

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Μεταπτυχιακή διατριβή**

**Ο ρόλος των λιγασών ουβικουΐτινης Neuralized και Mindbomb 1 στη  
σηματοδότηση Notch**

**Δασκαλάκη Αικατερίνη**

**Ηράκλειο 2006**

## **Ευχαριστώ, ευχαριστώ, ευχαριστώ.....**

Τελειώνοντας τη μεταπτυχιακή αυτή εργασία θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέβαλαν ώστε να ολοκληρωθεί.

Ευχαριστώ τον κ. Χρήστο Δελιδάκη, πρώτα από όλα γιατί με δέχθηκε ως μέλος του εργαστηρίου του και στη συνέχεια για τη συνεχή βοήθειά του μέχρι το πέρας αυτής της εργασίας

Ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δελιδάκη για τη βοήθεια τους στη διεξαγωγή των πειραμάτων αλλά και τον κάθε ένα για ξεχωριστό λόγο:

- ... Την Ιωάννα, γιατί μας αγαπάει και μας φροντίζει πάντα!
- ... Τη Μαριάνθη, γιατί κάνει τη ζωή στο εργαστήριο πιο ενδιαφέρουσα!
- ... Το John, γιατί το χιούμορ του είναι αστείρευτο!
- ... Την Κική και την Kristina, γιατί προσπαθήσαμε μαζί αυτή τη χρονιά...
- ... Τον Pawel, για την ατελείωτη συνεισφορά competent κυττάρων!
- ... Το Βασίλη, γιατί έλειπε!
- ... και τέλος την Άννα για ατελείωτους λόγους!

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## Εισαγωγή

- Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch
- Τα μόρια
- Η δράση
- Η ρύθμιση
- Στόχοι

## Υλικά και μέθοδοι

- Παροδική διαμόλυνση κυττάρων S2
- Ανοσοκατακρήμνιση-Συνανοσοκατακρήμνιση
- Ανάλυση κατά Western
- RNAi
- Σύστημα μιτωτικών κλώνων FLP/FRT
- Σύστημα εκτοπικής υπερέκφρασης UAS-Gal4
- Σύστημα MARCM
- Ανοσοϊστοχημεία
- Πλασμιδιακές κατασκευές

## Αποτελέσματα I

- Η πρωτεΐνη Delta ουβικουϊτινυλιώνεται
- Θέσεις αλληλεπίδρασης του δεσμευτή Delta με τις λιγάσες ουβικουϊτίνης neuralized και mindbomb
- Η πρωτεΐνη Serrate ουβικουϊτινυλιώνεται
- Θέσεις αλληλεπίδρασης του δεσμευτή Serrate με τη λιγάση ουβικουϊτίνης neuralized

## Αποτελέσματα II

- Κυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης Delta
- Η πρωτεΐνη δυναμίνη επηρεάζει την υποκυτταρική θέση του δεσμευτή Delta
- Ο ρόλος της Epsin στη σηματοδότηση μέσω πρωτεΐνης Delta
- Ο ρόλος της Epsin στη σηματοδότηση μέσω πρωτεΐνης Serrate

## Συζήτηση

- Η ουβικουϊτινυλίωση κατά τη σηματοδότηση Notch
- Η ενδοκύττωση κατά τη σηματοδότηση Notch
- Μελλοντικοί στόχοι

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

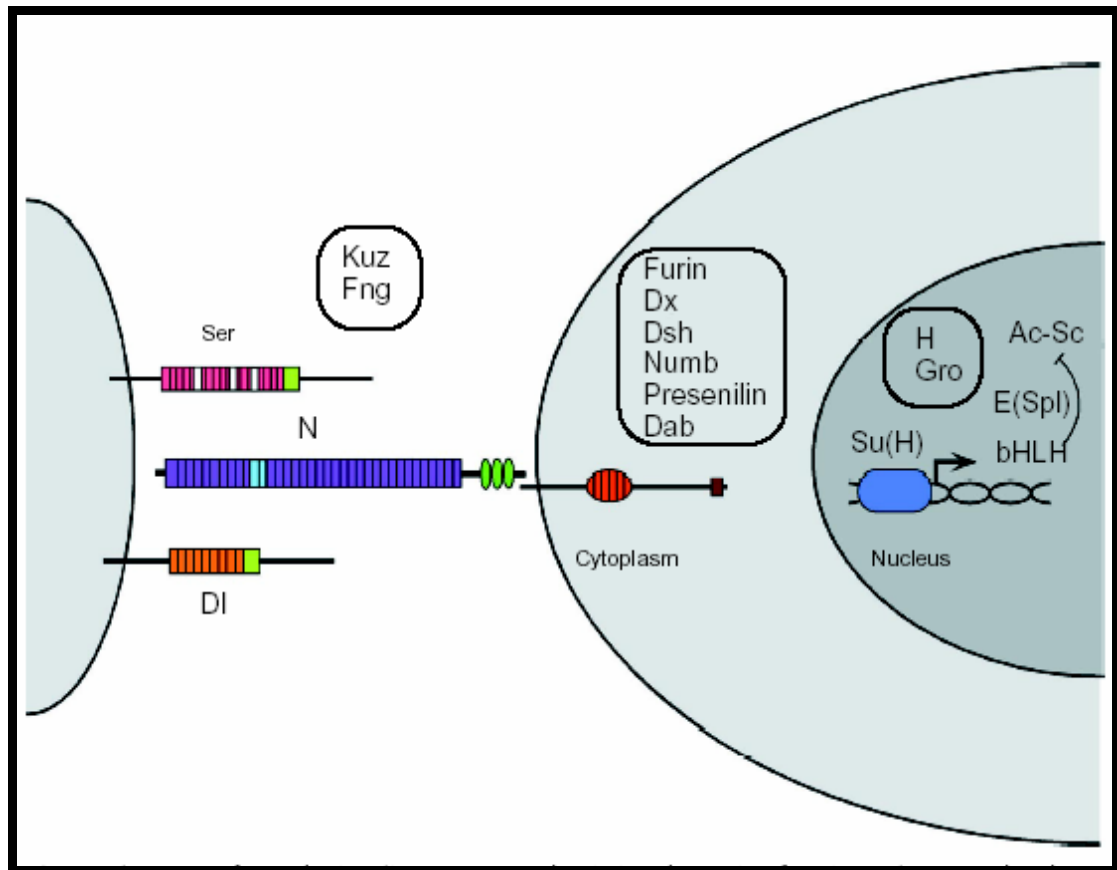
Η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων ενός πολυκύτταρου οργανισμού αποτελεί θεμέλιο λίθο της οργάνωσης και της ανάπτυξης του. Καθορίζει την αύξηση, τη διαφοροποίηση, τη μετανάστευση και τον θάνατο των κυττάρων. Η επικοινωνία αυτή στηρίζεται άμεσα στη κυτταρική σηματοδότηση και ο τρόπος με τον οποίο αυτό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

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

## ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ NOTCH

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch αποτελεί ένα εξελικτικά συντηρημένο μονοπάτι ρύθμισης της κυτταρικής τύχης σε πλειάδα πολυκύτταρων ζωικών οργανισμών. Λαμβάνει μέρος στον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση των κυττάρων σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999).

Περιληπτικά, η πρωτεΐνη Notch, η οποία αποτελεί τον υποδοχέα του σηματοδοτικού μονοπατιού, αλληλεπιδρά μέσω των εξωκυττάρων περιοχών της με τις πρωτεΐνες-δεσμευτές Delta και Serrate. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η ενεργοποίηση του υποδοχέα. Το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα αποκόπτεται, μεταναστεύει στον πυρήνα όπου και δεσμεύεται με το μεταγραφικό παράγοντα Suppressor of Hairless, ενεργοποιώντας την έκφραση γονιδίων όπως Enhancer of split, vestigial, cut και wingless (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1995, Heitzler *et al.*, 1996). Στην εικόνα 1 παρουσιάζεται σχηματικά το σηματοδοτικό μονοπάτι.



### Εικόνα 1: Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch

Στην εικόνα φαίνονται σχηματικά οι παράγοντες που εμπλέκονται κατά τη σηματοδότηση Notch. Ο υποδοχέας Notch αλληλεπιδρά με τους δεσμευτές του, DI και Ser, και ενεργοποιείται. Ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης, ακολουθούν δύο πρωτεολύσεις του υποδοχέα από πρωτεΐνες όπως η kuzbanian και η presenilin και το ενδοκυττάριο τμήμα απελευθερώνεται, μεταφέρεται στον πυρήνα όπου δρά ως μεταγραφικός συνενεργοποιητής του Su(H). Στο σχήμα φαίνονται και άλλοι παράγοντες που ρυθμίζουν τη σηματοδότηση αυτή (βλ. εισαγωγή).

# 1. ΤΑ ΜΟΡΙΑ

## 1.1 Ο Υποδοχέας Notch

Στη *D. melanogaster*, το γονίδιο *notch* ανακαλύφθηκε από τον Morgan το 1916, αλλά η μοριακή του ανάλυση δεν έγινε πριν το 1985 (Wharton *et al.*, 1985). Το όνομα του προήλθε από το φαινότυπο της μερικής έλλειψης λειτουργίας του, που προκαλεί εγκοπές στις άκρες των φτερών του ενηλικού ατόμου.

Η πρωτεΐνη Notch αποτελεί διαμεμβρανικό υποδοχέα απλής διέλευσης των 2704 αμινοξέων. Η ενδοκυττάρια περιοχή αποτελείται από 6 επαναλήψεις αγκυρίνης, μία περιοχή πλούσια σε γλουταμίνη (opa) και μία αλληλουχία PEST (Fleming, 1998). Στην ενδοκυττάρια περιοχή οφείλεται η αλληλεπίδραση με το μεταγραφικό παράγοντα Su(H) και άλλους συνενεργοποιητές.

Η εξωκυττάρια περιοχή αποτελείται από 36 επαναλήψεις τύπου EGF και 3 επαναλήψεις πλούσιες σε κατάλοιπα κυστεΐνης (Notch/Lin). Οι EGF επαναλήψεις ευθύνονται για την αλληλεπίδραση του υποδοχέα με τους δεσμευτές του και αποτελούν υπόστρωμα για γλυκοζυλίωση (Fehon *et al*, 1990).

## 1.2 Οι δεσμευτές Delta και Serrate

Οι δεσμευτές του υποδοχέα Notch, Dl και Ser, ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών DSL (Delta, Serrate, Lag-2). Κοινό χαρακτηριστικό τους η περιοχή DSL στο αμινοτελικό τους τμήμα, η οποία συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα Notch.

Ο δεσμευτής Serrate, αποτελεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη απλής διέλευσης, των 1404 αμινοξέων. Η εξωκυττάρια περιοχή της αποτελείται από την περιοχή DSL, 14 επαναλήψεις EGF και μία περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα κυστεΐνης.

Ο δεσμευτής Delta αποτελεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη απλής διέλευσης, των 832 αμινοξέων. Η εξωκυττάρια περιοχή της αποτελείται από την περιοχή DSL και 9 επαναλήψεις EGF. Οι ενδοκυττάριας περιοχές και των δύο δεσμευτών δεν παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ομολογία με άλλες πρωτεΐνες. Στην εικόνα 2 φαίνεται αναλυτικότερα η αλληλουχία της πρωτεΐνης Delta.

```

1  mhwikcllta ficftvivqv hssgsfelrl kyfsndhgrd negrccsges dgatgkclgs
61  cktrfrvclk hyqatidttts qctygdvitp ilgensvnltdaqrfgnkgf tnpiqfpfss
121 swpgtffsliv eawhdtnnsg nartnklliq rllvqqvlev ssewktnkse sqytsleydf
181 rvtcdlnyyg sgcakfcrpr ddsfghstcs etgeiicltg wggdychipk cakgcehghe
241 dkpnqcvcql gwkgalcnec vlepncihgt cnkpwteicn egwgglycnq dlnyctnhrp
301 cknggtcfnt geglytckca pgysgddcen eiyscdadvn pcqnggtcid ephtktgykc
361 hcangwsgkm ceekvltsd kpchqgicrn vrpqlgskgq gyqcecpigy sgpncdlqld
421 ncsprncing gscqpsgkci cpagfsgrc etniddclgh qcenggtcid mvnqyrcqcv
481 pgfhgthcss kvdlclirpc anggtclnlndyqctcrag ftgkdcsvdi decssgpchn
541 ggtcmnrvns fecvcangfr gkqcdesyd svtfdahqyg attqaradgl tnaqvliav
601 FSVAMPLVAV IAACVVFCMK RKRKRAQEKD DAEARKQNEQ NAVATMHNG SGVGVALASA
661 SLGGKTGSNS GLTFDGGNPN IIKNTWDKSV NNICASAAAA AAAAAADEC LMYGGYVASV
721 ADNNNANSDF CVAPLQRAKS QKQLNTDPTL MHRGSPAGSS AKGASGGGPG AAEGKRISVL
781 GEGSYCSQRW PSLAAAGVAG ACSSQLMAAA SVAGSGAGTA QQQRSVVCGT PHM 833aa

```

## Εικόνα 2: Η αλληλουχία της πρωτεΐνης Delta

Στην εικόνα δύο φαίνεται η αλληλουχία της πρωτεΐνης Delta.

**κόκκινο χρώμα:** signal peptide και διαμεμβρανική περιοχή

**γαλάζιο χρώμα:** αμινοτελικό άκρο

**πράσινο χρώμα:** DSL περιοχή

**μπλε χρώμα:** EGF-like repeats

**πορτοκαλί χρώμα:** συντηρημένες περιοχές σε Apis

### 1.3 Οι λιγάσες ουβικουΐνης *neuralized* και *mindbomb*

Το γονίδιο *neuralized* της *D. melanogaster* κλωνοποιήθηκε ως ένα ζυγωτικό νευρογόνο γονίδιο και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 754 αμινοξέων. Κατά την εμβρυογένεση το μετάγραφο εντοπίζεται σε επιδερμικά κύτταρα και νευροβλάστες. Επιπλέον η πρωτεΐνη *Neuralized* απαιτείται και κατά την ανάπτυξη του περιφερικού νευρικού συστήματος. Στους αναπτυξιακούς δίσκους του φτερού εκφράζεται σε όλα τα πρόδρομα κύτταρα αισθητηρίων οργάνων.

Η δομή της αποτελείται από μία αλληλουχία δακτυλίου Zn-RING τύπου C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> (Price *et al.*, 1993) και από δύο επαναλήψεις *neuZ* οι οποίες είναι συντηρημένες ανάμεσα στις ομόλογες πρωτεΐνες *Neuralized*. Επιπλέον υπάρχουν δύο



περιοχές πλούσιες σε όξινα αμινοξέα (ορα), με πιθανό ρόλο στις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις.

Η πρωτεΐνη Neuralized αποτελεί μια λιγάση ουβικουΐτινης (Yeh *et al.*, 2001). Είναι μία ενδοκυτταρική περιφερική μεμβρανική πρωτεΐνη η οποία επάγει την ενδοκύττωση της πρωτεΐνης Delta, μειώνει μεταμεταγραφικά τα επίπεδα της και ενισχύει τη σηματοδότηση Delta-Notch (Lai *et al.*, 2001, Pavlopoulos *et al.*, 2001). Ο δακτύλιος RING της πρωτεΐνης είναι απαραίτητος για την επαγωγή ενδοκύττωσης του δεσμευτή Delta και για την μεταμεταγραφική μείωση των επιπέδων του (Pavlopoulos *et al.*, 2001), δεν είναι όμως απαραίτητος για την αλληλεπίδραση του Neuralized με τους δεσμευτές Delta και Serrate (Pitsouli and Delidakis, 2005). Η πρωτεΐνη Neuralized αλληλεπιδρά τόσο με την πρωτεΐνη Delta όσο και με τη Serrate και ελέγχει εξίσου την υποκυτταρική τους θέση (Pitsouli and Delidakis, 2005).

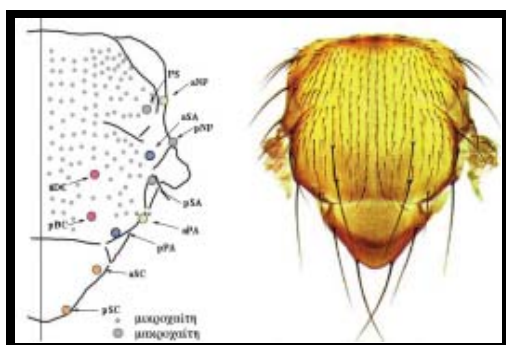
Το γονίδιο *mindbomb* κλωνοποιήθηκε αρχικά στο zebrafish, και η πρωτεΐνη αποδείχθηκε ότι είναι λιγάση ουβικουΐτινης. Η δομή της πρωτεΐνης αυτής αποτελείται από 2 μοτίβα Herc2/mib, 2 επαναλήψεις mib, 7 επαναλήψεις αγκυρίνης και 3 δακτυλίους RING. Η πρωτεΐνη αυτή αλληλεπιδρά με το zDelta και οδηγεί στην ενδοκύττωση και ουβικουΐτινυλίωση του δεσμευτή (Itoh *et al.*, 2003, Chen *et al.*, 2004). Στη *D. melanogaster* υπάρχουν δύο γονίδια με ομολογία με το zmib, τα mib1 και 2. Το mib2 έχει μικρότερη ομολογία με το zmib και εκφράζεται κυρίως στο μυϊκό σύστημα. Η πρωτεΐνη Mindbomb της *D. melanogaster* αλληλεπιδρά και με τους δύο δεσμευτές του Notch και επάγει την ενδοκύττωση και αποικοδόμηση τους (Lai *et al.*, 2005). Και σε αυτή την περίπτωση ο δακτύλιος RING δεν είναι απαραίτητος για την αλληλεπίδραση. Επιπλέον βρέθηκε ότι οι πρωτεΐνες Neuralized και Mindbomb δρουν συνεργατικά κατά την πλευρική αναστολή, ενώ μπορούν να δράσουν η μια στη θέση της άλλης κατά την επαγωγή του περιθωρίου του φτερού (Pitsouli and Delidakis, 2005).

## 2. ΤΑ ΓΕΓΟΝΟΤΑ

### 2.1 Πλευρική αναστολή

Ο όρος πλευρική αναστολή αναφέρεται στην διαδικασία κατά την οποία ένα κύτταρο μπορεί να επιλεγεί και να διαχωριστεί από μια ομάδα ισοδύναμων κυττάρων. Μία τέτοια περίπτωση αποτελεί η επιλογή του πρόδρομου κυττάρου αισθητηρίων οργάνων (ΠΑΟ), από ένα σύνολο κυττάρων που αποτελούν τον προνευρικό συναθροισμό (εικόνα 3).

Αρχικά όλα τα κύτταρα του προνευρικού πληθυσμού είναι ισοδύναμα και εκφράζουν τις προνευρικές πρωτεΐνες Achaete και Scute, οι οποίες και ενεργοποιούν την έκφραση των δεσμευτών Delta και Serrate. Συνεπώς όλα τα κύτταρα του συναθροισμού εκφράζουν τόσο τον υποδοχέα όσο και τους δεσμευτές και έχουν την ικανότητα και να αποστέλλουν και να λαμβάνουν σήμα. Για άγνωστο μέχρι στιγμής λόγο, ένα κύτταρο αποκτά μεγαλύτερη ικανότητα αποστολής σήματος από τα υπόλοιπα και αυτή η κατάσταση συντηρείται με μηχανισμό ανάδρασης: Τα κύτταρα που δέχονται περισσότερο σήμα έχουν ελαττωμένα επίπεδα πρωτεΐνης Delta, λόγω μεταγραφικής καταστολής από το σύμπλοκο των E(spl) (Culi and Modolell, 1998). Ένα μοντέλο που εξηγεί την διαφοροποίηση στη σηματοδότηση υποστηρίζει ότι η μεταγραφική ρύθμιση του δεσμευτή Delta από το Notch αποτελεί την αρχική αιτία επιλογής ενός κυττάρου (Heitzler *et al.*, 1996). Αυτό το μοντέλο αντιτίθεται από αποτελέσματα που δείχνουν ότι ενώ υπάρχει η μεταγραφική ρύθμιση του Delta κατά τον καθορισμό των μακροχαιτών του θώρακα αυτή δεν είναι απαραίτητη για την πλευρική αναστολή (Pitsouli and Delidakis, 2005).



**Εικόνα 3: Πλευρική αναστολή**

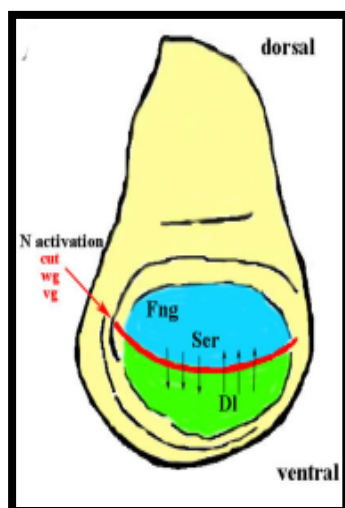
Στην εικόνα παρουσιάζονται σχηματικά και σε θώρακα ενηλίκου οι μικροχαιτίες και οι μακροχαιτίες

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

## 2.2 Δημιουργία ορίων

Στην εγκαθίδρυση του ραχαιοκοιλιακού ορίου του φτερού, το μονοπάτι Notch παίζει βασικό ρόλο (εικόνα 4). Ως αποτέλεσμα αυτής της σηματοδότησης, τα κύτταρα του ορίου αυτού εκκρίνουν το μορφογόνο Wg, το οποίο καθορίζει το πρότυπο του φτερού στον ραχαιοκοιλιακό άξονα.

