

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ**

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**«Μελέτη της επίδρασης του νευρογόνου γονιδίου *neuralized* της *D.melanogaster* στον
μηχανισμό διακυτταρικής σηματοδότησης Notch»**

Επιβλέπων Καθηγητής: Χ. Δελιδάκης

Δεύτερος εξεταστής: Χ.Σαββάκης

ΧΡΥΣΟΥΛΑ ΠΙΤΣΟΥΛΗ
ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2000

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....σελ. 4	
Εισαγωγή.....σελ. 5-23	
Το μονοπάτι μετάδοσης σήματος Notch στη Δροσόφιλα.....σελ. 5-15	
Ο υποδοχέας Notch.....σελ. 7	
Οι δεσμευτές Delta και Serrate.....σελ. 8	
Τροποποιητές.....σελ. 8	
Άλλο ένα επίπεδο ρύθμισης του μονοπατιού: Πρωτεόλυση του υποδοχέα Notch και του δεσμευτή Delta.....σελ. 9	
Μηχανισμοί και πεδία δράσης του μονοπατιού Notch.....σελ. 10	
Κυτταρικός πολλαπλασιασμός και Notch.....σελ. 14	
Το γονίδιο <i>neuralized</i>σελ. 16	
Η δομή της πρωτεΐνης.....σελ. 17	
Ποια είναι η πιθανή λειτουργία του γονιδίου <i>neuralized</i> ; Πως συσχετίζεται με το μονοπάτι μετάδοσης σήματος Notch;.....σελ. 19	
Η ουβικουΐτινη.....σελ. 21	
Δάκτυλος Zn-Ring και ουβικουΐτινη.....σελ. 22	
Σκοπός.....σελ. 23	
Υλικά και Μέθοδοι.....σελ. 24-31	
Επιλογή σταδίου εμβρύων, προνυμφών και νυμφών <i>D.melanogaster</i>σελ. 24	
Εκχύλιση πρωτεϊνών από έμβρυα και προνύμφες <i>D.melanogaster</i>σελ. 24	
Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα.....σελ. 24	
Ανάλυση Western.....σελ. 25	
Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις.....σελ. 25	
Χρώσεις ανίχνευσης δραστηριότητας β-γαλακτοσιδάσης.....σελ. 27	
Δημιουργία, εντοπισμός και μελέτη μιτωτικών κλώνων.....σελ. 28	
Κλώνοι εκτοπικής έκφρασης του γονιδίου <i>neuralized</i>σελ. 28	
Κλώνοι απώλειας λειτουργίας του γονιδίου <i>neuralized</i>σελ. 28	
Αντισώματα.....σελ. 29	
Μικροσκοπία-Φωτογράφιση.....σελ. 31	
Συνεστιακό μικροσκόπιο.....σελ. 31	
Αποτελέσματα.....σελ. 32-58	
Βιοχημική μελέτη της δράσης του γονιδίου <i>neuralized</i>σελ. 32-38	

Οι ισομορφές της πρωτεΐνης Delta κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης της Δροσόφιλας και η επίδραση του <i>neuralized</i>σελ. 32	σελ. 32
Η έκφραση της πρωτεΐνης Notch σε διαφορετικού γονοτύπου νευρογόνα έμβρυα.....σελ. 36	σελ. 36
Η έκφραση της πρωτεΐνης Delta σε προνύμφες 3ου σταδίου <i>D.melanogaster</i>σελ. 38	σελ. 38
Κυτταρική μελέτη της δράσης του γονιδίου <i>neuralized</i>σελ. 40-47	σελ. 40-47
Αλλαγή της κυτταρικής τοποθέτησης της πρωτεΐνης Delta ως αποτέλεσμα της εκτοπικής έκφρασης του γονιδίου <i>neuralized</i>σελ. 42	σελ. 42
Έλεγχος της μεταγραφής του <i>Delta</i> σε αναπτυξιακούς δίσκους προνύμφης όπου εκφράζεται εκτοπικά <i>Delta</i> και <i>neuralized</i>σελ. 47	σελ. 47
Μιτωτικοί κλώνοι εκτοπικής έκφρασης του γονιδίου <i>neuralized</i>σελ. 50	σελ. 50
Έκφραση γονιδίων-στόχων του μονοπατιού Notch σε εκτοπική έκφραση <i>neuralized</i>σελ. 53-56	σελ. 53-56
Το γονίδιο <i>cut</i>σελ. 53	σελ. 53
Το γονιδιακό σύμπλοκο <i>E(spl)</i>σελ. 55	σελ. 55
Κλώνοι απώλειας λειτουργίας του γονιδίου <i>neuralized</i>σελ. 57	σελ. 57

Συμπεράσματα-Συζήτηση.....σελ. 59-63

Βιβλιογραφία.....σελ. 64-69

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα νευρογόνα γονίδια, όπως αυτά που κωδικοποιούν τον υποδοχέα Notch και τον δεσμευτή Delta, παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην διακυτταρική σηματοδότηση που καθορίζει την επιδερμική έναντι της νευρικής τύχης κατά την ανάπτυξη της *D. melanogaster*. Το γονίδιο *neuralized*, ένα επιπλέον μέλος της οικογένειας των νευρογόνων γονιδίων, κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 754 αμινοξέων, της οποίας ο ρόλος δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός χιμαιρικών πρωτεϊνών του *Neuralized* με GFP ή myc στην κυτταρική μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα και όχι στον πυρήνα, όπως αρχικά πιστευότο, σε συνδυασμό με την παρουσία ενός μοτίβου RING στο μόριο, που ίσως σχετίζεται με ουβικουϊτινυλίωση, υποδεικνύουν ότι η εν λόγω πρωτεΐνη λειτουργεί σε κάποιο ρυθμιστικό στάδιο στο μονοπάτι.

Βιοχημικές και ιστολογικές μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση του *neuralized* σε βασικούς παράγοντες του σηματοδοτικού μονοπατιού, όπως ο υποδοχέας Notch και ο δεσμευτής του Delta. Ανάλυση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Western δείχνει ότι τα επίπεδα των πρωτεϊνών Delta και Notch αυξάνονται σε μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας του γονιδίου *neuralized* σε έμβρυα, ενώ σε εκτοπική έκφραση του γονιδίου (με τα σύστημα UAS-Gal4) σε προνύμφες 3ου σταδίου, τα επίπεδα της πρωτεΐνης Delta ελαττώνονται. Επιπλέον, παρουσία *neuralized*, παρατηρείται αλλαγή της κυτταρικής τοποθέτησης της πρωτεΐνης Delta και μεταφορά από την κυτταρική μεμβράνη σε κυστίδια αγνώστου ταυτότητας. Επίσης, παρουσία *neuralized*, παρατηρείται αυξημένη σηματοδότηση μέσω Delta (σε πειράματα εκτοπικής συνέκφρασης *Delta* και *neuralized*), η οποία σχετίζεται με αυξημένη έκφραση κάτωθεν γονιδίων-στόχων του μονοπατιού, όπως το *cut* και το γονιδιακό σύμπλοκο *E(spl)*. Συνεπώς, προτείνουμε ότι το *neuralized* επηρεάζει το *Delta* ή το *Notch* μετα-μεταγραφικά και οδηγεί σε ενίσχυση της σηματοδότησης.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

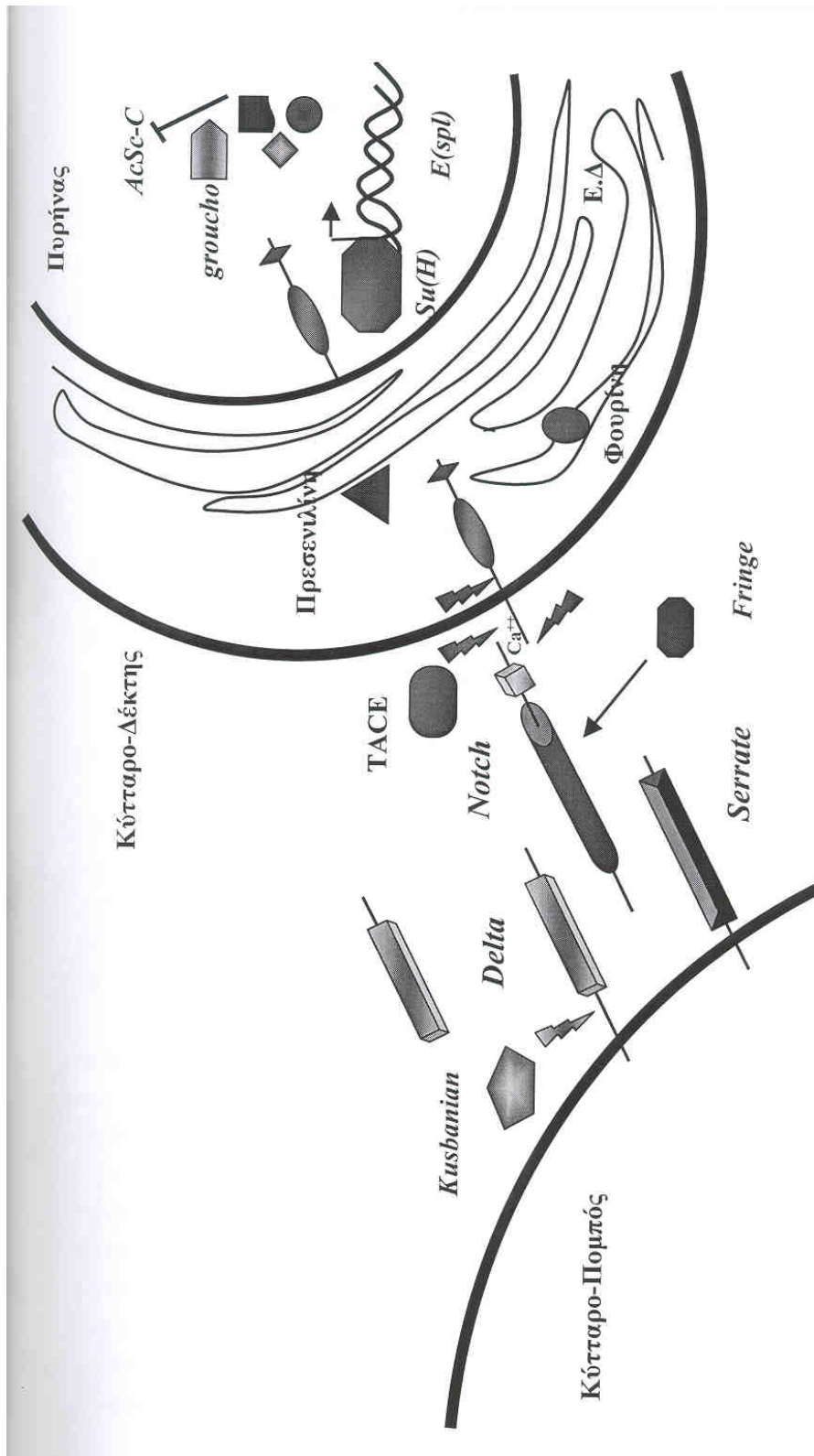
Η "κατασκευή" ενός πολυκύτταρου οργανισμού με χαρακτηριστικό σχήμα και μέγεθος από ένα κύτταρο, είναι το αποτέλεσμα της συντονισμένης δράσης γονιδίων, η οποία οδηγεί στον καθορισμό της αναπτυξιακής τύχης μοναδικών κυττάρων. Η "ενορχήστρωση" κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μετανάστευσης, αύξησης, διαφοροποίησης και θανάτου που επιτελείται με μεγάλη ακρίβεια, δημιουργεί ένα αρμονικό τελικό αποτέλεσμα. Εσωτερικοί, κυτταρικά αυτόνομοι παράγοντες, καθώς επίσης και μη αυτόνομοι, μικρού ή μεγάλου βεληνεκούς σήματα, κατευθύνουν τα κύτταρα προς συγκεκριμένα αναπτυξιακά μονοπάτια. Συχνά, ένας οργανισμός χρησιμοποιεί το ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι μέσα σε διαφορετικά κυτταρικά περιεχόμενα για να επιτύχει μοναδικούς αναπτυξιακούς στόχους. Ο τρόπος με τον οποίο εσωτερικά και εξωτερικά σήματα ενσωματώνονται κατά την οντογένεση του οργανισμού για να καθορίσουν κυτταρικές τύχες αποτελεί βασικό ερώτημα της αναπτυξιακής βιολογίας.

ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ NOTCH ΣΤΗ ΔΡΟΣΟΦΙΛΑ

Η σηματοδότηση μέσω Notch είναι ένας συντηρημένος εξελικτικά μηχανισμός, ο οποίος χρησιμοποιείται από τα μετόζωα για να ρυθμίζει κυτταρικές τύχες μέσω διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων. Σήματα που μεταδίδονται μέσω του υποδοχέα Notch, σε συνδυασμό και με άλλους κυτταρικούς παράγοντες, επηρεάζουν την διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση σε ποικίλα αναπτυξιακά στάδια και σε οργανισμούς από τον αχινό μέχρι τον άνθρωπο (Artavanis et al, 1999).

Στην εικόνα 1.1 φαίνεται ένα γενικό σχήμα του μονοπατιού μετάδοσης σήματος μέσω του υποδοχέα Notch στην *D. melanogaster*, που ισχύει στην περίπτωση της πλευρικής αναστολής.

Συγκεκριμένα, εξωκυττάρια περιοχές του Notch (υποδοχέας) και των δεσμευτών του, *Delta* ή *Serrate*, αλληλεπιδρούν και επιτυγχάνεται ενεργοποίηση του υποδοχέα. Ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης, το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα μεταναστεύει στον πυρήνα (Lieber et al, 1993), όπου βρίσκεται ο μεταγραφικός παράγοντας *Suppressor of Hairless* [*Su(H)*], ο οποίος τελικά προσδένεται σε ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων-στόχων του μονοπατιού, όπως π.χ. του συμπλόκου *Enhancer of split* [*E(spl)*], τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που προσδένονται στο DNA με χαρακτηριστικό μοτίβο βασικής Έλικας-Θηλειάς-Έλικας (basic Helix-Loop-Helix: bHLH). Οι πρωτεΐνες αυτές δρουν ως



Εικόνα 1.1: Το μονοπάτι μετάδοσης σήματος *Notch* και οι ρυθμιστές του.

καταστολείς και μαζί με το *groucho* (συγκαταστολέας) καταστέλλουν την έκφραση και δράση των προνευρικών γονιδίων του συμπλόκου *Achaete-Scute (AS-C)* και κατ' επέκταση την νευρική τύχη του κυττάρου (Artavanis et al, 1995, Heitzler et al, 1996, Kopan and Turner, 1996).

Στην *Drosophila melanogaster* υπάρχει ένα μόριο υποδοχέα Notch (N) και δύο διαφορετικοί δεσμευτές, οι πρωτεΐνες Delta (Dl) και Serrate (Ser).

O Υποδοχέας Notch

Το γονίδιο *Notch* της *D.melanogaster* ανακαλύφθηκε το 1916 από τον Morgan, αλλά η μοριακή του ανάλυση έγινε την δεκαετία του 1980 (Ramos et al, 1989, Simpson, 1998). Πήρε το όνομά του από τον φαινότυπο που προκαλεί η μερική έλλειψη λειτουργίας του (απλοανεπάρκεια), που οδηγεί σε κοψίματα στο περιθώριο των φτερών του ενηλικού εντόμου (Artavanis, 1999). Περαιτέρω απώλεια λειτουργίας του γονιδίου δημιουργεί "νευρογόνο φαινότυπο" σε έμβρυα, δηλαδή κύτταρα που φυσιολογικά θα γίνονταν επιδερμικά, αλλάζουν αναπτυξιακή μοίρα και γίνονται νευρικά (Artavanis, 1999).

Το γονίδιο *Notch* κωδικοποιεί έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα απλής διέλευσης μεγέθους 300kDa. Η μεγάλη εξωκυττάρια περιοχή του αποτελείται από 36 συνεχόμενες επαναλήψεις τύπου EGF και τρεις επαναλήψεις πλούσιες σε κατάλοιπα κυστεΐνης που ονομάζονται επαναλήψεις Notch/Lin12. Στην ενδοκυττάρια περιοχή απαντούν έξι συνεχόμενες επαναλήψεις αγκυρίνης, μία αλληλουχία πλούσια σε γλουταμίνη (opa) και μία αλληλουχία PEST (Fleming, 1998, Artavanis, 1999).

Οι επαναλήψεις EGF χρησιμεύουν για διαπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και σταθεροποιούν το μόριο. Συγκεκριμένα, οι επαναλήψεις EGF 11 και 12 είναι απαραίτητες για την αλληλεπίδραση του υποδοχέα με Delta και Serrate, όπως φάνηκε με πειράματα συγκόλλησης κυττάρων σε καλλιέργεια (Fehon et al, 1990, Rebay et al 1991).

Οι επαναλήψεις Notch/Lin12 απαντούν σε όλα τα ομόλογα του υποδοχέα Notch σε διάφορους οργανισμούς και παίζουν σημαντικό ρόλο στην σταθεροποίηση του εξωκυττάρια τμήματος αυτού (Fleming, 1998).

Το ενδοκυττάρια τμήμα του υποδοχέα περιλαμβάνει δομικά χαρακτηριστικά, όπως οι επαναλήψεις αγκυρίνης, αλληλουχίες opa και PEST που παίζουν σημαντικό ρόλο στην μετάδοση του σήματος προς το εσωτερικό του κυττάρου σε κάτωθεν γονίδια στόχους (Artavanis et al, 1999, Fleming, 1998).

Οι Δεσμευτές: Delta και Serrate

Το Delta είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη απλής διέλευσης (832 αμινοξέα) και αποτελεί έναν από τους δεσμευτές του υποδοχέα Notch. Χαρακτηρίζεται ως νευρογόνο γονίδιο, γιατί σε μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας του έχουμε υπερβολική ανάπτυξη του νευρικού συστήματος στο έμβρυο εις βάρος της επιδερμίδας, εξαιτίας ελλειπούς σηματοδότησης μέσω Notch (δεν γίνεται πλευρική αναστολή). Στην εξωκυττάρια πλευρά της πρωτεΐνης υπάρχουν τα εξής δομικά χαρακτηριστικά: ένα αμινοτελικό άκρο, την περιοχή DSL, μία σειρά από 9 συνεχείς επαναλήψεις EGF. Ακολουθεί μία διαμεμβρανική περιοχή και μία ενδοκυττάρια περιοχή χωρίς σημαντική ομολογία με άλλες πρωτεΐνες.

Το Serrate είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη απλής διέλευσης (1404 αμινοξέα) και αποτελεί έναν από τους δεσμευτές του υποδοχέα Notch. Το εξωκυττάριο τμήμα της αποτελείται από ένα αμινοτελικό άκρο, την περιοχή DSL, μια σειρά από 14 επαναλήψεις EGF και μία περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα κυστεΐνης (μοναδική περιοχή σε δεσμευτές *Serrate*). Το ενδοκυττάριο τμήμα της δεν παρουσιάζει σημαντική ομολογία με άλλες πρωτεΐνες, αλλά είναι απαραίτητο για σηματοδότηση.

Και οι δύο δεσμευτές του Notch ανήκουν στην ίδια οικογένεια πρωτεϊνών. Για τον λόγο αυτό έχουν και μερικά κοινά δομικά χαρακτηριστικά. Το αμινοτελικό άκρο των πρωτεϊνών (το οποίο αξίζει να σημειωθεί ότι είναι και αρκετά ποικίλο εξελικτικά) μαζί με μία περιοχή 45 αμινοξέων που το ακολουθεί (περιοχή DSL [Delta, Serrate, Lag-2] χαρακτηριστική και με υψηλή συντήρηση στα διάφορα μέλη της οικογένειας) δημιουργούν τη δομή εκείνη που είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα (Fleming, 1998).

Τροποποιητές

Όπως συμβαίνει με διάφορους υποδοχείς, οι οποίοι μεσολαβούν σε διαδικασίες ενδοκυττάριας σηματοδότησης, η έκφραση των δεσμευτών σε περιορισμένες θέσεις παίζει πρωταρχικό ρόλο στην ρύθμιση της σηματοδότησης από το ευρέως εκφραζόμενο *Notch*. Ωστόσο, εκτός από τους δεσμευτές DI και Ser, οι οποίοι μάλιστα σε κάποιες περιπτώσεις μπορούν να λειτουργήσουν και ως επικρατείς αρνητικοί παράγοντες (Sun and Artavanis, 1996, 1997), υπάρχει μεγάλος αριθμός μορίων που τροποποιούν το αποτέλεσμα της σηματοδότησης από το *Notch*. Η τροποποίηση μπορεί να επιτευχθεί σε διάφορα επίπεδα: στην εξωκυττάρια περιοχή (από γονίδια

όπως τα *fringe*, *brainiac*, *egghead* και *scabrous*), πάνω στην κυτταρική μεμβράνη (όπου δρα το *bigbrain*), στο κυτταρόπλασμα (οι περιπτώσεις των *numb*, *sanpodo*, *deltex*, *abl* και *disabled*) ή στον πυρήνα (όπως τα *hairless*, *nubbin*) (Panin and Irvine, 1998, Artavanis et al 1999, Baker 2000).

Άλλο ένα επίπεδο ρύθμισης της δράσης του μονοπατιού:

Πρωτεόλυση του υποδοχέα Notch και του δεσμευτή Delta.

Τα τελευταία χρόνια σειρά εργασιών έχει δείξει ότι τόσο ο υποδοχέας Notch, όσο και ο δεσμευτής του Delta υφίστανται μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις μεταξύ των οποίων και πρωτεόλυση. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε διαφορετικές ισομορφές των πρωτεϊνών *in vivo*, οι οποίες ενδεχομένως εξυπηρετούν διαφορετικές λειτουργίες (Ye and Fortini, 2000).

Στην περίπτωση του Notch, το πρώτο στάδιο πρωτεόλυσης του εξωκυττάριου τμήματος συμβαίνει στο δίκτυο trans-Golgi κατά την διάρκεια της σύνθεσης του ώριμου υποδοχέα, ο οποίος θα εμφανιστεί στην κυτταρική μεμβράνη με τη μορφή ενός ετεροδιμερούς των δύο πρωτεολυτικών τεμαχίων, που συνδέονται μεταξύ τους με μία ιοντική γέφυρα ασβεστίου (Blaumueller et al, 1997). Αυτή η πρωτεόλυση επιτυγχάνεται με τη δράση μίας φουρίνης. Η φουρίνη είναι ένζυμο που μοιάζει με την πρωτεάση σαμπτιλυσίνη και πρωτεολύει πρωτεΐνες μέσω του κλασσικού εκκριτικού μονοπατιού (Logeat et al 1998, 2000).

Όταν ο υποδοχέας Notch ενεργοποιηθεί από την πρόσδεση του δεσμευτή, ακολουθεί μία επιπλέον πρωτεόλυση από μία πρωτεάση τύπου TACE (Brou et al, 2000, Mumm et al, 2000) στο εξωκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης (και μάλιστα πολύ κοντά στην προηγούμενη). Η δεύτερη αυτή πρωτεόλυση μετατρέπει το μόριο σε καλό υπόστρωμα της πρεσενιλίνης (διαμεμβρανική νευρογόνος πρωτεΐνη), η οποία εντοπίζεται κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο και την κυτταρική μεμβράνη και πρωτεολύει τον υποδοχέα στο ενδοκυττάριο τμήμα και πολύ κοντά στη διαμεμβρανική περιοχή (Ray et al, 1999, Ye et al, 1999). Με τον τρόπο αυτό, ελευθερώνεται το ενεργό ενδοκυττάριο τμήμα του Notch, το οποίο θα μετακινηθεί στον πυρήνα και θα χρησιμεύσει για ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων-στόχων του σηματοδοτικού μονοπατιού (Chan and Jan, 1998, Koran et al 1996, Struhl and Greenwald 1999).

Όσον αφορά το Delta, δείχθηκε ότι σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από έμβρυα και προνύμφες *D.melanogaster*, απαντάται σε τέσσερεις ισομορφές, η μικρότερη εκ των οποίων αντιστοιχεί σε μία εκκρινόμενη ισομορφή που προκύπτει από πρωτεόλυση (Klueg et al 1998). Η εν λόγω πρωτεόλυση πιστεύεται ότι επιτελείται από την μεταλλοπρωτεάση *Kuzbanian*, που ανήκει στην

οικογένεια ADAM (Qi et al, 1999). Ωστόσο, ο φυσιολογικός ρόλος της εκκρινόμενης ισομορφής δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί.

Εκτός από την παρουσία διακριτών ισομορφών της πρωτεΐνης Delta σε εκχυλίσματα, παρουσιάζεται ποικιλομορφία και στον κυτταρικό εντοπισμό αυτής σε έμβρυα και προνύμφες *D. melanogaster*. Παρά το γεγονός ότι η λειτουργική για σηματοδότηση πρωτεΐνη Delta, εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη, όπου αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα της στο γειτονικό κύτταρο, έχει εντοπιστεί και κάποια μορφή της στο κυτταρόπλασμα συσσωρευμένη μέσα σε ενδοκυττωτικά κυστίδια (Klueg et al, 1998, Parks et al, 2000). Επειδή η παρουσία των κυστιδίων συμπίπτει χρονικά με περιόδους ελαττωμένης σηματοδότησης (Kooch et al, 1993) μπορεί να υποτεθεί ότι το κυστιδιακό Delta προέρχεται από ενδοκύτωση που ρυθμίζει τα επίπεδα της ενεργούς μεμβρανικής πρωτεΐνης. Επιπλέον, με πειράματα παροδικών διαμολύνσεων και συγκόλληση κυττάρων σε καλλιέργεια, δείχθηκε ότι το Delta (πλήρους μεγέθους) ενδοκυττώνεται σε κύτταρα που εκφράζουν Notch (και η διαδικασία αυτή δεν απαιτεί την παρουσία του ενδοκυττάρου τμήματος του δεσμευτή) και ο υποδοχέας με τη σειρά του εντοπίζεται μέσα στο κυτταρόπλασμα κυττάρων που εκφράζουν Delta (Klueg et al, 1998). Ο εντοπισμός του Delta μαζί με το Notch μέσα σε ενδοκυττωτικά κυστίδια έχει συσχετισθεί με περαιτέρω ενεργοποίηση του μονοπατιού. Η απομάκρυνση του εξωκυττάρου τμήματος του υποδοχέα από την κυτταρική μεμβράνη (ίσως μετά από αλληλεπίδραση με το Delta και ενδοκύτωση) είναι απαραίτητη για την πρωτεόλυση από την πρεσενιλίνη και την μετακίνηση του ενεργού ενδοκυττάρου τμήματος του υποδοχέα στον πυρήνα (Parks et al, 2000).

