

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

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

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*«Ο ρόλος των ενδοκυττάρων μοτίβων της πρωτεΐνης
Delta στη σηματοδότηση Notch»*

Δασκαλάκη Αικατερίνη

Ηράκλειο 2012

Επιβλέπων Καθηγητής:

Χ. Δελιδάκης, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τριμελής Επιτροπή:

Μ. Αβέρωφ, Ερευνητής Α΄, Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας

Χ. Δελιδάκης, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Δ. Καρδάσης, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Επταμελής Επιτροπή:

Μ. Αβέρωφ, Ερευνητής Α΄, Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας

Χ. Δελιδάκης, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Δ. Καραγωγέως, Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Δ. Καρδάσης, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Χ. Λούης, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Χ. Σπηλιανάκης, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ν. Ταβερναράκης, Ερευνητής, Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας

Στη μητέρα μου

Ευχαριστώ...

Ολοκληρώνοντας το διδακτορικό θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τους ανθρώπους που με βοήθησαν:

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το Χρήστο Δελιδάκη, που με δέχθηκε σαν μέλος της ομάδας του και με καθοδήγησε από την πρώτη στιγμή μέχρι και το τέλος της διατριβής αυτής.

Τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, Μιχάλη Αβέρωφ και Δημήτρη Καρδάση, που με συμβούλευσαν όποτε τους χρειάστηκα αλλά και τα μέλη της επταμελούς μου επιτροπής, Μ. Αβέρωφ, Χ. Δελιδάκη, Δ. Καραγωγέως, Δ. Καρδάση, Χ. Λούη, Χ. Σπηλιανάκη, και Ν. Ταβερναράκη, για τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση της διατριβής.

Τωρινά και πρώην μέλη των εργαστηρίων Δελιδάκη, Αβέρωφ, Μοναστηριώτη:

Μαρία Μοναστηριώτη, Εύα Ζαχαριουδάκη, Maura Strigini, Μαριάνθη Κηπαράκη, Βασίλη Μπαούση, Pawel Piwko, Kristina Kux, Ιωάννα Ζαρίφη, Claudia Rödel, Χάρη Κονταράκη, Νίκο Κωνσταντινίδη, Meriem Takarli, Βασίλη Δουρή, Αλέξανδρο Κιουπάκη, Andrew Peel, Devinder Mehet και Χρυσούλα Πιστούλη, για τη συνεχόμενη βοήθεια τους και την όμορφη παρέα.

Το Γιώργο Τσιμπίδη, που μας μύησε στον κόσμο του Matlab.

Το Γιάννη, τον Αλέκο και την κα Πόπη, για τη βοήθεια και την παρέα στο Flyroom.

Τη Στέλλα και την Κατερίνα για το ενδιαφέρον τους.

Τη μητέρα μου για τη στήριξη και την εμπύχωση.

...Καλή ανάγνωση!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	1
Abstract	3
1. Εισαγωγή	4
1. Τα μόρια	8
1.1. Ο υποδοχέας Notch.....	8
1.2. Οι δεσμευτές Delta και Serrate.....	11
1.3. Οι λιγάσες ουβικουιτίνης Neuralized και Mindbomb1.....	14
2. Τα γεγονότα.....	17
2.1. Πλευρική αναστολή.....	18
2.2. Δημιουργία ορίων.....	20
2.3. Αποφάσεις γενεαλογίας.....	21
3. Η ρύθμιση.....	24
3.1. Πρωτεόλυση.....	24
3.2. Γλυκοζυλίωση.....	27
3.3. Ουβικουϊτινυλίωση.....	28
4. Ουβικουϊτινυλίωση.....	28
5. Ενδοκύττωση.....	31
6. Ενδοκύττωση και Ουβικουϊτινυλίωση.....	34
7. Ενδοκύττωση, Ουβικουϊτινυλίωση και Notch.....	35
8. Στόχοι.....	40
2. Υλικά και μέθοδοι	41
1. Παροδική διαμόλυνση κυττάρων S2.....	42
2. Συνανοσοκατακρήμιση.....	43
3. Ουβικουιτινυλίωση.....	44
4. Ανάλυση Western.....	44
5. Γενετική ανάλυση.....	45
5.1. Σύστημα μιτωτικών κλώνων FLP/FRT.....	45
5.2. Σύστημα εκτοπικής υπερέκφρασης UAS-Gal4.....	46
5.3. Σύστημα MARCM.....	47

5.4.	Στελέχη Δροσόφιλας που χρησιμοποιήθηκαν.....	48
6.	Ανοσοϊστοχημεία.....	49
6.1.	Μονιμοποίηση προνυμφών.....	49
6.2.	Χρώσεις.....	49
7.	Μελέτη της ενδοκύττωσης σε ιστούς προνύμφης.....	50
8.	Μικροσκοπία.....	51
9.	Ανάλυση εικόνων.....	51
10.	Αντισώματα.....	52
10.1.	Πρωτεύοντα αντισώματα και προέλευση τους.....	52
10.2.	Δευτερεύοντα αντισώματα και προέλευση τους.....	53
11.	RNAi.....	53
12.	Πλασμιδιακές κατασκευές.....	55
12.1.	pIZDI*V5His ελλειμματικά μεταλλάγματα.....	55
12.2.	pUASTDI*V5His.....	57
12.3.	pIZDI*V5His σημειακά μεταλλάγματα.....	57
12.4.	RactHisXpress-Ubiquitin.....	57
12.5.	RactXpress-Ubiquitin.....	57
12.6.	Πλασμιδιακές κατασκευές για RNAi.....	57
13.	Στελέχη βακτηρίων και θρεπτικά υλικά.....	58
14.	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μικρής κλίμακας καλλιέργεια.....	59
15.	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μεσαίας κλίμακας καλλιέργεια.....	59
3.	Αποτελέσματα I: Βιοχημικές αναλύσεις των μεταλλαγμάτων DI.....	60
o	Συντηρημένες περιοχές στο ενδοκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης Delta.....	61
o	Θέσεις αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης Delta με τις λιγάσες ουβικουιτίνης Neuralized και Mindbomb1.....	65
o	Ουβικουιτινυλίωση του δεσμευτή Delta και των ελλειπτικών μεταλλαγμάτων από τις λιγάσες ουβικουιτίνης Neuralized και Mindbomb1.....	68
o	Ουβικουιτινυλίωση του δεσμευτή Delta και των σημειακών μεταλλαγμάτων από τις λιγάσες ουβικουιτίνης Neuralized και Mindbomb1.....	75
o	Συνοψίζοντας.....	86

4. Αποτελέσματα II: Ενεργότητα των μεταλλαγμάτων D1.....	87
○ Ενεργότητα των ελλειμματικών μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης Delta στο ραχιαιοκοιλιακό όριο του φτερού.....	88
○ Ενεργότητα των ελλειμματικών μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης Delta κατά την πλευρική αναστολή.....	95
○ Συνοψίζοντας.....	99
5. Αποτελέσματα III: Κυτταρική κατανομή και ενδοκύττωση των μεταλλαγμάτων D1.....	100
○ Κυτταρική κατανομή των μεταλλαγμάτων Delta.....	101
○ Συνεντοπισμός της πρωτεΐνης Delta και των μεταλλαγμάτων της με ενδοσωμικούς δείκτες.....	111
○ Κυτταρική κατανομή των μεταλλαγμάτων Delta στη βασική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων.....	116
○ Τα ελλειπτικά μεταλλάγματα Dli1 και Dli2 εντοπίζονται στους συνδέσμους προσκόλλησης και όχι στους διαφραγματικούς συνδέσμους όπως και η αγρίου τύπου πρωτεΐνη.....	120
○ Ενδοκύττωση των μεταλλαγμάτων Delta.....	123
○ Συνοψίζοντας.....	127
6. Συζήτηση.....	128
○ Ενδοκυττωτικά μοτίβα στις DSL πρωτεΐνες.....	129
○ Ουβικουϊτινυλίωση, ενδοκύττωση και σηματοδότηση Notch.....	131
○ Κυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης D1 στη βασική μεμβράνη.....	134
7. Αναφορές.....	137
8. Δημοσίευση.....	151

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch αποτελεί ένα εξαιρετικά συντηρημένο μηχανισμό ο οποίος συμμετέχει σε ποικιλία κυτταρικών αποφάσεων. Στη *D. melanogaster* οι βασικοί συμμετέχοντες σε αυτό το μονοπάτι είναι τρεις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες απλής διέλευσης και δύο λιγάσες ουβικουιτίνης. Η πρωτεΐνη Notch, η οποία αποτελεί τον υποδοχέα της σηματοδότησης, αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες Delta (DI) και Serrate (Ser) γειτονικών κυττάρων, που είναι οι δεσμευτές. Η δέσμευση αυτή επάγει την πρωτεόλυση του υποδοχέα, τη μεταφορά ενός ενεργού τμήματος του στον πυρήνα και εν τέλει την ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων του μονοπατιού. Για τη σωστή ενεργοποίηση του μονοπατιού, εκτός από μεταγραφικές ρυθμίσεις που λαμβάνουν χώρα, σημαντικό ρόλο παίζουν οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις των συστατικών της σηματοδότησης με την ουβικουιτινυλίωση να κατέχει κεντρική θέση. Οι E3 λιγάσες ουβικουιτίνης Neuralized (Neur) και Mindbomb1 (Mib1) σχετίζονται και ενδοκυττώνουν τους δεσμευτές του μονοπατιού και αυτή τους η δράση είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ενεργοποίηση της σηματοδότησης. Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε ο ρόλος της ουβικουιτινυλίωσης κατά τη σηματοδότηση Notch στη *D. melanogaster*.

Αρχικά, αναλύθηκε η ενδοκυττάρια περιοχή του δεσμευτή DI και βρέθηκαν τέσσερα συντηρημένα μοτίβα μεταξύ των πρωτεϊνών DI των εντόμων και τα τρία από αυτά συσχετίστηκαν με τη δράση των λιγασών. Το πρώτο αναγνωρίστηκε ως θέση αναγνώρισης και δέσμευσης από τη λιγάση Neur ενώ το δεύτερο από τη λιγάση Mib1. Επιπλέον, η συντηρημένη λυσίνη στο τρίτο μοτίβο αποτελεί θέση ουβικουιτινυλίωσης από τη λιγάση Neur. Στο συγκεκριμένο τμήμα της εργασίας δεν αποδείχθηκε μόνο η άμεση δέσμευση και ουβικουιτινυλίωση της πρωτεΐνης DI από τις Neur και Mib1 αλλά και το γεγονός ότι οι δύο αυτές λιγάσες δεσμεύονται και ουβικουιτινυλιώνουν το δεσμευτή με διαφορετικό τρόπο.

Στη συνέχεια η ουβικουιτινυλίωση των δεσμευτών συνδέθηκε άμεσα με την ικανότητα τους να σηματοδοτούν. Με τη χρήση μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης DI τα οποία αδυνατούσαν να ουβικουιτινυλιωθούν από τις λιγάσες Neur ή Mib1, αναλόγως τον ιστό, παρατηρήθηκε αδυναμία σηματοδότησης Notch, γεγονός που τοποθετεί την ουβικουιτινυλίωση ένα βήμα πριν τη σηματοδότηση και αναγκαία προϋπόθεση.

Τέλος, μελετήθηκε η κυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης DI. Ήταν ήδη γνωστό ότι η πρωτεΐνη DI εντοπίζεται τόσο στην κορυφαία μεμβράνη των

επιθηλιακών κυττάρων όσο και σε ενδοκυττωτικά κυστίδια και πως για ένα σημαντικό μέρος της ενδοκύττωσης αυτής υπεύθυνες είναι οι λιγάσες ουβικουιτίνης. Στη συγκεκριμένη εργασία αποδείχθηκε ότι η ουβικουιτινυλίωση από τις λιγάσες και όχι μόνο η αλληλεπίδραση με αυτές είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ενδοκύττωση του δεσμευτή. Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι η πρωτεΐνη D1 συνεντοπίζεται σε ενδοκυττωτικά διαμερίσματα με τους ενδοσωμικούς δείκτες Sara, Rab11 και Hrs, χωρίς όμως να στοχοποιηθεί κάποιο από τα ενδοκυττάρια μοτίβα της πρωτεΐνης για την τοποθέτηση αυτή. Παράλληλα, δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφορά στο ρυθμό ενδοκύττωσης του δεσμευτή από τις δύο λιγάσες ουβικουιτίνης.

ABSTRACT

The Notch signaling pathway is an evolutionary conserved mechanism which participates in a variety of cell fate decisions. In *D. melanogaster*, key-players in this signaling pathway are three single-pass transmembrane proteins and two E3 ubiquitin ligases. Notch protein, the receptor of the signaling, binds to Delta (Dl) and Serrate (Ser), which are the ligands. Following interaction, a proteolytic step is triggered which leads to the release of a part of the receptor, its translocation to the nucleus and finally the activation of target genes. Apart from transcriptional regulation, post-transcriptional modifications are important for the correct activation of the signaling. Ubiquitination is one of those modifications. E3 ligases of ubiquitin, Neuralized (Neur) and Mindbomb1 (Mib1), are known to trigger the endocytosis of the ligands and their function is a prerequisite for the activation of Notch signaling. In this work, the role of ubiquitination during Notch signaling was studied in *D. melanogaster*.

Initially, the intracellular part of Dl protein was analyzed and four conserved motifs were identified. Three of them are associated with the E3 ligases. The first one was the interaction site of Neur and the second one of Mib1. The conserved lysine in the third motif was identified as the acceptor site for ubiquitination by Neur. In this part of the work it was not only proved that Dl is ubiquitinated by Neur and Mib1 directly but also that these ligases bind to and ubiquitinate the ligand in a different way.

Then, ubiquitination of the ligands was connected with their ability to signal. Using Dl mutants that could not be ubiquitinated by Neur or Mib1, we were able to prove that ubiquitination is a step before signaling and a precondition for Notch pathway to be activated.

Finally, we analyzed the subcellular localization of Dl protein. It was already known that Dl protein localizes at the cell surface and in endocytic dots and that ubiquitin ligases are responsible for the endocytosis of the ligand. In this work we proved that not only interaction but ubiquitination by ligases is needed for the endocytosis of the ligand. Furthermore, it was shown that Dl colocalizes with the endocytic markers Sara, Rab11 and Hrs. For this colocalization none of the known endocytic motifs is responsible. Additionally, we were unable to find any differences in the rate of endocytosis triggered by Neur and Mib1.

1. Εισαγωγή

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων ενός πολυκύτταρου οργανισμού αποτελεί θεμέλιο λίθο της οργάνωσης και της ανάπτυξης του. Καθορίζει την αύξηση, τη διαφοροποίηση, τη μετανάστευση και τον θάνατο των κυττάρων. Η επικοινωνία αυτή στηρίζεται άμεσα στη κυτταρική σηματοδότηση και ο τρόπος με τον οποίο αυτό επιτυγχάνεται αποτελεί βασικό ερώτημα της αναπτυξιακής βιολογίας.

Η *Drosophila melanogaster* αποτελεί ένα από τους πιο γνωστούς οργανισμούς-μοντέλα. Το γνωστό της γονιδίωμα, η ευκολία χειρισμού της σε εργαστηριακό επίπεδο και η συντήρηση σηματοδοτικών μονοπατιών από τον οργανισμό αυτό έως τον άνθρωπο, κατατάσσουν τη δροσόφιλα σε ένα από τα πιο δημοφιλή πειραματικά μοντέλα. Στην παρούσα εργασία η *D.melanogaster* χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο στην μελέτη της σηματοδότησης Notch.

ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ NOTCH

Ένας από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς κυτταρικής σηματοδότησης μεσολαβείται από τον υποδοχέα Notch σε ένα μονοπάτι γνωστό ως σηματοδοτικό μονοπάτι Notch. Η συγκεκριμένη σηματοδότηση αποτελεί ένα εξελικτικά συντηρημένο μονοπάτι ρύθμισης της κυτταρικής τύχης σε πλειάδα πολυκύτταρων ζωικών οργανισμών. Λαμβάνει μέρος στον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση των κυττάρων σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια (Artavanis-Tsakonas et al., 1999).

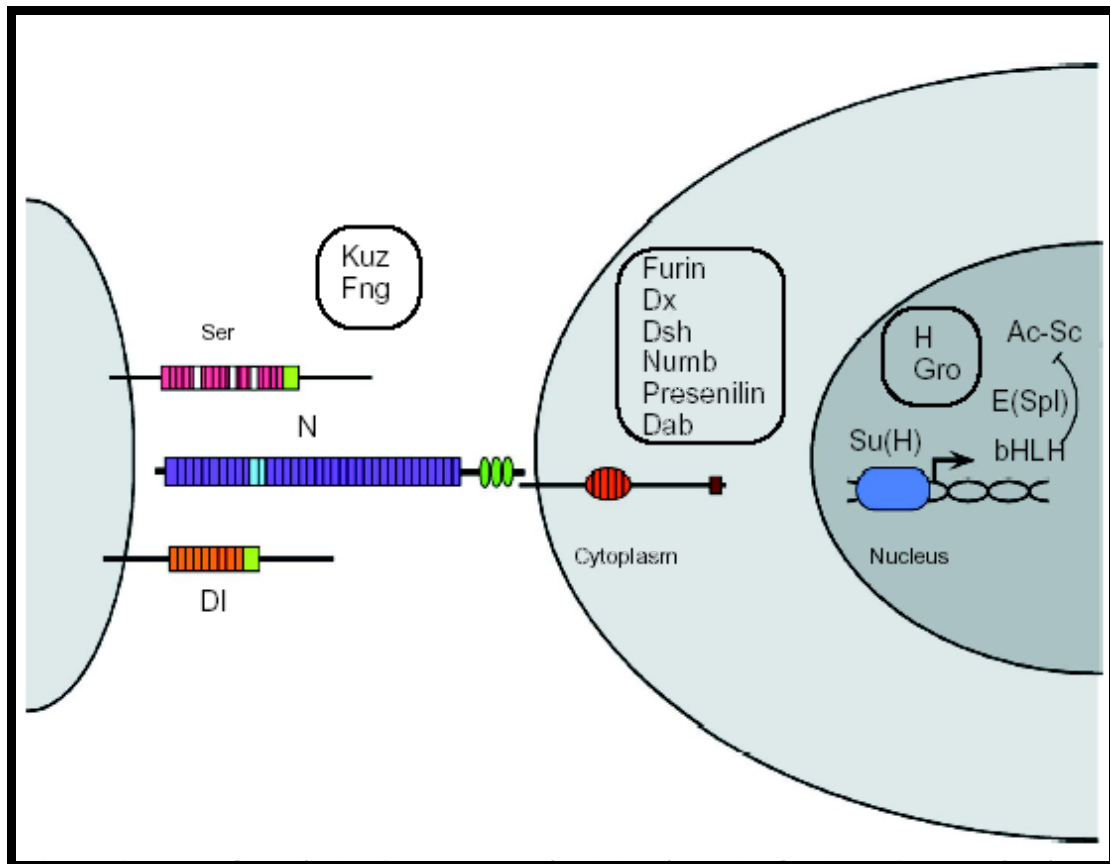
Η σηματοδότηση Notch ανακαλύφθηκε γενετικά περίπου 100 χρόνια πριν (Morgan, 1917), λόγω της ανάγκης της στην ανάπτυξη του φτερού της *D.melanogaster*. Από τότε, η λίστα αναπτυξιακών διαδικασιών που εξαρτώνται από αυτό το σηματοδοτικό μονοπάτι αυξάνεται συνεχώς, τόσο που είναι δύσκολο να βρεθεί κάποιος ιστός στη *D.melanogaster* και στον άνθρωπο που να μην εξαρτάται από τη σηματοδότηση Notch σε κάποιο στάδιο της ανάπτυξης του.

Η μη σωστή σηματοδότηση Notch μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις και συμβάλλει στην ανάπτυξη όγκων και μίας αυξανόμενης λίστας ασθενειών συμπεριλαμβανομένου το σύνδρομο Alagille το οποίο επηρεάζει πολλά

και διαφορετικά όργανα και το σύνδρομο CADASIL (Hansson et al, 2004, Lasky and Wu, 2005).

Περίληπτικά, η πρωτεΐνη Notch, η οποία αποτελεί τον υποδοχέα του σηματοδοτικού μονοπατιού, αλληλεπιδρά μέσω των εξωκυττάρων περιοχών της με τις πρωτεΐνες-δεσμευτές Delta (Dl) και Serrate (Ser) γειτονικών κυττάρων. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η ενεργοποίηση του υποδοχέα στα κύτταρα δέκτες. Σε κύτταρα όπου δεν έχει ενεργοποιηθεί ο υποδοχέας Notch, ο συγκαταστολέας Hairless δεσμεύεται με τον μεταγραφικό παράγοντα Suppressor of Hairless και στρατολογεί τις πρωτεΐνες Groucho και CtBP για να δημιουργηθεί ένα κατασταλτικό σύμπλοκο της μεταγραφής γονιδίων στόχων του Notch. Όταν οι δεσμευτές Dl και Ser δεσμεύονται με τον υποδοχέα, το ενδοκυττάριο τμήμα αυτού αποκόπτεται, μεταναστεύει στον πυρήνα όπου και δεσμεύεται με το μεταγραφικό παράγοντα Suppressor of Hairless, ενεργοποιώντας την έκφραση γονιδίων όπως *Enhancer of split*, *vestigial*, *cut* και *wingless* (Barolo and Posakony, 2002, Bray, 2006, Chitnis, 2006, Le Borgne, 2006, Louvi and Artavanis-Tsakonas, 2006, Nichols et al., 2007).

Η ενδοκυττάρια σηματοδότηση που προκαλείται στα κύτταρα δέκτες έχει ως αποτέλεσμα την υιοθέτηση ή τον αποκλεισμό μίας συγκεκριμένης κυτταρικής τύχης, γεγονός που εξαρτάται από τον ιστό και την αναπτυξιακή φάση (Artavanis-Tsakonas et al., 1999, Portin, 2002, Kadesch, 2004, Bray, 2006, Louvi and Artavanis-Tsakonas, 2006). Γενικώς η έλλειψη Notch σηματοδότησης οδηγεί σε υιοθέτηση λανθασμένης κυτταρικής τύχης. Στην εικόνα 1 παρουσιάζεται σχηματικά το σηματοδοτικό μονοπάτι.



Εικόνα 1.1: Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch

Στην εικόνα φαίνονται σχηματικά οι παράγοντες που εμπλέκονται κατά τη σηματοδότηση Notch σε διάφορα επίπεδα. Στην πραγματικότητα, και τα δύο κύτταρα μεταξύ των οποίων γίνεται η σηματοδότηση εκφράζουν τόσο μόρια υποδοχέα όσο και δεσμευτή. Ο υποδοχέας Notch αλληλεπιδρά με τους δεσμευτές του, DI και Ser, και ενεργοποιείται. Ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης, το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα απελευθερώνεται με πρωτεολύσεις, μεταφέρεται στον πυρήνα όπου δρα ως μεταγραφικός συνενεργοποιητής του Su(H). Στο σχήμα φαίνονται και άλλοι παράγοντες που ρυθμίζουν τη σηματοδότηση αυτή (βλ. εισαγωγή).

1. ΤΑ ΜΟΡΙΑ

1.1. Ο Υποδοχέας Notch

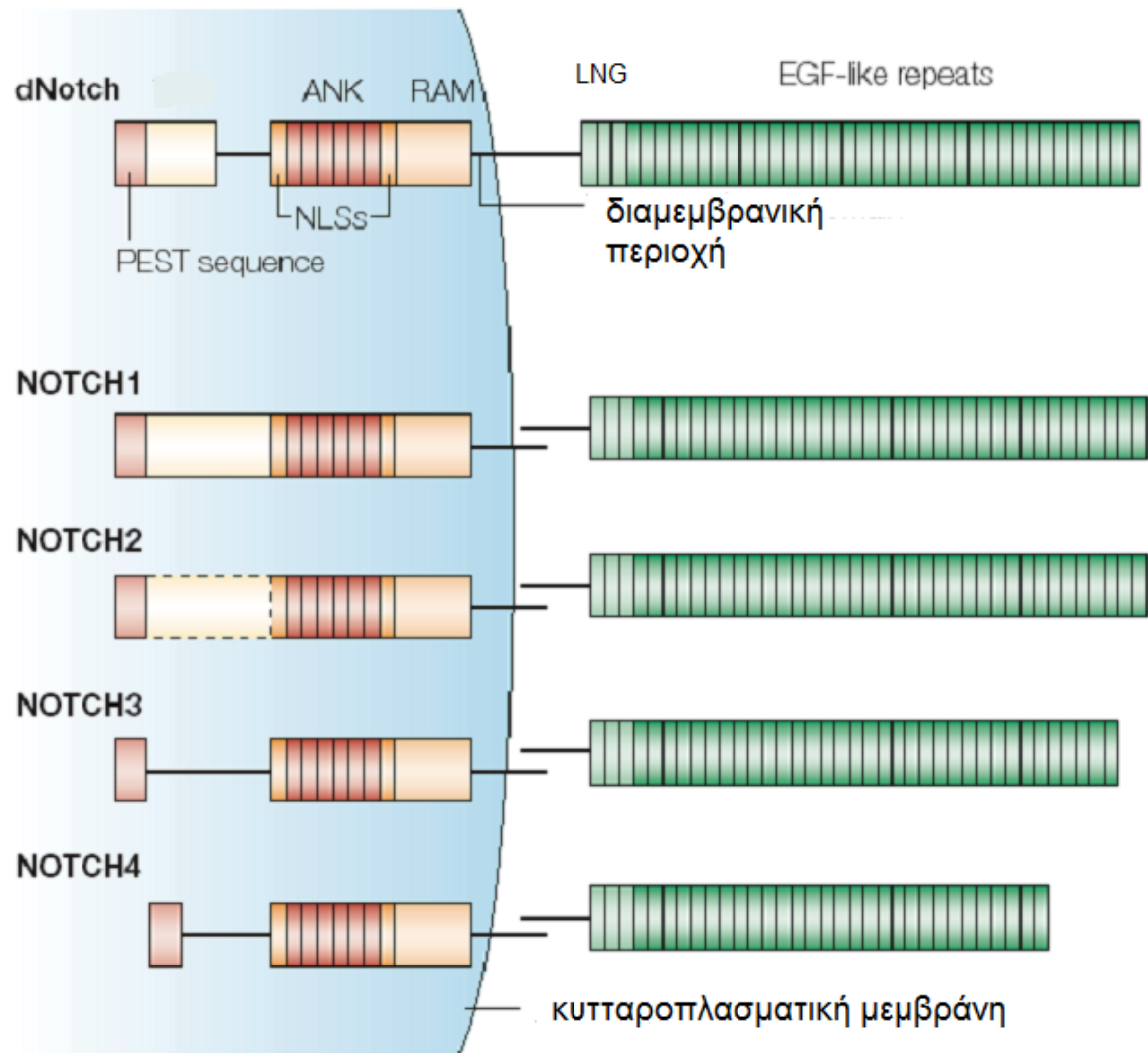
Όπως προαναφέρθηκε, το γονίδιο *Notch* ανακαλύφθηκε στη *D.melanogaster*, το 1917 αλλά η μοριακή του ανάλυση δεν έγινε πριν το 1985 (Wharton et al., 1985). Το όνομα του προήλθε από το φαινότυπο της μερικής έλλειψης λειτουργίας του, που προκαλεί εγκοπές στις άκρες των φτερών του ενηλικού ατόμου. Στη *D.melanogaster* υπάρχει ένας υποδοχέας Notch, ενώ στα θηλαστικά τέσσερις.

Η πρωτεΐνη Notch αποτελεί διαμεμβρανικό υποδοχέα απλής διέλευσης τύπου I, των 2704 αμινοξέων. Η ενδοκυττάρια περιοχή αποτελείται από μία περιοχή ονομαζόμενη RAM 23, 6 επαναλήψεις αγκυρίνης και μία αλληλουχία PEST (Fleming, 1998). Επιπλέον στο ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα της *D.melanogaster* έχει βρεθεί μία αλληλουχία πλούσια σε κατάλοιπα γλουταμίνης (opa), η οποία όμως είναι πολύ λίγο συντηρημένη στο Notch1, ενώ δεν έχει βρεθεί καθόλου στα υπόλοιπα ομόλογα των θηλαστικών (Weinmaster et al., 1992). Σε συγκεκριμένες θέσεις στην ενδοκυττάρια περιοχή οφείλεται η αλληλεπίδραση του υποδοχέα με πλειάδα παραγόντων. Ο μεταγραφικός παράγοντας Su(H) αλληλεπιδρά με την περιοχή RAM 23 και τις επαναλήψεις αγκυρίνης (Fortini and Artavanis-Tsakonas, 1994, Tamura et al., 1995). Η πρωτεΐνη Deltex αλληλεπιδρά με τις επαναλήψεις αγκυρίνης ενώ η Numb με τις αλληλουχίες RAM 23 και PEST (Diederich et al., 1994, Matsuno et al., 1995, Guo et al., 1996). Επιπλέον, η πρωτεΐνη Dishevelled αλληλεπιδρά με μια περιοχή καρβοξυτελικά των επαναλήψεων αγκυρίνης ενώ η Disabled με την RAM 23 περιοχή (Axelrod et al., 1996, Giniger, 1998).

Το εξωκυττάριο τμήμα φαίνεται να λειτουργεί κυρίως ως μία ρυθμιστική περιοχή. Κύριο χαρακτηριστικό είναι η ύπαρξη πολλών επαναλήψεων τύπου EGF (Epidermal Growth Factor), γνωστές ως ELRs. Συγκεκριμένα στον υποδοχέα Notch στη *D.melanogaster* υπάρχουν 36 τέτοιες επαναλήψεις. Συγκρίσεις στην αλληλουχία των αμινοξέων έχουν αποκαλύψει ότι μεμονωμένες ELRs είναι περισσότερο ομόλογες με τις αντίστοιχα τοποθετημένες επαναλήψεις σε υποδοχείς συγγενικών ειδών παρά με άλλες επαναλήψεις στο ίδιο μόριο του υποδοχέα (Fleming, 1998). Οι EGF επαναλήψεις 11 και 12 ευθύνονται για την αλληλεπίδραση του υποδοχέα με τους δεσμευτές του D1 και Ser (Fehon et al, 1990). Μεταλλάξεις σε αυτές τις

επαναλήψεις προκαλούν θνησιμότητα σε εμβρυικό στάδιο, πιθανόν λόγω αδυναμίας πρόσδεσης στους δεσμευτές (de Celis et al., 1993). Οι EGF επαναλήψεις 22 έως 29, σχηματίζουν μία ξεχωριστή λειτουργική περιοχή, την Abruptex. Πιθανολογείται πως αυτή η περιοχή αποτελεί έναν αρνητικό ρυθμιστή της πρόσδεσης του δεσμευτή DI στον υποδοχέα (Bruckner et al., 2000, Moloney et al., 2000). Καρβοξυτελικά των ELRs υπάρχουν 3 επαναλήψεις πλούσιες σε κατάλοιπα κυστεΐνης (LNG). Πιθανόν αυτή η περιοχή συμμετέχει στην σταθεροποίηση του εξωκυττάριου τμήματος της πρωτεΐνης (Heitzler and Simpson, 1993). Επιπλέον πολύ σημαντική λειτουργία των επαναλήψεων LNG είναι να καλύπτουν την HD περιοχή (heterodimerization domain) που βρίσκεται μόλις έξω απ τη μεμβράνη, και μέσα στην οποία βρίσκεται η S2 θέση (βλ. παράγραφο 3.1). (Gordon et al., 2008).

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της *D.melanogaster* υπάρχουν διαφορετικές μορφές του Notch υποδοχέα που εκφράζονται. Η κυρίαρχη μορφή κατά την ανάπτυξη της επιδερμίδας στο έμβρυο είναι ο υποδοχέας που αποτελείται από ολόκληρη την αλληλουχία, ενώ αντιθέτως στην κυρίαρχη μορφή στο αναπτυσσόμενο κεντρικό νευρικό σύστημα λείπει η περιοχή καρβοξυτελικά των επαναλήψεων αγκυρίνης (Wesley and Saez, 2000). Αυτή η διαφορά αποτελεί σημείο ρύθμισης της σηματοδότησης Notch, καθώς συσσώρευση της πλήρους μορφής πρωτεΐνης Notch στην αναπτυσσόμενη επιδερμίδα προωθεί τη συσσώρευση του μεταγραφικού παράγοντα Su(H), ο οποίος με τη σειρά του θα προωθήσει τη συσσώρευση πλήρους μήκους Notch, δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο μία θετική ανάδραση η οποία ενισχύει τη σηματοδότηση Notch που εξαρτάται από το Su(H) και το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα. Αντιθέτως η συσσώρευση της ελλιπούς Notch πρωτεΐνης στο αναπτυσσόμενο κεντρικό νευρικό σύστημα, προωθεί την αποικοδόμηση του Su(H), γεγονός το οποίο με τη σειρά του ενισχύει την αποικοδόμηση της πλήρους μορφής Notch, δημιουργώντας μία αρνητική ανάδραση στη σηματοδότηση Notch που εξαρτάται από το Su(H) και το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα (Wesley and Mok, 2003).



Εικόνα 1.2: Η δομή του υποδοχέα Notch

Στην παραπάνω εικόνα παρουσιάζεται η δομή του ενός υποδοχέα της *D.melanogaster* (dNotch) και των τεσσάρων στα θηλαστικά (Notch1-Notch4). Το εξωκυττάριο τμήμα βρίσκεται δεξιά της εικόνας. Σε αυτό παρατηρούμε την ύπαρξη των EGF επαναλήψεων, των οποίων ο αριθμός ποικίλλει. Επιπλέον παρατηρούμε τις χαρακτηριστικές επαναλήψεις LNG, οι οποίες είναι πλούσιες σε κατάλοιπα κυστεΐνης. Η ενδοκυττάρια περιοχή παρουσιάζεται αριστερά της εικόνας. Μετά τη διαμεμβρανική περιοχή, όλοι οι υποδοχείς διαθέτουν την περιοχή RAM 23 και ακολουθούν οι επαναλήψεις αγκυρίνης. Στο καρβοξυτελικό άκρο των πρωτεϊνών εντοπίζουμε την αλληλουχία PEST.

1.2. Οι δεσμευτές Delta και Serrate

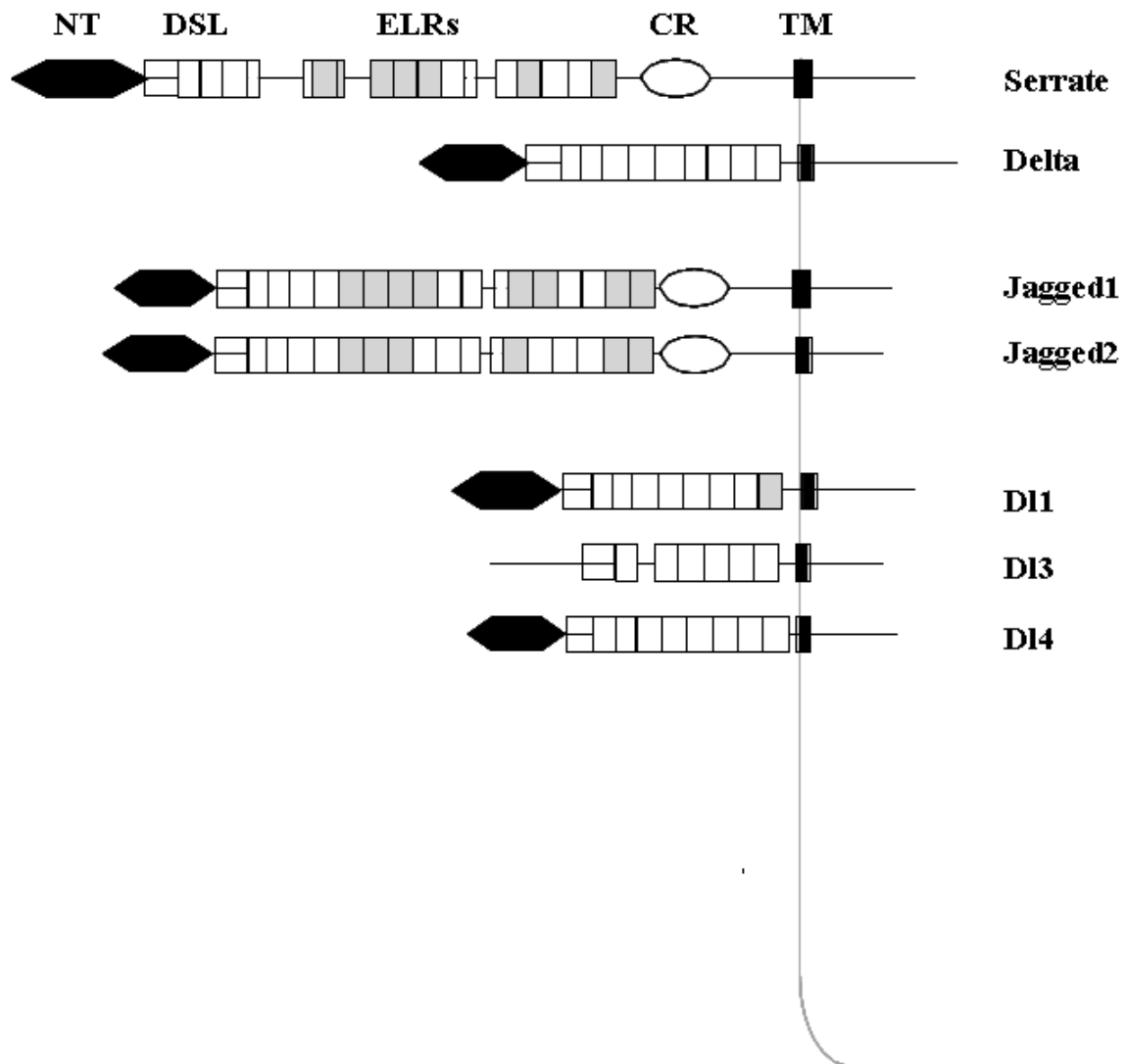
Οι δεσμευτές του υποδοχέα Notch, D1 και Ser, ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών DSL (Delta, Serrate, Lag-2). Κοινό χαρακτηριστικό τους η περιοχή DSL στο αμινοτελικό τους τμήμα, η οποία συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα Notch. Στη *D.melanogaster* υπάρχουν μία πρωτεΐνη D1 και μία Ser, ενώ στα θηλαστικά υπάρχουν πέντε διαφορετικοί δεσμευτές οι τρεις εκ των οποίων μοιάζουν δομικά με το D1 (D11, D13 και D14) και δύο που μοιάζουν με το Ser (Jagged1 και Jagged2).

Ο δεσμευτής Ser, αποτελεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη απλής διέλευσης, των 1404 αμινοξέων. Η εξωκυττάρια περιοχή της αποτελείται από το αμινοτελικό άκρο NT, την περιοχή DSL, 14 επαναλήψεις EGF και μία περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα κυστεΐνης. Ο δεσμευτής D1 αποτελεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη απλής διέλευσης, των 832 αμινοξέων. Στην εξωκυττάρια περιοχή της πρωτεΐνης και ξεκινώντας από το αμινοτελικό άκρο συναντάμε τις εξής περιοχές: Αμινοτελικό άκρο NT, περιοχή DSL και 9 συνεχείς επαναλήψεις EGF. Ακολουθεί η διαμεμβρανική περιοχή και στη συνέχεια το ενδοκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης (Fleming, 1998).

Εκτός την ομολογία που υπάρχει μεταξύ των DSL περιοχών ανάμεσα στους δεσμευτές (Tatex et al., 1994, Fleming, 1998), υπάρχει επίσης σημαντική ομοιότητα στην αμινοτελικό άκρο των δεσμευτών (Finn et al., 2006). Στην πρωτεΐνη D1, το τμήμα αυτό χωρίζεται σε δύο υποπεριοχές βάση του περιεχομένου τους σε κατάλοιπα κυστεΐνης, τις περιοχές N1 (αμινοξέα 22-82, ύπαρξη 6 κατάλοιπων κυστεΐνης) και N2 (αμινοξέα 83-181) (Parks et al., 2006). Το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης D1 είναι αυτό που συμμετέχει στις ομοτυπικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ δύο πρωτεϊνών D1. Μάλιστα, καταστροφή της DSL περιοχής εμποδίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ του δεσμευτή D1 και του υποδοχέα Notch, δεν επηρεάζει όμως τις ομοτυπικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δεσμευτών, αποδεικνύοντας ότι η πρόσδεση Delta-Notch είναι δομικά διαφορετική από την Delta-Delta πρόσδεση (Parks et al., 2006). Οι αλληλουχίες του δεσμευτή D1 που είναι αναγκαίες για την πρόσδεση πάνω στον υποδοχέα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις περιοχές: Την DSL περιοχή και τις N1 και N2 (Parks et al., 2006). Οι επαναλήψεις τύπου EGF, ονομαζόμενες ELRs, έχουν εμπλακεί στη συμμετοχή διαμοριακών αλληλεπιδράσεων συμπεριλαμβανομένου και του υποδοχέα Notch (Rebay et al., 1991, Fleming, 1998). Πιο συγκεκριμένα οι EGF επαναλήψεις 1-3 συμμετέχουν στην ομοτυπική

αλληλεπίδραση του δεσμευτή D1 μαζί με το αμινοτελικό τμήμα. Επιπλέον υπάρχουν ενδείξεις ότι οι ELRs 3 και 9 είναι σημαντικές για τη ενδοκύττωση της πρωτεΐνης (Parks et al., 2006). Επιπροσθέτως, μελέτες στο *C. Elegans* έδειξαν ότι οι ELRs1 και 2 χρειάζονται για την πρόσδεση στον υποδοχέα Notch (Komatsu et al, 2008).

Οι ενδοκυττάριας περιοχές και των δύο δεσμευτών δεν παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ομολογία με άλλες πρωτεΐνες. Είναι όμως σημαντικές για τη σηματοδότηση καθώς οι ελλειμματικές μορφές αυτών που δεν διαθέτουν το ενδοκυττάριο τμήμα δρουν ως επικρατώς αρνητικές μεταλλαγές (Sun and Artavanis-Tsakonas, 1997). Στο ενδοκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης Ser, βρέθηκε ένα συντηρημένο μοτίβο διλευκίνης και μία συντηρημένη περιοχή που περιέχει κατάλοιπα ασπαραγίνης. Το μοτίβο ασπαραγίνης συμμετέχει στην αλληλεπίδραση του δεσμευτή με τις δύο λιγάσες ουβικουιτίνης Neuralized και Mindbomb1 και είναι σημαντικό για τη σηματοδοτική ικανότητα της πρωτεΐνης. Το μοτίβο διλευκίνης, είναι αναγκαίο για την ενδοκύττωση του δεσμευτή, δεν επηρεάζει όμως τη σηματοδοτική ικανότητα της πρωτεΐνης (Glittenberg et al., 2006). Στην πρωτεΐνη D1 υπάρχει επίσης ένα μοτίβο που περιέχει κατάλοιπα ασπαραγίνης και βρέθηκε ότι μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση με τη λιγάση Neuralized (Fontana and Posakony, 2009). Δεν υπάρχουν αντίστοιχες περιοχές στα ενδοκυττάρια τμήματα των δεσμευτών στα σπονδυλωτά.



Εικόνα 1.3: Η δομή των δεσμευτών

Στην παραπάνω εικόνα παρουσιάζεται η δομή των δεσμευτών Delta και Serrate στη *D.melanogaster* και των Jagged και DI των θηλαστικών. Το εξωκυττάριο τμήμα βρίσκεται στο αριστερό τμήμα της εικόνας. Στην πρωτεΐνη Ser και στα ομόλογα της Jagged1 και 2 παρατηρούμε την ύπαρξη του αμινοτελικού άκρου (NT), της DSL περιοχής, των επαναλήψεων τύπου EGF (ELRs), της περιοχής πλούσιας σε κατάλοιπα κυστεΐνης (CR) και της διαμεμβρανικής περιοχής (TM). Στην περίπτωση του δεσμευτή DI και τον ομολόγων του D11 και D14 παρατηρούμε όλες τις παραπάνω περιοχές εκτός τη CR, ενώ στο D13 δεν υπάρχει και η NT περιοχή.

1.3 Οι λιγάσες ουβικουιτίνης *Neutralized* και *Mindbomb1*

Το γονίδιο *neutralized (neur)* της *D.melanogaster* κλωνοποιήθηκε ως ένα ζυγωτικό γονίδιο και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 754 αμινοξέων. Κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης το γονίδιο εκφράζεται στο εκτόδερμα και το μεσόδερμα (Boulianne et al., 1993). Στις ώρες 3-9 της εμβρυογένεσης το μετάγραφο εντοπίζεται σε επιδερμικά κύτταρα και νευροβλάστες. Η έκφραση αυτή συμπίπτει με την περίοδο που γίνεται ο διαχωρισμός νευροβλαστών και προδρόμων των αισθητηρίων οργάνων (Boulianne et al., 1993, Price et al., 1993). Με έλλειψη του γονιδίου εκδηλώνεται ένας ισχυρός νευρογόνος φαινότυπος με θάνατο στο εμβρυικό στάδιο, αποδεικνύοντας τη σημασία του κατά την εμβρυική ανάπτυξη (Lehmann et al., 1983). Επιπλέον, η δράση του γονιδίου *neur* απαιτείται και κατά την ανάπτυξη του περιφερικού νευρικού συστήματος του ενηλίκου. Πιο συγκεκριμένα για τους αναπτυξιακούς δίσκους του φτερού, το γονίδιο εκφράζεται σε όλα τα πρόδρομα κύτταρα των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων (Huang et al., 1991, Boulianne et al., 1993). Στο ποντίκι υπάρχουν δύο *neur* γονίδια με παρόμοια πρότυπα έκφρασης κατά την εμβρυογένεση (Pavlopoulos et al., 2001, Song et al., 2006).

Η δομή της πρωτεΐνης αποτελείται από μία αλληλουχία δακτυλίου Zn-RING τύπου $C_3H_4C_4$ στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου (Price et al., 1993) και από δύο επαναλήψεις NHR οι οποίες είναι συντηρημένες ανάμεσα στις ομόλογες πρωτεΐνες *Neutralized* αλλά δεν παρουσιάζουν ομολογία με αλληλουχίες άλλων γνωστών πρωτεϊνών (Yeh et al., 2001). Η πρωτεΐνη *Neutralized* είναι μια E3 λιγάση ουβικουιτίνης (Yeh et al., 2001). Η RING περιοχή της πρωτεΐνης είναι απαραίτητη και επαρκής για τη δράση της ως λιγάση ουβικουιτίνης και μάλιστα μία μεταλλαγή σε ένα κατάλοιπο κυστεΐνης στην περιοχή αυτή εμποδίζει τη συγκεκριμένη ενεργότητα (Yeh et al., 2001).

Η *Neutralized* είναι μία ενδοκυτταρική περιφερική μεμβρανική πρωτεΐνη η οποία επάγει την ενδοκύτωση της πρωτεΐνης DI, μειώνει μεταμεταγραφικά τα επίπεδα της και ενισχύει τη σηματοδότηση Delta-Notch (Lai et al., 2001, Pavlopoulos et al., 2001). Ο δακτύλιος RING της πρωτεΐνης είναι απαραίτητος για την επαγωγή ενδοκύτωσης του δεσμευτή DI και για την μεταμεταγραφική μείωση των επιπέδων του (Pavlopoulos et al., 2001), δεν είναι όμως απαραίτητος για την αλληλεπίδραση του *Neutralized* με τους δεσμευτές DI και Ser (Pitsouli and Delidakis, 2005). Η πρωτεΐνη *Neutralized* αλληλεπιδρά τόσο με την πρωτεΐνη DI όσο και με τη Ser και

ελέγχει εξίσου την υποκυτταρική τους θέση (Pitsouli and Delidakis, 2005). Υπεύθυνη περιοχή για την αλληλεπίδραση της λιγάσης με το δεσμευτή D1 είναι η NHR1. Μάλιστα ένα συγκεκριμένο κατάλοιπο γλυκίνης συντηρημένο όχι μόνο μεταξύ των ομόλογων Neur αλλά και μεταξύ των NHR περιοχών διαφορετικών πρωτεϊνών είναι πολύ σημαντικό για αυτή την αλληλεπίδραση (Commisso and Boulianne, 2007).

Στο έμβryo, η δραστηριότητα της πρωτεΐνης Neur ρυθμίζεται από πρωτεΐνες της οικογένειας Bearded όπως η Tom (Bardin and Schweisguth, 2006; De Renzis et al., 2006). Η πρωτεΐνη Tom δεσμεύεται στη λιγάση Neur και ανταγωνίζεται τη δράση της (Giot et al., 2003, De Renzis et al., 2006). Μάλιστα η πρωτεΐνη Tom ανταγωνίζεται τη δράση του Neur δεσμευόμενη στη θέση NHR1 μην αφήνοντας τη λιγάση να προσδεθεί με το D1 (Bardin and Schweisguth, 2006, Commisso and Boulianne, 2007, He et al., 2009).

Το γονίδιο *mindbomb* (*mib*) κλωνοποιήθηκε αρχικά στο zebrafish, και η πρωτεΐνη αποδείχθηκε ότι είναι E3 λιγάση ουβικουΐτινης. Η πρωτεΐνη αυτή αλληλεπιδρά με το zDelta και οδηγεί στην ενδοκύττωση και ουβικουΐτινυλίωση του δεσμευτή (Itoh et al., 2003, Chen et al., 2004). Όλες οι Mib πρωτεΐνες αποτελούνται από μία συγκεκριμένη δομή η οποία μπορεί να χωριστεί σε τρία τμήματα: Το αμινοτελικό άκρο αποτελείται από ένα zz zinc δακτύλιο ο οποίος περιβάλλεται από δύο μοτίβα Herc2/mib, ενώ ακολουθούν 2 επαναλήψεις χαρακτηριστικές των Mib πρωτεϊνών, οι επαναλήψεις mib. Η κεντρική περιοχή χαρακτηρίζεται από 8 επαναλήψεις αγκυρίνης και τέλος το καρβοξυτελικό τμήμα περιέχει 3 δακτυλίους ψευδαργύρου εκ των οποίων μόνο ο τρίτος έχει τη χαρακτηριστική δομή του πρότυπου RING (Lai et al., 2005). Υπεύθυνες περιοχές για την αλληλεπίδραση της λιγάσης με το δεσμευτή D1 είναι οι επαναλήψεις mib (Itoh et al., 2003, Lai et al., 2005). Στη *D.melanogaster* υπάρχουν δύο γονίδια με ομολογία με το *zmib*, τα *mib1* και 2. Το *mib2* έχει μικρότερη ομολογία με το *zmib* και εκφράζεται κυρίως στο μυϊκό σύστημα. Η πρωτεΐνη Mindbomb1 της *D.melanogaster* αλληλεπιδρά και με τους δύο δεσμευτές του Notch και επάγει την ενδοκύττωση και αποικοδόμηση τους, ενισχύοντας παράλληλα τη Notch σηματοδότηση (Lai et al., 2005, Le Borgne et al., 2005, Wang and Struhl, 2005). Και σε αυτή την περίπτωση ο δακτύλιος RING δεν είναι απαραίτητος για την αλληλεπίδραση με τους δεσμευτές. Επιπλέον βρέθηκε ότι οι πρωτεΐνες Neuralized και Mindbomb1 δρουν συνεργατικά κατά την πλευρική αναστολή, ενώ μπορούν να δράσουν η μια στη θέση της άλλης κατά την επαγωγή του περιθωρίου του φτερού (Pitsouli and Delidakis, 2005). Στο ποντίκι έχουν

χαρακτηριστεί δύο ομόλογα γονίδια του mindbomb, τα zmib1 και zmib2. Οι πρωτεΐνες που εκφράζουν έχουν και αυτές δράση E3 λιγάσης ουβικουιτίνης, η οποία εξαρτάται από την ύπαρξη του δακτυλίου RING. Επιπλέον αλληλεπιδρούν με τους δεσμευτές D1 και Jagged1 και οδηγούν στην ουβικουιτινυλίωση και ενδοκύττωση τους (Barsi et al., 2005, Koo et al., 2005a, Koo et al., 2005b, Takeuchi et al., 2005).

neuralized



mindbomb1

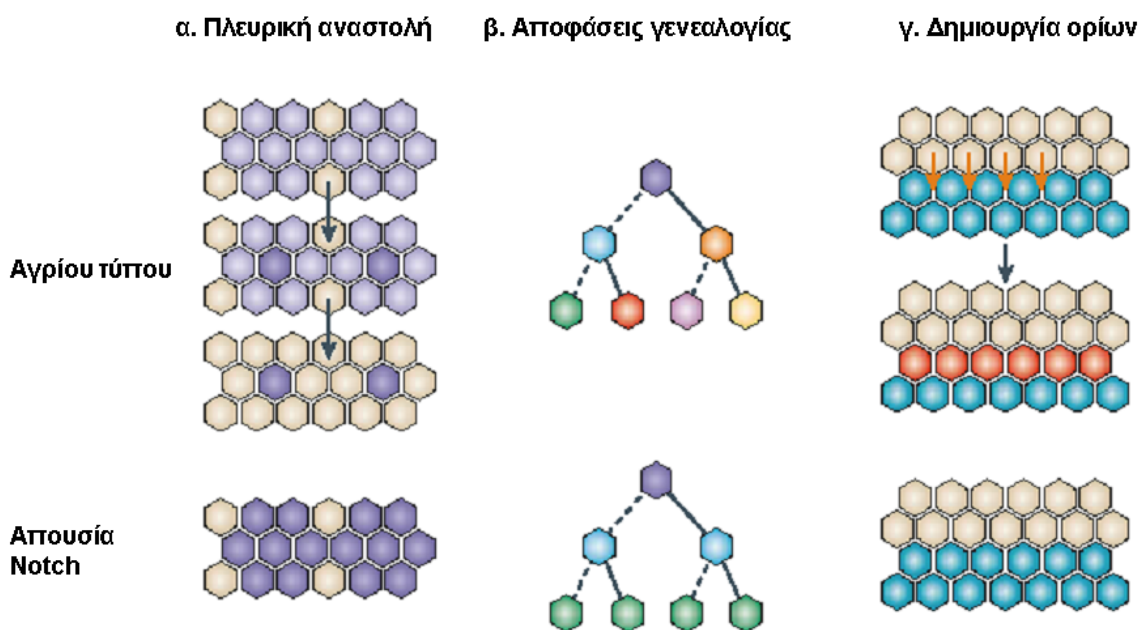


Εικόνα 1.4: Η δομή των λιγασών

Στην εικόνα παρουσιάζεται η δομή των πρωτεϊνών Neuralized και Mindbomb1. Στην πρωτεΐνη Neuralized διακρίνουμε τις δύο NHR περιοχές (πράσινο), η πρώτη εκ των οποίων είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση της λιγάσης με το δεσμευτή D1. Στη συνέχεια εντοπίζουμε τη RING περιοχή (κόκκινο), υπεύθυνη για τη δράση λιγάσης ουβικουιτίνης της πρωτεΐνης. Στην πρωτεΐνη Mindbomb1 διακρίνουμε τις δυο Mib/Herc2 (MH, μπλε), οι οποίες διαχωρίζονται από τον zz zinc δακτύλιο (ZF, κίτρινο). Ακολουθούν δύο mib επαναλήψεις (πράσινο), οι οποίες είναι υπεύθυνες την αλληλεπίδραση της λιγάσης με το δεσμευτή D1. Στο κεντρικό τμήμα συναντάμε 8 επαναλήψεις αγκυρίνης και τέλος τους 3 δακτυλίους RING (κόκκινο) εκ των οποίων μόνο ο τρίτος έχει τη χαρακτηριστική δομή του πρότυπου RING.

2. ΤΑ ΓΕΓΟΝΟΤΑ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο αριθμός των αναπτυξιακών διαδικασιών που εξαρτώνται από το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch είναι πολυάριθμος. Η συγκεκριμένη σηματοδότηση δρα κατά το εμβρυϊκό στάδιο της *D.melanogaster* και στα τρία βλαστικά στρώματα, ενώ κατά το προνυμφικό και νυμφικό στάδιο δρα στη γαμετική σειρά και στους αναπτυξιακούς δίσκους. Ο τρόπος με τον οποίο δρα η εν λόγω σηματοδότηση μπορεί να χωριστεί σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: Την πλευρική αναστολή, τις αποφάσεις γενεαλογίας και τη δημιουργία ορίων (Bray, 1998) (εικόνα 1.5).



Εικόνα 1.5: Αναπτυξιακές διαδικασίες που εξαρτώνται από τη σηματοδότηση Notch

Στην παραπάνω εικόνα παρουσιάζονται κυτταρικές αποφάσεις οι οποίες απαιτούν τη σηματοδότηση Notch, όπως είναι η πλευρική αναστολή κατά τον καθορισμό των κυττάρων ΠΑΟ και την ανάπτυξη των φλεβών, οι αποφάσεις γενεαλογίας κατά τη διαίρεση των κυττάρων ΠΑΟ και η δημιουργία ορίων στο περιθώριο του φτερού. Σε οποιαδήποτε διαδικασία αν απουσιάζει η σηματοδότηση Notch παρατηρείται και αντίστοιχη προβληματική ανάπτυξη.

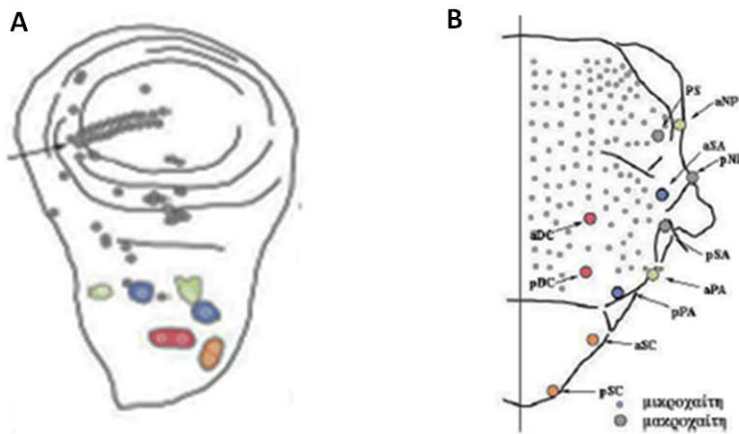
2.1 Πλευρική αναστολή

Ο όρος πλευρική αναστολή αναφέρεται στην διαδικασία κατά την οποία ένα κύτταρο μπορεί να επιλεγεί και να διαχωριστεί από μια ομάδα ισοδύναμων κυττάρων. Υπάρχουν πολλές περιπτώσεις όπου η σηματοδότηση Notch δημιουργεί πλευρική αναστολή. Ένα τέτοιο παράδειγμα στη *D.melanogaster* αποτελεί η επιλογή του πρόδρομου κυττάρου αισθητηρίων οργάνων (ΠΑΟ), από ένα σύνολο κυττάρων που αποτελούν τον προνευρικό συναθροισμό.

Κάθε ΠΑΟ κύτταρο διαφοροποιείται από μία ομάδα ισοδύναμων πρόδρομων προνευρικών κυττάρων που αποτελούν τον προνευρικό συναθροισμό. Αυτή η διαφοροποίηση στηρίζεται στο Notch, και αν η σηματοδότηση δε λειτουργεί τότε περισσότερα του ενός κύτταρα αποκτούν την αναπτυξιακή τύχη ενός ΠΑΟ. Αρχικά όλα τα κύτταρα του προνευρικού πληθυσμού είναι ισοδύναμα και εκφράζουν τις προνευρικές πρωτεΐνες Achaete και Scute, οι οποίες και ενεργοποιούν την έκφραση των δεσμευτών DI και Ser. Συνεπώς, αρχικά όλα τα κύτταρα του συναθροισμού εκφράζουν τόσο τον υποδοχέα όσο και τους δεσμευτές και έχουν την ικανότητα και να αποστέλλουν και να λαμβάνουν σήμα. Για άγνωστο μέχρι στιγμής λόγο, ένα κύτταρο αποκτά μεγαλύτερη ικανότητα αποστολής σήματος από τα υπόλοιπα και αυτή η κατάσταση συντηρείται με μηχανισμό ανάδρασης: Τα κύτταρα που δέχονται περισσότερο σήμα έχουν ελαττωμένα επίπεδα πρωτεΐνης DI, λόγω μεταγραφικής καταστολής από το σύμπλοκο των E(spl) (Culi and Modolell, 1998). Τα εν λόγω κύτταρα στη συνέχεια θα είναι λιγότερα ικανά να σηματοδοτήσουν στα γειτονικά τους. Το μοναδικό κύτταρο που θα γλιτώσει από την αναστολή είναι αυτό που θα συνεχίσει να σηματοδοτεί και θα επιλεγεί ως πρόδρομος αισθητηρίων οργάνων. Ένα μοντέλο που εξηγεί την διαφοροποίηση στη σηματοδότηση υποστηρίζει ότι η μεταγραφική ρύθμιση του δεσμευτή DI από το Notch αποτελεί την αρχική αιτία επιλογής ενός κυττάρου (Heitzler *et al.*, 1996). Και ενώ αυτό το μοντέλο εξηγεί ικανοποιητικά τη δημιουργία ομοιόμορφων προτύπων όπως είναι οι μικροχαίτες του θώρακα, αδυνατεί να εξηγήσει τη δημιουργία μακροχαιτών που πάντα βρίσκονται στις ίδιες θέσεις. Αυτό το μοντέλο αντιτίθεται από αποτελέσματα που δείχνουν ότι ενώ υπάρχει η μεταγραφική ρύθμιση του DI κατά τον καθορισμό των μακροχαιτών του θώρακα αυτή δεν είναι απαραίτητη για την πλευρική αναστολή (Pitsouli and Delidakis, 2005). Συνεπώς πρέπει να υπάρχει άλλος λόγος πέραν της μεταγραφικής

ρύθμισης του DI που να αποτελεί την αρχική αιτία διαφοροποίησης ενός κυττάρου του προνευρικού συναθροισμού.

Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της πλευρικής αναστολής στον καθορισμό των μακροχαιτών, οι δεσμευτές DI και Ser αλλά και οι λιγάσες Neur και Mib1 δρουν συνεργατικά. Η συνεισφορά των δεσμευτών όμως κατά την πλευρική αναστολή είναι διαφορετική με αυτή του DI να υπερισχύει λόγω επαρκούς έκφρασης του στην περιοχή αυτή, αντιθέτως με το Ser όπου τα ενδογενή επίπεδα της πρωτεΐνης δεν αρκούν για τη φυσιολογική διεξαγωγή της διαδικασίας (Pitsouli and Delidakis, 2005).



Εικόνα 1.6: Πλευρική αναστολή σε φτερό (A) και θώρακα (B)

A: Απεικόνιση των ΠΑΟ σε αναπτυξιακό δίσκο του φτερού προνύμφης τρίτου σταδίου. Διακρίνονται οι περιοχές που θα δώσουν τις μακροχαιτές του θώρακα και του εμπρόσθιου περιθωρίου του φτερού (βέλος).

B: Απεικόνιση των μικροχαιτών (μικροί κύκλοι) και των μακροχαιτών (μεγάλοι κύκλοι) σε θώρακα ενήλικου. Οι μακροχαιτές εμφανίζονται με τα ίδια χρώματα σε A και B

SC: scutelar, DC: dorsocentral, PA: postalar, NP: notopleural, SA: supra-alar, PS: presutural

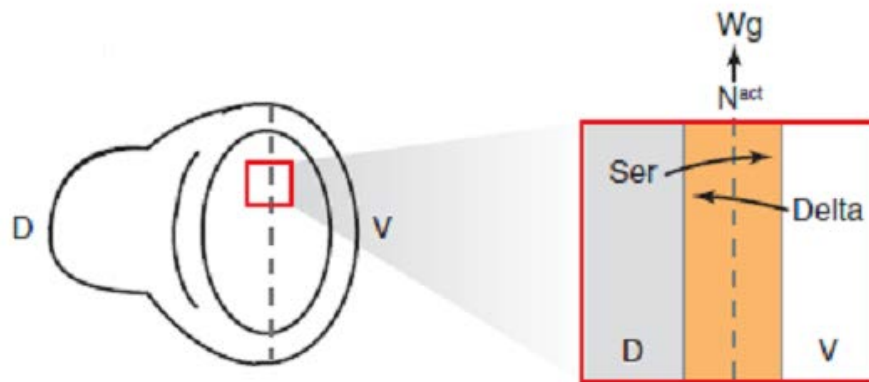
2.2 Δημιουργία ορίων

Η εγκαθίδρυση του ραχαιοκοιλιακού ορίου του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα δημιουργίας ορίων η οποία εξαρτάται από τη σηματοδότηση Notch. Ως αποτέλεσμα αυτής της σηματοδότησης, το μονοπάτι Notch ενεργοποιείται στα κύτταρα του ορίου αυτού τα οποία αποκτούν χαρακτήρα οργανωτικού κέντρου και ρυθμίζουν την ανάπτυξη του φτερού κατά τον ραχαιοκοιλιακό άξονα (Bray, 1998).

Οι δεσμευτές του Notch υποδοχέα D1 και Ser εκφράζονται εκατέρωθεν του ορίου του φτερού ραχιαία και κοιλιακά. Για να ενεργοποιηθεί η σηματοδότηση μόνο στο όριο μεταξύ ραχιαίου και κοιλιακού τμήματος, τα κύτταρα του ενός πεδίου πρέπει να σηματοδοτούν σε κύτταρα του απέναντι πεδίου και όχι μεταξύ τους. Η παρουσία της εκκρινόμενης γλυκοζυλτρανσφεράσης Fringe (Fng) στο ραχιαίο μισό τμήμα διασφαλίζει την ασυμμετρία αυτή (Kim et al., 1995, Panin et al., 1997). Η Fng γλυκοζυλιώνει τον υποδοχέα Notch στις επαναλήψεις EGF, καθιστώντας τον υπόστρωμα για αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη D1 αλλά όχι με την πρωτεΐνη Ser. Μάλιστα η προσθήκη N-ακετυλογλυκαζαμίνης από τη Fng, και όχι κάποια άλλη επακόλουθη τροποποίηση του Notch, είναι αρκετή ώστε να ενισχύσει τη δέσμευση του υποδοχέα από το D1 και να αναστείλει τη δέσμευση του από το Ser (Xu et al., 2007). Επιπλέον, η έκφραση του δεσμευτή Ser περιορίζεται στα κύτταρα του ραχιαίου τμήματος (Fleming et al., 1997). Η πρωτεΐνη D1 εκφράζεται σε πιο ευρεία περιοχή αλλά αρχικά πιο ισχυρά στο κοιλιακό διαμέρισμα (Irvine, 1999). Ως αποτέλεσμα, το D1 σηματοδοτεί στα κύτταρα που βρίσκονται ραχιαία του ορίου και το Ser σε αυτά που βρίσκονται κοιλιακά, δημιουργώντας ένα οργανωτικό κέντρο στο ραχαιοκοιλιακό όριο μέσω της έκφρασης των γονιδίων *wg*, *vg* και *cut* (de Celis et al., 1996, Doherty et al., 1996, Neumann et al., 1997). Η σηματοδότηση Notch σε αυτή την περίπτωση ονομάζεται επαγωγική.

Σημαντικό επίσης είναι να διασφαλιστεί η διατήρηση της σηματοδότησης κάτι που επιτυγχάνεται με ένα μηχανισμό θετικής ανάδρασης: Τα κύτταρα του ορίου που λαμβάνουν τη σηματοδότηση, ενεργοποιούν την έκφραση των δεσμευτών στα γειτονικά κύτταρα. Με το μηχανισμό αυτό, στα κύτταρα εκατέρωθεν του ορίου εκφράζονται υψηλά επίπεδα των δεσμευτών και βοηθούν στη διατήρηση του οργανωτικού κέντρου (Micchelli et al., 1997).

Τέλος, στη σηματοδότηση Notch οφείλεται η εγκαθίδρυση άλλων ορίων όπως είναι ο ισημερινός κατά την ανάπτυξη του ματιού και οι αρθρώσεις κατά την ανάπτυξη των ποδιών (de Celis et al., 1998, Papayannopoulos et al., 1998).



Εικόνα 1.7: Η σηματοδότηση Notch κατά τη δημιουργία ορίων

Το ραχιαιοκοιλιακό όριο του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού καθορίζεται από τη σηματοδότηση Notch. Η ραχιαία εκφραζόμενη γλυκοζυλτρανσφεράση Fng γλυκοζυλιώνει τον υποδοχέα Notch στις EGF επαναλήψεις καθιστώντας τον καλό υπόστρωμα πρόσδεσης για το D1 αλλά όχι για το Ser. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η σηματοδότηση από το δεσμευτή D1 από το κοιλιακό μέρος (όπου εκφράζεται ισχυρότερα) προς το ραχιαίο και από το δεσμευτή Ser από το ραχιαίο μέρος (όπου εκφράζεται) προς το κοιλιακό. Αποτέλεσμα αυτού είναι η ενεργοποίηση της σηματοδότησης σε μία γραμμή κυττάρων μεταξύ των διαμερισμάτων τα οποία αποκτούν τύχη οργανωτικού κέντρου και εκφράζουν τα γονίδια *wg*, *cut* και *vg*. D: dorsal, V: ventral

2.3 Αποφάσεις γενεαλογίας

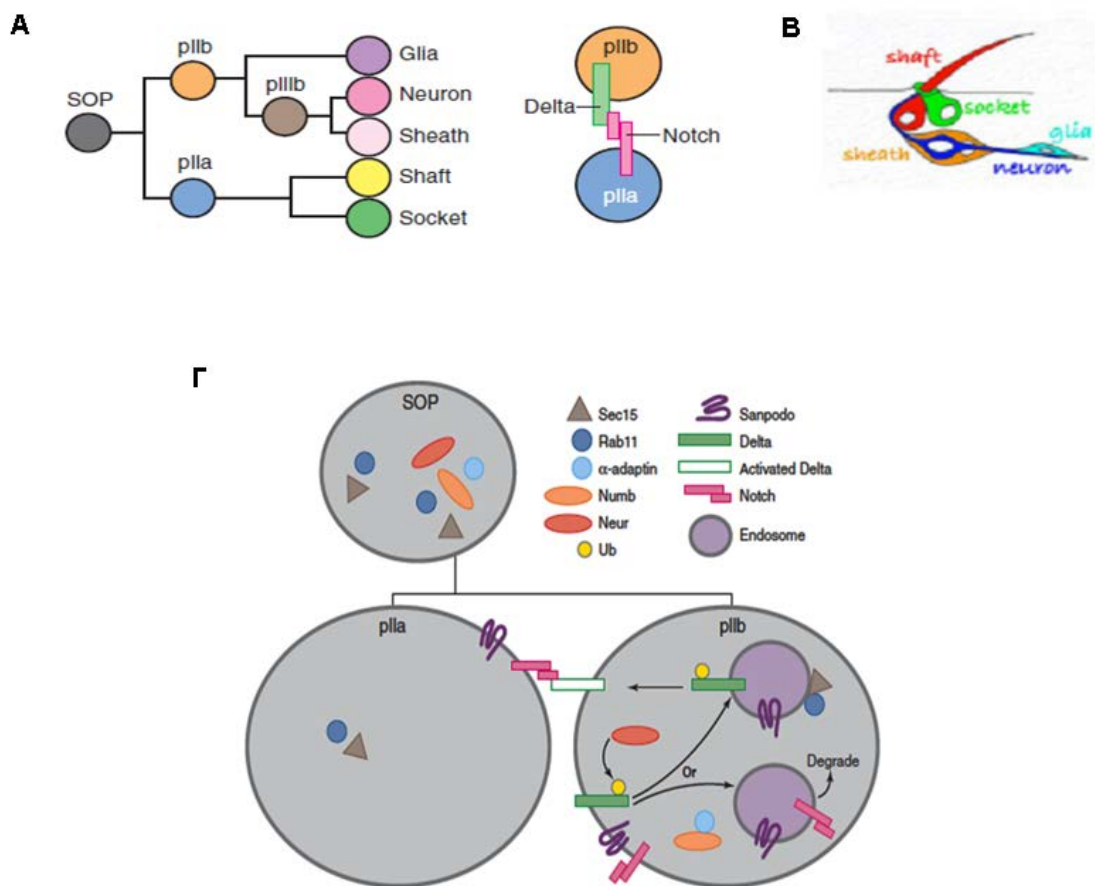
Μετά την επιλογή του προδρόμου των αισθητηρίων οργάνων, το κύτταρο αυτό διαιρείται ασύμμετρα ώστε να δημιουργηθούν 5 διαφορετικά κύτταρα: η σμήριγγα (shaft), ο νευρώνας (neuron), η θήκη (socket), το περίβλημα (seath) και το γλοιακό κύτταρο (glia) (εικόνα 1.8) (Gho et al., 1999). Το μονοπάτι Notch κατέχει βασικό ρόλο σε αυτές τις ασύμμετρες διαιρέσεις και μάλιστα σε πολλά στάδια: Στην πρώτη ασύμμετρη διαίρεση θα παραχθεί από το ΠΑΟ ένα pIIa και ένα pIIb κύτταρο. Το pIIa κύτταρο θα διαιρεθεί ασύμμετρα για να δώσει τη σμήριγγα και τη θήκη, ενώ το pIIb για να δώσει αρχικά το γλοιακό κύτταρο και το pIIIb το οποίο θα διαιρεθεί ασύμμετρα με τη σειρά του για να παράγει το νευρώνα και το περίβλημα.

