

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

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Δομική και λειτουργική ανάλυση των γονιδίων *neuralized*
του ποντικού και της *Drosophila* και διερεύνηση, *in vivo*,
του ρόλου τους στη σηματοδότηση Notch

Ηλίας Κ. Παυλόπουλος

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΜΑΡΤΙΟΣ 2002



UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF BIOLOGY
&
FOUNDATION FOR RESEARCH AND TECHNOLOGY
INSTITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Ph. D THESIS

**Structural and functional studies of mouse
and *Drosophila* neuralized genes; *in vivo*
analysis of their role in Notch signaling**

Elias K. Pavlopoulos

HERAKLION, MARCH 2002

.....στους γονείς μου Κωνσταντίνο και Γεωργία

.....στους παππούδες μου Παναγιώτη και Ηλία

.....στις γιαγιάδες μου Δέσποινα και Στέλλα

«Μόνο η ζωή που την αφιερώνεις στους άλλους είναι μία ζωή που αξίζει»

Albert Einstein

Επιβλέπων καθηγητής

Νίκος Κ. Μοσχονάς (καθηγητής)

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Νίκος Κ. Μοσχονάς (καθηγητής)

Χρήστος Δελιδάκης (αναπληρωτής καθηγητής)

Γιώργος Χαλεπάκης (αναπληρωτής καθηγητής)

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Νίκος Κ. Μοσχονάς (καθηγητής)

Χρήστος Δελιδάκης (αναπληρωτής καθηγητής)

Γιώργος Χαλεπάκης (αναπληρωτής καθηγητής)

Χρήστος Λούης (καθηγητής)

Γιώργος Γιαννόπουλος (καθηγητής, Παν/μιο Πάτρας, Τμήμα Βιολογίας)

Δέσποινα Αλεξανδράκη (αναπληρώτρια καθηγήτρια)

Δόμνα Καραγωγέως (αναπληρώτρια καθηγήτρια, Παν/μιο Κρήτης, Ιατρική Σχολή)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εκπόνηση αυτής της διατριβής αποτέλεσε ένα σημαντικό σταθμό στη ζωή μου. Δε θα ξεχάσω ποτέ τη στιγμή που πρωτοήλθα σε αυτόν το χώρο, γεμάτος όρεξη για δουλειά αλλά και αβεβαιότητα για τις αντοχές μου και το τελικό αποτέλεσμα μίας τόσο σημαντικής και δύσκολης προσπάθειας. Φθάνοντας, λοιπόν, στο τέλος νιώθω ότι όχι μόνο πήγαν όλα καλά, όσον αφορά τον όγκο και την ποιότητα των αποτελεσμάτων, αλλά ότι η εμπειρία που αποκόμισα, η γνώση που άντλησα και η συναισθηματική φόρτιση που αντιμετώπισα πάμπολλες φορές δεν ανταλλάσσονται με τίποτα. Είχα την τύχη και τη χαρά να συνεργαστώ και να συναναστραφώ με πολλούς ανθρώπους. Όλοι τους, ο καθένας με το δικό του τρόπο, άμεσα ή έμμεσα, με βοήθησαν και με στήριξαν σημαντικά σε αυτήν την προσπάθεια. Αυτούς τους ανθρώπους έχω την τιμή να τους ευχαριστήσω δημόσια.

Αρχικά, ευχαριστώ τον επιβλέποντα καθηγητή μου Νίκο Μοσχονά για την επιστημονική του καθοδήγηση και τις ευκαιρίες που μου προσέφερε. Από αυτόν έμαθα το σωστό προγραμματισμό και την απαίτηση για υψηλής ποιότητας αποτελέσματα. Η συμβολή του στη διαμόρφωση του τρόπου σκέψης μου ήταν ριζική. Εκτός όμως από όλα αυτά ο κ. Μοσχονάς αποτέλεσε συμπαραστάτη και φίλο σε κρίσιμες αποφάσεις μου και ιδιαίτερα δύσκολες στιγμές. Πάντα θα τριγυρνά στο μυαλό μου κάτι που μου έλεγε συνεχώς όταν γίνονταν οι καταστάσεις πιεστικές και με κυρίευε η αμφιβολία για το αν θα τα καταφέρω : «κάποτε θα δεις ότι οι δυνατότητες του ανθρώπου είναι απεριόριστες και θα πιάσεις τον εαυτό σου να ξεπερνά εμπόδια που ποτέ δε φανταζόσουν». Αυτές οι κουβέντες, που τελικά αποδείχθηκαν σοφές, αποτέλεσαν και θα αποτελούν για πάντα συνοδό στη ζωή μου.

Είχα, επίσης, την χαρά να συνεργαστώ όλα αυτά τα χρόνια με τον αναπλ. καθηγητή Χρήστο Δελιδάκη, ο οποίος αποτέλεσε για μένα το δεύτερο επιβλέποντα και φίλο μου. Η συμμετοχή του στη διεύθυνση της επιστημονικής μου σκέψης ήταν ουσιαστική και ριζική. Οι ιδέες και η αξιοσημείωτη επιστημονική του κατάρτιση με έμαθαν να σκέφτομαι πολύ πιο ώριμα και να αξιολογώ βαθύτερα και πολυπλοκότερα τα εκάστοτε δεδομένα.

Νιώθω την ανάγκη να πω ότι η συνεργασία και με τους δύο προαναφερόμενους ήταν ότι καλύτερο θα μπορούσε να συμβεί σε έναν νέο επιστήμονα. Πραγματικά, η συνεργασία αυτή δεν κλονίστηκε ποτέ, ήταν μακροχρόνια, προσοδοφόρα και θεωρώ ότι αποτελεί λαμπρό παράδειγμα για πολλούς. Βέβαια, πολλές φορές δυσκολεύτηκα να αποδίδω συνεχώς στο μέγιστο των δυνατοτήτων μου, μιας και οι απαιτήσεις ήταν διπλές, αλλά τελικά τα κατάφερα έχοντας αντλήσει μοναδικές εμπειρίες και ανεκτίμητης αξίας εφόδια. Μέσα από αυτή τη συνεργασία έμαθα να μην εγκαταλείπω ποτέ τους στόχους μου. Έμαθα να έχω έναν ευέλικτο τρόπο σκέψης και να μπορώ να διακρίνω και να δέχομαι κριτική και συμβουλές για τη δουλειά μου, από εκείνους που πραγματικά ενδιαφέρονταν για την ουσία. Μέσα από αυτή τη συνεργασία κατάφερα να ξεκινήσω από τα σπάργανα μία ερευνητική προσπάθεια την οποία έφθασα σε πολύ υψηλά επίπεδα. Νιώθω υπερήφανος που αυτό που ξεκίνησα και πάλεψα μόνος μαζί με τους δύο επιβλέποντές μου, εδώ και αρκετά χρόνια, έχει, τη στιγμή που εγώ παραδίδω τη σκυτάλη, τρεις νέους συνεχιστές και υποψήφιους διδάκτορες (Ευαγγελία Κουτέλου, Χρυσούλα

Πιτσούλη, Βασίλη Μπαούση), στους οποίους εύχομαι να είναι δυνατοί και άξιοι να πάνε αυτήν την προσπάθεια ακόμα πιο ψηλά. Τελειώνοντας την παράγραφο, έχω την ανάγκη να ευχαριστήσω, μέσα από την καρδιά μου, για μία ακόμη φορά τον κ. Μοσχονά και κ. Δελιδάκη. Θέλω να γνωρίζουν ότι νιώθω πολύ υπερήφανος που ήμουν πλάι τους.

Θεωρώ, επίσης, τον εαυτό μου τυχερό που γνώρισα έναν ιδιαίτερα ξεχωριστό άνθρωπο, τον λέκτορα Αλέξανδρο Αργυροκαστρίτη. Ο Αλέξανδρος ήταν ο δάσκαλος στην πρώτη μου επαφή με τη μοριακή βιολογία «στον πάγκο». Η υπομονή και η διάθεσή του να μου διοχετεύσει γνώση και τρόπους σκέψης ήταν τα ισχυρά θεμέλια για τη μετέπειτα πορεία μου. Περισσότερο όμως από όλα ήταν ο πιστός και αγαπημένος φίλος που ποτέ δε με άφησε αβοήθητο, με ανύψωνε και με καυτηρίαζε όπου χρειαζόταν, και πάντα είχε μία σωστή και αντικειμενική συμβουλή στους προβληματισμούς μου. Ο Αλέξανδρος, πράγματι, αποτέλεσε τον άνθρωπο-ορόσημο στη ζωή μου. Πάντα θα τον αγαπώ και δεν πρόκειται ποτέ να τον ξεχάσω.

Μοναδικός φίλος ήταν και ο Dr. Ashraf al Madhoon. Ήμασταν όπως λένε «κολλητοί». Δε θα σβήσουν ποτέ τα έντονα συναισθήματα που ζήσαμε και οι ατέρμονες συζητήσεις για τη δουλειά και άλλα πολλά. Αυτήν την προσπάθεια την ξεκινήσαμε παρέα και τη φέραμε εις πέρας με επιτυχία. Του εύχομαι να είναι πάντα καλά και ευτυχισμένος.

Η πιο σημαντική εμπειρία σε αυτή τη μακρόχρονη διαδρομή ήταν η προσπάθεια μεταβίβασης της γνώσης μου σε έναν νέο άνθρωπο που ξεκινούσε τη δική του προσπάθεια, όπως και εγώ κάποτε. Αυτό το «πνευματικό μου παιδί» είναι η Ευαγγελία Κουτέλου (το Λιάκι μου). Θέλω να της πω ότι τα τέσσερα χρόνια που συνεργαστήκαμε προσπάθησα να της δώσω όσα περισσότερα μπορούσα και την ευχαριστώ για την σημαντική της βοήθεια και την υπομονή που έδειξε στις απίστευτες, μερικές φορές, απαιτήσεις μου. Την ευχαριστώ γιατί έμαθα και εγώ από αυτήν, βελτιώθηκα σημαντικά και ωρίμασα και της ζητώ συγνώμη για τις στιγμές που τη στεναχώρησα. Πάντα θα είμαι δίπλα της.

Ευχαριστώ τη Μαρία Κοκκινάκη και την Αγγέλα Πασπαράκη, με τις οποίες μεγαλώσαμε, κυριολεκτικά, μαζί. Και οι δύο με στήριξαν σημαντικά σε αυτήν την προσπάθεια, όχι μόνο επιστημονικά αλλά και ψυχολογικά. Θα μου λείψουν οι στιγμές που μοιράστηκα μαζί τους. Με τη Μαρία συνεργαστήκαμε υποδειγματικά όλα τα χρόνια, αντλήσαμε γνώσεις και μάθαμε ο ένας από τον άλλο. Της εύχομαι να μη χάσει ποτέ το χαμόγελο και την αθωότητά της. Πάντα, όμως, θα απορώ για την ιώβεια υπομονή της. Κάποτε θα πρέπει να μου πει το μυστικό! Στην Αγγέλα θέλω να εκφράσω την τεράστια, επίσης, αγάπη μου και να της πω ότι η παρουσία της, η βοήθεια και ο δυναμισμός της όλα αυτά τα χρόνια αποτέλεσαν σημαντικό στήριγμα στην προσπάθειά μου. Ευχαριστώ και τη Λιλίκα Σαραφίδου με την οποία μολονότι δεν είχαμε την ευκαιρία να συνεργαστούμε εντούτοις συνέβαλλε με το δικό της, αυθόρμητο, τρόπο σε αυτήν την προσπάθεια. Πρέπει να πω ότι στο γυναικοκρατούμενο εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου η Μαρία, η Αγγέλα και η Λιλίκα με είχαν σαν πασά! Δε θα ξεχάσω ποτέ το πρωινό καφεδάκι που με περίμενε πάντα ζεστό στο γραφείο μου. Θέλω να ευχαριστήσω, επίσης, τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, τη Δάφνη Μπαζοπούλου, τον Κώστα Οικονόμου, το Σωτήρη Μπανάκο για τις ευχάριστες ώρες που περάσαμε και την συμπαράσταση και υπομονή που έδειξαν όταν οι καταστάσεις για μένα γίνονταν ιδιαίτερα αγχωτικές, στην προσπάθεια να υπερβάλλω εαυτόν, κυρίως στο χρονικό διάστημα που υπηρετούσα τη στρατιωτική μου θητεία και προσπαθούσα ταυτόχρονα να δουλεύω και στο εργαστήριο όσο το δυνατόν πιο εντατικά.

Αξέχαστες θα μου μείνουν και οι στιγμές που περάσαμε με τη φίλη και λίαν συντόμως διδάκτορα Σοφία Βρόντου. Αμέτρητα τα ξενύχτια, οι συζητήσεις και η αδιάκοπη στήριξη του ενός προς τον άλλο. Εύχομαι όλοι οι κόποι της, που πραγματικά θα έπρεπε να έχουν γραφτεί στο βιβλίο Γκίνες, να ευοδωθούν και τη συμβουλεύω να είναι λιγότερο συγκαταβατική με ανθρώπους και καταστάσεις. Είμαι σίγουρος ότι θα πάει πολύ ψηλά.

Πολύτιμη φίλη ήταν και η Dr. Σμάρω Καμακάρη. Την ευχαριστώ για την παρέα της, τις συμβουλές της και την ώριμη και αντικειμενική στάση που κρατούσε πάντα όταν ώρες ατελείωτες συζητούσαμε για διάφορα που με πονοκεφάλιαζαν.

Θέλω, επίσης, να ευχαριστήσω τη Χρυσούλα Πισσούλη για τη συνεργασία μας. Εύχομαι να συνεχίσει με επιτυχία το έργο που της παρέδωσα.

Είχα τη χαρά να συνεργαστώ με την αναπλ. καθηγήτρια Δόμνα Καραγωγέως, τον αναπλ. καθηγητή Γιώργο Χαλεπάκη και τον επικ. καθηγητή Βασίλη Γαλανόπουλο οι οποίοι βοήθησαν σημαντικά, τόσο με την παροχή υλικοτεχνικής υποδομής όσο και με τις επιστημονικές τους συμβουλές, στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Τους ευχαριστώ θερμά.

Ευχαριστώ, επίσης, τον καθηγητή Πέτρο Τσίπουρα (UCONN Health Center, USA), για τη συνεργασία και τη φιλοξενία στο εργαστήριό του, στα πλαίσια της παρούσας διατριβής καθώς και τον επικ. καθηγητή Ευθύμιο Μισιάδη (Universite de la Mediterranee, Marseille, France) για την ουσιαστική συμβολή του στην εκμάθηση της τεχνικής υβριδοποίησης *in situ* σε έμβρυα ποντικού.

Εκφράζω θερμές ευχαριστίες στους καθηγητές και μέλη της επταμελούς εξεταστικής μου επιτροπής, Χρήστο Λούη, Γιώργο Γιαννόπουλο και Δέσποινα Αλεξανδράκη. Για όλους έχω κάτι να πω. Ευχαριστώ τον αγαπητό μου καθηγητή κ. Γιαννόπουλο για την τιμή που μου έκανε να παρίσταται στην εξέτασή μου. Οι διορθώσεις της διατριβής και οι συμβουλές του ήταν πολύτιμες. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη και την εκτίμηση που μου έδειξε και τη συμπαράσταση και βοήθεια που είχα κάποτε, σε κάποιες δύσκολες στιγμές. Ο κ. Λούης ήταν πάντα η μεγάλη μου συμπάθεια, μολονότι από την πρώτη στιγμή που τον γνώρισα φοβόμουν το επιβλητικό του ανάστημα. Τον ευχαριστώ για τη συμμετοχή του στην εξέτασή μου και την αγχολυτική επίδραση που είχε εκείνη την ώρα. Επίσης, δε θα ξεχάσω ποτέ τα υπέροχα λουκουλλεία γεύματα στην καθιερωμένη χριστουγεννιάτικη συνάντηση στο σπίτι του. Ομολογώ ότι είναι εξαιρετος μάγειρας. Όσον αφορά την κ. Αλεξανδράκη, την ευχαριστώ γιατί, αν και ποτέ δεν είχα τη χαρά να συνεργαστούμε, γνώριζε ευαίσθητες πτυχές του εαυτού μου, με συμβούλευε και πίστευε στις ικανότητές μου. Πάντα θα θυμάμαι τις συζητήσεις μας. Ειλικρινά, ήταν μία σεβαστή σύμβουλος.

Ευχαριστώ, επίσης, το διευθυντή του I.M.B.B. Γιώργο Θηραίο, για τη βοήθειά του σε πολύ σημαντικές χρονικές περιόδους καθώς και το ενδιαφέρον του για την πορεία της δουλειάς μου. Πάντα τον θαύμαζα για τη διαφορετική και πιο στοχαστική αντίληψη που είχε για τα διάφορα θέματα. Λυπάμαι που δεν είχα την τύχη να συνεργαστώ μαζί του. Πιστεύω ότι θα μάθαινα ακόμη περισσότερα. Εύχομαι να είναι πάντα καλά και ποτέ να μη χάσει όλα αυτά που τον κάνουν να ξεχωρίζει.

Ευχαριστώ και τον καθηγητή Χαράλαμπο Σαββάκη που έδρασε άμεσα όταν τον χρειάστηκα, λίγο πριν ξεκινήσει η θητεία μου στο στρατό (δεν είμαι βέβαιος αν θα το θυμάται!). Ο κ. Σαββάκης μου

έδωσε σαν θέμα στα *qualifyings* τη μελέτη της GFP. Που να ήξερα τότε ότι λίγο αργότερα όσα είχα μάθει για αυτήν την πρωτεΐνη θα τα έθετα σε πλήρη εφαρμογή (βλ. αποτελέσματα).

Δε θα μπορούσα να ξεχάσω να ευχαριστήσω την Κατερίνα και τη Στέλλα Μιχελιδάκη που όλα αυτά τα χρόνια πάντα ενδιαφέρονταν για μένα και με στήριζαν με το δικό τους μοναδικό και αυθόρμητο τρόπο. Ευχαριστώ, επίσης, το Γιάννη Λειβαδάρα, τον πιο ικανό και γρήγορο στις μικροενέσεις εμβρύων *Drosophila*, για την πολύτιμη βοήθειά του και το συνεχές, πηγαίο, ενδιαφέρον του καθώς και όλους τους ανθρώπους του *fly room* (την κυρία Πόπη, τη Ντίνα, το Μιχάλη) για τη συμπαράσταση και την παρέα τους.

Πώς θα μπορούσα να ξεχάσω να ευχαριστήσω τις γραμματείς του Τμήματος Βιολογίας Χαρά Ζαφειροπούλου, Βάνα Μακράκη, Ελευθερία Λαρεντζάκη και Φωτεινή Χειλαδάκη. Ομολογώ ότι ποτέ δε μου χάλασαν χατίρι και πάντα ενεργούσαν άμεσα σε οτιδήποτε χρειαζόμουν. Θα ήθελα να ξέρουν ότι το χαμόγελό μου, όταν τις επισκεπτόμουν για να ζητήσω κάτι, ήταν πάντα αυθόρμητο γιατί απλά τις αγαπώ πολύ. Ευχαριστώ και τις γραμματείς του I.M.B.B. Γεωργία Χουλάκη και Νεκταρία Κελαϊδή, οι οποίες ήταν πάντα φιλικές, πρόσχαρες και εξυπηρετικές. Θα μου λείπει ο αυθορμητισμός της Γεωργίας, όπως και οι καταπληκτικές χορευτικές μας φιγούρες (αλήθεια, Γεωργία θυμάσαι άραγε εκείνη την τρομερή βραδιά στο *Barracuda Club*, πριν αρκετά χρόνια, που δίναμε μάθημα χορού με την υπόκρουση των *BEE GEES*!).

Βαθύτατα ευχαριστώ και τους πολύ στενούς μου φίλους, Δέσποινα Παγκάλου, Μιχάλη Νικητάκη, Ρένα Αλεξανδράκη, Μάριο Αγγελόπουλο, Χαρούλα Παπαδάκη, Σταύρο Δέρδα, Βίκη Προκόβα, Jana Proft, Γιώργο Κούκο και Γιώργο Κουτσοδόντη. Η συμπαράστασή τους στις δύσκολες ώρες και η πηγαία χαρά τους στις επιτυχίες μου είναι δύσκολο να εκτιμηθούν με λόγια.

Ευχαριστώ τη Βάσω Μαχαιράκη, τον άνθρωπο που αγάπησα δίχως όρια και που έζησα μαζί του τα πάντα. Η Βάσω ήταν μοναδική πηγή έμπνευσης και ανεξάντλητης δύναμης καθ' όλη την πορεία μου τα τελευταία επτά χρόνια. Ήταν εκείνη που μου έδινε συνεχώς κουράγιο και είχε το ταλέντο και την τρυφερότητα να με ηρεμεί ακόμα και όταν η πίεση έφτανε να γίνεται αφόρητα ασφυκτική. Με τη Βάσω μοιραστήκαμε χαρές και λύπες τόσο έντονα που είμαι σίγουρος ότι αυτές οι αναμνήσεις δεν πρόκειται να ξεθωριάσουν ποτέ. Από τα βάθη της καρδιάς μου της εύχομαι καλή σταδιοδρομία και μία ζωή όπως νομίζει εκείνη ότι θα είναι ευτυχισμένη. Θα τη σκέφτομαι και θα την αγαπάω για πάντα.

Για το τέλος άφησα τις ευχαριστίες για εκείνους που έχουν κατακτήσει το μεγαλύτερο κομμάτι της καρδιάς μου, τους γονείς μου και τον αδελφό μου. Για αυτούς τους ανθρώπους ότι και να πω είναι πάρα πολύ λίγο. Είναι εκείνοι που πόνεσαν, χάρηκαν και γενικά βίωσαν, όσο πιο έντονα γινόταν και περισσότερο από τον καθένα, όλες τις πτυχές της ζωής μου. Σε αυτούς, λοιπόν, τους ανθρώπους αφιερώνω την αγάπη μου και το βάθος κάποιων αισθημάτων που ποτέ κανείς δε θα μπορέσει να περιγράψει.

Ηλίας Κ. Παυλόπουλος

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδες
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5-25
1. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ <i>neuralized</i> ΚΑΙ ΤΑ ΝΕΥΡΟΓΟΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ	5
2. Η ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΝΕΥΡΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΗΝ <i>Drosophila</i>	6
3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>neuralized</i> ΣΤΗΝ <i>Drosophila</i> ΚΑΙ ΤΗ ΝΕΥΡΟΓΕΝΕΣΗ	7
4. Η ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗ ΤΩΝ ΟΡΘΟΛΟΓΩΝ ΜΟΡΙΩΝ <i>Neuralized</i>	8
5. Η ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ NOTCH ΣΤΗΝ <i>Drosophila</i> ΚΑΙ ΑΛΛΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ	11
7. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ NOTCH ΚΑΙ ΔΕΣΜΕΥΤΕΣ : ΔΟΜΙΚΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΑ ΕΙΔΗ	16
A. Οι υποδοχείς Notch	16
B. Οι δεσμευτές των υποδοχέων Notch	19
8. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ NOTCH : ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΑ ΚΑΙ ΕΝΔΟΚΥΤΤΩΤΙΚΑ ΓΕΓΟΝΟΤΑ	20
9. ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	24
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	26-69
1. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ cDNA	26
A. Ανάπτυξη της βιβλιοθήκης cDNA σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα	26
B. Μεταφορά των βακτηριοφάγων σε μεμβράνες υβριδοποίησης	27
Γ. Ανίχνευση θετικών κλώνων	27

2. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ DNA ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ	28
A. Τεμαχισμός μορίων DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	28
B. Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	28
Γ. Απομόνωση και καθαρισμός γραμμικών μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης	28
Δ. Κατασκευή τυφλών (blunt) άκρων σε γραμμικά μόρια DNA με προεξέχοντα 5' άκρα	28
E. Αντίδραση σύνδεσης γραμμικών μορίων DNA (ligation)	29
ΣΤ. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων	30
Ζ. Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων βακτηριακών κλώνων	31
3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA	31
4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΥ	32
A. Απομόνωση DNA βακτηριοφάγου από υγρή καλλιέργεια	32
B. Απομόνωση DNA βακτηριοφάγου από στερεή καλλιέργεια	33
5. ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΝΣΗ ΓΡΑΜΜΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ DNA	33
6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	34
A. Πειράματα υβριδοποίησης με τη μέθοδο Denhardt's	34
B. Υβριδοποίηση με τη μέθοδο των Church και Gilbert	35
7. ΑΝΑΛΥΣΗ DNA ΚΑΤΑ SOUTHERN	35
8. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR: POLYMERASE CHAIN REACTION)	36
9. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΜΟΡΙΩΝ DNA	37
A. Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με τη δράση του ενζύμου Sequenase	37
B. Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με αντίδραση PCR	38
Γ. Αυτοματοποιημένη διαδικασία προσδιορισμού νουκλεοτιδικής αλληλουχίας	38
10. ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA ΑΠΟ ΙΣΤΟΥΣ	39
11. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ (REVERSE TRANSCRIPTION)	40

A. Πέψη με δεοξυριβονουκλεάση I	41
B. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής	41
12. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗΣ <i>in situ</i> ΣΕ ΕΜΒΡΥΑ ΠΟΝΤΙΚΟΥ	42
A. Αντίδραση μεταγραφής <i>in vitro</i> : Κατασκευή ανιχνευτή RNA σημασμένου με διγοξυγενίνη	42
B. Πειράματα υβριδοποίησης <i>in situ</i> σε ολόκληρα έμβρυα ποντικού (whole mount <i>in situ</i>)	44
Γ. Πειράματα υβριδοποίησης <i>in situ</i> σε τομές εμβρύων	46
13. ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ	47
14. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ (SDS-PAGE)	48
15. ΑΝΟΣΟΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ (WESTERN BLOT)	50
A. Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	50
B. Πειράματα ανοσοανίχνευσης	50
16. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗΣ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΗ <i>Drosophila</i>	51
17. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ	54
A. Πειράματα απομόνωσης διαμεμβρανικών πρωτεϊνών	54
B. Πειράματα απομόνωσης όλων των πρωτεϊνών (διαμεμβρανικών και μη) που σχετίζονται με κυτταρικές μεμβράνες	55
18. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΕΨΗΣ ΠΡΟΝΥΜΦΙΚΩΝ ΔΙΣΚΩΝ ΦΤΕΡΟΥ <i>Drosophila</i> ΜΕ ΠΡΩΤΕΙΝΑΣΗ Κ	55
19. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΜΙΤΩΤΙΚΩΝ ΚΛΩΝΩΝ ΕΚΤΟΠΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ <i>Drosophila</i> (ΤΕΧΝΙΚΗ Flip out)	56
20. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ	58
A. Πειράματα ανοσοφθορισμού σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών	58
B. Πειράματα ανοσοφθορισμού σε προνυμφικούς δίσκους <i>Drosophila</i>	58
21. ΧΡΩΣΕΙΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΣΙΔΑΣΗΣ	59

22. ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΕΜΒΡΥΑ <i>Drosophila</i> ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟ-ΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΛΕΥΣΗΣ	60
Α. Επεξεργασία εμβρύων για τομές σε μικροτόμο	60
Β. Πειράματα ανοσοεντοπισμού σε τομές εμβρύων	61
23. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ	61
24. ΣΤΕΛΕΧΗ <i>Drosophila melanogaster</i>	65
25. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ	67
26. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	67
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	70-131
ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ <i>Neuralized</i> ΣΤΟΝ ΠΟΝΤΙΚΟ	70
1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ cDNA ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΕΙ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΙΝΗ <i>Neuralized</i> ΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ	70
2. ΔΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ <i>Neuralized</i>	76
3. ΤΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>Neuralized</i> ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ	78
ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΕ ΕΝΤΟΜΑ ΚΑΙ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ	85
1. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΤΟΠΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ <i>Neuralized</i> ΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΟΡΘΟΛΟΓΟΥ ΜΟΡΙΟΥ ΤΗΣ <i>D. melanogaster</i>	85
Α. Μελέτες με τη χρήση μικροσκοπίας	85
I) Κλωνοποίηση του cDNA του γονιδίου <i>neuralized</i> της <i>D. melanogaster</i>	85
II) Πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών	89
III) Πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού στην <i>Drosophila melanogaster</i>	99
Β. Βιοχημικές μελέτες	104
2. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ <i>Neuralized</i> ΣΤΙΣ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΚΑΙ ΣΤΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ <i>Notch</i>	112
Α. Η υπερέκφραση των διαγονιδίων <i>UAS-neur</i> και <i>UAS-Neur1</i> επηρεάζει το σηματοδοτικό μηχανισμό του υποδοχέα <i>Notch</i>	112

	x
B. Η παρουσία της πρωτεΐνης Neur ενισχύει τη σηματοδοτική ικανότητα του δεσμευτή Delta προς τον υποδοχέα Notch	115
Γ. Η πρωτεΐνη Neur επηρεάζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό του δεσμευτή Delta	120
Δ. Μελέτη της λειτουργικής δράσης του δακτύλου RING της πρωτεΐνης Neur : απαραίτητος για την ενδοκύτωση του δεσμευτή Delta αλλά όχι για την ενίσχυση της σηματοδοτικής του ικανότητας	125
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	132-153
1. ΜΙΑ ΝΕΑ ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ NEUZ	133
2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>Neutralized</i> ΣΤΟΝ ΠΟΝΤΙΚΟ : ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ Notch	136
3. ΟΙ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ <i>Neur1</i> ΚΑΙ <i>Neur</i> ΕΧΟΥΝ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ	139
4. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ <i>Neur1</i> ΚΑΙ <i>Neur</i> ΣΤΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ Notch ΣΤΗΝ <i>Drosophila</i>	142
A. Η κατευθυνόμενη έκφραση των μορίων <i>Neur1</i> και <i>Neur</i> επηρεάζει τη σηματοδότηση Notch	142
B. Διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου των πρωτεϊνών <i>Neur1</i> και <i>Neur</i> στη σηματοδοτική ικανότητα του δεσμευτή Delta προς τον υποδοχέα Notch	143
I) Η πρωτεΐνη <i>Neutralized</i> της <i>Drosophila</i> επάγει την ενδοκύτωση του δεσμευτή Delta:	144
II) Η πρωτεΐνη <i>Neutralized</i> της <i>Drosophila</i> ενισχύει τη σηματοδοτική ικανότητα του δεσμευτή Delta	146
III) Διερεύνηση της δράσης της πρωτεΐνης <i>Neutralized</i> του ποντικού στην ενίσχυση της σηματοδοτικής ικανότητας του δεσμευτή Delta και στην επαγωγή της ενδοκύτωσής του	150
5. ΣΥΝΟΨΙΖΟΝΤΑΣ	152
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	154
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	167

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένας βασικός στόχος του Προγράμματος Ανάλυσης του Ανθρώπινου Γονιδιώματος είναι η ταυτοποίηση και λειτουργική ανάλυση νέων γονιδίων. Στη χρωμοσωμική περιοχή 10q23.3-25.1 χαρτογραφούνται πολλά μη ταυτοποιημένα και αρκετά σχετιζόμενα με γενετικές ασθένειες, γονίδια. Ένα από αυτά είναι το *NEURL*, το ανθρώπινο ομόλογο του γονιδίου *neuralized (neur)* της *Drosophila*, που χαρτογραφείται στη θέση 10q25.1, την περιοχή με τις πιο συχνές χρωμοσωμικές ανωμαλίες σε καρκινικά αστροκυτώματα. Το *neur* της *Drosophila* όπως και τα γονίδια *Notch (N)*, *Delta (DI)*, *Enhancer of split [E(spl)]*, *big brain (bib)*, *mastermind (mam)* και *almondex (amx)*, ανήκει στα νευρογόνα γονίδια. Εκφράζεται σε πληθώρα ιστών σε πολλά αναπτυξιακά στάδια και συμμετέχει σε διαδικασίες διακυτταρικής επικοινωνίας, όπου κύριος ρυθμιστής είναι ο διαμεμβρανικός υποδοχέας Notch. Με βάση τα χαρακτηριστικά του δροσοφιλικού *neur*, διατυπώθηκε η υπόθεση ότι το ομόλογο γονίδιο του ανθρώπου, *NEURL*, πιθανόν να εμπλέκεται στις διαδικασίες καθορισμού της κυτταρικής τύχης στο νευρικό σύστημα και ότι η απενεργοποίηση του σχετίζεται με την δημιουργία καρκινικών νευροεκτοδερμικών όγκων. Προκειμένου να διευκολυνθεί η λειτουργική διερεύνηση του *neuralized* στα θηλαστικά, απομονώσαμε και μελετήσαμε το ομόλογο γονίδιο στον ποντικό, *Neurl*. Λόγω της περιορισμένης πληροφορίας που υπήρχε σχετικά με τη λειτουργία της δροσοφιλικής πρωτεΐνης *Neur*, αλλά και για να εκμεταλλευτούμε το πρόσφορο λειτουργικό σύστημα της *Drosophila*, θεωρήσαμε σκόπιμο να μελετήσουμε παράλληλα και τα δύο γονίδια *neur* και *Neurl*, ώστε η διαλεύκανση της λειτουργίας του *neur* να αξιοποιηθεί για τη διερεύνηση της λειτουργίας του γονιδίου των θηλαστικών.

Οι πρωτεΐνες *Neuralized* του ποντικού και της *Drosophila*, έχουν συντηρημένη αρχιτεκτονική δομή καθ' όλο το μήκος των μορίων τους. Τα κύρια κοινά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών αποτελούν δύο επαναλαμβανόμενες περιοχές, *NEUZ1* και *NEUZ2*, άγνωστης λειτουργίας και ο δάκτυλος ψευδαργύρου *RING*, που αποτελεί χαρακτηριστική δομική περιοχή λιγάσης ουβικουϊτίνης *E3*. Πειράματα προσδιορισμού του προτύπου έκφρασης έδειξαν ότι το γονίδιο *Neurl* είναι ενεργό από τα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης του ποντικού, στο νευρικό και στηρικτικό σύστημα, στα αναπτυσσόμενα άκρα και στα επιθήλια των εσωτερικών και αισθητηρίων οργάνων. Παροδική έκφραση

χιμαιρικών πολυπεπτιδίων *Neur* ή *Neurl*, αποτελούμενων από την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) συνδυασμένη με ολόκληρα μόρια ή υποπεριοχές τους, σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών καθώς και πειράματα κατευθυνόμενης υπερέκφρασης στη *Drosophila*, έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες ανιχνεύονται στην κυτταρική μεμβράνη και πιθανότατα σε ενδοκυττωτικά κυστίδια. Από το συνδυασμό βιοχημικών και ανοσο-ιστοχημικών μεθόδων, επίσης, διαπιστώθηκε ότι η σύνδεση των μορίων *Neutralized* στη μεμβράνη του κυττάρου και στα κυστίδια δεν είναι άμεση αλλά οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις με διαμεμβρανικές πρωτεΐνες ή άλλους παράγοντες της κυτταροπλασματικής περιφέρειας. Για την σωστή υποκυτταρική τοποθέτηση των πρωτεϊνών *Neurl* ή *Neur*, είναι ικανό και αναγκαίο ένα τμήμα της πρωτεΐνης που εκτείνεται από το αμινοτελικό άκρο μέχρι την περιοχή *NEUZ1*.

Η λειτουργική συγγένεια των πρωτεϊνών διαπιστώθηκε με επιπρόσθετα πειράματα στο σύστημα-μοντέλο της *Drosophila*. Κατευθυνόμενη υπερέκφραση του διαγονιδίου *neur* ή *Neurl* είχε παρόμοια φαινοτυπικά αποτελέσματα σε ενήλικα άτομα. Παρατηρήθηκε διακοπή του ορίου του φτερού και πάχυνση των φλεβών, φαινότυποι που χαρακτηρίζουν την απώλεια λειτουργίας του σηματοδοτικού μηχανισμού *Notch*. Επίσης παρατηρήθηκε καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *E(spl)m8*, ενός μεταγραφικού στόχου του *Notch*. Όπως ήταν αναμενόμενο λόγω της εξελικτικής απόστασης, η επίδραση του θηλαστικού πολυπεπτιδίου στο μονοπάτι *Notch* ήταν μικρότερης έντασης. Αναλυτικότερη λειτουργική μελέτη της πρωτεΐνης της *Drosophila* έδειξε ότι παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην ενίσχυση της ικανότητας του δεσμευτή *Delta* (*DI*) να ενεργοποιεί τον υποδοχέα *Notch* (*N*) όσο και στην μετέπειτα ενδοκύττωση, *in cis*, και αποικοδόμησή του πρώτου. Επιπλέον, δείχθηκε ότι το *DI* συμπαρασύρει σε ενδοκύττωση και την εξωκυττάρια περιοχή του *Notch* (*N_{EC}*). Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι ο δάκτυλος *RING* είναι υπεύθυνος για την ενδοκυτταρική μεταφορά του συμπλέγματος *DI-N_{EC}*. Αντίθετα, αυτή η περιοχή δεν συμμετέχει στην ενίσχυση της επαγωγικής ικανότητας του δεσμευτή *Delta*. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη *Neutralized* παίζει σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες διαφοροποίησης λειτουργικά ισοδύναμων κυττάρων και στην υιοθέτηση της διαφορετικής αναπτυξιακής τους πορείας.

ABSTRACT

A major task of the Human Genome Project is the detailed structural and functional analysis of novel genes. Within the chromosomal region 10q23.3-25.1 several, yet unidentified, disease-related gene loci have been localized. One of them is *NEURL*, the human homologue of *Drosophila neuralized (neur)* gene. *NEURL* has been mapped within 10q25.1, a region most frequently deleted in malignant astrocytomas. *Drosophila neuralized* belongs to the neurogenic genes also including *Notch (N)*, *Delta (DI)*, *Enhancer of split [E(spl)]*, *big brain (bib)*, *mastermind (mam)* and *almondex (amx)*. It is expressed in various tissues during development and participates in Notch receptor-dependent intracellular communication. Because of its significant sequence similarity with the *Drosophila* protein, and its defects determined in astrocytoma cell lines, it has been hypothesized that *NEURL* may be involved in cell fate determination of the mammalian nervous system, and that its inactivation is associated with the progression of malignant neuroectodermal tumors. In order to contribute to the elucidation of the functional role of *neuralized* in mammals, we isolated and analyzed the structure and the expression of the mouse ortholog, *Neurl*. Furthermore, we decided to analyze in parallel, both the insect and the mouse molecules using the well-studied *Drosophila* experimental model system. This approach would offer us the opportunity to obtain particularly useful information regarding the biological role of the insect polypeptide and at the same time, extrapolate this information to the mammalian homolog.

Mammalian and insect *neuralized* proteins share extensive structural similarities through-out the entire molecule. The most recognizable similarities are two neuralized-specific sequence repeats, NEUZ1 and 2, of unknown function and a carboxy-terminal RING Zinc finger, characterizing proteins with E3 ubiquitin ligase activity. Expression profile determination in embryo and adult mouse tissues, suggested that *Neurl* is active from the earliest embryonal developmental stages in neural and skeletal system, in the developing limbs and in epithelial cell layers of sense and internal organs. Transient expression in mammalian cell lines of GFP-tagged neuralized polypeptides (using either full length or truncated molecules) as well as targeted over-expression of either *Neur* or *Neurl* in *Drosophila* tissues, showed that both proteins are localized in the cytoplasmic

side of the plasma membrane and possibly, in endocytotic vesicles. Biochemical experiments and immunofluorescence microscopy observations suggested that the association of neuralized protein with the membrane is possibly due to interactions with transmembrane proteins or with other molecules of the cytoplasmic periphery. Furthermore, it was shown that the amino-terminal part of the neuralized protein extended up to the first NEUZ domain, is necessary and sufficient for its subcellular localization.

The functional similarities of the insect and the mammalian Neuralized were further corroborated with extensive functional experimentation in the *Drosophila* model system. Targeted over-expression of a *neur* or *Neur1* transgenes in *Drosophila* embryos resulted in similar phenotypic consequences, i.e.: loss of Notch function in adults as manifested by cut wings and vein thickening. Down-regulation of *E(spl)m8*, a transcription target gene of the Notch signaling pathway, at the wing margin was also observed. Possibly due to the evolutionary distance between the two homologs, the phenotypic effects of the mammalian transgene were weaker than those observed with the *Drosophila neur*. Detailed functional analysis of the *Drosophila* gene was undertaken in order to elucidate the exact function of Neuralized protein in Notch signaling and to get as much information as possible concerning the role of the murine polypeptide. Thus, it was shown that Neur plays a significant role in enhancing the ability of Delta ligand to activate Notch receptor, as well as in subsequent endocytosis, *in cis*, and posttranslational degradation of the former. Moreover, Delta endocytosis is followed by Notch extracellular region co-internalization. Furthermore, the Neur RING domain is required for DI internalization but is dispensable for DI signaling activity. The potent modulatory effect of Neur on DI activity makes Neur a good candidate for establishing signaling asymmetries and thus, different developmental fates within cellular equivalence groups.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *neuralized* ΚΑΙ ΤΑ ΝΕΥΡΟΓΟΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ

Ένας από τους βασικούς στόχους του Προγράμματος Ανάλυσης του Ανθρώπινου Γονιδιώματος είναι η δομική και λειτουργική ανάλυση νέων γονιδίων. Στη χρωμοσωμική περιοχή 10q23.3-25.1 χαρτογραφούνται πολλοί μη ταυτοποιημένοι και σχετιζόμενοι με ασθένειες γενετικοί τόποι. Στη θέση 10q25.1, στην οποία ανιχνεύονται οι πιο συχνές ανωμαλίες που παρατηρούνται σε καρκινικά αστροκυτώματα (Nakamura et al., 1998), έχει χαρτογραφηθεί και ταυτοποιηθεί το γονίδιο *Neur1* που είναι το ομόλογο του γονιδίου *neuralized (neur)* της *Drosophila*. Το *neur* ανήκει στην κατηγορία των νευρογόνων γονιδίων και συμμετέχει σε διαδικασίες διακυτταρικής επικοινωνίας όπου κύριος ρυθμιστής είναι ο διαμεμβρανικός υποδοχέας Notch. Με βάση το ρόλο του γονιδίου *neuralized* στην *Drosophila* και των παρατηρήσεων ελάττωσης των μεταγραφικών επιπέδων του θηλαστικού ομολόγου σε καρκινικά αστροκυτώματα (Nakamura et al., 1998) είναι δυνατόν να υποτεθεί η συμμετοχή του τελευταίου στις διαδικασίες της νευρογένεσης και η συσχέτισή του με τη δημιουργία καρκινωμάτων νευροεκτοδερμικής προέλευσης. Χρησιμοποιώντας το πειραματικό σύστημα της *Drosophila* είναι δυνατό να αντλήσουμε χρήσιμες πληροφορίες για το λειτουργικό ρόλο του γονιδίου *Neuralized* των θηλαστικών.

Στην *Drosophila*, στην ίδια κατηγορία με το *neur* ανήκουν και τα γονίδια *Notch (N)*, *Delta (Dl)*, *Enhancer of split [E(spl)]*, *big brain (bib)*, *mastermind (mam)* και *almondex (amx)* (Lehmann et al., 1983, Campos-Ortega, 1988), τα οποία ταυτοποιήθηκαν σαν νευρογόνες μεταλλάξεις, οι οποίες προκαλούν υπερπλασία του εμβρυϊκού νευρικού

συστήματος και απουσία επιδερμίδας (Lehmann et al., 1983, Campos-Ortega, 1988, Campos-Ortega and Jan, 1991). Τα γονίδια αυτά, εκτός από τη συμμετοχή τους στους μηχανισμούς της εμβρυϊκής νευρογένεσης παίζουν σημαντικό ρόλο και στον καθορισμό της ανάπτυξης του νευρικού συστήματος κατά τα προνυμφικά στάδια της *Drosophila* καθώς επίσης και σε πλειάδα άλλων αναπτυξιακών διαδικασιών.

2. Η ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΝΕΥΡΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΗΝ *Drosophila*

Η ανάπτυξη του νευρικού συστήματος κατά την εμβρυογένεση της *Drosophila* ξεκινά στην κοιλιακή νευρογόνο περιοχή του εμβρύου, όπου μόνο το 25% των εκτοδερμικών κυττάρων θα διατηρήσει τελικά το νευρογόνο δυναμικό του (νευροβλάστες) ενώ το υπόλοιπο 75% θα εξελιχθεί σε επιδερμικό ιστό (Hartenstein and Campos-Ortega., 1984). Αυτός ο καθορισμός της κυτταρικής τύχης πραγματοποιείται με μηχανισμούς πλευρικής αναστολής (lateral inhibition). Συγκεκριμένα, τα εκτοδερμικά κύτταρα που θα διατηρήσουν το νευρικό τους δυναμικό και θα εξελιχθούν σε νευροβλάστες παρεμποδίζουν τα γειτονικά κύτταρα να ακολουθήσουν την ίδια αναπτυξιακή πορεία, τα οποία τελικά διαφοροποιούνται σε αρχέγονα επιδερμικά κύτταρα (επιδερμοβλάστες) που θα οδηγήσουν στο σχηματισμό της επιδερμίδας (Doe and Goodman, 1985, Campos-Ortega, 1988). Παρόμοιοι μηχανισμοί δρουν και κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος στα προνυμφικά στάδια της *Drosophila* και συγκεκριμένα στις αναπτυξιακές διαδικασίες σχηματισμού των αισθητηρίων οργάνων (SO : sensory organs) του ενήλικου ατόμου (Hartenstein and Posakony, 1989, Huang et al., 1991, Posakony, 1994).

Τα νευρογόνα γονίδια αποτελούν βασικά συστατικά της διαδικασίας της πλευρικής αναστολής. Συγκεκριμένα, το κύτταρο που θα διατηρήσει το νευρογόνο δυναμικό του θα αναστείλει τα γειτονικά του μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών Delta και Notch. Η πρωτεΐνη Delta (δεσμευτής) δρα ως πομπός του σήματος αναστολής ενώ η πρωτεΐνη Notch αποτελεί τον υποδοχέα-δέκτη. Αυτή η αλληλεπίδραση έχει σαν αποτέλεσμα μία σειρά γεγονότων που οδηγούν στην πρωτεολυτική απελευθέρωση της ενδοκυττάριας περιοχής του υποδοχέα (Lecourtois and Schweisguth, 1998, Rebay et al., 1991, Schoeter et al., 1998, Struhl and Adachi, 1998). Το πολύ-πεπτιδίο αυτό μεταφέρεται στον πυρήνα και δρα συνεργατικά με τον μεταγραφικό παράγοντα Suppressor of Hairless [Su(H)] (Jarriault et al., 1995, Hsieh et al., 1996) για την ενεργοποίηση των κατάλληλων γονιδίων-στόχων, όπως τα νευρογόνα γονίδια του συμπλέγματος *E(spl)* (Bailey and Posakony, 1995, Furukawa et al., 1995, Lecourtois and Schweisguth, 1995, Nellesen et al., 1999, Lai et al., 2000) που κωδικοποιούν μεταγραφι-

κούς καταστολείς γονιδίων που ευνοούν το νευρικό καθορισμό (Jimenez and Ish-Horowicz, 1997).

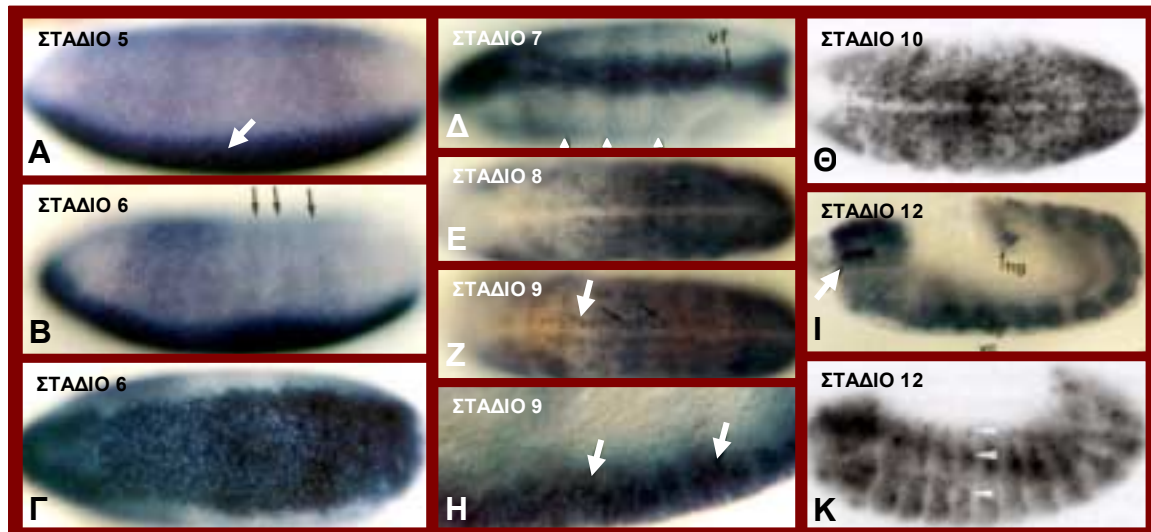
3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *neuralized* ΣΤΗ *Drosophila* ΚΑΙ ΤΗ ΝΕΥΡΟΓΕΝΕΣΗ

Το γονίδιο *neuralized*, όπως άλλωστε και όλα τα νευρογόνα γονίδια, συμμετέχει στο μονοπάτι Notch. Απώλεια λειτουργίας του *neur* προκαλεί τον ίδιο νευρογόνο φαινότυπο (υπερπλασία του νευρικού συστήματος των εμβρύων και θνησιμότητα) που παρατηρείται όταν κατασταλεί η λειτουργία του υποδοχέα Notch (Lehmann et al., 1983). Επίσης, από πειράματα γενετικών αλληλεπιδράσεων φάνηκε ότι το *neuralized* δρα πριν τη σηματοδότηση του υποδοχέα αφού οι φαινότυποι που προκαλούνται από την απώλεια της λειτουργίας του διασώζονται μερικώς όταν αυξηθεί η έκφραση του *Notch* ή των γονιδίων-στόχων *E(spl)* (de la Concha et al., 1988).

Παράλληλα με τα γενετικά δεδομένα, πειράματα υβριδοποίησης *in situ* έδειξαν ότι το *neur* εκφράζεται ευρέως από τα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης και τελικά περιορίζεται στους νευροβλάστες κατά τις αναπτυξιακές διαδικασίες καθορισμού της νευρικής κυτταρικής τύχης (Boulianne et al. 1991, Price et al., 1993) (Εικ.1). Αναλυτικά, μετάγραφα ανιχνεύονται σε όλο το έμβρυο στο στάδιο του συγκυτιακού βλαστοδέρματος ενώ μετά την κυτταροποίηση εντοπίζονται κυρίως σε μία ζώνη πλάτους 18-20 κυττάρων στην κοιλιακή περιοχή του εμβρύου, που αντιστοιχεί στο μεσόδερμα. Στο στάδιο 6 όλα τα κύτταρα του μεσοδέρματος εγκοιλώνονται, ενώ τα ανιχνευόμενα στο εκτόδερμα μετάγραφα *neur* οργανώνονται σε ραχιαιοκοιλιακές ζώνες (Εικ.1B,Δ). Κατά την έναρξη της επιμήκυνσης της ζώνης του κορμού η έκφραση του γονιδίου είναι ομοιόμορφη στην κοιλιακή περιοχή του εκτοδέρματος (στο νευροεκτόδερμα) (Εικ.1E) και στη συνέχεια γίνεται σπικτή, περιοριζόμενη στους νευροβλάστες (Εικ.1Z-Θ). Πλευρικά παρατηρούνται μετάγραφα στους νευρικούς και επιδερμικούς προγόνους του περιφερικού νευρικού συστήματος. Στα στάδια 11 και 12 (Εικ.1I,Κ) ανιχνεύεται υψηλή έκφραση του γονιδίου στην κοιλιακή χορδή, στους διαχωρισμένους νευροβλάστες και σε άλλες αρχέγονες νευρογόνες περιοχές όπως οι τρεις εγκοιλώσεις του εντέρου που θα δώσουν αργότερα το στοματογαστρικό νευρικό σύστημα. Από το στάδιο 12 και μετά παρατηρείται βαθμιαία ελάττωση των επιπέδων του *neur* από την επιδερμίδα και τους νευροβλάστες (Boulianne et al. 1991, Price et al., 1993).

Έκφραση του γονιδίου ανιχνεύεται και κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος του ενήλικου ατόμου. Συγκεκριμένα, στους προνυμφικούς δίσκους του φτερού ανιχνεύονται μετάγραφα στα πρόδρομα κύτταρα των εξωτερικών αισθητηρίων

οργάνων (στις μακροχαίτες του θώρακα και τα αισθητήρια όργανα του φτερού). Υψηλά επίπεδα παρατηρούνται και στις κυτταρικές ομάδες των δίσκων του ποδιού που θα δώσουν τα χορδοτονικά αισθητήρια όργανα καθώς και στους δίσκους της κεραίας, στην περιοχή δημιουργίας του οργάνου Johnston. Τέλος εντοπίζεται ισχυρή έκφραση πίσω από τη μορφογενετική αύλακα του προνυμφικού δίσκου του ματιού, όπου καθορίζονται οι φωτουποδοχείς (Boulianne et al., 1991). Επίσης, μετάγραφα ανιχνεύονται στους νευροβλάστες του ενήλικου ΚΝΣ.



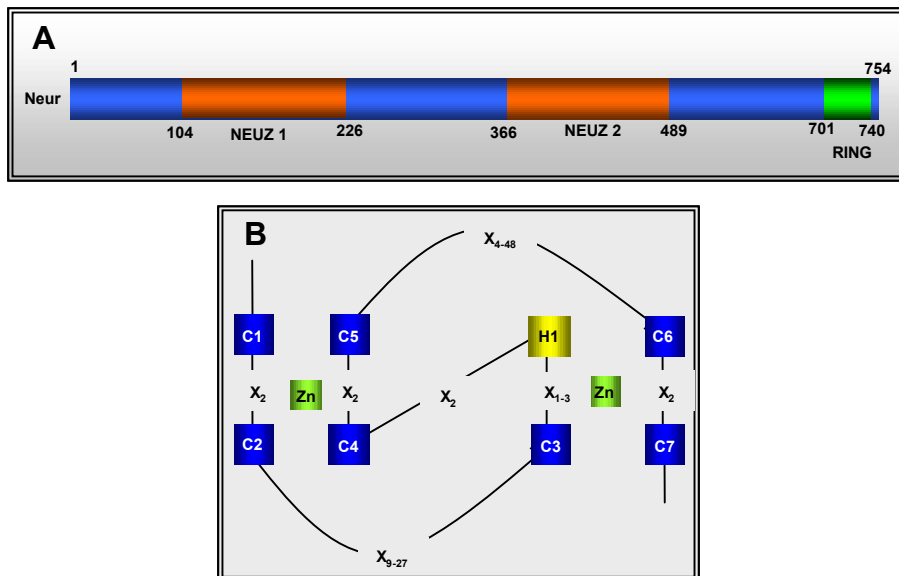
Εικόνα 1. Το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *neuralized* κατά την εμβρυογένεση της *Drosophila*. Μετάγραφα του γονιδίου ανιχνεύονται πριν από το στάδιο του συγκυτιακού βλαστοδέρματος. Μετά την κυτταροποίηση παρατηρείται έκφραση κατά μήκος της κοιλιακής επιφάνειας (στάδιο 5, Α-βέλος). Στα στάδια 6 και 7 (ΒΓ και Δ, αντίστοιχα) όλα τα κύτταρα που εκφράζουν *neur* εγκοιλπώνονται ενώ στη ραχιαία πλευρά του εμβρύου η έκφραση παρατηρείται σε ζώνες κατά μήκος του ραχαιοκοιλιακού άξονα (Β, Δ-βέλη). Στο στάδιο 8 (Ε) η έκφραση είναι διάχυτη και στη συνέχεια γίνεται σπικτή (στάδια 9 και 10-Ζ, Η και Θ, αντίστοιχα), εντοπισμένη στους νευροβλάστες (Ζ, Η-βέλη). Από το στάδιο 12 (Ι, Κ) τα μετάγραφα του γονιδίου είναι άφθονα στην κοιλιακή χορδή (vc, Ι), στις εγκοιλπώσεις του εντέρου (hg: hind gut, Ι) και συγκεκριμένα στις αρχέγονες περιοχές από όπου θα αναπτυχθεί το στοματογαστρικό νευρικό σύστημα, σε ένα τμήμα του εγκεφάλου (Ι-άσπρο βέλος), στους μύες και στο ραχιαίο εκτόδερμα (περιφερικό νευρικό σύστημα, Κ-βέλη).

Το χρωχρονικό πρότυπο έκφρασης του *neur* υποδηλώνει ότι ενδεχομένως να συμμετέχει όχι μόνο στον καθορισμό αλλά και στη διατήρηση της αναπτυξιακής τύχης των νευροβλαστών και των απογόνων τους. Επιπρόσθετα, όπως και άλλα νευρογόνα γονίδια, το *neuralized* συμμετέχει και στον καθορισμό της αναπτυξιακής τύχης των μεσοδερμικών κυττάρων (Bate et al., 1993) επειδή μεταλλαγμένα στελέχη *Drosophila* παρουσιάζουν εκτός από νευρική υπερτροφία και μυϊκή δυσπλασία (Corbin et al., 1991).

4. Η ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗ ΤΩΝ ΟΡΘΟΛΟΓΩΝ ΜΟΡΙΩΝ *Neuralized*

Εκτός από το γονίδιο *neur* της *Drosophila* και του ανθρώπου έχει ταυτοποιηθεί και το αντίστοιχο ορθόλογο γονίδιο στον *C. elegans*. Και τα τρία ορθόλογα πολυπεπτίδια

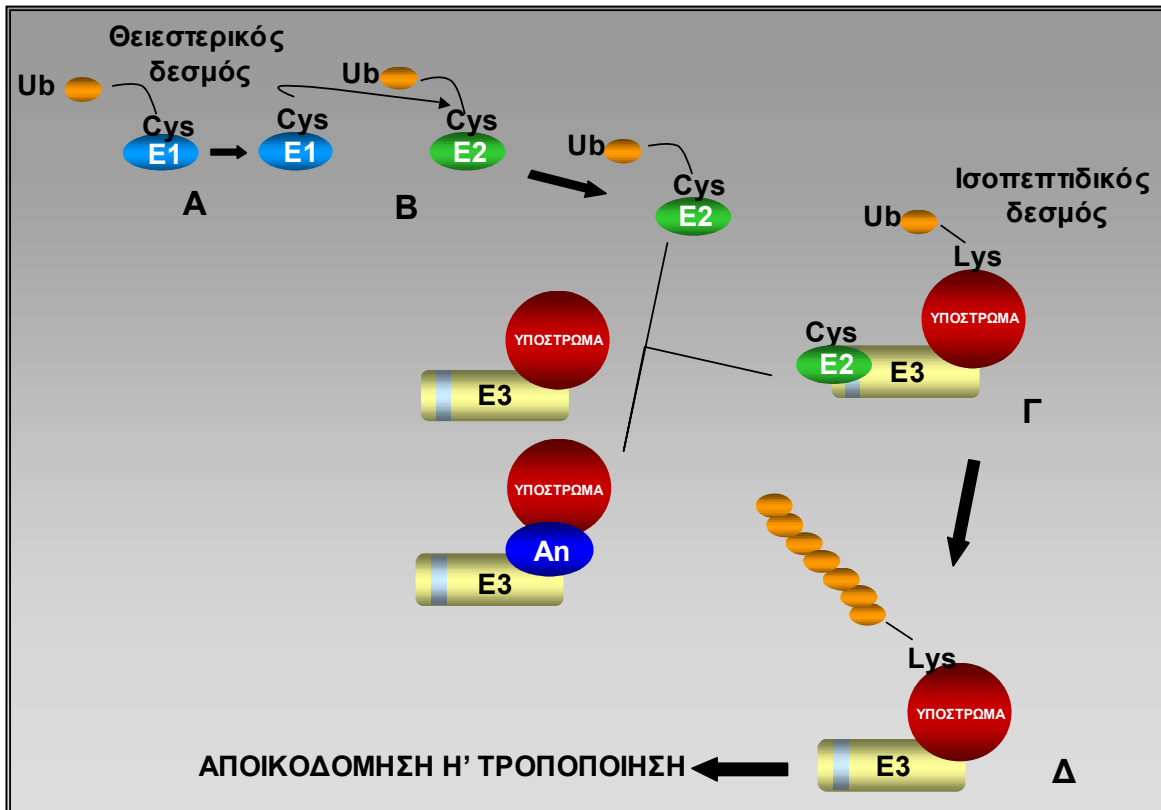
παρουσιάζουν την ίδια δομική οργάνωση. Διαθέτουν δύο εσωτερικές επαναλήψεις, χαρακτηριστικές της πρωτεΐνης Neuralized (Nakamura et al., 1998), που πρόσφατα ονομάστηκαν περιοχές NEUZ (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), ενώ στο καρβοξυτελικό τους άκρο διαθέτουν έναν δάκτυλο ψευδαργύρου τύπου C_3HC_4 RING (Really Interesting New Gene, Saurin et al., 1996) (Εικ.2Α). Και τα τρία πολυπεπτίδια παρουσιάζουν την υψηλότερη ομολογία σε αυτές τις περιοχές. Ο δάκτυλος RING (Εικ.2Β) είναι χαρακτηριστικός πολλών ρυθμιστικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε βασικές βιολο-



Εικόνα 2. A : Σχηματική αναπαράσταση της δομής της πρωτεΐνης Neur της *Drosophila*. Η πρωτεΐνη χαρακτηρίζεται από δύο ειδικές εσωτερικές επαναλήψεις (NEUZ1 και NEUZ2) και έναν δάκτυλο ψευδαργύρου τύπου C_3HC_4 RING **B :** Σχηματική αναπαράσταση της δομής του δακτύλου ψευδαργύρου τύπου C_3HC_4 RING. X : οποιοδήποτε αμινοξικό κατάλοιπο, C: κυστεΐνη, H : ιστιδίνη, Zn : ιόν ψευδαργύρου.

γικές διαδικασίες, όπως η ανάπτυξη και η ογκογένεση (Miki et al., 1994, Bardos et al., 2000), παίζοντας ρόλο σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν τη συμμετοχή του RING στη διαδικασία ουβικουτιλίωσης πολυπεπτιδίων όπου φαίνεται να αλληλεπιδρά με συζευκτικά ένζυμα ουβικουιίνης E2. Οι πρωτεΐνες που περιέχουν δάκτυλο RING αποτελούν λιγάσες ουβικουιίνης E3 (Lorick et al., 1999, Borden, 2000, Jackson et al., 2000, Freemont, 2000). Αναλυτικότερα, οι λιγάσες E3 αλληλεπιδρούν με διάφορα υποστρώματα, επιλέγοντας με αυτόν τον τρόπο ποιες πρωτεΐνες θα ουβικουιτιλιωθούν. Συγχρόνως αλληλεπιδρούν και με τα συζευκτικά ένζυμα E2, τα οποία είναι συνδεδεμένα με ένα μόριο ουβικουιίνης και καταλύουν τη μεταφορά της τελευταίας από την πρωτεΐνη E2 στο υπόστρωμα (Εικ. 3) (Ciechanover et al., 2000). Να σημειωθεί ότι οι λιγάσες E3 δρουν είτε μόνες τους είτε αποτελούν συστατικά ενός υπερμοριακού συμπλέγματος, το οποίο συνολικά λειτουργεί ως λιγάση ουβικουιίνης E3. Επιπρόσθετα, η αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα μπορεί να πραγματοποιείται απευθείας ή μέσω βοηθητικών πρωτεϊνών (Ancillary proteins) (Ciechanover et al., 2000).

Με βάση, λοιπόν, τα δεδομένα συμμετοχής του *neur* στη νευρογένεση της *Drosophila* και στο σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα Notch καθώς και την αποδεδειγμένη εξελικτική συντήρηση του τελευταίου (Artavanis-Tsakonas et al., 1995, Weinmaster, 1997, Greenwald, 1998), είναι δυνατόν το ορθόλογο γονίδιο στον άνθρωπο να είναι λειτουργικά συγγενές. Ενδεχομένως το *NEURL* συμμετέχει στους μηχανισμούς καθορισμού της κυτταρικής τύχης κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος με αποτέλεσμα η απενεργοποίησή του να οδηγεί στη δημιουργία καρκινικών όγκων νευροεκτοδερμικής προέλευσης (Nakamura et al., 1998).



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας ουβικουιτινίωσης πολυπεπτιδίων.

Στη διαδικασία αυτή συμμετέχουν τρεις κατηγορίες ενζύμων : Το ένζυμο ενεργοποίησης της ουβικουιτίνης (E1), τα συζευκτικά ένζυμα (E2) και οι λιγάσες ουβικουιτίνης (E3). **A** : η πρωτεΐνη E1 αλληλεπιδρά με την ουβικουιτίνη (Ub) και την ενεργοποιεί. Αυτό επιτυγχάνεται με τη δημιουργία ενός θειοστερικού δεσμού υψηλής ενέργειας ανάμεσα σε ένα κατάλοιπο κυστεΐνης (Cys) της E1 και ενός COOH-τελικού καταλοίπου γλυκίνης (Gly) της ουβικουιτίνης. **B** : η ενεργοποιημένη ουβικουιτίνη συνδέεται ακολούθως με τις πρωτεΐνες E2, κατά παρόμοιο τρόπο, προκειμένου να μεταφερθεί στη συνέχεια στο υπόστρωμα-στόχο. **Γ**. Οι λιγάσες E3 αλληλεπιδρούν τόσο με το υπόστρωμα, απευθείας ή μέσω βοηθητικών πρωτεϊνών (An), όσο και με τις E2-Ub και καταλύουν τη μεταφορά της ουβικουιτίνης στο πρώτο. **Δ** : ύστερα από πολλές επαναλήψεις της διαδικασίας το υπόστρωμα είναι συνδεδεμένο με μία αλυσίδα μορίων Ub, η οποία αναγνωρίζεται από τα συστατικά του πρωτεασώματος 26S με αποτέλεσμα την τελική αποικοδόμηση ή τροποποίηση του υποστρώματος και την απελευθέρωση των μορίων Ub στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον προκειμένου να ξαναχρησιμοποιηθούν.

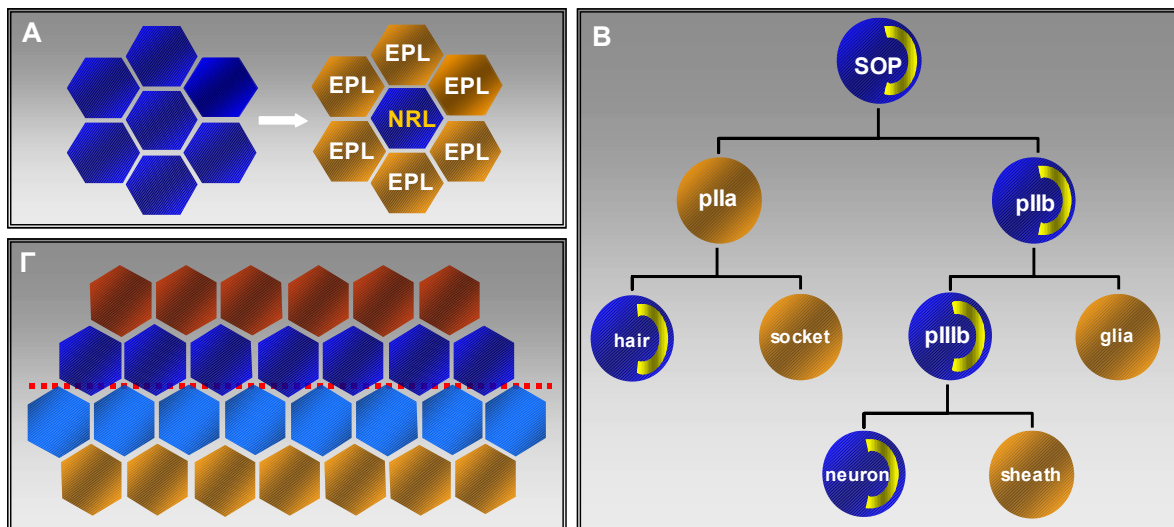
Σημείωση : στη συγκεκριμένη σχηματική αναπαράσταση η πρωτεΐνη E3 περιέχει μία περιοχή RING (γκρι). Η περιοχή RING αλληλεπιδρά με το ένζυμο E2.

5. Η ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ Notch ΣΤΗΝ *Drosophila* ΚΑΙ ΑΛΛΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

Ο συνεχώς αυξανόμενος αριθμός αναπτυξιακών διαδικασιών στην *Drosophila* στις οποίες φαίνεται να απαιτείται το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch οδηγεί στη διαπίστωση ότι δεν υπάρχει κάποιος ιστός που να μην εξαρτάται σε κάποιο στάδιο της ανάπτυξής του από το συγκεκριμένο μηχανισμό. Οι διαδικασίες στις οποίες συμμετέχει αυτή η σηματοδότηση εμπίπτουν σε τρεις κατηγορίες : α) τον καθορισμό της διαφορετικής αναπτυξιακής πορείας μεταξύ ισοδύναμων κυττάρων (πλευρική αναστολή), β) τις αποφάσεις γενεαλογίας και γ) τον καθορισμό και τη διατήρηση συνόρων ανάμεσα σε κυτταρικές ομάδες (Εικ.4) (Bray, 1998).

α. Καθορισμός διαφορετικής αναπτυξιακής τύχης ισοδύναμων κυττάρων : πρόκειται για πλευρικές αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα σε έναν πληθυσμό αναπτυξιακά ισοδύναμων κυττάρων και οδηγούν στη δημιουργία διαφορετικών κυτταρικών τύπων. Αποτελούν συνεπώς μία διαδικασία ανταγωνισμού για την απόκτηση μίας συγκεκριμένης τύχης, με ένα κύτταρο (κύτταρο πομπός) να υιοθετεί ένα συγκεκριμένο δυναμικό παρεμποδίζοντας ταυτόχρονα τα γειτονικά του (κύτταρα-δέκτες) να ακολουθήσουν την ίδια αναπτυξιακή πορεία (Greenwald,1998). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ανάπτυξη του νευρικού συστήματος κατά την εμβρυογένεση της *Drosophila* και η επιλογή του πρόδρομου κυττάρου των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων (SOP : sensory organ precursor) τόσο στο έμβρυο όσο και στην προνύμφη (Εικ.4Α). Η διαφοροποίηση ενός SOP λαμβάνει χώρα σε μία ομάδα κυττάρων με το ίδιο νευρογόνο δυναμικό που αποκαλείται προνευρικός συναθροισμός (proneural cluster) (Simpson, 1990). Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ένα μόνο κύτταρο διατηρεί το νευρικό δυναμικό και παρεμποδίζει τα γειτονικά του να αποκτήσουν την ίδια αναπτυξιακή τύχη, κατευθύνοντας με αυτόν τον τρόπο τη διαφοροποίησή τους σε επιδερμοβλάστες (Ghyssen et al., 1993). Αρχικά όλα τα κύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα Notch και το δεσμευτή Delta και έχουν ισοδύναμη ικανότητα να σηματοδοτούν το ένα το άλλο. Σύμφωνα με το επικρατέστερο μοντέλο, σε κάποια χρονική στιγμή μία μικρή διαφορά μεταξύ των κυττάρων ενισχύεται και γίνεται μόνιμη μέσω μηχανισμών ανάδρασης (Greenwald, 1998). Συγκεκριμένα, αν ο υποδοχέας ενεργοποιηθεί περισσότερο σε ένα κύτταρο τότε τα ενδογενή επίπεδα του δεσμευτή του ελαττώνονται με συνέπεια να μην είναι πλέον αποτελεσματικό στην εκπομπή σήματος αλλά καλύτερο στη λήψη. Αντίστοιχα, αν ένα κύτταρο έχει υψηλά επίπεδα Delta κάπως παρεμποδίζει τη λήψη σήματος και γίνεται καλύτερος πομπός παρά δέκτης. Το τελευταίο είναι ο SOP, ενώ όλα τα υπόλοιπα κύτταρα του προνευρικού συναθροισμού καταστέλλονται μέσω της σηματοδότησης Notch (Kopan and Turner, 1996). Πραγματικά, κάθε προνευρικός συναθροισμός περιέχει ένα κύτταρο που εκφράζει *neur*, το μελλοντικό SOP, ενώ όλα τα υπόλοιπα εκφράζουν *E(spl)*,

που όπως προαναφέρθηκε είναι απευθείας μεταγραφικοί στόχοι του Notch. Μολονότι η μη-αλληλεπικαλυπτόμενη έκφραση των *neur* και *E(spl)* φανερώνει ποιο κύτταρο εκπέμπει και ποια κύτταρα δέχονται το σήμα Notch εντούτοις δεν ανιχνεύονται ποσοτικές διαφορές στα επίπεδα των πρωτεϊνών N και DI ανάμεσα στα κύτταρα του προνευρικού συναθροισμού. Αυτό έρχεται σε αντίφαση με τον προτεινόμενο μηχανισμό ανάδρασης, όπου τα επίπεδα N και DI επηρεάζουν την ικανότητα κάποιου κυττάρου να στέλνει ή να λαμβάνει σήμα. Τα αποτελέσματά μας προτείνουν κάποια λύση σε αυτό το παράδοξο (βλ. συζήτηση).



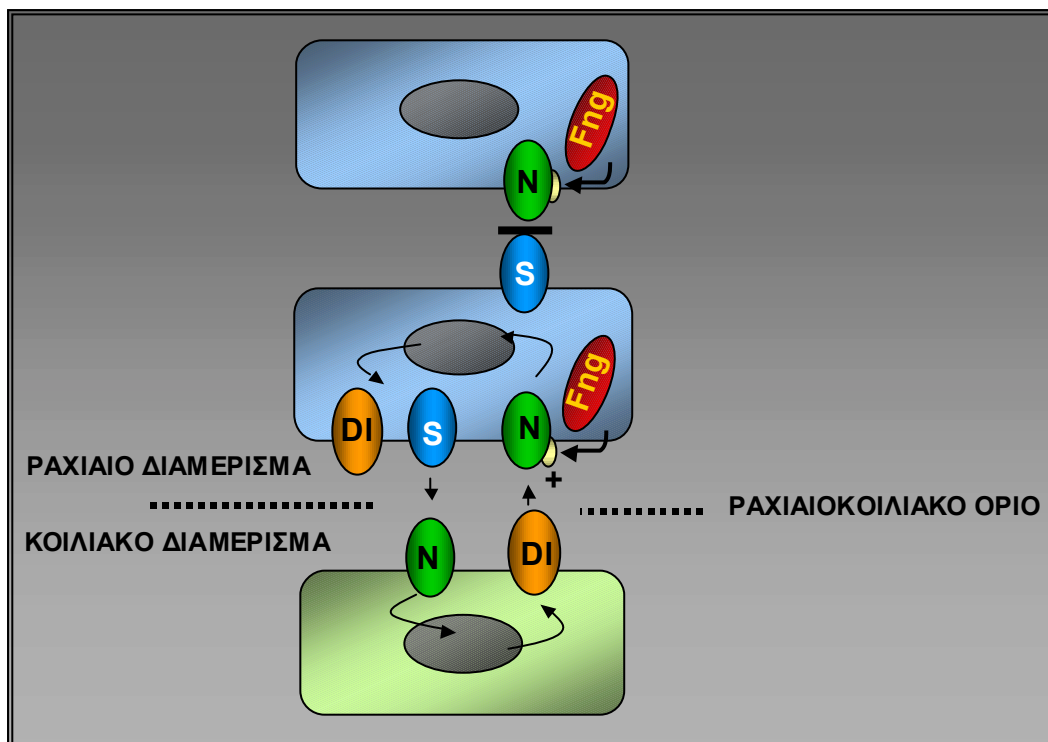
Εικόνα 4. Οι αναπτυξιακές διαδικασίες στις οποίες συμμετέχει η σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα Notch. **A** : Καθορισμός διαφορετικής αναπτυξιακής τύχης μεταξύ ισοδύναμων κυττάρων (πλευρική αναστολή). Κύτταρα μπλε χρώματος : κύτταρα που έχουν το ίδιο αρχικό δυναμικό (ισοδύναμα) και εκφράζουν τόσο το δεσμευτή όσο και τον υποδοχέα. EPL : επιδερμοβλάστες (epidermoblasts)-δέκτες σήματος. NRL : νευροβλάστης (neuroblast)-πομπός σήματος. **B** : Αποφάσεις γενεαλογίας. SOPs (sensory organ precursors) : αρχέγονα κύτταρα των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων. pIIa και pIIb : θυγατρικά κύτταρα (δευτερεύοντα SOPs) που προέρχονται από ασύμμετρη διαίρεση του αρχικού SOP. Το κύτταρο pIIa θα διαιρεθεί επίσης ασύμμετρα και θα δώσει τα κύτταρα της θήκης και του στελέχους (shaft – socket, αντίστοιχα) ενώ το κύτταρο pIIb θα διαιρεθεί, κατά αντίστοιχο τρόπο, σε ένα κύτταρο γλοίας (glia) και σε ένα θυγατρικό, που ονομάζεται pIIIb από το οποίο θα προέλθουν ανάλογα το νευρικό κύτταρο (neuron) και το περίβλημα (sheath). Η απόκτηση διαφορετικής αναπτυξιακής τύχης από τα θυγατρικά κύτταρα πραγματοποιείται μέσω σηματοδότησης Notch. Και τα δύο θυγατρικά κύτταρα που προέρχονται από μία διαίρεση μπορούν να σηματοδοτήσουν το Notch του γειτονικού τους κυττάρου. Εντούτοις, το μονοπάτι μπορεί να ενεργοποιηθεί στο ένα από αυτά (καφέ). Αυτό οφείλεται στην παρουσία της πρωτεΐνης Numb (κίτρινο ημικύκλιο), η οποία κληρονομείται στον ένα απόγονο και δρα κατασταλτικά στην ενεργοποίηση του υποδοχέα αυτού του κυττάρου. **Γ** : Καθορισμός και διατήρηση συνόρων ανάμεσα σε κυτταρικές ομάδες. Το μονοπάτι Notch ενεργοποιείται αμφίπλευρα στη μεσογραμμή (διακεκομμένη γραμμή) των δύο κυτταρικών ομάδων (μπλε). Η σηματοδότηση έχει σαν αποτέλεσμα τα κύτταρα στο σύνορο (μπλε) να αποκτήσουν τα χαρακτηριστικά ενός οργανωτικού κέντρου που είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων και τον επακόλουθο συντονισμό και διατήρηση του διαφορετικού αναπτυξιακού προτύπου ανάμεσα στα δύο διαμερίσματα.

β. Αποφάσεις γενεαλογίας (lineage decisions) : λαμβάνουν χώρα κατά τις διαιρέσεις και τις μετέπειτα διαφοροποιήσεις προγονικών κυττάρων, όπως π.χ. των μυϊκών και νευρικών. Η υιοθέτηση διαφορετικής αναπτυξιακής πορείας από τα θυγατρικά κύτταρα πραγματοποιείται με σηματοδότηση του Notch, η οποία λαμβάνει χώρα σε ένα μόνο από τα δύο κύτταρα (Guo et al., 1996, Spana and Doe, 1996, Ruiz-Gomez and

Bate, 1997, Park et al., 1998). Για παράδειγμα, τα εξωτερικά αισθητήρια όργανα των σμηρίγγων, τα οποία είναι και τα πιο καλά μελετημένα, αποτελούνται από πέντε κυτταρικούς τύπους: τη θήκη (socket), το στέλεχος (shaft), το γλοιακό κύτταρο, το περίβλημα (sheath) και το νευρώνα (Jan and Jan, 1993). Αυτοί οι κυτταρικοί τύποι είναι μιτωτικοί απόγονοι ενός αρχέγονου κύτταρου (SOP) (Εικ.4B). Το SOP αφού καθορισθεί μέσω πλευρικής αναστολής, διαιρείται ασύμμετρα και παράγει δύο θυγατρικά κύτταρα (δευτερεύοντα SOPs) που ονομάζονται p11a και p11b. Το κύτταρο p11a θα διαιρεθεί επίσης ασύμμετρα και θα δώσει τα κύτταρα της θήκης και του στελέχους (Hartenstein and Posakony, 1989) ενώ το κύτταρο p11b θα διαιρεθεί, κατά αντίστοιχο τρόπο, σε ένα κύτταρο γλοίας και σε ένα θυγατρικό, που ονομάζεται p111b, από το οποίο θα προέλθουν ανάλογα το νευρικό κύτταρο και το περίβλημά του (Gho et al., 1999). Η απόκτηση διαφορετικής τύχης από τα θυγατρικά κύτταρα πραγματοποιείται μέσω της σηματοδότησης Notch, η οποία λαμβάνει χώρα τόσο μεταξύ των αρχικών θυγατρικών κυττάρων p11a και p11b όσο και στους απογόνους τους. Η σημασία της διαδικασίας αυτής στις “αποφάσεις” γενεαλογίας κατά το σχηματισμό των αισθητηρίων οργάνων αποδείχθηκε με πειράματα καταστολής της (απώλειας λειτουργίας ενός από τα συστατικά του μονοπατιού Notch). Διαπιστώθηκε ότι παράγονται μόνο νευρώνες και κανένας από τους υπόλοιπους τέσσερις κυτταρικούς τύπους (Hartenstein and Posakony, 1990), υποδηλώνοντας διατάραξη των αναπτυξιακών διαδικασιών από την πρώτη κιάλας θυγατρική γενιά. Αυτό οφείλεται στη μεταβίβαση, σε κάθε ασύμμετρη διαίρεση, της πρωτεΐνης Numb σε ένα μόνο από τα θυγατρικά κύτταρα. Ο συγκεκριμένος παράγοντας δρα ανταγωνιστικά στο Notch, που υπάρχει στην μεμβρανική επιφάνεια και των δύο θυγατρικών κυττάρων, με αποτέλεσμα μόνο το κύτταρο που δεν κληρονομεί το μόριο Numb να είναι ικανός δέκτης σήματος, οδηγώντας το σε διαφορετική αναπτυξιακή πορεία από το αδελφό γειτονικό του (Spana and Doe, 1996).

γ. Καθορισμός και διατήρηση ορίων (boundary formation) : χαρακτηριστική περίπτωση απαίτησης της σηματοδότησης Notch για τη δημιουργία και την εγκαθίδρυση συνόρων αποτελεί ο σχηματισμός του ραχιαίο-κοιλιακού συνόρου στον προνυμφικό δίσκο του φτερού, μια αναπτυξιακή διαδικασία ιδιαίτερα μελετημένη, η οποία είναι εξελικτικά συντηρημένη μέχρι τα ανώτερα θηλαστικά (Irvine and Vogt, 1997). Συγκεκριμένα, ο υποδοχέας σηματοδοτείται στη μεσογραμμή (σύνορο) των κυτταρικών ομάδων της ραχιαίας και της κοιλιακής πλευράς του προνυμφικού δίσκου. Η σηματοδότηση έχει σαν αποτέλεσμα : 1) το διαχωρισμό των δύο πληθυσμών κυττάρων (απαγόρευση ανάμιξης) και 2) τα κύτταρα στο όριο να αποκτήσουν τα χαρακτηριστικά ενός οργανωτικού κέντρου που είναι υπεύθυνο για τον καθορισμό του αναπτυξιακού προτύπου του φτερού κατά μήκος του ραχιαιοκοιλιακού άξονα (Εικ.4Γ). Αυτό επιτυγχάνεται με την έκφραση, στα εν λόγω συνοριακά κύτταρα, του μορφογόνου Wingless (Wg) που διαχέεται

και επηρεάζει όλα τα πρόδρομα κύτταρα του φτερού. Για τον καθορισμό του ραχιαιο-κοιλιακού ορίου ο υποδοχέας σηματοδοτείται αμφίπλευρα και από διαφορετικό δεσμευτή σε κάθε πλευρά. Πιο αναλυτικά, τα κοιλιακά κύτταρα ενεργοποιούν το μονοπάτι Notch στη ραχιαία πλευρά μέσω του δεσμευτή Delta, ενώ η αντίστροφη σηματοδότηση επιτυγχάνεται από τον άλλο δεσμευτή του Notch, το Serrate (Ser). Αυτό οφείλεται στην παρουσία της πρωτεΐνης Fringe (Fng), η οποία εκφράζεται μόνο στο ραχιαίο διαμέρισμα (Εικ. 5). Συγκεκριμένα, το Fringe γλυκοσυλιώνει τον υποδοχέα Notch και αυτή η μεταμεταφραστική τροποποίηση έχει σαν αποτέλεσμα να ενισχύεται η αλληλεπίδρασή του τελευταίου με το Delta των κυττάρων του κοιλιακού διαμερίσματος και να παρεμποδίζεται η σηματοδότησή του από το Serrate (Blair, 2000, Bruckner et al., 2000, Moloney et al., 2000, Munro and Freeman, 2000). Αντίθετα, το Notch των κοιλιακών κυττάρων δεν υφίσταται γλυκοσυλίωση και ενεργοποιείται από το Serrate που δρα ανταγωνιστικά, απουσία του Fringe, και είναι πιο ισχυρό από το δεσμευτή Delta (Εικ. 5). Αυτή η αμφίδρομη σηματοδότηση έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της έκφρασης του αντίστοιχου δεσμευτή σε κάθε πλευρά και τη συνεχή ενεργοποίηση του μονοπατιού στο ραχιαιο-κοιλιακό σύνορο. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού περιορίζεται αποκλειστικά στο



Εικόνα 5. Η σηματοδότηση Notch στον καθορισμό και τη διατήρηση του ραχιαιοκοιλιακού ορίου στον προνυμφικό δίσκο του φτερού στη *Drosophila*. Ο υποδοχέας Notch (N) και ο δεσμευτής Delta (DI) εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων και στα δύο διαμερίσματα του δίσκου του φτερού. Αντίθετα, ο δεσμευτής Serrate (S) εκφράζεται μόνο στα ραχιαία κύτταρα. Η πρωτεΐνη Fringe (Fng), η οποία εντοπίζεται στο ραχιαίο διαμέρισμα και γλυκοσυλιώνει τον υποδοχέα Notch (κίτρινο ημικύκλιο), δρα θετικά στη σηματοδότησή του από το Delta των κοιλιακών κυττάρων και κατασταλτικά στη μετάδοση σήματος από το Serrate, το οποίο είναι ικανό να σηματοδοτήσει μόνο τα κοιλιακά κύτταρα. Η ενεργοποίηση του Notch και στις δύο πλευρές του ορίου έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων των δεσμευτών του (του Serrate στο ραχιαίο διαμέρισμα και του Delta στα κοιλιακά κύτταρα). Αυτή η επαγωγική ικανότητα του υποδοχέα εξασφαλίζει τη διάρκεια τη σηματοδότησης στην περιοχή και το διαχωρισμό των δυο διαμερισμάτων .

όριο του φτερού. Αυτό επιτυγχάνεται λόγω της μη ικανότητας του Serrate να σηματοδοτήσει τον γλυκοσυλιωμένο υποδοχέα Notch στα ραχιαία κύτταρα και του Delta να επεκτείνει τη σηματοδότηση πιο κοιλιακά, λόγω απουσίας της πρωτεΐνης Fng (Εικ.5).

Στην *Drosophila*, άλλες περιοχές στις οποίες συμμετέχει ο υποδοχέας Notch για το σχηματισμό ορίων αποτελούν ο ισημερινός στο αναπτυσσόμενο μάτι (Parayannopoulos et al., 1998) και οι αρθρώσεις των ποδιών του εντόμου (de Celis et al., 1998, Bishop et al., 1999). Η συγκεκριμένη σηματοδοτική διαδικασία είναι εξελικτικά συντηρημένη μέχρι τα ανώτερα θηλαστικά και λαμβάνει χώρα στις αναπτυξιακές διαδικασίες σχηματισμού των άκρων και των σωματιών (Zeller and Duboule, 1997, Moran et al., 1999).

Φαίνεται, λοιπόν, ότι η βιολογική δράση του Notch εξαρτάται κυρίως από το κυτταρικό/αναπτυξιακό υπόβαθρο, μέσα στο οποίο λαμβάνει χώρα. Εκτός από την ιδιαίτερα μελετημένη και αποδεδειγμένη συμμετοχή του σηματοδοτικού μηχανισμού στις διαδικασίες διαφοροποίησης, πρόσφατες μελέτες δείχνουν και την εμπλοκή του στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Εντούτοις, δεν έχει αποδειχτεί αν η εμπλοκή αυτή είναι άμεση ή έμμεση. Πειράματα σε προνυμφικούς δίσκους του φτερού της *Drosophila* έδειξαν ότι η ενεργοποίησή του Notch επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό έμμεσα, ενδεχομένως μέσω της τροποποίησης της λειτουργίας του εκκρινόμενου μορίου Wingless (Johnson and Edgar, 1998). Άλλες όμως μελέτες υποδηλώνουν πιο άμεση δράση (Baonza and Garcia-Bellido, 2000). Επίσης, αναλύσεις της ενεργοποίησης του υποδοχέα σε διαφορετικούς δίσκους δείχνουν ότι η ικανότητά του να επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο είναι αποτέλεσμα συνεργατικής δράσης με άλλους παράγοντες και εξαρτάται από το εκάστοτε αναπτυξιακό πλαίσιο δράσης του (Go et al., 1998). Ανάλογες ενδείξεις υπάρχουν και από μελέτες σε θηλαστικά σύμφωνα με τις οποίες τα ορθόλογα του Notch επηρεάζουν τον κυτταρικό κύκλο (Ronchini and Carobianco, 2001) και κάποια από αυτά (π.χ. Notch 1) ενέχονται στην ανάπτυξη του προστάτη και στην καρκινογένεση (Shou et al., 2001).

Ο μηχανισμός σηματοδότησης μέσω του υποδοχέα Notch είναι εξελικτικά συντηρημένος από τον *C. elegans*, τη *Drosophila* και τον αχινό μέχρι τα ανώτερα σπονδυλωτά και τον άνθρωπο (Artavanis-Tsakonas et al., 1995, Weinmaster, 1997, Greenwald, 1998, Artavanis-Tsakonas et al., 1999, Mumm and Kopan, 2000). Καταστολή της λειτουργίας του υποδοχέα Notch ή των γονιδίων-στόχων οδηγεί σε θνησιμότητα κατά την εμβρυϊκή ηλικία. Έμβρυα ποντικού ομόζυγα για μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας του *Notch* (null mutants) παρουσιάζουν ποικίλες ανωμαλίες, όπως διατάραξη της ανάπτυξης του κεντρικού νευρικού συστήματος και των σωματιών (Swiatek et al., 1994, Conlon et al., 1995, de la Pompa et al., 1997). Επιπλέον, η συνεχής σηματοδότηση, με

την έκφραση συνεχώς ενεργοποιημένων μορφών του υποδοχέα ή γονιδίων-στόχων, επηρεάζει τις αποφάσεις γενεαλογίας κατά τη νευρογένεση και μυογένεση, όπως συμβαίνει και στην *Drosophila* (Nye et al., 1994, Shawber et al., 1996, Wang et al., 1998, Nofziger et al., 1999). Εκτός από το ρόλο του μονοπατιού Notch στις αποφάσεις της κυτταρικής αναπτυξιακής τύχης, υπάρχουν ενδείξεις συμμετοχής του και στη διατήρηση και ομοιοστάση διαφοροποιημένων κυττάρων. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί ότι η ανάπτυξη των απολήξεων των νευρώνων του φλοιού του εγκεφάλου ρυθμίζεται από το συγκεκριμένο μηχανισμό, υποδηλώνοντας βασικό ρόλο όχι μόνο στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος αλλά και στη διατήρησή του ή την πλαστικότητά του (Sestan et al., 1999).

Από τις πολυάριθμες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί είναι φανερό ότι η μεταβίβαση σημάτων μέσω του υποδοχέα Notch, σε συνδυασμό με άλλους κυτταρικούς παράγοντες, επηρεάζει και κατευθύνει τη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και τις αποπτωτικές διαδικασίες σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Συνεπώς, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι η σηματοδότηση Notch αποτελεί ένα γενικό και παράλληλα βασικό αναπτυξιακό μηχανισμό που κατευθύνει την κυτταρική τύχη και τελικά την κατασκευή ενός οργανισμού.

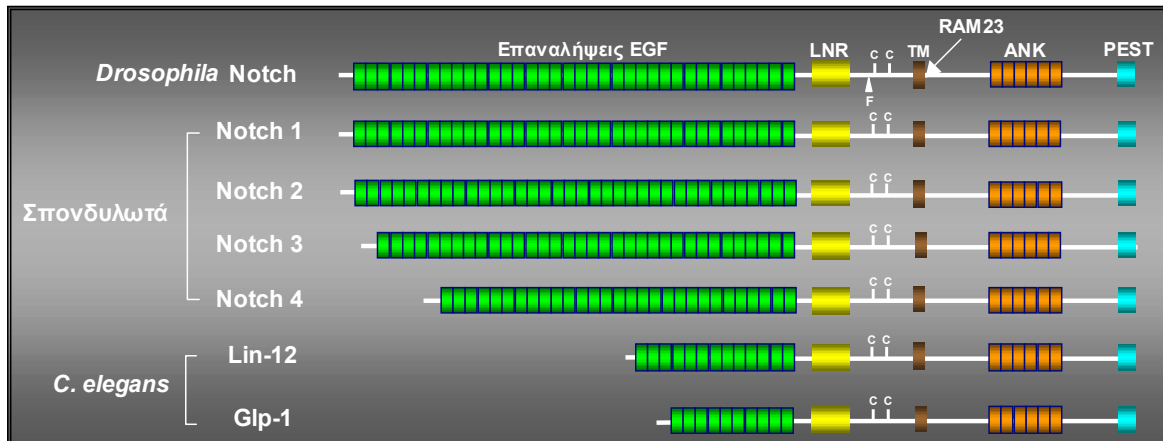
6. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ NOTCH ΚΑΙ ΔΕΣΜΕΥΤΕΣ : ΔΟΜΙΚΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΑ ΕΙΔΗ

A. Οι υποδοχείς Notch

Η ονομασία του γονιδίου Notch προήλθε από τα κοψίματα (notching) στο όριο των φτερών των ενήλικων ατόμων *Drosophila* που προκαλούνται από μερική έλλειψη της λειτουργίας του (απλοανεπάρκεια) (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Στο *C. elegans* έχουν ανιχνευτεί 2 ορθόλογα γονίδια (*lin-12* και *glp-1*) ενώ στα θηλαστικά είναι ταυτοποιημένες τέσσερις πρωτεΐνες της οικογένειας Notch/lin12 (Notch1-4), οι οποίες παρουσιάζουν τα ίδια δομικά χαρακτηριστικά με τον υποδοχέα της *Drosophila* (Εικ.6) (Greenwald and Rubin, 1992, Greenwald, 1994).

Ένας τυπικός υποδοχέας Notch αποτελεί μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη μονής διέλευσης (single-pass), μεγάλου μοριακού μεγέθους (το Notch της *Drosophila* έχει μέγεθος 300kDa), της οποίας η εξωκυττάρια και η ενδοκυττάρια περιοχή αποτελούν διακριτές λειτουργικές μονάδες (Rebay et al., 1993). Η εξωκυττάρια αμινοτελική περιοχή (N_{EC}) δρα ρυθμιστικά συμμετέχοντας στην αλληλεπίδραση με το δεσμευτή. Το ενδο-

κυττάριο καρβοξυτελικό τμήμα του υποδοχέα (N_{IC}) αποτελεί το λειτουργικό μέρος του μορίου. Οι υποδοχείς Notch συντίθενται σαν μονές πολυτεπετιδικές αλυσίδες, οι οποίες κατά την πορεία τους προς την κυτταρική επιφάνεια πρωτεολύονται στο εξωκυττάριο τμήμα τους και φτάνουν στον τελικό τους προορισμό ως ετεροδιμερή (Blaumueller et al., 1997, Logeat et al., 1998). Μολονότι υπάρχουν σημαντικές διακυμάνσεις στο μέγεθος των υποδοχέων ανάμεσα στα είδη η δομική τους αρχιτεκτονική παραμένει εξαιρετικά συντηρημένη (Εικ.6).



Εικόνα 6. Δομικά χαρακτηριστικά των υποδοχέων της οικογένειας Notch/LIN-12. Τα μόρια χαρακτηρίζονται από την ίδια αρχιτεκτονική δομή. Η εξωκυττάρια περιοχή διαθέτει πολλαπλές επαναλήψεις τύπου EGF (10-36), 3 επαναλήψεις πλούσιες σε κυστείνες (LNR : LIN-12/Notch Repeats) και δύο συντηρημένες κυστείνες (C). Ακολουθεί μία μονή διαμεμβρανική περιοχή (TM). Το ενδοκυττάριο τμήμα αποτελείται από έξι επαναλήψεις αγκυρίνης (ANK) και μία περιοχή που είναι πλούσια σε προλίνη, γλουταμικό οξύ, σερίνη και θρεονίνη (PEST). F : θέση πρωτεόλυσης των υποδοχέων Notch από τη φουρίνη.

Η εξωκυττάρια περιοχή των υποδοχέων Notch χαρακτηρίζεται από διαδοχικές επαναλήψεις τύπου EGF (EGFRs : Epidermal Growth Factor like Repeats/επαναλήψεις του παράγοντα αύξησης επιδερμίδας), ο αριθμός των οποίων ποικίλει στα διάφορα μόρια της οικογένειας και κυμαίνεται από 36 στη δροσοφιλική πρωτεΐνη και στις ορθόλογες Notch1 και Notch2, 34 στο Notch3, 29 στο Notch4 έως 10 στο πολυτεπετίδιο glp-1 του *C. elegans* (Εικ. 6) (Weinmaster, 1997). Οι EGFRs συμμετέχουν στις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις και στη σταθερότητα της πρωτεΐνης Notch. Πειράματα σε κυτταροκαλλιέργειες έδειξαν ότι οι επαναλήψεις 11 και 12, οι οποίες είναι εξαιρετικά συντηρημένες σε όλα τα ορθόλογα πολυτεπετίδια, είναι ικανές και αναγκαίες για την αλληλεπίδραση του Notch της *Drosophila* με τους δεσμευτές του, Delta και Serrate (Fehon et al., 1990, Rebay et al., 1991). Οι υπόλοιπες επαναλήψεις, ειδικότερα οι 14 και 24-30, πιθανόν να σταθεροποιούν αυτές τις αλληλεπιδράσεις επειδή αλλαγές σε αυτές επηρεάζουν τη δεσμευτική ικανότητα του υποδοχέα (Lieber et al., 1992) και μάλιστα με διαφορετικό τρόπο, ενδεχομένως μέσω αλληλεπιδράσεων με ιστοειδικούς παράγοντες που επηρεά-

ζουν διαφορετικά την λειτουργικότητά του (Rebay et al., 1991). Τέλος, ανάμεσα στη διαμεμβρανική περιοχή και τις EGFRs του Notch εντοπίζονται και άλλες επαναλήψεις, πλούσιες σε κυστείνες (LNRs : Lin12/Notch Repeats), που είναι σημαντικές για τη διατήρηση της σταθερότητας του μορίου (Fleming, 1998).

Το ενδοκυττάριο τμήμα των υποδοχέων Notch απελευθερώνεται πρωτεολυτικά ύστερα από την αλληλεπίδραση με το δεσμευτή και μεταφέρεται στον πυρήνα όπου δρα ως μεταγραφικός συνενεργοποιητής των γονιδίων-στόχων (Schroeter et al., 1998, Lecourtois and Schweisguth, 1998). Το τμήμα αυτό των μορίων χαρακτηρίζεται από τέσσερις διακριτές δομικές περιοχές: την περιοχή RAM23, η οποία βρίσκεται πολύ κοντά στη μεμβράνη, τις έξι επαναλήψεις τύπου αγκυρίνης (ANKRs), μία περιοχή που είναι πλούσια σε γλουταμίνες (ora) και μία αλληλουχία PEST. Το ενδοκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης Notch αλληλεπιδρά με πολυάριθμους παράγοντες από τους οποίους οι πιο σημαντικοί φαίνεται είναι αυτοί που ανήκουν στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων CSL (CBF1 στα θηλαστικά, Su(H) στην *Drosophila* και Lag-1 στο *C. elegans*) (Fortini and Artavanis-Tsakonas, 1994, Tamura et al., 1995). Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τις περιοχές RAM23 και ANKR των υποδοχέων και είναι βασικές, αλλά όχι απαραίτητες, σε όλες τις αναπτυξιακές διαδικασίες στις οποίες συμμετέχει η σηματοδότηση Notch (Shawber et al., 1996β, Matsuno et al., 1997). Υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που αλληλεπιδρούν με περιοχές του ενδοκυτταρίου τμήματος των πρωτεϊνών Notch και παρουσιάζουν ιστοειδική δράση, επηρεάζοντας θετικά ή αρνητικά τη σηματοδότηση. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη Numb αλληλεπιδρά με την περιοχή RAM23 και δρα ανταγωνιστικά στην ενεργοποίηση του Notch, παίζοντας σημαντικό ρόλο στις αποφάσεις γενεαλογίας κατά το σχηματισμό των προγονικών κυττάρων των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων (Guo et al., 1996). Με την ίδια περιοχή αλληλεπιδρά και η πρωτεΐνη Disabled (Dab) που συμμετέχει στην επέκταση των νευρικών αξόνων (Giniger, 1998). Επιπρόσθετα, οι επαναλήψεις αγκυρίνης αποτελούν θέσεις δέσμευσης θετικών ρυθμιστών των υποδοχέων Notch, όπως η πρωτεΐνη Deltex, η οποία εκφράζεται ευρέως και συμμετέχει στη μεταγραφική επαγωγική ικανότητά τους, πιθανόν αλληλεπιδρώντας με τα μόρια CSL (Matsuno et al., 1995, Matsuno et al., 1998). Διαπιστώνεται συνεπώς ότι τα πολυπεπτίδια Notch αλληλεπιδρούν με διάφορους κυτταρικούς παράγοντες, δικαιολογώντας την ικανότητά τους να παίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο σε ένα τεράστιο εύρος διαφορετικών αναπτυξιακών διαδικασιών καθώς και την εξελικτική τους επιλογή και συντήρηση ανάμεσα στα είδη ως μόρια-κλειδιά για την κατασκευή ενός οργανισμού.

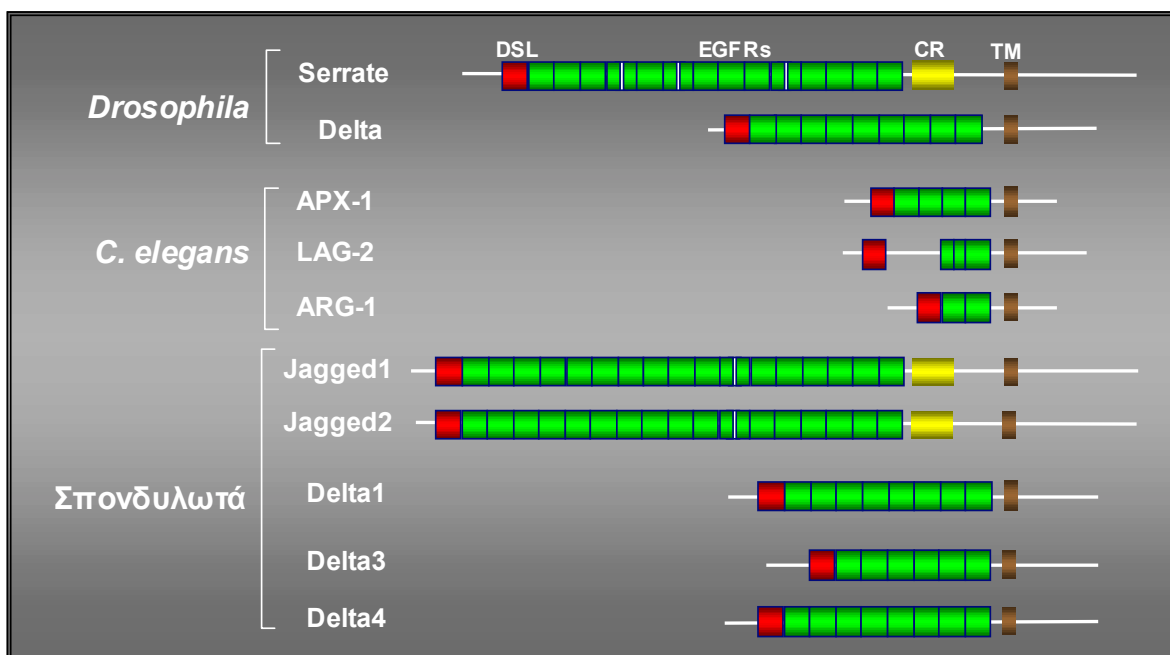
B. Οι δεσμευτές των υποδοχέων Notch

Οι δεσμευτές που ενεργοποιούν τους υποδοχείς της οικογένειας Notch/Lin12 ανήκουν στην οικογένεια DSL (Delta – Serrate – Lag-2) (Henderson et al., 1994, Mello et al., 1994, Tax et al., 1994). Όλα τα μέλη της συγκεκριμένης οικογένειας αποτελούν διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μονής διέλευσης, με το μεγαλύτερο αμινοτελικό τμήμα τους να βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο. Η ενδοκυττάρια περιοχή έχει μικρό μέγεθος και κυμαίνεται ανάμεσα στα είδη από 70-215 a.a. Όπως στις πρωτεΐνες Notch, η εξωκυττάρια περιοχή των πρωτεϊνών DSL χαρακτηρίζεται από την παρουσία επαναλήψεων τύπου EGF με τη διαφορά της ύπαρξης μίας εκφυλισμένης αμινοτελικής επανάληψης (περιοχή DSL) (Εικ. 7), η οποία είναι μοναδική σε αυτά τα μόρια και απαραίτητη για τη λειτουργία τους (Henderson et al., 1994, Muskavitch, 1994, Fleming, 1998). Η άμεση αλληλεπίδραση με τις EGFRs 11-12 του Notch γίνεται μέσω αυτής της περιοχής (Fleming, 1998).

Στην *Drosophila* οι δεσμευτές του Notch είναι οι πρωτεΐνες Delta και Serrate. Τα δύο μόρια εκτός από το μέγεθος (Delta : 832 aa, Serrate : 1404 aa) και τον αριθμό των επαναλήψεων EGF (Delta : 9 επαναλήψεις, Serrate : 14 επαναλήψεις) διαφέρουν σε μία περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες, μεγέθους 100 περίπου αμινοξέων (περιοχή CR), η οποία είναι χαρακτηριστική μόνο στο Serrate και στις ορθόλογες με αυτό πρωτεΐνες (Εικ.7). Η λειτουργία της περιοχής CR παραμένει άγνωστη αλλά πιστεύεται ότι συμμετέχει σε διαφορετικές αποκρίσεις του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch από αυτές που πραγματοποιούνται από το Delta (Fleming, 1998). Εξάλλου, οι δύο δεσμευτές έχουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης, μεταλλαγές τους προκαλούν διαφορετικούς φαινότυπους και φαίνεται να παίζουν ρόλο σε διαφορετικές αναπτυξιακές αποφάσεις μέσω ενεργοποίησης του ίδιου υποδοχέα (Doherty et al., 1996, Jonsson and Knust, 1996). Οι επαναλήψεις EGF του Ser και του Di συμμετέχουν ενδεχομένως στις αλληλεπιδράσεις με τον υποδοχέα Notch αφού μεταλλαγές τους επηρεάζουν τη δεσμευτική τους ικανότητα (Lieber et al., 1992).

Ορθόλογα μόρια των Ser και Di έχουν ταυτοποιηθεί στον *C. elegans* (Lag-2, APX-1, ARG-1) (Henderson et al., 1994, Mello et al., 1994, Tax et al., 1994, Fitzgerald and Greenwald, 1995) και στα σπονδυλωτά, από το βάτραχο (Chitnis et al., 1995, Jen et al., 1997) μέχρι τα ανώτερα θηλαστικά (Delta-1, Delta-3, Delta-4 και Jagged-1, Jagged-2-σχήμα 5) και παρουσιάζουν συντηρημένη αρχιτεκτονική δομή (Bettenhausen et al., 1995, Lindsell et al., 1995, Shawber et al., 1996α, Dunwoodie et al., 1997, Shutter et al., 2000). Οι πρωτεΐνες Jagged 1 και Jagged 2, παρόμοια με το δροσοφιλικό ορθόλογο Serrate, έχουν μεγαλύτερο αριθμό επαναλήψεων EGF από τους δεσμευτές Delta και χαρακτηρίζονται από την παρουσία της περιοχής CR.

Διαπιστώνεται συνεπώς ότι τα βασικά συστατικά του σηματοδοτικού μηχανισμού Notch παραμένουν δομικά συντηρημένα. Επίσης, από τις πολυάριθμες μελέτες που αναφέρονται παρακάτω, φαίνεται ότι ο κύριος μηχανισμός αλληλεπίδρασης δεσμευτή-υποδοχέα καθώς και τα βασικά γεγονότα που ακολουθούν αυτήν την αλληλεπίδραση παραμένουν αναλλοίωτα κατά την εξέλιξη, ενώ ο μεγάλος αριθμός των δομικών τους περιοχών και οι αλληλεπιδράσεις τους με ένα τεράστιο εύρος παραγόντων εξασφαλίζουν την σωστή πορεία των αναπτυξιακών διαδικασιών σε πολυάριθμα επίπεδα. Η σηματοδότηση Notch αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα επιλογής από τη φύση ενός βασικού μηχανισμού που λειτουργεί σχεδόν γενικευμένα αλλά ρυθμίζεται διαφορετικά ανάλογα με το αναπτυξιακό πλαίσιο δράσης του.



Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση των πρωτεϊνών της οικογένειας DSL. Όλα τα μέλη της ομάδας έχουν τη ίδια διάταξη συντηρημένων δομικών περιοχών. Η εξωκυτάρια περιοχή τους αποτελείται από επαναλήψεις τύπου EGF (2-16). Στις πρωτεΐνες που είναι ορθόλογες με το Serrate της *Drosophila* κάποιες επαναλήψεις διακόπτονται από ενδιάμεσες αλληλουχίες, ενώ το μόριο LAG-2 έχει και δύο μισές EGFRs. Επιπρόσθετα, διαθέτουν μία χαρακτηριστική περιοχή που είναι πλούσια σε κυστείνες (CR), η οποία απουσιάζει από τα πολυπεπτίδια Delta. Τα κυτταροπλασματικά τμήματα δεν παρουσιάζουν συγκεκριμένες δομές και δεν είναι εξελικτικά συντηρημένα. TM : διαμεμβρανική περιοχή.

7. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ NOTCH : ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΑ ΚΑΙ ΕΝΔΟΚΥΤΤΩΤΙΚΑ ΓΕΓΟΝΟΤΑ

Ένα σημαντικό ερώτημα που παραμένει αναπάντητο αποτελεί ο μηχανισμός με τον οποίο ο υποδοχέας Notch ενεργοποιείται από τους δεσμευτές του. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το ώριμο μόριο Notch φτάνει στην κυτταρική επιφάνεια σαν ετεροδιμερές

λόγω της πρωτεόλυσης που συμβαίνει στο δίκτυο Golgi από μία φουρίνη (θέση πρωτεόλυσης S1), περίπου 70 αμινοξέα έξω από τη διαμεμβρανική περιοχή (Blaumueller et al., 1997, Logeat et al., 1997). Οι δύο λειτουργικά διακριτές μονάδες συνδέονται μεταξύ τους με μία γέφυρα ασβεστίου (Rand et al., 2000).

Πρόσφατα έχει βρεθεί ότι το κρίσιμο γεγονός που προκαλεί την ενεργοποίηση του υποδοχέα Notch είναι η ενδομεμβρανική του πρωτεόλυση από τη διαμεμβρανική πρωτεάση πρεσενιλίνη που έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση του ενδοκυττάριου τμήματός του και την επακόλουθη ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων (Brou et al., 2000, Rand et al., 2000, Struhl and Adachi, 2000). Η πρεσενιλίνη μπορεί να τεμαχίσει μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη μονής διέλευσης, μέσα ή έξω από τη μεμβρανική της περιοχή, ανεξάρτητα από την αμινοξική αλληλουχία του εξωκυττάριου τμήματος αλλά σε άμεση εξάρτηση από το μέγεθός του, το οποίο δεν πρέπει να ξεπερνά τα 300 αμινοξέα (Struhl and Adachi, 2000). Πράγματι, βρέθηκε ότι ο υποδοχέας Notch εκτός από τη φουρίνη (θέση πρωτεόλυσης S1) πρωτεολύεται και σε μία δεύτερη θέση (S2), μεταξύ της S1 και της διαμεμβρανικής περιοχής (Brou et al., 2000, Mumm et al., 2000). Από βιοχημικές μελέτες σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών διαπιστώθηκε ότι αυτή η πρωτεόλυση εξαρτάται από την αλληλεπίδραση με το δεσμευτή Delta και λαμβάνει χώρα στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα, μεταξύ των αμινοξέων Ala¹⁷¹⁰ και Val¹⁷¹¹, περίπου 12 αμινοξέα μακριά από την διαμεμβρανική περιοχή (Brou et al., 2000, Mumm et al., 2000). Υπεύθυνη για αυτήν την πρωτεόλυση θεωρείται η μεταλλοπρωτεάση TACE/ADAM17 (Brou et al., 2000, Mumm et al., 2000). Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η απομάκρυνση του μεγαλύτερου τμήματος της εξωκυττάριας περιοχής του Notch (ectodomain shedding), έτσι ώστε να παραμείνει ένα μικρό μόνο τμήμα αυτής και να αποτελέσει συνεπώς ο υποδοχέας καλό υπόστρωμα για την πρεσενιλίνη.

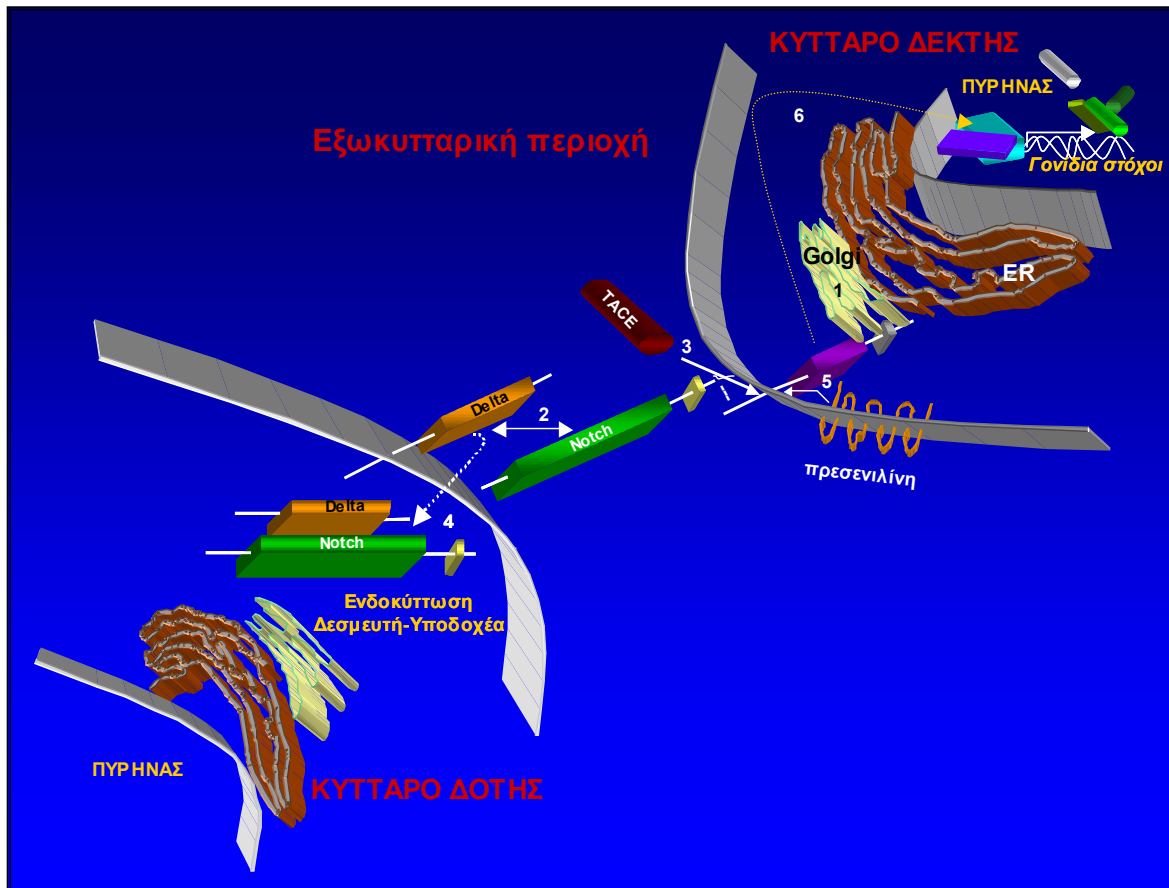
Από πολυάριθμες μελέτες φαίνεται ότι τα πρωτεολυτικά γεγονότα που οδηγούν στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Notch σχετίζονται με ενδοκυττωτικά γεγονότα. Έχει προταθεί από τον Parks και τους συνεργάτες του (Parks et al., 2000) ότι η σηματοδότηση του μονοπατιού Notch από το δεσμευτή Delta εξαρτάται από ενδοκυττωτικές διαδικασίες. Παρατήρησαν ότι η εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα, ύστερα από την πρωτεόλυση στη θέση S2, απομακρύνεται με ενδοκύτωση *in trans* στο κύτταρο-πομπό, συμπαρασυρόμενη από το δεσμευτή Delta ο οποίος ενδοκυττώνεται *in cis*. Πιο συγκεκριμένα, υποστηρίζουν ότι τα ενδοκυττωτικά γεγονότα στο κύτταρο-πομπό ξεκινούν πριν την έναρξη των πρωτεολυτικών γεγονότων που λαμβάνουν χώρα στο κύτταρο-δέκτη και είναι απαραίτητα για την πρωτεόλυση του Notch στις θέσεις S2 και S3 και την επακόλουθη ενεργοποίησή του. Το προτεινόμενο μοντέλο σχετικά με τη σπουδαιότητα της ενδοκύτωσης στη σηματοδότηση Notch βασίζεται στις εξής παρατηρήσεις : α) η ανα-

στολή της λειτουργίας της δυναμίνης, η οποία είναι υπεύθυνη για την έναρξη της ενδοκυττωτικής διαδικασίας και την αποκοπή των κυστιδίων από τη μεμβράνη, αναστέλλει τόσο την ενδοκύτωση του δεσμευτή Delta όσο και τη σηματοδότηση του Notch, β) η αποδέσμευση της εξωκυττάριας και ενδοκυττάριας περιοχής του υποδοχέα κατά τη σηματοδότηση εξαρτώνται από τη δράση της δυναμίνης και την ενδοκύτωση του Delta, γ) κυτταρικές σειρές που έχουν μειωμένη δράση δυναμίνης εμφανίζουν ελαττωμένη ενδοκύτωση του δεσμευτή *in cis* και του υποδοχέα *in trans* και δ) μία σημειακή μεταλλαγή στο Delta, η οποία παρεμποδίζει σε κυτταρικές σειρές την ενδοκύτωση του Notch *in trans*, αναστέλλει και *in vivo* την ενδοκύτωση του δεσμευτή καθώς και την εξαρτώμενη από τον τελευταίο σηματοδότηση της πρωτεΐνης Notch.

Η παραπάνω συσχέτιση της σηματοδότησης Notch με την ενδοκύτωση συμφωνεί με την παρατήρηση ότι στελέχη *Drosophila* που φέρουν μεταλλαγές του γονιδίου *shibire (shi)*, που κωδικοποιεί τη δυναμίνη, εμφανίζουν φαινοτύπους παρόμοιους με αυτούς που λαμβάνονται σε περιπτώσεις καταστολής της λειτουργίας του μονοπατιού Notch (Poody, 1990). Επίσης φαίνεται ότι η δραστηριότητα συνεχώς ενεργοποιημένων μορφών του υποδοχέα, στις οποίες απουσιάζει το εξωκυττάριο τμήμα, δεν επηρεάζεται από την απώλεια της λειτουργίας της δυναμίνης (Seugnet et al., 1997, Struhl and Adachi, 2000).

Το επικρατέστερο μοντέλο του μηχανισμού ενεργοποίησης του μονοπατιού Notch, το οποίο υποστηρίζεται και από τα δικά μας δεδομένα (βλ. συζήτηση), είναι το εξής (Εικ.8) : ο υποδοχέας φτάνει στην κυτταρική επιφάνεια σαν ετεροδιμερές, ύστερα από πρωτεόλυση που υφίσταται στο δίκτυο Golgi από τη δράση μίας φουρίνης (θέση S1). Η αλληλεπίδραση με το δεσμευτή του Delta ενεργοποιεί με κάποιον τρόπο την έναρξη της ενδοκύτωσης του τελευταίου συμπαρασύροντας την εξωκυττάρια περιοχή του Notch και προκαλώντας ενδεχομένως αλλαγές της διαμόρφωσής της, οι οποίες αποκαλύπτουν τη θέση πρωτεόλυσης S2 στη μεταλλοπρωτεάση TACE/ADAM17. Η εξωκυττάρια περιοχή στη συνέχεια απομακρύνεται, συμπαρασυρόμενη από το δεσμευτή στο κύτταρο-πομπό. Αυτό το πρωτεολυτικό γεγονός έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική ελάττωση του μεγέθους του εξωκυττάριας τμήματος του υποδοχέα Notch και επιτρέπει την επακόλουθη πρωτεόλυσή του από την πρεσενιλίνη (θέση S3). Η ενδοκυττάρια υπομονάδα του υποδοχέα απελευθερώνεται και ακολουθεί πορεία για τον πυρήνα προκειμένου να ενεργοποιηθεί η έκφραση των κατάλληλων γονιδίων-στόχων.

Αν και είναι προφανής η εξάρτηση της ενεργοποίησης του μονοπατιού Notch από ενδοκυττωτικά γεγονότα και τη λειτουργία της δυναμίνης εντούτοις δεν έχει επιβεβαιωθεί αν η τελευταία χρειάζεται στο κύτταρο-πομπό ή στο κύτταρο-δέκτη του σήματος ή και στα



Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση του επικρατέστερου μοντέλου του μηχανισμού ενεργοποίησης του υποδοχέα Notch. Ο υποδοχέας πρωτεολύεται στο δίκτυο Golgi από τη φουρίνη (1) και φτάνει στην κυτταρική επιφάνεια σαν ετεροδιμερές. Ο δεσμευτής Delta αλληλεπιδρά με την εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα (2). Αυτή η αλληλεπίδραση πιθανόν σηματοδοτεί την έναρξη της ενδοκύτωσης του πρώτου, συμπαρασύροντας την εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα και σηματοδοτώντας με αυτόν τον τρόπο την πρώτη πρωτεόλυσή της από την μεταλλοπρωτεάση TACE (3). Η εξωκυττάρια περιοχή του Notch απομακρύνεται μέσω ενδοκύτωσης, *in trans*, στο κύτταρο-πομπό (4). Αυτή η σημαντική ελάττωση του μεγέθους του εξωκυττάριου τμήματος του υποδοχέα τον μετατρέπει σε ιδανικό υπόστρωμα της πρεσενιλίνης, η οποία τον πρωτεολύει ενδομεμβρανικά (5). Η ενδοκυττάρια υπομονάδα του Notch απελευθερώνεται και ακολουθεί πορεία για τον πυρήνα προκειμένου να ενεργοποιηθούν τα γονίδια-στόχοι (6).

δύο (Seugnet et al., 1997). Η Seugnet και οι συνεργάτες της (Seugnet et al., 1997) υποστηρίζουν ότι η δυναμίνη απαιτείται και στους δύο τύπους κυττάρων, ερχόμενοι σε αντίθεση με το προαναφερόμενο μοντέλο. Μία εξήγηση που δίνουν είναι ότι ολόκληρη η πρωτεΐνη Delta ενδοκυττώνεται μαζί με τον υποδοχέα στο κύτταρο-δέκτη και αυτό επιτυγχάνεται με τη δημιουργία μεμβρανικών προεκβολών στο κύτταρο-πομπό και επακόλουθη αποκοπή και έγκλισή τους σε ενδοκυττωτικά κυστίδια του κυττάρου-δέκτη. Σε αυτή τη διαδικασία η δυναμίνη απαιτείται και στα δύο γειτονικά κύτταρα. Επιπλέον, από πειράματα σε κυτταροκαλλιέργειες παρατηρήθηκε και ενδοκύτωση της πρωτεΐνης Delta, *in trans*, στο κύτταρο-δέκτη του σήματος Notch (Klueg and Muskavitch, 1999). Ενδεχομένως, οι αλληλεπιδράσεις Delta-Notch να είναι διπλής κατεύθυνσης και σε ορισμένες περιπτώσεις ο δεσμευτής να λειτουργεί ως υποδοχέας, κάτι που φαίνεται να ισχύει και σε άλλα παραδείγματα διαμεμβρανικών δεσμευτών, όπως στην περίπτωση

των δεσμευτών της οικογένειας των υποδοχέων EPH (Holland et al., 1996). Αυτό έρχεται σε συμφωνία με την παρατηρούμενη, σε ορισμένες περιπτώσεις, μη κυτταρική αυτονομία της δράσης του Notch (Technau and Campos-Ortega, 1987, Baker and Schubiger, 1996).

8. ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο συνδυασμός λειτουργικής ανάλυσης σε οργανισμούς-μοντέλα και η ανάλυση της προκύπτουσας πληροφορίας στα πλαίσια της προσπάθειας προσδιορισμού της λειτουργίας του *NEURALIZED* και της πιθανής συσχέτισής του με γενετικές ασθένειες αποτέλεσε τη βάση της παρούσας εργασίας. Η εξελικτική συντήρηση μηχανισμών αποτελεί ένα γεγονός στο οποίο βασίζονται πλέον πολλές προσπάθειες για την απάντηση βιολογικών ερωτημάτων που έχουν ως απώτερο στόχο τη βελτίωση της υγείας και των συνθηκών διαβίωσης του ανθρώπου. Οι εξελικτικά κατώτεροι οργανισμοί-μοντέλα, όπως η *Drosophila*, είναι ιδιαίτερα μελετημένοι, γενετικά και αναπτυξιακά, και πειραματικά εύχρηστοι, αποτελώντας βασική πηγή δεδομένων που βοηθούν σημαντικά τις μελέτες που πραγματοποιούνται στα θηλαστικά. Οι προσπάθειες λειτουργικής ανάλυσης ενός μορίου ή και ενός ολόκληρου σηματοδοτικού μηχανισμού σε διάφορους οργανισμούς-μοντέλα είναι αλληλένδετες και αλληλοβοηθούμενες. Ο συνδυασμός της προκύπτουσας πληροφορίας αποτελεί ίσως τον πιο γρήγορο και ασφαλή τρόπο στην πορεία διαλεύκανσης ποικίλων βιολογικών ερωτημάτων.

Για να διευκολυνθεί η διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου του γονιδίου *NEURL*, απομονώθηκε και μελετήθηκε το ομόλογο στον ποντικό (*Neurl*). Μελετήσαμε το μόριο *Neurl* σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών αλλά εκμεταλλευτήκαμε και το εύχρηστο λειτουργικό σύστημα της *Drosophila*. Επίσης, λόγω της περιορισμένης πληροφορίας που υπήρχε σχετικά με το μηχανισμό λειτουργικής δράσης της δροσοφιλικής πρωτεΐνης *Neur* θεωρήσαμε σκόπιμο να μελετήσουμε παράλληλα και τα δύο γονίδια *neur* και *Neurl*. Η διαλεύκανση της λειτουργίας του *neur* θα μπορούσε να αποτελέσει τον οδηγό για τη διερεύνηση της λειτουργίας του γονιδίου *Neurl* των θηλαστικών.

Οι στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν :

- Η μελέτη της αρχιτεκτονικής δομής του πολυπεπτιδίου *Neurl* και η σύγκρισή του με άλλες πρωτεΐνες με τις οποίες έχει κοινά δομικά χαρακτηριστικά.
- Η μελέτη του προτύπου έκφρασης του γονιδίου *Neurl*.

- Η ανίχνευση της ενδοκυτταρικής τοπολογίας τόσο της πρωτεΐνης Neur1 όσο και της πρωτεΐνης της *Drosophila* (Neur) και η συσχέτιση του υποκυτταρικού εντοπισμού των μορίων με τις δομικές περιοχές τους.
- Η διερεύνηση της συμμετοχής των πρωτεϊνών Neur1 και Neur σε ενδοκυττωτικούς μηχανισμούς.
- Η λειτουργική ανάλυση των πολυπεπτιδίων Neur1 και Neur στην *Drosophila*, η διερεύνηση της συσχέτισής τους με τη σηματοδότηση του υποδοχέα Notch και η λεπτομερής μελέτη του αντίστοιχου μηχανισμού.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ cDNA

Διερευνήθηκε βιβλιοθήκη cDNA ποντικού σε βακτηριοφάγο/φορέα λExCell EcoR I/ CIP, η οποία προσφέρθηκε από τους Dr. R. Werh και Dr. P. Gruss (Department of Molecular Cell Biology, Max-Planck for Biophysical Chemistry, Göttingen, Germany). Τα ενθέματα της βιβλιοθήκης προέρχονταν από πειράματα αντίστροφης μεταγραφής RNA από εγκέφαλο εμβρύου ποντικού ημέρας E14.5 (στέλεχος C57BL/6). Η απομόνωση θετικών κλώνων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ραδιενεργά σημασμένου ανιχνευτή και υβριδοποίηση μεμβρανών στις οποίες είχαν μεταφερθεί, με υψηλό ποσοστό αντιπροσώπευσης, οι φάγοι-φορείς των ενθεμάτων της βιβλιοθήκης, αφού πρώτα αναπτύχθηκαν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Sambrook et al., 1989).

A. Ανάπτυξη της βιβλιοθήκης cDNA σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα

Για την ανάπτυξη της βιβλιοθήκης cDNA χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος *Escherichia coli* NM522. Συγκεκριμένα, κύτταρα NM522 που αναπτύχθηκαν από μία βακτηριακή αποικία, ύστερα από ολονύκτια επώαση στους 37°C σε 50 ml θρεπτικού μέσου LB (Luria-Bertani medium : 0.8% NaCl, 1% Bacto-Tryptone, 0.5% Yeast extract, pH 7.00) που περιείχε 0.2% μαλτόζη και 10mM MgSO₄, φυγοκεντρήθηκαν στις 1000 rpm και επαναιωρήθηκαν σε 20 ml διαλύματος 10mM MgSO₄. Σε καθέναν από τέσσερις βακτηριολογικούς σωλήνες τοποθετήθηκε κυτταρικό εναιώρημα 3 ml (~2x10⁹ κύτταρα) το οποίο επιμολύνθηκε με 2x10⁵ βακτηριοφάγους της βιβλιοθήκης και επώαστηκε στους 37°C για 20 λεπτά (πρόσδεση φάγων στα βακτηριακά τοιχώματα). Ακολούθησε προσθήκη 40 ml θρεπτικού μέσου NZY [0.5% NaCl, 0.2% MgSO₄.7H₂O,

0.2% Yeast extract, 1% NZ Amine (casein hydrolysate), pH 7.00] που περιείχε 0.7% αγαρόζη και είχε προθερμανθεί στους 45°C ώστε να βρίσκεται σε ρευστή κατάσταση. Το μίγμα προστέθηκε σε τρυβλία διαστάσεων 24cm x 24 cm με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (NZY και 1.5% άγαρ) και στερεοποιήθηκε. Ακολούθως τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στους 37°C για 12-14 ώρες προκειμένου να επιτευχθεί ο πολλαπλασιασμός των φάγων, η απελευθέρωσή τους με την λύση των βακτηριακών κυττάρων (φαγικές πλάκες) και τελικά η συνολική αναπαραγωγή, περίπου, 8×10^5 φαγικών μονάδων (pfus : plaque forming units) που σχηματίζουν αντίστοιχο αριθμό πλακών. Ο μεγάλος αριθμός pfus που αναπτύχθηκε εξασφαλίζει την υψηλή αντιπροσώπευση των ενθεμάτων cDNA της βιβλιοθήκης (αύξηση της πιθανότητας ανίχνευσης του επιθυμητού ενθέματος) αλλά αποκλείει την απομόνωση μοναδιαίων πλακών από την πρώτη προσπάθεια διερεύνησης.

B. Μεταφορά των βακτηριοφάγων σε μεμβράνες υβριδοποίησης

Οι βακτηριοφάγοι που αναπτύχθηκαν μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες υβριδοποίησης (Hybond-N⁺, Amersham) οι οποίες τοποθετήθηκαν στα τρυβλία για 2 λεπτά. Ακολούθησε απομάκρυνση των μεμβρανών, αποδιάταξη του DNA των δεσμευμένων βακτηριοφάγων (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl) για 2 λεπτά, εξουδετέρωση σε διάλυμα 0.5 M Tris-Cl pH 7.4 και 1.5 M NaCl για 10 λεπτά και πλύσιμο σε 2X SSC για 5 λεπτά. Το δεσμευμένο DNA μονιμοποιήθηκε με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV cross-linking) και θέρμανση των μεμβρανών στους 80 °C για 2 ώρες (Grunstein and Hogness, 1975).

Γ. Ανίχνευση θετικών κλώνων

Για την ανίχνευση θετικών κλώνων πραγματοποιήθηκαν πειράματα υβριδοποίησης των μεμβρανών. Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα Denhardt's και ανιχνευτής που είχε σημανθεί ραδιενεργά με την μέθοδο των τυχαίων εκκινήτων. Για κάθε θετικό σήμα υβριδοποίησης εντοπίστηκε η αντίστοιχη θέση στα τρυβλία που αναπτύχθηκε η βιβλιοθήκη και ακολούθησε περισυλλογή μιας ομάδας 200 περίπου πλακών που κάλυπτε μία περιοχή διαμέτρου ~1cm και αντιπροσώπευε 200 (το μέγιστο) διαφορετικά ενθέματα, τα οποία περιλαμβάνονταν συνολικά σε 2×10^7 βακτηριοφάγους (1πλάκα= $\sim 10^5$ φάγοι που φέρουν το ίδιο ένθεμα). Καθεμία από τις ομάδες τοποθετήθηκε σε 500 μl διαλύματος SM (0.2M NaCl, 10mM MgSO₄, 50mM Tris-Cl pH 7.5 και 0.01% ζελατίνη) που περιείχε 6% CHCl₃ ($\sim 4 \times 10^4$ φάγοι/μl). Για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος της διερεύνησης της βιβλιοθήκης καθώς και για την απομόνωση μοναδιαίων θετικών πλακών-κλώνων, για καθεμία από τις αρχικές ομάδες που ελήφθησαν, έγιναν επαναληπτικά πειράματα ανίχνευσης, σε μικρότερα τρυβλία (διαμέτρου 10cm), επιμολύνοντας κύτταρα NM522 με διαφορετικές αραιώσεις βακτηριοφάγων. Ακολούθησαν μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες

των επιλεγμένων φάγων, εκχυλίσεις του DNA τους και υποκλωνοποιήσεις των ενθεμάτων cDNA σε πλασμιδιακούς φορείς.

2. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ DNA ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ

A. Τεμαχισμός μορίων DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Σε μία τυπική αντίδραση τεμαχισμού DNA, συγκέντρωσης 50-100ng/μl, χρησιμοποιήθηκαν 1-5 μονάδες ενδονουκλεάσης ανά 1 μg DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα όπου το ένζυμο παρουσίαζε την υψηλότερη ενεργότητα. Τα διαλύματα, οι μονάδες των ενζύμων, οι θερμοκρασίες των αντιδράσεων καθώς και οι δυνατοί συνδυασμοί ενδονουκλεασών, στην περίπτωση ταυτόχρονου τεμαχισμού DNA με δύο ενδονουκλεάσες, περιγράφονται στις οδηγίες των κατασκευαστριών εταιριών (New England Biolabs και Minotech).

B. Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Τα γραμμικά μόρια DNA μεταναστεύουν σε πήκτωμα αγαρόζης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου και με ταχύτητα ανάλογη του μεγέθους τους. Η πυκνότητα του πηκτώματος καθώς και η εφαρμοζόμενη τάση πεδίου (volts/cm πηκτώματος) καθορίζονται από τα μεγέθη των μορίων που θα διαχωριστούν (Sambrook et al., 1989). Τα διαλύματα ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 1X TBE (45mM Tris-borate, 2mM EDTA pH 8.0) ή 1X TAE (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA pH 8.0).

Γ. Απομόνωση και καθαρισμός γραμμικών μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Χρησιμοποιήθηκε είτε η μέθοδος ηλεκτροέκλουσης σε μεμβράνες διαπίδυσης, με επακόλουθες εκχυλίσεις με φαινόλη και χλωροφόρμιο (Sambrook et al., 1989) είτε το Qiaex II gel extraction kit της εταιρίας Qiagen (Cat. No. 20021).

Δ. Κατασκευή τυφλών (blunt) άκρων σε γραμμικά μόρια DNA με προεξέχοντα 5' άκρα

Η μέθοδος εφαρμόστηκε στην περίπτωση που τα γραμμοποιημένα μόρια του πλασμιδιακού φορέα και του ενθέματος που επρόκειτο να κλωνοποιηθεί είχαν προεξέχοντα μη συμπληρωματικά 5' άκρα με αποτέλεσμα να είναι αδύνατη η αντίδραση σύνδεσής τους (βλ. παρακάτω). Η κατασκευή τυφλών άκρων σε γραμμικά μόρια DNA

που έχουν προεξέχοντα 5' άκρα πραγματοποιείται με τη δράση του κλάσματος Klenow της DNA πολυμεράσης I (DNA Pol I) (Jacobsen et al., 1974, Joyce and Grindley, 1983). Χρησιμοποιήθηκε είτε η 5'→3' ενεργότητα πολυμερισμού (προσθήκη νουκλεοτιδίων στο υπολειπόμενο 3' άκρο, έχοντας ως μήτρα το προεξέχον 5' άκρο) είτε η 3'→5' ενεργότητα εξωνουκλεάσης του ενζύμου (υδρόλυση των νουκλεοτιδίων του 5' άκρου), σε συνθήκες που περιγράφονται αναλυτικά στους Sambrook et al., 1989.

E. Αντίδραση σύνδεσης γραμμικών μορίων DNA (ligation)

Η αντίδραση πραγματοποιείται με τη δράση της λιγάσης του DNA του βακτηριοφάγου T4 (T4 DNA ligase), η οποία καταλύει το σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της φωσφορικής ομάδας του 5' άκρου και της υδροξυλικής ομάδας του παρακείμενου 3' άκρου δίκλωνων μορίων DNA ή RNA. Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιείται η διαδικασία σύνδεσης ποικίλουν και εξαρτώνται από τα άκρα των γραμμικών μορίων DNA που πρόκειται να ενωθούν (συμπληρωματικά ή τυφλά άκρα), το μέγεθός τους και από το επιθυμητό προϊόν της αντίδρασης, όπως επανακυκλοποίηση γραμμικού μορίου, κατασκευή ανασυνδυασμένου πλασμιδίου ή δημιουργία γραμμικών ή κυκλικών πολυμερών (Sambrook et al., 1989). Οι αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν περιγράφονται συνοπτικά παρακάτω :

I) Επανακυκλοποίηση πλασμιδιακού φορέα : Επανακυκλοποιήθηκαν πλασμιδιακοί φορείς, μεγέθους 2.9-11.5 Kbp, σε συγκεντρώσεις που δεν ξεπερνούσαν τα 5ng/μl. Το διάλυμα της αντίδρασης [50mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM MgCl₂, 10mM dithiothreitol (DTT), 1mM ATP και 25μg/ml BSA] προερχόταν από την κατασκευάστρια εταιρία της λιγάσης. Η ποσότητα του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε κυμαινόταν από 0.2 Weiss units (T4 DNA ligase, 6 Weiss units/μl, New England Biolabs), στην περίπτωση πλασμιδίων με συμβατά προεξέχοντα άκρα, έως 2.0 Weiss units, στην περίπτωση που τα άκρα ήταν τυφλά. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 16°C για 10-14 ώρες.

II) Κατασκευή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων : Η συγκέντρωση του DNA (φορέα και ενθέματος συνολικά) στην αντίδραση ήταν 10-25ng/μl, ο τελικός όγκος αντίδρασης 10-20μl και η ελάχιστη ποσότητα φορέα 80ngr. Οι συνθήκες αποτελούσαν συνάρτηση του μεγέθους των μορίων και του είδους των άκρων τους. Στην περίπτωση που πλασμίδιο και ένθεμα είχαν συμβατά (συμπληρωματικά) προεξέχοντα άκρα, το καθένα χωριστά αλλά και μεταξύ τους (μη προσανατολισμένη κλωνοποίηση), η αναλογία μορίων πλασμιδίου/ενθέματος ήταν 1:3-5 (ανάλογα με τα μοριακά τους μεγέθη) και η ποσότητα της T4 DNA λιγάσης 0.2-1.0 Weiss units. Η θερμοκρασία αντίδρασης ήταν 16°C ή 25°C και ο χρόνος αντίδρασης 10-14 ώρες ή 3 ώρες, αντίστοιχα. Αν η κλωνοποίη-

ση του ενθέματος στο φορέα ήταν προσανατολισμένη, οι συνθήκες παρέμεναν οι ίδιες εκτός από την μοριακή αναλογία (1:1). Τέλος, στην περίπτωση που τα άκρα των μορίων ήταν τυφλά χρησιμοποιήθηκαν μοριακές αναλογίες φορέα/ενθέματος 1:3-10, ποσότητα T4 DNA λιγάσης 2-4 Weiss units, θερμοκρασία 16⁰C και χρόνος αντίδρασης 10-14 ώρες.

ΣΤ. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Ο μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων είναι απαραίτητος τόσο για τον πολλαπλασιασμό και την απομόνωση πλασμιδιακού DNA όσο και για την ανίχνευση ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών κατασκευών που προέρχονται από αντίδραση σύνδεσης. Οι πλασμιδιακοί φορείς διαθέτουν θέση έναρξης αντιγραφής (origin of replication) που επιτρέπει τον αναδιπλασιασμό τους στο βακτήριο. Επιπρόσθετα, φέρουν γονίδια που κωδικοποιούν παράγοντες που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά (π.χ. αμπικιλίνη, καναμυκίνη). Κατά συνέπεια, τα μετασχηματισμένα βακτήρια είναι τα μόνα που αναπτύσσονται σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό για το οποίο το πλασμίδιο προσφέρει ανθεκτικότητα. Ο μετασχηματισμός των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με θερμικό σοκ (Sambrook et al., 1989).

I) Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων (competent cells) : Κύτταρα *Escherichia coli* DH5a, που είχαν αναπτυχθεί στους 37⁰C σε 50 ml θρεπτικού μέσου LB και βρίσκονταν σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης ($OD_{595}=0.4-0.45$), φυγοκεντρώνταν στις 2.000 rpm στους 4⁰C για 5 λεπτά. Τα κύτταρα επαναιωρούνταν σε 20ml διαλύματος TFB1 (100mM RbCl₂, 50mM MnCl₂, 30mM CH₃COOK, 10mM CaCl₂, 15% γλυκερόλη, pH 5.80) και επωάζονταν στους 4⁰C για 20 λεπτά. Ακολουθούσε φυγοκέντρωση, επαναιώρηση σε 3 ml διαλύματος TFB2 (10mM MOPS, 10mM RbCl₂, 75mM CaCl₂, 15% γλυκερόλη, pH 7.00) και αποθήκευση, σε όγκους των 300μl, στους -80⁰C για 6-8 μήνες. Η απόδοση της μεθόδου, όσον αφορά τη δεκτικότητα των κυττάρων για μετασχηματισμό, κυμαινόταν από 4x10⁷-5x10⁸ μετασχηματισμένες βακτηριακές αποικίες ανά 1 μg πλασμιδιακού υπερελικωμένου DNA.

II) Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* : 300μl δεκτικών κυττάρων επωάζονταν για 30 λεπτά στους 4⁰C παρουσία του πλασμιδιακού DNA με το οποίο θα μετασχηματίζονταν. Ακολουθούσε θερμικό σοκ στους 42⁰C για 90 δευτερόλεπτα, επώαση 2 λεπτών στους 4⁰C και προσθήκη 800μl θρεπτικού μέσου LB. Τα κύτταρα επωάζονταν για 60 λεπτά στους 37⁰C και στη συνέχεια καλλιεργούνταν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε το κατάλληλο επιλεκτικό μέσο (αμπικιλίνη 10μg/ml) και αναπτύσσονταν στους 37⁰C για 14-16 ώρες. Στην περίπτωση που το μέσο επιλογής ήταν καναμυκίνη (30μg/ml) η διάρκεια της επώασης των κυττάρων, πριν καλλιεργηθούν στο στερεό θρεπτικό μέσο, αυξανόταν στις 3 ώρες.

Z. Ταυτοποίηση ανασυνδυσασμένων βακτηριακών κλώνων

Η ανίχνευση βακτηριακών αποικιών που είχαν μετασχηματιστεί με ανασυνδυσασμένα πλασμίδια, προϊόντα αντιδράσεων σύνδεσης, γινόταν με διάφορες μεθόδους που περιγράφονται συνοπτικά παρακάτω. Ακολουθούσε υγρή καλλιέργεια των επιλεγμένων κλώνων, εκχύλιση του πλασμιδιακού τους DNA και ανάλυση με ενδονουκλεάσες περιορισμού :

I) χρωματική επιλογή : βασίζεται στην ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης (αν παρέχεται από το φορέα, π.χ ρBluescript). Συγκεκριμένα, ο πλασμιδιακός φορέας περιέχει το γονίδιο αναφοράς *lacZ* του οποίου το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης διακόπτεται, χωρίς να καταστρέφεται, από τις θέσεις κλωνοποίησης ενθεμάτων (polylinker). Στα ανασυνδυσασμένα πλασμίδια το γονίδιο *lacZ* δεν κωδικοποιεί τη β-γαλακτοσιδάση και στις αντίστοιχες βακτηριακές αποικίες δεν πραγματοποιείται αντίδραση χρώσης σε θρεπτικό μέσο που περιέχει το υπόστρωμα X-gal.

II) Μεταφορά των βακτηριακών αποικιών σε μεμβράνες : Οι μετασχηματισμένες βακτηριακές αποικίες μεταφέρονται σε μεμβράνες υβριδοποίησης (Hybond-N⁺, AMERSHAM) οι οποίες τοποθετούνται στα τρυβλία για 2 λεπτά. Ακολουθεί απομάκρυνση των μεμβρανών, λύση των βακτηρίων σε 10% SDS για 5 λεπτά, αποδιάταξη του DNA (0.5N NaOH, 1.5M NaCl) για 5 λεπτά, εξουδετέρωση σε διάλυμα που περιέχει 0.5 M Tris-Cl pH 7.4 και 1.5 M NaCl, για 10 λεπτά και πλύσιμο σε 2X SSC για 5 λεπτά (Grunstein and Hogness, 1975). Το δεσμευμένο DNA μονιμοποιείται με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV cross-linking) και θέρμανση των μεμβρανών στους 80°C για 2 ώρες. Ακολουθούν πειράματα υβριδοποίησης με ραδιενεργά σημασμένο ανιχνευτή, που αναμένεται να υβριδοποιηθεί με το επιθυμητό ένθεμα και επιλογή των ανασυνδυσασμένων κλώνων.

3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

Για την απομόνωση μικρής ποσότητας πλασμιδιακού DNA (10-15μgr) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης κυττάρων (Sambrook et al., 1989) με ορισμένες τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, 3ml ολονύκτιας καλλιέργειας μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων φυγοκεντρώνταν και επαναιωρούνταν σε 200μl διαλύματος 25mM Tris-Cl pH 8.0, 10mM EDTA και 25mM glucose. Η λύση των βακτηρίων πραγματοποιείται με την προσθήκη 400μl διαλύματος 0.2M NaOH και 1% SDS, επώαση για 5 λεπτά στους 4°C και επακόλουθη προσθήκη 300 μl 3M CH₃COOK pH 5.5. Ακολουθεί επώαση 20 λεπτών στους 4°C και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στην ίδια θερμοκρασία. Το υπερκείμενο, εμπλουτισμένο σε νουκλεϊκά οξέα, επωάζεται με ριβονουκλεάση A (RNase

A), τελικής συγκέντρωσης 140ng/ml, στους 37°C για 30 λεπτά. Το πλασμιδιακό DNA εκχυλίζεται με φαινόλη και χλωροφόρμιο και κατακρημνίζεται με ίσο όγκο ισοπροπανόλης.

Στην περίπτωση απαίτησης πλασμιδιακού DNA πολύ υψηλής καθαρότητας, ιδιαίτερα σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυτταρικών σειρών και κατασκευής διαγονιδιακών στελεχών *Drosophila*, χρησιμοποιήθηκε μοριακή διήθηση με στήλες διαχωρισμού Qiagen. Κατά την μέθοδο αυτή το πλασμιδιακό DNA, που εμπεριέχεται στο υπερκείμενο αλκαλικής λύσης βακτηρίων, δεσμεύεται στη ρητίνη (ιονικής ανταλλαγής) της στήλης υπό συνθήκες χαμηλής ιονικότητας και pH. Οι πρωτεΐνες, οι μεταβολίτες και οι υπόλοιπες προσμίξεις εκλύονται με διάλυμα μεσαίας ιονικότητας ενώ το καθαρό πλασμιδιακό DNA εκλύεται σε διάλυμα 1.25M NaCl και κατακρημνίζεται με ισοπροπανόλη. Η μέθοδος περιγράφεται αναλυτικά στο αντίστοιχο πρωτόκολλο της εταιρίας.

4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΥ

Για την απομόνωση DNA σε μεγάλη κλίμακα οι βακτηριοφάγοι αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες. Αντίθετα, στην περίπτωση απομόνωσης μικρών ποσοτήτων DNA, χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες βακτηριοφάγων σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.

A. Απομόνωση DNA βακτηριοφάγου από υγρή καλλιέργεια

Ακολουθήθηκε η μέθοδος απομόνωσης με κλίσεις γλυκερόλης (Sambrook et al., 1989). Συγκεκριμένα, βακτηριακά στελέχη *Escherichia coli* NM522 (~ 2×10^{10} κύτταρα) επιμολύνθηκαν με βακτηριοφάγους (2×10^7 pfus) και καλλιεργήθηκαν σε 500ml υγρού θρεπτικού μέσου NZY στους 37°C έως ότου επιτευχθεί πλήρης βακτηριακή λύση (12-14 ώρες). Τα βακτηριακά νουκλεϊκά οξέα υδρολύθηκαν παρουσία δεοξυριβονουκλεάσης I και ριβονουκλεάσης A, σε τελικές συγκεντρώσεις 1mg/ml, στους 25°C για 30 λεπτά. Ο απόχωρισμός των φαγικών σωματιδίων από τα κυτταρικά τοιχώματα γινόταν παρουσία 1M NaCl στους 4°C για 1 ώρα. Οι βακτηριοφάγοι λαμβάνονταν στο υπερκείμενο ύστερα από φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm (4°C για 10 λεπτά) και κατακρημνίζονταν με προσθήκη 1M NaCl και 10% πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG, M.B. 8.000) και επώαση για 3 ώρες στους 4°C. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm στους 4°C για 10 λεπτά και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος PEG/φάγων σε 5-10ml διαλύματος TM (50mM Tris-Cl pH 7.8 και 10mM MgSO₄). Η πολυαιθυλενογλυκόλη απομακρυνόταν με την προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου, ισχυρή ανάδευση (vortex) για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση στους 4°C για 15 λεπτά. Οι φάγοι, που αιωρούνταν στην υδάτινη φάση, απομονώνονταν με υπερφυγοκέντρηση (κεφαλή Beckman SW41, 35.000rpm, 4°C για 60 λεπτά) σε κλίσεις

γλυκερόλης (3 ml και 4ml διαλύματος TM με τελική συγκέντρωση γλυκερόλης 40% και 5%, αντίστοιχα). Το βακτηριοφαγικό ίζημα επαναιωρούνταν σε 500 ml διαλύματος TM. Ακολουθούσε επίδραση με δεοξυριβονουκλεάση I (5μg/ml) και ριβονουκλεάση A (1μg/ml) στους 37°C για 30 λεπτά, επακόλουθη προσθήκη EDTA σε τελική συγκέντρωση 20mM και υδρόλυση των πρωτεϊνών παρουσία πρωτεϊνάσης K (τελική συγκέντρωση 50μg/ml) παρουσία 0.5% SDS στους 56°C για 1 ώρα. Το DNA των βακτηριοφάγων εκχυλιζόταν με φαινόλη και χλωροφόρμιο και κατακρημνιζόταν με 0.3M οξικό νάτριο και 2.5 όγκους αιθυλικής αλκοόλης. Είναι αξιοσημείωτο ότι η αποδοτικότητα της μεθόδου είναι τόσο υψηλή που δεν γινόταν φυγοκέντρηση για την απομόνωση του DNA αλλά αυτό συλλεγόταν με περιτύλιξη σε πιπέτα pasteur. Ακολουθούσε επαναδιαλυτοποίηση στον επιθυμητό όγκο διαλύματος TE pH 8.0.

B. Απομόνωση DNA βακτηριοφάγου από στερεή καλλιέργεια

Βακτηριακά στελέχη *Escherichia coli* NM522 επιμολύνονταν με βακτηριοφάγους σε αναλογία 1:1.000 (φάγοι/βακτήρια) και αναπτύσσονταν σε τρυβλία, διαμέτρου 10cm, με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Ακολουθούσε προσθήκη διαλύματος SM, ανακίνηση των τρυβλίων για 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, προσθήκη CHCl_3 τελικής συγκέντρωσης 0.15% και επώαση για 5 λεπτά στις ίδιες συνθήκες. Το φαγικό εναιώρημα συλλεγόταν και καθαριζόταν από τα βακτηριακά υπολείμματα με φυγοκέντρηση στις 5.000 rpm για 10 λεπτά. Τα βακτηριακά νουκλεϊκά οξέα υδρολύονταν παρουσία δεοξυριβονουκλεάσης I (3mg/ml) και ριβονουκλεάσης A (1mg/ml) στους 25°C για 30 λεπτά. Ακολουθούσε κατακρήμνιση παρουσία 1M NaCl και 10% πολυαιθυλενογλυκόλης (M.B. 8.000), υπό ανάδευση και επώαση για 1 ώρα στους 4°C, επακόλουθη φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm στους 4°C για 10 λεπτά και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος PEG και βακτηριοφάγων σε διάλυμα SM (1/20 του αρχικού όγκου). Η πολυαιθυλενογλυκόλη απομακρυνόταν με εκχύλιση με ίσο όγκο χλωροφορμίου και στη συνέχεια το φαγικό DNA απομονωνόταν με διαδοχικές εκχυλίσεις με φαινόλη και χλωροφόρμιο και κατακρημνιζόταν παρουσία 0.3M οξικού νατρίου και 2.5 όγκων αιθυλικής αλκοόλης.

5. ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΝΣΗ ΓΡΑΜΜΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ DNA

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ραδιοσήμανσης με τη χρήση τυχαίων εκκινητών (Feinberg and Vogelstein, 1983). Τα ραδιοσημασμένα μόρια που παράγονται έχουν υψηλή ειδική ενεργότητα ($> 2 \times 10^8$ cpm/μg DNA). Η μέθοδος βασίζεται στην παροδική αποδιάταξη γραμμικού δίκλωνου DNA (150-800bp) και την επακόλουθη σύνθεση συμπληρωματικών αλυσίδων από το κλάσμα Klenow της DNA πολυμεράσης I παρουσία τυχαίων εξαμερών-εκκινητών και ραδιενεργά σημασμένων νουκλεοτιδίων $\alpha^{[32\text{P}]}$ -dATP

και α^[32P]-dCTP. Συγκεκριμένα, 50-80ng DNA, σε μέγιστο όγκο 7.5μl διαλύματος TE pH 8.0, αποδιατάσσονταν στους 100°C για 3 λεπτά. Ακολουθούσε προσθήκη 11.4μl διαλύματος LS 2X (1M HEPES pH 6.6, διάλυμα DTM και διάλυμα OL, σε αναλογία 25:25:7, αντίστοιχα), 1μl BSA (αρχική συγκέντρωση 10mg/ml), 20μCi α^[32P]-dATP (2μl από α^[32P]-dATP ειδικής ενεργότητας 800Ci/mmol, Amersham), 20μCi α^[32P]-dCTP (2μl από α^[32P]-dCTP ειδικής ενεργότητας 800Ci/mmol, Amersham) και 5 units του κλάσματος Klenow (5u/μl, New England Biolabs). Η αντίδραση γινόταν στους 37°C για 3 ώρες ή στους 25°C για 12-14 ώρες και διακοπτόταν με προσθήκη EDTA τελικής συγκέντρωσης 10mM. Τα ραδιοσημασμένα μόρια αφαλατώνονταν και καθαρίζονταν από την περίσσεια μη ενσωματωμένων ραδιενεργών νουκλεοτιδίων με μοριακή διήθηση από στήλη Sephadex G-50 (Pharmacia), όγκου 1 ml, αφού προηγουμένως ο όγκος της αντίδρασης είχε αυξηθεί στα 100μl με την προσθήκη διαλύματος TE pH 8.0. Η ειδική ενεργότητα των ραδιοσημασμένων προϊόντων υπολογιζόταν με μέτρηση των ραδιενεργών κρούσεων του 1/100 της αντίδρασης, το οποίο είχε κατακρημνιστεί παρουσία 10% τριχλωροξικού οξέως (TCA). Οι μετρήσεις πραγματοποιούνταν σε μετρητή σπινθηρισμού (Liquid Scintillation Counter LS 1701, Beckman) και ακολουθούσε αναγωγή των μετρήσεων στους αντίστοιχους όγκους της αντίδρασης και επακόλουθα στο 1μg DNA (Sambrook et al., 1989).

Πίνακας 1. Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση ραδιοσήμανσης με τη μέθοδο των τυχαίων εκκινήτων

Διάλυμα DTM	Διάλυμα OL	Ρυθμιστικό διάλυμα LS (2X)
250 mM Tris-Cl pH 8.0 25mM MgCl ₂ 50mM β-μερκαπτο-αιθανόλη 100μM dGTP 100μM dTTP	1mM Tris-Cl pH 7.5 1mM EDTA 90uOD/ml τυχαία εξανουκλεοτίδια [pd(N)6, Pharmacia, cat. N. 27-2166-01]	1M HEPES pH 6.6 Διάλυμα DTM Διάλυμα OL Αναλογία 25:25:7, αντίστοιχα

6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν ραδιενεργά σημασμένοι ανιχνευτές υψηλής ειδικής ενεργότητας (>2x10⁸cpm/μg DNA) οι οποίοι είχαν παρασκευαστεί με αντίδραση ραδιοσήμανσης με τυχαίους εκκινήτες. Στο διάλυμα υβριδοποίησης η τελική συγκέντρωση ραδιενεργών κρούσεων ήταν 1-1.5x10⁶cpm/ml.

A. Πειράματα υβριδοποίησης με τη μέθοδο Denhardt's

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε στη διερεύνηση βακτηριοφαγικής βιβλιοθήκης cDNA. Συγκεκριμένα, οι μεμβράνες που έφεραν ακινητοποιημένα τα νουκλεικά οξέα των βακτηριοφάγων επώαστηκαν σε διάλυμα 0.3X SSC και 0.1% SDS στους 65°C για 30 λεπτά και προϋβριδοποιήθηκαν σε διάλυμα υβριδοποίησης [3X SSC, 0.1% SDS και 10X

Denhardt's (0.2% Ficoll, 0.2% BSA Fraction V, 0.2% Polyvinyl pyrrolidone)] στους 65°C για 30 λεπτά. Ακολούθησε προσθήκη του ραδιενεργά σημασμένου ανιχνευτή αφού είχε προηγηθεί αποδιάταξή του στους 100°C για 3 λεπτά. Η υβριδοποίηση πραγματοποιήθηκε στους 65°C για 16-18 ώρες. Τα μη ειδικά προσδεδεμένα ραδιοσημασμένα μόρια απομακρύνθηκαν με διαδοχικές πλύσεις των μεμβρανών στους 65°C σε περίσσεια διαλυμάτων 3X SSX, 0.1% SDS (2 φορές για 20 λεπτά), 0.3X SSC, 0.1% SDS (2 φορές για 20 λεπτά) και 0.1X SSC, 0.1% SDS (2 φορές για 20 λεπτά).

B. Υβριδοποίηση με τη μέθοδο των Church και Gilbert (Church and Gilbert, 1984)

Οι υβριδοποιήσεις πραγματοποιήθηκαν στους 65°C για 16-18 ώρες σε διάλυμα που περιείχε 0.5M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7.2, 1mM EDTA, 7% SDS και 1% BSA Fraction V. Τα μη ειδικά προσδεδεμένα ραδιοσημασμένα μόρια απομακρύνονταν με πλύσεις των μεμβρανών στους 65°C σε περίσσεια διαλύματος 5% SDS, 40mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7.2 και 1mM EDTA (3 φορές για 20-30 λεπτά).

7. ANALΥΣΗ DNA KATA SOUTHERN

Η μέθοδος βασίζεται στη μεταφορά νουκλεϊκών οξέων, τα οποία έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά σε πηκτή αγαρόζης, σε μεμβράνες με τη βοήθεια τριχοειδών φαινομένων (Southern, 1975). Ο ρυθμός μεταφοράς εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων DNA και από την πυκνότητα της πηκτής αγαρόζης. Τα μόρια μικρού μεγέθους (μικρότερα από 1kb) μεταφέρονται εύκολα σε 1-2 ώρες ενώ μεγαλύτερα μόρια καθυστερούν περισσότερο. Επιπρόσθετα, η μετακίνησή τους παρεμποδίζεται με το πέρασμα του χρόνου και από την αφυδάτωση της πηκτής. Για αυτό το λόγο πριν τη μεταφορά τους πραγματοποιείται αποδιάταξή σε αλκαλικό περιβάλλον. Στην περίπτωση τεμαχίων DNA που το μέγεθός τους ξεπερνά τα 15kb ο χρόνος μεταφοράς αυξάνεται σημαντικά (περισσότερο από 15 ώρες) και είναι δυνατόν να μεταφερθεί τελικά ένα πολύ μικρό ποσοστό μορίων. Το πρόβλημα λύνεται με τεμαχισμό τους με μερική αποπουρίνωση, πριν την αποδιάταξη, σε ασθενές όξινο περιβάλλον (Wahl et al. 1972, Meinkoth and Wahl 1984). Την μεταφορά των νουκλεϊκών οξέων στη μεμβράνη ακολουθούν πειράματα υβριδοποίησης με ραδιοσημασμένους ανιχνευτές και αυτοραδιογραφία.

Συνοπτικά, τα διαχωρισμένα τεμαχισμένα μόρια DNA αποδιάσσονταν με τοποθέτηση της πηκτής αγαρόζης σε διάλυμα 0.75M NaCl και 0.25M NaOH, 2 φορές για 40 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούσε εξουδετέρωση σε διάλυμα 0.5M Tris-Cl pH 7.4 και 0.75M NaCl στις ίδιες συνθήκες. Στην περίπτωση που τα τεμάχια DNA που επρόκειτο να μελετηθούν είχαν μέγεθος μεγαλύτερο από 15kb, πριν την αποδιάταξη

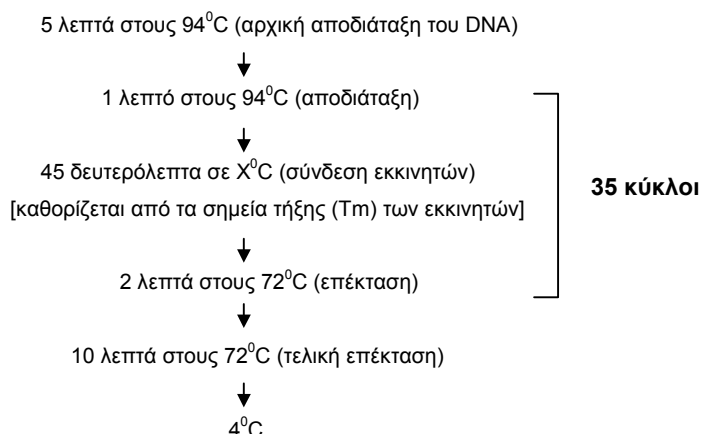
γινόταν αποπουρίνωση σε διάλυμα 0.2N HCl για 5-7 λεπτά. Τα νουκλεϊκά οξέα μεταφέρονταν σε μεμβράνες (HybondTM-NX, Amersham) χρησιμοποιώντας σαν διάλυμα μεταφοράς 2X SSC. Η μονιμοποίηση του δεσμευμένου DNA γινόταν με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV cross-linking) και θέρμανση των μεμβρανών στους 80 °C για 2 ώρες, σύμφωνα με τους Sambrook et al., 1989. Ακολουθούσαν πειράματα υβριδοποίησης και αυτοραδιογραφίας.

8. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR: POLYMERASE CHAIN REACTION)

Με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επιτυγχάνεται πολλαπλασιασμός περιοχών του DNA οι οποίες οριοθετούνται από δύο , μικρές συνήθως, μοναδιαίες αλληλουχίες που ανήκουν σε συμπληρωματικές αλυσίδες και με βάση τις οποίες κατασκευάζονται πανομοιότυπα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιούνται σαν εκκινητές (Mullis et al., 1987). Η σωστή επιλογή των εκκινητών αποτελεί βασική προϋπόθεση για την επιτυχία της αντίδρασης (Lowe et al., 1990). Για τον πολλαπλασιασμό του DNA απαιτείται μία σειρά επαναλαμβανόμενων κύκλων που περιλαμβάνουν αποδιάταξη των νουκλεϊκών οξέων (στους 94°C), επανασύνδεση των εκκινητών στις κατάλληλες συμπληρωματικές θέσεις (σε θερμοκρασία που καθορίζεται από τα σημεία τήξης των εκκινητών) και επακόλουθη ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων (στους 72°C) με την ενζυμική δράση της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης Taq (πολυμεράση του DNA του μικροοργανισμού *Thermus aquaticus*). Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε αυτόματους θερμικούς κυκλοποιητές. Η δυνατότητα πολλαπλασιασμού αμελητέας ποσότητας DNA, η ταχύτητα, η ευκολία καθώς και η πληθώρα εφαρμογών της αντίδρασης αποτελούν βασικό της πλεονέκτημα έναντι άλλων συμβατικών μεθόδων ανάλυσης νουκλεϊκών οξέων (Innis et al., 1990, Gibs, 1991).

Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε κυρίως για την κατασκευή και τον πολλαπλασιασμό δίκλωνων μορίων cDNA που προήλθαν από πειράματα αντίστροφης μεταγραφής, προκειμένου να αναλυθεί το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *Neurl*. Επιπρόσθετα, έγινε χρήση της αντίδρασης σε πειράματα προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μορίων DNA. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν επιλέχθηκαν με ιδιαίτερη προσοχή. Συγκεκριμένα, το μέγεθος των εκκινητών κυμαινόταν από 17-24 νουκλεοτίδια, τα ζεύγη των εκκινητών είχαν παραπλήσια σημεία τήξης, το περιεχόμενο σε G+C ήταν 40-60% και υπήρχε G ή C στο 3' άκρο. Επιπρόσθετα, γινόταν εκτεταμένη διερεύνηση της πιθανότητας ανάπτυξης ισχυρών δεσμών με άλλους εκκινητές, με μη ειδικές περιοχές του DNA καθώς και με τον εαυτό τους, χρησιμοποιώντας τα υπολογιστικά προγράμματα *DNA OligoAnalyzer version 2-2.5* (<http://www.idtdna.com/program/main/home.asp>) και *BEST*

FIT (GCG Winsconsin Package, Accelrys). Μία τυπική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είχε ως εξής :



Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνταν 10-20ng DNA , 25pmoles από κάθε εκκινητή (~100 ng εκκινητή ανά αντίδραση), δεοξυνουκλεοτίδια (Promega, Cat. No. U1240), το καθένα σε τελική συγκέντρωση 0.25mM και 2 units πολυμεράσης Taq (Roche, 5u/μl). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης Taq (100mM Tris-Cl pH 8.3, 100mM MgCl₂, 100mM KCl, 0.1% gelatin και 100μg/ml BSA), τελικού όγκου 25μl. Οι αυτόματοι θερμοκοί κυκλοποιητές ήταν των εταιριών Cetus-Perkin Elmer® (Thermal cycler 460) και Biometra® (UNO II Thermocycler). Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, οι θερμοκρασίες σύνδεσής τους καθώς και οι διαφοροποιημένες συνθήκες, στην περίπτωση πειραμάτων ανάλυσης γονιδιακής έκφρασης και προσδιορισμών νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, αναφέρονται λεπτομερώς σε επόμενα κεφάλαια.

9. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΜΟΡΙΩΝ DNA

Εφαρμόστηκαν διάφορες προσεγγίσεις οι οποίες βασίζονται στη μέθοδο τερματισμού της επιμήκυνσης της αλυσίδας του DNA μέσω της ενσωμάτωσης τριφωσφορικών δι-δεοξυνουκλεοτιδίων (dideoxy chain termination method) (Sanger et al., 1977). Προσδιορίστηκε η νουκλεοτιδική σύσταση ενθεμάτων σε υπερελικωμένους πλασμιδιακούς φορείς, γραμμικών ενθεμάτων που είχαν απομονωθεί ύστερα από πέψεις με περιοριστικά ένζυμα καθώς και προϊόντων που προήλθαν από αντιδράσεις PCR.

A. Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με τη δράση του ενζύμου Sequenase

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με τη δράση του ενζύμου Sequenase (USB) (τροποποιημένη πολυμεράση DNA του βακτηριοφάγου T7). Η σήμανση των μορίων έγινε με α[³²P]-dATP ή α[³⁵S]-dATP και σαν μήτρα χρησιμοποιήθηκαν είτε υπερελικωμένο

πλασμιδιακό DNA είτε γραμμικό DNA, προϊόν πέψης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες ή αντίδρασης PCR. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές ευρείας χρήσης (T7, T3, M13F, M13R) καθώς και ολιγονουκλεοτίδια (17-22bp) που είχαν κατασκευαστεί με βάση γνωστές αλληλουχίες των υπό μελέτη γονιδίων *Neur1* και *neur*. Οι συνθήκες των αντιδράσεων καθώς και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται λεπτομερώς στο σχετικό εγχειρίδιο της προμηθεύτριας εταιρίας (Sequenase[®] Version 2.0 DNA Sequencing Kit, USB, Cat. No. 70770).

B. Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με αντίδραση PCR

Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας επιτυγχάνεται με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης στην οποία χρησιμοποιείται ένας μόνο εκκινητής και η επιμήκυνση της αλυσίδας του DNA από την πολυμεράση Taq τερματίζεται με την ενσωμάτωση τριφωσφορικών δι-δεοξυνουκλεοτιδίων. Η μέθοδος εφαρμόστηκε στην περίπτωση ανίχνευσης της αλληλουχίας δίκλωνων μορίων cDNA τα οποία είχαν παραχθεί και πολλαπλασιαστεί με πειράματα RT-PCR. Για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας χρησιμοποιήθηκαν 1-2μg δίκλωνου cDNA και η σήμανση των μορίων έγινε με α[³²P]-dATP. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με τη δράση τροποποιημένης πολυμεράσης Taq (Sequencing Grade Taq DNA Polymerase, Promega). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και η συνθήκες των αντιδράσεων αναγράφονται στον Πίνακα 2 :

Πίνακας 2. Οι εκκινητές και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα προσδιορισμού νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με PCR.

Εκκινητής (5'→3')	Αρχική αποδιάταξη DNA	30 κύκλοι		
		Αποδιάταξη	Σύνδεση εκκινητή	επέκταση
CAA TGC TTC TGC TTG TGA TGG (R2)	95°C 2 λεπτά	95°C 30 δευτερόλεπτά	57°C 30 δευτερόλεπτα	70°C 1 λεπτό
GAT GGA GTC TTT GAG GTT CTG G (R1)			61°C 30 δευτερόλεπτα	
GCA GCT CCT GCC CGG CCT (F1)			61°C 30 δευτερόλεπτα	

Τα υλικά, οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων και των συστατικών της αντίδρασης καθώς και όλες οι απαραίτητες πληροφορίες περιγράφονται αναλυτικά στο αντίστοιχο εγχειρίδιο (*fmo*[®]DNA Sequencing System, Promega).

Γ. Αυτοματοποιημένη διαδικασία προσδιορισμού νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας επιτυγχάνεται με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με τη διαφορά ότι τα προϊόντα δε σημαίνονται ραδιενεργά αλλά

με φθορίζουσες ουσίες. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση τριφωσφορικών δι-δεοξυ-νουκλεοτιδίων που είναι σημασμένα με διαφορετική φθορίζουσα ουσία (Dye Terminator Cycle Sequencing). Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης, ταυτόχρονη σάρωση από ακτίνα laser και παράλληλη ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε κατάλληλο υπολογιστικό πρόγραμμα. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του FS Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, Norwalk, CT), ηλεκτροφορήθηκαν σε αυτόματο αναλυτή τύπου ABI 373 Stretch Sequencer (Perkin Elmer, Norwalk, CT) και αναλύθηκαν με τη χρήση του προγράμματος ABI PRISM™, Model version 2.1.1.

Σε όλες τις περιπτώσεις τα προϊόντα των αντιδράσεων ηλεκτροφορήθηκαν σε αποδιατακτικές πηκτές ουρίας-πολυακρυλαμίδης [6% ακρυλαμίδη : δις ακρυλαμίδη (38:2) και 8M ουρίας (σε διάλυμα 1X TBE)] υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου σταθερής ισχύος 80Watt χρησιμοποιώντας διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TBE. Εκτός από την αυτοματοποιημένη διαδικασία προσδιορισμού νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, οι πηκτές μετά την ηλεκτροφόρηση μεταφέρονταν σε χαρτί διήθησης (Whatman 3mm), στεγνώνονταν με θέρμανση σε κενό αέρος (BioRad Gel Dryer, Model 586) και ακολουθούσε αυτοραδιογραφία και ανάγνωση της νουκλεοτιδικής σύστασης των αλληλουχιών DNA.

10. ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA ΑΠΟ ΙΣΤΟΥΣ

Για την εκχύλιση ολικού RNA από ιστούς χρησιμοποιήθηκε ισοθειοκυανική γουανιδίνη και εφαρμόστηκε η “μέθοδος απομόνωσης RNA σε ένα βήμα” (Chomczynski and Sacchi, 1987) με ορισμένες τροποποιήσεις. Η μέθοδος αυτή προσφέρει τη δυνατότητα εκχύλισης μεγάλης ποσότητας RNA υψηλής καθαρότητας σε μικρό χρονικό διάστημα. Επιπρόσθετα, η υψηλή αποδοτικότητα της μεθόδου καθιστά δυνατή την απομόνωση ριβονουκλεϊκών οξέων από μικρές ποσότητες ιστών ή κυττάρων, επιτρέποντας ακόμα και την ανάλυση των προτύπων γονιδιακής έκφρασης σε περιπτώσεις που είναι διαθέσιμες ελάχιστες ποσότητες βιολογικού υλικού. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση RNA από ιστούς και όργανα εμβρύων και ενηλίκων ατόμων ποντικού. Ακολούθησε απομόνωση του πολυαδενυλιωμένου RNA [poly(A)⁺RNA], το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα αντίστροφης μεταγραφής.

Αναλυτικά, οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν μηχανικά σε σύριγγα 1ml και σε διάλυμα αποδιάταξης (4M ισοθειοκυανική γουανιδίνη, 25mM κιτρικό νάτριο, 0.5% Sarcosyl και 0.1M 2-μερκαπτο-αιθανόλη), ο όγκος του οποίου κυμαινόταν ανάλογα με την μάζα του ιστού. Συγκεκριμένα, ο όγκος αυξανόταν μέχρις ότου το εναιώρημα να μην είναι ιξώδες και να είναι εφικτή η πλήρης ομογενοποίηση του ιστού (να διέρχεται με ευκολία μέσα από τη βελόνα της σύριγγας). Ακολούθως προσθέτονταν, CH₃COONa pH 4.0 σε τελική

συγκέντρωση 0.2M, όξινη φαινόλη ίσου όγκου με το ομογενοποίηση και ακολουθούσε ισχυρή ανάδευση (vortex) για 1-2 λεπτά. Στη συνέχεια, γινόταν προσθήκη μίγματος χλωροφορμίου και ισοαμλικής αλκοόλης (24:1), όγκου ίσου με το 1/5 του ομογενοποίησης, το δείγμα αναδευόταν ισχυρά και επωαζόταν στους 4°C για 15 λεπτά. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 14.000rpm για 10 λεπτά, συλλογή της υδάτινης φάσης (εκχυλισμένο RNA), εκχυλίσεις με ουδέτερη φαινόλη και χλωροφόρμιο στις ίδιες συνθήκες και τελική κατακρήμνιση του RNA με 2.5 όγκους αιθυλικής αλκοόλης ή ίσο όγκο ισοπροπανόλης. Η απομόνωση poly(A)⁺RNA επιτεύχθηκε με χρωματογραφία συγγένειας, με τη χρήση σφαιριδίων κυτταρίνης προσδεδωμένων με ολιγονουκλεοτίδια θυμίνης [oligo(dT)-cellulose, Pharmacia] (Edmonds et al., 1971, Avin et al., 1972), όπως περιγράφεται αναλυτικά από τους Sambrook et al., 1989 και ακολουθήθηκε χωρίς τροποποιήσεις.

11. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ (REVERSE TRANSCRIPTION)

Στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής πολυαδενυλιωμένα μόρια RNA χρησιμοποιούνται σαν μήτρα για την κατασκευή συμπληρωματικών μονόκλωνων μορίων DNA (μονόκλωνο cDNA). Αυτό επιτυγχάνεται με την ενζυμική δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase), η οποία ενσωματώνει δεοξινουκλεοτίδια στο 3' άκρο ενός εκκινητή που έχει προσδεθεί στην συμπληρωματική του αλληλουχία στο RNA. Η κατασκευή της συμπληρωματικής αλυσίδας των μονόκλωνων μορίων cDNA πραγματοποιείται με την δράση του ενζύμου DNA πολυμεράση I. Εκτός από την παρασκευή βιβλιοθηκών cDNA η μέθοδος έχει αρχίσει να βρίσκει μεγάλη εφαρμογή σε πειράματα ανίχνευσης του προτύπου έκφρασης γονιδίων. Συγκεκριμένα, απομονώνεται RNA από διάφορους ιστούς και ακολουθεί αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιώντας, συνήθως, μη ειδικούς εκκινητές, όπως τυχαία εξαμερή ή ολιγονουκλεοτίδια από θυμίνη (oligo-dT primers). Η ανίχνευση και ταυτοποίηση ενός μεταγράφου γίνεται με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, χρησιμοποιώντας ως μήτρα τα προϊόντα της αντίστροφης μεταγραφής και εκκινητές ειδικούς για το υπό μελέτη γονίδιο. Με τον τρόπο αυτό κατασκευάζεται και πολλαπλασιάζεται μόνο το αντίστοιχο δίκλωνο cDNA. Η αποδοτικότητα της μεθόδου ενισχύεται αν χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής εκκινητής ειδικός για το υπό μελέτη μετάγραφο.

Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια πειραμάτων ανίχνευσης της έκφρασης του γονιδίου *Neurl* καθώς και στην προσπάθεια προσδιορισμού του 5' άκρου της μεταφραζόμενης αλληλουχίας του. Τα δείγματα RNA είχαν απομονωθεί από διάφορους ιστούς και όργανα εμβρύων και ενηλίκων ατόμων ποντικού και η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιήθηκε με τη χρήση εκκινητή ειδικού για το υπό μελέτη γονίδιο.

A. Πέψη με δεοξυριβονουκλεάση I

Προκειμένου να απαλειφθεί η πιθανότητα “μόλυνσης” των εκχυλισμάτων RNA με DNA πραγματοποιήθηκε αρχικά επίδραση με δεοξυριβονουκλεάση I. Συγκεκριμένα, εκχυλίσματα που περιείχαν 1μg poly(A)⁺RNA επωάζονταν με 20 units δεοξυριβονουκλεάσης I (DNase I, RNase free, 20u/μl, Boehringer Mannheim) παρουσία 40 units αναστολέα ριβονουκλεασών (RNasin, 40u/μl, Promega). Η πέψης πραγματοποιούνταν σε ρυθμιστικό διάλυμα για DNase I (200mM Tris-Cl pH 8.0, 50mM NaCl και 30mM MgCl₂), τελικού όγκου 130 μl και σε θερμοκρασία 37°C για 1 ώρα. Ακολουθούσε εκχύλιση του RNA με φαινόλη και χλωροφόρμιο, κατακρήμνιση με 3.5 όγκους μίγματος αιθυλικής αλκοόλης και οξικού αμμωνίου 7.5M (αναλογία μίγματος 6:1) και επαναδιαλυτοποίηση σε 20μl H₂O παρουσία 40 units RNasin.

B. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Όλα τα εκχυλίσματα poly(A)⁺RNA που χρησιμοποιήθηκαν είχαν υποστεί πέψη με δεοξυριβονουκλεάση I, σύμφωνα με τη διαδικασία που προαναφέρθηκε. Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκε 1μg poly(A)⁺RNA και 500ng εκκινητή, ο οποίος ήταν ειδικός για το μετάγραφο του γονιδίου *Neurl*. Αρχικά, το μίγμα RNA και εκκινητή θερμαινόταν στους 65°C για 10 λεπτά. Ακολουθούσε προσθήκη δεοξυνουκλεοτιδίων, τελικής συγκέντρωσης 0.5mM το καθένα, 20 units RNasin και 200 units αντίστροφης μεταγραφάσης [M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase), 200u/μl, Promega]. Η αντίδραση γινόταν στους 37°C, για 4 ώρες, σε ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφάσης 1X (5X M-MLV RT reaction buffer : 200mM Tris-Cl pH 8.3, 375mM KCl, 15mM Mg₂Cl και 50mM DTT, Promega) τελικού όγκου 40μl. Για να επιτευχθεί η υψηλότερη δυνατή απόδοση, η αντίδραση διακοπτόταν στις 2 ώρες, ακολουθούσε αποδιάταξη των μορίων στους 65°C για 5 λεπτά, προσθήκη 200 επιπλέον units αντίστροφης μεταγραφάσης και επώαση για άλλες 2 ώρες στους 37°C. Μετά το τέλος της αντίδρασης γινόταν τεμαχισμός των ριβονουκλεϊκών αλυσίδων των υβριδίων DNA-RNA με τη χρήση 15 units ριβονουκλεάσης H (RNase H, 15u/μl, Promega) στους 37°C για 30 λεπτά. Τα προϊόντα της αντίδρασης αφαλατώνονταν και καθαρίζονταν από την περίσσεια μη ενσωματωμένων νουκλεοτιδίων με μοριακή διήθηση από στήλη Sephadex G-50 (Pharmacia), όγκου 1 ml, αφού προηγουμένως ο όγκος της αντίδρασης έχει αυξηθεί στα 100μl με την προσθήκη H₂O. Η ανίχνευση του μεταγράφου στους ιστούς που μελετήθηκαν γινόταν με αντίδραση PCR, χρησιμοποιώντας σαν μήτρα το 1/3-1/2 της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αναφέρονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Οι εκκινητές και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αντίστροφης μεταγραφής και PCR.

ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ								
Εκκινητής (5'→3') (R3)		GAC TCC CTG GTA ATT GTG (R3)						
ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ								
			35 κύκλοι					
	Εκκινητής (5'→3')	Αρχική αποδιάταξη	Αποδιάταξη	Σύνδεση εκκινητή	Επέκταση	Τελική επέκταση		
1 ^ο ζεύγος	CAA TGC TTC TGC TTG TGA TGG (R2)	95 ^ο C 5 λεπτά	95 ^ο C 1 λεπτό	61 ^ο C 45 δευτερόλεπτα	72 ^ο C 2 λεπτά	72 ^ο C 10 λεπτά		
	GCA GCT CCT GCC CGG CCT (F1)							
2 ^ο ζεύγος	GCA CCA TTT GCT ATG AAC AC (F3)						57 ^ο C 45 δευτερόλεπτα	
	GAC TCC CTG GTA ATT GTG (R3)							

12. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗΣ *in situ* ΣΕ ΕΜΒΡΥΑ ΠΟΝΤΙΚΟΥ

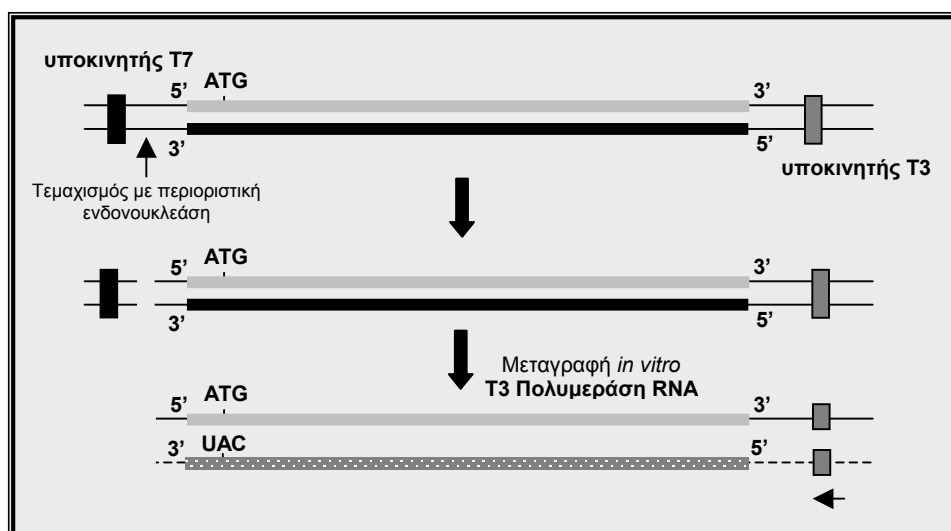
Πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε ολόκληρα έμβρυα και τομές εμβρύων ποντικού, αναπτυξιακών σταδίων-ημερών E8.0-E18.5. Στην πλειονότητα των πειραμάτων η ανίχνευση των μεταγράφων του γονιδίου έγινε με τη χρήση σημασμένου με διγοξυγενίνη (DIG) RNA, το οποίο ήταν συμπληρωματικό του ενδογενούς μεταγράφου και είχε κατασκευαστεί με αντίδραση μεταγραφής *in vitro*. Οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν με βάση τα πρωτόκολλα των Henrique et al., 1995, Mitsiadis et al., 1995 και Myat et al., 1996, με ορισμένες τροποποιήσεις.

A. Αντίδραση μεταγραφής *in vitro* : Κατασκευή ανιχνευτή RNA σημασμένου με διγοξυγενίνη

Η αντίδραση μεταγραφής *in vitro* βασίζεται στην ενζυμική δράση πολυμεράσης η οποία αναγνωρίζει ειδικά έναν υποκινητή και συνθέτει RNA, έχοντας ως μήτρα τη μία από τις αλυσίδες δίκλωνου DNA. Ο ανιχνευτής RNA που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των ενδογενών μεταγράφων στα πειράματα υβριδοποίησης *in situ* είναι συμπληρωματικός του ενδογενούς mRNA που πρόκειται να μελετηθεί (anti-sense probe). Προκειμένου να κατασκευαστεί ο ανιχνευτής RNA για τη μελέτη της έκφρασης ενός γονιδίου, του οποίου το cDNA έχει απομονωθεί και κλωνοποιηθεί σε πλασμιδιακό φορέα, συμβαίνουν τα εξής : αρχικά πραγματοποιείται γραμμοποίηση του ανασυνδυασμένου φορέα με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και σε σημείο πλησίον του 5' άκρου της αλυσίδας του ενθέματος cDNA που είναι ταυτόσημη με το ενδογενές μετάγραφο (sense strand). Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται μόνο η μεταγραφή του cDNA και όχι επιπρόσθετων αλληλουχιών του φορέα, οι οποίες πιθανόν να δημιουργήσουν "θόρυβο" στα πειράματα υβριδοποίησης. Η

μεταγραφή ξεκινά από τον κατάλληλο υποκινητή του πλασμιδίου (T3, T7 ή SP6) με τη χρήση πολυμεράσης ειδικής για τη συγκεκριμένη αλληλουχία και συντίθεται RNA με μήτρα την αλυσίδα του cDNA που είναι όμοια με το mRNA του γονιδίου (Εικ. 9).

Τα ενθέματα cDNA του γονιδίου *Neur1* που επρόκειτο να μεταγραφούν ήταν κλωνοποιημένα στον φορέα pBlueScript® KS II +. Το ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό DNA γραμμοποιήθηκε με το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο, ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αгарόζης και απομονώθηκε με τη χρήση του Qiaex II gel extraction kit της εταιρίας Qiagen. Σε κάθε αντίδραση μεταγραφής χρησιμοποιήθηκαν 1μg γραμμοποιημένου DNA, μίγμα σήμανσης DIG RNA 1X (10X DIG RNA labeling mix : 10mM ATP, 10mM CTP, 10mM GTP, 6.5mM UTP, 3.5mM DIG-11-UTP, pH 7.5, Boehringer Mannheim, Cat. No. 1277073), 40 units αναστολέα ριβονουκλεασών (RNasin, 40u/μl, Promega) και 40 units



Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση της κατασκευής ανιχνευτή RNA με αντίδραση μεταγραφής *in vitro*. Ο ανασυνδυασμένος πλασμιδιακός φορέας γραμμοποιείται, με πέψη με ενδονουκλεάση περιορισμού, σε σημείο κοντά στο 5' άκρο της αλυσίδας του cDNA η οποία είναι ταυτόσημη με το μετάγραφο του γονιδίου (γκρι ράβδος). Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται μεταγραφή με δράση της T3 πολυμεράσης RNA και συνεπώς κατασκευή ριβονουκλεοτιδικής αλυσίδας συμπληρωματικής του ενδογενούς μεταγράφου (anti-sense probe) (στικτή ράβδος). Για τον έλεγχο του "θορύβου" των πειραμάτων υβριδοποίησης *in situ* παρασκευάζεται ανιχνευτής ταυτόσημος με το ενδογενές mRNA. Σε αυτήν την περίπτωση η γραμμοποίηση του πλασμιδιακού φορέα πραγματοποιείται με πέψη σε σημείο πλησίον του 5' άκρου της αλυσίδας που είναι συμπληρωματική του γονιδιακού μεταγράφου (μαύρη ράβδος). Η αντίδραση μεταγραφής πραγματοποιείται με τη χρήση T7 πολυμεράσης RNA.

T3 ή T7 πολυμεράσης RNA (20u/μl, Promega). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταγραφής (40mM Tris-Cl pH 7.9, 6mM Mg₂Cl, 10mM DTT, 10mM NaCl και 1mM σπερμιδίνη) τελικού όγκου 20 μl και σε θερμοκρασία 37°C για 2 ώρες. Στη συνέχεια, γινόταν πέψη του DNA παρουσία 20 units DNase I (DNase I, RNase free, 20u/μl, Boehringer Mannheim) στους 37°C για 15 λεπτά και η οποία σταματούσε με προσθήκη EDTA pH 8.0 τελικής συγκέντρωσης 25mM. Το RNA κατακρημνιζόταν με την προσθήκη 75μl αιθυλικής αλκοόλης και 2.5 μl 4M LiCl (τελική συγκέντρωση 100mM) στους -20°C για τουλάχιστον 2 ώρες. Ακολουθούσε επαναδιαλυτοποίηση σε 100μl H₂O ή

διαλύματος TE pH 8.0. Ο έλεγχος της ποσότητας και της ποιότητας του RNA γινόταν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης πυκνότητας 1.2%.

B. Πειράματα υβριδοποίησης *in situ* σε ολόκληρα έμβρυα ποντικού (whole mount *in situ*)

I) Μονιμοποίηση και επεξεργασία των εμβρύων : Τα έμβρυα αφαιρούνταν από τη μήτρα του θηλυκού ποντικού, σε 1X PBS (40mM Na₂HPO₄, 5mM NaH₂PO₄ και 150mM NaCl) σε πάγο, και μονιμοποιούνταν σε διάλυμα 4% παραφορμαλεύδης (PFA) σε 1X PBS στους 4⁰C για 12-24 ώρες, ανάλογα με την ηλικία τους. Η PFA απομακρυνόταν με 3-4 δεκάλεπτα πλυσίματα με διάλυμα 1X PBT (1X PBS και 0.1% Tween-20) στους 4⁰C και ακολουθούσε σταδιακή αφυδάτωση των εμβρύων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις μεθανόλης (25%, 50%, 75% και 100% σε 1X PBT), ανά 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (τα έμβρυα είναι δυνατόν να διατηρηθούν σε 100% μεθανόλη, στους -20⁰C, για μεγάλο χρονικό διάστημα). Στη συνέχεια, γινόταν προσθήκη H₂O₂, σε τελική συγκέντρωση 6% και επώαση για μία ώρα, προκειμένου να απενεργοποιηθούν οι ενδογενείς αλκαλικές φωσφατάσες που θα δημιουργούσαν “θόρυβο” κατά την αντίδραση αποκάλυψης (βλ. αντίστοιχη ενότητα). Το H₂O₂ απομακρυνόταν με 3 πεντάλεπτα πλυσίματα με 1X PBT και ακολουθούσε επανενυδάτωση των εμβρύων μειώνοντας σταδιακά τις συγκεντρώσεις μεθανόλης (100%, 75%, 50% και 25% σε 1X PBT) ανά 5 λεπτά στις ίδιες συνθήκες και επανατοποθέτηση σε 1X PBT αφού προηγούνταν 3 πεντάλεπτες πλύσεις στο ίδιο διάλυμα. Στη συνέχεια, γινόταν πέψη με πρωτεΐνάση K, τελικής συγκέντρωσης 5-10μg/ml, για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση διακοπτόταν με την προσθήκη γλυκίνης, τελικής συγκέντρωσης 2mg/ml για 5 λεπτά, η πρωτεΐνάση K απομακρυνόταν με 2-3 πλύσεις με 1X PBT και ακολούθως τα έμβρυα μονιμοποιούνταν ξανά σε 4% PFA (σε 1X PBS) για 20 λεπτά στην ίδια θερμοκρασία. Έπειτα από πλήρη απομάκρυνση της PFA, με συνεχείς πλύσεις σε διάλυμα 1X PBT, τα έμβρυα ήταν κατάλληλα προετοιμασμένα για υβριδοποίηση *in situ*. Να σημειωθεί ότι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιούνταν με ήπια και συνεχή ανάδευση των εμβρύων.

II) Υβριδοποίηση του ανιχνευτή RNA με το mRNA-στόχο : Τα έμβρυα προϋβριδοποιούνταν για τουλάχιστον 1 ώρα στους 65⁰C, υπό ήπια και συνεχή ανάδευση, σε διάλυμα υβριδοποίησης αποτελούμενο από 50% φορμαμίδη, 2X SSC, 5mM EDTA pH 8.0, 50μg/ml Yeast RNA και 0.2% Tween-20. Ακολουθούσε αντικατάσταση του διαλύματος υβριδοποίησης με νέο, που περιείχε σημασμένο ανιχνευτή RNA τελικής συγκέντρωσης 1-1.5μg/ml και το οποίο έχει προθερμανθεί στους 65⁰C για 5 λεπτά, προκειμένου να αποδιαταχθούν οι δευτεροταγείς δομές των μορίων του ανιχνευτή. Η υβριδοποίηση γινόταν στους 65⁰C για 14-18 ώρες υπό συνεχή και ήπια ανάδευση.

III) Επώαση με το αντίσωμα anti-DIG-AP : Το μίγμα υβριδοποίησης απομακρυνόταν και τα έμβρυα ξεπλένονταν 2-3 φορές, στους 65°C, σε διάλυμα αποτελούμενο από 50% φορμαμίδη, 1X SSC και 0.1% Tween-20 (κάθε πλύσιμο διαρκούσε 30-60 λεπτά ανάλογα με την ηλικία των εμβρύων). Ακολουθούσαν επώσεις σε διάλυμα MABT (20mM μαλαϊκό οξύ pH 7.5, 30mM NaCl και 0.02% Tween-20), 2-3 φορές σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, τα έμβρυα τοποθετούνταν σε MABT που περιείχε 10% φυσιολογικό ορό κατσίκας (NGS : Normal Goat Serum, Gibco BRL) και επωάζονταν για 1-2 ώρες στην ίδια θερμοκρασία (παρεμπόδιση της μη ειδικής σύνδεσης του αντισώματος στους ιστούς). Το τελευταίο διάλυμα απομακρυνόταν και γινόταν προσθήκη νέου που περιείχε το αντίσωμα anti-DIG, προσδεδμεμένο με αλκαλική φωσφατάση, σε αραιώση 1:5000 (anti-DIG-AP, Fab fragments, Boehringer Mannheim, Cat. No. 1093274). Η επώαση γινόταν σε θερμοκρασία δωματίου για 2-4 ώρες ή στους 4°C για 14-18 ώρες, υπό συνεχή ήπια ανάδευση των εμβρύων. Η περίσσεια του αντισώματος απομακρυνόταν με διαδοχικές πλύσεις των εμβρύων (2-3 φορές) σε διάλυμα MABT σε θερμοκρασία δωματίου.

IV) Αντίδραση αποκάλυψης: Στην αντίδραση αποκάλυψης η αλκαλική φωσφατάση, που είναι συνδεδμεμένη με το αντίσωμα anti-DIG, αντιδρά με τα υποστρώματά της BciP (5-Bromo-4chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine salt) και NBT (Nitroblue Tetrazolium Chloride). Αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι η εμφάνιση χρώσης στα σημεία πρόσδεσης του αντισώματος και κατά συνέπεια στα σημεία υβριδοποίησης του ανιχνευτή RNA με το mRNA-στόχο. Αναλυτικά, μετά την απομάκρυνση του μη ειδικά συνδεδμεμένου αντισώματος πραγματοποιούνταν πλύσεις των εμβρύων σε διάλυμα NTMT (100mM NaCl, 100mM Tris-Cl pH 9.5, 50mM Mg₂Cl και 0.1% Tween-20), 2-3 φορές σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση γινόταν με την προσθήκη διαλύματος NTMT που περιείχε NBT (100 mg/ml, Boehringer Mannheim, Cat. No. 1383213) και BciP (50mg/ml, Boehringer Mannheim, Cat. No. 1383221) σε τελικές συγκεντρώσεις 337.5μg/ml και 175μg/ml, αντίστοιχα, λάμβανε χώρα στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου και διαρκούσε αρχικά 1-2 ώρες. Αν δεν εμφανιζόταν χρώση η επώαση συνεχιζόταν στους 4°C για 1-3 ημέρες, χρησιμοποιώντας μικρότερες συγκεντρώσεις NBT και BciP. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης τα έμβρυα ξεπλένονταν σε 1X PBT (2-3 φορές), μονιμοποιούνταν ξανά σε 4% PFA για 14-18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (για διατήρηση της χρώσης) και συντηρούνταν, στους 4°C, σε διάλυμα 1X PBT που περιείχε γλυκερόλη τελικής συγκέντρωσης 50%.

Γ. Πειράματα υβριδοποίησης *in situ* σε τομές εμβρύων

I) Επεξεργασία εμβρύων για τομές σε κρουστάτη : Τα έμβρυα αφαιρούνταν από τη μήτρα του θηλυκού σε διάλυμα 1X PBS σε πάγο και μονιμοποιούνταν σε διάλυμα 4% PFA (σε 1X PBS) στους 4°C για 12-24 ώρες ανάλογα με την ηλικία τους. Μετά την απομάκρυνση της PFA (2-3 πλυσίματα με 1X PBS) τα έμβρυα επωάζονταν σε διάλυμα 30% σουκρόζης, σε 1X PBS, στους 4°C για τουλάχιστον 24 ώρες, έως ότου επιτευχθεί πλήρης καθίζησή τους. Ακολουθούσε μερικό στέγνωμα, στερέωσή τους σε εκμαγεία που περιείχαν μέσο Polyfreeze (Tissue freezing medium, Polysciences INC. Cat. No. 19636) ειδικό για τομές σε κρουστάτη και τοποθέτηση στους -80°C για στερεοποίηση (διατήρηση για μεγάλο χρονικό διάστημα). Εναλλακτικά του μέσου Polyfreeze μπορεί να χρησιμοποιηθεί και διάλυμα που περιέχει 15% σουκρόζη και 7.5% ζελατίνη. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνταν τομές πάχους 12-20μm, σε θερμοκρασία -23°C, οι οποίες συλλέγονταν σε ειδικές αντικειμενοφόρους πλάκες (Superfrost/Plus Lanes Porte-Objects, O. Kindler GmbH & Co) και διατηρούνταν στους -80°C για μεγάλο χρονικό διάστημα.

II) Υβριδοποίηση του ανιχνευτή RNA με το mRNA-στόχο : Οι τομές των εμβρύων αφού προηγουμένως ξεπάγωναν και στέγνωσαν πλήρως (3-5 ώρες), σε θερμοκρασία δωματίου, ήταν έτοιμες για υβριδοποίηση. Σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετούνταν 70-100μl διαλύματος υβριδοποίησης (50% φορμαμίδη, 2X SSC, 5mM EDTA pH 8.0, 50μg/ml Yeast RNA και 0.2% Tween-20) που περιείχε τον ανιχνευτή RNA (DIG-RNA) σε τελική συγκέντρωση 1-2μg/ml και είχε προθερμανθεί στους 65°C για 5 λεπτά. Η υβριδοποίηση γινόταν στους 65°C για 14-18 ώρες και σε περιβάλλον κορεσμένο σε φορμαμίδη. Στη συνέχεια τα δείγματα πλένονταν σε διάλυμα 50% φορμαμίδης, 5X SSC και 0.1% Tween-20, για 15 λεπτά στους 65°C υπό συνεχή και ήπια ανάδευση σε ειδικά γυάλινα δοχεία. Ακολουθούσαν διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα 50% φορμαμίδης, 1X SSC, 0.1% Tween-20 και διάλυμα 50% φορμαμίδης, 0.1X SSC και 0.1% Tween-20 (30 λεπτά επί 3 φορές για κάθε διάλυμα) στις ίδιες συνθήκες.

III) Επώαση με το αντίσωμα anti-DIG-AP : Οι τομές ξεπλένονταν με διάλυμα MABT, σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση και στη συνέχεια τοποθετούνταν σε οριζόντια θέση. Ακολουθούσαν 2 επιπλέον πλύσεις (διάρκειας 30 λεπτών η καθεμία) με το ίδιο διάλυμα, στην ίδια θερμοκρασία. Στη συνέχεια, οι τομές επωάζονταν 1-2 ώρες σε MABT που περιείχε 10% NGS, στις ίδιες συνθήκες. Η επώαση με το αντίσωμα anti-DIG-AP γινόταν όπως και στην περίπτωση των υβριδισμών *in situ* σε ολόκληρα έμβρυα με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε υψηλότερης συγκέντρωσης αντίσωμα (αραίωση 1:500). Η απομάκρυνση της περίσσειας του αντισώματος γινόταν με

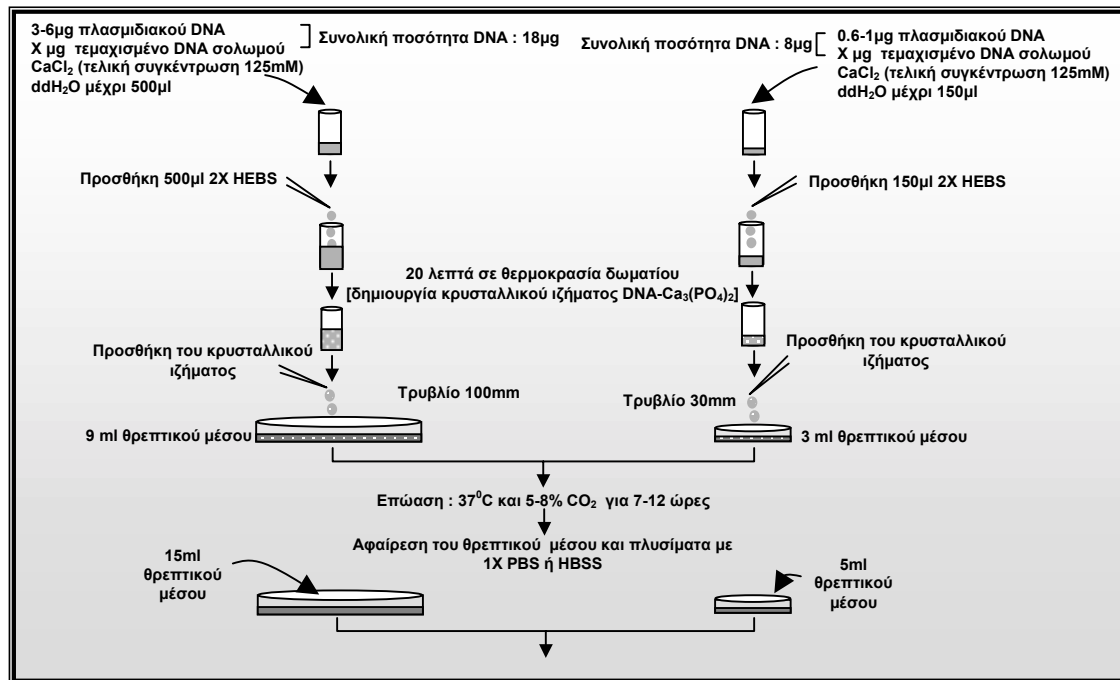
πλύσεις σε διάλυμα MABT, σε θερμοκρασία δωματίου, μία φορά μέσα σε γυάλινα δοχεία υπό ήπια ανάδευση και δύο φορές για 30 λεπτά σε οριζόντια θέση.

IV) Αντίδραση αποκάλυψης: Οι τομές πλένονταν με διάλυμα NTMT (100mM NaCl, 100mM Tris-Cl pH 9.5, 50mM Mg₂Cl και 0.1% Tween-20) 2-3 φορές σε θερμοκρασία δωματίου διατηρώντας τις αντικειμενοφόρους σε οριζόντια θέση. Ακολουθούσε αντικατάσταση του διαλύματος NTMT με διάλυμα αντίδρασης αποκάλυψης (100μl διαλύματος ανά αντικειμενοφόρο) και κάλυψη των τομών με καλυπτρίδες. Οι συνθήκες της αντίδρασης έχουν ήδη περιγραφεί στα πειράματα υβριδοποίησης *in situ* σε ολόκληρα έμβρυα. Μετά το τέλος της αντίδρασης οι τομές πλένονταν με διάλυμα 1X PBT (2-3 φορές σε θερμοκρασία δωματίου) και ακολουθούσε προσθήκη μικρής ποσότητας Aquamount improved (BDH Laboratory, Cat. No. 362262H), σκέπασμα των τομών με καλυπτρίδες, ολονύκτιο στέγνωμα σε απαγωγό και παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο.

13. ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ

Με αυτή τη διαδικασία επιτυγχάνεται η παροδική παραγωγή πολυπεπτιδίων ως αποτέλεσμα της έκφρασης των αντιστοιχών μορίων cDNA που τα κωδικοποιούν. Τα cDNAs έχουν εντεθεί σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς υπό τον έλεγχο υποκινητών οι οποίοι ενεργοποιούνται ισχυρά στο εσωτερικό περιβάλλον των διαμολυσμένων κυττάρων. Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η παραγωγή μίας ή περισσότερων πρωτεϊνών σε μικρό χρονικό διάστημα, σε ικανοποιητικό ποσοστό κυττάρων και σε υψηλά επίπεδα, επιτρέποντας την περαιτέρω ανάλυσή τους, όπως βιοχημικές μελέτες, πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού και ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Η παροδική διαμόλυνση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της συγκατακρίμνησης DNA με Ca₃(PO₄)₂ (Graham and Van der Eb, 1973). Σύμφωνα με τη μέθοδο, το ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό DNA αναμειγνύεται με διάλυμα CaCl₂ τελικής συγκέντρωσης 125mM και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (HEBS 1X :140mM NaCl, 5mM KCl, 0.75mM Na₂HPO₄, 6mM Dextrose και 25mM HEPES pH 7.0) με αποτέλεσμα το σχηματισμό λεπτόκοκκου κρυσταλλικού ιζήματος DNA-Ca₃(PO₄)₂. Οι κρύσταλλοι προστίθενται σε κύτταρα που βρίσκονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης και ενσωματώνονται με επώαση των κυττάρων στους 37°C, σε ατμόσφαιρα 5-8% CO₂ (ανάλογα με την κυτταρική σειρά) για 7-12 ώρες. Η απομάκρυνση των μη ενσωματωμένων κρυστάλλων πραγματοποιείται με διαδοχικές πλύσεις με 1X PBS ή HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Gibco BRL™). Ακολουθεί προσθήκη νέου θρεπτικού μέσου και συνέχιση της ανάπτυξης, στις ίδιες συνθήκες, για 12-24 ώρες προκειμένου να εκφραστεί στα διαμολυσμένα κύτταρα το ένθεμα του πλασμιδιακού φορέα.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα COS-7, NIH 3T3, CV1, CaCo2, K562 και HeLa, που αναπτύσσονταν σε τρυβλία διαμέτρου 30mm ή 100mm σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο όγκου 3ml και 9ml, αντίστοιχα, το οποίο είχε ανανεωθεί 2-3 ώρες πριν τη διαμόλυνση. Ο αριθμός των κυττάρων κυμαινόταν από $3-6 \times 10^3$, για τρυβλία διαμέτρου 30mm έως $1-1.5 \times 10^4$, για τρυβλία διαμέτρου 100mm. Οι ποσότητες ανασυνδυασμένου DNA που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0.6-6μg ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων και το σκοπό της πειραματικής διαδικασίας. Η διαδικασία περιγράφεται στην Εικόνα 10.



Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση παροδικής διαμόλυνσης κυτταρικών σειρών θηλαστικών. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που αναπτύσσονταν σε τρυβλία διαμέτρου 30mm (δεξί σχήμα) ή 100mm (αριστερό σχήμα). Το θρεπτικό μέσο είχε όγκο 3ml και 9ml, αντίστοιχα και είχε ανανεωθεί 2-3 ώρες πριν τη διαμόλυνση. Χρησιμοποιούνταν συνολικά 8 ή 18μg DNA ανάλογα με το μέγεθος των τρυβλίων και κατά συνέπεια τον αριθμό των κυττάρων. Αν η ποσότητα του πλασμιδιακού DNA δεν ήταν επαρκής γίνονταν προσθήκη τεμαχισμένου DNA σολωμού (carrier DNA). Η ανάμιξη του διαλύματος 2X HEBS (τελική συγκέντρωση 1X) με το αρχικό μίγμα DNA και CaCl₂ γινόταν σταδιακά, σταγόνα-σταγόνα, προκειμένου σχηματιστούν κρύσταλλοι DNA-Ca₃(PO₄)₂ όσο το δυνατόν μικρότερης διαμέτρου και κατά συνέπεια να επιτευχθεί το υψηλότερο δυνατό ποσοστό κυτταρικής διαμόλυνσης.

14. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ (SDS-PAGE)

Η μέθοδος βασίζεται στην ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτές ακρυλαμίδης υπό συνθήκες που εξασφαλίζουν την αποδιάταξη στις επιμέρους υπομονάδες τους και αποκλείουν τη δημιουργία πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων. Αυτές οι συνθήκες επιτυγχάνονται με την παρουσία του ισχυρού ανιονικού απορρυπαντικού SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfate) σε συνδυασμό με αναγωγικούς παράγοντες και τη θέρμανση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε υψηλή θερμοκρασία (100°C) (Laemmli, 1970). Τα αποδια-

ταγμένα πολυπεπτίδια προσδένουν SDS και φορτίζονται αρνητικά. Επειδή το ποσό του δεσμευμένου SDS είναι σχεδόν πάντα ανάλογο του μοριακού μεγέθους των πολυπεπτιδίων και ανεξάρτητο από την αμινοξική αλληλουχία, τα συμπλέγματα SDS-πρωτεϊνών μεταναστεύουν και διαχωρίζονται σε πηκτές πολυακρυλαμίδης με βάση το μέγεθος της πεπτιδικής αλυσίδας. Το μέγεθος των πρωτεϊνών μπορεί να υπολογιστεί με τη παράλληλη ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών δεικτών γνωστού μοριακού μεγέθους.

Η ανάλυση των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν βασίστηκε στην παραπάνω μέθοδο. Συγκεκριμένα, τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ηλεκτροφορήθηκαν σε αποδιατακτικές πηκτές ακρυλαμίδης παρουσία SDS (τελική συγκέντρωση 0.1%). Τα πολυμερή ακρυλαμίδης αποτελούνταν από δύο φάσεις : την πηκτική ευθυγράμμισης των πρωτεϊνών σε ένα ενιαίο μέτωπο (stacking gel) και την πηκτική διαχωρισμού τους με βάση το μοριακό τους μέγεθος (separating gel). Η πηκτική ευθυγράμμισης αποτελούνταν από διάλυμα ακρυλαμίδης:δισ-ακρυλαμίδης (29:1) τελικής συγκέντρωσης 5%, 125mM Tris-Cl pH 6.8 και 0.1% SDS ενώ η πηκτική διαχωρισμού περιείχε 375mM Tris-Cl pH 8.8, 0.1% SDS και διάλυμα ακρυλαμίδης:δισ-ακρυλαμίδης (29:1) σε τελική συγκέντρωση που κυμαινόταν από 8% έως 12% ανάλογα με το μέγεθος των πολυπεπτιδίων που επρόκειτο να διαχωριστούν. Η πηκτές πολυμερίζονταν με την προσθήκη TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl-ethylenediamine) και υπερθειικού αμμωνίου (Ammonium persulfate, APS) σε τελικές συγκεντρώσεις 0.04% και 0.1%, αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες των εκχυλισμάτων αποδιατάσσονταν σε διάλυμα Laemmli 1X (50mM Tris-Cl pH 6.8, 100mM DTT ή 5% 2-μερκαπτο-αιθανόλη, 2% SDS, 0.1% Bromophenol blue και 10% γλυκερόλη) και με θέρμανση για 5-8 λεπτά στους 100°C. Η ηλεκτροφόρηση γινόταν σε 25mM Tris-Cl pH 8.3, 250mM γλυκίνης και 0.1% SDS, σε συσκευές της εταιρίας BIO-RAD (Mini PROTEAN 3 Cell, Cat. No. 165-3301-02), υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου σταθερής έντασης αρχικά 35mA, έως ότου εισέλθουν οι πρωτεΐνες στην πηκτική διαχωρισμού και στη συνέχεια 45mA. Την ηλεκτροφόρηση ακολουθούσε ταυτόχρονη μονιμοποίηση και χρώση των διαχωρισμένων πολυπεπτιδίων με τοποθέτηση της πηκτικής σε διάλυμα 10% οξικού οξέος, 20% μεθανόλης, 0.25% Coomassie Brilliant Blue R250 και 3% γλυκερόλης, για 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια συνεχή ανάδευση. Οι πρωτεϊνικές ζώνες γίνονταν ορατές ύστερα από τοποθέτηση της πηκτικής σε διάλυμα αποχρωματισμού (10% οξικό οξύ, 30% μεθανόλη και 3% γλυκερόλη) και ανάδευση στην ίδια θερμοκρασία για μεγάλο χρονικό διάστημα προκειμένου να απομακρυνθεί πλήρως η χρωστική που δεν ήταν δεσμευμένη στις πρωτεΐνες.

15. ΑΝΟΣΟΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ (WESTERN BLOT)

Κατά τη μέθοδο αυτή, οι πρωτεΐνες που έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά μεταφέρονται σε μεμβράνες και ανιχνεύονται με τη χρήση αντισωμάτων που αλληλεπιδρούν ειδικά με αντιγονικούς επίτοπους των πολυπεπτιδίων-στόχων (Towbin et al., 1979, Burnette, 1981). Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών που περιέχονται σε διάφορα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα. Πιο συγκεκριμένα, οι μεμβράνες με τις ακινητοποιημένες πρωτεΐνες επωάζονται με αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη-στόχο (πρωτεύον αντίσωμα). Το προσδεδεμένο αντίσωμα και κατά συνέπεια η αντίστοιχη πρωτεΐνη-στόχος ανιχνεύεται με τη χρήση ειδικού δευτερεύοντος αντισώματος (πρόσδεση στο πρωτεύον αντίσωμα), συνδεδεμένου με αλκαλική φωσφατάση ή περοξειδάση ραπανιού (HRP : Horse Radish Peroxidase) και επακόλουθη αντίδραση με χρωμογόνα υποστρώματα ή αντίδραση χημειοφωταύγειας. Η ευαισθησία της μεθόδου αυξάνεται με την ελάττωση του “θορύβου” που προέρχεται από τη μη ειδική σύνδεση των αντισωμάτων. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση διαλυμάτων πλούσιων σε πρωτεΐνες που εμποδίζουν τη σύνδεση του αντισώματος με μη σχετιζόμενα πολυπεπτίδια. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται περιέχουν, συνήθως, ως μέσο παρεμπόδισης ξηρό άπαχο γάλα (Johnson et al., 1984) το οποίο πλεονεκτεί έναντι άλλων γιατί είναι φθινό και συμβατό με όλα τα συστήματα ανοσοανίχνευσης.

A. Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Οι πρωτεΐνες που μελετήθηκαν ηλεκτροφορήθηκαν αρχικά σε αποδιατακτικά πηκτώματα ακρυλαμίδης. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (PROTRAN[®], 0.45μm, Schleicher & Schuell, Cat. No. CH0778-1) με τη μέθοδο υγρής ηλεκτρομεταφοράς (Sambrook et al., 1987) και με τη χρήση συσκευών της εταιρίας BIO-RAD (Mini Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell, BIO-RAD, Cat. No. 170-3930, 170-3935). Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα μεταφοράς αποτελούμενο από 20% μεθανόλη, 25mM Tris-Cl pH 8.3, 250mM γλυκίνη και 0.1% SDS και εφαρμόστηκε ηλεκτρικό πεδίο σταθερής έντασης 110mA για 14-16 ώρες στους 4⁰C ή 30mA για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

B. Πειράματα ανοσοανίχνευσης

Οι μεμβράνες με τις ακινητοποιημένες πρωτεΐνες επωάζονταν σε παρεμποδιστικό διάλυμα. Ακολουθούσε επώαση με το πρωτεύον αντίσωμα, απομάκρυνση της περίσσειας του αντισώματος, επώαση με το κατάλληλο δευτερεύον αντίσωμα, το οποίο είχε

προσδεμένη HRP, πλύσεις των μεμβρανών και ανοσοανίχνευση. Χρησιμοποιήθηκαν διάφορα παρεμποδιστικά διαλύματα και χρόνοι επώασης ανάλογα με το είδος και την ποσότητα των μελετούμενων πρωτεϊνών. Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν καθώς και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στον Πίνακα 4.

Τα πρωτεύοντα και δευτερεύοντα αντισώματα, η προέλευσή τους και οι αραιώσεις τους αναφέρονται αναλυτικά σε επόμενη ενότητα. Η ανοσοανίχνευση γινόταν με το σύστημα χημειοφωταύγειας SuperSignal (SuperSignal® West Substrates, PIERCE) και σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας.

