδεση των δεσμευτών, τρεις επαναλήψεις LIN πλούσιες σε κυστεΐνες που αποτρέπουν τη σηματοδότηση που δεν επάγεται από τους δεσμευτές και μια περιοχή ετεροδιμερισμού. Οι ενδοκυττάριας περιοχές των υποδοχέων περιλαμβάνουν δύο μοτίβα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, το μοτίβο RAM (R) και έξι επαναλήψεις αγκυρίνης (ANK), καθώς επίσης δύο σινιάλα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) και την αλληλουχία PEST(P). Οι δεσμευτές του N εκφράζονται επίσης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και περιέχουν την περιοχή DSL (Delta, Serrate, Lag-2) και επαναλήψεις EGF. Οι δεσμευτές της οικογένειας Serrate εμφανίζουν και μία περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες (CR) αμέσως μετά τις επαναλήψεις EGF (Radtko & Raj, 2003).

CSL (CBF1 στον άνθρωπο, Suppressor of Hairless στη δροσόφιλα, Lag-1 στο νηματώδη) που αλληλεπιδρά με μόρια DNA και την πρωτεΐνη - συνενεργοποιητή Mastermind (Bray & Furriols, 2001, Fryer et al, 2002). Το σύμπλοκο αυτό αναγνωρίζει συγκεκριμένες ρυθμιστικές αλληλουχίες DNA και ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων στόχων. Κατά την απουσία του ενδοκυττάριας τμήματος NICD, οι πρωτεΐνες CSL στρατολογούν συνκαταστολείς στις cis-ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων στόχων του N. Συνεπώς, η ενεργοποίηση του υποδοχέα N πυροδοτεί έναν αναπτυξιακό διακοπτή για την ενεργοποίηση γονιδίων στόχων που βρίσκονταν σε καταστολή (Εικ. 3) (Kao et al, 1998, Morel & Schweisguth, 2000).



ινέχεια

πρωτεολυονται στο Γοίγι απο πρωτεασες τις οικογενειας των φουρινων (Furin-like convertase) κατα τη διαρκεια μεταφορας τους στην κυτταροπλασματικη μεμβρανή όπου εμφανίζονται σαν ετεροδιμερη μόρια. Η γλυκοζυλτρανσφεράση Fringe τροποποιει τις επαναλήψεις EGF στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα με την προσθήκη N-ακετυλγλυκοζαμίνης στο διαμέρισμα Golgi. Για να ενεργοποιηθεί το σηματοδοτικό μονοπάτι είναι απαραίτητη η αλληλεπίδραση του δεσμευτή με τον υποδοχέα, η οποία προκαλει δύο διαδοχικά πρωτεολυτικά γεγονότα. Η πρώτη πέψη (S2) πραγματοποιείται στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα από την μεταλλοπρωτεάση TACE (tumor necrosis factor α-converting enzyme). Το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα που απελευθερώνεται υφίσταται 'τρανς-ενδοκύττωση' από το γειτονικό κύτταρο που εκφράζει το δεσμευτή. Η διαδικασία αυτή φαίνεται να ρυθμίζεται από τις δύο E3 λιγάσες ουβικουιτίνης Neutralized και Mind Bomb. Η δεύτερη πέψη (S3) πραγματοποιείται στη διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα από την ενεργότητα γ-secretase του πρωτεϊνικού συμπλόκου των πρεσενιλινών, που περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες Nicastrin, APH-1 και PEN-2. Το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα που απελευθερώνεται μετακινείται μέσα στον πυρήνα και προσδένεται στον μεταγραφικό παράγοντα CSL (CBF1 στον άνθρωπο, Suppressor of Hairless στη δροσόφιλα, LAG1 στο *C. elegans*). Αυτή η αλληλεπίδραση οδηγεί στην απομάκρυνση μεταγραφικών συν-καταστολέων (Co-R) και στην ταυτόχρονη στρατολόγηση συν-ενεργοποιητών (Co-A), όπως οι πρωτεΐνες Mastermind-like (MAML1). Οι υποδοχείς που έχουν τροποποιηθεί από την γλυκοζυλτρανσφεράση Fringe δεν μπορούν να ενεργοποιηθούν από τους δεσμευτές Jagged, ενώ είναι δυνατή η ενεργοποίησή τους από τους δεσμευτές Delta (Radtke et al, 2005).

Οι δεσμευτές Delta (DI) και Serrate (Ser, το οποίο στα θηλαστικά είναι γνωστό σαν Jagged), είναι επίσης διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I (Εικ. 2), που αλληλεπιδρούν και ενεργοποιούν τον υποδοχέα *N in trans*, δηλαδή στην επιφάνεια γειτονικών κυττάρων. Υπάρχουν ωστόσο βιοχημικές μελέτες που δείχνουν ότι η εξωκυττάρια περιοχή του DI υφίσταται πέψη και απελευθερώνεται μια εκκρινόμενη μορφή, η οποία περιλαμβάνει την περιοχή αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα N (Qi et al, 1999, Klueg et al, 1998, Mishra-Gorur et al, 2002).

Η λειτουργική σημασία του πρωτεολυτικού αυτού γεγονότος δεν έχει αποσαφηνιστεί αφού υπάρχουν αντικρουόμενες παρατηρήσεις. Στο νηματώδη, η έκφραση των διαλυτών μορφών των δεσμευτών Lag-2 και Arx-1 μπορεί να διασώσει το φαινότυπο έλλειψης λειτουργίας του *lag-2* (Fitzgerald & Greenwald, 1995), ενώ στη μύγα οι εκκρινόμενες μορφές των DI και Ser εμφανίζουν επικρατή-αρνητική (dominant-negative) δράση και μάλιστα η πέψη του DI φαίνεται να αποτελεί σημαντικό βήμα της αποικοδόμησής του (Sun & Artavanis-Tsakonas, 1997, Mishra-Gorur et al, 2002). Η απομάκρυνση του εξωκυττάριου τμήματος των δεσμευτών δημιουργεί ένα ενδοκυττάριο τμήμα που παραμένει προσδεδεμένο στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και πρωτεολύεται από πρεσενιλίνες (Six et al, 2003, Ikeuchi & Sisodia, 2003, LaVoie & Selkoe, 2003). Μια πιθανή ερμηνεία είναι ότι η πρωτεόλυση του DI από τις πρεσενιλίνες αποτελεί τμήμα ενός γενικότερου μηχανισμού «εκκαθάρισης» (Struhl & Adachi, 2000). Εναλλακτικά οι ενδοκυττάρια μορφές του DI μπορεί να ρυθμίζουν νέα σηματοδοτικά γεγονότα, εγείροντας την πιθανότητα για σηματοδότηση διπλής κατεύθυνσης (Klueg et al, 1998, Bland et al, 2003). Η αποσαφήνιση της λειτουργικής σημασίας των πολλαπλών γεγονότων επεξεργασίας τόσο των υποδοχέων όσο και των δεσμευτών του σηματοδοτικού μονοπατιού N σίγουρα αποτελεί έναν πολύ ενδιαφέροντα τομέα έρευνας.

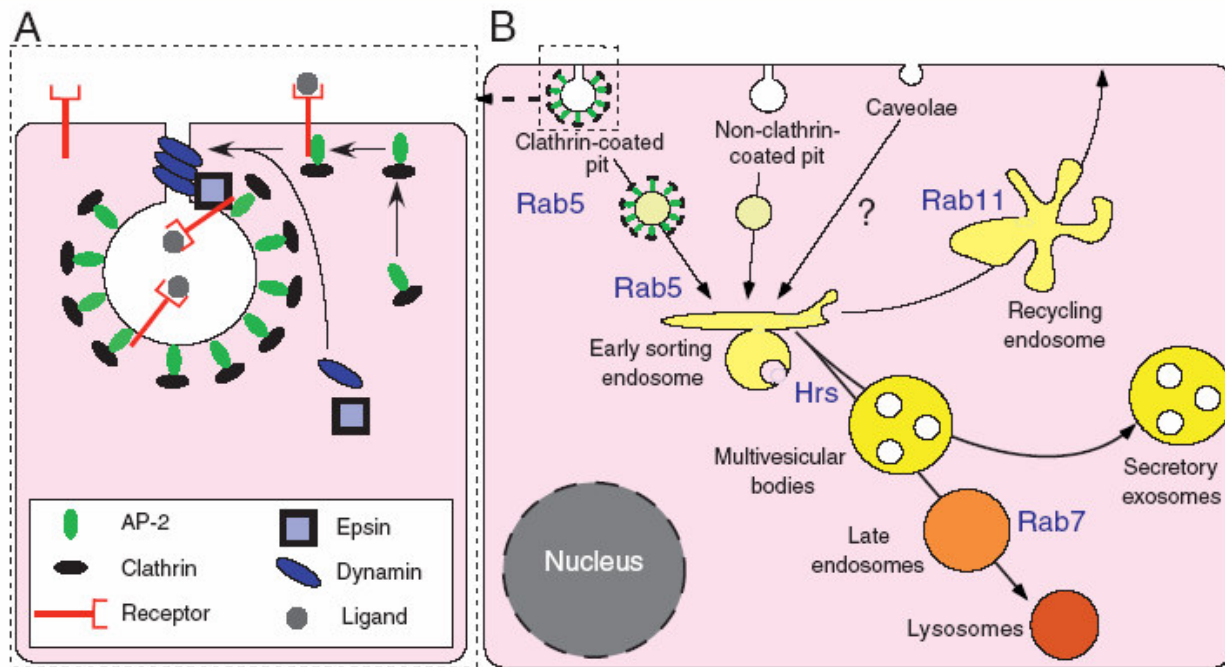
### **Ρύθμιση της σηματοδότησης μέσω ενδοκύττωσης**

Τα ενδοκυττωτικά μονοπάτια χρησιμοποιούνται από τα ευκαρυωτικά κύτταρα για την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών από το εξωτερικό περιβάλλον, για τη ρύθμιση της μεταγωγής σήματος και τη ρύθμιση της σύστασης της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Οι ενδοκυττάρια περιοχές διαμεμβρανικών πρωτεϊνών-φορτίων περιέχουν σήματα που αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες – μεσολαβητές του φορτίου (cargo adaptors). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες-φορτία να συγκεντρώνονται σε συγκεκριμένες περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης, από όπου ξεκινάει η ενδοκύττωσή τους με το σχηματισμό κατάλληλων κυστιδίων. Έχουν χαρακτηριστεί διαφορετικά ενδοκυττωτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την μετακίνηση διαφορετικών πρωτεϊνών-φορτίων. Το καλύτερα μελετημένο μονοπάτι είναι η ενδοκύττωση μέσω κλαθρίνης (clathrin - dependent endocytosis CDE), κατά την οποία μόρια κλαθρίνης αποτελούν το βασικό συστατικό του

καλύμματος του ενδοκυττωτικού κυστιδίου. Σε μονοπάτια όπου δεν συμμετέχει η κλαθρίνη (clathrin - independent endocytosis CIE), σημαντικό ρόλο παίζουν περιοχές της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που είναι πλούσιες σε χοληστερόλη και γλυκοσφιγγολιπίδια (lipid rafts) και περιβάλλονται από την πρωτεΐνη καβεολίνη (caveolin) για να σχηματίσουν μεμβρανικές εγκολπώσεις που ονομάζονται caveolae (Aguilar & Wedland, 2005).

Παραδοσιακά η ενδοκύττωση είχε θεωρηθεί μηχανισμός αποικοδόμησης διαμεμβρανικών υποδοχέων και απευαισθητοποίησης των κυττάρων στη λήψη σημάτων. Πρόσφατες εργασίες όμως σε διαφορετικά συστήματα μοντέλα δείχνουν ότι οποιοδήποτε σχεδόν μεμβρανικό διαμέρισμα του κυττάρου μπορεί να συνδέεται με τη ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών (Di Fiore & De Camilli, 2001). Η μεταγωγή του σήματος και η μετακίνηση του υποδοχέα σε διαφορετικά ενδοκυττωτικά διαμερίσματα ρυθμίζεται χρονικά και τοπικά με αυστηρό τρόπο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Έχουν χαρακτηριστεί πολλαπλοί μηχανισμοί με τους οποίους η ενδοκύττωση ρυθμίζει τη σηματοδότηση. Στους υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (Receptors Tyrosine Kinase RTK) η ενδοκύττωση μπορεί να αυξάνει την ένταση του σήματος με το να συνδέει τους υποδοχείς με σηματοδοτικούς στόχους που βρίσκονται σε ενδοσώματα, ενώ μπορεί να μειώνει το σήμα με την αποικοδόμηση των υποδοχέων στο λυσόσωμα. Μια μορφή ενδοκύττωσης, που είναι γνωστή σαν τρανς – ενδοκύττωση (trans endocytosis), θεωρείται ο πιθανός μηχανισμός δημιουργίας κλίσης μορφογόνου, όπου τα σηματοδοτικά μόρια (π.χ. Wiggless, TGFβ/ Dpp) ανακυκλώνονται ή αποικοδομούνται ελεγχόμενα, ώστε να σχηματίζεται η απαραίτητη διαβάθμιση της συγκέντρωσής τους. Τέλος, η ενδοκύττωση μπορεί να είναι απαραίτητος μηχανισμός για την ενεργοποίηση της σηματοδότησης, όπως χαρακτηριστικά παρατηρείται στην περίπτωση του υποδοχέα N (Seto, et al., 2002).





**Εικ. 4: Μετακίνηση διαλυτών μορίων, συστατικών της μεμβράνης ή διαμεμβρανικών υποδοχέων από την κυτταρική επιφάνεια μέσω του ενδοκυττωτικού μονοπατιού. Α.** Στο ενδοκυττωτικό μονοπάτι που εξαρτάται από την κλαθρίνη, τα κυστίδια περιβάλλονται από την κλαθρίνη και την ετεροτετραμερή πρωτεΐνη AP-2. Το σύμπλοκο της AP-2 συνδέει τον υποδοχέα με την κλαθρίνη (άμεσα ή έμμεσα). Οι υποδοχείς που ενδοκυττώνονται από κυστίδια κλαθρίνης περιέχουν κατάλληλες αλληλουχίες-σινιάλα στην ενδοκυττάρια τους περιοχή, τα οποία μπορεί να είναι εγγενή ή να προστίθενται σαν μετα-μεταφραστική τροποποίηση, όπως είναι η μονο-ουβικουτινιλιώση. Η συνθλιβή (pinching off) του κυστιδίου απαιτεί επιπλέον πρωτεΐνες όπως είναι η epsin, η οποία συνδέει τους υποδοχείς με τα συστατικά που περιβάλλουν το κυστίδιο και συμβάλλει στην κάμψη της λιπιδικής στοιβάδας. Επιπλέον η epsin δρα σαν μεσολαβητής που προσδένεται σε ουβικουτινιλιωμένα φορτία και επάγει την ενδοκύττωσή τους μέσω του μονοπατιού που δεν εξαρτάται από κλαθρίνη. Τέλος απαραίτητος είναι ο ρόλος της dynamin για την αποκοπή του κυστιδίου από την μεμβράνη. Μετά την αποκοπή του κυστιδίου η κλαθρίνη απομακρύνεται και ανακυκλώνεται στην κυτταρική μεμβράνη. **Β.** Κυστίδια χωρίς περίβλημα συντήκονται μεταξύ τους για να φτιάξουν νέα ενδοσώματα ή συντήκονται με προ-υπάρχοντα πρώιμα ενδοσώματα μέσω μιας διαδικασίας που απαιτεί τη δράση της GTPase Rab5. Μετά την ενδοκύττωσή τους και τη μεταφορά τους σε ενδοσώματα (sorting endosomes) πολλοί δεσμευτές παραμένουν συνδεδεμένοι με τους υποδοχείς τους και αποικοδομούνται μέσω ώριμων ενδοσωμάτων ή λυσοσωμάτων. Αντίθετα κάποιοι υποδοχείς όπως αυτός της τρανσφερίνης ανακυκλώνεται και χρησιμοποιείται πολλές φορές, ενώ άλλοι όπως ο EGFR στοχεύεται για αποικοδόμηση για να αποτραπεί παρατεταμένη σηματοδότηση. Πολλά ενδοσωμικά διαμερίσματα αποτελούν σημεία σηματοδότησης, ενώ τα πολυκυστιδιακά σώματα (MultiVesicular Bodies MVBs), αποτελούν ενδιάμεσο σταθμό πριν την αποικοδόμηση. Είναι ενδιάμεσα διαμερίσματα ανάμεσα στα πρώιμα (early sorting) και τα ώριμα (late) ενδοσώματα και χαρακτηρίζονται από την δημιουργία κυστιδίων μέσα στον αυλό τους, γεγονός που ελέγχεται από τη δράση του hrs (hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase substrate) (Le Borgne et al, 2005).

Η ενδοκύττωση των υποδοχέων μπορεί να γίνεται μέσω του μονοπατιού της κλαθρίνης ή μέσω καβεολίνης ή μέσω και των δύο μονοπατιών. Μέσω των διαφορετικών αυτών μηχανισμών είναι δυνατό να ρυθμίζονται πολλά χαρακτηριστικά του σήματος όπως η διάρκειά του, η ένταση, η εμβέλεια που μπορεί να καθορίζουν διαδικασίες όπως κυτταρική διαφοροποίηση ή κυτταρική μετανάστευση. Για τη ρύθμιση όλων αυτών των

γεγονότων είναι απαραίτητος ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών που συμμετέχουν στα ποικίλλα διαφορετικά στάδια της ενδοκύττωσης. Σύμπλοκα από πρωτεΐνες – μεσολαβητές αποτελούν απαραίτητα συστατικά του μονοπατιού της κλαθρίνης, τα οποία αλληλεπιδρούν άμεσα με την κλαθρίνη, την πρωτεΐνη-φορτίο και άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες που επάγουν το σχηματισμό του καλύμματος κλαθρίνης. Μια τέτοια πρωτεΐνη είναι η AP-2 (adaptor protein -2), η οποία είναι υπεύθυνη για την συνεχή ενδοκύττωση φορτίων που περιέχουν μοτίβα τυροσίνης ή δύο λευκινών, όπως ο υποδοχέας της τρανφερίνης (Εικ.4) (Nesterov, et al., 1999). Αντίθετα, η ενδοκύττωση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) εξαρτάται περισσότερο από την πρωτεΐνη Epsin και τα δύο συνοδά μόρια Eps15 (EGFR-pathway substrate-15) και Eps15R (Eps15-related protein) (Marmor & Yarden, 2004). Αυτές οι πρωτεΐνες σχηματίζουν ένα σύμπλοκο που ρυθμίζεται από τη φωσφορυλίωση του Eps15 μέσω του υποδοχέα και από την μονο-ουβικουιτινίωση των Epsin και Eps15 μετά από την πρόσδεση του δεσμευτή (Polo, et al., 2002)

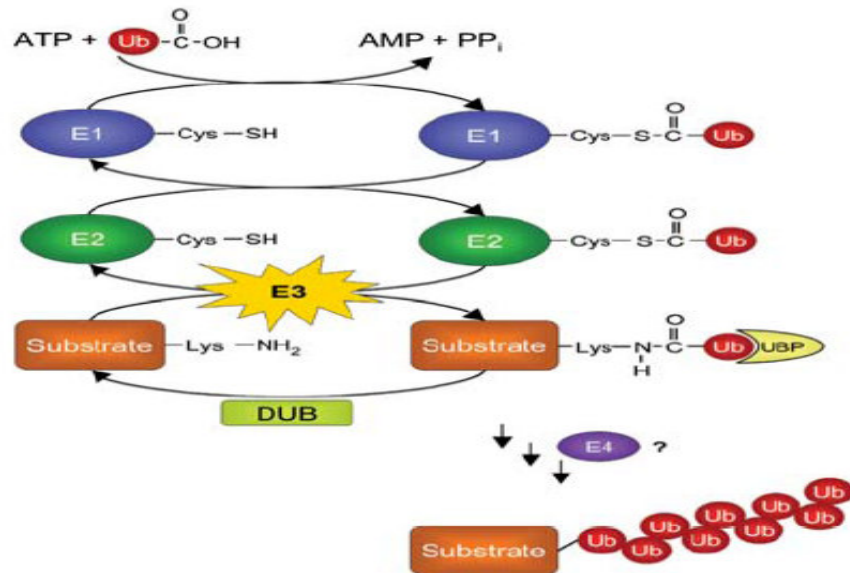
Μετά την ενδοκύττωση, οι υποδοχείς εισέρχονται σε πρώιμα ενδοσώματα και από εκεί είτε επιστρέφουν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη μέσω ανακύκλωσης, είτε αποικοδομούνται σε ώριμα ενδοσώματα/λυσosώματα. Η ανακύκλωση μέσω ενδοσωμάτων που είναι θετικά για Rab-11 (Ras-like small G-protein 11) μπορεί να διευκολύνεται με τον διαχωρισμό του δεσμευτή από τον υποδοχέα στα πρώιμα ενδοσώματα ή μπορεί να ρυθμίζεται άμεσα (French, et al, 1995). Όσον αφορά την αποικοδόμηση, έχει παρατηρηθεί ότι η πολλαπλή ουβικουιτινίωση των υποδοχέων αποτελεί σήμα που αναγνωρίζεται από τις περιοχές UIM (ubiquitin-interacting motif) που περιέχονται στην πρωτεΐνη Hrs (Hepatocyte-growth-factor- regulated tyrosine kinase substrate) και τους καθοδηγεί τελικά στα MVBs (multi-vesicular bodies), όπου η σηματοδότηση τερματίζεται και οι υποδοχείς αποικοδομούνται στα λυσοσώματα (Εικ.4) (Katzman et al., 2001). Είναι φανερό ότι πληθώρα συστατικών του ενδοκυττωτικού μονοπατιού υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως φωσφορυλίωση ή ουβικουιτινίωση, ενώ η συμμετοχή φωσφολιπιδίων είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό της αρχικής εγκόλπωσης. Τόσο λοιπόν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, όσο και οι αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών και λιπιδίων, που σχετίζεται με τη διαφορετική σύσταση της μεμβράνης σε διαφορετικά διαμερίσματα, είναι καθοριστικές

για τον διαχωρισμό φορτίων σε διαφορετικά ενδοκυττωτικά μονοπάτια καθώς και για τη ρύθμιση της σηματοδότης μέσω της ενδοκύττωσης (LeRoy & Wrana, 2005).

### Ρύθμιση της μεταφοράς διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο από την ουβικουιτίνη

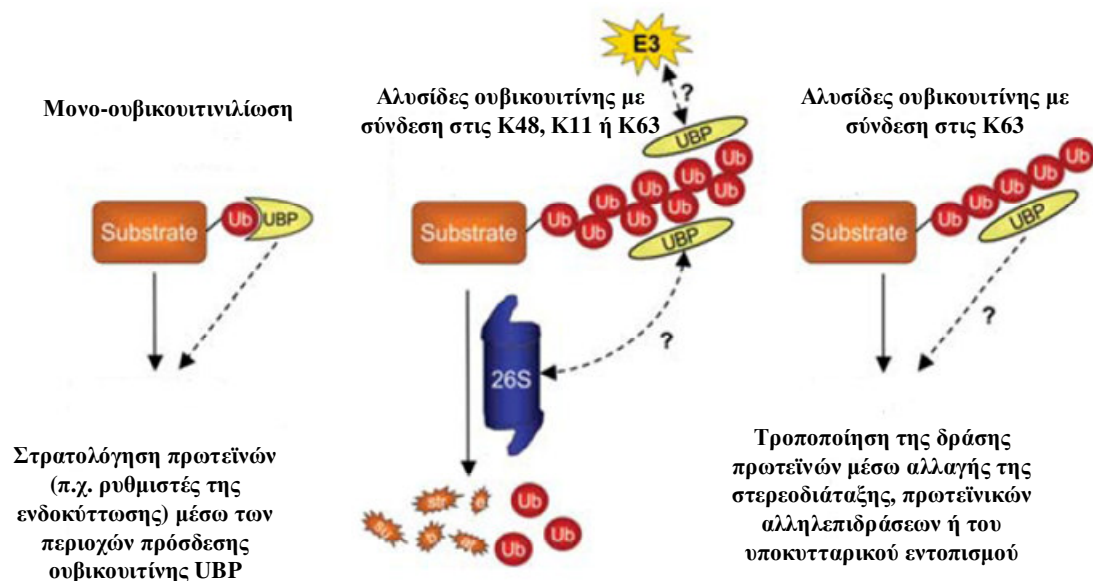
Η ουβικουιτίνη είναι μια πρωτεΐνη 76 αμινοξέων, η οποία συνδέεται ομοιοπολικά με την πρωτεΐνη-υπόστρωμα σε μια αντίδραση τριών διαδοχικών βημάτων.

Συγκεκριμένα το πρώτο στάδιο της αντίδρασης ξεκινάει με το σχηματισμό θειοεστερικού δεσμού μεταξύ της ουβικουιτίνης και του ενζύμου ενεργοποίησης E1 παρουσία ATP. Στο επόμενο στάδιο η ουβικουιτίνη μεταφέρεται από το ένζυμο ενεργοποίησης E1 στο ένζυμο σύζευξης E2 με το οποίο σχηματίζει νέο θειοεστερικό δεσμό. Τέλος η E3 λιγάση ουβικουιτίνης είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση του υποστρώματος και καταλύει τη μεταφορά ουβικουιτίνης από το ένζυμο E2 στο υπόστρωμα (Εικ.5).



**Εικ. 5 : Το μονοπάτι της ουβικουιτινίωσης.** Η ουβικουιτίνη (Ub) προσδένεται ομοιοπολικά στο υπόστρωμα μέσω της διαδοχικής δράσης τριών ενζύμων, το E1 ενζύμου ενεργοποίησης, του E2 ενζύμου πρόσδεσης και της E3 λιγάσης. Η προσθήκη πολλών μορίων ουβικουιτίνης μέσω της E3 λιγάσης (και πιθανόν με τη βοήθεια ενός ενζύμου E4), οδηγεί στο σχηματισμό αλυσίδων πολυ-ουβικουιτίνης. Τα μόρια ουβικουιτίνης μπορούν να αφαιρεθούν από ένα υπόστρωμα μέσω της δράσης ενζύμων απο-ουβικουιτινίωσης (DeUbiquitinating enzymes DUBs). Πρωτεΐνες που φέρουν περιοχές αλληλεπίδρασης με ουβικουιτίνη (Ubiquitin Binding Proteins UBPs) αναγνωρίζουν ουβικουιτινιωμένα υποστρώματα και μπορεί να αποτρέπουν τη μετατροπή της μονο-ουβικουιτινίωσης σε πολυ-ουβικουιτινίωση, μπορεί να προστατεύουν από τη δράση ενζύμων απο-ουβικουιτινίωσης, να στοχεύουν τις πρωτίνες στο πρωτεάσωμα ή να μεσολαβούν στη μεταγωγή του σήματος δημιουργώντας νέες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. (Passmore & Barford, 2004).

Οι πρωτεΐνες- υποστρώματα μπορεί να τροποποιούνται με την προσθήκη ενός μορίου ουβικουιτίνης (μονο-ουβικουιτινιλίωση) πάνω σε μία ή περισσότερες λυσίνες. Επειδή το ίδιο το μόριο της ουβικουιτίνης φέρει λυσίνες που μπορούν να δρουν σαν δέκτες μορίων ουβικουιτίνης, συχνά σχηματίζονται αλυσίδες πολυ-ουβικουιτίνης. Ο σχηματισμός αλυσίδων πολυ-ουβικουιτίνης, όπου η γλυκίνη του καρβοξυτελικού άκρου ενός μορίου συνδέεται με τη λυσίνη 48 του προηγούμενου μορίου, σχετίζεται με την καλύτερα μελετημένη δράση της ουβικουιτίνης, δηλαδή την αποικοδόμηση πρωτεϊνών μέσω του πρωτεασώματος (Thrower, et al., 2000). Η μονο-ουβικουιτινιλίωση αντίθετα σχετίζεται με διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι η ρύθμιση των ιστονών, η εκβλάστηση ρετρο-ιών από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και η ενδοκύττωση (Hicke, 2001). Έχει παρατηρηθεί πρόσφατα ότι όλο και περισσότερες από τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που εισέρχονται στο ενδοκυττωτικό μονοπάτι υφίστανται ουβικουιτινιλίωση στην ενδοκυττάριά τους περιοχή.



**Εικ. 6: Τροποποιήσεις μέσω ουβικουιτίνης.** Το αποτέλεσμα της ουβικουιτινιλίωσης εξαρτάται από τον τύπο της τροποποίησης. Προσθήκη ενός μόνο μορίου ουβικουιτίνης μπορεί να στρατολογήσει συγκεκριμένες πρωτεΐνες που προσδένονται σε ουβικουιτίνη (UBPs). Μονο-ουβικουιτινιλίωση μεμβρανικών πρωτεϊνών στρατολογεί πρωτεΐνες του ενδοκυττωτικού μονοπατιού και επάγει την ενδοκύττωσή τους. Αλυσίδες πολυ-ουβικουιτίνης με σύνδεση στη λυσίνη 48 (και πιο σπάνια στις λυσίνες 11 και 29) αναγνωρίζονται από το πρωτεάσωμα 26 S και οδηγούν σε αποικοδόμηση του υποστρώματος. Οι αλυσίδες πολυ-ουβικουιτίνης με σύνδεση στη λυσίνη 63 δεν στοχεύουν στο υπόστρωμα στο πρωτεάσωμα, αλλά ευθύνονται πιθανό για τροποποίηση της λειτουργίας του (Passmore & Barford, 2004).

Σε κύτταρα θηλαστικών πολλά κανάλια ιόντων και διαμεμβρανικοί υποδοχείς που ρυθμίζονται μέσω ενδοκύττωσης ουβικουιτινιλιώνονται μετά από την πρόσληψη εξοκυττάρων σημάτων και η ουβικουιτινιλίωση ρυθμίζει την πορεία τους στο ενδοκυττωτικό μονοπάτι (Hicke, 1999). Με ποιο τρόπο όμως χρησιμοποιούνται τα μόρια της ουβικουιτίνης για να σηματοδοτήσουν την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών στο όξινο περιβάλλον των λυσοσωμάτων; Τόσο στο σακχαρομύκητα όσο και σε κύτταρα θηλαστικών η μονο-ουβικουιτινιλίωση είναι ικανή να πυροδοτήσει την ενδοκύττωση πρωτεϊνών σε πρώιμα ενδοκυττωτικά κυστίδια (Roth & Davis, 2000). Για αρκετές περμεάσες αμινοξέων του σακχαρομύκητα, αλυσίδες δύο μορίων ουβικουιτίνης που συνδέονται στη λυσίνη 63 της ουβικουιτίνης, επάγουν περαιτέρω το ρυθμό της ενδοκύττωσης (Galan & Haguenaue-Tsapis, 1997). Η πληροφορία για την ενδοκύττωση φαίνεται να περιέχεται στα ίδια τα μόρια της ουβικουιτίνης, αφού η ουβικουιτίνη μπορεί να επάγει την ενδοκύττωση όταν προστεθεί στο αναγνωστικό πλαίσιο υποδοχέων που τους έχουν αφαιρεθεί οι λυσίνες - δέκτες ουβικουιτίνης ή ετερόλογων πρωτεϊνών που φυσιολογικά δεν ενδοκυττώνονται (Shih, et al., 2000). Η ενδοκύττωση ελέγχεται από την ουβικουιτίνη που έχει προστεθεί στο αναγνωστικό πλαίσιο της πρωτεΐνης, αφού όταν για αυτό το σκοπό χρησιμοποιείται ουβικουιτίνη που δεν έχει λυσίνες και κατά συνέπεια δεν μπορεί να σχηματίσει αλυσίδες, εξακολουθεί να παρατηρείται η επαγωγή της ενδοκύττωσης των χμαιοικών πρωτεϊνών (Εικ.6).

Η μονο-ουβικουιτινιλίωση δεν λειτουργεί μόνο σαν σήμα ενδοκύττωσης μιας πρωτεΐνης-φορτίου. Μπορεί επίσης να ελέγχει την ενεργότητα της ενδοκυττωτικής μηχανής. Η πρωτεΐνη Eps15 μονο-ουβικουιτινιλιώνεται μετά από ενεργοποίηση των κυττάρων από την πρόσδεση επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Wilde et al., 1999). Η πρωτεΐνη Fat facets στη δροσόφιλα έχει δράση ενζύμου απο-ουβικουιτινιλίωσης, αφαίρεσης δηλαδή μορίων ουβικουιτίνης από υποστρώματα - στόχους. Γενετικά πειράματα στη δροσόφιλα δείχνουν πιθανή αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης Fat facets με την Epsin, η οποία είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με την Eps15 στο ενδοκυττωτικό μονοπάτι (Cadavic et al., 2000).

## Ενδοκύττωση και ρύθμιση του μονοπατιού Notch

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch ρυθμίζεται από ενδοκύττωση τόσο του διαμεμβρανικού υποδοχέα όσο και του δεσμευτή. Ο ρόλος της ενδοκύττωσης σαν γενικός μηχανισμός ρύθμισης της σηματοδότησης έχει περιγραφεί για αρκετούς διαμεμβρανικούς υποδοχείς, οι οποίοι αμέσως μετά την ενεργοποίησή τους οδηγούνται μέσω ενδοκύττωσης από την κυτταροπλασματική μεμβράνη στο λυσόσωμα, όπου και αποικοδομούνται. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο υποδοχέας LIN-12 του *C.elegans*, ο οποίος φαίνεται να οδηγείται για ενδοκύττωση και επακόλουθη αποικοδόμηση μετά από την αναγνώριση ενός συντηρημένου μοτίβου δύο διαδοχικών καταλοίπων λευκίνης (Shaye et al, 2002). Η ενδοκύττωση του υποδοχέα Notch αποτελεί πιθανόν μια συντηρημένη διαδικασία, αφού τόσο η εξωκυττάρια, όσο και η ενδοκυττάρια περιοχή του είναι δυνατόν να ανιχνευθούν μέσα σε ώριμα ενδοσώματα (late endosomes) στη δροσόφιλα (Kooh et al, 1993). Η λειτουργική σημασία της ενδοκύττωσης του N δεν είναι ωστόσο γνωστή. Πρόσφατα δύο E3 λιγάσες ουβικουιτίνης, οι πρωτεΐνες Itch και Deltex, χαρακτηρίστηκαν υπεύθυνες για τη στόχευση του N σε ενδοκυττωτικά διαμερίσματα. Συγκεκριμένα η λιγάση Itch περιλαμβάνει ένα μοτίβο πρόσδεσης φωσφολιπιδίων τύπου C2, που πιθανόν οδηγεί την πρωτεΐνη στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, μια περιοχή με τέσσερα μοτίβα WW που είναι υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση με την ενδοκυττάρια περιοχή του N και μια περιοχή HECT με δράση E3 λιγάσης ουβικουιτίνης. Σε κύτταρα θηλαστικών η πρωτεΐνη Itch αλληλεπιδρά με την ενδοκυττάρια περιοχή του υποδοχέα και επάγει την ουβικουιτινιλιώσή της (Qiu et al, 2000). Η ορθόλογη πρωτεΐνη του Itch στη δροσόφιλα ονομάζεται Suppressor of Deltex (Su(dx)) και έχει ταυτοποιηθεί γενετικά σαν ένας ισχυρός καταστολέας της δράσης του Deltex, ο οποίος δρα σαν αρνητικός ρυθμιστής της σηματοδότησης από N. Αυτή η δράση του υποδηλώνει ότι μειώνει τα επίπεδα του N μέσα στο κύτταρο μέσω πιθανής αποικοδόμησής του. Το γονίδιο *Deltex* κωδικοποιεί και αυτό μια πρωτεΐνη τύπου RING που εντοπίζεται στην κυτταρική περιφέρεια, προσδένεται στην ενδοκυττάρια περιοχή του N και δρα σαν θετικός ρυθμιστής του υποδοχέα (Matsuno et al, 1995, Matsuno et al, 2002). Εάν οι πρωτεΐνες αυτές ρυθμίζουν

το N μέσω ενδοκύττωσης ή ελέγχουν τα επίπεδα και την ενεργότητα του τροποποιημένου N μέσα στο κύτταρο παραμένει ασαφές.

Η ενδοκύττωση του υποδοχέα μπορεί να αποτελεί ωστόσο και θετική ρύθμιση για τη σηματοδότηση. Ανάλυση του γονιδίου *shibire(shi)* της δροσόφιλα, το οποίο κωδικοποιεί την ορθόλογη πρωτεΐνη της δυναμίνης, μιας GTPase που εμπλέκεται στο μηχανισμό σχηματισμού των ενδοκυττωτικών κυστιδίων από την κυτταροπλασματική μεμβράνη, αποτέλεσε το πρώτο στοιχείο θετικής ρύθμισης της σηματοδότησης N από το μηχανισμό της ενδοκύττωσης. Όταν μύγες με μεταλλάξεις στο γονίδιο *shi* που είναι ευαίσθητες στη θερμοκρασία, μεγαλώσουν σε περιοριστικές συνθήκες, εμφανίζουν φαινότυπο όμοιο με αυτόν απώλειας λειτουργίας N. Επιπλέον, αποτελέσματα ανάλυσης μιτωτικών κλώνων δείχνουν ότι η δράση του *shi* είναι απαραίτητη τόσο στο κύτταρο δέκτη όσο και στο κύτταρο πομπό του σήματος (Seugnet et al, 1997). Για ποιο ακριβώς λόγο είναι απαραίτητη η δράση του γονιδίου *shi* στο κύτταρο δέκτη δεν είναι γνωστό. Με βάση την παρατήρηση ότι σε υπόβαθρο έλλειψης λειτουργίας του *shi* το πλήρους μήκους N είναι ανενεργό, ενώ η ενδοκυττάρια περιοχή του υποδοχέα είναι ικανή να σηματοδοτεί, είναι πιθανό η ενδοκύττωση να εμπλέκεται στη μεταφορά του τμήματος NTM του υποδοχέα στο κατάλληλο ενδοκυττωτικό διαμέρισμα που περιέχει την ενεργή  $\gamma$ -σεκρετάση (Schweisguth, 2004). Πρόσφατες μελέτες σε κύτταρα θηλαστικών ενισχύουν αυτή την υπόθεση, αφού φαίνεται ότι η μονο-ουβικουιτινιλίωση και ενδοκύττωση του υποδοχέα είναι απαραίτητα γεγονότα πριν την πρωτεολυτική πέψη του από τη  $\gamma$ -σεκρετάση (Gupta-Rossi et al, 2004).

Εκτός από την ενδοκύττωση του υποδοχέα και η ενδοκύττωση των δεσμευτών φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο για την ενεργοποίηση της σηματοδότησης. Τόσο το DI όσο και το Ser εντοπίζονται στην επιφάνεια ενδοκυττωτικών κυστιδίων στη δροσόφιλα (Kooh et al., 1993, Parks et al., 1995). Επιπλέον, δοκιμές πρόσληψης αντισωμάτων από ζωντανούς ιστούς δροσόφιλας έχουν δείξει ότι και οι δύο δεσμευτές DI και Ser ενδοκυττώνονται γρήγορα (Le Borgne et al. 2005a, Le Borgne & Schweisguth, 2003). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο υποκυτταρικός εντοπισμός των δεσμευτών στα σπονδυλωτά έχει μελετηθεί ελάχιστα. Μόνο το DeltaD του zebrafish έχει δείξει να εντοπίζεται κυρίως σε ενδοκυττωτικά κυστίδια νευροεπιθηλιακών κυττάρων (Itoh et al., 2003). Ο εντοπισμός του DI σε ενδοκυττωτικά κυστίδια φαίνεται να

σχετίζεται με τη σηματοδοτική του ενεργότητα σε πολλά αναπτυξιακά γεγονότα, καθώς μόρια τα οποία δεν μπορούν να ενδοκυττωθούν έχουν μειωμένη ικανότητα να σηματοδοτούν (Parks et al., 2000).

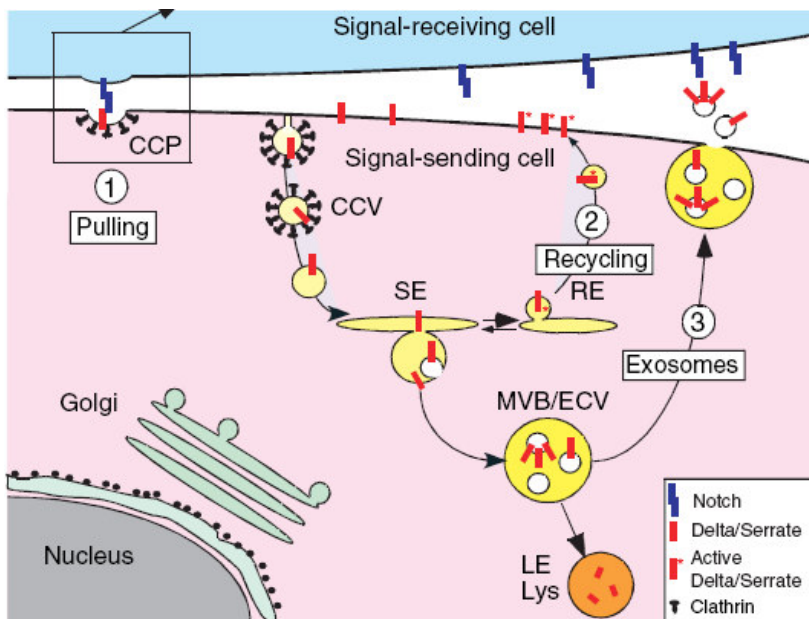
Επιπλέον παρατηρήσεις για το ρόλο της ενδοκύτωσης στη σηματοδότηση N έχουν προέλθει από γενετικές μελέτες στη δροσόφιλα και στο zebrafish, όπου ταυτοποιήθηκαν γονίδια όπως η *Epsin* και τα *neur* και *mind bomb1(mib1)* σαν ρυθμιστικά μόρια της σηματοδοτικής ενεργότητας των δεσμευτών. Απώλεια λειτουργίας του *neur*, του *mib* ή του *lqf* (liquid facets, το ορθόλογο της *Epsin* στη δροσόφιλα) προκαλεί φαινοτύπους που σχετίζονται με απώλεια λειτουργίας του N. Η συσσώρευση του δεσμευτή DI που παρατηρείται στην επιφάνεια κυττάρων με μεταλλαγή στο *lqf* στη δροσόφιλα πιθανώς οφείλεται σε μειωμένα επίπεδα ενδοκύτωσης του (Overstreet et al., 2004, Wang & Struhl, 2004). Το *neur* βρέθηκε αρχικά να αλληλεπιδρά με το DI και να επάγει την ουβικουιτινιλίωση και την ενδοκύτωσή του τόσο στη δροσόφιλα όσο και στο βάτραχο (Deblandre et al., 2001, Lai et al., 2001, Pavlopoulos et al., 2001, Yeh et al., 2001, Le Borgne & Schweisguth, 2003). Η ενδοκύτωση του DI που εξαρτάται από *neur* παρατηρείται και σε έμβρυα δροσόφιλας με μεταλλαγμένο N, γεγονός που δείχνει ότι η αλληλεπίδραση N-DI δεν είναι αναγκαία για την περαιτέρω ενδοκύτωση του δεσμευτή (Morel et al., 2003). Πιο πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι μπορεί επίσης να αλληλεπιδρά και να ρυθμίζει και το Ser με εντελώς παρόμοιο τρόπο (Pitsouli & Delidakis, 2005). Στη δροσόφιλα το *mib1* αλληλεπιδρά τόσο με το DI όσο και με το Ser (Le Borgne et al., 2005, Lai et al., 2005, Pitsouli & Delidakis, 2005), ενώ στο zebrafish φαίνεται να αλληλεπιδρά και να ρυθμίζει την ενδοκύτωση μόνο του DI (Chen & Casey Corliss, 2004, Itoh et al., 2003). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το *neur* και το *mib* ρυθμίζουν διαφορετικές διαδικασίες που απαιτούν σηματοδότηση N στη δροσόφιλα, υποδηλώνοντας ότι έχουν συμπληρωματικές λειτουργίες. Επιπλέον απώλεια λειτουργίας του *mib1* μπορεί να αντισταθμιστεί από εκτοπική έκφραση του *neur*, δείχνοντας ότι οι δύο πρωτεΐνες έχουν παρόμοια μοριακή δράση (Le Borgne, et al., 2005, Lai et al, 2005).

Με ποιο τρόπο η ενδοκύτωση του διαμεμβρανικού δεσμευτή στο κύτταρο πομπό σχετίζεται με την ενεργοποίηση του διαμεμβρανικού υποδοχέα στο γειτονικό κύτταρο δέκτη; Ποικίλλα μοντέλα έχουν διατυπωθεί για να ερμηνεύσουν αυτό το παράδοξο φαινόμενο. Με βάση την πρώτη υποθήση που διατυπώθηκε από τους Parks et al (2000), η



δεύτερη πρωτεολυτική πέψη S2 του υποδοχέα N προϋποθέτει αλλαγή στη στερεοδιάταξη της εξωκυττάριας περιοχής του, γεγονός που επιτυγχάνεται με μηχανικό τράβηγμα που προέρχεται από την ενδοκύττωση του δεσμευτή στο γειτονικό κύτταρο, καθώς αλληλεπιδρά με την εξωκυττάρια περιοχή του N (τρανς ενδοκύττωση) (Εικ.6 -1). Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από την παρατήρηση ότι η δράση της δυναμίνης κατά την ενδοκύττωση του DI είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της σηματοδότησης.

Ένα δεύτερο μοντέλο προϋποθέτει ότι οι δεσμευτές παράγονται σε ανενεργή μορφή και η ενδοκύττωσή τους αποτελεί απαραίτητο βήμα για να φτάσουν στην κυτταρική επιφάνεια πλήρως ενεργοποιημένοι. Το μοντέλο αυτό βασίζεται στην παρατήρηση ότι οι δεσμευτές συσσωρεύονται σε μεγάλα ενδοκυττωτικά κυστίδια που πιθανό αντιστοιχούν σε multivesicular bodies (MVBs). Η ενδοκύττωση εικάζεται ότι είναι απαραίτητη για την παραγωγή εξωσωμάτων (exosomes) που περιέχουν DI ή Ser και προέρχονται από την σύντηξη των MVBs με την κυτταροπλασματική μεμβράνη (Le Borgne & Schweisguth, 2003) (Εικ.6-3). Τα κυστίδια αυτά μπορεί να αποτελούν την ενεργή μορφή του δεσμευτή, η οποία έχει ανιχνευθεί στο θρεπτικό μέσο κυττάρων S2 τα οποία εκφράζουν σταθερά την πλήρους μήκους μορφή του δεσμευτή (Mishra-Gorur et al, 2002). Το μοντέλο αυτό έρχεται σε αντίθεση ωστόσο με την παρατήρηση ότι έλλειψη λειτουργίας της πρωτεΐνης hrs, η οποία αναστέλλει το σχηματισμό των MVBs, δεν φαίνεται να επηρεάζει την σηματοδοτική ενεργότητα του DI (Jekely & Rorth, 2003).



**Εικ. 6: Μοντέλα του τρόπου με τον οποίο η ενδοκύττωση μπορεί να επάγει τη σηματοδότηση N.** Τρία μοντέλα έχουν προταθεί για να εξηγήσουν το παράδοξο της αναγκαιότητας της ενδοκύττωσης του δεσμευτή DI ή Ser στο κύτταρο πομπό για να ενεργοποιηθεί η σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα N στο κύτταρο δέκτη. 1. Η ενδοκύττωση του δεσμευτή που είναι προσδεδεδεμένος στον υποδοχέα μπορεί να παράγει μηχανική πίεση στο N, η οποία να προκαλεί αλλαγές στερεοδιάταξης απαραίτητες για την πραγματοποίηση των πρωτεολυτικών γεγονότων που ακολουθούν. 2 και 3. Οι νεοσυντιθέμενοι δεσμευτές αποκτούν ενεργότητα μόνο μετά την μετακίνησή τους μέσω κατάλληλων ενδοκυττωτικών διαμερισμάτων. Στο μοντέλο 2, οι δεσμευτές ενεργοποιούνται αφού εισέλθουν στα ενδοσώματα ανακύκλωσης, όπου πιθανό υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Στο μοντέλο 3, οι δεσμευτές στοχεύονται στα πολυ-κυστιδιακά σωμάτια (MVBs) και στη συνέχεια είτε αποικοδομούνται στο λυσόσωμα, είτε εκκρίνονται μετά το σχηματισμό εξωσωμάτων. CCP: clathrin coated pit, CCV: clathrin coated vesicle, LE : late endosome, SE: sorting endosome, MVB : multivesicular bodies, RE : recycling endosome, Lys : lysosome (Le Borgne, 2005).

Το τρίτο μοντέλο υποθέτει ότι απαραίτητες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του δεσμευτή που τον οδηγούν σε κατάλληλα ενδοσώματα ανακύκλωσης, όπου και μετατρέπεται στην ενεργή του μορφή, ρυθμίζονται μέσω της ενδοκύττωσής του (Εικ.6-2) (Wang & Struhl, 2004). Η ανάλυση μιας σειράς χιμαιρικών μορφών του δεσμευτή DI ενισχύουν αυτό το μοντέλο. Οι Sun & Artavanis-Tsakonas (1996) έδειξαν αρχικά ότι αφαίρεση της ενδοκυττάριας περιοχής του DI αναστέλλει τη σηματοδοτική του δράση. Όταν η ενδοκυττάρια αυτή περιοχή αντικατασταθεί από πεπτίδιο του υποδοχέα λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDLR), που ευθύνεται για την ενδοκύττωση και ανακύκλωσή του στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, αποκαθίσταται η σηματοδοτική ενεργότητα του DI (σε χαμηλότερα ωστόσο επίπεδα από τα φυσιολογικά). Η αντικατάσταση της ενδοκυττάριας περιοχής του DI με ένα μόριο ουβικουιτίνης μπορεί επίσης να επάγει την ενδοκύττωση του DI και την ενεργοποίηση του N. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η χιμαιρική πρωτεΐνη με το πεπτίδιο του LDLR μπορεί να καταστείλει το φαινότυπο απώλειας λειτουργίας του *lqf*, κάτι που δεν παρατηρείται με τη χιμαιρική πρωτεΐνη με το μόριο ουβικουιτίνης. Το πεπτίδιο του LDLR έχει την ικανότητα να επάγει την ανακύκλωση της πρωτεΐνης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, τονίζοντας πιθανώς το σημαντικό ρόλο της *Lqf* στην ανακύκλωση (Wang & Struhl, 2004). Με τη χρήση τέτοιων χιμαιρικών κατασκευών είναι δυνατό να αναλυθούν όλα τα ενδιάμεσα βήματα της διακίνησης των δεσμευτών DSL από την κυτταρική μεμβράνη σε ενδοσώματα και πίσω στην μεμβράνη, καθώς επίσης να κατανοηθεί ο τρόπος ρύθμισης της ενεργοποίησης των δεσμευτών τοπικά και χρονικά, ταυτοποιώντας παράλληλα και τα μόρια που εμπλέκονται σε αυτά τα γεγονότα.




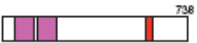




## Ο ρόλος της ουβικουιτινιλίωσης στο σηματοδοτικό μονοπάτι Notch

Οι πρώτες ενδείξεις για συμμετοχή του μονοπατιού της ουβικουιτίνης στη σηματοδότηση N προήλθαν από μελέτη μεταλλαγών των υπομονάδων του πρωτεασώματος στη δροσόφιλα. Παρά το γεγονός ότι πλήρης απώλεια λειτουργίας του πρωτεασώματος είναι θνησιγόνα, μια χρονικά περιορισμένη μείωση τη δράσης του βρέθηκε να προκαλεί συγκεκριμένη μετατροπή στη κυτταρική μοίρα των εξωτερικών μηχανο-αισθητηρίων οργάνων. Αυτές οι ανωμαλίες, που περιελάμβαναν μετατροπές shaft-to-socket και neuron-to-sheath, θυμίζουν αυξημένη λειτουργία της σηματοδότησης N, δείχνοντας πιθανή αρνητική ρύθμιση του μονοπατιού από το πρωτεάσωμα. Επιπλέον η σταθερότητα της ενδοκυττάριας περιοχής του N (NICD) φαίνεται αυξημένη σε μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας του πρωτεασώματος, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί από την άμεση ρύθμιση του υποδοχέα από το πρωτεάσωμα (Schweisguth 1999).

Η ταυτοποίηση E3 λιγασών ουβικουιτίνης, που εκφράζονται κάτω από δυναμικά ρυθμιζόμενες συνθήκες στο χώρο και στο χρόνο, έχειδειχτεί καθοριστική για την κατανόηση της ρύθμισης της σηματοδότησης μέσω N (Πιν.1). Η ρύθμιση μέσω ουβικουιτινιλίωσης φαίνεται να είναι πολύ σημαντική τόσο για τον έλεγχο των επιπέδων του μορίου στόχου (McGill & McGlade, 2003, Nie et al, 2002, Qiu et al, 2000) όσο και για τη στόχευσή του σε κατάλληλα κυτταρικά διαμερίσματα (Le Borgne, et al 2005, Chen & Corliss, 2004). Η πρωτεΐνη Sel-10 αλληλεπιδρά με την ενδοκυττάρια περιοχή του N (NICD) μέσω της περιοχής WD40 και επάγει την ουβικουιτινιλίωση και αποικοδόμησή του από το πρωτεάσωμα, μετά από στρατολόγηση του συμπλόκου SCF που αποτελείται από τις πρωτεΐνες Sel-10, Cullin-1, Skp-1 και Hrt-1 (Gupta-Rossi et al, 2001, Oberg et al, 2001, Wu et al, 2001). Η πρωτεΐνη Itch (ομόλογη του Su(dx) στη δροσόφιλα) είναι E3 λιγάση ουβικουιτίνης τύπου HECT, που επάγει την ενδοκύτωση του N σε συνεργασία με το Numb (McGill & McGlade, 2003, Qiu et al, 2001). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα επίπεδα του Numb ρυθμίζονται από μια άλλη E3 λιγάση ουβικουιτίνης LNX (ligand of Numb-protein-X), η οποία αλληλεπιδρά με την περιοχή PTB του Numb και προκαλεί την αποικοδόμησή του, με αποτέλεσμα να ενισχύει τη σηματοδότηση N (Nie et al, 2002). Εκτός από το *Su(dx)/Itch* και το γονίδιο *Deltex* κωδικοποιεί μία E3 λιγάση ουβικουιτίνης τύπου RING-H2, η οποία οδηγεί τον υποδοχέα

σε ώριμα ενδοκυττωτικά κυστίδια και προκαλεί ενεργοποίηση του μονοπατιού που δεν εξαρτάται από το Su(H) (Hori et al, 2004). Η εξισορρόπηση της δράσης των δύο αυτών λιγασών είναι πολύ σημαντική για τη στόχευση και συσώρευση του υποδοχέα σε ενδοκυττωτικά κυστίδια ή για την αποικοδόμησή του στο λυσόσωμα

**Πιν. 1: Δομή και λειτουργία των E3 λιγασών ουβικουιτίνης που συμμετέχουν στη σηματοδότηση N.**

Drosophila	Θηλαστικά	Λειτουργία στη σηματοδότηση N
D-mib  1226 Mind-bomb related  1060	Mind-bomb Skeletrophin	Ουβικουιτινίωση DI και Ser Ενδοκύττωση DI και Ser, ενεργοποίηση σηματοδότησης N Ουβικουιτινίωση Jagged2
Neuralized  755	Neuralized 1-2	Ουβικουιτινίωση DI και Ser Ενδοκύττωση DI και Ser, ενεργοποίηση σηματοδότησης N
Deltex  738	Deltex 1-4	Ουβικουιτινίωση N? Ενδοκύττωση και στόχευση N σε διαμέρισμα Rab-11 Ενεργοποίηση σηματοδότησης N ανεξάρτητης από CSL?
Su(dx)  950 Nedd4  1007	Itch/AIP4 Nedd4	Ουβικουιτινίωση N? Ενδοκύττωση και στόχευση N σε διαμέρισμα Rab-7 Αποικοδόμηση N στο λυσόσωμα
D-smurf  1052	Smurf	Άγνωστη
Cbl  970	Cbl	Αλληλεπίδραση με N Αποικοδόμηση N στο λυσόσωμα Αλληλεπίδραση με AIP4/Itch

Ring Finger  
  Mib HERC2  
  ZnF ZZ  
  Ankyrin repeat  
  Neuralized homology  
  HECT  
  WWE  
  C2  
 WW  
  SH2 SH2  
  N CblLN  
  N2 CblN2  
  UBA

Ένα καθοριστικό βήμα στη σηματοδότηση από τους δεσμευτές DI και Ser αποτελεί η ρύθμισή τους από τα γονίδια *neur* και *mib1* στη δροσόφιλα. Τα δύο αυτά γονίδια ταυτοποιήθηκαν με βάση το φαινότυπο απώλειας λειτουργίας τους, που μοιάζει με αυτό του N. Και τα δύο γονίδια κωδικοποιούν E3 λιγασές ουβικουιτίνης τύπου RING και είναι υπεύθυνα για την ουβικουιτινίωση των δεσμευτών DI και Ser. Τόσο το *Xneur* του βατράχου όσο και το *mib* του zebrafish έχει δείχτει να αλληλεπιδρούν με το DI και να ευθύνονται για την ουβικουιτινίωσή του. Επιπλέον, ανάλυση μιτωτικών κλώνων στη δροσόφιλα και μελέτες μεταμόσχευσης (transplantation) στο zebrafish υποδηλώνουν ότι

οι πρωτεΐνες *neur* και *mib1* αντίστοιχα, δρουν κυτταρικά μη αυτόνομα και ενεργοποιούν τη σηματοδότηση μέσω DI. Η ουβικουιτινίωση των δεσμευτών από τις δύο αυτές E3 λιγάσες θεωρείται ότι δρα σαν σήμα για την ενδοκύττωσή τους, επάγοντας την αλληλεπίδρασή τους με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες-ρυθμιστές που περιέχουν μοτίβα αναγνώρισης ουβικουιτίνης. Η πρωτεΐνη *Lqf*, η οποία περιέχει ένα τέτοιο μοτίβο UIM (ubiquitin interaction motif), δρα πιθανόν σαν ένας τέτοιος ρυθμιστής. Έχει ωστόσο παρατηρηθεί ότι μέρος των δεσμευτών συνεχίζει να ενδοκυττώνεται σε υπόβαθρο έλλειψης λειτουργίας της *lqf*, των *neur* ή/και *mib1*, χωρίς ωστόσο να έχει ενεργότητα για σηματοδότηση. Είναι πιθανό λοιπόν να υπάρχουν δύο ή περισσότερα διαφορετικά μονοπάτια ενδοκύτωσης των δεσμευτών που οδηγούν σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα και μόνο το ένα από αυτά να εξαρτάται από την ουβικουιτίνη.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι διαμεμβρανικοί υποδοχείς έχουν την ικανότητα να εισέρχονται σε διαφορετικές ενδοκυττωτικές οδούς. Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) ενδοκυττώνεται μέσω του μονοπατιού που εξαρτάται από την κλαθρίνη, αλλά και μέσω του μονοπατιού που είναι ανεξάρτητο από κλαθρίνη. Όταν ενεργοποιείται από χαμηλές συγκεντρώσεις του δεσμευτή, ενδοκυττώνεται σχεδόν αποκλειστικά από το μονοπάτι της κλαθρίνης και δεν ουβικουιτινιώνεται. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις του δεσμευτή, ένα μέρος του υποδοχέα ενδοκυττώνεται από μονοπάτι ανεξάρτητο της κλαθρίνης, μέσω μηχανισμού που απαιτεί λειτουργική *epsin* και ουβικουιτινίωση του υποδοχέα (Sigismund et al, 2005). Είναι πιθανό οι ουβικουιτινιώμενοι δεσμευτές του N να εισέρχονται στο μονοπάτι που είναι ανεξάρτητο της κλαθρίνης και απαιτεί λειτουργική *lqf*, ενώ μέρος των δεσμευτών να μην ουβικουιτινιώνεται και να ενδοκυττώνεται μέσω του μονοπατιού της κλαθρίνης. Η ενδοκυττωτική πορεία των δύο αυτών πληθυσμών μπορεί να διαφέρει.

Καθώς η ρυθμιζόμενη ενδοκύτωση των δεσμευτών φαίνεται να ελέγχεται από διαδικασίες που σχετίζονται με την ουβικουιτινίωσή τους, η λεπτομερής μελέτη αυτών των γεγονότων μπορεί να δώσει σημαντικές απαντήσεις για την συνολικότερη ρύθμιση της σηματοδότησης. Παρά το γεγονός ότι οι δύο E3 λιγάσες φαίνεται να παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση των δεσμευτών μέσα στο κύτταρο και της σηματοδοτικής του ενεργότητας, δεν είναι γνωστό αν αλληλεπιδρούν άμεσα με τους δεσμευτές προσθέτοντας μόρια ουβικουιτίνης σε κοινά ή διαφορετικά σημεία ή αν ρυθμίζουν την

μονο ή πολυ-ουβικουιτινιλίωσή τους. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι δύο λιγάσες επάγουν τόσο την ενδοκύττωση όσο και την αποκοδόμηση των δεσμευτών, υποδηλώνοντας ότι η ουβικουιτινιλίωση μπορεί να παίζει διπλό ρόλο ενεργοποίησης και καταστολής της σηματοδοτικής τους δράσης. Αυτά τα δύο διαφορετικά αποτελέσματα μπορεί να ρυθμίζονται από το ίδιο γεγονός ουβικουιτινιλίωσης ή να εξαρτώνται από διαφορετικό αριθμό ή τύπο σύνδεσης μορίων ουβικουιτίνης που καταλύονται από το *neur* ή/και το *mib*.

### **Τα γονίδια *neur* και *mib1* της δροσόφιλας**

Το γονίδιο *neur* έχει ταυτοποιηθεί εδώ και είκοσι χρόνια στη δροσόφιλα σαν ένα από τα έξι γονίδια, των οποίων η ζυγωτική δράση είναι απαραίτητη για την επιλογή της νευρικής έναντι της επιδερμικής μοίρας κατά την εμβρυική νευρογένεση (Lehmann et al, 1983). Σε αυτό το σύνολο των γονιδίων, που αρχικά ονομάστηκαν νευρογόνα, περιλαμβάνονται οι βασικοί πρωταγωνιστές του μονοπατιού N. Σε αντίθεση με το *neur*, το γονίδιο *mib1* δεν είχε ταυτοποιηθεί σε καμιά από τις γενετικές αναλύσεις που έγιναν στη δροσόφιλα για νευρογόνα γονίδια και αυτό γιατί ο ρόλος του στην εμβρυογένεση φαίνεται να είναι πλεονάζων (Lai et al, 2005, Le Borgne et al, 2005). Πρόσφατες μελέτες για τη λειτουργία των δύο γονιδίων δείχνουν ότι αυτά ρυθμίζουν το σηματοδοτικό μονοπάτι N σε διαφορετικές αναπτυξιακές διαδικασίες. Ενώ το *neur* φαίνεται να είναι απαραίτητο στη διαδικασία της πλευρικής αναστολής κατά την νευρογένεση του εμβρύου και της νύμφης, και να παίζει σημαντικό ρόλο στις αποφάσεις μοίρας της γενεαλογίας των αισθητηρίων οργάνων, το *mib1* φαίνεται να ρυθμίζει το σχηματισμό του περιθώριου του φτερού, την μεταμέρεια του ποδιού και το σχηματισμό των φλεβών. Παρά τη διαφορά στο πρότυπο έκφρασής τους, και οι δύο πρωτεΐνες όταν υπερεκφραστούν εκτοπικά μπορούν να επηρεάζουν τη σηματοδότηση του N, ακόμα και σε αναπτυξιακές διαδικασίες στις οποίες δεν συμμετέχουν φυσιολογικά. Βιοχημικές μελέτες έδειξαν ότι και οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τους δύο δεσμευτές του N, D1 και Ser, επάγοντας την ενδοκύττωσή τους και την σηματοδοτική τους δράση. Όταν από το καρβοξυτελικό τους άκρο αφαιρεθεί η περιοχή RING, που είναι υπεύθυνη για τη δράση τους σαν E3 λιγάσης ουβικουιτίνης, τότε και οι δύο πρωτεΐνες εμφανίζουν

επικρατή αρνητικό φαινότυπο, αφού αλληλεπιδρούν με τους δύο δεσμευτές, αλλά δεν μπορούν να τους ουβικουιτινιλιώσουν με αποτέλεσμα αυτοί να μην εμφανίζουν σηματοδοτική ενεργότητα (Lai et al, 2001, Pavlopoulos et al, 2001, Lai et al, 2005, Le Borgne et al, 2005).

