

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ (ΙΤΕ)

**ΚΗΤΤΑΡΑΚΗ ΜΑΡΙΑΝΘΗ**

Μεταπτυχιακή Εργασία Ειδίκευσης  
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ "alpha"  
ΜΕ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΥ ΕΝΟΣ ΥΒΡΙΔΙΟΥ

Υπεύθυνος Καθηγητής: **Χρήστος Δελιδάκης**  
Δεύτερη εξετάστρια: **Δέσποινα Αλεξανδράκη**

Ηράκλειο, Σεπτέμβριος 2004

## Εισαγωγή

Μια βασική διαδικασία κατά την ανάπτυξη των οργανισμών είναι η ανάθεση διαφορετικής μοίρας σε αρχικά ισοδύναμα κύτταρα. Στην *Drosophila*, η ανάλυση της πρώιμης ανάπτυξης του ενήλικου περιφερικού νευρικού συστήματος (ΠΝΣ), που περιλαμβάνει επιδερμικά όργανα όπως τις αισθητήριες τρίχες (*sensory bristles*), έχει προσφέρει αξιοσημείωτες γνώσεις στα γονίδια που αποφασίζουν μεταξύ της επιδερμικής και νευρικής τύχης. Κατά συνέπεια, τα προνευρικά γονίδια, που εκφράζονται από ομάδες κυττάρων γνωστές ως προνευρικές συστάδες (*proneural clusters*), παρέχουν σε αυτά τα κύτταρα τη δυνατότητα να γίνουν νευρικοί πρόδρομοι. Στη συνέχεια, κυτταρικές αλληλεπιδράσεις μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch (N) επιτρέπουν μόνο σε ένα ή σε μερικά κύτταρα κάθε ομάδας να αποκτήσουν τη νευρική μοίρα, ενώ τα υπόλοιπα κύτταρα γίνονται επιδερμίδα (Artavanis-Tsakonas and Simpson 1991).

Μεταξύ των καλύτερα χαρακτηρισμένων προνευρικών γονιδίων είναι τα *achaete* (*ac*) και *scute* (*sc*), δύο μέλη του συμπλόκου *ac-sc* (*AS-C*) (Campanazo και Modolell 1992). Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες της bHLH οικογένειας. Οι πρωτεΐνες *Ac* και *Sc*, που είναι σε μεγάλο βαθμό λειτουργικά πλεονάζουσες, εμφανίζονται να λειτουργούν *in vivo* ως ετεροδιμερή με την πρωτεΐνη *Daughterless* (Murre et al. 1989).

Η έκφραση του *ac* και του *sc* στις προνευρικές ομάδες των αναπτυξιακών δίσκων ρυθμίζεται από μεταγραφικούς παράγοντες προσχεδιασμού που αλληλεπιδρούν με τις *cis*-ρυθμιστικές περιοχές (*enhancers*) του συμπλόκου *AS-C* και ενεργοποιούν συγχρόνως το *ac* και το *sc*, έτσι ώστε να συνεκφράζονται σε όλες τις προνευρικές ομάδες (Ghysen and Dambly-Chaudiere 1988; Gomez-Skarmeta et al. 1995). Μια χαρακτηριστική ομάδα του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού που θα δημιουργήσει μια θωρακική μακροχαίτη αποτελείται από 20-30 κύτταρα, αλλά το μητρικό αισθητήριο κύτταρο (*sensory mother cell* - *SMC*) εμφανίζεται να επιλέγεται μεταξύ μιας μικρότερης ομάδας κυττάρων (το προνευρικό πεδίο-*proneural field*) που συσσωρεύει πιο υψηλά επίπεδα πρωτεϊνών *Ac/Sc* από τα γειτονικά της (Cubas et al. 1991; Skeath and Carroll 1991; Cubas and Modolell 1992). Τα κύτταρα του προνευρικού πεδίου και το κύτταρο *SMC*, που συσσωρεύουν ακόμα πιο υψηλά επίπεδα των πρωτεϊνών *Ac/Sc*, καταλαμβάνουν πάντα την ίδια θέση μέσα στη προνευρική ομάδα. Το κύτταρο *SMC* συσσωρεύει επίσης την bHLH πρωτεΐνη *Asense* που και αυτή κωδικοποιείται από το σύμπλοκο *AS-C* (Brand et al. 1993; Domínguez and Campanazo 1993; Jarman et al. 1993). Οι προαναφερθείσες

bHLH πρωτεΐνες συμβάλλουν όλες μαζί ώστε τα κύτταρα να ακολουθήσουν το νευρικό μονοπάτι διαφοροποίησης.

Η σηματοδότηση μεταξύ των κυττάρων των προνευρικών ομάδων διαμεσολαβείται από τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες Delta (DI) και Notch, που δρουν ως πομπός και δέκτης του σήματος αντίστοιχα (Heitzler και Simpson 1991). Στο κύτταρο δέκτη, η ενεργοποίηση του Notch υποδοχέα προωθεί, με τη βοήθεια του μεταγραφικού παράγοντα Suppressor of Hairless [Su(H)], την έκφραση των bHLH γονιδίων του συμπλόκου Enhancer of split [E(spl)-C] (Bailey και Posakony 1995, Lecourtois και Schweisguth 1995). Οι E(spl) πρωτεΐνες ανταγωνίζονται τη λειτουργία των προνευρικών πρωτεϊνών, είτε με απευθείας πρόσδεση σε αυτές εμποδίζοντας την δράση τους, είτε παρεμπόδιζοντας την ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων τους (Giatzoglou et al. 2003, Oellers et al. 1994; Ohsako et al. 1994; Van Doren et al. 1994; Heitzler et al. 1996). Θεωρείται ότι όσο μεγαλύτερα επίπεδα προνευρικών πρωτεϊνών συσσωρεύει ένα κύτταρο, τόσο ισχυρότερη είναι η ικανότητά του να στέλνει σήμα (μέσω του Delta) ενώ παράλληλα μειώνεται η ικανότητά του να δέχεται σήμα από τα γειτονικά του (μέσω του Notch υποδοχέα).

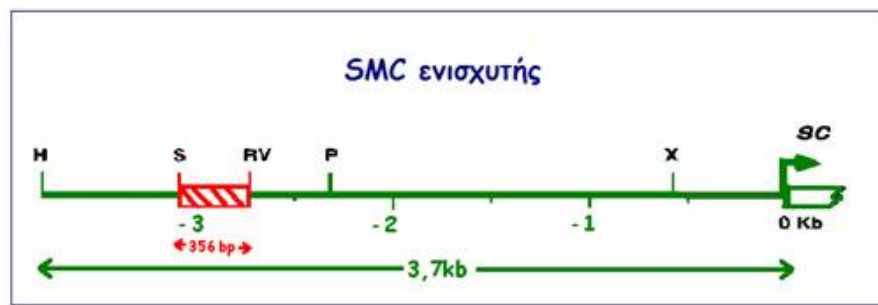
Κατά συνέπεια σε μια προνευρική ομάδα, τα κύτταρα που έχουν τα πιο υψηλά επίπεδα προνευρικών πρωτεϊνών τείνουν να «δραπετεύουν» από την πλευρική αναστολή. Όταν σ' ένα κύτταρο συμβεί αυτό, γίνεται SMC, στέλνει το μέγιστο σήμα, και αποτρέπει τους γείτονές του να αποκτήσουν την ίδια μοίρα (πλευρική αναστολή) (Simpson 1990, 1997; Heitzler and Simpson 1991).

### Ο ρόλος του ενισχυτή SMC

Ένα από τα πιο πρώιμα σημάδια της επιλογής ενός κυττάρου SMC είναι η μεγάλη συσσώρευση προνευρικών πρωτεϊνών, η οποία είναι ανεξάρτητη από τον τρόπο που γίνεται η αρχική έκφραση των γονιδίων ac-sc στην προνευρική ομάδα (Cubas et al. 1991; Skeath and Carroll 1991).

Στο DNA του συμπλόκου AS-C και μέσα σε μια περιοχή των 3,7 kb ανοδικά του γονιδίου sc, υπάρχει ένας ενισχυτής ικανός για να προκαλέσει έκφραση του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης ειδικά στα κύτταρα SMCs (Martinez και Modolell 1991). Επειδή αυτός ο ενισχυτής μπορεί να είναι υπεύθυνος για την αυξανόμενη έκφραση του sc σε αυτά τα κύτταρα, χαρακτηρίστηκε περαιτέρω από τους Culi et al (1998) με την ελπίδα να κατανοηθεί ο τρόπος επιλογής του κυττάρου SMC.

Έτσι βρέθηκε ότι ένα τμήμα των 356 βάσεων (SRV-lacZ) ήταν αρκετό για την έκφραση του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης ειδικά στα SMCs.

