

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ  
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Μεταπτυχιακή Εργασία**

**«Η σηματοδότηση Notch μέσω ενδοκύττωσης, η περίπτωση της πρωτεΐνης Delta»**

**Γιώργος Τσουμπέκος**

Ηράκλειο, Σεπτέμβριος 2011

UNIVERSITY OF CRETE  
FACULTY OF SCIENCE  
BIOLOGY DEPARTMENT



FORTH

INSTITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

*Master's thesis*

**«Notch Signalling via endocytosis – the case of Delta»**

**Giorgos Tsumpekos**

Heraklion, September 2011

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς Notch ενεργοποιούνται από τους διαμεμβρικούς προσδέτες της οικογένειας των πρωτεϊνών DSL, όπου και υποδιαιρούνται στις υποοικογένειες Delta / Jagged, υψηλά συντηρημένοι για όλα τα μετάζωα. Ακόμα και εάν οι πρωτεΐνες Notch και DSL είναι προσδεσμένες in trans, βασικό προαπαιτούμενο για τη σωστή σηματοδότηση Notch είναι οι προσδέτες DSL να ενεργοποιηθούν από μία E3 λιγάση ουβικουΐτινης.

Πρόσφατες ερευνητικές δουλειές από το εργαστήριο μας και άλλα την τελευταία δεκαετία έχουν χαρακτηρίσει δύο οικογένειες E3 λιγασών που φέρουν την επικράτεια RING, η οποία έχει τη δυνατότητα να ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες DSL. Αυτές είναι οι Neuralized και Mindbomb1. Επίσης είναι γνωστό πως η ουβικουΐτινυλίωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών είναι ένα σήμα για ενδοκύττωση, καθώς και μεταγενέστερων βημάτων στην ενδοκυττάρια διακίνηση.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, έχουμε χρησιμοποιήσει μεταλλαγές στο ενδοκυττάριο τμήμα ICD της πρωτεΐνης DI του οργανισμού *Drosophila melanogaster* και ελέγξαμε (I) την ενδοκυττάρια διακίνηση του DI. Επίσης χρησιμοποιήσαμε την πρωτεΐνη DI αγρίου τύπου και ελέγξαμε βιοχημικά την ικανότητα ουβικουΐτινυλίωσής της από διαφορετικές E3 λιγάσες (II). Για την επίτευξη του στόχου (II), αναλύσαμε άλλες μεμβρανικές E3 λιγάσες, και κατά πόσο χρησιμοποιούν ως στόχο την πρωτεΐνη DI, τις Cbl-S και Dx.

## **ABSTRACT**

The Notch transmembrane receptors are activated by transmembrane ligands of the DSL family, which is subdivided into the Delta and Serrate / Jagged subfamilies in higher metazoans. Even when Notch and DSL are engaged in trans, signaling ensues only when DSL proteins are activated by an ubiquitin E3 ligase.

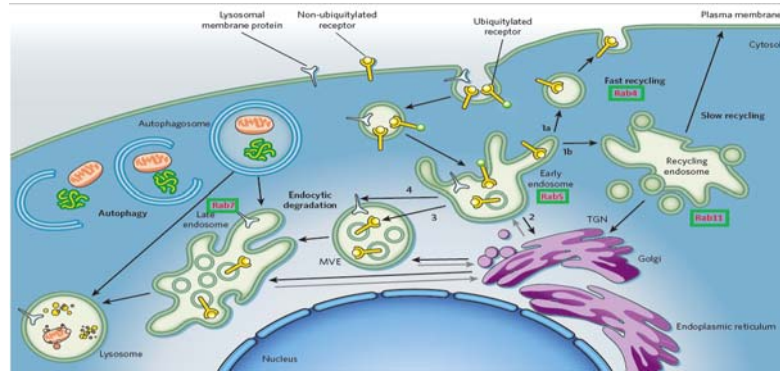
Work from our lab and others over the past decade has characterized two families of RING domain E3 ligases which have the ability to activate DSL proteins, Neuralized and Mindbomb1. Ubiquitylation of plasma membrane proteins is a signal for endocytosis, as well as further sorting steps in intracellular trafficking.

Here we have molecularly dissected the *Drosophila* DI ICD and have tested two parameters: (I) subcellular distribution of DI, (II) ubiquitylation by different E3 ligases, only in DIwt. In order to achieve aim (II), we tested new membrane associated Ub ligases to determine whether they might use DI as a substrate: Cbl-S (S: short isoform of Cbl protein) and Dx.

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

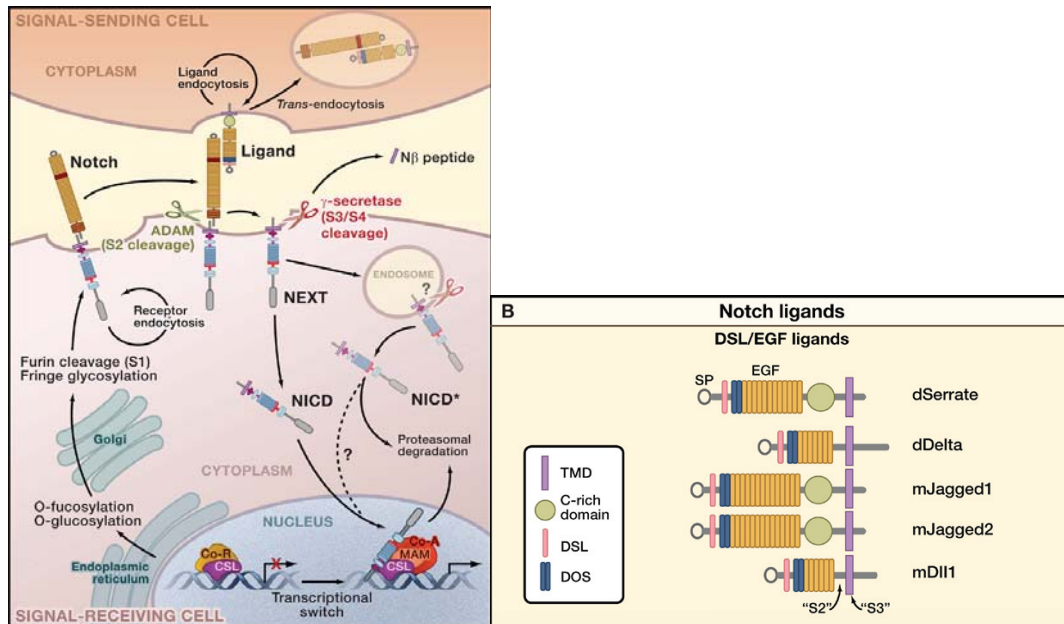
Μέχρι πρότινος ίσχυε η άποψη πως η κυτταρική σηματοδότηση συνέβαινε αυστηρά στην κυτταρική επιφάνεια, ενώ εξειδικευμένοι υποδοχείς προσδένονται με εξωκυττάρια σήματα και διεγείρουν την κυτταρική απόκριση μέσω δευτέρων αγγελιοφόρων. Το παραπάνω σενάριο, εξηγεί πως η ενδοκύττωση ενός υποδοχέα εξυπηρετεί μόνο την καθοδική ρύθμιση της αποδοχής του σήματος. Ωστόσο σήμερα, είναι καλά χαρακτηρισμένο ότι οι υποδοχείς συνεχίζουν να σηματοδοτούν και ύστερα από την εισαγωγή τους στο κύτταρο [1]. Στην πραγματικότητα, εξειδικευμένα ενδοσωματικά διαμερίσματα συνήθως προσφέρονται σαν σηματοδοτικά ικρίωματα (scaffolds) επιτρέποντας την δημιουργία ενός συμπλόκου μεταξύ των ενεργοποιημένων υποδοχέων και των δευτέρων αγγελιοφόρων.

Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες παράγονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) και διακινούνται μέσω της συσκευής Golgi προς την πλασματική μεμβράνη. Από την κυτταρική επιφάνεια αυτές επανα-εισάγονται στο κύτταρο μέσω της ενδοκύττωσης. Δημιουργούνται ενδοκυττωτικά κυστίδια τα οποία συνήθως συντήκονται με ένα πρώιμο ενδόσωμα, μία κατάσταση διαλογής του ενδοκυττωτικού μονοπατιού, γνωστά και ως «ενδοσώματα διαλογής». Από αυτό το πρώιμο ενδόσωμα/ενδόσωμα διαλογής, οι πρωτεΐνες μπορούν να ανακυκλωθούν πίσω στην πλασματική μεμβράνη, να μεταφερθούν στη συσκευή Golgi ή να μεταφερθούν στα όψιμα ενδοσώματα, όπου τελικά συντήκονται με τα λυσοσώματα και αποδομούνται. Η διαδρομή διακίνησης οποιασδήποτε διαμεμβρανικής πρωτεΐνης εξαρτάται από διαφορετικά σήματα που βρίσκονται στο ενδοκυττάριο τμήμα (ICD) της πρωτεΐνης. Ένα τέτοιο σήμα είναι και η ουβικουΐτινυλίωση [2], που δρα σε τουλάχιστον δύο «περιστάσεις». Στην πλασματική μεμβράνη προωθεί ενδοκύττωση (μεσουλαβούμενη από κλαθρίνη ή όχι) στο πρώιμο ενδόσωμα. Σε όψιμα στάδια, η προσθήκη της ουβικουΐτινης προωθεί την εισαγωγή από ένα ενδόσωμα διαλογής σε ενδοαυλικά κυστίδια (intraluminal vesicles) με σκοπό τη δημιουργία των πολυκυστιδιακών ενδοσωμάτων (multivesicular endosomes ή MVEs) [7]. Το MVE προηγείται του λυσοσώματος, όπου το φορτίο των ενδοαυλικών κυστιδίων αποδομείται (εικ. 1).