Πίνακας 4. Συνθήκες που εφαρμόστηκαν στα πειράματα ανοσοανίχνευσης πρωτεϊνών ακινητοποιημένων σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης

1 ^η ΜΕΘΟΔΟΣ				
Διαλύματα				
1X PBS		Παρεμποδιστικό διάλυμα Α (ΠΔ-Α)		
40mM Na ₂ HPO ₄ , 5mM NaH ₂ PO ₄ και 150mM NaCl		1X PBS 5% ξηρό άπαχο γάλα		
Συνθήκες				
ΠΔ-Α	ΠΔ-Β + πρωτεύον αντίσωμα	1X PBS	ΠΔ-Α + δευτερεύον αντίσωμα	1X PBS
Θερμοκρασία δωματίου (Θ.Δ) 1 ώρα	Θ.Δ για 3-5 ώρες ή 4°C για 14-18 ώρες	Θ.Δ για 15λεπτά 5-7 φορές	Θ.Δ για 1-2 ώρες	Θ.Δ για 15 λεπτά 5-7 φορές
2 ^η ΜΕΘΟΔΟΣ				
Διαλύματα				
Παρεμποδιστικό διάλυμα Α (ΠΔ-Α)		Παρεμποδιστικό διάλυμα Β (ΠΔ-Β)		
1X PBS 5% ξηρό άπαχο γάλα		1X TBS (20mM Tris-Cl pH 7.5, 500mM NaCl) 1% ξηρό άπαχο γάλα + 0.1% Tween-20		
Συνθήκες				
ΠΔ-Α	ΠΔ-Α + πρωτεύον αντίσωμα	ΠΔ-Β	ΠΔ-Β + δευτερεύον αντίσωμα	ΠΔ-Β
Θ.Δ για 1 ώρα	Θ.Δ για 3-5 ώρες ή 4°C για 14-18 ώρες	Θ.Δ για 15 λεπτά 4-5 φορές	Θ.Δ για 1-2 ώρες	Θ.Δ για 15 λεπτά 4-5 φορές

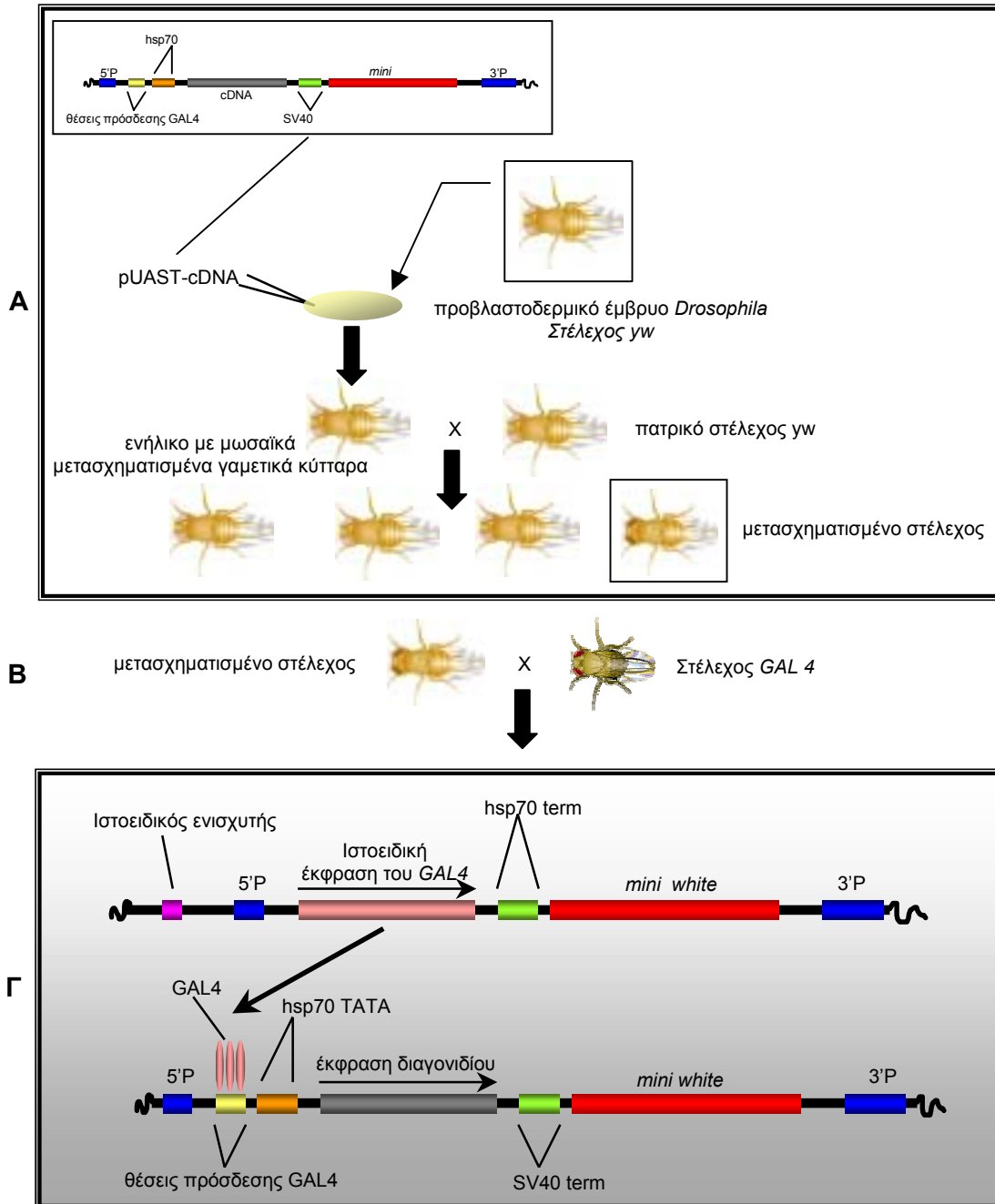
16. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗΣ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΗ *Drosophila*

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος κατευθυνόμενης υπερέκφρασης μέσω του μεταγραφικού ενεργοποιητή του σακχαρομύκητα GAL4 (Brand and Perrimon, 1993). Κατά τη μέθοδο αυτή, στελέχη *Drosophila* μετασχηματίζονται με ένθεση στο γονιδίωμα τους αλληλουχιών cDNA, οι οποίες βρίσκονται υπό τον έλεγχο υποκινητή που φέρει

θέσεις πρόσδεσης για τον παράγοντα GAL4. Συνεπώς, τα διαγονίδια παραμένουν μεταγραφικά ανενεργά εκτός από την περίπτωση της ταυτόχρονης παρουσίας του GAL4, η έκφραση του οποίου βρίσκεται υπό τον έλεγχο χαρακτηρισμένων ενδογενών ρυθμιστικών περιοχών. Αυτό επιτυγχάνεται σε απογόνους που προέρχονται από διασταυρώσεις στελεχών που φέρουν το υπό μελέτη διαγονίδιο με στελέχη που φέρουν στο γονιδίωμά τους το διαγονίδιο GAL4, το οποίο έχει εντεθεί σε ενδογενείς ρυθμιστικές περιοχές (Εικ.11B,Γ). Υπάρχουν διάφορα στελέχη-οδηγοί GAL4, σε καθένα από τα οποία το διαγονίδιο έχει εντεθεί κοντά σε διαφορετική ρυθμιστική περιοχή. Με τον τρόπο αυτό, ελέγχοντας την ενεργοποίηση της έκφρασης ενός θετικού μεταγραφικού ρυθμιστή ετερόλογου συστήματος είναι δυνατόν να κατευθύνουμε αντίστοιχα και την υπερέκφραση διαγονιδίων που βρίσκονται υπό τον έλεγχό του και να μελετήσουμε τα φαινοτυπικά τους αποτελέσματα.

Για την κατασκευή διαγονιδιακών στελεχών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ένθεσης διαγονιδίων μέσω της δράσης ενεργού μεταθετού στοιχείου *P* (*P*-element transformation). Τα ενθέματα cDNA κλωνοποιούνται σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα και βρίσκονται υπό τον έλεγχο υποκινητή που έχει θέσεις πρόσδεσης για τον ενεργοποιητή GAL4. Ο φορέας φέρει επιπλέον και το γονίδιο-δείκτη αναφοράς *mini white*, για την επιλογή των μετασχηματισμένων στελεχών. Πλευρικά του υποκινητή και του γονιδίου αναφοράς υπάρχουν οι 5' και 3' ακραίες αλληλουχίες του μεταθετού στοιχείου *P*, καθιστώντας έτσι δυνατή την ένθεση στο γονιδίωμα ολόκληρης της κατασκευής που βρίσκεται ανάμεσά τους (υποκινητής-cDNA-γονίδιο αναφοράς) (Εικ.11). Ταυτόχρονα με το ένθεμα cDNA εκφράζεται και το γονίδιο *mini white*, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την επιλογή των ατόμων που έχουν ενσωματώσει στο DNA τους το διαγονίδιο. Αυτό συμβαίνει γιατί οι πειραματικές διαδικασίες γίνονται σε στελέχη με γονότυπο *yw* (άσπρα μάτια, κιτρινωπό σώμα) και κατά συνέπεια μόνο τα ενήλικα άτομα που έχουν μετασχηματιστεί δε θα έχουν άσπρο χρώμα ομματαδίων (χρώμα από υποκίτρινο έως σκούρο πορτοκαλί ανάλογα με τη θέση ένθεσης της διαγονιδιακής κατασκευής) (Εικ. 11A).

Η εισαγωγή του ανασυνδυασμένου DNA γινόταν στην πολική περιοχή προβλαστοδερμικών εμβρύων με τη χρήση υδραυλικού συστήματος μικροενέσεων, σε θερμοκρασία 18°C. Συγκεκριμένα, γινόταν μικροένεση μίγματος αποτελούμενο από την ανασυνδυασμένη πλασμιδιακή κατασκευή (pP[UAST]-cDNA), τελικής συγκέντρωσης 300-400ng/μl, πλασμίδιο που έφερε την κωδικοποιούσα αλληλουχία ενεργού μεταθετού στοιχείου *P* (pΔ2.3 w.c), σε τελική συγκέντρωση 60-100ng/μl και διάλυμα μικροενέσεων 1X (10X injection buffer : 1mM NaP pH 6.8 και 50mM HCl). Τα έμβρυα αποχοριοποιούνταν σε χλωρίνη 50%, ξεπλένονταν με νερό και αφυδατώνονταν μερικώς πριν τη μικροένεση, ενώ στη συνέχεια τοποθετούνταν σε Halocarbon oil (Sigma) και αναπτύσσο-



Εικόνα 11. Σχηματική παράσταση της ένθεσης διαγονιδίων σε στελέχη *Drosophila* και της επακόλουθης κατευθυνόμενης υπερέκφρασής τους με το σύστημα GAL4. **A** : Τα ενθέματα cDNA κλωνοποιούνται στον φορέα ρP[UAST] και βρίσκονται υπό τον έλεγχο υποκινητή με θέσεις πρόσδεσης για τον μεταγραφικό ενεργοποιητή GAL4. Ο φορέας διαθέτει επιπλέον το γονίδιο αναφοράς *mini white* για την επιλογή των μετασχηματισμένων στελεχών. Πλευρικά του υποκινητή και του γονιδίου αναφοράς υπάρχουν οι 5' και 3' ακραίες αλληλουχίες του μεταθετού στοιχείου P, καθιστώντας δυνατή την ένθεση στο γονιδίωμα ολόκληρης της ενδιάμεσης κατασκευής. **B** : Τα διαγονιδιακά στελέχη διασταυρώνονται με στελέχη που έχουν ενσωματωμένο στο DNA τους το γονίδιο GAL4, το οποίο βρίσκεται υπό τον έλεγχο ενδογενών ρυθμιστικών περιοχών. **Γ** : Οι απόγονοι των διασταυρώσεων εκφράζουν τον ενεργοποιητή GAL4 σε συγκεκριμένες κυτταρικές ομάδες (ανάλογα με τη ρυθμιστική περιοχή ελέγχου). Ο GAL4 ενεργοποιεί την έκφραση του υπό μελέτη διαγονιδίου (cDNA).

νταν στους 25°C για 16-24 ώρες. Οι προνύμφες μεταφέρονταν σε στερεό θρεπτικό μέσο και ο κύκλος ανάπτυξης συνεχιζόταν στην ίδια θερμοκρασία. Τα ενήλικα άτομα που προέκυπταν, και που κάποια από αυτά είχαν μωσαϊκά διαγονιδιακά γαμετικά κύτταρα, διασταυρώνονταν με το πατρικό στέλεχος (Εικ. 11B).

Η ανίχνευση μετασχηματισμένων ενηλίκων γινόταν στη θυγατρική γενιά με βάση το χρώμα των ομματοειδών. Ακολουθούσε πολλαπλασιασμός των διαγονιδιακών στελεχών, χρωμοσωμική χαρτογράφηση του ενθέματος που έφεραν στο γονιδίωμά τους και χρήση τους σε πειράματα κατευθυνόμενης υπερέκφρασης (Εικ. 11Γ). Τα διαγονίδια *Neurl* και *Neur* υπερέκφράστηκαν εκτοπικά με τη χρήση διαφόρων σειρών-οδηγών GAL4 και πραγματοποιήθηκε ανάλυση της επίδρασής τους σε εξωτερικά μορφολογικά χαρακτηριστικά των ενηλίκων απογόνων. Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση των διαγονιδίων, σε εμβρυϊκά ή προνυμφικά στάδια, στην έκφραση και στον υποκυτταρικό εντοπισμό πρωτεϊνών που αποτελούσαν συστατικά ή στόχους του σηματοδοτικού μηχανισμού Notch. Τα στελέχη GAL4 που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται αναλυτικά σε επόμενη ενότητα.

17. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ

Πρόκειται για πειράματα διαχωρισμού μεμβρανών από τα υπόλοιπα κυτταρικά συστατικά, προκειμένου να διερευνηθεί η μεμβρανική συσχέτιση μίας πρωτεΐνης και να διαπιστωθεί αν οφείλεται σε πρόσδεση στη μεμβράνη ή σε αλληλεπιδράσεις με διαμεμβρανικές πρωτεΐνες ή μόρια που εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική περιφέρεια. Αυτό επιτυγχάνεται με εκχυλίσεις μεμβρανών σε εξειδικευμένες συνθήκες που αποκλείουν την απομόνωση πρωτεϊνών που δεν είναι διαμεμβρανικές. Στην περίπτωση που διαπιστωθεί ότι μία πρωτεΐνη δεν προσδέεται στη μεμβράνη, ο έλεγχος και η επιβεβαίωση της μεμβρανικής της συσχέτισης γίνεται με νέα πειράματα κλασματοποίησης σε ήπιες συνθήκες, οι οποίες επιτρέπουν την απομόνωση όλων των πρωτεϊνών που εντοπίζονται στις μεμβράνες είτε είναι προσδεμένες σε αυτές είτε όχι.

A. Πειράματα απομόνωσης διαμεμβρανικών πρωτεϊνών

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε βασιζόταν στην εκχύλιση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών με τη χρήση αλκαλικού pH (Fujiki et al. 1982a) και εφαρμόστηκε σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών και προνύμφες *Drosophila melanogaster*. Υπό αυτές τις συνθήκες επιτυγχάνεται πλήρης διαχωρισμός των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. αφού πραγματοποιείται γραμμοποίηση των μεμβρανών, απελευθέρωση των διαλυτών συστατικών του εσωτερικού των ενδοκυττάρων μεμβρανικών διαμερισμάτων (π.χ δίκτυο golgi, ενδοπλασματικό δίκτυο, υπεροξειδιοσώματα, μιτοχόνδρια, κυστίδια κ.λ.π.) και όλων των πρωτεϊνών που σχετίζονται με μεμβράνες αλλά δεν είναι διαμεμβρανικές (Fujiki et al., 1982α,β, James et al., 1989, Scherer et al., 1992, Scherer et al., 1996). Συγκεκριμένα, $1-3 \times 10^7$ κύτταρα, από κυτταρικές σειρές θηλαστικών, ή 40-50 προνύμφες *Drosophila*, ύστερα από εκτομή και αφαίρεση του οπίσθιου τμήματός τους, ομογενοποιούνταν σε 1ml

διαλύματος 100mM Na₂CO₃ pH. 11.5, παρουσία αναστολέων πρωτεασών (Pepstatin, Leupeptin, Aprotinin και PMSF σε τελικές συγκεντρώσεις 1μg/ml, 2mg/ml, 10μg/ml και 3mM, αντίστοιχα), με τη χρήση ομογενοποιητή Dounce (τύπου Β) και επωάζονταν για 45 λεπτά στους 4⁰C. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 14.000rpm για 1 λεπτό και λήψη του υπερκείμενου (μεμβρανικό + κυτταροπλασματικό εκχύλισμα). Ο διαχωρισμός του μεμβρανικού ιζήματος από το κυτταροπλασματικό κλάσμα (μη διαμεμβρανικές πρωτεΐνες) γινόταν με υπερφυγοκέντρηση στις 68.000 rpm (rotor TLA-120, Beckman ultramicrocentrifuge) στους 4⁰C για μία ώρα. Το μεμβρανικό ίζημα επαναδιαλυτοποιούνταν σε όγκο ίσο με τον όγκο του υπερκείμενου. Προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα ύπαρξης παγιδευμένων μη διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στο ίζημα, γινόταν νέα επαναδιαλυτοποίησή του και επαναδιαχωρισμός με υπερφυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Η διαδικασία επαναλαμβάνονταν συνολικά 3 φορές. Το τελικό διαμεμβρανικό καθώς και τα προκύπτοντα τρία κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα (υπερκείμενα) ηλεκτροφορούνταν σε αποδιατακτικές πηκτές ακρυλαμίδης και ακολουθούσαν πειράματα ανοσοανίχνευσης των μελετούμενων πρωτεϊνών Neur1 και Neur.

B. Πειράματα απομόνωσης όλων των πρωτεϊνών (διαμεμβρανικών και μη) που σχετίζονται με κυτταρικές μεμβράνες

Εφαρμόστηκαν οι ίδιες ακριβώς συνθήκες και πειραματικές διαδικασίες με τη διαφορά ότι οι ομογενοποιήσεις και εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν σε υποτονικό διάλυμα ουδέτερου pH (25mM HEPES pH 7.9, 1.5mM MgCl₂ και 10mM KCl).

18. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΕΨΗΣ ΠΡΟΝΥΜΦΙΚΩΝ ΔΙΣΚΩΝ ΦΤΕΡΟΥ *Drosophila* ΜΕ ΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗ Κ

Τα πειράματα πέψης με πρωτεΐνάση Κ (Strigini and Cohen, 2000) εφαρμόζονται σε διάφορα κύτταρα ή ιστούς και παρέχουν τη δυνατότητα να διαπιστωθεί αν μία πρωτεΐνη που σχετίζεται με την πλασματική μεμβράνη βρίσκεται στην εξωκυττάρια ή κυτταροπλασματική πλευρά της ή είναι διαμεμβρανική. Συγκεκριμένα, άθικτα κύτταρα ή ιστοί επωάζονται με πρωτεΐνάση Κ. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται υδρόλυση των πρωτεϊνών που βρίσκονται στην εξωκυττάρια πλευρά της πλασματικής μεμβράνης καθώς και των εξωκυττάρια περιοχών των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, σε αντίθεση με τα πολυπεπίδια που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική πλευρά και τα οποία προστατεύονται. Ακολουθούν κυτταρική λύση και ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε αποδιατακτικά πολυμερή ακρυλαμίδης. Μια πρωτεΐνη που σχετίζεται με την πλασματική μεμβράνη οριοθετείται, σε σχέση με τις πλευρές της μεμβράνης, με επακόλουθα πειράματα ανοσοεντοπισμού (western blots), αφού αυτή δεν θα ανιχνευτεί

αν βρίσκεται στην εξωκυττάρια πλευρά ενώ αν είναι διαμεμβρανική θα ανιχνευτεί με μικρότερο μέγεθος, εξαιτίας της υδρόλυσης του εξωκυττάριου τμήματός της. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η χρήση αντισώματος ειδικού για επίτοπο που εντοπίζεται στο κυτταροπλασματικό τμήμα της μελετούμενης πρωτεΐνης. Αν ολόκληρο το πολυπεπτίδιο βρίσκεται στην κυτταροπλασματική επιφάνεια της μεμβράνης θα εντοπιστεί μεμβρανική ζώνη πλήρους μήκους.

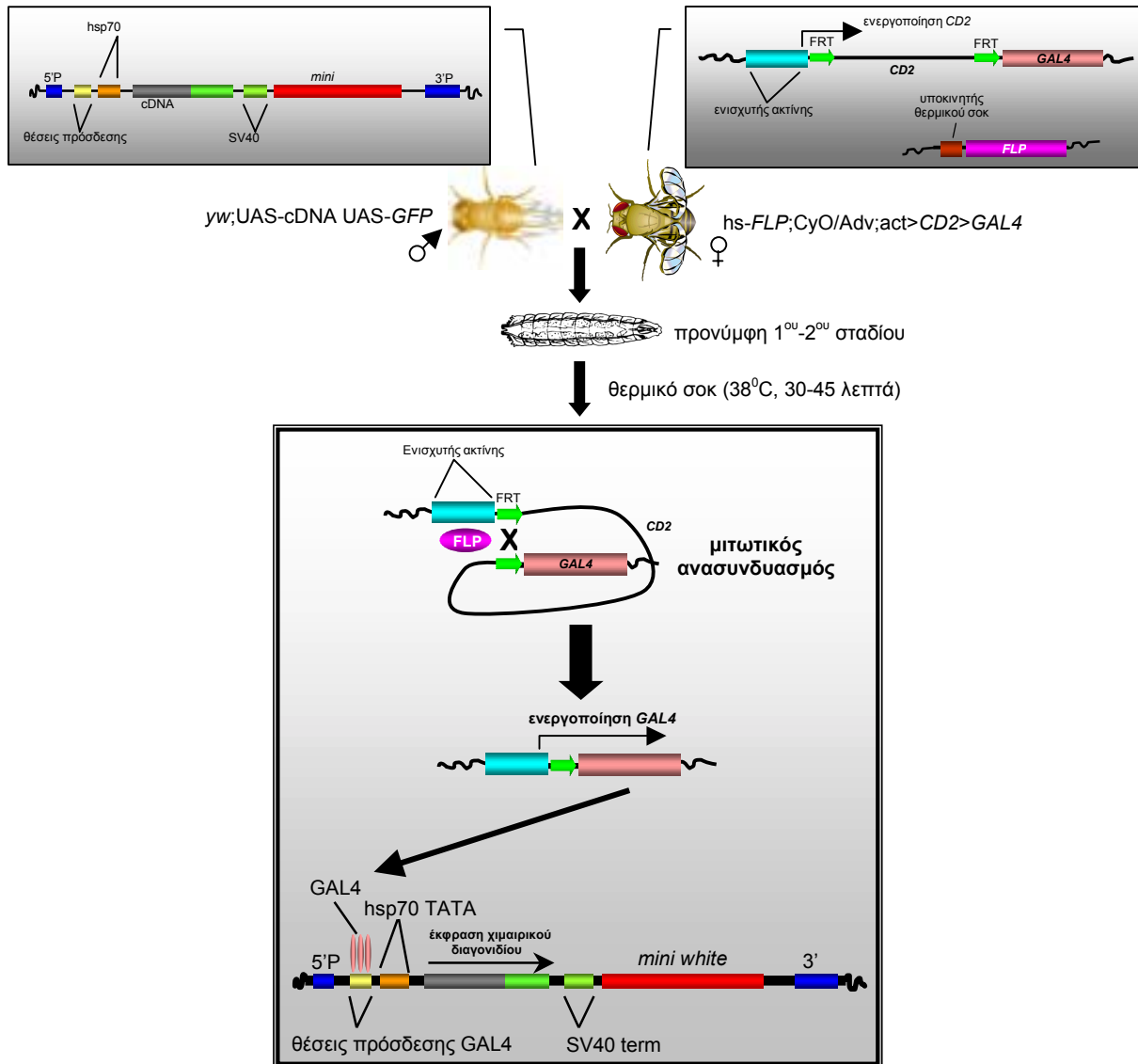
Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε προνυμφικούς δίσκους φτερού *Drosophila*, προκειμένου να ανιχνευτεί η τοπολογία των πρωτεϊνών Neur και Neurl. Αναλυτικά, συλλέγονταν 45-50 άθικτοι προνυμφικοί δίσκοι, στους οποίους υπερεκφράζονταν τα μελετούμενα πολυπεπτίδια και επωάζονταν με διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνάσης K (20μg/ml, 50μg/ml, 75μg/ml και 100μg/ml), σε διάλυμα 1X PBS, απουσία αναστολέων πρωτεασών, για 10 λεπτά στους 30°C ή 30-45 λεπτά στους 4°C. Να σημειωθεί ότι η συλλογή των προνυμφικών δίσκων γινόταν στους 4°C και δεν ξεπερνούσε τα 40 λεπτά προκειμένου να διατηρούνται οι δίσκοι ζωντανοί και να αποφευχθεί το ενδεχόμενο πρωτεϊνικής υδρόλυσης πριν την πέψη με την πρωτεΐνάση K. Ακολουθούσε προσθήκη PMSF σε τελική συγκέντρωση 3mM, διαλύματος Laemmli (τελική συγκέντρωση 1X), ομογενοποίηση, ηλεκτροφόρηση και ανοσοανίχνευση των πρωτεϊνών Neur και Neurl.

19. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΜΙΤΩΤΙΚΩΝ ΚΛΩΝΩΝ ΕΚΤΟΠΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ *Drosophila* (ΤΕΧΝΙΚΗ Flip-out)

Εφαρμόστηκε η μέθοδος μιτωτικού ανασυνδυασμού *in cis* (Flip-out technique, de Cellis and Bray, 1997). Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιείται προκειμένου να επιτευχθεί η ομοιογενής έκφραση ενός γονιδίου σε μία κυτταρική ομάδα (ίδια επίπεδα έκφρασης σε όλα τα κύτταρα), κάτι που δεν είναι εφικτό όταν πραγματοποιούνται πειράματα κατευθυνόμενης έκφρασης με τη χρήση στελεχών-οδηγών GAL4, μιας και είναι δυνατόν να υπάρχουν αυξομειώσεις ή διαβαθμίσεις μεταγραφικής ενεργότητας μέσα στην ίδια περιοχή έκφρασης.

Η μέθοδος βασίζεται στη δράση του ενζύμου του σακχαρομύκητα φλιπάση, η οποία αναγνωρίζει ειδικές αλληλουχίες (FRT sites, σύμβολο : ">") και προκαλεί μιτωτικό ανασυνδυασμό μεταξύ των συγκεκριμένων αλληλουχιών. Η τεχνική χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή μιτωτικών κλώνων εκτοπικής έκφρασης του ενεργοποιητή GAL4 και κατ' επέκταση των συνυπαρχόντων διαγονιδίων που μελετούνταν και που βρίσκονταν υπό τον έλεγχό του. Συγκεκριμένα, η φλιπάση επαγόταν με θερμικό σοκ (38°C για 30-45 λεπτά) σε προνύμφες 1^{ου} και 2^{ου} σταδίου που προέρχονταν από διασταυρώσεις του στελέχους *hs-FLP;CyO/Adv;act>CD2>GAL4* με διάφορα διαγονιδιακά στελέχη. Λόγω

μιτωτικού ανασυνδυασμού γινόταν ενεργοποίηση της έκφρασης του *GAL4* αφού η κωδικοποιούσα αλληλουχία του προσέγγιζε τον ενισχυτή του γονιδίου της ακτίνης, εξαιτίας της απομάκρυνσης του παρεμβαλλόμενου γονιδίου *CD2* (Εικ. 12).



Εικόνα 12. Γραφική αναπαράσταση της τεχνικής μιτωτικού ανασυνδυασμού *in cis*. Τα στελέχη που φέρουν τα υπό μελέτη διαγονίδια διασταυρώνονται με το στέλεχος *hs-FLP; CyO/Adv; act>CD2>GAL4*, το οποίο φέρει στο χρωμόσωμα X την κωδικοποιούσα αλληλουχία της φλιπάσης του σακχαρομύκητα. Στο 3^ο χρωμόσωμα του ίδιου στελέχους υπάρχουν τα διαγονίδια *GAL4* (το οποίο παραμένει ανενεργό) και *CD2*, που βρίσκεται υπό τον έλεγχο του ενισχυτή της ακτίνης. Πλευρικά του γονιδίου *CD2* βρίσκονται θέσεις αναγνώρισης από την φλιπάση (FRT). Οι προνύμφες 1^{ου}-2^{ου} σταδίου υφίστανται θερμικό σοκ με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της έκφρασης της φλιπάσης, η οποία με τη σειρά της αναγνωρίζει αλληλουχίες FRT και επάγει μιτωτικό ανασυνδυασμό. Με αυτόν τον τρόπο το διαγονίδιο *GAL4* έρχεται κοντά στον ενισχυτή της ακτίνης, ενεργοποιείται και επάγει με τη σειρά του την έκφραση των μελετούμενων διαγονιδίων, τα οποία βρίσκονται υπό τον έλεγχο του και πριν τον ανασυνδυασμό ήταν και αυτά ανενεργά.

Ο ενισχυτής της ακτίνης είναι ενεργός σε πληθώρα ιστών, εξασφαλίζοντας τη δυνατότητα δημιουργίας μιτωτικών κλώνων σε διάφορα σημεία του σώματος των απογόνων της διασταύρωσης. Ο εντοπισμός των κλώνων ήταν εφικτός λόγω της συνέκφρασης διαγονιδίου που κωδικοποιούσε την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green Fluorescent Protein, GFP) και βρισκόταν υπό τον έλεγχο του ρυθμιστή *GAL4* (Εικ.12).

Κατά συνέπεια η GFP εκφραζόταν μόνο στους παραγόμενους μιτωτικούς κλώνους, όπως άλλωστε και όλα τα υπό μελέτη διαγονίδια. Τα διαγονιδιακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν και μελετήθηκαν αναγράφονται σε επόμενη ενότητα.

20. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Τα πειράματα ανοσοφθορισμού παρέχουν τη δυνατότητα υποκυτταρικής ανίχνευσης πρωτεϊνών σε ιστούς ή κυτταρικές σειρές. Οι πρωτεΐνες ανιχνεύονται με μικροσκοπία φθορισμού αφού προηγουμένως έχουν αναγνωριστεί από πρωτεύοντα ειδικά αντισώματα, τα οποία στη συνέχεια αλληλεπιδρούν με δευτερεύουσες ανοσοσφαιρίνες προσδεδεδμένες με φθορίζουσες ουσίες. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών σε παροδικά μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές θηλαστικών καθώς και σε προνυμφικούς δίσκους *Drosophila melanogaster*.

A. Πειράματα ανοσοφθορισμού σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών

Χρησιμοποιήθηκαν παροδικά διαμολυσμένα κύτταρα COS-7 που είχαν πολλαπλασιαστεί πάνω σε καλυπτρίδες. Συγκεκριμένα, οι καλυπτρίδες τοποθετούνταν σε τρυβλία, διαμέτρου 30mm, που περιείχαν $3-6 \times 10^3$ κύτταρα και ακολουθούσαν πειράματα παροδικής διαμόλυνσης. Στη συνέχεια, οι καλυπτρίδες συλλέγονταν, τα προσκολλημένα κύτταρα ξεπλένονταν 2-3 φορές σε 1X PBS και μονιμοποιούνταν σε 4% PFA (σε 1X PBS) για 10-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούσε απομάκρυνση της PFA, με διαδοχικές πλύσεις με 1X PBS και επώαση σε παρεμποδιστικό διάλυμα 1X PBT (1X PBS που περιείχε 5% BSA και 0.2% Triton X-100) για 15 λεπτά. Γινόταν αφαίρεση του τελευταίου διαλύματος και προσθήκη νέου που περιείχε το πρωτεύον αντίσωμα. Τα κύτταρα επωάζονταν για 2-3 ώρες σε υγρή ατμόσφαιρα. Η περίσσεια του αντισώματος απομακρυνόταν (4-5 πλύσεις με 1X PBS) για να ακολουθήσει επώαση, για 1 ώρα στις ίδιες συνθήκες, με το δευτερεύον αντίσωμα. Τα κύτταρα πλένονταν με 1X PBS και στη συνέχεια οι καλυπτρίδες τοποθετούνταν, με την πλευρά που ήταν προσκολλημένα τα κύτταρα, σε αντικειμενοφόρους στις οποίες είχε προστεθεί μικρή ποσότητα διαλύματος 1X PBS που περιείχε 80% γλυκερόλη και 1% n-propyl-gallate. Τα δείγματα στεγανοποιούνταν και διατηρούνταν στους -20°C .

B. Πειράματα ανοσοφθορισμού σε προνυμφικούς δίσκους *Drosophila*

Αρχικά γινόταν εκτομή προνυμφών σε 1X PBS και συγκεκριμένα αφαίρεση του οπίσθιου τμήματός τους, αναστροφή του εμπρόσθιου μισού και απομάκρυνση του

λιπαρού σώματος (fat body). Οι προνύμφες στη συνέχεια μονιμοποιούνταν σε διάλυμα 4%PFA σε 1X PEM (100mM PIPES, 2mM EGTA και 1mM MgSO₄, pH 7.0), για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια ξεπλένονταν με 1X PBS. Ακολουθούσε επώαση των μονιμοποιημένων ιστών σε διάλυμα 1X PBT, στην ίδια θερμοκρασία για τουλάχιστον 3 ώρες, αφαίρεση του παρεμποδιστικού διαλύματος και προσθήκη νέου με την κατάλληλη αραίωση πρωτεΐοντος αντισώματος. Η επώαση γινόταν στους 4°C και διαρκούσε 16-20 ώρες. Η περίσσεια του αντισώματος απομακρυνόταν με 6-7 πεντάλεπτες πλύσεις με διάλυμα PT (1X PBS και 0.2% Triton X-100). Στη συνέχεια γινόταν επώαση με το δευτερεύον αντίσωμα σε 1X PBT για τουλάχιστον 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και επακόλουθη απομάκρυνσή του κατά τρόπο ανάλογο με το πρωτεύον αντίσωμα. Οι προνυμφικοί δίσκοι συλλέγονταν, τοποθετούνταν αρχικά σε 50% γλυκερόλη (σε 1X PBS), ακολούθως σε αντικειμενοφόρους και σε διάλυμα 1X PBS που περιείχε 80% γλυκερόλη και 1% n-propyl-gallate, καλύπτονταν με καλυπτρίδες, στεγανοποιούνταν και συντηρούνταν στους -20°C.

Και στις δύο πειραματικές διαδικασίες ο ανοσοεντοπισμός των πρωτεϊνών γινόταν με μικροσκοπία φθορισμού και λήψη οπτικών τομών με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου Leica TCS NT/SP. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν, οι αραιώσεις που εφαρμόστηκαν και όλες οι απαραίτητες πληροφορίες αναφέρονται λεπτομερώς σε επόμενη ενότητα.

21. ΧΡΩΣΕΙΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΣΙΔΑΣΗΣ

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τη μελέτη της έκφρασης ενδογενών γονιδίων της *Drosophila* και βασίζεται στην χρήση στελεχών που φέρουν το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (*lacZ*), το οποίο βρίσκεται υπό τον έλεγχο ενισχυτών των αντίστοιχων ενδογενών γονιδίων (στελέχη παγίδες ενισχυτών-enhancer trap lines). Στα στελέχη αυτά το γονίδιο *lacZ* εκφράζεται στους ίδιους ιστούς και αναπτυξιακά στάδια με τα αντίστοιχα ενδογενή γονίδια. Κατά συνέπεια, η έκφραση των τελευταίων μπορεί να μελετηθεί, εύκολα και γρήγορα, ανιχνεύοντας την έκφραση του γονιδίου αναφοράς, η οποία γίνεται ορατή με χρώση δραστηκότητας της β-γαλακτοσιδάσης. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την διερεύνηση της επίδρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών *Neur1/Neur* στο πρότυπο έκφρασης γονιδίων-στόχων του μονοπατιού Notch, σε δίσκους φτερού προνυμφών τρίτου σταδίου. Αρχικά γινόταν εκτομή των προνυμφών και μονιμοποίησή τους σε διάλυμα 1% γλουτεραλδεύδης (σε 1X PBS) σε θερμοκρασία δωματίου για 8 λεπτά. Η γλουτεραλδεύδη απομακρυνόταν με 4 πλύσεις σε 1X PBS. Ακολουθούσε ανίχνευση της δραστηκότητας της β-γαλακτοσιδάσης με την προσθήκη των ιστών σε διάλυμα χρώσης που περιείχε 10mM PB (10mM Na₂HPO₄, NaH₂PO₄), 150mM NaCl, 1mM MgCl₂, 3mM K₄[Fe₂CN₆], 3mM K₄[Fe₃CN₆], 0.3% Triton X-100 και 0.2% X-gal [αρχική συγκέντρωση

5% σε DMF (dimethyl-formamide), Promega]. Η επώαση γινόταν στους 37°C και η χρονική της διάρκεια ήταν συνάρτηση των διαγονιδιακών στελεχών που χρησιμοποιούνταν. Όταν η χρώση είχε φτάσει στα επιθυμητά επίπεδα η αντίδραση διακοπτόταν με την τοποθέτηση των ιστών σε 1X PBS. Οι προνυμφικοί δίσκοι συλλέγονταν, τοποθετούνταν αρχικά σε 50% γλυκερόλη (σε 1X PBS), ακολούθως σε αντικειμενοφόρους και σε διάλυμα 1X PBS που περιείχε 80% γλυκερόλη, καλύπτονταν με καλυπτρίδες και στεγανοποιούνταν. Ακολουθούσε παρατήρηση σε μικροσκόπιο Leica Diaplan με διερχόμενο φως και οπτικά Nomarski.

22. ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΕΜΒΡΥΑ *Drosophila* ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΛΕΥΣΗΣ

Οι πρωτεΐνες ανιχνεύονται αφού προηγουμένως έχουν αναγνωριστεί από πρωτεύοντα ειδικά αντισώματα, τα οποία στη συνέχεια αλληλεπιδρούν με δευτερεύουσες ανοσοσφαιρίνες που είναι προσδεδωμένες σε σφαιρίδια χρυσού. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης Neutralized της *Drosophila*, η οποία είχε υπερεκφραστεί εκτοπικά με τη χρήση του συστήματος GAL4.

A. Επεξεργασία εμβρύων για τομές σε μικροτόμο

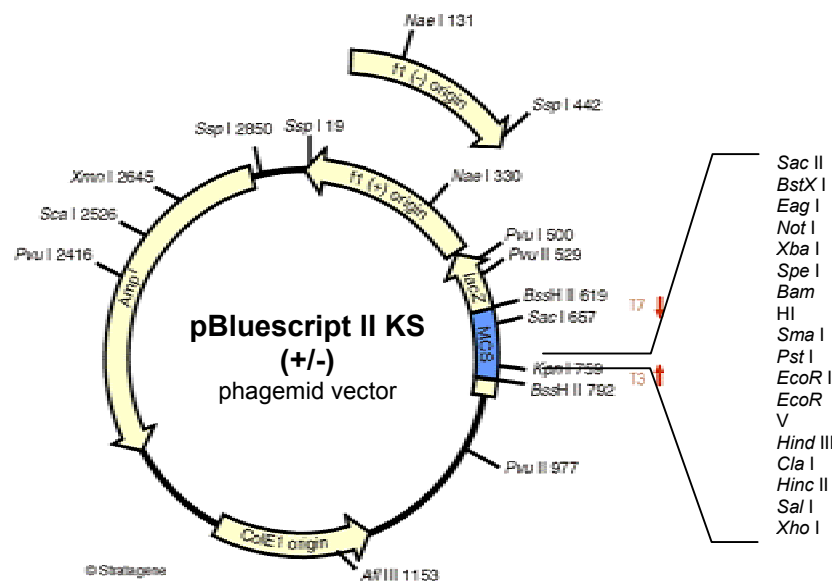
Τα έμβρυα, ηλικίας 8-16 ωρών, συλλέγονταν, αποχοριοποιούνταν σε υδατικό διάλυμα χλωρίνης, τελικής συγκέντρωσης 50% και μονιμοποιούνταν σε μίγμα που περιείχε διάλυμα μονιμοποίησης (100mM PIPES, 2mM EGTA και 1mM MgSO₄, pH 7.0 και 4% PFA ή 3.7% φορμαλδεΐδη) και ίσο όγκο επτανίου, για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ήπια ανάδευση. Ακολουθούσε αφαίρεση της υδάτινης φάσης, προσθήκη ίσου όγκου μεθανόλης και ισχυρή ανάδευση για 1-2 λεπτά, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση της βιτελλινικής μεμβράνης και καθίζηση των εμβρύων. Η πλήρης απομάκρυνση του επτανίου επιτυγχανόταν με 3 διαδοχικά πλυσίματα με μεθανόλη και ήπιες αναδεύσεις. Τα έμβρυα στη συνέχεια ξεπλένονταν με 1X PBS για 10-15 λεπτά και μονιμοποιούνταν ξανά σε διάλυμα 4% PFA και 1% γλουτεραλδεΐδης σε 1X PBS, για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούσαν δύο εικοσάλεπτες πλύσεις με 1X PBS στους 4°C και σταδιακή αφυδάτωση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθυλικής αλκοόλης (50% και 70% σε 1X PBS), δύο φορές ανά 15 λεπτά στους 4°C. Η έγκλιση των εμβρύων γινόταν αρχικά σε μίγμα 70% αιθυλικής αλκοόλης και ρητίνης (LRWhite), σε αναλογία όγκων 1:2, για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και επακόλουθα σε καθαρή ρητίνη, στις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνταν σε ειδικές κάψουλες και η ρητίνη πολυμεριζόταν με επώαση στους 50°C για 24 ώρες. Ακολουθούσαν, παρασκευή τομών και πειράματα ανοσοεντοπισμού.

B. Πειράματα ανοσοεντοπισμού σε τομές εμβρύων

Γινόταν πλύση των τομών σε παρεμποδιστικό διάλυμα A (1% BSA σε 1X PBS) για 30 λεπτά, το οποίο στη συνέχεια απομακρυνόταν και γινόταν προσθήκη διαλύματος B (1X PBS και 0.2% BSA) με το πρωτεΐον αντίσωμα σε κατάλληλη αραιώση. Η επώαση διαρκούσε 2 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου και σε υγρό περιβάλλον. Ακολουθούσαν τρία εικοσάλεπτα πλυσίματα με παρεμποδιστικό διάλυμα A και επώαση με το δευτερεύον αντίσωμα, αραιωμένο σε διάλυμα B. Οι συνθήκες επώασης και επακόλουθης απομάκρυνσης της περίσσειας του αντισώματος ήταν οι ίδιες με αυτές που εφαρμόστηκαν στην περίπτωση του πρωτεύοντος αντισώματος. Στη συνέχεια γινόταν χρώση των τομών με διάλυμα οξικού ουρανύλιου, τελικής συγκέντρωσης 2% και παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης τύπου JEOL JEM-100C. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν και οι αραιώσεις που εφαρμόστηκαν αναφέρονται σε επόμενη ενότητα.

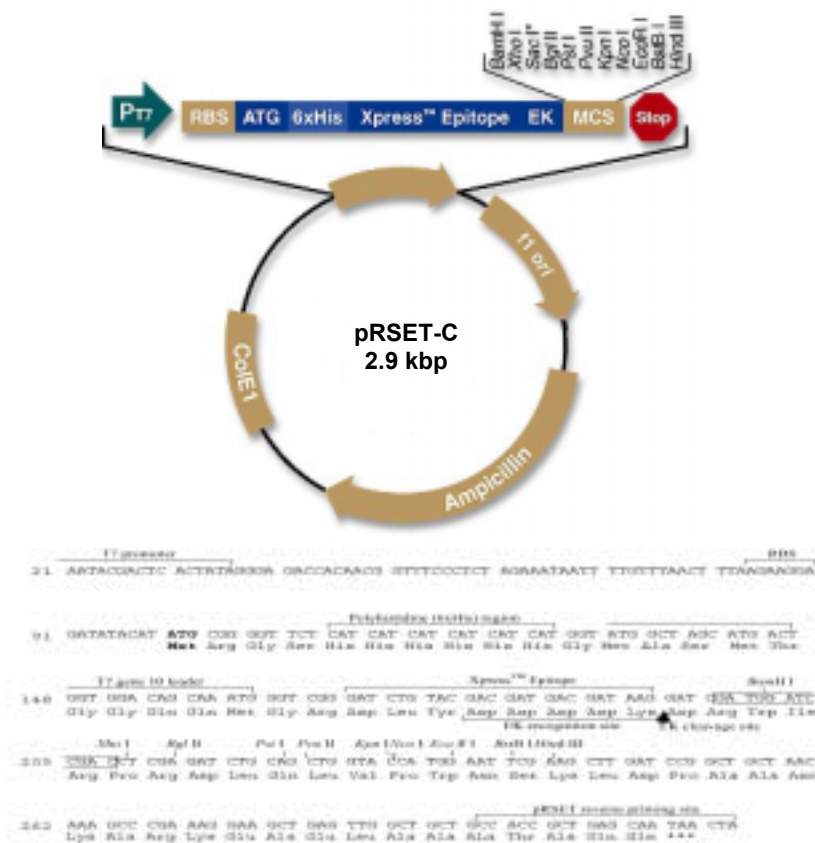
23. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ

pBluescript KS II + (Stratagene) : χρησιμοποιείται ευρέως για την κλωνοποίηση και ανάπτυξη ενθεμάτων DNA. Ο φορέας φέρει το γονίδιο *lacZ*, καθιστώντας εύκολη την επιλογή ανασυνδυασμένων βακτηριακών κλώνων (χρώση αντίδρασης β-γαλακτοσιδάσης). Επιπρόσθετα, η ύπαρξη υποκινητών T3 και T7 επιτρέπει τον προσδιορισμό νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των κλωνοποιημένων ενθεμάτων, με τη χρήση των αντίστοιχων εκκινήτων. Είναι επίσης δυνατή η πραγματοποίηση μεταγραφής *in vitro* από RNA πολυμεράσες που αναγνωρίζουν τους παραπάνω υποκινητές (Εικ. 13).



Εικόνα 13. Γραφική αναπαράσταση του πλασμιδιακού φορέα **pBluescript KS II +** : Η περιοχή κλωνοποίησης ενθεμάτων (MCS) χαρακτηρίζεται από πολυάριθμες θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων, γεγονός που καθιστά το φορέα ιδανικό για την κλωνοποίηση και ανάπτυξη ενθεμάτων DNA. Το γονίδιο *lacZ* επιτρέπει την εύκολη επιλογή ανασυνδυασμένων κλώνων. Η παρουσία υποκινητών T7 και T3 επιτρέπει τόσο πειράματα προσδιορισμού νουκλεοτιδικής αλληλουχίας όσο και μεταγραφής *in vitro*. Τα πλασμίδια pBluescript φέρουν κασέτα ανθεκτικότητας στελεχών *E. coli* σε αμπικιλίνη.

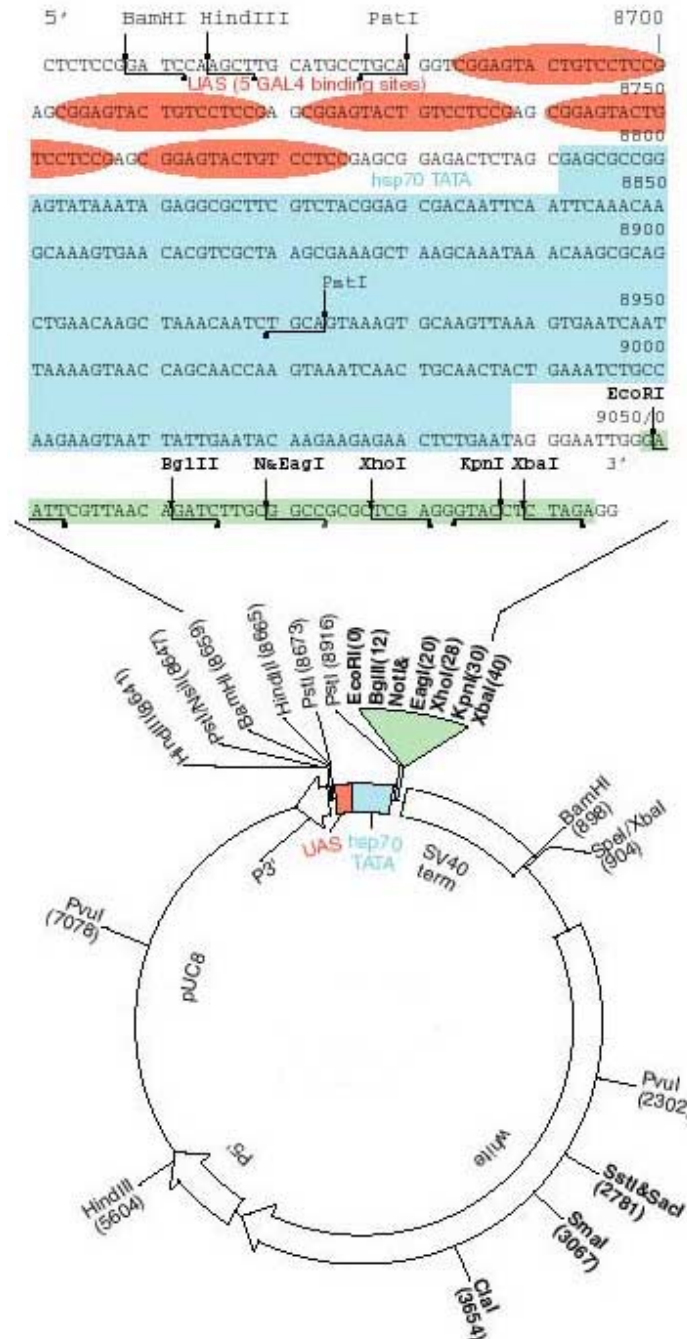
pRSET (Invitrogen) : πρόκειται για φορέα που έχει σχεδιαστεί να παρέχει υψηλά επίπεδα έκφρασης σε προκαρυωτικά κύτταρα, λόγω του ισχυρού υποκινητή του βακτηριοφάγου T7. Η έκφραση επάγεται σε στελέχη *Escherichia coli* BL21, με την προσθήκη IPTG. Το πλασμίδιο φέρει έξι αμινοτελικές ιστιδίνες για εύκολο καθαρισμό της παραγόμενης πρωτεΐνης καθώς και τον επίτοπο Xpress για πειράματα ανοσοεντοπισμού, με τη χρήση αντισώματος που κατασκευάζεται από την ίδια εταιρία. Επιπρόσθετα, υπάρχουν πολλαπλά κωδικόνια έναρξης μετάφρασης και πολυάριθμες θέσεις κλωνοποίησης. Διατίθενται τρεις τύποι pRSET (A, B και C), προκειμένου να είναι δυνατή η μετάφραση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης οποιουδήποτε ενθέματος cDNA. Τα μόρια cDNA που μελετήθηκαν κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pRSET-C (Εικ. 14).



Εικόνα 14. Γραφική αναπαράσταση του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης pRSETC : Ο φορέας διαθέτει τον ισχυρό υποκινητή T7, παρέχοντας υψηλά επίπεδα παραγωγής ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Ο αμινοτελικός επίτοπος Xpress και οι 6 ιστιδίνες καθιστούν δυνατή την ανοσοανίχνευση και τον εύκολο καθαρισμό της παραγόμενης πρωτεΐνης, αντίστοιχα. Οι πλασμιδιακοί φορείς pRSET φέρουν κασέτα ανθεκτικότητας στελεχών *E. coli* σε αμπικικιλίνη.

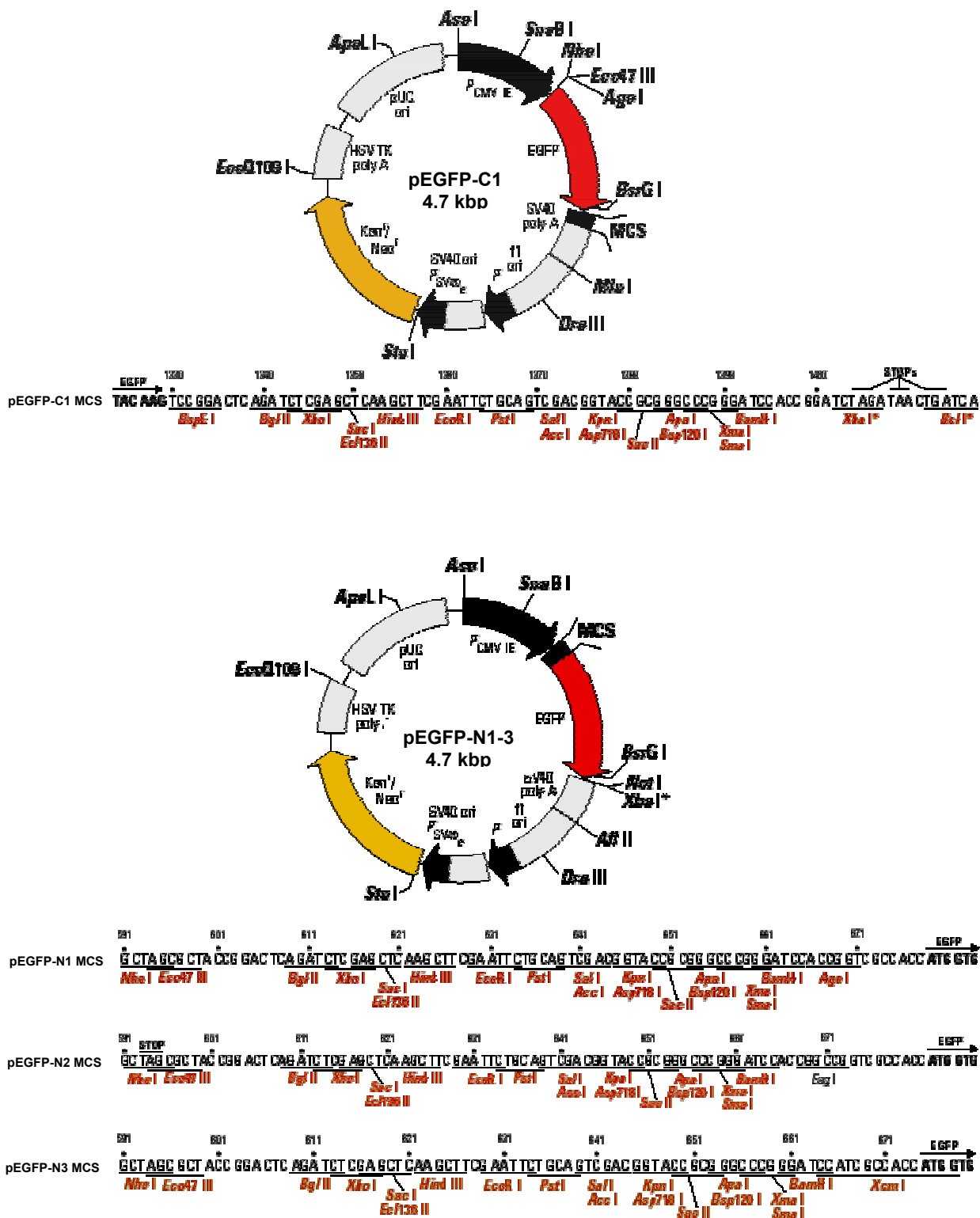
pP[UAST] : πρόκειται για πλασμιδιακό φορέα που χρησιμοποιείται στο μετασχηματισμό στελεχών *Drosophila*, μέσω του μεταθετού στοιχείου P. Τα ενθέματα cDNA που κλωνοποιούνται βρίσκονται υπό τον έλεγχο υποκινητή που ενεργοποιείται παρουσία του μεταγραφικού ενεργοποιητή GAL4. Ο φορέας φέρει επιπλέον και το

γονίδιο-δείκτη αναφοράς *mini white*, για την επιλογή των μετασχηματισμένων στελεχών. Πλευρικά του υποκινητή και του γονιδίου αναφοράς υπάρχουν οι 5' και 3' ακραίες αλληλουχίες του μεταθετού στοιχείου P, καθιστώντας δυνατή την ένθεση στο γονιδίωμα ολόκληρης της κατασκευής που βρίσκεται ανάμεσά τους (Εικ. 15).



Εικόνα 15. Γραφική αναπαράσταση του πλασμιδίου pP[UAST] : ο υποκινητής ελέγχου έκφρασης των κλωνοποιημένων ενθεμάτων (UAS-promoter) έχει πέντε θέσεις πρόσδεσης για τον μεταγραφικό ενεργοποιητή του σακχαρομύκητα GAL4. Το γονίδιο αναφοράς *mini white* είναι απαραίτητο για την επιλογή μετασχηματισμένων μυγών. Οι 5' και 3' ακραίες αλληλουχίες του μεταθετού στοιχείου P καθιστούν δυνατή την ένθεση της παρεμβαλλόμενης κατασκευής στο γονιδίωμα της *Drosophila*. Ο pP[UAST] πολλαπλασιάζεται σε βακτηριακά στελέχη *E. coli* και φέρει κασέτα ανθεκτικότητας σε αμπικιλίνη.

ρEGFP-C1-3 και ρEGFP-N1-3 (Clontech) : πρόκειται για πλασμιδιακούς φορείς που παρέχουν υψηλά επίπεδα έκφρασης σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών καθώς και τη



Εικόνα 16. Γραφικοί χάρτες των πλασμιδίων έκφρασης ρEGFP-C1 και ρEGFP-N1-3 : Οι φορείς διαθέτουν τον ισχυρό υποκινητή P_{CMV IE}, παρέχοντας υψηλά επίπεδα παραγωγής χιμαϊρικών πολυπεπτιδίων. Υπάρχει κασέτα ανθεκτικότητας σε νεομυκίνη και καναμυκίνη (Kan^r/Neo^r), επιτρέποντας την επιλογή μόνιμα μετασηματισμένων ευκαρυωτικών σειρών και ανασυνδυασμένων βακτηριακών στελεχών *E.coli*, αντίστοιχα. Οι περιοχές κλωνοποίησης ενθεμάτων (MCS) χαρακτηρίζονται από πολυάριθμες θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενδονουκλεασών, οι οποίες σε συνδυασμό με την δυνατότητα επιλογής φορέα, με το κατάλληλο πλαίσιο ανάγνωσης, επιτρέπουν την κλωνοποίηση οποιουδήποτε ενθέματος.

δυνατότητα κατασκευής χιμαιρικών πολυπεπτιδίων με την ενισχυμένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (EGFP). Η EGFP αποτελεί ισχυρότερη φθορίζουσα μορφή της αγρίου τύπου GFP, με μέγιστο απορρόφησης στα 488nm και εκπομπής στα 507nm. Η ενίσχυση του φθορισμού οφείλεται σε αντικαταστάσεις των αμινοξικών καταλοίπων Phe⁶⁴ και Ser⁶⁵ από λευκίνη και θρεονίνη, αντίστοιχα. Η EGFP είναι ιδιαίτερα σταθερή πρωτεΐνη και ο φθορισμός της διατηρείται για μεγάλα χρονικά διαστήματα ακόμα και αν χρησιμοποιηθούν ισχυρά μονιμοποιητικά διαλύματα (π.χ διάλυμα μονιμοποίησης αποτελούμενο από 1% γλουτεραλδεύδη και 4% PFA). Η κλωνοποίηση ενθεμάτων είναι δυνατή τόσο στο αμινοτελικό άκρο της GFP (pEGFP-N1-3) όσο και στο καρβοξυτελικό της άκρο (pEGFP-C1-3), σε όλα τα πλαίσια ανάγνωσης. Χρησιμοποιήθηκαν οι φορείς pEGFP-C1 και όλοι οι τύποι pEGFP-N (Εικ. 16).

Κλωνοποιήθηκαν ενθέματα των cDNAs των γονιδίων *neur* και *Neurl*, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών, ενώ κάποιες από τις χιμαιρικές κατασκευές απομονώθηκαν, εντέθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pP[UAST] και χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα κατευθυνόμενης υπερέκφρασης σε στελέχη *D. melanogaster*.

24. ΣΤΕΛΕΧΗ *Drosophila melanogaster*

Προκειμένου να διερευνηθεί η λειτουργική δράση των γονιδίων *Neurl* και *neur* καθώς και η επίδραση τους στην έκφραση και την τοπολογία διαφόρων πρωτεϊνών-στόχων του μονοπατιού Notch κατασκευάστηκαν διαγονιδιακά στελέχη τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα κατευθυνόμενης έκφρασης και δημιουργίας μιτωτικών κλώνων. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν διασταυρώσεις με σειρές GAL4 καθώς και με στελέχη που έφεραν το γονίδιο της φλιπάσης, η έκφραση του οποίου ελεγχόταν από υποκινητή θερμικού σοκ. Τα διαγονίδια χαρτογραφήθηκαν με τη χρήση στελεχών που έφεραν εξισορροπητές χρωμοσωμάτων (chromosomal balancers). Επιπρόσθετα, κατασκευάστηκαν και ανασυνδυασμένα στελέχη τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα συνέκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών με πρωτεΐνες-στόχους τους. Όλα τα στελέχη *Drosophila* που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Στελέχη *Drosophila melanogaster* που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα λειτουργικής ανάλυσης των γονιδίων *Neur1* και *neur*.

	Γενότυπος	Περιγραφή
Στελέχη για χρωμοσωμική χαρτογράφηση	<i>yw</i> ^{67c23} ; <i>CyO/Sco</i>	Χρήση στη χρωμοσωμική χαρτογράφηση των διαγονιδίων <i>Neur1</i> και <i>neur</i> και στην κατασκευή ανασυνδυασμένων στελεχών.
	<i>yw</i> ; <i>TM3/TM6B</i>	
Στελέχη-οδηγοί GAL4	<i>omb-GAL4/FM7</i>	Κατευθυνόμενη έκφραση από τον υποκινητή του γονιδίου <i>optomotor-blind</i> . Έκφραση στην κεντρική περιοχή του δίσκου του φτερού, εκατέρωθεν του προσθιο-οπίσθιου ορίου. Παρατηρείται σταδιακή ελάττωση των επιπέδων έκφρασης όσο αυξάνεται η απόσταση από το προσθιο-οπίσθιο όριο.
	<i>ptc-GAL4</i>	Αντιστοιχεί στην περιοχή έκφρασης του γονιδίου <i>patched</i> . Έκφραση στο πρόσθιο τμήμα του προσθιο-οπίσθιου ορίου. Η έκφραση ελαττώνεται όσο αυξάνει η απόσταση από το όριο.
	<i>w;neur-GAL4</i>	Αντιστοιχεί στις περιοχές έκφρασης του γονιδίου <i>neuralized</i> . Στο δίσκο του φτερού εκφράζεται στα προγονικά κύτταρα των αισθητηρίων οργάνων.
	<i>w;da.G32-GAL4</i> ^{UH1}	Αντιστοιχεί στην περιοχή έκφρασης του γονιδίου <i>daughterless</i> . Έκφραση από τα πρώιμα στάδια εμβρυογένεσης..
	<i>CyO/+;hs-GAL4</i>	Στέλεχος που φέρει διαγονίδιο που κωδικοποιεί τον GAL 4, το οποίο βρίσκεται υπό τον έλεγχο υποκινητή που επάγεται με θερμικό σοκ.
Στελέχη-παγίδες ενισχυτών (enhancer traps)	<i>yw;wg-lacZ/CyO</i>	Παγίδα ενισχυτή του γονιδίου <i>wingless</i> .
	<i>m8-lacZ-9</i>	Παγίδα ενισχυτή του γονιδίου <i>E(spl)m8</i> .
	<i>vg-lacZ (boundary)</i>	Παγίδα ενισχυτή του γονιδίου <i>vestigial</i> . Κατεύθυνση της έκφρασης στο ραχιαίο-κοιλιακό και προσθιο-οπίσθιο όριο του δίσκου του φτερού.
	<i>mβ-lacZ</i>	Παγίδα ενισχυτή του γονιδίου <i>E(spl)mβ</i> .
	<i>m4-lacZ</i>	Παγίδα ενισχυτή του γονιδίου <i>E(spl)m4</i> .
Στελέχη υπερέκφρασης	<i>yw;UAS-DxD</i> ^{B40}	Στέλεχος κατευθυνόμενης έκφρασης του διαγονιδίου <i>Delta</i> .
	<i>yw;UAS-GFP-Z</i>	Στέλεχος κατευθυνόμενης έκφρασης διαγονιδίου που κωδικοποιεί μία πυρηνική μορφή της GFP.
	<i>yw;UAS-neur</i> ^{12,4}	Στελέχη κατευθυνόμενης έκφρασης του διαγονιδίου <i>neuralized</i> της <i>D.melanogaster</i> .
	<i>yw;UAS-neur</i> ^{27,1}	
	<i>yw,UAS-Neur1</i>	Στέλεχος κατευθυνόμενης έκφρασης του διαγονιδίου <i>Neuralized</i> του ποντικού.
	<i>yw;UAS-DxD,UAS-neur</i> ^{12,4}	Στέλεχος κατευθυνόμενης συνέκφρασης των διαγονιδίων <i>neuralized</i> και <i>Delta</i> .
	<i>yw;UAS-DxD,UAS-GFP</i>	Στέλεχος κατευθυνόμενης συνέκφρασης των διαγονιδίων <i>GFP</i> (πυρηνική GFP) και <i>Delta</i> .
	<i>yw,UAS-Neur1;UAS-DxD</i>	Στέλεχος κατευθυνόμενης συνέκφρασης των διαγονιδίων <i>Neuralized</i> και <i>Delta</i> .
	<i>yw;UAS-neurΔRING-EGFP</i> ^{Δ032B}	Στελέχη κατευθυνόμενης έκφρασης διαγονιδίου που κωδικοποιεί χιμαιρική πρωτεΐνη, αποτελούμενη από την EGFP και την πρωτεΐνη <i>Neuralized</i> της <i>D.melanogaster</i> , στην οποία απουσιάζει ο δάκτυλος RING.
	<i>yw;UAS-neurΔRING-EGFP</i> ^{ΔA17A}	
	<i>yw;UAS-neurΔRING-EGFP</i> ^{ΔA9A}	
	<i>yw;UAS-neurΔRING-EGFP</i> ^{Δ021B}	
	<i>yw;UAS-Neur1-EGFP</i> ^{Δ015}	Στελέχη κατευθυνόμενης έκφρασης διαγονιδίου που κωδικοποιεί χιμαιρική πρωτεΐνη, αποτελούμενη από την EGFP και την πρωτεΐνη <i>Neuralized</i> του ποντικού.
	<i>yw;UAS-Neur1-EGFP</i> ^{M012}	
<i>yw;UAS-DxD, UAS-neurΔRING-EGFP</i> ^{Δ032B}	Στελέχη κατευθυνόμενης συνέκφρασης των διαγονιδίων <i>Delta</i> και <i>neurΔRING-EGFP</i> .	
<i>yw;UAS-DxD, UAS-neurΔRING-EGFP</i> ^{ΔA9A}		
Στελέχη για τη δημιουργία μιτωτικών κλώνων	<i>hs-FLP;CyO/Adv;act>CD2>GAL4</i>	Στέλεχος που φέρει διαγονίδιο που κωδικοποιεί τη φλιπάση. Το διαγονίδιο βρίσκεται υπό τον έλεγχο υποκινητή που επάγεται με θερμικό σοκ. Το στέλεχος φέρει επιπλέον το διαγονίδιο <i>GAL4</i> , η έκφραση του οποίου επάγεται ύστερα από μιτωτικό ανασυνδυασμό και ελέγχεται από τον υποκινητή της ακτίνης.

25. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

Χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης και υποκυτταρικού εντοπισμού των πρωτεϊνών Neur1 και Neur. Επιπρόσθετα, από παροδικά μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές απομονώθηκαν μεμβρανικά εκχυλίσματα και διερευνήθηκε η συσχέτιση των υπό μελέτη πολυπεπτιδίων με την πλασματική μεμβράνη ή εσωτερικές μεμβράνες του κυττάρου. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν και οι συνθήκες ανάπτυξής τους περιγράφονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Πληροφορίες για τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού των πρωτεϊνών Neur1 και Neur.

Κυτταρική σειρά	Τύπος κυττάρων-Προέλευση	Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης	Συνθήκες ανάπτυξης
COS-7	νεφρικά κύτταρα μετασχηματισμένα με SV-40 πράσινος αφρικάνικος πίθηκος (<i>Cercopithecus aethiops</i>)	DMEM (Gibco BRL™, Cat. No. 52100039)	37 °C 5% CO ₂
CV1	νεφρικά κύτταρα πράσινος αφρικάνικος πίθηκος (<i>Cercopithecus aethiops</i>)	10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco BRL™, Cat. No. 10106-169) 50μg/ml γενταμικίνη (Gentamycin)	
Hela	Καρκίνωμα επιθηλίου τραχήλου μήτρας <i>Homo sapiens</i>		
NIH 3T3	Εμβρυϊκοί ινοβλάστες ποντικού	DMEM (Gibco BRL™, Cat. No. 52100039) 8% calf serum (CS) (Gibco BRL™, Cat. No. 16170-086) 50μg/ml γενταμικίνη (Gentamycin)	37 °C 8% CO ₂
CaCo2	Αδενοκαρκίνωμα εντέρου <i>Homo sapiens</i>	DMEM (Gibco BRL™, Cat. No. 52100039) 20% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco BRL™, Cat. No. 10106-169) 50μg/ml γενταμικίνη (Gentamycin)	37 °C 5% CO ₂
K562	Χρόνια μυελογενής λευχαιμία <i>Homo sapiens</i>	RPMI 1640 (Gibco BRL™, Cat. No. 51800035) 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco BRL™, Cat. No. 10106-169) 50μg/ml γενταμικίνη (Gentamycin)	

26. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για πειράματα ανοσοεντοπισμού σε προνυμφικούς δίσκους *Drosophila melanogaster* και κυτταρικές σειρές θηλαστικών, σε πειραματικές διαδικασίες διερεύνησης της συσχέτισης των πρωτεϊνών Neur1 και Neur με κυτταρικές μεμβράνες και σε πειράματα υβριδοποιήσεων *in situ* σε έμβρυα ποντικού. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν, η προέλευσή τους καθώς και οι αραιώσεις που εφαρμόστηκαν συνοψίζονται παρακάτω (Πίνακας 7).

Πίνακας 7. Περιγραφή των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

ΠΡΩΤΕΥΟΝΤΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ				
Αντίσωμα	Αραίωση (ανοσοίστοχημεία)	Αραίωση (western blots)	Ειδικότητα	Προέλευση
Mouse-anti-Delta (mAb9B ή mAb202)	1 : 5000 (4°C, 16-20 ώρες)	1 : 3000 έως 1 : 5000 (4°C, 12-16 ώρες)	Εξωκυττάρια περιοχή της πρωτεΐνης Delta της <i>Drosophila</i>	Σπύρος Αρταβάνης (HARVARD, MGH)
Rabbit-anti-GFP	1 : 200 έως 1 : 300 (25°C, 2 ώρες) (TEM)	1 : 3000 (25°C, 4-5 ώρες) 1 : 5000 (4°C, 12-16 ώρες)	Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη	Invitrogen
Mouse-anti-β tubulin		1 : 2000 (25°C, 4-5 ώρες) 1 : 4000 (4°C, 12-16 ώρες)	β-σοληνίνη	Molecular probes
Mouse-anti-human p115	1 : 50 (25°C, 3 ώρες)	1 : 500 (4°C, 12-16 ώρες)	Πρωτεΐνη που σχετίζεται με τη μεμβράνη του δικτύου Golgi μοριακού, μεγέθους 115 Kda.	
Rabbit-anti-calnexin	1 : 80 (25°C, 3 ώρες)	1 : 1000 (4°C, 12-16 ώρες)	Διαμεμβρανική πρωτεΐνη ενδοπλασματικού δικτύου	
Rabbit-anti-ER proteins	1 : 500 (4°C, 12-16 ώρες)		Μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών ενδοπλασματικού δικτύου	Daniele Louvard (Institut Curie, Paris.)
Mouse-anti-wg	1 : 10 (4°C, 16-20 ώρες)		Πρωτεΐνη Wingless	Stephen Cohen (EMBL, Heidelberg)
Mouse-anti-Notch ^{ec}	1 : 100 (4°C, 16-20 ώρες)		Εξωκυττάρια περιοχή της πρωτεΐνης Notch της <i>Drosophila</i>	Σπύρος Αρταβάνης (HARVARD, MGH)
Guinea pig-anti-Delta	1 : 4000 (4°C, 16-20 ώρες)		Εξωκυττάρια περιοχή της πρωτεΐνης Delta της <i>Drosophila</i>	
Mouse-anti-Fas III	1 : 500 (4°C, 16-20 ώρες)		Φασικλίνη III (διαμεμβρανική πρωτεΐνη)	DSHB
Mouse-anti-DIG-AP	1 : 5000 (25°C, 2-4 ώρες) (4°C, 14-18 ώρες)		Διοξυγενίνη	Boehringer mannheim
Mouse-anti-myc	1 : 100 (25°C, 3 ώρες)		Επίτοπος myc	Santa Cruz
ΔΕΥΤΕΡΕΥΟΝΤΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ				
Αντίσωμα	Αραίωση (ανοσοίστοχημεία)	Αραίωση (western blots)	Χαρακτηριστικά-Ιδιότητες	Προέλευση
Donkey anti-mouse IgG -HRP (DaM-HRP)		1 : 5000 (25°C, 1-3 ώρες)	Προσδεσμένη περοξειδάση ραπανιού (Horseradish peroxidase)	Jackson Immunoresearch
Goat anti-rabbit IgG -HRP (GaR-HRP)		1 : 15000 (25°C, 1ώρα)		
Goat anti-mouse IgG -FITC (GaR-FITC)			Πράσινο μ.κ.: 488nm (Fluorescein)	
Goat anti-rabbit IgG -Cy TM 3 (GaR-Cy3)	1 : 250 (25°C, 3-5 ώρες)		Ερυθρό μ.κ.: 568nm (Cyanine-3)	
Goat anti-rabbit IgG -Cy TM 5 (GaR-Cy5)			Ερυθρό μακρού μ.κ.: 647nm (Cyanine-5)	
Alexa Fluor® 488 goat anti-guinea pig IgG (H+L) highly cross-adsorbed			Πράσινο μ.κ.: 488nm (Alexa Fluor® 488)	Molecular Probes
Alexa Fluor® 647 goat anti-guinea pig IgG (H+L) highly cross-adsorbed	1 : 1000 (25°C, 3-5 ώρες)		Ερυθρό μακρού μ.κ.: 647nm (Alexa Fluor® 647)	
Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L) highly cross-adsorbed			Πράσινο μ.κ.: 488nm (Alexa Fluor® 488)	
Alexa Fluor® 568 goat anti-mouse IgG (H+L) highly cross-adsorbed			Ερυθρό μ.κ.: 568nm (Alexa Fluor® 568)	
EM Goat anti-rabbit IgG (20nm Gold)	1 : 40 (25°C, 2 ώρες)		Προσδεσμένα σφαιρίδια χρυσού (διάμετρος σφαιριδίων : 20nm)	British BioCell International

Στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 8) αναφέρονται τα παρεμποδιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε πρωτεΐον αντίσωμα, ανάλογα με την πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε. Τα δευτερεύοντα αντισώματα αραιώνονταν στο ίδιο παρεμποδιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε και για το αντίστοιχο πρωτεΐον αντίσωμα.

Πίνακας 8. Περιγραφή των παρεμποδιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, για κάθε πρωτεΐον αντίσωμα, στα πειράματα ανοσοϊστοχημείας και western blots.

Πρωτεΐον αντίσωμα	Παρεμποδιστικά διαλύματα	
	ανοσοϊστοχημεία	western blots
Mouse-anti- β tubulin		1X TBS 1% άπαχο γάλα 0.1% Tween-20
Rabbit-anti-GFP	1X PBS 0.2% BSA (TEM)	
Mouse-anti-myc	1X PBS 5% BSA 0.2% Triton X-100	
Rabbit-anti-ER proteins		
Mouse-anti-human p115		1X PBS 5% άπαχο γάλα
Rabbit-anti-calnexin		
Mouse-anti-Delta (mAb9B ή mAb202)		
Mouse-anti-wg		
Mouse-anti-Notch ^{ec}		
Guinea pig-anti-Delta		
Mouse-anti-Fas III		
Mouse-anti-DIG-AP	20mM μαλεϊκό οξύ pH 7.5 30mM NaCl 0.02% Tween-20 10%NGS	

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *Neuralized* ΣΤΟΝ ΠΟΝΤΙΚΟ

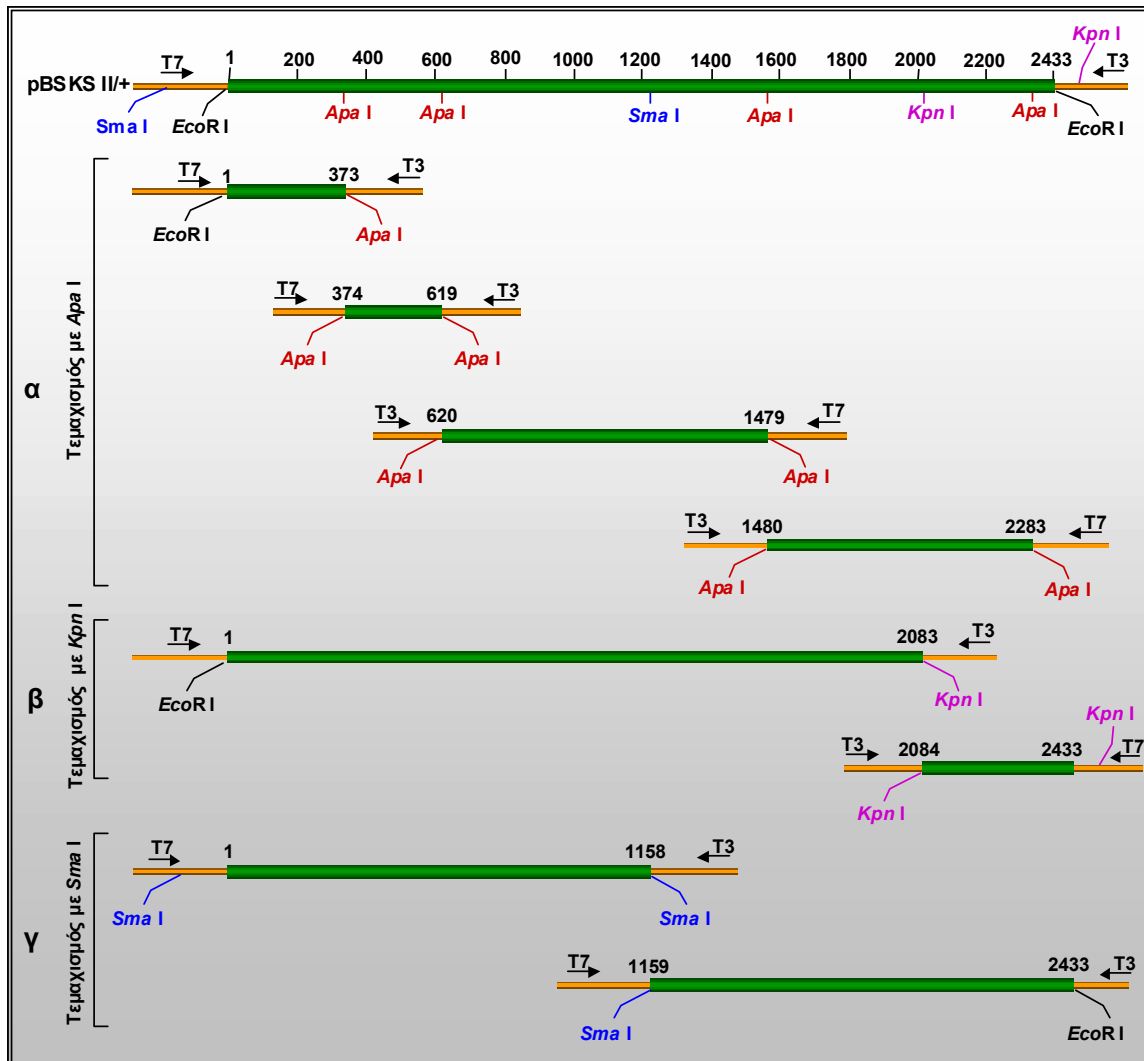
1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ cDNA ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΕΙ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΙΝΗ *Neuralized* ΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ

Προκειμένου να απομονωθούν μόρια cDNA που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη *Neuralized* του ποντικού διερευνήθηκε βιβλιοθήκη cDNA από εγκέφαλο εμβρύου ποντικού ημέρας E14.5 (στέλεχος C57BL/6). Συγκεκριμένα, διερευνήθηκαν, κατά προσέγγιση, 8×10^5 φαγικές μονάδες (rfus)-φορείς ενθεμάτων. Για την ανίχνευση θετικών κλώνων χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινο EST (expressed sequence tag), μεγέθους 734 νουκλεοτιδίων, το οποίο παρουσίαζε υψηλή ομολογία με το γονίδιο *neuralized* της *Drosophila melanogaster* και ήταν χαρτογραφημένο στη χρωμοσωμική περιοχή 10q25.1 (Banfi et. al., 1996). Το συγκεκριμένο EST είχε απομονωθεί από βιβλιοθήκη ενθεμάτων cDNA, προερχόμενη από εγκέφαλο ενηλίκου ατόμου (I.M.A.G.E #179548, GenBank No. H51467-H51423). Από τη διερεύνηση της βιβλιοθήκης προέκυψε ένθεμα cDNA, μεγέθους 2.433 bp, το οποίο απομονώθηκε από το DNA του βακτηριοφάγου, ύστερα από πέψη με την ενδονουκλεάση *EcoR* I και κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα pBluescript KS II+ (Stratagene) στην αντίστοιχη θέση ένθεσης. Ακολούθησε ανάλυση με τη χρήση ποικίλων περιοριστικών ενζύμων και επακόλουθες υποκλωνοποιήσεις προκειμένου να γίνει εφικτός ο προσδιορισμός της πλήρους νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

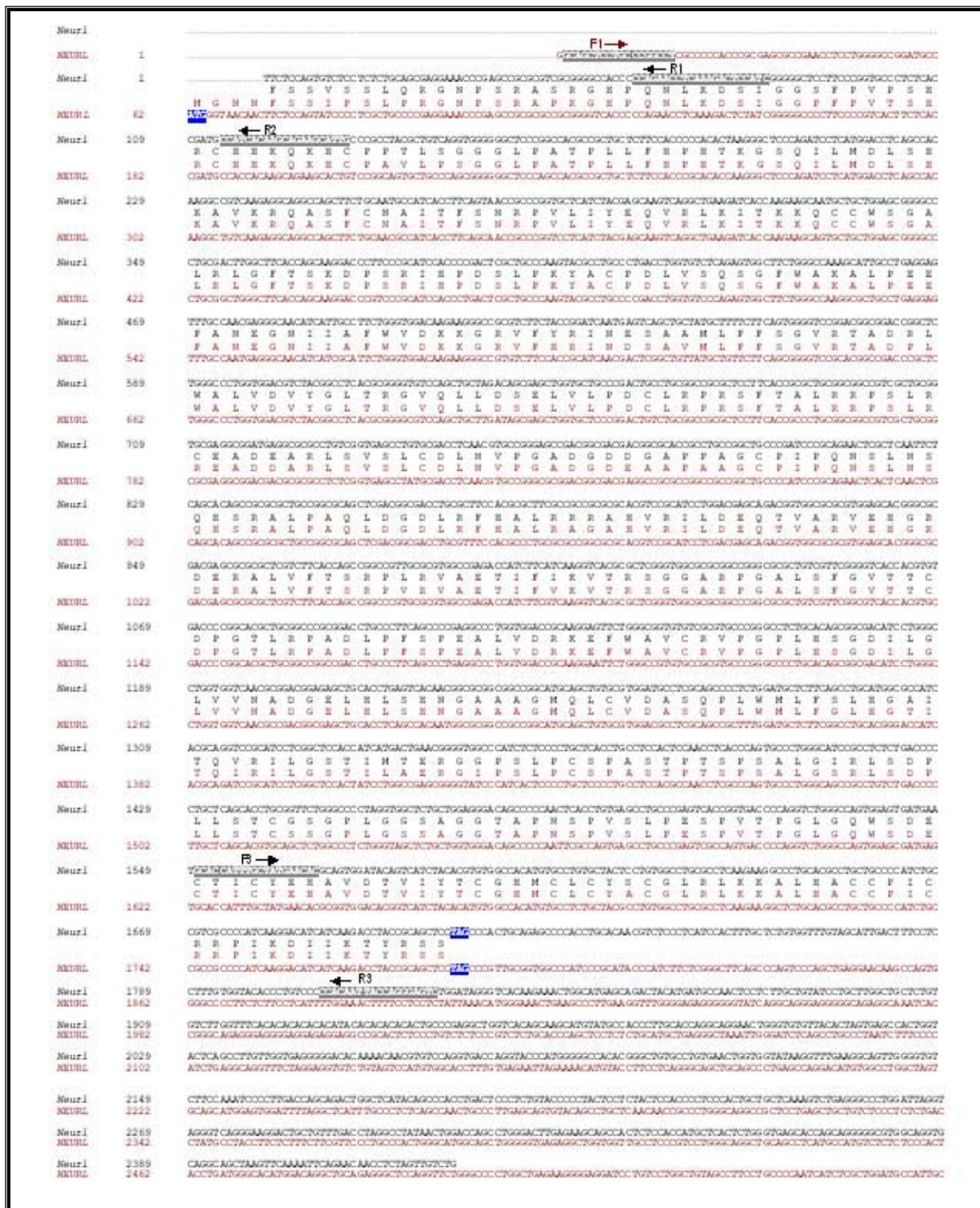
του. Υποκλωνοποιήθηκαν τέσσερα θραύσματα μεγέθους 373bp, 246bp, 860bp, 804bp (Εικ.17α), τα οποία προέκυψαν ύστερα από τεμαχισμό με την ενδονουκλεάση *Ara I* και δύο ζεύγη συμπληρωματικών ενθεμάτων μεγέθους 2084bp/348bp (Εικ.17β), 1158bp/1275bp (Εικ.17γ), επικαλυπτόμενα μεταξύ τους καθώς και με τα προηγούμενα, τα οποία απομονώθηκαν μετά από τεμαχισμό με τα περιοριστικά ένζυμα *Kpn I* και *Sma I*, αντίστοιχα. Η ανάλυση, η συγκριτική μελέτη των αλληλουχιών που ταυτοποιήθηκαν, η σύνθεση της πλήρους νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του κλώνου καθώς και η σύγκρισή του με τα cDNAs των ομολόγων γονιδίων στον άνθρωπο (*NEURL*, Genbank accession Nos. NM_004210, Nakamura et al., 1998 και AF029729, Prinios et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα) και στη *Drosophila* (*neur*, Genbank accession No. S62583, Price et al., 1993) πραγματοποιήθηκαν *in silico* με τη χρήση των υπολογιστικών προγραμμάτων BESTFIT, GAP και BLAST του πακέτου GCG (Genetics Computer Group-www.accelrys.com).

Από τις αναλύσεις *in silico* διαπιστώθηκε ότι ο κλώνος που απομονώθηκε αποτελούταν από ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, μεγέθους 1710bp, που κωδικοποιούσε ένα πολυπεπτιδίο 570 αμινοξέων, ακολουθούμενο από 723bp μη μεταφραζόμενης αλληλουχίας του 3' άκρου (Εικ.18). Συγκριτική μελέτη με το πλήρους μήκους cDNA του γονιδίου *NEURALIZED* του ανθρώπου έδειξε ότι το 5' άκρο του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του κλώνου ήταν ελλιπές κατά τέσσερα αμινοξέα (Εικ.19). Προκειμένου να προσδιοριστεί η απουσιάζουσα νουκλεοτιδική αλληλουχία και να εντοπιστεί το εναρκτήριο κωδικόνιο μετάφρασης πραγματοποιήθηκαν πειράματα RT-PCR. Αναλυτικά, πραγματοποιήθηκε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής σε poly(A)⁺ RNA από εγκέφαλο εμβρύου ποντικού ημέρας E14.5 (στέλεχος BALB/C). Χρησιμοποιήθηκε εκκινητής ειδικός για το mRNA του γονιδίου *Neuralized*, ο οποίος επιλέχθηκε με βάση την ήδη υπάρχουσα αλληλουχία του cDNA που απομονώθηκε (5'-GACTCCCTGGTAATTGTG-3', reverse, R3) και υβριδοποιούταν στη 3' μη μεταφραζόμενη αλληλουχία του μεταγράφου (Εικ.18). Το μονόκλωνο προϊόν της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για τη σύνθεση και τον πολλαπλασιασμό δίκλωνου προϊόντος, αναμενόμενου μεγέθους 213bp, με τη χρήση εκκινητή ειδικού για το cDNA του *Neuralized* του ποντικού (5'-CAATGCTTCTGCTTGTGATGG-3', reverse, R2) και ενός εκκινητή (5'-GCAGCTCCT-GCCCGCCT-3', forward, F1) που συντέθηκε με βάση την 5' μη μεταφραζόμενη αλληλουχία του ανθρώπινου ομολόγου (Genbank accession No. AF029729). Στο προϊόν που προέκυψε και που είχε, πράγματι, μέγεθος 213bp προσδιορίστηκε η νουκλεοτιδική του αλληλουχία με αντίδραση PCR και τη χρήση ενός μόνο εκκινητή που ήταν ειδικός για το συγκεκριμένο γονίδιο (5'-GATGGAGTCTT-TGAGGTTCTGG-5', reverse, R1 ή 5'-CAATGCTTCTGCTTGTGATGG-3', reverse, R2) (Εικ.18). Από την ανάλυση της αλληλουχίας του προϊόντος εντοπίστηκε το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης (ATG) και προσδιορίστηκε μέρος (55bp) της 5' μη μεταφραζόμενης αλληλουχίας (Εικ.19). Το πλήρες ανοιχτό πλαίσιο

ανάγνωσης, συνεπώς, είχε μέγεθος 1722bp και κωδικοποιούσε ένα πολυπεπτίδιο 574 αμινοξικών καταλοίπων, μεγέθους ίσου με το μέγεθος της ομόλογης πρωτεΐνης του ανθρώπου (Genbank accession No. NM_021360).



Εικόνα 17. Γραφική απεικόνιση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που κατασκευάστηκαν από επιμέρους τεμάχια του cDNA του γονιδίου *Neuralized* του ποντικού για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής του αλληλουχίας. Ο κλώνος cDNA που ανιχνεύτηκε από τη διερεύνηση της βιβλιοθήκης κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript KS II+ στη θέση ένθεσης *EcoR* I. Ακολούθησε τεμαχισμός του ενθέματος με τα περιοριστικά ένζυμα *Apa* I (α), *Kpn* I (β) και *Sma* I (γ). Τα νουκλεϊκά τεμάχια που απομονώθηκαν κλωνοποιήθηκαν στον ίδιο φορέα, στις αντίστοιχες θέσεις ένθεσης. Οι ανασυνδυασμένοι φορείς με τα παραμένοντα, από τις πέψεις, τμήματα του αρχικού κλώνου επανακυκλοποιήθηκαν (self ligation). Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των επιμέρους ενθεμάτων καθώς και του πλήρους μήκους cDNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των εκκινητών T3 και T7. Οι νουκλεοτιδικές αλυσίδες αναλύθηκαν, εντοπίστηκαν οι αλληλεπικαλύψεις τους και ακολούθως προσδιορίστηκε η πλήρης νουκλεοτιδική σύσταση του κλώνου. Το 5' άκρο της κωδικοποιούσας αλυσίδας του cDNA οριοθετείται από το νουκλεοτίδιο 1.

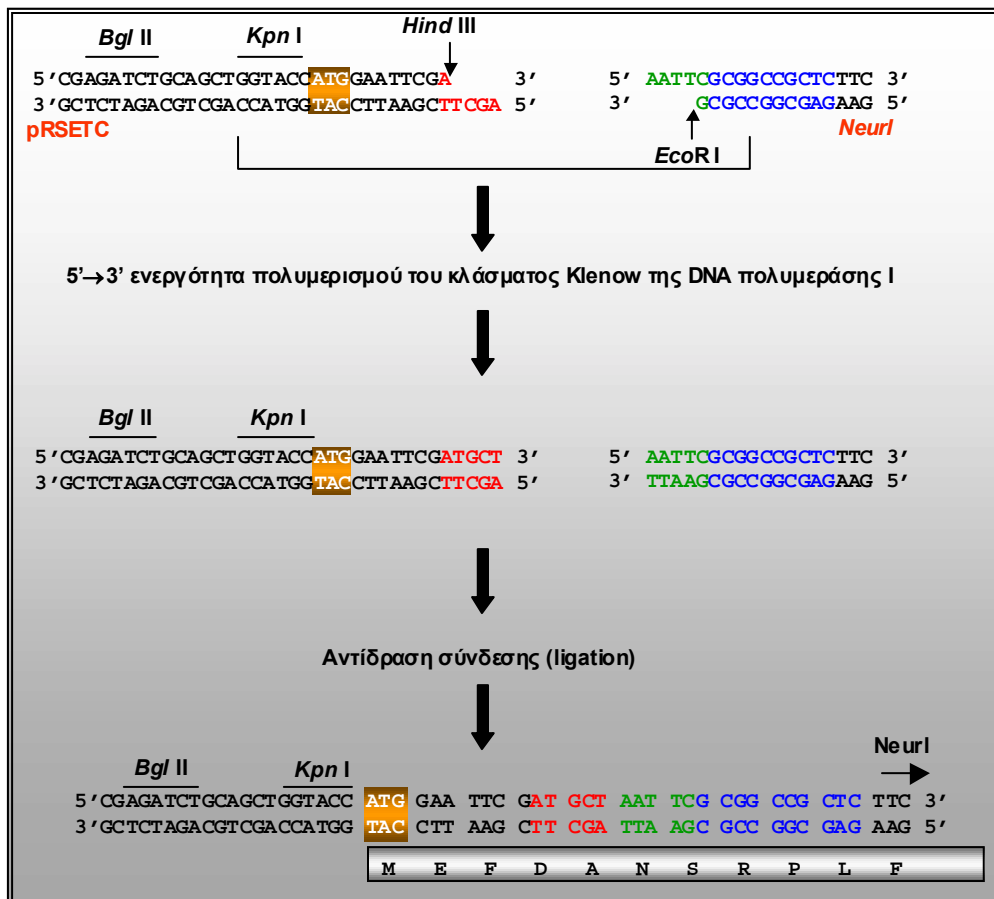


Εικόνα 18. Συγκριτική ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του cDNA του γονιδίου *Neuralized* του ποντικού (*Neurl*) με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του cDNA του ομολόγου γονιδίου του ανθρώπου (*NEURL*). Σημειώνονται οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα RT-PCR για την εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του απουσιάζοντος 5' άκρου της μεταφραζόμενης περιοχής του γονιδίου *Neurl*, η οποία απουσίαζε από τον κλώνο που απομονώθηκε, καθώς και οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα προσδιορισμού του προτύπου έκφρασης του γονιδίου. R : reverse, F : forward.

1	1	..GCTCCTGCCCAGCCTTGCTGGCTCCCGCGGAGCACCCCGGGGGCCGATGCCATGGGTAATAACTTCTCCAGTGTCTCCTCTCTGCAGCGA
		M G N N F S S V S S L Q R
95	14	GGAAACCCGAGCGCGCTCGCGGGGCCACCCCAAGACTCCATCGGGGGCTCTCCCGGTGCCCTCTCACCAGTGCATCACAAG
		G N P S R A S R G H P Q N L K D S I G G S F P V P S H R C H H K
191	46	CAGAAGCATTGCCCGCTACGCTGTCAGGTGGGGGGCTCCCGGCCACGCGCTGTCTTCCACCCCACTAAGGGTCCCAGATCTCATGGAC
		Q K H C P P T L S G Q G L P A T P L L F H P H T K G S Q I L M D
287	78	CTCAGCCACAAGCCGCTCAAGAGGCAGGCCAGCTTCTGCAATGCCATCACCTTTCAGTAACCGCCGGTGTCTATCTACGAGCAAGTCAGGCTGAAG
		L S H K A V K R Q A S F C N A I T F S N R P V L I Y E Q V R L K
383	110	ATCACCAAGAAGCAATGCTGCTGGAGCGGGCCCTGCGACTTGGCTTCAACCAGCAAGGACCCCTTCCCGCATCCACCCCGACTCGTGCCCAAGTAC
		I T K K Q C C W S G A L R L G F T S K D P S R I H P D S L P K Y
479	142	GCCTGCCTGACTGGTGTCTCAGAGTGGCTTCTGGGCCAAGCATTGCCTGAGGAGTTTGCCAACGAGGGCAACATCAITGCCTTCTGGGTGGAC
		A C P D L V S Q S G F W A K A L P E E F A N E G N I I A F W V D
575	174	AAGAAGGGCCCGCTTCTTACCGGATCAATGAGTCAGCTGCTACTGCTTTTCTTTCAGTGGGGTCCGGACGGCGGACCGGCTCTGGGCCCTGGTGGAC
		K K G R V F Y R I N E S A A M L F F S G V R T A D R L W A L V D
671	206	GTCTACGGCCTCACGCGGGGTCTCCAGCTGTAGACAGCAGCTGGTGTGCGCCGACTGCTGCGCGCGCGCTCTTCCACCGCGTGGCGGGCCG
		V Y G L T R G V Q L L D S E L V L P D C L R P R S F T A L R R P
767	238	TCGCTGCGGTGCGAGGCGGATGAGCGCGCTGTGCTGAGCCTTTCAGTCCGCGGAGCCGACGGCGACGAGCGCGCACCGCGCTGCC
		S L R C E A D E A R L S V S L C D L N V P G A D G D D G A P P A
863	270	GGCTCCCGATCCCGCAGAATCGCTCAATTCTCAGCACAGCGCGCGCTGCGCGCGCAGCTCGACGGCGACCTGCGCTTCCACCGCGCTTCCGCGC
		G C P I P Q N S L N S Q H S R A L P A Q L D G D L R F H A L G R R
959	302	CGCGCGCAGTCCGCTCCTGGACGAGCAGCGTGGCGCGCTGGAGCACGGGCGGACGAGCGCGCTCGTCTTCCACAGCCGGCCGTTGCGC
		R A H V R I L D E Q T V A R V E H G R D E R A L V F T S R P L R
1055	334	GTGGCCGAGACCATCTTCAAGTCAAGCTCAGCGCTCGGGTGGCGCGCGCGCGCTGTGCTTCCGGGGTCAACAGTGTGACCCCGGCAGCGTG
		V A E T I F I K V T R S G G A R P G A L S F G V T T C D P G T L
1151	366	CGGCCCGGACCTGCCCTTACGCCCCGAGGCCCTGGTGGACCGCAAGGAGTTCGGCGGTGTGCTGCGTCCCGGGCCCTTGACAGCGGGCAG
		R P A D L P F S P E A L V D R K E F W A V C R V P G P L H S G D
1247	398	ATCTGGGCTGGTGGTCAACGCGGACGAGCTGCACCTGAGTCAACAACGGCGCGCGCGCGCATGACAGTGTGCTGATGCTCAGCGCC
		I L G L V V N A D G E L H L S H N G A A A G M Q L C V D A S Q P
1343	430	CTCTGGATGCTCTTACGCTGCATGGCGCCATCAGCAGGTCGCGCATCTCCGCTCCACCATCATGACTGAACGGGGTGGCCCATCTCTCCCTGC
		L W M L F S L H G A I T Q V R I L G S T I M T E R G G P S L S P
1439	462	TCACCTGCCTCCACTCCAACCTCACCCAGTGCCTGGGCACTCCGCTCTTCAACCCCTGCTCAGCACCTGCGGTTCTGGGCCCTTAGTGGCTCT
		C P A S T P T S A L L G I R L S D P L L S T C G S G P L G G S
1535	494	GCTGGAGGGACAGCCCCAACTCACCTGTGAGCCTGCCGAGTCAACCGTGAACCCAGTCTGGGCCAGTGGAGTGAATGCACCATTTGCTAT
		A G G T A P N S P V S L P E S P V T P G L G Q W S D E C T I C Y
1631	526	GAACACGAGTGGATACAGTCACTACACGCTGTGCCACATGTGCTGTGCTACTCTGTGGCCTGCGCCTCAAGAAGGCCCTGCACGCTGTGTC
		E H A V D T V I Y T C G H M C L C Y S C G L R L K K A L H A C C
1727	558	CCCATCTGCGCTGCCCATCAAGGACATCATCAAGACTACCGCAGTCTCCAGCCACTGCAGAGCCCCACTGCACAACGCTCTCCCTCATCCAC
		P I C R R P I K D I I K T Y R S S
1823		TTTGCTCTGTGGTTTGTAGCATTGACTTTCCTCTTTGTGGTACACCCCTGTCCCCCACAATTACCAGGGAGTCTGGATAGGGTCAAGAAGACTGG
1919		CATGAGCAGACTACATGATGCCAATCCTCTTGTGTATCTGCTTGGCTGCTCTGTCTTGGTTTACACACACACACATACACACACTG
2015		CCCAGGCTGGTCAAGCATGTATGCCACCCCTTGACACAGCAGGAACCTGGGTGTGTACTAGTGGCCACTGGTACTCAGCCTTGTGTG
2111		TGAGGGGACACAAAACAGTGTCCAGGTGACCCAGTACCCATGGGGGCCACCGGGTGTGCTGTGAACTGGTGGTATAAGGTTTGAAGGCAG
2207		TTGGGGTGTCTTCCAAATCCCTTGACAGCAGACTGGCTCATACAGCCACTGACTCCCTCTGTACCCCTACTCTCTACTCCACCCCTCCCA
2303		CTGCTGCTCAAAGTCTGAGGGCCCTGGATTAGGTAGGGTCAGGAAGGACTGCTGTTGACCTAGGCTATAACTGGACAGCCTGGGACTTGAGA
2399		AGCAGCCACTCTCCACCATGCTCACTCTGGGTGAGCACCAGCGGGCGTGGCAGGTGCAGGCAGCTAAGTTCAAATTCAGAACAACCTCTAGT
2495		TGTCGTG

Εικόνα 19. Η υπάρχουσα γνωστή νουκλεοτιδική αλληλουχία (2500bp) του cDNA του γονιδίου *Neuralized* του ποντικού. Στη σημασμένη περιοχή (γκρι πλαίσιο) περιλαμβάνονται τα πρόσθετα 67 νουκλεοτίδια που απουσίαζαν από τον κλώνο cDNA που απομονώθηκε και που τελικά προσδιορίστηκαν με πειράματα RT-PCR, με βάση την υπάρχουσα πλήρους μήκους αλληλουχία του ταυτοποιημένου ανθρώπινου ομολόγου *NEURL*. Εντοπίστηκε το κωδικόνιο έναρξης μετάφρασης (πράσινο) και επιβεβαιώθηκε ότι το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης είχε μέγεθος 1722bp και κωδικοποιούσε ένα πολυπεπτίδιο μεγέθους 574 αμινοξικών καταλοίπων, κατ’ αντιστοιχία με την ανθρώπινη ομόλογη πρωτεΐνη.

Ο κλώνος *Neurl* που απομονώθηκε από τη διερεύνηση της βιβλιοθήκης χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα λειτουργικής ανάλυσης του γονιδίου. Προκειμένου να επιλυθεί το πρόβλημα της απουσίας εναρκτήριου κωδικονίου μετάφρασης ενσωματώθηκε “κασέτα” αποτελούμενη από την τριπλέτα ATG και εννέα πρόσθετες τριπλέτες που κωδικοποιούσαν αμινοξέα που, θεωρητικά, δεν επηρέαζαν τις ιδιότητες της πρωτεΐνης. Αυτό επιτεύχθηκε με κλωνοποίηση του πλήρους



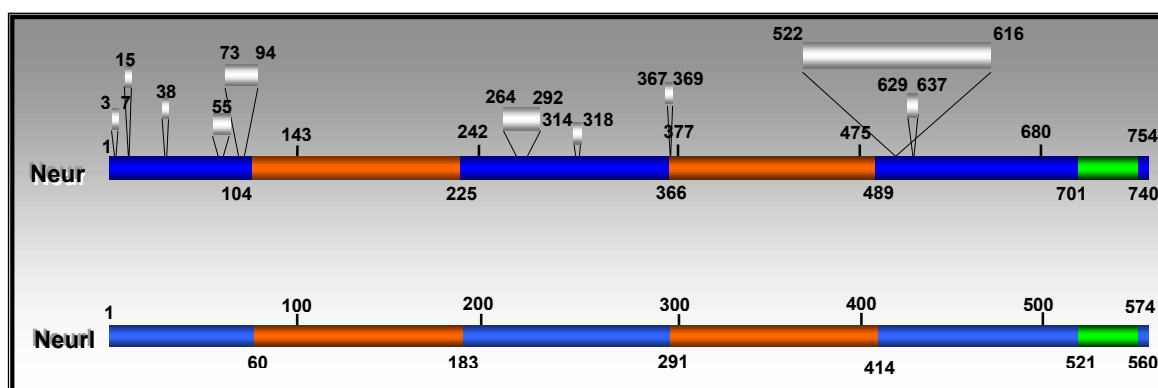
Εικόνα 20. Γραφική αναπαράσταση της ένθεσης συνθετικού κωδικονίου έναρξης μετάφρασης στον κλώνο cDNA του γονιδίου *Neuralized* του ποντικού. Το cDNA απομονώθηκε από τον πλασμιδιακό φορέα pBluescriptKSII+ με πέψη με *Eco*R I. Τα προεξέχοντα άκρα του ενθέματος μετατράπηκαν σε τυφλά με την 5'→3' ενεργότητα πολυμερισμού του κλάσματος *Klenow* της DNA Pol I και ακολούθησε ένθεση στον φορέα pRSETC. Ο pRSETC είχε γραμμοποιηθεί με *Hind* III και είχε τροποποιημένα (τυφλά) άκρα, κατ' αντίστοιχο τρόπο με το ένθεμα. Από την αντίδραση σύνδεσης επιλέχθηκαν οι ανασυνδυασμένοι φορείς στους οποίους το 5' άκρο της κωδικοποιούσας αλυσίδας του cDNA είχε εντεθεί πλησίον της θέσης *Kpn* I. Με τον τρόπο αυτό η κωδικοποιούσα αλληλουχία του κλώνου είχε το ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με μία τριπλέτα ATG του φορέα, η οποία βρισκόταν παρακείμενη της θέσης *Kpn* I (κίτρινο πλαίσιο). Ανάμεσα στην τριπλέτα ATG και το πρώτο κωδικόνιο του κλώνου (TTC : F) παρεμβάλλονταν 27 νουκλεοτίδια τα οποία κωδικοποιούσαν 9 αμινοξέα (E-F-D-A-N-S-R-P-L) που, θεωρητικά τουλάχιστον, δεν επηρέαζαν τις ιδιότητες της πρωτεΐνης *Neur1*. Το cDNA με το συνθετικό εναρκτήριο κωδικόνιο μετάφρασης χρησιμοποιήθηκε εκτενώς στη λειτουργική μελέτη του μορίου.

μήκους ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα pRSETC. Συγκεκριμένα, το cDNA απομονώθηκε με τεμαχισμό της κατασκευής pBSKS II+/*Neur1* με *Eco*R I. Τα άκρα του γραμμικού ενθέματος μετατράπηκαν σε τυφλά με τη 5'→3' ενεργότητα πολυμερισμού του κλάσματος *Klenow* της DNA Pol I και ακολούθησε κλωνοποίηση στο φορέα pRSETC, ο οποίος γραμμοποιήθηκε με *Hind* III και είχε τροποποιημένα μη προεξέχοντα άκρα, κατ' ανάλογο τρόπο με το ένθεμα (Εικ.20).

2. ΔΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Neuralized

Συγκριτική μελέτη της πρωτεΐνης Neuralized του ποντικού με την ομόλογη στον άνθρωπο έδειξε ότι υπάρχει υψηλή ομολογία σε νουκλεοτιδικό και αμινοξικό επίπεδο. Συγκεκριμένα και τα δύο γονίδια κωδικοποιούν πολυπεπτίδια του ίδιου μεγέθους (574 αμινοξέα), τα οποία εμφανίζουν αμινοξική ομολογία 95.65% και ταυτότητα 94.25%. Συνολικά εντοπίζονται 33 αντικαταστάσεις αμινοξέων (Εικ.21), εκ των οποίων μόνο πέντε είναι μη συντηρητικές. Αναλυτικά, τα αμινοξέα Cys²⁴¹, Arg^{301,302}, Gly⁴⁵⁶ και Ile⁴⁷⁵ του πολυπεπτιδίου του ποντικού έχουν αντικατασταθεί στο ανθρώπινο ομόλογο μόριο από Arg, Ala, Gly, Ile και Ser, αντίστοιχα. Και οι δύο πρωτεΐνες έχουν συγκρίσιμα θεωρητικά μοριακά μεγέθη (Neurl : 62.033 da, NEURL : 61.860 da, http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html), είναι ιδιαίτερα βασικές και έχουν παρόμοια ισοηλεκτρικά σημεία (Neurl pI : 8.97, NEURL pI : 8.89).