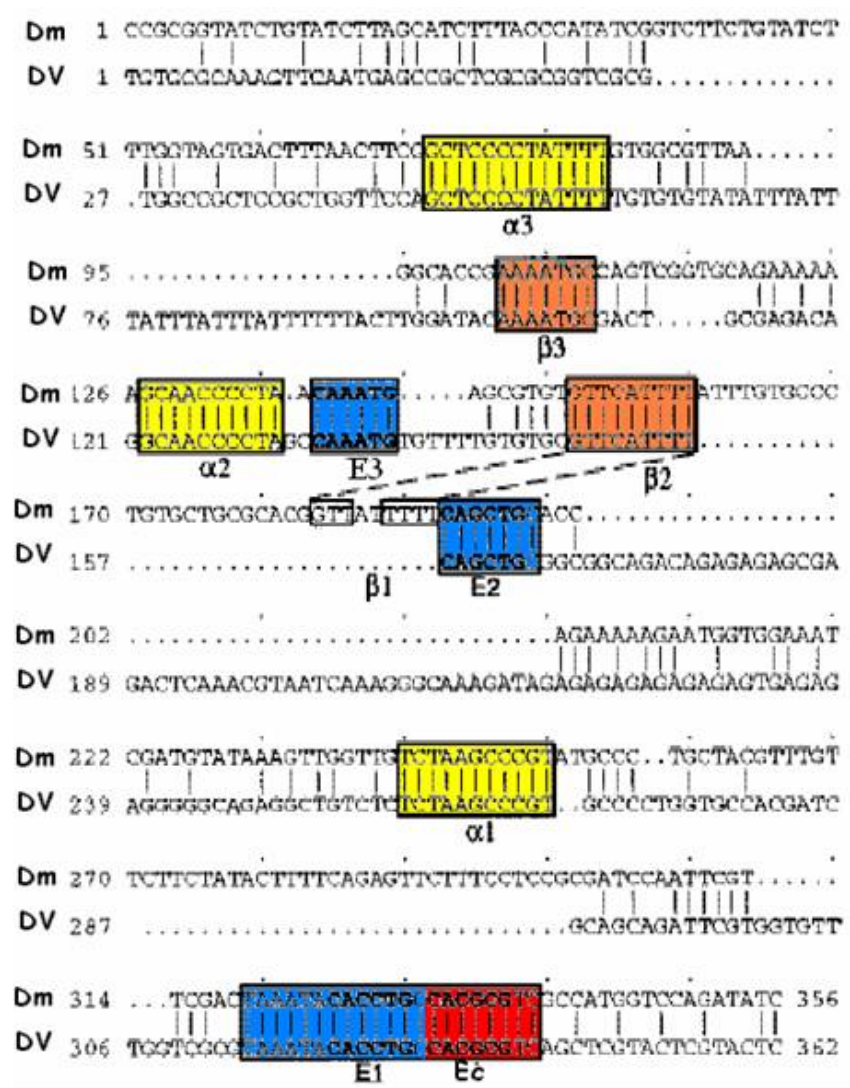


Παράλληλα έδειξαν ότι η αυξανόμενη συσσώρευση της πρωτεΐνης Sc μέσω αυτού του ενισχυτή στο κύτταρο SMC, απουσία των υπόλοιπων πρωτεϊνών του συμπλόκου AS-C, είναι ικάνη για την ανάπτυξη των μακροχαιτών. Επομένως η υψηλή συσσώρευση των προνευρικών πρωτεϊνών στο πρόδρομο κύτταρο του αισθητηρίου οργάνου είναι κατά κάποιον τρόπο προϋπόθεση για την ανάπτυξη του αισθητηρίου οργάνου. Αυτήν την συνθήκη φαίνεται να εκπληρώνει ο ενισχυτής SMC.

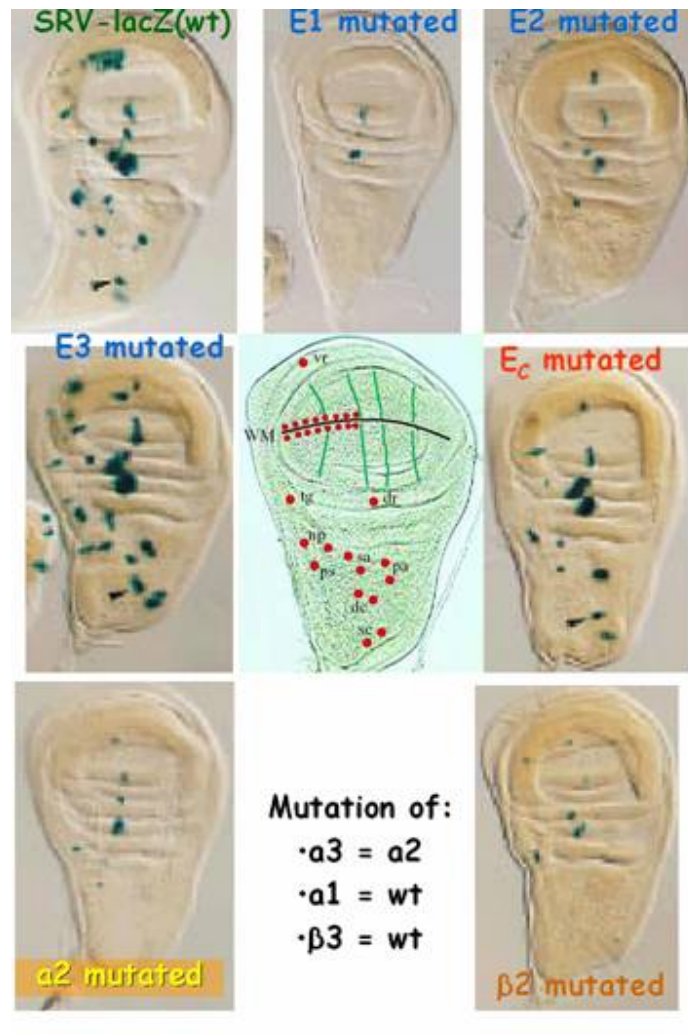
### Εξελικτικά συντηρημένες αλληλουχίες του ενισχυτή SMC

Συγκρίνοντας οι Culi et al (1998) την αλληλουχία του ενισχυτή SMC του γονιδίου sc της *Drosophila melanogaster* με την αλληλουχία ανοδικά του γονιδίου sc της *Drosophila virilis* βρήκαν σημαντικές ομοιότητες μόνο μέσα σε ένα τμήμα 362 βάσεων τοποθετημένο 4.3 kb ανοδικά του ενδογενούς γονιδίου sc της *D. virilis*. Οι συντηρημένες αλληλουχίες περιείχαν τρία μοτίβα τύπου E box, τα οποία αποτελούν πιθανές θέσεις πρόσδεσης των bHLH πρωτεϊνών Ac, Sc, και Da (for review, see Ohsako et al. 1994). Δίπλα στο πιο κοντινό, ως προς το sc γονίδιο, E box υπάρχει μια θέση πρόσδεσης (Ec box) που μπορεί να αναγνωριστεί από τις bHLH πρωτεΐνες του συμπλόκου E(spl)-C (Tietze et al. 1992; Ohsako et al. 1994).

Επιπλέον, υπήρχαν τρία αντίγραφα ενός μοτίβου που μοιάζει με αυτό που αναγνωρίζουν οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας NF-κB (που ονομάστηκαν  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  και  $\alpha 3$ ) (for review, see Lenardo and Baltimore 1989), και ενός πλούσιου σε T μοτίβου ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ), το οποίο δεν μοιάζει με τις γνωστές θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων.



Με στόχο την διερεύνηση της λειτουργικής σημασίας αυτών των μοτίβων, κάθε ένα μεταλλάχτηκε χωριστά και η ενεργότητα των τροποποιημένων ενισχυτών δοκιμάστηκε *in vivo*. Μεταλλαγή του E1 box και σε μικρότερο βαθμό των E2, α2, α3, και β2 μοτίβων μείωσε δραστικά τη λειτουργία των ενισχυτών. Αντίθετα, μεταλλαγή στα μοτίβα E3, α1, β3, ή Ec τροποποίησε ελάχιστα ή και καθόλου την δράση του ενισχυτή. Ταυτόχρονη μεταλλαγή του α2 και α3 μοτίβου δεν μείωσε περαιτέρω την εναπομείνουσα δραστηριότητα του ενισχυτή που εμφανιζόταν με μεταλλαγή του ενός μόνο μοτίβου.

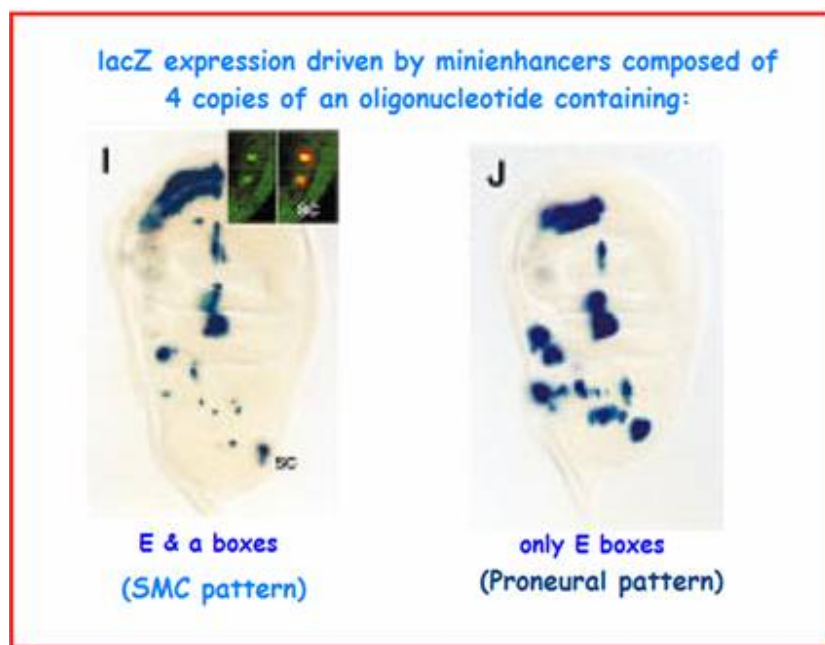


### Αυτοενεργοποίηση του γονιδίου *sc* στα κύτταρα *SMC*

Ο ενισχυτής *SMC* προωθεί την αυτοενεργοποίηση του γονιδίου *sc*, αν και μόνο παρουσία των πρόσθετων ενεργοποιητικών παραγόντων. Αυτό το συμπέρασμα συνάγεται από πειράματα *in vitro* όπου βρέθηκε ότι τα ετεροδιμερή *Da/Sc* προσδένονται στα μοτίβα *E1* και *E2*. Αλλά και από *in vivo* δεδομένα όπου ένας μινιενισχυτής αποτελούμενος μόνο από *E1* μοτίβα έχει ένα πολύ ευρύτερο πρότυπο έκφρασης από αυτό του *SMC*, που συμπίπτει με τις προνευρικές ομάδες, εκεί δηλαδή που εκφράζονται οι προνευρικές πρωτεΐνες. Παράλληλα από πειράματα *in vivo* διαπιστώθηκε ότι η υπερσυσσώρευση της πρωτεΐνης *Sc* από μόνη της δεν είναι αρκετή για να προκαλέσει την ενεργοποίηση του ενισχυτή *SMC* σε κύτταρα που δεν είναι *SMC*.

### Τα E box και a box είναι αρκετά για την κατασκευή ενός SMC-ειδικού ενισχυτή.

Το γεγονός της απαραίτητης συμμετοχής κάποιων μεταγραφικών παραγόντων παράλληλα με τις προνευρικές πρωτεΐνες οδηγεί στην υπόθεση ότι ίσως αυτοί οι παράγοντες προσδένονται πάνω στο a box ή στο β box. Πράγματι ένας μινιενισχυτής αποτελούμενος από τέσσερις επαναλήψεις ενός ολιγονουκλεοτιδίου που περιέχει δύο E1 box και ένα a box, είναι ικανός να οδηγήσει την έκφραση του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης ειδικά σε κύτταρα SMC. Το γεγονός ότι η ίδια κατασκευή με κατεστραμμένα a box οδηγεί, όπως προαναφέραμε, την έκφραση στις προνευρικές ομάδες, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το a box έχει ρόλο στον περιορισμό της έκφρασης σε ένα μόνο κύτταρο (το SMC) της προνευρικής ομάδας. Ενώ ο παραπάνω μινιενισχυτής με κατεστραμμένα τα E box και λειτουργικά μόνο τα a box δεν είναι ικανός να προκαλέσει ενεργοποίηση.