Αν και οι λειτουργίες των πρωτεϊνών neur/neurΔR και mib1/mib1ΔR είναι παρόμοιες στις περισσότερες περιπτώσεις, η πρωτεΐνη neurΔR έχει την ικανότητα να ενισχύει σημαντικά την ενεργότητα του DI όταν υπερεκφραστεί στο περιθώριο του φτερού, ακριβώς όπως και η πρωτεΐνη αγρίου τύπου (Pavlopoulos et al, 2001), παρά το γεγονός ότι η ίδια μορφή της πρωτεΐνης αναστέλλει τη σηματοδότηση N σε διαφορετικές διαδικασίες (Lai & Rubin, 2001a, Lai & Rubin, 2001b). Αυτή η παρόδοξη παρατήρηση εξηγήθηκε όταν η πρωτεΐνη neurΔR υπερεκφράστηκε σε υποβάθρο έλλειψης λειτουργίας του mib1, όπου κάθε ενισχυτική της δράση χάνεται εντελώς (Pitsouli & Delidakis, 2005). Ενώ λοιπόν αρχικά είχε υποθεθεί ότι ίσως η ουβικουιτινιλίωση του DI δεν είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της σηματοδότησης, είναι πλέον φανερό ότι όταν και οι δύο λιγάσες ουβικουιτίνης είναι ανενεργές αναστέλλεται η σηματοδότηση N. Παρόλα αυτά η πρωτεΐνη neurΔR φαίνεται να έχει κάποια επιπλέον ενισχυτική δράση πάνω στο δεσμευτή DI, η οποία είναι ανεξάρτητη από την ουβικουιτινιλίωση του.

Οι δύο λιγάσες ουβικουιτίνης ενεργοποιούν τους δύο δεσμευτές μέσω της ενδοκύττωσής τους, ενώ παράλληλα επάγουν και την αποικοδόμησή τους. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να είναι αντίθετη με την υπόθεση των Wang & Struhl, ότι οι δεσμευτές ενεργοποιούνται μετά από ανακύκλωσή τους στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Οι δύο αυτές δράσεις μπορεί να εναρμονίζονται αν η ουβικουιτινιλίωση θεωρηθεί ο μοριακός διακόπτης που καθορίζει ποιο μέρος του δεσμευτή θα ανακυκλωθεί μέσω της δράσης του Iqf και ποιο θα οδηγηθεί για αποικοδόμηση. Η δράση του Iqf είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του δεσμευτή, αλλά όχι για την γενικότερη ενδοκύττωσή του, γεγονός που ενισχύει την παραπάνω θεώρηση (Wang & Struhl, 2004). Αν η ουβικουιτινιλίωση αποτελεί προϋπόθεση για την ενεργοποίηση των δεσμευτών, ενώ παράλληλα αποτελεί το σήμα για την αποικοδόμησή τους, μπορεί να περιορίζει την αδιάκοπη ανακύκλωσή τους και να θέτει τον απαραίτητο χρονικό περιορισμό στην ενεργοποίηση της σηματοδότησης N (Schweisguth, 2004). Και ο ίδιος ο υποδοχέας φαίνεται να ρυθμίζεται με τη σύζευξη ενεργοποίησης και αποικοδόμησης, μέσω δύο

διαφορετικών μονοπατιών ενδοκύττωσης που εξαρτώνται από την ουβικουιτίνη (Schweisguth, 2005).

Μελέτες για το *neur* και το *mib1* προβλέπουν ότι η ρυθμιζόμενη συσσώρευση τους θα πρέπει να καθορίζει τον τόπο και το χρόνο που ο δεσμευτής σηματοδοτεί. Σε συμφωνία με αυτή την πρόβλεψη, το γονίδιο *neur* στη δροσόφιλα εκφράζεται συγκεκριμένα στα κύτταρα πομπούς του σήματος μέσα στην ομάδα των πρόδρομων αισθητηρίων οργάνων (sensory organ precursor SOPs) κατά την νευρογένεση του ενήλικου περιφερικού συστήματος. Το *neur* και το *N* ρυθμίζουν επίσης τη μοίρα των αδερφών κυττάρων *pIIa/pIIb* που προκύπτουν από την ασύμμετρη διαίρεση του πρόδρομου αισθητηρίου οργάνου (SOP). Ενεργοποίηση του *N* στο οπίσθιο κύτταρο είναι απαραίτητη για την κυτταρική μοίρα *pIIa*, ενώ αναστολή της σηματοδότησης από το *N* στο πρόσθιο κύτταρο είναι υπεύθυνη για την *pIIb* κυτταρική μοίρα (Posakony, 1994). Κατά τη μίτωση, το *neur* συσσωρεύεται ασύμμετρα στον ένα πόλο του πρόδρομου κυττάρου των αισθητηρίων οργάνων και εντοπίζεται τελικά μόνο στο κύτταρο *pIIb*, το οποίο παίζει ρόλο πομπού (Le Borgne & Schweisguth, 2003). Μεταγραφικοί και μετα-μεταγραφικοί μηχανισμοί φαίνεται λοιπόν να συμβάλλουν στον περιορισμό της λειτουργίας του *neur* στα κύτταρα πομπούς του σήματος στη δροσόφιλα.

Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται η ενδοκύττωση και ενεργοποίηση του δεσμευτή σε ένα από τα δύο θυγατρικά κύτταρα *pIIb*, ενώ στο ίδιο κύτταρο επάγεται και η απενεργοποίηση του υποδοχέα μέσω μηχανισμού ενδοκύττωσης που ρυθμίζεται από τις πρωτεΐνες *Numb/α-Adaptin*. Ο καθορισμός της μοίρας των πρόδρομων αισθητηρίων οργάνων αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα όπου η ενορχηστρωμένη δράση ενδοκύττωσης και σηματοδότησης είναι απαραίτητη για να ρυθμιστεί μια φαινομενικά απλή αναπτυξιακή διαδικασία (Polo & Di Fiore, 2006)

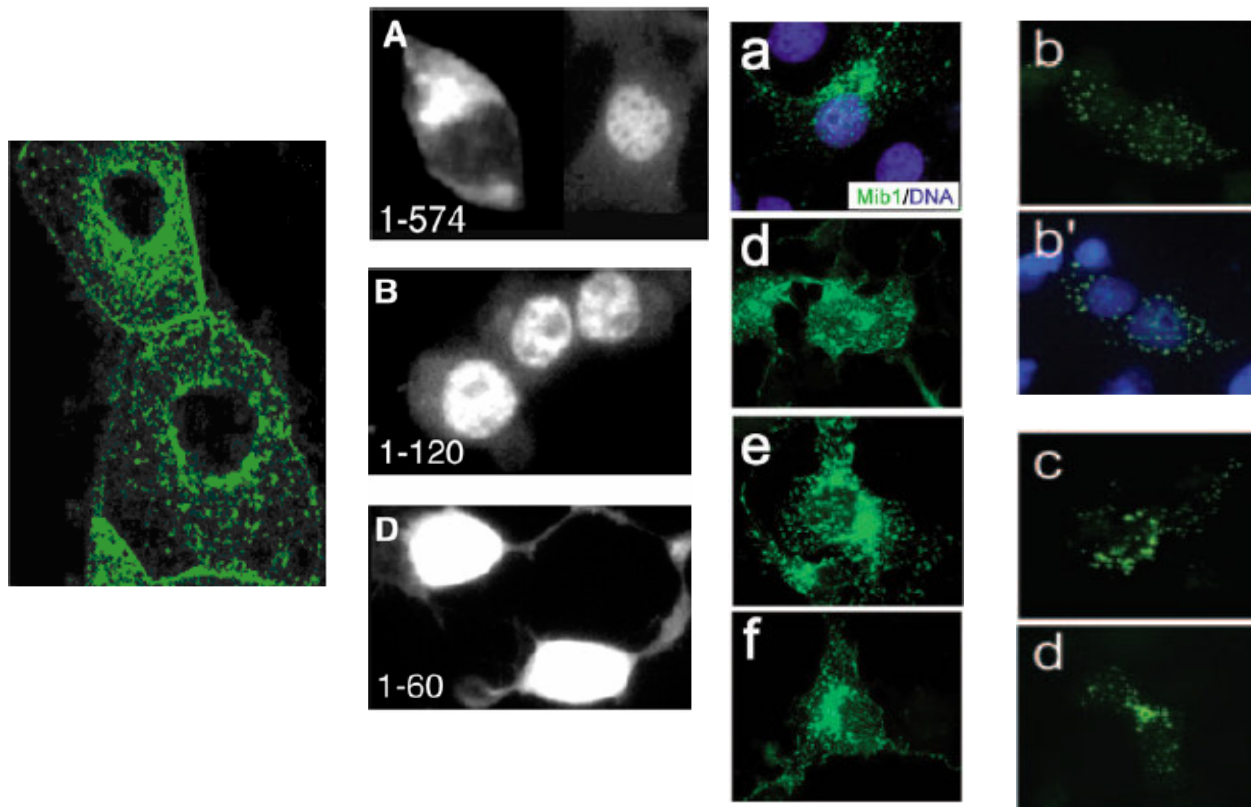
### **Τα γονίδια *Neurl* και *Mind bomb* του ποντικού**

Στα θηλαστικά η πρωτεΐνη *Neurl* παρουσιάζει την ίδια αρχιτεκτονική οργάνωση που παρατηρείται και στα ομόλογα μόρια της δροσόφιλα και του βατράχου. Συγκεκριμένα διακρίνονται τρεις περιοχές, οι επαναλήψεις *NEUZ1* και *NEUZ2* στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και μια περιοχή δακτυλίου *RING* τύπου  $C_3HC_4$ . Ο



ακριβής ρόλος των επαναλήψεων NEUZ στη λειτουργία των μορίων *Neur1* δεν είναι γνωστός. Η παρουσία της περιοχής NEUZ1 φαίνεται να είναι απαραίτητη για τον υποκυτταρικό εντοπισμό του μορίου κυρίως σε κυστίδα στο κυτταρόπλασμα και στην περιπυρηνική περιοχή (Pavlopoulos et al, 2002). Οι Timmusk et al, ωστόσο έδειξαν ότι η επανάληψη NEUZ1 περιέχει λειτουργικά σήματα πυρηνικού εντοπισμού που οδηγούν την πρωτεΐνη στον πυρήνα, ενώ η αφαίρεση αυτής της περιοχής έχει σαν αποτέλεσμα τον εντοπισμό της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα. Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης πρωτεϊνικών συμπλόκων του *neur* της δροσόφιλα (Lai et al, 2001) και του *Neur1* του ποντικού (Κοκκινάκη Διδακτορική Διατριβή 2005) υποστηρίζουν ότι οι περιοχές NEUZ είναι απαραίτητες για τις αλληλεπιδράσεις του μορίου. Η επανάληψη NEUZ ταυτοποιήθηκε πρόσφατα και σε μια δεύτερη πρωτεΐνη που ονομάστηκε Ozz (Nastasi et al, 2004) και έχει την ικανότητα να επάγει την ουβικουιτινιλίωση και την πρωτεόλυση της μεμβρανικής β-κατενίνης των μυικών ινών κατά την μυογένεση. Η δράση της σαν E3 λιγάσης ουβικουιτίνης οφείλεται στην αλληλεπίδραση της περιοχής SOCS (Suppressor of Cytokine Signaling) στο καρβοξυτελικό της άκρο με τις πρωτεΐνες Elongin B, Elongin, Rbx1 και Cullin 5, ενώ η επανάληψη NEUZ1 είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με την β-κατενίνη.

Η έκφραση του γονιδίου *Neur1* του ποντικού έχει παρατηρηθεί τόσο σε αρχικά στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης όσο και σε ιστούς ενήλικων ατόμων. Κατά την εμβρυογένεση το γονίδιο είναι μεταγραφικά ενεργό κυρίως σε επιθήλια, σε ποικιλία εσωτερικών και αισθητηρίων οργάνων καθώς και στο νευρικό και στηρικτικό σύστημα (Pavlopoulos et al, 2002). Το γονίδιο εμφανίζει υψηλά επίπεδα έκφρασης στο ενήλικο νευρικό σύστημα, σε σκελετικούς μύες, σε όρχεις και στο ήπαρ, ενώ λεπτομερέστερη μελέτη του στον ενήλικο εγκέφαλο δείχνει έντονη έκφραση του στον ιππόκαμπο και ανίχνευση μεταγράφων τόσο στα σώματα όσο και στους δενδρίτες των νευρώνων (Timmusk et al, 2002).



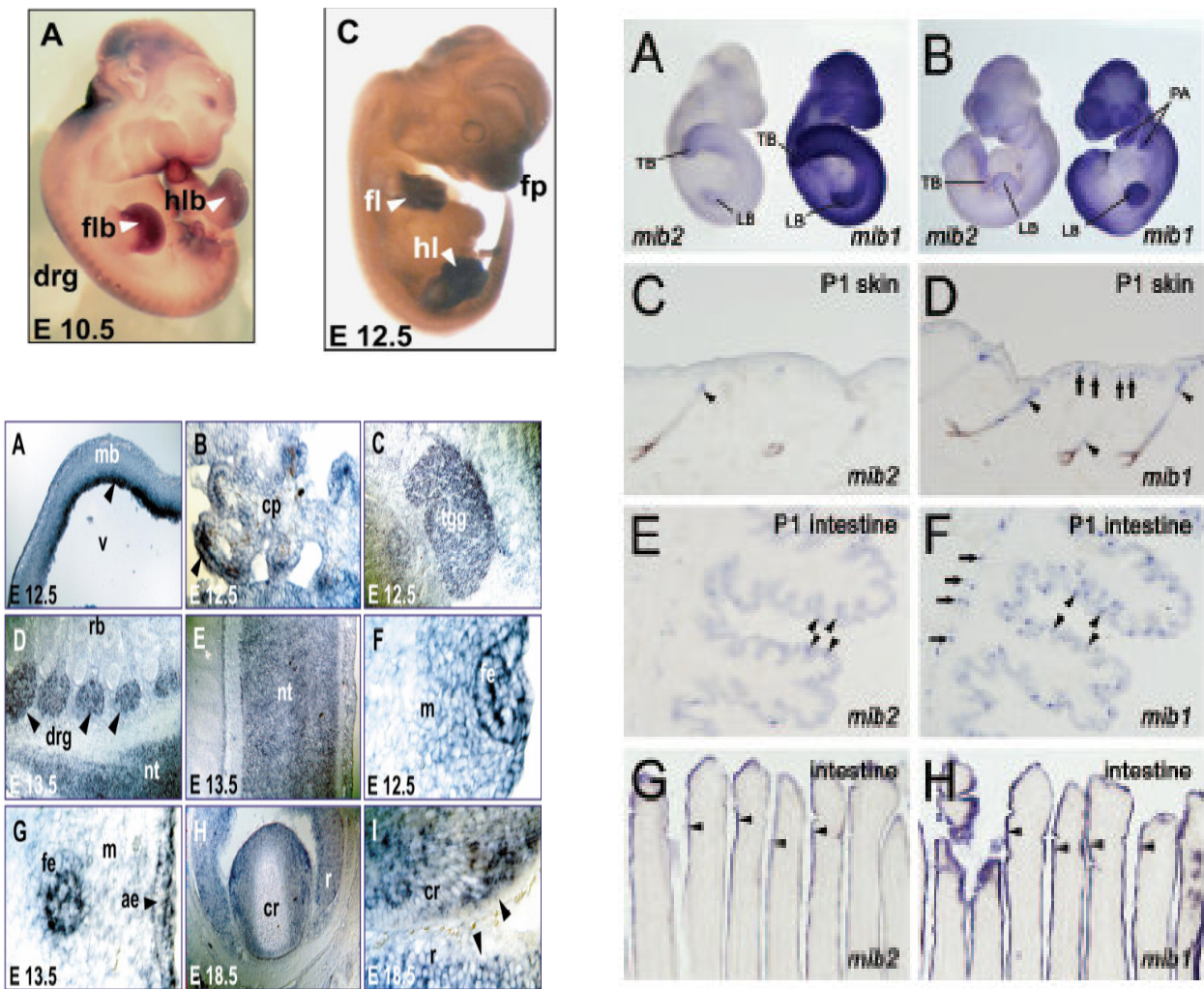
**Εικ. 7 :** Υποκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών *Neur1*, *Mib1* και *Mib2* του ποντικού. Η πρωτεΐνη *Neur1* εντοπίζεται σε κυστιδιακές δομές μέσα στο κυτταρόπλασμα, ενώ έχει δείχτει να εισέρχεται και στον πυρήνα (A,B,D). Αν και δεν έχουν ταυτοποιηθεί σήματα πυρηνικού εντοπισμού, η περιοχή που κωδικοποιεί τα αμινοξέα 60-120 έχει βρεθεί απαραίτητη για την είσοδο της πρωτεΐνης στον πυρήνα (Timmusk et al., 2002). Οι πρωτεΐνες *Mib1* (a,d,e,f) και *Mib2* (b,b',c,d) εντοπίζονται στο κύτταρο σε στικτές δομές και συγκεντρώνονται κυρίως γύρω από τον πυρήνα.

Στα θηλαστικά έχουν ταυτοποιηθεί δύο γονίδια *mind bomb*, το *Mib1* και *Mib2* (Koo et al, 2005a, Koo et al, 2005b), τα οποία φαίνεται να είναι συντηρημένα από τη δροσόφιλα μέχρι και τον άνθρωπο. Και οι δύο πρωτεΐνες εμφανίζουν την ίδια αρχιτεκτονική στις περιοχές που τις χαρακτηρίζουν, δηλαδή δύο περιοχές *Herc2/mib*, μία περιοχή *ZZ* δακτύλου ψευδαργύρου (*zinc finger domain*) και μία ή δύο επαναλήψεις *Mib* στο αμινοτελικό τους άκρο, επαναλήψεις αγκυρίνης στο μεσαίο τους τμήμα και τρεις ή δύο περιοχές δακτύλου *RING* στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Δοκιμές ουβικουιτινίωσης *in vitro* έχουν δείξει ότι και για τις δύο αυτές λιγάσες οι περιοχές δακτύλου *RING* είναι απαραίτητες για την προσθήκη μορίων ουβικουιτίνης πάνω στις

ίδιες (αυτο-ουβικουιτινιλίωση) όσο και στα υποστρώματά τους (Jin et al, 2002, Koo et al, 2005b).

Συγκεκριμένα για το Mib1 του ποντικού έχει δειχτεί ότι το καρβοξυτελικό άκρο με τις τρεις περιοχές RING είναι απαραίτητο για την αυτο-ουβικουιτινιλίωση *in vitro* και *in vivo*, ενώ σαν υπόστρωμά του έχει ταυτοποιηθεί η πρωτεΐνη DAPK (Death Associated Protein Kinase), η οποία εμπλέκεται στη ρύθμιση της απόπτωσης (Jin et al, 2002). Παρά το γεγονός ότι ο δεσμευτής XDelta-1 έχει αναγνωριστεί σαν υποστρώμα του mib1 του zebrafish (Itoh et al, 2003), στα θηλαστικά δεν υπάρχει απόδειξη ότι κάποιος από τους δεσμευτές του N αποτελεί άμεσο υποστρώμα του. Το ίδιο δεν ισχύει για το Mib2 του ποντικού, το οποίο φαίνεται να αλληλεπιδρά και να ουβικουιτινιλιώνει συγκεκριμένα την ενδοκυττάρια περιοχή του δεσμευτή Jagged2 και κανενός άλλου από τους πέντε δεσμευτές των θηλαστικών (Takeuchi et al, 2005).

Μετάγραφα του *Mib1* έχουν ανιχνευθεί στον εγκέφαλο, στα αναπτυσσόμενα άκρα, στην ουρά και στους σωμίτες εμβρύων ποντικού σταδίων E9.5 και E10.5, ενώ το γονίδιο *Mib2* παρουσιάζει πολύ χαμηλή έκφραση στις αντίστοιχες περιοχές αυτών των αναπτυξιακών σταδίων. Σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια (P1: postnatal day 1), και τα δύο γονίδια παρουσιάζουν υψηλή έκφραση στα θυλάκια τριχών του δέρματος, ενώ στο έντερο η έκφραση του *Mib1* στην εξωτερική μυική στοιβάδα είναι πολύ πιο έντονη από αυτή του *Mib2*. Γενικά, το *Mib1* εμφανίζει έντονη έκφραση τόσο σε έμβρυα όσο και σε ενήλικους ιστούς, ενώ το *Mib2* εκφράζεται πολύ χαμηλά σε εμβρυικά στάδια, αλλά παρουσιάζει έντονη έκφραση σε νεογνά και ενήλικα άτομα. Είναι πιθανό ο ρόλος του *Mib1* κατά την εμβρυογένεση να είναι επικρατέστερος από το *Mib2*, ενώ τα δύο γονίδια να δρούν συνεργατικά σε μεταγενέστερες αναπτυξιακές διαδικασίες (Koo et al, 2005b).



**Εικ. 8 : Πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *Neur1*, *Mib1* και *Mib2* του ποντικού.** Το γονίδιο *Neur1* (αριστερό πάνελ) εκφράζεται σε περιοχές του εγκεφάλου, στα πρόσθια και οπίσθια άκρα και στα ραχιαία ριζικά γάγγλια εμβρύων ηλικίας E10.5 και E12.5. Σε τομές εμβρύων ηλικίας E12.5-E13.5 εντοπίζονται μεταγράφα στην κοιλιακή ζώνη του μεσεγκεφάλου (mb), στην επιθηλιακή στοιβάδα του χοριοειδούς πλέγματος (cp), στο τρίδυμο γάγγλιο (tgg), στα ραχιαία ριζικά γάγγλια (drg), στο νευρικό σωλήνα (nt), στο θυλακοειδές επιθήλιο των μουστακιών (fe), στον αμφιβληστροειδή χιτώνα του ματιού (r) και σε κύτταρα του φακού του ματιού (cr) (Pavliopoulos et al, 2002). Τα γονίδια *Mib1* και *Mib2* (δεξιό πάνελ) εμφανίζουν πολύ διαφορετικό πρότυπο έκφρασης, αφού σε έμβρυα ηλικίας E9.5-E10.5 το γονίδιο *Mib1* εμφανίζει έντονα επίπεδα έκφρασης σε όλο το σώμα και ιδιαίτερα σε περιοχές του εγκεφάλου, στα βραγχιακά τόξα, στα αναπτυσσόμενα άκρα, στους σωματίτες και στην ουρά, ενώ το γονίδιο *Mib2* εμφανίζει πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης μόνο στο κεφάλι, στα άκρα και στην ουρά. Σε τομές που έγιναν στο δέρμα και στο επιθήλιο του εντέρου σε ποντίκια ηλικίας P1 (postnatal day 1), δείχνουν συγκρίσιμα επίπεδα έκφρασης των δύο γονιδίων (Koo et al, 2005b).

Στοχευμένη καταστροφή του γονιδίου *Mib1* του ποντικού παρουσιάζει πολλαπλές αναπτυξιακές ανωμαλίες που σχετίζονται με την σηματοδότηση N, όπως είναι προβλήματα στην ανάπτυξη των σωματιών, στη νευρογένεση, στο σχηματισμό της καρδιάς και στην αγγειογένεση (Koo et al, 2005a). Η έκφραση πολλών από τα γονίδια στόχων του σηματοδοτικού μονοπατιού N, όπως τα *Hes5*, *Hey1* και *Heyl*, παρουσιάζεται δραματικά μειωμένη σε έμβρυα *Mib<sup>-/-</sup>*. Συγκεκριμένα κατά τη νευρογένεση τα έμβρυα *Mib<sup>-/-</sup>* παρουσιάζουν χαρακτηριστική απώλεια έκφρασης του γονιδίου *Hes5* στον νευρικό σωλήνα και πρόωμη διαφοροποίηση σε νευρώνες (de la Pompa et al, 1997, Donoviel et al, 1999). Κατά τη σωματογένεση τα *Mib<sup>-/-</sup>* έμβρυα παρουσιάζουν απώλεια έκφρασης του γονιδίου *Uncx4.1* και προβλήματα στη χρονικά ρυθμιζόμενη έκφραση των γονιδίων *Hes7* και *Lfng* (Barrantes et al, 1999). Επιπλέον τα έμβρυα *Mib<sup>-/-</sup>* εμφανίζουν απώλεια στην έκφραση των γονιδίων *Ephrin B2* και *Hey1* στην ραχιαία αορτή (Krebs et al, 2004). Εκτός από την παρατηρούμενη μείωση στην έκφραση των γονιδίων στόχων που αναφέρθηκαν, τα έμβρυα *Mib<sup>-/-</sup>* παρουσιάζουν πλήρη έλλειψη παραγωγής της ενδοκυττάριας περιοχής του N, παρά το γεγονός ότι όλα τα απαραίτητα μόρια για το σχηματισμό της, όπως π.χ. οι πρεσενιλίνες ή οι δεσμευτές, είναι παρόντα.

Σε αντίθεση με τον θνησιγόνο φαινότυπο που παρατηρήθηκε στα έμβρυα *Mib<sup>-/-</sup>*, η στοχευμένη καταστροφή του γονιδίου *Neurl* του ποντικού από δύο ερευνητικές ομάδες έδωσε δύο διαφορετικούς φαινότυπους με πολύ ήπιες όμως διαταραχές. Συγκεκριμένα τα ποντίκια *Neurl<sup>-/-</sup>*, που κατασκευάστηκαν από τους Ruan et al (2001), είναι βιώσιμα και χωρίς μορφολογικές ανωμαλίες, αλλά εμφανίζουν υστέρηση στη διάκριση οσμών και αδυναμία συντονισμού των κινήσεών τους παρουσία αιθανόλης στο αίμα τους. Οι Vollrath et al (2001) αναφέρουν ότι τα ποντίκια *Neurl<sup>-/-</sup>* επιβιώνουν και αναπτύσσονται κανονικά, χωρίς να παρουσιάζουν ανωμαλίες στην ανάπτυξη του εγκεφάλου, του σκελετού και των μυών. Όμως τα αρσενικά ποντίκια *Neurl<sup>-/-</sup>* εμφανίζουν στειρότητα, η οποία οφείλεται σε έλλειψη κινητικότητας των σπερματοζωαρίων, εξαιτίας διαταραγμένης δομής του αξονήματος των μαστιγίων, και όχι σε ανωμαλίες κατά τη διαδικασία της σπερματογένεσης. Τα θηλυκά ποντίκια *Neurl<sup>-/-</sup>* είναι γόνιμα, εμφανίζουν ωστόσο ανώριμους γαλακτοφόρους αδένες κατά το θηλασμό, με αποτέλεσμα την αυξημένη θνησιμότητα των απογόνων τους. Τέλος οι Vollrath et al τονίζουν ότι τόσο στα ομόζυγα μεταλλαγμένα ζώα *Neurl<sup>-/-</sup>*, όσο και στα ετερόζυγα *Neurl<sup>+/-</sup>*, δεν

παρατηρείται αυξημένη συχνότητα εμφάνισης νεοπλασιών του κεντρικού νευρικού συστήματος σε σχέση με τα αγρίου τύπου ζώα, γεγονός που δεν υποστηρίζει το προτεινόμενο μοντέλο των Nakamura et al (1998) για συσχέτιση της μειωμένης έκφρασης του γονιδίου με την εμφάνιση γλοιοβλάστωμάτων στον άνθρωπο

### **Σκοπός της παρούσας διατριβής**

Ο τόσο διαδεδομένος και καθοριστικός ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch στα μετόζωα έχει τοποθετήσει τη μελέτη της λειτουργίας του στο επίκεντρο πολλών ερευνητικών προσπαθειών. Η λειτουργία του μονοπατιού είναι σημαντική στην ανάπτυξη και κατά συνέπεια σχετίζεται με ποικίλες ανθρώπινες ασθένειες. Απώλεια λειτουργίας του δεσμευτή Jag1 συνδέεται με το σύνδρομο Alagille, όπου η ανάπτυξη πολλών οργάνων όπως του συκωτιού, της καρδιάς, του σκελετού και των ματιών εμφανίζει προβλήματα (Li et al, 1997). Μεταλλάξεις στο δεσμευτή Dll3 προκαλούν σπονδυλοπλευρική δυσοστέωση, η οποία σχετίζεται με δυσμορφίες στο σκελετικό άξονα και σύντηξη σπονδύλων (Bulman et al, 2000). Μεταλλάξεις στις επαναλήψεις EGF του υποδοχέα Notch3 προκαλούν προδιάθεση για άνοια, ημικρανίες και εγκεφαλικά επεισόδια, αφού σχετίζονται με το σύνδρομο CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy) (Joutel et al, 1996). Προβλήματα στη σηματοδότηση N σχετίζονται και με πολλές μορφές καρκίνου. Η πιο καλά μελετημένη περίπτωση είναι αυτή της χρωμοσωμικής μετατόπισης t(7;9) που σχετίζεται με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία των πρώιμων T κυττάρων (T-ALL) και προκαλεί καταστατική ενεργοποίηση του υποδοχέα Notch στα T κύτταρα (Ellisen et al, 1991). Πολλές μορφές καρκίνου τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ποντίκια, όπως νευροβλαστώματα, καρκίνος του μαστού, του προστάτη, του τραχήλου και του δέρματος, συνδέονται με αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων Notch και των δεσμευτών τους. Στις περισσότερες περιπτώσεις ο μοριακός μηχανισμός που ρυθμίζει τη λειτουργία του μονοπατιού δεν είναι κατανοητός και πολλές παρατηρήσεις υποδηλώνουν ένα γενικότερο ρόλο της σηματοδότησης N στο μετασχηματισμό των κυττάρων (Lai, 2004).

Η ρύθμιση του μονοπατιού N γίνεται σε πολλά διαφορετικά επίπεδα και ελέγχεται από πληθώρα παραγόντων, που αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με τους υποδοχείς και τους δεσμευτές και επάγουν ή αναστέλλουν τη λειτουργία τους. Ο ρόλος της πρωτεΐνης *Neur1* του ποντικού στη ρύθμιση του μονοπατιού N δεν έχει διασαφηνιστεί, παρά το γεγονός ότι γενετικά και βιοχημικά πειράματα στη δροσόφιλα και στο *Xenopus* τονίζουν το σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο των ορθόλογων πρωτεϊνών. Συμμετέχοντας στην προσπάθεια του εργαστηρίου Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου του Πανεπιστημίου Κρήτης για την λειτουργική ανάλυση του γονιδίου *Neur1* του ποντικού και σε συνεργασία με το εργαστήριο Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Ινστιτούτου Stowers, η παρούσα διδακτορική διατριβή εστιάστηκε στην αντιμετώπιση των παρακάτω ερωτημάτων:

1. Εμφανίζει η πρωτεΐνη *Neur1* του ποντικού δράση E3 λιγάση ουβικουιτίνης;
2. Αποτελούν οι δεσμευτές του N στα θηλαστικά υποστρώματα για ουβικουιτινιλίωση της πρωτεΐνης *Neur1*;
3. Ρυθμίζει η πρωτεΐνη *Neur1* τα επίπεδα των δεσμευτών του N μέσω ουβικουιτινιλίωσης;
4. Παρατηρείται αλληλεπίδραση των δεσμευτών του N με την πρωτεΐνη *Neur1* *in vivo*;
5. Με ποιες άλλες πρωτεΐνες-πιθανά υποστρώματα αλληλεπιδρά η *Neur1* *in vivo*;

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## DNA

### **Κλωνοποίηση τεμαχίων DNA σε πλασμίδια**

Χρησιμοποιήθηκαν κλασσικές μέθοδοι κλωνοποίησης θραυσμάτων DNA, μετά από τον ενζυμικό τεμαχισμό μεγαλύτερων μορίων, διαχωρισμό με ηλεκτροφόρηση, απομόνωση και (μερικές φορές) κατάλληλη τροποποίηση των άκρων τους, ώστε αυτά να είναι συμβατά για σύνδεση με τα άκρα (συμπληρωματικά ή τυφλά) του γραμμοποιημένου πλασμιδιακού φορέα. Η πλασμιδιακή κατασκευή αναπτύσσεται μετασχηματίζοντας βακτηριακά κύτταρα (E.coli DH5a).

### **Βακτηριακά στελέχη**

**DH5a:** Η χρήση τους πραγματοποιήθηκε σε πειράματα μετασχηματισμού για την κλωνοποίηση θραυσμάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς και την απομόνωση υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA. Τα βακτήρια αυτού του στελέχους χαρακτηρίζονται από το ότι επιδέχονται μετασχηματισμό σε υψηλό ποσοστό, καθώς και από τη μεταλλαγή που φέρουν στο γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (LacZ), ώστε να επιτρέπεται η επιλογή των αποικιών που έχουν μετασχηματιστεί με πλασμίδια που φέρουν το γονίδιο (Sambrook et al, 1989).



### **Τεμαχισμός μορίων DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού**

Για τον τεμαχισμό μορίων DNA χρησιμοποιήθηκαν περιοριστικές ενδονουκλεάσες, σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστριών εταιριών (New England Biolabs).

### **Απομόνωση θραύσματος DNA από πήκτωμα αγαρόζης**

Μετά την ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα παρατηρείται στο υπεριώδες φως και αποκόπτεται το τεμάχιο της αγαρόζης που περιέχει το συγκεκριμένο θραύσμα DNA. Για τον καθαρισμό του DNA χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο kit (QIAquick gel extraction kit QIAGEN : 28704).

### **Κατασκευή τυφλών άκρων σε γραμμικά μόρια DNA με προεξέχοντα 5' άκρα**

Στις περιπτώσεις που τα γραμμοποιημένα μόρια του πλασμιδιακού φορέα και του ενθέματος που επρόκειτο να κλωνοποιηθεί είχαν προεξέχοντα μη συμπληρωματικά 5' άκρα, εφαρμόστηκε η μέθοδος κατασκευής τυφλών (blunt) άκρων, ώστε να είναι δυνατή η αντίδραση σύνδεσης (ligation). Χρησιμοποιήθηκε το κλάσμα Klenow της DNA πολυμεράσης I, και συγκεκριμένα η 5'→3' ενεργότητα πολυμερισμού (προσθήκη νουκλεοτιδίων στο υπολειπόμενο 3' άκρο, με μήτρα το προεξέχον 5' άκρο), όπως περιγράφεται από τους Sambrook et al (1989). Συνοπτικά, για μια τυπική αντίδραση με 1.5μg γραμμοποιημένου DNA με 5' προεξέχοντα άκρα, χρησιμοποιήθηκαν 5 μονάδες ενζύμου Klenow (New England Biolabs), 1x ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου Klenow (New England Biolabs), 50μM μίγματος dNTPs (12.5μM για κάθε dNTP), σε τελικό όγκο 40μl, επώαση στους 25°C για 30 min και τερματισμό με προσθήκη 1μl διαλύματος 0.5M EDTA και θέρμανση στους 72°C για 10 min.

### **Σύνδεση γραμμικών μορίων DNA (ligation)**

Για τη σύνδεση γραμμικών μορίων DNA χρησιμοποιείται το ένζυμο λιγάση του DNA του βακτηριοφάγου T4 (T4 DNA ligase) (DNA ligation kit, ver 2 TAKARA: 6022), το οποίο καταλύει τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού ανάμεσα στην υδροξυλική ομάδα του 3' άκρου και τη φωσφορική ομάδα του παρακείμενου 5' άκρου δίκλωνων μορίων DNA ή RNA.

Για την αντίδραση κατασκευής ανασυνδυασμένων πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκαν 30-50ng γραμμοποιημένου φορέα ανά αντίδραση, ενώ η ποσότητα του ενθέματος ήταν τέτοια ώστε η αναλογία μορίων φορέα : ενθέματος να είναι μεταξύ 1:5 (για προεξέχοντα άκρα και προσανατολισμένη κλωνοποίηση) και 1:20 (για τυφλά άκρα και μη προσανατολισμένη κλωνοποίηση). Στα γραμμοποιημένα τμήματα DNA προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος I και οι αντιδράσεις επωάζονται στους 16°C για 30-60 min.

### **Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)**

Η μέθοδος εφαρμόστηκε για την ανάκτηση τεμαχίων DNA με σκοπό την κλωνοποίησή τους. Για κάθε αντίδραση, χρησιμοποιήθηκαν 5-10ng κλωνοποιημένου DNA σε πλασμίδιο. Οι εκκινητές PCR είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια και χρησιμοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις 400nM ανά αντίδραση PCR. Ο όγκος των αντιδράσεων ήταν 50ul και τυπικά περιελάμβανε: μίγμα dNTPs (200μM από κάθε νουκλεοτίδιο), 1x ρυθμιστικό διάλυμα Taq DNA πολυμεράσης (10mM Tris-Cl pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>) και 1.25 ενζυμική μονάδα Taq DNA πολυμεράσης (5U/μl, Roche: 11 146 173 001). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε αυτόματο θερμοανακυκλωτή (Biometra, Perkin Elmer, Techne), που ρυθμίζεται να εκτελέσει ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 95 °C για 5 min και ένα στάδιο θερμικής ανακύκλωσης που επαναλαμβάνεται 35 φορές και περιλαμβάνει: ι) αποδιάταξη του DNA (95 °C για 45sec), ιι) υβριδοποίηση των εκκινητών στις συμπληρωματικές αλληλουχίες στόχους για 45sec, σε θερμοκρασία που υπολογίζεται με βάση το ποσοστό των βάσεων GC στην αλληλουχία των εκκινητών και εμπειρικά προκύπτει από τη σχέση:  $\theta = T_m - (3-5) ^\circ C$ , όπου  $T_m$  η θερμοκρασία στην οποία το 50% των μορίων του εκκινητή έχουν υβριδοποιηθεί στις αλληλουχίες-στόχους [ $T_m = 2 \times (\text{ποσοστό βάσεων AT}\%) + 4 \times (\text{ποσοστό βάσεων GC}\%)$ ], και ιιι) επέκταση των εκκινητών και σύνθεση της θυγατρικής αλυσίδας DNA σε θερμοκρασία όπου το ένζυμο παρουσιάζει την υψηλότερη ενεργότητα (72 °C για την Taq DNA πολυμεράση της εταιρίας Minotech, 68-72°C για ένζυμα άλλων εταιριών) για χρόνο που κυμαίνεται από 30sec για προϊόντα PCR μεγέθους μικρότερου των 200bp έως και 90sec για προϊόντα PCR μεγέθους 1-2Kb. Ακολουθεί ένα στάδιο τελικής επέκτασης για 2-5 min. Στις περιπτώσεις που οι εκκινητές PCR φέρουν θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικές ενδονουκλεάσες, πραγματοποιούνται αρχικά 5 κύκλοι σε θερμοκρασία υβριδοποίησης

των εκκινητών ελαττωμένη κατά 2-5°C. Επιπλέον, για την ελαχιστοποίηση της πιθανότητας λάθους στην αλληλουχία του DNA, η οποία για τις συμβατικές Taq DNA πολυμεράσες είναι περίπου 1/1000nt, σε περιπτώσεις που το προϊόν της αντίδρασης επρόκειτο να κλωνοποιηθεί σε φορέα έκφρασης χρησιμοποιήθηκαν βελτιωμένα ένζυμα με ικανότητα επιδιόρθωσης (proofreading) των σφαλμάτων (Expand High Fidelity PCR System Roche : 1 732 641) και πραγματοποιήθηκε μικρότερος αριθμός κύκλων (25-30). Το προϊόν της αντίδρασης καθαριζόταν είτε με τη χρήση QIAquick PCR purification kit (QIAGEN : 28104) είτε QIAquick gel extraction kit (QIAGEN : 28704) αφού είχε πραγματοποιηθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και αποκοπή του επιθυμητού τεμαχίου DNA.

### **Τεχνολογία κλωνοποίησης με τοπο-ισομεράση (TOPO TA cloning)**

Η τεχνολογία κλωνοποίησης TOPO δίνει τη δυνατότητα κλωνοποίησης προϊόντων αντίδρασης PCR σε φορέα μέσα σε 5 λεπτά και με απόδοση παραγωγής ανασυνδυασμένων μορίων 99%

[http://www.invitrogen.com/content/sfs/brochures/710\\_021849%20\\_B\\_TOPOCloning\\_bro.pdf](http://www.invitrogen.com/content/sfs/brochures/710_021849%20_B_TOPOCloning_bro.pdf)

Η ευκολία χρήσης του συστήματος έγκειται στην ενεργότητα του ενζύμου DNA τοπο-ισομεράση I, το οποίο λειτουργεί τόσο σαν περιοριστικό ένζυμο, όσο και σαν λιγάση. Ο βιολογικός του ρόλος είναι να κόβει και να επανασυνδέει το DNA κατά το διπλασιασμό του. Η τοπο-ισομεράση I του ιού *Vaccinia* αναγνωρίζει ειδικά την αλληλουχία 5'-(C/T)CCTT-3' και σχηματίζει ομοιοπολικό δεσμό με τη φωσφορική ομάδα 3' της θυμιδίνης. Κόβει την μία αλυσίδα του DNA επιτρέποντας την αποελικώσή της. Το ένζυμο στη συνέχεια επανενώνει τα άκρα της κομμένης αλυσίδας και αποδεσμεύεται από το DNA. Με σκοπό να χρησιμοποιηθεί η διπλή αυτή ενεργότητα του ενζύμου, ο φορέας TOPO είναι γραμμοποιημένος με την τοπο-ισομεράση I ομοιοπολικά συνδεδεμένη σε κάθε 3' άκρο του. Συγκεκριμένα 1ul καθαρισμένου προϊόντος αντίδρασης PCR αναμιγνύεται με 1ul γραμμοποιημένου φορέα και 1ul διαλύματος άλατος και επωάζονται σε άκρα σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Ακολουθεί μετασχηματισμός σε κατάλληλο βακτηριακό στέλεχος. (TOPO TA cloning kit Invitrogen: KNM 4550-01)

### Εισαγωγή σχεδιασμένων μεταλλάξεων (*in vitro* mutagenesis)

Η κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση χρησιμοποιείται για την εισαγωγή μεταλλάξεων που οδηγούν σε αντικατάσταση επιλεγμένων αμινοξέων, σε μία ή περισσότερες θέσεις. Η εισαγωγή της μετάλλαξης πραγματοποιήθηκε σε δύο κύκλους PCR (Ho, et al, 1989). Για την εισαγωγή κάθε σημειακής μετάλλαξης σχεδιάζονται 2 ζευγάρια εκκινητών, οι εξωτερικοί (1 και 2) και οι εσωτερικοί (3 και 4) που φέρουν την μετάλλαξη. Στον πρώτο κύκλο πολλαπλασιάζονται τμήματα από την αρχή του γονιδίου ως το σημείο της μετάλλαξης (εκκινητές 1 και 4) και από το σημείο της μετάλλαξης ως το τέλος του γονιδίου (εκκινητές 2 και 3). Στο δεύτερο κύκλο χρησιμοποιούνται ως μήτρες τα προϊόντα του προηγούμενου κύκλου και οι εξωτερικοί εκκινητές (1 και 2) ώστε το τελικό προϊόν να αντιστοιχεί στο γονίδιο πλήρους μήκους με την επιθυμητή μεταλλαγή. Για το γονίδιο *Neur1* σχεδιάστηκαν 5 πλασμιδιακές κατασκευές με μία ή δύο αμινοξικές αλλαγές.

**Πίν. 2:** Πλασμιδιακές κατασκευές που παράχθηκαν με σκοπό την εισαγωγή σχεδιασμένων μεταλλάξεων στο γονίδιο *Neuralized* του ποντικού.

	aa	tag	vector	Primers 1-2	Primers 3-4
<i>Neur1</i> RF mut	1-574	Flag Cter	pCDNA3.1	NheIF <i>Neur</i> - SbfIR <i>Neur</i>	C521SC524SF/R
<i>Neur1</i> G2A	1-574	Flag Cter	pCDNA3.1	NheIF <i>Neur</i> - SbfIR <i>Neur</i>	G2A F/R
<i>Neur1</i> S462A	1-574	Flag Cter	pCDNA3.1	NheIF <i>Neur</i> - SbfIR <i>Neur</i>	S462A F/R
<i>Neur1</i> S469A	1-574	Flag Cter	pCDNA3.1	NheIF <i>Neur</i> - SbfIR <i>Neur</i>	S469A F/R
<i>Neur1</i> S462AS469A	1-574	Flag Cter	pCDNA3.1	NheIF <i>Neur</i> - SbfIR <i>Neur</i>	S462AS469A F/R

### Μετασχηματισμός βακτηρίων με τη μέθοδο του θερμικού σοκ

Για τη χημική κατεργασία των βακτηρίων πριν το θερμικό σοκ χρησιμοποιείται συνδυασμός δισθενών κατιόντων  $Rb^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  και  $Ca^{+2}$  σε συγκεντρώσεις και χρόνους επώασης που προτείνονται σε σχετικά πρωτόκολλα (Sambrook et al, 1989).

*ι) Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων δεκτικών για μετασχηματισμό με θερμικό σοκ*

Καλλιέργεια κυττάρων *Escherichia coli* κατάλληλου στελέχους αναπτύσσεται σε 50ml θρεπτικού μέσου LB με ολονύκτια επώαση στους 37 °C και ανακίνηση στις 200 στροφές/ min. Στη συνέχεια, 500μl μεταφέρονται σε 100ml LB και η καλλιέργεια συνεχίζεται σε κωνική φιάλη όγκου 2 λίτρων στις ίδιες συνθήκες μέχρι να φτάσει σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης ( $OD_{595}=0.4-0.5$ ), ακολουθεί επώαση σε πάγο για 15 min και φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές / min για 10 min στους 40 °C. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται

αρχικά σε 40ml διαλύματος TFB1 (100mM RbCl<sub>2</sub>, 50mM MnCl<sub>2</sub>, 30mM CH<sub>3</sub>COOK, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 15% γλυκερόλη, pH 5.8), επώζεται στον πάγο για 20 min και στη συνέχεια σε 5ml διαλύματος TFB2 (10mM MOPS, 10mM RbCl<sub>2</sub>, 80mM CaCl<sub>2</sub>, 15% γλυκερόλη, pH 7.0). Τέλος, τα δεκτικά για μετασχηματισμό βακτηριακά κύτταρα αποθηκεύονται στους -80°C σε όγκους 200μl και χρησιμοποιούνται σε χρονικό διάστημα περίπου ενός έτους με απόδοση μετασχηματισμού  $5 \times 10^7$ - $5 \times 10^8$  αποικίες μετασχηματισμένων βακτηρίων ανά μg υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA.

#### *ii) Διαδικασία μετασχηματισμού*

Τα δεκτικά για μετασχηματισμό βακτηριακά κύτταρα όγκου 200μl μεταφέρονται από τους -80°C, όπου αποθηκεύονται, σε πάγο 15 min πριν την προσθήκη του πλασμιδιακού υπερελικωμένου DNA. Η παραμονή στον πάγο συνεχίζεται για 20 min και ακολουθεί απότομη μεταφορά των κυττάρων σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 42-43°C για 90sec, επαναφορά στον πάγο για 2min, προσθήκη 800μl θρεπτικού μέσου LB και επώαση στους 37°C για 1-3 hrs με ήπια ή και χωρίς ανακίνηση. Τέλος, τα μετασχηματισμένα βακτήρια αναπτύσσονται σε στερεό θρεπτικό μέσο LB για 16-20 hrs στους 37°C, παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού. Μετά τον μετασχηματισμό των βακτηρίων έγιναν πειράματα ταυτοποίησης των κλώνων που έφεραν ανασυνδυασμένα πλασμίδια.

#### **Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων βακτηριακών κλώνων**

Οι βακτηριακές αποικίες που φέρουν ανασυνδυασμένα πλασμίδια επιλέγονται με τις μεθόδους που περιγράφονται παρακάτω, και σε κάθε περίπτωση ακολουθεί απομόνωση του πλασμιδιακού DNA και ανάλυση με ενδονουκλεάσες περιορισμού.

#### *i) Επιλογή βάσει χρώματος*

Βασίζεται στην παρουσία του γονιδίου LacZ το οποίο κωδικοποιεί την β-γαλακτοσιδάση και βρίσκεται σε ορισμένους φορείς κλωνοποίησης (π.χ pBluescript, TOPO).

Συγκεκριμένα, ο πλασμιδιακός φορέας περιέχει το γονίδιο, του οποίου το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης διακόπτεται, χωρίς να καταστρέφεται, από τις πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης ενθεμάτων. Στα ανασυνδυασμένα πλασμίδια το γονίδιο LacZ δεν κωδικοποιεί τη β-γαλακτοσιδάση και στις αντίστοιχες βακτηριακές αποικίες δεν

πραγματοποιείται αντίδραση χρώσης σε θρεπτικό μέσο που περιέχει το υπόστρωμα X-gal, με αποτέλεσμα αυτές οι αποικίες να εμφανίζονται λευκές.

#### *ii) Επιλογή με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)*

Στις περιπτώσεις που η επιλογή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων πραγματοποιείται με PCR, χρησιμοποιούνται εκκινητές που υβριδοποιούνται εκατέρωθεν της θέσης κλωνοποίησης. Συγκεκριμένα, κάθε βακτηριακή αποικία υπό εξέταση, μεταφέρεται σε 15μl αποστειρωμένου και απιονισμένου H<sub>2</sub>O και 5μl αυτού του εναιωρήματος χρησιμοποιείται ως 'μήτρα' σε αντιδράσεις PCR, ενώ με το υπόλοιπο εμβολιάζεται μια υγρή καλλιέργεια. Οι βακτηριακοί κλώνοι που φέρουν ανασυνδυασμένα πλασμίδια δίνουν προϊόν PCR μεγέθους μεγαλύτερου κατά το μέγεθος του ενθέματος, σε σχέση με αυτούς που φέρουν μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια.

#### **Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια**

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή (5-10μg) ή μεγαλύτερη (100-500μg) κλίμακα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης και έγινε καθαρισμός με κολώνες Aurum (BIORAD plasmid mini kit: 732-6400) ή Qiagen (QIAGEN plasmid midi kit : 12145) αντίστοιχα.

#### **Ποσοτικοποίηση DNA με φασματοφωτομέτρηση**

Η συγκέντρωση του DNA υπολογίστηκε με τη μέτρηση οπτικής πυκνότητας στα 260 nm με τη χρήση φασματοφωτόμετρου (DU750; Beckmann). Διάλυμα που περιέχει 50 μg δίκλωνου DNA ανά ml έχει οπτική πυκνότητα 1 σε μήκος κύματος 260 nm.

#### **Αυτοματοποιημένη διαδικασία προσδιορισμού νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με PCR**

Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας πραγματοποιείται με PCR και τα προϊόντα σημαίνονται με φθορίζουσες ουσίες σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Applied Biosystems (Big Dye Terminator ver. 3.1). Τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια απομακρύνονται με κολώνες αποκλεισμού (exclusion columns). Τα δείγματα αναλύονται σε αυτόματο αναλύτη τύπου ABI 3730 (48-capillary DNA analyzer) τα δεδομένα

συλλέγονται με τη χρήση του προγράμματος 3730/3730xl Data Collection Software v3.0 (Molecular Biology Facility, SIMR).

## **RNA**

### **Πειράματα υβριδοποίησης *in situ* σε ολόκληρα έμβρυα ποντικού**

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

Για να παρασκευαστεί ο ανιχνευτής RNA που είναι συμπληρωματικός με το mRNA του γονιδίου (antisense probe) τμήματα του cDNA κάθε γονιδίου κλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλο φορέα. Το πλασμιδιακό DNA γραμμοποιήθηκε με το κατάλληλο ένζυμο περιορισμού, για να χρησιμοποιηθεί σαν μήτρα στην αντίδραση μεταγραφής (1μg), στην οποία προστέθηκαν τα εξής : ρυθμιστικό διάλυμα μεταγραφής 1x (40mM Tris-HCl, pH 8.00, 6mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 2mM spermidine), DIG-RNA μίγμα σήμανσης 1x (1mM ATP, 1mM CTP, 1mM GTP, 0.65mM UTP, 0.35mM DIG-11-UTP, pH 7.5) (Roche: 11 277 073 910), 2-3 units αναστολέα RNase (40u/10μl) (RNasin Promega: N261A), 40 units T3 ή T7 RNA πολυμεράση (20 units/μl) (T3 RNA pol Roche: 1 031 163, T7 RNA pol Invitrogen: 18033-019) και DEPC-H<sub>2</sub>O μέχρι ο τελικός όγκος να φτάσει τα 20μl. Ακολούθησε επώαση για 2 ώρες στους 37° C και στη συνέχεια προστέθηκαν 20 units DNase I (Roche: 10 776 785 001) 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 η αντίδραση τερματίζεται με 1μl EDTA 0.5M, pH 8.00.

Πραγματοποιήθηκε κατακρήμνιση του RNA με προσθήκη 2.5 μl LiCl 4M και 75 μl απόλυτης αιθανόλης για 2 ώρες στους -20° C (ή στους -80° C ολονύκτια). Ακολούθησε φυγοκέντρηση (12.000 rpm, 4° C, 15 min), πλύσιμο με 70% αιθανόλη και νέα φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. 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%

**Πιν. 3:** Πλασμιδιακές κατασκευές με τμήματα των γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία των αντίστοιχων ανιχνευτών mRNA (antisense probes) σε πειράματα υβριδοποίησης *in situ* εμβρύων ποντικών.

gene	bp	IMAGE	vector	RNA pol	primers
Neuralized	1611-2890	6831952	pCRII-TOPO	T7	FNeuISH/RNeuISH
Neuralized	1190-2445	HMGL	pBS	T7	
Mind Bomb	1724-3166	3981221	pCMV-sport6	T3	
Delta-like 1	1726-2821	948947	pT7T3D	T3	
Delta-like 3	1211-1894	6404029	pCRII-TOPO	T7	FDII3ISH/RDII3ISH
Delta-like 4	1797-3384	832357	pT7T3D	T3	
Jagged 1	2091-3971	1195272	pT7T3D	T7	
Jagged 2	2504-3961	3156268	pCMV-sport6	T7	

### Μονιμοποίηση και επεξεργασία των εμβρύων

Τα έμβρυα αφαιρέθηκαν από τη μήτρα του θηλυκού ποντικού CD-1 σε 1x PBS (40mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> και 150mM NaCl) σε πάγο, και μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα 4% παραφορμαλεύδης (PFA) σε 1x PBS στους 4°C για 12-24 ώρες, ανάλογα με την ηλικία τους. Η παραφορμαλεύδη απομακρύνθηκε με 3-4 πλυσίματα για 10 λεπτά σε 1x PBT (1x PBS και 0.1% Tween-20) στους 4°C και ακολούθησε σταδιακή αφυδάτωση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης (50% και 100% σε 1x PBT), ανά 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (τα έμβρυα είναι δυνατόν να διατηρηθούν σε 100% αιθανόλη, στους -20°C, για μεγάλο χρονικό διάστημα). Ακολούθησε επανενυδάτωση των εμβρύων μειώνοντας σταδιακά τις συγκεντρώσεις αιθανόλης (100% και 50% σε 1x PBT) ανά 5 λεπτά στις ίδιες συνθήκες και 3 πλυσίματα για 5 λεπτά σε 1x PBT. Στη συνέχεια, έγινε πέψη με πρωτεΐνάση K, τελικής συγκέντρωσης 10μg/ml, για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η πρωτεΐνάση K απομακρύνθηκε με 2-3 πλυσίματα με 1x PBT και τα έμβρυα μονιμοποιήθηκαν ξανά σε 4% PFA και 0.1% γλουταραλδεύδη (σε 1x PBS) για 20 λεπτά στην ίδια θερμοκρασία. Ακολούθησαν 3 πλυσίματα σε διάλυμα 1x PBT και τελικά ένα πλύσιμο σε διάλυμα PBT / διάλυμα υβριδοποίησης (1:1 v/v). Να σημειωθεί ότι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν με ήπια και συνεχή ανάδευση των εμβρύων.



### **Υβριδοποίηση του ανιχνευτή RNA με το mRNA-στόχο**

Τα έμβρυα προϋβριδοποιήθηκαν για τουλάχιστον 1 ώρα στους 68°C, σε διάλυμα υβριδοποίησης (50% φορμαμίδη, 2x SSC, 5mM EDTA pH 8.0, 50µg/ml tRNA, 0.2% Tween-20, 0.1% SDS, 100ug/ml heparin). Ο σημασμένος ανιχνευτής RNA προστέθηκε σε φρέσκο διάλυμα υβριδοποίησης σε τελική συγκέντρωση 1-1.5µg/ml. Η υβριδοποίηση πραγματοποιήθηκε στους 68°C για 14-18 ώρες.

### **Επώαση με το αντίσωμα anti-DIG-AP**

Μετά την υβριδοποίηση, τα έμβρυα πλύθηκαν 2-3 φορές, για 30 λεπτά στους 68°C, σε διάλυμα υβριδοποίησης και μία φορά σε διάλυμα υβριδοποίησης / TBST 1x (1:1, v/v) για 15 λεπτά. Ακολούθησαν 2-3 πλυσίματα για 15 λεπτά σε διάλυμα TBST 1x (25mM Tris-HCl, pH 7.8, 137mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.1% Tween-20) σε θερμοκρασία δωματίου και μετά 1-2 ώρες επώαση σε διάλυμα TBST 1x που περιείχε 20% φυσιολογικό ορό κατσίκας (NGS : Normal Goat Serum, Gibco BRL) και 2% διάλυμα παρεμπόδισης (20mM μαλαϊκό οξύ pH 7.5, 30mM NaCl και 0.1% Tween-20). Στο διάλυμα αυτό προστέθηκε αντίσωμα anti-DIG-AP σε αραιώση 1:2000 (Roche: 1 093 274) και τα έμβρυα επώαστηκαν στους 4°C για 14-18 ώρες, υπό συνεχή ήπια ανάδευση. Πραγματοποιήθηκαν 3 σύντομα πλυσίματα σε TBST 1x και στη συνέχεια 3 πλυσίματα για 60 λεπτά το καθένα. Τα έμβρυα πλύθηκαν τελικά 2 φορές, για 10 λεπτά, σε φρέσκο διάλυμα NTMT (100mM NaCl, 100mM Tris-Cl pH 9.5, 50mM Mg<sub>2</sub>Cl και 0.1% Tween-20).

### **Αντίδραση αποκάλυψης**

Στην αντίδραση αποκάλυψης η αλκαλική φωσφατάση, που είναι συνδεδεμένη με το αντίσωμα anti-DIG, αντιδρά με τα υποστρώματά της BciP (5-Bromo-4chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine salt) και NBT (Nitroblue Tetrazolium Chloride). Αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι η εμφάνιση χρώσης στα σημεία πρόσδεσης του αντισώματος και κατά συνέπεια στα σημεία υβριδοποίησης του ανιχνευτή RNA με το mRNA-στόχο. Αναλυτικά, τα έμβρυα επώαστηκαν σε NTMT που περιείχε NBT (100 mg/ml, Roche: 1 383 213) και BciP (50mg/ml, Roche: 1 383 221) σε τελικές συγκεντρώσεις 675 µg/ml και 175 µg/ml αντίστοιχα., στο σκοτάδι, αρχικά για 1-2 ώρες στους 4. Αν δεν εμφανιζόταν

χρώση η επώαση συνεχιζόταν για όσο χρονικό διάστημα ήταν απαραίτητο. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης τα έμβρυα πλύθηκαν σε 1x PBT, 2-3 φορές και τελικά διατηρήθηκαν σε διάλυμα 1x PBT με 0.01% αζίδιο Na, στους 4°C.

## ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

### Ανάλυση και ανίχνευση πρωτεϊνών

#### Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός πρωτεϊνικού εκχυλίσματος

Ακολουθήθηκε η μέθοδος ανάλυσης πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και SDS, όπως περιγράφεται αναλυτικά από τους Sambrook et al. Τα πήκτωμα πολυακρυλαμίδης περιλαμβάνουν δύο μέρη: το πρώτο για την ευθυγράμμιση των πρωτεϊνών σε ενιαίο μέτωπο (stacking gel) και το δεύτερο για τον διαχωρισμό τους (separating gel). Η σύσταση των πηκτωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 3.

**Πιν. 4:** Σύσταση πηκτωμάτων SDS-PAGE.

	Separating gel			Stacking gel	
<u>% acrylamid</u>	<u>8%</u>	<u>10%</u>	<u>12.5%</u>	<u>4%</u>	<u>% acrylamid</u>
1.5M Tris pH 8.0	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	1M Tris pH 6.8
40% (acryl/bis acryl 29:1)	2 ml	2.5 ml	3 ml	1 ml	40% (acryl/bis acryl 29:1)
SDS 20%	100μl	100μl	100μl	100μl	SDS 10%
H <sub>2</sub> O	5.3ml	4.8ml	4.175 ml	6.3 ml	H <sub>2</sub> O
APS 10%	100μl	100μl	100μl	100μl	APS 10%
TEMED	10μl	10μl	10μl	10μl	TEMED

Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης ήταν 25mM Tris-Cl, 192mM γλυκίνη, 1% SDS, pH 7.5. Τα δείγματα πριν την ηλεκτροφόρηση αποδιατάσσονται με βρασμό για 5 min σε 1x Laemli buffer (50mM Tris-Cl pH6.8, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% γλυκερόλη, 5% β-

μερκαπτοαιθανόλη). Ακολουθεί χρώση των πρωτεϊνών με χρωστική Coomassie brilliant blue R ή μεταφορά τους σε μεμβράνη (Western blot) και ανοσοανίχνευσή τους.

### **Χρώση πρωτεϊνών με Coomassie brilliant blue R**

Μετά την ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα επώάζεται για περίπου 1 hr, με ήπια ανακίνηση, σε διάλυμα χρώσης που περιέχει 0.16%(w/v) Coomassie brilliant blue R (Fisher : BP101-50), 50% μεθανόλη και 12% οξικό οξύ και στη συνέχεια σε διάλυμα αποχρωματισμού (30% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ, 3% γλυκερόλη), για 2 ή και περισσότερες ώρες. Η χρώση με Coomassie brilliant blue R μπορεί να ανιχνεύσει 50 ng πρωτεΐνης.