Οι δεσμευτές του Notch υποδοχέα εκφράζονται εκατέρωθεν του ορίου του φτερού. Η ραχιαία εκφραζόμενη γλυκοζυλτρανσφεράση Fng, γλυκοζυλιώνει τον υποδοχέα Notch στις επαναλήψεις EGF, καθιστώντας τον υπόστρωμα για αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη Delta αλλά όχι με την πρωτεΐνη Serrate (Irvine *et al.*, 1995). Ως αποτέλεσμα, το Delta σηματοδοτεί ραχιαία του ορίου και το Serrate κοιλιακά, δημιουργώντας ένα οργανωτικό κέντρο στο ραχαιοκοιλιακό όριο μέσω της έκφρασης των γονιδίων *wg*, *vg* και *cut*. Με ένα μηχανισμό θετικής ανάδρασης εξασφαλίζεται η διατήρηση της σηματοδότησης: Τα κύτταρα του ορίου που λαμβάνουν τη σηματοδότηση, ενεργοποιούν την έκφραση των δεσμευτών στα γειτονικά κύτταρα (Micchelli *et al.*, 1997).



**Εικόνα 4: Το ραχαιοκοιλιακό όριο**

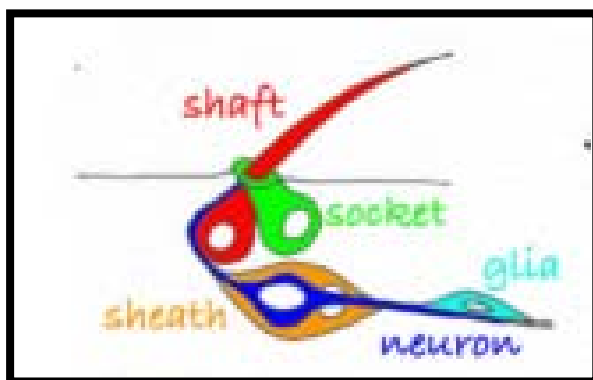
Η σηματοδότηση του Dl ραχιαία και του Ser κοιλιακά έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch στο ραχαιοκοιλιακό όριο το οποίο και αποκτά ιδιότητες οργανωτικού κέντρου.

## 2.3 Αποφάσεις γενεαλογίας

Μετά την επιλογή του προδρόμου των αισθητηρίων οργάνων, το κύτταρο αυτό διαιρείται ασύμμετρα ώστε να δημιουργηθούν 5 διαφορετικά κύτταρα (εικόνα 5): η σμήριγγα (shaft), ο νευρώνας (neuron), η θήκη (socket), το περίβλημα (seath) και το γλοιακό κύτταρο (glia). Το μονοπάτι Notch κατέχει βασικό ρόλο σε αυτές τις

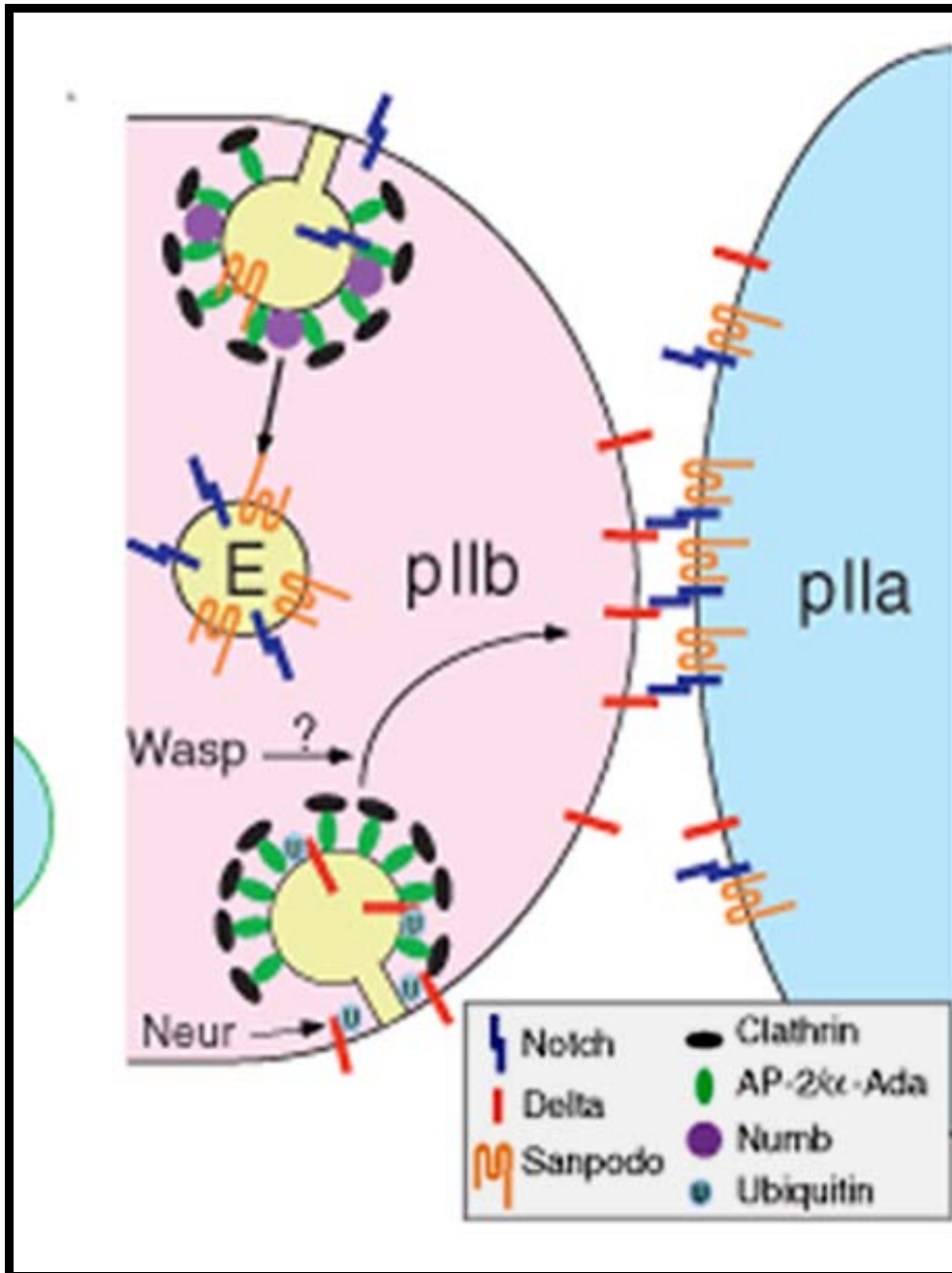
ασύμμετρες διαιρέσεις και μάλιστα σε πολλά στάδια: Στην πρώτη ασύμμετρη διαίρεση θα παραχθεί από το κύτταρο ΠΑΟ ένα pIIa και ένα pIIb κύτταρο (εικόνα 6). Το Notch μονοπάτι ενεργοποιείται στο pIIa κύτταρο ενώ το pIIb έχει την ικανότητα να σηματοδοτεί. Την ικανότητα αυτή εξασφαλίζει η ασύμμετρη κληρονόμηση των πρωτεϊνών Numb και Neur μόνο από το pIIb κύτταρο. Η πρωτεΐνη Numb, η οποία αλληλεπιδρά με την  $\alpha$ -adap $\tau$ in, πιθανότατα στοχεύει τον υποδοχέα Notch για αποικοδόμηση και τον απομακρύνει από τη μεμβράνη (O' Connor-Giles *et al.*, 2003). Επιπλέον η πρωτεΐνη Numb προσδένεται με την πρωτεΐνη Sanpodo και την απομακρύνει από την κυτταροπλασματική μεμβράνη εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την αλληλεπίδραση της με τον υποδοχέα Notch και την ενεργοποίησή της (Hutterer and Knoblich, 2005). Με αυτό τον τρόπο το pIIb κύτταρο δεν είναι ικανό να δεχτεί το σήμα. Επιπλέον η πρωτεΐνη Neur ενισχύει την ικανότητα αποστολής σήματος από τους δεσμευτές (Pavlopoulos *et al.*, 2001).

Το μονοπάτι Notch συμμετέχει και στις παρακάτω ασύμμετρες διαιρέσεις: απαιτείται στην ασύμμετρη διαίρεση του pIIb κυττάρου το οποίο θα δώσει τα κύτταρα pIIIb και γλοιακό και στην μετέπειτα διαίρεση του pIIIb κυττάρου που θα δώσει το νευρώνα και το περίβλημα. Τέλος το μονοπάτι Notch συμμετέχει και στην ασύμμετρη διαίρεση του pIIa κυττάρου το οποίο θα δώσει τη σμήριγγα και τη θήκη.



**Εικόνα 5: Οι απόγονοι του ΠΑΟ κυττάρου**

Στην εικόνα φαίνονται όλοι οι απόγονοι του ΠΑΟ κυττάρου: νευρώνας, περίβλημα, θήκη, σμήριγγα, γλοιακό κύτταρο.



**Εικόνα 6: Η σηματοδότηση Notch μεταξύ pIIb και pIIa κυττάρου**

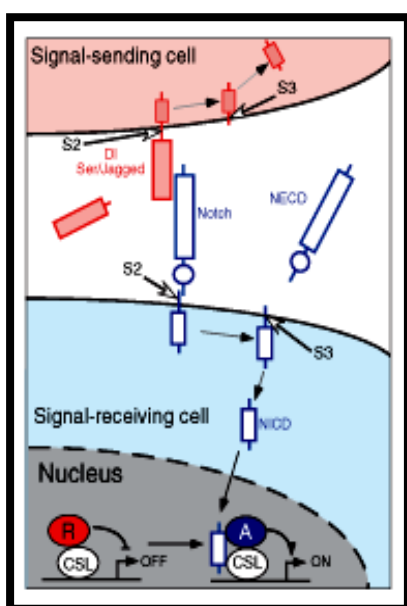
Το pIIb κύτταρο κληρονομεί εξολοκλήρου τις πρωτεΐνες numb και neur. Η πρωτεΐνη numb καθιστά το pIIb κύτταρο ανίκανο να δεχθεί σήμα από τους δεσμευτές του pIIa κυττάρου, επειδή απομακρύνει από τη μεμβράνη την πρωτεΐνη Spdo. Η πρωτεΐνη neur καθιστά τους δεσμευτές του Notch ικανότερους για σηματοδότηση.

### 3. Η ΡΥΘΜΙΣΗ

#### 3.1 Πρωτεόλυση

##### Πρωτεόλυση του υποδοχέα Notch

Πριν τη παρουσίαση του στη μεμβράνη, ο υποδοχέας Notch υφίσταται την πρώτη πρωτεόλυση στο διαμέρισμα του Golgi από τη δράση μιας φουρίνης. Το αποτέλεσμα της δράσης αυτής είναι να εμφανιστεί ο υποδοχέας στη μεμβράνη ως ένα ετεροδιμερές τα τμήματα του οποίου συνδέονται με μια ιοντική γέφυρα ασβεστίου (Blamueller *et al.*, 1997). Η ύπαρξη της πρώτης πρωτεόλυσης είναι αμφισβητούμενη



στη *D.melanogaster* και υποστηρίζεται ότι ο υποδοχέας στη μεμβράνη είναι πλήρους μήκους (Kidd and Lieber, 2002). Όταν ο υποδοχέας είναι στη μεμβράνη και αλληλεπιδράσει με έναν από τους δεσμευτές του ακολουθεί μια δεύτερη πρωτεόλυση (S2) από μία πρωτεάση τύπου ADAM. Πιθανή μεταλλοπρωτεάση που επιτελεί τη δεύτερη πρωτεόλυση είναι η πρωτεΐνη Kuzbanian (Lieber *et al.*, 2002). Η δεύτερη πρωτεόλυση είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την τρίτη. Όταν αποκοπεί το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα, το υπόλοιπο είναι κατάλληλο υπόστρωμα για το πρωτεολυτικό

σύμπλοκο της γ-σεκρετάσης (Struhl *et al.*, 2000). Η πρωτεολυτική δράση οφείλεται στην πρεσενιλίνη, μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη 8πλης διέλευσης. Μετά το πέρας της τρίτης πρωτεόλυσης (S3), το ενδοκυττάριο τμήμα του Notch μεταφέρεται στον πυρήνα όπου δρα ως μεταγραφικός συνενεργοποιητής.

##### Πρωτεόλυση των δεσμευτών

Με αντισώματα που αναγνωρίζουν το καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης Delta, ανιχνεύονται 4 ισομορφές της πρωτεΐνης αυτής σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα: Η μία, των 83kDa, αντιστοιχεί στην πλήρους μήκους πρωτεΐνη. Επιπλέον ανιχνεύονται 3 πρωτεολυτικά κοψίματα που δίνουν 3 ζώνες των 30, 28 και 26kDa, εκ των οποίων το πρώτο αποτελεί προϊόν της μεταλλοπρωτεάσης Kuzbanian, το δεύτερο πιθανόν προϊόν της γ-σεκρετάσης και το τρίτο είναι πιθανόν κυτταροπλασματικό προϊόν που

ανιχνεύεται στον πυρήνα ενώ το ένζυμο που οφείλεται για τη δημιουργία του είναι άγνωστο (Mishra-Gorur *et al.*, 2002). Οι θέσεις πρωτεόλυσης δεν είναι βέβαιες καθώς υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα (Mishra-Gorur *et al.*, 2002, Delwig *et al.*, 2006). Με αντισώματα που αναγνωρίζουν το αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης ανιχνεύονται 2 ισομορφές: Μία των 83kDa που αντιστοιχεί στην πλήρους μήκους πρωτεΐνη και μία των 62kDa που μάλλον εκκρίνεται.

### 3.2 Γλυκοζυλίωση

Ο υποδοχέας Notch και οι δεσμευτές του Delta και Serrate αποτελούν υποστρώματα για γλυκοζυλίωση. Σημαντικό ρόλο στο κεφάλαιο αυτό κατέχει η γλυκοζυλτρανσφεράση Fringe (Fng), η οποία απαντάται σε δύο ισομορφές: μια εκκρινόμενη μορφή και μία μορφή που βρίσκεται στο Golgi (Panin *et al.*, 1997). Η δεύτερη ισομορφή τροποποιεί των υποδοχέα Notch, γλυκοζυλιώνοντας τον στις επαναλήψεις EGF, ώστε να αποτελεί καλό υπόστρωμα για αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη Delta αλλά όχι με τη Serrate (Irvine *et al.*, 1999).

Μια επιπλέον γλυκοζυλτρανσφεράση, η O-Fut1, επηρεάζει τη σηματοδότηση Notch σε διαδικασίες ανεξάρτητες από την δράση της Fng, όπως η πλευρική αναστολή (Okajima *et al.*, 2003).

Οι δεσμευτές Delta και Serrate αποτελούν υποστρώματα γλυκοζυλίωσης των ενζύμων Fng και O-Fut1 *in vitro* (Panin *et al.*, 2002) αλλά ο ρόλος αυτής της τροποποίησης παραμένει άγνωστος.

### 3.4 Ουβικουϊτινυλίωση

Η ουβικουϊτίνη, μία συντηρημένη πρωτεΐνη των 76 αμινοξέων, προσδένεται ομοιοπολικά σε πρωτεΐνες υποστρώματα με τη δράση τριών ενζύμων, E1, 2 και 3. Ένας από τους ρόλους της ουβικουϊτινυλίωσης είναι η αποστολή των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών-στόχων στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση. Η ουβικουϊτίνη στοχεύει και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες οδηγούνται στο λυσόσωμα για αποικοδόμηση αφού πρώτα περάσουν μέσω του μονοπατιού ενδοκύττωσης. Σε αυτή την περίπτωση τελικός στόχος μπορεί να μην είναι το λυσόσωμα αλλά κάποιο άλλο μεμβρανικό διαμέρισμα του μονοπατιού ενδοκύττωσης (Hicke and Dunn, 2003) και με τον τρόπο αυτό τελικό αποτέλεσμα της ουβικουϊτινυλίωσης δεν είναι απαραίτητα η αποικοδόμηση μιας πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα για τους δεσμευτές του υποδοχέα Notch, βρέθηκε ότι οι λιγάσες

ουβικουϊτίνης Neuralized και Mindbomb επηρεάζουν τη δράση τους σημαντικά: Το Neuralized επάγει την ενδοκύττωση της πρωτεΐνης Delta, μειώνει μεταμεταγραφικά τα επίπεδα της και ενισχύει τη σηματοδότηση Delta-Notch (Lai *et al.*, 2001, Pavlopoulos *et al.*, 2001). Επιπλέον, το Neuralized αλληλεπιδρά και με το δεσμευτή Serrate και ελέγχει την υποκυτταρική του θέση (Pitsouli and Delidakis, 2005). Παράλληλα, η λιγάση ουβικουϊτίνης Mindbomb αλληλεπιδρά και με τους δύο δεσμευτές του Notch και επάγει την ενδοκύττωση και αποικοδόμηση τους (Lai *et al.*, 2005).

Μία επιπλέον ένδειξη ότι η ουβικουϊτινυλίωση κατέχει σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση Notch αποτέλεσε ο ρόλος της Epsin. Το γονίδιο *lqf* (*liquid facets*) κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Epsin στη *D. melanogaster*. Οι Epsins είναι ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες οι οποίες προσδέουν PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> στην πλασματική μεμβράνη όπως επίσης και την κλαθρίνη των ενδοκυττωτικών κυστιδίων και το AP-2 adapter σύμπλοκο. Η ανακάλυψη ότι οι Epsins αναγνωρίζουν ουβικουϊτινυλιωμένες πρωτεΐνες έχει οδηγήσει στο μοντέλο ότι οι πρωτεΐνες αυτές μεταφέρουν μονοουβικουϊτινυλιωμένες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες στο ενδοκυττωτικό μονοπάτι (Wendland, 2002). Έχει προταθεί ότι κατά τη σηματοδότηση Notch, οι συνδέτες πρέπει να ενδοκυττωθούν στο κύτταρο που στέλνει το σήμα μέσω τη δράση της Epsin (Wang and Struhl, 2004). Αυτή η ενδοκύττωση οδηγεί τους δεσμευτές σε ένα συγκεκριμένο υποκυτταρικό διαμέρισμα όπου και θα ενεργοποιηθούν πριν παρουσιαστούν στη μεμβράνη για σηματοδότηση.

Η πρώτη ένδειξη ότι η ενδοκύττωση παίζει σημαντικό ρόλο κατά τη σηματοδότηση του Notch προήλθε από ανάλυση της θερμοευαίσθητης μεταλλαγής *shibire<sup>ts</sup>* (Poodyry, 1990). Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την πρωτεΐνη δυναμίνη, υπεύθυνη για την αποκοπή των κυστιδίων καλυμμένων με κλαθρίνη. Έμβρυα με αυτή τη μεταλλαγή έφεραν νευρογόνο φαινότυπο. Επιπλέον βρέθηκε ότι ο δεσμευτής DI παρόλη την παρουσία του στη μεμβράνη, βρίσκεται και σε ενδοκυττωτικά κυστίδια (Parks *et al.*, 2000).

