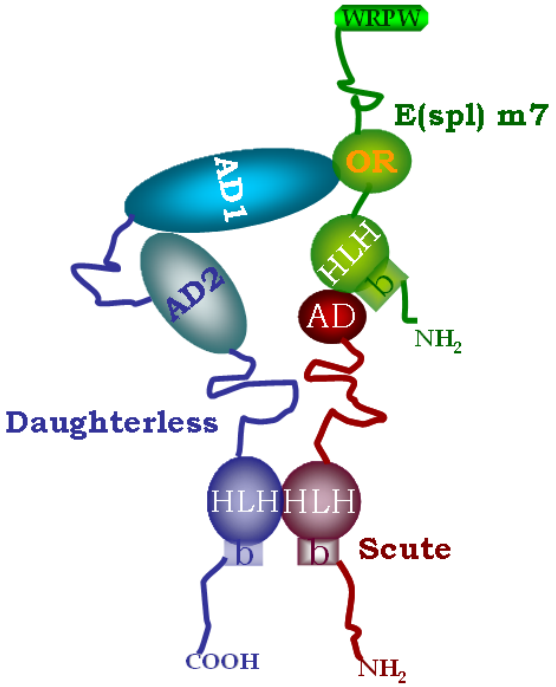
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ bHLH ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΜΕΣΩ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥΣ.

ΜΑΡΙΑΝΘΗ ΚΗΠΑΡΑΚΗ



επιβλέπων καθηγητής: **ΧΡΗΣΤΟΣ ΔΕΛΙΔΑΚΗΣ**

Δεκέμβριος 2011, Ηράκλειο Κρήτης

UNIVERSITY OF CRETE

DEPARTMENT OF BIOLOGY

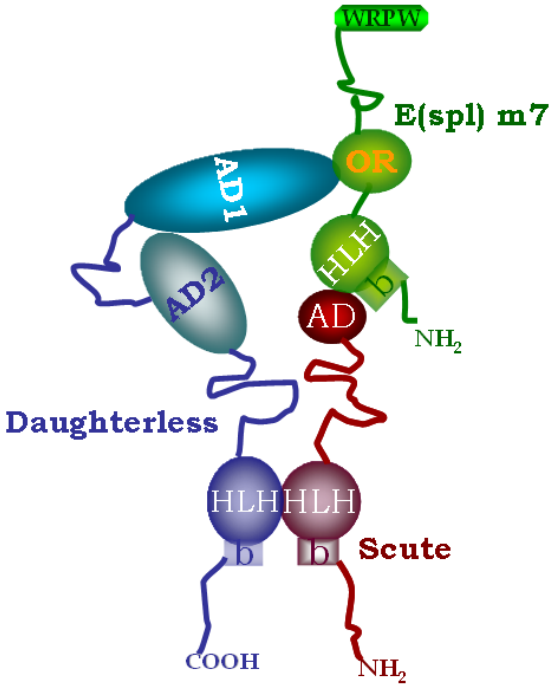
FOUNDATION FOR RESEARCH & TECHNOLOGY HELLAS

INSTITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

PhD THESIS

REGULATION OF POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS AND STABILITY OF bHLH TRANSCRIPTION FACTORS VIA MUTUAL INTERACTIONS.

MARIANTHI KIPARAKI



SUPERVISOR: Prof. CHRISTOS DELIDAKIS

December 2011, Heraklion, Crete

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε με την οικονομική υποστήριξη του έργου ΠΕΝΕΔ 2003 (υποέργο 03ΕΔ555) και με την επιστημονική υποστήριξη απο την Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή:

1. Χρήστος Δελιδάκης, Καθηγητής Τμ. Βιολογίας Παν/μίου Κρήτης (Π.Κ)
2. Δέσποινα Αλεξανδράκη, Αν. Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας Π.Κ
3. Ιωάννης Ταλιανίδης, Α' ερευνητής, Ερευνητικού Κέντρου Αλ. Φλέμινγκ

Στους γονείς μου, **Γιάννη και Κρυστάλλη**
στον αδελφό μου, **Μιχάλη**

στους παππούδες μου, **Νίκο** και **Μιχάλη**
στις γιαγιάδες μου, **Μαριάνθη** και **Κλεάνθη**

και στον αγαπημένο μου σύντροφο, **Ανδρέα**.

Περίληψη

Κατά τον καθορισμό της νευρικής τύχης, σε όλο το βασίλειο των μεταζώων, τρεις κατηγορίες μεταγραφικών παραγόντων τύπου bHLH έχουν καθοριστικό ρόλο. Οι bHLH μεταγραφικοί ενεργοποιητές, τάξης II, [όπως το Scute (Sc) στην *Drosophila*] ετεροδιμερίζονται με την πανταχού εκφραζόμενη τάξης I, bHLH πρωτεΐνη [Daughterless (Da)], και προωθούν την νευρική τύχη - για αυτό καλούνται προνευρικές πρωτεΐνες. Η νευρική τύχη καταστέλλεται από τους μεταγραφικούς καταστολείς της κατηγορίας bHLH-Orange πρωτεϊνών [όπως οι πρωτεΐνες Enhancer of split, E(spl)] (τάξη VI). Προηγούμενες μελέτες από το δίκο μας εργαστήριο και από άλλα, έχουν δείξει ότι οι πρωτεΐνες E(spl) και οι προνευρικές πρωτεΐνες αλληλο-ανταγωνίζονται την δράση με ποικίλους τρόπους. Οι τρόποι αυτοί περιλαμβάνουν την μεταγραφική ρύθμιση των ίδιων γονιδίων στόχων, είτε με άμεση πρόσδεση των πρωτεϊνών σε διαφορετικές θέσεις-στόχουςίδιες μέσα στους ίδιους ενισχυτές ή και με στρατολόγηση των πρωτεϊνών E(spl) σε γονίδια στόχους των προνευρικών πρωτεϊνών, μέσω αλληλεπιδράσεων με το σύμπλοκο Da/Sc.

Στην παρούσα μέλετη, ερευνήσαμε στοιχεία cis της πρωτεΐνης Sc τα οποία επηρεάζουν τη σταθερότητα και τη δράση της πρωτεΐνης όταν αυτή εκφράζεται μόνη της ή μαζί με τον παρτενερ της Da. Βρήκαμε ότι η πρωτεΐνη Sc είναι μια ασταθής φωσφοπρωτεΐνη, η οποία διαθέτει δύο τύπους αποικοδομητικών σινιάλων (degrons I, II) ανάλογα με την κατάσταση διμερισμού που βρίσκεται. Και τα δύο αποικοδομητικά σινιάλα οδηγούν την πρωτεΐνη στο πρωτεάσωμα. Απουσία Da, το κύριο αποικοδομητικό σινιάλο (degron I) είναι η περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής της πρωτεΐνης (TAD), η δράση του οποίου δεν εξαρτάται από την πρόσδεση του Sc στο DNA, αλλά ούτε από την φωσφορυλίωση του Sc. Το δεύτερο σινιάλο αποικοδόμησης (type II) ενεργοποιείται όταν το Sc ετεροδιμερίζεται με το Da, ενώ την ίδια στιγμή απενεργοποιείται το degron I. Το degron II είναι σύνθετο και πρέπει να πληρούνται τρεις προϋποθέσεις για να λειτουργήσει. Το ετεροδιμερές Da/Sc πρέπει να είναι ικανό να προσδεθεί στο DNA, χρειάζονται τα δύο TADs του Da, καθώς επίσης και το Sc να είναι φωσφορυλιωμένο στην κύρια θέση φωσφορυλίωσής του, S^{268}PTS. Παρά το γεγονός ότι τα μισά στοιχεία ανήκουν στην πρωτεΐνη Da (τα δύο TADs και η μισή περιοχή πρόσδεσης στο DNA), το Da καθαυτό είναι πολύ σταθερή πρωτεΐνη.

Παράλληλα με την παραπάνω ανάλυση βρήκαμε έναν νέο μηχανισμό ανταγωνισμού μεταξύ των προνευρικών και των E(spl) πρωτεϊνών, που είναι η αμοιβαία

αλληλοκαταστροφή τους μέσω αλληλεπίδρασης. Με την χρήση διαφορετικών μεταλλαγμένων μορφών των παραπάνω πρωτεϊνών συμπεράναμε ότι οι δύο καταστροφές [καταστροφή του συμπλόκου Da/Sc από τις E(spl) και καταστροφή των E(spl) από τις Da/Sc) χρησιμοποιούν διαφορετικούς μηχανισμούς που έχουν κάποιες ομοιότητες αλλά και διαφορές. Και στους δύο τύπους καταστροφών οι πρωτεΐνες πρέπει να είναι ικανές να αλληλεπιδράσουν καθώς επίσης είναι περιττή η πρόσδεση του E(spl)m7 στο DNA. Η αποικοδόμηση του E(spl)m7 από το σύμπλοκο Da/Sc, ευνοείται όταν το Da/Sc σύμπλοκο μπορεί να προσδεθεί στο DNA. Η αποικοδόμηση του συμπλόκου Da/Sc από την E(spl)m7, δεν χρειάζεται πρόσδεση στο DNA κανενός μεταγραφικού παράγοντα, αλλά εξαρτάται από την στρατολόγηση του συγκαταστολέα Groucho. Επιπλέον, η πρωτεΐνη Sc πρέπει να είναι φωσφορυλιωμένη στο μοτίβο S^{268}PTS για να καταστραφεί από την m7. Τα παραπάνω αποτελέσματα δηλώνουν ότι το σύμπλοκο Da/Sc/m7 στρατολογεί διαφορετικούς παράγοντες αποικοδόμησης (π.χ. λιγάσες E3) οι οποίοι στοχεύουν διαφορετικά στοιχεία του συμπλόκου.

Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση κατά την διάρκεια της παρούσας μελέτης ήταν ότι η πρωτεΐνη Da όταν αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες Sc και m7, επάγει σημαντική αύξηση του μοριακού τους βάρους. Αυτή η τροποποίηση επάγεται και με αναστολή του πρωτεασώματος, υποδηλώνοντας ότι πρόκειται για μια μορφή των πρωτεϊνών Sc και m7 που είναι ασταθής. Παρόλο που και οι δύο πρωτεΐνες Sc και E(spl)m7 φέρουν μονο- και πολυ-ουβικουϊτινιλιώσεις καθώς και άλλες τροποποιήσεις υψηλού μοριακού βάρους, δεν είμαστε σε θέση ακόμα να πιστοποιήσουμε τη μοριακή φύση της τροποποίησης που επάγει το Da.

Abstract

In neural fate assignment throughout the animal kingdom, three classes of bHLH transcription factors play crucial roles. Class II bHLH activators [such as Scute (Sc) in *Drosophila*] heterodimerize with a class I bHLH protein [Daughterless (Da)] and promote neural fate; they are therefore called proneural proteins. Neural fate is suppressed by transcriptional repressors that belong to class VI bHLH-Orange proteins [such as Enhancer of split, E(spl)]. Previous work, both from our lab and others, has shown that E(spl) and proneural proteins antagonize each other by various mechanisms, that include transcriptional regulation of the same target genes, either through binding to different DNA binding sites within the same cis-regulatory modules or/and by recruitment of E(spl) to proneural target genes via interaction with the Da/Sc complex.

In this study we examined cis elements of the Scute protein that affect its stability and function when the protein is expressed without or with its partner, Da. We found that Sc is a labile phosphorylated protein and has two types of degradation signals (degrons I , II) depending on its dimerization status; both degrons lead Scute to proteasome. In the absence of Da, the major Sc degron (degron I) is its transcriptional activation domain (TAD), which can promote degradation off DNA and does not require Sc phosphorylation. The second degron (type II) is activated when Sc is heterodimerized with Da, while at the same time degron I is inactivated. Degron II is a composite degron and has three prerequisites. The Da/Sc heterodimer must be able to bind DNA, the two Da TADs must be present and Sc must be phosporylated on its major phosphorylation motif, S^{268}PTS. Despite the fact that half of these elements belong to the Da partner (the two TADs and half of the basic DNA binding domain), Da itself is a very stable protein.

In parallel to the above analysis we found a new way of antagonism between proneural proteins and E(spl) proteins, which is mutual protein degradation upon interaction. By using different mutant forms of the proteins we conclude that the two events (Da/Sc degradation by E(spl) vs E(spl) degradation by Da/Sc) use two different mechanisms that have similarities and differences. In both types of degradation the proteins must be able to interact with each other and E(spl)m7 DNA binding is dispensable. Degradation of E(spl)m7 by the Da/Sc complex is

favoured if Da/Sc is able to bind onto DNA. Degradation of Da/Sc complex by E(spl)m7 does not need DNA binding of either transcription factor, but depends on recruitment of the corepressor Groucho. Additionally Scute has to be phosphorylated on the S^{268}PTS motif in order to be degraded by m7. These results indicate that the Da/Sc/m7 complex recruits different degradation factors (e.g. E3 ligases) that specifically target the different components of the complex.

An intriguing observation in the process of these studies is that Da induces a significant increase in the MW of both Sc and E(spl)m7 upon complex formation. This effect can be mimicked by proteasome inhibition suggesting that this modified fraction of Sc or m7 is rather unstable. Although both Sc and E(spl)m7 display mono- and poly- ubiquitylation, as well as other high MW modifications, we have no conclusive evidence regarding the molecular nature of the Da-induced MW shift.

Περιεχόμενα

Ευχαριστήρια **σελίδα i-iv**

Εισαγωγή **σελίδα 1-20**

Υλικά και Μέθοδοι **σελίδα 21-26**

Α' Κεφάλαιο **σελίδα 27-55**

Ενότητα Α.1.: Cis-στοιχεία (ενδομοριακά στοιχεία) της πρωτεΐνης Scute που καθορίζουν την σταθερότητά της, στην κυτταρική σειρά Schneider S2 της Δροσόφιλας. σελίδα 27-43

Ενότητα Α.2. Διαμοριακή (in trans) αποσταθεροποίηση της πρωτεΐνης Scute. Ο ρόλος της πρωτεΐνης Daughterless. σελίδα 44-55

Β' Κεφάλαιο **σελίδα 56-68**

Ενότητα Β.1. Διαμοριακή (in trans) αποσταθεροποίηση της πρωτεΐνης Scute. Ο ρόλος της πρωτεΐνης E(spl) m7. σελίδα 56-68

Γ' Κεφάλαιο **σελίδα 69-97**

Ενότητα Γ1. Αλληλεπίδραση με Da και/ή Sc προξενεί μετα-μεταφραστική τροποποίηση στο m7 σελίδα 69-87

Ενότητα Γ2. Καταστροφή της bHLH πρωτεΐνης E(spl) m7 από τις προνευρικές πρωτεΐνες Da και Sc. σελίδα 88-97

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α: Χαρακτηρισμός του ScRQEQ. **σελίδα 98-103**

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β: Χαρακτηρισμός του m7EQRQTKHQ **σελίδα 104-108**

Βιβλιογραφία **σελίδα 109-115**

Όταν νοιώθεις έντονη την ανάγκη να ευχαριστήσεις κάποιους ανθρώπους όταν τελειώνεις «κάτι», σημαίνει ότι αυτό το «κάτι» σου άρεσε, άρα άξιζε να το ζήσεις. Σκέφτηκα να μην γράψω ευχαριστήρια, αφού τα είπα εκτενώς στη δημόσια παρουσίαση της διατριβής μου. Αλλά επειδή τα γραπτά μένουν, τα «ευχαριστώ» αυτά θέλω να μείνουν. Ας ξεκινήσω λοιπόν...

Ήταν τιμή μου να δουλέψω με τον Χρήστο Δελιδάκη. Είναι μοναδική η ποιότητά του ως επιστήμονας και ως άνθρωπος. Τον ευχαριστώ για όλα όσα μου έμαθε αλλά κυρίως για την ελευθερία που μου έδωσε να πειραματιστώ, να κάνω λάθη, να μάθω, να αμφισβητήσω την σκέψη μου και τώρα πλέον να νοιώθω ότι έχω ωριμάσει αρκετά για να συνεχίσω την ερευνητική μου πορεία.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την κα Δέσποινα Αλεξανδράκη. Είναι αξιοθαύμαστος ο τρόπος με τον οποίο μεταδίδει τον ενθουσιασμό και την αγάπη της για την επιστήμη της Βιολογίας στους μαθητές της. Όμως την ευχαριστώ πρωτίστως για τις συμβουλές της και για τις πολλές και πολύ αυθεντικές συζητήσεις επί παντός επιστητού που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια.

Ευχαριστώ τον κ. Ταλιανίδη για την ουσιαστική συμμετοχή του στην τριμελή μου επιτροπή και για τις επιστημονικές του συμβουλές.

Τον κύριο Παπαματθαιάκη που το καλοκαίρι του 2000 με δέχτηκε στο εργαστήριο του για τρίμηνη πρακτική άσκηση, όπου έγινε και η πρώτη επαφή μου με τον ερευνητικό χώρο. Ευχαριστώ όλο το εργαστήριο του κ. Παπαματθαιάκη και ιδιαίτερα την Κατερίνα Λιαπάκη που για 3 μήνες ήμουνα η σκιά της. Εκεί γνώρισα και τον Μπάμπη Σπηλιανάκη- υποψήφιος διδάκτορας τότε. Η όρεξη του για την έρευνα ήταν μεταδοτική. Ευχαριστώ τον κύριο Οικονόμου για την συνεργασία του και το ενδιαφέρον του, τους 7 σχεδόν μήνες που συνεργαστήκαμε για το project της φασματοσκοπίας. Ευχαριστώ την Λίλυ, τον Νίκο και την Μαλβίνα. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Νεκτάριο Ταβερναράκη, τον οποίον γνώρισα το 1995, λίγο πριν φύγει για Αμερική, όπου αντικατέστησε για ένα καλοκαίρι στο φροντιστήριο τον εκπληκτικό καθηγητή Γκομπόιτζο Θανάση. Χάρηκα ιδιαίτερα όταν το 2000 τον είδα να γυρίζει πίσω στήνοντας το δικό του εργαστήριο στο ΙΜΒΒ και για όλες τις μετέπειτα ερευνητικές επιτυχίες του.

Καταλυτικό ρόλο στην πειραματική αντίληψη και προσέγγιση που απέκτησα, έχει ο Κωστής Κουμπανάκης. Ο Κωστής, ήταν ο supervisor μου στην πτυχιακή εργασία μου και για ένα χρόνο (Μάρτιος 2001-Φλεβάρης 2002) μου έμαθε πως να σχεδιάζω τα πειράματα. Του οφείλω πολλά και τον ευχαριστώ. Ευχαριστώ πολύ την τρυφερή και πραγματικά πολύ καλή φίλη Ιωάννα Ζαρίφη για όλη την υποστήριξή της. Ευχαριστώ τον αδιαπραγμάτευτο (με την καλή έννοια) Νίκο Γιαγτζόγλου, την γλυκιά και δυναμική Χρυσούλα Πιτσούλη και τον ενθουσιώδη Γιώργο Απιδιανάκη. Τα

παραπάνω πέντε παιδιά εκτός ότι με στήριξαν σε πολλούς τομείς, αποτέλεσαν για μένα πρότυπα-εργαστηριακής μίμησης και ήθους. Ο ενθουσιασμός τους σε συνδυασμό με την εξυπνάδα και την εργατικότητά τους δημιούργησαν ένα περιβάλλον που ήθελα να είμαι κομμάτι του.

Τα χρόνια περνούσαν. Πολλά καταπληκτικά παιδιά ήρθαν στο εργαστήριο και τα οποία άφησαν την δικιά τους, ξεχωριστή, πινελιά στον «καμβά» του εργαστηρίου. Ευχαριστώ τον Pawel με τον οποίο μοιραζόμασταν για περισσότερο από 7 χρόνια την ίδια γωνιά του εργαστηρίου και πραγματικά απόλαυσα την παρέα του και τις συζητήσεις μας. Για τις πολλές ευχάριστες στιγμές και για όλα όσα μοιραστήκαμε ευχαριστώ ιδιαίτερα την Κριστίνα, την Εύα, τον Νίκο Βρεττό και την Κατερίνα. Για το ωραίο κλίμα του εργαστηρίου ευχαριστώ τον Vatsha, την Κωνσταντίνα, το Βασίλη, τον John, την Dee, την Γιώτα και όλα τα παιδιά που πέρασαν από το εργαστήριο αυτά τα 11 χρόνια. Ευχαριστώ πολύ την Ιωάννα Ελευθεριάδου, με την οποία συνεργαστήκαμε άψογα για περισσότερο από 1,5 χρόνο. Με την Μαρίνα Θεοδοσίου δουλέψαμε μαζί 5 απολαυστικούς μήνες. Ευχαριστώ την Ιωάννα Κολτσάκη για την βοήθειά της στα stainings.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον καταπληκτικό και ευγενικό Stefan. Με βοήθησε πολύ όσο ήταν στο εργαστήριο του Σαββάκη στη Κρήτη. Χρυσός άνθρωπος και επιστήμονας.

Την Μαρία Μοναστηριώτη την ευχαριστώ για το ενδιαφέρον της και την βοήθεια της όλα αυτά τα χρόνια. Εκτιμώ ιδιαίτερα την όρεξη της να με βοηθήσει σε πολύ δύσκολες πειραματικές φάσεις.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην γλυκιά και πανέξυπνη Maura Strigini για το ενδιαφέρον της. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Μιχάλη Αβέρωφ για τις επιστημονικές-και όχι μόνο-συμβουλές του. Ευχαριστώ θερμά όλο το «αδελφικό» μας εργαστήριο. Την Μεριεμ, την Γεωργία, τον Χάρη, την Frederike, τον Νίκο, τον Andrew. Αλλά και προηγούμενα μέλη του εργαστηρίου: Τάσο, Αλέξανδρο, Tijana, Claudia, Βασίλη Δ., Θεοδώρα, Andres, Έλπη. Ευχαριστώ όλους όσους «πέρασαν» από τα εργαστήρια Δελιδάκη-Αβέρωφ για το ευχάριστο κλίμα που δημιούργησαν.

Ευχαριστώ τα εργαστήρια του Ταβερναράκη (ιδιαίτερα τους: Δαφνη, Matthias, Αγγέλα, Μαίρη), του Γαρίνη (ιδιαίτερα την Ισμήνη και τον Ζήση), του Λουκέρη (ιδιαίτερα την Εύη) καθώς και του κ. Λούη.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην γλυκιά Στέλλα Μιχελιδάκη και στην δυναμική Κατερίνα Μιχελιδάκη που με το ενδιαφέρον τους για όλους τους φοιτητές, και το ζήλο τους για την δουλειά με βοήθησαν ουσιαστικά όλα αυτά τα χρόνια.

Ευχαριστώ επίσης: τον Γιάννη Λειβαδάρα για την πολλή σημαντική βοήθεια του στις ενέσεις και στα staining. Τον Κουκλινό Γιάννη για το ενδιαφέρον του και την βοήθεια του. Ευχαριστώ πολύ την κα Πόπη, τον Σταύρο και την Μαρία από την αποθήκη, την κ. Ρένα και κ Πέπη από την Μικροχημεία, τον Γιώργο Βρεντζο. Καθώς και την Ελυθερία Λαρεντζάκη για τις εκπρόθεσμες υπογραφές.

Ευχαριστώ τους πολύ καλούς μου φίλους για την αγάπη τους και το ενδιαφέρον τους: την Χριστίνα Μ, τη Χριστίνα Κ, τη Γωγώ, τη Μάγδα, τη Ντίνα, το Μανώλη, το Λευτέρη και τη Κική.

Ευχαριστώ τους κολλητούς μου φίλους που αν και μερικοί πλέον βρίσκονται μακριά, η σκέψη τους και η αμοιβαία αγάπη μας εκμηδενίζουν τις αποστάσεις-την Έφη, το Νίκο, τη Κωστούλα, τη Βάλια και τη Ρένα. Είναι σπάνιοι άνθρωποι.

Ευχαριστώ τους συγγενείς μου και όλα τα ξαδέλφια μου για όλα αυτά που έχουμε μοιραστεί. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον παππού μου Νίκο για την αγάπη του και την πίστη του σε εμένα. Την γιαγιά Μαριάνθη γιατί απλά είναι αξιολάτρευτη. Ευχαριστώ την αγαπημένη μου θεία Δέσποινα και τις εξαδέλφες μου, Κλειώ και Μαριανθούλα, όχι μόνο για την αγάπη τους αλλά το αληθινό ενδιαφέρον τους για την πρόοδο μου και την ευτυχία μου.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στους 4 ανθρώπους που καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο κομμάτι του μυαλού και της καρδιάς μου και αισθάνομαι ΠΟΛΥ τυχερή που τους έχω στη ζωή μου. Είναι οι άνθρωποι που αγαπώ, θαυμάζω και υπερηφανεύομαι για την ποιότητα και το έργο τους.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ τους αξιολάτρευτους γονείς μου Γιάννη και Κρυστάλλη. Όχι μόνο για την ολοκληρωτική αγάπη τους, αλλά γιατί στηρίζουν τις επιλογές των παιδιών τους, παραγκωνίζοντας τις δικές τους επιθυμίες. Είναι άξιοι γονείς.

Ευχαριστώ τον αγαπημένο μου αδελφό, Μιχάλη. Αποτέλεσε και αποτελεί πρότυπο προς μίμηση. Το καλύτερο «δώρο» που μου έκαναν οι γονείς μου.

Τέλος **ευχαριστώ**, το «άλλο μου μισό», τον Ανδρέα. Ο Ανδρέας είχε καθοριστικό ρόλο στην ολοκλήρωση της διδακτορικής αυτής διατριβής. Τον ευχαριστώ για την τεράστια στήριξη και την απίστευτη υπομονή όλα αυτά τα χρόνια. Τον ευχαριστώ για όλα όσα ζήσαμε και θα ζήσουμε μαζί.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πως από ένα μόνο κύτταρο, το ζυγωτό, καταλήγουμε στην ανάπτυξη ενός πολυκύτταρου ζωντανού οργανισμού; Αυτό το ερώτημα αποτελεί το κινητήριο έναυσμα για την αναπτυξιακή βιολογία. Η ανάπτυξη ενός πολυκύτταρου οργανισμού στηρίζεται στην διαφορετική έκφραση των γονιδίων του στους διάφορους κυτταρικούς υποπληθυσμούς. Η κυτταρική τύχη που θα ακολουθήσει ένα κύτταρο εξαρτάται από το υποσύνολο του γονιδιώματος που εκφράζει, το οποίο στη σειρά του εξαρτάται από δύο συνιστώσες. Η πρώτη αφορά την κυτταρική γενεαλογία και η δεύτερη τα μηνύματα που το εκάστοτε κύτταρο λαμβάνει από το περιβάλλον του.

Πολλές αποφάσεις κατά την διαδικασία επιλογής της κυτταρικής τύχης, στους εξελικτικά ανώτερους οργανισμούς, βασίζονται σε διακυτταρική επικοινωνία. Ένα από τα βασικά σηματοδοτικά μονοπάτια είναι εκείνο του Notch (Artavanis-Tsakonas et al. 1995; Artavanis-Tsakonas et al. 1999). Μια από τις καλύτερα μελετημένες διαδικασίες στην οποία εμπλέκεται το μονοπάτι του Notch είναι η νευρογένεση. Το μονοπάτι του Notch εμπλέκεται και κατά τον σχηματισμό του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) και κατά την εμβρυϊκή και μετά-εμβρυϊκή ανάπτυξη του περιφερικού νευρικού συστήματος (ΠΝΣ).

Πολλά από τα σχετικά δεδομένα έχουν προέλθει τις τελευταίες δεκαετίες μελετώντας την ανάπτυξη και διαφοροποίηση του νευρικού συστήματος της δροσόφιλας, όπως και πολλών άλλων οργανισμών. Ο βασικότερος λόγος, για τον οποίο το νευρικό σύστημα έχει αποτελέσει σημείο αναφοράς, είναι ότι πολυάριθμοι διακριτοί τύποι νευρώνων (και άλλων κυττάρων επικουρικού χαρακτήρα), προκύπτουν με στερεότυπο τρόπο από ομάδες ισοδύναμων αρχικά κυττάρων.

ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

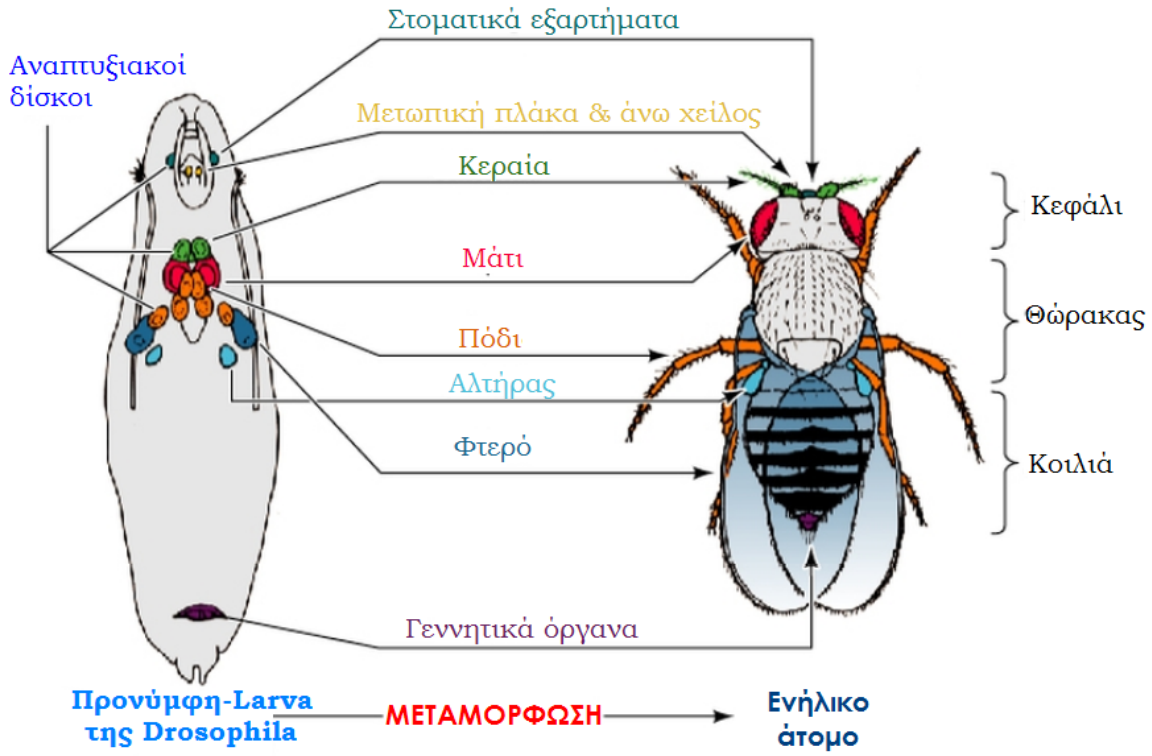
Το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα της Δροσόφιλας (ΚΝΣ) αποτελείται από τον εγκέφαλο και τη νευρική χορδή. Τα κύτταρα που αποτελούν το ΚΝΣ προέρχονται από το λεγόμενο νευροεκτόδερμα, μια στοιβάδα κυττάρων του εξωδέρματος που βρίσκεται πλευροκοιλιακά στο σώμα του εμβρύου. Μοναδιαίοι νευροβλάστες προκύπτουν με ένα περιοδικό πρότυπο, ενώ τα παρεμβαλλόμενα κύτταρα (επιδερμοβλάστες) αναπτύσσονται σε επιδερμίδα (Hartenstein and Campos-Ortega 1984). Οι επιδερμοβλάστες παραμένουν στην επιφάνεια του κοιλιακού εκτοδέρματος και δημιουργούν επιδερμικές δομές, ενώ οι νευροβλάστες εισχωρούν κάτω από το επιθήλιο, διαιρούνται ασύμμετρα, τελικά παράγοντας νευρώνες και

κύτταρα γλοίας, τα οποία αργότερα συγκροτούν τον εγκέφαλο και την κοιλιακή νευρική χορδή. Οι νευροβλάστες και οι επιδερμοβλάστες προέρχονται από ομάδες κυττάρων, που ονομάζονται ομάδες νευρικής ισοδυναμίας ή προνευρικοί συναθροισμοί. Αρχικά κάθε κύτταρο του προνευρικού συναθροισμού έχει την ικανότητα να ακολουθήσει την νευρική τύχη, αλλά εν τέλει μέσω της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch ένα μόνο κύτταρο υιοθετεί την νευρική τύχη, ενώ τα υπόλοιπα την επιδερμική. Απώλεια λειτουργίας του μονοπατιού Notch οδηγεί σε παραγωγή υπεράριθμων νευροβλαστών και ταυτόχρονη έλλειψη επιδερμικών κυττάρων (νευρογόνος φαινότυπος).

ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Η Drosophila melanogaster είναι ολομετάβολο έντομο. Οι ενήλικες δομές του εντόμου προέρχονται από μονόστοιβα επιθήλια, τους αναπτυξιακούς δίσκους, που μεγαλώνουν με κυτταρικό πολλαπλασιασμό κατά τα προνυμφικά στάδια ανάπτυξης και διαφοροποιούνται σταδιακά κατά την νυμφική περίοδο, αντικαθιστώντας τους προνυμφικούς ιστούς, οι οποίοι ιστολύονται.

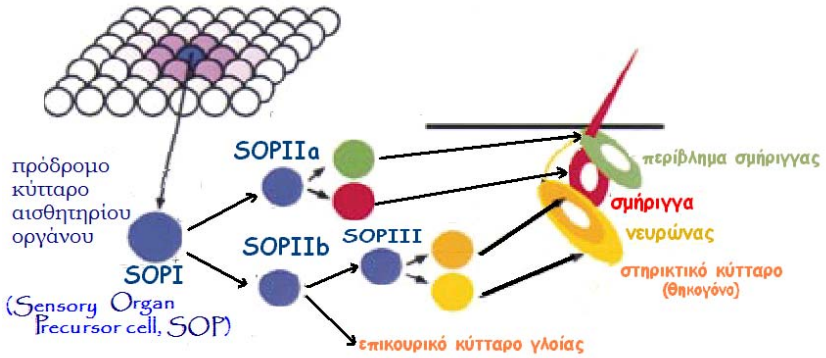
Ο μόνος ιστός που διατηρείται κατά τη μεταμόρφωση είναι ο νευρικός. Το προνυμφικό ΝΣ σχηματίζεται κατά την εμβρυογένεση ενώ κατά την φάση της προνύμφης/ νύμφης νέοι νευρώνες και κύτταρα γλοίας προστίθενται για να δομηθεί τελικά το ενήλικο ΝΣ. Οι αισθητήριοι νευρώνες του ενήλικου ατόμου σχηματίζονται κατά τη διάρκεια του τρίτου προνυμφικού σταδίου και του σταδίου της νύμφης.



Τα αισθητήρια όργανα της Drosophila melanogaster ποικίλλουν σε σχήμα και μορφή. Μπορούν να ομαδοποιηθούν σε εξωτερικά αισθητήρια όργανα, τα οποία αποτελούνται από εξωτερικές και εσωτερικές δομές, και τα εσωτερικά αισθητήρια όργανα, τα οποία αποτελούνται αποκλειστικά από εσωτερικές δομές (Jan and Jan 1993). Τα εξωτερικά αισθητήρια όργανα φέρουν εξωτερικές δομές για την ανίχνευση μηχανικών ή χημικών ερεθισμάτων.

Οι μηχανοαισθητήριες σμήριγγες (εξωτερικά αισθητήρια όργανα) καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας του ενήλικου ατόμου. Στον θώρακα της Δροσόφιλας υπάρχει ένας σταθερός αριθμός μεγάλων σμηρίγγων (έντεκα σε κάθε μισό του θώρακα), που καλούνται μακροχαίτες και βρίσκονται σε συγκεκριμένες θέσεις. Οι μικρότερες σμήρριγγες, που καλούνται μικροχαίτες, ποικίλουν στον αριθμό και βρίσκονται ομοιόμορφα ισοκατανεμημένες σε σειρές κατά μήκος του θώρακα. Κάθε αισθητήριο όργανο δημιουργείται από ένα πρόδρομο κύτταρο το οποίο καλείται πρόδρομο αισθητηρίου οργάνου (SOP, Sensory Organ Precursor) ή sensory mother cell (SMC).

Τα κύτταρα SOP των θωρακικών σμηρίγγων προέρχονται από ομάδες κυττάρων που βρίσκονται σε καθορισμένες θέσεις στο δίσκο του φτερού, οι οποίες ονομάζονται επίσης προνευρικοί συναθροισμοί, όπως συμβαίνει και κατά την ανάπτυξη του ΚΝΣ. Οι προνευρικοί συναθροισμοί κάνουν την εμφάνισή τους στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού στο στάδιο της προνύμφης τρίτου σταδίου είτε νωρίς στο στάδιο της νύμφης και με ακριβές χωροχρονικό αναπτυξιακό πρόγραμμα. (Romani et al. 1989; Simpson 1990; Cubas et al. 1991; Huang et al. 1991; Skeath and Carroll 1991). Οι πρόδρομοι των μακροχαιτών καθορίζονται πρώτοι (σε προχωρημένο στάδιο προνύμφης τρίτου σταδίου) και παραμένουν στην θέση που καθορίστηκαν, ανάμεσα από τα διαιρούμενα επιδερμικά κύτταρα. Οι μικροχαίτες καθορίζονται αργότερα, σε πρώιμο στάδιο της προνύμφης (Cubas et al. 1991; Skeath and Carroll 1991).

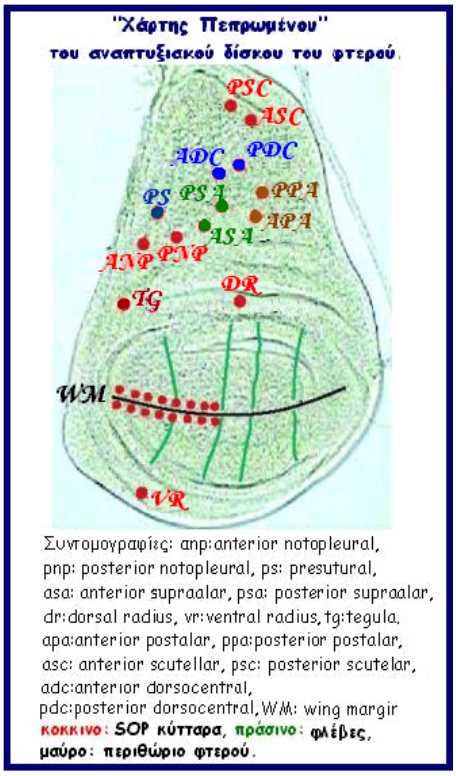


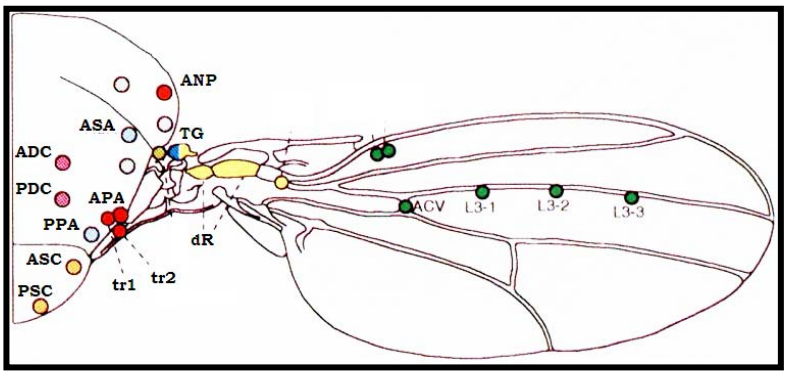
Κατά την μεταμόρφωση το SOP κύτταρο εκτελεί μια σιρά στερεότυπων ασύμμετρων διαιρέσεων που παράγουν το τελικό αισθητήριο όργανο, που αποτελείται από 5 κύτταρα, όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα.

Η ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ SOP ΚΥΤΤΑΡΟΥ

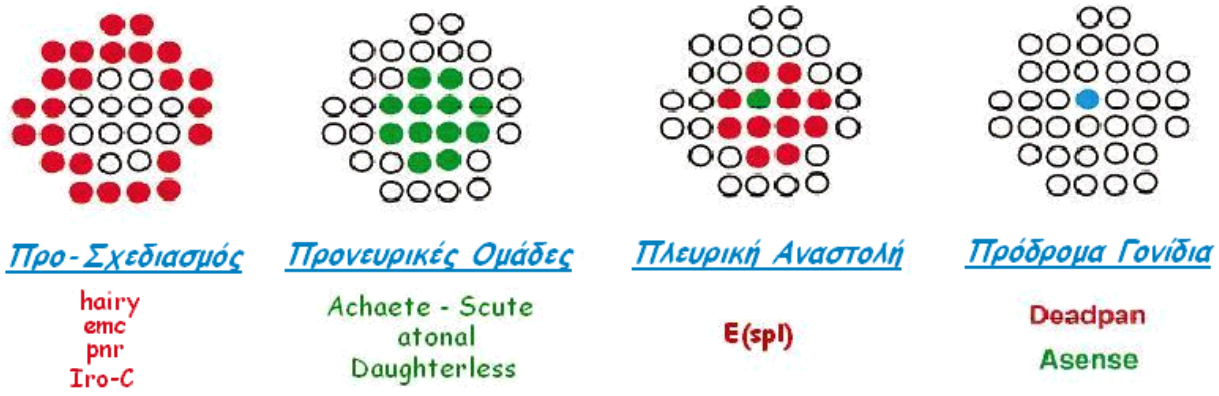
Η έναρξη της ανάπτυξης του ΠΝΣ χαρακτηρίζεται από την έκφραση προνευρικών γονιδίων του συμπλόκου achate-scute, όπως και των atonal και amos σε ομάδες κυττάρων του εξωδέρματος, που καλούνται προνευρικές ομάδες ή προνευρικοί συναθροισμοί (proneural clusters). Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες καθιστούν όλα τα κύτταρα μέσα σε αυτές τις ομάδες ικανά να διαφοροποιηθεί σε SOP.

Κάποιοι προνευρικοί συναθροισμοί θα δώσουν γένεση μόνο σ' ένα SOP κύτταρο (π.χ. anterior notopleural, posterior notopleural, anterior supraalar και posterior postalar), ενώ άλλοι γενικά μεγαλύτεροι θα δώσουν γένεση σε δύο ή περισσότερα κύτταρα SOP (π.χ. anterior postalar, tegula, wing margin). Κάποιοι συναθροισμοί όπως αυτοί που θα δώσουν γένεση στην anterior notopleural μακροχαίτη και στην posterior postalar μακροχαίτη, καθυστερούν χρονικά να καθορίσουν το SOP κύτταρο (Campuzano and Modolell 1992).





Σχηματικά η διαδικασία καθορισμού του SOP κυττάρου φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα



Αρχικά ένα σύνολο παραγόντων, που καλούνται παράγοντες προ-σχεδιασμού ή παράγοντες αρχικού σχεδιασμού, καθορίζουν διάφορες ομάδες κυττάρων (προνευρικοί συναθροισμοί) οι οποίες έχουν το δυναμικό να αναπτυχθούν σε πρόδρομα αισθητήρια κύτταρα (SOP). Τέτοιοι παράγοντες είναι τα γονίδια: Iroquois-Complex, wingless, pannier, hedgehog, decapentaplegic, extramacrochaete (emc) και hairy τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που δρουν καθορίζοντας τις γενικές χωρικές συντεταγμένες του δίσκου. Πολλοί απ' αυτούς είναι μεταγραφικοί (π.χ. hairy) ή μετα-μεταφραστικοί (emc) ρυθμιστές των Achaete και Scute. Τα Ac και Sc (και Atonal κλπ) είναι συγγενείς bHLH Πρωτεΐνες, που λειτουργούν ως ετεροδιμερή με την Daughterless (Da, βλ. παρακάτω) και προωθούν τη μετάβαση στην SOP τύχη, γιαυτό αποκαλούνται προνευρικές πρωτεΐνες.

Ενώ αρχικά ο προνευρικός συναθροισμός εκφράζει τα ac και sc σε ομοιόμορφα επίπεδα, το μελλοντικό πρόδρομο κύτταρο αρχίζει να συσσωρεύει υψηλότερα επίπεδα προνευρικών πρωτεϊνών ενώ συγχρόνως τα γύρω του κύτταρα μειώνουν τις προωευρικές πρωτεΐνες. Σύντομα κατόπιν, ενεργοποιούνται τα λεγόμενα πρόδρομα νευρικά γονίδια (π.χ asense, deadpan) τα οποία θα βοηθήσουν στην περαιτέρω διαφοροποίηση του SOP κυττάρου. Τα γονίδια αυτά εκφράζονται αποκλειστικά στο SOP κύτταρο, το οποίο πλέον έχει καθοριστεί.

Η μετάβαση από ομοιόμορφο προνευρικό συναθροισμό στην ώριμη κατάσταση του καθορισμένου SOP προϋποθέτει, μεταξύ άλλων, την μεταγραφική καταστολή των ac, sc (και των πρόδρομων νευρικών γονιδίων) στα πέριξ του SOP κύτταρα. Αυτό το επιτελεί ομάδα μεταγραφικών καταστολέων, ονόματι Enhancer of split complex (E(spl)-C) (Bailey and Posakony 1995; Lecourtois and Schweisguth 1995). Οι πρωτεΐνες E(spl) εκφράζονται αποκλειστικά στα μη-SOP κύτταρα του προνευρικού

συναθροισμού, ως στόχοι σηματοδότησης Notch μεταξύ των προνευρικών κυττάρων, μια διαδικασία που αποκαλείται πλευρική αναστολή . ((Cubas et al. 1991; Oellers et al. 1994; Ohsako et al. 1994; Van Doren et al. 1994; Heitzler et al. 1996; Culi and Modolell 1998; Giagtzoglou et al. 2003)

Ο Sriuranporg και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η σηματοδότηση μέσω του Notch οδηγεί εκτός από την μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων E(spl) και σε απότομη αποικοδόμηση των ομόλογων πρωτεϊνών achaete-scute στα θηλαστικά (Sriuranpong et al. 2002). Αυτός ο βαθμός αποικοδόμησης δεν μπορούσε να επιτευχθεί μόνο με υπερέκφραση της πρωτεΐνης HES [ομόλογη των E(spl) στα θηλαστικά]. Αντίθετα με υπερέκφραση της πρωτεΐνης E12 (ομόλογη της daughterless) υπήρχε προστασία έναντι της αποικοδόμησης.

Πρόσφατα η ομάδα Kageyama, παρουσίασε μία αναθεωρημένη άποψη της πλευρικής αναστολής στηριζόμενοι στην διαφοροποίηση των νευροβλαστών στο νευρικό σύστημα των θηλαστικών (Kageyama et al. 2008; Shimojo et al. 2008). Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν καλλιέργειες πρόδρομων νευρικών κυττάρων και τομές από εγκέφαλο τρωκτικού και απέδειξαν ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης Hes1 (ομόλογη των E(spl)) ταλαντώνονται χρονικά και οι ταλαντώσεις αυτές προκαλούν ταλαντώσεις με αντίθετη φάση των επιπέδων της προνευρικής πρωτεΐνης Ngn2 και του Notch-δεσμευτή Dll1. Οι ταλαντώσεις αυτές είναι απαραίτητες για την διατήρηση των νευρικών βλαστοκυττάρων σε αδιαφοροποίητη κατάσταση. Η διαφοροποίηση επέρχεται όταν τερματιστεί η ταλάντωση και ένα απόγονο κύτταρο αρχίσει να εκφράζει σταθερά ψηλά επίπεδα Ngn2 και Dll1 και χαμηλά Hes1. Ταλαντώσεις των Hes πρωτεϊνών όπως και συστατικών του μονοπατιού Notch έχουν περιγραφεί και σε άλλα συστήματα όπως κατά την σωμιτογένεση.

bHLH Μεταγραφικοί παράγοντες Και Νευρογένεση

Οι πρωτεΐνες bHLH (basic-helix-loop-helix) αποτελούν μία από τις πλέον πολυάριθμες οικογένειες μεταγραφικών πρωτεϊνών με κρίσιμους ρόλους σε πλειάδα αναπτυξιακών και μεταβολικών διαδικασιών (Massari and Murre 2000) και απαντούν σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα.

Η περιοχή bHLH αποτελείται από 60 αμινοξέα και συνισταται από μια βασική περιοχή (basic) και δύο αμφιπαθικές α-έλικες που χωρίζονται από μια θηλεια μεταβλητού μήκους. Η βασική περιοχή είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση της πρωτεΐνης στο DNA. Η περιοχή HLH προάγει τον διμερισμό των πρωτεϊνών, επιτρέποντας τον σχηματισμό ομό- ή ετερο- διμερών. Οι δύο βασικές περιοχές

πλησιάζουν κατά τον διμερισμό και προσδένονται σε συγκεκριμένες εξανουκλεοτιδικές αλληλουχίες που ονομάζονται E-box και έχουν την αλληλουχία CANNTG (Murre et al. 1989b; Van Doren et al. 1991; Ohsako et al. 1994; Van Doren et al. 1994). Οι E αλληλουχίες διακρίνονται σε διάφορους επιμέρους τύπους, όπως τους E_A (CAGC/GTG) και E_B (CACGTG). Υπάρχουν όμως και μη κανονικές αλληλουχίες τύπου E όπου επίσης προσδένονται συγκεκριμένες κατηγορίες παραγόντων bHLH, όπως, για παράδειγμα, οι αλληλουχίες τύπου E_C (CACGCG) και N (CACG/AAG).

Ένας αριθμός γνωρισμάτων αποκαλύφθηκε από την ανάλυση της κρυσταλλικής δομής της E47 πρωτεΐνης (Ellenberger et al. 1994). Σύμφωνα με την ανάλυση προκύπτει ότι το διμερές E47 σχηματίζει ένα παράλληλο δεμάτιο τεσσάρων ελίκων το οποίο επιτρέπει στην βασική περιοχή της πρωτεΐνης να έλθει σε επαφή με την μεγάλη αύλακα του DNA. Εκτός από την βασική περιοχή, αμινοξέα της θηλειάς και της έλικας II έρχονται σε επαφή με το DNA. Οι σταθερές αλληλεπιδράσεις των HLH περιοχών οφείλονται σε δυνάμεις van der Waals μεταξύ των υδρόφοβων αμινοξέων. Το διμερές E47 είναι τοποθετημένο στο κέντρο του E-box, με κάθε μονομερές να έρχεται σε επαφή με το ήμισυ του εξανουκλεοτιδίου (είτε με το CAC, είτε με το CAG). Το γλουταμινικό οξύ (E) που υπάρχει στην βασική περιοχή κάθε υπομονάδας, δημιουργεί επαφές με τις βάσεις του DNA, κυτοσίνη και αδενίνη, σε κάθε ήμισυ του E-box. Η παρακείμενη αργινίνη (R) σταθεροποιεί την θέση του γλουταμινικού, με το να έρχεται σε επαφή με τις δύο βάσεις του DNA καθώς και με τον φωσφοδιεστερικό σκελετό του DNA. Τα δύο αυτά αμινοξέα (γλουταμινικό και αργινίνη, ER) είναι συντηρημένα στις περισσότερες bHLH πρωτεΐνες, γεγονός που συμφωνεί με τον ρόλο που έχουν στην πρόσδεση των πρωτεϊνών σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA (Murre et al. 1989a; Murre et al. 1989b).

Οι δύο κατηγορίες bHLH μεταγραφικών παραγόντων που είναι σημαντικές κατά την νευρογένεση στη Δροσόφιλα όπως και στα θηλαστικά και οι οποίες μελετήθηκαν κατά την διάρκεια της παρούσας εργασίας είναι:

α)Οι προνευρικές πρωτεΐνες, όπως είναι οι πρωτεΐνες του συμπλόκου achaete-scute και η πρωτεΐνη Daughterless, οι οποίες είναι μεταγραφικοί ενεργοποιητές και προάγουν την νευρική τύχη των κυττάρων.

β)Οι πρωτεΐνες του συμπλόκου Enhancer of split, οι οποίοι δρουν ως μεταγραφικοί καταστολείς, ανήκουν στην κατηγορία των bHLH-Orange πρωτεϊνών και ανταγωνίζομενες τις προνευρικές πρωτεΐνες καταστέλλουν την νευρική τύχη των κυττάρων.

Προνευρικές πρωτεΐνες

Η μελέτη των προνευρικών γονιδίων ξεκίνησε την δεύτερη δεκαετία του 20ου αιώνα, όταν βρέθηκαν μεταλλαγμένες μύγες που τους έλειπαν υποσύνολα μακροχαιτών (εξωτερικά αισθητήρια όργανα) (Ghysen and Dambly-Chaudiere 1988). Τέλη της δεκαετίας του 1970 είχε ταυτοποιηθεί ένα σύνολο γονιδίων που ρύθμιζαν τα αρχικά στάδια την νευρικής ανάπτυξης της Δροσόφιλας (να βρω Garcia Bellido 1979_Genetics_491). Η μοριακή ανάλυση οδήγησε στην ταυτοποίηση 4 γονιδίων του συμπλόκου τα οποία ονομάστηκαν achaete (ac), scute (sc), lethal of scute (lsc) και asense (ase) {Gonzalez, 1989 #22; Villares, 1987 #63} και στην διαπίστωση ότι τα προϊόντα τους έχουν παρόμοια αλληλουχία αλλά και με τις πρωτεΐνες myc, Daughterless και MyoD {Villares, 1987 #63; Murre, 1989 #12}. Η δουλειά αυτή προετοίμασε τον δρόμο για την ταυτοποίηση της περιοχής bHLH, ένα δομικό μοτίβο που έχουν πολλές πρωτεΐνες και ευθύνεται για τον διμερισμό τους και την πρόσδεση στο DNA (Murre et al. 1989a).

Οι προνευρικές πρωτεΐνες επαρκούν και χρειάζονται για την νευρική ανάπτυξη. Εκτοπική έκφραση μερικών μελών της οικογένειας οδηγεί στην διαφοροποίηση του νευροεκτοδέρματος σε διαφοροποιημένους νευρώνες (Lee et al., 1995; Ma et al., 1996; Takebayashi et al., 1997). Επιπλεόν, Δροσόφιλες και ποντίκια που στερούνται ενός ή και περισσότερων από τα προνευρικά γονίδια, αποτυγχάνουν να αναπτύξουν υποσύνολα των πρόδρομων νευρικών κυττάρων, καθώς και διαφοροποιημένους νευρώνες (Jarman et al., 1993; Ma et al., 1998; Fode et al., 2000; Inoue et al., 2002).

Μέχρι σήμερα στα σπονδυλωτά και στα ασπόνδυλα, έχουν χαρακτηριστεί δύο υπο-οικογένειες προνευρικών bHLH πρωτεϊνών, η Achaete-Scute και η Ato-σχετιζόμενη οικογένεια. Στην Δροσόφιλα στην πρώτη οικογένεια ανήκουν οι πρωτεΐνες του συμπλόκου achaete-scute και οι ομόλογες στα σπονδυλωτά καλούνται achaete-scute homologue (Ash) (π.χ. Mash1, Xash1, hAsh1, Ash2). Στην δεύτερη κατηγορία υπάρχουν τέσσερις πρωτεΐνες της Δροσόφιλας που ανήκουν στην Ato-σχετιζόμενη οικογένεια, που ονομάζονται atonal (ato), target of poxn (tap), absent MD neurons and olfactory sensilla (amos), και cousin of atonal (cato). Οι ομόλογες πρωτεΐνες στα σπονδυλωτά καλούνται Ath, neurogenin (Ngn) και NeuroD.

Οι προνευρικές bHLH πρωτεΐνες (Scute, Achaete, Lethal of Scute, Asense, Atonal και Amos) λειτουργούν ως ετεροδιμερή με την απανταχού εκφραζόμενη πρωτεΐνη Daughterless (da) (Murre et al. 1989, Cabrera and

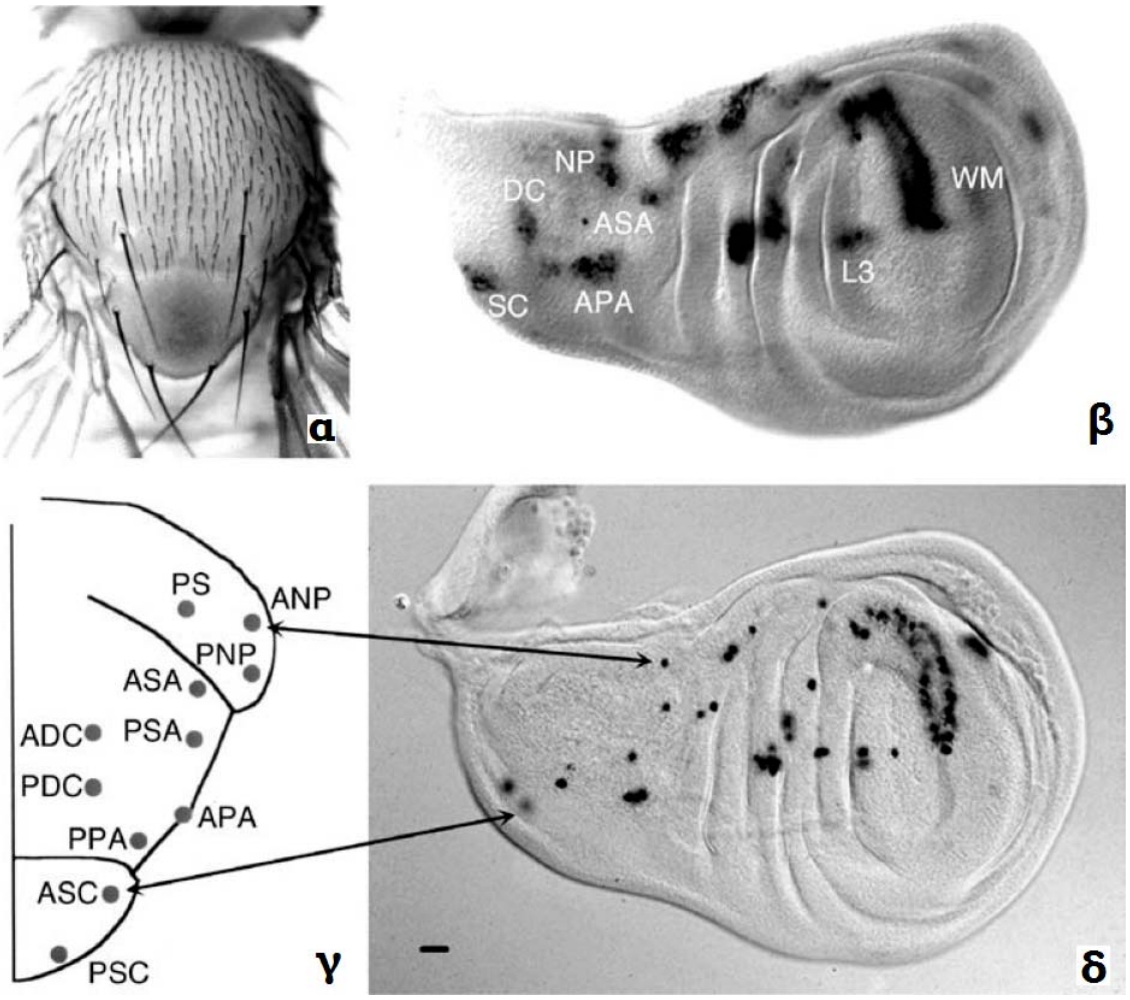
Alonso 1991). Τα ετεροδιμερή αυτά προσδένονται σε αλληλουχίες DNA των 6 νουκλεοτιδίων, που είναι γνωστές ως E_A boxes (CAGGTG ή CAGCTG) (Van Doren et al. 1991, Murre et al. 1994) και έχουν την ικανότητα να δρουν ως μεταγραφικοί ενεργοποιητές (Van Doren et al. 1992, Martinez et al. 1993). Οι πρωτεΐνες Scute και Achaete πιο συγκεκριμένα προτιμούν την αλληλουχία GCAG(G/C)TG. Τα ετεροδιμερή Ac-Sc/Da δημιουργούνται μέσω των αλληλεπιδράσεων των HLH περιοχών των πρωτεϊνών. Πρέπει στο σημείο αυτό να σημειώσουμε ότι σε αντίθεση με τα ετεροδιμερή Ac-Sc/Da, τα ομοδιμερή Sc/Sc και Da/Da δεν έχουν μεγάλη συνάφεια για τα E_A boxes.