### **Χρώση πρωτεϊνών με νιτρικό άργυρο**

Σε περιπτώσεις που ήταν απαραίτητη μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανίχνευση πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκε η χρώση με νιτρικό άργυρο που εμφανίζει 10 – 100 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία σε σύγκριση με τη χρώση με Coomassie brilliant blue R. Για χρώση με νιτρικό άργυρο χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο kit (Silver Stain II kit Wako: 291-50301).

### **Ανάλυση ‘Western blot’**

Η μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Protran, 0.2mm, Schleicher & Schuell) έγινε όπως περιγράφεται από τους Sambrook et al , με την πειραματική διάταξη που περιλαμβάνει η συσκευή Mini-PROTEAN 3 (Biorad). Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ίδιας σύστασης με αυτό της ηλεκτροφόρησης (βλ. παραπάνω), παρουσία 20% μεθανόλης, εφαρμόζοντας 60Volts για 2-3 hrs.

### **Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών μονιμοποιημένων σε μεμβράνες**

Μετά την επώαση της μεμβράνης σε παρεμποδιστικό διάλυμα TBSTM [5% άπαχο γάλα σε 1x TBST (20mM Tris-Cl pH 7.6, 137mM NaCl, 0.1% Tween 20)] για 1-2 hrs σε θερμοκρασία δωματίου, ακολουθεί επώαση με το κατάλληλο αντίσωμα. Η συγκέντρωση του αντισώματος, η ιδανική θερμοκρασία και η διάρκεια της επώασης καθορίζεται

εμπειρικά σε κάθε περίπτωση. Στη συνέχεια, η μεμβράνη ξεπλένεται σε 1x TBST τρεις φορές για 10-20min, με σκοπό την απομάκρυνση του αντισώματος που τυχόν είχε προσδεθεί μη ειδικά στη μεμβράνη. Ακολουθεί ανίχνευση του πρώτου αντισώματος με κατάλληλο δεύτερο αντίσωμα συζευγμένο με το ένζυμο HRP (horse radish peroxidase) σε διάλυμα TBSTM και σε συνθήκες που καθορίζονται για κάθε αντίσωμα. Στη συνέχεια, η μεμβράνη ξεπλένεται με διάλυμα TBST τρεις φορές για 10-20 min και τέλος επωάζεται με μίγμα των αντιδραστηρίων Supersignal West Dura Extended Duration (PIERCE: 34076) και Supersignal West Femto Maximum Sensitivity (PIERCE: 34096), τα οποία αποτελούν υπόστρωμα του ενζύμου HRP, σε αναλογία 1:1 για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης ανιχνεύεται με αυτοραδιογραφία.

#### **Συν-ανοσοκατακρήμνιση (co-immunoprecipitation)**

Η μέθοδος εφαρμόστηκε για την ανίχνευση πρωτεϊνικών συμπλόκων που υπάρχουν in vivo, σε κύτταρα θηλαστικών. Σε πρωτεϊνικό εκχυλίσμα καλλιέργειας κυττάρων θηλαστικών από πέτρι 10cm, προστέθηκαν 50 μl σφαιριδίων τα οποία ήταν συζευγμένα με το κατάλληλο αντίσωμα ανάλογα με 'tag' που έφερε η πρωτεΐνη που θα κατακρημνιζόταν. Τα σφαιρίδια είχαν εξισορροπηθεί στο διάλυμα λύσης των κυττάρων. Το πρωτεϊνικό δείγμα επώαστηκε για 2-4 hrs στους 4°C, σε περιστρεφόμενο αναδευτήρα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση του δείγματος (3000rpm, 30sec, 4°C), απομάκρυνση του υπερκείμενου και πλύσιμο των σφαιριδίων 3 φορές με το κατάλληλο διάλυμα πλυσίματος. Τέλος, τα σφαιρίδια επωάζονται σε διάλυμα έκλουσης σε μικρό όγκο (~50μl) το οποίο περιέχει το κατάλληλο πεπτίδιο που αναγνωρίζεται από το αντίσωμα που είναι συζευγμένο πάνω στα σφαιρίδια και οδηγεί στην έκλουση των πρωτεϊνών που είχαν δεσμευτεί στα σφαιρίδια. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα (βλ. παραπάνω), ανάλυση με Western blot και ανοσοανίχνευση με κατάλληλο αντίσωμα.

**Πιν. 5:** Αντιδραστήρια και συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για τα σφαιρίδια αγαρόζης που ήταν συζευγμένα με διαφορετικά αντισώματα σε πειράματα συν - ανοσοκατακρήμνισης.

	<b>Σφαιρίδια</b>	<b>Διάλυμα πλυσίματος</b>	<b>Πεπτίδιο έκλουσης</b>	<b>Συνθήκες έκλουσης</b>
<b>Flag</b>	Anti-Flag M2 affinity gel (SIGMA: A2220)	10mM Hepes pH7.9, 1.5mM MgCl <sub>2</sub> , 300mM NaCl, 10mM KCl, 0.2% Triton X-100	Flag Peptide (SIGMA: F3290)	200μg/ml peptide in 10mM Hepes pH7.9, 1.5mM MgCl <sub>2</sub> , 100mM NaCl, 10mM KCl, 0.05% Triton X-100, 4°C, O/N
<b>HA</b>	Anti-HA affinity matrix (Roche: 1 815 016)	10mM Hepes pH7.9, 1.5mM MgCl <sub>2</sub> , 300mM NaCl, 10mM KCl, 0.2% Triton X-100	HA Peptide (synthesized in Penn State Facility)	400μg/ml peptide in 10mM Hepes pH7.9, 1.5mM MgCl <sub>2</sub> , 100mM NaCl, 10mM KCl, 0.05% Triton X-100, 4°C, O/N
<b>HPC4</b>	Anti-Protein C Affinity Matrix (Roche : 1 815 024)	50mM Hepes pH7.9, 2mM CaCl <sub>2</sub> , 100mM NaCl, 0.05% Triton X-100, 10% glycerol	No CaCl <sub>2</sub>	50mM Hepes pH7.9, 100mM NaCl, 5mM EDTA, 0.05% Triton X-100, 10% glycerol, 4°C, O/N

### Υπολογισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

Η μέτρηση της ποσότητας της πρωτεΐνης γίνεται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Bradford (BIORAD) με βαθμονομημένη καμπύλη με bovine serum albumin (Bradford, 1976).

### Συστήματα υπερέκφρασης πρωτεϊνών

#### *Βακτήρια*

#### **Βακτηριακά στελέχη**

**BL21- DE3** (Novagen: 69387-3) Χρησιμοποιήθηκε για την επαγόμενη από IPTG (Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside) έκφραση πεπτιδίων. Τα βακτήρια αυτού του στελέχους επιτρέπουν την έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών σε υψηλά επίπεδα, ιδιαίτερα εκείνων που ελέγχονται από υποκινητή T7, γιατί φέρουν γονίδιο που επάγεται από IPTG και εκφράζει T7 RNA πολυμεράση.

**Rosetta-DE3** (Novagen: 71400-3) Χρησιμοποιήθηκε για την επαγόμενη από IPTG (Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside) έκφραση πεπτιδίων. Τα βακτήρια αυτού του

στελέχους φέρουν επιπλέον πλασμίδιο με γονίδια για tRNA που κωδικοποιούν 7 σπάνια κωδικόνια (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC, and CGG), ώστε να βελτιώνονται ακόμα περισσότερο τα επίπεδα έκφρασης της ετερόλογης πρωτεΐνης.

### Θρεπτικά μέσα

Για την ανάπτυξη των στελεχών *E.coli* χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο LB(Q-BIOgene: 3002-032) 1% NaCl, 1% Bacto-Tryptone, 0.5% Yeast extract, pH 7.0. Για στερεό θρεπτικό μέσο προστίθεται άγαρ τελικής συγκέντρωσης 1.5% (Q-BIOgene: 3002-231).

### Πλασμιδιακές κατασκευές σε φορείς pGEX και pET

Για να επιτευχθεί η έκφραση των αντίστοιχων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε βακτηριακά κύτταρα, πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση των ακόλουθων ενθεμάτων στους φορείς pGEX (pGEX-3x Amersham: 27-4803-01, pGEX4T-2 Amersham: 27-4581-01) και pET (pET41b Novagen: 70535)

**Πιν. 6:** Πλασμιδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν για την επαγωγή έκφρασης της πλήρους μήκους πρωτεΐνης Neutralized του ποντικού ή τμημάτων της σε βακτήρια.

GENE	BP OF CDS	AMINO ACIDS	TAGS	RESTRICTION SITES IN MCS	Vector
GST-Neurl full	2445*	570	GST Nter	EcoRI (digest from pBS)	pGEX-3x
GST-Neurl RF	1275(1170-2445)*	184	GST Nter	SmaI/SmaI-RV (digest from pBS)	pGEX4T-2
GST-Neurl DRF	1-1170*	390	GST Nter	BamHI/BglII- SmaI	pGEX4T-2
GST-PCR1 Neurl	400(1005-1400)*	130	GST Nter	BamHIFOR-XhoI REV	pGEX4T-2
GST-PCR2 Neurl	441(423-836)*	140	GST Nter	BamHIFOR-XhoI REV	pGEX4T-2
GST Dneu RF	369(1917-2262)	123	GST Nter	BamHIFOR-XhoI REV	pGEX4T-2
GST Neurl full 2	2445*	570	GST-His	EcoRI (digest from pGEX3x)	pET41b

### Έκφραση πρωτεΐνης σε βακτήρια με επαγωγή

Για την παραγωγή των πρωτεϊνών σε βακτηριακά κύτταρα BL21 που είχαν μετασχηματιστεί με τις πλασμιδιακές κατασκευές στον φορέα pGEX ακολουθήθηκε τυπικό εργαστηριακό πρωτόκολλο επαγωγής σε βακτήρια. Συγκεκριμένα 5-10 αποικίες μετασχηματισμένων βακτηρίων αναπτύσσονται για 16-20 hrs στους 30°C, σε καλλιέργεια όγκου 50ml (LB, 100μg/ml αμπικιλίνη) και στη συνέχεια 2ml βακτηρίων

μεταφέρονται σε 200ml θρεπτικού υλικού για χρόνο επώασης μέχρι τη λογαριθμική φάση ανάπτυξης ( $OD_{600} = 0.65$ ). Ακολουθεί επαγωγή με προσθήκη 100μl διαλύματος IPTG 1M για 4 επιπλέον hrs και, εν συνεχεία, συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση (2500 rpm, 20min, 4°C). Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 10ml διαλύματος λύσης (50mM Tris-Cl pH 8.0, 300mM NaCl, 10% glycerol, 1mM AEBSF) και προστίθεται λυσοζύμη (1ug/ml SIGMA L-3790 10mg/ml) και DNase 50U (Benzonase Nuclease Novagen: 70664-3 25U/uL). Ακολουθεί ομογενοποίηση χρησιμοποιώντας French Press, προστίθονται στο κυτταρικό εκχύλισμα 0.1% Triton X-100 και 1mM DTT και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση (15.000 rpm, 4°C, 60 min). Για την παραγωγή της πλήρους μήκους πρωτεΐνης Neutralized το παραπάνω πρωτόκολλο τροποποιήθηκε λόγω της δυσκολίας έκφρασης ικανοποιητικής ποσότητας της πρωτεΐνης σε διαλυτή μορφή. Για να επιτευχθεί αυτό τα μετασχηματισμένα βακτήρια BL21-DE3 ή Rosetta-DE3 με τον φορέα pET41b αναπτύχθηκαν για 16 ώρες στους 37°C χωρίς ανάδευση σε καλλιέργεια όγκου 500 ml (LB, 100μg/ml αμπικιλίνη, 34 ug/ml χλωραμφενικόλη, 2% γλυκόζη). Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (3000 rpm, 4°C, 15 min), το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 10 ml θρεπτικού μέσου χωρίς γλυκόζη και προστέθηκε σε 500 ml φρέσκου θρεπτικού επίσης χωρίς γλυκόζη.

([http://www.fhcrc.org/science/labs/hahn/methods/biochem\\_meth/pet.pdf](http://www.fhcrc.org/science/labs/hahn/methods/biochem_meth/pet.pdf))

Μετά από πολλές δοκιμές η βέλτιστη θερμοκρασία επαγωγής βρέθηκε να είναι 13°C. Η καλλιέργεια επώαστηκε λοιπόν στους 13 όπου προστέθηκε 0.1mM IPTG για 16-20 ώρες. Το κυτταρικό ίζημα συλλέχθηκε και ομογενοποιήθηκε όπως παραπάνω και το πρωτεϊνικό εκχύλισμα ηλεκτροφορήθηκε διαγνωστικά σε κατάλληλο πήκτωμα ακρυλαμίδης. Από 3 lit αρχικής καλλιέργειας παράχθηκε τελικά 1mg καθαρής πρωτεΐνης.

### **Καθαρισμός της υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας**

Τα χμιαρικά πεπτίδια, υπερεκφρασμένα από τους πλασμιδιακούς φορείς της οικογένειας pGEX ή pET, καθαρίζονται μερικώς, με βάση την ιδιότητα της πρωτεΐνης GST (glutathione-S-transferase) να προσδένεται ισχυρά στο υπόστρωμά της, την γλουταθειόνη. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ειδικά σφαιρίδια σεφαρόζης, καλυμμένα εξωτερικά με γλουταθειόνη (Glutathione Sepharose 4B, Amersham

Biosciences Cat.no. 17-0756-01). Τα σφαιρίδια αρχικά εξισορροπούνται με 3 πλυσίματα σε παγωμένο διάλυμα πρόσδεσης (50mM Tris-Cl pH 8.0, 300mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 10% glycerol, 1mM DTT, 1mM AEBSF) και στη συνέχεια επωάζονται με το πρωτεϊνικό εκχύλισμα στους 4°C για 2 hrs περίπου.

Χρησιμοποιήθηκαν περίπου 100μl σφαιριδίων σε εναιώρημα αιθανόλης 20% για 200-500μg υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης (ποσότητα που συνήθως αντιστοιχεί σε 0.5–1ml βακτηριακού εκχυλίσματος). Ακολουθεί διαχωρισμός των σφαιριδίων από το υπερκείμενο με φυγοκέντρηση (3000rpm/4°C /30sec). Τα σφαιρίδια φορτώθηκαν σε κολώνα (bio-spin disposable chromatography column BIORAD : 732-6008), και πλύθηκαν με 50x διαλύματος πρόσδεσης με ροή βαρύτητας (gravity flow). Ακολούθησε έκλυση της πρωτεΐνης από τα σφαιρίδια με 0.5x διαλύματος έκλυσης (100 mM Tris-Cl pH 8.0, 120 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 20μM glutathione-reduced, 1mM AEBSF).

### **Πέψη με θρομβίνη**

Για να απομακρυνθεί η GST από την ανασυνδυασμένη χιμαιρική πρωτεΐνη που εκφράστηκε στα βακτήρια χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο kit θρομβίνης (Novagen: 69022-3FRZ). Η θρομβίνη είναι συνδεδεμένη με βιοτίνη και έτσι αφού προστεθεί στο πρωτεϊνικό διάλυμα και πραγματοποιήσει πρωτεολυτική πέψη αναγνωρίζοντας ειδική αλληλουχία, είναι εύκολο να απομακρυνθεί με τη χρήση σφαιριδίων στρεπταβιδίνης. Τα σφαιρίδια στη συνέχεια απομακρύνονται με φυγοκέντρηση με χρήση φίλτρου και η καθαρισμένη πρωτεΐνη συλλέγεται σε διάλυμα που περιέχει δύο πεπτίδια (GST και την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη). Για το τελικό καθαρισμό της πρωτεΐνης ακολούθησε ένα ακόμα βήμα με τη χρήση σφαιριδίων σεφαρόζης, καλυμμένα εξωτερικά με γλουταθειόνη (Glutathione Sepharose 4B, Amersham Biosciences Cat.no. 17-0756-01), που δεσμεύουν την ελεύθερη GST και η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη συλλέγεται στο υπερκείμενο. Για να ελεγχθούν όλα τα βήματα του καθαρισμού πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση δειγμάτων από όλα τα ενδιάμεσα στάδια και ανάλυσή τους είτε με χρώση με Coomassie, είτε με Western blot.



### ***Κύτταρα εντόμων***

Η έκφραση πρωτεϊνών με διαμόλυνση κυττάρων εντόμων από baculovirus αποτελεί από το πιο ισχυρά και αξιόπιστα συστήματα έκφρασης. Μερικά από τα πλεονεκτήματα του συστήματος είναι η διατήρηση της ενεργότητας της πρωτεΐνης, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης, η δυνατότητα κλωνοποίησης ενθεμάτων μεγάλου μεγέθους, η ευκολία χρήσης του συστήματος, η ταυτόχρονη έκφραση πολλών πρωτεϊνών και η ευκολία καθαρισμού της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

([http://www.bdbiosciences.com/pharmingen/products/display\\_product.php?keyID=72](http://www.bdbiosciences.com/pharmingen/products/display_product.php?keyID=72))

### **Θρεπτικά μέσα**

Θρεπτικό μέσο Sf-900 II SFM (Invitrogen:

<https://catalog.invitrogen.com/index.cfm?fuseaction=viewCatalog.viewProductDetails&productDescription=2>) στο οποίο προστέθηκε 10% FBS (Biosource 200P-500GHI: Fetal Bovine Serum) και 100 ug/ml αντιβιοτικό (GIBCO 15140-122: Penicillin/Streptomycin) χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια κυττάρων εντόμων Sf21 σε μονόστιβο επιθήλιο είτε σε υγρή καλλιέργεια στους 27°C.

### **Πλασμιδιακές κατασκευές σε φορέα pBacPAK8**

Για να επιτευχθεί η έκφραση των αντίστοιχων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε κύτταρα εντόμων Sf21, πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση των ακόλουθων ενθεμάτων στο φορέα pBacPAK8 (clontech: <http://www.clontech.com/clontech/techinfo/vectors/vectorsA-B/pBacPAK8.shtml>).

**Πιν. 7:** Πλασμιδιακές κατασκευές των γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για έκφραση σε κύτταρα εντόμων μετά από διαμόλυνση με ιό βακίλου.

GENE	bp of CDS	Amino acids	tags	RESTRICTION SITES in MCS	PRIMERS
Neurl	1-1725	1-574	Flag Cter	NheI-XhoI	NeurlNheIFor-RevFlagXhoI
Neurl	1-1311	1-437	Flag Cter	NheI-XhoI	NeurlNheIFor-RevFlagXhoI
Neurl	1-606	1-202	Flag Cter	NheI-XhoI	NeurlNheIFor-RevFlagXhoI
Mib 1	1-3021	1-1007	Flag Nter	XhoI-BamHI	MibForXhoI-RevBamHI
Mib 1 Nter	1-1185	1-395	Flag Nter	XhoI-BamHI	MibForXhoI-Mib1185RevBamHI
Mib 1 Cter	1185-3021	395-1007	Flag Nter	XhoI-BamHI	Mib1186ForXhoI -RevBamHI
Jag1 ICD	3342-3365	1069-1091	HA Cter	BamHI-EcoRI	TMJ1ForBamHI- HARevEcoRI
Jag2 ICD	3332-3355	1085-1107	HA Cter	BamHI-NotI	TMJ2ForBamHI-TMJ2revNotI
DII1 ICD	1715-2182	545-567	HPC4 Cter	NheI-BamHI	TMD1FNheI -HPC4RevBamHI
DII3 ICD	1673-1897	489-511	HPC4 Cter	NheI-XhoI	TMD3FNheI - TMD3RXhoI
DII4 ICD	1978-2373	530-552	HPC4 Cter	NheI-XhoI	TMD4FNheI – TMD4RXhoI

### Παραγωγή του ανασυνδυασμένου ιού με συν - διαμόλυνση

Για την παραγωγή του ανασυνδυασμένου ιού που φέρει το κλωνοποιημένο ένθεμα είναι απαραίτητη η συνδιαμόλυνση κυττάρων εντόμων με τον φορέα μεταφοράς (transfer vector pBacPAK 8) και το γραμμοποιημένο ιικό DNA (BaculoGold DNA 21100D).

Από το τροποποιημένο ιικό DNA (BaculoGold DNA) έχει αφαιρεθεί ένα σημαντικό τμήμα με αποτέλεσμα ο ιός να μην μπορεί να παράγει βιώσιμα σωματίδια. Με την συνδιαμόλυνση επιτυγχάνεται ομόλογος ανασυνδυασμός του ιικού DNA με τον φορέα μεταφοράς, αποκαθίσταται η θανατηφόρα έλλειψη και εκφράζεται τελικά η αντίστοιχη πρωτεΐνη στα κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί.

Για την συνδιαμόλυνση αναμείχθηκαν 3 $\mu$ g πλασμιδιακού DNA με 0.5 $\mu$ g ιικού DNA και αυτά επώαστηκαν με 4 $\mu$ l FuGENE 6 για κάθε  $\mu$ g συνολικού DNA (ROCHE: 1 815 075) σε αντίστοιχο όγκο θρεπτικού μέσου Sf-900 II SFM το οποίο δεν περιέχει ορό. Μετά από επώαση του μίγματος για 20 λεπτά σε RT, αυτό προστέθηκε σε μονόστιβο επιθήλιο κυττάρων εντόμων ( $2 \times 10^6$  κύτταρα σε πέτρι 60cm). Τα κύτταρα επώαστηκαν για 3-4 ημέρες σε υγρό θάλαμο θερμοκρασίας 27°C. Το υπερκείμενο με τον ανασυνδυασμένο ιό συλλέχθηκε και φυλάχθηκε για περαιτέρω μολύνσεις στους 4°C σε σκοτεινό περιβάλλον. Η απόδοση της διαμόλυνσης ελέγχθηκε με δοκιμή διαδοχικών αραιώσεων του ιού (end-point dilution assay) ή με ταυτοποίηση του ανασυνδυασμένου ιού με δοκιμή

σχηματισμού πλακών (plaque assay). Ο τίτλος προσδιορίστηκε ότι ήταν της τάξεως του  $10^8$  πλάκες baculovirus/ml.

### **Πολλαπλασιασμός του ανασυνδυασμένου ιού.**

Μετά την παραγωγή του ιού με συνδιαμόλυνση σε μικρή κλίμακα είναι απαραίτητος ο πολλαπλασιασμός των ανασυνδυασμένων ικών σωματιδίων για την περαιτέρω μόλυνση καλλιιεργειών κυττάρων εντόμων και την παραγωγή των πρωτεϊνών. Για την προετοιμασία τέτοιων ικών αποθεμάτων είναι σημαντικό η αναλογία «αριθμός ικών σωματιδίων/αριθμός κυττάρων» να είναι  $<1$  (low multiplicity of infection). Με αυτό τον τρόπο η πιθανότητα μεταλλαγών στο ικό γονιδίωμα κατά τον πολλαπλασιασμό του ιού είναι χαμηλή.

Για τον πολλαπλασιασμό του ιού, απλώθηκαν  $2 \times 10^7$  κύτταρα σε πέτρι 15 cm

Προστέθηκαν διαφορετικές αραιώσεις των ικών σωματιδίων που συλλέχθηκαν μετά τη συνδιαμόλυνση (για να δοκιμαστούν τίτλοι  $10^7$  και  $10^8$  αντίστοιχα).

Τα κύτταρα επώαστηκαν για 3 ημέρες στους  $27^\circ\text{C}$  και ελέγχθηκαν για χαρακτηριστικά μόλυνσης από τον ιό μετά από τις 2 πρώτες μέρες.

Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά σε 10.000 g.

Τα ικά σωματίδια μπορούν να φυλαχθούν για διάστημα 6 μηνών στους  $4^\circ\text{C}$  ή να καταψυχθούν στους  $-80^\circ\text{C}$  για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Ο νέος τίτλος του ιού είναι δυνατό να καθοριστεί με δοκιμή σχηματισμού πλακών.

### **Έκφραση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης**

Τα επίπεδα έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με το συγκεκριμένο σύστημα μπορεί να κειμένονται μεταξύ 0.1% και 50% της ολικής πρωτεΐνης του κυττάρου που διαμολύνεται. Η αναλογία «αριθμός ικών σωματιδίων/αριθμός κυττάρων» πρέπει να είναι μεταξύ 3 και 10 (high multiplicity of infection), αν και οι ιδανικές συνθήκες έκφρασης ποικίλουν μεταξύ διαφορετικών πρωτεϊνών και πρέπει να καθορίζονται κατά περίπτωση.

Για την παραγωγή πρωτεΐνης σε μικρή κλίμακα χρησιμοποιήθηκαν  $2 \times 10^7$  κύτταρα ανά πέτρι 15 cm. Για να καθοριστεί το ποσό του ιού που είναι απαραίτητο χρησιμοποιήθηκε ο λόγος  $\frac{\text{(αριθμός ιικών σωματιδίων/αριθμός κυττάρων)} \times \text{αριθμός κυττάρων}}{\text{τίτλος του ιού/ ml}}$  .

Μετά τη μόλυνση των κυττάρων με το κατάλληλο ποσό ιού, ακολούθησε επώαση για 3-4 μέρες στους  $27^\circ\text{C}$ .

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 10.000 g. Το υπερκείμενο που περιέχει τα ιικά σωματίδια μετά από διαμόλυνση με υψηλή αναλογία «αριθμός ιικών σωματιδίων/αριθμός κυττάρων» δεν φυλάσσεται.

Ακολούθησε λύση του κυτταρικού ιζήματος στο κατάλληλο διάλυμα λύσης (50mM HEPES pH 7.9, 300mM NaCl, 5mM  $\text{MgCl}_2$ , 20% glycerol, 0.2% Triton X-100) και ανάλυση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Για την παραγωγή πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα χρησιμοποιήθηκαν  $2 \times 10^6$  κύτταρα / ml υγρής καλλιέργειας όγκου 100 ή 500 ml. Το ποσό του ιού που χρησιμοποιήθηκε για μόλυνση υπολογίστηκε με τον παραπάνω λόγο. Τα κύτταρα επώαστηκαν στους  $27^\circ\text{C}$  για 4- 5 μέρες και στη συνέχεια συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 10.000 g.

Για την ανάλυση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε κατάλληλο όγκο διαλύματος λύσης και ομογενοποιήθηκαν με τη χρήση French Press. Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης καθορίστηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

## **Κύτταρα θηλαστικών**

### **Κυτταρικές σειρές**

Τα χαρακτηριστικά και οι συνθήκες ανάπτυξης των κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα διαμόλυνσης ή ανοσοανίχνευσης πρωτεϊνών αναφέρονται στον κατάλογο κυτταρικών σειρών και υβριδωμάτων 'American Type Culture Collection' (ATCC, 1992):

**HeLa - S3** ( ATCC: CCL-2.2™) : Η κυτταρική σειρά έχει παραχθεί από κλώνο της πατρικής σειράς HeLa (ATCC [CCL-2](#)). Προέρχεται από ιστό τραχήλου ανθρώπου και έχει μορφολογία επιθηλίου. Αναπτύσσεται σε μονοστιβάδες κυττάρων, αλλά μπορεί να προσαρμοστεί και για ανάπτυξη σε υγρή καλλιέργεια.

**HEK293** (Invitrogen: Flp-In 293 ([R75007](#))): Η κυτταρική αυτή σειρά προέρχεται από νεφρό ανθρώπου και έχει μορφολογία επιθηλίου. Χρησιμοποιείται κυρίως για την εύκολη δημιουργία κυτταρικών σειρών σταθερής έκφρασης, αφού φέρει στο γονιδίωμα της θέσεις FRT για κατευθυνόμενη ένθεση του γονιδίου που πρόκειται να εκφραστεί σταθερά. Αναπτύσσεται σε μονοστιβάδες κυττάρων.

**Lcells** (ATCC: CRL-2648): Η κυτταρική σειρά προήλθε από κύτταρα υποδόριου συνδετικού ιστού ποντικού στελέχους C3H/An και έχει μορφολογία ινοβλάστη. Αναπτύσσεται σε μονοστιβάδες κυττάρων

### **Θρεπτικά μέσα**

Για την ανάπτυξη των κυτταρικών σειρών θηλαστικών χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium Cell gro: 15-013-CV) σε συγκέντρωση 80 ή 90% και ορός 10% FBS (Biosource 200P-500GHI: Fetal Bovine Serum). Για την παρεμπόδιση βακτηριακών μολύνσεων προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο 100 ug/ml αντιβιοτικό (GIBCO 15140-122: Penicillin/Streptomycin) . Τα κύτταρα αναπτύσσονται στους 37°C, σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub>.

### **Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών με πλασμιδιακές κατασκευές**

Η παροδική παραγωγή ανασυνδυασμένων πεπτιδίων σε κύτταρα θηλαστικών επιτυγχάνεται κλωνοποιώντας τα αντίστοιχα cDNAs σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς με ρυθμιστικά στοιχεία που επάγονται ισχυρά στο κυτταρικό περιβάλλον, όπου εισάγονται οι πλασμιδιακές κατασκευές. Η παροδική διαμόλυνση των κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κατάλληλου αντιδραστηρίου διαμόλυνσης FuGENE 6 (Roche: 1 815 075). Το FuGENE 6 είναι ένα μίγμα από λιπίδια το οποίο σχηματίζει σύμπλοκο με το DNA και το μεταφέρει σε ζωικά κύτταρα. Εμφανίζει μεγάλη αποδοτικότητα διαμόλυνσης στις περισσότερες ευρέως χρησιμοποιούμενες κυτταρικές σειρές και σχεδόν μηδενική τοξικότητα. Συγκεκριμένα 1μg DNA αναμειγνύεται με 4μl FuGENE 6 σε 100 μl OPTIMEM I (Reduced Serum Medium modification of MEM (Eagle's) Gibco: 31985) και επιάζεται για 20-40 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το μείγμα αυτό προστίθεται πάνω σε μονή στιβάδα κυττάρων που καλύπτουν την επιφάνεια του πιάτου κατά 70-80 %. Μετά από 5-16 ώρες προστίθεται στα κύτταρα 5% ορός FBS

(Biosource 200P-500GHI: Fetal Bovine Serum), αφού δεν είναι απαραίτητη η αντικατάσταση του θρεπτικού με φρέσκο, λόγω της χαμηλής τοξικότητας που παρουσιάζει το FuGENE 6. Τα κύτταρα συλλέγονται μετά από 24-48 ώρες για περαιτέρω ανάλυση του κυτταρικού εκχυλίσματος ή αναπτύσσονται για 12-15 μέρες σε θρεπτικό μέσο που περιέχει κατάλληλο μάρτυρα επιλογής, όταν πρόκειται να παραχθούν κυτταρικές σειρές σταθερής έκφρασης.

Στην περίπτωση που η ένθεση του πλασμιδίου στο γονιδίωμα του κυττάρου ( HeLa S3 ή Lcells) ήταν τυχαία, το ποσοστό επιτυχίας ήταν χαμηλό ( 5-10% θετικών κλώνων) και για αυτό συλλέχθηκε μεγάλος αριθμός κλώνων, οι οποίοι ελέγχονταν για πιθανή ένθεση αρχικά με PCR και στη συνέχεια με Western blot.

Όταν για την δημιουργία κυτταρικών σειρών σταθερής έκφρασης χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Flp-In 293, στα οποία είναι δυνατή η στοχευμένη ένθεση του γονιδίου σε κατάλληλες θέσεις FRT του γονιδιώματος, το ποσοστό επιτυχίας ήταν σημαντικά υψηλότερο (50-70%) και για αυτό μικρότερος αριθμός κλώνων ελέγχθηκε μόνο με Western blot.

#### *Δοκιμή έκφρασης με το γονίδιο αναφοράς της luciferase*

Όπου ήταν αναγκαίος ο έλεγχος του ποσοστού αποδοτικότητας της διαμόλυνσης, πλασμίδιο με το γονίδιο αναφοράς της luciferase συν-διαμολύνθηκε με τις πλασμιδιακές κατασκευές και χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο kit (Dual Luciferase Reporter (DLR) Assay Promega: E1910) για τη μέτρηση της έκφρασης της πρωτεΐνης με τη χρήση MPL2 (microplate luminometer Berthold Detection Systems). Η luciferase αποτελεί ιδανικό γονίδιο αναφοράς λόγω έλλειψης ενδογενούς δράσης luciferase σε θηλαστικά κύτταρα και επίσης γιατί το ένζυμο είναι ενεργό αμέσως μετά την μετάφραση της πρωτεΐνης.

**Πιν. 8:** Πλασμιδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν για παροδική διαμόλυνση κυττάρων HEK293.

γονίδια	bp	aa	Θέσεις περιορισμού	φορέας
Flag-Neurl	473-2197	1-574	XhoI-BamHI	pCDNA3.1
Neurl-Flag	473-2197	1-574	NheI-SbfI	pCDNA3.1
Flag-Mib	1-3021	1-1007	XhoI-BamHI	pCDNA3.1
NEUZ1-Flag	473-1079	1-200	NheI-SbfI	pCDNA3.1
NEUZ1-2-Flag	473-1784	1-437	NheI-SbfI	pCDNA3.1
Flag-NEUZ2RF	1220-2197	249-574	XhoI-BamHI	pCDNA3.1

Flag-NEUZ2	1220-1784	249-437	XhoI-BamHI	pCDNA3.1
Flag-Neurl mutRF	473-2197	1-574	XhoI-BamHI	pCDNA3.1
Neurl mutRF - Flag	473-2197	1-574	NheI-SbfI	pCDNA3.1
Flag-RF	2027-2197	518-574	XhoI-BamHI	pCDNA3.1
Neurl G2A – Flag	473-2197	1-574	NheI-SbfI	pCDNA3.1
Neurl S462A – Flag	473-2197	1-574	NheI-SbfI	pCDNA3.1
Neurl S469A – Flag	473-2197	1-574	NheI-SbfI	pCDNA3.1
Neurl S462AS469A - Flag	473-2197	1-574	NheI-SbfI	pCDNA3.1
Dll1-HPC4	14-2176	1-722	BamHI-XhoI	pCDNA3.1
Dll3-HPC4	140-1895	1-585	BamHI-XhoI	pCDNA3.1
Dll4-HPC4	313-2371	1-686	BamHI-XhoI	pCDNA3.1
Flag-MibN	1-1185	1-395	NheI-XhoI	pCDNA3.1
Flag-MibC	1185-3021	395-1007	NheI-XhoI	pCDNA3.1

**Πιν. 9:** Πλασμιδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία κυτταρικών σειρών σταθερής έκφρασης με τυχαία ένθεση

Κυτταρικές σειρές με τυχαία ένθεση	Πλασμιδιακές κατασκευές	πρωτεΐνες
<b>HeLa</b>		
Neurl – Flag (35C)	NheI-SbfI Flag pCDNA3.1	1-574 aa
Flag – Neurl (41 N)	Flag XhoI-BamHI pCDNA3.1	1-574 aa
<b>L cells</b>		
Neurl – Flag	NeurlNheI-XhoI- pIRES	1-574aa
Neurl- Flag / Dll1-HPC4	NeurlNheI-XhoI - pIRES-Dll1HPC4PmeI	1-574aa / 1-722aa
Neurl- Flag / Dll3-HPC4	NeurlNheI-XhoI - pIRES- Dll3HPC4PmeI	1-574aa / 1-585aa
Neurl- Flag / Dll4-HPC4	NeurlNheI-XhoI- pIRES- Dll4HPC4PmeI	1-574aa /1-686aa
Neurl- Flag / JAG1-HA	NeurlNheI-XhoI- pIRES- JAG1HA XbaI	1-574aa /1-1218aa
Neurl- Flag / JAG2-HA	NeurlNheI-XhoI- pIRES- JAG2HA XbaI	1-574aa /1-1247aa

**Πιν. 10 :** Πλασμιδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία κυτταρικών σειρών σταθερής έκφρασης με στοχευμένη ένθεση

Κυτταρικές σειρές με στοχευμένη ένθεση	Πλασμιδιακές κατασκευές	Πρωτεΐνες
<b>293 Flp In</b>		
Neurl – Flag	NheI-SbfI Flag pCDNA5/FRT	1-574 aa
Flag – Neurl	Flag XhoI-BamHI pCDNA5/FRT	1-574 aa
Flag – Mind Bomb	Flag XhoI-BamHI pCDNA5/FRT	1-1007 aa
NEUZ1-Flag	NheI-SbfI Flag pCDNA5/FRT	1-200aa
NEUZ1-2-Flag	NheI-SbfI Flag pCDNA5/FRT	1-437aa
Flag-NEUZ2RF	Flag XhoI-BamHI pCDNA5/FRT	249-574aa
Flag-NEUZ2	Flag XhoI-BamHI pCDNA5/FRT	249-437aa
Flag-Neurl mutRF	Flag XhoI-BamHI pCDNA5/FRT	1-574aa
Flag-RF	Flag XhoI-BamHI pCDNA5/FRT	518-574aa

### **Μεταγωγή DNA σε κυτταρικές σειρές μετά από μόλυνση με ρετρο-ιούς.**

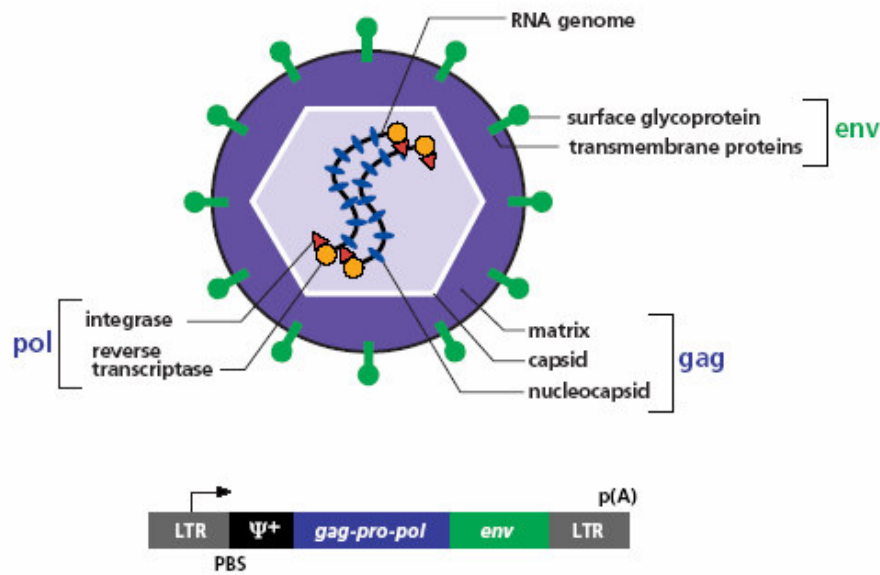
Ένας περιορισμός στη χρήση πλασμιδιακών κατασκευών για διαμόλυνση κυτταρικών σειρών είναι το γεγονός ότι μερικές κυτταρικές σειρές είναι πολύ δύσκολο ή ακόμα πρακτικά αδύνατο να διαμολυνθούν. Σε πολλές από αυτές τις σειρές και ιδιαίτερα σε πρωτογενείς κυτταρικές σειρές, ο πιο αποδοτικός τρόπος μεταγωγής DNA είναι η μόλυνσή τους με ιούς. Το πιο δημοφιλές σύστημα και εύκολο να χρησιμοποιηθεί είναι οι φορείς ρετρο-ιών. Η αποδοτικότητα μόλυνσης με ρετρο-ιούς μπορεί να είναι και 100%, ενώ ο αριθμός των αντιγράφων που εισάγονται μπορεί να ελεγχθεί με την επιλογή κατάλληλης αναλογίας «αριθμός ιικών σωματιδίων/αριθμός κυττάρων» (MOI: multiplicity of infection). Για να εξασφαλιστεί η έκφραση του γονιδίου που μελετάται, χωρίς να παραχθούν ιοί με δυνατότητα πολλαπλασιασμού μέσα στο κύτταρο δέκτη, το γονιδίωμα του ρετρο-ιού έχει τροποποιηθεί ώστε να παράγονται μόνο ιικά σωματίδια ανίκανα να πολλαπλασιαστούν

(<http://www.clontech.com/clontech/products/literature/pdf/brochures/RetroBR.pdf>).

Το σύστημα έκφρασης που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από μία κυτταρική σειρά πακεταρίσματος (packaging cell line) που εκφράζει σταθερά τα ιικά γονίδια, gag, pol, και env που είναι απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό του ιού και τον ιικό φορέα στον οποίο υπάρχουν θέσεις LTR και το κλωνοποιημένο γονίδιο που μελετάται.

Συγκεκριμένα, για το αρχικό πακετάρισμα του ιού χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Plat-E (Morita S, et al, 2000), η οποία διαμολύνεται με τον ιικό φορέα με τη χρήση FuGENE 6, όπως έχει περιγραφεί λεπτομερώς παραπάνω. Μετά από 48 ώρες τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (3000 rpm, 15 min, 4°C) και το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο συλλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε για τη μόλυνση κυττάρων L cells, τα οποία κάλυπταν 30-40 % της επιφάνειας πιάτου 6-well. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία σειρών σταθερής έκφρασης αραιώθηκαν 50 ή 500 φορές και επώαστηκαν με το κατάλληλο αντιβιοτικό. Η επιλογή των θετικών κλώνων έγινε όπως περιγράφηκε παραπάνω.





Εικ. 9: Σχηματική απεικόνιση ενός τυποποιημένου ρετρο-ιού

**Πιν. 11:** Πλασμιδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία κυτταρικών σειρών με τη χρήση ρετρο-ιού.

Κυτταρικές σειρές με χρήση ρετρο-ιού	Πλασμιδιακές κατασκευές	Πρωτεΐνες
Neurl – Flag	NotI/NheI (blunt)-SbfI Flag pQCXIN	1-574aa
Flag – Mind Bomb	Flag XhoI-BamHI pQCXIH	1-1007 aa
DII1-HPC4	NotI(blunt)/PmeI- XhoI HPC4 pQCXIN	1-722aa
DII3-HPC4	NotI(blunt)/PmeI- XhoI HPC4 pQCXIN	1-585aa
DII4-HPC4	NotI(blunt)/PmeI- XhoI HPC4 pQCXIN	1-686aa
JAG1-HA	PacI/XbaI (blunt) – NotI HA pQCXIN	1-1218aa
JAG2-HA	XbaI/PacI (blunt) HA pQCXIN	1-1247aa

### Ανίχνευση πρωτεΐνης σε κύτταρα θηλαστικών με *in situ* ανοσοφθορισμό

Τα πειράματα ανοσοεντοπισμού πραγματοποιήθηκαν ως επί το πλείστον σε κύτταρα που αναπτύσσονται προσκολλημένα σε καλυπτρίδα τοποθετημένη μέσα σε τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας, χρησιμοποιώντας πρώτο αντίσωμα ειδικό για την υπό ανίχνευση πρωτεΐνη και δεύτερο αντίσωμα συζευγμένο με φθορίζουσα ουσία, ικανό να αλληλεπιδράσει με το πρώτο. Αναλυτικότερα, τα κύτταρα αναπτύσσονται σε μονοστιβάδες, που καλύπτουν την επιφάνεια καλυπτρίδων κατά 80-90%. Στη συνέχεια, πλένονται 3 φορές με 1x PBS και μονιμοποιούνται με 4% PFA (παραφορμαλδεΰδη) για 5 min. Ακολουθούν 3 πλυσίματα με 1x PBS και προσθήκη διαλύματος 20mM γλυκίνης

για 10min. Η γλυκίνη απομακρύνεται με 1x PBS και ακολουθεί επώαση σε διάλυμα 0.5% Triton-X και 1x PBS για 20 min, το οποίο καθιστά τις μεμβράνες των κυττάρων διαπερατές. Στη συνέχεια, προστίθεται παρεμποδιστικό διάλυμα (2mM MgCl<sub>2</sub>, 5% BSA σε 1x PBS) για 10 min. Τα κύτταρα επωάζονται με το πρώτο αντίσωμα, αραιωμένο κατάλληλα σε παρεμποδιστικό διάλυμα. Ο χρόνος επώασης κυμαίνεται από 45 min έως και 2 hrs, ανάλογα με το αντίσωμα.

Στη συνέχεια, τα κύτταρα ξεπλένονται τρεις φορές με παρεμποδιστικό διάλυμα χωρίς BSA και επωάζονται με το δεύτερο (φθορίζον) αντίσωμα στο σκοτάδι για 45 min. Ακολουθεί πλύσιμο των κυττάρων τρεις φορές με παρεμποδιστικό διάλυμα (χωρίς BSA) και μία φορά με 1x PBS και μεταφορά της καλυπτρίδας με την πλευρά των κυττάρων πάνω σε μια σταγόνα (~10μl) διαλύματος 1% n-propyl-gallate και 80% γλυκερόλης σε 1x PBS. Η καλυπτρίδα σφραγίζεται αεροστεγώς και το δείγμα φυλάσσεται στους -20oC μέχρι να παρατηρηθεί σε απλό ή συνεστιακό (Leica TCS MP) μικροσκόπιο φθορισμού.

Στις περιπτώσεις πειράματος ανοσοεντοπισμού σε κύτταρα που δεν προσκολλώνται στο υπόστρωμα, ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι μετά το αρχικό πλύσιμο με 1x PBS, τα κύτταρα μεταφέρονται στην επιφάνεια αντικειμενοφόρων με επικάλυψη πολυλυσίνης (poly-L, SIGMA: P1524) όπου παραμένουν για περίπου 1hr, μέχρι να προσκολληθούν στην αντικειμενοφόρο, λόγω του θετικού φορτίου της επίστρωσης poly-L.

#### *Χρώση DNA με DAPI*

Στις περιπτώσεις που υπήρξε ανάγκη να παρατηρηθούν οι πυρήνες των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε χρώση του DNA με DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride). Συγκεκριμένα, μετά την επώαση των κυττάρων με το φθορίζον αντίσωμα, ακολουθεί πλύσιμο με 1x PBS και επώαση με διάλυμα DAPI 1μg/ml σε 1x PBS για 7 min. Η χρωστική απομακρύνεται με τρεις διαδοχικές πλύσεις με 1x PBS, τα κύτταρα τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρο, όπως προηγουμένως, και η παρατήρηση γίνεται σε μικροσκόπιο φθορισμού.

### **Απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών**

Για την απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, μονοστιβάδες κυττάρων αναπτύχθηκαν σε τρυβλία καλύπτοντας το υπόστρωμα κατά 90%. Μετά από έκπλυση από το θρεπτικό υλικό με παγωμένο 1x PBS που περιέχει και 1mM EDTA pH 8.0, τα κύτταρα αποκολλούνται από την επιφάνεια του τρυβλίου με τη βοήθεια πλαστικής ξύστρας και μεταφέρονται σε σωληνάριο φυγοκέντρου. Ακολουθεί φυγοκέντρωση (1200rpm/4oC/20min), και επαναιώρηση των κυττάρων σε 5-6 όγκους διαλύματος λύσης (50mM Tris-HCl, pH 7.9, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% DOC). Τα κύτταρα επωάζονται αρχικά για 30 min (4°C) και στη συνέχεια σε περιστρεφόμενο αναδευτήρα στους 4°C, μέχρι να παρατηρηθεί σχηματισμός νηματοειδούς ιζήματος από μεμβρανικά υπολείμματα και DNA. Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα φυγοκεντρείται (14.000rpm / 4°C / 25min) και το υπερκείμενο αναλύεται περαιτέρω.

### **Δοκιμές ουβικουιτινιλίωσης *in vitro***

Για να ελεγχθεί αν η πρωτεΐνη Neur1 του ποντικού έχει δράση E3 λιγάσης ουβικουιτίνης και να αναζητηθούν πιθανά υποστρώματα πραγματοποιήθηκαν δοκιμές ουβικουιτινιλίωσης *in vitro*. Για τις δοκιμές αυτές χρησιμοποιούνται ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που έχουν εκφραστεί σε βακτήρια ή κύτταρα εντόμων (Kamura, et al, 2000). Συγκεκριμένα εκφράστηκαν πλήρους μήκους ή τμήματα των πιθανών E3 λιγασών και των υποστρωμάτων και καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας. 1μM από την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε σαν E3, αναμείχθηκε με 50 nM E1, 0.2 μM E2, 0.5 mg/ml Ubiquitin σε 10μl αντίδρασης που περιέχει 50mM Tris-HCl pH 7.6, 50mM NaCl, 0.5mM EDTA, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM DTT, 5% γλυκερόλη και 2mM ATP με 60mM creatine phosphate, 0.3 mg/ml creatine phosphokinase και 0.3 U/ml pyrophosphatase που βοηθούν στην αναγέννηση του ATP.

Η αντίδραση επώαστηκε για 2 ώρες στους 37°C και τερματίστηκε με προσθήκη 1x Laemli buffer (50mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% γλυκερόλη, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη) και επώαση για 5 min στους 65°C. Το αποτέλεσμα

της αντίδρασης αναλύθηκε με ανοσοαποτύπωση, χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα αντισώματα.

## **Σύστημα δύο υβριδίων σακχαρομύκητα**

Πρόκειται για μια ευρέως διαδεδομένη πειραματική προσέγγιση, με σκοπό την ανίχνευση άμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων σε ένα *in vivo* σύστημα.

Χρησιμοποιείται τόσο για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης δύο πρωτεϊνών, όσο και για την ταυτοποίηση πεπτιδίων που εμφανίζουν αλληλεπίδραση με μία υπό μελέτη πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται σαν ‘δόλωμα’ (bait). Η μέθοδος στηρίζεται στο ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση ενός γονιδίου αναφοράς, η οποία λαμβάνει χώρα στον πυρήνα κυττάρων σακχαρομύκητα, εξαρτάται μόνο από την αλληλεπίδραση της υπό μελέτη πρωτεΐνης (‘δόλωμα’ , ‘bait’) με την πρωτεΐνη που προέκυψε από την επιλογή (‘θήραμα’, ‘prey’).

### **Στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4a**

Για το πείραμα των δύο υβριδίων χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα σακχαρομύκητα του στελέχους PJ69-4a με γονότυπο: MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ GAL2-AD2 LYS2::GAL1-HIS3 met2::GAL7-lacZ [James et al , 1996]. Το στέλεχος αυτό φέρει τρία διαφορετικά γονίδια αναφοράς, επαγόμενα από τον μεταγραφικό παράγοντα GAL4 μέσω διαφορετικών υποκινητών:

- i) Η κατασκευή GAL1-HIS3 έχει εντεθεί στην 3’ πλευρική περιοχή του γονιδίου LYS2.
- ii) Η κατασκευή GAL2-ADE2 αντικατέστησε τον γενετικό τόπο ADE2, ώστε ο υποκινητής του γονιδίου ADE2 να αντικατασταθεί από τον υποκινητή GAL2.
- iii) Η κατασκευή GAL7-lacZ έχει εντεθεί στην κωδική περιοχή του γονιδίου MET2, προκαλώντας έλλειμμα του μεγαλύτερου μέρους του MET2.

Η ομόλογη περιοχή μεταξύ των τριών υποκινητών (GAL1, GAL2, GAL7) περιορίζεται στις θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα GAL4, επιτρέποντας τον ασφαλέστερο αποκλεισμό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων.

### **Θρεπτικά μέσα**

Η σύσταση των θρεπτικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη κυττάρων σακχαρομύκητα περιγράφεται στα σχετικά εργαστηριακά εγχειρίδια (Ausubel et al , 2000, Guthrie & Fink, 1991). Συνθετικό θρεπτικό μέσο SC: Yeast nitrogen base (χωρίς αμινοξέα) 0.67%, γλυκόζη 2%, μίγμα αμινοξέων 0.2% (2gr από όλα τα αμινοξέα εκτός : Leu, Trp, His). Άγαρ (για στερεό θρεπτικό μέσο) 2%. Στερεό θρεπτικό μέσο SC με Xgal: Στο στερεό θρεπτικό μέσο SC προστίθεται μετά την αποστείρωση σε κλίβανο, διάλυμα φωσφορικού καλίου τελικής συγκέντρωσης 70mM (43.05mM  $K_2HPO_4$  και 26.95mM  $KH_2PO_4$ ) και X-gal 20μg / ml. Πλούσιο θρεπτικό μέσο YEP: Yeast extract 1%, γλυκόζη 2%, bactopeptone 2%, άγαρ (για στερεό θρεπτικό μέσο) 2%.

### **Πλασμιδιακές κατασκευές σε φορείς pGBT9 και pVP16**

Κλωνοποίηση του cDNA της πρωτεΐνης Neuralized σαν 'bait' στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGBT9 (ευγενική προσφορά της Δρ. Κοκκινάκη), στο αναγνωστικό πλαίσιο 3' της υπομονάδας πρόσδεσης στο DNA του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 (GAL4-BD). Οι ενδοκυττάριας περιοχές των πρωτεϊνών Delta-like 1 και Delta-like 4 του ποντικού κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pVP16, συντηγμένα με την υπομονάδα ενεργοποίησης της μεταγραφής του παράγοντα VP16.

### **Μετασηματισμός κυττάρων σακχαρομύκητα του στελέχους pJ69-4a και επιλογή των ανασυνδυασμένων αποικιών.**

Για τον μετασηματισμό κυττάρων σακχαρομύκητα με πλασμιδιακό DNA ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των Agater et al (1998), με ορισμένες τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, 50ml θρεπτικού μέσου YEP, το οποίο περιείχε και 0.25mM αδενίνης, εμβολιάζεται με μία αποικία κυττάρων σακχαρομύκητα στελέχους pJ69-4a και επώάζεται για 16-20 hrs στους 30°C με ανακίνηση (250 rpm). Στη συνέχεια, η καλλιέργεια αραιώνεται κατάλληλα με θρεπτικό μέσο (μέχρι  $OD_{550}=0.2-0.4$ ) και η επώαση συνεχίζεται μέχρι την  $OD_{550} = 0.6-0.7$  (συνολικός αριθμός κυττάρων:~109). Ακολουθεί φυγοκέντρωση, επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε 25ml αποστειρωμένου  $H_2O$  και δεύτερη επαναιώρηση σε 1ml φρέσκου διαλύματος οξικού

λιθίου συγκέντρωσης 100mM. Το δείγμα φυγοκεντρείται (4000 rpm / 5-10 min), απομακρύνεται το υπερκείμενο και ακολουθεί νέα επαναιώρηση των κυττάρων σε 500μl διαλύματος οξικού λιθίου 100mM. Για κάθε μετασχηματισμό, αναμιγνύονται: 0.5-1 μg πλασμιδιακού DNA και 500μg carrier DNA σε συνολικό όγκο 20μl και στη συνέχεια προσθέτονται 240μl διαλύματος 50% πολυαιθυλενικής γλυκόλης μοριακού βάρους 3350 (PEG 3350). Τέλος, προσθέτονται 100μl του κυτταρικού εναιωρήματος σε 100mM οξικού λιθίου, το δείγμα αναδεύεται ήπια και ακολουθεί προσθήκη 36μl πυκνού διαλύματος οξικού λιθίου (1M), ήπια ανάδευση (σε vortex) και επώαση για 30 min στους 30°C. Ακολουθεί θερμικό σοκ στους 42°C για 25 min, φυγοκέντρηση (3000rpm/10min), απομάκρυνση του υπερκείμενου, επαναιώρηση του ιζήματος σε 100μl θρεπτικού μέσου SC και άπλωμα των κυττάρων σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο. Η επιλογή των μετασχηματισμένων αποικιών πραγματοποιείται λόγω των αυξοτροφιών του στελέχους PJ69-4a, που συμπληρώνονται από γονίδια των πλασμιδίων.

Η ταυτοποίηση της αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη 'bait', πραγματοποιείται στο διπλά μετασχηματισμένο στέλεχος σακχαρομύκητα PJ69-4a, το οποίο φέρει τα πλασμίδια bait/pGBT9 και prey/pVP16, όπου ελέγχεται η ικανότητά του να αναπτύσσεται σε θρεπτικά μέσα επιλεκτικά για τη μεταγραφική ενεργοποίηση καθενός από τα τρία γονίδια αναφοράς του στελέχους PJ69-4a (HIS3, ADE2, και LacZ). Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιούνται σε κάθε περίπτωση ελέγχου μεταγραφικής ενεργοποίησης ήταν: *Θρεπτικό μέσο UA*: SC με Ura, Ade και 3mM ή 10mM 3-aminotriazol (3-AT), για τον έλεγχο της ενεργοποίησης του γονιδίου αναφοράς HIS3.

Η 3-αμινοτριαζόλη (AT) είναι τοξική για τα κύτταρα που δεν παράγουν ιστιδίνη ή παράγουν χαμηλά επίπεδα ιστιδίνης, λόγω μη ειδικής ενεργοποίησης του υποκινητή GAL1.

*Θρεπτικό μέσο UH*: SC με Ura και His για τον έλεγχο ενεργοποίησης του γονιδίου αναφοράς ADE2.

*Θρεπτικό μέσο UAH/X-gal*: SC με Ura, Ade, His και X-gal, για τον έλεγχο της ενεργοποίησης του γονιδίου αναφοράς LacZ.

### **Πειράματα αρνητικού ελέγχου**

Τα πειράματα αρνητικού ελέγχου είναι u945 απαραίτητα στο πείραμα των δύο υβριδίων σακχαρομύκητα, ώστε να αποκλειστεί το ενδεχόμενο οι υποκινητές των γονιδίων αναφοράς να ενεργοποιούνται μόνο από την πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται σαν ‘δόλωμα’ (bait) ή μόνο από την πρωτεΐνη – ‘θήραμα’ που επιλέγεται από τη βιβλιοθήκη (prey). Τα πειράματα αρνητικού ελέγχου που πραγματοποιήθηκαν ήταν:

α) μετασχηματισμός του στελέχους σακχαρομύκητα PJ69-4a με το πλασμίδιο cDNA-bait/pGBT9 ,

β) μετασχηματισμός του PJ69-4a με τον πλασμιδιακό φορέα pGBT9,

γ) μετασχηματισμός του PJ69-4a με τον πλασμιδιακό φορέα pVP16.

Ακολούθησε έλεγχος ενεργοποίησης των τριών γονιδίων αναφοράς στις συνθήκες που περιγράφονται για το 2ο στάδιο ελέγχου. Τα παραπάνω πειράματα αρνητικού ελέγχου πραγματοποιήθηκαν πριν τη διερεύνηση της βιβλιοθήκης, για να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

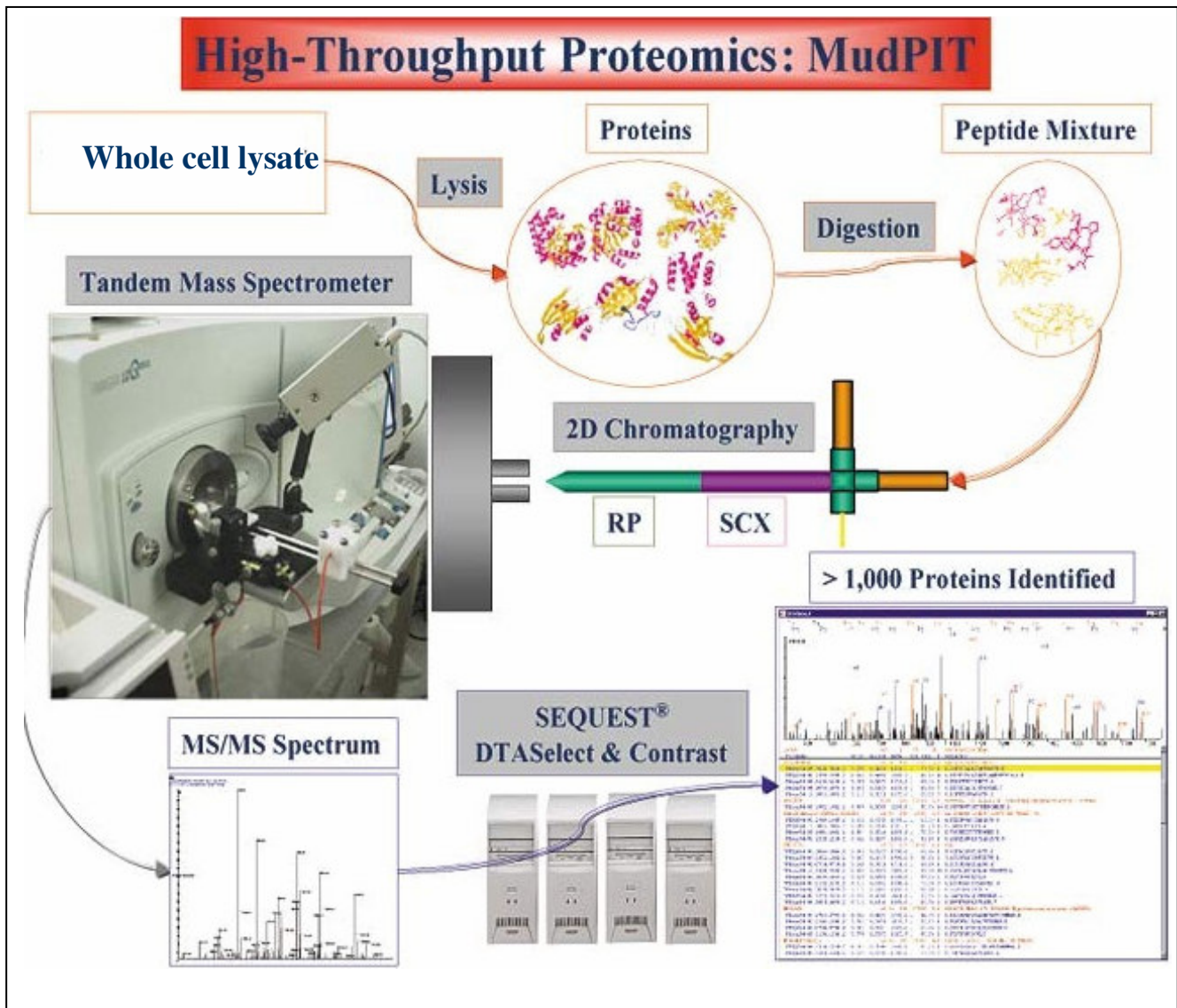
δ) μετασχηματισμός του PJ69-4a με καθέναν από τους επιλεγμένους κλώνους cDNA-prey/pVP16 και έλεγχος ενεργοποίησης των τριών γονιδίων αναφοράς, με σκοπό να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ενεργοποίησης των γονιδίων αναφοράς αποκλειστικά και μόνο λόγω ικανότητας πρόσδεσης του κωδικοποιούμενου πεπτιδίου-‘θηράματος’ (prey) στις θέσεις αναγνώρισης του μεταγραφικού παράγοντα GAL4, στους υποκινητές των τριών γονιδίων αναφοράς.