Η συγκριτική ανάλυση των πρωτεϊνών Neuralized ανθρώπου/ποντικού και της *Drosophila* έδειξε αμινοξική ομολογία 57% και ταυτότητα 33%, σε όλο το μήκος των πολυπεπτιδίων. Αντίστοιχες ομολογίες έχουν διαπιστωθεί στις περισσότερες περιπτώσεις που συγκρίνονται πολυπεπτίδια ανάμεσα σε θηλαστικά και έντομα (Sasai et al., 1992). Και τα τρία μόρια χαρακτηρίζονται από την ίδια δομική αρχιτεκτονική (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Συγκεκριμένα, στο καρβοξυτελικό άκρο των πολυπεπτιδίων εντοπίζεται ο δάκτυλος ψευδαργύρου τύπου C₃HC₄ RING, μεγέθους 40 αμινοξέων καθώς και δύο περιοχές NEUZ (NEUZ1 και NEUZ2), μεγέθους 124 αμινοξέων (Εικ.21,22). Στις τρεις αυτές περιοχές παρατηρείται και η υψηλότερη ομολογία μεταξύ των θηλαστικών και του δροσοφιλικού ομολόγου. Αναλυτικά, στο δάκτυλο RING τα μόρια παρουσιάζουν ομολογία 66% και ταυτότητα 49% ενώ στις επαναλήψεις NEUZ1 και NEUZ2 η ομολογία και η ταυτότητα ανέρχονται σε 52%, 45% (NEUZ1) και 43%, 32% (NEUZ2), αντίστοιχα. Μολονότι τα τρία ομόλογα χαρακτηρίζονται από την ίδια αρχιτεκτονική, η πρωτεΐνη της *Drosophila* είναι μεγαλύτερη κατά 180 αμινοξέα (Εικ.21,22). Αυτή η διαφορά μεγέθους ενδεχομένως να αντικατοπτρίζει πρόσθετα λειτουργικά χαρακτηριστικά στο δροσοφιλικό μόριο ή απλά τα αμινοξικά τεμάχια που απουσιάζουν από τα ομόλογα ανθρώπου/ποντικού να αποτελούν αδιαμόρφωτες αλυσίδες που συνδέουν τις παρακείμενες δομές (δάκτυλος RING και περιοχές NEUZ) και δεν έχουν καμία λειτουργική σημασία. Η δεύτερη πιθανότητα ενισχύεται από το γεγονός ότι οι περιοχές που απουσιάζουν από τα θηλαστικά πολυπεπτίδια δεν εντοπίζονται στις κοινές και μοναδικές δομικές περιοχές των μορίων. Επιπλέον, από υπολογιστικά προγράμματα πρόβλεψης δευτεροταγούς δομής πρωτεϊνών (<http://cubic.bioc.columbia.edu/predict-protein/>) φαίνεται ότι τα πρόσθετα τμήματα αποτελούν αδιαμόρφωτες αλυσίδες, αφού δεν ανιχνεύεται κάποια συγκεκριμένη διαμόρφωση (έλικα ή β-έλασμα).



Εικόνα 22. Γραφική αναπαράσταση της συγκριτικής δομικής μελέτης μεταξύ των πολυπεπτιδίων NeurI του ποντικού και Neur της *D. melanogaster*. Η πρωτεΐνη Neur είναι μεγαλύτερη κατά 180 αμινοξέα. Εντοπίζονται συνολικά 10 θέσεις πρόσθετων αμινοξικών αλληλουχιών, εκ των οποίων τέσσερις έχουν ιδιαίτερα σημαντικό μέγεθος που κυμαίνεται από 14 έως 95 κατάλοιπα. Μπλε : περιοχές ομολογίας <35%, Κόκκινο : Περιοχές Neuz, πράσινο : δάκτυλος RING, γκρι : περιοχές που απουσιάζουν από τη πρωτεΐνη NeurI.

3. ΤΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *Neuralized* ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ

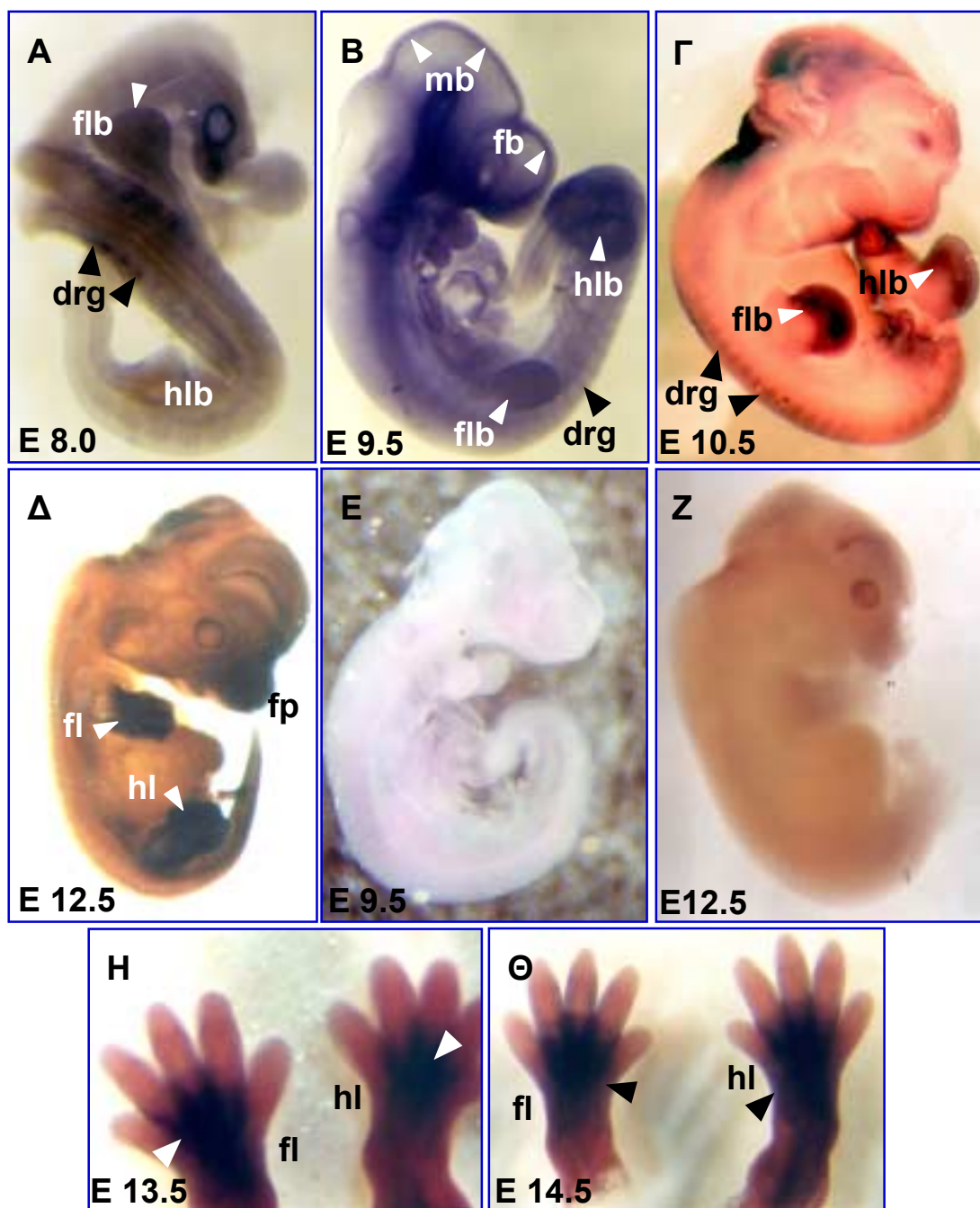
Το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *neur* της *Drosophila* καθώς και γενετικά δεδομένα υπεδείκνυαν ένα γονίδιο που συμμετέχει σε ποικίλες αναπτυξιακές διαδικασίες της μύγας, με ιδιαίτερη συμμετοχή στο καθορισμό της κυτταρικής τύχης κατά διάρκεια της νευρογένεσης (Boulianne et al., 1991, Price et al., 1993). Επιπρόσθετα, από μελέτες του ομόλογου γονιδίου στον άνθρωπο παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα μεταγράφων στον εγκέφαλο φυσιολογικών ατόμων, τα οποία ελαττώνονταν σημαντικά στους ιστούς με καρκινικά αστροκυττώματα (Nakamura et al., 1998). Η διερεύνηση, συνεπώς, του προτύπου έκφρασης του *Neuralized* κατά τις αναπτυξιακές διαδικασίες της εμβρυογένεσης καθώς και της ενήλικης ζωής του ποντικού και ο εντοπισμός των ιστών και των οργάνων όπου παρατηρούνται υψηλά επίπεδα μεταγράφων και κατά συνέπεια εν δυνάμει λειτουργικής συμμετοχής του γονιδίου, θα αποτελούσε μία εναρκτήρια πηγή πληροφορίας για τη σημαντικότητα και την πιθανή συσχέτισή του με άλλα γνωστά συνεκφραζόμενα γονίδια. Οι προκύπτουσες παρατηρήσεις, η αναδρομή στο ιδιαίτερα μελετημένο ετερόλογο σύστημα της *Drosophila* καθώς και η ενδεχόμενη συσχέτιση με το σηματοδοτικό μηχανισμό Notch ή άλλα γνωστά αναπτυξιακά μονοπάτια θα αποτελούσαν σημαντικό εφόδιο στην προσπάθεια διερεύνησης της λειτουργικής δράσης του γονιδίου από τη μύγα μέχρι τον άνθρωπο.

Η μελέτη του προτύπου έκφρασης του γονιδίου *Neuralized* στον ποντικό πραγματοποιήθηκε με πειράματα υβριδοποίησης *in situ* σε ολόκληρα έμβρυα καθώς και

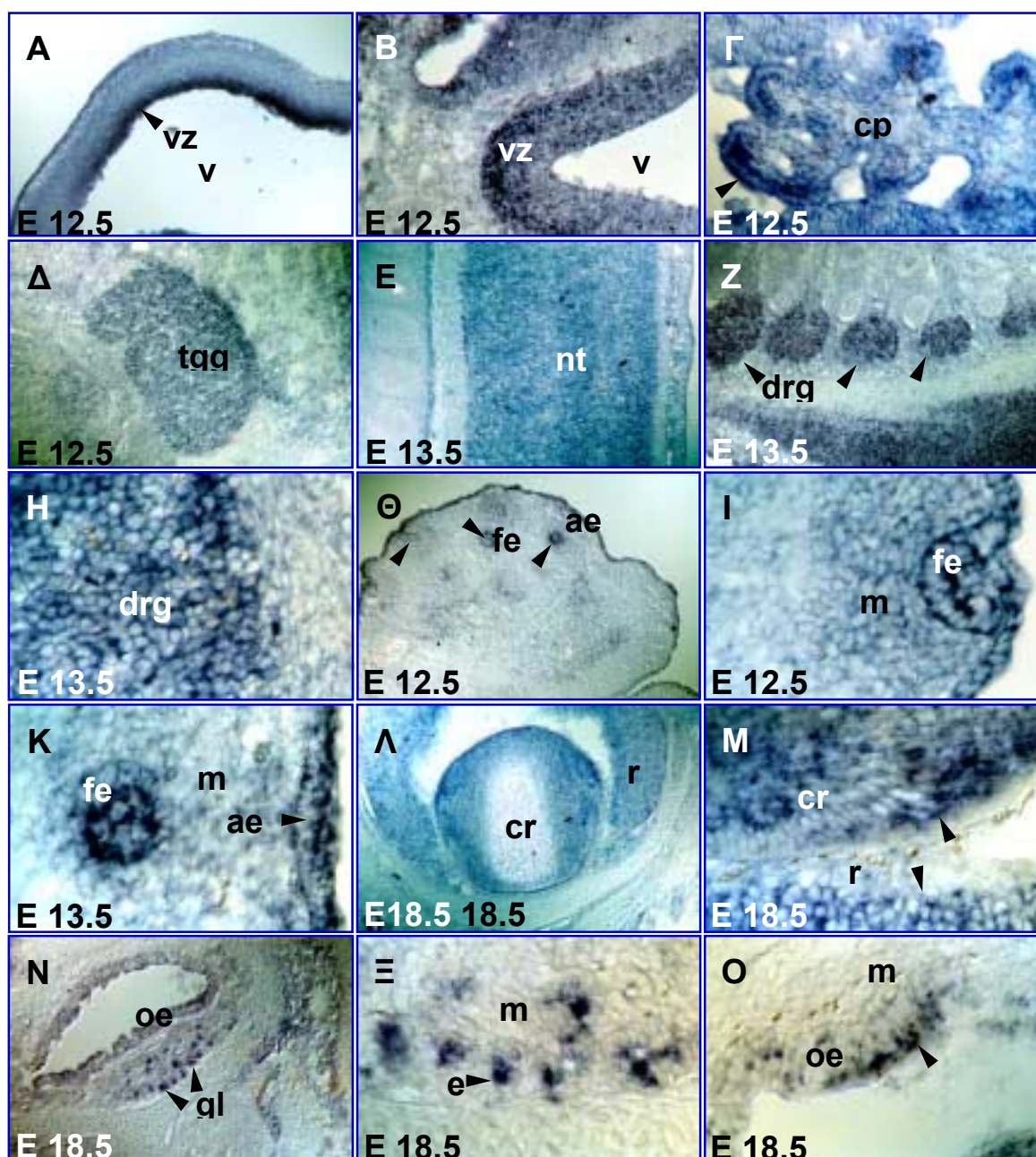
σε τομές εμβρύων από διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής RNA, συμπληρωματικός του ενδογενούς μεταγράφου (anti-sense probe), ο οποίος παρασκευάστηκε με μεταγραφή *in vitro* και είχε σημειωθεί με διγοξιγενίνη. Ως μήτρα στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκε τμήμα του κλώνου cDNA του *Neuralized* που περιελάμβανε το 3' άκρο της μη μεταφραζόμενης αλληλουχίας και 551 νουκλεοτίδια του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου (νουκλεοτίδια 1159-2433, Εικ.18). Το συγκεκριμένο ένθεμα ήταν κλωνοποιημένο στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript KS II+ (Εικ.17γ) και είχε προέλθει από την αρχική κατασκευή pBluescript KS II+/*Neurl* (1-2433bp) η οποία επανακυκλοποιήθηκε αφού προηγουμένως είχε πραγματοποιηθεί τεμαχισμός με *Sma* I και είχαν αφαιρεθεί τα 1158 νουκλεοτίδια του 5' άκρου του κλώνου (Εικ. 18). Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο γραμμοποιήθηκε με *Bam*H I (πλησίον του 5' άκρου της κωδικοποιούσας αλυσίδας του ενθέματος) και η αντίδραση μεταγραφής πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της T3 πολυμεράσης του RNA. Για τον έλεγχο της αξιοπιστίας της μεθόδου και των λαμβανόμενων αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν και πειράματα υβριδοποίησης *in situ* με τη χρήση ανιχνευτή RNA που ήταν ταυτόσημος με το ενδογενές μετάγραφο (sense probe). Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε σαν μήτρα το ίδιο ένθεμα με τη διαφορά ότι ο φορέας γραμμοποιήθηκε με *Hind* III (πλησίον του 3' άκρου της κωδικοποιούσας αλυσίδας του ενθέματος) και η μεταγραφή πραγματοποιήθηκε με T7 πολυμεράση του RNA.

Παρατηρήθηκε ότι το *Neuralized* στον ποντικό εκφράζεται σε συγκεκριμένες περιοχές και κυτταρικές ομάδες, σε διάφορους ιστούς και όργανα του αναπτυσσόμενου εμβρύου. Στα πειράματα υβριδοποίησης σε ολόκληρα έμβρυα, ηλικίας E8.0 έως E14.5, ανιχνεύτηκε έκφραση του γονιδίου στα ραχιαία ριζικά γάγγλια (Εικ.23Α-Γ), στα αναπτυσσόμενα άκρα (Εικ. 1Α-Δ, Η-Θ) και στην περιοχή του προσώπου (Εικ.23Γ-Δ). Λεπτομερέστερη μελέτη του προτύπου έκφρασης πραγματοποιήθηκε σε τομές εμβρύων ποντικού ηλικίας E12.5, E13.5 και E18.5 (Εικ.24-26). Διαπιστώθηκε ότι το γονίδιο εκφράζεται σε ιστούς νευρικής προέλευσης όπως στη κοιλιακή (πολλαπλασιαζόμενη) ζώνη του μεσεγκεφάλου (Εικ.24 Α,Β), την επιθηλιακή στοιβάδα του χοριοειδούς πλέγματος(Εικ. 24Γ), το τρίδυμο νεύρο (Εικ.24Δ), το νευρικό σωλήνα (Εικ.24Ε) και τα ραχιαία ριζικά γάγγλια (Εικ.24Ε,Ζ). Υψηλά επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν σε αισθητήρια όργανα και συγκεκριμένα στα επιθηλιακά κύτταρα των εκβλαστημάτων των μουστακιών (Εικ.24Θ-Κ), στον αμφιβληστροειδή χιτώνα και στα κύτταρα του φακού του ματιού (Εικ.24Λ-Μ) καθώς και στις επιθηλιακές στοιβάδες της ρινικής κοιλότητας και των ρινικών αδένων (Εικ.24Ν-Ο). Μετάγραφα ανιχνεύτηκαν, επίσης, σε διακριτές κυτταρικές ομάδες των εσωτερικών οργάνων. Αναλυτικά, παρατηρήθηκε έκφραση στο βρογχικό επιθήλιο των πνευμόνων (Εικ. 25Α,Β), στη στοιβάδα των σωληνοειδών επιθηλιακών κυττάρων των νεφρικών σπειραμάτων (Εικ.25Γ,Δ), στο βλεννογόνο επιθήλιο του

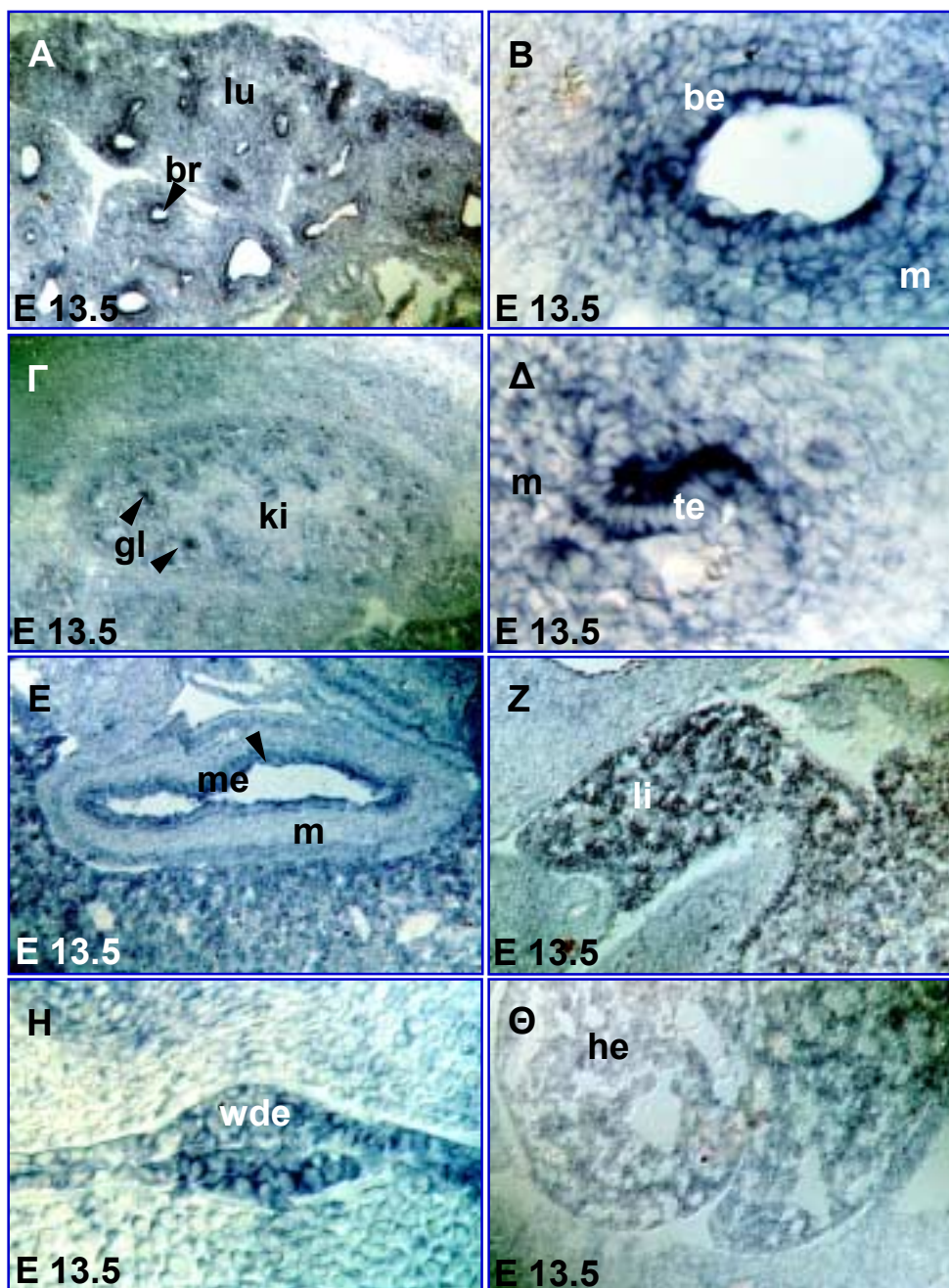
στομάχου (Εικ.25Ε), στο ήπαρ (Εικ.25Ζ), στο επιθήλιο του μεσενφρικού βολφιανού ουρογεννητικού αγωγού (Εικ.25Η) και στον καρδιακό ιστό (Εικ.25Θ.). Το γονίδιο *Neurl*



Εικόνα 23. Πειράματα υβριδοποίησης *in situ* σε έμβρυα ποντικού (στέλεχος BALB/C). A-Δ : ανίχνευση μεταγράφων του γονιδίου *Neuralized* σε έμβρυα αναπτυξιακών ημερών E8.0 - E12.5. E-Z : Πειράματα ελέγχου σε έμβρυα σταδίων E9.5 (E) και E12.5 (Z). Η-Θ : ανίχνευση του mRNA του γονιδίου *Neuralized* σε πρόσθια και οπίσθια άκρα εμβρύων E13.5 (Η) και E14.5 (Θ). Στα αναπτυξιακά στάδια E8.0 (A), E9.5 (B) και E10.5 (Γ) ανιχνεύονται μεταγράφα του *Neuralized* στα αναπτυσσόμενα εκβλαστήματα των πρόσθιων (flb : fore limb buds) και οπίσθιων (hlb : hind limb buds) άκρων καθώς και στα ραχιαία ριζικά γάγγλια (drg : dorsal root ganglia). Στα έμβρυα ηλικίας E9.5 παρατηρείται έκφραση και στον μεσεγκεφαλο (mb : midbrain) και πρόσθιο εγκέφαλο (fb : forebrain). Στην εμβρυϊκή ηλικία E12.5 (Δ) το γονίδιο *Neurl* εξακολουθεί να είναι ενεργό στα ραχιαία ριζικά γάγγλια καθώς και στα αναπτυσσόμενα πρόσθια (fl) και οπίσθια (hl) άκρα και συγκεκριμένα στα ακραία (distal) τμήματα κατά μήκος του άξονα επιμήκυνσης. Το *Neurl* φαίνεται, επίσης, ότι συμμετέχει και στις αναπτυξιακές διαδικασίες της ρινικής περιοχής (fp : facial processes). Η ανίχνευση μεταγράφων του γονιδίου κατά την διαδικασία ανάπτυξης των άκρων συνεχίζεται και στις εμβρυϊκές ηλικίες E13.5 (Η) και E14.5 (Θ).

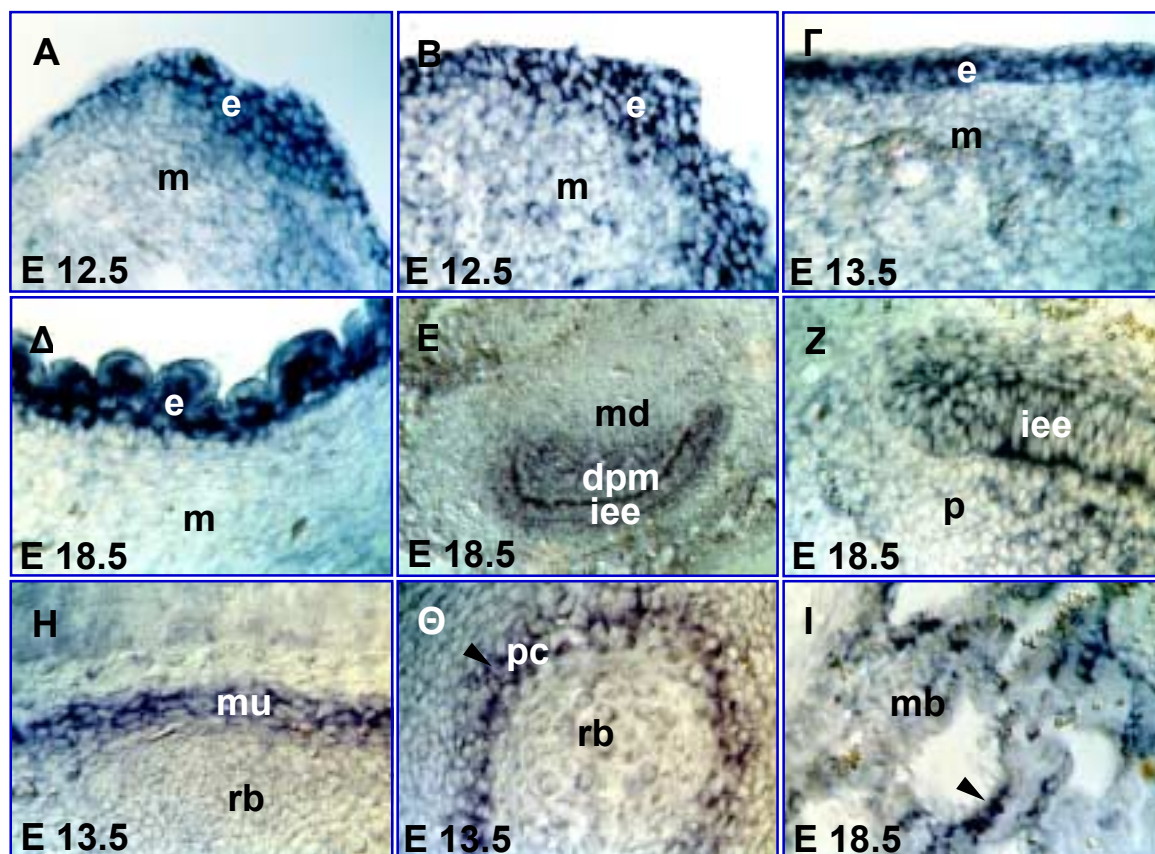


Εικόνα 24. Πειράματα υβριδοποίησης *in situ* σε επιμήκεις τομές εμβρύων ποντικού (στέλεχος BALB/C) ηλικίας E12.5, E13.5 και E18.5. Έκφραση του γονιδίου *Neuralized* σε νευρικούς ιστούς και αισθητήρια όργανα. Μετάγραφα του γονιδίου *Neuralized* ανιχνεύονται στην κοιλιακή ζώνη του μεσεγκεφάλου (vz : ventricular zone - A, B : μεγέθυνση), στο χοριοειδές πλέγμα (cp : choroid plexus - Γ), στο τρίδυμο νεύρο (tgg : trigeminal ganglion - Δ), στο νευρικό σωλήνα (nt : neural tube - E), στα ραχιαία ριζικά γάγγλια (drg : dorsal root ganglia - Z, H : μεγέθυνση). Αυξημένα επίπεδα mRNA ανιχνεύονται και στις αναπτυξιακές διαδικασίες του προσώπου και συγκεκριμένα στο θυλακοειδές επιθήλιο των εκβλαστημάτων των μουστακιών (fe : follicular epithelium, Θ, I-K : μεγεθύνσεις) και στο εξωστοματικό επιθήλιο (ae : aboral epithelium - Θ, K : μεγέθυνση). Το *Neuralized* εκφράζεται επίσης και σε αισθητήρια όργανα όπως στον αναπτυσσόμενο οφθαλμό και στη ρινική περιοχή (Λ-Ο). Συγκεκριμένα, ανιχνεύονται μετάγραφα του γονιδίου σε κυτταρικές ομάδες του φακού κατά την πορεία διαφοροποίησής τους σε κρυσταλλικά (cr : crystalline cells), στον αμφιβληστροειδή χιτώνα (r : retina) (Λ, M : μεγέθυνση) καθώς και στο ρινικό οσφρητικό επιθήλιο (oe : olfactory epithelium - N, O : μεγέθυνση) και στους οσφρητικούς αδένες (gl : glands - N, Ξ : μεγέθυνση). Πρόσθετες συντομογραφίες : m (mesenchyme) : μεσέγχυμα, v (ventricle) : τρίτη κοιλία εγκεφάλου.



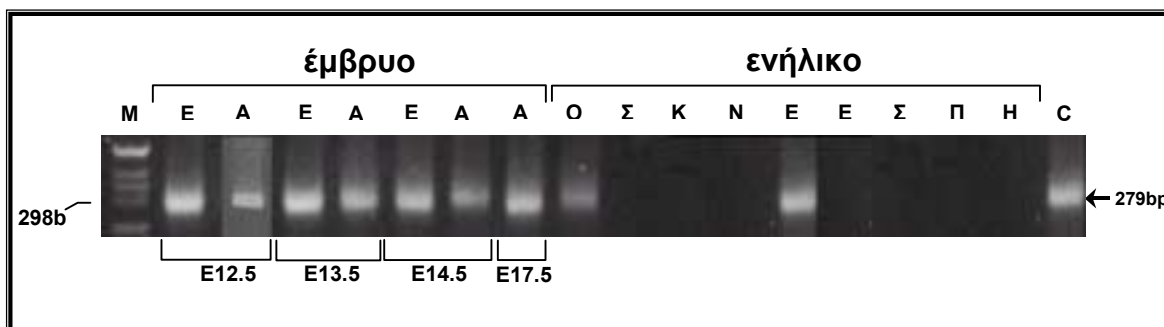
Εικόνα 25. Πειράματα υβριδοποίησης *in situ* σε τομές εμβρύων ποντικού ηλικίας E13.5. Ανίχνευση μεταγράφων του γονιδίου *Neurl* σε εσωτερικά όργανα. Μετάγραφα του γονιδίου *Neuralized* ανιχνεύονται στους βρόγχους των πνευμόνων (br : bronchus – A, B : μεγέθυνση), στη βρογχική επιθηλιακή στοιβάδα (be : bronchial epithelium-B), στα νεφρικά σπειράματα (gl : glomeruli Γ, Δ : μεγέθυνση) και συγκεκριμένα στο σωληνοειδές επιθήλιο (te : tubular epithelium, Δ), στο βλεννογόνο επιθήλιο του στομάχου (mu : mucosa epithelium – E), στο παρέγχυμα του ήπατος (li : liver parenchyma – Z) και στο επιθήλιο του μεσενφρικού βολφιανού ουρογεννητικού αγωγού (wde : Wolffian duct epithelium–H). Μετάγραφα του γονιδίου ανιχνεύτηκαν επίσης και στην καρδιά (he : heart). Πρόσθετες συντομογραφίες : m (mesenchyme) : μεσέγχυμα, lu (lung) : πνεύμονας, ki (kidney) : νεφρός.

ήταν μεταγραφικά ενεργό και στις επιθηλιακές στοιβάδες του δέρματος (Εικ.26Α-Δ) ενώ παρατηρήθηκε συμμετοχή και στις αναπτυξιακές διαδικασίες σχηματισμού των δοντιών, σε επιθηλιακές και μεσεγχυματικές κυτταρικές ομάδες (Εικ.26Ε,Ζ). Υψηλά επίπεδα μεταγράφων ανιχνεύτηκαν και στο αναπτυσσόμενο στηρικτικό σύστημα, όπως σε μύες (Εικ.26Η), στο περιχόνδριο των πλευρών (Εικ.26Θ), στα οστά των γνάθων (Εικ.26Ι) και των πρόσθιων και οπίσθιων άκρων.



Εικόνα 26. Πειράματα υβριδοποίησης *in situ* σε τομές εμβρύων ποντικού ηλικίας E12.5, E13.5 και E18.5. Ανίχνευση μεταγράφων του γονιδίου *Neurl* σε επιθηλιακές στοιβάδες του δέρματος (A-Δ), στο αναπτυσσόμενο μασητικό σύστημα (E-Z) και σε σθηρικούς ιστούς (H-I). Παρατηρείται έκφραση του γονιδίου στις επιθηλιακές στοιβάδες του δέρματος, όπως στα άκρα (A), στην ουρά (B), στη ράχη (Γ) και στο πρόσωπο (Δ). Μετάγραφα του γονιδίου ανιχνεύονται, επίσης, στις αναπτυξιακές διαδικασίες σχηματισμού των δοντιών, όπως στο εσωτερικό επιθήλιο της αδαμαντίνης (iee : inner enamel epithelium – E, Z : μεγέθυνση) και στο μεσέγχυμα της οδοντικής θηλής (dpm : dental papilla mesenchyme – E, Z). Αυξημένα επίπεδα έκφρασης ανιχνεύονται και στο αναπτυσσόμενο σθηρικό σύστημα και συγκεκριμένα σε μύες (mu : muscle - H), στο περιχόνδριο των πλευρών (pc : perichondrium – Θ) και στις γνάθους (mb : mandibular bone – I).
Πρόσθετες συντομογραφίες : e (epithelium) : επιθήλιο, m (mesenchyme) : μεσέγχυμα, md (mandible) : γνάθος, rb (rib) : πλευρά.

Το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *Neuralized* ανιχνεύτηκε, επίσης, με πειράματα αντίστροφης μεταγραφής και PCR με μήτρα poly(A)⁺RNA από τα αναπτυσσόμενα άκρα και τον εγκέφαλο εμβρύων ποντικού, ηλικίας E12.5, E13.5, E14.5, E17.5, καθώς επίσης και από εσωτερικά όργανα ενήλικων ατόμων (στελέχη BALB/C) (εγκέφαλο, σκελετικό μυ, ήπαρ, καρδιά, πνεύμονα, όρχεις, εντερικό σωλήνα, σπλήνα και νεφρό) χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών R3 και F3 και λαμβάνοντας ένα προϊόν μεγέθους 279bp (νουκλεοτίδια 1550-1828, Εικ.18). Οι αντιδράσεις PCR επαναλήφθηκαν με τη χρήση του ζεύγους F1/R2 προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα. Διαπιστώθηκε ότι το *Neuralized* εκφράζεται σε όλα τα αναπτυξιακά εμβρυϊκά στάδια που μελετήθηκαν, σε συμφωνία με τα πειράματα υβριδοποίησης *in situ*, ενώ το γονίδιο παραμένει ενεργό μόνο στον εγκέφαλο και στους όρχεις ενήλικου (Εικ.27).



Εικόνα 27. Πειράματα RT-PCR για τη μελέτη του προτύπου έκφρασης του γονιδίου *Neurl* σε όργανα εμβρύου και ενήλικου ποντικού. ΕΓ: εγκέφαλος, ΑΚ: άκρα, ΟΡ: όρχις, ΣΜ: σκελετικός μυς, ΚΑ: καρδιά, ΝΕ: νεφρός, ΕΝ: έντερο, ΣΠ: σπλήνας, ΠΝ: πνεύμονας, ΗΠ: ήπαρ, C: προϊόν αντίδρασης PCR έχοντας σαν μήτρα τον κλώνο cDNA του γονιδίου *Neuralized* και χρησιμοποιώντας τα αντίστοιχα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν και στα πειράματα RT-PCR (δείγμα θετικού ελέγχου). Μ: μάρτυρας μοριακού μεγέθους DNA (pBR322-*Hinf* I).

Συνοψίζοντας, μετάγραφα του γονιδίου *Neuralized* στον ποντικό ανιχνεύτηκαν από τα αρχικά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης σε συγκεκριμένες κυτταρικές ομάδες, κυρίως επιθήλια, σε ένα μεγάλο αριθμό εσωτερικών και αισθητηρίων οργάνων καθώς και στο νευρικό και στηρικτικό σύστημα. Αυτή η ευρέος φάσματος μεταγραφική ενεργότητα υποδηλώνει ενδεχομένως ένα σημαντικό ρόλο του *Neurl* στις αναπτυξιακές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την εμβρυογένεση. Φυσικά, δεν αποκλείεται και η πιθανότητα το *Neurl* να έχει πολλαπλό λειτουργικό ρόλο ή ακόμα και η περίπτωση να κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη με συγκεκριμένη λειτουργία αλλά με πολλαπλούς διαφορετικούς “στόχους”, ανάλογα με τον ιστό και τον κυτταρικό τύπο που εκφράζεται. Ο εντοπισμός άλλων γονιδίων που παρουσιάζουν παρόμοιο πρότυπο έκφρασης, οι συγκριτικές μελέτες με τα υπάρχοντα δεδομένα και τα υποψήφια γονίδια που σχετίζονται με τη λειτουργική δράση του ομολόγου της *Drosophila* καθώς και ο συνδυασμός της προκύπτουσας πληροφορίας με τα πειράματα διερεύνησης της λειτουργικής δράσης του *Neurl* θα έδιναν σημαντικές ενδείξεις για τα ενδεχόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχει και θα βοηθούσαν στη διαλεύκανση της βιολογικής του λειτουργίας.

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΕ ΕΝΤΟΜΑ ΚΑΙ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ

Η διερεύνηση της λειτουργίας του γονιδίου *Neur1* πραγματοποιήθηκε παράλληλα με τη λειτουργική μελέτη του ορθολόγου της *D. melanogaster*. Το πλεονέκτημα της *Drosophila* ως ένα σύστημα ιδιαίτερα μελετημένο, πειραματικά εύχρηστο, με πολύ καλή γενετική καθώς και η εξελικτική συντήρηση πολυάριθμων αναπτυξιακών σηματοδοτικών μηχανισμών από τα ασπόνδυλα μέχρι τα ανώτερα θηλαστικά δίνει τη δυνατότητα διερεύνησης των βασικών λειτουργικών ιδιοτήτων του γονιδίου και κατ' επέκταση της πρωτεΐνης *Neur1*. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν μελέτες υποκυτταρικού εντοπισμού και των δύο πρωτεϊνών *Neur* και *Neur1*, τόσο σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών όσο και σε διαγονιδιακά στελέχη *D. melanogaster* που είχαν μετασηματιστεί με το cDNA του ενδογενούς γονιδίου *neur* ή του γονιδίου του ποντικού. Ακολούθησαν πειράματα εκτοπικών υπερεκφράσεων κατά την εμβρυϊκή και προνυμφική ανάπτυξη της μύγας, παρατήρηση των φαινοτυπικών αποτελεσμάτων, διερεύνηση της επίδρασης της έκφρασης των μορίων στο μονοπάτι *Notch* και πειράματα συνέκφρασης καθενός από τα δύο ομόλογα πολυπεπτίδια με πιθανές πρωτεΐνες-στόχους. Με τον τρόπο αυτό θα μπορούσε να διαλευκανθεί, όσο το δυνατόν περισσότερο, η λειτουργία των δύο μελετούμενων πολυπεπτιδίων και να διερευνηθεί η λειτουργική τους συγγένεια.

1. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΤΟΠΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ *Neuralized* ΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΟΡΘΟΛΟΓΟΥ ΜΟΡΙΟΥ ΤΗΣ *D. melanogaster*

A. Μελέτες με τη χρήση μικροσκοπίας

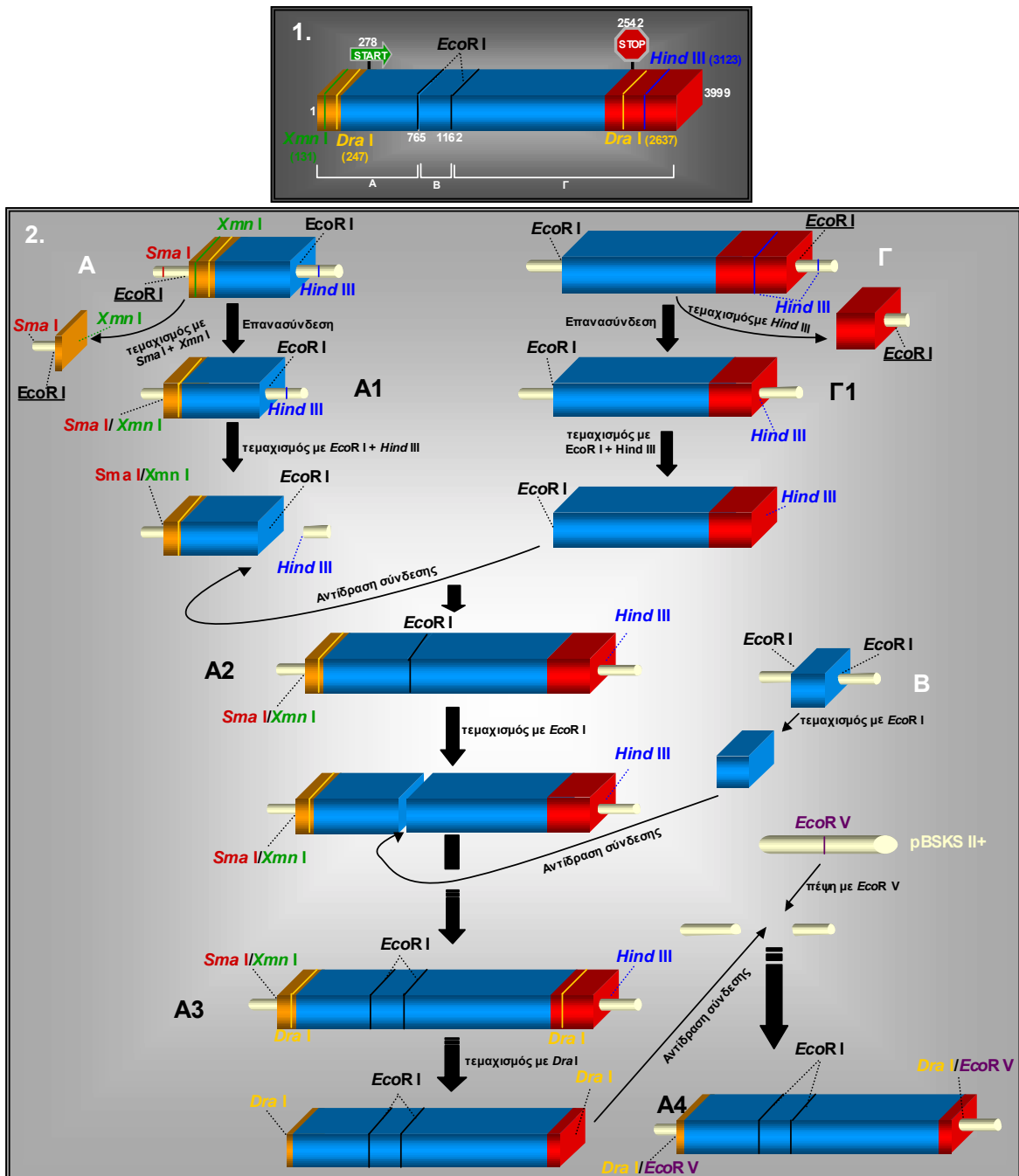
1) Συναρμολόγηση και κλωνοποίηση του cDNA του γονιδίου *neuralized* της *D. melanogaster*

Το cDNA του γονιδίου *neuralized* της *D. melanogaster* κατασκευάστηκε από τρία επιμέρους τμήματα του μορίου (προσφορά του Dr. A. Laughon, University of Wisconsin). Τα ενθέματα αυτά είχαν απομονωθεί από βακτηριοφαγικό φορέα βιβλιοθήκης cDNA με πέψη με την ενδονουκλεάση *EcoR I* και στη συνέχεια κλωνοποιήθηκαν στο πλασμιδίο *pBluescript KS II+*, στην αντίστοιχη θέση ένθεσης, έχοντας το 5' άκρο της κωδικοποιούσας αλυσίδας πλησίον του υποκινητή T7 του πλασμιδίου. Με βάση την αλληλουχία του πλήρους μήκους cDNA του γονιδίου [Genbank accession No. S62583 (Price et al., 1993)], τις προβλεπόμενες ενδογονιδιακές περιοριστικές θέσεις *EcoR I* (Εικ.28-1) και τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής σύστασης των ενθεμάτων επιβεβαιώ-

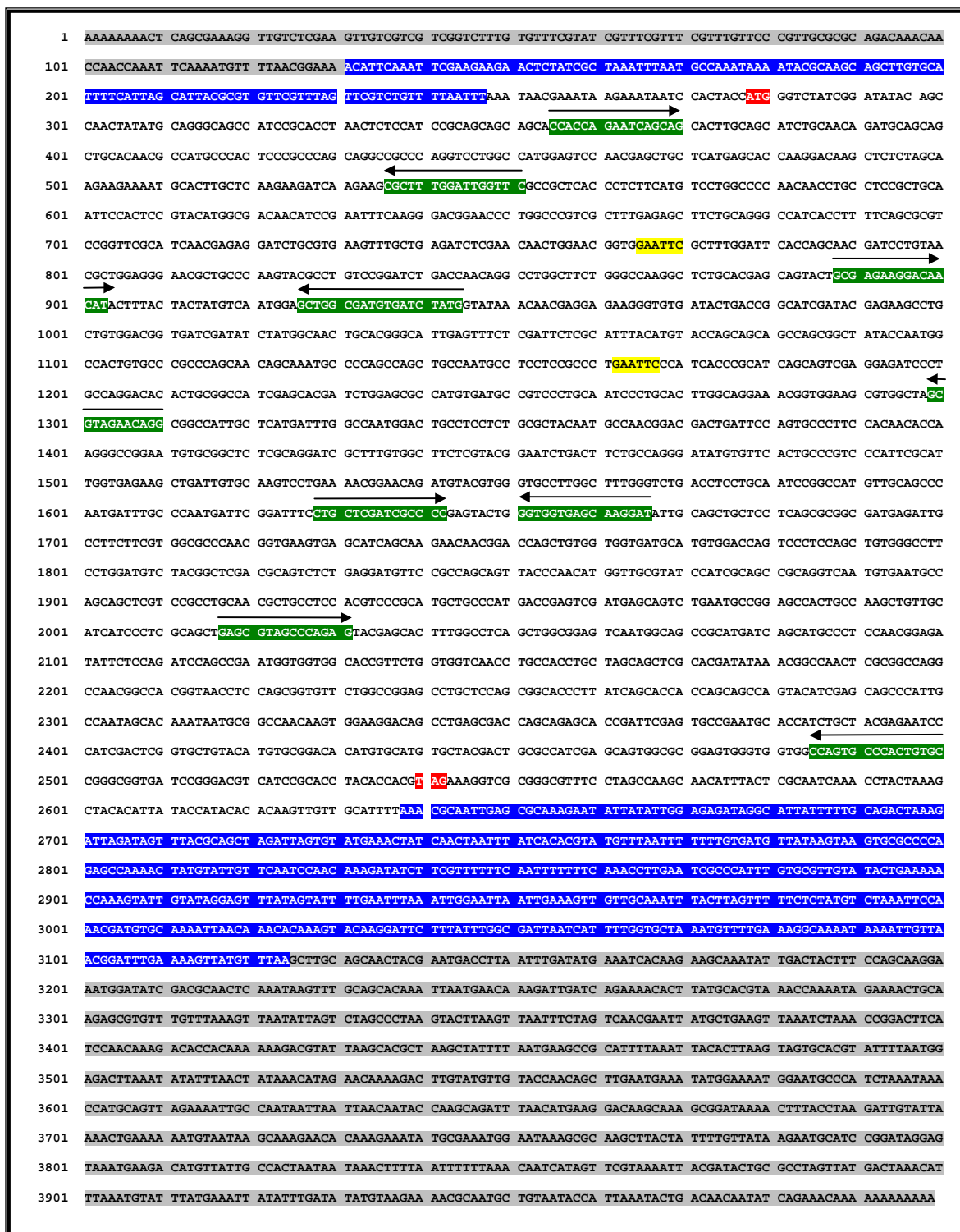
θηκε η οριοθέτησή τους σε σχέση με το μόριο πλήρους μήκους. Αναλυτικά, το πρώτο ένθεμα [pBSKS II+/neur(1-765), Εικ.28-2Α] περιελάμβανε 765 bp, εκ των οποίων οι πρώτες 277 αποτελούσαν μη κωδικοποιούσα αλληλουχία του 5' άκρου του cDNA (5' UTR). Το δεύτερο ένθεμα [pBSKS II+/neur(766-1162), Εικ.28-2Β] περιείχε τις επόμενες 398 bp του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (νουκλεοτίδια 765-1162), ενώ το τρίτο [pBSKS II+/neur(1163-3999), Εικ.28-2Γ] ήταν η υπόλοιπη αλληλουχία του κλώνου, αποτελούμενη από 1380 bp του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης και 1457 νουκλεοτίδια μη μεταφραζόμενης αλληλουχίας του 3' άκρου (3' UTR). Η σύνθεση του cDNA του *neur* επιτεύχθηκε με κλωνοποιήσεις των ενθεμάτων 766-1162bp και 1163-3999bp στην κατασκευή pBSKS II+/neur(1-765). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στην Εικόνα 28.

Το cDNA του *neur* που κατασκευάστηκε περιείχε ολόκληρη την κωδικοποιούσα αλληλουχία του γονιδίου ενώ απουσίαζαν τμήματα των 5' και 3' μη μεταφραζόμενων άκρων (νουκλεοτίδια 131-3123). Η αρτιότητα του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης επιβεβαιώθηκε από τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής σύστασης του κατασκευασθέντος κλώνου που ακολούθησε, με τη χρήση εκκινητών, συμπληρωματικών των ενδογενών αλληλουχιών, καθώς και των εκκινητών T3 και T7 (Εικ.29). Το μειονέκτημα της συγκεκριμένης κατασκευής, λόγω των αλληλάλληλων πέψων στο ίδιο, αρχικό, πλασμίδιο pBSKS II+/neur(1-765), ήταν ο σημαντικά ελαττωμένος αριθμός περιοριστικών θέσεων που βρισκόνταν εκατέρωθεν του ενθέματος, γεγονός που περιόριζε τη δυνατότητα υποκλωνοποιήσεων που απαιτούνταν στα πειράματα λειτουργικής ανάλυσης. Το πρόβλημα λύθηκε με πέψη με *Dra* I (νουκλεοτίδια 247-2637). Το ένθεμα που απομονώθηκε περιείχε το πλήρες ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης και κλωνοποιήθηκε σε pBSKS II+, ο οποίος είχε γραμμοποιηθεί με *EcoR* V (Εικ.28-2). Με αυτόν τον τρόπο κατορθώθηκε να υπάρξει εκατέρωθεν του ενθέματος πληθώρα περιοριστικών θέσεων για τις επικείμενες κλωνοποιήσεις που απαιτούνταν στην προσπάθεια διερεύνησης της δράσης του γονιδίου. Το 5' άκρο της μεταφραζόμενης αλυσίδας του cDNA κλωνοποιήθηκε πλησίον του υποκινητή T7.

Εκτός από την τελευταία πλασμιδιακή κατασκευή, βασικά εργαλεία για όλες τις επακόλουθες υποκλωνοποιήσεις σε φορείς έκφρασης αποτέλεσαν και οι ενθέσεις του κλώνου cDNA του γονιδίου του ποντικού στα πλασμίδια pBSKSII+ και pRSETC. Μια ακόμα κατασκευή, για την εξυπηρέτηση του ίδιου σκοπού, ήταν η δημιουργία χιμαιρικού ενθέματος μεταξύ υποπεριοχών των δύο ομολόγων γονιδίων. Συγκεκριμένα, το πλασμίδιο pBSKS II+/neur(247-2637) γραμμοποιήθηκε με *Bam*H I και *Eco*R I. Στη θέση του εκτμηθέντος cDNA (νουκλεοτίδια 247-1162) κλωνοποιήθηκε ένθεμα του κλώνου *Neur1* που απομονώθηκε από την κατασκευή pRSETC/*Neur1*, έπειτα από πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *Bam*H I και *Nae* I. Το συγκεκριμένο ένθεμα περιείχε την κασέτα με το συνθετικό κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης (Εικ.20) και τα επόμενα 820 νουκλεοτίδια



Εικόνα 28. Γραφική αναπαράσταση της συναρμολόγησης και κλωνοποίησης του cDNA του γονιδίου *neuralized* της *Drosophila melanogaster*. 1 : Σχηματική αναπαράσταση του cDNA του γονιδίου *neur*. Η πλήρης αλληλουχία του γονιδίου έχει μέγεθος 3999bp. Σημειώνονται οι ενδογενείς θέσεις αναγνώρισης για την ενδονουκλεάση *EcoR* I, οι οποίες εντοπίζονται στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF : open reading frame, περιοχή μπλε χρώματος). Στις μη μεταφραζόμενες αλληλουχίες (περιοχές με κόκκινο χρώμα) σημειώνονται, επίσης, οι θέσεις αναγνώρισης των ενζύμων *Xmn* I, *Dra* I και *Hind* III. Το cDNA κατασκευάστηκε από τρία επιμέρους τμήματα του μορίου (A, B και Γ), τα οποία ήταν κλωνοποιημένα στη θέση *EcoR* I του πλασμιδίου *pBluescript KSII+*, έχοντας το 5' άκρο της κωδικοποιούσας αλυσίδας πλησίον του υποκινητή T7 του πλασμιδίου. 2 : Στα τεμάχια A και Γ η μία από τις δύο θέσεις *EcoR* I αποτελούσε ενδογενή περιοριστική θέση του cDNA ενώ η δεύτερη (υπογραμμισμένη) ήταν συνθετική (adapter), προερχόμενη από το βακτηριοφάγο της βιβλιοθήκης από την οποία απομονώθηκε το cDNA. Αρχικά, από την κατασκευή A απομακρύνθηκε η συνθετική περιοριστική θέση *EcoR* I, ύστερα από διπλή πέψη με τα ένζυμα *Xmn* I και *Sma* I και επανακλωνοποίηση της κατασκευής (A1). Η αντίστοιχη θέση του ενθέματος Γ απομακρύνθηκε με υδρόλυση με *Hind* III (μία ενδογενής θέση αναγνώρισης και μία θέση στο φορέα) και επανακλωνοποίηση (Γ1). Το ένθεμα της κατασκευής Γ1 απομονώθηκε από το φορέα, με διπλή πέψη με *EcoR* I και *Hind* III και εντέθηκε προσανατολισμένα στην κατασκευή A1 (A2). Το τεμάχιο B απομονώθηκε με πέψη με *EcoR* I και ενσωματώθηκε στην κατασκευή A2, κατασκευάζοντας με αυτόν τον τρόπο cDNA που περιείχε το πλήρες ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου *neuralized* (A3). Για πρακτικούς λόγους, τμήμα το ενθέματος της κατασκευής A3, το οποίο περιείχε ολόκληρο το ORF απομονώθηκε με πέψη με *Dra* I και κλωνοποιήθηκε σε *pBluescript KSII+* στη θέση *EcoR* V και με το 5' άκρο της κωδικοποιούσας αλυσίδας προσανατολισμένο στον υποκινητή T7 (τελική κατασκευή A4).



Εικόνα 29. Η πλήρης νουκλεοτιδική αλληλουχία του cDNA του γονιδίου *neuralized* της *Drosophila melanogaster*. Το τελικό ένθεμα που κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript KS II+ (νουκλεοτιδία 247-2637) αποτελείται από την αλληλουχία που βρίσκεται ανάμεσα στις περιοχές με μπλε χρώμα (κατασκευή A4, Εικ. 28). Οι ενδογενείς περιοριστικές θέσεις *EcoR* I είναι χρωματισμένες κίτρινες. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό και την επαλήθευση της αλληλουχίας του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του τελικού κλωνοποιημένου ενθέματος του cDNA του *neur* είναι σκιασμένοι με πράσινο χρώμα.

Περιοχή γκρι χρώματος : η 3' μη μεταφραζόμενη αλληλουχία που αφαιρέθηκε από την κατασκευή Γ (προκύπτουσα κατασκευή Γ1, Εικ.28). Περιοχές μπλε χρώματος : οι μη μεταφραζόμενες αλληλουχίες που αφαιρέθηκαν από το ένθεμα της κατασκευής A3 (Εικ.28), ύστερα από πέψη με την ενδονουκlease *Dra* I (για τη δημιουργία της τελικής κατασκευής A4).

δια του 5' άκρου του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του κλώνου (κωδικοποιούμενα αμινοξέα 5-269, Εικ.19). Το συγκεκριμένο cDNA, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη σύντηξης μεταξύ των αμινοξέων 5-269 του μορίου *Neur1* και των αμινοξέων 295-754 του πολυπεπτιδίου *Neur*, χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού των μελετούμενων πρωτεϊνικών μορίων. Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 9) αναγράφονται αναλυτικά οι βασικές πλασμιδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν για τις περαιτέρω κλωνοποιήσεις ολόκληρων ή υποπεριοχών των αρχικών ενθεμάτων σε ποικίλους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης.

Πίνακας 9. Περιγραφή των αρχικών πλασμιδιακών κατασκευών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού και λειτουργικής ανάλυσης των πρωτεϊνών *Neur1* και *Neur*.

ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ (αρίθμηση σε bp)	ΦΟΡΕΑΣ (θέση ένθεσης)	ΕΝΘΕΜΑ (κατασκευή που απομονώθηκε)	ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ ΕΝΘΕΜΑΤΟΣ	ΑΜΙΝΟΞΕΑ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ
pBSKS II+/ <i>Neur1</i>	<i>EcoR</i> I	<i>EcoR</i> I	68-2500 (βάση αλληλουχίας Εικ.19)	5-574
pRSETC/ <i>Neur1</i>	<i>Hind</i> III*	<i>EcoR</i> I* (pBSKS II+/ <i>Neur1</i>)	68-2500 (βάση αλληλουχίας Εικ.19)	5-574
pBSKS II+/ <i>neur</i> (247-2637)	<i>EcoR</i> V	<i>Dra</i> I	247-2637	1-754
pBSKS II+/ <i>Neur1</i> (68-820)- <i>neur</i> (1162-2637)	<i>Bam</i> HI - <i>EcoR</i> I * (pBSKS II+/ <i>neur</i>)	<i>Bam</i> HI - <i>Nae</i> I (<i>Neur1</i>) (pRSETC/ <i>Neur1</i>)	68-820 (<i>Neur1</i>) / 1162-2637 (<i>neur</i>)	5-269 (<i>Neur1</i>) / 295-754 (<i>Neur</i>)
* : μη προεξέχον άκρο (5'→3' ενεργότητα πολυμερισμού του κλάσματος <i>Klenow</i>)				

II) Πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών

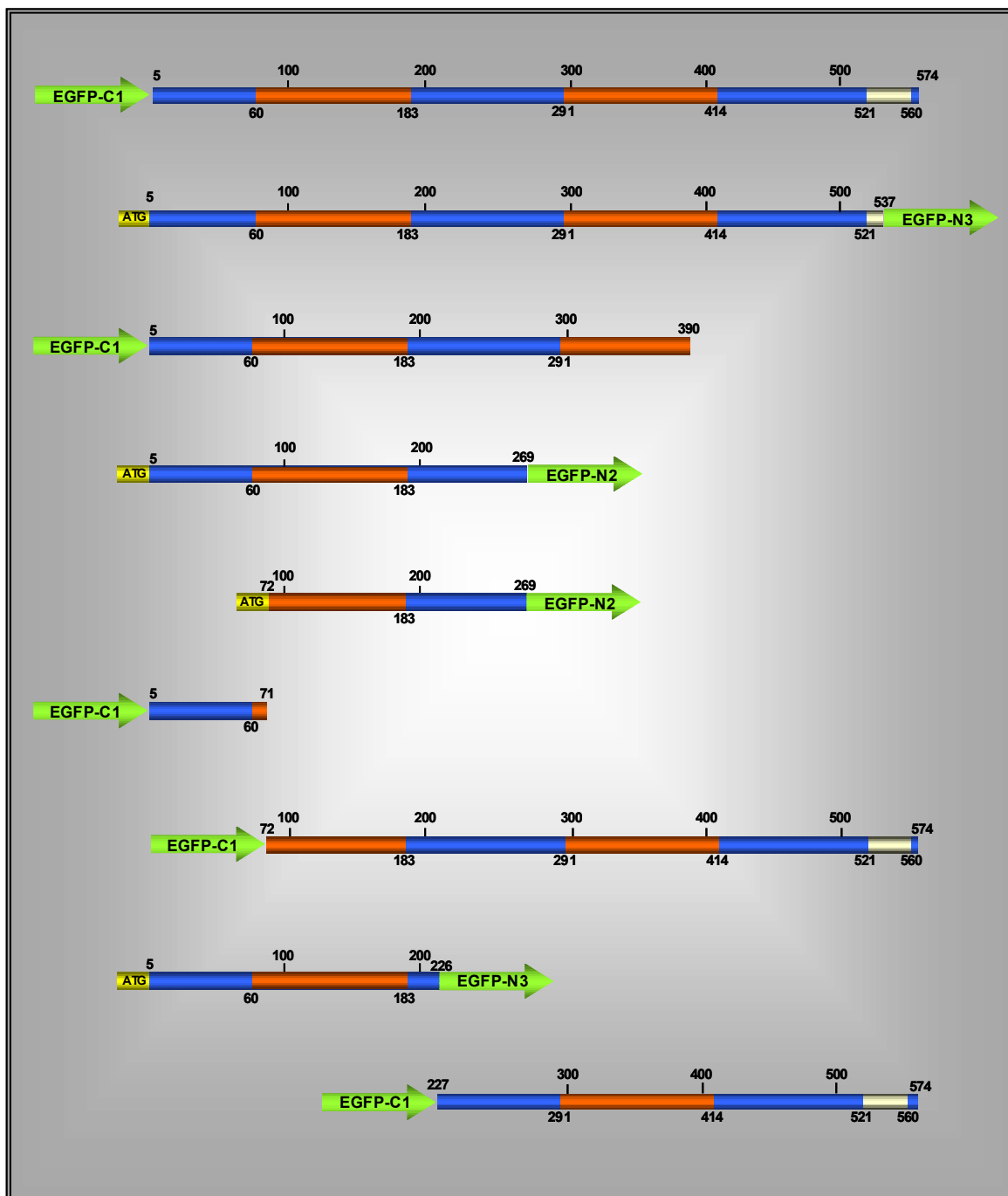
Τα πειράματα προσδιορισμού του υποκυτταρικού εντοπισμού των πρωτεϊνών *Neur1* και *Neur* βασίστηκαν στην έκφραση χιμαιρικών πολυπεπτιδίων, αποτελούμενων από τα πλήρους μήκους πολυπεπτιδία ή υποπεριοχές αυτών και την ενισχυμένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (EGFP : Enhanced Green Fluorescent Protein, υλικά και μέθοδοι). Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν παροδικές διαμόλυνσεις διάφορων κυτταρικών σειρών και ακολούθησε υποκυτταρικός εντοπισμός των χιμαιρικών πολυπεπτιδίων με μικροσκοπία φθορισμού. Αρχικά, εκφράστηκαν χιμαιρικές πρωτεΐνες της EGFP με ολόκληρη της πρωτεΐνη της *Drosophila* (αμινοξέα 1-754, Εικ. 31) και το πολυπεπτιδίο που κωδικοποιούσε ο κλώνος cDNA του γονιδίου *Neuralized* του ποντικού (αμινοξέα 5-574, Εικ.30). Η κλωνοποίηση και των δύο ενθεμάτων πραγματοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pEGFPC1 [κατασκευές pEGFPC1/*Neur*, pEGFPC1/*Neur1*, Πίνακας 10], στο 3' άκρο του cDNA της EGFP, η οποία έτσι συντήκεται στο αμινοτελικό άκρο του *Neur1* ή *Neur*. Ακολούθησε παροδική διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς COS-7 και μικροσκοπία φθορισμού.

Παρατηρήθηκε ότι και οι δύο εκφραζόμενες χιμαιρικές πρωτεΐνες Neur1/EGFP και Neur/EGFP ανιχνεύονταν σε σπικτικές δομές, διάσπαρτες στο κυτταρόπλασμα, σχηματίζοντας πολλές φορές ένα δακτύλιο γύρω από τον πυρήνα, περισσότερο (Εικ.32Α1,Α2 και Γ1) ή λιγότερο συμπαγή (Εικ.32 Α3-Α5 και Γ2-Γ4), ενώ υπήρχαν και

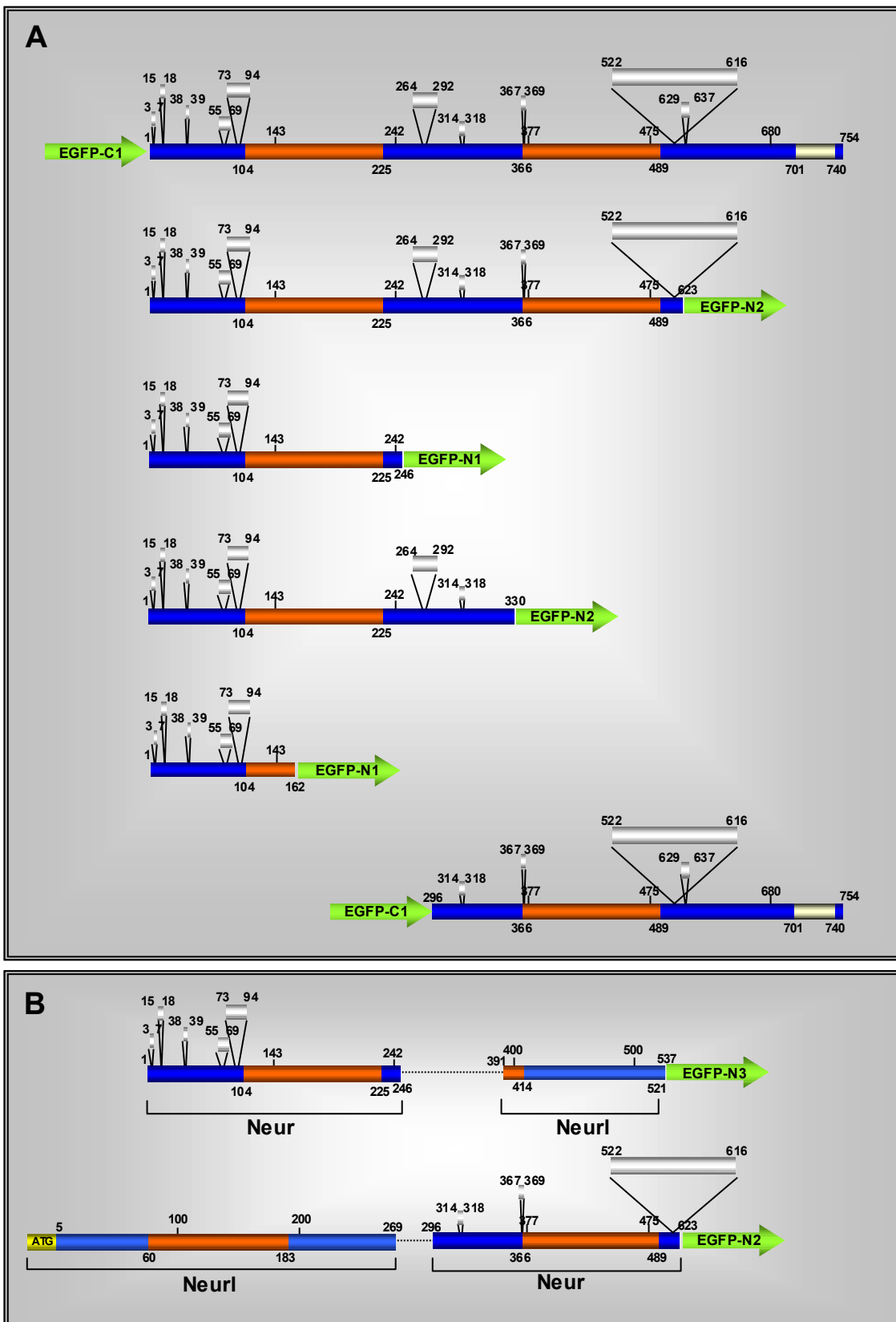
Πίνακας 10. Αναλυτική περιγραφή των χιμαιρικών πλασμιδιακών κατασκευών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού των πρωτεϊνών Neur1 και Neur σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών.

ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ Neur1 ΜΕ ΤΗΝ EGFP					
ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ (αρίθμηση σε a.a)	ΦΟΡΕΑΣ (θέση ένθεσης)	ΕΝΘΕΜΑ (κατασκευή που απομονώθηκε)	ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ ΕΝΘΕΜΑΤΟΣ (βάση αλληλουχίας-Εικ.19)	ΑΜΙΝΟΞΕΑ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ	ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ
pEGPC1/Neur1 (5-574) (ή pEGFPC1/Neur1)	<i>EcoR</i> I – <i>Kpn</i> I	<i>EcoR</i> I – <i>Kpn</i> I	68-2150	5-574	Σπικτικές δομές στο κυτταρόπλασμα και στην πλασματική μεμβράνη
pEGPN3/Neur1 (5-537) (ή pEGPN3/Neur1ΔRING)	<i>Bgl</i> II – <i>Sma</i> I	<i>Bgl</i> II – <i>Msc</i> I (pRSETC/Neur1)	68-1665	5-537	
pEGPC1/Neur1 (5-390)	<i>EcoR</i> I – <i>Sma</i> I	<i>EcoR</i> I – <i>Sma</i> I	68-1225	5-390	
pEGPN2/Neur1 (5-269)	<i>Xho</i> I – <i>Sma</i> I	<i>Xho</i> I- <i>Nae</i> I (pRSETC/Neur1)	68-862	5-269	
pEGPN3/Neur1 (5-226)	<i>Xho</i> I- <i>Sma</i> I	<i>Xho</i> I- <i>Not</i> I* (pRSETC/Neur1)	68-734	5-226	
pEGPC1/Neur1 (226-574)	<i>Not</i> I – <i>Kpn</i> I	<i>Not</i> I – <i>Kpn</i> I	734-2150	226-574	Διάχυτος εντοπισμός (πυρήνας + κυτταρόπλασμα)
pEGPC1/Neur1 (72-574)	<i>Bgl</i> II* – <i>EcoR</i> I	<i>Bst</i> Y I* – <i>EcoR</i> I	273-2500	72-574	
pEGPC1/Neur1 (5-71)	<i>EcoR</i> I – <i>Bam</i> HI	<i>EcoR</i> I- <i>Bst</i> Y I	68-273	5-71	
pEGPN2/Neur1 (72-269)	<i>Bgl</i> II – <i>Sma</i> I	<i>Bst</i> Y I- <i>Nae</i> I (pRSETC/Neur1)	273-862	72-269	
ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ Neur ΜΕ ΤΗΝ EGFP					
pEGPC1/Neur (1-754)** (ή pEGFPC1/Neur)	<i>Bgl</i> II- <i>Kpn</i> I	<i>Bam</i> HI I- <i>Kpn</i> I	247-2637	1-754	Σπικτικές δομές στο κυτταρόπλασμα και στην πλασματική μεμβράνη
pEGPN2/Neur (1-623) (ή pEGFPN2/NeurΔRING)	<i>Bgl</i> II- <i>Sma</i> I	<i>Bam</i> HI I- <i>Hinc</i> II	247-2146	1-623	
pEGPN2/Neur (1-330)	<i>Bgl</i> II- <i>Sma</i> I	<i>Bam</i> HI- <i>EcoR</i> V	247-1018	1-330	
pEGPN1/Neur (1-246)	<i>Bgl</i> II – <i>EcoR</i> I	<i>Bam</i> HI- <i>EcoR</i> I	247-765	1-246	
pEGPC1/Neur (295-754)	<i>EcoR</i> I- <i>Kpn</i> I	<i>EcoR</i> I- <i>Kpn</i> I	765-2637	296-754	Διάχυτος εντοπισμός (πυρήνας + κυτταρόπλασμα)
pEGPN1/Neur (1-162)	<i>Bgl</i> II- <i>EcoR</i> I	<i>Bam</i> HI- <i>EcoR</i> I	1-765	1-162	
ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΡΙΠΛΩΝ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ Neur-Neur1 ΚΑΙ EGFP					
pEGPN3/Neur (1-246)/ Neur1 (391-537)	<i>Bgl</i> II – <i>Sma</i> I (pEGPN3/Neur1 (5-537))	<i>Bam</i> HI – <i>EcoR</i> V (neur)	247-1018 (neur) / 1226-1665 (Neur1)	1-246 (neur) / 391-537 (Neur1)	Σπικτικές δομές στο κυτταρόπλασμα και στην πλασματική μεμβράνη
pEGPN2/ Neur1 (5-269)/ Neur (295-623)	<i>Bgl</i> II – <i>Sma</i> I	<i>Bam</i> HI – <i>Hinc</i> II ((pBSKS II+/ Neur1 (5-269)- Neur (295-754))	68-820 (Neur1) / 1162-2146 (neur)	5-269 (Neur1) / 295-623 (neur)	
* : μη προεξέχον άκρο (5'→3' ενεργότητα πολυμερισμού του κλάσματος Klenow)					
** : Το ένθεμα ελήφθη ύστερα από PCR με τη χρήση των εκκινητών 5'-CGC GGATCCATC GGTCTATCGGATATAC-3' (Forward-ενδογενής αλληλουχία) και 5'-CAAAAGCTG GGTACC GGG-3' (Reverse- αλληλουχία του polylinker του pBSKSII+), προκειμένου να αφαιρεθεί ένα κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης, το οποίο εντοπιζόταν στη 5' UTR του cDNA. Με αυτόν τον τρόπο ήταν δυνατή η παραγωγή της χιμαιρικής πρωτεΐνης EGPC1/Neur. Οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων <i>Bgl</i> II και <i>Kpn</i> I, οι οποίες σχεδιάστηκαν στους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση του ενθέματος, είναι χρωματισμένες με κόκκινο και πράσινο χρώμα, αντίστοιχα. Το κωδικόνιο έναρξης μετάφρασης του cDNA είναι σκιασμένο μπλε.					

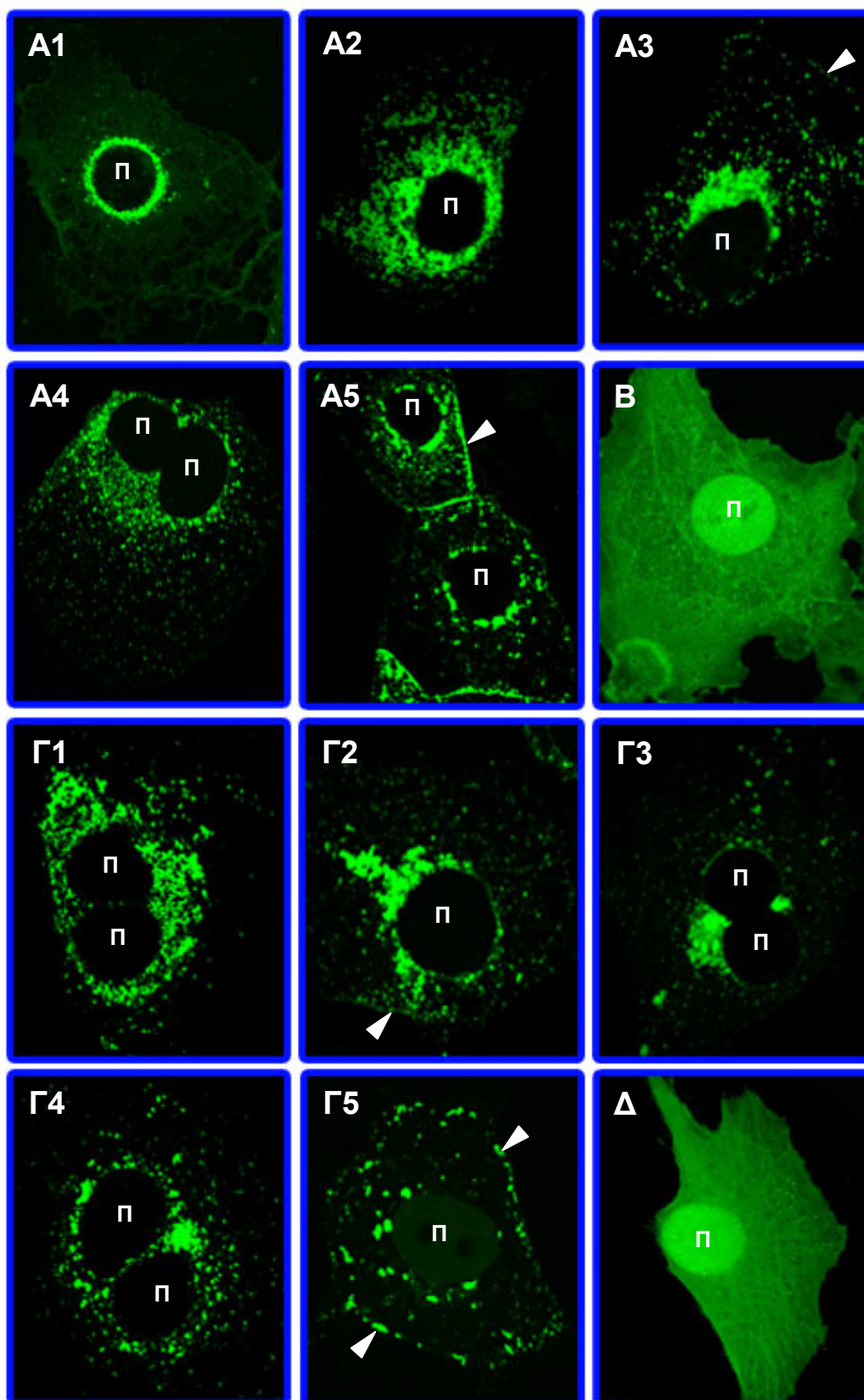
κύτταρα στα οποία τα πολυπεπτίδια σχετίζονταν με την πλασματική μεμβράνη (Εικ.32Α5 και Γ5). Ο συγκεκριμένος υποκυτταρικός εντοπισμός ήταν ειδικός και σαφώς διαφορετικός από τον μη ειδικό και διάχυτο εντοπισμό της EGFP, στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα, όταν αυτή εκφραζόταν μόνη της στα κύτταρα (Εικ. 32Β, Δ). Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι όταν μεταβαλλόταν το χρονικό διάστημα που μεσολαβούσε από τη διαμόλυνση των κυττάρων μέχρι την παρατήρηση (8, 12, 16 και 24 ώρες μετά τη διαμό-



Εικόνα 30. Σχηματική αναπαράσταση των χιμαιρικών κατασκευών της EGFP, με υποπεριοχές του cDNA του γονιδίου *Neur1* του ποντικού, που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών. Λόγω απουσίας του κωδικονίου έναρξης μετάφρασης από τον κλώνο cDNA του γονιδίου, όλες υποπεριοχές του μορίου κλωνοποιήθηκαν στο αμινοτελικό άκρο της EGFP περιείχαν συνθετική κασέτα ATG και απομονώθηκαν από την πλασμιδιακή κατασκευή pRSETC/*Neur1*. Περιοχές κόκκινου χρώματος : περιοχές NEUZ, περιοχή κίτρινου χρώματος : δάκτυλος ψευδαργύρου τύπου C₃HC₄ RING.



Εικόνα 31. Σχηματική αναπαράσταση των χιμαιρικών κατασκευών της EGFP, με υποπεριοχές του cDNA του γονιδίου *neuralized* της *Drosophila melanogaster*, που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών. Περιοχές κόκκινου χρώματος : περιοχές NEUZ, περιοχή κίτρινου χρώματος : ο δάκτυλος ψευδαργύρου τύπου RING. Περιοχές γκρι χρώματος : οι περιοχές που απουσιάζουν από την ομόλογη πρωτεΐνη του ποντικού. Β : Τριπλές χιμαιρικές κατασκευές μεταξύ υποπεριοχών της πρωτεΐνης Neuralized της *Drosophila*, του θηλαστικού ομόλογου και της EGFP. Στην περίπτωση του χιμαιρικού πολυτεπτιδίου που αποτελούταν από τα 269 αμινοτελικά κατάλοιπα του θηλαστικού μορίου η αντίστοιχη κωδικοποιούσα αλληλουχία απομονώθηκε από την πλασμιδιακή κατασκευή pRSETC/*Neur1* και περιείχε συνθετική κασέτα ATG.

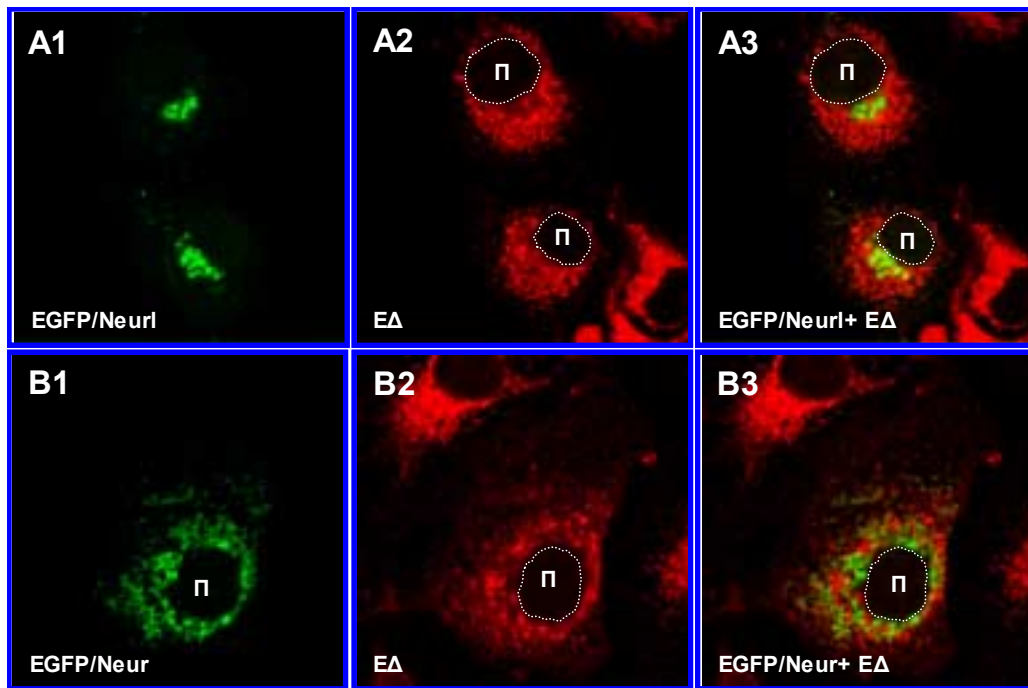


Εικόνα 32. Πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού σε κύτταρα COS-7. Ανίχνευση χιμαιρικών πολυυπεπτιδίων αποτελούμενων από την EGFP και την πρωτεΐνη Neur1 του ποντικού (A1-A5) ή το ομόλογο μόριο Neur της *D. melanogaster* (Γ1-Γ5). Οπτικές τομές συνεστιακού μικροσκοπίου. Και οι δύο εκφραζόμενες χιμαιρικές πρωτεΐνες ανιχνεύονται σε σπικτικές δομές, οι οποίες εντοπίζονται διάσπαρτες στο κυτταρόπλασμα και σχηματίζουν πολλές φορές ένα δακτύλιο γύρω από τον πυρήνα (Π), περισσότερο (A1, A2 και Γ1) ή λιγότερο συμπαγή (A3-A5 και Γ2-Γ4). Ανιχνεύονται, επίσης, και κύτταρα στα οποία οι συγκεκριμένες δομές σχετίζονται με την πλασματική μεμβράνη (A3, A5 και Γ2, Γ5-βέλη). Β και Δ: μη ειδικός και διάχυτος εντοπισμός της EGFP, στον πυρήνα (Π) και στο κυτταρόπλασμα, όταν αυτή εκφράζεται μόνη της στα κύτταρα.

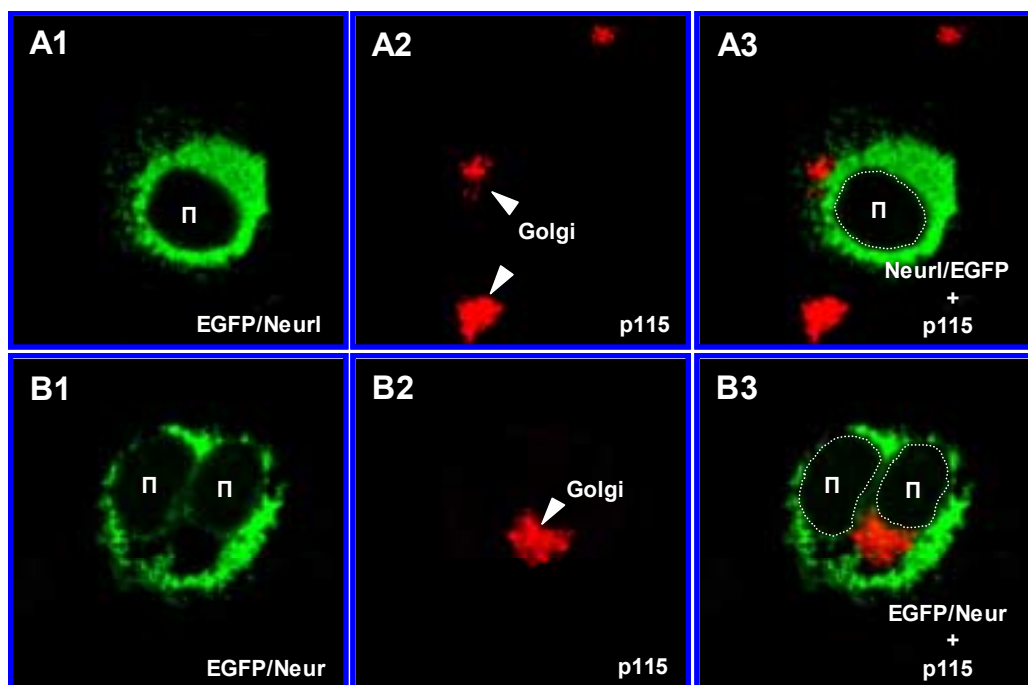
λυνση) άλλαζε το πρότυπο εντοπισμού των στικτών δομών στο κυτταρόπλασμα. Συγκεκριμένα, όσο μικρότερος ήταν ο χρόνος παρατήρησης τόσο μεγαλύτερο ήταν το ποσοστό των κυττάρων που οι συγκεκριμένες δομές εμφανίζονταν διάσπαρτες στο κυτταρόπλασμα και όχι σε ένα συμπαγή περιπυρηνικό δακτύλιο. Αυτή η μεταβολή, με την αύξηση του χρόνου παρατήρησης, του εντοπισμού των μελετούμενων μορίων προς το εσωτερικό του κυττάρου και γύρω από τον πυρήνα υποδήλωνε ενδεχομένως ότι οι ανιχνευόμενες πρωτεΐνες συμμετείχαν σε μία ενδοκυτταρική πορεία με τη συγκεκριμένη κατεύθυνση. Αναλυτικότερα, στις 24 ώρες παρατήρησης τα ποσοστά των κυττάρων που οι στικτές δομές σχημάτιζαν δακτύλιο γύρω από τον πυρήνα, βρισκόνταν διάσπαρτες στο κυτταρόπλασμα ή σχετιζόνταν με την πλασματική μεμβράνη ήταν, κατά προσέγγιση, 65-75%, 15-30% και 1-10%, αντίστοιχα. Αντίθετα, στις 8 ώρες παρατήρησης, τα ποσοστά μεταβάλλονταν σε 20-40%, 50-80% και 5-20%, αντίστοιχα.

Ταυτόσημο πρότυπο εντοπισμού ανιχνεύτηκε και στις περιπτώσεις διαμόλυνσης, με τις ίδιες κατασκευές, των κυτταρικών σειρών CV1 (νεφρικά κύτταρα πιθήκου), HeLa (καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μήτρας ανθρώπου), NIH 3T3 (εμβρυϊκοί ινοβλάστες ποντικού), CaCo2 (κύτταρα αδενοκαρκινώματος ανθρώπινου εντέρου) και K562 (μυελογενή λευχαιμικά κύτταρα ανθρώπου). Από πειράματα ανοσοφθορισμού διαπιστώθηκε ότι ο παρατηρούμενος υποκυτταρικός εντοπισμός δεν σχετιζόταν με το ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) ή το σύμπλεγμα Golgi. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν διαμολύνσεις κυττάρων COS-7 με τις κατασκευές pEGFPC1/Neur και pEGFPC1/Neur1 (Πίνακας 10). Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και επωάστηκαν με αντισώματα ειδικά για πρωτεΐνες που εδρεύουν στο ΕΔ (Εικ.33) (προσφορά του Dr. D. Louvard, Cellular Morphogenesis and Signalisation, UMR 144 CNRS-Institut Curie, Paris, France) και στο σύμπλεγμα Golgi (αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη p115) (Εικ.34). Σε καμία περίπτωση δεν φάνηκε συνεντοπισμός των χιμαιρικών πρωτεϊνών και του αντισώματος.

Ο αποκλεισμός της πιθανότητας τα υπό μελέτη πολυπεπτίδια να αποτελούν συστατικά των δύο παραπάνω ενδομεμβρανικών οργανιδίων καθώς και το γεγονός ότι το συγκεκριμένο πρότυπο υποκυτταρικού εντοπισμού παρατηρείται σε διάφορες πρωτεΐνες που εδρεύουν σε λυσοσώματα και κυστίδια μεταφοράς (από και προς την πλασματική μεμβράνη ή μεταξύ ενδοκυττάρων διαμερισμάτων) ενισχύει την πιθανότητα τα μόρια να εντοπίζονται σε κάποια από αυτές τις δομές. Ένα αρχικό πιλοτικό πείραμα που πραγματοποιήθηκε προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανότητα να συμμετέχουν οι μελετούμενες πρωτεΐνες σε μηχανισμούς κυστιδιακής μεταφοράς και ενδεχομένως ενδοκύτωσης, βασίστηκε στην επίδραση που έχει η θερμοκρασία σε αυτούς τους μηχανισμούς (Incardona et al., 2000). Συγκεκριμένα, κύτταρα COS-7 διαμολύνθηκαν με την κατασκευή pEGFPC1/Neur1 και επωάστηκαν αρχικά 5 ώρες στις κανονικές συνθήκες ανάπτυξης και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στους 4°C για 2 ώρες. Παρατηρήθηκε ότι σε

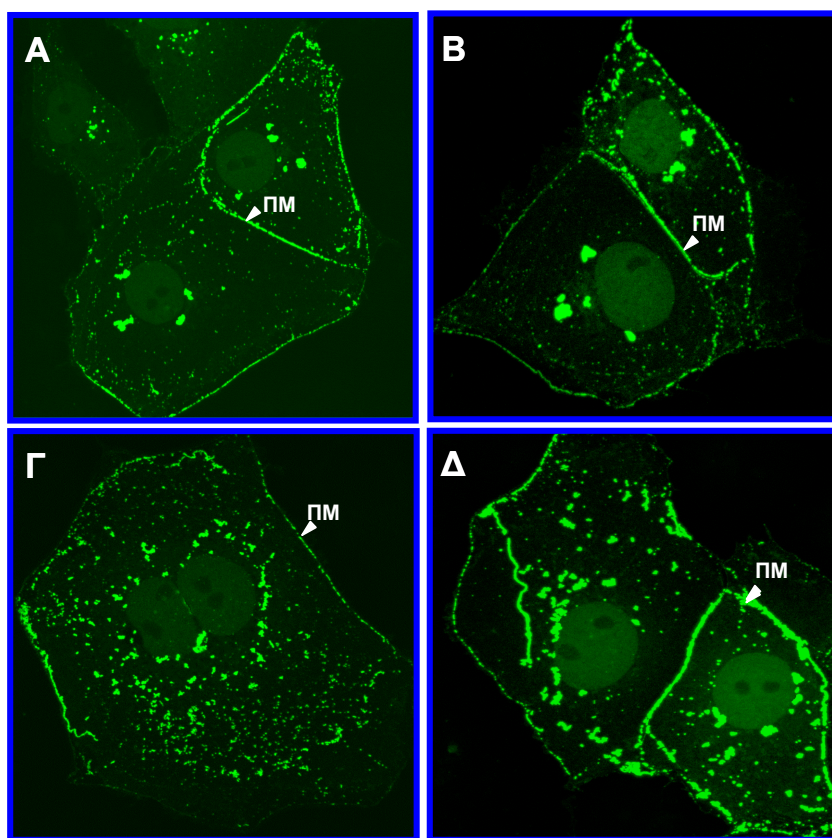


Εικόνα 33. Πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού σε κύτταρα COS-7. Ανοσοανίχνευση του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ) και συγκριτικές παρατηρήσεις με τον εντοπισμό των χιμαιρικών πολυπεπτιδίων EGFP/Neur1 (A) και EGFP/Neur (B). Οπτικές τομές από συνεστιακό μικροσκόπιο. Για την ανίχνευση του ενδοπλασματικού δικτύου (κόκκινο) χρησιμοποιήθηκε μίγμα αντισωμάτων για ένα μεγάλο εύρος πρωτεϊνών που εδρεύουν στο συγκεκριμένο ενδοκυτταρικό διαμέρισμα, επιτρέποντας την ανίχνευσή του σε όλη του την έκταση. Παρατηρείται ότι δεν υπάρχει αλληλοεπικάλυψη με τον εντοπισμό των μελετούμενων χιμαιρικών πρωτεϊνών (A3 και B3). Ο πυρήνας των κυττάρων (Π) οριοθετείται με διακεκομμένη γραμμή.



Εικόνα 34. Πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού σε κύτταρα COS-7. Ανοσοανίχνευση του δικτύου Golgi και συγκριτικές παρατηρήσεις με τον εντοπισμό των χιμαιρικών πολυπεπτιδίων EGFP/Neur1 (A) και EGFP/Neur (B). Οπτικές τομές από συνεστιακό μικροσκόπιο. Για την ανίχνευση του δικτύου Golgi χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα για την πρωτεΐνη p115. Παρατηρείται ότι δεν υπάρχει αλληλοεπικάλυψη με τον εντοπισμό των μελετούμενων χιμαιρικών πρωτεϊνών (A3 και B3). Ο πυρήνας των κυττάρων (Π) οριοθετείται με διακεκομμένη γραμμή.

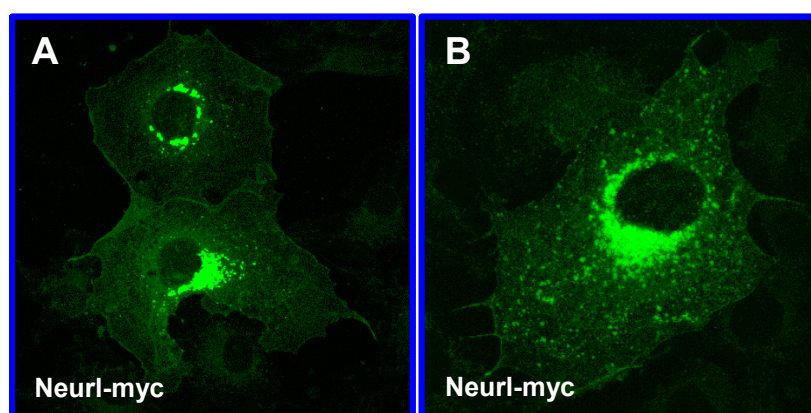
ένα πολύ μεγάλο ποσοστό των κυττάρων (περίπου 60-70%) η εκφραζόμενη πρωτεΐνη εντοπιζόταν στην πλασματική μεμβράνη (ή πλησίον αυτής) καθώς και στις γνωστές στικτές δομές, οι οποίες ήταν διάσπαρτες στο κυτταρόπλασμα αλλά δε συσσωρεύονταν ποτέ γύρω από τον πυρήνα (απουσία του περιπυρηνικού δακτυλίου) (Εικ.35). Ενδεχομένως, η σπάνια ανίχνευση της χίμαιρας EGFP/Neur1 στην πλασματική μεμβράνη, όταν τα κύτταρα αναπτύσσονταν υπό φυσιολογικές συνθήκες, πιθανόν να οφείλεται σε ταχείες ενδοκυττωτικές διαδικασίες με αποτέλεσμα την μη παραμονή της εκφραζόμενης πρωτεΐνης στην κυτταρική επιφάνεια και τον εντοπισμό της σε κυστίδια, που είχαν ήδη ξεκινήσει την πορεία τους προς το ενδοκυτταρικό περιβάλλον. Φυσικά, οι παρατηρήσεις αυτές αποτελούν ενδείξεις αλλά δεν είναι ικανές να υποστηρίξουν επαρκώς μία τέτοια υπόθεση. Απαιτείται εμπειριστατωμένη μελέτη με τη χρήση κατάλληλων δεικτών για ενδοκυττωτικά, εξωκυττωτικά κυστίδια και λυσοσώματα.



Εικόνα 35. Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης των κυττάρων στον εντοπισμό της πρωτεΐνης Neuralized του ποντικού. Πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού σε κύτταρα COS-7 τα οποία εκφράζουν το χιμαιρικό πολυπεπτίδιο EGFP/Neur1 και έχουν επωαστεί για 2 ώρες στους 4°C, ύστερα από 5 ώρες ανάπτυξης στις φυσιολογικές συνθήκες μετά την παροδική διαμόλυνση. Οπτικές τομές συνεστιακού μικροσκοπίου. Η χιμαιρική πρωτεΐνη ανιχνεύεται σε στικτές δομές, διάσπαρτες στο κυτταρόπλασμα και με υψηλή συσσώρευση στην πλασματική μεμβράνη (PM).

Προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα επίδρασης της EGFP στην τοπολογία των πρωτεϊνών, λόγω της ενσωμάτωσής της στο αμινοτελικό τους άκρο, κατασκευάστηκαν χιμαιρικά πολυπεπτίδια στα οποία η EGFP ενσωματώθηκε στο καρβοξυτελικό

άκρο των μορίων. Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκαν οι κατασκευές pEGPN3/Neur1ΔRING και pEGPN2/NeurΔRING (Πίνακας10). Οι διαμολύνσεις πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα COS-7 και ανιχνεύτηκε το ίδιο πρότυπο υποκυτταρικού εντοπισμού, διαπιστώνοντας επιπρόσθετα ότι αυτό δεν επηρεαζόταν από την απουσία του δακτύλου RING από τις συγκεκριμένες χίμαιρες (Εικ.30, 31). Επίσης, το ενδεχόμενο παραπλανητικών παρατηρήσεων, λόγω επίδρασης της EGFP στην στερεοδιαμόρφωση των μελετούμενων πρωτεϊνών, ελέγχθηκε με πειράματα έκφρασης της πρωτεΐνης Neutralized του ποντικού που είχε ενσωματωμένο στο καρβοξυτελικό της άκρο τον επίτοπο myc [pcDNA3/ Neur1(5-574)-myc, προσφορά της Μαρίας Κοκκινάκη]. Πειράματα ανοσοανίχνευσης, με τη χρήση αντισώματος ειδικό για τον επίτοπο, παρουσίασαν παρόμοια αποτελέσματα (Εικ.36).



Εικόνα 36. Πειράματα ανοσοεντοπισμού του πολυπεπτιδίου Neur1(5-574)-myc σε κύτταρα COS-7. Οπτικές τομές συνεστιακού μικροσκοπίου. Η εκφραζόμενη πρωτεΐνη ανιχνεύεται σε σπικτικές δομές, διάσπαρτες στο κυτταρόπλασμα ή συσσωρευμένες γύρω από τον πυρήνα. Το πρότυπο του υποκυτταρικού εντοπισμού είναι ταυτόσημο με εκείνο που παρατηρήθηκε όταν στα κύτταρα COS-7 εκφραζόταν το ίδιο πολυπεπτίδιο που ήταν όμως συνδεδεμένο με την EGFP.

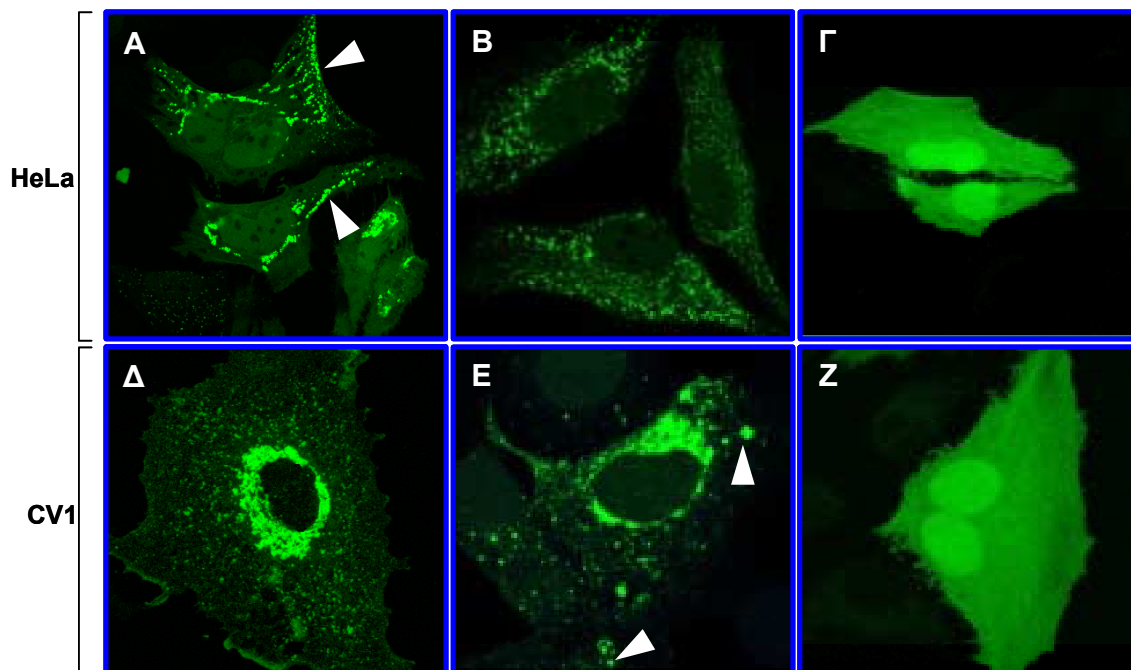
Στην προσπάθεια ανίχνευσης της περιοχής που είναι υπεύθυνη για το παρατηρούμενο πρότυπο υποκυτταρικού εντοπισμού των δύο ομολόγων πρωτεϊνών Neur1/Neur πραγματοποιήθηκαν πειράματα διαμολύνσεων με τη χρήση ενός μεγάλου αριθμού χιμαιρικών πολυπεπτιδίων, αποτελούμενων από την EGFP και υποπεριοχές τόσο της πρωτεΐνης Neutralized του ποντικού όσο και της ομόλογης της *Drosophila* (συνεργασία με Ευαγγελία Κουτέλου) (Εικ.30, 31). Όλες οι ανασυνδυασμένες πλασμιδιακές κατασκευές που μελετήθηκαν, ο τρόπος κατασκευής τους καθώς και πρόσθετες πληροφορίες αναγράφονται λεπτομερώς στον Πίνακα 10. Αρχικά αφαιρέθηκαν τμήματα από το καρβοξυτελικό άκρο των μορίων τα οποία περιλάμβαναν μέρος [pEGPC1/Neur1(5-390)] ή και ολόκληρη την περιοχή NEUZ2 [pEGPN2/Neur1(5-269), pEGPN2/Neur(1-330)]. Διαπιστώθηκε ότι οι πρωτεΐνες εξακολουθούσαν να εντοπίζονται στις ίδιες δομές ακόμα και στην περίπτωση που αφαιρέθηκαν μεγαλύτερα τμήματα, αφήνοντας άθικτο σχεδόν μόνο το 1/3 των μορίων που περιελάμβανε μόνο τα πρώτα αμινοτελικά αμινοξέα και την

περιοχή NEUZ 1 [pEGPN3/NeurI(5-226), pEGPN1/Neur(1-246)]. Αντίθετα, όταν αφαιρούνταν περιοχές από το αμινοτελικό άκρο των πολυπεπτιδίων [pEGPC1/NeurI(226-574), pEGPC1/NeurI(72-574), pEGPC1/Neur(295-754)] ο εντοπισμός ήταν ταυτόσημος με εκείνον της EGFP (διάχυτος στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα). Διαπιστώθηκε ότι τα 226 αμινοξέα του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης Neuralized του ποντικού και τα 246 αντίστοιχα αμινοξέα του ομόλογου μορίου της *D. melanogaster* είναι ικανά να καθοδηγούν την EGFP στις συγκεκριμένες ενδοκυττάρειες δομές, ενώ ο εντοπισμός γίνεται διάχυτος όταν τα τμήματα αυτά αφαιρεθούν από τα αρχικά, πλήρους μήκους, πολυπεπτίδια. Προκειμένου να μειωθεί ακόμα περισσότερο το μέγεθος της υποψήφιας περιοχής, δημιουργήθηκαν χιμαιρικές κατασκευές αποτελούμενες από την EGFP και επιμέρους τμήματα των προαναφερόμενων περιοχών [pEGPC1/NeurI(5-71), pEGPN2/NeurI(72-269), pEGPN2 /Neur(1-162)]. Και στις τρεις περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε εξειδικευμένος εντοπισμός της EGFP.

Η αυτονομία των περιοχών οι οποίες διαπιστώθηκε ότι είναι υπεύθυνες για τον υποκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών NeurI και Neur επιβεβαιώθηκε και με την κατασκευή τριπλών χιμαιρικών πολυπεπτιδίων που αποτελούνταν από την EGFP και συνδυασμό υποπεριοχών των δύο ομολόγων μορίων (Εικ.31B). Αναλυτικότερα, εκφράστηκε πολυπεπτίδιο αποτελούμενο από τα πρώτα 246 αμινοτελικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης Neur και τα αμινοξέα 391-537 του ομολόγου μορίου του ποντικού, ακολουθούμενο από την EGFP [pEGPN3/Neur(1-246)/NeurI(391-537)]. Επιπλέον, κατασκευάστηκε πολυπεπτίδιο που περιλάμβανε τα πρώτα 269 αμινοξέα του μορίου NeurI, τα κατάλοιπα 296-623 της δροσοφιλικής πρωτεΐνης και την EGFP [pEGPN2/NeurI(5-269)/Neur(295-623)]. Οι διαμολύνσεις πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα COS-7 και τα πολυπεπτίδια εντοπίστηκαν, ξανά, σε στικτές δομές στο κυτταρόπλασμα και στη μεμβράνη. Να σημειωθεί ότι όλες οι χιμαιρικές κατασκευές που μελετήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν και σε πειράματα διαμόλυνσης των κυτταρικών σειρών CV1 και HeLa και ελήφθησαν τα ίδια ακριβώς αποτελέσματα (Εικ.37).

Συνοψίζοντας, από τα πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών συμπεραίνουμε ότι και οι δύο ομόλογες πρωτεΐνες NeurI/Neur ανιχνεύονται σε στικτές δομές οι οποίες εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και σχετίζονται με την πλασματική μεμβράνη. Αυτές οι δομές ενδεχομένως να αποτελούν κυστίδια που συμμετέχουν στους μηχανισμούς ενδοκυττωτικής μεταφοράς. Η περιοχή που είναι υπεύθυνη για το συγκεκριμένο εντοπισμό των μορίων αποτελείται από τα πρώτα 226 αμινοτελικά αμινοξέα στην πρωτεΐνη του ποντικού και τα 246 αντίστοιχα αμινοξέα στην πρωτεΐνη της *Drosophila melanogaster*. Τα συγκεκριμένα τμήματα των μορίων περιλαμβάνουν την περιοχή NEUZ1 και είναι ικανά αλλά και αναγκαία για να οδηγούν τα

πολυπεπτίδια στις συγκεκριμένες κυτταροπλασματικές δομές. Αντίθετα, ο δάκτυλος RING και η περιοχή NEUZ2 δε φαίνεται να παίζουν ρόλο στον εντοπισμό των μορίων.



Εικόνα 37. Πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού σε κύτταρα HeLa (A-Γ) και CV1 (Δ-Z). **Οπτικές τομές συνεστιακού μικροσκοπίου.** Και στις δύο κυτταρικές σειρές πραγματοποιήθηκαν παροδικές διαμολύνσεις και επακόλουθη μικροσκοπία φθορισμού με όλες τις πλασμιδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν στα αντίστοιχα πειράματα στα κύτταρα COS-7. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε και για τα δύο μόρια Neur και NeurI. Σε όλες τις περιπτώσεις χιμαιρικών κατασκευών που ανιχνευόταν ο ειδικός στικτός υποκυτταρικός εντοπισμός στα κύτταρα COS-7, διαπιστώθηκε παρόμοιο πρότυπο και στα κύτταρα HeLa (A και B) και στα CV1 (Δ και E). Και στις δύο κυτταρικές σειρές ανιχνεύτηκαν στικτές δομές και στην πλασματική μεμβράνη [A και E (βέλη)]. Όσον αφορά τις χιμαιρικές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν στα κύτταρα COS-7 και ανιχνεύτηκε πρότυπο μη ειδικό και ταυτόσημο με εκείνο της EGFP, ελήφθησαν τα ίδια ακριβώς αποτελέσματα (Γ, Z).

III) Πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού στην *Drosophila melanogaster*

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων υποκυτταρικού εντοπισμού στις κυτταρικές σειρές θηλαστικών δημοσιεύτηκαν δύο εργασίες στις οποίες είχε μελετηθεί ο εντοπισμός της πρωτεΐνης Neur στην *Drosophila* (Yeh et al., 2000, Lai et al., 2001) και των οποίων οι παρατηρήσεις συμφωνούσαν μερικώς με τα δικά μας αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, από πειράματα εκτοπικής υπερέκφρασης του πλήρους μήκους πολυπεπτιδίου, συνδεδεμένου με τον επίτοπο myc, παρατηρήθηκε ότι το μόριο σχετιζόταν με την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων της μύγας.