Έτσι όπως φαίνεται και από το σχήμα εκτός από την bHLH περιοχή, στο καρβοξυτελικό άκρο των προνευρικών πρωτεϊνών του AS-C υπάρχει και μια περιοχή ενεργοποίησης (activation domain), η οποία είναι συντηρημένη σ' αυτές τις πρωτεΐνες (Giagtzoglou et al. 2003; Giagtzoglou et al. 2005). Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας (Ζαρίφη 2009) χαρακτήρισαν δύο περιοχές στο αμινοτελικό άκρο και στο μέσο της πρωτεΐνης Da που δρουν ως περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (Zarifi 2009).

Γενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα γονίδια του συμπλόκου Achaete-Scute καθορίζουν το κύτταρο που θα διαφοροποιηθεί σε SOP. Μεταλλαγές κέρδους λειτουργίας έχουν ως αποτέλεσμα στην δημιουργία εκτοπικών SOP, ενώ μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας οδηγούν σε απώλεια SOP κυττάρων. Οι προνευρικές bHLH πρωτεΐνες του AS-C έχει προταθεί ότι είναι λειτουργικά υπεράριθμες. Έχει βρεθεί για παράδειγμα ότι η προνευρική ενεργότητα του sc μπορεί να αντικαταστήσει εκείνη του ac (Cubas and Modollel 1992). Ανάλογα η πρωτεΐνη ase μπορεί να αντικαταστήσει την sc (Dominguez and Campunzano 1993). Ακόμη η πρωτεΐνη lethal of scute, αν και έχει βρεθεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του ΚΝΣ, αν εκφραστεί εκτοπικά προάγει την δημιουργία εκτοπικών κυττάρων SOP (Hinz et al. 1994).

Έκφραση των προνευρικών πρωτεϊνών Achaete και Scute

Το γονιδιακό σύμπλοκο Achaete-Scute (AS-C) βρίσκεται στην άκρη του X χρωμοσώματος και περιλαμβάνει τέσσερις μεταγραφικές μονάδες: την achaete (ή T5), την scute (ή T4), την lethal of scute (ή T3) και την asense (ή T8). Τα γονίδια achaete και scute είναι τα σημαντικότερα για την ανάπτυξη των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων στο ενήλικα άτομο. Στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού συνεκφράζονται στους προνευρικούς συναθροισμούς.



Η έκφραση των προνευρικών πρωτεϊνών στους προνευρικούς συναθροισμούς (β) θα οδηγήσει μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού Notch στην επιλογή των πρόδρομων νευρικών κυττάρων (γ), η διαφοροποίηση των οποίων θα δώσει γένεση στα μηχανοαισθητήρια όργανα του ενήλικου ατόμου με στερεοτυπικό πρότυπο (α,γ).

Το πολύπλοκο πρότυπο έκφρασης των γονιδίων achaete και scute συντονίζεται από πολλούς ενισχυτές, καθένας εκ των οποίων συμβάλλει σε συγκεκριμένο υποσύνολο του προτύπου έκφρασης των γονιδίων (Gomez-Skarmeta et al. 1995). Μετά την αρχική ενεργοποίηση της μεταγραφής των προνευρικών γονιδίων ac και sc από τους παράγοντες αρχικού σχεδιασμού (βλ. παραπάνω) οι οποίοι προσδένονται σε ενισχυτές που είναι κοινοί και για τα δύο γονίδια, η διατήρησή της έκφρασής τους οφείλεται κατά ένα μεγάλο ποσοστό σε θετική αυτορύθμιση, δηλαδή ενεργοποίηση των γονιδίων αυτών από τα ίδια τα προϊόντα τους (Van Doren et al. 1991; Martinez et al. 1993; Gomez-Skarmeta et al. 1995).

Απαραίτητα στοιχεία για την αυτορύθμιση αποτελούν τα E_A boxes στα οποία προσδένονται οι προνευρικές πρωτεΐνες ετεροδιμεριζόμενες με την Da (van Doren 1991). Έτσι στην 5' ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου *scute* έχει χαρακτηριστεί ένας ενισχυτής SMC, ο οποίος φαίνεται ότι είναι υπεύθυνος για την συσσώρευση της πρωτεΐνης Scute στο SOP κύτταρο (ή SMC κύτταρο). Στον SMC ενισχυτή του scute γονιδίου έχουν βρεθεί τρία E_A boxes, στα οποία προσδένονται τα ετεροδιμερή Ac-Sc/Da και συμβάλλουν στην αυτορύθμιση της πρωτεΐνης και ένα E_C box. Στο τελευταίο προσδένεται η πρωτεΐνη Hairy και οι bHLH πρωτεΐνες του E(spl)-C (Ohsako et al. 1994; Van Doren et al. 1994). Η θέση αυτή χρειάζεται για τον περιορισμό της έκφρασης του sc: αρχικά για την έκφρασή του σε συγκεκριμένες ομάδες από την Hairy πρωτεΐνη και στη συνέχεια σε ένα SOP κύτταρο ανά ομάδα από την πρωτεΐνες του E(spl)-C.

Εκτός από την αυτορύθμιση έχει βρεθεί και ένας άλλος υποψήφιος ανατροφοδοτικός μηχανισμός που διατηρεί την έκφραση των προνευρικών πρωτεϊνών στο SOP κύτταρο. Σύμφωνα με αυτόν οι προνευρικές πρωτεΐνες ενεργοποιούν την έκφραση ενός μεταγραφικού παράγοντα, του Senseless (Zn finger), ο οποίος με την σειρά του διατηρεί την έκφραση των προνευρικών πρωτεϊνών, είτε με απευθείας ενεργοποίησή τους, είτε μέσω καταστολής των E(spl) (Nolo et al. 2000).

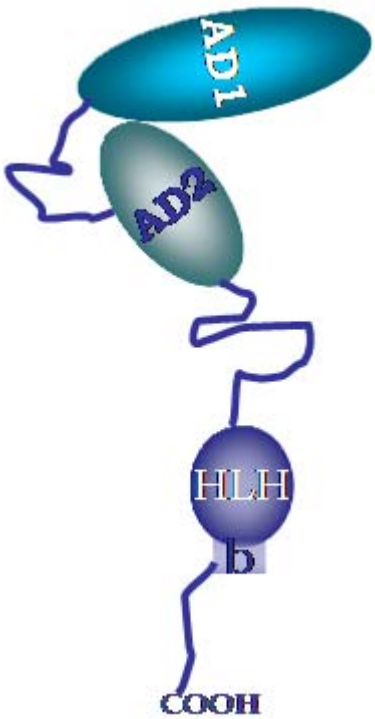
Αναμφισβήτητα σημαντικός παράγοντας για τον καθορισμό του SOP κυττάρου είναι εκτός από την έκφραση των προνευρικών πρωτεϊνών και η δράση τους. Έτσι όπως έχουμε προαναφέρει η δράση των προνευρικών πρωτεϊνών ρυθμίζεται αρνητικά και από την πρωτεΐνη emc. Οι πρωτεΐνες daughterless, achaete, scute, μπορούν να σχηματίζουν ετεροδιμερή με την emc (Murre et al. 1989b; Cabrera and Alonso 1991; Van Doren et al. 1991; Alifragis et al. 1997)) τα οποία όμως δεν έχουν την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA, επειδή η Emc στερείται βασικής περιοχής. Έχει προταθεί ότι το πρότυπο έκφρασης του emc επηρεάζει το *πού* μέσα στον προνευρικό συναθροισμό θα προκύψει το κύτταρο SOP. Το σημείο αυτό είναι το ελάχιστο της έκφρασης του emc (Cubas and Modollel 1992).

Η προνευρική πρωτεΐνη Daughterless

Η πρωτεΐνη Daughterless (Da), είναι η μοναδική τάξης I bHLH πρωτεΐνη (E-protein) στη D.melanogaster, γεγονός που την καθιστά κύριο ρυθμιστή σε πολλές αναπτυξιακές διαδικασίες, κάτι που αντικατοπτρίζεται και από την ευρεία, σχεδόν απανταχού, έκφραση του γονιδίου (Cronmiller and Cummings, 1993). Η πρωτεΐνη Da εμπλέκεται σε πολλά αναπτυξιακά γεγονότα όπως στον καθορισμό φύλου στο

εμβυϊκό στάδιο (Keyes et al. 1992), στη διαφοροποίηση του μεσοδέρματος (Gonzalez-Crespo and Levine 1993), διαφοροποίηση των σιελογόνων αδένων (King-Jones et al. 1999), στον σχηματισμό των ωοθυλακικών κυττάρων του ωαρίου (King-Jones et al. 1999) κ.α.

Όπως προαναφέρθηκε, η Da έχει την ικανότητα ετεροδιμερισμού με ιστοειδικές bHLH πρωτεΐνες για την ενεργοποίηση γονιδίων στόχων. Έτσι λοιπόν η δράση των προνευρικών πρωτεϊνών Ac, Sc και L'Sc που κωδικοποιούνται από το AS-C εξαρτάται από τον ετεροδιμερισμό τους με τη Da. Ο ετεροδιμερισμός οδηγεί στην πρόσδεση σε EA αλληλουχίες στο DNA (Cabrera and Alonso 1991; Giebel et al., 1997; Murre et al., 1989). Η πρωτεΐνη Da έχει κάποια μικρή ικανότητα πρόσδεσης σε EA ως ομοδιμερές (Cabrera 1991).



Στο στάδιο της προνύμφης η δράση της πρωτεΐνης είναι απαραίτητη για τη δημιουργία των SOP στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού που θα δώσουν γένεση στις αισθητήριες σμήριγγες του φτερού και του θώρακα (Cadigan et al.,2002; Jafar-Nehad et al., 2006; Wildonger and Mann, 2005), αλλά και για τη δημιουργία SOP σε πολλούς άλλους αναπτυξιακούς δίσκους.

Η πρωτεΐνη Da αποτελείται από 710 αμινοξέα και κωδικοποιείται από το γονίδιο daughterless στο δεύτερο χρώμοσωμα της Δροσόφιλας. Στο αμινοτελικό άκρο και στο μέσο της πρωτεΐνης απαντώνται δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής.

Η πρώτη περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής ονομάστηκε AD1 (Zarifi 2009), εντοπίζεται στα πρώτα 160 αμινοξέα της πρωτεΐνης. Η δεύτερη περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής είναι η συντηρημένη loop-helix (LH) περιοχή με την αντίστοιχη περιοχή των E πρωτεϊνών των θηλαστικών (Aronheim et al. 1993; Quong et al. 1993) και περιλαμβάνεται στην αμινοξική αλληλουχία 265-417. Η AD1 περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής της Daughterless δεν εμφανίζει καμία ομοιότητα με την αντίστοιχη περιοχή στις ομόλογες πρωτεΐνες των θηλαστικών, αλλά τα πρώτα 28 αμινοξέα είναι αυστηρά συντηρημένα στην τάξη των εντόμων. Η bHLH περιοχή βρίσκεται στο καρβοξυτελικό κομμάτι της πρωτεΐνης και στην αμινοξική αλληλουχία 551-610. Πρόσφατα χαρακτηρίστηκε και μία ακόμα δομική περιοχή που φαίνεται να έχει κατασταλτική δράση, η περιοχή Rep (Wong et al., 2008) στην αμινοξική αλληλουχία 494-530. Όπως και στις E πρωτεΐνες των θηλαστικών η περιοχή Rep εντοπίζεται αμινοτελικά της bHLH περιοχής και είναι συντηρημένη. Πρέπει

επίσης να σημειώσουμε ότι τα 20 αμινοξέα καρβοξυτελικά της bHLH περιοχής είναι αυστηρά συντηρημένα σε όλες τις ομόλογες E πρωτεΐνες. Η περιοχή αυτή που έχει χαρακτηριστεί σαν C domain στο ομόλογο E2-2 έχει δειχθεί ότι είναι απαραίτητη για το σχηματισμό ετεροδιμερών in vivo (Goldfarb et al., 1998).

Στη διαδικασία της επιλογής των προδρόμων των αισθητηρίων οργάνων του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού, το Da εμπλέκεται σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις με τις προνευρικές πρωτεΐνες Achaete (Ac) και Scute (Sc) για την δημιουργία bHLH ετεροδιμερών και ενεργοποίηση προνευρικών γονιδίων στόχων. Η Da επίσης αλληλεπιδρά με τις E(spl)m7, E(spl)m8, E(spl)mγ, E(spl)mβ, E(spl)m5 (Alifragis et al., 1997) οι οποίες δρουν κατασταλτικά στα προνευρικά σύμπλοκα που σχηματίζει η Da με τις Ac και Sc (Giagtzoglou et al.,2003). Η Da - E(spl) αλληλεπίδραση επιτυγχάνεται μεταξύ της AD1 περιοχής της Da και της Orange περιοχής των E(spl) (Ιωάννα Ζαρίφη 2009).

Στις E πρωτεΐνες των θηλαστικών ανήκουν οι E12, E47, E2-2 και HEB. Οι E12 και E47 είναι προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος του ίδιου γονιδίου E2A (Murre et al., 1989). Οι E-πρωτεΐνες εμπλέκονται σε πολλές διαδικασίες και δημιουργούν ετεροδιμερή με πολλούς ιστοειδικούς bHLH μεταγραφικούς παράγοντες όπως για παράδειγμα αυτούς που μετέχουν στη διαδικασία της μυογένεσης και της νευρογένεσης. Σημαντικός είναι επίσης ο ρόλος τους στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των B και T λεμφοκυττάρων (reviewed in (Massari and Murre 2000; Murre 2005); όπου μπορούν να δρουν και σαν ομοδιμερή σύμπλοκα (Bain et al. 1993; Shen and Kadesch 1995). Η πρόσδεση των Id πρωτεϊνών (ομόλογων του Emc) στις E πρωτεΐνες αποτρέπει την στρατολόγηση των τελευταίων στο DNA και την ενεργοποίηση γονιδίων στόχων (reviewed in (Ruzinova and Benezra 2003)).

Οι πρωτεΐνες bHLH-Orange

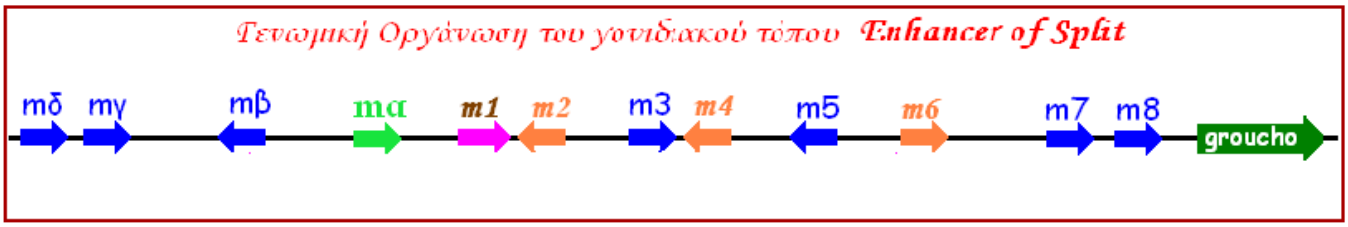
Μια οικογένεια bHLH πρωτεϊνών περιλαμβάνουν δίπλα (C-terminally προς) στην περιοχή bHLH μια αλληλουχία γνωστή ως Orange περιοχή, και για αυτό τον λόγο αναφερομάστε σε αυτές ως bHLH-Orange ή bHLH-O πρωτεΐνες. Πολλές πρωτεΐνες bHLH-O σε ασπόνδυλα και σπονδυλωτά είναι μεταγραφικοί στόχοι του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch και εμπλέκονται στην ρύθμιση της νευρογένεσης, αγγειογένεσης, μεσοδερμικής μεταμεριδίωσης, μυογένεσης, και διαφοροποίησης των T-λεμφοκυττάρων.

Μία βασική λειτουργία των πρωτεϊνων bHLH-O είναι η πρόσδεση σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA και η στρατολόγηση μεταγραφικών συγκαταστολέων.

Παρόλα αυτά είναι πιθανό οι πρωτεΐνες bHLH-O να καταστέλλουν την μεταγραφή εξίσου καλά με επιπρόσθετους μηχανισμούς. Η βέλτιστη θέση πρόσδεσης των bHLH-O πρωτεϊνών, πάνω στο DNA, είναι το εξανουκλεοτίδιο CACGTG (E_B box) (Jennings et al. 1999). Επίσης έχουν την ικανότητα να προσδένονται, αν και λιγότερο ισχυρά, πάνω σε E_C boxes (CACGCG) (Ohsako et al. 1994) και σε N boxes (CACNAG) (Akazawa et al. 1992; Sasai et al. 1992; Tietze et al. 1992).

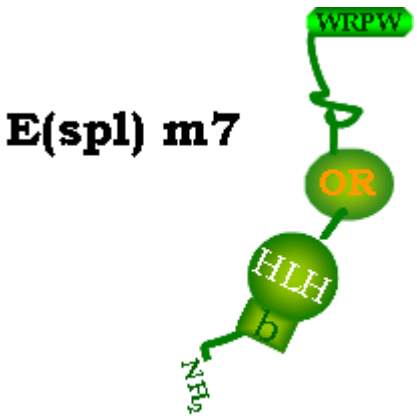
Enhancer of Split

Τα E(spl) bHLH γονίδια βρίσκονται στο τρίτο χρωμόσωμα του γονιδιώματος της Δροσόφιλα, συγκροτημένα σε ένα σύμπλοκο των 60-kb, το οποίο καλείται σύμπλοκο Enhancer of Split [E(spl)-C)] (Delidakis and Artavanis-Tsakonas 1992; Knust et al. 1992).



Σχηματικά το E(spl)-C περιλαμβάνει τις παρακάτω κατηγορίες πρωτεϊνών:

- αυτές που αποκρίνονται στο σηματοδοτικό μονοπάτι του Notch, και είναι
  - 7 bHLH-O πρωτεΐνες (mδ, mγ, mβ, m3, m5, m7, m8) και
  - 4 μη bHLH πρωτεΐνες (m4, ma, m2, m6), που ανήκουν στην οικογένεια Brd-like (Apidianakis et al. 1999).
- και αυτές που είναι ανεξάρτητες από το μονοπάτι σηματοδότησης του Notch και είναι πρωτεΐνες μη bHLH:
  - η m1 (αναστολέας πρωτεασών)
  - και τον συγκαταστολέα Groucho.



Ενώ οι πρωτεΐνες του AS-C είναι προνευρικές, δηλαδή προάγουν την νευρογένεση, οι πρωτεΐνες του E(spl)-C είναι ανασταλτικές της διαδικασίας της νευρογένεσης.

Όπως φαίνεται και από το σχήμα οι bHLH πρωτεΐνες του E(spl)-C αποτελούνται από:

- την bHLH περιοχή, υπεύθυνη για τον διμερισμό των πρωτεϊνών.
- την περιοχή Orange,
- ένα καρβοξυτελικό μοτίβο WRPW.

Μηχανισμοί δράσης των bHLH E(spl) πρωτεϊνών

Μεχρι σήμερα έχουν προταθεί τρεις τρόποι με τους οποίους οι πρωτεΐνες Enhancer of split ασκούν την κατασταλτική τους δράση:

(α) Με απευθείας πρόσδεση στο DNA. Στους φυσικούς ενισχυτές των πρόδρομων νευρικών γονιδίων (π.χ. senseless, asense) υπάρχουν E_A boxes, αλλά και $E_{C/B}$ boxes. Ενώ λοιπόν η πρόσδεση των προνευρικών πρωτεϊνών οδηγεί στην μεταγραφική ενεργοποίηση αυτών των γονιδίων, η πρόσδεση των E(spl) οδηγεί στην καταστολή των γονιδίων. Τέτοια μοτίβα πρόσδεσης υπάρχουν και στους ενισχυτές των προνευρικών γονιδίων αλλά και των ίδιων των E(spl). Δηλαδή από την μια μεριά σε μεταγραφικό επίπεδο οι προνευρικές πρωτεΐνες ρυθμίζουν θετικά και τον εαυτό τους, αλλα και τις πρωτεΐνες E(spl). Και από την άλλη μεριά οι πρωτεΐνες E(spl) ρυθμίζουν αρνητικά και τον εαυτό τους, αλλα και τις προνευρικές πρωτεΐνες.

(β) Με έμμεση πρόσδεση πάνω στο DNA. Στην δεύτερη περίπτωση, οι E(spl) στρατολογούνται στο DNA μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλες DNA προσδενόμενες πρωτεΐνες. Μελέτες μέχρι σήμερα έχουν δείξει ότι οι προνευρικές πρωτεΐνες Da και Sc αλληλεπιδρούν σε πρωτεϊνικό επίπεδο με τις πρωτείνες E(spl). Πιο συγκεκριμένα, η bHLH περιοχή των E(spl) m7, mβ, mγ και m3 αλληλεπιδρά με την καρβοξυτελική περιοχή της πρωτεΐνης Scute (Giagtzoglou et al. 2003; Giagtzoglou et al. 2005). Η περιοχή αυτή του Sc (αμινοξέα 320-345) αποτελεί ταυτόχρονα και την ενεργοποιητική περιοχή της πρωτεΐνης. Από την άλλη μεριά οι πρωτεΐνες E(spl) έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη Da (Zarifi 2009). Η αλληλεπίδραση αυτή γίνεται μέσω της Orange περιοχής των E(spl) και της AD1 περιοχής ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Da.

(γ) Παγιδεύοντας τον ενεργοποιητή (sequestering) εκτός DNA. Η τρίτη περίπτωση, είναι όμοια με την δράση της πρωτεΐνης emc, η οποία αλληλεπιδρώντας με τις προνευρικές πρωτεΐνες τις καθιστά ανίκανες να προσδεθούν στο DNA. Όμως δεν υπάρχουν ακόμα αποτελέσματα στην Δροσόφιλα που να υποστηρίζουν αυτόν τον τρόπο.

Τα παραπάνω 3 μοντέλα δράσης των πρωτεϊνών Enhancer of split δεν αλληλοαποκλείονται. Αντίθετα ενδέχεται οι E(spl) πρωτεΐνες να δρουν και με τους τρεις τρόπους. Αυτό όμως που έχει ενδιαφέρον είναι να βρεθεί ο μηχανισμός που επικρατεί κατά την πλευρική αναστολή. Ποιος δηλαδή είναι ο κύριος τρόπος δράσης των E(spl) πρωτεϊνών κατά την πλευρική αναστολή.

Καταστολή γονιδίων και ο συγκαταστολέας Groucho

Για πολλά χρόνια η μεγαλύτερη έμφαση είχε δωθεί στην μελέτη μηχανισμών που ενεργοποιούν την μεταγραφή. Πιο πρόσφατα, όμως, έχει γίνει σαφές ότι η καταστολή γονιδίων διαδραματίζει έναν εξίσου σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του προσδιορισμού της κυτταρικής μοίρας και της κυτταρικής διαφοροποίησης. Η μεταγραφική καταστολή εξαρτάται από μεταγραφικούς καταστολείς που προσδένονται σε συγκεκριμένες θέσεις στο DNA και στρατολογούν πυρηνικούς συμπαράγοντες, που καλούνται συγκαταστολείς και οι οποίοι είναι άμεσα υπεύθυνοι για την μεταγραφική σίγηση (Mannervik et al. 1999; Courey and Jia 2001). Η πλειοψηφία των γνωστών συγκαταστολέων είναι συστατικά πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων που κατέχουν ενζυμικές ενεργότητες όπως απακετυλίωση των ουρών των ιστονών και αναδιαμόρφωση της χρωματίνης με τρόπο εξαρτώμενο από ATP (Rosenfeld et al. 2006). Μέχρι πρόσφατα, οι συγκαταστολείς γενικότερα θεωρούνταν ότι εκφράζονται παντού και υπόκεινται σε μικρή ρύθμιση. Όμως με δεδομένο ότι λειτουργούν σε συνδυασμό με πολλούς καταστολείς και σε μια πληθώρα αναπτυξιακών διαδικασιών, αποτελούν ιδανικούς υποψήφιους κόμβους ρύθμισης με σκοπό να επιτευχθεί μια συντονισμένη μεταγραφική απόκριση.

Οι πρωτεΐνες Groucho/TLE είναι γενικοί μεταγραφικοί συγκαταστολείς που στρατολογούνται στους υποκινητές-στόχους μέσω αλληλεπιδράσεων με διαφορετικές οικογένειες DNA-προσδενόμενων καταστολέων. Πρόσφατα έχει δειχθεί ότι η δράση του συγκαταστολέα Gro υπόκειται σε ρύθμιση από φψσφορυλίωση, που στη σειρά της εξαρτάται από διακυτταρική σηματοδότηση (Cinnamon et al. 2008).

Μια βασική ανακάλυψη για την κατανόηση του μηχανισμού της λειτουργίας των πρωτεϊνών bHLH-O πραγματοποιήθηκε από τον Ish-Horowicz και τους συνεργάτες του. Χρησιμοποιώντας το σύστημα δύο υβριδίων του σακχαρομύκητα έδειξαν ότι η bHLH-O πρωτεΐνη Hairy της Δροσόφιλας προσδένει τον μεταγραφικό συγκαταστολέα Groucho και η αλληλεπίδραση αυτή απαιτεί το συντηρημένο καρβοξυτελικό τετραπεπτίδιο WRPW του Hairy (Paroush et al. 1994). Δεδομένου ότι το μοτίβο WRPW ή μια σχετική αλληλουχία υπάρχει στο καρβοξυτελικό άκρο των περισσότερων πρωτεϊνών bHLH-O, η ανακάλυψη πρότεινε αμέσως έναν κοινό μηχανισμό δράσης για αυτές τις πρωτεΐνες και στη Drosophila και στα σπονδυλωτά. Στη συνέχεια αποδείχθηκε ότι συνδέοντας το μοτίβο WRPW με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA της πρωτεΐνης GAL4 του σακχαρομύκητα αρκεί για να στρατολογήσει το Groucho σε έναν υποκινητή με θέσεις πρόσδεσεις του GAL4 και έτσι να καταστείλει τη μεταγραφή (Fisher et al. 1996). Η πρωτεΐνη Groucho έχει αρκετά ομόλογα στα σπονδυλωτά που είναι γνωστά ως πρωτεΐνες TLE, και οι οποίες έχουν δειχθεί να αλληλεπιδρούν με τις bHLH-O

πρωτεΐνες HES (Hairy/ Enhancer of split homologues) των θηλαστικών μέσω ανάλογων καρβοξυτελικών τετραπεπτίδιων (Grbavec and Stifani 1996; Grbavec et al. 1998).

Το τετραπεπτίδιο WRPW, όπως και άλλα μοτίβα που στρατολογούν το Gro, προσδενονται στην περιοχή WD40 του τελευταίου. Πρόσφατα η περιοχή WD40 αρκετών πρωτεϊνών χαρακτηρίστηκε ως περιοχή μη ομοιοπολικής πρόσδεσης ουβικουϊτίνης (ubiquitin-binding domain,UBD) (Pashkova et al. 2010). Στην συγκεκριμένη εργασία βρέθηκε ότι και ο συγκαταστολέας Tup1, μακρινό ομόλογο του Gro στον σακχαρομύκητα, έχει την ικανότητα να αλληλεπιδράσει in vitro με το μόριο της ουβικουϊτίνης.

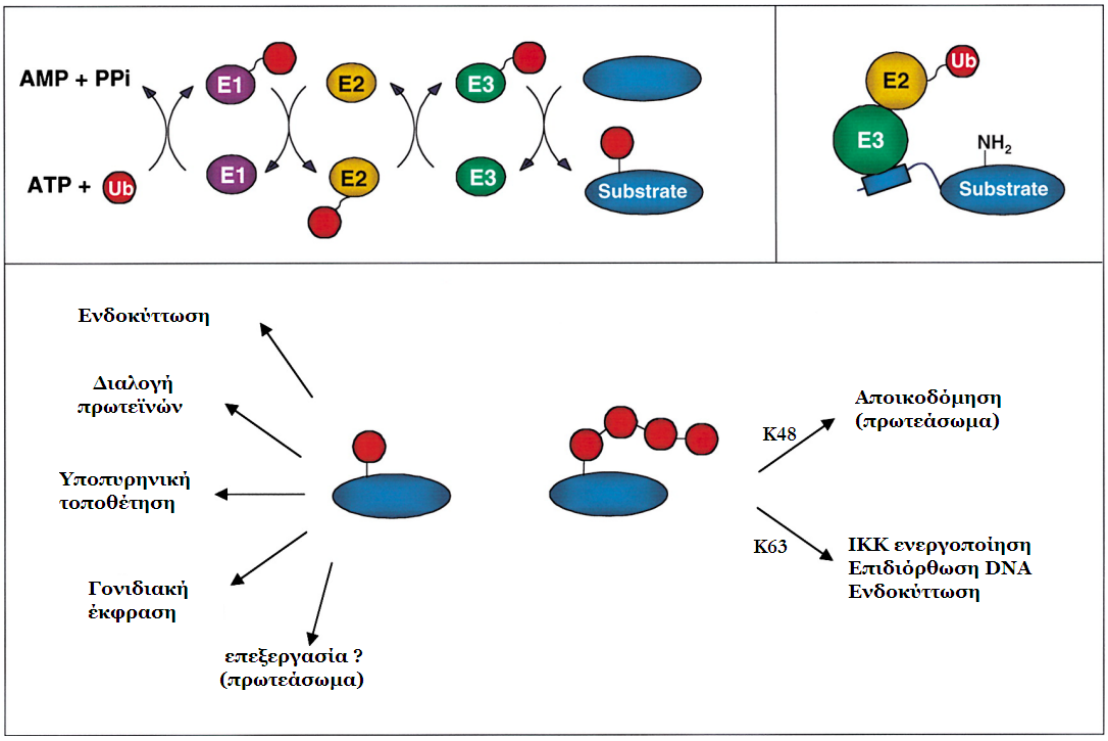
Το σύστημα της ουβικουϊτίνης-πρωτεασώματος

Πολλές πρωτεΐνες υπόκεινται σε ρυθμιζόμενη αποικοδόμηση, Η ρυθμιζόμενη πρωτεόλυση του 90% των ασταθών πρωτεϊνών επιτυγχάνεται μέσω του συστήματος της ουβικουϊτίνης-πρωτεασώματος (ubiquitin proteasome system, UPS) (Ciechanover et al. 1984b; Ciechanover et al. 1984a; Finley et al. 1984).

Το μόριο της ουβικουιτίνης αποτελείται από ~76 αμινοξέα και είναι ιδιαίτερα συντηρημένο μεταξύ των ευκαρυωτικών οργανισμών, αλλά απουσιάζει από τα βακτήρια και τα αρχαία. Αρχικά ανακαλύφθηκε ως μία μακρομοριακή ετικέτα που μπορούσε να συνδέεται ομοιοπολικά με ορισμένες πρωτεΐνες-στόχους και να τις «μαρκάρει» ώστε να καταστραφούν από το πρωτεάσωμα {Pickart, 2001 #52}. Χαρακτηριστικό του συτηματος είναι η προσθήκη περαιτέρω μορίων ουβικουιτίνης σε προυπάρχοντα, δημιουργώντας έτσι αλυσίδες πολυ-ουβικουιτινης. Μια αλυσίδα πολυ-ουβικουιτίνης τουλάχιστον 4 υπομονάδων αναγνωρίζεται από ειδικούς υποδοχείς μέσα στο πρωτεάσωμα (π.χ. Rpn10 υπομονάδα του πρωτεασώματος), είτε από πρωτεΐνες-προσαρμογείς που εν συνεχεία προσδένονται στο πρωτεάσωμα {Elsasser, 2002 #60} {Young, 1998 #61}.

Η ουβικουιτίνη ενώνεται σε λυσίνες της πρωτεΐνης-στόχου μέσω της δράσης διαδοχικών ενζύμων. Στο πρώτο στάδιο, το οποίο καταλύεται από το Ε1 ένζυμο και εξαρτάται από ATP, το καρβοξυτελικό άκρο του μορίου της ουβικουιτίνης ενεργοποιείται και προσδένεται ομοιοπολικά μέσω θειοεστερικού δεσμού σε μία κυστεΐνη του Ε1 ενζύμου που αποτελεί το ενεργό του κέντρο. Στο δεύτερο στάδιο, το μόριο της ουβικουιτίνης μεταφέρεται από το Ε1 ένζυμο στην κυστεΐνη ενός Ε2 ενζύμου. Στο τελικό στάδιο το οποίο πραγματοποιείται με την δράση μιας Ε3 λιγάσης ουβικουιτίνης, η ουβικουιτίνη προσδένεται ομοιοπολικά με ισοπεπτιδικό δεσμό στην ε αμινομάδα μιας λυσίνης της πρωτεΐνης-στόχου (Hershko 1983) (Pickart and Rose

1985b; Pickart and Rose 1985a). Η ουβικουϊτίνη έχει επτά αμινοξέα λυσίνης εκ των οποίων οι πέντε είναι γνωστές ότι αποτελούν θέσεις για διαδοχική ουβικουϊτινιλίωση in vivo (Lys 6, Lys 11, Lys 29, Lys 48 and Lys 63) οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο στην δημιοργία διαφορετικών τύπων αλυσίδων πολυουβικουϊτίνης. Η Ε3 λιγάση φαίνεται να εκτελεί την ιδιαίτερη αποστολή της αναγνώρισης, πρόσδεσης και στρατολόγησης των πρωτεϊνών-στόχων για ουβικουιτινυλίωση.



Ουβικουιτινυλίωση και δράση των ενεργοποιητικών περιοχών των μεταγραφικών πρωτεϊνών.

Αν και ήταν γνωστό ότι πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες είναι ασταθείς πρωτεΐνες οι οποίοι ρυθμίζονται από το κλασσικό μονοπάτι πρωτεόλυσης εξαρτώμενο από την ουβικουιτίνη, το 1999 ο Molinari και οι συνεργάτες του {Molinari, 1999 #19} έκαναν την ενδιαφέρουσα παρατήρηση ότι υπήρχε αντίστροφη συσχέτιση των ημιζωών ενός συνόλου γνωστών μεταγραφικών παραγόντων και της «ισχύος» των ενεργοποιητικών τους περιοχών. Οι ερευνητές μέτρησαν τις ημιζωές και την μεταγραφική ενεργότητα ενός συνόλου χιμαιρικών μεταγραφικών παραγόντων που αποτελούντο από την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του Gal4 μεταγραφικού παράγοντα συντηγμένες με μια σειρά καλά χαρακτηρισμένων περιοχών ενεργοποίησης. Οι μετρήσεις αυτές

αποκάλυψαν ότι οι χιμαιρικοί μεταγραφικοί παράγοντες που ενεργοποιούσαν περισσοτερο την μεταγραφή, ήταν περισσότερο ουβικουιτυνιλιωμένοι και καταστρέφονταν από το πρωτεάσωμα πιο γρήγορα. Επιπλέον παρατήρησαν ότι η γρήγορη αποικοδόμησή τους, εξαρτιόταν από την παρουσία μιας «ακέραιας» περιοχής πρόσδεσης στο DNA, προβάλλοντας την πιθανότητα ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες ουβικουιτυνιλιώνονται πιο αποτελεσματικά και καταστρέφονται όταν βρίσκονται προσδεδεμένοι στο DNA.

Σε ακόλουθες μελέτες (Salghetti et al. 2000; Salghetti et al. 2001) βρέθηκε ότι μερικές ενεργοποιητικές περιοχές πλούσιες σε όξινα αμινοξέα (acidic TADs) δρουν ως αποσταθεροποιητικές περιοχές. Αποκορύφωμα της στενής συσχέτισης μεταξύ «όξινων» TADs και αποσταθεροποιητικών περιοχών, οι προαναφερθέντες ερευνητές απέδειξαν ότι αποσταθεροποιητικές περιοχές των κυκλινών Cln1 και Cln3 του S. cerevisiae, οι οποίες δεν είναι μεταγραφικοί παράγοντες, δρουν ως TADs όταν συντηχθούν στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA του Gal4 (Salghetti et al. 2000).

Το σινιάλο αποικοδόμησης (degradation signal or degron) χαρακτηρίζεται ως εκείνο το ελάχιστο στοιχείο μέσα στην πρωτεΐνη που είναι αρκετό για την αναγνώριση και καταστροφή από την πρωτεολυτική μηχανή. Τα σινιάλα αποικοδήμησης του μονοπατιού ουβικουιτινιλίωσης απαιτούν συγκεκριμένους καθοριστές της πρόσδεσης της Ε3 λιγάσης, μια κατάλληλη θέση πρόσδεσης της ουβικουιτίνης και μία θέση έναρξης της αποικοδόμησης από το πρωτεάσωμα, που θα επιτρέπει το ξεδίπλωμα της πρωτεΐνης και την μετατόπισή της στο εσωτερικό τμήμα του πρωτεασώματος (for review (Laney and Hochstrasser 1999), (Ravid and Hochstrasser 2008). Η δράση ενός degron ρυθμίζεται με πολλούς τρόπους. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ενεργοποιούν πολλά degrons. Παραδείγματα τέτοιων τροποποιήσεων είναι φωσφορυλίωση, υδροξυλίωση και πρωτεολυτικό κόψιμο. Εναλλακτικά πολλά κρυπτικά degrons μπορεί να αποκαλύπτονται όταν η πρωτεΐνη παίρνει συγκεκριμένη διαμόρφωση ή κατάσταση συγκρότησης.

Είναι άγνωστο το πως σχετίζεται μηχανιστικά η πρωτεόλυση των μεταγραφικών ενεργοποιητών με την ενεργότητά τους. Έχει προταθεί ότι η ουβικουιτυλίωση μεταγραφικών ενεργοποιητών απαιτείται όχι για την έναρξη καθαυτή της μεταγραφής, αλλά για στρατολόγηση μετέπειτα παραγόντων επιμήκυνσης ή/και ωρίμανσης του μεταγράφου (Kurosu and Peterlin 2004; Muratani et al. 2005).

Σκοπός της εργασίας

Η παρούσα διδακτορική διατριβή επικεντρώνεται στη μελέτη των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που υπόκεινται οι μεταγραφικοί παράγοντες Daughterless, Scute και E(spl) m7 και πώς αυτές επηρεάζουν τη σταθερότητα και την ενεργότητά τους. Υπενθυμίζεται ότι οι Da/Sc συγκροτούν έναν ετεροδιμερή bHLH ενεργοποιητή, ο οποίος αλληλεπιδρά με τον bHLH-O καταστολέα E(spl)m7 με αποτέλεσμα την αναστολή της λειτουργίας του.

Στο πρώτο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων χαρακτηρίζονται τα cis ρυθμιστικά στοιχεία του Scute τα οποία βρήκαμε να έχουν καθοριστικό ρόλο στην σταθερότητά του απουσία (ενότητα 1) ή παρουσία του bHLH παρτενερ του Da (ενότητα 2).

Στο δεύτερο κεφάλαιο μελετάμε την επίδραση του μεταγραφικού παράγοντα E(spl)m7 στην σταθερότητα των προνευρικών πρωτεϊνών Da και Sc στην κυτταρική σειρά S2.

Στο τρίτο κεφάλαιο μελετάμε την επίδραση των πρωτεϊνών Da και Sc, στην σταθερότητα της πρωτεΐνης E(spl)m7.

Υλικά και Μέθοδοι

Γενετική Δροσόφιλας

Δημιουργία διαγονιδιακών στελεχών Δροσόφιλας

Τα διαγονιδιακά στελέχη UAS που κατασκευάστηκαν βασίστηκαν στην κλωνοποίηση του αντίστοιχου cDNA στον πλασμιδιακό φορέα pUAST (Brand and Perimon, 1993). Στον φορέα pUAST το ένθεμα εισάγεται ανάμεσα στα άκρα του μεταθετού στοιχείου P, όπου βρίσκεται και το γονίδιο αναφοράς mini-white. Για την ένθεση απαιτείται η παρουσία ενεργής τρανσποζάσης P, που παράγεται από το πλασμίδιο-δότη Δ2→3, το οποίο και ενύεται ταυτόχρονα. Τα ενήλικα άτομα που φέρουν ενθέσεις του πλασμιδίου επιλέγονται με βάση τη χρώση που παρατηρείται στα μάτια λόγω της ένθεσης του mini-white γονιδίου και διασταυρώνονται με κατάλληλα στελέχη εξισορρόπησης. Με αυτόν τον τρόπο επιλέγονται στελέχη που φέρουν μόνο μία ή συνδεδεμένες στο ίδιο χρωμόσωμα ενθέσεις, οι οποίες και διατηρούνται σταθερές σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία με χρωμοσώματα εξισορρόπησης. Τα χρωμοσώματα εξισορρόπησης (balancers) φέρουν εκτεταμένες αναστροφές έτσι ώστε να αναστέλλεται ο ανασυνδυασμός. Παράλληλα φέρουν επικρατείς γενετικούς δείκτες για να είναι δυνατός ο σαφής γονοτυπικός διαχωρισμός των απογόνων κάθε διασταύρωσης. Κάποια χρωμοσώματα, όπως το TM6B, φέρουν και προνυμφικούς και νυμφικούς μορφολογικούς δείκτες έτσι ώστε να είναι δυνατή η γονοτύπηση και στα στάδια αυτά. Όλες ενέσεις των στελεχών πραγματοποιήθηκαν από τον κ. Γιάννη Λειβαδάρα.

Εκτοπική έκφραση γονιδίων. Το σύστημα UAS-GAL4

Η κατευθυνόμενη γονιδιακή έκφραση σε συγκεκριμένους ιστούς ή κυτταρικούς τύπους αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για τη μελέτη της ανάπτυξης και φυσιολογικής λειτουργίας διαφόρων κυτταρικών ομάδων. Πολλές φορές όμως μια τέτοια έκφραση οδηγεί σε πρώιμη θνησιμότητα με αποτέλεσμα την αδυναμία σταθεροποίησης ενός στελέχους διαγονιδιακών ζώων τα οποία να αναπαράγονται επιτυχώς και να εκφράζουν το προς μελέτη γονίδιο στους ιστούς ή στα κύτταρα που επιθυμούμε. Γι' αυτόν το λόγο είναι αναγκαία η υπό συνθήκες έκφραση ενός γονιδίου.

Μια μορφή έκφρασης υπό συνθήκες εμπλέκει ένα "δυαδικό" σύστημα στο οποίο η έκφραση του γονιδίου που μας ενδιαφέρει εξαρτάται από την ταυτόχρονη παρουσία δυο γενετικών συστατικών στο ίδιο άτομο. Ο συνδυασμός αυτός πραγματοποιείται μόνο για το σκοπό του πειράματος και τα δυο στοιχεία κρατιούνται σαν ξεχωριστές διαγονιδιακές σειρές ζώων. Ένα τέτοιο "δυαδικό" σύστημα είναι και το σύστημα

GAL4/UAS το οποίο στηρίζεται στη δυνατότητα που έχουν κάποιοι μεταγραφικοί παράγοντες να λειτουργούν σε ετερόλογο περιβάλλον (Brand and Perimon, 1993).

Ένα στέλεχος (στέλεχος οδηγός) εκφράζει τον μεταγραφικό παράγοντα GAL4 του σακχαρομύκητα μέσω ενός ιστοειδικού ή κυτταροειδικού υποκινητή ή ενισχυτή (π.χ. pnr ενισχυτής). Η έκφραση του GAL4 δεν επηρεάζει το στέλεχος. Σε ένα δεύτερο στέλεχος (στέλεχος υπερέκφρασης) το γονίδιο του οποίου την εκτοπική έκφραση μας ενδιαφέρει να μελετήσουμε, είναι κάτω από τον έλεγχο ενός αποκρινόμενου σε GAL4 υποκινητή τον UAS_G (Upstream Activation Sequence). Στο δεύτερο αυτό στέλεχος δεν παρατηρείται έκφραση του προς μελέτη γονιδίου κάτι που δείχνει ότι δεν υπάρχει κάποιος ενδογενής παράγοντας ο οποίος θα μπορούσε να υποκαταστήσει τον GAL4.

Η διασταύρωση των δυο στελεχών έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μεταγραφής με την πρόσδεση του GAL4 στις θέσεις UAS και την έκφραση του γονιδίου που μελετάμε. Επειδή ο GAL4 βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο ενός ιστοειδικού ή κυτταροειδικού ενισχυτή η έκφραση του άρα και η ενεργοποίηση της μεταγραφής θα πραγματοποιηθεί στους ιστούς ή τα κύτταρα που το συγκεκριμένο ρυθμιστικό στοιχείο είναι ενεργό. Μ' αυτό τον τρόπο κατευθύνουμε την έκφραση ενός γονιδίου σε συγκεκριμένα κύτταρα ή ιστούς σε ορισμένο χρόνο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης.

Για τα πειράματα υπερέκφρασης που παρουσιάζονται στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη: pnrGal4, ap-Gal4 και omb-Gal4.

Τα UAS διαγονίδια που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

UAS-myc-sc (παρούσα διατριβή)

UAS-myc-sc^{AAV} (παρούσα διατριβή)

UAS-myc-sc^{APAAA} (παρούσα διατριβή)

UAS-myc-sc^{RQEQ} (παρούσα διατριβή)

UAS-myc-sc^{1-320} (παρούσα διατριβή)

UAS3xmycdaΔTADs (κατασκευή Ιωάννα Ζαρίφη)

UAS-sc39 (προσφορά εργαστηρίου Modolell).

UASE(spl)m7 (προσφορά εργαστηρίου S.Bray)

Χρώσεις ανίχνευσης ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης

Για τον εντοπισμό της ενεργότητας του ενζύμου της β-γαλακτοσιδάσης , οι ιστοί υπέστησαν την ακόλουθη διαδικασία:

- Συλλογή προνυμφών τρίτου σταδίου και ανατομία τους για διάστημα 20 λεπτών μέσα σε διάλυμα 1x PBS. Απομάκρυνση του οπίσθιου τμήματος της προνύμφης, αναστροφή του εμπρόσθιου μισού και απομάκρυνση του λιπαρού σώματος.
- Μονιμοποίηση των ιστών σε διάλυμα 1% γλουταραλδεΰδης σε 1x PBS για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τρεις γρήγορες πλύσεις με 1x PBS.
- Επώαση σε διάλυμα χρώσης (το οποίο έχει προθερμανθεί στους 65 oC) και 0.2% X-gal.
- Σε 500μl διαλύματος χρώσης προσθέτουμε 20 μl από διάλυμα 5% X-gal σε DMF(dimethyl-formamide).
- Η σύσταση του διαλύματος χρώσης είναι:

  10mM PB (10mM Na2HPO4, NaH2PO4)
  150mM NaCl
  1 mM MgCl2
  3mM K4[Fe2CN6]
  3mM K4[Fe3CN6] και
  0.3% Triton-X 100
- Η επώαση γίνεται στους 37o C και διαρκεί ανάλογο χρόνο με την διαγονιδιακή σειρά μυγών που χρησιμοποιείται.
- Η αντίδραση σταματά με τρεις γρήγορες πλύσεις με 1x PBS και ανατομία των αναπτυξιακών δίσκων και των σωμάτων της λάρβας όποτε κρίνεται απαραίτητο. Τοποθετούμε τα δείγματα σε αντικειμενοφόρο σε διάλυμα 80% γλυκερόλης και παρατηρούμε σε οπτικό μικροσκόπιο.

Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις

- Ανατομία των προνυμφών.
- Μονιμοποίηση των ιστών σε διάλυμα 1x PEM / 4% PFA για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τρεις γρήγορες πλύσεις με 1x PBS.
- Επώαση των μονιμοποιημένων ιστών με διάλυμα PBT (1x PBS, 0,5% BSA, 0.2% Triton-X 100) για τουλάχιστον 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το PBT χάρη στην BSA βοηθάει στην παρεμπόδιση των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης αντισωμάτων.
- Επώαση με το κατάλληλο πρωτεύον αντίσωμα το οποίο αραιώνεται σε διάλυμα PBT, για τουλάχιστον 16 ώρες στους 4o C.

- Πλύσεις της περίσσειας του πρωτεύοντος αντισώματος με διάλυμα PT (1x PBS, 0.2% Triton-X 100), τρεις φορές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επώαση με το κατάλληλο δευτερεύον αντίσωμα GaR-HRP, το οποίο αραιώνεται σε διάλυμα PBT, για τουλάχιστον 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πλύσεις της περίσσειας του δευτερεύοντος αντισώματος με διάλυμα PT (1x PBS, 0.2% Triton-X 100), τρεις φορές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Οι αναπτυξιακοί δίσκοι του φτερού απομακρύνονται με ανατομία και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρο σε 0.5% n-propyl-gallate σε 80% γλυκερόλη.

Πειράματα παροδικής διαμόλυνσης S2 κυττάρων.

Τα γονίδια αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα:

UAStkluc(περιγράφεται στους Giagtzoglou et al., 2005): Το γονίδιο της λουσιφεράσης βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο των UAS στοιχείων πρόσδεσης της πρωτεΐνης GAL4.

E1x4luc(κατασκευή Κουμπανάκης/Γιαγτζόγλου/Αλιφραγκής και τροποποίηση από Fullard): Το γονίδιο της λουσιφεράσης βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο συνθετικού ενισχυτή αποτελούμενου από E A στοιχεία πρόσδεσης των προνευρικών πρωτεϊνών.

Οι παροδικές διαμολύνσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο της δημιουργίας ιζήματος φωσφορικού ασβεστίου.

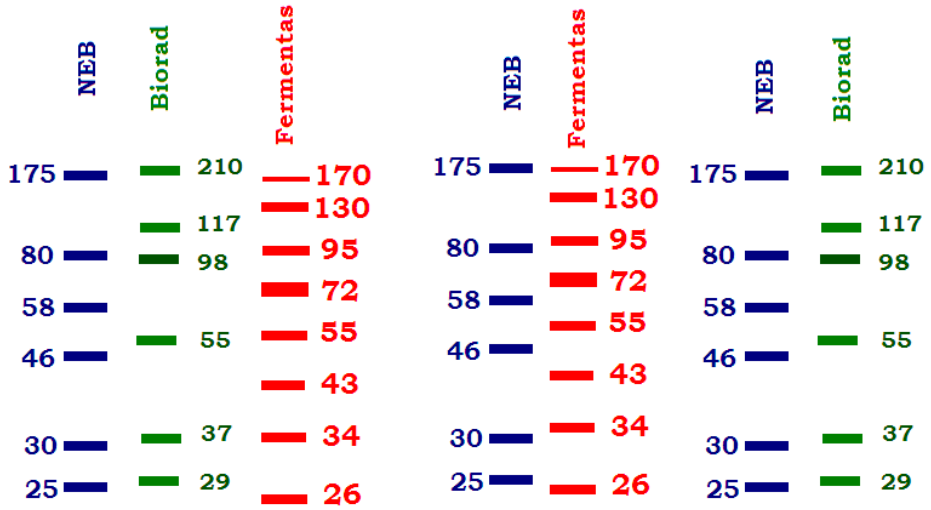
- Τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται καθαρίζονται με κολώνες τύπου Nucleobond ή QIAGEN.
- S2 κύτταρα που καλλιεργούνται στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο (M3 + 10%FCS +gentamycin), μοιράζονται σε 24-well plates (10^6 κύτταρα/ml). Κάθε πηγαδάκι περιέχει 0.5ml κυττάρων. (Η ποσότητα αυτή είναι υπολογισμένη έτσι ώστε να καλύπτεται το 80% της επιφάνειας κάθε πηγαδιού).
- Προετοιμάζεται το μίγμα του DNA το οποίο φέρει τις κατάλληλες ποσότητες των πλασμιδίων μαζί με το γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης, με το πλασμίδιο act-lacZ ή act-luc και κενό πλασμιδιακό φορέα έτσι ώστε τελικά ανά πηγαδάκι να περιέχεται 1μg DNA. (Κενός πλασμιδιακός φορέας χρησιμοποιείται κατά περίπτωση για τη συμπλήρωση της ποσότητας του DNA στο επιθυμητό). Το πλασμίδιο act-lacZ ή act-luc χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της επιτυχίας του μετασχηματισμού των κυττάρων.
- Στο μίγμα του DNA προστίθεται CaCl 2 σε τελική συγκέντρωση 0.125M. (Το μίγμα του DNA και το CaCl 2 έχουν τελικό όγκο 25μl). Αναδεύουμε και το προσθέτουμε σταγόνα σταγόνα σε ένα σωληνάκι στο οποίο ήδη έχουμε βάλει 125μl

2xHBS. Αναδεύουμε πολύ καλά και αφήνουμε να σχηματιστεί ίζημα σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Τέλος ρίχνουμε το σχηματισμένο ίζημα στα κύτταρα και το αφήνουμε για 40 ώρες το λιγότερο πριν μαζέψουμε τα κύτταρα.

Πρωτεϊνικοί Μάρτυρες

Στα πειράματα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήσαμε τους πρωτεϊνικούς μάρτυρες της της NEB (Αριθμός καταλόγου P7708) και Biorad (Αριθμός καταλόγου 161-0318) και της Fermentas (SM0671). Όπως φαίνεται και στο ακόλουθο σχήμα όπου τους συγκρίναμε δίπλα διπλα σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10%, υπάρχει κάποια διαφοροποίηση στα αναμενόμενα μεγέθη τους γεγονός που δικαιολογείται από το ότι οι πρωτεϊνικοί μάρτυρες που χρησιμοποιούμε είναι χρωματισμένοι (prestained), και το φορτίο της χρωστικής επηρεάζει την ηλεκτροφόρηση του μάρτυρα οπότε και μας δίνει μια γενικότερη εκτίμηση των μαζών και όχι απόλυτη. Επίσης ανάλογα με την παρτίδα (lot number) του πρωτεϊνικού μάρτυρα κάποιες φορές τα μοριακά μεγέθη άλλαζαν ελαφρώς, π.χ. η ζώνη 30kDa του NEB μάρτυρα ήταν 32,5 kDa. Στα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης που φαίνονται στα παρόντα πειράματα, αποτυπώνονται δίπλα και τα μεγέθη του εκάστοτε μάρτυρα.

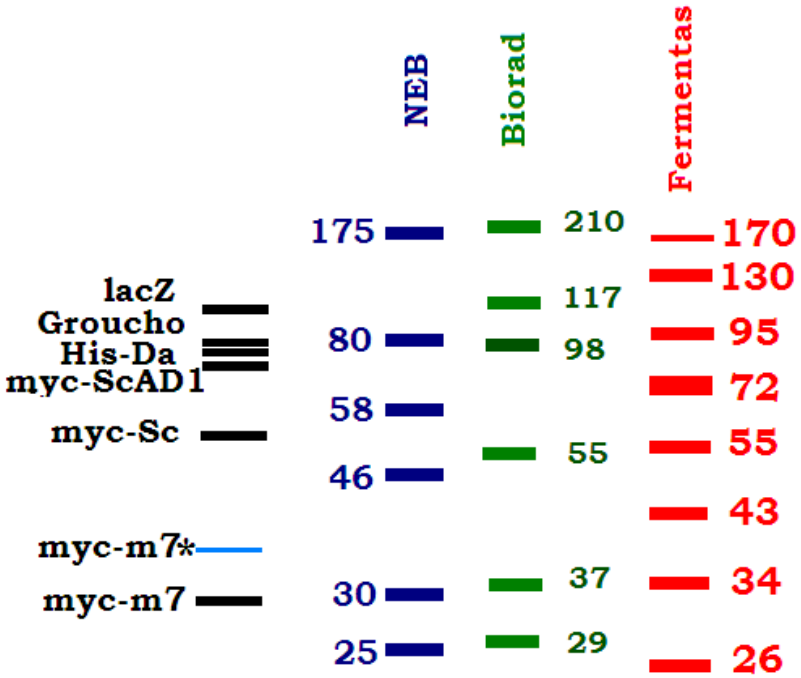
10% πήκτωμα ακρυλαμίδης: bis (29:1)



marker: Biorad (Αριθμός καταλόγου 161-0318)
marker: NEB (Αριθμός καταλόγου P7708)
marker: Fermentas SM0671

Την παραπάνω «ανακρίβεια» πρέπει να την έχουμε υπόψη μας όταν εκτιμάμε τα μεγέθη των πρωτεϊνών μας. Στην παρακάτω εικόνα έχουμε τοποθετήσει τις πρωτεΐνες myc-m7 (M.B.=25,7 kDa), myc-Sc (M.B.=43,2 kDa), myc-ScAD1 (M.B.=56,2 kDa), His-Da (M.B.=75,7 kDa), Groucho (M.B.=78,9 kDa), και β-γαλακτοσιδάση (lacZ, M.B.=119 kDa) σε σχέση με τους πρωτεϊνικούς μάρτυρες. Στο ακόλουθο σχήμα

έχουμε τοποθετήσει και την τροποποιημένη μορφή του m7 (myc-m7*) που εξαρτάται από το Da, ώστε να δοθεί μια εκτίμηση του μοριακού της βάρους (περίπου 5-10kDa πάνω από την βασική ζώνη του m7).



Α' Κεφάλαιο

Ενότητα Α.1.

Cis-στοιχεία (ενδομοριακά στοιχεία) της πρωτεΐνης Scute που καθορίζουν την σταθερότητά της, στην κυτταρική σειρά Schneider S2 της Δροσόφιλας.

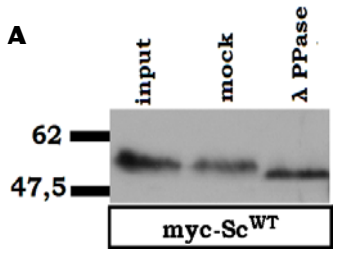
Θελήσαμε να μελετήσουμε τους παράγοντες που διέπουν τη σταθερότητα της πρωτείνης Sc, η οποία εμφανίζει πολύ δυναμική έκφραση κατά την ανάπτυξη. Υποθέσαμε ότι τόσο cis (μοτίβα αμινοξέων) όσο και trans στοιχεία (άλλες πρωτεΐνες) θα επηρεάζουν τη σταθερότητα της Sc. Για τον χαρακτηρισμό των cis στοιχείων πραγματοποιήσαμε μια σειρά πειραμάτων παροδικής διαμόλυνσης στην κυτταρική σειρά S2 της Δροσόφιλας. Με δεδομένο ότι δεν υπάρχουν αντισώματα στο εμπόριο που να ανιχνεύουν αποτελεσματικά τις bHLH πρωτεΐνες, οι κωδικές περιοχές των bHLH πρωτεϊνών που μελετήσαμε συντήχθηκαν στο 5' άκρο τους είτε με τρεις επιτόπους myc, είτε με τον επίτοπο 6xHis και τοποθετήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα, υπό τον έλεγχο του συστατικού υποκινητή του γονιδίου ακτίνης 5C. Με αυτόν τον τρόπο ήμασταν σε θέση να παρακολουθήσουμε τα πρωτεϊνικά επίπεδα και το μοριακό βάρος των μεταγραφικών παραγόντων μας στη Δροσοφιλίσια κυτταρική σειρά S2.

Αρχικά μέσα από τα πειράματα παροδικής διαμόλυνσης βρήκαμε ότι η πρωτεΐνη Scute είναι φωσφορυλιωμένη. Όπως φαίνεται στην εικόνα 2.1Α επεξεργασία του δείγματος με την φωσφατάση lambda προκαλεί αποφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Sc η οποία εκδηλώνεται με την αύξηση της ηλεκτροφορητικής της κινητικότητας. Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι οι φωσφορυλιώσεις προκαλούν αλλαγή στο πρότυπο τρεξίματος των πρωτεϊνών σε αποδιατακτικά πηκτώματα ακρυλαμίδης, αναγκάζοντάς τες να καθυστερούν σε σχέση με τις μη φωσφορυλιωμένες μορφές τους. Η φωσφατάση lambda αφαιρεί φωσφορικές ομάδες από αμινοξέα σερίνης, θρεονίνης αλλά και τυροσίνης. Αξιόλογο είναι το γεγονός ότι η πρωτεΐνη Sc είναι φωσφορυλιωμένη στο μεγαλύτερο ποσοστό της, μιας και η χαμηλοτερη ζώνη, αυτή της αποφωσφορυλιωμένης μορφής, είναι πολύ ασθενής.