Υπάρχουν τέσσερα μοντέλα για να εξηγήσουν πως η ενδοκύττωση του δεσμευτή επάγει τη σηματοδότηση Notch (εικόνα 7):

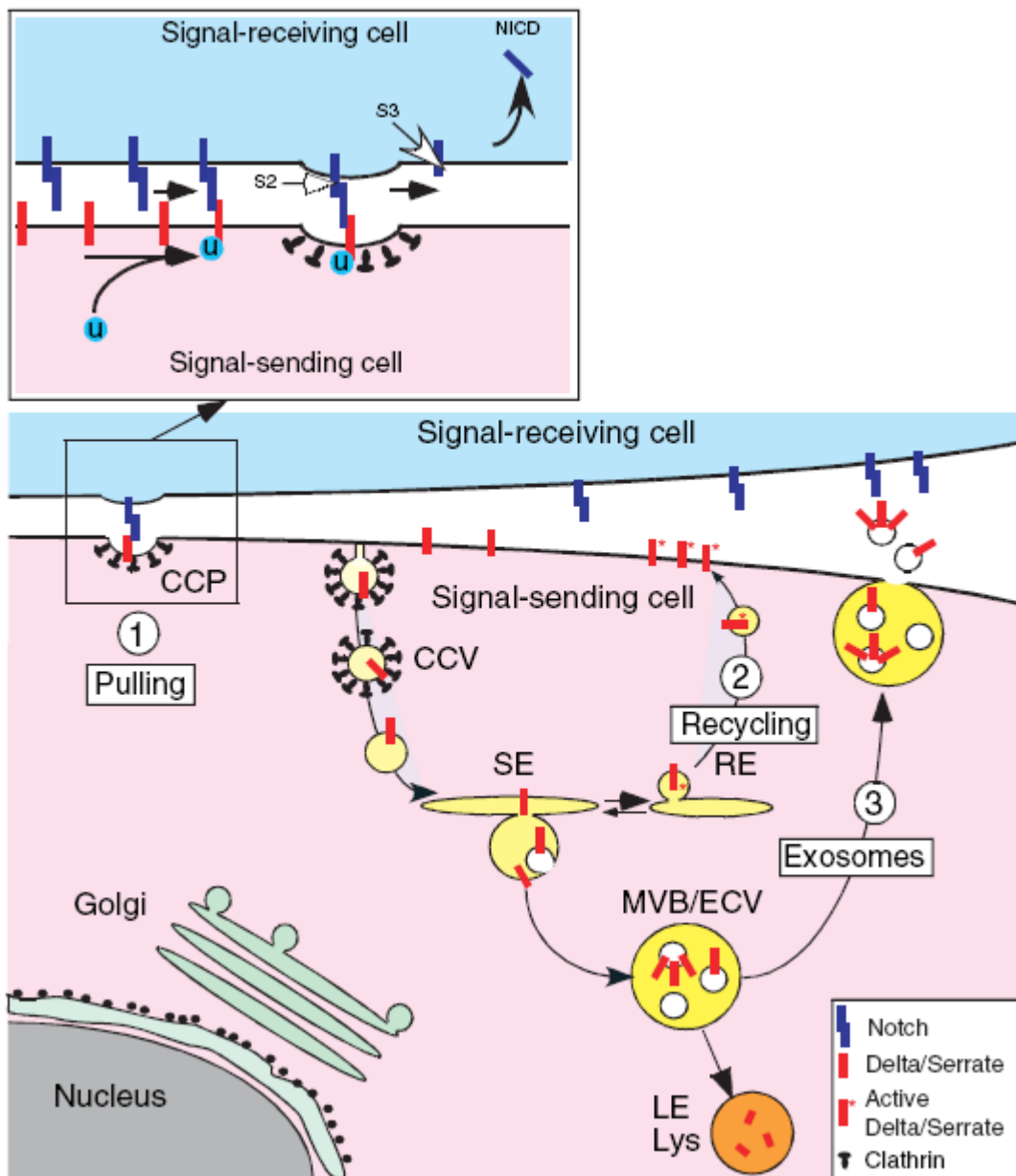
- Η ενδοκύττωση των δεσμευτών που αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα Notch ασκεί δυνάμεις πάνω στον υποδοχέα, επιφέροντας αλλαγές στη διαμόρφωση αυτού και καθιστώντας τον καλύτερο υπόστρωμα για την πρωτεόλυση S2



- Η ενδοκύττωση οδηγεί τους προσδέτες σε ένα συγκεκριμένο υποκυτταρικό διαμέρισμα όπου και θα υποστούν συγκεκριμένες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις υπεύθυνες για την ενεργοποίησή τους. Στη συνέχεια θα ξαναγυρίσουν στην μεμβράνη (Wang and Struhl, 2004)
- Οι προσδέτες μέσω του ενδοκυτταρικού μονοπατιού θα βρεθούν στον αυλό των MVBs (**m**ulti **v**esicular **b**odies). Εκεί, είτε θα οδηγηθούν στο λυσόσωμα κατά την ωρίμανση των MVBs, ή θα εκκριθούν στον εξωκυττάριο χώρο υπό μορφή μεμβρανικών εξω-κυστιδίων
- Η ενδοκύττωση των προσδετών συνεισφέρει στη συσσώρευση τους σε ένα συγκεκριμένο διαμέρισμα της πλασματικής μεμβράνης και αυτή η διαδικασία οδηγεί στην ενεργοποίησή τους

## Στόχοι

Στόχος της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη του ρόλου των λιγασών ουβικουΐτινης Neuralized και Mindbomb και κατ'επέκταση η μελέτη του ρόλου της ουβικουΐτινυλίωσης και της ενδοκύττωσης κατά την αποστολή σήματος στον υποδοχέα Notch.



**Εικόνα 7: Τρία μοντέλα για την ενδοκύττωση των προσδετών**

Η ενδοκύττωση των προσδετών δημιουργεί είτε δυνάμεις στον υποδοχέα Notch καθιστώντας τον καλύτερο υπόστρωμα για πρωτεόλυση, είτε οδηγεί τους προσδέτες σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα όπου τροποποιούνται μεταμεταφραστικά και γίνονται ενεργοί πριν οδηγηθούν πίσω στη μεμβράνη

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 1. ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

### 1.1 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων S2

Η υπερέκφραση πρωτεϊνών σε καλλιέργειες κυττάρων S2 έγινε μέσω παροδικής διαμόλυνσης με τη μέθοδο της δημιουργίας ιζήματος φωσφορικού ασβεστίου. Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την παροδική διαμόλυνση είναι τα ακόλουθα:

pIZ-DIV5His και pIZ- D1ΔCV5His για την έκφραση των πρωτεϊνών D1 και D1ΔC αντίστοιχα, pUAST-neur και pUAST-neurΔRGFP για την έκφραση των πρωτεϊνών Neur και NeurΔR αντίστοιχα, pUAST-mib και pUAST-mibΔR για την έκφραση των πρωτεϊνών Mib1 και Mib1ΔR αντίστοιχα και pMtSermyc για την έκφραση της πρωτεΐνης Ser. Για να επιτευχθεί η έκφραση πλασμιδίων pUAST είναι απαραίτητη η προσθήκη πλασμιδίου mtGal4, το οποίο θα οδηγήσει στην παραγωγή του μεταγραφικού ενεργοποιητή Gal4 και η επώαση με χαλκό η οποία επάγει την έκφραση αυτού του πλασμιδίου.

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση ή 24 ώρες μετά την επαγωγή με 0.7mM CuSO<sub>4</sub>.

### 1.2 Ανοσοκατακρήμνιση-Συνανοσοκατακρήμνιση

Η μέθοδος της ανοσοκατακρήμνισης χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη πιθανής ουβικουτίνιλίωσης των πρωτεϊνών D1, D1ΔC, Neur και Ser. Η μέθοδος της συνανοσοκατακρήμνισης χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ μεταλλάγματος της πρωτεΐνης D1 και της πρωτεΐνης Neur.

Σε κάθε περίπτωση ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Διαμολύνονται  $5 \times 10^6$  κύτταρα S2 και μετά από 48 ώρες λύνονται σε 500μl διαλύματος λύσης με τη μέθοδο της ψύξης-θέρμανσης. Τα διαλύματα λύσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:  
NP40: 300mM NaCl, 50mM Tris-Cl pH8, 0.5% NP40, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, protease inhibitors  
RIPA: 150mM NaCl, 20mM Tris-Cl pH7.5, 1% NP40, 0.5% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, protease inhibitors
- Φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 30min και διατήρηση του υπερκείμενου

- Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας αντισώματος στο υπερκείμενο και επώαση για 4 ώρες στους 4<sup>0</sup>C
- Προσθήκη 50μl σφαιριδίων σεφαρόζης πρωτεΐνης A και επώαση για 4 ώρες στους 4<sup>0</sup>C
- Φυγοκέντρωση στις 3000rpm για 1min και απομάκρυνση του υπερκειμένου
- 3 Πλύσεις των σφαιριδίων με το διάλυμα λύσης, προσθήκη 60μl διαλύματος Laemmli και διατήρηση στους -80<sup>0</sup>C

Εάν η πρωτεΐνη διαθέτει σειρά ιστιδινών σε κάποιο από τα άκρα της όπως η πρωτεΐνη D1, μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα σφαιρίδια νικελίου αντί του αντισώματος για την πρόσδεση της. Σε αυτή την περίπτωση, μετά τη λύση των κυττάρων και τη διατήρηση του υπερκειμένου, προστίθενται 50μl σφαιριδίων νικελίου και ακολουθεί επώαση για 2 ώρες στους 4<sup>0</sup>C.

### 1.3 Ανάλυση κατά Western

- Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που προέρχονται από διαδικασίες όπως η λύση των κυττάρων S2 ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης κατάλληλης πυκνότητας, στα 100V, σε θερμοκρασία δωματίου. Διάλυμα ηλεκτροφόρησης: 25mM Tris, 192mM glycine, 0.1% SDS)
- Ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης στους 4<sup>0</sup>C, στα 100V για 1h. Διάλυμα μεταφοράς: 25mM Tris, 192mM glycine, 0.01% SDS, 20% methanol
- Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση με 5% γάλα σε TTBS διάλυμα (20mM Tris-Cl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.3% Tween-20) για 1h σε θερμοκρασία δωματίου
- Επώαση με το εκάστοτε πρώτο αντίσωμα στους 4<sup>0</sup>C για 16 h
- Ακολουθούν 3 πλύσεις των 10 λεπτών με TTBS και επώαση με το δεύτερο αντίσωμα για 2h σε θερμοκρασία δωματίου
- Ακολουθούν 3 πλύσεις των 10 λεπτών με TTBS και εμφάνιση σε φιλμ με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας

## 1.4 RNAi

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

- Επιλέγεται μια περιοχή του γονιδίου από 300-700 βάσεις και κλωνοποιείται σε πλασμιδιακό φορέα pBS μεταξύ των υποκινητών T3 και T7
- Ο πλασμιδιακός φορέας pBS που φέρει το επιλεγμένο τμήμα του γονιδίου μεταξύ των υποκινητών γίνεται γραμμικός με περιοριστικές πέψεις έτσι ώστε να καταλήξουμε με δύο κατασκευές: Η μία θα οδηγήσει τη μεταγραφή του sense RNA από τον ένα υποκινητή και η άλλη του antisense RNA από τον δεύτερο υποκινητή
- Ακολουθούν δύο *in vitro* αντιδράσεις μεταγραφής χρησιμοποιώντας το Megascript kit της Ambion. Η μία οδηγεί σε μεταγραφή του τμήματος γονιδίου από την T3 και η άλλη από την T7 πολυμεράση. Κατά την αντίδραση προστίθενται κατάλληλες ποσότητες πλασμιδιακού φορέα, rNTPs και T3 ή T7 πολυμεράσης. Η αντίδραση γίνεται για 4h, στους 37<sup>0</sup>C.
- Στη συνέχεια απομονώνεται το RNA με τη χρήση φαινόλης/χλωροφορμίου και κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη. Επαναδιαλύουμε σε H<sub>2</sub>O
- Το μονόκλινο RNA από κάθε αντίδραση θα χρησιμοποιηθεί για να παραχθεί το δίκλινο RNA. Ίσες ποσότητες των sense και antisense RNA τοποθετούνται σε δοχείο με νερό θερμοκρασίας 90<sup>0</sup>C. Καθώς το νερό σταδιακά ψύχεται τα μονόκλινα RNAs ενώνονται για να δημιουργήσουν το δίκλινο. Η διαδικασία έχει ολοκληρωθεί όταν το νερό έχει πλησιάσει τους 40<sup>0</sup>C
- 1x10<sup>6</sup> κύτταρα S2 φυγοκεντρούνται σε θρεπτικό μέσο χωρίς ορό και τοποθετούνται σε πηγάδι από πιάτο των 6 πηγαδιών (1x10<sup>6</sup> κύτταρα/1ml θρεπτικού)
- Ακολουθεί επώαση των κυττάρων με 15μg dsRNA σε H<sub>2</sub>O. Επώαση για 30min, στους 25<sup>0</sup>C

- Προσθήκη 2ml θρεπτικού μέσου το οποίο περιέχει ορό και επώαση των κυττάρων για 72h, στους 25<sup>0</sup>C.
- Λύση των κυττάρων όπως περιγράφηκε παραπάνω

## **2. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

### **2.1 Σύστημα μιτωτικών κλώνων FLP/FRT**

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

### **2.2 Σύστημα εκτοπικής υπερέκφρασης UAS-Gal4**

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

### **2.3 Σύστημα MARCM**

Με τη χρήση του συστήματος MARCM (**M**osaic **A**nalysis with a **R**epressible **C**ell **M**arker), επιτυγχάνεται η δημιουργία μιτωτικών κλώνων και εκτοπικής υπερέκφρασης συγχρόνως. Σε αυτό το σύστημα κάθε κύτταρο διαθέτει τον καταστολέα της πρωτεΐνης Gal4, την πρωτεΐνη Gal80. Με αυτό τον τρόπο το διαγονίδιο δεν εκφράζεται παρά μόνο σε κύτταρα κλώνων όπου έχει συμβεί ο ανασυνδυασμός και τα οποία διαθέτουν την ομόζυγη επιθυμητή μεταλλαγή ενώ

παράλληλα δεν έχουν τον καταστολέα Gal80. Οι κλώνοι μπορούν να σημανθούν θετικά με την έκφραση ενός διαγονιδίου UAS-GFP (Lee and Luo, 2001).

## **2.4 Ανοσοϊστοχημεία**

### **2.4.α Μονιμοποίηση προνυμφών**

- Αρχικά συλλέγουμε προνύμφες τρίτου σταδίου και ακολουθεί ανατομία αυτών σε PBS διάλυμα (130mM NaCl, 70mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- Μονιμοποίηση των προνυμφών σε διάλυμα PEM/4% FA για 20min σε θερμοκρασία δωματίου. 2x διάλυμα PEM: 200mM Pipes, 2mM EGTA, 2mM MgCl<sub>2</sub>, pH6.9
- 3 πλύσεις με διάλυμα PBS

### **2.4.β Χρώσεις**

- Οι προνύμφες μετά τη μονιμοποίηση επώάζονται σε διάλυμα PBT (1x PBS, 0.5% BSA, 0.2% TritonX-100) για 1h σε θερμοκρασία δωματίου
- Επώαση με πρώτο αντίσωμα σε PBT για 16h, στους 4<sup>0</sup>C
- Ακολουθούν 3 πλύσεις των 10min με PT διάλυμα (1x PBS, 0.2% TritonX-100), σε θερμοκρασία δωματίου
- Επώαση με δεύτερο αντίσωμα σε PBT για 2h, σε θερμοκρασία δωματίου
- Ακολουθούν 3 πλύσεις των 10min με PT διάλυμα (1x PBS, 0.2% TritonX-100), σε θερμοκρασία δωματίου
- Τοποθέτηση του ιστού σε αντικειμενοφόρο με διάλυμα 0.5% n-propyl-gallate σε 80% γλυκερόλη



### 3. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ

#### 3.1 Πλασμιδιακή κατασκευή του Dli2

Στο συγκεκριμένο μετάλλαγμα της πρωτεΐνης Delta απουσιάζουν τα αμινοξέα IKNTWDKSYNNT από την καρβοξυτελική της περιοχή. Για τη δημιουργία αυτού του μεταλλάγματος χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές

5' ATGAGATCTACTCCTGCGATGCC 3' (ως forward primer)

5' ATGGATCCGATATTCGGGTTGCCGCC 3' (ως reverse primer)

και

5' ATGGATCCTGTGCCTCAGCAGCAGC 3' (ως forward primer)

5' GGTACGCGTAGAATCGAGACCGAG 3' (ως reverse primer)

Τα δύο προϊόντα που δημιουργήθηκαν από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ενώθηκαν μέσω του ενζύμου BamH1, θέσεις αναγνώρισης του οποίου φέρουν οι δύο εσωτερικοί εκκινητές. Το τεμάχιο ενώθηκε με τον πλασμιδιακό φορέα pIZ-DIV5His ο οποίος προηγουμένως είχε υποστεί πέψη με BglII/MluI (τις θέσεις αναγνώρισης αυτών των ενζύμων φέρουν οι εξωτερικοί εκκινητές). Συνεπώς σε αυτό το μετάλλαγμα λείπουν οι βάσεις 2660-2696 από το pIZ-DIV5His πλασμίδιο και αντί αυτών των αμινοξέων έχει προστεθεί ένα κατάλοιπο γλυκίνης και ένα σερίνης.

#### 3.2 Πλασμιδιακές κατασκευές για RNAi

##### pBlu2KSM neur568

Η κατασκευή αυτή δημιουργήθηκε για να χρησιμοποιηθούν 568 βάσεις του *neur* γονιδίου για *in vitro* μεταγραφή και εν συνεχεία για τη διεξαγωγή RNAi (βάσεις 174-742 από το γονίδιο του *neur*). Το γονίδιο *neur* είχε υποστεί πέψη με DraI και είχε εισαχθεί στον πλασμιδιακό φορέα pBlu2KSM στην θέση EcoRV. Η κατασκευή αυτή υπέστη πέψη με NcoI/EcoRV και απομονώθηκε το τεμάχιο του γονιδίου *neur* των 568 βάσεων. Το τεμάχιο (μετά από klenow-fill in ) κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα pBlu2KSM, ο οποίος είχε υποστεί πέψη με SmaI. Για την διεξαγωγή της *in vitro* μεταγραφής, ο πλασμιδιακός φορέας έγινε γραμμικός με τα περιοριστικά ένζυμα HindIII και BamH1, ώστε να μεταγραφεί από την T7 και T3 πολυμεράση αντίστοιχα.

### **pBlu2KSM neur797**

Η κατασκευή αυτή επίσης δημιουργήθηκε για να χρησιμοποιηθούν 797 βάσεις του *neur* γονιδίου για *in vitro* μεταγραφή και τη διεξαγωγή RNAi. Η κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα με το γονίδιο *neur* υπέστη πέψη με BamH1/EcoRV και απομονώθηκε το τεμάχιο του γονιδίου *neur* των 797 βάσεων (βάσεις 3016-4190 από την πλασμιδιακή κατασκευή pUAST-*neur*). Αυτό το τεμάχιο κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα pBlu2KSM ο οποίος είχε υποστεί πέψη με SmaI/BamH1. Για την διεξαγωγή της *in vitro* μεταγραφής, ο πλασμιδιακός φορέας έγινε γραμμικός με τα περιοριστικά ένζυμα HindIII και BamH1, ώστε να μεταγραφεί από την T7 και T3 πολυμεράση αντίστοιχα. Χρησιμοποιήθηκαν δύο πλασμιδιακές κατασκευές για τη διαδικασία του RNAi επειδή υπήρχε αμφιβολία για τον κατάλληλο αριθμό βάσεων που έπρεπε να έχει το μετάγραφο.

### **pBlu2KSM mib710**

Η κατασκευή αυτή δημιουργήθηκε για να χρησιμοποιηθούν 710 βάσεις του *mib1* γονιδίου για *in vitro* μεταγραφή και εν συνεχεία για τη διεξαγωγή RNAi. Η πλασμιδιακή κατασκευή pBlu2KSMmibexon2 υπέστη πέψη με PstI και απομονώθηκε το τεμάχιο των 710 βάσεων (βάσεις 706-1416 του δεύτερου εξωνίου του γονιδίου *mib1*), το οποίο κλωνοποιήθηκε σε pBlu2KSM, ο οποίος είχε υποστεί πέψη με PstI. Για την διεξαγωγή της *in vitro* μεταγραφής, ο πλασμιδιακός φορέας έγινε γραμμικός με τα περιοριστικά ένζυμα HindIII και BamH1, ώστε να μεταγραφεί από την T7 και T3 πολυμεράση αντίστοιχα.

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Ι**

**Ο ρόλος της ουβικουΐτινυλίωσης κατά τη σηματοδότηση Notch**



## 1.1 Η πρωτεΐνη Delta ουβικουΐτινυλιώνεται

Μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν ότι κύριος στόχος της ουβικουΐτινυλίωσης είναι η στόχευση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών-στόχων στο πρωτεάσωμα προς αποικοδόμηση. Στη συνέχεια έγινε γνωστό ότι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μπορούν να ουβικουΐτινυλιωθούν και ότι τελικός στόχος αυτών μπορεί να αποτελεί το λυσόσωμα αλλά και άλλα ενδιάμεσα μεμβρανικά διαμερίσματα (Hicke and Dunn, 2003).

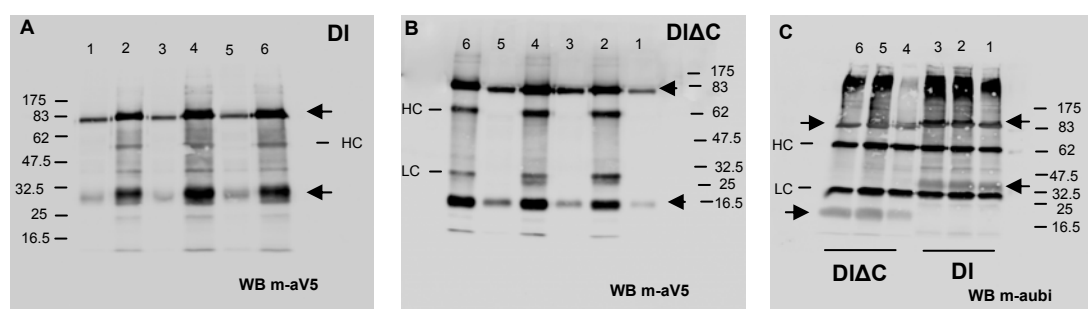
Για πολλά χρόνια θεωρούνταν ότι η ενδοκύττωση των υποδοχέων σχετίζεται με την αποικοδόμηση τους και κατ'έκταση την απενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης. Τα τελευταία χρόνια αποδεικνύεται συνεχώς η συσχέτιση μεταξύ της ενδοκύττωσης των μεμβρανικών υποδοχέων και των δεσμευτών τους και της ενεργοποίησης της σηματοδότησης.

