

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Εργασία

«Διερεύνηση των cis ρυθμιστικών
στοιχείων του γονιδίου Hey στην
Drosophila melanogaster»

Γεωργίου Παναγιώτα Χριστίνα

Ηράκλειο 2012

UNIVERSITY OF CRETE
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY
FORTH-INSTITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

Master Thesis

«Pattern of the b-HLH orange protein Hey
enhancers in different developmental
stages of *Drosophila melanogaster*»

Georgiou Panagiota-Christina

Herakleion 2012

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Hey ανήκει στην οικογένεια των b-HLH-O πρωτεϊνών, και πρόσφατα έχει βρεθεί ότι είναι στόχος του Notch μονοπατιού. Στο ιντρόνιο 2 και στο ανοδικό κομμάτι του γονιδίου Hey ανακαλύφθηκαν, σε ChIP on chip πειράματα (Ε. Ζαχαριουδάκη, Χ. Δελιδάκης, S.Bray, αδημοσίευτα δεδομένα), θέσεις πρόσδεσης της Su(H), η οποία είναι γνωστό ότι δρα σαν συμπαράγοντας του Notch. Αυτές οι περιοχές έχουν κλωνοποιηθεί σε φορείς μετασχηματισμού *Drosophila*, με γονίδιο αναφοράς τη β-γαλακτοσιδάση (bgal), που έχουν ενεθεί σε έμβρυα δημιουργώντας αντίστοιχες διαγονιδιακές σειρές της *Drosophila melanogaster*. Ανοσοϊστοχημικές μελέτες και συνεστιακή ανάλυση απεκάλυψαν το πρότυπο έκφρασης της bgal στο κεντρικό σύστημα (ΚΝΣ), περιφερικό νευρικό σύστημα (ΠΝΣ), αλλά και στο αναπτυσσόμενο μεσέντερο του εμβρύου και στο ΚΝΣ της προνύμφης. Μόνο στις σειρές του ιντρονίου 2 υπήρξε έκφραση της bgal, η οποία συνεντοπίζεται με το ενδογενές Hey. Εξαιρέση αποτελούν οι περιοχές των mushroom bodies των εγκεφαλικών λοβών της προνύμφης, καθώς και περιοχές του ΚΝΣ του εμβρύου, όπου η έκφραση του Hey δεν εξαρτάται από το Notch μονοπάτι και στις οποίες δεν παρατηρήθηκε έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης, ενισχύοντας την πρόβλεψη ότι η ενεργοποίηση του ιντρονίου 2 γίνεται μέσω του Notch. Επιπλέον σε κλώνους όπου το Notch μονοπάτι έχει καταστραφεί, καταστέλλεται η έκφραση της ενδογενούς πρωτεΐνης Hey αλλά και της β-γαλακτοσιδάσης, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ενεργοποίηση του ιντρονίου 2 γίνεται μέσω του Notch. Προσδιορίστηκε σε πειράματα στο ΚΝΣ του εμβρύου ότι υπάρχει σταθερότητα της bgal σε σύγκριση με την παροδική έκφραση του Hey. Στο ΠΝΣ φαίνεται ότι τα περισσότερα Hey/ bgal θετικά είναι και Elav θετικά κύτταρα άρα νευρώνες, αλλά υπάρχει μικρός αριθμός Hey/ bgal θετικών κυττάρων που είναι θετικά για repo (marker για γλοιακά κύτταρα). Στο μεσέντερο του εμβρύου παρατηρήθηκαν Hey/ bgal θετικά κύτταρα τα οποία επίσης εκφράζουν Prospero, πρωτεΐνη που χαρακτηρίζει τα εντεροενδοκρινή κύτταρα, ενώ υπάρχει και ένας πληθυσμός κυττάρων τα οποία είναι bgal θετικά απουσία Hey. Ερευνήθηκε, επίσης, σε S2 κύτταρα εάν υπάρχει ενεργοποίηση των cis ρυθμιστικών στοιχείων του γονιδίου Hey από το Notch μονοπάτι. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ιντρόνιο 2 ενεργοποιείται μέσω του Notch στα S2 κύτταρα, ενώ το ανοδικό κομμάτι δεν ενεργοποιείται.

ABSTARCT

Hey is a b-HLH-O protein, which has recently been found to be a target of Notch pathway. Chip-on-chip experiments (E.Zaxarioudaki, C. Delidakis and S. Bray, unpublished data) revealed binding sites of Su (H), a coactivator of Notch, in the upstream region and in the intron 2 of Hey. Those regions have been cloned in transformation vectors with a bgal reporter and respective *Drosophila* transgenic lines have been generated. Immunohistochemical studies and confocal analysis of these lines have revealed the pattern of bgal expression in embryonic PNS, CNS, and gut and in the larval brain. Only the intron 2 reporter lines showed bgal staining that coincides with Hey endogenous expression. On the other hand, the mushroom bodies of larval brain and regions in embryonic CNS where Hey is not expressed via the activated Notch pathway were areas with no expression of bgal suggesting that the activation of intron 2 is dependent on Notch signaling. Moreover, in clones where Notch signaling has been suppressed, besides endogenous Hey, bgal expression was also lost. In specific embryonic CNS cell lineages we observed perdurance of bgal protein versus the transient expression of Hey. In embryonic PNS the majority of Hey/bgal positive cells are also Elav positive, but there are also few Hey/bgal positive cells that are repo positive suggesting that Hey is also expressed in some glial cells in PNS. We also observed Hey/ bgal positive cells in the developing midgut of embryos. In addition we investigated whether the enhancers are activated by Notch in S2 cell lines. In this system as well we found that the intron 2 enhancer is activated while the promoter fragment is not.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

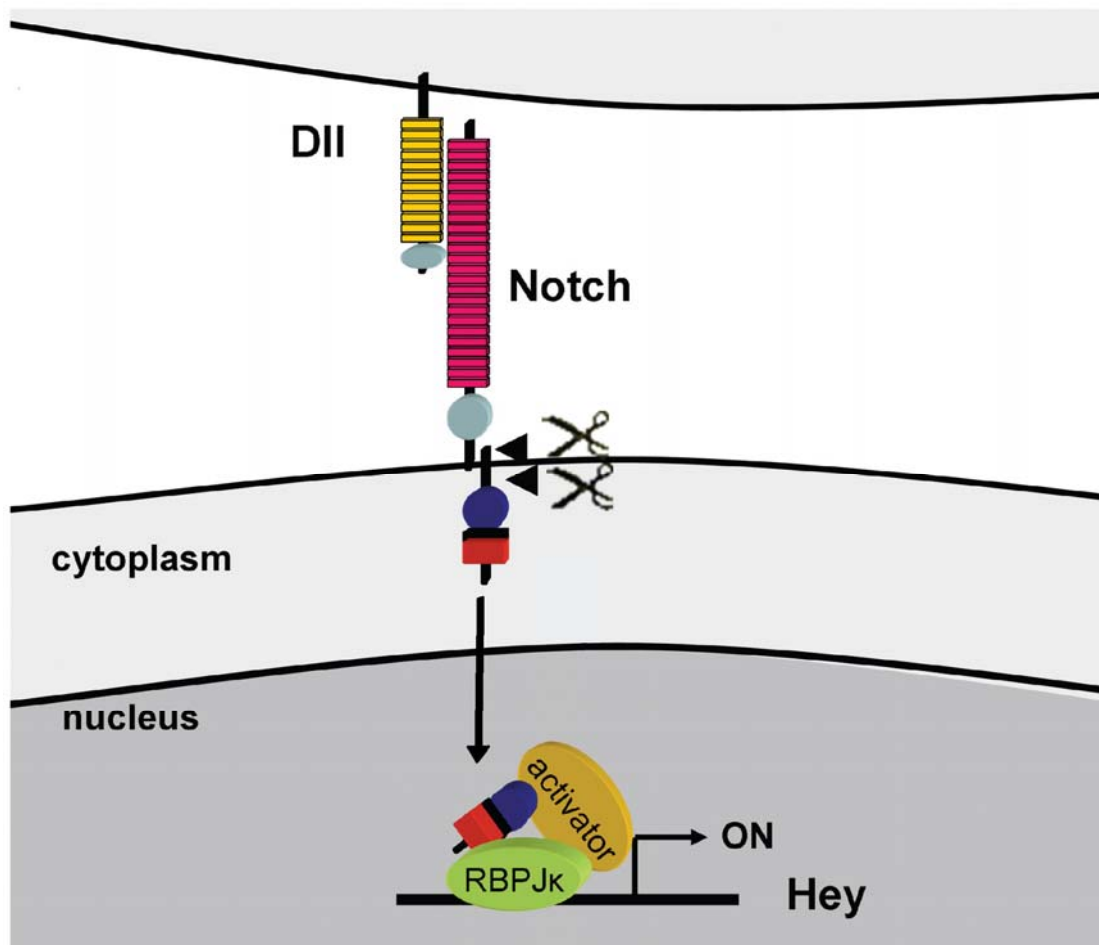
Σηματοδότηση Notch

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch αποτελεί έναν σημαντικό μηχανισμό για την επικοινωνία μεταξύ γειτονικών κυττάρων. Έχει κύριο ρόλο στην ανάπτυξη και στη διαφοροποίηση οργάνων όπως είναι το νευρικό σύστημα. Επίσης αποτελεί ένα συντηρημένο μονοπάτι για τον καθορισμό της μοίρας των κυττάρων.

Μία πρωτεΐνη DSL (στη *Drosophila* είναι οι πρωτεΐνες Delta, Serrate), η οποία βρίσκεται σε γειτονικό κύτταρο, ενεργοποιεί τον υποδοχέα Notch. Οι Delta, Serrate είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και στο εξωκυττάριο κομμάτι τους υπάρχει μεγάλος αριθμός επαναλήψεων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor-EGF repeats),(Εικ.1.1),(Vässin et al., 1987). Επίσης υπάρχει η περιοχή DSL η οποία φέρει μεγάλο αριθμό δισουλφιδικών δεσμών (Cordle et al., 2008) και μαζί με την EGF περιοχή έχουν σημαντικό ρόλο στην δέσμευση του Notch υποδοχέα.

Ο υποδοχέας Notch μοιάζει δομικά με τις Delta και Serrate όντας διαμεμβρανική πρωτεΐνη και έχοντας EGF repeats. Επίσης έχει την περιοχή LNR (Lin Notch Repeat) στον εξωκυττάριο τμήμα ενώ στο ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα υπάρχει μία περιοχή αποτελούμενη από έξι επαναλήψεις αγκυρίνης (cdc10) και στο καρβοξυτελικό άκρο υπάρχει η περιοχή OPA και η PEST. Η ενεργοποίηση του Notch γίνεται μέσω μιας διαδικασίας που περιλαμβάνει την πρωτεόλυση και την ενδοκύττωση του. Η πρωτεΐνη Notch υφίσταται δύο διαδοχικές πρωτεολύσεις. Η πρώτη γίνεται από την Kuzbanian (Pan & Rubin, 1997; Lieber et al., 2002) της οικογένειας των ADAM μεταλλοπρωτεασών που κόβει το εξωκυττάριο τμήμα και η δεύτερη γίνεται από την γ-σεκρετάση που κόβει στο ενδοκυττάριο τμήμα.

Τα γεγονότα αυτά έχουν ως τελικό αποτέλεσμα την απελευθέρωση του ενδοκυτταρικού τμήματος του Notch (NICD). Το NICD οδηγείται στον πυρήνα για τη ρύθμιση της μεταγραφής διάφορων γονιδίων στόχων (Fortini 2009). Το NICD δημιουργεί σύμπλοκο με την πρωτεΐνη Suppressor of Hairless [Su(H)] και προσδένεται σε ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων στόχων του μονοπατιού. Η Su(H) αποτελεί σημαντικό παράγοντα στο Notch σηματοδοτικό μονοπάτι και λειτουργεί καθοδικά του Notch (Fortini & Artavanis-Tsakonas, 1994). Γονίδια στόχοι του μονοπατιού Notch μεταξύ άλλων αποτελούν τα γονίδια των b-HLH πρωτεϊνών, όπως τα 7 γονίδια των Enhancer of split [E(spl)] (Bailey & Posakony, 1995) και το Hey (Maier & Gessler, 2000; Monastirioti et al., 2010).



Εικόνα 1.1: Ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου *Hey* .(rev. Fischer & Gessler, 2007, τροποποιημένη)

Νευρογένεση

Κεντρικό νευρικό σύστημα

Η νευρογένεση στη *Drosophila melanogaster* ξεκινά με τη δημιουργία νευροβλαστών. Τα κύτταρα του νευροεκτοδέρματος εκφράζουν τα προνευρικά γονίδια *achaete-scute*, τα οποία οδηγούν στη δημιουργία νευροβλαστών. Στο στάδιο του νευροεκτοδέρματος, το Notch σηματοδοτικό μονοπάτι καταστέλλει την έκφραση των προνευρικών γονιδίων μέσω του μηχανισμού της πλευρικής αναστολής. Τα κύτταρα, που δέχονται σηματοδότηση και ενεργοποιούν το μονοπάτι Notch, εκφράζουν τα γονίδια *E(spl)* τα οποία δρουν σαν καταστολείς των προνευρικών γονιδίων και γίνονται επιδερμοβλάστες. Άρα το κύτταρο, που έχει μικρή συγκέντρωση σε Notch, είναι εκείνο το οποίο θα γίνει νευροβλάστης.

Οι νευροβλάστες διαιρούνται στο στάδιο του εμβρύου, για να δημιουργήσουν τη βασική δομή του κεντρικού νευρικού συστήματος της προνύμφης. Μετά το πέρας της εμβρυογένεσης, οι νευροβλάστες σταματάνε την διαίρεση και μεταβαίνουν σε μια κατάσταση ηρεμίας (Wu et al., 2008). Κατά τη διάρκεια των τριών σταδίων της

προνύμφης, αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται ξανά για να δώσουν τους νευρώνες και τα γλοιακά κύτταρα του ενήλικου εγκεφάλου.

Από την στιγμή που καθορίζονται οι νευροβλάστες, υφίστανται ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις κατά τις οποίες τα θυγατρικά κύτταρα είναι ένας νευροβλάστης και ένα γαγγλιακό μητρικό κύτταρο (GMC). Το γαγγλιακό μητρικό κύτταρο θα διαιρεθεί δίνοντας είτε δύο νευρώνες, είτε λιγότερο συχνά, ένα νευρώνα και ένα γλοιακό κύτταρο (rev. Chia et al., 2008; rev. Egger et al., 2008). Κατά την κυτταρική διαίρεση του νευροβλάστη υπάρχουν πρωτεΐνες και mRNAs, που εντοπίζονται στον κυτταρικό φλοιό και είναι ασύμμετρα κατανομημένες. Στην κορυφαία πλευρά του κυττάρου σχηματίζεται μηνίσκος από τις Bazooka/Par6/αPKC, Insc και Pins/Gai, ενώ από την βασική πλευρά εντοπίζονται οι Numb, Miranda, Prospero, Pon, Staufen και Prospero mRNA (rev. Roegiers & Jan, 2004). Από την βασική πλευρά θα σχηματιστεί το γαγγλιακό μητρικό κύτταρο, κληρονομώντας τις ασύμμετρα τοποθετημένες πρωτεΐνες αυτής της πλευράς. Η πρωτεΐνη Prospero παραμένει στον κυτταρικό φλοιό του νευροβλάστη εξαιτίας της αλληλεπίδρασης της με την Miranda. Ωστόσο στο μητρικό γαγγλιακό κύτταρο, η Miranda αποσυντίθεται και η Prospero μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου ρυθμίζει θετικά την έκφραση νευροειδικών γονιδίων και αρνητικά την έκφραση των προνευρικών γονιδίων (Ikeshima-Kataoka et al., 1997; Mollinari et al., 2002). Απουσία Prospero όλα τα θυγατρικά κύτταρα των νευροβλαστών αντιδρούν σαν πολυδύναμα κύτταρα, παραλείποντας την διαφοροποίηση και δημιουργώντας υπερπλασία στον εγκέφαλο της προνύμφης (Choksi et al., 2006). Όταν το γαγγλιακό κύτταρο διαιρεθεί, θα δώσει δύο κύτταρα εκ των οποίων το ένα θα κληρονομήσει την πρωτεΐνη Numb, η οποία καταστέλλει άμεσα την σηματοδότηση μέσω Notch, (Spana & Doe, 1996). Αντίθετα το δεύτερο κύτταρο, όπου δεν θα τοποθετηθεί Numb επιτρέπει την σηματοδότηση μέσω Notch και την έκφραση του γονιδίου Hey (Monastiriotti et al 2010).

Περιφερικό νευρικό σύστημα

Οι περιφερικές αισθήσεις για την μύγα είναι η όραση, γεύση, οσμή, ακοή, αφή και η ιδιοδεκτικότητα. Στην παρούσα εργασία, μας ενδιαφέρουν περισσότερο η ανάπτυξη των οργάνων, που είναι υπεύθυνα για την αντίληψη της αφής, ουσιαστικά τις μηχανοαισθητήριες σμήριγγες. Βρίσκονται στον θώρακα της μύγας και χωρίζονται σε δύο ομάδες τις μακροχαίτες και τις μικροχαίτες.

Κατά την ανάπτυξη του εμβρύου, το πρόδρομο αισθητήριο όργανο (sensory organ precursor, SOP) διαιρείται σε PIIa και PIIb. Το PIIa διαιρείται και προκύπτουν το κύτταρο της σμήριγγας (τρίχα) και το κύτταρο περίβλημα της σμήριγγας. Το PIIb θα διαιρεθεί σε έναν PIII και σε ένα κύτταρο γλοίας. Από την διαίρεση του PIII, θα προκύψουν ο νευρώνας και το θηκογόνο (στηρικτικό κύτταρο) (Reddy & Rodrigues 1999).

b-HLH- Orange πρωτεΐνες

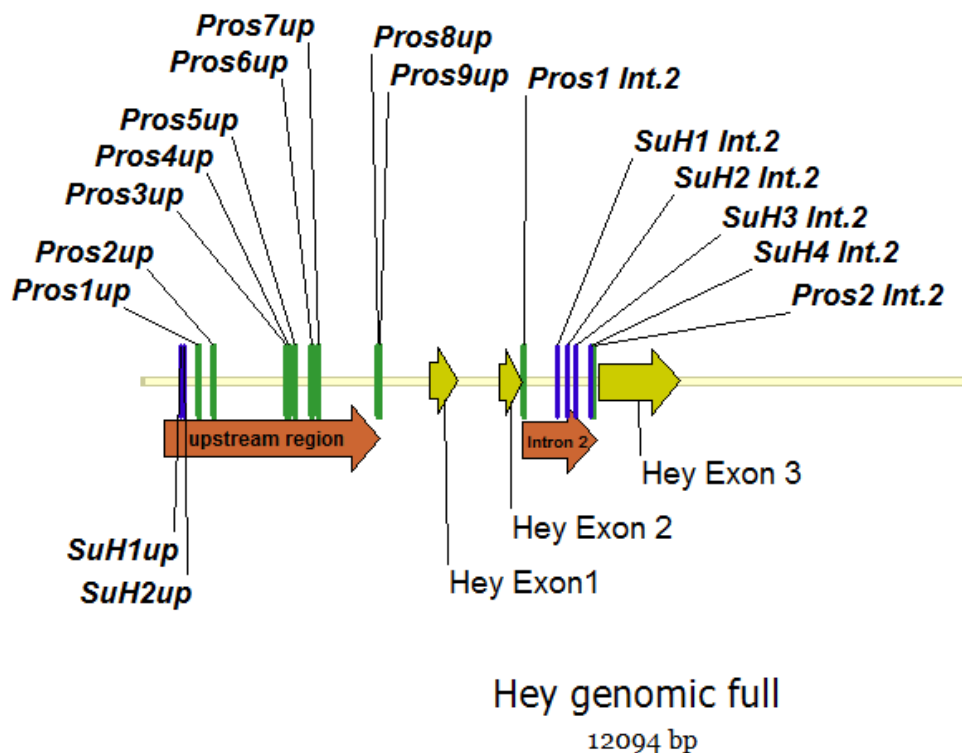
Οι b- HLH Orange πρωτεΐνες ανήκουν στην οικογένεια των HLH πρωτεϊνών, οι οποίες έχουν ένα κομμάτι που δημιουργεί δύο α-έλικες, χωρισμένες με μία λούπα. Η b-HLH περιοχή έχει σαν ρόλο τον διμερισμό και την ακόλουθη πρόσδεση στο DNA. Η Orange περιοχή, μια επίσης α-ελικωτή περιοχή που συναντάται σε ορισμένες b-HLH πρωτεΐνες καθοδικά της b-HLH, επηρεάζει θετικά τον διμερισμό των b- HLH Orange, όπως φαίνεται σε πειράματα που έγιναν στο *Xenopus* (Taelman et al., 2004). Στο γονιδίωμα της *Drosophila* υπάρχουν 13 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της b-HLH-Orange οικογένειας, τα 7 E(spl) (mβ, mδ, mγ, m3, m5, m7, m8) καθώς επίσης και τα *dpr*, *Side*, *Hey*, *Her*, *hairy* και *cwo*. Έχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, (π.χ. E(spl), Hey) ακόμα και στην ρύθμιση των κερκιδίων ρυθμών (*cwo*) (Lim et al., 2007). Τα 7 γονίδια E(spl) είναι στόχοι του μονοπατιού Notch, κατά τη δημιουργία του κεντρικού (ΚΝΣ) και περιφερικού νευρικού (ΠΝΣ) συστήματος στο έμβryo. Τα E(spl) εκφράζονται στο νευροεκτόδερμα, στα γειτονικά κύτταρα των νευροβλαστών, για να καταστείλουν σε αυτά την απόκτηση μοίρας νευροβλάστη (Jennings et al., 1994). Κατά το εμβρυϊκό στάδιο 8 και καθώς προχωράει η εμβρυογένεση και ο καθορισμός των νευροβλαστών, αρχίζει να εκφράζεται *dpr* σ'αυτούς, και κατά την διάρκεια των ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων τους εκφράζεται επίσης *mγ*, όπως και στους νευροβλάστες του εγκεφάλου της προνύμφης, ως ανταπόκριση στη σηματοδότηση του Notch (Zacharioudaki et al. 2012 in press).