### **Φασματοσκοπία Μάζας (Multi – Dimensional Protein Identification Technology)**

Η τεχνολογία MudPIT αποτελεί μια πρωτεωμική προσέγγιση που βασίζεται σε πολυ-διάστατη χρωματογραφία κατά την οποία μίγμα πρωτεϊνών πρωτεολύεται σε πεπτίδια και αναλύεται με φασματοσκοπία μάζας (tandem mass spectrometry), χωρίς να έχει προηγηθεί διαχωρισμός με ηλεκτροφόρηση μίας ή δυο διαστάσεων σε πήκτωμα ακρυλαμίδης (Wolters, et al, 2001, Washburn, et al, 2001). Η τεχνολογία MudPIT έχει αποδεικτεί μια εξαιρετικά ευαίσθητη και αντικειμενική μέθοδος για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών από πολύπλοκα μίγματα γιατί δεν εμφανίζει απώλειες που συχνά

παρατηρούνται κατά την ταυτοποίηση και έκλουση πρωτεϊνών από πηκτώματα. Συγκεκριμένα, κυτταρικό ίζημα, που προέρχεται από 4 λίτρα καλλιέργειας κυττάρων HeLa S3 ή από 10\*9 HEK293 που αναπτύσσονται σε κατάλληλη περιστρεφόμενη φιάλη (Roller Bottle 850 cm<sup>2</sup> VWR: 62404-504), επαναιωρείται σε διάλυμα λύσης 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.9), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.3 M NaCl, and 0.2% Triton X-100. Ακολουθεί φυγοκέντρηση ( 14.000 rpm, 30 min, 4 C) και το κυτταρικό εκχύλισμα επωάζεται με 100 μl σφαιρίδια αγαρόζης συζευγμένα με anti-FLAG. Τα σφαιρίδια πλένονται και οι προσδεδεμένες πρωτεΐνες εκλούνται χρησιμοποιώντας τα διαλύματα και τις συνθήκες που έχουν περιγραφεί παραπάνω. Οι πρωτεΐνες που εκλούστηκαν αποδιατάχθηκαν με 8 M ουρίας, ανάχθηκαν με 5 mM Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP, Roche), αλκυλιώθηκαν με 20 mM iodoacetamide (IAM, Sigma), και πρωτεολύθηκαν με ενδοπρωτεϊνάση ( Lys-C Roche) και με τροποποιημένη τρυψίνη (Roche) παρουσία 2 mM CaCl<sub>2</sub>. Το παραπάνω μείγμα φορτώθηκε σε διφασική μικροτριχοειδή κολώνα (biphasic microcapillary column) πακεταρισμένη με υλικά ιοντοανταλλαγής (SCX) και αντίστροφης φάσης (RP). Η κολώνα αφού φορτωθεί , εισέρχεται στην αυτοματοποιημένη συσκευή. Τα πεπτίδια μετακινούνται από την κολώνα ιοντο-ανταλλαγής σε αυτή της αντίστροφης φάσης και εκλούνται στο φασματογράφο μάζας (MS/MS). Τα παραγόμενα φάσματα συσχετίζονται με τα θεωρητικά φάσματα μάζας πεπτιδίων σε βάσεις δεδομένων του αλγορίθμου SEQUEST (Eng et al., 1994). Τα πεπτίδια που παράγονται από επαναλαμβανόμενα πειράματα συγκρίνονται με το πρόγραμμα CONTRAST (Tabb et al., 2002) (Proteomics Lab, SIMR).





**Εικ.10 :** Σχηματική απεικόνιση των διαδοχικών βημάτων ανάλυσης φασματοσκοπίας μάζας με την τεχνολογία MudPIT

Primer	bp	sequence	Tm
1.NeurlForXhoIN	37	C CTC GAG GGT AAC AAC TTC TCC AGT GTC TCC TCT CTG	61
2.NeurlRev BamHIN	34	C GGA TCC CTA GGA GCT GCG GTA GGT CTT GAT GAT	61
3.NeurlForXhoIC	36	C CTC GAG ATG GGT AAC AAC TTC TCC AGT GTC TCC TC	61
4.NeurlRev SbfIC	35	C CCT GCA GGG GGA GCT GCG GTA GGT CTT GAT GAT G	61
5.MibForXhoI(N)	29	C CTC GAG AGT AAC TCC CGC AAC AAC CGA G	57
6.MibRevBamHI(N)	35	C GGA TCC TCA GTA CAA AAG AAT CCT TCG TTC AAT T	57
7.DII1forBamHI14	27	C GGA TTC GGT ACC ATG GGC CGT CGG AG	60
8.DII1revXhoI2176	37	CCG CTC GAG CAC CTC AGT CGC TAT AAC ACA CTC ATC C	60
9.DII3forBamHI137	32	C GGA TTC GCA ATG GTC TCT CTG CAG GTG TCT C	60
10.DII3revXhoI1895	32	CCG CTC GAG GGC CTC TCG TGC ATA AAT GGA AG	59
11.DII4forBamHI308	28	C GGA TTC GAA GGG ATG ACG CCT GCG TCC	60
12.DII4revXhoI2371	35	CCG CTC GAG TAC CTC TGT GGC AAT CAC ACA CTC GT	60
13.RevSbfINeuz1	28	CCT GCA GGG CCA GAG CGG GTC CAC CGT C	61
14.RevSbfINeuz12	31	CCT GCA GGC ATG CAG GCT GAA GAG CAT CCA G	61
15.ForXhoINeuz2RF	29	C CTC GAG GTG AGC CTG TGC GAC CTC AAC G	61
16.FC521SC524S	27	AGT GAT GAA AGC ACC ATT AGC TAT GAA	59
17.RC521S C524S	27	TTC ATA GCT AAT GGT GCT TTC ATC ACT	59
18.Neuz2RBamHI	31	GGA TCC CTA ATGCAGGCTGAAGAGCATCCAG	60
19.RFFXhoI	33	CTC GAG AGT GATGAATGCACCATTGCTATGAA	60
20.DII1FXhoI N	26	CTC GAG GGT ACC ATG GGC CGT CGG AG	60
21.DII1RBamHI N	37	GGA TCC TTA CAC CTC AGT CGC TAT AAC ACA CTC ATC C	60
22.DII3FXhoI N	31	CTC GAG GCA ATG GTC TCT CTG CAG GTG TCT C	60
23.DII3RBamHI N	32	GGA TCC TCA GGC CTC TCG TGC ATA AAT GGA AG	60
24.DII4FXhoI N	27	CTC GAG GAA GGG ATG ACG CCT GCG TCC	60
25.DII4RBamHI N	35	GGA TCC TTA TAC CTC TGT GGC AAT CAC ACA CTC GT	60
26.NeuForNheI	36	G GCT AGC ATG GGT AAC AAC TTC TCC AGT GTC TCC TC	57
27.RevFlagXhoI	37	C CTC GAG CTA CTTATCGTCGTCATCCTTGTAAATCCAT	57
28.Mib1185RevBamHI	33	C GGA TCC CTA TGC AGG GTT ATA CGT CCA AGA TG	56
29.Mib1186ForXhoI	26	C CTCGAG GCA GTT TCC AAG GTG GCC C	56
30.NeurlFor Ser462A	22	CCC TGC GCA CCT GCC TCC ACT C	62
31.NeurlRev Ser462A	22	G AGT GGA GGC AGG TGC GCA GGG	62
32.NeurlFor Ser469A	23	TCC ACT CCA ACC GCA CCC AGT GC	62
33.NeurlRev Ser469A	23	GC ACT GGG TGC GGT TGG AGT GGA	64
34. NeurlForNheI G2A	35	C CTC GAG ATG GCT AAC AAC TTC TCC AGT GTC TCC TC	60
35.nTMJ1ForBamHI	33	C GGATCC ATG TAC TGG TGT GTA AGG AAG CGG CG	60
36.nTMJ2ForBamHI	33	C GGA TCC ATG ACA CGA AAG CGC AGG AAA GAA CG	61
37.nTMJ2revNotI	29	TT GCG GCC GCC CTC CCT GCC AGC ACG GCG	60
38.TMD1FNheI	31	G GCT AGC ATG TGC GTC CGG CTG AAG CTA CAG	60
39.TMD3FNheI	27	G GCT AGC ATG CAC GTT CGC CGC CGA GG	60
40.TMD3RXhoI	31	C CTC GAG GGC CTC TCG TGC ATA AAT GGA AGG	61
41.TMD4FNheI	28	G GCT AGC ATG CTG CGG CTT CGG AGG CCC	62
42.TMD4RXhoI	33	C CTC GAG TAC CTC TGT GGC AAT CAC ACA CTC GT	60
43.FNeurl ISH	21	GACATCCTGGGCCTGGTGGTC	60
44.RNeurl ISH	20	GGTTCCTGTCCCTCCTGGGC	59
45.FDII3ISH	21	CAGCCATGTCAGAATGGCGGC	62
46.RDII3ISH	23	GGCCTCTCGTGCATAAATGGAAG	61

**Πιν. 12:** Ολιγονουκλεοτίδια που φέρουν αλληλουχίες για αντίστοιχα tags.

Primer	bp	sequence
For primer Dll1	33	C GGA TCC G GCC AAG AAG AGC AGC TTT AAG GTC C
Rev primer Dll1	87	G TCT AGA C TTA CTT GCC GTC GAT CAG CCT GGG GTC CAC CTG GTC CTC GGC CTC GAG GCC CAC CTC AGT CGC TAT AAC ACA CTC ATC C
Dll1ForNotI	31	TT GCGGCCGC AGC AGC TTT AAG GTC CGA TAC
HPC4RevBamHI	87	C GGATCC G TTA CTT GCC GTC GAT CAG CCT GGG GTC CAC CTG GTC CTC GGC CTC GAG GCC CAC CTC AGT CGC TAT AAC ACA CTC ATC C
JAG1 For PacI	35	G TTAATTA GTCTTAACAGTGGCTTGGGTCTGTTG
HARevEcoRI	84	G GAATTC TTA ATA CGC ATA GTC AGG AAC ATC GTA TGG GTA GCG GCC GCC ACC GCG GAT TAC GAT GTA TTC CAT CCG GTT CAA GC
NeurForNotI	29	TT GCGGCCGC CCGCATCCTCGGCTCCACC
Flag Rev Bam	69	C GGATCC CTA CTT ATC GTC GTC ATC CTT GTA ATC CAT CCT GCA GGG GGA GCT GCG GTA GGT CTT GAT GA

**Πιν. 13:** Κλώνοι IMAGE

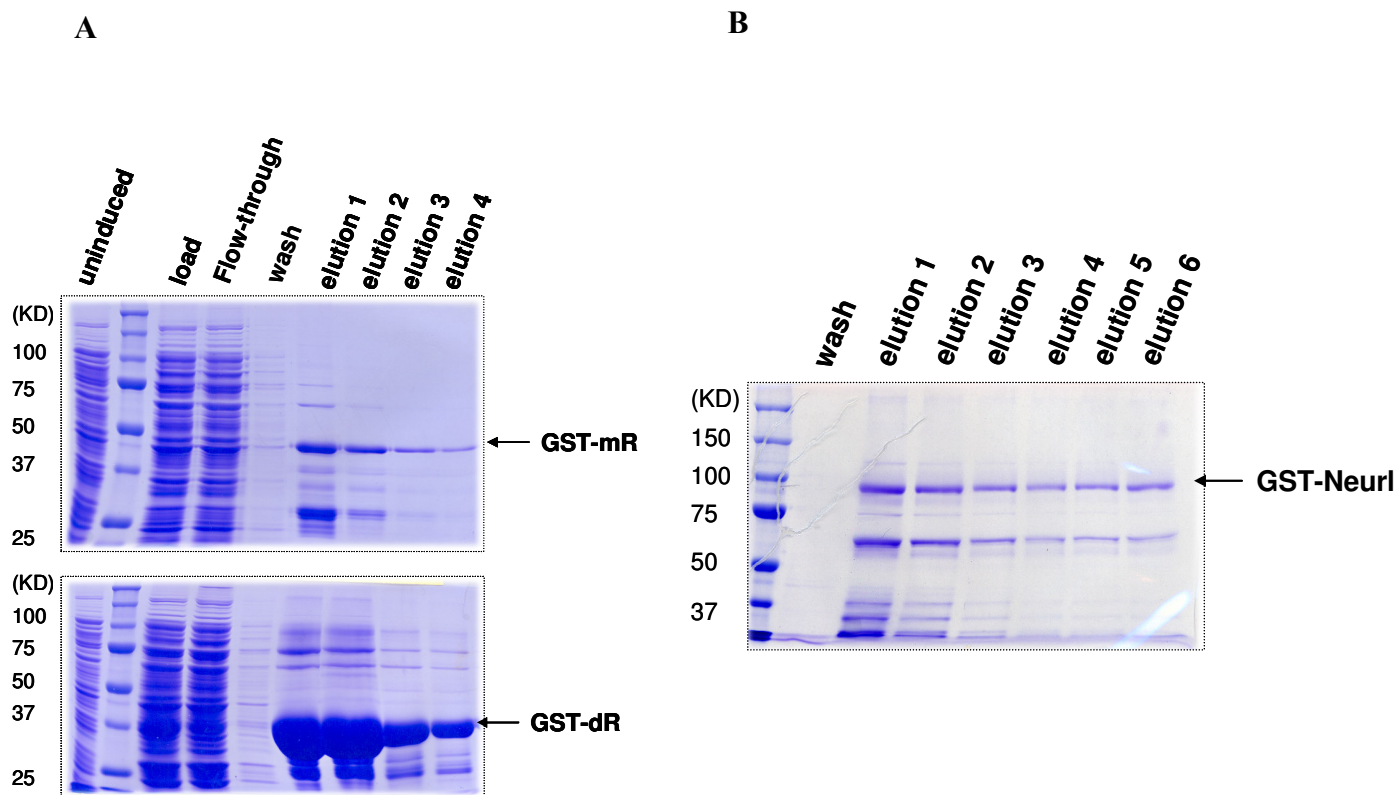
Γονίδιο	IMAGE	Accession #	aa
Neuralized	6831952 (1-3995bp)	BC058386	1-574
Mind Bomb	3981221 (2371-3080bp)	BC011287	riboprobe
Delta-like 1	948947(1726-2299bp)	AA544532	riboprobe
Delta-like 3	6404029 (1-2171bp)	BC052002	1-585
Delta-like 4	4017786 (1-3431bp)	BC042497	1-686
Delta-like 4	832357 (1797-3384bp)	AA427071	riboprobe
Jagged 1	1195272 (3685-3971bp)	AA754869	riboprobe
Jagged 2	3156268(2504-3961bp)	AW822917	riboprobe

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

## **A. Η βιοχημική δράση της πρωτεΐνης Neur1 του ποντικού**

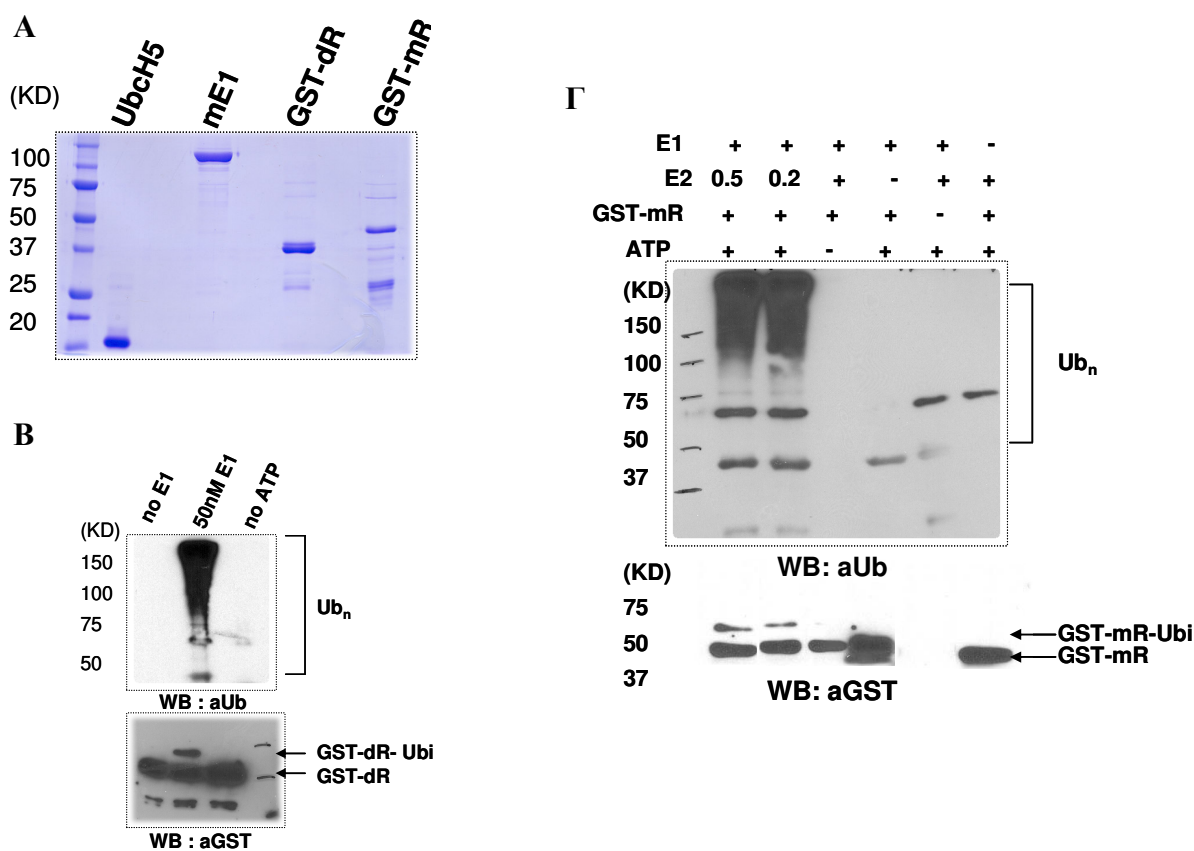
**Η πρωτεΐνη Neur1 εμφανίζει ενεργότητα E3 λιγάσης ουβικουιτίνης *in vitro*.**

Όπως ήδη αναπτύξαμε στην εισαγωγή, η πρωτεΐνη Neur1 (Neutralized-like) των θηλαστικών παρουσιάζει την ίδια αρχιτεκτονική οργάνωση και σημαντική δομική ομοιότητα στο επίπεδο της αμινοξικής αλληλουχίας (βλ. Μ. Κοκκινάκη Διδακ. Διατριβή, 2005) με τις πρωτεΐνες *neuralized* της δροσόφιλας και του *xenopus*. Για τις πρωτεΐνες αυτές έχει ήδη δειχθεί η δράση τους σαν E3 λιγάσες ουβικουιτίνης (Lai et al, 2001, Deblandre et al, 2001). Για να ελέξουμε την εύλογη υπόθεση, αν και η πρωτεΐνη Neur1 δρα ως E3 λιγάση ουβικουιτίνης, προχωρήσαμε σε μια εκτεταμένη σειρά αντιδράσεων ουβικουιτινιλίωσης *in vitro*, δοκιμάζοντας την πρωτεΐνη Neur1 σε αυτό το ρόλο. Για αυτό το σκοπό εκφράσαμε σε βακτήρια ως χιμαιρικές πρωτεΐνες με GST την πλήρους μήκους πρωτεΐνη Neur1 (GST-Neur1), καθώς και κομμάτι από το καρβοξυτελικό της άκρο που περιέχει μέρος της επανάληψης NEUZ2 και την περιοχή RING (R) (GST-mR), η οποία είναι απαραίτητη για τη δράση των E3 λιγάσεων ουβικουιτίνης. Οι πρωτεΐνες GST-Neur1 και GST-mR απομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας και στη συνέχεια προστέθηκαν σε δοκιμή ουβικουιτινιλίωσης *in vitro*. Η αντίστοιχη πρωτεΐνη GST-dR που περιέχει την περιοχή RING του Neur της δροσόφιλα, παράχθηκε και απομονώθηκε με τον ίδιο τρόπο (Εικ.11) για να χρησιμοποιηθεί σαν θετικό δείγμα ελέγχου της αντίδρασης ουβικουιτινιλίωσης.



**Εικ. 11: Έκφραση και απομόνωση των πρωτεϊνών GST-mR, GST-dR και GST-Neur1 σε βακτήρια.** Α. Οι πρωτεΐνες GST-mR και GST-dR επάχθηκαν σε 200ml καλλιέργειας βακτηρίων και απομονώθηκαν με τη χρήση σφαιριδίων γλουταθειόνης. Οι διαδοχικές εκλούσεις και δείγματα από τα ενδιάμεσα στάδια απομόνωσης αναλύθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης και χρώση Coomassie. Β. Η πρωτεΐνη GST-Neur1 επάχθηκε σε 2l βακτηριακής καλλιέργειας και απομονώθηκε με παρόμοιο τρόπο. Η ποσότητα της πρωτεΐνης πλήρους μήκους που παράχθηκε είναι πολύ λιγότερη συγκριτικά με τις αντίστοιχες κολοβές μορφές .

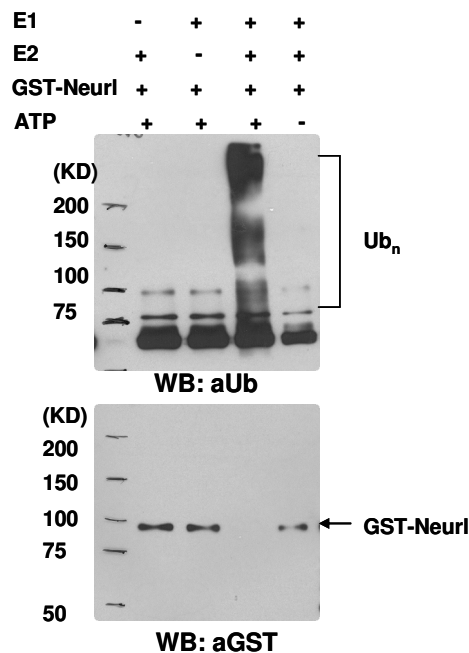
Για να πραγματοποιήσουμε τη δοκιμή ουβικουιτινίωσης, αναμείξαμε 50nM mE1 (mouse Ubiquitin activating enzyme UBE1, ευγενική προσφορά της T. Yao), 0.5  $\mu$ M UbcH5 (Human Ubiquitin Conjugating enzyme E2, ευγενική προσφορά της T. Yao), 2mM ATP και 0.5mg/ml ουβικουιτίνης με 1 $\mu$ M της ανασυνδρασμένης πρωτεΐνης που θέλουμε να ελέγξουμε για ενεργότητα E3 λιγάσης ουβικουιτίνης. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 37°C για 2 ώρες και τερματίζεται με βράσιμο για 5 λεπτά σε διάλυμα Lammle1 (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Τα δείγματα φορτώνονται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης και αναλύονται με αποτύπωση Western με αντίσωμα aGST και με αντίσωμα ενάντια στην ουβικουιτίνη (Εικ.12).



**Εικ. 12:** Η περιοχή RING της πρωτεΐνης Neur1 του ποντικού εμφανίζει ενεργότητα E3 λιγάσης ουβικουιτίνης *in vitro*, όπως και η ομόλογη περιοχή της πρωτεΐνης Neur της δροσόφιλα. Α. Ανάλυση των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμή ουβικουιτινίωσης με χρώση Coomassie. Β. Δοκιμή ουβικουιτινίωσης *in vitro* χρησιμοποιώντας την περιοχή RING της πρωτεΐνης Neur της δροσόφιλα σαν πείραμα θετικού ελέγχου. Ο σχηματισμός αλυσίδων πολυ-ουβικουιτίνης επάγεται παρουσία E1 (mouse Ubiquitin activating enzyme UBE1) και ATP, αλλά όχι απουσία τους. Η ανίχνευση ενός μορίου ουβικουιτίνης είναι δυνατή πάνω στην πρωτεΐνη GST-dR με τη χρήση αντισώματος aGST. Γ. Δοκιμές ουβικουιτινίωσης *in vitro* με τη μέθοδο ‘drop out’, όπου ένα αντιδραστήριο παραλείπεται από κάθε δοκιμή για να ελεγχθεί η ειδικότητα της αντίδρασης. Ο σχηματισμός αλυσίδων πολυ-ουβικουιτίνης παρατηρείται μόνο όταν στην αντίδραση περιέχονται E1(mouse Ubiquitin activating enzyme UBE1), E2 (UbchH5 Human Ubiquitin Conjugating enzyme E2) , ATP και η πρωτεΐνη GST-mR. Σε αντιστοιχία με την πρωτεΐνη της δροσόφιλα, ένα μόριο ουβικουιτίνης ανιχνεύεται και πάνω στην πρωτεΐνη GST-mR, με τη χρήση αντισώματος aGST.

Αναλύοντας τα δείγματα με αντίσωμα aGST, είναι δυνατό να παρατηρήσουμε μια μετατόπιση της ζώνης που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη GST-dR και GST-mR σε μεγαλύτερο μέγεθος, που πιθανό ισοδυναμεί με την προσθήκη ενός μορίου ουβικουιτίνης το οποίο είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο στην αντίστοιχη πρωτεΐνη (Εικ.15). Ανάλυση των ίδιων δοκιμών με αντίσωμα aUb αποκάλυψε το σχηματισμό αλυσίδων πολυ-ουβικουιτίνης μόνο με την ταυτόχρονη παρουσία των E1, E2, ATP και της πρωτεΐνης GST-mR ή GST-dR (Εικ.15).

Επαναλάβουμε τις ίδιες δοκιμές με την πρωτεΐνη Neur1 πλήρους μήκους και μπορέσαμε να επαληθεύσουμε την ενεργότητα E3 λιγάσης ουβικουιτίνης και σε αυτή την περίπτωση (Εικ.13).

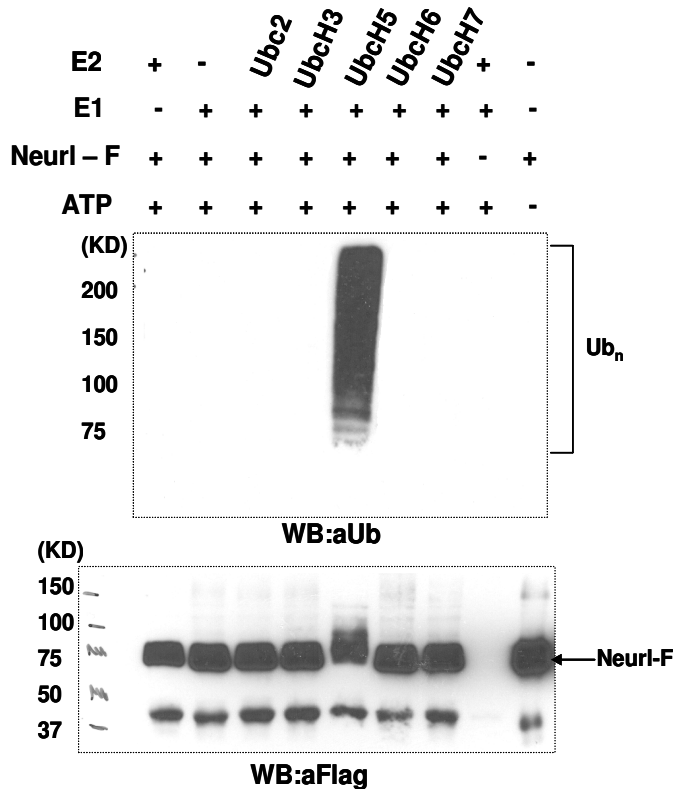


**Εικ. 13: Η πρωτεΐνη Neur1 πλήρους μήκους επάγει το σχηματισμό αλυσίδων ουβικουιτίνης *in vitro*.** Δοκιμές ουβικουιτινίωσης *in vitro* με τη μέθοδο 'drop out'. Ο σχηματισμός αλυσίδων πολυ-ουβικουιτίνης παρατηρείται μόνο όταν στην αντίδραση περιέχονται E1, E2, ATP και η πρωτεΐνη GST-Neur1. Η πρωτεΐνη GST-Neur1 δεν ανιχνεύεται στην αντίδραση που παρατηρείται σχηματισμός αλυσίδων πολυ-ουβικουιτίνης γιατί πιθανό μετατοπίζεται προς μεγαλύτερα μοριακά βάρη και το φάσμα όλων των ενδιάμεσων μορφών δεν είναι δυνατό να ανιχνευθούν από το αντίσωμα λόγω χαμηλής αφθονίας κάθε μορφής.

### Η πρωτεΐνη Neur1 εμφανίζει ειδικότητα για το ένζυμο σύνδεσης ουβικουιτίνης UbcH5.

Για να διερευνήσουμε τις βέλτιστες συνθήκες *in vitro* αντίδρασης ουβικουιτινίωσης χρησιμοποιήσαμε πέντε διαφορετικά ένζυμα σύνδεσης E2 που είναι εμπορικά διαθέσιμα για να ελέγξουμε αν η Neur1 εμφανίζει ειδικότητα για κάποιο από αυτά. Για αυτές τις δοκιμές χρησιμοποιήσαμε πρωτεΐνη Neur1-Flag, η οποία παράχθηκε και απομονώθηκε από κύτταρα εντόμων Sf21, μετά από μόλυνσή τους με τον βακιλο-ιό (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Η έκφραση της πλήρους μήκους πρωτεΐνης Neur1 με αυτό το σύστημα έκφρασης ήταν πολύ πιο αποδοτική από ότι η έκφραση της αντίστοιχης πρωτεΐνης στα βακτήρια. Πριν ελέγξουμε την ειδικότητα του Neur1 για κάποιο από τα ένζυμα E2, επιβεβαιώσαμε ότι η πρωτεΐνη που παράχθηκε σε κύτταρα εντόμων επάγει το σχηματισμό αλυσίδων πολυ-ουβικουιτίνης, όπως παρατηρήσαμε προηγουμένως και για την πρωτεΐνη που εκφράστηκε σε βακτήρια. Τα ένζυμα E2 που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα Ubc2, UbcH3, UbcH5, UbcH6 και UbcH7. Οι δοκιμές

ουβικουιτινιλίωσης επαναλήφθηκαν όπως περιγράφεται παραπάνω και αναλύθηκαν με Western χρησιμοποιώντας για την ανάλυση των προϊόντων αντίσωμα aFlag ή aUb (Εικ. 14). Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι οι μοναδικές συνθήκες για τη δράση του Neur1 ως E3 λιγάση ουβικουιτίνης απαιτούν ως ένζυμο E2 το UbcH5.



**Εικ.14: Διερεύνηση βέλτιστων συνθηκών για τη δράση της πρωτεΐνης Neur1 ως E3 λιγάσης ουβικουιτίνης παρουσία διαφορετικών E2 ενζύμων πρόσδεσης ουβικουιτίνης:** Οι δοκιμές ουβικουιτινιλίωσης πραγματοποιήθηκαν όπως και παραπάνω. Ο σχηματισμός αλυσίδων πολυ-ουβικουιτίνης παρατηρείται μόνο όταν στην αντίδραση έχει προστεθεί το ένζυμο σύνδεσης UbcH5. Η πρωτεΐνη Neur1-Flag (Neur1-F) στην αντίστοιχη αντίδραση φαίνεται να μετατοπίζεται προς μεγαλύτερα μοριακά βάρη και οι ενδιάμεσες μορφές ανιχνεύονται με αντίσωμα aFlag.

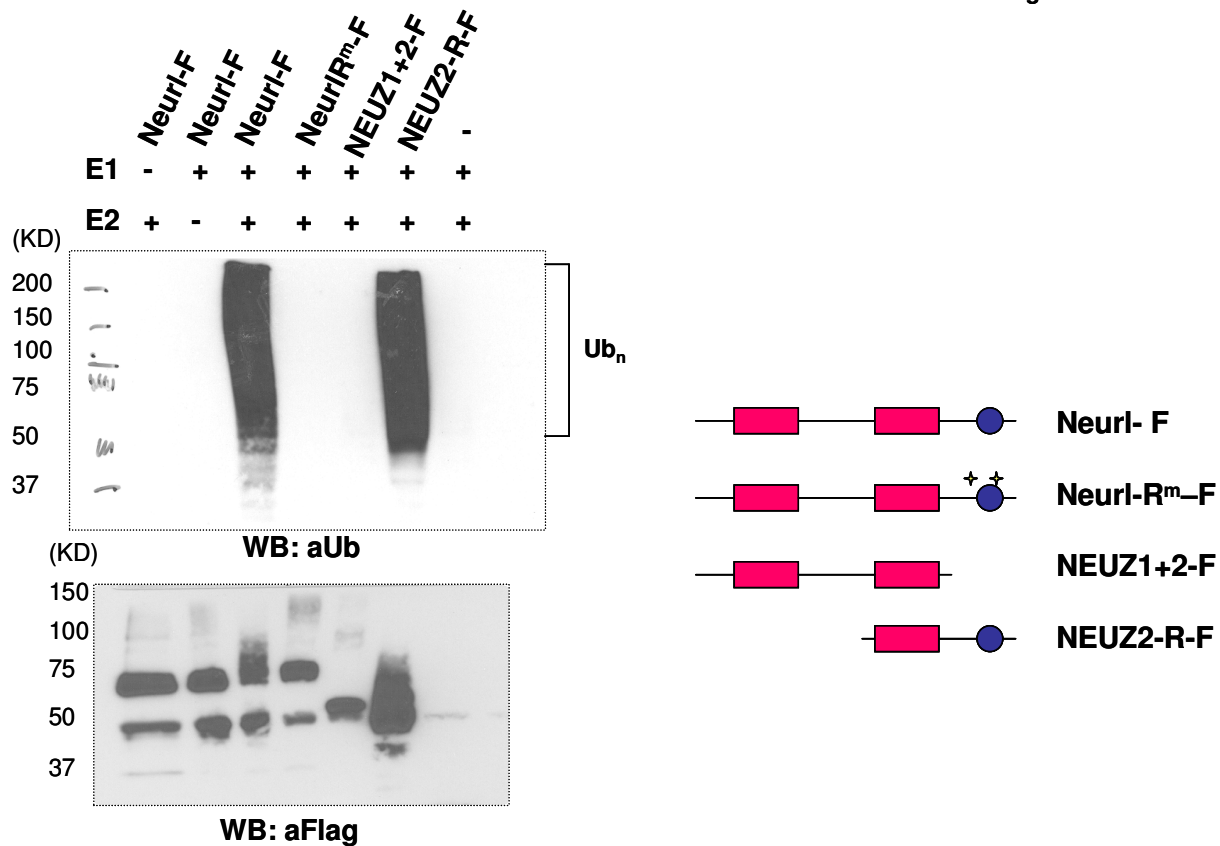
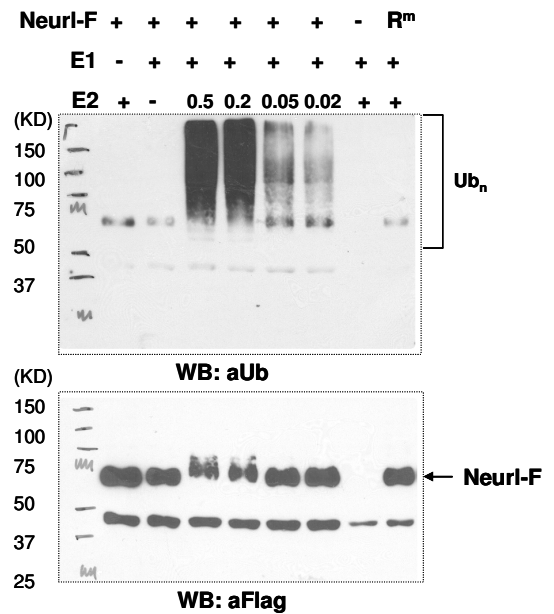
**Η πρωτεΐνη Neur1 αυτο-ουβικουιτινιλιώνεται in vitro και η δράση της ως E3 λιγάση ουβικουιτίνης εξαρτάται από τη δομική ακεραιότητα της περιοχής RING.**

Στις δοκιμές ουβικουιτινιλίωσης που πραγματοποιήσαμε, παρατηρήσαμε τόσο το σχηματισμό αλυσίδων πολυ-ουβικουιτίνης όσο και την προσθήκη μορίων ουβικουιτίνης πάνω στο Neur1. Ο σχηματισμός αλυσίδων πολυ-ουβικουιτίνης επάγεται συνήθως μη ειδικά σε μια in vitro δοκιμή παρουσία της E3 λιγάσης. Από ένα τέτοιο πείραμα παραμένει προς διερεύνηση το γεγονός αν μόρια ουβικουιτίνης προστίθενται ομοιοπολικά στην E3 λιγάση ή βρίσκονται σε μορφή ελεύθερων αλυσίδων ουβικουιτίνης. Για να διαχωρίσουμε τον μη ειδικό σχηματισμό ελεύθερων αλυσίδων ουβικουιτίνης στην αντίδραση από την πιθανή αυτο-ουβικουιτινιλίωση



του Neur1, κάναμε τιτλοδότηση του ενζύμου πρόσδεσης UbcH5 χρησιμοποιώντας εναλλακτικά συγκεντρώσεις 0.5μM, 0.2μM, 0.05μM και 0.02μM. Παρατηρήσαμε ότι μειώνοντας τη συγκέντρωση του E2, οι αλυσίδες πολυ-ουβικουιτίνης μειώνονται σημαντικά, ενώ τα τροποποιημένα μόρια Neur1 στην αντίδραση δεν είναι ανιχνεύσιμα σε χαμηλές συγκεντρώσεις του ενζύμου E2 (Εικ. 15). Αυτό υποδηλώνει ότι ένα ποσοστό τουλάχιστον από τις αλυσίδες ουβικουιτίνης είναι προσδεδεμένες ομοιοπολικά στην E3 λιγάση. Για να ελέγξουμε αν αυτή η πιθανή αυτο-ουβικουιτινίωση του Neur1 εξαρτάται από την περιοχή RING, μεταλλάξαμε τα δύο κατάλοιπα κυστεΐνης του μοτίβου (Cys521, Cys524), που εμφανίζουν το μεγαλύτερο βαθμό συντήρησης και εκφράσαμε και απομονώσαμε τη μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης σε κύτταρα Sf21. Η μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης προστέθηκε σε δοκιμή ουβικουιτινίωσης *in vitro* και παρατητήθηκε ότι δεν επάγει το σχηματισμό αλυσίδων πολυ-ουβικουιτίνης (Εικ. 15). Για να επιβεβαιώσουμε το ρόλο της περιοχής RING στην ενεργότητα της πρωτεΐνης Neur1 ως E3 λιγάση, δημιουργήσαμε δύο επιπλέον μορφές της πρωτεΐνης, την NEUZ1+2-F, από την οποία έχει αφαιρεθεί η περιοχή RING και την NEUZ2-R-F, από την οποία έχει αφαιρεθεί το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης που περιλαμβάνει την επανάληψη NEUZ1 (Εικ. 16). Οι δύο αυτές μεταλλαγμένες μορφές εκφράστηκαν και απομονώθηκαν σε κύτταρα SF21 και χρησιμοποιήθηκαν σε δοκιμή ουβικουιτινίωσης. Όπως ήταν αναμενόμενο, μόνο η μορφή της πρωτεΐνης που περιλαμβάνει την περιοχή RING έχει δράση E3 λιγάσης ουβικουιτίνης (Εικ. 16). Το γεγονός ότι η πρωτεΐνη Neur1 έχει τη δυνατότητα να αυτο-ουβικουιτινιώνεται εγείρει το ερώτημα αν αυτό συμβαίνει επίσης και *in vivo* και αν αυτή η τροποποίηση μπορεί να ρυθμίζει τη σχετική αφθονία της πρωτεΐνης στα κύτταρα.

**Εικ. 15 :** Η πρωτεΐνη *Neur1* αυτο-ουβικουτινιλιώνεται *in vitro* παρουσία του ενζύμου πρόσδεσης *UbcH5*. Δοκιμές ουβικουτινιλίωσης πραγματοποιήθηκαν με τιτλοδότηση του ενζύμου σύνδεσης *UbcH5* και τα δείγματα στη συνέχεια αναλύθηκαν με Western με τη χρήση αντισώματος *aUb* και *aFlag*. Η τροποποιημένη μορφή του *Neur1* δεν ανιχνεύεται με το αντίσωμα *aFlag* σε χαμηλές συγκεντρώσεις του ενζύμου *E2*.



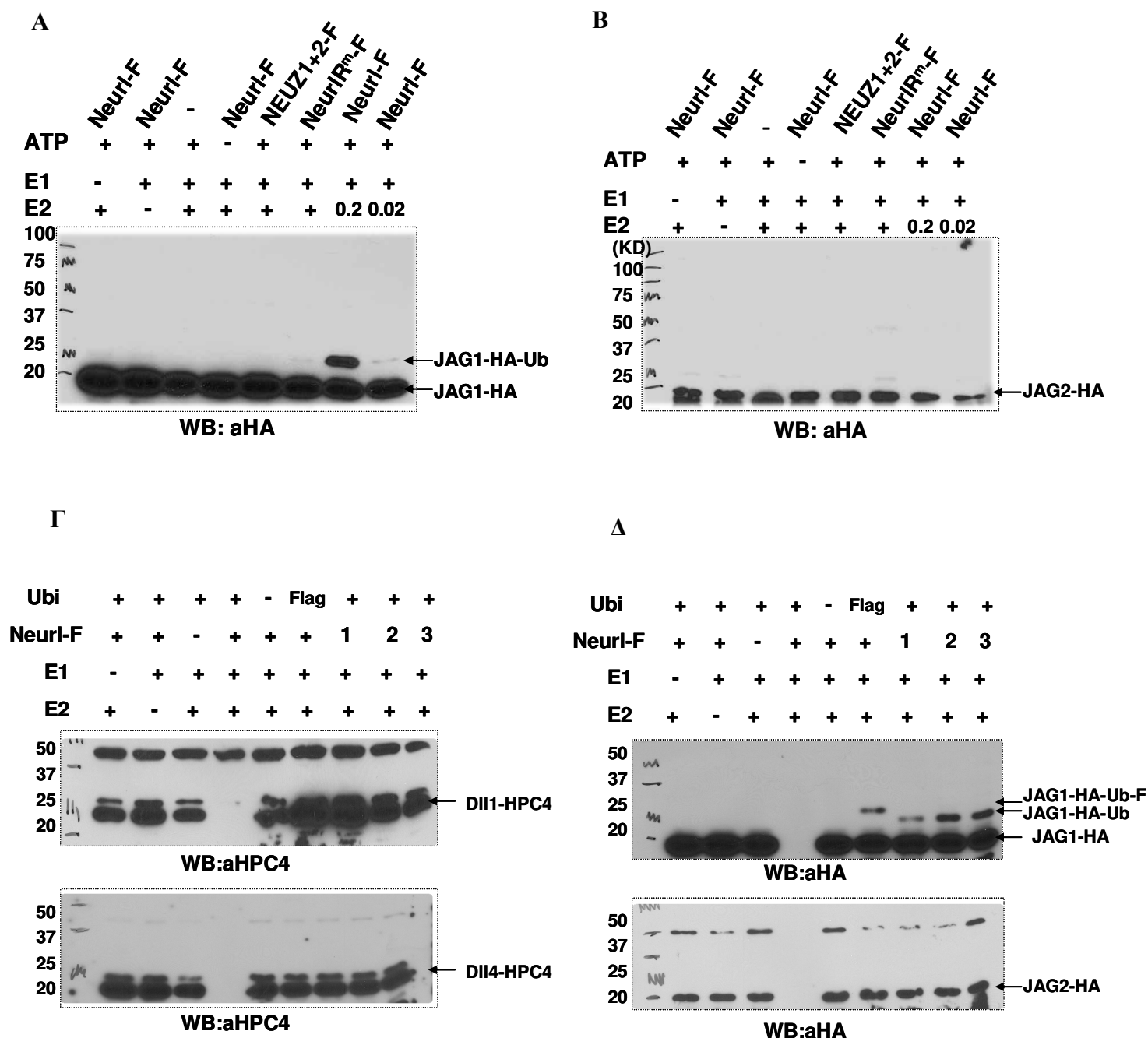
**Εικ. 16:** Η ενεργότητα της πρωτεΐνης *Neur1* εξαρτάται από τη δομική ακεραιότητα της περιοχής **RING**. Σχηματική αναπαράσταση των μορφών της πρωτεΐνης που παράχθηκαν και απομονώθηκαν από κύτταρα εντόμων Sf21, μετά από μόλυνσή τους με βακίλο-ϊό. Οι πρωτεΐνες αυτές χρησιμοποιήθηκαν σε δοκιμές ουβικουτινιλίωσης και τα δείγματα αναλύθηκαν με Western με τη χρήση αντισώματος *aUb* ή *aFlag*. Όπως και σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις, οι αντιδράσεις παραγματοποιούνται εις διπλούν για να αναλυθούν με τα δύο διαφορετικά αντισώματα.

### **Η πρωτεΐνη Neurl αλληλεπιδρά με την ενδοκυττάρια περιοχή του δεσμευτή JAG1 και την μονο-ουβικουτινιλιώνει *in vitro*.**

Αφού αποδείξαμε τη δράση του Neurl του ποντικού σαν E3 λιγάση ουβικουτίνης *in vitro* αποφασίσαμε να ελέγξουμε τις ενδοκυττάρια περιοχές των δεσμευτών του N ως πιθανά υποστρώματά του. Για να κάνουμε τις δοκιμές ουβικουτινίωσης εκφράσαμε και απομονώσαμε τις ενδοκυττάρια περιοχές των Dll1, Dll4, JAG1 και JAG2 σε κύτταρα εντόμων Sf21. 2μM από κάθε πρωτεΐνη προστέθηκε σε δοκιμή ουβικουτινίωσης που περιέχει 50nM E1, 0.5μM E2, 2mM ATP, 0.5mg/ml ουβικουτίνης και 1μM της πλήρους μήκους μορφής του Neurl ή της μορφής με μεταλλαγμένη περιοχή RING. Η ενδοκυττάρια περιοχή της πρωτεΐνης Dll3 δεν χρησιμοποιήθηκε γιατί δεν περιέχει κανένα κατάλοιπο λυσίνης, που ως γνωστό δρα σαν δέκτης μορίων ουβικουτίνης. Τα δείγματα αναλύθηκαν με Western χρησιμοποιώντας αντίσωμα ενάντια στο σινιάλο (tag) που είχαμε βάλει σε κάθε ενδοκυττάρια περιοχή (Dll1-HPC4, Dll4-HPC4, JAG1-HA, JAG2-HA). Μετά την ανάλυση όλων των δειγμάτων παρατηρήσαμε ότι μόνο η ενδοκυττάρια περιοχή του JAG1 μετατοπίζεται σε μέγεθος που αντιστοιχεί στην προσθήκη ενός μορίου ουβικουτίνης (μονο-ουβικουτινίωση) (Εικ.17).

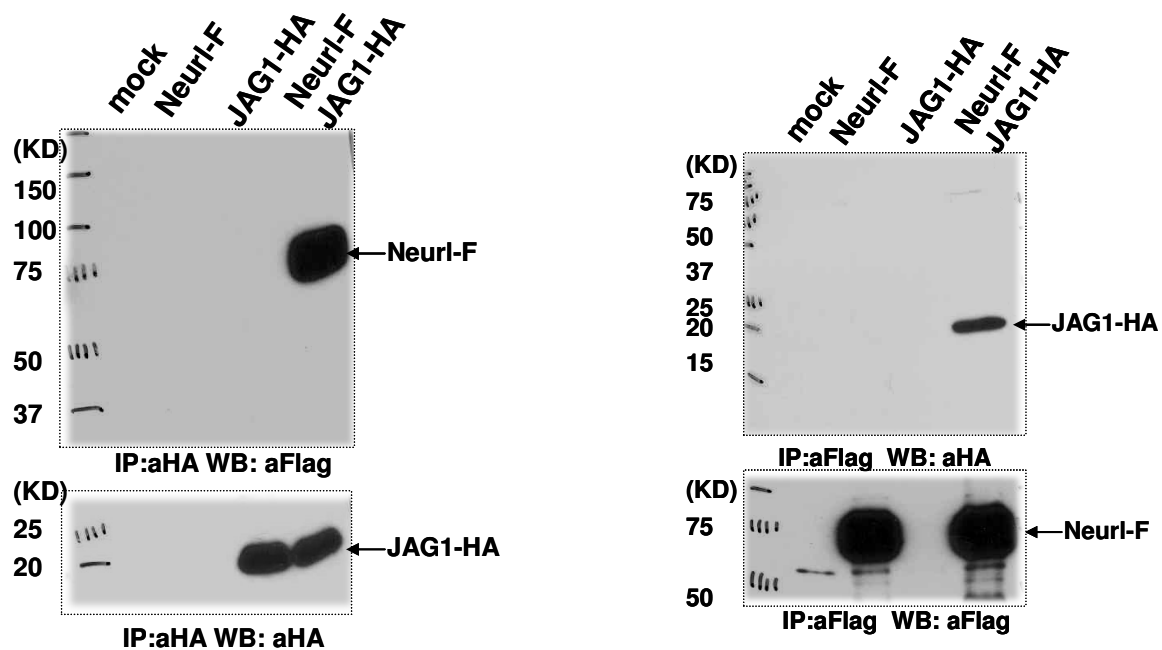
Για να επιβεβαιώσουμε ότι πράγματι η τροποποίηση που ανιχνεύουμε αντιστοιχεί σε μονο-ουβικουτινίωση του δεσμευτή, χρησιμοποιήσαμε ουβικουτίνη με σινιάλο Flag, η οποία έχει μεγαλύτερο μοριακό βάρος από την αγρίου τύπου πρωτεΐνη εύκολα ανιχνεύσιμη με ανάλυση Western. Επιπλέον κάναμε τιτλοδότηση της συγκέντρωσης του Neurl στην αντίδραση για να ελέγξουμε αν παρατηρείται αύξηση στην ουβικουτινιλωμένη μορφή του δεσμευτή (Εικ.17). Και στις δύο περιπτώσεις επαληθεύσαμε ότι το Neurl επάγει την μονο-ουβικουτινίωση της ενδοκυττάριας περιοχής του JAG1 *in vitro* (Εικ.17). Επιπλέον παρατηρήσαμε ότι η πρωτεΐνη Neurl με τη μεταλλαγμένη μορφή της περιοχής RING δεν είναι ικανή να ουβικουτινιλώσει το δεσμευτή.

Ελέγξαμε την αλληλεπίδραση του Neurl με την ενδοκυττάρια περιοχή του δεσμευτή JAG1, κάνοντας ανοσοκατακρήμιση σε κυτταρικό εκχύλισμα από κύτταρα Sf21, τα οποία είχαμε μολύνει ταυτόχρονα με τους δύο βακίλο-ιούς που εκφράζουν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες. Πράγματι επιβεβαιώσαμε την αλληλεπίδραση του Neurl με το JAG1, πραγματοποιώντας ανοσοκατακρήμιση και με τις δύο πρωτεΐνες (Εικ.18).

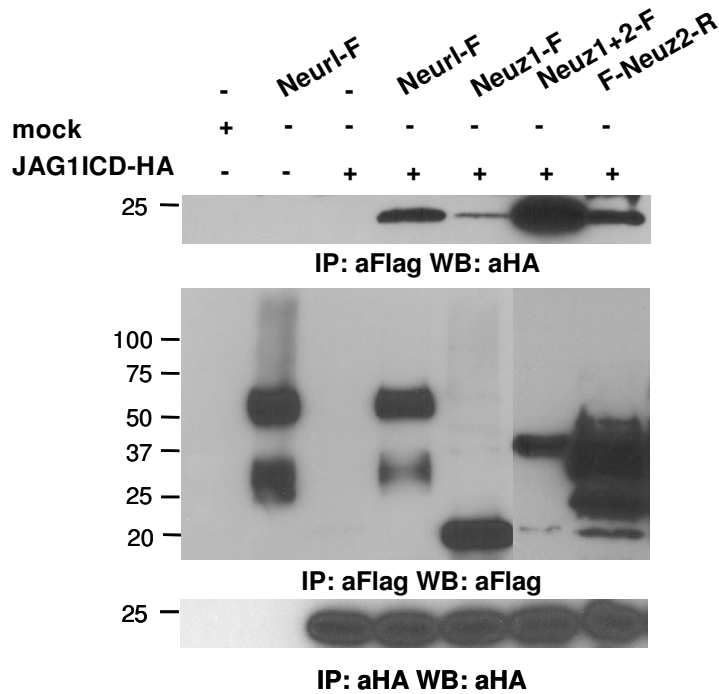


**Εικ. 17: Το Neur1 μονο-ουβικουιτινιλιώνει την ενδοκυττάρια περιοχή του δεσμευτή Jag1 in vitro. A, B.** Δοκιμές ουβικουιτινιλίωσης *in vitro* όπου έχουν χρησιμοποιηθεί οι ενδοκυττάρια περιοχές των δεσμευτών JAG1 και JAG2 σαν υποστρώματα. Οι αντιδράσεις έχουν πραγματοποιηθεί όπως παραπάνω και αναλύθηκαν με Western με αντίσωμα aHA. Γ, Δ. Δοκιμές ουβικουιτινιλίωσης *in vitro* όπου έχουν χρησιμοποιηθεί οι ενδοκυττάρια περιοχές των δεσμευτών DII1, DII4 και JAG1,2 σαν υποστρώματα και πραγματοποιήθηκε τιτλοδότηση της συγκέντρωσης του Neur1 στην αντίδραση. Η ανάλυση των δοκιμών έγινε με Western με αντισώματα aHPC4 για τους δεσμευτές DII1,4 και aHA για τους δεσμευτές JAG1,2. Η μορφή Flag-Ub χρησιμοποιήθηκε για να επιβεβαιωθεί ότι η μετατόπιση που παρατηρείται οφείλεται σε προσθήκη μορίου ουβικουιτίνης και όχι σε κάποια με ειδική ενεργότητα των αντιδραστηρίων.

Για να χαρτογραφήσουμε με περισσότερη λεπτομέρεια τις περιοχές του Neu1 που είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση με το JAG1, επαναλάβαμε την ανοσοκατακρήμνιση σε κυτταρικό εκχύλισμα από κύτταρα Sf21, τα οποία μολύναμε με διαφορετικές κολοβές μορφές του Neu1, το Neu1-F, το Neu1+2-F και το F-Neu2-R (Εικ. 19). Μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα aFlag παρατηρήσαμε ότι η ισχυρότερη αλληλεπίδραση ανιχνεύεται με την περιοχή Neu1+2, ενώ αντίθετα μόνο η περιοχή Neu1 εμφανίζει την ασθενέστερη αλληλεπίδραση με το JAG1. Η περιοχή Neu2-R ανοσοκατακρημνίζει συγκρίσιμη ποσότητα JAG1 με την πλήρους μήκους πρωτεΐνη Neu1, γεγονός που υποδηλώνει ότι η παρουσία της περιοχής Neu2 είναι πιο σημαντική από αυτή της Neu1, ενώ οι δύο περιοχές μαζί φαίνεται να ενισχύουν την αλληλεπίδραση με το JAG1.



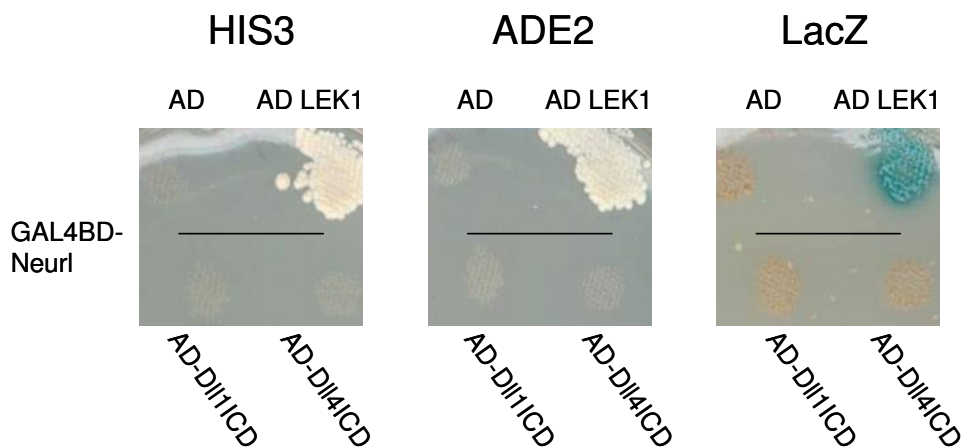
**Εικ. 18:** Η πρωτεΐνη Neu1 αλληλεπιδρά με την ενδοκυττάρια περιοχή του δεσμευτή JAG1. Κύτταρα εντόμων Sf21 μολύνθηκαν μεμονωμένα ή συνδυαστικά με βακίλο-ιούς που εκφράζουν την πρωτεΐνη Neu1-F και την ενδοκυττάρια περιοχή του JAG1ICD-HA. Το κυτταρικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε για ανοσοκατακρήμνιση τόσο με αντίσωμα a-Flag όσο και a-HA συζευγμένα στα κατάλληλα σφαιρίδια και τα δείγματα εκλούσθηκαν από τα σφαιρίδια με τη χρήση αντίστοιχων πεπτιδίων ή κατάλληλων συνθηκών. Μετά την έκλυση τα δείγματα αναλύθηκαν με αποτύπωση Western.



**Εικ. 19: Η περιοχή Neuz2 είναι πιθανό υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης Neur1 με την ενδοκυττάρια περιοχή του δεσμευτή Jag1.** Κύτταρα εντόμων Sf21 μολύνθηκαν μεμονωμένα ή συνδυαστικά με βακίλο-ιούς που εκφράζουν διαφορετικές περιοχές της πρωτεΐνης Neur1-F (Neuz1-F, Neuz1+2-F, F-Neuz2-R) και την ενδοκυττάρια περιοχή του Jag1ICD-HA. Το κυτταρικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε για ανοσοκατακρήμνιση τόσο με αντίσωμα a-Flag όσο και a-HA συζευγμένα στα κατάλληλα σφαιρίδια και τα δείγματα εκλούστηκαν από τα σφαιρίδια με τη χρήση αντίστοιχων πεπτιδίων ή κατάλληλων συνθηκών. Μετά την έκλουση τα δείγματα αναλύθηκαν με αποτύπωση Western.

Το γεγονός ότι δεν μπορέσαμε να παρατηρήσουμε αλληλεπίδραση του Neur1 με τις ενδοκυττάριας περιοχές των δεσμευτών Dll1 και Dll4 μετά από ανοσοκατακρήμνιση των αντίστοιχων πρωτεϊνών από κυτταρικό εκχύλισμα Sf21 επιβεβαιώνεται και από το πείραμα που πραγματοποιήσαμε χρησιμοποιώντας το σύστημα δύο υβριδίων του σακχαρομύκητα. Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη πλήρους μήκους Neur1 χρησιμοποιήθηκε σαν ‘δόλωμα’ αφού εκφράστηκε σαν χμιαρική πρωτεΐνη GAL4-BD-Neur1 (προσφορά της Κοκκινάκη Μ.) και οι ενδοκυττάριας περιοχές των δεσμευτών Dll1 και Dll4 χρησιμοποιήθηκαν σαν ‘θηράματα’ αφού εκφράστηκαν σαν χμιαρικές πρωτεΐνες VP16-AD-Dll1ICD και VP16-AD-Dll4ICD. Οι χμιαρικές κατασκευές ή μόνο ο φορέας pVP16 χρησιμοποιήθηκαν για μετασχηματισμό σε κύτταρα σακχαρομύκητα pJ694a παρουσία της κατασκευής pGBT9/Neur1. Οι

μετασηματισμένες αποικίες μεταφέρθηκαν σε κατάλληλα θρεπτικά μέσα για τον έλεγχο μεταγραφικής ενεργοποίησης των γονιδίων αναφοράς HIS3, ADE2, και LacZ (Εικ. 20). Δεν παρατηρήσαμε ενεργοποίηση για κανένα από τα τρία γονίδια αναφοράς, γεγονός που δείχνει ότι δεν υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών που αναλύθηκαν.



**Εικ. 20: Η πρωτεΐνη Neurl δεν αλληλεπιδρά με τις ενδοκυττάρειες περιοχές των δεσμευτών DII1 και DII4.** Κύτταρα σακχαρομύκητα στελέχους pJ694a μετασηματίστηκαν με τις κατασκευές Neurl/pGBT9 και DII1ICD/pVP16 ή DII4ICD/pVP16. Η κατασκευή LEK1/pVP16 χρησιμοποιήθηκε για θετικό έλεγχο, ενώ μόνο ο φορέας pVP16 για αρνητικό έλεγχο. Οι μετασηματισμένες αποικίες μεταφέρθηκαν σε θρεπτικά μέσα επιλογής για τον έλεγχο ενεργοποίησης των τριών γονιδίων αναφοράς HIS3, ADE2 και LacZ.

## Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης Neurl

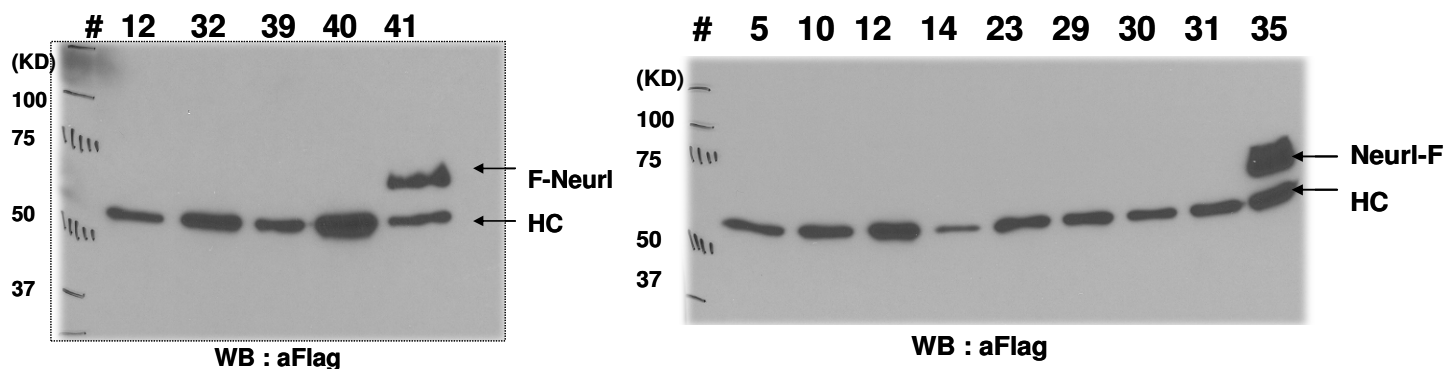
### Δημιουργία κυτταρικών σειρών που εκφράζουν σταθερά τις πρωτεΐνες Neuralized και Mind Bomb του ποντικού

Για τη μελέτη της λειτουργίας της πρωτεΐνης Neuralized (Neurl) και τη σύγκρισή της με την πρωτεΐνη Mind Bomb1 (Mib1) του ποντικού σε κύτταρα θηλαστικών, καθώς και για την ανάλυση των αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης Neurl, αποφασίσαμε να παράγουμε κυτταρικές σειρές σταθερής έκφρασής τους. Για να το καταφέρουμε αυτό ακολουθήσαμε δύο διαφορετικές στρατηγικές, αυτή της τυχαίας ένθεσης του γονιδίου σε κυτταρική σειρά HeLa και αυτή της στοχευμένης ένθεσης με τη χρήση τροποποιημένων κυττάρων HEK 293 FRT (βλ. Υλικά και Μέθοδοι), τα οποία φέρουν κατάλληλες θέσεις FRT για να πραγματοποιηθεί ομόλογος ανασυνδυασμός με τον φορέα που φέρει το γονίδιο στόχο. Αρχικά παράχθηκαν δύο κυτταρικές σειρές σταθερής έκφρασης της πρωτεΐνης Neurl που φέρει το σινιάλο Flag στο αμινοτελικό ή στο καρβοξυτελικό άκρο (F-Neurl ή Neurl-F) σε κύτταρα HeLa και οι αντίστοιχες σε κύτταρα HEK293 FRT (F-Neurl/FRT ή Neurl-F/FRT), καθώς επίσης και κυτταρική σειρά σταθερής έκφρασης της πρωτεΐνης Mib1 με το σινιάλο Flag στο αμινοτελικό της άκρο (F-Mib1).