Στην περίπτωση των δεσμευτών του υποδοχέα Notch, D1 και Ser, υποστηρίζεται επίσης το μοντέλο όπου για να ενεργοποιηθούν οι δεσμευτές και να είναι ικανοί να σηματοδοτήσουν πρέπει να ενδοκυτταρωθούν και να τροποποιηθούν σε κατάλληλο μεμβρανικό διαμέρισμα και μάλιστα αυτή η ενδοκύττωση εξαρτάται άμεσα από την πρωτεΐνη epsin (Wang and Struhl, 2004), (βλ. αποτελέσματα II). Επιπλέον προτείνεται ότι για να ενδοκυτταρωθούν οι δεσμευτές στο κατάλληλο ενδοκυτταρικό διαμέρισμα πρέπει να ουβικουΐτινυλιωθούν.

Για να βρεθεί αν η ουβικουΐτινυλίωση έχει ρόλο στη σηματοδότηση του δεσμευτή Delta, η πρωτεΐνη D1 και το ελλειμματικό μόριο D1ΔC ελέγχθησαν για την ικανότητα τους να ουβικουΐτινυλιώνονται. Η πρωτεΐνη D1ΔC δεν διαθέτει τα καρβοξυτελικά κατάλοιπα από τη βαλίνη 720 και μετέπειτα. Συνεπώς δε διαθέτει και το συντηρημένο μοτίβο KQLNTD, το οποίο περιέχει ένα από τα 4 συντηρημένα ενδοκυττάρια κατάλοιπα λυσίνης των πρωτεϊνών D1. Έγινε παροδική διαμόλυνση κυττάρων S2 με τα πλασμίδια pIZ-D1 και pIZ-D1ΔC. Ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση με anti-V5 αντίσωμα και western blot με anti-ubi αντίσωμα ώστε να ελεγχθεί η ικανότητα των δύο πρωτεϊνών να ουβικουΐτινυλιώνονται (εικόνα 1.1). Η πρωτεΐνη Delta φέρει τον επίτοπο V5 στο καρβοξυτελικό της άκρο. Παρατηρούμε ότι στην περίπτωση της πλήρους μήκους πρωτεΐνης ουβικουΐτινυλιώνεται όχι μόνο η ολόκληρη πρωτεΐνη αλλά και το πρωτεολυτικό καρβοξυτελικό τμήμα της των 30kDa (εικόνα 1.1C). Παρομοίως, στην περίπτωση του

ελλειμματικού μορίου, ουβικουΐτινυλιώνεται ξανά η πλήρους μήκους πρωτεΐνη αλλά και το πρωτεολυτικό τμήμα της των 16kDa.

Συμπερασματικά, η πρωτεΐνη DI μπορεί να ουβικουΐτινυλιωθεί και το καρβοξυτελικό τμήμα από τη βαλίνη 720 και μετέπειτα δεν είναι απαραίτητο για τη μεταμεταφραστική τροποποίηση αυτή.



### Εικόνα 1.1: Οι πρωτεΐνες DI και DIΔC ουβικουΐτινυλιώνονται

Έγινε πείραμα παροδικής διαμόλυνση των κυττάρων S2 με αυξανόμενες ποσότητες pIZ-DI και pIZ-DIΔC. Ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση με m-aV5 αντίσωμα και western blot με m-aV5 και m-aubi αντισώματα. Για western blot με το m-aV5 αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε το 1/6 της ποσότητας του εκχυλίσματος ενώ για western blot με το m-aUbi αντίσωμα τα 5/6. Το συνολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα προήλθε από  $5 \times 10^6$  κύτταρα

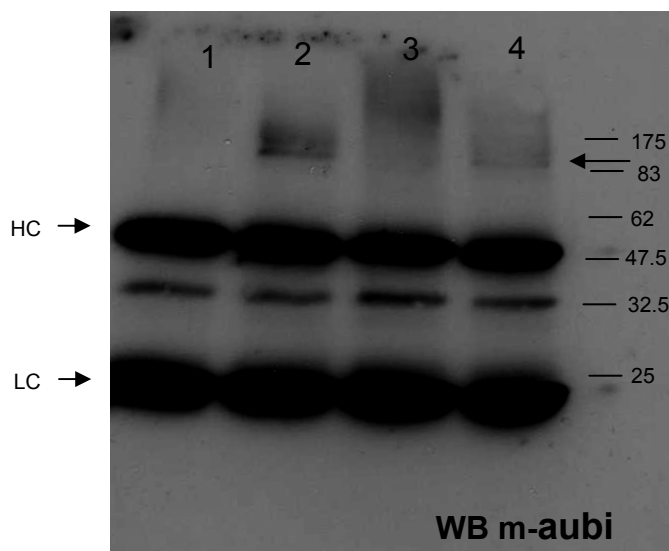
A) 1,3,5 πηγάδια: Input από διαμολυσμένα κύτταρα με 2,4,6μg πλασμιδίου pIZ-DI αντίστοιχα. Δεν παρατηρείται σημαντική αύξηση της ποσότητας πρωτεΐνης DI στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα πλήρους μήκους και πρωτεολυτικού τμήματος. 2,4,6 πηγάδια: IP από διαμολυσμένα κύτταρα με 2,4,6μg πλασμιδίου pIZ-DI αντίστοιχα. Δεν παρατηρείται σημαντική αύξηση της ποσότητας πρωτεΐνης DI που προσδένεται στο m-aV5 αντίσωμα πλήρους μήκους και πρωτεολυτικού τμήματος

B) 1,3,5 πηγάδια: Input από διαμολυσμένα κύτταρα με 2,4,6μg πλασμιδίου pIZ-DIΔC αντίστοιχα. Δεν παρατηρείται σημαντική αύξηση της ποσότητας πρωτεΐνης DIΔC στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα πλήρους μήκους και πρωτεολυτικού τμήματος. 2,4,6 πηγάδια: IP από διαμολυσμένα κύτταρα με 2,4,6μg πλασμιδίου pIZ-DIΔC αντίστοιχα. Δεν παρατηρείται σημαντική αύξηση της ποσότητας πρωτεΐνης DIΔC που προσδένεται στο m-aV5 αντίσωμα πλήρους μήκους και πρωτεολυτικού τμήματος

C) 1,2,3 πηγάδια: IP από διαμολυσμένα κύτταρα με 2,4,6μg πλασμιδίου pIZ-DI αντίστοιχα. Ανιχνεύεται ουβικουΐτινυλιωμένη μορφή της πλήρους μήκους πρωτεΐνης και του πρωτεολυτικού τμήματος της. 4,5,6 πηγάδια: IP από διαμολυσμένα κύτταρα με 2,4,6μg πλασμιδίου pIZ-DIΔC αντίστοιχα. Ανιχνεύεται ουβικουΐτινυλιωμένη μορφή της πλήρους μήκους πρωτεΐνης και του πρωτεολυτικού τμήματος της

Για να επιβεβαιωθεί ότι η πρωτεΐνη DI ουβικουΐτινυλιώνεται, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά S2DI. Η κυτταρική αυτή σειρά είναι σταθερά διαμολυσμένη με το γονίδιο *delta* και η έκφραση του επάγεται με την παρουσία χαλκού. Χρησιμοποιήθηκαν  $1 \times 10^6$  και  $2 \times 10^6$  κύτταρα (εικόνα 1.2). Έγινε επαγωγή με χαλκό και ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση με m-aDI αντίσωμα. Ο επίτοπος αυτού

του αντισώματος βρίσκεται στο αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης. Στη συνέχεια έγινε western blot με m-aubi αντίσωμα, όπου και παρατηρείται η ουβικουΐτινυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης DI μετά από επαγωγή.



**Εικόνα 1.2: Η πρωτεΐνη DI ουβικουΐτινυλιώνεται στα S2DI κύτταρα**

1,3 πηγάδια:  $2 \times 10^6$  και  $1 \times 10^6$  κύτταρα S2DI αντίστοιχα στα οποία δεν έχει γίνει επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης DI με χαλκό. Τα κύτταρα ανοσοκατακρημνίστηκαν με m-aDI αντίσωμα και ακολούθησε western blot με m-aubi αντίσωμα

2,4 πηγάδια:  $2 \times 10^6$  και  $1 \times 10^6$  κύτταρα S2DI αντίστοιχα στα οποία έχει γίνει επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης DI με χαλκό. Τα κύτταρα ανοσοκατακρημνίστηκαν με m-aDI αντίσωμα και ακολούθησε western blot με m-aubi αντίσωμα. Παρατηρείται η ανιχνεύσιμη ουβικουΐτινυλιωμένη πλήρους μήκους μορφή της πρωτεΐνης DI.

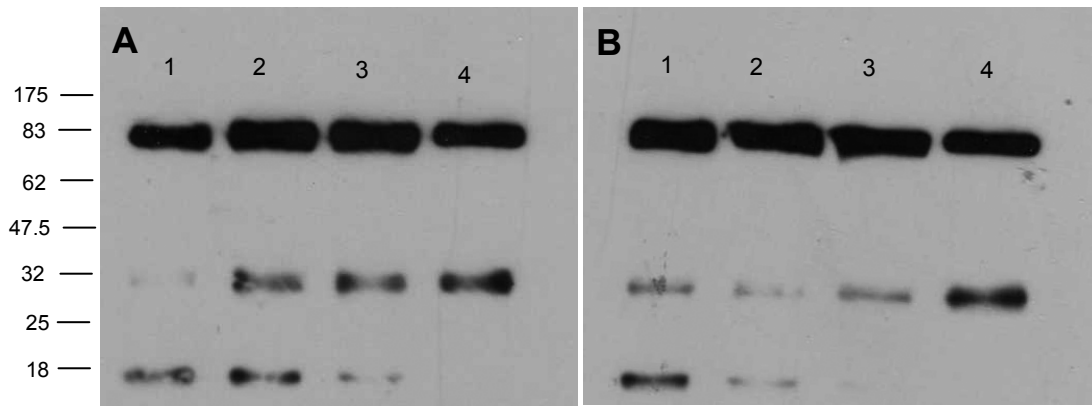
Η πρωτεΐνη Neur έχει δειχθεί ότι ενισχύει τη σηματοδότηση Notch και ότι ενδοκυτταρώνει την πρωτεΐνη Delta (Pavlopoulos *et al.*, 2001). Πιθανώς τα δύο αυτά γεγονότα σχετίζονται μεταξύ τους καθώς επίσης έχει προταθεί ότι για να ενεργοποιηθεί η πρωτεΐνη DI οφείλει να βρεθεί σε ένα συγκεκριμένο υποκυτταρικό διαμέρισμα (Wang and Struhl, 2004). Συνεπώς είναι πιθανό η λιγάση ουβικουΐτινης Neuralized να ουβικουΐτινυλιώνει την πρωτεΐνη DI και αυτό να αποτελεί σημάδι αναγνώρισης από το μηχανισμό ενδοκύττωσης ώστε ο δεσμευτής να μεταφερθεί σε ένα συγκεκριμένο υποκυτταρικό διαμέρισμα όπου και θα ενεργοποιηθεί. Η πρωτεΐνη NeurDR δε διαθέτει το δακτύλιο RING που πιθανόν αλληλεπιδρά με τα συζευκτικά ένζυμα ουβικουΐτινης E2 και προωθεί την ουβικουΐτινυλίωση των πρωτεϊνών-στόχων. Έχει βρεθεί ότι ο δακτύλιος RING της πρωτεΐνης είναι απαραίτητος για την επαγωγή

ενδοκύττωσης του δεσμευτή Delta και για την μεταμεταγραφική μείωση των επιπέδων του (Pavlopoulos *et al.*, 2001), δεν είναι όμως απαραίτητος για την αλληλεπίδραση του Neuralized με τους δεσμευτές Delta και Serrate (Pitsouli and Delidakis, 2005).

Για να βρεθεί εάν η ουβικουΐτινυλίωση της πρωτεΐνης DI οφείλεται στην λιγασή ουβικουΐτινης Neuralized ακολουθήθηκε παροδική διαμόλυνση των κυττάρων S2 με σταθερή ποσότητα του πλασμιδίου pIZ-DI και αυξανόμενες ποσότητες των πλασμιδίων puast-neur και puast-neurΔR (εικόνα 1.3). Ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση με σφαιρίδια νικελίου και western blot με m-aV5 αντίσωμα (η πρωτεΐνη DI διαθέτει 6 κατάλοιπα ιστιδίνης στο καρβοξυτελικό της άκρο). Παρατηρείται ότι καθώς αυξάνονται οι ποσότητες των πρωτεϊνών Neur και NeurΔR αλλάζει και το πρότυπο της πρωτεΐνης DI. Ενώ χωρίς την υπερέκφραση των πρωτεϊνών Neur και NeurΔR παρατηρούνται 3 ζώνες των 83, 32 και 18kDa, με την ύπαρξη της μίας ή της άλλης πρωτεΐνης η μικρότερη ζώνη εξαφανίζεται ενώ γίνεται εντονότερη αυτή των 32kDa. Ουσιαστικά η ζώνη των 32kDa δεν είναι μία αλλά τρεις διαφορετικές ζώνες από διαφορετικές πρωτεολύσεις του DI (βλ. εισαγωγή). Πιθανή εξήγηση είναι ότι η μικρότερη ζώνη της πρωτεΐνης DI ουβικουΐτινυλιώνεται με την ύπαρξη της πρωτεΐνης Neur και μετατρέπεται σε ζώνη μοριακού βάρους των 32kDa. Παράδοξο αποτελεί το γεγονός ότι παρόμοιο αποτέλεσμα επιφέρει και η πρωτεΐνη NeurΔR. Πιθανόν το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται και στα ενδογενή ποσοστά των πρωτεϊνών Neur και Mib1 που διαθέτουν τα κύτταρα S2 και με κάποιο άγνωστο μηχανισμό το ελλειμματικό μόριο NeurΔR υποβοηθά τις λιγασές αυτές στην ουβικουΐτινυλίωση της πρωτεΐνης DI.

Εδώ πρέπει να αναφερθεί ότι η μικρότερη ζώνη της πρωτεΐνης DI των 18kDa δεν ανιχνεύεται πάντα σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης. Συνεπώς παρατηρείται έλλειψη επαναληψιμότητας του προτύπου αυτού. Ο ακριβής λόγος αυτού του προβλήματος παραμένει άγνωστος. Πιθανή εξήγηση είναι ότι οι ενδογενείς ποσότητες λιγασών ουβικουΐτινης Neuralized και Mindbomb είναι ικανές να ουβικουΐτινυλώσουν το πρωτεολυτικό αυτό τμήμα της πρωτεΐνης DI.





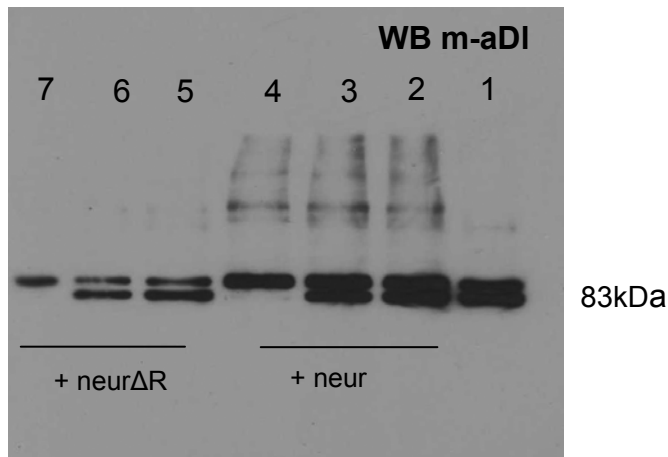
**Εικόνα 1.3: Οι πρωτεΐνες neur και neurΔR αλλάζουν το πρότυπο της πρωτεΐνης D1 στα κύτταρα S2**

A) Έγινε παροδική διαμόλυνση των κυττάρων S2 με σταθερή ποσότητα πλασμιδίου pIZ-D1 (2μg) και αυξανόμενες ποσότητες puast-neur (1: 0μg neur, 2: 2μg neur, 3: 4μg neur, 4: 6μg neur). Ακολούθηθηκε ανοσοκατακρήμνιση με σφαιρίδια νικελίου και western blot με m-aV5 αντίσωμα. Παρατηρείται η σταδιακή εξαφάνιση της ζώνης των 18kDa και η σταδιακή εμφάνιση της ζώνης των 32kDa

B) Έγινε παροδική διαμόλυνση των κυττάρων S2 με σταθερή ποσότητα πλασμιδίου pIZ-D1 (2μg) και αυξανόμενες ποσότητες puast-neurΔR (1: 0μg neurΔR, 2: 2μg neurΔR, 3: 4μg neurΔR, 4: 6μg neurΔR). Ακολούθηθηκε ανοσοκατακρήμνιση με σφαιρίδια νικελίου και western blot με m-aV5 αντίσωμα. Παρατηρείται η σταδιακή εξαφάνιση της ζώνης των 18kDa και η σταδιακή εμφάνιση της ζώνης των 32kDa

Για να αποσαφηνισθεί αν και η πλήρους μήκους πρωτεΐνη ουβικουΐτινυλιώνεται παρουσία των πρωτεϊνών Neur και NeurΔR τα ίδια δείγματα με τα παραπάνω χρησιμοποιήθηκαν σε western blot με αντίσωμα m-aD1 (εικόνα 1.4). Το αντίσωμα αυτό δεσμεύει το εξωκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης και γι αυτό δεν ανιχνεύονται τα ενδοκυττάρια πρωτεολυτικά τμήματα. Συνήθως αναγνωρίζεται και το εξωκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης αλλά όχι πάντα, όπως στην περίπτωση αυτή, επειδή εκκρίνεται στο θρεπτικό μέσο. Στην εικόνα φαίνεται ότι με αυξανόμενες ποσότητες πρωτεϊνών Neur και NeurΔR η πλήρους μήκους πρωτεΐνη αλλάζει μοριακό βάρος σταδιακά, γεγονός που δηλώνει ότι ουβικουΐτινυλιώνεται.

Συμπερασματικά, η πρωτεΐνη D1 ουβικουΐτινυλιώνεται και η ουβικουΐτινυλίωση αυτή αυξάνεται με την πρωτεΐνη Neuralized αλλά και το ελλειμματικό μόριο NeurΔR γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ενδογενείς πρωτεΐνες Neur ή/και Mib1 ή/και κάποια άλλη λιγάση ουβικουΐτίνης υποβοηθούνται από το μόριο αυτό.