Όσον αφορά την πρώτη ασύμμετρη διαίρεση, το Notch μονοπάτι ενεργοποιείται στο pIIa κύτταρο ενώ το pIIb έχει την ικανότητα να σηματοδοτεί. Σε

αυτή την περίπτωση απώλεια της σηματοδότησης οδηγεί στην παραγωγή μόνο νευρώνων επειδή προκύπτουν μόνο pIIb κύτταρα. Υπάρχουν δύο διαφορετικοί μηχανισμοί που διασφαλίζουν ότι το pIIb κύτταρο μόνο θα αποστέλλει σήμα ενώ το pIIa θα γίνει κύτταρο δέκτης. Και οι δύο εμπλέκουν την ενδοκύττωση. Πρώτον, η λιγάση Neur, βασικός ενεργοποιητής του D1 κληρονομείται μόνο από το pIIb κύτταρο. Δεύτερον, η πρωτεΐνη Numb, αρνητικός ρυθμιστής του Notch, επίσης κληρονομείται μόνο από το pIIb (Rhyu et al., 1994, Berdnik et al., 2002, Le Borgne and Schweisguth, 2003). Το επικρατέστερο μοντέλο είναι ότι η Numb ενδοκυττώνει τον υποδοχέα Notch, προσδένοντας την ενδοκυττάρια περιοχή του, και τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη Sanpodo (Spdo), γεγονός το οποίο επιφέρει αποικοδόμηση του Notch ή/και του Spdo. Η πρωτεΐνη Spdo αποτελεί θετικό ρυθμιστή της σηματοδότησης (Guo et al., 1996, Berdnik et al., 2002). Συνεπώς δεν ενεργοποιείται η σηματοδότηση στο pIIb κύτταρο (Dye et al., 1998, Hutterer and Knoblich, 2005). Άλλες μελέτες αναφέρουν ότι τα επίπεδα του υποδοχέα στη μεμβράνη σε pIIb και pIIa δε διαφέρουν, οπότε πιθανόν η Numb να ενδοκυττώνει και να αποικοδομεί μόνο τη Spdo. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, έχει βρεθεί ότι η κατανομή της Spdo σε pIIa κύτταρο είναι κυρίως στη μεμβράνη ενώ σε pIIb σε ενδοσώματα (Hutterer and Knoblich., 2005, Roegiers et al., 2005). Ένα τελείως διαφορετικό μοντέλο αναφέρει ότι η Spdo είναι απαραίτητη όχι στο pIIa κύτταρο αλλά στο pIIb για την ενεργοποίηση του D1 μέσω ενδοκύττωσης και ανακύκλωσης του στη μεμβράνη (Jafar-Nejad et al., 2005). Όποιος και αν είναι ο μηχανισμός με τον οποίο δρα η πρωτεΐνη Numb, η συμβολή της στην ασύμμετρη διαίρεση είναι καθοριστική αφού σε *numb* μεταλλάγματα η σηματοδότηση ενεργοποιείται και στο pIIb κύτταρο μετατρέποντας το σε pIIa (Guo et al., 1996).

Όπως υπάρχουν μηχανισμοί που διασφαλίζουν ότι το pIIb κύτταρο θα είναι ο αποστολέας της σηματοδότησης, υπάρχουν και αντίστοιχοι μηχανισμοί ώστε να διασφαλίσουν ότι το pIIa κύτταρο θα είναι ο δέκτης. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν ρύθμιση της δημιουργίας ενδοσωμάτων ανακύκλωσης (Emery et al., 2005, Jafar-Nejad et al., 2005). Η ενδοκύττωση παίζει καθοριστικό ρόλο στη σηματοδότηση Notch (βλ. Ενδοκύττωση και σηματοδότηση Notch). Συγκεκριμένα στην ασύμμετρη διαίρεση του ΠΑΟ, στο pIIa κύτταρο η δημιουργία Rab11-θετικών ενδοσωμάτων εμποδίζεται καθώς δε στρατολογούνται σημαντικοί παράγοντες όπως η πρωτεΐνη Nuclear fallout (Nuf) στο κεντρόσωμα. Rab11-θετικά ενδοσώματα, κάποια εκ των οποίων περιέχουν D1 δημιουργούνται κοντά στο κεντρόσωμα μόνο σε pIIb

κύτταρα. Σε pIIa κύτταρα στα οποία συνεκφράστηκε Nuf και συνεχώς ενεργό Rab11 μετατράπηκαν σε pIIb, γεγονός που συσχετίζει την ασύμμετρη δημιουργία Rab11-θετικών ενδοσωμάτων με τη σηματοδότηση από το DI και τον καθορισμό της κυτταρικής τύχης (Emery et al., 2005). Επιπλέον, η πρωτεΐνη Sec15, η οποία συμμετέχει στη μεταφορά εκκριτικών κυστιδίων, αν και κατανέμεται συμμετρικά σε pIIa και b κύτταρα, χρειάζεται στα δεύτερα για την ανακύκλωση του DI (Jafar-Nejad et al., 2005, Wu et al., 2005).



Εικόνα 1.8: Η σηματοδότηση Notch στις ασύμμετρες διαιρέσεις του ΠΑΟ

A,B: Το ΠΑΟ (SOP) κύτταρο διαιρείται ασύμμετρα ώστε να δώσει το αισθητήριο όργανο το οποίο αποτελείται από πέντε κύτταρα: την τρίχα (shaft), τη θήκη (socket), το γλοιακό κύτταρο (glia), το στηρικτικό κύτταρο (sheath) και τον νευρώνα (neuron). Στην πρώτη ασύμμετρη διαίρεση προκύπτουν τα pIIb και pIIa κύτταρα με το πρώτο να στέλνει Notch σήμα και το δεύτερο να αποδέχεται.

Γ: Πολλοί διαφορετικοί μηχανισμοί διασφαλίζουν την απόκτηση διαφορετικής τύχης μεταξύ pIIb και pIIa κυττάρων. Οι πρωτεΐνες Numb και Neur κληρονομούνται ασύμμετρα μόνο από το pIIb κύτταρο, με την πρώτη να καταστέλλει την αποδοχή σήματος από τον υποδοχέα και τη δεύτερη να ενισχύει την αποστολή σήματος από το δεσμευτή. Επιπλέον, η απουσία Rab11-θετικών ενδοσωμάτων στο pIIa αποκλείει την αποστολή σήματος από το κύτταρο αυτό.

3. Η ΡΥΘΜΙΣΗ

3.1 Πρωτεόλυση

Πρωτεόλυση του υποδοχέα Notch

Πριν τη παρουσίαση του στη μεμβράνη, ο υποδοχέας Notch υφίσταται την πρώτη πρωτεόλυση στο διαμέρισμα του Golgi από τη δράση μιας φουρίνης (πρωτεόλυση S1). Το ένζυμο φουρίνη μοιάζει με την πρωτεάση σαμπτυλυσίνη και πρωτεολύει πρωτεΐνες μέσω του κλασσικού εκκριτικού μονοπατιού (Logeat et al., 1998). Το αποτέλεσμα της δράσης αυτής είναι να εμφανιστεί ο υποδοχέας στη μεμβράνη ως ένα ετεροδιμερές τα τμήματα του οποίου συνδέονται με μια ιοντική γέφυρα ασβεστίου (Blau Mueller et al., 1997). Η πρωτεόλυση αυτή είναι συστατική και άσχετη με την ενεργοποίηση του μονοπατιού. Η ύπαρξη της πρώτης πρωτεόλυσης είναι αμφισβητούμενη στη *D.melanogaster* και υποστηρίζεται ότι ο υποδοχέας στη μεμβράνη είναι πλήρους μήκους, ενώ είναι αποδεδειγμένη στα θηλαστικά (Kidd and Lieber, 2002).

Όταν ο υποδοχέας είναι στη μεμβράνη και αλληλεπιδράσει με έναν από τους δεσμευτές του, ακολουθεί μια δεύτερη πρωτεόλυση (πρωτεόλυση S2) από μία πρωτεάση τύπου ADAM, στο εξωκυττάριο τμήμα του. Στα θηλαστικά, η πρωτεάση τύπου ADAM 17, TACE, είναι υπεύθυνη για την πρωτεόλυση S2 (Brou et al., 2000). Στη *D.melanogaster* υπάρχει το γονίδιο *kuzbanian* (kuz), το οποίο κωδικοποιεί μία εξωκυττάρια μεταλλοπρωτεάση τύπου ADAM 10, η οποία αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα και τον πρωτεολύει (Pan and Rubin, 1997, Lieber et al., 2002). Το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα που αποκόπτεται, ενδοκυττώνεται μαζί με τον προσδεδεμένο σε αυτό δεσμευτή στο κύτταρο-αποστολέα σήματος. Έχει προταθεί ότι η διαδικασία της ενδοκύττωσης του συμπλόκου δεσμευτή-εξωκυττάρια τμήματος υποδοχέα, δημιουργεί αλλαγές στη διαμόρφωση του υποδοχέα επιτρέποντας στη S2 πρωτεόλυση να λάβει χώρα (Parks et al., 2000). Μελέτες όμως στα θηλαστικά έδειξαν ότι το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα μπορεί να ενδοκυττωθεί μαζί με το δεσμευτή από το γειτονικό κύτταρο ανεξάρτητα από την S2 πρωτεόλυση. Η ενδοκύττωση αυτή εξαρτάται μόνο από την S1 πρωτεόλυση. Το προτεινόμενο μοντέλο αναφέρει ότι το ετεροδιμερές Notch στην πλασματική μεμβράνη πρέπει να διαχωριστεί πριν συμβεί η S2 πρωτεόλυση και ο διαχωρισμός γίνεται με την

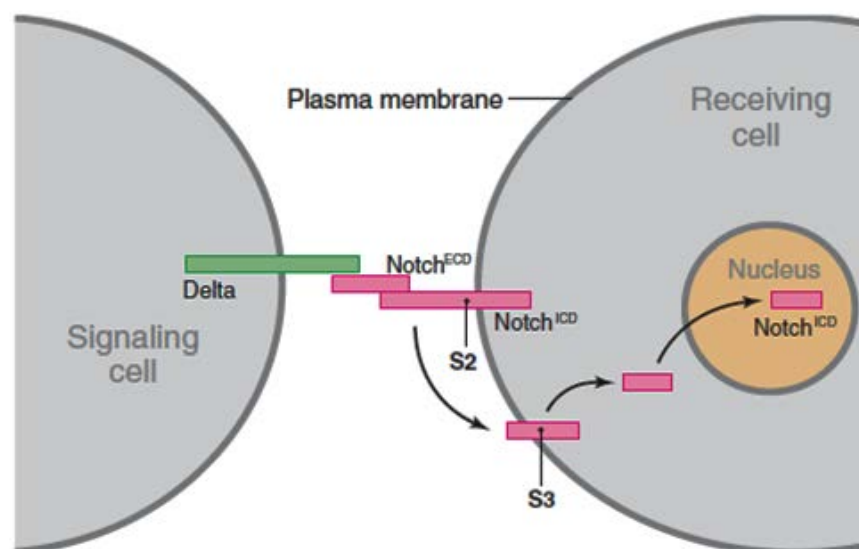
πρόσδεση στους δεσμευτές και την ενδοκύττωση του συμπλόκου και όχι ενζυματικά (Nichols et al., 2007).

Η δεύτερη πρωτεόλυση και η απομάκρυνση του εξωκυττάριου τμήματος μετατρέπει τον υποδοχέα σε καλό υπόστρωμα για την τρίτη (πρωτεόλυση S3) και τελευταία πρωτεόλυση, η οποία συμβαίνει στην ενδομεμβρανική περιοχή του μορίου. Η συγκεκριμένη πρωτεόλυση καταλύεται από το πρωτεολυτικό σύμπλοκο της γ-σεκρετάσης (Struhl and Adachi, 2000). Το σύμπλοκο αυτό έχει μέγεθος περίπου 250kDa και η πρωτεολυτική του δράση οφείλεται στην πρεσενιλίνη, μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη 8πλης διέλευσης. Το κάθε σύμπλοκο μπορεί να περιέχει ένα ή δύο μόρια πρεσενιλίνης και μία σειρά από ρυθμιστικές πρωτεΐνες όπως Nicastrin/APH2, APH1 και Pen-2 (Fortini, 2002). Η πρεσενιλίνη εντοπίζεται κυρίως ενδοκυτταρικά, στο ενδοπλασματικό δίκτυο και το σύμπλεγμα Golgi, και ένα μικρό ποσοστό αυτής στην πλασματική μεμβράνη και σε ενδοκυττωτικά διαμερίσματα (Zhang et al., 1998, Annaert et al., 1999, Lah and Levey, 2000, Kaether et al., 2006). Μετά το πέρας της τρίτης πρωτεόλυσης, το ενδοκυττάριο τμήμα του Notch μεταφέρεται στον πυρήνα όπου δρα ως μεταγραφικός συνενεργοποιητής (Kopan et al., 1996, Struhl and Greenwald, 1999). Έχει προταθεί ότι στη *D.melanogaster* η S3 πρωτεόλυση του υποδοχέα συμβαίνει είτε στην πλασματική μεμβράνη είτε σε κάποιο ενδοκυττωτικό διαμέρισμα (Lopez-Schier and Johnston, 2002, Vaccari et al., 2008). Επιπλέον έχει δειχθεί ότι η μόνο-ουβικουιτινυλίωση του υποδοχέα και η ενδοκύττωση αυτού είναι απαραίτητες προϋποθέσεις για την πρωτεόλυση του από τη γ-σεκρετάση (Gupta-Rossi et al., 2004, Vaccari et al., 2008). Τόσο η S2 όσο και η S3 πρωτεολύσεις είναι προϋποθέσεις απαραίτητες για την ενεργοποίηση Notch. Οι πρωτεολύσεις του υποδοχέα παρουσιάζονται στην εικόνα 1.9.

Πρωτεόλυση των δεσμευτών

Μία σειρά από μεταλλοπρωτεάσες τύπου ADAM (ADAM 9, 10, 12, 17) πρωτεολύουν τις DSL πρωτεΐνες των θηλαστικών, ενώ στη *D.melanogaster* έχουν εμπλακεί οι τύπου ADAM10 (Kuzbanian, Kuzbanian-like) και ADAM17 (B D'Souza et al., 2008). Δε είναι όμως ακόμα γνωστός ο ρόλος της πρωτεόλυσης των δεσμευτών πέραν της αποικοδόμησής τους/ εκκαθάρισης από την πλασματική μεμβράνη. Δε φαίνεται όμως να είναι απαραίτητες για τη σηματοδότηση, σε αντίθεση με τις πρωτεολύσεις του Notch. Αν η πρωτεόλυση συνέβαινε στο κύτταρο αποστολέα θα

μειωνόταν η διαθέσιμη ποσότητα δεσμευτή που θα μπορούσε να σηματοδοτήσει. Σύμφωνα με αυτή την ιδέα είναι το αποτέλεσμα από την υπερέκφραση της Kuzbanian-like (Kul) στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού όπου τα αποτελέσματα θυμίζουν απώλεια σηματοδότησης Notch (Sapir et al., 2005). Επιπλέον, επειδή η Kul πρωτεολύει μόνο τους δεσμευτές και όχι τον υποδοχέα μπορεί να λειτουργήσει ως ρυθμιστής της Notch σηματοδότησης (Lieber et al., 2002, Sapir et al., 2005). Η πρωτεόλυση από τις ADAM οδηγεί στη δημιουργία εξωκυττάρων παραγώγων που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη σηματοδότηση. Αυτά τα εξωκυττάρια τμήματα των δεσμευτών φαίνονται ανενεργά αλλά αρκετές μελέτες έχουν προτείνει ότι μπορούν να ενισχύσουν και να καταστείλουν τη σηματοδότηση (Sun and Artavanis-Tsakonas, 1997, Chen and Greenwald, 2004). Αντιθέτως με ότι συμβαίνει στα θηλαστικά, στη *D.melanogaster* το τμήμα της πρωτεΐνης μετά την πρωτεόλυση από τις ADAM μεταλλοπρωτεάσες δε φαίνεται να πρωτεολύεται περαιτέρω (Bland et al., 2003, Delwig et al., 2006).



Εικόνα 1.9: Πρωτεόλυση του υποδοχέα Notch.

Μετά τη πρόσδεση του υποδοχέα με το δεσμευτή ακολουθεί η S2 πρωτεόλυση από τη μεταλλοπρωτεάση τύπου ADAM10, Kuz, και η ενδοκυττάρωση του εξωκυττάρου τμήματος μαζί με τον δεσμευτή στο κύτταρο-αποστολέα. Στη συνέχεια ακολουθεί η πρωτεόλυση S3 από το σύμπλοκο της γ-σεκρετάσης, η απελευθέρωση του ενδοκυττάρου τμήματος του υποδοχέα και η μεταφορά του στον πυρήνα.

3.2 Γλυκοζυλίωση

Μία επιπλέον σημαντική τροποποίηση για τη ρύθμιση της σηματοδότησης Notch είναι η γλυκοζυλίωση. Τόσο ο υποδοχέας Notch όσο και οι δεσμευτές του D1 και Ser διαθέτουν συντηρημένες αλληλουχίες σε συγκεκριμένες επαναλήψεις EGF που μπορούν να τροποποιηθούν με γλυκοζυλίωση. Σημαντικό ρόλο στο κεφάλαιο αυτό κατέχει η γλυκοζυλτρανσφεράση Fringe (Fng), η οποία απαντάται σε δύο ισομορφές: μια εκκρινόμενη μορφή και μία μορφή που βρίσκεται στο Golgi (Panin *et al.*, 1997). Η δεύτερη ισομορφή καταλύει την προσθήκη N-ακετυλογλυκοζαμίνης πάνω σε O-φουκόζη στις EGF επαναλήψεις. Έχειδειχθεί ότι αυτή η τροποποίηση επηρεάζει την ικανότητα των δεσμευτών να προσδένονται στον υποδοχέα και συγκεκριμένα ενισχύει την αλληλεπίδραση D1-Notch ενώ αναστέλλει την Ser-Notch (Irvine *et al.*, 1999). Μάλιστα έχει αποδειχθεί ότι αυτή η τροποποίηση και όχι κάποια περεταιίρω είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση της διαφορικής ικανότητας πρόσδεσης των δεσμευτών. Συνεπώς η τροποποίηση από τη Fng του υποδοχέα ρυθμίζει άμεσα την πρόσδεση και δεν δρα ως σκαλοπάτι για μετέπειτα μεταμεταφραστική τροποποίηση (Xu *et al.*, 2007). Η δράση της πρωτεΐνης Fng είναι σημαντική για το κύτταρο που λαμβάνει το σήμα ενώ συμμετέχει σε διαδικασίες καθορισμού ορίων (ραχιαιοκοιλιακό όριο του φτερού) και όχι στην πλευρική αναστολή πιθανότατα λόγω προτύπου έκφρασης της πρωτεΐνης.

Η δεύτερη σημαντική για τη σηματοδότηση Notch γλυκοζυλτρανσφεράση που ανακαλύφθηκε ήταν η O-Fut1. Το ένζυμο αυτό προσθέτει O-φουκόζη σε κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης των επαναλήψεων EGF του υποδοχέα Notch (Sasamura *et al.*, 2003). Αυτή η τροποποίηση είναι απαραίτητη προϋπόθεση ώστε να ακολουθήσει επιμήκυνση της αλυσίδας των σακχάρων από τη Fng (Lai *et al.*, 2004). Η έκφραση της O-Fut1 κατά την ανάπτυξη είναι ομοιόμορφη και επηρεάζει και διαδικασίες ανεξάρτητες από τη δράση της Fng όπως είναι η πλευρική αναστολή και οι ασύμμετρες διαιρέσεις (Okajima and Irvine, 2002, Okajima *et al.*, 2003). Επιπροσθέτως έχειδειχθεί ότι η γλυκοζυλτρανσφεράση O-Fut1 έχει διπλό ρόλο: Εκτός της δράσης της ως O-φουκοζυλτρανσφεράσης δρα και ως σαπερόνη βοηθώντας τη σωστή στερεοδιαμόρφωση του υποδοχέα Notch και στόχευση του στην κυτταρική μεμβράνη από το ενδοπλασματικό δίκτυο (Okajima *et al.*, 2008). Και οι δύο αυτές δράσεις της είναι απαραίτητες για τη σηματοδότηση Notch (Rampal *et al.*, 2005, Stanley, 2007). Αντίθετα με ότι συμβαίνει στη *D.melanogaster*, η O-Fut1 των

θηλαστικών, Pofut1, δε χρειάζεται για την εμφάνιση του Notch στην κυτταρική μεμβράνη, είναι όμως απαραίτητη η ενζυμική της δράση ως γλυκοζυλτρανσφεράση για να επιτευχθεί σωστή διαμόρφωση της πρωτεΐνης και σωστή πρόσδεση στους δεσμευτές (Stahl et al., 2008).

Πρόσφατα, μία επιπλέον γλυκοζυλτρανσφεράση, η Rumi, ανακαλύφθηκε στη *D.melanogaster*. Μελέτες έχουν δείξει ότι η Rumi είναι απαραίτητη για τη σηματοδότηση με έναν θερμοευαίσθητο τρόπο, υποδηλώνοντας ότι η προσθήκη Ο-γλυκόζης στον υποδοχέα από το ένζυμο αυτό επηρεάζει τη διαμόρφωση του αλλά όχι και την πρόσδεση των δεσμευτών (Acar et al., 2008).

Αξιοσημείωτο επίσης είναι το γεγονός ότι οι δεσμευτές D1 και Ser αποτελούν υποστρώματα γλυκοζυλίωσης των ενζύμων Fng και O-Fut1 *in vitro* (Panin et al., 2002) αλλά ο ρόλος αυτής της τροποποίησης παραμένει άγνωστος.

3.3 Ουβικουΐτινυλίωση

(βλέπε: 7. Ενδοκύττωση, Ουβικουΐτινυλίωση και Notch)

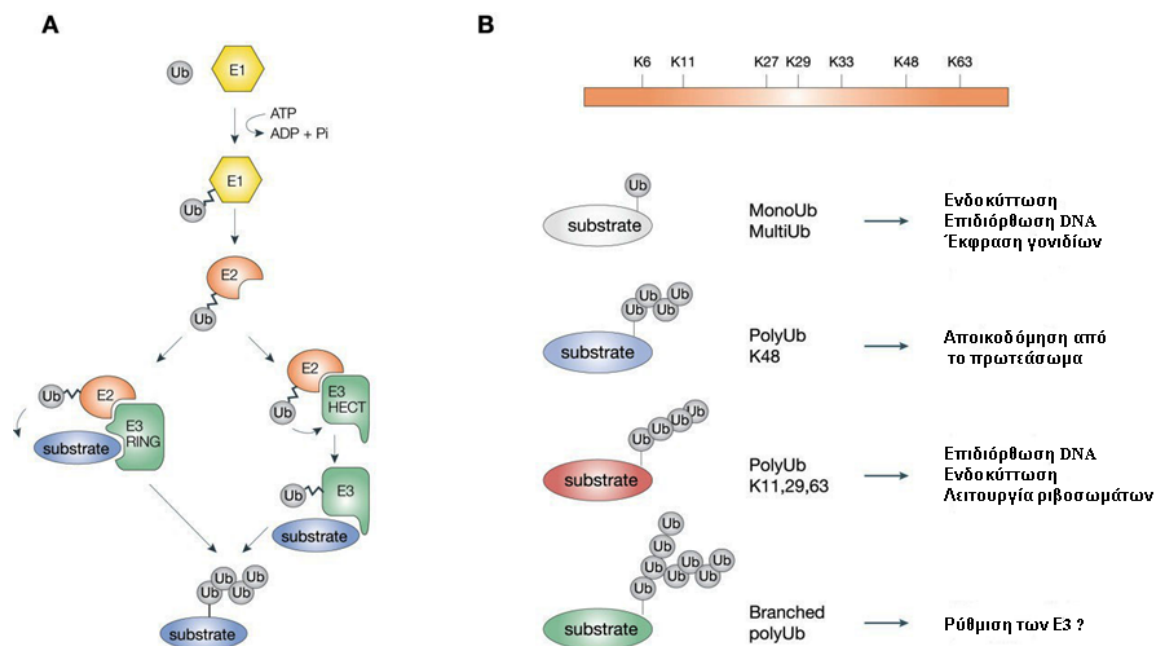
4. ΟΥΒΙΚΟΥΪΤΙΝΥΛΙΩΣΗ

Η ουβικουΐτινυλίωση είναι από τις σημαντικότερες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών και έχει βασικό ρόλο σε μία πλειάδα διαφορετικών κυτταρικών διαδικασιών. Αρχικά η ουβικουΐτινυλίωση των πρωτεϊνών είχε συνδεθεί άμεσα με την αποικοδόμηση τους από το πρωτεάσωμα (Ciechanover et al., 2000), αλλά μετέπειτα βρέθηκε ότι συνδέεται και με άλλες κυτταρικές διαδικασίες όπως η ενδοκύττωση μεμβρανικών πρωτεϊνών και σε κάποιες περιπτώσεις ενεργοποίηση τους, η ρύθμιση της δραστηριότητας των ιστονών, ρύθμιση εξόδου από τον πυρήνα και επιδιόρθωση γενετικού υλικού (Haglund et al., 2003). Η ουβικουΐτινη είναι μία υψηλά συντηρημένη πρωτεΐνη 8kDa η οποία προσδέεται ομοιοπολικά σε πρωτεΐνες υποστρώματα σε τρία στάδια (Pickart and Eddins, 2004, εικόνα 1.10): Αρχικά το καρβοξυτελικό άκρο της ουβικουΐτινης ενεργοποιείται από το ενεργοποιητικό ένζυμο E1. Μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από το ATP, η ουβικουΐτινη δεσμεύεται με ένα κατάλοιπο κυστεΐνης του E1 ενζύμου με θειοστερικό δεσμό. Κατά το δεύτερο στάδιο, η ενεργοποιημένη ουβικουΐτινη μεταφέρεται σε ένα συντηρημένο κατάλοιπο κυστεΐνης ενός από τα διάφορα συζευκτικά ένζυμα (E2) που διαθέτει το κύτταρο. Τα

E2 ένζυμα καταλύουν την ουβικουιτυλίωση των υποστρωμάτων σε συνεργασία με τις λιγάσες ουβικουιτίνης (E3). Μία κατηγορία E3 λιγασών, οι HECT E3, δρουν πρώτα δεσμεύοντας την ουβικουιτίνη σε ένα κατάλοιπο κυστεΐνης στο μόριο τους και στη συνέχεια τη μεταφέρουν σε ένα κατάλοιπο λυσίνης (συνήθως) πάνω στην πρωτεΐνη-υπόστρωμα. Στις περισσότερες όμως περιπτώσεις οι E3 λιγάσες λειτουργούν ως γέφυρα μεταξύ του συμπλόκου E2-ουβικουιτίνης και υποστρώματος και με αυτό τον τρόπο υποβοηθούν τη μεταφορά της ουβικουιτίνης από το E2 στο υπόστρωμα. Η πλειοψηφία αυτών των λιγασών διαθέτουν ένα RING μοτίβο. Όταν αναφερόμαστε στα μόρια-κλειδιά της ουβικουιτυλίωσης δεν πρέπει να παραλείπουμε τις DUB, ένζυμα τα οποία αποδεσμεύουν την ουβικουιτίνη από τις πρωτεΐνες-υποστρώματα. Υπάρχουν τουλάχιστον 5 διαφορετικές δομικές κατηγορίες τέτοιων ενζύμων για τις οποίες έχει αναφερθεί ένα μεγάλο εύρος λειτουργιών (Amerik and Hochstrasser, 2004, Nijman et al., 2005).

Εδώ και πολλά χρόνια έχει βρεθεί ότι τα μόρια ουβικουιτίνης μπορούν να ενωθούν το ένα με το άλλο ώστε να δημιουργηθούν πολυμερή της πρωτεΐνης πάνω στα υποστρώματα (Chau et al., 1989). Δύο μόρια ουβικουιτίνης ενώνονται μεταξύ τους με ισοπεπτιδικό δεσμό ο οποίος δημιουργείται ανάμεσα στην ε-αμινομάδα μίας λυσίνης της μίας ουβικουιτίνης και στην καρβοξυλομάδα στο καρβοξυτελικό άκρο της άλλης ουβικουιτίνης. Το μόριο της ουβικουιτίνης έχει 7 κατάλοιπα λυσίνης τα οποία θεωρητικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία αλυσίδας. Ανάλογα με το ποιο κατάλοιπο λυσίνης χρησιμοποιείται για τη δημιουργία της αλυσίδας ουβικουιτινών εξυπηρετείται και διαφορετικός σκοπός (εικόνα 1.10). Οι πρωτεΐνες οι οποίες έχουν πάνω τους αλυσίδα τουλάχιστον 4 ουβικουιτινών συνδεδεμένες μεταξύ τους στη λυσίνη 48 είναι πιθανά υποστρώματα για αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα. Όταν χρησιμοποιείται η λυσίνη 63, 11 ή 29 της ουβικουιτίνης συνήθως ενεργοποιούνται πρωτεΐνες για την επιδιόρθωση του DNA, για μετάβαση σήματος, για ενδοκύττωση ενώ εμπλέκονται και στη λειτουργία των ριβοσωμάτων αλλά όχι για αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα (Pickart and Fushman, 2004, Sun and Chen, 2004). Επιπλέον η πολυ-μονοουβικουιτυλίωση έχει εμπλακεί στην ενδοκύττωση των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, ενώ η μονοουβικουιτυλίωση μπορεί να έχει διάφορους ρυθμιστικούς ρόλους όπως η έλεγχος της υποκυτταρικής κατανομής της πρωτεΐνης, αλλαγή της διαμόρφωσης της ή και ρύθμιση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (Haglund et al., 2003a, Hicke and Dunn, 2003). Όσον αφορά τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις πρέπει να αναφερθεί ότι έχουν βρεθεί συγκεκριμένα

μοτίβα πρωτεϊνών τα οποία αναγνωρίζουν και δεσμεύουν την ουβικουιτίνη και τις ουβικουιτινυλιωμένες πρωτεΐνες, τα UBD (ubiquitin binding domains). Οι δυναμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των μοτίβων και των ουβικουιτινυλιωμένων πρωτεϊνών μπορούν να δημιουργήσουν ένα δίκτυο ουβικουιτίνης μέσα στο κύτταρο (Hicke and Dunn, 2003). Το δίκτυο αυτό περιπλέκεται αν λάβουμε υπόψη ότι πολλές πρωτεΐνες οι οποίες περιέχουν UBD ουβικουιτινυλιώνονται και οι ίδιες και μάλιστα τα UBD χρειάζονται για την ουβικουιτινύλιωση αυτή (Polo et al., 2002).



Εικόνα 1.10: Το μονοπάτι της ουβικουιτινύλιωσης

A: Η προσθήκη ενός μορίου ουβικουιτίνης σε ένα υπόστρωμα είναι μία διαδικασία 3 σταδίων: Αρχικά ενώνεται με θειοστερικό δεσμό το ενεργοποιητικό ένζυμο (E1) με την ουβικουιτίνη και στη συνέχεια το μόριο της ουβικουιτίνης μεταφέρεται στο συζευκτικό μόριο (E2). Η λιγάση ουβικουιτίνης (E3) μπορεί είτε να προσδένεται με την ουβικουιτίνη και να τη μεταφέρει στο υπόστρωμα (HECT), είτε να λειτουργεί ως γέφυρα αλληλεπιδρώντας με το E2 και το υπόστρωμα (RING).

B: Το μόριο της ουβικουιτίνης διαθέτει 7 κατάλοιπα λυσίνης τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία αλυσίδας ουβικουιτίνης πάνω στο υπόστρωμα. Κάθε τύπος ουβικουιτινύλιωσης έχει εμπλακεί σε μια σειρά από κυτταρικές διαδικασίες.

5. ΕΝΔΟΚΥΤΤΩΣΗ

Ο όρος ενδοκύττωση αναφέρεται στην πρόσληψη μορίων από το εξωκυττάριο περιβάλλον στο εσωτερικό του κυττάρου και μπορεί να διακριθεί σε δύο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με το υλικό που ενδοκυττώνεται, την φαγοκύττωση και την πινοκύττωση. Η φαγοκύττωση αναφέρεται στην ενδοκύττωση μεγάλων μορίων (>200nm) μέσω ενός μηχανισμού που βασίζεται στον κυτταροσκελετό ακτίνης (Caron and Hall, 2001). Η πινοκύττωση αναφέρεται στην ενδοκύττωση εξωκυττάριου μέσου και μπορεί να λάβει χώρα μέσω τεσσάρων βασικών μηχανισμών: Μηχανισμός εξαρτώμενος από την κλαθρίνη, μηχανισμός εξαρτώμενος από την καβεολίνη, μακροπινοκύττωση και μηχανισμός ανεξάρτητος από τη δυναμίνη και την κλαθρίνη (Gesbert et al., 2004). Ο πρώτος περιλαμβάνει τη δημιουργία κυστιδίων με τη βοήθεια της κλαθρίνης και απαντάται σε σχεδόν όλους τους κυτταρικούς τύπους. Ο δεύτερος μηχανισμός πιστεύεται ότι μεσολαβεί στην ενδοκύττωση υποδοχέων σε πολλούς αλλά όχι σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. Περιλαμβάνει τη δημιουργία μεμβρανικών εγκολπώσεων (caveolae), οι οποίες είναι πλούσιες σε χοληστερόλη, σφιγγολιπίδια και καβεολίνη. Στη *D.melanogaster* δεν υπάρχει καβεολίνη αλλά συγγενικές πρωτεΐνες όπως η φλοτιλίνη και η ανεξίνη (Fischer et al., 2006). Κατά τη μακροπινοκύττωση δημιουργούνται μεγάλα κυστίδια τα οποία ενσωματώνουν εξωκυττάριο υλικό σε μία διαδικασία μηχανιστικά όμοια με τη φαγοκύττωση. Και οι τρεις πρώτοι μηχανισμοί εξαρτώνται από τη δράση της δυναμίνης κάτι που διαχωρίζει τον τελευταίο καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι υπάρχει ένας μηχανισμός πινοκύττωσης ο οποίος είναι ανεξάρτητος από τη δράση της πρωτεΐνης αυτής και της κλαθρίνης.

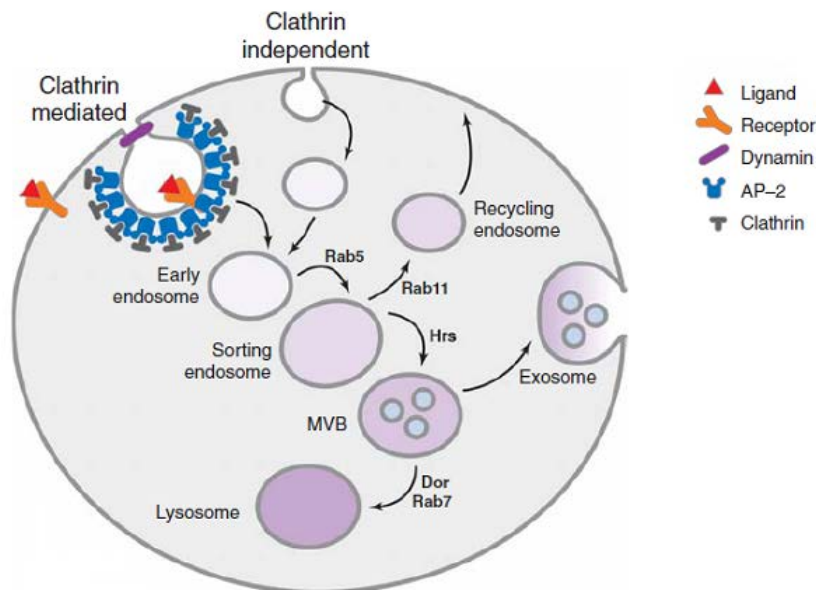
Εκτός από την πρόσληψη εξωκυττάριου μέσου η ενδοκύττωση χρησιμεύει για την εισαγωγή και μετέπειτα διακίνηση στο κύτταρο επιφανειακών πρωτεϊνών, πχ υποδοχέων - αυτά τα μόρια τα αποκαλούμε πρωτεΐνες-φορτία (cargo). Η ενδοκύττωση σηματοδοτικών μορίων από την κυτταρική μεμβράνη μέσω κλαθρίνης είναι ο καλύτερα μελετημένος μηχανισμός ενδοκύττωσης. Η διαδικασία ξεκινά με την ανακατανομή των μεμβρανικών πρωτεϊνών-φορτίων σε εγκολπώσεις της μεμβράνης που περιέχουν κλαθρίνη (clathrin-coated pits) (Brodsky et al., 2001). Οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς προσδένονται άμεσα ή έμμεσα στο σύμπλοκο AP2, το οποίο με τη σειρά του προσδένεται στην κλαθρίνη βοηθώντας την να πολυμεριστεί και να ασκήσει δύναμη στην κυτταρική μεμβράνη προς το εσωτερικό του κυττάρου

ώστε να δημιουργηθεί μία εσωτερική εγκόλπωση (Kirchhausen et al., 1997). Όταν η δημιουργία της εσωτερικής εγκόλπωσης ολοκληρωθεί, η αλληλεπίδραση του συμπλόκου AP2 με τη GTPase δυναμίνη επιτρέπει την αποκοπή του κυστιδίου από τη μεμβράνη (Wang et al., 1995, Ringstad et al., 1997). Μία επιπλέον πρωτεΐνη που κατέχει σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία είναι η Eps15, η οποία πιστεύεται ότι συσπειρώνει το σύμπλοκο ενδοκύττωσης με τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της (Wong et al., 1995, Iannolo et al., 1997, Wendland and Emr, 1998). Το σύμπλοκο AP2 και άλλα μέλη του ενδοκυττωτικού μηχανισμού αναγνωρίζουν και αλληλεπιδρούν με τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μέσω ενδοκυττωτικών μοτίβων. Υπάρχουν δύο μεγάλες κατηγορίες τέτοιων μοτίβων για τους υποδοχείς των θηλαστικών, τα μοτίβα που βασίζονται σε τυροσίνη και τα μοτίβα διλευκίνης (Brodsky et al., 2001).

Άσχετα από τα αν η διαδικασία ενδοκύττωσης εξαρτάται από την κλαθρίνη ή όχι στη συνέχεια πιστεύεται ότι το κυστίδιο που δημιουργήθηκε θα ακολουθήσει τον ενδοκυττάριο δρόμο των ενδοσωμάτων. Πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες συμμετέχουν στη δημιουργία των ενδοσωμάτων αυτών, με κυρίαρχη θέση να κατέχουν οι πρωτεΐνες Rab, οι οποίες είναι μεμβρανικές GTPases που ελέγχουν τη μεμβρανική σύντηξη (Zerial and Stenmark H, 1993). Διαφορετικές πρωτεΐνες Rab συσχετίζονται με διαφορετικά είδη ενδοσωμάτων και ρυθμίζουν τη σύντηξη ενδοσώμα με ενδόσωμα και ενδόσωμα με κυτταρική μεμβράνη. Αυτό εξαρτάται από τη σύσταση της κάθε μεμβράνης σε φωσφοϊνοσιτίδια τα οποία προσδένουν με διαφορετική συγγένεια πρωτεΐνες με μοτίβα πρόσδεσης λιπιδίων (Lemmon, 2003, Leroy and Wrana, 2005). Η πρώτη Rab που συναντάμε στο ενδοσωμικό μονοπάτι είναι η Rab5, η οποία ελέγχει τη σύντηξη των αρχικών κυστιδίων που αποκόπηκαν από τη μεμβράνη με τα πρώιμα ενδοσώματα και τη σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων μεταξύ τους (Gorvel et al., 1991, Stenmark et al., 1994). Υπάρχουν ενδείξεις που υποστηρίζουν την ύπαρξη διαφορετικών πληθυσμών πρώιμων ενδοσωμάτων ή και διαφορετικών μεμβρανικών περιοχών σε κάθε πρώιμο ενδόσωμα (Gruenberg, 2001). Όταν οι υποδοχείς που ενδοκυττώθηκαν βρίσκονται στα πρώιμα ενδοσώματα αποδεσμεύονται από τους δεσμευτές τους λόγω του ελαφρώς όξινου περιβάλλοντος και μπορούν να ξαναγυρίσουν πίσω στην κυτταρική μεμβράνη μέσω των κυστιδίων ανακύκλωσης (Maxfield and McGraw, 2004). Τα ενδοσώματα ανακύκλωσης αποκόπτονται από τα πρώιμα και συντήκονται με την κυτταρική μεμβράνη με τη δράση των πρωτεϊνών Rab4, Rab11 και Cellubrevin (πρωτεΐνη SNARE) (Peters et al., 2001). Οι

εναλλακτικές διαδρομές, εάν δεν καταλήξει ο υποδοχέας στα ενδοσώματα ανακύκλωσης, είναι το σύστημα Golgi, απ' όπου και πάλι μπορεί να ανακυκλωθεί στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, ή τα MVBs (multivesicular bodies), οργανίδια με αρκετά πιο όξινο περιβάλλον από τα πρώιμα ενδοσώματα. Σε αυτά συλλέγονται όσες πρωτεΐνες και λιπίδια θα καταλήξουν στα όψιμα ενδοσώματα ή σε εξωσώματα, μέσω μιας διαδρομής που εξαρτάται από τους μικροσωληνίσκους (Gruenberg and Stenmark, 2004). Σημαντική πρωτεΐνη για τη δημιουργία των εσωτερικών κυστιδίων των MVBs είναι η Hrs (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate), η οποία βρίσκεται και στα πρώιμα ενδοσώματα (Komada and Kitamura, 2005) και το υπερσύμπλοκο ESCRT I-II-III. Το τελευταίο είναι υπεύθυνο για την εγκόλπωση της μεμβράνης του MVB και την δημιουργία ενδο-αυλικών κυστιδίων (intraluminal vesicles), η ύπαρξη των οποίων έδωσε το όνομα στο οργανίδιο. Τα όψιμα ενδοσώματα, ένα βήμα πριν το λυσόσωμα, είναι οργανίδια με αρκετά όξινο περιβάλλον τα οποία διακρίνονται σε διαφορετικούς πληθυσμούς και περιέχουν διάφορες υποπεριοχές μεμβρανών με διαφορετική σύσταση πρωτεϊνών και λιπιδίων (Barbero et al., 2002, Russel et al., 2006). Είναι ο τελευταίος σταθμός όπου μπορούν να διαχωριστούν πρωτεΐνες και λιπίδια που θα πάνε στο λυσόσωμα ή στο σύστημα Golgi (Gruenberg, 2001). Στα όψιμα ενδοσώματα εδράζεται η GTPase Rab7 (Rink et al., 2005).

Όπως σε όλες της γνωστές διαδικασίες σύντηξης μεμβρανών, έτσι και στην περίπτωση των ενδοσωμάτων απαιτείται η δημιουργία συμπλόκων SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) ώστε να δημιουργηθούν γέφυρες μεταξύ των μεμβρανών (Hazuka et al., 1999).



Εικόνα 1.11: Το μονοπάτι της ενδοκύττωσης

Στην εικόνα φαίνεται συνοπτικά η πορεία της ενδοκύττωσης και των διαφορετικών εναλλακτικών μονοπατιών που μπορεί να ακολουθήσει ένα μόριο που εισέρχεται στο κύτταρο με τη βοήθεια ή μη της κλαθρίνης. Αναφέρονται τα σημαντικότερα ενδοσώματα του μονοπατιού καθώς και οι βασικότερες πρωτεΐνες που τα χαρακτηρίζουν.

6. ΕΝΔΟΚΥΤΤΩΣΗ ΚΑΙ ΟΥΒΙΚΟΥΙΤΙΝΥΛΙΩΣΗ

Η προσθήκη ουβικουιτίνης σε διαμεμβρανικές πρωτεΐνες θεωρείται σήμερα σήμα για ενδοκύττωση. Αρκετές πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τα ενδοκυττωτικά σύμπλοκα με τις πρωτεϊνικές τους αλληλεπιδράσεις έχει βρεθεί ότι περιέχουν περιοχές δέσμησης ουβικουιτίνης (UBD, ubiquitin-binding domain), ενώ επίσης και οι ίδιες ρυθμίζονται με ουβικουιτινυλίωση (Hicke and Dunn, 2003). Τέτοια παραδείγματα πρωτεϊνών είναι η Hrs, η Eps15 και οι Epsins οι οποίες περιέχουν UBD και αναγνωρίζουν τις ουβικουιτινυλιωμένες μορφές των πρωτεϊνών που ενδοκυττώνονται ώστε να τις ταξινομήσουν κατάλληλα κατά μήκος του ενδοκυττωτικού μονοπατιού (Di Fiore et al., 2003). Οι Epsins είναι ενδοκυττωτικές πρωτεΐνες οι οποίες προσδένουν PtIns(4,5)P2 στην κυτταρική μεμβράνη όπως επίσης την κλαθρίνη και το AP-2 σύμπλοκο όπως και άλλες βοηθητικές πρωτεΐνες του ενδοκυττωτικού μονοπατιού. Η διαπίστωση ότι περιέχουν UBD στη δομή τους έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι ανήκουν στην οικογένεια ρυθμιστών του ενδοκυττωτικού μονοπατιού που συνδέουν την ενδοκύττωση των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών με την

ουβικουιτινυλίωση τους (Wendland, 2002). Επιπλέον έχει βρεθεί ότι η ουβικουιτινυλίωση ρυθμίζει τη λειτουργία αρκετών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο ενδοκυττωτικό μονοπάτι καθώς μπορούν να υποστούν ουβικουιτινυλίωση σε κάποια περιοχή τους η οποία μάλιστα είναι διαφορετική από το UBD μοτίβο (Hicke and Dunn 2003)

Η ουβικουιτινυλίωση των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, όπως οι υποδοχείς και οι δεσμευτές σηματοδοτικών μονοπατιών, αποτελεί σινιάλο για είσοδο στον ενδοκυττωτικό δρόμο που είτε θα οδηγήσει στο λυσόσωμα για αποικοδόμηση (πιθανή μείωση της σηματοδότησης), είτε χρησιμοποιείται για στόχευση των μορίων στο κατάλληλο υποκυτταρικό διαμέρισμα εξυπηρετώντας τις ανάγκες της σηματοδότησης (Hicke and Dunn, 2003). Στην περίπτωση όμως των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών του ενδοπλασματικού δικτύου (ER) έχει βρεθεί ότι οι μη σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες ουβικουιτινυλιώνονται από E3 λιγάσες του ER και οδηγούνται στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση (Smith et al., 2011).

7. ΕΝΔΟΚΥΤΤΩΣΗ, ΟΥΒΙΚΟΥΙΤΙΝΥΛΙΩΣΗ ΚΑΙ NOTCH

Μία σειρά από ενδείξεις τα τελευταία χρόνια συνηγορούν στο ότι η ενδοκύττωση κατέχει ρόλο κλειδί στη σηματοδότηση Notch, με πρώτη την ανάλυση της θερμοευαίσθητης μεταλλαγής *shibire^{ts}* (Poody, 1990). Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την πρωτεΐνη δυναμίνη, υπεύθυνη για την αποκοπή των κυστιδίων καλυμμένων με κλαθρίνη. Έμβρυα με αυτή τη μεταλλαγή έφεραν νευρογόνο φαινότυπο, ενώ διατυπώθηκε η άποψη ότι η ενδοκύττωση είναι απαραίτητη και στο κύτταρο-αποστολέα και στο κύτταρο-δέκτη του σήματος (Seugnet et al., 1997).

Ένα ανοιχτό πεδίο έρευνας είναι ο ρόλος της ενδοκύττωσης των δεσμευτών DI και Ser στο κύτταρο-αποστολέα κατά τη σηματοδότηση Notch. Πρώτες μελέτες έδειξαν ότι στη *D.melanogaster*, οι πρωτεΐνες DI και Ser εντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια αλλά και σε ενδοκυττάρια κυστίδια, που μάλιστα προτάθηκε ότι είναι ενδοκυττωτικής φύσης (Kooh et al., 1993, Parks et al, 1995, Kramer and Pistry, 1996). Επιπλέον πειράματα με αντισώματα σε ζωντανούς ιστούς απέδειξαν ότι οι δύο δεσμευτές ενδοκυττώνονται και μάλιστα ταχύτατα (Le Borgne and Schweisguth, 2003, Le Borgne et al., 2005). Πολύ σημαντικό είναι το γεγονός ότι η παρουσία της DI σε ενδοκυττωτικά κυστίδια σχετίζεται άμεσα με την ικανότητα της για σηματοδότηση (Parks et al., 2000). Καθοριστικές ήταν οι μελέτες που αναγνώρισαν

την Epsin και τις δύο E3 λιγάσες ουβικουιτίνης Neur και Mib1 ως ρυθμιστές της ικανότητας των δεσμευτών για σηματοδότηση. Σε *neur*, *mib* και *lqf* (liquid facet, γονίδιο της Epsin) μεταλλάγματα στη *D.melanogaster* παρατηρήθηκε φαινότυπος που σχετίζεται με έλλειψη σηματοδότησης Notch. Η λιγάση Neur αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη D1, προκαλεί την ουβικουιτινυλίωση και την ενδοκύττωση της και μειώνει τα επίπεδα της μεταγραφικά (Deblandre et al., 2001, Lai et al., 2001, Pavlopoulos et al., 2001, Yeh et al., 2001, Le Borgne and Schweisguth 2003b). Με παρόμοιο τρόπο, αλληλεπιδρά με τη Ser και ελέγχει την υποκυτταρική της θέση (Pitsouli and Delidakis, 2005). Η λιγάση Mib1 επίσης αλληλεπιδρά με τις D1 και Ser και προκαλεί την ενδοκύττωση τους (Lai et al., 2005, Le Borgne et al., 2005). Σημαντικότερο όμως όλων είναι το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες Neur, Mib1 και Epsin δρουν στο κύτταρο αποστολέα για να ενισχύσουν τη σηματοδότηση Notch (Pavlopoulos et al., 2001, Itoh et al., 2003, Le Borgne and Schweisguth, 2003a, Le Borgne and Schweisguth, 2003b, Wang and Struhl, 2004, Overstreet et al., 2004, Le Borgne et al., 2005). Αυτό υποδηλώνει ότι κάποια ουβικουιτινυλίωση και κατόπιν η αναγνώρισή της από την Epsin είναι απαραίτητη στο κύτταρο-πομπό για την αποστολή του DSL σήματος. Η εν λόγω ουβικουιτινυλίωση μπορεί να συμβαίνει πάνω στην ίδια τη DSL πρωτεΐνη και να πυροδοτεί την ενδοκύττωσή της.

Η διαπίστωση ότι η ενδοκύττωση του διαμεμβρανικού δεσμευτή στο κύτταρο αποστολέα είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ενεργοποίηση του υποδοχέα στο κύτταρο δέκτη αρχικά αποτελεί παράδοξο αν σκεφτούμε ότι ένα από τα αποτελέσματα της ενδοκύττωσης είναι η απομάκρυνση του δεσμευτή από την κυτταρική μεμβράνη όπου και αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα. Έχουν διατυπωθεί διάφορα μοντέλα που προσπαθούν να εξηγήσουν το παραπάνω φαινόμενο (εικόνα 1.11):

- Το πρώτο μοντέλο υποστηρίζει ότι η ενδοκύττωση των δεσμευτών που αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα Notch ασκεί δυνάμεις πάνω σε αυτόν, επιφέροντας αλλαγές στη διαμόρφωση του και καθιστώντας τον καλύτερο υπόστρωμα για την πρωτεόλυση S2 (Parks et al., 2000). Πρόσφατες μελέτες σε θηλαστικά έδειξαν ότι το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα μπορεί να ενδοκυττωθεί μαζί με το δεσμευτή από το γειτονικό κύτταρο ανεξάρτητα από την S2 πρωτεόλυση. Το προτεινόμενο μοντέλο αναφέρει ότι το ετεροδιμερές Notch στην πλασματική μεμβράνη πρέπει να διαχωριστεί πριν συμβεί η S2 πρωτεόλυση και ο διαχωρισμός γίνεται με την πρόσδεση στους δεσμευτές και

την ενδοκύττωση του συμπλόκου και όχι ενζυματικά (Nichols et al., 2007). Πρέπει όμως να σημειώσουμε ότι αυτό είναι αδύνατο αν δεν έχει προηγηθεί η S1 πέψη του Notch, όπως φαίνεται να ισχύει σε πολλούς κυτταρικούς τύπους της Δροσόφιλας. Εκεί ίσως η S2 πέψη να προϋποθέτει μηχανική παραμόρφωση του (πλήρους μήκους) μορίου Notch.

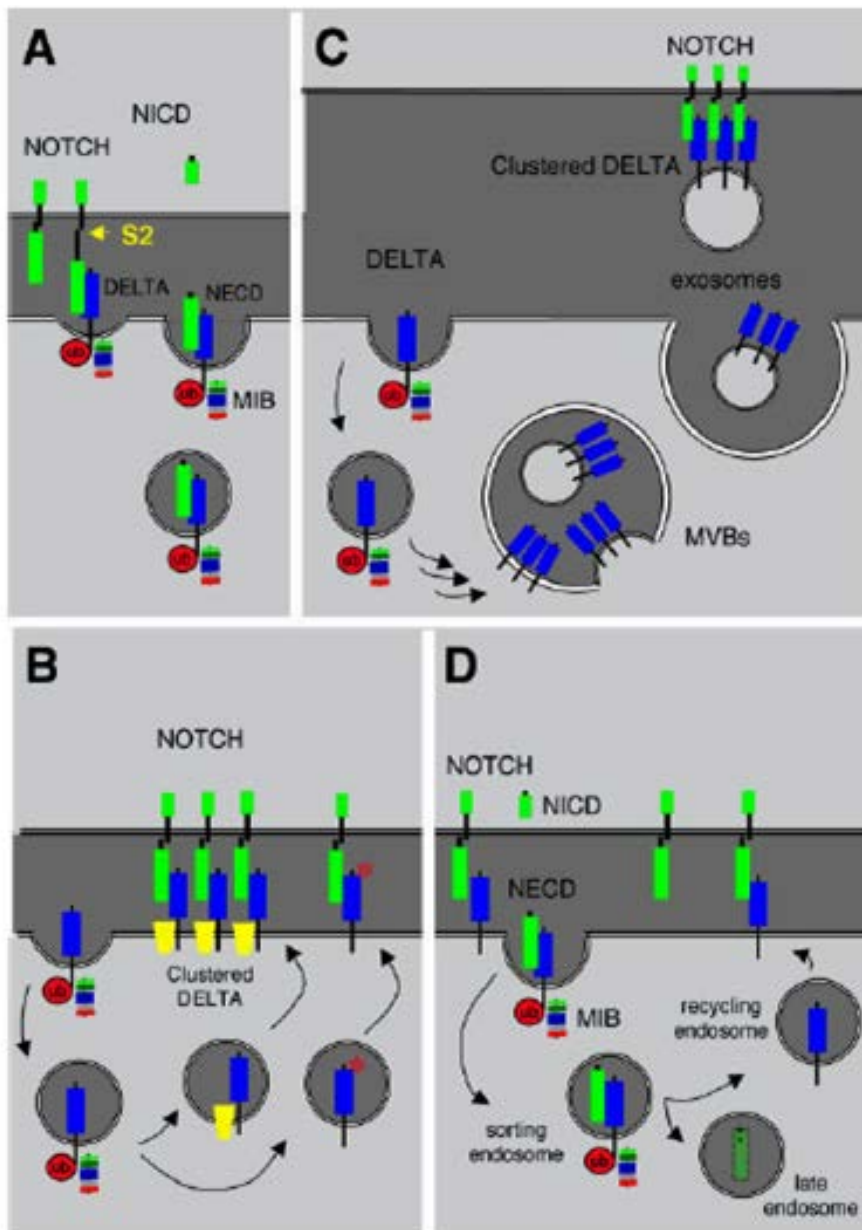
- Το δεύτερο μοντέλο αναφέρει ότι η ενδοκύττωση οδηγεί τους δεσμευτές σε ένα συγκεκριμένο υποκυτταρικό διαμέρισμα όπου και θα υποστούν συγκεκριμένες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις υπεύθυνες για την ενεργοποίησή τους. Στη συνέχεια θα ξαναγυρίσουν στην μεμβράνη μέσω των ενδοσωμάτων ανακύκλωσης (Wang and Struhl, 2004). Η ενδοκύττωση στο συγκεκριμένο υποκυτταρικό διαμέρισμα εξαρτάται από την ουβικουιτινυλίωση των δεσμευτών και την αναγνώριση τους από την Epsin. Μάλιστα ένα μικρό ποσοστό του DI που υπάρχει στην κυτταρική μεμβράνη ακολουθεί αυτό το δρόμο ενώ το υπόλοιπο πιθανόν ενδοκυττώνεται μέσω άλλου μηχανισμού και ίσως ακολουθεί το δρόμο της αποικοδόμησης από το λυσόσωμα (Wang and Struhl, 2004). Αυτό το μοντέλο υποστηρίζεται από το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες Rab11 και Sec15 δρουν στο pIb κύτταρο κατά την ασύμμετρη διαίρεση του ΠΑΟ (βλέπε: 2.3 Αποφάσεις γενεαλογίας). Άλλες μελέτες όμως στη γαμετική σειρά της *D.melanogaster* αναφέρουν ότι η σηματοδότηση από το DI μπορεί να συμβεί και με ένα μηχανισμό ανεξάρτητο από την κλαθρίνη όταν εμποδίζεται η είσοδος στα ενδοσώματα και όταν μειώνεται η δράση της Rab11 υποδηλώνοντας ότι ο δεσμευτής δε χρειάζεται να περάσει μέσω κάποιου μονοπατιού ανακύκλωσης (Windler and Bilder, 2010).
- Το τρίτο μοντέλο υποστηρίζει ότι οι δεσμευτές μέσω του ενδοκυτταρικού μονοπατιού θα βρεθούν στον αυλό των MVBs (**m**ulti **v**esicular **b**odies). Εκεί, είτε θα οδηγηθούν στο λυσόσωμα κατά την ωρίμανση των MVBs, ή θα εκκριθούν στον εξωκυττάριο χώρο υπό μορφή μεμβρανικών εξω-κυστιδίων (Mishra-Gorur et al., 2002, Le Borgne and Schweisguth, 2003a). Αυτό το μοντέλο δεν υποστηρίζεται από την παρατήρηση ότι έλλειψη της δραστηριότητας της Hrs πρωτεΐνης που αναστέλλει τη δημιουργία των MVBs δεν επηρεάζει αρκετά τη δραστηριότητα του DI (Jekely and Rorth, 2003). Πρέπει όμως να αναφερθεί ότι το ESCRT-0 σύμπλοκο είναι διμερές των

Hrs/Stam. Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες έχουν UBD μοτίβα γεγονός που ίσως υποδηλώνει μία εναπομένουσα ενεργότητα αυτού του συμπλόκου σε μεταλλάγματα hrs.

- Το τέταρτο μοντέλο αναφέρει ότι η ενδοκύττωση των δεσμευτών συνεισφέρει στη συσσώρευση τους σε ένα συγκεκριμένο διαμέρισμα της πλασματικής μεμβράνης μετά από ανακύκλωση και αυτή η διαδικασία οδηγεί στην ενεργοποίησή τους. Υποστήριξη γι' αυτό το μοντέλο έχουν δώσει πρόσφατες μελέτες που δείχνουν ότι στο κύτταρο p11b υπάρχει μια δομή πλούσια σε ακτίνη που απαιτείται για τη μετατόπιση της πρωτεΐνης DI από τη βασική στην κορυφαία περιοχή του κυττάρου, διαδικασία που επίσης απαιτεί την παρουσία της λιγάσης Neur (Rajan et al., 2009, Benhra et al., 2010).

Η ουβικουιτυλίωση και η ενδοκύττωση είναι απαραίτητες όχι μόνο στο κύτταρο αποστολέα αλλά και στο κύτταρο δέκτη με πρώτη ένδειξη το γεγονός ότι για να ενεργοποιηθεί ο υποδοχέας Notch με πρωτεόλυση από τη γ-σεκρετάση πρέπει να ουβικουιτυλιωθεί και να οδηγηθεί σε κάποιο ενδοκυτταρικό διαμέρισμα (Gurta-Rossi et al., 2004).

Η πρωτεΐνη Deltex (Dx), η οποία είναι μία E3 λιγάση ουβικουιτίνης, βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα, συμβάλει στην ενδοκύττωση του σε διαμέρισμα όπου υπάρχει η Rab11 και ρυθμίζει θετικά τη σηματοδότηση με ένα μηχανισμό ανεξάρτητο από τους δεσμευτές του (Matsuno et al., 1995, Ramain et al., 2001, Takeyama et al., 2003, Hori et al., 2004, Wilkin et al., 2004). Έχουν βρεθεί δύο επιπλέον λιγάσες ουβικουιτίνης που στοχεύουν τον υποδοχέα Notch, η Suppressor of Deltex Su(Dx) και η Nedd4. Οι πρωτεΐνες Su(dx) και Nedd4 είναι οι ομόλογες της Rsp5 της ζύμης, που έχει αρχίσει να διαφαίνεται ότι είναι η κύρια E3 λιγάση για την ουβικουιτυλίωση και ενδοκύττωση των πρωτεϊνών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Πιθανότατα η δράση τους οδηγεί τον υποδοχέα στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση (Sakata et al., 2004, Wilkin et al., 2004). Το επικρατέστερο μοντέλο για τη δράση των τριών αυτών λιγάσων αναφέρει ότι η Dx δρα ανταγωνιστικά με τις Su(Dx) και Nedd4 στη ρύθμιση της κατανομής του υποδοχέα στα ενδοσώματα. Με την άφιξη του στα πρώιμα ενδοσώματα, το Notch στέλνεται για αποικοδόμηση στα όψιμα με τη δράση των Su(Dx) και Nedd4. Αντιθέτως η Dx δρα ανταγωνιστικά για να στείλει τον υποδοχέα από τα πρώιμα στα ενδοσώματα ανακύκλωσης (Le Borgne et al., 2005).



Εικόνα 1.12: Τέσσερα μοντέλα για την ενδοκύττωση των δεσμευτών

A: Η ενδοκύττωση του δεσμευτή βοηθά τη S2 πρωτεόλυση του υποδοχέα η οποία και είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ενεργοποίηση της σηματοδότησης.

B: Η ανακύκλωση του δεσμευτή οδηγεί σε μία συσσώρευση πολλών μορίων σε συγκεκριμένες υποπεριοχές της κυτταρικής μεμβράνης κάνοντας την αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα πιο αποτελεσματική. **C:** Μετά την ενδοκύττωση ο δεσμευτής οδηγείται στα MVBs από τα οποία τελικά καταλήγει σε εξωσώματα. **D:** Μετά την ενδοκύττωση ο δεσμευτής αποχωρίζεται από το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα, ενεργοποιείται με κάποια μεταμεταφραστική τροποποίηση και ξαναγυρίζει στη μεμβράνη έτοιμος για σηματοδότηση.

8. ΣΤΟΧΟΙ

Η έρευνα για τη σηματοδότηση Notch τα τελευταία χρόνια έχει εστιαστεί και στο κεφάλαιο της ρύθμισης της, με σημαντικές ανακαλύψεις όσον αφορά τη συμμετοχή πρωτεϊνών-κλειδιών σε αυτή τη διαδικασία και το ρόλο σημαντικών μηχανισμών όπως είναι η ενδοκύττωση και η ουβικουιτινυλίωση.

Στόχος της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής ήταν η αποσαφήνιση του ρόλου της ουβικουιτινυλίωσης και της ενδοκύττωσης του δεσμευτή D1 κατά τη σηματοδότηση Notch. Τα επιμέρους βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν:

- Μελέτη του ενδοκυττάριου τμήματος της πρωτεΐνης D1 με στόχο τον εντοπισμό των περιοχών που ευθύνονται για την αλληλεπίδραση της με τις E3 λιγάσες ουβικουιτίνης Neur και Mib1.
- Μελέτη της ικανότητας της πρωτεΐνης D1 να ουβικουιτινυλιώνεται από τις λιγάσες ουβικουιτίνης Neur και Mib1 και εντοπισμός των περιοχών-στόχων ουβικουιτινυλίωσης πάνω στην πρωτεΐνη D1.
- Μελέτη της σχέσης μεταξύ της ουβικουιτινυλίωσης του D1 και της ικανότητας του για σηματοδότηση.
- Μελέτη της σχέσης μεταξύ της ουβικουιτινυλίωσης του D1 και της ενδοκύττωσης του.

2. Υλικά και Μέθοδοι

1. Παροδική διαμόλυνση κυττάρων S2

Η υπερέκφραση πρωτεϊνών σε καλλιέργειες κυττάρων S2 έγινε μέσω παροδικής διαμόλυνσης με τη μέθοδο της δημιουργίας ιζήματος φωσφορικού ασβεστίου.

Αναλυτικότερα:

- Μια μέρα πριν τη διαμόλυνση τα κύτταρα συλλέγονται, φυγοκεντρούνται και προσδιορίζεται η συγκέντρωσή τους σε αιμοκυτταρόμετρο.
- Τα κύτταρα αραιώνονται κατάλληλα ώστε η τελική συγκέντρωσή τους να είναι 10^6 κύτταρα/ml θρεπτικού μέσου.
- Τα κύτταρα μοιράζονται σε πηγάδια τριβλίου. Η ποσότητα των κυττάρων εξαρτάται από το μέγεθος των πηγαδιών.
- Για τη διαμόλυνση ετοιμάζεται το κατάλληλο μίγμα πλασμιδίων. Για 2.5×10^6 κύτταρα, το σύνολο του πλασμιδιακού μίγματος είναι 5μg σε όγκο 112.5μl.
- Κατόπιν προστίθενται 12.5μl διαλύματος 2,5M CaCl_2
- Το μίγμα ανακατεύεται και προστίθεται στάγδην σε 125μl διαλύματος 2x HBS (50μM HEPES, 280mM NaCl, 10mM KCl, 1.5mM Na_2HPO_4)
- Επώση του μίγματος για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και προσθήκη του στα κύτταρα.

Πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης:

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την παροδική διαμόλυνση είναι τα ακόλουθα:

pIZ-DIV5His (Bland et al., 2003), pIZ-Dli1V5His, pIZ-Dli2V5His, pIZ-Dli1/2V5His, pIZ-Dli3V5His (this work) και pIZ-DIΔCV5His (A. Delwig and M. D. Rand, unpublished) για την έκφραση των πρωτεϊνών DI, Dli1, Dli2, Dli1/2, Dli3 και DIΔC αντίστοιχα, και pUAST-neurΔRGFP (Pavlopoulos et al., 2001) και pUAST-HMmibΔR (Lai et al., 2005) για την έκφραση των πρωτεϊνών NeurΔRGFP και HMmib1ΔR αντίστοιχα.

Πειράματα ουβικουιτινυλίωσης:

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την παροδική διαμόλυνση είναι τα ακόλουθα:

pIZ-DIV5His (Bland et al., 2003), pIZ-Dli1V5His, pIZ-Dli2V5His, pIZ-Dli1/2V5His, pIZ-Dli3V5His (this work) και pIZ-DIΔCV5His (A. Delwig and M. D. Rand, unpublished) για την έκφραση των πρωτεϊνών DI, Dli1, Dli2, Dli1/2, Dli3 και DIΔC

αντίστοιχα, και pUAST-EGFP_{neur} (Pitsouli and Delidakis, 2005) και pUAST-HMMib1 (Lai et al., 2005) για την έκφραση των πρωτεϊνών EGFP_{Neur} και HMMib1 αντίστοιχα. Για την υπερέκφραση της Xpress-Ubiquitin χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο Ract-XpressUb (this work).

5 ώρες πριν τη λύση των κυττάρων γίνεται προσθήκη 100μM E64, αναστολέα του λυσοσώματος (Rock et al., 1994).

Και στις δύο κατηγορίες πειραμάτων η έκφραση των πλασμιδίων pUAST επιτυγχάνεται από την παρουσία του πλασμιδίου pMt-Gal4 και με επαγωγή με 0.7mM CuSO₄. Τα κύτταρα συλλέγονται μετά από επαγωγή 16 ωρών.

2. Συνανοσοκατακρήμνιση

Η μέθοδος της συνανοσοκατακρήμνισης χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης DI και των πρωτεϊνών NeurΔRGFP και HMMib1ΔR.

- 5x10⁶ S2 διαμολυσμένα κύτταρα ξεπλένονται 2 φορές με 1x PBS και λύνονται σε 500μl διάλυμα λύσης (300mM NaCl, 50mM Tris-Cl, pH8.0, 0.5% NP-40, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂ και αναστολείς πρωτεασών*) με τη μέθοδο της ψύξης (ξηρός πάγος/ αιθανόλη ή -80⁰C)/ θέρμανσης (37⁰C) για τρεις φορές.
- Φυγοκέντρηση στις 13000rpm, για 30 λεπτά, στους 4⁰C και διατήρηση του υπερκειμένου.
- Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας αντισώματος στο υπερκείμενο και επώαση για 4 ώρες στους 4⁰C.
- Προσθήκη 50μl σφαιριδίων σεφαρόζης πρωτεΐνης A και επώαση για 4 ώρες στους 4⁰C.
- Φυγοκέντρηση στις 3000rpm για 1min και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
- 3 πλύσεις των σφαιριδίων με το διάλυμα λύσης, προσθήκη 60μl διαλύματος Laemmli και διατήρηση στους -80⁰C.

*Αναστολείς πρωτεασών: 1μg/ml leupeptin, 1μg/ml aprotinin, 1μg/ml pepstatin, 100 μg/ml PMSF.

3. Ουβικουιτινυλίωση

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη πιθανής ουβικουιτινυλίωσης της πρωτεΐνης DI και των μεταλλαγμάτων της από τις λιγάσες ουβικουιτίνης Neur και Mib1.

- 5×10^6 S2 διαμολυσμένα κύτταρα ξεπλένονται 2 φορές με 1x PBS και λύνονται σε 700μl διάλυμα λύσης (50mM NaH_2PO_4 , 300mM NaCl, 8M Urea, 0.2% Triton-X100, pH8.0 συμπεριλαμβανομένου 10mM N-ethylmaleimide, 1mM E64 και 1mM PMSF) με τη μέθοδο της ψύξης (ξηρός πάγος/ αιθανόλη ή -80°C)/ θέρμανσης (37°C) για τρεις φορές.
- Φυγοκέντρωση στις 13000rpm για 30 λεπτά στους 4°C και διατήρηση του υπερκείμενου.
- Προσθήκη 50μl σφαιριδίων Ni-TED και επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- 2 πλύσεις των σφαιριδίων με το διάλυμα λύσης και 2 πλύσεις των σφαιριδίων με το διάλυμα λύσης χωρίς την παρουσία ουρίας.
- Προσθήκη 60μl διαλύματος Laemmli και διατήρηση στους -80°C .