Η σηματοδότηση Notch ενεργοποιεί επίσης στα μισά θυγατρικά κύτταρα του γαγγλιακού μητρικού κυττάρου την έκφραση της b- HLH Orange πρωτεΐνης Hey τόσο στο εμβρυϊκό νευρικό σύστημα, περιφερικό και κεντρικό όσο και στον εγκέφαλο της προνύμφης (Monastirioti et al., 2010). Το γονίδιο Hey ανήκει στην οικογένεια HERP (HES-related repressor protein), ή Hey (Hairy/E(spl)- related with YPPW motif). Ενώ στην *Drosophila* υπάρχει μόνο ένα γονίδιο *Hey*, στο ποντίκι έχουν βρεθεί τρία γονίδια *Hey1*, *Hey2*, *HeyL*. Τα γονίδια αυτά εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως η σωματογένεση, η μυογένεση, αγγειογένεση, γλοιογένεση (Fischer & Gessler, 2007).

Συγκεκριμένα το γονίδιο *Hey* εκφράζεται, ως στόχος του Notch, στους μισούς πρώιμους νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος στο στάδιο του εμβρύου, και στο στάδιο της προνύμφης (Monastirioti et al., 2010), στο περιφερικό νευρικό σύστημα και σε κύτταρα του εντέρου του εμβρύου. Το *Hey* εκφράζεται και σε κάποια κύτταρα ανεξαρτήτως Notch, όπου στη μεν προνύμφη είναι οι νευρώνες των mushroom bodies ενώ στο έμβryo δεν έχουν χαρακτηριστεί ακόμα. Η ενεργοποίηση της έκφρασης του γίνεται κατά το εμβρυϊκό στάδιο 11, και μέχρι το στάδιο 16 παρατηρείται αύξηση της έκφρασης. Ο τρόπος με τον οποίο εκφράζεται το γονίδιο *Hey* είναι αρκετά σημαντικός, διότι εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των κυττάρων όπως στον καθορισμό της νευρικής τύχης. Με βάση την αλληλουχία του,

προβλέπεται να έχει ικανότητα πρόσδεσης στο DNA και να καταστέλλει γονίδια, ακόμα όμως δεν υπάρχουν στοιχεία για το πώς δρα στην *Drosophila melanogaster*.

Πρόσφατα ChIP on chip πειράματα, που έγιναν στο εργαστήριο της Dr. Sarah Bray (Cambridge), σε συνεργασία με την υποψήφια διδάκτορα Εύα Ζαχαριουδάκη (εργαστήριο κ. Δελιδάκη), είχαν σκοπό τον εντοπισμό θέσεων πρόσδεσης του Su(H) σε γενωμική κλίμακα στον εγκέφαλο της προνύμφης όπου και βρέθηκαν ανοδικά του γονιδίου Hey τρεις θέσεις Su(H) και τέσσερις στο ιντρόνιο 2 του Hey. Επίσης, με βιοπληροφορική ανάλυση, διαπιστώθηκε ότι τα τμήματα του γονιδίου Hey φέρουν πιθανές θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Prospero, και ειδικότερα δύο θέσεις στο ιντρόνιο 2 και εννέα στο ανοδικό κομμάτι. Τα τμήματα αυτά (**Εικ. 1.2**) κλωνοποιήθηκαν, από την Μαρίνα Θεοδοσίου (εργαστήριο κ. Δελιδάκη), σε φορείς οι οποίοι φέρουν το γονίδιο reporter της β-γαλακτοσιδάσης και χρησιμοποιήθηκαν για μετασχηματισμό εμβρύων *Drosophila*.



Εικόνα 1.2: Γενομική περιοχή του γονιδίου *Hey*. Με πορτοκαλί φαίνονται οι περιοχές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν (ανοδική και ιντρόνιο 2) και οι θέσεις πρόσδεσης της Su(H) (μπλέ) και της Prospero (πράσινο). Φαίνονται επίσης τα εξόνια του γονιδίου (κίτρινα βέλη)

ΣΚΟΠΟΣ

Επειδή το γονίδιο *Hey* έχει σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση, θα πρέπει να διερευνηθεί η ενεργοποίηση της μεταγραφής του, και πως επηρεάζεται από τους ρυθμιστές του, είτε *cis* είτε *trans*. Ο γενικός σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι να μελετηθεί η σημασία της ενεργοποίησης των *cis* ρυθμιστικών στοιχείων, που περιέχονται στο ιντρόνιο 2 και στο ανοδικό κομμάτι, στην έκφραση του γονιδίου *Hey* από το Notch σηματοδοτικό μονοπάτι. Αρχικά ο σκοπός μας είναι να βρεθεί σε ποια στάδια ενεργοποιούνται οι συγκεκριμένες ρυθμιστικές περιοχές, ιντρόνιο 2 και ανοδικό κομμάτι. Θα πρέπει να γίνει χαρακτηρισμός των κυττάρων στα οποία εκφράζονται, και για αυτό το σκοπό θα χρησιμοποιηθούν δείκτες συγκεκριμένων κυττάρων. Μετέπειτα να ελεγχθούν αλλαγές στο πρότυπο έκφρασης τους σε μύγες με Notch μεταλλαγμένο γενετικό υπόβαθρο, εφόσον έχουμε προηγούμενα δεδομένα ότι ο κύριος ενεργοποιητής του *Hey* είναι το Notch. Τέλος να ελεγχθεί κατά πόσο είναι δυνατόν τα *cis* ρυθμιστικά στοιχεία των περιοχών αυτών μπορούν να ενεργοποιηθούν σε κυτταρικές σειρές καθοδικά του ενδοκυττάριου κομματιού του Notch και του Su(H).

ΜΕΘΟΔΟΙ

Drosophila melanogaster στελέχη:

Για την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα εξής στελέχη: Α) τα reporter lines του ιντρονίου 2 με την ονομασία Heinz^{17δ1}, Heinz^{17α1}, Heinz^{20γ1}, Heinz^{20α1}, Heinz^{13β2}, Heinz^{13δ1}, Heinz^{27β2}, Heinz^{27α1}, Heinz^{23γ1}, Heinz^{23β2}, όπου στα Heinz^{20γ1} και Heinz^{27α1} το διαγονίδιο βρίσκεται στο δεύτερο χρωμόσωμα ενώ στα υπόλοιπα βρίσκεται στο τρίτο, Β) τα reporter lines του ανοδικού κομματιού με την ονομασία Heyur^{A21}, Heyur^{A1E}, Heyur^{6β1}, Heyur^{6α1} [για περισσότερες πληροφορίες για τα παραπάνω στελέχη βλ. πτυχιακή εργασία Μ. Θεοδοσίου (2009) Γ) στελέχη που φέρουν την θερμοευαίσθητη Nts1 μετάλλαξη, Δ) και για την δημιουργία κλώνων, με Notch μεταλλαγμένο υπόβαθρο, με το μηχανισμό FRT/ FLP, τα εξής στελέχη: yw; [Cyo/Sco], w; [FRT82B DI e Ser/TM6B], w; [T(2;3)/UAS-mβ;32B-Gal4] και [hsFLP tub-Gal4 UAS-GFP/FM7];; [FRT82B tubGal80/TM6B].

Διασταυρώσεις:

Επειδή η απώλεια του Notch υποδοχέα είναι θνησιγόνος η προσέγγιση της δημιουργίας Notch μεταλλαγμένου γενετικού υπόβαθρου έγινε με δύο τρόπους.

Α) Διασταύρωση αρσενικών ατόμων του Heinz^{13δ1} με θηλυκά Nts1. Η Nts1 είναι θερμοευαίσθητη μεταλλαγή ενός αμινοξέος (Shellenbarger & Mohler, 1975) και μπορεί να αναπαράγεται φυσιολογικά στην θερμοκρασία 18°C. Τρεις μέρες μετά την έναρξη της διασταύρωσης στους 18°C, οι απόγονοι μεταφέρθηκαν στους 32 °C. Επειδή το *Notch* γονίδιο βρίσκεται στο φυλογενετικό χρωμόσωμα επιλέχθηκαν οι αρσενικές προνύμφες, όντας ημίζυγες για την Nts1 μεταλλαγή, για την ομάδα όπου δεν είναι λειτουργικό το Notch μονοπάτι και αντίστοιχα οι ετερόζυγες θηλυκές μύγες για την φυσιολογική κατάσταση σαν πείραμα ελέγχου και σύγκρισης.

Β) Επαγωγή κλώνων: Αρχικά θηλυκές μύγες yw; [Cyo/Sco] διασταυρώνονται με αρσενικές w; [FRT82B DI e Ser/TM6B], και συλλέγονται οι αρσενικοί απόγονοι yw; [Sco/+]; [82BDI e ser/+] οι οποίοι διασταυρώνονται με θηλυκά άτομα από τις σειρές Heinz^{27α1} είτε Heinz^{20γ1} (επιλέγονται γιατί διευκολύνεται η διασταύρωση, το διαγονίδιο βρίσκεται στο δεύτερο χρωμόσωμα). Από αυτήν την διασταύρωση επιλέγονται αρσενικοί με τον γονότυπο +; [27α1 ή 20γ1;/Sco]; [82B DI e Ser/+] για να διασταυρωθούν με θηλυκές w; [T(2;3)/mβ;32B]. Από αυτήν την διασταύρωση οι θηλυκές και οι αρσενικές μύγες με γονότυπο w; [T(2;3)/ (27α1 ή 20γ1; 82B DI e Ser)] διασταυρώθηκαν με [hsFLP tub-Gal4 UAS-GFP/FM7];; [FRT82B tubGal80/TM6B] αρσενικές ή θηλυκές μύγες αντίστοιχα.

Η όλη διαδικασία γίνεται γιατί οι μεταλλαγές στο *Delta* και *Serrate* γονίδιο έχουν σαν αποτέλεσμα μη λειτουργικές πρωτεΐνες, και επιλέγονται στην συγκεκριμένη περίπτωση γιατί απουσία των προσδετών του Notch υποκινητή δεν ενεργοποιείται

το μονοπάτι. Όμως επειδή είναι θνησιγόνες σε ομόζυγη κατάσταση, χρησιμοποιείται το δυαδικό σύστημα FLP-FRT. Στο δυαδικό σύστημα FLP-FRT επάγεται μιτωτικός ανασυνδυασμός, μια διαδικασία που δε λαμβάνει χώρα φυσιολογικά και περιλαμβάνει δύο γενετικά στοιχεία: το ένζυμο φλιπάση που έχει απομονωθεί από μύκητα, υπό τον έλεγχο κάποιου θερμοεπαγόμενου υποκινητή και τις αλληλουχίες FRT (Flipase Recognition Targets). Οι αλληλουχίες FRT βρίσκονται συνήθως κοντά στη βάση του μεγάλου βραχίονα του χρωμοσώματος (Xu & Rubin, 1993). Με τη διαδικασία αυτή δημιουργούμε γενετικά μωσαϊκά άτομα, που φέρουν κυτταρικούς κλώνους που εκφράζουν στην περίπτωση μας GFP, διαχωρίζοντας τους από τον υπόλοιπο ιστό.

Μετά από τρεις μέρες, όπου έχει ξεκινήσει η τελική διασταύρωση, οι απόγονοι μεταφέρονται στους 37°C για μία ώρα, επάγοντας την έκφραση της φλιπάσης, ώστε στοχαστικά σε κάποιο ποσοστό του συνόλου των κυττάρων να πραγματοποιηθεί ανασυνδυασμός, και το ένα θυγατρικό κύτταρο που θα προκύψει, θα φέρει μόνο τη μεταλλαγή, ενώ το άλλο το γονίδιο-μάρτυρα.

Απομόνωση και ανοσοϊστοχημική μελέτη προνυμφικού εγκεφάλου:

Αρχικά οι προνύμφες τοποθετούνται σε διάλυμα PBS [1x:0,13M NaCl, 0,07M Na₂HPO₄, 0,03M NaH₂PO₄ (pH=7,4)] και γίνεται η πρώτη ανατομή, με τη χρήση λαβίδων, κατά την οποία το εσωτερικό πρέπει να γυρίσει έξω. Οι γυρισμένες, πλέον, προνύμφες τοποθετούνται σε διάλυμα μονιμοποίησης (fixation solution: 4% φορμαλδεΐδη, 1xPEM), για 20 λεπτά στους 25°C. Μετά το πέρας των 20 λεπτών, γίνονται τρία γρήγορα πλυσίματα με διάλυμα PBS. Οι προνύμφες επωάζονται σε blocking buffer (PBT: : 1xPBS, 0, 2% Triton, 0, 5% BSA) για 1 ώρα, στους 25°C, σε χαμηλής ταχύτητας ανάδευση, για την αποφυγή μη ειδικής πρόσδεσης. Μετά τοποθετούνται στο διάλυμα του πρώτου αντισώματος, στους 4°C, σε χαμηλής ταχύτητας ανάδευση, overnight (16h-18h). Ακολουθούν τρία πλυσίματα των 10 min, με PT (1x PBS, 0, 2% Triton) και η τοποθέτηση των προνυμφών στο δεύτερο αντίσωμα, για 1,5 h στους 25°C. Γίνονται τρία πλυσίματα, των 10 min, με PT, και ακολουθεί η ανατομή των εγκεφάλων, σε PBS. Οι εγκεφαλοι συλλέγονται σε αντικειμενοφόρο πλάκα, η οποία φέρει μία σταγόνα (12-13μl) mounting buffer και ακολουθεί η κάλυψη με καλυπτρίδα και η παρατήρηση των τομών με συνεστιακή μικροσκοπία.

Μονιμοποίηση και ανοσοϊστοχημική μελέτη εμβρύων:

Τα έμβρυα συλλέγονται, με τη χρήση πινέλου, και τοποθετούνται σε 50% χλωρίνη, για 3 min, για να γίνει η αποχοριοποίηση. Τοποθετούνται σε διφασικό διάλυμα, το οποίο περιέχει επτάνιο και 4% φορμαλδεΐδη, 1xPEM σε αναλογία 1:1 και αναδεύονται για 20 min. Αφαιρείται το 4% φορμαλδεΐδη, 1xPEM και προστίθεται μεθανόλη (3x), για να αποχωριστούν την βιτελινική μεμβράνη. Ακολουθούν τρία

πλυσίματα με μεθανόλη. Αφαιρείται η μεθανόλη και προστίθεται στάγδην ΡΤ. Όπως και στους εγκεφάλους, το blocking γίνεται με ΡΒΤ για 1 ώρα, στους 25°C. Μετά τοποθετούνται στο διάλυμα του πρώτου αντισώματος στους 4°C, overnight (16h-18h). Ακολουθούν τρία πλυσίματα των 10 min με ΡΤ(1x ΡΒS, 0, 2% Triton) και η τοποθέτηση των εμβρύων στο δεύτερο αντίσωμα για 1,5 h στους 25°C. Γίνονται τρία πλυσίματα, των 10 min, με ΡΤ, και ακολουθεί τοποθέτηση σε ΡΒS. Τα έμβρυα συλλέγονται σε αντικειμενοφόρο πλάκα, μετέπειτα προστίθεται mounting buffer και ακολουθεί η κάλυψη με καλυπτρίδα και η παρατήρηση των εμβρύων.

Αντισώματα

Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω πρώτα αντισώματα: 1:1000 guinearig-a-Hev (κατασκευάστηκε στο εργαστήριο Χ.Δελιδάκη) για τον εντοπισμό κυττάρων που εκφράζουν Hev, 1:1000 rabbit-a-β Gal (από το εργαστήριο του Cappel) και 1:1000 m-a-β Gal (από Promega) για τον εντοπισμό κυττάρων που εκφράζουν β-γαλακτοσιδάση, 1:50 m-a-Wg 4D4 (Developmental Studies Hybridoma Bank-DSHB), για τον εντοπισμό της wingless πρωτεΐνης, η οποία επάγεται από την ενεργοποίηση του Notch μονοπατιού και δημιουργεί ένα συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασης στο δίσκο του φτερού, 1:500 rabbit -a-Ase (από το εργαστήριο του A. Jarman), για τον εντοπισμό νευροβλαστών, 1:1000 rabbit -a-GFP (από Minotech) για τον εντοπισμό των κλώνων, 1:100 rat-a-elav (από DSHB) για τον εντοπισμό νευρώνων, m-a-Pros εντοπισμό κυττάρων που εκφράζουν Prospero, 1:50 m-a-gero για τον εντοπισμό γλοιακών κυττάρων, 1:3000 rabbit -a-eve (στάλθηκε από το εργαστήριο M.Frasch) για τον εντοπισμό νευρώνων, 1:100 m-a-nubbin (δόθηκε από το εργαστήριο M. Αβέρωφ) για τον εντοπισμό κυττάρων στο μεσέντερο του εμβρύου.

Τα δεύτερα αντισώματα είναι 1:1500 goat-a-mouse IgG Alexa 555 (από Molecular Probes), 1:1000 goat-a-mouse IgG Alexa 647 (από Molecular Probes), 1:2000 goat-a-rabbit IgG Cy3 (Jackson Immunoresearch), goat-a-rabbit IgG Alexa 633 (από Molecular Probes), 1:2000 goat-a-guinea pig IgG Alexa 488 (από Molecular Probes), 1:2000 goat-a-guinea pig IgG Alexa 555 (από Molecular Probes), 1:2000 goat-a-rat IgG Alexa 633 (από Invitrogen).

S2 κύτταρα:

Παροδική διαμόλυνση: Η έκφραση των πρωτεϊνών σε S2 κύτταρα γίνεται με τη μέθοδο της δημιουργίας ιζήματος φωσφορικού ασβεστίου. Η προεργασία απαιτεί μία μέρα πριν από την διαμόλυνση να γίνει η στρώση των κυττάρων. Αναλυτικά, τα κύτταρα μαζεύονται για φυγοκέντρηση σε 1000rpm, για 5min, μετέπειτα επαναδιαλύονται σε θρεπτικό μέσο Μ3 με ορό (φυλάσσεται στους 4°C, αλλά για την χρήση του πρέπει να είναι σε θερμοκρασία δωματίου). Προσδιορίζεται η συγκέντρωση τους με αιμοκυτταρόμετρο, η τελική συγκέντρωση των κυττάρων πρέπει να είναι 1×10^6 κύτταρα/ml.

Για την διαμόλυνση, ετοιμάστηκαν τα δείγματα τα οποία περιείχαν τους διάφορους συνδυασμούς σε πλασμίδια (αναλυτικότερα πιο κάτω). Για τα πειράματα Western blot χρησιμοποιήθηκαν τα 12-well plates όπου η τελική συνολική ποσότητα DNA δεν πρέπει να ξεπερνάει τα 2μg, ενώ για τα πειράματα προσδιορισμού της ενεργότητας της λουσιφεράσης χρησιμοποιήθηκαν τα 24-well plates όπου η τελική συνολική ποσότητα DNA δεν πρέπει να ξεπερνάει τα 1μg. Οι τελικοί όγκοι ήταν 45μl και 22,5μl αντίστοιχα. Κατόπιν προστίθεται 5μl και 2,5μl, αντίστοιχα, 0.25M CaCl₂. Το διάλυμα μεταφέρεται σε 100 μl και 50 μl, αντίστοιχα, διαλύματος HBS (2x-280 mM NaCl, 1,5mM Na₂HPO₄, 10mM KCl, 50mM HEPES). Το τελικό διάλυμα επωάζεται, για 20 min, για να δημιουργηθεί το ίζημα και έπειτα προστίθεται στάγδην στα κύτταρα.

Για την ενεργοποίηση της έκφρασης γονιδίων με υποκινητές της μεταλλοθειονίνης μία μέρα πριν την συλλογή των κυττάρων προστίθεται CuSO₄ (70 μM).

Συλλογή: Τα κύτταρα συλλέγονται από τα πηγαδάκια και φυγοκεντρούνται, για 5min, στους 2.000rpm, σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρείται το υπερκείμενο και γίνεται ένα πλύσιμο με 1ml PBS(1x). Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στα 13.000rpm, για 1 min. Αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται το μείγμα της λύσης των κυττάρων. Στην περίπτωση των δειγμάτων που προορίζονται για Western blot χρησιμοποιήθηκε διάλυμα λύσης LB (150mM NaCl, 1%NP4O, 50mM Tris-HCl pH=8) 100μl για κάθε δείγμα. Για τα δείγματα του προσδιορισμού της ενεργότητας της λουσιφεράσης, χρησιμοποιήθηκε για κάθε δείγμα 50μl 1x Promega Lysis Buffer. Σε κάθε περίπτωση προστέθηκε ο αναστολέας πρωτεασών PMSF. Τα δείγματα περνάνε από μία διαδικασία όπου μεταφέρονται από τον ξηρό πάγο σε θερμοκρασία 37°C, για λιγότερο από 1min, προωθώντας έτσι την λύση των κυττάρων. Τέλος φυγοκεντρούνται για 15min, στους 13000rpm, σε 4°C.