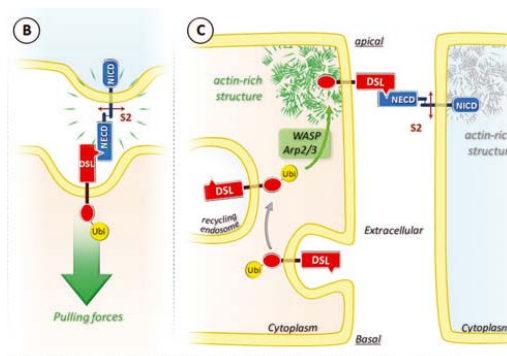
Εικ.1 Πορείες ενδοκύτωσης και διαλογής των πρωτεϊνών στο κύτταρο. Raiborg et al, NATURE | Vol 458 | 26 March 2009

Η σηματοδότηση Notch έχει μελετηθεί εκτενώς από τη σκοπιά του κυττάρου-δέκτη (signal receiving cell) [8]. Ο υποδοχέας του Notch ενεργοποιείται μέσω της αλληλεπίδρασής του με έναν προσδέτη DSL από ένα γειτονικό κύτταρο (αλληλεπίδραση trans). Από την άλλη, ο υποδοχέας καταστέλλεται όταν ο προσδέτης DSL βρίσκεται στο ίδιο κύτταρο (αλληλεπίδραση cis). Η trans σύνδεση μεταξύ DSL-Notch υποδοχέα (εικ.2) οδηγεί στην έκθεση μίας θέσης κοπής για μία πρωτεάση στο εξωκυττάριο/γειτονικό στη μεμβράνη τμήμα του υποδοχέα του Notch. Η θέση αυτή κόβεται από μία εξωκυττάρια μεταλλοπρωτεάση, της οικογένειας των πρωτεϊνών ADAMs, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του διαμεμβρανικού ICD τμήματος. Στη συνέχεια το ίδιο τμήμα κόβεται από μία άλλη πρωτεάση, την διαμεμβρανική γ-σεκρετάση, οδηγώντας στην αποδέσμευση του ICD τμήματος του υποδοχέα του Notch από τη μεμβράνη. Αυτό το τμήμα του υποδοχέα μεταναστεύει στον πυρήνα, όπου και δρα σαν συν-ενεργοποιητής για ένα μεγάλο εύρος ομάδων γονιδίων. Τα παραπάνω γεγονότα, παραδοσιακά λαμβάνουν χώρα στην πλασματική μεμβράνη. Πρόσφατα, ένας νέος μηχανισμός σηματοδότησης μη-εξαρτώμενος από προσδέτη μελετάται [9]. Η E3 λιγάση ουβικουιτίνης Deltex (Dx) προωθεί τη μετακίνηση του υποδοχέα του Notch σε ένα πρώιμο – MVE ενδόσωμα διαλογής, όπου και ενεργοποιεί τη σηματοδότηση του υποδοχέα του Notch συνεχόμενα, για παράδειγμα από μία γ-σεκρετάση χωρίς την ανάγκη κάποιου προσδέτη. Η Suppressor of Deltex [Su(dx)], άλλη μία E3 λιγάση ουβικουιτίνης, προωθεί την εσωτερίκευση του υποδοχέα του Notch από την περικλείουσα μεμβράνη των MVEs, όπου και η σηματοδότηση διακόπτεται ενώ ο υποδοχέας του Notch οδηγείται στο λυσόσωμα και αποδομείται.



Εικ.2: Σηματοδότηση trans του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch (αριστερά), DSL προσδέτες του Notch (δεξιά) Kopan et al, j.cell.2009.03.045

Από την άλλη λίγα είναι γνωστά από τη πλευρά του κυττάρου – δότη (signal sending cell). Διάφορα εργαστήρια, μεταξύ των οποίων και το δικό μας, έχουν ταυτοποιήσει δύο E3 λιγάσες, τις Neuralized (Neur) και Mindbomb1 (Mib1), οι οποίες είναι απαραίτητες για τη σηματοδότηση στο κύτταρο – δότη (που εκφράζει τους DSL προσδέτες) [3,4,5,12,13]. Συνεπώς, φαίνεται αυτές οι E3 λιγάσες να είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση των DSL προσδετών. Η ανάγκη των Neur/Mib1 για τη μετάδοση του σήματος, έχει οδηγήσει στην υποβολή δύο προτεινόμενων υποθετικών μοντέλων (εικ.3). (1) Η μηχανική υπόθεση «ελκτικής δύναμης» (pulling force) προτείνει ότι η ουβικουϊτινυλίωση των DSL προσδετών εκκινεί την ενδοκύττωσή των, ασκώντας μία δύναμη στο trans-προσδεμένο υποδοχέα Notch. Η συγκεκριμένη δύναμη, παραμορφώνει το LNR τμήμα του υποδοχέα Notch, με αποτέλεσμα την αποκάλυψη της θέσης της ADAM πρωτεόλυσης, που πριν ήταν απροσπέλαστη και στη συνέχεια το κόψιμο του εξωκυττάριου τμήματός του. (2) Η υπόθεση «ανακύκλωσης» (recycling) υποστηρίζει ότι οι DSL πρωτεΐνες φθάνουν στην πλασματική μεμβράνη σε ανενεργή ακτάσταση. Η ουβικουϊτινυλίωση διεγείρει την ενδοκύττωσή των DSL πρωτεϊνών και τις μεταφέρει στα ενδοσώματα διαλογής όπου και ανακυκλώνονται με κατεύθυνση προς την πλασματική μεμβράνη ως ώριμα πλέον μόρια, ικανά να ενεργοποιήσουν τον υποδοχέα του Notch. Η ωρίμανση μπορεί να έγγειται είτε στη μετακίνηση των DSL πρωτεϊνών σε κάποιο μεμβρανικό χώρο που προωθεί την σύνδεσή της με το Notch (όπως απεικονίζεται παρακάτω) είτε σε κάποια μετα-μεταφραστική τροποποίηση που ενεργοποιεί το μόριο.



Εικ.3 Μοντέλα ενδοκύττωσης και ενεργοποίησης του προσδέτη DI. Μοντέλο μηχανικής έλξης (B), Μοντέλο ανακύκλωσης (C) Le Bras et al, Traffic 2010

Πρόσφατες εντατικές έρευνες προσπαθούν να διακρίνουν μεταξύ των δύο υποθετικών μοντέλων, ωστόσο δεν υπάρχει κανένα ξεκάθαρο συμπέρασμα, μέχρι τώρα [10,11]. Επιπλέον, είναι πιθανόν τα δύο μοντέλα να ισχύουν ταυτόχρονα προς την ενεργοποίηση των προσδετών DSL, π.χ. η έλξη να απαιτείται μετά από την ανακύκλωση του μορίου. Πρόσφατα, από το εργαστήριό μας, έχουν χαρακτηριστεί δύο τμήματα του ICD του DI (Delta) προσδέτη του Notch, ονόματι i1 και i2, τα οποία είναι απαραίτητα για αλληλεπίδραση με τις E3 λιγάσες Neur και Mib1, αντιστοίχως [6]. Απομάκρυνση καθενός από αυτά τα i τμήματα οδηγεί σε μερική απώλεια της ενεργότητας του DI, που απαιτεί την παρουσία της αντίστοιχης E3 λιγάσης (το μοτίβο αλληλεπίδρασης της οποίας έχει αφαιρεθεί). Έχειδειχτεί ότι το DI ουβικουιτινυλιώνεται είτε από το Neur είτε από το Mib1 (εξαρτώμενο από τα i1 ή i2 τμήματα), προτείνοντας ότι η τροποποίηση ουβικουιτίνης υπαγορεύει την κυτταρική διακίνηση του DI και συνεπώς την ενεργοποίησή του. Βέβαια, δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως με ακρίβεια το σημείο διακίνησης, όπου βασίζεται η σηματοδότηση ουβικουιτινυλίωσης. Τελικά ποιο από τα δύο μοντέλα ισχύουν; Είναι λοιπόν η πρώιμη ενδοκύττωση (όπως προτείνει η υπόθεση ελκτικής δύναμης) ή/και ένα πιο όψιμο στάδιο διαλογής (όπως υποστηρίζει το μοντέλο ανακύκλωσης);

## ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, συμπεριλαμβάνει το παραπάνω γενικό ερώτημα. Πιο συγκεκριμένα, προσπαθήσαμε να περιγράψουμε με λεπτομέρεια τον ενδοκυττάριο εντοπισμό της πρωτεΐνης DI καθώς και των μεταλλαγμάτων του Dli1, Dli2, Dli1/2, DliΔC, DliDL+, χρησιμοποιώντας διάφορους ενδοκυτταρικούς δείκτες (**Σκοπός I**). Πιθανές ποιοτικές διαφορές στα ενδοσωματικά διαμερίσματα για τα παραπάνω μεταλλάγματα θα δώσουν απαντήσεις για την αποδόμηση έναντι της ανακύκλωσης του DI. Επιπλέον, προσπαθήσαμε να επεκτείνουμε τη βιοχημική ανάλυση της ουβικουιτινυλίωσης του DI (**Σκοπός II**). Υπάρχουν και άλλες μεμβρανικές E3 λιγάσες, πέραν των Neur και



Mib1, που ουβικουϊτινυλιώνουν το DI; Συνοψίζοντας, συνολικά τα παραπάνω πειράματα θα συνεισφέρουν σημαντικά στην σχέση της ουβικουϊτινυλίωσης με την διακίνηση και σηματοδότηση του προσδέτη DI.

## Υλικά & Μέθοδοι

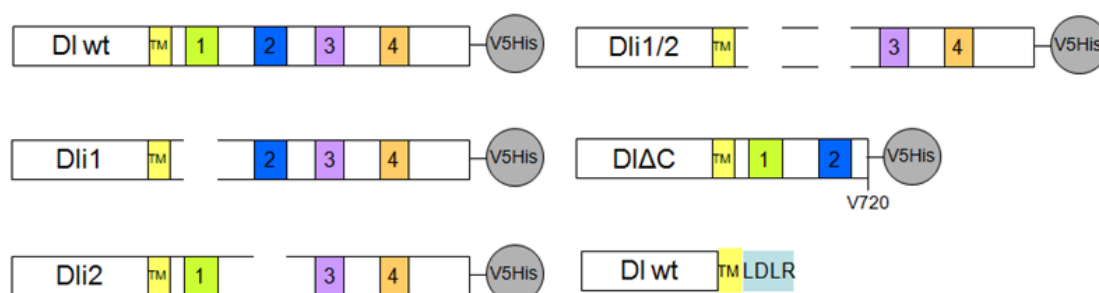
### Πλασμίδια και διαγονίδια

Στις βιοχημικές αναλύσεις ουβικουΐτινης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω πλασμίδια:

- Το rIZDI-V5His είναι ένα πλασμίδιο που φέρει στο C-τελικό άκρο έναν 6XHis-V5 επίτοπο μαζί με το γονίδιο DI αγρίου τύπου [14].
- Επίσης κλωνοποιήθηκαν οι E3 λιγάσες Mib1, Neur, Neur-C, Cbl-S και Dx, στο πλασμίδιο pAMW, όπου και φέρουν στο N-τελικό τους άκρο έναν 6XMyc επίτοπο. Περιγράφονται με λεπτομέρεια παρακάτω (Αποτελέσματα & Συζήτηση II).
- Για την υπερέκφραση της ουβικουΐτινης χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο Ract-Ubi, όπου φέρει στο C-τελικό άκρο έναν Xpress επίτοπο [6].
- Όπου ήταν απαραίτητο, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο RactHADh, σαν αρνητικός μάρτυρας για τα πειράματα διαμόλυνσης.

Οι διαγονιδιακές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα ενδοκυττάριου εντοπισμού της πρωτεΐνης DI είναι οι παρακάτω (Εικ. 4):

- *UAS-DIV5His*, *UAS-EGFP-neur* [4], *UAS-Dli1V5His*, *UAS-Dli2V5His*, *UAS-Dli1/2V5His*, *UAS-DIΔCV5His* [6], *UAS-DI-LDL+* [3].
- Για την υπερέκφραση των διαγονιδίων συγκεκριμένα στην λωρίδα (stripe) του AP (antero-posterior) ορίου του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού χρησιμοποιήθηκε η σειρά *ptc-Gal4* που προέρχεται από το Bloomington Drosophila Stock Center.