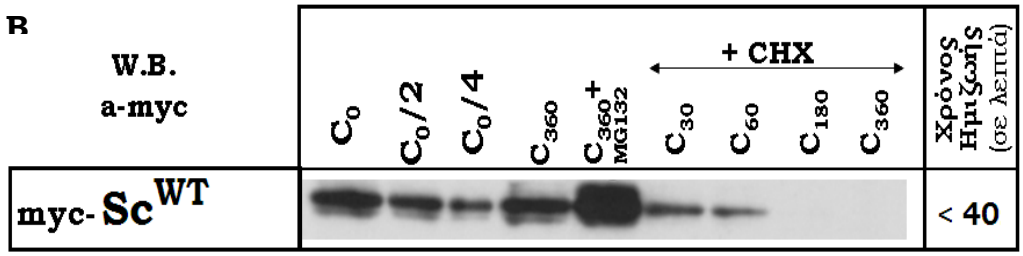
Παράλληλα διαπιστώσαμε ότι η πρωτεΐνη Sc είναι ιδιαίτερα ασταθής. Χρησιμοποιώντας το κυκλοεξιμίδιο (cyclohexímide, CHX), που είναι χημικός αναστολέας της πρωτεϊνοσύνθεσης, υπολογίστηκε ο χρόνος ημιζωής της πρωτεΐνης Scute στα 20-30 λεπτά περίπου (εικόνα 2.1Β). Καλύτερη περιγραφή του πρωτοκόλλου γίνεται στην σελίδα 37 .

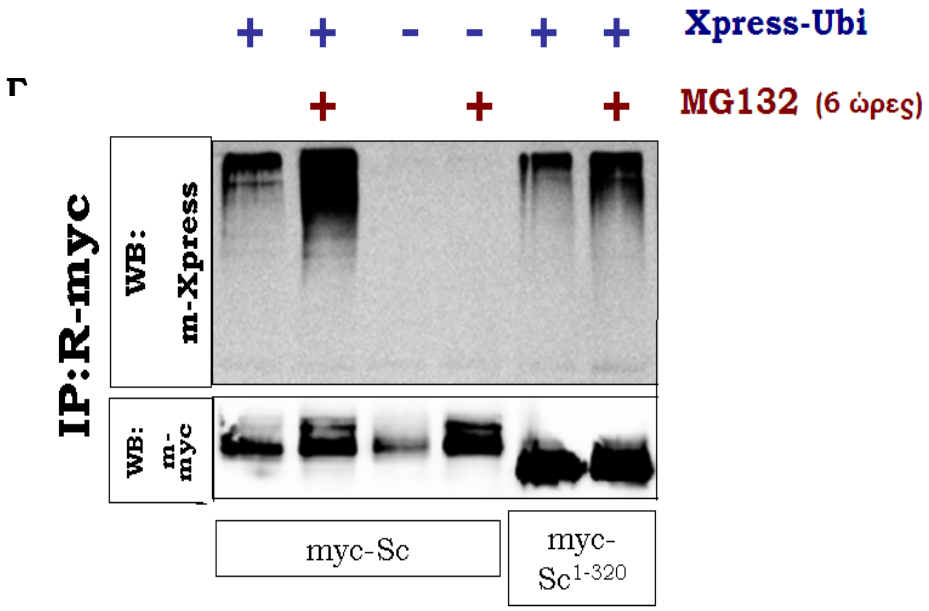
Έχοντας εξακριβώσει το χαμηλό χρόνο ημιζωής της Sc, αποφασίσαμε να μελετήσουμε κατά πόσον η πρωτεΐνη Scute ουβικουιτινυλιώνεται και αποικοδομείται

μέσω του πρωτεασώματος. Στα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιήσαμε τον ίδιο πληθυσμό παροδικά διαμολυσμένων κυττάρων και χωρίζοντας τα σε δύο μέρη, το ένα το επεξεργαστήκαμε με τον αναστολέα του πρωτεασώματος MG132 για 6 ώρες ενώ τον άλλο με το DMSO, που ήταν το μέσο διάλυσης του MG132. Παρατηρήσαμε ότι συσσωρεύονται μεγαλύτερα επίπεδα της πρωτεΐνης παρουσία του αναστολέα πρωτεασώματος (εικόνα 2.1Β). Όταν σε παρόμοιο πείραμα συνεκφράσαμε μαζί με την πρωτεΐνη myc-Sc, μια μορφή της ουβικουϊτίνης συντηγμένη αμινοτελικά με τον



Εικόνα 2.1
Η πρωτεΐνη Sc βρίσκεται σε φωσφορυλιωμένη κατάσταση στην κυτταρική σειρά S2, έχει μικρό χρόνο ημιζωής, ουβικουϊτινιλιώνεται και καταστρέφεται από το πρωτεάσωμα.





επίτοπο Xpress και ανοσοκατακρημνίσαμε την πρωτεΐνη Sc, παρατηρήσαμε ότι αυξάνονται οι ουβικουϊτινιλιώμενες μορφές της πρωτεΐνης Sc παρουσία MG132.

Επομένως η πρωτεΐνη Sc είναι μια ασταθής φωσφοπρωτεΐνη η οποία ουβικουϊτινιλιώνεται και καταστρέφεται από το πρωτεάσωμα.

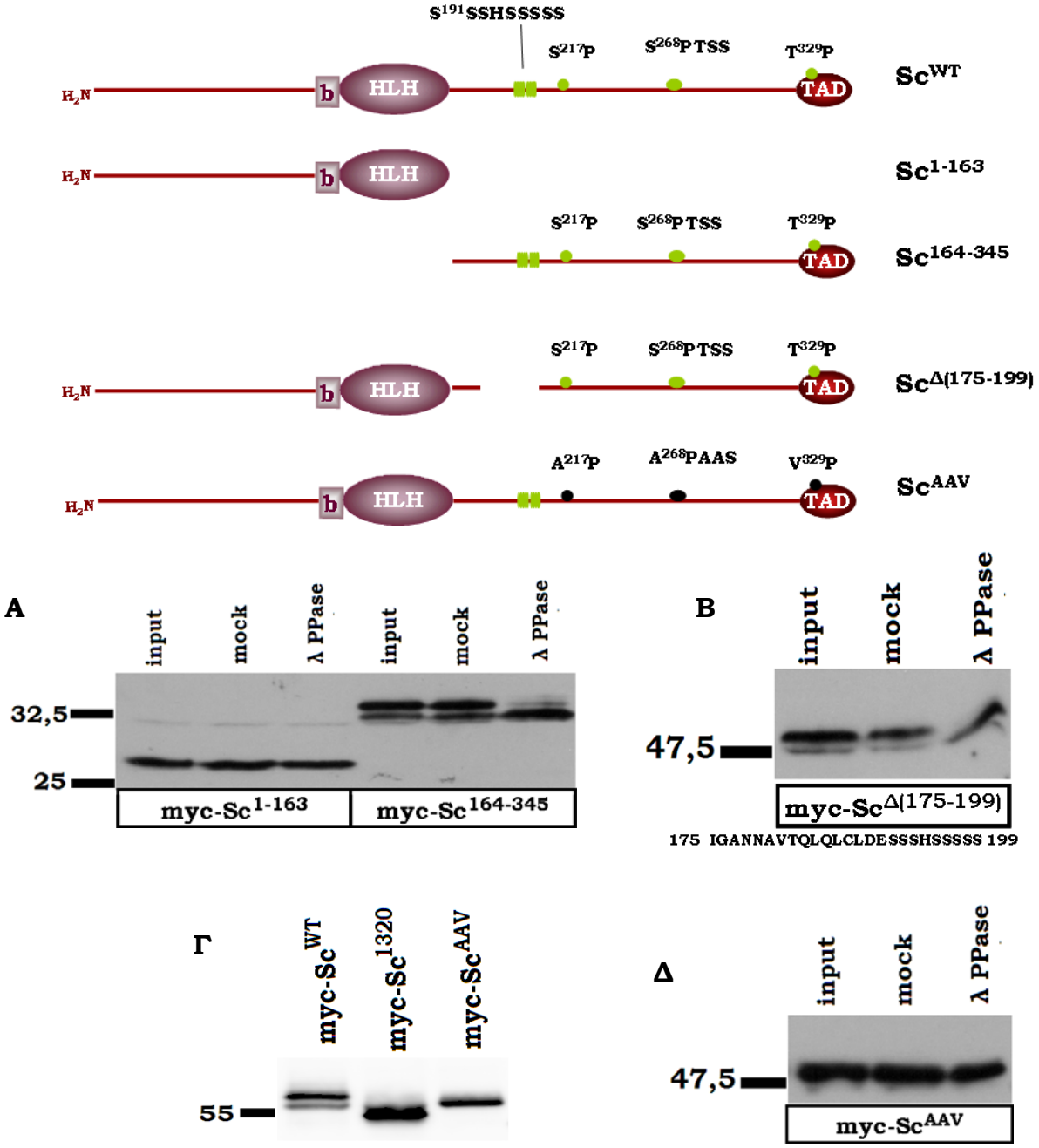
Για να ταυτοποιήσουμε τις περιοχές φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης χρησιμοποιήσαμε δύο διαφορετικά κομμάτια αυτής και κάναμε επίδραση λ φωσφατάσης σε αυτά. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 2.2Α η πρωτεΐνη myc-Sc(1-163) (Μ.Β 23 kDa), η οποία συνιστά το αμινοτελικό κομμάτι της πρωτεΐνης και περιλαμβάνει όλη την bHLH περιοχή της πρωτεΐνης, δεν είναι φωσφορυλιωμένη. Αντίθετα η πρωτεΐνη myc-Sc(163-345) (Μ.Β 25,1 kDa) η οποία περιλαμβάνει το καρβοξυτελικό κομμάτι της πρωτεΐνης εμφανίζεται φωσφορυλιωμένη και με επίδραση της φωσφατάσης το σύνολο της πρωτεΐνης αποφωσφορυλιώνεται (Εικόνα 2.2Α). Ετσι οδηγηθήκαμε στο συμπέρασμα ότι οι θέσεις φωσφορυλίωσεις της πρωτεΐνης Sc βρίσκονται στο καρβοξυτελικό της τμήμα.

Χρησιμοποιωντας τον αλγόριθμο NetPhosK 1.0 εντοπίσαμε αρκετές πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης στο καρβοξυτελικό της άκρο. Προχωρήσαμε στη δημιουργία μιας μεταλλαγμένης μορφής της Sc που της έλειπε μια περιοχή πλούσια σε σερίνες (αμινοξέα 175 έως 199, IGANNAVTQLQLCLDESSSHSSSSS), που την ονομάσαμε ScΔ(175-199) (Μ.Β. 40,54 kDa). Με την επίδραση της λ φωσφατάσης διαπιστώσαμε ότι η πρωτεΐνη myc-ScΔ(175-199) συνεχίζει να είναι φωσφορυλιωμένη (Εικόνα 2.2Β).

Αποφασίσαμε να μεταλλάξουμε τις πιθανές θέσεις σερίνης η θρεονίνης που ακολουθούνται από προλίνη. Τέτοια μοτίβα αποτελούν θέσεις φωσφορυλίωσεις από διάφορες κινάσες όπως MAPK κινάσες, τις κινάσες κυκλινών και GSK3 κινάση (Ubersax and Ferrell 2007). Έτσι δημιουργήσαμε αρχικά το μετάλλαγμα ScAAV (Μ.Β. 42,98 kDa), στο οποίο το συντηρημένο μοτίβο S268PTSS272 έχει μετατραπεί σε APAAS και επιπλέον έχει δύο σημειακές μεταλλαγές σε αμινοξέα ικανά να φωσφορυλιωθούν (S217→A και T329→V) (βλ. Σχήμα, εικόνα 2.2). Εκφράζοντας την πρωτεΐνη ScAAV στην κυτταρική σειρά S2 διαπιστώσαμε ότι το ηλεκτροφορητικό πρότυπο της πρωτεΐνης σε SDS πήκτωμα πολυακρυλαμίδης άλλαξε. Η πρωτεΐνη ScAAV μετατοπίζεται στο ύψος που βρίσκεται και η αποφωσφορυλιωμένη μορφή του Sc (εικόνα 2.2 Γ) μετά την επίδραση της λ φωσφατάσης. Παράλληλα επεξεργασία της πρωτεΐνης ScAAV με λ φωσφατάση δεν προκαλούσε καμία επιπλέον αλλαγή στο πρότυπο ηλεκροφορητικής κινητικότητας (εικόνα 2.2 Δ).

Θελήσαμε να ταυτοποιήσουμε ποια ήταν η κύρια θέση φωσφορυλίωσης οπότε και δημιουργήσαμε τα επί μέρους μεταλλάγματα ScAP (S217P→AP), ScAPAA ($S^{268}PTSS^{272}$ →APAAS) και ScVP (T329P→VP) αλλά και τον ανά δύο συνδυασμό αυτών, τα οποία παρουσιάζονται σχηματικά στην εικόνα 2.3. Διαπιστώσαμε λοιπόν ότι

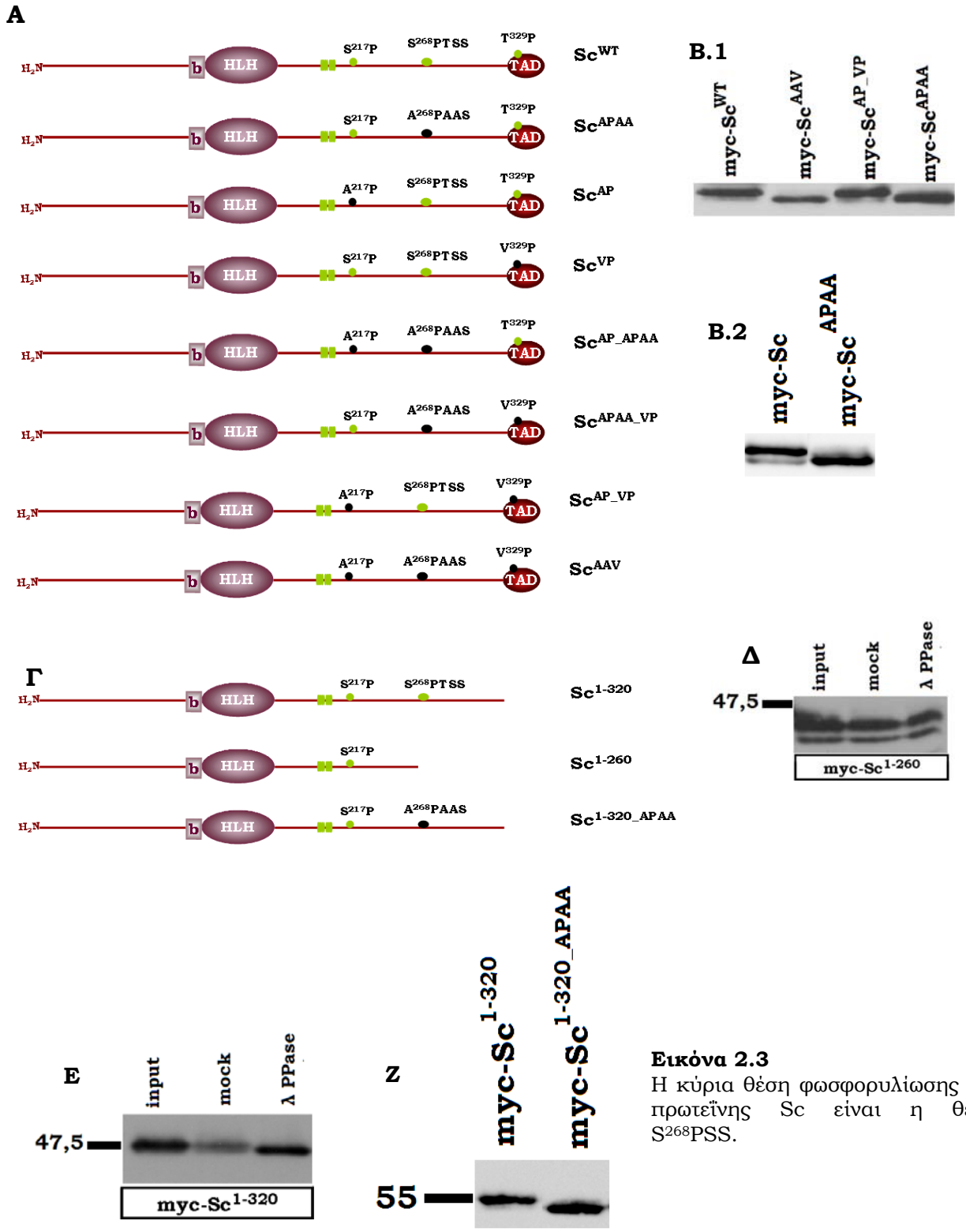
οι τρεις πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης ήταν στο μοτίβο $S^{268}PTSS^{272}$, αφού το ηλεκτροφορητικό πρότυπο της πρωτεΐνης Scute έμοιαζε με εκείνο της μη φωσφορυλιω-



Εικόνα 2.2
Η πρωτεΐνη Sc είναι φωσφορυλιωμένη στο καρβοξυτελικό της άκρο σε μοτίβα SerPro.

μένης μορφής της στην περίπτωση των μεταλλαγμένων μορφών ScAPAA, ScAP_APAA και ScAPAA_VP ενώ δεν άλλαζε στην περίπτωση των μεταλλαγμάτων ScAP και ScVP αλλά ούτε στο διπλό μετάλλαγμα ScAP_VP. Για οικονομία χώρου στην εικόνα 2.2Β παραθέτουμε το πρότυπο τρεξίματος των πρωτεϊνών Sc, ScAP_VP, ScAAV και ScAPAA.

Αυτό συμφωνεί με το γεγονός ότι η κολοβωμένη πρωτεΐνη myc-Sc(1-320) (Μ.Β. 40,15 kDa) που της λείπουν τα τελευταία 25 αμινοξέα, που αποτελούν και την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής, συνεχίζει να αποφωσφορυλιώνεται παρουσία λ φωσφατάσης (εικόνα 2.3Ε), ενώ η κολοβωμένη μορφή myc-Sc(1-260) (Μ.Β. 33,1 kDa) δεν επηρεάζεται παρουσία της φωσφατάσης (εικόνα 2.3Δ).



Εικόνα 2.3
Η κύρια θέση φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Sc είναι η θέση S^{268}PSS.

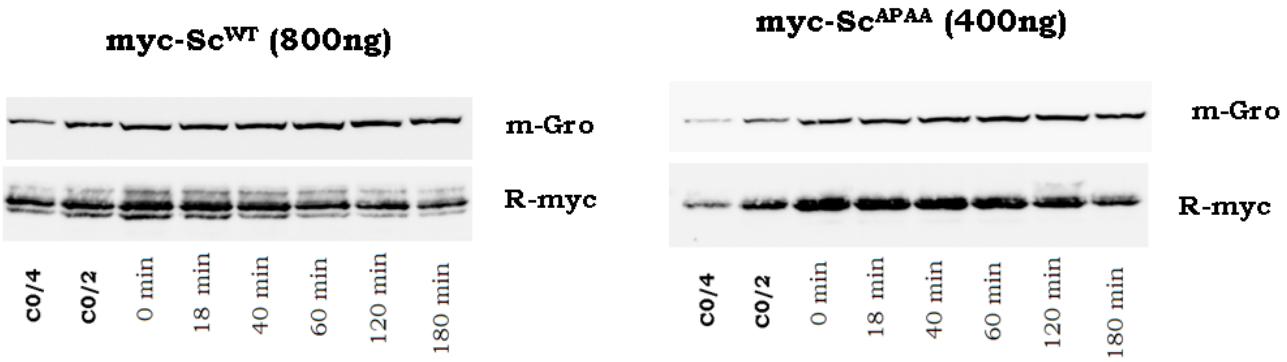
Μάλιστα όταν δημιουργήσουμε το διπλό μετάλλαγμα Sc(1320_APAA) στο οποίο όπως φαίνεται και στο σχήμα της εικόνας 2.3Γ, του λείπει η περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (TAD) αλλά και η θέση φωσφορυλίωσης, η πρωτεΐνη μετατοπίζεται πιο γρήγορα στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε σχέση με την Sc(1320) (εικόνα 2.3Ζ).

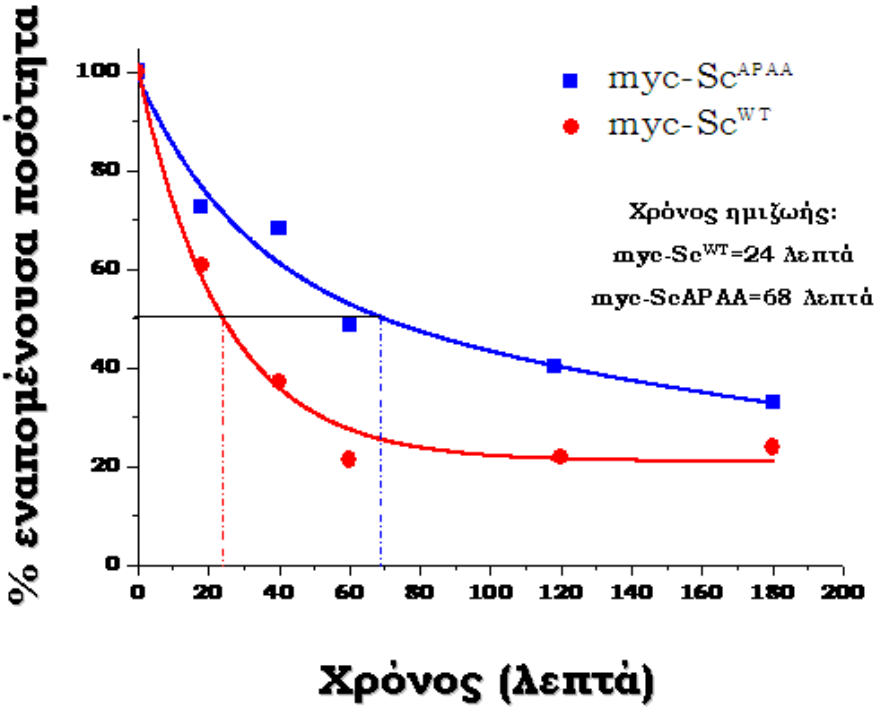
Παρατηρήσαμε ότι όταν συνδιαμολύναμε με την ίδια ποσότητα πλασμιδίου και φορτώναμε ανάλογες ποσότητες πλασμιδίου με βάση την πρωτεΐνη κανονικοποίησης (act-luc ή act-lacZ) τα σταθερά επίπεδα της πρωτεΐνης ScAPAA στα S2 κύτταρα ήταν αυξημένα σε σχέση με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη.

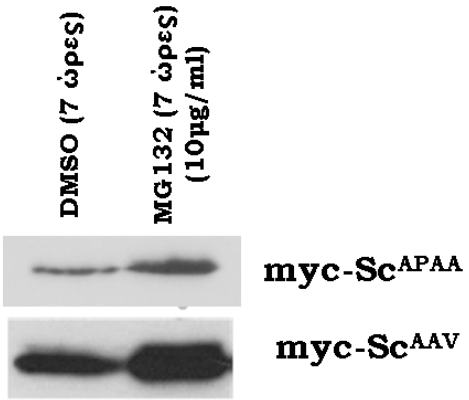
Για αυτό το λόγο θελήσαμε να μετρήσουμε πιο προσεκτικά τον χρόνο ημιζωής των πρωτεϊνών παρουσία κυκλοεξιμιδίου. Στα συγκεκριμένα πειράματα σε παροδικά διαμολυσμένα κύτταρα S2 με τους myc σημασμένους μεταγραφικούς παράγοντες προστέθηκε κυκλοεξιμίδιο (χημικός αναστολέας της πρωτεϊνοσύνθεσης), και τα δείγματα χωρίστηκαν σε 6 ίσα μέρη. Μετά το πέρας 7-10 λεπτών συλλέγουμε το πρώτο δείγμα (χρονικό σημείο 0 min) και στην συνέχεια συλλέγουμε τα επόμενα δείγματα στους χρόνους που αναγράφονται. Φορτώσαμε τα δείγματα μετρώντας είτε την συνολική πρωτεΐνη με την μέθοδο Bradford, είτε την ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης την οποία είχαμε εξωγενώς συνεκφράσει με τις πρωτεΐνες μας. Για να κανονικοποιήσουμε επιπλέον τα δείγματα πάνω στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, χρησιμοποιήσαμε ως δείγμα ελέγχου την πρωτεΐνη Groucho, η οποία είναι πολύ σταθερή πρωτεΐνη. Από το πρώτο δείγμα φορτώσαμε συγχρόνως την μισή ποσότητα (C0/2) και το ένα τέταρτο της ποσότητας (C0/4) ώστε να επιβεβαιώσουμε την γραμμική απόκριση των αντισωμάτων (R-myc και Groucho) σε συνάρτηση με την ποσότητα της πρωτεΐνης. Χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα επεξεργασία εικόνας Image J για την μέτρηση των εντάσεων. Στο διπλανό διαγραμμα, φαίνεται η εναπομένουσα ποσότητα της πρωτεΐνης σε κάθε χρονική στιγμή, εκφράζοντας την αρχική ποσότητα ως 100%. Χρόνος ημιζωής είναι η χρονική στιγμή που η ποσότητα της πρωτεΐνης έχει μειωθεί στο μισό. Σε κάποιες περιπτώσεις το σημείο 0 min είναι αμέσως μετά την προσθήκη κυκλοεξιμιδίου, οπότε σε αυτές τις περιπτώσεις ο χρόνος ημιζωής μπορεί να είναι 2-3 λεπτά πιο μικρός σε σχέση με τον εκτιμώμενο χρόνο, αν θεωρήσουμε ότι το κυκλοεξιμίδιο χρειάζεται λίγα ενδεχομένως λεπτά για να προσληφθεί από τα κύτταρα και να μπλοκάρει την πρωτεϊνοσύνθεση.

Μετρήσαμε τον χρόνο ημιζωής της πρωτεΐνης myc-ScAPAA και βρήκαμε ότι ήταν μεγαλύτερος από την αγρίου τύπου πρωτεΐνη, συγκεκριμένα κυμαινόταν μεταξύ 60-90 λεπτά. Στο πείραμα που παρουσιάζουμε ήταν 68 λεπτά. Ωστόσο η πρωτεΐνη ScAPAA όπως και η ScAAV συνέχιζε να καταστρέφεται από το πρωτεάσωμα αφού επεξεργασία

των κυττάρων με αναστολέα πρωτεασώματος για 7 ώρες προκαλούσε αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης.



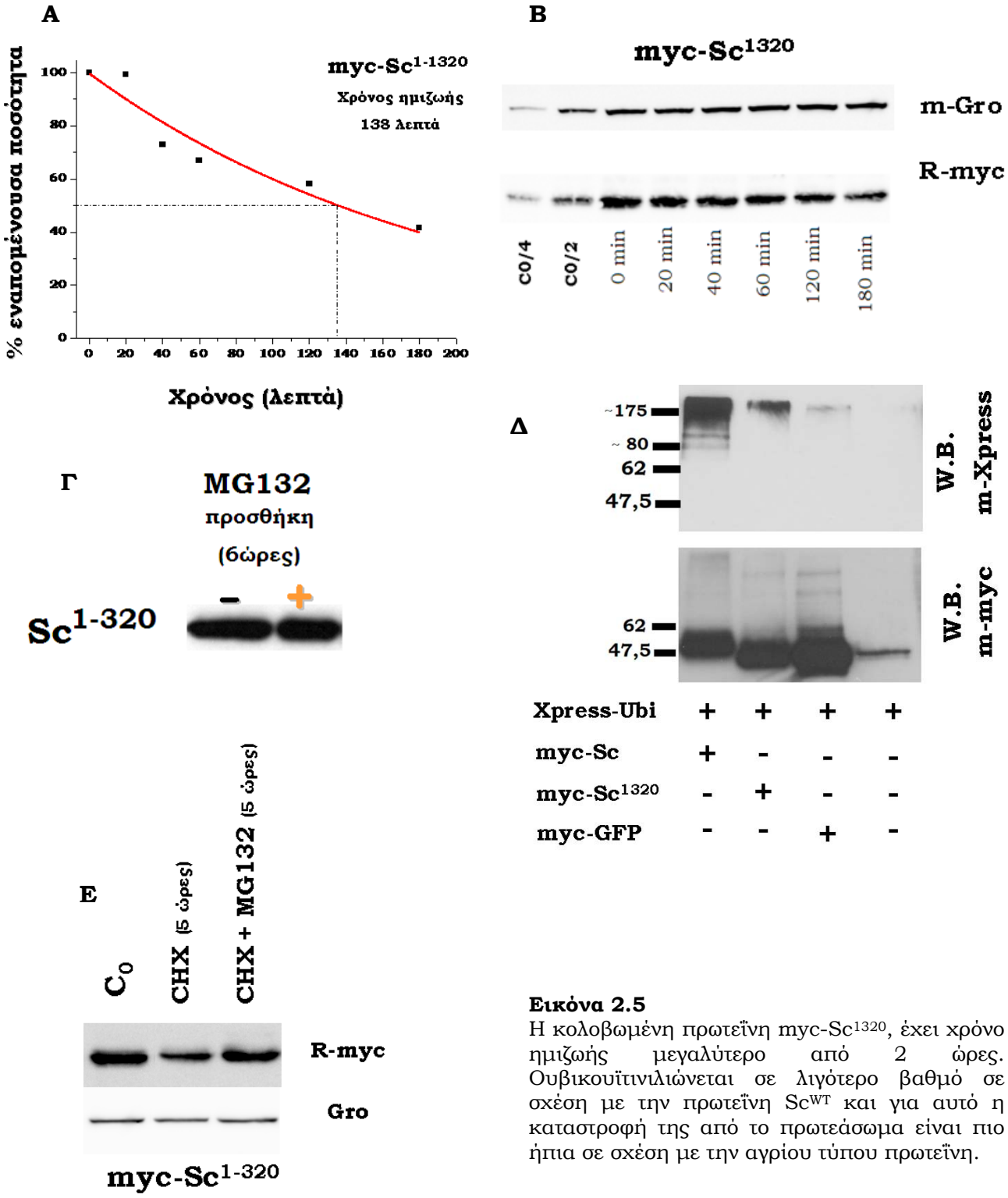




Εικόνα 2.4
Το $Sc^{\Delta PAA}$ έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής από το ScWT, αλλά συνεχίζει να καταστρέφεται από το πρωτεάσωμα.

Όπως ήδη έχουμε αναφέρει, από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας είχε βρεθεί ότι τα τελευταια 25 αμινοξέα της πρωτεΐνης Scute αποτελούν την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής, αλλά και την κύρια περιοχή αλληλεπίδρασης της Sc με την πρωτεΐνη E(spl)m7. Κατά την διάρκεια της παραπάνω ανάλυσης θελήσαμε να ελέγξουμε την κολοβωμένη μορφή της πρωτεΐνης Sc (Sc^{1-320}) που της λείπει το TAD. Με ενδιαφέρον διαπιστώσαμε ότι η πρωτεΐνη Sc^{1-320} συσσωρευόταν σε ιδιαιτέρως μεγαλύτερα ποσά κατά την υπερέκφραση της στα κύτταρα σε σύγκριση με την αγρίου τύπου. Η πρωτεΐνη Sc^{1-320} παραμένει φωσφορυλιωμένη (εικόνα 2.3E) στην θέση S268PTSS. και με χρήση κυκλοεξιμιδίου βρήκαμε ότι έχει χρόνο ημιζωής που

ξεπερνά τις 2 ώρες. Η πρωτεΐνη Sc^{1-320} δεν φαίνεται να σταθεροποιείται ιδιαίτερα με επίδραση για 6 ώρες από τον αναστολέα πρωτεασώματος. Σε πειραματα ουβικουιτινυλίωσης παρατηρούμε επίσης ότι αν και έχει ανοσοκατακρημνιστεί πολύ μεγαλύτερη ποσοτητα myc-Sc^{1-320} σε σύγκριση με την Sc^{WT}, οι ουβικουϊτινιλιώμενες μορφές της είναι λιγότερες σε σύγκριση με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη (εικόνα 2.1Γ).

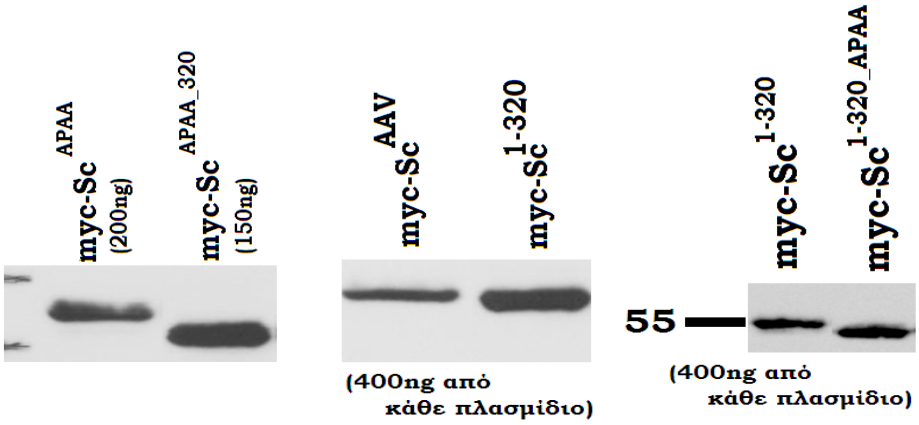


Εικόνα 2.5
Η κολοβωμένη πρωτεΐνη myc-Sc^{1320}, έχει χρόνο ημιζωής μεγαλύτερο από 2 ώρες. Ουβικουϊτινιλιώνεται σε λιγότερο βαθμό σε σχέση με την πρωτεΐνη Sc^{WT} και για αυτό η καταστροφή της από το πρωτεάσωμα είναι πιο ήπια σε σχέση με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη.

Ωστόσο συνεχίζει να έχει πολυ-ουβικουϊτινιλιωμένες μορφές σε σχέση με τα αρνητικά δείγματα ελέγχου της εικόνας 2.5Δ. Το αποτέλεσμα δεν συμφωνεί με το γεγονός ότι δεν συσσωρεύεται επιπλέον πρωτεΐνη με αναστολέα του πρωατεασώματος, αφού κατά κύριο λόγο οι πολυουβικουϊτινιλιώσεις στέλνουν την πρωτεΐνη στο πρωτεάσωμα. Πράγματι με μια διαφορετική προσέγγιση είδαμε ότι και το myc-Sc1320 καταστρέφεται από το πρωτεάσωμα, ενδεχομένως με αργότερο ρυθμό. Στο πείραμα αυτό, που παρουσιάζεται στην εικόνα 2.5Ε, χωρίσαμε παροδικά διαμολυσμένα κύτταρα με τον παράγοντα myc-Sc(1320) σε τρία μέρη. Το πρώτο μέρος (C_0) το συλλέξαμε κατευθείαν και στα άλλα δύο μέρη βάλαμε κυκλοεξιμίδιο για 5 ώρες. Η διαφορά είναι ότι στο τρίτο μέρος πριν προσθέσουμε κυκλοεξιμίδιο, βάλαμε MG132, ώστε να μπλοκάρουμε το πρωτεάσωμα. Παρατηρούμε πράγματι ότι στην περίπτωση που μπλοκάρουμε το πρωτεάσωμα πριν σταματήσουμε την πρωτεϊνοσύνθεση, τότε περισσότερη πρωτεΐνη myc-Sc1320 «επιβιώνει» μετά από 5 ώρες. Επομένως ένα ποσοστό της πρωτεΐνης καταστρέφεται από το πρωτεάσωμα. Ο λόγος που δεν βλέπουμε αύξηση της ποσότητας της πρωτεΐνης μετά από επώαση των κυττάρων με MG132 για 6 ώρες, θα μπορούσε να δικαιολογηθεί ότι λόγω του μεγάλου χρόνου ημιζωής, δεν συσσωρεύεται ποσότητα ικανή για να αυξήσει σημαντικά την ήδη συσσωρευμένη ποσότητα του myc-Sc1320. Υπενθυμίζουμε ότι η διαμόλυνση των κυττάρων γίνεται 1,5 με 2 μέρες πριν γίνει η επεξεργασία των κυττάρων είτε με το κυκλοεξιμίδιο, είτε με το MG132. Κάποια πρωτεΐνη που έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής να συσσωρεύεται αθροιστικά στην διάρκεια αυτών των ημερών, σε σχέση με μία άλλη με μικρό χρόνο ημιζωής, όπου ο ρυθμός παραγωγής και καταστροφής της είναι παραπλήσιος.

Όπως έχουμε αναφέρει και στην εισαγωγή πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες έχουν σήματα αποικοδόμησης (τα οποία καλούνται “degrons”) τα οποία αλληλεπικαλύπτονται με την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (όπως το myc, p53, Hif-1a κ.ά.). Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι και η πρωτεΐνη Scute ανήκει σε αυτήν την κατηγορία. Σε αρκετές μάλιστα περιπτώσεις το σινιάλο αποικοδόμησης λειτουργεί σε σύζευξη με κάποια φωσφορυλίωση του μορίου και πλέον το μοτίβο αυτό αποκαλείται φωσφο-αποικοδομητικό σινιάλο ή στην αγγλική ορολογία phosphodegron. Η περιοχή φωσφορυλίωσης βρίσκεται κοντά στην περιοχή ενεργοποίησης της πρωτεΐνης αλλά δεν αποτελεί τμήμα αυτής. Με δεδομένο το γεγονός ότι ο χρόνος ημιζωής του Sc^{1-320} (140 λεπτά) είναι μεγαλύτερος από αυτόν της Sc^{APAA} (70 λεπτά) συμπεραίναμε ότι η περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής του Sc (ScTAD) συνεχίζει να δρα ως degron ακόμα και όταν η πρωτεΐνη δεν είναι φωσφορυλιωμένη.

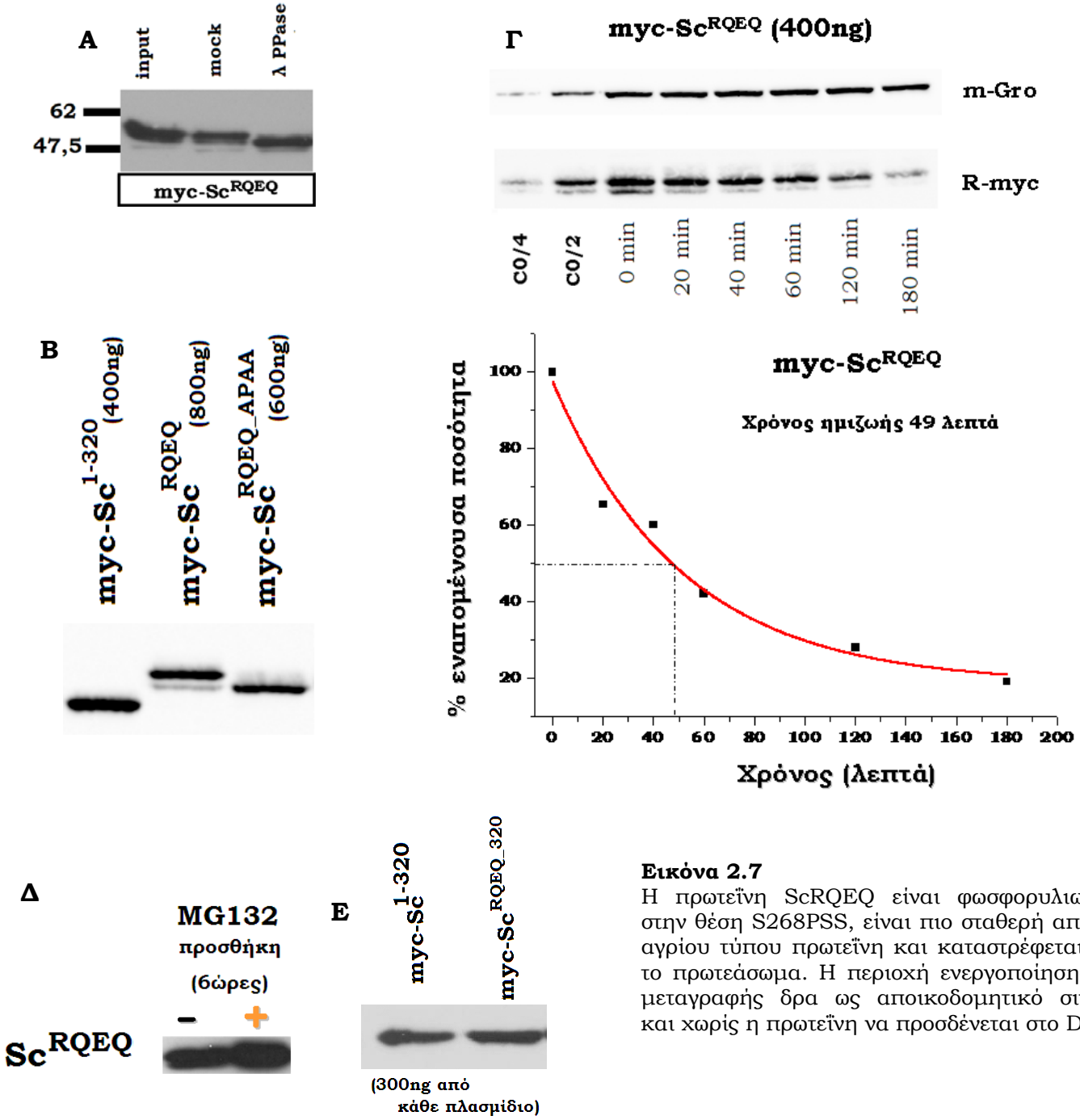
Για αυτόν τον λόγο δημιουργήσαμε το σύνθετο μετάλλαγμα Sc(APAA_320), το οποίο έχει ήδη παρουσιαστεί στα προηγούμενα πειράματα και στο οποίο λείπει το ScTAD και συγχρόνως φέρει την μεταλλαγή στην θέση φωσφορυλίωσης (εικόνα 2.3Z). Η πρωτεΐνη Sc^{APAA_320}, όπως είδαμε, μετατοπίζεται πιο γρήγορα σε σύγκριση με την Sc^{1_320}, που συμφωνεί με το ότι η βασική θέση φωσφορυλίωσης είναι η S^{268}PTS. Παρατηρήσαμε ότι η πρωτεΐνη Sc^{APAA_320} συσσωρεύεται σε μεγαλύτερο βαθμό σε σύγκριση με την Sc^{APAA} και σε επίπεδα παρόμοια με αυτά της Sc^{1_320}, όταν διαμολύνουμε με αντίστοιχες ποσότητες πλασμιδίων και φορτώνουμε με βάση την πρωτεΐνη κανονικοποίησης (λουσιφεράση ή β-γαλακτοσιδάση) (εικόνα 2.6). Στις παρακάτω εικόνες αναγράφονται οι ποσότητες πλασμιδίων. Με δεδομένο ότι ο υποκινητής είναι ο ίδιος, η διαφορά στην ποσότητά της πρωτεΐνης οφείλεται στην σταθερότητά της. Άλλωστε και οι προηγούμενες μετρήσεις των χρόνων ημιζωής επιβεβαιώνουν την αντιστοιχία αυξημένων σταθερών επιπέδων της πρωτεΐνης και μεγαλύτερου χρόνου ημιζωής. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει ότι το ScTAD δρα ως σινιάλο αποικοδόμησης είτε η πρωτεΐνη είναι φωσφορυλιωμένη, είτε όχι.



Εικόνα 2.6
Η πρωτεΐνη ScAPAA_320 συσσωρεύεται σε επίπεδα μεγαλύτερα της ScAPAA και παρόμοια της Sc1320

Οι μέχρι τώρα μελέτες έχουν δείξει ότι σε πολλές περιπτώσεις, η καταστροφή ενός μεταγραφικού παράγοντα βρίσκεται σε σύζευξη με την μεταγραφική του ενεργότητα. Για αυτόν τον λόγο δημιουργήσαμε ένα μετάλλαγμα του Sc, το λεγόμενο Sc^{RQEQ} το οποίο είναι ανίκανο να προσδεθεί στο DNA (αναλυτική περιγραφή στο Παράρτημα Α). Η πρωτεΐνη ScRQEQ φέρει δύο σημειακές μεταλλαγές στην βασική περιοχή της πρωτεΐνης Scute (R104Q και E108Q) σε αμινοξέα που ακουμπούν στο DNA. Με βάση το ηλεκτροφορητικό της πρότυπο (μετατοπίζεται στο ίδιο ύψος με την αγρίου τύπου Sc) αλλά και με χρήση λ φωσφατάσης βρήκαμε ότι η πρωτεΐνη ScRQEQ βρίσκεται σε φωσφορυλιωμένη κατάσταση (2.7Α). Επίσης το διπλό μετάλλαγμα ScRQEQ_APAA, το

οποίο εκτός τις μεταλλαγές του ScRQEQ έχει μεταλλαγμένη την θέση φωσφορυλίωσης S268PSS, μετατοπίζεται στα πηκτώματα πιο γρήγορα σε σχέση με το ScRQEQ (εικόνα 2.7B), στο ύψος της αποφωσφορυλιωμένης μορφής του. Επομένως η φωσφορυλίωση στη θέση S268PSS δεν προϋποθέτει την πρόσδεση στο DNA.



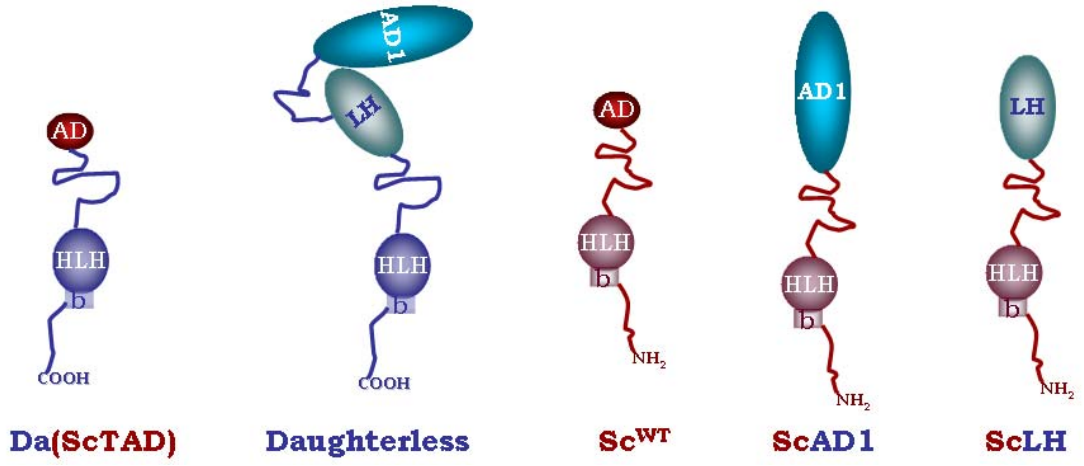
Εικόνα 2.7
Η πρωτεΐνη ScRQEQ είναι φωσφορυλιωμένη στην θέση S268PSS, είναι πιο σταθερή από την αγρίου τύπου πρωτεΐνη και καταστρέφεται από το πρωτεάσωμα. Η περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής δρα ως αποικοδομητικό σινιάλο και χωρίς η πρωτεΐνη να προσδένεται στο DNA.

Και σε αυτήν την περίπτωση μετρήσαμε τον χρόνο ημιζωής της πρωτεΐνης myc-ScRQEQ με την χρήση κυκλοεξιμιδίου και διαπιστώσαμε ότι είναι μεγαλύτερος από την αγρίου τύπου πρωτεΐνη. Την εκτιμήσαμε περίπου στα 50-60 λεπτά. Επομένως η μεταγραφική ενεργότητα της πρωτεΐνης Sc συνεισφέρει ως ένα βαθμό στην

αποικοδόμηση της πρωτεΐνης. Για άλλη μια φορά χρήση του αναστολέα πρωτεασώματος στα κύτταρα για 6 ώρες οδηγεί σε σταθεροποίηση της πρωτεΐνης.

Επιπλέον κατασκευάσαμε μια διπλά μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης Sc, την οποία καλούμε Sc(RQEQ_1-320), η οποία είναι ανίκανη να προσδεθεί στο DNA αλλά παράλληλα δεν έχει την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής. Παρατηρούμε ότι η πρωτεΐνη Sc(RQEQ_1-320) συσσωρεύεται σε μεγαλύτερα επίπεδα σε σχέση με την ScRQEQ και παρόμοια με αυτα της πρωτεΐνης Sc(1-320) (εικόνα 2.7E). Οδηγούμαστε δηλαδή στο συμπέρασμα ότι η περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής δρα ως αποικοδομητικό σινιάλο και χωρίς η πρωτεΐνη να δένεται στο DNA.

Στη συνέχεια θελήσαμε να μελετήσουμε την ικανότητα διαφορετικών περιοχών ενεργοποίησης της μεταγραφής (TAD) να δρουν ως αποικοδομητικά σινιάλα (degrons). Από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας (Ζαρίφη Ιωάννα) είχαν βρεθεί δύο περιοχές της πρωτεΐνης Daughterless να δρουν ως περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής, η περιοχή LH και η περιοχή AD1. Μάλιστα είχε βρεθεί ότι η περιοχή AD1 ενεργοποιεί την μεταγραφή πολύ πιο ισχυρά σε σχέση με την περιοχή LH, όταν αυτές συντηχθούν με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του μεταγραφικού παράγοντα Gal4 (αδημ. δεδομ Ζαρίφη Ιωάννα). Έτσι δημιουργήσαμε τις κατασκευές ScLH και ScAD1 στις οποίες αντικαταστήσαμε το TAD του Sc με τα δύο ήδη χαρακτηρισμένα TAD της πρωτεΐνης Da (το LH και το AD1 αντίστοιχα, βλ. Εικόνα 2.8).



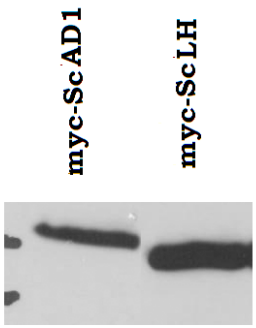
Εικόνα 2.8

Σχηματική απεικόνιση των χιμαιρικών πρωτεϊνών ScAD1, ScLH και Da(ScTAD) σε σύγκριση με τις αγρίου τύπου πρωτείνες Daughterless και Scute.

Αρχικά παρατηρήσαμε ότι τα σταθερά επίπεδα της πρωτεΐνης ScLH είναι περισσότερα σε σύγκριση με αυτά της ScAD1, όταν εκφράζαμε την ίδια ποσότητα πλασμιδίου και κανονικοποιήσουμε με βάση το γονίδιο αναφοράς hs-lacZ (εικόνα 2.9). Μετρήσαμε τον χρόνο ημιζωής των δύο πρωτεϊνών και παρατηρήσαμε ότι και οι

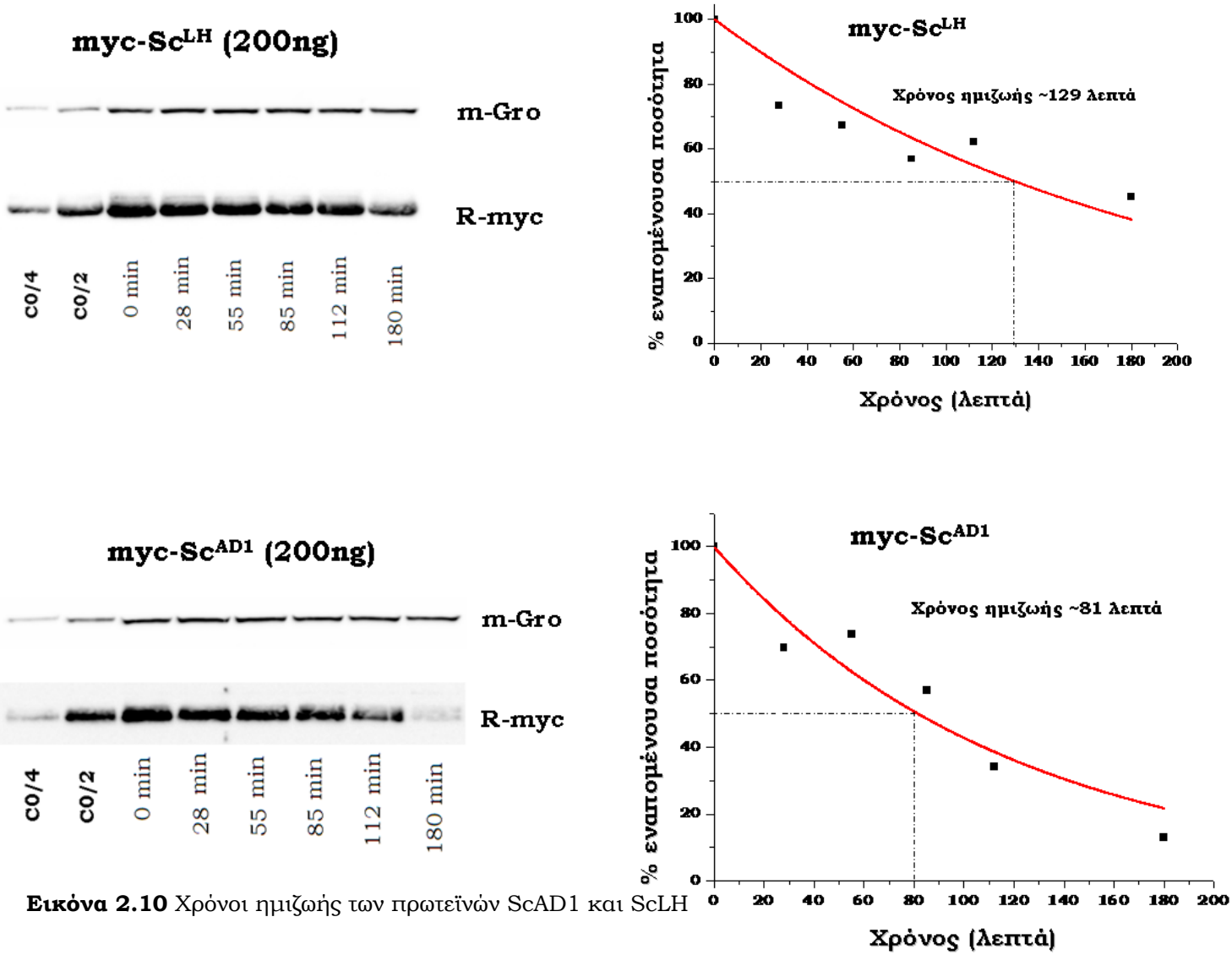
δύο πρωτεΐνες είναι εξαιρετικά πιο σταθερές σε σχέση με την αγρίου τύπου Sc (εικόνα 2.10). Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη ScLH είχε χρόνο ημιζωής ~129 λεπτά, ίδιο περίπου με την Sc(1-320) (χρ.ημ. 138 λεπτά), υποδηλώνοντας ότι η προσθήκη της περιοχής LH δεν επηρέαζε περαιτέρω την σταθερότητα της πρωτεΐνης. Από την άλλη μεριά ο χρόνος ημιζωής της πρωτεΐνης ScAD1 εκτιμήθηκε ~81 λεπτά, ο οποίος ναι μεν ήταν μεγαλύτερος από την αγρίου τύπου Sc (23 λεπτά) αλλά μικρότερος από την Sc^{1-320}. Επομένως και η περιοχή AD1 του Da έχει κάποια δράση ως αποικοδομητικό σινιάλο, αλλά όχι τόσο ισχυρό όσο το TAD του Sc.

Έτσι προχωρήσαμε για να ελέγξουμε κατά πόσο οι χιμαιρικές πρωτεΐνες ScLH και ScAD1 μπορούν να ενεργοποιήσουν την μεταγραφή ενός γονιδίου ανταποκριτή (λουσιφεράση) που βρίσκεται υπό τον έλεγχο E_A μοτίβων, στα οποία προσδένονται τα ετεροδιμερή Da/Sc (E1x4_ luciferase reporter) (εικόνα 2.11). Χρησιμοποιήσαμε πάλι την κυτταρική σειρά S2 και σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης διαπιστώσαμε ότι και οι δύο πρωτεΐνες μπορούν να ετεροδιμεριστούν με την ενδογενή πρωτεΐνη Da και να ενεργοποιήσουν την μεταγραφή. Μάλιστα η ScAD1 φαίνεται να ενεργοποιεί την μεταγραφή πιο αποδοτικά σε σχέση με την ScLH. Η πρωτεΐνη ScLH φαίνεται να ενεργοποιεί την μεταγραφή στον βαθμό που την ενεργοποιεί και η πρωτεΐνη Sc(1-320), που της λείπει η περιοχή ενεργοποίησης. Εφόσον και οι δύο πρωτεΐνες είναι εξίσου σταθερές, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι βασικό ρόλο στην ενεργοποίηση έχουν τα TADs του ενδογενούς Da και όχι η LH μεταγραφική περιοχή που φέρει η χιμαιρική πρωτεΐνη Sc. Παράλληλα παρατηρούμε ότι αντίστοιχες ποσότητες από το πλασμίδιο Sc^{WT}, ενεργοποιούν σε παρόμοιο, αν όχι μικρότερο βαθμό την μεταγραφή όπως και τα Sc1320 και ScLH. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στο ότι η πρωτεΐνη Sc είναι πιο ασταθής πρωτεΐνη, οπότε από ίδιες ποσότητες πλασμιδίων «επιβιώνει» τελικά λιγότερη ποσότητα πρωτεΐνης. Όμως έχοντας δει πλέον ότι η πρωτεΐνη ScAD1 είναι λιγότερο ασταθής από την Sc1320 και την ScLH και παρατηρώντας ότι ενεργοποιεί περισσότερο αποτελεσματικά την μεταγραφή συμφωνεί με τα προηγούμενα δεδομένα του εργαστηρίου ότι η περιοχή AD1 είναι πολύ ισχυρό TAD. Με την προσθήκη μιας μικρής ποσότητας πρωτεΐνης Da βλέπουμε όλες οι μορφές του Sc να ενεργοποιούν περισσότερο την μεταγραφή, αφού δημιουργούνται περισσότερα ετεροδιμερή Da/Sc.

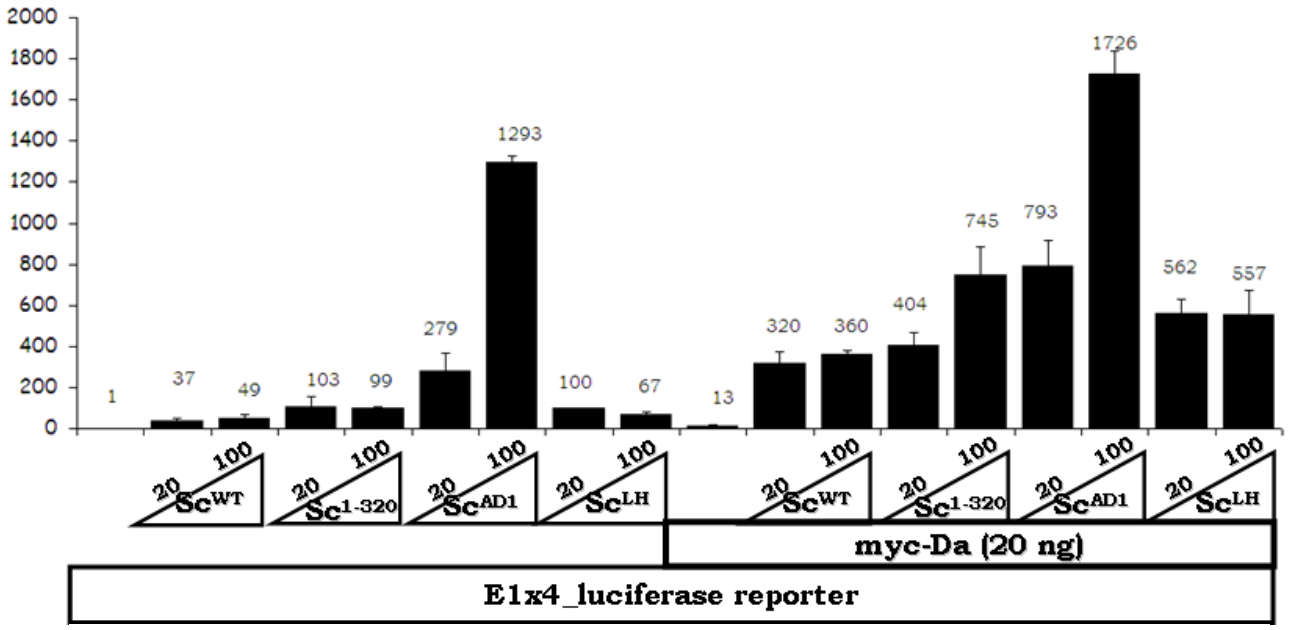


(400ng από κάθε πλασμίδιο)

Εικόνα 2.9
Τα σταθερά επίπεδα έκφρασης της ScLH είναι μεγαλύτερα από αυτά της ScAD1, όταν διαμολύνουμε ίδιες ποσότητες πλασμιδίου.