### Διατήρηση των μοτίβων του ενισχυτή SMC σε άλλα γονίδια

Παράλληλα σύγκριση των ρυθμιστικών περιοχών του γονιδίου asense της *Drosophila melanogaster* και της *Drosophila virilis* αποκάλυψε την ύπαρξη τεσσάρων E box, ενός Ec box, δύο a box, και ενός β box. Έτσι για άλλη μια φορά, ενισχύθηκε η συσχέτιση αυτών των μοτίβων με την λειτουργία του ενισχυτή SMC.

Επιπλέον, το νευρογόνο γονίδιο *Bearded*, το οποίο εκφράζεται στις προνευρικές ομάδες και στα κύτταρα *SMC*, περιέχει στις ρυθμιστικές περιοχές του ένα *E box*, που είναι απαραίτητο για την έκφρασή του καθώς και ένα μοτίβο όμοιο με το *a2 box*. Ένα εξελικτικά συντηρημένο *a box* υπάρχει στην ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου *rough*, ενός *homeobox* γονιδίου απαραίτητο για την επιλεκτική διαφοροποίηση του *R8* φωτούποδοχέα.

### **Ο ενισχυτής *SMC* ελέγχεται από το σηματοδοτικό μονοπάτι *Notch***

Το σηματοδοτικό μονοπάτι του *Notch* συμβάλλει στην επιλογή του κυττάρου *SMC* από το σύνολο των κυττάρων της προνευρικής ομάδας (Artavanis-Tsakonas and Simpson 1991). Όταν το μονοπάτι *Notch* είναι μη λειτουργικό, για παράδειγμα σε μεταλλαγές του γονιδίου *Su(H)*, οι προνευρικές πρωτεΐνες συσσωρεύονται σε πολλά κύτταρα της προνευρικής ομάδας (Schweisguth and Rosakony 1994). Στην περίπτωση αυτή ο ενισχυτής *SMC* οδηγεί στην έκφραση του *lacZ* σε πολλά κύτταρα της προνευρικής ομάδας. Ενώ ο ενισχυτής που είναι υπεύθυνος για την έκφραση των κυττάρων της προνευρικής ομάδας παραμένει ανεπηρέαστος.

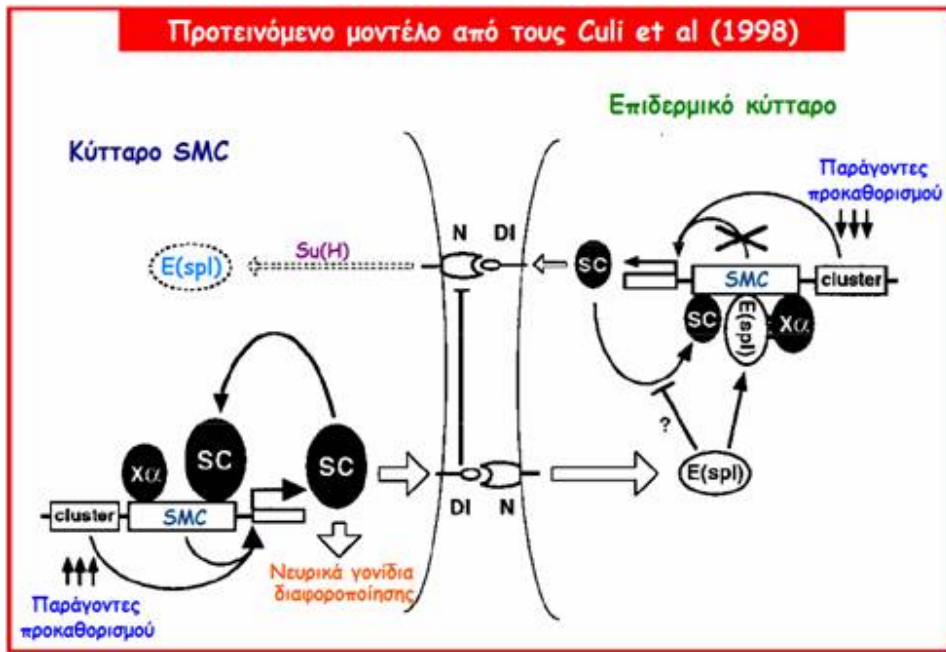
Παράλληλα είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες του συμπλόκου *E(spl)-C* ανιχνεύονται σε όλα τα κύτταρα της προνευρικής ομάδας, εκτός από το κύτταρο *SMC* (Jennings et al. 1995). Αυτό συνδέεται με το γεγονός ότι το κύτταρο *SMC* είναι αυτό που στέλνει το πιο δυνατό σήμα και εμποδίζει τα γειτονικά του από να αποκτήσουν την νευρική τύχη. Εκτοπική έκφραση των πρωτεϊνών *E(spl)* εμποδίζει την δημιουργία του κυττάρου *SMC* (Nakao et al. 1996, Tata et al. 1995, ).

Στα υπόλοιπα κύτταρα της προνευρικής ομάδας, οι πρωτεΐνες *bHLH E(spl)*, εμποδίζουν την αυτοενεργοποίηση του *sc* και τα αποτρέπουν από την απόκτηση της νευρικής μοίρας. Επίσης υπερέκφραση είτε της πρωτεΐνης *E(spl)-m8* ή της *E(spl)-m7* βρέθηκε ότι σταματά την ενεργότητα του ενισχυτή *SMC* και την ανάπτυξη του αντίστοιχου αισθητηρίου οργάνου. Αντίθετα, καθεμία αυτών των υπερεκφράσεων επέτρεψε την κανονική συσσώρευση των προνευρικών πρωτεϊνών στις προνευρικές ομάδες. Τα παραπάνω δεδομένα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο ενισχυτής *SMC* είναι ο στόχος στην αναστολή μέσω των *E(spl)*, και όχι οι ενισχυτές που οδηγούν την έκφραση στις προνευρικές ομάδες.

Οι Culi et al (1998) πρότειναν το ακόλουθο μοντέλο για τον τρόπο ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου *scute* στο κύτταρο *SMC* και στα γειτονικά επιδερμικά του κύτταρα. Το κύριο σημείο αυτού του μοντέλου είναι ότι οι πρωτεΐνες *E(spl)* καταστέλλουν την έκφραση του *scute* στο κύτταρο *SMC*, μέσω του ενισχυτή *SMC*, προσδεδεμένες σ' αυτόν μέσω αλληλεπίδρασης με τον "alpha factor". Αν και δεδομένα του δικού μας εργαστηρίου (Giagtzoglou et al 2003) φαίνεται να αντικρούουν αυτόν τον τρόπο πρόσδεσης των πρωτεϊνών *E(spl)* στον ενισχυτή *SMC*.



Αντίθετα προτείνουν ότι οι E(spl) στρατολογούνται μέσω του Scute και όχι του παράγοντα "αλφα". Δεν αμφισβητούν όμως τον ρόλο του "αλφα" μεταγραφικού παράγοντα στην ρύθμιση SMC ειδικών ενισχυτών.



### Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας

Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω δεδομένα, ο μεταγραφικός παράγοντας ("alpha factor") που προσδέεται στο α μοτίβο είναι βασικός για την ενεργοποίηση του γονιδίου *scute* και φαίνεται να έχει καθοριστικό ρόλο στην διαδικασία της πλευρικής αναστολής. Για τον λόγο αυτό προσπαθήσαμε να εντοπίσουμε τον παράγοντα αυτόν μέσω του συστήματος του ενός υβριδίου. Ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης αυτής θα μπορούσε να μας δώσει περισσότερες πληροφορίες για τον μηχανισμό επιλογής του κυττάρου SMC.

## Υλικά και Μέθοδοι

### Το σύστημα ενός υβριδίου του σακχαρομύκητα

#### Γενικά

Το σύστημα ενός υβριδίου στον σακχαρομύκητα (yeast one-hybrid system) είναι ένα από τα βασικότερα εργαλεία για την απομόνωση νέων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, που έχουν την ικανότητα να προσδένονται σε μια ήδη γνωστή *cis*-ρυθμιστική αλληλουχία του DNA. Η αλληλουχία του DNA που χρησιμοποιείται καλείται «στοιχείο στόχος» (target element).

Η μέθοδος αυτή προσφέρει τη μέγιστη ευαισθησία για την ανίχνευση των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών με το DNA επειδή οι πρωτεΐνες διατηρούν την *in vivo* φυσική τους διαμόρφωση. Επιπλέον, το γονίδιο που κωδικοποιεί την αναζητούμενη πρωτεΐνη είναι άμεσα διαθέσιμο μετά από μια διαλογή της βιβλιοθήκης (library screening).

Για την πραγματοποίηση της παραπάνω μεθόδου απαιτείται η κατασκευή μιας αλληλουχίας αποτελούμενης από επαναλαμβανόμενα αντίγραφα των *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων του DNA που μας ενδιαφέρει. Η παραπάνω αλληλουχία κλωνοποιείται ανοδικά του υποκινητή ενός γονιδίου ανταποκριτή (reporter gene) που μπορεί να είναι για παράδειγμα είτε το *HIS3*, είτε το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (*lacZ*). Υπάρχουν ειδικά πλασμίδια που χρησιμοποιούνται για αυτήν την κατασκευή. Μετά την παραπάνω κλωνοποίηση, το πλασμίδιο γίνεται γραμμικό και ενσωματώνεται μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού στο γονιδίωμα του σακχαρομύκητα. Το νέο στέλεχος που προκύπτει καλείται στέλεχος ανταποκριτής.

Στη συνέχεια ακολουθεί ο μετασχηματισμός του παραπάνω στελέχους με μια *cDNA* βιβλιοθήκη. Τα αντίγραφα *cDNA* της βιβλιοθήκης αυτής είναι συντηγμένα με την περιοχή ενεργοποίησης του μεταφραστικού παράγοντα *Gal4*. Έτσι προκύπτουν πρωτεΐνες που έχουν όλες ενεργοποιητική περιοχή του *Gal4*. Αν κάποια από αυτές έχει την ικανότητα να προσδένεται στο «στοιχείο στόχο», τότε θα προκαλέσει την έκφραση του γονιδίου ανταποκριτή.