*Αναζήτηση θετικών κλώνων σταθερής έκφρασης της πρωτεΐνης Neurl μετά από τυχαία ένθεση σε κύτταρα HeLa.*

Η αποδοτικότητα της τυχαίας ένθεσης σε κύτταρα HeLa είναι σχετικά χαμηλή και για αυτό αναλύθηκε μεγάλος αριθμός κλώνων, αρχικά με PCR σε γενωμικό DNA και στη συνέχεια με ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα ενάντια στο Flag. Αυτό που αμέσως παρατηρήσαμε ήταν ότι τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Neurl ήταν πολύ χαμηλά, με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να μην είναι ανιχνεύσιμη σε ολικό κυτταρικό εκχύλισμα. Έτσι οι θετικοί κλώνοι επιλέχθηκαν με βάση το αποτέλεσμα από πειράματα ανοσοκατακρήμισης όπου εμπλουτίζεται η εκφραζόμενη πρωτεΐνη (Εικ. 21).





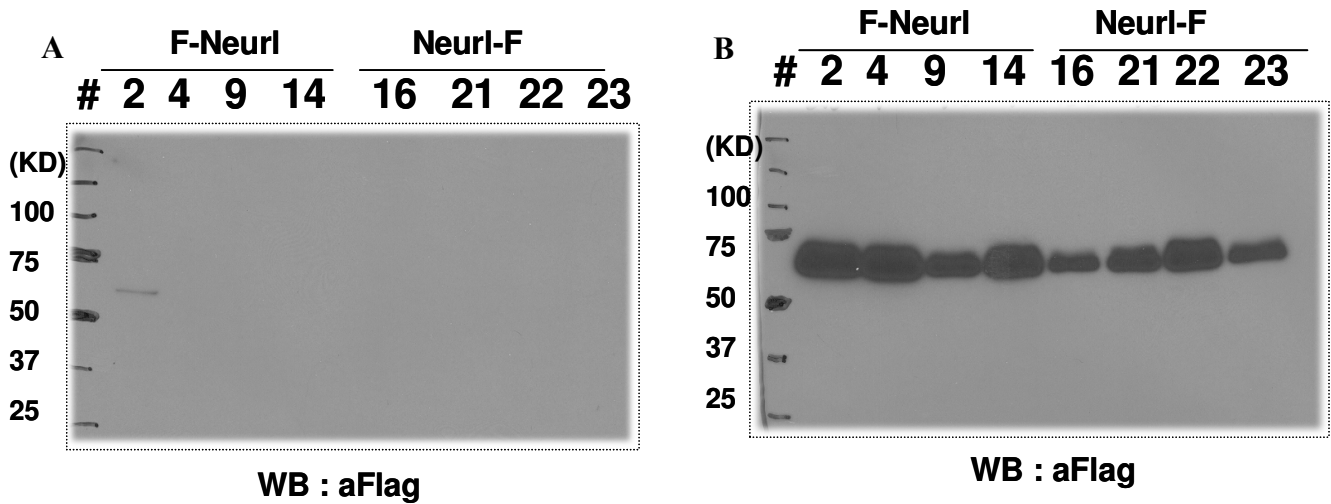
**Εικ. 21: Επιλογή θετικών κλώνων σταθερής έκφρασης της πρωτεΐνης Neur1 σε κύτταρα HeLa.** Κυτταρικό εκχύλισμα από κλώνους κυττάρων που είχαν ήδη επιλεγεί μέσω PCR, χρησιμοποιήθηκε για ανοσοκατακρήμνιση με aFlag και στη συνέχεια αναλύθηκε με ανοσοαποτύπωση με aFlag. Ο κλώνος 41 είναι θετικός για έκφραση της πρωτεΐνης F-Neur1 και ο κλώνος 35 για την πρωτεΐνη Neur1-F.

Αναλύθηκαν 60 μοναδιαίοι κλώνοι για την επιλογή της πρωτεΐνης F-Neur1 και 85 για την πρωτεΐνη Neur1-F με PCR γενωμικού DNA και προέκυψαν 22 και 31 θετικοί αντίστοιχα. Από αυτούς καλλιεργήθηκαν 12 εν δυνάμει θετικοί από κάθε κατασκευή σε πετρί 10cm και το κυτταρικό εκχύλισμα που συλλέχθηκε χρησιμοποιήθηκε για ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα aFlag. Καταφέραμε να συλλέξουμε τελικά ένα θετικό κλώνο από κάθε κατασκευή (Εικ.21).

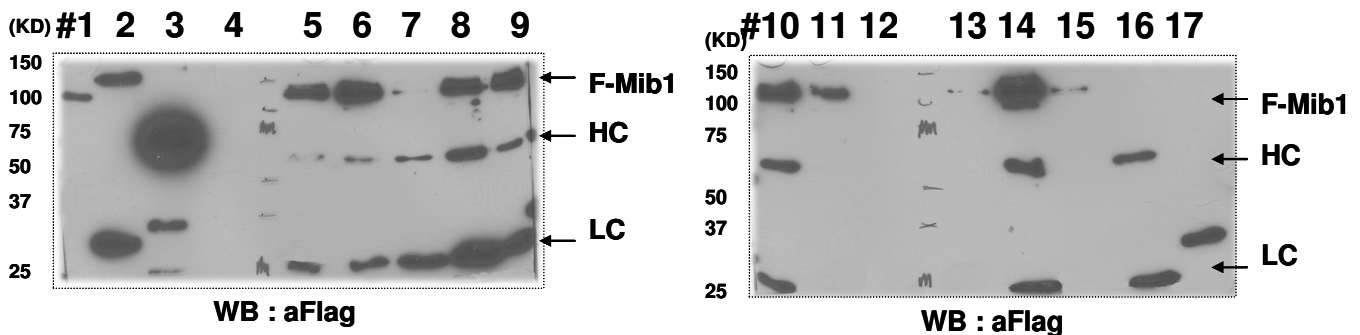
*Αναζήτηση θετικών κλώνων σταθερής έκφρασης της πρωτεΐνης Neur1 και Mib1 μετά από στοχευμένη ένθεση σε κύτταρα HEK293FRT .*

Ο αριθμός των θετικών κλώνων που προκύπτουν με τη στοχευμένη ένθεση σε κύτταρα HEK293 FRT είναι πολύ μεγάλος, έτσι η επιλογή έγινε απευθείας με ανοσοκατακρήμνιση κυτταρικού εκχυλίσματος με αντίσωμα aFlag. Από τους 10 κλώνους που αναλύθηκαν για κάθε κατασκευή, βρέθηκαν 10 θετικοί για την πρωτεΐνη F-Neur1, 10 για την πρωτεΐνη Neur1- F (Εικ.22), ενώ για την πρωτεΐνη F-Mib1 βρέθηκαν 11 θετικοί κλώνοι από τους 17 που αναλύθηκαν (Εικ.23). Ανάλυση Western στο ολικό κυτταρικό εκχύλισμα χωρίς να έχει προηγηθεί ανοσοκατακρήμνιση δεν καθιστούσε δυνατή την ανίχνευση καμίας από τις παραπάνω πρωτεΐνες, δείχνοντας τα χαμηλά

επίπεδα έκφρασης τους μέσα στο κύτταρο, πιθανόν συγκρίσιμα με αυτά των ενδογενών πρωτεϊνών (Εικ.22)



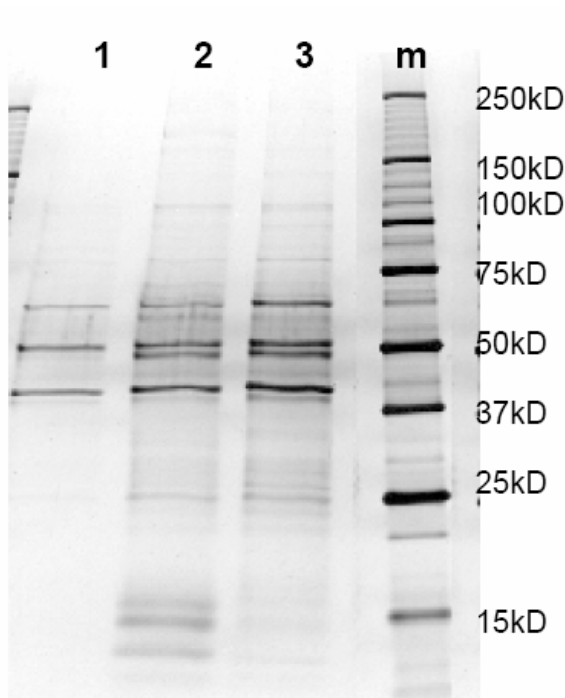
**Εικ. 22: Επιλογή θετικών κλώνων σταθερής έκφρασης της πρωτεΐνης Neur1 σε κύτταρα HEK293 FRT.** Α. Κυτταρικό εκχύλισμα από κλώνους κυττάρων που είχαν καλλιεργηθεί σε πετρί 10cm χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση Western με αντίσωμα aFlag, αλλά τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών ήταν πολύ χαμηλά καθιστώντας αδύνατη την ανίχνευσή τους. Β. Κυτταρικό εκχύλισμα από τους ίδιους κλώνους χρησιμοποιήθηκε για ανοσοκατακρήμνιση και στη συνέχεια αναλύθηκε με αποτύπωση Western με το ίδιο αντίσωμα. Όλοι οι κλώνοι που αναλύθηκαν στην περίπτωση της στοχευμένης έκφρασης ήταν θετικοί. Σημ. Τα υποστρώματα χημειοφωταύγειας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα πιο ευαίσθητα (δυνατότητα ανίχνευσης femtogram πρωτεΐνης).



**Εικ. 23: Επιλογή θετικών κλώνων σταθερής έκφρασης της πρωτεΐνης Mib1 σε κύτταρα HEK293 FRT.** Κυτταρικό εκχύλισμα από κλώνους κυττάρων που είχαν καλλιεργηθεί σε πετρί 10cm χρησιμοποιήθηκε για ανοσοκατακρήμνιση και στη συνέχεια αναλύθηκε με αποτύπωση Western με αντίσωμα aFlag. Από τους 17 κλώνους που αναλύθηκαν 11 ήταν θετικοί για την πρωτεΐνη F-Mib1.

### **Ταυτοποίηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με F-Neur1 και Neur1-F που εκφράζονται σταθερά σε κύτταρα HeLa με φασματοσκοπία μάζας (MudPIT)**

Οι κυτταρικές σειρές σταθερής έκφρασης F-Neur1 και Neur1-F που παράχθηκαν σε κύτταρα HeLa, χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με το Neur1. Από καλλιέργεια εναιωρούμενων κυττάρων συλλέχθηκαν  $10^9$  κύτταρα και το ολικό κυτταρικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε για ανοσοκατακρήμνιση της πρωτεΐνης Neur1 με αντίσωμα aFlag. Οι πρωτεΐνες εκλούστηκαν από τα σφαιρίδια που ήταν συζευγμένα με το αντίσωμα aFlag με τη χρήση πεπτιδίου Flag και 1/10 του όγκου της έκλουσης αναλύθηκε αρχικά με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης και χρώση νιτρικού αργύρου (Εικ. 24). Το υπόλοιπο δείγμα αναλύθηκε με τη μέθοδο φασματοσκοπίας μάζας MudPIT (βλ. Υλικά & Μέθοδοι) στο εργαστήριο πρωτεομικής ανάλυσης.



**Εικ. 24: Ανάλυση με χρώση αργύρου των πρωτεϊνών που ανοσοκατακρημνίζονται μαζί με το Neur1 . 1. Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών με αντίσωμα aFlag από ολικό κυτταρικό εκχύλισμα πατρικών κυττάρων HeLa (πείραμα αρνητικού ελέγχου). 2, 3. Ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα aFlag από ολικό κυτταρικό εκχύλισμα HeLa που εκφράζουν σταθερά την πρωτεΐνη F-Neur1 (#41) ή Neur1-F (#35) αντίστοιχα.**

Μετά από την ανάλυση των δειγμάτων (βλ Υλικά & Μέθοδοι), οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το Neur1 ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση κατάλληλου

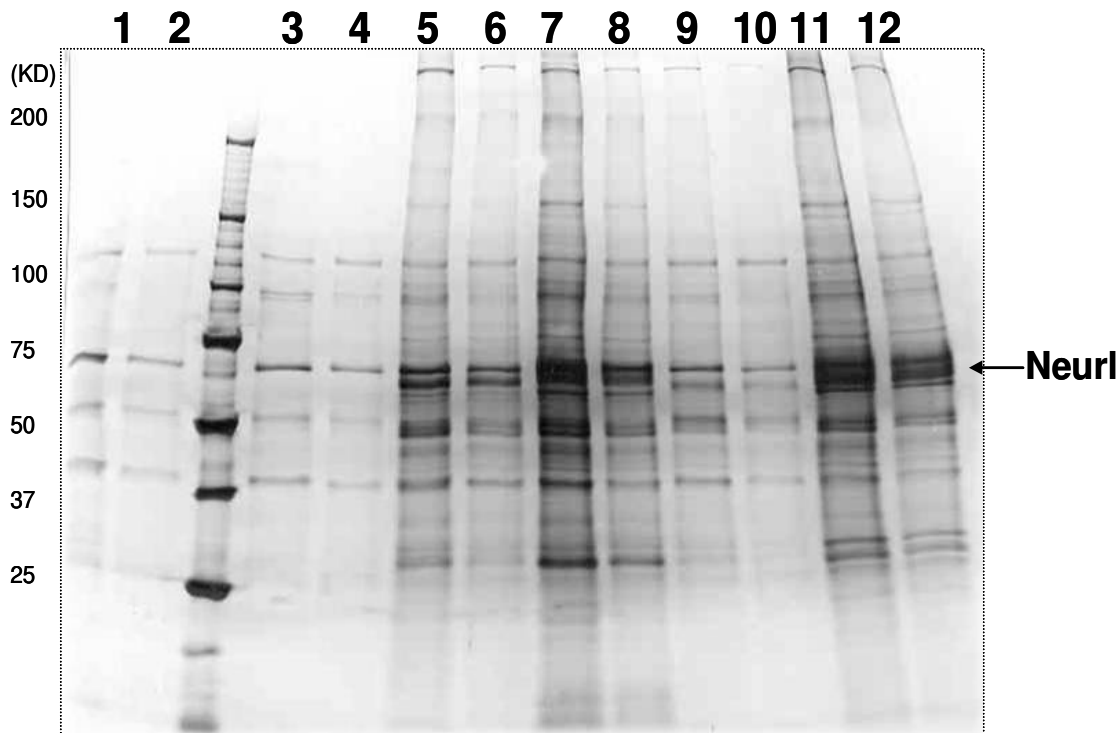
υπολογιστικού προγράμματος. Από αυτή την ανάλυση προέκυψε ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών, από τις οποίες επιλέχθηκαν αυτές που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη αντιπροσώπευση στα δείγματα με F-Neur1 ή Neur1-F, και μηδενικό θόρυβο στο δείγμα αρνητικού ελέγχου. Οι τρεις πρωτεΐνες που προέκυψαν με τη μεγαλύτερη αντιπροσώπευση είναι η NuMA1 (Nuclear Mitotic Apparatus Protein 1) με αριθμό πεπτιδίων που καλύπτουν το 49.3% της πρωτεϊνικής αλληλουχίας, η πρωτεΐνη myopalladin με κάλυψη 41.1% της πρωτεϊνικής αλληλουχίας και η πρωτεΐνη Homer 3 με κάλυψη 20.5 % της πρωτεϊνικής αλληλουχίας (Πιν.1). Με χαμηλότερη αντιπροσώπευση ανιχνεύθηκαν οι πρωτεΐνες topoisomerase II binding protein (10.5%), η Rb1 Inducible coiled coil protein (1.6%) και η υποθετική πρωτεΐνη FLJ 10101 (2.2%). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η πρωτεΐνη N-myristoyltransferase 1 με σημαντικό ποσοστό κάλυψης 13.7% η οποία φαίνεται να αλληλεπιδρά μόνο με την πρωτεΐνη Neur1-F, ενώ δεν ανιχνεύεται καθόλου όταν το Flag βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Το αντίθετο παρατηρείται με την πρωτεΐνη Rho-associated, coiled coil containing kinase 2 και την laminin 1, οι οποίες φαίνεται να αλληλεπιδρούν μόνο με την πρωτεΐνη F-Neur1 με ποσοστό κάλυψης 10.6% και 6.2 % αντίστοιχα (Πιν.14).

**Πιν. 14: Οι πρωτεΐνες που παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιπροσώπευση στην αλληλεπίδρασή τους με το Neur1 σε κύτταρα HeLa μετά από ανάλυση φασματοσκοπίας μάζας.**

	F - Neur1		Neur1 - F	
	Κάλυψη αλληλ.	Αρ. Πεπτιδ.	Κάλυψη αλληλ.	Αρ. Πεπτιδ.
Nuclear Mitotic Apparatus Protein 1 (NuMA1)	<b>49.3</b>	<b>96</b>	<b>34.2</b>	<b>57</b>
Myopalladin	<b>37.3</b>	<b>31</b>	<b>41.1</b>	<b>37</b>
Homer, neuronal immediate early gene, 3	<b>20.5</b>	<b>3</b>	<b>14.7</b>	<b>2</b>
Topoisomerase (DNA) II binding protein	<b>10.5</b>	<b>8</b>	<b>1.4</b>	<b>1</b>
N- myristoyltransferase 1	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>13.7</b>	<b>4</b>
laminin, gamma 1 precursor;	<b>6.2</b>	<b>6</b>	<b>x</b>	<b>x</b>
Hypothetical protein FLJ10101	<b>2.2</b>	<b>1</b>	<b>2.2</b>	<b>1</b>
Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2	<b>10.6</b>	<b>12</b>	<b>x</b>	<b>x</b>
Rb1-inducible coiled coil protein	<b>1.6</b>	<b>2</b>	<b>0.8</b>	<b>1</b>

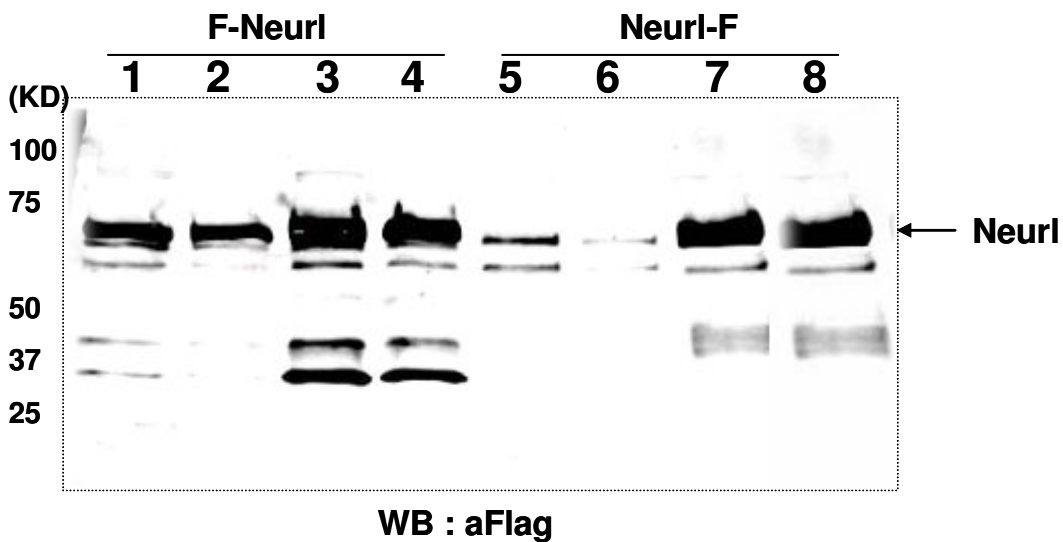
**Ταυτοποίηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με F-Neurl και Neurl-F που εκφράζονται σταθερά σε κύτταρα HEK293 FRT με τη χρήση φασματοσκοπία μάζας (MudPIT)**

Για να ελέγξουμε τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση των κυττάρων HeLa και να επαληθεύσουμε τις αλληλεπιδράσεις που παρατηρήσαμε, επαναλάβαμε την ανάλυση φασματοσκοπίας μάζας στις αντίστοιχες κυτταρικές σειρές HEK293 FRT. Σε αυτή τη δεύτερη ανάλυση αποφασίσαμε να επεξεργαστούμε πριν την ανοσοκατακρήμνιση τα κύτταρα με τον αναστολέα του πρωτεασώματος MG132, αφού είχαμε αρχικά παρατηρήσει ότι τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Neurl μέσα στο κύτταρο είναι πολύ χαμηλά. Επιπλέον ζητήσαμε από το εργαστήριο πρωτεομικής ανάλυσης να ταυτοποιήσει πιθανές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης Neurl.



**Εικ. 25:** Ανάλυση με χρώση αργύρου των πρωτεϊνών που ανοσοκατακρημνίζονται με το Neurl σε κύτταρα HEK293 FRT . 1, 2, 3, 4. Ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα aFlag πρωτεϊνών από ολικό κυτταρικό εκχύλισμα πατρικών κυττάρων HEK293FRT, (πείραμα αρνητικού ελέγχου). Τα δείγματα 3,4 έχουν υποστεί επεξεργασία με 50μM αναστολέα του πρωτεασώματος MG132 για 8 ώρες πριν συλλεχθούν. 5, 6, 7, 8 Ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα aFlag από ολικό κυτταρικό εκχύλισμα HEK293 FRT που εκφράζουν σταθερά την πρωτεΐνη F-Neurl . Τα δείγματα 7,8 έχουν υποστεί επεξεργασία με 50μM αναστολέα του πρωτεασώματος MG132 για 8 ώρες. 9, 10, 11, 12 Ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα aFlag από ολικό κυτταρικό εκχύλισμα HEK293 FRT που εκφράζουν σταθερά την πρωτεΐνη Neurl-F. Τα δείγματα 11,12 έχουν υποστεί επεξεργασία με 50μM αναστολέα του πρωτεασώματος MG132 για 8 ώρες. Σημ: όλα τα δείγματα ανά δυάδες αντιστοιχούν σε δύο διαδοχικές εκλούσεις από τα σφαιρίδια που είναι συζευγμένα με aFlag.

Οι πρωτεΐνες απομονώθηκαν όπως και στην περίπτωση των κυττάρων HeLa και το 1/10 του όγκου της έκλουσης αναλύθηκε σε πήκτωμα ακρυλαμίδης με χρώση αργύρου (Εικ.25), ενώ 1/10 του όγκου αναλύθηκε και με αποτύπωση Western χρησιμοποιώντας αντίσωμα aFlag (Εικ.26). Τόσο με την χρώση αργύρου όσο και με την ανάλυση Western παρατηρήσαμε σημαντική αύξηση στα επίπεδα της πρωτεΐνης F-Neur1 και Neur1-F μέσα στα κύτταρα.



**Εικ. 26:** Αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης Neur1 που εκφράζεται σταθερά σε κύτταρα HEK293 FRT μετά από επεξεργασία των κυττάρων με τον αναστολέα του πρωτεασώματος MG132. 1,2. Δύο διαδοχικές εκλούσεις μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα aFlag σε ολικό κυτταρικό εκχύλισμα κυττάρων που εκφράζουν σταθερά F-Neur1. Τα δείγματα 3,4 έχουν υποστεί επεξεργασία με 50μM MG132 αναστολέα του πρωτεασώματος για 8 ώρες. 5,6. Δύο διαδοχικές εκλούσεις μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα aFlag σε ολικό κυτταρικό εκχύλισμα κυττάρων που εκφράζουν σταθερά Neur1-F. Τα δείγματα 7,8 έχουν υποστεί επεξεργασία με 50μM MG132 αναστολέα του πρωτεασώματος για 8 ώρες.

Από τη νέα ανάλυση με φασματοσκοπία μάζας επαληθεύθηκαν μερικές από τις παραπάνω αλληλεπιδράσεις, ενώ προέκυψαν και μερικές νέες (Αναλυτικός Πίνακας βλ. Παράρτημα Πιν.2). Πιο αναλυτικά και συγκριτικά με την προηγούμενη ανάλυση, επαληθεύσαμε την αλληλεπίδραση του Neur1 με τις πρωτεΐνες NuMA1 (11%), topoisomerase II binding protein (20.5%), Rb1 Inducible coiled coil protein (4%) και Rho-associated, coiled coil containing kinase 2 (2%), ενώ δεν μπορούσαμε να

ανιχνεύσουμε τις πρωτεΐνες myopalladin και Homer 3. Η πρωτεΐνη N-myristoyltransferase 1 εμφανίζεται με σημαντικό ποσοστό κάλυψης 8.3% μόνο μετά από ανοσοκατακρήμιση με την πρωτεΐνη Neur1-F και αφού έχει προηγηθεί επεξεργασία των κυττάρων με αναστολέα του πρωτεασώματος MG132, κάτι που παρατηρείται επίσης με την πρωτεΐνη tumor necrosis factor receptor DcR2 (26.9%), που δεν είχε ανιχνευθεί στα κύτταρα HeLa. Δύο επιπλέον πρωτεΐνες που ανιχνεύθηκαν στα κύτταρα HEK293 είναι η like mouse brain protein E46 με υψηλό ποσοστό κάλυψης 20% και η υποθετική πρωτεΐνη FLJ20718 με ποσοστό 13.8 % (Πιν.15).

**Πιν. 15: Οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το Neur1 σε κύτταρα HEK 293 μετά από ανάλυση με φασματοσκοπία μάζας.**

	293 HEK Flag-Neur1		293 HEK Neur1 – Flag		293 HEK MG132 Flag-Neur1		293 HEK MG132 Neur1 -Flag	
	Κάλ. Αλληλ.	Αρ. Πεπτ.	Κάλ. Αλληλ.	Αρ. Πεπτ.	Κάλ. Αλληλ.	Αρ. Πεπτ.	Κάλ. Αλληλ.	Αρ. Πεπτ.
<b>NuMA 1</b>	<b>10.6</b>	<b>12</b>	<b>11</b>	<b>14</b>	<b>16.8</b>	<b>20</b>	<b>10.2</b>	<b>18</b>
myopalladin	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Topoisomerase (DNA) II binding protein</b>	<b>20.5</b>	<b>23</b>	<b>18.1</b>	<b>15</b>	<b>26.7</b>	<b>25</b>	<b>15.8</b>	<b>21</b>
<b>Rho-associated, coiled coil containing protein</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>9</b>
Homer 3	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>like mouse brain protein E46</b>	<b>20</b>	<b>5</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	-	-	-	-
<b>FLJ20718</b>	<b>13.8</b>	<b>6</b>	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>5.1</b>	<b>2</b>	<b>8.1</b>	<b>4</b>
<b>Laminin, gamma 1 precursor</b>	-	-	-	-	<b>7.1</b>	<b>9</b>	<b>12.1</b>	<b>13</b>
<b>Rb1-inducible coiled coil protein</b>	<b>3.6</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	-	-	<b>1.9</b>	<b>2</b>
<b>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d precursor (DcR2)</b>	-	-	-	-	-	-	<b>26.9</b>	<b>8</b>
<b>N-myristoyltransferase</b>	-	-	-	-	-	-	<b>8.3</b>	<b>3</b>

Εκτός από τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που αναλύθηκαν στα κύτταρα HEK293, ταυτοποιήθηκαν και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης Neu1. Συγκεκριμένα βρέθηκαν δύο κατάλοιπα σερίνης, η σερίνη 462 και η σερίνη 469 να είναι φωσφορυλιωμένα, ενώ με μικρότερο ποσοστό αξιοπιστίας, ένα κατάλοιπο λυσίνης (K552) να είναι ουβικουιτινιλιωμένο και η προλίνη 199 και η τρυπτοφάνη 201 να είναι υδροξυλιωμένες (Πιν.16). Πρέπει να σημειωθεί ότι το ποσοστό κάλυψης της πρωτεΐνης Neu1 σε αυτή την ανάλυση ήταν 67.3% μετά από πρωτεολυτικές πέψεις που πραγματοποιήθηκαν, γεγονός που σημαίνει ότι το 1/3 της πεπτιδικής αλληλουχίας δεν ήταν δυνατό να ελεγχθεί. Είναι πιθανό να υπάρχουν περισσότερες τροποποιήσεις στην πρωτεΐνη, οι οποίες δεν ταυτοποιήθηκαν με αυτή την ανάλυση.

**Πιν. 16: Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης Neu1 που ταυτοποιήθηκαν με ανάλυση φασματοσκοπίας μάζας σε κύτταρα HEK293 FRT.**

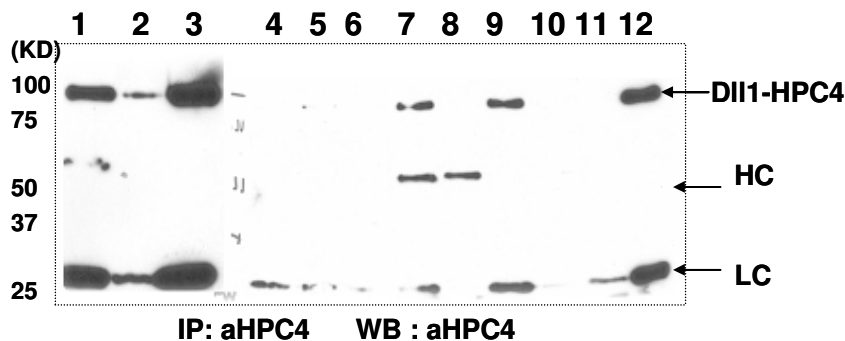
	<b>Neu1-F HEK293</b>	<b>Αρ. Πεπτ.</b>	<b>Επιβεβαίωση</b>
<b>Ser 462</b> (φωσφορυλίωση)	* PC <b>S</b> PASTPTSPSALGIR	3	Nα ι
<b>Ser469</b> (φωσφορυλίωση)	* SPASTPT <b>S</b> PSALGIR	3	Nα ι
<b>Lys552</b> (ουβικουιτινιλίωση)	⊘ <b>K</b> ALHACCPICR	1	‘Οχ ι
<b>Pro 199</b> (υδροξυλίωση)	@ TVD <b>P</b> LWALVDVYGLTR	1	Nα ι
<b>Trp 201</b> (υδροξυλίωση)	@ TVDPL <b>W</b> ALVDVYGLTR	1	Nα ι

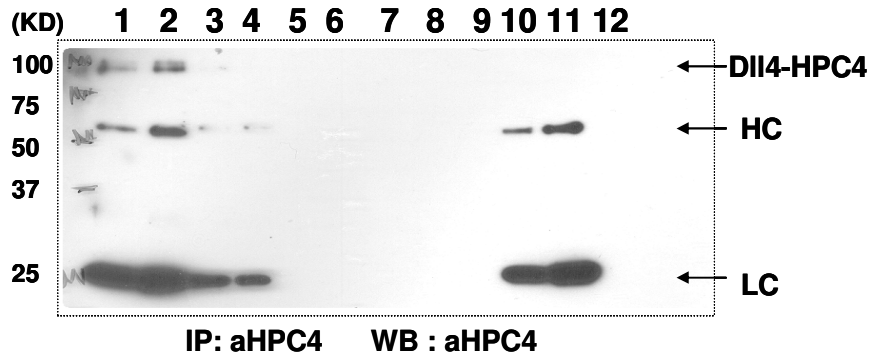
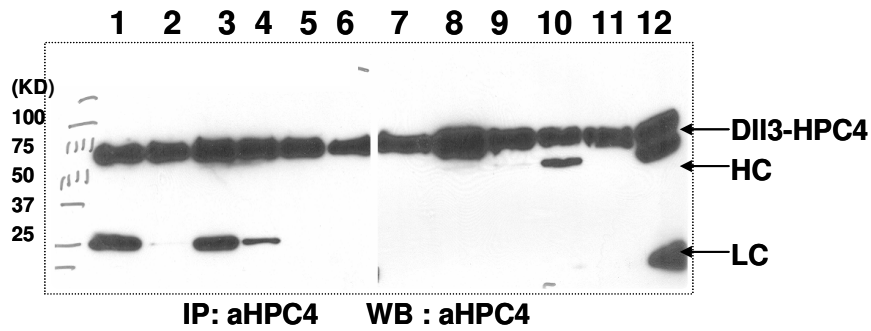


### Δημιουργία κυτταρικών σειρών που εκφράζουν σταθερά τους δεσμευτές του Notch, Delta-like 1,3,4 και Jagged 1,2 του ποντικού.

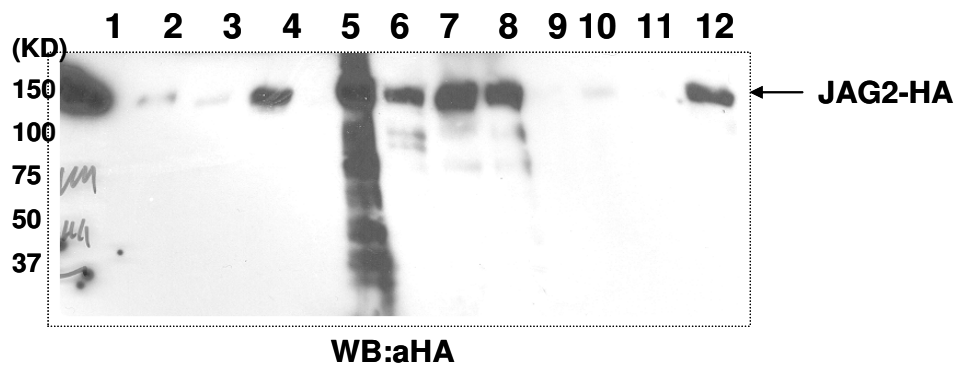
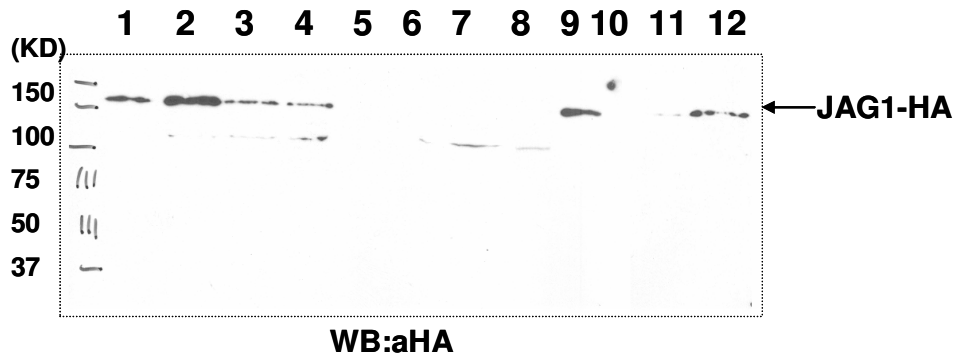
Μετά την ανάλυση των κυτταρικών σειρών που αναφέρθηκαν με φασματοσκοπία μάζας, παρατηρήσαμε ότι δεν μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε κανένα από τα πρωταγωνιστικά μόρια του μονοπατιού N και ιδιαίτερα κανέναν από τους δεσμευτές, οι οποίοι είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρούν με το Neu1 στη δροσόφιλα και στο βάτραχο (Lai et al, 2001, Lai et al, 2005, Pitsouli & Delidakis, 2005). Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι οι συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήσαμε δεν εκφράζουν πρωτεΐνες του μονοπατιού N, κάτι που είναι πιθανό αφού δεν μπορέσαμε να βρούμε σχετικές αναφορές στη βιβλιογραφία. Για να διερευνήσουμε το ενδεχόμενο αλληλεπίδρασης με τους δεσμευτές και να μελετήσουμε τον πιθανό ρόλο του Neu1 στο μονοπάτι N, αποφασίσαμε να δημιουργήσουμε κυτταρικές σειρές που εκφράζουν σταθερά καθένα από τους δεσμευτές. Επιλέξαμε την κυτταρική σειρά L (L cells) του ποντικού, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί για την έκφραση των δεσμευτών και για την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού N σε πειράματα συγκαλλιέργειας κυττάρων (Fryer et al, 2002, Hicks et al., 2000).

Για τη δημιουργία των κυτταρικών σειρών που εκφράζουν σταθερά τους δεσμευτές χρησιμοποιήσαμε το σύστημα του ρετρο-ιού για να μολύνουμε τα κύτταρα L cells, τα οποία έχουν πολύ χαμηλό ποσοστό διαμόλυνσης με τις κλασσικές μεθόδους. Με τη χρήση κατάλληλων φορέων του ρετρο-ιού (βλ. Υλικά & Μέθοδοι) καταφέραμε να παράγουμε κυτταρικές σειρές σταθερής έκφρασης και των πέντε δεσμευτών του N (Εικ.27, 28). Μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε θετικούς κλώνους σε ποσοστό 20-100% και παρατηρήσαμε ότι όλοι οι δεσμευτές εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα, ενώ συγκεκριμένα για τους δεσμευτές JAG1 και 2 ήταν δυνατή η ανιχνεύσή τους σε ολικό κυτταρικό εκχύλισμα με ανάλυση Western, χωρίς να έχει προηγηθεί ανοσοκατακρήμνιση (Εικ.28).





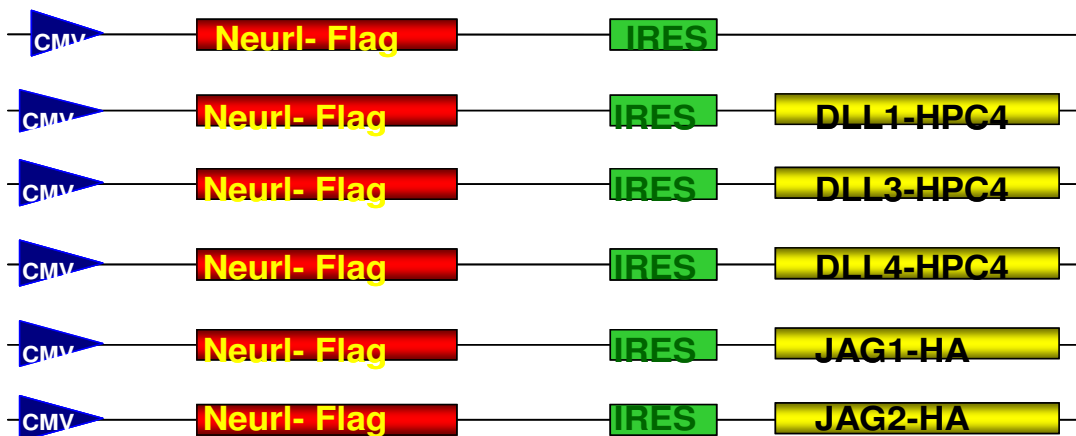
**Εικ. 27: Επιλογή θετικών κλώνων σταθερής έκφρασης των δεσμευτών DII1-HPC4, DII3-HPC4, DII4-HPC4 σε κύτταρα L cells.** Κυτταρικό εκχύλισμα από κλώνους κυττάρων που είχαν καλλιεργηθεί σε πετρί 10cm χρησιμοποιήθηκε για ανοσοκατακρήμιση και στη συνέχεια αναλύθηκε με αποτύπωση Western με αντίσωμα aHPC4. 50% των κλώνων ήταν θετικοί για DII1, 100% ήταν θετικοί για DII3 και 25% για DII4.



**Εικ. 28:** Επιλογή θετικών κλώνων σταθερής έκφρασης των δεσμευτών JAG1-HA και JAG2-HA σε κύτταρα L cells. Κυτταρικό εκχύλισμα από κλώνους κυττάρων που είχαν καλλιεργηθεί σε πετρί 10cm χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση Western με αντίσωμα αHA. 60% των κλώνων που αναλύθηκαν ήταν θετικοί για τις αντίστοιχες πρωτεΐνες.

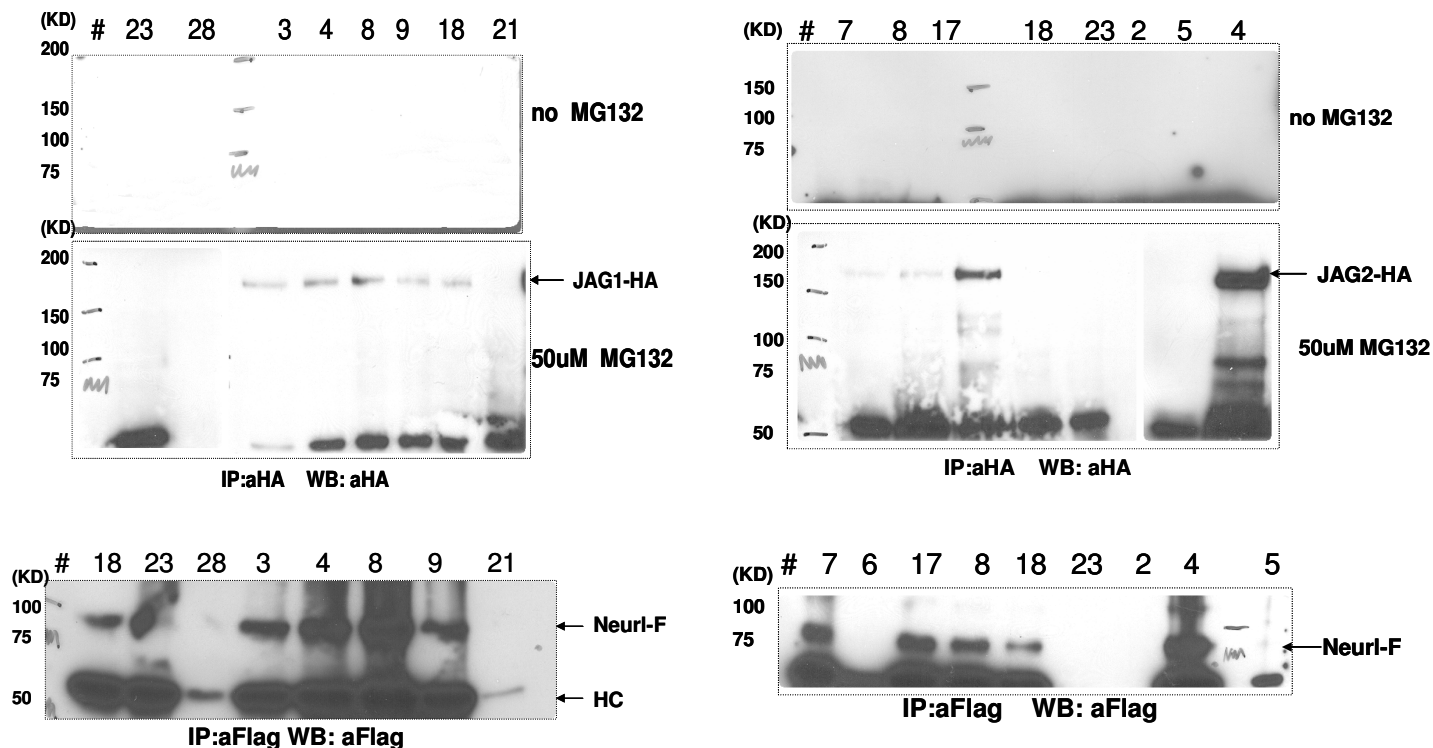
**Υπερέκφραση του Neurl σε κυτταρική σειρά L (L cells) που εκφράζει σταθερά τους δεσμευτές JAG1 και JAG2 έχει σαν αποτέλεσμα σημαντική μείωση των επιπέδων των δεσμευτών στο κύτταρο, με πιθανή επαγωγή της αποικοδόμησής που εξαρτάται από το πρωτεάσωμα.**

Η εκτοπική έκφραση του Neurl της δροσόφιλα ταυτόχρονα με τους δεσμευτές DI ή Ser έχει σαν αποτέλεσμα την δραματική μείωση των επιπέδων των δεσμευτών, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι το Neurl, πιθανόν μέσω ουβικουιτινιλίωσης, επάγει την αποικοδόμησή τους. Για να δούμε αν το Neurl του ποντικού έχει το ίδιο αποτέλεσμα στους δεσμευτές του N αποφασίσαμε να φτιάξουμε κυτταρικές σειρές που εκφράζουν σταθερά καθένα από τους δεσμευτές μαζί με το Neurl. Επειδή η ρύθμιση των αντίστοιχων πρωτεϊνών στη δροσόφιλα φαίνεται να εξαρτάται από τα επίπεδα έκφρασης των αντίστοιχων πρωτεϊνών, αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε φορέα που περιέχει IRES (internal ribosomal entry site), ώστε να παράγεται ένα κοινό μετάγραφο κάτω από τον ίδιο υποκινητή CMV (βλ. Υλικά & Μέθοδοι) και στη συνέχεια να μεταφράζονται ανεξάρτητα οι δύο πρωτεΐνες (Εικ. 29). Με αυτό τον τρόπο θεωρήσαμε ότι θα καταφέρουμε να έχουμε πολύ συγκρίσιμα επίπεδα του Neurl με καθένα από τους δεσμευτές τουλάχιστον στο μεταγραφικό επίπεδο.



**Εικ. 29:** Σχηματική αναπαράσταση των πλασμιδιακών κατασκευών σε φορέα pIRES που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία κυτταρικών σειρών L με σταθερή έκφραση για το Neurl-F και καθένα από τους δεσμευτές του N.

Παράχθηκαν λοιπόν 5 κυτταρικές σειρές που εκφράζουν σταθερά *Neurl-F* και *Dll1-HPC4*, *Neurl-F* και *Dll3-HPC4*, *Neurl-F* και *Dll4-HPC4*, *Neurl-F* και *JAG1-HA*, *Neurl-F* και *JAG2-HA*. Η αρχική επιλογή κλώνων έγινε με ανοσοκατακρήμιση του *Neurl-F* με αντίσωμα aFlag και οι θετικοί κλώνοι που προέκυψαν ελέγχθηκαν με ανοσοκατακρήμιση για την έκφραση καθενός από τους δεσμευτές (Εικ.30). Κανένας από τους αρχικούς κλώνους κυττάρων με *Dll1*, *Dll4*, *Jag1*, *Jag2* που εξέφραζε σταθερά *Neurl* δεν βρέθηκε να είναι θετικός για τους συγκεκριμένους δεσμευτές, ενώ μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε μόνο το *Dll3-HPC4* μετά από ανοσοκατακρήμιση με το αντίστοιχο αντίσωμα και ανάλυση Western. Θεωρήσαμε ότι αυτό οφείλεται στην αποικοδόμησή τους από το *Neurl* και αποφασίσαμε να επεξεργαστούμε τα κύτταρα με αναστολέα του πρωτεασώματος για να ελέγξουμε αν με αυτό τον τρόπο τα επίπεδα των δεσμευτών αυξάνονται στο κύτταρο. Μετά από 12 ώρες επεξεργασίας με 50μM MG132, ήταν ικανή η ανίχνευση των δεσμευτών *JAG1* και *JAG2* μετά από ανοσοκατακρήμιση με αντίσωμα aHA (Εικ.30), γεγονός που ενισχύει την υπόθεσή μας ότι οι δύο αυτοί δεσμευτές ρυθμίζονται αρνητικά από το *Neurl* και η αποικοδόμησή τους φαίνεται να γίνεται από το πρωτεάσωμα. Η αντίστοιχη επεξεργασία με αναστολέα του πρωτεασώματος δεν είχε σαν αποτέλεσμα την ανίχνευση των δεσμευτών *Dll1* και *Dll4* στα κύτταρα.

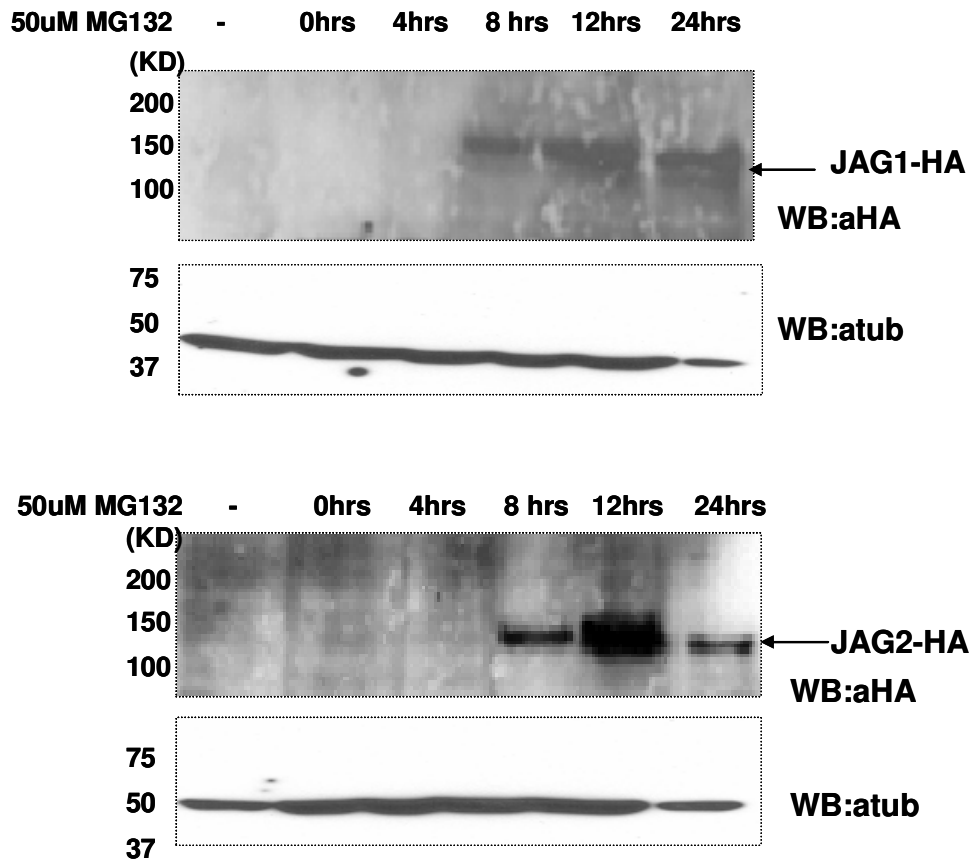


**Εικ. 30: Η αποικοδόμηση των δεσμευτών JAG1 και JAG2 του ποντικού επάγεται από την παρουσία του Neu1 σε κύτταρα L cells και εξαρτάται από τη δράση του πρωτεασώματος. Α.** Κυτταρικό εκχύλισμα από L cells που εκφράζουν σταθερά Neu1-F ελέγχθηκαν με ανοσοκατακρήμιση με αντίσωμα αΗΑ για την έκφραση της πρωτεΐνης JAG1-HA. Η πρωτεΐνη δεν είναι δυνατό να ανιχνευθεί παρά μόνο μετά από επεξεργασία των κύτταρων με αναστολέα του πρωτεασώματος MG132 για 12 ώρες. Β. Όμοια με το Α για την πρωτεΐνη JAG2-HA

**Οι πρωτεΐνες JAG1-HA και JAG2-HA συσσωρεύονται μέσα σε κύτταρα L cells που εκφράζουν σταθερά Neu1-F μετά από επεξεργασία των κυττάρων με αναστολέα του πρωτεασώματος**

Για να επιβεβαιώσουμε την ειδική δράση του αναστολέα του πρωτεασώματος στην αναστολή της αποικοδόμησης των δεσμευτών JAG1-HA και JAG2-HA σε κύτταρα που εκφράζουν σταθερά Neu1-F επεξεργαστήκαμε τα κύτταρα με 50μM MG132 και συλλέξαμε κυτταρικό εκχύλισμα σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, δηλαδή 0 ώρες, 4 ώρες, 8 ώρες, 12 ώρες και 24 ώρες. Αναλύσαμε το κυτταρικό εκχύλισμα με Western με αντίσωμα αΗΑ, χωρίς να έχει προηγηθεί ανοσοκατακρήμιση για εμπλουτισμό των πρωτεϊνών (Εικ.31).

Παρατηρήσαμε ότι και οι δύο πρωτεΐνες JAG1-HA και JAG2-HA συσσωρεύονται στο κύτταρο μετά από 8 ώρες επεξεργασίας με αναστολέα πρωτεασώματος, ενώ είναι αδύνατη η ανίχνευσή τους πριν από αυτή τη χρονική στιγμή. Η παρουσία λοιπόν του Neu1 επάγει την αποικοδόμησή τους, αφού οι δεσμευτές εκφράζονταν κανονικά σε κύτταρα L (L cells) που δεν εκφράζουν Neu1 (Εικ.28) και η αποικοδόμησή τους εξαρτάται από τη δράση του πρωτεασώματος.

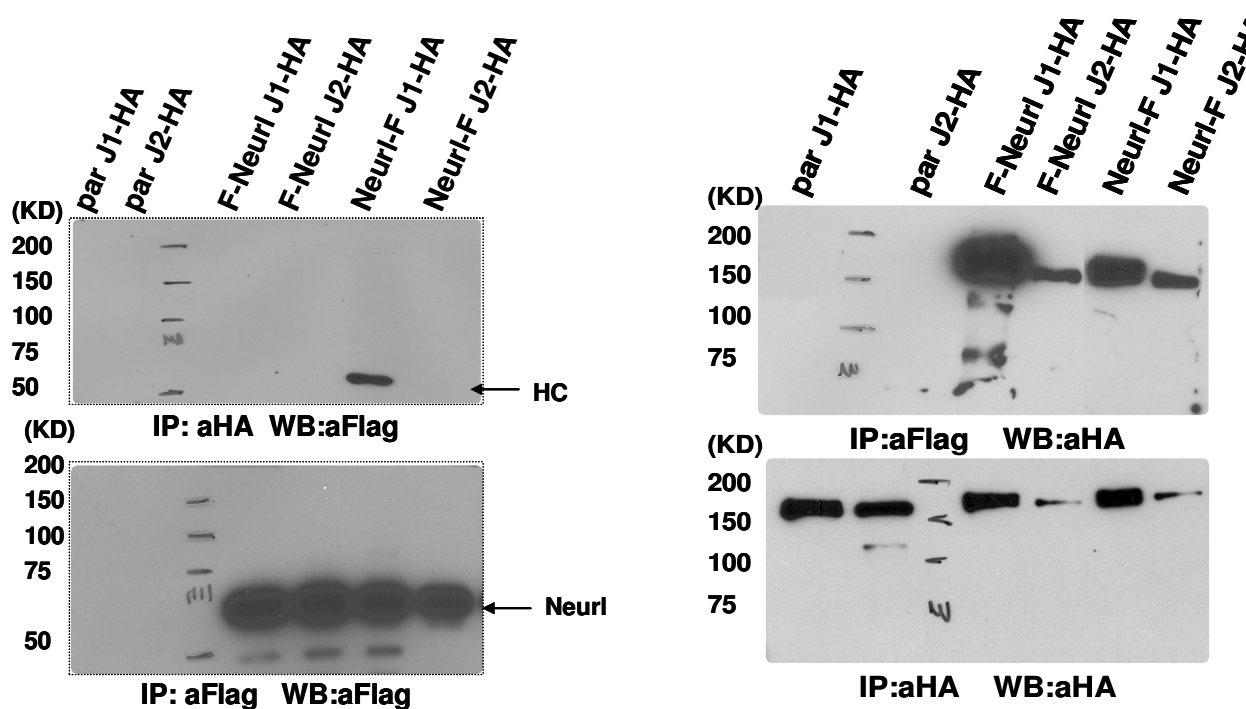


**Εικ. 31:** Συσώρευση των πρωτεϊνών JAG1-HA και JAG2-HA σε κύτταρα Lcells που εκφράζουν σταθερά *Neur1-F* μετά από επεξεργασία με αναστολέα του πρωτεασώματος MG132. Κυτταρικό εκχύλισμα από κύτταρα Lcells που εκφράζουν σταθερά *Neur1-F* αναλύθηκε με Western με αντίσωμα aHA, μετά από επεξεργασία των κυττάρων με 50μM MG132 αναστολέα του πρωτεασώματος για διαφορετικές χρονικές στιγμές, 0 ώρες, 4 ώρες, 8 ώρες, 12 ώρες και 24 ώρες. Η ολική ποσότητα πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα ελέγχθηκε με τη χρήση αντισώματος ενάντια στην τουμπουλίνη. Μετά από 24 ώρες επεξεργασίας με τον αναστολέα του πρωτεασώματος το 50% των κυττάρων είναι νεκρά, γεγονός που φαίνεται από την ποσότητα της τουμπουλίνης που μπορεί να ανιχνευθεί στο αντίστοιχο δείγμα.

### **Οι πρωτεΐνες *Neur1* και *Mib1* αλληλεπιδρούν με τους δεσμευτές JAG1 και JAG2 σε κύτταρα HEK293.**

Αφού παρατηρήσαμε ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης *Neur1* επάγει την αποικοδόμηση των δεσμευτών JAG1 και JAG2, αποφασίσαμε να ελέγξουμε αν υπάρχει αλληλεπίδραση του *Neur1* με τους δύο αυτούς δεσμευτές. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήσαμε τις κυτταρικές σειρές HEK293 που εκφράζουν σταθερά *Neur1* και τις διαμολύναμε παροδικά με τους αντίστοιχους δεσμευτές. Με αυτή την προσέγγιση ήταν δυνατή η ανίχνευση των δεσμευτών

μετά από ανοσοκατακρήμνιση, χωρίς να είναι απαραίτητη η επεξεργασία των κυττάρων με αναστολέα του πρωτεασώματος, πιθανό γιατί τα επίπεδα έκφρασης του Neu1 είναι πολύ χαμηλότερα από αυτά των δεσμευτών που εκφράζονται μετά από παροδική διαμόλυνση (Εικ.32). Για να εξασφαλίσουμε ότι οι δεσμευτές εκφράζονται σε συγκρίσιμα επίπεδα μετά την παροδική διαμόλυνση, κανονικοποιήσαμε το κυτταρικό εκχύλισμα που χρησιμοποιείται σε κάθε ανοσοκατακρήμνιση με δοκιμή λουσιφεράσης, αφού συνδιαμολύναμε τα κύτταρα με το αντίστοιχο πλασμίδιο αναφοράς.

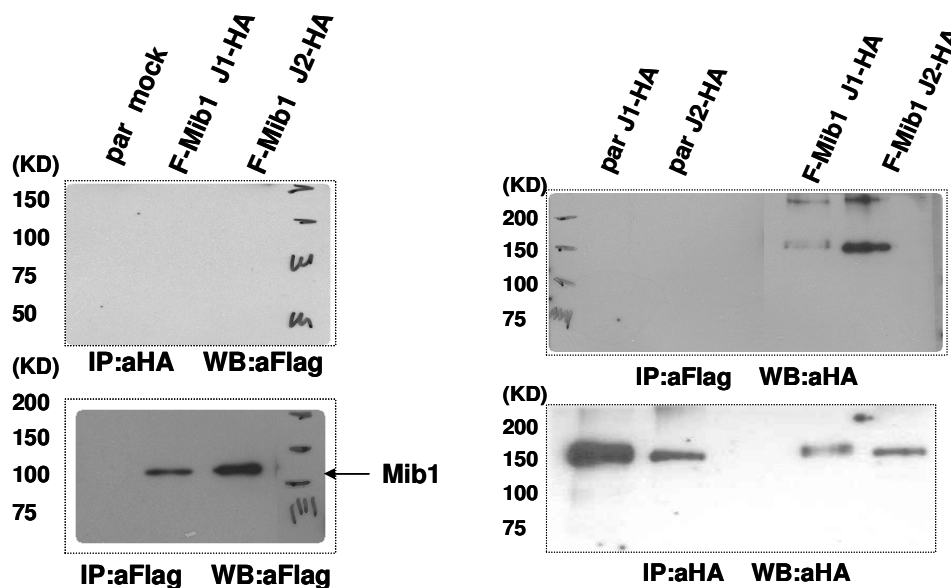


**Εικ. 32:** Η πρωτεΐνη Neu1 αλληλεπιδρά σε κύτταρα HEK293 με τους δεσμευτές JAG1 και JAG2. Κύτταρα που εκφράζουν σταθερά την πρωτεΐνη Neu1 (F-Neu1 ή Neu1-F) διαμολύνθηκαν παροδικά με κατασκευές που εκφράζουν τους δεσμευτές JAG1-HA και JAG2-HA. Το κυτταρικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε για ανοσοκατακρήμνιση τόσο με αντίσωμα a-Flag όσο και a-HA συζευγμένα στα κατάλληλα σφαιρίδια και τα δείγματα εκλούσθηκαν από τα σφαιρίδια με τη χρήση αντίστοιχων πεπτιδίων. Μετά την έκλουση τα δείγματα αναλύθηκαν με αποτύπωση western. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών σε ολικό κυτταρικό εκχύλισμα δεν ήταν δυνατή.

Μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα aFlag ενάντια στην πρωτεΐνη Neu1 και ανάλυση Western με αντίσωμα aHA για την ανίχνευση των δύο δεσμευτών JAG1-HA και JAG2-HA, μπορέσαμε να παρατηρήσουμε αλληλεπίδραση του Neu1 και με τους δύο δεσμευτές,

δεν μπορέσαμε όμως να παρατηρήσουμε την αλληλεπίδραση πραγματοποιώντας ανοσοκατακρήμιση με αντίσωμα aHA και ανάλυση Western με aFlag (Εικ.32). Το γεγονός αυτό είχε παρατηρηθεί και στα αντίστοιχα πειράματα αλληλεπίδρασης του Neur1 της δροσόφιλα με τους δύο δεσμευτές D1 και Ser (Lai et al, 2001, Lai et al, 2005). Αν και για το Neur1 του ποντικού δεν υπάρχει αναφορά αλληλεπίδρασής του με τους δεσμευτές του N, έχει δημοσιευτεί ότι η πρωτεΐνη Mib1 αλληλεπιδρά σε κύτταρα HEK293 και με τους πέντε δεσμευτές N των θηλαστικών μετά από πείραμα παροδικής διαμόλυνσης (Koo et al, 2005a). Για να ελέγξουμε την ακρίβεια του πειράματός μας αποφασίσαμε να επαναλάβουμε την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης Mib1 που εκφράζεται σταθερά σε κύτταρα HEK293 FRT με τους δεσμευτές JAG1-HA και JAG2-HA.

Επαναλαμβάνοντας την ίδια διαδικασία που ακολουθήσαμε για το Neur1 επιβεβαιώσαμε την αλληλεπίδραση του Mib1 με τους δύο δεσμευτές (Εικ.33).

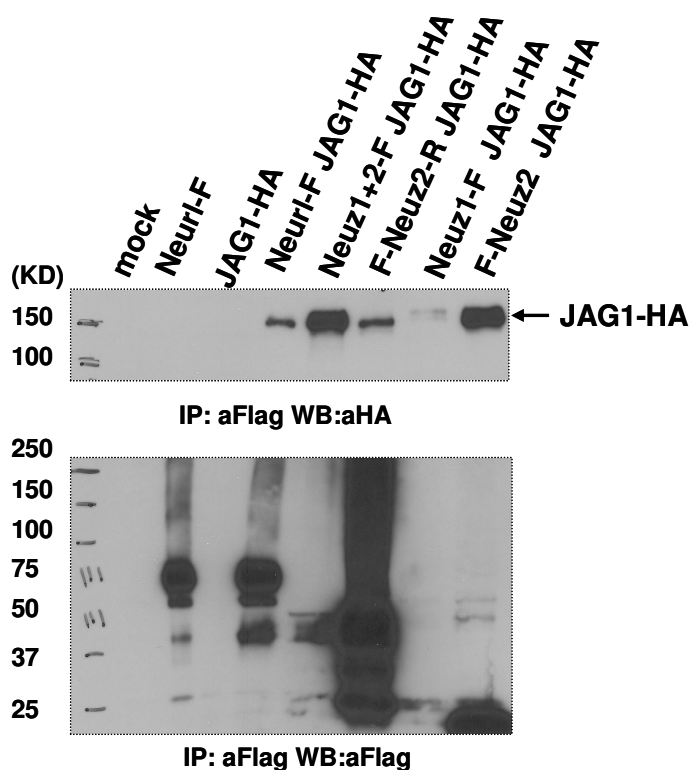


**Εικ. 33: Η πρωτεΐνη Mib1 αλληλεπιδρά σε κύτταρα HEK293 με τους δεσμευτές JAG1 και JAG2.**

Κύτταρα που εκφράζουν σταθερά την πρωτεΐνη Mib1 (F-Mib1) διαμολύνθηκαν παροδικά με κατασκευές που εκφράζουν τους δεσμευτές JAG1-HA και JAG2-HA. Η ανοσοκατακρήμιση πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται για το Neur1. Το κυτταρικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε για ανοσοκατακρήμιση τόσο με αντίσωμα a-Flag όσο και a-HA συζευγμένα στα κατάλληλα σφαιρίδια και τα δείγματα εκλούστηκαν από τα σφαιρίδια με τη χρήση αντίστοιχων πεπτιδίων. Μετά την έκλουση τα δείγματα αναλύθηκαν με αποτύπωση western. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών σε ολικό κυτταρικό εκχύλισμα δεν ήταν δυνατή.