Μέτρηση διαμόλυνσης: Για να μπορέσουμε να δούμε την απόδοση του μετασχηματισμού σε κάθε ομάδα διαμόλυνσης, προστίθεται πλασμίδιο το οποίο περιέχει τον υποκινητή hsr70 και το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (WB:200μl, luc activity: 100μl). Αφού έχει συλλεχτεί το πρωτεϊνικό εκχύλισμα χρησιμοποιούμε την LacZ-assay. Σε 20 μl πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, προστίθεται 300 μl LacZ buffer (Na₂HPO₄ 60mM, Na₂H₂PO₄ 40mM, KCl 10mM, MgSO₄ 1mM, pH=7.0), 60 μl ONPG και μερκαπτοαιθανόλη με αναλογία , 13,5 μl mercaptoethanol / 5 ml LacZ buffer.

Τα δείγματα τοποθετούνται σε 37°C και ελέγχονται ανά 3min, η αλλαγή του χρώματος σε κίτρινο σημαίνει ότι υπάρχει η ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης. Για να σταματήσει η ενεργότητα της, προστίθεται ίσως όγκος Na₂CO₃ 1 M. Ακολουθεί η φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 420nm.

Luciferase assay: Σε 3μl πρωτεϊνικού εκχυλίσματος προστίθενται 20μl λουσιφερίνης υπόστρωμα της λουσιφεράσης μετριέται η φωταύγεια στο Turner TD-20/20

luminometer. Με αυτόν τον τρόπο, θα ελέγξουμε την ενεργοποίηση των *cis* ρυθμιστικών στοιχείων του γονιδίου *Hey*.

Western blot: Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αφού τους έχει προστεθεί loading buffer (1x- 10% γλυκερόλη, μερκαπτοαιθανόλη, 50mM Tris pH=6.8, 0,066% βρωμοφαινόλη Blue και 2% SDS) ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 10% στα 100V, σε θερμοκρασία δωματίου, το κύκλωμα λειτουργεί με την βοήθεια του Running buffer (25mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS). Αφού βράσουμε τα δείγματα σε νερό, για 5 min, και τον marker για 2min, τα φορτώνουμε στο gel, το οποίο αποτελείται από δύο τμήματα, το πάνω κομμάτι stacking gel, και το running gel 10%. Το running gel, που χρησιμεύει για το διαχωρισμό των πρωτεϊνικών βάσει του μεγέθους και το stacking gel, που χρησιμεύει για το πακετάρισμα του μείγματος των πρωτεϊνών.

Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, στους 4⁰C, στα 100V, για 1 ώρα. Το διάλυμα, το οποίο βοηθάει το κύκλωμα, είναι το transfer buffer (25mM Tris, 192mM glycine, 0.01% SDS, 20% methanol).

Η μεμβράνη επώαζεται σε 5% γάλα σε TTBS (20mM Tris-Cl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.3% Tween-20) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, όπου ακολουθεί η επώαση με το πρώτο αντίσωμα στους 4⁰C για 16 ώρες. Μετά από 3 πλύσεις των 10 λεπτών με TTBS, ακολουθεί η επώαση με το δεύτερο αντίσωμα, για 2 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από 3 πλύσεις των 10 λεπτών με TTBS προστίθεται ECL, το οποίο είναι το υπόστρωμα χημειοφωταύγειας για την HRP. Το film εμφανίζεται σε σκοτεινό θάλαμο και με εκθέσεις 50sec, 3min, 30min, διαδοχικά.

Ανοσοαποτύπωση

Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκαν 1:2000 rabbit -a-myc (από Santa Cruz) γιατί το γονίδιο *Su(H)* στο πλασμίδιο, που διαμολύνει τα κύτταρα έχει ένα κομμάτι που εκφράζει ένα επίτοπο myc, m-a-Notch C17.9C6 (από DSHB) για τον εντοπισμό του ενδοκυττάριου κομματιού του Notch.

Τα δεύτερα αντισώματα φέρουν HRP την υπεροξειδάση, η οποία θα αντιδράσει με το υπόστρωμα χημειοφωταύγειας, για να μαυρίσει το φιλμ, και είναι 1:10000 donkey-a-mouse IgG HRP (από Jackson Immunoresearch), 1:20000 goat-a-rabbit HRP (από Jackson Immunoresearch).

Πλασμιδιακές κατασκευές για τα S2 κύτταρα

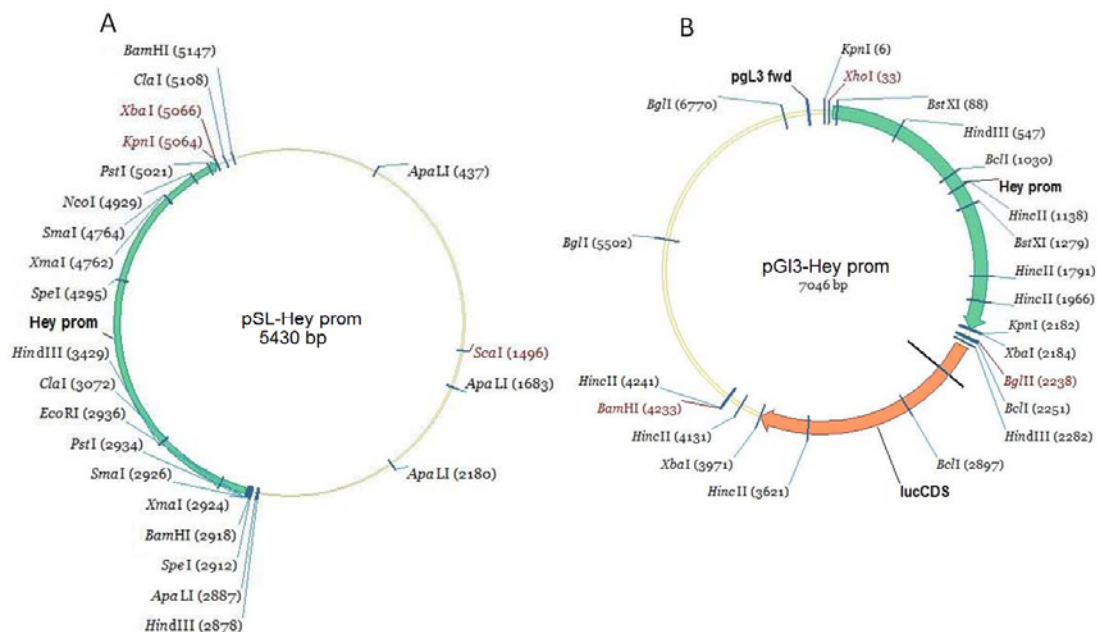
Τα ήδη κατασκευασμένα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν είναι: Α) pmtgal4 για τα γονίδια που έχουν μεταλουποκινητές, Β) hsp70lacz, για την μέτρηση της αποτελεσματικότητας της διαμόλυνσης, Γ) pmt-ICN πλασμίδιο που φέρει το ενδοκυττάριο κομμάτι του Notch καθοδικά μεταλοϋποκινητή, (Eastman et al., 1997) Δ) phsCasper-Su(H), στο πλασμίδιο αυτό το γονίδιο *Su(H)* υπάρχει στο καρβοξυτελικό

άκρο ένας *myc* επίτοπος, (Eastman et al., 1997) Ε) pGL2-*myc-luc* σαν θετικό ομάδα ελέγχου του συστήματος (Apidianakis et al 1999),

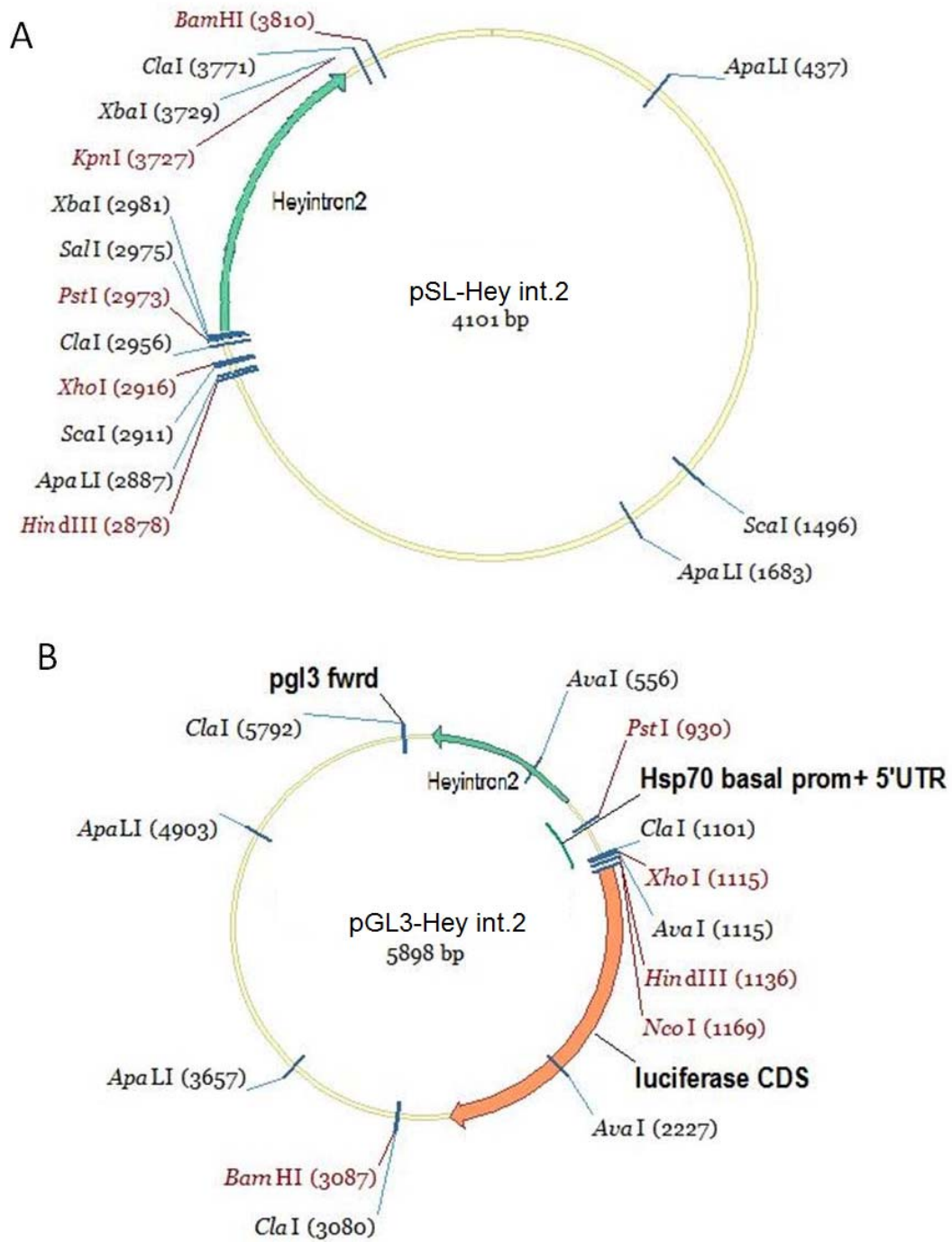
Κατασκευάστηκαν πλασμίδια-ανταποκριτές για το ιντρόνιο 2 και για το ανοδικό κομμάτι του *Hey* όπου τα *cis* ρυθμιστικά στοιχεία κλωνοποιούνται ανοδικά του γονιδίου λουσιφεράσης σε πλασμίδιο pGL3.

Το ανοδικό κομμάτι δόθηκε σε pBS KSII-gal-*Hey* promoter. Είχε κλωνοποιηθεί από την Μαρίνα Θεοδοσίου με PCR και είχε υποκλωνοποιηθεί με *EcoRI* και *KpnI* (πέψη και συγκόλληση DNA). Για να μπορέσουμε να το χρησιμοποιήσουμε έγινε ένα ενδιάμεσο στάδιο, όπου πραγματοποιήθηκε πέψη με *XbaI*/*KpnI* στο pBS KSII-gal-*Hey* promoter για να μπει το ένθεμα στο πλασμίδιο pSL1180 (περιλαμβάνει θέσεις πολλών περιοριστικών ενζύμων) στο οποίο έγινε πέψη με *SpeI*/*KpnI*. Η *SpeI* με την *XbaI* δημιουργούν συμπληρωματικά άκρα οπότε το ένθεμα μπορεί να ενσωματωθεί στο πλασμίδιο. Από το pSL-*Hey* prom απομονώθηκε κομμάτι που περιείχε το ανοδικό κομμάτι με πέψη *BamHI* και προστέθηκε σε pGL3-*luc* πλασμίδιο ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης με πέψη *BglII* (pGL3- *Hey*prom).

Το ιντρόνιο 2 δόθηκε σε pHZ50PL-intr2 όπου είχε μπει με *XbaI*/*KpnI*. Κλωνοποιήθηκε σε pSL1180 με πέψη *PstI*/*KpnI* (pSL-*Hey* int.2). Μετέπειτα απομονώθηκε το κομμάτι που περιείχε το ιντρόνιο με *XbaI* και ενσωματώθηκε σε pGL3-*hs-luc* ανοδικά της λουσιφεράσης που φέρει ένα ελάχιστο υποκινητή *hs* (pGL3-*Hey* int2). Οι κατασκευές επιβεβαιώθηκαν με sequencing.



Εικόνα 2.1: Οι πλασμιδιακές κατασκευές για το ανοδικό κομμάτι A) pSL1180-prom B) pGL3-prom-luc



Εικόνα 2.2: Οι πλασμιδιακές κατασκευές για το intron 2 A) pSL1180-intron B) pGL3-intron-hsp-luc

3. Αποτελέσματα & Συζήτηση

Διερεύνηση της ενεργοποίησης των cis ρυθμιστικών στοιχείων του γονιδίου *Hey* από το Notch μονοπάτι.

Στο γονίδιο *Hey* έχουν βρεθεί θέσεις πρόσδεσης της Su(H), ανοδικά του γονιδίου και στο δεύτερο ιντρόνιο. Για κάθε μια από τις περιοχές αυτές δημιουργήθηκαν σειρές οι οποίες φέρουν καθοδικά το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης έκφραση του οποίου θα αποκρίνεται στην ενεργοποίηση των cis ρυθμιστικών στοιχείων

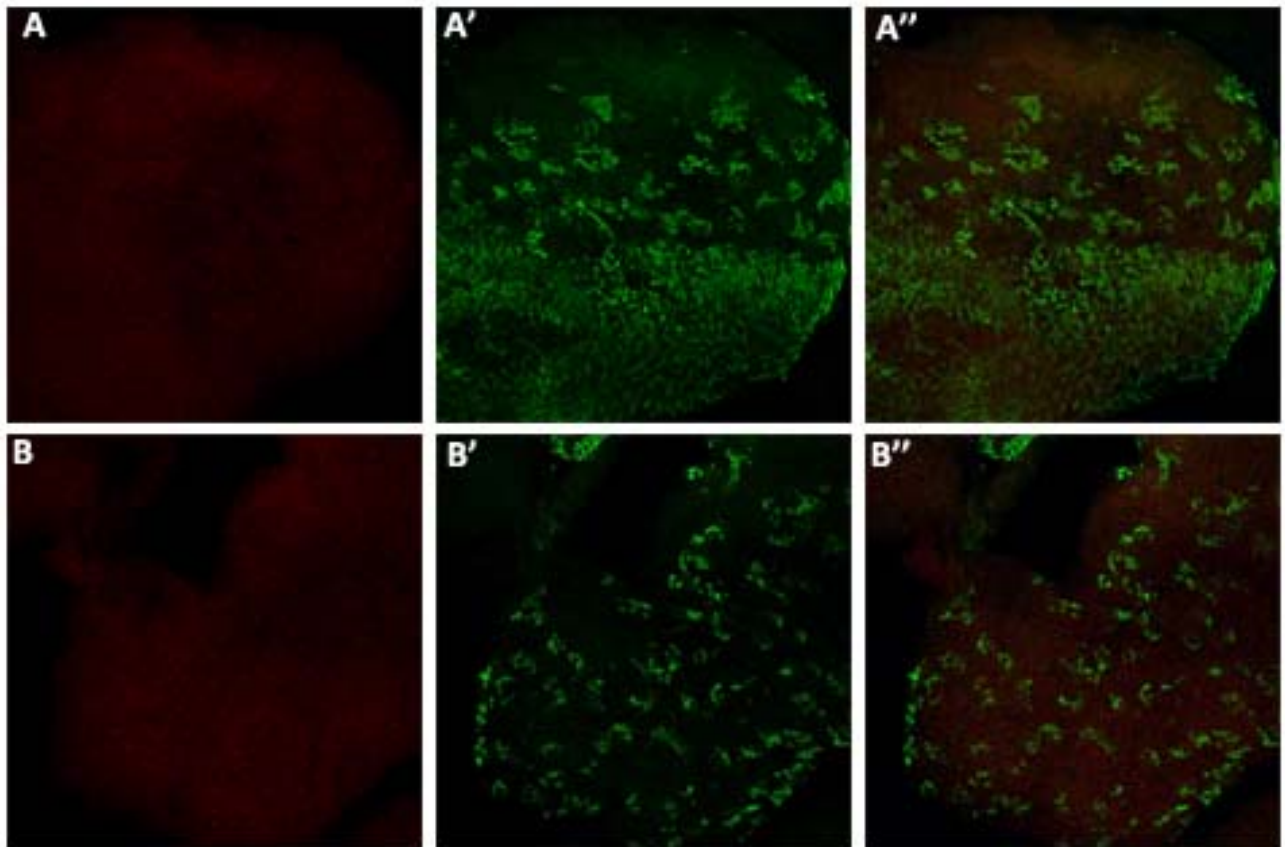
Ανοδικό κομμάτι (*Hey up*)

Για να διαπιστωθεί εάν το ανοδικό κομμάτι ενεργοποιεί, ελέγχθηκε η έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης στις διαγονιδιακές σειρές, *Heyup*^{A21}, *Heyup*^{A1E}, *Heyup*^{6β1}, *Heyup*^{6α1}, σε σύγκριση με την έκφραση του ενδογενούς *Hey*, στο κεντρικό νευρικό σύστημα της προνύμφης και στα εμβρυϊκά στάδια.

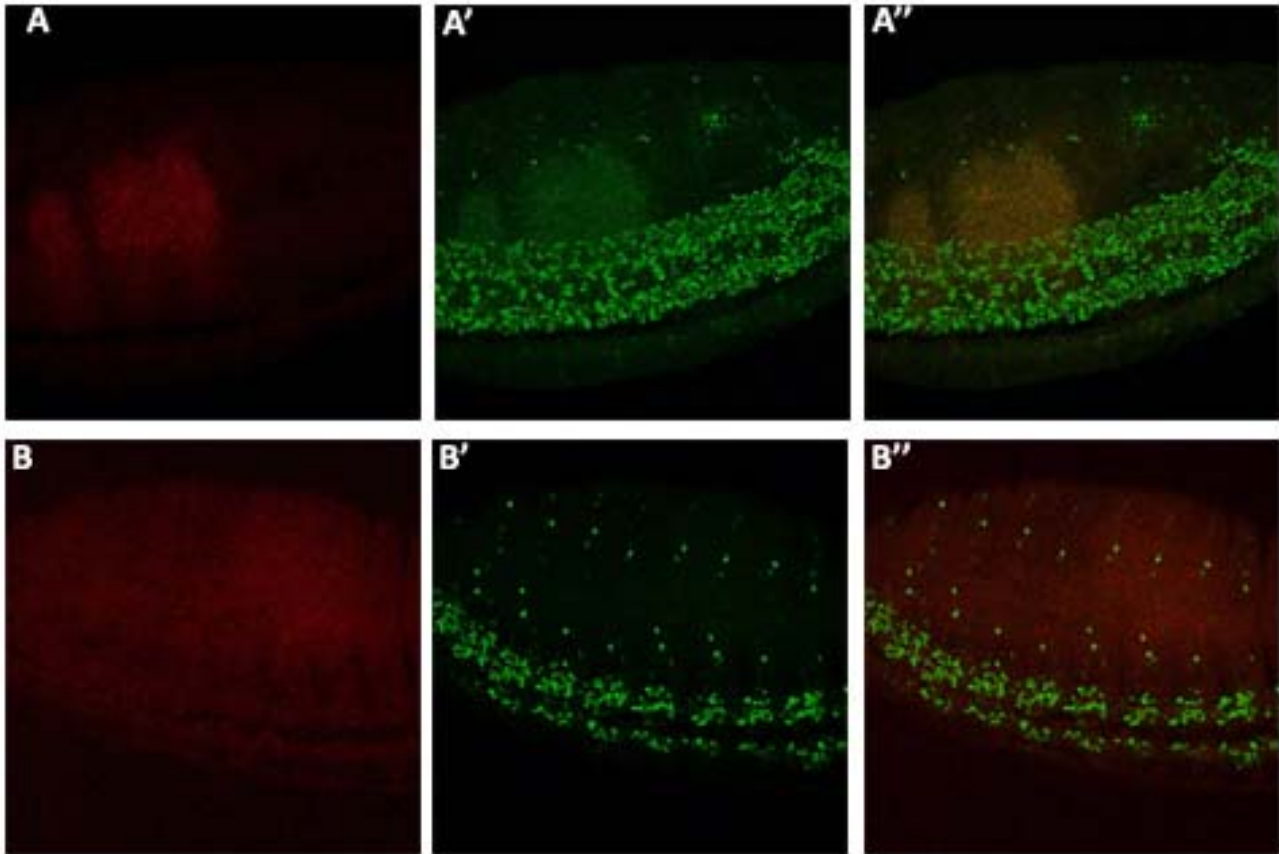
Η **3.1** περιέχει αντιπροσωπευτικές εικόνες από την *Heyup*^{6β1}, του ανοδικού κομματιού, όπου απεικονίζεται το κεντρικό νευρικό σύστημα της προνύμφης, με ανοσοεντοπισμό για β-γαλακτοσιδάση (κόκκινο) και για *Hey* (πράσινο). Στις **3.1A-A''** απεικονίζεται ο εγκεφαλικός λοβός και στις **3.1B-B''** το κοιλιακό γάγγλιο, που χαρακτηρίζονται από απουσία εντοπισμού της β-γαλακτοσιδάσης. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι δεν υπάρχει περιοχή στο κεντρικό νευρικό σύστημα της προνύμφης που να εκφράζεται η β-γαλακτοσιδάση.