4. Ανάλυση Western

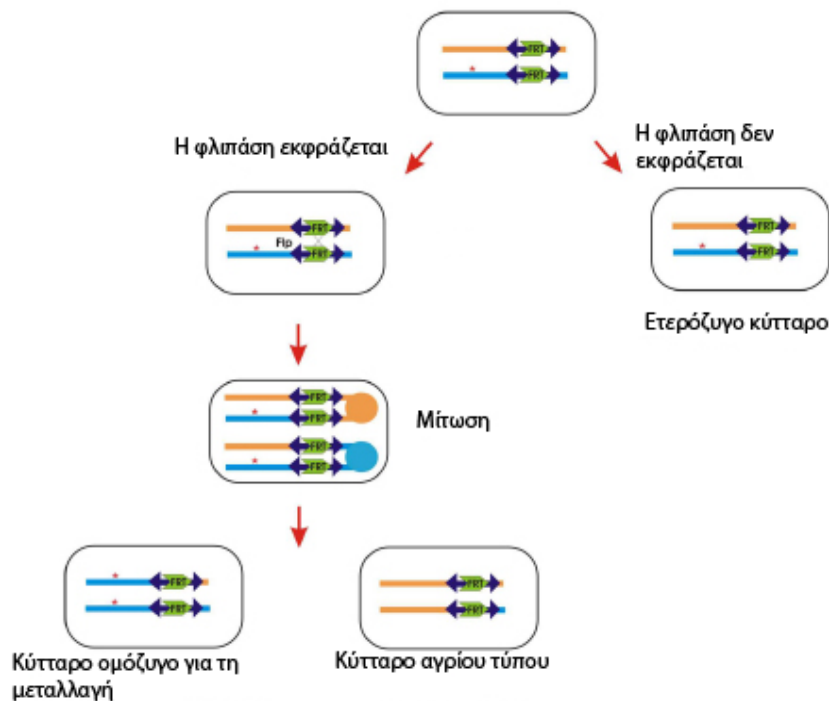
- Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που προέρχονται από διαδικασίες όπως η λύση των κυττάρων S2 ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης κατάλληλης πυκνότητας, στα 100V, σε θερμοκρασία δωματίου. Διάλυμα ηλεκτροφόρησης: 25mM Tris, 192mM glycine, 0.1% SDS).
- Ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στους 4°C , στα 100V για 1 ώρα. Διάλυμα μεταφοράς: 25mM Tris, 192mM glycine, 0.01% SDS, 20% methanol. Η επιτυχία της μεταφοράς διαπιστώνεται με τη χρώση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη με διάλυμα PonceauS.
- Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση με 5% γάλα σε TTBS διάλυμα (20mM Tris-Cl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.3% Tween-20) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επώαση με το εκάστοτε πρώτο αντίσωμα στους 4°C για 16 ώρες.
- Ακολουθούν 3 πλύσεις των 10 λεπτών με TTBS και επώαση με το δεύτερο αντίσωμα για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

- Ακολουθούν 3 πλύσεις των 10 λεπτών με TTBS και εμφάνιση σε φιλμ με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας.

5. Γενετική ανάλυση

5.1 Σύστημα μιτωτικών κλώνων FLP/FRT

Ο μιτωτικός ανασυνδυασμός επιτυγχάνεται με τη χρήση της πρωτεΐνης FLP η οποία ανασυνδυάζει συγκεκριμένες αλληλουχίες στόχους (FRTs: **F**lipase **R**ecognition **T**argets). Αναλυτικότερα, η FLP βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο θερμοεπαγόμενου υποκινητή. Μετά την θερμοεπαγωγή και την έκφραση της, η πρωτεΐνη αυτή ανασυνδυάζει τα FRTs. Σε κάθε περίπτωση, ένα ετερόζυγο άτομο φέρει μεταλλαγή σε επιθυμητό γονίδιο το οποίο βρίσκεται άπω ενός FRT. Με αυτό τον τρόπο, μετά τον ανασυνδυασμό προκύπτουν δύο κύτταρα το ένα εκ των οποίων φέρει τη μεταλλαγή σε ομοζυγωτία και το άλλο δύο αλληλόμορφα αγρίου τύπου (Harrison and Perrimon, 1993).

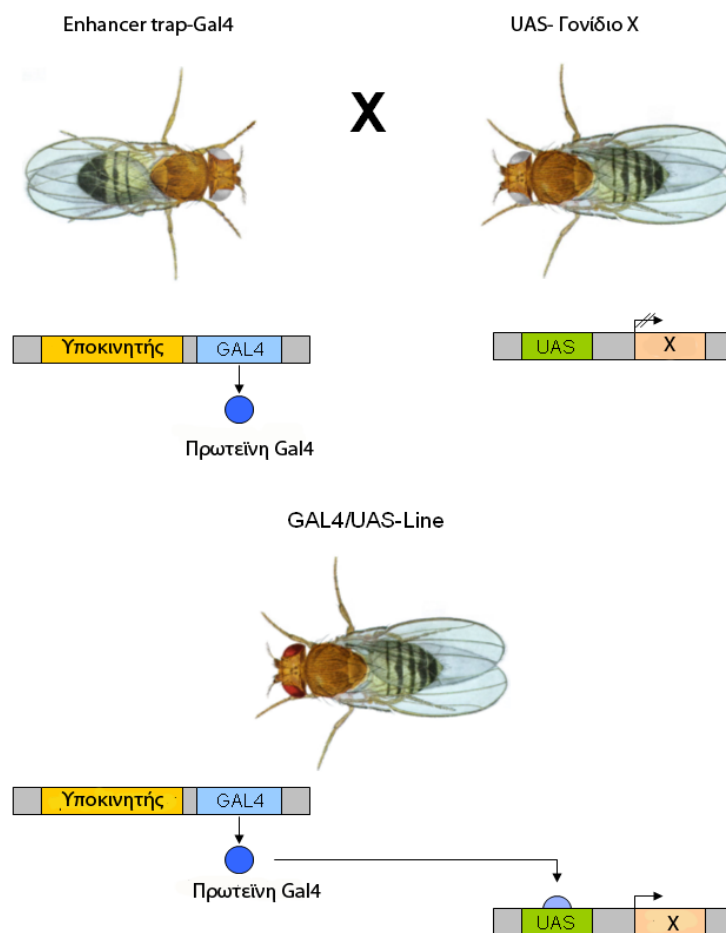


Εικόνα 2.1: Το σύστημα μιτωτικών κλώνων FLP/FRT.

Ένα ετερόζυγο άτομο φέρει την επιθυμητή μεταλλαγή γονιδίου (*) δίπλα σε ένα FRT. Με την υπερέκφραση της φλιπάσης επιτυγχάνεται ανασυνδυασμός ανάμεσα στα FRTs και προκύπτουν δύο κύτταρα, ένα εκ των οποίων φέρει τη μεταλλαγή σε ομοζυγωτία και το άλλο είναι αγρίου τύπου.

5.2 Σύστημα εκτοπικής υπερέκφρασης UAS-Gal4

Για την εκτοπική υπερέκφραση πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το σύστημα UAS-Gal4. Τα διαγονίδια που υπερεκφράζονται φέρουν τη ρυθμιστική αλληλουχία UAS, η οποία αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη Gal4 που επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου. Η πρωτεΐνη Gal4 βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο ενός ιστοειδικού υποκινητή και με αυτό τον τρόπο το διαγονίδιο υπερεκφράζεται κάθε φορά μόνο σε ιστούς όπου ο υποκινητής της πρωτεΐνης Gal4 είναι ενεργός (Brand and Perrimon, 1993)

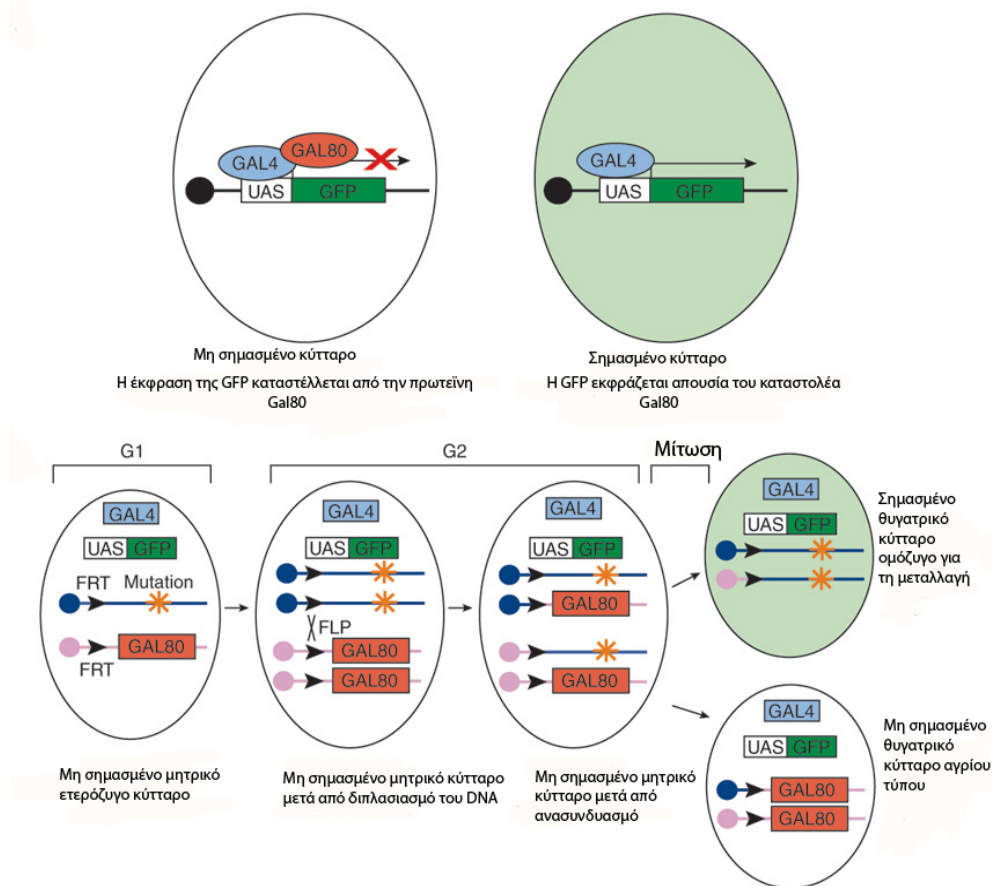


Εικόνα 2.2. Το σύστημα εκτοπικής έκφρασης Gal4-UAS

Ο ενεργοποιητής Gal4 βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο ενός ιστοειδικού υποκινητή. Με αυτό τον τρόπο το διαγονίδιο UAS εκφράζεται μόνο στο ειδικό πρότυπο του ενεργοποιητή Gal4.

5.3 Σύστημα MARCM

Με τη χρήση του συστήματος MARCM (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker), επιτυγχάνεται η δημιουργία μιτωτικών κλώνων και εκτοπικής υπερέκφρασης συγχρόνως. Σε αυτό το σύστημα κάθε κύτταρο διαθέτει τον καταστολέα της πρωτεΐνης Gal4, την πρωτεΐνη Gal80, εκφραζόμενη από συστατικό υποκινητή (α -tubulin) σε ετεροζυγωτία με την επιθυμητή μεταλλαγή και με τα δύο ομόλογα να φέρουν θέσεις FRT. Με αυτό τον τρόπο το διαγονίδιο δεν εκφράζεται παρά μόνο σε κύτταρα κλώνων όπου έχει συμβεί ο ανασυνδυασμός και τα οποία διαθέτουν την ομόζυγη επιθυμητή μεταλλαγή ενώ παράλληλα δεν έχουν τον καταστολέα Gal80. Οι κλώνοι μπορούν να σημανθούν θετικά με την έκφραση ενός διαγονιδίου UAS-GFP (Lee and Luo, 2001).



Nature protocols

Εικόνα 2.3: Το σύστημα MARCM

Στο ετερόζυγο για τη μεταλλαγή μητρικό κύτταρο, η έκφραση του διαγονιδίου από τον ενεργοποιητή Gal4 καταστέλλεται από την πρωτεΐνη Gal80. Με τον ανασυνδυασμό, ο καταστολέας Gal80

διαχωρίζεται από το κύτταρο που φέρει τη μεταλλαγή, οπότε στο ομόζυγο μεταλλαγμένο κύτταρο ο ενεργοποιητής Gal4 είναι ελεύθερος να επάγει το διαγονίδιο UAS. Οι κλώνοι αυτοί μπορούν να σημειωθούν θετικά από την έκφραση ενός διαγονιδίου *UAS-GFP*.

5.4 Στελέχη Δροσόφιλας που χρησιμοποιήθηκαν

UAS σειρές:

UAS-DIV5His (Pitsouli and Delidakis, 2005)

UAS-EGFP-neur (Pitsouli and Delidakis, 2005)

UAS-Dli1V5His (this work)

UAS-Dli2V5His (this work)

UAS-Dli1/2V5His (this work)

UAS-DliΔCV5His (this work)

UAS-Dli1V5His (this work)

UAS-DIK742R (this work)

UAS-DI-LDL+ (Wang and Struhl, 2004)

UAS-DIΔICD (Wang and Struhl, 2004)

Gal4 σειρές:

ptc-Gal4 (Bloomington Drosophila Stock Center)

hsFlp;act>CD2stop>Gal4 (Bloomington Drosophila Stock Center)

Eq-Gal4 (Pi et al., 2001)

Το σύστημα MARCM χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία θετικά σημασμένων κλώνων. Για την υπερέκφραση της πρωτεΐνης DI ή μεταλλαγμάτων αυτής (DI*) με ταυτόχρονη απουσία των ενδογενών πρωτεϊνών DI και Ser χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω διασταύρωση:

y w hsFLP122 tubGal4 UAS-GFP-6xnl5; FRT82B tubGal80/ TM6B x
w; UAS-DI; FRT82B DI^{rev10} e Ser^{RX106}/T(2;3)SM5;TM6B*

Για την υπερέκφραση της πρωτεΐνης DI ή μεταλλαγμάτων αυτής (DI*) με ταυτόχρονη απουσία της ενδογενούς πρωτεΐνης Mindbomb χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω διασταύρωση:

y w hsFLP122 tubGal4 UAS-GFP-6xnl5; tubG80 FRT2A/ TM6B x
w; UAS-DI; mib^{EY9780} FRT2A/T(2;3) SM5;TM6B*

Οι μιτωτικοί κλώνοι επάγονται σε προνύμφες πρώτου ή δεύτερου σταδίου με θερμικό σοκ 37⁰C για 1 ώρα. Στην περίπτωση όμως των μιτωτικών κλώνων υπερέκφρασης με χρήση του στελέχους hsFlp;act>CD2stop>Gal4 το θερμικό σοκ διαρκεί για 12-13 λεπτά.

6. Ανοσοϊστοχημεία

6.1 Μονιμοποίηση προνυμφών

- Αρχικά συλλέγουμε προνύμφες τρίτου σταδίου και ακολουθεί ανατομία αυτών σε PBS διάλυμα (10x PBS: 1.3M NaCl, 0.07M Na₂HPO₄, 0.03M NaH₂PO₄).
- Μονιμοποίηση των προνυμφών σε διάλυμα PEM/4% FA για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
(2x διάλυμα PEM: 200mM Pipes, 2mM EGTA, 2mM MgCl₂, pH6.9)
- 3 πλύσεις με διάλυμα PBS.

6.2 Χρώσεις

- Οι προνύμφες μετά τη μονιμοποίηση επώάζονται σε διάλυμα PBT (1x PBS, 0.5% BSA, 0.2% TritonX-100) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επώαση με πρώτο αντίσωμα σε διάλυμα PBT για 16 ώρες, στους 4⁰C.
- Ακολουθούν 3 πλύσεις των 10 λεπτών με PT διάλυμα (1x PBS, 0.2% TritonX-100), σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επώαση με δεύτερο αντίσωμα σε διάλυμα PBT για 2 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθούν 3 πλύσεις των 10 λεπτών με PT διάλυμα (1x PBS, 0.2% TritonX-100), σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τοποθέτηση του ιστού σε αντικειμενοφόρο με διάλυμα 0.5% n-propyl-gallate σε 80% γλυκερόλη.

Σε πειράματα όπου μελετήθηκε η κατανομή των πρωτεϊνών στην κυτταρική επιφάνεια, χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα στα οποία δεν είχε συμπεριληφθεί το απορρυπαντικό Triton X-100. Επιπλέον η peripodial μεμβράνη των δίσκων του φτερού τραυματιζόταν ελαφρά με βελόνα ώστε να επιτραπεί η πρόσβαση των αντισωμάτων στην κορυφαία επιφάνεια του επιθηλίου.

7. Μελέτη της ενδοκύττωσης σε ιστούς προνύμφης

- Ανατομία προνυμφών τρίτου σταδίου και αφαίρεση των αναπτυξιακών δίσκων του φτερού σε θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιιεργειών M3 με 10% FBS, στους 4°C.
- Τραυματισμός των αναπτυξιακών δίσκων με βελόνα ώστε να καταστραφεί η peripodial μεμβράνη και να επιτραπεί η πρόσβαση του αντισώματος στην κορυφαία μεμβράνη του επιθηλίου.
- Επώαση των αναπτυξιακών δίσκων με το πρωτεΐον αντίσωμα σε M3 θρεπτικό μέσο για 30 λεπτά στον πάγο (τα πρωτεΐοντα αντισώματα στα πειράματα ενδοκύττωσης χρησιμοποιούνται 3-10 φορές πιο πυκνά από τις συμβατικές χρώσεις).
- Τρεις γρήγορες πλύσεις με θρεπτικό μέσο M3 στον πάγο.
- Επώαση των αναπτυξιακών δίσκων σε M3 θρεπτικό μέσο σε θερμοκρασία δωματίου για διάφορα χρονικά διαστήματα (Όσον αφορά την ενδοκύττωση της πρωτεΐνης Delta οι χρόνοι ήταν 0 έως 15 λεπτά).
Μονιμοποίηση των αναπτυξιακών δίσκων σε διάλυμα PEM/4% FA για 10 λεπτά στον πάγο (2x διάλυμα PEM: 200mM Pipes, 2mM EGTA, 2mM MgCl₂, pH6.9).
- Μονιμοποίηση των αναπτυξιακών δίσκων σε διάλυμα PEM/4% FA για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 1 πλύση με διάλυμα PBS (10x PBS: 1.3M NaCl, 0.07M Na₂HPO₄, 0.03M NaH₂PO₄).
- 3 πλύσεις με διάλυμα PT (1x PBS, 0.2% TritonX-100).
- Επώαση με πρωτεΐον αντίσωμα σε διάλυμα PBT (1x PBS, 0.5% BSA, 0.2% TritonX-100), για 16 ώρες στους 4°C.
- Ακολουθούν 3 πλύσεις των 10 λεπτών με PT διάλυμα (1x PBS, 0.2% TritonX-100), σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επώαση με δεύτερο αντίσωμα σε διάλυμα PBT για 2 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθούν 3 πλύσεις των 10 λεπτών με PT διάλυμα.
- Τοποθέτηση του ιστού σε αντικειμενοφόρο με διάλυμα 0.5% n-propyl-gallate σε 80% γλυκερόλη.

8. Μικροσκοπία

Για την απόκτηση εικόνων ανοσοϊστοχημικών χρώσεων με φθορίζοντα αντισώματα χρησιμοποιήθηκε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica SP2 με αντικειμενικούς φακούς 20x/0.7, 40x/1.25 ή 63x/1.4.

9. Ανάλυση εικόνων

Για να βρεθούν τα ποσοστά συνεντοπισμού μεταξύ των κυστιδίων που περιέχουν τις πρωτεΐνες D1 και αυτών που έχουν τους ενδοσωμικούς δείκτες, χρησιμοποιήθηκε ένα υπολογιστικό πρόγραμμα που δημιουργήθηκε μέσω Matlab (Γιώργος Τσιμπίδης). Το πρόγραμμα αυτό αναγνώριζε τα κυστίδια που ήταν θετικά με πρωτεΐνη D1, με ενδοσωμικό δείκτη ή και με τα δύο. Ως αντικείμενα ορίστηκαν τουλάχιστον 4 συνεχόμενα square-pixels ($0.1 \mu\text{m}^2$). Το κατώφλι της έντασης ρυθμιζόταν ανάλογα με την ποιότητα της χρώσης και ήταν 38-77 για D1, 38-51 για Rab11, 28-77 για Sara και 38-77 για Hrs. Από την ανάλυση εξαιρέθηκαν η κορυφαία και η βασική μεμβράνη των κυττάρων λόγω υπερσυσσώρευσης σήματος που καθιστούσε αδύνατες τις μετρήσεις. Γι αυτό το λόγο, ο συνεντοπισμός των πρωτεϊνών D1 με τους ενδοσωμικούς δείκτες Rab11 και Sara ίσως είναι υποτιμημένος επειδή και οι δύο τελευταίοι συσσωρεύονταν στην κορυφαία μεμβράνη. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ αγρίου τύπου πρωτεΐνης και μεταλλαγμάτων οριζόταν από το Fisher's exact test (<http://udel.edu/~mcdonald/statfishers.html>). Για όλες τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν τουλάχιστον 11 τομές από κάθε ιστό και μετρήθηκαν τουλάχιστον 100 κηλίδες. Για τη δημιουργία των οπτικών τομών χρησιμοποιήθηκε το συνεστιακό μικροσκόπιο Leica SP2, με 63x φακό και 3x zoom, σε XZ mode ώστε να απεικονίζεται το συνολικό ύψος του επιθηλίου σε κάθε τομή. Για τα πειράματα μέτρησης του ρυθμού ενδοκύττωσης των πρωτεϊνών D1 χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος τρόπος ανάλυσης.

10. Αντισώματα

10.1 Πρωτεύοντα αντισώματα και προέλευση τους

Αντίσωμα	Προέλευση
Mouse anti-V5	Invitrogen
Mouse anti-Xpress	Invitrogen
Mouse anti-Notch C458.2H (εξωκυττάριος επίτοπος)	DSHB (Diederich et al., 1994)
Mouse anti-Notch C17.9C6 (ενδοκυττάριος επίτοπος)	SAT (Fehon et al., 1990)
Mouse anti-Wg 4D4	DSHB (Brook and Cohen, 1996)
Mouse anti-Arm N2 7A1	DSHB (Riggleman et al., 1990)
Mouse anti-Dl C594.9B (εξωκυττάριος επίτοπος)	SAT (Qi et al., 1999)
Mouse anti-Dlg 4F3	DSHB
Guinea pig anti-Dl 581 (ενδοκυττάριος επίτοπος)	Huppert et al., 1997
Guinea pig anti-Senseless	Nolo et al., 2000
Guinea pig anti-HrsFL	H. Bellen (Lloyd et al., 2002)
Rabbit anti-Neur	Pitsouli and Delidakis, 2005
Rabbit anti-myc epitope	Santa Cruz
Rabbit anti-Sara	M. González-Gaitán (Bikel et al., 2006)
Rat anti-Rab11	R. Cohen (Dollar et al., 2002)
Rat anti-E cadherin	DSHB

10.2 Δευτερεύοντα αντισώματα και προέλευση τους

Αντίσωμα	Προέλευση
Donkey anti-mouse HRP	Jackson Immunoresearch
Goat anti-rabbit-HRP	Jackson Immunoresearch
Goat anti-mouse Alexa 555	Invitrogen/ Molecular Probes
Goat anti-mouse Alexa 568	Invitrogen/ Molecular Probes
Goat anti-mouse Alexa 647	Invitrogen/ Molecular Probes
Goat anti-mouse Alexa 488	Invitrogen/ Molecular Probes
Goat anti-rabbit Alexa 488	Invitrogen/ Molecular Probes
Goat anti-rabbit Cy3	Jackson Immunoresearch
Goat anti-guinea pig Alexa 488	Invitrogen/ Molecular Probes
Goat anti-guinea pig Alexa 555	Invitrogen/ Molecular Probes
Goat anti-guinea pig Alexa 647	Invitrogen/ Molecular Probes
Goat anti-rat Alexa 555	Jackson Immunoresearch

11. RNAi

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για να επιτευχθεί καταστολή επιλεγμένων γονιδίων μέσω αποικοδόμησης του mRNA. Δημιουργούνται δίκλινα RNA από μεταγραφή τμημάτων γονιδίων, τα οποία όταν εισαχθούν στα κύτταρα κόβονται σε μικρά τμήματα των 20-21 νουκλεοτιδίων. Αυτά τα τμήματα RNA, αφού μετατραπούν σε μονόκλινα, αναγνωρίζουν και προσκολλώνται στο ενδογενές mRNA, προκαλώντας την αποικοδόμηση του. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την καταστολή των γονιδίων *neuralized* και *mindbomb* σε καλλιέργειες κυττάρων S2.

- Επιλέγεται μια περιοχή του γονιδίου από 300-700 βάσεις και κλωνοποιείται σε πλασμιδιακό φορέα pBS μεταξύ των υποκινητών T3 και T7.
- Ο πλασμιδιακός φορέας pBS που φέρει το επιλεγμένο τμήμα του γονιδίου μεταξύ των υποκινητών γίνεται γραμμικός με περιοριστικές πέψεις έτσι ώστε να καταλήξουμε με δύο εκμαγεία: Το ένα θα οδηγήσει τη μεταγραφή του sense RNA από τον ένα υποκινητή και το άλλο του antisense RNA από τον δεύτερο υποκινητή.
- Ακολουθούν δύο *in vitro* αντιδράσεις μεταγραφής χρησιμοποιώντας το Megascript kit της Ambion. Η μία οδηγεί σε μεταγραφή του τμήματος γονιδίου από την T3 και η άλλη από την T7 πολυμεράση. Κατά την αντίδραση προστίθενται κατάλληλες ποσότητες πλασμιδιακού φορέα, rNTPs και T3 ή T7 πολυμεράσης. Η αντίδραση γίνεται για 4h, στους 37⁰C.
- Στη συνέχεια απομονώνεται το RNA με τη χρήση φαινόλης/χλωροφορμίου και κατακρήμνισης με ισοπροπανόλη. Επαναδιαλύουμε σε H₂O.
- Το μονόκλωνο RNA από κάθε αντίδραση θα χρησιμοποιηθεί για να παραχθεί το δίκλωνο RNA. Ίσες ποσότητες των sense και antisense RNA τοποθετούνται σε δοχείο με νερό θερμοκρασίας 90⁰C. Καθώς το νερό σταδιακά ψύχεται τα μονόκλιωνα RNAs ενώνονται για να δημιουργήσουν το δίκλωνο. Η διαδικασία έχει ολοκληρωθεί όταν το νερό έχει πλησιάσει τους 40⁰C.
- 1x10⁶ κύτταρα S2 φυγοκεντρώνονται σε M3 θρεπτικό μέσο χωρίς ορό και τοποθετούνται σε πηγάδι από πιάτο των 6 πηγαδιών (1x10⁶ κύτταρα/1ml θρεπτικού).
- Ακολουθεί επώαση των κυττάρων με 15μg dsRNA σε H₂O, για 30min, στους 25⁰C.
- Προσθήκη 2ml θρεπτικού μέσου το οποίο περιέχει 10% FBS και επώαση των κυττάρων για 72 ώρες, στους 25⁰C.
- Τα κύτταρα συλλέγονται και λύνονται σε 500μl διάλυμα λύσης (300mM NaCl, 50mM Tris-Cl, pH8.0, 0.5% NP-40, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂ και αναστολείς πρωτεασών*) με τη μέθοδο της ψύξης (ξηρός πάγος/ αιθανόλη ή -80⁰C)/ θέρμανσης (37⁰C) για τρεις φορές.
- Φυγοκέντρωση στις 13000rpm, για 30 λεπτά, στους 4⁰C και διατήρηση του υπερκειμένου.

*Αναστολείς πρωτεασών: 1μg/ml leupeptin, 1μg/ml aprotinin, 1μg/ml pepstatin, 100 μg/ml PMSF.

12. Πλασμιδιακές κατασκευές

12.1 pIZDI*V5His ελλειμματικά μεταλλάγματα

pIZDli1V5His

Στο συγκεκριμένο μετάλλαγμα της πρωτεΐνης Delta απουσιάζουν τα αμινοξέα DDAEARKQNEQN από την καρβοξυτελική της περιοχή. Για τη δημιουργία αυτού του μεταλλάγματος έγιναν δύο αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης στο πλασμίδιο pIZDIV5His (Bland et al., 2003) και χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές

5' ATGAGATCTACTCCTGCGATGCC 3' (ως forward primer)

5' ATGGATCCCTTTTCCTGAGCACGCTTACG 3' (ως reverse primer)

και

5' ATGGATCCGCGGTGGCCACAATGC 3' (ως forward primer)

5' GGTACGCGTAGAATCGAGACCGAG 3' (ως reverse primer)

Τα δύο προϊόντα που δημιουργήθηκαν από τις αντιδράσεις ενώθηκαν μέσω του ενζύμου BamH1, θέσεις αναγνώρισης του οποίου φέρουν οι δύο εσωτερικοί εκκινητές. Το τεμάχιο ενώθηκε με τον πλασμιδιακό φορέα pIZ-DIV5His ο οποίος προηγουμένως είχε υποστεί πέψη με BglII/MluI (τις θέσεις αναγνώρισης αυτών των ενζύμων φέρουν οι εξωτερικοί εκκινητές). Συνεπώς σε αυτό το μετάλλαγμα αντί αυτών των αμινοξέων έχει προστεθεί ένα κατάλοιπο γλυκίνης και ένα σερίνης.

pIZDli2V5His

Στο συγκεκριμένο μετάλλαγμα της πρωτεΐνης Delta απουσιάζουν τα αμινοξέα IKNTWDKSYNNT από την καρβοξυτελική της περιοχή. Για τη δημιουργία αυτού του μεταλλάγματος έγιναν δύο αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης στο πλασμίδιο pIZDIV5His (Bland et al., 2003) και χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές

5' ATGAGATCTACTCCTGCGATGCC 3' (ως forward primer)

5' ATGGATCCGATATTCGGGTTGCCGCC 3' (ως reverse primer)

και

5' ATGGATCCTGTGCCTCAGCAGCAGC 3' (ως forward primer)

5' GGTACGCGTAGAATCGAGACCGAG 3' (ως reverse primer)

Τα δύο προϊόντα που δημιουργήθηκαν από τις αντιδράσεις ενώθηκαν μέσω του ενζύμου BamH1, θέσεις αναγνώρισης του οποίου φέρουν οι δύο εσωτερικοί

εκκινητές. Το τεμάχιο ενώθηκε με τον πλασμιδιακό φορέα pIZ-DIV5His ο οποίος προηγουμένως είχε υποστεί πέψη με BglII/MluI (τις θέσεις αναγνώρισης αυτών των ενζύμων φέρουν οι εξωτερικοί εκκινητές). Συνεπώς σε αυτό το μετάλλαγμα αντί αυτών των αμινοξέων έχει προστεθεί ένα κατάλοιπο γλυκίνης και ένα σερίνης.

pIZDli3V5His

Στο συγκεκριμένο μετάλλαγμα της πρωτεΐνης Delta απουσιάζουν τα αμινοξέα KQLNTD από την καρβοξυτελική της περιοχή. Για τη δημιουργία αυτού του μεταλλάγματος έγιναν δύο αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης στο πλασμίδιο pIZDIV5His (Bland et al., 2003) και χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές

5' ATGAGATCTACTCCTGCGATGCC 3' (ως forward primer)

5' ATGGATCCTTGCGACTTGGCTCTTTGTAG 3' (ως reverse primer)

και

5' ATGGATCCCCACGCTCATGCACCG 3' (ως forward primer)

5' GGTACGCGTAGAATCGAGACCGAG 3' (ως reverse primer)

Τα δύο προϊόντα που δημιουργήθηκαν από τις αντιδράσεις ενώθηκαν μέσω του ενζύμου BamHI, θέσεις αναγνώρισης του οποίου φέρουν οι δύο εσωτερικοί εκκινητές. Το τεμάχιο ενώθηκε με τον πλασμιδιακό φορέα pIZ-DIV5His ο οποίος προηγουμένως είχε υποστεί πέψη με BglII/MluI (τις θέσεις αναγνώρισης αυτών των ενζύμων φέρουν οι εξωτερικοί εκκινητές). Συνεπώς σε αυτό το μετάλλαγμα αντί αυτών των αμινοξέων έχει προστεθεί ένα κατάλοιπο γλυκίνης και ένα σερίνης.

pIZDli1/2V5His

Στο συγκεκριμένο μετάλλαγμα της πρωτεΐνης Delta απουσιάζουν τα αμινοξέα DDAEARKQNEQN και IKNTWDKSYNNT από την καρβοξυτελική της περιοχή. Για τη δημιουργία αυτού του μεταλλάγματος έγινε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης στο πλασμίδιο pIZDli2V5His και χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές

5' ATAGATCTGCGGTGGCCACAATGC 3' (ως forward primer)

5' GGTACGCGTAGAATCGAGACCGAG 3' (ως reverse primer)

Το προϊόν που δημιουργήθηκε από την αντίδραση αυτή ενώθηκε με το προϊόν της πρώτης αντίδρασης που έγινε για το μετάλλαγμα Dli1. Το τεμάχιο ενώθηκε με τον πλασμιδιακό φορέα pIZ-DIV5His ο οποίος προηγουμένως είχε υποστεί πέψη με BglII/MluI (τις θέσεις αναγνώρισης αυτών των ενζύμων φέρουν οι εξωτερικοί εκκινητές).

12.2 pUASTDI*V5His

Στα πλασμίδια pIZDI*V5His έγιναν περιοριστικές πέψεις με τα ένζυμα EcoRI/DraI. Τα τεμάχια που δημιουργήθηκαν κλωνοποιήθηκαν σε EcoRI/XhoI (μετά από Klenow fill-in) θέσεις του pUAST.

12.3 pIZDI*V5His σημειακά μεταλλάγματα

Για τη μεταφορά των σημειακά μεταλλαγμένων DI γονιδίων από το pExpUAS πλασμίδιο (τα οποία μας παρασχέθηκαν κλωνοποιημένα από τους N. Shalaby και M. A.T. Muskavitch, Boston college) στο pIZ-V5His πλασμίδιο ακολούθησε η παρακάτω διαδικασία: Αρχικά έγινε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης στα pExpUAS-DI* πλασμίδια και χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές

5' ATGAGATCTACTCCTGCGATGCC 3' (ως forward primer)

5' AGGTCTAGACTCATATGCGGAGTGC 3' (ως reverse primer)

Το τεμάχιο ενώθηκε με τον πλασμιδιακό φορέα pIZ-DIV5His ο οποίος προηγουμένως είχε υποστεί πέψη με BglII/XbaI (τις θέσεις αναγνώρισης αυτών των ενζύμων φέρουν οι εκκινητές).

12.4 RactHisXpress-Ubiquitin

Το τεμάχιο PSTI/ScaI που προήλθε από το πλασμίδιο pCIHisXpress-Ubiquitin ενώθηκε με τις θέσεις HincII/PSTI του πλασμιδίου RactHAdh (Swevers et al., 1996).

12.5 RactXpress-Ubiquitin

Το τεμάχιο NheI του πλασμιδίου RactHisXpress-Ubiquitin, μετά από klenow fill-in, ενώθηκε στη θέση HincII του πλασμιδίου RactHAdh.

12.6 Πλασμιδιακές κατασκευές για RNAi

pBlu2KSM neur568

Η κατασκευή αυτή δημιουργήθηκε για να χρησιμοποιηθούν 568 βάσεις του *neur* γονιδίου για *in vitro* μεταγραφή και εν συνεχεία για τη διεξαγωγή RNAi (βάσεις 174-742 από το γονίδιο του *neur*). Το γονίδιο *neur* είχε υποστεί πέψη με DraI και είχε εισαχθεί στον πλασμιδιακό φορέα pBlu2KSM στην θέση EcoRV. Η κατασκευή αυτή

υπέστη πέψη με NcoI/EcoRV και απομονώθηκε το τεμάχιο του γονιδίου *neur* των 568 βάσεων. Το τεμάχιο (μετά από *klenow-fill in*) κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα pBlu2KSM, ο οποίος είχε υποστεί πέψη με SmaI. Για την διεξαγωγή της *in vitro* μεταγραφής, ο πλασμιδιακός φορέας έγινε γραμμικός με τα περιοριστικά ένζυμα HindIII και BamHI, ώστε να μεταγραφεί από την T7 και T3 πολυμεράση αντίστοιχα.

pBlu2KSM neur797

Η κατασκευή αυτή επίσης δημιουργήθηκε για να χρησιμοποιηθούν 797 βάσεις του *neur* γονιδίου για *in vitro* μεταγραφή και τη διεξαγωγή RNAi. Η κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα με το γονίδιο *neur* υπέστη πέψη με BamHI/EcoRV και απομονώθηκε το τεμάχιο του γονιδίου *neur* των 797 βάσεων (βάσεις 3016-4190 από την πλασμιδιακή κατασκευή pUAST-*neur*). Αυτό το τεμάχιο κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα pBlu2KSM ο οποίος είχε υποστεί πέψη με SmaI/BamHI. Για την διεξαγωγή της *in vitro* μεταγραφής, ο πλασμιδιακός φορέας έγινε γραμμικός με τα περιοριστικά ένζυμα HindIII και BamHI, ώστε να μεταγραφεί από την T7 και T3 πολυμεράση αντίστοιχα. Χρησιμοποιήθηκαν δύο πλασμιδιακές κατασκευές για τη διαδικασία του RNAi επειδή υπήρχε αμφιβολία για τον κατάλληλο αριθμό βάσεων που έπρεπε να έχει το μετάγραφο.

pBlu2KSM mib710

Η κατασκευή αυτή δημιουργήθηκε για να χρησιμοποιηθούν 710 βάσεις του *mib1* γονιδίου για *in vitro* μεταγραφή και εν συνεχεία για τη διεξαγωγή RNAi. Η πλασμιδιακή κατασκευή pBlu2KSMmibexon2 υπέστη πέψη με PstI και απομονώθηκε το τεμάχιο των 710 βάσεων (βάσεις 706-1416 του δεύτερου εξωνίου του γονιδίου *mib1*), το οποίο κλωνοποιήθηκε σε pBlu2KSM, ο οποίος είχε υποστεί πέψη με PstI. Για την διεξαγωγή της *in vitro* μεταγραφής, ο πλασμιδιακός φορέας έγινε γραμμικός με τα περιοριστικά ένζυμα HindIII και BamHI, ώστε να μεταγραφεί από την T7 και T3 πολυμεράση αντίστοιχα.

13. Στελέχη βακτηρίων και θρεπτικά υλικά

Για τη διαδικασία πολλαπλασιασμού πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια *Escherichia coli* στελέχους DH5a. Το υγρό θρεπτικό μέσο, Luria-Bertani, αποτελείται από 10% τρυπτόνη, 5% εκχύλισμα ζύμης και 10% NaCl, pH 7. Το στερεό θρεπτικό μέσο περιέχει επιπλέον 15% άγαρ.

14. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μικρής κλίμακας καλλιέργεια

- Μόλυνση καλλιεργειών LB παρουσίας του κατάλληλου αντιβιοτικού με βακτηριακό στέλεχος.
- Επώαση της καλλιέργειας στους 37°C για 12-16 ώρες.
- Φυγοκέντρηση της καλλιέργειας στις 12.000rpm, για 1 λεπτό και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 200μl διαλύματος 1 (50mM γλυκόζη, 25mM Tris-Cl, 10mM EDTA, pH 8).
- Προσθήκη 200μl διαλύματος 2 (0,2N NaOH, 1% SDS) και επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη 200μl κρύου διαλύματος 3 (3M CH₃COOK, 11,5% CH₃COOH) και επώαση στον πάγο για 5 λεπτά.
- Προσθήκη 150μl χλωροφορμίου και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά.
- Το υπερκείμενο αναμιγνύεται με 2.5 όγκους απόλυτης αιθανόλης και φυγοκεντρείται στις 13000rpm, στους 4°C για 30 λεπτά.
- Ακολουθεί πλύση του ιζήματος με 1ml 70% αιθανόλης και φυγοκέντρηση στις 13000rpm, στους 4°C για 10 λεπτά.
- Επαναδιάλυση του DNA.

15. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μεσαίας κλίμακας καλλιέργεια

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA έγινε με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης ακολουθούμενη από χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής. Για τον σκοπό χρησιμοποιήθηκαν τα tip 100 (QIAGEN) και Nucleobond Xtra Midi kit (Machery-Nagel), ακολουθώντας τα πρωτόκολλα τους.

3. Αποτελέσματα I

Βιοχημικές αναλύσεις των μεταλλαχμάτων
DL

Συντηρημένες περιοχές στο ενδοκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης Delta

Αντιθέτως με τις εξωκυττάριας περιοχές των DSL πρωτεϊνών, οι ενδοκυττάριας έχουν μικρό βαθμό συντήρησης. Μελετώντας τις ενδοκυττάριας περιοχές των DSL πρωτεϊνών DI και Ser στη *Drosophila melanogaster*, βρέθηκαν 3 συντηρημένα μοτίβα. Δύο από αυτά περιέχουν κατάλοιπα ασπαραγίνης, ένα σε κάθε πρωτεΐνη και ένα μοτίβο διλευκίνης στην πρωτεΐνη Ser. Στην πρωτεΐνη Ser, το μοτίβο ασπαραγίνης συμμετέχει στην αλληλεπίδραση του δεσμευτή με τις δύο λιγάσες ουβικουιτίνης Neuralized και Mindbomb1, ενώ το ίδιο μοτίβο στην πρωτεΐνη DI μεσολαβεί για την αλληλεπίδραση με τη λιγάση Neuralized (Fontana and Posakony, 2009; Glittenberg et al., 2006). Επιπλέον, στην πρωτεΐνη Ser, το μοτίβο ασπαραγίνης ήταν σημαντικό για τη σηματοδοτική ικανότητα του δεσμευτή, γεγονός που δεν ισχύει για το μοτίβο διλευκίνης. Στα σπονδυλωτά δεν υπάρχουν αντίστοιχα μοτίβα στα ενδοκυττάρια τμήματα των δεσμευτών, γεγονός που υποδηλώνει τη μειωμένη συντήρηση και τη δυσκολία για λειτουργική ανάλυση των ενδοκυττάριας τμημάτων των DSL πρωτεϊνών.

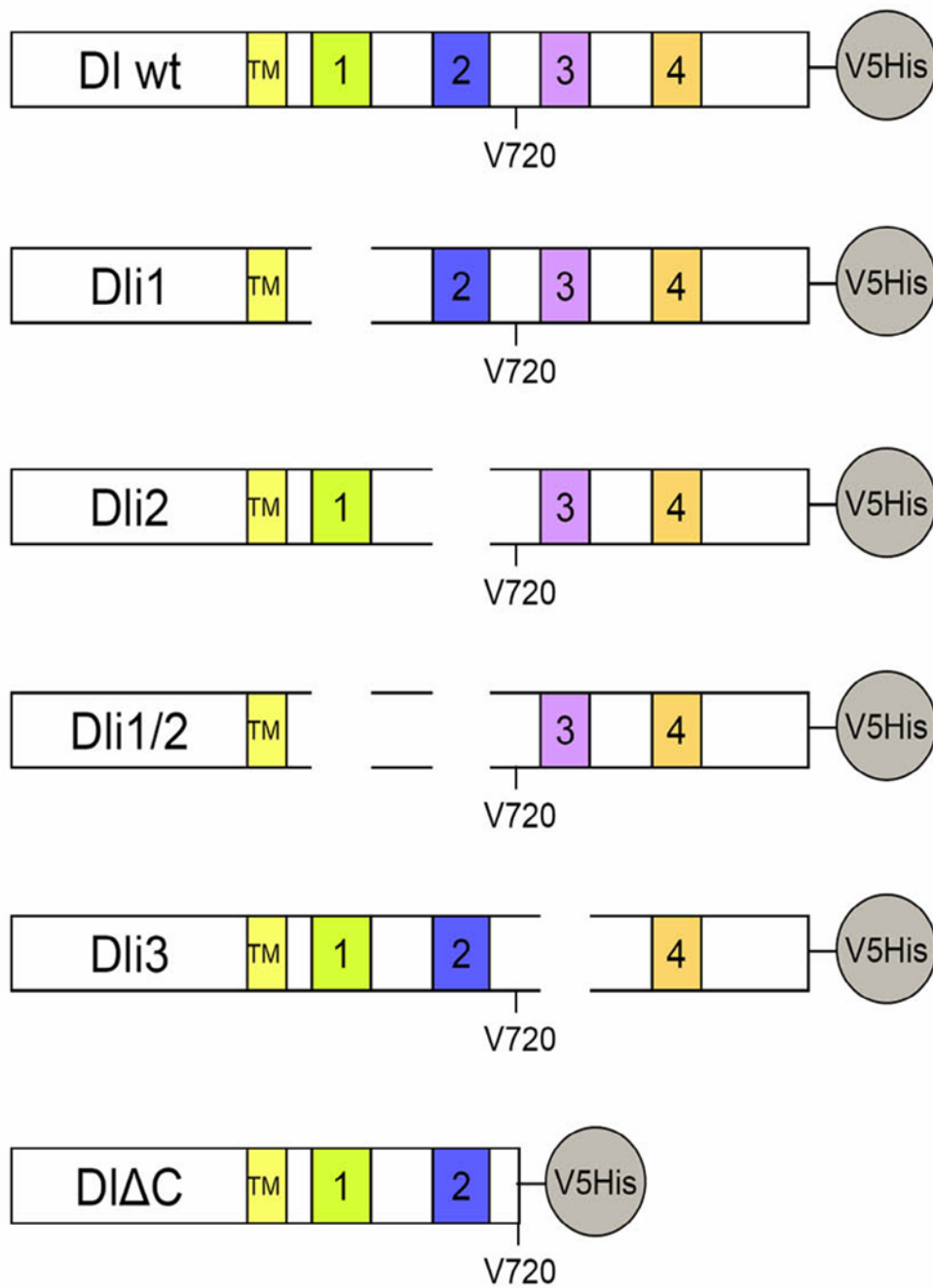
Για να εξετάσουμε αν υπάρχουν επιπλέον σημαντικές λειτουργικές περιοχές στο ενδοκυττάριο τμήμα του δεσμευτή DI, ερευνήσαμε τη συντήρηση των ενδοκυττάριας τμημάτων σε απομακρυσμένα μεταξύ τους είδη εντόμων. Χρησιμοποιήσαμε αλληλουχίες από τα είδη *Aedes aegypti*, *Bombyx mori*, *Tribolium castaneum*, *Apis mellifera*, *Periplaneta americana*, *Acyrtosiphon pisum* και *Pediculus humanus corporis*.

Όταν συγκρίναμε τα ενδοκυττάρια τμήματα μεταξύ τους βρέθηκαν τέσσερα συντηρημένα μοτίβα, ενώ ένα πέμπτο βρέθηκε κατόπιν προσεκτικότερης ανάλυσης επειδή δεν θεωρήθηκε σημαντικό από τον ClustalW2 αλγόριθμο (εικόνα 3.1). Το πρώτο μοτίβο αποτελεί την stop-transfer αλληλουχία στο αμινοτελικό άκρο της ενδοκυττάριας περιοχής. Τα υπόλοιπα τέσσερα ονομάστηκαν icd1, icd2, icd3 και icd4.

Στην εικόνα 3.1 έχουν υπογραμμιστεί τα αμινοξέα που μεταλλάχθηκαν με σκοπό να μελετηθεί η λειτουργία των παραπάνω συντηρημένων περιοχών και δημιουργήθηκαν τα παρακάτω ελλειμματικά μόρια της πρωτεΐνης D1 (εικόνα 3.2):

- D1i1: Πρωτεΐνη D1 στην οποία το icd1 έχει αντικατασταθεί από ένα κατάλοιπο γλυκίνης και ένα σερίνης.
- D1i2: Πρωτεΐνη D1 στην οποία το icd2 έχει αντικατασταθεί από ένα κατάλοιπο γλυκίνης και ένα σερίνης.
- D1i3: Πρωτεΐνη D1 στην οποία το icd3 έχει αντικατασταθεί από ένα κατάλοιπο γλυκίνης και ένα σερίνης.
- D1i1/2: Πρωτεΐνη D1 στην οποία τα icd1 και icd2 έχουν αντικατασταθεί από ένα κατάλοιπο γλυκίνης και ένα σερίνης το κάθε ένα.
- D1ΔC: Πρωτεΐνη D1 στην οποία το τελευταίο κατάλοιπο είναι η V720. Αυτή η πρωτεΐνη δε διαθέτει τα συντηρημένα μοτίβα icd3 και icd4 (M. Rand, προσωπική επικοινωνία).

Είναι σημαντικό να παρατηρήσουμε ότι στις περιοχές icd1 και icd3 υπάρχει μία λυσίνη και στην περιοχή icd2 υπάρχουν δύο, οι οποίες δεν παρουσιάζονται στα αντίστοιχα ελλειμματικά μόρια D1. Όλα τα μεταλλάγματα, όπως και η αγρίου τύπου πρωτεΐνη περιέχουν 6xHis-V5 επίτοπους καρβοξυτελικά, που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις βιοχημικές αναλύσεις.



Εικόνα 3.2: Σχηματική παρουσίαση της πρωτεΐνης DI και των μεταλλαγμάτων της.

Στην εικόνα φαίνονται τα συντηρημένα μοτίβα που περιέχει κάθε πρωτεΐνη. TM: διαμεμβρανική περιοχή. Επιπλέον σημειώνεται το αμινοξύ V720, το τελευταίο κατάλοιπο της πρωτεΐνης DIΔC. Όλες οι πρωτεΐνες διαθέτουν τους επιτόπους V5 και His.

Θέσεις αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης Delta με τις λιγάσες ουβικουιτίνης Neutralized και Mindbomb1

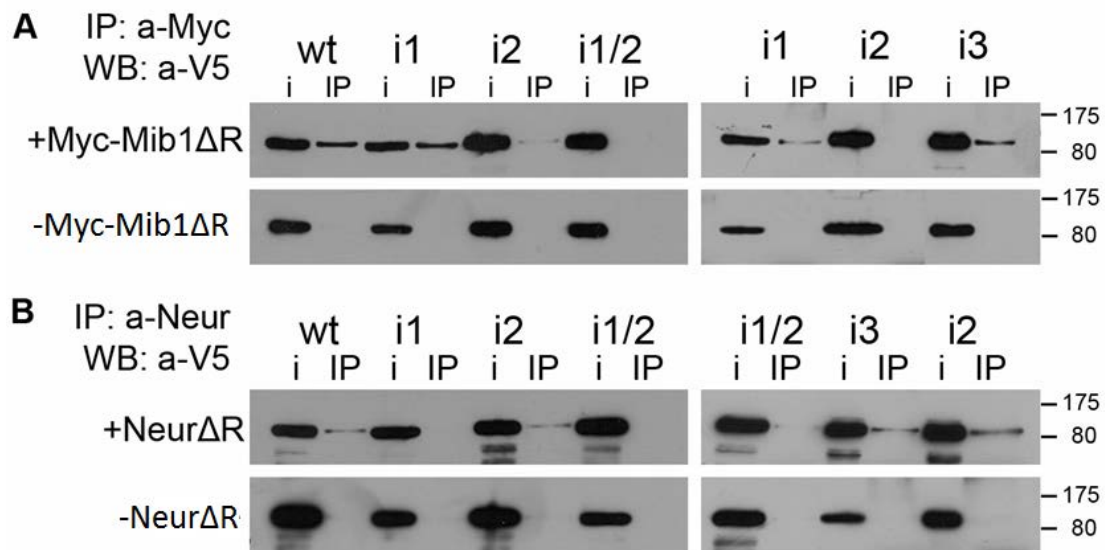
Όπως είναι γνωστό, εκτός από τη δέσμευση in trans των DSL πρωτεϊνών με τον υποδοχέα Notch, η σηματοδότηση χρειάζεται και την παρουσία των E3 λιγασών (Le Borgne, 2006, Pitsouli and Delidakis, 2005). Μελέτες προηγούμενων ετών έχουν ανακαλύψει δύο κατηγορίες E3 λιγασών που έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν τις DSL πρωτεΐνες, το Neutralized (Deblandre et al., 2001, Lai et al., 2001, Pavlopoulos et al., 2001, Yeh et al., 2001) και το Mindbomb1 (Koo et al., 2005, Lai et al., 2005, Le Borgne et al., 2005, Pitsouli and Delidakis, 2005, Wang and Struhl, 2005). Και ενώ ήταν ξεκάθαρη η ανάγκη των λιγασών αυτών για την ενεργοποίηση της σηματοδοτικής ικανότητας των DSL πρωτεϊνών, δεν ήταν γνωστό ο τρόπος με τον οποίο αυτές συνδέονται με την πρωτεΐνη Delta. Όπως ήδη αναφέρθηκε, στην πρωτεΐνη Ser υπάρχει ένα μοτίβο ασπαραγίνης το οποίο συμμετέχει στην αλληλεπίδραση του δεσμευτή με τις δύο λιγάσες ουβικουιτίνης Neutralized και Mindbomb1 (Glittenberg et al., 2006). Το επόμενο ερώτημα ήταν αν κάποια από τις συντηρημένες περιοχές στο ενδοκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης Delta αποτελεί θέση αναγνώρισης και δέσμευσης της από τις λιγάσες ουβικουιτίνης Neutralized και Mindbomb1.

Για το σκοπό αυτό, συνεκφράσαμε τα διάφορα D1 μεταλλάγματα μαζί με την πρωτεΐνη Mib1ΔR, σε κύτταρα S2. Ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση με r-amyc αντίσωμα, το οποίο προσδένει την Mib1ΔR και western blot με m-aV5 αντίσωμα το οποίο ανιχνεύει τις πρωτεΐνες D1 (εικόνα 3.3 A). Ένα μικρό ποσοστό του κυτταρικού εκχυλίσματος δεν ανοσοκατακρημνήθηκε αλλά χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της έκφρασης των πρωτεϊνών Delta στα κύτταρα (διαδρομές i). Από το πείραμα αυτό παρατηρούμε ότι οι πρωτεΐνες D1, Dli1 και Dli3 συνανοσοκατακρημνήστηκαν με τη Mib1ΔR, ενώ η ικανότητα των Dli2 και Dli1/2 να κατακρημνίζονται έχει μειωθεί σημαντικά (διαδρομές IP). Ως πείραμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στα οποία είχε γίνει παροδική διαμόλυνση μόνο με τα μεταλλάγματα Delta, ώστε να βεβαιωθούμε ότι δεν κατακρημνίζονται απουσία της λιγάσης. Συμπεραίνουμε ότι το δεύτερο συντηρημένο μοτίβο, το οποίο και λείπει από τα τελευταία μεταλλάγματα είναι υπεύθυνο για την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης D1 με τη λιγάση ουβικουιτίνης Mib1.

Το ίδιο πείραμα χρησιμοποιήθηκε για να βρεθεί αν κάποιο από τα τρία συντηρημένα μοτίβα στην ενδοκυττάρια περιοχή της πρωτεΐνης D1 είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση της με τη λιγάση ουβικουιτίνης Neuralized. Σε κύτταρα S2 συνεκφράστηκαν τα διάφορα D1 μεταλλάγματα μαζί με την πρωτεΐνη NeurΔR. Ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση με r-aNeur αντίσωμα, το οποίο προσδένει την πρωτεΐνη NeurΔR και western blot με m-aV5 αντίσωμα το οποίο ανιχνεύει τις πρωτεΐνες D1 (εικόνα 3.3 B). Ένα μικρό ποσοστό του κυτταρικού εκχυλίσματος δεν ανοσοκατακρημνήθηκε αλλά χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της έκφρασης των πρωτεϊνών Delta στα κύτταρα (διαδρομές i). Από το πείραμα αυτό παρατηρούμε ότι οι πρωτεΐνες D1, Dli2 και Dli3 συνανοσοκατακρημνήστηκαν με τη NeurΔR, ενώ η ικανότητα των Dli1 και Dli1/2 να κατακρημνίζονται έχει μειωθεί σημαντικά (διαδρομές IP). Όπως και στην περίπτωση της Mib1ΔR, ως πείραμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στα οποία είχε γίνει παροδική διαμόλυνση μόνο με τα μεταλλάγματα Delta, ώστε να βεβαιωθούμε ότι δεν κατακρημνίζονται απουσία της λιγάσης. Συμπεραίνουμε ότι το πρώτο συντηρημένο μοτίβο είναι υπεύθυνο για την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης D1 με τη λιγάση ουβικουιτίνης Neur.

Και από τα δύο πειράματα καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το τρίτο συντηρημένο μοτίβο δεν χρειάζεται για τις αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης D1 με καμία από τις δύο λιγάσες ουβικουιτίνης. Επιπλέον, το γεγονός ότι και στις δύο περιπτώσεις το ποσοστό της συνανοσοκατακρήμνισης είναι μικρό σε σχέση με τη συνολική ποσότητα της πρωτεΐνης D1 στα κύτταρα, ίσως αποτελεί ένδειξη ότι η σύνδεση των δύο πρωτεϊνών είναι παροδική.

Οι μορφές Mib1ΔR και NeurΔR, είναι ελλειμματικά μόρια των πρωτεϊνών Mib1 και Neur αντίστοιχα, τα οποία δεν περιέχουν την περιοχή RING απαραίτητη για τη δράση λιγάσης ουβικουιτίνης. Παρόλα αυτά, μπορούν να αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη D1 και είναι πιο σταθερά μόρια από τις αγρίου τύπου πρωτεΐνες. Επιπλέον δεν ευνοούν την αποικοδόμηση των DSL πρωτεϊνών (Glittenberg et al., 2006, Lai et al., 2005, Lai et al., 2001, Pitsouli and Delidakis, 2005). Για τους δύο παραπάνω λόγους οι αλληλεπιδράσεις τους με τις DSL πρωτεΐνες είναι πολύ πιο σταθερές και πιο εύκολα ανιχνεύσιμες από τις ολόκληρες μορφές και γι αυτό χρησιμοποιήθηκαν στα συγκεκριμένα βιοχημικά πειράματα.



Εικόνα 3.3: Τα μοτίβα *icd1* και *icd2* αποτελούν θέσεις αλληλεπίδρασης του DI με τις λιγάσες *Neutralized* και *Mindbomb1* αντίστοιχα.

A: Διάφορες μορφές DI πρωτεΐνης οι οποίες έφεραν τον V5 επίτοπο εκφράστηκαν σε κύτταρα S2 παρουσία (πάνω μισό), είτε απουσία (κάτω μισό) πρωτεΐνης Mib1ΔR. Τα εκχυλίσματα των κυττάρων ανοσοκατακρήμνιστηκαν με γ -amyc αντίσωμα και η ανίχνευση έγινε με m-aV5 αντίσωμα. Με IP συμβολίζεται η ανοσοκατακρήμνιση ενώ με i ένα μικρό ποσοστό του κυτταρικού εκχυλίσματος (4%) για να ελεγχθεί η έκφραση των DI πρωτεϊνών. Οι κύριες ζώνες αποτελούν τις πρωτεΐνες DI, με μοριακό βάρος 90kDa. Παρατηρείται ότι με έλλειψη του δεύτερου συντηρημένου μοτίβου η ικανότητα της πρωτεΐνης DI να αλληλεπιδρά με τη λιγάση Mib1 μειώνεται σημαντικά.

B: Διάφορες μορφές DI πρωτεΐνης οι οποίες έφεραν τον V5 επίτοπο εκφράστηκαν σε κύτταρα S2 παρουσία (πάνω μισό), είτε απουσία (κάτω μισό) πρωτεΐνης NeurΔR. Τα εκχυλίσματα των κυττάρων ανοσοκατακρήμνιστηκαν με γ -aNeur αντίσωμα και η ανίχνευση έγινε με m-aV5 αντίσωμα. Με IP συμβολίζεται η ανοσοκατακρήμνιση ενώ με i ένα μικρό ποσοστό του κυτταρικού εκχυλίσματος (4%) για να ελεγχθεί η έκφραση των DI πρωτεϊνών. Οι κύριες ζώνες αποτελούν τις πρωτεΐνες DI, με μοριακό βάρος 90kDa. Παρατηρείται ότι με έλλειψη του πρώτου συντηρημένου μοτίβου η ικανότητα της πρωτεΐνης DI να αλληλεπιδρά με τη λιγάση Neur μειώνεται σημαντικά. Και στα δύο πειράματα, οι πρωτεΐνες DI δεν κατακρήμνίζονται απουσία των λιγασών, γεγονός που αποδεικνύει ότι η ανοσοκατακρήμνιση οφείλεται σε αλληλεπίδραση.

Ουβικουιτινυλίωση του δεσμευτή Delta και των ελλειπτικών μεταλλαγμάτων από τις λιγάσες ουβικουιτίνης Neuralized και Mindbomb1

Μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν ότι κύριος στόχος της ουβικουιτινυλίωσης είναι η στόχευση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών-στόχων στο πρωτεάσωμα προς αποικοδόμηση. Στη συνέχεια έγινε γνωστό ότι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μπορούν να ουβικουιτινυλιωθούν και ότι τελικός στόχος αυτών μπορεί να αποτελεί το λυσόσωμα αλλά και άλλα ενδιάμεσα μεμβρανικά διαμερίσματα (Hicke and Dunn, 2003). Επίσης θεωρούνταν ότι η ενδοκύττωση των υποδοχέων σχετίζεται με την αποικοδόμηση τους και κατ'έπекταση την απενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης. Τα τελευταία χρόνια αποδεικνύεται συνεχώς η συσχέτιση μεταξύ της ενδοκύττωσης των μεμβρανικών υποδοχέων και των δεσμευτών τους και της ενεργοποίησης της σηματοδότησης. Στην περίπτωση των δεσμευτών του υποδοχέα Notch, D1 και Ser, υποστηρίζεται επίσης το μοντέλο όπου για να ενεργοποιηθούν οι δεσμευτές και να είναι ικανοί να σηματοδοτήσουν πρέπει να ενδοκυτταρωθούν και να τροποποιηθούν σε κατάλληλο μεμβρανικό διαμέρισμα και μάλιστα αυτή η ενδοκύττωση εξαρτάται άμεσα από την πρωτεΐνη Epsin (Wang and Struhl, 2004). Επιπλέον προτείνεται ότι για να ενδοκυτταρωθούν οι δεσμευτές στο κατάλληλο ενδοκυτταρικό διαμέρισμα πρέπει να ουβικουιτινυλιωθούν.

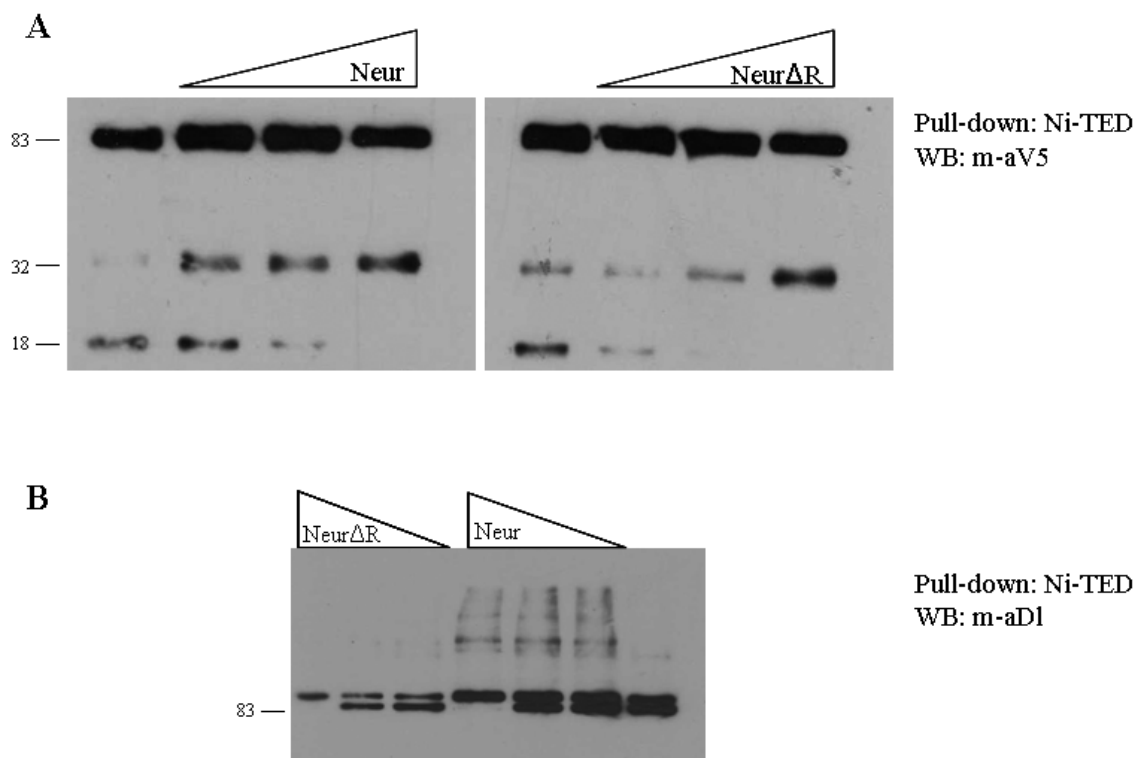
Η πρωτεΐνη Neuralized έχει δειχθεί ότι ενισχύει τη σηματοδότηση Notch και ότι ενδοκυτταρώνει την πρωτεΐνη Delta (Pavlopoulos et al., 2001). Πιθανώς τα δύο αυτά γεγονότα σχετίζονται μεταξύ τους καθώς επίσης έχει προταθεί ότι για να ενεργοποιηθεί η πρωτεΐνη D1 οφείλει να βρεθεί σε ένα συγκεκριμένο υποκυτταρικό διαμέρισμα (Wang and Struhl, 2004). Συνεπώς είναι πιθανό η λιγάση ουβικουιτίνης Neuralized να ουβικουιτινυλιώνει την πρωτεΐνη D1 και αυτό να αποτελεί σημάδι αναγνώρισης από το μηχανισμό ενδοκύττωσης ώστε ο δεσμευτής να μεταφερθεί σε ένα συγκεκριμένο υποκυτταρικό διαμέρισμα όπου και θα ενεργοποιηθεί. Η πρωτεΐνη NeurDR δε διαθέτει το δακτύλιο RING που αλληλεπιδρά με τα συζευκτικά ένζυμα ουβικουιτίνης E2 και προωθεί την ουβικουιτινυλίωση των πρωτεϊνών-στόχων. Έχει βρεθεί ότι ο δακτύλιος RING της πρωτεΐνης είναι απαραίτητος για την επαγωγή ενδοκύττωσης του δεσμευτή Delta και για την μεταμεταγραφική μείωση των επιπέδων του (Pavlopoulos et al., 2001), δεν είναι όμως απαραίτητος για την αλληλεπίδραση του Neuralized με τους δεσμευτές Delta και Serrate (Pitsouli and Delidakis, 2005).

Η πρώτη βιοχημική ένδειξη ότι η πρωτεΐνη D1 ουβικουιτινυλιώνεται από τη λιγάση ουβικουιτίνης Neuralized ήταν η αλλαγή ηλεκτροφορητικού προτύπου του δεσμευτή σε S2 κύτταρα με αυξανόμενες ποσότητες της λιγάσης. Έγινε παροδική διαμόλυνση των κυττάρων S2 με σταθερή ποσότητα του πλασμιδίου pIZ-DIV5His και αυξανόμενες ποσότητες των πλασμιδίων puast-EGFPneur και puast-EGFPneurΔR. Ακολούθησε κατακρήμνιση της πρωτεΐνης D1 με σφαιρίδια νικελίου και western blot με m-aV5 αντίσωμα (εικόνα 3.4A). Παρατηρείται ότι καθώς αυξάνονται οι ποσότητες των πρωτεϊνών Neur και NeurΔR αλλάζει και το πρότυπο της πρωτεΐνης D1. Ενώ χωρίς την υπερέκφραση των πρωτεϊνών Neur και NeurΔR παρατηρούνται 3 ζώνες των 90, 32 και 18kDa, με την ύπαρξη της μίας ή της άλλης πρωτεΐνης η μικρότερη ζώνη εξαφανίζεται ενώ γίνεται εντονότερη αυτή των 32kDa. Ουσιαστικά η ζώνη των 32kDa δεν είναι μία αλλά τρεις διαφορετικές ζώνες από διαφορετικές πρωτεολύσεις του D1 (βλ. εισαγωγή). Πιθανή εξήγηση είναι ότι η μικρότερη ζώνη της πρωτεΐνης D1 ουβικουιτινυλιώνεται με την ύπαρξη της πρωτεΐνης Neur και μετατρέπεται σε ζώνη μοριακού βάρους των 32kDa. Παράδοξο αποτελεί το γεγονός ότι παρόμοιο αποτέλεσμα επιφέρει και η πρωτεΐνη NeurΔR. Πιθανόν το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται και στα ενδογενή ποσοστά των πρωτεϊνών Neur και Mib1 που διαθέτουν τα κύτταρα S2 και με κάποιο άγνωστο μηχανισμό, όπως για παράδειγμα μέσω ολιγομερισμού μεταξύ μορίων Neur, το ελλειμματικό μόριο NeurΔR υποβοηθά τις λιγάσες αυτές στην ουβικουιτινυλίωση της πρωτεΐνης D1 κατά περίπτωση, ανάλογα με την εκάστοτε αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης.

Πρέπει να αναφερθεί ότι η μικρότερη ζώνη της πρωτεΐνης D1 των 18kDa δεν ανιχνεύεται πάντα σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων S2. Συνεπώς παρατηρείται έλλειψη επαναληψιμότητας του προτύπου αυτού. Ο ακριβής λόγος αυτού του προβλήματος παραμένει άγνωστος. Πιθανή εξήγηση είναι ότι οι ενδογενείς ποσότητες λιγασών ουβικουιτίνης Neuralized και Mindbomb1 είναι ικανές να ουβικουιτινυλώσουν το πρωτεολυτικό αυτό τμήμα της πρωτεΐνης D1.

Για να αποσαφηνισθεί αν και η πλήρους μήκους πρωτεΐνη αλλάζει μοριακό βάρος παρουσία των πρωτεϊνών Neur και NeurΔR τα ίδια δείγματα με τα παραπάνω χρησιμοποιήθηκαν σε western blot με αντίσωμα m-aD1 (εικόνα 3.4B). Το αντίσωμα αυτό δεσμεύει το εξωκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης και γι αυτό δεν ανιχνεύονται τα ενδοκυττάρια πρωτεολυτικά τμήματα. Συνήθως αναγνωρίζεται και μία επιπλέον ζώνη που αντιστοιχεί στο εξωκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης αλλά όχι πάντα, όπως στην περίπτωση αυτή, επειδή εκκρίνεται στο θρεπτικό μέσο. Στην εικόνα φαίνεται ότι με

αυξανόμενες ποσότητες πρωτεϊνών Neur και NeurΔR η πλήρους μήκους πρωτεΐνη αλλάζει μοριακό βάρος σταδιακά. Επιπλέον στην περίπτωση όπου γίνεται προσθήκη της πλήρους μορφής λιγάσης, παρατηρούνται ζώνες της πρωτεΐνης DI πολύ υψηλού μοριακού βάρους, γεγονός που υποδηλώνει την ουβικουιτινυλίωση της πρωτεΐνης από το Neuralized.



Εικόνα 3.4: Αλλαγή του προτύπου της πρωτεΐνης DI παρουσία των πρωτεϊνών Neur και NeurΔR σε κύτταρα S2.

A: Η πρωτεΐνη DI υπερεκφράστηκε σε κύτταρα S2 παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων πρωτεΐνης Neur (αριστερό μισό), ή NeurΔR (δεξί μισό). Τα εκχυλίσματα των κυττάρων κατακρημνήστηκαν με σφαιρίδια νικελίου και η αντίχενυση έγινε με m-aV5 αντίσωμα (η πρωτεΐνη DI φέρει τους επιτόπους His και V5). Παρατηρείται ότι καθώς αυξάνονται οι ποσότητες των πρωτεϊνών Neur και NeurΔR αλλάζει και το πρότυπο της DI και ειδικότερα εξαφανίζεται η ζώνη των 18kDa, ενώ ενισχύεται αυτή των 32kDa.

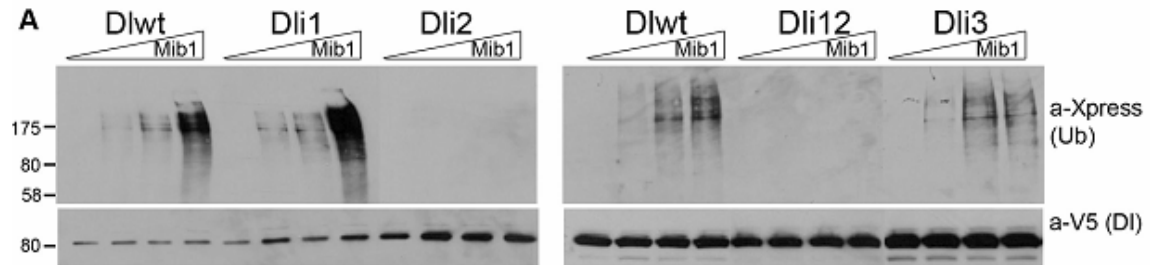
B: Τα ίδια δείγματα με την εικόνα A, χρησιμοποιήθηκαν σε western blot με αντίσωμα m-aDI. Το αντίσωμα αυτό δεσμεύει το εξωκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης. Παρατηρείται ότι με αυξανόμενες ποσότητες πρωτεϊνών Neur και NeurΔR η πλήρους μήκους πρωτεΐνη DI αλλάζει μοριακό βάρος σταδιακά. Επιπλέον παρατηρούνται υψηλού μοριακού βάρους ζώνες όταν γίνεται προσθήκη της πλήρους μορφής λιγάσης.