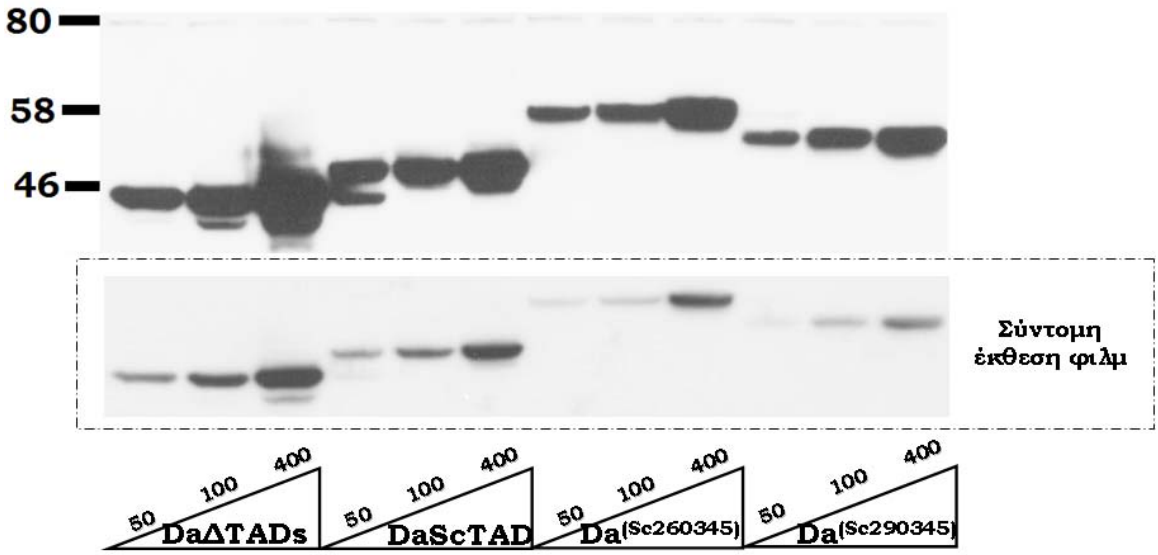


Εικόνα 2.10 Χρόνοι ημιζωής των πρωτεϊνών ScAD1 και ScLH



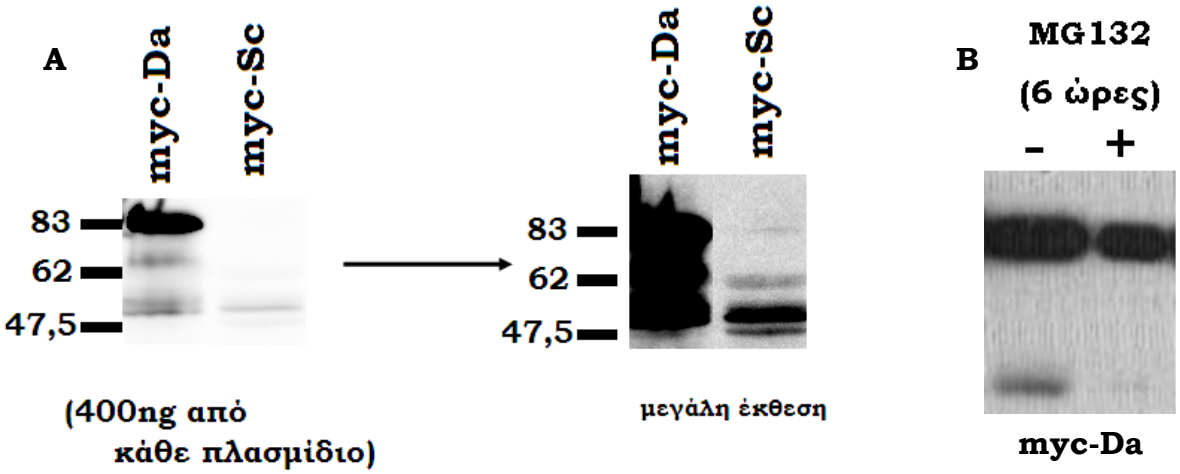
Εικόνα 2.11. Ενεργοποίηση του E1x4 γονιδίου αναφοράς από το ScWT, Sc(1-320), ScAD1 και ScLH, απουσία ή παρουσία εξωγενώς προσφερόμενου Da.

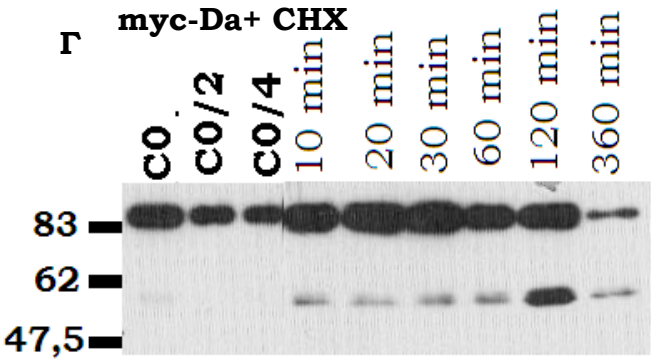
Παράλληλα αποφασίσαμε να μελετήσουμε αν το ScTAD είναι μεταφερόμενο σινιάλο αποικοδόμησης. Χρησιμοποιήσαμε την πρωτεΐνη DaΔTADs (κατασκευή Ζαρίφη Ιωάννας), στην οποία έχουν αφαιρεθεί και οι δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (AD1 και LH), ενώ διατηρεί την περιοχή πρόσδεσης στο DNA και είναι μεταγραφικά ανενεργό μόριο. Συντήξαμε το ScTAD στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης DaΔTADs, και την χιμαιρική πρωτεΐνη την ονομάσαμε Da(ScTAD) (σχήμα εικόνας 2.8). Τα σταθερά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Da(ScTAD) σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης εμφανίζονται χαμηλότερα σε σύγκριση με αυτά της DaΔTADs (εικόνα 2.12). Επίσης συντήξαμε στην πρωτεΐνη DaΔTADs την περιοχή 290-345 του Sc που περιλαμβάνει εκτός από το ScTAD και ένα πιθανό μοτίβο σουμοϋλίωσης [χιμαιρική πρωτεΐνη Da(Sc290-345)] καθώς και την περιοχή 260-345 που εκτός από τα προηγούμενα στοιχεία περιλαμβάνει και την κύρια θέση φωσφορυλίωσης του Sc [χιμαιρική πρωτεΐνη Da(Sc260-345)]. Παρατηρήσαμε ότι τα σταθερά επίπεδα της πρωτεΐνης μειώθηκαν ακόμα περισσότερο όταν υπερεκφράσαμε αυτές τις μορφές του, γεγονός που υποδηλώνει ότι το αποικοδομητικό σινιάλο της πρωτεΐνης Scute είναι μεταφερόμενο. Χρειάζεται ενδεχομένως στο μέλλον να γίνουν ακριβείς μετρήσεις για να διαπιστώσουμε κατά πόσο η ημιζωή του Da(Sc260345) είναι μικρότερη του Da(ScTAD), ώστε να ελέγξουμε την συμμετοχή της φωσφορυλίωσης στην ενίσχυση της αποικοδόμησης της πρωτεΐνης Da(Sc260345).



Εικόνα 2.12
Το σινιάλο αποικοδόμησης του ScTAD είναι μεταφερόμενο.

Πριν προχωρήσουμε σε μια μικρή σύνοψη της παρούσας ενότητας, θα ήταν καλο να αναφέρουμε δυο «λόγια» για την σταθερότητα της πρωτεΐνης Da. Έγινε εύκολα αντιληπτό και από τα πρώτα μόλις πειράματα διαμόλυνσης ότι η πρωτεΐνη Da είναι πολύ σταθερή πρωτεΐνη, σε αντίθεση με την πρωτεΐνη Sc. Η πρωτεΐνη myc-Da (ΜΒ=78,9 kDa) συσσωρευόταν εκπληκτικά πιο πολύ σε σύγκριση με την πρωτεΐνη myc-Sc (ΜΒ=43 kDa) (εικόνα 2.13Α). Παρότι οι πρωτεΐνες myc-Da και myc-Sc, έχουν μεγάλη διαφορά στο μοριακό τους βάρος, η ύπαρξη μιας κουτσουρεμένης ζώνης του myc-Da, ακριβώς στο ίδιο ύψος που μετατοπίζεται το myc-Sc μας ανάγκασε στα επόμενα πειράματα που θα παρουσιαστούν να χρησιμοποιούμε την συντηγμένη πρωτεΐνη Da με τον επίτοπο 6xHis, την οποία καλούμε His-Da, ώστε στο ίδιο αποτύπωμα νιτροκυτταρίνης να μπορούμε ταυτόχρονα να ανιχνεύουμε τις πρωτεΐνες με τα διαφορετικά αντισώματα.





Εικόνα 2.13
Η πρωτεΐνη Da είναι πολύ σταθερή πρωτεΐνη με χρόνο ημιζωής που ξεπερνά τις 3 ώρες. Παρουσία αναστολέα του πρωτεασώματος μειώνονται τα επίπεδα της.

Παρουσία αναστολέα του πρωτεασώματος η πρωτεΐνη μειώνεται αντί για να συσσωρεύεται. Αυτό για παράδειγμα θα μπορούσε να δικαιολογηθεί αν ο παράγοντας που την καταστρέφει αυξανόταν με την χρήση του MG132.

Μετρήσαμε τον χρόνο ημιζωής με προσθήκη κυκλοεξιμιδίου (CHX) και βρήκαμε ότι και μετά το πέρας δύο ωρών από το μπλοκάρισμα της πρωτεϊνοσύνθεσης η

πρωτεΐνη φαίνεται να μην έχει καταστραφεί καθόλου. Δεν ασχοληθήκαμε περαιτέρω για να βρούμε τον ακριβή χρόνο ημιζωής της πρωτεΐνης, αφού έγινε εμφανές ότι πρόκειται για μια ιδιαίτερα σταθερή πρωτεΐνη.

Έτσι συνοψίζοντας τα αποτελέσματα αυτής της ενότητας, πρέπει να τονίσουμε ότι η πρωτεΐνη Scute μας έχει αποκαλύψει έως τώρα τρεις τρόπους με τους οποίους καταστρέφεται. Το πιο ισχυρό αποικοδομητικό cis στοιχείο της είναι η περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (TAD). Αποδείξαμε ότι το TAD της συμβάλει στην ουβικουϊτινιλίωση της πρωτεΐνης και την καταστροφή της από το πρωτεάσωμα. Φαίνεται ότι πρόκειται για μεταφερόμενο σινιάλο αποικοδόμησης. Το TAD της για να δράσει ως "degron" δεν χρειάζεται την πρόσδεση στο DNA, αλλά ούτε την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης.

Το δεύτερο αποικοδομητικό σινιάλο της είναι η φωσφορυλίωσή της στην θέση S268PTS. Φαίνεται να συμβαίνει εκτός DNA σε ένα βαθμό. Αλλά είναι λιγότερο αποτελεσματικός cis-καταστροφέας της σε σύγκριση με το TAD της.

Το τρίτο αποικοδομητικό σινιάλο της είναι η πρόσδεσή της στο DNA. Και αυτό το cis-στοιχείο είναι πιο ασθενές degron σε σχέση με το TAD της πρωτεΐνης.

Από την άλλη μεριά η πρωτεΐνη Da, που αποτελεί παρτενέρ της πρωτεΐνης Scute, παρουσιάζει μια εκπληκτική σταθερότητα. Δεν φαίνεται να καταστρέφεται από το πρωτεάσωμα. Αν όμως πάρουμε τα TAD της και τα τοποθετήσουμε στην πρωτεΐνη Sc, τότε το ένα εκ των δύο, το AD1 και όχι το LH έχει την ικανότητα να δράσει ως αποικοδομητικό σινιάλο. Θα μπορούσαμε να σκεφτούμε διάφορους τρόπους για τους οποίους το AD1 μπορεί να δράσει ως degron στο myc-Sc1320, αλλά να μην μπορεί να δράσει στο πλήρους μήκους Da. Ένας από αυτούς μπορεί να έχει να κάνει με το γεγονός της ταυτόχρονης συνύπαρξης της φωσφορυλιωμένης θέσης του Sc S268PTS, που απουσιάζει από το Da. Ένας άλλος μπορεί να εμπλέκει την μη ύπαρξη κατάλληλης θέσης προσθήκης της ουβικουϊτίνης ή και απουσία περιοχής ξεδιπλώματος της πρωτεΐνης ώστε η πρωτεΐνη να εισέλθει στο πρωτεάσωμα. Θα μπορούσε επίσης η πρωτεΐνη Da να αλληλεπιδρά ισχυρά με κάποιο ένζυμο απο-ουβικουϊτινιλίωσης (Deubiquitinating enzymes, DUBs) το οποίο να αφαιρεί τα ubi μόρια.

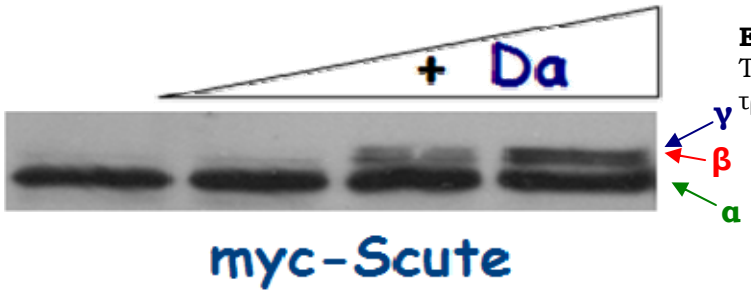
Ενότητα Α.2.

Διαμοριακή (In trans) αποσταθεροποίηση της πρωτεΐνης Scute. Ο ρόλος της πρωτεΐνης Daughterless.

Επαγώμενες τροποποιήσεις της πρωτεΐνης Scute από τον παρτενέρ της Da.

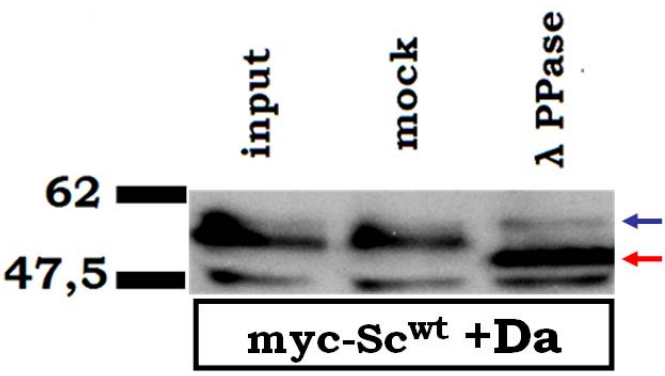
Η πρωτεΐνη Scute, όπως και οι περισσότεροι bHLH παράγοντες, έχει μικρή ικανότητα πρόσδεσης στο DNA ως ομοδιμερές. Αντίθετα ετεροδιμερίζεται με την πανταχού εκφραζόμενη πρωτεΐνη Da, σχηματίζοντας ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο με ισχυρή ικανότητα πρόσδεσης στο DNA. Με σκοπό να δούμε την επίδραση της πρωτεΐνης Da στην σταθερότητα της πρωτεΐνης Scute, συνδιαμολύναμε τις πρωτεΐνες στα κύτταρα S2.

Παρατηρήσαμε ότι η πρωτεΐνη Sc παρουσία του Da, εμφανίζει δυο νέες μορφές (τροποποίηση β και γ) οι οποίες μετατοπίζονται πιο αργά στο SDS πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε σχέση με την κύρια μορφή του Sc (ζώνη α) (Εικόνα 2.16).



Εικόνα 2.16
Το Da επάγει μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στην πρωτεΐνη Sc.

Οι τροποποιήσεις αυτές δεν είναι φωσφορυλιώσεις αφού με χρήση λαμβδα φωσφατάσης η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των δύο αυτών μορφών δεν επηρεαζόταν (μπλε βέλος), ενώ συγχρόνως η κύρια ζώνη του Sc αποφωσφορυλιωνόταν κόκκινο βέλος.



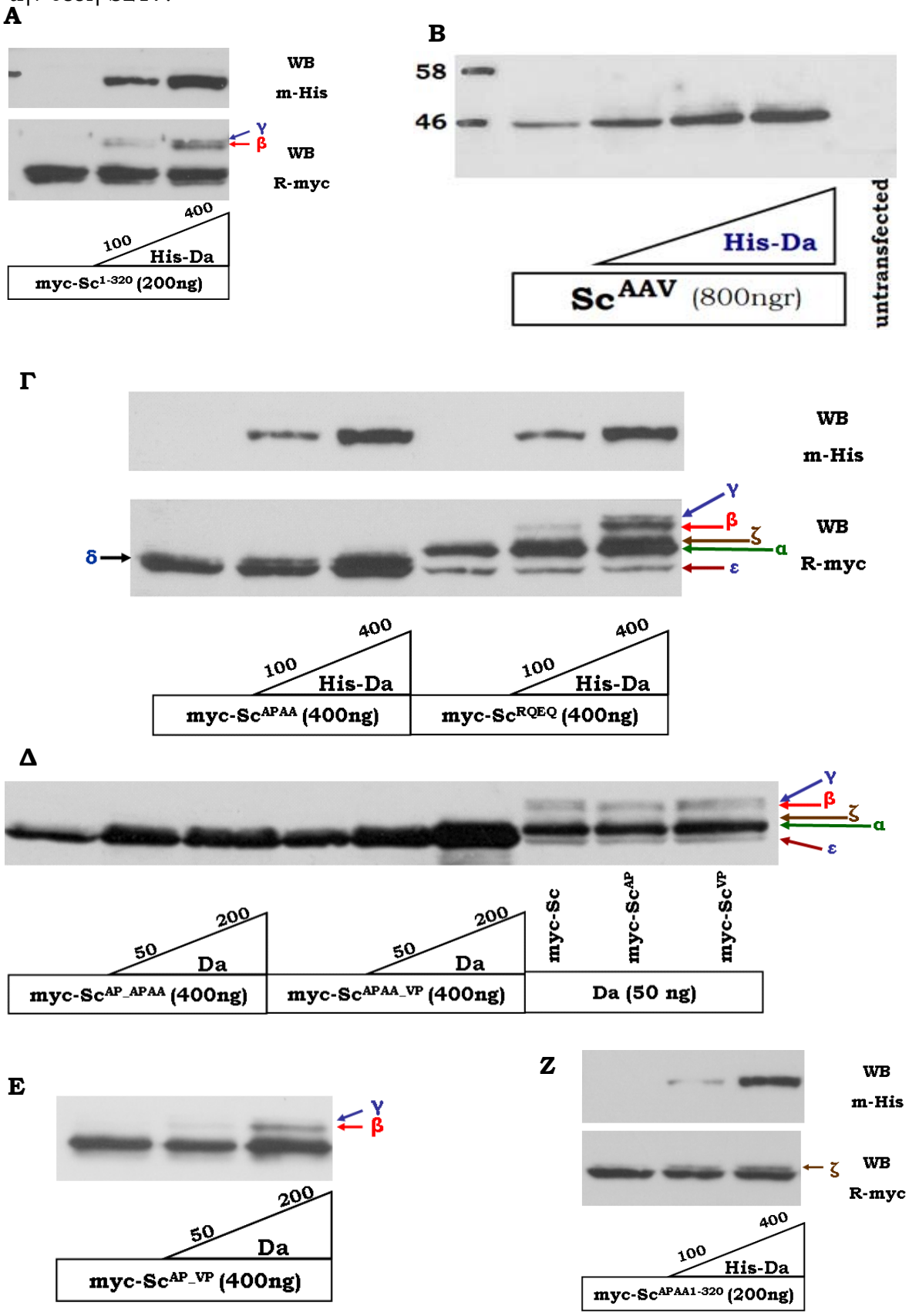
Εικόνα 2.17
Η τροποποίηση που εξαρτάται από το Da δεν είναι φωσφορυλίωση. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα από παροδικά διαμολυσμένα S2 κύτταρα που εκφράζουν ταυτόχρονα την πρωτεΐνη myc-Sc και τον παρτενέρ της Da (μη σημασμένο) χωρίστηκε στα τρία μέρη. Στο ένα προστέθηκε κατευθείαν Laemmli buffer και φυλάκτηκε στους -80°C (input). Στα άλλα δύο (mock & λ PPase) προστέθηκαν τα διαλύματα της λ φωσφατάσης και μόνο στο ένα (λ PPase) προστέθηκε και το ένζυμο της φωσφατάσης (Sigma, P9614). Και τα δύο δείγματα επωάστηκαν στους 30 ^{o}C για 30 λεπτά.

Στη συνέχεια μελετήσαμε μερικές από τις μεταλλαγμένες μορφές του Sc, τις οποίες παρουσιάσαμε στην προηγούμενη ενότητα, για να δούμε κατά πόσο υπόκεινται σε αυτές τις τροποποιήσεις. Θέλαμε να ελέγξουμε αν υπάρχουν κάποιες προϋποθέσεις για την επαγωγή αυτών των τροποποιήσεων ώστε να καταλάβουμε καλύτερα τον μηχανισμό με των οποίων εμφανίζονται. Πράγματι εντοπίσαμε κάποιες διαφορές στην ικανότητα του Da, να επαγει τις τροποποιήσεις αυτές στα διάφορα μεταλλάγματα και τις οποίες θα παρουσιάσουμε παρακάτω.

Οι δύο αυτές τροποποιήσεις του Sc παρουσία Da δεν εξαρτώνται από την ύπαρξη του ScTAD, μιας και η πρωτεΐνη Sc(1-320) τροποποιείται παρουσία του Da (εικόνα 2.18 Α). Επίσης η πρωτεΐνη ScRQEQ, που έχει χάσει την ικανότητα να προσδένεται στο DNA εμφανίζει και τις δύο τροποποιήσεις, με μια μικρή έμφαση στην τροποποίηση β έναντι της γ (εικόνα 2.18 Γ). Αντίθετα οι εξαρτώμενες από το Da μορφές του Scute δεν εμφανίζονται στην περίπτωση του μεταλλάγματος ScAAV (εικόνα 2.18Β). Όμως παρατηρήσαμε ότι παρουσία της πρωτεΐνης Da, η πρωτεΐνη Sc^{APAA}, εμφανίζει μια διαφορετική τροποποίηση (τροποποίηση δ) η οποία μετατοπίζεται πολύ κοντά στην κύρια ζώνη του ScAPAA, και με βάση το μοριακό της βάρος δεν φαίνεται να συμπίπτει με τις τροποποιήσεις β και γ. Θελήσαμε να αναλύσουμε τις επιπλέον μεταλλαγές που φέρει το Sc^{AAV} ώστε να δούμε σε ποια θέση από τις άλλες δύο οφείλεται η εμφάνιση της τροποποίησης δ. Διαπιστώσαμε λοιπόν ότι η πρωτεΐνη ScVP (T329P→VP) παρουσία της Da εμφάνιζε τις τροποποιήσεις β και γ (εικόνα 2.18Δ). Οι πρωτεΐνες ScAP (S217P→AP) και Sc(AP_VP) (S217P→AP, T329P→VP) εμφάνιζαν πιο έντονα την τροποποίηση β και ελάχιστα την γ (εικόνα 2.18Δ και 2.18Ε). Επίσης η πρωτεΐνη Sc(APAA_VP) (S^{268}PTSS^{272} →APAAS, T329P) συμπεριφερόταν όπως και η ScAPAA, δηλαδή παρουσία Da εμφάνιζε την τροποποίηση δ, αλλά όχι της β και γ (εικόνα 2.18Δ). Τέλος η πρωτεΐνη Sc(AP_APAA) συμπεριφερόταν ακριβώς όπως την AAV και δεν εμφάνιζε καμία από τις τρεις προαναφερόμενες τροποποιήσεις (εικόνα 2.18Δ).

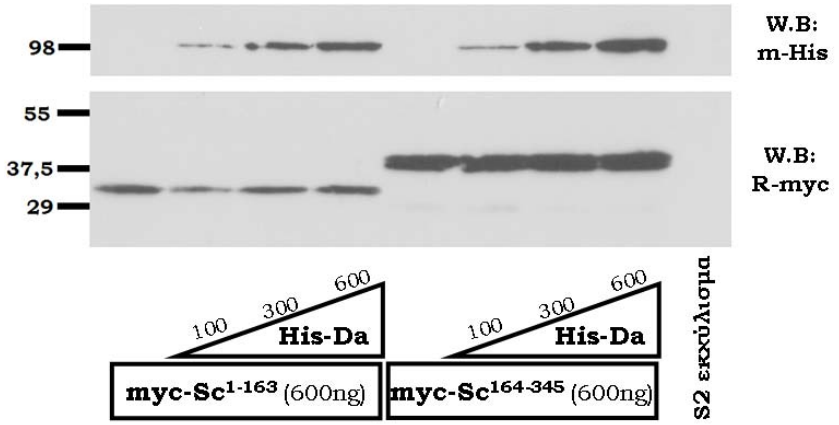
Κάνοντας μια μικρή περίληψη ως τώρα θα λέγαμε ότι η πρωτεΐνη Da, επάγει στο Scute την τροποποίηση β, μεγάλου σχετικά μοριακού βάρους, η οποία εξαρτάται από την ύπαρξη της θέση S^{268}PTSS^{272}, που όπως αποδείξαμε στο προηγούμενο κεφάλαιο αποτελεί την κύρια θέση φωσφορυλίωσης του Sc. Η δεύτερη τροποποίηση (δ) που επάγεται από το Da, εξαρτάται από την ύπαρξη της σερίνης στην θέση 217, αφού δεν συμβαίνει στο μετάλλαγμα ScAAV, ενώ επάγεται εντονότατα και στην πρωτεΐνη ScAPAA καθώς και στην Sc(APAA_1320) (εικόνα 2.18 Ζ). Να υπενθυμίσουμε ότι η πρωτεΐνη Sc(APAA_1320) έχει μεταλλαγμένη την σερίνη 268 αλλά συγχρόνως της λείπει και η θρεονίνη 329, οπότε η μόνη θέση που διαθέτει σε αντίθεση με την ScAAV, είναι η σερίνη 217. Αν συνδυάσουμε το γεγονός ότι τα μεταλλάγματα ScAP και Sc(AP_VP) δεν

εμφανίζουν έντονα την τροποποίηση γ, αλλά εμφανίζουν κανονικότατα την τροποποίηση β, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι και η τροποποίηση γ εξαρτάται από την θέση S217.



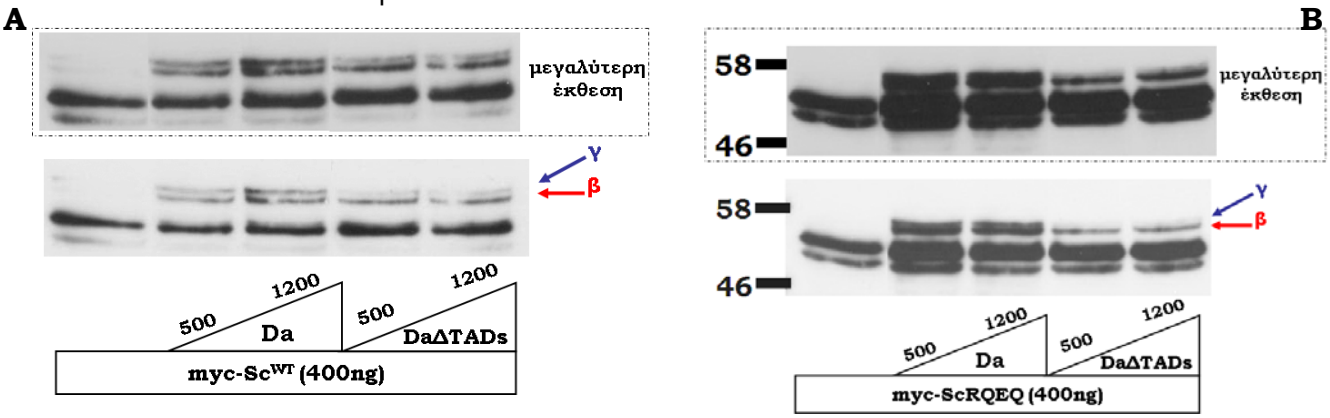
Εικόνα 2.18
Τροποποιήσεις που επάγονται στο Scute από την παρουσία του Da.

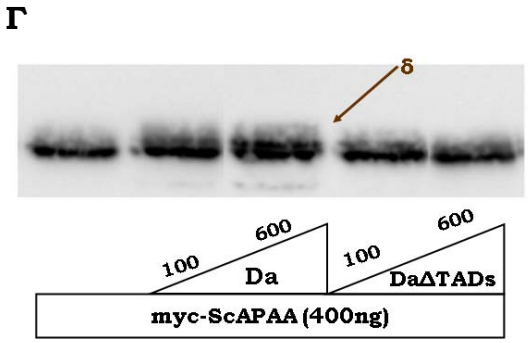
Επίσης τα κουτσουρεμένα κομμάτια Sc163-345 και Sc1-163 δεν εμφάνιζαν αυτές τις τροποποιήσεις γεγονός που μας δείχνει ότι δεν χρειάζεται μόνο η καρβοξυτελική περιοχή της πρωτεΐνης Sc, όπου βρίσκονται οι θέσεις S217P και $S^{268}PTSS^{272}$, αλλά και η bHLH περιοχή της (αμινοξέα 101-163) ώστε να μπορέσει να αλληλεπιδράσει με την πρωτεΐνη Da.



Εικόνα 2.19
Η πρωτεΐνη Da δεν προκαλεί τις τροποποιήσεις στις κολοβωμένες πρωτεΐνες myc-Sc(1-163) και myc-Sc(164-345). Κανονικοποίηση με act-luc

Η πρωτεΐνη DaΔTADs, η οποία περιλαμβάνει την bHLH περιοχή και επομένως μπορεί να ετεροδιμεριστεί με την Sc, αλλά απουσιάζει η αμινοτελική περιοχή της, στην οποία βρίσκονται τα TADs του Da, συνεχίζει να προκαλεί στην πρωτεΐνη Sc την τροποποίηση β και λιγότερο αποτελεσματικά την τροποποίηση γ. Είχαμε παρατηρήσει και στην εικόνα 2.18, ότι το μετάλλαγμα ScRQEQ παρουσία αγρίου τύπου Da εμφανίζει πιο έντονα την τροποποίηση β και λιγότερο την γ. Αυτή η διαφοροποίηση ενισχύεται επιπλέον παρουσία DaΔTADs.

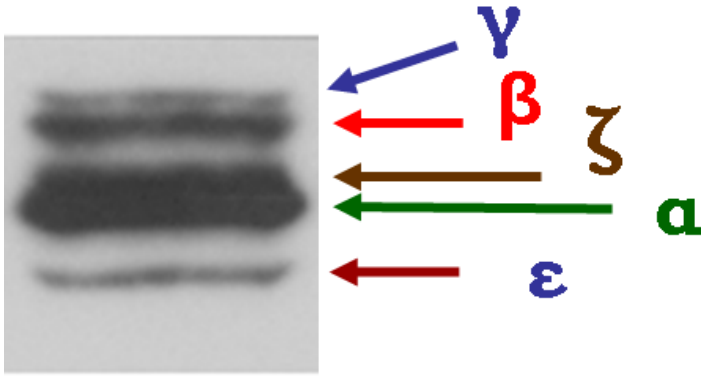




Εικόνα 2.20
Η πρωτεΐνη DaΔTADs επάγει την τροποποίηση β στις πρωτεΐνες myc-Sc και myc-ScRQEQ και λιγότερο αποτελεσματικά την τροποποίηση γ. Στην πρωτεΐνη ScAPAA δεν φαίνεται να επάγεται η τροποποίηση δ, παρουσία του DaΔTADs.

Συγκεκριμένα η τροποποίηση γ, γίνεται ελάχιστα έως καθόλου. Επίσης η μεταλλαγμένη μορφή ScAPAA, η οποία εμφάνιζε την τροποποίηση δ παρουσία Da, φαίνεται να μην τροποποιείται παρουσία DaΔTADs. Επομένως βλέπουμε ότι η τροποποίηση β χρειάζεται μονάχα τον ετεροδιμερισμό της πρωτεΐνης Sc με την Da, ενώ η τροποποίηση γ ευνοείται από την παρουσία των περιοχών TADs του Da και από την πρόσδεση του Sc στο DNA.

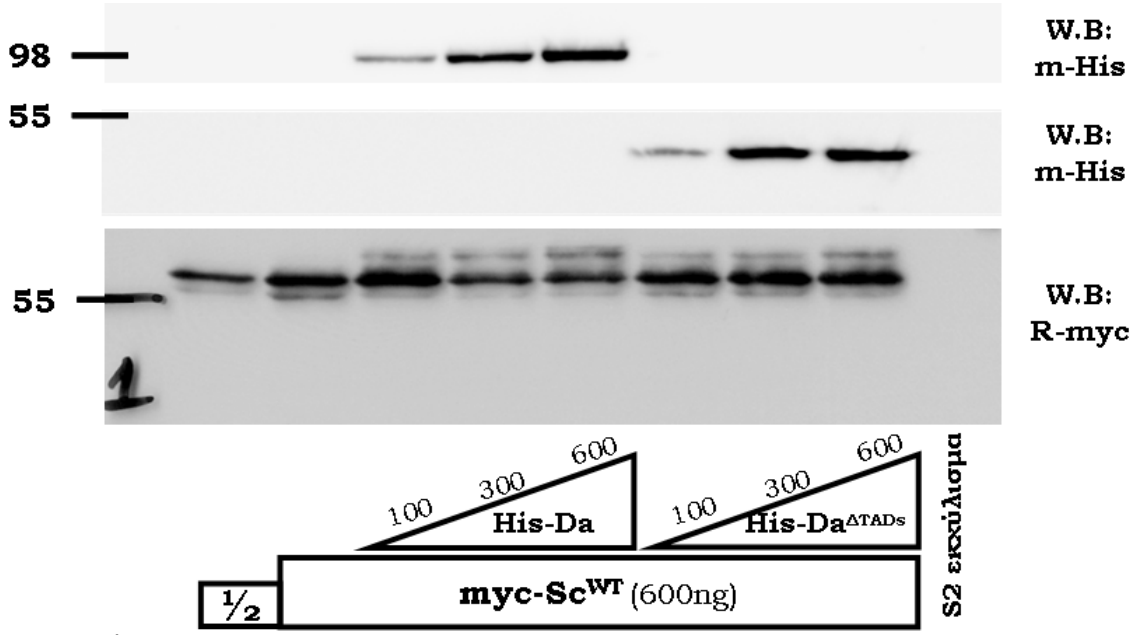
Αν επικεντρωθούμε στην πρωτεΐνη myc-ScRQEQ παρουσία Da, μπορούμε να διαφοροποιήσουμε τις διάφορες μορφές του ScRQEQ όπως φαίνονται στην εικόνα 2.21. Η μορφή α είναι η φωσφορυλιωμένη μορφή του Sc και εξαρτάται από την ακεραιότητα της θέσης $S^{268}PTSS^{272}$. Η μορφή ε αποτελεί την αποφωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης Sc, αφού με τη χρηση φωσφατάσης η ζώνη α, μετατοπίζεται στην ε. Η μορφή β εξαρτάται, ή για να είμαστε πιο σωστοί ενισχύεται, από την παρουσία του Da σε συνδυασμό με την ύπαρξη της θέσης $S^{268}PTSS^{272}$, αλλά δεν είναι φωσφορυλίωση αφού η λ φωσφατάση επηρεάζει την α μορφή αλλά όχι την β. Η μορφή δ της πρωτεΐνης ScAPAA, εξαρτάται από την παρουσία του Da, αλλά και από την παρουσία της θέσης S217. Η μορφή ζ πιστεύουμε ότι φέρει την τροποποίηση της μορφής δ και της μορφής α. Το γεγονός ότι η γ εξαρτάται από το Da αλλά και από τις θέσεις $S^{268}PTSS^{272}$ και S217, μας οδηγεί σε ένα λογικό συμπέρασμα ότι η γ φέρει την τροποποίηση της β μαζί με την τροποποίηση της ζώνης ζ. Στο μέλλον πρέπει να ελεγχθεί αν η τροποποίηση ζ, γ και δ είναι φωσφορυλιώσεις, ώστε να επιβεβαιωθεί η κοινή τους ιδιότητα.



Εικόνα 2.21
Οι διάφορες καταστάσεις της πρωτεΐνης ScRQEQ παρουσία της πρωτεΐνης Da.

Επίδραση της πρωτεΐνης Da στην σταθερότητα της πρωτεΐνης Scute

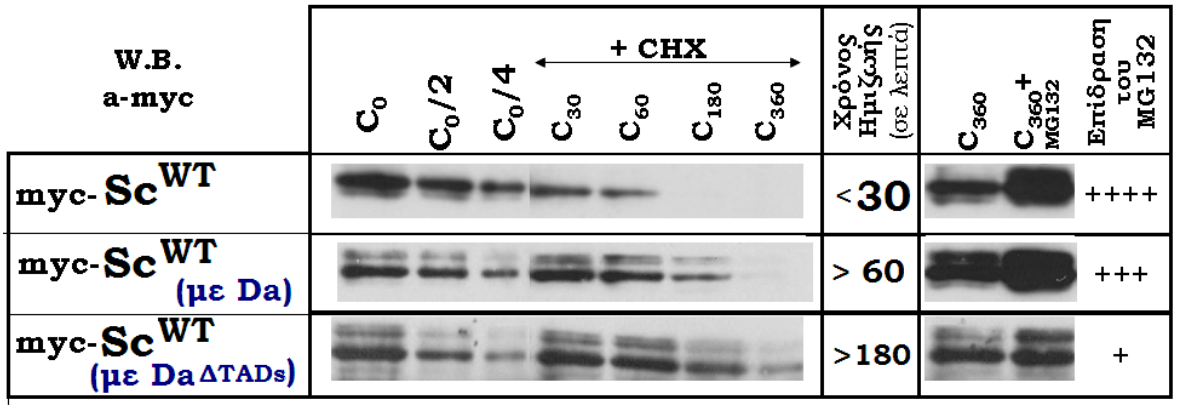
Κατά την διάρκεια των πειραμάτων μας παρατηρήσαμε ότι συνδιαμολύνοντας την πρωτεΐνη Sc με αυξανόμενες ποσότητες της πρωτεΐνης Da είχαμε το εξής φαινόμενο. Αρχικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης Da εμφανιζόντουσαν οι τροποποιήσεις α και β, αλλά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, ενώ οι τροποποιήσεις παρέμεναν, τα επίπεδα της βασικής ζώνης (φωσφορυλιωμένη μορφή) της Sc μειωνόντουσαν. Αυτό δεν συνέβαινε εάν εκφράζαμε αντί για την πλήρου μήκους πρωτεΐνη, την κολοβωμένη πρωτεΐνη DaΔTADs, παρόλο που εμφανιζόντουσαν οι τροποποιήσεις (με την β τροποποίηση να υπερτερεί έναντι της γ) και η βασική ζώνη του Sc αύξανε. Να τονίσουμε ότι στα ακόλουθα πειράματα έγινε κανονικοποίηση των δειγμάτων με το γονίδιο act5C-luc. Στο δείγμα ½ έχουμε φορτώσει την μισή ποσότητα του Sc (εικόνα 2.22) ή του ScRQEQ (εικόνα 2.24) όταν εκφράζονται μόνα τους.



Εικόνα 2.22
Η πρωτεΐνη Sc καταστρέφεται παρουσία Da, ενώ σταθεροποιείται παρουσία DaΔTADs

Αποφασίσαμε να μετρήσουμε τον χρόνο ημιζωής του myc-Sc παρουσία του Da και του DaΔTADs. Όπως και στις προηγούμενες μετρήσεις ημιζωής, φορτώσαμε και την ποσότητα ίση με την μισή (C0/2) και το ένα τέταρτο (C0/4) της αρχικής ποσότητας ώστε να έχουμε και μία ποσοτική εκτίμηση «με το μάτι», για τον χρόνο στον οποίο η αρχική ποσότητα του myc-Sc, μειώνεται στο μισό (ορισμός χρόνου ημιζωής) (εικόνα 2.23). Παρατηρήσαμε ότι όταν το Sc συνεκφράζεται με το Da, ο χρόνος ημιζωής

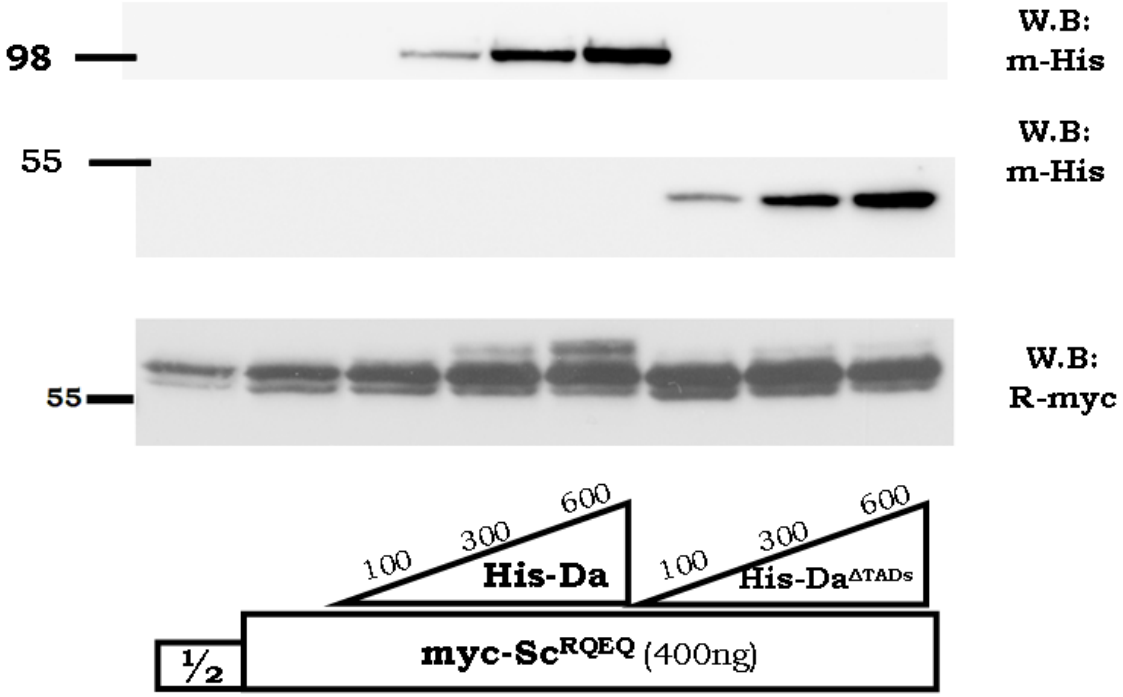
αυξάνει σε περισσότερο από μία ώρα, ενώ όταν συνεκφράζαμε το DaΔTADs, ο χρόνος ημιζωής ξεπερνούσε τις 3 ώρες. Εντυπωσιακό ήταν το γεγονός ότι ενώ το Sc παρουσία Da, συνέχιζε να καταστρέφεται από το πρωτεάσωμα (συσσωρευόταν με επίδραση MG132 για 6 ώρες), όταν ήταν μαζί με το DaΔTADs, η αναστολή του πρωτεασώματος δεν επέφερε αλλαγή στα επίπεδα της πρωτεΐνης Sc. Φαίνεται δηλαδή ο ετεροδιμερισμός με την πρωτεΐνη DaΔTADs να προστάτευε την πρωτεΐνη από το πρωτεάσωμα. Αυτός ο ετεροδιμερισμός όμως αν το Da είχε τις περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής δεν προστάτευε τόσο αποτελεσματικά το Sc από το πρωτεάσωμα. Στο πείραμα αυτό είχε χρησιμοποιηθεί 800ng Sc και 200 ng από το Da και DaΔTADs, οπότε ενδεχομένως αυτό να εξηγεί γιατί δεν βλέπουμε την καταστροφή του Sc από το Da. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 2.22 σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του Da παρατηρούμε την αποικοδόμηση του Sc.



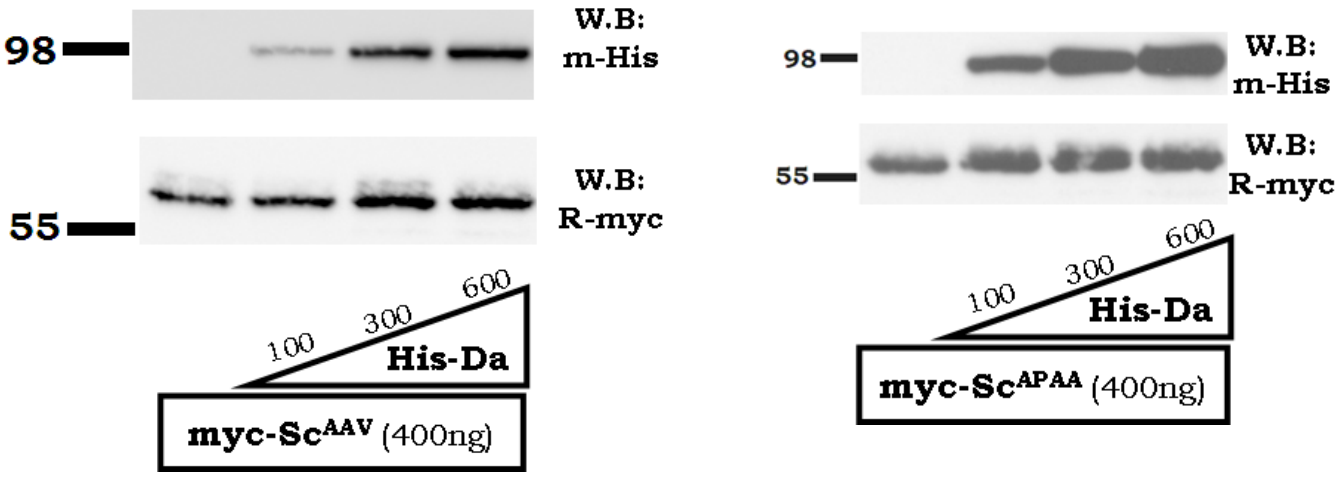
Εικόνα 2.23
Ο χρόνος ημιζωής του Sc παρουσία DaΔTADs αυξάνει περισσότερο από ότι παρουσία Da. Παρουσία DaΔTADs το Sc δεν καταστρέφεται από το πρωτεάσωμα, ενώ παρουσία Da, συνεχίζει να καταστρέφεται.

Ενδιαφέρον παρουσίαζε το γεγονός ότι η πρωτεΐνη ScRQEQ ναι μεν παρουσίαζε τις την τροποποίηση β και λιγότερο την γ, αλλά την ίδια στιγμή η βασική μορφή του Sc σταθεροποιούνταν παρουσία Da, με αποτέλεσμα να αυξάνουν τα συνολικά επίπεδα της πρωτεΐνης. Η σταθεροποίηση συνέβαινε είτε συνεκφράζαμε την αγρίου τύπου πρωτεΐνη Da, είτε την κολοβωμένη DaΔTADs.

Η πρωτεΐνη ScAAV, η οποία υπενθυμίζουμε είναι μη φωσφορυλιωμένη και όπως έχουμε ήδη αναφέρει δεν υπόκειται σε καμία τροποποίηση παρουσία της Da, με αυξανόμενες συγκεντρώσεις της Da σταθεροποιείται. Την ίδια σταθεροποίηση παρουσιάζει και το μετάλλαγμα ScAPAA, παρότι εμφανίζει την τροποποίηση δ.

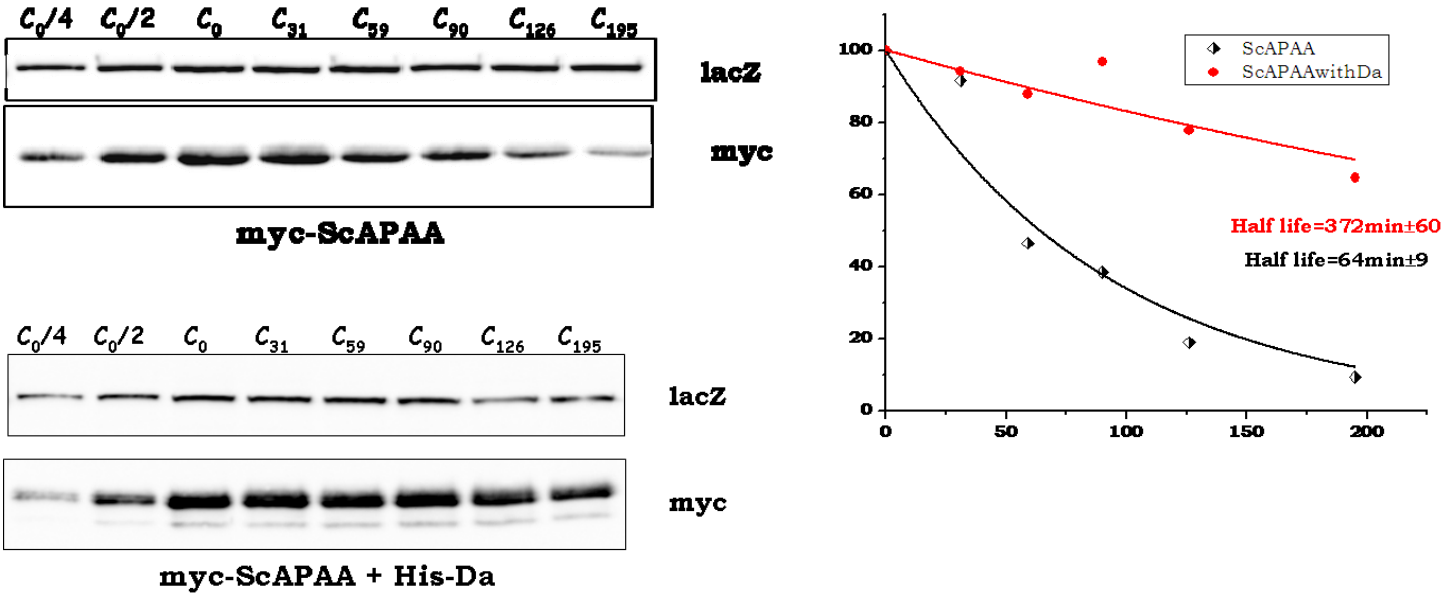


Εικόνα 2.24
Η πρωτεΐνη ScRQEQ σταθεροποιείται παρουσία Da ή DaΔTADs



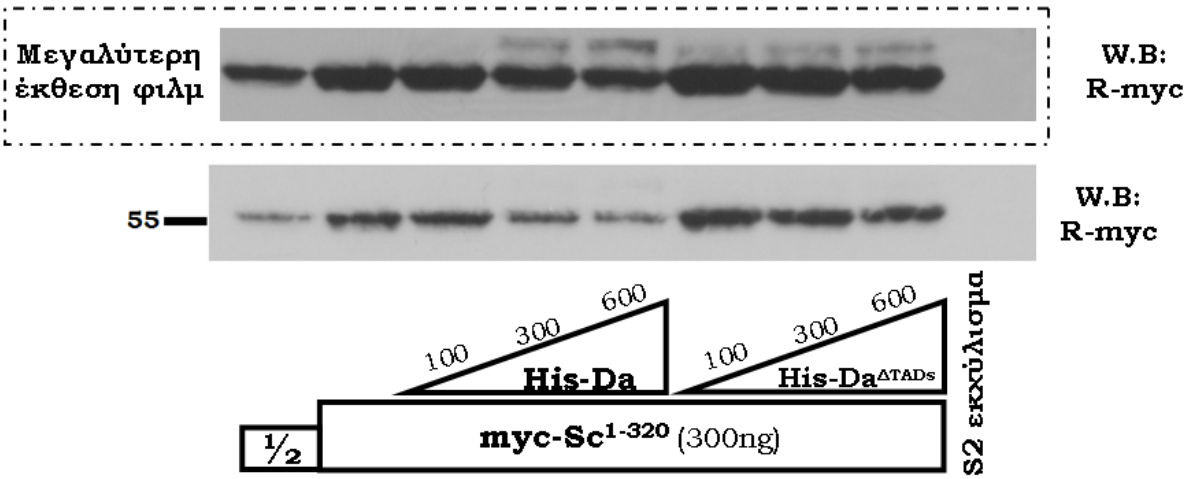
Εικόνα 2.25
Οι πρωτεΐνες ScAAV και ScAPAA σταθεροποιούνται παρουσία Da ή DaΔTADs

Μετρήσαμε τον χρόνο ημιζωής της πρωτεΐνης ScAPAA μόνη της και παράλληλα μαζί με την πρωτεΐνη Da και επιβεβαιώσαμε ότι πραγματι η πρωτεΐνη ScAPAA αυξάνει τον χρόνο ημιζωής της παρουσία Da.



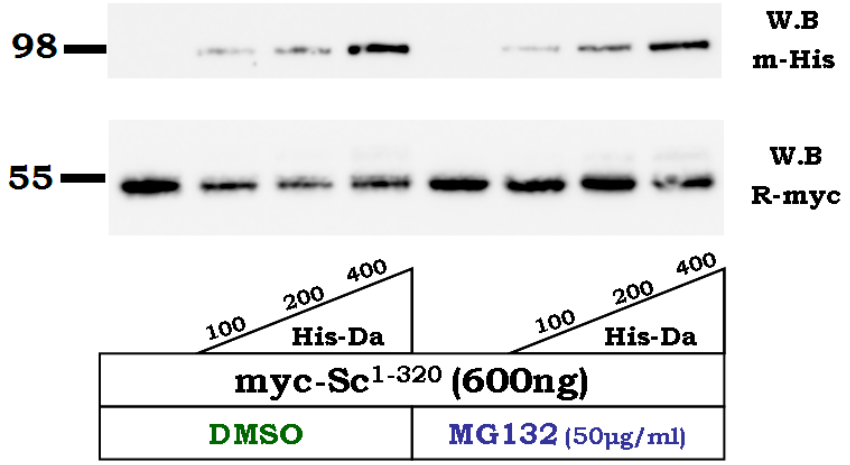
Εικόνα 2.26
Ο χρόνος ημιζωής της πρωτεΐνης ScAPAA αυξάνει παρουσία Da.

Επίσης παρατηρήσαμε ότι αυξανόμενες ποσότητες της Da προκαλούσε στην πρωτεΐνη Sc1320 την εμφάνιση τις τροποποίησης β και γ και επιπλέον η βασική φωσφορυλιωμένη μορφή της καταστρεφόταν. Η καταστροφή αυτή πάλι δεν συνέβαινε παρουσία του DaΔTADs.



Εικόνα 2.27
Το Sc(1-320) παρουσία αυξανόμενων επιπέδων Da καταστρέφεται.

Είχαμε δει από προηγούμενα πειράματα ότι η πρωτεΐνη myc-Sc(1320) είναι ιδιαίτερα σταθερή και παρουσία του MG132 για 6 ώρες δεν προκαλούσε σταθεροποίηση των επιπέδων της. Κύτταρα τα οποία είχαν παροδικά διαμολυνθεί με την πρωτεΐνη myc-Sc1320 και αυξημένες συγκεντρώσεις του παράγοντα His-Da, χωρίστηκαν σε δύο ίσα μέρη και στο ένα μέρος έγινε επώαση των κυττάρων με MG132 για 6 ώρες, ενώ στο άλλο με DMSO (μέσο διάλυσης του MG132). Παρατηρούμε ότι επώαση των κυττάρων με αναστολέα του πρωτεασώματος, αναιρούσε σε μεγάλο βαθμό την καταστροφή της από την πρωτεΐνη Da. Επομένως η επαγώμενη από το Da καταστροφή του Sc1320, γινόταν μέσω του πρωτεασώματος.

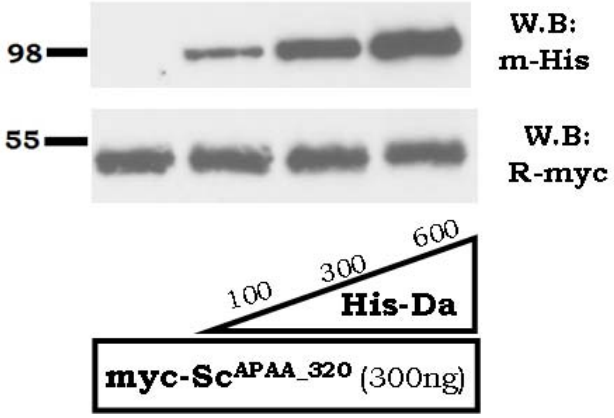


Εικόνα
Το His-Da καταστρέφει το myc-Sc1320, μέσω του πρωτεασώματος.

Εικόνα 2.28
Το Da οδηγεί στην αποικόμηση το Sc(1-320) μέσω του πρωτεασώματος.

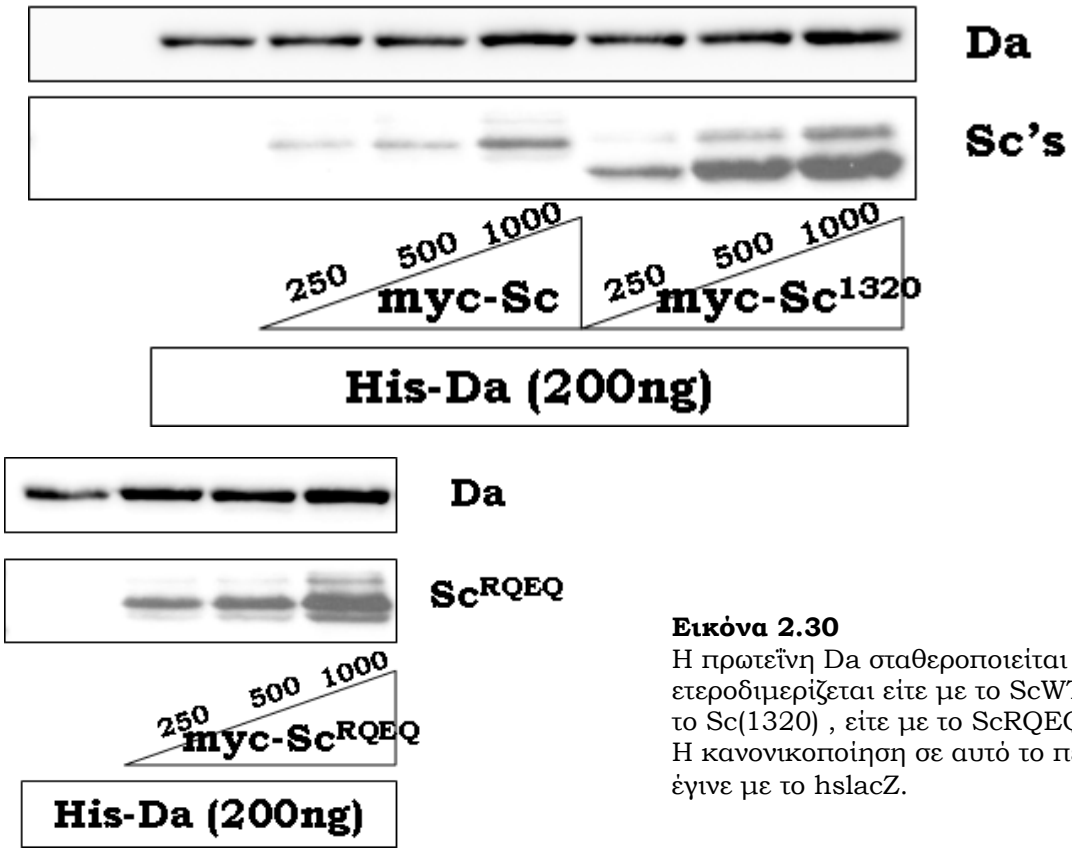
Με δεδομένο το γεγονός ότι το ScAPAA σταθεροποιείται από το Da ενώ το Sc1320 καταστρεφόταν, θελήσαμε να δούμε τι συνέβαινε στο διπλά μεταλλαγμένο Sc(APAA_320). Διαπιστώσαμε τα επίπεδα πρωτεΐνης του Sc(APAA_320) δεν άλλαζαν σχεδόν καθόλου παρουσία Da.

Εικόνα 2.29
Το Sc(APAA_320) δεν επηρεάζεται παρουσία Da.