Αν για την επιλογή χρησιμοποιηθεί ως γονίδιο ανταποκριτής το *HIS3*, τότε επειδή υπάρχει κάποια "διαρροή" στην έκφραση του γονιδίου, συνιστάται η προσθήκη κάποιας ποσότητας 3-amino-1,2,3-triazole (3-AT), ώστε να εξαλειφθούν τα «ψευδώς θετικά» (false positives). Το 3-AT είναι αναστολέας του *HIS3* και επομένως «εξουδετερώνει» κατά κάποιο τρόπο τα βασικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ανταποκριτή. Το *lacZ* μπορεί να χρησιμοποιηθεί παράλληλα με το *HIS3*, για επιβεβαιωτικό έλεγχο.

Η μέθοδος ενός υβριδίου δίνει λιγότερα «ψευδώς θετικά» αποτελέσματα σε σύγκριση με την μέθοδο δύο υβριδίων και γι' αυτό το λόγο αρκεί και μόνο το ένα γονίδιο ανταποκριτής για το «library screening».

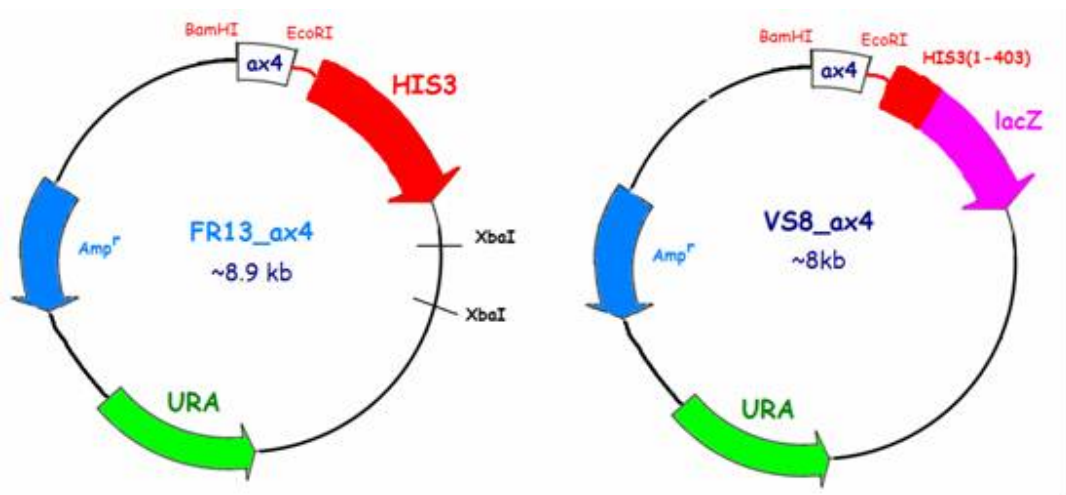
## Ειδικά

Για το δικό μας "one hybrid" χρησιμοποιήθηκε ο μινιενισχυτής που περιγράφηκε από τους Culi et al. (1998) και ο οποίος αποτελείται από 4 επαναλήψεις ενός ολιγονουκλεοτιδίου που περιέχει ένα  $\alpha$  box και δύο κατεστραμμένα E1 box.

Η αλληλουχία του ενός ολιγονουκλεοτιδίου είναι η ακόλουθη:

GATCC**AAAGCAACCCCTAAG**AACTAAATA**GACCTGCGAGCTAAATA**GACCTGCA  
 (α box) (κατεστραμμένα E1 box)

Ο παραπάνω μινιενισχυτής κλωνοποιήθηκε από προηγούμενους συναδέλφους (Νικο Γιατζόγλου) στους φορείς κλωνοποίησης FR13 και VS8 ως BamHI/EcoRI κομμάτι.

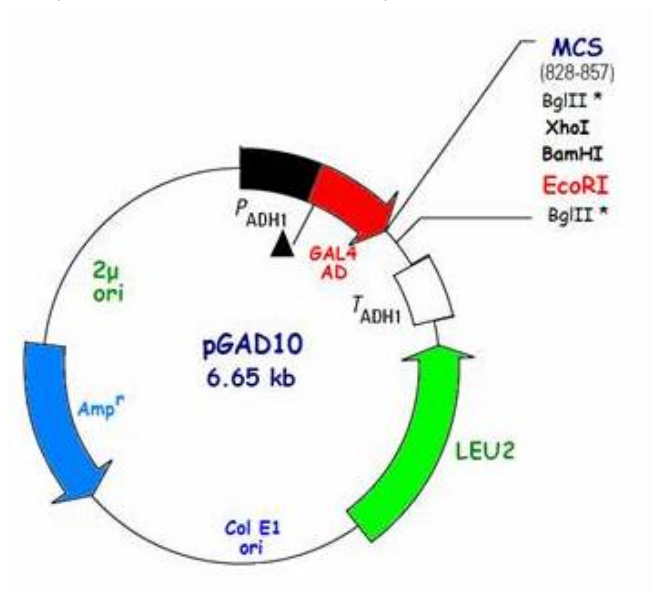


Όπως φαίνεται παραπάνω οι φορείς κλωνοποίησης έχουν το γονίδιο ανθεκτικότητας σε αμπικιλίνη (για επιλογή στα βακτήρια) καθώς και τον αυξοτροφικό μάρτυρα της ουρακίλης (για επιλογή στον σακχαρομύκητα). Επίσης ο φορέας FR13 έχει το γονίδιο ανταποκριτή HIS3 με τον υποκινητή του ενδογενούς γονιδίου (78 βάσεις ανοδικά του +1). Ενώ ο φορέας VS8 έχει το lacZ γονίδιο ανταποκριτή, το προϊόν του οποίου (~1000 αμινοξέα) εκφράζεται σε σύντηξη με τα πρώτα 143 αμινοξέα της πρωτεΐνης HIS3. Επίσης ο υποκινητής του lacZ προέρχεται από το ενδογενές γονίδιο HIS3 του σακχαρομύκητα (47 βάσεις ανοδικά του +1).

Ο φορέας κλωνοποίησης FR13 εν συνεχεία έγινε γραμμικός χρησιμοποιώντας το ένζυμο XbaI και στην συνέχεια μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού των άκρων του ενσωματώθηκε στο γένωμα του στελέχους FT5 (MAT $\alpha$ , ura3-52 trp1-D63 leu2::ret56 his3-D200). Κατά τον ανασυνδυασμό ενσωματωνόταν συγχρόνως και ο αυξοτροφικός μάρτυρας URA. Το στέλεχος που προέκυψε ονομάστηκε FT5ax4HIS3. Ελέγξαμε τον επιτυχημένο ανασυνδυασμό με αντίδραση PCR (data not shown).

Δημιουργήσαμε παράλληλα και το στέλεχος FT5αx4lacZ μέσω μετασχηματισμού στο FT5 στέλεχος του πλασμιδίου VS8\_αx4. Η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων έγινε μέσω του URA αυξοτροφικού μάρτυρα.

Η βιβλιοθήκη που χρησιμοποιήσαμε για την σάρωση (screening) περιείχε cDNA από έμβρυα Δροσόφιλας κλωνοποιημένα στον φορέα pGAD10 ως EcoRI κομμάτια. Η βιβλιοθήκη συνολικά περιείχε 2.000.000 διαφορετικούς cDNA κλώνους.



**Συνθήκες μετασχηματισμού:** Για το μετασχηματισμό του FT5αx4HIS3 στελέχους με το cDNA της βιβλιοθήκης χρησιμοποιήσαμε το πρωτόκολλο των Gietz et al., ενώ βρέθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες και χρησιμοποιήθηκαν ως εξής:

20 αντιδράσεις με 20 ml καλλιέργεια (OD=0,8) και σε καθεμιά προσθέταμε:

400ng cDNA βιβλιοθήκης

240μl PEG 50%

36μl LiCl 1M

7μl salmon sperm

H<sub>2</sub>O μέχρι 360μl.

Το heatshock γινόταν για 20-25 λεπτά στους 42°C και έπειτα αφήναμε να κύτταρα να ανακάμψουν 30-40 λεπτά πριν τα απλώσουμε σε πιάτα επιλογής.

**"Plasmid rescue":** για την απομόνωση του πλασμιδίου της βιβλιοθήκης αρχικά απομονώναμε DNA (χρωμοσωμικό και πλασμιδιακό) από τους κλώνους του σακχαρομύκητα και στην συνέχεια το χρησιμοποιούσαμε για να μετασχηματίσουμε κύτταρα E. coli. Μόνο το πλασμίδιο είχε την ικανότητα να πολλαπλασιάζεται στα βακτηριακά κύτταρα και να τους δίδει την ικανότητα επιβίωσης στο αντιβιοτικό αμπικικιλίνη.

## Αποτελέσματα-Συζήτηση

### Διαλογή της βιβλιοθήκης cDNA

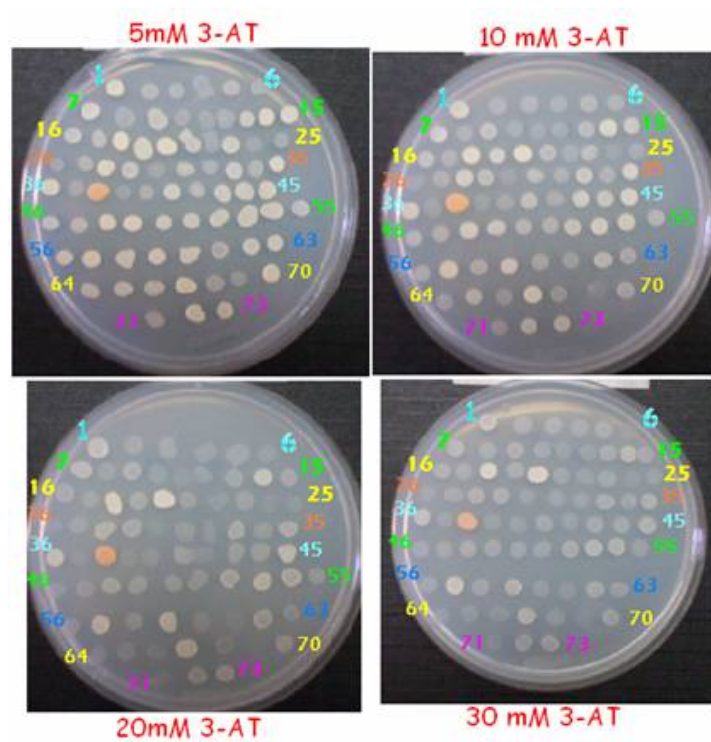
Μετά την δημιουργία του FT5αx4HIS3 στελέχους ελέγξαμε την ελάχιστη ποσότητα του χημικού αναστολέα 3-AT που απαιτείται για την «εξουδετέρωση» των βασικών επιπέδων έκφρασης του HIS3 γονιδίου. Διαπιστώθηκε ότι με την προσθήκη 1mM 3-AT «εξουδετερώναμε» τα βασικά επίπεδα μεταγραφής. Για την διαλογή της βιβλιοθήκης χρησιμοποιήσαμε 3,7 mM 3-AT, έτσι ώστε να κάνουμε πιο αυστηρή την επιλογή και να μειώσουμε τον αριθμό των «ψευδώς θετικών».