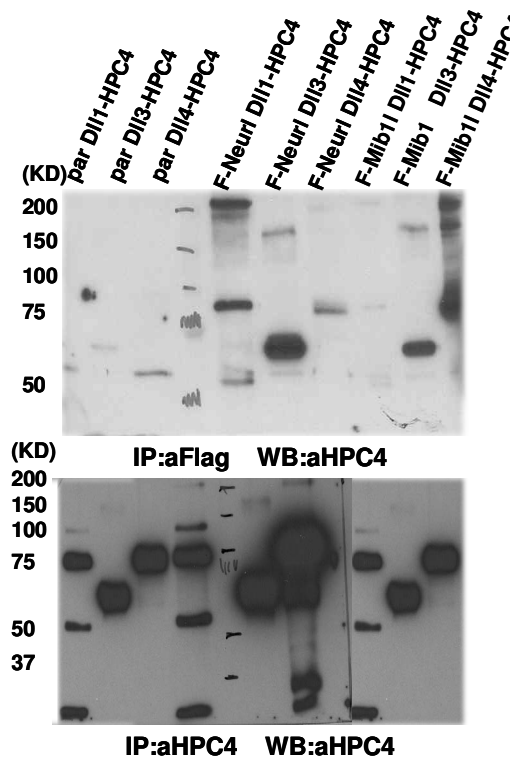
Η λεπτομερής ανάλυση της αλληλεπίδρασης της ενδοκυττάριας περιοχής του JAG1 με περιοχές της πρωτεΐνης Neu1 σε κύτταρα εντόμων έδειξε ότι η περιοχή Neu2 είναι πιθανό απαραίτητη για αυτή την αλληλεπίδραση *in vitro* (Εικ. 19). Για να επιβεβαιώσουμε αυτή την παρατήρηση και να χαρτογραφήσουμε την αλληλεπίδραση του δεσμευτή JAG1 με περιοχές του Neu1 *in vivo*, διαμολύναμε παροδικά κύτταρα HEK293T με τον δεσμευτή JAG1-HA και καθεμία από τις κατασκευές Neu1-F, Neu1+2-F, F-Neu2 και F-Neu2-R. Μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα aFlag και ανάλυση Western με αντίσωμα aHA, παρατηρήσαμε ότι πράγματι η περιοχή Neu2 είναι ικανή και αναγκαία για την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης Neu1 με το δεσμευτή JAG1 *in vivo*, αφού η πιο ισχυρή αλληλεπίδραση παρατηρείται με τις κατασκευές F-Neu2 και Neu1+2-F, παρά το γεγονός ότι τα επίπεδα έκφρασης της δεύτερης είναι πολύ χαμηλά (Εικ. 34).



**Εικ. 34:** Η πρωτεΐνη Neu1 αλληλεπιδρά ισχυρά με το δεσμευτή JAG1, μέσω της περιοχής Neu2 σε κύτταρα HEK293. Κύτταρα HEK293T διαμολύνθηκαν παροδικά με κατασκευές που εκφράζουν το δεσμευτή JAG1-HA και διαφορετικά τμήματα της πρωτεΐνης Neu1 (Neu1+2-F, F-Neu2-R, Neu1-F και F-Neu2). Το κυτταρικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε για ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα a-Flag και τα δείγματα εκλούστηκαν από τα σφαιρίδια με τη χρήση Flag πεπτιδίου. Μετά την έκλυση τα δείγματα αναλύθηκαν με αποτύπωση Western με αντίσωμα aHA και aFlag.

**Η πρωτεΐνη Neur1 αλληλεπιδρά ισχυρότερα με το Dll1, ενώ το Mib1 με το Dll4.**

Αφού παρατήρησαμε ότι και οι δύο πρωτεΐνες Neur1 και Mib1 αλληλεπιδρούν σε κύτταρα με τους δεσμευτές JAG1 και JAG2, επαναλάβαμε την ίδια διαδικασία με τους δεσμευτές Dll1, Dll3 και Dll4 του ποντικού. Όπως και στην περίπτωση των δεσμευτών JAG1 και JAG2, ανοσοκατακρήμιση με τους δεσμευτές Dll1-HPC4, Dll3-HPC4, Dll4-HPC4 και ανάλυση Western με αντίσωμα aFlag δεν μας οδήγησε σε ανίχνευση των πρωτεϊνών Neur1 και Mib1. Η ανοσοκατακρήμιση με αντίσωμα aFlag και στη συνέχεια ανάλυση Western με αντίσωμα aHPC4 για τους δεσμευτές, έδωσε ισχυρό σήμα του Dll1 όταν ανοσοκατακρημνίσαμε με Neur1 και ισχυρό σήμα για το Dll4 όταν ανοσοκατακρημνίσαμε με Mib1, παρά το γεγονός ότι και οι τρεις δεσμευτές εκφράζονταν σε συγκρίσιμα επίπεδα μετά την παροδική διαμόλυνση (Εικ. 35). Ο δεσμευτής Dll3 φαίνεται να αλληλεπιδρά και με τις δύο πρωτεΐνες Neur1 και Mib1 στα κύτταρα.

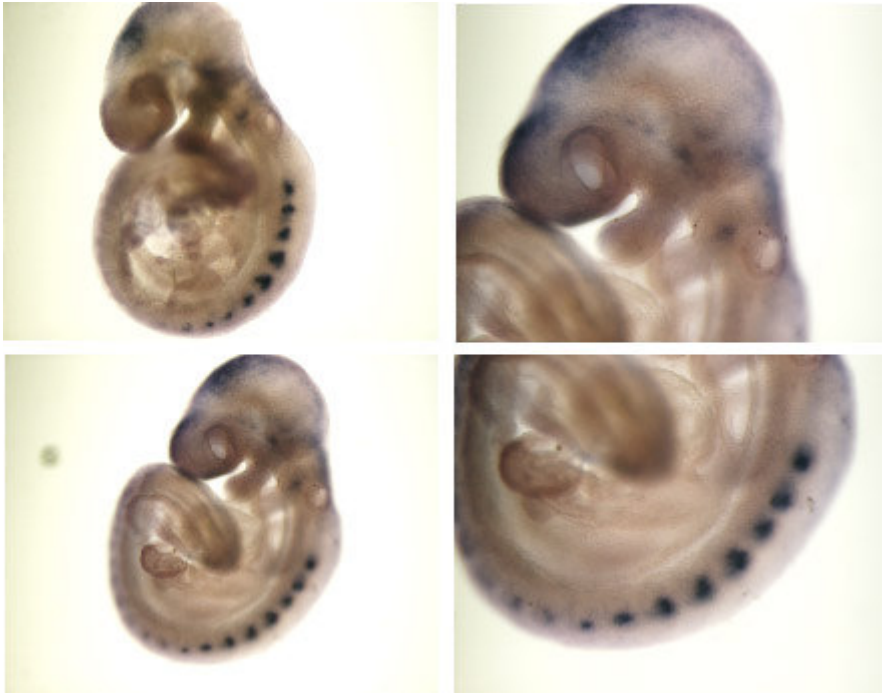


**Εικ. 35: Η πρωτεΐνη Neur1 αλληλεπιδρά ισχυρά με το δεσμευτή Dll1, ενώ η πρωτεΐνη Mib1 με το δεσμευτή Dll4 σε κύτταρα HEK293.** Κύτταρα που εκφράζουν σταθερά την πρωτεΐνη Neur1 (F-Neur1) ή την Mib1 (F-Mib1) διαμολύνθηκαν παροδικά με κατασκευές που εκφράζουν τους δεσμευτές Dll1-HPC4, Dll3-HPC4 και Dll4-HPC4. Η ανοσοκατακρήμιση πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται στις εικόνες 11 και 12. Το κυτταρικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε για ανοσοκατακρήμιση τόσο με αντίσωμα a-Flag όσο και a-HPC4 συζευγμένα στα κατάλληλα σφαιρίδια και τα δείγματα εκλούσθηκαν από τα σφαιρίδια με τη χρήση αντίστοιχων πεπτιδίων ή κατάλληλων συνθηκών. Μετά την έκλυση τα δείγματα αναλύθηκαν με αποτύπωση western. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών σε ολικό κυτταρικό εκχύλισμα δεν ήταν δυνατή.

## **Συγκριτική ανάλυση του προτύπου έκφρασης του γονιδίου *Neur1* και *Mib1* με τους δεσμευτές του N σε αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης του ποντικού**

Το πρότυπο έκφρασης διαφορετικών γονιδίων μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες για τη συμμετοχή τους σε κοινές αναπτυξιακές διαδικασίες. Ανάλυση του προτύπου έκφρασης του *Neur1* σε τομές εμβρύου ποντικού διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων E12.5-E15.5 έδειξε ότι το *Neur1* εκφράζεται σε πληθώρα ιστών και πιθανό συμμετέχει σε πολλαπλές αναπτυξιακές διαδικασίες (Pavlopoulos et al, 2002). Σε προηγούμενη ανάλυσή μας (Ευαγγελία Κουτέλου, Μεταπτυχιακή Εργασία 2001), είχαμε προσπαθήσει να συγκρίνουμε το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *Neur1* με αυτό των δεσμευτών του N *Dll1*, *Dll4*, *JAG1* και *JAG2* σε τομές εμβρύων ποντικού αυτών των αναπτυξιακών σταδίων (E12.5-15.5), και η έκφραση των γονιδίων σε πολλούς διαφορετικούς ιστούς μας έδωσε ενδείξεις για πιθανή κοινή λειτουργία του *Neur1* με καθένα από τους παραπάνω δεσμευτές, χωρίς ωστόσο να εστιάσουμε σε κάποια συγκεκριμένη αναπτυξιακή διαδικασία. Αποφασίσαμε να επαναλάβουμε τη μελέτη του προτύπου έκφρασης του *Neur1* σε έμβρυα ποντικού αρχικότερων αναπτυξιακών σταδίων και να το συγκρίνουμε με την έκφραση του γονιδίου *Mib1* καθώς και με τους δεσμευτές του N για να ελέγξουμε αν υπάρχουν αναπτυξιακά πρότυπα στα οποία να μπορούμε να εντοπίσουμε συμμετοχή κάποιου δεσμευτή με συγκεκριμένη E3 λιγάση.

Πραγματοποιήσαμε ανάλυση του προτύπου έκφρασης του γονιδίου *Neur1* σε εμβρυικό στάδιο E9, χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικούς ανιχνευτές και παρατηρήσαμε ότι ανιχνεύεται κυρίως στους σωμαίτες, αλλά εμφανίζει επιφανειακή έκφραση και στον προσθεγέφαλο και μεσεγέφαλο εμβρύου του ίδιου σταδίου (Εικ. 36). Αντίθετα το *Mib1* του ποντικού παρουσιάζει ευρύ πρότυπο έκφρασης σε έμβρυο σταδίου E9 και πιο συγκεκριμένα εκφράζεται στην περιοχή του κεφαλιού, στην ουρά, στα αναπτυσσόμενα άκρα και στους σωμαίτες (Εικ. 37,39).



**Εικ. 36: Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου Neu1 του ποντικού σε έμβryo σταδίου E9.** Η έκφραση του γονιδίου φαίνεται να είναι πολύ έντονη στους διαφοροποιημένους σωμίτες, ενώ είναι επιφανειακή σε περιοχές του προσθγκεφάλου και του μεσεγκεφάλου.

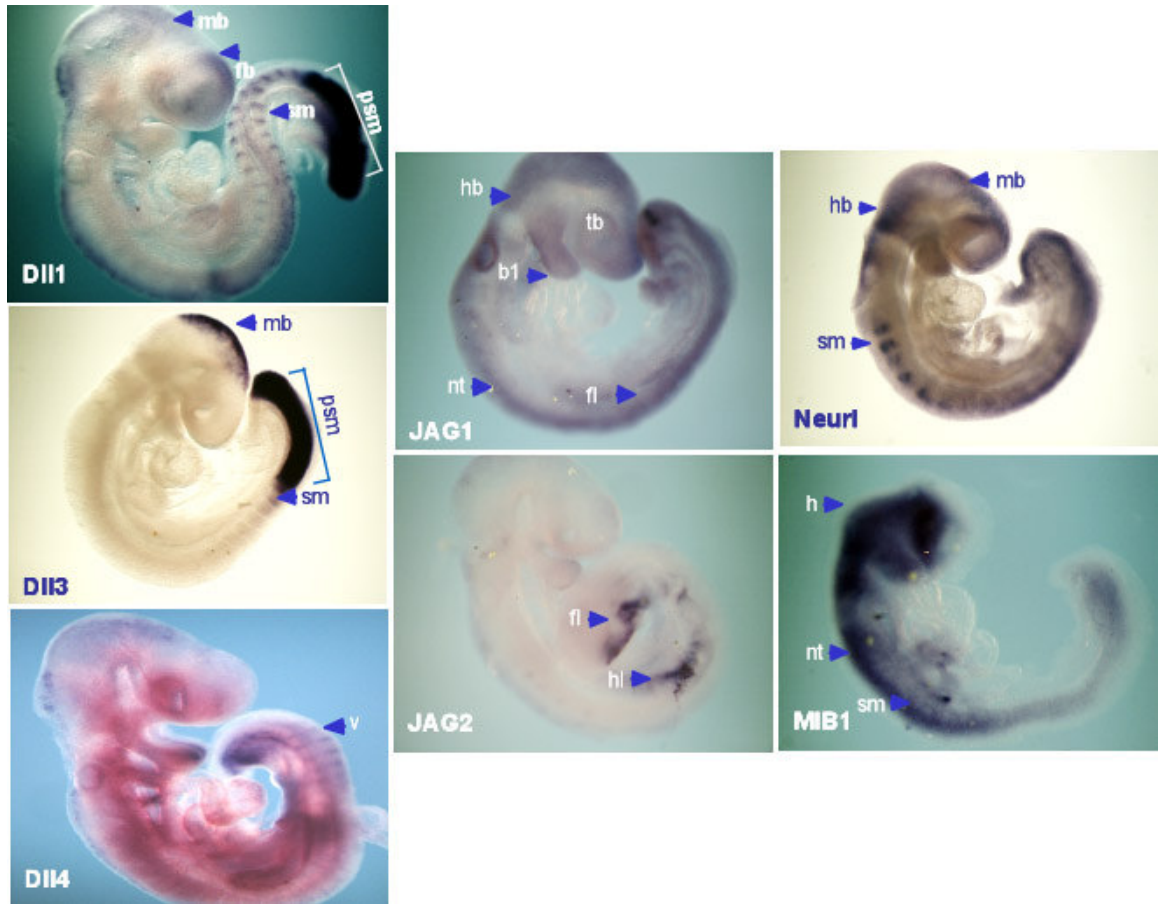
Υβριδοποίηση με ανιχνευτές για τους πέντε δεσμευτές του N στα αντίστοιχα αναπτυξιακά στάδια (E9-9.5) μας έδειξε σημαντική επικάλυψη με το γονίδιο Mib1, ενώ αντίθετα μικρή συσχέτιση με το γονίδιο Neu1 του ποντικού. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήσαμε ότι το JAG1 εκφράζεται στο πρώτο και δεύτερο βραγχιακό τόξο, στον μεσεγκέφαλο και τον οπισθγκεφαλο, στον νευρικό σωλήνα, στα πρόσθια άκρα και στο μεσέγχυμα της ουράς. Χαμηλά επίπεδα έκφρασης του JAG1 παρατηρούνται στην οπίσθια περιοχή του νεοσχηματιζόμενου σωμίτη (Εικ 37,38).

Το JAG2 εκφράζεται στο επιφανειακό εκτόδερμα του πρώτου βραγχιακών τόξου και των άκρων κατά μήκος του (AER Apical Ectodermal Ridge) σε έμβρυο σταδίου E9, ενώ σε στάδιο E10 επεκτείνεται στο εκτόδερμα των τριών βραγχιακών τόξων και αργότερα στο πλευρικό και μεσαίο εκτόδερμα ρινικών διαδικασιών (Εικ. 37,39).

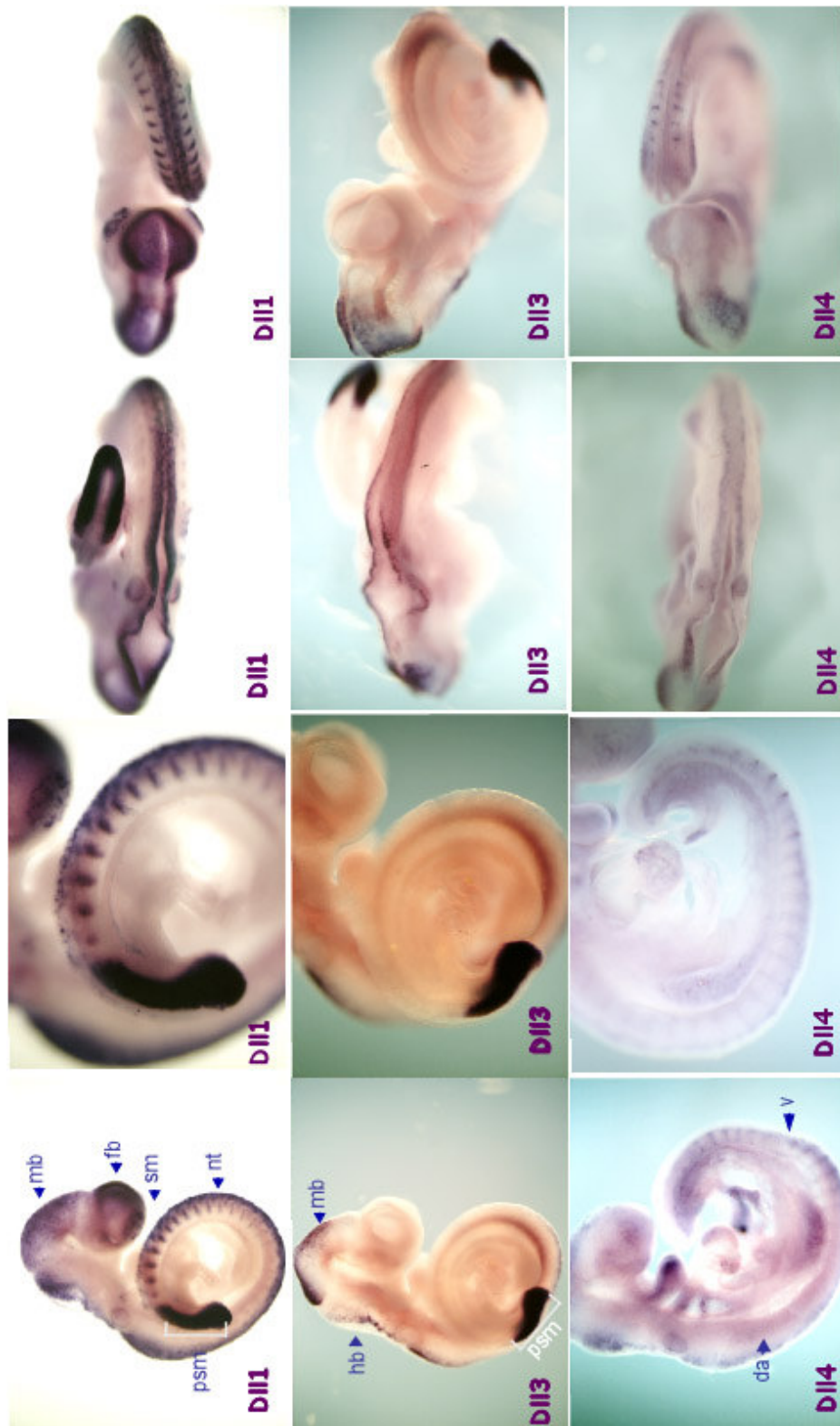
Το Dll1 στα πρώιμα εμβρυικά στάδια εμφανίζεται σε έντονες λωρίδες μόλις αρχίζουν να σχηματίζονται οι πρώτοι σωμαίτες και συγκεκριμένα εκφράζεται στο πρόσθιο μεσόδερμα. Στο στάδιο 9.5 εντοπίζεται στο οπίσθιο μισό όλων των σχηματιζόμενων σωματιών, ενώ σταδιακά περιορίζεται στους πιο οπίσθιους σωμαίτες και τελικά ανιχνεύεται μόνο στην άκρη της ουράς στο στάδιο E12. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα η έκφραση του Dll1 στο στάδιο E9 εντοπίζεται στον προσθεγκέφαλο και μεσεγκέφαλο και λίγο αργότερα στο νευροεκτόδερμα του οπισθεγκέφαλου και σε διασκορπισμένα κύτταρα του επιφανειακού εκτοδέρματος στο κεφάλι. Έντονη έκφραση παρατηρείται και κατά μήκος του νευρικού σωλήνα με εξαίρεση τον οπίσθιο νευρικό πόρο. Χαρακτηριστικό είναι το «λεπτόκοκκο» πρότυπο (fine-grained pattern) έκφρασης του Dll1 στο νευροεκτόδερμα, με κύτταρα που εμφανίζουν έντονη έκφραση και κύτταρα που δεν εκφράζουν καθόλου Dll1. Επιπλέον έκφραση παρατηρείται σε οπτικά και ακουστικά κυστίδια, σε εκτοδερμικά κύτταρα της οσφρητικής περιοχής και σε πλακόδια πάνω από τα αναπτυσσόμενα κρανιακά γάγγλια VIII-X. Οι κύριες περιοχές έκφρασης του Dll1 κατά τα πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης είναι το προ-σωματικό μεσόδερμα και το νευροεκτόδερμα (Εικ. 37,38).

Το Dll3 εκφράζεται στο στάδιο E9 κυρίως στο προ-σωματικό μεσόδερμα, όπως παρατηρείται και για το Dll1, αλλά περιορίζεται μόνο στον πιο νεο-σχηματιζόμενο σωμαίτη και χάνεται στο αμέσως επόμενο στάδιο ωρίμανσης. Η έκφραση είναι εντονότερη στο προ-σωματικό μεσόδερμα, πιο χαμηλή στον πρώτο σωμαίτη που είναι στη διαδικασία σχηματισμού και στον πιο νεο-σχηματισμένο σωμαίτη παρατηρούνται μόνο πολύ χαμηλά επίπεδα στο πρόσθιο όριο. Αυτό το πρότυπο έκφρασης διατηρείται σε όλη τη διάρκεια της σωματογένεσης, υποδηλώνοντας ότι το Dll3 παίζει ρόλο μόνο στο αρχικό στάδιο της σωματογένεσης που αφορά τη διαμόρφωση του μεσοδέρματος και τα πρώτα στάδια σχηματισμού των σωματιών, αλλά όχι την περαιτέρω διαφοροποίησή τους. Όσον αφορά το κεντρικό νευρικό σύστημα, υψηλά επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται αρχικά στον μεσεγκέφαλο και στη συνέχεια επεκτείνονται στον οπισθεγκέφαλο και σε περιοχές

του νευρικού σωλήνα (Εικ. 37,38). Τέλος, το Dll4 σε έμβryo σταδίου E9 εκφράζεται στην ραχιαία αορτή και στα αγγεία μεταξύ των σωματιών, αποτελώντας το μοναδικό από τους πέντε δεσμευτές του N που φαίνεται να παίζει ρόλο σε ενδοθηλιακά κύτταρα του αγγειακού συστήματος (Εικ. 37,38).



**Εικ. 37 :** Σύγκριση του προτύπου έκφρασης των των δεσμευτών του N με τα γονίδια *Neurl* και *Mib1* μετά από υβριδοποίηση *in situ* σε έμβρυα ποντικού σταδίου E9. Παρατηρείται έντονη έκφραση των δεσμευτών Dll1 και Dll3 στο προ-σωμιακό μεσόδερμα (psm) και στους νεοσχηματιζόμενους σωματίες, ενώ αντίθετα η έκφραση του Dll4 στην αντίστοιχη περιοχή περιορίζεται στα αγγεία ανάμεσα στους σωματίες (v). Το γονίδιο JAG1 εκφράζεται κυρίως στο νευρικό σωλήνα και στα αναπτυσσόμενα άκρα, ενώ η έκφραση του JAG2 είναι πολύ έντονη στην κορυφαία εκτοδερμική ακρολοφία του πρόσθιου και οπίσθιου άκρου. Η έκφραση του *Neurl* είναι χαρακτηριστική στους διαφοροποιημένους σωματίες, ενώ το *Mib1* παρουσιάζει ευρύ πρότυπο έκφρασης σε ολόκληρο το έμβryo.



**Εικ. 38 :** Πρότυπο έκφρασης των γονιδίων Dll1, Dll3, και Dll4 μετά από υβριδοποίηση *in situ* σε έμβρυα ποντικού σταδίου E9.5. Το γονίδιο Dll1 εκφράζεται πιο έντονα στο προ-σωμιτικό μεσόδερμα (psm), στους σωμίτες (sm), ενώ εμφανίζει χαρακτηριστικό πρότυπο λεπτών κόκκων στο νευρικό σωλήνα(nt), στον προσθεγκέφαλο (fb) και στο μεσεγκέφαλο(mb). Το γονίδιο Dll3 εκφράζεται στο προσωμιτικό μεσόδερμα (psm), καθώς και στον μεσεγκέφαλο (mb) και οπισθεγκέφαλο (hb), ενώ το γονίδιο Dll4 εκφράζεται στα αγγεία (v) μεταξύ των σωμιτών και στην ραχιαία αορτή (da).



**Εικ. 39 :** Πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *Jag1*, *Jag2*, *Neurl* και *Mib1* μετά από υβριδοποίηση *in situ* σε έμβρυα ποντικού σταδίου E9.5. Το γονίδιο *Jag1* εκφράζεται στο πρώτο και δεύτερο βραγχιακό τόξο (b1,b2), στο νευρικό σωλήνα(nt), και στον οπισθεγέφαλο (hb), ενώ το *Jag2* εκφράζεται έντονα στο πρόσθιο και οπίσθιο άκρο (fl, hl) και στο πρώτο βραγχιακό τόξο (b1). Το γονίδιο *Neurl* εκφράζεται έντονα στους σωμίτες (sm) και επιφανειακά στον μεσεγέφαλο (mb) και οπισθεγέφαλο (hb), ενώ το γονίδιο *Mib1* εμφανίζει πολύ ευρύ πρότυπο έκφρασης τόσο στο κεφάλι όσο και στον κορμό του εμβρύου.



Το χαρακτηριστικό πρότυπο του *Neur1* στους σωμαίτες μας οδήγησε να εστιάσουμε την προσοχή μας στο ρόλο που παίζουν οι δεσμευτές του *N* στη διαδικασία της σωματογένεσης. Η έκφραση των γονιδίων *Dll1*, *Dll3*, *N1* και *RBPJk* στο προ-σωμικό μεσόδερμα ταυτίζεται με την περιοχή όπου θα σχηματιστεί το όριο μεταξύ του οπίσθιου τμήματος του πιο ώριμου αναπτυξιακά σωμαίτη και του πρόσθιου τμήματος του νεοσχηματιζόμενου σωμαίτη. Το προτεινόμενο μοντέλο για τη συμμετοχή του μονοπατιού *N* σε αυτή τη διαδικασία είναι πιθανό μέσω ενός επαγωγικού σήματος στο όριο του νεοσχηματιζόμενου σωμαίτη, το οποίο περιορίζεται τοπικά από τη ρυθμιζόμενη έκφραση του *Lunatic fringe* (del Barco Barrantes et al, 1999). Από την ανάλυσή μας είναι ωστόσο φανερό ότι το *Neur1* δεν συμμετέχει στη ρύθμιση της επαγωγικής σηματοδότησης από το *N* στη συγκεκριμένη αναπτυξιακή διαδικασία. Τόσο στη δροσόφιλα όσο και στο *Xenopus* ο ρόλος του *Neur1* είναι καθοριστικός σε διαδικασίες που ρυθμίζονται από πλευρική αναστολή ή αποφάσεις γενεαλογίας που αφορούν ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις (Lai et al, 2001, Le Borgne et al, 2003). Τα τελικά στάδια διαφοροποίησης των σωματιών, όπου παρατηρούμε την εντονότερη έκφραση του *Neur1*, είναι πιθανό ότι ρυθμίζονται μέσω πλευρικής αναστολής, αφού γονίδια υπεύθυνα για τα τελικά στάδια διαφοροποίησης, όπως η μυογενίνη, η *MyoD*, *Myf5* και *MEF2* καταστέλλονται με την ενεργοποίηση του μονοπατιού *N* (Berkes & Tapscott, 2005). Το γεγονός ωστόσο ότι η καταστροφή του γονιδίου στο ποντίκι δεν προκαλεί κανένα πρόβλημα στη διαδικασία της σωματογένεσης δείχνει ότι ο ρόλος του σε αυτή τη διαδικασία είναι πιθανό πλεονάζων.

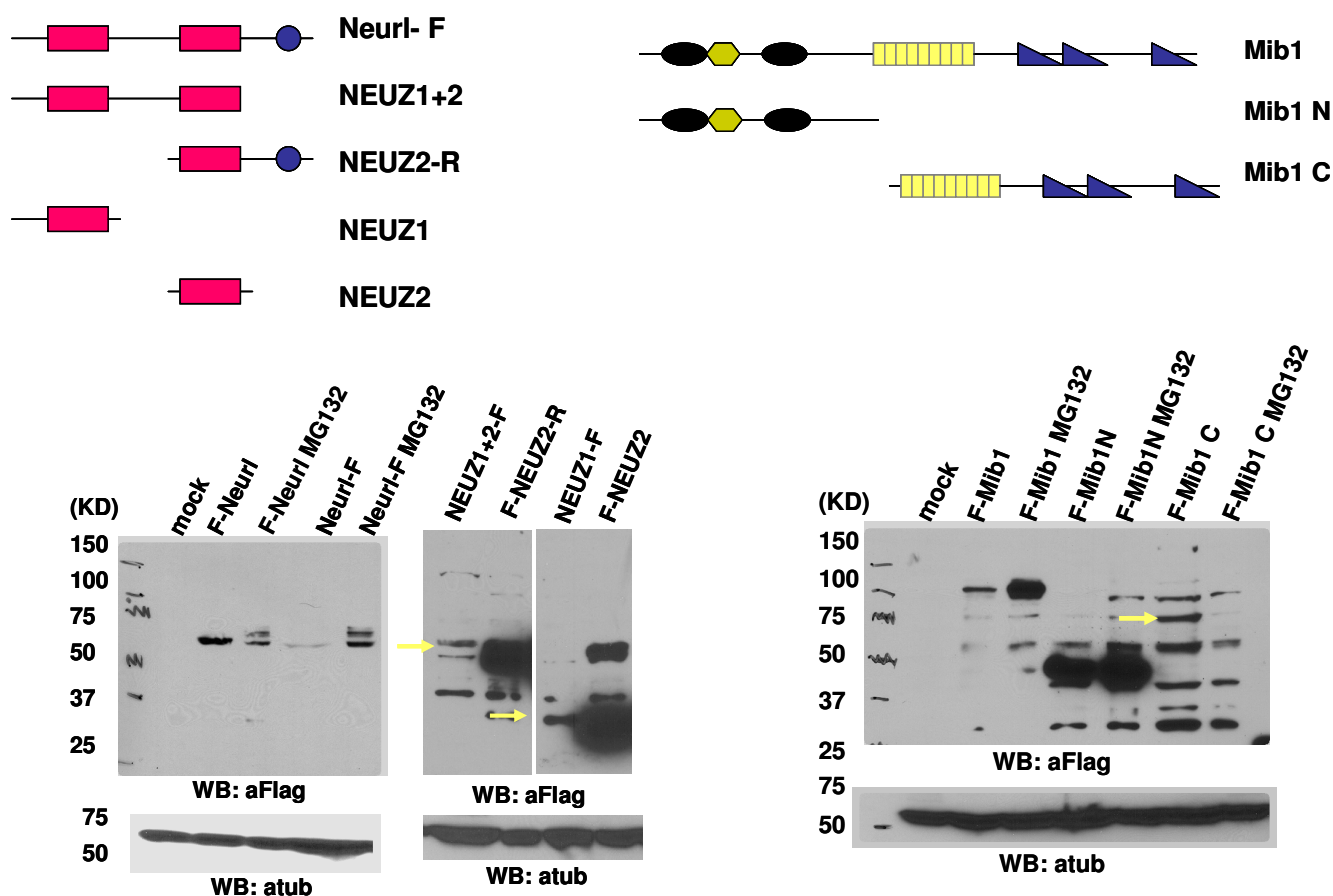
## Συσχέτιση δομής και λειτουργίας της πρωτεΐνης Neurl

**Η πρωτεΐνη Neurl είναι ασταθής ενδοκυττάρια και τα επίπεδά της αυξάνονται μετά από επεξεργασία των κυττάρων με αναστολέα του πρωτεασώματος**

Στις κυτταρικές σειρές σταθερής έκφρασης των πρωτεϊνών Neurl και Mib1 παρατηρήσαμε πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασής τους (Εικ. 22, 23). Μία επιπλέον παρατήρηση ήταν ότι η πρωτεΐνη F-Neurl εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα από την πρωτεΐνη Neurl-F και επεξεργασία των κυττάρων με 50μM του αναστολέα του πρωτεασώματος MG132 φαίνεται να προκαλεί αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης (Εικ.26). Η πρωτεΐνη Mib1 έχει ήδη αναφερθεί ότι ουβικουιτινιλιώνεται μέσα στα κύτταρα και ότι αποικοδομείται από το πρωτεάσωμα (Jin et al, 2002). Για να ελέγξουμε αντίστοιχα το ενδεχόμενο ουβικουιτινιλίωσης και αποικοδόμησης του Neurl στα κύτταρα και να διερευνήσουμε τα αίτια για τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των δύο επισημασμένων (tagged) μορφών, δημιουργήσαμε μία σειρά από πλασμιδιακές κατασκευές που εκφράζουν διαφορετικά τμήματα της πρωτεΐνης και ελέγξαμε τα επίπεδα αφθονίας σε συνδυασμό με τον υποκυτταρικό τους εντοπισμό μετά από παροδική διαμόλυνση των πλασμιδίων σε κύτταρα HEK293T.

Αρχικά ελέγξαμε τα επίπεδα έκφρασης της πλήρους μήκους πρωτεΐνης (F-Neurl ή Neurl-F) και τεσσάρων κατασκευών με διαφορετικά τμήματα της πρωτεΐνης (Neuz1+2-F, F-Neuz2-RF, Neuz1-F, και F-Neuz2). Η αποδοτικότητα της παροδικής διαμόλυνσης κανονικοποιήθηκε με δοκιμές λουσιφεράσης, σε πειράματα συνδιαμόλυνσης με το κατάλληλο πλασμίδιο αναφοράς και οι ποσότητες του ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος που αναλύθηκαν από κάθε δείγμα, ελέγχθηκαν πραγματοποιώντας ανάλυση Western με αντίσωμα ενάντια στην τουμπουλίνη. Μετά από ανάλυση των δειγμάτων με αποτύπωση Western με αντίσωμα aFlag επιβεβαιώσαμε τις προηγούμενες παρατηρήσεις μας στις κυτταρικές σειρές σταθερής έκφρασης. Πράγματι τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης F-Neurl είναι πολύ υψηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα της Neurl-F και επεξεργασία των κυττάρων με αναστολέα του πρωτεασώματος αυξάνει τα επίπεδα έκφρασής της (Εικ. 40). Πολλές E3 λιγάσες ουβικουιτίνης έχουν βρεθεί να είναι ασταθείς και η αφαίρεση της περιοχής RING έχει συνήθως αποτέλεσμα την αύξηση της πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο, όπως έχει αναφερθεί και για την ορθόλογη πρωτεΐνη στη δροσόφιλα και στο βάτραχο (Lai et al, 2001, Deblandre et al, 2001). Σε αντίθεση με τις παρατηρήσεις αυτές, η αφαίρεση της περιοχής RING από το καρβοξυτελικό άκρο του

Neurl1 (Neuz1+2-F) δεν οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο, ενώ το τμήμα της πρωτεΐνης που περιλαμβάνει την περιοχή RING (F-Neuz2-R), εκφράζεται σε πολύ υψηλά επίπεδα, ακόμα και χωρίς να έχει προηγηθεί επεξεργασία των κυττάρων με αναστολέα του πρωτεασώματος (Εικ.40). Παρατηρήσαμε επίσης μεγάλη διαφορά στα επίπεδα έκφρασης της περιοχής Neuz1, η οποία ανιχνεύεται με δυσκολία σε σύγκριση με την περιοχή Neuz2, η οποία εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα (Εικ.40). Όλες οι παραπάνω πρωτεΐνες εκφράζονται κάτω από τον ίδιο υποκινητή, αφού για όλες τις κατασκευές έχει χρησιμοποιηθεί ο ίδιος φορέας έκφρασης. Για να ελέγξουμε το σύστημα που χρησιμοποιούμε, επαναλάβαμε το ίδιο πείραμα χρησιμοποιώντας την πρωτεΐνη Mib1 πλήρους μήκους, καθώς και δύο τμήματά της (Mib1 N και Mib1C) και συγκρίναμε τα επίπεδα έκφρασής τους κάτω από ανάλογες συνθήκες (Εικ.40).



**Εικ. 40:** Η πρωτεΐνη Neurl1 είναι ασταθής μέσα στο κύτταρο και η αφαίρεση της περιοχής RING δεν αυξάνει τα επίπεδά της. Κύτταρα HEK293 διαμολύνθηκαν παροδικά με κατασκευές που εκφράζουν την πρωτεΐνη Neurl1 (F-Neurl1 ή Neurl1-F), καθώς επίσης και τμήματά της (NEUZ1+2-F, F-NEUZ2-R, NEUZ1-F, F-NEUZ2). Το κυτταρικό εκχύλισμα αναλύθηκε με αποτύπωση Western με αντίσωμα a-Flag, αφού είχε προηγηθεί κανονικοποίηση των ποσοτήτων που χρησιμοποιήθηκαν με δοκιμή λουσιφεράσης και Bradford. Τα κίτρινα βέλη δείχνουν τη ζώνη που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη με πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης. Το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε με κατασκευές που εκφράζουν την πρωτεΐνη Mib1 (F-Mib1), καθώς και τμήματά της (F-Mib1N, F-Mib1C) και τα δείγματα αναλύθηκαν με αντίστοιχο τρόπο. Για έλεγχο της ποσότητας που φορτώθηκε χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα ενάντια στην τουμπουλίνη.

Παρατηρήσαμε ότι η πρωτεΐνη Mib1 πλήρους μήκους είναι ασταθής και επεξεργασία των κυττάρων με αναστολέα του πρωτεασώματος MG132 αυξάνει σημαντικά τα επίπεδά της μέσα στο κύτταρο, όπως έχει περιγραφεί από τους Jin et al (2002). Επιπλέον αφαίρεση του καρβοξυτελικού άκρου που περιλαμβάνει τις περιοχές RING, αυξάνει σημαντικά τη σταθερότητα της πρωτεΐνης, όπως έχει περιγραφεί για πολλές E3 λιγάσες ουβικουιτίνης. Επιβεβαιώσαμε λοιπόν ότι το σύστημά μας λειτουργεί κανονικά και η ιδιαιτερότητα που παρατηρείται στο Neur1 πιθανόν οφείλεται σε κάποια ρύθμιση της πρωτεΐνης μέσα στα κύτταρα.

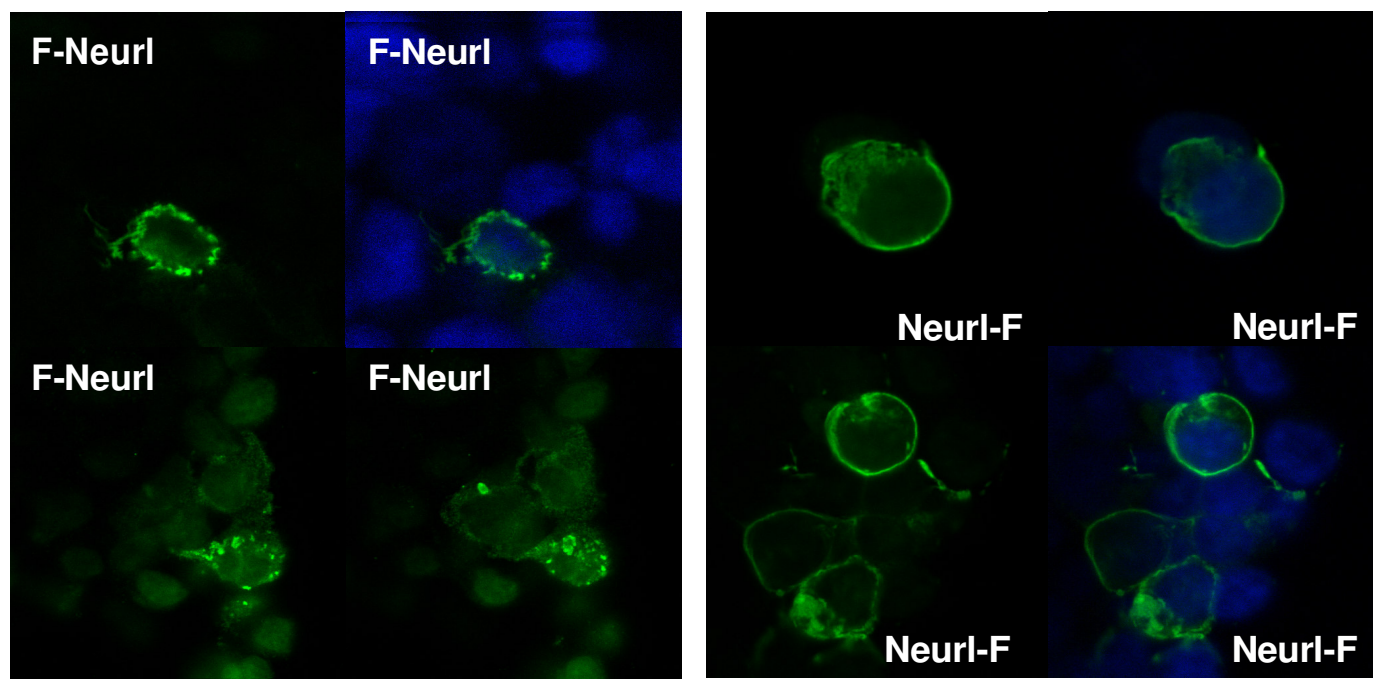
### **Η πρωτεΐνη Neur1 στοχεύεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη πιθανόν μετά από μυριστουλίωσή της**

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, θεωρήσαμε ότι το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης είναι ιδιαίτερα ασταθές και αναλύσαμε την αλληλουχία του με υπολογιστικά προγράμματα αναζητώντας πιθανά σινιάλα που να δικαιολογούν αυτή την αστάθεια. Παρατηρήσαμε ότι το δεύτερο κατάλοιπο γλυκίνης (Gly2) εμφανίζει σημαντική πιθανότητα μυριστουλίωσης (Πιν.17), γεγονός που ενισχύεται από τα αποτελέσματα της ανάλυσης φασματοσκοπίας μάζας, όπου η πρωτεΐνη Neur1 φαίνεται να αλληλεπιδρά με την N-myristoyltransferase 1, μόνο όταν το αμινοτελικό της άκρο είναι ελεύθερο. Αν η πρωτεΐνη Neur1-F, μυριστουλιώνεται και στοχεύεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, σε αντίθεση με την πρωτεΐνη F-Neur1, θα πρέπει ο υποκυτταρικός εντοπισμός των δύο μορφών της πρωτεΐνης να διαφέρει σημαντικά. Για να ελέγξουμε αυτή την πιθανότητα διαμολύνουμε παροδικά κύτταρα HEK293T με τις δύο παραπάνω κατασκευές (Neur1-F και F-Neur1) καθώς και τα τμήματα της πρωτεΐνης που αναφέρονται στην προηγούμενη παράγραφο και πραγματοποιήσαμε ανοσοανίχνευση με αντίσωμα aFlag και παρατήρηση των δειγμάτων σε συνεστιακό μικροσκόπιο.

**Πίν. 17:** Προβλεπόμενες θέσεις μυριστοϋλίωσης της πρωτεΐνης Neurl του ποντικού και των ορθόλογών της στο βάτραχο, τη δροσόφιλα και το σκουλήκι.

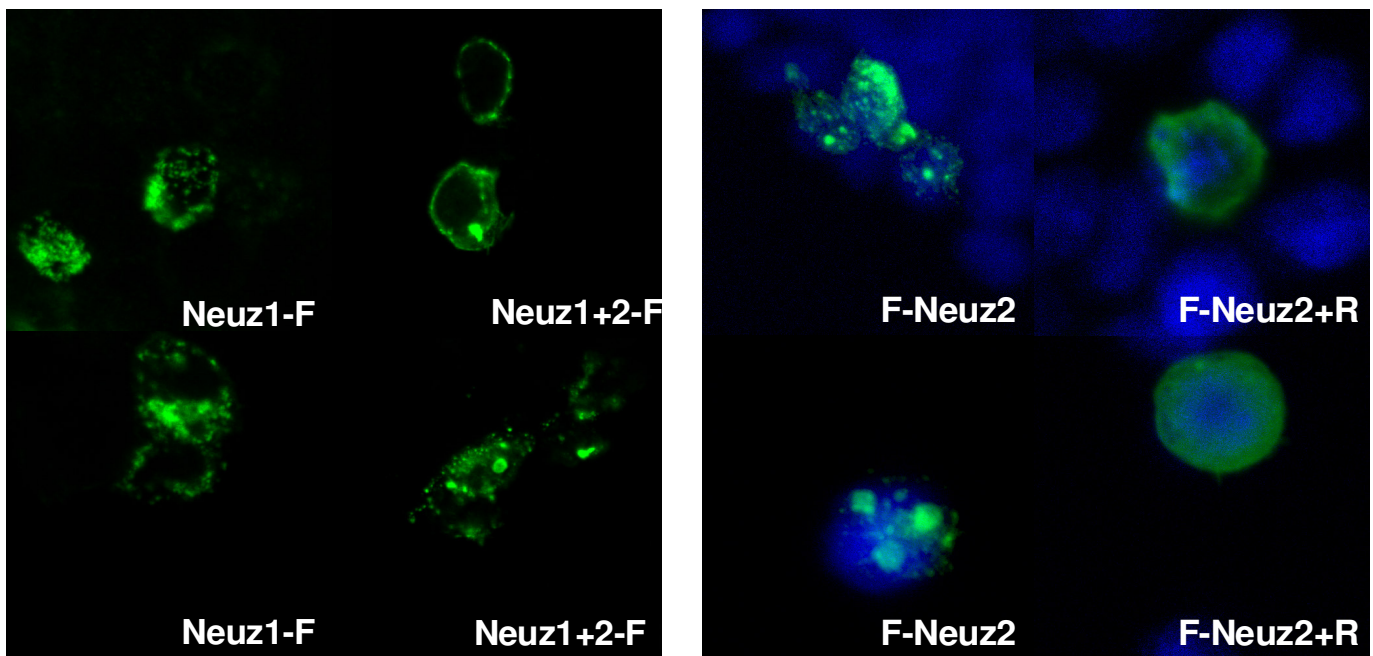
	NMT( <a href="http://mendel.imp.ac.at/sat/myristate/cgi-bin/myr_pred.cgi">http://mendel.imp.ac.at/sat/myristate/cgi-bin/myr_pred.cgi</a> )	score	Expasy( <a href="http://au.expasy.org/tools/myristoylator/">http://au.expasy.org/tools/myristoylator/</a> )	score
Neurl Mm (574aa) (Ruan et al, 2001)	MGNNFSSVSS LQRGNPSRAS RGHPQNLKDS	2.348 RELIABLE	<b>myristoylated</b>	<b>0.989</b> (High Confidence)
Neurl Mm (557aa) (Vollrath et al, 2001)	MGGQITRNTI HDSIGGSFPV PSHRCHHKQK	1.124 RELIABLE	<b>non-myristoylated</b>	<b>-0.769</b>
Neurl XI (555aa)	MGGQITRH TL YDSIGGTFPS SSHRCHHKQK	-1.375 'TWILIGHT ZONE'	<b>non-myristoylated</b>	<b>-0.919</b>
Neur Dm (754aa)	MGLSDIPANY MQGSHPHLTL HPQQQH HQNQ	'NO'	<b>non-myristoylated</b>	<b>-0.985</b>
Neur Ce (634aa)	MGNENSRTYK DMVNNFGMQI DDETRDI INQ	-1.537 'TWILIGHT ZONE'	<b>myristoylated</b>	<b>0.967</b>

Όπως φαίνεται καθαρά, η πρωτεΐνη Neurl-F στοχεύεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, ενώ η πρωτεΐνη F-Neurl εντοπίζεται μέσα στο κυτταρόπλασμα σε στικτές δομές (Εικ. 41), επιβεβαιώνοντας την πρόβλεψή μας.



**Εικ. 41:** Η πρωτεΐνη Neurl στοχεύεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη πιθανόν μέσω μυριστοϋλίωσης. Ανοσοανίχνευση με αντίσωμα αFlag σε κύτταρα HEK293 T μετά από παροδική διαμόλυνση με τις κατασκευές Neurl-F ή F-Neurl. Το πράσινο χρώμα αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη Neurl, ενώ με χρώση DAPI (μπλε) ανιχνεύονται οι πυρήνες. Είναι εμφανής ο εντοπισμός της πρωτεΐνης Neurl-F στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, ενώ η πρωτεΐνη F-Neurl ανιχνεύεται μόνο στο κυτταροπλάσμα, σε στικτές δομές συχνά γύρω από τον πυρήνα.

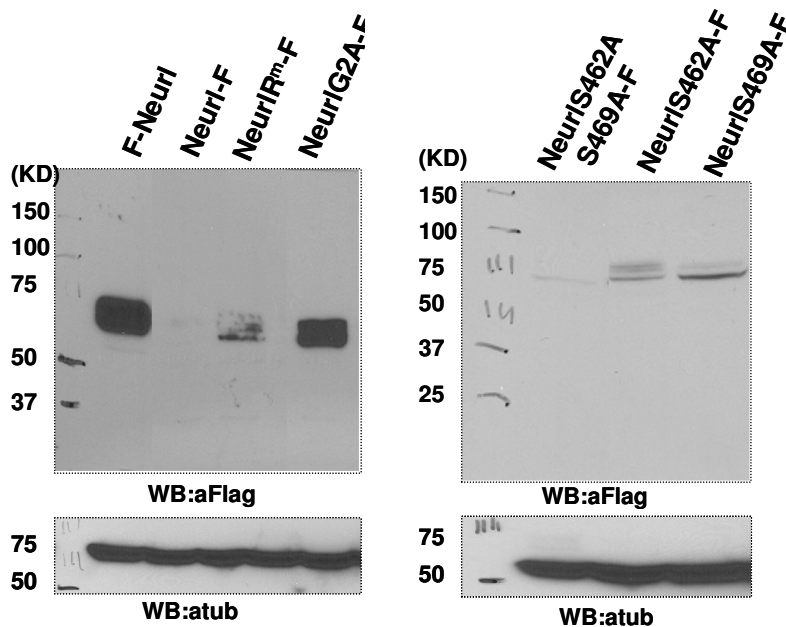
Η αντίστοιχη ανάλυση των διαφορετικών τμημάτων της πρωτεΐνης έδωσε πιο πολύπλοκο πρότυπο υποκυτταρικού εντοπισμού, αφού τα τμήματα Neuz1-F, και Neuz1+2-F, εντοπίζονται μόνο μερικώς στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, ενώ τα τμήματα F-Neuz2-R και F-Neuz2 ανιχνεύονται στο κυτταρόπλασμα, υποδηλώνοντας ότι η πιθανή μυριστοϋλίωση της πρωτεΐνης είναι αναγκαία αλλά όχι ικανή για την στόχευση στη μεμβράνη (Εικ.42).



**Εικ. 42: Διαφορετικά τμήματα της πρωτεΐνης Neuz1 εμφανίζουν διαφορετικό υποκυτταρικό εντοπισμό.** Ανοσοανίχνευση με αντίσωμα aFlag σε κύτταρα HEK293 T μετά από παροδική διαμόλυνση με τις κατασκευές Neuz1-F, Neuz1+2-F, F-Neuz2, F-Neuz2-R. Το πράσινο χρώμα αντιστοιχεί στα τμήματα της πρωτεΐνης Neuz1, ενώ με χρώση DAPI (μπλε) ανιχνεύονται οι πυρήνες. Το πιθανό σήμα μυριστοϋλίωσης που βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο των τμημάτων Neuz1-F και Neuz1+2-F δεν είναι ικανό για στόχευση στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η περιοχή F-Neuz2 φαίνεται να συσσωρεύεται σε έντονες στικτές δομές μέσα στο κυτταρόπλασμα, ενώ η περιοχή F-Neuz2-R είναι περισσότερο διάχυτη μέσα στο κύτταρο.

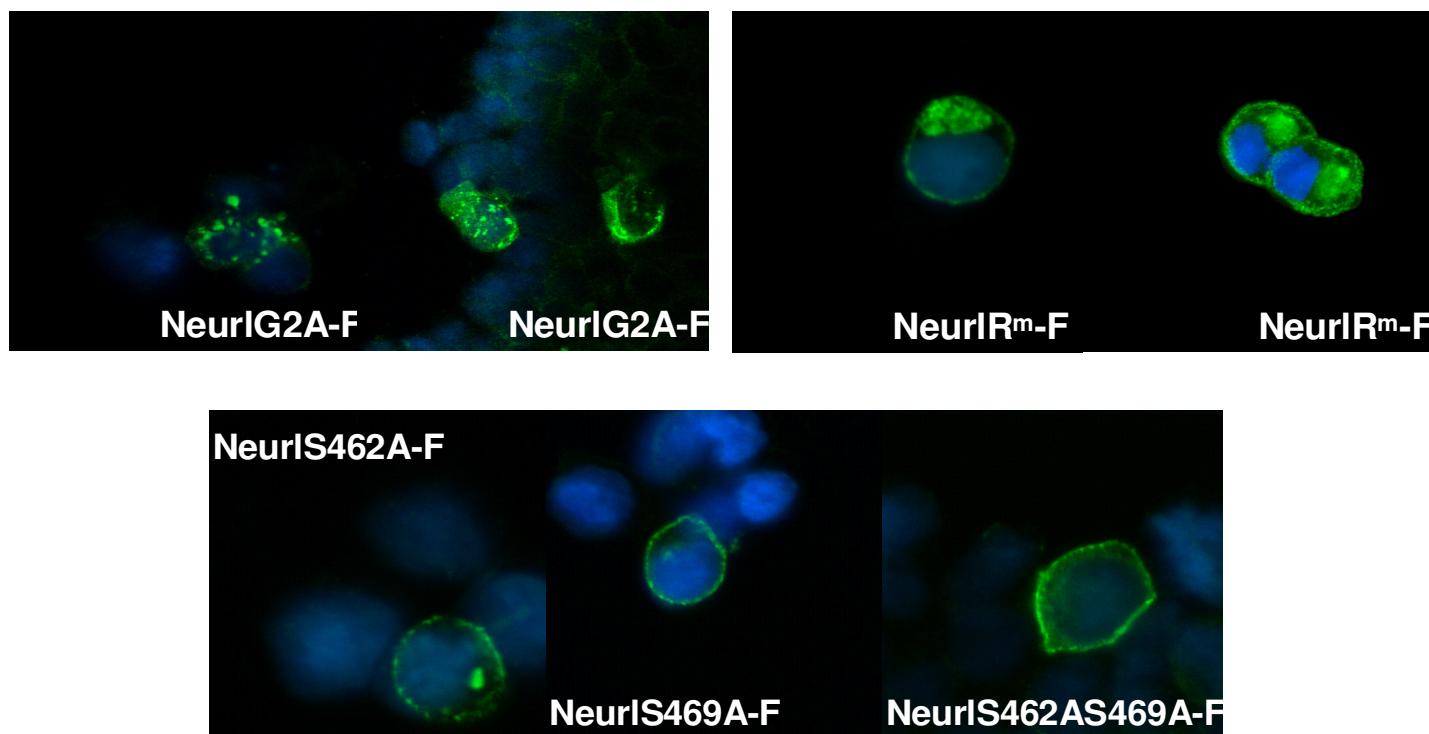
**Η στόχευση της πρωτεΐνης Neur1 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη εμποδίζεται από σημειακή μετάλλαξη του κατάλοιπου γλυκίνης (Gly2) σε αλανίνη, και συνεπάγεται αύξηση τη σταθερότητά της μέσα στο κύτταρο.**

Για να ελέγξουμε το ρόλο της πιθανής μυριστοϋλίωσης στον υποκυτταρικό εντοπισμό και τη σταθερότητα της πρωτεΐνης, σχεδιάσαμε μία σειρά από σημειακές μεταλλάξεις, τις οποίες εισάγαμε στην πρωτεΐνη με κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση (βλ. Υλικά και μέθοδοι). Μεταλλάξαμε την γλυκίνη (Gly2), που προβλέπεται να μυριστοϋλιώνεται σε αλανίνη, ώστε να μην επιτρέπεται αυτή η τροποποίηση. Επιπλέον μεταλλάξαμε τα δύο κατάλοιπα σερίνης (Ser462, Ser469) σε αλανίνη, γιατί σε αρκετές περιπτώσεις η φωσφορυλίωση έχει βρεθεί να δρα ανταγωνιστικά με την μυριστοϋλίωση, επάγοντας την απομάκρυνση της μυριστοϋλιωμένης πρωτεΐνης από την μεμβράνη (Resh, 1999). Επιπλέον μεταλλάξαμε και τα κατάλοιπα κυστεΐνης (Cys521, Cys524) της περιοχής RING, τα οποία γνωρίζουμε από τις δοκιμές ουβικουιτινίωσης *in vitro* ότι αναστέλλουν τη δράση της πρωτεΐνης σαν E3 λιγάση ουβικουιτίνης για να ελέγξουμε αν αυτή η δράση σχετίζεται με τη σταθερότητα της πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο. Πραγματοποιήσαμε παροδική διαμόλυνση κυττάρων HEK293T με όλες τις παραπάνω κατασκευές και αναλύσαμε το κυτταρικό εκχύλισμα με αποτύπωση Western για να ελέγξουμε την σταθερότητα των μεταλλαγμένων μορφών, καθώς επίσης και τον υποκυτταρικό τους εντοπισμό με ανοσοανίχνευση.



**Εικ. 43 : Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Neur1 στο κύτταρο επηρεάζονται από τη δομική ακεραιότητα της περιοχής RING και από τη στόχευσή της στην μεμβράνη. .** Κύτταρα HEK293 διαμολύνθηκαν παροδικά με κατασκευές που εκφράζουν την πρωτεΐνη Neur1 (F-Neur1 ή Neur1-F), καθώς επίσης και σημειακές μεταλλαγές της πρωτεΐνης στην περιοχή RING (Neur1R<sup>m</sup>-F), στην πιθανή θέση μυριστοϋλίωσης (Neur1 G2A-F), και στις θέσεις φωσφορυλίωσης (Neur1S462A-F, Neur1S469-F, Neur1S462AS469A-F). Το κυτταρικό εκχύλισμα αναλύθηκε όπως και σε προηγούμενο πείραμα. Για έλεγχο της ποσότητας που φορτώθηκε χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα ενάντια στην τουμπουλίνη.

Επιβεβαιώσαμε ότι η πρωτεΐνη F- Neur1 εκφράζεται σε πολύ υψηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με την Neur1 – F και η μετάλλαξη των συντηρημένων καταλοίπων κυστεΐνης στην περιοχή RING αυξάνει μερικώς τα επίπεδα της πρωτεΐνης. Αντίθετα δραματική αύξηση της αφθονίας της πρωτεΐνης παρατηρούμε όταν έχουμε μεταλλάξει την Gly2 που πιθανώς μυριστοϋλιώνεται, παρά το γεγονός ότι η περιοχή RING παραμένει πλήρως λειτουργική. Οι σημειακές μεταλλάξεις στα κατάλοιπα σερίνης που βρέθηκαν φωσφορυλιωμένα επηρεάζουν αμυδρά τα επίπεδα της πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο (Εικ. 43). Ο υποκυτταρικός εντοπισμός των αντίστοιχων πρωτεϊνών επιβεβαιώνει την πρόβλεψη μας για στόχευση της πρωτεΐνης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη λόγω πιθανής μυριστοϋλίωσης, αφού η μεταλλαγμένη μορφή Neur1G2A-F εντοπίζεται σε κυστιδιακές μορφές μέσα στο κύτταροπλασμα. Η μεταλλαγμένη μορφή στην περιοχή RING εντοπίζεται στην κυτταρική επιφάνεια, αλλά σχηματίζει και συσσωματώματα μέσα στο κυτταρόπλασμα, ενώ οι μεταλλαγμένες μορφές σε κατάλοιπα σερίνης δεν εμφανίζουν πολύ διαφορετικό υποκυτταρικό εντοπισμό από την πρωτεΐνη αγρίου τύπου (Εικ. 44).

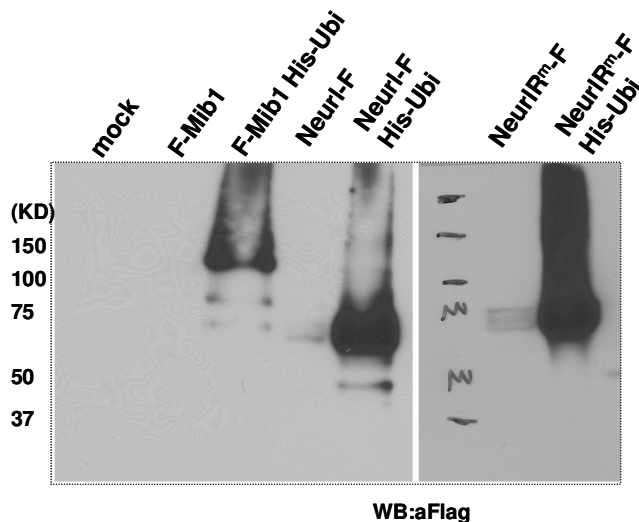


**Εικ. 44:** Διαφορετικές σημειακές μεταλλάξεις της πρωτεΐνης Neur1 επηρεάζουν τον υποκυτταρικό της εντοπισμό. Ανοσοανίχνευση με αντίσωμα aFlag σε κύτταρα HEK293 T μετά από παροδική διαμόλυνση με τις κατασκευές Neur1 G2A-F, Neur1R<sup>m</sup> – F και Neur1S462A-F, Neur1S469-F, Neur1S462AS469A-F. Η σημειακή μετάλλαξη της G2 εμποδίζει τη στόχευση της πρωτεΐνης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, ενώ μεταλλάξεις στην περιοχή RING προκαλούν συσσώρευση της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα. Μεταλλάξεις στις σερίνες που φωσφορυλιώνονται δεν επηρεάζουν σημαντικά τον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης.