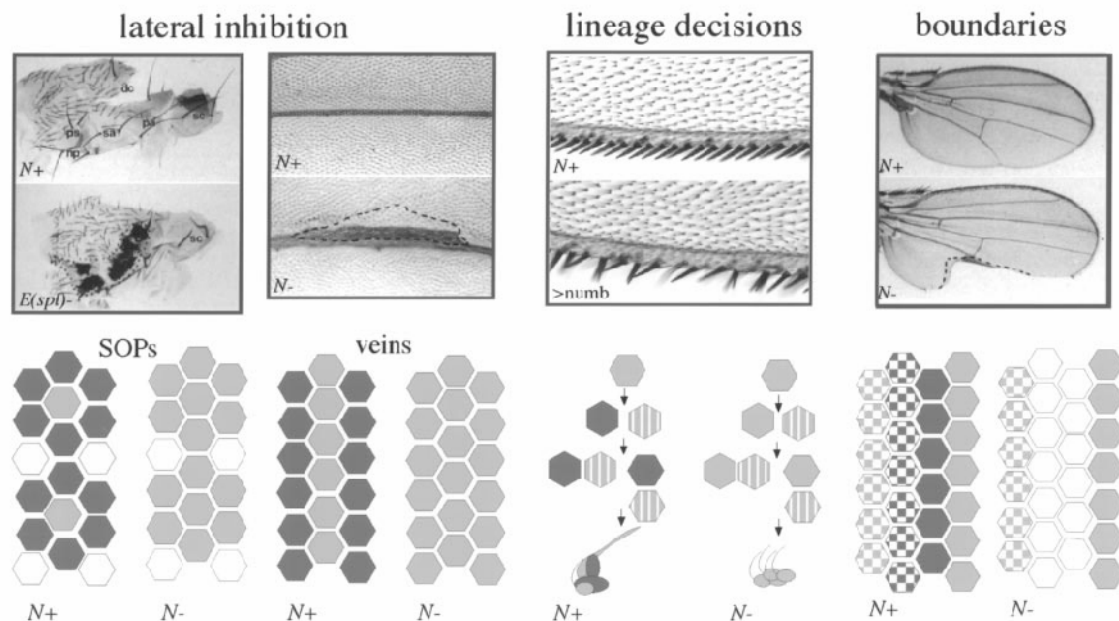
Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι το *kuz* αρχικά (πριν την ανακάλυψη της φουρίνης) πιστεύετο ότι επηρεάζει την πρωτεόλυση του Notch, πριν την έξοδο αυτού στην κυτταρική μεμβράνη, καθώς οι φαινότυποι που προκύπτουν σε απώλεια λειτουργίας του *kuz* είναι παρόμοιοι με αυτούς της απώλειας λειτουργίας του *Notch* (Kopan and Cagan, 1997, Pan and Rubin, 1997). Παρά το γεγονός ότι το γονίδιο αποδείχθηκε ότι επηρεάζει την πρωτεόλυση του δεσμευτή DI, δεν μπορεί να αποκλειστεί το γεγονός ότι επηρεάζει και τον υποδοχέα.

Μηχανισμοί και πεδία δράσης του μονοπατιού Notch

Ο αριθμός των αναπτυξιακών διαδικασιών που απαιτούν σηματοδότηση μέσω *Notch* αυξάνεται ολοένα, οπότε είναι μάλλον αδύνατο να βρεθεί ένας ιστός για την ανάπτυξη του οποίου σε κάποιο στάδιο δεν απαιτείται η λειτουργία του εν λόγω μονοπατιού. Το σηματοδοτικό μονοπάτι *Notch* δρα και στα τρία βλαστικά στρώματα κατά την διάρκεια της εμβρυϊκής

ανάπτυξης της *D. melanogaster*, καθώς επίσης και στη γαμετική σειρά και στους αναπτυξιακούς δίσκους κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της προνύμφης και της νύμφης (interactive fly).

Υπάρχουν τρεις τρόποι με τους οποίους γίνεται χρήση του μονοπατιού και φαίνονται σχηματικά στην Εικόνα 1.2 (Muskavitch, 1994, Kimble and Simpson, 1997, Bray, 1998, Greenwald, 1998):



Εικόνα 1.2: Οι μηχανισμοί δράσης του μονοπατιού Notch.

Στις περιπτώσεις που το μονοπάτι μετάδοσης σήματος Notch επιτελεί πλευρική αναστολή, το κύτταρο-πομπός εμποδίζει τα γειτονικά του να ακολουθήσουν την νευρική τύχη. Όταν υπάρχει πρόβλημα στο μονοπάτι (π.χ. μεταλλαγή του συμπλόκου καταστολέων *E(spl)* ή μεταλλαγή του ίδιου του υποδοχέα *N*, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την σηματοδότηση), τα κύτταρα διαφεύγουν της αναστολής και αποκτούν την νευρική τύχη, με αποτέλεσμα υπεραριθμία εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων (στην περίπτωση των μικροχατών του θώρακα) ή παχύνσεις φλεβώσεων (στο φτερό).

Η δράση του *N* στις αποφάσεις γενεαλογίας, σχετίζεται με την προκαθορισμένη ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού στα κύτταρα, που δεν κληρονομούν μία κυτταροπλασματική ρυθμιστική πρωτεΐνη (π.χ. το *Numb*) κατά την διάρκεια ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων (π.χ. στα πρόδρομα αισθητηρίων οργάνων, που τελικά θα δώσουν πέντε διαφορετικά κύτταρα). Όταν το μονοπάτι είναι μη λειτουργικό, όλα τα κύτταρα θα αποκτήσουν την ίδια αναπτυξιακή τύχη (θα γίνουν νευρώνες).

Η δράση του *N* στον καθορισμό ορίων (π.χ. στο περιθώριο του φτερού) σχετίζεται με επαγωγική σηματοδότηση στην θέση όπου συναντώνται πληθυσμοί κυττάρων που εκφράζουν διαφορετικό δεσμευτή (*DI*, *Ser*), με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός οργανωτικού κέντρου και επαγωγή διαφοροποίησης μέσω ενός θετικού μηχανισμού ανάδρασης.

- **Πλευρική αναστολή (lateral inhibition)**

Το κλασικό μοντέλο για την πλευρική αναστολή εξηγεί πως ένα κύτταρο μπορεί να επιλεγεί από μία ομάδα ισοδύναμων πρόδρομων κυττάρων. Υπάρχουν πολλά παραδείγματα όπου το Notch επιτελεί πλευρική αναστολή.

Ένα πολύ καλά μελετημένο παράδειγμα είναι η επιλογή του πρόδρομου κυττάρου των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων (ΠΑΟ). Κάθε ΠΑΟ δημιουργείται από μία ομάδα ισοδύναμων πρόδρομων προνευρικών κυττάρων και αν η σηματοδότηση μέσω Notch είναι μη λειτουργική πολλά κύτταρα αποκτούν την αναπτυξιακή τύχη του ΠΑΟ. Σύμφωνα με το παραπάνω μοντέλο, όλα τα κύτταρα αρχικά εκφράζουν τόσο δεσμευτή όσο και υποδοχέα και έχουν την ικανότητα να σηματοδοτούν το ένα στο άλλο. Όμως, κάποια μικρή διαφορά που δημιουργείται μεταξύ των κυττάρων σε κάποια στιγμή, ενισχύεται και γίνεται μόνιμη μέσω ενός μηχανισμού ανάδρασης. Οπότε, αν το *Notch* ενεργοποιηθεί λίγο περισσότερο σε κάποιο κύτταρο, τα επίπεδα του *Delta* σε αυτό θα ελαττωθούν και θα γίνει λιγότερο ικανό να σηματοδοτήσει στα γειτονικά του. Εφόσον το *Notch* σε αυτήν την περίπτωση έχει ανασταλτικό αποτέλεσμα στην κυτταρική τύχη, το μεμονωμένο κύτταρο που θα επιλεγεί ως η πηγή του σήματος είναι το μόνο που θα γλιτώσει από την αναστολή (Korpan and Turner, 1997).

Το παραπάνω μοντέλο εξηγεί ικανοποιητικά την δημιουργία ομοιόμορφα κατανεμημένων δομών από ένα πεδίο, όπως η δημιουργία των νευροβλαστών στο έμβρυο και των μικροχαιτών στον θώρακα της *D.melanogaster*.

Όμως, υπάρχουν πολλά παραδείγματα όπου η επιλογή των προδρόμων δεν είναι εντελώς τυχαία. Στην περίπτωση αυτή εμπίπτουν οι μακροχαίτες του εντόμου, που πάντα βρίσκονται στις ίδιες θέσεις και η ανάπτυξη των φλεβώσεων του φτερού.

- **Καθορισμός γενεαλογίας (lineage decisions)**

Στον καθορισμό γενεαλογίας των μυϊκών και νευρικών προδρόμων, η ενεργότητα του *Notch* σε ένα από τα δύο θυγατρικά κύτταρα τα οδηγεί στην απόκτηση διαφορετικής αναπτυξιακής τύχης. Έτσι, το ΠΑΟ τελικά θα δώσει πέντε διαφορετικά κύτταρα: σμήριγγα (shaft), θήκη (socket), γλοιακό, περίβλημα και νευρώνας (Gu et al, 1999). Αν λείπει το *Notch*, δημιουργούνται μόνο νευρώνες. Αυτό συμβαίνει, γιατί η σηματοδότηση μέσω Notch απαιτείται σε δύο αποφάσεις γενεαλογίας. Καταρχήν, για να διακριθούν τα θυγατρικά κύτταρα Πa και Πb του ΠΑΟ (αν δεν υπάρχει *Notch*, προκύπτουν μόνο κύτταρα Πb) και στην συνέχεια για να καθοριστεί ότι το κύτταρο Πb θα επιτρέψει σε έναν από τους απογόνους του να γίνει γλοιακό (Το κύτταρο Πb δίνει δύο θυγατρικά κύτταρα: το γλοιακό και το κύτταρο ΠIb, το οποίο με τη σειρά του θα διαιρεθεί ασύμμετρα και θα δώσει τον νευρώνα και το περίβλημα). Επιπλέον, το *Notch* απαιτείται για μία τρίτη απόφαση μεταξύ σμήριγγας και θήκης στους απογόνους του κυττάρου Πa. Τα παραπάνω

προκύπτουν από την ασύμμετρη κληρονόμηση της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης Numb. Η εν λόγω ανταγωνίζεται το *Notch*, κι έτσι στο θυγατρικό κύτταρο, όπου δεν υπάρχει *Numb*, το *Notch* είναι λειτουργικό, παρά το γεγονός ότι ο δεσμευτής του εκφράζεται και στα δύο κύτταρα και στα γειτονικά τους (όπως συμβαίνει στους νευροβλάστες).

- **Καθορισμός - Δημιουργία ορίου (boundary formation)**

Το χαρακτηριστικότερο παράδειγμα της δράσης του *Notch* στην εγκαθίδρυση ορίων είναι το ραχαιοκοιλιακό όριο του δίσκου του φτερού. Στην περίπτωση αυτή, το *Notch* ενεργοποιείται στα κύτταρα που βρίσκονται μεταξύ δύο πεδίων κυττάρων: το ραχιαίο και το κοιλιακό πεδίο, και δρα ώστε να διατηρηθούν οι δύο πληθυσμοί διαφορετικοί. Ως αποτέλεσμα της δράσης του, τα κύτταρα του ορίου αποκτούν χαρακτηριστικά "οργανωτικού κέντρου", που είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση της ανάπτυξης και του προτύπου του φτερού στον ραχαιοκοιλιακό άξονα. Για να ενεργοποιηθεί το *Notch* στο ραχαιοκοιλιακό όριο, τα κύτταρα της ραχιαίας πλευράς σηματοδοτούν στα κοιλιακά κύτταρα και το αντίστροφο.

Η διαφοροποίηση των ραχιαίων και κοιλιακών κυττάρων για σηματοδότηση επιτυγχάνεται με την βοήθεια και δράση της πρωτεΐνης Fringe (Fng), η οποία εκφράζεται στο ραχιαίο διαμέρισμα και εμποδίζει την ενεργοποίηση του *Notch* από Serrate (το οποίο απαντά επίσης στο ραχιαίο διαμέρισμα), αλλά ταυτόχρονα υποβοηθά την ενεργοποίηση του *Notch* από Delta (το οποίο εκφράζεται σε πιο ευρεία περιοχή, αλλά ισχυρά αρχικά στο κοιλιακό διαμέρισμα).

Ενώ η πρωτεΐνη Fng απαντάται σε δύο μορφές, μία κυτταροπλασματική ενδο-Golgi και μία εκκρινόμενη (Panin et al, 1997), φαίνεται ότι η ενδο-Golgi ισομορφή της με δράση γλυκοζυλ-τρανσφεράσης μετατρέπει τον υποδοχέα *Notch*, με γλυκοζυλίωση των επαναλήψεων EGF του εξωκυττάρου τμήματος, με τρόπο τέτοιο ώστε γίνεται ικανότερος να σηματοδοτήσει μέσω του DI (Bruckner et al, 2000). Όπως δείχθηκε με πειράματα παροδικών διαμολύνσεων, το Fng για να δράσει πρέπει να εκφράζεται στο κύτταρο που λαμβάνει το σήμα και δίνει τη δυνατότητα σ'αυτό να βελτιώσει την ικανότητα πρόσδεσής του με το DI και όχι με το Ser.

Ο τύπος αυτός δράσης του *Notch* στο ραχαιοκοιλιακό όριο έχει τελικά θετικό αποτέλεσμα, καθώς επιτυγχάνεται η δημιουργία ενός οργανωτικού κέντρου μέσω της έκφρασης γονιδίων-στόχων και έτσι η σηματοδότηση σε αυτήν την περίπτωση ονομάζεται επαγωγική (inductive signaling). Επιπλέον, τα κύτταρα που λαμβάνουν το σήμα, χρειάζεται να παράγουν δεσμευτή για να ενεργοποιήσουν τα κύτταρα της αντίθετης πλευράς. Αυτό δείχνει ότι ένας θετικός μηχανισμός ανάδρασης υπάρχει στην έκφραση των δεσμευτών για την διατήρηση του ορίου (σε αντίθεση με αυτό που συμβαίνει στην περίπτωση της πλευρικής αναστολής).

Άλλα παραδείγματα συμμετοχής του *Notch* στην εγκαθίδρυση ορίων αποτελούν ο ισημερινός στο αναπτυσσόμενο μάτι του εντόμου και οι αρθρώσεις των αναπτυσσόμενων ποδιών.

Κυτταρικός πολλαπλασιασμός και *Notch*

Το *Notch* ελέγχει άμεσα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού. Η δημιουργία μιτωτικών κλώνων απώλειας λειτουργίας του εν λόγω γονιδίου σε οποιοδήποτε σημείο του δίσκου (ακόμα και μακριά από το ραχαιοκοιλιακό όριο, που λειτουργεί ως οργανωτής λόγω της παρουσίας του N) οδηγεί σε πολύ μικρή βιωσιμότητα του μεταλλαγμένου ιστού, γιατί δεν γίνεται κυτταρικός πολλαπλασιασμός, έστω κι αν το μέγεθος του κλώνου είναι μικρό. Επιπλέον, η εκτοπική έκφραση ενεργοποιημένων ισομορφών του *Notch* ή των δεσμευτών του (*Dl* και *Ser*) στο φτερό προκαλεί σημεία κυτταρικού υπερπολλαπλασιασμού στον δίσκο και την εμφάνιση εκτοπικών περιθωρίων φτερού στο ενήλικο (Go et al, 1998, Baonza and Garcia-Bellido, 2000).

Οι δύο δεσμευτές του N στο φτερό έχουν την ικανότητα να αλληλοεπάγονται μέσω ενός θετικού μηχανισμού ανάδρασης. Εκτοπική έκφραση του *Dl* οδηγεί σε έκφραση της πρωτεΐνης *Ser* στο ραχιαίο διαμέρισμα, ενώ εκτοπική έκφραση του *Ser* οδηγεί σε έκφραση του *Dl* κυρίως στο κοιλιακό διαμέρισμα. Ο παράγοντας που καθορίζει ποιος δεσμευτής θα ενεργοποιήσει τον υποδοχέα και θα ξεκινήσει η σηματοδότηση είναι το *Fng* (Panin et al, 1997). Επιπλέον, εκτοπικός κυτταρικός πολλαπλασιασμός και δημιουργία εκτοπικών περιθωρίων λαμβάνει χώρα σε σημεία όπου κύτταρα που εκφράζουν *Fng* συναντούν κύτταρα που δεν εκφράζουν (μιτωτικοί κλώνοι του *fng*) (Rauskolb et al, 1999).

Κλώνοι απώλειας λειτουργίας του *Dl* στο κοιλιακό διαμέρισμα, που έρχονται σε επαφή με το ραχαιοκοιλιακό όριο, προκαλούν απώλεια ιστού, ενώ ραχιαίοι κλώνοι προκαλούν απλώς παχύνσεις φλεβώσεων. Εκτοπική έκφραση του *Dl* οδηγεί σε εκτοπικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στα δύο διαμερίσματα (πχ αν το *Dl* εκφραστεί εκτοπικά με τη σειρά οδηγό *ptcGal4*, που διασχίζει το ραχαιοκοιλιακό όριο) και δημιουργία εκτοπικού περιθωρίου στο ραχιαίο διαμέρισμα του φτερού του ενήλικου ατόμου. Επιπλέον, το εκτοπικό *Dl* επάγει την έκφραση γονιδίων στόχων του μονοπατιού *Notch* που εκφράζονται φυσιολογικά στο περιθώριο και βοηθούν στη δημιουργία προτύπου και ανάπτυξη του φτερού, όπως τα *wg*, *vg* και *cut*. Το γονίδιο *cut* εκφράζεται σε αυτήν την περίπτωση μόνο στο ραχιαίο διαμέρισμα (Doherty et al, 1996).

Όταν το *Ser* εκφραστεί εκτοπικά, όπως το *Dl* προηγουμένως, η έκφραση των γονιδίων-στόχων του μονοπατιού *wg*, *vg* και *cut* περιορίζεται στο κοιλιακό διαμέρισμα του δίσκου και εκεί δημιουργείται εκτοπικό περιθώριο στο φτερό (Kim et al, 1995).

Συνεπώς, και στην περίπτωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, παρατηρείται ότι ο περιορισμός της δράσης του *Notch* επιτυγχάνεται μέσω της ρύθμισης της θέσης των δεσμευτών του. Παρά το γεγονός ότι οι δεσμευτές D1 και Ser είναι πρωτεΐνες με μεγάλη ομοιότητα σε δομικά χαρακτηριστικά και μπορούν να αλληλοαντικατασταθούν κατά την δημιουργία των νευροβλαστών στο έμβρυο (Gu et al, 1995) και στον καθορισμό των προδρόμων αισθητηρίων οργάνων (Zeng et al, 1998), η λειτουργικότητά τους σε άλλες περιπτώσεις ποικίλλει και καθορίζεται από μία άλλη πρωτεΐνη, το Fng.

ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *NEURALIZED*

Ένα από τα ζυγωτικά νευρογόνα γονίδια της *D.melanogaster* είναι το *neuralized*. Το γονίδιο χαρτογραφείται στην θέση 85C στο δεξί σκέλος του 3ου χρωμοσώματος. Το cDNA έχει μέγεθος περίπου 4kb και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που αποτελείται από 754 αμινοξικά κατάλοιπα, έχει μοριακό βάρος περίπου 82kDa, και παίζει άγνωστο ακόμη ρόλο στην ανάπτυξη του εντόμου.

Το γονίδιο κλωνοποιήθηκε δύο ανεξάρτητες φορές (Boulianne et al 1991, Price et al, 1993) και το πρότυπο έκφρασης του μεταγράφου του εντοπίστηκε με την τεχνική *in situ*. Απαντά σε δύο μετάγραφα 4.1 και 3.7kb, που προκύπτουν από διαφορετική χρήση σημάτων πολυαδενυλιώσης, με ισχυρότερη έκφραση στις ώρες 3-9 της εμβρυογένεσης της *D.melanogaster* (Price et al, 1993). Εκφράζεται σε πλειάδα κυτταρικών ομάδων κατά την εμβρυογένεση και κατά την ανάπτυξη του εντόμου στα στάδια της προνύμφης. Συγκεκριμένα, στο στάδιο των αρχικών πυρηνικών διαιρέσεων και πριν την κυτταροποίηση του βλαστοδέρματος, το RNA του *neuralized* εντοπίζεται σε όλο το έμβryo. Μετά την κυτταροποίηση η έκφραση του *neuralized* αρχικά εντοπίζεται κατά μήκος της κοιλιακής επιφάνειας του εμβρύου. Η έκφραση γίνεται σύντομα ομοιόμορφη σε όλο το μεσόδερμα. Κατά την διάρκεια της επιμήκυνσης της ζώνης του κορμού (στάδια 8-10) τα μετάγραφα του εντοπίζονται σε όλο το εκτόδερμα. Καθώς οι νευροβλάστες αρχίζουν να διαχωρίζονται, το *neuralized* περιορίζεται σε μία ομάδα κυττάρων: στα κύτταρα εκείνα από όπου θα προκύψουν τα περιφερικά αισθητήρια όργανα. Μετά την μετανάστευση όλων των νευροβλαστών εσωτερικά, οι περισσότεροι από αυτούς εκφράζουν *neuralized*. Νευροβλάστες του εγκεφάλου και του στοματογαστρικού νευρικού συστήματος εκφράζουν *neuralized*, επίσης. Από το στάδιο 12 και μετά ο εντοπισμός του μεταγράφου βαθμιαία εξαφανίζεται από την επιδερμίδα και τους νευροβλάστες. Παραμένει έκφραση μόνο σε τμήμα του εγκεφάλου, σε μύες και στο εκτόδερμα (Boulianne et al 1991, Price et al, 1993).

Εν περιλήψει, κατά την διάρκεια της εμβρυογένεσης το *neuralized* εκφράζεται σε εκτόδερμα και μεσόδερμα/μεσεκτόδερμα. Κατά την διάρκεια της έντονης έκφρασης (3-9 ώρες της εμβρυογένεσης) το *neuralized* εκφράζεται σε επιδερμοβλάστες και νευροβλάστες. Η έκφραση αυτή συμπίπτει με την περίοδο που γίνεται ο διαχωρισμός νευροβλαστών και προδρόμων των αισθητηρίων οργάνων.

Το μετάγραφο του *neuralized* απαιτείται και κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος του ενηλίκου. Συγκεκριμένα, σε αναπτυξιακούς δίσκους του φτερού, το *neuralized* εκφράζεται σε όλα τα πρόδρομα κύτταρα των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων (μακροχαίτες το θώρακα και των κοιλιακών και ραχιαίων αισθητηρίων οργάνων του περιθωρίου του φτερού). Στους αναπτυξιακούς δίσκους του ποδιού, το μετάγραφο του ενεργοποιείται σε συναθροισμούς

κυττάρων που θα δώσουν τα χορδογονικά όργανα. Σε δίσκους αντέννας προηγείται της δημιουργίας του οργάνου Johnston. Στον δίσκο του ματιού εκφράζεται ισχυρά σε κύτταρα στο οπίσθιο τμήμα και ασθενώς στο πρόσθιο τμήμα της μορφογενετικής αύλακας (Boulianne, et al 1991).

H δομή της πρωτεΐνης

Τα δομικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης Neuralized, που προκύπτουν από *in silico* μελέτη φαίνονται σχηματικά στην εικόνα 1.3 και είναι τα ακόλουθα:

- Δύο περιοχές επαναλήψεων ορα (21-43αα και 256-303αα) πλούσιες σε κατάλοιπα γλουταμίνης. Οι επαναλήψεις αυτές πιθανώς παίζουν ρόλο σε διαπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις (Boulianne, et al 1991).
- Μία αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (NLS: Nuclear Localization Signal) στην θέση 82-89αα της πρωτεΐνης. Η αλληλουχία αυτή είναι πλούσια σε βασικά αμινοξικά κατάλοιπα, αλλά πρέπει να σημειωθεί ότι δεν ανταποκρίνεται επακριβώς σε καλά χαρακτηρισμένα NLS (Boulianne, et al 1991).
- Μία αλληλουχία που παρουσιάζει ομοιότητες με μοτίβα που προσδέχουν DNA (homeodomain-like αλληλουχία) στην θέση 304-347αα (Boulianne et al, 1991).
- Μία αλληλουχία δακτύλου Zn-Ring τύπου C_3HC_4 στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου στην θέση 701-742αα, που μπορεί να σχετίζεται με διαπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις (Price et al, 1993).
- Δύο εσωτερικές επαναλήψεις στις θέσεις 109-250αα και 371-513αα (επαναλήψεις *neuralized*), οι οποίες δεν παρουσιάζουν ομολογία με αλληλουχίες άλλων γνωστών πρωτεϊνικών μορίων, αλλά είναι αρκετά συντηρημένες μεταξύ τους (Pavlopoulos, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Ο ρόλος των εν λόγω είναι άγνωστος.

Εκτός από το *neuralized* της *D.melanogaster*, έχουν κλωνοποιηθεί και ομόλογα στον άνθρωπο (Nakamura et al, 1998), στον ποντικό (Pavlopoulos et al, αδημοσίευτα αποτελέσματα) και στον νηματώδη *C. elegans* (Wilson et al, 1994). Η μεγαλύτερη ομολογία ανάμεσα στο *neuralized* της *D.melanogaster* και στα ομόλογά του παρουσιάζεται στην περιοχή που χαρακτηρίζεται από το πρωτεϊνικό πρότυπο του RING.

```

1   MGLSDIPANY MQGSHPHLTL HPQQQHHQNO QHLQHLQOMQ QLHNAMPTPA
51  QQAAQVLAME SNELLMSTKD KLSSKKKMHL LKKIKKRFGL VRRSPSSCPG
101 PNNLPPLQFH SVHGDNIRIS RDGTLARRFE SFCRAITFSA RPVRINERIC
151 VKFAEISNNW NGGIRFGFTS NDPVTLEGTL PKYACPDLTN RPFQWAKALH
201 EQYCEKDNIL YYYVNGAGDV IYGINNEEKG VILTGIDTRS LLWTVIDIYG
251 NCTGIEFLDS RIYMYQQQPA AIPMATVPAQ QQQMPQPAAN ASSALNSHHP
301 HQQSRRLPG HTAAIEHDLE RHVMPSLQSL HLAGNGGSVA SVEQAAIAHD
351 LANGLPPLRY NANGRLIPVP FHNTKGRNVR LSQDRFVASR TESDFCQGYV
401 FTARPIRIGE KLIVQVLKTE QMYVGALALG ITSCNPAMLQ PNDLPNDSDF
451 LLDRPEYWVV SKDIAAAPQR GDEIAFFVAP NGEVSISKNN GPAVVVMHVD
501 QSLQLWAFLD VYGSTQSLRM FRQQLPNMVA YPSQPQVNVN ASSSSACNAA
551 STSRMLPMTE SMSSLNAGAT AKLLHHPSQL SVAQSTSTLA SAGGVNGSRM
601 ISMPSNGDIL QIQPNGGTV LVVNLPPASS SHDINGQLAA RPTATVTSSG
651 VLAGACSSGT LISTTSSQYI EQPIANSTNN AANKWKDSL S DQQSTDSSAE
701 CTICYENPID SVLYMCGHMC MCYDCAIEQW RGVGGGQCPL CRAVIRDVIR
751 TYTT

```



Εικόνα 1.3: Η αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης *Neuralized* και τα διάφορα δομικά χαρακτηριστικά της.