Για να διαπιστωθεί αν η πρωτεΐνη Delta και τα ελλειμματικά μεταλλάγματα αυτής έχουν την ικανότητα να ουβικουιτυλιώνονται από τις λιγάσες Mindbomb1 και Neuralized, έγινε παροδική διαμόλυνση κυττάρων S2 με τα πλασμίδια piZ-DliwtV5His, piZ-Dli1V5His, piZ-Dli2V5His, piZ-Dli1/2V5His και piZ-Dli3V5His συνεκφράζοντας την πρωτεΐνη Ubiquitin-Xpress, με αυξανόμενες ποσότητες των λιγασών. Ακολούθησε κατακρήμνιση των Dli πρωτεϊνών με Ni-TED σφαιρίδια κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες ώστε να αποφύγουμε τις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες και να βεβαιωθούμε ότι οι ουβικουιτυλιωμένες μορφές που παρατηρούμε ανήκουν στις Dli πρωτεΐνες. Η ανίχνευση των ουβικουιτυλιωμένων πρωτεϊνών έγινε με α-Xpress αντίσωμα, επίτοπο που φέρει η ουβικουιτίνη. Η έκφραση των Dli πρωτεϊνών, ελέγχθηκε με α-V5 αντίσωμα (εικόνα 3.5).

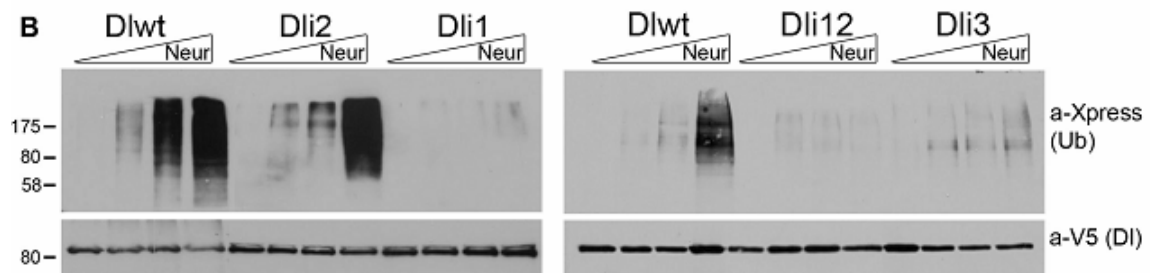
Παρατηρείται ότι με αυξανόμενες ποσότητες της λιγάσης Mib1 αυξάνεται η ποσότητας ουβικουιτυλιωμένης Dli πρωτεΐνης που ανιχνεύεται, γεγονός που δείχνει ότι η πρωτεΐνη Dli δεσμεύεται και ουβικουιτυλιώνεται από τη λιγάση Mib1. Το ίδιο παρατηρείται και για όσα μεταλλάγματα διατηρούν την ικανότητα αλληλεπίδρασης με την συγκεκριμένη λιγάση, δηλαδή τα Dli1 και Dli3, ενώ όπως ήταν αναμενόμενο, οι πρωτεΐνες Dli2 και Dli1/2 οι οποίες δεν μπορούν να αλληλεπιδράσουν δεν ουβικουιτυλιώνονται (εικόνα 3.5A).

Όσον αφορά την ουβικουιτυλίωση από τη λιγάση Neuralized, με αυξανόμενες ποσότητες αυτής, αυξάνεται η ανιχνεύσιμη ουβικουιτυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης Dli γεγονός που υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη Dli δεσμεύεται και ουβικουιτυλιώνεται από τη λιγάση Neuralized. Όπως είναι αναμενόμενο τα μεταλλάγματα που δεν μπορούν να αλληλεπιδράσουν, Dli1 και Dli1/2, δεν ουβικουιτυλιώνονται. Το μετάλλαγμα όμως Dli3 διατηρεί την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη λιγάση Neuralized, παρόλα αυτά δεν μπορεί να ουβικουιτυλιωθεί από αυτή. Αυτή ήταν και η πρώτη ένδειξη ότι η λυσίνη 742 που υπάρχει στο τρίτο συντηρημένο μοτίβο, αποτελεί στόχο ουβικουιτυλίωσης από τη συγκεκριμένη λιγάση (εικόνα 3.5B).

Pull down: Ni-TED beads WB: m-aXpress/m-aV5



Pull down: Ni-TED beads WB: m-aXpress/m-aV5



Εικόνα 3.5: Ουβικουιτινλίωση της πρωτεΐνης D1 και των ελλειμματικών μεταλλαγμάτων της από τις λιγάσες ουβικουιτίνης Mindbomb1 και Neuralized.

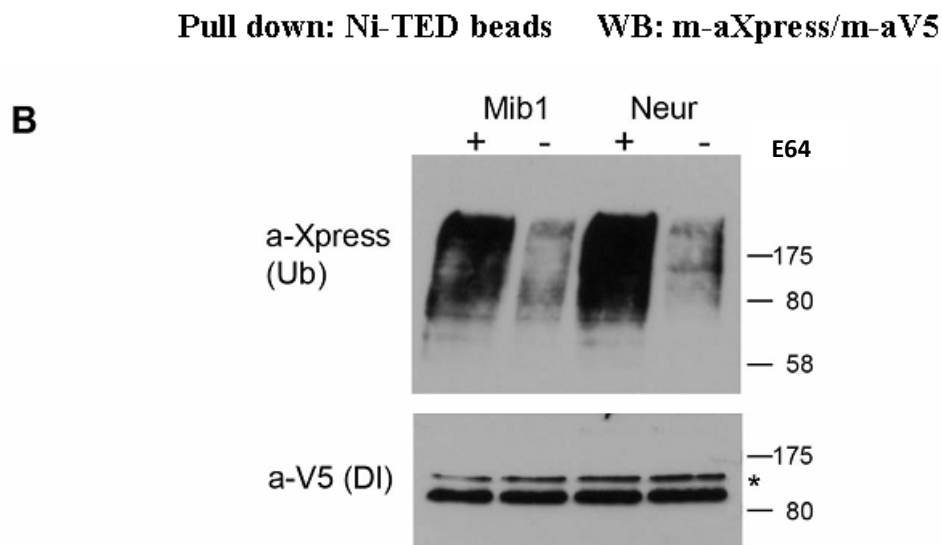
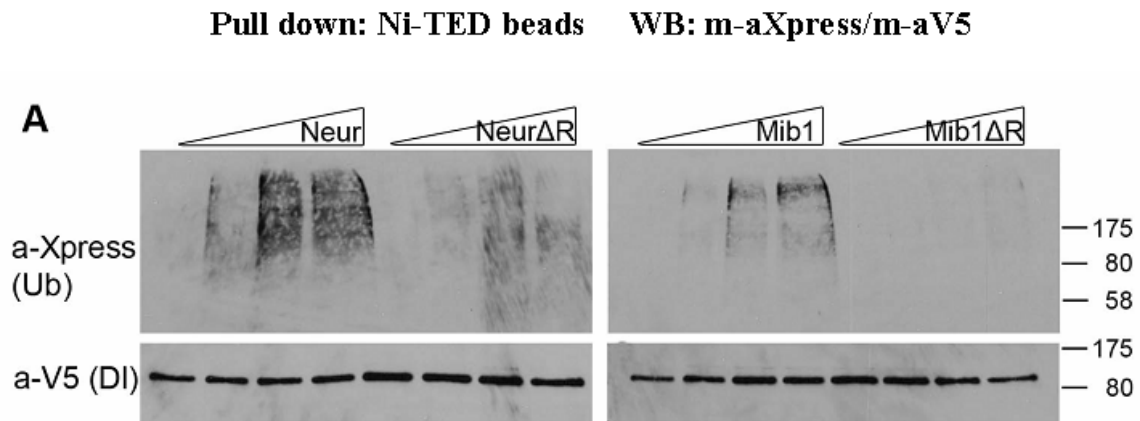
A: Πλασμίδια των D1 πρωτεϊνών συνεκφράστηκαν σε κύτταρα S2 με πλασμίδιο Xpress-ubi και αυξανόμενες ποσότητες του πλασμιδίου (0, 0.5, 1 και 1.5μg) που εκφράζει τη λιγάση Mib1. Μετά τη λύση κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, οι D1 πρωτεΐνες απομονώθηκαν με σφαιρίδια νικελίου. Τα δείγματα εξετάστηκαν για την ύπαρξη ουβικουιτινυλιωμένων μορφών των πρωτεϊνών D1 με a-Xpress αντίσωμα (1/4 του συνολικού δείγματος) και για την έκφραση των πρωτεϊνών D1 στα κύτταρα με a-V5 αντίσωμα (1/3 του συνολικού δείγματος). Παρατηρείται η ουβικουιτινλίωση των D1, Dli1 και Dli3 από τη λιγάση Mib1.

B: Πλασμίδια των D1 πρωτεϊνών συνεκφράστηκαν σε κύτταρα S2 με πλασμίδιο Xpress-ubi και αυξανόμενες ποσότητες του πλασμιδίου (0, 0.5, 1 και 1.5μg) που εκφράζει τη λιγάση Neur. Όπως και στην περίπτωση της λιγάσης Mib1, οι D1 πρωτεΐνες απομονώθηκαν με σφαιρίδια νικελίου κατόπιν λύσης των κυττάρων κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες. Τα δείγματα εξετάστηκαν για την ύπαρξη ουβικουιτινυλιωμένων μορφών των πρωτεϊνών D1 με a-Xpress αντίσωμα (1/4 του συνολικού δείγματος) και για την έκφραση των πρωτεϊνών D1 στα κύτταρα με a-V5 αντίσωμα (1/3 του συνολικού δείγματος). Παρατηρείται η ουβικουιτινλίωση των D1 και Dli2 από τη λιγάση Neur.

Για να βεβαιωθούμε ότι η αύξηση της ουβικουιτινυλίωσης που παρατηρήθηκε οφείλεται στο δακτύλιο RING των λιγασών, σε κύτταρα S2 συνεκφράστηκαν η αγρίου τύπου πρωτεΐνη DIV5His, η Xpress-Ubi και αυξανόμενες ποσότητες των λιγασών Neur ή Mib1, καθώς όμως και των καταλυτικά ανενεργών μορφών τους NeurΔRING ή Mib1ΔRING. Ακολούθησε λύση των κυττάρων κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες και δέσμευση της πρωτεΐνης DI σε σφαιρίδια νικελίου. Η ύπαρξη ουβικουιτινυλιωμένων μορφών της πρωτεΐνης DI εξετάστηκε με a-Xpress αντίσωμα και η έκφραση της με a-V5 αντίσωμα. Παρατηρούμε ότι η ουβικουιτινυλίωση της πρωτεΐνης DI είναι πολύ ισχυρότερη στην περίπτωση των καταλυτικά ενεργών λιγασών (εικόνα 3.6A). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι παρατηρείται μια μικρή αύξηση της ουβικουιτινυλίωσης και στην περίπτωση που προστέθηκαν τα ελλειμματικά μόρια των λιγασών. Πιθανή εξήγηση είναι η αλληλεπίδραση αυτών με τις ενδογενείς λιγασές του κυττάρου και η στρατολόγησή τους. Αυτό φυσικά θα προϋπόθετε ότι οι λιγασές Neur και Mib1 συμμετέχουν σε ενζυματικά ενεργά σύμπλοκα.

Σε όλα τα πειράματα ουβικουιτινυλίωσης τα κύτταρα επώαστηκαν με E64, καταστολέα των πρωτεασών του λυσοσώματος (Rock et al., 1994) για 6 ώρες πριν τη λύση. Για να βρεθεί αν η απουσία αυτού του καταστολέα επηρεάζει την ανίχνευση των ουβικουιτινυλιωμένων μορφών, σε κύτταρα S2, συνεκφράστηκαν η αγρίου τύπου πρωτεΐνη DI, η Xpress-Ubi και μία ποσότητα των λιγασών Neur ή Mib1. Στη συνέχεια τα κύτταρα είτε επώαστηκαν με E64 πριν τη λύση, είτε όχι. Μετά τη λύση κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, η DI πρωτεΐνη απομονώθηκε με σφαιρίδια νικελίου. Τα δείγματα εξετάστηκαν για την ύπαρξη ουβικουιτινυλιωμένων μορφών της πρωτεΐνης DI με a-Xpress αντίσωμα και για την έκφραση της στα κύτταρα με a-V5 αντίσωμα. Παρατηρούμε ότι αν παραλείψουμε το λυσοσωμικό καταστολέα από τη διαδικασία, η ανιχνεύσιμη ποσότητα ουβικουιτινυλιωμένων μορφών είναι σημαντικά λιγότερη. Αυτό αποδεικνύει ότι ο τελικός στόχος της πρωτεΐνης DI μέσα στο κύτταρο μετά την ουβικουιτινυλίωση της είναι τα λυσοσώματα και η αποικοδόμηση της από αυτά.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι σε όλα τα πειράματα ουβικουιτινυλίωσης δεν ανιχνεύθηκε μια κύρια μονο-ουβικουιτινυλιωμένη ζώνη των DI πρωτεϊνών, μοριακού βάρους 100kDa, από καμία από τις δύο λιγασές, γεγονός που υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη DI πολυ-ουβικουιτινυλιώνεται ή μονο-ουβικουιτινυλιώνεται σε πολλαπλές θέσεις ή και τα δύο.



Εικόνα 3.6: Παράγοντες που επηρεάζουν την αντίγνωση της ουβικουιτινυλίωσης.

A: Σε κύτταρα S2, συνεκφράστηκαν η αγρίου τύπου πρωτεΐνη DI, η Xpress-Ubi και αυξανόμενες ποσότητες των λιγασών Neur ή Mib1 καθώς και των καταλυτικά ανενεργών μορφών τους NeurΔR ή Mib1ΔR. Μετά τη λύση κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, η DI πρωτεΐνη απομονώθηκε με σφαιρίδια νικελίου. Τα δείγματα εξετάστηκαν για την ύπαρξη ουβικουιτινυλιωμένων μορφών της πρωτεΐνης DI με a-Xpress αντίσωμα και για την έκφραση της στα κύτταρα με a-V5 αντίσωμα. Η ουβικουιτινυλίωση είναι πολύ ισχυρότερη στην περίπτωση των καταλυτικά ενεργών λιγασών. Μικρή αύξηση της ουβικουιτινυλίωσης παρατηρείται και στην περίπτωση προσθήκης των ελλειμματικών λιγασών στα κύτταρα. Πιθανότατα αλληλεπιδρούν και στρατολογούν τις ενδογενείς αγρίου τύπου λιγάσες, αποτελώντας ένδειξη συμμετοχής των Neur και Mib1 σε ενζυματικά ενεργά σύμπλοκα.

B: Σε κύτταρα S2, συνεκφράστηκαν η αγρίου τύπου πρωτεΐνη DI, η Xpress-Ubi και μία ποσότητα των λιγασών Neur ή Mib1. Σε κάθε περίπτωση τα κύτταρα επωάστηκαν ή όχι για 6 ώρες με τον λυσοσωμικό καταστολέα E64. Μετά τη λύση κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, η DI πρωτεΐνη απομονώθηκε με σφαιρίδια νικελίου. Τα δείγματα εξετάστηκαν για την ύπαρξη ουβικουιτινυλιωμένων μορφών της πρωτεΐνης DI με a-Xpress αντίσωμα και για την έκφραση της στα κύτταρα με a-V5 αντίσωμα. Η ουβικουιτινυλίωση που ανιχνεύεται με την ύπαρξη του καταστολέα είναι πολύ ισχυρότερη, αποδεικνύοντας ότι ένα μεγάλο ποσοστό της ουβικουιτινυλιωμένης πρωτεΐνης DI καταλήγει στο λυσόσωμα για αποικοδόμηση. Ο αστερίσκος δείχνει μια μη ειδική ζώνη.

Ουβικουιτινυλίωση του δεσμευτή Delta και των σημειακών μεταλλαγμάτων από τις λιγάσες ουβικουιτίνης Neutralized και Mindbomb1

Στο ενδοκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης D1 υπάρχουν 12 κατάλοιπα λυσίνης. 3 από αυτά βρίσκονται στην stop-transfer αλληλουχία, αμέσως μετά τη διαμεμβρανική περιοχή και δεν είναι σημαντικές για τη σηματοδοτική ικανότητα της πρωτεΐνης (Wang and Struhl, 2004). Οι υπόλοιπες 9 κατανέμονται ως εξής:

- K629: Αμέσως πριν το μοτίβο icd1
- K636: Εντός του μοτίβου icd1
- K665: Μεταξύ των μοτίβων icd1 και icd2
- K683, K688: Εντός του μοτίβου icd2
- K739: Μεταξύ των μοτίβων icd2 και icd3
- K742: Εντός του μοτίβου icd3
- K762, K775: Μετά το icd3 μοτίβο

Όπως ήδη προαναφέρθηκε, όταν εξετάστηκε η ικανότητα ουβικουιτινυλίωσης των ελλειπτικών μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης D1, το μετάλλαγμα Dli3, το οποίο διατηρεί την ικανότητα να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη NeurΔR (εικόνα 3.3), έδειξε πολύ μειωμένη ικανότητα να ουβικουιτινυλιώνεται από τη λιγάση Neur (εικόνα 3.5). Πιθανή εξήγηση θα αποτελούσε η πιθανότητα το Neur να δεσμεύεται με την πρωτεΐνη D1 στο μοτίβο icd1 αλλά να την ουβικουιτινυλιώνει σε ένα κατάλοιπο λυσίνης στο μοτίβο icd3. Στο μοτίβο icd3 υπάρχει μία μόνο λυσίνη, η K742, η οποία μάλιστα είναι η πιο συντηρημένη σε ολόκληρη την ενδοκυττάρια περιοχή της πρωτεΐνης D1 (εικόνα 3.1).

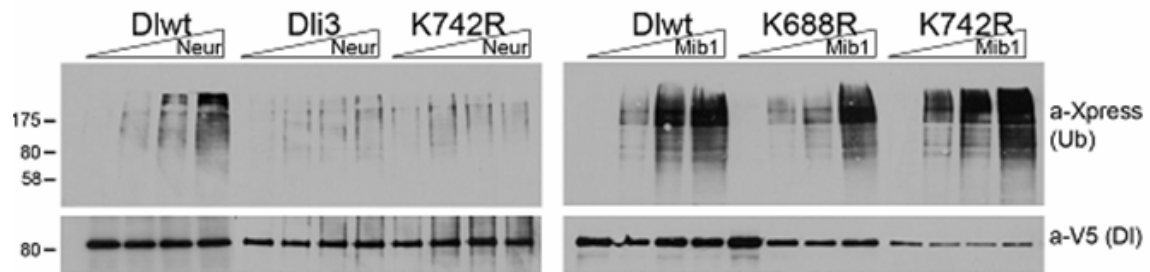
Για να ελεγχθεί η παραπάνω εξήγηση, δημιουργήθηκε σημειακό μετάλλαγμα στο οποίο η συγκεκριμένη λυσίνη έχει μετατραπεί σε αργινίνη, το D1-K742R (η μεταλλαγή προήλθε από την Nevine Shalaby που την κατασκεύασε στο εργαστήριο του Marc Muskavitch, Boston college). Σε κύτταρα S2 συνεκφράστηκαν μία από τις πρωτεΐνες D1, Dli3 ή D1-K742R μαζί με την πρωτεΐνη Xpress-Ubi και αυξανόμενες ποσότητες της λιγάσης Neur. Μετά τη λύση των κυττάρων κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, το εκχύλισμα επώαστηκε με σφαιρίδια νικελίου ώστε να δεσμευθούν οι πρωτεΐνες D1, και η ουβικουιτινυλίωση τους εξετάστηκε με α-Xpress αντίσωμα, επίτοπο που φέρει η ουβικουιτίνη. Η έκφραση των πρωτεϊνών D1 στα κύτταρα εξετάστηκε με α-V5 αντίσωμα (εικόνα 3.7).

Παρατηρείται ότι, αντιθέτως με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη DI, η ουβικουιτινυλίωση των πρωτεϊνών DIi3 και DI-K742R δεν αυξάνεται με την αύξηση των ποσοτήτων του Neur στα κύτταρα. Συμπεραίνουμε ότι η λυσίνη 742 του icd3 είναι ο κύριος στόχος ουβικουιτινυλίωσης της πρωτεΐνης DI από τη λιγάση Neur.

Ομοίως ερευνήθηκε αν η λυσίνη 742 και συγκριτικά με αυτή η λυσίνη 688, αποτελεί στόχο ουβικουιτινυλίωσης και από τη λιγάση Mib1. Σε κύτταρα S2 συνεκφράστηκαν μία από τις πρωτεΐνες DI, DI-K742R ή DI-K688R μαζί με την πρωτεΐνη Xpress-Ubi και αυξανόμενες ποσότητες της λιγάσης Mib1. Μετά τη λύση των κυττάρων κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, το εκχύλισμα επώαστηκε με σφαιρίδια νικελίου ώστε να δεσμευθούν οι πρωτεΐνες DI, και η ουβικουιτινυλίωση τους ανιχνεύθηκε με α-Xpress αντίσωμα, επίτοπο που φέρει η ουβικουιτίνη. Η έκφραση των πρωτεϊνών DI στα κύτταρα εξετάστηκε με α-V5 αντίσωμα (εικόνα 3.7).

Παρατηρούμε ότι όπως και στην περίπτωση της αγρίου τύπου πρωτεΐνης, η ποσότητα ανιχνεύσιμων ουβικουιτινυλιωμένων μορφών των σημειακών μεταλλαγμάτων DI-K742R και DI-K688R αυξάνεται με την αύξηση της ποσότητας της λιγάσης στα κύτταρα. Συμπερασματικά οι λυσίνες 742 και 688 δεν αποτελούν ή δεν αποτελούν το μοναδικό στόχο ουβικουιτινυλίωσης από τη λιγάση Mib1 πάνω στην πρωτεΐνη DI. Αυτή η παρατήρηση είναι και η πρώτη ένδειξη ότι οι δύο λιγάσες δημιουργούν διαφορετικές ουβικουιτινυλιωμένες μορφές της πρωτεΐνης DI.

Pull down: Ni-TED beads WB: m-aXpress/m-aV5



Εικόνα 3.7: Ουβικουτινυλίωση των πρωτεϊνών DI, Dli3 και DI-K742R από τη λιγάση Neuralized και των πρωτεϊνών DI, DI-K742R και DI-K688R από τη λιγάση Mindbomb1.

Αριστερά: Οι πρωτεΐνες D1wt, Dli3 ή DI-K742R συνεκφράστηκαν σε κύτταρα S2 μαζί με την Xpress-Ubi και αυξανόμενες ποσότητες (0, 0.5, 1 και 1.5μg) του πλασμιδίου που εκφράζει τη λιγάση Neur. Μετά τη λύση των κυττάρων κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, οι DI πρωτεΐνες απομονώθηκαν με σφαιρίδια νικελίου. Τα δείγματα εξετάστηκαν για την ύπαρξη ουβικουτινυλιωμένων μορφών των πρωτεϊνών DI με a-Xpress αντίσωμα (1/4 του συνολικού δείγματος) και για την έκφραση των πρωτεϊνών DI στα κύτταρα με a-V5 αντίσωμα (1/3 του συνολικού δείγματος). Παρατηρείται η αδυναμία ουβικουτινυλίωσης των Dli3 και DI-K742R από τη λιγάση Neur.

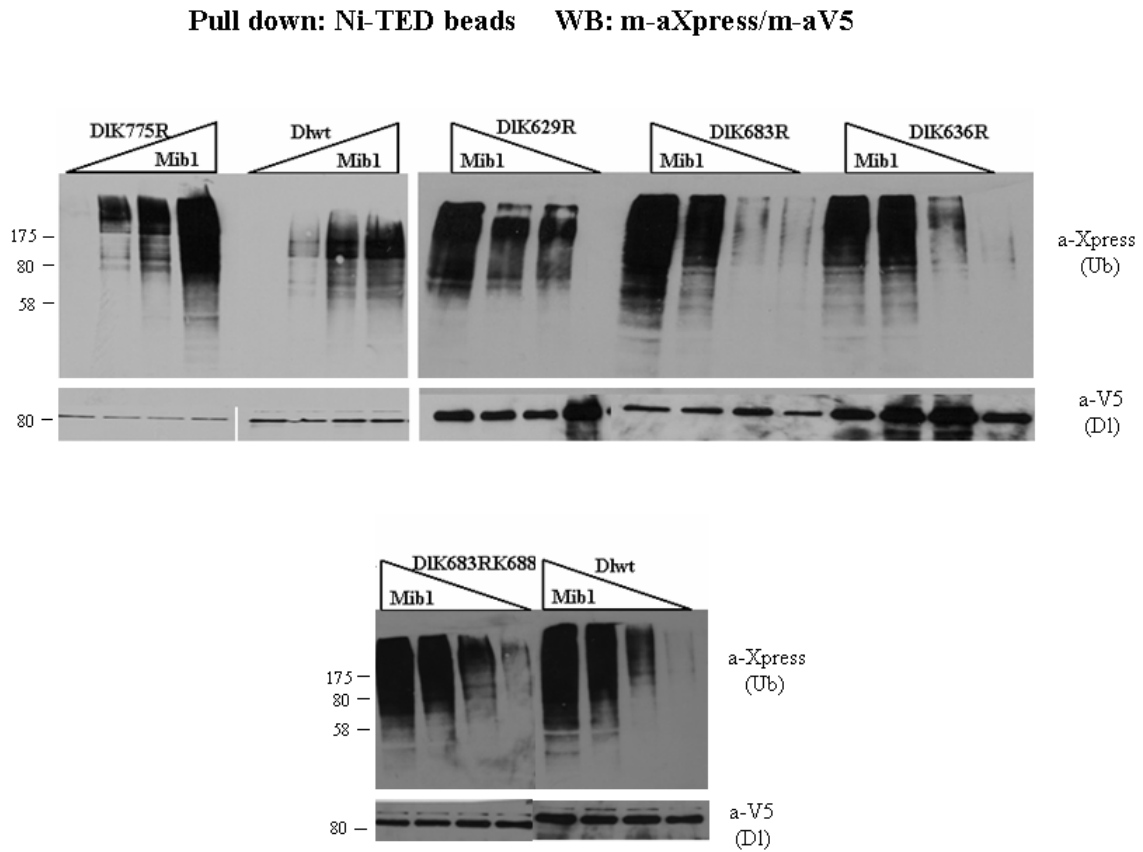
Δεξιά: Οι πρωτεΐνες D1wt, DI-K742R ή DI-K688R συνεκφράστηκαν σε κύτταρα S2 μαζί με την Xpress-Ubi και αυξανόμενες ποσότητες (0, 0.5, 1 και 1.5μg) του πλασμιδίου που εκφράζει τη λιγάση Mib1. Μετά τη λύση των κυττάρων κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, οι DI πρωτεΐνες απομονώθηκαν με σφαιρίδια νικελίου. Τα δείγματα εξετάστηκαν για την ύπαρξη ουβικουτινυλιωμένων μορφών των πρωτεϊνών DI με a-Xpress αντίσωμα (1/4 του συνολικού δείγματος) και για την έκφραση των πρωτεϊνών DI στα κύτταρα με a-V5 αντίσωμα (1/3 του συνολικού δείγματος). Παρατηρείται η ικανότητα της λιγάσης Mib1 να ουβικουτινυλιώνει τις DI-K742R και DI-K688R όπως την αγρίου τύπου πρωτεΐνη.

Στην προσπάθεια να βρεθεί η λυσίνη/λυσίνες –στόχος της Mib1 πάνω στην πρωτεΐνη D1, ακόμα 5 μεταλλάγματα λυσινών εξετάστηκαν για την ικανότητα τους να ουβικουιτινυλιώνονται από τη συγκεκριμένη λιγάση. Σε κύτταρα S2 συνεκφράστηκαν μία από τις πρωτεΐνες D1, D1-K629R, D1-K636R, D1-K683R, D1-K775R ή το διπλό μετάλλαγμα D1-K683RK688R, μαζί με την πρωτεΐνη Xpress-Ubi και αυξανόμενες ποσότητες της λιγάσης Mib1. Μετά τη λύση των κυττάρων κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, το εκχύλισμα επώαστηκε με σφαιρίδια νικελίου ώστε να δεσμευθούν οι πρωτεΐνες D1, και η ουβικουιτινυλίωση τους ελέγχθηκε με a-Xpress αντίσωμα, επίτοπο που φέρει η ουβικουιτίνη. Η έκφραση των πρωτεϊνών D1 στα κύτταρα εξετάστηκε με a-V5 αντίσωμα (εικόνα 3.8).

Παρατηρείται ότι κανένα από τα μονά ή το διπλό μετάλλαγμα που εξετάστηκαν δεν παρουσίασαν πρόβλημα στην ικανότητα τους να ουβικουιτινυλιώνονται από τη λιγάση Mib1. Όπως ήδη αναφέραμε οι K683 και K688 είναι τα μοναδικά κατάλοιπα λυσίνης στο *icd2*, το δεύτερο συντηρημένο μοτίβο το οποίο αποτελεί θέσης δέσμευσης της Mib1 πάνω στη D1. Παρόλα αυτά το διπλό μετάλλαγμα λυσινών δεν παρουσιάζει πρόβλημα ουβικουιτινυλίωσης από αυτή τη λιγάση.

Επιπλέον ελέγχθηκαν τα υπόλοιπα σημειακά μεταλλάγματα λυσίνης, για να διαπιστωθεί αν η λιγάση Neur ουβικουιτινυλιώνει την πρωτεΐνη D1 και σε κάποια άλλη λυσίνη εκτός της 742. Για το σκοπό αυτό, σε κύτταρα S2 συνεκφράστηκαν μία από τις πρωτεΐνες D1, D1-K629R, D1-K636R, D1-K683R, D1-K688R, D1-K775R ή το διπλό μετάλλαγμα D1-K683RK688R, μαζί με την πρωτεΐνη Xpress-Ubi και αυξανόμενες ποσότητες της λιγάσης Neur. Μετά τη λύση των κυττάρων κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, το εκχύλισμα επώαστηκε με σφαιρίδια νικελίου ώστε να δεσμευθούν οι πρωτεΐνες D1, και η ουβικουιτινυλίωση τους ελέγχθηκε με a-Xpress αντίσωμα, επίτοπο που φέρει η ουβικουιτίνη. Η έκφραση των πρωτεϊνών D1 στα κύτταρα ελέγχθηκε με a-V5 αντίσωμα (εικόνα 3.9).

Παρατηρείται ότι οποιαδήποτε μεταλλαγή λυσίνης, εκτός αυτή που αφορούσε την K742, άφηνε ανεπηρέαστη την ουβικουιτινυλίωση της πρωτεΐνης D1 από τη λιγάση Neur. Ακόμα και η λυσίνη 636, η οποία βρίσκεται μέσα στο μοτίβο *icd1* το οποίο είναι θέση δέσμευσης της συγκεκριμένης λιγάσης, και η λυσίνη 629 η οποία βρίσκεται ακριβώς πριν από αυτό, δεν άλλαξαν τις ανιχνεύσιμες ποσότητες ουβικουιτινυλιωμένων μορφών της πρωτεΐνης D1.

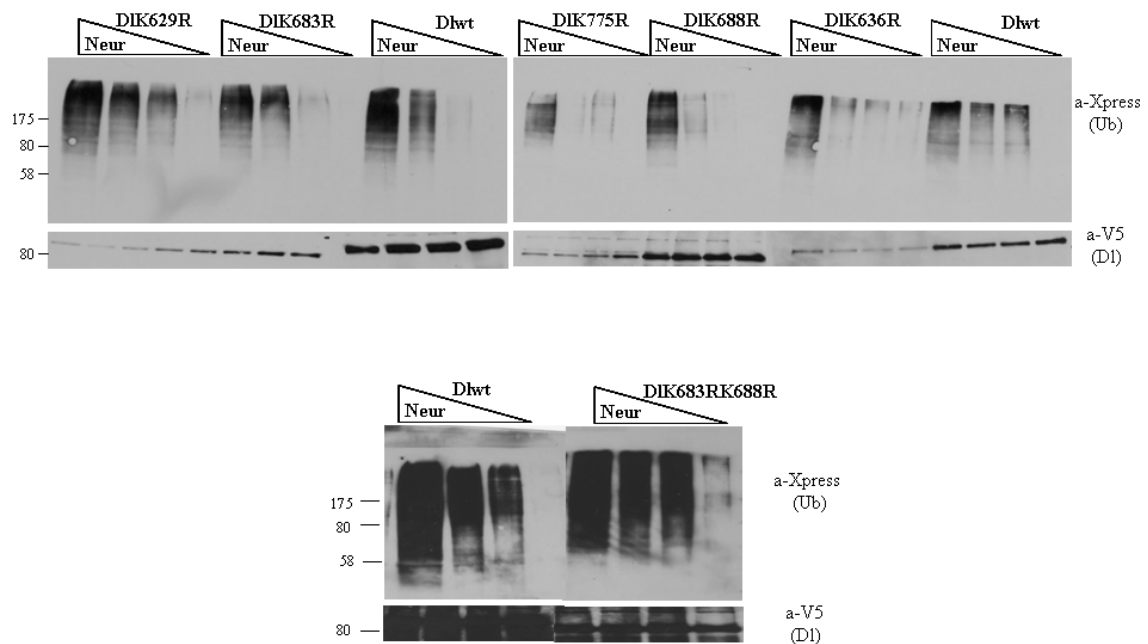


Εικόνα 3.8: Ουβικουιτινυλίωση σημειακών μεταλλάξεων λυσίνης της πρωτεΐνης DI από τη λιγάση Mindbomb1.

Πάνω: Οι πρωτεΐνες DI-K775R, DI-wt, DI-K629R, DI-683R ή DI-K636R συνεκφράστηκαν σε κύτταρα S2 μαζί με την Xpress-Ubi και αυξανόμενες ποσότητες (0, 0.5, 1 και 1.5μg) του πλασμιδίου που εκφράζει τη λιγάση Mib1. Μετά τη λύση των κυττάρων κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, οι DI πρωτεΐνες απομονώθηκαν με σφαιρίδια νικελίου. Τα δείγματα εξετάστηκαν για την ύπαρξη ουβικουιτινυλιωμένων μορφών των πρωτεϊνών DI με a-Xpress αντίσωμα (1/4 του συνολικού δείγματος) και για την έκφραση των πρωτεϊνών DI στα κύτταρα με a-V5 αντίσωμα (1/3 του συνολικού δείγματος). Παρατηρείται η ικανότητα όλων των πρωτεϊνών να ουβικουιτινυλιώνονται από τη λιγάση Mib1.

Κάτω: Η αγρίου τύπου πρωτεΐνη DI ή το διπλό σημειακό μετάλλαγμα DI-K683K688R συνεκφράστηκαν σε κύτταρα S2 μαζί με την Xpress-Ubi και αυξανόμενες ποσότητες (0, 0.5, 1 και 1.5μg) του πλασμιδίου που εκφράζει τη λιγάση Mib1. Μετά τη λύση των κυττάρων κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, οι DI πρωτεΐνες απομονώθηκαν με σφαιρίδια νικελίου. Τα δείγματα εξετάστηκαν για την ύπαρξη ουβικουιτινυλιωμένων μορφών των πρωτεϊνών DI με a-Xpress αντίσωμα (1/4 του συνολικού δείγματος) και για την έκφραση των πρωτεϊνών DI στα κύτταρα με a-V5 αντίσωμα (1/3 του συνολικού δείγματος). Ακόμα και αν αφαιρέσουμε τις δύο λυσίνες που βρίσκονται στο μοτίβο δέσμευσης της λιγάσης Mib1 (icd2), αυτή δεν αντιμετωπίζει πρόβλημα στο να ουβικουιτινυλιώσει την πρωτεΐνη DI.

Pull down: Ni-TED beads WB: m-aXpress/m-aV5

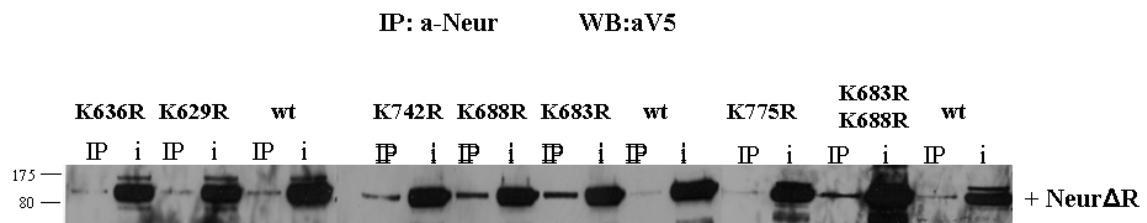


Εικόνα 3.9: Ουβικουτινυλίωση σημειακών μεταλλαγμάτων λυσίνης της πρωτεΐνης D1 από τη λιγάση Neuralized.

Πάνω: Οι πρωτεΐνες D1-K629R, D1-K683R, D1wt, D1-K775R, D1-K688R ή D1-K636R συνεκφράστηκαν σε κύτταρα S2 μαζί με την Xpress-Ubi και αυξανόμενες ποσότητες (0, 0.5, 1 και 1.5 μg) του πλασμίδιου που εκφράζει τη λιγάση Neur. Μετά τη λύση των κυττάρων κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, οι D1 πρωτεΐνες απομονώθηκαν με σφαιρίδια νικελίου. Τα δείγματα εξετάστηκαν για την ύπαρξη ουβικουτινυλιωμένων μορφών των πρωτεϊνών D1 με a-Xpress αντίσωμα (1/4 του συνολικού δείγματος) και για την έκφραση των πρωτεϊνών D1 στα κύτταρα με a-V5 αντίσωμα (1/3 του συνολικού δείγματος). Παρατηρείται η ικανότητα όλων των πρωτεϊνών να ουβικουτινυλιώνονται από τη λιγάση Neur.

Κάτω: Η αγρίου τύπου πρωτεΐνη D1 ή το διπλό σημειακό μετάλλαγμα D1-K683K688R συνεκφράστηκαν σε κύτταρα S2 μαζί με την Xpress-Ubi και αυξανόμενες ποσότητες (0, 0.5, 1 και 1.5 μg) του πλασμίδιου που εκφράζει τη λιγάση Neur. Μετά τη λύση των κυττάρων κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, οι D1 πρωτεΐνες απομονώθηκαν με σφαιρίδια νικελίου. Τα δείγματα εξετάστηκαν για την ύπαρξη ουβικουτινυλιωμένων μορφών των πρωτεϊνών D1 με a-Xpress αντίσωμα (1/4 του συνολικού δείγματος) και για την έκφραση των πρωτεϊνών D1 στα κύτταρα με a-V5 αντίσωμα (1/3 του συνολικού δείγματος). Η αφαίρεση και των δύο καταλοίπων λυσίνης που βρίσκονται στο icd2 δεν επηρεάζει την ουβικουτινυλίωση της πρωτεΐνης D1 από τη λιγάση Neur.

Για να επιβεβαιώσουμε ότι τα σημειακά μεταλλάγματα λυσινών της πρωτεΐνης D1 διατηρούν την ικανότητα τους να αλληλεπιδρούν με τη λιγάση ουβικουιτίνης Neutralized ακολούθησε πείραμα συνανοσοκατακρήμισης. Συνεκφράσαμε τα διάφορα D1 μεταλλάγματα μαζί με την πρωτεΐνη NeurΔR, σε κύτταρα S2. Ακολούθησε ανοσοκατακρήμιση με r-aNeur αντίσωμα, το οποίο προσδένει την NeurΔR και western blot με m-aV5 αντίσωμα το οποίο ανιχνεύει τις πρωτεΐνες D1 (εικόνα 3.10). Ένα μικρό ποσοστό του κυτταρικού εκχυλίσματος δεν ανοσοκατακρημνήθηκε αλλά χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της έκφρασης των πρωτεϊνών Delta στα κύτταρα (διαδρομές i). Παρατηρούμε ότι όλα τα σημειακά μεταλλάγματα μπορούσαν να συνανοσοκατακρημνηθούν (διαδρομές IP) διατηρώντας την αλληλεπίδραση τους με τη λιγάση Neur.



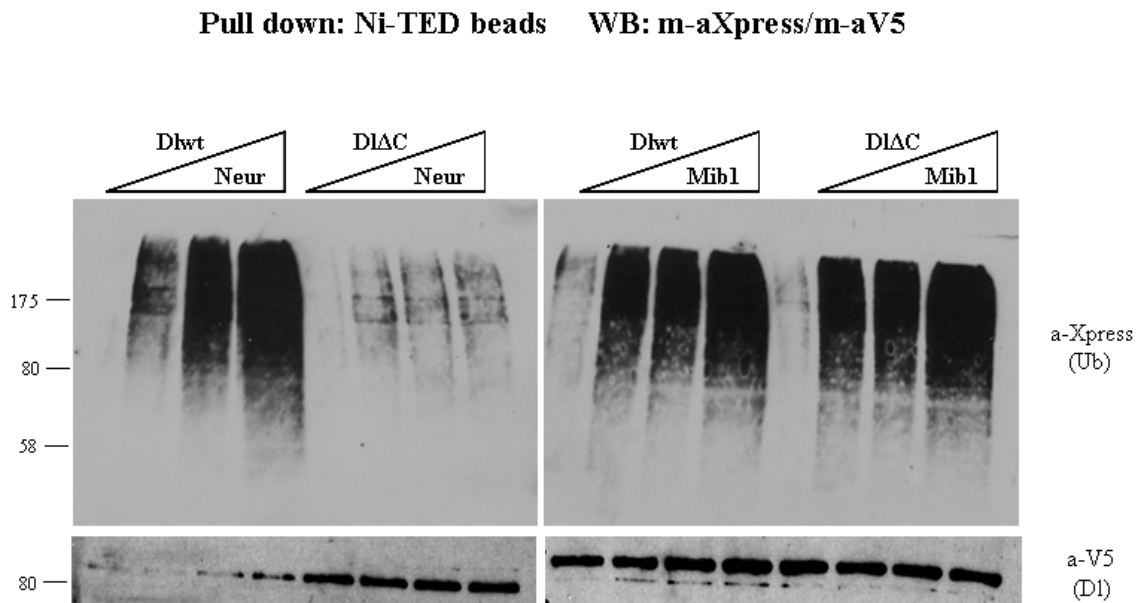
Εικόνα 3.10: Τα σημειακά μεταλλάγματα λυσινών της πρωτεΐνης D1 μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τη λιγάση ουβικουιτίνης Neutralized.

Διάφορα μεταλλάγματα της D1 πρωτεΐνης τα οποία έφεραν τον V5 επίτοπο εκφράστηκαν σε κύτταρα S2 παρουσία πρωτεΐνης NeurΔR. Τα εκχυλίσματα των κυττάρων ανοσοκατακρημνήθηκαν με r-aNeur αντίσωμα και η ανίχνευση έγινε με m-aV5 αντίσωμα. Με IP συμβολίζεται η ανοσοκατακρήμιση ενώ με i ένα μικρό ποσοστό του κυτταρικού εκχυλίσματος (4%) για να ελεγχθεί η έκφραση των D1 πρωτεϊνών. Οι κύριες ζώνες αποτελούν τις πρωτεΐνες D1, με μοριακό βάρος 90kDa. Παρατηρείται ότι όλα τα μεταλλάγματα διατηρούν την ικανότητα τους να αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη NeurΔR.

Στην προσπάθεια να εντοπιστεί κάποια συγκεκριμένη λυσίνη-στόχος για τη λιγάση Mib1 στην ενδοκυττάρια περιοχή της πρωτεΐνης D1, χρησιμοποιήθηκε το μεταλλάγμα D1ΔC. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη αποτελεί μια ελλειμματική μορφή της D1 η οποία σταματάει στο αμινοξύ V720 (εικόνα 3.1), συνεπώς δεν περιέχει τις λυσίνες 739, 742, 762 και 775. Ήδη γνωρίζουμε από προηγούμενα πειράματα ότι η λυσίνη 742 δεν αποτελεί στόχο ή μοναδικό στόχο ουβικουιτινυλίωσης της D1 από τη Mib1 (εικόνα 3.7). Για να ελεγχθούν και οι υπόλοιπες τρεις λυσίνες, η πρωτεΐνη D1ΔC και συγκριτικά η αγρίου τύπου D1, υπερεκφράστηκαν σε κύτταρα S2, μαζί με την πρωτεΐνη Xpress-Ubi και αυξανόμενες ποσότητες της λιγάσης Mib1. Μετά τη λύση των κυττάρων κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, το εκχύλισμα επώαστηκε με σφαιρίδια νικελίου ώστε να δεσμευθούν οι πρωτεΐνες D1, και η ουβικουιτινυλίωση τους ελέγχθηκε με α-Xpress αντίσωμα, επίτοπο που φέρει η ουβικουιτίνη. Η έκφραση των πρωτεϊνών D1 στα κύτταρα ελέγχθηκε με α-V5 αντίσωμα (εικόνα 3.11). Για άμεση σύγκριση το ίδιο πείραμα έγινε και τη λιγάση Neur.

Όπως ήταν αναμενόμενο η λιγάση Neur δεν μπορεί να ουβικουιτινυλιώσει την πρωτεΐνη D1ΔC, από τη στιγμή που της λείπει η λυσίνη 742. Όσον αφορά την ουβικουιτινυλίωση από τη λιγάση Mib1 δεν παρουσιάστηκε κάποια διαφορά σε σύγκριση με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη.

Συνοψίζοντας μπορούμε να αναφέρουμε ότι το Neutralized ουβικουιτινυλιώνει τα μεταλλάγματα K629R, K636R, K683R, K688R, και K775R αντιθέτως με το K742R. Συνεπώς η λυσίνη 742 είναι σημαντική για την ουβικουιτινυλίωση από τη συγκεκριμένη λιγάση ενώ οι υπόλοιπες όχι. Από τα συγκεκριμένα πειράματα δε γνωρίζουμε το ρόλο των λυσινών K665, K739, K762 κατά την ουβικουιτινυλίωση από τη λιγάση Neur. Η Mib1 ουβικουιτινυλιώνει τα μεταλλάγματα K629R, K636R, K683R, K688R, K742R, K775R και το D1ΔC και επομένως τις λυσίνες K739, K762 δεν τις χρειάζεται. Δεν γνωρίζουμε το ρόλο της K665 για την ουβικουιτινυλίωση από τη συγκεκριμένη λιγάση. Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι είτε η λυσίνη 665 είναι ο σημαντικός στόχος για τη λιγάση Mib1, ή η λιγάση Mib1 δεν προτιμά μία συγκεκριμένη λυσίνη στην ενδοκυττάρια περιοχή της D1 αλλά μπορεί να ουβικουιτινυλιώσει ισάξια σε πολλούς διαφορετικούς στόχους σε αντίθεση με τη Neur, που πιθανώς να ουβικουιτινυλιώνει και αυτή σε πολλές λυσίνες στόχους, η βασική όμως είναι η 742.



Εικόνα 3.11: Ουβικουιτυλίωση των πρωτεϊνών D1 και D1ΔC από τις λιγάσες Mindbomb1 και Neuralized.

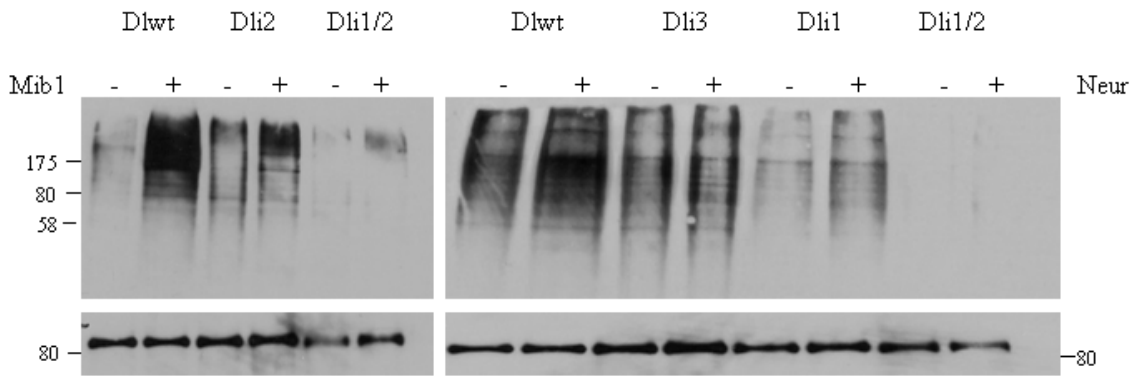
Αριστερά: Οι πρωτεΐνες D1wt και D1ΔC συνεκφράστηκαν σε κύτταρα S2 μαζί με την Xpress-Ubi και αυξανόμενες ποσότητες (0, 0.5, 1 και 1.5μg) του πλασμιδίου που εκφράζει τη λιγάση Neur. Μετά τη λύση των κυττάρων κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, οι D1 πρωτεΐνες απομονώθηκαν με σφαιρίδια νικελίου. Τα δείγματα εξετάστηκαν για την ύπαρξη ουβικουιτυλιωμένων μορφών των πρωτεϊνών D1 με a-Xpress αντίσωμα (1/4 του συνολικού δείγματος) και για την έκφραση των πρωτεϊνών D1 στα κύτταρα με a-V5 αντίσωμα (1/3 του συνολικού δείγματος). Παρατηρείται η αδυναμία ουβικουιτυλίωσης του D1ΔC.

Δεξιά: Οι πρωτεΐνες D1wt και D1ΔC συνεκφράστηκαν σε κύτταρα S2 μαζί με την Xpress-Ubi και αυξανόμενες ποσότητες (0, 0.5, 1 και 1.5μg) του πλασμιδίου που εκφράζει τη λιγάση Mib1. Μετά τη λύση των κυττάρων κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, οι D1 πρωτεΐνες απομονώθηκαν με σφαιρίδια νικελίου. Τα δείγματα εξετάστηκαν για την ύπαρξη ουβικουιτυλιωμένων μορφών των πρωτεϊνών D1 με a-Xpress αντίσωμα (1/4 του συνολικού δείγματος) και για την έκφραση των πρωτεϊνών D1 στα κύτταρα με a-V5 αντίσωμα (1/3 του συνολικού δείγματος). Παρατηρείται η ικανότητα της λιγάσης Mib1 να ουβικουιτυλιώνει την D1ΔC όπως την αγρίου τύπου πρωτεΐνη.

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι για όλα τα πειράματα ουβικουιτινυλίωσης σε κάθε πηγάδι του western blot χρησιμοποιήθηκαν περίπου 1.2×10^6 κύτταρα. Αυτή η ποσότητα επιλέχθηκε σύμφωνα με την ουβικουιτινυλίωση της αγρίου τύπου πρωτεΐνης D1. Όταν χρησιμοποιούσαμε μεγαλύτερη ποσότητα κυττάρων η ουβικουιτινυλίωση έφτανε σε σημείου κορεσμού και ήταν δύσκολο να ανιχνευθεί αύξηση της με αυξανόμενες ποσότητες των λιγασών.

Χρησιμοποιώντας όμως μεγαλύτερη ποσότητα κυττάρων, 3.3×10^6 , έγινε εφικτό να ανιχνευθεί ουβικουιτινυλίωση σε μεταλλάγματα που με τις προηγούμενες συνθήκες ήταν μη ανιχνεύσιμη (εικόνα 3.12). Σε κύτταρα S2, υπερεκφράστηκε ή όχι η λιγάση Neur ή η Mib1 (μία μόνο ποσότητα), μαζί με την πρωτεΐνη Xpress-Ubi και τα μεταλλάγματα που η κάθε λιγάση αδυνατούσε να ουβικουιτινυλίώσει, συγκριτικά με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη. Μετά τη λύση των κυττάρων κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, το εκχύλισμα επώαστηκε με σφαιρίδια νικελίου ώστε να δεσμευθούν οι πρωτεΐνες D1, και η ουβικουιτινυλίωση τους εξετάστηκε με a-Xpress αντίσωμα, επίτοπο που φέρει η ουβικουιτίνη. Η έκφραση των πρωτεϊνών D1 στα κύτταρα εξετάστηκε με a-V5 αντίσωμα.

Παρατηρούμε ότι όταν χρησιμοποιήσουμε αυξημένες ποσότητες κυττάρων μπορούμε να ανιχνεύσουμε ουβικουιτινυλίωση του Dli2 όταν εκφράζουμε τη λιγάση Mib1 και των Dli3 και Dli1 όταν εκφράζουμε τη Neur. Δεν παρατηρούμε όμως αξιοσημείωτη διαφορά από την ύπαρξη ή απουσία της λιγάσης κάθε φορά, όσον αφορά την ουβικουιτινυλίωση των μεταλλαγμάτων. Πιθανότητα αυτό το σήμα να οφείλεται στις ενδογενείς Neur και Mib1 των S2 κυττάρων. Σε αυτό συνηγορεί το γεγονός ότι το μετάλλαγμα Dli1/2 ακόμα και σε αυτές τις συνθήκες δεν παρουσίασε σημαντικές ποσότητες ουβικουιτινυλιωμένων μορφών, προφανώς επειδή οι ενδογενείς λιγάσες Neur και Mib1 δεν μπορούν να προσδεθούν. Όμως το μικρό ποσοστό ουβικουιτινυλιωμένων μορφών του μεταλλάγματος Dli1/2 ίσως εξηγείται από την ύπαρξη και άλλων E3 λιγασών που στοχεύουν την πρωτεΐνη D1.



Εικόνα 3.12: Ανίχνευση της ουβικουιτινύωσης των πρωτεϊνών Dli2 και Dli1/2 από τη Mib1 και των Dli3, Dli1 και Dli1/2 από τη Neur με αυξημένες ποσότητες κυττάρων S2.

Αριστερά: Οι πρωτεΐνες Dlwt, Dli2 και Dli1/2 συνεκφράστηκαν σε κύτταρα S2 μαζί με την Xpress-Ubi παρουσία ή απουσία του πλασμιδίου που εκφράζει τη λιγάση Mib1 (1μg). Μετά τη λύση των κυττάρων κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, οι DI πρωτεΐνες απομονώθηκαν με σφαιρίδια νικελίου. Τα δείγματα εξετάστηκαν για την ύπαρξη ουβικουιτινυλωμένων μορφών των πρωτεϊνών DI με α-Xpress αντίσωμα (2/3 του συνολικού δείγματος) και για την έκφραση των πρωτεϊνών DI στα κύτταρα με α-V5 αντίσωμα (1/3 του συνολικού δείγματος). Υπό αυτές τις συνθήκες είναι δυνατή η ανίχνευση ουβικουιτινυλωμένων μορφών της Dli2.

Δεξιά: Οι πρωτεΐνες Dlwt, Dli3, Dli1 και Dli1/2 συνεκφράστηκαν σε κύτταρα S2 μαζί με την Xpress-Ubi παρουσία ή απουσία του πλασμιδίου που εκφράζει τη λιγάση Neur (1μg). Μετά τη λύση των κυττάρων κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, οι DI πρωτεΐνες απομονώθηκαν με σφαιρίδια νικελίου. Τα δείγματα εξετάστηκαν για την ύπαρξη ουβικουιτινυλωμένων μορφών των πρωτεϊνών DI με α-Xpress αντίσωμα (2/3 του συνολικού δείγματος) και για την έκφραση των πρωτεϊνών DI στα κύτταρα με α-V5 αντίσωμα (1/3 του συνολικού δείγματος). Υπό αυτές τις συνθήκες είναι δυνατή η ανίχνευση ουβικουιτινυλωμένων μορφών της Dli3 και Dli1.

Συνοψίζοντας:

- Το πρώτο συντηρημένο μοτίβο αποτελεί τη θέση αλληλεπίδρασης της λιγάσης Neur στην πρωτεΐνη D1.
- Το δεύτερο συντηρημένο μοτίβο αποτελεί τη θέση αλληλεπίδρασης της λιγάσης Mib1 στην πρωτεΐνη D1.
- Η πρωτεΐνη D1 ουβικουιτυλιώνεται σε κύτταρα S2 από τις λιγάσες ουβικουιτίνης Neur και Mib1.
- Η λυσίνη 742, η οποία βρίσκεται στο τρίτο συντηρημένο μοτίβο, αποτελεί στόχο ουβικουιτυλίωσης της λιγάσης Neur.
- Είτε δεν υπάρχει συγκεκριμένη, μοναδική λυσίνη-στόχος για την λιγάση Mib1 ή αυτή αποτελεί η λυσίνη K665 η οποία δεν εξετάστηκε.
- Και οι δύο λιγάσες παράγουν πολυ-ουβικουιτυλιωμένες μορφές της πρωτεΐνης D1, ενώ η λιγάση Neur φαίνεται να παράγει σε μεγάλη ποσότητα και μια μονο-ουβικουιτυλιωμένη μορφή.

4. Αποτελέσματα II

Ενεργότητα των μεταλλαγμάτων DI

Ενεργότητα των ελλειμματικών μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης Delta στο ραχαιοκοιλιακό όριο του φτερού

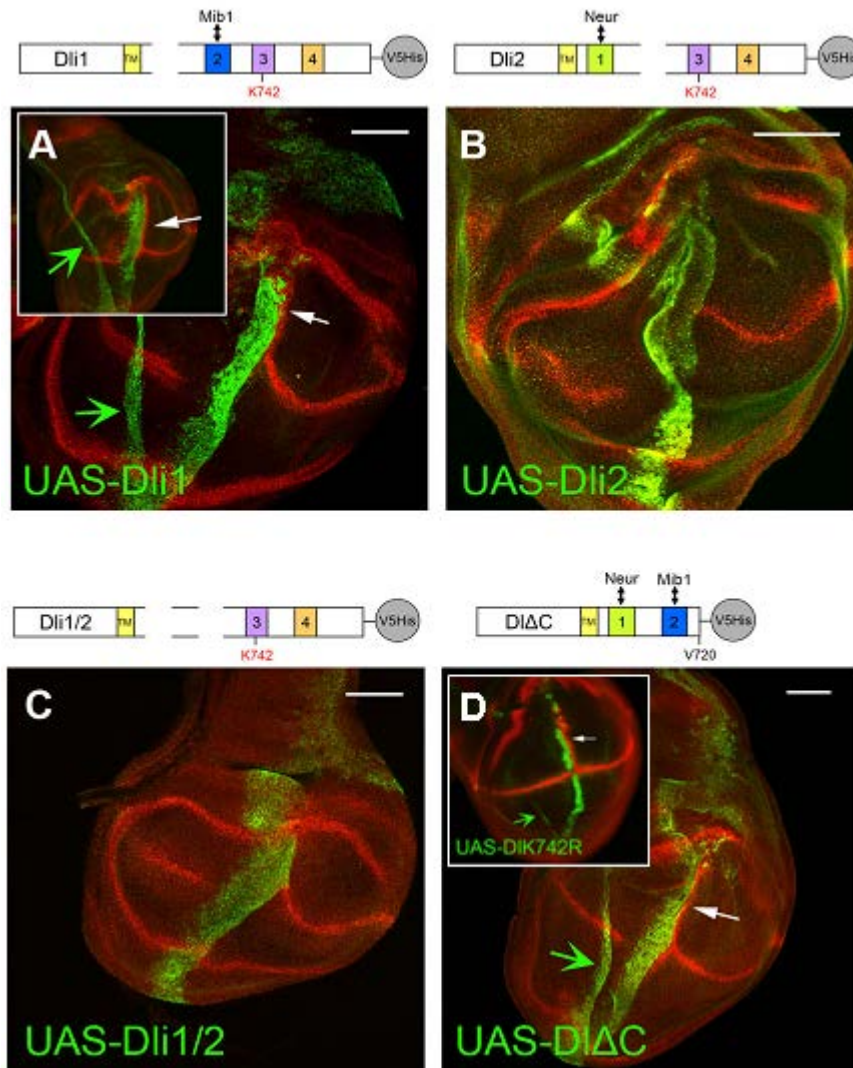
Από την ανάλυση που παρουσιάστηκε στην προηγούμενη ενότητα προκύπτει ο ρόλος των ενδοκυττάρων συντηρημένων μοτίβων *icd1* και *icd2* της πρωτεΐνης DI όσον αφορά την πρόσδεση των E3 λιγασών ουβικουιτίνης *Neur* και *Mib1* αντίστοιχα. Επιπλέον συμπεραίνουμε ότι ο βασικός στόχος ουβικουιτινυλίωσης από τη λιγάση *Neur* είναι η λυσίνη του *icd3* μοτίβου. Ο επόμενος στόχος ήταν να βρεθεί η πιθανή σχέση μεταξύ της ουβικουιτινυλίωσης της πρωτεΐνης DI και της ικανότητας της για σηματοδότηση. Συνεπώς η ερώτηση που προκύπτει είναι αν και πώς τα συντηρημένα ενδοκυττάρια μοτίβα καθορίζουν τη ενεργότητα της πρωτεΐνης DI *in vivo*.

Αρχικά, για να μελετήσουμε την ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch χρησιμοποιήσαμε τον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού της προνύμφης και συγκεκριμένα το τμήμα από όπου θα προκύψει το φτερό του ενήλικου ατόμου. Στο συγκεκριμένο τμήμα του αναπτυξιακού δίσκου το μονοπάτι Notch ενεργοποιείται σε μία γραμμή κυττάρων που ονομάζεται ραχαιοκοιλιακό όριο. Η ενεργοποίηση αυτή προκύπτει από τη συντονισμένη δράση των δεσμευτών DI και Ser εκατέρωθεν του ορίου. Ο υποδοχέας Notch είναι γλυκοζυλιωμένος στο ραχιαίο τμήμα του φτερού και όχι στο κοιλιακό και αυτή η διαφοροποίηση τον κάνει να ενεργοποιείται από το DI στη ραχιαία πλευρά και από το Ser στην κοιλιακή. Αποτέλεσμα αυτής της συντονισμένης δράσης είναι η ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch στο ραχαιοκοιλιακό όριο και η ενεργοποίηση στα κύτταρα αυτά γονιδίων-στόχων όπως τα *wg*, *vg*, *cut* και *E(spl)*.

Για να μελετηθεί η ενεργότητα των ελλειπτικών μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης DI στο ραχαιοκοιλιακό όριο του φτερού, οι πρωτεΐνες αυτές υπερεκφράστηκαν σε μία ομάδα κυττάρων κάθετα στο όριο. Η υπερέκφραση των UAS διαγονιδίων στο συγκεκριμένο τμήμα του δίσκου οδηγήθηκε από το *ptc-Gal4*. Όταν ένα αγρίου τύπου UAS-DI διαγονίδιο υπερεκφράζεται στην περιοχή αυτή, η ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch συμβαίνει στα κύτταρα τα οποία βρίσκονται δίπλα στα κύτταρα που υπερεκφράζουν, στο εμπρόσθιο και οπίσθιο τμήμα του φτερού (εικόνα 4.1). Στα κύτταρα τα οποία υπερεκφράζουν τους δεσμευτές DI και Ser δεν μπορεί να γίνει επαγωγή του μονοπατιού Notch, γιατί δεσμευτές και υποδοχέας προσδένονται στο ίδιο κύτταρο (*cis*-αναστολή) (de Celis and Bray, 1997,

Doherty et al., 1996). Επιπλέον η επαγωγή από την πρωτεΐνη D1 περιορίζεται στο ραχιαίο τμήμα λόγω διαφορικής γλυκοζυλίωσης του υποδοχέα όπως προαναφέρθηκε (Irvine and Vogt, 1997). Τέλος η επαγωγή που οδηγείται από το *ptc-Gal4* είναι καλύτερα ανιχνεύσιμη σε κύτταρα που βρίσκονται στο οπίσθιο τμήμα του φτερού, γιατί στην περιοχή αυτή η έκφραση του *ptc* διακόπτεται απότομα δημιουργώντας ένα ξεκάθαρο όριο μεταξύ κυττάρων που υπερεκφράζουν και όχι. Στο εμπρόσθιο τμήμα η έκφραση πέφτει σταδιακά καθώς απομακρυνόμαστε με αποτέλεσμα η επαγωγή να είναι πιο αδύναμη. Για να ερευνηθεί η σηματοδοτική ικανότητα των D1 μεταλλάξεων ελέγξαμε αν μπορούν να επάγουν την έκφραση του *wg*, γονιδίου στόχου του μονοπατιού Notch στο ραχιαιοκοιλιακό όριο (de Celis et al., 1996, Doherty et al., 1996, Neumann and Cohen, 1996). Είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch στην περιοχή αυτή του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού εξαρτάται μόνο από τη λιγάση Mib1, η οποία εκφράζεται ομοιογενώς σε ολόκληρο το δίσκο και όχι από τη Neur, η οποία εκφράζεται κυρίως στους προνευρικούς πληθυσμούς (Lai et al., 2005, Le Borgne et al., 2005, Pitsouli and Delidakis, 2005, Wang and Struhl, 2005).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.1, η υπερέκφραση των πρωτεϊνών Dli1, D1ΔC και D1K742R οδήγησε στην επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης Wg στα γειτονικά κύτταρα όπως ακριβώς και η αγρίου τύπου D1 (εικόνα 4A, D). Αντιθέτως η υπερέκφραση των πρωτεϊνών Dli2 και D11/2 δεν οδήγησε στο ίδιο αποτέλεσμα αποτυγχάνοντας να επάγει την έκφραση της Wg (εικόνα 4B, C). Παρατηρούμε όμως ότι σε όλες τις περιπτώσεις κύτταρα τα οποία υπερέκφραζαν τον δεσμευτή σταματούσαν να εκφράζουν την πρωτεΐνη Wg η οποία είχε επαχθεί ενδογενώς κατά μήκος του ραχιαιοκοιλιακού ορίου. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η αδυναμία δέσμευσης με τη λιγάση Mib1, στις περιπτώσεις όπου δεν υπάρχει το δεύτερο συντηρημένο μοτίβο, οδηγεί σε ανικανότητα της πρωτεΐνης D1 να ενεργοποιήσει το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch, αποτέλεσμα που συνδέει άμεσα την ουβικουιτινυλίωση του D1 με τη σηματοδοτική του ικανότητα. Αντιθέτως η ικανότητα του δεσμευτή να προσδένεται στον υποδοχέα και να προκαλεί το φαινόμενο του *cis-inhibition* παραμένει ανεπηρέαστη, συμπέρασμα που προκύπτει από τη διακοπή έκφρασης Wg σε κύτταρα που υπερεκφράζουν τα μεταλλάγματα. Η ανικανότητα δέσμευσης ή ουβικουιτινυλίωσης από τη λιγάση Neur στην περίπτωση των Dli1, D1ΔC και D1K742R δεν επηρεάζει τη σηματοδότηση επειδή αυτή η λιγάση δε εκφράζεται σε αυτό το τμήμα του αναπτυξιακού δίσκου.



Εικόνα 4.1: Ενεργότητα των DI ελλειπτικών μεταλλάξεων στο ραχαιοκοιλιακό όριο του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού με τη χρήση *ptc-Gal4*.

Οι παραπάνω εικόνες δείχνουν αναπτυξιακούς δίσκους του φτερού από προνύμφες τρίτου σταδίου. Έχει γίνει χρώση για τις DI πρωτεΐνες με *gr-aDI* αντίσωμα (πράσινο) και για *Wg* με *m-aWg* αντίσωμα (κόκκινο). Το εμπρόσθιο τμήμα του δίσκου βρίσκεται αριστερά, ενώ το ραχιαίο πάνω. Οι γραμμές κλίμακας είναι των 50μm. Στις εικόνες A-D υπερεκφράζονται τα διάφορα DI ελλειμματικά μεταλλάγματα κάτω από τον έλεγχο του *ptc-Gal4*. Η μικρή εικόνα στο πρώτο πάνελ αντιπροσωπεύει την αγρίου τύπου πρωτεΐνη, ενώ αυτή στο τελευταίο το σημειακό μετάλλαγμα DIK742R. Παρατηρείται εκτοπική ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch, η οποία ανιχνεύεται με την επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης *Wg* στο ραχιαίο και οπίσθιο τμήμα, όταν υπερεκφράζεται η αγρίου τύπου DI, η Dli1, η DIΔC και η DIK742R (A, D, άσπρα βέλη). Επιπλέον παρατηρείται αδυναμία σηματοδότησης από τις πρωτεΐνες Dli2 και Dli1/2 (B, C). Τα πράσινα βέλη υποδεικνύουν την εκτοπική έκφραση των DI σε κύτταρα της περιπόδιας μεμβράνης τα οποία αντιθέτως με τα κύτταρα του επιθηλίου δεν επάγουν *Wg* κατά τη σηματοδότηση Notch.

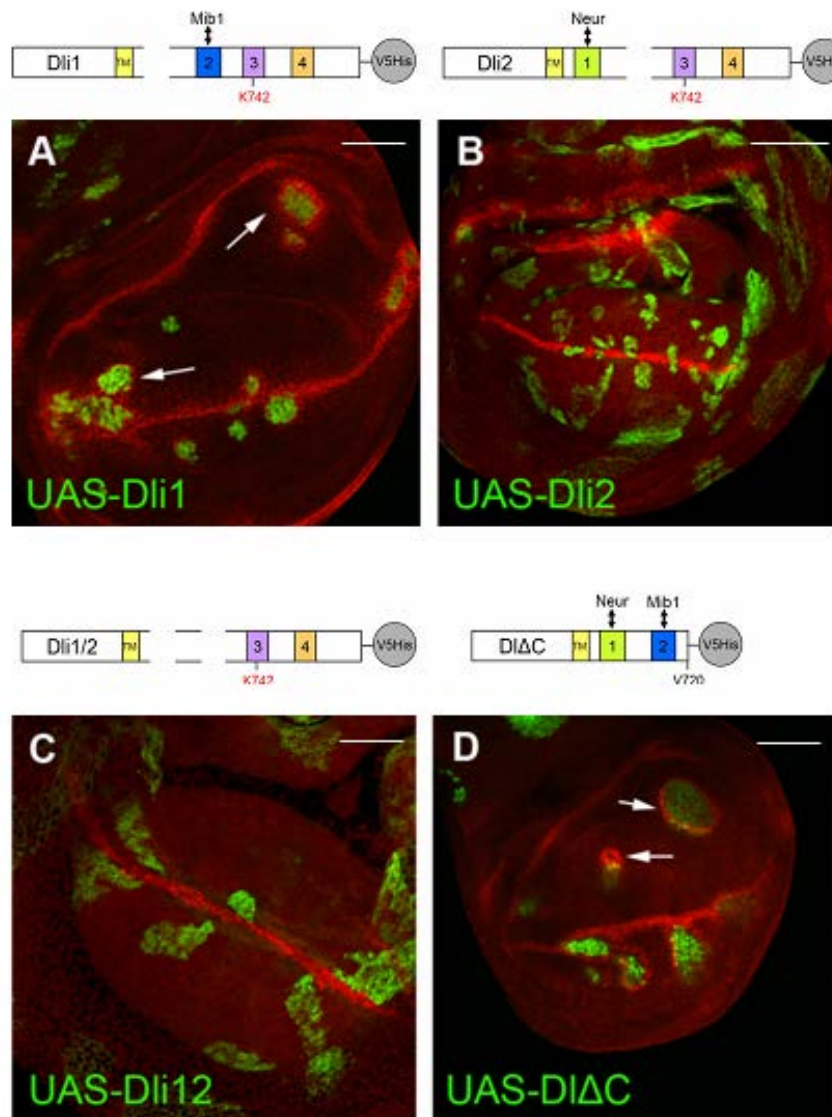
Για να μελετηθεί εκτενέστερα η σηματοδοτική ικανότητα των ελλειπτικών μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης D1 στο ραχιαιοκοιλιακό όριο του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού, δημιουργήθηκαν μιτωτικοί κλώνοι υπερέκφρασης των D1 πρωτεϊνών. Όπως και στην περίπτωση του *ptc-Gal4*, έτσι και οι μιτωτικοί κλώνοι που υπερεκφράζουν D1 ενεργοποιούν εκτοπικά το μονοπάτι N κυρίως στο ραχιαίο διαμέρισμα του δίσκου. Τα ενεργά μεταλλάγματα, στην προκειμένη περίπτωση αυτά που αλληλεπιδρούν με το Mib1, οφείλουν να προκαλούν την επαγωγή της πρωτεΐνης Wingless στα γειτονικά τους κύτταρα. Πράγματι, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.2, οι μιτωτικοί κλώνοι υπερέκφρασης των πρωτεϊνών Dli1 και D1ΔC προκαλούν την ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch στα γειτονικά κύτταρα με αποτέλεσμα την υπερέκφραση της πρωτεΐνης Wg (εικόνα 4.2A, D). Αντιθέτως οι ανενεργές πρωτεΐνες, δηλαδή αυτές που δεν μπορούν να δεσμευτούν από τη λιγάση Mib1, αδυνατούν να προκαλέσουν την επαγωγή Wg (εικόνα 4.2B, C).