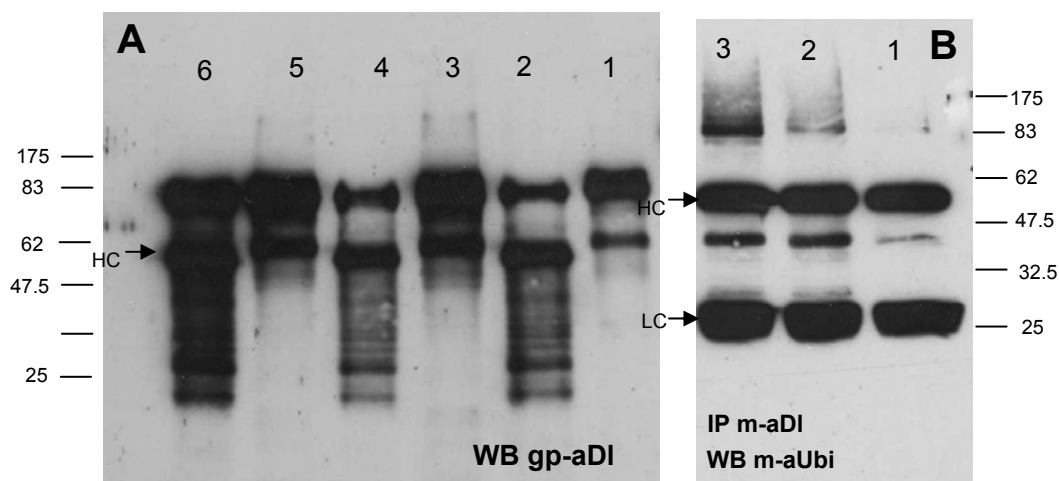
**Εικόνα 1.4: Η πλήρους μήκους πρωτεΐνη D1 ουβικουΐτινυλιώνεται παρουσία neur και neurΔR**

Έγινε παροδική διαμόλυνση κυττάρων S2 με σταθερή ποσότητα πλασμιδίου pIZ-D1 (2μg) και αυξανόμενες ποσότητες puast-neur και puast-neurΔR. 1: 0μg neur/neurΔR, 2: 2μg neur, 3: 4μg neur, 4: 6μg neur, 5: 2μg neurΔR, 6: 4μg neurΔR, 7: 6μg neurΔR, 1-7: 2μg D1. Παρατηρείται ότι καθώς αυξάνουν οι ποσότητες neur και neurΔR η ζώνη των 83kDa αντικαθιστάται σταδιακά από μία μεγαλύτερου μοριακού βάρους, που πιθανώς αντιπροσωπεύει την ουβικουΐτινυλιωμένη μορφή της πλήρους μήκους πρωτεΐνης D1. Παρατηρούνται επίσης πιθανές πολυουβικουΐτινυλιωμένες μορφές του D1, όπου υπάρχει η πρωτεΐνη Neur

Για να διευκρινισθεί περαιτέρω εάν η ουβικουΐτινυλίωση της πρωτεΐνης D1 οφείλεται στις λιγασές ουβικουΐτίνης Neuralized και Mindbomb, διεξήχθη RNAi για τις λιγασές ουβικουΐτίνης σε κύτταρα S2D1. Σε κάθε  $1 \times 10^6$  κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν 15μg δίκλωνου RNA τμημάτων των γονιδίων *neur* και *mib*. Η επώαση έγινε όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο (βλ. Υλικά και Μέθοδοι) και την επόμενη μέρα τα κύτταρα επώαστηκαν με χαλκό ώστε να επαχθεί η έκφραση της πρωτεΐνης D1. Στη συνέχεια ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση με m-aDI αντίσωμα και western blots με gp-aDI και m-aubi αντισώματα (εικόνα 1.5). Παρατηρείται ότι με την επώαση των κυττάρων με δίκλιωνα μόρια RNA των γονιδίων *neur* και *mib1*, αυξάνονται οι ποσότητες της πρωτεΐνης D1 που μπορούν να ανοσοκατακρημνισθούν. (εικόνα 1.5, A). Μάλιστα περισσότερη ποσότητα της πρωτεΐνης ανοσοκατακρημνίζεται απουσία Mib1. Επιπλέον παρατηρείται το παράδοξο ότι παρουσία των δίκλωνων RNA και για τις δύο πρωτεΐνες, αυξάνεται η ουβικουΐτινυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης D1 (εικόνα 1.5, B).

Πιθανή εξήγηση αποτελεί ότι παρουσία των λιγασών Neur και Mib1, η πρωτεΐνη D1 οδηγείται σε κάποιο ενδοκυτταρικό διαμέρισμα (π.χ. ενδοκυττωτικά

κυστίδια) όπου και είναι αδύνατον να ανοσοκατακρημνιστεί. Με απουσία των λιγασών η πρωτεΐνη είναι λιγότερο έγκλειστη σε μεμβρανικά κυστίδια και η μεγαλύτερη ποσότητα ουβικουΐτινυλίωσης οφείλεται απλά στην μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης DI που μπορεί να ανοσοκατακρημνιστεί.



#### Εικόνα 1.5: RNAi για τις πρωτεΐνες neur και mib σε S2DI κύτταρα

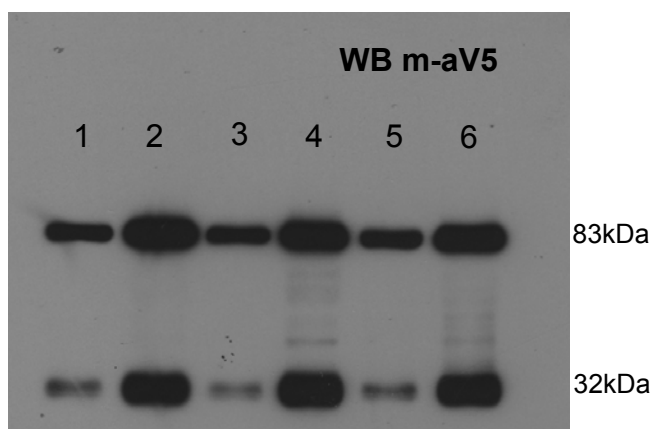
Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα S2DI τα οποία επώαστηκαν με δίκλωνο RNA για τα γονίδια *neur* και *mib1* χωριστά. Μετά από 24 ώρες έγινε επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης DI με χαλκό και μετά από 72 ώρες το πρωτεϊνικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε για ανοσοκατακρήμνιση

A) Έγινε ανοσοκατακρήμνιση με m-aDI αντίσωμα και western blot με gp-aDI. Πηγάδια 1,3,5: Input από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα με καθόλου δίκλωνο RNA, με δίκλωνο RNA για *neur* και με δίκλωνο RNA για *mib1*, αντίστοιχα. Παρατηρείται η ολόκληρη μήκους πρωτεΐνη DI και το εξοκυττάριο τμήμα αυτής. Πηγάδια 2,4,6: IP από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα με καθόλου δίκλωνο RNA, με δίκλωνο RNA για *neur* και με δίκλωνο RNA για *mib1*, αντίστοιχα. Παρατηρείται ότι με την απουσία της πρωτεΐνης Neur και κυρίως με απουσία της πρωτεΐνης Mib1, η ποσότητα της πρωτεΐνης DI που μπορεί να ανοσοκατακρημνιστεί αυξάνεται

B) Έγινε ανοσοκατακρήμνιση με m-aDI αντίσωμα και western blot με m-aubi. 1: δε χρησιμοποιήθηκε καθόλου δίκλωνο RNA, 2: τα κύτταρα επώαστηκαν με 30μg δίκλωνου RNA *neur*, 3: τα κύτταρα επώαστηκαν με 30μg δίκλωνου RNA *mib1*. Παρατηρείται αύξηση της ουβικουΐτινυλίωσης όταν απουσιάζουν οι λιγάσες ουβικουΐτινης.

Αν πραγματικά η πρωτεΐνη DI μεταφέρεται σε κάποιο ενδομεμβρανικό διαμέρισμα παρουσία των λιγασών, τότε πιθανόν η λύση των κυττάρων με ισχυρότερο διάλυμα λύσης ίσως μπορέσει να την απομονώσει από τα μεμβρανικά κυστίδια. Έγινε παροδική διαμόλυνση κυττάρων S2 με πλασμίδιο pIZ-DI και ακολούθησε λύση με διάλυμα λύσης NP-40 και τη μέθοδο ψύξης-θέρμανσης, διάλυμα λύσης RIPA και τη μέθοδο ψύξης-θέρμανσης και με διάλυμα λύσης NP-40

και χρήση υπερήχων. Με το διάλυμα NP-40 μπορεί να γίνει ήπια λύση των κυττάρων. Το διάλυμα λύσης RIPA περιέχει τον απορρυπαντικό παράγοντα SDS και με αυτό τον τρόπο προσπαθούμε να επιτύχουμε ισχυρότερη λύση των κυττάρων. Επιπλέον η χρήση υπερήχων μπορεί να λύσει μεμβρανικά κυστίδια και με αυτό τον τρόπο ίσως κατακρημνιστεί περισσότερη ποσότητα της πρωτεΐνης D1. Ακολούθησε ανοσοκατακρήμιση με σφαιρίδια νικελίου και western blot με m-aV5 αντίσωμα (εικόνα 1.6). Παρατηρείται ότι και με τους τρεις τύπους λύσεις των κυττάρων η ποσότητα της πρωτεΐνης D1 που μπορεί να ανοσοκατακρημνιστεί είναι ίδια. Πιθανότατα με τους τρεις τρόπους αυτούς δεν έγινε εφικτή η λύση των μεμβρανικών κυστιδίων και η απομόνωση της έγκλειστης πρωτεΐνης D1.



**Εικόνα 1.6: Ανοσοκατακρήμιση της πρωτεΐνης D1 μετά από λύση των κυττάρων με NP-40 διάλυμα, RIPA διάλυμα και υπέρηχους**

Έγινε παροδική διαμόλυνση κυττάρων S2 με το πλασμίδιο pIZ-D1. Ακολούθησε ανοσοκατακρήμιση με σφαιρίδια νικελίου και western blot με m-aV5 αντίσωμα. Το 1/50 του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος χρησιμοποιήθηκε ως input και το 1/5 της ανοσοκατακρήμισης χρησιμοποιήθηκε ως IP δείγμα. Το συνολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα προήλθε από  $5 \times 10^6$  κύτταρα

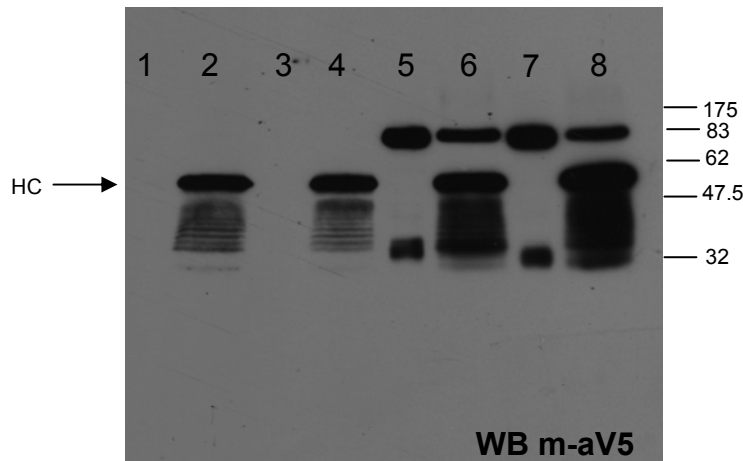
1,3,5 πηγάδια: Input από κύτταρα τα οποία λύθηκαν με NP40 διάλυμα και ψύξη-θέρμανση, με RIPA διάλυμα και ψύξη-θέρμανση και με NP40 διάλυμα και χρήση υπερήχων, αντίστοιχα. 2,4,6 πηγάδια: IP από κύτταρα τα οποία λύθηκαν με NP40 διάλυμα και ψύξη-θέρμανση, με RIPA διάλυμα και ψύξη-θέρμανση και με NP40 διάλυμα και χρήση υπερήχων, αντίστοιχα.

Παρατηρείται ότι σε όλες τις περιπτώσεις ανοσοακτακρημνίστηκαν ίσες ποσότητες της πρωτεΐνης D1

## 1.2 Θέσεις αλληλεπίδρασης του δεσμευτή Delta με τις λιγάσες ουβικουϊτίνης neutralized και mindbomb

Στο καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης Delta υπάρχουν τρία συντηρημένα μοτίβα: DDAEARKQNEQNAVATMH, IKNTWDKSYNNI και KQLNTD. Δημιουργήθηκε ένα ελλειμματικό μόριο της πρωτεΐνης D1, η πρωτεΐνη Dli2, στην οποία το δεύτερο συντηρημένο μοτίβο έχει αντικατασταθεί από ένα κατάλοιπο γλυκίνης και ένα σερίνης (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Το μόριο αυτό ελέγχθηκε για την ικανότητα του αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη Neutralized. Έγινε παροδική διαμόλυνση κυττάρων S2 με τα πλασμίδια pIZ-Dli2 και puast-neur. Ακολούθησε ανοσοκατακρήμιση με r-aneur αντίσωμα και western blot με m-aV5 αντίσωμα (εικόνα 1.7). Ως control χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στα οποία είχε γίνει παροδική διαμόλυνση με το πλασμίδιο pIZ-D1, κύτταρα στα οποία έγινε παροδική διαμόλυνση μόνο με το πλασμίδιο puast-neur και κύτταρα στα οποία δεν έγινε παροδική διαμόλυνση.

Παρατηρούμε ότι η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη Dli2 διατηρεί την ικανότητα αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη Neur. Συμπεραίνουμε ότι το δεύτερο συντηρημένο μοτίβο δεν αποτελεί τη θέση αναγνώρισης της πρωτεΐνης neur στην πρωτεΐνη D1. Αξίζει να αναφερθεί ότι το μοτίβο αυτό περιέχει 2 από τα 4 συντηρημένα κατάλοιπα λυσίνης που απαντούν στις πρωτεΐνες D1. Πιθανότατα οι θέσεις αυτές αποτελούν στόχους ουβικουϊτινυλίωσης, γεγονός που δεν έχει εξεταστεί ακόμα.



**Εικόνα 1.7: Το συντηρημένο μοτίβο IKNTWDKSYNNI δεν αποτελεί θέση αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη neuralized**

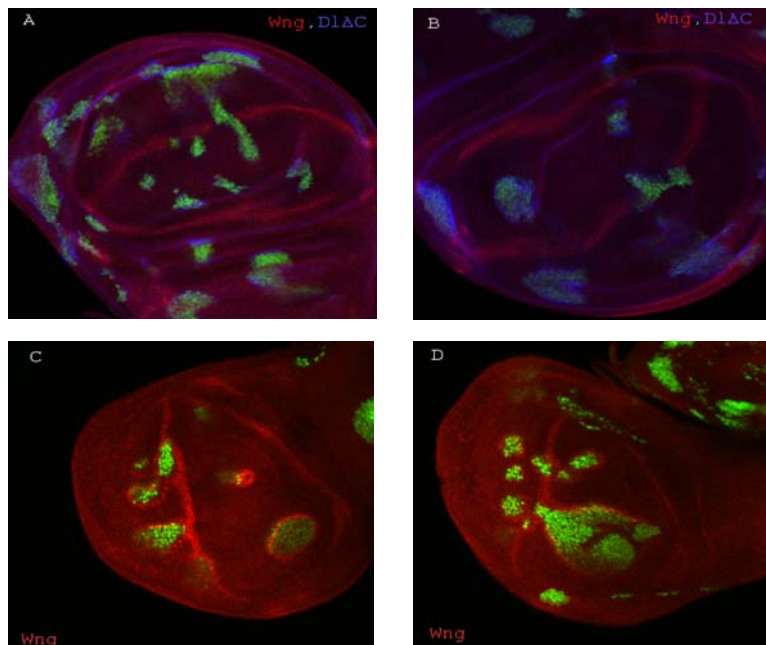
Έγινε παροδική κυττάρων S2 με τα πλασμίδια ruast-neur και rIZ-Dli2 και αποδείχθηκε με ανοσοκατακρήμνιση ότι μπορούν να αλληλεπιδράσουν. Πηγάδια 1,3,5,7: Input από κύτταρα στα οποία έγινε παροδική διαμόλυνση με τίποτα, 3µg ruast-neur, 3µg ruast-neur και 4µg rIZ-Dl1, 3µg ruast-neur και 4µg rIZ-Dli2, αντίστοιχα. Πηγάδια 2,4,6,8: IP από κύτταρα στα οποία έγινε παροδική διαμόλυνση με τίποτα, 3µg ruast-neur, 3µg ruast-neur και 4µg rIZ-Dl1, 3µg ruast-neur και 4µg rIZ-Dli2, αντίστοιχα. Ως input χρησιμοποιήθηκε το 1/50 της ποσότητας του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και ως IP το 1/5. Το συνολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα προήλθε από  $5 \times 10^6$  κύτταρα

Παρατηρείται ότι η πρωτεΐνη Dli2 μπορεί να αλληλεπιδράσει με την πρωτεΐνη neur όπως ακριβώς και η αγρίου τύπου πρωτεΐνη.

Όπως προαναφέρθηκε, η πρωτεΐνη Dli2 αποτελεί ένα ελλειμματικό μετάλλαγμα της πρωτεΐνης Dl, το οποίο δε διαθέτει τα καρβοξυτελικά αμινοξικά κατάλοιπα από τη βαλίνη 720 και μετέπειτα. Συνεπώς δε διαθέτει το τρίτο συντηρημένο μοτίβο της καρβοξυτελικής περιοχής της πρωτεΐνης, το μοτίβο KQLNTD. Όπως αποδείχθηκε όμως (εικόνα 1.1) μπορεί να ουβικουϊτινυλιωθεί όπως και η πλήρους μήκους πρωτεΐνη. Συμπερασματικά το τρίτο συντηρημένο μοτίβο δεν αποτελεί θέση αναγνώρισης για την πρωτεΐνη neur. Επιπλέον το ένα συντηρημένο αμινοξικό κατάλοιπο λυσίνης που διαθέτει δεν είναι γνωστό αν αποτελεί στόχο ουβικουϊτινυλίωσης, σίγουρα όμως δεν αποτελεί τον μοναδικό, αφού η πρωτεΐνη αυτή μπορεί να ουβικουϊτινυλιωθεί και σε άλλα κατάλοιπα.

Χρησιμοποιώντας το driver ptc δείχθηκε ότι το ελλειμματικό μόριο Dli2 συνεχίζει να είναι ενεργή πρωτεΐνη *in vivo*, αφού μπορεί να επάγει την εκτοπική έκφραση της πρωτεΐνης Wingless (data shown). Στη συνέχεια δημιουργήθηκαν μιτωτικοί κλώνοι στον αναπτυξιακό δίσκο φτερού οι οποίοι δεν εξέφραζαν την

πρωτεΐνη *mib* αλλά υπερέκφραζαν την πρωτεΐνη *D1ΔC*. Παρατηρείται ότι η πρωτεΐνη *D1ΔC* είναι ανίκανη να επάγει την εκτοπική έκφραση της πρωτεΐνης *wingless* και συνεπώς είναι ανίκανη να σηματοδοτήσει με την απουσία της πρωτεΐνης *mib* (εικόνα 1.8. A,B). Αντιθέτως, παρουσία της λιγάσης *mib*, η πρωτεΐνη *D1ΔC* είναι ικανή να σηματοδοτήσει την εκτοπική έκφραση της πρωτεΐνης *wingless* και μάλιστα τόσο στο ραχιαίο όσο και στο κοιλιακό τμήμα του δίσκου (εικόνα 1.8. C,D). Πιθανότητα λοιπόν, το τρίτο συντηρημένο μοτίβο της πρωτεΐνης *D1* δεν αποτελεί θέση αναγνώρισης ούτε από την πρωτεΐνη *mib* και η έλλειψη του δεν εμποδίζει την επαρκή ουβικουΐτινυλίωση της πρωτεΐνης από τη λιγάση αυτή ώστε να γίνει ικανή για σηματοδότηση.



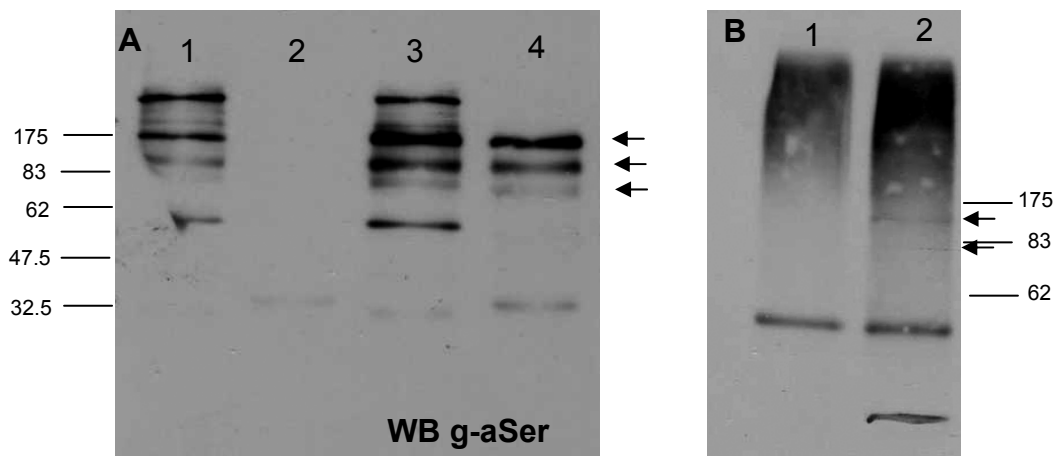
**Εικόνα 1.8: Η πρωτεΐνη *D1ΔC* εξαρτάται από τη λιγάση ουβικουΐτίνης *mindbomb* κατά τη σηματοδότηση στο ραχιακοκοιλιακό όριο του φτερού**

A,B) Στις εικόνες φαίνονται μιτωτικοί κλώνοι σε αναπτυξιακό δίσκο φτερού οι οποίοι δεν εκφράζουν *Mib* αλλά υπερέκφραζουν *D1ΔC*. Οι κλώνοι είναι μαρκαρισμένοι θετικά με την ύπαρξη GFP. Με κόκκινο χρώμα βάφεται η πρωτεΐνη *Wg* και με μπλε η *D1ΔC*. Παρατηρείται η αδυναμία της πρωτεΐνης *D1ΔC*, απουσία *Mib*, να επάγει την εκτοπική έκφραση της πρωτεΐνης *Wg* (έλλειψη πρωτεΐνης *Wg* γύρω από τους μιτωτικούς κλώνους)

C,D) Στις εικόνες φαίνονται μιτωτικοί κλώνοι σε αναπτυξιακό δίσκο φτερού οι οποίοι εκφράζουν *Mib* και υπερέκφραζουν *D1ΔC*. Οι κλώνοι είναι μαρκαρισμένοι θετικά με την ύπαρξη GFP. Με κόκκινο χρώμα βάφεται η πρωτεΐνη *Wg*. Παρατηρείται η ικανότητα της πρωτεΐνης *D1ΔC*, παρουσία *Mib*, να επάγει την εκτοπική έκφραση της πρωτεΐνης *Wg* (παρουσία πρωτεΐνης *Wg* γύρω από τους μιτωτικούς κλώνους)

### 1.3 Η πρωτεΐνη Serrate ουβικουΐτινυλιώνεται

Στις προηγούμενες ενότητες αποδείχθηκε ότι η πρωτεΐνη D1 ουβικουΐτινυλιώνεται. Εύλογο ερώτημα είναι αν το ίδιο συμβαίνει και με το δεύτερο δεσμευτή του υποδοχέα Notch, την πρωτεΐνη Serrate. Για να διαπιστωθεί αυτό, έγινε παροδική διαμόλυνση των κυττάρων S2 με το πλασμίδιο pMt-Sermyc. Ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση με  $\gamma$ -amyc αντίσωμα και western blot με g-aSer και m-aUbi αντισώματα (εικόνα 1.9). Παρατηρείται, αν και όχι ξεκάθαρα, ότι η πρωτεΐνη Ser ουβικουΐτινυλιώνεται (εικόνα 1.9. B). Είναι άγνωστο ακόμα αν αυτή η μεταμεταφραστική τροποποίηση οφείλεται στην ενδογενή πρωτεΐνη Neur ή/και στην Mib.