Με πράσινο χρώμα σημειώνονται τα πιθανά μοτίβα opa, με ροζ το πιθανό σινιάλο πυρηνικού εντοπισμού, με μοβ η αλληλουχία που παρουσιάζει ομοιότητες με μοτίβα που προσδέουν DNA, με κόκκινο οι επαναλήψεις Neur και με μπλε το πρότυπο RING. Η υπογραμμισμένη ακολουθία με μαύρο χρώμα απουσιάζει από τα ομόλογα της πρωτεΐνης στα θηλαστικά. Το πρότυπο RING και μία ακόμα αμινοξική ακολουθία που σημειώνεται με μπλε είναι πλήρως συντηρημένες αλληλουχίες στα ομόλογα της πρωτεΐνης.

Ποια είναι η πιθανή λειτουργία του γονιδίου *neuralized*;

Πως συσχετίζεται με το μονοπάτι μετάδοσης σήματος *Notch*;

Το γονίδιο *neuralized*, όπως προαναφέρθηκε, ανήκει στην οικογένεια των ζυγωτικών νευρογόνων γονιδίων της *D.melanogaster*. Η εν λόγω οικογένεια περιλαμβάνει τα γονίδια *Notch* (*N*), *Delta* (*Dl*), *Enhancer of split* [*E(spl)*], *neuralized* (*neur*), *mastermind* (*mam*) και *big brain* (*bib*). Τα πρωτεϊνικά προϊόντα μερικών από αυτά, και συγκεκριμένα των *N*, *Dl* και *bib* είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες, ενώ άλλα κωδικοποιούν κυτταροπλασματικές ή πυρηνικές πρωτεΐνες. Ακριβώς σε ποια κατηγορία ανήκει το *neuralized* δεν είναι ακόμα γνωστό.

Γενετικά πειράματα αλληλεπιδράσεων για να διαπιστωθεί η σχέση των νευρογόνων γενετικών τόπων πραγματοποιήθηκαν με την παρατήρηση του φαινότυπου εμβρύων που έχουν έλλειψη κάποιου από αυτά, αν διπλασιαστεί η δόση του αγρίου τύπου αλληλομόρφου ενός άλλου νευρογόνου γονιδίου (de la Concha et al, 1988). Για παράδειγμα, διπλασιασμός της δόσης του *N* ή του *E(spl)* οδηγεί σε ελάττωση της σοβαρότητας του νευρογόνου φαινότυπου λόγω έλλειψης *neur*, ενώ διπλασιασμός της δόσης του *Dl* ενισχύει τον εν λόγω νευρογόνο φαινότυπο. Συνεπώς, το *neur* φαίνεται ότι λειτουργεί άνωθεν των *N*, *E(spl)* και *Dl*. Επιπλέον, ο διπλασιασμός της δόσης του *neur*, σε αυτού του τύπου τις γενετικές αλληλεπιδράσεις, φαίνεται ότι επηρεάζει μόνο το *mam*, καθώς ελαττώνει τη σοβαρότητα του νευρογόνου φαινότυπου αυτού και συνεπώς δρα κάτωθεν αυτού. Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι το *neur* αλληλεπιδρά με άλλα νευρογόνα γονίδια, τα οποία εμπλέκονται στον καθορισμό της αναπτυξιακής απόφασης ενός κυττάρου να γίνει νευροβλάστης ή επιδερμικό.

Το *neuralized* αρχικά θεωρήθηκε μεταγραφικός παράγοντας που δρα στον πυρήνα των κυττάρων που εκφράζεται (Boulianne et al, 1991). Σημαντικό ρόλο σε αυτήν την υπόθεση υπήρξε ο εντοπισμός ενός πιθανού μοτίβου πυρηνικού εντοπισμού και ενός άλλου που μοιάζει με μοτίβο πρόσδεσης στο DNA (homeodomain-like). Ωστόσο, πειράματα κυτταρικού εντοπισμού χημεικής πρωτεΐνης *Neuralized* με επίτοπο *myc* μετά από υπερέκφρασή της σε προνευρικούς συναθροισμούς σε αναπτυξιακούς δίσκους φτερού, με χρήση της κατάλληλης διαγονιδιακής σειράς οδηγού (*sca-Gal4*), δείχνουν ότι ο επίτοπος, και κατ'επέκταση η πρωτεΐνη, εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη (Yeh, et al 2000).

Επιπλέον, πειράματα κυτταρικού εντοπισμού με χρήση χημεικών μορφών της πρωτεΐνης *Neuralized* με GFP σε παροδικές διαμολύνσεις κυττάρων *Cos-7* σε καλλιέργεια, δείχνουν ότι ο φθορισμός εντοπίζεται έξω από τον πυρήνα και μάλιστα γύρω από αυτόν, κάτι που υποδεικνύει

ότι ο εντοπισμός είναι σε κάποιο ευρύ κυτταρικό διαμέρισμα-οργανίδιο, πχ το ενδοπλασματικό δίκτυο (Pavloroulos, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Επειδή το *Neur* είναι μεμβρανική πρωτεΐνη, θα μπορούσε να δρα σε κάποιου τύπου ρύθμιση σε πρωτεϊνικό επίπεδο μιας άλλης πρωτεΐνης (του Notch ή του Delta ή κάποιου μεμβρανικού ρυθμιστή τους, π.χ. της πρεσενιλίνης) είτε μεταφραστικά, είτε μετα-μεταφραστικά (ρύθμιση επιπέδων υποδοχέα ή δεσμευτή).

Το γεγονός ότι παρατηρείται συσχέτιση της έκφρασης του γονιδίου *neur* με πεδία και αναπτυξιακά στάδια έντονης σηματοδότησης *Notch*, ενισχύει την παραπάνω υπόθεση. Συγκεκριμένα, το *neur* εκφράζεται στο εμβρυϊκό μεσόδερμα (Boulianne et al, 1991), στο εμβρυϊκό νευροεκτόδερμα (Boulianne et al, 1991), στα πρόδρομα των αισθητηρίων οργάνων στην προνύμφη (Huang et al, 1991, Boulianne et al, 1991) και στις περιοχές που θα δώσουν τις φλεβώσεις των φτερών στην νύμφη. Σε όλες τις παραπάνω θέσεις το σηματοδοτικό μονοπάτι λειτουργεί μέσω ενεργοποίησης του συμπλόκου καταστολέων *E(spl)*, εκτός από την πρώτη περίπτωση, όπου εκτός από *E(spl)* χρησιμοποιείται και *single-minded (sim)* (Morel and Schweisguth, 2000).

Πρόσφατα δείχθηκε ότι το *neur* απαιτείται για τον καθορισμό της αναπτυξιακής τύχης των επιδερμικών κυττάρων στους προνευρικούς συναθροισμούς. Με την δημιουργία μιτωτικών κλώνων απώλειας λειτουργίας του γονιδίου οι Yeh et al (2000) έδειξαν ότι όταν οι κλώνοι αυτοί συμπέσουν με προνευρικές περιοχές, οδηγούν σε υπεραριθμία προδρόμων αισθητηρίων οργάνων (ΠΑΟ). Η απώλεια λειτουργίας του *neur* προκαλεί φαινοτύπους παρόμοιους με αυτούς που προκύπτουν σε περιπτώσεις κλώνων απώλειας λειτουργίας των *N* και *Dl*, υποδεικνύοντας ότι το *neur* απαιτείται για τον σωστό καθορισμό της κυτταρικής τύχης στην γενεαλογία του αισθητηρίου οργάνου και ενισχύοντας την υπόθεση ότι η δράση του επιτυγχάνεται μέσω *N* και *Dl*.

Η ΟΥΒΙΚΟΥΪΤΙΝΗ

Η ουβικουΐτινη είναι ένα εξαιρετικά συντηρημένο πολυπεπτίδιο μεγέθους 76 αμινοξέων, που παίζει ρόλο σε μία πλειάδα κυτταρικών διαδικασιών. Για ιστορικούς λόγους, η ουβικουΐτινη συσχετίζεται άμεσα με την αποικοδόμηση πρωτεϊνών, οι οποίες είναι μη λειτουργικές ή μεταλλαγμένες ή έχουν περιορισμένο χρόνο ζωής, όπως π.χ κυκλίνες και μεταγραφικοί παράγοντες. Αυτό επιτυγχάνεται καθώς το πολυπεπτίδιο της ουβικουΐτινης λειτουργεί ως σινιάλο αναγνώρισης από το πρωτεάσωμα 26S, όπου επιτελείται η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών (Hershko and Ciechanover, 1998, Hicke, 1999, Ciechanover et al, 2000).

Η ουβικουΐτινη συνδέεται ομοιοπολικά με το υπόστρωμα και ένας πεπτιδικός δεσμός δημιουργείται μεταξύ της καρβοξυτελικής γλυκίνης αυτής με την ε-αμινομάδα καταλοίπων λυσίνης του υποστρώματος. Η ουβικουΐτινυλίωση των πρωτεϊνών απαιτεί την δράση δύο ή τριών ενζύμων. Αρχικά, η ουβικουΐτινη ενεργοποιείται με την δημιουργία ενός θειεστρικού δεσμού υψηλής ενέργειας με κατάλοιπο κυστεΐνης ενός ενεργοποιητικού ενζύμου (E1). Στην συνέχεια, η ουβικουΐτινη μεταφέρεται σε κυστεΐνη ενός συζευκτικού ενζύμου (E2) και μετά ακολουθεί η πρόσδεση με την πρωτεΐνη-υπόστρωμα, που επιτελείται με την αρωγή μίας πρωτεϊνικής λιγάσης (E3). Συνήθως γίνεται πολυουβικουΐτινυλίωση των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων που καταλήγει σε αποικοδόμησή τους στο πρωτεάσωμα (Ciechanover et al, 2000).

Η ουβικουΐτινη δεν στοχεύει μόνο κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, αλλά και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως είναι οι υποδοχείς εξωκυτταρίων σηματοδοτικών μονοπατιών. Σ' αυτήν την περίπτωση όμως, οι πρωτεΐνες οδηγούνται στο λυσόσωμα για αποικοδόμηση. Επίσης, πρωτεΐνες του ενδοπλασματικού δικτύου, που δεν έχουν αναδιπλωθεί σωστά, ουβικουΐτινυλιώνονται, μεταφέρονται στο πρωτεάσωμα και αποικοδομούνται στο κυτταρόπλασμα ή στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης.

Η ουβικουΐτινυλίωση πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης αποτελεί ακόμα ένα μυστήριο. Έχει βρεθεί ότι η πρόσδεση της ουβικουΐτινης δεν οδηγεί απαραίτητα σε αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα, αλλά σε ενδοκύττωση αυτής (Hicke, 1999). Η συσχέτιση ουβικουΐτινυλίωσης πρωτεϊνών και ενδοκύττωσης προήλθε από πειράματα στον *Saccharomyces cerevisiae*, όπου ένας διαμεμβρανικός μεταφορέας πεπτιδίων, ο STE6, παρουσιαζόταν ως μία κλίμακα ισομορφών υψηλού μοριακού βάρους σε μεταλλαγμένα στελέχη, τα οποία δεν είχαν την ικανότητα να επιτελούν ενδοκύττωση. Αποδείχθηκε ότι οι ισομορφές αυτές του μεταφορέα STE6 ήταν

ουβικουϊτινυλιωμένες. Στην συνέχεια, εντοπίστηκαν και άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες στον *S. cerevisiae*, οι οποίες ουβικουϊτινυλιώνονται και ακολούθως ενδοκυττώνονται, όπως υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες και ο υποδοχέας του α-παράγοντα σύζευξης.

Η ρύθμιση της αναγνώρισης του υποστρώματος ποικίλλει κατά περίπτωση. Για παράδειγμα, η μονο- ή δι-ουβικουϊτινυλίωση και ενδοκύττωση (που δεν οδηγεί στο πρωτεάσωμα) συχνά επιβοηθάται από φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης σε κάποιο κατάλοιπο σερίνης, όπως στην περίπτωση του STE6, αλλά αυτό δεν συμβαίνει πάντα π.χ. στον α-παράγοντα δεν προηγείται στάδιο φωσφορυλίωσης. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι οι παραπάνω πρωτεΐνες μετατρέπονται μεταμεταφραστικά από την κινάση ή την ουβικουϊτίνη σε μια ακολουθία PEST που διαθέτουν (Hicke, 1999).

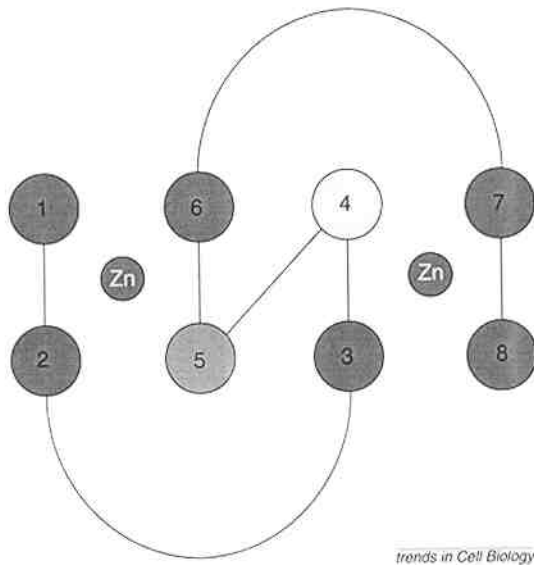
Με την πάροδο των χρόνων όλο και μεγαλύτερος αριθμός πρωτεϊνών που υφίστανται ρύθμιση μέσω ουβικουϊτινυλίωσης γίνεται γνωστός και όσο περνάει ο καιρός γνωρίζουμε όλο και περισσότερα ένζυμα που συμμετέχουν στη διαδικασία. Τα ευκαρυωτικά γονιδιώματα κωδικοποιούν μία ή μερικές E1. Υπάρχουν αρκετές E2, τουλάχιστον 11 στον *S. cerevisiae* και πάνω από 20 έχουν εντοπιστεί στα θηλαστικά. Ωστόσο, η ποικιλία και ο αριθμός των πρωτεϊνών που ρυθμίζονται με ουβικουϊτινυλίωση, προβλέπει ότι υπάρχουν πολλές E3 λιγάσες (Joazeiro and Weissman, 2000, Jackson et al, 2000).

Δάκτυλος Zn-Ring και ουβικουϊτίνη

Ο δάκτυλος RING (πήρε το όνομα του από την ανθρώπινη πρωτεΐνη RING1: Really Interesting New Gene, στην οποία πρωτοεντοπίστηκε) είναι ένα μικρό πρωτεϊνικό μοτίβο που προσδένει ψευδάργυρο και απαντάται σε πολλές δομικά διαφορετικές πρωτεΐνες ευκαρυωτών (δεν υπάρχει σε πρωκαρύωτες), που εμπλέκονται σε ποικιλία διαδικασιών και στις οποίες αρχικά δεν είχε αποδοθεί κάποια κοινή λειτουργία. Η δυσκολία ήταν ακόμα μεγαλύτερη, καθώς πρωτεΐνες με RING εντοπίζονταν τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα και η βιοχημεία τους είναι δύσκολη καθώς έχουν την τάση να δημιουργούν συσσωματώματα (Borden, 2000).

Η συντηρημένη αμινοξική αλληλουχία που ορίζει τον δάκτυλο ψευδαργύρου RING είναι η εξής: **CysX₂CysX₉₋₃₉CysX₁₋₃HisX₂₋₃Cys/HisX₂CysX₄₋₄₈CysX₂Cys**

Υπάρχουν όμως και παραλλαγές, οι οποίες κυρίως αφορούν τα κατάλοιπα κυστεΐνης και ιστιδίνης που προσδένουν το μέταλλο. Συνήθως, ο δάκτυλος εντοπίζεται στο αμινοτελικό ή καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Μία γενικότερη απεικόνιση της αναδίπλωσης ενός μοτίβου RING φαίνεται στην εικόνα 1.4.



Εικόνα 1.4: Η δομή του μοτίβου Zn-RING.

Οι αριθμημένοι κύκλοι αντιστοιχούν σε αμινοξικά κατάλοιπα Cys και His που προσδένουν τα ιόντα του Zn.

Νεότερες μελέτες δείχνουν ότι ο δάκτυλος RING μπορεί να αλληλεπιδρά με συζευκτικά ένζυμα ουβικουΐτινης E2, να προωθεί ουβικουΐτινυλίωση και να λειτουργεί ως πρωτεϊνική λιγάση E3 (Freemont, 2000). Ενα χαρακτηριστικό παράδειγμα πρωτεΐνης με RING, η οποία παίζει ρόλο πρωτεϊνικής λιγάσης E3, είναι το *cbl-2*, το οποίο ρυθμίζει την σηματοδότηση μέσω μεμβρανικών υποδοχέων τυροσίνης, όπως αυτοί των EGF, PDGF και CSF-1 (Joazeiro and Weissman, 2000, Joazeiro et al, 1999).

Ο δάκτυλος Zn-RING του γονιδίου *neur* της *D. melanogaster* παρουσιάζει υψηλή συντήρηση μεταξύ των ομολόγων του σε άλλα είδη και του γονιδίου *cbl-2* των θηλαστικών, άρα υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να λειτουργεί και το *neur*, ως λιγάση ουβικουΐτινης E3, ρυθμίζοντας τα επίπεδα του υποδοχέα N ή του δεσμευτή DI στην επιφάνεια των κυττάρων ή την ενδοκύττωση των παραπάνω.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της εν λόγω εργασίας είναι η μελέτη της δράσης του γονιδίου *neuralized* της *Drosophila melanogaster* κατά την ανάπτυξη του εντόμου και η σχέση του με το μονοπάτι μετάδοσης σήματος μέσω του υποδοχέα Notch.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Επιλογή σταδίου εμβρύων, προνυμφών και νυμφών *D. melanogaster*

Η ηλικία των εμβρύων που χρησιμοποιήθηκαν για τα βιοχημικά πειράματα καθορίστηκε σύμφωνα με τους Hartenstein και Campos-Ortega.

Οι προνύμφες, που χρησιμοποιήθηκαν τόσο στα βιοχημικά πειράματα, όσο και στις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις, βρίσκονταν προς το τέλος του 3ου σταδίου και περιπλανιόνταν στο δοχείο της τροφής.

Η ηλικία των νυμφών που χρησιμοποιήθηκαν στις ιστοχημικές χρώσεις υπολογίστηκε ως ο χρόνος που μεσολάβησε από την στιγμή δημιουργίας της λευκής νύμφης μέχρι την ανατομία.

2. Εκχύλιση πρωτεϊνών από έμβρυα και προνύμφες *D. melanogaster*

Έμβρυα κατάλληλης ηλικίας από αγρίου τύπου και μεταλλαγμένα στελέχη *D. melanogaster* συλλέχθηκαν και αποχοριοποιήθηκαν σε 50% v/v χλωρίνη για 3-4 λεπτά. Ακολούθησε ομογενοποίηση των εμβρύων σε ειδικούς ομογενοποιητές και σε διάλυμα εκχύλισης με σύσταση 300mM NaCl, 50mM Tris-Cl pH 8.0, 0.5% Nopidet-P40, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂ (Fehon et al, 1991) και αναστολείς πρωτεασών (1μg/ml aprotinin, 1μg/ml leupeptin, 1μg/ml pepstatin και 100μg/ml PMSF).

Στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκαν προνύμφες για έλεγχο της παρουσίας κάποιας πρωτεΐνης, η διαδικασία της ομογενοποίησης ήταν η ίδια με αυτή που αναφέρεται παραπάνω, αφού προηγουμένως αποκόπηκε το οπίσθιο μισό της προνύμφης και αφαιρέθηκε το λιπαρό σώμα.

3. Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδιου και SDS (sodium dodecyl sulfate), όπως περιγράφεται στον Sambrook et al, 1989.

Στην περίπτωση που ο σκοπός είναι η μελέτη των ισομορφών της πρωτεΐνης *Delta*, δεν χρησιμοποιούνται αναγωγικοί παράγοντες (DTT ή β'μερκαπτοαιθανόλη) στο διάλυμα φόρτωσης (Laemli) των δειγμάτων. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται κανονικά αναγωγικοί παράγοντες.

4. Ανάλυση Western

Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από έμβρυα συγκεκριμένων σταδίων και προνύμφες 3^{ου} σταδίου *D. melanogaster* αναλύθηκαν ηλεκτροφορητικά σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμιδίου και SDS κατάλληλης πυκνότητας (8% για ανίχνευση της πρωτεΐνης Delta και 6% για ανίχνευση της πρωτεΐνης Notch). Μετά την ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες του πηκτώματος μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (PROTRAN) με την μέθοδο της υγρής ηλεκτρομεταφοράς (σε συσκευή BioRad) και με τάση 100V για 1 ώρα στους 8°C.

Στην συνέχεια, η μεμβράνη επώαστηκε με παρεμποδιστικό διάλυμα 1x PBS (0.13M NaCl, 0.007M Na₂HPO₄, 0.003M NaH₂PO₄), 5% w/v άπαχο γάλα σε σκόνη (carnation) σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 1 ώρα, για να εμποδιστούν οι μη ειδικές θέσεις πιθανής πρόσδεσης του αντισώματος. Ακολούθησε επώαση με το πρωτεύον αντίσωμα, το οποίο αραιώθηκε στο παρεμποδιστικό διάλυμα (το μονοκλωνικό αντίσωμα α-N 9C6 χρησιμοποιείται σε αραιώση 1:5.000, ενώ το μονοκλωνικό αντίσωμα α-DI Mab9B ή Mab202 χρησιμοποιείται σε αραιώση 1:10.000 αν προέρχεται από ασκитικό υγρό ή σε αραιώση 1:30 αν προέρχεται από υπερκείμενο κυτταροκαλλιέργειας), για τουλάχιστον 16 ώρες στους 8°C.

Η περίσσεια του πρωτεύοντος αντισώματος απομακρύνεται με τρεις πλύσεις της μεμβράνης (5 λεπτών) με διάλυμα 1x PBS.

Ακολουθεί επώαση με το δευτερεύον αντίσωμα GaM-HRP (Goat anti Mouse- Horse Radish Peroxidase), το οποίο αραιώνεται σε παρεμποδιστικό διάλυμα 1:8.000, για 2-3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Η περίσσεια του δευτερεύοντος αντισώματος απομακρύνεται με τρεις πεντάλεπτες πλύσεις της μεμβράνης με 1x PBS και ακολουθεί εμφάνιση με χρήση του συστήματος της χημειοφωταύγειας SuperSignal της εταιρείας PIERCE και σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας.

5. Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις

Για την μελέτη της παρουσίας κάποιας ή κάποιων πρωτεϊνών σε προνύμφες *D. melanogaster* ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- Σ Ανατομία των προνυμφών μέσα σε διάλυμα 1x PBS. Απομάκρυνση του οπισθίου τμήματος της προνύμφης, αναστροφή του εμπρόσθιου μισού και απομάκρυνση του λιπαρού σώματος.
- Σ Μονιμοποίηση των ιστών σε διάλυμα 1x PEM / 4% PFA για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Σ Τρεις γρήγορες πλύσεις με 1x PBS.

- Σ Επώαση των μονιμοποιημένων ιστών με διάλυμα PBT (1x PBS, 5% BSA, 0.2% Triton-X 100) για τουλάχιστον 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, το οποίο χάρη στην BSA βοηθάει στην παρεμπόδιση των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης αντισωμάτων.
- Σ Επώαση με το πρωτεύον (-ντα) αντίσωμα (-ματα), το οποίο αραιώνεται σε διάλυμα PBT για τουλάχιστον 16 ώρες στους 4⁰C.
- Σ Πλύσεις της περίσσειας του πρωτεύοντος αντισώματος με διάλυμα PT (1x PBS, 0.2% Triton-X 100), τρεις φορές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Σ Επώαση με το δευτερεύον (-ντα) αντίσωμα (-τα), το οποίο αραιώνεται σε διάλυμα PBT για τουλάχιστον 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Σ Πλύσεις της περίσσειας του δευτερεύοντος αντισώματος με διάλυμα PT (1x PBS, 0.2% Triton-X 100), τρεις φορές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Σ Εάν πρόκειται για δευτερεύον αντίσωμα συζευγμένο με HRP (Horseradish peroxidase), ακολουθεί εμφάνιση της χρώσης με ενζυμική αντίδραση με DAB και H₂O₂. Συγκεκριμένα, παρασκευάζεται διάλυμα που περιέχει 935 μl διαλύματος PT, 30 μl 10mg/ml DAB (diaminobenzamine), 30 μl διαλύματος 50 μM NiCl₂ / 50 μM CoCl₂ και 5 μl 0.37% H₂O₂. Η χρώση εμφανίζεται μέσα σε περίπου 5 λεπτά και η αντίδραση σταματά με μεταφορά των ιστών σε 1x PBS. Ακολουθεί ανατομία των αναπτυξιακών δίσκων, μεταφορά τους σε αντικειμενοφόρο σε διάλυμα 80% γλυκερόλης, τοποθέτηση καλυπτρίδας και στερέωση αυτής. Τα δείγματα παρατηρούνται σε οπτικό μικροσκόπιο.
- Σ Εάν πρόκειται για δευτερεύον αντίσωμα συζευγμένο με φθορίζουσα ουσία, όλοι οι χειρισμοί από την επώαση με αυτό και στο εξής γίνονται στο σκοτάδι. Δεν χρειάζεται εμφάνιση της χρώσης, αλλά απλώς οι αναπτυξιακοί δίσκοι ανατέμνονται, τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρο σε διάλυμα 80% γλυκερόλης με 1% w/v n-propyl-gallate ή vectashield (ουσίες που εμποδίζουν το ξεθώριασμα της χρώσης). Ακολουθεί τοποθέτηση καλυπτρίδας και στερέωση αυτής. Τα δείγματα παρατηρούνται σε μικροσκόπιο φθορισμού ή σε συνεστιακό μικροσκόπιο.

Στις περιπτώσεις ανοσοϊστοχημικών χρώσεων με το μονοκλωνικό αντίσωμα *α-E(spl)* Mab323 χρησιμοποιήθηκε ένα εναλλακτικό πρωτόκολλο:

- Σ Ανατομία των προνυμφών μέσα σε χρονικό διάστημα λιγότερο από 20 λεπτά και τοποθέτηση σε διάλυμα μονιμοποίησης (1x PEM, 1% Triton-X 100, 1% PFA) σε θερμοκρασία πάγου.
- Σ Μονιμοποίηση των ιστών με επώαση στο ίδιο διάλυμα για 1 ώρα στους 8⁰C.
- Σ Δύο γρήγορες πλύσεις με διάλυμα 1x PBS σε θερμοκρασία πάγου (μεταφορά των ιστών από το ένα διάλυμα στο άλλο).