Κατά τον μετασχηματισμό του στελέχους χρησιμοποιήσαμε 8μg από τη cDNA βιβλιοθήκη. Η καλλιέργεια του FT5αx4HIS3 που μετασχηματίστηκε ήταν περίπου 400ml με OD=0,8. Δηλαδή συνολικά 2-3 δισεκατομμύρια κύτταρα.

Τα αρχικά μετασχηματισμένα κύτταρα που πήραμε ήταν 7,5 εκατομμύρια περίπου. Από αυτά μόλις τα 73 επέζησαν κατά την επιλογή με το 3-AT και μέσα σε χρονικό διάστημα 8 ημερών.

### Αρχικά επίπεδα επιβίωσης των κλώνων σε 3-AT

Αρχικά ελέγξαμε την μέγιστη αρχική συγκέντρωση 3-AT στην οποία μπορούσαν να μεγαλώσουν οι κλώνοι μας. Όπως φαίνεται και στις ακόλουθες φωτογραφίες μετά από 4 μέρες αρκετοί κλώνοι μπορούσαν να μεγαλώσουν ακόμα και σε 30 mM 3-AT (π.χ. Νο 18, 20, 57). Επίσης διαπιστώθηκε ότι ο κλώνος Νο38 είναι κάποια μόλυνση.



### Απομόνωση του πλασμιδίου της βιβλιοθήκης και χαρακτηρισμός του

Στην συνέχεια προχωρήσαμε στην διαδικασία απομόνωσης του πλασμιδίου της βιβλιοθήκης από τα κύτταρα του σακχαρομύκητα. Η απομόνωση αυτή έγινε μετασχηματίζοντας κύτταρα *E. coli* με το DNA κάθε κλώνου. Ο μετασχηματισμός αυτός απαιτεί υψηλή ικανότητα μετασχηματισμού των βακτηριακών κυττάρων και γι' αυτό το λόγο πήραμε λίγες αποικίες από κάθε μετασχηματισμό.

Ο αριθμός των αποικιών που πήραμε σε κάθε μετασχηματισμό αναγράφεται στην δεύτερη στήλη του ακόλουθου πίνακα για κάθε κλώνο χωριστά. Στις περιπτώσεις των κλώνων 6, 11, 41, 44, 62 αν και έγιναν ως και 8 προσπάθειες μετασχηματισμού δεν καταφέραμε να πάρουμε αποικίες και πιθανόν αυτό να οφείλεται στο γεγονός ότι οι κλώνοι αυτοί δεν περιείχαν πλασμίδιο της βιβλιοθήκης και συμπληρώνεται η αυξοτροφία της λευκίνης μέσω κάποιας μεταλλαγής του κλώνου.

Για να χαρακτηρίσουμε το ένθεμα κάθε κλώνου, κάναμε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *EcoRI*, αφού τα cDNA της βιβλιοθήκης είναι κλωνοποιημένα ως *EcoRI* κομμάτια στον φορέα *pGAD10*.

Σε κάποιες περιπτώσεις απομονώσαμε διαφορετικά πλασμίδια από τις προκύπτουσες αποικίες. Έτσι στους κλώνους Νο 22, 23, 24, 28, 34, 37, 45, 60, 64 και 67 απομονώσαμε δύο διαφορετικά πλασμίδια (τα μεγέθη των διαφορετικών ενθεμάτων χωρίζονται με κάθετο) ενώ στους κλώνους Νο 29 και 49 τα διαφορετικά πλασμίδια ήταν 3.

Στους κλώνους 2, 20 και 59 μετά την πέψη με *EcoRI* δεν εμφανιζόταν κάποια ζώνη του ενθέματος (μόνο η ζώνη του *pGAD10*) γεγονός που ίσως οφειλόταν είτε στο μικρό μέγεθος του ενθέτου (<100 βάσεις), είτε στην ύπαρξη εσωτερικών θέσεων *EcoRI* που έκοβαν το ένθεμα σε πολύ μικρά κομμάτια που δεν ήταν ανιχνεύσιμα στο πήκτωμα αγαρόζης.

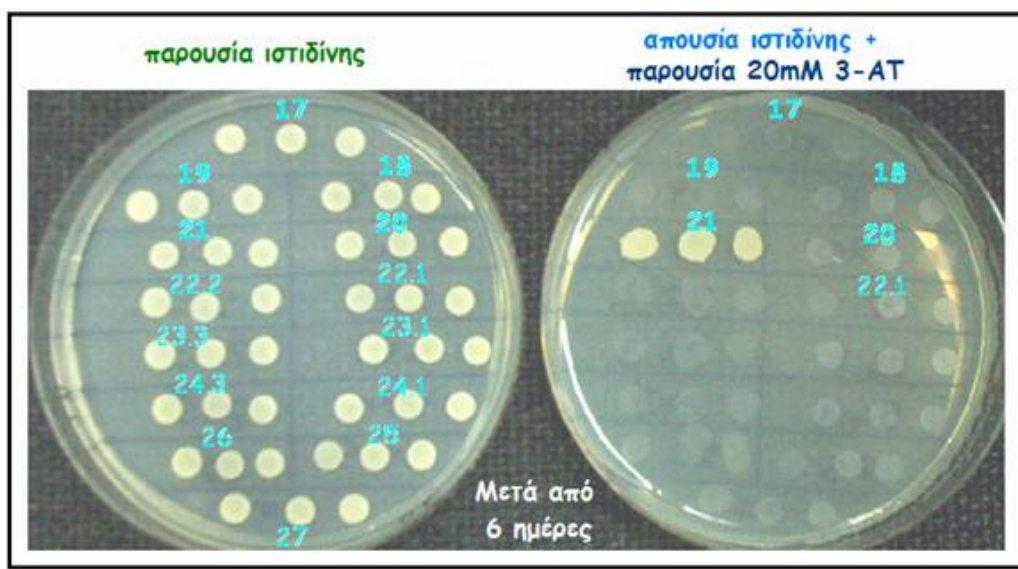
Κλώνος	Συνολικές αποικίες <i>E. coli</i>	Μέγεθος ενθέματος μετά από πέψη με <i>EcoRI</i> ένζυμο	Κλώνος	Συνολικές αποικίες <i>E. coli</i>	Μέγεθος ενθέματος μετά από πέψη με <i>EcoRI</i> ένζυμο
1	2	250+750	6		
2	1	καμία ζώνη	7	1	350+750
3	2	600	8	2	400+650
4	1	1100	9	3	700 (διπλή ζώνη)
5	2	650	10	7	350

Κλώνος	Συνολικές αποικίες E.coli	Μέγεθος ενθέματος μετά από πέψη με EcoRI ένζυμο	Κλώνος	Συνολικές αποικίες E.coli	Μέγεθος ενθέματος μετά από πέψη με EcoRI ένζυμο
11			43	3	750
12	1	700	44		
13	1	700 (διπλή ζώνη)	45	2	300 / 600
14	3	750 (διπλή ζώνη)	46	1	400
15	1	900	47	1	500
16	3	650 + 900 + 1700	48	2	900
17	2	700	49	4	350 / 600 / 200
18	1	1200	50	3	700
19	2	200	51	2	650
20	2	καμία ζώνη	52	1	700
21	1	2300	53	2	400
22	2	1700 / 600	54	1	750
23	3	700 / 900	55	2	700
24	3	200 + 300 + 400 / 700	56	2	650
25	3	600	57	1	200
26	3	600	58	2	350
27	1	1600	59	2	καμία ζώνη
28	3	250 + 400 / 900	60	3	650 / 600
29	3	400 / 1100 / 1200	61	2	300+1800
30	3	850	62		
31	3	350	63	1	650
32	1	1800	64	2	500 / 700
33	3	200+700	65	3	250+400
34	3	400 / 800	66	1	600
35	3	350+450	67	3	1400 / 600
36	1	750	68	1	900
37	3	700 / 600	69	1	300
38		μόλυνση	70	1	400+550
39	1	850	71	2	800
40	2	700	72	3	300+850
41			73	4	350+600
42	3	850			

### “Επαναμετασχηματισμός” του στελέχους FT5αx4HIS3

Εν συνεχεία προχωρήσαμε στον “επανα-μετασχηματισμό” του στελέχους FT5αx4HIS3 με τα απομονωθέντα πλασμίδια έτσι ώστε να ελέγξουμε αν η αρχική επιβίωση των κλώνων παρουσία 3-AT, οφειλόταν στα πλασμίδια της βιβλιοθήκης που αυτά έφεραν. Στις περιπτώσεις που είχαμε απομονώσει περισσότερα από ένα πλασμίδια σε κάποιον κλώνο (π.χ. Νο 22) χρησιμοποιήσαμε όλα τα πλασμίδια χωριστά για να δημιουργήσουμε αντίστοιχο αριθμό νέων στελεχών (Νο 22.1 και 22.2). Ελέγξαμε την ικανότητα επιβίωσης όλων των καινούριων στελεχών για να δούμε αν επαναλαμβάνεται η επιβίωση παρουσία 3-AT.

Οι συγκεντρώσεις 3-AT που χρησιμοποιήσαμε ήταν 4 mM, 10 mM, 20 mM και 30 mM. Ο έλεγχος αυτός επαναλήφθηκε 4 φορές χρησιμοποιώντας για κάθε στέλεχος τρεις διαφορετικές μετασχηματισμένες αποικίες ώστε να αποκλείσουμε την πιθανότητα κάποιας μεταλλαγής. Πράγματι όπως φαίνεται και στην παρακάτω φωτογραφία μόνο ο κλώνος Νο21 επανεμφάνισε την ικανότητα επιβίωσης σε 3-AT ακόμα και σε συγκέντρωση 30mM.



Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται μόνο το πιάτο που περιέχει τον κλώνο Νο 21, αφού οι κλώνοι όλων των υπόλοιπων πιάτων δεν επιβίωσαν (όπως τους κλώνους 17-19 παραπάνω). Επίσης παραπάνω στο πρώτο πιάτο προσφέρουμε στα κύτταρα την ιστιδίνη (όχι όμως λευκίνη, ούτε ουρακίλη), έτσι ώστε να δείξουμε ότι τα κύτταρα κατά τα άλλα είναι ικανά να επιβιώσουν. Ενώ στο δεύτερο πιάτο δεν προσθέτουμε ιστιδίνη, αλλά αντίθετα προσθέτουμε 3-AT ώστε να κάνουμε πιο αυστηρή επιλογή.

Έτσι στείλαμε για αλληλούχιση των κλώνο Νο21, ώστε να δούμε την ταυτότητα του cDNA που αυτός περιέχει.



### Μετασχηματισμός\* του στελέχους FT5ax4lacZ

Παράλληλα μετασχηματίσαμε το στέλεχος FT5ax4lacZ με τα περισσότερα από τα παραπάνω πλασμίδια για να ελέγξουμε το δεύτερο γονίδιο αναφοράς, αλλά δυστυχώς τα αποτελέσματα από εκεί δεν ήταν και τόσο ενθαρρυντικά. Ούτε το πλασμίδιο από το No21 κλώνο εμφάνιζε δραστικότητα β-γαλακτοσιδάσης. Πιο συγκεκριμένα όταν κάναμε πιάτα Xgal κάποιες αποικίες γινόταν μπλε μετά την παρέλευση 5 ημερών (μη αξιόπιστο δεδομένο), ενώ όταν χρησιμοποιήσαμε μέτρηση της β-γαλακτοσιδάσης σε υγρή καλλιέργεια με ONPG αυτή γινόταν λίγο κίτρινη μετά από 12 ώρες (επίσης μη αξιόπιστο δεδομένο). Βέβαια το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε κάποια μεταλλαγή του φορέα VS8 με αποτέλεσμα το mRNA της συντηγμένης πρωτεΐνης να μην δίδει προϊόν (π.χ. λόγω λάθους στο πλαίσιο διαβάσματος), είτε ακόμα και στο γεγονός ότι οι υποκινητές των δύο γονιδίων αναφοράς δεν είναι ακριβώς οι ίδιοι, συνυπολογίζοντας το δεδομένο ότι η μέτρηση της β-γαλακτοσιδάσης είναι λιγότερο ευαίσθητη μέτρηση συγκριτικά με την HIS3.

### Αλληλουχία του κλώνου No21

Η αλληλουχία του κλώνου ήταν οι ακόλουθη:

Κάνοντας Blast στην βάση δεδομένων (<http://www.ncbi.nih.gov/blast>) διαπιστώσαμε ότι ο κλώνος μας αντιστοιχεί στην ισομορφή 54.6 της πρωτεΐνης mod(modg4). Μάλιστα περιλαμβάνει όλη την κωδική περιοχή της ισομορφής αυτής (θέση 159-1655). Παράλληλα στην αλληλουχία φαίνονται οι αλληλουχίες σύνδεσης της βιβλιοθήκης (διπλά υπογραμμισμένες)

```

1      GAATTCGCGGCCGGTTCGACGTCAAAGAACTCGGACGCGTTCTGCGTGTTCG
51     GCCGCGCTAGCAAAAAAACTCTGGCTTTAGTTAGTTATTTTATTGGAAAAA
101    TATTTAGTCAAGAGCCAACAACGCATAGATACAGAAAAGTATTGATTTT
151    CGTCCAAGATGGCGGACGACGAGCAATTCAGCTTGTGCTGGAACAAC TTC
201    AACACGAATTTGTTCGGCCGGCTTCCACGAGTCGCTATGCCGCGGCGACCT
251    GGTGGACGTCTCGCTGGCCGCGAGGGCCAAATAGTGAAGGCCACCGAT
301    TGGTGTATCCGTCTGCTCGCCCTTCTTCCGCAAGATGTTCACTCAGATG
351    CCGTCGAACACCCACGCTATCGTATTCCTGAACAACGTCAGCCACTCGGC
401    GCTGAAGGACCTCATCCAATTCATGTACTGCGGCGAGGTCAACGTGAAGC
451    AGGACGCCCTGCCCGCTTTATTAGCACCGCGGAATCGCTGCAAAATCAAG
501    GGGCTAACGGATAACGATCCTGCGCCTCAGCCGCGCAGGAATCCAGCCC
551    GCCGCCAGCAGCACCTCATGTACAACAACAGCAAATACCGGCTCAGCGGG
601    TGCAGCGCCAGCAGCCTCGCGCCTCCGCCCGCTACAAGATCGAGACCGTG

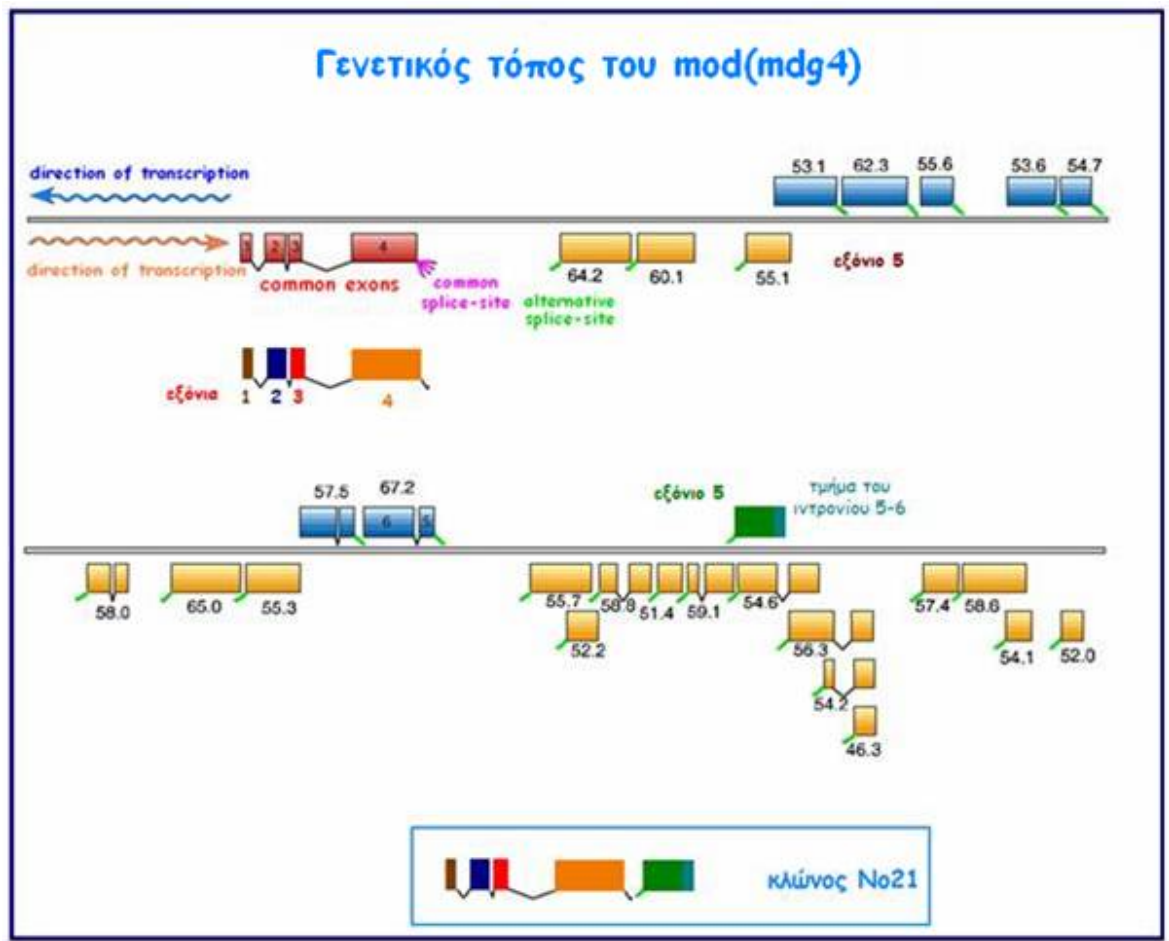
```

651 GACGACGGCCTGGGCGACGAGAAACAGAGCACCACCCAGATCGTCATCCA  
 701 GACCACGGCCGCACCCCAAGCCACCATTGTACAACAGCAGCAACCCGCAGC  
 751 AGGCGGCGCAGCAGATCCAATCGCAGCAGCTGCAGACGGGAACCACGACG  
 801 ACGGCGACGCTGGTGTGACAAAACAAACGCTCTGCCAGCGCTCCTCCCT  
 851 GACCCCGCCTCCTCGAGCGCCGGCGTAAAGCGCTCCAAGACAAGCACCTC  
 901 CCGCAAATGTTATGGACCCTCTCGACTCGACCACTGAAACTGGAGCCACG  
 951 ACAACCGCCCAACTTGTGCCGCAACAGATCACCGTGCAAACCTCTGTGGT  
 1001 CTCTGCCGCGAGAAGCAAAGCTCCACCAGCAATCGCCGCAGCAGGTTTCGAC  
 1051 AGGAGGAAGCCGAGTACATTGATCTCCCCATGGAATTGCCACGAAATCT  
 1101 GAACCTGACTACTCTGAGGACCATGGCGACGCCGCCGGCGATGCCGAGGG  
 1151 CACCTATGTGGAGGACGATACTTACGGAGACATGCGCTACGACGACAGCT  
 1201 ACTTCACTGAAAACGAGGATGCTGGCAACCAGACTGCGGCAAATACGAGC  
 1251 GGTGGCGGAGTGACGGCGACCACTTCCAAGGCTGTGGTCAAGCAACAGTC  
 1301 CCAGAACTACAGTGAATCATCGTTTGTGACACCAGCGGGGATCAGGGCA  
 1351 ACACAGAGGCTCAAGTGACATTTGATGTGTTAACGGATCCCATCGTAAAA  
 1401 CCCGATCAACACCAGCTGATGAAGCGGTTTCGTTTGTCCAAATCCATGGA  
 1451 GGGCGTGCACTACGTTTCGCACTCCGGCCGGGAATGTCGTTCTGCACTGTG  
 1501 GGGAGCATCGTTACCTGCGGAATGCCGCCTATAAGGACAAGGTCTACTGG  
 1551 AAGTGCAGCAAGTGGCGCAAGCAATGCCGCTCCCGCGTCATCACTCACAT  
 1601 CTTGCCGAATGGCCAATCCCGCTACGCAGTCAGTGGCGTGCATAATCATC  
 1651 CATAGATCAAAGAGCATTCAGAAGTCTGAATCGGGACACATACATAGCTG  
 1701 TATAGATTAGGCAGCTTTTTGTACAGAAATGATGTAGTAAACGAAATTGAA  
 1751 CCGAAATCCATTTCTAGTTTTTGCGCAATAACACCTTTTAATTTGTCAGAT  
 1801 CTTAAGCTTGATATATAAACAGGCTTAGGATTATTTTGCAGAAGATAGTA  
 1851 TTTATTAAGGTAAGGTGAGTGTGTTGCAATTGACTTGTTTAAAACTTTAC  
 1901 TTATGTTTATGAATAGACCAACCTCTTGTTTTATTTTACTGTACCTAAAT  
 1951 ATATATTTTTTTTACAAAAAAAAGTCGACGCGGCCGCGAATTCCAGATC  
 2001 TATGAATCGTAGATACTGAAAAACCCCGCAAGTTCACCTCAACTGTGCAT  
 2051 CGTGCACCATCTCAATTCTttcA