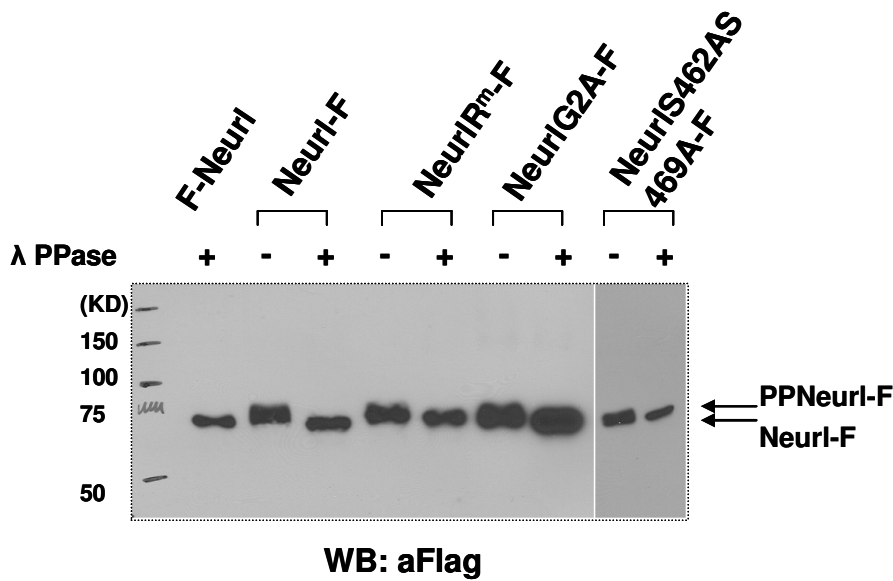
**Η πρωτεΐνη Neur1 είναι φωσφορυλιωμένη και ουβικουτινιλιωμένη μέσα στα κύτταρα, ενώ η ουβικουτινίωσή της δεν εξαρτάται από την ενεργότητα της περιοχής RING.**

Για να ελέγξουμε αν τα χαμηλά επίπεδα της πρωτεΐνης Neur1 μέσα στο κύτταρο οφείλονται στην ουβικουτινίωσή της και τη στόχευσή της στο πρωτεάσωμα αποφασίσαμε να ελέγξουμε αν η πρωτεΐνη αγρίου τύπου και οι μεταλλαγμένες μορφές της είναι ουβικουτινιλιωμένες. Για αυτό το σκοπό εκτελέσαμε πείραμα παροδικής συνδιαμόλυνσης κυττάρων HEK293T με τις αντίστοιχες κατασκευές και με πλασμίδιο His-Xpress-Ubi. Μετά από 48 ώρες συλλέξαμε τα κύτταρα και τα λύσαμε σε ισχυρά αποδιατακτικές συνθήκες (8M Guanidine-HCl). Στη συνέχεια απομονώσαμε τις ουβικουτινιλιωμένες πρωτεΐνες με κολώνα νικελίου. Εκλούσαμε τις πρωτεΐνες και αναλύσαμε τα δείγματα με αποτύπωση Western με αντίσωμα aFlag. Παρατηρήσαμε ότι τόσο η πρωτεΐνη αγρίου τύπου όσο και η πρωτεΐνη με μεταλλαγές στην περιοχή RING είναι ουβικουτινιλιωμένες, γεγονός που φανερώνει ότι κάποιος άλλος παράγοντας μέσα στο κύτταρο ρυθμίζει την ουβικουτινίωση του Neur1 (Εικ. 45).



**Εικ. 45 : Η πρωτεΐνη Neur1 είναι ουβικουτινιλιωμένη μέσα στα κύτταρα, αλλά η ουβικουτινίωσή της δεν εξαρτάται μόνο από τη δομική ακεραιότητα της περιοχής RING.** Κύτταρα HEK293 T διαμολύνθηκαν παροδικά με τις κατασκευές Neur1-F και Neur1R<sup>m</sup>-F παρουσία ή απουσία His-Ubi και μετά από λύση σε αυστηρά αποδιατακτικές συνθήκες απομονώθηκαν οι αντίστοιχες ουβικουτινιλιωμένες πρωτεΐνες με κολώνα νικελίου. Τα δείγματα αναλύθηκαν με αποτύπωση Western με αντίσωμα a-Flag. Η πρωτεΐνη F-Mib1 χρησιμοποιήθηκε για θετικό έλεγχο

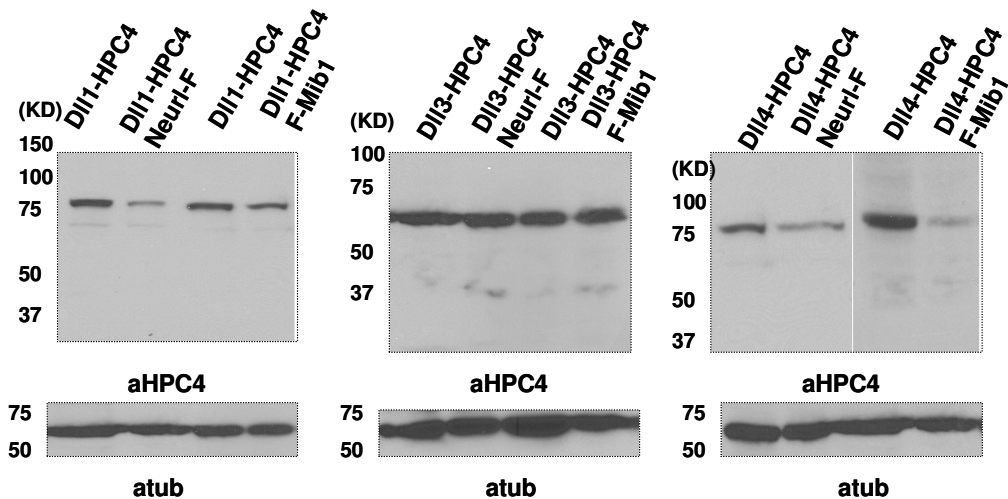
Επιπλέον για να ελέγξουμε την πιθανή φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης μέσα στα κύτταρα επώασαμε την αγρίου τύπου πρωτεΐνη και τις μεταλλαγμένες μορφές της που είχαμε απομονώσει με ανοσοκατακρήμιση από κύτταρα HEK293T με φωσφατάση και ελέγξαμε την αλλαγή στο μοριακό βάρος με αποτύπωση western με αντίσωμα a-Flag. Πράγματι παρατηρήσαμε ότι τόσο η αγρίου τύπου όσο και οι μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο είναι φωσφορυλιωμένες, αφού επώαση με φωσφατάση προκαλεί μείωση του μοριακού βάρους (Εικ. 46). Το γεγονός ότι ακόμα και για την πρωτεΐνη στην οποία έχουμε μεταλλάξει και τα δύο κατάλοιπα σερίνης 462 και 469 σε αλανίνη, παρατηρείται μετατόπιση του μοριακού της βάρους, δείχνει ότι υπάρχουν επιπλέον κατάλοιπα στην αμινοξική αλληλουχία, τα οποία φωσφορυλιώνονται. Με τα παραπάνω πειράματα αποκτήσαμε τις πρώτες ενδείξεις για μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του Neur1 μέσα στο κύτταρο.



**Εικ. 46 : Η πρωτεΐνη Neur1 είναι φωσφορυλιωμένη στα κύτταρα.** Κύτταρα HEK293 T διαμολύνθηκαν παροδικά με τις αντίστοιχες κατασκευές (F-Neur1, Neur1-F, Neur1 G2A-F, Neur1<sup>m</sup>-F, Neur1S462AS469A-F), το κυτταρικό εκχύλισμα συλλέχθηκε και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες απομονώθηκαν με ανοσοκατακρήμιση με αντίσωμα a-Flag. Μετά από επώαση των πρωτεϊνών με φωσφατάση ( $\lambda$  PPase) ακολούθησε αποτύπωση Western με αντίσωμα a-Flag. Παρατηρήθηκε μετατόπιση στο μοριακό βάρος για όλες τις πρωτεΐνες που αναλύθηκαν δίνοντας ενδείξεις για φωσφορυλίωσή τους μέσα στο κύτταρο.

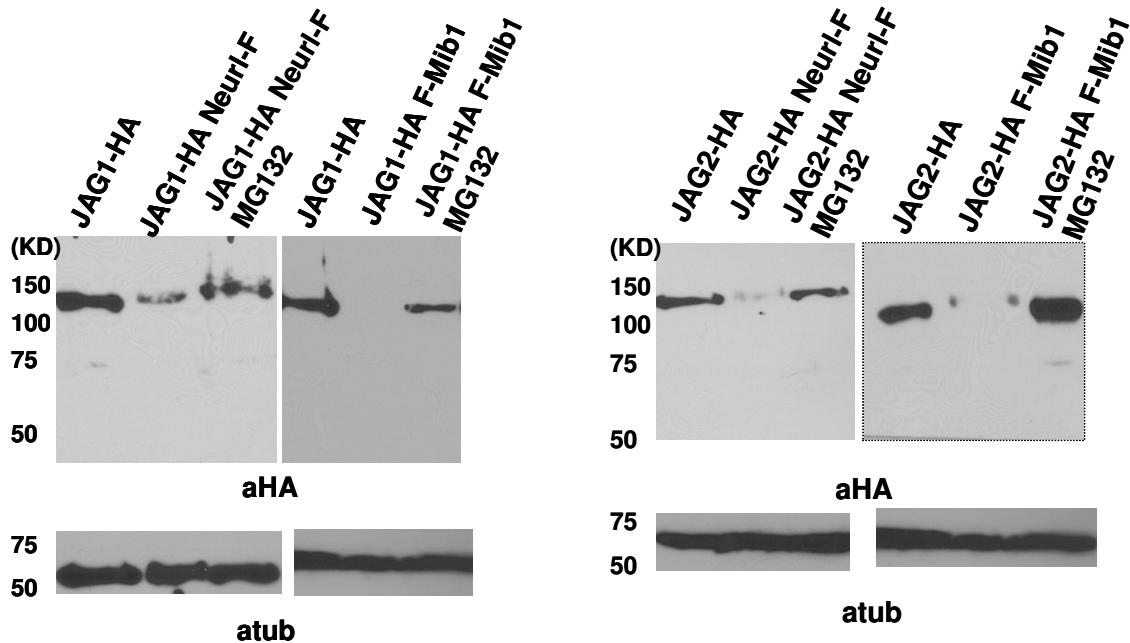
**Υπερέκφραση των E3 λιγασών ουβικουιτίνης Neur1 και Mib1 με τους δεσμευτές Dll1, Dll4, JAG1 και JAG2 σε κύτταρα HEK293 T επάγει την αποικοδόμησή τους.**

Αναλύοντας τις σειρές κυττάρων L που δημιουργήσαμε με σταθερή έκφραση της πρωτεΐνης Neur1 συνδυαστικά με καθένα από τους δεσμευτές του N, παρατηρήσαμε ότι τα επίπεδα έκφρασης των δεσμευτών Dll1, Dll4, JAG1 και JAG2 ήταν τόσο χαμηλά που δεν μπορούσαμε να ανιχνεύσουμε τις πρωτεΐνες ούτε μετά από ανοσοκατακρήμνιση. Επεξεργασία των κυττάρων με αναστολέα του πρωτεασώματος MG132 προκάλεσε σημαντική αύξηση στα επίπεδα των δεσμευτών JAG1 και JAG2, αλλά όχι στους Dll1, Dll4. Για να επιβεβαιώσουμε τα παραπάνω αποτελέσματα και να ελέγξουμε τη δράση τόσο του Neur1 όσο και του Mib1 στην επαγωγή της αποικοδόμησης των δεσμευτών, διαμολύναμε παροδικά κύτταρα HEK293T με καθένα από τους δεσμευτές παρουσία ή απουσία της αντίστοιχης E3 λιγασής ουβικουιτίνης. Το κυτταρικό εκχύλισμα αναλύθηκε στη συνέχεια με αντισώματα aHPC4 και aHA που αναγνωρίζουν τους αντίστοιχους δεσμευτές.



**Εικ. 47 :** Οι E3 λιγασές ουβικουιτίνης Neur1 και Mib1 επάγουν την αποικοδόμηση των δεσμευτών Dll1, Dll4, αλλά όχι του Dll3. Κύτταρα HEK293 T διαμολύνθηκαν παροδικά με τους δεσμευτές Dll1, Dll3 και Dll4 απουσία ή παρουσία των E3 λιγασών ουβικουιτίνης. Το κυτταρικό εκχύλισμα αναλύθηκε με αποτύπωση Western με αντίσωμα aHPC4, αφού είχε προηγηθεί κανονικοποίηση των δειγμάτων με δοκιμή λουσιφεράσης και Bradford. Για έλεγχο της ποσότητας που φορτώθηκε χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα ενάντια στην τουμπουλίνη.

Μετά από κανονικοποίηση των δειγμάτων που αναλύθηκαν παρατηρήσαμε ότι η υπερέκφραση των δύο λιγασών ουβικουιτίνης επάγει την αποικοδόμηση των δεσμευτών Dll1, Dll4, JAG1 και JAG2, αλλά δεν επηρεάζει τα επίπεδα του δεσμευτή Dll3, επιβεβαιώνοντας τις αρχικές παρατηρήσεις μας για τη δράση του *Neur1* στις κυτταρικές σειρές σταθερής έκφρασης (Εικ.47, 48). Επεξεργασία των κυττάρων που εκφράζουν τους δεσμευτές JAG1 και JAG2 και *Neur1* ή *Mib1* με αναστολέα του πρωτεασώματος MG132 είχε σαν αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση των επιπέδων των αντίστοιχων δεσμευτών στο κύτταρο, δίνοντας ενδείξεις για συμμετοχή του μονοπατιού του πρωτεασώματος στην αποικοδόμησή τους (Εικ. 48). Παρά λοιπόν το γεγονός ότι το *Neur1* μπορεί να μονο-ουβικουιτινιώνει άμεσα μόνο το δεσμευτή JAG1, ενδέχεται ενδοκυττάρια να συμβάλλει στην αποικοδόμηση όλων των δεσμευτών του N που φέρουν στην ενδοκυττάρια περιοχής τους κατάλοιπα λυσίνης σαν δέκτες ουβικουιτίνης. Ανάλογη παρατήρηση είχε γίνει και για το ορθόλογο μόριο *Xneur* του βατράχου, το οποίο είχε την ικανότητα *in vitro* να μονο-ουβικουιτινιώνει το δεσμευτή *XDelta1* του βατράχου, αλλά όχι την ορθόλογη πρωτεΐνη *D1* της δροσόφιλα. Εκτοπική υπερέκφρασή του στο δίσκο του φτερού προκαλούσε σημαντική επαγωγή στην ενδοκύττωση και αποικοδόμηση της πρωτεΐνης *D1* της δροσόφιλα (Deblandre, et al., 2001)



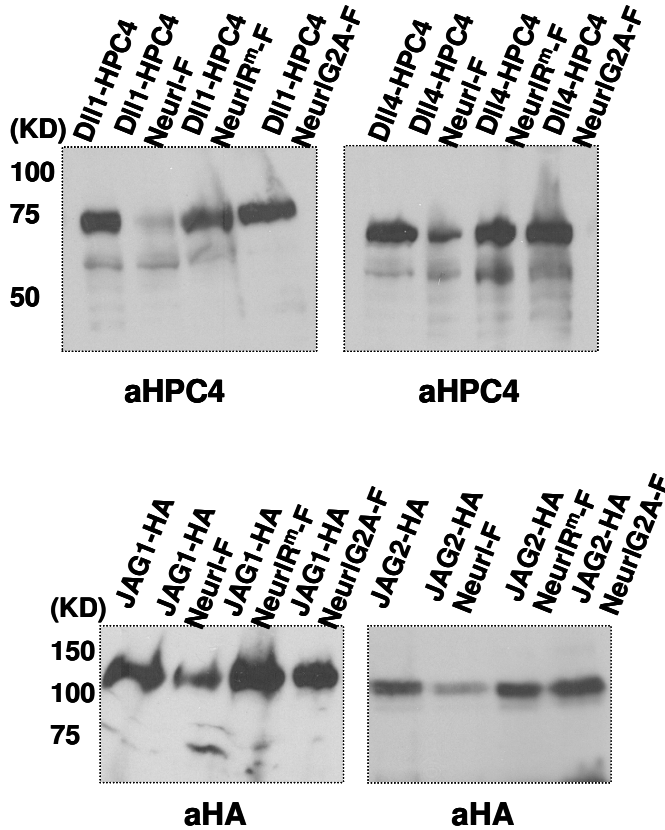
**Εικ. 48: Οι E3 λιγάσες ουβικουιτίνης Neur1 και Mib1 επάγουν την αποικοδόμηση των δεσμευτών Jag1 και Jag2.** Κύτταρα HEK293 T διαμολύνθηκαν παροδικά με τους δεσμευτές JAG1 και JAG2 απουσία ή παρουσία των E3 λιγασών ουβικουιτίνης. Το κυτταρικό εκχύλισμα αναλύθηκε με αποτύπωση Western με αντίσωμα αHA, αφού είχε προηγηθεί κανονικοποίηση των δειγμάτων με δοκιμή λουσιφεράσης και εκτίμηση της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης με Bradford. Για έλεγχο της ποσότητας που φορτώθηκε χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα ενάντια στην τουμπουλίνη.

Η αποικοδόμηση λοιπόν των δεσμευτών του N από τις δύο E3 λιγάσες ουβικουιτίνης είναι πιθανό να ελέγχεται από ένα γενικότερο μηχανισμό που δεν απαιτεί άμεση αλληλεπίδραση ή τροποποίηση των δεσμευτών από τις αντίστοιχες λιγάσες, αλλά η ουβικουιτινιλίωσή τους φαίνεται να είναι απαραίτητη. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα έχει η ταυτοποίηση των καταλοίπων που ουβικουιτινιλιώνονται και η μετάλλαξή τους σε αργινίνη, γεγονός που θα επιτρέψει την κατανόηση του ρόλου της ουβικουιτινιλίωσης στην αποικοδόμησή τους, αλλά πιθανό και στην ενεργότητά τους.

**Υπερέκφραση των μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης Neur1 αναστέλλει την επαγωγή της αποικοδόμησης των δεσμευτών Dll1, Dll4, JAG1 και JAG2**

Οι μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης Neur1 στην πιθανή θέση μυριστουλίωσης (Neur1 G2A-F) και στην περιοχή RING (Neur1<sup>m</sup> - F) μας έδωσαν σημαντικές πληροφορίες για πιθανή ρύθμιση της ενεργότητας της πρωτεΐνης ως E3 λιγάση ουβικουιτίνης σε συνδυασμό με τον υποκυτταρικό της εντοπισμό. Για να ελέγξουμε αν η στόχευση της πρωτεΐνης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη είναι απαραίτητη για την επαγωγή της αποικοδόμησης των διαμεμβρανικών δεσμευτών του N, χρησιμοποιήσαμε τη μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης Neur1G2A-F σε πείραμα παροδικής διαμόλυνσης, σε σύγκριση με την αγρίου τύπου και ελέγξαμε τα επίπεδα έκφρασης των δεσμευτών Dll1, Dll4, JAG1 και JAG2. Επιπλέον χρησιμοποιήσαμε και τη μορφή με τις μεταλλαγές στην περιοχή RING (Neur1<sup>m</sup> - F) για να ελέγξουμε αν η ενεργότητα E3 λιγάσης είναι απαραίτητη για την αποικοδόμηση των δεσμευτών. Με μεγάλο ενδιαφέρον παρατηρήσαμε ότι και οι δύο μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης Neur1 επηρεάζουν σημαντικά την ικανότητά της να επάγει την αποικοδόμηση των δεσμευτών (Εικ. 49), γεγονός που φανερώνει ότι η πρωτεΐνη είναι απαραίτητο να στοχευθεί στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και να αλληλεπιδράσει με τοπικούς

παράγοντες για να επάγει την αποικοδόμηση των δεσμευτών. Παρά το γεγονός ότι οι δεσμευτές Dll1, Dll4, Jag2 δεν αποτελούν υποστρώματα της πρωτεΐνης, η λειτουργία της περιοχής RING είναι απαραίτητη για τη ρύθμισή τους μέσα στο κύτταρο.



**Εικ. 49:** Οι μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης Neuro1, Neuro1 G2A-F και Neuro1R<sup>m</sup>-F εμποδίζουν την αποικοδόμηση των δεσμευτών Dll1, Dll4, Jag1 και Jag2. Κύτταρα HEK293 T διαμολύνθηκαν παροδικά με τους δεσμευτές Dll1, Dll4, Jag1 και Jag2 και κατασκευές των αντίστοιχων μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης Neuro1. Το κυτταρικό εκχύλισμα αναλύθηκε με αποτύπωση Western με αντίσωμα aHPC4 και aHA για τους αντίστοιχους δεσμευτές, αφού είχε προηγηθεί κανονικοποίηση των δειγμάτων με δοκιμή λουσιφεράσης και Bradford.

Τα παραπάνω αποτελέσματα ενισχύουν την άποψη για διπλό ρόλο της πρωτεΐνης Neurl στη ρύθμιση του μονοπατιού N. Φαίνεται ότι αφενός έχει την ικανότητα να τροποποιεί συγκεκριμένα μόνο το δεσμευτή Jag1 με συνέπειες που έχει πολύ ενδιαφέρον να διερευνηθούν. Επιπλέον όμως, εμφανίζει μια δράση στην κυτταροπλασματική μεμβράνη που χρειάζεται την ενεργότητα της περιοχής RING, αλλά όχι και την άμεση αλληλεπίδρασή της με διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως είναι οι δεσμευτές του N, για να επάγει πιθανό την ενδοκύττωση και την αποικοδόμησή τους. Η επιλογή κατάλληλων συστημάτων που θα εστιάζονται ειδικά στην κατανόηση της λειτουργίας του Neurl σε κάθε μία από αυτές τις διαδικασίες θα δώσει σημαντικές απαντήσεις τόσο για τη ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού N, όσο και για το μηχανισμό που στοχεύει διαμεμβρανικές πρωτεΐνες σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα και ρυθμίζει την ενεργοποίηση ή αναστολή της δράσης τους.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το σηματοδοτικό μονοπάτι N θεωρείται από τα πιο άμεσα στην μεταγωγή του σήματος, αφού ο ίδιος υποδοχέας μετά την πρωτεόλυσή του μετατοπίζεται στον πυρήνα και δρα σαν μεταγραφικός συνεργοποιητής ρυθμίζοντας την έκφραση ποικίλων γονιδίων στόχων. Αυτή η αμεσότητα στη μεταγωγή του σήματος είχε αρχικά συνδεθεί με περιορισμένες δυνατότητες ρύθμισης του τελικού αποτελέσματος, κάτι που σήμερα γνωρίζουμε ότι δεν ισχύει. Πλήθωρα πρωτεϊνών έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί για την ικανότητά τους να ρυθμίζουν σε πολλαπλά επίπεδα τόσο τον υποδοχέα N όσο και τους δεσμευτές του, ενώ ένας καθοριστικός μηχανισμός ρύθμισης φαίνεται να είναι η απομάκρυνσή τους από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και η αποικοδόμησή τους, μέσω της συντονισμένης δράσης ποικίλων πρωτεϊνών. Η αναγκαιότητα αυστηρής ρύθμισης της ποσότητας του δεσμευτή και του υποδοχέα που φτάνει στην κυτταροπλασματική μεμβράνη είχε τονιστεί σε πολλές αναπτυξιακές διαδικασίες (Artavanis-Tsakonas et al., 1999) και η πρόβλεψη δραστηρικής ρύθμισης του σήματος από



παράγοντες που επηρεάζουν την ωρίμανση, μετακίνηση ή αποικοδόμηση του υποδοχέα και του δεσμευτή επαληθεύεται πλήρως.

Δύο πρωτεΐνες που φαίνεται να παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση των δεσμευτών Delta και Serrate είναι οι E3 λιγάσες ουβικουιτίνης Neur και Mib. Η ανάλυση της λειτουργίας των πρωτεϊνών αυτών στη δροσόφιλα και στα σπονδυλωτά (βάτραχοκαι ψάρι), έδωσε σημαντικές ενδείξεις για τον καθοριστικό ρόλο της ουβικουιτινιλίωσης στη ρύθμιση της ενδοκύττωσης και αποικοδόμησης των δεσμευτών. Η προσπάθεια κατανόησης αυτών των γεγονότων σε μεγαλύτερη λεπτομέρεια φανερώνει την πολυπλοκότητα του μηχανισμού ρύθμισης της σηματοδότησης N στο χρόνο και στο χώρο. Παρά το γεγονός ότι η λειτουργία της πρωτεΐνης Mib1 του ποντικού φαίνεται να ρυθμίζει τη σηματοδότηση N, η συμμετοχή της πρωτεΐνης Neur1 σε αντίστοιχες διαδικασίες δεν έχει αποσαφηνιστεί. Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής καταφέραμε να αποδείξουμε τη δράση του Neur1 του ποντικού σαν E3 λιγάσης ουβικουιτίνης *in vitro* και να ταυτοποιήσουμε το δεσμευτή Jagged1 σαν άμεσο υπόστρωμά του, ενώ παράλληλα δείξαμε την δυνατότητα του Neur1 να επάγει την αποικοδόμηση των δεσμευτών Jagged1, 2 και Dll1, Dll4 μετά από ταυτόχρονη υπερέκφρασή τους σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν τις πρώτες ενδείξεις συμμετοχής της πρωτεΐνης Neur1 στη ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού N των θηλαστικών.

Με τη χρήση των κυτταρικών σειρών που παράχθηκαν καταφέραμε να αποκτήσουμε σημαντικές πληροφορίες για τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης Neur1 μέσα στα κύτταρα και το ρόλο που αυτές μπορεί να παίζουν στη σηματοδότηση N. Η ανάλυση του προτύπου έκφρασης των δύο E3 λιγασών ουβικουιτίνης σε σύγκριση με τους πέντε δεσμευτές των θηλαστικών εξηγεί την αναγκαιότητα της δράσης του Mib1 στα πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης και την πλεονάζουσα δράση του Neur1. Τέλος η ανάλυση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με τη χρήση φασματοσκοπίας μάζας δεν μας βοήθησε να ταυτοποιήσουμε πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μονοπάτι N, αλλά οδήγησε στην επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης του Neur1 με πρωτεΐνες που είχαν προκύψει με το σύστημα δύο υβριδίων του σακχαρομύκητα (Διδακτορική Διατριβή Κοκκινάκη 2005), καθώς και στην ταυτοποίηση νέων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που υποδηλώνουν τη συμμετοχή του Neur1 σε

πολλαπλές κυτταρικές διαδικασίες, όπως ακριβώς έχει τονιστεί από το εργαστήριό μας και σε προηγούμενες μελέτες (Διδακτορική Διατριβή Κοκκινάκη 2005).

## **Ταυτοποίηση πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά το Neu1 μετά από ανάλυση φασματοσκοπίας μάζας.**

### **A. Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις**

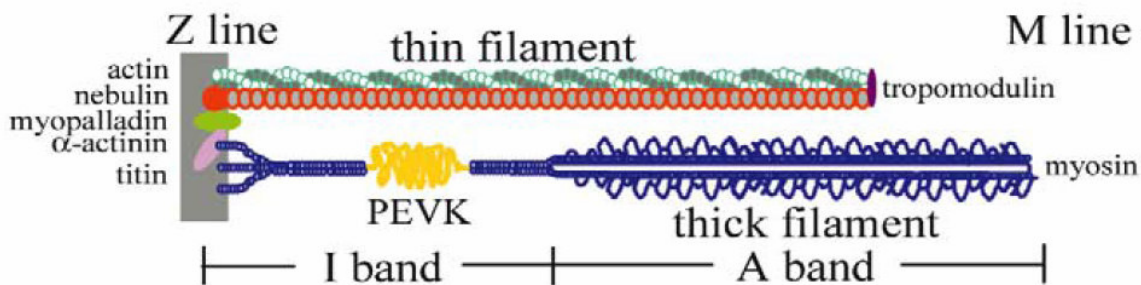
Ένας από τους στόχους που τέθηκε για την κατανόηση της λειτουργίας της πρωτεΐνης Neu1 του ποντικού ήταν η διερεύνηση συμμετοχής του στο σηματοδοτικό μονοπάτι N, όπως χαρακτηριστικά παρατηρείται για τις ορθόλογες πρωτεΐνες της δροσόφιλα και του βατράχου. Η πρώτη προσπάθεια ταυτοποίησης πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με το Neu1 με τη χρήση του συστήματος δύο υβριδίων του σακχαρομήκτυα (Κοκκινάκη Διδακτορική Διατριβή 2005) έδωσε σημαντικές πληροφορίες για ποικίλες πρωτεΐνες μέσα στο κύτταρο, καμία από αυτές δεν σχετίζεται όμως άμεσα με το μονοπάτι N. Αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε την τεχνολογία πολυδιάστατης ταυτοποίησης πρωτεϊνών (MudPIT), η οποία δίνει τη δυνατότητα χαρακτηρισμού πρωτεϊνικών συμπλόκων αμέσως μετά την απομόνωσή τους από το κυτταρικό εκχύλισμα. Παρά το γεγονός ότι χρησιμοποιήσαμε δύο διαφορετικές κυτταρικές σειρές για την απομόνωση των πρωτεϊνικών συμπλόκων, δεν καταφέραμε να ταυτοποιήσουμε ούτε με αυτή τη μέθοδο αλληλεπιδράσεις του Neu1 με μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού N. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στο ότι δεν επιλέξαμε τις κατάλληλες κυτταρικές σειρές που να εκφράζουν τους βασικούς πρωταγωνιστές του μονοπατιού N, είτε στο γεγονός ότι οι αλληλεπιδράσεις του Neu1 με συστατικά του μονοπατιού N στα θηλαστικά είναι ασθενείς ή ρυθμιζόμενες.

Η πρωτεΐνη που φαίνεται να αλληλεπιδρά εντονότερα με το Neu1 σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν είναι η NuMA1 (Nuclear mitotic apparatus protein 1), ενώ σε μικρότερο ποσοστό ταυτοποιήθηκε και η πρωτεΐνη laminin, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της Κοκκινάκη για τις αντίστοιχες πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνη NuMA1 λειτουργεί στα αρχικά στάδια της πρόφασης, πριν τη διάλυση του πυρηνικού φακέλου, όπου προσδένεται στα (-) άκρα των μικροσωληνίσκων του κεντροσώματος (Merdes et al,

2000, Blagden & Glover, 2003). Στο τέλος της ανάφασης και κατά την τελόφαση, η NuMA1 παύει να είναι προσδεδεμένη στους πόλους της ατράκτου και φαίνεται ότι ρυθμίζει τον επανασηματισμό του πυρηνικού φακέλου (Price & Pettijohn, 1986). Πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού (Κοκκινάκη, Διδακτορική Διατριβή, 2005) έδειξαν ότι το Neurl συνεντοπίζεται στην περιοχή του κεντροσώματος με την NuMA1, καθώς επίσης και με τις πρωτεΐνες Dlc-1 και  $\gamma$ -tubulin, δίνοντας ενδείξεις για πιθανό ρυθμιστικό ρόλο του Neurl σε αυτή τη φάση του κυτταρικού κύκλου.

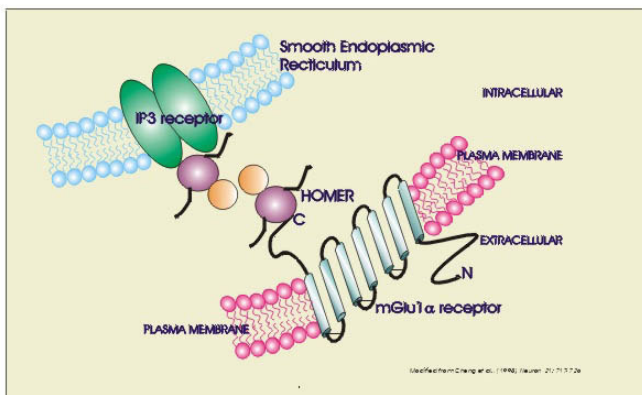
Ενδιαφέρον εμφανίζει ο ρόλος της πρωτεΐνης NuMA1 στη σταθεροποίηση της μιτωτικής ατράκτου και στον καθορισμό του προσανατολισμού της ατράκτου σε ασύμμετρες διαιρέσεις σε κύτταρα θηλαστικών μετά από αλληλεπίδρασή της με την πρωτεΐνη LGN (ομόλογη της δροσοφιλικής πρωτεΐνης Pins, Partner of inscrutable) (Du & Macara, 2004). Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση αποτελεί σημαντικό μηχανισμό καθορισμού κυτταρικής μοίρας από τα ασπόνδυλα μέχρι τα σπονδυλωτά (Knoblich, 2001). Η πρωτεΐνη neur της δροσόφιλα φαίνεται να κατανέμεται ασύμμετρα στο πρόδρομο κύτταρο των αισθητηρίων οργάνων και η παρουσία της στο ένα μόνο από τα δύο θυγατρικά κύτταρα, σε συνδυασμό με την παρουσία της πρωτεΐνης Numb, που είναι επίσης ασύμμετρα κατανεμημένη, παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της σηματοδότησης N (Le Borngé & Schweisguth, 2003). Η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης Neurl του ποντικού με τη NuMA1 θέτει σημαντικά ερωτήματα για την πιθανότητα ασύμμετρης κατανομής της σε αντίστοιχες αποφάσεις κυτταρικής μοίρας στα θηλαστικά και η διερεύνηση αυτής της πιθανότητας στο κατάλληλο πειραματικό σύστημα παρουσιάζει ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον.

Άλλες δύο πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν σε κύτταρα HeLa (αλλά όχι σε κύτταρα HEK293) να αλληλεπιδρούν με το Neurl είναι η Myopalladin και η Homer 3. Η Myopalladin είναι μια πρωτεΐνη 145kD, η οποία συνδέει την περιοχή SH3 στο καρβοξυτελικό άκρο της nebulin με τα μοτίβα EF hand της  $\alpha$ -actinin στην οργάνωση των Z ζωνών των σαρκομεριδίων των σπονδυλωτών (Εικ.50) (Bang et al., 2001). Η βασική της λειτουργία είναι να συμμετέχει στην οργάνωση των συστατικών των Z ζωνών σε κανονικά, εξαγωνικά πλέγματα, είναι όμως πιθανό να παίζει σημαντικό ρόλο στο συντονισμό ενός δικτύου του κυτταροσκελετού με τον περιμυοϊνιδιακό χώρο των γραμμών Z, ώστε να ρυθμίζεται η μετάδοση μηχανικών και χημικών ερεθισμάτων.



**Εικ. 50:** Σχηματική απεικόνιση μισού σαρκομεριδίου, όπου παρατηρείται η πρόσδεση στη ζώνη Z της actin (σκούρο πράσινο), της nebulin (κόκκινο), της myopalladin (πράσινο), της K-actinin (ροζ) και της titin (μπλε). Η περιοχή SH3 στο καρβοξυτελικό άκρο της nebulin φαίνεται σαν κόκκινος κύκλος και η περιοχή PEVK της titin σαν κίτρινο σχοινί. Η tropomodulin είναι μωβ και η myosin μπλε και γκρι.

Οι πρωτεΐνες Homer ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των πρωτεϊνών με περιοχή PDZ (post-synaptic, density-95, discs large, zona occludens-1) που έχουν ένα χαρακτηριστικό μοτίβο Gly-Leu-Gly-Phe στο αμινοτελικό τους άκρο (Hata et al., 1998). Αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς γλουταμικού οξέος της ομάδας I και φαίνεται να συμβάλλουν στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, καθώς επίσης και σε διαδικασίες μνήμης και μάθησης. Η ακριβής τους λειτουργία δεν είναι γνωστή, αλλά έχει προταθεί η συμμετοχή τους στην ρύθμιση της πλαστικότητας των συνάψεων με το να συνδέουν τους υποδοχείς του γλουταμικού με συστατικά του κυτταροσκελετού ή με πρωτεΐνες που ρυθμίζονται από ιόντα ασβεστίου (Kato et al., 1998, Tu et al., 1998, Xiao et al., 1998).

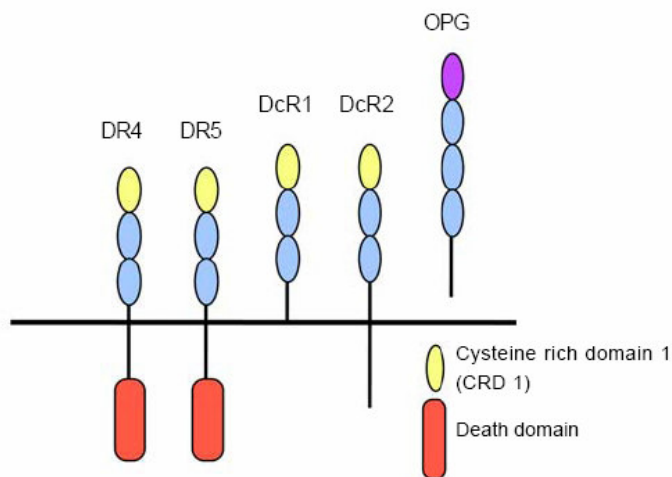


**Εικ. 51:** Οι πρωτεΐνες Homer αλληλεπιδρούν με υποδοχείς γλουταμικού οξέος και με υποδοχείς IP3 και σχηματίζουν πολύ-πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Παρά το γεγονός ότι η λειτουργία τους δεν είναι γνωστή, είναι πιθανό να εμπλέκονται στην διμερισμό των υποδοχέων του γλουταμικού και να λειτουργούν σαν συνδετικά μόρια (adaptors) με τους υποδοχείς IP3 που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος μέσω των υποδοχέων του γλουταμικού.

Οι πρωτεΐνες Myopalladin και Homer 3 συνδέουν τη λειτουργία του *Neurl* του ποντικού με διαδικασίες που σχετίζονται με τη μυογένεση και τη νευρογένεση αντίστοιχα. Η έκφραση του *Neurl* στα πρώιμα εμβρυικά στάδια ενισχύει την πιθανότητα αυτή, αφού μεταγραφά του εντοπίζονται έντονα στους διαφοροποιημένους σωματίτες εμβρύου ποντικού σταδίου E9-E10, καθώς και σε περιοχές του αναπτυσσόμενου προσθεγκεφάλου και μεσεγκεφάλου. Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι και οι δύο παραπάνω πρωτεΐνες, όπως και η NuMA1, σχετίζονται με το δίκτυο του κυτταροσκελετού και η πιθανή σχέση της πρωτεΐνης *Neurl* με τον κυτταροσκελετό έχει ήδη τονιστεί από την Κοκκινάκη (Διδακτορική Διατριβή, 2005). Η πρωτεΐνη Rb1-inducible coiled coil protein που επίσης ταυτοποιήθηκε από την ανάλυση φασματοσκοπίας μάζας εμφανίζει ευρύ πρότυπο έκφρασης, αλλά φαίνεται να σχετίζεται ιδιαίτερα με την ωρίμανση των εμβρυικών μυοσκελετικών κυττάρων, αφού πείραμα καταστολής της έκφρασής της πρωτεΐνης (RNAi mediated knock-down) σε κύτταρα μυοβλαστών C2C12 έχει σαν αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η διαφοροποίησή τους σε μυικά (Watanabe et al., 2004).

Μέσω της αλληλεπίδρασής του με την πρωτεΐνη Homer 3 (Εικ. 51), το *Neurl* είναι πιθανό να εμπλέκεται και σε διαδικασίες που αφορούν γεγονότα μνήμης και μάθησης. Πειράματα καταστροφής του γονιδίου *Neurl* έδωσαν βιώσιμα ζώα με ήπιες μόνο διαταραχές στο νευρικό σύστημα που αφορούν την απώλεια συντονισμού κινητικών νευρώνων και την αδυναμία διάκρισης οσμών μετά από την εισαγωγή αιθανόλης στην κυκλοφορία (Ruan et al., 2001). Λεπτομερής ανάλυση του προτύπου έκφρασης του *Neurl* του αρουραίου εντοπίζει μετάγραφα σε πολλές περιοχές του εγκεφάλου, υποδηλώνοντας συμμετοχή του στη ρύθμιση της λειτουργίας των συνάψεων. Πιο συγκεκριμένα τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν σε νευρώνες του προσθεγκεφάλου όπως στον ιππόκαμπο, τον εγκεφαλικό φλοιό, το πλευρικό διάφραγμα και τα αμύγδαλα, ενώ μετάγραφα εντοπίστηκαν και στους δενδρίτες κοκκιωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου (Timmusk et al, 2002). Πειράματα υπερέκφρασης του *neur* της δροσόφιλα στα μανιταροειδή σωματίδια (mushroom bodies) έδειξαν σημαντική ενίσχυση της μακροπρόθεσμης μνήμης (Παυλόπουλος, αδημοσίευτα αποτελέσματα), δίνοντας περαιτέρω ενδείξεις για συντηρημένη λειτουργία της πρωτεΐνης *Neurl* σε διαδικασίες μνήμης και μάθησης στα ασπόνδυλα και τα σπονδυλωτά.

Τέλος, μια ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα αλληλεπίδραση του Neu1 που προέκυψε από την ανάλυση φασματοσκοπίας μάζας είναι αυτή με τον υποδοχέα DcR2 (TRAILR4/TRUND), ο οποίος ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων TNF (tumor necrosis factor receptors) και αλληλεπιδρά με το δεσμευτή TRAIL με την εξωκυττάρια περιοχή του, ενώ η χαρακτηριστική περιοχή Death στην ενδοκυττάρια περιοχή του είναι κολοβή και ανενεργή (Εικ. 52) (Degli-Esposti et al., 1997). Η φυσιολογική του λειτουργία δεν έχει αποσαφηνιστεί, αλλά θεωρείται ότι δρα ανταγωνιστικά (decoy receptor) με τους υποδοχείς DR4 και DR5 (Death Receptor 4, 5) στην μεταγωγή του αποπτωτικού σήματος από το δεσμευτή TRAIL (Deng et al., 2000).



**Εικ. 52: Σχηματική αναπαράσταση των πέντε υποδοχέων TRAIL.** Η εξωκυττάρια περιοχή τους περιέχει περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνες, οι οποίες απεικονίζονται με οβάλ σχήματα.

Η αλληλεπίδρασή του με το Neu1 με τον υποδοχέα DcR2 παρατηρήθηκε σε σημαντικό ποσοστό μόνο μετά από επεξεργασία των κυττάρων που αναλύθηκαν με τον αναστολέα του πρωτεασώματος MG132. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη ότι ο υποδοχέας πιθανόν στοχεύεται στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση και η ανίχνευσή του είναι δυνατή μόνο μετά από αναστολή της λειτουργίας του πρωτεασώματος μέσα στο κύτταρο. Η επεξεργασία των κυττάρων με αναστολείς του πρωτεασώματος χρησιμοποιείται σαν μέθοδος ταυτοποίησης υποστρωμάτων E3 λιγασών ουβικουιτίνης, αφού απουσία των αναστολέων, η γρήγορη αποικοδόμηση των υποστρωμάτων – στόχων καθιστά αδύνατη την ταυτοποίησή τους. Είναι λοιπόν πολύ πιθανό ο υποδοχέας DcR2 να αποτελεί υπόστρωμα του Neu1 σαν E3 λιγασή ουβικουιτίνης. Η συμμετοχή του Neu1

σε διαδικασίες που αφορούν την απόπτωση είχε τονιστεί και από την Κοκκινάκη (Διδακτορική Διατριβή, 2005) μετά από ταυτοποίηση της αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη Peg3, η οποία αλληλεπιδρά με τον παράγοντα TRAF2 (TNF Receptor Associated Factor 2), με τον οποίο δρα συνεργατικά για την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB και ενδεχομένως συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού του TNF (Relaix et al., 1998).

## **B. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις**

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αλληλεπίδραση του Neur1 με τις πρωτεΐνες N-myristoyltransferase 1 και Rho-associated coiled coil containing protein kinase 2, οι οποίες είναι πιθανόν να ευθύνονται για μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του Neur1 μέσα στο κύτταρο. Η N-myristoyltransferase 1 είναι ένα μονομερές ένζυμο 50-60 kD, υπεύθυνο για την προσθήκη μιας ομάδας μυριστοϊκού οξέος στο αμινοτελικό άκρο μιας πρωτεΐνης που ξεκινάει με την αλληλουχία M-G. Η αντίδραση μυριστοϋλίωσης έχει μελετηθεί εκτενώς και περιλαμβάνει ένα πρώτο βήμα αφαίρεσης του καταλοίπου μεθειονίνης από το ένζυμο αμινο-πεπτιδάση της μεθειονίνης κατά τη διάρκεια της μετάφρασης, ενώ στη συνέχεια η μυριστοϋλτρανφεράση προσθέτει το μυριστοϊκό οξύ με το σχηματισμό αμιδικού δεσμού στη G2 (Wilcox et al., 1987). Η παρουσία του καταλοίπου γλυκίνης είναι αναγκαία για την προσθήκη του μυριστοϊκού οξέος, αλλά δεν είναι ικανή για τη μυριστοϋλίωση όλων των πρωτεϊνών που το δεύτερο κατάλοιπό τους είναι γλυκίνη. Το μοτίβο M-G-X-X-X-S/T- έχει ταυτοποιηθεί σε όλα τα υποστρώματα που μυριστοϋλιώνονται, όπου τα κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης προτιμώνται στη θέση 6 και κατάλοιπα λυσίνης ή αργινίνης στις θέσεις 7 ή 8 (Resh, 1999). Η αναγνώριση αυτού του μοτίβου στο αμινοτελικό άκρο του Neur1 καθώς επίσης και η αλληλεπίδρασή του με το ένζυμο N-myristoyltransferase 1 μόνο όταν το αμινοτελικό άκρο του Neur1 ήταν ελεύθερο από πεπτιδιο-σινιάλο, μας έδωσε ενδείξεις για πιθανή λειτουργική ρύθμιση του Neur1 από μυριστοϋλίωση μέσα στο κύτταρο και μας οδήγησε στην περαιτέρω διερεύνηση αυτής της πιθανότητας (βλ. παρακάτω).

Εκτός από το μοτίβο μυριστοϋλίωσης που αναγνωρίστηκε στο αμινοτελικό άκρο του Neur1, τρία πιθανά μοτίβα φωσφορυλίωσής του από κινάσες σερίνης/θρεονίνης έχουν προβλεφθεί στην πρωτεϊνική αλληλουχία του Neur1 (Timmusk et al, 2002). Η αλληλουχία RPSFTA ανάμεσα στις δύο επαναλήψεις NEUZ1 και NEUZ2 εμφανίζει ομοιότητα με το μοτίβο RXRXXS/T, το οποίο αναγνωρίζεται από την κινάση σερίνης/θρεονίνης PKB/Akt (Datta et al., 1999). Η πρωτεΐνη Rho-associated coiled coil containing protein kinase 2, που ταυτοποιήθηκε να αλληλεπιδρά με το Neur1, είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης, η οποία επίσης αναγνωρίζει το παραπάνω μοτίβο φωσφορυλίωσης στα υποστρώματά της, γεγονός που υποδηλώνει ότι το Neur1 μπορεί να αποτελεί στόχο της συγκεκριμένης κινάσης.

Με τη χρήση της φασματοσκοπίας μάζας καταφέραμε να επιβεβαιώσουμε τη φωσφορυλίωση του Neur1 σε κατάλοιπα σερίνης στο δεύτερο προβλεπόμενο μοτίβο S/TXPXSPXSXPXSPXXXGXXX(X)SD από τους Timmusk et al, (όπου X είναι οποιοδήποτε αμινοξύ) και συγκεκριμένα βρέθηκαν φωσφορυλιωμένα τα κατάλοιπα S462 και S469 στην αλληλουχία PCSPASTPTSPSALGILR. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι επαναλήψεις σερίνης προλίνης που παρατηρούνται στο Neur1 των θηλαστικών δεν εμφανίζουν ομοιότητα με κανένα άλλο γνωστό μοτίβο. Πρωτεολυτική πέψη της πρωτεΐνης με φωσφατάση (λ protein phosphatase) επιβεβαίωσε την φωσφορυλίωσή της, η οποία παρατηρείται ακόμα και μετά από διπλή σημειακή μεταλλαγή των δύο καταλοίπων σερίνης που ταυτοποιήθηκαν σαν πιθανοί στόχοι κινασών, δείχνοντας ότι η πρωτεΐνη Neur1 φωσφορυλιώνεται σε περισσότερα κατάλοιπα. Ο λόγος που αυτά δεν ήταν δυνατό να ταυτοποιηθούν είναι πιθανό οι περιορισμοί της ανάλυσης φασματοσκοπίας μάζας να ταυτοποίησαν πεπτίδια που καλύπτουν μεγαλύτερο ποσοστό της πρωτεϊνικής αλληλουχίας. Για να επιτευχθεί αυτό γίνεται συνδυασμένη πρωτεολυτική πέψη με περισσότερες από μία πρωτεάσες (trypsin, subtilisin, elastase). Αντίθετα το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε για ταυτοποίηση μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων του Neur1 είχε πρωτεολυθεί μόνο με τη χρήση θρυψίνης, περιορίζοντας έτσι σημαντικά το ποσοστό κάλυψης της πρωτεϊνικής αλληλουχίας από τα πεπτίδια που προέκυψαν.



## **Η δράση του Neurl σαν E3 λιγάση ουβικουιτίνης *in vitro* και η ταυτοποίηση του δεσμευτή Jagged1 σαν υποστρώμα του.**

Η αναγνώριση της περιοχής RING στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης Neurl του ποντικού, αλλά και των ορθόλογων μορίων της δροσόφιλα και του βατράχου οδήγησε στη διερεύνηση της δράσης του σαν E3 λιγάση ουβικουιτίνης. Η προσθήκη των πρωτεϊνών neur της δροσόφιλα και του βατράχου σε δοκιμές ουβικουιτινιλίωσης *in vitro* έδειξε την ικανότητα της πρωτεΐνης να επάγει το σχηματισμό αλυσίδων πολυ-ουβικουιτίνης και η δράση αυτή να εξαρτάται από την παρουσία της περιοχής RING (Lai et al., 2001, Deblandre et al., 2001). Επαναλαμβάνοντας αντίστοιχες δοκιμές ουβικουιτινιλίωσης *in vitro* καταφέραμε να δείξουμε ότι και η πρωτεΐνη Neurl του ποντικού εμφανίζει δράση λιγάσης ουβικουιτίνης και η ενεργότητά της εξαρτάται από τη δομική ακεραιότητα της περιοχής RING. Επιπλέον ταυτοποιήσαμε το ένζυμο πρόσδεσης E2 UbcH5 να αλληλεπιδρά και να επάγει τη δράση του Neurl σαν E3 λιγάση ουβικουιτίνης. Έχει παρατηρηθεί η ικανότητα των E3 λιγασών με περιοχή RING να επάγουν την αυτο-ουβικουιτινιλίωση των E2 σε μια δοκιμή *in vitro*, καθώς και το σχηματισμό ελεύθερων αλυσίδων πολυ-ουβικουιτίνης απουσία υποστρωμάτων (Joazeiro et al., 1999, Lorick et al., 1999). Με τη χρήση περιοριστικών συγκεντρώσεων ενζύμου E2 μπορέσαμε να δείξουμε την αυτο-ουβικουιτινιλίωση του Neurl *in vitro*. Επειδή είναι γνωστό ότι οι E3 λιγάσες τύπου RING δεν σχηματίζουν θειο-εστερικό δεσμό με μόρια ουβικουιτίνης (Ozkan et al., 2005), η αυτο-ουβικουιτινιλίωσή τους *in vitro* μπορεί να φανερώνει τροποποίηση της πρωτεΐνης με κάποια φυσιολογική σημασία, μπορεί όμως και να είναι απλά παραπροϊόν της αντίδρασης (Pickart, 2001). Η πρωτεΐνη Neurl βρήκαμε ότι είναι ουβικουιτινιλωμένη και *in vivo*, η δομική ακεραιότητα της περιοχής RING δεν είναι ωστόσο απαραίτητη για αυτή την τροποποίηση. Είναι πιθανό η περιοχή RING της πρωτεΐνης να μην ευθύνεται για την αυτο-ουβικουιτινιλίωση του Neurl, αλλά να στρατολογεί απαραίτητους παράγοντες που ρυθμίζουν τη ουβικουιτινιλίωση του Neurl τοπικά και χρονικά.

Χρησιμοποιώντας τις ενδοκυττάριας περιοχές των δεσμευτών του N στα θηλαστικά ταυτοποιήσαμε το δεσμευτή Jagged1 σαν υπόστρωμα του Neu1, το οποίο επάγει την μονο-ουβικουιτινιλίωση της ενδοκυττάριας περιοχής *in vitro*. Οι ενδοκυττάριας περιοχές των δεσμευτών του N δεν εμφανίζουν καμία συντηρημένη περιοχή. Οι ενδοκυττάριας περιοχές των Dll1 και Dll4 παρουσιάζουν 43% ομοιότητα και 32% ταυτότητα μεταξύ τους, ενώ αντίστοιχα οι ενδοκυττάριας περιοχές των Jag1 και Jag2 παρουσιάζουν 33% ομοιότητα και 22% ταυτότητα (Εικ. 53). Δεν είναι εύκολο λοιπόν να κατανοήσουμε γιατί το Neu1 μπορεί να ουβικουιτινιλιώνει μόνο το Jag1 και κανέναν από τους υπόλοιπους δεσμευτές. Η ενδοκυττάρια περιοχή του Dll3 δεν έχει κανένα κατάλοιπο λυσίνης και για αυτό δεν χρησιμοποιήθηκε στις δοκιμές ουβικουιτινιλίωσης *in vitro*. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα έχει η ταυτοποίηση του καταλοίπου λυσίνης που ουβικουιτινιλιώνεται, καθώς η μεταλλαγή του σε κατάλοιπο αργινίνης που θα εμπόδιζε την ουβικουιτινιλίωση του Jag1 θα μπορούσε να δώσει σημαντικές πληροφορίες για τη λειτουργική σημασία αυτής της τροποποίησης του δεσμευτή στη ρύθμιση της σηματοδότησης N. Μια πρόσφατη μελέτη στη δροσόφιλα ταυτοποίησε στην ενδοκυττάρια περιοχή του Ser ένα μοτίβο το οποίο φαίνεται να είναι υπεύθυνο για την αλληλεπίδραση του δεσμευτή τόσο με το Neu1 όσο και με το Mib, αφού αφαίρεση αυτού του μοτίβου έχει σαν αποτέλεσμα να χάνεται η αλληλεπίδραση και με τις δύο αυτές E3 λιγάσες, γεγονός που καταστέλλει τόσο την ενδοκύττωση όσο και την σηματοδοτική ενεργότητα του δεσμευτή (Glittenberg et al, 2006). Η ταυτοποίηση δύο καταλοίπων λυσίνης στο παραπάνω μοτίβο που πιθανό τροποποιούνται από τις δύο E3 λιγάσες αποτελεί ακόμα μία ένδειξη για το σημαντικό ρόλο της ουβικουιτινιλίωσης στη ρύθμιση της σηματοδότησης. Οι λυσίνες αυτές είναι συντηρημένες μεταξύ του Ser της δροσόφιλα και του JAG1 του ποντικού, αλλά το αντίστοιχο μοτίβο δεν παρατηρείται στο δεσμευτή JAG2. Αξίζει ωστόσο να τονισθεί ότι το υπόστρωμα του Neur και του Mib1 της δροσόφιλα δεν έχει ταυτοποιηθεί βιοχημικά, ενώ για το Xneur του βατράχου έχει βρεθεί ότι μπορεί να μονο-ουβικουιτινιλιώνει το XDelta1 *in vitro* (Deblandre et al., 2001). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι και η ενδοκυττάρια περιοχή του Jag2 ουβικουιτινιλιώνεται από την πρωτεΐνη skeletrophin (mib2), χωρίς να διευκρινίζεται αν πρόκειται για μόνο ή πολυ-ουβικουιτινιλίωση (Takeuchi et al., 2005).

## A

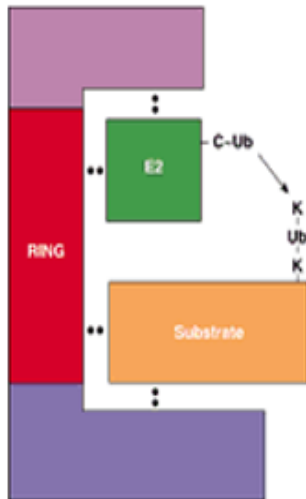
D111 ICD	(1)	-----CVRLKQLQKHQPPP
D113 ICD	(1)	-----
D114 ICD	(1)	-----LRLRRPDD
Delta ICD	(1)	FCMKRKRKRAQEKDDAEARKQNEQNAVATMHHNGSGVGVVALASASLGGKT
Consensus	(1)	V L L P
		51 100
D111 ICD	(14)	EPCGGETETMNNLANCQREKDVSVSLIGATQIKNTNKKADFHGDHGAKKS
D113 ICD	(1)	-----
D114 ICD	(9)	E----SR EAMNLSDFQKD-----NLIPAAQLKNTNQKKELEVDCGLDKS
Delta ICD	(51)	GSNSGLTFDGGNPNIIKNTWDKSVNNICASAAAAAAAAAADECLMYGGY
Consensus	(51)	E G TE MNNLA QKD D SVNII ASQIKNTN KAD D D G KS
		101 150
D111 ICD	(64)	-SFVRYPTVDYNLVLDLKGDEATVVDTHSKRDTICQSQSSAGEEKIAPT
D113 ICD	(1)	---HVRRRGPGQDTGTRLLS-----GTREPSVHTLPDALNNLRLQ
D114 ICD	(50)	NCGLQNHHTLDYNLAPGLLG-----RGGMPGYPHSDKSLGKVVPLR
Delta ICD	(101)	VASVADNNNANSDFCVAPLQRAKSKQ--QLNTDPTLMHRGSPAGSSAKGA
Consensus	(101)	A KVRN TLDYNLA ALLG S K GTD K MHS SAAGEKIKL
		151 200
D111 ICD	(113)	LRGGEIPDRK-----RPESVYSTSKDTKYQSVYVLSAEKDECVIATEV--
D113 ICD	(38)	DGAGDGPS-----SSADWNHPEDGDSRSIYVIPAPSIYAREA-----
D114 ICD	(92)	LHS-EKPE-----CRISAICSPRDSMYQSVCLISEERNECVIATEV--
Delta ICD	(149)	SGGGPGAAEGKRISVLGEGSYCSQRWPSLAAAGVAGACSSQLMAASVAG
Consensus	(151)	LGGGEGPE ESAYCSPRDS YQSVYVISAES ECVIATEV
		201 219
D111 ICD	(156)	-----
D113 ICD	(75)	-----
D114 ICD	(132)	-----
Delta ICD	(199)	SGAGTAQQQRSVVCCTPHM
Consensus	(201)	

## B

Jag1 ICD	(1)	YWCVRKR-----RKPSSHTHSAPEDNNTNNVREQLNQIKNPIEKHG
Jag2 ICD	(1)	---TRKR-----RVERERSR-LPRDESTNNQWAPLNPIRNPPIERP
Ser ICD	(1)	-W-KQRLAYRTSSGMNLTPSLDALRHEEEKSNLQNEENLRRYT-----NPLKGST
Consensus	(1)	W RKR RK SS P D STNN E LN IKNPIEK G
		51
Jag1 ICD	(42)	TVPIKDYE---NNSKMSKIRTHNS-----EVEEDDMDKHQ
Jag2 ICD	(38)	GSGLGTGCHKDILYQCKNFTPPPRRAGEALPGPAGHGAGGEDEEDEELSR
Ser ICD	(50)	SSLRAATGMELSLNPAPELAASAASSALHRSQPLFPCCDFERELDSSTG
Consensus	(51)	S A G L P K A EEDELD
		101 150
Jag1 ICD	(78)	KVRFAYQPVYTLVDRREEKAPSGTPTKHPNWTN--KQDNRDLESAQSLNRM
Jag2 ICD	(88)	GDGDSPEAEKFLSHFTDPSCSLGRPACWAPGPKVDNRRAVRSKDVVRA
Ser ICD	(100)	LKQAHKRSQILLHKITQNSDMRKNITVGLDSPRKDFGKRSINCKSMPPSS
Consensus	(101)	AK A LLHK KAPS TK A WSP K DNRAI S L RA
		151 164
Jag1 ICD	(126)	EYIV-----
Jag2 ICD	(138)	GRE-----
Ser ICD	(150)	GDEGSDVLATTVMV
Consensus	(151)	G E

**Εικ. 53 : Σύγκριση των ενδοκυττάρων περιοχών των πέντε δεσμευτών του N. Α. Σύγκριση των ενδοκυττάρων περιοχών των δεσμευτών D111, D113 και D114. Β. Σύγκριση των ενδοκυττάρων περιοχών των δεσμευτών JAG1 και JAG2.**

Το γεγονός ότι το Neurl του ποντικού αλληλεπιδρά και ουβικουτινιλιώνει *in vitro* την ενδοκυττάρια περιοχή του JAG1 αποτελεί σημαντική ένδειξη για άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών. Ο ρόλος των E3 λιγασών τύπου RING στην αντίδραση ουβικουτινιλίωσης είναι να δρουν σαν μόρια μεσολαβητές που προσδένονται ταυτόχρονα στο ένζυμο πρόσδεσης E2 και στο υπόστρωμα, ώστε να τα φέρνουν κοντά και να διευκολύνουν την μεταφορά μορίων ουβικουτίνης από το ένζυμο E2 σε κατάλοιπα λυσίνης του υποστρώματος (κατάλυση μέσω γειννίαςης) (Εικ. 5). Παρά το γεγονός ότι η καταλυτική τους δράση είναι έμμεση, η κύρια αρμοδιότητά τους είναι η αλληλεπίδραση με συγκεκριμένα υποστρώματα τα οποία τροποποιούνται με την προσθήκη μορίων ουβικουτίνης (Pickart, 2001) .



**Εικ. 54: Μοντέλο της δράσης των E3 λιγασών τύπου RING στην αντίδραση ουβικουτινιλίωσης.** Η E3 λιγάση ουβικουτίνης απεικονίζεται σαν μόριο γεφύρωσης (bridging protein), αλληλεπιδρά τόσο με το υπόστρωμα (πορτοκαλί), όσο και με το ένζυμο πρόσδεσης E2. Η περιοχή RING έχει χαρακτηριστεί σαν το κύριο σημείο αλληλεπίδρασης της E3 λιγάσης με το ένζυμο E2, ενώ ποικίλες περιοχές έχουν ταυτοποιηθεί για την αλληλεπίδραση της E3 λιγάσης με το υπόστρωμα. Το κατάλοιπο κυστεΐνης του ενεργού κέντρου του E2 (C) φαίνεται να σχηματίζει θειοεστερικό δεσμό με την ουβικουτίνη (Ub). Κατάλοιπα λυσίνης (K) του υποστρώματος εμπλέκονται στο σχηματισμό ισοπεπτιδικού δεσμού με μόρια ουβικουτίνης.