- Σ Επώαση των ιστών με διάλυμα παρεμπόδισης (50mM Tris-Cl, pH 6.8, 150mM NaCl, 0.5% NP-40, 5% NGS), που βοηθάει στην κατάληψη μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του αντισώματος (εξαιτίας της παρουσίας NGS) για τουλάχιστον 1 ώρα στους 8⁰C.
- Σ Επώαση των ιστών με το πρωτεύον αντίσωμα, το οποίο αραιώνεται στο παραπάνω διάλυμα για τουλάχιστον 16 ώρες στους 8⁰C.
- Σ Πλύσεις της περίσσειας του πρωτεύοντος αντισώματος με διάλυμα 50mM Tris-Cl, pH 6.8, 150mM NaCl, 0.5% NP-40, 1% NGS με απλή μεταφορά των ιστών από ένα δοχείο σε άλλο σε θερμοκρασία πάγου.
- Σ Επώαση με το δευτερεύον αντίσωμα GaM-HRP, το οποίο αραιώνεται στο παραπάνω διάλυμα για τουλάχιστον 3 ώρες στους 8⁰C.
- Σ Δύο γρήγορες πλύσεις σε διάλυμα 50mM Tris-Cl, pH 6.8, 150mM NaCl, 0.5% NP-40, 1% NGS σε θερμοκρασία πάγου.
- Σ Εμφάνιση της χρώσης με εμζυμική αντίδραση, όπως αναφέρεται παραπάνω.

Στην περίπτωση ανοσοϊστοχημικής χρώσης νυμφών ηλικίας 6 ωρών, η διαδικασία ήταν ακριβώς η ίδια που ακολουθήθηκε για τις προνύμφες.

6. Χρώσεις ανίχνευσης δραστηριότητας β-γαλακτοσιδάσης

Για τον έλεγχο της έκφρασης ενδογενών γονιδίων, χρησιμοποιήθηκαν παγίδες ενισχυτών των εν λόγω με β-γαλακτοσιδάση. Για τον εντοπισμό της ενεργότητας του ενζύμου της β-γαλακτοσιδάσης, οι ιστοί υπέστησαν την ακόλουθη διαδικασία:

ΣΑνατομία των προνυμφών.

ΣΜονιμοποίηση των ιστών σε διάλυμα 1% γλουταραλδεϋδης σε 1x PBS για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

ΣΤρεις γρήγορες πλύσεις με 1x PBS.

ΣΕπώαση σε διάλυμα χρώσης με σύσταση 10mM PB (10mM Na₂HPO₄, NaH₂PO₄), 150mM NaCl, 1mM MgCl₂, 3mM K₄[Fe₂CN₆], 3mM K₄[Fe₃CN₆], 0.3% Triton-X 100 (το οποίο έχει προθερμανθεί στους 65⁰C) και 0.2% Xgal (20 μl από διάλυμα 5% Xgal σε DMF -dimethyl-formamide- σε 500 μl διαλύματος χρώσης). Η επώαση γίνεται στους 37⁰C και διαρκεί ανάλογο χρόνο με την διαγονιδιακή σειρά μυγών που χρησιμοποιείται.

ΣΗ αντίδραση σταματά με την τοποθέτηση των ιστών σε διάλυμα 1x PBS, ακολουθεί ανατομία των αναπτυξιακών δίσκων, τοποθέτηση σε αντικειμενοφόρο σε διάλυμα 80% γλυκερόλης και μικροσκοπία.

Στην περίπτωση που χρειάστηκε να πραγματοποιηθούν χρώσεις ανίχνευσης δράσης β-γαλακτοσιδάσης σε νύμφες, υπήρξαν κάποιες παρεκκλίσεις από το παραπάνω πρωτόκολο. Συγκεκριμένα, δεν χρησιμοποιήθηκε γλουταραλδεΐδη για μονιμοποίηση του ιστού, αλλά 4% PFA/1x PEM. Η διαδικασία της μονιμοποίησης διήρκεσε από 20 λεπτά (για νύμφες ηλικίας 2-8 ωρών) έως 45 λεπτά (για νύμφες 24 και 30 ωρών) σε θερμοκρασία δωματίου. Στην δεύτερη περίπτωση (24-30 ώρες), για να επιτευχθεί η ανατομία των πρώιμων φτερών, αφαιρέθηκε μία μεμβράνη που περιβάλλει τον ιστό σε αυτήν την ηλικία, ενώ οι νύμφες βρίσκονταν ακόμα μέσα στο διάλυμα μονιμοποίησης. Ακολούθησε διαδικασία χρώσης, όπως περιγράφεται προηγουμένως για τις προνύμφες.

Ο χρόνος διάρκειας της χρώσης εξαρτάται από την παγίδα ενισχυτή με *lacZ* (στέλεχος εντόμου) που μελετάται σε κάθε περίπτωση. Συγκεκριμένα, για την A101-*lacZ* απαιτούνται 5-8 ώρες επώασης στους 37°C, ενώ για την *DI-lacZ* 2.5 –3 ώρες είναι αρκετές.

7. Δημιουργία, εντοπισμός και μελέτη μιτωτικών κλώνων

– Κλώνοι εκτοπικής έκφρασης του γονιδίου *neuralized*

Κλώνοι εκτοπικής έκφρασης δημιουργήθηκαν με την μέθοδο του μιτωτικού ανασυνδυασμού *in cis* ή Flip-out (de Celis and Bray, 1997), με την χρήση του στελέχους *ywhsFLP*; *Ubx>stop^f>Gal4lacZ/CyO*. Ο ενισχυτής *Ubx* εκφράζεται σε διάφορους ιστούς και έτσι το στέλεχος επιτρέπει την δημιουργία μιτωτικών κλώνων σε διάφορα σημεία του σώματος του εντόμου-απόγονου της διασταύρωσης του παραπάνω στελέχους με ένα στέλεχος υπερέκφρασης του γονιδίου που μας ενδιαφέρει (*UAS-dneuralized*). Η φλιπάση επάγεται με θερμικό σοκ στους 38°C για 15 λεπτά σε προνύμφες 1^{ov} - 2^{ov} σταδίου. Οι μιτωτικοί κλώνοι εντοπίζονται από την παρουσία κατσαρών εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων (sensory bristles) στα φτερά και στον θώρακα του εντόμου σε ενήλικα άτομα και από την παρουσία της β'γαλακτοσιδάσης σε αναπτυξιακούς δίσκους προνυμφών ή νυμφών.

– Κλώνοι απώλειας λειτουργίας του γονιδίου *neuralized*

Κλώνοι απώλειας λειτουργίας του γονιδίου δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο του μιτωτικού ανασυνδυασμού *in trans* (Xu and Rubin, 1993) σε απογόνους της διασταύρωσης:

ywhsFLP; *FRT82Barm-lacZ/TM6B* x *w*; *FRT82Bneur^{LL119}/TM6B*

Η επαγωγή της φλιπάσης στην περίπτωση αυτή έγινε σε προνύμφες 1^{ου}-2^{ου} σταδίου με θερμικό σοκ στους 38⁰C για 1 ώρα. Ο εντοπισμός των κλώνων σε αναπτυξιακούς δίσκους προνυμφών 3^{ου} σταδίου γίνεται από την απουσία της β-γαλακτοσιδάσης μέσα σε αυτούς.

Αντισώματα

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της εργασίας αυτής για ανοσοϊστοχημικές χρώσεις αναπτυξιακών δίσκων προνυμφών *D. melanogaster* και οι σχετικές αραιώσεις αυτών συνοψίζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

ΠΡΩΤΕΥΟΝΤΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ			
ΑΝΤΙΣΩΜΑ	ΑΡΑΙΩΣΗ	ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ
M-α-N mAb9C6	1:1.000	Ενδοκυτάρια περιοχή της πρωτεΐνης Notch	SAT
M-α-D1 mAb9B ή mAb202	1:5.000	Εξωκυτάρια περιοχή της πρωτεΐνης Delta	SAT
M-α-ct	1:100	Πρωτεΐνη cut	Karen Blochlinger
R-α-ase	1:1.000	Πρωτεΐνη asense	Andrew Jarman
R-α-β-gal	1:10.000	β-γαλακτοσιδάση	Cappel
M-α-β-gal	1:1.000	β-γαλακτοσιδάση	Dev. Studies Hybridoma Bank
M-α-E(spl) mAb323	1:3	E(spl): mδ, mγ, m7, m3	SJB
ΔΕΥΤΕΡΕΥΟΝΤΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ			
ΑΝΤΙΣΩΜΑ	ΑΡΑΙΩΣΗ	ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ
GαM-HRP	1:250	Horseradish peroxidase	Jackson Immunoresearch
GαR-HRP	1:500	Horseradish peroxidase	Jackson Immunoresearch
GαM-FITC	1:250	Πράσινο (Fluorescein)	Jackson Immunoresearch
GαR-Cy3	1:1.000	Κόκκινο (Cyanine-3)	Jackson Immunoresearch
GαM-TRITC	1:250	Κόκκινο (Rhodamine)	Jackson Immunoresearch

G: κατσίκια, M: ποντίκι, R: κουνέλι

Στελέχη *D. melanogaster*

Στελέχη οδηγοί

ombGal4/FM7: Αντιστοιχεί στον υποκινητή του γονιδίου *optomotor-blind*. Έκφραση στην κεντρική περιοχή του δίσκου του φτερού εκατέρωθεν του προσθιοπίσθιου ορίου και μάλιστα σε κλίση συγκέντρωσης μακριά από το όριο

ptcGal4: Αντιστοιχεί στην περιοχή έκφρασης του γονιδίου *patched*. Έκφραση σε κλίση αρχόμενη από την εμπρόσθια πλευρά του εμπροσθιοπίσθιου ορίου και ελαττούμενη προς τα εμπρός.

pnrGal4/TM3: Έκφραση σε μία λωρίδα κατά μήκος του σώματος του ζώου εκατέρωθεν της ραχιαίας μεσογραμμής. Αντιστοιχεί στην περιοχή έκφρασης του γονιδίου *pannier*.

Στελέχη υπερέκφρασης

yw;UAS-dneur^{12,4}: Στέλεχος εκτοπικής έκφρασης του γονιδίου *neuralized*.

w;UAS-DxD^{B40}: Στέλεχος εκτοπικής έκφρασης του γονιδίου *Delta*.

w;UAS-GFP-z: Στέλεχος υπερέκφρασης μιας πυρηνικής μορφής της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης.

UAS-DxD;UAS-dneur: Στέλεχος που δημιουργήθηκε με ανασυνδυασμό των δύο παραπάνω στελέχων στο 3^ο χρωμόσωμα και χρησιμεύει για την εκτοπική συνέκφραση των *neuralized* και *Delta*.

Στελέχη παγίδες ενισχυτών

A101-lacZ.IF3/TM3: Παγίδα ενισχυτή του γονιδίου *neuralized*.

Dl-lacZ: Παγίδα ενισχυτή του γονιδίου *Delta*.

Για δημιουργία μιτωτικών κλώνων

yw^{fhs}FLP;Ubx>stop^{f+}>Gal4lacZ/CyO: Περιέχει υποκινητή που εκφράζεται σε διάφορα σημεία του ζώου (και στο φτερό), φλιπάση, Gal4 για εκτοπική έκφραση και β-γαλακτοσιδάση για σήμανση των μιτωτικών κλώνων.

w;FRT82Bneur^{LL119}/TM6B: Περιλαμβάνει το μη λειτουργικό αλληλόμορφο *neur^{LL119}* για μιτωτικό ανασυνδυασμό.

ywhsFLP;FRT82Barm-lacZ/TM6B: Περιέχει φλιπάση και μάρτυρα β-γαλακτοσιδάση, που βοηθάει στον εντοπισμό των μιτωτικών κλώνων απώλειας λειτουργίας στο 3^ο χρωμόσωμα.

Και άλλα...

ru h th st neur¹ cu sr es ca / TM3, ftz-lacZ

ru h th st neur¹ cu sr es ca / TM3, Kr-GAL4^{DC2} UAS-GFP65T^{DC10}

e Df(3R)gro^{b32.2}/ TM3, ftz-lacZ

eDf(3R)gro^{b32.2}/ TM3, Kr-GAL4^{DC2} UAS-GFPS65T^{DC10}

Df(3R)DI^{BX6} / TM6B

Τα τέσσερα πρώτα από τα παραπάνω περιέχουν εξισορροπητικά χρωμοσώματα για την διευκόλυνση της γονοτυπικής διάκρισης ομοζύγων και ετεροζύγων ατόμων (είτε με β-γαλακτοσιδάση, είτε με πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη). Όλα τα στελέχη αυτά χρησιμοποιούνται για την βιοχημική μελέτη που περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω (Αποτελέσματα).

8. Μικροσκοπία - Φωτογράφιση

Τα παρασκευάσματα των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο τύπου Leica με διερχόμενο φως και οπτικά Nomarski.

Η λήψη των φωτογραφιών έγινε με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή προσαρμοσμένη στο μικροσκόπιο, τύπου Pixera και η επεξεργασία των φωτογραφιών έγινε με την χρήση του προγράμματος Adobe Photoshop 4.0.

9. Συνεστιακό μικροσκόπιο

Οι εικόνες που προέρχονται από ανοσοϊστοχημικές χρώσεις με φθορισμό ελήφθησαν με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου τύπου Leica. Οι συνθήκες μικροσκοπίας και οι μεγεθύνσεις σε κάθε περίπτωση αναφέρονται στις εικόνες των αποτελεσμάτων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για να μελετηθεί η δράση του γονιδίου *neuralized* στην ανάπτυξη της *Drosophila melanogaster* και συγκεκριμένα να εντοπιστεί ο ρόλος του στην λειτουργία του μονοπατιού μετάδοσης σήματος *Notch*, ακολουθήθηκαν δύο προσεγγίσεις: η βιοχημική μελέτη και η μελέτη σε ιστολογικό/κυτταρικό επίπεδο.

ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *NEURALIZED*

Επειδή, όπως προαναφέρθηκε στην εισαγωγή, το γονίδιο *neuralized* είναι νευρογόνο και εμπλέκεται στην σηματοδότηση μέσω του *Notch* και επειδή φαίνεται να εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ελέγχθηκε αν οι βασικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που απαρτίζουν αυτό το μονοπάτι, ο υποδοχέας *Notch* και ο δεσμευτής *Delta* επηρεάζονται από την δράση του *neuralized*. Γι'αυτόν τον λόγο, ελέγχθηκε η παρουσία των διαφόρων ισομορφών των παραπάνω πρωτεϊνών *in vivo* με την χρήση της τεχνικής *Western*. Συγκεκριμένα, έγινε προσπάθεια για απάντηση των ακόλουθων ερωτημάτων:

Τι συμβαίνει σε έμβρυα με μεταλλαγή απώλειας λειτουργίας του γονιδίου *neuralized*, στην έκφραση της πρωτεΐνης *Delta* και στην έκφραση της πρωτεΐνης *Notch*;

Τι συμβαίνει στην πρωτεΐνη *Delta* σε εκτοπική έκφραση του γονιδίου *neuralized* σε προνύμφες;

ΟΙ ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ DELTA ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΕΜΒΡΥΪΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΗΣ ΔΡΟΣΟΦΙΛΑΣ ΚΑΙ Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ *NEURALIZED*

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, η πρωτεΐνη *Delta* απαντάται σε διαφορετικές ισομορφές στην *D.melanogaster*, οι οποίες βρίσκονται σε μία δυναμική κατάσταση κατά την ανάπτυξη του εντόμου από το έμβρυο, μέχρι το ενήλικο. Για να εντοπιστούν οι διαφορετικές ισομορφές της εν λόγω πρωτεΐνης και να διασαφηνιστεί η πιθανή δράση του γονιδίου *neuralized* στην εξισορρόπηση των διαφορετικών ισομορφών της, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική *Western*.

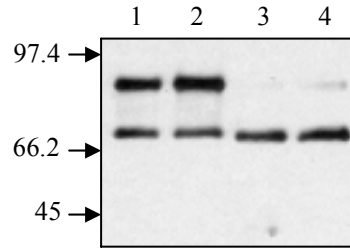
Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από έμβρυα *D.melanogaster* 9ου-10ου (3.5-5.5 ώρες μετά την ωοαπόθεση) και 16ου σταδίου (13-16 ώρες μετά την ωοαπόθεση) χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση Western. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *ru h th st neur^l cu sr es ca/ TM3, Kr-GAL4^{DC2} UAS-GFPS65T^{DC10}*. Η επιλογή νευρογόνων και αγρίου τύπου εμβρύων έγινε με την βοήθεια του εξισορροπητικού χρωμοσώματος TM3, το οποίο φέρει την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη και όποιο άτομο το φέρει φθορίζει, εάν ελεγχθεί σε κατάλληλο μικροσκόπιο με λυχνία φθορισμού. Τα πράσινα έμβρυα - που φέρουν TM3 - είναι αγρίου τύπου, καθώς είναι ετερόζυγα για την υπολειπόμενη μεταλλαγή *neur^l*, ενώ τα νευρογόνα ομόζυγα *neur^l/neur^l* έμβρυα δεν φθορίζουν. (Τα ομόζυγα έμβρυα για το εξισορροπητικό χρωμόσωμα διακρίνονται από την ένταση του φθορισμού τους και δεν επιλέγονται για το πείραμα).

Η ποσοτικοποίηση των εκχυλισμάτων έγινε με μέτρηση του αριθμού των εμβρύων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε διαδρομή πριν την εκχύλιση. Η εκχύλιση, η ηλεκτροφόρηση και η ανάλυση Western έγιναν όπως αναφέρεται στα Υλικά και Μέθοδοι.

Το αποτέλεσμα του Western φαίνεται στην εικόνα 3.1. Η επάνω ζώνη αντιστοιχεί στην ολόκληρου μεγέθους πρωτεΐνη Delta, ενώ η κάτω στην εκκρινόμενη ισομορφή της. Οι ενδιάμεσες ισομορφές (Klueg et al, 1998) διακρίνονται ελάχιστα (ίσως το μέγεθος του πηκτώματος δεν είναι το κατάλληλο για να επιτρέπει την διάκρισή τους).

Παρατηρούμε ότι όσο αυξάνει η εμβρυϊκή ηλικία, τόσο ελαττώνεται η ολόκληρου μεγέθους πρωτεΐνη και σχετικά αυξάνεται η εκκρινόμενη ισομορφή. Επιπλέον, στα νευρογόνα *neur^l/neur^l* έμβρυα παρατηρείται μία μικρή αλλά σταθερή αύξηση της συνολικής ποσότητας της πρωτεΐνης Delta και στα δύο διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια που μελετήθηκαν. Ειδικότερα, στα νεαρότερα έμβρυα φαίνεται ότι η ποσοτική αύξηση της πρωτεΐνης είναι εντονότερη στην ολόκληρου μεγέθους ισομορφή.

Πρέπει να σημειωθεί ότι το αποτέλεσμα που αντιστοιχεί στην εμβρυϊκή ηλικία 3.5-5.5 ώρες είναι σημαντικό, καθώς το γονίδιο *neuralized* έχει δειχθεί ότι εκφράζεται σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο στους προδρόμους των νευρικών κυττάρων (Boulianne et al, 1991). Τότε γίνεται έντονη σηματοδότηση από το *Notch* για επιλογή της αναπτυξιακής τύχης των κυττάρων και την απόφαση για το ποιο κύτταρο θα γίνει νευρικό και ποιο επιδερμικό μέσω πλευρικής αναστολής.



Εικόνα 3.1: Ανίχνευση της πρωτεΐνης Delta σε νευρογόνα και αγρίου τύπου έμβρυα σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια.

Τα έμβρυα προέρχονται από το στέλεχος *ru h th st neur^l cu sr es ca / TM3, Kr-GAL4^{DC2} UAS-GFPS65T^{DC10}* και διακρίνονται σε αγρίου τύπου (1,3) και νευρογόνα (2,4). Στις διαδρομές 1 και 2 ελέγχονται εμβρυϊκά εκχυλίσματα 9ου-10ου σταδίου και στις διαδρομές 3 και 4 έμβρυα 16ου σταδίου, αγρίου τύπου και νευρογόνα, αντίστοιχα. Η ανίχνευση της πρωτεΐνης έγινε με το αντίσωμα α -DI Mab202.

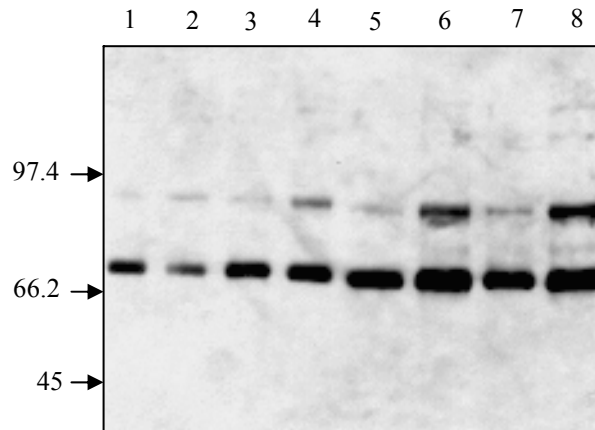
Ο αριθμός των εμβρύων που εκχυλίστηκαν είναι ο ίδιος σε κάθε δείγμα.

Αριστερά φαίνονται τα μεγέθη μάρτυρα μοριακών βαρών σε kDa.

Για να διαπιστωθεί αν το αποτέλεσμα της αύξησης της συνολικής πρωτεΐνης Delta απαντάται αποκλειστικά σε έμβρυα με απώλεια λειτουργίας του γονιδίου *neuralized* ή είναι γενικότερο χαρακτηριστικό νευρογόνων εμβρύων, έγινε ανάλυση Western πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων εμβρύων *D.melanogaster* 16ου σταδίου (13-16 ώρες μετά την ωοαπόθεση).

Τα έμβρυα αυτά προέρχονται από τα στελέχη *ru h th st neur^l cu sr es ca / TM3, ftz-lacZ, e Df(3R)gro^{b32.2} / TM3, ftz-lacZ* και *Df(3R)Dl^{BX6} / TM6B*. Η διάκριση των νευρογόνων (φέρουν σε ομοζυγωτία την έλλειψη) και των αγρίου τύπου εμβρύων (είναι ετερόζυγα για την έλλειψη) έγινε με φαινοτυπική διάκρισή τους (τα νευρογόνα έμβρυα στο στάδιο αυτό της ανάπτυξης έχουν υπερπλασία του νευρικού συστήματος σε σχέση με την επιδερμίδα και ο πεπτικός σωλήνας τους δεν είναι ενιαίος, αλλά διακόπτεται).

Το αποτέλεσμα του πειράματος φαίνεται στην εικόνα 3.2. Παρατηρείται ότι η αύξηση της πρωτεΐνης είναι ένα γενικότερο χαρακτηριστικό των νευρογόνων εμβρύων (διαδρομές3-8). Στην διαδρομή 2 φαίνεται το ποσό της μητρικής πρωτεΐνης Delta που απομένει στα έμβρυα μέχρι το 16ο στάδιο (σε σχέση με την 1). Στα *neur^l/neur^l* έμβρυα το αποτέλεσμα φαίνεται να είναι ποσοτικά εντονότερο και συγκεκριμένα αυτό που δείχνει να διαφοροποιεί τα εν λόγω από τα *E(spl)⁻/E(spl)⁻* έμβρυα είναι η αύξηση της μεγάλης ισομορφής της πρωτεΐνης.



Εικόνα 3.2: Ανίχνευση της πρωτεΐνης *Delta* σε διαφορετικού γονοτύπου νευρογόνα έμβρυα *D.melanogaster* 16ου σταδίου.

Τα εμβρυϊκά εκχυλίσματα προέρχονται από τα στελέχη:

Διαδρομές 1 και 2: $Df(3R)Dl^{BX6} / TM6B$ αγρίου τύπου (ετερόζυγα) και νευρογόνα (ομόζυγα $Df(3R)Dl^{BX6} / Df(3R)Dl^{BX6}$) αντίστοιχα.

Διαδρομές 3 και 4: $e Df(3R)gro^{b32.2} / TM3$ αγρίου τύπου (ετερόζυγα) και νευρογόνα (ομόζυγα $e Df(3R)gro^{b32.2} / e Df(3R)gro^{b32.2}$) αντίστοιχα.

Διαδρομές 5 έως 8: $ru h th st neur^1 cu sr es ca / TM3, ftz-lacZ$ αγρίου τύπου ετερόζυγα (5,7) και νευρογόνα ομόζυγα $ru h th st neur^1 cu sr es ca / ru h th st neur^1 cu sr es ca$ (6,8).

Στις διαδρομές 1-4 τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προέρχονται από 14 έμβρυα, ενώ στις 5-8 προέρχονται από 25 έμβρυα.

Τα δείγματα 1-6 προέρχονται παρασκευάστηκαν με απλή ομογενοποίηση των εμβρύων σε διάλυμα Laemli, ενώ τα δύο τελευταία δείγματα προέρχονται από ομογενοποίηση σε διάλυμα εκχύλισης με αναστολείς πρωτεασών (Υλικά και Μέθοδοι).

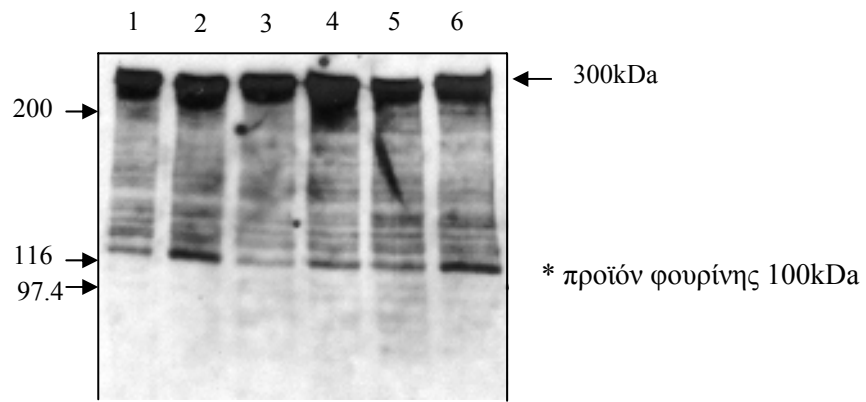
Η ανίχνευση της πρωτεΐνης έγινε με το αντίσωμα α -DI Mab202.

Αριστερά φαίνονται τα μεγέθη μάρτυρα μοριακών βαρών σε kDa.

Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ NOTCH ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ ΝΕΥΡΟΓΟΝΑ ΕΜΒΡΥΑ

Για να διαπιστωθεί τι αποτέλεσμα έχουν οι νευρογόνοι γονότυποι στην παρουσία της πρωτεΐνης Notch, πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε νευρογόνα και αγρίου τύπου έμβρυα 16ου σταδίου διαφορετικών γονοτύπων *D.melanogaster* (όπως και προηγουμένως τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής: *ru h th st neur¹ cu sr es ca* / TM3, *ftz-lacZ*, *e Df(3R)gro^{b32.2}* / TM3, *ftz-lacZ* και *Df(3R)Dl^{BX6}* / TM6B). Η διάκριση των νευρογόνων και μη εμβρύων έγινε φαινοτυπικά. Η ποσοτικοποίηση έγινε με αρίθμηση των εμβρύων που εκχύλιστηκαν. Η εκχύλιση και η ανάλυση έγινε όπως αναφέρεται στα Υλικά και Μέθοδοι.