Γιατί να συμβαίνει αυτό? Είχαμε δει προηγουμένως ότι το Sc(APAA_320) είναι εξίσου σταθερό όσο και το Sc1320. Το γεγονός ότι παρουσία της πρωτεΐνης Da δεν βλέπουμε καταστροφή του Sc(APAA_320), όπως συμβαίνει στην περίπτωση του Sc1320, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η φωσφορυλίωση του Sc1320 χρειάζεται για την καταστροφή του από το πρωτεάσωμα λόγω του ετεροδιμερισμού του με την Da. Αυτό άλλωστε συμφωνεί με το γεγονός ότι το ScAPAA σταθεροποιείται παρουσία Da, ενώ το αγρίου τύπου Sc καταστρεφόταν. Από την άλλη μεριά δεν βλέπουμε επιπλέον σταθεροποίηση της Sc(APAA_320) από το Da, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του ScAPAA. Ένα τρόπος ερμηνείας αυτού του αποτελέσματος είναι ότι ο ετεροδιμερισμός της πρωτεΐνης ScAPAA με το Da, οδηγεί στην «απενεργοποίηση» του ScTAD ώστε πια αυτό δεν δρα ως αποικοδομητικό σινιάλο και για αυτό η πρωτεΐνη ScAPAA σταθεροποιείται. Η Sc(APAA_320) η οποία δεν διαθέτει αυτό το degron, δεν επηρεάζεται από το Da αφού δεν έχει να απενεργοποιήσει το μη υπαρχων TAD της και είναι ήδη πολύ σταθερή. Ενδεχομένως η συμπλοκοποίηση του Scute με το Da να εμποδίζει (π.χ. λόγω κοινής περιοχής αλληλεπίδρασης) την E3 λιγάση που δρα μέσω του TAD του να το καταστρέψει.

Να κάνουμε μια μικρή παρένθεση για το συμβαίνει στο Da παρουσία Sc. Άραγε και αυτό καταστρέφεται; Η απάντηση είναι όχι. Αν εμπιστευτούμε τα σταθερά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Da παρουσία αυξανόμενης ποσότητας της πρωτεΐνης Sc, Sc1320 ή ScRQEQ βλεπουμε ότι αυξάνωντας το Sc, αυξάνουν τα επίπεδα της πρωτεΐνης Da (εικόνα 2.30).



Εικόνα 2.30
Η πρωτεΐνη Da σταθεροποιείται όταν ετεροδιμερίζεται είτε με το ScWT, είτε με το Sc(1320) , είτε με το ScRQEQ.
Η κανονικοποίηση σε αυτό το πείραμα έγινε με το hslacZ.

Συνολικά τα δεδομένα από αυτό το κεφάλαιο οδηγούν στα εξής συμπεράσματα:

1. Η προνευρική πρωτεΐνη Scute βρίσκεται σε φωσφορυλιωμένη κατάσταση και στα S2 κύτταρα και στον αναπτυξιακό δίσκο της μύγας (Παράρτημα Γ) και είναι ιδιαίτερα ασταθής.
2. Όταν η πρωτεΐνη Scute δεν είναι ετεροδιμερισμένη με την πρωτεΐνη Da, βασικός παράγοντας αποικοδόμησής της είναι η περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (TAD). Σε αυτήν την κατάσταση:
    a. Το TAD της προκαλεί πολυουβικουϊτινιλίωση στην πρωτεΐνη Scute και την οδηγεί στο πρωτεάσωμα
    b. Το TAD της δρα ως αποικοδομητικό σινιάλο (degron) είτε η πρωτεΐνη προσδένεται στο DNA, είτε όχι.
    c. Το TAD της δρα ως αποικοδομητικό σινιάλο είτε η πρωτεΐνη είναι φωσφορυλιωμένη είτε όχι.
3. Ο ετεροδιμερισμός της πρωτεΐνης Scute με το Da μπορούμε να πούμε ότι απενεργοποιεί το πρώτο degron και ενεργοποιεί ένα δεύτερο σύνθετο φωσφο-degron. Το degron αυτό είναι σύνθετο γιατί για να λειτουργήσει χρειάζεται «πληροφορία» και από τις δύο πρωτεΐνες Da και Sc. Από την μεριά της η πρωτεΐνη Sc πρέπει να είναι φωσφορυλιωμένη και επίσης να έχει την ικανότητα ετεροδιμερισμού με το Da. Αφού το κομμάτι Sc164-345 που δεν έχει την bHLH περιοχή δεν καταστρέφεται παρουσία Da (εικόνα 2.19). Οι απαιτήσεις του δεύτερου degron όσον αφορά την συνεισφορά του Da, βλέπουμε ότι σε πρώτη φάση χρειάζεται η καρβοξυτελική περιοχή για την τροποποίηση β του Sc (βλ. Εικόνα 2.21). Αυτή είναι το πρώτο σήμα για την περαιτέρω τροποποίηση γ μέσω της αμινοτελικής περιοχής του Da που περιλαμβάνει τα TADs της πρωτεΐνης και την καταστροφή του Sc. Αν λοιπόν το Scute ετεροδιμεριστεί με το Da, και το σύμπλοκο είναι μεταγραφικά ενεργό και έχει υποστεί της τροποποιήσεις από το Da, καταστρέφεται πάλι μέσω του πρωτεασώματος.
4. Από την άλλη μεριά το Da είτε μόνο είτε με το Sc είναι ιδιαίτερα σταθερή πρωτεΐνη.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ένα πολύ αποτελεσματικό τρόπο και πολύ οικονομικό ώστε να ρυθμίζεται η δράση των bHLH μεταγραφικών ενεργοποιητών.

Το Da είναι η μοναδική τάξης I bHLH πρωτεΐνη στη Δροσόφιλα, έχει πλειοτροπικό ρόλο και με βάση την πρωτεΐνη που ετεροδιμερίζεται ενεργοποιεί τα αντίστοιχα γονίδια στόχους. Είναι σοφό λοιπόν αυτή να παραμένει σταθερή και αυτό που να ρυθμίζεται να είναι η ύπαρξη ή όχι του παρτενέρ της, και με αυτό τον τρόπο να αλλάζουν οι μεταγραφικοί στόχοι του Da ανάλογα με το αναπτυξιακό δυναμικό του κυττάρου.

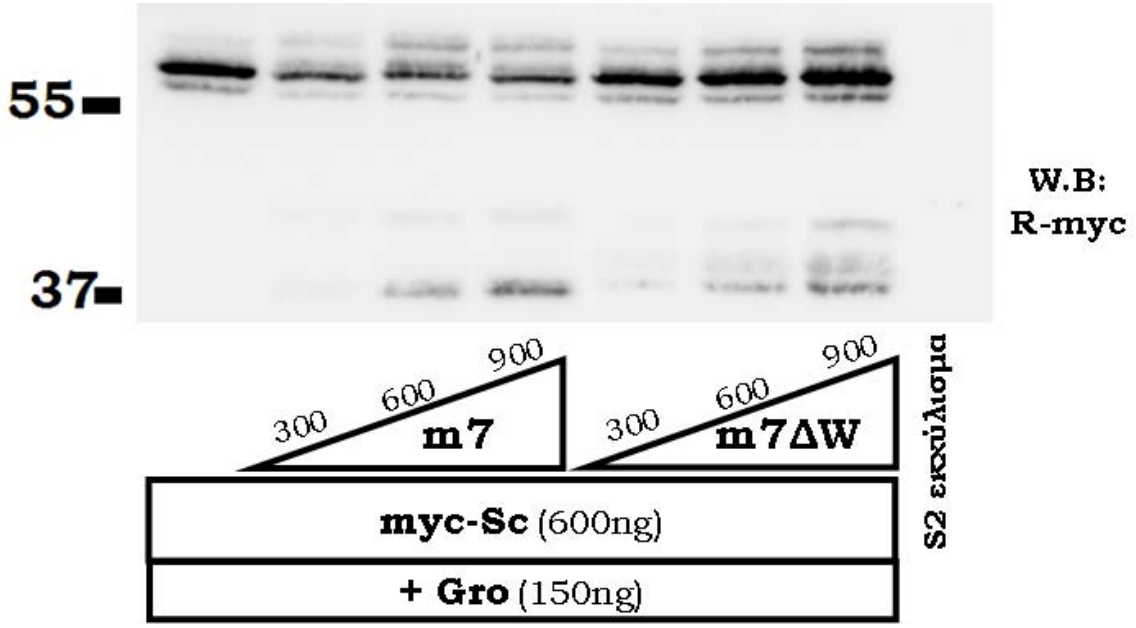
Β' Κεφάλαιο

Ενότητα Β.1.

Διαμοριακή (In trans) αποσταθεροποίηση της πρωτεΐνης Scute. Ο ρόλος της πρωτεΐνης E(spl) m7.

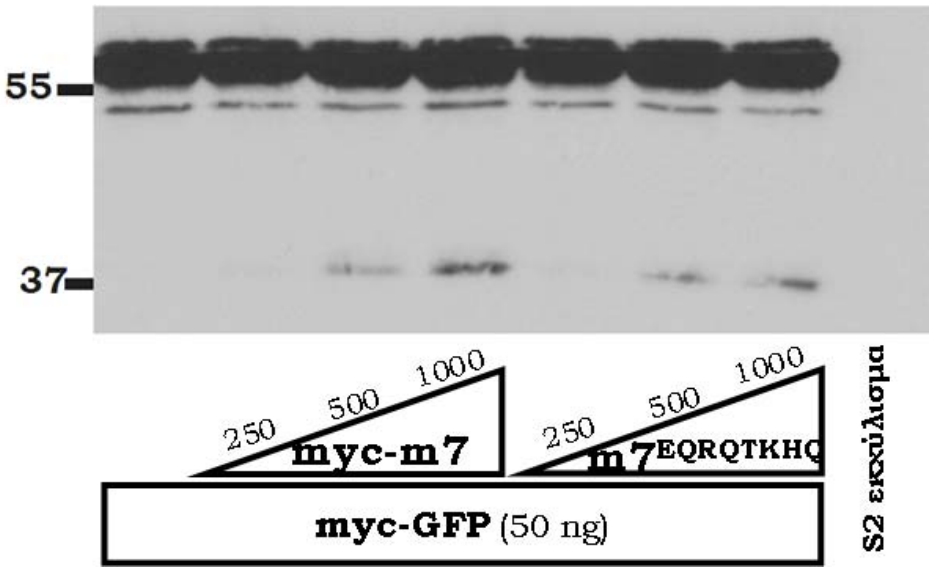
Για να μπορούμε να ανιχνεύουμε ταυτόχρονα τις δύο πρωτεΐνες χρησιμοποιήσαμε τις συντηγμένες μορφές τους με τον επίτοπο myc, myc-Sc και myc-m7. Τα διαφορετικά μοριακά βάρη του myc-Sc (43,2 kDa) και του myc-m7 (25,7 kDa) και ο σαφής διαχωρισμός τους σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (10%) μας επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση και των δύο πρωτεϊνών με το myc αντίσωμα.

Με πειράματα παροδικής διαμόλυνσης στη δροσοφιλική κυτταρική σειρά S2 συνεκφράσαμε τις πρωτεΐνες Sc και E(spl)m7 (χάρη συντομίας, από τώρα και στο εξής θα την αποκαλούμε m7). Παρατηρήσαμε ότι η πρωτεΐνη Sc ελαττωνόταν όσο περισσότερο m7 προσθέταμε (εικόνα 3.1). Ενδιαφέρον παρουσίαζε το γεγονός ότι όταν χρησιμοποιούσαμε μια μεταλλαγμένη μορφή του m7, η οποία στερείται της τελευταίας καρβοξυτελικής τρυπτοφάνης και είναι ανίκανη να αλληλεπιδράσει με τον συγκαταστολέα Groucho, η καταστροφή του Sc δεν επαγόταν.



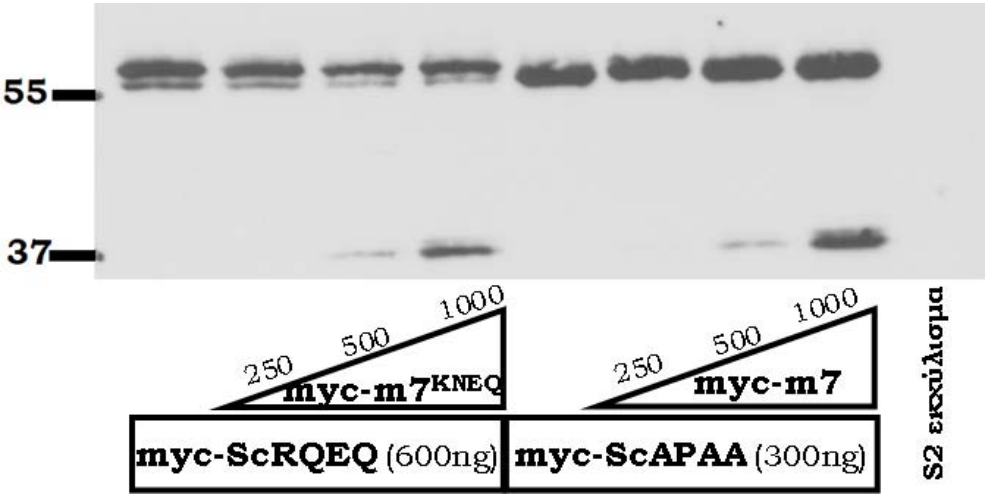
Εικόνα 3.1
Η πρωτεΐνη m7, αλλά όχι η m7ΔW, οδηγεί σε αποικοδόμηση της πρωτεΐνης Scute

Καθώς ο υποκινητής που κατευθύνει την έκφραση των γονιδίων είναι του γονιδίου act5C της Δροσόφιλας, θεωρήσαμε απίθανο ότι καταστέλλεται από το m7. Επίσης η πρωτεΐνη (λουσιφεράση ή γαλακτοσιδάση) η οποία χρησιμοποιούμε για την κανονικοποίηση των δειγμάτων είναι και η ίδια κλωνοποιημένη στον ίδιο πλασμιδιακό φορέα και έτσι επιδιορθώνεται οποιαδήποτε διαφοροποίηση της έκφρασης του υποκινητή act5C. Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήσαμε για τις παροδικές διαμολύνσεις φέρει επίσης και την απαραίτητη 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3' UTR, untranlated region) του γονιδίου της αλκοολικής αφυδρογονάσης της Δροσόφιλας (Adh). Άρα, το μόνο που εισάγουμε εμείς στον φορέα είναι η κωδική περιοχή των εκάστοτε γονιδίων που θέλουμε να υπερεκφράσουμε και για αυτό θεωρούμε λιγότερο πιθανό το σενάριο η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων να οφείλεται σε ρύθμιση από μετα-μεταγραφικούς μηχανισμούς. Έτσι, οδηγηθήκαμε στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη m7 επάγει την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης Sc σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Η υπόθεση μας επιβεβαιώθηκε από το γεγονός ότι η πρωτεΐνη myc-GFP δεν μειώνεται παρουσία m7, ούτε παρουσία μιας μεταλλαγμένης μορφής του m7, που την αποκαλούμε m7EQRQKTHQ (εικόνα 3.2). Η πρωτεΐνη m7EQRQTKHQ φέρει 4 αμινοξικές μεταλλαγές σε συντηρημένα αμινοξέα της περιοχής Orange (E93Q, R96Q, T114K, H115Q, κατασκευή της παρούσας διατριβής, αναλυτική περιγραφή στο παράρτημα Β). Αυτές σχεδιάστηκαν με βάση τα ομόλογα κατάλοιπα των πρωτεϊνών E(spl)m3 και E(spl)mδ, οι οποίες δεν αλληλεπιδρούν με τον ενεργοποιητή Da. Επιβεβαιώσαμε ότι και το m7EQRQTKHQ μετάλλαγμα έχει χάσει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με το Da, αλλά διατηρεί την αλληλεπίδραση του με την πρωτεΐνη Sc.



Εικόνα 3.2
Η myc-m7 και η myc-m7EQRQTKHQ δεν μειώνουν τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης myc-GFP.

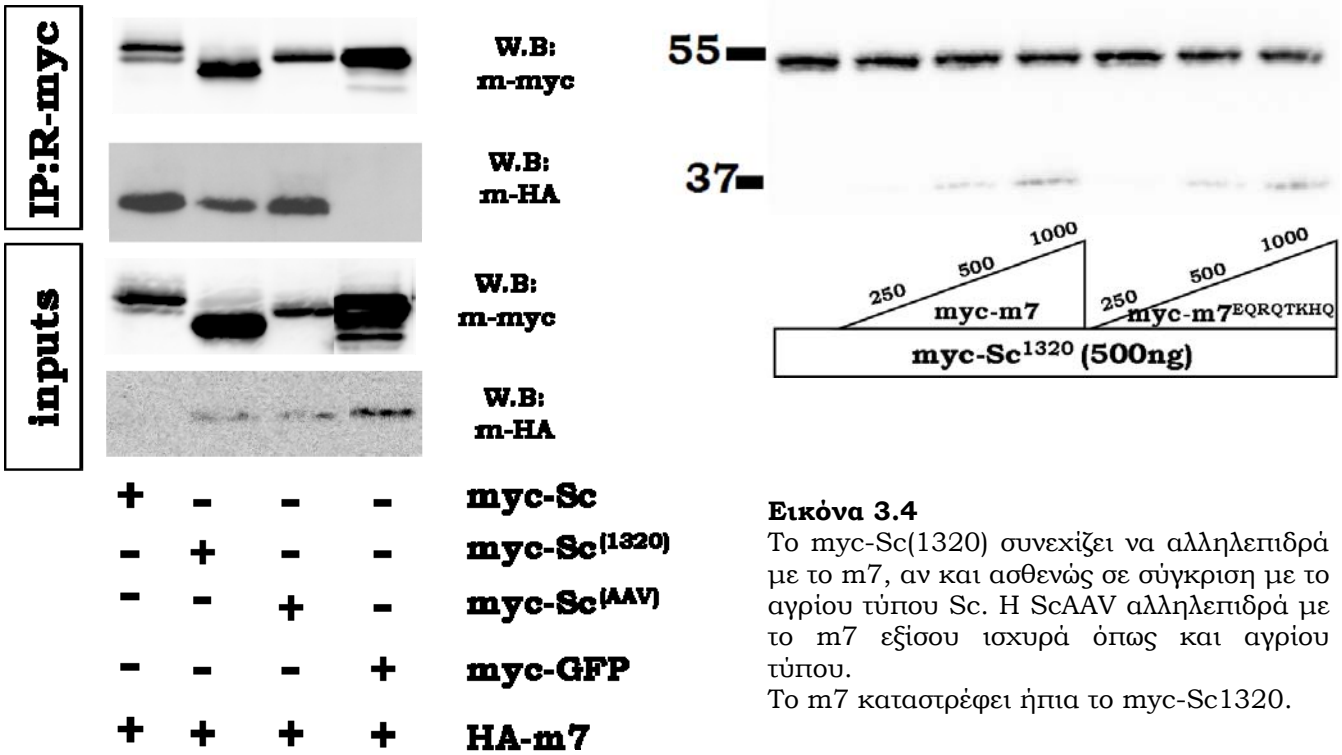
Με στόχο την καλύτερη διελεύκανση του μηχανισμού καταστροφής του Sc από το m7, συνεκφράσαμε διαφορετικές μεταλλαγμένες μορφές των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες ScRQEQ και m7KNEQ φέρουν δύο μεταλλαγές στην βασική περιοχή της πρωτεΐνης Sc (R104Q και E108Q) και m7 (K15N και E22Q,) και τις καθιστούν ανίκανες να δεθούν στο DNA. Παρατηρήσαμε ότι η καταστροφή του Scute από το m7 δεν χρειάζεται την πρόσδεση στο DNA, αφού η m7KNEQ μπορεί να μειώσει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της πρωτεΐνης ScRQEQ (εικόνα 3.3). Όμως παρατηρήσαμε ότι για να γίνει αποτελεσματική η καταστροφή του Scute από το m7 χρειάζεται το Sc να είναι φωσφορυλιωμένο, αφού οι δύο μεταλλαγμένες μορφές του Sc, myc-ScAAV και myc-ScAPAA, οι οποίες όπως περιγράψαμε στο προηγούμενο κεφάλαιο έχουν μεταλλαγή στην κύρια θέση φωσφορυλίωσης του Scute, δεν καταστρέφονται παρουσία m7 (εικόνα 3.3). Αυτό δεν οφείλεται σε μη αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών ScAAV και m7, αφού όπως είδαμε και σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης η myc-ScAAV ανοσοκατακρήμνιζε το HA-m7 εξίσου ικανά όπως και η αγρίου τύπου πρωτεΐνη myc-Sc (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.3
Το m7KNEQ καταστρέφει το myc-ScRQEQ αποτελεσματικά, ενώ η μεταλλαγμένη μορφή ScAPAA δεν επηρεάζεται παρουσία m7.

Η πρωτεΐνη Sc(1320) υπενθυμίζουμε είναι μια κουτσουρεμένη μορφή του Sc που της λείπουν τα τελευταία 25 αμινοξέα της πρωτεΐνης που συνιστούν την περιοχή ενεργοποίηση της μεταγραφής (TAD, transcriptional activation domain). Παρατηρήσαμε ότι η πρωτεΐνη myc-Sc(1320) καταστρέφεται, όχι όμως πολυ αποτελεσματικά, και από την πρωτεΐνη m7 και από την m7EQRQTKHQ. Έχει δειχτεί από το εργαστήριό μας με πειράματα δύο υβριδίων του σακχαρομύκητα ότι η περιοχή ενεργοποίησης του Scute (320-345αα, SCTAD) αλληλεπιδρά ισχυρά με την αμινοξική περιοχή 1-80αα του E(spl) m7, που περικλείει την bHLH περιοχή (14-69 αα). Στην ίδια εργασία είχε παρατηρηθεί μία πιο ασθενής αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης m7 με

το υπόλοιπο κομμάτι της πρωτεΐνης Sc (1-320αα), η οποία δεν είχε επισημανθεί ιδιαίτερα. Πραγματοποιήσαμε πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης συνεκφράζοντας την πρωτεΐνη m7 (συντηγμένη με τον επίτοπο HA, HA-m7) είτε με την πρωτεΐνη myc-Sc πλήρους μήκους, είτε με την κουτσουρεμένη μορφή της myc-Sc^{1-320}, είτε με την myc-GFP. Διαπιστώσαμε ότι η πλήρους μήκους πρωτεΐνη Sc συνανοσοκατακρημνίζει πολύ ισχυρά την πρωτεΐνη m7, ενώ η GFP καθόλου, όπως και οφείλει. Η Sc1320 αν και εχει ανοσοκατακρημνιστεί πολύ πιο αποτελεσματικά από την Sc^{WT}, έχει συνανοσοκατακρημνίσει λίγοτερη πρωτεΐνη m7. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει τα πειράματα των δύο υβριδίων του σακχαρομύκητα (Y2H) και δείχνει ότι η πρωτεΐνη Sc έχει δυο τρόπους αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη m7. Ο πρώτος τρόπος περιλαμβάνει την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής του Sc και την bHLH περιοχή του m7. Ο δεύτερος τρόπος που είναι και πιο ασθενής, περιλαμβάνει τα αμινοξέα 1-320 του Sc. Αν στηριχτούμε στα αποτελέσματα του Y2H φαίνεται ότι τα αμινοξέα 81-186 του m7 είναι απαραίτητα για την δεύτερη αλληλεπίδραση.



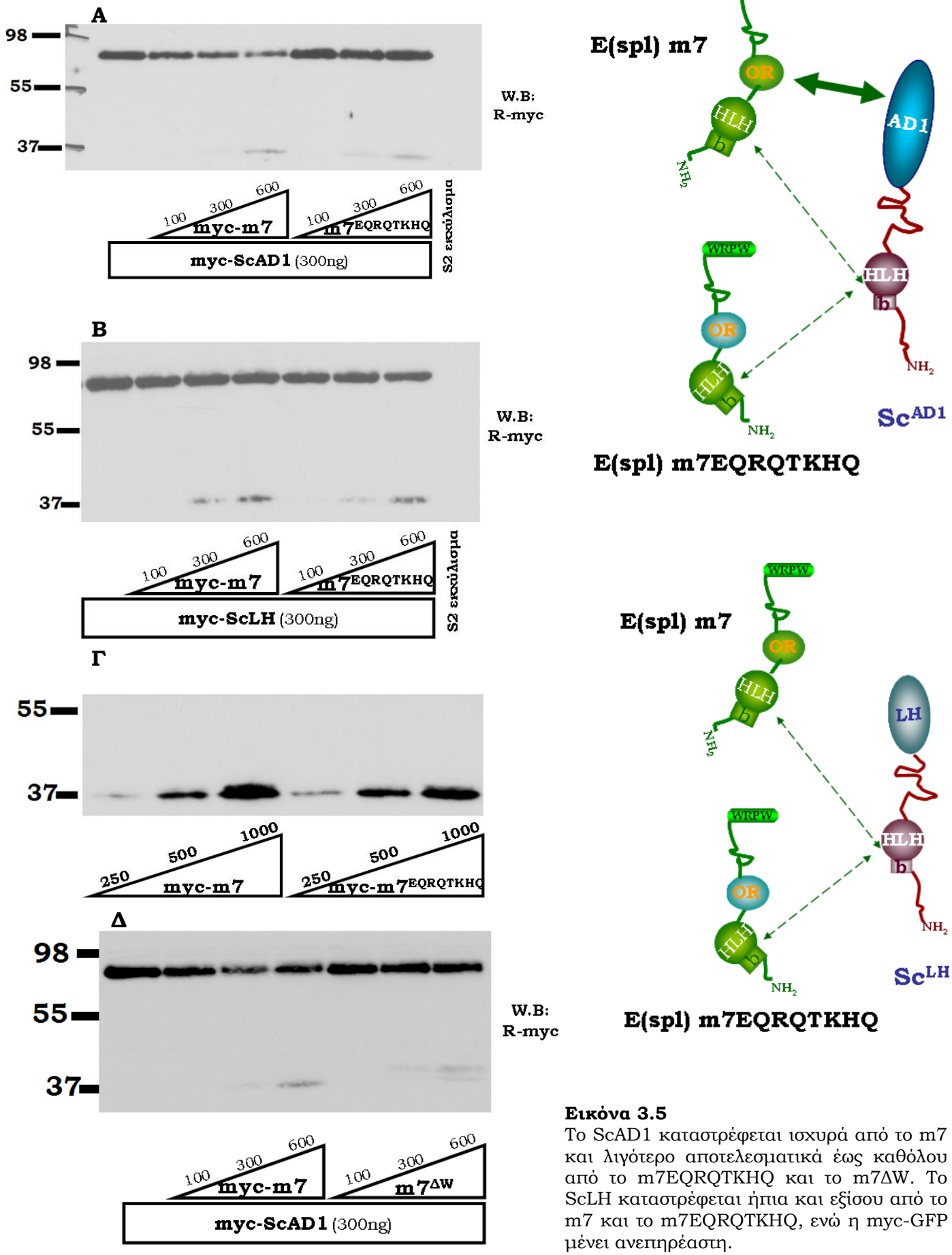
Εικόνα 3.4
Το myc-Sc(1320) συνεχίζει να αλληλεπιδρά με το m7, αν και ασθενώς σε σύγκριση με το αγρίου τύπου Sc. Η ScAAV αλληλεπιδρά με το m7 εξίσου ισχυρά όπως και αγρίου τύπου.
Το m7 καταστρέφει ήπια το myc-Sc1320.

Με την λογική ότι για να καταστραφεί το Sc από το m7, χρειάζεται η συμπλοκοποίηση των δύο πρωτεϊνών αποφασίσαμε να βάλουμε στο παιγνίδι και τα μεταλλάγματα ScAD1 και ScLH, στα οποία όπως έχουμε αναφέρει έχει αντικατασταθεί το ScTAD με τις περιοχές ενεργοποίησης του Da (AD1 και LH αντίστοιχα). Η σκέψη

ήταν να μπορέσουμε να “στρατολογήσουμε” στο Sc320 με έναν διαφορετικό τρόπο την πρωτεΐνη m7, μέσω του AD1. Αδημοσίευτα δεδομένα από το εργαστήριο μας δείχνουν ότι η μια εκ των δυο περιοχών ενεργοποίησης του Da (AD1) και όχι η δεύτερη (LH) αλληλεπιδρά με την περιοχή Orange του m7. Χρησιμοποιήσαμε τις χιμαιρικές πρωτεΐνες ScAD1 και ScLH σε πειράματα συνδιαμόλυνσης με την πρωτεΐνη $m7^{WT}$ και m7EQRQTKHQ. Παρατηρήσαμε ότι το ScAD1 καταστρέφεται εντυπωσιακά αποτελεσματικά από το m7 και σε πολύ μικρότερο βαθμό από το m7EQRQTKHQ (εικόνα 3.5Α). Καταφέραμε λοιπόν συντήκοντας το AD1 στο Sc1320 να “επιδιορθώσουμε” την χαμένη ισχυρή αλληλεπίδραση του Sc1320 με το m7 και έτσι το ScAD1 να καταστρέφεται ραγδαία. Ωστόσο το m7EQRQTKHQ το οποίο όπως έχουμε αναφέρει δεν αλληλεπιδρά με το AD1 του Da, συνεχίζει να έχει μόνο την ασθενή αλληλεπίδραση με το ScAD1 και για αυτό η καταστροφή του μας θυμίζει αυτήν του Sc1320 από το m7. Παράλληλα και επιβεβαιώνοντας την ανάγκη συμπλοκοποίησης για την καταστροφή του Sc, το μετάλλαγμα ScLH καταστρέφεται σε πολύ μικρό βαθμό και από το m7 και από το m7EQRQTKHQ, αφού και σε αυτές τις περιπτώσεις μεταξύ των πρωτεϊνών υπάρχει μόνο η ασθενής αλληλεπίδραση (εικόνα 3.5Β). Παράλληλα η πρωτεΐνη myc-GFP όπως έχουμε ήδη αναφέρει (εικόνα 3.2) δεν καταστρέφεται καθόλου ούτε από το m7 ούτε από το m7EQRQTKHQ, γεγονός που ενισχύει την θεωρία μας για μετα-μεταφραστική και όχι μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων Τα σταθερά επίπεδα των πρωτεϊνών m7 και m7EQRQTKHQ είναι τα παρόμοια όταν τις εκφράσουμε μόνες τους στα S2 κύτταρα (εικόνα 3.5Γ), επομένως η «ανικανότητα» του m7EQRQTKHQ μεταλλάγματος δεν οφείλεται σε μη ικανή έκφραση της πρωτεΐνης στα S2 κύτταρα. Επίσης με πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης (Παράρτημα Β) αποδείξαμε ότι η πρωτεΐνη m7EQRQTKHQ αλληλεπιδρά πολύ αποτελεσματικά με το Groucho, οπότε δεν μπορεί να αποδωθεί σε αυτό η μη καταστροφή του ScAD1. Και σε αυτήν την περίπτωση η κουτσουρεμένη μορφή m7ΔW, που δεν αλληλεπιδρά με τον συγκαταστολέα Groucho, εμφανίζει μειωμένη ικανότητα καταστροφής του ScAD1 (εικόνα 3.5Δ).

Στην Δροσόφιλα υπαρχουν επτά συνολικά E(spl) bHLH πρωτεΐνες, οι οποίες εμφανίζουν διαφοροποίηση ως προς την αλληλεπίδραση τους με τις πρωτεΐνες Da και Sc (βλ. Σχήμα Α, Παράρτημα Β). Με δεδομένο ότι έχει δειχτεί από την Ιωάννα Ζαρίφη ότι οι πρωτεΐνες m8 και mγ αλληλεπιδρούν μέσω της Orange περιοχής τους, με την περιοχή AD1 του Da, σε αντίθεση με την mδ που δεν αλληλεπιδρά, θελήσαμε να ελέγξουμε την ικανότητα και αυτών των παραγόντων να επάγουν μέσω συμπλοκοποίησης την καταστροφή του ScAD1. Πράγματι παρατηρήσαμε ότι η m8

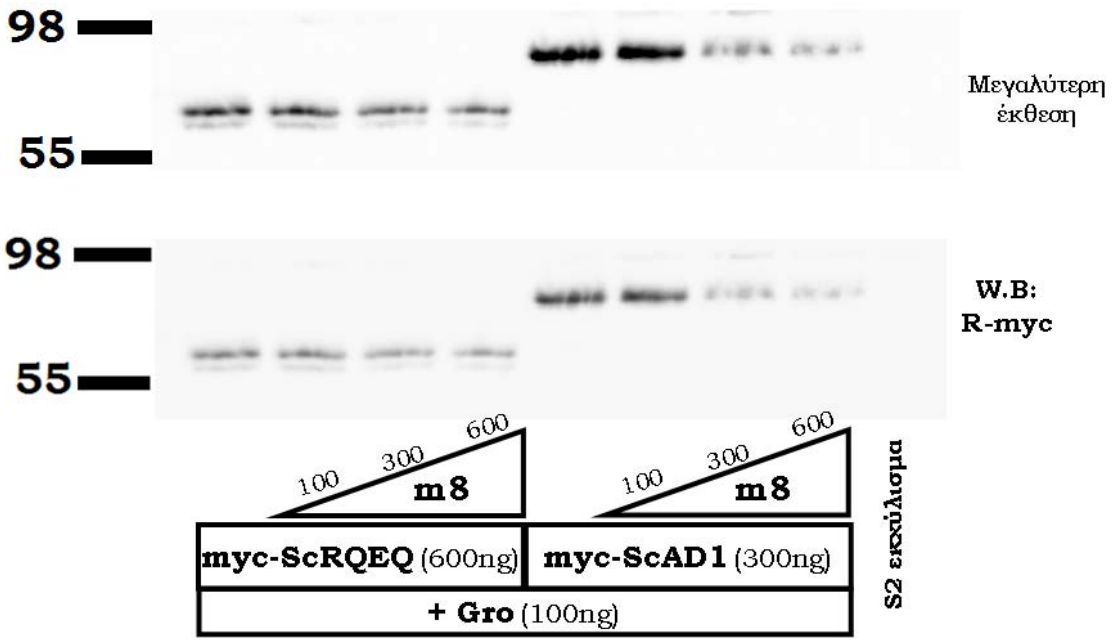
(εικόνα 3.6) και η mγ (εικόνα 3.7Α) πρωτεΐνη καταστρέφει πολύ αποτελεσματικά την χιμαιρική πρωτεΐνη ScAD1.



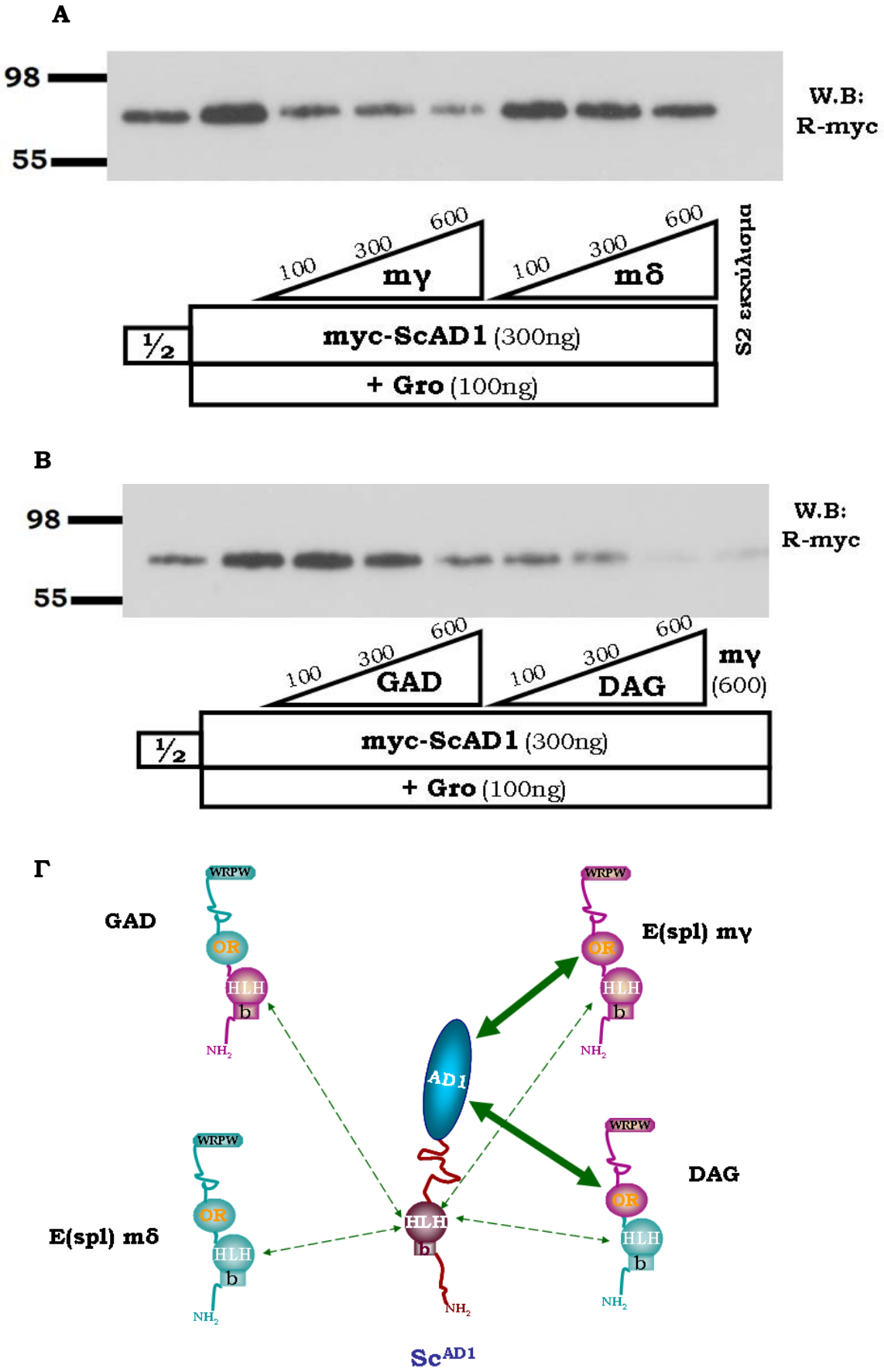
Εικόνα 3.5
Το ScAD1 καταστρέφεται ισχυρά από το m7 και λιγότερο αποτελεσματικά έως καθόλου από το m7EQRQTKHQ και το m7ΔW. Το ScLH καταστρέφεται ήπια και εξίσου από το m7 και το m7EQRQTKHQ, ενώ η myc-GFP μένει ανεπηρέαστη.

Μάλιστα χρησιμοποιώντας δύο χιμαιρικές πρωτεΐνες που καλούνται GAD και DAG (πλασμιδιακές κατασκευές Κουμπανάκη Κωστή) καταφέραμε να αποδείξουμε ότι η Orange περιοχή έχει καθοριστικό ρόλο στην καταστροφή της πρωτεΐνης λόγω ισχυρής συμπλοκοποίησης με το Da. Στις χιμαιρικές πρωτεΐνες GAD και DAG έχουν ανταλλαχτεί η καρβοξυτελικές και αμινοτελικές περιοχές του mγ και του mδ. Η πρωτεΐνη GAD έχει αποτελείται από την αμινοτελική περιοχή της mγ (που περιλαμβάνει την bHLH περιοχή) και την καρβοξυτελική περιοχή της mδ (που περιλαμβάνει την περιοχή Orange). Η πρωτεΐνη DAG είναι η ακριβώς συμπληρωματική της GAD όπως φαίνεται και στο σχήμα της εικόνας 3.7.

Παρατηρήσαμε λοιπόν ότι η ScAD1 καταστρέφεται ραγδαία από τις πρωτεΐνες mγ και DAG και λιγότερο αποτελεσματικά από τις πρωτεΐνες mδ και GAD (εικόνα 3.7 A και B). Αυτό είναι μια επιπλέον ισχυρή ένδειξη ότι η στρατολόγηση των E(spl) πρωτεϊνών μέσω της ισχυρής αλληλεπίδρασής τους με την AD1 περιοχή οδηγεί στην καταστροφή την πρωτεΐνη ScAD1.

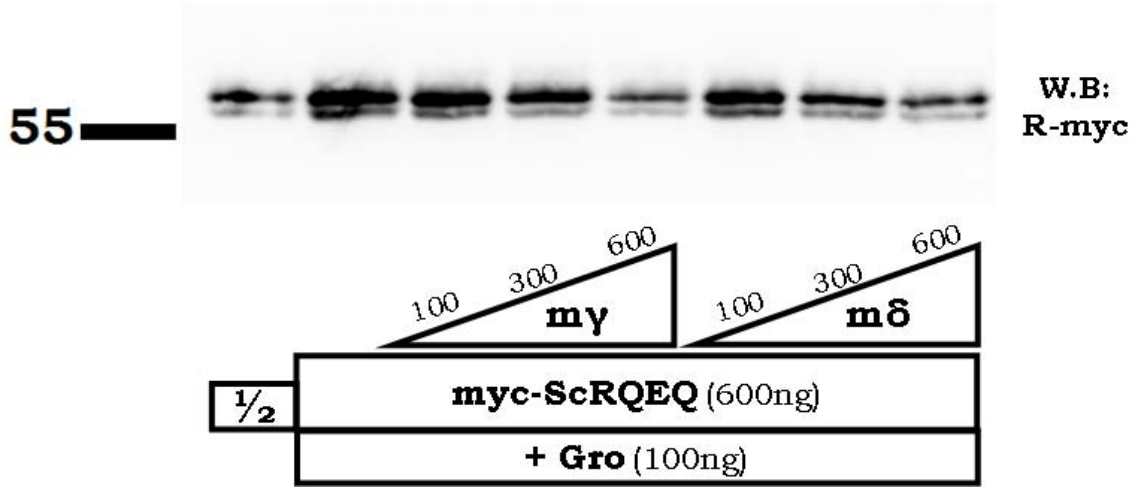


Εικόνα 3.6
Η πρωτεΐνη m8 καταστρέφει την πρωτεΐνη ScAD1 πολύ αποτελεσματικά και την ScRQEQ λιγότερο αποτελεσματικά.



Εικόνα 3.7
Η πρωτεΐνη ScAD1 καταστρέφεται ραγδαία από τις πρωτεΐνες E(spl) mγ και DAG, λόγω ενδεχομένως της ισχυρής αλληλεπίδρασής της με την περιοχή Orange του mγ. Η πρωτεΐνη ScAD1 καταστρέφεται πολύ ήπια από τις πρωτεΐνες E(spl) mδ και GAD εξαιτίας ασθενούς αλληλεπίδρασης μέσω των bHLH περιοχών.

Όμως ελέγχοντας την καταστροφή της πρωτεΐνης ScRQEQ από τις πρωτεΐνες m8, mγ και mδ, διαπιστώσαμε ότι και οι τρεις πρωτεΐνες μπορούν να καταστρέψουν, αν και όχι τοσο ισχυρά την πρωτεΐνη myc-ScRQEQ. Αυτό είναι λιγάκι περίεργο από την άποψη ότι με την πρωτεΐνη Sc, έχει βρεθεί να αλληλεπιδρούν οι πρωτεΐνες mβ, mγ, m3 και m7, αλλά όχι η mδ, η m5 και η m8. Στα κύτταρα S2 έχει βρεθεί ότι εκφράζονται οι πρωτεΐνες mβ και m3. Έχει επίσης δεικτεί ότι η πρωτεΐνη mβ αλληλεπιδρά πολύ ισχυρά και με την mδ, με την m7 και με την m8. Με δεδομένο ότι οι πρωτεΐνες αυτές ετεροδιμεριζονται, δεν αποκλείει το ενδεχόμενο η mβ η οποία αλληλεπιδρά ισχυρά και με το Da, αλλά και με το Sc, να είναι υπεύθυνη για την αδύναμη στρατολόγηση του mδ και του m8 στο Scute και την μετέπειτα καταστροφή του. Βέβαια δεν αποκλείεται και το γεγονός μιας διαφορετικής προσέλκυσης των πρωτεϊνών στο Sc.

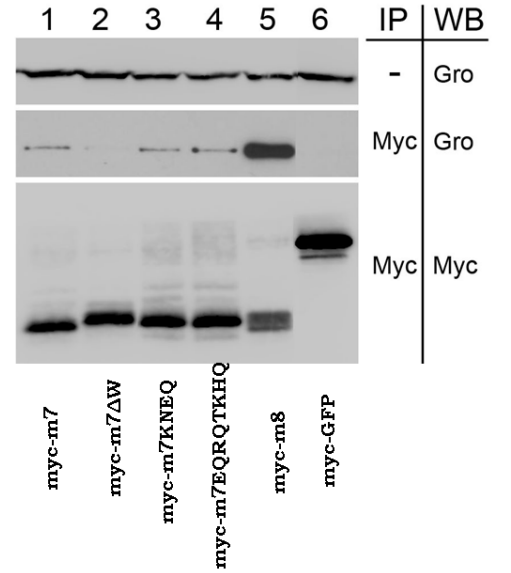


Σε συντομία τα προαναφερόμενα αποτελέσματα δείχνουν ότι το m7, μπορεί να οδηγήσει στην καταστροφή του Sc, η οποία μπορεί να συμβεί ανεξάρτητα από την πρόσδεση των πρωτεϊνών στο DNA. Όσο πιο ισχυρή είναι η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών τόσο πιο έντονη καταστροφή παρατηρείται. Επίσης φάνηκε να χρειάζεται το το μοτίβο αλληλεπίδρασης του m7 με το Groucho καθώς και η φωσφορυλίωση του Sc.

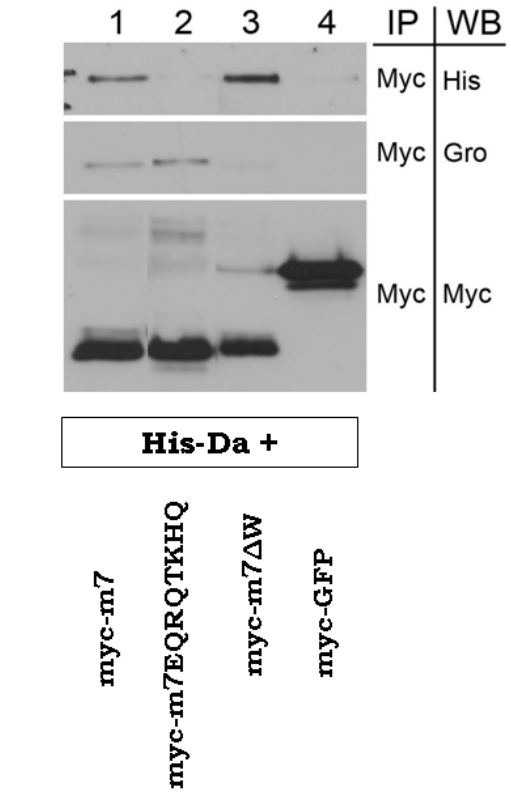
Επομένως οδηγηθήκαμε στην υπόθεση ότι η αποικοδόμηση του Sc από τις E(spl) πρωτεΐνες απαιτεί την συμπλοκοποίηση μεταξύ των πρωτεϊνών Sc, E(spl) και Gro, με την E(spl) να δρα ως γέφυρα σύνδεσης του Sc με τον συγκαταστολέα Gro.

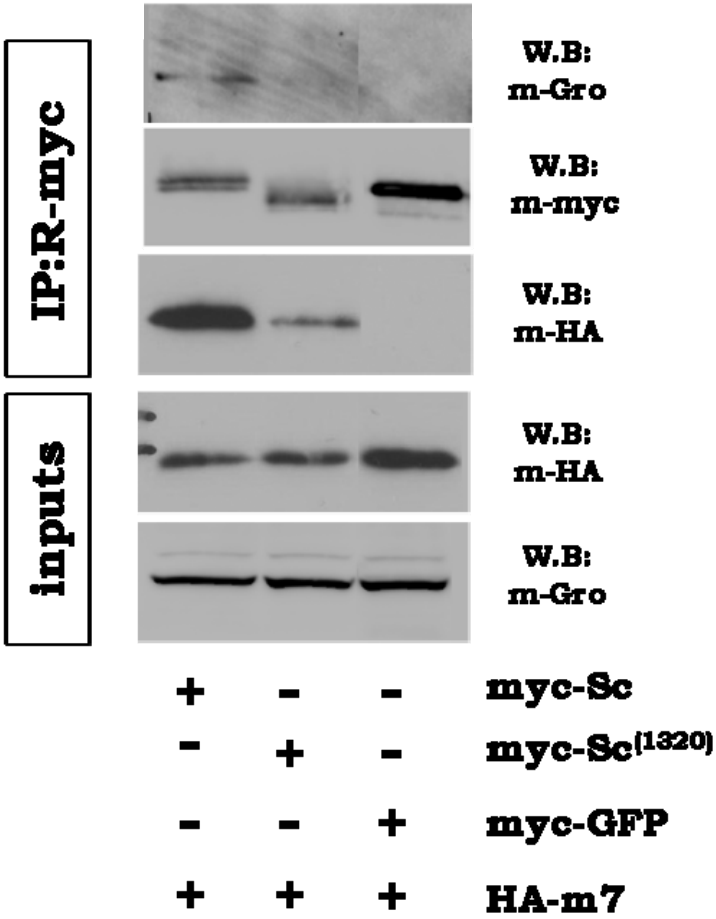
Πραγματοποιήσαμε πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης για να ελέγξουμε την πιθανότητα ύπαρξης του συμπλόκου Sc-m7-Gro. Πρώτα αποδείξαμε ότι η πρωτεΐνη m7 αλληλεπιδρά με το Gro εκτός DNA, αφού και η πρωτεΐνη m7 αλλά και η

m7KNEQ, μπορούν να συνανοσοκατακρημνίσουν το Gro εξίσου αποτελεσματικά. Όπως αναμένεται, η πρωτεΐνη m7ΔW και η GFP ήταν ανίκανες να αλληλεπιδράσουν με το Groucho. Η ακεραιότητα της περιοχής Orange του m7 ήταν περιττή για αυτήν την αλληλεπίδραση, αφού το μετάλλαγμα m7EQRQTKHQ αλληλεπιδρούσε με την πρωτεΐνη Gro, και όχι με το Da. Πρέπει επίσης να σημειώσουμε ότι το μετάλλαγμα m7ΔW, αν και δεν αλληλεπιδρούσε με το Gro, συνέχιζε να αλληλεπιδρά πολύ αποτελεσματικά με το Da. Ελέγξαμε την στρατολόγηση του Gro πάνω στο Sc παρουσία του m7. Και το Sc και το Sc1320 σε μικρότερο βαθμό μπορούσε να ανοσοκατακρημνίσει το m7 και μάλιστα στην περίπτωση του Sc^{WT}, όπου το m7 έχει κατέβει σε μεγάλο βαθμό, ήμασταν στην θέση να ανιχνεύσουμε και το Gro, υποστηρίζοντας τον σχηματισμό του συμπλόκου Sc-m7-Gro. Η πρωτεΐνη GFP, η οποία δεν αλληλεπιδρούσε με το m7, δεν αλληλεπιδρούσε ούτε με το Gro.

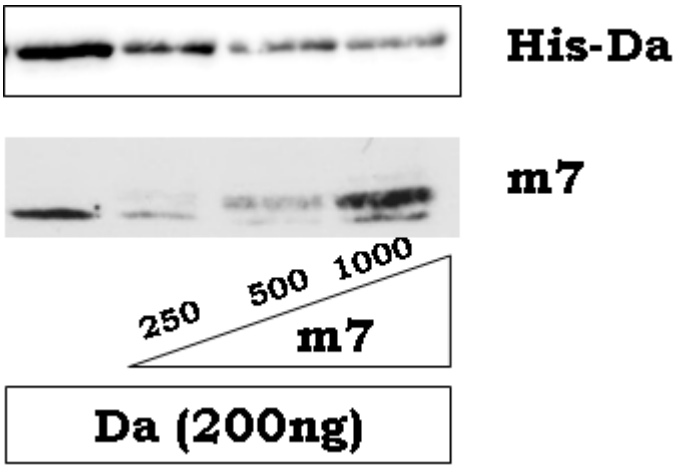


Εικόνα 3.9
Αλληλεπιδράσεις E(spl) πρωτεϊνών με Da και Gro. Στρατολόγηση του Gro στο Scute μέσω m7.



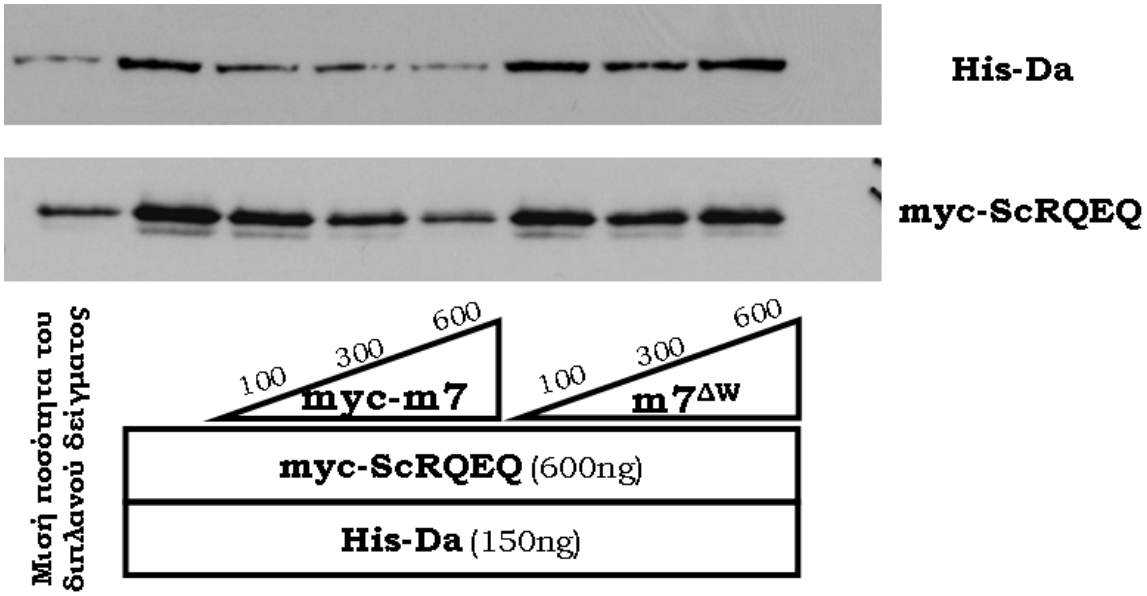


Ελέγξαμε επίσης κατά πόσο η m7 μπορεί να προκαλεί την καταστροφή του Da και είδαμε ότι πράγματι κρατώντας σταθερά τα επίπεδα του His-Da και προσθέτοντας αυξημένες συγκεντρώσεις m7 βλέπουμε μείωση των επιπέδων του Da, ακόμα και σε χαμηλή συγκέντρωση. Το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε με κανονικοποίηση με το hslacZ και όχι actin. Τα επόμενα όμως κανονικοποιήθηκαν με act-luc ή act-lacZ.



Εικόνα 3.10
Το m7 καταστρέφει το Da

Όταν πραγματοποιήσαμε το πείραμα παρουσία του ScRQEQ είδαμε ότι και το Da και το Sc καταστρέφονται με αυξημένες συγκεντρώσεις m7, αλλά όχι με αυξημένες συγκεντρώσεις m7ΔW. Δηλαδή και στην περίπτωση του συμπλόκου Da/ScRQEQ χρειάζεται η στρατολόγηση του συγκαταστολέα Groucho.



Εικόνα 3.11
Το m7 καταστρέφει το Da και το ScRQEQ όταν βρίσκονται μαζί.
Το m7ΔW δεν μπορεί να το κάνει αυτό.

Έχουν πραγματοποιηθεί πειράματα με το hslacZ ως μέσο κανονικοποίησης τα οποία δείχνουν ότι χρειάζεται η συμπλοκοποίηση του Da/Sc και m7 χρειάζεται για την καταστροφή, τα οποία όμως χρειάζονται επανάληψη με το νέο σύστημα κανονικοποίησης act-luc ώστε να είμαστε σίγουροι.

Τα παραπάνω αποτελέσματα μας δείχνουν ένα νέο τρόπο δράσης ανταγωνισμού των πρωτεϊνών E(spl) m7 και των προνευρικών, που είναι η καταστροφή των ενεργοποιητών, Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανάγκη του συγκαταστολέα Groucho για αυτήν την καταστροφή. Πέραν από τον κλασσικό τρόπο δράσης του Groucho, μέσω στρατολόγησης απακετυλασών στο DNA, φαίνεται να αποκαλύπτεται παράλληλα ένας νέος τρόπος δράσης του. Αυτός συνιστά καταστολή της δράσης των μεταγραφικής ενεργοποιητών εκτός DNA μέσω καταστροφής τους. Έχει βρεθεί ότι το Groucho αλληλεπιδρά με την υπομονάδα Cullin 4 του συμπλόκου SCF που έχει δράση λιγάσης ουβικουϊτίνης (Higa et al. 2006). Επίσης πρόσφατα μια πρωτεΐνη της κατηγορίας STUBL που καλείται Degringolade (Dgrn) έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά με όλες τις E(spl) πρωτεΐνες της Δροσόφιλας και η αλληλεπίδραση αυτή να ενισχύεται από το σουμολιωμένο Groucho (Abed et al. ; Barry et al.). Η πρωτεΐνη STUBL (sumo dependent ubiquitin ligase), έχει την ικανότητα να προσδένεται σε Sumo μόρια που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα σε μια πρωτεΐνη και να τοποθετεί στην πρωτεΐνη-στόχο μόρια ουβικουϊτίνης. Μάλιστα τα εργαστήρια της Parkhurst και του Orian έδειξαν ότι η Dgrn έχει την ικανότητα in vitro να προκαλεί πολυουβικουϊτινιλίωση στην πρωτεΐνη Sc. Είμαστε καθοδον για να επιβεβαιώσουμε (ή όχι) πειράματα που μας έχουν δείξει ότι η Dgrn είναι η λιγάση που προσελκύεται από το m7 και το Groucho και καταστρέφει το Sc.

Τέλος πρέπει να τονίσουμε ότι το μονοπάτι του Notch στα θηλαστικά έχει συσχετιστεί με την καταστροφή μέσω πρωτεασώματος των ομόλογων προνευρικών πρωτεϊνών (Sriuranpong et al. 2002). Ωστόσο στην μία περίπτωση απέκλεισαν να γίνεται αυτό μέσω των E(spl), έχοντας όμως ελέγξει μία από τις E(spl) πρωτεΐνες (Hes1) και όχι τις υπόλοιπες (Sriuranpong et al. 2002; Nie et al. 2003; Huang et al. 2004). Στην ίδια εργασία είχε βρεθεί η ομόλογη πρωτεΐνη του Da, η E12, να προστατεύει το hASH1 από την καταστροφή. Στην άλλη εργασία είχε βρεθεί ότι το μονοπάτι του Notch οδηγούσε στην καταστροφή της ομόλογες πρωτεΐνες του Da, E12 και E47. Για την καταστροφή αυτή χρειαζόταν η πρωτεΐνη E47 να έχει πρώτα φωσφορυλιωθεί απο την κινάση MAPK (Nie et al. 2003).

Οπότε πιστεύουμε ότι θα έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον εάν το Notch τελικά ενεργοποιώντας τα πιο φημισμένα γονίδια στόχους του, τα E(spl) ανταγωνίζεται την νευρική διαφοροποίηση των κυττάρων μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης και καταστροφής των προνευρικών πρωτεϊνών. Αλλά όπως θα δείτε και στη συνέχεια ούτε οι προνευρικές πρωτεΐνες μένουν απροστάτευτες σε αυτόν τον αποικοδομητικό πόλεμο.

Γ' Κεφάλαιο

Ενότητα Γ1.