Ενώ λοιπόν η απομόνωση των πρωτεϊνών από κύτταρα εντόμων με ανοσοκατακρήμνιση δεν αποκλείει την παρουσία επιπλέον παραγόντων στην δοκιμή ουβικουτινιλίωσης *in vitro*, η εξειδίκευση που παρουσιάζει το Neurl στο να αλληλεπιδρά και να τροποποιεί έναν μόνο από τους πέντε δεσμευτές του N τονίζει τη σημαντική λειτουργία του Neurl να αναγνωρίζει ειδικά το συγκεκριμένο δεσμευτή και να επάγει την τροποποίησή του. Η παρατήρηση αυτή δίνει ενδείξεις για συμμετοχή του Neurl στη ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού και επιπλέον επικεντρώνει τις προσπάθειες κατανόησης της λειτουργίας του σε διαδικασίες που σχετίζονται

συγκεκριμένα με τη δράση του δεσμευτή JAG1. Η λεπτομερέστερη χαρτογράφηση της αλληλεπίδρασης τόσο *in vitro* σε κύτταρα εντόμων, όσο και *in vivo*, έδειξε ότι η περιοχή Neuz2 της πρωτεΐνης είναι ικανή και αναγκαία για την αναγνώριση της ενδοκυττάριας περιοχής του δεσμευτή JAG1. Πρόσφατη μελέτη στη δροσόφιλα ταυτοποίησε την περιοχή Neuz1 σαν ικανή και αναγκαία για την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης Neur με το δεσμευτή D1 (Commisso & Boulianne, 2006). Η μελέτη αυτή σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής τονίζουν το ρόλο των περιοχών Neuz στη ρύθμιση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων και στην περίπτωση του Neur είναι υπεύθυνες για την αναγνώριση του υποστρώματος που πρόκειται να ουβικουτινιωθεί.

### **Η έκφραση του γονιδίου *Neur1* στα πρώιμα εμβρυικά στάδια του ποντικού δεν συμπίπτει με την έκφραση των δεσμευτών του N**

Η μελέτη του προτύπου έκφρασης του Neur και του Mib στη δροσόφιλα σε συνδυασμό με γενετικά πειράματα έδειξε ότι οι δύο πρωτεΐνες φαίνεται να ρυθμίζουν διαφορετικές αναπτυξιακές διαδικασίες που εξαρτώνται από τη σηματοδότηση N. Συγκεκριμένα το Mib ρυθμίζει το σχηματισμό του περιθωρίου του φτερού, το μεταμερισμό του ποδιού και το σχηματισμό των φλεβών (Le Borgne et al., 2005, Lai et al., 2005), όπου η ενεργότητα του neur δεν είναι απαραίτητη, ενώ αντίθετα το neur παίζει καθοριστικό ρόλο στον καθορισμό κυτταρικής μοίρας των πρόδρομων αισθητηρίων οργάνων και στη διαδικασία της νευρογένεσης στο έμβρυο και τη νύμφη (Lai & Rubin, 2001, Yeh et al., 2000). Οι διαδικασίες αυτές είναι ανεξάρτητες από την ενεργότητα του Mib, αφού η απώλεια λειτουργίας του γονιδίου προκαλεί μόνο πολύ ήπιο νευρογόνο φαινότυπο στο θώρακα. Το γεγονός αυτό εξηγεί γιατί το γονίδιο Mib δεν είχε ταυτοποιηθεί σαν νευρογόνο σε πολλαπλά γενετικά πειράματα αναζήτησης συστατικών του μονοπατιού N.

Παρά τον καθοριστικό ρυθμιστικό ρόλο του γονιδίου neur στο μονοπάτι N στη δροσόφιλα, η απώλεια λειτουργίας του στο ποντίκι προκαλεί πολύ ήπιο φαινότυπο (Vollrath, et al., 2001, Ruan et al., 2001). Ο ήπιος αυτός φαινότυπος μπορεί να οφείλεται εν μέρει στην ύπαρξη γονιδίων με πλεονάζουσα δράση όπως είναι το *neur1-2* και τα γονίδια *Mib1* και *2* που έχουν ταυτοποιηθεί στο ποντικό. Ένας επιπλέον λόγος μπορεί να

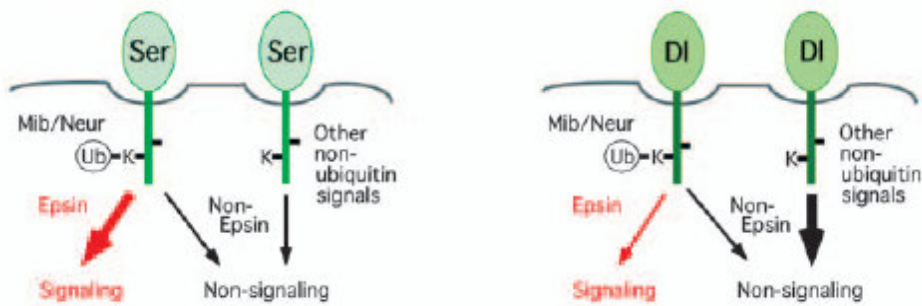
είναι η περιορισμένη έκφραση του *Neur1* στα πρώιμα εμβρυικά στάδια σε σύγκριση με το ευρύ πρότυπο έκφρασης του *mib1*, όπως παρατηρείται από τη συγκριτική μελέτη του προτύπου έκφρασής του με τους πέντε δεσμευτές του N που πραγματοποιήσαμε. Το *Neur1* φαίνεται να εκφράζεται πολύ ειδικά στους σωμαίτες κατά το τελευταίο στάδιο της διαφοροποίησής τους. Η σωμαιτογένεση ξεκινάει με τον αρχικό σχηματισμό του προ-σωμιτικού μεσοδέρματος, συνεχίζει με τη δημιουργία ορίων μεταξύ των νεο-σχηματιζόμενων σωματιών και ολοκληρώνεται με την τελική διαφοροποίηση των σωματιών (Gossler & Hrabe de Angelis, 1998). Οι δεσμευτές *Dll1* και *Dll3* εκφράζονται πολύ έντονα στο προ-σωμιτικό μεσόδερμα και παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στον αρχικό σχηματισμό του όσο και στη δημιουργία ορίων μεταξύ των σωματιών. Επίσης ο δεσμευτής *Jag1* εκφράζεται στο προσωμιτικό μεσόδερμα και στο οπίσθιο τμήμα του πρώτου σωμαίτη που σχηματίζεται, σε αντίθεση με το *Dll1* που εκφράζεται στο οπίσθιο τμήμα όλων των σωματιών. Ο ρόλος της σηματοδότησης N είναι πολύ σημαντικός στα πρώτα δύο στάδια της σωμαιτογένεσης μέσω της ρύθμισης της κυκλικής έκφρασης γονιδίων όπως είναι το *L-fringe* (Zhang & Gridley, 1998), ενώ ο μηχανισμός αναστολής της κυτταρικής διαφοροποίησης κατά τη μυογένεση είναι όμοιος με αυτό της νευρογένεσης, αφού η ενεργοποίηση της σηματοδότησης N εμποδίζει την έκφραση των μυογόνων ρυθμιστικών παραγόντων όπως είναι οι *MyoD*, *myogenin*, *Myf-5* και *MRF4* (Luo et al., 2005). Η έκφραση του *Neur1* περιορίζεται στους πλήρως διαφοροποιημένους σωμαίτες και φαίνεται να ταυτίζεται με την έκφραση μεταγραφικών παραγόντων bHLH όπως είναι η μυογενίνη και *MyoD*, χωρίς να είναι γνωστός ο ακριβής του ρόλος σε αυτή τη διαδικασία.

## **Η επαγωγή της αποικοδόμησης των δεσμευτών Jagged1, 2 και Dll1, Dll4 από την πρωτεΐνη Neurl μέσα στο κύτταρο.**

Η ουβικουιτινιλίωση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών σε ένα κατάλοιπο (mono) ή σε περισσότερα κατάλοιπα (multi) λυσίνης έχει συνδεθεί με την επαγωγή της ενδοκύττωσής τους και το διαχωρισμό τους σε ενδοκυττωτικά διαμερίσματα. Οι πρωτεΐνες αυτές είτε ανακυκλώνονται (επιστρέφουν στην κυτταροπλασματική επιφάνεια) είτε οδηγούνται στο λυσόσωμα μέσω των πολυκυστιδιακών σωματίων (MVBs) και αποικοδομούνται (Bonifacino & Traub, 2003). Η πληροφορία που είναι απαραίτητη για την ενδοκύττωση φαίνεται να περιέχεται στο μόριο της ουβικουιτίνης, αφού χιμαιρικές πρωτεΐνες με ένα μόριο ουβικουιτίνης που δεν διαθέτουν κατάλοιπα λυσίνης ή άλλα σινιάλα ενδοκύττωσης εισέρχονται κανονικά στο ενδοκυττωτικό μονοπάτι (Haglund et al., 2003). Αυτή η εγγενής ικανότητα στόχευσης των μονο-ουβικουιτινιωμένων πρωτεϊνών στο ενδοκυττωτικό μονοπάτι οφείλεται στο γεγονός ότι η ουβικουιτίνη αναγνωρίζεται από πρωτεΐνες, όπως είναι η Epsin, που περιέχουν μοτίβα αλληλεπίδρασης ουβικουιτίνης και δρουν σαν δέκτες που διευκολύνουν την αναγνώριση, ενδοκύττωση και μετακίνηση των τροποποιημένων φορτίων. Πρόσφατα πειράματα δείχνουν ότι ο δεσμευτής D1 ενδοκυττώνεται μετά από μονο-ουβικουιτινιλίωση της ενδοκυττάριας περιοχής του και η μετακίνησή του σε ενδοκυττωτικά διαμερίσματα είναι απαραίτητη για τη σηματοδοτική του ενεργότητα (Wang & Struhl, 2004). Ο ρόλος των δύο λιγασών ουβικουιτίνης neur και mib1, καθώς επίσης και η αναγκαιότητα της πρωτεΐνης epsin (Iqf στη δροσόφιλα) φάνηκε από το φαινότυπο απώλειας λειτουργίας των παραπάνω πρωτεϊνών. Η μία από τις δύο λιγάσες ουβικουιτίνης είναι απαραίτητη για να εμφανίζει σηματοδοτική ενεργότητα ο δεσμευτής, αφού απουσία και των δύο λιγασών παρατηρείται πλήρης αναστολή της σηματοδότησης N (Pitsouli & Delidakis, 2005). Η ουβικουιτινιλίωση λοιπόν των δεσμευτών φαίνεται να είναι απαραίτητη για την ενδοκύττωση και σηματοδοτική τους ενεργότητα.

Η μελέτη της λειτουργίας της epsin στη ρύθμιση της σηματοδότησης N έδωσε σημαντικές πληροφορίες για το ρόλο της ενδοκύττωσης στη σηματοδότηση. Παρά το γεγονός ότι η epsin έχει βρεθεί να παίζει γενικό ρόλο στην ενδοκύττωση, η απώλεια λειτουργίας της στη δροσόφιλα επηρεάζει συγκεκριμένα τη σηματοδοτική ενεργότητα

των δύο δεσμευτών DSL (Wang & Struhl, 2004). Ενώ όμως η ‘γενική’ ενδοκύττωση του DI δεν επηρεάζεται από την απουσία της Iqf, η ενδοκύττωση του Ser αναστέλλεται σημαντικά, με αποτέλεσμα ο δεσμευτής συσσωρεύεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, γεγονός που δίνει ενδείξεις για διαφορετικά ενδοκυττωτικά μονοπάτια που πιθανόν ακολουθούν οι δύο δεσμευτές. Απώλεια λειτουργίας του mib1 αναστέλλει ακόμα πιο δραματικά τη γενική ενδοκύττωση του Ser, σε σύγκριση με το φαινότυπο της Iqf, δείχνοντας ότι το περισσότερο Ser ενδοκυττώνεται από μονοπάτι που απαιτεί την ουβικουιτινίωσή του και τη δράση της Iqf, ενώ αντίθετα η γενική ενδοκύττωση του DI γίνεται από διαφορετικά μονοπάτια που δεν απαιτούν ουβικουιτινίωση (Wang & Struhl, 2005).

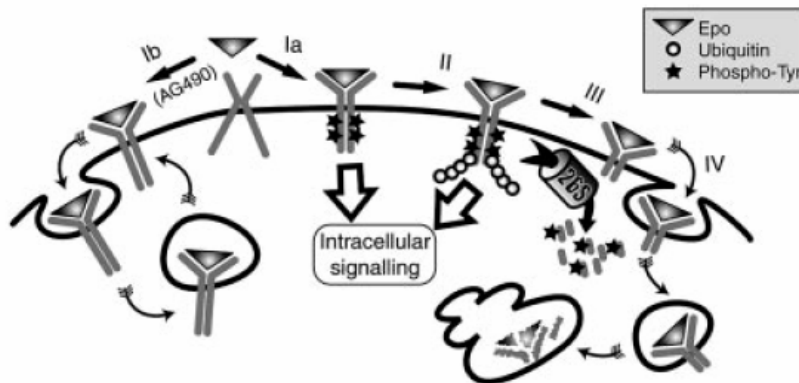


**Εικ. 56: Διαφορετικά ενδοκυττωτικά μονοπάτια από τους δεσμευτές DSL στη δροσόφιλα.** Και οι δύο δεσμευτές μπορούν να ενδοκυττωθούν από τρία διαφορετικά μονοπάτια. Οι E3 λιγάσες ουβικουιτίνης Mib1/Neur ουβικουιτινιώνουν ένα κατάλοιπο λυσίνης στην ενδοκυττάρια περιοχή των δεσμευτών και τους στοχεύουν για ενδοκύττωση μέσω της δράσης της Epsin ή μέσω άλλων παραγόντων, καθορίζοντας δύο διαφορετικές πορείες. Και οι δύο δεσμευτές περιέχουν όμως εποπλέον σινιάλα ενδοκύττωσης που τους οδηγούν σε ένα τρίτο ενδοκυττωτικό μονοπάτι, ανεξάρτητο από την ουβικουιτίνη ή την Epsin. Το εντονότερο κόκκινο βέλος στο Ser δείχνει ότι ακολουθεί κυρίως το μονοπάτι που εξαρτάται από την ουβικουιτίνη και τη δράση της Epsin, ενώ αντίθετα το DI ενδοκυττώνεται κυρίως από το τρίτο μονοπάτι (έντονο μαύρο βέλος). Και οι δύο δεσμευτές έχουν όμως σηματοδοτική ενεργότητα μόνο όταν ακολουθήσουν το μονοπάτι που εξαρτάται από την Epsin.

Πρόσφατες μελέτες πάνω στην ενδοκύττωση που εξαρτάται από Epsin σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών δείχνουν ότι η Epsin μπορεί να κατευθύνει τις πρωτεΐνες σε διαφορετικά μονοπάτια ανάλογα με την κατάσταση ουβικουιτινίωσής τους. Επιπλέον υπάρχουν ενδείξεις ότι αλληλεπιδράσεις της Epsin με συστατικά του μονοπατιού της κλαθρίνης μπορούν να καθορίζουν τον τόπο και τον τρόπο ενδοκύττωσης πρωτεϊνών φορτίων (Chen & De Camilli, 2005, Sigismund et al., 2005). Η



ενδοκύττωση των δεσμευτών του N στα θηλαστικά δεν έχει μελετηθεί καθόλου και τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής αποτελούν την πρώτη ένδειξη ότι η E3 λιγάση Neur1 επάγει την αποικοδόμησή τους στοχεύοντας τους σε κάποιο ενδοκυττωτικό διαμέρισμα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει η παρατήρησή μας ότι παρά το γεγονός ότι η υπερέκφραση των δύο λιγασών Neur/Mib1 του ποντικού επάγουν την αποικοδόμηση των δεσμευτών, η επεξεργασία των κυττάρων με αναστολέα του πρωτεασώματος φαίνεται να επηρεάζει μόνο τους δεσμευτές Jag1, 2 και όχι τους δεσμευτές Dll1,3,4. Η παρατήρηση ότι η λειτουργία του πρωτεασώματος μπορεί να σχετίζεται με την αποικοδόμηση των δεσμευτών Jag1,2 δημιουργεί ερωτηματικά, αφού όλες οι μελέτες στη δrosόφιλα τονίζουν την αποικοδόμηση των δεσμευτών στο λυσόσωμα μετά πιθανόν από μονο-ουβικουιτινιλίωσή τους. Η αναστολή της δράσης του πρωτεασώματος έχει βρεθεί να εμποδίζει την ενδοκύττωση ή την αποικοδόμηση αρκετών μεμβρανικών πρωτεϊνών (Wojcikiewicz, 2004, Berthoud et al., 2004). Οι αναστολείς όπως το MG132, lactacystin, ή ALLN μπορεί να αναστέλουν και τη δράση κάποιων λυσοσωμικών ενζύμων, το γεγονός όμως ότι ειδικά εμποδίζουν την αποικοδόμηση κάποιων μεμβρανικών πρωτεϊνών υποδηλώνει ότι και τα δύο μονοπάτια αποικοδόμησης μπορεί να συνεργάζονται για τη ρύθμιση κάποιων πρωτεϊνών στόχων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το παράδειγμα του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης και ο πιθανός μηχανισμός ρύθμισής του από το πρωτεάσωμα (Walfaren et al., 2004). Μετά την μονο-ουβικουιτινιλίωση και την ενδοκύττωσή του υποδοχέα, η ενδοκυττάρια περιοχή του κόβεται ή/και επεξεργάζεται από το πρωτεάσωμα, ενώ το υπόλοιπο τμήμα του υποδοχέα φτάνει στο λυσόσωμα μέσω των MVBs (Εικ. 57)



**Εικ. 57: Προτεινόμενο μοντέλο αποικοδόμησης του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης (EpoR).** Μετά από πρόσδεση του δεσμευτή, ο υποδοχέας φωσφορυλιώνεται και οδηγείται για ενδοκυττώση. Στην επιφάνεια του κυττάρου ουβικουτινιλιώνεται και αναγνωρίζεται από το πρωτεάσωμα, το οποίο αποικοδομεί την ενδοκυττάρια περιοχή του (III). Με αυτό τον τρόπο απομακρύνονται από τον υποδοχέα όλες οι φωσφορυλιωμένες τυροσίνες, σταματώντας τη μεταγωγή του σήματος. Το υπόλοιπο τμήμα του υποδοχέα ενδοκυττώνεται και οδηγείται στο λυσόσωμα (IV). Αν η ενεργοποίηση του υποδοχέα εμποδιστεί, τότε δεν φωσφορυλιώνεται ούτε ουβικουτινιλιώνεται, αλλά ακολουθεί μονοπάτι ανακύκλωσης.

Η πρωτεολυτική πέψη και απελευθέρωση της ενδοκυττάριας περιοχής των δεσμευτών από την ενεργότητα  $\gamma$ -secretase των πρεσενιλινών έχει παρατηρηθεί στη δροσόφιλα και στο ποντίκι, αλλά η ρύθμιση αυτών των περιοχών από το πρωτεάσωμα δεν έχει ελεγχθεί (Ikeuchi & Sisodia, 2003, La Voie, & Selkoe, 2003, Bland et al., 2003). Αντίθετα το προτεινόμενο μοντέλο είναι πιθανό να ισχύει για την ενδοκυττάρια περιοχή του N, η οποία ουβικουτινιλιώνεται από την E3 λιγάση mSel-10 και αποικοδομείται μέσω πρωτεασώματος αφού επεξεργασία με αναστολέα του πρωτεασώματος MG132 έχει σαν αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση των επιπέδων της ενδοκυττάριας περιοχής (Oberg et al., 2001). Η παρατήρηση ότι η αποικοδόμηση των δεσμευτών Dll1,4 δεν εξαρτάται πιθανό από το πρωτεάσωμα δίνει ενδείξεις για διαφορετική ρύθμιση τους από αυτή που παρατηρείται για τους δεσμευτές Jagged. Αξίζει να τονίσουμε ότι και για τους δύο δεσμευτές Jagged1 και Jagged2 του ποντικού έχει παρατηρηθεί ουβικουτινιλίωση *in vitro* από δύο διαφορετικές E3 λιγάσες (Neur1 παρούσα διατριβή και Mib2 Takeuchi, 2005 αντίστοιχα), ενώ δεν έχει παρατηρηθεί η ουβικουτινιλίωση των δεσμευτών Dll1,4.

Η υπερέκφραση του *Neur1* μπορεί να επάγει την αποικοδόμηση και των τεσσάρων δεσμευτών, παρά το ότι ουβικουιτινιλιώνει μόνο το *Jagged1*, κάτι που δημιουργεί σημαντικά ερωτήματα για την αναγκαιότητα της ουβικουιτινιλίωσης για την επαγωγή της αποικοδόμησης των δεσμευτών ή για τη στόχευσή τους σε διαφορετικά ενδοκυττωτικά διαμερίσματα. Επιπλέον το γεγονός ότι η αποικοδόμηση του δεσμευτή *Dll3* δεν φαίνεται να επάγεται από την υπερέκφραση των 2 λιγασών ουβικουιτίνης *Neur1/Mib1*, αφού είναι αδύνατο να ουβικουιτινιλωθεί στην ενδοκυττάρια περιοχή του, δείχνει συσχέτιση της ουβικουιτινιλίωσης και της αποικοδόμησης. Είναι πιθανό το *Neur1* να συμμετέχει σε ένα γενικότερο μηχανισμό απομάκρυνσης διαμεμβρανικών πρωτεϊνών από την κυτταροπλασματική μεμβράνη, χωρίς να τους στοχεύει άμεσα για ουβικουιτινιλίωση. Αυτή η πιθανότητα ενισχύεται από την παρατήρηση ότι απώλεια λειτουργίας του *neur* στα SOPs έχει σαν αποτέλεσμα την συσσώρευση της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης *sanpodo* στην επιφάνεια του κυττάρου, λόγω πιθανό αναστολής της ενδοκύττωσής της (Roegiers et al., 2005), καθώς και από την παρατήρησή μας ότι το *Neur1* αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα *DcR2*.

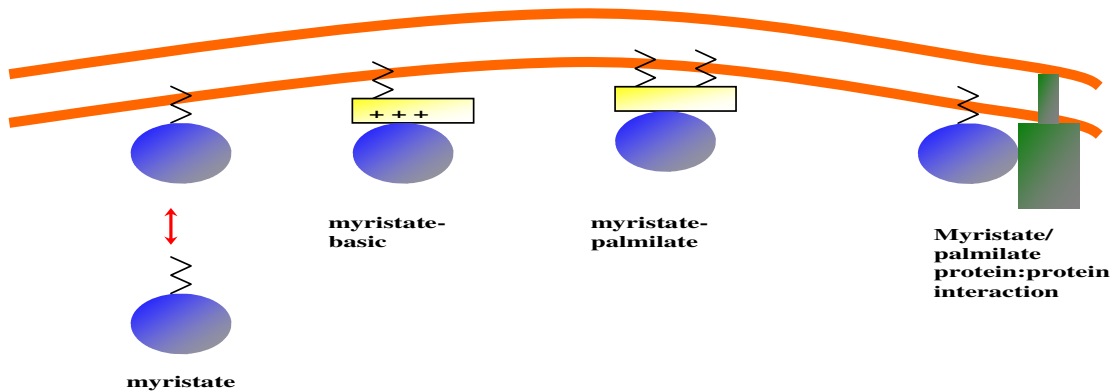
Ο στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της λειτουργίας του *Neur1* του ποντικού, για αυτό και τα αποτελέσματά μας που αφορούν στην ρύθμιση των δεσμευτών του *N* μέσω ουβικουιτινιλίωσης είναι πολύ προκαταρκτικά. Οι πρώτες ενδείξεις που αποκτήσαμε θετούν πολλά σημαντικά ερωτήματα για τη ρύθμιση των δεσμευτών από E3 λιγασές στα θηλαστικά και για τις συνέπειες αυτής της ρύθμισης στη σηματοδότηση. Ακόμα και στη δροσόφιλα όπου υπάρχουν πολλά γενετικά πειράματα για τη ρύθμιση της ενεργότητας των δεσμευτών, δεν υπάρχουν βιοχημικά πειράματα που να δείχνουν άμεσα την ουβικουιτινιλίωση τους. Αυτό είχε οδηγήσει σε πληθώρα ερωτημάτων για τον ακριβή βιοχημικό ρόλο του *neur* και *mib1*, όπως η ταυτοποίηση των καταλοίπων που ουβικουιτινιλιώνονται, αν πράγματι πρόκειται για μόνο ή πολυ-ουβικουιτινιλίωση και κυρίως με ποιο τρόπο οι λιγασές επάγουν την ενδοκύττωση και την αποικοδόμηση των δεσμευτών. Το γεγονός ότι η ίδια η ουβικουιτινιλίωση μπορεί να προκαλεί δύο ανταγωνιστικά αποτελέσματα, την επαγωγή της σηματοδότησης και την αναστολή της θέτει σημαντικά ερωτήματα για το ρυθμιστικό ρόλο των δύο λιγασών ουβικουιτίνης.

## **Η ρύθμιση της πρωτεΐνης Neurl του ποντικού μέσα στο κύτταρο.**

Πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης Neurl από το εργαστήριό μας και άλλες ερευνητικές ομάδες έχουν δώσει διαφορετικά αποτελέσματα. Ενώ για την πρωτεΐνη neur της δροσόφιλα ήταν σαφές ότι σχετίζεται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη (Pavlopoulos et al, 2001, Lai & Rubin, 2001a), η πρωτεΐνη Neurl του ποντικού εμφανίζεται κυρίως σε κυστιδιακές δομές μέσα στο κυτταρόπλασμα (Pavlopoulos et al, 2002), ενώ έχει παρατηρηθεί να εισέρχεται και στον πυρήνα (Timmusk et al., 2002). Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής δίνουν σημαντικές ενδείξεις για στόχευση της πρωτεΐνης Neurl στην κυτταροπλασματική μεμβράνη μετά από πιθανή μυριστοϋλίωσή της στο αμινοτελικό της άκρο. Η συσχέτιση του Neurl με την κυτταροπλασματική μεμβράνη ενισχύει το ρόλο του σαν ρυθμιστή της ενδοκύττωσης διαμεμβρανικών πρωτεϊνών και στα θηλαστικά, καθώς επίσης και την πιθανότητα ρύθμισης των δεσμευτών του N. Η στόχευση του στη μεμβράνη φαίνεται ωστόσο να σχετίζεται και με το ρυθμό αποικοδόμησής του, αφού η μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης που δεν μπορεί πιθανό να μυριστοϋλιωθεί (το κατάλοιπο γλυκίνης έχει αντικατασταθεί από αλανίνη) συσσωρεύεται μέσα στο κύτταρο, σε αντίθεση με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη που αποικοδομείται γρήγορα. Οι περισσότερες E3 λιγάσες ουβικουιτίνης είναι γνωστό ότι αυτο-ουβικουιτινιλιώνονται και στοχεύονται στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση (d' Azzo et al., 2005). Για αυτό και αφαίρεση της περιοχής RING έχει συχνά σαν αποτέλεσμα την αναστολή της αποικοδόμησής τους και την συσσώρευσή τους μέσα στο κύτταρο, κάτι που έχει παρατηρηθεί για την πρωτεΐνη Xneur του βατράχου (Deblandre et al., 2001). Τα πειράματά μας δείχνουν ότι αυτό δεν παρατηρείται για την πρωτεΐνη Neurl του ποντικού, αφού αφαίρεση της περιοχής RING δεν αυξάνει τα επίπεδά της μέσα στο κύτταρο, ενώ σημειακές μεταλλάξεις στις συντηρημένες κυστεΐνες της περιοχής προκαλεί μόνο μικρή αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης. Αντίθετα παρατηρούμε σημαντική συσσώρευση της πρωτεΐνης στο κύτταρο με τη σημειακή μετάλλαξη στη δεύτερη γλυκίνη που μυριστοϋλιώνεται, παρά το γεγονός ότι η περιοχή RING της πρωτεΐνης είναι πλήρως λειτουργική. Κάτι αντίστοιχο έχει παρατηρηθεί και για την πρωτεΐνη PAR-2 του C.elegans, η οποία στοχεύεται στον κυτταρικό φλοιό μετά από φωσφορυλίωσή της, ενώ η περιοχή RING φαίνεται να ρυθμίζει τα επίπεδά της μέσα στο

κύτταρο. Μεταλλαγές στις σερίνες που φωσφορυλιώνονται επηρεάζουν τον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης, αποκλείοντάς τη από τον κυτταρικό φλοιό, ενώ παράλληλα προκαλούν και σημαντική αύξηση στα επίπεδα της πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο, παρά το γεγονός ότι η περιοχή RING είναι πλήρως λειτουργική (Hao et al., 2006).

Όπως και για το Neur1, είναι πιθανό να υπάρχει κάποια συσχέτιση της ενεργότητας της περιοχής RING με τη στόχευση της πρωτεΐνης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Επιπλέον παρατηρήσαμε ότι και οι δύο παραπάνω μεταλλαγμένες μορφές είναι ουβικουιτινιωμένες μέσα στο κύτταρο, γεγονός που υποδηλώνει την αλληλεπίδραση και ρύθμιση του Neur1 του ποντικού από κάποια άλλη λιγάση ουβικουιτίνης. Τέλος μελετήσαμε και την πιθανότητα ρύθμισης του υποκυτταρικού εντοπισμού και της σταθερότητας του Neur1 μέσω φωσφορυλίωσης των καταλοίπων σερίνης που ταυτοποιήθηκαν από την ανάλυση φασματοσκοπίας μάζας, αλλά οι μεταλλαγές στις παραπάνω σερίνες δεν φάνηκαν να επηρεάζουν τα επίπεδα της πρωτεΐνης, ούτε τον υποκυτταρικό της εντοπισμό. Ενώ η ρύθμιση μυριστοϋλιωμένων πρωτεϊνών μέσω φωσφορυλίωσης έχει αναφερθεί σε αρκετές περιπτώσεις (Eικ. 58) (Resh, 1999), είναι πιθανό να μην μπορέσαμε να παρατηρήσουμε κάποια ρύθμιση μεταξύ μυριστοϋλίωσης και φωσφορυλίωσης γιατί υπάρχουν επιπλέον κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης που φωσφορυλιώνονται, αλλά δεν στοχεύθηκαν με σημειακή μεταλλαξογένεση. Αυτή η πιθανότητα ενισχύεται από το γεγονός ότι η μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης με τις δύο σερίνες φαίνεται να παραμένει φωσφορυλιωμένη.



**Εικ. 58 : Μοντέλο δύο βημάτων στόχευσης μυριστοϋλιωμένων πρωτεϊνών στην κυτταροπλασματική μεμβράνη.** Για να αλληλεπιδρούν πιο σταθερά με την μεμβράνη οι μυριστοϋλιωμένες πρωτεΐνες χρειάζονται συνήθως και ένα δεύτερο σινιάλο. Αυτό μπορεί να είναι είτε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τις όξινες φωσφολιπιδικές κεφαλές της διπλοστοιβάδας (οι οποίες συνήθως διαταράσσονται μετά από φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης), είτε με επιπλέον παλμιτοϋλίωση της πρωτεΐνης, είτε με αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες που είναι προσδεμένες στην μεμβράνη.

Οι μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης που αναστέλλουν τη μυριστοϋλίωση της πρωτεΐνης και την ενεργότητα της περιοχής RING φαίνεται επίσης να επηρεάζουν την ικανότητα του Neur1 να ρυθμίζει την αποικοδόμηση των δεσμευτών του N. Η παρατήρηση αυτή πρέπει να επιβεβαιωθεί με επιπλέον πειράματα που να ελέγχουν την αλληλεπίδραση των μεταλλαγμένων μορφών με τους δεσμευτές και την πιθανή αναστολή της ουβικουιτινιλώσής τους. Αν η στόχευση του Neur1 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη προκαλεί γενικότερη αποικοδόμηση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, τότε η ρύθμιση της ενεργότητας του σαν E3 λιγάση ουβικουιτίνης θα είναι απαραίτητη για να εξασφαλίζεται η ελεγχόμενη ενεργοποίηση της σηματοδότησης στο χώρο και στο χρόνο. Η ρύθμιση της ενεργότητας των λιγασών μέσω επιπλέον πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μπορεί να προσθέτει επίπεδα ελέγχου της σηματοδότησης και η ταυτοποίηση αυτών των νέων παραγόντων να δώσει σημαντικές πληροφορίες για τη σχέση της ουβικουιτινιλώσης με την ενδοκύττωση και τη σηματοδότηση.

## **Η συμμετοχή της πρωτεΐνης *Neurl* του ποντικού στο σηματοδοτικό μονοπάτι N.**

Η πρωτεΐνη *Neurl* είναι συντηρημένη στους πολυκύτταρους οργανισμούς. Σύγκριση των ορθόλογων πρωτεϊνών των θηλαστικών με αυτές του βατράχου και της δροσόφιλας (Κοκκινάκη Διδακτορική Διατριβή, 2005) υπέδειξε ταυτότητα αμινοξικών καταλοίπων σε ποσοστά 63% και 27% αντίστοιχα. Συγκρίνοντας ξεχωριστά τις περιοχές των επαναλήψεων NEUZ1, NEUZ2 και το RING των ορθόλογων πρωτεϊνών προκύπτει σημαντική αμινοξική συντήρηση, γεγονός που υποδηλώνει τη σημασία της κάθε περιοχής στη λειτουργία του μορίου. Ενώ όμως ο ρόλος της πρωτεΐνης *neur* της δροσόφιλα και του βατράχου είχε αποδειχτεί να είναι συντηρημένος και να εμπλέκει την πρωτεΐνη στη ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού N, δεν υπήρχαν ικανοποιητικά πειραματικά δεδομένα που να υποστηρίζουν αντίστοιχο ρόλο για την πρωτεΐνη των θηλαστικών. Η παρούσα διδακτορική διατριβή δίνει τις πρώτες σημαντικές ενδείξεις για την λειτουργία του *Neurl* του ποντικού σαν E3 λιγάση ουβικουιτίνης και την συμμετοχή της στη ρύθμιση του μονοπατιού N των θηλαστικών. Τα γενετικά δεδομένα που ήταν διαθέσιμα μέχρι τώρα δεν υποστήριζαν τη συμμετοχή του *Neurl* στο μονοπάτι N, αφού ο φαινότυπος απώλειας λειτουργίας του έδινε βιώσιμα και γόνιμα άτομα με πολύ ήπιες ανωμαλίες στο νευρικό και αναπαραγωγικό σύστημα (Ruan et al., 2001, Vollrath et al., 2001), σε αντίθεση με το φαινότυπο απώλειας λειτουργίας του γονιδίου *Mib1*, που φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά όλες τις αναπτυξιακές διαδικασίες που ρυθμίζονται από το μονοπάτι N στα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης (Koo et al., 2005a). Επιπλέον πειράματα εκτοπικής υπερέκφρασης του γονιδίου *Xneur* του βατράχου στον εμβρυικό δίσκο του φτερού έδειξαν ότι, όπως ακριβώς το *neur* της δροσόφιλα, έτσι και η πρωτεΐνη του βατράχου επάγει την ενδοκύττωση και αποικοδόμηση του δεσμευτή D1, κάτι που δεν παρατηρήθηκε με το αντίστοιχο πείραμα εκτοπικής έκφρασης του *Neurl* στο δίσκο του φτερού της δροσόφιλα (Παυλόπουλος Η, Διδακτορική Διατριβή, 2002). Σε αυτό το γεγονός μπορεί να συντέλεσε η πρόσθετη αλληλουχία που ενσωματώθηκε στον αρχικό κλώνο cDNA του γονιδίου *Neurl* προκειμένου να κατασκευαστεί τεχνητό κωδικόνιο έναρξης μετάφρασης (Παυλόπουλος Η, Διδακτορική Διατριβή, 2002). Είναι πιθανό τα πρόσθετα εννέα αμινοτελικά αμινοξέα στη θέση των τεσσάρων πρώτων ενδογενών καταλοίπων να αλλοίωσαν τη λειτουργική δράση του μορίου, αφού όπως έχει τονιστεί

παραπάνω φαίνεται να ρυθμίζουν σημαντικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο.

Η βιοχημική μελέτη της δράσης του Neurl αποκάλυψε τη συντηρημένη δράση του σαν E3 λιγάση ουβικουτίνης και στα θηλαστικά, όπως έχει αποδειχτεί για τις πρωτεΐνες της δροσόφιλα και του βατράχου. Η ταυτοποίηση του δεσμευτή Jagged1 σαν υπόστρωμα του Neurl του ποντικού αποτελεί σημαντική ένδειξη για τη συμμετοχή του στο σηματοδοτικό μονοπάτι N, ενώ παράλληλα αποτελεί και το πρώτο βιοχημικό πείραμα που δείχνει άμεση αλληλεπίδραση και ουβικουτινιλίωση του δεσμευτή Jagged1. Οι E3 λιγάσες στα θηλαστικά που ουβικουτινιλιώνουν τους δεσμευτές Dll1,4 δεν έχουν ταυτοποιηθεί, κάτι που είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την μελέτη του μονοπατιού, δεδομένου ότι η ουβικουτινιλίωση των δεσμευτών στη δροσόφιλα έχει δείχτεί να είναι απαραίτητη για τη σηματοδοτική τους ενεργότητα. Η αλληλεπίδραση του Neurl με τους δεσμευτές του N μέσα στα κύτταρα και η επαγωγή της αποικοδόμησής τους δίνει επιπλέον ενδείξεις για τη συμμετοχή του στο μονοπάτι και παράγει πολλά ερωτήματα για το μηχανισμό με τον οποίο η δράση των E3 λιγασών ουβικουτίνης Neurl και Mib1,2 ρυθμίζουν το μονοπάτι σε διαφορετικά αναπτυξιακά υπόβαθρα. Μια επιπλέον ένδειξη που θα ενίσχυε ακόμα περισσότερο την πιθανότητα συμμετοχής του Neurl στο μονοπάτι N είναι η επίδραση της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης στη σηματοδοτική ενεργότητα των δεσμευτών. Αυτό θα μπορούσε να ελεγχθεί πειραματικά με τη χρήση του συστήματος συγκαλλιέργειας κυττάρων που εκφράζουν σταθερά τον υποδοχέα και τους διαφορετικούς δεσμευτές. Η μελέτη της υπερέκφρασης του Neurl και των διαφορετικών μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης που έχουν παραχθεί, σε αυτό το σύστημα θα έδινε σημαντικές για το ρόλο της ουβικουτινιλίωσης στην ενεργοποίηση της σηματοδότησης, καθώς επίσης θα συνέβαλλε σε λεπτομερέστερη ανάλυση της λειτουργίας του Neurl στη ρύθμιση των δεσμευτών N.



## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Agatep, R., Kirkpatrick, RD., Parchaliuk, DL., Woods, RA., Gietz, RD. (1998) Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol protocol. *Technical Tips Online 1*, P01525.
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., Fortini, M. (1995) Notch Signaling. *Science 268*, 225-232.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., Lake, R.J. (1999) Notch signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science 284*, 770-776.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, RE., Moore, DD., Seidman, JG., Smith, JA., Struhl, K. (2000) *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Protocols in Molecular Biology Unit 13*.
- Bang, M.-L., Mudry, R.E., McElhinny, A.S., Trombitás, K., Geach, A.J., Yamasaki, R., Sorimachi, H., Granzier, H., Gregorio, C.C., Labeit S. (2001) Myopalladin, a Novel 145-Kilodalton Sarcomeric Protein with Multiple Roles in Z-Disc and I-Band Protein Assemblies. *Journal of Cell Biology 153*, 413-427.
- Barsi, J. C., Rajendra, R., Wu, J.I., Artzt, K. (2005) Mind Bomb 1 is a ubiquitin ligase essential for mouse embryonic development and Notch signaling. *Mechanisms of Development 122*, 1106-1117.

- Berthoud, V. M., Minogue, P.J., Laing, J.G., Beyer, E.C. (2004) Pathways for degradation of connexins and gap junctions. *Cardiovasc Res* 62, 256-267.
- Bettenhausen, B., Hrabe de Angelis, M., Simon, D., Guenet, J-L., Gossler, A. (1995) Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll1, a murine gene closely related to Drosophila Delta. *Development* 121, 2407-2418.
- Blagden, S. P., Glover, D.M. (2003) Polar expeditions--provisioning the centrosome for mitosis. *Nat Cell Biology* 5, 505-511.
- Bland, C. E., Kimberly, P., Rand, M.D. (2003) Notch-induced proteolysis and nuclear localization of the Delta ligand. *Journal of Biological Chemistry* 278, 13607-13610.
- Bonifacino, J. S., Traub, L.M. (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annual Reviews of Biochemistry* 72.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bray, S., Furriols, M. (2001) Notch pathway: making sense of suppressor of hairless. *Current Biology* 11, R217-R221.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., Le Bail, O., 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. *Molecular Cell* 5, 207-216.
- Cadavid, A. L., Ginzl, A., Fischer, J.A. (2000) The function of the Drosophila fat facets deubiquitinating enzyme in limiting photoreceptor cell number is intimately associated with endocytosis. *Development* 127, 1727-1736.
- Chen, H., De Camilli, P. (2005) The association of epsin with ubiquitinated cargo along the endocytic pathway is negatively regulated by its interaction with clathrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2766-2771.
- D'Azzo, A., Bongiovanni, A., Nastasi, T. (2005) E3 Ubiquitin ligases as regulators of membrane protein trafficking and degradation. *Traffic* 6, 429-441.
- De Strooper, B. (2003) Aph-1, Pen-2 and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-secretase complex. *Neuron* 38, 9 -12.
- Deblandre, G. A., Lai, E.C., Kitner, C. (2001) Xenopus Neuralized is a ubiquitin ligase that interacts with XDelta1 and regulates Notch signaling. *Developmental Cell* 1, 795-806.

- Degli-Esposti MA, D. W., Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG. (1997) The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 7, 813-820.
- Di Fiore, P. P., De Camilli, P. (2001) Endocytosis and signaling: an inseparable partnership. *Cell* 106, 1-4.
- Du, Q., Macara, I.G. (2004) Mammalian Pins is a conformational switch that links NuMA to heterotrimeric G proteins. *Cell* 119, 503-516.
- Dunwoodie, S. L., Henrique, D., Harrison, S.M., Beddington, R.S.P. (1997) Mouse Dll3: a novel divergent Delta gene may complement the function of other Delta homologues during early pattern formation in the mouse embryo. *Development* 124, 3065-3076.
- Eng, J. K., McCormick, A.L., and Yates, J.R., 3rd (1994) An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J Am Soc Mass Spectrom* 5, 976-989.
- Fleming, R. J. (1998) Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Seminars in Cellular and Developmental Biology* 9, 599-607.
- Fortini, M. E. (2001) Notch and presenilin: a proteolytic mechanism emerges. *Current Opinion in Cell Biology* 13, 627-634.
- French, A. R., Tadaki, D. K., Niyogi, S.K., Lauffenburger, D.A. (1995) Intracellular trafficking of epidermal growth factor family ligands is directly influenced by the pH sensitivity of the receptor/ligand interaction. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 26178-26168.
- Fryer, C. J., White, B.J., Jones, K.A. (2004) Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. *Molecular Cell* 16, 509-520.
- Galan, J., Haguenaer-Tsapis R. (1997) Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO J* 16, 5847-5854.
- Gossler A, H. d. A. M. (1998) Somitogenesis. *Curr Top Dev Biol* 38, 225-287.
- Gupta-Rossi, N., Le Bail, O., Gonen, H., Brou, C., Logeat, F., Six, E., Ciechanover, A., Israel, A. (2001) Functional interaction between SEL-10, an F-box protein, and the nuclear form of activated Notch1 receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 34371-34378.
- Gupta-Rossi, N., Six, E., Le Bail, O., Logeat, F., Chastagner, P., Olry, A., Israel, A., Brou, C. (2004) Monoubiquitination and endocytosis direct  $\alpha$ -secretase cleavage of activated Notch receptor. *The Journal of Cell Biology* 166, 73-83.

Gurthie, C., Fink, GR. (1991) Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology; methods in Enzymology. Academic Press 169.

Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P.P., Dikic, I. (2003) Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biology* 5, 461-466.

Hao, Y., Boyd, I., Seydoux, G. (2006) Stabilization of Cell Polarity by the *C. elegans* RING Protein PAR-2. *Developmental Cell* 10, 199-208.

Hata, Y., Nakanishi, H., Takai, Y. (1998) Synaptic PDZ-domain containing proteins. *Neuroscience Research* 32, 1-7.

Hicke, L. (1999) Getting down with ubiquitin: turning off cell surface receptors, transporters and channels. *Trends in Cell Biology* 9, 107-112.

Hicke, L. (2001) Protein regulation by monoubiquitin. *Nature Reviews Molecular Cellular Biology* 2, 195-201.

Hicks, C., Johnston, S.H., diSibio, G., Collazo, A., Vogt, T.F., Weinmaster, G. (2000) Fringe differentially modulates Jagged1 and Delta1 signalling through Notch1 and Notch2. *Nat Cell Biology* 2, 515-520.

Ho SN, H. H., Horton RM, Pullen JK, Pease LR. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51-59.

Ikeuchi, T., Sidodia, S.S. (2003) The Notch1 ligands, Delta1 and Jagged2, are substrates for presenilin-dependent "α-secretase" cleavage. *Journal of Biological Chemistry* 278, 7751-7754.

Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E.H., Kopan, R., Israel, A. (1995) Signaling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 377, 355-358.

Jekely, G., Rorth, P. (2003) Hrs mediates downregulation of multiple signaling receptors in *Drosophila*. *EMBO Reports* 4, 1163-1168.

Jin, Y., Blue, E.K., Dixon, S., Shao, Z., Gallagher, P.J. (2002) A Death-associated Protein Kinase (DAPK)- interacting Protein, DIP-1, is an E3 Ubiquitin Ligase that promotes tumor necrosis factor-induced Apoptosis and Regulates the cellular levels of DAPK. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 46980-46986.

Joazeiro, C. A., Wing, S.S., Huang, H., Levenson, J.D., Hunter, T., Liu, Y.C. (1999) The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* 286, 309-312.

- Kamura T, S. S., Iwai K, Czyzyk-Krzeska M, Conaway RC, Conaway JW. (2000) Activation of HIF1 $\alpha$  ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10430-10435.
- Kao, H. Y., Ordentlich, P., Koyano-Nakagawa, N., Tang, Z., Downes, M., Kintner, Evans, R.M., Kadesch, T. (1998) A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes & Development* 12, 2269-2277.
- Kato, A., Ozawa, F., Saitoh, Y., Fukazawa, Y., Sugiyama, H. & Inokuchi, K. (1998) Novel members of the Ves1/Homer family of PDZ proteins that bind metabotropic glutamate receptors. *Journal of Biological Chemistry* 273, 23969-23975.
- Katzmann, D. J., Babst, M., Emr, S.D. (2001) Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106, 145-155.
- Kidd, S., Lieber, T. (2002) Furin cleavage is not a requirement for drosophila Notch function. *Mechanisms of Development* 115, 41-51.
- Knoblich, J. A. (2001) Asymmetric cell division during animal development. *Nat Reviews Molecular Cell Biology* 2, 11-20.
- Koo, B.-H., Lim, H-S., Song, R., Yoon, M-J., Yoon, K-J., Moon, J-S., Kim, Y-W., Kwon, M-C., Yoo, K-W., Kong, M-P., Lee, J., Chitnis, A.B., Kim C-H., Kong, Y-Y. (2005a) Mind Bomb 1 is essential for generating functional Notch ligands to activate Notch. *Development* 132, 3459-3470.
- Koo, B.-H., Yoon, K-J., Yoo, K-W., Lim, H-S., Song, R., Yoon, M-J., Moon, J-S., Kim, Y-W., So, J-H., Kim C-H., Kong, Y-Y. (2005b) Mind Bomb-2 is an E3 Ligase for Notch Ligand. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 22335-22342.
- Krebs, L., T., Xue, Y., Norton, C.R., Shutter, J.R., Maguire, M., Sundberg, J.P., Gallahan, D., Closson, V., Kitajewski, J., Callahan, R., Smith, G.H., Stark, K.L., Gridley, T. (2000) Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes & Development* 14, 1343-1352.
- La Voie, M. J., Selkoe, D.J. (2003) The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by  $\alpha$ -secretase and presenilin/  $\gamma$ -secretase and release signaling fragments. *Journal of Biological Chemistry* 278, 34427-34437.
- Lai, E. C., Deblandre, G.A., Kintner, C., Rubin, G.M. (2001b) Drosophila Neuralized is a ubiquitin ligase that promotes the internalization and degradation of Delta. *Developmental Cell* 1, 783-794.

Lai, E. C., Orgogozo, V. (2004) A hidden program in *Drosophila* periheral neurogenesis revealed: fundamental principles underlying sensory organ diversity. *Developmental Biology* 269, 1-17.

Lai, E. C., Roegiers, F., Qin, X., Jan, Y.N., Rubin, G. (2005) The ubiquitin ligase *Drosophila* Mind Bomb promotes Notch signaling by regulating the localization and activity of Serrate and Delta. *Development* 132, 2319-2332.

Lai, E. C., Rubin, G.M. (2001a) neuralized functions cell-autonomously to regulate a subset of Notch-dependent processes during adult *drosophila* development. *Developmental Biology* 231, 217-233.

Le Borgne, R., Bardin, A., Schweisguth, F. (2005b) The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development* 132, 1751-1762.

Le Borgne, R., Remaud, S., Hamel, S., Schweisguth, F. (2005a) Two distinct E3 ubiquitin ligases have complementary functions in the regulation of Delta and Serrate signaling in *Drosophila*. *PLoS* 3.

Le Borgne, R., Schweisguth, F. (2003) Unequal segregation of Neuralized biases Notch activation during asymmetric cell division. *Developmental Cell* 5, 139-148.

Le Roy, C., Wrana, J.L. (2005) Clathrin and non-clathrin mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nature Reviews Molecular Cellular Biology* 6, 112-126.

Lieber, T., Kidd, S., Young, M.W. (2002) kuzbanian-mediated cleavage of *drosophila* Notch. *Genes & Development* 16, 209-221.

Lindsell, C. E., Boulter, J., diSibio, G., Gossler, A., Weinmaster, G. (1996) Expression Patterns of Jagged, Delta1, Notch1, Notch2, and Notch3 genes identify ligand-receptor pairs that may function in neural development. *Molecular and Cellular Neuroscience* 8, 14-27.

Lindsell, C. E., Shawber, C.J. Boulter, J., Weinmaster, G. (1995) Jagged: A mammalian Ligand that activates Notch1. *Cell* 80, 908-917.

Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., Le Bail, O., Jarriault, S., Seidah, N.G., Israel A. (1998) The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8108-8112.

Lorick, K. L., Jensen, J.P., Fang, S., Ong, A.M., Hatakeyama, S., Weissman, A.M. (1999) RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11364-11369.

- Luo, D., Renault, V.M., Rando, T.A. (2005) The regulation of Notch signaling in muscle stem cell activation and postnatal myogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 16, 612-622.
- Marmor, M. D., Yarden, Y. (2004) Role of protein ubiquitylation in regulating endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Oncogene* 23, 2057-2070.
- Matsuno, K., Diederich, R.J., Go, M.J., Blaumueller, C.M., Artanvanis-Tsakonas, S. (1995) Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. *Development* 121, 2633-2644.
- Matsuno, K., Ito, M., Hori, K., Miyashita, F., Suzuki, S., Artanvanis-Tsakonas, S., Okano, H. (2002) Involvement of a proline rich motif and RING-H2 finger of Deltex in the regulation of Notch signaling. *Development* 129, 1049-1059.
- McGill, M. A., McGlade, C.j. (2003) Mammalian Numb Proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 23196-23203.
- Meng RD, M. E. r., Sheikh MS, Fornace AJ Jr, El-Deiry WS. (2000) The TRAIL decoy receptor TRUNDD (DcR2, TRAIL-R4) is induced by adenovirus-p53 overexpression and can delay TRAIL-, p53-, and KILLER/DR5-dependent colon cancer apoptosis. *Molecular Therapy* 1, 130-144.
- Merdes A, H. R., Samejima K, Earnshaw WC, Cleveland DW (2000) Formation of spindle poles by dynein/dynactin-independent transport of NuMA. *Journal of Cell Biology* 149, 851-862.
- Mishra-Gorur, K., Rand, M.D., Perez-Villamil, B., Artavanis-Tsakonas, S. (2002) Down-regulation of Delta by proteolytic processing. *The Journal of Cell Biology* 159, 313-324.
- Morel, V., Schweisguth, F. (2000) Repression by suppressor of hairless and activation by Notch are required to define a single row of single-minded expressing cells in the *Drosophila* embryo. *Genes & Development* 14, 377-388.
- Morita S, K. T., Kitamura T. (2000) Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* 7, 1063-1066.
- Mumm, J. S., Schroeter, E.H., Saxena, M.T, Griesemer, A., Tian X., Pan, D.J., Ray, W.J., Kopan, R. (2000) A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Molecular Cell* 5, 197-206.
- Nakamura, H., Yoshida, M., Tsuiki, H., Ito, K., Ueno, M., Nakao, M., Oka, K., Tada, M., Kochi, M., Kuratsu, J-I., 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, 1009-1019.

Nastasi, T., Bongiovanni, A., Campos, Y., Mann, L., Toy, J.N., Bostrom, J., Rottier, R., Hahn C., Conaway, J.W., Harris, A.J., d'Azzo, A. (2004) Ozz-E3, A muscle specific ubiquitin ligase, regulates b-catenin degradation during myogenesis. *Developmental Cell* 6, 269-282.

Nesterov, A., Carter, R.E., Sorkina, T., Gill, C.N., Sorkin, A. (1999) Inhibition of the receptor-binding function of clathrin adaptor protein AP-2 by dominant-negative mutant  $\beta$ 2 subunit and its effect on endocytosis. *EMBO J* 18, 2489-2499.

Nie, J., McGill, M., Dremer, M., Dho, S., Wolting, C., McGlade, C.J. (2002) LNX functions as a RING type E3 ubiquitin ligase that targets the cell fate determinant Numb for ubiquitin dependent degradation. *EMBO J* 21, 93-102.

Oberg, C. J. L., Pauley, A., Wolf, E., Gurney, M., Lendahl, U. (2001) The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 35847-35853.

Okochi, M., Steiner, H., Fukumori, A., Tanii, H., Tomita, T., Tanaka, T., Iwatsudo, T., Kudo, Takeda, M., Haass, C. (2002) Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1. *EMBO J* 21, 5408-5416.

Overstreet, E., Chen, X., Wendland, B., Fischer, J.A. (2003) Either part of a Drosophila Epsin Protein, Divided after the ENTH domain, functions in endocytosis of Delta in the developing eye. *Current Biology* 13, 854-860.

Overstreet, E., Fitch, E., Fischer, J.A. (2004) Fat facets and Liquid facets promote Delta endocytosis and Delta signaling in the signaling cells. *Development* 131, 5355-5366.

Ozkan E., Y., H., Deisenhofer, J. (2005) Mechanistic insight into the allosteric activation of a ubiquitin-conjugating enzyme by RING-type ubiquitin ligases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18890-18895.

Parks, A. L., Klueg, K.M., Stout, J.R., Muskavitch, M.A. (2000) Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* 127, 1373-1385.

Parks, A. L., Turner, F.R., Muskavitch, M.A. (1995) Relationships between complex Delta expression and the specification of retinal cell fates during Drosophila eye development. *Mechanisms of Development* 50, 201-216.

Passmore, L. A., Barford, D. (2004) Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochemistry Journal* 379, 513-525.

Pavlopoulos, E., Kokkinaki, M., Koutelou, E., Mitsiadis, T.A., Prinos, P., Delidakis, C., Kilpatrick, M.W., Tsipouras, P., Moschonas, N.K. (2002) Cloning, chromosomal



- organization and expression analysis of Neurl, the mouse homolog of *Drosophila melanogaster* neuralized gene. *Biochimica et Biophysica Acta* 1574, 375-382.
- Pavlopoulos, E., Pitsouli, C., Klueg, K.M., Muskavitch, M.A.T., Moschonas, N.K., Delidakis, C. (2001) neuralized encodes a peripheral membrane protein involved in Delta signaling and endocytosis. *Developmental Cell* 1, 1-10.
- Pickart, C. M. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual Reviews of Biochemistry* 70, 503-533.
- Pitsouli, C., Delidakis, C. (2005) The interplay between DSL proteins and ubiquitin ligases in Notch signaling. *Development* 132, 4041-4050.
- Polo, S., Sigismund, S., Faretta, M., Guidi, M., Capua, M.R., Bossi, G., Chen, H., De Camilli, P., Di Fiore, P.P. (2002) A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* 416, 451-455.
- Posakony, J. W. (1994) Nature versus nurture: asymmetric cell divisions in *Drosophila* bristle development. *Cell* 76, 415-418.
- Qiu, L., Joazeiro, C., Fang, N.H.W., Elly, C., Altman, Y., Fang, D., Hunter, T., Liu, Y. (2000) Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, A HECT-type E3 ubiquitin ligase. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 35734-35737.
- Rand, M. D., Grimm, L.M., Artavanis-Tsakonas, S., Patriub, V., Blacklow, S.C., Sklar, J., Aster, J.C. (2000) Calcium depletion dissociates heterodimeric notch receptors. *Molecular and Cellular Biology* 20, 1825-1835.
- Ratdke, F., Schweisguth, F., Pear, W. (2005) The Notch 'gospel'. *EMBO Reports* 6, 1120-1125.
- Relaix F, Wu X, Sassoon DA (1998) Peg3/Pw1 is an imprinted gene involved in the TNF-NFkappaB signal transduction pathway. *Nat Genetics* 18, 287-291.
- Resh, M. D. (1999) Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1451, 1-16.
- Roegiers, F., Jan, L.Y., Jan, Y.N. (2005) Regulation of membrane localization of Sanpodo by lethal giant larvae and neuralized in asymmetrically dividing cells of *Drosophila* Sensory Organs. *Molecular Biology of the Cell* 16, 3480-3487.
- Ruan, Y., Tecott, L., Jiang, M-M., Jan, L.Y., Jan, Y.N. (2001) Ethanol hypersensitivity and olfactory discrimination defect in mice lacking a homolog of *Drosophila* neuralized. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9907-9912.

Sambrook J., F. E., Maniatis MJ. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schroeter, E. H., Kisslinger, J.A., Kopan R. (1998) Notch-1 signaling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* *393*, 382-386.

Schweisguth, F. (1999) Dominant-negative mutation in the  $\hat{2}$  and  $\hat{6}$  proteasome-subunit genes affect alternative cell fate decisions in the drosophila sense organ lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 11382-11386.

Schweisguth, F. (2004) Regulation of Notch signaling activity. *Current Biology* *14*, R129-R138.

Seto, E. S., Bellen, H.J., Lloyd, T.E. (2002) When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways. *Genes & Development* *16*.

Seugnet, L., Simpson, P., Haenlin, M. (1997) Requirement for dynamin during Notch signaling in *Drosophila* neurogenesis. *Developmental Biology* *192*, 585-598.

Shih, S., Slooper-Mould, KE., Hicke, L. (2000) Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors. *EMBO J* *19*, 187-198.

Shutter, J. R., Scully, S., Fan, W., Richards, W.G., 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.

Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspero, E., Tacchetti, C., Transidico, P., Di Fiore, P.P., Polo, S. (2005) Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*.

Tabb DL, M. W., Yates JR 3rd. (2002) DTASelect and Contrast: tools for assembling and comparing protein identifications from shotgun proteomics. *J Proteome Res* *1*, 21-26.

Takeuchi, T., Adachi, Y., Ohtsuki, Y. (2005) Skeletrophin, a Novel Ubiquitin Ligase to the Intracellular Region of Jagged-2, is aberrantly expressed in multiple myeloma. *American Journal of Pathology* *166*, 1817-1826.

Takeuchi, T., Heng, H.H.Q., Ye, C.J., Liang, S-B., Iwata, J., Sonobe, H., Ohtsuki, Y. (2003) Down-Regulation of a novel Actin-binding Molecule, Skeletrophin, in Malignant Melanoma. *American Journal of Pathology* *163*, 1395-1404.

Timmusk, T., Palm, K., Belluardo, N., Mudo, G., Neuman, T. (2002) Dendritic localization of mammalian neuralized mRNA encoding a protein with transcription repression activities. *Molecular and Cellular Neuroscience* *20*, 649-668.

- Tu, J. C., Xiao, B., Yuan, J. P., Lanahan, A. A., Leoffert, K., Li, M., Linden, D. J. & Worley, P. F. (1998) Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors. *Neuron* 21, 717-726.
- Valsecchi, V., Ghezzi, C., Ballabio, A., Rugarli, E.I. (1997) JAGGED2: a putative Notch ligand expressed in the apical ectodermal ridge and in sites of epithelial-mesenchymal interactions. *Mechanisms of Development* 69, 203-207.
- Vollrath, B., Pudney, J., Asa, S., Leder, P., Fitzgerald, K. (2001) Isolation of a murine homologue of the drosophila neuralized gene, a gene required for axonemal integrity in spermatozoa and terminal maturation of mammary gland. *Molecular and Cellular Biology* 21, 7481-7494.
- Walrafen, P., Verdier, F., Kadri, Z., Chretien, S., Lacombe, C., Mayeux, P. (2004) Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. *Blood* 105, 600-608.
- Wang, W., Struhl, G. (2004) Drosophila Epsin mediates a select endocytic pathway that DSL ligands must enter to activate Notch. *Development* 131, 5367-5380.
- Wang, W., Struhl, G. (2005) Distinct roles for Mind bomb, Neuralized and Epsin in mediating DSL endocytosis and signaling in Drosophila. *Development* 132, 2883-2894.
- Washburn MP, W. D., Yates JR 3rd. (2001) Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnology* 19, 242-247.
- Watanabe R, C. T., Inoue H, Isono T, Koiwai O, Okabe H. (2005) Rb1cc1 is critical for myoblast differentiation through Rb1 regulation. *Virchows Archives* 447, 643-648.
- Wilcox, C., Hu, J.S., Olson, E.N. (1987) Acylation of proteins with myristic acid occurs cotranslationally. *Science* 238, 1275-1278.
- Wilde, A., Beattie, E.C., Lem, L., Riethof, D.A., Liu, S.H., Mobley, W.C., Soriano, P., Brodsky, F.M. (1999) EGF receptor signaling stimulates SRC kinase phosphorylation of clathrin, influencing clathrin redistribution and EGF uptake. *Cell* 96, 677-687.
- Wojcikiewicz, R. (2004) Regulated ubiquitination of proteins in GPCR-initiated signaling pathways. *Trends in Pharmacol Sci* 25, 35-41.
- Wolters DA, W. M., Yates JR 3rd. (2001) An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem* 73, 5683-5690.
- Wu, G., Lyapina, S., Das, I., Li, J., Gurney, M., Pauley, A., Chui, I., Deshaies, R., Kitajewski, J. (2001) Sel-10 is an inhibitor of Notch signaling that targets Notch for ubiquitinatin-mediated protein degradation. *Molecular and Cellular Biology* 21, 7403-7415.

Xiao, B., Tu, J. C., Petralia, R. S., Yuan, J. P., Doan, A., Breder, C. D., Ruggiero, A., Lanahan, A. A., Wenthold, R. J. & Worley, P. F. (1998) Homer regulates the association of group 1 metabotropic glutamate receptors with multivalent complexes of Homer-related, synaptic proteins. *Neuron* *21*, 707-716.

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

Zhang, N., Gridley, T. (1998) Defects in somite formation in lunatic fringe-deficient mice. *Nature* *394*, 374-377.