Το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε και στα έμβρυα. Στις **Εικ 3.2 A-A''** απεικονίζεται ένα έμβρυο στο στάδιο 15, από την σειρά *Heyup*^{6β1}, σε καμία δομή του οποίου δεν εντοπίζεται η β γαλακτοσιδάση. Το ίδιο ισχύει και για έμβρυα διαφορετικών σταδίων και διαφορετικών σειρών, **Εικ 3.2 B-B''**-όπου απεικονίζεται ένα έμβρυο σταδίου 13 της σειράς *Heyup*^{6α1}. Οι χρώσεις με β-γαλακτοσιδάση (κόκκινο) και ενδογενές *Hey* (πράσινο) σε έμβρυα των σειρών του ανοδικού κομματιού έδειξαν ότι δεν εκφράζεται η β γαλακτοσιδάση σε κανένα εμβρυϊκό στάδιο σε σύγκριση με την ενδογενή πρωτεΐνη *Hey* όπου φαίνεται η έκφραση της, κατά μήκος του εμβρύου.

Από αυτά τα αποτελέσματα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το ανοδικό κομμάτι δεν ενεργοποιείται ούτε στο κεντρικό νευρικό σύστημα της προνύμφης ούτε και στα εμβρυϊκά στάδια.



Εικόνα 3.1: Μη ενεργοποίηση του ανοδικού τμήματος του γονιδίου Hey-KNS προνύμφης. Αντιπροσωπευτικές εικόνες για τις σειρές του ανοδικού κομματιού στο κεντρικό νευρικό σύστημα της προνύμφης (σειρά $Hey_{up}^{6\beta 1}$). Οι εικόνες είναι αποτέλεσμα συνάθροισης τομών από συνεσιακή μικροσκοπία και έχουν γίνει με ανοσοεντοπισμό για την β-γαλακτοσιδάση (κόκκινο) και για την Hey (πράσινο). Οι (A-A'') αντιστοιχούν σε εγκεφαλικό λοβό και οι (B-B'') στο κοιλιακό γάγγλιο. Σε καμία από τις εικόνες A και B δεν υπάρχει έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης. Στις A,B απεικονίζεται ανοσοεντοπισμός για β-γαλακτοσιδάση, στις A',B' για την Hey και στις A'',B'' φαίνεται η συγχώνευση των δύο ανοσοεντοπισμών. Πρόσθια πλευρά είναι προς τα πάνω. Φακός 40x.



Εικόνα 3.2: Μη ενεργοποίηση του ανοδικού τμήματος του γονιδίου Hey- EMBRYO.

Αντιπροσωπευτικές εικόνες για τις σειρές του ανοδικού κομματιού σε έμβρυα. Οι εικόνες είναι αποτέλεσμα συνάθροισης τομών από συνεστιακή μικροσκοπία και έχουν γίνει με ανοσοεντοπισμό για την β-γαλακτοσιδάση (κόκκινο) και για την ενδογενή Hey (πράσινο). Οι (A, A', A'') είναι από την σειρά Hey^{6α1}, οι (B, B', B'') είναι από την σειρά Hey^{6β1}. Στις A,B απεικονίζεται ο ανοσοεντοπισμός για β-γαλακτοσιδάση, στις A',B' για την Hey και στις A'',B'' φαίνεται η συγχώνευση των δύο ανοσοεντοπισμών. Δε παρατηρείται έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης Το πρόσθιο τμήμα εμβρύου είναι προς τα δεξιά, και ραχιαία πλευρά προς τα πάνω . Φακός 40x.

Ιντρόνιο 2 (Heinz2)

Για να διερευνηθεί η ενεργοποίηση του ιντρονίου 2 χρησιμοποιήθηκαν οι σειρές Heinz^{17δ1}, Heinz^{17α1}, Heinz^{20γ1}, Heinz^{20α1}, Heinz^{13β2}, Heinz^{13δ1}, Heinz^{27β2}, Heinz^{27α1}, Heinz^{23γ1}, Heinz^{23β2}, οι οποίες έφεραν το κομμάτι του ιντρονίου ανοδικά του γονιδίου *bgal*. Ο πειραματικός έλεγχος έγινε με ανοσοεντοπισμό για β-γαλακτοσιδάση (κόκκινο) και για την ενδογενή πρωτεΐνη Hey (πράσινο) για να συγκριθεί το πρότυπο της έκφρασης της β-γαλακτοσιδάσης με το πρότυπο της έκφρασης της πρωτεΐνης Hey.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στο κεντρικό νευρικό σύστημα της προνύμφης υπάρχει έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης σε όλες τις σειρές. Στην (Εικ. 3.3) δίνονται αντιπροσωπευτικές εικόνες από τις σειρές Heinz^{13β2}, όπου στην (A-A'') είναι η

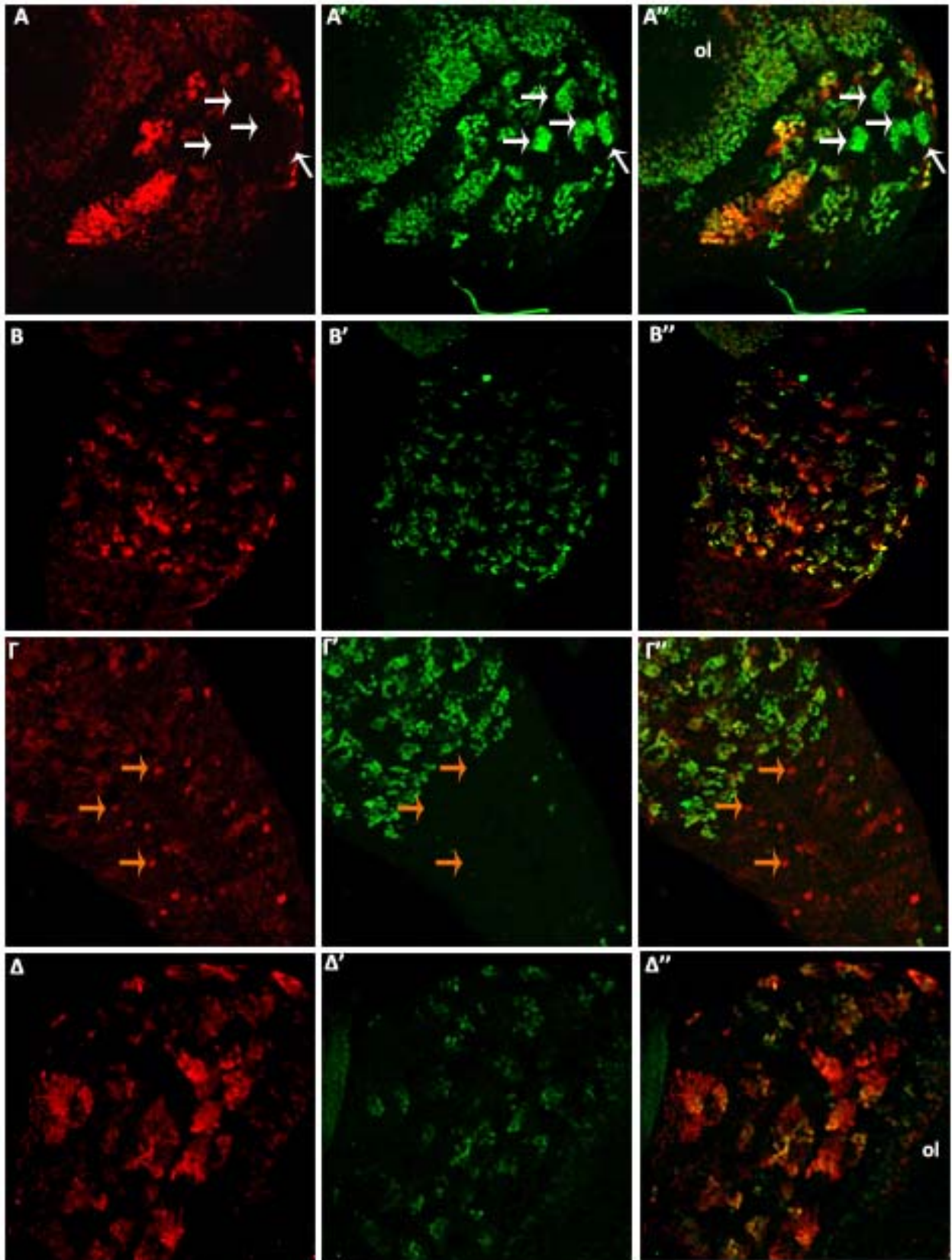
ραχιαία πλευρά του εγκεφαλικού λοβού και στην (**B-B''**) το κοιλιακό γάγγλιο, $Heinz^{17\delta 1}$ (**Γ-Γ''**) όπου φαίνεται το κοιλιακό γάγγλιο και τέλος $Heinz^{23\gamma 1}$ (**Δ-Δ''**) όπου φαίνεται η κοιλιακή πλευρά του εγκεφαλικού λοβού. Στον εγκεφαλικό λοβό της προνύμφης (**A-A''**, και **Δ-Δ''**) η β-γαλακτοσιδάση εκφράζεται και συνεντοπίζεται με την ενδογενή πρωτεΐνη Hey. Εξαιρέση αποτελούν οι περιοχές των mushroom bodies όπου εντοπίζεται η πρωτεΐνη Hey αλλά δεν υπάρχει β-γαλακτοσιδάση (**Εικ 3.3 A''**-λευκά βέλη) Στο κοιλιακό γάγγλιο (**B-B''** και **Γ-Γ''**) η β-γαλακτοσιδάση συνεντοπίζεται με την ενδογενή πρωτεΐνη Hey, εκτός από τις περιπτώσεις όπου στο οπίσθιο τμήμα του κοιλιακού γαγγλίου, (**Εικ 3.3 Γ''**-κίτρινα βέλη), υπάρχουν κύτταρα όπου εντοπίζεται μόνο β-γαλακτοσιδάση

Επειδή οι νευροβλάστες λαμβάνουν σηματοδότηση από το Notch μονοπάτι και εκφράζουν τις b-HLH-O πρωτεΐνες mγ and m8 (Zacharioudaki et al.,2012) θέλαμε να δούμε εάν το ιντρόνιο 2, στο οποίο όπως έχει ήδη αναφερθεί υπάρχουν θέσεις πρόσδεσης του συμπλόκου Su(H)-NICD και πιθανόν ενεργοποιείται από το μονοπάτι θα ενεργοποιηθεί και στους νευροβλάστες όπου θα παρατηρηθεί εάν εκφράζεται η β γαλακτοσιδάση.

Η πρωτεΐνη Asense είναι επίσης μία b-HLH πρωτεΐνη (Alonso & Cabrera, 1988) η οποία εκφράζεται σε όλους στους νευροβλάστες εκτός από τους PAN (Type II). Οι νευροβλάστες διαιρούνται δίνοντας ένα κύτταρο, το οποίο συνεχίζει να διαιρείται σαν νευροβλάστης και ένα γαγγλιακό μητρικό κύτταρο, από το οποίο θα προκύψουν νευρικά (νευρώνες και γλοιακά) κύτταρα. Υπάρχουν, όμως, στο ραχιαίο τμήμα του εγκεφαλικού λοβού της προνύμφης, κοντά στη μεσογραμμή, οκτώ νευροβλάστες, οι οποίοι θα διαιρεθούν σε ένα νευροβλάστη και σε ένα ενδιάμεσο νευρικό πρόγονο (intermediate neural progenitor-INP) (Boone JQ, Doe CQ. 2008). Με τη σειρά τους, τα INPs διαιρούνται σε ένα ενδιάμεσο νευρικό πρόγονο και σε ένα μητρικό γαγγλιακό κύτταρο. Οι Type II και οι πρώιμοι ενδιάμεσοι νευρικοί πρόγονοι δεν εκφράζουν Asense, ενώ οι ώριμοι ενδιάμεσοι νευρικοί πρόγονοι οι οποίοι έχουν αρχίσει να διαιρούνται, εκφράζουν Asense όπως οι Type I νευροβλάστες.

Εικόνα 3.3: Ενεργοποίηση του Int.2 του γονιδίου Hey. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από τις σειρές του ιντρονίου 2 σε κεντρικό νευρικό σύστημα προνύμφης. Οι εικόνες είναι αποτέλεσμα συνάθροισης τομών από συνεστιακή μικροσκοπία και έχουν γίνει με ανοσοεντοπισμό για την β-γαλακτοσιδάση (κόκκινο) και για την ενδογενή Hey (πράσινο). Οι (A, A', A'', B, B', B'') είναι από την σειρά $Heinz^{13\beta 2}$, όπου (A-A'') ραχιαία όψη του αριστερού εγκεφαλικού λοβού και (B-B'') το κοιλιακό γάγγλιο, οι (Γ-Γ'') παρουσιάζουν το κοιλιακό γάγγλιο από τη σειρά $Heinz^{17\delta 1}$ ενώ στις (Δ-Δ'') φαίνεται η κοιλιακή όψη του δεξιού εγκεφαλικού λοβού, από τη σειρά $Heinz^{23\gamma 1}$. Τα λευκά βέλη δείχνουν τα mushroom bodies τα οποία δεν υπάρχει έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης. Τα πορτοκαλί βελόνια δείχνουν μερικά από τα κύτταρα τα οποία εκφράζουν β-γαλακτοσιδάση αλλά δεν εκφράζουν Hey. Στις A,B απεικονίζεται ο ανοσοεντοπισμός για β γαλακτοσιδάση, στις A'-B' για την Hey και στις A''-B'' φαίνεται η συγχώνευση των δύο ανοσοεντοπισμών. (οι) οπτικός λοβός. Η πρόσθια πλευρά είναι προς τα πάνω και η οπίσθια προς τα κάτω. Φακός 40x

Etik.3.3

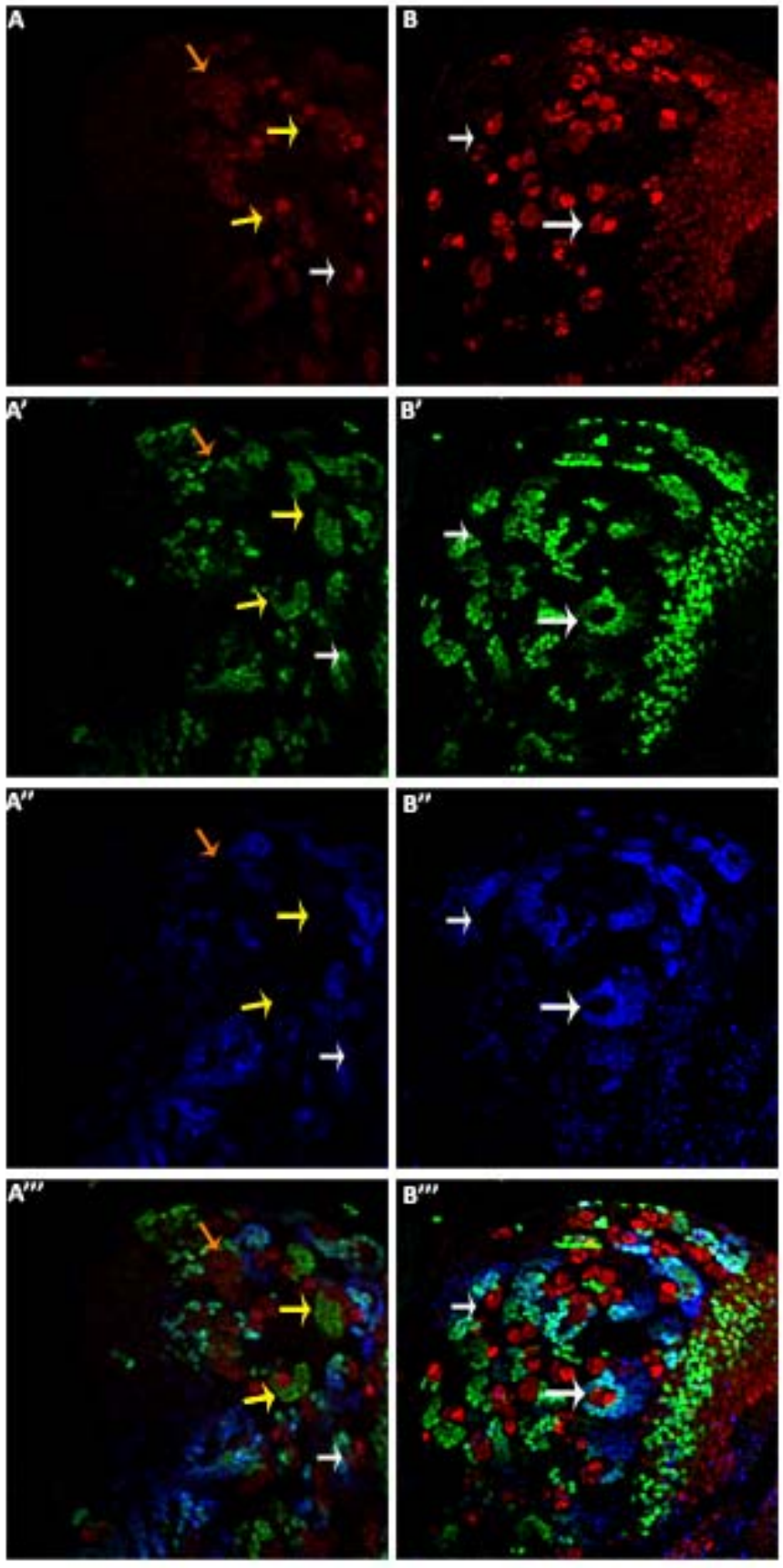


Στην **3.4** φαίνονται οι δύο πλευρές, ραχιαία (**A-A'''**) και κοιλιακή (**B-B'''**) ενός δεξιού εγκεφαλικού λοβού μετά από ανοσοεντοπισμό με Asense (κόκκινο), β-γαλακτοσιδάση (μπλε) και Hey (πράσινο). Όπως ήταν αναμενόμενο εντοπίστηκαν στην κοιλιακή πλευρά μόνο Type I νευροβλάστες (άσπρο βέλος) οι οποίοι περιβάλλονται από την γενεαλογία τους, νευρικά κύτταρα ένας αριθμός των οποίων εκφράζουν Hey και β-γαλακτοσιδάση (**Εικ. 3.4 B'''**). Στην ραχιαία πλευρά επίσης διακρίνονται Type I νευροβλάστες (**Εικ. 3.4 A'''**-άσπρο βέλος) οι οποίοι συμπεριφέρονται με τον ίδιο τρόπο όπως οι αντίστοιχοι στην κοιλιακή πλευρά. Στις γενεαλογικές σειρές των Type II, (**Εικ. 3.4 A'''** -κίτρινο βέλος), η Asense πρωτεΐνη εντοπίζεται σε πολλά κύτταρα που θα πρέπει να αντιστοιχούν σε INPs τα οποία περιβάλλονται από μικρό αριθμό κυττάρων που είναι Hey/bgal θετικά. Επιπλέον φαίνονται οι νευροβλάστες των mushroom bodies (κίτρινο βέλος) οι απόγονοι των οποίων δεν εκφράζουν β-γαλακτοσιδάση αλλά εκφράζουν Hey. Συνεπώς, εφόσον δεν υπάρχει συνεντοπισμός της β-γαλακτοσιδάσης με την Asense στους νευροβλάστες (**Εικ. 3.4 A''', B'''**) μπορούμε να συμπεράνουμε ότι παρόλο που το ιντρόνιο 2 δεν ενεργοποιείται στους νευροβλάστες αλλά μόνο σε διαφοροποιημένα κύτταρα.