Εικ. 4 Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης DI αγρίου τύπου καθώς και των μεταλλαγμάτων της. **TM**: διαμεμβρανικό τμήμα, Το εξωκυττάριο σε σχέση με το ενδοκυττάριο τμήμα δεν έχει σχεδιαστεί σε κλίμακα. 1-4: είναι μικρά συντηρημένα μοτίβα λίγων αμινοξέων, ύστερα από συγκριτική μελέτη μεταξύ 6 πρωτεϊνών DI από 6 αρθρόποδα, [6]

- Για τα πειράματα ανοσοϊστοχημείας για την παρατήρη της πρωτεΐνης Rab7, χρησιμοποιήθηκε η διαγονιδιακή σειρά *tub-YFP::Rab7/TM* [15].

## **Αντισώματα, Ανοσοϊστοχημεία & Μικροσκοπία**

Τα πειράματα ανοσοϊστοχημείας υλοποιήθηκαν όπως περιγράφονται στη δημοσίευση του εργαστηρίου μας Pανlorouλος et al 2001 [12].

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Mouse anti-V5 (Invitrogen), (1:5000)
- Mouse anti-Xpress (Invitrogen), (1:5000)
- Mouse anti-DI C594.9B (από S. Artavanis-Tsakonas, παραγγελία από την DSHB), (1:100)
- Rabbit anti-myc epitope (Santa Cruz), (1:1500)
- Rabbit anti-Sara (ευγενική χορηγία από τον M. González-Gaitán)[16], (1:100)
- Rat anti-Rab11 (ευγενική χορηγία από τον R. Cohen) [17], (1:100)
- Guinea pig anti-HrsFL (ευγενική χορηγία από τον H. Bellen) [18], (1:100)
- Τα Φθορίζοντα (Alexa488, Alexa561, Alexa633) and HRP-σημασμένα Δευτερογενή Αντισώματα προέρχονται από τις Invitrogen/ Molecular Probes και Jackson Immunoresearch, αντίστοιχα.

Για όλες τις εικόνες χρησιμοποιήθηκε το συνεστιακό μικροσκόπιο Leica SP2, Πανεπιστήμιο Κρήτης, με τους φακούς 20x/0.7, 40x/1.25 or 63x/1.4. Για τη λήψη όλων των εικόνων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα του κατασκευαστή (LCS), ενώ για την επεξεργασία των εικόνων το πρόγραμμα Adobe Photoshop.

Για την ποσοτικοποίηση του συνεντοπισμού μεταξύ της πρωτεΐνης DI και των διάφορων ενδοκυτταρικών δεικτών χρησιμοποιήσαμε τον xz-τρόπο απεικόνισης. Στη συνέχεια μετρήσαμε το ποσοστό των ολικών στιγμάτων της πρωτεΐνης DI που είναι θετικό για κάθε ενδοκυτταρικό δείκτη (βλ. παρακάτω, Πίνακας 1). Μόνο τα ευκρινή στίγματα του DI υπολογίστηκαν στην ανάλυσή μας. Επιπλέον, εξαιρέσαμε τα κορυφαία και βασικά μέρη του ιστού μας, μια που η πρωτεΐνη DI εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα, και δυσκολεύει την ανάλυση του συνεντοπισμού. Επιπλέον οι πρωτεΐνες Sara και Rab11 επίσης συσσωρεύονται στο κορυφαίο επιθήλιο των αναπτυξιακών δίσκων του φτερού, ενώ οι δείκτες Hrs και Rab7 δεν εντοπίζονται τόσο έντονα στην κορυφαία μεμβράνη. Θα ήταν λοιπόν πιθανόν να υπερεκτιμούσαμε τον συνεντοπισμό του DI με τους δείκτες Sara και Rab11, στην κορυφαία μεμβράνη, για αυτό και τα απαλείψαμε από την ανάλυσή μας. Για τη στατιστική σημαντικότητα του συνεντοπισμού του DI με τους διάφορους ενδοκυτταρικούς δείκτες χρησιμοποιήθηκε το Fishers's exact test (<http://udel.edu/~mcdonald/statfishers.html>). Όλες οι αναλύσεις ποσοτικοποίησης της πρωτεΐνης DI πραγματοποιήθηκαν από την Υποψήφια Διδάκτωρ του εργαστηρίου μας, Κατερίνα Δασκαλάκη.

## **Βιοχημικά πειράματα ουβικουΐτινυλίωσης**

Για τα βιοχημική πειράματα, για την ανίχνευση της ουβικουϊτινυλίωσης, που πραγματοποιήθηκαν στα κύτταρα S2, χρησιμοποιήθηκαν αναλυτικά τα παρακάτω πρωτόκολλα:

#### Παροδική διαμόλυνση κυττάρων S2

Η υπερέκφραση πρωτεϊνών σε καλλιέργειες κυττάρων S2 έγινε μέσω παροδικής διαμόλυνσης με τη μέθοδο της δημιουργίας ιζήματος φωσφορικού ασβεστίου.

Αναλυτικότερα:

- Μια μέρα πριν τη διαμόλυνση τα κύτταρα συλλέγονται, φυγοκεντρούνται και προσδιορίζεται η συγκέντρωσή τους σε αιμοκυτταρόμετρο.
- Τα κύτταρα αραιώνονται κατάλληλα ώστε η τελική συγκέντρωσή τους να είναι  $10^6$  κύτταρα/ml θρεπτικού μέσου.
- Τα κύτταρα μοιράζονται σε πηγάδια τριβλίου. Η ποσότητα των κυττάρων εξαρτάται από το μέγεθος των πηγαδιών.
- Για τη διαμόλυνση ετοιμάζεται το κατάλληλο μίγμα πλασμιδίων. Για  $2.5 \times 10^6$  κύτταρα, το σύνολο του πλασμιδιακού μίγματος είναι 5μg σε όγκο 112.5μl.
- Κατόπιν προστίθενται 12.5μl διαλύματος 0.25M  $\text{CaCl}_2$ . Το μίγμα ανακατεύεται και προστίθεται στάγδην σε 125μl διαλύματος 2x HBS.

Επώαση του μίγματος για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και προσθήκη του στα κύτταρα.

#### Πειράματα ουβικουϊτινυλίωσης:

Πέντε ώρες πριν τη λύση των κυττάρων γίνεται προσθήκη 50μM E64, αναστολέα του λυσοσώματος (Sigma), [19].

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη πιθανής ουβικουϊτινυλίωσης της πρωτεΐνης D1 και των μεταλλαγμάτων της από τις λιγασές ουβικουϊτίνης Neur, Neur-C, Mib1, Cbl-S και Dx.

- $5 \times 10^6$  S2 διαμολυσμένα κύτταρα ξεπλένονται 2 φορές με 1x PBS και λύνονται σε 700μl διάλυμα λύσης (50mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300mM NaCl, 8M Urea, 0.2% Triton-X100, pH8.0 συμπεριλαμβανομένου 10mM N-ethylmaleimide και

1mM PMSF) με τη μέθοδο της ψύξης (ξηρός πάγος/ αιθανόλη ή  $-80^{\circ}\text{C}$ )/ θέρμανσης ( $37^{\circ}\text{C}$ ) για τρεις φορές.

- Φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 30 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$  και διατήρηση του υπερκειμένου.
- Προσθήκη 50μl σφαιριδίων Ni-TED και επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- 2 πλύσεις των σφαιριδίων με το διάλυμα λύσης και 2 πλύσεις των σφαιριδίων με το διάλυμα λύσης χωρίς την παρουσία ουρίας.
- Προσθήκη 60μl διαλύματος Laemmli και διατήρηση στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Ανάλυση Western

- Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που προέρχονται από διαδικασίες όπως η λύση των κυττάρων S2 ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 10% στα 100V, σε θερμοκρασία δωματίου. Διάλυμα ηλεκτροφόρησης: 25mM Tris, 192mM glycine, 0.1% SDS).
- Ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στους  $4^{\circ}\text{C}$ , στα 100V για 1 ώρα. Διάλυμα μεταφοράς: 25mM Tris, 192mM glycine, 0.01% SDS, 20% methanol. Η επιτυχία της μεταφοράς διαπιστώνεται με τη χρώση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη με διάλυμα PonceauS.
- Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση με 5% γάλα σε TTBS διάλυμα (20mM Tris-Cl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.3% Tween-20) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επώαση με το εκάστοτε πρώτο αντίσωμα στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 16 ώρες.
- Ακολουθούν 3 πλύσεις των 10 λεπτών με TTBS και επώαση με το δεύτερο αντίσωμα για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθούν 3 πλύσεις των 10 λεπτών με TTBS και εμφάνιση σε φιλμ με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας και απεικόνιση σε φιλμ.

## **Αποτελέσματα & Συζήτηση I**

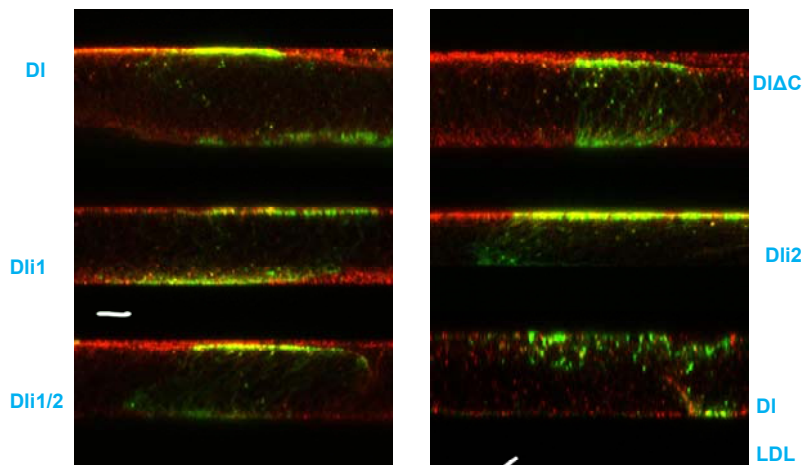
### **Υποκυττάριος εντοπισμός του προσδέτη DI καθώς και των μεταλλαγμάτων του**

Καθώς είναι γνωστό πως η ουβικουΐτινυλίωση είναι σήμα για τη διακίνηση των μεμβρανικών κυστιδίων, αναρωτηθήκαμε εάν ο τρόπος εσωτερίκευσης κάποιων μεταλλαγμάτων του DI αλλάζει. Αυτή η πειραματική προσέγγιση θα βοηθήσει στη αποσαφήνιση προηγούμενων αποτελεσμάτων του εργαστηρίου μας. Μέχρι τώρα έχει δειχτεί ότι κάποια μεταλλάγματα της πρωτεΐνης DI (π.χ. K742 σε αντιδιαστολή με τις μη-μεταλλαγμενη θέση K742), φαινόταν από τη βιοχημική ανάλυση, να έχουν διαφορετικού τύπου τροποποιήσεις ουβικουΐτινης. Άρα ίσως να θα έπρεπε, αυτές οι συγκεκριμένες θέσεις να αναγνωρίζονται από διαφορετικές πρωτεΐνες διακόπτες (adaptors), κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε στόχευση σε διαφορετικά ενδοσώματα. Για αυτό το λόγο, εστίασαμε στη μελέτη του υποκυττάριου εντοπισμού της πρωτεΐνης DI χρησιμοποιώντας ως μοντέλο τους αναπτυξιακούς δίσκους του φτερού κατά το 3<sup>ο</sup> λαρβικό στάδιο της ανάπτυξης της *D. melanogaster*.