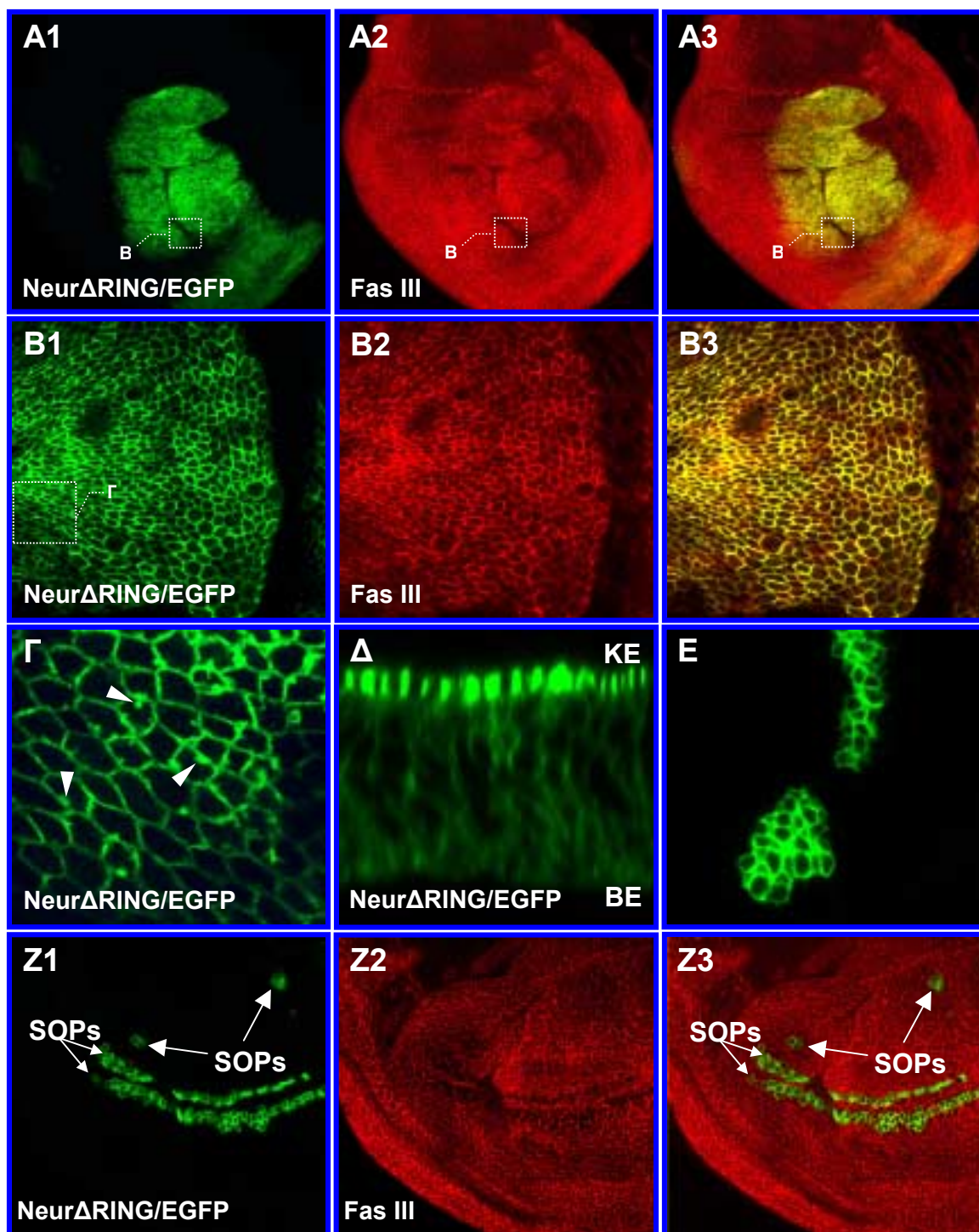
Βασιζόμενοι στα δεδομένα μας και στις ανωτέρω δημοσιεύσεις, πραγματοποιήσαμε πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης NeurI των θηλαστικών στην *Drosophila*, σε μία προσπάθεια διερεύνησης του ενδεχόμενου παρόμοιου ρόλου των

μορίων, των οποίων ο κοινός υποκυτταρικός εντοπισμός και στα δύο συστήματα που μελετούνταν θα αποτελούσε την πρώτη ένδειξη εξελικτικής συντήρησης της λειτουργικής τους δράσης. Συγκεκριμένα, έγιναν πειράματα κατευθυνόμενης υπερέκφρασης χιμαιρικού πολυπεπτιδίου αποτελούμενου από τη θηλαστική πρωτεΐνη (αμινοξέα 5-574) και την EGFP. Επιπλέον, κατασκευάστηκε και χίμαιρα της EGFP με το δροσοφιλικό πρωτεΐνη από την οποία είχαν αφαιρεθεί τα 131 καρβοξυτελικά αμινοξέα, που περιείχαν το δάκτυλο RING, προκειμένου να διερευνηθεί αν η απουσία του τελευταίου επηρεάζει τον εντοπισμό του μορίου. Τα χιμαιρικά ενθέματα EGFP/Neur(5-574) (ή EGFP/NeurI) και EGFPN2/Neur(1-623) (ή NeurΔRING/EGFP) κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pP[UAST] και ενσωματώθηκαν στο γονιδίωμα στελεχών *D. melanogaster* με τη βοήθεια του μεταθετού στοιχείου P (Υλικά και Μέθοδοι, ενότητα 16). Η κατασκευή pP[UAST] NeurΔRING/EGFP χρησιμοποιήθηκε και στα πειράματα λειτουργικής ανάλυσης στην *Drosophila*. Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων αναλύθηκαν συγκριτικά με εκείνα που χρησιμοποιήθηκε το ολόκληρο πολυπεπτίδιο, προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος του δακτύλου RING στη λειτουργική δράση του μορίου στο κύτταρο. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που κατασκευάστηκαν και όλες οι απαραίτητες πληροφορίες αναγράφονται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11. Πλασμιδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού των πρωτεϊνών NeurI και NeurΔRING στη *Drosophila melanogaster*.

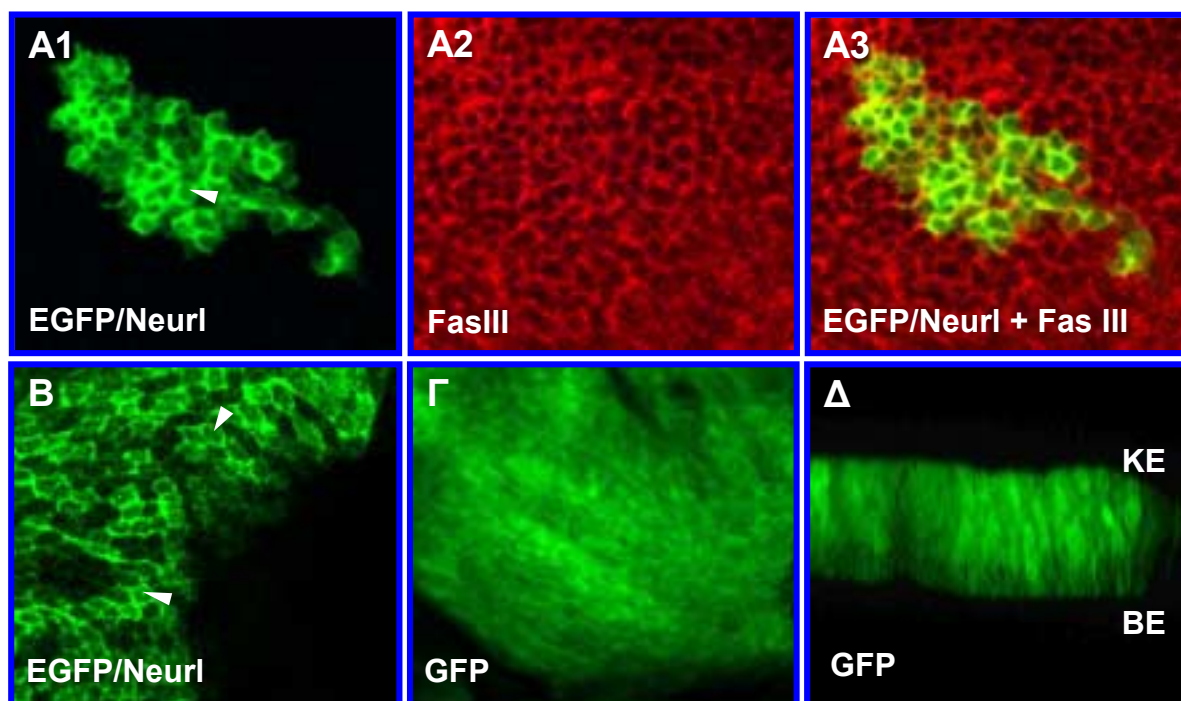
ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ (η αριθμηση σε a.a)	ΦΟΡΕΑΣ pP[UAST]	ΕΝΘΕΜΑ (κατασκευή που απομονώθηκε)	ΑΜΙΝΟΞΕΑ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ	ΧΡΗΣΗ
pP[UAST]EGFPN2/Neur(1-623) (ή pP[UAST]NeurΔRING/EGFP)	<i>EcoR I</i> *- <i>Not I</i>	<i>Sma I</i> - <i>Not I</i> [pEGPN2/Neur (1-623)]	1-226 (EGFP) - 1-623 (Neur)	Υποκυτταρικός εντοπισμός στη <i>D. melanogaster</i> + Πειράματα διερεύνησης του ρόλου του δακτύλου RING
pP[UAST]EGFPC1/NeurI(5-574) (ή pP[UAST]EGFP/NeurI)	<i>EcoR I</i> *- <i>Kpn I</i>	<i>Nhe I</i> *- <i>Kpn I</i> [pEGPC1/NeurI (5-574)]	5-574 (NeurI)- 1-226 (EGFP)	Υποκυτταρικός εντοπισμός στη <i>D. melanogaster</i>
* : μη προεξέχον άκρο (5'→3' ενεργότητα πολυμερισμού του κλάσματος Klenow)				

Η κατευθυνόμενη υπερέκφραση των διαγονιδίων πραγματοποιήθηκε μέσω του συστήματος GAL4 (υλικά και μέθοδοι, ενότητα 16). Η έκφραση των χιμαιρικών πρωτεϊνών κατευθύνθηκε σε δίσκους φτερού προνυμφών τρίτου σταδίου (third instar larvae) και συγκεκριμένα στην περιοχή έκφρασης του γονιδίου *omb*, η οποία καλύπτει μία μεγάλη εύρους ζώνη κατά μήκος του προσθιο-οπίσθιου άξονα των προνυμφικών δίσκων. Πιο αναλυτικά, διασταυρώθηκαν τα στελέχη $yw;UAS-neur\Delta RING-EGFP^{\Delta\Theta 32B}$ και $yw;UAS-NeurI-EGFP^{\Delta\Theta 15}$ με το στέλεχος οδηγό *omb-GAL4/FM7*. Στη συνέχεια, απομονώθηκαν δίσκοι φτερού από θηλυκές προνύμφες με γενότυπο *omb-GAL4/+;UAS-EGFP-NeurI^{\Delta\Theta 15}/+* και *omb-GAL4/+;UAS-neur\Delta RING-EGFP^{\Delta\Theta 32B}/+*, αντίστοιχα, μονιμοποιήθηκαν κατάλληλα και παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.



Εικόνα 38. Η απουσία του δακτύλου RING δεν επηρεάζει την τοπολογία της πρωτεΐνης *Neur*. Οπτικές τομές προνυμφικών δίσκων φτερού που εκφράζουν εκτοπικά τη χιμαιρική πρωτεΐνη *NeurΔRING/EGFP*. A-Δ : ανίχνευση της χιμαιρικής πρωτεΐνης στην περιοχή έκφρασης του γονιδίου *omb*, σε θηλυκές προνύμφες τρίτου σταδίου με γενότυπο *omb-GAL4/+;UAS-neurΔRING-EGFP^{Δ32B}/+*. Η χιμαιρική πρωτεΐνη ανιχνεύεται στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων (A1 και B1). Ο μεμβρανικός εντοπισμός επιβεβαιώθηκε με ταυτόχρονη ανοσοανίχνευση της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης φασικλίνης III (*Fas III*, A2 και B2). A3 και B3 : συμπροβολή των οπτικών τομών A1-A2 και B1-B2, αντίστοιχα (overlay) και επιβεβαίωση του συνεντοπισμού (κίτρινο χρώμα). Σε μεγαλύτερη μεγέθυνση (Γ) το χιμαιρικό πολυπεπτίδιο ανιχνεύεται και σε σπικτικές δομές που σχετίζονται με την πλασματική μεμβράνη (κεφαλή βέλους). Δ : Εγκάρσια οπτική τομή του επιθηλίου του προνυμφικού δίσκου, στην περιοχή έκφρασης της χιμαιρικής πρωτεΐνης. Παρατηρείται ότι ο μεμβρανικός εντοπισμός είναι συσσωρευμένος σε σημαντικό βαθμό στην κορυφαία επιφάνεια (KE) της πλασματικής μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων του δίσκου. E : μιτωτικός κλώνος υπερέκφρασης της χίμαιρας *NeurΔRING/EGFP* σε προνυμφικό δίσκο φτερού τρίτου σταδίου. Z1-Z3 : ανίχνευση της χιμαιρικής πρωτεΐνης στην περιοχή έκφρασης του γονιδίου *neuralized*, στους προγόνους των αισθητηρίων οργάνων (SOPs), σε δίσκους φτερού προνυμφών τρίτου σταδίου με γενότυπο *neur-GAL4/+;UAS-neurΔRING-EGFP^{Δ32B}/+*. Πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη ανοσοανίχνευση για την φασικλίνη III (Z2). Z3 : συμπροβολή των Z1 και Z2. Πρόσθετες συντομογραφίες : BE : βασική επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων του προνυμφικού δίσκου του φτερού.

Διαπιστώθηκε ότι η πρωτεΐνη Neuralized της *Drosophila*, παρά την απουσία του δάκτυλου RING, σχετίζεται με την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων (Εικ.38Α-Δ), παρουσιάζοντας την υψηλότερη συσσώρευση στην κορυφαία επιφάνεια (Εικ.38Δ). Ανιχνεύτηκαν, επίσης, στικτές δομές πλησίον αυτής (Εικ.38Γ) οι οποίες ενδεχομένως να αποτελούσαν κυστίδια. Ο μεμβρανικός εντοπισμός του χιμαιρικού πολυπεπτιδίου επιβεβαιώθηκε με ταυτόχρονη ανοσοανίχνευση της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης φασικλίνης III (Εικ.38Α,Β). Όσον αφορά την πρωτεΐνη Neuralized του ποντικού, ανιχνεύτηκε στην πλασματική μεμβράνη με τη διαφορά ότι δεν διαπιστώθηκαν περιοχές υψηλότερης συσσώρευσης, ενώ παρατηρήθηκαν και σημαντικά επίπεδα συσσώρευσης στο κυτταρόπλασμα (Εικ. 39Α,Β).



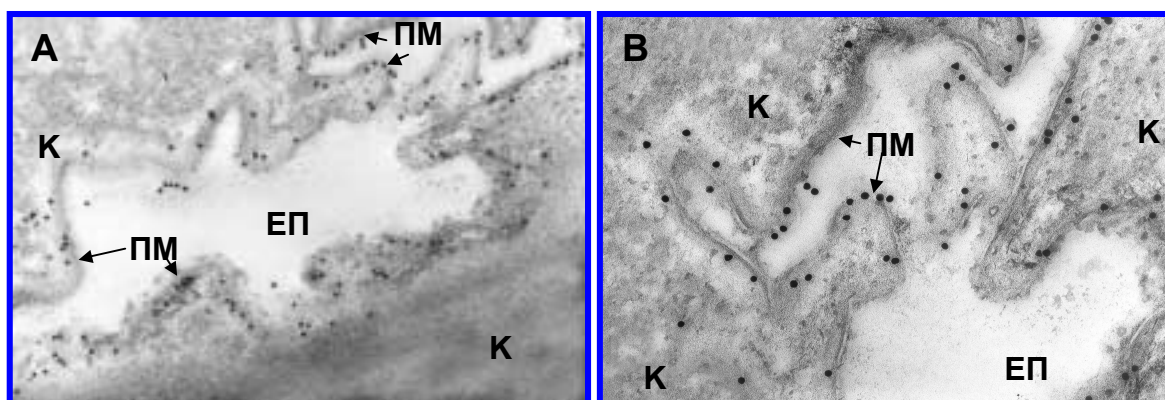
Εικόνα 39. Η πρωτεΐνη Neuralized του ποντικού εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων του δίσκου του φτερού της *Drosophila*. Οπτικές τομές συνεστιακού μικροσκοπίου προνυμφικών δίσκων φτερού που εκφράζουν εκτοπικά τη χιμαιρική πρωτεΐνη EGFP/Neur1 (A, B) και την GFP (Γ, Δ). A1-A3 : μπιωτικός κλώνος υπερέκφρασης της χίμαιρας EGFP/Neur1 σε προνυμφικό δίσκο φτερού τρίτου σταδίου. Πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη ανοσοανίχνευση με την πρωτεΐνη φασικλίνη III (A2). A3 : συμπροβολή των οπτικών τομών A1 και A2 (overlay) και επιβεβαίωση του συνεντοπισμού (κίτρινο χρώμα). B : ανίχνευση της χιμαιρικής πρωτεΐνης στην περιοχή έκφρασης του γονιδίου *omb*, σε θηλυκές προνύμφες τρίτου σταδίου με γενότυπο *omb-GAL4/+;UAS-EGFP-Neur1^{M015}/+*. Το χιμαιρικό πολυπεπτίδιο ανιχνεύεται στην πλασματική μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα (A, B-κεφαλή βέλους). Δεν παρατηρήθηκαν περιοχές υψηλότερης συσσώρευσης στην πλασματική μεμβράνη. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός τόσο του θηλαστικού μορίου Neuralized όσο και του δροσοφιλικού ομολόγου ήταν ειδικός και σαφώς διαφορετικός από την περίπτωση που η GFP εκφραζόταν μόνη της (Γ και Δ). Δ : εγκάρσια οπτική τομή του Γ.

Πρόσθετες συντομογραφίες : KE + BE : κορυφαία και βασική επιφάνεια, αντίστοιχα, των επιθηλιακών κυττάρων του προνυμφικού δίσκου του φτερού.

Η μεμβρανική συσχέτιση της χιμαιρικής πρωτεΐνης NeurΔRING/EGFP ανιχνεύτηκε και στην περίπτωση εκτοπικής έκφρασής της στις κυτταρικές ομάδες που εκφράζεται το ενδογενές γονίδιο *neuralized*. Συγκεκριμένα, το διαγονίδιο *UAS-neurΔRING-EGFP^{Δ032B}* ενεργοποιήθηκε στα προγονικά κύτταρα των αισθητηρίων οργάνων (SOPs) του φτερού,

σε δίσκους προνυμφών τρίτου σταδίου, οι οποίες προήλθαν από τη διασταύρωση του στελέχους που έφερε το διαγονίδιο με το στέλεχος οδηγό $w;neur-GAL4$ (Εικ.38Ζ).

Οι παρατηρήσεις που έγιναν με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού επιβεβαιώθηκαν και με πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης (συνεργασία με Δρ. Βασίλη Γαλανόπουλο) σε έμβρυα στα οποία το χιμαιρικό πολυπεπτίδιο $Neur\Delta RING/EGFP$ εκφράστηκε με τη χρήση της σειράς οδηγού $daG32-GAL4^{UH1}$ (Εικ.40). Συγκεκριμένα, διασταυρώθηκαν τα στελέχη $yw;UAS-neur\Delta RING-EGFP^{\Delta G32B}$ και $w;da.G32-GAL4^{UH1}$. Ακολούθησαν τομές σε έμβρυα με γενότυπο $daG32-GAL4/+;UAS-neur\Delta RING-EGFP^{\Delta G32B}/+$, ηλικίας 12-16 ωρών και πειράματα ανοσοανίχνευσης με τη χρήση αντισώματος ειδικού για την EGFP και δευτερογενούς ανοσοσφαιρίνης προσδεμένης σε σφαιρίδια χρυσού (υλικά και μέθοδοι, ενότητα 22).



Εικόνα 40. Ανοσοανίχνευση της χιμαιρικής πρωτεΐνης $Neur\Delta RING/EGFP$. Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης σε τομές εμβρύων *Drosophila melanogaster*. Η χιμαιρική πρωτεΐνη εκφράστηκε εκτοπικά σε έμβρυα με γενότυπο $daG32-GAL4/+;UAS-neur\Delta RING-EGFP^{\Delta G32B}/+$, ηλικίας 12-16 ωρών. Η ανοσοανίχνευση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αντισώματος ειδικού για την EGFP και δευτερογενούς ανοσοσφαιρίνης προσδεμένης σε σφαιρίδια χρυσού, διαμέτρου 20nm. Α : μεγέθυνση x 82.500. Σντομογραφίες : ΠΜ : πλασματική μεμβράνη, Κ : κυτταρόπλασμα, ΕΠ : εξωκυτταρικό περιβάλλον.

Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούσαν με τα δημοσιευμένα πειράματα ανοσοεντοπισμού ολόκληρης της πρωτεΐνης $Neur$ και επισφράγισαν την αρχική διαπίστωση, στις κυτταρικές σειρές θηλαστικών, ότι ο δάκτυλος $RING$ και η περιοχή $NEUZ2$ δεν ευθύνονται για τον εντοπισμό του μορίου. Αντίστοιχες παρατηρήσεις με αυτές των πειραμάτων κατευθυνόμενης υπερέκφρασης με το σύστημα $GAL4$ ελήφθησαν και στην περίπτωση εκτοπικής ενεργοποίησης των δύο μελετούμενων χιμαιρικών διαγονιδίων $Neur\Delta RING/EGFP$ και $EGFP/NeurI$ σε μιτωτικούς κλώνους δίσκων φτερού, τρίτου προνυμφικού σταδίου (Εικ.38Ε και 39Α), οι οποίοι κατασκευάστηκαν με την τεχνική $Flip-out$ (υλικά και μέθοδοι, ενότητα 19).

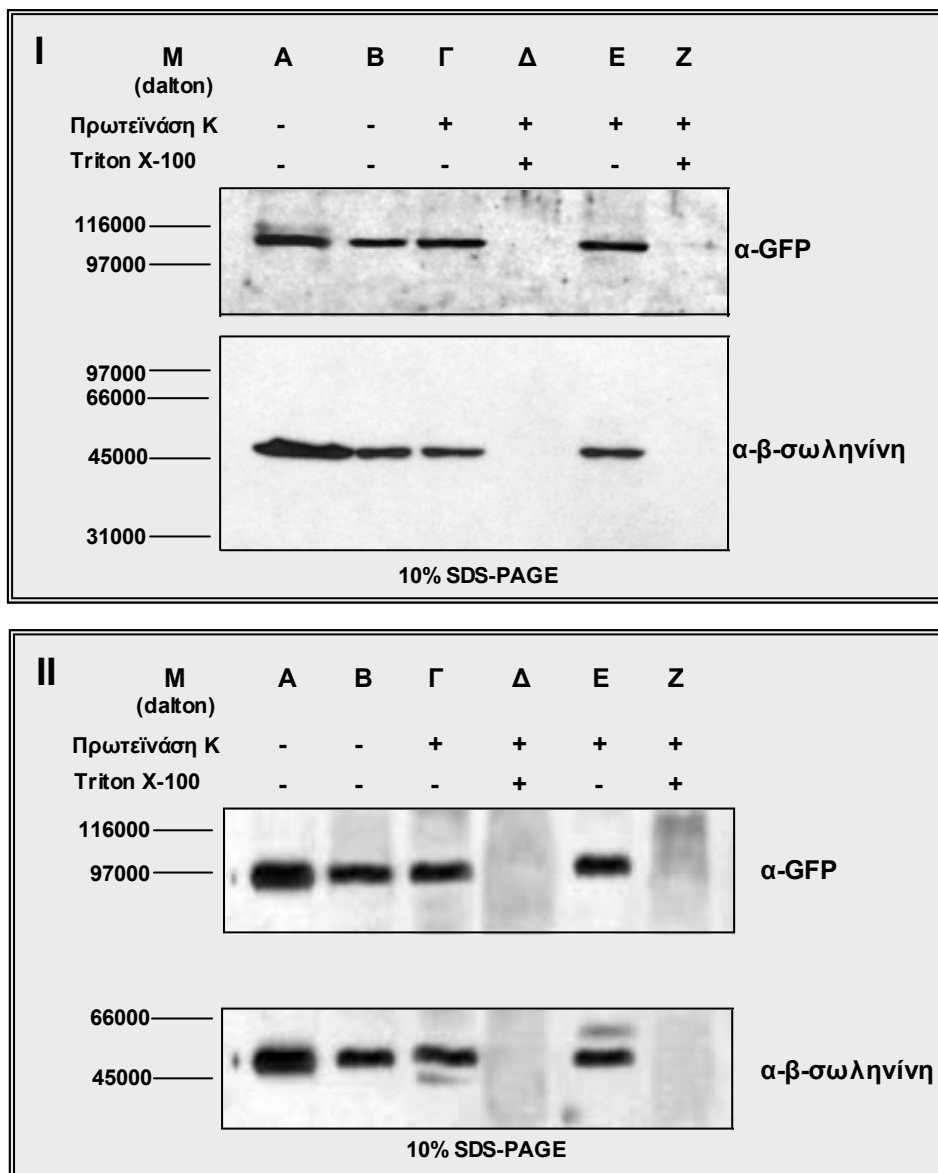
Η ανίχνευση των μελετούμενων μορίων Neutralized στη μεμβράνη δε σημαίνει ότι πρόκειται για διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Άλλωστε, η μη πρόβλεψη διαμεμβρανικών περιοχών και θέσεων πρόσδεσης λιπιδικών αλυσίδων από τα υπολογιστικά προγράμματα (<http://dodo.cpmc.columbia.edu/predictprotein/>, <http://www.ch.mbnnet.org/software/TMPREDform.html>, <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>, <http://sosui.Proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html>, <http://smart.embl-heidelberg.de/>) ενισχύουν την υπόθεση ότι ο εντοπισμός των πρωτεϊνών στην περιφέρεια του κυττάρου πιθανόν να οφείλεται στην αλληλεπίδρασή τους με διαμεμβρανικά πολυπεπτίδια ή εδρεύοντα στην μεμβρανική περιφέρεια υπερμοριακά συμπλέγματα. Επιπρόσθετα, η μη ανίχνευση στικτών δομών στο κυτταρόπλασμα, σε αντίθεση με τις κυτταρικές σειρές, θα μπορούσε να δικαιολογηθεί από τη φύση των πειραμάτων τα οποία δίνουν μεν σημαντική πληροφορία αλλά δεν αντικατοπτρίζουν πάντα και την πραγματική κατάσταση της ενδογενούς πρωτεΐνης, αφού το διαγονίδιο εκφράζεται σε διαφορετικές από τις φυσιολογικές (ενδογενείς) συνθήκες. Για παράδειγμα, είναι δυνατόν το μόριο κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του στο κύτταρο να εντοπίζεται ως περιφερειακή πρωτεΐνη της πλασματικής μεμβράνης, χωρίς αυτό να συνεπάγεται ότι τοπολογικά βρίσκεται πάντα εκεί αλλά να αποτελεί ενδιάμεσο σταθμό ενός ενδοκυτταρικού μονοπατιού στο οποίο συμμετέχει.

Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα των κατευθυνόμενων υπερεκφράσεων επιβεβαιώνουν την αρχική υπόθεση ότι τόσο η πρωτεΐνη Neutralized της *Drosophila* όσο και η ομόλογή της στα θηλαστικά σχετίζονται με την πλασματική μεμβράνη και ότι αυτή η συσχέτιση δεν εξαρτάται από το δάκτυλο RING και την περιοχή NEUZ2, αλλά μόνο από την περιοχή NEUZ1. Η ερμηνεία για τις αποκλίνουσες παρατηρήσεις (στικτές δομές στο κυτταρόπλασμα των θηλαστικών κυττάρων) δεν είναι ακόμα δυνατή με αυτού του είδους τα πειράματα επειδή πρόκειται για δύο διαφορετικά ετερόλογα συστήματα-μοντέλα στα οποία λαμβάνουν χώρα πολλές διαφορετικές παράμετροι.

B. Βιοχημικές μελέτες

Προκειμένου να ελεγχθεί αν τα πολυπεπτίδια NeurΔRING/EGFP και EGFP/NeurI εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική ή στην εξωκυττάρια πλευρά της πλασματικής μεμβράνης, όταν εκφράζονται εκτοπικά στην *Drosophila*, πραγματοποιήθηκαν πειράματα πέψης με πρωτεϊνάση K σε δίσκους φτερού προνυμφών τρίτου σταδίου με γενότυπο omb-GAL4/+;UAS-neurΔRING-EGFP^{Δ^{32B}}/+ και omb-GAL4/+;UAS-EGFP-NeurI^{M¹⁵}/+, αντίστοιχα (υλικά και μέθοδοι, ενότητα 18). Πιο αναλυτικά, άθικτοι προνυμφικοί δίσκοι επώαστηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεϊνάσης K (20μg/ml, 50μg/ml, 75μg/ml και 100μg/ml) για 10 λεπτά στους 30°C. Ακολούθησε ομογενοποίηση, ηλεκτροφόρηση και

ανοσοανίχνευση των χιμαιρικών πρωτεϊνών, με τη χρήση αντισώματος ειδικού για την EGFP. Διαπιστώθηκε ότι τα υπό μελέτη πολυπεπτίδια προστατεύονταν από τη δράση της πρωτεϊνάσης, σε όλες τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν, ενώ υδρολύονταν όταν τα κύτταρα γίνονταν διαπερατά μέσω της παρουσίας Triton X-100 (Εικ.41). Η ανίχνευση των

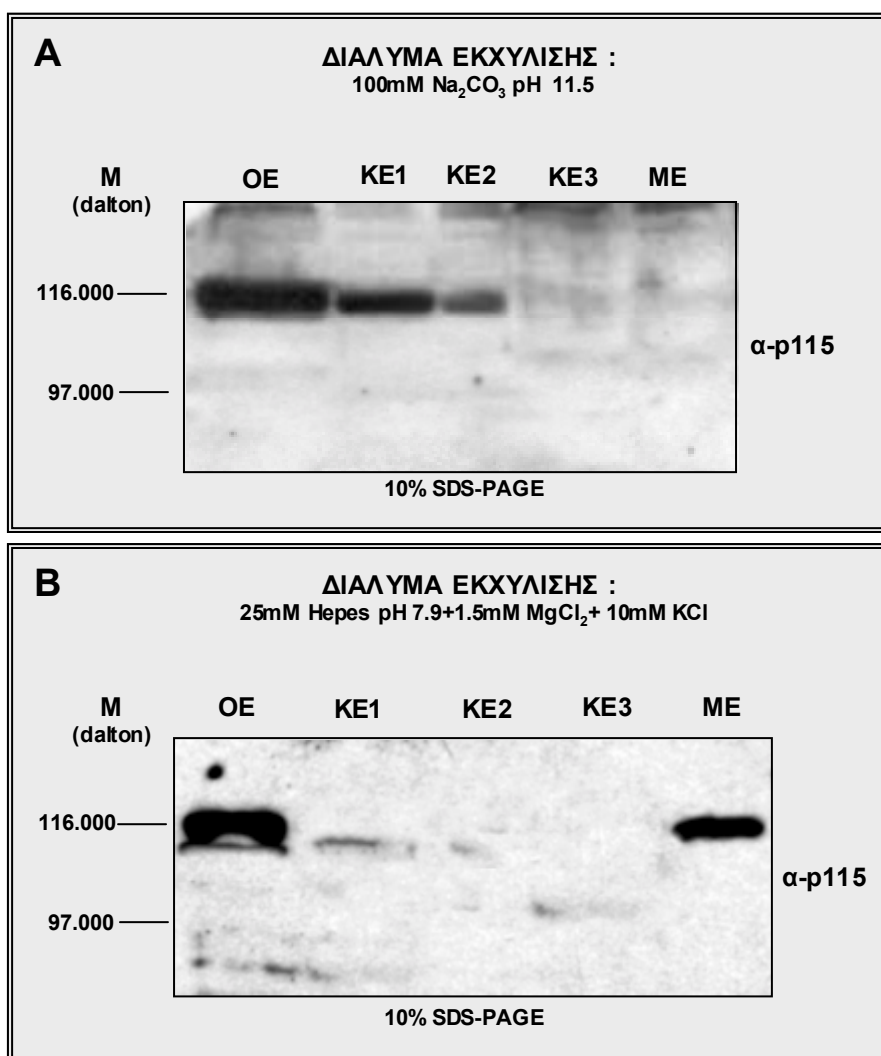


Εικόνα 41. Πειράματα ανοσοανίχνευσης των χιμαιρικών πρωτεϊνών *NeurΔRING/EGFP* (I) και *EGFP/NeurI* (II) σε εκχυλίσματα προνυμφικών δίσκων φτερού *D. melanogaster* που είχαν υποστεί πέψη με πρωτεϊνάση K. Τόσο το δροσοφιλικό όσο και το θηλαστικό χιμαιρικό πολυπεπτίδιο εκφράστηκαν στην περιοχή έκφρασης του γονιδίου *omb*. Για τα πειράματα ανοσοανίχνευσης ηλεκτροφορήθηκε ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από 16 δίσκους φτερού που είχαν επωαστεί σε διάλυμα 1X PBS, παρουσία πρωτεϊνάσης K (δείγματα Γ-Z). Γ και Δ : ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα 16 δίσκων φτερού που επωάστηκαν με πρωτεϊνάση K τελικής συγκέντρωσης 20μg/ml. E και Z : ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα 16 δίσκων φτερού που επωάστηκαν με πρωτεϊνάση K τελικής συγκέντρωσης 50μg/ml. Γ και E : η επώαση των προνυμφικών δίσκων με την πρωτεϊνάση K πραγματοποιήθηκε σε 1X PBS που περιείχε Triton X-100, τελικής συγκέντρωσης 1%. A : ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα εμβρύων με γενότυπο *daG32-GAL4/+;UAS-neurΔRING-EGFP^{Δ32B/+}* (IA) και *daG32-GAL4/+;UAS-EGFP-Neur^{ME15/+}* (IIA). B : ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα 16 άθικτων προνυμφικών δίσκων φτερού (δείγμα ελέγχου του μεγέθους των χιμαιρικών μορίων). M : πρωτεϊνικός μάρτυρας. Για τον έλεγχο της αρτιότητας των προνυμφικών δίσκων (αποκλεισμός της πιθανότητας να είναι διαπερατοί στην πρωτεϊνάση K) πραγματοποιήθηκε ανοσοανίχνευση της β-σωληνίνης.

χιμαιρικών πολυπεπτιδίων NeurΔRING/EGFP και EGFP/NeurI καθώς και το γεγονός ότι εμφάνιζαν το αναμενόμενο θεωρητικό μέγεθος αποτελούν ένδειξη ότι πρόκειται για μη διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που βρίσκονται εξ' ολοκλήρου στην κυτταροπλασματική περιφέρεια της μεμβράνης των κυττάρων. Η αρτιότητα των προνυμφικών δίσκων (μη διαπερατότητα των κυττάρων στην πρωτεΐνάση K) ελέγχθηκε με ταυτόχρονη ανίχνευση της β-σωληνίνης (β-tubulin), η οποία ως γνωστόν εντοπίζεται στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον (Εικ.41). Για να διερευνηθεί αν η μεμβρανική τοπολογία των μελετούμενων πρωτεϊνών οφειλόταν σε απευθείας δέσμευσή τους στη μεμβράνη ή σε αλληλεπιδράσεις με άλλα διαμεμβρανικά ή περιφερειακά μόρια, πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσσεις μεμβρανών σε ιδιαίτερα περιοριστικές συνθήκες, με τη χρήση αλκαλικού pH (διάλυμα εκχύλισης αποτελούμενο από 100mM Na₂CO₃ pH. 11.5), προκειμένου να απομονωθούν αποκλειστικά διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (υλικά και μέθοδοι, ενότητα 17A).

Για να ελεγχθεί ότι η μέθοδος εξασφαλίζει την αποδέσμευση από τη μεμβράνη των πρωτεϊνών που σχετίζονται έμμεσα με αυτή, και συνεπώς λαμβάνονται στα κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα, πραγματοποιήθηκαν κλασματοποιήσεις και ακολούθησε ανοσοανίχνευση της σχετιζόμενης με τις μεμβράνες του δικτύου Golgi πρωτεΐνης p115. Οι εκχυλίσσεις έγιναν τόσο στις προαναφερόμενες περιοριστικές συνθήκες όσο και σε συνθήκες που επέτρεπαν την απομόνωση στο μεμβρανικό ίζημα και των πρωτεϊνών που σχετίζονται με μεμβράνες αλλά δεν έχουν διαμεμβρανική περιοχή [λύση σε υποτονικό διάλυμα ουδέτερου pH (25mM HEPES pH 7.9, 1.5mM MgCl₂ και 10mM KCl – υλικά και μέθοδοι, ενότητα 17B)]. Πράγματι, διαπιστώθηκε ότι η p115 εντοπίζεται στο μεμβρανικό κλάσμα μόνο όταν χρησιμοποιηθούν ήπιες συνθήκες εκχύλισης (Εικ.42). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τόσο στη *Drosophila* και για τα δύο ομόλογα μόρια, όσο και στην κυτταρική σειρά COS-7, για την πρωτεΐνη του ποντικού. Στη *Drosophila* οι εκχυλίσσεις έγιναν σε προνύμφες τρίτου σταδίου, με γενότυπο *hs-GAL4/+;UAS-neurΔRING-EGFP/+* και *hs-GAL4/+;UAS-EGFP-NeurI/+*, αντίστοιχα, ύστερα από θερμικό σοκ, στους 38⁰C για 50 λεπτά, με αποτέλεσμα την ομοιογενή έκφραση του μεταγραφικού ενεργοποιητή GAL4 και κατ' επέκταση των χιμαιρικών διαγονιδίων.

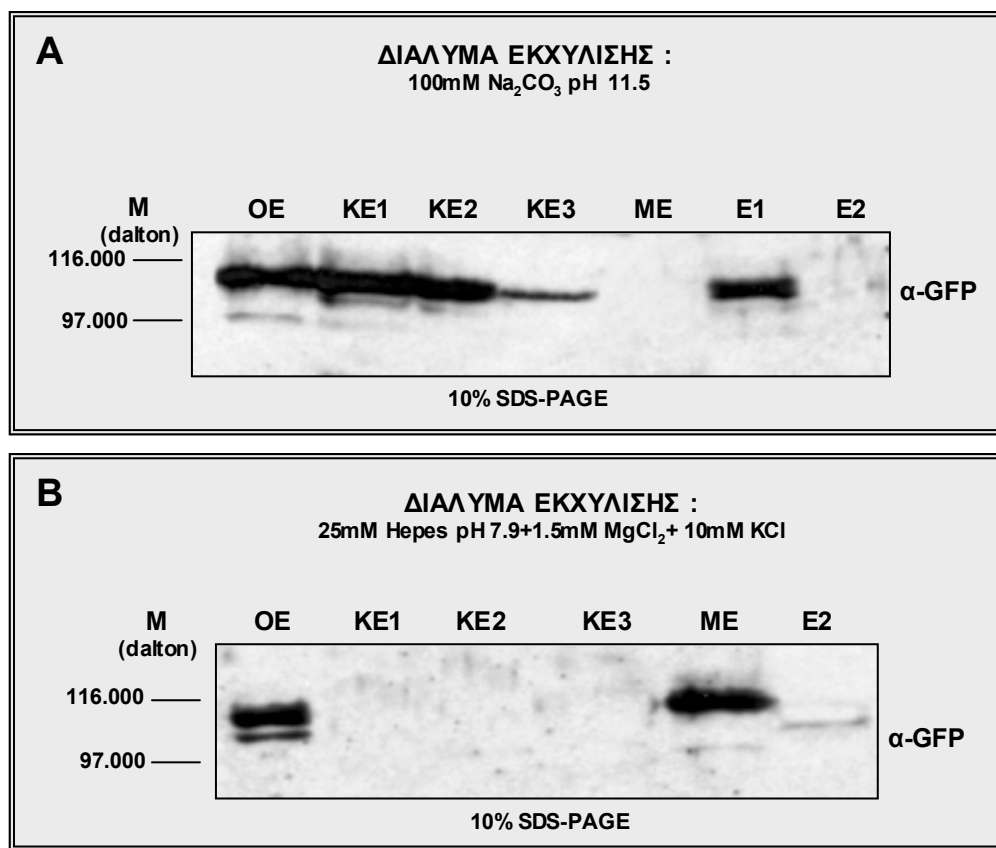
Προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα ύπαρξης στο μεμβρανικό εκχύλισμα παγιδευμένων κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές (υλικά και μέθοδοι, ενότητα 17A). Το τελικό μεμβρανικό καθώς και τα τρία μη μεμβρανικά κλάσματα ηλεκτροφορήθηκαν σε αποδιατακτικές πηκτές ακρυλαμίδης και ακολούθησαν πειράματα ανοσοανίχνευσης με τη χρήση αντισώματος ειδικού για την EGFP. Διαπιστώθηκε ότι και τα δύο χιμαιρικά πολυπεπτιδία NeurΔRING/EGFP και EGFP/NeurI ανιχνεύονταν αποκλειστικά στα κυτταροπλασματικά δείγματα (Εικ.43A, 44A). Αντίθετα,



Εικόνα 42. Πειράματα ανοσοανίχνευσης της πρωτεΐνης p115 του δικτύου Golgi σε μεμβρανικά εκχυλίσματα κυττάρων COS-7 που εξέφραζαν το χιμαιρικό πολυπεπτίδιο EGFP/Neur1. Ο αποκλεισμός των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών από το μεμβρανικό ίζημα επιτεύχθηκε με επαναιώρηση του αρχικού μεμβρανικού δείγματος και επανάληψη της κλασματοποίησης. Η διαδικασία επαναλήφθηκε στο νέο μεμβρανικό εκχύλισμα. Ηλεκτροφορήθηκαν συνεπώς 3 κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα (KE1-KE3) και ένα τελικό μεμβρανικό εκχύλισμα (ME). A : εκχύλιση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών (αυστηρά περιοριστικές συνθήκες, διάλυμα εκχύλισης αποτελούμενο από 100mM Na₂CO₃ pH. 11.5). B : εκχύλιση διαμεμβρανικών και σχετιζόμενων έμμεσα με την μεμβράνη πρωτεϊνών (ήπιες συνθήκες εκχύλισης-υποτονικό διάλυμα με ουδέτερο pH). Η p115 ανιχνεύεται στο μεμβρανικό δείγμα όταν οι συνθήκες των εκχυλίσεων είναι ήπιες (B) ενώ σε συνθήκες υψηλού pH εντοπίζεται στα κυτταροπλασματικά κλάσματα (A). OE : ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα παροδικά διαμολυσμένων κυττάρων. KE1-KE3 : κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα. ME : τελικό μεμβρανικό εκχύλισμα. M : μάρτυρας μοριακού μεγέθους. Να σημειωθεί ότι οι ποσότητες των δειγμάτων KE1-KE3 και ME που ηλεκτροφορήθηκαν αντιστοιχούν στον ίδιο αριθμό κυττάρων.

όταν εφαρμόστηκαν ήπιες συνθήκες εκχύλισης διαπιστώθηκε ότι οι πρωτεΐνες ανιχνεύονταν στο μεμβρανικό κλάσμα (Εικ.43B, 44B). Σε αντίθεση με το δροσοφιλικό μόριο, το θηλαστικό ομόλογο εξακολουθούσε να εντοπίζεται και στο κυτταροπλασματικό εκχύλισμα, όπως άλλωστε είχε παρατηρηθεί και στα πειράματα μικροσκοπίας φθορισμού. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την υπόθεση ότι ο εντοπισμός των δύο ομολόγων πρωτεϊνών στην κυτταροπλασματική περιφέρεια της πλασματικής

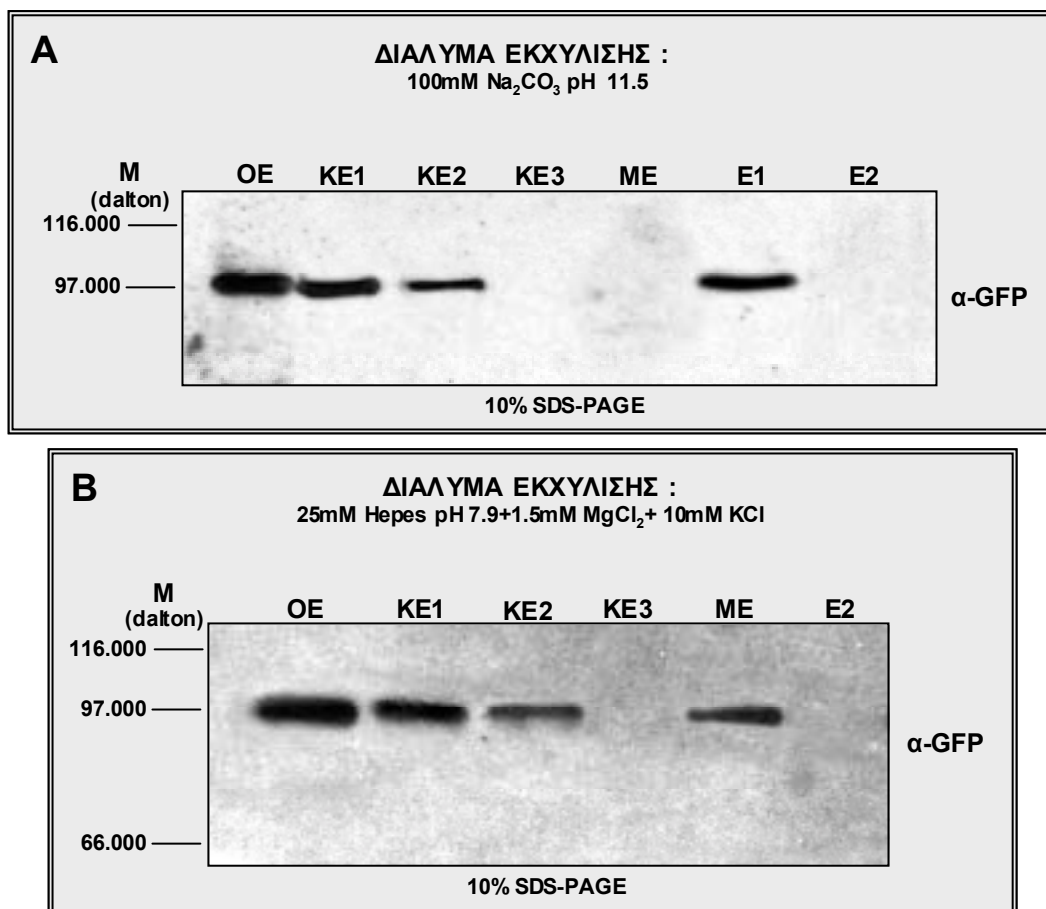
μεμβράνης οφειλόταν σε αλληλεπιδράσεις με άλλους παράγοντες και όχι σε άμεση σύνδεση με αυτή.



Εικόνα 43. Πειράματα ανοσοανίχνευσης της χιμαιρικής πρωτεΐνης *NeurΔRING/EGFP* σε μεμβρανικά εκχύλισματα προνυμφών *Drosophila melanogaster*. Οι πειραματικές διαδικασίες κλασματοποίησης πραγματοποιήθηκαν σε προνύμφες τρίτου σταδίου με γενότυπο *hs-GAL4/+;UAS-neurΔRING-EGFP^{Δ632B}/+*, που είχαν υποστεί θερμικό σοκ. A : εκχύλιση υπό αυστηρά περιοριστικές συνθήκες. B : ήπιες συνθήκες εκχύλισης. Για την ανοσοανίχνευση της χιμαιρικής πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα ειδικό για την EGFP. OE : ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα των μελετούμενων προνυμφών. E1 : ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων COS-7 που είχαν διαμολυνθεί παροδικά με την αντίστοιχη κατασκευή *NeurΔRING-EGFP*C1 (δείγμα ελέγχου του μεγέθους της χιμαιρικής πρωτεΐνης). E2 : ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα προνυμφών που δεν είχαν υποστεί θερμικό σοκ και συνεπώς δεν εκφράζανε τη χιμαιρική πρωτεΐνη (δείγμα αρνητικού ελέγχου). Οι ποσότητες των ηλεκτροφορημένων δειγμάτων OE, KE1-KE3, ME και E2 αντιστοιχούν στον ίδιο αριθμό προνυμφών (ίδιος αριθμός κυττάρων). KE1-KE3 : κυτταροπλασματικά εκχύλισματα, ME : τελικό μεμβρανικό εκχύλισμα.

Ανάλογες παρατηρήσεις έγιναν και στις αντίστοιχες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα COS-7, τα οποία είχαν διαμολυνθεί παροδικά με την κατασκευή *pEGFP1/NeurI* (Εικ.45). Διαπιστώθηκε ότι μόνο σε ήπιες συνθήκες η χιμαιρική πρωτεΐνη εντοπιζόταν στο μεμβρανικό ίζημα. Η μεμβρανική συσχέτιση του πολυτεπεπτιδίου *EGFP/NeurI* αποτελεί απόδειξη ότι οι στικτές δομές που ανιχνεύονται με μικροσκοπία φθορισμού είναι μεμβρανικές. Αξίζει να σημειωθεί ότι η πρωτεΐνη *EGFP/NeurI* δεν ανιχνευόταν όταν το εκχύλισμα των μεμβρανών επωαζόταν με πρωτεϊνάση K (Εικ.45). Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι οι ανιχνευόμενες μεμβρανικές δομές, οι οποίες αποτελούν πιθανόν, σύμφωνα με τις υπάρχουσες ενδείξεις, κυστίδια, έχουν επανακυκλοποιηθεί κατά την εκχύλιση. Το χιμαιρικό πολυτεπεπίδιο *EGFP/NeurI* δεν εντοπίζεται

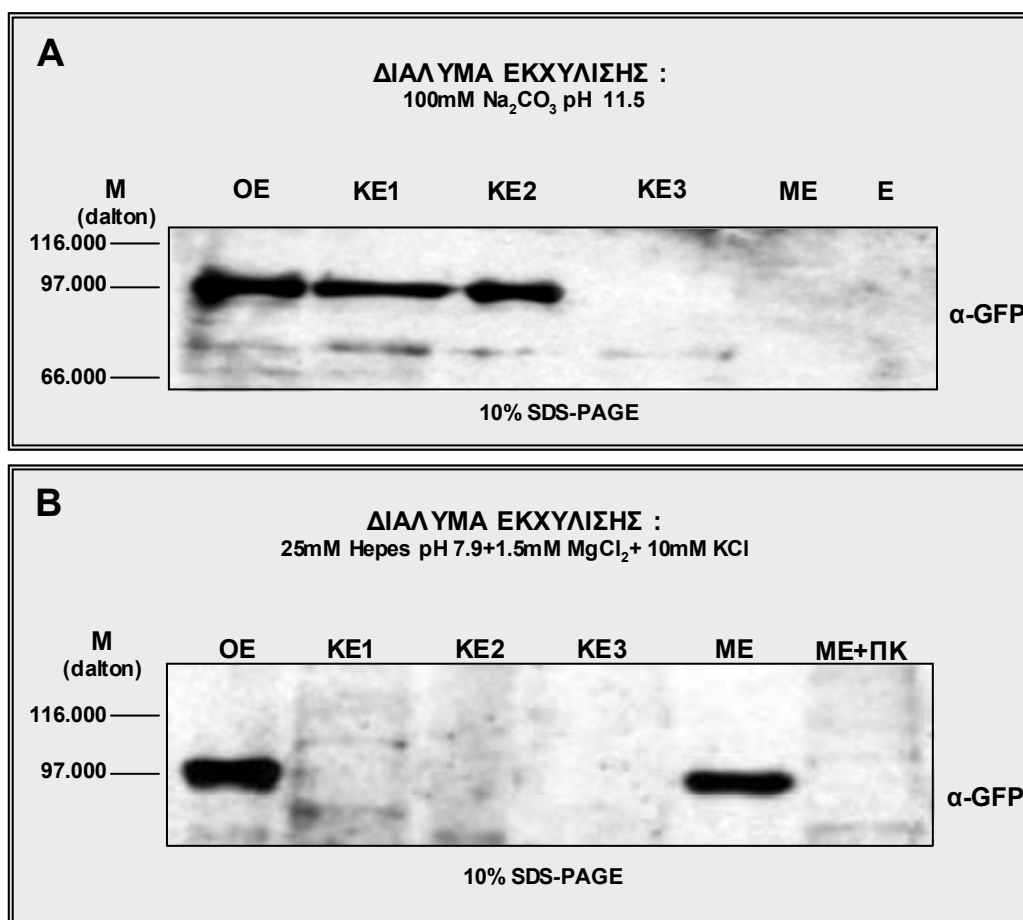
στον εσωτερικό χώρο αυτών των κυστιδίων αλλά στην κυτταροπλασματική τους επιφάνεια.



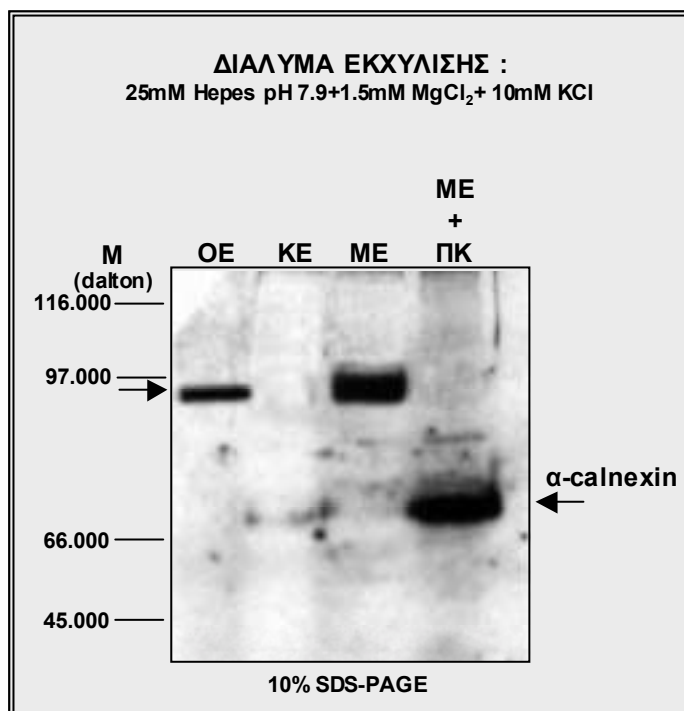
Εικόνα 44. Πειράματα ανοσοανίχνευσης της χιμαιρικής πρωτεΐνης EGFP/Neur1 σε μεμβρανικά εκχυλίσματα προνυμφών *Drosophila melanogaster*. Οι κλασματοποιήσεις πραγματοποιήθηκαν σε προνύμφες τρίτου σταδίου με γενότυπο *hs-GAL4/+;UAS-EGFP-Neur1^{MO15}/+*, αφού προηγήθηκε θερμικό σοκ. A : εκχύλιση υπό αυστηρά περιοριστικές συνθήκες. B : εκχύλιση υπό ήπιες συνθήκες. Για την ανοσοανίχνευση της χιμαιρικής πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα ειδικό για την EGFP. KE1-KE3 : κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα, ME : τελικό μεμβρανικό εκχύλισμα. OE : ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα των μελετούμενων προνυμφών. E1 : ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων COS-7 που είχαν διαμολυνθεί παροδικά με την κατασκευή rEGFPC1/Neur1 (δείγμα ελέγχου του μεγέθους της χιμαιρικής πρωτεΐνης). E2 : ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα προνυμφών που δεν είχαν υποστεί θερμικό σοκ. Οι ποσότητες των ηλεκτροφορημένων δειγμάτων OE, KE1-KE3, ME και E2 αντιστοιχούν στον ίδιο αριθμό προνυμφών (ίδιος αριθμός κυττάρων).

Επειδή κατά την κυτταρική λύση υπό ήπιες συνθήκες οι γραμμοποιημένες μεμβράνες επανακυκλοποιούνται, κάτι που, όπως προαναφέρθηκε, διαπιστώθηκε στην ανίχνευση του πολυπεπτιδίου EGFP/Neur1, ήταν απαραίτητο να διαπιστωθεί αν διατηρείται ο αρχικός τους (ενδογενής) προσανατολισμός. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοανίχνευσης της πρωτεΐνης καλνεξίνης, η οποία εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Πρόκειται για μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη μεγέθους 592 αμινοξέων (90kda), της οποίας τα 492, περίπου, αμινοτελικά αμινοξέα βρίσκονται στην κοιλότητα του ενδοπλασματικού δικτύου. Διαπιστώθηκε, πράγματι, εντοπισμός της καλνεξίνης στο μεμβρανικό κλάσμα των διαμολυσμένων κυττάρων COS-7. Όταν έγινε

πέψη αυτού του δείγματος με πρωτεϊνάση K παρατηρήθηκε μείωση του μεγέθους του πολυπεπτιδίου κατά το μέγεθος της κυτταροπλασματικής του περιοχής, υποδηλώνοντας ότι οι επανακυκλοποιημένες μεμβράνες του ΕΔ, κατ' επέκταση και όλες οι μεμβράνες των ενδοκυτταρικών δομών, είχαν διατηρήσει τον προσανατολισμό που παρουσιάζουν μέσα στο κύτταρο (Εικ.46). Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων διαμολύνσεων με την πρωτεΐνη Neu1 των θηλαστικών και των τελευταίων πειραμάτων ελέγχου, βγαίνει το συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη Neu1 εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική επιφάνεια μεμβρανικών κυστιδιακών δομών και αυτό επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλα μόρια.



Εικόνα 45. Πειράματα ανοσοανίχνευσης της χιμαιρικής πρωτεΐνης EGFP/Neu1 σε μεμβρανικά εκχυλίσματα παροδικά διαμολυσμένων κυττάρων COS-7. Η ανοσοανίχνευση πραγματοποιήθηκε στα ίδια ηλεκτροφορημένα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν και για την ανίχνευση της πρωτεΐνης p115 (εικ. 42). A : εκχύλιση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. B : εκχύλιση διαμεμβρανικών και σχετιζόμενων έμμεσα με την μεμβράνη πρωτεϊνών. Για την ανοσοανίχνευση της χιμαιρικής πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα ειδικό για την EGFP. OE : ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα παροδικά διαμολυσμένων κυττάρων. KE1-KE3 : κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα. ME : τελικό μεμβρανικό εκχύλισμα. M : μάρτυρας μοριακού μεγέθους. E: ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα μη διαμολυσμένων κυττάρων COS-7. ME+PK : τελικό μεμβρανικό εκχύλισμα ύστερα από πέψη με πρωτεϊνάση K τελικής συγκέντρωσης 50μg/ml. Οι ποσότητες των ηλεκτροφορημένων δειγμάτων OE, KE1-KE3, ME και ME+PK αντιστοιχούν στον ίδιο αριθμό διαμολυσμένων κυττάρων.



Εικόνα 46. Πειράματα ανοσοανίχνευσης της καλνεξίνης (calnexin) σε μεμβρανικά εκχυλίσματα κυττάρων COS-7 που εκφράζουν το χιμαιρικό πολυπεπτίδιο EGFP/Neur1. Η ανοσοανίχνευση πραγματοποιήθηκε στα εκχυλίσματα που είχαν απομονωθεί υπό ήπιες συνθήκες. Η πρωτεΐνη ανιχνεύεται στο μεμβρανικό εκχύλισμα πριν (ME) και μετά (ME+ΠΚ) από πέψη με πρωτεϊνάση K, με τη διαφορά ότι στη δεύτερη περίπτωση έχει μικρότερο μέγεθος (~72kda). Η διαφορά μεγέθους είναι ίση με το μέγεθος της περιοχής της πρωτεΐνης που βρίσκεται στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης του ενδοπλασματικού δικτύου. OE : ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα παροδικά διαμολυσμένων κυττάρων. KE1-KE3 : κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα. M : μάρτυρας μοριακού μεγέθους. E: ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα μη διαμολυσμένων κυττάρων COS-7. ME+ΠΚ : τελικό μεμβρανικό εκχύλισμα ύστερα από πέψη με πρωτεϊνάση K τελικής συγκέντρωσης 50μg/ml. Οι ποσότητες των ηλεκτροφορημένων δειγμάτων αντιστοιχούν στον ίδιο αριθμό κυττάρων .

Τα αποτελέσματα υποκυτταρικού εντοπισμού έδειξαν ότι τόσο η πρωτεΐνη Neuralized της *Drosophila* όσο και η θηλαστική ομόλογή της εντοπίζονται, τουλάχιστον για κάποιο χρονικό διάστημα του κύκλου ζωής τους, στην κυτταροπλασματική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης και αυτή η τοπολογική τους θέση οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις με άλλα διαμεμβρανικά ή περιφερειακά μόρια. Για τον υποκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών ευθύνονται τα πρώτα 226 και 246 αμινοτελικά αμινοξέα του θηλαστικού και του δροσοφιλικού μορίου, αντίστοιχα, τα οποία περιλαμβάνουν την περιοχή NEUZ1. Αντίθετα, ο δάκτυλος RING και η περιοχή NEUZ2 δεν παίζουν ρόλο στον εντοπισμό των πολυπεπτιδίων. Επιπρόσθετα, η ανίχνευση των πρωτεϊνών, στο σύστημα των θηλαστικών, στην κυτταροπλασματική επιφάνεια κυστιδίων, συγκλίνει με την υπόθεση της πιθανής συμμετοχής των μορίων σε μηχανισμούς ενδοκυτταρικής διακίνησης, ίσως ενδοκύτωσης, με ενδιάμεσο σταθμό την πλασματική μεμβράνη.

2. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ *Neuralized* ΣΤΙΣ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΚΑΙ ΣΤΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ Notch

A. Η υπερέκφραση των διαγονιδίων *UAS-neur* και *UAS-Neur1* επηρεάζει το σηματοδοτικό μηχανισμό του υποδοχέα Notch

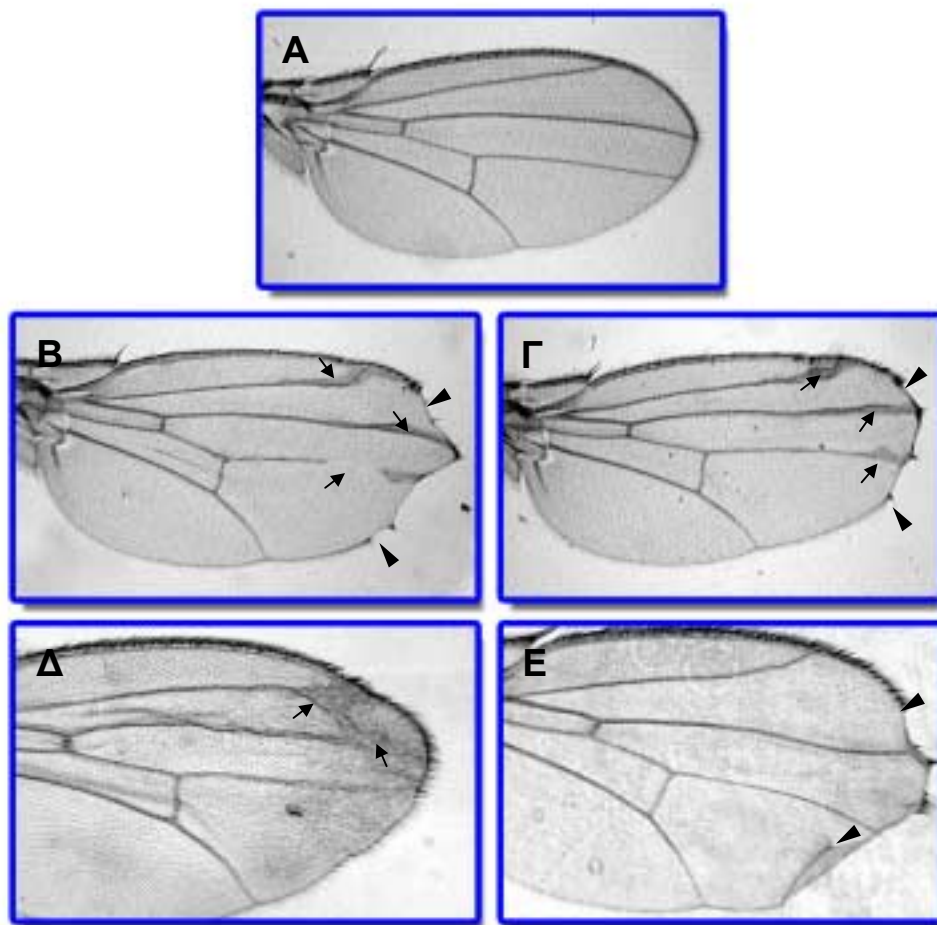
Τη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού των δύο ομολόγων πρωτεϊνών *Neur1* και *Neur1* ακολούθησαν νέα πειράματα κατευθυνόμενων υπερεκφράσεων, προκειμένου να εντοπιστούν στα ενήλικα άτομα *Drosophila* πιθανοί μορφολογικοί φαινότυποι και να διερευνηθεί η επίδραση της έκφρασης των μορίων στο σηματοδοτικό μονοπάτι Notch. Κατασκευάστηκαν στελέχη τα οποία έφεραν διαγονίδια που κωδικοποιούσαν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες, οι οποίες ήταν πλήρους μήκους και δεν συνδέονταν με κάποιον επίτοπο ή πρωτεΐνη αναφοράς (EGFP), έτσι ώστε να εξασφαλιστεί ότι η λειτουργία τους δεν επηρεάζεται από παρακείμενες πρόσθετες πεπτιδικές αλληλουχίες. Οι κλωνοποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν περιγράφονται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11. Περιγραφή των πλασμιδιακών κατασκευών που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία διαγονιδιακών στελεχών *Drosophila melanogaster*.

ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ	ΦΟΡΕΑΣ (θέση ένθεσης)	ΕΝΘΕΜΑ (κατασκευή που απομονώθηκε)	ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ ΕΝΘΕΜΑΤΟΣ	ΑΜΙΝΟΞΕΑ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ
pP[UAST]/ <i>Neur1</i>	<i>Bgl</i> II – <i>Xba</i> I	<i>Bgl</i> II – <i>Spe</i> I (pRSETC/ <i>Neur1</i>)	68-2500 (βάση αλληλουχίας Εικ.19)	5-574
pP[UAST]/ <i>neur</i>	<i>Bgl</i> II – <i>Kpn</i> I	<i>Bam</i> H I – <i>Kpn</i> I pBSKS II+/ <i>neur</i> (247-2637)	247-2637	1-754

Με βάση τα υπάρχοντα γενετικά δεδομένα που υποδήλωναν πιθανή συμμετοχή του *neuralized* στο σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα Notch, η έκφραση των δύο ομολόγων διαγονιδίων κατευθύνθηκε σε προνυμφικούς δίσκους φτερού (*wing pouch*), όπου είναι εύκολη η ανίχνευση της ενεργοποίησης ή καταστολής του συγκεκριμένου μονοπατιού μιας και είναι γνωστή μία πληθώρα γονιδίων-στόχων που επάγονται σε αυτήν την περιοχή [*Enhancer of split Complex [E(spl)]*, *wingless (wg)*, *vestigial (vg)* (Doherty et al., 1996)]. Να σημειωθεί ότι στον προνυμφικό δίσκο του φτερού δεν εκφράζεται το ενδογενές γονίδιο *neuralized* παρά μόνο σε λίγα κύτταρα που αποτελούν τους προδρόμους των αισθητηρίων οργάνων (SOPs). Το καθένα από τα δύο διαγονίδια ενεργοποιήθηκε στην περιοχή έκφρασης του γονιδίου *omb* (περιοχή *omb*). Οι διασταυρώσεις έγιναν στους 25⁰C και στους 29⁰C, όπου ο GAL4 είναι πιο ενεργός και συνεπώς παράγονται αυξημένα επίπεδα των μελετούμενων πολυπεπτιδίων. Διαπιστώθηκε ότι οι ενήλικοι απόγονοι με γονότυπο *omb-GAL4/+;UAS-neur1/+* και *omb-*

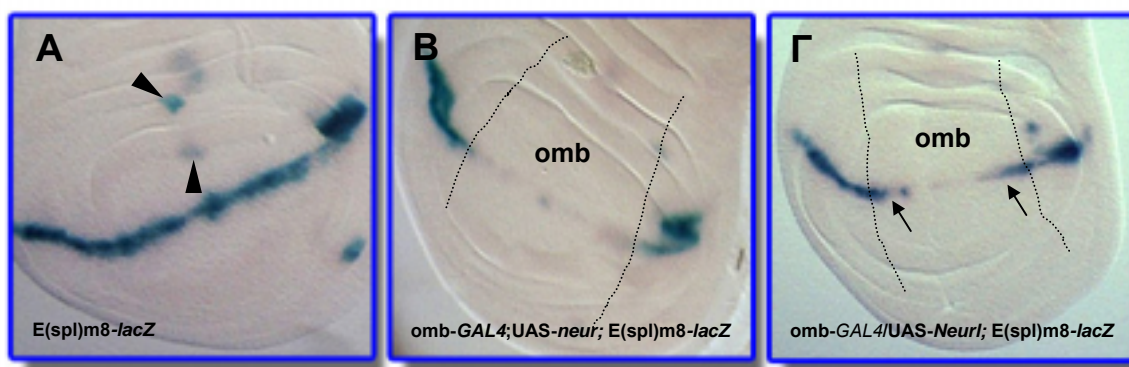
GAL4/UAS-Neur1 εμφάνιζαν φαινοτυπικές αλλοιώσεις και συγκεκριμένα κομμένο όριο φτερού (wing margin) και παχύνσεις φλεβών (Εικ. 47B-E). Οι αλλοιώσεις αυτές είναι χαρακτηριστικές της απώλειας λειτουργίας του σηματοδοτικού μηχανισμού μέσω του υποδοχέα Notch. Ο φαινότυπος ήταν συγκρίσιμος και για τα δύο ομόλογα διαγονίδια αλλά παρουσίαζε υψηλότερη ένταση στην περίπτωση του γονιδίου *neur* αφού εμφανιζόταν όταν το διαγονίδιο εκφραζόταν και στους 25°C, σε αντίθεση με το μόριο του ποντικού του οποίου η έκφραση έπρεπε να ενισχυθεί σημαντικά (29°C) για να εκδηλωθεί στο φαινότυπο.



Εικόνα 47. Η υπερέκφραση των διαγονιδίων *UAS-neur* και *UAS-Neur1* σε προνυμφικούς δίσκους φτερού, στην περιοχή έκφρασης του γονιδίου *omb*, καταστέλλει το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch. Τα διαγονιδιακά στελέχη *yw; UAS-neur* και *yw; UAS-Neur1* διασταυρώθηκαν με το στέλεχος οδηγό *omb-GAL4/FM7*. Οι απόγονοι με γενότυπο *omb-GAL4/+;UAS-neur/+* (B και Γ) και *omb-GAL4/UAS-Neur1* (Δ και Ε) εμφανίζουν φαινοτυπικές αλλοιώσεις και συγκεκριμένα κομμένο όριο φτερού (κεφαλή βέλους) και παχύνσεις ή κόψιμο φλεβών (βέλη). Τα φαινοτυπικά αποτελέσματα είναι λιγότερο έντονα στους απογόνους που εκφράζουν το θηλαστικό μόριο αφού παρουσιάζονται μόνο όταν η διασταύρωση πραγματοποιείται στους 29°C, σε αντίθεση με τη δροσοφιλική πρωτεΐνη, η έκφραση της οποίας δίνει φαινοτυπικές αλλοιώσεις σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (25°C). Α : φτερό ενήλικου ατόμου αγρίου τύπου.

Η διαφαινόμενη επίδραση της εκτοπικής υπερέκφρασης των μελετούμενων γονιδίων στο σηματοδοτικό μονοπάτι Notch ελέγχθηκε με ανίχνευση της έκφρασης γονιδίων-στόχων του μονοπατιού. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα

ανίχνευσης δραστηριότητας της β-γαλακτοσιδάσης (υλικά και μέθοδοι, ενότητα 21). Η μελέτη του προτύπου έκφρασης των γονιδίων-στόχων του μονοπατιού Notch πραγματοποιήθηκε σε δίσκους φτερού από προνύμφες τρίτου σταδίου, στους οποίους εκφράζονταν στην περιοχή omb τα μελετούμενα διαγονίδια (*neur* και *Neur1*) καθώς και το γονίδιο αναφοράς (*lacZ*) που βρισκόταν υπό τον έλεγχο των ρυθμιστικών στοιχείων του αντίστοιχου γονιδίου-στόχου. Αρχικά ανιχνεύτηκε η έκφραση του γονιδίου *E(spl)m8* και παρατηρήθηκε ότι αυτή διακοπτόταν στην περιοχή έκφρασης των πρωτεϊνών *Neur* και *Neur1* (Εικ. 48). Η ένταση του φαινοτυπικού αποτελέσματος, όπως αναμενόταν, ήταν μικρότερη στην περίπτωση του γονιδίου του ποντικού, μιας και η καταστολή της έκφρασης του *E(spl)m8-lacZ* ήταν μικρότερης έκτασης απ' ό,τι στο ομόλογο της *Drosophila* και παρατηρήθηκε μόνο όταν η διασταύρωση έγινε σε υψηλή θερμοκρασία. Εκτός από το γονίδιο *E(spl)m8* μελετήθηκε η έκφραση και άλλων γονιδίων-στόχων [*E(spl)m4*, *E(spl)mβ*, *vestigial*, *wingless*] αλλά δεν ανιχνεύτηκε αλλοίωση του προτύπου έκφρασής τους. Αυτό πιθανόν να οφειλόταν σε διαφορετική απόκριση της μεταγραφικής τους ενεργότητας στις μεταβολές της σηματοδότησης Notch.

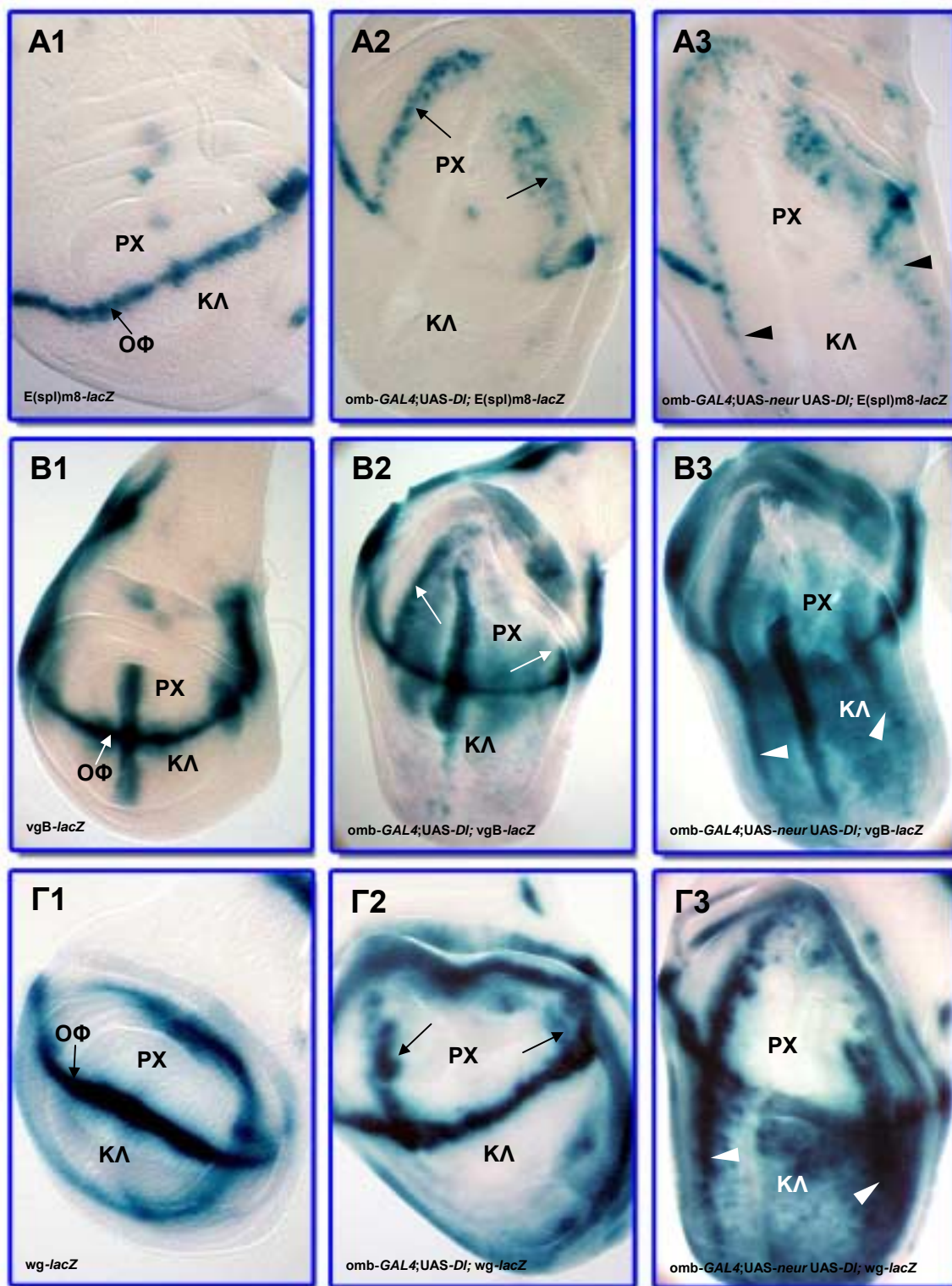


Εικόνα 48. Η υπερέκφραση των διαγονιδίων *UAS-neur* και *UAS-Neur1* σε προνυμφικούς δίσκους φτερού, στην περιοχή έκφρασης του γονιδίου *omb*, καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου *E(spl)m8*, η οποία ενεργοποιείται από το σηματοδοτικό μηχανισμό μέσω του υποδοχέα Notch. Πραγματοποιήθηκε αντίδραση ανίχνευσης δραστηριότητας της β-γαλακτοσιδάσης (X-gal stainings) σε δίσκους φτερού, σε προνύμφες τρίτου σταδίου, με γενότυπο *omb-GAL4;UAS-neur; E(spl)m8-lacZ* (B) και *omb-GAL4/UAS-Neur1; E(spl)m8-lacZ* (Γ). Διαπιστώνεται ότι η έκφραση του γονιδίου *E(spl)m8-lacZ* διακόπτεται στο όριο του φτερού, στα σύνορα της περιοχής *omb* (διακεκομμένες γραμμές). Επίσης παρατηρείται καταστολή της έκφρασης του γονιδίου σε περιοχές εκτός του ορίου του φτερού, οι οποίες βρίσκονται μέσα στην περιοχή *omb* (A, κεφαλές βέλους). Στην περίπτωση του *Neuralized* (Γ) η καταστολή στο όριο του φτερού είναι μικρότερης έντασης. Το *E(spl)m8-lacZ* εκφράζεται ως ένα βαθμό και μέσα στην περιοχή έκφρασης του θηλαστικού διαγονιδίου (βέλη). Οι διασταυρώσεις σε αυτήν την περίπτωση πραγματοποιήθηκαν στους 29°C. A : χρώση δραστηριότητας β-γαλακτοσιδάσης σε προνυμφικούς δίσκους φτερού αγρίου τύπου που φέρουν το διαγονίδιο *lacZ* υπό τον έλεγχο των ρυθμιστικών στοιχείων του γονιδίου *E(spl)m8*.

B. Η παρουσία της πρωτεΐνης *Neur* ενισχύει τη σηματοδοτική ικανότητα του δεσμευτή *Delta* προς τον υποδοχέα *Notch*

Η υποδηλούμενη εμπλοκή του γονιδίου *neur* και του θηλαστικού ομολόγου του στο σηματοδοτικό μονοπάτι *Notch* σε συνδυασμό με τον παρόμοιο υποκυτταρικό εντοπισμό τους αποτελούσαν σημαντικές ενδείξεις της λειτουργικής τους συγγένειας. Τα παρατηρούμενα αποτελέσματα καθώς και η «τοποθέτηση», από γενετικά δεδομένα, της δράσης του *neur* πριν από τη σηματοδότηση του υποδοχέα *Notch* και την έναρξη του μονοπατιού (de la Concha et al., 1988), οδήγησαν στην πραγματοποίηση σειράς πειραμάτων κατευθυνόμενης συνέκφρασης καθενός από τα μελετούμενα γονίδια με το δεσμευτή *Delta* και επακόλουθης ανίχνευσης της έκφρασης γονιδίων-στόχων του μονοπατιού *Notch*. Με αυτόν τον τρόπο διερευνήθηκε η επίδραση της παρουσίας των μελετούμενων πολυπεπτιδίων στη σηματοδοτική ικανότητα του δεσμευτή προς τον υποδοχέα.

Οι μελέτες πραγματοποιήθηκαν στο δίσκο του φτερού όπου η απόκριση του *Notch* στο *Delta* είναι διαμερισματοποιημένη κατά μήκος του ραχιαίο-κοιλιακού άξονα. Συγκεκριμένα, η σηματοδοτική ικανότητα του *DI* προς τον υποδοχέα είναι ισχυρή στο ραχιαίο διαμέρισμα, ενώ αντίθετα στο κοιλιακό διαμέρισμα η σηματοδότηση του *Notch* είναι μηδαμινή. Η αιτία είναι η προτίμηση του *Delta* για γλυκοσυλιωμένο υποδοχέα *Notch*, διαδικασία που πραγματοποιείται μόνο στα κύτταρα του ραχιαίου διαμερίσματος από τη δράση της πρωτεΐνης *Fringe* (βλ. εισαγωγή). Αντίθετα, στα κοιλιακά κύτταρα ο υποδοχέας δεν γλυκοσυλιώνεται με αποτέλεσμα η σηματοδότησή του να πραγματοποιείται από τον ανταγωνιστικά, στη συγκεκριμένη περίπτωση, ισχυρότερο δεσμευτή *Serrate* που εντοπίζεται στα γειτονικά ραχιαία κύτταρα (Blair, 2000, Bruckner et al., 2000, Moloney et al., 2000, Munro and Freeman, 2000). Κατασκευάστηκαν στελέχη που έφεραν στο γονιδιώμα τους τόσο το διαγονίδιο *UAS-Delta* όσο και καθένα από τα διαγονίδια *UAS-neur* (*yw; UAS-Delta UAS-neur*) και *UAS-Neur1* (*UAS-Neur1/FM7; UAS-Delta*). Η συνέκφραση κατευθύνθηκε στην περιοχή *omb*. Η σηματοδότηση του μονοπατιού παρατηρήθηκε με ανίχνευση της έκφρασης του γονιδίου-στόχου *wingless*, με τη χρήση του αντίστοιχου στελέχους-παγίδας ενισχυτή (*yw; wg-lacZ*) ή αντισώματος αντι-*Wg*. Η διερεύνηση της ενδεχόμενης μεταβολής της σηματοδοτικής ικανότητας του *Delta* πραγματοποιήθηκε συγκριτικά με την αντίστοιχη ικανότητά του όταν συνεκφραζόταν με το “ουδέτερο” διαγονίδιο *UAS-GFP*, προκειμένου να διατηρηθεί σταθερός ο αριθμός των στόχων *UAS*. Διαπιστώθηκε ότι όταν ο δεσμευτής εκφραζόταν μαζί με την *GFP* το αποτέλεσμα ήταν το αναμενόμενο, δηλαδή όπως στην περίπτωση που αυτός εκφραζόταν μόνος του. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε εκτοπική έκφραση του *wg* μόνο στο ραχιαίο διαμέρισμα του φτερού (Εικ. 49-Γ2 και 50-A). Αντίθετα, στην περίπτωση της συνέκφρα-

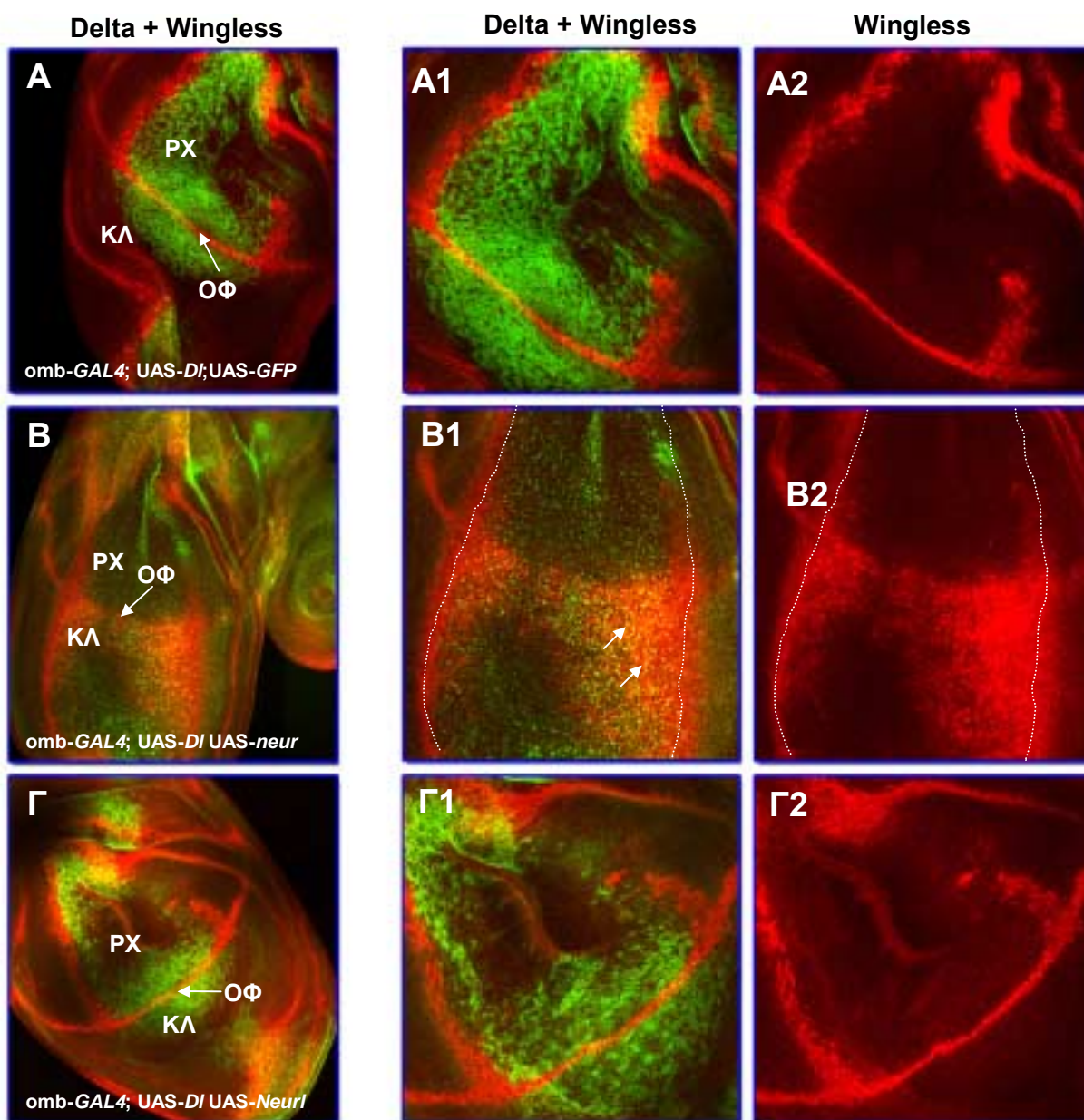


Εικόνα 49. Η παρουσία της πρωτεΐνης Neuralized ενισχύει τη σηματοδοτική ικανότητα του δεσμευτή Delta προς τον υποδοχέα Notch. Η πρωτεΐνη Delta εκφράστηκε μόνη της (A2, B2 και G2) ή μαζί με την πρωτεΐνη Neur (A3, B3 και G3) σε προνυμφικούς δίσκους φτερού, στην περιοχή omb. Η σηματοδότηση του υποδοχέα Notch ανιχνεύτηκε με μελέτη της έκφρασης γονιδίων-στόχων, όπως *E(spl)m8* (A1-A3), *vgB* (B1-B3) και *wingless* (G1-G3). Η ανίχνευση της έκφρασής τους πραγματοποιήθηκε έμμεσα, με κατάλληλες διασταυρώσεις με τα αντίστοιχα στελέχη παγίδες-ενισχυτών. Ακολούθησαν χρώσεις ανίχνευσης δραστηριότητας της β-γαλακτοσιδάσης. Παρατηρείται ότι όταν ο δεσμευτής Delta εκφράζεται μόνος του προκαλεί εκτοπική σηματοδότηση μόνο στο ραχιαίο (PX) διαμέρισμα του προνυμφικού δίσκου (βέλη). Αντίθετα, η παρουσία της πρωτεΐνης Neur ενισχύει σημαντικά τη σηματοδοτική του ικανότητα, αφού ανιχνεύεται ισχυρότατη εκτοπική έκφραση και των τριών γονιδίων-στόχων και στο κοιλιακό (ΚΛ) διαμέρισμα (κεφαλή βέλους). A1, B1 και G1 : ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων-στόχων σε προνυμφικούς δίσκους φτερού των αντίστοιχων στελεχών παγίδων ενισχυτών (προνυμφικοί δίσκοι αγρίου τύπου). Πρόσθετες συντομογραφίες : ΟΦ : Όριο φτερού.

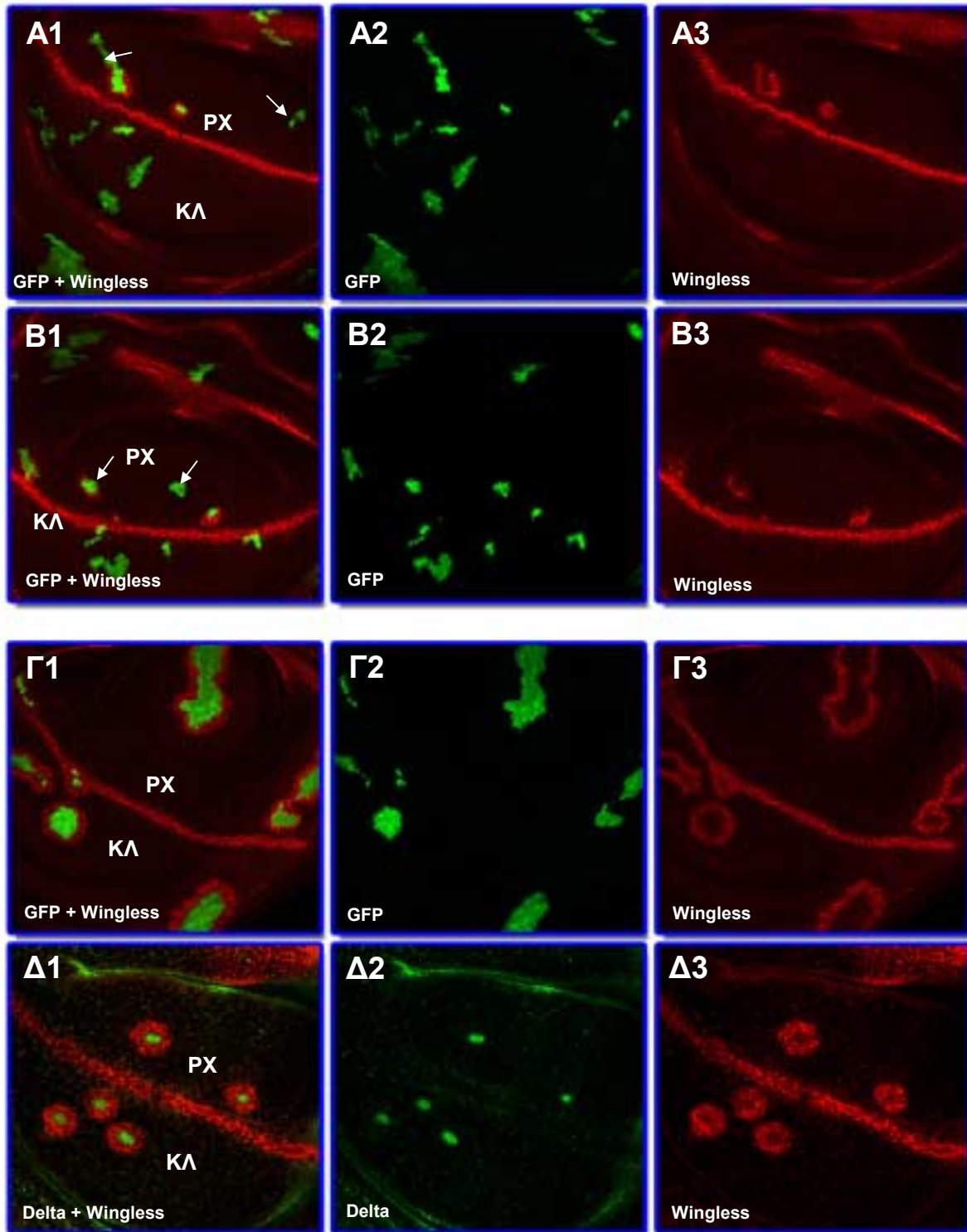
σης του *DI* με το *Neur* ο τοπικός περιορισμός της σηματοδοτικής ικανότητας του δεσμευτή εξαφανιζόταν αφού ανιχνεύονταν υψηλά επίπεδα έκφρασης του *wg* και στο κοιλιακό διαμέρισμα (Εικ.49-Γ3 και 50-B). Σε αντιδιαστολή με το πολυτεππίδιο *Neur* της *Drosophila*, το θηλαστικό ομόλογο *Neur1* δεν επηρέαζε τη σηματοδοτική ικανότητα του δεσμευτή, σε οποιαδήποτε θερμοκρασία και αν πραγματοποιήθηκαν οι διασταυρώσεις συνέκφρασης (Εικ. 50Γ). Η ενίσχυση της σηματοδοτικής ικανότητας του *Delta* από την παρουσία της πρωτεΐνης *Neur* επιβεβαιώθηκε και από αντίστοιχα πειράματα ανίχνευσης της έκφρασης και άλλων γονιδίων-στόχων του μονοπατιού *Notch*, όπως *vestigial* [*vgBE-lacZ* (ενισχυτής ειδικός για την έκφραση του γονιδίου *vestigial* στο ραχιαίο-κοιλιακό σύνορο-όριο φτερού)] και *E(spl)m8* [*E(spl)m8-lacZ*] (Εικ. 49A,B).

Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν και στην περίπτωση κατασκευής μιτωτικών κλώνων υπερέκφρασης με την τεχνική *FLP-out* (υλικά και μέθοδοι, ενότητα 19) και επακόλουθης ανίχνευσης της έκφρασης του γονιδίου *wingless* (Εικ. 51A,B). Πιο αναλυτικά, ο συνδυασμός *DI +GFP* είχε σαν αποτέλεσμα την μη αυτόνομη επαγωγή έκφρασης του *wg* στα κύτταρα που γειννιάζαν με τα όρια των κλώνων, μόνο όταν αυτοί βρίσκονταν στο ραχιαίο διαμέρισμα του δίσκου του φτερού. Επιπρόσθετα, η σηματοδότηση εξασθενούσε βαθμιαία όσο αυξανόταν η απόσταση των κλώνων από το ραχιαίοκοιλιακό σύνορο (Εικ. 51A,B). Αντίθετα, η συνέκφραση *Delta* και *neuralized* οδηγούσε σε μη αυτόνομη επαγωγή του *wingless* και στα δύο διαμερίσματα του δίσκου, ανεξάρτητα από την απόσταση από το ραχιαίο-κοιλιακό σύνορο υποδεικνύοντας σημαντικότερη αύξηση της σηματοδοτικής ικανότητας του δεσμευτή, ξεπερνώντας οποιοδήποτε τοπικό περιορισμό (Εικ. 51Γ,Δ). Η μόνη διαφορά που παρατηρήθηκε με τα πειράματα κατευθυνόμενης υπερέκφρασης με το στέλεχος-οδηγό *omb-GAL4* ήταν η επαγωγή έκφρασης *wg* και σε κύτταρα που βρίσκονταν στο εσωτερικό της περιοχής *omb*, όπου συνεκφράζονταν οι πρωτεΐνες *DI* και *Neur* (Εικ. 50B), κάτι που δεν παρατηρήθηκε στους κλώνους *FLP-out*. Αυτό θα μπορούσε να δικαιολογηθεί ως αποτέλεσμα σημαντικής μείωσης των επιπέδων του *Delta* σ' αυτά τα κύτταρα (που έχει δείχθει ότι συμβαίνει, Χρυσούλα Πισούλη) μιας και είναι γνωστό ότι τα ενδογενή επίπεδα έκφρασης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης σ' ένα κύτταρο επηρεάζουν την ικανότητά του να σηματοδοτηθεί από τον ίδιο δεσμευτή ενός γειτονικού κυττάρου (Doherty et al., 1996, Jacobsen et al. 1998). Πιο αναλυτικά, σε δύο γειτονικά κύτταρα που εκφράζουν το δεσμευτή *DI* και τον υποδοχέα *Notch* λαμβάνουν χώρα δύο ειδών αλληλεπιδράσεις : α) *in trans*, μεταξύ δεσμευτή και υποδοχέα, οι οποίοι βρίσκονται σε διαφορετικά κύτταρα και β) *in cis*, μεταξύ μορίων του ίδιου κυττάρου. Είναι προφανές ότι υπάρχει ανταγωνισμός ανάμεσα σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις. Συνεπώς, αν τα δύο κύτταρα (πομπός και δέκτης) είναι ισοδύναμα τότε δεν είναι δυνατή η σηματοδότηση *in trans* του υποδοχέα του κυττάρου-δέκτη και η έναρξη του μονοπατιού *Notch*. Αντίθετα, στην περίπτωση που η έκφραση του *Delta* ελαττώνεται στο κύτταρο δέκτη τότε το μονοπάτι ενεργοποιείται. Έτσι

θα μπορούσε να εξηγηθεί η ανίχνευση σηματοδότησης στο εσωτερικό της περιοχής omb μιας και υπάρχει βαθμιαία εξασθένηση της έκφρασης της πρωτεΐνης Delta όσο πλησιάζει τα όρια της συγκεκριμένης περιοχής.



Εικόνα 50. Η πρωτεΐνη Neur ενισχύει τη σηματοδοτική ικανότητα του δεσμευτή Delta προς τον υποδοχέα Notch. Οπτικές τομές συνεστιακού μικροσκοπίου. Προνυμφικοί δίσκοι φτερού στους οποίους υπερεκφράζεται, στην περιοχή omb, ο δεσμευτής Delta (πράσινο) παρουσία GFP (A, A1-A2) είτε μαζί με την πρωτεΐνη Neur (B, B1-B2) ή το θηλαστικό ομόλογο μόριο (Γ, Γ1-Γ2). Πραγματοποιήθηκε ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης Wingless (κόκκινο). Διαπιστώνεται ότι η σηματοδοτική ικανότητα του Delta δεν μεταβάλλεται παρουσία GFP (A) ενώ ενισχύεται μόνο παρουσία της πρωτεΐνης Neur (B). Παρατηρείται ότι η επαγωγική έκφραση *wg* στο κοιλιακό διαμέρισμα (ΚΛ) του δίσκου δεν περιορίζεται μόνο στα όρια της περιοχής omb (διακεκομμένες γραμμές), όπως παρατηρείται στο ραχιαίο τμήμα (PX) αλλά επεκτείνεται και σε κύτταρα που βρίσκονται στο εσωτερικό της περιοχής, υποδηλώνοντας κυτταρική αυτονομία της ενεργοποίησης του *wingless* (B2). Η συνέκφραση του θηλαστικού ομόλογου δεν επηρεάζει την επαγωγική ικανότητα του δεσμευτή (Γ). Να σημειωθεί ότι παρουσία του δροσοφιλικού μορίου αλλάζει και ο αναμενόμενος μεμβρανικός υποκυτταρικός εντοπισμός του DI (A και Γ), ο οποίος εντοπίζεται σε κυστιδιακές δομές (B1, βέλη) και ενδεχομένως σχετίζεται με την παρατηρούμενη ενίσχυση της σηματοδοτικής του ενεργότητας. A1-A2, B1-B2 και Γ1-Γ2 : μεγεθύνσεις των εικόνων A, B και Γ, αντίστοιχα. Πρόσθετες συντομογραφίες : ΟΦ : όριο φτερού.



Εικόνα 51. Η πρωτεΐνη *Neur* ενισχύει τη σηματοδοτική ικανότητα του δεσμευτή *Delta* προς τον υποδοχέα *Notch*. Οπτικές τομές, συνεστιακού μικροσκοπίου, μιτωτικών κλώνων υπερέκφρασης σε προνυμφικούς δίσκους φτερού. Η επαγωγή της σηματοδότησης *Notch* ανιχνεύτηκε ως επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης *Wingless* (ανοσοανίχνευση, κόκκινο). **A, B** : μιτωτικοί κλώνοι με γενότυπο $act^{>>GAL4;UAS-Dl;UAS-GFP}$ (πράσινο). Παρατηρείται μη αυτόνομη επαγωγή έκφρασης *wg*, μόνο στο ραχιαίο διαμέρισμα (*PX*), στα κύτταρα που γειτονεύουν με τα όρια των κλώνων. Επιπρόσθετα, η σηματοδότηση εξασθενεί βαθμιαία όσο αυξάνεται η απόσταση από το ραχιαίο-κοιλιακό σύνορο του φτερού (βέλη). **Γ** : μιτωτικοί κλώνοι με γενότυπο $act^{>>GAL4;UAS-Dl UAS-neur;UAS-GFP}$ (πράσινο). **Δ** : μιτωτικοί κλώνοι με γενότυπο $act^{>>GAL4;UAS-Dl UAS-neur}$. Ο εντοπισμός τους πραγματοποιήθηκε με ανοσοανίχνευση της πρωτεΐνης *Delta* (κυστιδιακές πράσινες δομές). Διαπιστώνεται μη αυτόνομη επαγωγή του *wingless* και στα δύο διαμερίσματα του δίσκου, ανεξάρτητα από την απόσταση των κλώνων από το ραχιαίο-κοιλιακό σύνορο, υποδεικνύοντας σημαντικότητα αύξηση της σηματοδοτικής ικανότητας του δεσμευτή, ξεπερνώντας οποιοδήποτε τοπικό περιορισμό. Πρόσθετες συντομογραφίες : ΚΛ : κοιλιακό διαμέρισμα του δίσκου του φτερού.

Γ. Η πρωτεΐνη Neur επάγει την ενδοκύττωση του δεσμευτή Delta

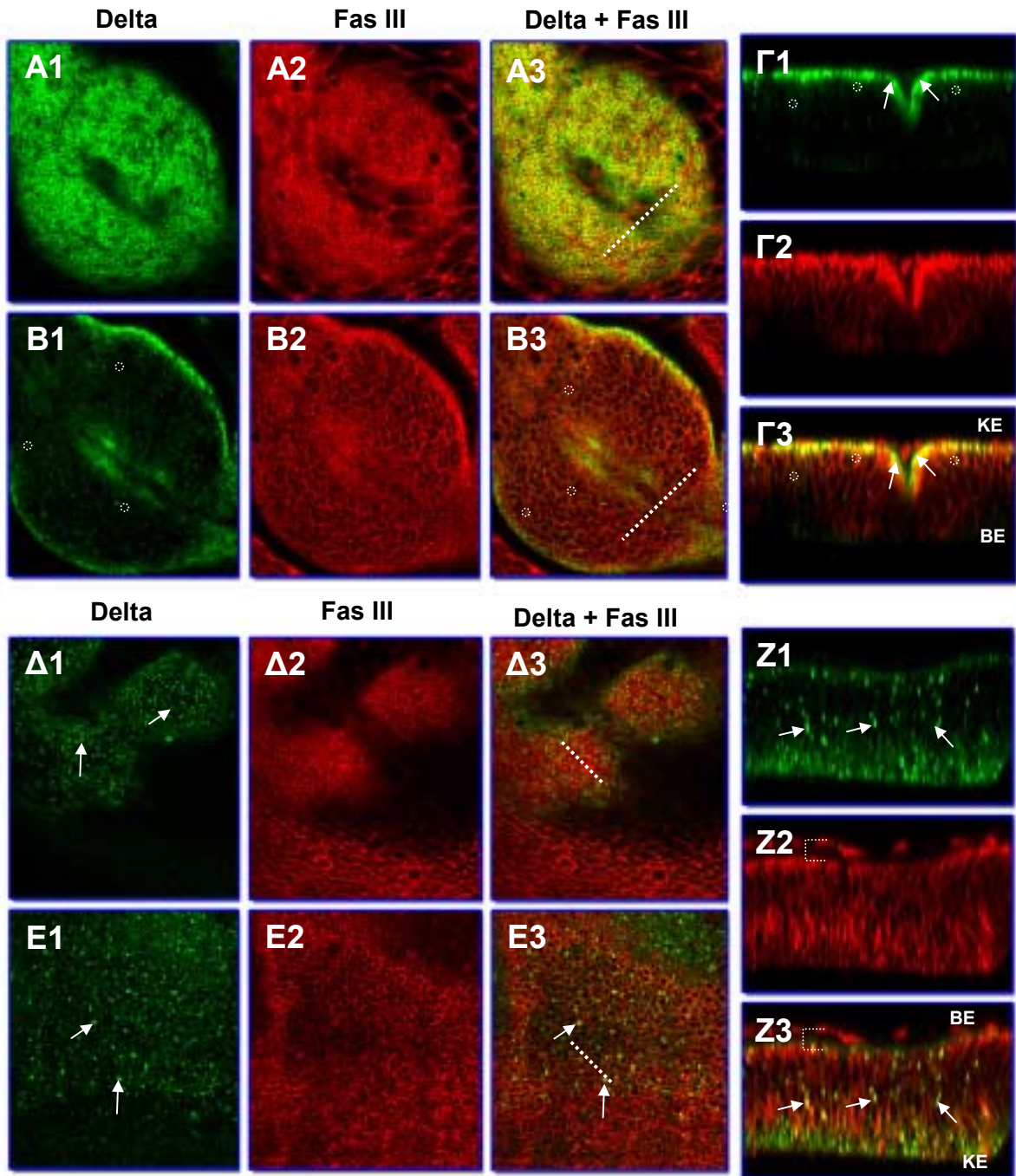
Στα προηγούμενα πειράματα παρατηρήθηκε ότι η παρουσία της πρωτεΐνης Neur όχι μόνο ενίσχυε τη σηματοδοτική ικανότητα του δεσμευτή Delta προς τον υποδοχέα Notch αλλά ταυτόχρονα επηρέαζε και τον υποκυτταρικό του εντοπισμό. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση που η πρωτεΐνη DI εκφραζόταν μόνη της (ή παρουσία της GFP) ανιχνευόταν στην κορυφαία επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων του δίσκου του φτερού (Εικ. 50A1). Η συνέκφρασή της με την πρωτεΐνη Neur είχε σαν αποτέλεσμα ελάχιστη ανοσοανίχνευση στη πλασματική μεμβράνη και υψηλά επίπεδα εντοπισμένα σε πολλαπλά κυστίδια κατά μήκος του κορυφαιο-βασικού άξονα των κυττάρων (Εικ. 50B1, 52Δ-Z), τα οποία διαπιστώθηκε στη συνέχεια ότι ανήκουν σε ενδοκυττωτικό μονοπάτι (Χ. Πισούλη, προσωπική επικοινωνία). Η ενδοκύττωση του Delta από το Neur ήταν ειδική αφού δεν παρατηρήθηκε αλλαγή του εντοπισμού άλλων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, όπως η φασικλίνη III, η οποία εξακολουθούσε να εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη όταν υπερεκφραζόταν *neuralized* (Εικ. 52Δ-Z). Το γεγονός της αλλαγής του προτύπου του κυτταρικού εντοπισμού του Delta αποτελούσε μεταμεταφραστική τροποποίηση αφού το διαγονίδιο που το κωδικοποιούσε (UAS-Delta) ήταν υπό τον έλεγχο ετερόλογων και όχι ενδογενών ρυθμιστικών στοιχείων (θέσεις πρόσδεσης του GAL4).

Καθώς η πρωτεΐνη Neur φαινόταν να επάγει την ενδοκύττωση του δεσμευτή Delta το ερώτημα που ετίθετο ήταν αν αυτό το γεγονός συνοδεύεται και από αλλαγή των επιπέδων του τελευταίου. Πράγματι, από πειράματα ανοσοεντοπισμού σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προνυμφικών δίσκων φτερού που συνέκφραζαν στην περιοχή *omb* τα πολυπεπίδια Delta και Neur, διαπιστώθηκε σημαντική ελάττωση των επιπέδων του μορίου DI (Χ. Πισούλη). Αναλυτικότερα, σε προνυμφικούς δίσκους τρίτου σταδίου η πρωτεΐνη DI ανιχνεύεται σε δύο ισομορφές, το μόριο πλήρους μήκους και ένα μικρότερο πολυπεπίδιο που αντιστοιχεί στην εξωκυττάρια περιοχή του δεσμευτή. Η επίδραση του μορίου Neur μελετήθηκε σε δίσκους φτερού οι οποίοι συνέκφραζαν το διαγονίδιο UAS-DI με το διαγονίδιο UAS-GFP ή UAS-*neur*. Παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα και των δύο ισομορφών του δεσμευτή ελαττώθηκαν σημαντικά όταν συνεκφράζονταν DI+Neur, σε αντίθεση με την συνέκφραση DI+GFP όπου δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή. Κατά συνέπεια, η παρουσία της πρωτεΐνης *Neuralized* επάγει την ενδοκύττωση του δεσμευτή και την επακόλουθη αποικοδόμησή του.