Αντίστοιχη μελέτη στα έμβρυα έδειξε ότι όπως στο κεντρικό νευρικό σύστημα της προνούμφης έτσι και στα έμβρυα όλων των σειρών του ιντρονίου 2 εκφράζεται β-γαλακτοσιδάση και αναλύθηκε το πρότυπο της. Στην εικόνα **3.5** υπάρχουν αντιπροσωπευτικές συναθροίσεις τομών από έμβρυα διαφόρων σταδίων. Οι **3.5 A-A''** δείχνουν τμήμα του κεντρικού νευρικού συστήματος του εμβρύου στο στάδιο 16. Οι **3.5 B-B''** απεικονίζουν το περιφερικό νευρικό σύστημα εμβρύου σταδίου 15 και στις **3.5 Γ-Γ''** απεικονίζεται το μεσέντερο του ίδιου εμβρύου. Φαίνεται ότι και στα έμβρυα το πρότυπο της έκφρασης της β-γαλακτοσιδάσης ακολουθεί το πρότυπο της έκφρασης της Hey. Εξάιρεση αποτελούν οι περιπτώσεις όπου υπάρχει β-γαλακτοσιδάση χωρίς Hey, όπως φαίνεται στην **A''** (βέλος) στο ΚΝΣ, στην **B''** στο ΠΝΣ (βέλος) και στην **Γ''** στο μεσέντερο (βέλος). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί ως είτε

Εικόνα 3.4: Διερεύνηση του προτύπου έκφρασης του Int.2 του γονιδίου Hey στο κεντρικό νευρικό σύστημα της προνούμφης. Οι εικόνες είναι αποτέλεσμα συνάθροισης τομών από συνεστιακή μικροσκοπία και έχουν γίνει με ανοσοεντοπισμό για την β-γαλακτοσιδάση (μπλε), για την Hey (πράσινο) και για την Asense (κόκκινο). Η Asense πρωτεΐνη εκφράζεται σε νευροβλάστες. Ραχιαία (A-A''') και κοιλιακή πλευρά (B-B''') δεξιού εγκεφαλικού λοβού. Η Asense δεν συνεντοπίζεται με την β-γαλακτοσιδάση (A''', B''') ούτε στην κοιλιακή ούτε στην ραχιαία πλευρά. Τα άσπρα βέλη δείχνουν τους Type I νευροβλάστες οι οποίοι περιβάλλονται από Hey και bgal θετικά απόγονα κύτταρα, τα κίτρινα βέλη στην A' δείχνουν τους νευροβλάστες των mushroom bodies και την γενεαλογική τους σειρά η οποία εκφράζει Hey αλλά όχι β-γαλακτοσιδάση και τα πορτοκαλί βέλη δείχνουν την γενεαλογική σειρά των νευροβλαστών Type II. Στις A,B απεικονίζεται ο ανοσοεντοπισμός για Asense, στις A'-B' για την Hey, στις A''-B'' για β-γαλακτοσιδάση και στις A'''-B''' φαίνεται η συγχώνευση των τριών ανοσοεντοπισμών. Η πρόσθια πλευρά είναι προς τα πάνω. Φακός 40x

Елк. 3.4

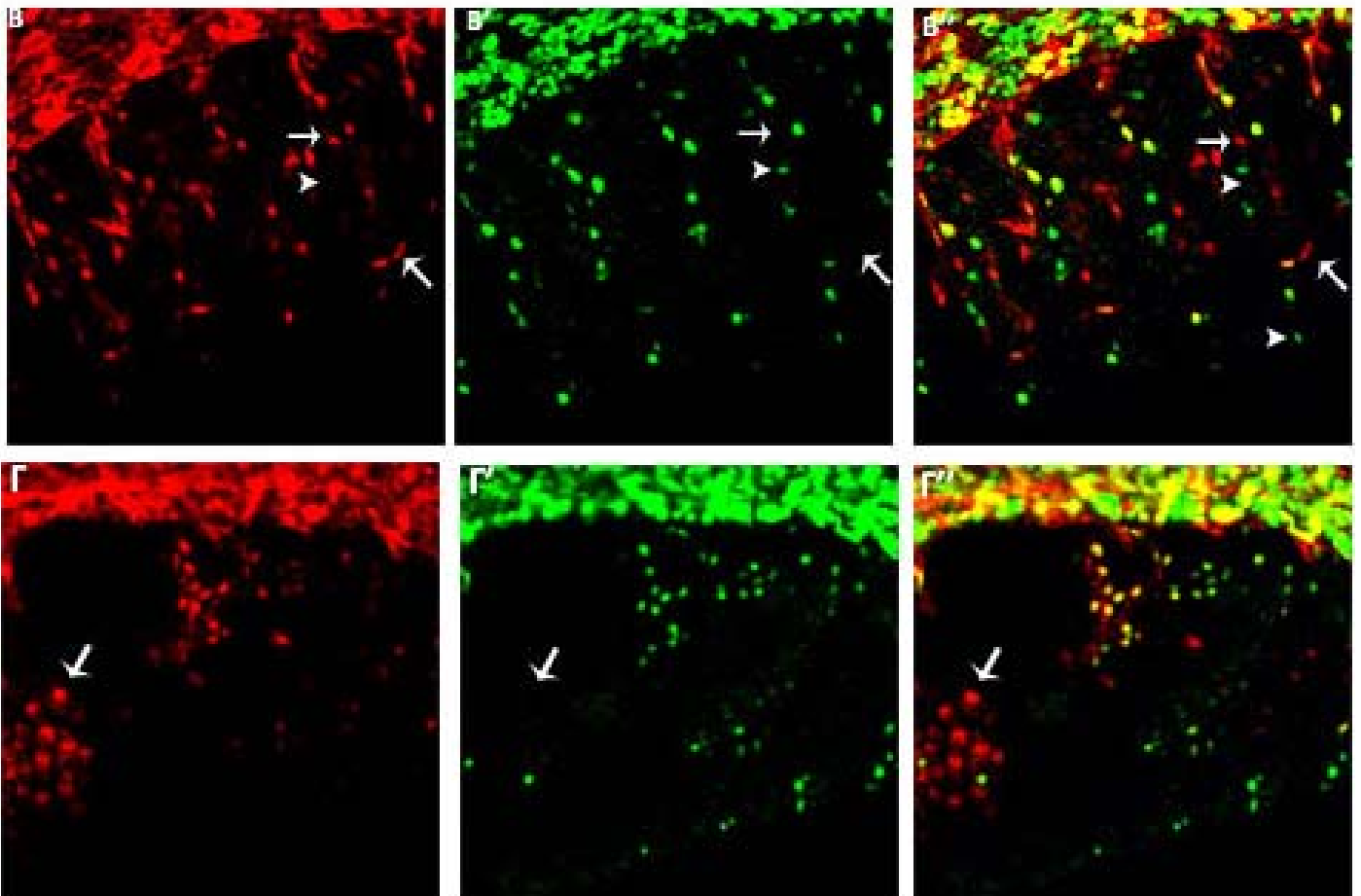
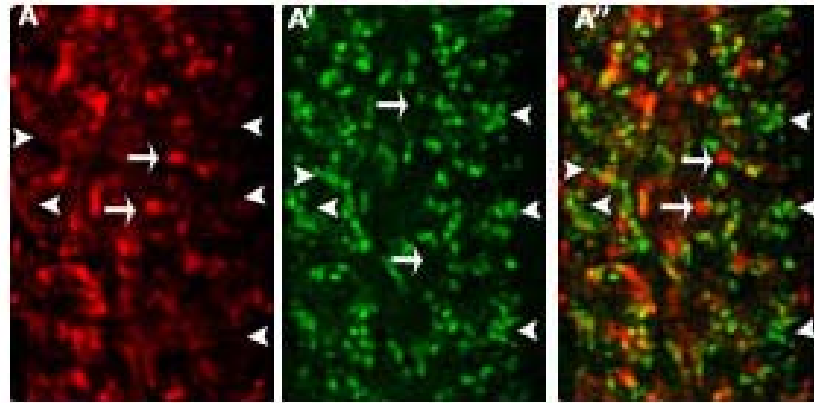


διατήρηση της πρωτεΐνης β-γαλακτοσιδάσης από χρονικά προηγούμενη έκφραση είτε από απουσία κάποιου αρνητικού ρυθμιστικού στοιχείου από το ιντρόνιο 2. Επειδή η β-γαλακτοσιδάση είναι κυτταροπλασματική, τα σημεία στο ΠΝΣ όπου εκφράζεται και είναι ακαθόριστου σχήματος μπορεί να είναι νευράξονες. Ακόμα στο έντερο του εμβρύου φαίνεται ότι τα κύτταρα στα οποία δεν υπάρχει Hey αλλά υπάρχει β-γαλακτοσιδάση δεν έχουν την μορφολογία των κυττάρων που εκφράζουν Hey στο έντερο του εμβρύου. Συγκριτικά είναι πιο μεγάλα από τα κύτταρα που εκφράζουν Hey. Επιπλέον υπάρχουν περιοχές στο κεντρικό νευρικό σύστημα, (**A''**- κεφαλή βέλους), και στο περιφερικό νευρικό, (**B''**- κεφαλή βέλους), στις οποίες δεν εντοπίζεται β-γαλακτοσιδάση αλλά υπάρχει Hey. Σε πειράματα που έχουν γίνει σε μεταλλαγές *DI*, *Serrate*, *mat* και *sanpodo*, οι οποίες έχουν σαν αποτέλεσμα μη λειτουργικό Notch μονοπάτι, έχειδειχθεί ότι ενώ το Hey δεν εκφράζεται πλέον στη πλειοψηφία των νευρώνων υπάρχουν εντούτοις κύτταρα στο ΚΝΣ του εμβρύου τα οποία συνεχίζουν να εκφράζουν Hey (Monastirioti et al., 2010). Τα αποτελέσματα αυτά και η παραπάνω παρατήρηση θα ήταν συμβατά με την υπόθεση ότι στο ΚΝΣ του εμβρύου το ιντρόνιο 2 ενεργοποιείται μέσω του Notch.

Συμπεραίνουμε ότι και κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη και κατά την ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού της προνύμφης η ενεργοποίηση του ιντρονίου 2 ακολουθεί την έκφραση του γονιδίου *Hey*, εκτός των περιπτώσεων που αναφέρθηκαν. Η ενεργοποίηση του ιντρονίου 2 υποθέτουμε ότι είναι μέσω του Notch μονοπατιού και σαν πρώτη ένδειξη αυτής της υπόθεσης είναι η απουσία ενεργοποίησης του ιντρονίου 2 στις περιοχές των mushroom bodies και στις περιοχές του ΚΝΣ στο έμβρυο, όπως αναφέρθηκε. Στις περιοχές των mushroom bodies έχει αποδειχθεί με ανάλυση κλώνων MARCM ότι η ρύθμιση του γονιδίου *Hey* γίνεται ανεξάρτητα από το Notch μονοπάτι. (Monastirioti et al., 2010).

Εικόνα 3.5: Ενεργοποίηση του ιντρονίου2 του γονιδίου Hey. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από τις σειρές του ανοδικού κομματιού σε έμβρυα. Οι εικόνες είναι αποτέλεσμα συνάθροισης τομών από συνεστιακή μικροσκοπία και έχουν γίνει με ανοσοεντοπισμό για την β-γαλακτοσιδάση (κόκκινο) και για την ενδογενή Hey (πράσινο). Συνάθροιση τομών από συνεστιακή μικροσκοπία σε έμβρυα. (A, A', A'') κεντρικό νευρικό σύστημα εμβρύου (B, B', B'') περιφερικό νευρικό σύστημα εμβρύου, (Γ, Γ', Γ'') κοιλιακή χώρα εμβρύου. Τα βέλη δείχνουν περιοχές όπου δεν υπάρχει Hey ενώ υπάρχει β-γαλακτοσιδάση και οι κεφαλές βέλους δείχνουν τα σημεία του εμβρύου στα οποία υπάρχει Hey, απουσία β-γαλακτοσιδάσης. Στις A,B απεικονίζεται ο ανοσοεντοπισμός για β γαλακτοσιδάση στις A'-B' για την Hey και στις A''-B'' φαίνεται η συγχώνευση των δύο ανοσοεντοπισμών. A-A'' πρόσθια πλευρά προς τα πάνω, φακός 63x. B-Γ'' πρόσθια πλευρά προς τα αριστερά κοιλιακή πλευρά προς τα πάνω φακός 40x

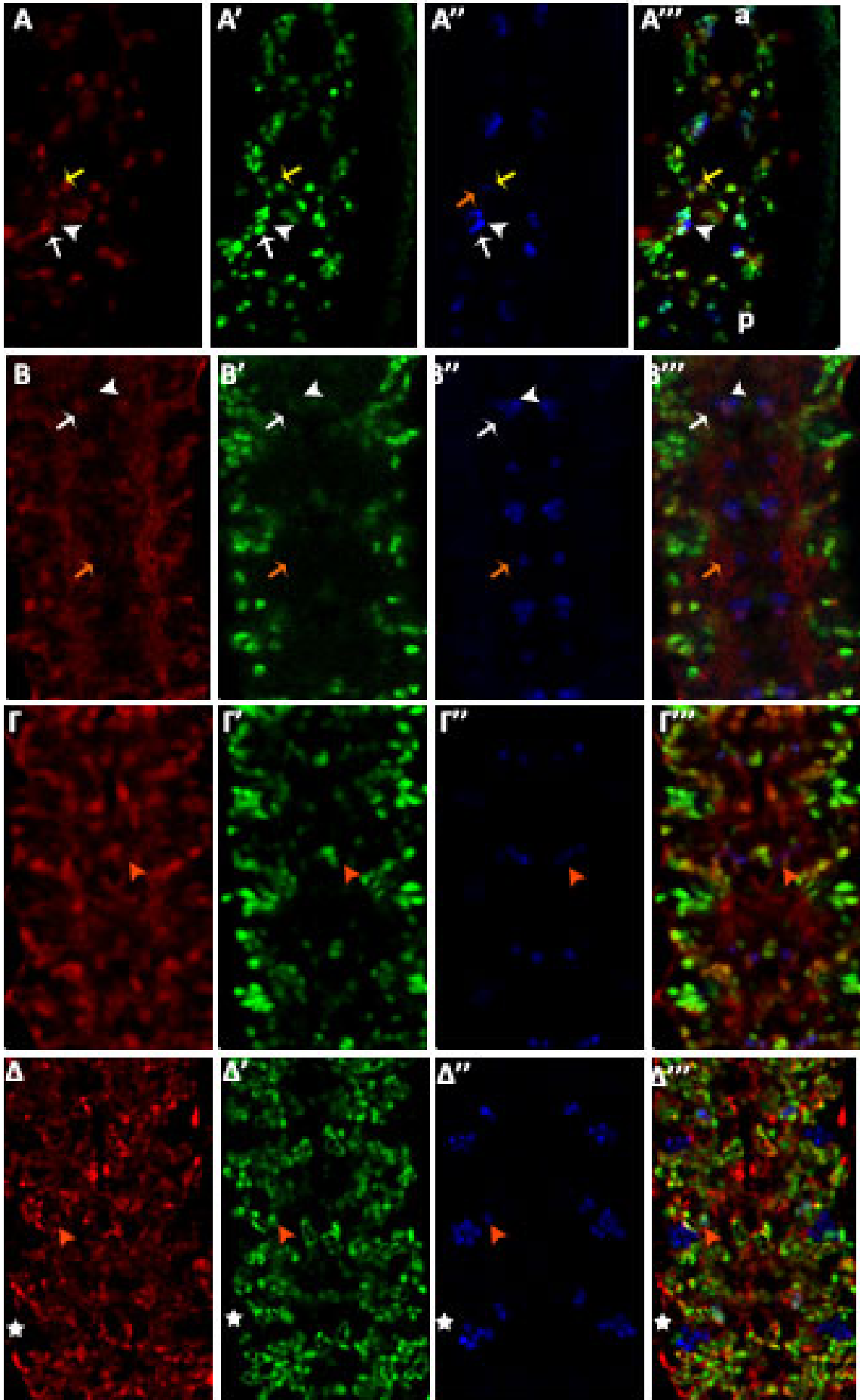
Et3.5



Διερεύνηση της έκφρασης της β γαλακτοσιδάσης σε συγκεκριμένες κυτταρικές γενεολογικές σειρές

Για να διερευνηθεί η έκφραση της β γαλακτοσιδάσης στα κύτταρα θα πρέπει να ελεγχθεί σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές. Η Eve πρωτεΐνη εντοπίζεται σε ένα μικρό αριθμό γαγγλιακών μητρικών κυττάρων και νευρώνων (Patel et al., 1989) οι οποίοι είναι εύκολο να εντοπιστούν. Οι νευρώνες των οποίων η κυτταρική τύχη αναλύθηκε είναι aCC/pCC, RP2/ RP2sib, U/ U sib και EL νευρώνες. Είναι χωρισμένοι σε ζευγάρια γιατί προέρχονται από το ίδιο γαγγλιακό μητρικό κύτταρο αλλά μόνο ένα από τα δύο κύτταρα σηματοδοτείται από το Notch μονοπάτι (Skeath & Doe, 1998). Οι pCC, RP2sib και U είναι οι νευρώνες οι οποίοι σηματοδοτούνται από το Notch μονοπάτι και εκφράζουν *Hey* πρωτεΐνη παροδικά μετά τη γέννηση τους αλλά χάνουν την έκφραση *Hey* σε μετέπειτα χρονολογικά στάδια (Monastirioti et al 2010). Στην **Εικ. 3.6** υπάρχουν έμβρυα διαφορετικών σταδίων στα οποία έχει γίνει ανοσοεντοπισμός με β-γαλακτοσιδάση (κόκκινο), *Hey* (πράσινο) και Eve (μπλε). Στην **A-A''** φαίνεται ένα έμβρυο σταδίου 11 όπου το pCC (λευκό βέλος) εκφράζει *Hey* και *bgal* ενώ το aCC (κεφαλή βέλους) δεν εκφράζει κανένα από τους δυο δείκτες. Στην ίδια εικόνα διακρίνονται το ζεύγος RP2/ RP2sib, το πορτοκαλί βέλος δείχνει το RP2 και το κίτρινο το RP2sib. Ο RP2sib εκφράζει παροδικά Eve στο συγκεκριμένο στάδιο και έτσι μπορούμε να διακρίνουμε ότι εκφράζει επίσης *Hey* και β-γαλακτοσιδάση. Δεν θα ασχοληθούμε περαιτέρω με αυτό το κύτταρο επειδή δεν θα μπορούμε να το αναγνωρίσουμε σε μετέπειτα εμβρυϊκά στάδια. Από την **B-Δ'''** απεικονίζεται το ίδιο έμβρυο, το οποίο είναι σταδίου 16, και η διαφορά σε **B-B'''**, με **Γ-Γ'''** και **Δ-Δ'''** είναι η συνάθροιση τομών από διαφορετικές ραχιαιοκοιλιακές περιοχές του ΚΝΣ του εμβρύου. Οι **B-B'''** είναι τομές από πιο ραχιαία/εσωτερική περιοχή του ΚΝΣ, οι **Γ-Γ'''** αντιστοιχούν σε πιο εξωτερικές τομές σε σύγκριση με τις **B-B'''** ενώ οι **Δ-Δ'''** από τομές οι οποίες βρίσκονται πιο κοντά στην εξωτερική κοιλιακή πλευρά. Τα κύτταρα τα οποία βρίσκονται εσωτερικά (**B-B'''**) έχουν γεννηθεί/διαφοροποιηθεί νωρίτερα από αυτά στις **Γ-Γ'''** και **Δ-Δ'''**. Στην εικόνα **A'''**, όπως αναφέρθηκε διακρίνεται το pCC (λευκό βέλος) το οποίο εκφράζει *bgal* και *Hey*, ενώ στο aCC (λευκή κεφαλή βέλους) εντοπίζεται μόνο Eve. Στην **B'''** φαίνεται ακόμα το ζεύγος των aCC/pCC (λευκή κεφαλή/ λευκό βέλος) όπου το pCC έχει σχεδόν σταματήσει να εκφράζει *Hey* αλλά έχει β-γαλακτοσιδάση. Ακόμα ένα παράδειγμα αποτελούν τα U κύτταρα. Στην **Γ'''** διακρίνονται τα πρώιμα Uς (πορτοκαλί βέλος) τα οποία εκφράζουν μόνο β-γαλακτοσιδάση αλλά δεν έχουν πια *Hey* σε σύγκριση με τα νεαρά Uς (**Δ'''** πορτοκαλί βέλος) τα οποία εκφράζουν ακόμα *Hey* και έχουν β-γαλακτοσιδάση.

Ο εντοπισμός της β-γαλακτοσιδάσης στα κύτταρα pCC και U θα πρέπει να οφείλεται στην σταθερότητα της πρωτεΐνης η οποία φαίνεται να εκφράζεται εκτοπικά (Echelard et al.,1994; Arnone et al., 2004) σε συνδυασμό με την παροδική έκφραση της *Hey* πρωτεΐνης, η οποία μειώνεται από το στάδιο 14 του εμβρύου (Monastirioti et al., 2010) στα κύτταρα αυτά.