Αλληλεπίδραση με Da και/ή Sc προξενεί μεταμεταφραστική τροποποίηση στο m7

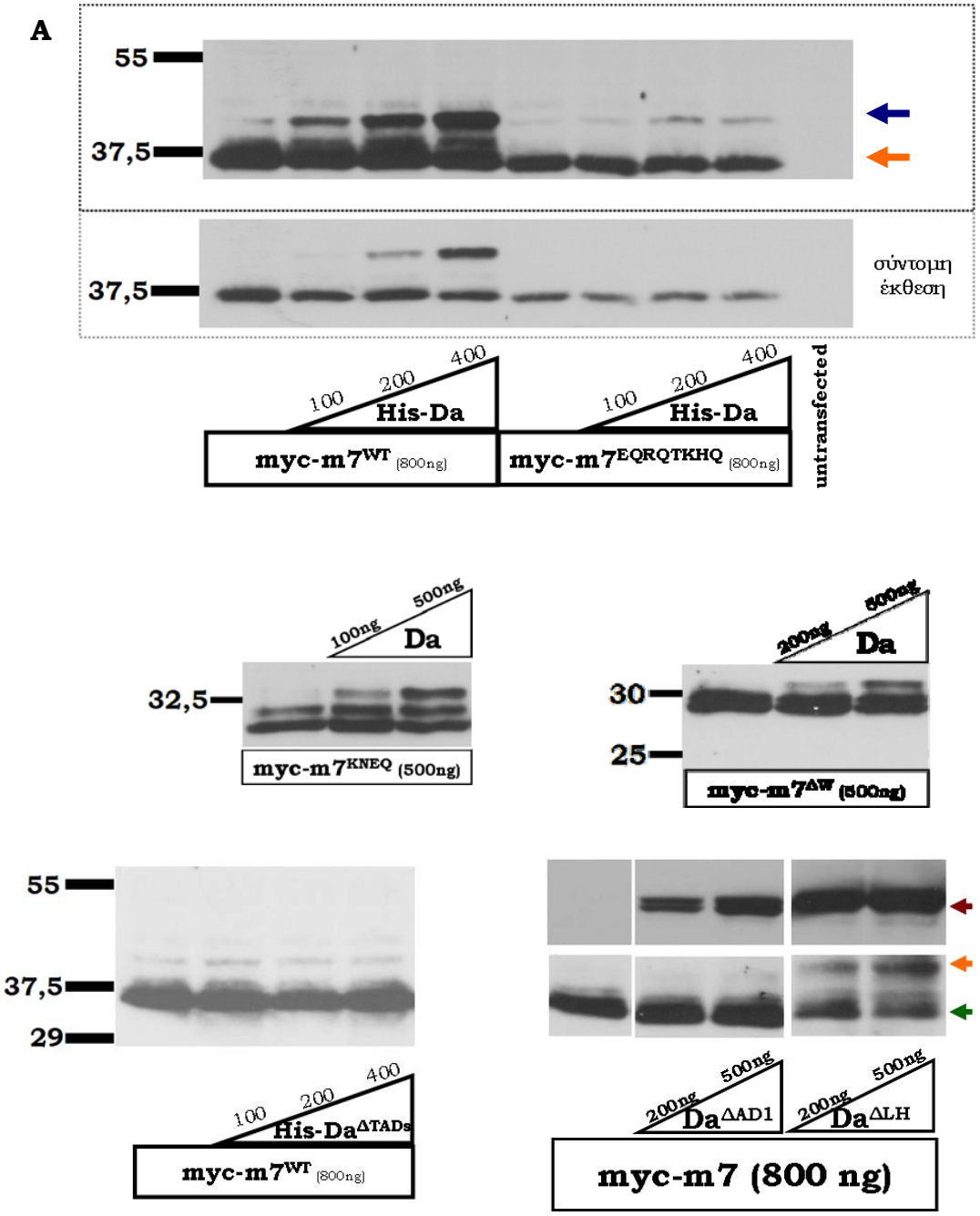
Στην πορεία των πειραμάτων παρατηρήσαμε ότι η πρωτεΐνη E(spl)m7 τροποποιείται παρουσία Da. Διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση του πλασμιδίου myc-m7 (800 ng) και αυξάνοντας την ποσότητα του πλασμιδίου της πρωτεΐνης His-Da (100-200-400 ng), επάχθηκε μια τροποποιημένη μορφή του m7 (εικόνα 4.1_A). Με βάση τον πρωτεϊνικό δείκτη εκτιμάται ότι η νέα μορφή αυτή του m7 μετατοπίζεται μεταξύ 5-10 kDa από την βασική ζώνη του m7 (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, σελίδα 30).

Η τροποποίηση αυτή φαίνεται να χρειάζεται την συμπλοκοποίηση του m7 με το Da, αφού η μεταλλαγμένη μορφή του m7, το m7EQRQTKHQ, που δεν αλληλεπιδρά με το Da, δεν την εμφανίζει ή για να είμαστε πιο ακριβείς την εμφανίζει ελάχιστα-σχεδόν καθόλου (εικόνα 4.1_A). Να σημειώσουμε στο σημείο αυτό ότι μια παρόμοιου τύπου τροποποιημένη μορφή αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό εμφανίζει το m7 και χωρίς την προσθήκη εξωγενώς Da (εικόνα 4.1_A). Μια πρώτη σκέψη είναι ότι αυτή προκαλείται από την ενδογενώς εκφραζόμενη πρωτεΐνη Da. Με δεδομένο ότι την εμφανίζει και το m7EQRQTKHQ, του οποίου η τροποποιημένη μορφή δεν ενισχύεται ιδιαίτερα με την προσθήκη Da, κάνει δυνατό το ενδεχόμενο κάποιος άλλος παράγοντας X να τροποποιεί με παρόμοιο τρόπο το m7 και ίσως το Da να ευνοεί την επαφή μεταξύ του m7 και του παράγοντα X.

Παράλληλα βρήκαμε ότι ούτε η πρόσδεση του m7 στο DNA, αλλά ούτε και η αλληλεπίδραση με το Groucho, είναι απαραίτητες προϋποθέσεις για την τροποποίηση του m7 από το Da, αφού και το m7KNEQ (δεν προσδένεται στο DNA) και το m7ΔW (δεν αλληλεπιδρά με το Groucho) τροποποιείται (εικόνα 4.1Γ, Δ).

Επίσης ούτε η πρωτεΐνη DaΔTADs δεν προκαλούσε τις προαναφερόμενες αλλαγές στο m7 κα αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι δεν μπορούσε να αλληλεπιδράσει με το m7, μιας και της λείπει τα πρώτα 414 αμινοξέα που περιλαμβάνουν και την περιοχή ενεργοποίησης AD1 που συγχρόνως αποτελεί και την περιοχή αλληλεπίδρασης με την m7 (εικόνα 4.1_B). Μάλιστα χρησιμοποιωντας μια κολοβωμένη μορφή του Da που της λείπει συγκεκριμένα η περιοχή AD1 (myc-DaΔAD1), παρατηρήσαμε ότι και πάλι η τροποποίηση του m7 δεν συμβαίνει. Αντίθετα όταν χρησιμοποιήσαμε μια κολοβωμένη μορφή του Da, την myc-DaΔLH, που της

λείπει η δεύτερη περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (LH), αλλά η οποία έχει την AD1 περιοχή είδαμε ότι η τροποποίηση του m7 εμφανίζεται.

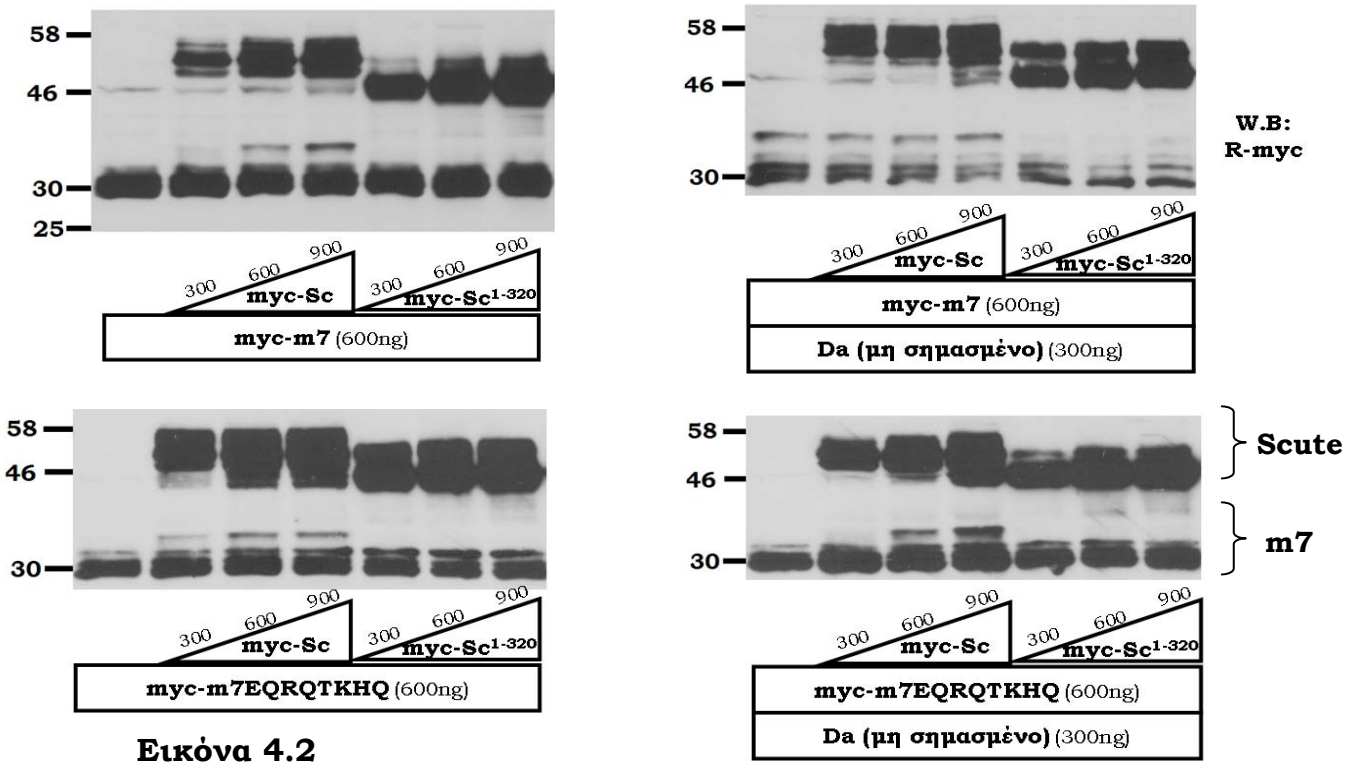


Εικόνα 4.1.
Η πρωτεΐνη E(spl) m7 παρουσία της Da τροποποιείται, μέσω συμπλοκοποίησης με αυτήν.

Επομένως όταν στην κυτταρική σειρά S2 εκφράσουμε την Da πρωτεΐνη, βλέπουμε ότι πολύ σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της τροποποίησης του m7, έχει η ύπαρξη δυνατής αλληλεπίδρασης των δυο πρωτεϊνών μέσω της AD1 περιοχής του Da και της περιοχής Orange του m7.

Συγχρόνως παρατηρήσαμε ότι η τροποποίηση του m7 λάμβανε χώρα όταν υπερεκφράζαμε την πρωτεΐνη myc-Sc, αλλά όχι την myc-Sc$^{1-320}$ (που της λείπει η ισχυρή περιοχή αλληλεπίδρασης με το m7) (εικόνα 4.2_Α). Αν υπερεκφράζαμε σταθερές ποσότητες myc-m7 και Da και αυξάναμε σταδιακά την πρωτεΐνη Sc, η τροποποίηση συνέχιζε να υφίσταται. Αν όμως στο σύμπλοκο Da/m7 υπερεκφράζαμε την myc-Sc^{1320}, τότε η τροποποίηση σχεδόν εξαφανιζόταν (εικόνα 4.2_Β). Η ερμηνεία μας για αυτό το αποτέλεσμα είναι ότι όταν υπερεκφράζουμε μονάχα το Sc, δημιουργούνται ετεροδιμερή με το ενδογενές Da τα οποία αλληλεπιδρούν με το m7 σταθερά μεσω των αλληλεπιδράσεων DaAD1/Orangem7 και ScTAD/bHLHm7. Αυτή η σταθερή συμπλοκοποίηση οδηγεί στην τροποποίηση του m7. Όταν αντικαταστήσουμε το Sc με ένα Sc που του λείπει το TAD και επομένως δεν αλληλεπιδρά ισχυρά με το m7, η μοναδική πλέον αλληλεπίδραση με το AD1 του Da δεν είναι αρκετή για την τροποποίηση του m7.

Όμως για άλλη μια φορά η αντικατάσταση του m7 με το μετάλλαγμα m7EQRQTKHQ, το οποίο δεν αλληλεπιδρά ισχυρά εώς καθόλου με το Da, αλλά συνεχίζει να αλληλεπιδρά με το Sc, μας βοήθησε να δούμε και κάποιες επιπλέον μεταβλητές του συστήματος.



Εικόνα 4.2

Έτσι ενώ το m7EQRQTKHQ δεν τροποποιείται από το Da, αν προσθέσουμε σταδιακά Sc στα κύτταρα παρατηρούμε ότι η τροποποίηση συμβαίνει και στο m7EQRQTKHQ (εικόνα 4.2_Γ). Αυτό δεν συμβαίνει αν αντικαταστήσουμε το Sc με το

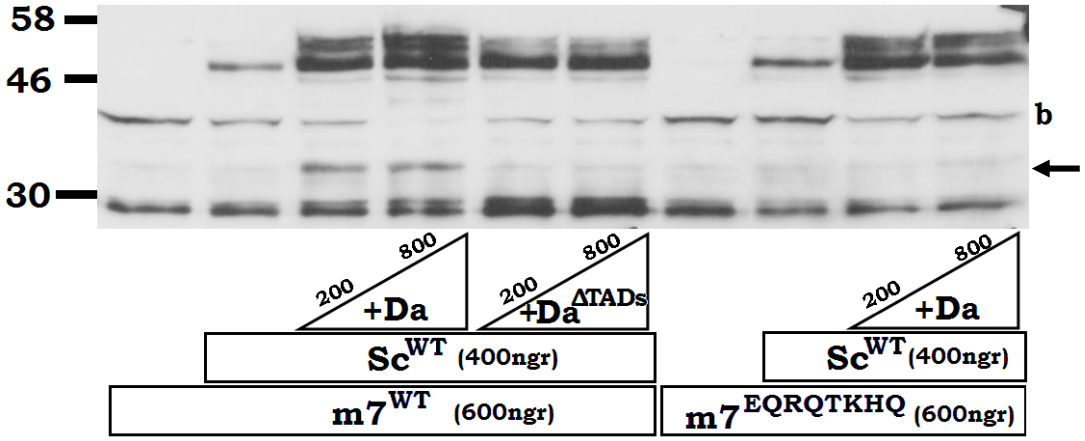
Sc1320. Το m7EQRQTKHQ μπορεί να αλληλεπιδράσει με το σύμπλοκο Da/Sc μέσω του TAD του Sc και της αμινοτελικής περιοχής του m7. Φαίνεται δηλαδή ότι η αλληλεπίδραση του m7 μέσω του TAD του Sc αρκεί για την τροποποίηση του πρώτου είτε το Da είναι παρόν είτε οχι. Απουσία Sc, όπως είδαμε στα προηγούμενα πειράματα, όπου το Da ενδεχομένως είναι ομοδιμερές, η αλληλεπίδραση με το AD1 του Da και της Orange περιοχής του m7 έχει πρωταρχικό ρόλο, αφού είναι και η μοναδική που λαμβάνει χώρα.

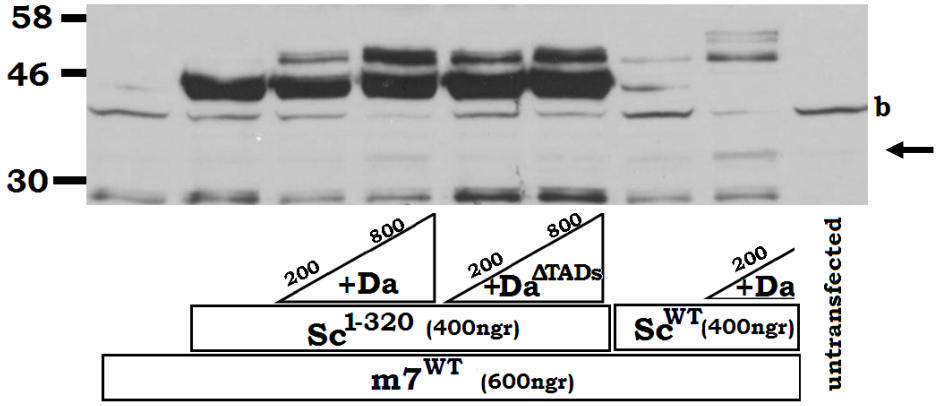
Ενα ερώτημα που τίθεται είναι κατά πόσο όταν υπάρχει το σύμπλοκο Da/Sc η αλληλεπίδραση με το Da συνεισφέρει καθόλου στην τροποπίηση του m7. Τα προηγούμενα πειράματα μας έδειξαν ότι το ScTAD, είναι απαραίτητο για την τροποποίηση αυτή, είναι όμως και αρκετό; Για να απαντήσουμε αυτό το ερώτημα, χρησιμοποιήσαμε σταθερές ποσότητες από τα πλασμίδια myc-Sc και myc-m7 και προσθέταμε στα κύτταρα αυξημένες ποσότητες των πλασμιδίων Da ή της DaΔTADs (μη σημασμένες). Παρατηρούμε ότι παρουσία Sc αγρίου τύπου (Sc^{WT}) και αυξάνοντας την πρωτεΐνη Da, η τροποποίηση του $m7^{WT}$ αυξάνει (βέλος). Αυτό δεν οφείλεται απλά και μόνο στις bHLH αλληλεπιδράσεις των Da/Sc στο κύτταρο, γιατί αν αντικαταστήσουμε το Da με το DaΔTADs, το οποίο είναι ικανό να ετεροδιμεριστεί με το Sc, η τροποποίηση δεν αυξάνει (εικόνα 4.3_A). Αν αντί $m7^{WT}$, στα παραπάνω πειράματα βάλουμε το m7EQRQTKHQ, τότε η τροποποίηση δεν αυξάνει (εικόνα 4.3_A). Φαίνεται δηλαδή πάλι η αναγκαιότητα της αλληλεπίδρασης της περιοχής Orange της m7 με την περιοχή AD1 του Da.

Παράλληλα αν σε σταθερές ποσότητες των πρωτεϊνών των πλασμιδίων myc-Sc^{1320} και myc-m7 προσθέσουμε αυξημένες συγκεντρώσεις του Da, παρατηρούμε ότι η τροποποίηση του m7 εμφανίζεται αμυδρά στην μεγαλύτερη συγκέντρωση του Da (800ng), ενώ αν αντί Sc^{1320} υπάρχει Sc^{WT} τότε η τροποποίηση του m7 εμφανίζεται και με την μικρότερη συγκέντρωση του Da (200ng) (εικόνα 4.3_A). Αν αντί για m7, έχουμε το μετάλλαγμα m7EQRQTKHQ, τότε η τροποποίηση του m7 δεν εμφανίζεται παρουσία Sc^{1320} όσο και αν αυξήσουμε το Da (εικόνα 4.3_A).. Είχαμε δει στα προηγούμενα πειράματα ότι όταν αυξάναμε την ποσότητα του Sc, στο σύμπλοκο Da/m7EQRQTKHQ εμφανιζόταν η τροποποίηση του m7 (εικόνα 4.2).

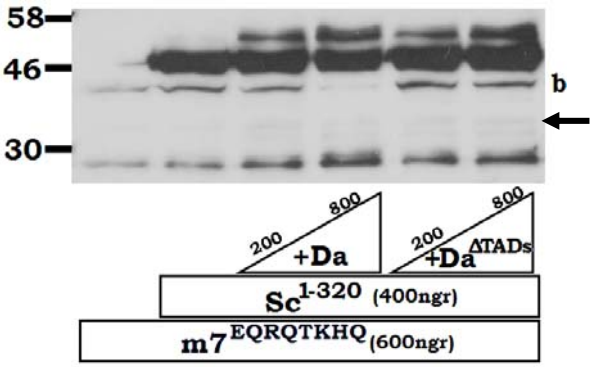
Να σημειώσουμε στο σημείο αυτό ότι τα πειράματα που παρουσιάζονται σε αυτήν την ενότητα (εικόνα 4.1 έως 4.2) έγιναν χρησιμοποιώντας ως δείγμα ελέγχου την β-γαλακτοσιδάση κάτω από τον έλεγχο ενός θερμικά επαγόμενου (heat shock) υποκινητή. Στα πειράματα δεν κάναμε heat shock στα κύτταρα αφού στην θερμοκρασία που ζουν τα κύτταρα (25 ^{o}C), υπάρχει ενεργότητα του υποκινητή αρκετή για την μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της γαλακτοσιδάσης και εκτίμηση με αυτόν

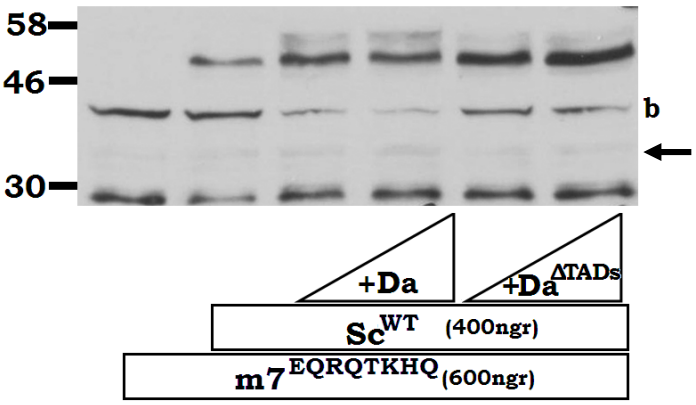
τον τρόπο της αποτελεσματικότητας της παροδικής διαμόλυνσης. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες (διάφορες μορφές του Scute, του m7 και του Da) ωστόσο εκφράζονται κάτω από τον έλεγχο του actin5C υποκινητή.





Εικόνα 4.3





Στην πορεία ανακαλύψαμε ότι είναι πιο αξιόπιστο να χρησιμοποιούμε τον ίδιο υποκινητή για να εκφράζουμε το γονίδιο ελέγχου (β γαλακτοσιδάση ή λουσιφεράση). Μάλιστα πιο γραμμική απόκριση στα κύτταρα έχει η λουσιφεράση, οπότε και την κλωνοποιήσαμε κάτω από τον έλεγχο του actin5C υποκινητή (εν συντομία θα το λέμε act-luc) και την χρησιμοποιήσαμε στα πειράματα, όπου χρειαζόταν ακριβής ποσοτική

εκτίμηση των πρωτεϊνών. Μόνο τα πειραματα στις εικόνες 4.1Α και 4.1Δ έγιναν με την act-luc.

Για τον προαναφερόμενο λόγο, δεν σχολιάζουμε στις προηγούμενες εικόνες αυτής της ενότητας την ποσοτική αλλαγή των πρωτεϊνών, αλλά μόνο την ποιοτική συμπεριφορά τους.

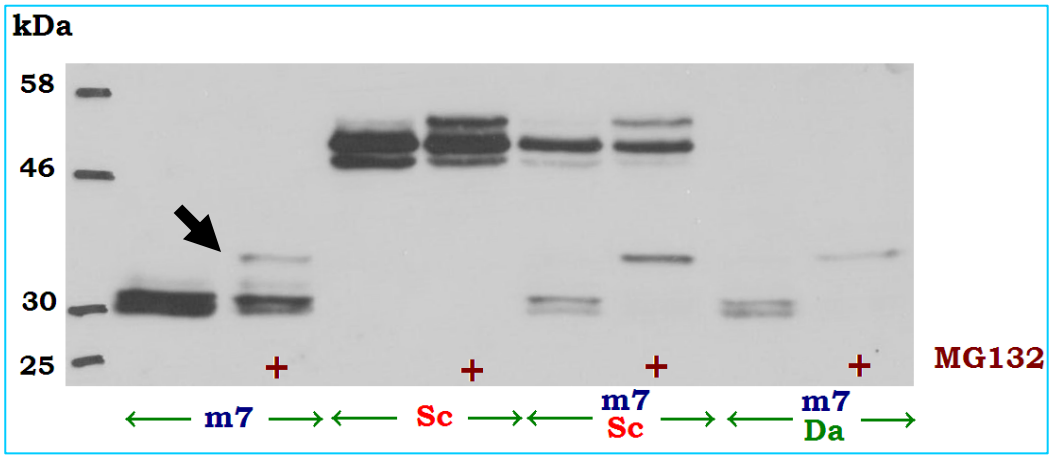
Τα παραπάνω πειράματα μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η τροποποίηση επάγεται από ομοδιμερή Da, όπου η αλληλεπίδραση του m7 με το Da γίνεται μέσω της περιοχής Orange του m7 και του AD1 του Da. Το εξωγενώς προσφερόμενο Scute πιστεύουμε ότι συμπλοκοποιείται με το ενδογενές Da και αλληλεπιδρά με το m7. Η τροποποίηση του m7 από το σύμπλοκο Da/Sc είναι η βέλτιστη όταν το m7 μπορεί να αλληλεπιδράσει ισχυρά και με τις δύο πρωτεΐνες. Όταν χαλάσουμε μία εκ των δύο αλληλεπιδράσεων, η τροποποίηση γίνεται σε μικρότερο βαθμό με αποτέλεσμα να πρέπει να αυξήσουμε πολύ τις πρωτεΐνες μας για να την δούμε.

Η αναστολή του πρωτεασώματος προκαλεί μεταμεταφραστική τροποποίηση του m7

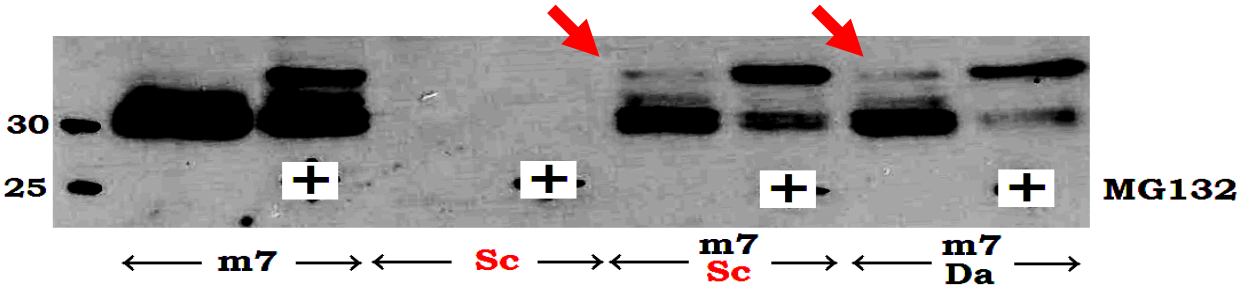
Μια τροποποίηση στο ίδιο μοριακό βάρος εμφάνιζε η πρωτεΐνη m7 όταν επωάζαμε τα κύτταρα με τον αναστολέα του πρωτεασώματος για 4-8 ώρες. Συγκεκριμένα έγινε παροδική διαμόλυνση των κυττάρων με την πρωτεΐνη myc-m7(600ng) ή myc-Sc (600ng) ή ταυτόχρονα myc-m7 και myc-Sc (600ng το καθένα), είτε με την myc-m7 (600ng) μαζί με μη σημασμένο Da (300ng). Τα κύτταρα χωρίστηκαν σε δύο ίσα μέρη και στο ένα προστέθηκε αναστολέας του πρωτεασώματος, το MG132, ενώ στο άλλο DMSO, που αποτελούσε το μέσο διάλυσης του MG132. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 8 ώρες, συλλέχθηκαν και λύθηκαν σε ίδιο όγκο διαλύματος λυσης και φορτώσαμε στο πηκτωμα ίσο όγκο δείγματος. Παρατηρούμε ότι το myc-m7 παρουσία αναστολέα πρωτεασώματος εμφανίζει μια τροποποιημένη μορφή (βέλος μαύρο). Αν δούμε τις πιο βαριές εκθέσεις, θα διαπιστώσουμε ότι αυτή η τροποποιημένη μορφή μετατοπίζεται στο ίδιο ύψος που βρίσκεται και η τροποποιημένη μορφή του m7 από το Sc και το Da , που εμφανίζεται στις διαδρομές χωρίς MG132 (κόκκινο βέλος)..

Μάλιστα ενδιαφέρον παρουσιάζει το φαινόμενο ότι η βασική ζώνη του m7 μειώνεται. Το γεγονός ότι η συσσωρεύεται η τροποποιημένη μορφή του m7 όταν μπλοκάρουμε το πρωτεάσωμα, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η μορφή αυτή του m7 καταστρέφεται από αυτό. Από την άλλη μεριά το γεγονός ότι μειώνεται η ποσότητα της βασικής ζώνης του m7, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ένα μέρος της καταστρέφεται

από έναν μηχανισμό ανεξάρτητο από το πρωτεάσωμα. Μείωση της ομόλογης πρωτεΐνης Hes6 σε ανθρώπινα κύτταρα μετά από αναστολή του πρωτεασώματος είχε παρατηρηθεί, χωρίς όμως να έχει παρατηρηθεί αύξηση κάποιας άλλης μορφής της πρωτεΐνης (Gratton et al. 2003). Οι ερευνητές είχαν δώσει την εξήγηση ότι ενδεχομένως αυτό να οφείλεται στο ότι ο πρωτεολυτικός μηχανισμός που καταστρέφει την πρωτεΐνη να ενεργοποιείται από το μπλοκάρισμα του πρωτεασώματος. Ίσως κάτι αντίστοιχο να ισχύει και στην δική μας περίπτωση. Πιθανόν το m7 να καταστρέφεται με δύο τρόπους, ο ένας να εξαρτάται από το πρωτεάσωμα και ο άλλος από κάποιον άλλο μηχανισμό που να ενισχύεται με την αναστολή του πρωτεασώματος. Για παράδειγμα θα μπορούσε να είναι μία πρωτεάση, η οποία να καταστρέφεται από το πρωτεάσωμα, αλλά με το να το μπλοκάρουμε να ενισχύουμε την δράση της.



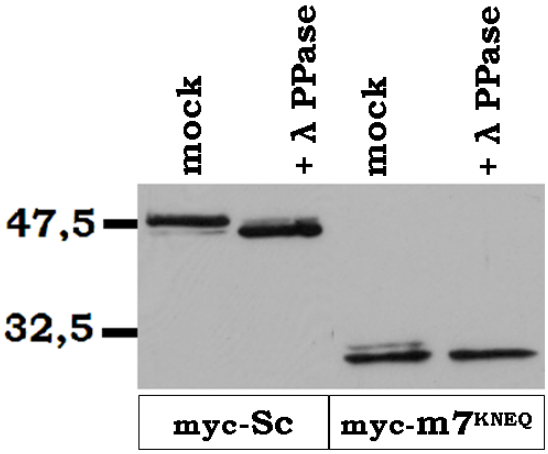
Σύντομη έκθεση φιλμ



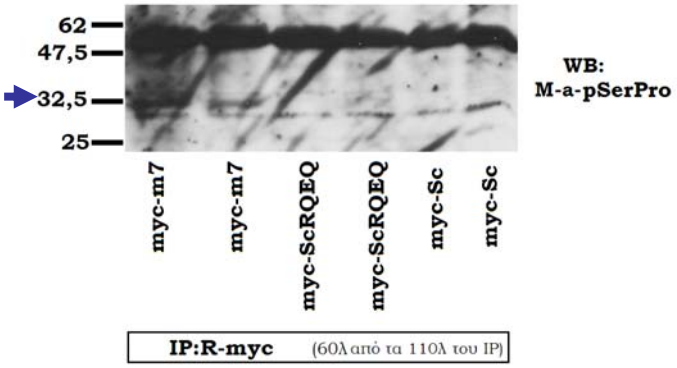
Είναι γνωστό ότι όταν μπλοκάρουμε το πρωτεάσωμα συσσωρεύονται ουβικουϊνιλιωμένες μορφές των πρωτεϊνών. Θέλαμε λοιπόν να ελέγξουμε κατά πόσο η τροποποίηση αυτή είναι μονο-ουβικουϊτινιλίωση. Αλλά πριν προχωρήσουμε σε αυτήν την εξέταση, θα κάνουμε μια μικρή παρένθεση για να δούμε την φωσφορυλιωμένη κατάσταση του m7 και κατά πόσο η τροποποίηση που επάγεται από το Da και το Sc είναι φωσφορυλίωση.

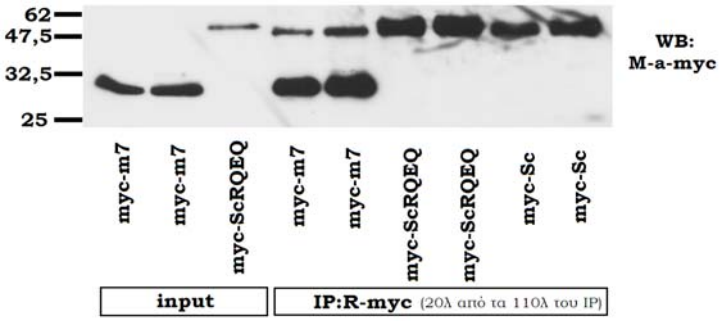
Η m7 υπόκειται σε φωσφορυλίωση, ουβικουιτυλίωση, SUMOυλίωση και Neddυλίωση

Από τα πρώτα κιόλας πειράματα είχαμε παρατηρήσει ότι το ένα ποσοστό της πρωτεΐνης m7 είναι φωσφορυλιωμένο. Αυτή η μορφή του m7 μετατοπίζεται πολύ κοντα στη βασική ζώνη του m7 και με χρήση λ φωσφατάσης, αποφωσφορυλιώνεται.



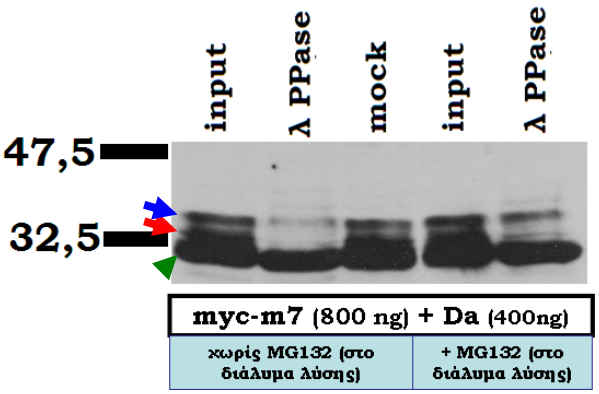
Πραγματοποιώντας πειράματα ανοσοκατακρήμνισης στα S2 κύτταρα με αντίσωμα myc για τις πρωτεΐνες myc-m7, myc-ScRQEQ και myc-Sc και ανιχνεύοντας με την χρήση κατάλληλου αντισώματος την ύπαρξη φωσφορυλιωμένων σερινών ή θρεονινών που ακολουθούνται από προλίνη (Ser/Thr-Pro), διαπιστώσαμε ότι το αντίσωμα (Upstate signaling, MPM2, αριθμός καταλόγου 05-368) αναγνώριζε μια ζώνη συγκεκριμένα στο δείγμα myc-m7 και στο ύψος που τρέχει η φωσφορυλιωμένη μορφή του m7 (μπλε βέλος). Αυτό μας κάνει να πιστεύουμε ότι και το m7 είναι φωσφορυλιωμένο σε μοτίβο SP ή TP. Το m7 διαθέτει ένα TP και δύο SP μοτίβα στο καρβοξυτελικό του άκρο. Ωστόσο δεν έχουμε αναλύσει περαιτέρω τον ρόλο αυτής της φωσφορυλίωσης.

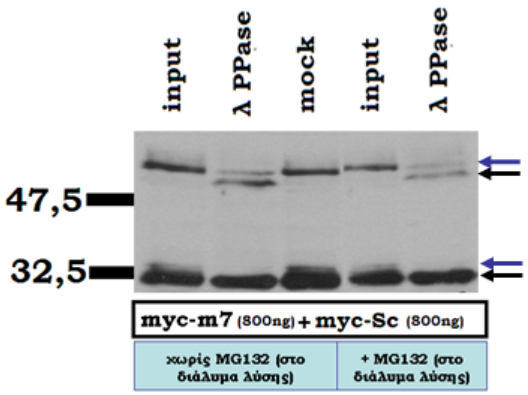




Επειδή κατα την διαδικασία της αποφωσφορυλίωσης, επωάζουμε το κυτταρικό εκχύλισμα με το διάλυμα της λ φωσφατάσης στους 30 oC για 30 λεπτά, θελήσαμε να πραγματοποιήσουμε την αποφωσφορυλίωση με αναστολέα του πρωτεασώματος ώστε σε περίπτωση που παραμένει κάποια ενεργότητα μετά την λύση των κυττάρων να μην επηρεάσει το αποτέλεσμα. Είναι γενικότερα διαδεδομένη η συνήθεια προσθήκης αναστολέα πρωτεασώματος στο διάλυμα της λύσης των κυττάρων όταν ελέγχεται η ουβικουϊτινιλίωση των πρωτεϊνών. Παροδικά διαμολυσμένα κύτταρα που συνέκφραζαν την πρωτεΐνη myc-m7 μαζί με την Da (μη σημασμένη) χωρίστηκαν σε 5 ίσα μέρη. Στα πρώτα τρία δείγματα της εικόνας το NP40 διάλυμα λύσης δεν περιείχε MG132, ενώ στα επόμενα δύο βάλαμε 50μg/ml. Επεξεργασία με lambda φωσφατάση των δειγμάτων η φωσφορυλιωμένη μορφή του m7 (κόκκινο βέλος) που μετατοπίζεται πολύ κοντα στην βασική του ζώνη (πράσινο βέλος) αποφωσφορυλιώνεται, ενώ η Da εξαρτώμενη μορφή του m7 (μπλε βέλος) επηρεάζεται λιγότερο. Ακόμα λιγότερο επηρεάζεται στην περίπτωση που έχουμε προσθέσει MG132.

Σε παράλληλα πειράματα που είχαμε συνεκφράσει μαζί με το myc-m7 και το myc-Sc, παρατηρούμε ότι η χρήση αναστολέα του πρωτεασώματος δεν επηρέαζε καθόλου την μετατροπή των φωσφορυλιωμένων μορφών του m7 και του Sc (μπλε βέλη), σε μη φωσφορυλιωμένες (μαύρα βέλη). Αυτό μας κάνει να πιστεύουμε ότι η τροποποίηση που επάγει το Da στο m7 δεν είναι φωσφορυλίωση.





Έχοντας αποκλείσει την φωσφορυλίωση προχωρήσαμε να ελέγξουμε άλλες πιθανές τροποποιήσεις. Διαπιστώσαμε με πειραματα ανοσοκατακρήμνισης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες ότι η πρωτεΐνη m7 είναι πολυουβικουϊτινιλιωμένη (τα πειράματα αυτά δεν παρουσιάζονται). Είμασταν σε θέση να δούμε τις πολυουβικουϊτινιλιωμένες μορφές της πρωτεΐνης και χωρίς να προσθέσουμε αναστολέα του πρωτεασώματος γεγονός που δηλώνει ότι οι τροποποιήσεις αυτές έχουν μεγάλο χρόνο ημιζωής και επομένως δεν καταστρέφονται από το πρωτεάσωμα.

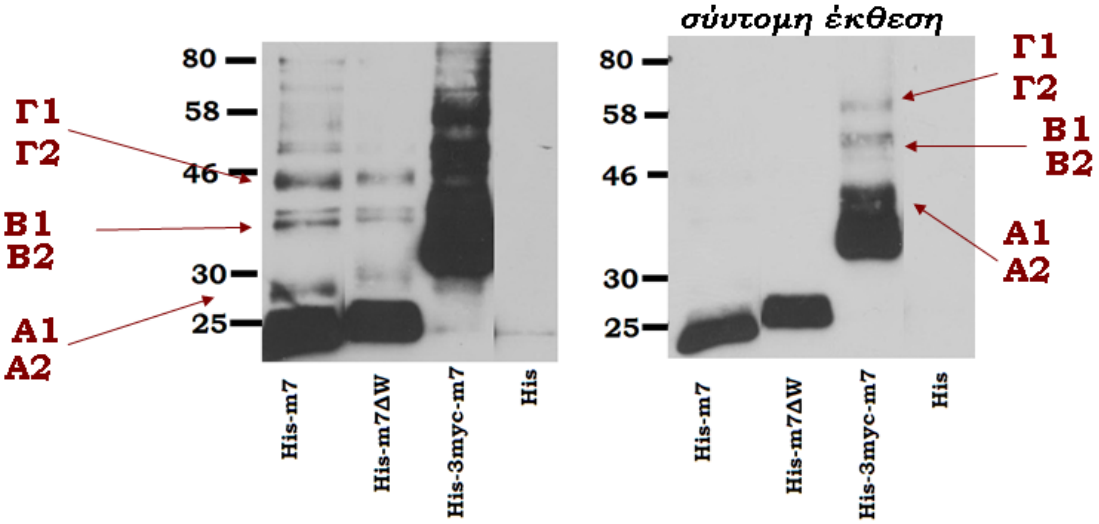
Για να είμαστε πιο σίγουροι ότι δεν συγκατακρημνίζουμε άλλες Ub-πρωτεΐνες που αλληλεπιδρουν με το m7 αποφασίσαμε να πραγματοποιήσουμε τα πειράματα σε συνθήκες αποδιατακτικές, χρησιμοποιώντας 8M ουρία και κατακρημνίζοντας της His σημασμένες πρωτεΐνες με Ni-NTA σφαιρίδια αγαρόζης. Συνολικά διαμολύναμε 10^7 κύτταρα για κάθε πρωτεΐνη. Διαμολύναμε με την πρωτεΐνη His-m7 (σημασμένη με τον 6xHis επίτοπο, Μ.Β. 22,64kDa), με την His-m7ΔW (που δεν αλληλεπιδρά με το Groucho, Μ.Β.=22,46 kDa), με την His-3myc-m7 (που έχει και τον 6xHis επίτοπο αλλά και τρεις επιτόπους myc, Μ.Β.= 28,34 kDa) και για δείγμα αρνητικού ελέγχου χρησιμοποιήσαμε τον πλασμιδιακό φορέα που εκφράζει τον 6xHis επίτοπο.

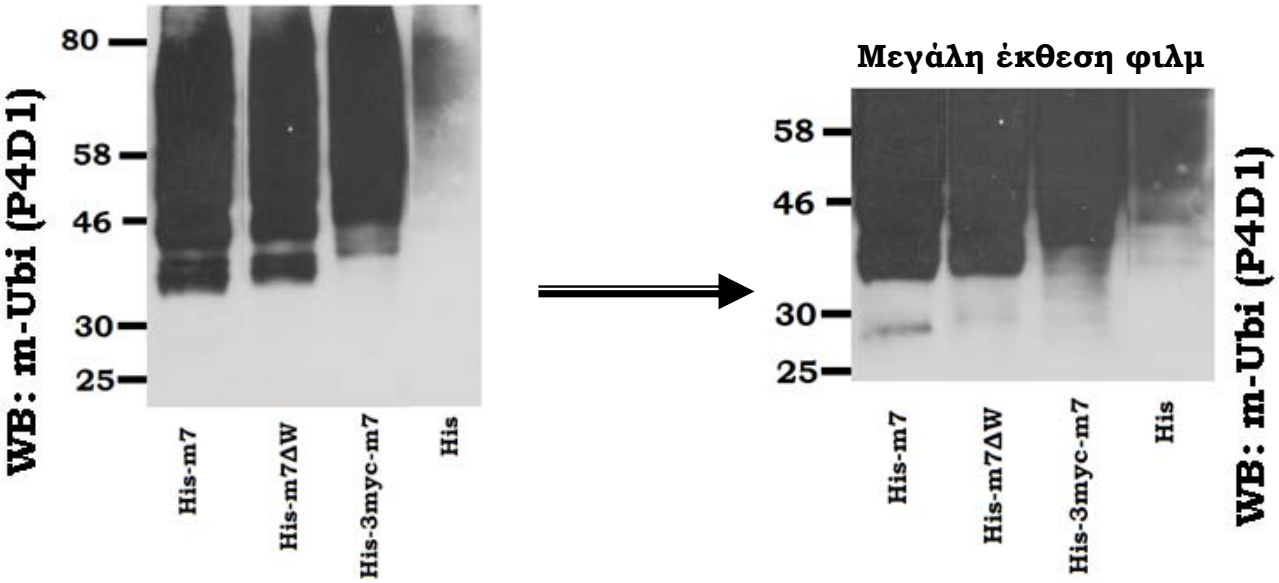
Κάθε δείγμα χωρίστηκε σε τρία άνισα μέρη. Το 1/10 το τρέξαμε για να δούμε την ποσότητα της πρωτεΐνης που κατεβάσαμε με τα σφαιρίδια και χρησιμοποιήσαμε το αντίσωμα anti-His για να ανιχνεύσουμε τις πρωτεΐνες. Τα 3/10 τα ηλεκτροφορήσαμε για να ανιχνεύσουμε με το αντίσωμα m-Ubi (P4D1, Santa Cruz) τις ουβικουϊτινιλιωμένες μορφές της πρωτεΐνης μας. Τα υπόλοιπα 6/10 του δείγματος τα ηλεκτροφορήσαμε για να ανιχνεύσουμε με το αντίσωμα R-Sumo (ευγενική χορηγεία του εργαστηρίου του καθ. Αρταβάνη-Τσάκωνα) τις σουμοϋλιωμένες μορφές του m7.

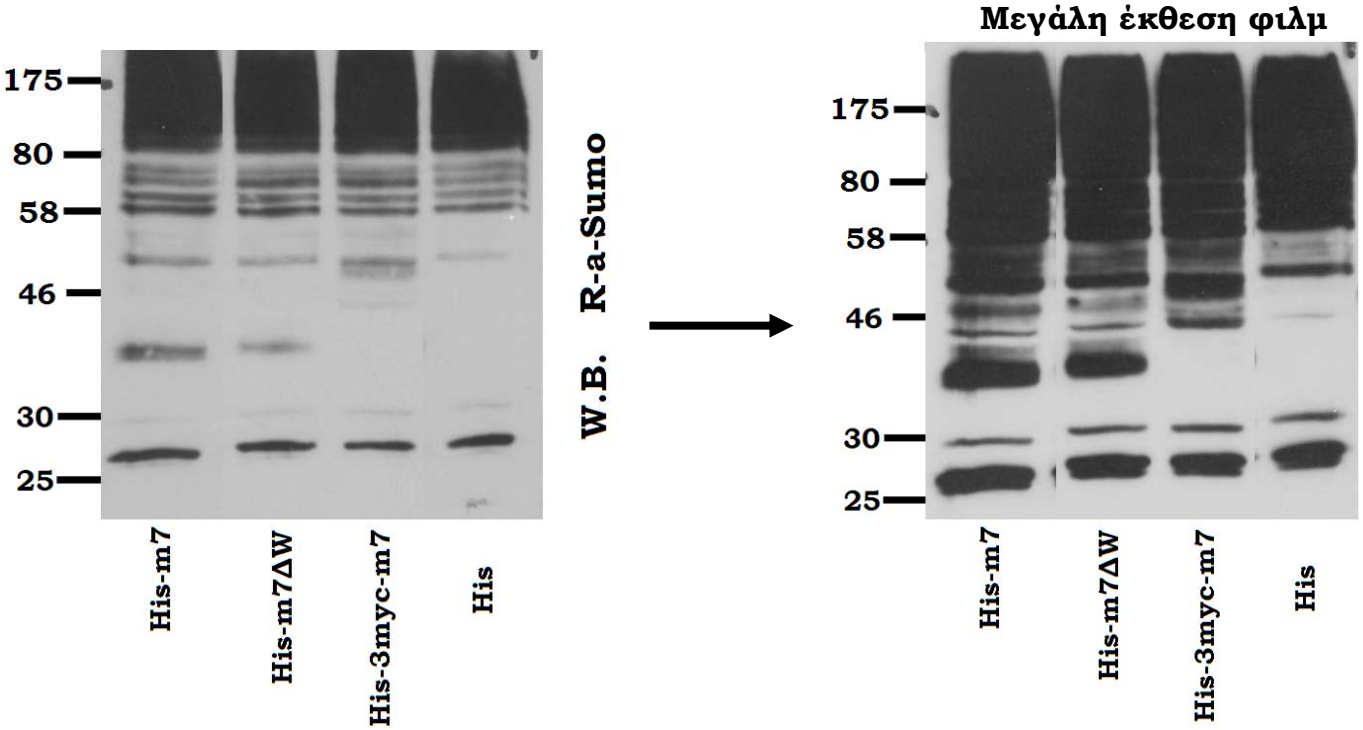
Καταρχήν παρατηρούμε ότι εκτός από την βασική ζώνη του His-m7 βλέπουμε και κάποιες άλλες μεγαλύτερου μοριακού βάρους, που τρεχουν ως διπλέτες. Για δική μας διευκόλυνση ας την ονομάσουμε Α1, Α2, Β1, Β2 και Γ1, Γ2, όπως φαίνονται και στην εικόνα. Το ίδιο πρότυπο ζωνών παρουσιάζει και το His-m7ΔW με την διαφορά ότι είναι ελάχιστα μετατοπισμένες προς τα πάνω, όπως είναι άλλωστε και η βασική ζώνη του His-m7ΔW σε σύγκριση με αυτην του His-m7. Ακριβώς το ίδιο πρότυπο παρουσιάζει και η His-3myc-m7, αλλά είναι ακόμα πιο μετατοπισμένες λόγω του επιπλέον επιτόπου που φέρει η πρωτεΐνη.

Πρέπει να υπενθυμίσουμε ότι οι αποδιατακτικές συνθήκες που χρησιμοποιήσαμε μας εξασφαλίζουν οτιδήποτε έχει κατακρημνιστεί μαζί με την πρωτεΐνη μας οφείλει να είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με αυτήν, αφού χάνονται κάθε είδους αλληλεπιδράσεις. Μελετώντας την ανοσοαποτύπωση με το αντίσωμα έναντι της ουβικουϊτίνης διαπιστώνουμε ότι στο δείγμα His-m7 μία τουλάχιστον από τις ζώνες Α1 και Α2 καθώς και οι ζώνες Β1 και Β2 περιέχουν μόρια ουβικουϊτίνης. Παρατηρούμε πόσο έντονη είναι η ουβικουϊτινιλίωση σε σχέση με το αρνητικό δείγμα ελέγχου. Επομένως το m7 βρίσκεται σε κατάσταση όπου είναι μονό, δι- και πολυουβικουϊτινιλιώμενο σε μεγάλο βαθμό. Η ουβικουϊτινιλίωση αυτή οφείλει να μην οδηγεί την πρωτεΐνη για καταστροφή, αφού αυτές τις μορφές τις βλέπουμε χωρίς να έχουμε κάνει επίδραση στα κύτταρα με αναστολέα του πρωτεασώματος. Ενδεχομένως η ουβικουϊτινιλίωση να έχει κάποιο άλλο ενδεχομένως λειτουργικό ρόλο στην πρωτεΐνη.

WB: m-His


σύντομη έκθεση
80
58
46
30
25
Γ1
Γ2
Β1
Β2
Α1
Α2
His-m7
His-m7ΔW
His-3myc-m7
His


WB: m-Ubi (P4D1)
Μεγάλη έκθεση φιλμ
80
58
46
30
25
His-m7
His-m7ΔW
His-3myc-m7
His


W.B. R-a-Sumo
Μεγάλη έκθεση φιλμ
175
80
58
46
30
25
His-m7
His-m7ΔW
His-3myc-m7
His

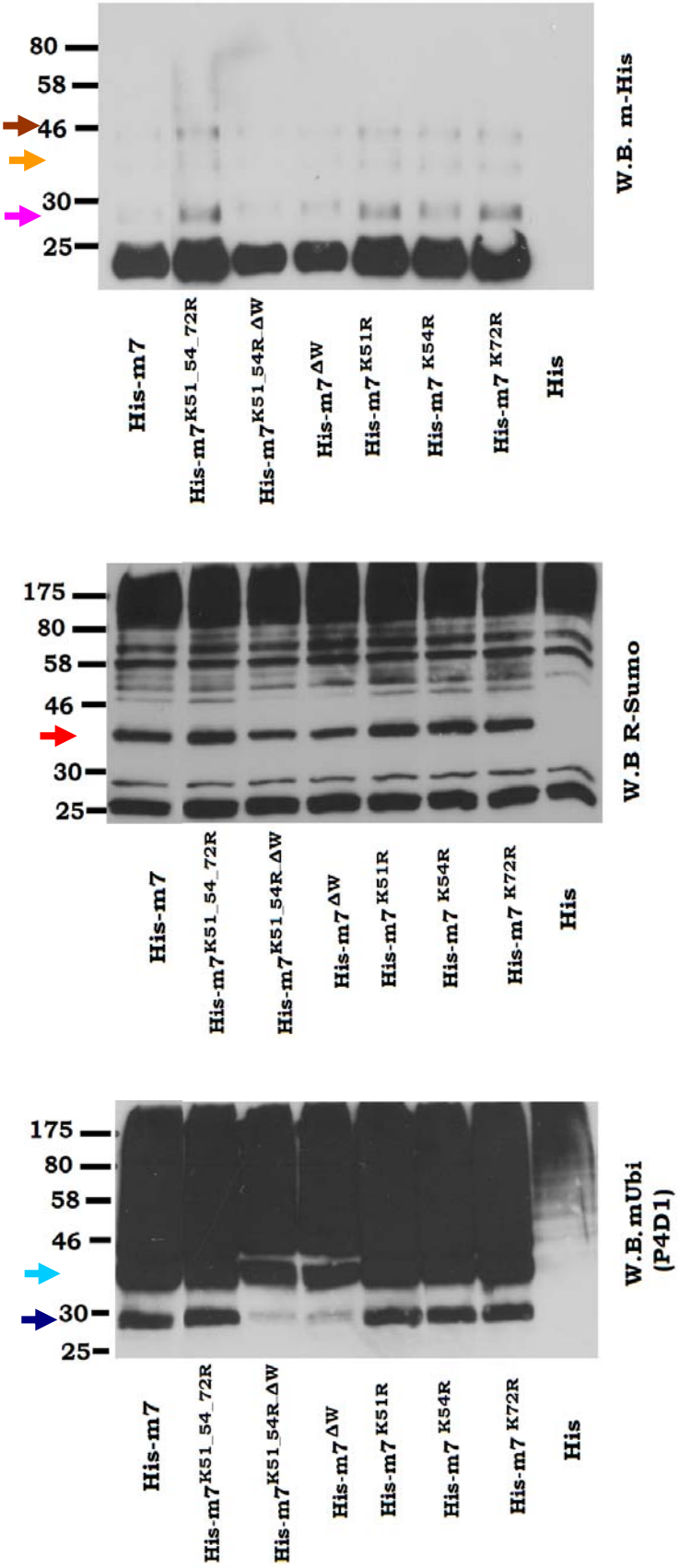
Επιπλέον ελέγχοντας το ανοσοαποτύπωμα με το αντίσωμα R-Sumo, βλέπουμε ότι η ζώνη B1 του His-m7 και του His-m7$^{\Delta W}$ είναι σουμοϋλιωμένες. Θα βιαζόμασταν να βγάζαμε το συμπέρασμα ότι συνιστούν την μονοσουμοϋλιωμένη μορφή της m7, αλλά αν κοιτάξουμε λίγο πιο προσεκτικά θα δούμε ότι η ζώνη A1/A2 του His-myc-m7 είναι σουμοϋλιωμένη. Το γεγονός ότι την σουμοϋλίωση δεν την ανιχνεύσαμε στην ζώνη A1/A2 του His-m7, ενδεχομένως να οφείλεται στο ότι η συνολική πρωτεΐνη His-m7 που έχει κατέβει είναι λιγότερη απο την His-myc-m7. Άλλωστε η ουβικουϊτίνη (8,5 kDa) και το μόριο Sumo της Δροσόφιλας (9,95 kDa) έχουν διαφορά μόλις 1,5 kDa. Οπότε είναι λογικό η μονοουβικουϊτινιλιωμένη μορφή του m7 να τρέχει ελάχιστα χαμηλότερα από την σουμοϋλιωμένη του μορφή. Συνοψίζοντας καταλήγουμε ότι η ζώνη A1/A2 περιλαμβάνει μονοουβικουϊτινιλιωμένες και μονοσουμοϋλιωμένες μορφές της πρωτεΐνης m7. Πιο ψηλά στο πήκτωμα της ακρυλαμίδης έχουμε τις δι- τρι-τροποποιημένες μορφές της m7.

Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Sumosp 2.0 (Ren et al. 2009) το οποίο προβλέπει πιθανές θέσεις σουμοϋλίωσης βρήκαμε ότι το m7 εχει 3 πιθανές θέσεις όπως φαίνονται και ακολούθως.

Position	Peptide	Score	Cutoff	Type
51	GDAKFEK	0,341	0,1	TypeI: Ψ-K-X-E
54	KFEKADI	2,779	2,26	TypeII: Non-consensus
72	KESKKHV	2,382	2,26	TypeII: Non-consensus

Η πιο πιθανή θέση είναι η λύσίνη στη θέση 54. Προχωρήσαμε στην μεταλλαγή των παραπάνω λυσινών σε αργινίνες, με την ελπίδα ότι θα βρίσκαμε τη θέση σουμοϋλίωσης. Έτσι φτιάξαμε τα ακόλουθα μεταλλάγματα m7K51R (K51→R), m7K54R (K54→R), m7K72R (K72→R), m7K51_54R_ΔW (K51→R, K54→R και ταυτόχρονη έλλειψη της τελευταίας τρυπτοφάνης) και το τριπλά μεταλλαγμένο m7 K51_54_72R (K51→R, K54→R και K72→R). Τα σημάναμε είτε με το myc, είτε με το 6xHis επίτοπο.

Στα πειράματα που ακολουθούν χρησιμοποιήσαμε τις σημασμενες μορφές με τον His επίτοπο, έτσι ώστε να χρησιμοποιήσουμε αποδιατακτικές συνθήκες κατακρήμνισης των πρωτεϊνών. Να υπενθυμίσουμε ότι η πρωτεΐνη m7ΔW έχει έλλειψη της τελευταίας τρυπτοφάνης και επομένως το μοτίβο αλληλεπίδρασης (WRPW) με τον συγκαταστολέα Groucho δεν είναι πλέον λειτουργικό.

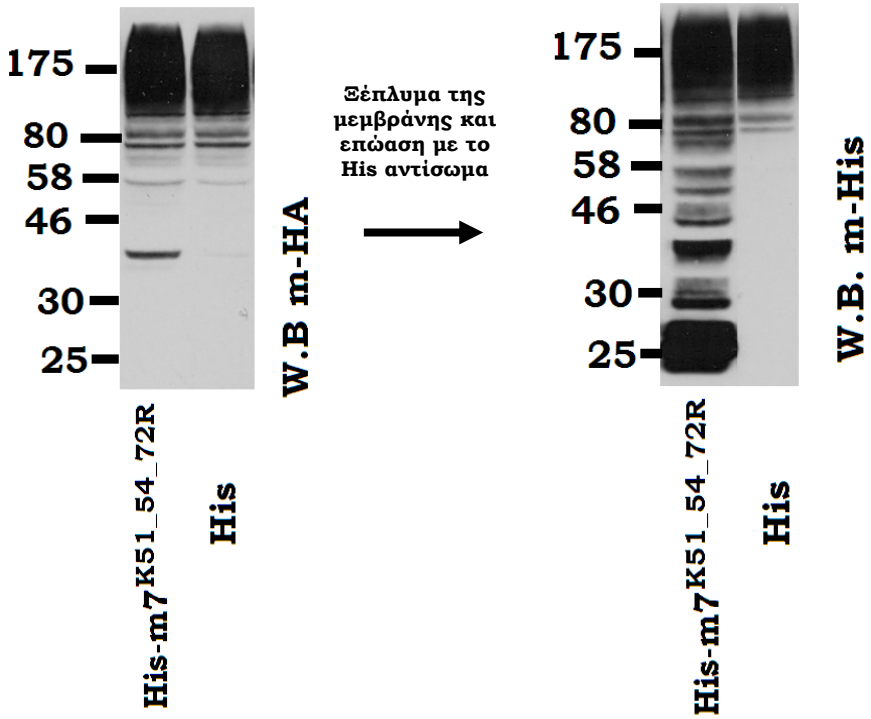

80
58
46
30
25
His-m7
His-m7K51_54_72R
His-m7K51_54R_ΔW
His-m7ΔW
His-m7K51R
His-m7K54R
His-m7K72R
His
W.B. m-His
175
80
58
46
30
25
His-m7
His-m7K51_54_72R
His-m7K51_54R_ΔW
His-m7ΔW
His-m7K51R
His-m7K54R
His-m7K72R
His
W.B R-Sumo
175
80
58
46
30
25
His-m7
His-m7K51_54_72R
His-m7K51_54R_ΔW
His-m7ΔW
His-m7K51R
His-m7K54R
His-m7K72R
His
W.B.mUbi
(P4D1)

Συνολικά για κάθε πρωτεΐνη κατακρημνίσαμε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από 10^7 παροδικά διαμολυσμένα κύτταρα τα οποία υπερέκφραζαν τις πρωτεΐνες όπως αναγράφονται στην εικόνα. Το 1/8 του κατακρημνισμένου υλικού το ηλεκτροφορήσαμε για ανοσοαποτύπωση με το His αντίσωμα, ώστε αν εκτιμήσουμε την ποσότητα της κάθε πρωτεΐνης που κατεβάσαμε. Το ¼ το χρησιμοποιήσαμε για ανοσοαποτύπωση με το αντίσωμα της ουβικουϊτίνης και το υπόλοιπο (5/8) για την ανοσοαποτύπωση με το αντίσωμα έναντι του Sumo.