Για να επιβεβαιώσουμε ότι ενεργότητα που δείχνουν τα μεταλλάγματα Dli1 και D1ΔC οφείλεται στην ενεργοποίηση τους από τη λιγάση Mib1, δημιουργήθηκαν μιτωτικοί κλώνοι στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού οι οποίοι υπερέκφραζαν ένα από αυτά τα μεταλλάγματα αλλά δεν εξέφραζαν την πρωτεΐνη Mib1. Παρατηρούμε ότι σε αυτή την περίπτωση οι πρωτεΐνες Dli1 και D1ΔC είναι ανενεργές, δεν μπορούν να ενεργοποιήσουν το μονοπάτι Notch στα γειτονικά κύτταρα και να προκαλέσουν την επαγωγή της Wg (εικόνα 4.3A, D). Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η ενεργότητα τους σε αυτή την περιοχή του δίσκου οφείλεται στην αλληλεπίδραση τους με τη λιγάση Mib1.

Επιπλέον θέλαμε να επιβεβαιώσουμε ότι η σηματοδοτική ικανότητα της πρωτεΐνης Dli2 θα επανερχόταν με συνέκφραση της λιγάσης Neur. Η πρωτεΐνη Dli2 αδυνατεί να αλληλεπιδράσει με τη λιγάση Mib1 και γι αυτό δεν μπορεί να σηματοδοτήσει σε αυτή την περιοχή του φτερού, όπου η λιγάση Neur δεν εκφράζεται ενδογενώς. Σε μιτωτικούς κλώνους όμως όπου υπερεκφραζόταν η Dli2 μαζί με τη λιγάση Neur, η πρώτη ανέκτησε τη σηματοδοτική της ικανότητα και προκάλεσε την έκφραση της πρωτεΐνης Wg στα γειτονικά κύτταρα, επιβεβαιώνοντας ότι δεν ενεργοποιείται από τη λιγάση Mib1 λόγω έλλειψης αλληλεπίδρασης αλλά μόνο από τη λιγάση Neur (εικόνα 4.3B).

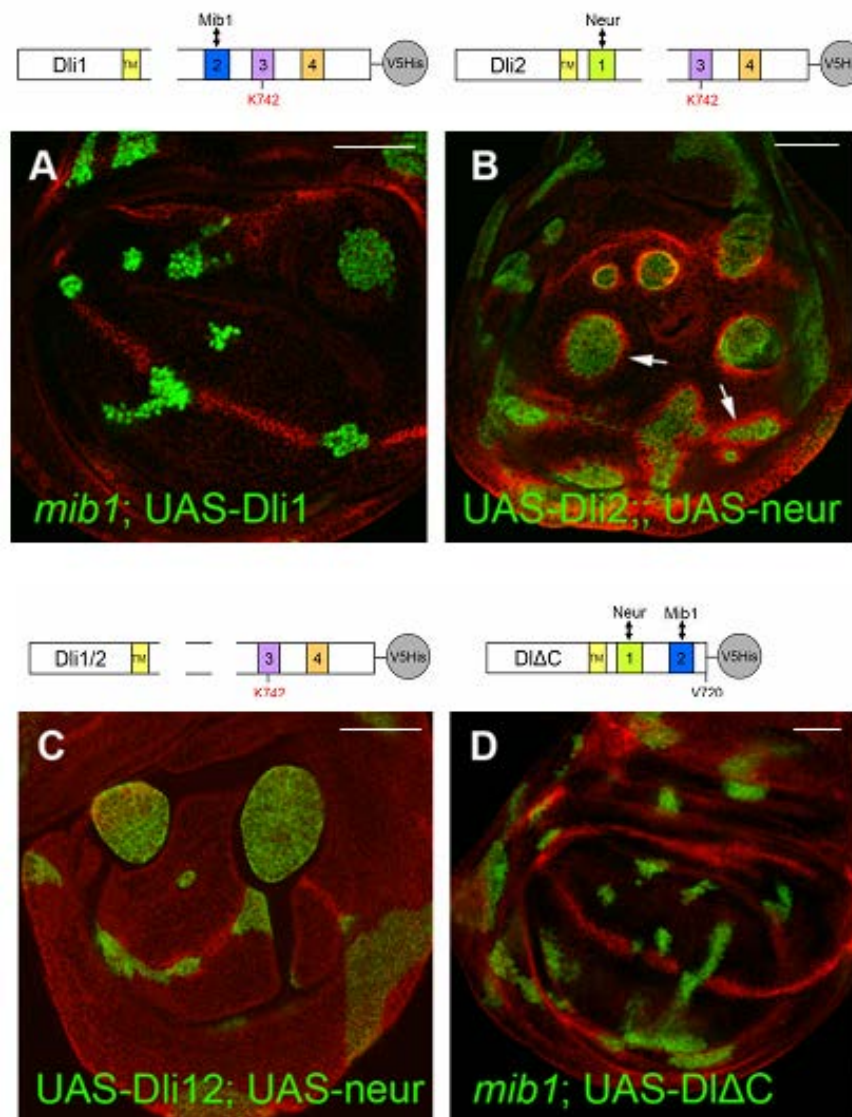
Αντιθέτως όταν μιτωτικοί κλώνοι υπερέκφρασης του μεταλλάγματος Dli1/2 και της λιγάσης Neur εξετάστηκαν για τη σηματοδοτική τους ικανότητα, διαπιστώθηκε ότι παρέμεναν ανενεργοί, γεγονός που επιβεβαιώνει την αδυναμία του διπλού μεταλλάγματος να αλληλεπιδράσει τόσο με τη λιγάση Mib1 όσο και με τη Neur και να σηματοδοτήσει (εικόνα 4.3C).

Σε όλες τις περιπτώσεις, είτε αφορούσε κλώνους σηματοδοτικά ενεργών μεταλλαγμάτων είτε ανενεργών, το φαινόμενο του cis-inhibition λάμβανε χώρα κανονικά (παρατηρείται η διακοπή έκφρασης της ενδογενούς Wg από κύτταρα που υπερεκφράζουν τα μεταλλάγματα), γεγονός που επιβεβαιώνει προηγούμενα αποτελέσματα που αποδείκνυαν ότι η ενεργότητα των λιγασών ουβικουιτίνης δεν χρειάζεται για το cis-inhibition (Glittenberg et al., 2006, Miller et al., 2009).



Εικόνα 4.2: Ενεργότητα των DII ελλειπτικών μεταλλάξεων στο ραχαιοκοιλιακό όριο του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού με τη χρήση μιτωτικών κλώνων.

Οι παραπάνω εικόνες δείχνουν αναπτυξιακούς δίσκους του φτερού από προνύμφες τρίτου σταδίου. Έχει γίνει χρώση για τις DII πρωτεΐνες με gr-aDII αντίσωμα (πράσινο) και για Wg με m-aWg αντίσωμα (κόκκινο). Το εμπρόσθιο τμήμα του δίσκου βρίσκεται αριστερά, ενώ το ραχιαίο πάνω. Οι γραμμές κλίμακας είναι των 50μm. Στις εικόνες A-D υπερεκφράζονται, κάτω από τον έλεγχο του act5C-Gal4, τα διάφορα DII ελλειμματικά μεταλλάγματα με δημιουργία τυχαίων μιτωτικών κλώνων υπερέκφρασης. Παρατηρείται εκτοπική ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch, η οποία ανιχνεύεται με την επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης Wg, όταν υπερεκφράζονται οι Dli1 και DIΔC (A, D, άσπρα βέλη). Επιπλέον παρατηρείται η αδυναμία σηματοδότησης από τα μεταλλάγματα Dli2 και Dli1/2 (B, C).



Εικόνα 4.3: Ενεργότητα των DII ελλειπτικών μεταλλάξεων στο ραχιαιοκοιλιακό όριο του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού με τη χρήση μιτωτικών κλώνων.

Οι παραπάνω εικόνες δείχνουν αναπτυξιακούς δίσκους του φτερού από προνύμφες τρίτου σταδίου. Το εμπρόσθιο τμήμα του δίσκου βρίσκεται αριστερά, ενώ το ραχιαίο πάνω. Οι γραμμές κλίμακας είναι των 50μm. Στις εικόνες A και D παρατηρούμε κλώνους όπου υπερεκφράζονται, κάτω από τον έλεγχο του atub-Gal4, τα μεταλλάγματα Dli1 και DliΔC απουσία της λιγάσης Mib1. Έχει γίνει χρώση για Wg με m-aWg αντίσωμα (κόκκινο) και οι κλώνοι σημαίνονται με πυρηνική GFP (πράσινο). Παρατηρείται ανικανότητα των μεταλλάξεων να σηματοδοτήσουν με έλλειψη της λιγάσης Mib1. Στις εικόνες B και C υπερεκφράζονται, κάτω από τον έλεγχο του act5C-Gal4, τα μεταλλάγματα Dli2 και Dli1/2 μαζί με τη λιγάση Neur. Έχει γίνει χρώση για Wg με m-aWg αντίσωμα (κόκκινο) και για τις DII πρωτεΐνες με gr-aDI αντίσωμα (πράσινο). Παρατηρείται εκτοπική ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch, η οποία ανιχνεύεται με την επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης Wg, όταν υπερεκφράζεται το μέταλλαγμα Dli2 μαζί με τη λιγάση Neur, γεγονός που αποδεικνύει ότι ανέκτησε τη σηματοδοτική του ικανότητα (B, άσπρα βέλη), αντιθέτως με το μέταλλαγμα Dli1/2 το οποίο παραμένει ανενεργό.

Ενεργότητα των ελλειμματικών μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης Delta κατά την πλευρική αναστολή

Με σκοπό να μελετηθεί περαιτέρω η σχέση μεταξύ της ουβικουιτινυλίωσης της πρωτεΐνης DI και της ικανότητας της για σηματοδότηση, ελέγξαμε αν και πώς τα συντηρημένα ενδοκυττάρια μοτίβα καθορίζουν τη ενεργότητα της πρωτεΐνης DI κατά την πλευρική αναστολή. Ο όρος πλευρική αναστολή αναφέρεται στην διαδικασία κατά την οποία ένα κύτταρο μπορεί να επιλεγεί και να διαχωριστεί από μια ομάδα ισοδύναμων κυττάρων. Μία τέτοια περίπτωση αποτελεί η επιλογή του πρόδρομου κυττάρου αισθητηρίων οργάνων (ΠΑΟ), από ένα σύνολο κυττάρων που αποτελούν τον προνευρικό συναθροισμό. Αρχικά όλα τα κύτταρα του προνευρικού πληθυσμού είναι ισοδύναμα και εκφράζουν τις προνευρικές πρωτεΐνες *Achaete* και *Scute*, οι οποίες και ενεργοποιούν την έκφραση των δεσμευτών *Delta* και *Serrate*. Συνεπώς όλα τα κύτταρα του συναθροισμού εκφράζουν τόσο τον υποδοχέα όσο και τους δεσμευτές και έχουν την ικανότητα και να αποστέλλουν και να λαμβάνουν σήμα. Για άγνωστο μέχρι στιγμής λόγο, ένα κύτταρο αποκτά μεγαλύτερη ικανότητα αποστολής σήματος από τα υπόλοιπα και αυτή η κατάσταση συντηρείται με μηχανισμό ανάδρασης: Τα κύτταρα που δέχονται περισσότερο σήμα έχουν ελαττωμένα επίπεδα πρωτεΐνης *Delta*, λόγω μεταγραφικής καταστολής από το σύμπλοκο των *E(spl)* (Culi and Modolell, 1998). Επίσης αυτό το κύτταρο επάγει τη μεταγραφή του *neur*, ενώ το *mib1* εκφράζεται ομοιόμορφα. Έχει δειχθεί ότι αυτή η διαδικασία εξαρτάται κυρίως από τη λιγάση *Neur*, αλλά και η λιγάση *Mib1* παίζει ένα μικρό ρόλο (Pitsouli and Delidakis, 2005). Στην περίπτωση όπου η σηματοδότηση μέσω *Notch* είναι μη λειτουργική πολλά κύτταρα αποκτούν την αναπτυξιακή τύχη του ΠΑΟ. Για παράδειγμα, σε μιτωτικούς κλώνους όπου δεν εκφράζονται οι ενδογενείς πρωτεΐνες *DI* και *Ser*, όλα τα κύτταρα του προνευρικού συναθροισμού μετατρέπονται σε ΠΑΟ. Αντιθέτως, σε κλώνους όπου δεν εκφράζονταν οι ενδογενείς δεσμευτές, αλλά στη θέση τους υπερεκφραζόταν το διαγονίδιο *UAS-DI*, η πλευρική αναστολή λάμβανε χώρα και μόνο ένα ΠΑΟ επιλεγόταν από τον προνευρικό συναθροισμό (Pitsouli and Delidakis, 2005).

Στα πειράματα που ακολούθησαν βασικό ερώτημα ήταν αν οι μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης *DI* μπορούσαν να υποκαταστήσουν τις ενδογενείς πρωτεΐνες *DI* και *Ser* και να ενεργοποιήσουν τη σηματοδότηση *Notch* κατά την πλευρική

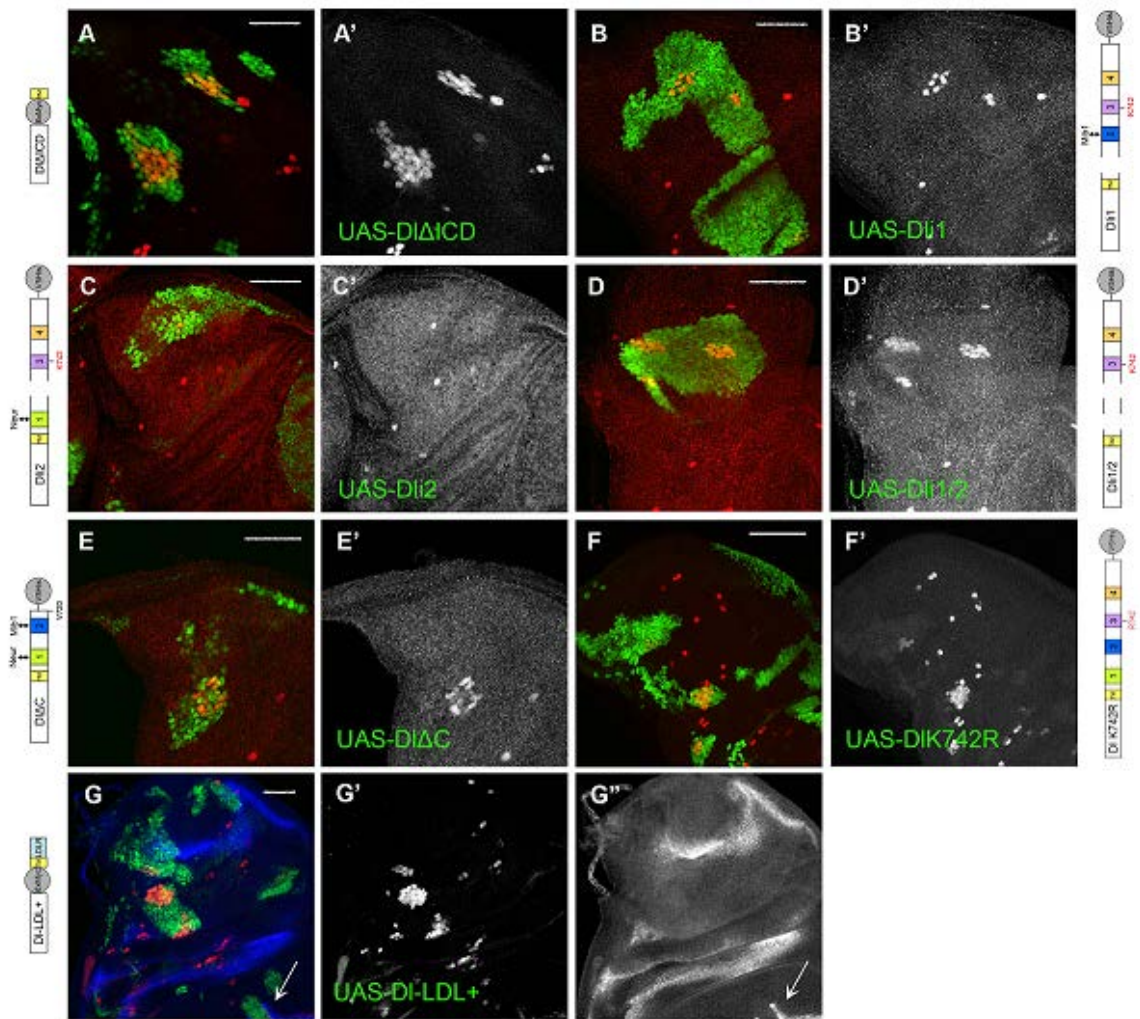
αναστολή. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκαν μιτωτικοί κλώνοι στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού, οι οποίοι δεν εξέφραζαν τις ενδογενείς πρωτεΐνες D1 και Ser. Στη θέση τους, κάτω από τον έλεγχο του atub-Gal4 υπερεκφάζονταν τα διαφορετικά UAS διαγονίδια. Τα ΠΑΟ ανιχνεύτηκαν με την πρωτεΐνη-μάρτυρα Sensless, η οποία εκφράζεται μόνο σε αυτά.

Σε μιτωτικούς κλώνους όπου δεν υπήρχαν οι ενδογενείς πρωτεΐνες D1 και Ser, αλλά τη θέση τους πήρε το μετάλλαγμα Dli2, η πλευρική αναστολή λάμβανε χώρα κανονικά όπως μαρτυρά η ύπαρξη μοναδικού πρόδρομου αισθητηρίων οργάνων (εικόνα 4.4C). Άρα αποδεικνύεται ότι το Dli2 είναι ενεργό κατά την πλευρική αναστολή, γεγονός αναμενόμενο αφού αυτή η διαδικασία εξαρτάται κυρίως από τη λιγάση Neur, και το μετάλλαγμα αυτό μπορεί να αλληλεπιδράσει και να ουβικουιτυλιωθεί από αυτή. Απεναντίας, οι πρωτεΐνες Dli1 και Dli1/2, δεν μπόρεσαν να υποκαταστήσουν τους ενδογενείς δεσμευτές, όπως μαρτυράει η ύπαρξη πολλών πρόδρομων αισθητηρίων οργάνων (εικόνα 4.4B, D). Η παρατήρηση αυτή εξηγείται αν λάβουμε υπόψη μας την αδυναμία αλληλεπίδρασης των μεταλλαγμάτων αυτών με τη λιγάση Neur. Πολύ ενδιαφέρονσα είναι η παρατήρηση ότι και τα μεταλλάγματα D1ΔC και D1K742R δεν μπορούσαν να σηματοδοτήσουν κατά την πλευρική αναστολή (εικόνα 4.4E, F). Βάσει των βιοχημικών πειραμάτων, οι δύο αυτές πρωτεΐνες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις λιγάσες ουβικουιτίνης Neur και Mib1 αλλά μπορούν να ουβικουιτυλιωθούν μόνο από τη δεύτερη. Η αδυναμία σηματοδοτικής ικανότητας κατά την πλευρική αναστολή, αντανακλά την αδυναμία να ουβικουιτυλιωθούν από τη λιγάση Neur, γεγονός που αποδεικνύει ότι για να ενεργοποιηθεί η πρωτεΐνη D1 δεν αρκεί μόνο να αλληλεπιδράσει με τις λιγάσες αλλά και να ουβικουιτυλιωθεί από αυτές.

Μία επιπλέον σημαντική παρατήρηση από τους συγκεκριμένους μιτωτικούς κλώνους είναι ότι τα μεταλλάγματα Dli1/2 και D1ΔICD (πρωτεΐνη όπου λείπει ολόκληρη η ενδοκυττάρια περιοχή, Wang and Struhl, 2004) δημιουργούσαν ομάδες υπεράριθμων ΠΑΟ εφραπτόμενα μεταξύ τους (εικόνα 4.4A, D). Ο ίδιος φαινότυπος παρατηρείται και στην περίπτωση όπου υπάρχει έλλειψη δεσμευτών (Pitsouli and Delidakis, 2005), κάτι που αποδεικνύει την παντελή έλλειψη σηματοδοτικής ικανότητας αυτών των δύο πρωτεϊνών. Αντιθέτως, στην περίπτωση των πρωτεϊνών Dli1, D1ΔC και D1K742R παράγονταν υπεράριθμα, απομακρυσμένα ΠΑΟ, παρατήρηση που υποστηρίζει ότι τα μεταλλάγματα αυτά διατηρούν μια ελάχιστη ενεργότητα κατά την πλευρική αναστολή (εικόνα 4.4B, E, F). Καθώς μπορούν να

αλληλεπιδράσουν και να ουβικουιτινυλιωθούν από τη λιγάση Mib1, πιθανώς αυτή η ενεργότητα ευθύνεται στη συγκεκριμένη λιγάση, υπόθεση που υποστηρίζεται και από προηγούμενες παρατηρήσεις που αποδείκνυαν την ενεργότητα της λιγάσης Mib1 κατά την πλευρική αναστολή (Pitsouli and Delidakis, 2005).

Καθώς η σηματοδότηση κατά την πλευρική αναστολή είναι προβληματική απουσία λειτουργίας της λιγάσης Neur και ενώ η λιγάση Mib1 είναι παρούσα, υπάρχει η πιθανότητα ότι ο τύπος ουβικουιτινυλίωσης της πρωτεΐνης DI, ο οποίος είναι διαφορετικός από τις δύο λιγάσες, να σχετίζεται με την ενεργότητα του δεσμευτή κατά αυτή τη διαδικασία. Αντιθέτως, ίσως αυτή η διαφορά στην απόκριση στις δύο λιγάσες κατά την πλευρική αναστολή να οφείλεται στα μικρά ποσά έκφρασης της λιγάσης Mib1. Για να αποσαφηνιστούν τα παραπάνω ενδεχόμενα, ελέγξαμε τη σηματοδοτική ικανότητα ενός DI μεταλλάγματος το οποίο δεν μπορούσε να ουβικουιτινυλιωθεί λόγω έλλειψης όλων των καταλοίπων λυσίνης από την ενδοκυττάρια περιοχή. Αυτή η πρωτεΐνη δημιουργήθηκε ενώνοντας την εξωκυττάρια και διαμεμβρανική περιοχή της πρωτεΐνης DI με το ενδοκυττάριο μοτίβο του LDL υποδοχέα το οποίο περιέχει σινιάλο ενδοκύττωσης (Wang and Struhl, 2004). Αυτή η χιμαιρική πρωτεΐνη έχει δειχθεί ότι ενεργή κατά την επαγωγή του ραχαιοκοιλιακού ορίου του φτερού. Αυτό σημαίνει ότι κατά αυτή τη διαδικασία, η πρωτεΐνη DI μπορεί να παρακάμψει την ανάγκη για ουβικουιτινυλίωση, ενδοκύττωση και ενεργοποίηση της από τη λιγάση Mib1 αν ενδοκυττωθεί με διαφορετικό τρόπο. Όταν όμως υπερεκφράσαμε τη DI-LDL+ πρωτεΐνη στη θέση των ενδογενών DI και Ser πρωτεϊνών κατά τη διαδικασία της πλευρικής αναστολής, παρατηρήσαμε την ύπαρξη πολλών ΠΑΟ που εφάπτονται μεταξύ τους, γεγονός που σημαίνει πλήρη αδυναμία σηματοδότησης (εικόνα 4.4G). Η παραπάνω παρατήρηση θέτει θέμα για ποιοτική διαφορά στην ενδοκύττωση της πρωτεΐνης DI μεταξύ της σηματοδότησης στο ραχαιοκοιλιακό όριο και την πλευρική αναστολή.



Εικόνα 4.4: Ενεργότητα των D1 μεταλλαγμάτων κατά την πλευρική αναστολή στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού με τη χρήση μιτωτικών κλώνων.

Οι παραπάνω εικόνες δείχνουν αναπτυξιακούς δίσκους του φτερού από προνύμφες τρίτου σταδίου βαμμένους για την πρωτεΐνη Sens (κόκκινο, δείχνεται χωριστά στις εικόνες A'-G'), μάρτυρα των ΠΑΟ που φυσιολογικά εμφανίζονται ως μοναδικά κύτταρα σε πολύ καθορισμένες θέσεις. Οι κλώνοι που δεν εκφράζουν τις ενδογενείς πρωτεΐνες D1 και Ser αλλά υπερεκφράζουν, κάτω από τον έλεγχο του *atub-Gal4*, ένα D1 μεταλλάγμα μαρκάρονται με την ύπαρξη πυρηνικής GFP (πράσινο). Οι κλώνοι υπερεκφράζουν ένα διαφορετικό D1 μετάλλαγμα κάθε φορά: **A:** D1ΔICD, **B:** Dli1, **C:** Dli2, **D:** Dli1/2, **E:** D1ΔC, **F:** D1K742R, **G:** D1-LDL+.

Μόνο στην περίπτωση όπου οι ενδογενείς δεσμευτές αντικαθιστώνται από την πρωτεΐνη Dli2 η πλευρική αναστολή λαμβάνει χώρα κανονικά (C). Τα μεταλλάγματα D1ΔICD και Dli1/2 είναι τελείως ανενεργά όπως φαίνεται από την ύπαρξη ομάδας κυττάρων που εκφράζουν την πρωτεΐνη Sens (εικόνες A και D). Στην περίπτωση των Dli1, D1ΔC και D1K742R, αν και η πλευρική αναστολή δεν λειτουργεί, τα ΠΑΟ κύτταρα χωρίζονται μεταξύ τους από αγρίου τύπου κύτταρα γεγονός που υποδεικνύει Notch σηματοδότηση (εικόνα B και E). Η ικανότητα για σηματοδότηση πιθανώς οφείλεται στην ενεργότητα της λιγάσης Mib1 η οποία είναι παρούσα και ενεργή κατά την πλευρική αναστολή.

Στην εικόνα G έχει γίνει παράλληλη χρώση για τις πρωτεΐνες Sens (κόκκινο) και Wg (κυανό, εικόνα G''). Παρατηρούμε ότι ενώ το D1-LDL+ είναι ικανό να σηματοδοτεί κατά το ραχαιοκοιλιακό όριο του φτερού (μπορεί να επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης Wg στα γειτονικά κύτταρα, άσπρο βέλος), είναι ανενεργό κατά την πλευρική αναστολή (πολλά ΠΑΟ που εκφράζουν την πρωτεΐνη Sens).

Οι γραμμές κλίμακας είναι των 50μm. Το εμπρόσθιο τμήμα του δίσκου βρίσκεται αριστερά και το κοιλιακό πάνω.

Συνοψίζοντας:

- Τα συντηρημένα ενδοκυττάρια μοτίβα 1 και 3 τα οποία σχετίζονται με τη λιγάση Neur, έχουν κυρίαρχο ρόλο κατά τη διαδικασία της πλευρικής αναστολής.
- Το δεύτερο συντηρημένο μοτίβο, το οποίο σχετίζεται με τη λιγάση Mib1 παίζει βασικό ρόλο κατά την επαγωγή του ραχαιοκοιλιακού ορίου του φτερού.
- Κανένα συντηρημένο μοτίβο δε συμμετέχει κατά το cis-inhibition, υποδηλώνοντας ότι η διαδικασία αυτή είναι ανεξάρτητη από την ουβικουιτινυλίωση.
- Υπάρχουν ενδείξεις για ποιοτική διαφορά στην ουβικουιτινυλίωση και την ενδοκύττωση της πρωτεΐνης D1 κατά την επαγωγή του ραχαιοκοιλιακού ορίου του φτερού και την πλευρική αναστολή.

5. Αποτελέσματα III

Κυτταρική κατανομή και ενδοκύττωση των
μεταλλαχμάτων DL

Κυτταρική κατανομή των μεταλλαγμάτων Delta

Τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού αποτελούν ένα μονόστιβο επιθήλιο με καθορισμένη πολικότητα όπου πρωτεΐνες και σηματοδοτικά μόρια εντοπίζονται σε διακριτές περιοχές. Ένα επιθηλιακό κύτταρο χωρίζεται σε τρεις κύριες ζώνες: Την κορυφαία περιοχή (apical), τη βασική (basal) και την ενδιάμεση (lateral). Όσον αφορά την αγρίου τύπου πρωτεΐνη Delta, είτε την ενδογενή είτε μετά από υπερέκφραση έχει μία πολύ συγκεκριμένη κατανομή στα επιθηλιακά κύτταρα: Το μεγαλύτερο ποσοστό της συσσωρεύεται στην κορυφαία επιφάνεια των κυττάρων, ενώ επίσης εντοπίζεται σε κυστίδια καθ'όλο το ύψος του κυττάρου που αποτελούν κυρίως ενδοσώματα (Pavlopoulos et al., 2001, Wang and Struhl, 2004). Επιπλέον ένα ποσοστό αυτής εντοπίζεται στην βασική επιφάνεια του κυττάρου, αλλά είναι σαφώς μικρότερο συγκριτικά με αυτό της κορυφαίας.

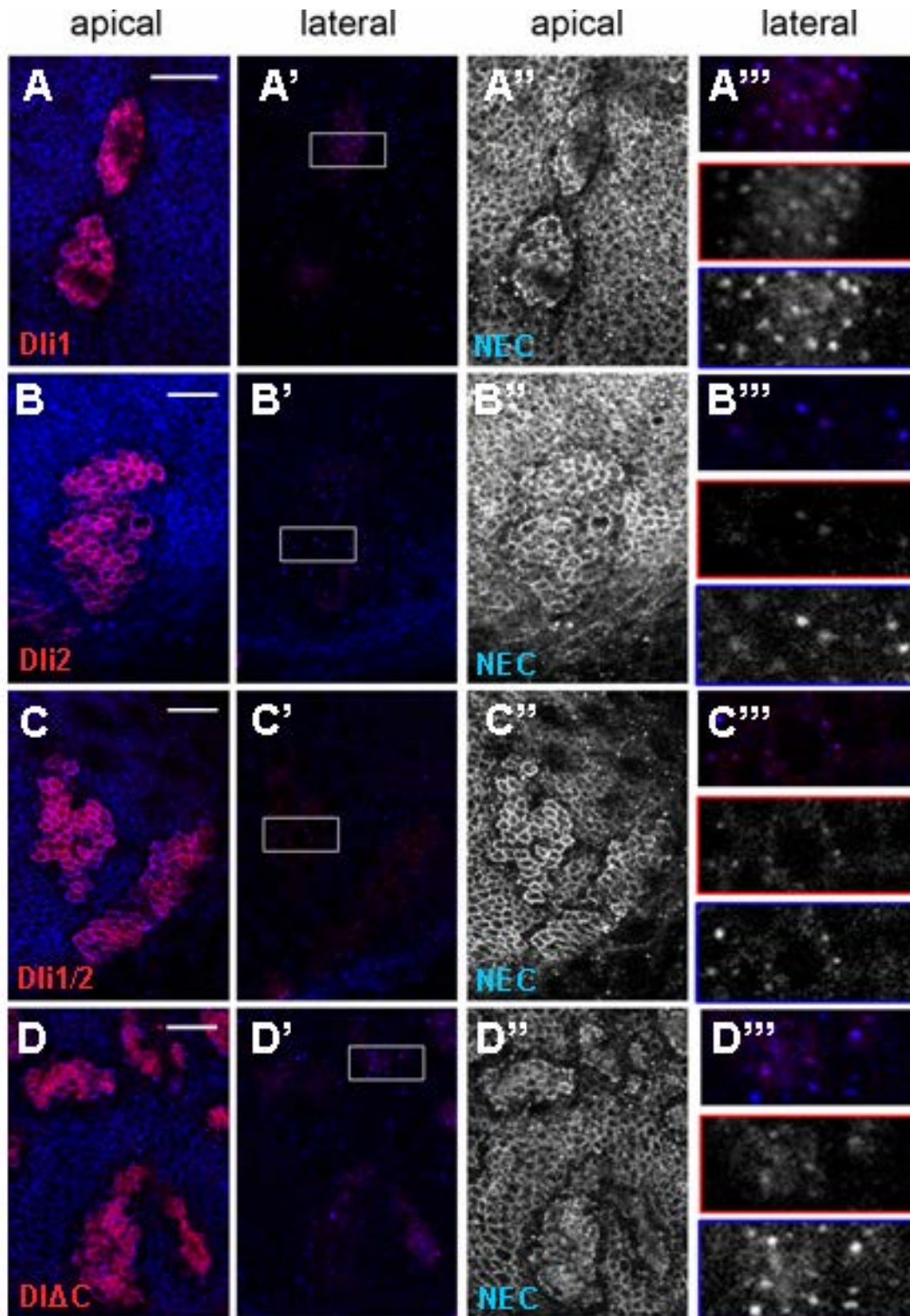
Στην περίπτωση όπου η πρωτεΐνη Delta συνεκφραστεί με τη λιγάση Neur παρατηρείται μία εμφανής απομάκρυνση του δεσμευτή από την κορυφαία μεμβράνη. Πλέον το μεγαλύτερο ποσοστό της βρίσκεται σε μεγάλα, ενδοκυττάρια κυστίδια συνεντοπιζόμενο με τη λιγάση ως αποτέλεσμα αυξημένης ενδοκύττωσης. Η εκκαθάριση της κορυφαίας μεμβράνης από την πρωτεΐνη DI συνοδεύεται με εκκαθάριση από τον υποδοχέα Notch, ο οποίος συνεντοπίζεται και αυτός στα ενδοκυττωτικά κυστίδια μαζί με το δεσμευτή και τη λιγάση (Lai et al., 2001, Pavlopoulos et al., 2001).

Για να μελετηθεί η κυτταρική κατανομή των ελλειμματικών πρωτεϊνών Delta, δημιουργήθηκαν μιτωτικοί κλώνοι υπερέκφρασης των πρωτεϊνών αυτών στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού κάτω από τον έλεγχο του act5C-Gal4, και ακολούθησαν ανοσοϊστοχημικές χρώσεις. Στην περιοχή του δίσκου όπου μελετήθηκαν οι συγκεκριμένοι κλώνοι, (wing pouch), υπάρχει έκφραση ενδογενούς πρωτεΐνης Mindbomb1 αλλά όχι Neuralized. Όπως είναι εμφανές στην εικόνα 5.1, όλα τα μεταλλάγματα είχαν μια έντονη συσσώρευση στην κορυφαία μεμβράνη του κυττάρου, όπως ακριβώς και η αγρίου τύπου πρωτεΐνη (εικόνα 5.1A-D).

Επιπροσθέτως, παρατηρείται ο εντοπισμός όλων των παραλλαγών του DI σε ενδοκυττωτικά κυστίδια. Στην περιοχή αυτή όπως προαναφέρθηκε εκφράζεται ενδογενώς μόνο η λιγάση Mindbomb1, συνεπώς τα μεταλλάγματα Dli1 και Dli2 δεν μπορούν να ουβικουτινυλιωθούν αφού δεν μπορούν να αλληλεπιδράσουν μαζί της. Το γεγονός αυτό όμως δεν επηρεάζει τη συστατική ενδοκύττωση τους χωρίς βέβαια

να αποκλείονται μικρές ποσοτικές διαφοροποιήσεις (εικόνα 5.1A'-D' και εικόνα 5.1A''-D'').

Όσον αφορά τον υποδοχέα Notch, αυτός εντοπίζεται κυρίως στην κορυφαία μεμβράνη των κυττάρων, αλλά εντοπίζεται και σε ενδοκυττωτικά κυστίδια κάποια εκ των οποίων διαθέτουν την πρωτεΐνη DI (εικόνα 5.1A''-D'' και εικόνα 5.1A'''-D'''). Χαρακτηριστικό στην κατανομή του υποδοχέα Notch όταν στα ίδια κύτταρα υπερεκφράζεται ένα εκ των μεταλλαγμάτων DI, είναι η συσσώρευση του σε συσσωματώματα στην πλασματική μεμβράνη. Επιπλέον φαίνεται να δημιουργείται ένα κενό γύρω από τα κύτταρα υπερέκφρασης σαν μία σειρά κυττάρων γύρω από τον κλώνο να μην διαθέτει Notch υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί αν υποθέσουμε ότι ο υποδοχέας Notch πολώνεται στα κύτταρα που εφάπτονται του κλώνου και συσσωρεύεται στα σημεία επαφής με τα DI θετικά κύτταρα. Το ίδιο ακριβώς φαινόμενο παρατηρείται όταν τα κύτταρα υπερεκφράζουν την αγρίου τύπου DI.



Εικόνα 5.1: Κυτταρική κατανομή των Delta μεταλλαγμάτων σε μιτωτικούς κλώνους υπερέκφρασης αυτών.

Οι παραπάνω εικόνες δείχνουν μιτωτικούς κλώνους σε αναπτυξιακούς δίσκους του φτερού από προνύμφες τρίτου σταδίου. Έχει γίνει χρώση για τις DI πρωτεΐνες με gr-aDI αντίσωμα (κόκκινο) και για τον υποδοχέα Notch με m-aNec αντίσωμα (κυανό). Η υπερέκφραση έγινε κάτω από τον έλεγχο του act5C-Gal4. Οι γραμμές κλίμακας είναι των 15μm και 5μm για τις μεγεθύνσεις.

A-D: Εκτοπική έκφραση των DI μεταλλαγμάτων όπως σημειώνεται σε κάθε εικόνα. Οι εικόνες αποτελούν μεμονωμένες τομές συνεστιακού μικροσκοπίου στην κορυφαία μεμβράνη των επιθηλιακών

κυττάρων. Παρατηρείται η έντονη συσσώρευση όλων των πρωτεϊνών που εξετάστηκαν στην περιοχή αυτή.

A'-D': Οι εικόνες αποτελούν μεμονωμένες τομές συνεστιακού μικροσκοπίου περίπου 3μm χαμηλότερα των τομών A-D. Παρατηρείται ο εντοπισμός των πρωτεϊνών σε ενδοκυττωτικά κυστίδια τα οποία σε αρκετές περιπτώσεις περιέχουν και τον υποδοχέα Notch.

A''-D'': Οι συγκεκριμένες εικόνες είναι ίδιες με αυτές των A-D αλλά σε αυτές παρουσιάζεται μόνο η κατανομή του ενδογενούς υποδοχέα Notch. Παρατηρείται η έντονη συσσώρευση του στην κορυφαία επιφάνεια του μιτωτικού κλώνου, στην ίδια περιοχή όπου συσσωρεύονται και οι πρωτεΐνες DI. Επιπλέον παρατηρείται η απομάκρυνση του από την κορυφαία επιφάνεια μιας σειράς κυττάρων που συνορεύουν με το μιτωτικό κλώνο.

A'''-D''': Οι περιοχές που είναι εσωτερικά των τετραγώνων στις εικόνες A'-D' έχουν μεγεθυνθεί 3 φορές. Οι χρωματισμοί δείχνονται και μεμονωμένα: Στις εικόνες με το κόκκινο πλαίσιο παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες DI και σε αυτές με το μπλε ο υποδοχέας Notch. Σε κάθε περίπτωση μπορεί να παρατηρηθεί η παρουσία των μεταλλαγμάτων DI σε ενδοκυττάρια κυστίδια, σε ορισμένα εκ των οποίων συνεντοπίζεται και ο υποδοχέας Notch.

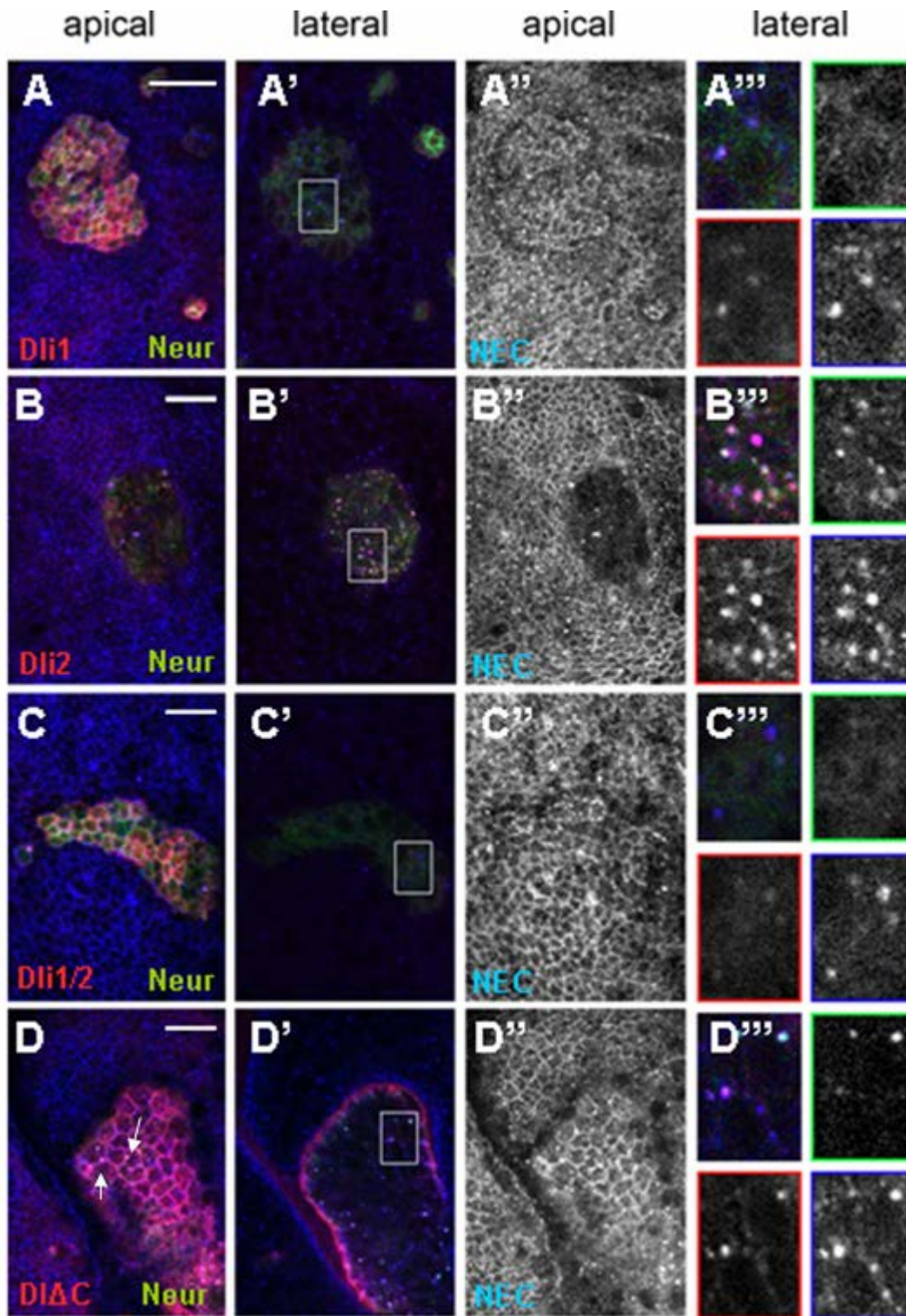
Στην κυτταρική κατανομή που παρουσιάζουν τα ελλεμματικά μεταλλάγματα της πρωτεΐνης D1 όταν αυτά υπερεκφράζονται μόνα τους σε μιτωτικούς κλώνους δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους και σε σύγκριση με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη.

Το επόμενο βήμα ήταν να υπερεκφραστούν κάθε ένα από τα ελλεμματικά μεταλλάγματα της πρωτεΐνης Delta μαζί με τη λιγάση Neuralized. Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο συγκεκριμένο τμήμα του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού που εξετάζεται, το wing pouch, εκφράζεται ενδογενώς η λιγάση ουβικουιτίνης Mindbomb1 αλλά όχι το Neuralized, του οποίου η έκφραση περιορίζεται στους πρόδρομους αισθητηρίων οργάνων, όσον αφορά τις νύμφες τρίτου σταδίου. Οι πρωτεΐνες Dli2 και Dli1/2 δεν αλληλεπιδρούν συνεπώς δεν ουβικουιτυλιώνονται από τη λιγάση Mib1. Παρόλα αυτά η μέση ενδοκύττωση αυτών των πρωτεϊνών δεν είχε διαφορές, ή ήταν ελαφρώς μειωμένη, σε σχέση με αυτή των Dli1 και Dli2 που αλληλεπιδρούν και ουβικουιτυλιώνονται από τη Mib1. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα ενδογενή επίπεδα της λιγάσης δεν επαρκούν για να παρουσιαστούν μεγάλες διαφορές στην ενδοκύττωση των δεσμευτών.

Αντιθέτως, όταν δημιουργήθηκαν μιτωτικοί κλώνοι υπερέκφρασης των δεσμευτών με τη λιγάση Neur, παρατηρήθηκαν δραματικές διαφορές στην ενδοκύττωση των μεταλλαγμάτων (εικόνα 5.2). Όπως έχει προαναφερθεί, όταν εκφραστεί η αγρίου τύπου πρωτεΐνη D1 μαζί με τη λιγάση Neur, το μεγαλύτερο ποσοστό και των δύο συνεντοπίζεται σε ενδοκυττάρια κυστίδια ενώ η κατανομή του δεσμευτή στην κορυφαία πλασματική μεμβράνη είναι σαφώς μειωμένη. Το ίδιο ακριβώς φαινόμενο παρατηρήθηκε με την πρωτεΐνη Dli2, η οποία διατηρεί την ικανότητα αλληλεπίδρασης και ουβικουιτυλίωσης από τη συγκεκριμένη λιγάση. Σχεδόν όλη η ποσότητα του μεταλλάγματος χάθηκε από την κορυφαία μεμβράνη και συγκεντρώθηκε σε ενδοκυττάρια κυστίδια. Σε αυτά συνεντοπιζόταν η λιγάση Neur και ο υποδοχέας Notch, του οποίου η κατανομή στην κορυφαία μεμβράνη χάθηκε (εικόνα 5.2B, B', B'', B'''). Στην περίπτωση όπου υπερεκφράστηκαν τα μεταλλάγματα Dli1 και Dli1/2 μαζί με τη λιγάση Neur, διατήρησαν τον εντοπισμό τους στην κορυφαία μεμβράνη και η κατανομή τους σε ενδοκυττάρια κυστίδια ήταν πολύ μικρή. Σε αυτά τα κυστίδια τις περισσότερες φορές συνεντοπιζόταν ο υποδοχέας Notch αλλά όχι η λιγάση Neur. Επιπλέον, ο υποδοχέας διατήρησε και αυτός τον εντοπισμό του στην κορυφαία μεμβράνη (εικόνα 5.2A, A', A'', A''' και 5.2C, C', C'', C'''). Το γεγονός αυτό ήταν αναμενόμενο, δεδομένου ότι τα

μεταλλάγματα αυτά έχουν χάσει την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη συγκεκριμένη λιγάση και δεν μπορούν να ενδοκυττωθούν από αυτή. Τα λίγα κυστίδια ίσως αντιπροσωπεύουν ενδοκύττωση από την ενδογενή λιγάση Mib1 στην περίπτωση του Dli1 ή κάποιον άλλο μηχανισμό ενδοκύττωσης. Όταν υπερεκφράστηκε η πρωτεΐνη D1ΔC, η οποία αλληλεπιδρά αλλά δεν ουβικουιτινυλιώνεται από τη λιγάση Neur, διατήρησε και αυτή τον εντοπισμό της στην κορυφαία μεμβράνη των κυττάρων ενώ ο συνεντοπισμός της σε κυστίδια με τον υποδοχέα και τη λιγάση ήταν πολύ μικρός (εικόνα 5.2D, D', D'', D'''). Αυτό το αποτέλεσμα ήταν πολύ σημαντικό καθώς συμπεραίνουμε ότι η ουβικουιτινυλίωση και όχι απλά η αλληλεπίδραση είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ενδοκύττωση του δεσμευτή DI, ο οποίος ενδοκυττώνεται ως σύμπλοκο με τον υποδοχέα Notch.

Σημαντική διαφορά παρουσίασε επίσης και η κατανομή της λιγάσης Neur. Όταν υπερεκφράζεται μόνη της, συσσωρεύεται στην κορυφαία επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων ενώ στο εσωτερικό των κυττάρων παρουσιάζει μια διάχυτη κατανομή (Pitsouli and Delidakis, 2005, Skwarek et al., 2007). Το ίδιο φαινόμενο παρουσιάστηκε όταν υπερεκφράστηκε με τις πρωτεΐνες Dli1 και Dli1/2 (εικόνα 5.2A', C'). Αντιθέτως, όταν υπερεκφράστηκε με την πρωτεΐνη Dli2, η κατανομή της άλλαξε τελείως και συσσωρεύτηκε σε ενδοκυττωτικά κυστίδια τα οποία εντοπίζονται κυρίως αμέσως κάτω από την κορυφαία μεμβράνη (εικόνα 5.2B'). Σε αυτά συσσωματώματα συνεντοπίζεται με το δεσμευτή Dli2 και τον υποδοχέα Notch, όπως ακριβώς συμβαίνει και όταν υπερεκφραστεί με την αγρίου τύπου DI (Lai et al., 2001). Είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί ότι τέτοιου είδους συσσωματώματα που περιείχαν τον δεσμευτή, τον υποδοχέα και τη λιγάση, αμέσως μετά την κορυφαία επιφάνεια, εμφανίστηκαν και στην περίπτωση του D1ΔC (εικόνα 5.2D, D'''). Μαζί με αυτά παρατηρήθηκαν και συσσωματώματα πάνω στην κορυφαία μεμβράνη των κυττάρων (εικόνα 5.2D, άσπρα βέλη), τα οποία δεν έχουν παρατηρηθεί ξανά σε περίπτωση άλλου DI μεταλλάγματος ή αγρίου τύπου πρωτεΐνης. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η ουβικουιτινυλίωση από τη λιγάση Neur ενεργοποιεί την ενδοκύττωση του DI/N συμπλόκου, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της αγρίου τύπου DI και του Dli2, αλλά η συσσώρευση του δεσμευτή και του υποδοχέα σε συσσωματώματα μπορεί να γίνει και χωρίς ουβικουιτινυλίωση αλλά απλά με αλληλεπίδραση της λιγάσης με το δεσμευτή, όπως στην περίπτωση του D1ΔC. Όσον αφορά τα Dli1 και Dli1/2 δεν λαμβάνει χώρα ούτε συσσώρευση ούτε ενδοκύττωση.



Εικόνα 5.2: Κυτταρική κατανομή των Delta μεταλλαγμάτων σε μιτωτικούς κλώνους υπερέκφρασης αυτών και της λιγάσης Neuralized.

Οι παραπάνω εικόνες δείχνουν μιτωτικούς κλώνους σε αναπτυξιακούς δίσκους του φτερού από προνύμφες τρίτου σταδίου. Έχει γίνει χρώση για τις D1 πρωτεΐνες με gr-aDl αντίσωμα (κόκκινο) και για τον υποδοχέα Notch με m-aNec αντίσωμα (κυανό). Με πράσινο παρουσιάζεται η λιγάση Neur (EGFP-Neur). Η υπερέκφραση έγινε κάτω από τον έλεγχο του act5C-Gal4. Οι γραμμές κλίμακας είναι των 15μm και 5μm για τις μεγεθύνσεις.

A-D: Εκτοπική έκφραση των D1 μεταλλαγμάτων και της λιγάσης Neur όπως σημειώνεται σε κάθε εικόνα. Οι εικόνες αποτελούν μεμονωμένες τομές συνεστιακού μικροσκοπίου στην κορυφαία

μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων. Παρατηρείται η έντονη συσσώρευση των πρωτεϊνών Dli1 και Dli1/2 στην περιοχή αυτή. Αντιθέτως η συσσώρευση του Dli2 που υπήρχε στην κορυφαία μεμβράνη όταν αυτό υπερεκφράστηκε μόνο του, έχει χαθεί τελείως. Στην περίπτωση του D1ΔC παρατηρούμε ότι η συσσώρευση της πρωτεΐνης στην κορυφαία επιφάνεια παραμένει με την υπερέκφραση της λιγάσης Neur, υπάρχει όμως η δημιουργία συσσωματωμάτων στην περιοχή αυτή τα οποία περιέχουν το δεσμευτή, τον υποδοχέα και τη λιγάση (άσπρα βέλη).

A'-D': Οι εικόνες αποτελούν μεμονωμένες τομές συνεστιακού μικροσκοπίου περίπου 3μm χαμηλότερα των τομών A-D. Στις περιπτώσεις των Dli1, Dli1/2 και D1ΔC, παρατηρείται πολύ μικρός αριθμός κυστιδίων που φέρουν τον δεσμευτή και τον υποδοχέα ενώ ο εντοπισμός των ενδοσωμάτων αυτών με τη λιγάση Neur είναι πολύ σπάνιος. Αντιθέτως, στην περίπτωση του Dli2, τα κυστίδια που φέρουν το δεσμευτή και τον υποδοχέα είναι πάρα πολλά και η πλειονότητα των οποίων περιέχει και τη λιγάση Neur.

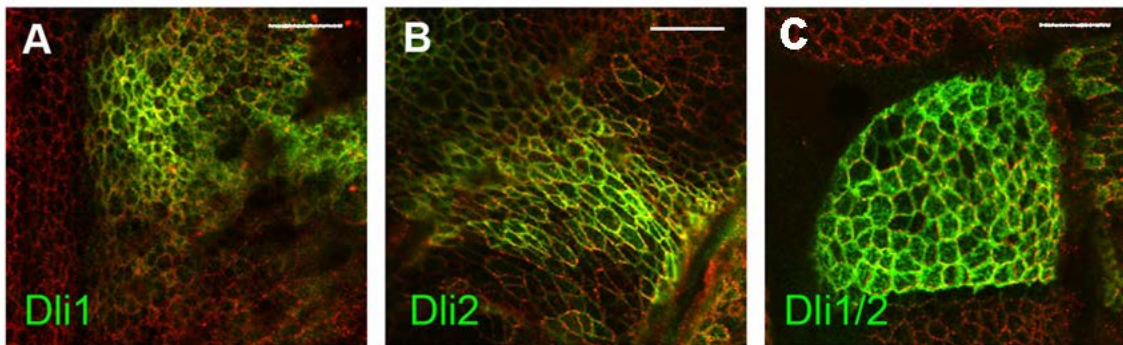
A''-D'': Οι συγκεκριμένες εικόνες είναι ίδιες με αυτές των A-D αλλά σε αυτές παρουσιάζεται μόνο η κατανομή του ενδογενούς υποδοχέα Notch. Στις περιπτώσεις των Dli1, Dli1/2 και D1ΔC παρατηρείται η έντονη συσσώρευση του στην κορυφαία επιφάνεια του μιτωτικού κλώνου, στην ίδια περιοχή όπου συσσωρεύονται και οι πρωτεΐνες D1. Επιπλέον παρατηρείται η απομάκρυνση του από την κορυφαία επιφάνεια μιας σειράς κυττάρων που συσσωρεύουν με το μιτωτικό κλώνο. Αντιθέτως, στο μιτωτικό κλώνο όπου υπερεκφράζεται η πρωτεΐνη Dli2 και η λιγάση Neur, ο ενδογενής υποδοχέας Notch χάνεται τελείως από την κορυφαία μεμβράνη.

A'''-D''': Οι περιοχές που είναι εσωτερικά των τετραγώνων στις εικόνες A'-D' έχουν μεγεθυνθεί 3 φορές. Οι χρωματισμοί δείχνονται και μεμονωμένα: Στις εικόνες με το κόκκινο όριο παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες D1, σε αυτές με το μπλε ο υποδοχέας Notch και σε αυτές με πράσινο η λιγάση Neur. Στην περίπτωση των Dli1, Dli1/2 και D1ΔC μπορεί να παρατηρηθεί η μικρή παρουσία των μεταλλαγμάτων D1 σε ενδοκυττάρια κυστίδια, σε ορισμένα εκ των οποίων συνεντοπίζεται και ο υποδοχέας Notch, αλλά πολύ σπάνια και η λιγάση Neur. Στην περίπτωση του Dli2 αντιθέτως παρατηρείται η έντονη παρουσία δεσμευτή, υποδοχέα και λιγάσης σε ενδοκυττωτικά κυστίδια.

Με τις υπερεκφράσεις των ελλειμματικών μεταλλαγμάτων σε μιτωτικούς κλώνους στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού και τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις που ακολούθησαν διαπιστώθηκε μια έντονη κατανομή όλων των πρωτεϊνών που εξετάστηκαν στην κορυφαία μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων (εικόνα 5.1). Επιπλέον έχουμε ήδη αναφέρει ότι η ουβικουιτινυλίωση του δεσμευτή D1 συνδέεται άμεσα με την ικανότητα του για σηματοδότηση.

Είναι λοιπόν αναγκαίο να αποκλείσουμε την πιθανότητα η έλλειψη ουβικουιτινυλίωσης των ελλειπτικών μεταλλαγμάτων να προκαλεί και αδυναμία αυτών να εντοπιστούν στην εξωτερική πλευρά της κορυφαίας μεμβράνης, και αυτό να έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία σηματοδότησης τους.

Για να επιβεβαιωθεί ότι οι D1 πρωτεΐνες μπορούν να εντοπιστούν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, και ότι δεν έχει επηρεαστεί η εξωκύττωση αυτών, τα μεταλλάγματα Dli1, Dli2 και Dli1/2 υπερεκφράστηκαν σε μια ομάδα κυττάρων κάθετα στο ραχιαιοκοιλιακό όριο του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού κάτω από τον έλεγχο του *ptc-Gal4*. Οι ανοσοϊστοχημικές χρώσεις που ακολούθησαν έγιναν απουσία απορρυπαντικού (εικόνα 5.3). Σε αυτή την περίπτωση, επειδή δεν επιτρέπεται η εισχώρηση των αντισωμάτων μέσα στα κύτταρα, οποιοδήποτε σήμα παρατηρείται προέρχεται από την εξωτερική επιφάνεια των μεμβρανών. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρείται έντονο σήμα στην κορυφαία επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων και πιο αδύναμο στη βασική, αποκλείοντας την πιθανότητα οι ελλείψεις των πρωτεϊνών να έχουν επηρεάσει την εξωκύττωση τους. Ακόμα και το μετάλλαγμα Dli1/2, το οποίο είναι τελείως ανενεργό μπορεί να εξωκυττωθεί αποκλείοντας την πιθανότητα η έλλειψη ενεργότητας του να είναι αποτέλεσμα της αδυναμίας σωστής τοποθέτησης στην κυτταρική μεμβράνη.



Εικόνα 5.3: Τα ελλειμματικά μεταλλάγματα Delta μπορούν να εκτεθούν την κορυφαία επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων.

Στις παραπάνω εικόνες παρουσιάζονται αναπτυξιακοί δίσκοι του φτερού από προνύμφες τρίτου σταδίου, στους οποίους τα D1 ελλειμματικά μεταλλάγματα υπερεκφράζονται κάτω από τον έλεγχο του *pic-Gal4*. Έχει γίνει χρώση για τις D1 πρωτεΐνες με *gr-aD1* αντίσωμα (πράσινο) και για Notch με *m-aNec* αντίσωμα (κόκκινο). Και τα δύο αντισώματα δεσμεύουν μία εξωκυττάρια περιοχή των πρωτεϊνών. Οι ανοσοϊστοχημικές χρώσεις έγιναν απουσία απορρυπαντικού αλλά με τραυματισμό της περιπόδιας μεμβράνης ώστε η κορυφαία μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων να γίνει προσβάσιμη στα αντισώματα. Όλες οι εικόνες παρουσιάζουν την κορυφαία μεμβράνη των κυττάρων. Παρατηρούμε τον εντοπισμό όλων των ελλειπτικών μεταλλαγμάτων στην εξωτερική επιφάνεια της κορυφιας μεμβράνης. Οι γραμμές κλίμακας είναι των 15µm.

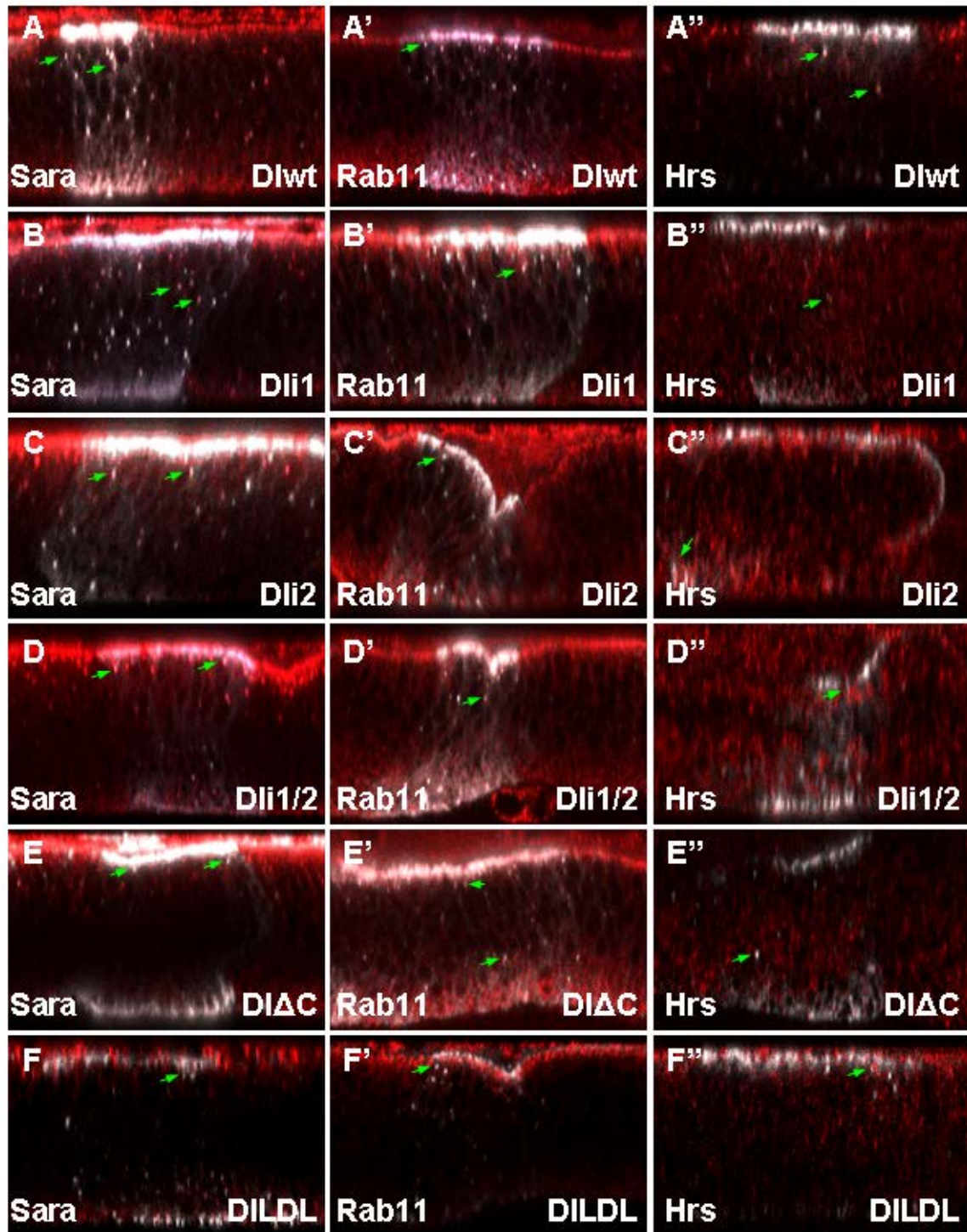
Συνεντοπισμός της πρωτεΐνης Delta και των μεταλλάγματων της με ενδοσωμικούς δείκτες

Από τα πειράματα που παρουσιάστηκαν στην προηγούμενη ενότητα διαπιστώνεται ότι τόσο η αγρίου τύπου πρωτεΐνη Delta όσο και τα μεταλλάγματα αυτής εντοπίζονται σε ενδοσώματα στην ενδιάμεση περιοχή των επιθηλιακών κυττάρων του αναπτυξιακού δίσκου φτερού. Επόμενος στόχος ήταν να διαπιστωθεί αν υπάρχουν ποιοτικές διαφορές στην υποκυτταρική κατανομή των συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Γι αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκαν τρεις αντιπροσωπευτικοί δείκτες που εδράζονται σε διαφορετικά ενδοσωμικά διαμερίσματα: Επιλέχθηκε η πρωτεΐνη Sara ως δείκτης των πρώιμων ενδοσωμάτων και το Rab11 ως δείκτης των ενδοσωμάτων ανακύκλωσης. Τέλος χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη Hrs ως δείκτης των MVBs (multivesicular bodies). Για να μελετηθεί η κυτταρική κατανομή των μεταλλάγματων Delta συγκριτικά με τους δείκτες ακολούθησε υπερέκφραση αυτών στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού κάτω από τον έλεγχο του *ptc-Gal4*, και ακολούθησαν ανοσοϊστοχημικές χρώσεις (για την ανάλυση των εικόνων βλ. Υλικά και Μέθοδοι).

Η αγρίου τύπου πρωτεΐνη Delta δείχνει ένα πολύ καλό συνεντοπισμό με τόσο με το δείκτη Sara (46%) όσο και με το Hrs (37%). Ο συνεντοπισμός με το Rab11 ήταν αρκετά λιγότερος (15%). Τα διάφορα μεταλλάγματα παρουσίασαν παρόμοιο συνεντοπισμό με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη όσο αφορά τους συγκεκριμένους δείκτες. Οι μόνες διαφορές που εντοπίστηκαν ήταν στην περίπτωση του *Dl-LDL+*, το οποίο συνεντοπιζόταν πολύ λιγότερο με το δείκτη Sara (22%) και στην περίπτωση των *Dli1/2* και *DlΔC* τα οποία έδειξαν μειωμένο συνεντοπισμό με το Hrs (πίνακας 5.1, εικόνα 5.4). Από την πρώτη διαφορά συμπεραίνουμε ότι η ενδοκυττάρια περιοχή του Delta ευθύνεται στον εντοπισμό της πρωτεΐνης στα πρώιμα ενδοσώματα αλλά καμία από τις συντηρημένες περιοχές μεμονωμένα δεν είναι υπεύθυνη για την κατανομή αυτή. Δεν υπάρχει εξήγηση για τη δεύτερη διαφορά με τα παρόντα δεδομένα καθώς στις πρωτεΐνες *Dli1/2* και *DlΔC* λείπουν συμπληρωματικά μοτίβα στην ενδοκυττάρια περιοχή.

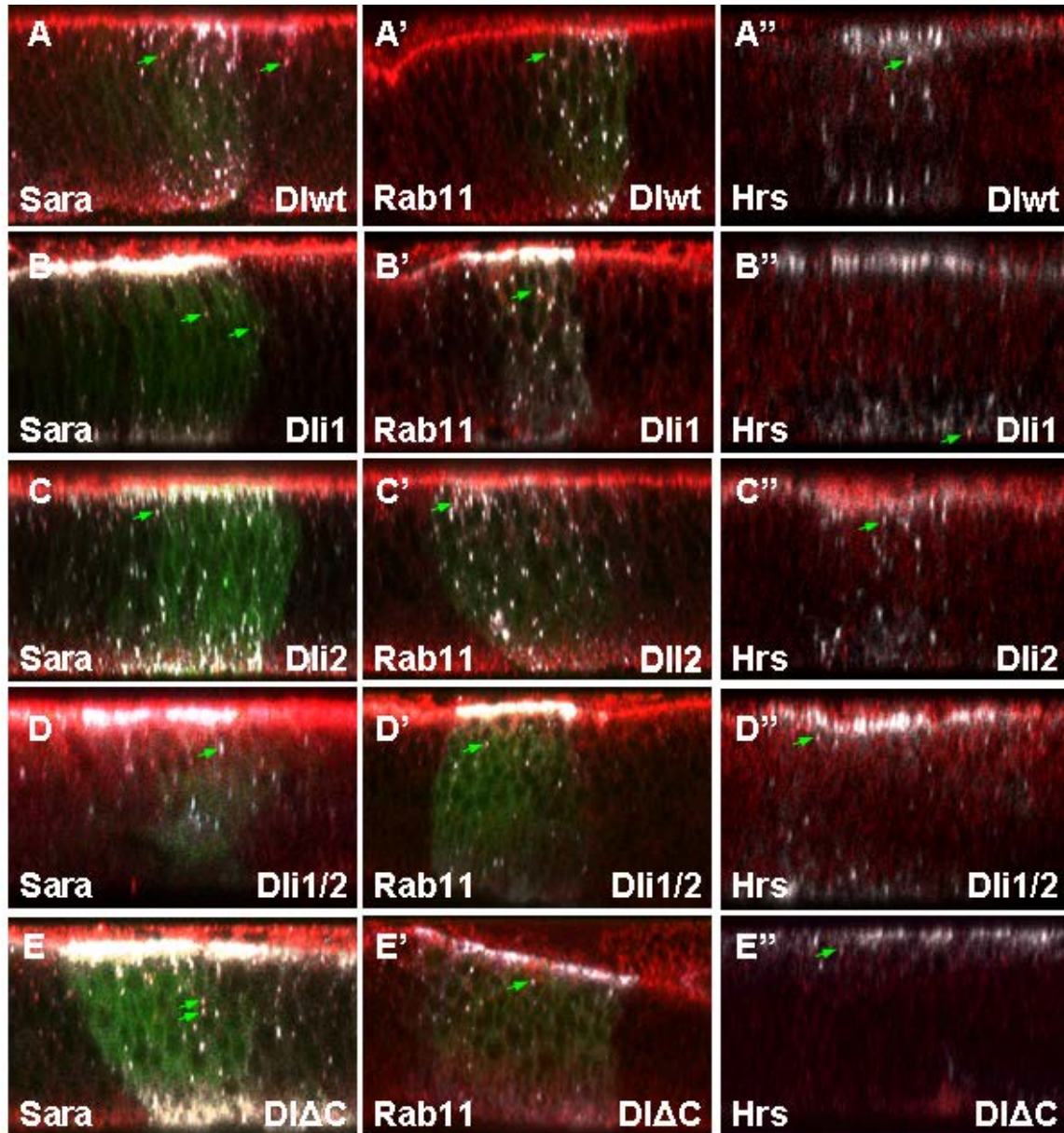
Στη συνέχεια εξετάστηκε ο συνεντοπισμός των πρωτεϊνών Delta με τους ενδοσωμικούς δείκτες με την παράλληλη υπερέκφραση της λιγάσης *Neur*, η οποία δεν εκφράζεται ενδογενώς στην συγκεκριμένη περιοχή. Παρατηρήθηκε δραματική αύξηση των ενδοσωμικών κυστιδίων στην περίπτωση του *Dlwt* και του *Dli2* όπως και σε προηγούμενα πειράματα. Παρόλα αυτά η σχετική κατανομή όλων των

μεταλλαγμάτων σε κυστίδια θετικά για τους δείκτες Sara και Rab11 δεν παρουσίασε αξιοσημείωτη διαφορά (πίνακας 5.1, εικόνα 5.5). Εντοπίστηκε μία σημαντική μείωση συνεντοπισμού με το δείκτη Hrs, γεγονός όμως γενικό που δεν μπορεί να συσχετιστεί με κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο της ενδοκυττάριας περιοχής της πρωτεΐνης Delta. Η διαφορά αυτή ίσως είναι γενική επίπτωση στα ενδοσώματα λόγω της υπερέκφρασης της λιγάσης Neur κάτι όμως που δεν εξετάστηκε περαιτέρω. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι τα ενδοκυττωτικά μοτίβα icd1, 2 και 3 δεν επηρεάζουν σημαντικά την οδό ενδοκύττωσης της πρωτεΐνης Delta παράλλες τις σημαντικές επιπτώσεις που έχουν στην ουβικουιτινυλίωση της.