Για τη μελέτη λοιπόν της διακίνησης του DI και των μεταλλαγμάτων του, χρησιμοποιήσαμε πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε διαπερατοποιημένο ιστό και μελέτη της πρωτεΐνης DI (ενδογενή/υπερέκφρασης), παρουσία απορρυπαντικών. Παρατηρήσαμε πως ο προσδέτης DI εντοπίζεται σε μεγάλο βαθμό στην κορυφαία μεμβράνη σε μορφή μεγάλων στιγμάτων και βρίσκεται σε μεγάλα ενδοκυττάρια διαμερίσματα [4, 12, 20]. Χρησιμοποιήσαμε τρεις αντιπροσωπευτικούς δείκτες για διαφορετικά ενδοσωματικά διαμερίσματα, και προσπαθήσαμε να προσδιορίσουμε εάν τα ενδοκυττάρια μεταλλάγματα της πρωτεΐνης DI επηρεάζουν την πορεία διακίνησης της πρωτεΐνης. Επιλέξαμε την πρωτεΐνη Sara ως δείκτη για τα πρώιμα ενδοσώματα, μια που πρόσφατα έχει συσχετιστεί με τη σηματοδότηση Notch-DI [16, 21]. Η πρωτεΐνη Rab11, που επίσης εμπλέκεται στη λειτουργία της πρωτεΐνης DI [22, 23, 24], χρησιμοποιήθηκε σαν δείκτης των ενδοσωμάτων ανακύκλωσης. Τέλος η πρωτεΐνη Hrs χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης των ενδοσωμάτων διαλογής. Υποθέσαμε πως η πρωτεΐνη Hrs θα συνεντοπίζεται με την πρωτεΐνη DI, καθώς είναι γνωστό ότι προσδένει φορτία συνδεδεμένα με μόρια ουβικουΐτινης και διεγείρει την είσοδό τους στα αντίστροφα σωματίδια γνωστά ως ILVs (intraluminal vesicles) των σωματιδίων MVBs (multivesicular bodies) [18, 25].

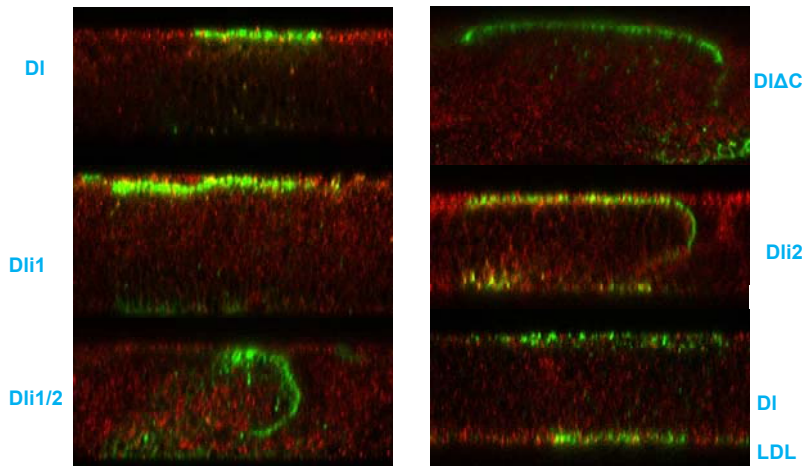
Η παραπάνω έρευνα έδειξε πως τουλάχιστον το εξωκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης DI αγρίου τύπου (ο επίτοπος που αναγνωρίζεται από το αντίσωμα *a-mouse-DI*) συνεντοπίζεται μαζί με την πρωτεΐνη Sara σε ποσοστό 49% (Εικ. 5,7. Α,Β,Γ Πιν. 1). Μάλιστα τα στίγματα που διακρίνουμε μπορεί να περιέχουν και κομμένο DI (από πρωτεάσες της οικογένειας ADAMs), που δε φέρει καθόλου ενδοκυττάριο τμήμα (ICD) του DI. Σε μικρότερο ποσοστό συνέβη συνεντοπισμός με την πρωτεΐνη Hrs, 39% (Εικ. 6,7. Δ,Ε,Ζ Πιν. 1), ενώ ακόμα λιγότερος με την πρωτεΐνη Rab11, 13% (Εικ. 7. Η,Θ,Ι Πιν. 1). Τα μεταλλάγματα της πρωτεΐνης DI έδειξαν κορυφαίο, στικτό και λιγότερο βασικό εντοπισμό με παρόμοιο συνεντοπισμό σε σύγκριση με την πρωτεΐνη αγρίου τύπου και για τους τρεις ενδοκυτταρικούς δείκτες (Πίν. 1). Εξαιρεση στον κανόνα αποτελεί το μετάλλαγμα DI-LDL+ όπου συνεντοπίζεται σε μικρότερο ποσοστό με την πρωτεΐνη Sara, σε ποσοστό 22%. Για το μετάλλαγμα DI-LDL+, έχει αντικατασταθεί πλήρως το ενδοκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης DI με τμήμα του υποδοχέα LDL των θηλαστικών, υπεύθυνο για ενδοκύττωση, και χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας για ενδοκύττωση στη συγκεκριμένη μελέτη. Επιπλέον, τα μεταλλάγματα Dli1/2 και DIΔC έδειξαν μειωμένο συνεντοπισμό με την πρωτεΐνη Hrs, όπου και δεν μπορούμε να ερμηνεύσουμε, μια που έχουν μη-αλληλοεπικαλυπτόμενες ελλείψεις στο ενδοκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης DI.

## Υποκυττάριος Εντοπισμός του DI (UAS-Delta, SARA)

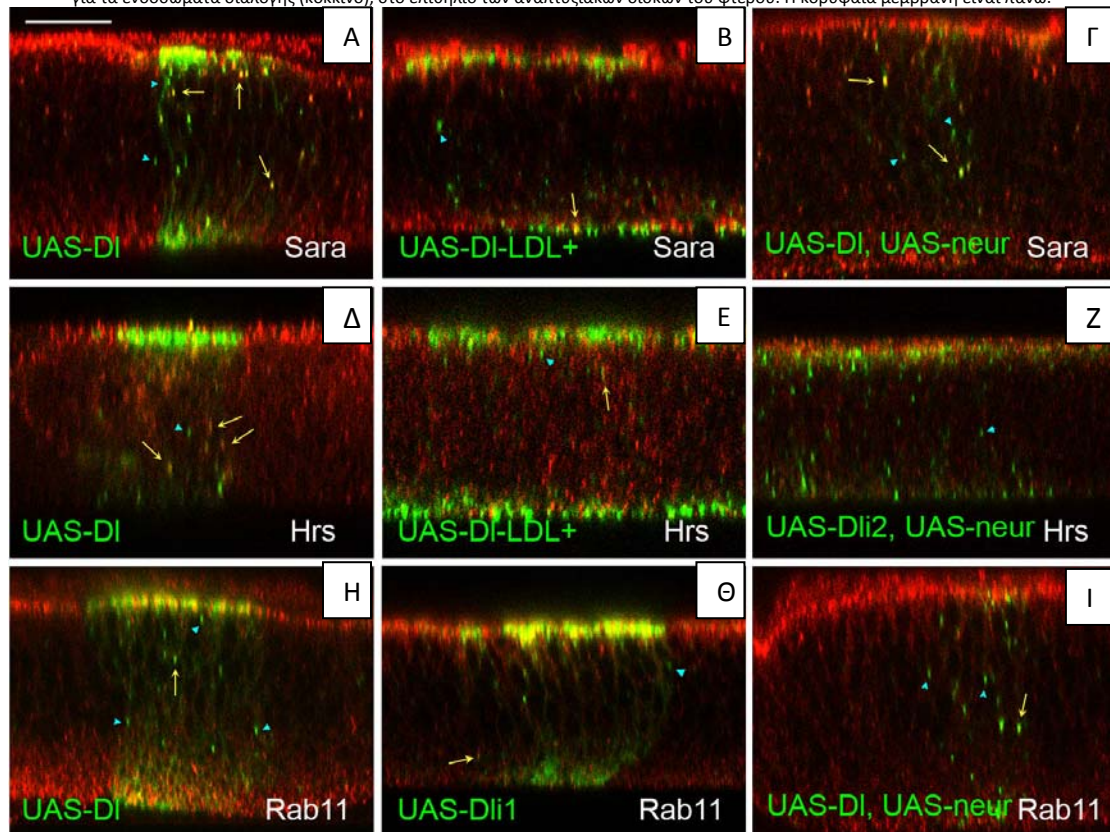


**Εικ. 5** Υποκυττάριος εντοπισμός της πρωτεΐνης DI αγρίου τύπου καθώς και των μεταλλαγμάτων της (πράσινο) και του ενδοκυτταρικού δείκτη Sara για τα πρώιμα ενδοσώματα (κόκκινο), στο επιθήλιο των αναπτυξιακών δίσκων του φτερού. Η κορυφαία μεμβράνη είναι πάνω.

## Υποκυττάριος Εντοπισμός του DI (UAS-Delta, Hrs)



**Εικ. 6** Υποκυττάριος εντοπισμός της πρωτεΐνης DI αγρίου τύπου καθώς και των μεταλλαγμάτων της (πράσινο) και του ενδοκυτταρικού δείκτη Hrs για τα ενδοσώματα διαλογής (κόκκινο), στο επιθήλιο των αναπτυξιακών δίσκων του φτερού. Η κορυφαία μεμβράνη είναι πάνω.