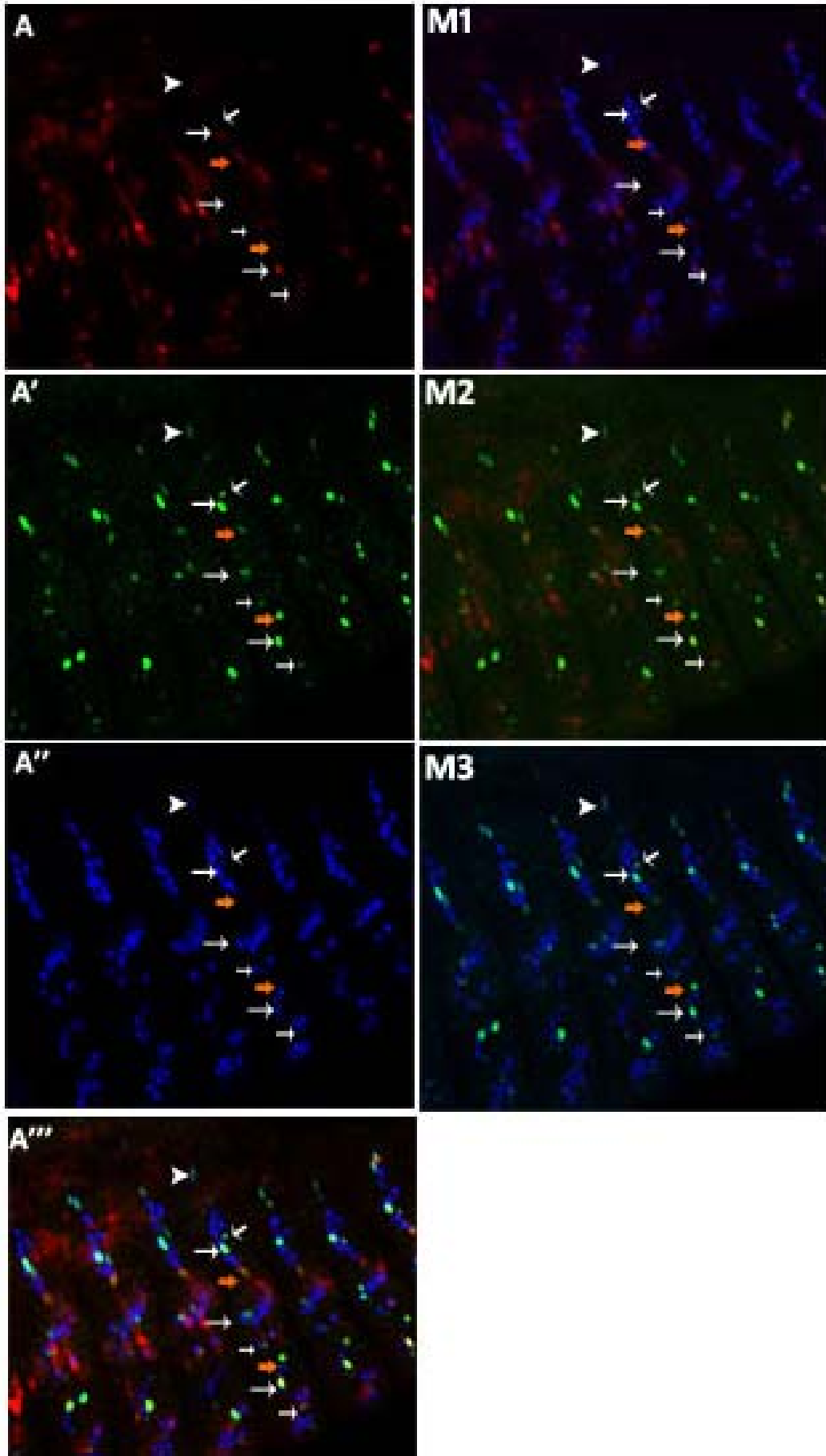


Εικόνα 3.6: Σταθερότητα της πρωτεΐνης β-γαλακτοσιδάσης. Οι εικόνες είναι αποτέλεσμα συνάθροισης τομών από συνεστιακή μικροσκοπία και έχουν γίνει με ανοσοενοτοπισμό για την β-γαλακτοσιδάση (κόκκινο), για το ενδογενές *Hey* (πράσινο) και *Eve* (μπλε), στο ΚΝΣ εμβρύων. (A-A'') έμβρυο σταδίου 11, (B-Δ''') έμβρυο σταδίου 16. Οι λευκές κεφαλές δείχνουν τα aCC κύτταρα στα οποία δεν εντοπίζεται *Hey* ούτε β-γαλακτοσιδάση. Τα λευκά βέλη δείχνουν τα pCC τα οποία εκφράζουν *Hey* και β-γαλακτοσιδάση (A''') αλλά είναι παροδική η έκφραση του, στην B''' έχει χαθεί η *Hey* αλλά συνεχίζουν να έχουν β-γαλακτοσιδάση. Το πορτοκαλί βέλος δείχνει το RP2(A-A''',B-B''') και το κίτρινο το RP2sib(A-A'''). Στα μεγαλύτερης ηλικίας U, πορτοκαλί κεφαλή Γ-Γ''', δεν εντοπίζεται *Hey* αλλά υπάρχει ότι β-γαλακτοσιδάση, ενώ στα νεαρά U, πορτοκαλί κεφαλή Δ-Δ''', εντοπίζεται η *Hey* και η β-γαλακτοσιδάση. Στις A-Δ απεικονίζεται ο ανοσοενοτοπισμός για β γαλακτοσιδάση, στις A'-Δ' για την *Hey*, στις A''-Δ'' για την *Eve* και στις A'''-Δ''' η συγχώνευση των τριών ανοσοενοτοπισμών. Πρόσθια πλευρά προς τα πάνω. Φακός 63x

Διερεύνηση της έκφρασης της β-γαλακτοσιδάσης και της *Hey* στο ΠΝΣ

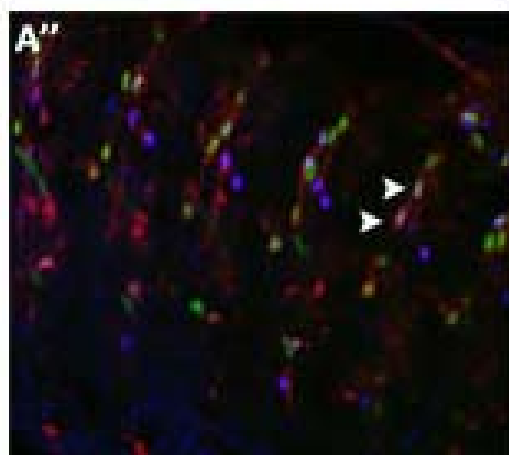
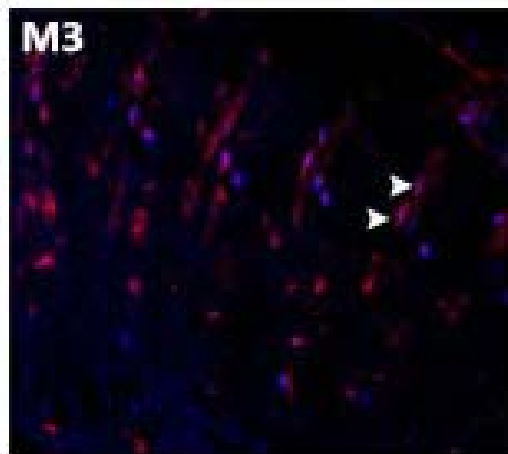
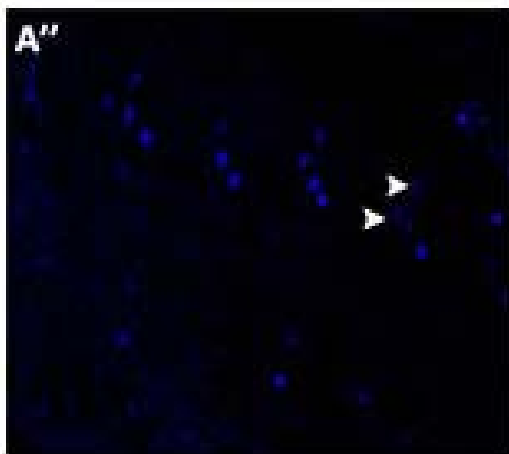
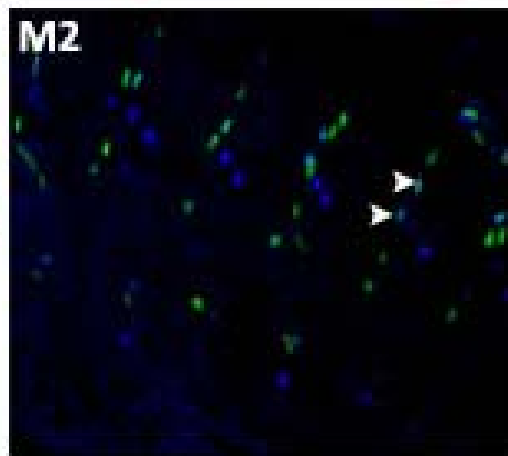
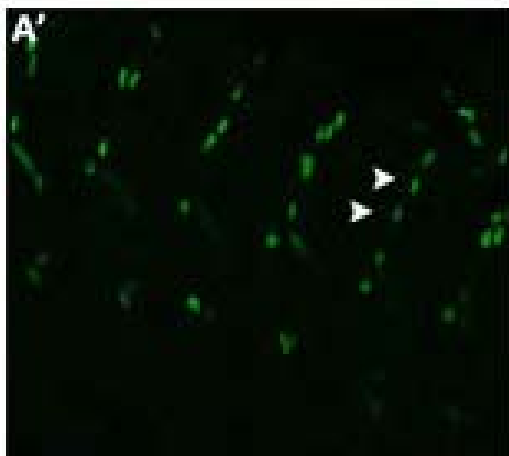
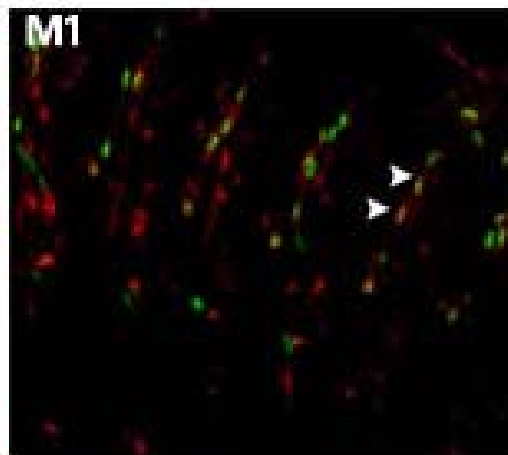
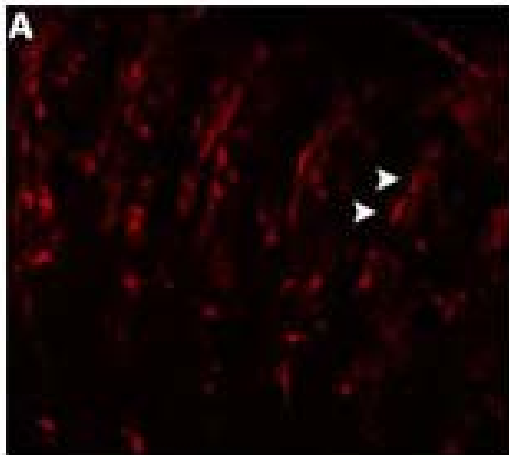
Το γονίδιο *Hey* εκφράζεται στο περιφερικό νευρικό σύστημα (Monastiriotti et al., 2010) αλλά ακόμα δεν γνωρίζουμε σε ποιες ομάδες κυττάρων. Επίσης όπως αναφέρθηκε προηγουμένως υπάρχουν κύτταρα στο ΠΝΣ τα οποία εκφράζουν *Hey* χωρίς να εκφράζουν *bgal*. Για να διαπιστωθεί εάν εκφράζονται σε νευρώνες ή σε γλοιακά κύτταρα έγιναν χρώσεις με δύο δείκτες *Elan* και *Rero*, αντίστοιχα για νευρώνες και γλοιακά κύτταρα.\

Η *Elan* είναι πυρηνική πρωτεΐνη όλων των νευρικών κυττάρων. Στην **Εικ. 3.7** φαίνεται ανοσοενοτοπισμός για *Elan* (μπλε), για β-γαλακτοσιδάση (κόκκινο) και για *Hey* (πράσινο). Στη πλειοψηφία των κυττάρων (A''') εντοπίζεται *Elan*, β-γαλακτοσιδάση και *Hey* (λευκά βέλη). Ακόμα υπάρχουν κύτταρα στα οποία εντοπίζεται *Hey* και β-γαλακτοσιδάση αλλά όχι *Elan* (**Εικ 3.7 A'''** πορτοκαλί βέλος) Υπάρχουν δύο κύτταρα προς την ραχιαία πλευρά του εμβρύου στα οποία υπάρχει *Hey* χωρίς να εκφράζεται ο *int2-lacZ* ανταποκριτής, (**A'''**-κεφαλή βέλους). Συμπεραίνουμε ότι αυτά στα οποία συνεντοπίζονται *Elan*, β-γαλακτοσιδάση και *Hey* (λευκά βέλη) είναι νευρώνες, όπως και αυτά στα οποία συνεντοπίζεται *Elan* και *Hey* αλλά δεν υπάρχει β-γαλακτοσιδάση. Σε αυτούς τους νευρώνες είναι πιθανό η έκφραση του *Hey* να μην ενεργοποιείται από το intron 2. Η **Εικ. 3.8** δείχνει τον ανοσοενοτοπισμό για β-γαλακτοσιδάση (κόκκινο), *Hey* (μπλε) και *Rero* (πράσινο), που εκφράζεται στα γλοιακά κύτταρα. Στην **Εικ. 3.8** απεικονίζονται δύο κύτταρα τα οποία εκφράζουν *rero*, *Hey*, και *Bgal* (κεφαλές βελών) και τοποθετούνται στη περιοχή όπου ανιχνευτήκαν *Hey/bgal* θετικά και *Elan* αρνητικά κύτταρα (**βλ. παραπάνω –Εικ3.7.**). Συμπεραίνουμε ότι σ' αυτά τα γλοιακα κύτταρα η έκφραση του *Hey* ενεργοποιείται από το intron 2.



Εικόνα 3.7: Έκφραση Hey στο περιφερικό νευρικό σύστημα- E1an. Οι εικόνες είναι αποτέλεσμα συνάθροισης τομών από συνεστιακή μικροσκοπία και έχουν γίνει με ανοσοεντοπισμό για την β-γαλακτοσιδάση (κόκκινο), για την Hey (πράσινο) και E1an (μπλε), σε έμβρυα. Περιφερικό νευρικό σύστημα. (A-A'') έμβρυο σταδίου 15. Τα λευκά βέλη δείχνουν τα κύτταρα τα οποία είναι θετικά σε β-γαλακτοσιδάση, Hey και E1an, οι κεφαλές βελών δείχνουν τα κύτταρα στα οποία συνεντοπίζεται Hey και E1an, απουσία β-γαλακτοσιδάσης. Τα πορτοκαλί βέλη δείχνουν κύτταρα στα οποία συνεντοπίζεται η β-γαλακτοσιδάση και η Hey, απουσία E1an,. Στην A απεικονίζεται ο ανοσοεντοπισμός για β-γαλακτοσιδάση, στην A' για την Hey, στην A'' για την E1an και στη A''' η συγχώνευση των τριών ανοσοεντοπισμών, M1 ο ανοσοεντοπισμός της β-γαλακτοσιδάσης και της E1an, M2 ο ανοσοεντοπισμός για β-γαλακτοσιδάση και Hey, και M3 ανοσοεντοπισμός για Hey και E1an. Πρόσθια πλευρά προς τα αριστερά, ραχιαία προς τα πάνω. Φακός 40x

Εικόνα 3.8: Έκφραση Hey στο περιφερικό νευρικό σύστημα- Repo. Οι εικόνες είναι αποτέλεσμα συνάθροισης τομών από συνεστιακή μικροσκοπία και έχουν γίνει με ανοσοεντοπισμό για την β-γαλακτοσιδάση (κόκκινο), για το ενδογενές Hey (μπλε) και Repo (πράσινο), σε έμβρυα. Περιφερικό νευρικό σύστημα. (A-A'') έμβρυο σταδίου 13. Οι λευκές κεφαλές δείχνουν τα κύτταρα στα οποία συνεντοπίζεται η Repo με την Hey και την β-γαλακτοσιδάση, Στην A απεικονίζεται ο ανοσοεντοπισμός για β-γαλακτοσιδάση, στην A' για την Hey, στην A'' για την Repo και στη A''' η συγχώνευση των τριών ανοσοεντοπισμών, στην M1 ο ανοσοεντοπισμός για β-γαλακτοσιδάση και Repo, στην M2 ο ανοσοεντοπισμός για Repo και Hey και στην M3 ο ανοσοεντοπισμός για Hey και β-γαλακτοσιδάση. Πρόσθια πλευρά προς τα αριστερά, ραχιαία προς τα κάτω Φακός 40x (z=1,2)



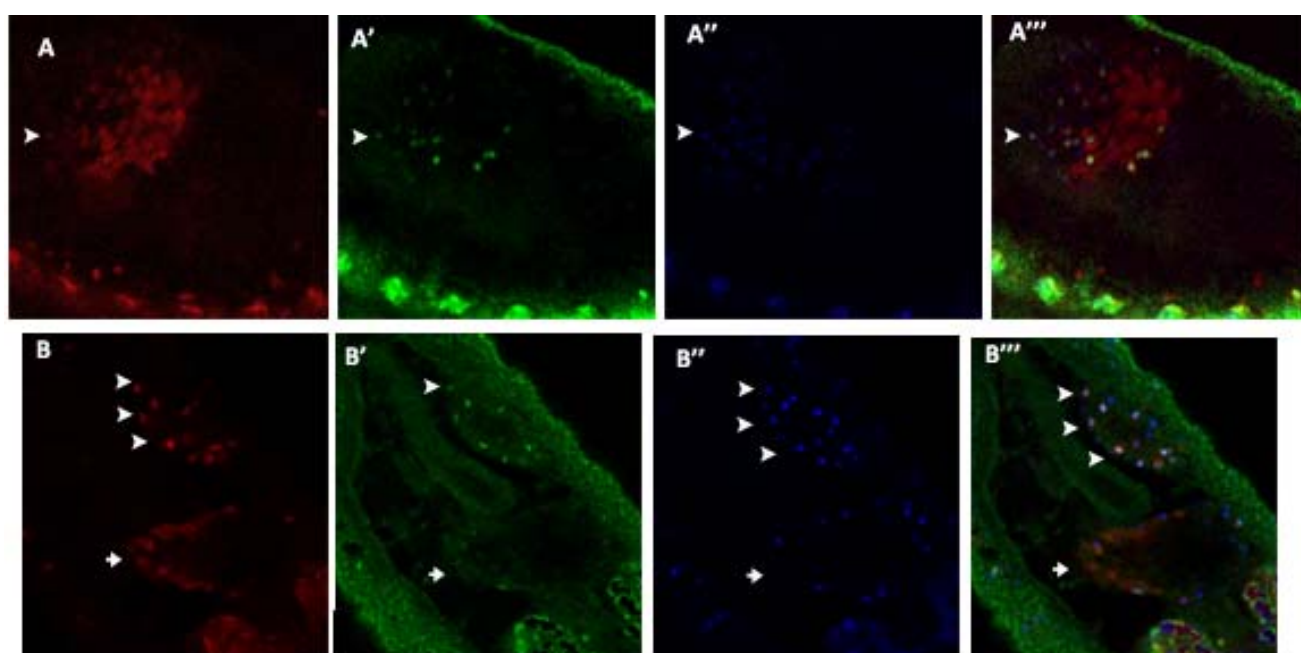
Έκφραση Hey και β-γαλακτοσιδάσης στο έντερο του εμβρύου

Όπως είδαμε στην **Εικ 3.5 Γ-Γ'** στο έντερο του εμβρύου εκφράζονται το *Hey* και το *bgal*. Για να διερευνηθεί η έκφραση τους σε αυτά τα κύτταρα μελετήθηκε ο εντοπισμός τους μαζί με τον εντοπισμό των πρωτεϊνών Prospero, Nubbin. Το μεσέντερο του εμβρύου αποτελείται από τρεις κύριους κυτταρικούς τύπους, τα κύτταρα που θα αποτελέσουν τα εντεροενδοκρινή κύτταρα και τα εντεροκύτταρα του μεσεντέρου της προνύμφης και τα πρόγονα κύτταρα του ενήλικου μεσεντέρου. Το Notch σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποιεί την εντεροκυτταρική μοίρα και καταστέλλει την εντεροενδοκρινή. Σε μεταλλάξεις στο *Notch* ή στο *DI* έχει δειχθεί αύξηση των εντεροενδοκρινών κυττάρων, ενώ υπερέκφραση Notch προκαλεί μείωση αυτών των κυτταρικών τύπων. Τα εντεροενδοκρινή κύτταρα είναι Prospero θετικά (Takashima et al., 2010) και τα εντεροκύτταρα είναι Nubbin θετικά (Lee et al., 2009).