### Γενικές πληροφορίες για το mod(mdg4) και χαρακτηρισμός του κλώνου 21.

Ο γονιδιακός τόπος του mod(mdg4) στην Δροσόφιλα εκτείνεται σε μια περιοχή των 28 kb και κωδικοποιεί 26 εναλλακτικές μορφές mRNA. Κάθε mRNA δημιουργείται μέσω εναλλακτικού ματίσματος των πρώτων τεσσάρων κοινών εξονίων (κόκκινα εξόνια) με κάποιο από τα εξόνια που βρίσκονται καθοδικά αυτών (κίτρινα ή μπλε εξόνια). Τα κίτρινα εξόνια μεταγράφονται από την ίδια αλυσίδα του

DNA με τα κοινά εξόνια, ενώ τα μπλε εξόνια μεταγράφονται από την αντίθετη αλυσίδα (trans-splicing).



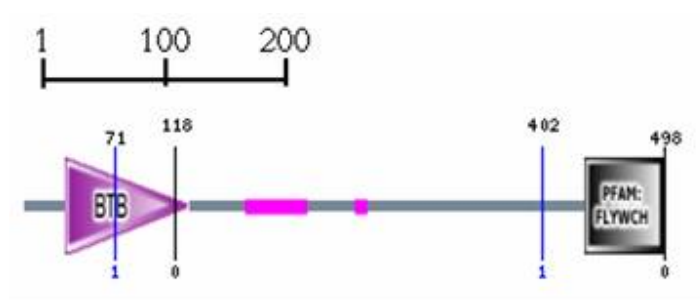
Στο παραπάνω σχήμα φαίνεται και ο κλώνος No21 (με χρώματα αντίστοιχα της αλληλουχίας). Αν και από το σχήμα φαίνεται να απουσιάζει το εξόνιο 6 της ισομορφής 54.6, δεν έχει αποτέλεσμα στην έκφραση της πρωτεΐνης μιας και το εξόνιο 6 αποτελεί 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή του mRNA.

Παράλληλα διαπιστώσαμε ότι το παραπάνω cDNA δεν μεταγράφεται στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με την ενεργοποιητική περιοχή (AD) του GAL4. Όμως επειδή ο κλώνος περιέχει ολόκληρη την κωδική περιοχή του γονιδίου θα μπορούσε η πρωτεΐνη που φτιάχνεται να χρησιμοποιεί την δική της ενεργοποιητική περιοχή, χωρίς να χρειάζεται το AD του GAL4. Ακόμα υπάρχει η πιθανότητα του λεγόμενου «read-through» δηλαδή παρά το γεγονός ότι υπάρχουν κωδικόνια λήξης μεταξύ του GAL4 και του cDNA, να τα «προσπερνά» η ριβοσωμική μηχανή και να παράγει την συντηγμένη πρωτεΐνη.

Η αμινοξική αλληλουχία της παραπάνω ισομορφής είναι η ακόλουθη:

MADDEQFSLCWNNTNLSAGFHESLCRGDLVDVSLAAEGQIVKAHRLVLSVCS  
 PFFRKMFTQMPNSTHAIIVFLNNVSHSALKDLIQFMYCGEVNVKQDALPAFISTA  
 ESLQIKGLTDNDPAPQPPQESSPPPAAPHVQQQIIPAQRVQRQQPRASARYKIE  
 TVDDGLGDEKQSTTQIVIQTTAARQATIVQQQQPQQAAQQIQSQQLQTGTTTTA  
 TLVSTNKRSAQRSSLTPASSSAGVKRSKTSTSANVMDPLDSTTETGATTTAQLV  
 PQQITVQTSVNSAAEAKLHQQSPQQVVRQEEAEYIDLPMELPTKSEPDYSEDHGD  
 AAGDAEGTYVEDDTYGDMRYDDSYFTENEDAGNQTAAANTSGGGVTATTSKAVVK  
 QQSQNYSESSFVDTSGDQGNTEAQVTFDVLTDPIVKPDQHQLMKRVRLSKSMEG  
 VHYVRTPAGNVVLHCGEHRYL RNAAYKDKVYWKCSKWRKQCRSRVITHILPNGQ  
 SRYAVSGVHNHP

Παράλληλα χρησιμοποιώντας την βάση δεδομένων SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) βρήκαμε τις ακόλουθες περιοχές στην πρωτεΐνη αυτή:



Καταρχήν η πρωτεΐνη διαθέτει δύο αλληλεπικαλυπτόμενες περιοχές που καλούνται BTB/POZ. Είναι ένα πρωτεϊνικό μοτίβο που βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο αρκετών μεταγραφικών πρωτεϊνών που διαθέτουν συγχρόνως μια περιοχή γνωστή ως «δάκτυλος ψευδαργύρου» (zinc finger domain) του τύπου C2H2. Η περιοχή «δάκτυλος ψευδαργύρου» συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών με το DNA.

Η περιοχή BTB/POZ κωδικοποιείται από τα εξόνια 2-4 και φαίνεται στικτά υπογραμμισμένη στην παραπάνω αμινοξική αλληλουχία (από τα αμινοξέα 22-128 το πρώτο προβλεπόμενο BTB/POZ domain, και από 32-128 το δεύτερο προβλεπόμενο BTB/POZ domain). Το BTB/POZ domain έχει δείχτει να συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών, για όμο- ή ετεροδιμερισμό (Bardwell & Treisman, 1994; Ahmad, Engel & Prive, 1998).

Στο αμινοτελικό άκρο (αμινοξέα 435-497, υπογραμμισμένα) υπάρχει μια νέα μορφή μοτίβου Cys2His2, το οποίο βρίσκεται σε 22 από τις 26 ισομορφές του mod(mdg4) (βλέπε εικόνα παρακάτω). Η περιοχή αυτή χαρακτηρίζεται από πέντε συντηρημένα αμινοξέα, από τα οποία παίρνει και το όνομά της, περιοχή FLYWCH. Η λειτουργία αυτής της περιοχής δεν έχει αποδειχτεί. Όμως ήδη υπάρχοντα



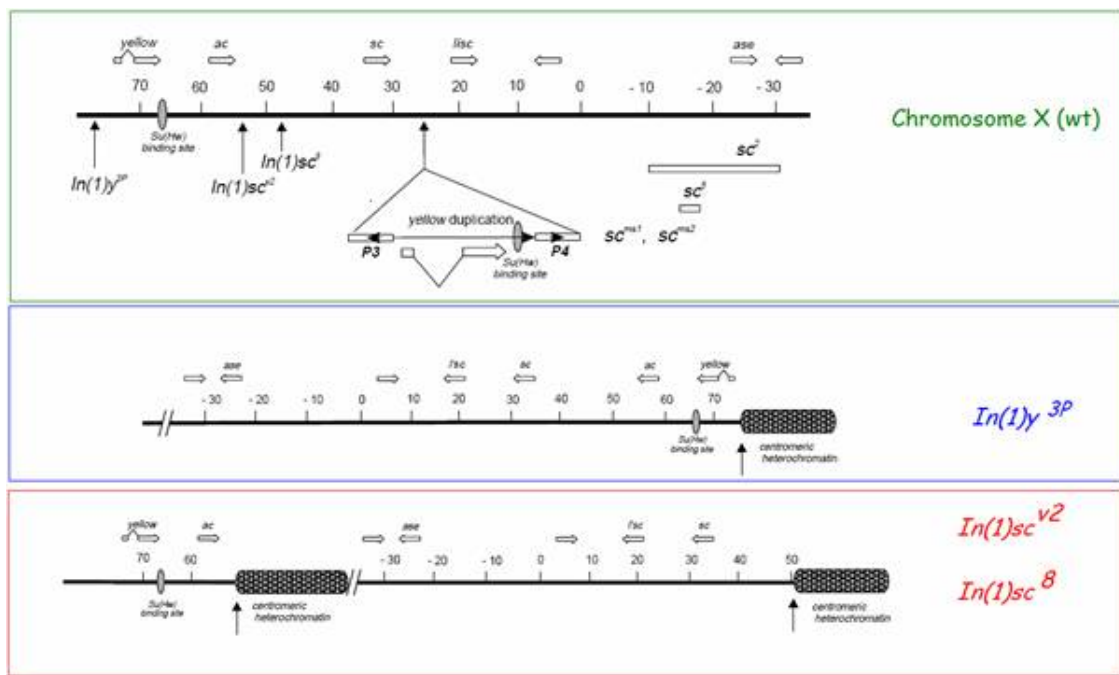
Μερικοί από τους λόγους που μας κάνουν να πιστεύουμε ότι το *mod(mdg4)* ίσως είναι πράγματι το γονίδιο που ψάχναμε παραθέτονται στη συνέχεια.

A) Οι Goczycza et al. (1999) προσδιόρισαν το *mod(mdg4)* σε ένα «screen» για μεταλλαγές που εμπλέκονται στον μηχανισμό νεύρωσης των μυικών κυττάρων της προνύμφης. Ο φαινότυπος αυτής της μεταλλαγής, που οφειλόταν στο αλληλομορφο *brd* (branch point disrupted), ήταν ανώμαλες νευρικές διακλαδώσεις και βλάβες στην μεμβράνη των νευρικών κυττάρων. Οι συγγραφείς απέδιδαν πιθανό ρόλο του *mod(mdg4)* στην ρύθμιση της έκφρασης των νευρο-ειδικών γονιδίων.