Εικόνα 5.4: Συνεντοπισμός των Delta μεταλλαγμάτων με τους ενδοσωμικούς δείκτες Sara, Rab11 και Hrs.

Οι παραπάνω εικόνες δείχνουν αναπτυξιακούς δίσκους του φτερού από προνύμφες τρίτου σταδίου όπου έχουν υπερεκφραστεί οι πρωτεΐνες Delta κάτω από τον έλεγχο του *ptc-Gal4*. Έχει γίνει χρώση για τις DI πρωτεΐνες (άσπρο) και για τους ενδοσωμικούς δείκτες (κόκκινο). Η κορυφαία επιφάνεια των κυττάρων βρίσκεται πάνω. Τα πράσινα βέλη δείχνουν κυστίδια όπου συνεντοπίζονται οι πρωτεΐνες DI με τους δείκτες.



Εικόνα 5.5: Συνεντοπισμός των Delta μεταλλαγμάτων με τους ενδοσωμικούς δείκτες Sara, Rab11 και Hrs με ταυτόχρονη υπερέκφραση της λιγάσης Neur.

Οι παραπάνω εικόνες δείχνουν αναπτυξιακούς δίσκους του φτερού από προνύμφες τρίτου σταδίου όπου έχουν υπερέκφραστεί οι πρωτεΐνες Delta και η λιγάση Neur κάτω από τον έλεγχο του *ptc-Gal4*. Έχει γίνει χρώση για τις DI πρωτεΐνες (άσπρο) και για τους ενδοσωμικούς δείκτες (κόκκινο), ενώ για τις εικόνες που αφορούν τους δείκτες Sara και Rab11 είναι διακριτή και η λιγάση (EGFP-Neur, πράσινο). Η κορυφαία επιφάνεια των κυττάρων βρίσκεται πάνω. Τα πράσινα βέλη δείχνουν κυστίδια όπου συνεντοπίζονται οι πρωτεΐνες DI με τους δείκτες.

Alone	Sara ^a	n	p	Hrs ^a	n	p	Rab11 ^a	n	p
wt	46	166	-	37	109	-	15	141	-
Dli1	60	106	0.02	37	73	1.00	14	200	0.75
Dli2	54	112	0.22	33	122	0.58	13	238	0.54
Dli1/2	47	100	0.90	18	201	<0.01	14	125	1.00
DIΔC	42	114	0.62	18	104	<0.01	16	129	1.00
DI-LDL	19	503	<0.01	34	131	0.68	14	151	0.87

+Neur	Sara ^b	n	p	Hrs ^b	n	p	Rab11 ^b	n	p
wt	45	317	0.92	5	222	<0.01	10	192	0.24
Dli1	49	214	0.48	6	143	0.63	11	150	1.00
Dli2	46	226	0.86	6	343	0.57	11	240	1.00
Dli1/2	34	170	0.02	4	93	1.00	11	124	1.00
DIΔC	46	156	0.85	5	134	0.80	10	129	1.00

Πίνακας 5.1: Συνεντοπισμός των πρωτεϊνών Delta με τους δείκτες Sara, Rab11 και Hrs.

Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αναλύσεων που αφορούν το συνεντοπισμό των διαφόρων DI πρωτεϊνών με τους επιλεγμένους ενδοσωμικούς δείκτες Sara, Rab11 και Hrs. Ο πάνω πίνακας αφορά πειράματα υπερέκφρασης μόνο των πρωτεϊνών DI, ενώ ο κάτω πίνακας με παράλληλη υπερέκφραση της λιγάσης Neur.

^a Στις συγκεκριμένες στήλες αναγράφεται το ποσοστό των DI κυστιδίων τα οποία ήταν θετικά και για τον εκάστοτε δείκτη. Στην περίπτωση του Rab11 δεν υπήρξαν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των DI μεταλλάξεων. Στην περίπτωση του Sara, το DI-LDL+ είχε μειωμένο συνεντοπισμό συγκρινόμενο με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη, ενώ κάτι αντίστοιχο συμβαίνει με τα Dli1/2 και DIΔC στην περίπτωση του Hrs.

^b Στις συγκεκριμένες στήλες αναγράφεται το ποσοστό των DI κυστιδίων που ήταν θετικά και για τον εκάστοτε δείκτη αλλά σε αυτή την περίπτωση μαζί με τις πρωτεΐνες DI υπερεκφραζόταν και η λιγάση Neur. Παρατηρείται μια συνολική πτώση στα ποσοστά συνεντοπισμού με το δείκτη Hrs, η οποία όμως αφορούσε όλα τα μεταλλάγματα, και δε μπορεί να συνδεθεί με κάποιο από τα ενδοκυττάρια μοτίβα της DI. Στους υπόλοιπους δείκτες δεν παρουσιάστηκαν αξιοσημείωτες διαφορές.

n: Συνολικός αριθμός κυστιδίων DI που καταμετρήθηκαν.

p: Οι τιμές p υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμή Fisher συγκρίνοντας κάθε μετάλλαγμα με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη. Τιμές μικρότερες του 0,01 θεωρούνται σημαντική διαφορά μεταξύ του μεταλλάγματος και της αγρίου τύπου και παρουσιάζονται με Bold γραμματοσειρά. Στην περίπτωση υπερέκφρασης και της λιγάσης Neur, η αγρίου τύπου συγκρίθηκε με την αγρίου τύπου όταν υπερεκφράζεται μόνη της, και τα μεταλλάγματα συγκρίθηκαν με την αγρίου τύπου όταν υπερεκφράζεται με τη λιγάση.

Πρέπει να σημειωθεί ότι σε κάθε τομή συνενστιακού μικροσκοπίου, αναλύθηκε η ενδιάμεση περιοχή αποκλείοντας την κορυφαία και τη βασική επιφάνεια στις οποίες υπήρχε υπερβολική συσσώρευση σήματος δυσκολεύοντας την καταμέτρηση (εικόνες 5.4, 5.5).

Κυτταρική κατανομή των μεταλλαγμάτων Delta στη βασική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων

Όπως έχει ήδη προαναφερθεί ο αναπτυξιακός δίσκος του φτερού αποτελείται από μία στιβάδα κολωνοειδών και μία άλλη πεπλατυσμένων επιθηλιακών κυττάρων. Η σηματοδότηση μεταξύ των κολωνοειδών κυττάρων όπως επίσης και μεταξύ των κολωνοειδών και πεπλατυσμένων κυττάρων είναι απαραίτητη για τη σωστή ανάπτυξη του δίσκου του φτερού (Ramirez-Weber and Kornberg, 2000, Gibson and Schubiger, 2001). Στην επικοινωνία αυτή μεταξύ των κυττάρων έχουν βρεθεί να συμμετέχουν διάφορες προεκτάσεις της κυτταρικής μεμβράνης.

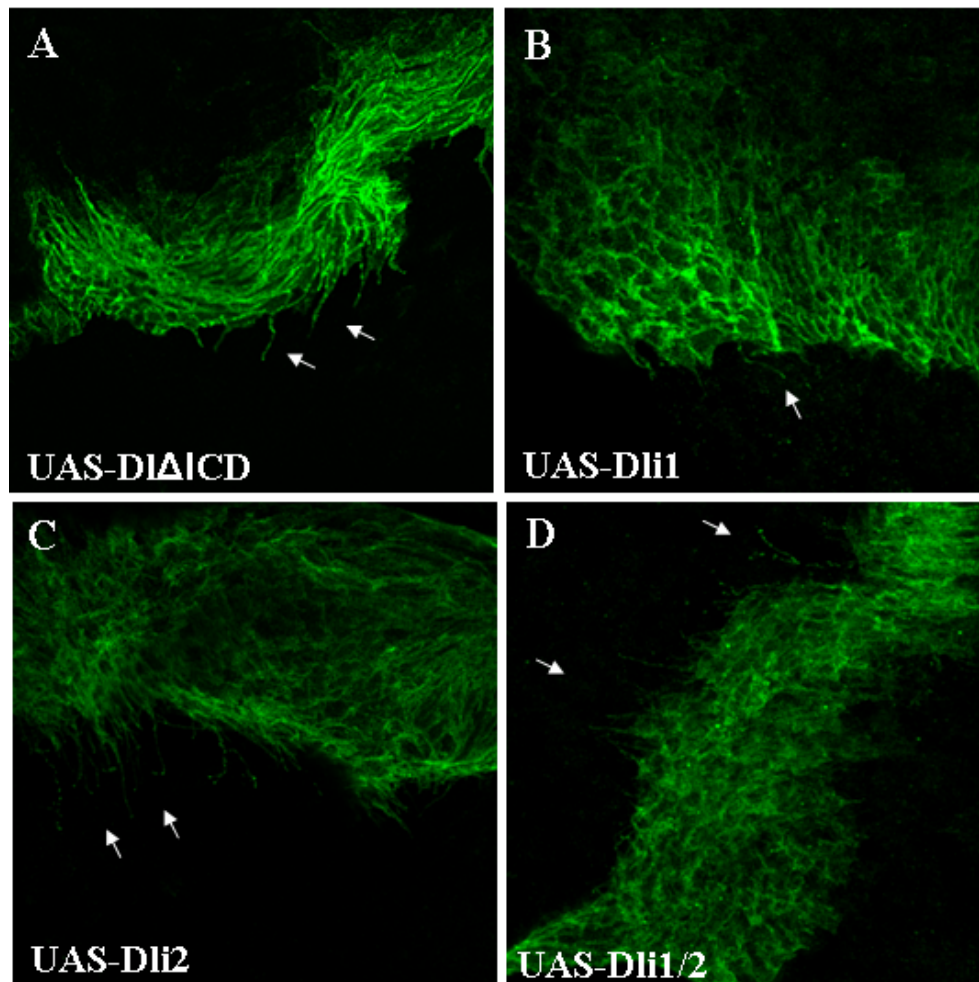
Στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού έχουν βρεθεί διάφορες προεκτάσεις της κυτταρικής μεμβράνης. Η κορυφαία μεμβράνη του επιθηλίου είναι διακοσμημένη με μικρολάχνες (Poody and Schneideman, 1970, Ursprung, 1972), ενώ η βασική περιέχει προεκβολές που ονομάζονται φιλοπόδια (Eaton et al., 1995). Τρία επιπλέον είδη μεμβρανικών προεκβολών έχουν παρατηρηθεί όλα εκ των οποίων εμπλέκονται στην ανταλλαγή σηματοδοτικών μορίων σημαντικά για την ανάπτυξη του δίσκου. Κύτταρα στην περιφέρεια του επιθηλίου παρουσιάζουν μακριές προεκβολές που μοιάζουν με φιλοπόδια και που συνδέουν τα κύτταρα αυτά με κύτταρα που βρίσκονται στο κέντρο. Οι προεκβολές αυτές ονομάζονται cytonemes (Ramirez-Weber and Kornberg, 1999). Τα επιθηλιακά κύτταρα έχουν επιπλέον μεμβρανικές προεκτάσεις μήκους μερικών κυττάρων που εμπλέκονται στη διαδικασία της πλευρικής αναστολής (De Jossineau et al., 2003, Cohen et al., 2010). Επιπροσθέτως, ομάδα πεπλατυσμένων κυττάρων δημιουργούν μεμβρανικές προεκβολές που περιέχουν μικροσωληνίσκους και που εκτείνονται ως τα κολωνοειδή κύτταρα (Cho et al., 2000, Gibson and Schubiger, 2000). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ορισμένα είδη μεμβρανικών προεκβολών περιείχαν ακτίνη όπως επίσης και τον υποδοχέα Thickveins και την πρωτεΐνη των ενδοσωμάτων Rab5, εμπλέκοντας τις προεκτάσεις αυτές στην κυτταρική σηματοδότηση (Demontis and Dahmann, 2007).

Υπερεκφράζοντας τα Delta ελλειμματικά μόρια κάτω από τον έλεγχο του *ptcGal4*, εκτός από την κυτταρική κατανομή τους που περιγράφηκε παραπάνω, εντοπίστηκε η συσσώρευση αυτών και σε μεμβρανικές προεκβολές στην βασική μεμβράνη των κυττάρων (εικόνα 5.6, άσπρα βέλη). Με την υπερέκφραση της αγρίου τύπου Delta πρωτεΐνης οι προεκβολές αυτές είναι πιο σπάνιες και συνήθως

μικρότερου μήκους (δε δείχνεται). Επιπλέον, η ελλειμματική μορφή της πρωτεΐνης Delta, Dli1CD, η οποία αποτελείται μόνο από την εξωκυττάρια και διαμεμβρανική περιοχή της εντοπιζόταν σε παρόμοιες δομές. Δεν είναι ακόμα γνωστό αν οι προεκβολές αυτές προϋπάρχουν ή επάγονται με την υπερέκφραση των πρωτεϊνών αυτών. Για να εντοπιστούν οι μεμβρανικές αυτές προεκβολές οι ανοσοϊστοχημικές χρώσεις που ακολούθησαν έγιναν απουσία απορρυπαντικού, καθώς έχει αποδειχθεί ότι το απορρυπαντικό, όπως και η μονιμοποίηση του ιστού, μπορεί να καταστρέψει μέρος των μεμβρανικών προεκτάσεων (Ramirez-Weber and Kornberg, 1999). Παρόλα αυτά τα ακόλουθα πειράματα διεξήχθησαν κατόπιν μονιμοποίησης του ιστού.

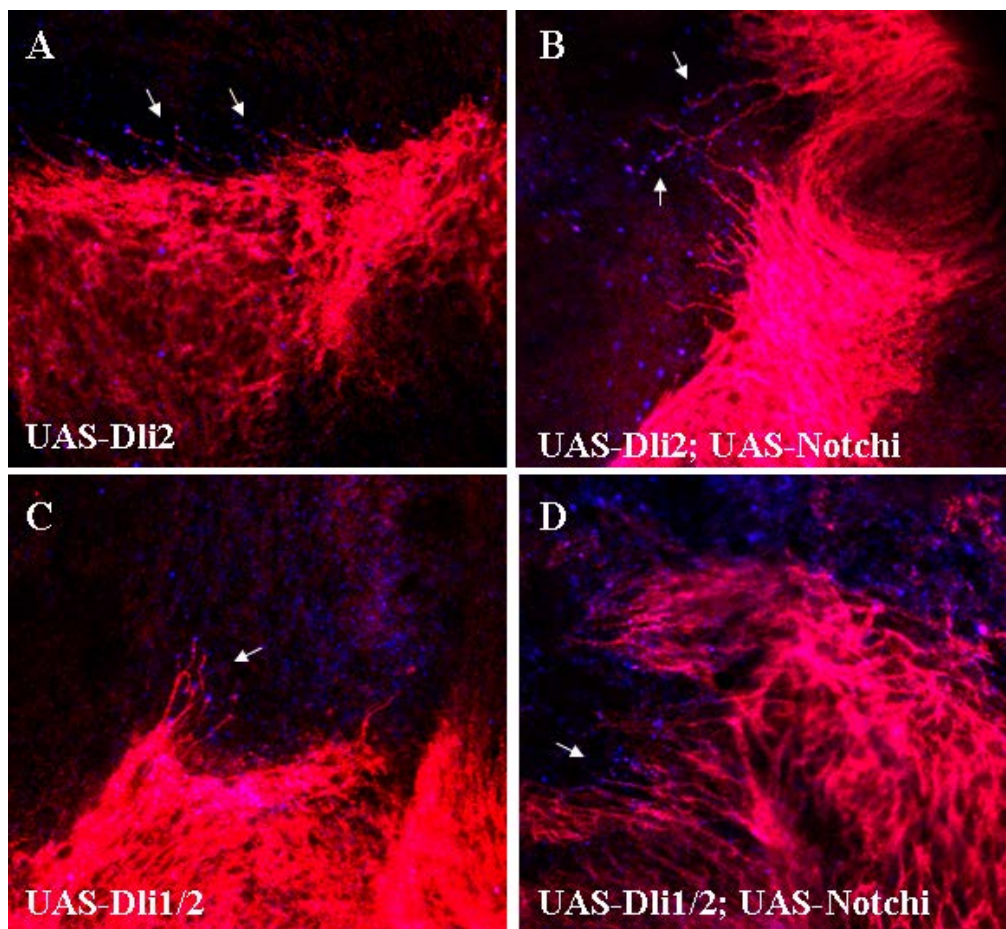
Στη συνέχεια ακολούθησε ταυτόχρονη χρώση των μεταλλάξεων Dli2 και Dli1/2, των οποίων η έκφραση είχε επαχθεί στον δίσκο του φτερού με *ptc-Gal4*, και του ενδογενούς υποδοχέα Notch. Παρατηρήθηκε συσσώρευση δομών που περιέχουν τον υποδοχέα Notch πάνω στις μεμβρανικές προεκτάσεις που βρίσκονται τα ελλειμματικά μεταλλάγματα του δεσμευτή (εικόνα 5.7A, C). Επιπλέον όταν υπερεκφράστηκαν τα συγκεκριμένα μεταλλάγματα κάτω από τον έλεγχο του *ptcGal4* και ταυτόχρονα έγινε καταστολή έκφρασης του Notch υποδοχέα από αυτά τα κύτταρα (UNotchRNAi), οι δομές συνέχιζαν να ανιχνεύονται δηλώνοντας ότι τα Delta μεταλλάγματα που συσσωρεύονται στις μεμβρανικές προεκβολές αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα Notch των γειτονικών κυττάρων (εικόνα 5.7B, D). Αποδεικνύεται λοιπόν ότι τα ελλειμματικά μεταλλάγματα της πρωτεΐνης Delta εντοπίζονται σε μεμβρανικές προεκτάσεις της βασικής μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων και ότι για αυτή την τοποθέτηση δε συμμετέχει κάποιου είδους ενδοκύττωση αφού και η πρωτεΐνη Dli1CD, που δεν έχει καθόλου ενδοκυττάρια περιοχή, μπορεί να εντοπιστεί εκεί. Η παρουσία της αγρίου τύπου πρωτεΐνης σε αυτές τις δομές ανιχνεύεται πολύ δυσκολότερα όπως αρκετά δύσκολα ανιχνεύεται και το Dli1. Συνεπώς οι ενεργές σε αυτή την περιοχή πρωτεΐνες ανιχνεύονται πολύ δυσκολότερα από τις σηματοδοτικά ανενεργές Dli2, Dli1/2 και Dli1CD. Τα μεταλλάγματα Dli2 και Dli1/2 που ανιχνεύονται σε αυτές τις προεκτάσεις αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα Notch γειτονικών κυττάρων. Η σημασία αυτής της αλληλεπίδρασης για τη σηματοδότηση δεν είναι γνωστή αλλά συλλέγοντας τα παραπάνω δεδομένα μπορούμε να υποθέσουμε ότι συμβαίνει κάποιου είδους Notch σηματοδότηση στη βασική πλευρά των επιθηλιακών κυττάρων μέσω μάλιστα μεμβρανικών προεκβολών. Σε κύτταρα όπου αυτή η σηματοδότηση είναι αδύνατη, η πιθανή ενδοκύττωση του

υποδοχέα και του δεσμευτή «παγώνει», καθιστώντας ευκολότερη την ανίχνευση των δύο πρωτεϊνών πάνω στις μεμβρανικές προεκβολές.



Εικόνα 5.6: Τα ελλειμματικά μεταλλάγματα Delta κατανέμονται σε προεκβολές της βασικής μεμβράνης.

Στις παραπάνω εικόνες παρουσιάζονται αναπτυξιακοί δίσκοι του φτερού από προνύμφες τρίτου σταδίου, στους οποίους τα DI ελλειμματικά μεταλλάγματα υπερεκφράζονται κάτω από τον έλεγχο του *ptc-Gal4*. Έχει γίνει χρώση για τις DI πρωτεΐνες με *gr-aDI* αντίσωμα (πράσινο) απουσία απορρυπαντικού. Όλες οι εικόνες παρουσιάζουν τη βασική μεμβράνη των κυττάρων. Παρατηρούμε τον εντοπισμό όλων των μεταλλαγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε μεμβρανικές προεκτάσεις της βασικής επιφάνειας (A-D, άσπρα βέλη).



Εικόνα 5.7: Τα ελλειμματικά μεταλλάγματα *Dll2* και *Dll1/2* που κατανέμονται σε προεκβολές της βασικής μεμβράνης συνεντοπίζονται με τον υποδοχέα Notch γειτονικών κυττάρων.

Στις παραπάνω εικόνες παρουσιάζονται αναπτυξιακοί δίσκοι του φτερού από προνύμφες τρίτου σταδίου, στους οποίους τα *Dl* ελλειμματικά μεταλλάγματα υπερεκφράζονται κάτω από τον έλεγχο του *ptc-Gal4*. Έχει γίνει χρώση για τις *Dl* πρωτεΐνες με *gr-aDl* αντίσωμα (κόκκινο) και για τον υποδοχέα Notch με *m-aNec* αντίσωμα (μπλε), απουσία απορρυπαντικού. Όλες οι εικόνες παρουσιάζουν τη βασική επιφάνεια των κυττάρων.

A και C: Παρατηρούμε τον εντοπισμό του υποδοχέα Notch στις μεμβρανικές προεκτάσεις των κυττάρων στις οποίες κατανέμονται τα *Dll2* και *Dll1/2* (άσπρα βέλη).

B και D: Ακόμα και μετά την καταστολή της έκφρασης του υποδοχέα Notch από τα κύτταρα που υπερεκφράζουν τα μεταλλάγματα *Dll2* και *Dll1/2*, συνεχίζεται ο συνεντοπισμός του υποδοχέα με τους δεσμευτές στις μεμβρανικές προεκβολές υποδηλώνοντας πως τα μεταλλάγματα των κυττάρων αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα Notch γειτονικών κυττάρων μέσω προεκτάσεων της βασικής μεμβράνης (άσπρα βέλη).

Τα ελλεμματικά μεταλλάγματα Dli1 και Dli2 εντοπίζονται στους συνδέσμους προσκόλλησης και όχι στους διαφραγματικούς συνδέσμους όπως και η αγρίου τύπου πρωτεΐνη

Τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού είναι πολωμένα όσον αφορά τον κορυφαίο-βασικό άξονα τους. Σε αυτά τα πολωμένα κύτταρα η κυτταρική μεμβράνη υποδιαιρείται σε κορυφαίες και κεντρικο-πλευρικές περιοχές οι οποίες χωρίζονται μεταξύ τους από εξειδικευμένες δομές τους συνδέσμους προσκόλλησης και τους διαφραγματικούς συνδέσμους (Muller, 2000, Tepass et al., 2001, Roh and Margolis, 2003). Η δημιουργία και η σταθερότητα αυτών των δομών είναι προϋπόθεση για τη διατήρηση της πολικότητας των κυττάρων, η οποία με τη σειρά της είναι πολύ σημαντική για τη φυσιολογία, την κινητικότητα, τη διαίρεση και τη σηματοδότηση (Tepass et al., 2001).

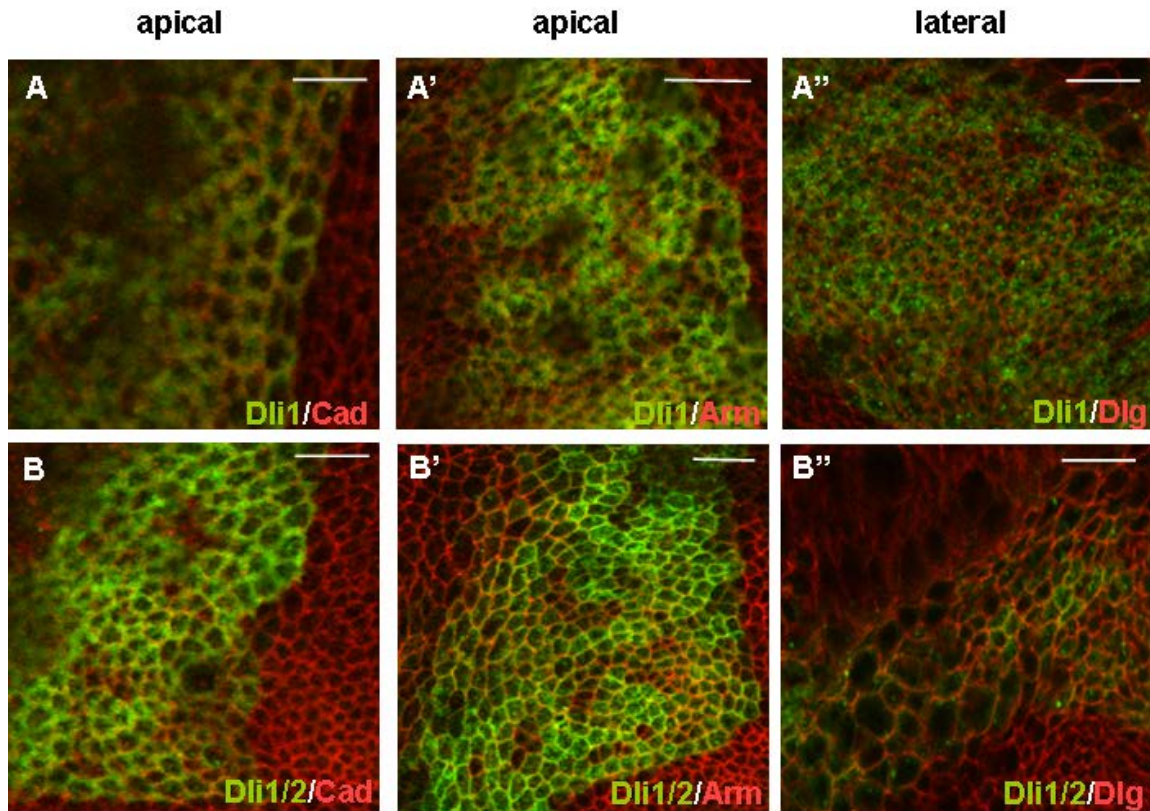
Η κορυφαία με τη κεντρικο-βασική περιοχή της κυτταρικής μεμβράνης του επιθηλίου μπορεί να διαχωριστεί με τη χρήση αντισωμάτων και συγκεκριμένα με αντίσωμα για τις πρωτεΐνες Cadherin και Armadillo που σημαίνουν τους συνδέσμους προσκόλλησης και άρα το κορυφαίο τμήμα του κυττάρου και με αντίσωμα για την πρωτεΐνη Discs-large η οποία είναι συστατικό των διαφραγματικών συνδέσμων και άρα ορίζει την κεντρικο-πλευρική περιοχή του κυττάρου (Sasaki et al., 2007).

Τόσο ο υποδοχέας Notch, όσο και οι δεσμευτές του Delta και Serrate εντοπίζονται στην κορυφαία μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων (Fehon et al., 1991, Bender et al., 1993, Kooh et al., 1993). Συγκεκριμένα μάλιστα έχει βρεθεί ότι συνεντοπίζονται με τις πρωτεΐνες Cadherin και Armadillo στην περιοχή των συνδέσμων προσκόλλησης της κυτταρικής μεμβράνης ενώ δεν συνεντοπίζονται με την πρωτεΐνη Discs-large στην περιοχή των διαφραγματικών συνδέσμων (Sasaki et al., 2007). Επιπλέον, η τοποθέτηση του υποδοχέα στις περιοχές αυτές της μεμβράνης είναι ανεξάρτητη από αυτή των δεσμευτών και το αντίστροφο (Sasaki et al., 2007).

Στην προσπάθεια να διαλευκάνουμε περισσότερο την κυτταρική κατανομή των ελλεμματικών μεταλλάγμάτων της πρωτεΐνης Delta, οι πρωτεΐνες Dli1 και Dli1/2 υπερεκφράστηκαν σε αναπτυξιακούς δίσκους του φτερού κάτω από τον έλεγχο του *ptc-Gal4*. Στη συνέχεια ακολούθησαν ανοσοϊστοχημικές χρώσεις για τα συγκεκριμένα μεταλλάγματα και για τους δείκτες Cadherin, Armadillo και Discs-large (εικόνα 5.8). Παρατηρείται ο συνεντοπισμός και των δύο μεταλλάγμάτων με τις πρωτεΐνες Cadherin και Armadillo στην περιοχή των συνδέσμων προσκόλλησης

(εικόνα 5.8A, A', B, B'). Αντιθέτως, όταν προχωράμε προς το τμήμα της μεμβράνης στην πλευρική περιοχή του κυττάρου όπου βρίσκονται οι διαφραγματικοί σύνδεσμοι, δεν παρατηρούμε συνεντοπισμό των μεταλλάγμάτων με την πρωτεΐνη Discs-large. Στην περιοχή αυτή του κυττάρου η Discs-large είναι στην κυτταρική μεμβράνη ως συστατικό των διαφραγματικών συνδέσμων ενώ τα μεταλλάγματα της πρωτεΐνης Delta βρίσκονται σε κυστίδια στο εσωτερικό του κυττάρου (εικόνα 5.8A'', B'').

Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι τόσο το σηματοδοτικά ενεργό στην συγκεκριμένη περιοχή του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού μετάλλαγμα Dli1 όσο και το ανενεργό Dli1/2 μπορούν να ακολουθήσουν το κυτταρικό πρότυπο κατανομής της αγρίου τύπου πρωτεΐνης Delta. Άρα τα συγκεκριμένα τμήματα της ενδοκυττάριας περιοχής της πρωτεΐνης δεν συμμετέχουν στην στόχευση του δεσμευτή σε συγκεκριμένες περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης.



Εικόνα 5.8: Τα ελλειμματικά μεταλλάγματα Dli1 και Dli1/2 εντοπίζονται στους συνδέσμους προσκόλλησης και όχι στους διαφραγματικούς συνδέσμους.

Στις παραπάνω εικόνες παρουσιάζονται αναπτυξιακοί δίσκοι του φτερού από προνύμφες τρίτου σταδίου, στους οποίους τα Dli ελλειμματικά μεταλλάγματα υπερεκφράζονται κάτω από τον έλεγχο του *ptc-Gal4*. Έχει γίνει χρώση με aDl αντίσωμα (πράσινο) και με aCadherin, aArmadillo ή με aDiscs-large (κόκκινο). Οι γραμμές κλίμακας είναι των 10μm.

A, A', B και B': Παρατηρούμε τον συνεντοπισμό των μεταλλαγμάτων Dli1 και Dli1/2 με τις πρωτεΐνες Cadherin και Armadillo στους συνδέσμους προσκόλλησης της κυτταρικής μεμβράνης.

A'' και B'': Στην κεντρικο-βασική περιοχή του κυττάρου, όπου εντοπίζονται οι διαφραγματικοί σύνδεσμοι, τα μεταλλάγματα Dli1 και Dli1/2 δεν συνεντοπίζονται με τη Discs-large στην κυτταρική μεμβράνη αλλά ήδη βρίσκονται σε κυστίδια στο εσωτερικό του κυττάρου.

Ενδοκύττωση των μεταλλαγμάτων Delta

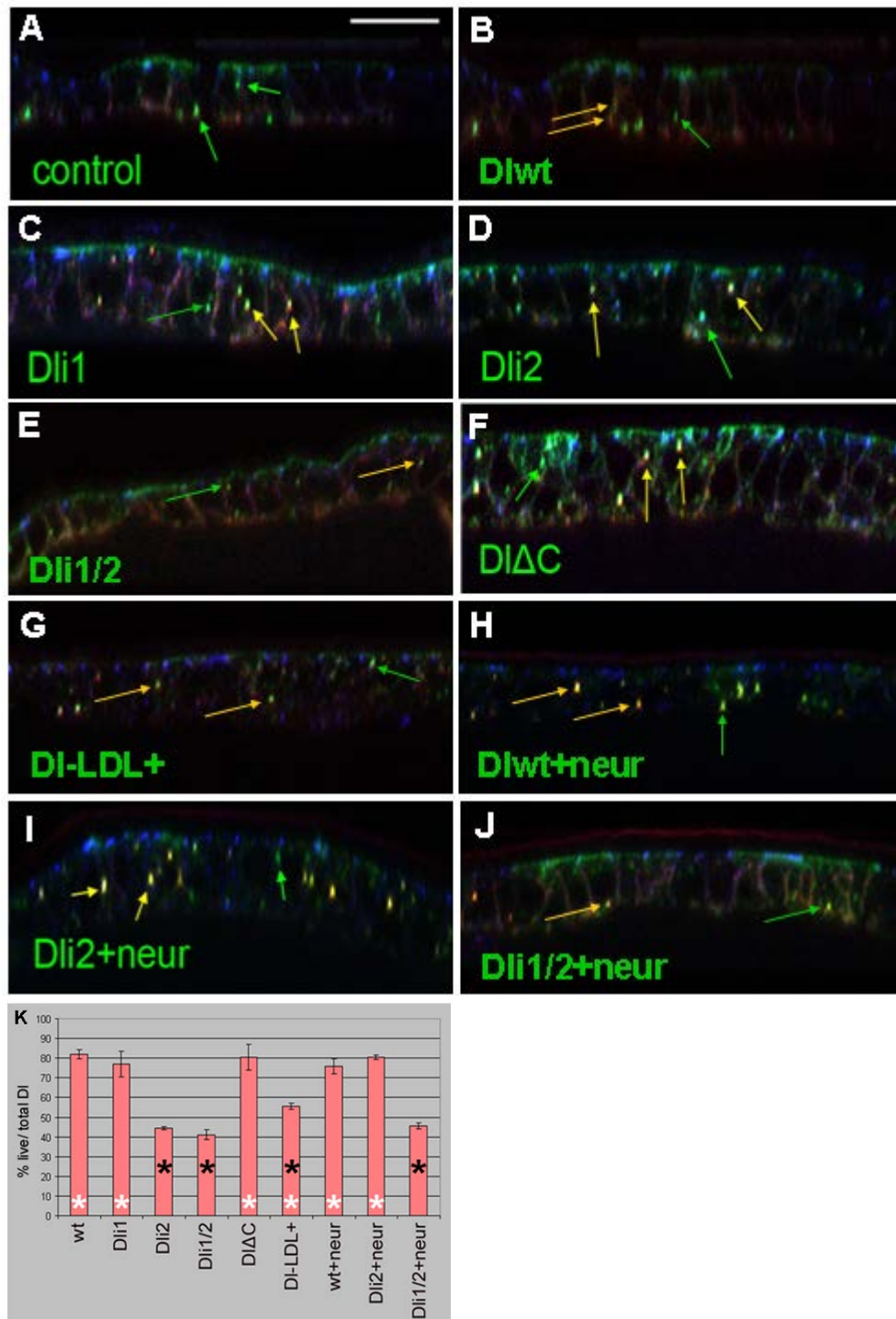
Από τα πειράματα που παρουσιάστηκαν στις προηγούμενες ενότητες δεν έγινε εφικτό να εντοπιστεί κάποια ποιοτική διαφορά στον τρόπο ενδοκύττωσης μεταξύ της αγρίου τύπου πρωτεΐνης D1 και των μεταλλαγμάτων της, ή στην κατανομή σε υποπεριοχές της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, συνεπώς δεν είναι δυνατόν να «στοχοποιηθεί» κάποιο από τα ενδοκυττάρια μοτίβα ως υπεύθυνο για την υποκυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης. Για το λόγο αυτό, η μελέτη εστιάστηκε στο ρυθμό ενδοκύττωσης των μεταλλαγμάτων.

Ακολούθησε πείραμα πρόσληψης αντισώματος από ζώντα ιστό (Le Borgne and Schweisguth, 2003): Κάτω από τον έλεγχο του Eq-Gal4 υπερεκφράστηκε τόσο η αγρίου τύπου πρωτεΐνη D1 όσο και τα μεταλλάγματα αυτής. Για τεχνικούς λόγους στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν θώρακες νύμφης 17-26 ωρών. Αυτοί επώαστηκαν με mouse anti-D1 αντίσωμα για 15 λεπτά πριν τη μονιμοποίηση τους. Στη συνέχεια ακολούθησε συμβατική χρώση με guinea pig anti-D1 αντίσωμα (μετά τη μονιμοποίηση και διαπερατοποίηση με απορρυπαντικό του ιστού). Με αυτό τον τρόπο μπορούσαμε να ανιχνεύσουμε σε ποιο ποσοστό τα συνολικά D1 ενδοσώματα (guinea pig αντίσωμα) περιείχαν πρωτεΐνη D1 η οποία είχε ενδοκυττωθεί στα 15 λεπτά που έγινε η επώαση (mouse αντίσωμα). Αυτό το ποσοστό, της ενδοκυττωμένης πρωτεΐνης, κυμαινόταν από 72 έως 88% της συνολικής πρωτεΐνης για την αγρίου τύπου και τα μεταλλάγματα Dli1 και D1ΔC. Οι πρωτεΐνες Dli2 και Dli1/2 όμως, έδειξαν μειωμένο ρυθμό ενδοκύττωσης με μόλις 38 - 45% των συνολικών ενδοσωμάτων να περιέχουν mouse αντίσωμα. Επιπλέον η πρωτεΐνη D1-LDL+ έδειξε μειωμένο ρυθμό ενδοκύττωσης (56%). Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι σημαντικό ρόλο στο ρυθμό ενδοκύττωσης κατέχει το δεύτερο συντηρημένο μοτίβο, η περιοχή αλληλεπίδρασης με τη λιγάση Mib1.

Τα παραπάνω πειράματα έγιναν με τη χρήση του Eq-Gal4, ο οποίος οδηγεί την υπερέκφραση σε κύτταρα που κατά την πλειονότητα τους δεν εκφράζουν τη λιγάση Neur. Ίσως αυτός να είναι ο λόγος που το *icd2*, η θέση αλληλεπίδρασης με τη λιγάση Mib1, φαίνεται τόσο σημαντικό στο ρυθμό ενδοκύττωσης των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, με τον ίδιο τρόπο υπερεκφράστηκε οι D1wt, Dli2 και Dli1/2 μαζί όμως με τη λιγάση Neur και ακολούθησε το ίδιο πείραμα. Βρέθηκε ότι το ποσοστό ενδοκύττωσης της αγρίου τύπου πρωτεΐνης δεν άλλαξε αλλά αυξήθηκε δραματικά η ενδοκύττωση του Dli2. Αντιθέτως, η ενδοκύττωση του Dli1/2 παρέμενε σε αργούς

ρυθμούς. Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι σε αυτό το πείραμα, ο ρυθμός ενδοκύττωσης των πρωτεϊνών είναι άμεσα συνδεδεμένος με την ουβικουιτινυλίωση τους.

Πρέπει να αναφερθεί ότι η συγκεκριμένη μέθοδος αδυνατεί να μετρήσει ενδοκύττωση από την κορυφαία μεμβράνη των κυττάρων λόγω του δερματιδίου της νύμφης.



Εικόνα 5.9: Ρυθμός ενδοκύττωσης D1 πρωτεϊνών

B-J: Εικόνες από ιστούς (nota) νύμφης όπου διακρίνονται η E-cadherin (μπλε), guinea pig anti-D1 (πράσινο) και mouse anti-D1 (κόκκινο). Το mouse anti-D1 αντίσωμα επώαστηκε με το ζωντανό ιστό για 15 λεπτά. Για τα υπόλοιπα αντισώματα ακολούθηθηκε συμβατική χρώση μετά από μονιμοποίηση. Η E-cadherin μας δείχνει την πολικότητα των κυττάρων. Σε όλες τις εικόνες η κορυφαία μεμβράνη των κυττάρων είναι πάνω. Οι γραμμή κλίμακας είναι 16μm. Τα κίτρινα βέλη δείχνουν ενδοσώματα τα οποία είναι θετικά και για τα δύο D1 αντισώματα. Τα πράσινα βέλη δείχνουν ενδοσώματα τα οποία είναι θετικά μόνο για το guinea pig αντίσωμα.

A: Πείραμα ελέγχου όπου ο ιστός βρισκόταν στον πάγο κατά την επώαση με το mouse anti-D1 αντίσωμα ώστε να εμποδιστεί η ενδοκύττωση. Παρατηρείται η απουσία θετικών ενδοσωμάτων και για

τα δύο αντισώματα. Για τα υπόλοιπα πειράματα η επώαση με το mouse anti-DI αντίσωμα έγινε στους 25°C.

Κ: Διάγραμμα όπου παρουσιάζονται τα ποσοστά των συνολικών DI ενδοσωμάτων (θετικά για guinea pig αντίσωμα) που ήταν θετικά για το mouse anti-DI αντίσωμα. Οι μαύροι αστερίσκοι δείχνουν τους γονότυπους που είχαν μεγάλες διαφορές με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη. Οι άσπροι αστερίσκοι δείχνουν τους γονότυπους που είχαν μεγάλες διαφορές με την Dli1/2 πρωτεΐνη. Παρατηρείται ότι ο ρυθμός ενδοκύτωσης των Dli2, Dli1/2, DILDL+ είναι αρκετά πιο αργός από αυτόν της DIwt. Όταν στο πείραμα προστίθεται η λιγάση Neur, τότε ο ρυθμός ενδοκύτωσης του Dli2 διπλασιάζεται και μοιάζει με αυτό της DIwt, ενώ δεν παρατηρούνται αλλαγές στην περίπτωση του Dli1/2.

Συνοψίζοντας:

- Δεν παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές κυρίως στην κατανομή των μεταλλαγμάτων στην κορυφαία μεμβράνη των κυττάρων σε σύγκριση με την αγρίου τύπου D1, όταν αυτά υπερεκφράζονται μόνα τους σε μιτωτικούς κλώνους στο φτερό.
- Μόνο το μετάλλαγμα Dli2 ακολούθησε το πρότυπο της απομάκρυνσης από την κορυφαία μεμβράνη της πρωτεΐνης D1 όταν συνεκφράστηκε σε μιτωτικούς κλώνους στο φτερό με τη λιγάση Neur.
- Δεν παρουσιάστηκαν αξιοσημείωτες μεταβολές στο συνεντοπισμό των D1 μεταλλαγμάτων με τους ενδοσωμικούς δείκτες σε σύγκριση με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη.
- Οι σηματοδοτικά ανενεργές μορφές του D1, με εξαίρεση την D1-LDL+, συνεντοπίζονται με τον υποδοχέα Notch γειτονικών κυττάρων, σε προεκβολές της βασικής μεμβράνης.
- Οι πρωτεΐνες Dli2, Dli1/2 και D1-LDL+ παρουσίασαν μειωμένο ρυθμό ενδοκύττωσης, ο οποίος στην περίπτωση του πρώτου διορθώθηκε με την συνέκφραση της λιγάσης Neur.

6. Συζήτηση

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως προαναφέρθηκε, η διακυτταρική σηματοδότηση Notch ενεργοποιείται σε μία ποικιλία κυτταρικών αποφάσεων και καθορίζει τη δημιουργία διαφορετικών κυτταρικών τύπων. Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε ο ρόλος τόσο της ουβικουιτινυλίωσης όσο και της ενδοκύττωσης στο συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι. Μελετήσαμε τους μηχανισμούς που διέπουν αυτές τις διαδικασίες αλλά και τη σημασία τους κατά τη σηματοδότηση.

Στη συνέχεια αναφέρονται τα βασικά συμπεράσματα και συσχετίζονται με αποτελέσματα άλλων ερευνητικών ομάδων.

Ενδοκυττωτικά μοτίβα στις DSL πρωτεΐνες

Σε αντίθεση με την υψηλή συντήρηση που παρουσιάζεται στις εξωκυττάρειες περιοχές των DSL πρωτεϊνών, ο μικρός βαθμός συντήρησης των ενδοκυττάρειων δυσκολεύει τη μελέτη του ρόλου τους. Μελετώντας την πρωτεΐνη Ser είχε βρεθεί ότι διαθέτει μία περιοχή με κατάλοιπα ασπαραγίνης (Glittenberg et al., 2006). Η περιοχή αυτή συμμετέχει στην αλληλεπίδραση του δεσμευτή με τις δύο λιγάσες ουβικουιτίνης Neuralized και Mindbomb1, είναι σημαντική για τη σηματοδοτική ικανότητα του δεσμευτή και είναι καλά συντηρημένη στα έντομα (Glittenberg et al., 2006, Fontana and Posakony, 2009).

Στη συγκεκριμένη εργασία βρέθηκαν τρεις συντηρημένες περιοχές στις πρωτεΐνες DI των εντόμων που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση και την ουβικουιτινυλίωση από τις E3 λιγάσες. Αντιθέτως με την πρωτεΐνη Ser, η DI διαθέτει δύο διαφορετικές θέσεις αλληλεπίδρασης για τις λιγάσες Neur και Mib1.

Η πρώτη, icd1 (DDAEARKQNEQN), αποτελεί θέση αναγνώρισης και δέσμευσης από τη λιγάση Neur. Παράλληλα με εμάς, μία άλλη ερευνητική ομάδα απέδειξε ότι οι αλληλουχίες QNxxN αποτελούν θέσεις αναγνώρισης για τη λιγάση Neur (Fontana and Posakony, 2009). Παρόμοια πεπτίδια έχουν βρεθεί στις πρωτεΐνες της οικογένειας Bearded, οι οποίες λειτουργούν ως αναστολείς της δράσης του Neur, ανταγωνιζόμενες τις DSL στη δέσμευση πάνω στη λιγάση, οδηγώντας σε μείωση της σηματοδότησης Notch (Bardin and Schweisguth, 2006, Fontana and Posakony, 2009).

Η δεύτερη, icd2 (IKNTWDKSVNNI), αποτελεί θέση αναγνώρισης και δέσμευσης από τη λιγάση Mib1. Η αλληλουχία NNL/I/V θα μπορούσε να αποτελεί

γενικώς θέση αναγνώρισης από τη λιγάση Mib1 πάνω στις DSL πρωτεΐνες αλλά υπάρχουν δεσμευτές οι οποίοι παρόλο που διατηρούν την υπόλοιπη *icd2* περιοχή, δεν τις διαθέτουν, όπως στην περίπτωση των DI πρωτεϊνών στο *B. mori* και *A. Pisum*.

Η τρίτη, *icd3* (KQLNTD), διαθέτει ένα καλά συντηρημένο κατάλοιπο λυσίνης το οποίο αποτελεί θέση ουβικουιτινυλίωσης από τη λιγάση Neur.

Συγκρίνοντας τις συντηρημένες περιοχές των δεσμευτών DI και Ser, παρατηρούμε ότι το μοτίβο της Ser με τα κατάλοιπα ασπαραγίνης περιέχει αλληλουχίες που θυμίζουν και την *icd1* και την *icd2* του DI. Η αλληλουχία QNEEN του Ser είναι παρόμοια με την αλληλουχία QNExN στην *icd1* περιοχή των DI πρωτεϊνών και η NNL του Ser μοιάζει με την NNI/V που εμφανίζεται στην *icd2*, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η μία περιοχή αναγνώρισης και αλληλεπίδρασης και με τις δύο E3 λιγάσες στην πρωτεΐνη Ser αντιστοιχεί σε δύο χωριστά μοτίβα στην πρωτεΐνη DI. Αν και υπάρχουν συντηρημένες λυσίνες στην ενδοκυττάρια περιοχή της πρωτεΐνης Ser, καμία δε βρίσκεται σε περιοχή που να θυμίζει την *icd3* του DI. Η έλλειψη μίας *icd3* περιοχής στην πρωτεΐνη Ser, όπως και η διαφορετική κατανομή των θέσεων αλληλεπίδρασης των E3 λιγασών στις πρωτεΐνες DI και Ser οδηγούν στο συμπέρασμα ότι πιθανόν οι δύο δεσμευτές ρυθμίζονται με διαφορετικό τρόπο από την ουβικουιτινυλίωση.

Όσον αφορά τα σπονδυλωτά, διαθέτουν πολλαπλά παραομόλογα των πρωτεϊνών DI και Jagged (Ser) σε αντίθεση με τα έντομα. Συγκρίνοντας τις DSL πρωτεΐνες δε βρέθηκε κάποιο μοτίβο παρόμοιο με τις QNExN αλληλουχίες των DSL των εντόμων. Παρόλα αυτά ένα λιγότερο συντηρημένο μοτίβο (NxxN) έχει βρεθεί στο Dll1 και Jagged1 (Fontana and Posakony, 2009). Επιπλέον δεν έχει βρεθεί στα σπονδυλωτά κάποιο μοτίβο αντίστοιχο με το *icd3*. Η έλλειψη συντήρησης των περιοχών δέσμευσης και ουβικουιτινυλίωσης του Neur στην πρωτεΐνη DI μεταξύ εντόμων και σπονδυλωτών, πιθανόν αντανακλά την έλλειψη συντήρησης στη λειτουργία της συγκεκριμένης λιγάσης. Παρόλο που οι DSL πρωτεΐνες στα σπονδυλωτά είναι υποστρώματα των λιγασών Neur1 και 2, δεν υπάρχει αποδεδειγμένος ρόλος των λιγασών αυτών στην προώθηση της Notch σηματοδότησης (Song et al., 2006, Koo et al., 2007, Koutelou et al., 2008, Benhra et al., 2010). Αντιθέτως, έχει αποδειχθεί ότι η Neur1 μάλλον λειτουργεί αρνητικά στη σηματοδότηση καθώς προκαλεί αποικοδόμηση της Jagged1 (Koutelou et al., 2008). Επιπλέον, η απώλεια της Mib1 λιγάσης επιφέρει πλήρη απώλεια της Notch σηματοδότησης και συνεπώς υπάρχει ο ισχυρισμός ότι στα σπονδυλωτά η Mib1

λιγάση είναι η μοναδική που ενεργοποιεί τις DSL πρωτεΐνες (Koo et al., 2005b, Koo et al., 2007, Zhang et al., 2007).

Σε αντίθεση με το *icd1* μοτίβο, συγκρίνοντας τα Dll1 και 4 του ποντικού, το Dll1 του *Xenopus laevis* και τα D1A, DID και Dll4 του zebrafish βρήκαμε ένα μοτίβο ((L/I/V)KN(T/I)N) και ένα τριπεπτίδιο (NNL) το οποίο είναι παρόμοιο με τις αλληλουχίες του *icd2* των εντόμων. Το τριπεπτίδιο (NNL) υπήρχε και στο Dll3 του ποντικού και του *Xenopus laevis* και στο DIC του zebrafish τα οποία δεν είχαν την πρώτη αλληλουχία. Επιπλέον, οι Jagged πρωτεΐνες των σπονδυλωτών έχουν ένα NNxxxxL συντηρημένο μοτίβο (Glittenberg et al., 2006), το οποίο ακολουθεί ένα IKNxIEK μοτίβο στις Jagged1 (ποντικού, zebrafish και *Xenopus*) αλλά όχι στις Jagged2. Πιθανότατα αυτά τα μοτίβα να έχουν κάποιο ρόλο στην αλληλεπίδραση όλων αυτών των DSL πρωτεϊνών με τη λιγάση Mib1.

Ουβικουϊτινυλίωση, ενδοκύττωση και σηματοδότηση Notch

Πλειάδα πειραμάτων στο παρελθόν έχουν συνδέσει την ικανότητα των πρωτεϊνών D1 και Ser να σηματοδοτήσουν με την ουβικουϊτινυλίωση. Όσον αφορά τη λιγάση Neur, έχει δειχθεί ότι προκαλεί την ενδοκύττωση της πρωτεΐνης D1 και μειώνει τα επίπεδα της μεταμεταγραφικά (Deblandre et al., 2001, Lai et al., 2001, Pavlopoulos et al., 2001, Yeh et al., 2001, Le Borgne and Schweisguth 2003b). Επιπλέον ελέγχει την υποκυτταρική θέση και της πρωτεΐνης Ser (Pitsouli and Delidakis, 2005). Αναφορικά με τη λιγάση Mib1 γνωρίζουμε ότι προκαλεί την ενδοκύττωση και των δύο δεσμευτών (Lai et al., 2005, Le Borgne et al., 2005). Πολύ σημαντικά όμως είναι τα πειράματα που αποδεικνύουν τη θετική συσχέτιση της ουβικουϊτινυλίωσης με τη σηματοδότηση Notch. Βασικοί συμμετέχοντες στο μονοπάτι της ουβικουϊτινυλίωσης όπως οι E3 λιγάσες Neur και Mib1 αλλά και η πρωτεΐνη Epsin δρουν στο κύτταρο αποστολέα για να ενισχύσουν τη σηματοδότηση Notch (Pavlopoulos et al., 2001, Itoh et al., 2003, Le Borgne and Schweisguth, 2003a, Le Borgne and Schweisguth, 2003b, Wang and Struhl, 2004, Overstreet et al., 2004, Le Borgne et al., 2005).

Στη συγκεκριμένη ερευνητική εργασία αποδείχθηκε ότι η πρωτεΐνη D1 ουβικουϊτινυλιώνεται άμεσα από τις λιγάσες Neur και Mib1 σε S2 κύτταρα. Επιπλέον εντοπίστηκε η K742 ως η λυσίνη-στόχος της λιγάσης Neur στην ενδοκυττάρια περιοχή του δεσμευτή. Δεν κατέστη δυνατή η εύρεση συγκεκριμένης λυσίνης στόχου

για τη λιγάση Mib1, γεγονός που ίσως υποδηλώνει σημαντικές διαφορές στον τρόπο ουβικουιτινυλίωσης της πρωτεΐνης D1 από τις δύο E3 λιγάσες. Παράλληλα από τα συγκεκριμένα πειράματα συμπεραίνουμε ότι η πρωτεΐνη D1 είτε πολυμονοουβικουιτινυλιώνεται είτε πολυουβικουιτινυλιώνεται και από τις δύο λιγάσες, εάν λάβουμε υπόψη την εμφάνιση μεγάλου μοριακού βάρους μορφών της και ότι ένα μεγάλο ποσοστό των ουβικουιτινυλιωμένων μορφών της πρωτεΐνης καταλήγει στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση.

Πολύ σημαντικό συμπέρασμα είναι η άμεση σύνδεση της ουβικουιτινυλίωσης, και της ικανότητας για σηματοδότηση. Στις περιπτώσεις όπου η ουβικουιτινυλίωση ήταν αδύνατη από τη λιγάση Mib1 (Dli2, Dli1/2), ο δεσμευτής έχανε την ικανότητα του να σηματοδοτεί για την επαγωγή Wg στο ραχιαιοκοιλιακό όριο του φτερού. Επιπλέον, όταν εμποδίστηκε η ουβικουιτινυλίωση από τη λιγάση Neur (Dli1, Dli1/2, D1ΔC) επηρεάστηκε η ικανότητα του δεσμευτή να σηματοδοτήσει κατά την πλευρική αναστολή. Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι όταν η πρωτεΐνη D1 δεν ουβικουιτινυλιώνεται από τη λιγάση Neur ή Mib1 ανάλογα με τον ιστό, δεν είναι ικανή να σηματοδοτήσει.

Από την ανάλυση της θερμοευαίσθητης μεταλλαγής *shibire^{ts}* (Poodyry, 1990) έως και σήμερα, ποικιλία αποτελεσμάτων συνηγορούν στο γεγονός ότι οι δεσμευτές D1 και Ser ενδοκυττώνονται και ότι η ενδοκύττωση αυτή είναι σημαντική για τη σηματοδοτική τους ικανότητα. Αρχικά παρατηρήθηκε ότι οι δεσμευτές βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων αλλά και σε κυστίδια ενδοκυττωτικής φύσης (Kooch et al., 1993, Parks et al., 1995, Kramer and Phistry, 1996) και μάλιστα η παρουσία σε αυτά τα κυστίδια συνδέθηκε με την ικανότητα για σηματοδότηση (Parks et al., 2000). Επιπλέον αποδείχθηκε ότι οι δύο δεσμευτές ενδοκυττώνονται και μάλιστα ταχύτατα (Le Borgne and Schweisguth, 2003, Le Borgne et al., 2005) και όπως αναφέρθηκε προηγουμένως οι λιγάσες Neur και Mib1 προκαλούν την ενδοκύττωση και των δύο δεσμευτών. Όπως ήδη αναφέρθηκε (βλ. Εισαγωγή) υπάρχουν αρκετά μοντέλα που προσπαθούν να συσχετίσουν την ενδοκύττωση των δεσμευτών με τη σηματοδοτική τους ικανότητα.

Στη δική μας εργασία παρατηρήσαμε ότι η πρωτεΐνη D1 εντοπίζεται στην κορυφαία και βασική επιφάνεια των κυττάρων και σε ενδοκυττωτικά κυστίδια όπως ήδη έχει αναφερθεί, αλλά ο εντοπισμός της στα κυστίδια ήταν άμεσα συνδεδεμένος με την ικανότητα της να ουβικουιτινυλιωθεί. Μεταλλάγματα τα οποία αδυνατούσαν ουβικουιτινυλιωθούν, όπως το Dli2 και Dli1/2 στην περιοχή του φτερού,

παρουσίαζαν πολύ μειωμένο εντοπισμό στο εσωτερικό των κυττάρων και διατηρούσαν την κατανομή τους στην κορυφαία μεμβράνη. Πολύ σημαντική ήταν η περίπτωση του DIΔC από την οποία συμπεραίνουμε ότι για να συμβεί συσσώρευση του DI/N συμπλόκου σε συσσωματώματα στην κορυφαία μεμβράνη των κυττάρων αρκεί η αλληλεπίδραση με τη λιγάση ουβικουιτίνης αλλά για να υπάρξει ενδοκύττωση αυτού του συμπλόκου, η ουβικουιτινυλίωση του δεσμευτή είναι αναγκαία προϋπόθεση.

Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι η ενδοκύττωση των δεσμευτών είναι αποτέλεσμα της ουβικουιτινυλίωσης αυτών από τις λιγάσες Mib1 και Neur. Από τη στιγμή όμως που οι δύο λιγάσες ουβικουιτινυλιώνουν την πρωτεΐνη DI με διαφορετικό τρόπο, δεν είναι βέβαιο ότι ακολουθεί την ίδια ενδοκυττωτική πορεία μετά την ουβικουιτινυλίωση της από Neur και Mib1. Για το λόγο αυτό, προσπαθήσαμε να εντοπίσουμε αν κάποια ενδοκυττάρια περιοχή της DI είναι υπεύθυνη για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης σε κάποιο συγκεκριμένο υποκυτταρικό διαμέρισμα ή αν επηρεάζει το ρυθμό ενδοκύττωσης της. Από το συνεντοπισμό των διαφόρων μεταλλαγμάτων DI με ενδοσωμικούς δείκτες δεν στοχοποιήσαμε κάποιο ενδοκυττάριο μοτίβο της πρωτεΐνης για την τοποθέτηση της σε συγκεκριμένο υποκυτταρικό διαμέρισμα. Παρατηρήσαμε ότι η πρωτεΐνη DI εντοπίζεται σε πρώιμα ενδοσώματα (θετικά για Sara) και είχε μικρότερο συνεντοπισμό με τους δείκτες Hrs και Rab11. Κανένα από τα αναγνωρισμένα icd δεν ήταν υπεύθυνο για την τοποθέτηση της πρωτεΐνης σε αυτά τα κυστίδια. Συγκεκριμένα για την τοποθέτηση της DI στα πρώιμα ενδοσώματα ήταν αναγκαία ολόκληρη η ενδοκυττάρια περιοχή, λόγω του μειωμένου εντοπισμού του DI-LDL+ σε αυτά. Επιπλέον δεν καταφέραμε να εντοπίσουμε διαφορές στο ρυθμό ενδοκύττωσης πρωτεΐνης DI που είχε ουβικουιτινυλιωθεί από Neur ή από Mib1. Και στις δύο περιπτώσεις ο δεσμευτής ενδοκυττώνεται με πολύ γρήγορο ρυθμό. Ακόμα και το μετάλλαγμα Dli1/2 ενδοκυττώνεται αλλά με πιο αργούς ρυθμούς γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη και άλλων ενδοκυττωτικών μηχανισμών για την πρωτεΐνη DI χωρίς την ανάγκη για αλληλεπίδραση και ουβικουιτινυλίωση από τις δύο γνωστές E3 λιγάσες.

Η μοναδική περίπτωση η οποία παρέχει ενδείξεις για ποιοτική ή ποσοτική διαφορά στην ενδοκύττωση μετά από ουβικουιτινυλίωση από Neur και Mib1 είναι αυτή του DI-LDL+. Η χιμαιρική αυτή πρωτεΐνη δημιουργήθηκε ενώνοντας την εξωκυττάρια και διαμεμβρανική περιοχή της πρωτεΐνης DI με το ενδοκυττάριο μοτίβο του LDL υποδοχέα το οποίο περιέχει σινιάλο ενδοκύττωσης (Wang and Struhl,

2004). Το συγκεκριμένο μετάλλαγμα δε διαθέτει λυσίνες στην ενδοκυττάρια περιοχή και άρα δεν ουβικουιτυλιώνεται. Η πρωτεΐνη αυτή έχειδειχθεί ότι ενεργή κατά την επαγωγή του ραχαιοκοιλιακού ορίου του φτερού και μάλιστα με τρόπο που απαιτεί την παρουσία του ενδοκυττωτικού μοτίβου (Wang and Struhl, 2004). Αυτό σημαίνει ότι κατά αυτή τη διαδικασία, η πρωτεΐνη D1 μπορεί να παρακάμψει την ανάγκη για ουβικουιτυλίωση, ενδοκύττωση και ενεργοποίηση της από τη λιγάση Mib1 αν ενδοκυττωθεί με διαφορετικό τρόπο. Δεν συνέβη όμως το ίδιο στην περίπτωση της πλευρικής αναστολής όπου η ουβικουιτυλίωση και η ενδοκύττωση της D1 εξαρτάται από τη λιγάση Neur. Σε αυτή την περίπτωση το D1-LDL+ αδυνατούσε να σηματοδοτήσει. Επιπλέον όταν δοκιμάστηκε σε πειράματα ενδοκύττωσης βρέθηκε ότι ενδοκυττώνεται με ένα μέτριο ρυθμό σε σχέση με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη. Οι παραπάνω παρατηρήσεις μας οδηγούν στην υπόθεση ότι είτε ο μειωμένος ρυθμός ενδοκύττωσης του D1-LDL+ είναι αρκετός για την επαγωγή Wg στο ραχαιοκοιλιακό όριο του φτερού αλλά για να επιτευχθεί πλευρική αναστολή χρειάζεται γρήγορη ενδοκύττωση η οποία επιτυγχάνεται με τη λιγάση Neur, ή υπάρχουν σημαντικές διαφορές στα ενδοκυττωτικά μονοπάτια που ακολουθούν οι δεσμευτές κατά την πλευρική αναστολή η οποία είναι κυρίως εξαρτώμενη από το Neur και την επαγωγή Wg η οποία είναι εξαρτώμενη από Mib1. Χρειάζονται όμως περαιτέρω έρευνες για να διαπιστωθεί εάν υπάρχουν ποιοτικές διαφορές στην ενδοκύττωση των δεσμευτών αναλόγως με τη λιγάση ουβικουιτίνης.

Κυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης D1 στη βασική μεμβράνη

Η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων του επιθηλίου όπως επίσης μεταξύ αυτών και των κυττάρων της περιπόδιας μεμβράνης είναι σημαντική για τη σωστή ανάπτυξη και λειτουργία του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού (Ramirez-Weber and Kornberg, 2000, Gibson and Schubiger, 2001). Στην επικοινωνία αυτή έχουν βρεθεί να συμμετέχουν διάφορες προεκτάσεις της κυτταρικής μεμβράνης.

Και η κορυφαία και η βασική επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων είναι διακοσμημένη με μεμβρανικές προεκτάσεις. Πιο συγκεκριμένα, στην κορυφαία επιφάνεια υπάρχουν οι μικρολάχνες, ενώ η βασική περιέχει προεκβολές που ονομάζονται φιλοπόδια (Poodyry and Schneidenman, 1970, Ursprung, 1972, Eaton et al., 1995). Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν εντοπίσει επιπλέον μεμβρανικές προεκτάσεις που δημιουργούνται από τα επιθηλιακά κύτταρα του φτερού και πολύ

σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι προεκβολές αυτές συνδέονται με τη σηματοδότηση μεταξύ των κυττάρων. Έχουν εντοπιστεί μακριές μεμβρανικές προεκβολές, οι οποίες μοιάζουν με φιλοπόδια, δημιουργούνται από κύτταρα στην περιφέρεια του δίσκου και συνδέουν αυτά με κύτταρα που βρίσκονται στο κέντρο. Οι προεκβολές αυτές ονομάζονται cytonemes (Ramirez-Weber and Kornberg, 1999). Επιπλέον έχει βρεθεί ότι ομάδα πεπλατυσμένων κυττάρων της περιπόδιας μεμβράνης δημιουργεί μεμβρανικές προεκβολές που περιέχουν μικροσωληνίσκους και που εκτείνονται ως τα κολωνοειδή κύτταρα (Cho et al., 2000, Gibson and Schubiger, 2000). Το γεγονός ότι ορισμένα είδη μεμβρανικών προεκβολών περιείχαν ακτίνη όπως επίσης και τον υποδοχέα Thickveins και την πρωτεΐνη των ενδοσωμάτων Rab5 εμπλέκει περισσότερο τις προεκτάσεις αυτές στην κυτταρική σηματοδότηση (Demontis and Dahmann, 2007). Συγκεκριμένα για τη συμμετοχή των μεμβρανικών προεκβολών κατά τη σηματοδότηση Dpp, έχει βρεθεί ότι υπάρχουν cytonemes τα οποία εκτείνονται και προς τα δύο οργανωτικά κέντρα του δίσκου (A/P και D/V) και πως η παρουσία τους συνδέεται άμεσα με τη σηματοδότηση, καθώς ο υποδοχέας Thickveins εντοπίζεται σε κυστίδια τα οποία κινούνται κατά μήκος αυτών των προεκτάσεων (Hsiung et al., 2005).

Αναφορικά με τη σηματοδότηση Notch, έχει βρεθεί ότι μεμβρανικές προεκτάσεις συμμετέχουν στη σηματοδότηση των κυττάρων κατά την διαδικασία της πλευρικής αναστολής. Οι προεκβολές αυτές είναι μήκους μερικών κυττάρων, η δημιουργία τους επάγεται από την πρωτεΐνη D1 και με αυτό τον τρόπο λαμβάνει χώρα η απομακρυσμένη σηματοδότηση κατά τη διαδικασία αυτή (De Joussineau et al., 2003, Cohen et al., 2010). Επιπροσθέτως έχει βρεθεί ότι οι πρωτεΐνες Delta1 και Delta4 συμμετέχουν στη δημιουργία φιλοποδίων και πως αυτή η δράση τους είναι ανεξάρτητη από τη σηματοδότηση Notch (Sugiyama et al., 2010).

Στη συγκεκριμένη εργασία βρέθηκε ότι εκτός από τον κυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης D1 στην κορυφαία μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων και σε ενδοκυττωτικά κυστίδια, η πρωτεΐνη εντοπίζεται και στη βασική μεμβράνη όπως και σε προεκβολές αυτής. Τον ίδιο εντοπισμό είχαν και τα ελλειμματικά μόρια όπως και η μορφή D1ΔICD γεγονός που υποδηλώνει ότι για την τοποθέτηση αυτή δεν είναι αναγκαία η ενδοκύττωση της πρωτεΐνης. Μάλιστα, τα ελλειμματικά μόρια που αδυνατούσαν να ενδοκυττωθούν στην περιοχή αυτή (Dli2, Dli1/2), είχαν καλύτερο εντοπισμό στις μεμβρανικές προεκβολές σε σχέση με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη. Πιθανή εξήγηση για το φαινόμενο αυτό θα ήταν η ενδοκύττωση της πρωτεΐνης D1 και

από τη βασική μεμβράνη του επιθηλίου, μία πιθανότητα όμως η οποία δεν έχει αποδειχθεί. Συνηγορώντας με την άποψη αυτή, έχει βρεθεί ότι το Dll1 του ποντικού μετατοπίζεται από τη βασική στην κορυφαία επιφάνεια των κυττάρων λόγω δράσης της λιγάσης Neur (Benhra et al., 2010).

Πολύ σημαντική επιπλέον είναι η παρατήρηση ότι ο υποδοχέας Notch εντοπιζόταν σε κυστίδια πάνω στις μεμβρανικές προεκβολές στις οποίες εδράζονταν οι δεσμευτές και μάλιστα αυτός ο υποδοχέας προερχόταν από γειτονικά κύτταρα, υποδηλώνοντας αλληλεπίδραση των δεσμευτών με τον υποδοχέα γειτονικών κυττάρων. Χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για την απόδειξη πιθανής σηματοδότησης Notch και από τη βασική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων και την εύρεση της σημασίας της σε σχέση με τη σηματοδότηση από την κορυφαία μεμβράνη.

7. Αναφορές

- Acar, M., Jafar-Nejad, H., Takeuchi, H., Rajan, A., Ibrani, D., Rana, N. A., Pan, H., Haltiwanger, R. S., and Bellen, H. J. (2008). Rumi is a CAP10 domain glycosyltransferase that modifies Notch and is required for Notch signaling. *Cell*. 132, 247-258.
- Amerik, A. Y., and Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta*. 29, 189-207.
- Annaert, W., and De Strooper, B. (1999). Presenilins: molecular switches between proteolysis and signal transduction. *Trends Neurosci.*, 10 439-443.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., and Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770-776.
- Axelrod, J.D., Matsuno, K., Artavanis-Tsakonas, S., and Perrimon, N. (1996). Interaction between Wingless and Notch signaling pathways mediated by dishevelled. *Science*, 271, 1826-1832.
- Barbero, P., Bittova, L., and Pfeffer, S. R. (2002). Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells. *J Cell Biol*. 156, 511-518.
- Bardin, A.J., and Schweisguth, F. (2006). Bearded family members inhibit Neuralized-mediated endocytosis and signaling activity of Delta in *Drosophila*. *Dev. Cell* 10, 245-255.
- Barolo, S., Stone, T., Bang, A.G., and Posakony, J.W. (2002). Default repression and Notch signaling: Hairless acts as an adaptor to recruit the corepressors Groucho and dCtBP to Suppressor of Hairless. *Genes Dev*. 16, 1964-76.
- Barsi, J.C., Rajendra, R., Wu, J.I., and Artzt, K. (2005). Mind bomb1 is a ubiquitin ligase essential for mouse embryonic development and Notch signaling. *Mech Dev*. 122, 1106-17.
- Bender, L. B., Kooh, P. J., and Muskavitch, M. A. (1993). Complex function and expression of Delta during *Drosophila* oogenesis. *Genetics* 133, 967-978.
- Benhra, N., Vignaux, F., Dussert, A., Schweisguth, F., and Le Borgne, R. (2010). Neuralized promotes basal to apical transcytosis of delta in epithelial cells. *Mol Biol Cell*. 21, 2078-2086.
- Berdnik, D., Torok, T., Gonzalez-Gaitan, M., and Knoblich, J. A. (2002). The endocytic protein alpha-Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in *Drosophila*. *Dev Cell* 3, 221-231.
- Bland, C. E., Kimberly, P., and Rand, M.D. (2003). Notch-induced proteolysis and nuclear localization of the Delta ligand. *J Biol Chem*. 278, 13607-13610.
- Blaumueller, C. M., Qi, H., Zagouras, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1997). Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* 90, 281-291.
- Brand, A. H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Bray, S.L. (1998). Notch signalling in *Drosophila*: three ways to use a pathway. *Semin Cell Dev Biol* 9, 591-597.
- Bray, S.L. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7, 678-689.
- Brodsky, F. M., Chen, C. Y., Knuehl, C., Towler, M. C., and Wakeham, D. E. (2001). Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 17, 517-568.