**Εικ. 7** Αντιπροσωπευτικές εικόνες/τομές από *rtc-Gal4*, UAS-DI, DI μεταλλάγματα, των αναπτυξιακών δίσκων του φτερού, σημασμένα με anti-DI (πράσινο) και τον αντίστοιχο ενδοκυτταρικό δείκτη (κόκκινο). Η ενδογενής πρωτεΐνη DI εκφράζεται σε χαμηλότερα επίπεδα, όπου και δεν είναι ορατή με την ένταση του laser που χρησιμοποιήσαμε. Η κορυφαία μεμβράνη είναι πάνω. Κλίμακα: 15μm. Κίτρινα βέλη: δείχνουν DI στικτά σημεία θετικά ως προς τον αντίστοιχο ενδοκυτταρικό δείκτη, Μπλε κεφαλή βέλους: δείχνουν DI στικτά σημεία αρνητικά ως προς τον αντίστοιχο ενδοκυτταρικό δείκτη

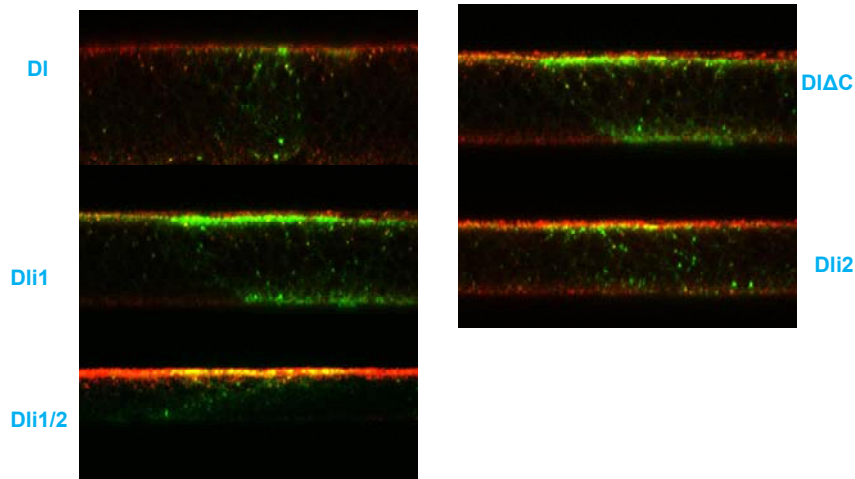
Συνοψίζοντας, το ενδοκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης DI δείχνει μία προτίμηση προς συσσώρευση στα πρώιμα ενδοσώματα/Sara. Βέβαια κανένα μετάλλαγμα για το ενδοκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης DI δε φαίνεται να αλλάζει τον εντοπισμό της πρωτεΐνης DI μέσα στο κύτταρο, τουλάχιστον με τους τρεις ενδοκυτταρικούς δείκτες που αναλύθηκαν.



Καθένα από τα παραπάνω πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο επιθήλιο των αναπτυξιακών δίσκων του φτερού όπου η πρωτεΐνη Mib1 εκφράζεται σε αντίθεση με την πρωτεΐνη Neur. Επειδή λοιπόν θα θέλαμε να δούμε εάν οι δύο E3 λιγάσες ουβικουϊτίνης διαταράσσουν τον εντοπισμό της πρωτεΐνης DI, επαναλάβαμε τα ίδια πειράματα αυτή τη φορά συνεκφράζοντας την πρωτεΐνη Neur. Σε αυτή την περίπτωση παρατηρήσαμε ότι ο εντοπισμός της πρωτεΐνης DI στο κύτταρο αλλάζει δραματικά, σαν αποτέλεσμα διέγερσης της ενδοκύττωσης. Η πρωτεΐνη DI απομακρύνεται από την κορυφαία μεμβράνη και μετακινείται μέσα σε μεγάλα ενδοκυττάρια τμήματα, όπου συχνά συνεντοπίζεται με την πρωτεΐνη Neur. Αυτή η βασική απομάκρυνση του DI συνοδεύεται με απομάκρυνση του υποδοχέα του Notch, όπου επίσης συσσωρεύεται σε DI/Neur θετικά ενδοκυττάρια τμήματα [12, 26]. (εικ 7. Γ, Z, I)

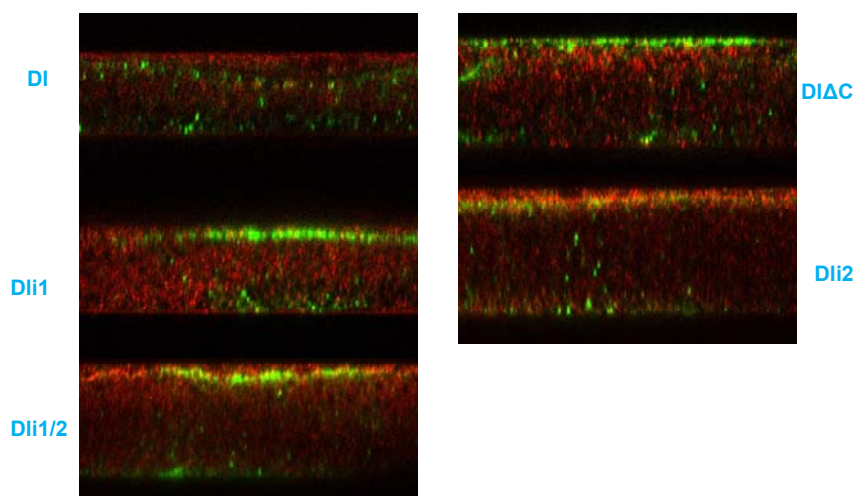
Ύστερα λοιπόν από συνέκφραση του Neur, μελετήσαμε τον εντοπισμό του DI με τους ίδιους ενδοκυτταρικούς δείκτες, Sara, Hrs και Rab11 (Εικ. 7-9). Ο αντίστοιχος ενδοκυττάριος εντοπισμός του DI κάτω από υπερέκφραση του Neur, φαίνεται να μην αλλάζει, παρά τη μαζική ποσοτική αύξηση των ενδοκυτταρικών στιγμάτων για τις πρωτεΐνες DI αγρίου τύπου και Dli2. Επίσης, παρατηρήθηκε μία συνολική μείωση του εντοπισμού του DI με την πρωτεΐνη Hrs, χωρίς να εξαρτάται από την εκάστοτε πρωτεΐνη DI (Πιν. 1). Πιθανόν το αποτέλεσμα αυτό να έχει να κάνει με αλλαγές στο επιθήλιο που προκαλούνται από την υπερέκφραση της πρωτεΐνης Neur, κάτι που δεν αναλύθηκε περαιτέρω.

## Υποκυττάριος Εντοπισμός του DI (UAS-Delta-Neur, SARA)



Εικ. 8 Υποκυττάριος εντοπισμός της πρωτεΐνης DI αγρίου τύπου καθώς και των μεταλλαγμάτων της (πράσινο), παρουσία Neur και του ενδοκυτταρικού δείκτη Sara για τα πρώιμα ενδοσώματα (κόκκινο), στο επιθήλιο των αναπτυξιακών δίσκων του φτερού. Η κορυφαία μεμβράνη είναι πάνω.

## Υποκυττάριος Εντοπισμός του DI (UAS-Delta-Neur, Hrs)



Εικ. 9 Υποκυττάριος εντοπισμός της πρωτεΐνης DI αγρίου τύπου καθώς και των μεταλλαγμάτων της (πράσινο), παρουσία Neur και του ενδοκυτταρικού δείκτη Hrs για τα ενδοσώματα διαλογής (κόκκινο), στο επιθήλιο των αναπτυξιακών δίσκων του φτερού. Η κορυφαία μεμβράνη είναι πάνω.

Γενικά, συμπεραίνουμε λοιπόν ότι ο τύπος της ουβικουΐτινυλίωσης δεν επηρεάζει αισθητά την πορεία διακίνησης της πρωτεΐνης. Βέβαια, το παραπάνω αποτέλεσμα προέρχεται μόνο από τους τρεις ενδοκυτταρικούς δείκτες που μελετήσαμε.

Alone	Sara <sup>a</sup>	n	p	Hrs <sup>a</sup>	n	p	Rab11 <sup>a</sup>	n	p
wt	49	124	-	39	96	-	14	162	0.90
DII1	54	149	0.47	33	97	0.45	13	123	1.00
DII2	49	92	1.00	31	109	0.30	12	127	0.85
DII1/2	53	119	0.61	<b>18</b>	96	<b>&lt;0.01</b>	8	142	0.16
DIΔC	47	95	0.89	<b>20</b>	100	<b>&lt;0.01</b>	13	111	1.00
DI-LDL	<b>22</b>	145	<b>&lt;0.01</b>	36	104	0.77	13	217	0.89

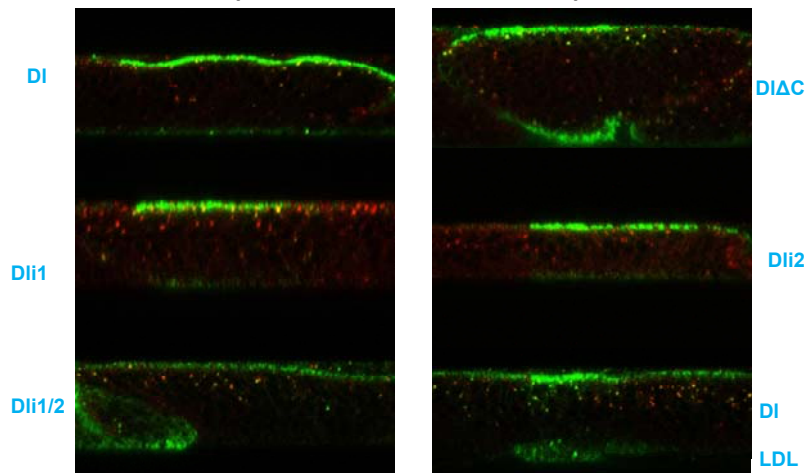
+Neur	Sara <sup>b</sup>	n	p	Hrs <sup>b</sup>	n	p	Rab11 <sup>b</sup>	n	p
wt	42	246	<i>0.19</i>	<b>4</b>	131	<b>&lt;0.01</b>	8	159	<i>0.18</i>
DII1	50	234	0.08	3	137	0.75	8	149	1.00
DII2	44	293	0.73	7	139	0.29	9	158	0.70
DII1/2	38	214	0.45	5	136	0.77	7	123	0.83
DIΔC	53	209	0.02	5	107	0.76	4	136	0.24

Πιν. 1 α,β: ποσοστό συνεντοπισμού για κάθε πρωτεΐνη DI με τον αντίστοιχο ενδοκυτταρικό δείκτη Sara, Hrs και Rab11. n: ολικός αριθμός των στικτών σημείων DI που αναλύθηκαν. P-τιμές: υπολογίστηκαν βάση του Fisher's exact test κατά την πρωτεΐνη DI αγρίου τύπου. Τιμές χαμηλότερες από 0.01 (έντονα γράμματα) θεωρούνται στατιστικά σημαντικές σε σχέση με το DI αγρίου τύπου. (Τα ποσοστά του συνεντοπισμού του DI παρουσία της πρωτεΐνης Neur συγκρίνονται κατά το DI αγρίου τύπου μόνο του (p τιμές σε Italics). Οι τιμές για όλα τα μεταλλάγματα του DI παρουσία Neur συγκρίνονται με τις τιμές του DI αγρίου τύπου +Neur (αυτή η δουλειά πραγματοποιήθηκε από τους Κ. Δασκαλάκη & Γ. Τασιτίδη).