Το αποτέλεσμα της ανάλυσης Western φαίνεται στην εικόνα 3.3. Παρατηρείται ότι στα νευρογόνα έμβρυα 16ου σταδίου τα συνολικά επίπεδα της πρωτεΐνης *Notch* αυξάνονται. Ουσιαστικές ποιοτικές αλλαγές στις διάφορες ισομορφές της πρωτεΐνης δεν είναι εμφανείς.



Εικόνα 3.3: Ανίχνευση της πρωτεΐνης Notch σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από αγρίου τύπου και νευρογόνα έμβρυα *D.melanogaster* 16ου σταδίου.

Τα εμβρυϊκά εκχυλίσματα προέρχονται από τα στελέχη:

Διαδρομές 1 και 2: $Df(3R)Dl^{BX6} / TM6B$ αγρίου τύπου (ετερόζυγα) και νευρογόνα (ομόζυγα $Df(3R)Dl^{BX6} / Df(3R)Dl^{BX6}$) αντίστοιχα.

Διαδρομές 3 και 4: $e Df(3R)grob^{32.2} / TM3$ αγρίου τύπου (ετερόζυγα) και νευρογόνα (ομόζυγα $e Df(3R)grob^{32.2} / e Df(3R)grob^{32.2}$) αντίστοιχα.

Διαδρομές 5 και 6: $ru h th st neur^1 cu sr es ca / TM3, ftz-lacZ$ αγρίου τύπου (ετερόζυγα) και νευρογόνα (ομόζυγα $ru h th st neur^1 cu sr es ca / ru h th st neur^1 cu sr es ca$) αντίστοιχα.

Χρησιμοποιήθηκε ίσος αριθμός εμβρύων σε κάθε δείγμα (65 έμβρυα).

Τα δείγματα παρασκευάστηκαν με απλή ομογενοποίηση των εμβρύων σε διάλυμα Laemli (Υλικά και Μέθοδοι).

Η ανίχνευση της πρωτεΐνης έγινε με το αντίσωμα α -N Mab9B.

Αριστερά φαίνονται τα μεγέθη μάρτυρα μοριακών βαρών σε kDa.

Με το βέλος σημειώνεται η ολόκληρου μεγέθους πρωτεΐνη Notch (300kDa).

Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ DELTA ΣΕ ΠΡΟΝΥΜΦΕΣ 3ου ΣΤΑΔΙΟΥ

Drosophila melanogaster

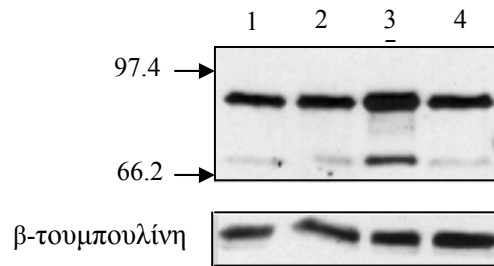
Επειδή δεν μπορούμε να μελετήσουμε βιοχημικά τα αποτελέσματα της απώλειας λειτουργίας του γονιδίου *neuralized* σε προνύμφες ή ενήλικα (τα άτομα πεθαίνουν κατά το τέλος της εμβρυογένεσης), μελετήθηκε με ανάλυση Western το αποτέλεσμα της εκτοπικής έκφρασης του εν λόγω σε αναπτυξιακούς δίσκους προνυμφών 3ου σταδίου *D.melanogaster*. Το *neuralized* ($yw;UAS-neur^{12.4}$) υπερεκφράστηκε με το σύστημα *UAS-Gal4* (Brand and Perimmon, 1993) με την σειρά *ombGal4/FM7*. Το *omb* (κάτωθεν γονίδιο-στόχος της σηματοδότησης του *dpp*) εκφράζεται σε ένα μεγάλο τμήμα του δίσκου του φτερού, στον δίσκο του αλτήρα, των ποδιών και στον δίσκο του ματιού.

Επιπλέον, για να γίνει πιο έντονο το αποτέλεσμα της δράσης του *neuralized* στην πρωτεΐνη *Delta* χρησιμοποιήθηκαν και προνύμφες, στις οποίες γίνεται συνυπερέκφραση του *neuralized* με *Delta* ($w;UAS-DxD^{B40}$).

Η εκχύλιση των πρωτεϊνών των προνυμφών, η ηλεκτροφόρηση και η ανάλυση Western πραγματοποιήθηκαν όπως αναφέρεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων έγινε με ανίχνευση της β-τουμπουλίνης (στο κάτω μέρος της εικόνας)

Το αποτέλεσμα φαίνεται στην εικόνα 3.4. Παρατηρούμε ότι όταν συνεκφραστεί εκτοπικά το *neuralized* με το *Delta* (διαδρομές 3,4), η συνολική ποσότητα της πρωτεΐνης *Delta* ελαττώνεται σε σημαντικό βαθμό. Η ελάττωση αφορά κυρίως την εκκρινόμενη ισομορφή της πρωτεΐνης.

Το γεγονός ότι το ίδιο αποτέλεσμα δεν παρατηρείται με σύγκριση των διαδρομών 1 και 2, οφείλεται στο ότι η εκτοπική έκφραση του *neuralized* γίνεται σε μία περιορισμένη περιοχή των αναπτυξιακών δίσκων, όπου η συνολική ποσότητα της πρωτεΐνης *Delta* είναι μικρή και η διαφορά στις σχετικές ποσότητες δεν γίνεται αντιληπτή. Επιπλέον, εξαιτίας του τρόπου παρασκευής των δειγμάτων υπάρχει και μεγάλο ποσοστό ιστού (επιπλέον των δίσκων) που δεν ανταποκρίνεται στην εκτοπική έκφραση, αλλά είναι αγρίου τύπου. Φυσικά, αξίζει να σημειωθεί ότι αγρίου τύπου ιστός υπάρχει και στα δείγματα 3 και 4, αλλά η εκτοπική έκφραση του *Delta* δημιουργεί αυξημένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων ιδίως στον δίσκο του φτερού, όπου γίνεται η συνυπερέκφραση, με αποτέλεσμα την αύξηση της έντασης του αποτελέσματος.



Εικόνα 3.4: Ανίχνευση των ισομορφών της πρωτεΐνης *Delta* σε προνύμφες 3ου σταδίου *D.melanogaster*, όπου εκφράζεται εκτοπικά το γονίδιο *neuralized*.

Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προέρχονται σε κάθε περίπτωση (Υλικά και Μέθοδοι) από 5 προνύμφες 3ου σταδίου με τους ακόλουθους γονοτύπους:

Διαδρομή 1: *ombGal4 / ombGal4* θηλυκά άτομα.

Διαδρομή 2: *ombGal4 + UAS-neur^{12.4}*.

Διαδρομή 3: *ombGal4 + UAS-DxD^{B40}*.

Διαδρομή 4: *ombGal4 + UAS-DxD^{B40} + UAS-neur^{12.4}*.

Η ανίχνευση της πρωτεΐνης έγινε με το αντίσωμα α-DI Mab202.

Αριστερά φαίνονται τα μεγέθη μάρτυρα μοριακών βαρών σε kDa.

Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων έγινε με ανίχνευση της β-τουμπουλίνης μετά από πλύση της ίδιας μεμβράνης.

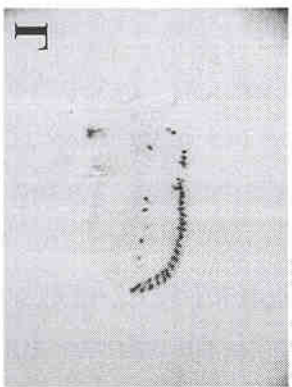
ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *NEURALIZED*

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, παρά το γεγονός ότι γνωρίζουμε ότι το γονίδιο *neuralized* είναι νευρογόνο, οπότε υποθέτουμε ότι κάποιον ρόλο παίζει στην σηματοδότηση μέσω *Notch*, ακόμα δεν είναι γνωστός ο ακριβής τρόπος και χρόνος δράσης του. Τα μετάγραφα mRNA του *neuralized* έχουν εντοπιστεί με *in situ* (Boulianne et al, 1991) και μία παγίδα ενισχυτή η A101-*lacZ* αντικατοπτρίζει το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου (Huppert et al, 1990). Με ιστοχημική χρώση ανίχνευσης γαλακτοσιδάσης, διαπιστώθηκαν οι θέσεις έκφρασης της παγίδας ενισχυτή A101 σε αναπτυξιακούς δίσκους φτερού προνύμφης 3ου σταδίου και στα επόμενα στάδια του αναπτυσσόμενου φτερού της *D.melanogaster* (κατά την διάρκεια του σταδίου της νύμφης).

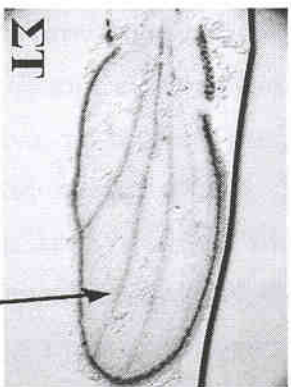
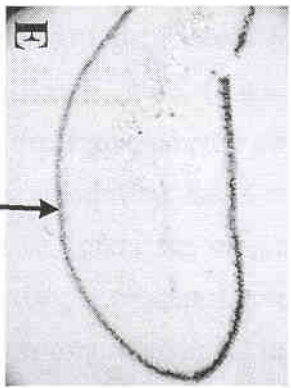
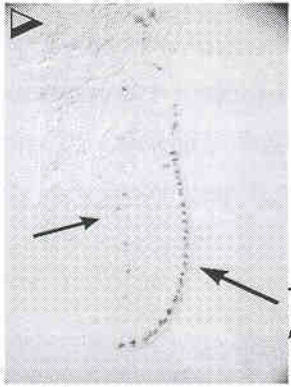
Το αποτέλεσμα των χρώσεων φαίνεται στην εικόνα 3.5. Η έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης μεταβάλλεται με την πάροδο του χρόνου, αλλά η χρώση είναι εστιασμένη σε μεμονωμένα κύτταρα. Συγκεκριμένα, σημαίνονται τα κύτταρα-πρόδρομοι των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων του ενήλικου εντόμου, των οποίων η περαιτέρω ανάπτυξη καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό μέσω σηματοδότησης *Notch*.

Κύτταρα, τα οποία θα δώσουν τα αισθητήρια όργανα (μακροχαίτες) του θώρακα και του εμπρόσθιου περιθωρίου του φτερού εκφράζουν A101-*lacZ* στους αναπτυξιακούς δίσκους της προνύμφης. Στην συνέχεια, η έκφραση επεκτείνεται σε κύτταρα που θα δώσουν τις μικροχαίτες του θώρακα (Huppert et al, 1990) και τα αισθητήρια όργανα της τρίτης φλέβας του φτερού (μετά τις 24 ώρες από την δημιουργία της λευκής νύμφης).

Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τις 24 ώρες μετά την δημιουργία της νύμφης παρατηρείται χρώση γαλακτοσιδάσης στην περιοχή που αντιστοιχεί στο οπίσθιο τμήμα του περιθωρίου του φτερού του εντόμου, όπου όμως δεν έχει αναφερθεί σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού *Notch*. Στην περιοχή αυτή στο ενήλικο έντομο υπάρχουν σχηματισμοί που μοιάζουν με εξωτερικά αισθητήρια όργανα, τα οποία όμως δεν νευρώνονται και δεν λειτουργούν ως τέτοια. Ο ρόλος του γονιδίου *neuralized* σε αυτά τα κύτταρα είναι επίσης άγνωστος. Τέλος, στις 30 ώρες μετά τη δημιουργία της νύμφης, η χρώση ανιχνεύεται στις φλεβώσεις καθεαυτές.



εμπροσθιο περιθώριο
πτερογού



αισθητήρια όργανα
της 3ης φάλαβας

οπίσθιο περιθώριο
πτερογού

φάλαβα

Εικόνα 3.1: Έκφραση της παγίδας ενσωχυτή Δ101-lacZ σε διάφορα στάδια της ανάπτυξης του πτερογού της *D.melanogaster*.

Στην εικόνα Α φαίνεται η έκφραση της παγίδας ενσωχυτή Δ101 σε αναπτυξιακό δίσκο προνήμφης 3ου σταδίου και στις επόμενες

Β, Γ, Δ, Ε, ΣΤ σε πρόδρομα πτερογού νήμφης 2, 6, 8, 24, και 30 ώρες μετά την δημιουργία της λευκής νήμφης αντίστοιχα.

Για να μελετηθεί *in vivo* η δράση του γονιδίου *neuralized* και να διαπιστωθεί ο τρόπος με τον οποίο επηρεάζει την διακυτταρική σηματοδότηση μέσω *Notch*, πραγματοποιήθηκαν ανοσοϊστοχημικές χρώσεις για να ελεγχθεί η πιθανή δράση της εκτοπικής έκφρασης του γονιδίου στις πρωτεΐνες Notch και Delta. Στην συνέχεια, ακολούθησαν πειράματα που ελέγχουν την λειτουργικότητα του σηματοδοτικού μονοπατιού με χρήση ως μαρτύρων κάτωθεν γονίδια - στόχους.

Επίσης, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα δημιουργίας μιτωτικών κλώνων για να ελεγχθεί το αποτέλεσμα τόσο της εκτοπικής έκφρασης, όσο και της απώλειας λειτουργίας του γονιδίου *neuralized*.

ΑΛΛΑΓΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ DELTA ΩΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΤΗΣ ΕΚΤΟΠΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ NEURALIZED

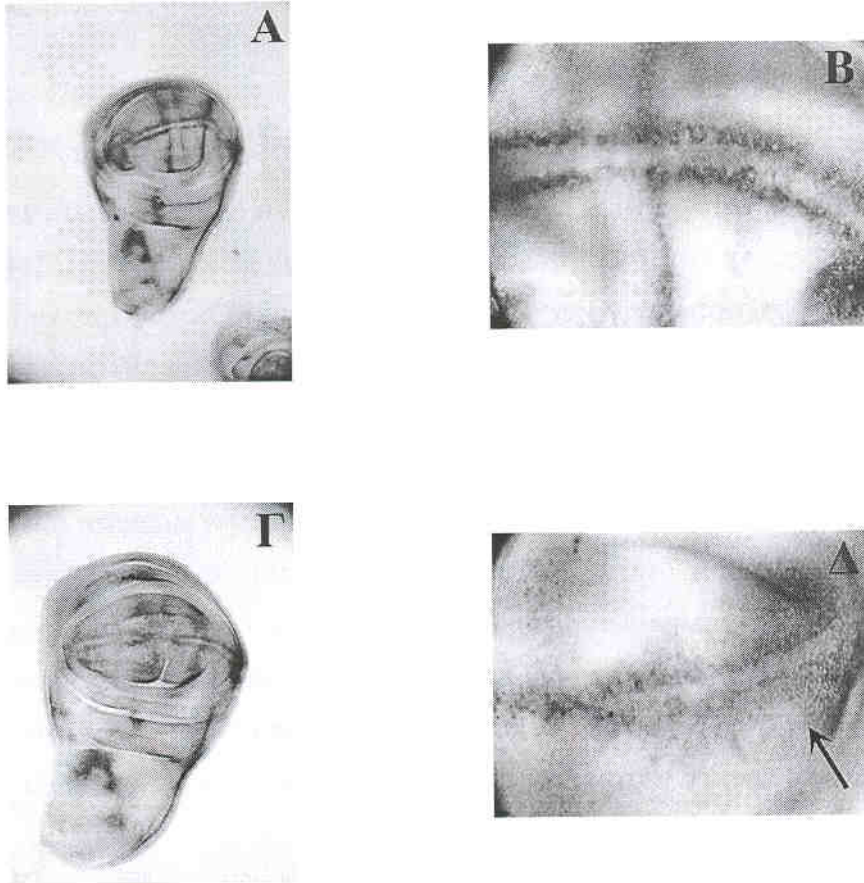
Για να ελεγχθεί το αποτέλεσμα της εκτοπικής έκφρασης του γονιδίου *neuralized*, το γονίδιο εκφράστηκε ως κατασκευή *UAS* (*UAS-neuralized*: Pavlouroulos, αδημοσίευτα αποτελέσματα) με τη χρήση του στελέχους-οδηγού *ombGal4*. Τα άτομα *ombGal4 + UAS-neur* ελέγχθηκαν για την έκφραση της πρωτεΐνης Delta στο στάδιο της προνύμφης. Η εκτοπική έκφραση του γονιδίου *neur* με τη χρήση της σειράς οδηγού *ombGal4* προκαλεί απώλεια ιστού του φτερού κοντά στο περιθώριο (κόψιμο), απώλεια ιστού φλεβώσεων (κυρίως της L4 φλέβωσης) ή παχύνσεις φλεβώσεων (δημιουργία δέλτα).

Στην εικόνα 3.6 φαίνεται το αποτέλεσμα της ανοσοϊστοχημικής χρώσης με το αντίσωμα α -DI Mab202 (Υλικά και Μέθοδοι). Η πρωτεΐνη Delta απαντάται στο 3ο στάδιο της προνύμφης σε δύο λωρίδες στο ραχιαιοκοιλιακό όριο του δίσκου του φτερού, στα σημεία που θα δώσουν τις φλεβώσεις των φτερών και στην περιοχή που θα δώσει εξωτερικά αισθητήρια όργανα (μακροχαίτες) στον θώρακα (3.6A)

Παρατηρείται ότι η κυτταρική τοποθέτηση και το πρότυπο έκφρασης της υπό μελέτη πρωτεΐνης αλλάζει. Συγκεκριμένα, το πρότυπο έκφρασης αλλάζει και γίνεται πιο ασαφές, τουλάχιστον όσον αφορά στις φλέβες (3.6Γ). Επίσης, ο δίσκος παρουσιάζει μία χαρακτηριστική πτύχωση που οφείλεται σε αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Επιπλέον, ενώ σε αγρίου τύπου αναπτυξιακούς δίσκους (3.6A, 3.6B) η πρωτεΐνη *Delta* είναι κυρίως μεμβρανική με την παρουσία κάποιου ποσοστού κυστιδιακής μορφής, σε εκτοπική έκφραση του γονιδίου *neuralized* (3.6Γ, 3.6Δ), αλλάζει η σαφώς η κυτταρική της τοποθέτηση και

στο σύνολό της η πρωτεΐνη είναι κυστιδιακή. Ωστόσο, η ταυτότητα των κυστιδίων δεν έχει ακόμα διαλευκανθεί (αν πρόκειται για ενδοκυττωτικά, εξωκυττωτικά



Εικόνα 3.6: Επίδραση της εκτοπικής έκφρασης του γονιδίου *neuralized* στην πρωτεΐνη *Delta*.

Ανοσοϊστοχημική χρώση αναπτυξιακών δίσκων προνύμφης 3ου σταδίου με το αντίσωμα α -DI Mab202. Στα A και B φαίνεται αναπτυξιακός δίσκος αγρίου τύπου σε μεγέθυνση 10x και 63x αντίστοιχα. Στα Γ και Δ φαίνεται δίσκος προνύμφης με γονότυπο *ombGal4;UAS-neur^{V1}* σε αντίστοιχες μεγεθύνσεις. Στην 63 x μεγέθυνση η εστίαση γίνεται στην περιοχή που θα δώσει το περιθώριο του φτερού και φαίνεται η κυτταρική τοποθέτηση της χρώσης. Με το βέλος δείχνεται το όριο της περιοχής εκτοπικής έκφρασης *omb* και φαίνεται χαρακτηριστικά η διαφορετική κυτταρική τοποθέτηση της πρωτεΐνης *Delta* (αριστερά του βέλους η πρωτεΐνη φαίνεται κυστιδιακή, ενώ δεξιά, όπου δεν υπάρχει υπερέκφραση, φαίνεται εντοπισμένη στην κυτταρική μεμβράνη).

κυστίδια ή κάποια μορφή εκκρινόμενης πρωτεΐνης). Χαρακτηριστικό σημείο, όπου φαίνεται ξεκάθαρα η ριζική αλλαγή της κυτταρικής τοποθέτησης της πρωτεΐνης Delta, είναι το όριο της εκτοπικής έκφρασης του *ombGal4* σε σχέση με τον αγρίου τύπου ιστό που βρίσκεται ακριβώς δίπλα και σημειώνεται με βέλος στην 3.6Δ.

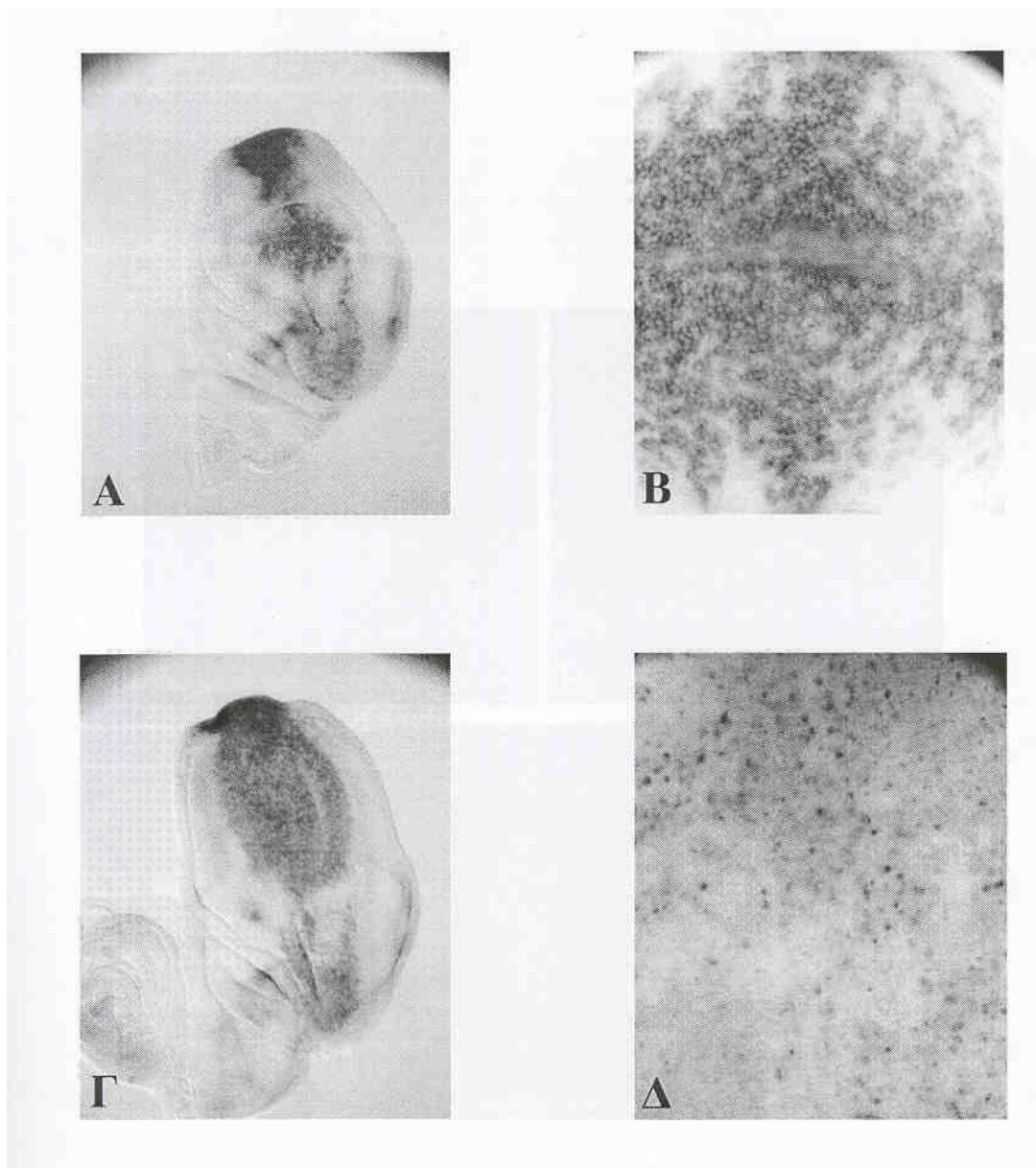
Για να ελεγχθεί αν το αποτέλεσμα που αναφέρεται στην εκτοπική έκφραση του γονιδίου *neuralized* (Εικ. 3.6) αντικατοπτρίζει πιθανή μεταγραφική ρύθμιση του Delta από το *Neuralized* ή σχετίζεται με την ίδια την πρωτεΐνη Delta (την μετάφρασή της ή κάποιου τύπου μετα-μεταφραστική τροποποίηση αυτής), πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική χρώση ανίχνευσης της πρωτεΐνης Delta σε προνύμφες 3ου σταδίου, όπου συνεκφράστηκαν εκτοπικά τόσο το γονίδιο *Delta*, όσο και το *neuralized*.

Το αποτέλεσμα του πειράματος φαίνεται στην εικόνα 3.7. Ως γονότυπος ελέγχου χρησιμοποιείται άτομο με εκτοπική έκφραση του γονιδίου *Delta* και μόνο.

Παρατηρείται ότι το αποτέλεσμα είναι μεταφραστικό, καθώς η εκτοπική πρωτεΐνη Delta μετατρέπεται εξολοκλήρου σε κυστιδιακή παρουσία *neuralized* (3.7Γ, 3.7Δ), ενώ η απλή εκτοπική έκφραση του *delta* δίνει ισχυρή μεμβρανική χρώση (3.7Α, 3.7Β) και μάλιστα εντονότερη στην κορυφαία επιφάνεια του δίσκου. Το μέγεθος των δίσκων αυξάνεται σημαντικά, εξαιτίας της δράσης της πρωτεΐνης Delta στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Εντούτοις, με την συνέκφραση του *neuralized* ο αναπτυξιακός δίσκος φαίνεται να μεγενθύνεται ακόμα περισσότερο κυρίως προς την κοιλιακή πλευρά.

Με την χρήση φθορίζοντος δευτερεύοντος αντισώματος και τη βοήθεια συνεστιακού μικροσκοπίου, μπορούμε να εστιάσουμε σε διαφορετικά επίπεδα του αναπτυξιακού δίσκου της προνύμφης και να διαπιστώσουμε που εντοπίζεται η πρωτεΐνη *Delta*. Το αποτέλεσμα της ίδιας χρώσης με αυτήν που παρουσιάζεται στην εικόνα 3.7, αλλά με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας φαίνεται στην εικόνα 3.8.