- Brook, W. J., and Cohen, S. M. (1996). Antagonistic interactions between wingless and decapentaplegic responsible for dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* Leg. *Science* 273, 1373-1377.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., Cumano, A., Roux, P., Black, R. A., and Israel, A. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* 5, 207-216.
- Bruckner, K., Perez, L., Clausen, H., and Cohen, S. (2000). Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* 406, 411-415.
- Boulianne, G. L., de la Concha, A., Campos-Ortega, J. A., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1993). The *Drosophila* neurogenic gene *neuralized* encodes a novel protein and is expressed in precursors of larval and adult neurons. *Embo J.* 12, 2586.
- Chen, W., and Corliss, D. C. (2004). Three modules of zebrafish Mind bomb work cooperatively to promote Delta ubiquitination and endocytosis. *Dev Biol* 267, 361-373.
- Chen, N., and Greenwald, I. (2004). The lateral signal for LIN-12/Notch in *C. elegans* vulval development comprises redundant secreted and transmembrane DSL proteins. *Dev Cell.* 6, 183-92.
- Chitnis, A. (2006). Why is delta endocytosis required for effective activation of notch? *Dev Dyn.* 235, 886-894.
- Cho, K. O., Chern, J., Izaddoost, S., and Choi, K. W. (2000). Novel signaling from the peripodial membrane is essential for eye disc patterning in *Drosophila*. *Cell* 103, 331-342.
- Ciechanover, A., Orian, A., and Schwartz, A. L. (2000). The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: Mode of action and clinical implications. *J Cell Biochem* 77, 40-51.
- Cohen, M., Georgiou, M., Stevenson, N. L., Miodownik, M., and Baum, B. (2010). Dynamic filopodia transmit intermittent Delta-Notch signaling to drive pattern refinement during lateral inhibition. *Dev Cell.* 19, 78-89.
- Commisso, C., and Boulianne, G.L. (2007). The NHR1 domain of Neuralized binds Delta and mediates Delta trafficking and Notch signaling. *Mol. Biol. Cell* 18, 1-13.
- Culi, J., and Modolell, J. (1998). Proneural gene self-stimulation in neural precursors: an essential mechanism for sense organ development that is regulated by Notch signaling. *Genes Dev* 12, 2036-2047.
- Deblandre, G. A., Lai, E. C., and Kintner, C. (2001). *Xenopus* Neuralized is a ubiquitin ligase that interacts with XDelta1 and regulates Notch signaling. *Dev Cell* 1, 795-806.
- de Celis, J.F., Barrio, R., del Arco, A., and García-Bellido, A. (1993). Genetic and molecular characterization of a Notch mutation in its Delta- and Serrate-binding domain in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90, 4037-4041.
- de Celis, J. F., Bray, S., and Bellido, A. G. (1996). Activation and function of Notch at the dorsoventral boundary in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* 122, 359-369.
- de Celis, J. F., and Bray, S. (1997). Feed-back mechanisms affecting Notch activation at the dorsoventral boundary in the *Drosophila* wing. *Development* 124, 3241-3251.

- de Celis, J. F., Tyler, D. M., de Celis, J., and Bray, S. J. (1998). Notch signalling mediates segmentation of the *Drosophila* leg. *Development* 125, 4617- 4626.
- De Joussineau, C., Soulé, J., Martin, M., Anguille, C., Montcourrier, P., and Alexandre, D. (2003). Delta-promoted filopodia mediate long-range lateral inhibition in *Drosophila*. *Nature* 426, 555-559.
- Delwig, A., Bland, C., Beem-Miller, M., Kimberly, P., and Rand, M. D. (2006). Endocytosis-independent mechanisms of Delta ligand proteolysis. *Exp Cell Res.*312, 1345-1360.
- Demontis, F., and Dahmann, C. (2007). Apical and lateral cell protrusions interconnect epithelial cells in live *Drosophila* wing imaginal discs. *Dev Dyn.* 236, 3408-3418.
- De Renzis, S., Yu, J., Zinzen, R., and Wieschaus, E. (2006). Dorsal-ventral pattern of Delta trafficking is established by a Snail-Tom-Neuralized pathway. *Dev. Cell* 10, 257-264.
- Diederich, R. J., Matsuno, K., Hing, H., and Artavanis-Tsakonas, S. (1994). Cytosolic interaction between Deltex and Notch ankyrin repeats implicates Deltex in the Notch signaling pathway. *Development* 120, 473-481.
- Di Fiore, P. P., Polo, S., and Hofmann, K. (2003). When ubiquitin meets ubiquitin receptors: a signalling connection. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4, 491-497.
- Doherty, D., Feger, G., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1996). Delta is a ventral to dorsal signal complementary to Serrate, another Notch ligand, in *Drosophila* wing formation. *Genes & Development* 10, 421-434.
- Dollar, G., Struckhoff, E., Michaud, J., and Cohen, R. S. (2002). Rab11 polarization of the *Drosophila* oocyte: a novel link between membrane trafficking, microtubule organization, and oskar mRNA localization and translation. *Development* 129, 517-526.
- Dye, C. A., Lee, J. K., Atkinson, R. C., Brewster, R., Han, P. L., and Bellen, H. J. (1998). The *Drosophila* sanpodo gene controls sibling cell fate and encodes a tropomodulin homolog, an actin/tropomyosin-associated protein. *Development* 125, 1845-1856.
- Eaton, S., and Simons, K. (1995). Apical, basal, and lateral cues for epithelial polarization. *Cell* 82, 5-8.
- Emery, G., Hutterer, A., Berdnik, D., Mayer, B., Wirtz-Peitz, F., Gaitan, M. G., and Knoblich, J. A. (2005). Asymmetric Rab 11 endosomes regulate delta recycling and specify cell fate in the *Drosophila* nervous system. *Cell* 122, 763-773.
- Fehon, R. G., Kooh, P. J., Rebay, I., Regan, C. L., Xu, T., Muskavitch, M. A. T., 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, 523-534.
- Fehon, R. G., Johansen, K., Rebay, I., and Artavanis-Tsakonas, S. (1991). Complex cellular and subcellular regulation of notch expression during embryonic and imaginal development of *Drosophila*: implications for notch function. *J Cell Biol.* 113, 657-669.

- Fischer, J. A., Eun, S. H., and Doolan, B. T. (2006). Endocytosis, endosome trafficking, and the regulation of *Drosophila* development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 22, 181-206.
- Fleming R.J., Purcell, K., and Artavanis-Tsakonas, S. (1997). The NOTCH receptor and its ligands. *Trends Cell Biol.* 11, 437-441.
- Fleming, R. J. (1998). Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Semin Cell Dev Biol* 9, 599-607.
- Fontana, J.R., and Posakony, J.W. (2009). Both inhibition and activation of Notch signaling rely on a conserved Neuralized-binding motif in Bearded proteins and the Notch ligand Delta. *Dev. Biol.* 333, 373-385.
- Fortini, M.E., and Artavanis-Tsakonas, S. (1994). The suppressor of hairless protein participates in notch receptor signaling. *Cell*, 79, 273-282.
- Fortini, M. E. (2002). Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 673-684.
- Gesbert, F., Sauvonnnet, N., and Dautry-Varsat, A. (2004). Clathrin-Independent endocytosis and signalling of interleukin 2 receptors IL-2R endocytosis and signalling. *Curr Top Microbiol Immunol.* 286, 119-148.
- Gho, M., Bellaiche, Y., and Schweisguth, F. (1999). Revisiting the *Drosophila* microchaete lineage: a novel intrinsically asymmetric cell division generates a glial cell. *Development* 126, 3573-3584.
- Gibson, M. C., and Schubiger, G. (2000). Peripodial cells regulate proliferation and patterning of *Drosophila* imaginal discs. *Cell* 103, 343-350.
- Giniger, E. (1998). A role for Abl in Notch signalling. *Neuron*, 20, 667-681.
- Giot, L., Bader, J.S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y.L., Ooi, C.E., Godwin, B., Vitols, E., Vijayadamodar, G., Pochart, P., Machineni, H., Welsh, M., Kong, Y., Zerhusen, B., Malcolm, R., Varrone, Z., Collis, A., Minto, M., Burgess, S., McDaniel, L., Stimpson, E., Spriggs, F., Williams, J., Neurath, K., Ioime, N., Agee, M., Voss, E., Furtak, K., Renzulli, R., Aanensen, N., Carrola, S., Bickelhaupt, E., Lazovatsky, Y., DaSilva, A., Zhong, J., Stanyon, C.A., Finley, R.L. Jr., White, K.P., Braverman, M., Jarvie, T., Gold, S., Leach, M., Knight, J., Shimkets, R.A., McKenna, M.P., Chant, J., and Rothberg, J.M. (2003). A protein interaction map of *Drosophila* melanogaster. *Science* 302, 1727-1736.
- Glittenberg, M., Pitsouli, C., Garvey, C., Delidakis, C., and Bray, S. (2006). Role of conserved intracellular motifs in Serrate signalling, cis-inhibition and endocytosis. *Embo J.* 25, 4697-4706.
- Gordon, WR., Roy, M., Vardar-Ulu, D., Garfinkel, M., Mansour, MR., Aster, JC., and Blacklow, SC. (2008). Structure of the Notch1-negative regulatory region: implications for normal activation and pathogenic signaling in T-ALL. *Blood* 113, 4381-4390.
- Gorvel, J. P., Chavrier, P., Zerial, M., and Gruenberg, J. (1991). rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell.* 64, 915-925.
- Gruenberg, J. (2001). The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10, 721-730.
- Gruenberg, J., and Stenmark, H. (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4, 317-323.
- Guo, M., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1996). Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of Numb and Notch. *Neuron*, 17, 27-41.

- Gupta-Rossi, N., Six, E., LeBail, O., Logeat, F., Chastagner, P., Olry, A., Israel, A., and Brou, C. (2004). Monoubiquitination and endocytosis direct gamma-secretase cleavage of activated Notch receptor. *J Cell Biol* 166, 73-83.
- Haglund, K., Di Fiore, P. P., and Dikic, I. (2003). Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem Sci.* 11, 598-603.
- Hannson, E.M., Lendahl U., and Chapman, G. (2004). Notch signaling in development and disease. *Semin Cancer Biol.* 14, 320-328.
- Harrison, D. A., and Perrimon, N. (1993). Simple and efficient generation of marked clones in *Drosophila*. *Curr Biol.* 3, 424-433.
- Hazuka, C. D., Foletti, D. L., Hsu, S. C., Kee, Y., Hopf, F. W., and Scheller R. H. (1999). The sec6/8 complex is located at neurite outgrowth and axonal synapse-assembly domains. *J Neurosci.* 19, 1324-1334.
- He, F., Saito, K., Kobayashi, N., Harada, T., Watanabe, S., Kigawa, T., Güntert, P., Ohara, O., Tanaka, A., Unzai, S., Muto, Y., and Yokoyama, S. (2009). Structural and functional characterization of the NHR1 domain of the *Drosophila* neuralized E3 ligase in the notch signaling pathway. *J. Mol. Biol.* 393, 478-495
- Heitzler, P., and Simpson, P. (1993). Altered epidermal growth factor-like sequences provide evidence for a role of Notch as a receptor in cell fate decisions. *Development* 117, 1113-1123.
- Heitzler, P., Bourouis, M., Ruel, L., Carteret, C., and Simpson, P. (1996). Genes of the *Enhancer of split* and *achaete-scute* complexes are required for a regulatory loop between *Notch* and *Delta* during lateral signalling in *Drosophila*. *Development* 122, 161-171.
- Hicke, L., and Dunn, R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 19, 141-172.
- Hori, K., Fostier, M., Ito, M., Fuwa, T. J., Go, M. J., Okano, H., Baron, M., and Matsuno, K. (2004). *Drosophila* Deltex mediates suppressor of Hairless-independent and late-endosomal activation of Notch signaling. *Development* 131, 5527-5537.
- Hsiung, F., Ramirez-Weber, F. A., Iwaki, D. D., and Kornberg, T. B. (2005). Dependence of *Drosophila* wing imaginal disc cytonemes on Decapentaplegic. *Nature* 437, 560-563.
- Huang, F., Dambly-Chaudiere, C., and Ghysen, A. (1991). The emergence of sense organs in the wing disc of *Drosophila*. *Development* 111, 1087-1095.
- Huppert, S. S., Jacobsen, T. L., and Muskavitch, M. A. (1997). Feedback regulation is central to Delta-Notch signalling required for *Drosophila* wing vein morphogenesis. *Development* 124, 3283-3291.
- Hutterer, A., and Knoblich, J.A. (2005). Numb and alpha-Adaptin regulate Sanpodo endocytosis to specify cell fate in *Drosophila* external sensory organs. *EMBO Rep.* 6, 836-42.
- Iannolo, G., Salcini, A. E., Gaidarov, I., Goodman, Jr Baulida, J., Carpenter, G., Pelicci, P. G., Di Fiore, P. P., and Keen, J. H. (1997). Mapping of the molecular determinants involved in the interaction between eps15 and AP-2. *Cancer Res.* 57, 240-245.
- Irvine, K. D., and Vogt, T. F. (1997). Dorsal-ventral signaling in limb development. *Curr Opin Cell Biol.* 9, 867-876.

- Irvine, K. D. (1999). Fringe, Notch, and making developmental boundaries. *Curr Opin Genet Dev* 9, 434-441.
- Itoh, M., Kim, C. H., Palardy, G., Oda, T., Jiang, Y. J., Maust, D., Yeo, S. Y., Lorick, K., Wright, G. J., Ariza-McNaughton, L., *et al.* (2003). Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Dev Cell* 4, 67-82.
- Jafar-Nejad, H., Andrews, H. K., Acar, M., Bayat, V., Wirtz-Peitz, F., Mehta, S. Q., Knoblich, J. A., and Bellen, H. J. (2005). Sec15, a component of the exocyst, promotes notch signaling during the asymmetric division of *Drosophila* sensory organ precursors. *Dev Cell*. 9, 351-363.
- Jékely, G., and Rørth, P. (2003). Hrs mediates downregulation of multiple signalling receptors in *Drosophila*. *EMBO Rep.* 4, 1163-1168.
- Kadesch, T. (2004). Notch signaling: the demise of elegant simplicity. *Curr Opin Genet Dev.* 14, 506-512.
- Kaether, C., Haass, C., and Steiner, H. (2002). Assembly, trafficking and function of gamma-secretase. *Neurodegener Dis.* 3, 275-283.
- Kidd, S., and Lieber, T. (2002). Furin cleavage is not a requirement for *Drosophila* Notch function. *Mech Dev* 115, 41-51.
- Kim, J., Irvine, K.D., and Carroll, S.B. (1995). Cell recognition, signal induction, and symmetrical gene activation at the dorsal-ventral boundary of the developing *Drosophila* wing. *Cell* 82, 795-802.
- Kirchhausen, T., Bonifacino, J. S., and Riezman, H. (1997). Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 4, 488-495.
- Komada, M., and Kitamura, N. (2004). The Hrs/STAM complex in the downregulation of receptor tyrosine kinases. *J Biochem.* 137, 1-8.
- Komatsu, H., Chao, M.Y., Larkins-Ford, J., Corkins, M.E., Somers, G.A., Tucey, T., Dionne, H.M., White, J.Q., Wani, K., Boxem, M., and Hart, A.C. (2008). OSM-11 facilitates LIN-12 Notch signaling during *Caenorhabditis elegans* vulval development. *PLoS Biol.* 6, 196.
- Koo, B. K., 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., *et al.* (2005a). Mind bomb 1 is essential for generating functional Notch ligands to activate Notch. *Development* 132, 3459-3470.
- Koo, B. K., Yoon, K. J., Yoo, K. W., Lim, H. S., Song, R., So, J. H., Kim, C. H., and Kong, Y. Y. (2005b). Mind bomb-2 is an E3 ligase for Notch ligand. *J Biol Chem* 280, 22335-22342.
- Koo, B. K., Yoon, M. J., Yoon, K. J., Im, S. K., Kim, Y. Y., Kim, C. H., Suh, P. G., Jan, Y. N., and Kong, Y. Y. (2007). An obligatory role of mind bomb-1 in notch signaling of mammalian development. *PLoS One* 2, 1221.
- Kooh, P. J., Fehon, R. G., and Muskavitch, M. A. T. (1993). Implication of dynamic patterns of Delta and Notch expression for cellular interactions during *Drosophila* development. *Development* 117, 493-507.
- Kopan, R., Schroeter, E. H., Weintraub, H., and Nye, J. S. (1996). Signal transduction by activated mNotch: Importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 1683-1688.
- Koutelou, E., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Florens, L., Swanson, S. K., Washburn, M. P., Kokkinaki, M., Conaway, R. C., Conaway, J. W.,

- Moschonas, N. K. (2007). Neuralized-like 1 (Neurl1) targeted to the plasma membrane by N-myristoylation regulates the Notch ligand Jagged1. *J Biol Chem*. 283, 3846-3853.
- Krämer H., and Phistry, M. (1996). Mutations in the *Drosophila* hook gene inhibit endocytosis of the boss transmembrane ligand into multivesicular bodies. *J Cell Biol*. 133, 1205-1215.
 - Lah, J. J., and Levey, A. I. (2000). Endogenous presenilin-1 targets to endocytic rather than biosynthetic compartments. *Mol Cell Neurosci*. 2, 111-126.
 - Lai, E. C., Deblandre, G. A., Kintner, C., and Rubin, G. M. (2001). *Drosophila* Neuralized is a ubiquitin ligase that promotes the internalization and degradation of Delta. *Dev Cell* 1, 783-794.
 - Lai, E. C., and Rubin, G. M. (2001a). neuralized functions cell-autonomously to regulate a subset of Notch- dependent processes during adult *Drosophila* development. *Dev Biol* 231, 217-233.
 - Lai, E. C., and Rubin, G. M. (2001b). Neuralized is essential for a subset of Notch pathway-dependent cell fate decisions during *Drosophila* eye development. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 5637-5642.
 - Lai, E. C. (2002). Protein degradation: four E3s for the Notch pathway. *Curr Biol* 12, 74-78.
 - Lai, E. C. (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development*. 5, 965-973.
 - Lai, E. C., Roegiers, F., Qin, X., Jan, Y. N., and Rubin, G. M. (2005). The ubiquitin ligase *Drosophila* Mind bomb promotes Notch signaling by regulating the localization and activity of Serrate and Delta. *Development* 132, 2319-2332.
 - Lasky, J.L., and Wu, H. (2005). Notch signalling, brain development and human disease. *Pediatr Res*. 57, 104-109.
 - Le Borgne, R., and Schweisguth, F. (2003). Unequal segregation of Neuralized biases Notch activation during asymmetric cell division. *Dev Cell* 5, 139-148.
 - Le Borgne, R., Bardin, A., and Schweisguth, F. (2005a). The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development* 132, 1751-1762.
 - Le Borgne, R., Remaud, S., Hamel, S., and Schweisguth, F. (2005b). Two distinct E3 ubiquitin ligases have complementary functions in the regulation of Delta and Serrate signaling in *Drosophila*. *PLoS Biol* 3, e96.
 - Le Borgne, R. (2006). Regulation of Notch signalling by endocytosis and endosomal sorting. Regulation of Notch signalling by endocytosis and endosomal sorting. *Curr. Opin. Cell Biol*. 18, 213-222.
 - Lee, T., and Luo, L. (2001). Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development. *Trends Neurosci* 24, 251-254.
 - Lehman, R., Jimenez, F., Dietrich, U., and Campos-Ortega, J. A. (1983). On the phenotype and development of mutants of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Archives of Developmental Biology* 192, 62-74.
 - Lieber, T., Kidd, S., and Young, M. W. (2002). kuzbanian-mediated cleavage of *Drosophila* Notch. *Genes Dev* 16, 209-221.

- Lloyd, T. E., Atkinson, R., Wu, M. N., Zhou, Y., Pennetta, G., and Bellen, H. J. (2002). Hrs regulates endosome membrane invagination and tyrosine kinase receptor signaling in *Drosophila*. *Cell* 108, 261-269.
- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N. G., and Israel, A. (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8108-8112.
- López-Schier, H., and St Johnston, D. (2002). *Drosophila* nicastrin is essential for the intramembranous cleavage of notch. *Dev Cell*. 1, 79-89.
- Louvi, A., and Artavanis-Tsakonas, S. (2006). Notch signalling in vertebrate neural development. *Nature Reviews Neuroscience* 7, 93-102.
- Matsuno, K., Diederich, R. J., Go, M. J., Blaumueller, C. M., and Artavanis-Tsakonas, S. (1995). Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. *Development* 121, 2633-2644.
- Maxfield, F. R., and McGraw, T. E. (2004). Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2, 121-132.
- Micchelli, C. A., Rulifson, E. J., and Blair, S. S. (1997). The function and regulation of *cut* expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate. *Development* 124, 1485-1495.
- Miller, A. C., Lyons, E. L., and Herman, T. G. (2009). cis-Inhibition of Notch by endogenous Delta biases the outcome of lateral inhibition. *Curr Biol*. 19, 1378-1383.
- Mishra-Gorur, K., Rand, M. D., Perez-Villamil, B., and Artavanis-Tsakonas, S. (2002). Down-regulation of Delta by proteolytic processing. *J Cell Biol*. 159, 313-324.
- Moloney, D.J., Panin, V.M., Johnston, S.H., Chen, J., Shao, L., Wilson, R., Wang, Y., Stanley, P., Irvine, K.D., Haltiwanger, R.S., and Vogt, T.F. (2000). Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* 406, 369-375.
- Müller, H. A. (2000). Genetic control of epithelial cell polarity: lessons from *Drosophila*. *Dev Dyn*. 218, 52-67.
- Neumann, C.J., and Cohen, S.M. (1996). Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development* 124, 871-880.
- Nichols, J.T., Miyamoto, A., and Weinmaster, G. (2007). Notch signaling-constantly on the move. *Traffic* 8, 959-969.
- Nijman, S. M., Luna-Vargas, M. P., Velds, A., Brummelkamp, T. R., Dirac, A. M., Sixma, T. K., and Bernards, R. (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell*. 123, 773-786.
- Nolo, R., Abbott, L. A., and Bellen, H. J. (2000). Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in *Drosophila*. *Cell* 102, 349-362.
- Okajima, T., and Irvine, K. D. (2002). Regulation of Notch signaling by O-linked fucose. *Cell* 111, 893-904.
- Okajima, T., Xu, A., and Irvine, K. D. (2003). Modulation of Notch-ligand binding by protein O-fucosyltransferase 1 and Fringe. *J Biol Chem* 278, 42340-42345.

- Okajima, T., Reddy, B., Matsuda, T., and Irvine, K. D. (2008). Contributions of chaperone and glycosyltransferase activities of O-fucosyltransferase 1 to Notch signaling. *BMC Biol.*, 14.
- Overstreet, E., Fitch, E., and Fischer, J. A. (2004). Fat facets and Liquid facets promote Delta endocytosis and Delta signaling in the signaling cells. *Development* 131, 5355-5366.
- 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.
- Panin, V. M., Papayannopoulos, V., Wilson, R., and Irvine, K. D. (1997). Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* 387, 908-912.
- Panin, V. M., Shao, L., Lei, L., Moloney, D. J., Irvine, K. D., and Haltiwanger, R. S. (2002). Notch ligands are substrates for protein O-fucosyltransferase-1 and Fringe. *J Biol Chem* 277, 29945-29952.
- Papayannopoulos, V., Tomlinson, A., Panin, V. M., Rauskolb, C., and Irvine, K. D. (1998). Dorsal-ventral signaling in the *Drosophila* eye. *Science* 281, 2031-2034.
- Parks, A. L., Turner, F. R., and Muskavitch, M. A. (1995). Relationships between complex Delta expression and the specification of retinal cell fates during *Drosophila* eye development. *Mech Dev.* 50, 201-216.
- Parks, A. L., Klueg, K. M., Stout, J. R., and Muskavitch, M. A. (2000). Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* 127, 1373-1385.
- Parks, A.L., Stout, J.R., Shepard, S.B., Klueg, K.M., Dos Santos, A.A., Parody, T.R., Vaskova, M., and Muskavitch, M.A. (2006). Structure-function analysis of delta trafficking, receptor binding and signaling in *Drosophila*. *Genetics* 174, 1947-1961.
- Pavlopoulos, E., Pitsouli, C., Klueg, K. M., Muskavitch, M. A., Moschonas, N. K., and Delidakis, C. (2001). *neuralized* encodes a peripheral membrane protein involved in Delta signaling and endocytosis. *Dev Cell* 1, 807-816.
- Peters, S. E., English, K., Rana, A., Akter, S., Malik, S., Warburton, N. C., and Duckett, J. G. (2001). Synaptonemal complexes in the pre-cyst of *Pneumocystis carinii*. *J Eukaryot Microbiol. Suppl.* 134S
- Pi, H., Wu, H. J., and Chien, C. T. (2001). A dual function of phyllopod in *Drosophila* external sensory organ development: cell fate specification of sensory organ precursor and its progeny. *Development* 128, 2699-2710.
- Pickart, C. M., and Eddins, M. J. (2004) Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 1695, 55-72.
- Pickart, C. M., and Fushman, D. (2004). Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol.* 6, 610-616.
- Pitsouli, C., and 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., and Di Fiore, P. P. (2002). A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* 416, 451-455.
- Poodry, C. A. (1990). *shibire*, a neurogenic mutant of *Drosophila*. *Dev Biol* 138, 464-472.

- Portin, P. (2002). General outlines of the molecular genetics of the Notch signalling pathway in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas*. 136, 89-96.
- Price, B. D., Chang, Z., Smith, R., Bockheim, S., and Laughon, A. (1993). The *Drosophila neuralized* gene encodes a C3HC4 zinc finger. *Embo J*. 12, 2411-2418.
- Qi, H., Rand, M. D., Wu, X., Sestan, N., Wang, W., Rakic, P., Xu, T., and Artavanis-Tsakonas, S. (1999). Processing of the Notch ligand Delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science* 283, 91-94.
- Rajan, A., Tien, A. C., Haueter, C. M., Schulze, K. L., and Bellen, H. J. (2009). The Arp2/3 complex and WASp are required for apical trafficking of Delta into microvilli during cell fate specification of sensory organ precursors. *Nat Cell Biol*. 11, 815-824.
- Romain, P., Khechumian, K., Seugnet, L., Arbogast, N., Ackermann, C., and Heitzler, P. (2001). Novel Notch alleles reveal a Deltex-dependent pathway repressing neural fate. *Curr Biol* 11, 1729-1738.
- Ramírez-Weber, F. A., and Kornberg, T. B. (1999). Cytonemes: cellular processes that project to the principal signaling center in *Drosophila* imaginal discs. *Cell* 97, 599-607.
- Ramírez-Weber, F. A., and Kornberg, T. B. (2000). Signaling reaches to new dimensions in *Drosophila* imaginal discs. *Cell* 103, 189-192.
- Rampal, R., Arboleda-Velasquez, J. F., Nita-Lazar, A., Kosik, K. S., and Haltiwanger, R. S. (2005). Highly conserved O-fucose sites have distinct effects on Notch1 function. *J Biol Chem*. 280, 32133-32140.
- Rebay, I., Fleming, R. J., Fehon, R. G., Cherbas, L., Cherbas, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1991). Specific EGF Repeats of Notch Mediate Interactions with Delta and Serrate: Implications for Notch as a Multifunctional Receptor. *Cell* 67, 687-699.
- Rhyu, M. S., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1994). Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell* 76, 477-491.
- Riggelman, B., Schedl, P., and Wieschaus, E. (1990). Spatial expression of the *Drosophila* segment polarity gene armadillo is posttranscriptionally regulated by wingless. *Cell* 63, 549-560.
- Ringstad, N., Nemoto, Y., and De Camilli, P., (1997). The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94, 8569-8574.
- Rock, K. L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., and Goldberg, A. L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*. 78, 761-771.
- Roegiers, F., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (2005). Regulation of membrane localization of Sanpodo by lethal giant larvae and neuralized in asymmetrically dividing cells of *Drosophila* sensory organs. *Mol Biol Cell*. 16, 3480-3487.
- Roh, M. H., and Margolis, B. (2003). Composition and function of PDZ protein complexes during cell polarization. *Am J Physiol Renal Physiol*. 285, 377-387.

- Sakata, T., Sakaguchi, H., Tsuda, L., Higashitani, A., Aigaki, T., Matsuno, K., and Hayashi, S. (2004). *Drosophila* Nedd4 regulates endocytosis of Notch and suppresses its ligand-independent activation. *Curr Biol* 14, 2228-2236.
- Sapir, A., Assa-Kunik, E., Tsruya, R., Schejter, E., and Shilo, B. Z. (2005). Unidirectional Notch signaling depends on continuous cleavage of Delta. *Development* 132, 123-132.
- Sasaki, N., Sasamura, T., Ishikawa, H. O., Kanai, M., Ueda, R., Saigo, K., and Matsuno, K. (2007). Polarized exocytosis and transcytosis of Notch during its apical localization in *Drosophila* epithelial cells. *Genes Cells*. 12, 89-103.
- Sasamura, T., Sasaki, N., Miyashita, F., Nakao, S., Ishikawa, H. O., Ito, M., Kitagawa, M., Harigaya, K., Spana, E., Bilder, D., et al. (2003). neurotic, a novel maternal neurogenic gene, encodes an O-fucosyltransferase that is essential for Notch-Delta interactions. *Development* 130, 4785-4795.
- Seugnet, L., Simpson, P., and Haenlin, M. (1997). Requirement for dynamin during Notch signaling in *Drosophila* neurogenesis. *Dev Biol* 192, 585-598.
- Skwarek, L. C., Garroni, M. K., Commisso, C., and Boulianne, G. L. (2007). Neuralized contains a phosphoinositide-binding motif required downstream of ubiquitination for delta endocytosis and notch signaling. *Dev Cell*. 13, 783-795.
- Smith, M. H., Ploegh, H. L., and Weissman J. S. (2011). Road to Ruin: Targeting Proteins for Degradation in the Endoplasmic Reticulum. *Science* 6059, 1086-1090.
- Song, R., Koo, B.K., Yoon, K.J., Yoon, M.J., Yoo, K.W., Kim, H.T., Oh, H.J., Kim, Y.Y., Han, J.K., Kim, C.H., and Kong, Y.Y. (2006). Neuralized-2 regulates a Notch ligand in cooperation with Mind bomb-1. *J. Biol. Chem.* 281, 36391-36400.
- Stahl, M., Uemura, K., Ge, C., Shi, S., Tashima, Y., and Stanley, P. (2008). Roles of Pofut1 and O-fucose in mammalian Notch signaling. *J Biol Chem.* 283, 13638-13651.
- Stanley, P. (2007). Regulation of Notch signaling by glycosylation. *Curr Opin Struct Biol.* 5, 530-535.
- Stenmark, H., Parton, R. G., Steele-Mortimer, O., Lütcke, A., Gruenberg, J., and Zerial, M. (1994). Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J.* 13, 1287-1296.
- Struhl, G., and Greenwald, I. (1999). Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* 398, 522-525.
- Struhl, G., and Adachi, A. (2000). Requirements for presenilin-dependent cleavage of Notch and other transmembrane proteins. *Mol Cell* 6, 625-636.
- Sugiyama, K., Nishide, K., Matsuo, H., Okigawa, S., Okano, M., Ishitani, T., Matsumoto, K., and Itoh, M. (2010). Delta1 family members are involved in filopodial actin formation and neuronal cell migration independent of Notch signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 398, 118-124.
- Sun, X., and Artavanis-Tsakonas, S. (1997). Secreted forms of DELTA and SERRATE define antagonists of Notch signaling in *Drosophila*. *Development* 124, 3439-3448.
- Swevers, L., Cherbas, L., Cherbas, P., and Iatrou, K. (1996). Bombyx EcR (BmEcR) and Bombyx USP (BmCF1) combine to form a functional ecdysone receptor. *Insect Biochem Mol Biol.* 26, 217-221.

- Takeuchi, T., Adachi, Y., and Ohtsuki, Y. (2005). Skeletrophin, a novel ubiquitin ligase to the intracellular region of Jagged-2, is aberrantly expressed in multiple myeloma. *Am J Pathol* 166, 1817-1826.
- Takeyama, K., Aguiar, R. C., Gu, L., He, C., Freeman, G. J., Kutok, J. L., Aster, J. C., and Shipp, M. A. (2003). The BAL-binding protein BBAP and related Deltex family members exhibit ubiquitin-protein isopeptide ligase activity. *J Biol Chem.* 278, 21930-21937.
- Tamura, K., Taniguchi, Y., Minoguchi, S., Sakai, T., Tun, T., Furukawa, T., and Honjo, T. (1995). Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr. Boil.*, 12, 1416-1423.
- Tepass, U., Tanentzapf, G., Ward, R., and Fehon, R. (2001). Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu Rev Genet.* 35, 747-784.
- Vaccari, T., Lu, H., Kanwar, R., Fortini, M. E., and Bilder, D. (2008). Endosomal entry regulates Notch receptor activation in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol.* 180, 755-62.
- Wang, L. H., Südhof, T. C., and Anderson, R. G. (1995). The appendage domain of alpha-adaptin is a high affinity binding site for dynamin. *J Biol Chem.* 270, 10079-10083.
- Wang, W., and Struhl, G. (2004). *Drosophila* Epsin mediates a select endocytic pathway that DSL ligands must enter to activate Notch. *Development* 131, 5367-5380.
- Wang, W., and Struhl, G. (2005). Distinct roles for Mind bomb, Neuralized and Epsin in mediating DSL endocytosis and signaling in *Drosophila*. *Development* 132, 2883-2894.
- Weinmaster, G., Roberts, V.J., and Lemke, G. (1992). Notch2: a second mammalian Notch gene. *Development*, 116, 931-941.
- Wendland, B., and Emr, S. D. (1998). Pan1p, yeast eps15, functions as a multivalent adaptor that coordinates protein-protein interactions essential for endocytosis. *J Cell Biol.* 141, 71-84.
- Wendland, B. (2002). Epsins: adaptors in endocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 971-977.
- Wesley, C.S., and Saez, L. (2000). Analysis of notch lacking the carboxyl terminus identified in *Drosophila* embryos. *J Cell Biol.* 149, 683-696.
- Wesley, C.S., and Mok, L.P. (2003). Regulation of Notch signaling by a novel mechanism involving suppressor of hairless stability and carboxyl terminus-truncated notch. *Mol. Cell Biol.* 16, 5581-5593.
- Wilkin, M. B., Carbery, A. M., Fostier, M., Aslam, H., Mazaleyrat, S. L., Higgs, J., Myat, A., Evans, D. A., Cornell, M., and Baron, M. (2004). Regulation of Notch endosomal sorting and signaling by *Drosophila* Nedd4 family proteins. *Curr Biol* 14, 2237-2244.
- Windler, S. L., and Bilder, D. (2010). Endocytic internalization routes required for delta/notch signaling. *Curr Biol.* (2010). 23, 538-543.
- Wong, W. T., Schumacher, C., Salcini, A. E., Romano, A., Castagnino, P., Pelicci, P. G., Di Fiore, P. P. (1995). A protein-binding domain, EH, identified in the receptor tyrosine kinase substrate Eps15 and conserved in evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 9530-9534.

- Wu, S., Mehta, S. Q., Pichaud, F., Bellen, H. J., and Quioco, F. A. (2005). Sec15 interacts with Rab11 via a novel domain and affects Rab11 localization in vivo. *Nat Struct Mol Biol.* 10, 879-885.
- Xu, A., Haines, N., Dlugosz, M., Rana, N.A., Takeuchi, H., Haltiwanger, R.S., and Irvine, K.D. (2007). In vitro reconstitution of the modulation of *Drosophila* Notch-ligand binding by Fringe. *J. Biol. Chem.* 282, 35153-35162.
- Yeh, E., Dermer, M., Commisso, C., Zhou, L., McGlade, C. J., and Boulianne, G. L. (2001). Neuralized functions as an E3 ubiquitin ligase during *Drosophila* development. *Curr Biol* 11, 1675-1679.
- Zerial, M., and Stenmark, H. (1993). Rab GTPases in vesicular transport. *Curr Opin Cell Biol.* 4, 613-620.
- Zhang, J., Kang, D. E., Xia, W., Okochi, M., Mori, H., Selkoe, D. J., and Koo, E. H. (1998). Subcellular distribution and turnover of presenilins in transfected cells. *J Biol Chem.* 273, 12436-13442.
- Zhang, C., Li, Q., Lim, C. H., Qiu, X., and Jiang, Y. J. (2007). The characterization of zebrafish antimorphic mib alleles reveals that Mib and Mind bomb-2 (Mib2) function redundantly. *Dev Biol.* 305, 14-27.

8. Δημοσίευση

Distinct intracellular motifs of Delta mediate its ubiquitylation and activation by Mindbomb 1 and Neuralized

Aikaterini Daskalaki,^{1,3} Nevine A. Shalaby,⁴ Kristina Kux,^{1,3} Giorgos Tzoumpikos,^{1,3} George D. Tsididis,² Marc A.T. Muskavitch,⁴ and Christos Delidakis^{1,3}

¹Institute of Molecular Biology and Biotechnology and ²Institute of Electronic Structure and Lasers, Foundation for Research and Technology–Hellas, 70013 Heraklion, Crete, Greece

³Department of Biology, University of Crete, 71409 Heraklion, Crete, Greece

⁴Biology Department, Boston College, Chestnut Hill, MA 02467

DSL proteins are transmembrane ligands of the Notch receptor. They associate with a RING (really interesting new gene) family E3 ubiquitin ligase, either Neuralized (Neur) or Mindbomb 1 (Mib1), as a prerequisite to signaling. Although Neur and Mib1 stimulate internalization of DSL ligands, it is not known how ubiquitylation contributes to signaling. We present a molecular dissection of the intracellular domain (ICD) of *Drosophila melanogaster* Delta (DI), a prototype DSL protein. Using a cell-based assay, we

detected ubiquitylation of DI by both Neur and Mib1. The two enzymes use distinct docking sites and displayed different acceptor lysine preferences on the DI ICD. We generated DI variants that selectively perturb its interactions with Neur or Mib1 and analyzed their signaling activity in two in vivo contexts. We found an excellent correlation between the ability to undergo ubiquitylation and signaling. Therefore, ubiquitylation of the DSL ICD seems to be a necessary step in the activation of Notch.

Introduction

The Notch transmembrane receptors are activated by transmembrane ligands of the DSL family, which is subdivided into the Delta (DI) and Serrate (Ser)/Jagged subfamilies in higher metazoans (Kopan and Ilagan, 2009). Contact of Notch and DSL, however, is not sufficient for eliciting intracellular signal transduction. Signaling is productive only when Notch and DSL are engaged in trans, namely from adjacent cells, whereas cis-binding (Notch and DSL on the same cell) is usually inhibitory to signaling (de Celis and Bray, 1997; Klein et al., 1997; Micchelli et al., 1997; Miller et al., 2009; Sprinzak et al., 2010). Even when Notch and DSL are engaged in trans, signaling ensues only when DSL proteins are coexpressed with a ubiquitin (Ub) E3 ligase (Pitsouli and Delidakis, 2005; Le Borgne, 2006). Work from our laboratory and others over the past decade has characterized two families of RING (really interesting new gene)

domain E3 ligases, which have the ability to activate the DSL proteins Neuralized (Neur; Deblandre et al., 2001; Lai et al., 2001; Pavlopoulos et al., 2001; Yeh et al., 2001) and Mindbomb 1 (Mib1; Itoh et al., 2003; Barsi et al., 2005; Koo et al., 2005a; Lai et al., 2005; Le Borgne et al., 2005; Pitsouli and Delidakis, 2005; Wang and Struhl, 2005). RING domains catalyze Ub transfer from an E2 intermediate (Ub-conjugating enzyme) to the substrate protein (Deshaies and Joazeiro, 2009). Coexpression of DSL proteins with a Neur or Mib1 E3 ligase stimulates DSL clearance from the cell surface and its relocation into endosomes (Lai et al., 2001, 2005; Pavlopoulos et al., 2001; Le Borgne et al., 2005). Ubiquitylation of plasma membrane proteins is a signal for endocytosis as well as further sorting steps in intracellular trafficking (Acconcia et al., 2009; Clague and Urbé, 2010), raising the possibility that Neur and Mib1 proteins ubiquitylate DSL ligands to trigger their endocytosis. Indeed, DSL activity seems to depend on a select set of

Correspondence to Christos Delidakis: delidaki@imbb.forth.gr

Abbreviations used in this paper: Brd, Bearded; DI, Delta; DV, dorsoventral; ECD, extracellular domain; Eq, Equator; Hrs, hepatocyte growth factor–regulated tyrosine kinase substrate; ICD, intracellular domain; LDL, low density lipoprotein; Mib1, Mindbomb 1; MM, molecular mass; Neur, Neuralized; Ser, Serrate; SOP, sensory organ precursor; UAS, upstream activation sequence; Ub, ubiquitin; Wg, Wingless; wt, wild type.

© 2011 Daskalaki et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons License [Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>].

Supplemental Material can be found at:
<http://jcb.rupress.org/content/suppl/2011/12/08/jcb.201105166.DC1.html>
Original image data can be found at:
<http://jcb-dataviewer.rupress.org/jcb/browse/4951>

endocytic proteins, namely dynamin (Seugnet et al., 1997), epsin (Overstreet et al., 2004; Wang and Struhl, 2004), and auxilin (Eun et al., 2008; Kandachar et al., 2008; Banks et al., 2011).

The correlation between E3 ligase expression, DSL internalization, and signaling has given rise to several (nonmutually exclusive) hypotheses regarding the mechanism of DSL signal emission (Le Borgne, 2006; Weinmaster and Fischer, 2011). The mechanical force hypothesis proposes that DSL endocytosis pulls on the trans-bound Notch molecule, thus deforming its extracellular juxtamembrane domain and exposing a buried juxtamembrane metalloprotease cleavage site (Parks et al., 2000; Nichols et al., 2007; Gordon et al., 2008). This promotes Notch cleavage, which is a prerequisite for receptor activation. The recycling hypothesis proposes that endocytosis of DSL, which is synthesized as an inactive molecule, is followed by its recycling to the plasma membrane after it has been modified (in a yet uncharacterized manner) in an endosomal compartment, such that it is now competent to engage in productive signaling (Wang and Struhl, 2004; Emery et al., 2005). Recycling may mediate relocalization of DSL to a plasma membrane microdomain conducive to signaling (Heuss et al., 2008; Rajan et al., 2009; Benhra et al., 2010). All hypotheses emphasize internalization rather than ubiquitylation, assuming that the former is a direct consequence of the latter. Yet, there are still many open questions. The cargo complex, which undergoes ubiquitylation, is only rather poorly characterized. Is the DSL protein itself ubiquitylated or does the Ub tag mark another adaptor protein, perhaps even the E3 ligase itself? The little data on DSL ubiquitylation by Neur and Mib1 are based mostly on *in vitro* reconstitutions (Deblandre et al., 2001; Koutelou et al., 2008). Ubiquitylation using cell-based assays has also been reported (Itoh et al., 2003; Chen and Casey Corliss, 2004; Koo et al., 2005b; Song et al., 2006; Skwarek et al., 2007). However, these assays used native immunoprecipitation conditions, leaving open the possibility that additional proteins, besides DI itself, may have been detected bearing the Ub modification, whereas the molecular masses (MMs) detected are consistent with proteins in a size range similar to DI.

DSL intracellular domains (ICDs) should play a central role in assembling the cargo recognition complexes in the process of DSL trafficking. Consistent with a trafficking–signaling connection, removal of the ICD has been shown to disable DSL proteins, even to convert them to signaling antagonists (Chitnis et al., 1995; Hukriede et al., 1997; Sun and Artavanis-Tsakonas, 1997). Replacement of the DI ICD with a heterologous non-Ub-mediated endocytic motif from the low density lipoprotein (LDL) receptor (Wang and Struhl, 2004) was able to restore signaling, albeit only partially; this rescue required the integrity of the LDL receptor endocytic motif, suggesting a causal role of endocytosis in signal emission rather than the converse (endocytosis being a consequence of productive signaling). Dissection of the *Drosophila melanogaster* DI and Ser ICDs has identified three endocytic motifs, an Asn-based peptide on each protein, and a dileucine motif on Ser (Glittenberg et al., 2006; Fontana and Posakony, 2009). The Ser Asn motif mediates interaction with both Neur and Mib1, whereas the similar DI motif was shown to be necessary for Neur binding (Mib1 was not tested).

Furthermore, the Ser Asn motif was shown to be absolutely necessary for signaling activity, whereas the LL motif was dispensable. It is likely that additional endocytic motifs are found on DSL proteins. Vertebrate DSL proteins, whose ICDs have diverged significantly from insect ones, do not contain the aforementioned Asn or LL motifs. Two mouse DI paralogues, DI11 and DI13, display distinct modes of endocytosis: DI11 requires ubiquitylation, whereas DI13, which is not ubiquitylated, as it contains no lysines in its ICD, can internalize and recycle just as efficiently (Heuss et al., 2008). However, only DI11 can signal efficiently, suggesting that internalization alone is not sufficient for signaling. In *Drosophila* too, the correlation between DSL internalization and signaling is not perfect. In *liquid facets* mutant tissue (lacking the endocytic adaptor epsin), bulk DI internalization occurs normally, but signaling is abolished (Wang and Struhl, 2004). Conversely, the Ser^{LL} variant, which lacks the dileucine internalization motif, displays defective internalization but signals efficiently (Glittenberg et al., 2006).

In summary, DSL proteins have been variously shown to interact with E3 ligases and to be actively endocytosed. However, the mechanistic relation between these events and DSL signaling is still largely unknown, owing to the complexity of transmembrane protein trafficking and the inability to distinguish the signaling pool of DSL proteins from the bulk. Here, we have molecularly dissected the *Drosophila* DI ICD and have tested five parameters: (1) interaction with E3 ligases Neur and Mib1, (2) ubiquitylation by these enzymes, (3) ability to signal in two different contexts, (4) subcellular distribution, and (5) efficiency of endocytosis. We identify distinct motifs of the DI ICD that are required for physical interaction with Neur and Mib1. We find that DI is ubiquitylated and that physical interactions between DI and the E3 ligases via the DI ICD motifs are a prerequisite for its ubiquitylation. Therefore, we propose that both Mib1 and Neur can directly ubiquitylate DI and that this enhances DI endocytosis. More importantly, we find an excellent correlation between the ability of DI to undergo ubiquitylation and its ability to signal. Activity also correlates quite well with endocytic efficiency but not with subcellular localization.

Results

DI ICD conserved motifs are interaction domains for Neur and Mib1

To identify important functional elements in the DI ICD, we searched for conserved motifs among distantly related insect species. We retrieved DI orthologue sequences from a basal dipteran (*Aedes aegypti*) as well as from representatives of six different insect families (*Bombyx mori*, *Tribolium castaneum*, *Apis mellifera*, *Periplaneta americana*, *Acyrtosiphon pisum*, and *Pediculus humanus corporis*). When we aligned DI ICDs (Fig. S1), four short conserved motifs were identified; a fifth motif was noticed by visual inspection of the alignment, although it had not been deemed significant enough by the ClustalW2 algorithm. The first motif is the stop transfer sequence at the very N terminus of the ICD. We named the remaining four DIs ICD1, ICD2, ICD3, and ICD4. To investigate the functional

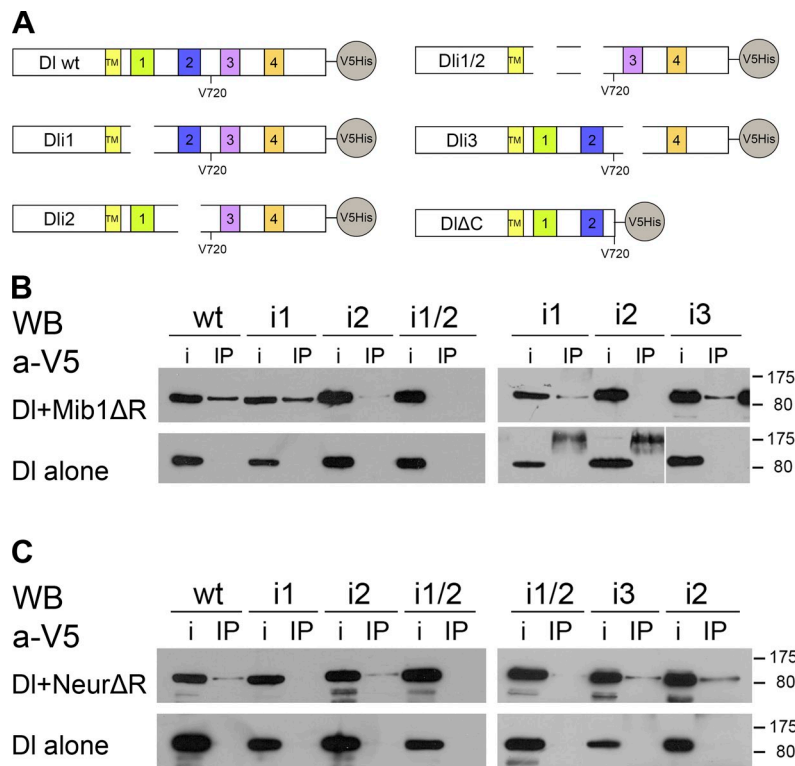


Figure 1. DI interactions with Neur and Mib1. (A) Schematic of DI and its variants tested in this study. TM, transmembrane domain. ECDs and ICDs are not drawn to scale. For the exact extent of motifs 1–4, refer to Fig. S1. (B) C-terminally V5-tagged DI variants, as indicated, were expressed alone (bottom) or with Myc-tagged Mib1ΔR (top). Immunoprecipitation (IP) lanes: extracts were immunoprecipitated with anti-Myc and detected with anti-V5. Input (i) lanes: 4% of the total extract from the same transfection was kept before immunoprecipitating the rest. The main band is full-length DI (predicted MM of 90 kD). The bands visible in the bottom right near 175 kD are nonspecific cross-reacting bands. Marker sizes are shown on the right in kilodaltons. The white line indicates that intervening lanes have been spliced out. (C) The same DI variants were expressed alone (bottom) or with NeurΔR (top). Extracts were immunoprecipitated with an anti-Neur antiserum and detected with anti-V5. Labels are the same as in B. WB, Western blot.

importance of these motifs, we generated mutated forms of DI by deleting each of the three motifs ICD1–3: Dli1 lacks ICD1, Dli2 lacks ICD2, and Dli3 lacks ICD3 (Fig. 1 A). We further constructed Dli1/2, which lacks both ICD1 and ICD2, and we obtained the C-terminal truncation DIΔC, which inserts a stop codon after amino acids 720 and removes ICD3, ICD4, and beyond (Rand, M.D., personal communication). All mutants and the wild-type (wt) control were C-terminally tagged with a 6×His-V5 epitope to facilitate biochemical detection (see Materials and methods and Fig. 1 A).

We coexpressed the various DI mutants in *Drosophila* Schneider S2 cells with Mib1ΔR, a Mib1 variant that lacks the catalytic RING domain, to address a possible function of these motifs as Mib1 docking sites. Mib1ΔR had been shown before to physically interact with wt DI and Ser, and deletion of the RING domain facilitated detection of these interactions, as it diminished DSL degradation (Lai et al., 2005). We observed that DI, Dli1, and Dli3 coimmunoprecipitated with Mib1ΔR. On the contrary, coimmunoprecipitation of Dli2 and Dli1/2 was severely compromised, suggesting that motif 2 is responsible for the interaction with Mib1 (Fig. 1 B).

The same assay was used to test the ability of the mutant forms to coimmunoprecipitate with NeurΔR, a RING-less Neur variant, which was already known to interact with wt DI and Ser (Lai et al., 2001; Pitsouli and Delidakis, 2005; Glittenberg et al., 2006). Whereas Dli2 and Dli3 were coimmunoprecipitated by an anti-Neur antibody, Dli1 and Dli1/2 coimmunoprecipitation was strongly attenuated, pointing to motif 1 as a potential interaction site for Neur (Fig. 1 C; in agreement with Fontana and Posakony, 2009). Based on these results, we propose that two of the conserved motifs in DI ICD, ICD1 and ICD2, are docking

sites for Neur and Mib1, respectively, whereas ICD3 is dispensable for the recruitment of either Ub ligase. ICD4 is also dispensable because DIΔC could be coimmunoprecipitated with either Mib1ΔR or NeurΔR (unpublished data).

DI is ubiquitylated by Neur and Mib1

We next coexpressed the DI variants with catalytically active (full length) E3 ligases in S2 cells to assess their ability to be ubiquitylated. Ubiquitylated species were detected after co-transfecting with an Xpress epitope-tagged version of Ub. We pulled down 6×His-tagged DI under strong denaturing conditions to eliminate other interacting proteins and thus ensure that ubiquitylated species observed represent DI itself. Transfected DI displayed low background levels of ubiquitylation (anti-Xpress signal), visible only at higher exposures than those displayed in Fig. 2. For this reason, we transfected with increasing amounts of *neur*- or *mib1*-expressing plasmids and asked whether we see a corresponding increase in DI ubiquitylated species.

When Mib1 was expressed in increasing amounts (Fig. 2 A), we detected a concomitant increase in high MM ubiquitylated species of DI, Dli1, or Dli3 but not of Dli2 or Dli1/2. Using Neur in the same assay, we could stimulate ubiquitylation of wt DI as well as Dli2 but not Dli1 or Dli1/2 (Fig. 2 B). These results are in agreement with our interaction data because deletion of each docking site compromised ubiquitylation by the cognate E3 ligase; Dli1 was ubiquitylated only by Mib1, and Dli2 was ubiquitylated only by Neur. For both enzymes, ubiquitylation was dependent on the RING domain, as incubation with NeurΔR or Mib1ΔR strongly reduced the Ub signal (Fig. S2 A). In all experiments, cells were incubated with E64, a lysosomal

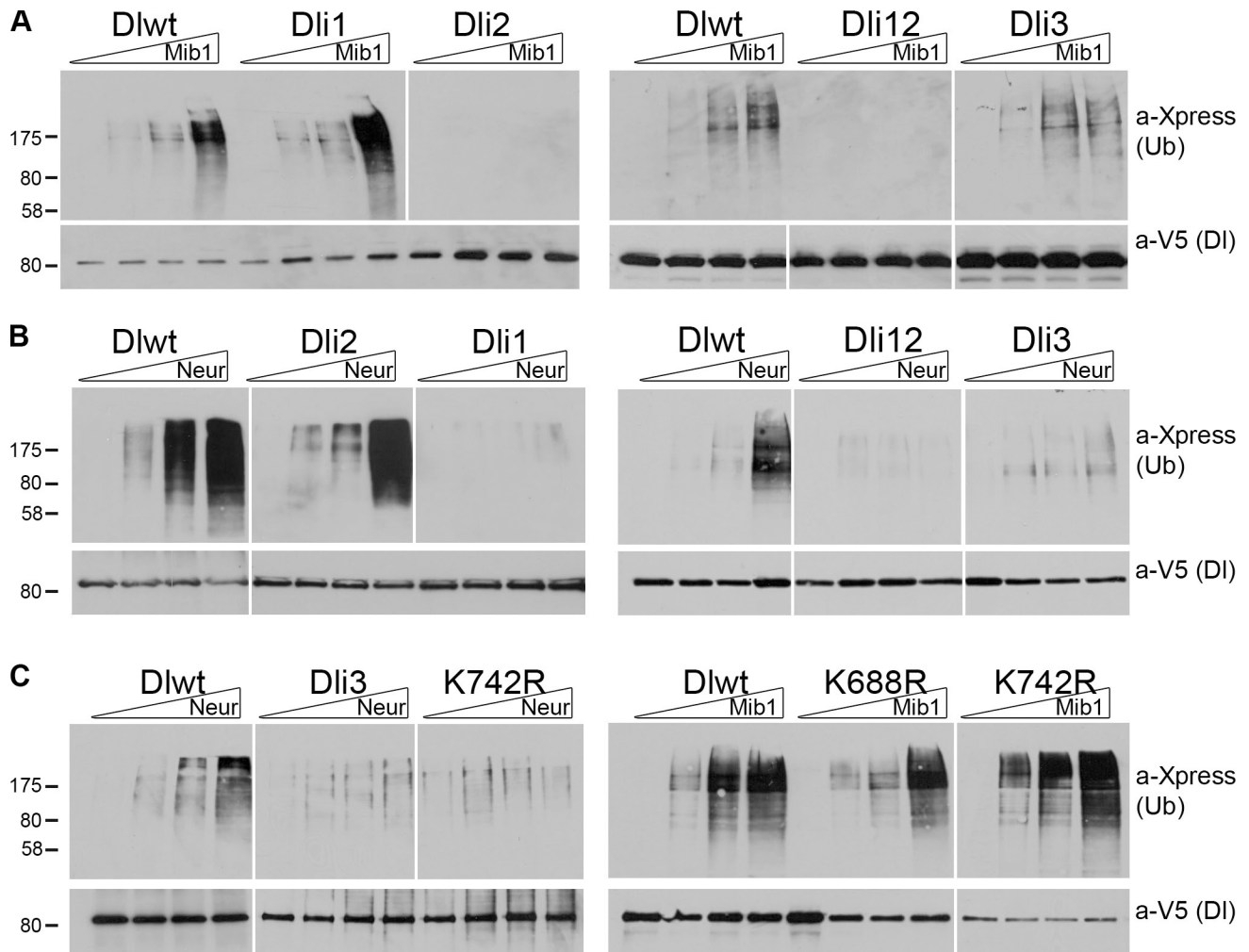


Figure 2. Ubiquitylation of DI variants. (A) DI-expressing constructs were cotransfected with Xpress-Ub and increasing amounts (0, 0.5, 1, and 1.5 μ g) of Mib1-expressing constructs. DI protein was isolated by affinity purification on a Ni^{2+} resin under denaturing conditions. Eluates of the Ni^{2+} column were probed with anti-Xpress to detect ubiquitylated species (top shows 1/4 of total loaded) and anti-V5 to detect total DI as a loading control (bottom shows 1/3 of total loaded). Note that ubiquitylated species, where present, run at much higher MM than the expected 90 kD of unmodified DI. (B) DI-expressing constructs were cotransfected with Xpress-Ub and increasing amounts (0, 0.5, 1, and 1.5 μ g) of Neur-expressing constructs. Note weaker levels of Ub signal in Dli3. (C) Ubiquitylation assays performed as in A and B using the DI variants and E3 ligases shown at the top. Note that DI-K742R is weakly ubiquitylated by Neur but resembles wt DI in its response to Mib1. MM markers are shown in kilodaltons. White lines indicate that intervening lanes have been spliced out.

protease inhibitor (Rock et al., 1994), before lysis. When E64 was omitted, much less ubiquitylated DI could be detected, consistent with lysosomal clearance of DI ubiquitylated species (Fig. S2 B). E64 did not qualitatively alter the MM pattern of DI Ub adducts, suggesting that the modifications observed are not a secondary consequence of blocking the lysosomal pathway. Importantly, a major monoubiquitylated band at the predicted MM of 102 kD was not produced by either Mib1 or Neur. This shows that these E3 ligases catalyze preferentially the multi- or polyubiquitylation of DI.

Dli3 gave strong ubiquitylation by Mib1 and detectable ubiquitylation by Neur, albeit at much reduced levels compared with wt (Fig. 2, A and B). This was unexpected because deletion of ICD3 had not affected recruitment of Neur Δ R in our earlier coimmunoprecipitation assay (Fig. 1). We entertained the possibility that Neur docks on ICD1 but uses a lysine in ICD3 to conjugate the Ub moiety. K742, the sole lysine residue

within ICD3, is in fact the most highly conserved lysine in the entire DI ICD (Fig. S1). A mutant, DI-K742R, converting this lysine to arginine, which cannot be ubiquitylated, behaved like Dli3, namely it was only weakly ubiquitylated by Neur, whereas it still displayed robust ubiquitylation by Mib1 (Fig. 2 C). We conclude that K742 is a preferred Ub acceptor site by Neur but not by Mib1, suggesting that the two E3 ligases produce different ubiquitylated products. Six other K \rightarrow R mutations were assayed, namely K629R, K636R, K683R, K688R, K775R, as well as the double mutant K683,688R. None of these showed any defect in ubiquitylation by either E3 ligase (Fig. 2 C and not depicted). Note that K683 and K688 are the two lysines within ICD2, whereas K636 is the sole lysine within motif ICD1. None of the three is conserved across insects, although K683 and K688 show partial conservation, as do K629 and K775 (Fig. S1). Finally, we tested the C-terminal truncation DI Δ C, which lacks K742 as well as K739, K762, and K775. Neur-dependent

ubiquitylation was compromised, as expected from the absence of K742, but Mib1-dependent ubiquitylation was unaffected (unpublished data), eliminating the remaining C-terminal-proximal lysine residues as preferred Mib1 modification sites. It therefore appears that Neur displays strong selectivity for K742, whereas Mib1 is more promiscuous in its choice of lysine residue to be ubiquitylated.

Role of DI ICD conserved motifs in wing dorsoventral (DV) boundary induction and sensory organ precursor (SOP) lateral inhibition

The analysis presented in the previous two sections revealed the role of ICD1 and ICD2 in binding Neur and Mib1, respectively, and that of ICD3 as a main ubiquitylation target by Neur. To address the relationship between ubiquitylation and signaling, we proceeded to ask whether these motifs play a role in DI activity in vivo. To that end, we tested each mutant in two settings. In the first, we asked whether ectopic expression of DI in the larval wing epithelium can induce *wingless* (*wg*), a Notch target gene normally found in the DV boundary (de Celis et al., 1996; Doherty et al., 1996; Neumann and Cohen, 1996). This event is known to be dependent on *mib1* (Lai et al., 2005; Le Borgne et al., 2005; Pitsouli and Delidakis, 2005; Wang and Struhl, 2005), which is ubiquitously expressed in the wing disk. In the second setting, we asked whether transgenic DI variants can rescue the process of SOP lateral inhibition (Bray, 1998) in a *DI Ser* mutant background. Consistent with the expression of *neur* in proneural territories, we have previously shown that this process relies on Neur, although Mib1 also plays a minor role (Pitsouli and Delidakis, 2005).

To monitor the ability of DI mutants to signal in wing DV boundary induction, we expressed wt and mutant forms of the ligand in a stripe perpendicular to the DV boundary using *ptc-Gal4*. When an upstream activation sequence (UAS)-DI wt transgene is expressed, ectopic Notch activity (reported by *Wg* expression) becomes apparent in cells immediately adjacent to the *ptc-GAL4*-expressing cells. As previously reported, Notch activation is restricted to dorsal cells, as a result of differential Notch glycosylation (Irvine and Vogt, 1997), and is excluded from high DI-expressing cells because of the well-documented effect of DI cis-inhibition of Notch (Doherty et al., 1996; de Celis and Bray, 1997). For this reason, *Wg* induction is stronger in the posterior compartment, where the *ptc* expression stripe ends abruptly, creating a sharp expression/nonexpression boundary, whereas it is weaker anterior to the stripe, where ectopic DI expression levels drop more gradually (Fig. 3 A, inset). Dli1, DI Δ C, and DI-K742R were active in this assay, exhibiting robust ectopic *Wg* expression (Fig. 3 A, D, and H). When ICD2 was deleted (in Dli2 and Dli1/2), thus interfering with interaction with Mib1 (Fig. 1), no *Wg* induction was observed (Fig. 3 B and C). Thus, inability to interact with Mib1 abolishes signaling of DI in trans to Notch but does not affect cis-inhibition in this context. Inability to interact or get ubiquitylated by Neur, on the other hand, does not abolish either trans-activation or cis-inhibition (Fig. 3 A, D, and H).

The activity displayed in this assay by Dli1 and DI Δ C is Mib1 dependent, as it was abolished in clones expressing these proteins and simultaneously mutated for *mib1* (Fig. 3, E, I, and L). The same had been shown earlier for wt DI. Conversely, it was shown before that *neur*, if ectopically expressed, can compensate for loss of *mib1* in this context (Pitsouli and Delidakis, 2005; Wang and Struhl, 2005). When we coexpressed Dli2 with Neur (here, we did not use a *mib1*⁻ background because Dli2 is inactive in a wt background anyway), we got a strong induction of *Wg* (Fig. 3, F and J), suggesting that this mutant regained its ability to signal. We were not able to detect any *Wg* induction when we expressed Dli1/2 with or without Neur (Fig. 3, G and K), confirming that this variant, which is unable to interact with either Neur or Mib1, is inactive, other than being able to cis-inhibit Notch. This is in agreement with previous data showing that Ub ligase activity is not needed for cis-inhibition (Glittenberg et al., 2006; Miller et al., 2009).

The DI variants behaved differently when assayed in the context of lateral inhibition. Notch signaling normally restricts the generation of SOPs from a field of tens of cells to only one or two. Clones mutant for *DI Ser* give rise to clustered supernumerary SOPs, as all cells within the proneural field adopt the SOP fate. In a *DI Ser* background, expression of UAS-DI by the ubiquitous driver α -*tubulin-Gal4* restored Notch signaling, and individualized SOPs were born (Pitsouli and Delidakis, 2005). UAS-Dli2 reproduced this effect (Fig. 4 C), but neither Dli1 nor Dli1/2 was able to do so (Fig. 4, B and D), pointing to the ICD1-Neur interaction as playing a major role in this context. Interestingly, DI Δ C and DI-K742R, which can interact with both Mib1 and Neur, but cannot be properly ubiquitylated by Neur, could not rescue lateral inhibition (Fig. 4, E and F). These data suggest that not only interaction (affected by Dli1 and Dli1/2) but also strong ubiquitylation by Neur (affected by DI Δ C and DI-K742R) is needed in this process. Upon close observation of clone phenotypes, we noticed that Dli1/2 and DI Δ ICD, a mutant in which the entire DI ICD has been deleted (Wang and Struhl, 2004), produced clusters of adjacent SOPs (Fig. 4, A and D), the same phenotype that loss of *DI Ser* would have in the absence of any transgene—this is in agreement with the complete inactivity of these two variants. In the case of Dli1, DI Δ C, and DI-K742R, on the other hand (Fig. 4, B, E, and F), although supernumerary SOPs were still produced, these were often spaced apart from each other, suggesting that a low level of lateral inhibition was taking place. As Dli1, DI Δ C, and DI-K742R are good substrates for Mib1, it is likely that endogenous Mib1 can provide partial activity in this context, which agrees with a previously noted minor role of Mib1 in lateral inhibition (Pitsouli and Delidakis, 2005).

In summary, of the three DI ICD motifs, Neur-associated motifs ICD1 and 3 seem to play a major role in lateral inhibition, whereas the Mib1-associated motif ICD2 is predominant in DV boundary induction. We wondered whether lateral inhibition might be supported by a previously reported active DI variant that cannot be ubiquitylated at all because of the lack of lysine residues in its ICD. This artificial variant has been made by fusing an NPXY-dependent endocytosis

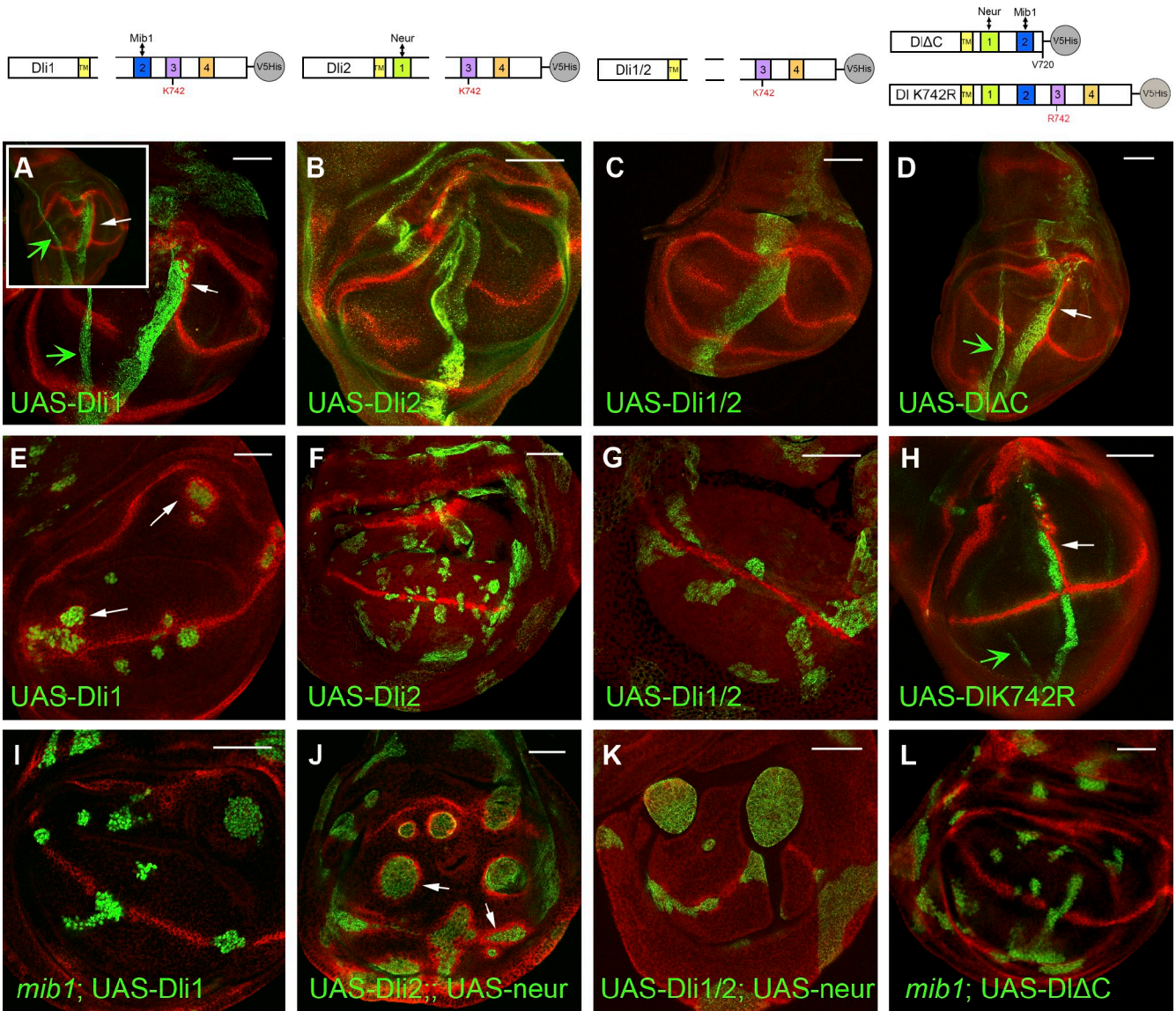


Figure 3. Induction of Wg by DI variants. Third instar wing pouches overexpressing DI variants and stained for Wg (red) are shown. Anterior is to the left and ventral is down. [A–D and H] DI variants as indicated are expressed with *ptc-Gal4* and detected with anti-DI. [A, inset] Disk expressing wt DI under *ptc-Gal4*. Note ectopic Wg expression posterior to the DI stripe. The narrow stripe of DI expression sometimes seen (green arrows) comes from the overlying squamous peripodial membrane cells, which do not express *wg* in response to Notch. [E–G] Ectopic expression of DI variants, as indicated, in random clones. Dli1 (E) induces Wg, whereas Dli2 (F) and Dli1/2 (G) do not. In E, the DI transgene is driven by *α-tubulin-Gal4*, and the clones are visualized by coexpressed UAS–nuclear GFP (green). In F and G, the DI transgenes are expressed by *act5C-Gal4*, and the clones are visualized by anti-DI (green). [I and L] The indicated DI variants are expressed in clones mutant for *mib1*. Clones are marked as in E. Compared with D and E, no ectopic Wg is produced, confirming that signaling by these variants depends on Mib1. [J and K] The indicated DI variants are coexpressed with EGFP–Neur under *act5C-Gal4* control. Clones are visualized by the presence of EGFP–Neur. Comparing F with J, we conclude that Neur, when ectopically provided, can activate Dli2, whereas it cannot activate Dli1/2 (G vs. K). The slight Wg expression close to the DV boundary in K is occasionally seen also in Dli1/2-expressing clones (without UAS–Neur), hinting at a possible residual activity of the protein. Open arrows show Wg induction. TM, transmembrane domain. Bars, 50 μm.

signal from a mammalian LDL receptor (Chen et al., 1990) to the DI extracellular domain (ECD)⁺ transmembrane domain (Wang and Struhl, 2004). This DI-LDL⁺ fusion had been shown to be active in *wg* induction but had not been tested in the context of lateral inhibition. In *DI Ser* clones expressing UAS–DI-LDL⁺, we detected no rescue of lateral inhibition, as a large number of adjacent SOPs were reproducibly detected (Fig. 4 G). Therefore, whereas a heterologous endocytosis signal can restore DI activity in one context (DV boundary induction), it fails to do so in another (lateral inhibition).