Σε αντίθεση με την πρωτεΐνη Neur της *Drosophila*, η πρωτεΐνη Neur1 του ποντικού δεν επηρέαζε τον εντοπισμό του δεσμευτή (Εικ. 50Γ), όπως άλλωστε και την επαγωγική

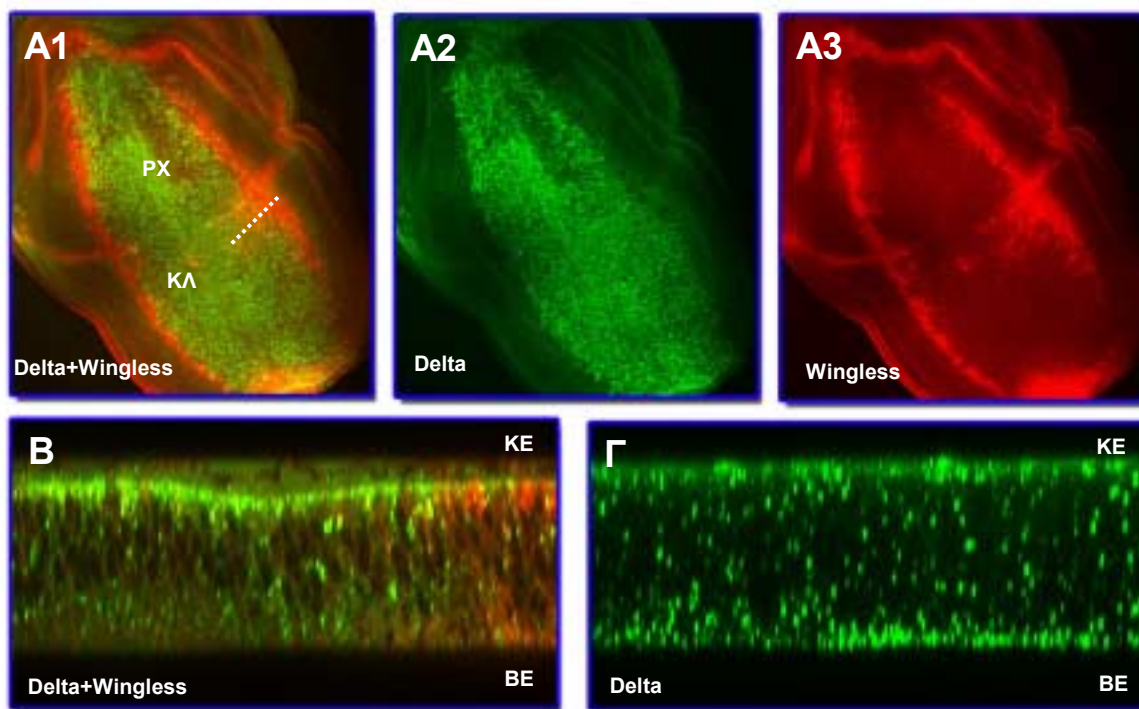
του ικανότητα. Εντούτοις, όταν συνεκφράστηκε μαζί με το δροσοφιλικό ορθόλογο πολυπεπτιδίο και την πρωτεΐνη Delta παρατηρήθηκε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό του δεσμευτή ήταν εντοπισμένο σε κυστίδια, στην κορυφαία επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης (Εικ. 53A,B, σύγκριση με Εικ.52A). Η επαγωγική ικανότητα του D1 δε φαινόταν να αλλοιώνεται όπως συνέβη στην περίπτωση συνέκφρασής του μόνο με το μόριο Neur της *Drosophila* (Εικ.53Γ). Ενδεχομένως, η θηλαστική πρωτεΐνη να ανταγωνίζεται το δροσοφιλικό ορθόλογο σε πρώιμο στάδιο της ενδοκύττωσης. Η διαφορετική συμπεριφορά των δύο μορίων Neur1 και Neur πιθανόν να οφείλεται σε εξελικτική απόκλιση της λειτουργίας τους, ενώ δεν μπορεί να αποκλειστεί και το ενδεχόμενο να έχουν το ίδιο λειτουργικό ρόλο, συμμετέχοντας πιθανόν σε μηχανισμούς ενδοκύττωσης, αλλά να “στοχεύουν” διαφορετικά υποστρώματα ή να αποτελούν μέλη υπερμοριακών συμπλόκων, των οποίων η σύσταση είναι δυνατόν να διαφέρει στους διάφορους οργανισμούς. Πρέπει να ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι η πρωτεΐνη του ποντικού αναλύεται σε ένα ετερόλογο σύστημα, το οποίο ενδεχομένως δεν παρέχει όλες τις προϋποθέσεις (π.χ. άλλους πρωτεϊνικούς παράγοντες) για πλήρη λειτουργική δράση του μορίου. Όσον αφορά τη λειτουργία του δροσοφιλικού πολυπεπτιδίου, τα δεδομένα συγκλίνουν στην υπόθεση ότι η παρουσία του σηματοδοτεί την κυστιδίωση και αποικοδόμηση του Delta, ενισχύοντας συγχρόνως την επαγωγική του ικανότητα προς τον υποδοχέα Notch.

Επίσης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοανίχνευσης της ενδογενούς πρωτεΐνης Notch και συγκεκριμένα της εξωκυττάριας περιοχής της, σε δίσκους φτερού στους οποίους συνεκφράζονταν Delta και Neur στην περιοχή omb. Παρατηρήθηκε ότι η παρουσία της πρωτεΐνης Neur επάγει ενδοκύττωση του υποδοχέα, ο οποίος μάλλον παρασύρεται από το δεσμευτή του (Εικ.54), βασιζόμενοι στα ήδη υπάρχοντα δημοσιευμένα δεδομένα (Parks et al., 2000). Πιο αναλυτικά, η εξωκυττάρια περιοχή του ενδογενούς Notch ανοσοανιχνευόταν ως επί το πλείστον σε ενδοκυττωτικά κυστίδια που ήταν θετικά και για το δεσμευτή του (Εικ. 54Γ,Δ), σε αντίθεση με το μεμβρανικό κυρίως πρότυπο τόσο έξω από την περιοχή υπερέκφρασης (Εικ. 54Γ3,Δ3) όσο και σε δίσκους που υπερεκφραζόταν μόνο της η πρωτεΐνη Delta (Εικ. 54A,B). Στην τελευταία περίπτωση τα υψηλότερα επίπεδα του υποδοχέα ανιχνεύονταν στη κορυφαία επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων ενώ εντοπιζόταν και σε κυστίδια στα οποία απουσίαζε ο δεσμευτής (Εικ. 54B1). Διαπιστώθηκε ακόμα ότι τα ελάχιστα ενδοκυττωτικά κυστίδια που υπήρχε ο δεσμευτής ήταν θετικά και στην ανοσοανίχνευση της εξωκυττάριας περιοχής του Notch (Εικ. 54B1). Η έμμεσα επαγόμενη ενδοκύττωση του υποδοχέα από την παρουσία του Neur, λόγω ενδοκύττωσης του δεσμευτή του, αποδείχτηκε με πειράματα υπερέκφρασης της πρωτεΐνης Neur στην περιοχή omb και ανοσοεντοπισμού της εξωκυττάριας περιοχής του πρώτου. Ο εντοπισμός του Notch σε αυτή την περίπτωση παρέμενε ο ίδιος τόσο μέσα όσο και έξω από την περιοχή υπερέκφρασης. Επίσης, από πειράματα της Χ. Πιτσούλη διαπιστώθηκε ότι η επίδραση



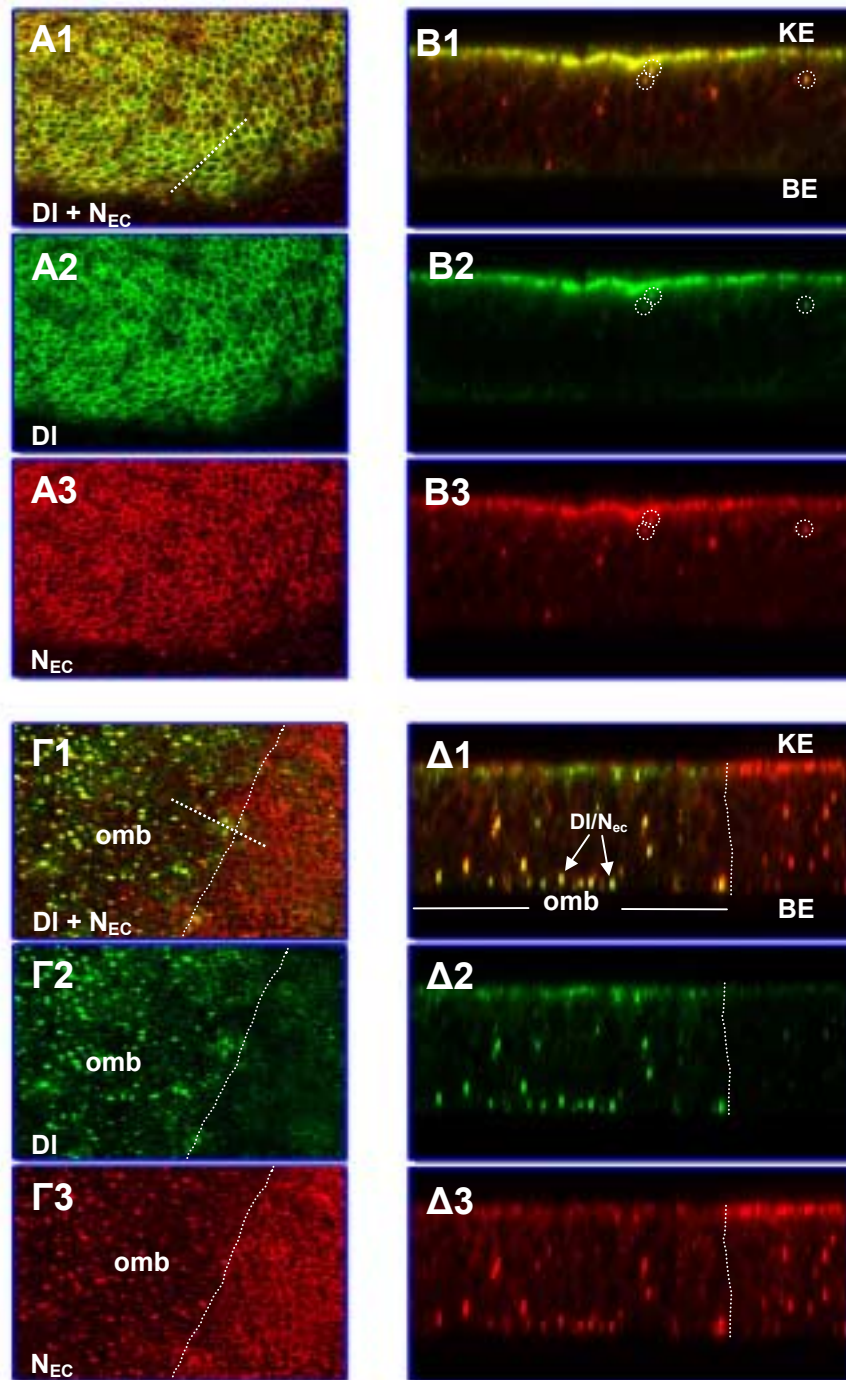
Εικόνα 52. Η πρωτεΐνη Neur επηρεάζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό του δεσμευτή Delta. Οπτικές τομές από προνυμφικούς δίσκους φτερού στους οποίους ο δεσμευτής Delta εκφράζεται στην περιοχή *omb*, μόνος του (Α-Γ) ή παρουσία του μορίου Neur (Δ-Ζ). Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοεντοπισμού του Delta (πράσινο) και της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης φασικλίνη III (Fas III, κόκκινο). Α-Γ : (Α) : οπτική τομή σε δίσκο φτερού προνύμφης με γονότυπο *omb-GAL4/+;UAS-Dl*. Η τομή πραγματοποιήθηκε στο επίπεδο της κορυφαίας επιφάνειας (ΚΕ) της επιθηλιακής στοιβάδας. Παρατηρείται ότι ο δεσμευτής Delta συνεντοπίζεται με την Fas III στην πλασματική μεμβράνη. (Β) : οπτική τομή σε επίπεδο πλησίον της βασικής επιφάνειας (ΒΕ) των επιθηλιακών κυττάρων. Ο ανοσοεντοπισμός του Delta περιορίζεται σε έναν μικρό αριθμό κυστιδίων (κύκλοι). (Γ) : Εγκάρσια οπτική τομή. Ο προσανατολισμός υποδεικνύεται από τη διακεκομμένη γραμμή που φαίνεται στα Α3 και Β3. Διαπιστώνεται ότι η πρωτεΐνη Delta ανοσοανιχνεύεται στην κορυφαία επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης (βέλη) με μικρή συγκέντρωση σε ενδοκυτταρικά κυστιδία (κύκλοι). Δ-Ζ : οπτικές τομές σε προνυμφικό δίσκο φτερού, με γονότυπο *omb-GAL4/+;UAS-Dl UAS-neur*, και σε επίπεδο πλησίον της κορυφαίας (Δ) ή της βασικής επιφάνειας (Ε) της πλασματικής μεμβράνης του επιθηλίου. (Ζ) : Εγκάρσια οπτική τομή (διακεκομμένη γραμμή στα Δ3 και Ε3). Παρατηρείται ανοσοεντοπισμός, σχεδόν εξ' ολοκλήρου, σε ενδοκυτταρικά κυστιδία σε όλο το μήκος του άξονα μεταξύ της κορυφαίας και βασικής επιφάνειας της πλασματικής μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων (βέλη). Η κυστιδίωση του Delta είναι ειδική αφού δεν παρατηρείται μεταβολή στην τοπολογία της πρωτεΐνης Fas III. Η αγκύλη στα Ζ2 και Ζ3 δείχνει την περιποδική μεμβράνη του δίσκου του φτερού.

Σημείωση : τα μεγάλα κύτταρα στο Α2 είναι αυτά της περιποδικής μεμβράνης, μίας δεύτερης στοιβάδας κυττάρων που καλύπτει το καθ' αυτό επιθήλιο του φτερού από την κορυφαία του πλευρά (στην περιποδική μεμβράνη δεν εκφράζεται *omb-GAL4*).



Εικόνα 53. Η πρωτεΐνη Neuralized του ποντικού ανταγωνίζεται στις ενδοκυττωτικές διαδικασίες το ορθόλογο μόριο Neur της *Drosophila*. **A-B** : Οπτικές τομές από προνυμφικούς δίσκους φτερού στους οποίους συνεκφράζονται, στην περιοχή omb, οι πρωτεΐνες Delta (πράσινο), Neur και Neural. **A**: οπτική τομή πλησίον της κορυφαίας επιφάνειας (KE) της πλασματικής μεμβράνης του επιθηλίου του δίσκου του φτερού. **B** : εγκάρσια τομή (διακεκομμένη γραμμή στο A1). **Γ**: αντίστοιχη εγκάρσια τομή προνυμφικού δίσκου στον οποίο συνεκφράζονται ο δεσμευτής Delta (πράσινο) και το μόριο Neur της *Drosophila*. Διαπιστώνεται ότι η παρουσία του θηλαστικού μορίου Neural έχει σαν αποτέλεσμα να ανοσοανιχνεύεται υψηλό ποσοστό του Delta στην κορυφαία επιφάνεια (KE) των επιθηλιακών κυττάρων (B). Ο εντοπισμός του δεσμευτή δεν είναι μεμβρανικός (A σύγκριση με Εικ.52A1). Συνεπώς, δημιουργούνται κυστίδια τα οποία φαίνεται ότι δεν αποχωρίζονται από την πλασματική μεμβράνη, πιθανόν λόγω ανταγωνισμού του μορίου Neural στη δράση του δροσοφιλικού ομολόγου του (σύγκριση B και Γ). κόκκινη χρώση : πρωτεΐνη Wingless. Πρόσθετες συντομογραφίες : ΚΛ + ΡΧ : κοιλιακό και ραχιαίο διαμέρισμα του ελάσματος του φτερού, αντίστοιχα. BE : Βασική επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων.

του Neur στο Notch ήταν μετα-μεταφραστική και εξαρτώμενη από τη συνέκφραση του Delta. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούμε να υποθέσουμε ότι η πρωτεΐνη Neur σηματοδοτεί την ενδοκύττωση του δεσμευτή Delta, ο οποίος με τη σειρά του συμπαρασύρει σε ενδοκύττωση την εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα Notch, με επακόλουθη έναρξη των πρωτεολυτικών γεγονότων και ενεργοποίηση του αντίστοιχου μονοπατιού στο κύτταρο-δέκτη. Αυτή η υπόθεση ερμηνεύει και την ενίσχυση της επαγωγικής ιδιότητας του δεσμευτή από το πολυπεπίδιο Neur.



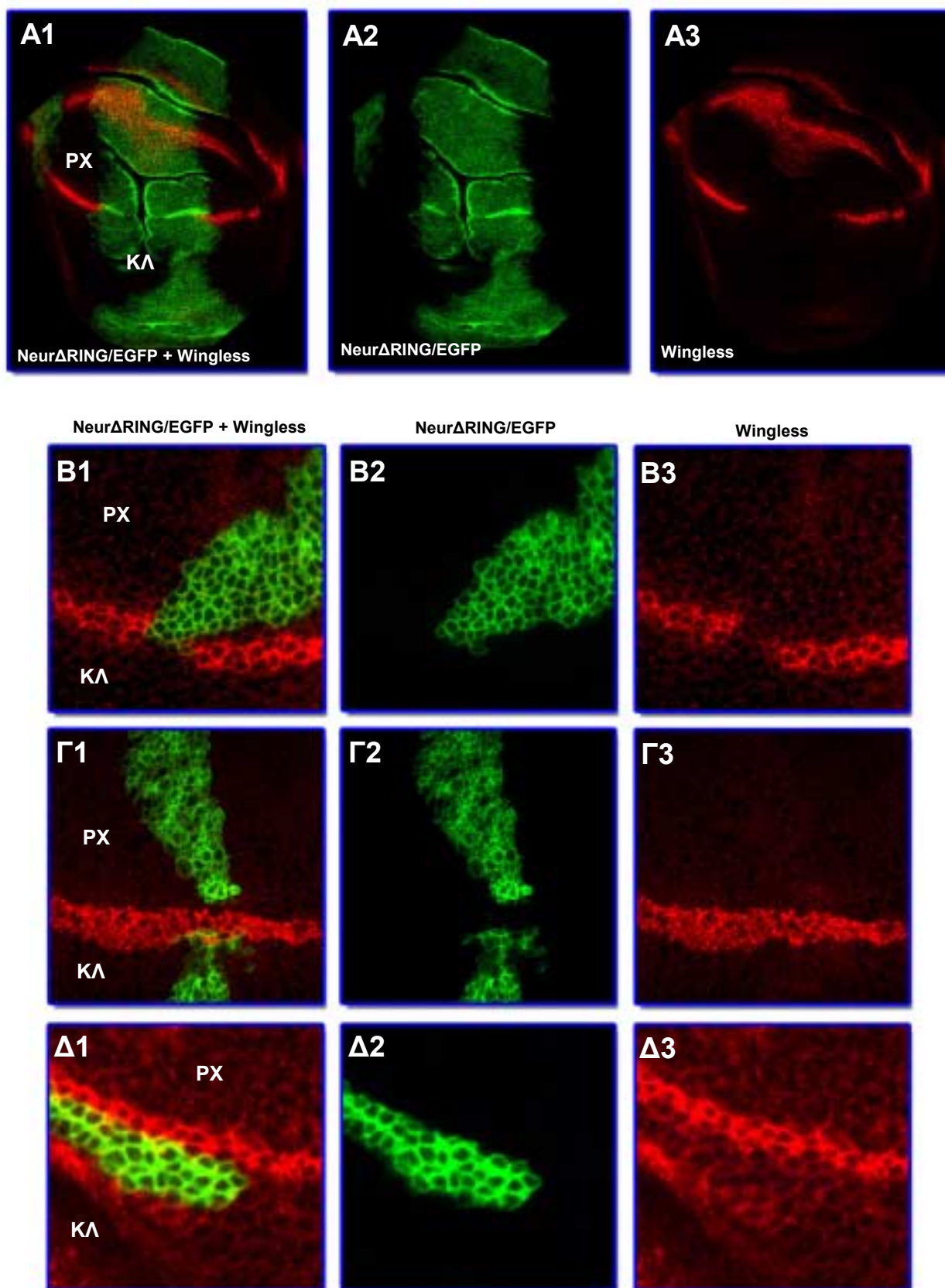
Εικόνα 54. Η συνέκφραση των πρωτεϊνών Delta και Neur επηρεάζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό του υποδοχέα Notch. Οπτικές τομές από προνυμφικούς δίσκους φτερού στους οποίους ο δεσμευτής Delta εκφράζεται στην περιοχή omb, μόνος του (A-B) ή παρουσία του μορίου Neur (Γ-Δ). Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοεντοπισμού του Delta (πράσινο) και της εξωκυτταρικής περιοχής του ενδογενούς υποδοχέα Notch (N_{EC} , κόκκινο). **A-B** : (A) : οπτική τομή σε δίσκο φτερού προνύμφης με γενότυπο *omb-GAL4/+;UAS-Dl*. Η τομή πραγματοποιήθηκε στο επίπεδο της κορυφαίας επιφάνειας (KE) της επιθηλιακής στοιβάδας. (B) : Εγκάρσια οπτική τομή. Ο προσανατολισμός υποδεικνύεται από τη διακεκομμένη γραμμή που φαίνεται στο A1. Παρατηρείται ότι τα υψηλότερα επίπεδα του υποδοχέα Notch ανιχνεύονται στη κορυφαία επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων ενώ εντοπίζεται και σε κυστίδια, στα οποία δεν ανιχνεύεται δεσμευτής. Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε ότι τα ελάχιστα ενδοκυττωτικά κυστίδια που ανιχνεύεται ο δεσμευτής είναι θετικά και στην ανοσοανίχνευση της εξωκυτταρικής περιοχής του Notch (κύκλοι). **Γ-Δ** : (Γ) : οπτική τομή σε προνυμφικό δίσκο φτερού, με γενότυπο *omb-GAL4/+;UAS-Dl UAS-neur* και σε επίπεδο πλησίον της κορυφαίας επιφάνειας της πλασματικής μεμβράνης του επιθηλίου. (Δ) : Εγκάρσια οπτική τομή (διακεκομμένη γραμμή στο Γ1). Διαπιστώνεται ότι η εξωκυτταρική περιοχή του ενδογενούς Notch ανοσοανιχνεύεται σχεδόν αποκλειστικά σε ενδοκυττωτικά κυστίδια που είναι θετικά και για το δεσμευτή του (Δ1, βέλη). Αντίθετα, εξωτερικά της περιοχής omb (διακεκομμένη γραμμή στα Γ1 –Γ3) παρατηρείται ο γνωστός ανοσοεντοπισμός στην κορυφαία επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης και σε κυστίδια. BE : βασική επιφάνεια πλασματικής μεμβράνης.

Δ. Μελέτη της λειτουργικής δράσης του δακτύλου RING της πρωτεΐνης Neur : απαραίτητος για την ενδοκύττωση του δεσμευτή Delta αλλά όχι για την ενίσχυση της σηματοδοτικής του ικανότητας

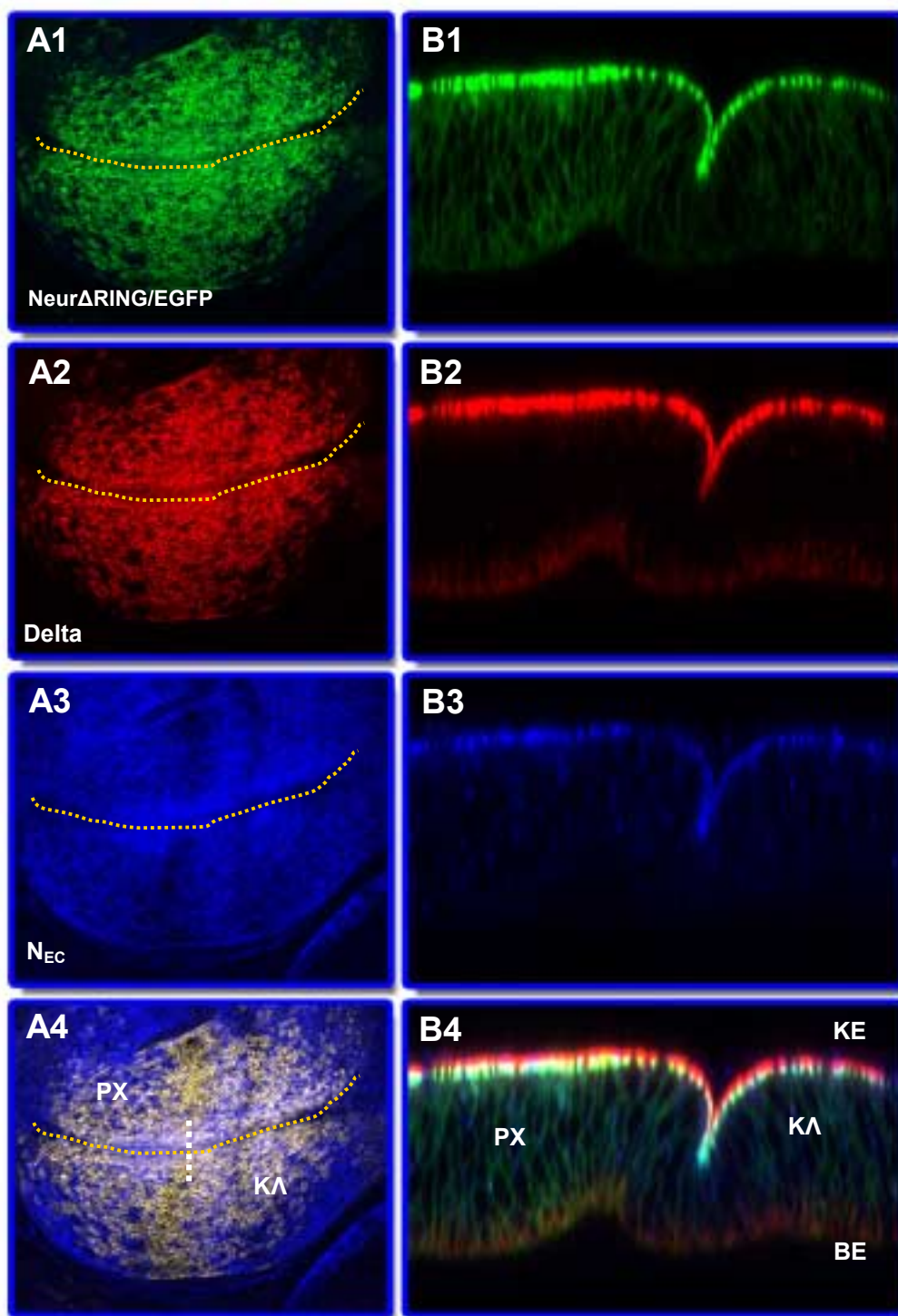
Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος του δακτύλου RING, που εντοπίζεται σε όλα τα ομόλογα μόρια της οικογένειας Neutralized, μελετήθηκε η λειτουργική δράση του πολυπεπτιδίου της *Drosophila* στο οποίο είχε αφαιρεθεί μία περιοχή που περιελάμβανε το δάκτυλο RING (αμινοξέα 624-754) και είχε αντικατασταθεί από την EGFP (NeurΔRING/EGFP). Η συγκεκριμένη χιμαιρική πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε ήδη στα πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού και είχε διαπιστωθεί ότι ο δάκτυλος ψευδαργύρου δεν είναι απαραίτητος για τον εντοπισμό του μορίου στην κυτταροπλασματική περιφέρεια της πλασματικής μεμβράνης.

Αρχικά το χιμαιρικό μόριο NeurΔRING/EGFP υπερεκφράστηκε μόνο του σε προνυμφικούς δίσκους φτερού στην περιοχή omb. Ανοσοανιχνεύοντας την πρωτεΐνη Wingless παρατηρήθηκε πλήρης και αυτόνομη καταστολή της έκφρασής της στο ραχιαιο-κοιλιακό σύνορο του φτερού (Εικ. 55Α). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τη μη ανιχνεύσιμη καταστολή στην περίπτωση υπερέκφρασης του πλήρους μήκους πολυπεπτιδίου Neur. Αυτό πιθανότατα να οφείλεται σε παρεμπόδιση του μηχανισμού σηματοδότησης Notch σε πολύ υψηλότερα επίπεδα από ότι συνέβη με το αγρίου τύπου Neur, τα οποία ήταν ικανά να καταστείλουν την ενεργοποίηση του γονιδίου *wingless*. Από την κατασκευή μιτωτικών κλώνων υπερέκφρασης NeurΔRING/EGFP διαπιστώθηκε ότι η καταστολή ήταν δυνατή μόνο όταν οι κλώνοι βρίσκονταν στο ραχιαίο ήμισυ της ζώνης έκφρασης του μορίου Wg (Εικ. 55B-Δ). Δε γνωρίζουμε ποια είναι η μηχανιστική βάση αυτού του φαινομένου.

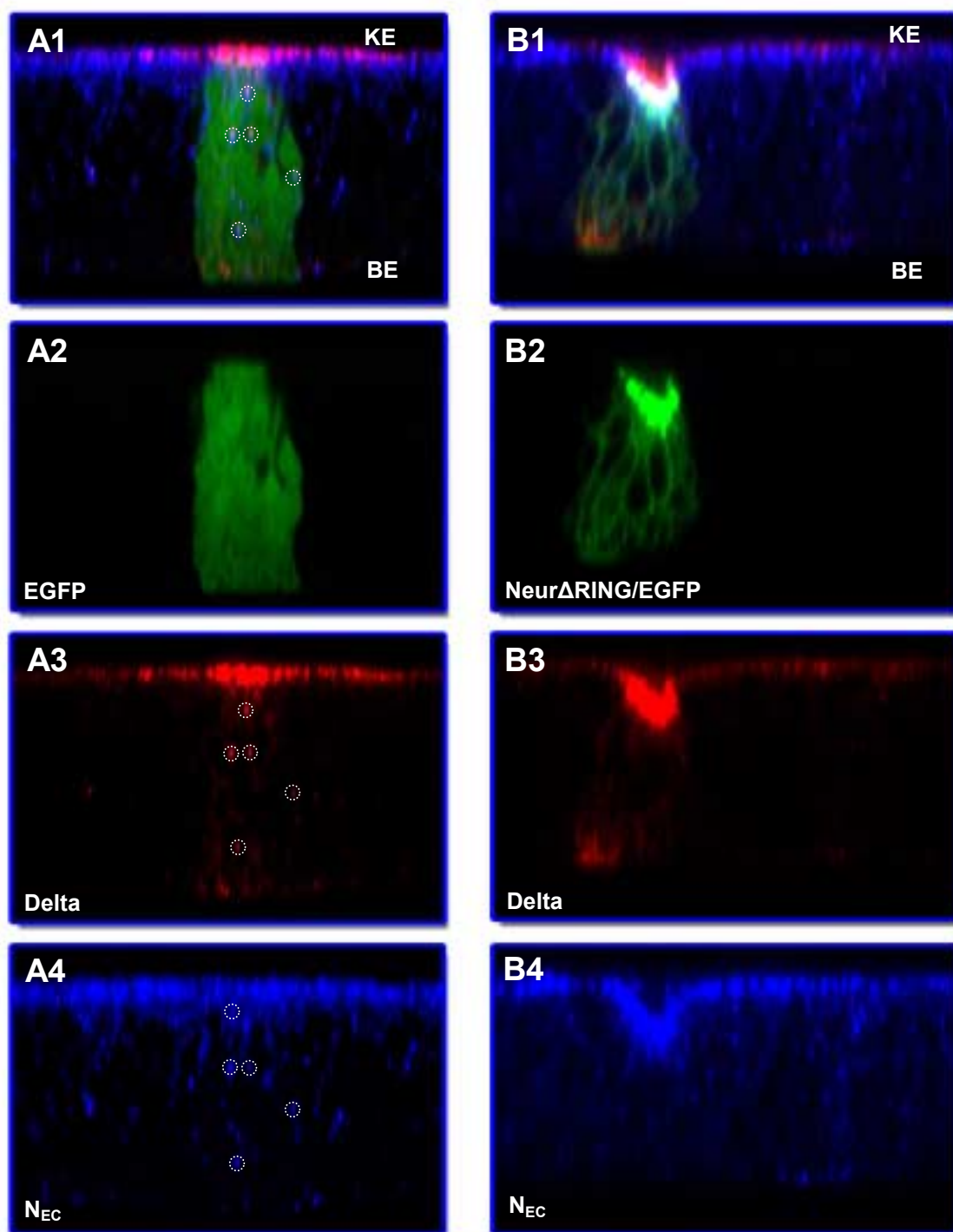
Είναι γνωστό ότι ο δάκτυλος RING συναντάται και σε άλλες πρωτεΐνες στις οποίες έχει αποδειχτεί ότι σχετίζεται με τη δράση λιγάσης ουβικουιτίνης τύπου E3 (Lorick et al., 1999, Borden, 2000, Jackson et al., 2000, Freemont, 2000). Με βάση το γεγονός ότι η ουβικουιτινίωση αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς ρύθμισης ενδοκυττωτικών διαδικασιών (Hicke, 2001, Hershko et al., 2000, Hirsch and Ploegh, 2000, Ciechanover et al., 2000, Di Fiore and De Camilli, 2001) το ερώτημα που αναμενόταν να απαντηθεί ήταν εάν και κατά πόσο καταστέλλεται η ενδοκύττωση του δεσμευτή Delta. Οι πρωτεΐνες Delta και NeurΔRING/EGFP συνεκφράστηκαν στην περιοχή omb και ακολούθησε ανοσοανίχνευση τόσο του δεσμευτή όσο και του υποδοχέα Notch. Πράγματι, παρατηρήθηκε ότι και τα δύο μόρια εξακολουθούσαν να εντοπίζονται στην κορυφαία επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης, όπως και στην περίπτωση συνέκφρασης Delta και GFP και σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν όταν ο δεσμευτής συνεκφραζόταν με την πλήρους μήκους πρωτεΐνη Neur (Εικ. 56, σύγκριση με Εικ. 54Γ,Δ).



Εικόνα 55. Η πρωτεΐνη *NeurΔRING/EGFP* αναστέλλει την έκφραση του γονιδίου *wingless* στο ραχιαίο-κοιλιακό όριο του φτερού μόνο όταν αυτή εκφράζεται στο ραχιαίο διαμέρισμα των προ-νυμφικών δίσκων. Η έκφραση του *wingless* ανιχνεύτηκε με ανοσοεντοπισμό της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης (κόκκινο). Α1-Α3 : Οπτική τομή, συνεστιακού μικροσκοπίου, προνυμφικών δίσκων φτερού στους οποίους η χιμαιρική πρωτεΐνη (πράσινο) υπερεκφράζεται στην περιοχή omb. Παρατηρείται καταστολή της έκφρασής του *wingless*. Β-Δ : Οπτικές τομές μιτωτικών κλώνων *act>>GAL4; UAS-neurΔRING-EGFP*. Η έκφραση του *wingless* καταστέλλεται όταν οι κλώνοι βρίσκονται στο ραχιαίο διαμέρισμα (PX) του φτερού (Β). Αντίθετα δεν παρατηρείται καμία μεταβολή στο πρότυπο έκφρασης όταν οι κλώνοι εντοπίζονται στο κοιλιακό διαμέρισμα (ΚΛ) (Γ και Δ).

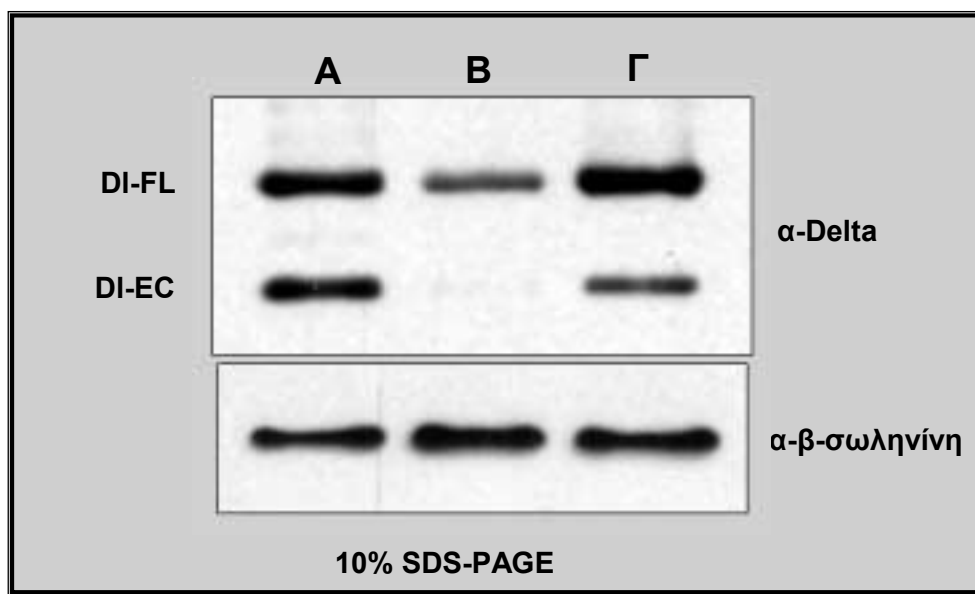


Εικόνα 56. Η απουσία του δακτύλου RING από την πρωτεΐνη Neur αναστέλλει την ενδοκύτωση του δεσμευτή Delta και κατ' επέκταση την ενδοκύτωση της εξωκυττάριας περιοχής του ενδογενούς υποδοχέα Notch. Οπτικές τομές από προνυμφικούς δίσκους φτερού όπου ο δεσμευτής Delta εκφράζεται, στην περιοχή omb, παρουσία του πολυπεπτιδίου NeurΔRING/EGFP. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοεντοπισμού του Delta (κόκκινο) και της εξωκυττάριας περιοχής του ενδογενούς υποδοχέα Notch (NEC, μπλε). **A** : οπτική τομή σε δίσκο φτερού προνύμφης με γενότυπο omb-GAL4/+; UAS-DI UAS-neurΔRING-EGFP. Η τομή πραγματοποιήθηκε στο επίπεδο της κορυφιαίας επιφάνειας (KE) της επιθηλιακής στοιβάδας. **B** : Εγκάρσια οπτική τομή. Ο προσανατολισμός υποδεικνύεται από τη διακεκομμένη γραμμή που φαίνεται στο A4. Παρατηρείται ότι και ο δεσμευτής και ο υποδοχέας δεν ανιχνεύονται σε κυστίδια, όπως συνέβαινε όταν το Delta συνεκφραζόταν με την πλήρους μήκους πρωτεΐνη Neur, αλλά συσνετοπίζονται με τη χημειρική πρωτεΐνη (πράσινο) στην κορυφιαία επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης. Ανοσοεντοπισμός NEC παρατηρείται και σε ενδοκυττωτικά κυστίδια (B3 και B4), στην πλειονότητα των οποίων δεν ανιχνεύεται Delta, όπως και στην περίπτωση που ο δεσμευτής εκφραζόταν εκτοπικά μόνος του ή μαζί με την GFP. Κίτρινη διακεκομμένη γραμμή (A) : ραχιαίο-κοιλιακό όριο φτερού. Πρόσθετες συντομογραφίες : PX και ΚΛ: ραχιαίο και κοιλιακό διαμέρισμα, αντίστοιχα, του δίσκου του φτερού. BE : βασική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων του δίσκου του φτερού.



Εικόνα 57. Η απουσία του δακτύλου RING από την πρωτεΐνη Neur αναστέλλει την ενδοκύττωση του δεσμευτή Delta και κατ' επέκταση την ενδοκύττωση της εξωκυττάριας περιοχής του ενδογενούς υποδοχέα Notch. Εγκάρσιες οπτικές τομές μιτωτικών κλώνων *act>>GAL4; UAS-DI UAS-GFP* (A) και *act>>GAL4; UAS-DI UAS-neurΔRING-EGFP* (B). Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοεντοπισμού του Delta (κόκκινο) και της εξωκυττάριας περιοχής του ενδογενούς υποδοχέα Notch (N_{EC} , μπλε). **A** : Δεσμευτής και υποδοχέας συνεντοπίζονται στη κορυφαία επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων του κλώνου. Επιπρόσθετα, παρατηρείται ότι όλα τα κυστίδια που ανοσοανιχνεύονται για την πρωτεΐνη Delta είναι θετικά και για την εξωκυττάρια περιοχή του Notch (κύκλοι) ενώ υπάρχουν και κυστίδια που φέρουν μόνο το N_{EC} . Το υποκυτταρικό πρότυπο του υποδοχέα είναι ταυτόσημο και έξω από τα όρια του μιτωτικού κλώνου. **B** : Παρατηρείται ότι και ο δεσμευτής και ο υποδοχέας (σε μικρότερο βαθμό) δεν ενδοκυττώνονται, αντίθετα με ότι συνέβαινε όταν το Delta συνεκφραζόταν με την πλήρους μήκους πρωτεΐνη Neur, αλλά συνεντοπίζονται με τη χιμαιρική πρωτεΐνη NeurΔRING/EGFP (πράσινο) στην κορυφαία επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων του κλώνου. Πρόσθετες συντομογραφίες : KE και BE : κορυφαία και βασική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων του δίσκου του φτερού, αντίστοιχα.

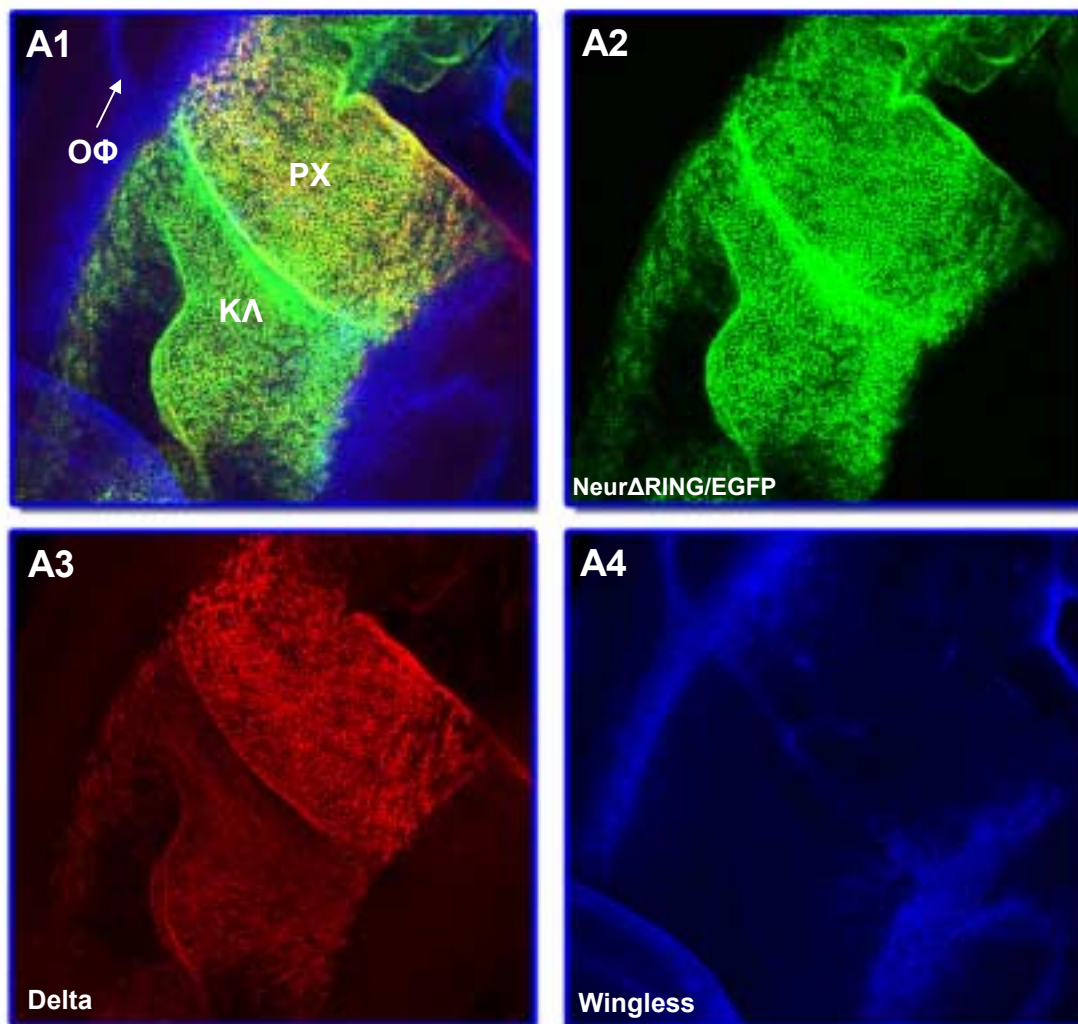
Ταυτόσημα αποτελέσματα υπήρξαν και όταν κατασκευάστηκαν μιτωτικοί κλώνοι συνέκφρασης (Εικ. 57). Άρα ο δάκτυλος RING είναι απαραίτητος για την ενδοκύττωση του συμπλόκου DI-NEC. Επίσης, πειράματα ανοσοεντοπισμού σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προνυμφικών δίσκων φτερού που συνέκφραζαν Delta και NeurΔRING/EGFP (περιοχή omb) έδειξαν, όπως άλλωστε αναμενόταν, ότι η παρεμπόδιση της ενδοκύττωσης του δεσμευτή συνοδευόταν και από παρεμπόδιση της αποικοδόμησής του (Εικ.58).



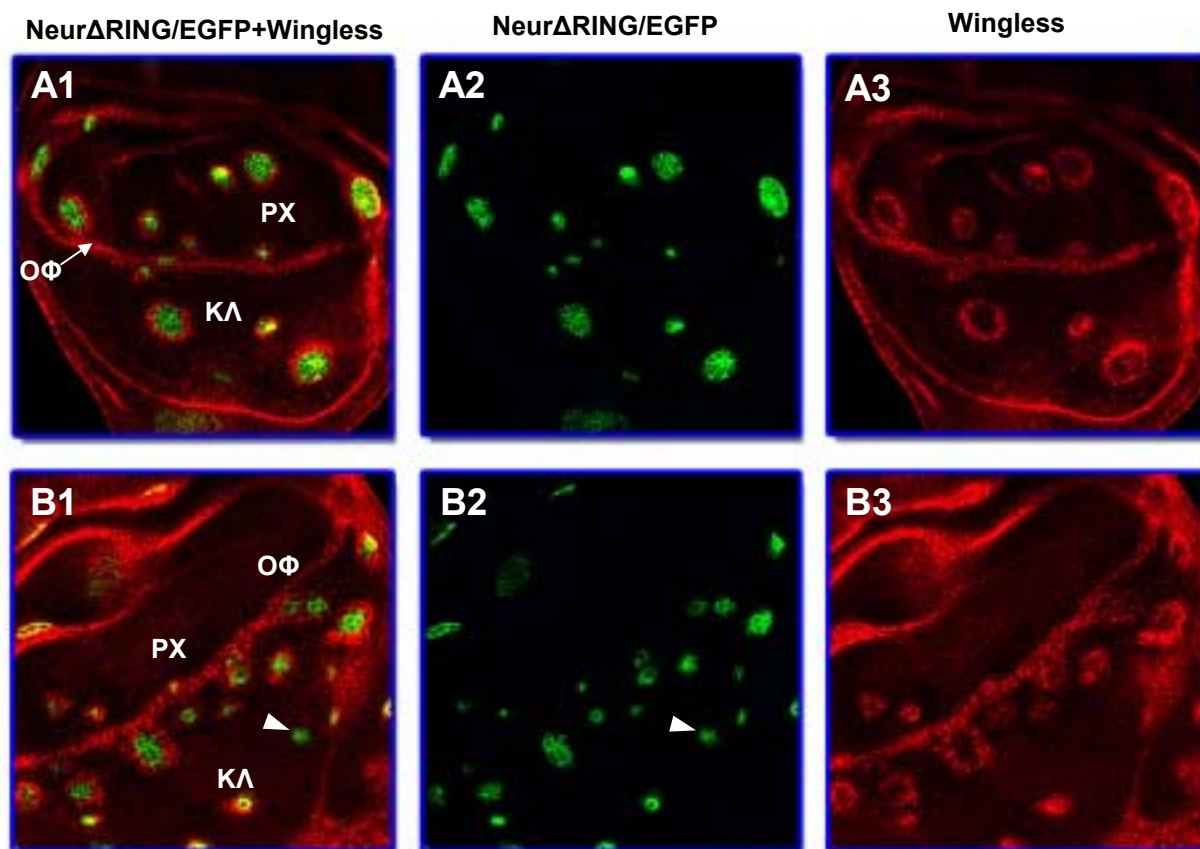
Εικόνα 58. Η πρωτεΐνη NeurΔRING/EGFP παρεμποδίζει την αποικοδόμηση του δεσμευτή Delta. Ανάλυση Western σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προνυμφικών δίσκων φτερού *Drosophila* που εκφράζανε, στην περιοχή omb, είτε την πρωτεΐνη Delta μόνη της (A) είτε μαζί με το πολυπεπτίδιο Neur (B) ή NeurΔRING/EGFP (Γ). Και στις τρεις περιπτώσεις ελήφθη πρωτεϊνικό εκχύλισμα από 16 προνυμφικούς δίσκους. Για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων έγινε ανοσοανίχνευση της β-σωληνίνης. Διαπιστώνεται ότι η απουσία του δακτύλου RING από την πρωτεΐνη Neur παρεμποδίζει την αποικοδόμηση του μορίου Delta (Γ, σύγκριση με B). DI-FL : το πλήρες μήκους πολυπεπτίδιο Delta, DI-EC : η εξωκυτάρια περιοχή του δεσμευτή Delta.

Προκειμένου να διερευνηθεί αν η παρεμπόδιση της ενδοκύττωσης του Delta επηρεάζει τη σηματοδοτική του ικανότητα προς τον υποδοχέα Notch, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοανίχνευσης της πρωτεΐνης Wiggless σε δίσκους φτερού, τόσο στην περιοχή omb όσο και σε μιτωτικούς κλώνους, υπερεκφράζοντας Delta και NeurΔRING/EGFP. Διαπιστώθηκε ότι ο δεσμευτής, παρά την αναστολή της ενδοκύττωσής του, ήταν ικανός να επάγει σηματοδότηση, κατά μη αυτόνομο τρόπο, ανεξάρτητα από τοπικούς περιορισμούς και σε επίπεδα συγκρίσιμα με τα πειράματα συνέκφρασης της πρωτεΐνης αγρίου τύπου (Εικ. 59 και 60, σύγκριση με Εικ. 50,51). Στα πειράματα κατασκευής μιτωτικών κλώνων διαπιστώθηκε ότι στο ραχιαίο διαμέρισμα του προνυμφικού δίσκου όλοι οι κλώνοι σηματοδοτούσαν, μη αυτόνομα, έκφραση Wiggless ενώ στο κοιλιακό διαμέρισμα η σηματοδότηση ήταν εφικτή στο 95% περίπου των κλώνων που συνέκφραζαν τις δύο πρωτεΐνες DI+EGFP/NeurΔRING. Όσοι κλώνοι δεν σηματοδο-

τούσαν το μονοπάτι Notch εντοπίζονταν μακριά από το ραχιαίο-κοιλιακό όριο του δίσκου του φτερού. Τα παραπάνω δεδομένα συγκλίνουν στην υπόθεση ότι η ενεργοποίηση του δεσμευτή Delta επιτυγχάνεται από την πρωτεΐνη Neur ανεξάρτητα (και μάλλον χρονικά πριν) από την ενδοκύτωση του συμπλόκου DI-NEC.



Εικόνα 59. Η απουσία του δακτύλου RING από την πρωτεΐνη Neuralized της *Drosophila* αναστέλλει την ενδοκύτωση του δεσμευτή Delta αλλά δεν επηρεάζει την ενίσχυση της επαγωγικής του ικανότητας προς τον υποδοχέα Notch. Οπτικές τομές από προνυμφικό δίσκο φτερού στον οποίο ο δεσμευτής Delta εκφράζεται στην περιοχή omb μαζί με τη χιμαιρική πρωτεΐνη NeurΔRING/EGFP (πράσινο). Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοεντοπισμού του Delta (κόκκινο). Η σηματοδότηση του μονοπατιού Notch ανιχνεύθηκε με ανοσοεντοπισμό της πρωτεΐνης Wingless (μπλε). Διαπιστώνεται ότι ο δεσμευτής παρά την καταστολή της ενδοκύτωσής του (A3) είναι ικανός να επάγει σηματοδότηση (A4) ανεξάρτητα από χωρικούς περιορισμούς και σε επίπεδα συγκρίσιμα με τα πειράματα συνέκφρασης της πρωτεΐνης αγρίου τύπου (σύγκριση με εικ. 24B). Η μόνη διαφορά με την περίπτωση υπερέκφρασης της πρωτεΐνης Neur αγρίου τύπου είναι ότι η επαγωγή σηματοδότησης από το Delta γίνεται αποκλειστικά κατά μη αυτόνομο τρόπο (έκφραση *wingless* στα σύνορα της περιοχής omb και ελάχιστα ή καθόλου μέσα στη συγκεκριμένη περιοχή, σύγκριση με εικόνα 24B).
 Συνομογραφίες : PX και ΚΛ : ραχιαίο και κοιλιακό διαμέρισμα του ελάσματος του φτερού, αντίστοιχα. ΟΦ : ραχιαίο-κοιλιακό όριο του φτερού.



Εικόνα 60. Η απουσία του δακτύλου RING από την πρωτεΐνη Neur δεν επηρεάζει την ενίσχυση της επαγωγικής ικανότητας του δεσμευτή Delta προς τον υποδοχέα Notch. Οπτικές τομές μιτωτικών κλώνων *act>>GAL4; UAS-Dl UAS-neurΔRING/EGFP*. Η σηματοδότηση Notch ανιχνεύτηκε με ανοσοεντοπισμό της πρωτεΐνης Wingless (κόκκινο). Παρατηρείται ότι ο δεσμευτής είναι ικανός να επάγει σηματοδότηση κατά μη αυτόνομο τρόπο, ανεξάρτητα από τοπικούς περιορισμούς, όπως και στα πειράματα συνέκφρασης της πρωτεΐνης αγρίου τύπου. Διαπιστώνεται ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό κλώνων (~5%), που βρίσκονται στο κοιλιακό διαμέρισμα του προνυμφικού δίσκου και μακριά από το όριο του φτερού (B1,B2-κεφαλή βέλους), δεν είναι ικανό να επάγει έκφραση του γονιδίου *wingless*. Συνομογραφίες : PX και ΚΛ : ραχιαίο και κοιλιακό διαμέρισμα του ελάσματος του φτερού, αντίστοιχα. ΟΦ : ραχιαίο-κοιλιακό όριο του φτερού.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το σηματοδοτικό μονοπάτι μέσω του υποδοχέα Notch αποτελεί ένα βασικό μηχανισμό καθορισμού της αναπτυξιακής μοίρας κυτταρικών ομάδων από τα ασπόνδυλα μέχρι να ανώτερα θηλαστικά. Τα βασικά συστατικά αυτής της διαδικασίας σηματοδότησης, οι υποδοχείς και οι δεσμευτές τους, εμφανίζουν εξαιρετική δομική συντήρηση μεταξύ των μεταζώων ενώ αρχίζει να διαφαίνεται ότι και τα ενδοκυττωτικά και πρωτεολυτικά γεγονότα που λαμβάνουν χώρα προκειμένου να μεταβιβαστεί από το δεσμευτή το σήμα για την ενεργοποίηση του υποδοχέα παραμένουν αναλλοίωτα κατά την εξέλιξη.

Μολονότι η συμμετοχή του γονιδίου *neuralized* στη σηματοδότηση της πρωτεΐνης Notch είχε αποδειχθεί με γενετικά δεδομένα στη *Drosophila* εντούτοις δεν υπήρχε καμία ένδειξη για τον επακριβή λειτουργικό του ρόλο. Επιπρόσθετα, το ορθόλογο μόριο που ταυτοποιήθηκε στον άνθρωπο και που η ελάττωση των επιπέδων έκφρασής του σχετίστηκε με τη δημιουργία καρκινικών αστροκυττωμάτων δεν είχε διερευνηθεί όσον αφορά τη συσχέτισή του με το συγκεκριμένο μονοπάτι (Nakamura et al., 1998). Στην παρούσα εργασία απομονώθηκε το ομόλογο του γονιδίου στο ποντίκι, προκειμένου να μελετηθεί η συμμετοχή του στις αναπτυξιακές διαδικασίες των θηλαστικών, να διερευνηθεί ο ενδεχόμενος λειτουργικός του ρόλος στη σηματοδότηση του υποδοχέα Notch και να διαπιστωθεί η εξελικτική του συντήρηση. Σημαντική πληροφορία αντλήθηκε από την παράλληλη ανάλυση του γονιδίου της *Drosophila* η οποία πραγματοποιήθηκε προκειμένου να αναλυθεί εις βάθος η λειτουργική δράση του μορίου στο συγκεκριμένο

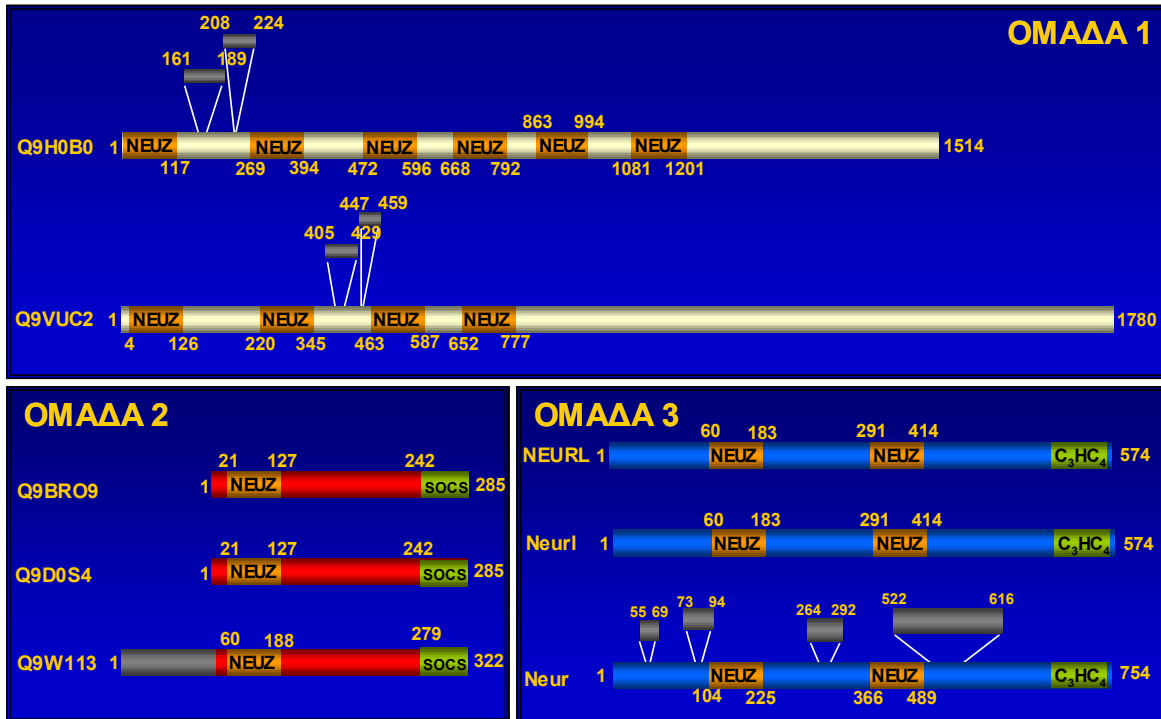
μονοπάτι και να αξιοποιηθεί ως οδηγός για τη διερεύνηση της λειτουργίας του γονιδίου των θηλαστικών.

1. ΜΙΑ ΝΕΑ ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ NEUZ

Το cDNA του γονιδίου *Neurl* του ποντικού κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη μεγέθους 574 αμινοξέων η οποία χαρακτηρίζεται από την ίδια αρχιτεκτονική δομή που παρουσιάζουν και τα υπόλοιπα ταυτοποιημένα ορθόλογα μόρια, αποτελούμενη από έναν δάκτυλο ψευδαργύρου τύπου C₃HC₄ RING, εντοπισμένο στο καρβοξυτελικό της άκρο και δύο περιοχές NEUZ, χαρακτηριστικές της συγκεκριμένης ομάδας μορίων. Σε αντίθεση με την πρωτεΐνη Neutralized της *Drosophila* τα θηλαστικά ορθόλογα μόρια είναι μικρότερα σε μέγεθος κατά 180 αμινοξέα. Η διαφορά μεγέθους μεταξύ των πολυπεπτιδίων οφείλεται στην απουσία αμινοξικών αλληλουχιών που διαφαίνεται από τα υπολογιστικά προγράμματα πρόβλεψης δευτεροταγούς δομής ότι αποτελούν αδιαμόρφωτες αλυσίδες που συνδέουν τις δομικές, εξελικτικά συντηρημένες, περιοχές των μορίων.

Χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών της οικογένειας Neutralized αποτελούν οι περιοχές NEUZ. Η περιοχή NEUZ είχε αρχικά χαρακτηριστεί ως εσωτερική ειδική επανάληψη της πρωτεΐνης NEURALIZED του ανθρώπου (Nakamura et al., 1998) και στη συνέχεια εντοπίστηκε σε 2 επιπλέον διακριτές πρωτεϊνικές ομάδες (<http://smart.embl-heidelberg.de/> - Εικ. 61). Η πρώτη ομάδα αποτελείται από δύο νέα ομόλογα πολυπεπτιδία άγνωστης λειτουργίας, στον άνθρωπο (#QBH0B0, EMBL acc. No. AL136870, μερικού μήκους πολυπεπτιδίο, 1524 aa) και τη *Drosophila* (#Q9VUC2, EMBL acc. No. AE003536, πλήρους μήκους πολυπεπτιδίο, 1780 aa), τα οποία παρουσιάζουν αμινοξική ταυτότητα 41%, σε όλο το μήκος της αλληλουχίας και χαρακτηρίζονται από την παρουσία 6 και 4 περιοχών NEUZ, αντίστοιχα ενώ δεν εντοπίζεται δάκτυλος ψευδαργύρου ή κάποια άλλη γνωστή δομή. Η δεύτερη ομάδα απαρτίζεται από τρεις ορθόλογες πρωτεΐνες, στον άνθρωπο (#Q9BRO9, EMBL acc. No. AL008726, πλήρους μήκους πολυπεπτιδίο, 285 aa), στο ποντίκι (#9D0S4, EMBL acc. No. AK004524, πλήρους μήκους πολυπεπτιδίο, 285 aa) και στη *Drosophila* (#Q9w113, EMBL acc. No. AE003465, πλήρους μήκους πολυπεπτιδίο, 322 aa). Τα θηλαστικά πολυπεπτιδία έχουν μεταξύ τους αμινοξική ομολογία 90% και ταυτότητα 85% ενώ με το ορθόλογό τους στη *Drosophila* 48% και 39%, αντίστοιχα, σε όλο το μήκος των πολυπεπτιδίων. Και τα τρία μόρια χαρακτηρίζονται από μία περιοχή NEUZ και μία περιοχή SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling) (Nicholson and Hilton, 1998, Chen et al., 2000, Zhang et al., 2001), μεγέθους 44 αμινοξέων, εντοπισμένη στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η ομοιότητα μεταξύ των δύο προαναφερθέντων πρωτεϊνικών ομάδων και της ομάδας Neutralized περιορίζεται στην περιοχή NEUZ, γεγονός που ενδεχομένως υποδηλώνει ότι

η συγκεκριμένη περιοχή είναι ιδιαίτερα συντηρημένη και ότι τα γονίδια *neuralized* μπορεί να θεωρηθούν ότι ανήκουν σε υπεροικογένεια NEUZ, η οποία έχει μέλη από τα ασπόνδυλα μέχρι τα σπονδυλωτά.



Εικόνα 61. Σχηματική αναπαράσταση των τριών διακριτών πρωτεϊνικών ομάδων που χαρακτηρίζονται από την παρουσία περιοχών NEUZ. **Ομάδα 1** : αποτελείται από δύο ομόλογα μη ταυτοποιημένα πολυπεπτίδια. Q9H0B0 : ανθρώπινο πολυπεπτίδιο με ατελή αμινοξική αλληλουχία. Q9VUC2 : πρωτεΐνη της *Drosophila*. Πλήρους μήκους αμινοξική αλληλουχία. Και τα δύο ομόλογα χαρακτηρίζονται από πολυάριθμες περιοχές NEUZ ενώ δεν έχει ανιχνευτεί κάποια άλλη δομή. **Ομάδα 2** : αποτελείται από τρία ομόλογα, μικρού μεγέθους, πολυπεπτίδια. Q9BRO9 : ανθρώπινη πρωτεΐνη. Q9D0S4 : ομόλογο μόριο στο ποντίκι. Q9W113 : πρωτεΐνη της *Drosophila*. Για όλα τα μόρια έχει προσδιοριστεί η πλήρης αμινοξική αλληλουχία. Χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη μίας περιοχής NEUZ και μίας περιοχής SOCS η οποία εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο. Το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης της *Drosophila* είναι μεγαλύτερο κατά 37 αμινοξέα. Η υψηλότερη ομολογία των μορίων εντοπίζεται στις περιοχές NEUZ και SOCS. **Ομάδα 3** : οι πρωτεΐνες Neuralized. Και στις τρεις ομάδες οι πρόσθετες αμινοξικές αλληλουχίες που υπάρχουν σε ένα μόριο και απουσιάζουν στα υπόλοιπα ομόλογα είναι χρωματισμένες γκρι.

Ανάμεσα στα μόρια της οικογένειας Neuralized παρατηρείται ότι η περιοχή NEUZ1 είναι πιο συντηρημένη σε σχέση με την περιοχή NEUZ2, υποδηλώνοντας ενδεχομένως σημαντικό λειτουργικό ρόλο. Πράγματι διαπιστώθηκε στη συνέχεια ότι είναι απαραίτητη για τον υποκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών και κατ' επέκταση για αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια. Είναι αξιοσημείωτο ότι η αντίστοιχη περιοχή NEUZ που εντοπίζεται στην υποομάδα των πρωτεϊνών SOCS παρουσιάζει ιδιαίτερα υψηλή ομολογία με την περιοχή NEUZ1 και όχι με την περιοχή NEUZ2 (Εικ.62). Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν πρόσφατα νέα μέλη μιας υπεροικογένειας πρωτεϊνών οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία της περιοχής SOCS (SOCS box) στο καρβοξυτελικό τους άκρο και παίζουν κατασταλτικό ρόλο στις διαδικασίες σηματοδότησης μέσω κυτοκινών (Chen et al., 2000, Nicola and Greenhalgh, 2000, Krebs and Hilton, 2000,

A	
Q9D0S4	: P P P T R F H R - V H G A N I R V D P S G T R A T R V E S F A H G V C F S R E P L A P G Q V F L V E I E E K E L G W C G H L R L G L T A L D P - - - - A S L A P V P E : 78
Q9BR09	: P P P T R F H Q - V H G A N I R M D P S G T R A T R V E S F A H G V C F S R E P L A P G Q V F L V E I E E K E L G W C G H L R L G L T A L D P - - - - A S L A A V P E : 78
Q9w113	: R Q L S R F H P - Y H C S N I Q L G D D A T V A Y R R A S F A D A L T F S E R P L A P G D I F L V E I E K I E R G W S G H M R L G L T E L A P N V I R T S S E G L P H : 82
Neur1	: A T P L L F H P H T K G S Q L M D L S H K A V R Q A S F C N A I T F S N R P V L I Y E Q V R L K I T K K Q C C W S G A L R L G F T S K D P S R I H P D S - - L P K : 81
NEURL	: A T P L L F H P H T K G S Q L M D L S H K A V R Q A S F C N A I T F S N R P V L I Y E Q V R L K I T K K Q C C W S G A L R L G F T S K D P S R I H P D S - - L P K : 81
neur	: L P P L Q F H - S V H C D N I R I S R D G T L A R R F E S F C R A I T F S A R P V R I N E R I C V K F A E I S N N W N G G I R F C F T S N D E V T I L E - G T - - L P K : 79
Q9D0S4	: F S L P D L V N L G H T W F A I T R H H N R V P R E G R ~ ~ ~ ~ ~ : 107
Q9BR09	: F S L P D L V S L G H S W F A I T R H H N R V P R E G Q P E A E A A V P S G P Q ~ ~ ~ ~ ~ : 119
Q9w113	: F A L P D L A N L G N S W I Y P I S K F E M N Q R Q D A N D I I E P E T D D A P H R N L L G D : 129
Neur1	: Y A C P D L V S Q S G F W A K A L - - - P E E F A N E G N I I A F W V D K K G R V F H R I N ~ : 124
NEURL	: Y A C P D L V S Q S G F W A K A L - - - P E E F A N E G N I I A F W V D K K G R V F H R I N ~ : 124
neur	: Y A C P D L T N R P G F W A K A L - - - H E Q Y C E K D N I L Y Y Y V N G A G D V I Y G I N ~ : 122
B	
Q9D0S4	: P P P T R F H Q V H - G A N I R M D P S G T R A T R V E S - F A H G V C F S R E P L A P G Q V F L V E I E E K E L G W C G H L R L G L T A L D P - - - - A S L A A V P E : 77
Q9BR09	: P P P T R F H R V H - G A N I R V D P S G T R A T R V E S - F A H G V C F S R E P L A P G Q V F L V E I E E K E L G W C G H L R L G L T A L D P - - - - A S L A P V P E : 77
Q9w113	: R Q L S R F H P Y H - G S N I Q L G D D A T V A Y R R A S - F A D A L T F S E R P L A P G D I F L V E I E K I E R G W S G H M R L G L T E L A P N V I R T S S E G L P : 81
Neur1	: D G D L R F H A L R R R A H V R I L D E Q T V A R V E H G R D E R A L V E T S R P L R V A E T I F I K V T R S G G A R P C A L S F G V T T C D P G T L R P - - A D L P : 81
NEURL	: D G D L R F H A L R A G A H V R I L D E Q T V A R V E H G R D E R A L V E T S R P V R V A E T I F V K V T R S G G A R P C A L S F G V T T C D P G T L R P - - A D L P : 81
neur	: L I P V P F H N T K - G R N V R L S Q D R F V A S R T E S D F C Q G Y V F T A R P I R I G E K L I V Q V L K T E Q M Y V G A L A L G L T S C N P A M L Q P - - N D L P : 80
Q9D0S4	: E F S L P D L V N L G H T W F A I T R H H N R V P R E G Q P E A E A A V P S G P Q ~ ~ ~ ~ ~ : 119
Q9BR09	: E F S L P D L V N L G H T W F A I T R H H N R V P R E G R ~ ~ ~ ~ ~ : 107
Q9w113	: H F A L P D L A N L G N S W I Y P I S K F E M N Q R Q D A N D I I E P E T D D A P H R N L L G D : 129
Neur1	: - F S P E A L V D R K E F W - - A V C R - V P G P L H S G D I L G L V V N A D G E L H L S H N ~ : 124
NEURL	: - F S P E A L V D R K E F W - - A V C R - V P G P L H S G D I L G L V V N A D G E L H L S H N ~ : 124
neur	: - N D S D F L D R P E Y W - - V V S K D I A A A P Q R G D E I A F F V A P N G E V S I S K N ~ : 124

Εικόνα 62. Συγκριτική στοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας των περιοχών NEUZ1 (A) και NEUZ2 (B) με την αντίστοιχη περιοχή NEUZ των πρωτεϊνών της οικογένειας SOCS.

Q9BR09 : ανθρώπινη πρωτεΐνη. Q9D0S4 : ομόλογο μόριο στο ποντίκι. Q9W113 : πρωτεΐνη της *Drosophila*. Διαπιστώνεται ότι η το υψηλότερο ποσοστό ταυτόσημων αμινοξικών καταλοίπων (μαύρο) εντοπίζεται στην περιοχή NEUZ 1.

Krebs and Hilton, 2001). Ο διαχωρισμός τους σε υποομάδες βασίζεται στην παρουσία πρόσθετων περιοχών που συμμετέχουν σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, όπως η περιοχή SH2 (Src Homology 2 domain), SPRY (*S*prouty domain) και οι επαναλήψεις WD-40 και αγκυρίνης. Πρόσφατες μελέτες διερεύνησης του λειτουργικού ρόλου μελών της υποομάδας των μορίων SOCS που φέρουν την περιοχή SH2 έδειξαν ότι αποτελούν συστατικά του συμπλέγματος λιγάσης ουβικουιτίνης SCF (Skp1, Cdc53, E-box protein complex), συμμετέχοντας με αυτόν τον τρόπο στην καταστολή της δράσης διαφόρων παραγόντων-συστατικών της σηματοδότησης από κυτοκίνες μέσω αποικοδόμησης στο πρωτεάσωμα (Nicola et al., 2000, Kamizono et al., 2001). Είναι πιθανόν όλες οι πρωτεΐνες SOCS να αποτελούν συστατικό συμπλεγμάτων λιγάσης ουβικουιτίνης αλληλεπιδρώντας με την συντηρημένη περιοχή SOCS με κάποιον ή κάποιους παράγοντες του συμπλέγματος, ενώ η δεύτερη περιοχή που εντοπίζεται και που ποικίλει ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας ίσως να καθορίζει την εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα που πρόκειται να αποικοδομηθεί είτε μέσω απευθείας αλληλεπίδρασης είτε μέσω αλληλεπιδράσεων με ενδιάμεσους βοηθητικούς παράγοντες.

Τα παραπάνω δεδομένα, καθώς και η ύπαρξη του δακτύλου RING στο καρβοξυτελικό άκρο των μορίων *Neuralized* και οι πληροφορίες του λειτουργικού του ρόλου ως βασική δομική περιοχή πρωτεϊνών που αποτελούν λιγάσες ή συστατικά συμπλεγμάτων λιγασών ουβικουιτίνης υποδηλώνουν πιθανή συμμετοχή των μελετούμενων πολυπεπτιδίων *Neur* σε αντίστοιχες διαδικασίες κατά τρόπο ανάλογο με τη δράση των πρωτεϊνών SOCS. Η ενδεχόμενη συμμετοχή του μορίου *Neuralized* στις διαδικασίες ουβικουιτινίωσης σε συνδυασμό με τα γενετικά δεδομένα δράσης του πριν από την ενεργοποίηση του Notch θα μπορούσε να συσχετιστεί με τα ενδοκυττωτικά γεγονότα που λαμβάνουν χώρα κατά την σηματοδότηση του υποδοχέα από το δεσμευτή του Delta. Είναι άλλωστε γνωστό ότι η ουβικουιτινίωση πρωτεϊνών της κυτταρικής επιφάνειας σηματοδοτεί την ενδοκύτωση και/ή μεταγενέστερα στάδια της ενδοκυτταρικής τους διακίνησης (Bonifacino and Weissman, 1998, Ciechanover et al., 2000). Για να αποδειχθεί μία τέτοια υπόθεση έπρεπε να διερευνηθεί αρχικά ο ρόλος του *Neuralized* στην ενεργοποίηση του υποδοχέα Notch και στις ενδοκυττωτικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κατά τη σηματοδότηση του τελευταίου και στη συνέχεια να αναλυθεί η δράση του ως λιγάση ουβικουιτίνης και η συσχέτισή του με κάποιο υπόστρωμα, ενδεχομένως το δεσμευτή Delta.

2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *Neuralized* ΣΤΟΝ ΠΟΝΤΙΚΟ : ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ Notch

Από τα πειράματα ανίχνευσης της έκφρασης του θηλαστικού ομολόγου *Neuralized* κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη του ποντικού διαπιστώθηκε ότι το γονίδιο είναι μεταγραφικά ενεργό από τα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης, σε συγκεκριμένες κυτταρικές ομάδες, κυρίως επιθήλια, σε ένα μεγάλο αριθμό εσωτερικών και αισθητηρίων οργάνων καθώς και στο νευρικό και στηρικτικό σύστημα. Αυτή η ευρέος φάσματος μεταγραφική ενεργότητα του γονιδίου υποδηλώνει ενδεχομένως ένα σημαντικό ρόλο στις αναπτυξιακές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την εμβρυογένεση. Εντούτοις, τα αποτελέσματα πειραμάτων μερικής ή ολικής καταστροφής του γονιδίου που δημοσιεύτηκαν πρόσφατα (Vollrath et al. 2001, Ruan et al. 2001) δεν έδειξαν σημαντικές μεταβολές σε εξωτερικά μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως πιθανόν να αναμενόταν για ένα γονίδιο με τόσο ευρύ πρότυπο έκφρασης. Συγκεκριμένα, η ομάδα του Y. N. Jan (Ruan et al. 2001) παρατήρησε ότι η πλήρης απώλεια λειτουργίας του *Neuralized* δεν προκαλεί ανιχνεύσιμες φαινοτυπικές αλλοιώσεις αλλά δημιουργεί προβλήματα στη διακριτική ικανότητα της όσφρησης και υπερευαίσθησία στην αιθανόλη και ειδικότερα στο συντονισμό των κινητικών νευρώνων. Αντίθετα, οι Vollrath et al. πραγματοποίησαν μερική καταστροφή του γονιδίου (εξακολουθούσε να εντοπίζεται μετάγραφο που κωδικοποιούσε την περιοχή NEUZ1) και παρατήρησαν προβλήματα στειρότητας στα

αρσενικά άτομα και ανάπτυξης των μαστικών αδένων σε θηλυκούς ομόζυγους απογόνους οδηγώντας σε ανεπαρκή έκκριση γάλακτος. Η εκτενέστερη μελέτη στις αντίστοιχες δομές οδήγησε στον εντοπισμό μορφολογικών αλλοιώσεων. Διαπιστώθηκε ότι ενώ τα αρσενικά άτομα όταν αναλύθηκαν με γνωστές ιστολογικές τεχνικές εμφάνιζαν φυσιολογικά αναπαραγωγικά όργανα εντούτοις τα σπερματοζωάρια τους παρουσίαζαν προβλήματα κινητικότητας. Με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας ανιχνεύθηκαν δομικές αλλοιώσεις του μαστιγίου των σπερματοζωαρίων και ειδικότερα απουσία ζευγών μικροσωληνίσκων από τη γνωστή διάταξη 9+2 που χαρακτηρίζει τα αξονήματά τους. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ελλιπής ανάπτυξη των μαστικών αδένων κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης με αποτέλεσμα να είναι ανέφικτος ο θηλασμός των απογόνων που προέρχονταν από θηλυκά άτομα με γενότυπο *Neur^f/Neur^f*.

Αξίζει να αναφερθεί ότι όλες οι φαινοτυπικές αλλοιώσεις που εντοπίστηκαν και από τις δύο ερευνητικές ομάδες σχετίζονταν με περιοχές που εντοπίζονται μετάγραφα του γονιδίου *Neur^l*. Πράγματι, όπως διαπιστώνεται από τη μελέτη του προτύπου έκφρασής του, από την παρούσα μελέτη και από τις προαναφερόμενες ερευνητικές ομάδες, ανιχνεύεται υψηλή μεταγραφική ενεργότητα τόσο στο οσφρητικό επιθήλιο, οσφρητικό φλοιό και οσφρητικό βολβό, στην παρεγκεφαλίδα και το ραβδωτό σώμα (περιοχές που σχετίζονται με το συντονισμό νευρώνων) όσο και στους μαστικούς αδένες και τους όρχεις. Η παρατήρηση διαφορετικών φαινοτυπικών αποτελεσμάτων θα μπορούσε να δικαιολογηθεί ποικιλοτρόπως. Αρχικά, πρέπει να σημειωθεί ότι πλήρης καταστροφή του γονιδίου πραγματοποιήθηκε μόνο από τους Ruan et al. αφού στις πειραματικές προσεγγίσεις της άλλης ομάδας εξακολουθούσε να ανιχνεύεται μετάγραφο που ενδεχομένως κωδικοποιούσε πολυπεπτιδίο αποτελούμενο από την περιοχή NEUZ1, η οποία όπως αποδείχθηκε από την παρούσα διατριβή συμμετέχει σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που παίζουν ρόλο στον υποκυτταρικό εντοπισμό του μορίου και πιθανότατα σε πρόσθετες λειτουργίες που ακόμα δεν έχουν διαλευκανθεί. Συνεπώς οι αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν σε αυτήν την περίπτωση μπορεί να οφείλονται σε μερική απώλεια της λειτουργίας της πρωτεΐνης *Neur^l* αλλά δεν μπορεί να αποκλειστεί και το ενδεχόμενο να αποτελούν παραπλανητικά αποτελέσματα που προέρχονται όχι από απώλεια λειτουργίας του υπό μελέτη μορίου αλλά από μη ειδική παρέμβαση μίας νεομορφικής πρωτεΐνης στους μηχανισμούς ανάπτυξης των οργάνων όπου παρατηρήθηκαν δομικές μεταβολές. Η μη αναφορά φαινοτύπων αντίστοιχων με αυτούς που παρατηρήθηκαν από την ομάδα των Ruan et al. θα μπορούσε να δικαιολογηθεί από τη μη επίτευξη πλήρους καταστροφής του γονιδίου. Βέβαια, δεν διαφαίνεται αν πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες μελέτες και έτσι δεν μπορεί να αποκλειστεί και το ενδεχόμενο ότι οι μεταβολές στην οσφρητική ικανότητα και στο συντονισμό των κινητικών νευρώνων των ποντικών υπήρχαν αλλά δεν παρατηρήθηκαν. Από την άλλη, εξετάζοντας τα αποτελέσματα των Ruan et al. διαπιστώνεται ότι δεν υπάρχει καμία αναφορά για

προβλήματα κινητικότητας σπερματοζωαρίων και ανάπτυξης μαστικών αδένων. Αν οι δομικές μεταβολές που παρατηρήθηκαν από τους Vollrath et al. οφείλονται πράγματι σε απώλεια λειτουργίας του *Neuralized* τότε η μη ανίχνευση τους από τους Ruan et al. πιθανόν να δικαιολογείται από τη χρήση διαφορετικών στελεχών ποντικών, φαινόμενο που συναντάται συχνά στα πειράματα καταστροφής γονιδίων (Pearson, 2002).

Αυτό που είναι εύκολο να διαπιστωθεί από τις προηγούμενες αναλύσεις των δύο ερευνητικών ομάδων είναι ότι η επίδραση της απώλειας της λειτουργίας του γονιδίου *Neuralized* σχετίζεται με δομές στις οποίες υπάρχουν ενδείξεις συμμετοχής του σηματοδοτικού μηχανισμού μέσω του υποδοχέα Notch. Συγκεκριμένα, έχει ανιχνευτεί μεταγραφική ενεργότητα του γονιδίου Notch4 (Gallahan and Callahan, 1997) στους μαστικούς αδένες (Callahan and Raafat, 2001), ενώ παρατηρήθηκε ότι διαγονιδιακά ποντίκια που εξέφραζαν συνεχείς ενεργοποιημένες μορφές του υποδοχέα παρουσίαζαν προβλήματα γαλουχίας λόγω καθυστερημένης ανάπτυξης των μαστικών αδένων κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (Jhappan et al., 1992, Gallahan et al., 1996). Επιπρόσθετα, έχουν ανιχνευτεί στους όρχεις μετάγραφα των υποδοχέων Notch1-3 και των δεσμευτών Delta1 (Dll1) και Jagged1-2. Καθένας από τους υποδοχείς και τους δεσμευτές εντοπίζεται σε συγκεκριμένες κυτταρικές ομάδες. Και οι τρεις υποδοχείς ανιχνεύονται στα σπερματογόνια ενώ ο υποδοχέας Notch2 εντοπίζεται και στα κύτταρα Sertoli. Αντίθετα, οι πρωτεΐνες Delta1 και Jagged1 ανιχνεύονται αποκλειστικά στα σπερματογόνια και στα κύτταρα Sertoli, αντίστοιχα. Τα παραπάνω δεδομένα υποδηλώνουν πιθανό ρόλο της σηματοδότησης Notch στις διαδικασίες της σπερματογένεσης (Hayashi et al., 2001, Dirami et al., 2001). Συνεπώς δεν μπορεί να αποκλειστεί και η πιθανότητα τα φαινοτυπικά αποτελέσματα που προκλήθηκαν από την απώλεια λειτουργικής πρωτεΐνης *Neuralized* να οφείλονται σε απορύθμιση των συγκεκριμένων σηματοδοτικών μηχανισμών. Όσον αφορά τα αποτελέσματα των Ruan et al. η απώλεια λειτουργίας του γονιδίου δεν επηρεάζει το σχηματισμό και την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος όπως θα αναμενόταν με βάση τα δεδομένα που υπάρχουν από τη *Drosophila*. Παρ' όλα αυτά διαφαίνεται ότι παίζει ρόλο κατά τη διάρκεια ζωής των νευρώνων στα ενήλικα άτομα, κάτι που συμφωνεί και με την παρατήρηση της συμμετοχής του μονοπατιού Notch όχι μόνο στην ανάπτυξη αλλά και τη διατήρηση και πλαστικότητα του νευρικού συστήματος (Sestan et al., 1999).

Είναι χαρακτηριστικό επίσης ότι πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το γενικότερο πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *Neur1* σε διάφορους ιστούς και όργανα συμπίπτει με τα πρότυπα έκφρασης των θηλαστικών ομολόγων των δεσμευτών της οικογένειας DSL (Ευαγγελία Κουτέλου, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Οι δεσμευτές που έχουν ταυτοποιηθεί στα θηλαστικά εκφράζονται σε διαφορετικούς ιστούς, αλληλεπιδρώντας με έναν ή περισσότερους από τους υποδοχείς Notch. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται

εξειδίκευση του σηματοδοτικού μονοπατιού στις αναπτυξιακές διαδικασίες και ρύθμιση της σηματοδότησης σε πολλαπλά επίπεδα. Δεν αποκλείεται το μόριο *Neuralized* να συμμετέχει σε ένα από αυτά τα ρυθμιστικά επίπεδα και να αλληλεπιδρά με έναν ή περισσότερους δεσμευτές στους κυτταρικούς πληθυσμούς που αυτοί είναι ενεργοί. Οι συγκριτικές αναλύσεις των προτύπων γονιδιακής έκφρασης που πραγματοποιήθηκαν αφορούσαν τους δεσμευτές *Dll1*, *Dll4*, *Jagged 1* και *Jagged 2*. Διαπιστώθηκε συνεντοπισμός μεταγραφικής ενεργότητας τόσο στο κεντρικό όσο και στο περιφερικό νευρικό σύστημα καθώς και σε εσωτερικά όργανα. Εντούτοις, η έκφραση του γονιδίου *Neuralized* είναι ευρύτερη και αλληλεπικαλύπτεται με τα σημεία έκφρασης καθενός των τεσσάρων δεσμευτών που μελετήθηκαν. Αυτό το ευρύτερο πρότυπο έκφρασης του *Neuralized* είναι δυνατόν να υποδηλώνει πιθανή αλληλεπίδραση όχι μόνο με παράγοντες που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι Notch αλλά και με άλλες πρωτεΐνες, δρώντας κατά παρόμοιο τρόπο ή έχοντας πολλαπλές λειτουργικές δράσεις.

Το γονίδιο *Neuralized* του ποντικού είναι μεταγραφικά ενεργό σε πολυάριθμους ιστούς και όργανα, η έκφρασή του συμπίπτει ως ένα βαθμό με εκείνη των υποδοχέων Notch και των δεσμευτών τους ενώ δεν αποκλείεται να εμπλέκεται και σε άλλα αναπτυξιακά μονοπάτια. Η καταστροφή του όμως δεν έχει εμφανείς μορφολογικές επιπτώσεις όπως συμβαίνει για παράδειγμα με τις περιπτώσεις καταστολής της λειτουργίας των πρωτεϊνών της οικογένειας DSL. Συγκεκριμένα, απώλεια λειτουργίας του γονιδίου *Dll1* επηρεάζει τη νευρογένεση και σωματογένεση (Bettenhausen et al., 1995), του *Dll4* την ανάπτυξη ενδοθηλιακών ιστών (Shutter et al., 2000), του *Jagged1* την δημιουργία του καρδιαγγειακού συστήματος (Xue et al., 1999) και του *Jagged2* τη διαμόρφωση του σκελετού και των άκρων (Jiang et al., 1998). Η ύπαρξη ενός δεύτερου γονιδίου *Neurl* στο γονιδίωμα του ποντικού που λειτουργεί συμπληρωματικά με το πρώτο δε φαίνεται πιθανή, όπως έδειξαν οι αναλύσεις κατά Southern και οι μελέτες *in silico* όλων των διαθέσιμων γενωμικών αλληλουχιών και αλληλουχιών cDNA από άνθρωπο και ποντικό (Μαρία Κοκκινάκη). Οι παρατηρούμενοι φαινότυποι θα μπορούσαν να οφείλονται σε πλεονασμό (redundancy) του βιολογικού ρόλου του γονιδίου *Neuralized*, ο οποίος προέρχεται από τη λειτουργία άλλων παραγόντων που δρουν συμπληρωματικά και περιέχουν αντίστοιχα δομικά χαρακτηριστικά (περιοχές NEUZ ή δάκτυλος RING), όπως για παράδειγμα οι πρωτεΐνες SOCS.

3. ΟΙ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ *Neurl* ΚΑΙ *Neur* ΕΧΟΥΝ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ

Η πρώτη προσπάθεια στα πλαίσια της διερεύνησης του λειτουργικού ρόλου των πρωτεϊνών *Neuralized* του ποντικού και της *Drosophila* αφορούσε τον υποκυτταρικό τους εντοπισμό. Σύμφωνα με αναλύσεις *in silico* και τα δύο πολυπεπτίδια αποτελούσαν κυττα-

ροπ्लाσματικές πρωτεΐνες, αφού δεν ανιχνεύονταν εν δυνάμει διαμεμβρανικές περιοχές και θέσεις πρόσδεσης λιπιδικών αλυσίδων αλλά και οποιοδήποτε άλλη περιοχή που θα μπορούσε να αποτελέσει κατευθυντήριο σήμα των πρωτεϊνών σε κάποιο γνωστό ενδοκυτταρικό διαμέρισμα. Προκειμένου, λοιπόν, τα δύο μόρια να εντοπιστούν υποκυτταρικά κατασκευάστηκαν χιμαιρικές πρωτεΐνες αποτελούμενες από την EGFP και τα υπό μελέτη πολυπεπτίδια, οι οποίες ανιχνεύτηκαν με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού σε καλλιέργειες παροδικά διαμολυσμένων κυττάρων θηλαστικών. Παρατηρήθηκε ότι τόσο το θηλαστικό μόριο Neur1 όσο και το δροσοφιλικό ομόλογό του παρουσιάζουν ταυτόσημο υποκυτταρικό πρότυπο σε σικτές δομές που εντοπίζονται κοντά στη μεμβράνη και διάσπαρτες στο κυτταρόπλασμα. Ανοσοϊστοχημικές και βιοχημικές αναλύσεις έδειξαν ότι αυτές οι δομές είναι μεμβρανικές και δε σχετίζονται με το ενδοπλασματικό δίκτυο ή το σύμπλεγμα Golgi αλλά αποτελούν κυστίδια τα οποία από αρχικά πειράματα παρατηρήθηκε ότι έχουν κατεύθυνση από την κυτταρική επιφάνεια προς το εσωτερικό του κυττάρου και εικάζουμε ότι είναι ενδοσωμικά. Η συσχέτιση των μελετούμενων πρωτεϊνών με τις συγκεκριμένες μεμβρανικές δομές διαπιστώθηκε ότι οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις με άλλους παράγοντες, πιθανόν διαμεμβρανικά πολυπεπτίδια ή πρωτεϊνικά συμπλέγματα της κυτταροπλασματικής επιφάνειας των ανιχνευόμενων οργανιδίων. Η πιθανότητα τα παρατηρούμενα κυστίδια να είναι ενδοκυττωτικά θα μπορούσε να διερευνηθεί με την επώαση παροδικά διαμολυσμένων κυττάρων με φθορίζουσα δεξτράνη και επακόλουθες παρατηρήσεις με μικροσκοπία φθορισμού. Ο συνεντοπισμός των χιμαιρικών πρωτεϊνών Neur ή Neur1 με τη δεξτράνη θα αποτελούσε απόδειξη της συμμετοχής τους σε ενδοκυττωτικούς μηχανισμούς. Το είδος των κυστιδίων θα μπορούσε να μελετηθεί, επίσης, τόσο με τη χρήση αντισωμάτων ειδικών για λυσοσώματα, ενδοσώματα και άλλα ενδοκυτταρικά οργανίδια όσο και με κλασματοποιήσεις οργανιδίων και επακόλουθες ανοσοανιχνεύσεις (western blots) των μελετούμενων πρωτεϊνών.

Η μεμβρανική συσχέτιση του δροσοφιλικού ομόλογου είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από πειράματα κατευθυνόμενης υπερέκφρασης στη *Drosophila*, τα οποία πραγματοποιήθηκαν από δύο άλλες ερευνητικές ομάδες (Yeh et. al., 2000, Lai and Rubin 2001). Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη Neur ανιχνεύεται στην πλασματική μεμβράνη όταν αυτή εκφραστεί εκτοπικά σε διάφορες κυτταρικές ομάδες προνυμφικών δίσκων. Συνεπώς, ο κοινός υποκυτταρικός εντοπισμός των δύο μελετούμενων πολυπεπτιδίων και στο σύστημα της μύγας θα αποτελούσε την πρώτη ένδειξη εξελικτικής συντήρησης της λειτουργικής τους δράσης. Για το λόγο αυτό η χιμαιρική πρωτεΐνη Neur(1-574)/EGFP εκφράστηκε εκτοπικά σε προνυμφικούς δίσκους φτερού. Παρατηρήθηκε ότι εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων ενώ ανιχνευόταν και στο κυτταρόπλασμα (Εικ.39). Τα μερικώς αποκλίνοντα αποτελέσματα συγκριτικά με το ομόλογο πολυπεπτίδιο της *Drosophila* θα μπορούσαν να αιτιολογηθούν

σαν συνέπεια των διαφορετικών παραμέτρων που λαμβάνουν χώρα σε ένα ετερόλογο σύστημα. Δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα της απαίτησης περισσότερων παραγόντων που καθορίζουν τον υποκυτταρικό εντοπισμό του θηλαστικού μορίου και ενδεχομένως τη λειτουργικότητά του και πιθανότατα απουσιάζουν στο εξελικτικά κατώτερο και πιο απλό σύστημα της μύγας.

Η επακόλουθη μελέτη υποπεριοχών των μορίων, σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών, προκειμένου να οριοθετηθεί η αμινοξική αλληλουχία που ευθύνεται για τον παρατηρούμενο εντοπισμό τους, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι και για τις δύο μελετούμενες πρωτεΐνες απαιτείται ένα σημαντικό τμήμα του αμινοτελικού τους άκρου που ξεκινά από την πρώτη μεθειονίνη και περιλαμβάνει ολόκληρη την περιοχή NEUZ1. Αντίθετα η περιοχή NEUZ2 και ο δάκτυλος RING δεν παίζουν ρόλο στον υποκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών. Η σημαντικότητα της περιοχής NEUZ1 που διαπιστώσαμε από τις μελέτες μας επιβεβαιώθηκε από την πολύ πρόσφατη δημοσίευση μιας εκ των προαναφερθέντων ερευνητικών ομάδων (Yeh et al., 2001), σύμφωνα με την οποία η αφαίρεση της συγκεκριμένης περιοχής από την πρωτεΐνη Neuralized έχει σαν αποτέλεσμα το διάχυτο κυτταροπλασματικό της εντοπισμό στα επιθηλιακά κύτταρα των προνυμφικών δίσκων της *Drosophila*.

Η μη συμμετοχή του δακτύλου RING στον υποκυτταρικό εντοπισμό των μελετούμενων πρωτεϊνών στα κύτταρα των θηλαστικών επιβεβαιώθηκε με την πραγματοποίηση πειραμάτων κατευθυνόμενης υπερέκφρασης της πρωτεΐνης Neuralized της *Drosophila*, στην οποία η περιοχή RING είχε αντικατασταθεί από την EGFP (EGFP/NeurΔRING). Πράγματι, διαπιστώθηκε ότι η απουσία της συγκεκριμένης περιοχής δεν επηρεάζει το μεμβρανικό εντοπισμό του πολυπεπτιδίου, το οποίο ανιχνεύεται συγκεκριμένα στην κορυφαία επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων των προνυμφικών δίσκων του φτερού(Εικ.38). Παρατηρώντας προσεκτικά και σε υψηλές μεγεθύνσεις διαπιστώνεται ότι το μόριο εντοπίζεται και σε σικτικές δομές που βρίσκονται πλησίον της μεμβράνης (Εικ.38Γ) οι οποίες ενδεχομένως να αποτελούν πρώιμα ενδοκυττωτικά κυστίδια, γεγονός που θα συμφωνούσε με τις παρατηρήσεις από τα πειράματα σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών. Ο μεμβρανικός εντοπισμός επιβεβαιώθηκε και με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης. Επίσης, βιοχημικές μελέτες απέδειξαν ότι η δροσοφιλική πρωτεΐνη σχετίζεται με την κυτταροπλασματική περιφέρεια της μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων του δίσκου του φτερού, συμφωνώντας απόλυτα με τα δεδομένα που είχαν ληφθεί από τις μελέτες στο σύστημα των θηλαστικών.

Συνεπώς τα αποτελέσματα από τη μελέτη των μορίων Neur και NeurI σε δύο διαφορετικά συστήματα συμφωνούν επαρκώς προκειμένου να συμπεράνουμε ότι δεν είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες αλλά σχετίζονται με την κυτταροπλασματική επιφάνεια

της μεμβράνης των κυττάρων και να υποθέσουμε ότι συμμετέχουν πιθανότατα σε ενδοκυττωτικούς μηχανισμούς. Ο μεμβρανικός τους εντοπισμός οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις με άλλους παράγοντες που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική περιφέρεια και οι οποίες πραγματοποιούνται μέσω του αμινοτελικού τους άκρου που περιλαμβάνει και την περιοχή NEUZ1. Ο δάκτυλος RING συμμετέχει σε άλλες αλληλεπιδράσεις που έχουν να κάνουν με διαδικασίες ουβικουιπινιλίωσης (βλ. παρακάτω). Τα παραπάνω δεδομένα ενισχύουν το ενδεχόμενο η λειτουργική δράση των μορίων να είναι εξελικτικά συντηρημένη και να σχετίζεται με το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch και ενδοκυττωτικά γεγονότα.

4. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ *Neur1* ΚΑΙ *Neur* ΣΤΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ Notch ΣΤΗΝ *Drosophila*

A. Η κατευθυνόμενη έκφραση των μορίων *Neur1* και *Neur* επηρεάζει τη σηματοδότηση Notch

Προκειμένου να διαπιστωθεί και να διερευνηθεί λεπτομερώς η συμμετοχή των μελετούμενων μορίων στο σηματοδοτικό μονοπάτι Notch πραγματοποιήθηκαν κατευθυνόμενες υπερεκφράσεις διαγονιδίων που κωδικοποιούσαν τα πλήρους μήκους πολυπεπτίδια *Neur* και *Neur1*, τα οποία να σημειωθεί ότι δεν συνδέονταν με κάποιον επίτοπο ή την EGFP, ώστε να εξασφαλιστεί ότι η λειτουργική τους δράση δεν επηρεάζεται από παρακείμενες πρόσθετες πεπτιδικές αλληλουχίες. Η ενεργοποίηση ή καταστολή του μονοπατιού Notch μελετήθηκε στο όριο του φτερού και ανιχνεύτηκε από τη μελέτη της έκφρασης διαφόρων γονιδίων-στόχων του. Διαπιστώθηκε ότι καθεμία από τις δύο ομόλογες πρωτεΐνες όταν εκφραζόταν στη συγκεκριμένη περιοχή προκαλούσε μερική καταστολή της σηματοδότησης του υποδοχέα. Ανιχνεύτηκε η έκφραση πολλών γονιδίων-στόχων [*wingless*, *vestigial*, *E(spl)mβ*, *E(spl)m4*, *E(spl)m8*], εντούτοις παρατηρήθηκε καταστολή της έκφρασης μόνο του γονιδίου *E(spl)m8* (Εικ.48). Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί σαν αποτέλεσμα της διαφορετικής ευαισθησίας της καταστολής της έκφρασης των γονιδίων σε ελάττωση των επιπέδων της σηματοδότησης. Πιθανόν η παρεμπόδιση της ενεργοποίησης του μονοπατιού από τα διαγονίδια να είναι σχετικά μικρή και ικανή να επηρεάσει μόνο την έκφραση του *E(spl)m8*, η οποία απαιτεί ενδεχομένως υψηλότερα επίπεδα σηματοδότησης από ότι τα υπόλοιπα γονίδια-στόχοι με αποτέλεσμα να επηρεάζεται ακόμα και στην περίπτωση μερικής ελάττωσης της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Notch. Η ταυτόσημη κατασταλτική δράση των πρωτεϊνών *Neur1* και *Neur* στο μονοπάτι Notch αποτελούσε την πρώτη ένδειξη συντήρησης του λειτουργικού τους ρόλου πέρα από τα κοινά δομικά χαρακτηριστικά και τον παρόμοιο υποκυτταρικό τους εντοπισμό. Εντούτοις, παρατηρήθηκε ότι το φαινοτυπικό αποτέλεσμα του θηλαστικού μορίου *Neur1* ήταν λιγότερο ισχυρό από ότι του δροσοφιλικού ομολόγου (Εικ.48). Αυτό θα

μπορούσε να αιτιολογηθεί είτε λόγω της έκφρασής του σε ένα ετερόλογο σύστημα είτε σαν αποτέλεσμα της επίδρασης της θέσης ένθεσής του στο γονιδίωμα της μύγας. Δυστυχώς δεν υπήρχε η δυνατότητα χρήσης στελεχών με άλλες ενθέσεις προκειμένου να ελεγχθεί το ενδεχόμενο επίδρασης της χρωμοσωμικής θέσης στη μεταγραφική ενεργότητα του διαγονιδίου *UAS-Neurl*.

Η υπόθεση της συντήρησης του λειτουργικού ρόλου των πρωτεϊνών Neutralized ανάμεσα στα είδη ενισχύθηκε ακόμα περισσότερο από τα αποτελέσματα της ομάδας των Deblandre et al. (Deblandre et al., 2001), οι οποίοι απομόνωσαν και μελέτησαν τη δράση του ομόλογου γονιδίου στο *Xenopus* (*Xneur*). Παρατηρήθηκε ότι το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *Xneur* είναι παρόμοιο με εκείνο του γονιδίου της *Drosophila*. Συγκεκριμένα, στα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης ανιχνεύεται διάχυτο και σε χαμηλά επίπεδα στο αναπτυσσόμενο νευρικό εδάφιο και στο δέρμα ενώ στη συνέχεια η έκφρασή του ενισχύεται και περιορίζεται στους αρχέγονους νευρώνες και στους προγόνους των βλεφαριδοφόρων κυττάρων, των οποίων η μετέπειτα διαφοροποίηση εξαρτάται από τη δράση του μονοπατιού Notch και τη διαδικασία πλευρικής αναστολής. Πειράματα στη *Drosophila* έδειξαν ότι η κατευθυνόμενη υπερέκφραση του πολυπεπτιδίου XNeur διαταράσσει το μονοπάτι Notch δίνοντας φαινοτύπους που υποδηλώνουν κυρίως απώλεια λειτουργίας του μονοπατιού, όπως διαπιστώθηκε και για τα ομόλογα πολυπεπτίδια του ποντικού και της μύγας.

B. Διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου των πρωτεϊνών Neurl και Neur στη σηματοδοτική ικανότητα του δεσμευτή Delta προς τον υποδοχέα Notch

Λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα συμμετοχής των γονιδίων *neur* και *Neurl* στο σηματοδοτικό μονοπάτι Notch, του παρόμοιου υποκυτταρικού εντοπισμού τους, της πιθανής συμμετοχής τους σε ενδοκυττωτικούς μηχανισμούς καθώς και της «τοποθέτησης», από γενετικές μελέτες, της δράσης του δροσοφιλικού μορίου πριν από τη σηματοδότηση του υποδοχέα Notch από την πρωτεΐνη Delta το ερώτημα που αμέσως τίθεται είναι κατά πόσο η δράση των μελετούμενων μορίων σχετίζεται με την σηματοδοτική ικανότητα του δεσμευτή και αν ναι με ποιόν τρόπο. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα κατευθυνόμενης συνέκφρασης καθενός από τα μελετούμενα γονίδια με το συγκεκριμένο δεσμευτή και ανιχνεύτηκε η σηματοδοτική ικανότητά του τελευταίου προς τον υποδοχέα μελετώντας την έκφραση γονιδίων-στόχων του μονοπατιού. Βασιζόμενοι επίσης στα δεδομένα συσχέτισης των ενδοκυττωτικών διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα στο κύτταρο-πομπό του σήματος και στην ενεργοποίηση του υποδοχέα στο κύτταρο-δέκτη (Parks et al., 2000) μελετήσαμε τον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης Delta παρουσία καθενός από τα δύο μελετούμενα μόρια Neur και Neurl.

I) Η πρωτεΐνη Neuralized της *Drosophila* επάγει την ενδοκύτωση του δεσμευτή Delta: Διαπιστώθηκε ότι η παρουσία του δροσοφιλικού μορίου επηρεάζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης Delta. Συγκεκριμένα, ο δεσμευτής δεν ανιχνεύεται στην κυτταρική μεμβράνη αλλά σε ενδοκυττωτικά κυστίδια (Εικ.52), υποδηλώνοντας επαγωγή της ενδοκύττωσής του η οποία όπως αποδείχθηκε με τη χρήση ποικίλων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών-δεικτών ήταν ειδική. Πρόσθετα πειράματα (συνεργασία με Χ. Πισσούλη) έδειξαν σημαντική ελάττωση (μετα-μεταφραστικά) των επιπέδων του μορίου Delta όταν αυτό συνεκφράζεται με το πολυπεπτίδιο Neur, υποδεικνύοντας ότι η παρουσία του τελευταίου επάγει την ενδοκύτωση και επακόλουθη αποικοδόμησή του πρώτου. Αυτή η ενδοκύτωση του δεσμευτή δείξαμε ότι οδηγεί σε ταυτόχρονη ενδοκύτωση στα ίδια κυστίδια και της εξωκυττάριας περιοχής του υποδοχέα Notch, ερχόμενη σε συμφωνία με τα δεδομένα των Parks et al. (Parks et al., 2000), αλλά χωρίς να μπορεί να διευκρινιστεί από τα μέχρι τώρα πειράματά μας αν γίνεται *in trans* ή *in cis* (δηλ. αν το συνεντοπισμένο N_{EC} προέρχεται από τα γειτονικά κύτταρα ή από το ίδιο κύτταρο στο οποίο ενδοκυττώνεται ο δεσμευτής).

Η επαγωγή της ενδοκύτωσης του μορίου DI από την πρωτεΐνη Neur επιβεβαιώθηκε και από τους Lai et al., των οποίων τα αποτελέσματα δημοσιεύτηκαν ταυτόχρονα με τα δικά μας δεδομένα (Lai et al., 2001). Έδειξαν ότι το μόριο Neuralized επάγει ειδικά την ενδοκύτωση της πρωτεΐνης Delta ενώ κατασκεύασαν αντίσωμα για το πολυπεπτίδιο Neur και παρατήρησαν ότι συνεντοπίζεται με το δεσμευτή τόσο στη μεμβράνη όσο και σε ενδοκυττωτικά κυστίδια. Επιπρόσθετα, προκειμένου να διαπιστώσουν κατά πόσο ο συνεντοπισμός Delta και Neuralized υποδηλώνει και συσχέτιση των δύο μορίων στο ίδιο πρωτεϊνικό σύμπλεγμα πραγματοποίησαν πειράματα ανοσοκατακρημνίσεων *in vitro* και *in vivo*, χρησιμοποιώντας ολόκληρο το πολυπεπτίδιο Neur αλλά και υποπεριοχές αυτού. Πράγματι, παρατηρήθηκε ότι οι πρωτεΐνες βρίσκονται στο ίδιο σύμπλεγμα και ότι σε αυτή την αλληλεπίδραση παίζει ρόλο μόνο η περιοχή NEUZ1. Αυτό έρχεται σε πλήρη συμφωνία με τη δική μας διαπίστωση ότι η συγκεκριμένη περιοχή είναι υπεύθυνη για τον εντοπισμό του μορίου στη μεμβράνη του κυττάρου και την υπόθεσή μας ότι συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις με άλλα πρωτεϊνικά μόρια-υποστρώματα, όπως ο δεσμευτής Delta. Περαιτέρω βιοχημικά πειράματα θα μπορούσαν να δείξουν αν η αλληλεπίδραση Neuralized και Delta είναι άμεση ή όχι.

Η απόδειξη συσχέτισης της δροσοφιλικής πρωτεΐνης Neuralized με την επαγωγή των ενδοκυττωτικών γεγονότων που αναφέρθηκαν οδηγούσε στο ερώτημα αν το μόριο συμμετέχει σε διαδικασίες ουβικουτινίωσης που σηματοδοτούν ειδικά την ενδοκύτωση και αποικοδόμηση του μορίου Delta. Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο δάκτυλος RING έχει συσχετιστεί με πρωτεΐνες που έχουν δράση λιγάσης ουβικουιτίνης τύπου E3. Επειδή είναι γνωστό ότι η ουβικουιτινίωση αποτελεί ρυθμιστικό μηχανισμό ενδοκυττωτικών διαδικα-

σιών αποφασίσαμε να διερευνήσουμε κατά πόσο επηρεάζεται η παρατηρούμενη ενδοκύτωση της πρωτεΐνης Delta παρουσία του πολυπεπτιδίου neur στο οποίο η περιοχή RING είχε αντικατασταθεί από την EGFP (EGFP/neurΔRING). Πράγματι, παρατηρήθηκε ότι η απουσία του δακτύλου RING είχε σαν αποτέλεσμα την παραμονή του δεσμευτή στη μεμβράνη (Εικ.56A2,B2 και Εικ.57A3,B3). Από αναλύσεις western διαπιστώθηκε ότι η παρατηρούμενη καταστολή της ενδοκύτωσης του Delta συνοδεύταν από καταστολή της αποικοδόμησής του (Εικ. 58). Το ίδιο ισχύει και για το ομόλογο XNeur αφού πειράματα στη *Drosophila* και στο σύστημα του βατράχου έδειξαν ότι η επαγωγή της ενδοκύτωσης και αποικοδόμησης του δεσμευτή Delta εξαρτάται από το δάκτυλο ψευδαργύρου RING (Deblandre et al., 2001).