Τέλος, αναλύσαμε τον ενδοκυττάριο εντοπισμό της πρωτεΐνης DI, αυτή τη φορά χρησιμοποιώντας ένα δείκτη για τα όψιμα ενδοσώματα, την πρωτεΐνη Rab7. Ο ενδοκυττάριος συνεντοπισμός του DI και των μεταλλαγμάτων του με την πρωτεΐνη Rab7, αυξάνεται αρκετά (80%) σε σχέση με τα παραπάνω τρεις ενδοκυτταρικούς δείκτες που χρησιμοποιήσαμε (Εικ. 10). Αυτό μπορεί να οφείλεται

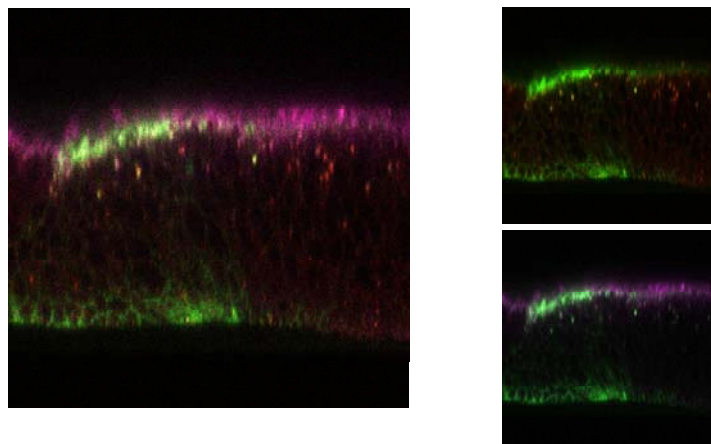
σε μία άμεση διακίνηση/προτίμηση της πρωτεΐνης DI για τα όψιμα ενδοσώματα. Επίσης, μπορεί να προέρχεται στη μη ειδικότητα της πρωτεΐνης Rab7 για τα όψιμα ενδοσώματα, μια που είδαμε 100% συνεντοπισμό των Sara θετικών διαμερισμάτων – DI με τα Rab7 θετικά διαμερίσματα –DI. Ύστερα από πειράματα ανοσοϊστοχημείας για τις πρωτεΐνες Sara και Rab7 ταυτόχρονα, φάνηκε μία αλληλοεπικάλυψη περίπου 50% μεταξύ των Sara και Rab7 ενδοσωμάτων, τόσο για την υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη DI αγρίου τύπου (Εικ. 11) όσο και για την ενδογενή πρωτεΐνη DI (Εικ. 12). Μάλιστα όλα τα θετικά ενδοσώματα για DI-Sara είναι επίσης και θετικά ως προς τις πρωτεΐνες DI-Rab7.

### Υποκυττάριος Εντοπισμός του DI (UAS-Delta, Rab7)



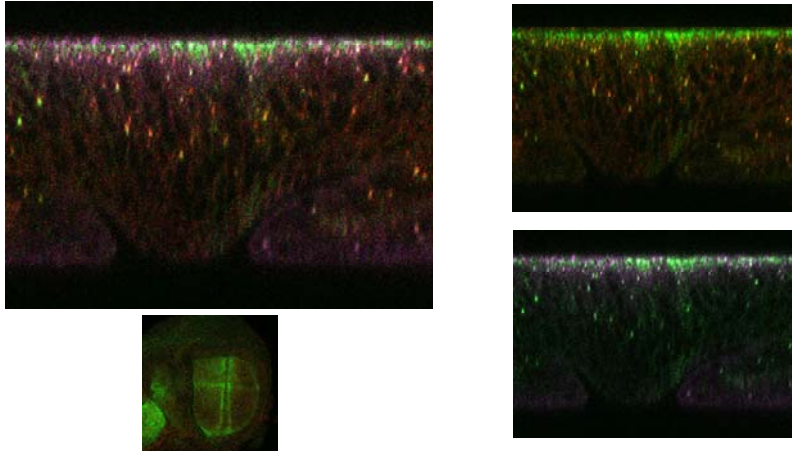
**Εικ. 10** Υποκυττάριος εντοπισμός της πρωτεΐνης DI αγρίου τύπου καθώς και των μεταλλαγμάτων της (πράσινο) και του ενδοκυτταρικού δείκτη Rab7 για τα όψιμα ενδοσώματα (κόκκινο), στο επιθήλιο των αναπτυξιακών δίσκων του φτερού. Η κορυφαία μεμβράνη είναι πάνω.

### Υποκυττάριος Εντοπισμός του DI (UAS-Delta 1/2, Rab7, SARA)



**Εικ. 11** Υποκυττάριος εντοπισμός της υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης Dli1/2 (πράσινο), του ενδοκυτταρικού δείκτη Rab7 για τα όψιμα ενδοσώματα (κόκκινο) καθώς και του δείκτη Sara για τα πρώιμα ενδοσώματα (μπλέ) στο επιθήλιο των αναπτυξιακών δίσκων του φτερού. Η κορυφαία μεμβράνη είναι πάνω.

## Υποκυττάριος Εντοπισμός του DI (Ενδογενές Delta, Rab7, SARA)



**Εικ. 12** Υποκυττάριος εντοπισμός της ενδογενούς πρωτεΐνης DI αγρίου τύπου (πράσινο), του ενδοκυτταρικού δείκτη Rab7 για τα όψιμα ενδοσώματα (κόκκινο) καθώς και του δείκτη SARA για τα πρώιμα ενδοσώματα (μπλέ) στο επιθήλιο των αναπτυξιακών δίσκων του φτερού. Η κορυφαία μεμβράνη είναι πάνω.

Μελλοντικά πειράματα για την πλήρη αποσαφήνιση της ενδοκυττάριας διακίνησης του DI, είναι αναγκαία. Θα μπορούσαμε λοιπόν να χρησιμοποιήσουμε διάφορα αντισώματα ή διάφορες διαγονιδιακές σειρές YFP, με σκοπό να παρατηρήσουμε τα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα. Συγκεκριμένα:

- Rab5-YFP, SARA (δείκτες του πρώιμου ενδοσώματος)
- Hrs (δείκτης των προ-MVE ενδοσωμάτων)
- Rab7-YFP, (δείκτης του όψιμου ενδοσώματος)
- LAMP, Dor (δείκτες του λυσοσώματος)
- Rab4-YFP, Rab11-YFP(δείκτες των ανακυκλωτικών ενδοσωμάτων)

Ο καθένας από τους παραπάνω δείκτες θα απεικονιστεί ταυτόχρονα με το DI. Με αυτόν τον τρόπο θα αναλυθούν το ενδογενές DI αγρίου τύπου καθώς και η υπερέκφρασή του όσο και των μεταλλαγμένων μορφών i1,2. Η συχνότητα συνεντοπισμού του DI με τους διάφορους ενδοκυτταρικούς δείκτες θα αναλυθούν μέσω του συνεστιακού μικροσκοπίου. Έτσι, θα είμαστε σε θέση να καθορίσουμε εάν οι μεταλλαγμένες μορφές, που επηρεάζουν τις θέσεις αγκυροβόλησης των E3 λιγασών, επηρεάζουν τον ενδοκυττάριο εντοπισμό του DI.

Άλλη μία σειρά πειραμάτων αφορά τη χρήση αρνητικών επικρατών μεταλλαγών για τα διάφορα ενδοκυττάρια σωματίδια. Πιο συγκεκριμένα, στο εργαστήριό μας υπάρχουν διαγονιδιακές σειρές YFP, υπό τον έλεγχο ενός συστατικού υποκινητή τουμπουλίνης (tub promoter), Rab4,5,7,11 – DN. Έτσι

διαταράσσοντας το σχηματισμό των διαφόρων ενδοσωμάτων, θα ξεκαθαρίσουμε το ρόλο της ενδοκύττωσης του D1 στη σηματοδότηση του Notch.

## Αποτελέσματα & Συζήτηση II

### Εύρεση νέων πιθανών μεμβρανικών E3 λιγασών που χρησιμοποιούν την πρωτεΐνη D1 ως υπόστρωμα για ουβικουϊτινυλίωση

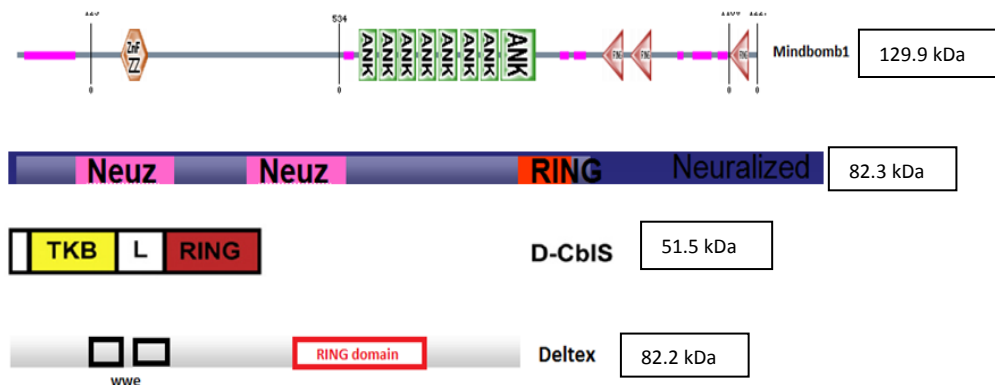
Ο σκοπός της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας, αφορά την διεύρυνση των γνώσεών μας για τις E3 λιγασές ουβικουϊτίνης που πιθανόν χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα τον προσδέτη D1. Για την επίτευξη του παραπάνω στόχου χρησιμοποιήθηκαν πειράματα κυτταροκαλλιιεργειών.

Μέχρι τώρα, με πειράματα που έχουν γίνει από το εργαστήριό μας, έχει φανεί πως οι E3 λιγασές Neur και Mib1, χρησιμοποιούν την πρωτεΐνη D1 ως στόχο προς ουβικουϊτινυλίωση, μία εξειδικευμένη διαδικασία που επηρεάζει τη σηματοδότηση Notch μέσω ενδοκύττωσης του D1 στο κύτταρο-δότη του σήματος. Πιο συγκεκριμένα, γνωρίζουμε πως το Dli1 ουβικουϊτινυλιώνεται από την E3 λιγάση Mib1, ενώ το Dli2 από τη λιγάση Neur. Από την άλλη το Dli1/2 δεν ουβικουϊτινυλιώνεται από καμία από τις παραπάνω E3 λιγασές [6]. Παρόλα αυτά όταν υπερεκθέσουμε τα films από πειράματα westerns για την ανίχνευση ουβικουϊτινυλίωσης, βλέπουμε ακόμα και τη Dli1/2 να έχει λιγη ενδογενή ουβικουϊτινυλίωση, χωρίς να γνωρίζουμε από ποιά ή ποιές E3 λιγασές καταλύεται.

Πιο συγκεκριμένα, επεκτείναμε την ήδη υπάρχουσα ανάλυση της ουβικουϊτινυλίωσης του D1. Συνεκφράσαμε το D1 αγρίου τύπου το οποίο είναι προσδεμένο με έναν επίτοπο ιστιδίνης (His epitope tag), με καταλυτικά ενεργές E3 λιγασές στα κλασικά εμβρυονικά κύτταρα S2, της *Drosophila melanogaster*, με σκοπό την εύρεση της ικανότητάς των να ουβικουϊτινυλιώνονται. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήσαμε τις E3 λιγασές Neur, Neur-C (μικρότερη ισομορφή της πρωτεΐνης Neur), Cbl-S (Shorth isoform), Dx (Deltex) και Mib1 (Mindbomb1). Αυτές είναι E3 λιγασές που φέρουν το RING domain, υπεύθυνο για τη μεταφορά ενός μορίου ουβικουϊτίνης από ένα E2 ένζυμο σε ένα υπόστρωμα (Εικ. 13).