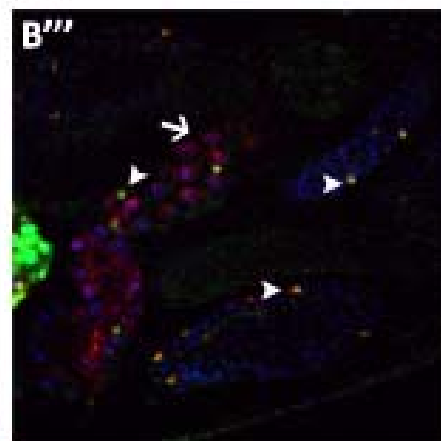
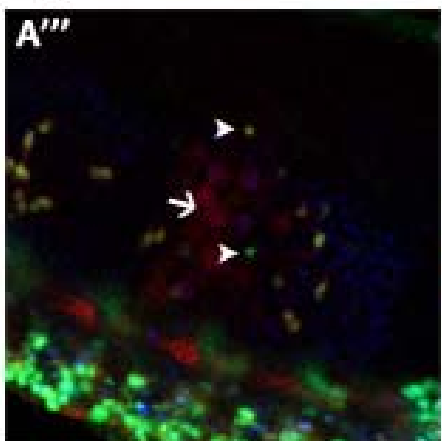
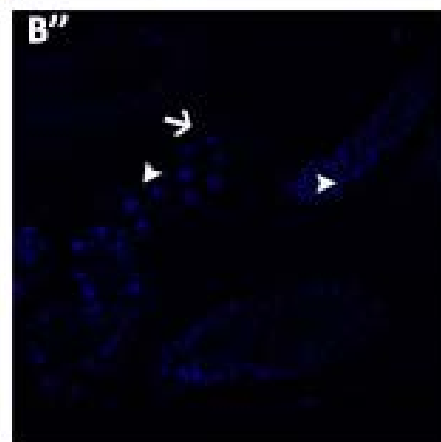
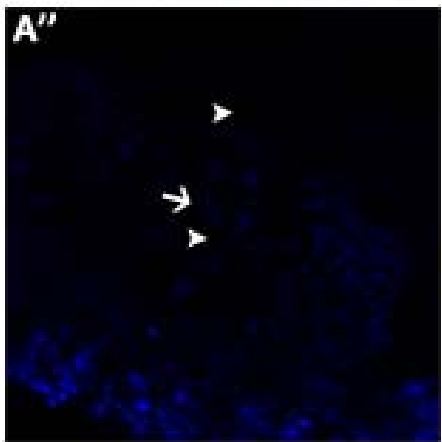
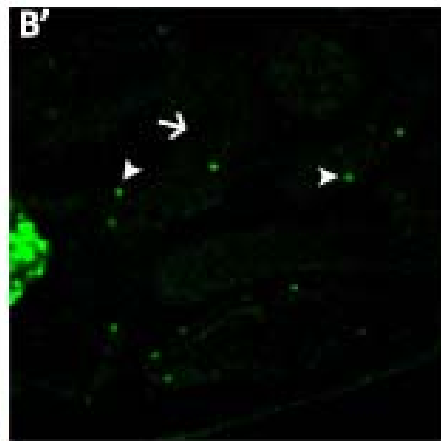
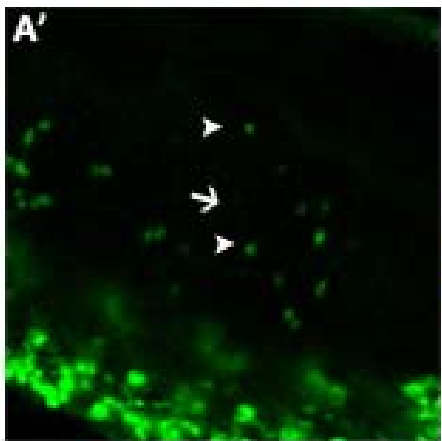
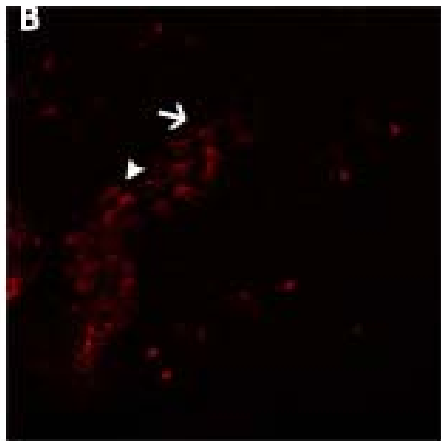
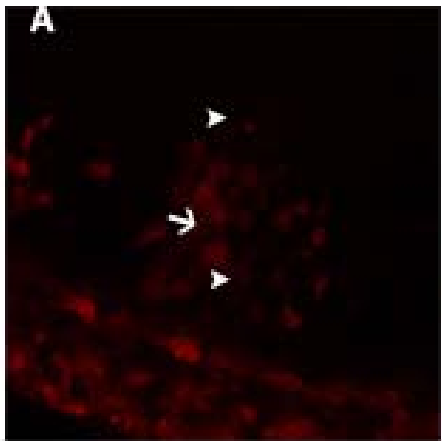
Ενώ τα κύτταρα που εκφράζουν Hey και β-γαλακτοσιδάση φαίνεται να είναι μικρά και να συνεντοπίζονται οι δύο πρωτεΐνες (κίτρινο χρώμα) υπάρχουν κύτταρα τα οποία εκφράζουν β-γαλακτοσιδάση, είναι Hey αρνητικά και έχουν μεγάλο μέγεθος σε σύγκριση με τα υπόλοιπα. Αυτά τα κύτταρα εντοπίζονται στην περιοχή όπου γίνεται η σύμπτυξη του πρόσθιου και του οπίσθιου τμήματος του αναπτυσσόμενου μεσεντέρου κατά την εμβρυογένεση..

Στην **Εικ. 3.9** απεικονίζεται ανοσοεντοπισμός για Prospero (μπλε), για β-γαλακτοσιδάση (κόκκινο) και για Hey (πράσινο). Φαίνεται τα *Hey/bgal* θετικά κύτταρα αποτελούν έναν υποπληθυσμό των Prospero θετικών κυττάρων (κεφαλή βέλους) ενώ τα κύτταρα στα οποία εντοπίζεται η β-γαλακτοσιδάση απουσία Hey (βέλος) δεν είναι Prospero θετικά. Τα τελευταία όπως φαίνεται στην εικόνα **3.9** εντοπίζονται στη μέση του μεσεντέρου ενός εμβρύου σταδίου 13 (**A-A'''**), ενώ σε μεγαλύτερο αναπτυξιακό στάδιο (**B'-B'''**) έχουν συγκεκριμένη τοποθέτηση. Τα κύτταρα αυτά διαφέρουν μορφολογικά από τα κύτταρα τα οποία είναι Hey, Prospero και *bgal* θετικά (κεφαλή βέλους). Έγινε ανοσοεντοπισμός για Nubbin (μπλε), β-γαλακτοσιδάση (κόκκινο) και Hey (πράσινο). Στην **Εικ.3.10** απεικονίζονται έμβρυα 12^{ου} σταδίου (**A-A'''**) και 16^{ου} σταδίου (**B-B'''**). Στα κύτταρα που εκφράζεται Hey και *bgal* δεν υπάρχει Nubbin πρωτεΐνη (κεφαλή βέλους). Ενώ τα κύτταρα στα οποία εντοπίζεται β-γαλακτοσιδάση, απουσία Hey, συνεντοπίζεται η Nubbin (βέλος). Επειδή τα εντεροκύτταρα δέχονται Notch σηματοδότηση μπορεί να ενεργοποιείται το *Int.2* και να εκφράζεται το γονίδιο *bgal*.

Εικόνα 3.9: Έκφραση Hey στο έντερο του εμβρύου- Prospero. Οι εικόνες είναι αποτέλεσμα συνάθροισης τομών από συνεστιακή μικροσκοπία και έχουν γίνει με ανοσοεντοπισμό για την β γαλακτοσιδάση (κόκκινο), για το ενδογενές Hey (πράσινο) και Prospero (μπλε), σε μεσέντερο εμβρύου. (A-A'') έμβρυο σταδίου 13 (B-B''') σταδίου 16, διακρίνονται δομές του μεσεντέρου. Οι λευκές κεφαλές δείχνουν τα κύτταρα στα οποία συνεντοπίζεται η Prospero με την Hey και την β γαλακτοσιδάση, συμπεραίνοντας ότι πρόκειται για ενδοκρινή κύτταρα, ενώ υπάρχουν θετικά σε β γαλακτοσιδάση, απουσία Hey κύτταρα (βέλος) τα οποία μορφολογικά είναι διαφορετικά από τα Hey θετικά κύτταρα του μεσεντέρου. Στις A-B απεικονίζεται ο ανοσοεντοπισμός για β γαλακτοσιδάση, A'-B' απεικονίζεται ο ανοσοεντοπισμός για την Hey, στην A''-B'' φαίνεται ο ανοσοεντοπισμός για την Prospero και στις A'''-B''' η συγχώνευση των τριών ανοσοεντοπισμών. Το A-A''' έμβρυο έχει δεξιά την πρόσθια και αριστερά την οπίσθια πλευρά, και ραχιαία επάνω και κοιλιακή κάτω. Το B-B''' είναι συνάθροιση τομών από την ραχιαία πλευρά. Φακός 40x (z=1)



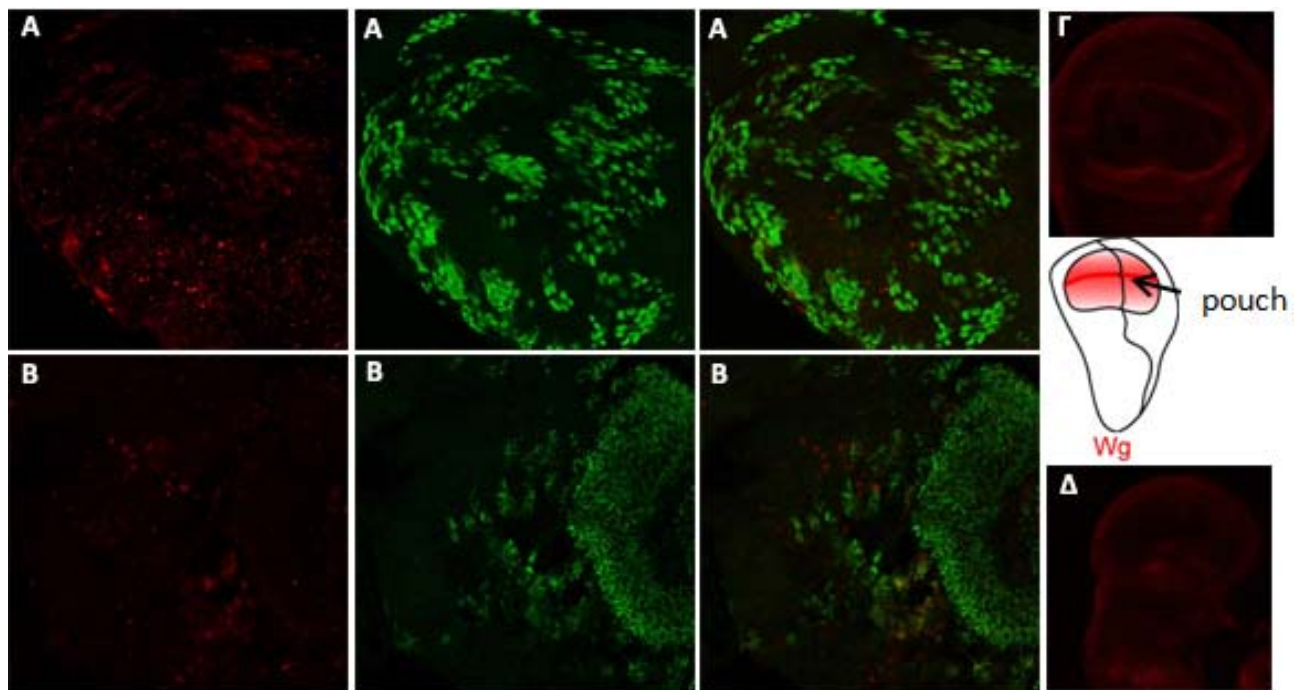
Εικόνα 3.10: Έκφραση Hey στο έντερο του εμβρύου- Nubbin. Οι εικόνες είναι αποτέλεσμα συνάθροισης τομών από συνεστιακή μικροσκοπία και έχουν γίνει με ανοσοεντοπισμό για την β γαλακτοσιδάση (κόκκινο), για το ενδογενές Hey (πράσινο) και Nubbin (μπλε), σε έμβρυα. Μεσέντερο εμβρύου. (A-A'') έμβρυο 12 σταδίου (B-B''') 16 σταδίου, διακρίνονται δομές του μεσεντέρου. Οι λευκές κεφαλές δείχνουν τα κύτταρα στα οποία συνεντοπίζεται η Hey με την β γαλακτοσιδάση απουσία Nubbin, συμπεραίνοντας ότι δεν υπάρχουν εντεροκύτταρα τα οποία εκφράζουν Hey και Nubbin, ενώ υπάρχουν θετικά σε β γαλακτοσιδάση, απουσία Hey κύτταρα (βέλος) τα οποία συνεντοπίζονται με Nubbin υποδηλώνοντας ότι είναι εντεροκύτταρα. Στις A-B απεικονίζεται ο ανοσοεντοπισμός για β γαλακτοσιδάση, A'-B' απεικονίζεται ο ανοσοεντοπισμός για την Hey, στην A''-B'' φαίνεται ο ανοσοεντοπισμός για την Nubbin και στις A'''-B''' η συγχώνευση των τριών ανοσοεντοπισμών. Το A-A''' έμβρυο έχει δεξιά την πρόσθια και αριστερά την οπίσθια πλευρά, και ραχιαία επάνω και κοιλιακή κάτω. Το B-B''' είναι συνάθροιση τομών από την ραχιαία πλευρά. Φακός 63x



Η ενεργοποίηση του Int.2 γίνεται μέσω της σηματοδότησης Notch

Για να διαπιστωθεί με βεβαιότητα ότι η ενεργοποίηση του ιντρονίου 2 έγινε μέσω του Notch μονοπατιού θα πρέπει να δημιουργηθεί Notch μεταλλαγμένο υπόβαθρο. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν στελέχη που φέρουν την θερμοευαίσθητη μεταλλαγή Nts1 (Shellenbarger & Mohler, 1975). Η συγκεκριμένη μεταλλαγή στην ημίζυγη ή ομόζυγη κατάσταση προκαλεί μείωση των νευροβλαστών της προνύμφης και αύξηση αυτών του εμβρύου όταν αυτά τα στελέχη έχουν αναπτυχθεί στην περιοριστική θερμοκρασία (Wang et al., 2006).

Στην **Εικ. 3.11 A-A'', B'-B''** απεικονίζονται εγκεφαλικοί λοβοί, θηλυκών ετερόζυγων (**A-A''**) και αρσενικών ημίζυγων (**B'-B''**) προνυμφών, οι οποίες έχουν αναπτυχθεί για 3 μέρες στη επιτρεπτή θερμοκρασία, για 1 μέρα στην περιοριστική και για 3 μέρες στην επιτρεπτή. Συγκρίνοντας τους εγκεφάλους των θηλυκών και αρσενικών προνυμφών παρατηρείται μείωση της έκφρασης της Hey (**A',B'**) και κυρίως της bgal (A,B). Όμως δεν υπάρχει ολική απώλεια της έκφρασης τους συμπεραίνοντας ότι υπάρχει μηχανισμός ο οποίος αποτρέπει την ολική απουσία Hey, τον οποίο δεν γνωρίζουμε ακόμα. Στις ίδιες προνύμφες μελετήθηκε ο ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης Wg, στόχου του Notch μονοπατιού, που εκφράζεται στο wing pouch (απεικονίζεται στο cartoon της **Εικ.3.11**) του δίσκου του φτερού, ώστε να διαπιστωθούν οι αναμενόμενες αλλαγές στο πρότυπο της έκφρασης της και κατ' επέκταση να επιβεβαιωθεί η απόδοση της μετάλλαξης. Στην **Γ** φαίνεται ο δίσκος του φτερού της θηλυκής προνύμφης (πρότυπο ελέγχου της Wg) και στην **Δ** της αρσενικής, όπου δεν υπάρχει το πρότυπο της Wg.

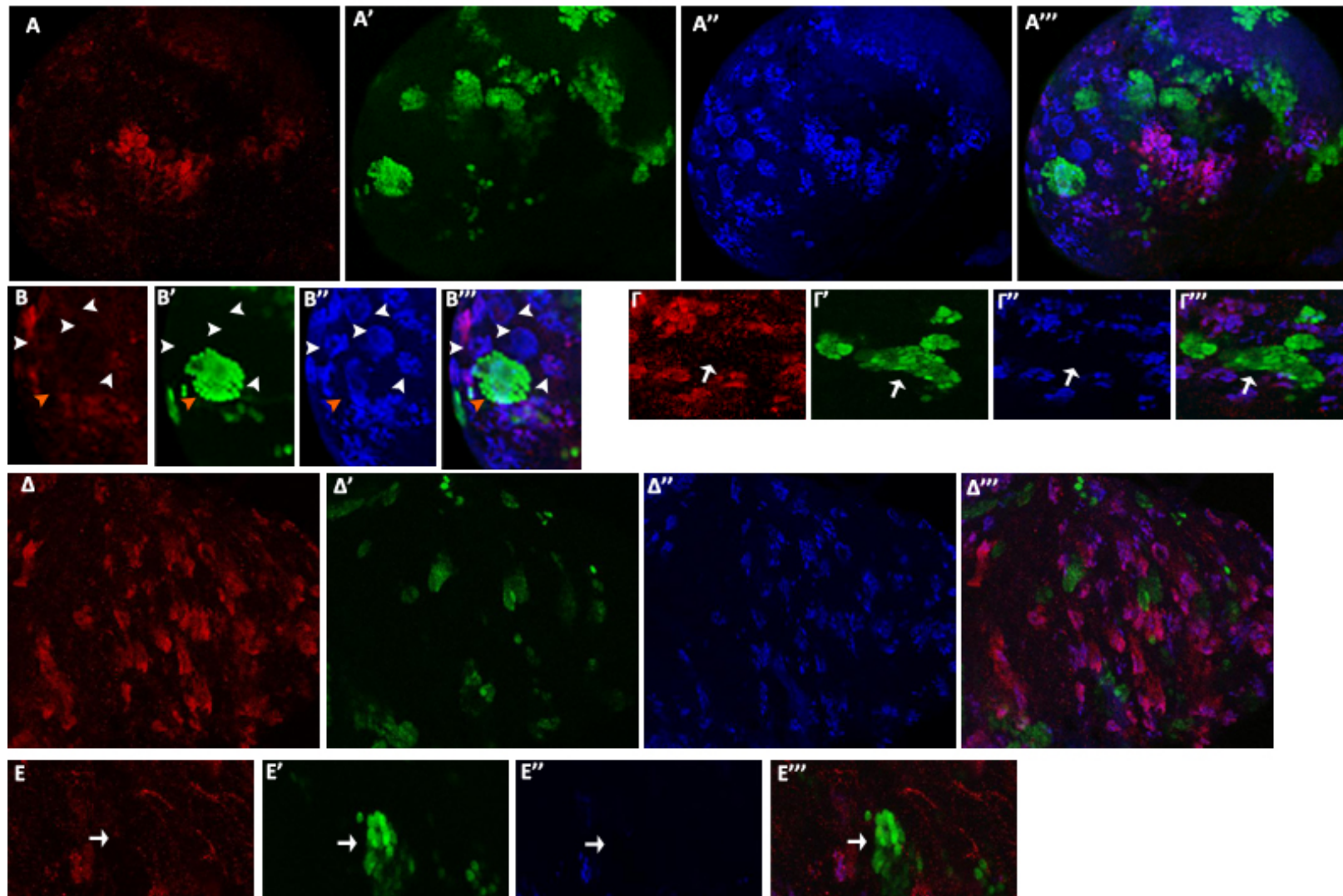


Εικόνα 3.11: Επίδραση της μεταλλαγής Nts1. (A-B'') Οι εικόνες είναι αποτέλεσμα συνάθροισης τομών από συνεστιακή μικροσκοπία και έχουν γίνει με ανοσοεντοπισμό για την β-γαλακτοσιδάση (κόκκινο)

και για την Hey (πράσινο) (A-A'') κοιλιακή πλευρά εγκεφαλικού λοβού θηλυκής ετερόζυγης προνύμφης και (B-B'') κοιλιακή πλευρά εγκεφαλικού λοβού προνύμφης αρσενικού ημίζυγου. Παρατηρείται μείωση της β γαλακτοσιδάσης και της Hey στον εγκεφαλικό λοβό της αρσενικής προνύμφης. Cartoon απεικόνιση προτύπου έκφρασης τις Wg, Γ) δίσκος φτερού θηλυκού ατόμου, Δ) δίσκος φτερού αρσενικού ατόμου. Παρατηρείται απώλεια της Wg στο rouch στην αρσενική προνύμφη. A,B απεικονίζεται ο ανοσοεντοπισμός για β γαλακτοσιδάση, στις A'- για την Hey, στις A''-B'' φαίνεται η συγχώνευση των δύο ανοσοεντοπισμών Φακός 40x. Γ,Δ ανοσοεντοπισμός Wg

Για να διαπιστωθεί με μεγαλύτερη βεβαιότητα η επίδραση της απώλειας του Notch μονοπατιού στην ενεργοποίηση των ρυθμιστικών περιοχών του ιντρονίου 2 του γονιδίου Hey έγιναν κλώνοι όπου οι πρωτεΐνες Delta και Serrate ήταν μη λειτουργικές. Οι Delta και Serrate είναι οι προσδέτες του Notch υποκινητή και απουσία τους δεν μπορεί να γίνει η ενεργοποίηση του (Sun & Artavanis-Tsakonas, 1996). Στην **Εικ. 3.12** απεικονίζονται τα τμήματα του κεντρικού νευρικού συστήματος της προνύμφης στα οποία υπάρχουν GFP κλώνοι. Η εικόνα **A-A'''** δείχνει τον εγκεφαλικό λοβό όπου υπάρχουν GFP κλώνοι σε ένα από τα mushroom bodies(**B-B'''**) και σε Type I νευροβλάστες. Στα mushroom bodies(**B-B'''**) όπου το γονίδιο Hey εκφράζεται ανεξάρτητα από το Notch σηματοδοτικό μονοπάτι η επαγωγή των μεταλλάξεων στα Delta και Serrate δεν επηρεάζει την έκφραση του Hey που φαίνεται να συνεντοπίζεται με τον δείκτη της GFP (πορτοκαλί κεφαλή βέλους) του κλώνου. Σε διπλανά mushroom bodies όπου δεν υπάρχουν κλώνοι υπάρχει μόνο έκφραση Hey (λευκή κεφαλή βέλους). Σε Type I νευροβλάστες (**Γ-Γ'''**) δεν υπάρχει ούτε έκφραση του Hey ούτε του bgal γονιδίου(λευκό βέλος **Γ-Γ'''**). Η ίδια συμπεριφορά ακολουθείται και σε κλώνους του κοιλιακού γαγγλίου (**Δ-Δ'''**), δηλαδή μέσα στους κλώνους δεν εντοπίζεται ούτε Hey ούτε β-γαλακτοσιδάση (**Ε-Ε'''** μεγαλύτερη μεγέθυνση κλώνων του κοιλιακού γαγγλίου). Ο πίνακας δείχνει συνολικά πόσοι κλώνοι παρατηρήθηκαν, τι τύπου είναι και τι δείκτες εκφραζονται στα κύτταρα τους.