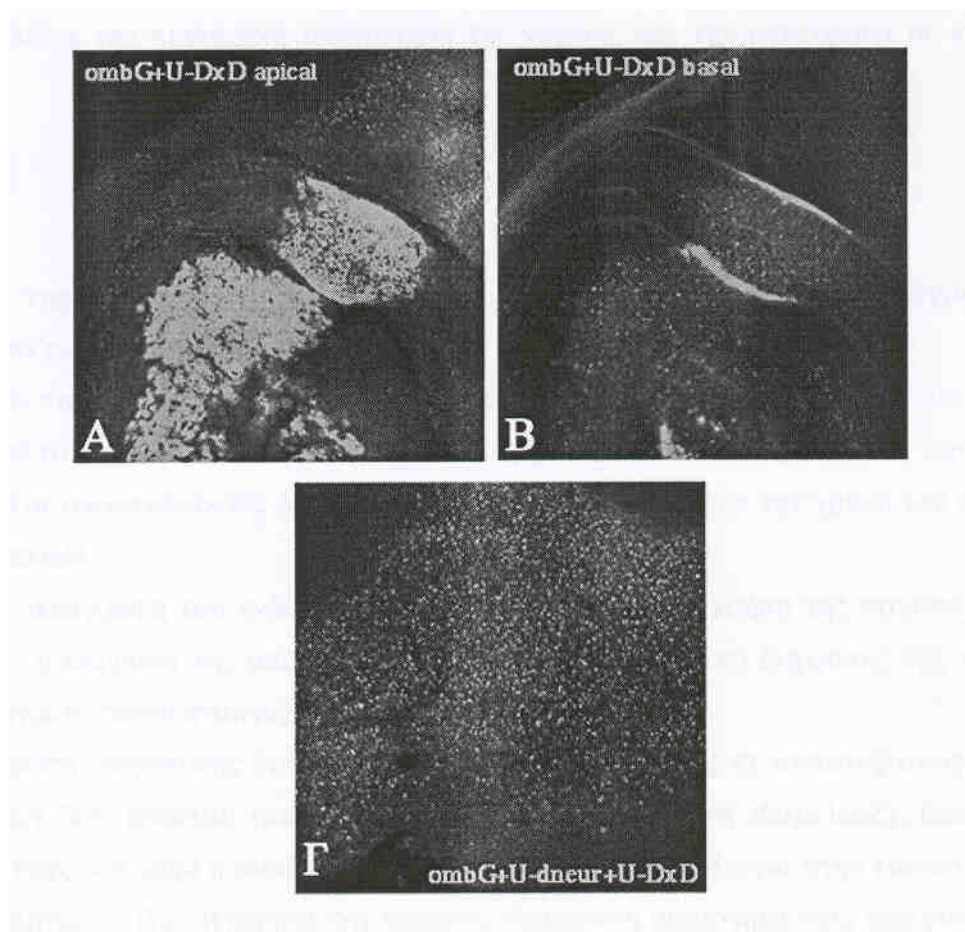
Παρατηρείται ότι η χρώση για την πρωτεΐνη *Delta* είναι μεμβρανική, απουσία *neuralized* (Α, Β), ενώ παρουσία αυτού η χρώση είναι αποκλειστικά κυστιδιακή (Γ). Επιπλέον, φαίνεται ότι ο μεμβρανικός εντοπισμός της πρωτεΐνης *Delta* βρίσκεται στην κορυφαία επιφάνεια του δίσκου (Α), ενώ σε περισσότερο βασικά επίπεδα (Β), η χρώση εξασθενεί και μπορούν να εντοπιστούν λίγα κυστίδια. Στην περίπτωση της συνέκφρασης *delta* και *neuralized* η εικόνα από κορυφαία προς πιο βασικά επίπεδα είναι όπως φαίνεται στο Γ, δηλαδή δεν διαπιστώνεται διαβάθμιση της ποσότητας ή της ποιότητας της πρωτεΐνης *Delta*.



Εικόνα 3.7: Εκτοπική συνέκφραση των γονιδίων Delta και neuralized με τη χρήση του στελέχους-οδηγού ombGal4.

Ανοσοϊστοχημική χρώση ανίχνευσης της πρωτεΐνης Delta σε προνύμφες 3ου σταδίου με εκτοπική έκφραση είτε του γονιδίου *Delta* (A, B) ή συνέκφραση των *Delta* και *neuralized* (Γ, Δ) στην περιοχή *omb*.

Οι εικόνες B και Δ αντιστοιχούν στους ίδιους δίσκους με τις A και Γ και συγκεκριμένα στην περιοχή που θα δώσει το φτερό του ενήλικου ατόμου, αλλά με μεγέθυνση 63x και σε αυτές φαίνεται ξεκάθαρα η κυτταρική τοποθέτηση της πρωτεΐνης Delta και η αλλαγή από μεμβρανική (B) σε κυστιδιακή μορφή (Δ) εξαιτίας της παρουσίας του *neuralized*.



Εικόνα 3.8: Εκτοπική συνέκφραση των γονιδίων *Delta* και *neuralized* με τη χρήση του στελέχους-οδηγού *ombGal4* και συνεστιακή μικροσκοπία.

Ανοσοϊστοχημική χρώση ανίχνευσης της πρωτεΐνης *Delta* με φθορισμό (πράσινο χρώμα) σε αναπτυξιακούς δίσκους φτερού προνυμφών 3ου σταδίου με εκτοπική έκφραση είτε του γονιδίου *delta* (A, B) ή συνέκφραση των *delta* και *neuralized* (Γ) στην περιοχή *omb*.

Στις εικόνες A και B φαίνεται η εκτοπική έκφραση του *delta* σε κορυφαία και σε βασικά επίπεδα του δίσκου. Διαπιστώνεται η έντονη μεμβρανική χρώση και μικρός αριθμός κυστιδίων στα πιο βασικά επίπεδα. Στην εικόνα Γ φαίνεται το αποτέλεσμα της εκτοπικής συνέκφρασης των *delta* και *neuralized* στην πρωτεΐνη *Delta* και η αποκλειστικά κυστιδιακή μορφή της σε όλα τα επίπεδα. (Σε όλες τις εικόνες φαίνεται η περιοχή του δίσκου που θα δώσει το φτερό).

Το ίδιο αποτέλεσμα της αλλαγής της κυτταρικής τοποθέτησης της πρωτεΐνης *Delta* επιτυγχάνεται με την σειρά-οδηγό *ptcGal4* σε μία πιο περιορισμένη περιοχή του δίσκου του φτερού. Η χρώση για την πρωτεΐνη *Delta* φαίνεται στην εικόνα 3.9. Παρατηρείται ότι ενώ η εκτοπική έκφραση του *neuralized* (3.9A) δεν προκαλεί κάποια ουσιαστική διαφορά στην χρώση (μοιάζει αγρίου τύπου) και η εκτοπική έκφραση του *Delta* μόνο (3.9B) δημιουργεί μεμβρανική

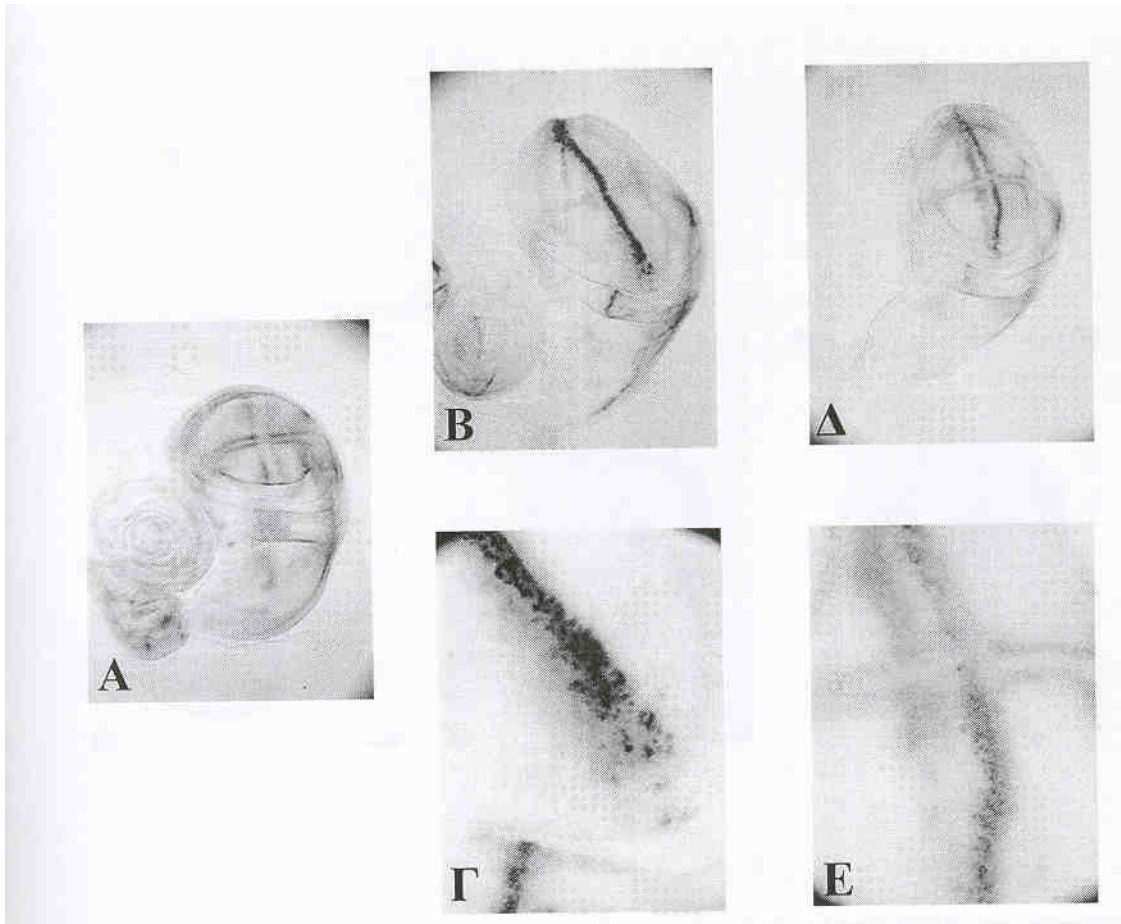
χρώση στην περιοχή *ptc* (3.9Γ), η εκτοπική συνέκφραση *Delta* και *neuralized* (3.9Δ) αλλάζει την κυτταρική τοποθέτηση της χρώσης και την μετατρέπει σε κυστιδιακή (3.9Ε).

Έλεγχος της μεταγραφής του Delta σε αναπτυξιακούς δίσκους προνύμφης όπου εκφράζεται εκτοπικά Delta και neuralized.

Για να επιβεβαιωθεί η δράση του *neuralized* στην πρωτεΐνη *Delta* και όχι στην μεταγραφή του γονιδίου *delta*, ελέγχθηκε τι συμβαίνει σε εκτοπική έκφραση των *delta* και *neuralized* σε αναπτυξιακούς δίσκους προνύμφης 3ου σταδίου με την χρήση του στελέχους-οδηγού *ptcGal4*.

Η μεταγραφή του ενδογενούς *delta* μελετάται με τη χρήση της παγίδα ενισχυτή *delta-lacZ*, η έκφραση της οποίας μοιάζει πολύ με το πρότυπο έκφρασης της πρωτεΐνης *Delta* σε αγρίου τύπου αναπτυξιακούς δίσκους φτερού (3.10Α).

Χρώση ανίχνευσης δραστηριότητας β' γαλακτοσιδάσης σε αναπτυξιακούς δίσκους προνυμφών 3ου σταδίου (που φέρουν την παγίδα ενισχυτή *delta-lacZ*), όπου γίνεται εκτοπική έκφραση *delta* ή συνέκφραση *delta* και *neuralized* φαίνεται στην εικόνα 3.10Β και 3.10Γ αντίστοιχα. Παρατηρείται ότι υπάρχει εξαιρετική ομοιότητα στις δύο εικόνες, κάτι που επιβεβαιώνει ότι η δράση του *neuralized* εντοπίζεται σε πρωτεϊνικό επίπεδο (ρύθμιση των επιπέδων της πρωτεΐνης ή μετα-μεταφραστική τροποποίηση αυτής), καθώς το ίδιο πρότυπο μεταγράφοι δίνει τελικά διαφορετικό πρότυπο πρωτεΐνης (3.9).

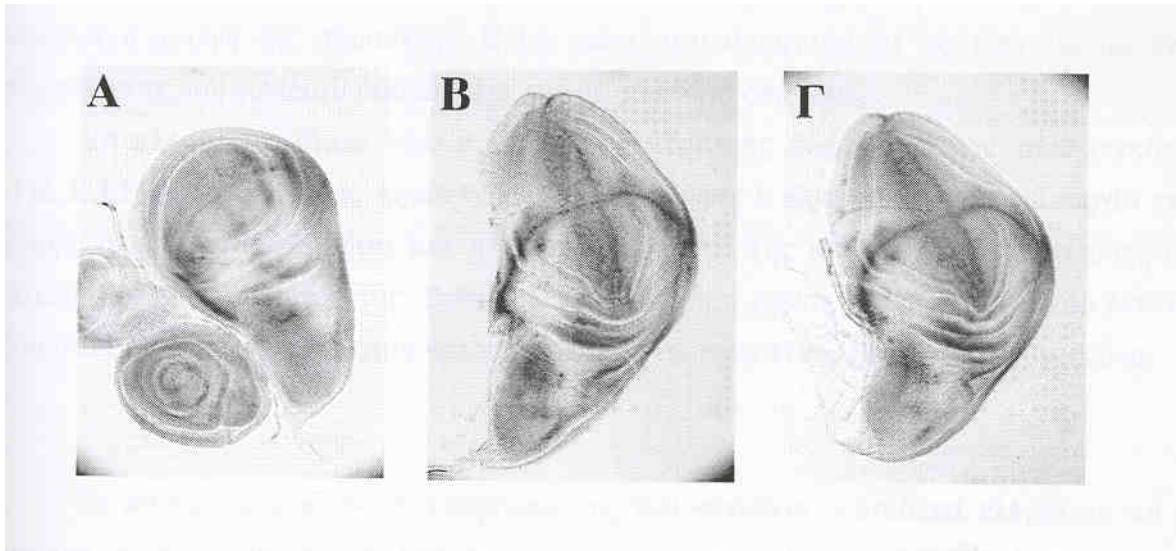


Εικόνα 3.9: Εκτοπική συνέκφραση των γονιδίων Delta και neuralized με τη χρήση του στελέχους-οδηγού ptcGal4.

Ανοσοϊστοχημική χρώση ανίχνευσης της πρωτεΐνης Delta σε προνύμφες 3ου σταδίου με εκτοπική έκφραση είτε του γονιδίου *neuralized* (A), είτε του γονιδίου *Delta* (B, Γ) ή συνέκφραση των *Delta* και *neuralized* (Δ, E) στην περιοχή *ptc*.

Η εκτοπική έκφραση του *neuralized* μόνο (A) δε φαίνεται να δημιουργεί κάποια σημαντική αλλαγή στο πρότυπο έκφρασης της πρωτεΐνης Delta.

Οι εικόνες Γ και E αντιστοιχούν στους ίδιους δίσκους με τις B και Δ και συγκεκριμένα στην περιοχή που θα δώσει το φτερό του ενήλικου ατόμου, αλλά με μεγέθυνση 63x και σε αυτές φαίνεται ξεκάθαρα η κυτταρική τοποθέτηση της πρωτεΐνης Delta και η αλλαγή από μεμβρανική (B) σε κυστιδιακή μορφή (Δ) εξαιτίας της παρουσίας του *neuralized*.



Εικόνα 3.10: Έλεγχος της παρουσίας του ενδογενούς μεταγράφου Delta σε αναπτυξιακούς δίσκους προνύμφης όπου εκφράζεται εκτοπικά Delta και neuralized.

Χρώση ανίχνευσης β-γαλακτοσιδάσης σε αναπτυξιακούς δίσκους προνύμφης 3ου σταδίου που φέρουν την παγίδα ενισχυτή *Delta-lacZ*: αγρίου τύπου (Α), με εκτοπική έκφραση *Delta* (Β) και με εκτοπική συνέκφραση *Delta* και *neuralized* (Γ).

Δεν παρατηρείται διαφοροποίηση μεταξύ Β και Γ. Συνεπώς, το *neuralized* δεν επηρεάζει την μεταγραφή του γονιδίου *Delta*.

ΜΙΤΩΤΙΚΟΙ ΚΛΩΝΟΙ ΕΚΤΟΠΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *NEURALIZED*

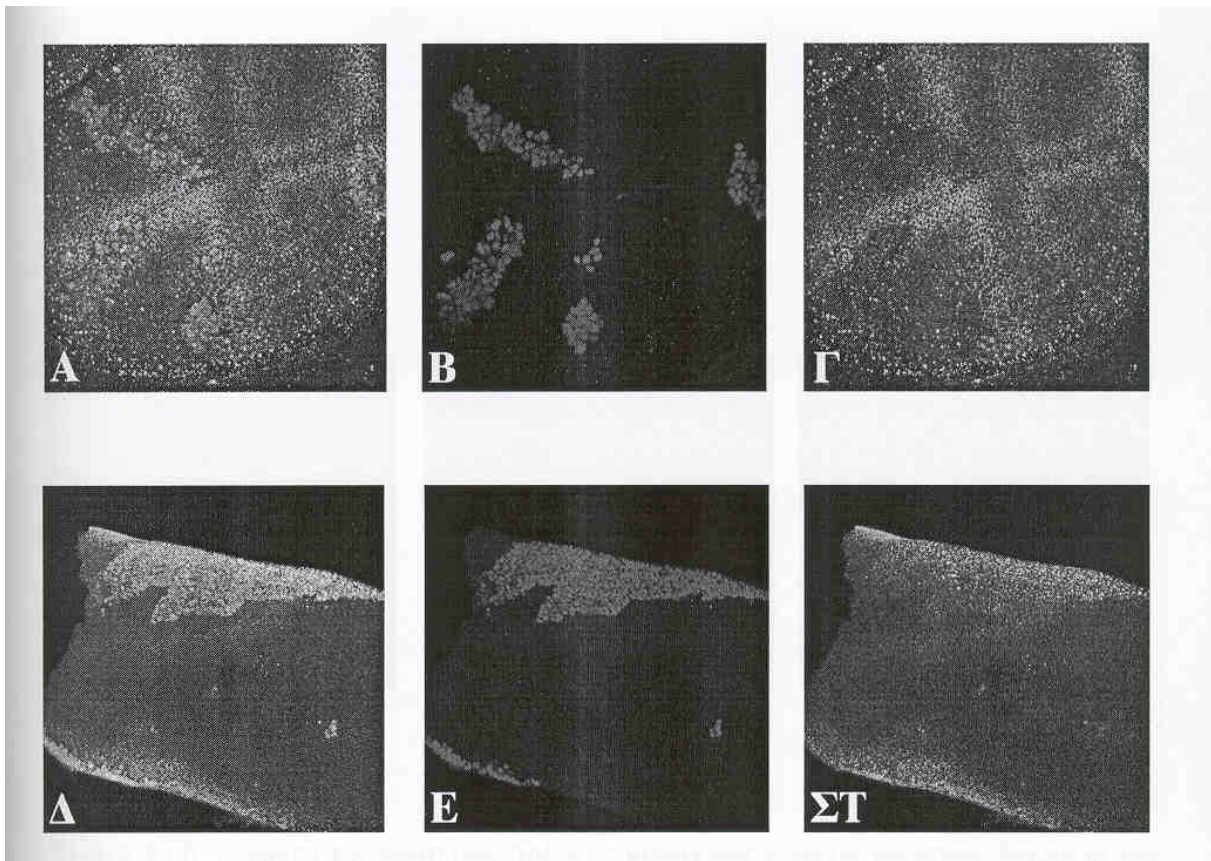
Μιτωτικοί κλώνοι εκτοπικής έκφρασης του γονιδίου *neuralized* δημιουργήθηκαν για να ελεγχθεί η επίδραση του εν λόγω γονιδίου στην αγρίου τύπου εκφραζόμενη πρωτεΐνη *Delta* σε αναπτυξιακούς δίσκους προνύμφης 3ου σταδίου. Στην εικόνα 3.11Α,Β,Γ φαίνονται μιτωτικοί κλώνοι εκτοπικής έκφρασης στην περιοχή του δίσκου που θα δώσει το φτερό.

Παρατηρείται ότι στις θέσεις που υπάρχουν οι κλώνοι (κόκκινο χρώμα), χάνεται η κορυφαία χρώση της πρωτεΐνης (πράσινο χρώμα) και δεν υπάρχει μεμβρανική, αλλά μόνο κυστιδιακή μορφή της πρωτεΐνης *Delta*, κάτι που συμφωνεί με το αποτέλεσμα της υπερέκφρασης του γονιδίου *neuralized* με την σειρά-οδηγό *ombGal4*.

Επιπλέον, σε ίδιου τύπου κλώνους εκτοπικής έκφρασης του *neur* (εικόνα 3.11Δ,Ε,ΣΤ) και έλεγχο της πρωτεΐνης *Delta* σε νύμφες 6 ώρες μετά την δημιουργία της λευκής νύμφης, παρατηρείται και πάλι το φαινόμενο της μετακίνησης της χρώσης σε κυστίδια αγνώστου ταυτότητας. Στην περίπτωση αυτή η χρώση φαίνεται ιδιαίτερα έντονη μέσα στον κλώνο, σαν να γινόταν υπερσυσσώρευση της πρωτεΐνης *Delta* μέσα στον κλώνο.

Σε παρόμοιους κλώνους υπερέκφρασης του γονιδίου *neuralized*, ελέγχθηκε και η έκφραση της πρωτεΐνης *Notch*. Στην εικόνα 3.12 φαίνονται κλώνοι εκτοπικής έκφρασης του γονιδίου *neuralized* (κόκκινο χρώμα) και χρώση ανίχνευσης της πρωτεΐνης *Notch* (πράσινο χρώμα). Παρατηρείται ότι η χρώση της πρωτεΐνης *Notch* στα κορυφαία επίπεδα του δίσκου ελαττώνεται μέσα στον κλώνο εκτοπικής έκφρασης (το φαινόμενο δείχνει αυτόνομο).

Τα ενήλικα άτομα που φέρουν κλώνους εκτοπικής έκφρασης του γονιδίου *neur* φαίνεται να έχουν απώλεια ιστού φτερού κοντά στο περιθώριο, παχύνσεις φλεβώσεων και πυκνές μικροχαίτες στο θώρακα.



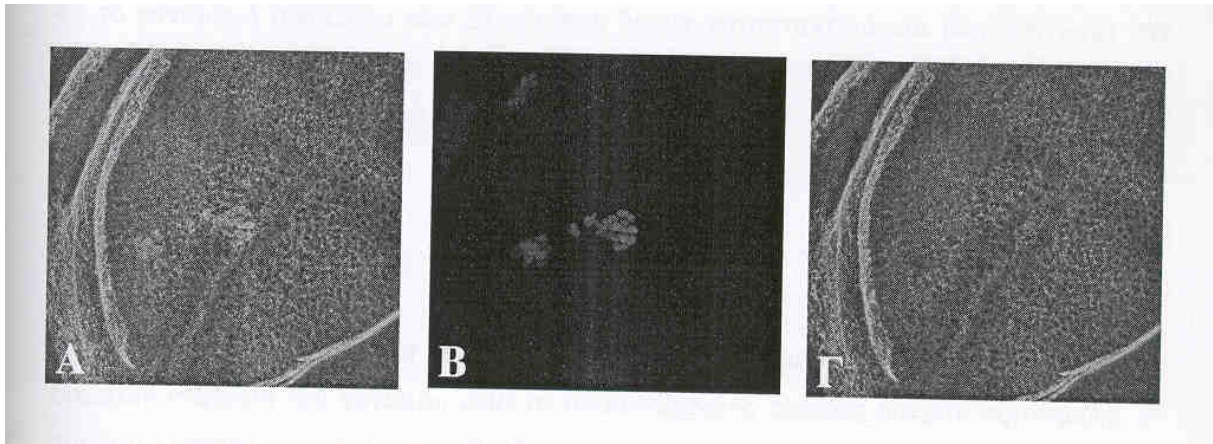
Εικόνα 3.11: Έκφραση της πρωτεΐνης Delta σε μιτωτικούς κλώνους εκτοπικής έκφρασης του γονιδίου *neuralized*.

Στην εικόνα φαίνονται μιτωτικοί κλώνοι εκτοπικής έκφρασης του γονιδίου *neur*.

Με κόκκινο σημαίνονται οι κλώνοι (β-γαλακτοσιδάση) και με πράσινο φαίνεται η χρώση για την πρωτεΐνη Delta (α-DI Mab202).

Οι εικόνες προέρχονται από συνεστιακό μικροσκόπιο με μεγέθυνση 63x.

Στα A, B, Γ φαίνονται κλώνοι σε προνύμφη 3ου σταδίου στην περιοχή του δίσκου που θα δώσει το φτερό του ενήλικου, ενώ στα Δ, E, ΣΤ φαίνονται κλώνοι σε φτερό νύμφης 6 ωρών.



Εικόνα 3.12: Έκφραση της πρωτεΐνης Notch σε μιτωτικούς κλώνους εκτοπικής έκφρασης του γονιδίου neuralized.

Η εικόνα αντιστοιχεί στην περιοχή του αναπτυξιακού δίσκου που θα δώσει το φτερό του ενήλικου εντόμου. Με πράσινο χρώμα (FITC) φαίνεται η χρώση για την πρωτεΐνη Notch (A, B). Παρατηρείται ότι η χρώση είναι ομοιόμορφη, αλλά υπάρχει ένα χαρακτηριστικό πρότυπο στο περιθώριο και στις φλεβώσεις του φτερού.

Οι μιτωτικοί κλώνοι εκτοπικής έκφρασης φαίνονται με κόκκινο χρώμα (Cy3) που αντιστοιχεί στις θέσεις έκφρασης της β-γαλακτοσιδάσης (A, Γ).

Διαπιστώνεται ότι στους κλώνους χάνεται η έστω και χαμηλής έντασης κορυφαία μεμβρανική χρώση που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη Notch. Το φαινόμενο δείχνει να είναι αυτόνομο.

ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ-ΣΤΟΧΩΝ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ NOTCH ΣΕ ΕΚΤΟΠΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ NEURALIZED

Για να μελετηθεί η επίδραση της αλλαγής της κυτταρικής τοποθέτησης του δεσμευτή Delta, παρουσία του *neuralized*, στο σηματοδοτικό μονοπάτι μέσω Notch, ελέγχθηκαν κάποια γονίδια που αποτελούν κάτωθεν στόχους του εν λόγω μονοπατιού. Τέτοια είναι:

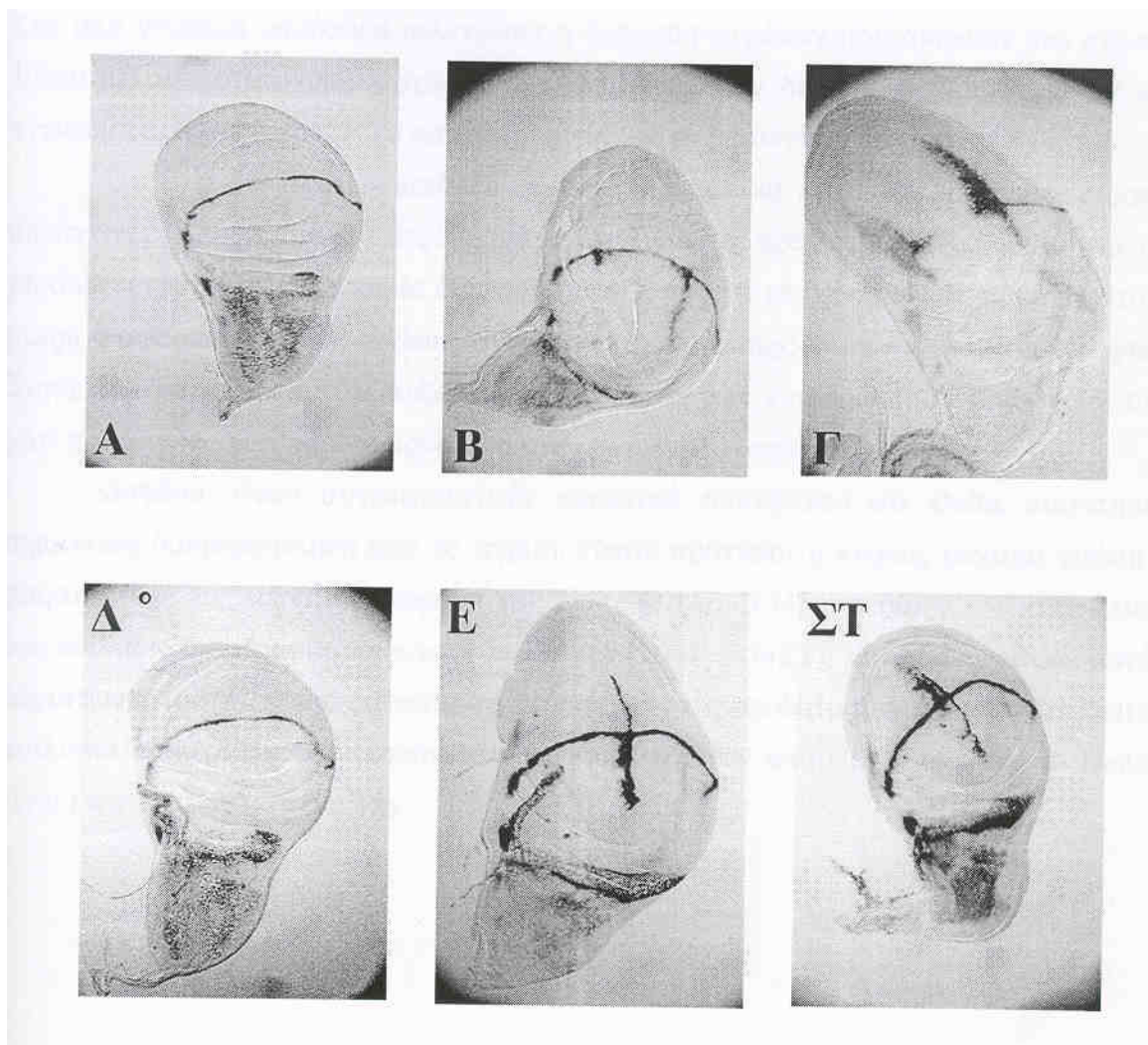
- ο μεταγραφικός παράγοντας που κωδικοποιείται από το γονίδιο *cut* και παίζει σημαντικό ρόλο στην εγκαθίδρυση του περιθωρίου του φτερού (Micchelli et al, 1997).
- το γονιδιακό σύμπλοκο των *E(spl)*, που δρουν κατασταλτικά και βοηθούν κατά την πλευρική αναστολή που λαμβάνει χώρα κατά τον καθορισμό των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων (Heitzler et al, 1996).

Το γονίδιο cut

Το γονίδιο *neuralized* εκφράστηκε εκτοπικά είτε μόνο του ή σε συνδυασμό με εκτοπική έκφραση του γονιδίου *delta* σε αναπτυξιακούς δίσκους φτερού προνύμφης 3^{ου} σταδίου *D.melanogaster*, με την βοήθεια των στελεχών-οδηγών *ombGal4* και *ptcGal4*. Ακολούθησε ανοσοϊστοχημική χρώση των αναπτυξιακών δίσκων με το αντίσωμα α -*cut*. Το αποτέλεσμα της χρώσης φαίνεται στην εικόνα 3.13.

Παρατηρείται ότι η εκτοπική έκφραση του *neuralized* και με τις δύο σειρές οδηγούς (3.13A, 3.13B) οδηγεί σε ελάττωση της χρώσης στην κεντρική περιοχή του περιθωρίου του φτερού (εκεί που η έκφραση του *Gal4* είναι ισχυρότερη και εντονότερα με την σειρά *ombGal4*).

Το αποτέλεσμα γίνεται ακόμη εντονότερο, αν μαζί με το *neuralized* εκφραστεί εκτοπικά και *Delta*. Η εκτοπική έκφραση του *Delta* οδηγεί σε ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου *cut* κυρίως προς το ραχιαίο διαμέρισμα (3.13B, 3.13E) και με τις δύο σειρές οδηγούς. Όταν όμως συνεκφραστεί εκτοπικά και *neuralized* (3.13Γ, 3.13ΣΤ), το αποτέλεσμα είναι ακριβώς το αντίθετο: το *cut* φαίνεται να ενεργοποιείται καλύτερα προς την κοιλιακή πλευρά του δίσκου του φτερού. Και στις δύο περιπτώσεις (*ombGal4* και *ptcGal4*) γίνεται προφανές ότι εντονότερη σηματοδότηση από το Notch παρουσία *neuralized* υπάρχει εκεί που τα επίπεδα της πρωτεΐνης Delta είναι χαμηλότερα (στα όρια της περιοχής *omb* και μπροστά από το προσθιοπίσθιο όριο του δίσκου του φτερού στην περίπτωση του *ptc*) και μάλιστα στο κοιλιακό διαμέρισμα του δίσκου του φτερού, όπου υπό φυσιολογικές συνθήκες το *Delta* δεν σηματοδοτεί, γιατί εκεί δεν υπάρχει *fringe*.



Εικόνα 3.13: Έκφραση του γονιδίου *cut* σε αναπτυξιακούς δίσκους προνύμφης 3^{ου} σταδίου *D.melanogaster* με εκτοπική έκφραση του γονιδίου *neuralized* με την χρήση στελεχών-οδηγών *ombGal4* και *ptcGal4*.

Ο μεταγραφικός παράγοντας εντοπίστηκε με το αντίσωμα α -*ct*. Οι γονότυποι των αναπτυξιακών δίσκων που φαίνονται στην εικόνα είναι:

A. *ombGal4;Uneur*^{12.4}

B. *ombGal4;UDxD*^{B40}

Γ. *ombGal4; Uneur*^{12.4} - *UDxD*^{B40}

Δ. *ptcGal4;Uneur*^{12.4}

E. *ptcGal4;UDxD*^{B40}

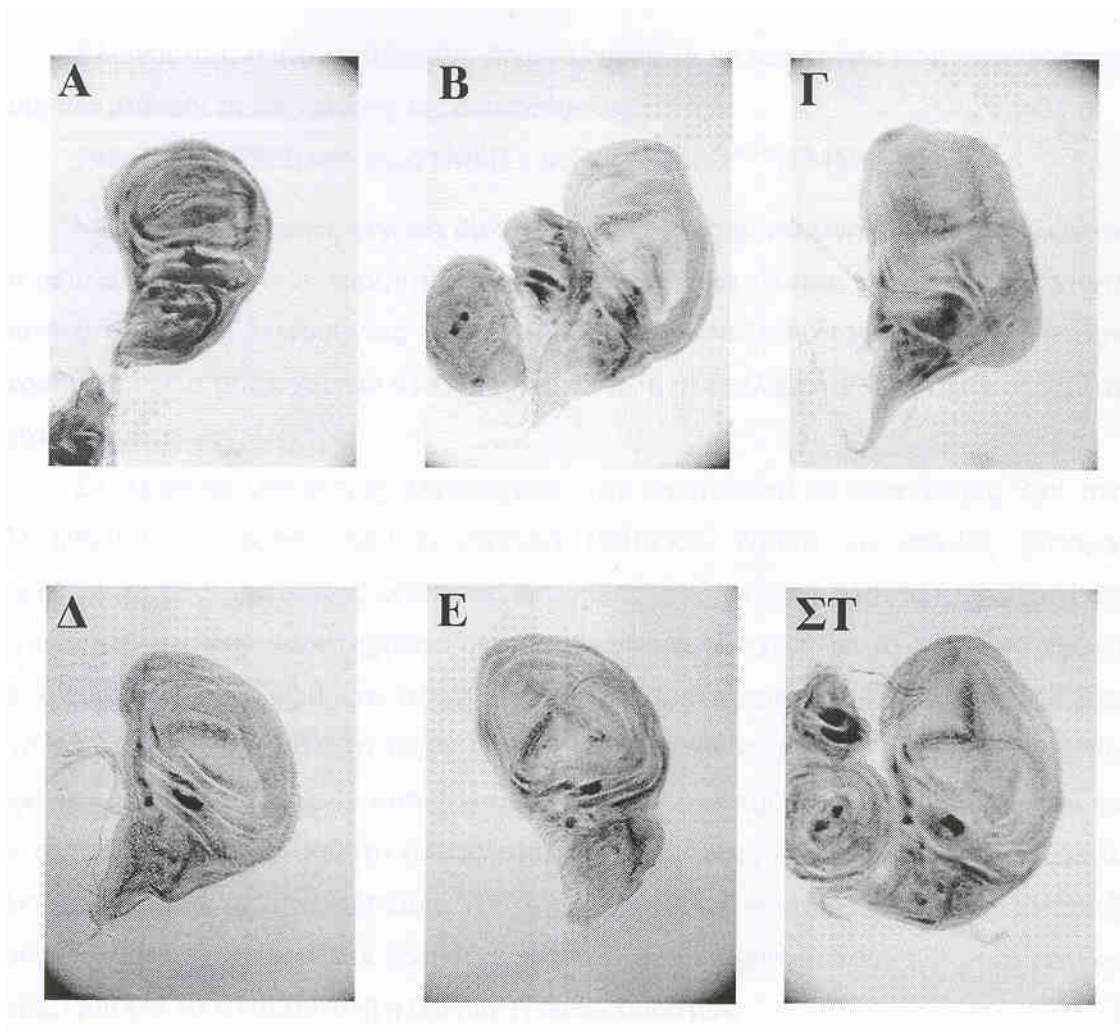
ΣΤ. *ptcGal4; Uneur*^{12.4} - *UDxD*^{B40}

Το γονιδιακό σύμπλοκο *E(spl)*

Στα ίδια γενετικά υπόβαθρα μελετήθηκε η έκφραση γονιδίων που ανήκουν στο σύμπλοκο *E(spl)* με ανοσοϊστοχημική χρώση των αναπτυξιακών δίσκων των προνυμφών με το αντίσωμα α -*E(spl)* Mab323. Το αποτέλεσμα της χρώσης φαίνεται στην εικόνα 3.14.

Όταν το γονίδιο *neuralized* εκφραστεί εκτοπικά μόνο του, δεν παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές από το αγρίου τύπου πρότυπο της χρώσης με Mab323. Με την σειρά *ptcGal4* δεν παρατηρείται καμία διαφορά (3.14Γ). Με την σειρά *ombGal4*, παρατηρείται μία μικρή διαφοροποίηση της χρώσης στην περιοχή του εμπρόσθιου περιθωρίου του φτερού. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι αυξάνεται η απόσταση των κυττάρων που εκφράζουν *E(spl)*, κάτι που υποδεικνύει κάποιο πρόβλημα στην πλευρική αναστολή (3.14Α).

Ωστόσο, όταν συνεκφραστούν εκτοπικά *neuralized* και *Delta*, παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση από το αγρίου τύπου πρότυπο: η κυρίως ραχιαία χρώση που παρατηρείται με εκτοπική έκφραση του *Delta* (3.14Β, 3.14Ε), περιορίζεται αποκλειστικά στο κοιλιακό διαμέρισμα, παρουσία *neuralized* (3.14Γ, 3.14ΣΤ). Επομένως, και σε αυτή την περίπτωση, το *neuralized* φαίνεται να ενισχύει την σηματοδοτική ικανότητα του *Delta* στο κοιλιακό διαμέρισμα του δίσκου του φτερού, όπου δεν υπάρχει *Fringe* και το *Delta* δεν είναι ενεργό για σηματοδότηση.



Εικόνα 3.14: Έκφραση του γονιδιακού συμπλόκου *E(spl)* σε αναπτυξιακούς δίσκους προνόμφης 3^{ου} σταδίου *D.melanogaster* με εκτοπική έκφραση του γονιδίου *neuralized* με την χρήση στελεχών-οδηγών *ombGal4* και *ptcGal4*.

Ο μεταγραφικός παράγοντας εντοπίστηκε με το αντίσωμα α-*E(spl)* Mab323. Οι γονότυποι των αναπτυξιακών δίσκων που φαίνονται στην εικόνα είναι:

A. *ombGal4;Uneur*^{12.4}

B. *ombGal4;UDxD*^{B40}

Γ. *ombGal4; Uneur*^{12.4} - *UDxD*^{B40}

Δ. *ptcGal4;Uneur*^{12.4}

Ε. *ptcGal4;UDxD*^{B40}

ΣΤ. *ptcGal4; Uneur*^{12.4} - *UDxD*^{B40}

ΚΛΩΝΟΙ ΑΠΩΛΕΙΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *NEURALIZED*

Κλώνοι απώλειας λειτουργίας δημιουργήθηκαν με τον τρόπο που περιγράφεται στα υλικά και μέθοδοι σε απογόνους της διασταύρωσης:

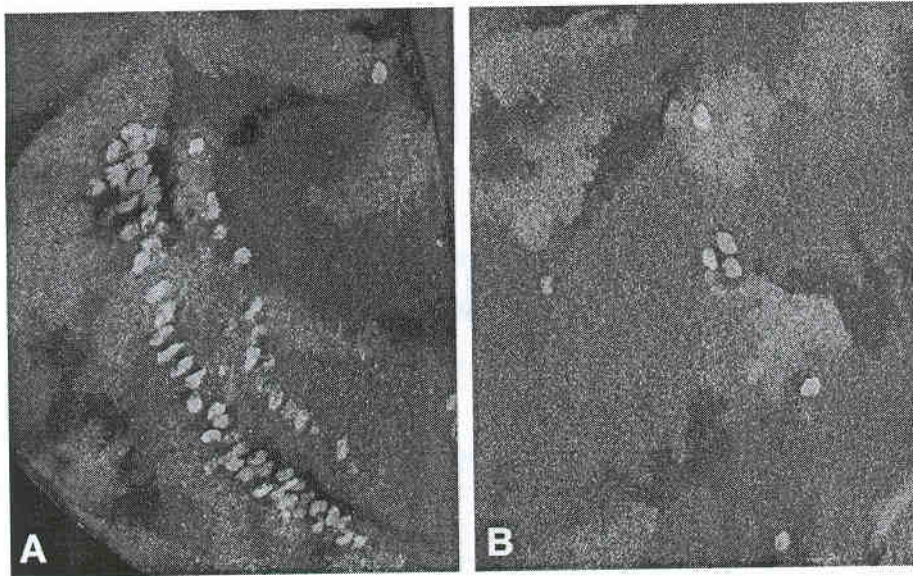
ywhsFLP;FRT82Barm-lacZ/TM6B x w;FRT82Bneur^{LL119}/TM6B

Με τον τρόπο αυτό, γίνεται δυνατή η μελέτη της μεταλλαγής απώλειας λειτουργίας του *neuralized* που είναι εμβρυϊκά θνησιγόνο. Ενήλικα άτομα, που φέρουν μιτωτικούς κλώνους απώλειας λειτουργίας του γονιδίου, παρουσιάζουν παχύνσεις φλεβώσεων των φτερών, απώλεια μικροχαιτών στο θώρακα, μείωση μεσοφλεβικού διαστήματος και άτακτη διάταξη ομματιδίων.

Σε κλώνους απώλειας λειτουργίας του *neuralized* σε προνύμφες 3ου σταδίου μελετήθηκαν η έκφραση των πρωτεϊνών Delta και Notch, οι οποίες φάνηκε ότι επηρεάζονται σε περιπτώσεις εκτοπικής έκφρασης του γονιδίου. Ωστόσο, σε καμία από τις δύο περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά σε σχέση με το πρότυπο της αγρίου τύπου χρώσης. Αυτό συμβαίνει προφανώς επειδή τα κύτταρα που εκφράζουν *neuralized* σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο είναι λίγα (αντιστοιχούν στα ΠΑΟ των μακροχαιτών του θώρακα και των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων του πρόσθιου περιθωρίου του φτερού και της τρίτης φλέβας) και το αποτέλεσμα της απώλειας λειτουργίας είναι δύσκολο να μελετηθεί σε μεμονωμένα κύτταρα. Αν οι κλώνοι μελετηθούν σε μετέπειτα αναπτυξιακό στάδιο (νύμφη), όπου το Delta εκφράζεται σε πεδία κυττάρων (μικροχαιτές του θώρακα και φλέβες) μπορεί να είναι δυνατή η εξαγωγή συμπερασμάτων.

Επιπλέον όμως, έγινε χρώση αναπτυξιακών δίσκων που φέρουν κλώνους απώλειας λειτουργίας του *neuralized* με το αντίσωμα *a-ase* (Jarman et al, 1993), το οποίο είναι δείκτης των προδρόμων κυττάρων των αισθητηρίων οργάνων, παρατηρήθηκε πολλαπλασιασμός αυτών μέσα στον κλώνο (εικόνα 3.15). Ωστόσο, το αποτέλεσμα δεν είναι σαφώς αυτόνομο ή μη αυτόνομο.

Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με το αποτέλεσμα της εκτοπικής έκφρασης του γονιδίου, που οδηγεί σε απώλεια της χρώσης από τα πρόδρομα κύτταρα των αισθητηρίων οργάνων (*pnrGal4+Uneur* οδηγεί σε απώλεια της χρώσης για τα πρόδρομα κύτταρα των αισθητηρίων οργάνων σε αναπτυξιακούς δίσκους προνυμφών). Αξίζει να σημειωθεί ότι και στις δύο περιπτώσεις (υπερέκφραση και απώλεια λειτουργίας), το τελικό αποτέλεσμα είναι απώλεια εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων. Αυτό σημαίνει ότι στην περίπτωση απώλειας λειτουργίας τα υπεράριθμα ΠΑΟ δεν παράγουν εξωτερικές δομές. Άρα ίσως δημιουργείται κάποιο πρόβλημα στον καθορισμό της γενεαλογίας των κυττάρων, όπου εμπλέκεται η σηματοδότηση μέσω *Notch*.



Εικόνα 3.15: Κλώνοι απώλειας λειτουργίας του γονιδίου *neuralized*.

Στις φωτογραφίες φαίνονται αναπτυξιακοί δίσκοι προνύμφης 3ου σταδίου, οι οποίοι φέρουν κλώνους απώλειας λειτουργίας του γονιδίου *neuralized*.

Οι κλώνοι σημαίνονται από την έκφραση της γαλακτοσιδάσης: απώλεια πράσινης χρώσης αντιστοιχεί στην περιοχή του κλώνου, ενώ έντονη πράσινη χρώση σε περιοχή έκφρασης δύο δόσεων γαλακτοσιδάσης. Με κόκκινο χρώμα σημαίνονται τα κύτταρα που αντιστοιχούν στα πρόδρομα των αισθητηρίων οργάνων (ΠΑΟ) και εκφράζουν το γονίδιο *asense*.

Στα Α και Β δείχνονται κλώνοι στις περιοχές που θα δώσουν το περιθώριο του φτερού και τις μακροχαίτες του θώρακα, αντίστοιχα.

Παρατηρείται υπεραριθμία κυττάρων ΠΑΟ μέσα στους κλώνους.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στα πλαίσια της εν λόγω εργασίας έγινε μία προσπάθεια διερεύνησης της λειτουργίας του ζυγωτικού νευρογόνου γονιδίου *neuralized* της *D.melanogaster*. Το γεγονός ότι η έκφραση του γονιδίου αυτού συμπίπτει με τις θέσεις και τον χρόνο ενεργοποίησης του μονοπατιού

διακυτταρικής σηματοδότησης *Notch* κατά την διάρκεια της εμβρυϊκής, της προνυμφικής και νυμφικής ανάπτυξης του εντόμου σε συνδυασμό με το τελικό αποτέλεσμα μεταλλαγών απώλειας λειτουργίας του (νευρογόνος φαινότυπος), μας οδηγεί στην υπόθεση ότι το *neuralized* εμπλέκεται με κάποιον τρόπο στην ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού. Επιπλέον, ο κυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης (στην κυτταρική μεμβράνη και στο ενδοπλασματικό δίκτυο) υποδεικνύει ότι ο ρόλος της είναι μάλλον στην ρύθμιση κάποιου ή κάποιων από τους συμμετέχοντες στο μονοπάτι σε επίπεδο μεταφραστικό ή μετα-μεταφραστικό και όχι σε επίπεδο μεταγραφής. Τελικά, η παρουσία του μοτίβου RING στο μόριο και η συσχέτιση αυτού (σε άλλες καλά μελετημένες πρωτεΐνες) με την ενδοκύττωση μεμβρανικών μορίων και την πρωτεόλυσή τους στο λυσόσωμα ή την ανακύκλωσή τους, ενισχύει την υπόθεση της μετα-μεταφραστικής δράσης του *neuralized*.

Για να διευκρινιστεί η παραπάνω υπόθεση, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές πειραματικές προσεγγίσεις: η βιοχημική και η ιστολογική/κυτταρική. Με τους τρόπους αυτούς μελετήθηκε η επίδραση του γονιδίου *neuralized* σε βασικά συστατικά του μονοπατιού. Επικεντρωθήκαμε σε πρωτεΐνες, οι οποίες εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη, συγκεκριμένα στον υποδοχέα *Notch* και τον δεσμευτή *Delta*, χωρίς φυσικά να αποκλείεται η πιθανότητα το *neuralized* να επηρεάζει κάποιο άλλο μόριο που συμμετέχει στο μονοπάτι (τον δεσμευτή *Serrate* ή κάποια από τις πρωτεάσες που δρουν για την διεκπεραίωση του σήματος και εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη).

Από τα βιοχημικά πειράματα φαίνεται ότι μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας του γονιδίου *neuralized* προκαλούν μικρή αλλά σταθερή αύξηση της συνολικής ποσότητας της πρωτεΐνης *Delta* σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια των εμβρύων. Η αύξηση της ποσότητας της ισομορφής πλήρους μεγέθους είναι εντονότερη τόσο σε έμβρυα 9ου-10ου σταδίου, όσο και σε 16ου σταδίου (μάλιστα στην δεύτερη περίπτωση η αύξηση της μεγάλης ισομορφής είναι αυτή που διαφοροποιεί τα *neur¹/neur¹* έμβρυα από τα νευρογόνα διαφορετικού γονοτύπου). Η ποσοτική αύξηση της πρωτεΐνης μπορεί να είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης εξαιτίας ελλειπών μετα-μεταφραστικής ρύθμισης του δεσμευτή, που συμβαίνει σε μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας του γονιδίου *neuralized*. Σύμφωνα με τα παραπάνω, όταν το γονίδιο *neuralized* υπερεκφράστηκε μαζί με *Delta* σε μία ευρεία περιοχή των αναπτυξιακών δίσκων προνυμφών, φάνηκε ότι οδηγεί σε συνολική ελάττωση της πρωτεΐνης *Delta* (υπερεκφρασμένης και μη). Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι όλο σχεδόν το ποσό του επιπλέον *Delta* εξαφανίζεται, αν και το πείραμα πρέπει να επαναληφθεί με πιο ποσοτικά αυστηρό τρόπο. Όταν ο ίδιος γονότυπος εμβρύων *neur¹/neur¹*, που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της παρουσίας της πρωτεΐνης *Delta*, ελέγχθηκε για την έκφραση του υποδοχέα *Notch*, έδειξε μία συνολική αύξηση των επιπέδων αυτού. Όμως και σε διαφορετικού γονοτύπου νευρογόνα έμβρυα παρατηρείται συνολική αύξηση της πρωτεΐνης, κάτι

που μπορεί να σημαίνει ότι η αύξηση αυτή είναι απόκριση στην γενικότερη δυσλειτουργία του μονοπατιού και όχι εξειδικευμένη για έλλειψη *Neutralized*.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω βιοχημικά αποτελέσματα, θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι το γονίδιο *neuralized* ρυθμίζει τα επίπεδα του δεσμευτή Delta άμεσα ή έμμεσα (π.χ. ρυθμίζοντας τον ίδιο τον υποδοχέα), οδηγώντας σε ελάττωση της ποσότητας της πρωτεΐνης, τόσο σε έμβρυα, όσο και σε προνύμφες. Ο τρόπος με τον οποίο επιτελείται αυτή η ρύθμιση παραμένει προς το παρόν άγνωστος, αν και η συσχέτιση του RING, που διαθέτει το *Neutralized*, προτείνει την ενδιαφέρουσα πιθανότητα άμεσης ουβικουϊτινυλίωσης και αποικοδόμησης.

Όταν η μελέτη της δράσης του γονιδίου *neuralized* προσεγγίστηκε από την πλευρά της κυτταρικής και αναπτυξιακής βιολογίας, με χρήση εκτοπικής έκφρασης, μιτωτικών κλώνων (υπερέκφρασης και απώλειας λειτουργίας) και ανοσοϊστοχημικών χρώσεων, τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν τη στενή σχέση μεταξύ *neuralized* και Delta. Η έντονη αλλαγή του κυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης Delta, από την κυτταρική μεμβράνη, σε κυστίδια (άγνωστης ταυτότητας), όταν το γονίδιο *neuralized* εκφράζεται εκτοπικά σε αναπτυξιακούς δίσκους προνυμφών, υποδεικνύει ότι το εν λόγω γονίδιο πιθανώς ρυθμίζει την μεταφορά του Delta από την μεμβράνη σε διαφορετικό κυτταρικό διαμέρισμα. Αν αποδειχθεί ότι τα κυστίδια αυτά αντιστοιχούν σε ενδοκυττωτικά, και εφόσον τέτοια έχουν συσχετιστεί με ελάττωση της δράσης του σηματοδοτικού μονοπατιού, θα μπορούσε να υποθεθεί ότι το *neuralized* υποβοηθά την ενδοκύττωση του δεσμευτή κατά την περίοδο που το μονοπάτι πρέπει να πάψει να λειτουργεί. Για τον χαρακτηρισμό των κυστιδίων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε μεταλλαγές του *Delta* που έχουν πρόβλημα στην μεταφορά-ενδοκύττωση της πρωτεΐνης ή να χρησιμοποιηθούν στελέχη με μεταλλαγές που επηρεάζουν την ενδοκύττωση γενικά (π.χ. *shibire*, *hook*) και να μελετηθεί η δράση του *neuralized* στην πρωτεΐνη Delta σε αυτά τα γενετικά υπόβαθρα. Το γεγονός ότι το *neuralized* επηρεάζει την ίδια την πρωτεΐνη Delta και όχι τη μεταγραφή του γονιδίου, δείχθηκε με την ταυτόχρονη συνέκφραση των *neuralized* και *Delta* που είχε σαν συνέπεια το ίδιο αποτέλεσμα για τον κυτταρικό εντοπισμό του δεύτερου (εντοπισμός σε κυστίδια), ενώ ο μάρτυρας *Dl-lacZ*, που ανταποκρίνεται στην έκφραση του ενδογενούς μεταγράφου *Delta*, δεν παρουσιάζει διαφορά σε γονότυπο ελέγχου (υπερέκφραση μόνο *Delta*) και υπερέκφραση *Delta* και *neuralized*.

Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι σε κλώνους εκτοπικής έκφρασης του γονιδίου *neuralized*, ο υποδοχέας Notch επηρεάζεται (κάτι που δεν είναι εντελώς προφανές σε απλή υπερέκφραση του γονιδίου με το σύστημα *UAS-Gal4*, ίσως γιατί τα σχεδόν ομοιόμορφα και χαμηλά επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα απαιτούν την ευκρίνεια συνεστιακού μικροσκοπίου) και συγκεκριμένα παρατηρείται ελάττωση των επιπέδων της πρωτεΐνης στην κορυφαία επιφάνεια των δίσκων (όπου εντοπίζεται κυρίως και μάλλον είναι σηματοδοτικά λειτουργική). Δεν παρατηρήθηκε αλλαγή κυτταρικής τοποθέτησης του υποδοχέα (παραμένει μεμβρανική η χρώση),

αλλά θα μπορούσε το *neuralized* να επηρεάζει τον υποδοχέα και ελαττώνοντας τα επίπεδά του να οδηγεί σε ενδοκύττωση του δεσμευτή και ελάττωση των επιπέδων αυτού. Ίσως λοιπόν το αποτέλεσμα της αλλαγής της κυτταρικής τοποθέτησης του Delta να είναι δευτερογενές. Για να διευκρινιστεί αν η αλλαγή της κυτταρικής τοποθέτησης του Delta είναι άμεσο αποτέλεσμα της δράσης του *neuralized* στην εν λόγω πρωτεΐνη ή έμμεσο (λόγω αλλαγής των επιπέδων του υποδοχέα), μιτωτικοί κλώνοι απώλειας λειτουργίας του *Notch* σε θέσεις όπου υπερεκφράζεται *neuralized* θα πρέπει να ελεγχθούν για την τοποθέτηση της πρωτεΐνης Delta.

Από την μελέτη μιτωτικών κλώνων απώλειας λειτουργίας του γονιδίου *neuralized* στις πρωτεΐνες Notch και Delta, σε προνύμφες 3^{ου} σταδίου, δεν κατέστη δυνατός ο εντοπισμός κάποιας αλλαγής σε πρότυπα ή επίπεδα αυτών. Η αδυναμία αυτή προφανώς οφείλεται στο ότι η έκφραση του *neuralized* εντοπίζεται σε συγκεκριμένα λίγα κύτταρα του αναπτυξιακού δίσκου (σε αυτά που θα δώσουν τις μακροχαίτες του θώρακα και τα αισθητήρια του περιθωρίου και της τρίτης φλέβας του φτερού) σε αυτό το στάδιο και κλώνοι που αφαιρούν το γονίδιο από αυτά ήταν δύσκολο να εντοπιστούν και να μελετηθούν. Το πρόβλημα αυτό όμως μπορεί να ξεπεραστεί, αν σε επανάληψη του πειράματος, αντί για προνύμφες χρησιμοποιηθούν πρόδρομα φτερών (μελέτη των περιοχών που θα δώσουν τις φλεβώσεις) ή θώρακες (πρόδρομα μικροχαιτών) νύμφης, όπου οι περιοχές έκφρασης του *neuralized* είναι ευρύτερες και το αποτέλεσμα θα είναι σαφέστερο.

Για να ελεγχθεί η επίδραση του γονιδίου *neuralized* στο μονοπάτι μετάδοσης σήματος καθεαυτό, ελέγχθηκαν κάτωθεν γονίδια-στόχοι αυτού, όπως το γονίδιο *cut*, το οποίο ενεργοποιείται στο ραχαιοκοιλιακό όριο και είναι σημαντικό για την δημιουργία του περιθωρίου του φτερού του εντόμου και το γονιδιακό σύμπλοκο *E(spl)*, το οποίο ενεργοποιείται σε πλειάδα θέσεων, όπου ενεργοποιείται το μονοπάτι *Notch*, και τα γονίδια που κωδικοποιεί καταστέλλουν την νευρική τύχη. Όταν υπερεκφράζεται εκτοπικά το γονίδιο *neuralized*, παρατηρείται ελάττωση της χρώσης του *cut* στο κέντρο της περιοχής υπερέκφρασης (όπου υπάρχει ισχυρότερη έκφραση της *UAS* κατασκευής π.χ. σε *omb* ή *ptc*), γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με το τελικό αποτέλεσμα στον φαινότυπο του εντόμου, που χαρακτηρίζεται από απώλεια ιστού στο περιθώριο του φτερού και έλλειψη λειτουργίας του μονοπατιού (σε γενετικό υπόβαθρο *ombGal4+UAS-neur*). Όταν η χρώση πραγματοποιηθεί σε αναπτυξιακούς δίσκους με εκτοπική συνέκφραση *Delta* και *neuralized*, παρατηρείται σημαντική απώλεια χρώσης στο ραχαιοκοιλιακό όριο και έντονη χρώση (που μοιάζει να ακολουθεί κάποιο κλινές) στα όρια της περιοχής υπερέκφρασης (*omb*), όπου η έκφραση της *UAS* κατασκευής ελαττώνεται. Στο κέντρο της περιοχής υπερέκφρασης, όπου τα επίπεδα του Delta είναι υψηλά, το αποτέλεσμα πιθανώς οφείλεται σε επικρατή αρνητική επίδραση της υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης, που οδηγεί σε αναστολή της σηματοδότησης. Επιπλέον, παρατηρείται χαρακτηριστική αλλαγή προτύπου μεταξύ ραχιαίου και κοιλιακού

διαμερίσματος σε δείγματα με διπλή συνέκφραση και δείγματα ελέγχου με απλή υπερέκφραση *Delta*.

Όταν πραγματοποιήθηκε χρώση για το γονιδιακό σύμπλοκο *E(spl)* στα ίδια γενετικά υπόβαθρα, παρατηρήθηκε και πάλι (όπως και στην χρώση για το γονίδιο *cut*) η διαφοροποίηση της χρώσης μεταξύ ραχιαίου και κοιλιακού διαμερίσματος παρουσία *neuralized*. Με κάποιον άγνωστο τρόπο φαίνεται ότι το *neuralized* προωθεί την ενεργοποίηση του μονοπατιού *Notch* προς την κοιλιακή πλευρά του δίσκου. Η πρωτεΐνη *Delta*, η οποία εκφράζεται εκτοπικά κάθετα στο ραχαιοκοιλιακό όριο (με τη σειρά-οδηγό *ptcGal4*) «προτιμά» να σηματοδοτεί στο ραχιαίο διαμέρισμα του δίσκου, επειδή η γλυκοσυλίωση του *Notch* από το *Fringe* ευνοεί την αλληλεπίδραση με τον δεσμευτή *Delta*. Όμως, παρουσία *Neuralized* η πρωτεΐνη *Delta* παύει να σηματοδοτεί στο ραχιαίο διαμέρισμα και το μονοπάτι αρχίζει να δραστηριοποιείται ισχυρά στο κοιλιακό διαμέρισμα. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί με την ενεργοποίηση του μονοπατιού πάνω από κάποιο κατώφλι συγκέντρωσης του ενεργού δεσμευτή *Delta*. Στο ραχιαίο διαμέρισμα, όπου το *Delta* επιβουηθάται στη δράση του από το *Fringe*, απαιτείται μικρότερη συγκέντρωση δεσμευτή για ενεργοποίηση του μονοπατιού και εξαιτίας της έλλειψης *Fringe* στο κοιλιακό διαμέρισμα δεν υπάρχει ενεργοποίηση. Όταν όμως συνεκφραστούν *Delta* και *neuralized*, το δεύτερο μπορεί να ενισχύει την ικανότητα του δεσμευτή για σηματοδότηση π.χ. μέσω ενδοκύττωσης (παρά το γεγονός ότι ελαττώνει τα επίπεδά του, όπως φαίνεται από βιοχημικό πείραμα στα αντίστοιχα γενετικά υπόβαθρα) και να αρχίζει έκφραση γονιδίων-στόχων του μονοπατιού στο κοιλιακό διαμέρισμα και ταυτόχρονα το ακόμα περισσότερο ενεργό *Delta* του ραχιαίου διαμερίσματος να λειτουργεί ανασταλτικά στη σηματοδότηση στο εν λόγω πεδίο.

Ένα ερώτημα που παραμένει ακόμα αναπάντητο είναι η αυτονομία ή όχι της δράσης του *neuralized*. Σε ποιο κύτταρο χρειάζεται το *neuralized*; Στο κύτταρο-πομπό ή στο κύτταρο-δέκτη του σήματος; Αν το *Neuralized* δρα ως ρυθμιστής της πρωτεΐνης *Delta*, τότε πρέπει να δρα στο κύτταρο-πομπό, αλλά έχει προταθεί από τους Yeh et al ότι δρα αυτόνομα στο κύτταρο-δέκτη και ενδεχομένως επηρεάζει τον υποδοχέα *Notch*. Εκτός από την λεπτομερέστερη μελέτη των μιτωτικών κλώνων, πειράματα διαμόλυνσης και συγκόλλησης σε κυτταροκαλλιέργειες θα μπορούσαν ενδεχομένως να παρέχουν σημαντική πληροφορία σχετικά με την ενίσχυση της δράσης του υποδοχέα ή του δεσμευτή ή με την ενδοκύττωση αυτών στο γειτονικό ή το ίδιο κύτταρο και την σηματοδότηση.

Ένα επίσης αναπάντητο και σημαντικό ερώτημα σχετικά με τη λειτουργία του γονιδίου *neuralized* είναι το αν παίζει κάποιον ρόλο στην ουβικουϊτινυλίωση κάποιας πρωτεΐνης του σηματοδοτικού μονοπατιού (του υποδοχέα ή του δεσμευτή). Θα μπορούσε το *neuralized* να λειτουργεί ως λιγάση E3 και να μονο- ή δι-ουβικουϊτινυλιώνει κάποιο συστατικό του μονοπατιού με τελικό αποτέλεσμα την ενδοκύττωση και ρύθμιση των επιπέδων αυτού (με αποικοδόμηση στο

λυσόσωμα) ή την ενεργοποίηση του μονοπατιού με κάποιον ακόμα άγνωστο τρόπο (πιθανολογείται ότι η απομάκρυνση του εξωκυττάριου τμήματος του υποδοχέα Notch με τη βοήθεια ενδοκυττώσεως, που λαμβάνει χώρα μετά την αλληλεπίδραση με τον δεσμευτή, είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης μέσω του ενδοκυττάριου Notch). Η παρουσία ενός μοτίβου RING (που απαντάται σε E3 λιγάσες) στο *neuralized* σε συνδυασμό με την παρουσία ενός PEST πρωτεϊνικού μοτίβου (συχνά συσχετίζεται με ουβικουϊτινυλίωση) στην ενδοκυττάρια περιοχή του υποδοχέα Notch ενισχύει μια τέτοια υπόθεση. Επιπλέον, η παρουσία του Delta σε κυστίδια (πιθανώς ενδοκυττωτικά) θα μπορούσε να σημαίνει ότι μετά από μία διαδικασία ουβικουϊτινυλίωσης από το Neuralized, ο δεσμευτής ενδοκυττώνεται. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από έμβρυα *D.melanogaster* αγρίου τύπου, με μεταλλαγές του *neuralized* και με υπερέκφρασή του, με τη χρήση αντισωμάτων που ανιχνεύουν την ουβικουϊτίνη θα δώσουν την απάντηση.

Συμπερασματικά, θα λέγαμε ότι από τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά την διεξαγωγή της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν ότι το ζυγωτικό νευρογόνο γονίδιο *neuralized* της *D.melanogaster* εμπλέκεται στην διεκπεραίωση του σηματοδοτικού μονοπατιού *Notch* και μάλιστα επηρεάζει έντονα την συσσώρευση και υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης Delta. Η περαιτέρω διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης του *neuralized* θα δώσει σημαντική πληροφορία για την ρύθμιση και λειτουργία του εξελικτικά συντηρημένου μονοπατιού *Notch* που εμπλέκεται σε πολυάριθμες αναπτυξιακές διαδικασίες και κυτταρικές αποφάσεις των πολυκύτταρων οργανισμών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., Fortini, M.E. (1995). Notch signaling. Science Vol. 268, 225-232.
2. Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M., Lake, R.J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. Science Vol. 284, 770-776.
3. Ashburner, M. (1989). *Drosophila*, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

4. Baker, N.E. (2000). Notch signaling in the nervous system. Pieces still missing from the puzzle. *BioEssays* 22:264-273.
5. Baonza, A., Garcia-Bellido, A. (2000). Notch signaling directly controls cell proliferation in the *Drosophila* wing disc. *PNAS* Vol. 97, No. 6, 2609-2614.
6. Blair, S.S. (1997). Limb development: Marginal Fringe benefits. *Current Biology* 7:R686-R690.
7. Blau Mueller, C.M., Qi, H., Zagouras, P., Artavanis-Tsakonas, S. (1997). Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell*, Vol. 90, 281-291.
8. Boulianne, G.L., de la Concha, A., Campos-Ortega, J.A., Jan, L.Y., Jan, Y.N. (1991). The *Drosophila* neurogenic gene *neuralized* encodes a novel protein and is expressed in precursors of larval and adult neurons. *EMBO J.* Vol. 10, No. 10, 2975-2983.
9. Boulianne, G.L., de la Concha, A., Campos-Ortega, J.A., Jan, L.Y., Jan, Y.N. (1991). The *Drosophila* neurogenic gene *neuralized* encodes a novel protein and is expressed in precursors of larval and adult neurons. *EMBO J.* Vol. 12, No. 6, 2586.
10. Borden, K.L.B. (1999) Ring Domains: Master Builders of Molecular Scaffolds? *J. Mol. Biol* 295, 1103-1112.
11. Brand, M., Jarman, A.P., Jan, L.Y., Jan, Y.N. (1993). *asense* is a *Drosophila* neural precursor gene and is capable of initiating sense organ formation. *Development* 119, 1-17.
12. Brand, A.H., Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
13. Bray, S. (1998). Notch signaling in *Drosophila*: three ways to use a pathway. *Sem. Cell Dev. Biol.*, Vol. 9, 591-597.
14. Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, A., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Black, R.A., Israel, A. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol. Cell*, Vol. 5, 207-216.
15. Bruckner, K., Perez, L., Clausen, H., Cohen, S. (2000). Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature*, Vol. 406, 411-415.
16. 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.
17. Chan, Y.M., Jan, Y.N. (1998). Roles of proteolysis and trafficking in the Notch maturation and signal transduction. *Cell*, Vol. 94, 423-426.
18. Ciechanover, A., Orian, A., Schwartz, A. (2000). Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *BioEssays* 22: 442-451.
19. de la Concha, A., Dietrich, U., Weigel, D., Campos-Ortega, J.A. (1988). Functional interactions of neurogenic genes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 118: 499-508.

20. Doherty, D., Feger, G., Younger-Shepherd, S., Jan, L.Y., Jan, Y.N. (1996). Delta is a ventral to dorsal signal complementary to Serrate, another Notch ligand, in *Drosophila* wing formation. *Genes and Development* 10: 421-434.
21. Fehon, R.G., Kooh, P.J., Rebay, I., Regan, C.L., Xu, T., Muskavitch, M.A.T., Artavanis-Tsakonas, S. (1990). Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci *Notch* and *Delta*, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell*, Vol. 61, 523-534.
22. Fehon, R.G., Johansen, K., Rebay, I., 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. Biology*, Vol. 113, 657-669.
23. Fleming, R.J., Gu, Y., Hukriede, N.A. (1997). *Serrate*-mediated activation of *Notch* is specifically blocked by the product of the gene *fringe* in the dorsal compartment of the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* 124: 2973-2981.
24. Fleming, R.J. (1998). Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Sem. Cell Dev. Biol.*, Vol. 9, 599-607.
25. Freemont, P.S. (2000) Ubiquitination: Ring for destruction? *Current Biology* 10: R84-R87.
26. Gho, M., Bellaiche, Y., Schweisguth, F. (1999). Revisiting the *Drosophila* microchaete lineage: a novel intrinsically asymmetric cell division generates a glial cell. *Development* 126, 3573-3584.
27. Go, M.J., Eastman, D.S., Artavanis-Tsakonas, S. (1998). Cell proliferation control by Notch signaling in *Drosophila* development. *Development* 125, 2031-2040.
28. Greenwald, I. (1998). LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes and Development* 12: 1751-1762.
29. Gu, Y., Hukriede, N.A., Fleming, R.J. (1995). *Serrate* expression can functionally replace *Delta* activity during neuroblast segregation in the *Drosophila* embryo. *Development* 121, 855-865.
30. Hartenstein, V. and Campos-Ortega, J.A. (1997). The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. 2nd edition, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
31. Heitzler, P. and Simpson, P. (1991). The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*. *Cell*, Vol. 64, 1083-1092.
32. Heitzler, P., Bourouis, M., rue, L., Carteret, C., 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.
33. Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 425-479.

34. Hicke, L. (1999). Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends in Cell Biology*, Vol. 9, 107-112.
35. Huang, F., Dambly-Chaudiere, C., Ghysen, A. (1991). The emergence of sense organs in the wing disc of *Drosophila*. *Development* 111, 1087-1095.
36. Huppert, S.S., Jacobsen, T.L., Muskavitch, M.A.T. (1997). Feedback regulation is central to Delta-Notch signalling required for *Drosophila* wing vein morphogenesis. *Development* 124, 3283-3291.
37. Interactive fly: <http://cdbridges.harvard.edu:7081/allied-data/ik/interactive-fly>
38. Irvine, K.D. (1999). Fringe, Notch, and making developmental boundaries. *Curr. Opin. Gen. Devel.* 9:434-441.
39. Jackson, P.K., Eldridge, A.G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J.Y., Kaiser, B.K., Reimann, J.D.R. (2000). The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends in Cell Biology*, Vol. 10, 429-439.
40. Joazeiro, C.A.P., Wing, S.S., Huang, H., Leverson, J.D., Hunter, T., Liu, Y. (1999). The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent Ubiquitin-Protein ligase. *Science* 286, 309-312.
41. Joazeiro, C.A.P., Weissman, A.M. (2000). RING finger proteins: Mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell*, Vol. 102, 549-552.
42. Kim, J., Irvine, K.D., Carroll, S.B. (1995). Cell recognition, signal induction and symmetrical gene activation at the dorsal-ventral boundary of the developing *Drosophila* wing. *Cell*, Vol. 82, 795-802.
43. Kimble, J., Simpson, P. (1997). The LIN12/Notch signaling pathway and its regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 333-361.
44. Klueg, K.M., Parody, T.R., Muskavitch, M.A.T. (1998). Complex proteolytic processing acts on Delta, a transmembrane ligand for Notch, during *Drosophila* development. *Mol. Biol. Cell*, Vol. 9, 1709-1723.
45. Klueg, K.M. and Muskavitch, M.A.T. (1999). Ligand-receptor interactions and trans-endocytosis of Delta, Serrate and Notch: members of the Notch signalling pathway in *Drosophila*. *J. Cell Science* 112, 3289-3297.
46. Kooh, P.J., Fehon, R.G., Muskavitch, M.A.T. (1993). Implications of dynamic patterns of Delta and Notch expression for cellular interactions during *Drosophila* development. *Development* 117, 493-507.
47. Kopan, R., Turner, D.L. (1996). The Notch pathway: democracy and aristocracy in the selection of cell fate. *Curr. Opin. Neurobiology*, 6: 594-601.

48. Kopan, R., Schroeter, E.H., Weintraub, H., Nye, J.S. (1996). Signal transduction by activated mNotch: Importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain. PNAS, Vol. 93, 1683-1688.
49. Kopan, R., Cagan, R. (1997). Notch on the cutting edge. TIG Vol. 13, No. 12, 465-467.
50. Lawrence, N., Klein, T, Brennan, K, Martinez-Arias, A. (2000). Structural requirements for Notch signalling with Delta and Serrate during the development and patterning of the wing disc of *Drosophila*. Development 127, 3185-3195.
51. Lewis, J. (1998). Notch signaling and control of cell fate choices in vertebrates. Sem. Cell Dev. Biol., Vol. 9, 583-589.
52. Lieber, T., Kidd, S., Alcamo, E., Corbin, V., Young, M.W. (1993). Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for Notch in nuclei. Gen. Dev. 7: 1949-1965.
53. Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N.G., Israel, A. (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. PNAS Vol.95, 8108-8112.
54. Micchelli, C.A., Rulifson, E.J., Blair, S.S. (1997). The function and regulation of *cut* expression on the margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate. Development 124, 1485-1495.
55. Morel, V. and Schweisguth, F. (2000). Repression by Suppressor of Hairless and activation by Notch are required to define a single row of *single-minded* expressing cells in the *Drosophila* embryo. Gen. and Dev. 14: 377-388.
56. Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Saxena, M.T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D.J., Ray, W.J., Kopan, R. (2000). A ligand-induced extracellular cleavage regulates γ -secretase-like proteolytic activation of Notch1. Mol. Cell, Vol. 5, 197-206.
57. Muskavitch, M.A.T. (1994). Delta-Notch signaling and *Drosophila* cell fate choice. Dev. Biol. 166, 415-430.
58. Nakamura, H., Yoshida, M., Tsuiki, H., Ito, K., Ueno, M., Nakao, M., Oka, K., Tada, M., Kochi, M., Kuratsu, J., Ushio, Y. and Saya, H. (1998). Identification of a human homolog of the *Drosophila* neuralized gene within the 10q25.1 malignant astrocytoma deletion region. Oncogene 16 (8), 1009-1019.
59. Panin, V.M., Papayannopoulos, V., Wilson, R., Irvine, K.D. (1997). Fringe modulates Notch-ligand interactions. Nature, Vol. 387, 908-912.
60. Panin, V.M., Irvine, K.D. (1998). Modulators of Notch signaling. Sem. Cell Dev. Biol., Vol. 9, 609-617.

61. Parks, A.L., Huppert, S.S., Muskavitch, M.A.T. (1997). The dynamics of neurogenic signalling underlying bristle development in the *Drosophila melanogaster*. *Mech. Dev.* 63, 61-74.
62. Parks, A.L., Klueg, K.M., Stout, J.R., Muskavitch, M.A.T. (2000). Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* 127, 1373-1385.
63. Pavlopoulos, E., Prinos, P., Kilpatrick, M., Tsipouras, P. and Moschonas, N.K., αδημοσίευτα αποτελέσματα.
64. Pavlopoulos, E., αδημοσίευτα αποτελέσματα.
65. Price, B.D., Chang, Z., Smith, R., Bockleim, S., Laughon, A. (1993). The *Drosophila neuralized* gene encodes a C₃HC₄ zinc finger. *EMBO J.*, Vol. 12, No. 6, 2411-2418.
66. Ramos, R.G.P., Grimwade, B.G., Wharton, K.A., Scottgale, T.N., Artavanis-Tsakonas, S. (1989). Physical and functional definition of the *Drosophila Notch* locus by *P* element transformation. *Genetics* 123: 337-348.
67. Rauskolb, C., Correlá, T., Irvine, K.D. (1999). Fringe-dependent separation of dorsal and ventral cells in the *Drosophila* wing. *Nature*, Vol. 401, 476-480.
68. Ray, W.J., Yao, M., Nowotny, P., Mumm, J., Zhang, W., Wu, J.Y., Kopan, R., Goate, A.M. (1999). Evidence for a physical interaction between presenilin and Notch. *PNAS*, Vol. 96, 3263-3268.
69. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
70. Simpson, P. (1997). Notch signaling in development: on equivalence groups and asymmetric developmental potential. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 7: 537-542.
71. Simpson, P. (1998). Introduction: Notch signaling and choice of cell fates in development. *Sem. Cell Dev. Biol.*, Vol. 9, 581-582.
72. Speicher, S.A., Thomas, U., Hinz, U., Knust, E. (1994). The *Serrate* locus of *Drosophila* and its role in the morphogenesis of the wing imaginal discs: control of cell proliferation. *Development* 120, 535-544.
73. Struhl, G. and Greenwald, I. (1999). Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature*, Vol. 398, 522-525.
74. Sun, X. and Artavanis-Tsakonas, S. (1996). The intracellular deletions of DELTA and SERRATE define dominant negative forms of the *Drosophila* Notch ligands. *Development* 122, 2465-2474.
75. Sun, X. and Artavanis-Tsakonas, S. (1997). Secreted forms of DELTA and SERRATE define antagonists of Notch signaling in *Drosophila*. *Development* 124, 3439-3448.

76. Wilson R, Ainscough R, Anderson K, Baynes C, Berks M, Bonfield J, Burton J, Connell M, Copsey T, Cooper J, et al (1994). 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. Nature Vol. 368(6466):32-8.
77. Wu, J.Y. and Rao, Y. (1999). Fringe: defining borders by regulating the Notch pathway. Curr. Opin. Neurobiology 9: 537-543.
78. Ye, Y., Lukinova, N., Fortini, M.E. (1999). Neurogenic phenotypes and altered Notch processing in the *Drosophila Presenilin* mutants. Nature, Vol. 398, 525-529.
79. Ye, Y. and Fortini, M.E. (2000). Proteolysis and developmental signal transduction. Sem. Cell. Dev. Biol., Vol. 11, 211-221.
80. Yeh, E., Zhou, L., Rudzik, N., Boulianne, G.L. (2000). *Neuralized* functions cell autonomously to regulate *Drosophila* sense organ development. EMBO J. Vol. 19, No. 17, 4827-4837.
81. Qi, H., Rand, M.D., Wu, X., Sestan, N., Wang, W., Rakic, P., Xu, T., Artavanis-Tsakonas, S. (1999). Processing of the Notch ligand Delta by the metalloprotease Kusanian. Science, Vo. 283, 91-94.
82. Xu, T., Rubin, G.M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. Development 117, 1223-1237.
83. Zeng, C., Younger-Shepherd, S., Jan, L.Y., Jan, Y.N. (1998). Delta and Serrate are redundant Notch ligands required for asymmetric cell divisions within the *Drosophila* sensory organ lineage. Gen. Dev. 12: 1086-1091.
84. Zheng, N., Wang, P., Jeffrey, P.D., Pavletich, N.P. (2000). Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. Cell, Vol 102, 533-539.