Οι δύο νέες E3 λιγασές που μελετήσαμε Cbl-S και Dx, είναι και αυτές μεμβρανικές E3 λιγασές και εμπλέκονται με τη σηματοδότηση Notch. Πρόσφατη δημοσίευση του 2010 με πειράματα στους αναπτυξιακούς δίσκους του ματιού στη *D. melanogaster* αναφέρει πως η πρωτεΐνη Cbl-S χρησιμοποιεί σαν υπόστρωμα την πρωτεΐνη D1 και την οδηγεί σε αποδόμηση, μία διαδικασία που ελέγχει ενεργά τη σηματοδότηση Notch [27]. Από την άλλη, η μεγάλη ισομορφή της Cbl E3 λιγάσης, η Cbl-L, είναι γνωστή για τη δράση της στο μονοπάτι του EGFR [27]. Η E3 λιγάση ουβικουϊτίνης Deltex (Dx) προωθεί τη μετακίνηση του υποδοχέα του Notch στο πρώιμο – MVE ενδόσωμα διαλογής, όπου και ενεργοποιεί τη σηματοδότηση του

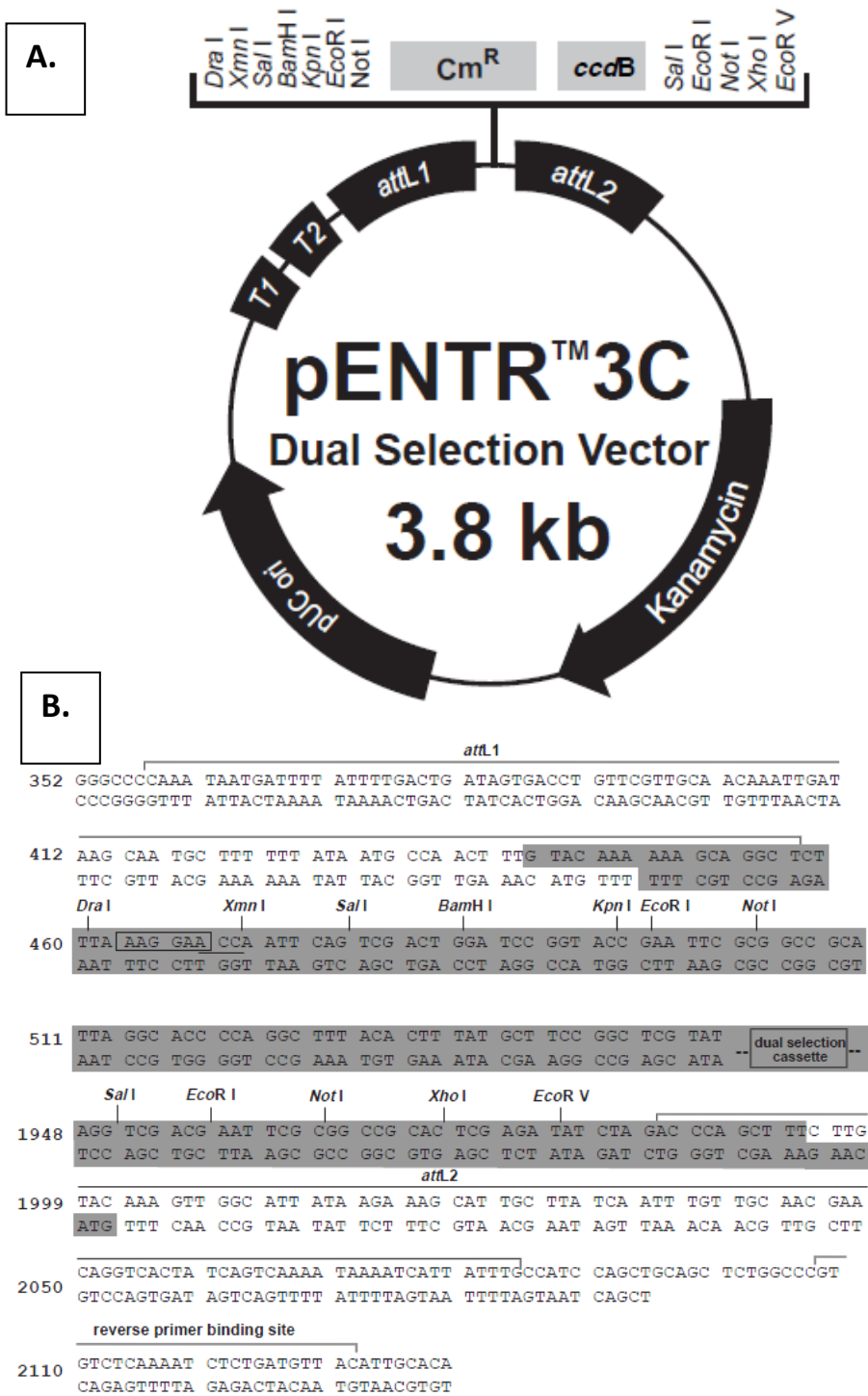
υποδοχέα του Notch συνεχόμενα, για παράδειγμα από μία  $\gamma$ -σεκρετάση χωρίς την ανάγκη κάποιου προσδέτη. Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται τα δομικά στοιχεία των E3 λιγασών που μελετήθηκαν.



Εικ. 13 Τα βασικά δομικά στοιχεία των τεσσάρων E3 λιγασών που μελετήσαμε, Mib1, Neur, Cbl-S και Dx

Για να εξασφαλίσουμε ότι θα έχουμε ίδια επίπεδα έκφρασης των E3 λιγασών στα S2 κύτταρα, κλωνοποιήσαμε τα υπό μελέτη γονίδια των E3 λιγασών σε ένα κοινό πλασμίδιο για να βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο ενός κοινού υποκινητή, του actin 5C όπου και φέρουν στο N-τελικό τους άκρο ένα 6ΧΜγς επίτοπο. Πιο συγκεκριμένα λοιπόν έγινε υποκλωνοποίηση των E3 λιγασών Neur, Neur-C, Cbl-S, Dx και Mib1 στο πλασμίδιο pENTR3C, ο χάρτης του οποίου φαίνεται παρακάτω (Εικ. 14).

Ο λόγος των παρακάτω πειραμάτων, βασίζεται στην παρατήρηση ότι κάτω από γενετική αφαίρεση τόσο της Mib1 όσο και της Neur πρωτεΐνης δεν ακυρώνεται ο ενδοκυττάριος εντοπισμός του DI (εντοπισμός σε ενδοσώματα) στα επιθηλιακά κύτταρα της *Drosophila melanogaster*. Άρα υπάρχουν επιπρόσθετες πορείες ενδοκύτωσης του DI και θα θέλαμε να ξέρουμε εάν οι παραπάνω E3 λιγασές ουβικουϊτίνης εμπλέκονται. Πρόσφατα δεδομένα, μάλιστα, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω υποστηρίζουν ότι τουλάχιστον μία από τις παραπάνω λιγασές η Cbl-S στοχεύει τον προσδέτη DI [27].



Εικ. 14 Χάρτης του πλασμιδίου pENTR3C (A), σε λεπτομέρεια όλες οι θέσεις κλωνοποίησης γονιδίων στον pENTR3C (B)



Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση των εκάστοτε πέντε γονιδίων στο πλασμίδιο pENTR3C είναι οι εξής:

**Neuralized:**

-(Forward): 5'-GCGGATCC ATGGGTCTATCGGATATACC-3'(28nt)[BamHI]

-(Reversed): 5'-GCCTCGAGCTACGTGGTGTAGGTGCG-3' (26nt) [XhoI]

**Neuralized (isoform C):**

-(Forward): 5'- GCGGATCCATGGGTCAGTCGGCTGG -3'(25nt) [BamHI]

-(Reversed): 5'-GCCTCGAGCTACGTGGTGTAGGTGCG-3' (26nt) [XhoI]

**Cbl-S:**

-(Forward): 5'- GCGGATCCATGGCGACGAGAGGCAGTG (27nt) [BamHI]

-(Reversed): 5'-GCGAATTCCTATACCTCAGTGTCGTCTTC (29nt) [EcoRI]

**Deltex**

-(Forward): 5'-GCGGTACC ATGGCCAGCAGCGCC -3'(23nt) [KpnI]

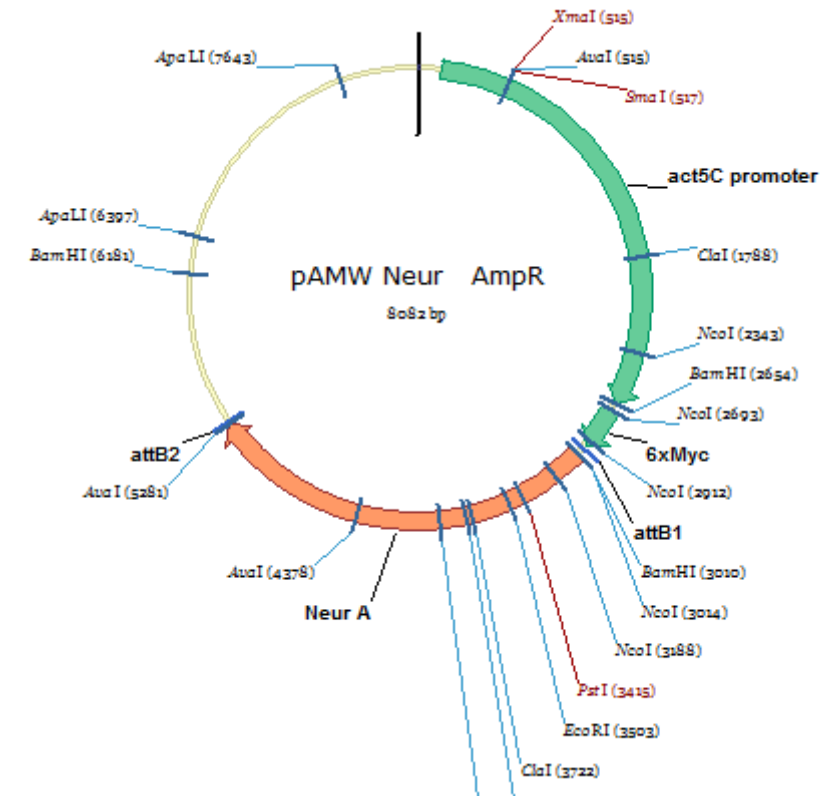
-(Reversed): 5'-GCTTGCGGCCGCTTAATCCGTCACGCCAG -3' (30nt) [NotI]