Ήμασταν σε θέση να ξεχωρίσουμε το πρότυπο των ζωνών A1/A2 , B1/B2 και Γ1/Γ2 (ροζ, πορτοκαλί και καφέ βέλος αντίστοιχα). Επίσης ανιχνεύσαμε της δισουμοϋλιωμένες μορφές του m7 (κόκκινο βέλος, εικόνα Y_B), τις μονο- και διουβικουϊτινιλιωμένες μορφές του m7 (μπλε και γαλάζιο βέλος, εικόνα Y_Γ) καθώς και τις πολυουβικουϊτινιλιωμένες μορφές του. Γενικά το πρότυπο σουμοϋλίωσης και ουβικουϊτινιλίωσης των πρωτεϊνών δεν αλλάζει, μειώνεται στις περιπτ΄ςσεις που έχουμε κατακρημνίσει λιγότερη πρωτεΐνη. Παρατηρούμε παρότι μεταλλάξαμε όλες τις προβλεπόμενες θέσεις σουμοϋλίωσης το m7 συνεχίζει να σουμοϋλιώνεται.

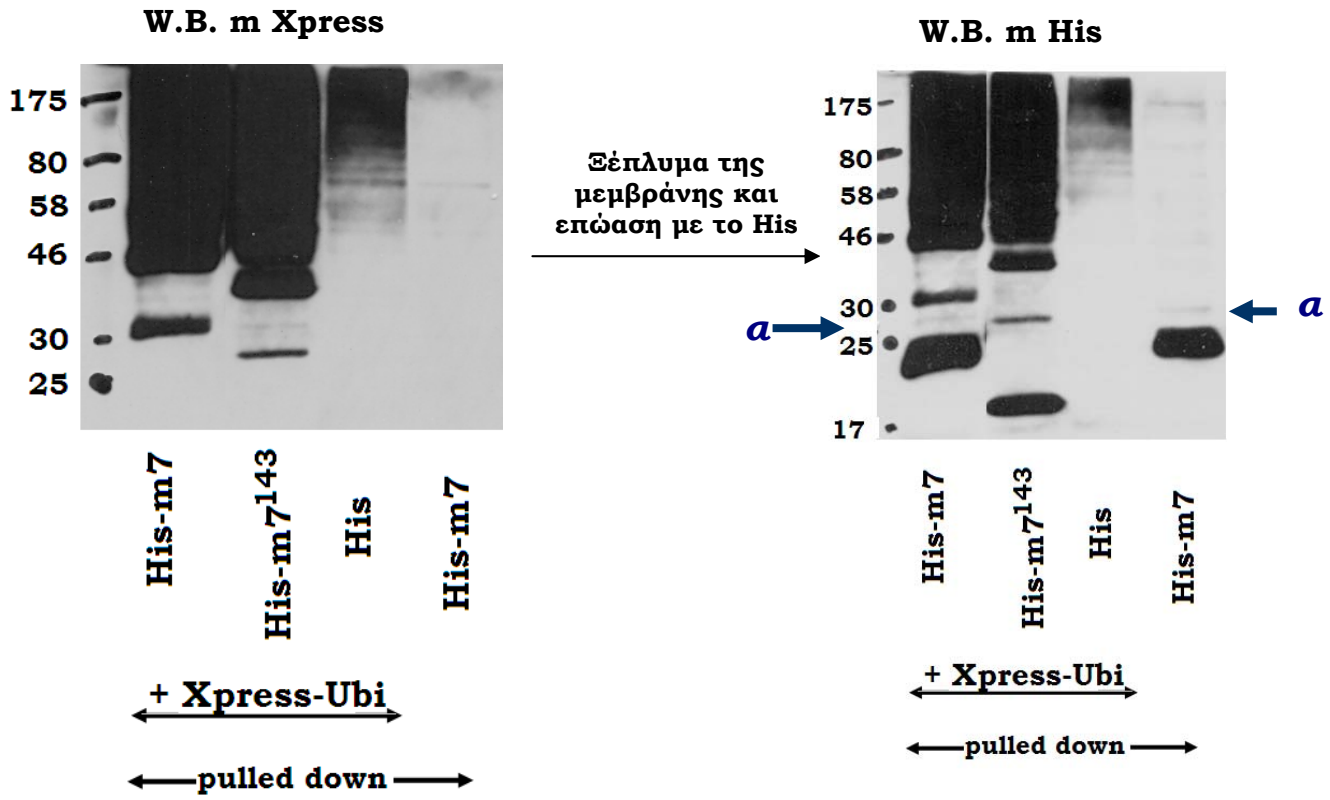
Αυτό έχει παρατηρηθεί και σε άλλες περιπτώσεις πρωτεϊνών. Ναι μεν υπάρχει μια θέση που ενδεχομένως να είναι προτιμητέα για σουμοϋλίωση, αλλά σε περίπτωση που αυτή απουσιάζει, άλλες λυσίνες της πρωτεΐνης θα σουμοϋλιωθούν από την λιγάση που θα αλληλεπιδράσει με την πρωτεΐνη (Yamamoto et al. 2003; Mauri et al. 2008).

Οποιαδήποτε αμφιβολία κατά πόσο τα αντισώματα R-Sumo είναι ειδικό για Sumo, εξαφανίστηκε γιατί ήμασταν σε θέση να ανιχνεύσουμε σουμοϋλίωση της m7 και με έναν διαφορετικό τρόπο. Σε αυτήν την περίπτωση διαμολύναμε τα κύτταρα με πλασμίδια για τις διάφορες His σημασμένες πρωτεΐνες καθώς και πλσμίδιο που εξέφραζε την πρωτεΐνη Sumo σημασμένη στο αμινοτελικό της άκρο με τον επίτοπο HA. Χρησιμοποιήσαμε και πάλι αποδιατακτικές συνθήκες, κατακρημνίσαμε με σφαιρίδια NiNTA τις His σημασμένες πρωτεΐνες και ελέγξαμε με το αντίσωμα HA αυτήν την φορά αν ανιχνεύουμε σουμοϋλίωση στις πρωτεΐνες μας. Για οικονομία χώρου παραθέτουμε μόνο το τριπλό μετάλλαγμα, αλλά ελέγχθηκαν και οι υπόλοιπες μορφές και όλες εμφάνιζαν αντίστοιχο πρότυπο.



Κάτι αντίστοιχο πραγματοποιήσαμε και για την ουβικουϊτινιλίωση, όπου συνεκφράσαμε μαζί με τις πρωτεΐνες μας και την πρωτεΐνη Ubi σημασμένη με τον επίτοπο Xpress (Xpress-Ubi). Και πάλι κατακρημνίζοντας με NiNTA σφαιρίδια και ανοσοαποτυπώντας με το Xpress αντίσωμα ταυτοποιήσαμε τις ουβικουϊτινιλιωμένες μορφές της m7. Το μοριακό βάρος της Xpress-Ubi είναι 12,06 kDa έναντι 8,56 kDa της ενδογενούς (3,5 kDa διαφορά). Για αυτόν τον λόγο και ανιχνεύουμε την μονοουβικουϊτινιλιωμένη μορφή του m7 ψηλότερα σε σχέση με αυτήν που είναι τροποποιημένη με την ενδογενή ουβικουϊτίνη. Όταν ανοσοαποτυπώσαμε την ίδια μεμβράνη με το His αντίσωμα είδαμε και την μονοουβικουϊτινιλίωση από την ενδογενή πρωτεΐνη που τρέχει λιγάκι πιο χαμηλά (μπλε βέλος, ζώνη α). Να σημειώσουμε ότι παρότι ξεπλύναμε εκτενώς την μεμβράνη από το πρώτο αντίσωμα (mouse-anti-Xpress) επαναμφανίζονται οι ζώνες του Xpress επιτόπου, γιατί το His αντίσωμα που χρησιμοποιήσαμε ήτανε ποντικού, οπότε το δευτερεύον αντίσωμα (anti-mouse-HRP) επανεμφάνισε και τις ζώνες του mouse-anti-Xpress. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήσαμε και μια κολοβωμένη μορφή της πρωτεΐνης m7, την His-m7$^{1-143}$, της οποίας της λείπει η καρβοξυτελική περιοχή (από το 144^{ο} εώς το 186^{ο} αμινοξύ) και έχει μοριακό βάρος 18,2 kDa. Σε σύγκριση με την πλήρους μήκους πρωτεΐνη His-m7 (22,6 kDa) είναι 4,4kDa πιο μικρή. Ανιχνεύσαμε και την μονοουβικουϊτινιλιωμένη

μορφή της $m7^{1-143}$ (με την Xpress-ubi) και παρατηρούμε ότι τρέχει λιγάκι πιο χαμηλά από την ζώνη α του His-m7. Η ηλεκτροφορητική αυτή σχέση των δύο πρωτεϊνών (His-$m7^{1143}$-Xpress-Ubi σε σχέση με His-m7-Ubi) συμφωνεί απόλυτα, αν σκεφτούμε ότι η διαφορα Xpress-Ubi και ενδογενούς Ubi είναι 3,5 kDa, που είναι λίγο μικρότερη από την διαφορά του His-m7 με το His-$m7^{1-143}$.



Οφείλονται οι τροποποιησεις από το Da/Sc και το MG132 σε ουβικουιτίνη;

Παρότι είχαμε τα παραπάνω εργαλεία και παρότι η απόσταση της επαγώμενης από το Da τροποποίησης του m7 από την βασική του ζώνη μοιάζει με αυτήν της μονοουβικουϊτινιλίωσης ή της μονοσουμοϋλίωσης, δεν έχουμε καταφέρει ακόμα να διαπιστώσουμε με βεβαιότητα αν η ζώνη του m7 που επάγεται από το Da και το πρωτεάσωμα είναι ουβικουϊτινιλίωση ή σουμοϋλίωση ή τίποτα από τα δύο. Θελήσαμε να ελέγξουμε μήπως είναι κάποιου άλλου τύπου τροποποίηση που μοιάζει με ουβικουϊτινιλίωση, όπως είναι η νεντυλίωση (neddylation). Η νεντυλίωση είναι μια μεταφραστική τροποποίηση στην οποία ένα μόριο Nedd8 προσδένεται ομοιοπολικά στην αμινομάδα μιας λυσίνης της πρωτεΐνης στόχου. Για την κατάλυση της αντίδρασης συμμετέχει μια σειρά ενζύμων παρόμοια με αυτά της ουβικουϊτινιλίωσης. Το μοριακό βάρος του μορίου Nedd8 που συγκολλάται στην πρωτεΐνη είναι 8,51kDa, παρόμοιο με

αυτό της ουβικουϊτίνης 8,56 kDa. Μάλιστα τα δύο αυτά μόρια παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα όπως φαίνεται και στην παρακάτω αμινοξική αντιστοίχηση.

```
Nedd8 Drosophila   (1) MLIKVKTLTGKEIEIDIEPTDKVDRIKERVEEKEGIPPQQQRLIFSGKQM
Ubiquitin          (1) MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQL
                       51                                  76
Nedd8 Drosophila  (51) NDDKTAADYKVQGGSVLHLVLALRGG
Ubiquitin         (51) EDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRLRGG
```

Παρόλα αυτά τους έχουν απονεμηθεί ξεχωριστοί ρόλοι μέσα στο κύτταρο. Για να απαντήσουμε το ερώτημα αν το m7 είναι νεντυλιωμένο και επειδή δεν είχαμε αντίσωμα έναντι του Nedd8, χρησιμοποιήσαμε ανάλογο τρόπο όπως και στα παραπάνω πειράματα. Συνδιαμολύναμε τα κύτταρα με πλασμίδια που έκφραζαν τις His σημασμένες πρωτεΐνες μας μαζί με ενα πλασμίδιο που εξέφραζε την πρωτεΐνη Nedd8 συζευγμένη με τέσσερις myc επιτόπους. Χρησιμοποιήσαμε αποδιατακτικές συνθήκες και κατακρημνίσαμε τις His σημασμένες πρωτεΐνες και ελέγξαμε με το R-myc αντίσωμα, αν φέρουν μόρια Nedd8 πάνω τους. Πράγματι όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα, είδαμε το m7 να φέρει πάνω του μόρια Nedd8.

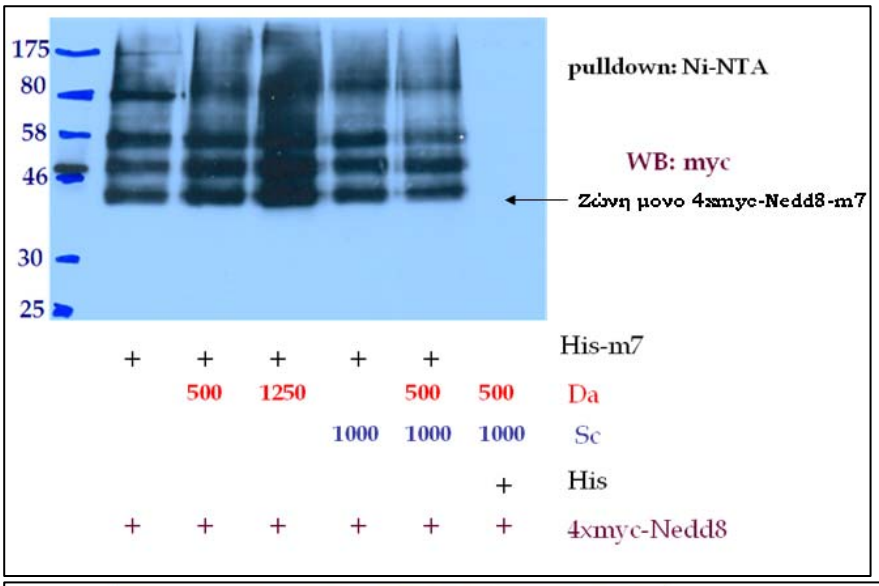
Το 4xmyc-Nedd8 έχει MB 14,7kDa, ενώ το ενδογενές 8,51kDa. Η διαφορά των 6,19 kDa αυτή μπορεί να δικαιολογήσει το ύψος στο οποίο τρέχει η τροποποιημένη His-m7 πρωτεΐνη, με ένα μόριο Nedd8, όπως φαίνεται στην ακόλουθη εικόνα.

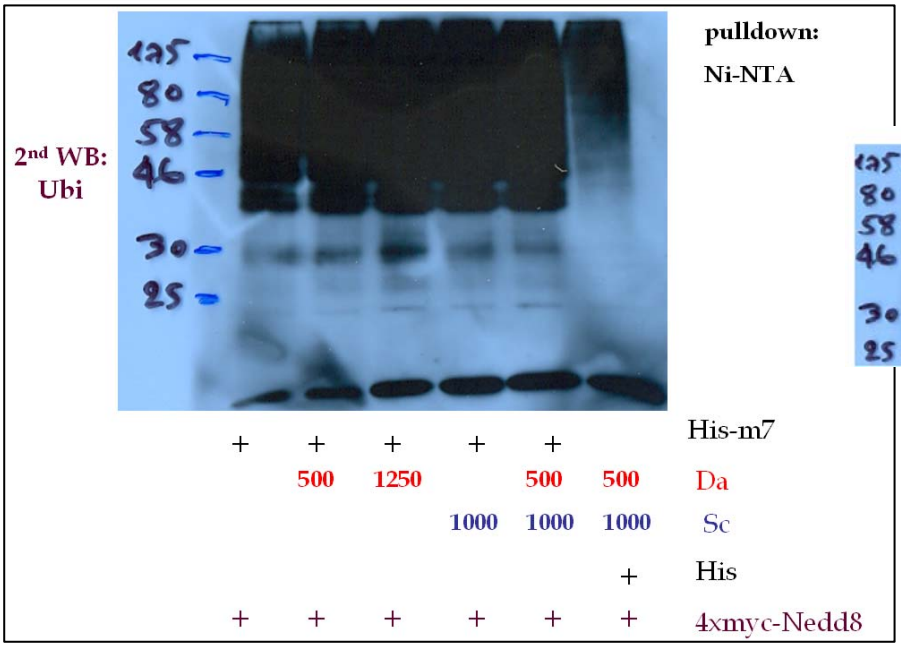
Την ίδια μεμβράνη την ξεπλύναμε και την επωάσαμε με αντίσωμα m-Ubi. Βλεπουμε αύξηση της μόνο και πολυ-ουβικουϊτινιλίωσης στην τρίτη διαδρομή που έχουμε προσθέσει Da.

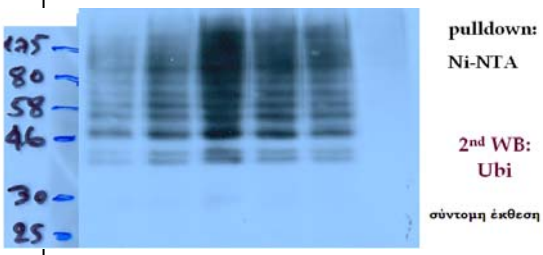
Με μια πρώτη ματιά φαίνεται αύξηση της Neddυλίωσης και της ουβικουϊτινιλίωσης στα δείγματα που έχουμε προσθέσει Da, αλλά επειδή όταν την ίδια μεμβράνη την επωάσουμε την τρίτη φορά με το αντίσωμα His βλέπουμε ότι συνολικά το His-m7 που κατακρημνίσαμε ήταν περισσότερο σε αυτά τα δείγματα, δεν μπορούμε να είμαστε απόλυτα σίγουροι ότι η διαφορά στα δείγματα δεν οφείλεται στην διαφορά της συνολικής πρωτεΐνης που κατακρημνίσαμε και όχι στην αύξηση του Nedd8 ή του Ubi πάνω σε αυτήν. Επίσης είμαστε σε θέση όταν χρησιμοποιούμε το His αντίσωμα, να δούμε έστω και αχνά την ζώνη του His-m7 που επάγεται από την παρουσία του Da (πράσινο βέλος) η οποία είναι στο ίδο ύψος που τρέχει η μονο-ουβικουτινιλιώμενη μορφή που ανιχνευσαμε με το m-Ubi.

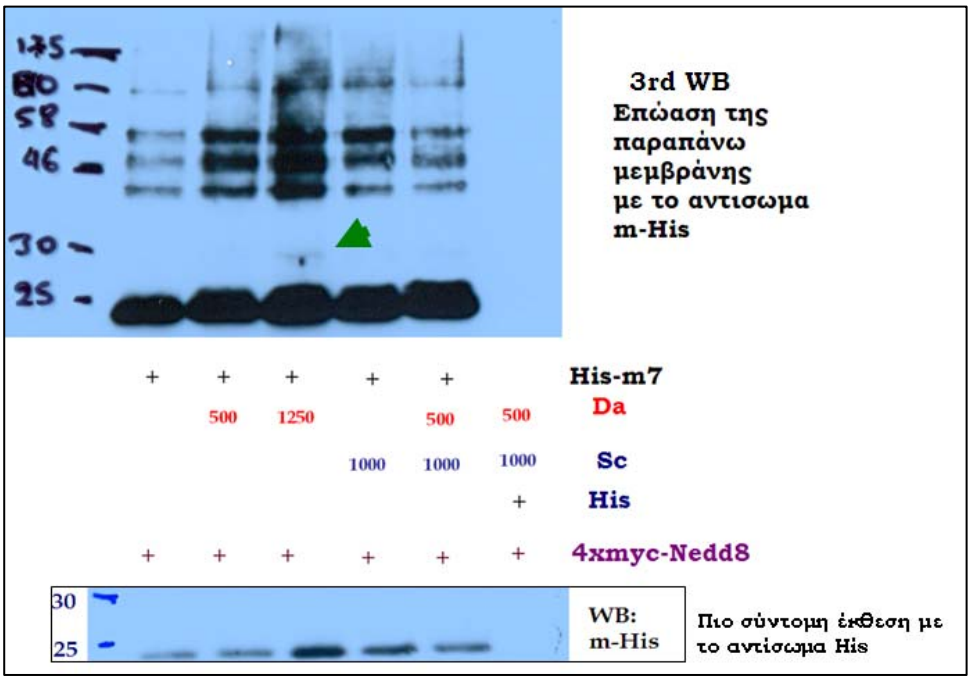
Έχει περιγραφεί ότι αλλαγές στην αναλογία των ελεύθερων μορίων Nedd8 ως προς τα ελεύθερα μόρια ουβικουϊτίνης οδηγεί τα μόρια του Nedd8 να συζευγνύονται με τις πρωτεΐνες χρησιμοποιώντας τα ένζυμα του μονοπατιού της ουβικουϊτινιλίωσης (Hjerpe et al. 2011). Αυτή η αύξηση του λόγου ελεύθερο Nedd8/ελεύθερο Ubi μπορούσε να επιτευχθεί είτε με υπερέκφραση του Nedd8 στα κύτταρα, είτε με αναστολή του

πρωτεασώματος, κατά την οποία μειώνονται τα επίπεδα της ελεύθερης ουβικουϊτίνης (Hjerpe et al. 2011).









Αν και οι ενδείξεις είναι πολλές ότι η τροποποίηση που επάγεται από το Da είναι κάποιο ubi-like μόριο, παρόλα αυτά ακόμα δεν είμαστε σε θέση να ταυτοποιήσουμε με σιγουριά την τροποποίηση αυτή. Πιο προσεκτικά πειράματα στο μέλλον ίσως δώσουν μια απάντηση.

Ενότητα Γ2.

Καταστροφή της bHLH πρωτεΐνης E(spl) m7 από τις προνευρικές πρωτεΐνες Da και Sc.

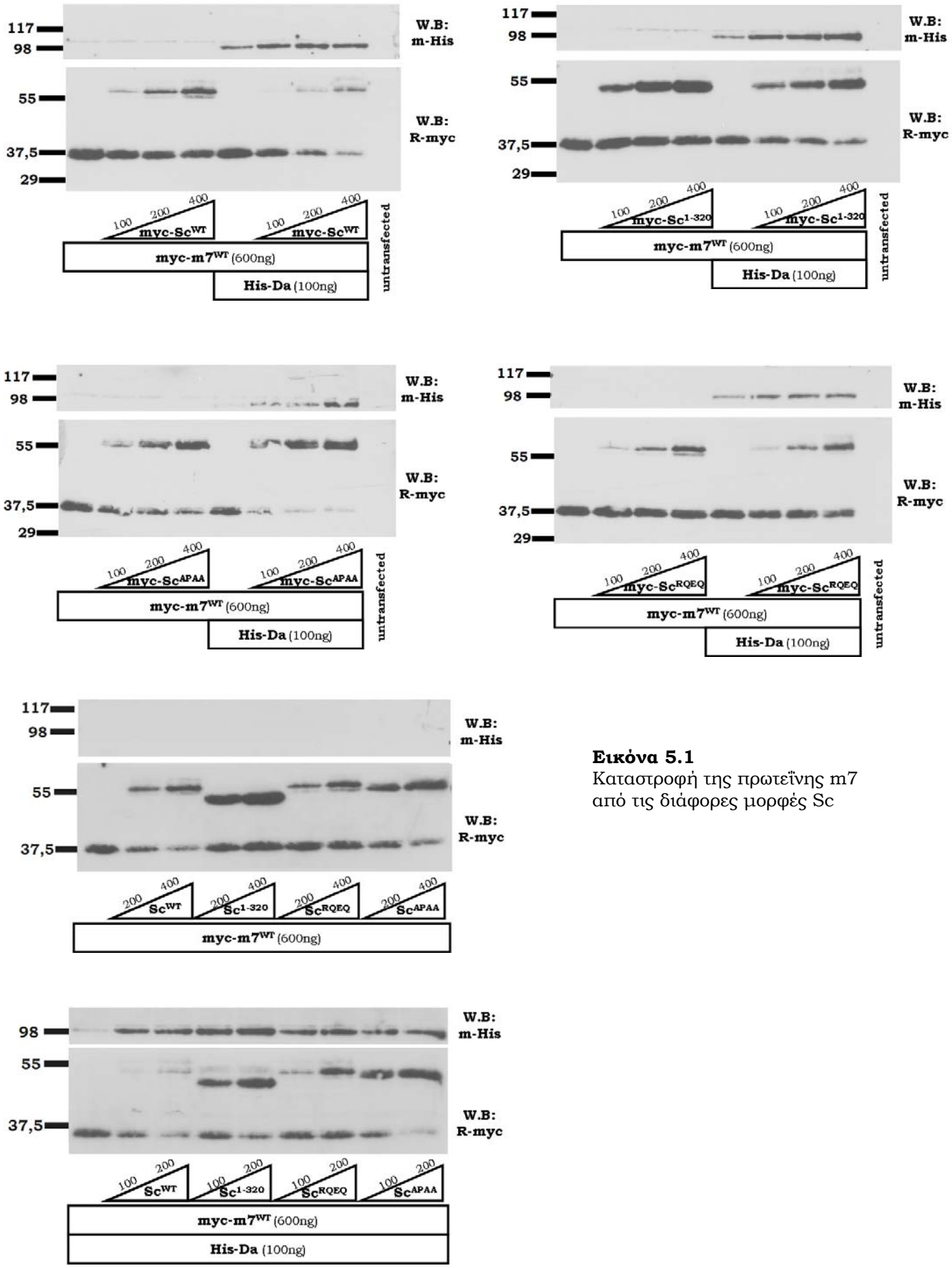
Στα πειράματα του της προηγούμενης ενότητας συχνά παρατηρήσαμε οτι εκφράζοντας σταθερή ποσότητα της πρωτεΐνης m7 και αυξανόμενες ποσότητες της πρωτεΐνης Scute το m7 μειωνόταν. Εάν συγχρόνως με το Sc προσφέραμε σταθερή και σε χαμηλά επίπεδα ποσότητα της πρωτεΐνης Da (100ng πλασμιδίου), η αποικοδόμηση του m7 ήταν πιο απότομη (εικόνα 5.1).

Εκμεταλλευόμενοι τις διάφορες μεταλλαγμένες μορφές των πρωτεϊνών που είχαμε στα χέρια μας, θελήσαμε να αναλύσουμε με περισσότερη λεπτομέρεια τις συνθήκες καταστροφής της πρωτεΐνη E(spl)m7 από τις προνευρικές πρωτεΐνες Sc και Da. Αρχικά ελέγξαμε κατά πόσο η κολοβωμένη μορφή του Scute, το Sc^{1-320}, που της λείπει η περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής, που συνιστά και την περιοχή ισχυρής αλληλεπίδρασης με το m7 είναι ικανή να οδηγήσει σε αποικοδόμηση του m7. Υπερεκφράζοντας την πρωτεΐνη Sc1320 είδαμε ότι η καταστροφή του m7 έχει μειωθεί σε μεγάλο βαθμό (εικόνα 5.1). Όταν όμως παράλληλα προσφέραμε εξωγενώς στα κύτταρα μόρια της πρωτεΐνης Da, παρατηρήσαμε ότι πλέον το Sc1320 ήταν σε θέση να καταστρέψει το m7. Αυτό το αποδώσαμε στο γεγονός ότι πλέον το m7 ίσως να στρατολογείται στο σύμπλοκο Da/Sc^{1-320} μέσω της περιοχής AD1 του Da (εικόνα).

Στη συνέχεια ελέγξαμε την μεταλλαγμένη μορφή του Scute που της λείπει η κύρια θέση φωσφορυλίωσης, το ScAPAA. Παρατηρήσαμε ότι το ScAPAA είναι εξίσου ικανό με τον άγριο τύπο να καταστρέψει το m7. Η ικανότητά του αυξάνεται αν προσφέρουμε στα κύτταρα περισσότερη πρωτεΐνη Da.

Στην προηγούμενη ενότητα είχαμε δει ότι η αντίθετη καταστροφή, δηλαδή του Sc από το m7 εξαρτιόταν από την φωσφορυλίωση του Sc. Αυτό είναι ένα ισχυρό στοιχείο ότι οι δύο πρωτεΐνες οδηγούνται χωριστά στην καταστροφή και ότι η συμπλοκοποίηση δεν αρκεί από μόνη της να οδηγήσει όλες τις πρωτεΐνες στο «θάνατο». Δηλαδή στην περίπτωση που το σύμπλοκο αποτελείται από την $Da/Sc^{APAA}/m7$ το m7 καταστρέφεται, ενώ το ScAPAA μένει ανεπηρέαστο.

Παρατηρήσαμε επίσης ότι η πρωτεΐνη ScRQEQ, η οποία έχει χάσει την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA, έχει μειωμένη ικανότητα καταστροφής του m7. Συνεκφράζοντας την πρωτεΐνη Da, ενισχύεται η καταστροφή του m7 από την ScRQEQ, αλλά συνεχίζει να είναι σαφώς λιγότερο αποτελεσματική σε σύγκριση με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη ή και με την πρωτεΐνη Sc^{1320}.



Εικόνα 5.1
Καταστροφή της πρωτεΐνης m7 από τις διάφορες μορφές Sc

Επομένως χρειάζεται η πρόσδεση στο DNA του συμπλόκου Da/Sc για αποτελεσματική καταστροφή του m7. Μία πιθανή εξήγηση για αυτήν την προϋπόθεση είναι είτε οτι το σύμπλοκο Da/Sc ενεργοποιεί μεταγραφικά ένα γονίδιο στόχο (π.χ. μια λιγάση ουβικουϊτίνης), το προϊόν του οποίου συμμετέχει ενεργά στην καταστροφή του m7. Μία άλλη ενδεχομένως εξήγηση (που μπορεί και να συμβαίνει παράλληλα με την προηγούμενη) είναι ότι η προσέλκυση της πρωτεΐνης m7 στο μικροπεριβάλλον της χρωματίνης μέσω του προσδεδεμένου σε αυτήν, συμπλόκου Da/Sc ευνοεί την καταστροφή του m7. Το γεγονός ότι συνεχίζουμε να παρατηρούμε ένα ποσοστό καταστροφής, δηλώνει ότι η καταστροφή μπορεί να γίνει έστω και λιγότερο αποτελεσματικά και χωρίς πρόσδεση του συμπλόκου στο DNA. Αυτό συνιστά μια δεύτερη διαφορά των δύο καταστροφών, μιας και το ScRQEQ, καταστρεφόταν εξ ίσου αποτελεσματικά και από το m7 και από το m7KNEQ, άρα η καταστροφή του μάλλον λάμβανε χώρα εκτός χρωματίνης.

Αν παρατηρήσουμε πιο προσεκτικά τις προηγούμενες εικόνες (1-4) παρατηρούμε ότι όταν προσθέτουμε 100ng πλασμιδίου Da στο σύμπλοκο Sc/m7, εκτός από το να μειώνεται το m7 παρατηρούμε και μείωση και του Sc, στην περίπτωση του αγρίου τύπου Sc και λιγότερο στην περίπτωση του κολοβωμένου Sc1-320. Στην περίπτωση του ScRQEQ δεν παρατηρείται σχεδόν καθόλου το φαινόμενο. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί με διάφορους τρόπους. Πρώτον το ScRQEQ καταστρέφεται εξίσου αποτελεσματικά από το m7, είτε είναι το Da παρόν είτε όχι. Οπότε προσθήκη επιπλέον Da δεν αυξάνει την ήδη υπάρχουσα αποδοτική καταστροφική του δράση στο m7. Ένας άλλος λόγος μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι αν και μπορεί να αυξάνεται η καταστροφή του m7 από το ScRQEQ παρουσία Da, την ίδια στιγμή κάποια μόρια ScRQEQ που καταφέρνουν να ετεροδιμεριστούν με το Da, χωρίς να είναι το m7 παρών, σταθεροποιούνται. Το αποτέλεσμα αυτών των πολύπλοκων αποικοδομήσεων και σταθεροποιήσεων είναι το συνολικό ScRQEQ να παραμένει περίπου σταθερό με την προσθήκη Da.

Κάτι αντίστοιχο παρατηρούμε και στην περίπτωση του ScAPAA. Μάλιστα στην περίπτωση αυτή βλέπουμε αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης ScAPAA όταν στο σύμπλοκο ScAPAA/m7 προσθέσουμε Da και την ίδια στιγμή παρατηρούμε απότομη καταστροφή του m7. Το ScAPAA όπως ήδη έχουμε πει δεν καταστρέφεται παρουσία Da από το m7. Την ίδια στιγμή το ScAPAA σταθεροποιείται παρουσία Da. Οι δυο αυτές παράλληλες σχέσεις σταθεροποίησης μέσω συμπλοκοποίησης με το Da και μη καταστροφής από το m7 οδηγούν σε αύξηση της συνολικής ποσότητας του ScAPAA.

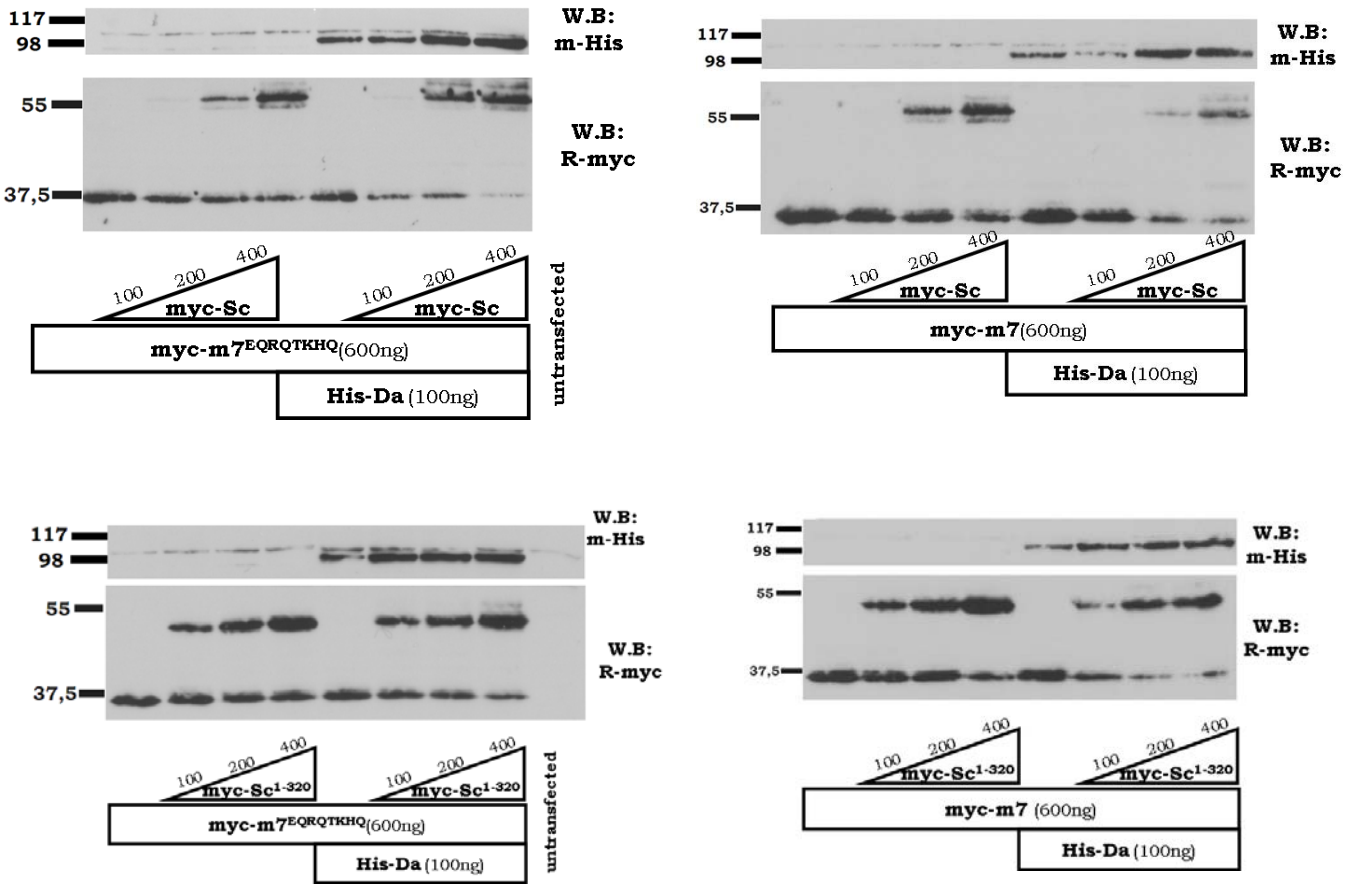
Μερικά από τα δείγματα των εικόνων 1-4 τα ηλεκτροφορήσαμε στο ίδιο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης ώστε να μπορούμε να κάνουμε πιο άμεσες συγκρίσεις της καταστροφής του m7 από τις διάφορες μορφές του Scute απουσία (εικόνα 7) ή παρουσία εξωγενώς προσφερόμενου Da (εικόνα 8). Για λόγους περιορισμού του χώρου στο πηκτωμα, επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε τις συγκεντρώσεις 200 και 400 ng του Scute στην περίπτωση που δεν είχαμε Da, και 100 ng και 200 ng όταν είχαμε. Φαίνεται στις εικόνες αυτές πιο ξεκάθαρα ότι απουσία Da, το m7 καταστρέφεται αποτελεσματικά από το Sc και το ScAPAA, ενώ αμελητέα από το Sc1-320 και το ScRQEQ. Παρουσία αυξημένων επιπέδων Da, το σκηνικό διαφοροποιείται κάπως αφού πλέον το Sc1320 είναι σε θέση να καταστρέψει αρκετά αποτελεσματικά το m7, ενώ το ScRQEQ καταστρέφει χειρότερα το m7 και παρουσία Da.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το φαινόμενο ότι ενώ προσφέροντας αυξημένες συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης Sc και κρατώντας σταθερά τα επίπεδα του m7 και του Da, βλέπουμε καταστροφή του m7, την ίδια στιγμή η πρωτεΐνη Da σταθεροποιείται. Υπενθυμίζουμε στο σημείο αυτό ότι όλα τα πλασμίδια που χρησιμοποιούμε για να υπερεκφράσουμε τις πρωτεΐνες έχουν τον ίδιο υποκινητή (actin 5C).), Επίσης υπενθυμίζουμε ότι οι όγκοι φόρτωσης στα πηκτώματα έχουν εξισορροπηθεί με βάση το γονίδιο αναφοράς act5c-luc για καλύτερη ποσοτικοποίηση. Το φαινόμενο αυτό να αυξάνεται το Da παρουσία του Sc, ενώ την ίδια στιγμή το m7 να μειώνεται μας καθησυχάζει επιπλέον ότι δεν πρόκειται για επίδραση του αυξανόμενου Sc στον υποκινητή act5C, μιας και θα έπρεπε οι πρωτεΐνες Da και m7 να συμπεριφέρονται το ίδιο. Πως λοιπόν δικαιολογείται αυτή η διαφορετική συμπεριφορά των πρωτεϊνών Da και m7; Είχαμε παρατηρήσει και νωρίτερα ότι ο ετεροδιμερισμός της πρωτεΐνης Da με την πρωτεΐνη Sc, οδηγεί σε σταθεροποίηση της Da, ανεξάρτητα αν το σύμπλοκο μπορεί ή όχι να δεθεί στο DNA, αν η πρωτεΐνη Sc φωσφορυλιώνεται, ή αν έχει την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής.

Το γεγονός ότι παρατηρούμε μεγαλύτερη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης Da από την Sc1320 σε σύγκριση με το ScWT, ScAPAA και ScRQEQ ενώ προσφέρουμε τα ίδια μόρια mRNA (πλασμιδίου) στα κύτταρα, μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι το Sc1320 είναι περισσότερο σταθερή πρωτεΐνη, οπότε στο "τέλος της μέρας" περισσότερα μόρια Da, ετεροδιμερίζονται με το Sc^{1-320}. Ένας άλλος ενδεχομένως παράγοντας για τον οποίο παρατηρούμε σταθεροποίηση του Da, παρουσία m7, όσο πρωτεΐνη Sc προσθέτουμε είναι το γεγονός ότι το m7 καταστρέφεται. Όπως είχαμε δει και στην προηγούμενη ενότητα το m7 μπορεί να μειώσει τα επίπεδα του Da. Επομένως αρχικά απουσία Sc, το m7 ασκεί το μέγιστο της καταστροφικής του δράσης στο Da, ενώ

προσθέτοντας Sc και καταστρέφοντας το m7 μειώνουμε ταυτόχρονα και το δυναμικό της καταστροφής του Da.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δεν κάνουν ξεκάθαρο κατά πόσο η καταστροφή του m7 από το Scute απουσία εξωγενώς προσφερούμενου Da εμπλέκει την ενδογενή και σε χαμηλά επίπεδα, ποσότητα Da που υπάρχει στα κύτταρα S2. Για να προσεγγίσουμε αυτό το ερώτημα χρησιμοποιήσαμε την μεταλλαγμένη μορφή του m7, το m7EQRQTKHQ, το οποίο όπως έχουμε δείξει δεν αλληλεπιδρά με το Da. Και στην περίπτωση του m7EQRQTKHQ, το Sc1320 το καταστρέφει λιγότερο αποτελεσματικά σε σύγκριση με το Sc αγρίου τύπου. Παρουσία Da, το Sc συνεχίζει να καταστρέφει πιο αποτελεσματικά το m7EQRQTKHQ, σε σχέση με το Sc1320. Αυτό δεν συμβαίνει στην περίπτωση του m7, όπου παρουσία του Da, το Sc1320 καταστρέφει εξίσου αποτελεσματικά το m7, όπως το κάνει και το Sc.

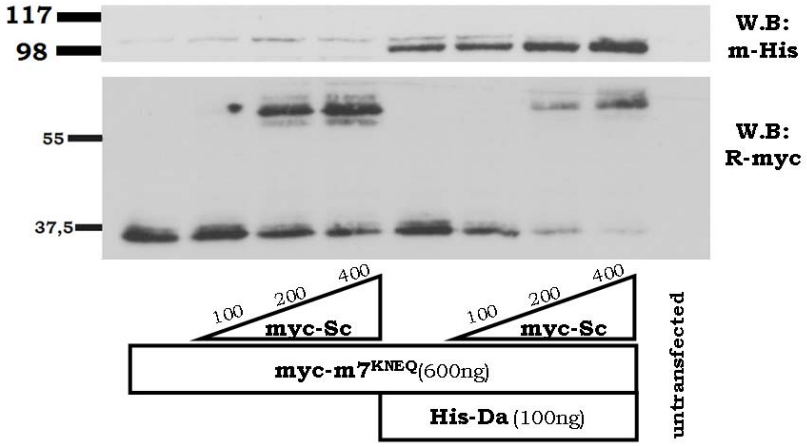


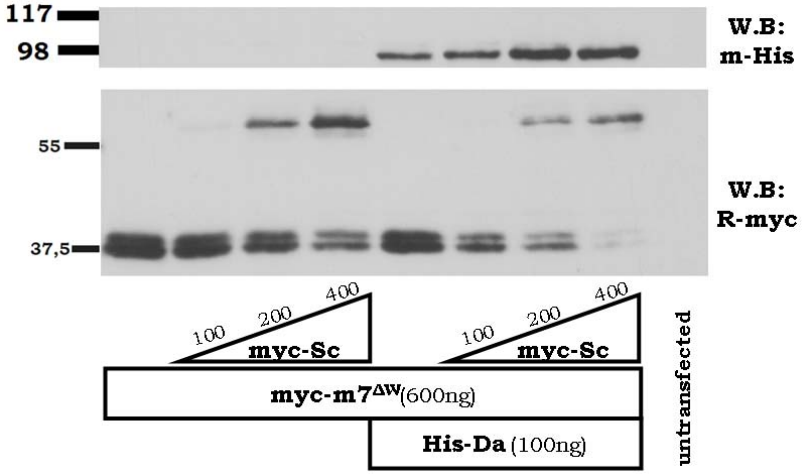
Για κάνουμε μια μικρή σύνοψη, φαίνεται ότι απουσία αυξημένων επίπεδων Da, όπου τα μόρια του Sc που υπερεκφράζονται δεν βρίσκονται όλα ετεροδιμερισμένα με το Da, ο κύριος τρόπος αλληλεπίδρασης του Sc με το m7 αποτελεί η περιοχή TAD του Sc και η bHLH του m7. Οπότε η καταστροφή του m7 του m7EQRQTKHQ

παρουσιάζουν την ίδια συμπεριφορά κατά την υπερέκφραση του Sc και του Sc1320. Όμως παρουσία Da, η αλληλεπίδραση και επομένως η καταστροφή του m7 από το Sc, μπορεί να συμβεί είτε μέσω του TAD του Sc, είτε μέσω του AD1 του Da. Η ύπαρξη κάποιας καταστροφής του m7EQRQTKHQ παρουσία Da από το Sc1320, αν και μειωμένη σε σύγκριση με το m7, μπορεί να εξηγηθεί ενδεχομένως είτε από την ασθενή αλληλεπίδραση που είχαμε παρατηρήσει να υπάρχει μεταξύ Sc1320 και m7, είτε από την ασθενή αλληλεπίδραση που παραμένει μεταξύ m7EQRQTKHQ και Da. Αυτή η ασθενής αλληλεπίδραση είναι σε θέση να οδηγήσει στην καταστροφή το m7EQRQTKHQ, ενώ το Sc1320 σε αυτό το σύμπλοκο δεν επηρεάζεται από την αλληλεπίδραση αυτή. Σε αυτό το συμπέρασμα είχαμε καταλήξει και στην προηγούμενη ενότητα, αλλά και εδώ στην εικονα 9 βλέπουμε όταν στα σύμπλοκα Sc/m7 και Sc1320/m7 βάλουμε μια μικρή ποσότητα Da, τα Sc και Sc1320 να μειώνονται, όπως μειώνονται και τα m7. Αντίθετα όταν στα σύμπλοκα Sc/m7EQRQTKHQ και Sc1320/m7EQRQTKHQ προσθέσουμε μια μικρή ποσότητα Da, τα Sc και Sc1320 δεν επηρεάζονται, ενώ το m7EQRQTKHQ συνεχίζει να καταστρέφεται. Ίσως ένα λιγάκι επιπόλαιο συμπέρασμα να λέει ότι η ισχυρή αλληλεπίδραση του m7 με το σύμπλοκο Da/Sc μέσω των TADs τους, χρειάζεται για την καταστροφή του Sc, ενώ αρκεί και μια ασθενής αλληλεπίδραση των τριών για να καταστραφεί το m7. Δεν αποκλείεται στην τελευταία περίπτωση να μεσολαβεί μια τέταρτη πρωτεΐνη που να γεφυρώνει ασθενώς τις πρωτεΐνες Da/Sc/m7.

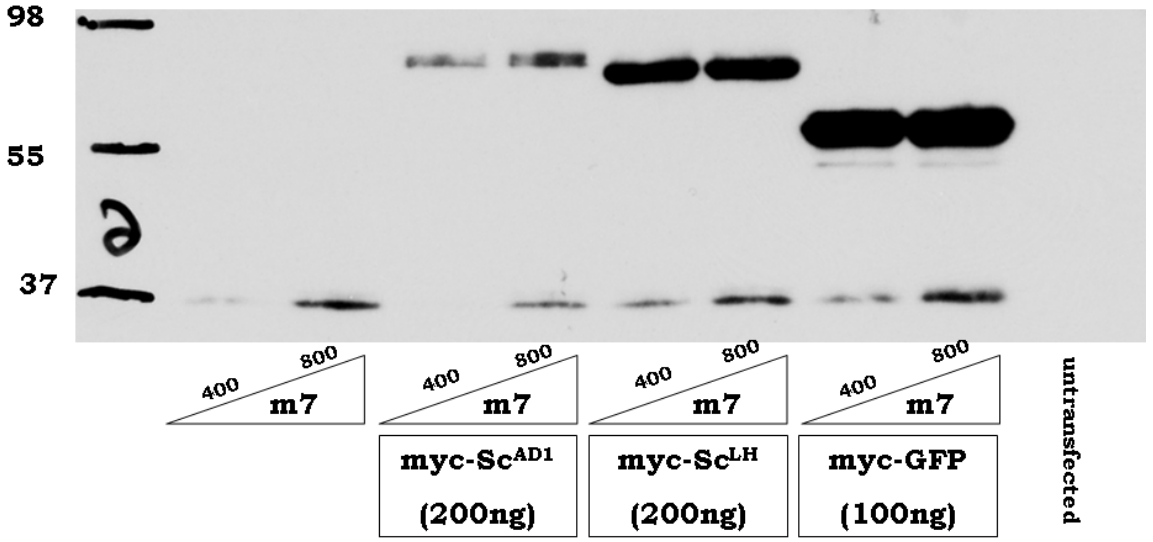
Παράλληλα ελέγξαμε την αναγκαιότητα της πρόσδεσης της m7 στο DNA για να καταστραφεί από τις Da/Sc. Διαπιστώσαμε ότι η μεταλλαγμένη μορφή του m7, m7KNEQ, που δεν δένεται στο DNA, καταστρέφεται πολύ αποτελεσματικά από το Sc και η καταστροφή αυτή ενισχύεται με την προσθήκη της πρωτεΐνης Da. Επομένως δεν χρειάζεται η πρόσδεση του m7 στο DNA για να καταστραφεί. Αλλά να υπενθυμίσουμε ότι η πρόσδεση του Sc στο DNA επηρέαζε σε μεγάλο βαθμό την αποικοδόμηση του m7.

Μια άλλη παράμετρο που θελήσαμε να ελέγξουμε ήταν κατά πόσο το Groucho, χρειάζεται για την καταστροφή του m7 από το Da/Sc. Είχαμε δει στην προηγούμενη ενότητα ότι το Groucho χρειάζοταν για την καταστροφή του Sc από το m7. Αυξημένες συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης Sc οδηγούσε στην καταστροφή του myc-m7ΔW (το οποίο δεν αλληλεπιδρά με το Groucho). Έτσι λοιπόν ενώ το myc-m7ΔW δεν κατέστρεφε το Sc, αυτό καταστρεφόταν πολύ αποτελεσματικά από το Sc.





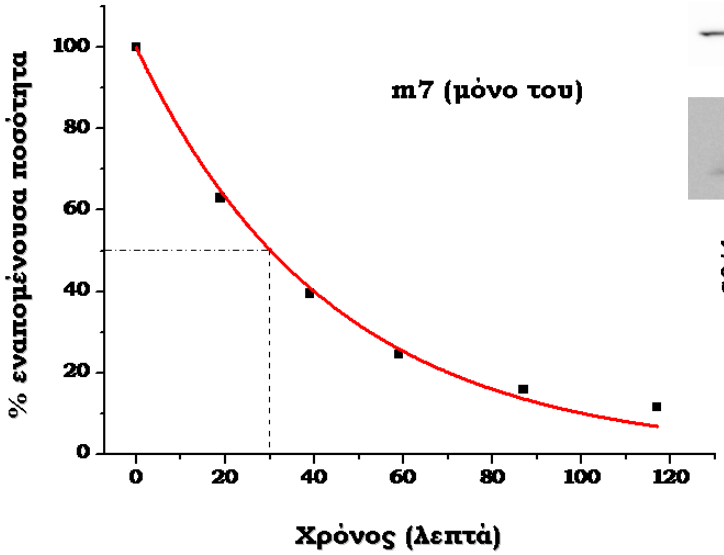
Παράλληλα παρατηρήσαμε ότι και το ScAD1 μπορεί να καταστρέψει το m7, ενώ το ScLH όχι εμφανώς και η GFP καθόλου.

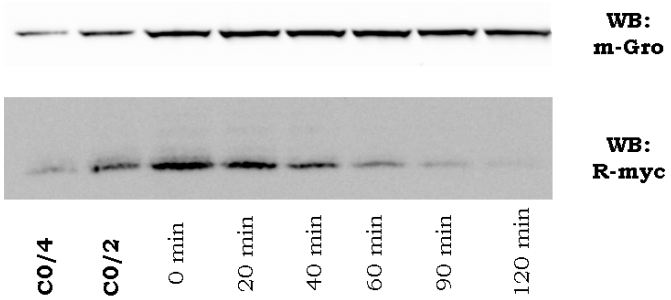


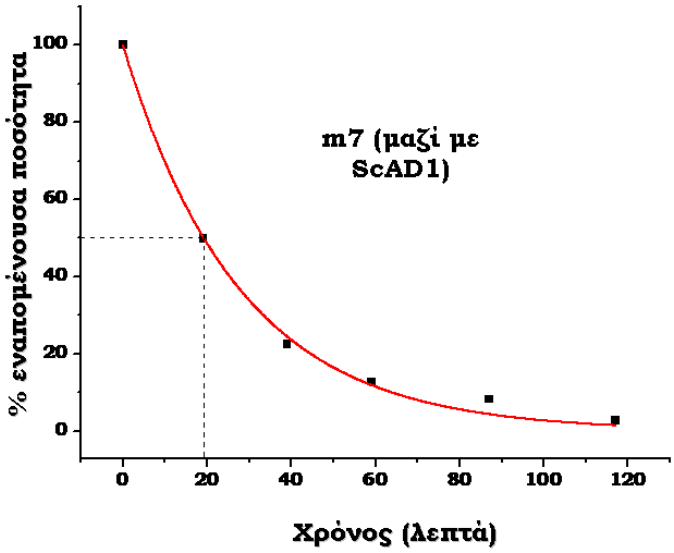
Στην παραπάνω εικόνα βλέπουμε οι δύο συγκεντρώσεις του m7 (400 και 800) να επηρέαζονται αρκετά παρουσία ScAD1, αλλά όχι ιδιαίτερα από το ScLH και καθόλου από την GFP.

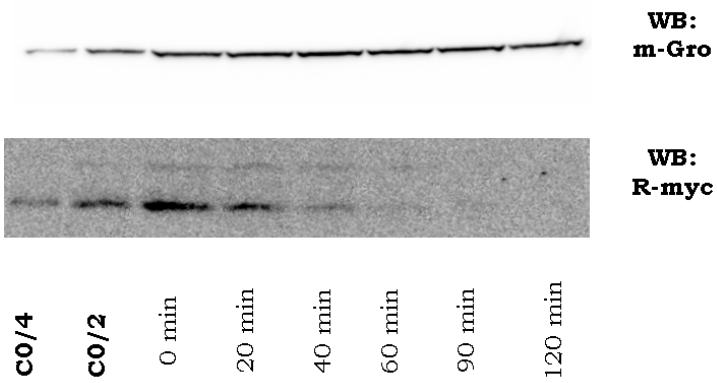
Πριν κλείσουμε αυτήν την ενότητα να πούμε ότι έχει γίνει μια σειρά πειραμάτων μέτρησης με κυκλοεξιμίδιο του χρόνου ημιζωής του m7. Έχει βρεθεί ότι είναι πολύ ασταθής πρωτεΐνη με χρόνο ημιζωής που κυμαίνεται από 30-40 λεπτά.

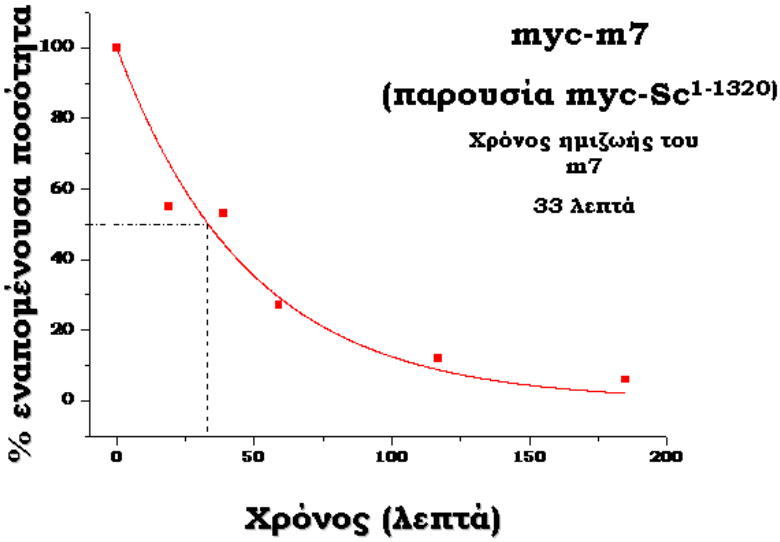
Όταν στο πείραμα μαζί με το m7 προσθέσαμε ScAD1 ο χρόνος του μειώθηκε στα 19 λεπτά, ενώ όταν μαζί με το m7 εκφράσαμε το myx-Sc1320 ο χρόνος ημιζωής του παρέμενε περίπου στα 33 λεπτα.

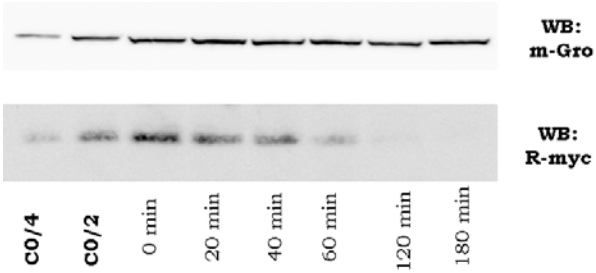












Γενικά μας είναι πιο εύκολο να μετρήσουμε την μείωση της ημιζωής του m7 παρουσία του Sc, παρά την αντίθετη καταστροφή στην οποία αναφερθήκαμε στο κεφάλαιο Β. Δηλαδή είναι σχετικά λίγα τα πειράματα (αλλά συμβαίνει) στα οποία έχουμε μετρήσει τον χρόνο ημιζωής του Sc να μειώνεται παρουσία m7. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι βάζοντας κυκλοεξιμίδιο το m7 καταστρέφεται πολύ γρήγορα και δεν προλαβαίνει να καταστρέψει το Sc ώστε να γίνει αντιληπτή η μείωσή του. Μία άλλη μεταβλητή μπορεί να είναι ότι η καταστροφή του Scute από το m7 χρησιμοποιεί μια λιγάση η οποία έχει μικρό χρόνο ημιζωής (και από αυτό του m7) και αυτή αποτελεί τον αδύναμο κρίκο για αξιόπιστη μείωση της ημιζωής του Sc από το m7.

Για αυτόν τον λόγο προσπαθήσαμε στα τελευταία πειράματα που κοιτούσαμε την καταστροφή των μεταγραφικών μας παραγόντων να σιγουρευόμαστε ότι δείγματα κανονικοποίησης είναι τα πρέποντα.

Συνοψίζοντας μπορούμε να επισημάνουμε τις ομοιότητες και τις διαφορές που παρουσιάζουν οι αμοιβαίες καταστροφές του Sc από το m7.

Και οι δύο καταστροφές χρειάζονται την συμπλοκοποίηση των πρωτεϊνών, η οποία ευνοείται παρουσία Da. Η πρόσδεση του m7 στο DNA δεν χρειάζεται σε καμία καταστροφή. Η φωσφορυλίωση του Sc χρειάζεται για την καταστροφή του από το m7, αλλά δεν χρειάζεται για να καταστρέψει το m7. Η πρόσδεση του Sc χρειάζεται για την αποτελεσματική καταστροφή του m7, αλλά όχι για να καταστραφεί αυτό από το m7. Το Groucho συμμετέχει στην καταστροφή του Scute από το m7, αλλά δεν έχει κανένα ρόλο στην αντίθετη καταστροφή. Το γεγονός ότι υπάρχουν διαφορές μας κάνει να

πιστεύουμε ότι το σύμπλοκο Da/Sc/m7 στρατολογεί κάμποσους διαφορετικούς αποικοδομητικούς παράγοντες (πχ λιγάσες ουβικουϊτίνης) οι οποίοι στοχεύουν τα διάφορα συστατικά του συμπλόκου (Da, Sc, m7). Οι διαφορετικοί αυτοί παράγοντες φαίνεται να έχουν διαφορετικές απαιτήσεις για τη στρατολόγησή τους.

Στην παρούσα διατριβή προσπαθήσαμε να μελετήσουμε έναν νεό μηχανισμό ανταγωνισμού των προνευρικών πρωτεϊνών και των E(spl). Η αμοιβαία αποικοδόμησή τους θέτει μια νεά μεταβλητή στο σύστημα, η οποία ενδεχομένως να επηρεάζει την ανάπτυξη και την κυτταρική τύχη.