	Clone type				
	Type I	Type II	MB	O.L.	V.G.
Nu.	38	3	2	9	10
Hey-/bgal-	38	3	0	9	10
Hey+/bgal-	0	0	2	0	0
Hey+/bgal+	0	0	0	0	0



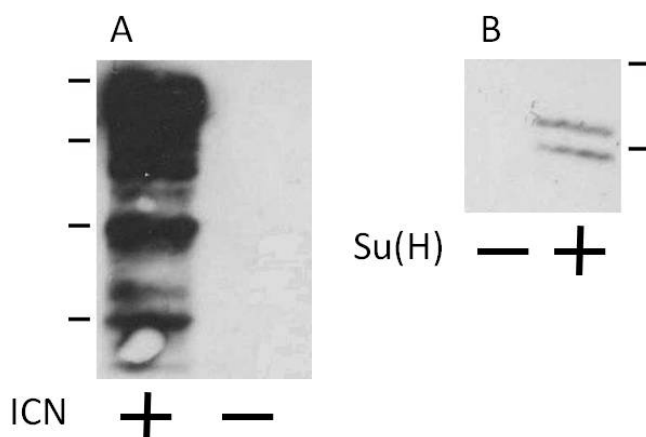
EtK.3.12

Εικόνα 3.12: Επαγωγή κλώνων DI, Ser-GFP marked. Οι εικόνες είναι αποτέλεσμα συνάθροισης τομών από συνεστιακή μικροσκοπία και έχουν γίνει με ανοσοεντοπισμό για την β-γαλακτοσιδάση (κόκκινο), για το ενδογενές Hey (μπλε) και GFP (πράσινο), σε κεντρικό νευρικό σύστημα της προνύμφης. A-A''' εγκεφαλικός λοβός, διακρίνονται κλώνοι σε mushroom bodies και σε Type I νευροβλάστες (40x) B-B''' κοντινή εικόνα (63x) κλώνου mushroom body, δεν επηρεάζεται η έκφραση του Hey (πορτοκαλί κεφαλή βέλους), οι διπλανοί mushroom bodies καταδεικνύονται με τις λευκές κεφαλές βέλους. Γ-Γ''' κοντινή εικόνα (63x) κλώνου από Type I νευροβλάστη της κοιλιακής πλευράς του ίδιου εγκεφαλικού λοβού, δεν υπάρχει Hey και β γαλακτοσιδάση μέσα στον κλώνο(λευκό βέλος). Δ-Δ''' απεικόνιση(40x) θωρακικού γαγγλίου όπου υπάρχουν κλώνοι GFP. E-E''' κοντινή εικόνα(63x) κλώνου του κοιλιακού γαγγλίου (λευκό βέλος) όπου δεν υπάρχει Hey και β- γαλακτοσιδάση μέσα στον κλώνο. Στις A-E απεικονίζεται ο ανοσοεντοπισμός για την β-γαλακτοσιδάση, στις A'-E' για την GFP, στις A''-E'' για την Hey και στις A'''-E''' η συγχώνευση των τριών ανοσοεντοπισμών.

Ενεργοποίηση ρυθμιστικών στοιχείων σε κυτταροκαλιέργειες

Ένας βασικός μας στόχος ήταν να διαπιστωθεί εάν στα S2 κύτταρα μπορούν να ενεργοποιηθούν τα cis ρυθμιστικά στοιχεία του γονιδίου Hey. Τα S2 κύτταρα αποτελούν ένα αρκετά ικανοποιητικό σύστημα όπου μπορεί να μελετηθεί το Notch μονοπάτι. Σε μη διαμολυσμένα κύτταρα φαίνεται πως κάποια από τα στοιχεία του Notch μονοπατιού εκφράζονται όπως είναι η Su(H) πρωτεΐνη(Eastman et al., 1997), ενώ παράλληλα ο υποδοχέας Notch δεν εκφράζεται (Fehon et al., 1990). Έχει δειχθεί ότι τα cis ρυθμιστικά στοιχεία του b-HLH-O γονιδίου E(spl)mg μπορούν να ενεργοποιηθούν στα S2 κύτταρα μετά από διαμόλυνση με το ενδοκυττάριο κομμάτι του Notch υποδοχέα (ICN) και του συμπαραγόντα του Su(H)(Eastman et al., 1997).

Επιβεβαιώθηκε ότι μετά από διαμόλυνση με πλασμιδιακές κατασκευές για ICN, και Su(H) οι πρωτεΐνες εκφράζονται (Εικ 3.13). Στο **ραβδόγραμμα1** φαίνονται οι συνδυασμοί πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη του ανοδικού κομματιού. Όπως δείχνει ο πίνακας δεν υπήρξε καμία αύξηση στην ενεργότητα της λουσιφεράσης που υποδηλώνει για άλλη μια φορά ότι το ανοδικό κομμάτι δεν πρέπει ενεργοποιείται από το μονοπάτι Notch.

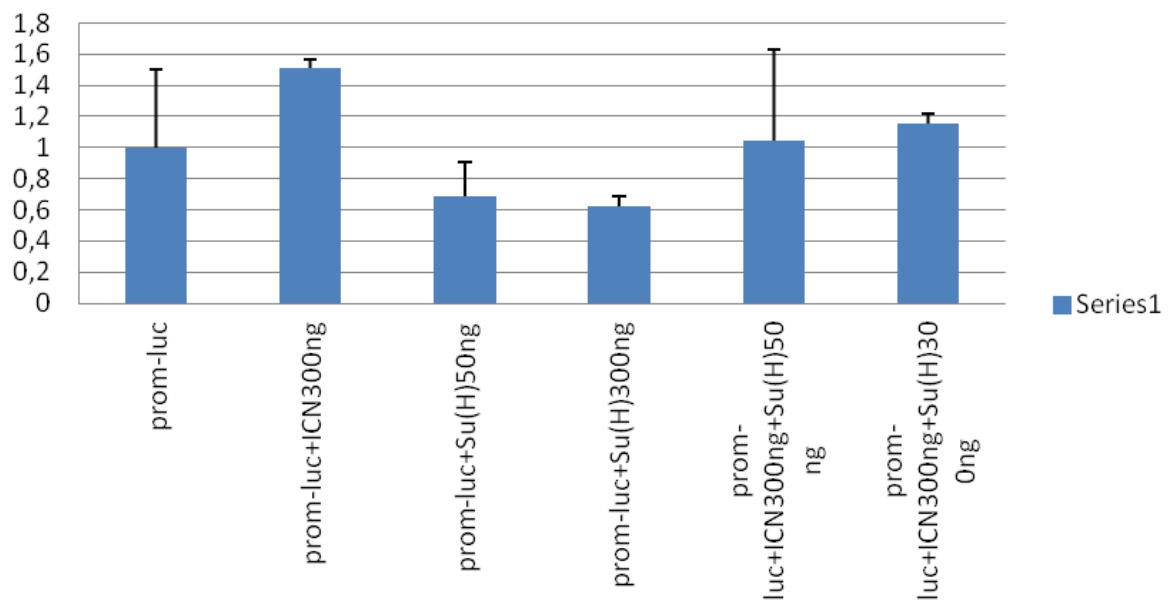


Εικόνα 3.13: Έκφραση πρωτεϊνών στα S2 κύτταρα. Α)ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα για το ενδογενές κομμάτι του Notch. Β)ανοσοαποτύπωση για το mgc επίτοπο που βρίσκεται στην Su(H)

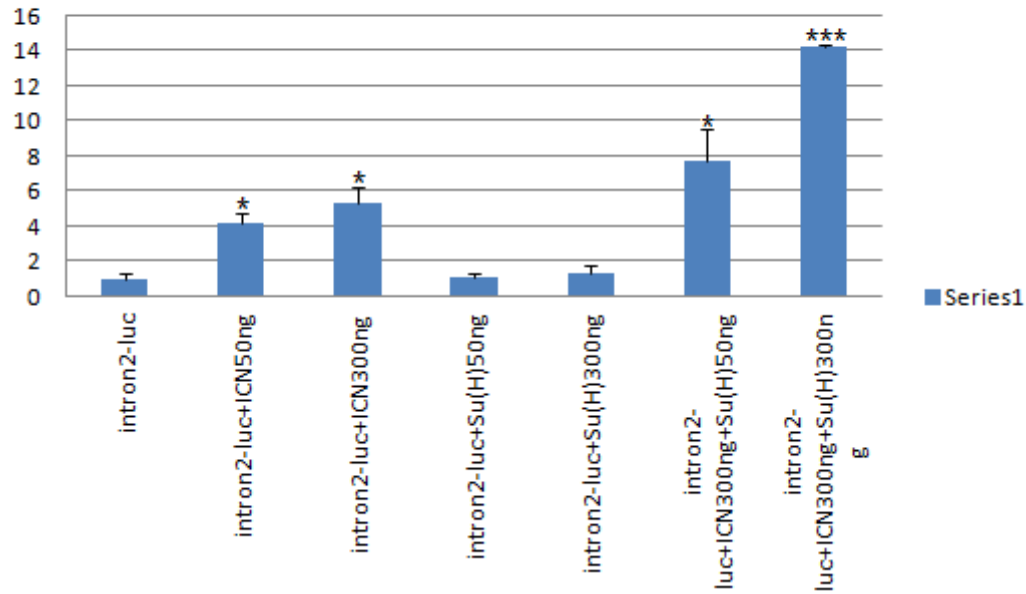
Στο **ραβδόγραμμα 2** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ενεργοποίησης του ιντρονίου 2, στις κυτταρικές σειρές. Παρατηρούμε ότι μόνο του το Su(H) φαίνεται να μην έχει κάποια επίδραση στην ενεργοποίηση της λουσιφεράσης και στις δύο συγκέντρωσεις που χρησιμοποιήθηκε (intron2-luc + Su(H)50ng, intron2-luc + Su(H)300ng) σε σύγκριση με το control (intron2-luc). Αντίθετα παρουσία μόνο ICN (50ng) προκαλεί ενεργοποίηση του intron2-luc γεγονός που οφείλεται στην αλληλεπίδραση του ICN με το ενδογενές Su(H). Αυξάνοντας την ποσότητα του ICN(300ng) δεν δίνει στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης της λουσιφεράσης. Τέλος διαμόλυνση των S2 με συνδιασμό πλασμιδίων Su(H) και ICN προκαλεί ενεργοποίηση του ιντρονίου 2 και αύξηση των επιπέδων της λουσιφεράσης που φτάνει τις 14 φορές περισσότερο (intron2-luc+ICN300ng +Su(H)300ng---ομάδα με την μέγιστη ποσότητα σε ICN και Su(H)) από το control. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τον συνεργατικό χαρακτήρα της ενεργοποίησης του ιντρονίου 2 από ICN και Su(H).

Τα αντίστοιχα πειράματα έγιναν παράλληλα και με τον my υποκινητή (my-luc) όπου παρατηρήθηκε η αναμενόμενη με βάση την βιβλιογραφία αύξηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης στην ομάδα my-luc+ICN300ng+Su (H)300ng(Eastman et al., 1997).

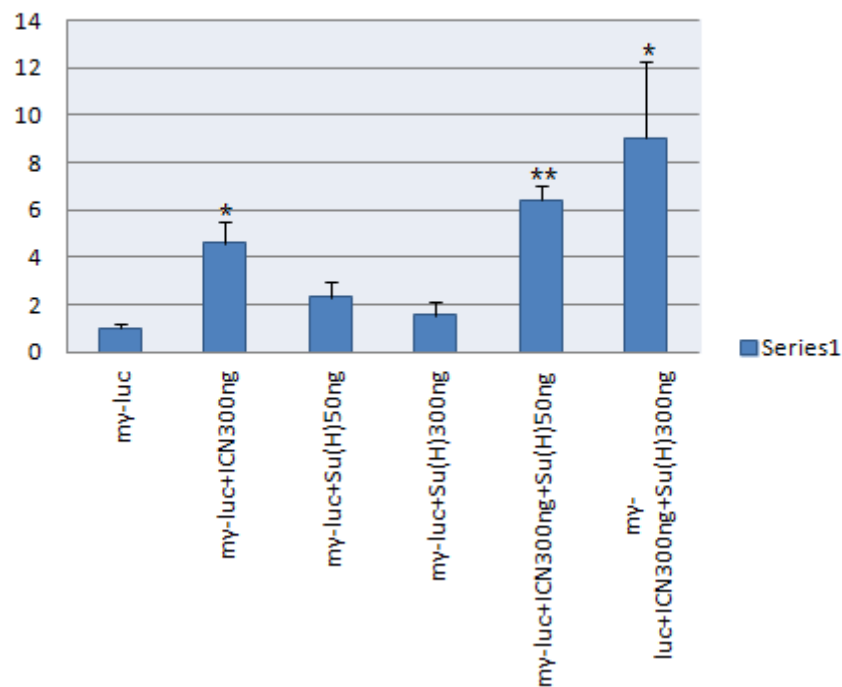
Ποσοστιαία ενεργοποίηση της λουσιφεράσης από ανοδικό κομμάτι



Ποσοστιαία ενεργοποίηση της λουσιφεράσης από Int. 2



Ποσοστιαία ενεργοποίηση της λουσιφεράσης από τον my



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα εργασία είμαστε σε θέση να συμπεράνουμε ότι:

- Το Ιντρόνιο 2 ενεργοποιείται σε αντίθεση με το ανοδικό κομμάτι.
- Η ενεργοποίηση του Ιντρονίου 2 ακολουθεί την έκφραση του γονιδίου *Hey* σε νευρώνες, γλοία και εντεροενδοκρινή κύτταρα του εμβρύου όπως και σε νευρώνες της προνύμφης.
- Στο κεντρικό νευρικό σύστημα της προνύμφης η ενεργοποίηση του Ιντρονίου 2 γίνεται μέσω του Notch.
- Υπάρχουν και άλλοι ενισχυτές εφόσον παρατηρήθηκαν κύτταρα, στο έμβρυο και στην προνύμφη, στα οποία εκφράζεται *Hey* αλλά δεν ενεργοποιείται το Ιντρόνιο 2.
- Η σταθερότητα της β-γαλακτοσιδάσης μας επιτρέπει να ανιχνεύουμε την έκφραση του Ιντρονίου 2 ενισχυτή ακόμα και μετά το σβήσιμό του, όπως φάνηκε με τα κύτταρα β CC και U.
- Ο Ιντρόνιο 2 ενισχυτής μπορεί να ενεργοποιηθεί από το Su(H)/NICD σύμπλοκο και σε S2 κύτταρα.
- Όσον αναφορά τον υποκινητή του *Hey*, αν και περιέχει θέσεις πρόσδεσης του Su(H), δεν φαίνεται να είναι ικανός από μόνος του να υποστηρίξει ανιχνεύσιμα επίπεδα έκφρασης ούτε σε S2 κύτταρα ούτε σε ιστούς *Drosophila melanogaster*.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alonso, M.C. and Cabrera, C.V.** (1988) The achaete-scute gene complex of *Drosophila melanogaster* comprises four homologous genes. *EMBO J.* 7, 2585-2591.
- Arnone, M.I., Dmochowski, I.J. and Gache, C.** (2004). Using reporter genes to study cis-regulatory elements. *Methods Cell Biol.* 74,621-652.
- Bailey, A.M. and Posakony, J.W.** (1995). Suppressor of Hairless directly activates transcription of Enhancer of split complex genes in response to Notch receptor activity. *Genes & Dev.* 9, 2609-2622.
- Boone, J.Q. and Doe, C.Q.** (2008). Identification of *Drosophila* type II neuroblast lineages containing transit amplifying ganglion mother cells. *Dev. Neurobiol.* 68, 1185–1195.
- Chia, W., Somers, W.G. and Wang, H.** (2008) *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions: cell cycle regulators, asymmetric protein localization, and tumorigenesis. *J. Cell Biol.* 180, 267-72 Review.
- Choksi, S.P., Southall, T.D., Bossing, T., Edoff, K., de Wit, E., Fischer, B.E, van Steensel, B., Micklem, G. and Brand, A.H.** (2006). Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in *Drosophila* neural stem cells. *Dev. Cell* 11, 775-89.
- Cordle, J., Johnson, S., Tay, J.Z., Roversi, P., Wilkin, M.B., de Madrid, B.H., Shimizu, H., Jensen, S., Whiteman, P., Jin, B., Redfield, C., Baron, M., Lea, S.M. and Handford, P.A.**(2008) A conserved face of the Jagged/Serrate DSL domain is involved in Notch trans-activation and cis-inhibition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 849-857.
- Eastman, D.S., Slee R., Skoufos E., Bangalore L., Bray S. and Delidakis, C.** (1997). Synergy between suppressor of Hairless and Notch in regulation of Enhancer of split m gamma and m delta expression. *Mol. Cell Biol.* 17, 5620-8.
- Echelard, Y., Vassileva, G. and McMahon, A.P.** (1994). Cis-acting regulatory sequences governing Wnt-1 expression in the developing mouse CNS. *Development.* 120, 2213-2224.
- Egger, B., Chell, J.M. and Brand, A.H.** (2008). Insights into neural stem cell biology from flies. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 363, 39-56. Review.
- Fehon, R.G., Kooh, P.J., Rebay, I., Regan, C.L., Xu, T., Muskavitch, M.A. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1990) Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell* 61, 523-34.
- Fischer, A. and Gessler, M.** (2007). Delta-Notch-and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey b-HLH factors. *Nucleic Acids Res.* 35, 4583-96.
- Fortini, M.E.** (2009). Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Dev. Cell.* 16, 633-47. Review.

- Fortini, M.E. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1994). The suppressor of hairless protein participates in notch receptor signaling. *Cell*. 79, 273-282.
- Ikeshima-Kataoka, H., Skeath, J., Nabeshima, Y., Doe, C., Matsuzaki, F.** (1997). Miranda directs Prospero to a daughter cell during *Drosophila* asymmetric divisions. *Nature* 390, 625-629.
- Jennings, B., A. Preiss, C. Delidakis, and Bray, S.** (1994). The Notch signaling pathway is required for Enhancer of split bHLH protein expression during neurogenesis in the *Drosophila* embryo. *Development* 120, 3537-3548.
- Lieber, T., Kidd, S. and Young, M.W.** (2002). Kuzbanian mediated cleavage of *Drosophila* Notch. *Genes Dev.* 16, 209-221.
- Lim, C., Chung, B.Y., Pitman, J.L., McGill J.J., Pradhan S., Lee J., Keegan K.P., Choe J. and Allada, R.** (2007). clockwork orange encodes a transcriptional repressor important for circadian clock amplitude in *Drosophila* *Curr. Biol.* 17, 1082-1089.
- Maier, M.M. and Gessler M.** (2000). Comparative analysis of the human and mouse Hey1 promoter: Hey genes are new Notch target genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 652-60.
- Mollinari, C., Lange, B. and González, C.** (2002). Miranda, a protein involved in neuroblast asymmetric division, is associated with embryonic centrosomes of *Drosophila melanogaster*. *Biol. Cell* 94, 1-13.
- Monastirioti, M., Giagtzoglou, N., Koumbanakis, K.A., Zacharioudaki, E., Deligiannaki, M., Wech, I., Almeida, M., Preiss, A., Bray, S. and Delidakis, C.** (2010). *Drosophila* Hey is a target of Notch in asymmetric divisions during embryonic and larval neurogenesis. *Development*. 137, 191-201.
- Pan, D. and Rubin, G.M.** (1997). Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell* 90, 271-280.
- Patel, N.H., Schafer, B., Goodman, C.S. and Holmgren, R.** (1989) The role of segment polarity genes during *Drosophila* neurogenesis. *Genes Dev.* 3, 890-904.
- Reddy, G.V. and Rodrigues, V.** (1999). A glial cell arises from an additional division within the mechanosensory lineage during development of the microchaete on the *Drosophila* notum. *Development* 126, 4617-4622.
- Roegiers, F. and Jan, Y.N.** (2004). Asymmetric cell division. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 195-205 Review.
- Shellenbarger, D.L. and Mohler, J.D.** (1975). Temperature-sensitive mutations of the notch locus in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 81, 143-162.
- Skeath, J.B. and Doe, C.Q.** (1998). Sanpodo and Notch act in opposition to Numb to distinguish sibling neuron fates in the *Drosophila* CNS. *Development*. 125, 1857-1865.
- Spana, E.P. and Doe, C.Q.** (1996) Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates. *Neuron*. 17,21-6.
- Taelman, V., Van Wayenbergh, R., Sölter, M., Pichon, B., Pieler, T., Christophe, D. and Bellefroid, E.J.** (2004). Sequences downstream of the bHLH domain of

the *Xenopus* hairy-related transcription factor-1 act as an extended dimerization domain that contributes to the selection of the partners. *Dev. Biol.* 276, 47-63.

Takashima, S., Adams, K.L., Ortiz, P.A., Ying, C.T., Moridzadeh, R., Younossi-Hartenstein, A. and Hartenstein, V. (2011). Development of the *Drosophila* entero-endocrine lineage and its specification by the Notch signaling pathway. *Dev Biol.* 353, 161-172.

Vässin, H., Bremer, K.A., Knust, E. and Campos-Ortega, J.A. (1987). The neurogenic gene Delta of *Drosophila melanogaster* is expressed in neurogenic territories and encodes a putative transmembrane protein with EGF-like repeats. *EMBO J.* 6, 3431-3440.

Wang, H., Somers, G.W., Bashirullah, A., Heberlein, U., Yu, F. and Chia, W. (2006). Aurora-A acts as a tumor suppressor and regulates self-renewal of *Drosophila* neuroblasts. *Genes Dev.* 20, 3453-3463.

Wu, P.S., Egger, B. and Brand, A.H.(2008). Asymmetric stem cell division: lessons from *Drosophila*. *Semin Cell Dev. Biol.* 19, 283-293. Review.

Zacharioudaki, E., Magadi, S.S. and Delidakis C. (2012). The role of Dpn, E(spl) and Notch signalling in *Drosophila* neuroblast maintenance and proliferation
Development accepted in pressed.