B) Οι Giotz et al σε ένα μαζικό two-hybrid που έκαναν το 2003 βρήκαν ότι η πρωτεΐνη *Mod(mdg4)* αλληλεπιδρά με την bHLH πρωτεΐνη *m7*. Η πρωτεΐνη αυτή είναι μια από τις πρωτεΐνες του συμπλόκου *E(spl)*, που αποτελούν όπως προαναφέραμε καθοδικούς τελεστές (downstream effectors) της ενεργοποίησης του υποδοχέα *Notch*.

Γ) Οι Gholonin et al (2003) έδειξαν ότι η πρωτεΐνη *Mod(mdg4)* μαζί με την *Suppressor of Hairy-wing* [*Su(Hw)*] εμπλέκονται την μεταγραφική ρύθμιση του συμπλόκου *Achaete-Scute* (*AS-C*).

Πιο συγκεκριμένα ο ρόλος των *Mod(mdg4)* και *Su(Hw)* στην έκφραση των γονιδίων του *AS-C* έγινε φανερός όταν με χρωμοσωμικές αναδιατάξεις τροποποίησαν την ρυθμιστική περιοχή του *AS-C*. Αρκετές ήδη περιγραφμένες αναστροφές με σημεία σημεία θραύσεως στην *AS-C* ρυθμιστική περιοχή και στην κεντρική ετεροχρωματίνη είχαν μικρή επίδραση στον φαινότυπο. Αυτό οδήγησε στην υπόθεση ότι υπάρχουν κάποιες περιοχές που εμποδίζουν αποτελεσματικά την «εξάπλωση» (spread) της αποσιώπησης λόγω της ετεροχρωματίνης (heterochromatic silencing).



Πιο συγκεκριμένα στην μεταλλαγή  $In(1)y3p$  όταν συγχρόνως υπάρχει απώλεια λειτουργίας είτε της πρωτεΐνης  $Mod(mdg4)$  είτε της  $Su(Hw)$  η έκφραση του γονιδίου *yellow* δεν επηρεάζεται, σε αντίθεση με την έκφραση των *ac* και *sc* (Golovnin, 2003) που μειώνεται ισχυρά. Το γεγονός αυτό υποστηρίζει ότι υπάρχει μια θέση πρόσδεσης των  $Mod(mdg4)/Su(Hw)$  μεταξύ *yellow* και *ac* που εμποδίζει την εξάπλωση της χρωματίνης. Οπότε απουσία των πρωτεϊνών αυτών τα γονίδια *ac* και *sc* επηρεάζονται πλέον από την κεντρική ετεροχρωματίνη.

Επίσης κατά τις αναστροφές της χρωματίνης  $In(1)sc8$  και  $In(1)scv2$  γίνεται διαχωρισμός των γονιδίων *ac* και *sc*. Η αναγκαιότητα των  $Mod(mdg4)$  και  $Su(Hw)$  για την κανονική έκφραση του *sc* ενισχύει την υπόθεση ότι υπάρχουν και άλλες θέσεις πρόσδεσης των  $Mod(mdg4)/Su(Hw)$  ανοδικά του *sc*. Άλλωστε μην ξεχνάμε ότι ο ενισχυτής *SMC* βρίσκεται 3.7kb ανοδικά του *sc*.

Τα παραπάνω δεδομένα μας ωθούν να ελέγξουμε πιο προσεκτικά την ικανότητα της  $Mod(mdg4)$  να προσδένεται στον *a box* και στην συνέχεια τον ρόλο της στον καθορισμό του *SMC* κυττάρου.

## Βιβλιογραφία

1. Ahmad, K.F., C.K. Engel & G.G. Prive, 1998. Crystal structure of the BTB domain from PLZF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 12123-12128.
2. Artavanis-Tsakonas, S. and P. Simpson. 1991. Choosing a cell fate: A view from the Notch locus. *Trends Genet.* 7: 403-408.
3. Bailey, A.M. and J.W. Posakony. 1995. Suppressor of Hairless directly activates transcription of Enhancer of split complex genes in response to Notch receptor activity. *Genes & Dev.* 9: 2609-2622.
4. Bardwell, V.J. & R. Treisman, 1994. The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev.* 8: 1664-1677.
5. Brand, M., A.P. Jarman, L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 1993. *asense* is a *Drosophila* neural precursor gene and is capable of initiating sense organ formation. *Development* 119: 1-17.
6. Campuzano, S. and J. Modolell. 1992. Patterning of the *Drosophila* nervous system: The achaete-scute gene complex. *Trends Genet.* 8: 202-207.
7. Cubas, P. and J. Modolell. 1992. The extramacrochaetae gene provides information for sensory organ patterning. *EMBO J.* 11: 3385-3393.
8. Cubas, P., J.F. de Celis, S. Campuzano, and J. Modolell. 1991. Proneural clusters of achaete-scute expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc. *Genes & Dev.* 5: 996-1008.
9. 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 signalling. *Genes Dev.* 12, 2036-2047.
10. Dominguez, M. and S. Campuzano. 1993. *asense*, a member of the *Drosophila* achaete-scute complex, is a proneural and neural differentiation gene. *EMBO J.* 12: 2049-2060.
11. Gause, M., Morcillo, P. and Dorsett, D. (2001). Cooperation between Suppressor of Hairy Wing and Modifier of *mdg4* proteins in insulation of enhancer-promoter communication by the gypsy transposon in the *Drosophila* cut gene. *Mol. Cell. Biol.* 21, 4807-4817.
12. Ghysen, A. and C. Dambly-Chaudiere. 1988. From DNA to form: The achaete-scute complex. *Genes & Dev.* 2: 495-501.
13. Giagtzoglou, N., P. Alifragis, K. A. Koumbanakis, and C. Delidakis. 2003. Two modes of recruitment of E(spl) repressors onto target genes. *Development* 130:259-270.
14. Giot et al. 2003. A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science.* 2003 5;302(5651):1727-36.
15. Golovnin A, Birukova I, Romanova O, Silicheva M, Parshikov A, Savitskaya E, Pirrotta V, Georgiev P. 2003. An endogenous Su(Hw) insulator separates the yellow gene from the Achaete-scute gene complex in *Drosophila*. *Development.* 130(14):3249-58.



16. Gomez-Skarmeta, J.L., I. Rodriguez, C. Martinez, J. Culi, M.D. Ferrer-Marco, D. Beamonte, and J. Modolell. 1995. Cis-regulation of achaete and scute: Shared enhancer-like elements drive their coexpression in proneural clusters of the imaginal discs. *Genes & Dev.* 9: 1869-1882.
17. Gorczyca, M., E. Popova, X.X. Jia & V. Budnik, 1999. The gene mod(mdg4) affects synapse specificity and structure in *Drosophila*. *J. Neurobiol.* 39: 447-460.
18. Harvey, A.J., A.P. Bidwai & L.K. Miller, 1997. Doom, a product of the *Drosophila* mod(mdg4) gene, induces apoptosis and binds to baculovirus inhibitor-of-apoptosis proteins. *Mol. Cell. Biol.* 17: 2835-2843.
19. Heitzler, P. and P. Simpson. 1991. The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*. *Cell* 64: 1083-1092.
20. Heitzler, P., M. Bourouis, L. Ruel, C. Carteret, and P. Simpson. 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.
21. Jarman, A.P., M. Brand, L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 1993. The regulation and function of the helix-loop-helix gene, asense, in *Drosophila* neural precursors. *Development* 119: 19-29.
22. Jennings, B., J. de Celis, C. Delidakis, A. Preiss, and S. Bray. 1995. Role of Notch and achaete-scute complex in the expression of Enhancer of split bHLH proteins. *Development* 121: 3745-3752.
23. Lecourtois, M. and F. Schweisguth. 1995. The neurogenic Suppressor of Hairless DNA-binding protein mediates transcriptional activation of the Enhancer of split complex genes triggered by Notch signaling. *Genes & Dev.* 9: 2598-2608.
24. Lenardo, M.J. and D. Baltimore. 1989. NF- $\kappa$ B: A pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell* 58: 227-229.
25. Ligoxygakis, P., Bray, S. J., Apidianakis, Y. and Delidakis, C. (1999). Ectopic expression of individual E(spl) genes has differential effects on different cell fate decisions and underscores the biphasic requirement for notch activity in wing margin establishment in *Drosophila*. *Development* 126,2205 -2214.
26. Martinez, C. and J. Modolell. 1991. Cross-regulatory interactions between the proneural achaete and scute genes of *Drosophila*. *Science* 251: 1485-1487.
27. Murre, C., P.S. McCaw, H. Vaessin, M. Caudy, L.Y. Jan, Y.N. Jan, C.V. Cabrera, and D. Baltimore. 1989. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58: 537-544.
28. Nakao, K. and J.A. Campos-Ortega. 1996. Persistent expression of genes of the Enhancer of Split complex suppresses neural development in *Drosophila*. *Neuron* 16: 275-286.
29. Oellers, N., M. Dehio, and E. Knust. 1994. bHLH proteins encoded by the Enhancer of split complex of *Drosophila* negatively interfere with

transcriptional activation mediated by proneural genes. *Mol. Gen. Genet.* 244: 465-473.

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

31. Schweisguth, F. and J.W. Posakony. 1994. Antagonistic activities of Suppressor of Hairless and Hairless control alternative cell fates in the *Drosophila* adult epidermis. *Development* 120: 1433-1441.

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

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

34. Simpson, P. 1997. Notch signalling in development: On equivalence groups and asymmetric developmental potential. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7: 537-542.

35. Tata, F. and D.A. Hartley. 1995. Inhibition of cell fate in *Drosophila* by Enhancer of split genes. *Mech. Dev.* 51: 305-315.

36. Thatcher, J.D., A.P. Fernandez, L. Beaster-Jones, C. Haun & P.G. Okkema, 2001. The *Caenorhabditis elegans* peb-1 gene encodes a novel DNA-binding protein involved in morphogenesis of the pharynx, vulva, and hindgut. *Dev. Biol.* 229: 480-493.

37. Tietze, K., N. Oellers, and E. Knust. 1992. Enhancer of split<sup>D</sup>, a dominant mutation of *Drosophila*, and its use in the study of functional domains of a helix-loop-helix protein. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89: 6152-6156.

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