Η υπόθεση της δράσης του μορίου Neuralized ως λιγάση ουβικουιτίνης επαληθεύτηκε από τους Lai et al., Deblandre et al. και Yeh et al. (Lai et al., 2001, Deblandre et al., 2001, Yeh et al., 2001). Από πειράματα *in vitro* διαπιστώθηκε ότι οι πρωτεΐνες Neur και XNeur δρουν ως λιγάσες ουβικουιτίνης τύπου E3 και αυτο-ουβικουιτινιλιώνονται, όπως συμβαίνει άλλωστε και με πολλές άλλες λιγάσες του ίδιου τύπου, ενώ η απουσία του δακτύλου RING (Yeh et al., 2001, Deblandre et al., 2001) ή ακόμα και σημειακή μετάλλαξη του (Yeh et al., 2001) έχει σαν αποτέλεσμα παρεμπόδιση της δράσης τους (Yeh et al., 2001, Deblandre et al., 2001). Ο ρόλος του δροσοφιλικού μορίου ως λιγάση ουβικουιτίνης ανιχνεύτηκε και *in vivo* με πειράματα γενετικών αλληλεπιδράσεων (Lai et al., 2001). Αναλυτικότερα, παρατήρησαν ότι οι φαινότυποι που προκαλούνταν από την εκτοπική υπερέκφραση της πρωτεΐνης Neur, σε στελέχη *Drosophila* αγρίου τύπου, επανέρχονταν στην φυσιολογική σχεδόν κατάσταση όταν η υπερέκφραση γινόταν σε στελέχη που παρουσίαζαν απώλεια δράσης της πρωτεΐνης UbcD1, η οποία αποτελεί συζευκτικό ένζυμο ουβικουιτίνης. Επιπρόσθετα, υποστηρίζουν ότι η επακόλουθη αποικοδόμηση του DI πραγματοποιείται από το πρωτεάσωμα αφού από γενετικά δεδομένα παρατηρήθηκε ότι όταν παρεμποδίζεται παροδικά η δράση του τελευταίου αναστέλλεται και η αποικοδόμηση του πρώτου (Lai et al., 2001). Αντίστοιχες παρατηρήσεις έγιναν και για το πολυπεπτίδιο XNeur (Deblandre et al., 2001). Από πειράματα παροδικών διαμολύνσεων παρατήρησαν ότι η αυτο-ουβικουιτινιλίωση του μορίου XNeur έχει σαν αποτέλεσμα την περαιτέρω αποικοδόμησή του στο πρωτεάσωμα αφού καταστολείς της δράσης του τελευταίου αυξάνουν τα επίπεδα της πρωτεΐνης στα κύτταρα. Υποστηρίζεται επίσης ότι το υπόστρωμά της στο βάτραχο αποτελεί ο δεσμευτής XDelta1, ο οποίος, με βάση πειράματα *in vitro*, μονο-ουβικουιτινιλιώνεται. Παρόμοιες διαδικασίες έλαβαν χώρα και για το δροσοφιλικό ομόλογο μόριο χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα το πολυπεπτίδιο XDelta1 αλλά δεν ελήφθησαν θετικά αποτελέσματα. Αντίστοιχα πειράματα στη *Drosophila* δεν έχουν πραγματοποιηθεί.

Το ερώτημα που γεννάται από τα δεδομένα που προκύπτουν από τη διερεύνηση του ρόλου της πρωτεΐνης *Neutralized* του *Xenopus* είναι πώς μπορεί να σχετιστεί η μονοουβικουιτινιλίωση του *Delta* με τα δεδομένα της αποικοδόμησής του από το πρωτεάσωμα (Lai et al., 2001). Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η προσθήκη ενός μορίου ουβικουιτίνης αποτελεί το σήμα για την ενδοκύτωση επιφανειακών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών και τη συσσώρευσή τους στα εσωτερικά κυστίδια των πολυκυστιδιακών ενδοσωμάτων τελικού σταδίου με τελικό προορισμό την αποικοδόμησή τους στα λυσοσώματα (Dupre et al., 2001, Hicke, 2001). Η λεπτομερέστερη ανάλυση της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας της πρωτεΐνης *XDelta1* τόσο σε κύτταρα αγρίου τύπου όσο και σε κύτταρα στα οποία υπάρχει απώλεια λειτουργίας της πρωτεΐνης *XNeutralized* είναι απαραίτητη προκειμένου να εντοπιστεί ο προορισμός της μετά την ενδοκύττωσή της. Πρόσθετα βιοχημικά πειράματα τόσο στο σύστημα του βατράχου όσο και στη *Drosophila* απαιτούνται για να επιβεβαιωθεί αν τελικά η πρωτεΐνη *Delta* αποτελεί στόχο ουβικουιτινιλίωσης από την πρωτεΐνη *Neur*. Δεν μπορεί να αποκλειστεί φυσικά και το ενδεχόμενο ο δεσμευτής *Delta* να μην ουβικουιτινιλιώνεται από το πολυπεπτίδιο *Neur* αλλά η αυτο-ουβικουιτινιλίωση του τελευταίου να αποτελεί το σήμα για την ενδοκύτωση του πρώτου, κάτι που είναι ήδη γνωστό ότι συμβαίνει σε ορισμένες περιπτώσεις ενδοκυττωτικών διαδικασιών (Ciechanover et al., 2000).

II) Η πρωτεΐνη *Neutralized* της *Drosophila* ενισχύει τη σηματοδοτική ικανότητα του δεσμευτή *Delta*: Διαπιστώθηκε ότι η παρουσία του δροσοφιλικού μορίου ενισχύει τη σηματοδοτική ικανότητα του δεσμευτή *Delta* προς τον υποδοχέα *Notch* κατά μη αυτόνομο τρόπο (το γονίδιο-στόχος *wingless* επάγεται στα κύτταρα που εφάπτονται σ' αυτά που εκφράζουν *DI* ή *DI+Neur* και όχι στα κύτταρα που εκφράζουν το δεσμευτή (Εικ.50B και 51Γ,Δ). Αυτή η ενίσχυση της ενεργότητας του *Delta* παρατηρήθηκε ότι συνοδεύεται με μεταβολή του υποκυτταρικού εντοπισμού του σε ενδοκυττωτικά κυστίδια και υποδηλώνει συμμετοχή της πρωτεΐνης *Neur* τόσο στην ενίσχυση της σηματοδοτικής ικανότητας του δεσμευτή όσο και στην επαγωγή της ενδοκύττωσής του.

Αυτή η ενίσχυση της σηματοδοτικής ικανότητας του *Delta* παρουσία του μορίου *Neutralized*, διαπιστωμένη ως εκτοπική ενεργοποίηση του μονοπατιού *Notch*, έρχεται σε αντίθεση με την παρατηρούμενη καταστολή της σηματοδότησης στο ραχιαιοκοιλιακό σύνορο του φτερού όταν υπερεκφράζεται μόνο το πολυπεπτίδιο *Neur* (Εικ.48B, σύγκριση με Εικ.50B). Μολονότι η πρωτεΐνη *DI* εκφράζεται ενδογενώς στη συγκεκριμένη περιοχή εντούτοις δεν ενισχύεται, όπως θα αναμενόταν, η σηματοδοτική της ικανότητα. Αυτό θα μπορούσε να αιτιολογηθεί ως αποτέλεσμα ταχύτατης ενδοκύτωσης και αποικοδόμησής της λόγω των υψηλών επιπέδων της υπερεκφραζόμενης πρωτεΐνης *Neutralized*, με συνέπεια να μην υπάρχουν ικανά επίπεδα *DI* για την ενεργοποίηση του μονοπατιού.

Προκειμένου να διερευνηθεί η συσχέτιση της επαγωγής της ενδοκύτωσης του δεσμευτή από την πρωτεΐνη *Neuralized* με την ενίσχυση της σηματοδοτικής του ικανότητας μελετήθηκε η επίδραση της απουσίας του δακτύλου *RING* από το μόριο *Neur* στη σηματοδότηση *Notch*. Είναι αξιοσημείωτο ότι δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στην επαγωγική δράση του δεσμευτή σε σχέση με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν όταν χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη *Neur* αγρίου τύπου. Η συνέκφραση του διαγονιδίου *UAS-Delta* με το διαγονίδιο που κωδικοποιούσε το μεταλλαγμένο πολυπεπτίδιο *Neur* ήταν ικανή να ενεργοποιεί εκτοπικά και μη αυτόνομα το μονοπάτι *Notch* και στα δύο διαμερίσματα του δίσκου του φτερού (Εικ.59 και 60).

Το γεγονός ότι ο δάκτυλος *RING* παίζει ρόλο στην ενδοκύτωση του δεσμευτή αλλά δεν επηρεάζει τη σηματοδοτική του ικανότητα προς τον υποδοχέα *Notch* ίσως να υποδηλώνει ότι η ενεργοποίηση του τελευταίου δεν εξαρτάται από τα ενδοκυττωτικά γεγονότα που λαμβάνουν χώρα κατά τη σηματοδότηση, σε αντίθεση με ότι υποστηρίζεται από τους *Parks et al.* (*Parks et al.*, 2000). Εντούτοις η μη ανιχνεύσιμη ενδοκύτωση του *Delta* παρουσία της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης *Neur* δεν αποκλείει την πιθανότητα της έναρξης των πρώτων σταδίων της ενδοκυττωτικής διαδικασίας όπως π.χ. ο σχηματισμός καλυμμένων με κλαθρίνη κυστιδίων, τα οποία δεν είναι ανιχνεύσιμα με μικροσκοπία φθορισμού. Μελέτες με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας θα βοηθήσουν να διαπιστωθεί αν τελικά η ενδοκύτωση της πρωτεΐνης *Delta* προαπαιτείται για την ενεργοποίηση της σηματοδότησης του μονοπατιού *Notch*. Αρχικά πειραματικά δεδομένα (αδημοσίευτα αποτελέσματα) συγκλίνουν στην τελευταία υπόθεση. Συγκεκριμένα, ο δεσμευτής προστατευόταν από τη δράση της πρωτεΐνης *K* όταν πραγματοποιήθηκαν πειράματα πέψης σε προνυμφικούς δίσκους φτερού που τον υπερέκφραζαν παρουσία και του χιμαιρικού πολυπεπτιδίου *EGFP/NeurΔRING*, ενδεχομένως λόγω έγκλισης του πρώτου σε κυστίδια κλαθρίνης που δεν είχαν την ικανότητα να αποκοπούν από τη μεμβράνη και έτσι δεν ήταν ανιχνεύσιμα με μικροσκοπία φθορισμού. Αντίθετα, όταν η πρωτεΐνη *Delta* εκφραζόταν μόνη της δεν προστατευόταν από τη δράση της πρωτεΐνης *K*. Φυσικά, απαιτούνται αρκετά πειράματα ελέγχου προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα τελευταία αποτελέσματα.

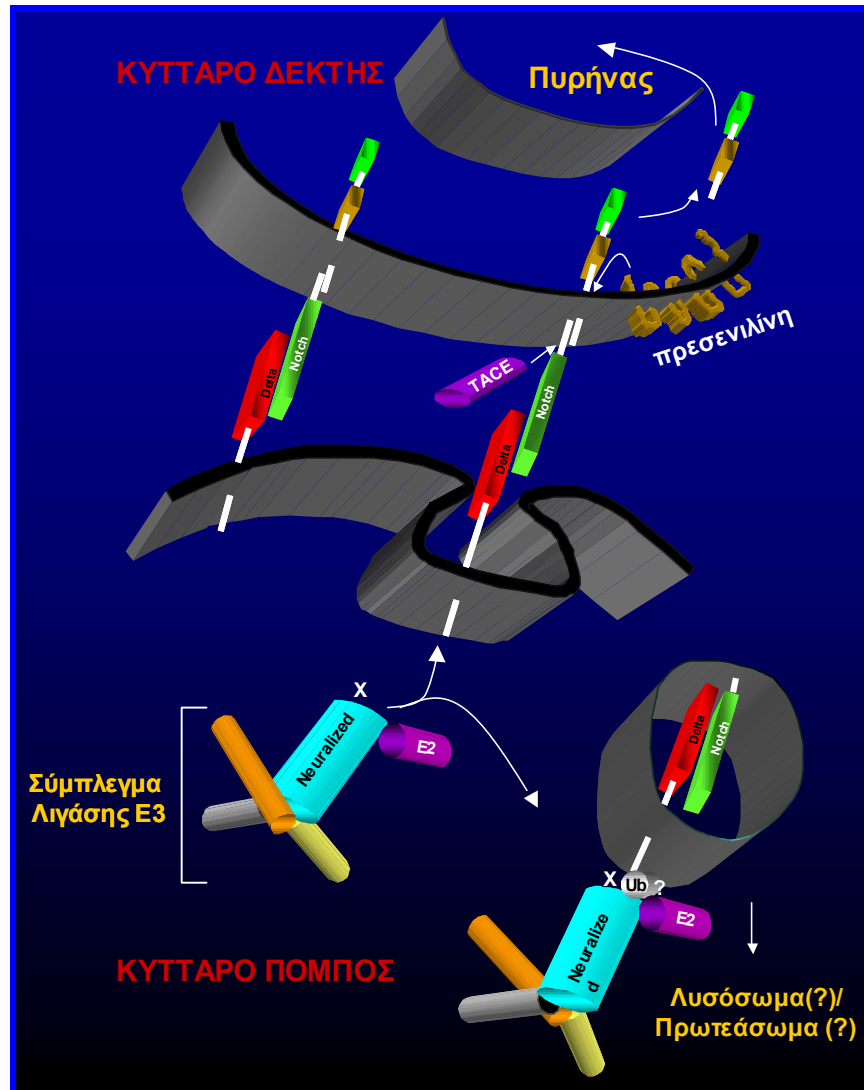
Αυτό που αξίζει να σημειωθεί είναι η παρατηρούμενη διαφορετική επίδραση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης *neur* στη σηματοδότηση *Notch*. Πιο συγκεκριμένα, το μόριο *NeurΔRING* δρα αρνητικά στη σηματοδότηση *Notch* όταν εκφράζεται μόνο του στο ραχιαιοκοιλιακό σύνορο στην περιοχή *omb* (Εικ.55A) και με οποιοδήποτε γονίδιο-στόχο και αν μελετηθεί. Αντίθετα όταν συνεκφράζεται με *Delta* δρα επαγωγικά στα όρια της περιοχής της κατευθυνόμενης έκφρασης (περιοχή *omb*) (Εικ.59). Μία υπόθεση είναι ότι η πρωτεΐνη *neurΔRING* ενισχύει τη σηματοδότηση μη αυτόνομα αλλά τη μπλοκάρει αυτόνομα (ενισχύει την εκπομπή σήματος αλλά εμποδίζει τη λήψη). Ειδικά στο ραχιαιο-

κοιλιακό όριο αυτή η κατασταλτική δράση εντοπίζεται μόνο όταν το μόριο NeurΔRING εκφράζεται στο ραχιαίο διαμέρισμα του δίσκου του φτερού (Εικ.55B-Δ). Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί ως αποτέλεσμα της παρεμπόδισης της ενδοκύτωσης της ενδογενούς πρωτεΐνης Delta ευνοώντας τα σύμπλοκα N-Dl *in cis* τα οποία εμποδίζουν τη λήψη σήματος Dl (*in trans*, δηλ. λήψη σήματος από τα κοιλιακά κύτταρα του ορίου του φτερού) αλλά όχι τη λήψη σήματος Ser (*in trans*, δηλ. σηματοδότηση από τα ραχιαία κύτταρα).

Διαπιστώνοντας τη σημαντική επίδραση της πρωτεΐνης Neutralized στη σηματοδότηση Notch και παρατηρώντας ότι το πρότυπο έκφρασής της είναι πολύ περιορισμένο συγκριτικά με εκείνο του δεσμευτή Delta και του υποδοχέα Notch το ερώτημα που τίθεται είναι γιατί δεν αποτελεί πανταχού παρόν συστατικό του συγκεκριμένου σηματοδοτικού μηχανισμού. Μία προσεκτική μελέτη οδηγεί στην παρατήρηση ότι το μόριο Neur ανιχνεύεται σε κυτταρικές ομάδες στις οποίες όλα τα κύτταρα εκφράζουν τόσο το δεσμευτή όσο και τον υποδοχέα και είναι λειτουργικά ισοδύναμα. Αντίθετα δεν εντοπίζεται έκφρασή του σε περιοχές όπως στο ωοθυλάκιο της *Drosophila* όπου δεσμευτής και υποδοχέας εκφράζονται σε διαφορετικές κυτταρικές ομάδες και η κατεύθυνση της σηματοδότησης είναι συγκεκριμένη. Ίσως τελικά η πρωτεΐνη Neutralized να είναι εκείνος ο παράγοντας που σε μία ομάδα ισοδύναμων κυττάρων, όπως τα προνευρικά κυτταρικά συναθροίσματα, ωθεί τη σηματοδότηση προς μία κατεύθυνση ενισχύοντας την επαγωγική ικανότητα του δεσμευτή που βρίσκεται στο ίδιο κύτταρο, με συνέπεια την ενισχυμένη ενεργοποίηση του υποδοχέα Notch στα γειτονικά κύτταρα-δέκτες του σήματος και με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία της ασυμμετρίας που απαιτείται για να ξεκινήσουν οι διαδικασίες διαφοροποίησης και υιοθέτησης διαφορετικής κυτταρικής τύχης.

Με βάση όλα τα παραπάνω δεδομένα και συνδυάζοντας τα αποτελέσματα των Parks et al. σχετικά με την ενδοκύτωση *in trans* της εξωκυττάριας περιοχής του πολυπεπτιδίου Notch (Parks et al., 2000), το μοντέλο που προτείνουμε για το λειτουργικό ρόλο του μορίου Neutralized της *Drosophila* είναι ότι αρχικά επάγει την συνάθροιση δεσμευτών Delta στην κυτταρική επιφάνεια και την έναρξη του σχηματισμού ενδοκυττωτικών κυστιδίων (Εικ. 63). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα ενδεχομένως τη μηχανική τροποποίηση της διαμόρφωσης της εξωκυττάριας περιοχής της πρωτεΐνης Notch με συνέπεια την εμφάνιση θέσεων πέψης από μεταλλοπρωτεάσες και τα επακόλουθα πρωτεολυτικά γεγονότα που οδηγούν στην ενεργοποίηση του υποδοχέα. Ακολούθως η εξωκυττάρια περιοχή του τελευταίου συμπαρασύρεται από το δεσμευτή *in trans* στα σχηματιζόμενα κυστίδια κλαθρίνης, στα κύτταρα πομπούς του σήματος και ακολουθεί αποκοπή των κυστιδίων η οποία φαίνεται ότι εξαρτάται επίσης από τη δράση της πρωτεΐνης Neutralized και συγκεκριμένα την παρουσία του δακτύλου RING και

διαδικασίες ουβικουιτινίωσης. Φαίνεται ότι η ενεργότητα λιγάσης ουβικουιτίνης του μορίου Neur δε χρειάζεται για την έναρξη των ενδοκυττωτικών γεγονότων που είναι ίσως υπεύθυνα για τη σηματοδότηση του υποδοχέα Notch αλλά ευθύνεται για την μετέπειτα αποκοπή των κυστιδίων κλαθρίνης από την κυτταρική επιφάνεια και την έναρξη της ενδοκυτταρικής τους μεταφοράς στο πρωτεάσωμα ή στα λυσοσώματα.



Εικόνα 63. Σχηματική αναπαράσταση του προτεινόμενου μοντέλου για τη λειτουργική δράση της πρωτεΐνης Neuralized της *Drosophila*. Η πρωτεΐνη Neuralized φαίνεται να αποτελεί συστατικό ενός υπερμοριακού συμπλέγματος λιγάσης ουβικουιτίνης με το οποίο αλληλεπιδρά και η πρωτεΐνη Delta. Ο ρόλος του μορίου Neur μάλλον είναι διπλός. Αρχικά έχει να κάνει με την έναρξη των ενδοκυττωτικών γεγονότων (δράση περιοχής NEUZ1) που θα προκαλέσουν πιθανόν μία μηχανική αλλαγή στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα Notch με αποτέλεσμα να εμφανιστεί ενδεχομένως η θέση δράσης της πρωτεάσης TACE και να ξεκινήσει η σειρά των πρωτεολυτικών γεγονότων ώστε να απελευθερωθεί το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα το οποίο θα λειτουργήσει στον πυρήνα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής γονιδίων-στόχων. Ακολούθως ο δεσμευτής Delta συμπαρασύρει την εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα Notch σε ενδοκύτωση *in trans*, στα ίδια σχηματισμένα κυστίδια των οποίων η μετέπειτα διακίνηση απαιτεί τη δράση λιγάσης E3 του Neur (δεύτερος ρόλος). Η δράση του μορίου Neuralized στις διαδικασίες ουβικουιτινίωσης είναι όπως φαίνεται διαφορετική από τη δράση του στην επαγωγή της ενεργοποίησης του υποδοχέα Notch. Δεν είναι γνωστό αν η πρωτεΐνη Neur αλληλεπιδρά απευθείας με το δεσμευτή ή μεσολαβεί κάποιος άλλος παράγοντας (X) ενώ επίσης δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί πλήρως αν συμβαίνει ουβικουιτινίωση του Delta και αν ναι αν γίνεται προσθήκη ενός ή περισσότερων μορίων ουβικουιτίνης (?).

III) Διερεύνηση της δράσης της πρωτεΐνης **Neutralized** του ποντικού στην ενίσχυση της σηματοδοτικής ικανότητας του δεσμευτή **Delta** και στην επαγωγή της ενδοκύττωσής του : Προκειμένου να διαπιστώσουμε κατά πόσο ο λειτουργικός ρόλος του μορίου **Neutralized** του ποντικού σχετίζεται με τη σηματοδοτική ικανότητα του δεσμευτή **Delta** πραγματοποιήσαμε στο σύστημα της *Drosophila* πειράματα κατευθυνόμενων συνεκφράσεων των δύο πρωτεϊνών κατά τρόπο αντίστοιχο με το δροσοφιλικό ομόλογο μόριο. Μολονότι είχε ήδη διαπιστωθεί ότι η παρουσία της πρωτεΐνης **Neur1** στο ραχαιοκοιλιακό σύνορο του δίσκου του φτερού διαταράσσει τη σηματοδότηση του μονοπατιού **Notch** (Εικ.48Γ) εντούτοις η συνέκφρασή της με το δεσμευτή δε μεταβάλλει την επαγωγική του ικανότητα (Εικ.50Γ), σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που είχαν ληφθεί από τα αντίστοιχα πειράματα με το πολυπεπτιδίο **Neur** της *Drosophila* (Εικ.50B). Όπως αναμενόταν η μη μεταβολή της σηματοδοτικής ενεργότητας του μορίου **Delta** συνοδεύεται από την παραμονή του στην κυτταρική επιφάνεια και τη μη ανίχνευση έναρξης ενδοκυττωτικών γεγονότων. Το αξιοσημείωτο είναι ότι όταν συνεκφράστηκαν τόσο ο δεσμευτής όσο και οι δύο πρωτεΐνες **Neur** και **Neur1** παρατηρήθηκε μερική παρεμπόδιση της ενδοκύττωσης του **Delta** και σημαντική συσσώρευση του στη μεμβράνη υποδηλώνοντας πιθανό ανταγωνισμό των δύο ομόλογων πολυπεπτιδίων **Neutralized** (53B,Γ). Αντίθετα δεν παρατηρήθηκε μεταβολή της επαγωγικής ικανότητας του δεσμευτή, η οποία παρέμενε σε συγκρίσιμα επίπεδα με την περίπτωση που αυτός συνεκφραζόταν παρουσία μόνο του δροσοφιλικού ομόλογου (Εικ.53A).

Πρέπει να αναφερθεί ότι τα αποτελέσματα που ελήφθησαν στη *Drosophila* ίσως να μην ήταν και τόσο αναμενόμενα αν συγκριθούν με τη συμπεριφορά του ομόλογου πολυπεπτιδίου του *Xenopus* μιας και τα δύο μόρια παρουσιάζουν πολύ υψηλά ποσοστά ομολογίας (ταυτότητα 72% και ομοιότητα 78% σε όλο το μήκος της αλληλουχίας). Οι τιμές γίνονται ακόμα υψηλότερες στην περιοχή **NEUZ1** (ταυτότητα 92% και ομοιότητα 94%) η οποία διαφαίνεται ότι είναι υπεύθυνη για το συνεντοπισμό των πρωτεϊνών **Delta** και **Neur** στο ίδιο πρωτεϊνικό σύμπλεγμα (Lai et al., 2001). Ίσως να χρειάζεται να επαναληφθούν κάποιες πειραματικές διαδικασίες κατασκευάζοντας και χρησιμοποιώντας νέα στελέχη που φέρουν το διαγονίδιο που κωδικοποιεί τη θηλαστική πρωτεΐνη, προκειμένου να ελεγχθεί και η πιθανότητα της επίδρασης της θέσης ένθεσης του διαγονιδίου **UAS-Neur1** στη μεταγραφική του ενεργότητα και κατ' επέκταση στα επίπεδα της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι δεν μπορεί να αποκλειστεί και το ενδεχόμενο της επίδρασης της πρόσθετης αλληλουχίας που ενσωματώθηκε στο αρχικό κλώνο cDNA του γονιδίου **Neur1** προκειμένου να κατασκευαστεί τεχνητό κωδικόνιο έναρξης μετάφρασης. Είναι ίσως πιθανό είτε τα πρόσθετα εννέα αμινοτελικά αμινοξέα στη θέση των τεσσάρων πρώτων ενδογενών καταλοίπων ή η απουσία και μόνο των τελευταίων να κατέστειλε τη λειτουργική δράση του μορίου χωρίς να επηρέασε την τοπολογία του. Προκειμένου να αποκλειστεί αυτό το ενδεχόμενο θα ήταν σκόπιμο στα πειράματα που θα

επαναληφθούν να χρησιμοποιηθεί διαγονίδιο που έχει απομονωθεί με αντίδραση PCR και περιέχει το πλήρες ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης. Εντούτοις οι συγκριτικές αναλύσεις όλων των ομολόγων πολυπεπτιδίων της ομάδας Neutralized δε συνηγορούν σε μία τέτοια υπόθεση αφού είναι εύκολο να παρατηρηθεί ότι το μήκος και η αμινοξική σύσταση των αλληλουχιών από την πρώτη μεθειονίνη έως την περιοχή NEUZ1 ποικίλει ανάμεσα στα μόρια ενώ η ομολογία κυμαίνεται σε χαμηλά ποσοστά και δε διαφαίνεται να υπάρχει κάποιο συντηρημένο κατάλοιπο που να εντοπίζεται στα τέσσερα αμινοξέα που λείπουν από το θηλαστικό ομόλογο. Επιπρόσθετα, δε μπορεί να αποκλειστεί η περίπτωση της απουσίας κάποιου ή κάποιων παραγόντων από το σύστημα της *Drosophila* οι οποίοι δεν απαιτούνται στην περίπτωση δράσης τόσο του ενδογενούς μορίου όσο και του ομόλογου πολυπεπτιδίου του βατράχου. Έτσι θα μπορούσε να εξηγηθεί και ο ανταγωνισμός μεταξύ των μορίων NeurI και NeurII που πιθανότατα να οφείλεται στην παρουσία του δακτύλου RING. Οι αρχικές μας παρατηρήσεις ότι η συγκεκριμένη περιοχή ευθύνεται για την αποκοπή των ενδοκυττωτικών κυστιδίων που περιέχουν το δεσμευτή και όχι για την έναρξη των ενδοκυττωτικών γεγονότων θα μπορούσε να ερμηνεύσει την μείωση, από την ανταγωνιστική παρουσία του θηλαστικού μορίου NeurI, της επαγόμενης από την πρωτεΐνη NeurI ενδοκύττωσης του Delta χωρίς να επηρεάζεται η σηματοδοτική ενεργότητα του τελευταίου. Απαιτούνται αρκετά πειράματα ακόμα για να ελεγχθεί μία τέτοια υπόθεση. Αναλύσεις western θα μπορούσαν να δείξουν αν πράγματι επηρεάζεται η ενδοκύττωση του δεσμευτή και η επακόλουθη αποικοδόμησή του.

Αξίζει να σημειωθεί ότι παρά το γεγονός ότι τα λαμβανόμενα αποτελέσματα της μελέτης του λειτουργικού ρόλου του θηλαστικού μορίου Neutralized στο σύστημα της *Drosophila* πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω, η εκτενής μελέτη και αποκάλυψη της δράσης του δροσοφιλικού πολυπεπτιδίου έχουν ήδη δώσει σημαντική πληροφορία που μπορούμε να βασιστούμε και να σχεδιάσουμε πειραματικές διαδικασίες προκειμένου να διαπιστώσουμε τη λειτουργία της πρωτεΐνης NeurI σε συστήματα θηλαστικών και όχι σε ετερόλογους οργανισμούς. Είναι πολύ πιθανόν η δράση του μορίου να είναι συντηρημένη αλλά να απαιτεί περισσότερους παράγοντες, λόγω της συμμετοχής του σε εξελικτικά πιο πολύπλοκους μηχανισμούς και της ανάγκης ρύθμισης της λειτουργίας του σε πολλαπλά επίπεδα. Ιδιαίτερα ενδιαφέροντα θα ήταν πειράματα ουβικουιτινιλίωσης *in vitro* ώστε να διαπιστωθεί αν το μόριο αποτελεί λιγάση E3 και διερεύνηση κατά πόσο κάποιο από τα θηλαστικά ομόλογα του δεσμευτή Delta αποτελούν πιθανά υποστρώματα μιας και ήδη υπάρχουν ενδείξεις συνέκφρασης σε πολυάριθμους ιστούς στους οποίους δρα ο σηματοδοτικός μηχανισμός Notch. Επιπλέον, έχουν ήδη ξεκινήσει και πειράματα με τη βοήθεια του διυβριδικού συστήματος του σακχαρομύκητα, προκειμένου να εντοπιστούν υποψήφια μόρια που αλληλεπιδρούν με το πολυπεπτίδιο NeurI καθώς και διερεύνηση της λειτουργικής σημασίας υποπεριοχών του τελευταίου στην αλληλεπίδραση με αυτά (Μαρία Κοκκινάκη). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η προσπάθεια ανοσοεντοπισμού των

δεσμευτών σε φυσιολογικά ποντίκια και στα στελέχη που πραγματοποιήθηκε καταστροφή του γονιδίου *Neurl* καθώς και η ανάλυση σε περιοχές φυσιολογικών εμβρύων και ενηλίκων ατόμων όπου παρατηρείται αλληλοεπικάλυψη μεταγραφικής ενεργότητας του γονιδίου *Neurl* και των υπό μελέτη δεσμευτών αλλά το πρότυπο έκφρασης των τελευταίων είναι ευρύτερο. Με τον τρόπο αυτό ίσως θα μπορούσε να παρατηρηθεί *in vivo* μία πιθανή μεταβολή του υποκυτταρικού εντοπισμού των δεσμευτών. Σημαντική πληροφορία θα μπορούσε να αντληθεί και από περαιτέρω βιοχημικές και γενετικές μελέτες προκειμένου να διερευνηθούν άμεσες ή έμμεσες αλληλεπιδράσεις με τους εν λόγω δεσμευτές.

5. ΣΥΝΟΨΙΖΟΝΤΑΣ

Συνοψίζοντας, σκοπό της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η απομόνωση και η διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου *Neuralized* του ποντικού στις αναπτυξιακές διαδικασίες και στο σηματοδοτικό μηχανισμό του υποδοχέα Notch. Λόγω της αμελητέας πληροφορίας που υπήρχε για το δροσοφιλικό ομόλογο γονίδιο αποφασίσαμε να μελετήσουμε ταυτόχρονα και τα δύο μόρια σε μία προσπάθεια άντλησης όσο το δυνατόν περισσότερων δεδομένων που θα βοηθούσαν σημαντικά στη διαλεύκανση της λειτουργικής δράσης του γονιδίου του ποντικού στην ανάπτυξη. Αρχικά, λοιπόν, απομονώθηκε το θηλαστικό γονίδιο *Neurl* και διαπιστώθηκε ότι εκφράζεται από τα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης σε πληθώρα, επιθηλιακών κυρίως, κυτταρικών ομάδων καθώς και στο νευρικό και το στηρικτικό σύστημα, ενώ παρατηρήθηκε ότι το πρότυπο έκφρασής του αλληλεπικαλύπτεται σημαντικά με το πρότυπο έκφρασης συστατικών του μονοπατιού Notch και συγκεκριμένα των δεσμευτών της οικογένειας DSL. Η πρωτεΐνη *Neuralized* του ποντικού έχει συντηρημένη αρχιτεκτονική δομή, αποτελούμενη από δύο ειδικές περιοχές NEUZ και ένα δάκτυλο ψευδαργύρου RING. Τόσο το θηλαστικό όσο και το δροσοφιλικό πολυπεπτιδίο εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική περιφέρεια της κυτταρικής μεμβράνης αλληλεπιδρώντας με άλλα περιφερειακά μόρια. Παρατηρήθηκε ότι για τον υποκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών είναι υπεύθυνο το αμινοτελικό τμήμα των μορίων το οποίο ξεκινά από την πρώτη μεθειονίνη και περιλαμβάνει την περιοχή NEUZ1. Μελετώντας και τις δύο πρωτεΐνες στη *Drosophila* διαπιστώθηκε ότι η παρουσία τους επηρεάζει τη σηματοδότηση Notch. Εντούτοις φαίνεται ότι η λειτουργική δράση του πολυπεπτιδίου του ποντικού εξαρτάται από περισσότερους παράγοντες, κάτι που θα διερευνηθεί εκτενώς στο μέλλον. Ακολούθησε εμπειριστατωμένη λειτουργική μελέτη της πρωτεΐνης της *Drosophila* προκειμένου να διαλευκανθεί ο λειτουργικός της ρόλος και να αντληθεί σημαντική πληροφορία στην οποία θα βασιστεί ο σχεδιασμός πειραμάτων για τη διερεύνηση του ρόλου του ομόλογου μορίου του ποντικού χρησιμοποιώντας πλέον συστήματα θηλαστικών.

Διαπιστώθηκε ότι πρωτεΐνη Neur της *Drosophila* παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην ενίσχυση της ικανότητας του δεσμευτή Delta να ενεργοποιεί τον υποδοχέα Notch όσο και στην μετέπειτα ενδοκύττωση και αποικοδόμησή του πρώτου, συμπαρασύροντας και την εξωκυττάρια περιοχή του τελευταίου. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι ο δάκτυλος RING, ο οποίος σχετίζεται με δράση λιγάσης ουβικουιίνης, είναι υπεύθυνος για την αποκοπή των ενδοκυττωτικών κυστιδίων και την επακόλουθη ενδοκυτταρική μεταφορά του δεσμευτή και του υποδοχέα. Ερευνητικές προσπάθειες από άλλες ομάδες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη Neutralized αποτελεί λιγάση ουβικουιίνης και συμμετέχει στο ίδιο πρωτεϊνικό σύμπλεγμα με την πρωτεΐνη Delta, χωρίς ακόμα να έχει διερευνηθεί εκτενώς αν υπάρχει άμεση ή έμμεση αλληλεπίδραση των δύο μορίων καθώς και αν ο δεσμευτής ενδοκυττώνεται με τη δική του ουβικουιτινιλίωση ή αν τελικά συμπαρασύρεται από κάποιον άλλο παράγοντα, με τον οποίο αλληλεπιδρά και ο οποίος αποτελεί στόχο του συμπλέγματος λιγάσης ουβικουιίνης που συμμετέχει το μόριο Neur. Η συγκεκριμένη δράση της πρωτεΐνης Neutralized φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες διαφοροποίησης λειτουργικά ισοδύναμων κυττάρων και υιοθέτησης διαφορετικής αναπτυξιακής τύχης.

Η τεράστια πληροφορία που έχει συλλεχθεί όσον αφορά τη δράση του δροσοφιλικού πολυπεπτιδίου αποτελεί σημαντική βάση για τη διερεύνηση του ρόλου της πρωτεΐνης Neur1 σε συστήματα θηλαστικών. Οι μελέτες της τελευταίας στη *Drosophila* έδωσαν ήδη αρκετή πληροφορία, η οποία φυσικά θα διερευνηθεί περαιτέρω, αλλά ίσως δεν επαρκεί αφού είναι πιθανόν η δράση της θηλαστικής πρωτεΐνης να είναι συντηρημένη αλλά δύσκολα να μπορεί να τεκμηριωθεί επαρκώς σε απλούστερα συστήματα όπως η μύγα. Αυτό είναι δυνατόν να συμβεί μιας και μπορεί να απαιτεί περισσότερους παράγοντες από ότι τα ομόλογα μόρια κατώτερων οργανισμών, έτσι ώστε να είναι δυνατή η ρύθμιση της σε πολλαπλά επίπεδα κάτι που είναι λογικό να ισχύει σε έναν εξελικτικά ανώτερο και πολυπλοκότερο οργανισμό όπως τα θηλαστικά.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K. and Fortini, M. (1995). Notch signaling. *Science* **268**, 225-232.

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. and Lake, R. J. (1999). Notch signaling : Cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-776.

Avin, H. and Leder, P. (1972). Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 1408.

Bailey, A. M. and Posakony, J. W. (1995). Suppressor of hairless directly activates transcription of enhancer of split complex genes in response to Notch receptor activity. *Genes Dev.* **9**, 2609-2622.

Baker, R. and Schubiger, G. (1996). Autonomous and nonautonomous Notch functions for embryonic muscle and epidermis development in *Drosophila*. *Development* **122**, 617-626.

Baonza, A. and Carcia-Bellido, A. (2000). Notch signaling directly controls cell proliferation in the *Drosophila* wing disc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2609-2614.

Bardos, J. I., Saurin, A. J., Tissot, C., Duprez, E. and Freemont, P. S. (2000). HPC3 is a new human polycomb orthologue that interacts and associates with RING1 and Bmi1 and has transcriptional repression properties. *J. Biol. Chem.* **275**, 28785-28792.

Bate, M., Rushton, E. and Frasch, M. (1993). A dual requirement for neurogenic genes in *Drosophila* myogenesis. *Dev. Suppl.*, 149-161.

Bettenhausen, B., deAndelis, M. H., Simon, D., Guenet, J. L. and Gossler, A. (1995). Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll1, a murine gene closely related to *Drosophila* Delta. *Development* **121**, 2407-2418.

- Bishop, S. A., Klein, T., Arias, A. M. and Couso, J. P.** (1999). Composite signalling from Serrate and Delta establishes leg segments in *Drosophila* through Notch. *Development* **126**, 2993-3003.
- Blair, S. S.** (2000). Notch signaling: Fringe really is a glycosyltransferase. *Curr. Biol.* **10**, R608-R612.
- Blaumueller, C. M., Qi, H., Zagouras, P. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1997). Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* **90**, 281-291.
- Bonifacino, J. S. and Weissman, A. M.** (1998). Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 19-57.
- Borden, K. L.** (2000). RING domains: master builders of molecular scaffolds? *J. Mol. Biol.* **295**, 1103-1112.
- Boulianne, G. L., delaConcha, A., Campos-Ortega, J. A., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1991). The *Drosophila* neurogenic gene neuralized encodes a novel protein and is expressed in precursors of larval and adult neurons. *EMBO J.* **10**, 2975-2983.
- Brand, A. H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415.
- Bray, S.** (1998). Notch signaling in *Drosophila* : three ways to use a pathway. *Dev. Biol.* **9**, 591-597.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., Cumano, A., Roux, P., Black, R. A. and Israel, A.** (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol. Cell.* **5**, 207-216.
- Bruckner, K., Perez, L., Clausen, H. and Cohen, S.** (2000). Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* **406**, 411-416.
- Burnette, W. N.** (1981). "Western Blotting" : Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195.
- Callahan, R. and Raafat, A.** (2001). Notch signaling in mammary gland tumorigenesis. *J. Mammary Gland Biol.* **1**, 23-36.
- Campos-Ortega, J. A.** (1988). Cellular interactions during early neurogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Trends Neurosci.* **11**, 400-405.
- Campos-Ortega, J. A. and Jan, Y. N.** (1991). Genetic and molecular bases of neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Neurosci.* **14**, 399-420.
- Chen, X. P., Losman, J. A. and Rothman, P.** (2000). SOCS proteins, regulators of intracellular signaling. *Immunity* **13**, 287-290.
- Chitnis, A., Henrique, D., Lewis, J., Ish-Horowicz, D. and Kintner, C.** (1995). Primary neurogenesis in *Xenopus* embryos regulated by the a homologue of the *Drosophila* neurogenic gene Delta. *Nature* **375**, 761-766.

- Chomczynski, P. and Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Church, G. and Gilbert, W.** (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1991-1995.
- Ciechanover, A., Orian, A. and Schwartz, A. L.** (2000). Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays* **22**, 442-451.
- Conlon, R. A., Reaume, A. G. and Rossant, J.** (1995). Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development* **121**, 1533-1545.
- Corbin, V., Michelson, A. M., Abmayr, S. M., Neel, V., Alcamo, E., Maniatis, T. and Young, M. W.** (1991). A role for the Drosophila neurogenic genes in mesoderm differentiation. *Cell* **67**, 311-323.
- Deblandre, G. A., Lai, E. C. and Kintner, C.** (2001). Xenopus neuralized is a ubiquitin ligase that interacts with XDelta1 and regulates Notch signaling. *Dev. Cell* **1**, 795-806.
- De Cellis, J. F. and Bray, S.** (1997). Feed-back mechanisms affecting Notch activation at the dorsoventral boundary in the Drosophila wing. *Development* **124**, 3241-3251.
- De Celis, J. F., Tyler, D. M., de Celis, J. and Bray, S. J.** (1998). Notch signalling mediates segmentation of the Drosophila leg. *Development* **125**, 4617-4626.
- De la Concha, A., Dietrich, U., Weigel, D. and Campos-Ortega, J. A.** (1988). Functional interactions of neurogenic genes of Drosophila melanogaster. *Genetics* **118**, 499-508.
- De la Pompa, J. L., Wakeham, A., Correia, K. M., Samper, E., Brown, S., Aguilera, R. J., Nakano, T., Honjo, T., Mak, T. W., Rossant, J. et al.** (1997). Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development* **124**, 1139-1148.
- Dietrich, U. and Campos-Ortega, J. A.** (1984). The expression of neurogenic loci in imaginal epidermal cells of Drosophila melanogaster. *J. Neurogenet.* **1**, 315-332.
- Di Fiore, P. P. and de Camilli, P.** (2001). Endocytosis and signaling. an inseparable partnership. *Cell* **106**, 1-4.
- Dirami, G., Ravindranath, N., Achi, M. V. and Dym, M.** (2001). Expression of Notch pathway components in spermatogonia and Sertoli cells of neonatal mice. *J. Androl.* **22**, 944-952.
- Doe, C. Q. and Goodman, C. S.** (1985). Early events in insect neurogenesis. II. The role of cell interactions and cell lineage in the determination of neuronal precursor cells. *Dev. Biol.* **111**, 206-219.
- Doherty, D., Feger, G., Yougner-Shepherd, S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1996). Delta is a ventral to dorsal signal complementary to Serrate, another Notch ligand, in Drosophila wing formation. *Genes Dev.* **10**, 421-434.
- Dunwoodie, S. L., Henrique, D., Harrison, S. M. and Bendington, R. S.** (1997). Mouse Dll3: a novel divergent Delta gene which may complement the function of other Delta

homologues during early pattern formation in the mouse embryo. *Development* **124**, 3065-3076.

Dupre, S., Volland, C. and Haguenauer-Tsapis, R. (2001). Membrane transport: ubiquitylation in endosomal sorting. *Curr. Biol.* **11**, R932-934.

Edmonds, M., Vaughn, M. H. and Nakazato, N. (1971). Polyadenilic acid sequences in the heterogeneous nuclear RNA and rapidly-labeled polyribosomal RNA of Hela cells : Possible evidence for a precursor relationship. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 1336-1341.

Fehon, R. G., Koon, P. J., Rebay, I., Regan, C. L., Xu, T., Muskavitch, M. A. and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell* **61**, 523-534.

Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13.

Fiore, P. P. D. and Camilli, P. D. (2001). Endocytosis and signaling. an inseparable partnership. *Cell* **106**, 1-4.

Fitzgerald, K. and Greenwald, I. (1995). Interchangeability of *Caenorhabditis elegans* DSL proteins and intrinsic signalling activity of their extracellular domains in vivo. *Development* **121**, 4275-4282.

Fleming, R. J. (1998). Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Semin Cell Dev Biol.* **9**, 599-607.

Fortini, M. E. and Artavanis-Tsakonas, S. (1994). The suppressor of hairless protein participates in notch receptor signaling. *Cell.* **79**, 273-282.

Freemont, P. S. (2000). RING for destruction? *Curr. Biol.* **10**, R84-R87.

Fujiki, Y., Hubbard, A. L., Fowler, S. and Lazarow, P. B. (1982 α). Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment : Applications to endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **93**, 97-102.

Fujiki, Y., Fowler, S., Shio, H., Hubbard, A. L. and Lazarow, P. B. (1982 β). Polypeptide and phospholipid composition of the membrane of rat liver peroxisomes : Comparison with endoplasmic reticulum and mitochondrial membranes. *J. Cell Biol.* **93**, 103-110.

Furukawa, T., Kobayakawa, Y., Tamura, K., Kimura, K., Kawaichi, M., Tanimura, T. and Honjo, T. (1995). Suppressor of hairless, the *Drosophila* homologue of RBP-J kappa, transactivates the neurogenic gene *E(spl)m8*. *Jpn. J. Genet.* **70**, 505-524.

Gallahan, D., Jhappan, C., Robinson, G., Hennighausen, L., Sharp, R., Kordon, E., Callahan, R., Merlino, G. and Smith, G. H. (1996). Expression of a truncated *Int3* gene in developing secretory mammary epithelium specifically retards lobular differentiation resulting in tumorigenesis. *Cancer Res.* **56**, 1775-1785.

- Gallahan, D. and Callahan, R.** (1997). The mouse mammary tumor associated gene INT3 is a unique member of the NOTCH gene family (NOTCH4). *Oncogene* **14**, 1883-1890.
- Gho, M., Bellaiche, Y. and Schweisguth, F.** (1999). Revisiting the Drosophila microchaete lineage: a novel intrinsically asymmetric cell division generates a glial cell. *Development* **126**, 3573-3584.
- Gho, M. and F.Schweisguth.** (1998). Frizzled signalling controls orientation of asymmetric sense organ precursor cell divisions in Drosophila. *Nature* **393**, 178-181.
- Ghysen, A., Dambly-Chaudiere, C., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1993). Cell interactions and gene interactions in peripheral neurogenesis. *Genes Dev.* **7**, 723-733.
- Gibbs, A. R.** (1991). Polymerase chain reaction techniques. *Cur. Opin.Biotech.* **2**, 69-75.
- Giniger, E.** (1998). A role for Abl in Notch signaling. *Neuron* **20**, 667-681.
- Go, M. J., Eastman, D. S. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1998). Cell proliferation control by Notch signaling in Drosophila development. *Development* **125**, 2031-2040.
- Graham, F. and vanderEb, A.** (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**, 456-467.
- Greenwald, I. and Rubin, G. M.** (1992). Making a difference : The role of cell-cell interactions in establishing separate identities for equivalent cells. *Cell* **68**, 271-281.
- Greenwald, I.** (1994). Structure/function studies of lin-12/Notch proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**, 556-562.
- Greenwald, I.** (1998). LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev.* **12**, 1751-1762.
- Grunstein, M. and Hogness, D.** (1975). Colony hybridization : A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 3961.
- Guo, M., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1996). Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of Numb and Notch. *Neuron* **17**, 27-41.
- Hartenstein, V. and Campos-Ortega, J. A.** (1984). *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* **193**, 308-325.
- Hartenstein, V. and Posakony, J. W.** (1989). Development of adult sensilla on the wing and notum of Drosophila melanogaster. *Development* **107**, 389-405.
- Hartenstein, V. and Posakony, J. W.** (1990). A dual function of the Notch gene in Drosophila sensillum development. *Dev Biol.* **142**, 13-30.
- Hayashi, T., Kageyama, Y., Ishizaka, K., Xia, G., Kihara, K. and Oshima, H.** (2001). Requirement of Notch 1 and its ligand jagged 2 expressions for spermatogenesis in rat and human testes. *J. Androl.* **22**, 999-1011.

- Henderson, S. T., Gao, D., Lambie, E. J. and Kimble, J.** (1994). lag-2 may encode a signaling ligand for the GLP-1 and LIN-12 receptors of *C. elegans*. *Development* **120**, 2913-2924.
- Henrique, D., Adam, J., Myat, A., Chitnis, A., Lewis, J. and Ish-Horowicz, D.** (1995). Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature* **375**, 787-790.
- Hershko, A., Ciechanover, A. and Varshavsky, A.** (2000). Basic Medical Research Award. The ubiquitin system. *Nat. Med.* **6**, 1073-1081.
- Hicke, L.** (2001). A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell* **106**, 527-530.
- Hirsch, C. and Ploegh, H. L.** (2000). Intracellular targeting of the proteasome. *Trends Cell Biol.* **10**, 268-272.
- Holland, S. J., Gale, N. W., Mbamalu, G., Yancopoulos, G. D., Henkemeyer, M. and Pawson, T.** (1996). Bidirectional signalling through the EPH-family receptor Nuk and its transmembrane ligands. *Nature* **383**, 722-725.
- Hsieh, J. J., Henkel, T., Salmon, P., Robey, E., Peterson, M. G. and Hayward, S. D.** (1996). Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. *Mol. Cell Biol.* **16**, 952-959.
- Huang, F., Dambly-Chaudiere, C. and Ghysen, A.** (1991). The emergence of sense organs in the wing disc of *Drosophila*. *Development* **111**, 1087-1095.
- Incardona, J. P., Lee, J. J., Robertson, C. P., Enga, K., Kapur, R. P. and Roelink, H.** (2000). Receptor-mediated endocytosis of soluble and membrane-tethered Sonic hedgehog by Patched-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **97**, 12044-12049.
- Innis, M., Gelfrand, D., Sninsky, J. and White, T.** (1990). PCR Protocols : A guide to methods and applications. *Academic Press, Inc.*
- Irvine, K. D. and Vogt, T. F.** (1997). Dorsal-ventral signaling in limb development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 867-876.
- Jackson, P. K., Eldridge, A. G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J. Y., Kaiser, B. K. and Reimann, J. D.** (2000). The lore of the RINGS: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.* **10**, 429-439.
- Jacobsen, H., Klenow, H. and Ovargaard-Hansen, K.** (1974). The N-terminal amino-acid sequences of DNA polymerase I from *Escherichia coli* and of the large and the small fragments obtained by a limited proteolysis. *Eur. J. Biochem.* **45**, 623.
- Jacobsen, T. L., Brennan, K., Arias, A. M. and M.A.** (1998). Cis-interactions between Delta and Notch modulate neurogenic signalling in *Drosophila*. *Development* **125**, 4531-4540.
- James, G. and Olson, E. N.** (1989). Identification of a novel fatty acylated protein that partitions between the plasma membrane and cytosol and is deacylated in response to serum and growth factor stimulation. *J. Biol. Chem.* **264**, 20998-21006.

- Jan, Y. N. and Jan, L. Y.** (1993). HLH proteins, fly neurogenesis, and vertebrate myogenesis. *Cell* **75**, 827-830.
- Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E. H., Kopan, R. and Israel, A.** (1995). Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* **377**, 355-358.
- Jen, W. C., Wettstein, D., Turner, D., Chitnis, A. and Kintner, C.** (1997). The Notch ligand, X-Delta-2, mediates segmentation of the paraxial mesoderm in *Xenopus* embryos. *Development* **124**, 1169-1178.
- Jhappan, C., Gallahan, D., Stahle, C., Chu, E., Smith, G. H., Merlino, G. and Callahan, R.** (1992). Expression of an activated Notch-related int-3 transgene interferes with cell differentiation and induces neoplastic transformation in mammary and salivary glands. *Genes Dev.* **3**, 345-355.
- Jiang, R., Lan, Y., Chapman, H. D., Shawber, C., Norton, C. R., Serreze, D. V., Weinmaster, G. and Gridley, T.** (1998). Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged2 mutant mice. *Genes Dev.* **12**, 1046-1057.
- Jimenez, G. and Ish-Horowicz, D.** (1997). A chimeric enhancer-of-split transcriptional activator drives neural development and achaete-scute expression. *Mol. Cell Biol.* **17**, 4355-4362.
- Johnson, D. A., Gautsch, J. W., Sportsman, J. R. and Elder, J. H.** (1984). Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene Anal. Tech.* **1**, 3.
- Johnston, L. A. and Edgar, B. A.** (1998). Wingless and Notch regulate cell-cycle arrest in the developing *Drosophila* wing. *Nature* **394**, 82-84.
- Jonsson, F. and Knust, E.** (1996). Distinct actions of the *Drosophila* genes Serrate and Delta revealed by ectopic expression during wing development. *Dev. Genes Evol.* **206**, 91-101.
- Joyce, C. M. and Grindley, N. D. F.** (1983). Construction of a plasmid that overproduces the large proteolytic fragment (Klenow fragment) of DNA polymerase I of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 1830.
- Kamizono, S., Hanada, T., Yasukawa, H., Minoguchi, S., Kato, R., Minoguchi, M., Hattori, K., Hatakeyama, S., Yada, M., Morita, S. et al.** (2001). The SOCS box of SOCS-1 accelerates ubiquitin-dependent proteolysis of TEL-JAK2. *J. Biol. Chem.* **276**, 12530-12538.
- Klug, K. M. and Muskavitch, M. A.** (1999). Ligand-receptor interactions and trans-endocytosis of Delta, Serrate and Notch: members of the Notch signalling pathway in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* **112**, 3289-3297.
- Kopan, R. and Turner, D. L.** (1996). The Notch pathway : democracy and aristocracy in the selection of cell fate. *Cur. Opin.Neurobiology.* **6**, 594-601.
- Krebs, D. L. and Hilton, D. J.** (2000). SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J. Cell Sci.* **113**, 2813-2819.

- Krebs, D. L. and Hilton, D. J.** (2001). Socs proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* **19**, 378-387.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680.
- Lai, E. C., Bodner, R. and Posakony, J. W.** (2000). The enhancer of split complex of *Drosophila* includes four Notch-regulated members of the bearded gene family. *Development* **127**, 3441-3455.
- Lai, E. C., Deblandre, G. A., Kintner, C. and Rubin, G. M.** (2001). *Drosophila* neuralized is a ubiquitin ligase that promotes the internalization and degradation of delta. *Dev. Cell* **1**, 783-794.
- Lai, E. C. and Rubin, G. M.** (2001). neuralized functions cell-autonomously to regulate a subset of notch-dependent processes during adult *Drosophila* development. *Dev. Biol.* **231**, 217-233.
- Lecourtois, M. and Schweisguth, F.** (1995). The neurogenic suppressor of hairless DNA-binding protein mediates the transcriptional activation of the enhancer of split complex genes triggered by Notch signaling. *Genes Dev.* **9**, 2598-2608.
- Lecourtois, M. and Schweisguth, F.** (1998). Indirect evidence for Delta-dependent intracellular processing of notch in *Drosophila* embryos. *Curr. Biol.* **18**, 771-774.
- Lehmann, R., Jimenez, F., Dietrich, U. and Campos-Ortega, J. A.** (1983). On the phenotype and development of mutants of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **192**, 62-74.
- Lieber, T., Wesley, C., Alcamo, E., Hassel, B., Krane, J. F., Campos-Ortega, J. A. and Young, M. W.** (1992). Single amino acid substitutions in EGF-like elements of Notch and Delta modify *Drosophila* development and affect cell adhesion *in vitro*. *Neuron* **9**, 847-859.
- Lindsell, C. E., Shawber, C. J., Boulter, J. and Weinmaster, G.** (1995). Jagged : A mammalian ligand that activates Notch1. *Cell* **80**, 909-917.
- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N. G. and Israel, A.** (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**, 8108-8112.
- Lorick, K. L., Jensen, J. P., Fang, S., Ong, A. M., Hatakeyama, S. and Weissman, A. M.** (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**, 11364-11369.
- Lowe, T., Sharefkin, J., Yang, S. and Dieffenbach, C.** (1990). A computer program for selection of oligonucleotide primers for polymerase chain reactions. *Nucleic Acids Res.* **18**, 1757-1761.
- Matsuno, K., Diederich, R. J., Go, M. J., Blaumueller, C. M. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1995). Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. *Development* **121**, 633-2644.

- Matsuno, K., Go, M. J., Sun, X., Eastman, D. S. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1997). Suppressor of Hairless-independent events in Notch signaling imply novel pathway elements. *Development* **124**, 4265-4273.
- Matsuno, K., Eastman, D., Mitsiades, T., Quinn, A. M., Carcanciu, M. L., Ordentlich, P., Kadesch, T. and ., S. A.-T.** (1998). Human deltex is a conserved regulator of Notch signalling. *Nat. Genet.* **19**, 74-78.
- Meinkoth, J. and Wahl, G.** (1984). Hybridization of nucleic acids immobilized in solid supports. *Anal. Biochem.* **138**, 267.
- Mello, C. C., Draper, B. W. and Priess, J. R.** (1994). The maternal genes *apx-1* and *glp-1* and establishment of dorsal-ventral polarity in the early *C. elegans* embryo. *Cell* **77**, 95-106.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M., Ding, W. et al.** (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* **266**, 66-71.
- Mitsiadis, T. A., Lardelli, M., Thesleff, I. and Lendahl, U.** (1995). Expression of Notch 1, 2 and 3 is regulated by epithelial-mesenchymal interactions and retinoic acid in the developing mouse tooth and associated with determination of ameloblast cell fate. *J. Cell. Biol.* **130**, 407-418.
- Moloney, D. J., Panin, V. M., Johnston, S. H., Chen, J., Shao, L., Wilson, R., Wang, Y., Stanley, P., Irvine, K. D., Haltiwanger, R. S. et al.** (2000). Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* **406**, 369-375.
- Moran, J. L., Levorse, J. M. and Vogt, T. F.** (1999). Limbs move beyond the radical fringe. *Nature* **399**, 742-743.
- Mullis, K. B. and Faloona, F.** (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.
- Mumm, J. S. and Kopan, R.** (2000). Notch signaling: from the outside in. *Dev. Biol.* **228**, 151-165.
- Mumm, J. S., Schroeter, E. H., MT, M. T. S., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D. J., Ray, W. J. and Kopan, R.** (2000). A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol. Cell* **5**, 197-206.
- Munro, S. and Freeman, M.** (2000). The notch signalling regulator fringe acts in the Golgi apparatus and requires the glycosyltransferase signature motif DXD. *Curr Biol.* **10**, 813-820.
- Muskavitch, M. A.** (1994). Delta-Notch signaling and Drosophila cell fate choice. *Dev. Biol.* **166**, 415-430.
- Myat, A., Henrique, D., Ish-Horowisc, D. and Lewis, J.** (1996). A chick homologue of Serrate, and its relationship with Notch and Delta homologues during central neurogenesis. *Dev. Biol.* **174**, 233-247.

- Nakamura, H., Yoshida, M., Tsuiki, H., Ito, K., Ueno, M., Nakao, M., Oka, K., Tada, M., Kochi, M., Kuratsu, J. et al.** (1998). Identification of a human homolog of the *Drosophila* neuralized gene within the 10q25.1 malignant astrocytoma deletion region. *Oncogene* **26**, 1009-1019.
- Nellesen, D. T., Lai, E. C. and Posakony, J. W.** (1999). Discrete enhancer elements mediate selective responsiveness of enhancer of split complex genes to common transcriptional activators. *Dev. Biol.* **213**, 33-53.
- Nicholson, S. E. and Hilton, D. J.** (1998). The SOCS proteins: a new family of negative regulators of signal transduction. *J. Leukoc. Biol.* **63**, 665-668.
- Nicola, N. A. and Greenhalgh, C. J.** (2000). The suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins: important feedback inhibitors of cytokine action. *Exp. Hematol.* **28**, 1105-1112.
- Nofziger, D., Miyamoto, A., Lyons, K. M. and Weinmaster, G.** (1999). Notch signaling imposes two distinct blocks in the differentiation of C2C12 myoblasts. *Development* **126**, 1689-1702.
- Nye, J. S., Kopan, R. and Axel, R.** (1994). An activated Notch suppresses neurogenesis and myogenesis but not gliogenesis in mammalian cells. *Development* **120**, 2421-2430.
- Papayannopoulos, V., Tomlinson, A., Panin, V. M., Rauskolb, C. and Irvine, K. D.** (1998). Dorsal-ventral signaling in the *Drosophila* eye. *Science* **281**, 2031-2034.
- Park, M., Yaich, L. E. and Bodmer, R.** (1998). Mesodermal cell fate decisions in *Drosophila* are under the control of the lineage genes *numb*, *Notch*, and *sanpodo*. *Mech Dev.* **75**, 117-126.
- Parks, A. L., Klueg, K. M., Stout, J. R. and Muskavitch, M. A.** (2000). Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* **127**, 1373-1385.
- Patel, N. H.** (1994). Imaging neuronal subsets and other cell types in whole-mount *Drosophila* embryos and larvae using antibody probes. *Methods Cell Biol.* **44**, 445-487.
- Pearson, H.** (2002). Surviving a knockout blow. *Nature* **415**, 8-9.
- Poodry, C. A.** (1990). *shibire*, a neurogenic mutant of *Drosophila*. *Dev. Biol.* **138**, 464-472.
- Posakony, J. W.** (1994). Nature versus nurture: asymmetric cell divisions in *Drosophila* bristle development. *Cell* **76**, 415-418.
- Price, B. D., Chang, Z., Smith, R., Bockheim, S. and Laughon, A.** (1993). The *Drosophila* neuralized gene encodes a C3HC4 zinc finger. *EMBO J.* **12**, 2411-2418.
- Rand, M. D., Grimm, L. M., Artavanis-Tsakonas, S., Patriub, V., Blacklow, S. C., Sklar, J. and Aster, J. C.** (2000). Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric notch receptors. *Mol. Cell Biol.* **20**, 1825-1835.

- Rebay, I., Fleming, R. J., Fehon, R. G., Cherbas, L., Cherbas, P. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1991). Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell* **67**, 687-699.
- Rebay, I., Fehon, R. G. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1993). Specific truncations of Drosophila Notch define dominant activated and dominant negative forms of the receptor. *Cell* **74**, 319-329.
- Ronchini, C. and Capobianco, A. J.** (2001). Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic). *Mol. Cell. Biol.* **21**, 5925-5934.
- Ruan, Y., Tecott, L., MM, M. M. J., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (2001). Ethanol hypersensitivity and olfactory discrimination defect in mice lacking a homolog of Drosophila neuralized. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**, 9907-9912.
- Ruiz-Gomez, M. and Bate, M.** (1997). Segregation of myogenic lineages in Drosophila requires numb. *Development* **124**, 4857-4866.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning : A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press second edition*.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sasai, Y., Kageyama, R., Tagawa, Y., Shigemoto, R. and Nakanishi, S.** (1992). Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to Drosophila hairy and Enhancer of split. *Genes Dev.* **6**, 2620-2634.
- Saurin, A. J., Borden, K. L., Boddy, M. N. and Freemont, P. S.** (1996). Does this have a familiar RING? *Trends Biochem. Sci.* **21**, 208-214.
- Scherer, P. E., Manning-Krieg, U. C., Jenö, P., Schatz, G. and Horst, M.** (1992). Identification of a 45-kDa protein at the protein import site of the yeast mitochondrial inner membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11930-11934.
- Scherer, P. E., Lederkremer, G. Z., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G. and Lodish, H. F.** (1996). Cab45, a novel (Ca²⁺)-binding protein localized to the Golgi lumen. *J. Cell Biol.* **133**, 257-268.
- Schroeter, E. H., Kisslinger, J. A. and Kopan, R.** (1998). Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* **393**, 382-386.
- Sestan, N., Artavanis-Tsakonas, S. and Rakic, P.** (1999). Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science* **286**, 741-746.
- Seugnet, L., Simpson, P. and Haenlin, M.** (1997). Requirement for dynamin during Notch signaling in Drosophila neurogenesis. *Dev. Biol.* **192**, 585-598.
- Shawber, C., Boulter, J., Lindsell, C. E. and Weinmaster, G.** (1996α). Jagged2 : A Serrate-like gene expressed during rat embryogenesis. *Dev. Biol.* **180**, 370-376.

- Shawber, C., Nofziger, D., Hsieh, J. J., Lindsell, C., Bogler, O., Hayward, D. and Weinmaster, G.** (1996β). Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Development* **122**, 3765-3773.
- Shou, J., Ross, S., Koeppen, H., Sauvage, F. J. d. and Gao, W. Q.** (2001). Dynamics of notch expression during murine prostate development and tumorigenesis. *Cancer Res.* **61**, 7291-7297.
- Shutter, J. R., Scully, S., Fan, W., Richards, W. G., Kitajewski, J., Deblandre, G. A., Kintner, C. R. and Stark, K. L.** (2000). Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes Dev.* **14**, 1313-1318.
- Simpson, P.** (1990). Lateral inhibition and the development of the sensory bristles of the adult peripheral nervous system of *Drosophila*. *Development* **109**, 509-519.
- Simpson, P.** (1997). Notch signalling in development: on equivalence groups and asymmetric developmental potential. *Curr Opin Genet Dev.* **4**, 537-542.
- Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Spana, E. P. and Doe, C. Q.** (1996). Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates. *Neuron* **17**, 21-26.
- Strigini, M. and Cohen, S. M.** (2000). Wingless gradient formation in the *Drosophila* wing. *Curr. Biol.* **10**, 193-300.
- Struhl, G. and Adachi, A.** (1998). Nuclear access and action of notch in vivo. *Cell* **93**, 649-660.
- Struhl, G. and Adachi, A.** (2000). Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Mol. Cell.* **6**, 625-636.
- Swiatek, P. J., Lindsell, C. E., delAmo, F. F., Weinmaster, G. and Gridley, T.** (1994). Notch1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes Dev.* **8**, 707-719.
- Tamura, K., Taniguchi, Y., Minoguchi, S., Sakai, T., Tun, T., Furukawa, T. and Honjo, T.** (1995). Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr. Biol.* **5**, 1416-1423.
- Tax, F. E., Yeagers, J. and Thomas, J. H.** (1994). Sequence of *C. elegans* lag-2 reveals a cell-signaling domain shared with Delta and Serrate of *Drosophila*. *Nature* **368**, 150-154.
- Technau, G. M. and Campos-Ortega, J. A.** (1987). Cell autonomy of expression of neurogenic genes of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **84**, 4500-4504.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350.
- Vollrath, B., Pudney, J., Asa, S., Leder, P. and Fitzgerald, K.** (2001). Isolation of a murine homologue of the *Drosophila* neuralized gene, a gene required for axonemal

integrity in spermatozoa and terminal maturation of the mammary gland. *Mol. Cell Biol.* **21**, 7481-7494.

Wahl, G. M., Stern, M. and Stark, G. R. (1979). Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 3683.

Wang, S., Sdrulla, A. D., diSibio, G., Bush, G., Nofziger, D., Hicks, C., Weinmaster, G. and Barres, B. A. (1998). Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neuron* **21**, 63-75.

Weinmaster, G. (1997). The Ins and Outs of Notch signaling. *Molec. Cell. Neurosc.* **9**, 91-102.

Xue, Y., Gao, X., Lindsell, C. E., Norton, C. R., Chang, B., Hicks, C., Gendron-Maguire, M., Rand, E. B., Weinmaster, G. and Gridley, T. (1999). Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 723-730.

Yeh, E., Zhou, L., Rudzik, N. and Boulianne, G. L. (2000). Neuralized functions cell autonomously to regulate Drosophila sense organ development. *EMBO J.* **19**, 4827-4837.

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

Zeller, R. and Duboule, D. (1997). Dorso-ventral limb polarity and origin of the ridge: on the fringe of independence? *Bioessays* **7**, 541-546.

Zhang, J. G., Metcalf, D., Rakar, S., Asimakis, M., Greenhalgh, C. J., Willson, T. A., Starr, R., Nicholson, S. E., Carter, W., Alexander, W. S. et al. (2001). The SOCS box of suppressor of cytokine signaling-1 is important for inhibition of cytokine action in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**, 13261-13265.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

neuralized Encodes a Peripheral Membrane Protein Involved in Delta Signaling and Endocytosis

Elias Pavlopoulos,^{1,2,8} Chrysoula Pitsouli,^{1,2,8}
 Kristin M. Klueg,³ Marc A.T. Muskavitch,⁴
 Nicholas K. Moschonas,^{1,2}
 and Christos Delidakis^{1,2,8}

¹Institute of Molecular Biology and Biotechnology
 Foundation for Research and Technology Hellas

²Department of Biology
 University of Crete
 711 10 Heraklion, Crete
 Greece

³Department of Biology
 Indiana University
 Bloomington, Indiana 47405

⁴Biology Department
 Boston College
 Chestnut Hill, Massachusetts 02467

Summary

Activation of the Notch (N) receptor involves an intracellular proteolytic step triggered by shedding of the extracellular N domain (N-EC) upon ligand interaction. The ligand *Delta* has been proposed to effect this N-EC shedding by transendocytosing the latter into the signal-emitting cell. We find that *Delta* endocytosis and N signaling are greatly stimulated by expression of *neuralized* (*neur*). *neur* inactivation suppresses *Delta* endocytosis, while its overexpression enhances *Delta* endocytosis and Notch-dependent signaling. We show that *neur* encodes an intracellular peripheral membrane protein. Its C-terminal RING domain is necessary for *Delta* accumulation in endosomes, but may be dispensable for *Delta* signaling. The potent modulatory effect of *Neur* on *Delta* activity makes *Neur* a candidate for establishing signaling asymmetries within cellular equivalence groups.

Introduction

Notch (N) signaling mediates a multitude of developmental processes in metazoans, most of which are related to cell fate acquisition. Although considerable progress has been made in elucidating the molecular mechanism of Notch signaling (reviewed in Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Mumm and Kopan, 2000), a number of puzzling questions remain. One concerns the spatial regulation of the signal. In *Drosophila*, the N receptor is relatively ubiquitously expressed. Its ligands, *Delta* (*Di*) and *Serrate* (*Ser*), though displaying more dynamic expression, are expressed in broad cellular ensembles (Kooch et al., 1993; Speicher et al., 1994). Only a subset of these cells receives the signal at any time, as reflected by the expression of transcriptional targets of N, such as *Enhancer of split* (*E(spl)*) or *vestigial* (*vg*). These observations raise the question of what it is that determines

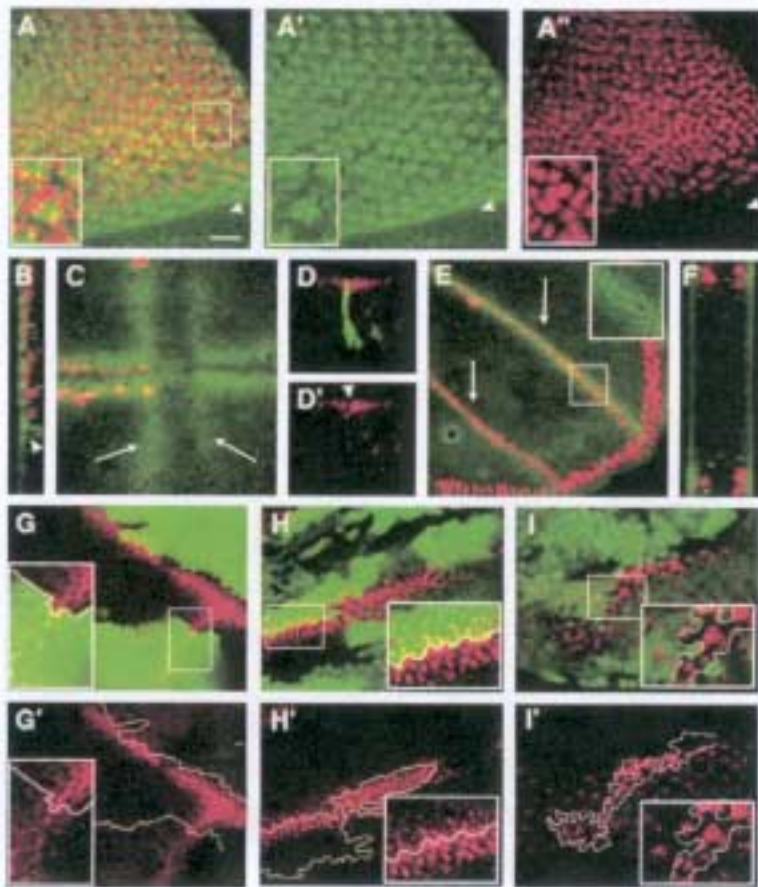
which cells send and which receive signal (Baker, 2000). In the case of wing dorso-ventral (DV) boundary establishment, this can be accounted for in part by differential glycosylation of N by *Fringe* (*Fng*; Blair, 2000) and in part by a transcriptional threshold imposed on N target genes by the repressor *Nubbin* (Neumann and Cohen, 1996). In the case of lateral inhibition, it has been proposed that nascent neural/vein precursors upregulate *Delta* transcription while repressing N and vice versa for their neighbors, making the former better signal emitters and the latter better signal receivers (Hoitzler and Simpson, 1991). This reciprocal transcriptional regulation has been experimentally substantiated in the case of vein lateral inhibition (de Celis et al., 1997; Huppert et al., 1997), but not in proneural fields, where *Delta* and N are simultaneously downregulated in the signal-emitting cell (Baker and Yu, 1998; Fehon et al., 1991; Koch et al., 1993).

A second puzzling question regards the actual mechanism of N activation by its ligands. It has recently been shown that a crucial extracellular event during N activation is proteolysis close to the cell membrane followed by shedding of the large N extracellular domain (Brou et al., 2000; Rand et al., 2000; Struhl and Adachi, 2000). Ligand binding should somehow precipitate these events, but the mechanism remains unclear. A possible way to achieve ectodomain shedding has been proposed by Parks et al. (2000), who showed that *Delta* can trigger transendocytosis of the N-EC, but not the N intracellular (N-IC), domain. Indeed, the role of endocytosis in N signaling has remained something of a mystery. A mutation in *shibire* (*sh*), the gene encoding the GTPase dynamin, which mediates pinching off of coated pits, phenocopies N mutations (Poodry, 1990). However, mosaic analysis has not been able to pinpoint whether *sh* is needed in the sending or the receiving cell; it seems to be required in both (Seugnet et al., 1997). This possibly reflects the pleiotropic roles of dynamin in membrane reorganization processes, including secretion from the Golgi (McNiven et al., 2000). From genetic studies it appears that *sh* is not required for the constitutive activity of dominant N truncations that lack the ectodomain, even if they are membrane tethered (Seugnet et al., 1997; Struhl and Adachi, 2000). This places the role of dynamin-mediated processes (including endocytosis) upstream of or during N extracellular cleavage and ectodomain shedding.

Our analysis of *neuralized* (*neur*), a classic Notch pathway ("neurogenic") gene, has revealed that it stimulates *Delta* endocytosis. *neur* loss-of-function (*lof*) blocks Notch signaling during lateral inhibition and produces embryonic lethality with the same neurogenic phenotype as N *lof* mutations (Lehman et al., 1983). *neur* encodes a membrane-associated protein with two novel internal repeats and a C-terminal RING domain (Lai and Rubin, 2001; Price et al., 1993). We show that *Neur* can cause dramatic relocalization of *Delta* from the cell membrane to intracellular vesicles and concomitantly enhance *Delta* signaling to N. We discuss how *Neur* activity, coupled

⁸Correspondence: delidakis@imbb.forth.gr

⁸These authors contributed equally to this work.



(G) Thirty hour APF veins; *neur*⁺ clone. Di exhibits membrane localization in the mutant tissue.

(H) Thirty hour APF veins; *E(sp)*^{mut} clones. Di is still internalized in the mutant tissue. Note also increased Di expression, presumably due to relief of repression by *E(sp)*.

(I) Third instar eye disk; *neur* clones. As in (G), Di is distinctly pericellular within the clone.

The scale bars indicate 10 μ m in (A-D) and (F), 20 μ m in (E), and 14 μ m in (G-I).

Insets show corresponding boxed regions at twice the magnification.

with its documented preferential expression in signal-emitting cells (Boulianne et al., 1993; Huang et al., 1991), might generate asymmetries in N signaling.

Results

Neur Influences Di Subcellular Localization

Di, a transmembrane ligand of N, is found either on the apical side of the cell membrane or in more basally located intracellular particles that appear to be endocytic vesicles (Kooch et al., 1993). We noticed that increased Di internalization occurs in tissues that express *neur*, such as the invaginating embryonic mesoderm (Kooch et al., 1993). We found that this correlation holds in many tissues. In the third instar larval eye disk, *neur* is expressed in differentiating cells posterior to the furrow, in which Di accumulates in a number of large punctate structures (Parks et al., 1995; Figures 1A and 1B). In contrast, most third instar wing disk cells do not express *neur*, and Di displays a pronounced pericellular distribution with little intracellular staining (Figure 1C). The only wing disk cells that express *neur* are the sensory organ precursors (SOPs), which exhibit little or no

Figure 1. *neur* Is Required for Di Endocytosis (A-C, E, and F) Di accumulation (green) in *Neur*-expressing cells (red, nuclear β -galactosidase from *neur*^{+/+}-lacZ) in eye and wing disks.

(C) Di accumulation (red) in SOPs (green cytoplasmic EGFP from *neur*-Gal4/UAS-EGFP). (A and B) Third instar eye disk [(A), posterior upward] and its corresponding cross-section [(B), apical left] display vesicular accumulation of Di. Di only (A'); β -galactosidase (*neur*^{+/+}-lacZ) only (A'). The arrowhead indicates morphogenetic furrow.

(C) Third instar wt wing disk (anterior at left, dorsal upward). Di is pericellular both in the wing margin (anterior half marked by *neur*^{+/+}-lacZ-positive SOPs) and in the vein primordia (arrows).

(D) Cross-section of third instar wing margin; apical is up. The apical aspect of the most intensely labeled SOP exhibits reduced Di (red) accumulation, more clearly evident as a gap (arrowhead) in D' (red channel only).

(E) Thirty hour APF pupal wing. *neur*^{+/+}-lacZ marks the wing margin and the veins. At this stage, there is no Di immunoreactivity at the wing margin, but veins (arrows) contain vesicular Di. Inset: green channel only of boxed region at twice the magnification.

(F) The cross-section corresponding to (E) reveals vesicular Di accumulation and the absence of apical Di. Unlike the monolayer epithelium shown in (B), the pupal wing consists of two layers: the apposed dorsal and ventral wing blade epithelia. Apical sides are outward. (G-I) Di accumulation (red, shown separately in [G']-[I']) in mutant tissues, identified by the absence of β -galactosidase (green in [G]) or GFP (green in [H] and [I]).

apical membrane Di (Kooch et al., 1993), and instead contain a number of intracellular puncta (Figure 1D). Di is also expressed in the wing veins. In the third larval instar as well as during early pupal stages, vein cells do not express *neur* and exhibit pericellular Di (Figure 1C). From about 24 hr after puparium formation (APF), central vein cells express *neur*^{+/+}-lacZ, and at the same time Di protein distribution switches to a vesicular pattern (Figures 1E and 1F; Huppert et al., 1997).

To determine whether this correlation between *neur* expression and Di internalization was causal, we assayed the localization of Di in a *neur* lof genetic background. *neur*⁺ clones were analyzed in late larval eyes and late pupal wings (30 hr APF), tissues in which Di is normally seen exclusively in internalized vesicles. Mutant cells displayed increased apical pericellular Di (Figures 1G and 1I) with only residual intracellular staining, suggesting a defect in internalization. As a control, we studied clones of a deficiency for the *E(sp)* locus, which is involved in lateral inhibition but acts downstream of the N signal. Unlike their *neur*⁺ counterparts, late pupal prolegs bearing *E(sp)* null clones still internalized Di and displayed no pericellular immunoreactivity (Figure

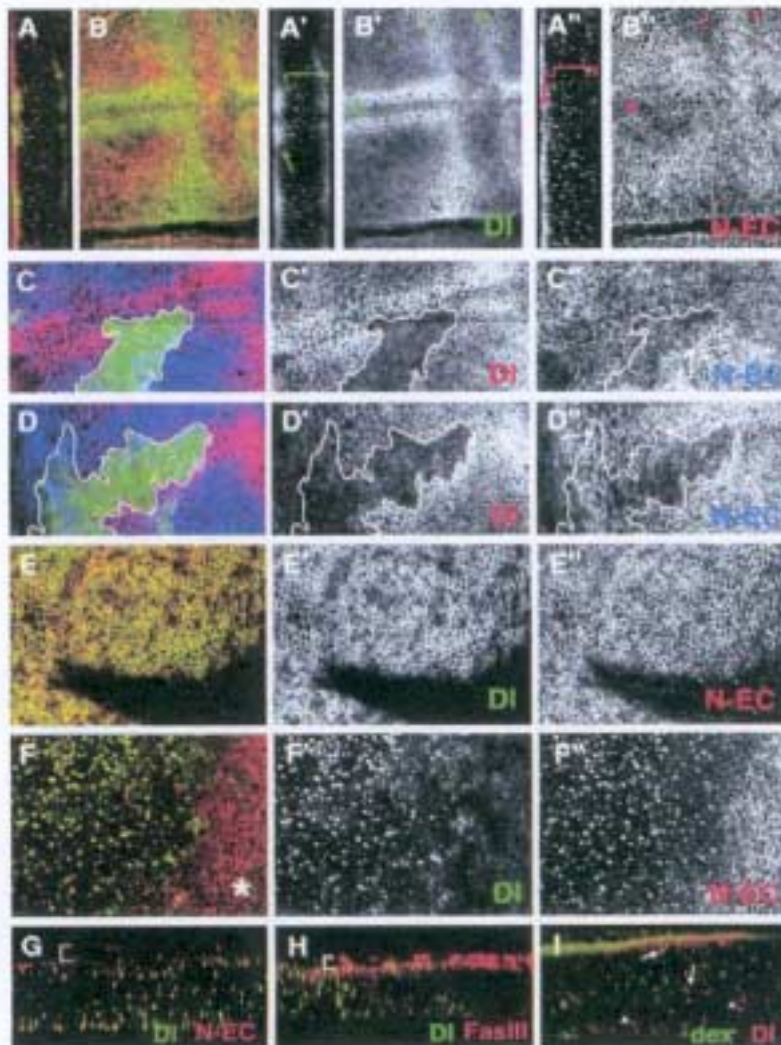


Figure 2. Ectopic Neur Stimulates DI Internalization

(A and B) Di (green, shown separately in [A'] and [B']) and N-EC (red, shown separately in [A''] and [B'']) accumulation in a wt wing disk.

(A) Cross-section through the DV boundary (middle) and an adjacent vein (lower; apical is to the left. N and DI both exhibit apical localization (arrows in [A'] and [A'']), as well as accumulation in internalized vesicles (brackets in [A'] and [A'']). Within regions of DI expression, N and DI colocalize in the apical cell membrane and in vesicles (yellow vesicles in [A]).

(B) Horizontal section, showing the expression pattern of DI and N. Note lower levels of N at DV boundary (large arrowhead) and provens (small arrowheads), due to transcriptional regulation.

(C and D) DI (red, shown separately in [C'] and [D']) and N-EC (blue, shown separately in [C''] and [D'']) in FLP-out clones of neur overexpression, marked by GFP (green). Neur overexpression overlapping a DI stripe at the wing margin (C) or proven (D) stimulates DI and N-EC internalization (seen in these apical slices as loss of apical pericellular staining). However, N pericellular accumulation is not altered in parts of the clones that do not overlap with DI stripes (arrows in [C''] and [D'']).

(E) Detail of an *omb-Gal4; UAS-Di* wing pouch. Both ectopic DI (green, [E']) and endogenous N-EC (red, [E'']) accumulate on the apical plasma membrane.

(F) Detail of an *omb-Gal4; UAS-Di UAS-neur* wing pouch. DI (green, [F']) and N-EC (red, [F'']) colocalize in intracellular vesicles (yellow in [F']) and are absent from the plasma membrane. For comparison, cells outside the *omb-Gal4* expression domain (*satishk*) contain membrane N (and no DI).

(G) Cross-section of an *omb-Gal4; UAS-Di UAS-neur* disk (apical at top), stained as in (E) and (F). The bracket indicates the extent of the peripodial membrane which lies above the disk epithelium and expresses N, but no

DI. For the most part N and DI colocalize within large vesicles along the apical-basal axis of the epithelium (yellow).

(H) Cross-section of an *omb-Gal4; UAS-Di UAS-neur* wing pouch stained for DI (green) and FasIII (red). FasIII is ubiquitously expressed and marks a subapical domain on both the peripodial membrane (brackets) and the epithelium. Internalized DI vesicles within the *omb-Gal4* domain (left half) do not contain FasIII, implying that Neur does not stimulate FasIII internalization.

(I) Cross-section of an *omb-Gal4; UAS-Di UAS-neur* wing pouch that has been incubated with fluorescein-dextran (green) to mark early endocytic vesicles, and stained for DI (red). Many of the DI vesicles are marked with fluorescein-dextran (some indicated by arrows), suggestive of endocytic provenance. Other DI vesicles are dextran-negative (arrowheads); these more basally located structures do label with fluorescein-dextran after a 30–60 min chase (data not shown), suggesting that they belong to a later endosomal compartment.

1H). Similar effects on DI subcellular localization were observed in *neur*¹ embryos (data not shown). It therefore appears that *neur* lof blocks DI internalization.

If Neur is needed to stimulate DI internalization, then ectopic expression of *neur* might induce DI relocation in tissues in which it normally resides on the plasma membrane, such as the wing disk (Figures 1C, 2A, and 2B). Indeed, ectopically expressing a *UAS-neur* transgene at uniform levels in clones of larval wing disk cells (using the FLP-out technique; see Experimental Procedures) resulted in DI internalization (Figures 2C and 2D). The apparent loss of pericellular DI was not transcriptional because *UAS-neur* had no effect on a *Di-lacZ* reporter (data not shown), while it induced DI internalization even when *Di* was ectopically coexpressed (Figures 2E and 2F).

While *UAS-Di* expression alone targeted the protein to the apical plasma membrane, virtually no DI immunoreactivity remained apical when *UAS-neur* was coexpressed. Instead, DI relocated to a multitude of vesicles found at various levels along the apical-basal axis (Figures 2F and 2G; see Supplemental Figure S1 [complementing Figure 2] at <http://www.developmentalcell.com/cgi/content/full/11/6/807/DC1>). That these belong to the endocytic compartment was confirmed by marking the latter with fluorescent dextran; dextran and DI immunoreactivity colocalized in early (Figure 2I) and late endosomes. Localization of Fasciclin III, an apical transmembrane protein that does not participate in N signaling, did not change upon *neur* overexpression (Figure 2H).

In regions within which *Di* and *N* are expressed, *neur*

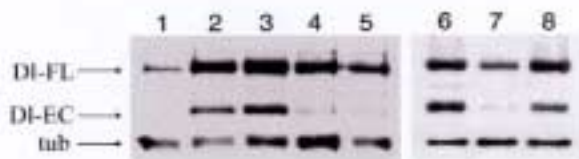


Figure 3. *neur* Expression Downregulates DI Protein Levels in Wing Disks

Wing disk extracts were analyzed by Western blot for DI protein and for β -tubulin (*tub*) as a loading control. DI-FL and DI-EC are the full-length and extracellular cleavage product, respectively. Lanes 1–5 are from one experiment and lanes 6–8 from another. Lane 1: wt; lanes 2 and 3: *omb-Gal4*; *UAS-DI UAS-GFP*; lanes 4, 5, and 7: *omb-Gal4*; *UAS-DI UAS-neur*; lane 6: *omb-Gal4*; *UAS-DI*; lane 8: *omb-Gal4*; *UAS-DI UAS-neur Δ RING-GFP*.

expression induced DI-N-EC cointernalization, consistent with formation of a DI-N-EC complex (Figures 2C and 2D). In regions within which *N* alone is expressed, *neur* expression did not affect N-EC subcellular localization (arrows in Figures 2C and 2D), suggesting that DI-N cointernalization in the former regions does not reflect a direct effect of *neur* on N. As observed for DI, the effect of *neur* on N is posttranscriptional because *UAS-neur* expression did not affect expression of an *N-lacZ* enhancer trap (data not shown). In wild-type wing disks and in disks expressing *UAS-DI* alone, the few internalized DI vesicles observed were positive for N-EC, while most N-EC immunoreactivity was at the membrane (where DI also resides) and in additional DI-negative vesicles (Figure 2A). In contrast, coexpression of *DI* and *neur* led to substantial internalization of endogenous N, with most N-EC immunoreactivity found colocalizing with the DI vesicles (Figure 2G; Supplemental Figure S1).

Neur Activity Decreases DI Protein Levels Posttranscriptionally

As *neur* appears to stimulate internalization of DI and N, we asked whether this might be accompanied by a change in the overall levels or the pattern of proteolytic processing of either protein. DI exists in two major isoforms, a full-length and an extracellularly cleaved one (Klug et al., 1996; Qi et al., 1999). In protein extracts of late larval wing disks, the full-length DI isoform predominated, with cleaved DI present at roughly 10-fold lower levels than full-length. The effect of *neur* was studied using *omb-Gal4* (broad wing pouch pattern) to overexpress *UAS-DI* with either a neutral second transgene, *UAS-GFP* (to keep the total dosage of *UAS* targets constant), or with *UAS-neur*. As *DI* is expressed from a heterologous promoter in these experiments, the effects observed must be posttranscriptional. Comparing *DI+neur* with *DI+GFP* expression revealed lower amounts of both DI isoforms (Figure 3) in the former case. From densitometry analysis, we concluded that the total DI levels were reduced by about 3-fold upon *DI+neur* coexpression. Furthermore, whereas cleaved DI accounted for about a third of the total DI protein in control *omb-Gal4*; *UAS-DI UAS-GFP* disks, its abundance dropped sharply upon coexpression of *neur*, to account for only one-tenth of the total DI protein. This implies that *neur* posttranscriptionally downregulates the levels of DI, especially of the cleaved isoform. This probably reflects

increased turnover of DI after internalization. The same samples of wing disks were analyzed for the presence of N isoforms using two antibodies, one against an extracellular and one against an intracellular epitope. No major changes in N levels were observed when *neur* was expressed (data not shown).

Neur Activity Stimulates DI-N Signaling

Given the dramatic effect of *neur* on DI levels and subcellular localization, we decided to study its effect on the ability of DI to signal. This can best be assayed in the larval wing pouch, where N signaling is known to induce a number of target genes including *vg*, *wingless* (*wg*), *cut* (*cf*), and *E(spl)* (Doherty et al., 1996). Furthermore, Notch is differentially glycosylated in the ventral versus dorsal wing compartments, making it preferentially responsive to DI dorsally and preferentially responsive to Ser ventrally (Blair, 2000). We expressed *UAS-DI* together with *UAS-GFP* (control) or with *UAS-neur* in *act>>Gal4* FLP-out clones and monitored expression of the downstream target gene product *Wg* (Figures 4A and 4B). The *DI+GFP* combination gave the expected result, namely *Wg* expression induced in cells adjacent to clone borders in a nonautonomous fashion. Only cells adjacent to dorsal clones showed *Wg* expression, with the magnitude of induction gradually dropping with increased distance from the DV boundary. In contrast, coexpression of *DI* with *neur* resulted in intense nonautonomous *Wg* induction adjacent to all wing pouch clones, regardless of compartment or distance from the DV boundary, suggesting that DI signaling had been intensified to overcome compartmental limitations. Similar results were obtained when *DI (+GFP or +neur)* was overexpressed under *omb-Gal4* control and various Notch target genes were assayed, such as *ct*, *E(spl)*, *vgBE-lacZ* (the DV boundary-specific enhancer of *vg*), and *wg* (Figures 4C and 4D; Supplemental Figures S2 and S3 [complementing Figure 4]; data not shown). In these experiments, we observed that, in addition to overcoming compartmental limitations, some *Wg* expression occurred within the *omb-Gal4* (*DI*) expression domain. As the inability of a cell to receive DI signal depends on its endogenous level of DI expression (Doherty et al., 1996; Jacobsen et al., 1998), the autonomous *Wg* activation observed within the *DI+neur* expression domain is probably due to the dramatic lowering of DI protein levels in those cells.

neur Exhibits Non-Cell-Autonomous Function during Lateral Inhibition

Given that *neur* enhances DI signaling capacity, it is not surprising that loss of *neur* compromises the process of lateral inhibition (Lehman et al., 1983). Because the direct effects we observe are on the ligand rather than the receptor of the N signal, we would predict that the defect in lateral inhibition would be non-cell autonomous; however, recent reports have suggested an autonomous role for *neur* (Lai and Rubin, 2001; Yeh et al., 2000). To address this apparent discrepancy, we examined the effects of *neur* *lof* clones on development of the chemosensory SOPs of the larval wing margin, which arise in a regularly spaced pattern from two contiguous proneural clusters during the third larval instar.

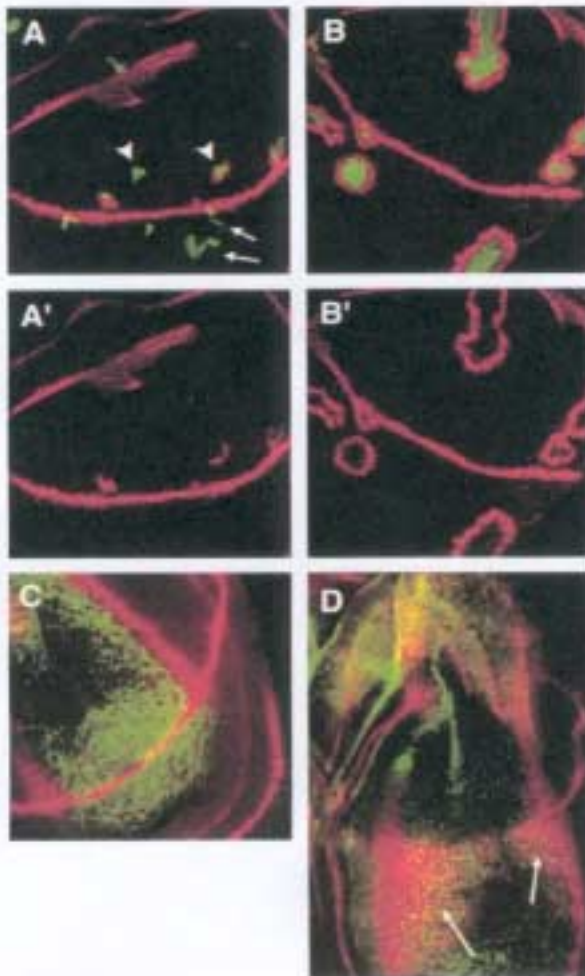


Figure 4. Effects of *neur* Overexpression on N Signaling

(A and B) Wing pouch FLP-out clones expressing *Df* (A) or *Df+neur* (B) are stained for Wg (red) as a read-out of N activity. GFP marks the clones.

(A) Ventral clones (arrows) or dorsal clones away from the DV boundary (arrowheads) do not turn on Wg, or do so only around part of the clone.

(B) In contrast, Wg is turned on by all *Df+neur*-expressing clones. The same increase in Wg expression was observed upon coexpression of *Df+neur* without GFP, showing that it is not an artifact due to UAS dosage.

(A' and B') Wg channel only.

(C) *omb-Gal4; UAS-Df UAS-GFP* wing disk stained for Wg (red) and Df (green).

(D) *omb-Gal4; UAS-Df UAS-neur* wing disk stained as in (C). Here the Df staining is faint and dispersed due to increased internalization. Note that whereas in (C) there is no overlap between Df and Wg, in (D) there is substantial overlap in the V compartment (arrows). Also note the increased overgrowth: (D) is at 67% the magnification of (A–C).

We were able to focus on lateral inhibition because loss of *neur* does not affect wing margin establishment (Lai and Rubin, 2001; our unpublished observations). The *E(spl)* genes are direct transcriptional targets of N signaling during lateral inhibition. Using the mAb323, which detects five of the *E(spl)* bHLH proteins (Jennings et al.,

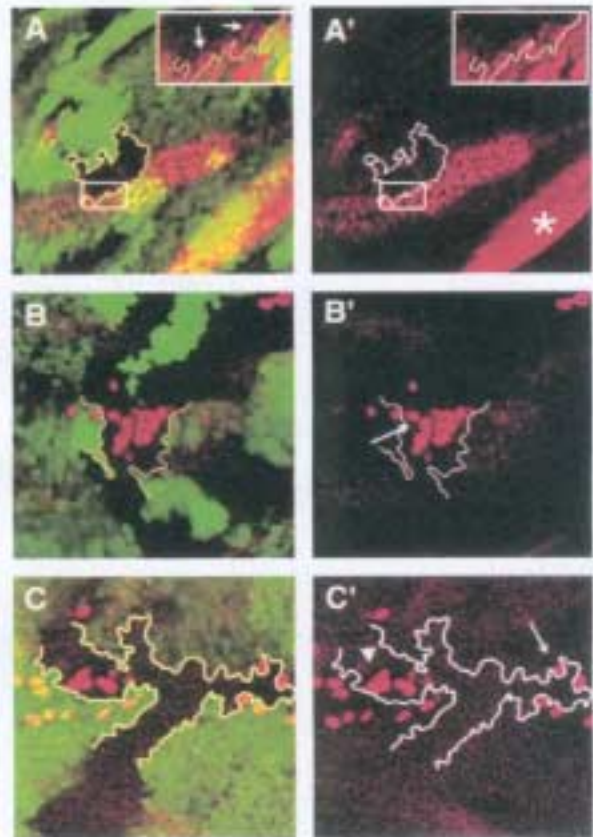


Figure 5. *neur⁻* Affects Lateral Inhibition Nonautonomously

Mutant clones are analyzed in the third instar anterior wing margin; clones are marked by the absence of GFP (green).

(A) *neur⁻* clone stained for *E(spl)* proteins (red, shown separately in [A']), as a read-out of N signaling. Although overall *E(spl)* protein accumulation is lost within the clone (outlined), mutant cells immediately adjacent to the clone boundary within the region of neural competence do express *E(spl)*. Inset shows higher magnification of boxed region; arrows point to some *neur⁻* cells that express *E(spl)*. The asterisk indicates background staining.

(B and C) SOPs are visualized using anti-*Asa* (red, shown separately in [B'] and [C']).

(B) A *neur⁻* clone that straddles the DV boundary is shown. Mutant cells immediately adjacent to the clone boundary can be inhibited from adopting the SOP fate, as they do not turn on *Asa* (arrow).

(C) *Df^{+/+}* clone stained for *Asa*; where the clone crosses the boundary, no SOPs are seen, as the wing margin organization is disrupted. However, when the clone is only in the dorsal compartment, overcommitment of SOPs is seen (arrowhead), as in a *neur⁻* clone (B). In one part of the clone (arrow), the surrounding wt SOPs have completely inhibited SOP generation by the *Df⁻* cells (nonautonomy). Elsewhere, a mutant SOP (arrowhead) is adjacent to wild-type non-SOP territory, an apparently autonomous arrangement. In all panels, anterior is left and dorsal is up.

1994), we observed overall loss of *E(spl)* within *neur⁻* clones (Figure 5A), in agreement with a defect in lateral inhibition. Still, *E(spl)* expression was detected in *neur⁻* cells, when the latter were adjacent to wild-type (wt) cells (Figure 5A). This implies that *neur⁻* cells are not defective in receiving signals sent by wt cells.

To further investigate the ability of *neur⁻* cells to receive N signal, we scored the disposition of SOPs (detected by *Asense* immunoreactivity; Brand et al., 1993)

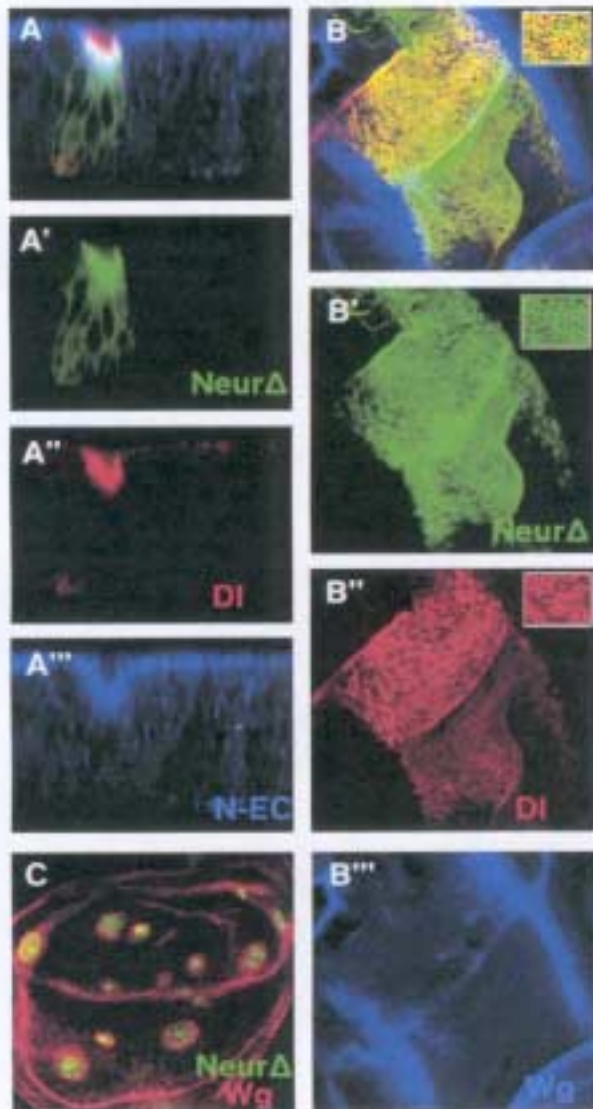


Figure 6. Effects of Neur Δ RING on DI Localization and Signaling
 (A) FLP-out clone of UAS-*Df* UAS-*neur* Δ RING-GFP seen in cross-section (green, GFP; red, DI; blue, N-EC; shown separately in [A'], [A''], and [A''']), respectively). All three proteins accumulate at the apical plasma membrane, with Neur Δ RING-GFP showing some additional cytoplasmic localization (A').
 (B) *omb-Gal4*; UAS-*Df* UAS-*neur* Δ RING-GFP third instar wing disk stained for DI (red, [B'']) and Wg (blue, [B''']). Neur Δ RING-GFP (B'). N signaling is stimulated, as Wg expression (blue, [B''']) is induced in the ventral compartment (cf. Figure 4C). This induction is more spatially restricted than that caused by wt *Neur* (cf. Figure 4D).
 (C) *ac1>>Gal4*; UAS-*Df* UAS-*neur* Δ RING-GFP FLP-out clones stained for Wg (red). Wg induction is induced (nonautonomously) in both dorsal and ventral compartments (cf. Figures 4A and 4B).

relative to clone borders. If loss of *neur* affected signal sending rather than receiving, we would expect to encounter *neur*⁻ cells that are inhibited, that is, do not become SOPs, next to wt SOPs at clone borders. This nonautonomous arrangement was observed in 24 cases (60% of the clone borders scored; Figure 5B), whereas

the converse "autonomous" arrangement (wt non-SOP next to *neur* SOP) was observed in only seven cases (18%). The remaining nine clone borders (23%) showed adjacent wt and *neur*⁻ SOPs. These could be interpreted either as inability of the *neur*⁻ SOP to send signal (thereby not inhibiting its neighboring wt cell) or its inability to receive signal (thereby not becoming laterally inhibited by the neighboring wt SOP). Scoring of *Df*⁻ clone borders (Figure 5C), as a bona fide non-cell-autonomous control, yielded a predominance of the nonautonomous arrangement in agreement with Heitzler and Simpson (1991): 29 wt SOPs next to *Df*⁻ non-SOPs (83% nonautonomous) versus five *Df*⁻ SOPs next to wt non-SOPs (14% autonomous), and almost no pairs of wt mutant SOPs at the border (one case; 3%). *N*⁻ clones, by contrast, produced the autonomous arrangement in 98% of clone borders (Heitzler and Simpson, 1991). Thus, *neur*⁻ clones behave more like *Df*⁻ clones than like *N*⁻ clones, arguing for a nonautonomous action of *Neur*. The somewhat lower incidence of nonautonomy in *neur*⁻ clones compared to *Df*⁻ clones may be due to an early bias of *Df*⁻ cells to become inhibited by their wt neighbors (Heitzler and Simpson, 1991). As this bias probably arises before onset of *neur* expression in the nascent SOP, it cannot be expected to occur in *neur*⁻ clones.

The *Neur* RING Domain Is Required for DI Internalization but Is Dispensable for DI Signaling

Although the biochemical function of *Neur* remains to be elucidated, the protein contains a RING domain, which has been associated with E3 ubiquitin ligase activity in other proteins (Freemont, 2000). Because ubiquitination is known to regulate endocytic events (Di Fiore and De Camilli, 2001), we asked whether a mutant lacking the RING would be defective in stimulating DI internalization. We substituted the RING domain with a GFP moiety, in order to additionally monitor the localization of the protein. The tagged mutant protein accumulated at the apical plasma membrane (Figures 6A and 6B), which is where wt *Neur* has been reported to localize (Lai and Rubin, 2001; Yeh et al., 2000). This suggests that the RING is dispensable for membrane localization.

Despite the correct subcellular localization of Neur Δ RING-GFP, its coexpression with UAS-*Df* resulted in retention of DI at the apical membrane, comparable to that observed when expressing UAS-*Df* alone (Figures 6A and 6B). The RING domain is, therefore, required for DI internalization. The lack of internalization was accompanied by lack of turnover. Coexpression of *Df* and *neur* Δ RING-GFP led to accumulation of the full-length DI isoform to a level comparable to that associated with expression of *Df* alone, whereas accumulation of the cleaved isoform was reduced by about 50% (Figure 3). We next assessed Wg expression to determine the extent to which the mutant *Neur* was able to stimulate DI signaling. To our surprise, coexpression of DI with Neur Δ RING-GFP was still able to stimulate Wg expression in both compartments of the wing in a nonautonomous fashion (Figures 6B and 6C; Supplemental Figure S4 [complementing Figure 6]). The only difference between wt *Neur* and Neur Δ RING-GFP in this assay was

Neur Stimulates DI Signaling and Endocytosis
813

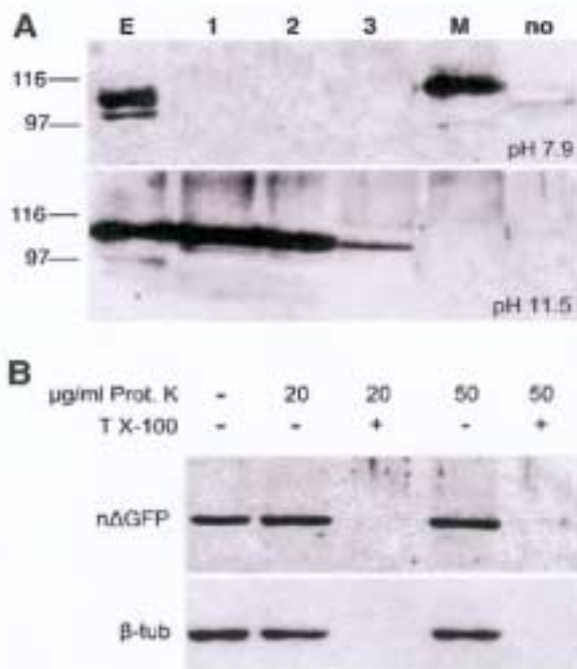


Figure 7. NeurΔRING-GFP is an Intracellular Peripheral Membrane Protein

(A) Subcellular fractionation of *hs-Gal4; UAS-neurΔRING-GFP* larvae was performed after lysis in a hypotonic buffer (top panel) or by high pH (bottom panel). GFP is visualized by immunoblotting. Lane E: crude extract; lanes 1, 2, and 3: soluble fractions after successive washes; lane M: insoluble "membrane" fraction; lane no: no heat shock control crude extract.

(B) NeurΔRING-GFP is protected from proteinase K digestion in intact tissue. Total extracts of *omb-Gal4; UAS-neurΔRING-GFP* wing disks. Each sample was treated as indicated before lysis. Western blot with anti-GFP antibody (top panel) or with anti-β-tubulin antibody (bottom panel).

the inability of the latter to overcome the cis-dominant-negative effect of DI, when expressed under *omb-Gal4* (compare Figure 6B with Figure 4D).