Subcellular localization of DI variants

As ubiquitylation is a signal for membrane cargo trafficking, we wondered whether the inability of some DI mutants to accept Ub moieties would alter their patterns of internalization. Most importantly, we wanted to confirm that the intracellular deletions had not adversely affected other aspects of the protein’s biogenesis, such as targeting to the cell surface. To confirm cell surface exposure for all our DI variants, we visualized them by immunofluorescence in the absence of detergent. In all cases, strong signal was obtained on the apical plasma membrane with much weaker signal basally, suggesting that polarized exocytosis of DI was not

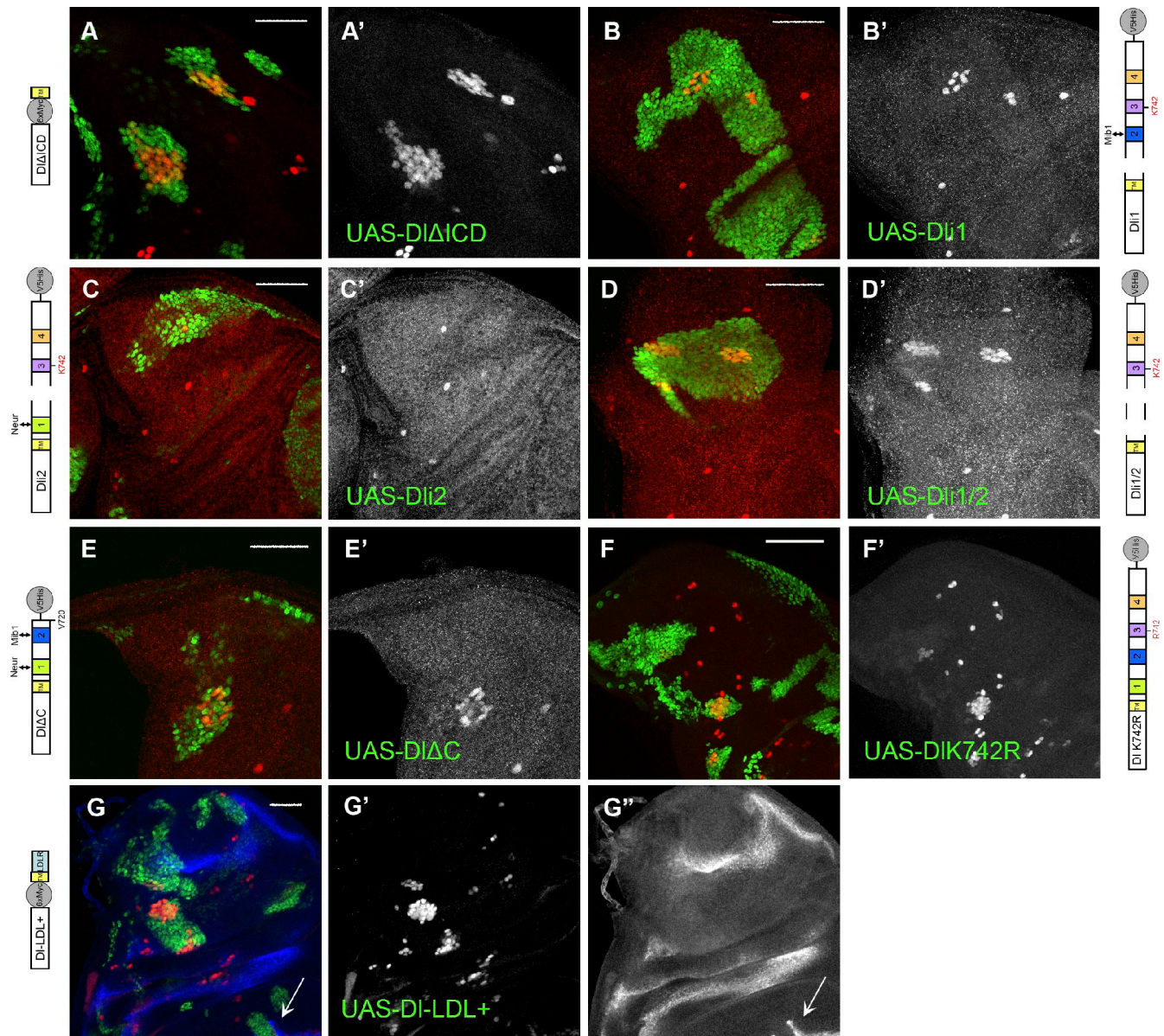


Figure 4. Rescue of lateral inhibition by DI variants. (A–G') In all panels, notum regions of third instar wing disks are shown stained for Sens (red; shown separately in A'–G'), a marker for SOPs, which normally arise as single cells at defined positions. *DI Ser* mutant clones are marked by the expression of nuclear GFP (green); clones coexpress the indicated DI variant. Note that a singularized SOP is present only in C, whereas all other variants cannot abolish the birth of clustered supernumerary SOPs. An unrescued *DI Ser* mutant would look like the clones in A or D (e.g., Pitsouli and Delidakis, 2005). (G–G'') In G, we have costained for Wg (blue; shown separately in G''). The edge of the wing pouch is visible at the bottom, where *DI-LDL** is capable of inducing Wg (arrows), confirming its activity in a different context. Anterior is to the left and dorsal is up. LDLR, LDL receptor; TM, transmembrane domain. Bars, 50 μ m.

affected by these deletions (Fig. S3). This was even true for the inactive *Dli1/2*, eliminating the trivial possibility that its inactivity results from a defect in its plasma membrane localization.

When assayed in permeabilized tissue, wt DI (either endogenous or overexpressed) is highly enriched on the apical cell surface with additional intracellular puncta, which are in large part endosomes (Pavlopoulos et al., 2001; Le Borgne and Schweisguth, 2003; Wang and Struhl, 2004). We used three representative markers of different endosomal compartments to ask whether they colocalize with intracellular DI in an attempt to determine whether our DI ICD mutants may affect the protein's trafficking route. We chose Sara as an early endosome marker

because of its recently reported connection with Notch–DI signaling (Bökel et al., 2006; Coumailleau et al., 2009). Rab11, which has also been implicated in DI function (Emery et al., 2005; Jafar-Nejad et al., 2005; Banks et al., 2011), was used as a recycling endosome marker. Hepatocyte growth factor–regulated tyrosine kinase substrate (Hrs) was used as a sorting endosome marker. It is known to bind Ub-tagged cargoes and stimulate their import into intraluminal vesicles of the multivesicular body (Lloyd et al., 2002; Jékely and Rørth, 2003). DI wt intracellular puncta showed the best colocalization with Sara (46%). Less colocalization was evident with Hrs (37%), and even less was evident with Rab11 (15%). DI variants showed

Table 1. DI colocalization with Sara, Hrs, and Rab11

DI variant	Sara			Hrs			Rab11		
	Colocalization	n	P-value	Colocalization	n	P-value	Colocalization	n	P-value
	%			%			%		
Alone									
wt	46	166	–	37	109	–	15	141	–
Dli1	60	106	0.02	37	73	1.00	14	200	0.75
Dli2	54	112	0.22	33	122	0.58	13	238	0.54
Dli1/2	47	100	0.90	18 ^a	201	<0.01 ^a	14	125	1.00
DIΔC	42	114	0.62	18 ^a	104	<0.01 ^a	16	129	1.00
DI-LDL	19 ^a	503	<0.01 ^a	34	131	0.68	14	151	0.87
+Neur									
wt	45	317	0.92 ^b	5 ^a	222	<0.01 ^{a,b}	10	192	0.24 ^b
Dli1	49	214	0.48	6	143	0.63	11	150	1.00
Dli2	46	226	0.86	6	343	0.57	11	240	1.00
Dli1/2	34	170	0.02	4	93	1.00	11	124	1.00
DIΔC	46	156	0.85	5	134	0.80	10	129	1.00
+Mib1									
wt	50	92	0.52 ^b	NT	–	–	13	286	0.66 ^b

The percentage of colocalization of each DI variant with Sara, Hrs, and Rab11 is shown. The numbers refer to the percentage of DI puncta that are also positive for each endocytic marker. *n* = total number of DI puncta scored. P-values were calculated using the Fisher exact test against the DI wt control. In the +Neur and +Mib1 sections, DI variants were coexpressed with UAS-Neur or UAS-YFP-Mib1, respectively. The variant +Neur p-values are computed against DI wt +Neur. Minus signs indicate not applicable data. NT, not tested.

^aValues below 0.01 are considered significantly different than wt.

^bThe wt +Neur/Mib1 colocalization p-values are computed against DI wt alone.

subapical/laterobasal puncta with a similar distribution to that of the wt among the three markers used (Table 1 and Fig. S4). One exception was DI-LDL⁺, which colocalized less efficiently with Sara (22%). Also, Dli1/2 and DIΔC showed decreased colocalization with Hrs, which we do not presently understand, as they have essentially complementary deletions in the DI ICD. We conclude that the DI ICD confers a preference to accumulate into Sara endosomes, but none of our ICD deletions seems to abolish this affinity or greatly alter DI distribution among the endosomal compartments tested.

All of the aforementioned localization tests were performed in the larval wing epithelium, where *mib1* is present, but *neur* is hardly expressed at all. We therefore repeated the assays with *neur* coexpression, whereupon DI wt relocalizes dramatically as a result of stimulated endocytosis. It pulls away from the apical surface and moves into large intracellular puncta, where it often colocalizes with Neur. This apical DI clearance is accompanied by clearance of Notch, which also accumulates on the DI-Neur-positive intracellular puncta (Lai et al., 2001; Pavlopoulos et al., 2001). When coexpressed with Neur, dramatic differences were observed among the DI variants (Fig. 5). Dli2 was cleared from the apical surface and massively relocalized into intracellular puncta together with Notch and Neur (Fig. 5 F), like wt DI. Dli1, Dli1/2 (which cannot interact with Neur), and DIΔC (which interacts with Neur but cannot be properly ubiquitylated) retained their apical accumulation and were not enriched intracellularly (Fig. 5, E–H). This was mirrored in the effect on endogenous Notch, which was cleared from the apical surface only by the Dli2-Neur combination (Fig. 5, E''–H''). Therefore, apical clearance of DI-Notch

complexes by Neur can occur only when DI can be ubiquitylated by Neur.

We also tested the distribution of DI variants among the three endosomal compartments, Sara, Rab11, and Hrs, upon Neur coexpression. The relative distribution of DI in Sara and Rab11 endosomes essentially did not change (Table 1), despite the quantitative increase in endosomal puncta for the wt and Dli2. An overall decrease in Hrs colocalization was seen, but this was not DI variant-specific, possibly hinting at a global effect of Neur, which was not studied further. A similar study coexpressing DI with Mib1 failed because of lethality at prelarval stages. The few escapers that were recovered did not show a significantly altered distribution of DI (Table 1). We conclude that the identified ICD motifs (1, 2, and 3), despite their influence on DI ubiquitylation, do not significantly affect its trafficking route, at least as revealed by the small number of endosomal markers tested.

Endocytosis of DI variants

As the differences in endocytosis among our DI variants did not appear to be qualitative, we turned to a live antibody uptake assay, first described by Le Borgne and Schweisguth (2003), to gauge the efficiency of DI internalization upon mutating the various ICD motifs. For technical reasons, this was best performed in pupal nota at 18–22 h after puparium formation. We cultured the dissected tissue in the presence of mouse anti-DI antibody for 15 min before fixation. Using a different (guinea pig) anti-DI antibody to detect total DI after fixation/permeabilization, we could determine the fraction of total (guinea pig) DI endosomal puncta that had gotten occupied by the live (mouse)

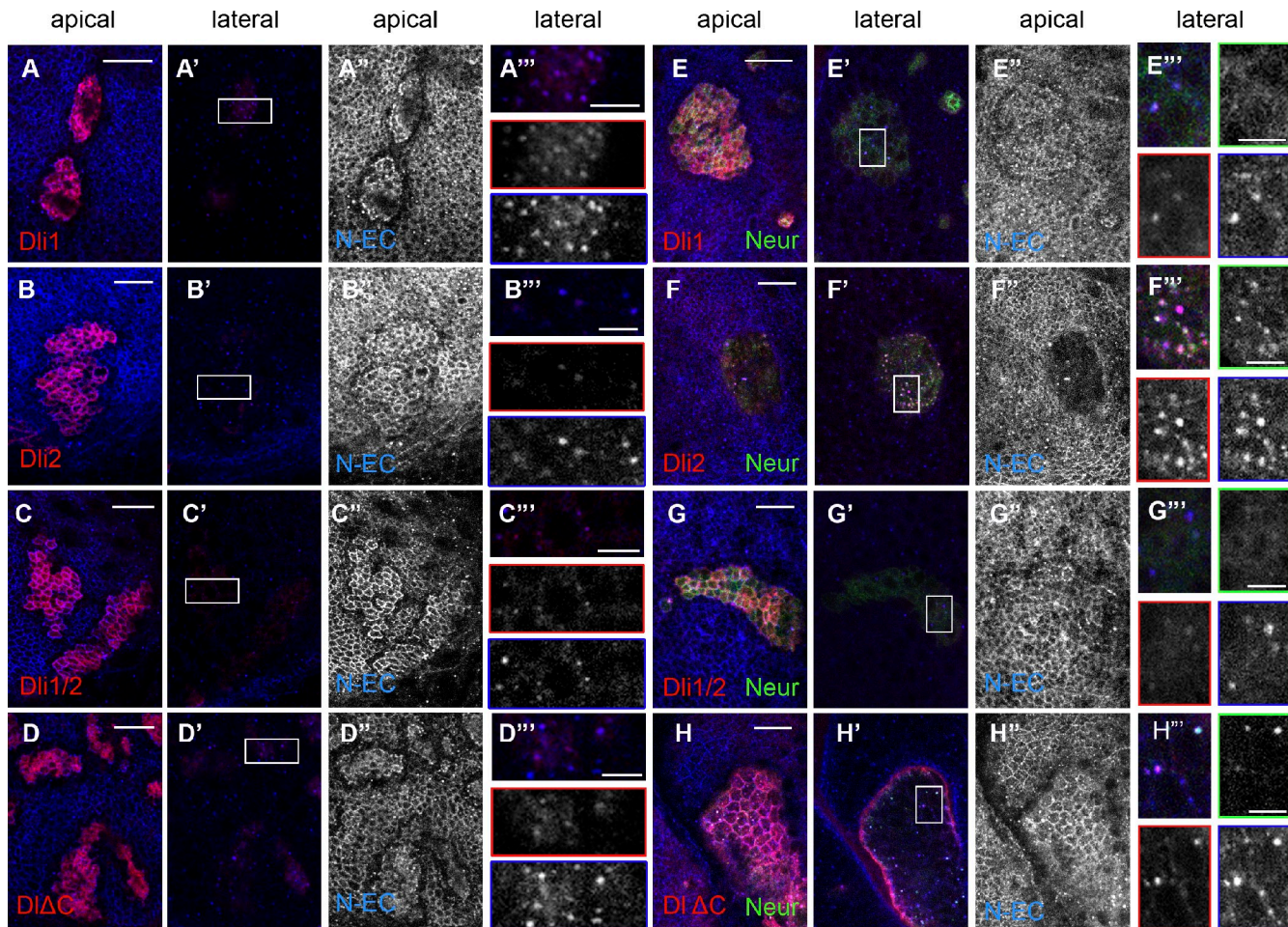


Figure 5. Subcellular localization of Dli variants. Close ups of third instar wing epithelia stained for Dli ECD (red) and Notch ECD (N-EC). EGFP-Neur, whenever coexpressed, is detected in green. Overexpressed Dli variants are detected, whereas endogenous Dli is undetectable at the illumination level used. (A–D''') Ectopic expression of Dli variants, as indicated. A–D are apical single confocal sections, whereas A'–D' are lateral single sections $\sim 3 \mu\text{m}$ below A–D. Strong accumulation of ectopic Dli apically is accompanied with strong endogenous Notch accumulation, shown separately in A''–D''. Laterally, the Dli variants accumulate in puncta that also contain Notch (A'–D'). Boxed regions of these panels are enlarged in A'''–D''', in which individual channels are also shown: Dli (red borders) and Notch (blue borders). (E–H''') Ectopic coexpression of Dli variants, as indicated, with EGFP-Neur. E'–H' are the corresponding lateral sections at $3 \mu\text{m}$ below E–H. E''–H'' show the apical Notch staining alone. (F'') Note that only Dli2 + Neur efficiently clears Notch away from the apical surface; (F) Dli and Neur are also cleared. E'''–H''' are enlarged sections of the boxed regions in E'–H'. Individual channels for Dli, Notch, and Neur are shown with red, blue, and green borders, respectively. (F''') Large lateral puncta of Dli are detected in the case of Dli2 colocalizing with Notch and Neur. The fewer DliΔC puncta (H''') also colocalize with Neur (and Notch), whereas Neur is diffusely cortical when coexpressed with Dli1 (E''') or Dli1/2 (G'''). Note that, whenever overexpressed Dli accumulates apically (all panels except F), endogenous Notch seems depleted from a row of cells around the clone. This probably results from polarization of Notch in these cells toward the highly Dli-expressing cells of the clone. Bars: (A–H) $15 \mu\text{m}$; (A'''–H''') $5 \mu\text{m}$.

antibody during the 15-min uptake window. This fraction (percentage of Dli internalized) ranged from 72 to 88% of the total Dli puncta for the wt, Dli1, and DliΔC variants (Fig. 6); the differences among these variants were statistically insignificant. However, Dli2 and Dli1/2 displayed a much slower endocytosis occupying only 38–45% of the total Dli-positive endosomes within the uptake window. Dli-LDL⁺ (56%) was also significantly more slowly endocytosed than wt but faster than Dli1/2. We conclude that the Dli ICD regulates the rate of Dli internalization and that motif i2, the Mib1 interaction motif, is critical for efficient internalization.

The Gal4 driver used to express our Dli variants in the pupal notum expresses mostly in nonsensory epithelial cells (Fig. S5), which do not express *neur*, consistent with ICD2, the Mib1-interacting motif, playing an important role in the rate

of internalization. We wondered what would happen if we provided Neur exogenously. When we coexpressed Dli (wt) and Neur, the percentage of Dli taken up in a 15-min window remained unchanged (Fig. 6). However, the efficiency of Dli2 endocytosis increased dramatically to wt levels. Dli1/2 uptake remained slow. Therefore, in this assay, uptake efficiency seems to be correlated with ubiquitylation, with Dli2 being endocytosed slowly in the notum epithelium but attaining a faster uptake rate when Neur is supplied.

Discussion

Mechanism of DSL ligand activation

Our dissection of the Dli ICD has revealed two discrete motifs, ICD1 and ICD2, for docking of Neur and Mib1, respectively. Moreover, we showed that Mib1 and Neur can ubiquitylate Dli

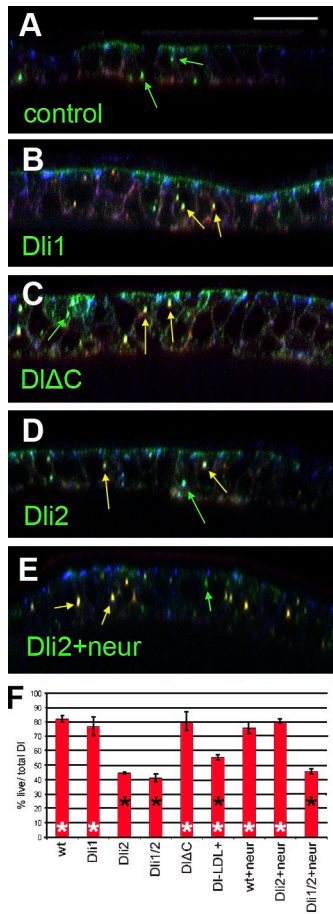


Figure 6. Live uptake assays for DI variants. (A–E) Examples of pupal notum expressing the indicated DI variant under *Eq-Gal4*. Optical cross sections are shown; apical is up, shown by high E-cadherin accumulation (blue). Anti-DI taken up live for 15 min before fixation (red) and total anti-DI (green) are shown. Yellow arrows mark DI puncta that have been labeled by the live protocol; green arrows mark DI puncta that did not get labeled by the live protocol. (A) The control notum expressed wt DI but was cultured on ice to inhibit endocytosis; note the absence of yellow puncta and accumulation of the live anti-DI (red) immunoreactivity on the basal side of the cells. In B–E, live uptake was performed at 25°C. (F) Bar graph of the percentages of total DI puncta that were labeled by the live antibodies. The experiments were replicated two to three times, and means are shown. Error bars are standard deviations. Genotypes with significant differences from the wt ($P < 0.01$, Student's *t* test) are indicated by filled asterisks. Genotypes with significant differences from Dli1/2 are indicated by open asterisks. Bar, 16 μ m.

in *Drosophila* cells. As we have used stringent denaturing conditions to isolate DI, we are confident that DI is the ubiquitylation substrate and have identified a major acceptor residue for Neur-mediated ubiquitylation, K742. It has been suggested in the past that DI is usually monoubiquitylated. However, our results show that both E3 ligases produce high MM species, consistent with multi/polyubiquitylation. Whereas Neur prefers K742 as the Ub acceptor site on DI, Mib1 does not display a lysine preference*,

*We have not strictly excluded a Mib1 preference for the three lysines in the stop transfer sequence, K665 (the only other ICD lysine not mutagenized), or the single lysine residue in the V5 epitope tag. However, K665 is not conserved, and lysines 620/622/624 (stop transfer) have been tested by Wang and Struhl (2004) and shown not to be necessary for DI activity. We therefore do not think that any of these would act as a major acceptor site for Mib1 modification.

pointing to qualitatively different Ub modifications catalyzed by the two E3 ligases. As different Ub modifications may be recognized by different endocytic adaptors, the possibility arises that DI modified by Mib1 versus Neur can display different trafficking behavior. From our marker colocalization and endocytic uptake assays, we could not discern any major differences among DI ICD variants. DI accumulated in early Sara-positive endosomes and showed lower colocalization with Hrs or Rab11. The ICD was necessary for the Sara colocalization (because DI-LDL⁺ showed a significant reduction), but none of the identified ICD motifs seemed to be necessary (Table 1). We did not discern differences in uptake rate between Mib1-modified and Neur-modified DI either. Both Ub ligases promoted a high rate of DI uptake ($\sim 80\%$ of DI-positive endosome occupancy is achieved within 15 min; Fig. 6). A slower mode of DI uptake, independent of either Mib1 or Neur, was typified by Dli1/2 (and Dli2 in the absence of Neur) and amounted to only $\sim 45\%$ endosome occupancy in the same time. We conclude that DI contains several endocytic motifs: the conserved ICD1, 2, and 3 mediate ubiquitylation by Mib1/Neur and rapid uptake, and additional uncharacterized endocytic mechanisms must also exist to account for the slower uptake of ICD1/2. The DI-LDL⁺ variant, which uses a distinct Ub-independent mechanism of endocytosis, was taken up faster than Dli1/2 but slower than wt DI.

Can we correlate DI signaling activity with its ubiquitylation and/or trafficking? Correlation with ubiquitylation was very good (Fig. 7 A). When ubiquitylation by Mib1 was abolished (Dli2 or Dli1/2), the ligand lost its ability to activate Notch at the wing DV boundary. Reciprocally, in cases in which we eliminated ubiquitylation by Neur (Dli1, Dli1/2, and DIΔC), the ability of the ligand to sustain lateral inhibition was compromised. As *mib1* is expressed ubiquitously in the wing disk, whereas *neur* is limited to proneural regions, there is some residual lateral inhibition activity by Dli1 and DIΔC, variants that retain interaction with Mib1 (Fig. 7 A). The behavior of DI-LDL⁺ allows us to formulate a hypothesis about the relation of endocytosis to signaling (Fig. 7 B). A high rate of internalization at the plasma membrane seems to be a prerequisite for signaling in either context tested, with two qualifications: (1) Even a moderate internalization rate (DI-LDL⁺) seems sufficient to promote *wg* expression but not lateral inhibition, which absolutely requires high rates. (2) For lateral inhibition to be properly executed, direct interaction/ubiquitylation by Neur is required in addition to high internalization rates. This requirement was inferred from the inability of Dli1 and DIΔC to fully rescue lateral inhibition and from the fact that *neur* loss of function does attenuate lateral inhibition but does not completely abolish it, as in the case of the *mib1 neur* double mutant (Pitsouli and Delidakis, 2005). This direct requirement for Neur may be caused by some subtle modulation of DI endocytosis or subsequent recycling, which cannot be recapitulated by Mib1. Higher resolution uptake and colocalization assays may reveal such subtle effects in the future. An additional very likely reason for the indispensability of Neur in lateral inhibition is the network of regulatory interactions in

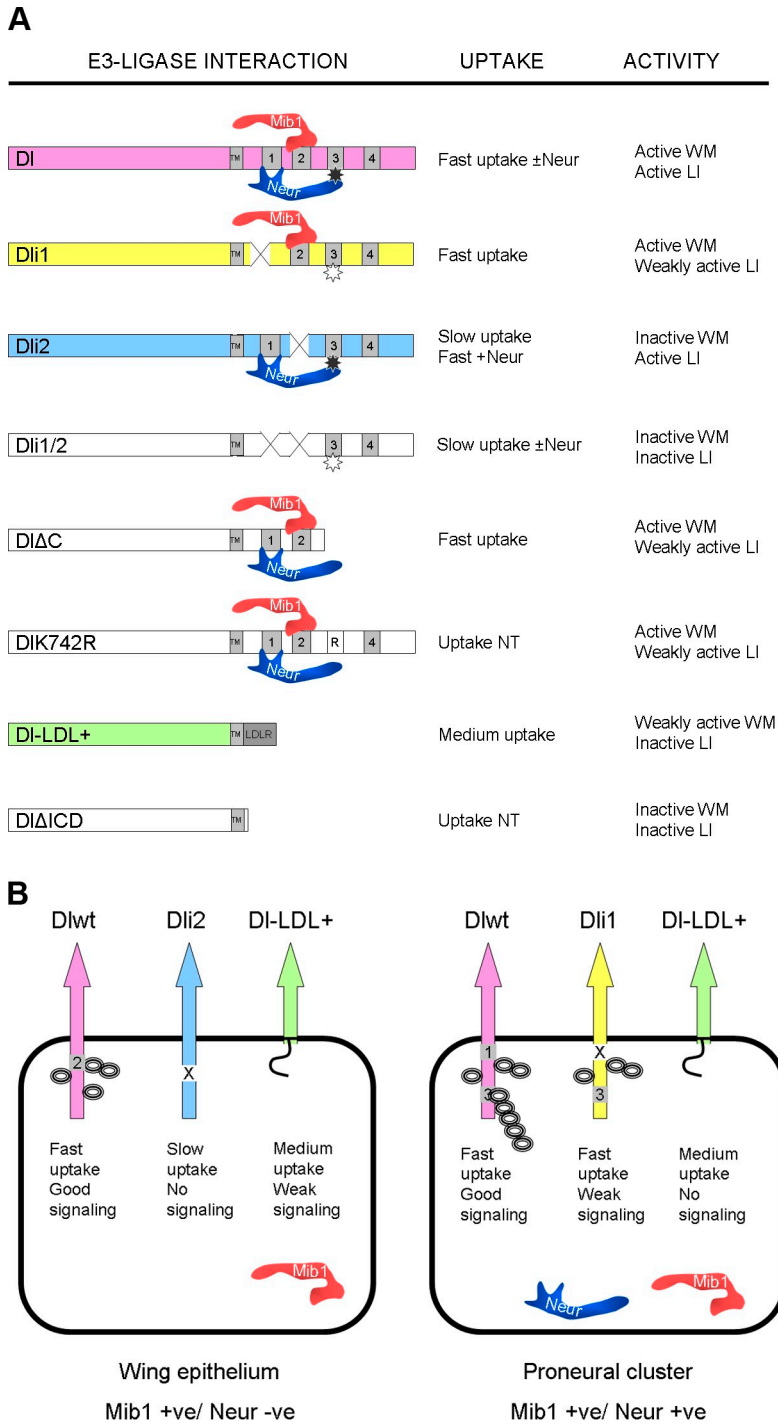


Figure 7. **DI activity depends on ubiquitylation.** (A) The different DI variants used are shown interacting with Neur or Mib1, depicted as touching at their respective docking site. The star in ICD3 represents K742; filled is ubiquitylated, and open is nonubiquitylated. WM, wing margin; LI, lateral inhibition; NT, not tested; TM, transmembrane domain; LDLR, LDL receptor. (B) Behavior of indicative DI variants in two different cell contexts. Ovals attached to the DI ICD represent Ub moieties. In the Mib1-only cell, they are arbitrarily depicted on three positions to indicate the lack of lysine preference. See Discussion for details. +ve, positive; -ve, negative.

which it participates. On one hand, Notch signaling probably represses *neur* expression, which attains the highest levels in the Notch refractory cell, the SOP (Huang et al., 1991). On the other, Notch signaling activates transcription of the *Bearded (Brd)* family of genes (Castro et al., 2005), which act to inhibit DI–Neur interaction (Bardin and Schweisguth, 2006; De Renzis et al., 2006; Fontana and Posakony, 2009) in the Notch receiving cells (non-SOPs). Neither transcription nor activity of Mib1 has in any way been shown to respond to Notch signaling, which may account for why Mib1 alone is unable to fully sustain lateral inhibition.

Divergence of intracellular motifs on DSL proteins

We have identified three conserved domains in insect DIs that seem to mediate E3 ligase recruitment and Ub ligation, explaining the necessity of the ICD for signaling. The other Notch ligand, Ser, has been previously shown to require an Asn-based motif for both Neur and Mib1 interactions. This motif is well conserved among insects (Glittenberg et al., 2006; Fontana and Posakony, 2009) and possesses features reminiscent of both DI ICD1 and ICD2. A QNEEN stretch is similar to the QNE_xN stretch in DI ICD1, and an NNL is similar to the NNI/V present

in most insects in DI ICD2. QNxxN stretches were recently shown to be direct interaction sites for Neur (Fontana and Posakony, 2009), in agreement with our data on the role of ICD1 as a Neur docking site. In fact, similar peptides are found in the Brd family of Neur inhibitors (Bardin and Schweisguth, 2006; Fontana and Posakony, 2009). This enables Brd-like proteins to outcompete DSL binding to Neur, thus decreasing signal emission. The NNL/I/V stretch of DSL proteins could be important for Mib1 docking, although this amino acid stretch is lost from the DIs of *B. mori* and *A. pisum*, which do maintain the rest of ICD2 (Fig. 1). Mutation of the Ser NNL peptide partially reduced its ability to induce *wg* in the wing, consistent with a role in Mib1-dependent signaling (Glittenberg et al., 2006). Although four lysine residues were found to be conserved among five insect Sers (unpublished data), none resided inside a motif reminiscent of DI ICD3. The absence of ICD3 together with the divergence in sequence and relative arrangement of E3 ligase docking sites raise the possibility that ubiquitylation of DIs versus Sers is subject to different fine tuning.

Unlike insects, vertebrates have multiple paralogues of DI and Ser (or Jagged). Comparing mouse (DII1 and 4), zebrafish (DIA, DID, and DII4), and *Xenopus laevis* DII1, we detected a conserved (L/I/V)KN(T/I)N motif, similar to the IKNTW stretch of insect DI ICD2, as well as a nearby NNL tripeptide (unpublished data). NNL stretches were also found in DII3 (mouse and *Xenopus*) and DIC (zebrafish) paralogues, which lack the (L/I/V)KN(T/I)N motif. Vertebrate Jaggeds contain a conserved NNxxxL motif (Glittenberg et al., 2006), closely followed by an IKNxIEK motif (ICD2-like) in Jagged1 (mouse, zebrafish, and *Xenopus*) but not in Jagged2 (unpublished data). It is tempting to speculate that these motifs may play an important role in vertebrate DSL–Mib1 interactions, which have been documented for all aforementioned DSL paralogues (Itoh et al., 2003; Koo et al., 2005a). However, no NExN conserved stretches or other motifs similar to ICD1 (e.g., QNxxN) or ICD3 could be discerned in several vertebrate DIs and Jaggeds, whereas the looser putatively Neur-binding motif NxxN exists in some vertebrate DSLs (Fontana and Posakony, 2009). Still, mouse DII1 was shown to respond to Neur by relocalizing from the basolateral to the apical side of polarized cultured cells via transcytosis (Benhra et al., 2010). Perhaps the molecular details of vertebrate Neur action may be different than those revealed here for *Drosophila* Neur.

The lack of conservation in Neur binding between insects and vertebrates is mirrored in a similar lack of conservation in function. Although vertebrate DSL proteins are putative substrates of Neur1 or 2, there is no substantiated role for either Neur paralogue in promoting Notch signaling (Song et al., 2006; Koo et al., 2007; Koutelou et al., 2008; Benhra et al., 2010). In fact, knockout of Mib1 seems to phenocopy all aspects of complete loss of Notch signaling in the mouse (Koo et al., 2007) but see also Koo et al. (2005b) and Zhang et al. (2007), suggesting that Mib1 proteins are the only E3 ligases that activate vertebrate DSLs. Neur1, on the other hand, may even act negatively on Notch signaling, as it can promote ubiquitylation-dependent degradation of Jagged1 accompanied by a decrease in signal emission (Koutelou et al., 2008).

It is therefore necessary to directly test for E3 ligase–DSL interactions that may mediate ubiquitylation of vertebrate DSLs to unravel the activation mechanism of vertebrate DSL–Notch signaling.

Materials and methods

Protein sequence comparison

DI orthologues were downloaded from the National Center for Biotechnology Information Entrez protein database. Their transmembrane domains were identified by the SMART (simple modular architecture research tool) algorithm, and their ICDs were aligned using the ClustalW2 algorithm.

Plasmids and transgenics

pIz-DI-V5-His is a plasmid expressing a C-terminally 6xHis-V5 epitope-tagged wt DI (Bland et al., 2003). It was used as a template for the generation of DI deletion mutants i1, i2, and i3. Two PCR products were generated on either side of the motif to be deleted. Primers for the generation of pIz-DI1-V5-His were reaction 1, 5'-ATGAGTCTACTCTGCGATGCC-3' (forward) and 5'-ATGGATCCCTTTTCCTGAGCACGCTTACG-3' (reverse), and reaction 2, 5'-ATGGATCCGCGGTGGCCACAATGC-3' (forward) and 5'-GGTACGCGTAGAATCGAGACCGAG-3' (reverse). Primers for the generation of pIz-DI2-V5-His were reaction 1, 5'-ATGAGTCTACTCTCTGCGATGCC-3' (forward) and 5'-ATGGATCCGATATTCGGGTGGCCGCC-3' (reverse), and reaction 2, 5'-ATGGATCCTGTGCCTCAGCAGCAGC-3' (forward) and 5'-GGTACGCGTAGAATCGAGACCGAG-3' (reverse). Primers for the generation of pIz-DI3-V5-His were reaction 1, 5'-ATGAGTCTACTCTCTGCGATGCC-3' (forward) and 5'-ATGGATCCTTGGCAGCTTGCTCTTTGTAG-3' (reverse), and reaction 2, 5'-ATGGATCCCCACGCTCATGCACCG-3' (forward) and 5'-GGTACGCGTAGAATCGAGACCGAG-3' (reverse). Primers for the generation of pIz-DI1/2-V5-His were 5'-ATGAGTCTGCGGTGGCCACAATGC-3' (forward) and 5'-GGTACGCGTAGAATCGAGACCGAG-3' (reverse). The two fragments were joined by an artificial BamHI site and then used to replace the wt DI coding sequence in pIz-DI-V5-His. In this way, each motif deleted is substituted by a Gly-Ser dipeptide. pIz-DI1/2-V5-His was constructed using the same strategy to delete ICD1 using pIz-DI2-V5-His (instead of wt DI) as a template. pIz-DIΔC-V5-His (Delwig, A., and M.D. Rand, personal communication) was provided by M.D. Rand (University of Vermont, Burlington, VT).

Each pUAST-DI-V5-His deletion mutant was generated by subcloning an EcoRI–DraI fragment containing the entire V5-His-tagged DI* coding sequence from pIz-DI*-V5-His into pUAST cut with EcoRI–XhoI (filled in). Transgenic flies were generated in a *yw*^{67c23} background.

To generate DI point mutants, site-directed mutagenesis was performed using a site-directed mutagenesis kit (QuikChange; Agilent Technologies) on the P{UASDelta.Nde.Myc} vector (Parks, A.L., personal communication). An EcoRI fragment encompassing the *DINdeMyc* open reading frame containing the mutation was restricted and ligated into the vector pExpUAS. A BglII–XbaI fragment from each construct (corresponding to amino acids 331–834) was then used to substitute the corresponding fragment of pIz-DI-V5-His. Ract-Xpress-Ub was constructed by ligating a NheI filled-in fragment from pCneo/Ub (Koutelou, E., and J. Conaway, personal communication) into the *Drosophila* RactHADh (Swevers et al., 1996) actin promoter vector cut with HincII.

Transient transfections, immunoprecipitation, and ubiquitylation assays

Transient transfections of S2 cells were performed with the calcium phosphate precipitation method. For immunoprecipitation experiments, pIz-DI-V5-His (Bland et al., 2003) or a deletion variant was cotransfected with pUAST-NeurΔR-GFP (Pavlopoulos et al., 2001) or UAS-HMmib1ΔR (Lai et al., 2005) and metallothionein promoter–Gal4 (inducible by 0.7 mM Cu²⁺). Transfected cell lysate was used for immunoprecipitation with rabbit anti-Neur antiserum or rabbit anti-Myc antibody and protein A Sepharose.

For ubiquitylation experiments, pIz-DI-V5-His (Bland et al., 2003) or a deletion variant was cotransfected with pUAST-EGFP-Neur (Pitsouli and Delidakis, 2005) or UAS-HMmib1 (Lai et al., 2005) and metallothionein promoter–Gal4. Ract-Xpress-Ub was included to express Xpress-tagged Ub. Transfected cells were treated with 100 μM E64 (cell-permeable lysosomal protease inhibitor; Rock et al., 1994) for 5 h before harvesting. Transfected cell lysate was used for pull-down with Ni-TED beads (Macherey-Nagel) under denaturing conditions (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 8 M urea, and 0.2% Triton X-100, pH 8, including 10 mM N-ethylmaleimide

and 1 mM PMSF). For the experiments shown in Fig. 3, an equivalent of $\sim 1.2 \times 10^6$ cells was loaded per lane. When 5×10^6 cells worth of extract was loaded, ubiquitylation signals became saturated, and background levels of DI ubiquitylation became detectable, caused by endogenous S2 cell E3 ligases. HMMib1 also bears a His tag but is apparently not significantly autoubiquitylated because we get no detectable Xpress signal when we coexpress it with Dli2 or Dli1/2. Western blots were developed using HRP-coupled secondary antibodies (Jackson Immuno-Research Laboratories, Inc.) and the SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate obtained from Thermo Fisher Scientific.

Drosophila strains

UAS lines used in this study were *UAS-DI-V5-His*, *UAS-EGFP-Neur* (Pitsouli and Delidakis, 2005), *UAS-Dli1-V5-His*, *UAS-Dli2-V5-His*, *UAS-Dli1/2-V5-His*, *UAS-DliC-V5-His*, *UAS-DH42R* (this study), *UAS-DHDL⁺*, and *UAS-DliACD* (Wang and Struhl, 2004). Driver lines used in this study were obtained as follows: *Equator (Eq)-Gal4* (Pi et al., 2001) was provided by H. Bellen (Baylor College of Medicine, Houston, TX). *ptc-Gal4* and *hsFlp; act>CD2stop>Gal4* were obtained from the Bloomington Drosophila Stock Center. With the latter driver, larvae were incubated at 37°C for 13 min to induce clones. The MARCM (mosaic analysis with a repressible cell marker) system (Lee and Luo, 2001) was used to generate positively marked clones as follows. To express our DI variants (DI*) in the absence of endogenous DI and Ser (Fig. 5), the following cross was used: *y w hsFLP122 tubGal4 UAS-GFP-6xnlx; FRT82B tubGal80/TM6B* crossed to *w; UAS-DI*; FRT82B D^{rev10} e Ser^{RX106}/T(2;3)SM5;TM6B*. To express our DI variants (DI*) in the absence of endogenous *mib1* (Fig. 4), the following cross was used: *y w hsFLP122 tubGal4 UAS-GFP-6xnlx; tubG80 FRT2A/TM6B* crossed to *w; UAS-DI*; mib^{EY780} FRT2A/T(2;3) SM5;TM6B*.

Antibodies, immunohistochemistry, and microscopy

For immunohistochemistry, dissected tissues were fixed for 20 min in 4% formaldehyde (Polysciences) in either 0.1 M Pipes, pH 6.9, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, or in PBS + 1 mM CaCl₂ (for the DCAD2 antibody). Antibody incubations were performed in PBS supplemented with 0.2% Triton X-100 and 0.5% BSA. Washes were performed in the same solution omitting BSA. In experiments analyzing cell surface DI (Fig. S2), Triton X-100 was omitted from all solutions. To allow antibody access to the apical cell surface, the disk peripodial membrane was disrupted by gentle pricking with a pulled-out tungsten needle. Tissues were mounted in 80% glycerol in PBS with 0.5% N-propyl-gallate as an antileach medium.

Antibodies used in this study were mouse anti-V5 (Invitrogen), mouse anti-Xpress (Invitrogen), mouse anti-Notch C458.2H (developed by S. Artavanis-Tsakonas [Harvard University, Boston, MA] and obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank), mouse anti-Wg 4D4 (obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank; Brook and Cohen, 1996), mouse anti-DI (extracellular epitope) C594.9B (developed by S. Artavanis-Tsakonas and obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank), rat anti-E-cadherin (DCAD2; obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank), rabbit anti-Neur (Pitsouli and Delidakis, 2005), rabbit anti-Myc epitope (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), rabbit anti-Sara (gift from M. González-Gaitán, University of Geneva, Geneva, Switzerland; Bökel et al., 2006), rat anti-Rab11 (gift from R. Cohen, University of Kansas, Lawrence, KS; Dollar et al., 2002), guinea pig anti-DI 581 (extracellular epitope; Huppert et al., 1997), guinea pig anti-Senseless (Nolo et al., 2000), and guinea pig anti-Hrs full length (gift from H. Bellen; Lloyd et al., 2002). The Developmental Studies Hybridoma Bank was developed under the auspices of the National Institute of Child Health and Human Development and maintained by the University of Iowa Department of Biology. Fluorescent (Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 561, and Alexa Fluor 633) secondary antibodies were obtained from Invitrogen.

Images were acquired on a confocal microscope (SP2; Leica) at the University of Crete using 20x/0.7 NA (dry), 40x/1.25 NA (oil), or 63x/1.4 NA (oil) Plan Apochromat objectives (at room temperature). They were processed with the manufacturer's software and assembled on Photoshop (Adobe), in which some contrast adjustment was performed.

For quantifying colocalization between DI and endosomal markers, we used the mouse anti-DI mAb together with an antibody against endosomal markers (rat anti-Rab11, rabbit anti-Sara, or guinea pig anti-Hrs). Images were acquired at the University of Crete confocal facility (SP2) at 63x with a 3x zoom using the xz (optical cross section) mode. A computer interface developed in Matlab (MathWorks, Inc.) was used to identify and count intracellular puncta positive for each of the two markers (DI vs. endocytic marker). The system provided an efficient methodology to facilitate image segmentation based on intensity thresholding (Tsididis and

Tavernarakis, 2007; Tsididis et al., 2011) and offered a rapid object extraction and overview. Objects were called if they consisted of at least four contiguous square pixels (0.1 μm^2) when pixel value was above a certain threshold. This depended on the quality of the staining and was (on an 8-bit scale) 38–77 for DI, 38–51 for Rab11, 28–77 for Sara, and 38–77 for Hrs. Coalesced puncta were resolved by manual intervention. In this analysis, we excluded the extreme apical and basal domains of the wing disk epithelium, in which high levels of a contiguous DI signal are seen. We may have therefore underestimated DI colocalization with Sara and Rab11, as the latter also accumulated highly at the apical regions of disk cells (which were not scorable), whereas Hrs had less apical bias. The statistical significance of colocalization differences between samples was computed using Fisher's exact test. It should be noted that the colocalizations measured by this assay reflect total DI ECD. This will include DI endocytosed as a full-length molecule or after ECD shedding (Delwig et al., 2006) and reuptake. Because of the inherently noisy nature of the endosomal marker antibodies, we could not consistently detect all marker-positive structures with the same confidence as we had for DI-positive structures. We therefore present (Table 1) only the percentage of colocalization based on the total DI-positive structures, which was more reproducible across samples. The percentage of colocalization based on the total marker-positive structures was more variable and unreliable.

Live-antibody uptake assay and image analysis

The live-antibody uptake assay was performed as previously described in Le Borgne and Schweisguth (2003). In brief, pupae 18–24 h after puparium formation were dissected in M3 tissue-culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum and incubated in the same medium in the presence of 1:15 diluted mouse anti-DI C594.9B supernatant, which recognizes the DI ECD. After 15 min at room temperature, the pupal carcasses were quickly washed in M3 medium and fixed. After fixation, they were permeabilized and incubated with additional primary antibodies, namely rat anti-E-cadherin and guinea pig anti-DI. As a control, we repeated the uptake assay with the live-tissue incubation at 4°C, in which endocytosis is blocked. Although we detected basolateral surface staining for the mouse anti-DI, no intracellular puncta were labeled (Fig. 6A). Also, no apical surface staining was observed, suggesting that apical access of the live antibody is blocked by the pupal cuticle; therefore, this assay measures basolateral uptake.

Nota were imaged at the University of Crete confocal facility (SP2) at 63x and a 3x zoom using the xz (optical cross section) mode. This ensured that the whole height of the epithelium was imaged under identical conditions for all samples. To quantitatively estimate uptake efficiency, we calculated the percentage of total (guinea pig positive) DI puncta that are also live uptake (mouse) positive. A total of ≥ 10 optical sections and ≥ 100 puncta were scored. Even though our optical sections were taken at 0.3- μm intervals, we scored every third image (0.9 μm apart) to avoid double scoring of large particles, which would appear in consecutive slices.

Online supplemental material

Fig. S1 presents the comparison of DI ICDs from several insect species. Fig. S2 shows representative controls on the ubiquitylation assays of Fig. 2. Fig. S3 shows that DI variants are exposed on the apical surface of the wing disk epithelium. Fig. S4 shows localization of DI variants relative to Sara, Hrs, and Rab11. Fig. S5 shows the expression pattern of the Eq-Gal4 driver used for the experiments of Fig. 6. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201105166/DC1>.

We are indebted to Matt Rand, Hugo Bellen, Joan Conaway, Lia Koutelou, Gary Struhl, Marcos Gonzalez-Gaitán, Bob Cohen, and Eric Lai for providing DNA constructs, fly strains, and antibodies. Special thanks go to Dan Finley and Maranthi Kiparaki for their invaluable help on establishing the ubiquitylation assay and to Nikos Giagtzoglou for his help on establishing the live uptake assay. We also thank Dina Lyka for help with statistical analysis of colocalization. Many thanks go to Savvas Christoforidis and George Diallinas for helpful discussions and also to Sarah Bray and Maura Strigini for their critical reading of the manuscript.

A. Daskalaki, K. Kux, and C. Delidakis were supported by the European Union Marie Curie Project No. 7295 and by intramural Institute of Molecular Biology and Biotechnology and University of Crete funds. Work by N.A. Shalaby and M.A.T. Muskavitch was supported by the Deluca Professorship from Boston College.

Submitted: 27 May 2011

Accepted: 7 November 2011

References

- Acconcia, F., S. Sigismund, and S. Polo. 2009. Ubiquitin in trafficking: the network at work. *Exp. Cell Res.* 315:1610–1618. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.10.014>
- Banks, S.M., B. Cho, S.H. Eun, J.H. Lee, S.L. Windler, X. Xie, D. Bilder, and J.A. Fischer. 2011. The functions of auxilin and Rab11 in *Drosophila* suggest that the fundamental role of ligand endocytosis in notch signaling cells is not recycling. *PLoS ONE*. 6:e18259. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0018259>
- Bardin, A.J., and F. Schweisguth. 2006. Bearded family members inhibit Neuralized-mediated endocytosis and signaling activity of Delta in *Drosophila*. *Dev. Cell*. 10:245–255. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2005.12.017>
- Barsi, J.C., R. Rajendra, J.I. Wu, and K. Artzt. 2005. Mind bomb1 is a ubiquitin ligase essential for mouse embryonic development and Notch signaling. *Mech. Dev.* 122:1106–1117. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mod.2005.06.005>
- Benhra, N., F. Vignaux, A. Dussert, F. Schweisguth, and R. Le Borgne. 2010. Neuralized promotes basal to apical transcytosis of delta in epithelial cells. *Mol. Biol. Cell*. 21:2078–2086. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E09-11-0926>
- Bland, C.E., P. Kimberly, and M.D. Rand. 2003. Notch-induced proteolysis and nuclear localization of the Delta ligand. *J. Biol. Chem.* 278:13607–13610. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C300016200>
- Bökel, C., A. Schwabedissen, E. Entchev, O. Renaud, and M. González-Gaitán. 2006. Sara endosomes and the maintenance of Dpp signaling levels across mitosis. *Science*. 314:1135–1139. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1132524>
- Bray, S. 1998. Notch signalling in *Drosophila*: three ways to use a pathway. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9:591–597. <http://dx.doi.org/10.1006/scdb.1998.0262>
- Brook, W.J., and S.M. Cohen. 1996. Antagonistic interactions between wingless and decapentaplegic responsible for dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* Leg. *Science*. 273:1373–1377. <http://dx.doi.org/10.1126/science.273.5280.1373>
- Castro, B., S. Barolo, A.M. Bailey, and J.W. Posakony. 2005. Lateral inhibition in proneural clusters: cis-regulatory logic and default repression by Suppressor of Hairless. *Development*. 132:3333–3344. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.01920>
- Chen, W., and D. Casey Corliss. 2004. Three modules of zebrafish Mind bomb work cooperatively to promote Delta ubiquitination and endocytosis. *Dev. Biol.* 267:361–373. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.11.010>
- Chen, W.J., J.L. Goldstein, and M.S. Brown. 1990. NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* 265:3116–3123.
- Chitnis, A., D. Henrique, J. Lewis, D. Ish-Horowicz, and C. Kintner. 1995. Primary neurogenesis in *Xenopus* embryos regulated by a homologue of the *Drosophila* neurogenic gene Delta. *Nature*. 375:761–766. <http://dx.doi.org/10.1038/375761a0>
- Clague, M.J., and S. Urbé. 2010. Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. *Cell*. 143:682–685. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.012>
- Coumailleau, F., M. Fürthauer, J.A. Knoblich, and M. González-Gaitán. 2009. Directional Delta and Notch trafficking in Sara endosomes during asymmetric cell division. *Nature*. 458:1051–1055. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07854>
- Deblandre, G.A., E.C. Lai, and C. Kintner. 2001. *Xenopus* neuralized is a ubiquitin ligase that interacts with XDelta1 and regulates Notch signaling. *Dev. Cell*. 1:795–806. [http://dx.doi.org/10.1016/S1534-5807\(01\)00091-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1534-5807(01)00091-0)
- de Celis, J.F., and S. Bray. 1997. Feed-back mechanisms affecting Notch activation at the dorsoventral boundary in the *Drosophila* wing. *Development*. 124:3241–3251.
- de Celis, J.F., A. Garcia-Bellido, and S.J. Bray. 1996. Activation and function of Notch at the dorsal-ventral boundary of the wing imaginal disc. *Development*. 122:359–369.
- Delwig, A., C. Bland, M. Beem-Miller, P. Kimberly, and M.D. Rand. 2006. Endocytosis-independent mechanisms of Delta ligand proteolysis. *Exp. Cell Res.* 312:1345–1360. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.12.037>
- De Renzis, S., J. Yu, R. Zinzen, and E. Wieschaus. 2006. Dorsal-ventral pattern of Delta trafficking is established by a Snail-Tom-Neuralized pathway. *Dev. Cell*. 10:257–264. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2006.01.011>
- Deshaies, R.J., and C.A. Joazeiro. 2009. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Biochem.* 78:399–434. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.101807.093809>
- Doherty, D., G. Feger, S. Younger-Shepherd, L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 1996. Delta is a ventral to dorsal signal complementary to Serrate, another Notch ligand, in *Drosophila* wing formation. *Genes Dev.* 10:421–434. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.10.4.421>
- Dollar, G., E. Struckhoff, J. Michaud, and R.S. Cohen. 2002. Rab11 polarization of the *Drosophila* oocyte: a novel link between membrane trafficking, microtubule organization, and oskar mRNA localization and translation. *Development*. 129:517–526.
- Emery, G., A. Hutterer, D. Berdnik, B. Mayer, F. Wirtz-Peitz, M.G. Gaitan, and J.A. Knoblich. 2005. Asymmetric Rab 11 endosomes regulate delta recycling and specify cell fate in the *Drosophila* nervous system. *Cell*. 122:763–773. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.017>
- Eun, S.H., S.M. Banks, and J.A. Fischer. 2008. Auxilin is essential for Delta signaling. *Development*. 135:1089–1095. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.009530>
- Fontana, J.R., and J.W. Posakony. 2009. Both inhibition and activation of Notch signaling rely on a conserved Neuralized-binding motif in Bearded proteins and the Notch ligand Delta. *Dev. Biol.* 333:373–385. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.06.039>
- Glittenberg, M., C. Pitsouli, C. Garvey, C. Delidakis, and S. Bray. 2006. Role of conserved intracellular motifs in Serrate signalling, cis-inhibition and endocytosis. *EMBO J.* 25:4697–4706. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601337>
- Gordon, W.R., K.L. Arnett, and S.C. Blacklow. 2008. The molecular logic of Notch signaling—a structural and biochemical perspective. *J. Cell Sci.* 121:3109–3119. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.035683>
- Heuss, S.F., D. Ndiaye-Lobry, E.M. Six, A. Israël, and F. Loegeat. 2008. The intracellular region of Notch ligands Dll1 and Dll3 regulates their trafficking and signaling activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105:11212–11217. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0800695105>
- Huang, F., C. Dambly-Chaudière, and A. Ghysen. 1991. The emergence of sense organs in the wing disc of *Drosophila*. *Development*. 111:1087–1095.
- Hukriede, N.A., Y. Gu, and R.J. Fleming. 1997. A dominant-negative form of Serrate acts as a general antagonist of Notch activation. *Development*. 124:3427–3437.
- Huppert, S.S., T.L. Jacobsen, and M.A. Muskavitch. 1997. Feedback regulation is central to Delta-Notch signalling required for *Drosophila* wing vein morphogenesis. *Development*. 124:3283–3291.
- Irvine, K.D., and T.F. Vogt. 1997. Dorsal-ventral signaling in limb development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:867–876. [http://dx.doi.org/10.1016/S0955-0674\(97\)80090-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0955-0674(97)80090-7)
- Itoh, M., C.H. Kim, G. Palardy, T. Oda, Y.J. Jiang, D. Maust, S.Y. Yeo, K. Lorick, G.J. Wright, L. Ariza-McNaughton, et al. 2003. Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Dev. Cell*. 4:67–82. [http://dx.doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00409-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00409-4)
- Jafar-Nejad, H., H.K. Andrews, M. Acar, V. Bayat, F. Wirtz-Peitz, S.Q. Mehta, J.A. Knoblich, and H.J. Bellen. 2005. Sec15, a component of the exocyst, promotes notch signaling during the asymmetric division of *Drosophila* sensory organ precursors. *Dev. Cell*. 9:351–363. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2005.06.010>
- Jékely, G., and P. Rørth. 2003. Hrs mediates downregulation of multiple signalling receptors in *Drosophila*. *EMBO Rep.* 4:1163–1168. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.embor.7400019>
- Kandachar, V., T. Bai, and H.C. Chang. 2008. The clathrin-binding motif and the J-domain of *Drosophila* Auxilin are essential for facilitating Notch ligand endocytosis. *BMC Dev. Biol.* 8:50. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-213X-8-50>
- Klein, T., K. Brennan, and A.M. Arias. 1997. An intrinsic dominant negative activity of serrate that is modulated during wing development in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 189:123–134. <http://dx.doi.org/10.1006/dbio.1997.8564>
- Koo, B.K., H.S. Lim, R. Song, M.J. Yoon, K.J. Yoon, J.S. Moon, Y.W. Kim, M.C. Kwon, K.W. Yoo, M.P. Kong, et al. 2005a. Mind bomb 1 is essential for generating functional Notch ligands to activate Notch. *Development*. 132:3459–3470. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.01922>
- Koo, B.K., K.J. Yoon, K.W. Yoo, H.S. Lim, R. Song, J.H. So, C.H. Kim, and Y.Y. Kong. 2005b. Mind bomb-2 is an E3 ligase for Notch ligand. *J. Biol. Chem.* 280:22335–22342. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M501631200>
- Koo, B.K., M.J. Yoon, K.J. Yoon, S.K. Im, Y.Y. Kim, C.H. Kim, P.G. Suh, Y.N. Jan, and Y.Y. Kong. 2007. An obligatory role of mind bomb-1 in notch signaling of mammalian development. *PLoS ONE*. 2:e1221. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0001221>
- Kopan, R., and M.X. Ilagan. 2009. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*. 137:216–233. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.045>
- Koutelou, E., S. Sato, C. Tomomori-Sato, L. Florens, S.K. Swanson, M.P. Washburn, M. Kokkinaki, R.C. Conaway, J.W. Conaway, and N.K. Moschonas. 2008. Neuralized-like 1 (Neurl1) targeted to the plasma membrane by N-myristoylation regulates the Notch ligand Jagged1. *J. Biol. Chem.* 283:3846–3853. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M706974200>
- Lai, E.C., G.A. Deblandre, C. Kintner, and G.M. Rubin. 2001. *Drosophila* neuralized is a ubiquitin ligase that promotes the internalization and degradation of delta. *Dev. Cell*. 1:783–794. [http://dx.doi.org/10.1016/S1534-5807\(01\)00092-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1534-5807(01)00092-2)

- Lai, E.C., F. Roegiers, X. Qin, Y.N. Jan, and G.M. Rubin. 2005. The ubiquitin ligase *Drosophila* Mind bomb promotes Notch signaling by regulating the localization and activity of Serrate and Delta. *Development*. 132:2319–2332. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.01825>
- Le Borgne, R. 2006. Regulation of Notch signalling by endocytosis and endosomal sorting. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18:213–222. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2006.02.011>
- Le Borgne, R., and F. Schweisguth. 2003. Unequal segregation of Neuralized biases Notch activation during asymmetric cell division. *Dev. Cell*. 5: 139–148. [http://dx.doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00187-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00187-4)
- Le Borgne, R., S. Remaud, S. Hamel, and F. Schweisguth. 2005. Two distinct E3 ubiquitin ligases have complementary functions in the regulation of delta and serrate signaling in *Drosophila*. *PLoS Biol.* 3:e96. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0030096>
- Lee, T., and L. Luo. 2001. Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development. *Trends Neurosci.* 24:251–254. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01791-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01791-4)
- Lloyd, T.E., R. Atkinson, M.N. Wu, Y. Zhou, G. Pennetta, and H.J. Bellen. 2002. Hrs regulates endosome membrane invagination and tyrosine kinase receptor signaling in *Drosophila*. *Cell*. 108:261–269. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00611-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00611-6)
- Micchelli, C.A., E.J. Rulifson, and S.S. Blair. 1997. The function and regulation of *cut* expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate. *Development*. 124: 1485–1495.
- Miller, A.C., E.L. Lyons, and T.G. Herman. 2009. cis-Inhibition of Notch by endogenous Delta biases the outcome of lateral inhibition. *Curr. Biol.* 19:1378–1383. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.042>
- Neumann, C.J., and S.M. Cohen. 1996. A hierarchy of cross-regulation involving *Notch*, *wingless*, *vestigial* and *cut* organizes the dorsal/ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development*. 122:3477–3485.
- Nichols, J.T., A. Miyamoto, S.L. Olsen, B. D'Souza, C. Yao, and G. Weinmaster. 2007. DSL ligand endocytosis physically dissociates Notch1 heterodimers before activating proteolysis can occur. *J. Cell Biol.* 176:445–458. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200609014>
- Nolo, R., L.A. Abbott, and H.J. Bellen. 2000. Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in *Drosophila*. *Cell*. 102:349–362. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00040-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00040-4)
- Overstreet, E., E. Fitch, and J.A. Fischer. 2004. Fat facets and Liquid facets promote Delta endocytosis and Delta signaling in the signaling cells. *Development*. 131:5355–5366. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.01434>
- Parks, A.L., K.M. Klueg, J.R. Stout, and M.A. Muskavitch. 2000. Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development*. 127:1373–1385.
- Pavlopoulos, E., C. Pitsouli, K.M. Klueg, M.A. Muskavitch, N.K. Moschonas, and C. Delidakis. 2001. *neuralized* encodes a peripheral membrane protein involved in delta signaling and endocytosis. *Dev. Cell*. 1:807–816. [http://dx.doi.org/10.1016/S1534-5807\(01\)00093-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1534-5807(01)00093-4)
- Pi, H., H.J. Wu, and C.T. Chien. 2001. A dual function of phyllopod in *Drosophila* external sensory organ development: cell fate specification of sensory organ precursor and its progeny. *Development*. 128:2699–2710.
- Pitsouli, C., and C. Delidakis. 2005. The interplay between DSL proteins and ubiquitin ligases in Notch signaling. *Development*. 132:4041–4050. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.01979>
- Rajan, A., A.C. Tien, C.M. Haueter, K.L. Schulze, and H.J. Bellen. 2009. The Arp2/3 complex and WASp are required for apical trafficking of Delta into microvilli during cell fate specification of sensory organ precursors. *Nat. Cell Biol.* 11:815–824. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1888>
- Rock, K.L., C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang, and A.L. Goldberg. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*. 78:761–771. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(94\)90462-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(94)90462-6)
- Seugnet, L., P. Simpson, and M. Haenlin. 1997. Requirement for dynamin during Notch signaling in *Drosophila* neurogenesis. *Dev. Biol.* 192:585–598. <http://dx.doi.org/10.1006/dbio.1997.8723>
- Skwarek, L.C., M.K. Garroni, C. Commisso, and G.L. Boulianne. 2007. Neuralized contains a phosphoinositide-binding motif required downstream of ubiquitination for delta endocytosis and notch signaling. *Dev. Cell*. 13:783–795. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2007.10.020>
- Song, R., B.K. Koo, K.J. Yoon, M.J. Yoon, K.W. Yoo, H.T. Kim, H.J. Oh, Y.Y. Kim, J.K. Han, C.H. Kim, and Y.Y. Kong. 2006. Neuralized-2 regulates a Notch ligand in cooperation with Mind bomb-1. *J. Biol. Chem.* 281:36391–36400. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M606601200>
- Sprinzak, D., A. Lakhanpal, L. Lebon, L.A. Santat, M.E. Fontes, G.A. Anderson, J. Garcia-Ojalvo, and M.B. Elowitz. 2010. Cis-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states. *Nature*. 465:86–90. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08959>
- Sun, X., and S. Artavanis-Tsakonas. 1997. Secreted forms of DELTA and SERRATE define antagonists of Notch signaling in *Drosophila*. *Development*. 124:3439–3448.
- Swevers, L., L. Cherbas, P. Cherbas, and K. Iatrou. 1996. Bombyx EcR (BmEcR) and Bombyx USP (BmCF1) combine to form a functional ecdysone receptor. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26:217–221. [http://dx.doi.org/10.1016/0965-1748\(95\)00097-6](http://dx.doi.org/10.1016/0965-1748(95)00097-6)
- Tsibidis, G.D., and N. Tavernarakis. 2007. Nemo: a computational tool for analyzing nematode locomotion. *BMC Neurosci.* 8:86. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2202-8-86>
- Tsibidis, G.D., N.J. Burroughs, W. Gaze, and E.M.H. Wellington. 2011. Semi-automated *Acanthamoeba polyphaga* detection and computation of *Salmonella typhimurium* concentration in spatio-temporal images. *Micron*. 42:911–920. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2011.06.010>
- Wang, W., and G. Struhl. 2004. *Drosophila* Epsin mediates a select endocytic pathway that DSL ligands must enter to activate Notch. *Development*. 131:5367–5380. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.01413>
- Wang, W., and G. Struhl. 2005. Distinct roles for Mind bomb, Neuralized and Epsin in mediating DSL endocytosis and signaling in *Drosophila*. *Development*. 132:2883–2894. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.01860>
- Weinmaster, G., and J.A. Fischer. 2011. Notch ligand ubiquitylation: what is it good for? *Dev. Cell*. 21:134–144. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.006>
- Yeh, E., M. Dermer, C. Commisso, L. Zhou, C.J. McGlade, and G.L. Boulianne. 2001. Neuralized functions as an E3 ubiquitin ligase during *Drosophila* development. *Curr. Biol.* 11:1675–1679. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00527-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00527-9)
- Zhang, C., Q. Li, C.H. Lim, X. Qiu, and Y.J. Jiang. 2007. The characterization of zebrafish antimorphic mib alleles reveals that Mib and Mind bomb-2 (Mib2) function redundantly. *Dev. Biol.* 305:14–27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.01.034>

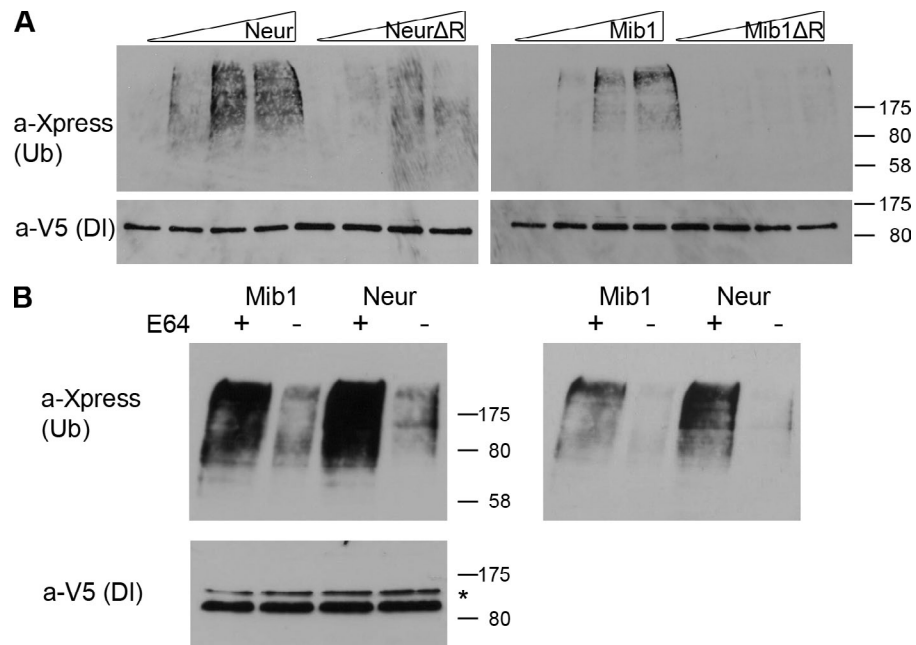


Figure S2. **Factors affecting detection of DI ubiquitylation.** (A) DI was coexpressed in S2 cells with Xpress-Ub and increasing amounts of wt E3 ligases or their corresponding RING-deleted versions, which are catalytically inactive. After Ni^{2+} pull-down to isolate His-tagged DI from the lysate, duplicate blots were probed with anti-Xpress to detect Ub and anti-V5 to detect total DI. The first of each group of four samples contained no E3 ligase. Ubiquitylation is much stronger with the catalytically active E3 ligases. Residual above background ubiquitylation by the Δ RING variants may be caused by recruitment of endogenous unidentified E3 ligases, suggestive of participation of Neur and Mib1 in enzymatically active complexes. (B) S2 cell assays using wt DI coexpressed with each of the two E3 ligases. Plus and minus refer to addition or absence of lysosomal protease inhibitor E64 to the cells before lysis. Omission of the E64 treatment significantly suppresses the accumulation of ubiquitylated species, suggesting that E64 inhibits their turnover. A lighter exposure is shown in the right, indicating that addition of E64 does not qualitatively alter the banding pattern, despite the major quantitative effect. MM markers are shown in kilodaltons. The asterisk points to a spurious cross-reacting band.

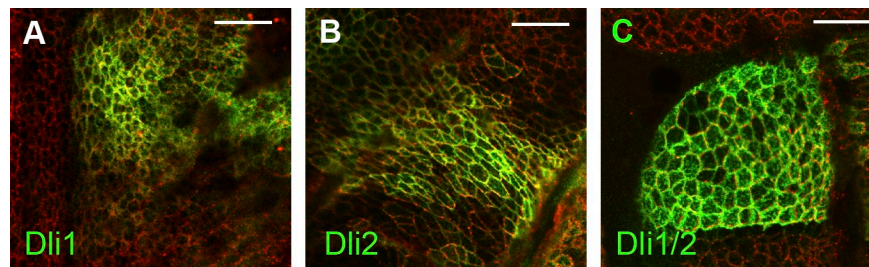


Figure S3. **DI variants are exposed on the apical surface of the wing disk epithelium.** (A–C) UAS-DI variants were expressed by *ptc-Gal4* and detected by an antibody against the DI ECD (green). Simultaneously, the Notch ECD was detected in red. Antibody incubations were performed without detergent, and the apical disk surface was accessible only after local injury of the overlying peripodial membrane. Images are from the apical surface. Bars, 15 μm .

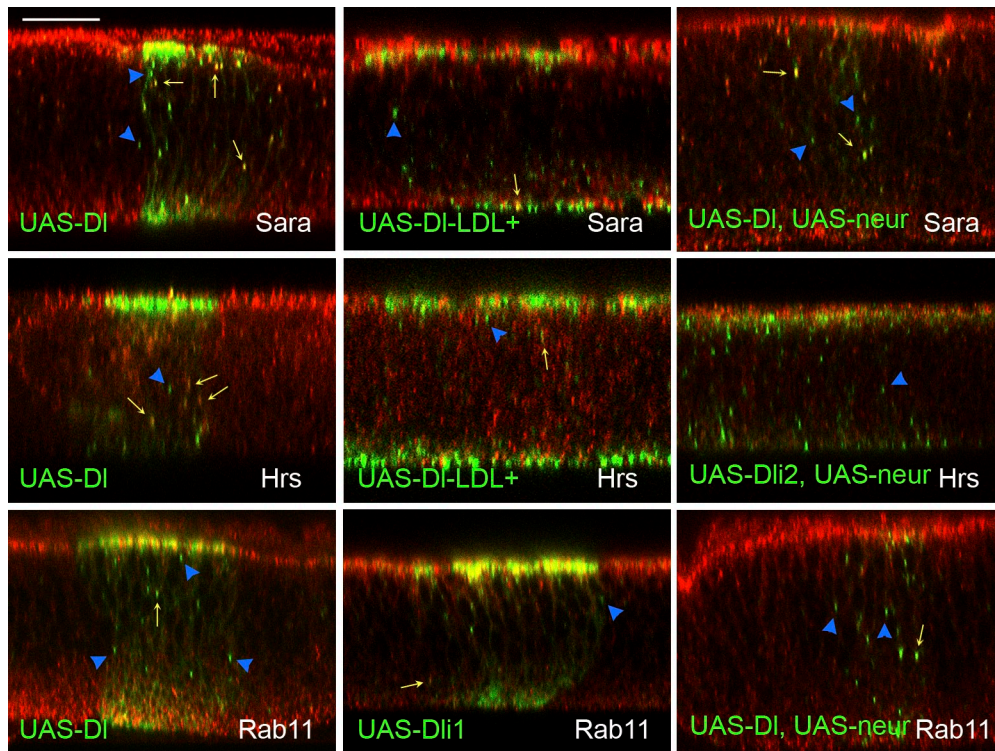


Figure S4. **Localization of DI variants relative to Sara, Hrs, and Rab11.** Representative optical cross sections of *ptc-Gal4; UAS-DI* (variant as indicated) wing imaginal disks are shown stained with anti-DI and the respective endosome marker (red). Endogenous DI is expressed at lower levels and is not detected at the level of illumination used. Apical is up. Yellow arrows point to examples of DI puncta that are positive for the endosomal marker. Blue arrowheads point to examples of DI puncta that are negative for the endosomal marker. For the quantification shown in Table 1, only discrete intracellular DI puncta were scored. The apical and basal extremities were excluded because of the high signal accumulation for DI and for some of the endocytic markers (Sara and Rab11). Bar, 15 μ m.

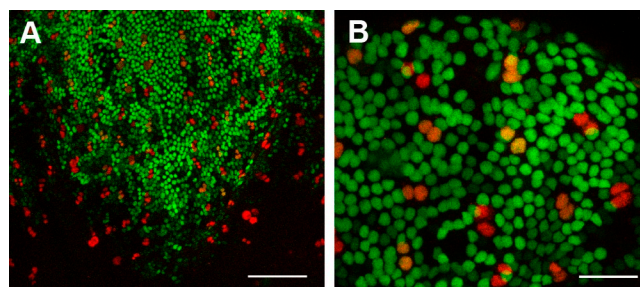


Figure S5. **Expression pattern of the Eq-Gal4 driver.** (A and B) Expression of *Eq-Gal4* in 18–24-h pupal notum was revealed by crossing to *UAS-GFPnls* (green). Anti-Cut (red) reveals the nuclei of developing sensory organs, which also express *neur* (not depicted). A is an almost entire notum, whereas B is a detail from a different notum. Note that the Eeq-positive nuclei greatly outnumber the Cut/Eq double-positive ones. Bars: (A) 75 μ m; (B) 24 μ m.