#### Εικόνα 1.9: Η πρωτεΐνη Serrate ουβικουΐτινυλιώνεται

Έγινε πείραμα παροδικής διαμόλυνση των κυττάρων S2 με 4 $\mu$ g πλασμιδίου puast-Sermyc. Ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση με  $\gamma$ -amyc αντίσωμα και western blot με g-aSer και m-aubi αντισώματα.

A) 1,3 πηγάδια: Input από διαμολυσμένα κύτταρα S2 με 0 $\mu$ g και 4 $\mu$ g pMt-Sermyc αντίστοιχα. Πηγάδια 2,4: IP από διαμολυσμένα κύτταρα S2 με 0 $\mu$ g και 4 $\mu$ g pMt-Sermyc αντίστοιχα. Παρατηρείται η έκφραση και ανοσοκατακρήμνιση της πρωτεΐνης Ser η οποία παρουσιάζεται με τη μορφή τριών ζωνών. Ως input χρησιμοποιήθηκε το 1/50 του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και ως IP το 1/6. Το συνολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα προήλθε από 5x10<sup>6</sup> κύτταρα

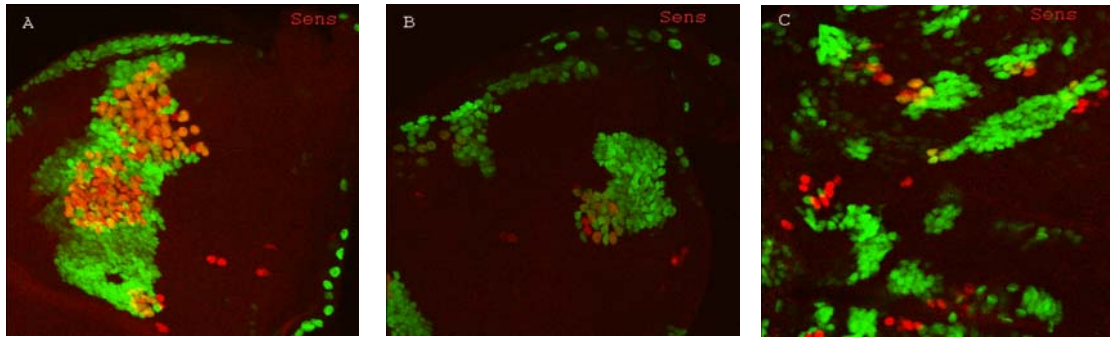
B) Πηγάδι 1: IP από μη διαμολυσμένα κύτταρα S2. Πηγάδι 2: IP από διαμολυσμένα κύτταρα S2 με 4 $\mu$ g πλασμιδίου pMt-Sermyc. Παρατηρούνται οι ουβικουΐτινυλιωμένες ζώνες της πρωτεΐνης Ser οι οποίες πιθανών αντιστοιχούν στις δύο εντονότερες ζώνες που ανοσοκατακρημνίζονται. Ως IP χρησιμοποιήθηκαν τα 5/6 του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Το συνολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα προήλθε από 5x10<sup>6</sup> κύτταρα



#### 1.4 Θέσεις αλληλεπίδρασης του δεσμευτή Serrate με τη λιγάση ουβικουΐτινης *neuralized*

Αν και υπάρχει χαμηλή ομολογία στα ενδοκυττάρια τμήματα των δεσμευτών του υποδοχέα Notch, αναγνωρίστηκε ένα συντηρημένο μοτίβο στο καρβοξυτελικό τμήμα των πρωτεϊνών Serrate και Jagged, το οποίο έχει ομοιότητα και με μια περιοχή στο ενδοκυττάριο τμήμα των δεσμευτών Delta (Glittenberg *et al.*, in press). Το μοτίβο αυτό είναι το SNNLQ-E-N—R—NP. Δημιουργήθηκε ένα ελλειμματικό μόριο της πρωτεΐνης Ser, το Ser<sup>Δint</sup>, το οποίο δε διαθέτει το μοτίβο αυτό (Glittenberg *et al.*, unpublished data). Η πρωτεΐνη αυτή δεν είναι ικανή να αλληλεπιδράσει με τις πρωτεΐνες Neur και NeurΔR, αντιθέτως με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη Ser και δεν μπορεί να ενδοκυττωθεί (Glittenberg *et al.*, unpublished data). Συνεπώς το μοτίβο αυτό πιθανόν αποτελεί τη θέση αναγνώρισης της πρωτεΐνης Neur στην πρωτεΐνη Ser. Αυτή η υπόθεση θα επιβεβαιωθεί με βιοχημικές μελέτες όπου θα ελεγχθεί η ικανότητα του συγκεκριμένου μεταλλάγματος να ουβικουΐτινυλιώνεται.

Δημιουργήθηκαν μιτωτικοί κλώνοι στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού οι οποίοι δεν εξέφραζαν τις πρωτεΐνες DI και Ser αλλά υπερέκφραζαν την πρωτεΐνη Ser<sup>Δint</sup> (εικόνα 1.10). Όπως φαίνεται στην εικόνα 1.10 η πρωτεΐνη Ser<sup>Δint</sup> δεν είναι ικανή να σηματοδοτήσει κατά την πλευρική αναστολή στον προνευρικό συναθροισμό γεγονός που αποκαλύπτεται από τον ισχυρό νευρογόνο φαινότυπο των κλώνων αυτών. Συμπερασματικά, για να επιτευχθεί η πλευρική αναστολή από την πρωτεΐνη Ser, αυτή πρέπει να αλληλεπιδράσει με τις λιγάσες ουβικουΐτινης και να ενδοκυττωθεί.



**Εικόνα 1.10: Η πρωτεΐνη  $Ser^{\Delta int}$  δεν μπορεί να σηματοδοτήσει κατά την πλευρική αναστολή**

Στις εικόνες φαίνονται μιτωτικοί κλώνοι δίσκου φτερού όπου δεν εκφράζονται οι πρωτεΐνες D1 και Ser αλλά υπερεκφράζεται η πρωτεΐνη  $Ser^{\Delta int}$ . Οι κλώνοι μαρκάρονται από την ύπαρξη GFP. Με κόκκινο βάφεται η πρωτεΐνη Senseless. Παρατηρείται η ύπαρξη ισχυρού νευρογόνου φαινοτύπου γεγονός που δηλώνει ότι η πρωτεΐνη  $Ser^{\Delta int}$  δεν μπορεί να σηματοδοτήσει κατά την πλευρική αναστολή.

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ II:**

**Κυτταρική διακίνηση των δεσμευτών Delta και Serrate κατά τη σηματοδότηση Notch**

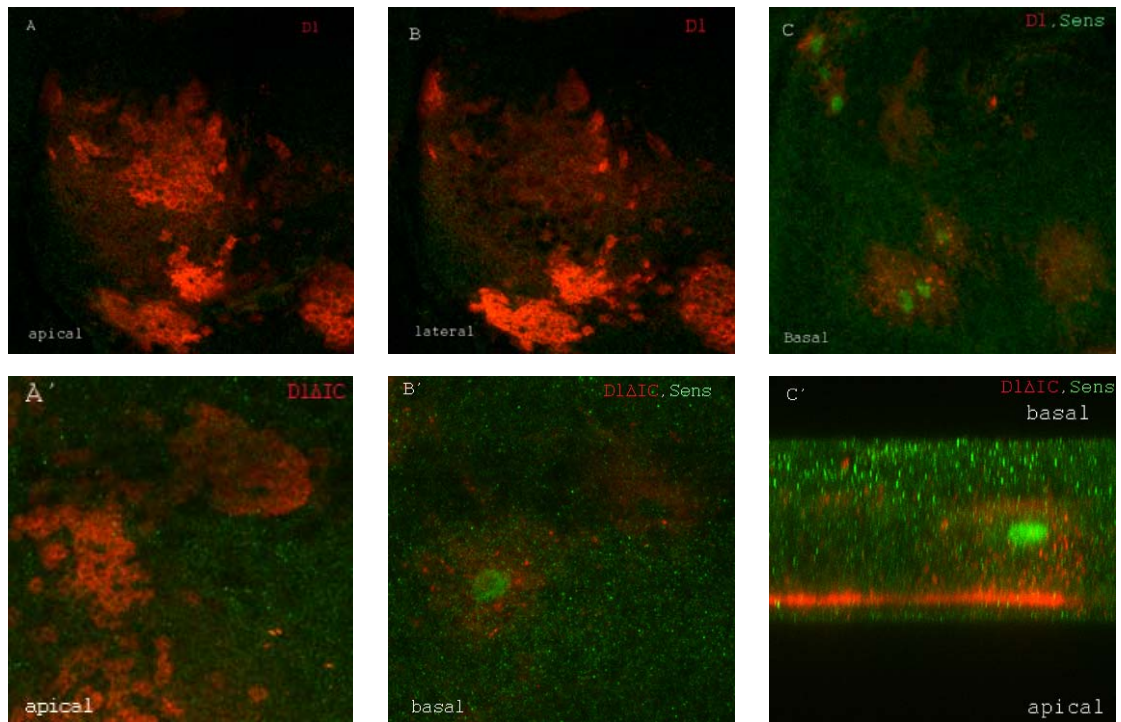
## 2.1 Κυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης Delta

Η πρωτεΐνη Delta είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία απαντάται στην κορυφαία επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων και σε κυτταροπλασματικά κυστίδια στο εσωτερικό των κυττάρων αυτών, τα οποία αντιστοιχούν σε ενδοσώματα. Παρατηρήθηκε ότι οι περιοχές όπου η πρωτεΐνη Delta είναι περισσότερο ενδοκυττωμένη συμπίπτει με τις περιοχές έκφρασης του γονίδιου *neur* στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού της προνύμφης (Pavlopoulos *et al.*, 2001). Επιπλέον μελέτες έδειξαν ότι στα κύτταρα ΠΑΟ, η πρωτεΐνη D1 εντοπίζεται σε ψευδοπόδια και στη βασική μεμβράνη του επιθηλίου και με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η πλευρική αναστολή σε πιο μακρινή απόσταση (De Joussineau *et al.*, 2003).

Για να μελετηθεί περισσότερο η κυτταρική κατανομή του δεσμευτή Delta και ο τρόπος που αυτή επιτυγχάνεται, η πρωτεΐνη αυτή και το ελλειμματικό μόριο D1ΔIC υπερεκφράστηκαν στον προνευρικό πληθυσμό (εικόνα 1). Στην πρωτεΐνη D1ΔIC απουσιάζει το ενδοκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης D1. Παρατηρείται ότι η πρωτεΐνη Delta στον προνευρικό συναθροισμό συσσωρεύεται στην κορυφαία επιφάνεια των κυττάρων αλλά και σε ενδοκυττωτικά κυστίδια (εικόνα 2.1.A,B). Παρατηρείται επίσης ότι συσσωρεύεται αν και ελάχιστα και στην βασική επιφάνεια των κυττάρων (εικόνα 2.1.C). Το ελλειμματικό μόριο D1ΔIC εμφανίζει και αυτό συσσώρευση στην κορυφαία επιφάνεια (εικόνα 2.1.A'), ενώ παρατηρείται μειωμένος εντοπισμός του σε ενδοκυττωτικά κυστίδια (δε δείχνεται). Παρομοίως με την πρωτεΐνη πλήρους μήκους συσσωρεύεται και αυτό στην βασική επιφάνεια αν και ελάχιστα (εικόνα 2.1.B',C').

Η συσσώρευση στη βασική επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων αποτελεί χαρακτηριστικό των κυττάρων του προνευρικού πληθυσμού και δεν παρατηρείται στον υπόλοιπο δίσκο του φτερού. Αυτό το γεγονός δηλώνει ότι η κυτταρικός αυτός εντοπισμός πιθανώς συμβάλει στην πλευρική αναστολή που επιτυγχάνεται με τη σηματοδότηση Notch.

Η υπερέκφραση και των δύο πρωτεϊνών στους προνευρικούς συναθροισμούς δεν επηρέασε την πλευρική αναστολή σημαντικά, αφού δεν παρατηρείται νευρογόνος φαινότυπος ούτε στους αναπτυξιακούς δίσκους φτερού της προνύμφης (εικόνα 2.1), ούτε στα ενήλικα άτομα (σπάνιοι και μεμονωμένοι διπλασιασμοί μακροχαιτών, δε δείχνεται).



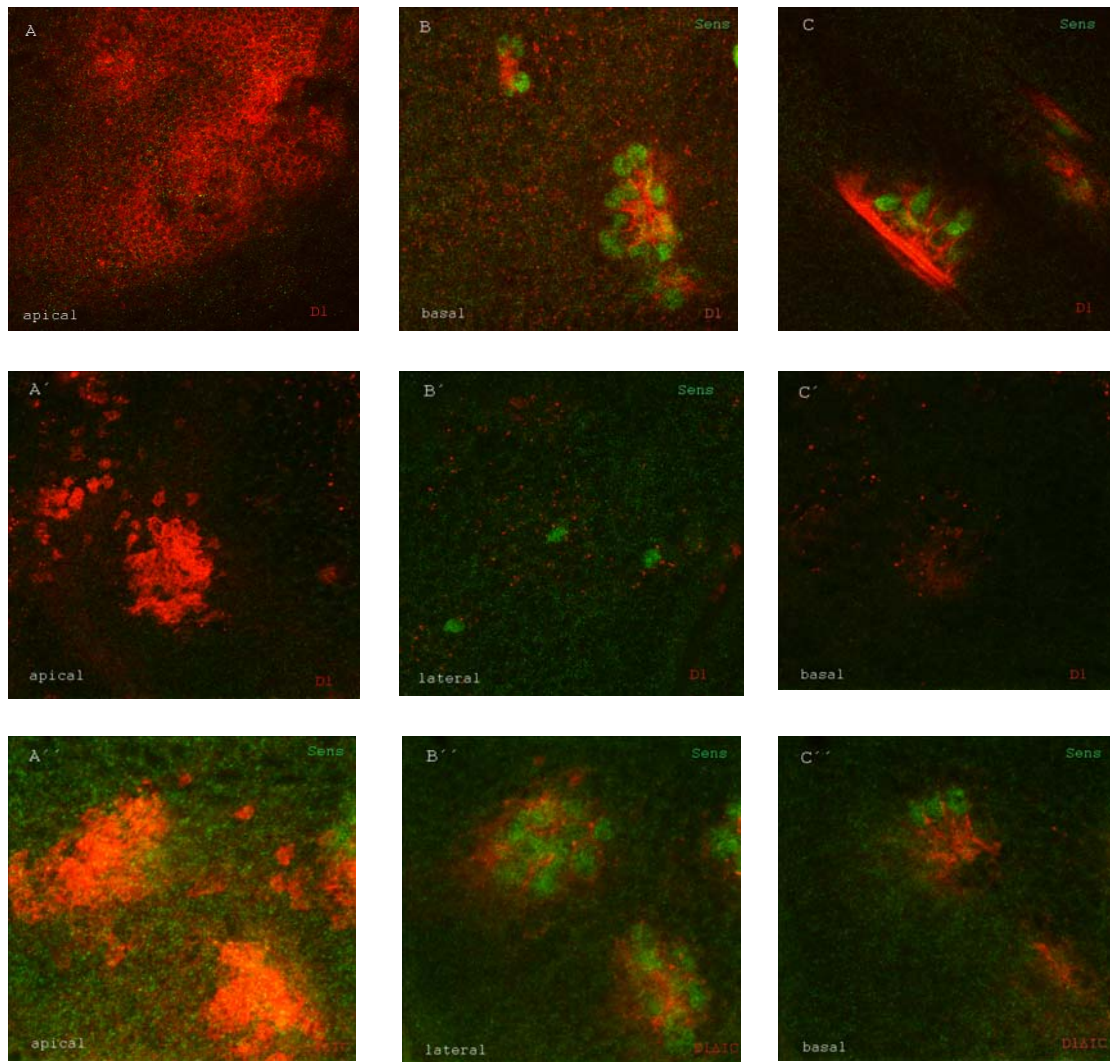
**Εικόνα 2.1: Κυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης Delta και του ελλειμματικού μορίου D1ΔIC σε κύτταρα προνευρικού συναθροισμού**

Στις εικόνες φαίνονται θώρακες προνευρών τρίτου σταδίου όπου υπερεκφράζεται η πρωτεΐνη Delta (A-C) και το ελλειμματικό μόριο D1ΔIC (A'-C') σε κύτταρα του προνευρικού πληθυσμού. Με κόκκινο φαίνεται η χρώση για Delta και D1ΔIC. Με πράσινο βάφεται η πρωτεΐνη Senseless, η οποία μαρκάρει τα ΠΑΟ κύτταρα. Οι εικόνες A-B' αποτελούν οριζόντιες τομές στη στιβάδα του επιθηλίου ενώ η εικόνα C' εγκάρσια τομή.

## 2.2 Η πρωτεΐνη δυναμίνη επηρεάζει την υποκυτταρική θέση του δεσμευτή Delta

Για να μελετηθεί καλύτερα ο ρόλος της ενδοκύττωσης της πρωτεΐνης Delta στην υποκυτταρική της κατανομή χρησιμοποιήσαμε μια επικρατή αρνητική μεταλλαγή της δυναμίνης. Η πρωτεΐνη δυναμίνη είναι υπεύθυνη για την αποκοπή των κυστιδίων καλυμμένων με κλαθρίνη από τη μεμβράνη. Για να αποτρέψουμε την ενδοκύττωση στους προνευρικούς πληθυσμούς υπερεκφράσαμε την επικρατή αρνητική μεταλλαγή της δυναμίνης, UAS-shiDN, με τη χρήση της σειράς 253-Gal4. Φαίνεται ότι η πρωτεΐνη DI συσσωρεύεται στην βασική επιφάνεια των κυττάρων του προνευρικού πληθυσμού, αν και λιγότερο από τη συσσώρευση της κορυφαίας επιφάνειας, και παρατηρείται ισχυρός νευρογόνος φαινότυπος (εικόνα 2.2.A-C). Τα ίδια αποτελέσματα προκύπτουν και από την ταυτόχρονη υπερέκφραση των πρωτεϊνών DI και DIΔIC με την αρνητική μεταλλαγή της δυναμίνης (εικόνα 2.2.A'-C'). Στην περίπτωση του ελλειμματικού μορίου μάλιστα παρατηρείται πιο ισχυρός νευρογόνος φαινότυπος και μεγαλύτερη συσσώρευση στη βασική μεμβράνη (εικόνα 2.2.A''-C'). Επιπλέον, με ταυτόχρονη έλλειψη των πρωτεϊνών Mindbomb και Neutralized παρατηρείται επίσης νευρογόνος φαινότυπος στους προνευρικούς συναθροισμούς, ο οποίος συνοδεύεται από συσσώρευση της πρωτεΐνης DI στη βασική επιφάνεια του επιθηλίου (Pitsouli and Delidakis, 2005, Pitsouli ΔΔ).

Συμπερασματικά, η παρεμπόδιση της ουβικουϊτινυλίωσης και της ενδοκύττωσης οδηγεί σε απώλεια σηματοδότησης η οποία συνοδεύεται από συσσώρευση της πρωτεΐνης DI στη βασική αλλά και στην κορυφαία επιφάνεια των εκτοπικών κυττάρων ΠΑΟ. Ο ρόλος αυτής της συσσώρευσης του DI παραμένει άγνωστος. Παράδοξο είναι το γεγονός ότι το ελλειμματικό μόριο DIΔIC έχει την ίδια συμπεριφορά ως προς την απουσία ενδοκύττωσης με την πλήρους μήκους πρωτεΐνη. Φαίνεται ότι το ενδοκυττάριο τμήμα του DI, δεν εμπλέκεται στη διαδικασία που είναι υπεύθυνη για τη συσσώρευση της πρωτεΐνης στη βασική μεμβράνη των κυττάρων.