NeurΔRING-GFP Is an Intracellular Peripheral Membrane Protein

As the Neur sequence does not contain any obvious signal peptide or transmembrane domain, we undertook a biochemical approach to determine the type of association Neur might have with the membrane. Extracts from larvae ubiquitously expressing *UAS-neurΔRING-GFP* were fractionated by ultracentrifugation and the GFP-tagged Neur was detected by immunoblotting. Under mild extraction conditions, NeurΔRING-GFP was found in the membrane fraction, consistent with histological observations. However, following extraction with high pH, which strips membranes of all but integral proteins (Fujiki et al., 1982), NeurΔRING-GFP was detected exclusively in the cytosolic fraction, suggesting a peripheral association with the membrane (Figure 7A). This association must occur on the cytoplasmic face of the cell membrane, as Neur contains no signal peptide. To test this hypothesis, we isolated wing disks overexpressing *UAS-neurΔRING-GFP* and subjected them to

proteinase K digestion before lysis and immunoblotting. The GFP (NeurΔRING-GFP) immunoreactivity was resistant to the membrane-impermeable proteinase K, supporting the assignment to Neur of an intracellular location (Figure 7B). We believe that the wt Neur protein, which is known to associate with the membrane (Lai and Rubin, 2001; Yeh et al., 2000), will also have the same topology, because the RING domain should not act as a transmembrane domain.

Discussion

The importance of *neur* in N signaling has been realized ever since its identification, as its null embryonic phenotype is indistinguishable from that of *N* mutants (Lehman et al., 1983). Nonetheless, its position in the N pathway was heretofore unclear. Our analysis of *neur* loss of function (*lof*) and overexpression suggests a link between *neur* expression and DI signaling and endocytosis. Loss of *neur* diminishes DI endocytosis, whereas *neur* ectopic expression enhances DI endocytosis and turnover. While this manuscript was under review, a paper by Yeh et al. (2001) reported that Neur indeed has RING-dependent E3 ubiquitin ligase activity in vitro. Taken together, our data and those of Yeh et al. (2001) link DI endocytosis with ubiquitination, as originally hypothesized (see Results).

One caveat to our interpretation is that our static pictures of DI localization do not allow us to unambiguously conclude whether intracellular DI is endocytosed or blocked in its secretory trafficking. We favor the former hypothesis for three reasons: (1) intracellular DI often colocalizes with endocytosed fluorescent dextran; (2) if DI were retained in the endoplasmic reticulum or Golgi, it would not be available at the cell surface where signaling is taking place; yet, concomitant with increased endocytosis, Neur is able to stimulate DI signaling; and (3) wt Neur protein is found mostly at the plasma membrane (Lai and Rubin, 2001; Yeh et al., 2000), so it is more likely to affect endocytic events rather than steps in secretory processes.

The nonautonomous effect of *neur*⁻ clones on lateral inhibition (Figure 5) favors a role for Neur in signal-emitting, rather than signal-receiving, cells. Such a function is consistent with the fact that Neur is an intracellular peripheral membrane protein expressed preferentially in the signal-emitting cells during lateral inhibition, such as the neuroblasts, SOPs, and central proneur cells (Boulianne et al., 1993; Huang et al., 1991; this work). In agreement with a role for Neur in generating the DI signal, prior epistasis analysis showed that *neur* is required to express the embryonic neural suppression ("antineurogenic") phenotype associated with ligand-dependent *N* gain-of-function (*gof*) mutants (Lieber et al., 1993). In the same study, *neur* was dispensable for the constitutive activity of ligand-independent *N* variants. Interestingly, some *N* variants that are *DI* independent are also *shv* (Dynammin) independent (Seugnet et al., 1997; Struhl and Adachi, 2000). Taken together, these data point to the involvement of Neur and Dynammin in processes upstream of (or parallel to) N activation by DI. Our implication of Neur in endocytic regulation suggests an important role for endocytosis in events leading

up to N activation (Parks et al., 2000; Seugnet et al., 1997).

If DI endocytosis and DI-N signaling are causally linked, then our analysis of the *NeurΔRING-GFP* mutant poses a paradox: although *NeurΔRING-GFP* does not detectably stimulate DI endocytic trafficking (or turnover), it retains the ability to enhance DI signaling. On the one hand, this could mean that the above model is wrong and endocytosis is simply a consequence of DI-N stimulation, rather than a prerequisite for DI signaling. Alternatively, the absence of detectable DI internalization upon coexpression of *NeurΔRING-GFP* does not necessarily preclude the possibility that early endocytic events (e.g., recruitment of DI into coated pits) that are undetectable by light microscopy are initiated by *NeurΔRING-GFP*. Such events might be sufficient to stimulate ligand-dependent N cleavage and activation. Ultrastructural analysis will be required to distinguish between these alternative models.

Removal of the *Neur RING* domain does seem to adversely affect its ability to stimulate N signaling in some contexts: in the study of Lai and Rubin (2001), *UAS-neurΔRING* yielded phenotypes indicative of a negative effect on N signaling (tufted bristles, thick veins, and notched wings) with most *Gal4* driver lines, although in certain cases, positive effects were also observed (shaft to socket transformation). We have observed the same context-dependent variability with our *UAS-neurΔRING-GFP* construct (data not shown), suggesting that these differences do not result from the presence of the GFP moiety but rather from the type of assay employed. In fact, we have shown that *NeurΔRING-GFP* coexpressed with DI blocks N signaling within the *omb-Gal4* domain, where wt *Neur* and DI are able to induce *Wg*, even though the nonautonomous signaling (at the borders of the *omb-Gal4* domain or at the borders of FLP-out clones) appears unaffected by the *RING* deletion (Figures 6B and 6C). It is possible then that *NeurΔRING* can exert negative effects on DI-N signaling in a cell-autonomous fashion and positive effects in a cell-non-autonomous fashion. The cell-autonomous block in N signaling could be due to the block in DI turnover and its accumulation at the apical membrane, because it has been proposed that high levels of DI may sequester N receptor molecules in unproductive cis complexes (Jacobsen et al., 1998).

Two major models for DI signaling have been put forward. In one, the active DI species is proposed to be the extracellularly cleaved, secreted DI-EC fragment (Qi et al., 1999), because it is produced by the metalloprotease Kuzbanian (Kuz), and the *kuz* lof phenotype is similar to the *N* lof phenotype (Rooke et al., 1996). In the other, binding of cell surface-tethered DI to N on the apposing cell has a dual impact: activating extracellular cleavage of Notch and mediating the transendocytosis into the signal-sending cell of N-EC complexed with DI (Parks et al., 2000). Our observations suggest that *Neur* could act intracellularly in the signal-sending cell to promote assembly of a productive DI-N complex and to trigger its endocytosis. Concomitantly with endocytosis, *Neur* leads to a drastic reduction in the levels of the DI-EC fragment (Figure 3), even as DI-N signaling is increased. It therefore appears unlikely that DI-EC is the active signal that stimulates N in the wing disk. This

leaves unanswered at present the question of why Kuz is needed for N signaling. Perhaps Kuz has pleiotropic activity and acts on some other protein(s) required for N activation, and Kuz-dependent DI cleavage is a secondary effect. Better characterization of the different DI isoforms, including their localization and trafficking, will be required to understand the detailed mechanism of DI-N activation.

Despite the proposed role of *Neur* to promote DI signaling, we also note that DI can signal in the absence of *Neur*, inasmuch as there are instances of DI signaling where *Neur* is not detectably expressed, such as from the germline to ovarian follicle cells (Lopez-Schier and St Johnston, 2001). In the experiments of Figures 4A and 4C, we indeed observed N target gene expression induced by DI in the absence of *neur*. To be certain, we monitored *neur^{ΔRING}-lacZ* and showed that *UAS-DI* overexpression in the wing disk does not induce endogenous *neur* expression (data not shown). With the caveat that available detection methods may fail to detect low levels of *neur* expression, we propose that two types of DI signaling may exist: basal signaling that does not require *Neur* activity and high-intensity signaling that does. During neurogenesis, basal DI-N signaling probably takes place during early stages among all cells within proneural clusters, where DI and N are uniformly expressed but *Neur* is absent. Upon expression of *neur* by a nascent neural precursor, signaling becomes asymmetric, as the neighboring cells receive more intense signal even though DI and N levels have not changed. The absolute requirement for *neur* in neurogenesis suggests that basal "mutual" inhibition is insufficient to permanently block proneural protein activity. Indeed, the E(spl) bHLH Notch targets, which are the main antagonists of proneural proteins, are not expressed in *neur* embryos (Jennings et al., 1994) or clones (Figure 5A), suggesting that their expression may be induced only by intense *Neur*-dependent "lateral" inhibitory signaling.

We can extend our hypothesis to propose that *Neur* may be required more stringently in instances in which a novel asymmetry has to be imposed upon uniform basal N-DI signaling. *neur* is not required at the wing DV boundary (Lai and Rubin, 2001; our unpublished observations), where asymmetry is imposed by *Fringe* (Blair, 2000) or in the egg chamber, where asymmetry is imposed by expression of N and DI in distinct cells (Lopez-Schier and St Johnston, 2001). Similarly, *neur* is not essential during lateral inhibition within the provein. Despite its expression there and its dramatic effect on DI localization (Figure 1G), *neur* lof clones yield normal looking veins with only minor thickenings (Lai and Rubin, 2001; our unpublished observations). We believe that *neur* is not crucial for this process because wing patterning mechanisms place N and DI in different cells: DI expression is most intense within the central proveins and N expression is most intense within the lateral proveins (de Cells et al., 1997; Huppert et al., 1997).

Although the exact relationship between DI endocytosis and N activation remains to be resolved, our findings emphasize the importance of *Neur* for both of these processes. Given the complexity and pleiotropy of Notch signaling, alternative mechanisms of signal generation may be operative in different developmental contexts. The questions of whether this is so, and if so,

what mechanisms operate in which contexts, will be resolved by future work.

Experimental Procedures

Antibodies and Immunohistochemistry

For antibody staining, dissected larvae were fixed for 20 min at room temperature in PEM plus 4% formaldehyde. Pupal dissection and fixation was done as in Parks et al. (2000). To induce the *hs-GFP* marker, 1 hr of heat shock at 38°C and 1–1.5 hr recovery was done prior to dissection. Di was detected using mouse mAb C594.9B (Fehon et al., 1990) at 1:5,000 or guinea pig serum GP581 (Huppert et al., 1997) at 1:4,000, both directed against extracellular epitopes. N was detected using mouse mAb C458.2H (Diederich et al., 1994) supernatant at 1:100, also recognizing an extracellular epitope. Fasciclin III was detected using mAb 7G10 (Developmental Studies Hybridoma Bank; developed under the auspices of the NICHD and maintained by the University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City) supernatant at 1:500. For β -galactosidase, we used a rabbit antiserum from Cappel (1:10,000). mAbs against Ct (1:100), Wg (1:10), and E[sp] (1:3) were kindly provided by Karen Blochlinger (FHRC, Seattle), Stephen Cohen (EMBL, Heidelberg), and Sarah Bray (University of Cambridge, UK), respectively. Rabbit anti-Ase serum (1:1,000) was kindly provided by Andrew Jaman (University of Edinburgh). Fluorescent and HRP-coupled secondary antibodies were from Jackson Immunochemicals or Molecular Probes. They were preadsorbed and used at 1:200–1:1,000. Antibody incubations were done in PBS/0.2% Triton/0.5% BSA at 4°C for 4 hr to overnight. Fluorescent samples were observed using a Leica SP confocal microscope. Transmitted light images were obtained on a Leica Diaplan microscope.

Mosaic Analysis

Mitotic clones were induced using the *FLP-FRT* technique. Flies were raised at 25°C and *hsFLP* was induced by heat-shocking first to second instar larvae of the following genotypes for 1 hr at 38°C: (1) *y w hsFLP1 w; FRT82B neur¹/FRT82B hsGFP or FRT82B arm-lacZ*; (2) *y w hsFLP1 w; FRT82B Di¹⁰⁰/FRT82B hsGFP*; and (3) *y w hsFLP1 w; FRT82B P[gro⁺] D[3R]b32.2/FRT82B hsGFP*.

FRT82B stands for *P[neoFRT]82B* and *hsFLP* stands for *P[hsFLP]1*. All alleles and inserts shown above are described in FlyBase (<http://flybase.bio.indiana.edu>). The *FRT82B P[gro⁺] D[3R]b32.2* chromosome (kindly provided by Pat Simpson) carries a *P[gro⁺]* transgene to complement the partial inactivation of *gro* by the deficiency for the *E[sp]* locus.

Constructs and Transgenic Lines

UAS-neur was constructed as follows: a DnaI fragment was isolated corresponding to nucleotides 247–2637 of the *neur* cDNA (includes 30 bp of 5' UTR and 95 bp of 3' UTR) and cloned into the EcoRV site of pBluescript KSII+ (Stratagene) to generate pBNeur. A BamHI-KpnI (polylinker sites) fragment from pBNeur was isolated and cloned into pUAST cut with BglII and KpnI.

UAS-neurΔRING-GFP was constructed as follows: a BamHI (polylinker)-HindIII (*neur* cDNA nucleotide 2146) fragment was isolated from pBNeur and cloned into the pEGFP-N2 vector (Clontech) cut with BglII and SmaI, fusing the first 623 amino acids of *Neur* in-frame with EGFP. The chimeric *neur-EGFP* fragment was isolated from this plasmid by SmaI-NotI (polylinker sites) and cloned into pUAST cut with EcoRI/NotI and NotI. Transgenic lines were generated in a *yw¹⁰⁰* background.

Other transgenes used were *P[Arb]neur¹⁰⁰ (neur¹⁰⁰-lacZ)*, *P[Arb]Di¹⁰⁰ (Di-lacZ)*, and *P[Arb]N¹⁰⁰ (N-lacZ)*, all described in FlyBase. *UAS-Di* was kindly provided by Nick Baker (Albert Einstein College of Medicine, New York).

Targeted Gene Expression

The following Gal4 drivers were used: *P[GAL4]br¹⁰⁰Δact>CD2>Gal4* (FlyBase: *P[GAL4-Act5C]/FRT,CD2,PF5*), *P[GAL4]neur^{Δ4,4-100}* (kindly provided by Veronica Rodriguez, Bombay), and *P[GAL4-Hsp70.sev/K25 (hs-Gal4)*. All crosses were performed at 25°C. For the FLP-cut clones larvae carrying the *act>CD2>Gal4* line, *P[hsFLP]1* and a *UAS* transgene were heat-shocked for 30 min at

37°C to induce the clonal elimination of the *CD2* cassette by FLP-mediated intramolecular recombination between the two *FRT* sites (>). This juxtaposes the *Act5C* promoter to *Gal4* and drives *UAS* transgene expression at a low uniform level in all cells of the clone.

Endocytosis Assay

Dissected third instar larval disc complexes were incubated in 1 mM fluorescein-dextran/lysine-fixable, MW 3,000 (Molecular Probes) in M3 cell culture medium at 25°C for 10 min (pulse), and then washed five times in ice-cold M3 medium. After a variable chase period (0–60 min), they were fixed in PEM plus 4% formaldehyde. Dextran is taken up by endocytosis and marks progressively later endosomal compartments as the chase time is increased (Entchev et al., 2000).

Protein Analysis

For the Di Westerns, wing disks of the appropriate genotypes were collected in ice-cold PBS and subsequently extracted in a buffer consisting of 300 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 8.0), 0.5% NP-40, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, and protease inhibitors. Laemmli gels were run in the absence of reducing agents. Di was detected on a Western blot using mAb C594.9B at 1:10,000. N-EC was detected using the same conditions and the C458.2H mAb at 1:1,000. N-IC was detected using reducing conditions and the C17.9C6 mAb at 1:5,000 (Fehon et al., 1990). We used anti- β -tubulin mAb (Amersham) at 1:4,000 as a loading control. The HRP-coupled goat anti-mouse IgG (Jackson Immunochemicals) was used at 1:10,000 and the blots were developed using a chemiluminescent substrate (Pierce).

For the subcellular fractionation analysis, we used *hs-Gal4; UAS-neurΔRING-GFP* third instar larval brain disk complexes. The larvae had been heat-shocked for 1 hr at 38°C to induce the transgene and returned to room temperature for 3 hr before dissection. To strip membranes from peripherally associated proteins, we homogenized the tissue in 100 mM Na₂CO₃ (pH 11.5) (Fujiki et al., 1982) in the presence of protease inhibitors. After a 45 min incubation at 4°C, we separated the membrane and cytosolic fractions by ultracentrifugation (68,000 rpm in TLA-120 rotor, Beckman ultracentrifuge). For mild lysis, we used the same procedure, changing the lysis buffer to a hypotonic one, 25 mM HEPES (pH 7.9), 1.5 mM MgCl₂, and 10 mM KCl. We detected the *NeurΔRING-GFP* protein by Western blot (as above) using rabbit anti-GFP (Invitrogen) at 1:5,000 and HRP-coupled goat anti-rabbit IgG (Jackson Immunochemicals) at 1:15,000.

For the proteinase K protection analysis, we collected 50 third instar wing disks from *omb-Gal4; UAS-neurΔRING-GFP* animals and incubated them intact in various concentrations of proteinase K in PBS (10 min at 30°C). PMSF (3 mM) was added to stop the reaction, and the tissue was homogenized directly in 1× Laemmli sample buffer. The fusion protein and β -tubulin were detected by Western blot, as above.

Acknowledgments

The authors would like to thank the members of the Delidakis, Averof, and Moschonas labs for support and encouragement. We also thank Annette Parks for teaching CP pupal dissections, Matt Rand for help with Western conditions, Spyros Artavanis-Tsakonas and Allen Laughon for providing materials, Yannis Livadaras for embryo injections, Despina Stamataki for help with fly work, and Isabel Guerrero for help with the dextran endocytosis assay. Numerous other workers have kindly provided materials and are mentioned in the text. This work was funded by the EPETII program of the Greek General Secretariat for Research and Technology and IMBB intramural funds. M.A.T.M. and K.M.K. were funded by NIH grant GM33291 to M.A.T.M.

Received September 4, 2001; revised November 5, 2001.

References

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., and Lake, R.J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770–776.

- Baker, N.E. (2000). Notch signaling in the nervous system. Pieces still missing from the puzzle. *Bioessays* 22, 264-273.
- Baker, N.E., and Yu, S.Y. (1998). The R8-photoreceptor equivalence group in *Drosophila*: fate choice precedes regulated Delta transcription and is independent of Notch gene dose. *Mech. Dev.* 74, 3-14.
- Blair, S.S. (2000). Notch signaling: Fringe really is a glycosyltransferase. *Curr. Biol.* 10, R608-R612.
- Boullanne, G.L., de la Concha, A., Campos-Ortega, J.A., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1993). The *Drosophila* neurogenic gene *neuralized* encodes a novel protein and is expressed in precursors of larval and adult neurons. *EMBO J.* 12, 2586.
- Brand, M., Jarman, A.P., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1993). *asense* is a *Drosophila* neural precursor gene and is capable of initiating sense organ formation. *Development* 119, 1-17.
- Brou, C., Logeat, F., Gupts, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Black, R.A., and Israel, A. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol. Cell* 5, 207-218.
- de Celis, J.F., Bray, S., and Garcia-Bellido, A. (1997). Notch signalling regulates veinlet expression and establishes boundaries between veins and interveins in the *Drosophila* wing. *Development* 124, 1919-1928.
- Diederich, R.J., Matsuno, K., Hing, H., and Artavanis-Tsakonas, S. (1994). Cytosolic interaction between *delta* and Notch ankyrin repeats implicates *delta* in the Notch signaling pathway. *Development* 120, 473-481.
- Di Fiore, P.P., and De Camilli, P. (2001). Endocytosis and signaling. An inseparable partnership. *Cell* 106, 1-4.
- Doherty, D., Feger, G., Younger-Shepherd, S., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1996). Delta is a ventral to dorsal signal complementary to *Serrate*, another Notch ligand, in *Drosophila* wing formation. *Genes Dev.* 10, 421-434.
- Entchev, E.V., Schwabedissen, A., and Gonzalez-Gaitan, M. (2000). Gradient formation of the TGF-beta homolog Dpp. *Cell* 103, 981-991.
- Fehon, R.G., Kooh, P.J., Rebay, I., Regan, C.L., Xu, T., Muskavitch, M.A.T., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci *Notch* and *Delta*, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell* 61, 523-534.
- Fehon, R.G., Johansen, K., Rebay, I., and Artavanis-Tsakonas, S. (1991). Complex cellular and subcellular regulation of Notch expression during embryonic and imaginal development of *Drosophila*: implications for Notch function. *J. Cell Biol.* 113, 657-669.
- Freemont, P.S. (2000). Ubiquitination: RING for destruction? *Curr. Biol.* 10, R84-R87.
- Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S., and Lazarow, P.B. (1982). Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: applications to endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 93, 97-102.
- Haltzier, P., and Simpson, P. (1991). The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*. *Cell* 64, 1083-1092.
- Huang, F., Dambly-Chaudière, C., and Ghysen, A. (1991). The emergence of sense organs in the wing disc of *Drosophila*. *Development* 111, 1067-1093.
- Huppert, S.S., Jacobsen, T.L., and Muskavitch, M.A. (1997). Feedback regulation is central to Delta-Notch signaling required for *Drosophila* wing vein morphogenesis. *Development* 124, 3283-3291.
- Jacobsen, T.L., Brennan, K., Martinez-Arias, A., and Muskavitch, M.A. (1998). Cis-interactions between Delta and Notch modulate neurogenic signaling in *Drosophila*. *Development* 125, 4531-4540.
- Jennings, B., Preiss, A., Delidakis, C., and Bray, S. (1994). The Notch signaling pathway is required for *Enhancer of split* bHLH protein expression during neurogenesis in the *Drosophila* embryo. *Development* 120, 3537-3548.
- Klug, K.M., Parody, T.R., and Muskavitch, M.A. (1998). Complex proteolytic processing acts on Delta, a transmembrane ligand for Notch, during *Drosophila* development. *Mol. Biol. Cell* 9, 1709-1723.
- Kooh, P.J., Fehon, R.G., and Muskavitch, M.A.T. (1993). Implication of dynamic patterns of Delta and Notch expression for cellular interactions during *Drosophila* development. *Development* 117, 493-507.
- Lai, E.C., and Rubin, G.M. (2001). *neuralized* functions cell-autonomously to regulate a subset of Notch-dependent processes during adult *Drosophila* development. *Dev. Biol.* 231, 217-233.
- Lehman, R., Jiménez, F., Dietrich, U., and Campos-Ortega, J.A. (1983). On the phenotype and development of mutants of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 192, 62-74.
- Lieber, T., Kidd, S., Alcamo, E., Corbin, V., and Young, M.W. (1993). Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function of Notch in nuclei. *Genes Dev.* 7, 1949-1965.
- Lopez-Schier, H., and St Johnston, D. (2001). Delta signaling from the germ line controls the proliferation and differentiation of the somatic follicle cells during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev.* 15, 1393-1405.
- McNiven, M.A., Cao, H., Pitts, K.R., and Yoon, Y. (2000). The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places. *Trends Biochem. Sci.* 25, 115-120.
- Mumm, J.S., and Kopan, R. (2000). Notch signaling: from the outside in. *Dev. Biol.* 228, 151-165.
- Neumann, C.J., and Cohen, S.M. (1998). Boundary formation in *Drosophila* wing: Notch activity attenuated by the POU protein Nubbin. *Science* 281, 409-413.
- Parke, A.L., Turner, F.R., and Muskavitch, M.A. (1995). Relationships between complex Delta expression and the specification of retinal cell fates during *Drosophila* eye development. *Mech. Dev.* 50, 201-216.
- Parke, A.L., Klueg, K.M., Stout, J.R., and Muskavitch, M.A. (2000). Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* 127, 1373-1385.
- Poddy, C.A. (1990). *shibire*, a neurogenic mutant of *Drosophila*. *Dev. Biol.* 138, 464-472.
- Price, B.D., Chang, Z., Smith, R., Bockheim, S., and Laughon, A. (1993). The *Drosophila* *neuralized* gene encodes a C2H2 zinc finger. *EMBO J.* 12, 2411-2418.
- Qi, H., Rand, M.D., Wu, X., Sestan, N., Wang, W., Rakic, P., Xu, T., and Artavanis-Tsakonas, S. (1999). Processing of the Notch ligand Delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science* 283, 91-94.
- Rand, M.D., Grimm, L.M., Artavanis-Tsakonas, S., Patriub, V., Blacklow, S.C., Sklar, J., and Aster, J.C. (2000). Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric notch receptors. *Mol. Cell Biol.* 20, 1825-1835.
- Rooke, J., Pan, D., Xu, T., and Rubin, G.M. (1998). KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in *Drosophila* neurogenesis. *Science* 273, 1227-1231.
- Seugnet, L., Simpson, P., and Haenlin, M. (1997). Requirement for dynamin during Notch signaling in *Drosophila* neurogenesis. *Dev. Biol.* 182, 585-598.
- Speicher, S.A., Thomas, U., Hinz, U., and Knust, E. (1994). The *Serrate* locus of *Drosophila* and its role in morphogenesis of the wing imaginal discs: control of cell proliferation. *Development* 120, 535-544.
- Struhl, G., and Adachi, A. (2000). Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Mol. Cell* 6, 625-636.
- Yeh, E., Zhou, L., Rudzik, N., and Boullanne, G.L. (2000). *Neuralized* functions cell autonomously to regulate *Drosophila* sense organ development. *EMBO J.* 19, 4827-4837.
- Yeh, E., Demmer, M., Commisso, C., Zhou, L., McGlade, C.J., and Boullanne, G.L. (2001). *Neuralized* functions as an E3 ubiquitin ligase during *Drosophila* development. *Curr. Biol.* 11, 1675-1679.

ARTICLE IN PRESS



Biochimica et Biophysica Acta 91596 (2001) 1–8



www.bba-direct.com

Short sequence-paper

Cloning, chromosomal organization and expression analysis of *Neur1*¹, the mouse homolog of *Drosophila melanogaster neuralized* gene

Elias Pavlopoulos ^{a,b}, Maria Kokkinaki ^{a,b}, Evangelia Koutelou ^a,
Thymios A. Mitsiadis ^c, Panagiotis Prinos ^{d,2}, Christos Delidakis ^{a,b},
Michael W. Kilpatrick ^d, Petros Tsipouras ^d, Nicholas K. Moschonas ^{a,b,*}

^a Department of Biology, University of Crete, P.O. Box 2208, Heraklion, 714 09, Crete, Greece

^b Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation of Research and Technology-Hellas, P.O. Box 1327, Heraklion, 711 10, Crete, Greece

^c IMEB EA 2198, Faculté d'Odontologie, Université de la Méditerranée, Marseille, France

^d Department of Pediatrics, University of Connecticut Health Center, Farmington, CT 06030, USA

Received 2 August 2001; received in revised form 1 October 2001; accepted 2 October 2001

Abstract

The *Drosophila neuralized* (*neur*) gene belongs to the neurogenic group of genes involved in regulating cell–cell interactions required for neural precursor development. *neur* mutant phenotypes include strong overcommitment to neural fates at the expense of epidermal fates. The human *neuralized* homolog (*NEURL*) has been recently determined and found to map to chromosome 10q25.1 within the region frequently deleted in malignant astrocytomas. Because of its potential importance in developmental processes, we analyzed the structure of the mouse homolog, *Neur1*, and its expression pattern in embryonic tissues. *Neur1* activity is detected from early developmental stages in several tissues and organs including neural tissues, limbs, the skeletal system, sense organs and internal organs undergoing epithelial–mesenchymal interactions. *Neur1* encodes a polypeptide associated with the plasma membrane but also detected in the cytoplasm. Similarly to the *Drosophila* gene, mammalian *neuralized* may code for an important regulatory factor. © 2001 Published by Elsevier Science B.V.

Keywords: Neurogenic gene; NEUZ domain; RING finger domain; Mouse embryo development; Malignant astrocytoma

Drosophila neuralized encodes a RING finger polypeptide and belongs to the neurogenic genes which also include *Notch*, *Delta*, *Enhancer of split*, *big brain*, and *mastermind* [1,2]. These genes are involved in cell fate determination of, among others, the neurogenic regions of the *Drosophila* embryo [3] by mediating lateral inhibition, a process whereby neural precursor cells inhibit neighboring cells from adopting a neural fate [4,5]. Loss-of-function mutations of any of the neurogenic genes are associated with hyperplasia of the embryonic nervous system [6]. *neur* represents a strong neurogenic mutant. Re-

cent studies have suggested that *neur* participates in *Notch-Delta* signaling during *Drosophila* peripheral neurogenesis [7,8]. The human homolog, *NEURL*, has been identified and mapped within the region of loss of heterozygosity at chromosome 10q25.1, the most frequent chromosomal aberration found in malignant astrocytomas ([9] and references therein). Compared to normal brain tissue, *NEURL* was found to be expressed at very low levels in astrocytomas and several glioma cell lines examined [9]. Among *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* ([10]; Acc. No. U40945) and human *neuralized* genes [9], extensive sequence homology is observed at the carboxy-terminal C₂HC₄ RING finger domain. Plenty of regulatory proteins containing this domain are involved in important biological processes including oncogenesis and development (e.g. [11,12]). Recent evidence suggests that proteins containing this domain participate in protein interactions and regulate cellular protein levels serving as ubiquitin E3 ligases [13–15]. Based on *Drosophila neur* functional role in neurogenesis, it has been hypothesized that *NEURL* may be involved in cell fate determination of the nervous sys-

* Corresponding author. Fax: +30-81-394-408.

E-mail address: moschon@imbb.forth.gr (N.K. Moschonas).

¹ The mouse *Neur1* cDNA sequence has been submitted to GenBank with Acc. No.: NM_021360. *Neur1* genomic DNA sequences are available under GenBank Acc. Nos. AG271919–23. *NEURL* (*Drosophila neuralized*-like) is a gene symbol approved by the HUGO/GDB Nomenclature Committee.

² Present address: Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Clinical Research Institut of Montreal, 110 Pine Avenue West, Montreal, QC, Canada H2W 1R7.

ARTICLE IN PRESS

2

E. Pavlopoulou et al. / *Biochimica et Biophysica Acta* 91395 (2001) 1–8

tem, and its inactivation may be associated with progression of malignant neuroectodermal tumors in human [9]. Because of its potential contribution in important developmental processes in mammals, we isolated and analyzed the mouse *neur* homolog, *Neurl*. Here, we present its structure and genomic organization, the subcellular localization and the expression profile during mouse embryo development.

An IMAGE human EST (#179548) was used to probe a C57BL/6 mouse E14.5 λ ExCell *EcoRI* CIP cDNA library (inserts containing *EcoRI*-*NotI* adaptors; a generous gift of R. Wehr and P. Gruss) under standard conditions. Overlapping restriction fragments of a positive 2433 bp long cDNA clone, λ *Neurl*, were appropriately subcloned in pBluescript (pBS), sequenced on both strands on an ABI 373 sequencer and evaluated in silico. Sequence alignment to the *NEURL* cDNA (GenBank Acc. Nos.: NM_004210, [9] and AF029729; the latter corresponding to a 3634 bp long *NEURL* cDNA, unpublished data of our group) and in silico analysis (see also, below) revealed a nearly full-length, 1710 bp long, open reading frame (i.e. 570 aa) followed by 723 bp of a 3'-untranslated region (UTR) (Fig. 1). To generate the missing part of the coding sequence, a *Neurl* primer (R1; Fig. 1) and a *NEURL*-specific primer (5'-GCAGCTCCTGCCCGGCT-3'; AF029729) located at the 5'-UTR of the human gene (data not shown) assumed to hybridize to the respective region of the mouse gene, were employed to reverse transcribe and PCR amplify (RT-PCR) an E14.5 BALB/C mouse brain poly A⁺ RNA sample (80 ng) pre-treated by DNase I. The RT DNA product was amplified with denaturation at 94°C (1 min), annealing at 61°C (45 s) and extension at 72°C (2 min). Indeed, the 140 bp product included the missing *Neurl* translation initiation region as well as the adjacent 55 bp of the putative 5'-UTR of the gene (GenBank Acc. No. NM_021360). As suggested by a recently submitted *Neurl* cap-trapper selected cDNA clone ([16]; GenBank Acc. No. AK010787), the transcription initiation site extends 261 bp further upstream, thus making 316 bp the overall size of *Neurl* 5'-UTR (not shown).

Alignment between *NEURL* and the composite *Neurl* cDNA sequence suggested a high degree of homology at both the nucleotide and the cDNA-deduced polypeptide level (Fig. 1). The length of the two putative polypeptides is the same, i.e. 574 aa, sharing 97% sequence similarity and 94% identity. Thirty-three amino acid changes may

cause slight variation of their physicochemical properties, however, they possibly do not interfere with their functional characteristics. Furthermore, comparison between mouse/human and *Drosophila neuralized* suggested a protein sequence identity of about 33% and a similarity of 57% determined throughout the molecules (Fig. 1). This is not an uncommon finding when mammalian and insect homologous polypeptides are compared [17]. Although the molecules share the same overall architecture (see below), there is a 180 aa difference between the mammalian and the *Drosophila* molecule (Fig. 1). The extra *Drosophila* sequences may reflect additional functional characteristics of the insect molecule or, simply, represent unstructured extra chain fragments linking adjacent polypeptide domains. Analysis of the putative *Neurl* polypeptide sequence using the SMART server tools (smart.embl-heidelberg.de/), identified a carboxy-terminal C₃HC₄ RING finger, a domain suggested to be involved in DNA-protein, RNA-protein and protein-protein interactions which is characteristic of a large variety of regulatory proteins (e.g. [15,18]), and two NEUZ domains, in the same order as in human, *Drosophila* and *C. elegans* homologs. NEUZ, a recently introduced domain of unknown function, was firstly identified as an internal neuralized-specific repeat in *NEURL* [9]. Interestingly, two novel cDNA-deduced protein groups have been predicted as containing NEUZ domains but no RING fingers (SMART server). The first consists of two possibly orthologous genes, i.e. *Drosophila melanogaster* Q9VUC2 and human Q9H0B0, containing four and six NEUZ domains, respectively. The second includes a *D. melanogaster* gene, Q9W113, and two highly homologous mammalian genes, i.e. human Q9BRO9 and mouse Q9D0S4, all containing a NEUZ domain accompanied by a SOCs ('suppressor of cytokine signaling') domain. Sequence similarity among the above and neuralized proteins is limited to NEUZ (not shown) suggesting that it is a well-conserved protein domain and that neuralized belongs to a functionally diverged NEUZ superfamily with members both in vertebrate and invertebrate species.

Neurl gene locus was mapped to mouse chromosome 19, between *Pitx3* and *D19Mit1* [19], a region syntenic to human chromosome 10q25.1 [20] associated with several genetic defects of the nervous system and developmental malformations (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM/>). To investigate whether *Neurl* exists in a single or multiple copies in the mouse genome, we performed standard genomic DNA Southern analysis using three non-overlap-

Fig. 1. Upper part: Nucleotide (nt) and derived amino acid (aa) sequence of *Neurl* aligned to human *NEURL* gene and *D. melanogaster* *neur* protein. *Neurl* is equivalent to the recently reported *Neurl* [26]. The alignment was done by using either the 'GAP' or the 'BEST FIT' software (GCG Waccuson Package, Accelrys). The proposed translation initiation codon [9] and the stop codon are underlined. The exon boundaries have remained the same in mouse and human; they are indicated by vertical arrow heads. Boxed are the neuralized-specific domains, NEUZ (open) and the RING finger (gray). Amino acid differences between *Neurl* and *NEURL* are shown in black boxes. The *D. melanogaster* *neur* protein sequence is shown in italics. Arrows indicate the position and orientation of synthetic oligonucleotides used as PCR primers for structural (R1, F2/R2) or expression pattern (F3/R3) analysis. Lower part: Comparative schematic presentation of the mouse (*Neurl*) with the *Drosophila* (*neur*) proteins. The overall organization has remained the same. Extra *Drosophila* protein regions are indicated by open boxes. Numbers show aa positions.

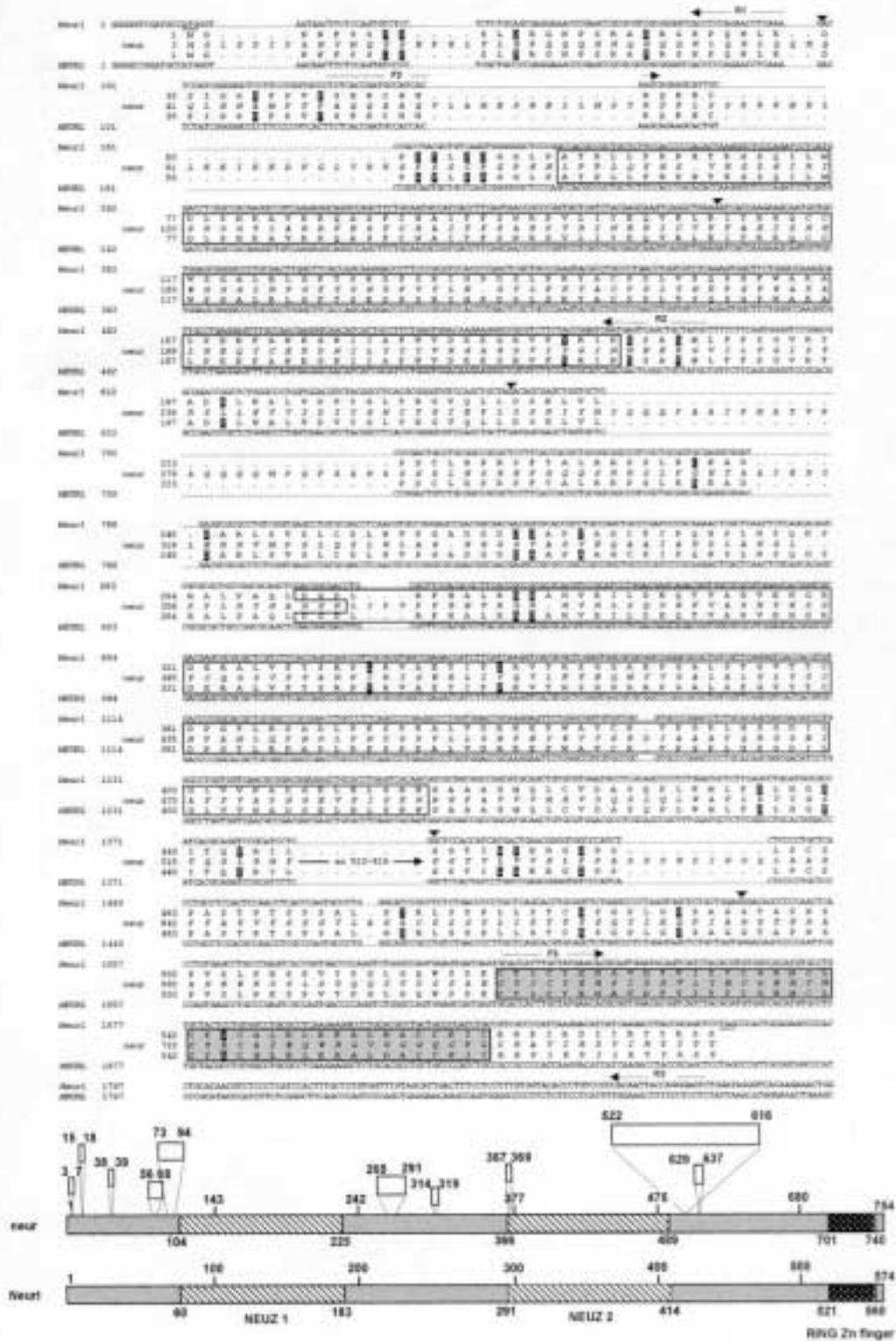
ARTICLE IN PRESS

E. Pavlopoulos et al. / Biochimica et Biophysica Acta 91596 (2001) 1–8

3

ping *Neur1* cDNA probes sequentially hybridized, at high stringency, to a nylon blot containing several lanes of BALB/C mouse DNA digests. The simple hybridization pattern detected, is consistent with the existence of a

unique *Neur1* gene (data not shown). To determine the genomic organization of *Neur1*, we screened a mouse (strain 129SV) liver λFIXII genomic library (Stratagene) using as probes three cDNA fragments, i.e. the almost



ARTICLE IN PRESS

4

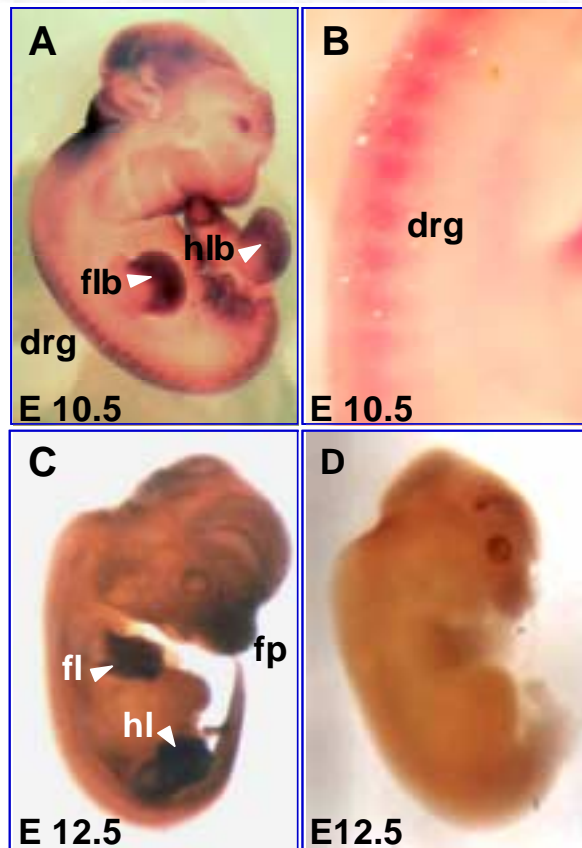
E. Parlipoulas et al. / *Biochimica et Biophysica Acta* 91596 (2001) 1–8

Fig. 2. Whole-mount in situ hybridization to a *Neurl* DIG-labeled probe. Lateral view of E10.5–11.0 and E12.5 BALB/C mouse embryos. *Neurl* transcripts are clearly detected in the forelimb and the hindlimb bud (flb and hlb, respectively, A), and the dorsal root ganglia (drg; B, zoom in of A). At E12.5 (C), *Neurl* activity is detected in the facial processes (fp) and the distal parts of the developing limbs (fl, forelimb; hl, hindlimb). The *Neurl* antisense riboprobe was synthesized by T3 RNA polymerase (Promega) from a 1275 bp *Sma*I/*Eco*RI *Neurl* cDNA template cloned in pBS KSII⁺ and linearized at the *Sma*I site. D is a control E12.5 embryo hybridized to the sense *Neurl* riboprobe.

full-length 2433 bp *Neurl* cDNA together with a 231 bp *Eco*RI/*Bst*YI and a 424 bp *Nor*I/*Sac*II fragment corresponding to the 5'- and the 3'-end of the gene, respectively. Three positive clones representing more than 52 kb covered the entire *Neurl*-specific genomic region (data not shown). Exon/intron boundaries, intron approximate sizes and the full sequence of the second intron were determined by Southern analysis and appropriate subcloning and sequencing (GenBank Acc. Nos. AG271919–23). *Neurl* coding sequence is embedded in a region of about 21 kb (not shown) and consists of six exons (Fig. 1). Mapping analysis suggested an intron of about 10 kb interrupting the 3'-UTR of *Neurl* (data not shown). In silico analysis of *NEURL* cDNA and genomic sequence (GenBank Acc. Nos. AL139339 and AL121929) permitted us to determine the respective structure of the human homolog. Comparison with *Neurl* suggested that the two genes share

the same exon/intron organization; however the relative sizes of most of the introns differ significantly (not shown). Furthermore, *NEURL* 3'-UTR is not interrupted by an intron suggesting an increased structural divergence in the non-translated regions of the two genes.

Expression analysis of *NEURL* suggested that the gene is transcriptionally active in normal human brain and at much lower levels in malignant astrocytoma tissues [9]. Investigation of *Neurl* expression pattern by RNA in situ hybridization on mouse embryo tissues permitted us to identify sites potentially requiring *Neurl* function. A digoxigenin (DIG)-labeled *Neurl* antisense riboprobe was used under conditions previously described [21]. *Neurl* expression was detected at specific sites and cell layers in several organs of the developing embryo. In situ hybridization on whole-mount E10.5 and E12.5 embryos, indicated expression of *Neurl* in the developing limb buds, dorsal root ganglia and facial processes (Fig. 2A–C). Furthermore, analysis of cryosections from E12.5, E13.5 and E18.5 embryos (Figs. 3 and 4) revealed *Neurl* transcripts in neural tissues, such as the ventricular (proliferative) zone of the midbrain (Fig. 3A), the choroid plexus epithelium (Fig. 3B), the neural tube (Fig. 3E), the trigeminal ganglion (Fig. 3C), the dorsal root ganglia (Fig. 3D) and sense organs, i.e. the retina and eye lens cells (Fig. 3H, I), the olfactory and gland epithelium of the nose (Fig. 4J, K) and the whisker cells (Fig. 3F, G) undergoing epithelial-mesenchymal interactions. *Neurl* is also expressed at distinct cell layers of internal organs, i.e. lung alveolar epithelium (Fig. 4B, C), liver parenchyma (Fig. 4D), stomach mucosa epithelium (Fig. 4E), kidney tubular epithelium (Fig. 4F), mesonephric (Wolffian) urogenital duct epithelium (Fig. 4G), limb epithelium (Fig. 4A), muscle (Fig. 4H), perichondrium of the ribs (Fig. 4I) and in facial skin epithelium (Fig. 4L). In addition, RT-PCR applying the F3/R3 set of primers (Fig. 1) to DNA-free poly A⁺ RNA showed that *Neurl* is also expressed in the adult brain, testis and liver as well as in embryonal mouse NIH 3T3 and teratocarcinoma P19 cells (not shown). Similarly to mouse, in situ hybridization to 6 weeks human embryo sections, showed *NEURL* expression throughout the skin, the differentiating cartilaginous elements of the limb, rib and vertebrae, as well as in liver parenchyma, lung and muscle (R. Kosher, C. Dealy and P. Tsipouras, unpublished observations).

Finally, to assess the subcellular localization of *Neurl*, we proceeded in transient expression of a green fluorescent protein (GFP) *Neurl* chimera in African green monkey COS-7 cells. The construct, pEGFP/*Neurl*, contained the enhanced GFP open reading frame (Clontech) combined at its 3'-end with the almost full-length *Neurl* translated region (*Neurl* aa 5–574). The GFP tag *Neurl* was found associated with the plasma membrane as well as in the cytoplasm localized to punctate structures (Fig. 5A). The same accumulation pattern was obtained when the GFP tag was placed at the C-terminal region of the chimera

ARTICLE IN PRESS

E. Parlopoulou et al. / *Biochimica et Biophysica Acta* 91596 (2001) 1–8

5

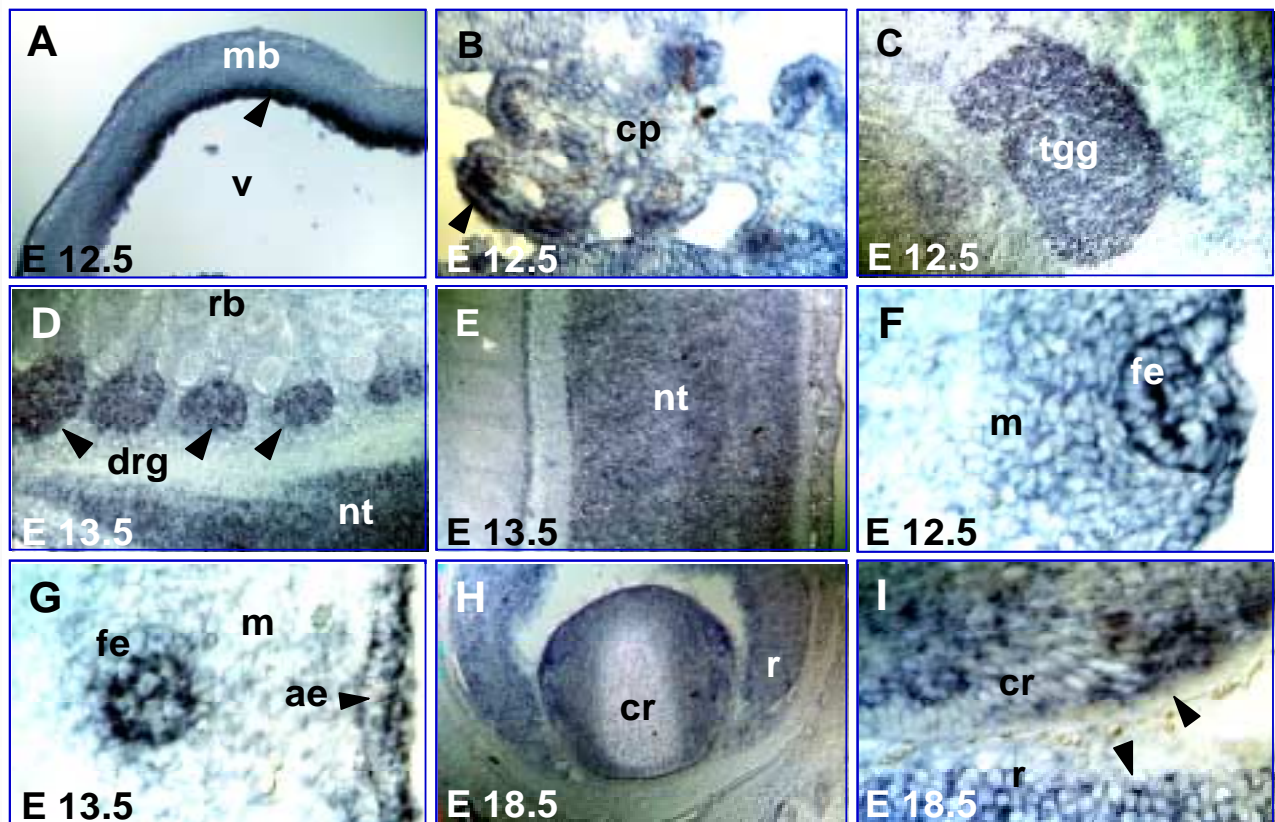


Fig. 3. Representative cryosection in situ hybridization panels of E12.5, E13.5 and E18.5 Swiss mouse embryos. *Neu1* transcripts are detected in the ventricular zone of the midbrain (mb), A; the choroid plexus (cp) epithelium, B; the trigeminal ganglion (tgg), C; the dorsal root ganglia (drg), D; the neural tube (nt), E; the whisker follicular epithelium (fe), F and G; and the eye, retina (r) and crystalline or lens fibers (cr), H and I (detail of H). Additional abbreviations: v, third ventricle; rb, rib; m, mesenchyme; ae, aboral epithelium. All sections are sagittal.

suggesting that GFP possibly does not interfere with *Neu1* localization. In similar transfection experiments using mouse neuroblastoma Neuro2a cells, Ruan et al. [26] found *Neu1* throughout the cytoplasm. The difference in the accumulation pattern observed may be due to different cell types employed. Notably, *Drosophila* epitope-tagged *neuralized* protein has been recently shown by in vivo experiments to be primarily associated with the plasma membrane, also localized to punctate structures [7,8]. Since there are no recognizable signal peptide or transmembrane domains in either the mammalian or the *Drosophila* molecules (SMART search), it is likely that *Neu1* will have a peripheral membrane association. Biochemical experiments are underway to elucidate the basis of *Neu1* association with the membrane and the nature of the punctate structures in the cytoplasm. The latter may be relevant to the current generalized concept about RING proteins function, i.e. their ability to form large macromolecular scaffolds required for various complex molecular or enzymatic processes taking place in the cell [14]. To get a better understanding on *Neu1* subcellular localization in relation to its structure, we extended our analysis to a series of truncated *Neu1* GFP tag derivatives from

either the N- or the C-terminus. Our data revealed that the absence of 226 aa from the *Neu1* N-terminus (chimeric plasmid pEGFP/ Δ *Neu1*) results in the abolishment of the characteristic accumulation pattern and drives the molecule to nucleo-cytoplasmic diffusion (Fig. 5B) reminiscent of the control GFP accumulation pattern [23]. Interestingly, expression of a reciprocal *Neu1* (aa 1–269)/GFP tag chimera containing the first NEUZ domain resulted in a pattern comparable to that of the intact molecule (not shown). This suggests the existence of a necessary and sufficient element for the proper subcellular accumulation of *Neu1* within its N-terminal 269 aa.

In conclusion, we have analyzed the structure and genomic organization of the mouse *Neu1* homolog and compared its genomic organization to the human counterpart. Orthologous *neuralized* genes encoding a subgroup of RING proteins may, also, be considered as members of a novel gene family characterized by the presence of one or multiple NEUZ domains, the biological role of which remains to be elucidated. The gene is active from early embryonic stages, in several tissues (mostly epithelia) in a variety of sense and internal organs as well as in the nervous and skeletal system. The *Drosophila* homolog

ARTICLE IN PRESS

6

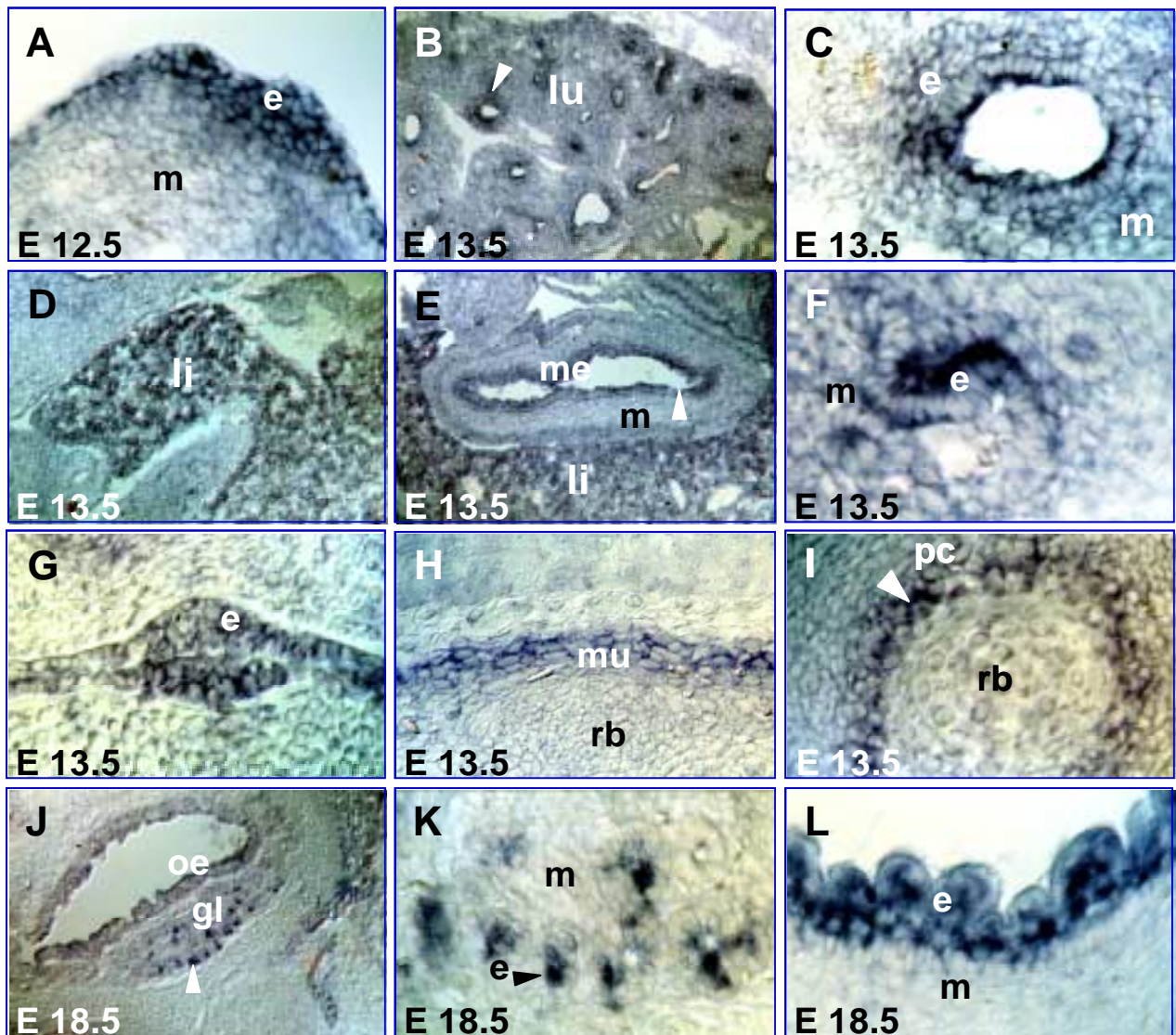
E. Pavlopoulou et al. / *Biochimica et Biophysica Acta* 91596 (2001) 1–8

Fig. 4. Representative cryosection in situ hybridization panels of E12.5, E13.5 and E18.5 mouse embryos. *Neur1* transcripts are detected in limb epithelium (e). A; lung (lu) alveolar epithelium, B and C (detail of B); liver (li) parenchyma, D; mucosa epithelium (me) of stomach, E; kidney tubular epithelium, F; epithelium (e) of mesonephric (Wolffian) urogenital duct, G; muscles (mu), H; perichondrium (pc) of the ribs (rb), I; nasal olfactory epithelium (oe) and gland (gl) epithelium (e), J and K (detail of J); facial skin epithelium, L. Additional abbreviation: m, mesenchyme. All sections are signal.

seems to be intimately associated with the *Notch-Delta* signaling [3,7,8,24]. Interestingly, in the developing mouse embryo, the expression pattern of *Delta1(Dll1)*, a homolog of *Drosophila Delta* gene, includes several sites of activity, e.g. nasal olfactory and gland epithelia, lung respiratory epithelia, skeletal muscles, whiskers, central nervous system [25], also exhibiting *Neur1* activity. Although extensive experiments are needed for a definitive proof, it is tempting to suggest a possible involvement of *Neur1* in *Notch*-dependent processes during fetal mammalian development.

The authors wish to thank Drs. R.A. Kosher and C. Dealy for permitting the use of unpublished observations,

Dr. G. Chalepakis for useful discussions and A. Pasparaki for technical assistance. This work was supported by IMBB (grant #56), University of Crete (grant #1199), and the Greek Ministry of Development (#236/234/603) (N.K.M.), HD-22610 and Coles Family Foundation (P.T.) and the Association pour la Recherche sur le Cancer (T.A.M.).

References

- [1] J.A. Campos-Ortega, Cellular interactions during early neurogenesis of *Drosophila melanogaster*, *Trends Neurosci.* 11 (1988) 400–405.

ARTICLE IN PRESS

E. Pavlopoulos et al / *Biochimica et Biophysica Acta* 91596 (2001) 1–8

7

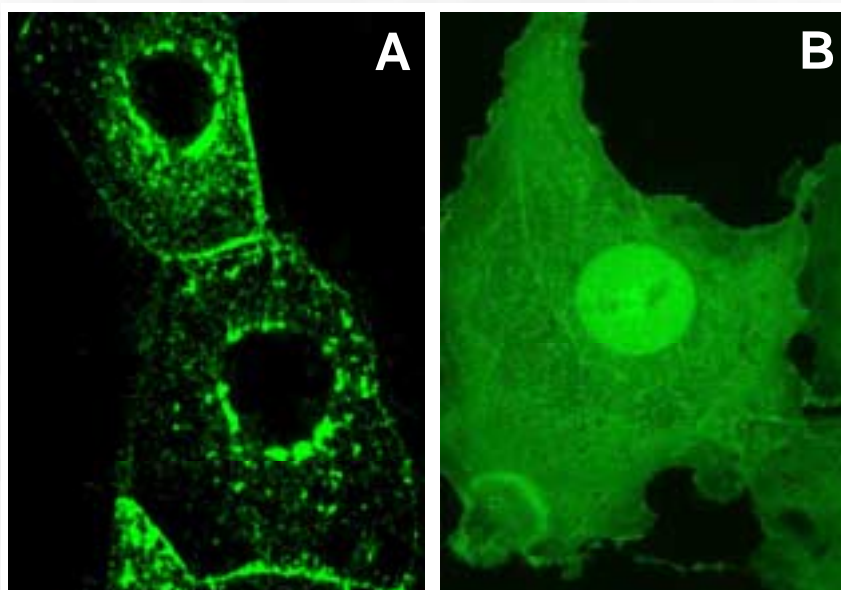


Fig. 5. Confocal fluorescence optical sections of transfected COS-7 cells showing the subcellular localization of GFP tag *Neurl* chimeras. (A) Transfection performed by pEGFP/*Neurl*, generated by direct insertion of the 2083 bp *EcoRI* (at λ ExCell adaptor)/*XbaI* fragment of λ *Neurl* to the *EcoRI/KpnI* linearized pEGFPc1 vector. About 2×10^5 COS-7 cells were transfected with 0.5–1.0 μ g of plasmid DNA using the calcium phosphate co-precipitation method [22] and examined 24–36 h after transfection. (B) Transfection performed by pEGFP/ Δ *Neurl*, made from pEGFP/*Neurl* by excision of a 677 bp *NofI* (at λ ExCell adaptor)/*NofI* (at nt 693; Fig. 1) fragment.

- [2] R. Lehmann, F. Jimenez, U. Dietrich, J.A. Campos-Ortega, On the phenotype and development of mutants of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*, *Roux's Arch. Dev. Biol.* 192 (1983) 62–74.
- [3] A. de la Concha, U. Dietrich, D. Weigel, J.A. Campos-Ortega, Functional interactions of neurogenic genes of *Drosophila melanogaster*, *Genetics* 118 (1988) 499–508.
- [4] S. Artavanis-Tsakonas, P. Simpson, Choosing a cell fate: a view from the Notch locus, *Trends Genet.* 7 (1991) 403–408.
- [5] S. Artavanis-Tsakonas, M.D. Rand, R.J. Lake, Notch signaling cell fate control and signal integration in development, *Science* 284 (1999) 770–776.
- [6] S. Artavanis-Tsakonas, K. Matsuno, M.E. Fortini, Notch signaling, *Science* 268 (1995) 225–232.
- [7] E.C. Lai, G.M. Rubin, *neuralized* functions cell-autonomously to regulate a subset of notch-dependent processes during adult *Drosophila* development, *Dev. Biol.* 231 (2001) 217–233.
- [8] E. Yeh, L. Zhou, N. Rudnik, G.L. Boulianne, *Neuralized* functions cell autonomously to regulate *Drosophila* sense organ development, *EMBO J.* 19 (2000) 4827–4837.
- [9] H. Nakamura, M. Yoshida, H. Tsuki, K. Ito, M. Ueno, M. Nakan, K. Oka, M. Tada, M. Kochi, J. Kuratsu, Y. Ushio, H. Saya, Identification of a human homolog of the *Drosophila neuralized* gene within the 10q25.1 malignant astrocytoma deletion region, *Oncogene* 16 (1998) 1009–1019.
- [10] R. Wilson, R. Aincough, K. Anderson, C. Baynes, M. Berks, J. Bonfield, J. Barton, M. Connell, T. Copley, J. Cooper et al., 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*, *Nature* 368 (1994) 32–38.
- [11] Y. Miki, J. Swensen, D. Shattuck-Eidens, P.A. Futreal, K. Harshman, S. Tavtigian, Q. Liu, C. Cochran, L.M. Bennett, W. Ding, A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1, *Science* 266 (1994) 66–71.
- [12] J.J. Baidos, A.J. Saurin, C. Tissot, E. Duprez, P.S. Freemont, HPC3 is a new human polycomb orthologue that interacts and associates with RING1 and Bmi1 and has transcriptional repression properties, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 28785–28792.
- [13] K.L. Lorick, J.P. Jensen, S. Fang, A.M. Ong, S. Hatakeyama, A.M. Weissman, RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 11364–11369.
- [14] K.L. Borden, RING domains: master builders of molecular scaffolds?, *J. Mol. Biol.* 295 (2000) 1103–1112.
- [15] P.K. Jackson, A.G. Eldridge, E. Freed, L. Furstenthal, J.Y. Hsu, B.K. Kaiser, J.D. Reimann, The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases, *Trends Cell Biol.* 10 (2000) 429–439.
- [16] P. Carninci, Y. Shibata, N. Hayatsu, Y. Sugahara, K. Shibata, M. Itoh, H. Konno, Y. Okazaki, M. Muramatsu, Y. Hayashizaki, Normalization and subtraction of cap-trapper-selected cDNAs to prepare full-length cDNA libraries for rapid discovery of new genes, *Genome Res.* 10 (2000) 1617–1630.
- [17] Y. Sasai, R. Kageyama, Y. Tagawa, R. Shigemoto, S. Nakamshi, Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to *Drosophila hairy* and *Enhancer of split*, *Genes Dev.* 6 (1992) 2620–2634.
- [18] D.P. Satijn, M.J. Gunster, J. van der Vliet, K.M. Hamer, W. Schul, M.J. Alkema, A.J. Saurin, P.S. Freemont, R. vanDriel, A.P. Otte, RING1 is associated with the polycomb group protein complex and acts as a transcriptional repressor, *Mol. Cell Biol.* 17 (1997) 4105–4113.
- [19] G.M. Hansen, D. Tackles, C. Schwartz, M.J. Justice, A mouse chromosome 19 genetic map including the *Lvis* viral insertion site, *Genomics* 56 (1999) 228–231.
- [20] S. Banfi, G. Bonani, E. Rossi, L. Bernard, A. Guffanti, F. Rubboli, A. Marchitello, S. Giglio, E. Coluccia, M. Zollo, O. Zuffardi, A. Ballabio, Identification and mapping of human cDNAs homologous to *Drosophila* mutant genes through EST database searching, *Nat. Genet.* 13 (1996) 167–174.
- [21] T.A. Mitsiadis, E. Hirsinger, U. Lendahl, C. Gurdix, Delta-notch

ARTICLE IN PRESS

8

E. Pavlopoulos et al. / Biochimica et Biophysica Acta 91596 (2001) 1-8

- signaling in odontogenesis: correlation with cytodifferentiation and evidence for feedback regulation, *Dev. Biol.* 204 (1998) 420-431.
- [22] F.L. Graham, A.J. van der Eb, Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5, *Virology* 54 (1973) 536-539.
- [23] M.A. Powers, D.J. Forbes, Cytosolic factors in nuclear transport: what's importin?, *Cell* 79 (1994) 931-934.
- [24] E.C. Lai, G.M. Rubin, Neuralized is essential for a subset of Notch pathway-dependent cell fate decisions during *Drosophila* eye development, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 5637-5642.
- [25] J. Beckers, A. Clark, K. Wenzel, M. Hrabe De Angelis, A. Gosler, Expression of the mouse *Delta1* gene during organogenesis and fetal development, *Mech. Dev.* 84 (1999) 165-168.
- [26] Y. Ruan, L. Tecott, M.M. Jiang, L.Y. Jan, Y.N. Jan, Ethanol hypersensitivity and olfactory discrimination defect in mice lacking a homolog of *Drosophila* neuralized, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 9907-9912.

UNCORRECTED PROOF



ERF: Genomic organization, chromosomal localization and promoter analysis of the human and mouse genes

Derong Liu¹, Elias Pavlopoulos², William Modi¹, Nickolas Moschonas² and George Mavrothalassitis¹

¹SAIC, National Cancer Institute-FCRDC, Frederick, Maryland 21702-1201, USA; ²Department of Biology, University of Crete, and Institute of Molecular Biology and Biotechnology, FORTH, Heraklion, Crete, Greece 71-110; ³Laboratory of Molecular Oncology, National Cancer Institute-FCRDC, Frederick, Maryland 21702-1201, USA

ERF (Ets2 Repressor Factor) is a ubiquitously expressed ets-domain protein that exhibits strong transcriptional repressor activity, has been shown to suppress *ets*-induced transformation and has been suggested to be regulated by MAPK phosphorylation. We report here the sequence of the mouse gene, the genomic organization of the human and the mouse genes, their chromosomal position and the analysis of the promoter region. Genomic clones encompassing either the human *ERF* or the mouse *Erf* gene were isolated and utilized to define their molecular organization. The gene in both species consists of 4 exons over a 10 kb region. Utilizing FISH, somatic cell hybrids and linkage analysis, we identified the chromosomal position of *ERF* on human chromosome 19q13.1 and on its syntenic region in the mouse, on chromosome 7. Sequence analysis of the mouse gene indicated a 90% identity to the human gene within the coding and promoter regions. The predicted Erf protein is 98% identical to the human protein and all of the identifiable motifs are conserved between the two proteins. However, the mouse protein is three amino acids longer (551 versus 548 aa). The area surrounding the region that is homologous to the 5' end of the human cDNA can serve as a promoter in transfection into eukaryotic cells. This region is highly conserved between the mouse and the human genes. A number of conserved transcription factor binding sites can be identified in the region including an ets binding site (EBS). Interestingly, removal of a small segment that includes the EBS, seriously hampers promoter function, suggesting the ERF transcription may be regulated by *ets*-domain proteins.

Keywords: ets; transcriptional repressor; genomic organization; promoter

Introduction

The *ets* family of genes was originally discovered by its homology to the avian transforming virus E26 (Nunn *et al.*, 1984; Bister *et al.*, 1982) and is characterized by a conserved DNA binding domain (Watson *et al.*, 1988; Karim *et al.*, 1990) which recognize the GGA A/T motif (Macleod *et al.*, 1992; Wasylyk *et al.*, 1993; Werner *et al.*, 1995; Kodandapani *et al.*, 1996). *Ets* genes have been found throughout the metazoan

evolution (Lautenberger *et al.*, 1992; Laudet *et al.*, 1993; Degan *et al.*, 1993) which is suggestive of their fundamental role. They have been implicated in cellular proliferation and tumorigenesis (Macleod *et al.*, 1992; Wasylyk *et al.*, 1993; Seth *et al.*, 1992; Janknecht and Nordheim, 1993) and have been suggested to be involved in the regulation of key cellular genes as *c-fos* (Karin, 1994; Treisman, 1994), *c-myc* (Roussel *et al.*, 1994), Rb (Savoysky *et al.*, 1994) and *ETS2* (Mavrothalassitis and Papas, 1991). They have been found to cooperate with other cellular transcription factors in early mitogenic response (Treier *et al.*, 1995; Sieweke *et al.*, 1996) and have been suggested to be downstream effectors in the *ras*/MAPK signalling pathway (Janknecht and Nordheim, 1993; Yang *et al.*, 1996; Janknecht, 1996; Gille *et al.*, 1992; Hill *et al.*, 1993; Marais *et al.*, 1993; O'Neill *et al.*, 1994; Rao and Reddy, 1994; Brunner *et al.*, 1994) and regulated by MAPK. The data suggesting a possible association of *ets* genes with proliferative processes have been supported by the identification of *ets* genes at chromosomal breakpoints, which result in *ets* gene-rearrangement in certain human malignancies. *Fli1* has been identified in 11;22 translocation of Ewing's Sarcoma (May *et al.*, 1993; Delattre *et al.*, 1992) and peripheral neuroepithelioma (Hromas *et al.*, 1993; Hromas and Klemsz, 1994). The *ERG* gene in 21;22 translocation in Ewing's Sarcoma (Sorensen *et al.*, 1994) and 16;21 translocation in AML (Shimizu *et al.*, 1993; Panagopoulos *et al.*, 1994), the *ETV1* in 7;22 Ewing's Sarcoma translocation (Jeon *et al.*, 1995) and the *TEL* gene in 5;12 and 22;12 translocations in myeloproliferative disorders (Buijs *et al.*, 1995; Wlodarska *et al.*, 1995). Finally, it recently has been shown that overexpression of *ets2* in mice can partially mimic the Down Syndrome phenotype (Sumarsono *et al.*, 1996).

ERF is a novel member of the *ets* family that has been isolated by its interaction with the *ETS2* promoter (Sgouras *et al.*, 1995). It has no similarity to other *ets* genes outside the DNA-binding domain; the family member most similar to *ERF* is PE-1 (Klemsz *et al.*, 1994). *ERF* is ubiquitously expressed, exhibits strong transcriptional repressor activity and has been shown to be regulated by phosphorylation throughout the cell cycle and during mitogenic stimulation. Furthermore, is capable of suppressing *ets* and *fos* induced tumorigenicity in the NIH3T3 system and may act as a tumor suppressor gene.

To further analyse *ERF*'s function and its possible implication in malignancies, we isolated both the human and mouse genes and analysed their structure and organization. Both genes have identical intron/exon

Correspondence: G Mavrothalassitis.
Received 28 May 1996; revised 31 October 1996; accepted 13 November 1996



1446

ERF genomic structure
D. Liu et al.

boundaries although the intron sizes are slightly different. The genes are 90% identical within their coding region at the nucleotide level and 98% identical at the amino acid level. Interestingly, most of the differences appear at the carboxy terminus, which harbors the transcriptional repressor domain. Both genes are driven of a promoter with a high GC content; this is consistent with their ubiquitous expression. Interestingly, the proximal promoter region between the two species is as homologous as the rest of the coding region, i.e. about 91%. The human gene is localized on chromosome 19q13.1, while the mouse gene in the syntenic region on mouse chromosome 7. The chromosomal position of *ERF* suggests a possible implication in certain human malignancies and makes it a target for future investigation.

Results

Isolation and characterization of *ERF* gene from human and mouse

We utilized the *ERF* cDNA to screen both a human cosmid library (Stratagene, La Jolla, CA) and a mouse C127 library (Stratagene, La Jolla, CA). Two overlapping cosmid clones were isolated for the human gene and a phage clone for the mouse gene (Figure 1) that contained the entire *erf* gene. The intron/exon organization of both genes was determined by restriction mapping and dideoxy sequencing utilizing primers derived from the human cDNA sequence as well as new ones derived from the determined mouse sequence. The gene in both species consists of 4 exons, the 2nd and 3rd of which are coding for the ets DNA binding domain. The last three exons are separated by very small introns (88–387 bp) in contrast to the first intron that is ~5 kb (Figure 2). The intron/exon splice junctions are identical in both genes. The overall nucleotide identity between the human and the mouse gene is 90% within the coding region (Figure 3B and drops to 50–60% within the sequenced introns and the 3' untranslated regions (not shown).

The deduced amino acid sequence of the mouse gene is 98% homologous to the human gene (Figure 3A), although the mouse protein is three amino acids longer than the human protein (551 versus 549 aa). The proteins are identical within the DNA binding domain and all of the seven putative MAP kinase sites can also be found within the mouse sequence at exactly the same positions. Interestingly, six out of the 10 non-conservative mutations can be found within the repressor domain of *ERF* genes (amino acids 476–529 of the human protein).

Promoter analysis

In order to determine if the previously identified *ERF* cDNA contained the entire *ERF* mRNA, we analysed the genomic DNA sequence surrounding the 5' end of the *ERF* cDNA for its ability to function as a promoter. Immediately upstream from the area that corresponds to the 5' end of the cDNA, there is a putative TATA element conserved both in mouse (Figure 2A) and human (Figure 5A). This area has a very high GC content consistent with the promoter of a ubiquitously expressed gene, such as *ERF*. Indeed, *ERF* can be

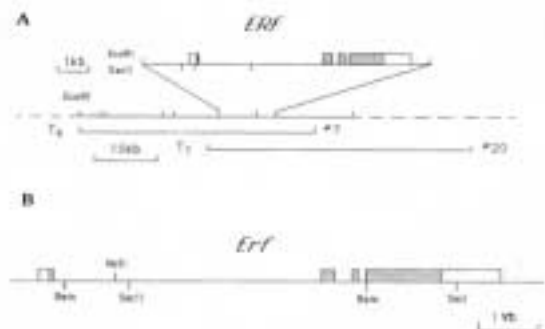


Figure 1 Genomic organization of the human (A) and mouse (B) *erf* gene. The exons are indicated by boxes and the shaded areas represent the coding regions

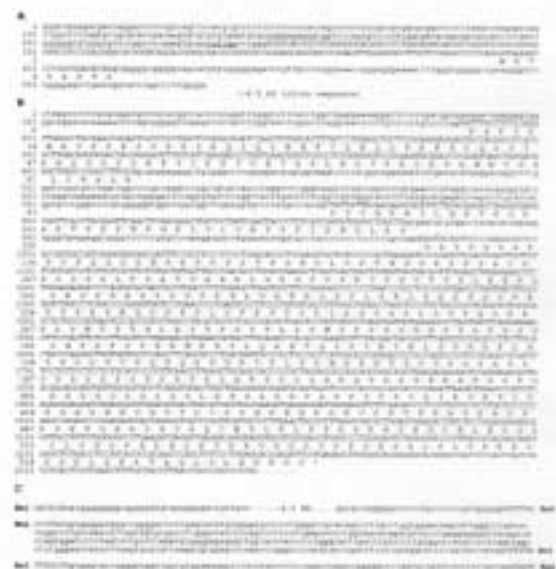


Figure 2 (A) Nucleotide sequence of the mouse gene promoter region. The putative TATA box is underlined. Capital letters depict sequences homologous to the human *ERF* cDNA. The predicted amino acid sequence is represented by the single letter code under the corresponding codons. (B) Sequence of the 2nd, 3rd and 4th exons of the mouse *Erf* gene. Capital letters as in (A). The numbering of the amino acid sequence is continuous between (A) and (B). (C) Sequence of the splice junctions of intron 1 and introns 2 and 3 of the human *ERF* gene. Capital letters as in (A)

detected in all cell lines and tissues tested, similar levels, when compared to actin mRNA (Figure 4).

There is a remarkable homology between the mouse and the human gene within the 250 bp region upstream of the putative initiation point. The extent of homology is equivalent to that of the coding region, i.e. ~91% (Figure 3C). In addition to the TATA box, a number of other putative transcription factor binding sites are conserved in sequence and relative position between the two species, including two Sp1 sites, one CREB/ATF site and one ets binding site (EBS). The EBS site within the mouse promoter is actually 13 bp upstream of the corresponding position within the human promoter (Figure 3C).



1446

ERF genomic structure
D. Lai et al.

boundaries although the intron sizes are slightly different. The genes are 90% identical within their coding region at the nucleotide level and 98% identical at the amino acid level. Interestingly, most of the differences appear at the carboxy terminus, which harbors the transcriptional repressor domain. Both genes are driven of a promoter with a high GC content; this is consistent with their ubiquitous expression. Interestingly, the proximal promoter region between the two species is as homologous as the rest of the coding region, i.e. about 91%. The human gene is localized on chromosome 19q13.1, while the mouse gene is in the syntenic region on mouse chromosome 7. The chromosomal position of *ERF* suggests a possible implication in certain human malignancies and makes it a target for future investigation.

Results

Isolation and characterization of *ERF* gene from human and mouse

We utilized the *ERF* cDNA to screen both a human cosmid library (Stratagene, La Jolla, CA) and a mouse C127 library (Stratagene, La Jolla, CA). Two overlapping cosmid clones were isolated for the human gene and a phage clone for the mouse gene (Figure 1) that contained the entire *erf* gene. The intron/exon organization of both genes was determined by restriction mapping and dideoxy sequencing utilizing primers derived from the human cDNA sequence as well as new ones derived from the determined mouse sequence. The gene in both species consists of 4 exons, the 2nd and 3rd of which are coding for the ets DNA binding domain. The last three exons are separated by very small introns (88–387 bp) in contrast to the first intron that is ~5 kb (Figure 2). The intron/exon splice junctions are identical in both genes. The overall nucleotide identity between the human and the mouse gene is 90% within the coding region (Figure 3B and drops to 50–60% within the sequenced introns and the 3' untranslated regions (not shown).

The deduced amino acid sequence of the mouse gene is 98% homologous to the human gene (Figure 3A), although the mouse protein is three amino acids longer than the human protein (551 versus 549 aa). The proteins are identical within the DNA binding domain and all of the seven putative MAP kinase sites can also be found within the mouse sequence at exactly the same positions. Interestingly, six out of the 10 non-conservative mutations can be found within the repressor domain of *ERF* genes (amino acids 476–529 of the human protein).

Promoter analysis

In order to determine if the previously identified *ERF* cDNA contained the entire *ERF* mRNA, we analysed the genomic DNA sequence surrounding the 5' end of the *ERF* cDNA for its ability to function as a promoter. Immediately upstream from the area that corresponds to the 5' end of the cDNA, there is a putative TATA element conserved both in mouse (Figure 2A) and human (Figure 5A). This area has a very high GC content consistent with the promoter of a ubiquitously expressed gene, such as *ERF*. Indeed, *ERF* can be

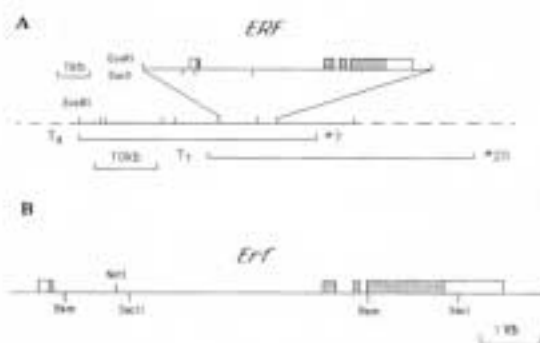


Figure 1 Genomic organization of the human (A) and mouse (B) *erf* gene. The exons are indicated by boxes and the shaded areas represent the coding regions



Figure 2 (A) Nucleotide sequence of the mouse gene promoter region. The putative TATA box is underlined. Capital letters depict sequences homologous to the human *ERF* cDNA. The predicted amino acid sequence is represented by the single letter code under the corresponding codons. (B) Sequence of the 2nd, 3rd and 4th exons of the mouse *Erf* gene. Capital letters as in (A). The numbering of the amino acid sequence is continuous between (A) and (B). (C) Sequence of the splice junctions of intron 1 and introns 2 and 3 of the human *ERF* gene. Capital letters as in (A)

detected in all cell lines and tissues tested, similar levels, when compared to actin mRNA (Figure 4).

There is a remarkable homology between the mouse and the human gene within the 250 bp region upstream of the putative initiation point. The extent of homology is equivalent to that of the coding region, i.e. ~91% (Figure 3C). In addition to the TATA box, a number of other putative transcription factor binding sites are conserved in sequence and relative position between the two species, including two Sp1 sites, one CREB/ATF site and one ets binding site (EBS). The EBS site within the mouse promoter is actually 13 bp upstream of the corresponding position within the human promoter (Figure 3C).

We tested the ability of a 330 bp fragment of the human gene that harbors the area that corresponds to the 5' end of the cDNA, to function as a promoter

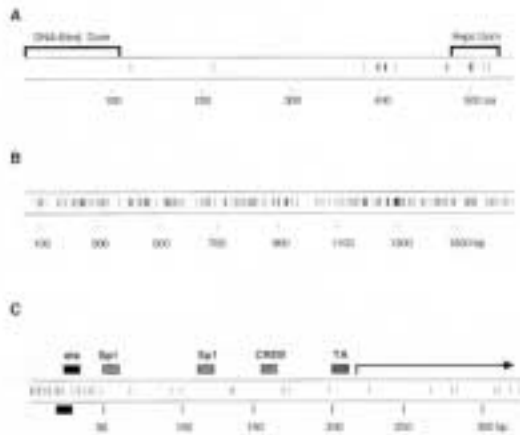


Figure 3 Graphical representation of the homology between the human and mouse proteins (A), nucleotide sequence (B) of coding regions and promoter sequences (C). The graphs were generated by the GapShow program of the GCG analysis package. The vertical lines indicate non-identical positions. The area that corresponds to the DNA-binding and repressor domains are indicated in (A). The putative transcription factor recognition motifs, conserved between the human and the mouse promoter sequence, are indicated in (C). Note that the position of the putative ets binding site is slightly shifted in the mouse sequence. The arrow in (C) indicates the area of identity with the human *ERF* cDNA

ERF genomic structure
D. Liu et al.



after transfection in HeLa cells. As shown in Figure 5B, this fragment exhibited an orientation-specific promoter function. The promoter strength of this fragment was 50% of the *ETS2* promoter (Mavrothalassitis *et al.*, 1990a,b) when tested in the same vector, cells and under the same conditions (data not shown). This is consistent with the relative mRNA levels of *ERF* and *ETS2* in HeLa cells (not shown). Interestingly, when an 80 bp fragment that contains the putative ets binding site and one Sp1 was removed,

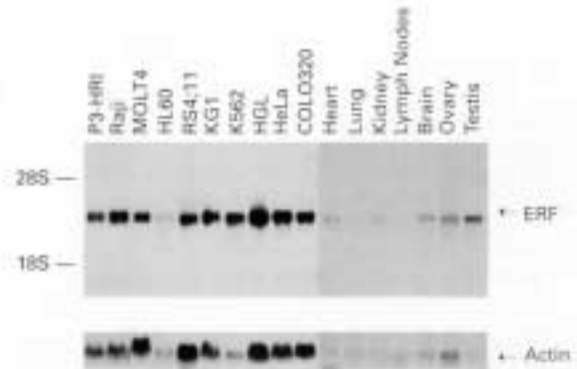


Figure 4 Northern analysis of the *ERF* mRNA levels. The indicated cell line and tissue RNAs were analysed by Northern blot. The *ERF* cDNA and the β -actin cDNA were used as probes, as indicated

A

```

SacII                               ets                               Sp1
1  ccgcgggacccccatcccacccccccccttctcttgcctccctcccccggcgggccctttaagcccag
                               BssHII                               Sp1
71  agccggcgggtcctcagtgctgcgcgcgacgagcgtgtgtgtgagtgccgggggagggggggggcgcag
                               CREB/ATF
141  tgtctccatggggaacggcggcgggagcagcgcggcggggggcgtggcggtcccgcccccggagtgcgat
    Tata
211  attaacccgggAGGCGCGCGGGGAGGGGAGAGGCTCTGAGAGGCGAGGCCGGGTGAGCCGGCGAGGGC
                               SacII
281  GGCCCGACGGGCGCGGGACGGGACGGGCGAGCGAGGGCGCGGGAGCCCGG
    
```

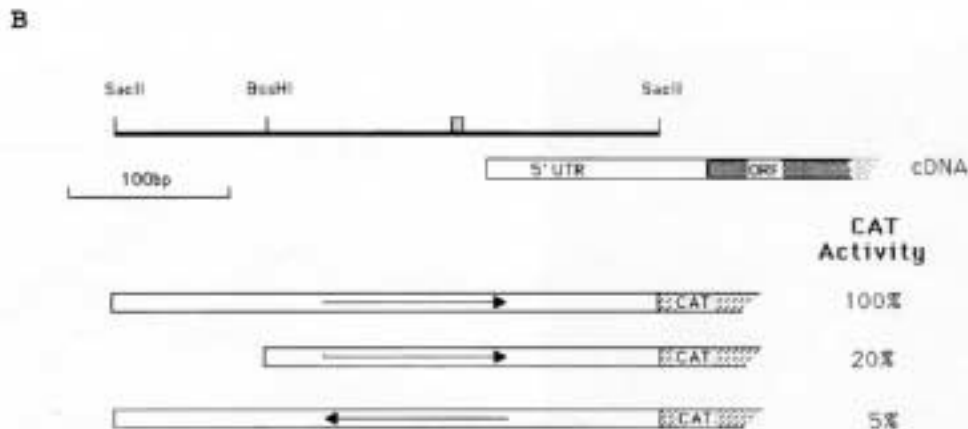


Figure 5 The promoter of the human *ERF* gene. (A) Nucleotide sequence of the *ERF* promoter region. The putative transcription factor binding sites are underlined and the putative transcription factor is represented by bold letters. The relevant restriction sites are indicated over their recognition sequence (B). A schematic representation of the *ERF* promoter region and the reporter constructs used to determine promoter activity. Promoter strength is expressed as a percentile of the activity of the 332 bp *SacII* fragment. Striped box indicates the position of the putative TATA box



1448

ERF genomic structure
D. Liu et al.

the promoter activity was dramatically reduced, suggesting that this area is important for the promoter function in this cell type.

Chromosomal localization

The ability of the ERF gene to suppress *ets*-induced tumorigenesis suggested that it may have some tumor suppressor function. To identify possible human malignancies which may be associated with ERF function, we determined its chromosomal position in both human and mouse. Southern analysis with an ERF-specific probe of somatic cell hybrid panels (BIOS Corp., New Haven, CT) revealed that ERF is localized on human chromosome 19 (data not shown). For the regional assignment of ERF, we performed fluorescent *in situ* hybridization (FISH) analysis using both cosmids no. 7 and no. 20 (Figure 1) carrying the human ERF gene as a probe. A total of 67 metaphase cells were examined. Twenty-five of these cells revealed paired hybridization signals and an additional 24 cells exhibited single signals at chromosomal region 19q13.1. Consistent background hybridization was not observed at any other specific chromosomal position (Figure 6).

In addition to the mapping of the human gene, we have determined the chromosomal position of *Erf* in mice by linkage analysis. We performed genotypic analysis of about 60 random back-cross progeny mice using a mouse *Erf* probe that can detect a TaqI polymorphism in *Mus spretus* and C57BL/6 genomic DNA (data not shown). Analyses of the genotypic data, using the mapping service of the UK Human Genome Mapping Program Research Center, have indicated that the mouse *Erf* gene is localized on chromosome 7 close to the *Pkcc* anchor marker proximal to the centromere (Lod:3.19). This chromosomal region is syntenic to the human chromosomal 19q13 region where the *Pkcc* marker is also localized and consistent with our mapping data of the human gene.

(GT)_n dinucleotide repeat polymorphism

Polymorphic microsatellite sequences serving as molecular markers are particularly useful tools in human

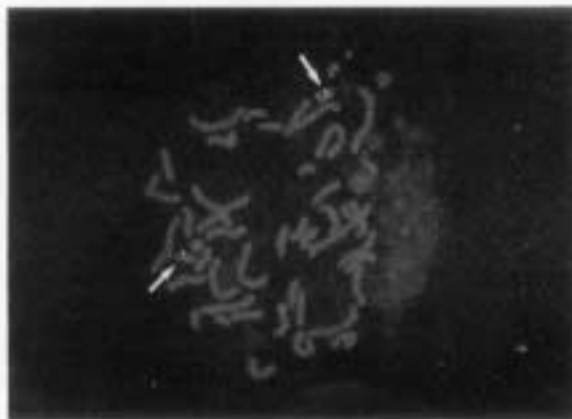


Figure 6 Chromosomal localization of the ERF gene. Metaphase chromosome following FISH with the pEW15 no. 7 and no. 20 genomic clones. Arrows indicate specific hybridization at 19q13.1

chromosome genetic and physical mapping and, potentially, in genotype-phenotype correlations. To identify these sequences, which are closely linked to human ERF, the two overlapping cosmid clones containing the gene, pEW15 no. 20 and pEW15 no. 7 (Figure 1), were investigated by Southern analysis. A 380 bp *Hae*III fragment from pEW15 no. 20 yielded a strong hybridization signal after probing to a synthetic (GT)₁₉-oligonucleotide. The fragment was partially sequenced (EMBL accession No. X97703) to identify the GT repeat and to provide information for appropriate PCR primers flanking the repeat. Genotyping across the CEPH (Centre d'Etude du Polymorphisme Humain) parental DNAs determined four alleles, i.e. A1 (167 bp), A2 (169 bp), A3 (171 bp) and A4 (173 bp) (data not shown). The observed heterozygosity was 53%. Allele frequencies estimated from 154 chromosomes of 77 unrelated individuals, i.e. parents of the three generation CEPH (Paris) families, were: 0.30, 0.51, 0.17 and 0.02, respectively. Co-dominant segregation was observed in seven large CEPH families tested, i.e. no. 1333, no. 1340, no. 1344, no. 66, no. 102, no. 1418 and no. 12, suggesting the stability of the repeat and thus its applicability as an ERF linked microsatellite genetic marker.

Discussion

ERF, a new *ets* domain protein (Sgouras *et al.*, 1995), is the first mammalian member of this family that exhibits transcriptional repressor activity. This ERF product has been shown to be regulated by phosphorylation during cell cycle and mitogenic stimulation via the *ras*/MAPK signaling pathway (Sgouras *et al.*, 1995, and unpublished data). To this extent, it is analogous to the only other *ets*-domain protein that has transcriptional repressor function, the *Drosophila* gene, *Yan* (O'Neill *et al.*, 1994). Furthermore, ERF has been shown to suppress *ets*- and *fos*-induced transformation (Sgouras *et al.*, 1995) and phosphorylation deficient mutant of ERF can suppress *ras*-induced transformation (to be published elsewhere). Thus, it would appear that *erf* may function as a tumor-suppressor gene, suggesting that part of the *ets* oncogenic phenotype may be associated with the inhibition of *erf* function.

In order to further our understanding of ERF function, its association with other *ets* genes and its possible implication in malignant processes, we have characterized the gene structurally from both human and mouse, determined its chromosomal localization, identified a potentially useful microsatellite polymorphic marker and characterized its promoter region. Structural analysis of the human and mouse genes indicated a high degree of conservation between the two species both at the intron/exon organization and sequence level. This is consistent with our preliminary data indicating that the *erf* gene can be detected by Southern analysis in species throughout evolution from chicken to man (unpublished data). Comparison between the human and mouse gene suggests that the targets of the gene should be identical in the two species. This is apparent from the identity of the DNA-binding domains. The conservation of all the recognizable motifs, including the



MAPK sites and the putative SH3 interaction domains, indicate that the possible regulatory mechanism should also be conserved. Interestingly, a number of mutations can be found in the area previously defined as the repressor domain. Since the human gene can effectively repress transcription in mouse cells (Sgouras *et al.*, 1995, and unpublished data), it is unlikely that these differences are a result of diverging co-factors required for repressor function. Thus, it is likely that these amino acid differences provide a more narrow definition of the *erf* repressor domain. However, this hypothesis requires further testing.

The DNA-binding domain of *erf*, as in most of the characterized *ets* genes, is encoded by two exons (exons II and III). However, the intron-exon boundaries of *erf* are distinct from other *ets* genes, indicating an early divergence of *erf* from the other *ets* genes in evolution. This observation is consistent with the positioning of *ERF* in the *ets* gene evolutionary tree. Computer analysis performed by comparison of the *ets*-DNA-binding domains of the known *ets* family members by the PileUp program of the GCG package, positioned *erf* between *Yan* and *PE-1* (data not shown).

In addition to the structural and sequence conservation of *erf* between human and mouse, we also observed a conservation in their respective chromosomal positions. Thus, the human gene was localized in chromosome 19q13.1 and the mouse gene in the syntenic position proximal to the centromere of chromosome 7. Both the human chromosome 19 and the mouse chromosome 7 have been associated with a number of abnormal phenotypes. Specifically, human chromosome 19 has been associated with a number of hematopoietic malignancies that involve translocations or trisomies (Johanson *et al.*, 1994; Stark *et al.*, 1995). Although the most common translocation, t(14;19)(q32;q13), involves the *BCL3* gene (Tanaka *et al.*, 1990; Yabumoto *et al.*, 1994; Ohno *et al.*, 1993), a number of case reports referring to abnormalities in chromosome 19q13 have been published (Paietta *et al.*, 1988; Belge *et al.*, 1992; Bartnitzke *et al.*, 1989). An increasing volume of data implicates *ets* genes in lymphoid malignancies, suggesting a role for *ets* genes in lymphoid development and differentiation. To this extent, it is plausible that *ERF* may be involved in some of the malignancies associated with 19q13 abnormalities. Chromosome 19 abnormalities have also been reported in a number of solid tumors in breast, lung and GI tract. Although solid tumors usually display multiple chromosomal abnormalities, it is possible that *ERF* deregulation may contribute to the transformed phenotype. The possible involvement of *ERF* in growth regulation suggests that loss or modulation of *ERF* function may contribute to the proliferative aspect of the malignant phenotype. However, extensive analysis is required in order to establish any possible association of *ERF* with these cases. Thus, the microsatellite polymorphic marker that we have identified proximal to the *ERF* gene should facilitate the determination of a possible linkage of *ERF* with the transforming phenotype.

Another interesting point of the comparison between human and mouse *erf* is the high degree of conservation in their promoter region. The region that is surrounding the area homologous to the 5' end of

the human *ERF* cDNA is 91% identical between the two species and for the first 150 nt upstream of the cDNA end contain no gaps. The degree of structural conservation in this area is equal to that of the coding regions, and it is in clear contrast to other sequenced areas of the two genes as the second and third introns and the 3' untranslated regions, which have a low degree of similarity (i.e. 50–60%). This region can serve as a promoter in transient transfection assays and contains a number of putative binding sites for transcription factors that are conserved both in sequence and in relative positions, suggesting that the level of *ERF* transcription may be important. Indeed, in most tissues and cell lines tested, *ERF* mRNA levels exhibit little difference and it is not clear at this point whether these minor observed differences also reflect protein levels or are compensatory for protein turnover among different cell types. We were unable to detect any difference in *ERF* transcription as a function of cell cycle or growth stage (unpublished data) and we could only observe a dramatic decrease in *ERF* mRNA levels in cultures that were entering density crisis and consequently apoptosis (unpublished data). However, under these conditions most of the cellular transcription is terminated and is unknown at this point whether loss of *ERF* function might be a contributing factor in this process.

It is of interest that a putative *ets*-binding site (EBS), adjacent to an Sp1 site, within the *ERF* promoter is required for promoter function. Although further experiments are required to determine the contribution of the EBS, by itself and in association with the Sp1 site, in the regulation of *ERF* transcription, it is suggestive of a possible feedback loop in *ERF* regulation. *ERF* was isolated by its association with the *ETS2* promoter regulatory sequence, and our data indicate that it may itself be regulated by other *ets*-domain proteins, suggesting an additional level of coordinated regulation among *ets* family members.

Materials and methods

Isolation and analysis of *erf* genes

The human placenta cosmid and the bacteriophage lambda 129SVJ libraries were purchased from Stratagene (Cat. Nos. 951202 and 946309, respectively) and were screened according to the protocols of the company. Duplicate filters were screened with the entire *ERF* cDNA as a probe. Restriction mapping, Southern and Northern blot analysis, subcloning and sequencing, as well as all other molecular techniques were performed according to Sambrook *et al.* (1989). Total RNA from cell lines and tissues was isolated with RNazol according to the manufacturer's specifications. Computer analysis was performed with the University of Wisconsin GCG package.

Cell lines and transfections

HeLa cells were maintained in DMEM supplemented with 10% bovine serum. P3-HR1, Raji, MOLT4, HL60, RS 4;11, KG1, K562, HGL and Colo320 cells were maintained in RPMI with 15% fetal bovine serum. The cells were transfected with the Calcium Phosphate method according to Gorman *et al.* (1982) with 1–3 µg reporter plasmid. One µg pCH110 plasmid (Pharmacia) was used to monitor the transfection variation. All transfections were performed at



least in triplicate with two independent DNA preparations. Determination of CAT activity was performed with a diffusion based assay using 14 C-labeled acetyl-CoA (NEN) according to the manufacturer's protocol. DNA fragments to be tested for promoter activity were subcloned at the NotI site of the pUMS P-L vector (Jorcyk *et al.*, 1991).

Chromosomal mapping

Fluorescence *in situ* hybridization was performed as described (Tory *et al.*, 1992). Briefly, the two pEW15 genomic clones no. 7 and no. 20 were pooled and labeled with biotin-11-dUTP using nick translation. Hybridization was performed at a probe concentration of 30 ng/microliter at 37°C for 16 h followed by washing at 40°C in 50% formamide in 2×SSC. Slides were then incubated in a detection solution containing 5 µg/ml fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated avidin. Chromosome identification was mediated using QFJ banding by simultaneous Hoechst 33258 staining.

Genetic linkage analysis

Genetic linkage analysis was performed with the support and technical advice of UK Human Genome Mapping Programme (HGMP), Resource Center which provides the facility based on an interspecific backcross between c57BL/6 and *Mus spretus* for the genetic mapping of mouse probes on the mouse genome (Genome News, 1995). Genotypic analysis of a panel of about 50 random backcross progeny mice was performed by Southern blots using as a probe a mouse ERF 950 bp KpnI fragment. Earlier, this fragment was found to detect a TaqI polymorphism on *Mus spretus* and C57BL/6 parental polyblots provided by the Resource Center (data not shown). Linkage to chromosome 7 was carried out at the Resource Center by haplotype ordering. Relevant computation of linkage was obtained through the MBx database where mouse, locus, probe and allele data at each chromosome locus for each of 1000 backcross progeny, are stored.

References

- Bartnitzke S, Hermann ME, Lobeck H, Zuschned W, Neuhaus P and Bullerdiek J. (1989). *Cancer Genet. Cytogenet.*, **39**, 65–68.
- Belge G, Thode B, Bullerdiek J and Bartnitzke S. (1992). *Cancer Genet. Cytogenet.*, **60**, 23–26.
- Bister K, Nunn M, Moscovici C, Perbal B, Baluda MA and Duesberg PH. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3677–3681.
- Buijs A, Sherr S, van Baul S, van Bezouw S, van der Plas D, Geurts van Kessel A, Riegman P, Lekanne Deprez R, Zwartthoff E, Hagemeijer A, *et al.* (1995). *Oncogene*, **10**, 1511–1519.
- Brunner D, Ducker K, Oellers N, Hafen E, Scholz H and Klambt C. (1994). *Nature*, **370**, 386–389.
- Degnan BM, Degnan SM, Naganuma T and Morse DE. (1993). *Nucleic Acids Res.*, **21**, 3479–3484.
- Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaziere C, Melot T, Peter M, Kovar H, Joubert I, de Jong P, Rouleau G, *et al.* (1992). *Nature*, **359**, 162–165.
- Genome News. (1995). The European Collaborative Interspecific Backcross (EUCIB). A Facility for Mapping the Mouse Genome. Vol. **19**, pp. 21–22.
- Gille H, Sharrocks AD and Shaw PE. (1992). *Nature*, **358**, 415–417.
- Gorman CM, Merlino GT, Willingham MC, Pastan I and Howard BH. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6777–6781.

GT-dinucleotide polymorphism

The oligonucleotides CTGAGGGGTTATTCTGTCTC and AGCCAGGTGCAGAGTAATAC were used to determine a possible (GT)_n polymorphism by PCR. The PCR reaction was performed in a volume of 25 µl containing 30 ng of DNA, 35 pmoles of each of the primers, 0.3 pmole of 32 P-labeled GT-strand primer, 250 mM of each dATP, dCTP, dGTP and dTTP, 5 mg BSA, 0.5 U Taq polymerase (Minotech), 10 mM Tris HCl pH 8.3, 50 mM KCl and 1.5 mM MgCl₂, initial denaturation at 94°C (5 min) was followed by 35 cycles with denaturation at 94°C (45 s), annealing at 57°C (60 s). And extension at 72°C (2 min). The final extension step was for 7 min. Products were resolved on 6% polyacrylamide/urea gels. Allele sizes were estimated by comparison to a M13mp18 sequencing ladder. The most intense band for each allele was used to obtain the allele size. Genomic DNA from CEPH families was provided by GENETHON to NKM, in the context of the EUROGEN project.

Acknowledgements

We thank Dr A Argyrokastritis and M Kapsetaki for advice with the marker identification and genotyping; Mr G Beul Jr for technical assistance; Ms Lisa Virtz and Ms Karen Cannon for typing this manuscript. The part of the work done at IMBB-FORTH was funded through the European Genetic Linkage Map project (EUROGEN) to NKM and project BMH4-GT96-1355 to GJM.

The content of this publication does not necessarily reflect the views or policies of the Department of Health and Human Services, nor does mention of trade names, commercial products, or organizations imply endorsement by the US Government.

Accession numbers

The nucleotide sequence data reported in this manuscript have been submitted to GenBank and assigned the accession numbers; X97703, U58533, U58534, U58545, U58536, U58537, U58538 and U58539.

- Hill CS, Marais R, John S, Wynne J, Dalton S and Treisman R. (1993). *Cell*, **73**, 395–406.
- Hromas R and Klemsz M. (1994). *Int. J. Hematol.*, **59**, 257–265.
- Hromas R, May W, Denny C, Raskind W, Moore J, Maki RA, Beck E and Klemsz MJ. (1993). *Biochim. Biophys. Acta*, **1172**, 155–158.
- Junknecht R and Nordheim A. (1993). *Biochim. Biophys. Acta*, **1155**, 346–356.
- Junknecht R. (1996). *Mol. Cell Biol.*, **16**, 1550–1556.
- Jeon IS, David JN, Braun BS, Sublett JE, Roussel MF, Denny CT and Shapiro DN. (1995). *Oncogene*, **10**, 1229–1234.
- Johansson B, Billstrom R, Mauritzson N and Mitelman F. (1994). *Cancer Genet. Cytogenet.*, **74**, 62–65.
- Jorcyk CL, Watson DK, Mavrothalassitis GJ and Papas TS. (1991). *Oncogene*, **6**, 523–534.
- Karim FD, Urress LD, Thummel CS, Klemsz M, McKercher SR, Celada A, *et al.* (1990). *Genes Dev.*, **4**, 1451–1453.
- Karin M. (1994). *Curr. Opin. Cell Biol.*, **6**, 415–424.
- Klemsz M, Hromas R, Raskind W, Bruno E and Hoffman R. (1994). *Genomics*, **20**, 291–294.
- Kodandapani R, Pio F, Ni C-Z, Piccialli G, Klemsz M, McKercher S, Maki RA and Ely KR. (1996). *Nature*, **380**, 456–460.

- Laudet V, Niel C, Duterque-Coquillaud M, Leprince D and Stehelin D. (1993). *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **190**, 8–14.
- Lautenberger JA, Burdett LA, Gunnell MA, Qi S, Watson DK, O'Brien SJ and Papas TS. (1992). *Oncogene*, **7**, 1713–1719.
- Macleod K, Leprince D and Stehelin D. (1992). *Trends Biochem. Sci.*, **17**, 251–256.
- Marais R, Wynne J and Treisman R. (1993). *Cell*, **73**, 381–393.
- Mavrothalassitis GJ and Papas TS. (1991). *Cell Growth Differ.*, **2**, 215–224.
- Mavrothalassitis GJ, Watson DK and Papas TS. (1990a). *Oncogene*, **5**, 1337–1342.
- Mavrothalassitis GJ, Watson DK and Papas TS. (1990b). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1047–1051.
- May WA, Gishizky ML, Lessnick SL, Lunsford LB, Lewis BC, Delattre O, Zucman J, Thomas G and Denny CT. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5752–5756.
- Nunn M, Weiber H, Bullock P and Duesberg P. (1984). *Virology*, **133**, 330–339.
- Ohno H, Doi S, Yabumoto K, Fukuhara S and McKeithan TW. (1993). *Leukemia*, **7**, 2057–2063.
- O'Neill EM, Rebay I, Tjian R and Rubin GM. (1994). *Cell*, **78**, 137–147.
- Pazetta E, Papenhausen P, Gucalp R and Wiernik PH. (1988). *Cancer Genet. Cytogenet.*, **34**, 19–23.
- Panagopoulos I, Aman P, Fioretos T, Hoglund M, Johansson B, Mandahl N, Heim S, Behrendtz M and Mitelman F. (1994). *Genes Chromosomes Cancer*, **11**, 256–262.
- Rao VN and Reddy ESP. (1994). *Oncogene*, **9**, 1855–1860.
- Roussel MF, Davis JN, Cleveland JL, Ghysdael J and Hiebert SW. (1994). *Oncogene*, **9**, 405–415.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Savoysky E *et al.* (1994). *Oncogene*, **9**, 1839–1846.
- Seth A, Ascione R, Fisher RJ, Mavrothalassitis GJ, Bhat NK and Papas TS. (1992). *Cell Growth Differ.*, **3**, 327–334.
- Sgouras N, Athanasiou MA, Beal Jr, GJ, Fisher RJ, Blair DG and Mavrothalassitis GJ. (1995). *EMBO J.*, **14**, 4781–4793.
- Shimizu K, Ichikawa H, Tojo A, Kaneko Y, Maseki N, Hayashi Y, Ohira M, Asano S and Ohki M. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10280–10284.
- Sieweke MH, Tekotte H, Frampton J and Graf T. (1996). *Cell*, **85**, 49–60.
- Sorensen PH, Lessnick SL, Lopez-Terrada D, Liu XF, Triche TJ and Denny CT. (1994). *Nat. Genet.*, **6**, 146–151.
- Stark B, Resnitzky P, Jeison M, Luria D, Blau O, Avigad S, Shafl D, Kodman Y, Gobuzov R, Ash S, *et al.* (1995). *Leukemia Res.*, **19**, 367–379.
- Sumarsono SH, Wilson TJ, Tymms MJ, Venter DJ, Corrick CM, Kola R, Lahoud MH, Papas TS, Seth A and Kola I. (1996). *Nature*, **379**, 534–537.
- Tanaka S, Nishigaki H, Nakagawa H, Okuda T, Nishida K, Tsuda S, Taniwaki M, Imanishi H, Misawa S, Kashima K, Urata Y, Inazawa J, Abe T and McKeithan TW. (1990). *Cancer Genet. Cytogenet.*, **49**, 219–224.
- Tory K, Latif F, Modi W, Schmidt L, Wei MH, Li H, Cobler P, Orcutt ML, Deliso J, Geil L, *et al.* (1992). *Genomics*, **13**, 275–286.
- Treier M, Bohmann D and Miodzik M. (1995). *Cell*, **83**, 753–760.
- Treisman R. (1994). *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **4**, 96–101.
- Wasyluk B, Hahn SL and Giovane A. (1993). *Eur. J. Biochem.*, **211**, 7–18.
- Watson DK, McWilliams MJ, Lapis P, Lautenberger JA, Schweinfest CW and Papas TS. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7862–7866.
- Werner MH, Clore GM, Fisher CL, Fisher RJ, Trinh L, Shiloach J and Gronenborn AM. (1995). *Cell*, **83**, 761–771.
- Wlodarska I, Mecucci C, Marynen P, Guo C, Franekx D, La Starza R, Aventin A, Bosly A, Martelli MF, Cassiman JJ, *et al.* (1995). *Blood*, **85**, 2848–2852.
- Yabumoto K, Ohno H, Doi S, Edamura S, Arita Y, Akasaka T, Matsumoto J, Kadowaki N, Fukuhara S and Okuma M. (1994). *Int. J. Hematol.*, **59**, 211–218.
- Yang B-S, Hauser CA, Henkel G, Colman MS, Van Beveren C, Stacey KJ, Hume DA, Maki RA and Ostrowski MC. (1996). *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 538–547.

ERF genomic structure

D Liu *et al.*

1451