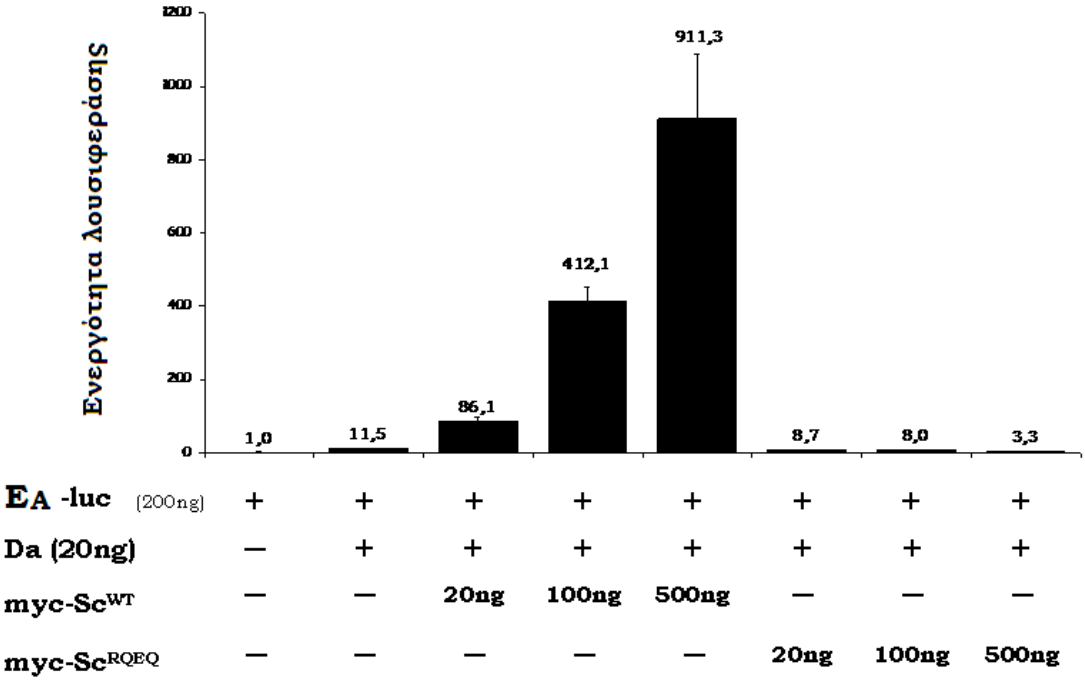
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α: Χαρακτηρισμός του ScRQEQ.

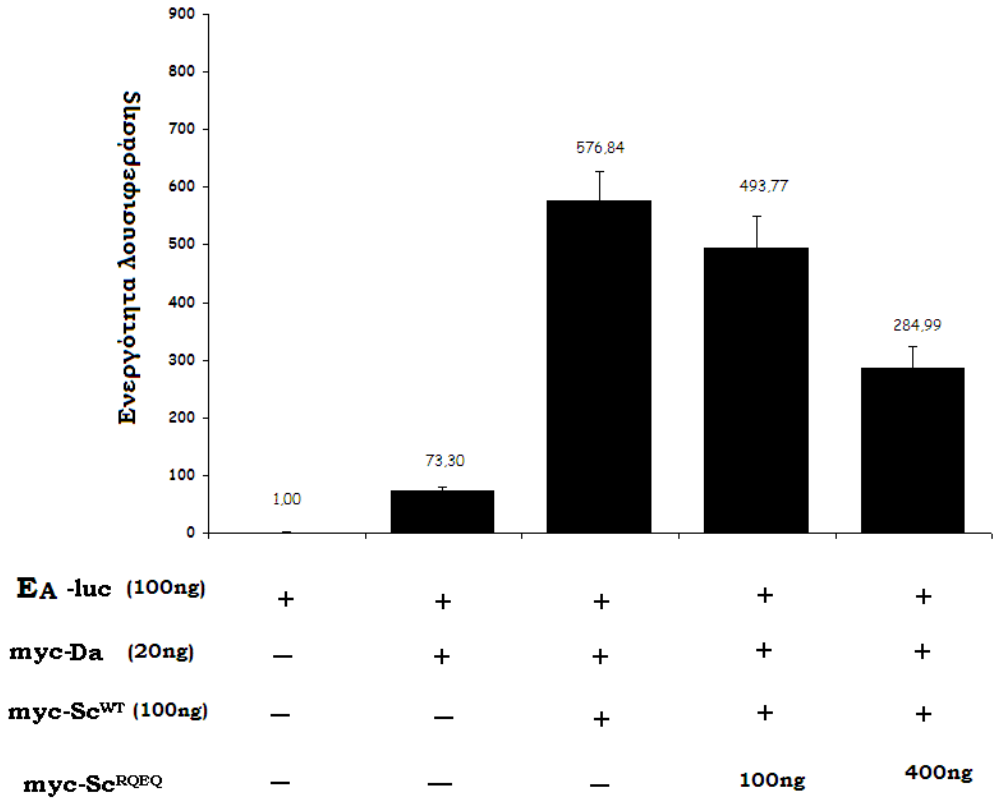
Στην πορεία των πειραμάτων μας θελήσαμε να δημιουργήσουμε μια μορφή του Scute που επιλεκτικά να έχει χάσει την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA. Όλες οι bHLH πρωτεΐνες ετερο- ή ομοδιμερίζονται μέσω της περιοχής HLH και προσδένονται στο DNA σε μοτίβα E-box μέσω της βασικής τους περιοχής (basic domain). Μεταλλάξαμε συγχρόνως την αργινίνη στην θέση 104 και το γλουταμινικό στην θέση 108 σε γλουταμίνες (R104→Q, E108→Q). Η απόφασή μας αυτή στηρίχτηκε στην ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου της πρωτεΐνης MyoD με το DNA, όπου φαίνεται τα αντίστοιχα αμινοξέα να έρχονται σε άμεση επαφή με το DNA (Ma et al. 1994). Άλλωστε μεταλλαγές στα αντίστοιχα αμινοξέα της βασικής περιοχής του m7 έδειξαν ότι η μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης (που την αποκαλούμε $m7^{KNEQ}$) να έχει χάσει την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA (Jimenez and Ish-Horowicz 1997).
Συντήξαμε την πρωτεΐνη με τον επίτοπο myc στο αμινοτελικό άκρο, ώστε να μπορούμε να την ανιχνεύουμε με ανοσοαποτύπωση.

Da	**(555)**	**RRQANNARERIR**
Scute	**(103)**	**RR---NARERNR**
Sc^{RQEQ}	**(103)**	**RQ---NARQRNR**
Ato	**(256)**	**RRLAANARERRR**
MyoD	**(162)**	**RRKAATMRERRR**
m7	**(14)**	**RKVMKPLLERKR**
$m7^{KNEQ}$	**(14)**	**RNVMKPLLQRKR**

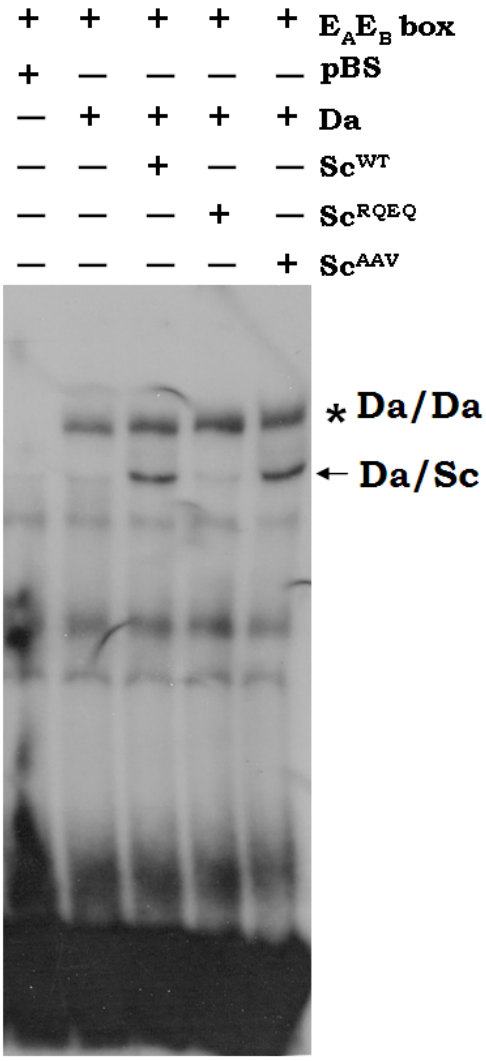
Πραγματοποιήσαμε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης στην κυτταρική σειρά S2 και ενεργοποίησης ενός γονιδίου αναφοράς, η έκφραση του οποίου οδηγείται από 8 μοτίβα πρόσδεσης E1 (μοτίβα EA-box από τον ενισχυτή SMC του γόνιδίου sc). Συγχρόνως συνεκφράζαμε την πρωτεΐνη Da, ώστε να ευνοήσουμε την δημιουργία ετεροδιμερών Da/Sc. Παρατηρήσαμε ότι ενώ η αγρίου τύπου πρωτεΐνη Sc μπορεί να ενεργοποιήσει το γονίδιο αναφοράς, το ScRQEQ έχει χάσει την μεταγραφική του ενεργότητα. Μάλιστα παρατηρούμε ότι τα βασικά επιπέδα ενεργοποίησης του γονιδίου αναφοράς μειώνονται (από 11,5 μονάδες σε 3,3) όσο προσθέτουμε την πρωτεΐνη ScRQEQ. Μία πιθανή εξήγηση για αυτό είναι ότι το ScRQEQ ετεροδιμερίζεται με το ενδογενές Da και μπλοκάρει την δημιουργία ομοδιμερών συμπλόκων Da, τα οποία όπως έχουμε ήδη αναφέρει, έχει δειχτεί ότι έχουν κάποια ικανότητα πρόσδεσης στο DNA και ενεργοποίησης της μεταγραφής. Στη συνέχεια ελέγξαμε τη δυνατότητα το ScRQEQ να

εκτοπίζει το Sc από το σύμπλοκο Da/Sc. Πράγματι όταν σε παροδικές διαμολύνσεις προσθέσαμε αυξημένες συγκεντρώσεις ScRQEQ σε προϋπάρχων σύμπλοκο Da/Sc, παρατηρήσαμε η ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς να μειώνεται (από 576 στις 285 μονάδες). Οπότε κατά αυτόν τον τρόπο το ScRQEQ, δρα επικρατώς αρνητικά (dominant negative), εκτοπίζοντας την αγρίου τύπου πρωτεΐνη Sc από το Da και με αυτόν τον τρόπο μειώνει την ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς.





Στη συνέχεια προχωρήσαμε σε πειράματα υστέρησης κινητικότητας για να ελέγξουμε την ικανότητα πρόσδεσης in vitro στο DNA. Συνθέσαμε in vitro τις πρωτεΐνες με την τυποποιημένη συσκευασία (kit) TNT/T7 Coupled Reticulocyte Lysate System της Promega. Επωάσαμε τις in vitro μεταφρασμένες πρωτεΐνες με ραδιοσημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο που περιέχει μία θέση πρόσδεσης ΕΑ και μία ΕΒ (η τελευταία δεν παίζει καποιο ρόλο στο παρόν πείραμα). Όπως φαίνεται και στην εικόνα το Da μπορεί να προσδεθεί στο DNA ως ομοδιμερές (αστερίσκος). Παρουσία αγρίου τύπου Sc, δημιουργούνται συγχρόνως και ετεροδιμερή Da/Sc σύμπλοκα (βέλος) τα οποία μετατοπίζονται γρηγορότερα στο πήκτωμα ακρυλαμίδης λόγω του μικρότερου μοριακού βάρους του συμπλόκου Da/Sc σε σύγκριση με το σύμπλοκο Da/Da. Με τα πειράματα αυτά επιβεβαιώσαμε την ανικανότητα του ScRQEQ να δεθεί στο DNA. Συγχρόνως επιβεβαιώσαμε την ικανότητα της μεταλλαγμένης, σε θέσεις φωσφορυλίωσης, μορφής του Sc (αποκαλούμενο Sc^{AAV}) να ετεροδιμερίζεται με το Da και να προσδένεται στο DNA.



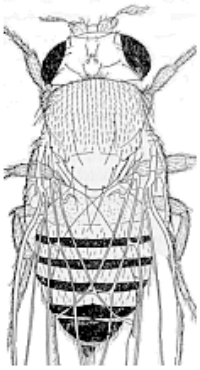
Εν συνεχεία θελήσαμε να μελετήσουμε και in vivo την δράση της πρωτεΐνης ScRQEQ. Δημιουργήσαμε διαγονιδιακές σειρές Δροσόφιλας που φέρουν το myc-ScRQEQ, υπό τον έλεγχο UAS στοιχείων πρόσδεσης της πρωτεΐνης GAL4. Υπερεκφράζοντας τις πρωτεΐνες με το στέλεχος-οδηγό pnr-Gal4, ελέγξαμε την δράση του μεταγραφικού παράγοντα σε προνύμφη τρίτου σταδίου. Τα στελέχη μας έφεραν ταυτόχρονα και το γονίδιο αναφοράς της β-γαλακτοσιδάσης κάτω από τον έλεγχο 8 μοτίβων πρόσδεσης E_A, το συγκεκριμένο γονίδιο αναφοράς το αποκαλούμε E1x4_lacZ 1. Όπως φαίνεται και στην εικόνα το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου αναφοράς συμπίπτει με τις περιοχές των προνευρικών συναθροισμών, με δεδομένο ότι αυτό ενεργοποιείται από την πρόσδεση των ενδογενών προνευρικών πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα από το σύμπλοκο Da/Sc. Υπερκφράζοντας εκτοπικά στην περιοχή του pnr την αγρίου τύπου

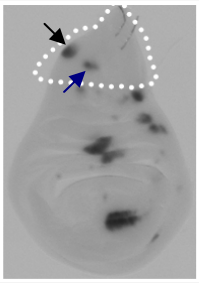
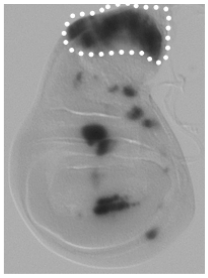
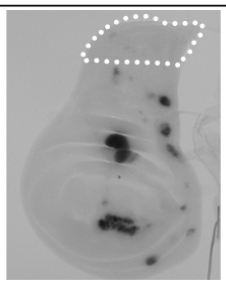
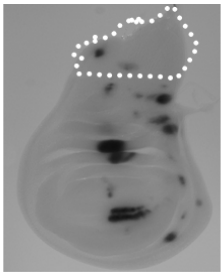
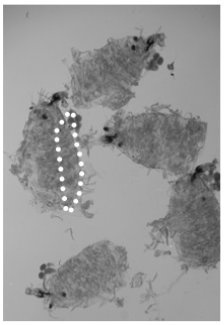
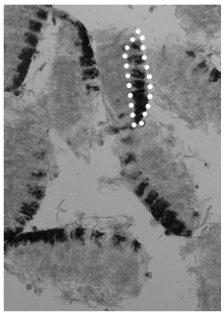
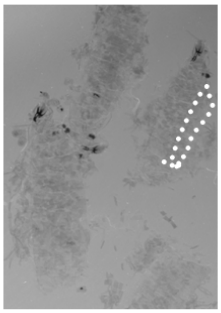
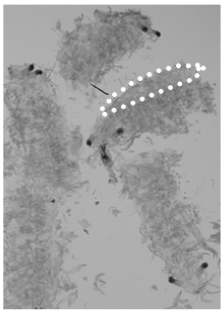
πρωτεΐνη Sc (διαγονιδιακή σειρά No9), το οποίο ετεροδιμερίζεται με το ενδογενές Da, βλέπουμε ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς μας σε όλη την περιοχή του pnr (η οποία οριοθετείται στις εικόνες μας με την άσπρη στικτή γραμμή) και εκτός των ορίων των προνευρικών συναθροισμών dorsocentral και scutelar (μάυρο και μπλε βελάκι αντίστοιχα). Ενεργοποίηση βλέπουμε επίσης και κατά μήκος του κεντρικού τμήματος του σώματος της προνύμφης αφού και εκεί επάγεται η έκφραση του Sc από το pnr-Gal4. Αντίθετα αν αντί του Sc^{WT} υπερεκφράσουμε την Sc^{RQEQ} (διαγονιδιακή σειρά No 13α) παρατηρούμε ότι όχι μονο δεν ενεργοποιείται το γονίδιο αναφοράς, αλλά επιπλέον καταστέλεται και η έκφρασή του στις περιοχές των προνευρικών συναθροισμών, dorsocentral και scutelar. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τα πειράματα στην κυτταρική σειρά S2, αφού μπορεί να εξηγηθεί με ετεροδιμερισμό του ScRQEQ με το ενδογενές Da και εκτοπισμό των αγρίου τύπου μορίων Sc. Τα σύμπλοκα αυτά έχοντας χάσει την ικανότητα πρόσδεσης δεν ενεργοποιούν την μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς. Κάποιες διαγονιδιακές σειρές του UAS-Sc^{RQEQ}, όπως για παράδειγμα η 54α που φαίνεται την εικόνα, είχαν μειωμένη την ικανότητα να αναιρούν την ενεργότητα των ενδογενών πρωτεϊνών, αλλά ποτέ δεν ένεργοποίησαν τον E1x4 γονίδιο αναφοράς. Η μειωμένη δράση αυτή μπορεί να εξηγηθεί από τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης του Sc^{RQEQ}, με αποτέλεσμα την μικρότερη ικανότητα ανταγωνισμού των ενδογενών πρωτεϊνών.

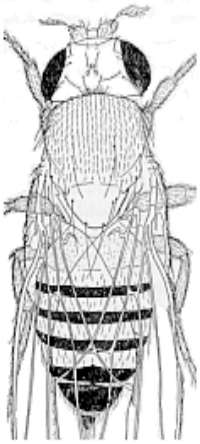
Έχοντας επιβεβαιώσει την ανικανότητα του ScRQEQ να ενεργοποιεί την μεταγραφή, ελέγξαμε την επίδραση της εκτοπικής υπερέκφρασής του στην ικανότητα νευρικής διαφοροποίησης. Όπως έχουμε αναφέρει οι μακροχαίτες και οι μικροχαίτες είναι μία κατηγορία εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων του περιφερικού νευρικού συστήματος, η γένεση των οποίων πυροδοτείται από ένα παλμό έκφρασης του Sc. Υπερεκφράζοντας με το στέλεχος οδηγό pannier-Gal4 (εικόνα A) ή το apterous-Gal4 (εικόνα B) στις περιοχές που οριοθετούνται με την άσπρη στικτή γραμμή το αγρίου τύπου Sc (διαγ. Σειρά No9) βλέπουμε την δημιουργία επιπλέον μακροχαιτών. Αν αντ' αυτού, υπερκφράσουμε την μεταλλαγμένη μορφή του ScRQEQ (διαγονιδιακή σειρά 13α) στην περιοχή pnr ή apterous όχι μόνο δεν βλέπουμε εκτοπικές μακροχαίτες, αλλά για άλλη μία φορά βλέπουμε την αρνητική δράση του μεταλλάγματος, δηλαδή να λείπουν μακροχαίτες και μικροχαίτες. Φαίνεται επίσης και η ποσοτική εξάρτηση της δράσης του ScRQEQ ως επικρατώς αρνητικού μιας και πάλι η ασθενέστερη διαγονιδιακή σειρά 54α δεν φαίνεται ιδιαίτερα να επηρεάζει τον αριθμό των μακρο- ή μικρο-χαιτών.

Τα παραπάνω in vivo και in vitro πειράματα επιβεβαιώνουν ότι καταφέραμε να φτιάξουμε μια μορφή του Sc, που έχει χάσει την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA ενώ διατηρεί την ικανότητα ετεροδιμερισμού με τον μεταγραφικό παρτενέρ του,

Daughterless. Για αυτόν τον λόγο έχει χαθεί και η ικανότητα της πρωτεΐνης Sc^{RQEQ} να ενεργοποιεί τα γονίδια στόχους και την νευρική διαφοροποίηση.

		Χωρίς UAS	UAS-myc-$Sc^{WT_\#9}$	UAS-myc-$Sc^{RQEQ_\#13a}$	UAS-myc-$Sc^{RQEQ_\#54a}$
Ενήλικα άτομα	**pnr-Gal4**				

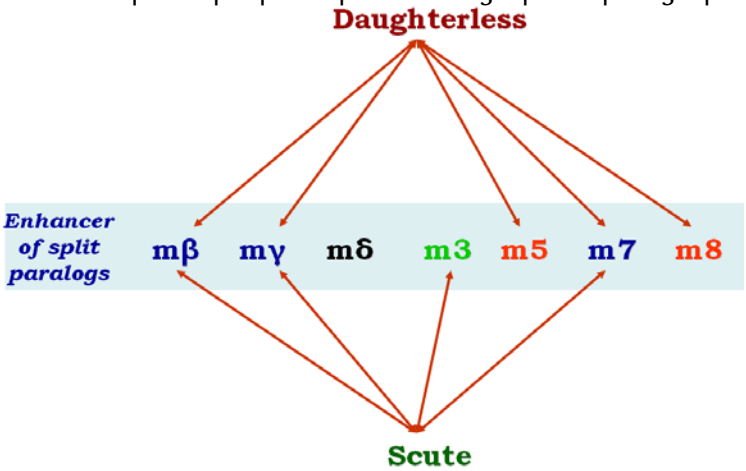
		Χωρίς UAS	UAS-myc-$Sc^{WT_\#9}$	UAS-myc-$Sc^{RQEQ_\#13a}$	UAS-myc-$Sc^{RQEQ_\#54a}$
E1x4_lacZ ; pnr-Gal4	**Αναπτυξιακός δίσκος φτερού**				
	Κουφάρια προνύμφης 3ου σταδίου				

		Χωρίς UAS	UAS-myc-$Sc^{WT_\#9}$	UAS-myc-$Sc^{RQEQ_\#13a}$	UAS-myc-$Sc^{RQEQ_\#54a}$
Ενήλικα άτομα	ap-Gal4				Data not shown

Είναι αξιοσημείωτο ότι το ScRQEQ, παρότι σταθερότερο από το wtSc (κάτι που δείχνεις πειραματικά ακόμα και in vivo, right?), έχει πολύ ασθενή επικρατώς αρνητική δράση, σαν να μην μπορεί να εκτοπίσει πολύ αποτελεσματικά το Sc-wt (ούτε καν στα S2 cells). Σε τί θα μπορούσε να οφείλεται αυτό? Πυρηνικό εντοπισμό? Σταθεροποίηση του Da/Sc συμπλόκου από κάποιον chromatin-bound συμπαράγοντα? Σχηματισμό του συμπλόκου πάνω στο DNA?

Παράρτημα Β: Χαρακτηρισμός του m7EQRQTKHQ

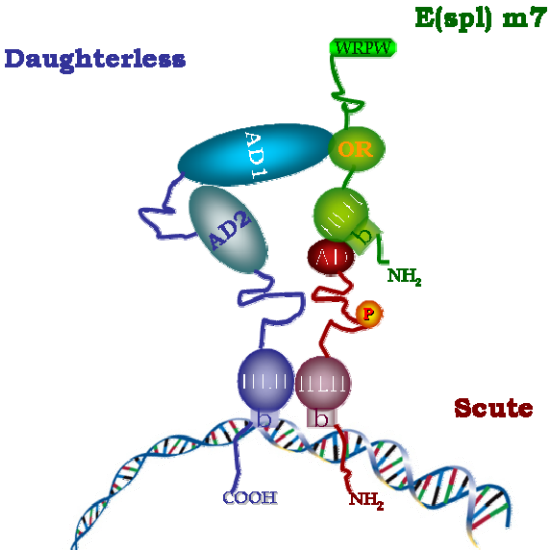
Ήταν γνωστό από προηγούμενες δουλειές του εργαστηρίου μας (Alifragis et al. 1997; Giagtzoglou et al. 2003; Giagtzoglou et al. 2005; Zarifi 2009) ότι οι προνευρικές πρωτεΐνες Daughterless και Scute αλληλεπιδρούν με ένα υποσύνολο των πρωτεΐνων Enhancer of split. Συγκεκριμένα και όπως φαίνεται και στο ακόλουθο σχήμα η πρωτεΐνη Da αλληλεπιδρά ισχυρά με τις E(spl) mβ, mγ, m5, m7 και m8, ενώ η πρωτεΐνη Sc αλληλεπιδρά με τις E(spl) mβ, mγ, m3 και m7. Παρατηρούμε επίσης ότι η E(spl)mδ δεν αλληλεπιδρά με καμία από τις προνευρικές πρωτεΐνες.



Ο Νίκος Γιαγτζόγλου στη διάρκεια της διατριβής του χαρακτήρισε την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης Sc με τις E(spl). Βρήκε, λοιπόν ότι τα τελευταία 25 αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης Scute που αποτελούν συγχρόνως και την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (ScTAD) είναι ικανά και απαραίτητα για την ισχυρή αλληλεπίδραση με τα πρώτα 80 αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης m7. Η περιοχή αυτή του m7 περιλαμβάνει την bHLH περιοχή της πρωτεΐνης (αμινοξέα 15-68). Οπότε απλοποιώντας, συνηθίζουμε να λέμε ότι η bHLH περιοχή του m7, αλληλεπιδρά με την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής της πρωτεΐνης Scute, χωρίς όμως να αποκλείουμε το ενδεχόμενο η αλληλεπίδραση να γίνεται με τα αμινοξέα 1-15 ή 69-80. Βρήκε επίσης ότι και οι υπόλοιπες πρωτεΐνες E(spl) mβ, mγ και m3 αλληλεπιδρούν με την περιοχή ενεργοποίησης του Scute. Η αλληλεπίδραση αυτή βοηθάει στην στρατολόγηση του m7 σε γονίδια στόχους που ενεργοποιεί το σύμπλοκο Da/Sc και στην καταστολή της μεταγραφής, χωρίς να είναι απαραίτητη η άμεση πρόσδεση του m7 στο DNA.

Τα επόμενα χρόνια η Ιωάννα Ζαρίφη χαρακτήρισε τις περιοχές των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση των E(spl) και Daughterless. Βρήκε ότι η μια (εκ των δύο) περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (που αποκαλείται AD1) του Daughterless αλληλεπιδρά με την περιοχή Orange της m7. Είναι ενδιαφέρον ότι και

σε αυτήν την αλληλεπίδραση συμμετέχει μια περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής. Με την ίδια περιοχή του Da αλληλεπιδρούν και οι υπόλοιπες E(spl) πρωτεΐνες mβ, mγ, m5 και m8. Μια σχηματική αναπαράσταση της συμπλοκοποίησης των πρωτεϊνών Da, Sc και E(spl) φαίνεται στο διπλανό σχήμα.

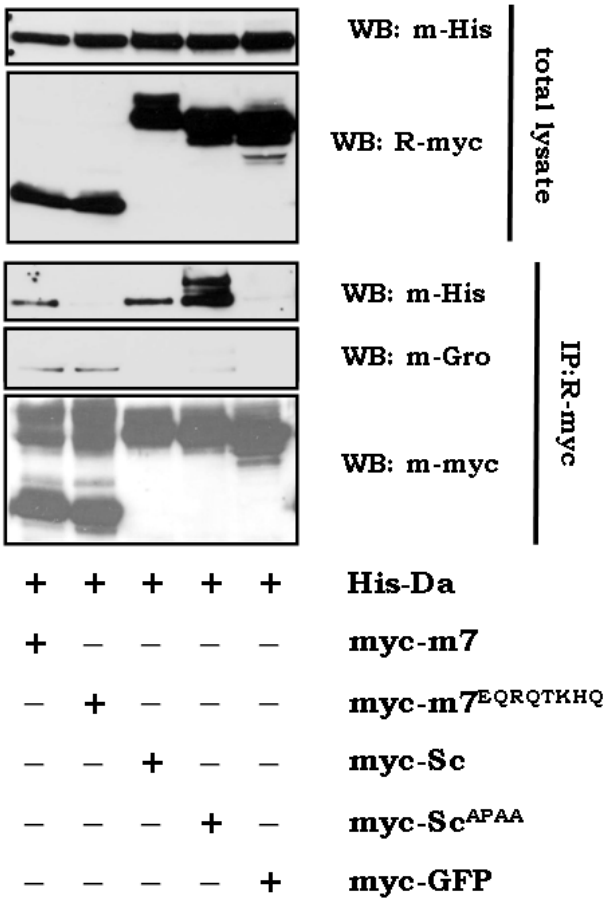


Εκείνη την περίοδο δημιουργήθηκαν 2 μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης m7 σε συντηρημένα αμινοξέα της περιοχής Orange, το m7^{TNHQ} (T114→N, H115→Q) και m7^{NTEK} (N92→T, E93→K). Με πειράματα συστήματος δύο υβριδίων του σακχαρομύκητα βρέθηκε το Da να αλληλεπιδρά με το m7TNHQ, αλλά όχι με το m7NTEK. Στις μύγες παρόλα αυτά το m7NTEK μπορούσε να καταστείλει τον γονίδιο αναφοράς E1x4_lacZ, η έκφραση του οποίου οδηγείται από το προνευρικό σύμπλοκο Da/Sc. Έτσι θελήσαμε να προχωρήσουμε στην δημιουργία νέων μεταλλαγών στην περιοχή Orange, ώστε να καταστρέψουμε το δυνατό περισσότερο την αλληλεπίδραση Da/m7. Αρχικά φτιάξαμε το διπλό μετάλλαγμα m7^{EQRQ} (E93→Q και R96→Q) όπου είχαμε μεταλλάξει συγχρόνως τα αμινοξέα E93 και R96 στα αντίστοιχα αμινοξέα της πρωτεΐνης m3, που όπως είπαμε δεν αλληλεπιδρά με το Da.

```
    E(spl) m5    (85)  PMDSFKNGYMNAVSEISRVMACTPAMSVDVGKTVMTHLGVEFQRML-
    E(spl) m8    (79)  PLDSFKNGYMNAVNEVSRVMASTPGMSVDLGKSVMTHLGRVYKNLQ-
 E(spl) mbeta    (95)  IAESFRAGYVHAANEVSKTLAAVPGVSVDLGTQLMSHLGHRLNYLQ-
E(spl) mgamma    (89)  PAEGFRSGYIHAVNEVSRSLSQLPGMNVSLGTQLMTHLGQRLNQIQ-
E(spl) mdelta    (89)  NLDKFRAGYTQAAYEVSHIFSTVPGLDLKFGTHLMKQLGHQLKDMK-
    E(spl) m3    (94)  HVESFRSGYVHAADQITQVLLQT-QQTDEIGRKIMKFLSTRLIELQT
    E(spl) m7    (79)  PEQSFRAGYIRAANEVSRALASLPRVDVAFGTTLMTHLGMRLNQLE-
       m7EQRQ    (79)  PEQSFRAGYIRAANQVSQALASLPRVDVAFGTTLMTHLGMRLNQLE-
   m7EQRQTKHQ    (79)  PEQSFRAGYIRAANQVSQALASLPRVDVAFGTTLMKQLGMRLNQLE-
      m7TNHQ     (79)  PEQSFRAGYIRAANEVSRALASLPRVDVAFGTTLMNQLGMRLNQLE-
      m7NTEK     (79)  PEQSFRAGYIRAATKVSRALASLPRVDVAFGTTLMTHLGMRLNQLE-
                                     *   *                  **
```

Αντιστοίχηση της περιοχής Orange των πρωτεϊνών E(spl) και των διάφορων μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης m7.

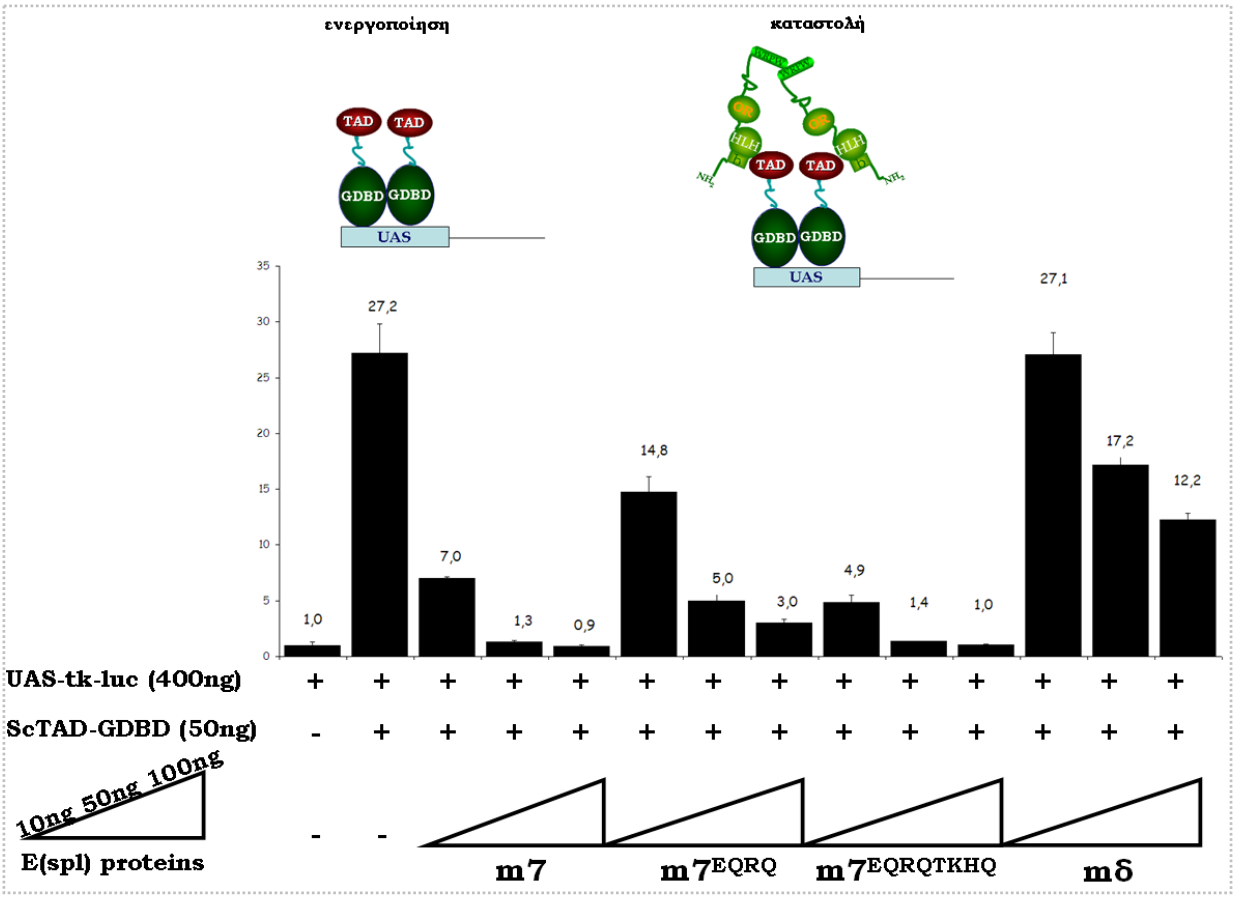
Επιπλέον προχωρήσαμε στη δημιουργία του τετραπλού μεταλλάγματος m7EQRQTKHQ, όπου συγχρόνως με τις μεταλλαγές E93→Q και R96→Q δημιουργήσαμε και τις μεταλλαγές T114→K & H115→Q. Οι μεταλλαγές T114→K και H115→Q στηρίζονται στα αντίστοιχα αμινοξέα της πρωτεΐνης mδ, η οποία δεν αλληλεπιδρά με το Da.

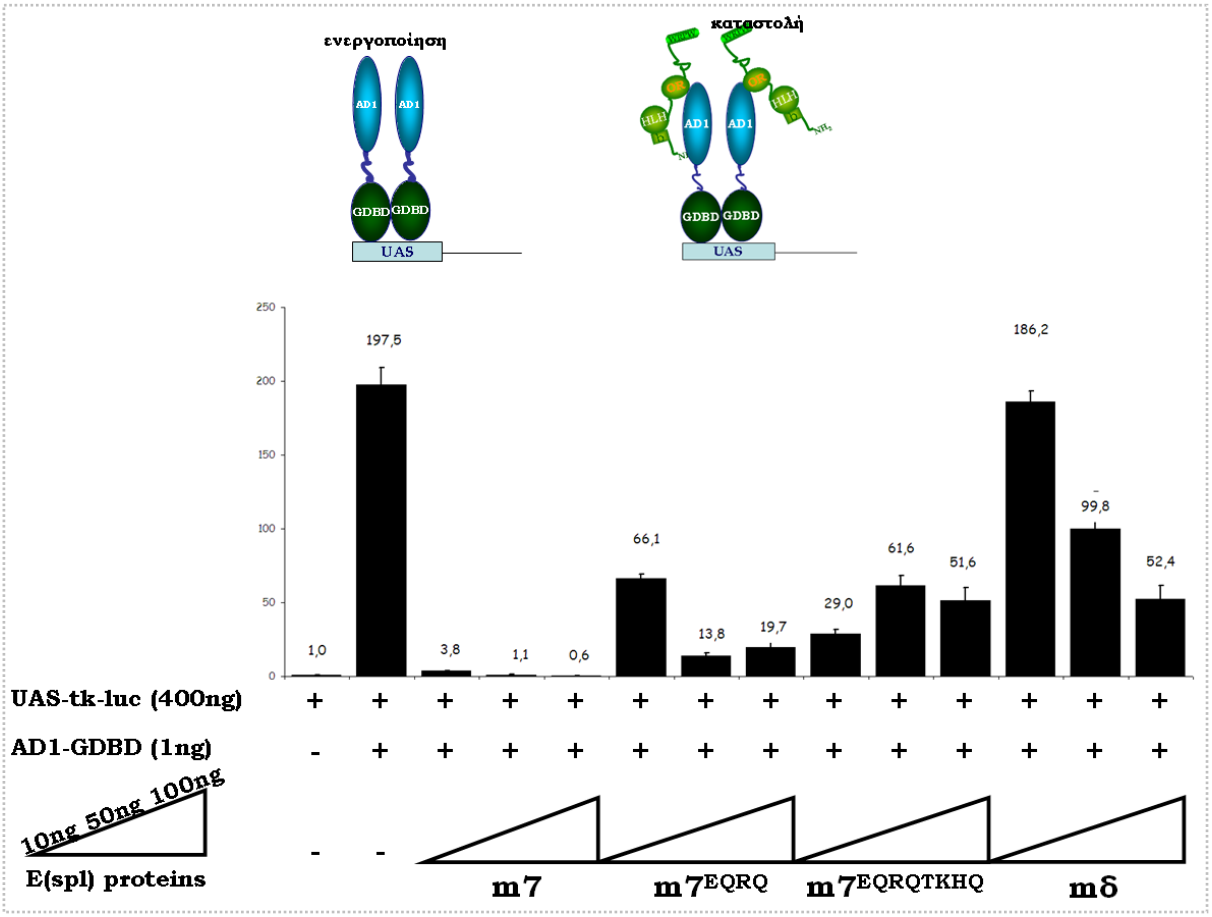


Πραγματοποιήσαμε πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα παροδικά διαμολυσμένων κυττάρων S2 για να ελέγξουμε τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Διαπιστώσαμε ότι η πρωτεΐνη Da (συντηγμένη με τον επίτοπο 6xHis) συνανοσοκατακρημνίζεται με την πρωτεΐνη myc-m7, αλλά όχι με την πρωτεΐνη myc-m7^{EQRQTKHQ}. Ως θετικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήσαμε τις πρωτεΐνες Sc και ScAPAA οι οποίες ανοσοκατακρημνίζουν την πρωτεΐνη 6xHis-Da. Ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήσαμε την myc-GFP η οποία δεν αλληλεπιδρά με το Da. Στα ίδια δείγματα ελέγξαμε αν συνανοσοκατακρημνίζεται ο ενδογενώς εκφραζόμενος μεταγραφικός συγκαταστολέας Groucho. Πράγματι και η πρωτεΐνη m7 και η πρωτεΐνη m7^{EQRQTKHQ} συνανοσοκατακρημνίζουν το Groucho. Ενώ αυτό δεν συμβαίνει, όπως και θα όφειλε, στην περίπτωση της πρωτεΐνης myc-Sc, myc-ScAPAA και myc-GFP.

Με παροδικές διαμολύνσεις στα S2 κύτταρα, ελέγξαμε την ικανότητα του E(spl)m7EQRQTKHQ και το E(spl)m7EQRQ να καταστέλλουν την ενεργοποίηση του UAStkluc γονιδίου αναφοράς από τις χιμαιρικές πρωτεΐνες AD1-GDBD και ScTAD-GDBD. Οι χιμαιρικές πρωτεΐνες GDBD-AD1 και ScTAD-GDBD αποτελούνται από την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του μεταγραφικού παράγοντα Gal4 (Gal4 DNA binding domain, GDBD) και τη περιοχή ενεργοποίησης AD1 του Da ή TAD του Scute αντίστοιχα. Ενώ και οι δυο πρωτεΐνες E(spl)m7EQRQTKHQ και το E(spl)m7EQRQ καταστέλλουν τη δραστικότητα του ScTAD-GDBD όπως η αγρίου τύπου E(spl)m7, δεν μπορούν να καταστείλουν στον ίδιο βαθμό τη δραστικότητα των AD1-GDBD. Μάλιστα το E(spl)m7^{EQRQTKHQ} καταστέλλει λιγοτερο από το m7^{EQRQ} γεγονός που συμφωνεί με την ικανότητα του EQRQ να αλληλεπιδρά με το His-Da σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης (data not shown).

Με δεδομένο το γεγονός ότι το μετάλλαγμα m7TNHQ (T114→N, H115→Q) αλληλεπιδρούσε με το Da, και ότι το m7EQRQ (E93→Q και R96→Q) αλληλεπιδρά με το Da, ενώ το m7EQRQTKHQ (E93→Q, R96→Q, T114→K και H115→Q) δεν φαίνεται


ενεργοποίηση
καταστολή
TAD
TAD
GDBD
GDBD
UAS
35
30
25
20
15
10
5
0
1,0
27,2
7,0
1,3
0,9
14,8
5,0
3,0
4,9
1,4
1,0
27,1
17,2
12,2
UAS-tk-luc (400ng)
ScTAD-GDBD (50ng)
10ng 50ng 100ng
E(spl) proteins
m7
m7EQRQ
m7EQRQTKHQ
mδ


ενεργοποίηση
καταστολή
AD1
AD1
GDBD
GDBD
UAS
250
200
150
100
50
0
1,0
197,5
3,8
1,1
0,6
66,1
13,8
19,7
29,0
61,6
51,6
186,2
99,8
52,4
UAS-tk-luc (400ng)
AD1-GDBD (1ng)
10ng 50ng 100ng
E(spl) proteins
m7
m7EQRQ
m7EQRQTKHQ
mδ

να ανοσοκατακρημνίζεται με το Da, δείχνει ότι χρειάζεται η ταυτόχρονη μεταλλαγή και των 4 αμινοξέων (στα δύο άκρα της περιοχής Orange) ώστε να εμποδίσουμε την αλληλεπίδραση Da/m7. Οι μεταλλαγές αυτές δεν επηρεάζουν την αλληλεπίδραση με την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής του Scute.

Γιατί όμως παρατηρούμε την μερική καταστολή του AD1-GDBD από το $m7^{EQRQTKHQ}$, εφόσον σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης η συμπλοκοποίηση εμποδίζεται; Επίσης παρατηρείται μερική καταστολή του γονιδίου αναφοράς από την πρωτεΐνη mδ, η οποία θεωρητικά δεν αλληλεπιδρά με τα TADs ούτε του Da ούτε του Sc. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι η καταστολή είναι πιο ευαίσθητη δοκιμασία και μία μικρή αλληλεπίδραση που δεν ανιχνευεται με ανοσοκατακρήμνιση μπορεί να έχει επίδραση στην ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς. Μια άλλη εξήγηση είναι το m7EQRQTKHQ να αλληλεπιδρά με το Da μέσω άλλης E(spl) πρωτεΐνης. Οι E(spl) πρωτεΐνες m3 και mβ εκφράζονται στα S2 κύτταρα σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Krejci and Bray 2007). Επίσης η m7 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες m3 και mβ (Alifragis et al. 1997; Koumbanakis and Delidakis 2007) και η mβ αλληλεπιδρά με το Da (Alifragis et al. 1997; Zarifi 2009). Η ύπαρξη αυτών των αλληλεπιδράσεων θα μπορούσε να φέρει το $m7^{EQRQTKHQ}$ σε επαφή με το Da.

Καταφέραμε λοιπόν με την δημιουργία του $m7^{EQRQTKHQ}$ επιλεκτικά να εμποδίσουμε την αλληλεπίδραση του m7 με το Da και να αφήσουμε ανεπηρέαστες τις αλληλεπιδράσεις του m7 με το Sc και το Groucho.

Βιβλιογραφία

Abed, M., Barry, K.C., Kenyagin, D., Koltun, B., Phippen, T.M., Delrow, J.J., Parkhurst, S.M., and Orian, A. Degringolade, a SUMO-targeted ubiquitin ligase, inhibits Hairy/Groucho-mediated repression. *EMBO J* **30**(7): 1289-1301.

Akazawa, C., Sasai, Y., Nakanishi, S., and Kageyama, R. 1992. Molecular characterization of a rat negative regulator with a basic helix-loop-helix structure predominantly expressed in the developing nervous system. *J Biol Chem* **267**(30): 21879-21885.

Alifragis, P., Poortinga, G., Parkhurst, S.M., and Delidakis, C. 1997. A network of interacting transcriptional regulators involved in Drosophila neural fate specification revealed by the yeast two-hybrid system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(24): 13099-13104.

Apidianakis, Y., Nagel, A.C., Chalkiadaki, A., Preiss, A., and Delidakis, C. 1999. Overexpression of the m4 and malpha genes of the E(spl)-complex antagonizes notch mediated lateral inhibition. *Mech Dev* **86**(1-2): 39-50.

Aronheim, A., Shiran, R., Rosen, A., and Walker, M.D. 1993. The E2A gene product contains two separable and functionally distinct transcription activation domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(17): 8063-8067.

Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., and Fortini, M.E. 1995. Notch signaling. *Science* **268**(5208): 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.

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**(21): 2609-2622.

Bain, G., Gruenwald, S., and Murre, C. 1993. E2A and E2-2 are subunits of B-cell-specific E2-box DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* **13**(6): 3522-3529.

Barry, K.C., Abed, M., Kenyagin, D., Werwie, T.R., Boico, O., Orian, A., and Parkhurst, S.M. The Drosophila STUbL protein Degringolade limits HES functions during embryogenesis. *Development* **138**(9): 1759-1769.

Cabrera, C.V. and Alonso, M.C. 1991. Transcriptional activation by heterodimers of the achaete-scute and daughterless gene products of Drosophila. *EMBO J* **10**(10): 2965-2973.

Campuzano, S. and Modolell, J. 1992. Patterning of the Drosophila nervous system: the achaete-scute gene complex. *Trends Genet* **8**(6): 202-208.

Ciechanover, A., Finley, D., and Varshavsky, A. 1984a. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway and mechanisms of energy-dependent intracellular protein degradation. *J Cell Biochem* **24**(1): 27-53.

-. 1984b. Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell* **37**(1): 57-66.

Cinnamon, E., Helman, A., Ben-Haroush Schyr, R., Orian, A., Jimenez, G., and Paroush, Z. 2008. Multiple RTK pathways downregulate Groucho-mediated repression in Drosophila embryogenesis. *Development* **135**(5): 829-837.

Courey, A.J. and Jia, S. 2001. Transcriptional repression: the long and the short of it. *Genes Dev* **15**(21): 2786-2796.

Cubas, P., de Celis, J.F., Campuzano, S., and Modolell, J. 1991. Proneural clusters of achaete-scute expression and the generation of sensory organs in the Drosophila imaginal wing disc. *Genes Dev* **5**(6): 996-1008.

Culi, J. and Modolell, J. 1998. Proneural gene self-stimulation in neural precursors: an essential mechanism for sense organ development that is regulated by Notch signaling. *Genes Dev* **12**(13): 2036-2047.

Delidakis, C. and Artavanis-Tsakonas, S. 1992. The Enhancer of split [E(spl)] locus of Drosophila encodes seven independent helix-loop-helix proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(18): 8731-8735.

Ellenberger, T., Fass, D., Arnaud, M., and Harrison, S.C. 1994. Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes Dev* **8**(8): 970-980.

Finley, D., Ciechanover, A., and Varshavsky, A. 1984. Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell* **37**(1): 43-55.

Fisher, A.L., Ohsako, S., and Caudy, M. 1996. The WRPW motif of the hairy-related basic helix-loop-helix repressor proteins acts as a 4-amino-acid transcription repression and protein-protein interaction domain. *Mol Cell Biol* **16**(6): 2670-2677.

Ghysen, A. and Dambly-Chaudiere, C. 1988. From DNA to form: the achaete-scute complex. *Genes Dev* **2**(5): 495-501.

Giagtzoglou, N., Alifragis, P., Koumbanakis, K.A., and Delidakis, C. 2003. Two modes of recruitment of E(spl) repressors onto target genes. *Development* **130**(2): 259-270.

Giagtzoglou, N., Koumbanakis, K.A., Fullard, J., Zarifi, I., and Delidakis, C. 2005. Role of the Sc C terminus in transcriptional activation and E(spl) repressor recruitment. *J Biol Chem* **280**(2): 1299-1305.

Gomez-Skarmeta, J.L., Rodriguez, I., Martinez, C., Culi, J., Ferres-Marco, D., Beamonte, D., and Modolell, J. 1995. Cis-regulation of achaete and scute: shared enhancer-like elements drive their coexpression in proneural clusters of the imaginal discs. *Genes Dev* **9**(15): 1869-1882.

Gonzalez-Crespo, S. and Levine, M. 1993. Interactions between dorsal and helix-loop-helix proteins initiate the differentiation of the embryonic mesoderm and neuroectoderm in Drosophila. *Genes Dev* **7**(9): 1703-1713.

Gratton, M.O., Torban, E., Jasmin, S.B., Theriault, F.M., German, M.S., and Stifani, S. 2003. Hes6 promotes cortical neurogenesis and inhibits Hes1 transcription repression activity by multiple mechanisms. *Mol Cell Biol* **23**(19): 6922-6935.

Grbavec, D., Lo, R., Liu, Y., and Stifani, S. 1998. Transducin-like Enhancer of split 2, a mammalian homologue of Drosophila Groucho, acts as a transcriptional repressor, interacts with Hairy/Enhancer of split proteins, and is expressed during neuronal development. *Eur J Biochem* **258**(2): 339-349.

Grbavec, D. and Stifani, S. 1996. Molecular interaction between TLE1 and the carboxyl-terminal domain of HES-1 containing the WRPW motif. *Biochem Biophys Res Commun* **223**(3): 701-705.

Heitzler, P., Bourouis, M., Ruel, L., Carteret, C., and Simpson, P. 1996. Genes of the Enhancer of split and achaete-scute complexes are required for a regulatory loop between Notch and Delta during lateral signalling in Drosophila. *Development* **122**(1): 161-171.

Hershko, A. 1983. Ubiquitin: roles in protein modification and breakdown. *Cell* **34**(1): 11-12.

Higa, L.A., Wu, M., Ye, T., Kobayashi, R., Sun, H., and Zhang, H. 2006. CUL4-DDB1 ubiquitin ligase interacts with multiple WD40-repeat proteins and regulates histone methylation. *Nat Cell Biol* **8**(11): 1277-1283.

Hjerpe, R., Thomas, Y., Chen, J., Zemla, A., Curran, S., Shpiro, N., Dick, L.R., and Kurz, T. 2011. Changes in the ratio of free Nedd8 to Ubiquitin triggers neddylation by ubiquitin enzymes. *Biochem J.*

Huang, F., Dambly-Chaudiere, C., and Ghysen, A. 1991. The emergence of sense organs in the wing disc of Drosophila. *Development* **111**(4): 1087-1095.

Huang, Z., Nie, L., Xu, M., and Sun, X.H. 2004. Notch-induced E2A degradation requires CHIP and Hsc70 as novel facilitators of ubiquitination. *Mol Cell Biol* **24**(20): 8951-8962.

Jennings, B.H., Tyler, D.M., and Bray, S.J. 1999. Target specificities of Drosophila enhancer of split basic helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol* **19**(7): 4600-4610.

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**(8): 4355-4362.

Kageyama, R., Ohtsuka, T., Shimojo, H., and Imayoshi, I. 2008. Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells and a revised view of lateral inhibition. *Nat Neurosci* **11**(11): 1247-1251.

Keyes, L.N., Cline, T.W., and Schedl, P. 1992. The primary sex determination signal of Drosophila acts at the level of transcription. *Cell* **68**(5): 933-943.

King-Jones, K., Korge, G., and Lehmann, M. 1999. The helix-loop-helix proteins dAP-4 and daughterless bind both in vitro and in vivo to SEBP3 sites required for transcriptional activation of the Drosophila gene Sgs-4. *J Mol Biol* **291**(1): 71-82.

Knust, E., Schrons, H., Grawe, F., and Campos-Ortega, J.A. 1992. Seven genes of the Enhancer of split complex of Drosophila melanogaster encode helix-loop-helix proteins. *Genetics* **132**(2): 505-518.

Koumbanakis, K.A. and Delidakis, C. 2007. IN VITRO ΚΑΙ IN VIVO ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ bHLH E(SPL) ΣΕ ΣΤΟΧΟΥΣ DNA *Διδακτορική διατριβή* **Πανεπιστήμιο Κρήτης**.

Krejci, A. and Bray, S. 2007. Notch activation stimulates transient and selective binding of Su(H)/CSL to target enhancers. *Genes Dev* **21**(11): 1322-1327.

Kurosu, T. and Peterlin, B.M. 2004. VP16 and ubiquitin; binding of P-TEFb via its activation domain and ubiquitin facilitates elongation of transcription of target genes. *Curr Biol* **14**(12): 1112-1116.

Laney, J.D. and Hochstrasser, M. 1999. Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell* **97**(4): 427-430.

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**(21): 2598-2608.

Ma, P.C., Rould, M.A., Weintraub, H., and Pabo, C.O. 1994. Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell* **77**(3): 451-459.

Mannervik, M., Nibu, Y., Zhang, H., and Levine, M. 1999. Transcriptional coregulators in development. *Science* **284**(5414): 606-609.

Martinez, C., Modolell, J., and Garrell, J. 1993. Regulation of the proneural gene achaete by helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol* **13**(6): 3514-3521.

Massari, M.E. and Murre, C. 2000. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* **20**(2): 429-440.

Mauri, F., McNamee, L.M., Lunardi, A., Chiacchiera, F., Del Sal, G., Brodsky, M.H., and Collavin, L. 2008. Modification of Drosophila p53 by SUMO modulates its transactivation and pro-apoptotic functions. *J Biol Chem* **283**(30): 20848-20856.

Muratani, M., Kung, C., Shokat, K.M., and Tansey, W.P. 2005. The F box protein Dsg1/Mdm30 is a transcriptional coactivator that stimulates Gal4 turnover and cotranscriptional mRNA processing. *Cell* **120**(6): 887-899.

Murre, C. 2005. Helix-loop-helix proteins and lymphocyte development. *Nat Immunol* **6**(11): 1079-1086.

Murre, C., McCaw, P.S., and Baltimore, D. 1989a. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* **56**(5): 777-783.

Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., and et al. 1989b. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* **58**(3): 537-544.

Nie, L., Xu, M., Vladimirova, A., and Sun, X.H. 2003. Notch-induced E2A ubiquitination and degradation are controlled by MAP kinase activities. *EMBO J* **22**(21): 5780-5792.

Nolo, R., Abbott, L.A., and Bellen, H.J. 2000. Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in Drosophila. *Cell* **102**(3): 349-362.

Oellers, N., Dehio, M., and Knust, E. 1994. bHLH proteins encoded by the Enhancer of split complex of Drosophila negatively interfere with transcriptional activation mediated by proneural genes. *Mol Gen Genet* **244**(5): 465-473.

Ohsako, S., Hyer, J., Panganiban, G., Oliver, I., and Caudy, M. 1994. Hairy function as a DNA-binding helix-loop-helix repressor of Drosophila sensory organ formation. *Genes Dev* **8**(22): 2743-2755.

Paroush, Z., Finley, R.L., Jr., Kidd, T., Wainwright, S.M., Ingham, P.W., Brent, R., and Ish-Horowicz, D. 1994. Groucho is required for Drosophila neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins. *Cell* **79**(5): 805-815.

Pickart, C.M. and Rose, I.A. 1985a. Functional heterogeneity of ubiquitin carrier proteins. *J Biol Chem* **260**(3): 1573-1581.

-. 1985b. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase acts on ubiquitin carboxyl-terminal amides. *J Biol Chem* **260**(13): 7903-7910.

Quong, M.W., Massari, M.E., Zwart, R., and Murre, C. 1993. A new transcriptional-activation motif restricted to a class of helix-loop-helix proteins is functionally conserved in both yeast and mammalian cells. *Mol Cell Biol* **13**(2): 792-800.

Ravid, T. and Hochstrasser, M. 2008. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(9): 679-690.

Ren, J., Gao, X., Jin, C., Zhu, M., Wang, X., Shaw, A., Wen, L., Yao, X., and Xue, Y. 2009. Systematic study of protein sumoylation: Development of a site-specific predictor of SUMOsp 2.0. *PROTEOMICS* **9**(12): 3409-3412.

Romani, S., Campuzano, S., Macagno, E.R., and Modolell, J. 1989. Expression of achaete and scute genes in Drosophila imaginal discs and their function in sensory organ development. *Genes Dev* **3**(7): 997-1007.

Rosenfeld, M.G., Lunyak, V.V., and Glass, C.K. 2006. Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev* **20**(11): 1405-1428.

Ruzinova, M.B. and Benezra, R. 2003. Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends Cell Biol* **13**(8): 410-418.

Salghetti, S.E., Caudy, A.A., Chenoweth, J.G., and Tansey, W.P. 2001. Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. *Science* **293**(5535): 1651-1653.

Salghetti, S.E., Muratani, M., Wijnen, H., Futcher, B., and Tansey, W.P. 2000. Functional overlap of sequences that activate transcription and signal ubiquitin-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3118-3123.

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**(12B): 2620-2634.

Shen, C.P. and Kadesch, T. 1995. B-cell-specific DNA binding by an E47 homodimer. *Mol Cell Biol* **15**(8): 4518-4524.

Shimojo, H., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. 2008. Oscillations in Notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. *Neuron* **58**: 52-64.

Simpson, P. 1990. Lateral inhibition and the development of the sensory bristles of the adult peripheral nervous system of Drosophila. *Development* **109**(3): 509-519.

Skeath, J.B. and Carroll, S.B. 1991. Regulation of achaete-scute gene expression and sensory organ pattern formation in the Drosophila wing. *Genes Dev* **5**(6): 984-995.

Sriuranpong, V., Borges, M.W., Strock, C.L., Nakakura, E.K., Watkins, D.N., Blaumueller, C.M., Nelkin, B.D., and Ball, D.W. 2002. Notch signaling induces rapid degradation of achaete-scute homolog 1. *Mol Cell Biol* **22**(9): 3129-3139.

Tietze, K., Oellers, N., and Knust, E. 1992. Enhancer of splitD, a dominant mutation of Drosophila, and its use in the study of functional domains of a helix-loop-helix protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(13): 6152-6156.

Ubersax, J.A. and Ferrell, J.E., Jr. 2007. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(7): 530-541.

Van Doren, M., Bailey, A.M., Esnayra, J., Ede, K., and Posakony, J.W. 1994. Negative regulation of proneural gene activity: hairy is a direct transcriptional repressor of achaete. *Genes Dev* **8**(22): 2729-2742.

Van Doren, M., Ellis, H.M., and Posakony, J.W. 1991. The Drosophila extramacrochaetae protein antagonizes sequence-specific DNA binding by daughterless/achaete-scute protein complexes. *Development* **113**(1): 245-255.

Yamamoto, H., Ihara, M., Matsuura, Y., and Kikuchi, A. 2003. Sumoylation is involved in beta-catenin-dependent activation of Tcf-4. *EMBO J* **22**(9): 2047-2059.

Zarifi, I. 2009. Ο ρόλος των ενεργοποιητικών περιοχών του προνευρικού συμπλόκου Daughterless/Scute στη μεταγραφική ρύθμιση της νευρογένεσης *Διδακτορική διατριβή* **Πανεπιστήμιο Κρήτης**.