**Εικόνα 2.2: Η απουσία ενδοκύττωσης επηρεάζει την κυτταρική κατανομή των πρωτεϊνών Delta και DIIIC**

A-C) Παρατηρείται η κυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης Dl όταν απουσιάζει η ενδοκύττωση (UAS-ShiDN). Φαίνεται η ύπαρξη της στην κορυφαία επιφάνεια (A) αλλά και η αυξημένη συσσώρευση της στη βασική επιφάνεια (B,C). Επιπλέον παρατηρείται ο ισχυρός νευρογόνος φαινότυπος. Με κόκκινο βάφεται η πρωτεΐνη Dl και με πράσινο η πρωτεΐνη Senseless.

A'-C') Παρατηρείται η κυτταρική κατανομή της υπερεκφραζόμενης στους προνευρικούς πληθυσμούς πρωτεΐνης Dl όταν απουσιάζει η ενδοκύττωση (UAS-ShiDN). Φαίνεται η συσσώρευση της στην κορυφαία (A') αλλά και στη βασική (C') μεμβράνη. Επιπλέον παρατηρείται νευρογόνος φαινότυπος. Με κόκκινο βάφεται η πρωτεΐνη Dl και με πράσινο η πρωτεΐνη Senseless

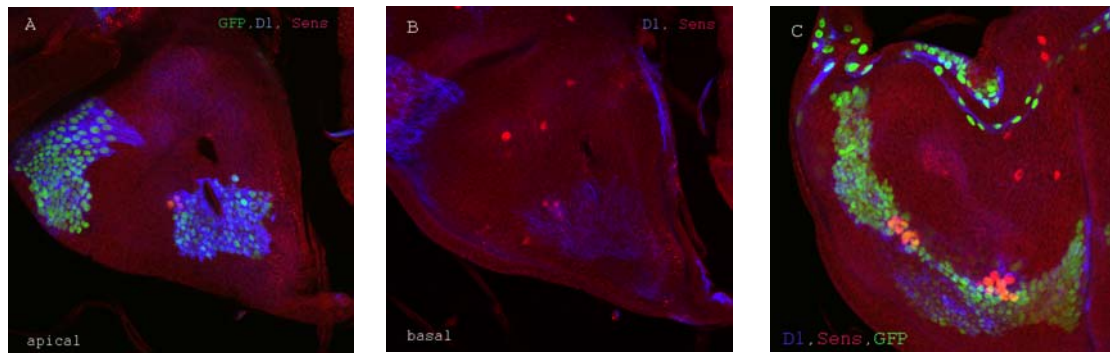
A''-C'') Παρατηρείται η κυτταρική κατανομή της υπερεκφραζόμενης στους προνευρικούς πληθυσμούς πρωτεΐνης DIIIC όταν απουσιάζει η ενδοκύττωση (UAS-ShiDN). Είναι φανερό η συσσώρευση της πρωτεΐνης στην κορυφαία (A'') αλλά και τη βασική επιφάνεια (C''). Παρατηρείται και ισχυρός νευρογόνος φαινότυπος. Με κόκκινο βάφεται η πρωτεΐνη DIIIC και με πράσινο η πρωτεΐνη Senseless

### 2.3 Ο ρόλος της Epsin στη σηματοδότηση μέσω πρωτεΐνης Delta

Για να αποσαφηνίσουμε περαιτέρω το ρόλο της ενδοκύττωσης και της ουβικουΐτινυλίωσης στην κυτταρική κατανομή του D1 και τη σηματοδότηση, κατασκευάσαμε μιτωτικούς κλώνους lqf. Το γονίδιο lqf (liquid facets) κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Epsin στη *D. melanogaster*. Οι Epsins είναι ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες οι οποίες προσδέουν PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> στην πλασματική μεμβράνη όπως επίσης και την κλαθρίνη των ενδοκυττωτικών κυστιδίων και το AP-2 adapter σύμπλοκο. Η ανακάλυψη ότι οι Epsins αναγνωρίζουν ουβικουΐτινυλιωμένες πρωτεΐνες έχει οδηγήσει στο μοντέλο ότι οι πρωτεΐνες αυτές μεταφέρουν μονοουβικουΐτινυλιωμένες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες στο ενδοκυττωτικό μονοπάτι (Wendland, 2002). Έχει προταθεί ότι κατά τη σηματοδότηση Notch, οι συνδέτες πρέπει να ενδοκυττωθούν στο κύτταρο που στέλνει του σήμα μέσω τη δράση της Epsin (Wang and Struhl, 2004). Αυτή η ενδοκύττωση οδηγεί τους δεσμευτές σε ένα συγκεκριμένο υποκυτταρικό διαμέρισμα όπου και θα ενεργοποιηθούν πριν παρουσιαστούν στη μεμβράνη για σηματοδότηση.

Σε κλώνους επιθηλιακών κυττάρων του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού όπου δεν υπήρχε η πρωτεΐνη Epsin, υπερεκφράστηκε η πρωτεΐνη Delta (εικόνα 2.3). Παρατηρείται ισχυρός νευρογόνος φαινότυπος από την πιθανή παρεμπόδιση της σηματοδότησης. Στα ενήλικα άτομα παρατηρείται έλλειψη μικροχαιτών και μακροχαιτών στο θώρακα (δε δείχνεται). Μελετήθηκε η υποκυτταρική θέση της πρωτεΐνης D1 στους νευρογόνους συναθροισμούς και παρατηρήθηκε συσσώρευση της πρωτεΐνης στη βασική πλευρά του επιθηλίου και μάλιστα εντονότερα από την περίπτωση έλλειψης ενδοκύττωσης λόγω αρνητικής, επικρατούσας μεταλλαγής της δυναμίνης. Συνεπώς η ενδοκύττωση μέσω Epsin είναι σημαντική για την πλευρική αναστολή και τη φυσιολογική τοποθέτηση του δεσμευτή D1 στον προνευρικό συναθροισμό.





**Εικόνα 2.3: Η πρωτεΐνη epsin συμμετέχει στην κυτταρική κατανομή του δεσμευτή Delta και στη σηματοδότηση**

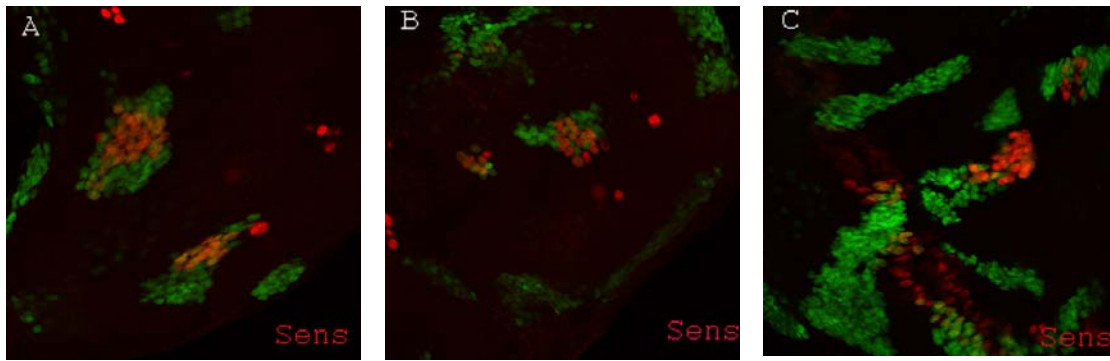
Στις εικόνες φαίνονται κλώνοι σε επιθηλιακά κύτταρα αναπτυξιακού δίσκου φτερού που δεν εκφράζουν epsin αλλά υπερεκφράζουν D1. Οι κλώνοι μαρκάρονται με την παρουσία GFP. Με κόκκινο χρώμα βάφεται η πρωτεΐνη Senseless και με μπλε η D1

A) Κορυφαία επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων του δίσκου. Φαίνεται η κατανομή στην κορυφαία μεμβράνη της πρωτεΐνης D1

B) Βασική επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων του δίσκου. Φαίνεται η συσσώρευση της πρωτεΐνης D1 στην βασική μεμβράνη.

C) Τομή στη μέση των επιθηλιακών κυττάρων. Παρατηρείται ο νευρογόνος φαινότυπος που προκαλείται από την έλλειψη της epsin

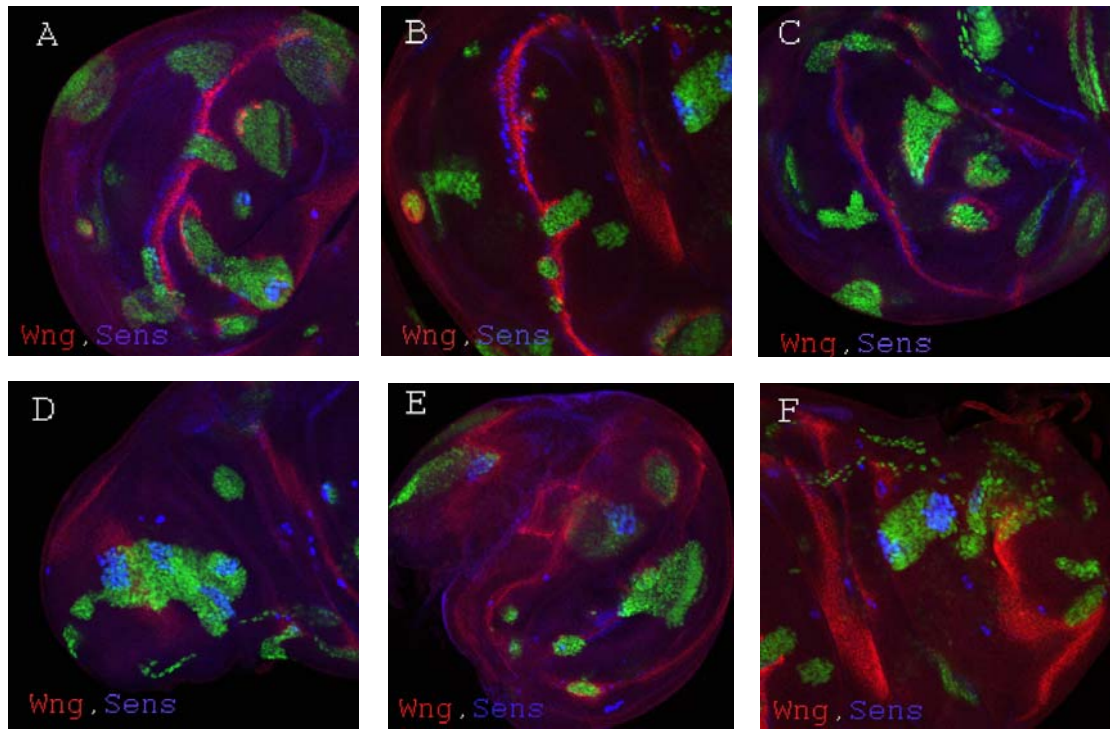
Σύμφωνα με το μοντέλο των Wang και Struhl, το ελλειμματικό μόριο D1ΔIC δεν θα έπρεπε να μπορεί να σηματοδοτήσει κατά την πλευρική αναστολή. Πράγματι η έκφραση του προκαλεί ισχυρό νευρογόνο φαινότυπο (εικόνα 2.4). Δημιουργήσαμε μιτωτικούς κλώνους στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού όπου δεν υπήρχαν οι δεσμευτές D1 και Ser αλλά στη θέση τους υπερεκφράστηκε η πρωτεΐνη D1ΔIC της οποίας λείπει το ενδοκυττάριο τμήμα. Παρατηρούνται πολλά εκτοπικά κύτταρα ΠΑΟ, γεγονός που δηλώνει ότι δεν μπορεί να επιτευχθεί πλευρική αναστολή στους προνευρικούς συναθροισμούς και κατ'επέκταση δεν μπορεί να γίνει σηματοδότηση από το δεσμευτή αυτό. Πιθανή εξήγηση είναι ότι το μόριο αυτό δεν μπορεί να ενδοκυττωθεί μέσω της Epsin και να ενεργοποιηθεί σε ένα συγκεκριμένο υποκυτταρικό διαμέρισμα. Σε συμφωνία έρχεται και το γεγονός ότι δεν παρατηρούνται ενδοκυττωτικά κυστίδια που να περιέχουν την πρωτεΐνη αυτή (δε δείχνεται).



**Εικόνα 2.4: Η ελλειμματική πρωτεΐνη D1ΔIC δεν μπορεί να σηματοδοτήσει**

Στις εικόνες φαίνονται μιτωτικοί κλώνοι στον αναπτυξιακό δίσκο φτερού οι οποίοι δεν εκφράζουν τους δεσμευτές DI και Ser αλλά υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη D1ΔIC. Οι κλώνοι μαρκάρονται θετικά με GFP. Παρατηρείται ισχυρός νευρογόνος φαινότυπος. Με κόκκινο βάφεται η πρωτεΐνη Senseless

Αν πραγματικά η ελλειμματική μορφή του DI δεν μπορεί να σηματοδοτήσει επειδή δεν μπορεί να ενδοκυττωθεί, η αντικατάσταση της ενδοκυττάριας περιοχής με ετερόλογη περιοχή που περιέχει άλλα σήματα ενδοκύτωσης θα έπρεπε να μπορεί να επάγει την ενδοκύτωση και τη σηματοδότηση ξανά. Η αντικατάσταση της ενδοκυττάριας περιοχής του DI με 21 αμονοξικά κατάλοιπα από τον υποδοχέα LDL που περιέχουν σήμα ενδοκύτωσης έκανε ικανό το μόριο αυτό να σηματοδοτεί στην περιοχή του ραχαιοκυλίου ορίου του φτερού (Wang and Struhl, 2004, εικόνα 2.5). Η πρωτεΐνη αυτή είναι ικανή να επάγει την έκφραση εκτοπικού Wingless στο ραχιαίο τμήμα του δίσκου του φτερού. Σε αυτή την περίπτωση φαίνεται πως η πρωτεΐνη DI ανακτά την ικανότητα της να ενδοκυττώνεται και να σηματοδοτεί. Δε συμβαίνει όμως το ίδιο στην περίπτωση της πλευρικής αναστολής στο θώρακα της προνύμφης (εικόνα 2.5). Εδώ φαίνεται πως το DI δεν έχει ανακτήσει την ικανότητα του να σηματοδοτεί αφού παρατηρείται ισχυρός νευρογόνος φαινότυπος. Ο λόγος για αυτή τη διαφορετική συμπεριφορά της πρωτεΐνης παραμένει άγνωστος.



**Εικόνα 2.5: Η πρωτεΐνη DILDL μπορεί να σηματοδοτήσει την επαγωγή εκτοπικού wingless αλλά δεν μπορεί να σηματοδοτήσει κατά την πλευρική αναστολή**

Στις παραπάνω εικόνες φαίνονται μιτωτικοί κλώνοι σε δίσκους φτερού οι οποίοι δεν εκφράζουν τους δεσμευτές D1 και Ser και έναντι αυτών υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη DILDL. Οι κλώνοι μαρκάρονται θετικά από την ύπαρξη GFP. Με κόκκινο χρώμα βάφεται η πρωτεΐνη wingless και με μπλε η Senseless

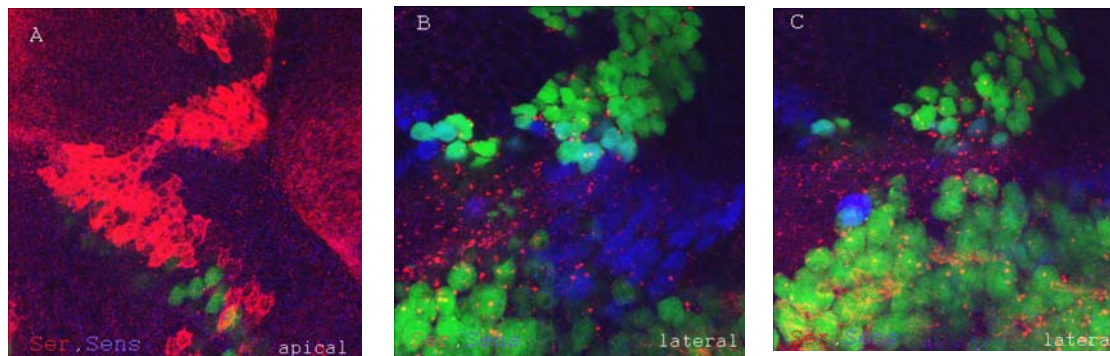
A-C) Φαίνεται η ικανότητα επαγωγής wingless της πρωτεΐνης DILDL. Παρατηρείται η έκφραση εκτοπικού wingless (κόκκινο) γύρω από κλώνους που βρίσκονται στο ραχιαίο διαμέρισμα

D-F) Φαίνεται πιο καθαρά η αδυναμία της πρωτεΐνης DILDL να σηματοδοτήσει κατά την πλευρική αναστολή. Παρατηρείται η ύπαρξη πολυάριθμων εκτοπικών κυττάρων ΠΑΟ στους μιτωτικούς κλώνους.

## 2.4 Ο ρόλος της Epsin στη σηματοδότηση μέσω πρωτεΐνης Serrate

Η πρωτεΐνη Serrate είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία απαντάται στην κορυφαία επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων και σε κυτταροπλασματικά κυστίδια στο εσωτερικών των κυττάρων αυτών. Μάλιστα, ο κυστιδιακός εντοπισμός είναι εντονότερος από αυτόν της πρωτεΐνης Delta. Δεν έχει παρατηρηθεί ποτέ συσσώρευση της πρωτεΐνης Ser στη βασική μεμβράνη του επιθηλίου. Η πρωτεΐνη Neuralized επηρεάζει την υποκυτταρική θέση της πρωτεΐνης Serrate όπως επηρεάζει και αυτήν της πρωτεΐνης Delta (Pitsouli and Delidakis, 2005). Με υπερέκφραση του Neuralized ο εντοπισμός του δεσμευτή Ser στην κορυφαία επιφάνεια των κυττάρων μειώνεται δραματικά, γεγονός που δηλώνει ότι η πρωτεΐνη Neug επάγει την ενδοκύτωση της πρωτεΐνης Ser και την απομάκρυνση της από την κυτταροπλασματική μεμβράνη.

Όπως προαναφέρθηκε, η πρωτεΐνη Epsin επηρεάζει την υποκυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης D1 και τη σηματοδότηση αυτής κατά την πλευρική αναστολή. Για να βρεθεί εάν το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση της πρωτεΐνης Ser, δημιουργήθηκαν μιτωτικοί κλώνοι στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού οι οποίοι δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη epsin αλλά υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Ser (εικόνα 2.6). Όπως παρατηρείται στην εικόνα 2.6 δεν αλλάζει δραματικά η υποκυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης Ser με έλλειψη της Epsin, αν και παρατηρείται μερική συσσώρευση στη βασική επιφάνεια όπως και στην περίπτωση της πρωτεΐνης D1. Συνεχίζονται να παρατηρούνται ενδοκυττωτικά κυστίδια γεγονός που υποδηλώνει ότι η συνολική ενδοκύτωση της πρωτεΐνης δεν έχει επηρεαστεί. Δεν είναι γνωστό αν επηρεάζεται μόνο ένα τμήμα της ενδοκύτωσης της πρωτεΐνης Ser, που θα την οδηγήσει σε συγκεκριμένο υποκυτταρικό διαμέρισμα ώστε να ενεργοποιηθεί. Επιπλέον παρατηρείται ισχυρός νευρογόνος φαινότυπος που οφείλεται στην έλλειψη της πλευρικής αναστολής. Δεν είναι όμως ξεκάθαρο αν αυτό προκαλείται από την έλλειψη ενδοκύτωσης της ενδογενούς πρωτεΐνης D1 ή/και από την έλλειψη ενδοκύτωσης της υπερεκφραζόμενης πρωτεΐνης Ser.



**Εικόνα 2.6: Η υποκυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης Ser χωρίς την παρουσία της πρωτεΐνης epsin**

Στις εικόνες φαίνονται μιτωτικοί κλώνοι σε αναπτυξιακό δίσκο φτερού οι οποίοι δεν εκφράζουν epsin αλλά υπερεκφράζουν Ser. Οι κλώνοι είναι μαρκαρισμένοι θετικά με την ύπαρξη GFP. Με κόκκινο χρώμα βάφεται η πρωτεΐνη Ser και με μπλε η Senseless.

A) Παρατηρείται η συσσώρευση της πρωτεΐνης Ser στην κορυφαία επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων

B-C) Παρατηρούνται ενδοκυττωτικά κυστίδια που περιέχουν την πρωτεΐνη Ser. Επιπλέον παρατηρείται ο ισχυρός νευρογόνος φαινότυπος.

## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**



## Συζήτηση

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch συμμετέχει σε μια πλειάδα κυτταρικών αποφάσεων σε διαφορετικούς οργανισμούς. Κατά τη μεταπτυχιακή εργασία αυτή έγινε μια προσπάθεια διαλεύκανσης του ρόλου της ουβικουϊτινυλίωσης και της ενδοκυττώσης των D1 και Ser προσδετών κατά τη σηματοδότηση αυτή. Παρακάτω συζητούνται τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής.

### 1. Η ουβικουϊτινυλίωση κατά τη σηματοδότηση Notch

Η λειτουργία της πρωτεΐνης Neuralized έγινε γνωστή τα τελευταία χρόνια. Αποδείχθηκε ότι είναι μία λιγάση ουβικουϊτίνης και ότι η ενζυμική δράση αυτή εξαρτάται από το δακτύλιο RING (Yeh *et al.*, 2001). Ακολούθησαν πολλές έρευνες ως προς τη δράση της πρωτεΐνης αυτής σε σχέση με τη σηματοδότηση Notch (Deblandre *et al.*, 2001, Lai *et al.*, 2001, Lai and Rubin, 2001a/b, Pavlopoulos *et al.*, 2001). Βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη Neur μπορεί να ενδοκυττώσει τον δεσμευτή του υποδοχέα Notch, D1, να μειώσει τα επίπεδα του μεταμεταγραφικά και να συμβάλει στην ενίσχυση της σηματοδότησης από τον δεσμευτή D1 στον υποδοχέα Notch (Pavlopoulos *et al.*, 2001).

Επιπλέον, ανακαλύφθηκε μια δεύτερη λιγάση ουβικουϊτίνης στον οργανισμό zebrafish, η πρωτεΐνη mib και δείχθηκε ότι έχει σημαντικό ρόλο στην πλευρική αναστολή (Bingham *et al.*, 2003, Itoh *et al.*, 2003). Αποδείχθηκε ότι η πρωτεΐνη Mindbomb1 και η πρωτεΐνη Neuralized έχουν πλεονάζουσα δράση στη *D.melanogaster* (Pitsouli and Delidakis, 2005).

Δεν είχε όμως αποδειχθεί η άμεση ουβικουϊτινυλίωση των δεσμευτών του υποδοχέα Notch. Στην εργασία αυτή έγινε εφικτό να ανιχνευτούν ουβικουϊτινυλιωμένες μορφές των πρωτεϊνών Delta και Serrate. Αυτό αποτελεί μια ακόμη απόδειξη ότι οι λιγάσες ουβικουϊτίνης Neur και Mib1 συμβάλλουν θετικά στη σηματοδότηση Notch, ουβικουϊτινυλιώνοντας τους δεσμευτές του υποδοχέα.

Δεν ήταν γνωστές ακόμη οι θέσεις αναγνώρισης των πρωτεϊνών Neur και Mib1 στους δεσμευτές D1 και Ser. Στην παρούσα εργασία έγινε μια προσπάθεια αναγνώρισης των περιοχών αυτών αποκλείοντας μοτίβα αμινοξέων τα οποία δε συμβάλλουν στην αλληλεπίδραση ή και στη ουβικουϊτινυλίωση από τις πρωτεΐνες Neur και Mib1. Η πρωτεΐνη Delta διαθέτει τρία συντηρημένα μοτίβα στο ενδοκυττάριο τμήμα της. Αποδείχθηκε ότι το δεύτερο εξ'αυτών, το μοτίβο



IKNTWDKSYNNI, δε συμβάλει στην αναγνώριση από την πρωτεΐνη neur. Αξίζει να αναφερθεί ότι το μοτίβο αυτό περιέχει 2 από τις 4 συντηρημένες λυσίνες του ενδοκυττάριου τμήματος της πρωτεΐνης DI. Άρα η περιοχή αυτή μπορεί να μην αποτελεί θέση αναγνώρισης για την λιγάση neur αλλά ίσως αποτελεί θέση ουβικουΐτινυλίωσης από αυτήν. Επιπλέον αποδείχθηκε ότι το τρίτο μοτίβο, το μοτίβο KQLNTD, δε συμβάλει στην ουβικουΐτινυλίωση της πρωτεΐνης αλλά ούτε στην αναγνώριση από τις λιγάσες Mib1 και Neur. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν το ενδιαφέρον προς το πρώτο συντηρημένο μοτίβο της πρωτεΐνης DI, το μοτίβο DDAEARKQNEQNAVATMH. Πιθανόν αυτό να αποτελεί τη θέση αναγνώρισης από τις λιγάσες ουβικουΐτίνης.

## **2. Η ενδοκύττωση κατά τη σηματοδότηση Notch**

Από τα αρχικά πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκε μια θερμοευαίσθητη μεταλλαγή της πρωτεΐνης δυναμίνης (Poody, 1990), μέχρι και τις πρόσφατες μελέτες, αποδεικνύεται ότι η ενδοκύττωση κατέχει βασικό ρόλο κατά τη σηματοδότηση του Notch μονοπατιού. Είναι γνωστό ότι οι δεσμευτές του υποδοχέα Notch ενδοκυττώνονται και ότι υπεύθυνες για αυτή την ενδοκύττωση είναι οι λιγάσες ουβικουΐτίνης Neur και Mib1 (Lai *et al.*, 2001, Pavlopoulos *et al.*, 2001).

Το μοντέλο που πρόσφατα προτάθηκε από τους Wang και Struhl αναφέρει ότι οι δεσμευτές του υποδοχέα Notch πρέπει να οδηγηθούν σε ένα συγκεκριμένο υποκυτταρικό διαμέρισμα ώστε να ενεργοποιηθούν και να μπορούν να σηματοδοτήσουν. Στο συγκεκριμένο ενδοκυττωτικό διαμέρισμα μεταφέρονται μέσω της δράσης της Epsin, πρωτεΐνη η οποία συνδέει μονοουβικουΐτινυλιωμένες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με το μονοπάτι ενδοκύττωσης (Wang and Struhl, 2004).

Στη συγκεκριμένη εργασία ελέγξαμε την υποκυτταρική κατανομή των δεσμευτών του Notch. Βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη Delta στους προνευρικούς συναθροισμούς συσσωρεύεται στην κορυφαία και βασική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων και σε ενδοκυττωτικά κυστίδια. Επιπλέον, κυρίως στις περιοχές των κυττάρων ΠΑΟ συσσωρεύεται και στη βασική μεμβράνη του επιθηλίου. Ίσως κοντά στη βασική μεμβράνη να υπάρχει το ενδοκυττωτικό διαμέρισμα όπου η πρωτεΐνη DI μπορεί να τροποποιηθεί. Τη θεωρία αυτή όμως δε στηρίζουν αποτελέσματα που αποκαλύπτουν ότι με έλλειψη της ενδοκύττωσης (shiDN) αλλά και με απουσία της Epsin, η πρωτεΐνη DI συσσωρεύεται ακόμα περισσότερο στη βασική μεμβράνη

(βλ. αποτελέσματα). Το ίδιο παρατηρείται με έλλειψη των λιγασών Neur και Mib1 (Pitsouli, ΔΔ). Αν η βασική μεμβράνη αποτελούσε τόπο τροποποίησης του D1, με τις παραπάνω συνθήκες θα παρατηρούσαμε έλλειψη και όχι συσσώρευση της πρωτεΐνης D1 στο διαμέρισμα αυτό. Σε αντίθεση με την παραπάνω πρόταση έρχεται ένα ακόμη αποτέλεσμα: Η πρωτεΐνη D1ΔIC, η οποία δε διαθέτει το ενδοκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης δεν μπορεί να ενδοκυττωθεί (παρατηρούμε έλλειψη των ενδοκυττωτικών κυστιδίων), αλλά μπορεί να συσσωρεύεται στη βασική μεμβράνη και μάλιστα περισσότερο από την πλήρους μήκους πρωτεΐνη. Αντιθέτως μπορεί να υποτεθεί ότι η έλλειψη δυναμίνης ή εψίνης δεν μπλοκάρει την ενδοκύττωση αλλά την ανακύκλωση της πρωτεΐνης D1 στην κορυφαία μεμβράνη. Υπό αυτή την άποψη το D1 συσσωρεύεται στη βασική μεμβράνη καθώς δεν μπορεί να ανακυκλωθεί στην κορυφαία πλευρά των επιθηλιακών κυττάρων. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία η βασική μεμβράνη θα μπορούσε να αποτελεί διαμέρισμα τροποποίησης των δεσμευτών του Notch. Ο ρόλος της συσσώρευσης της πρωτεΐνης D1 στην βασική μεμβράνη παραμένει άγνωστος, πιθανόν όμως να έχει σχέση με την πλευρική αναστολή αφού κυρίως εντοπίζεται στα κύτταρα ΠΑΟ. Ελέγξαμε και την υποκυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης Ser, η οποία παρουσιάζει και αυτή ελάχιστο εντοπισμό στη βασική μεμβράνη. Συνεπώς η κυτταρική αυτή τοποθέτηση πιθανόν αποτελεί χαρακτηριστικό των δεσμευτών του υποδοχέα Notch.

Τα αποτελέσματα μας όσον αφορά το ρόλο της ενδοκύττωσης των δεσμευτών συμφωνούν με το μοντέλο των Wang και Struhl καθώς και η έλλειψη δυναμίνης αλλά και η έλλειψη Epsin επιφέρουν παύση της σηματοδότησης κατά την πλευρική αναστολή και ισχυρό νευρογόνο φαινότυπο. Συνεπώς, όχι μόνο οι δεσμευτές πρέπει να ενδοκυττωθούν για να δράσουν αλλά και μέσω ενός συγκεκριμένου μονοπατιού που ελέγχεται από την Epsin.

Η σημασία της ενδοκύττωσης των δεσμευτών κατά την πλευρική αναστολή αποκαλύπτεται και από την πρωτεΐνη D1ΔIC. Όπως προαναφέρθηκε η πρωτεΐνη αυτή δεν διαθέτει το ενδοκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης D1, συνεπώς δεν μπορεί να ενδοκυττωθεί. Βρήκαμε ότι το μετάλλαγμα αυτό είναι τελείως ανενεργό κατά τη σηματοδότηση της πλευρικής αναστολής, ενισχύοντας την άποψη ότι η ενδοκύττωση των υποδοχέων είναι προϋπόθεση για την ικανότητα τους για σηματοδότηση.

Σύμφωνα με το παραπάνω μοντέλο περί ουβικουϊτινυλίωσης και ενδοκύττωσης, η προσθήκη στην πρωτεΐνη D1ΔIC ενός διαφορετικού σήματος ενδοκύττωσης θα την έκανε ικανή να ενδοκυττωθεί και να σηματοδοτήσει

ανεξάρτητα ουβικουϊτινυλίωσης και μονοπατιού ενδοκύττωσης μέσω Epsin. Πραγματικά η προσθήκη του σήματος ενδοκύττωσης του υποδοχέα LDL στην πρωτεΐνη DIDIC, την έκανε ικανή να ενδοκυττωθεί και να σηματοδοτήσει χωρίς την ανάγκη ουβικουϊτινυλίωσης, στο ραχαιοκοιλιακό όριο του φτερού (Wang and Struhl, 2004). Σε αυτή τη μελέτη αποκαλύφθηκε ότι δεν ισχύει το ίδιο στην περίπτωση της πλευρικής αναστολής: Η πρωτεΐνη  $DI^{LDL}$ , είναι ανίκανη να σηματοδοτήσει την πλευρική αναστολή και παρατηρείται ισχυρός νευρογόνος φαινότυπος. Πιθανή εξήγηση θα αποτελούσε η υπόθεση ότι διαφορετικά μονοπάτια ενδοκύττωσης εμπλέκονται σε κάθε διαδικασία. Το μονοπάτι ενδοκύττωσης μέσω του σήματος του LDL υποδοχέα μπορεί να καταστήσει ενεργή την πρωτεΐνη DI στη σηματοδότηση του ραχαιοκοιλιακού ορίου αλλά η σηματοδότηση κατά την πλευρική αναστολή χρειάζεται οπωσδήποτε την ουβικουϊτινυλίωση του δεσμευτή και τη μεταφορά σε συγκεκριμένο υποκυτταρικό διαμέρισμα μέσω της epsin. Στην σηματοδότηση του ορίου, η ουβικουϊτινυλίωση είναι απαραίτητη όσο είναι ο μόνος τρόπος ενδοκύττωσης των δεσμευτών αλλά η ανάγκη ξεπερνιέται όταν γίνει εφικτή η ενδοκύττωση με άλλον τρόπο. Επιπλέον θα μπορούσε να υποθεθεί ότι η πρωτεΐνη  $DI^{LDL}$  έχει μερική έλλειψη λειτουργίας. Η δραστηριότητα όμως της πρωτεΐνης αυτής είναι αρκετή για τη σηματοδότηση του ραχαιοκοιλιακού ορίου του φτερού, όχι όμως και για την πλευρική αναστολή. Οι υποθέσεις αυτές δεν έχουν ελεγχθεί και μέχρι τώρα παραμένει άγνωστη η αιτία διαφορετικής συμπεριφοράς της πρωτεΐνης  $DI^{LDL}$ .

### 3. Μελλοντικοί στόχοι

Τα παρακάτω ερωτήματα είναι μερικά από τα οποία θα γίνει προσπάθεια να απαντηθούν στο μέλλον:

- Η ουβικουϊτινυλίωση των δεσμευτών Delta και Serrate οφείλεται άμεσα στις λιγασές ουβικουϊτίνης Neuralized και Mindbomb1;
- Ποιες είναι οι θέσεις αναγνώρισης των λιγασών στους δεσμευτές;
- Ποιες είναι οι θέσεις ουβικουϊτινυλίωσης στους δεσμευτές;
- Ποια η σημασία της συσσώρευσης της πρωτεΐνης Delta στη βασική μεμβράνη των κυττάρων του νευρικού συναθροισμού; Αποτελεί το διαμέρισμα τροποποίησης της πρωτεΐνης Delta και αν όχι ποιο είναι αυτό;

- Ακολουθεί η πρωτεΐνη Delta το ίδιο μονοπάτι ενδοκύττωσης κατά τις διαδικασίες της πλευρικής αναστολής και της επαγωγής του ραχαιοκοιλιακού ορίου;

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., and Fortini, M. E. (1995). Notch Signaling. *Science* 268, 225-232
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., and Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770-776
- Bingham, S., Chaudhari, S., Vanderlaan, G., Itoh, M., Chitnis, A., and Chandrasekhar, A. (2003). Neurogenic phenotype of *mind bomb* mutants leads to severe patterning defects in the zebrafish hindbrain. *Dev Dyn* 228, 451-463.
- Blaumueller, C. M., Qi, H., Zagouras, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1997). Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* 90, 281-291
- Brand, A. H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415
- Chen, N., and Greenwald, I. (2004). The lateral signal for LIN-12/Notch in *C. elegans* vulval development comprises redundant secreted and transmembrane DSL proteins. *Dev Cell*. 6, 183-92.
- Culi, J., and Modolell, J. (1998). Proneural gene self-stimulation in neural precursors: an essential mechanism for sense organ development that is regulated by Notch signaling. *Genes Dev* 12, 2036-2047
- De Jossineau, C., Soule, J., Martin, M., Anguille, C., Montcourrier, P., and Alexandre, D. (2003). Delta-promoted filopodia mediate long-range lateral inhibition in *Drosophila*. *Nature* 426, 555-559
- Deblandre, G. A., Lai, E. C., and Kintner, C. (2001). *Xenopus* Neuralized is a ubiquitin ligase that interacts with XDelta1 and regulates Notch signaling. *Dev Cell* 1, 795-806.
- Fehon, R. G., Kooh, P. J., Rebay, I., Regan, C. L., Xu, T., Muskavitch, M. A. T., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). Molecular Interactions between the Protein Products of the Neurogenic Loci *Notch* and *Delta*, Two EGF-Homologous Genes in *Drosophila*. *Cell* 61, 523-534.
- Fleming, R. J. (1998). Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Semin Cell Dev Biol* 9, 599-607
- Heitzler, P., Bourouis, M., Ruel, L., Carteret, C., and Simpson, P. (1996). Genes of the *Enhancer of split* and *achaete-scute* complexes are required for a regulatory loop between *Notch* and *Delta* during lateral signalling in *Drosophila*. *Development* 122, 161-171.
- Hicke, L., and Dunn, R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 19, 141-72
- Hutterer, A., and Knoblich, J.A. (2005). Numb and alpha-Adaptin regulate Sanpodo endocytosis to specify cell fate in *Drosophila* external sensory organs. *EMBO Rep*. 6, 836-42
- Irvine, K., and Wieshaus, E. (1995). Fringe, a boundary specific signalling molecule, mediates interactions between dorsal and ventral cells during *Drosophila* wing development. *Cell* 79, 595-606.
- Irvine, K. D. (1999). Fringe, Notch, and making developmental boundaries. *Curr Opin Genet Dev* 9, 434-441.
- Itoh, M., Kim, C. H., Palardy, G., Oda, T., Jiang, Y. J., Maust, D., Yeo, S. Y., Lorick, K., Wright, G. J., Ariza-McNaughton, L., *et al.* (2003). Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Dev Cell* 4, 67-82.

- Kidd, S., and Lieber, T. (2002). Furin cleavage is not a requirement for *Drosophila* Notch function. *Mech Dev* 115, 41-51
- Lai, E. C., Deblandre, G. A., Kintner, C., and Rubin, G. M. (2001). *Drosophila* Neuralized is a ubiquitin ligase that promotes the internalization and degradation of Delta. *Dev Cell* 1, 783-794.
- Lai, E. C., and Rubin, G. M. (2001a). *neuralized* functions cell-autonomously to regulate a subset of Notch- dependent processes during adult *Drosophila* development. *Dev Biol* 231, 217-233.
- Lai, E. C., and Rubin, G. M. (2001b). Neuralized is essential for a subset of Notch pathway-dependent cell fate decisions during *Drosophila* eye development. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 5637-5642.
- Lai, E. C., Roegiers, F., Qin, X., Jan, Y. N., and Rubin, G. M. (2005). The ubiquitin ligase *Drosophila* Mind bomb promotes Notch signaling by regulating the localization and activity of Serrate and Delta. *Development* 132, 2319-2332.
- Lee, T., and Luo, L. (2001). Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development. *Trends Neurosci* 24, 251-254
- Lieber, T., Kidd, S., and Young, M. W. (2002). *kuzbanian*-mediated cleavage of *Drosophila* Notch. *Genes Dev* 16, 209-221
- Micchelli, C. A., Rulifson, E. J., and Blair, S. S. (1997). The function and regulation of *cut* expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate. *Development* 124, 1485-1495
- O'Connor-Giles, K.M., and Skeath, J.B. (2003). Numb inhibits membrane localization of Sanpodo, a four-pass transmembrane protein, to promote asymmetric divisions in *Drosophila*. *Dev Cell*. 5, 231-43
- Okajima, T., Xu, A., and Irvine, K. D. (2003). Modulation of Notch-ligand binding by protein O-fucosyltransferase 1 and Fringe. *J Biol Chem* 278, 42340-42345
- Panin, V. M., Papayannopoulos, V., Wilson, R., and Irvine, K. D. (1997). Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* 387, 908-912
- Panin, V. M., Shao, L., Lei, L., Moloney, D. J., Irvine, K. D., and Haltiwanger, R. S. (2002). Notch ligands are substrates for protein O-fucosyltransferase-1 and Fringe. *J Biol Chem* 277, 29945-29952
- Parks, A. L., Klueg, K. M., Stout, J. R., and Muskavitch, M. A. (2000). Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* 127, 1373-1385
- Pavlopoulos, E., Pitsouli, C., Klueg, K. M., Muskavitch, M. A., Moschonas, N. K., and Delidakis, C. (2001). *neuralized* encodes a peripheral membrane protein involved in Delta signaling and endocytosis. *Dev Cell* 1, 807-816.
- Poodry, C. A. (1990). *shibire*, a neurogenic mutant of *Drosophila*. *Dev Biol* 138, 464-472
- Price, B. D., Chang, Z., Smith, R., Bockheim, S., and Laughon, A. (1993). The *Drosophila neuralized* gene encodes a C3HC4 zinc finger. *Embo J* 12, 2411-2418
- Ramos, R. G., Grimwade, B. G., Wharton, K. A., Scottgale, T. N., and Artavanis-Tsakonas, S. (1989). Physical and functional definition of the *Drosophila* Notch locus by P element transformation. *Genetics* 123, 337-348.

- Struhl, G., and Adachi, A. (2000). Requirements for presenilin-dependent cleavage of Notch and other transmembrane proteins. *Mol Cell* 6, 625-636
- Wang, W., and Struhl, G. (2004). *Drosophila* Epsin mediates a select endocytic pathway that DSL ligands must enter to activate Notch. *Development* 131, 5367-5380.
- Wang, W., and Struhl, G. (2005). Distinct roles for Mind bomb, Neuralized and Epsin in mediating DSL endocytosis and signaling in *Drosophila*. *Development* 132, 2883-2894.
- Wendland, B. (2002). Epsins: adaptors in endocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 971-977
- Yeh, E., Dermer, M., Commisso, C., Zhou, L., McGlade, C. J., and Boulianne, G. L. (2001). Neuralized functions as an E3 ubiquitin ligase during *Drosophila* development. *Curr Biol* 11, 1675-1679