**Mindbomb1:**

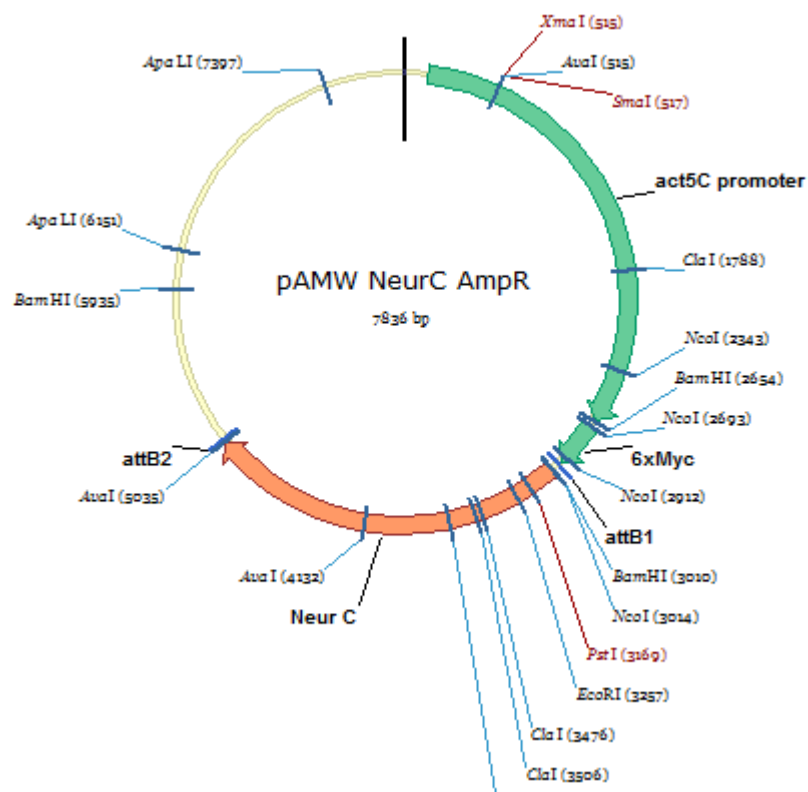
-(Forward): 5'- GCGAATTC ATGTCTTGTGCGGCCACC -3'(26nt) [EcoRI]

-(Reversed): 5'-GCCTCGAGTCAGAAGAGCAGGATGCG -3' (26nt) [XhoI]

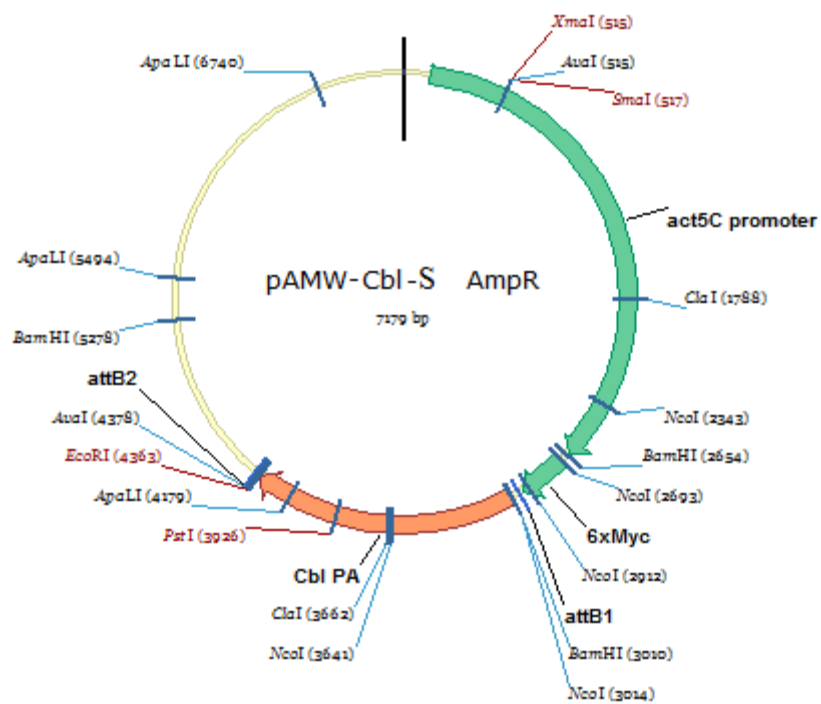
Στη συνέχεια με την τεχνολογία Gateway system της Invitrogen με ομόλογο ανασυνδυασμό, επιτεύχθηκε η κλωνοποίηση των αλληλουχιών των υπό μελέτη πέντε E3 λιγασών στο τελικό πλασμίδιο pAMW (Εικ. 15 – 19).



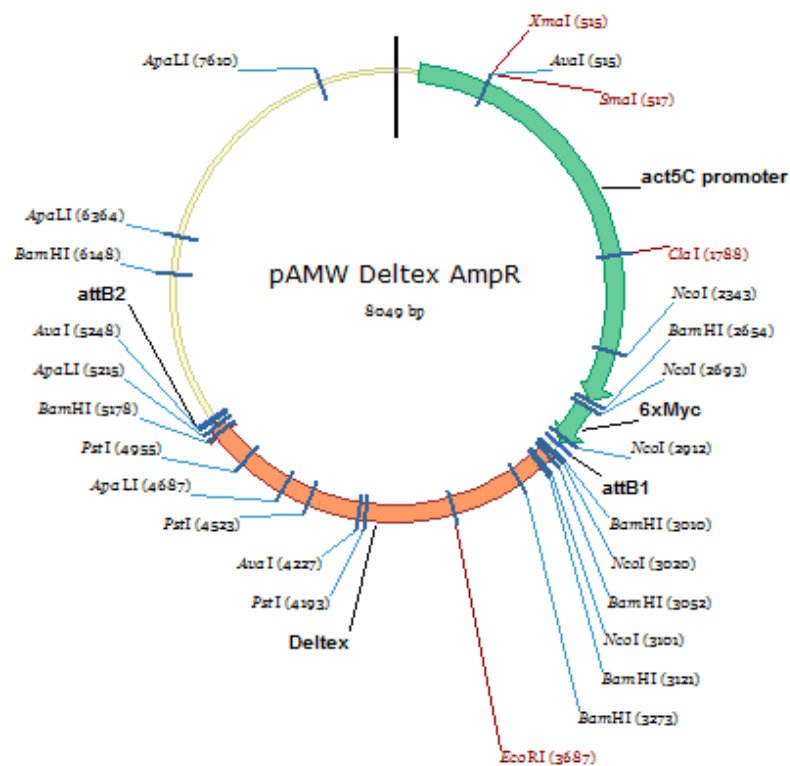
Εκ. 15 Χάρτης του πλασμιδίου pAMW-Neur



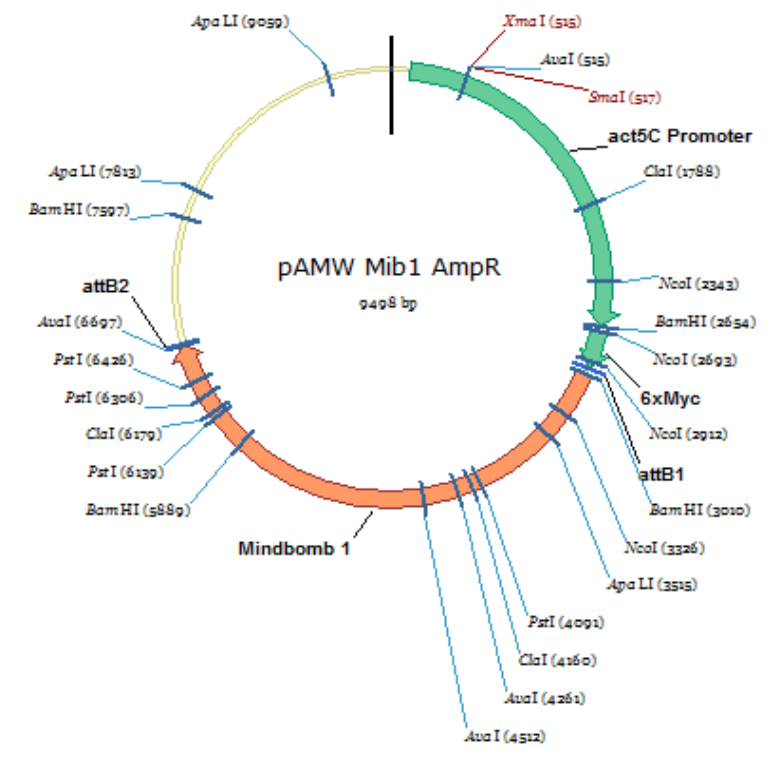
Εκ. 16 Χάρτης του πλασμιδίου pAMW-Neur-C



Εικ. 17 Χάρτης του πλασμιδίου pAMW-Cbl-S

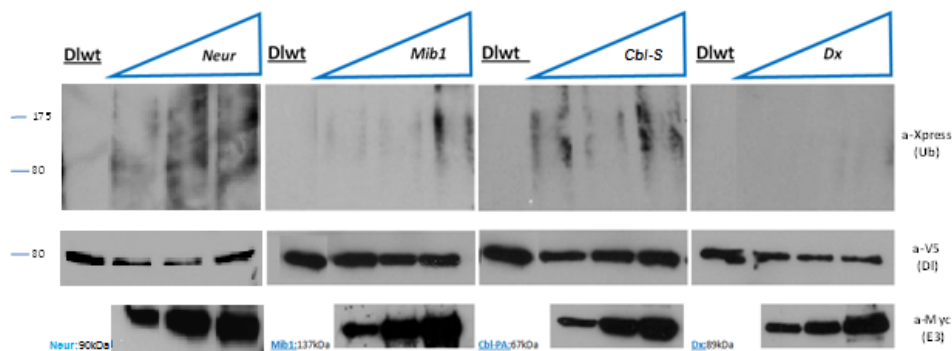


Εικ. 18 Χάρτης του πλασμιδίου ρAMW-Dx



Εικ. 19 Χάρτης του πλασμιδίου ρAMW-Mib1

Τα ουβικουΐτυλιωμένα μόρια αναγνωρίστηκαν ύστερα από συνδιαμόλυνση του DI με το πλασμίδιο Xpress(επίτοπος)-ουβικουΐτίνη. Απομονώσουμε (κατεβάσαμε – pull down) την πρωτεΐνη DI, κάτω από πλήρως αποδιατακτικές συνθήκες (ουρία 8M), με σκοπό να εξαλείψουμε την πιθανότητα απομόνωσης άλλων πρωτεϊνικών συμπλόκων, και κατ'επέκταση την αναγνώριση της ουβικουΐτυλίωσης που προέρχεται μόνο από τον προσδέτη DI.



Εικ. 20 Ανάλυση Western για ανίχνευση ουβικουΐτυλίωσης του προσδέτη DI σε S2 κύτταρα. Υπερέκφραση τόσο DI, Xpress-Ubi σε αύξουσα ποσότητα των αντίστοιχων E3 λιγασών (0, 0.2, 0.4 και 1μg ρAMW πλασμίδιο-εκάστοτε E3 λιγάση)

Όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα, έγινε ανίχνευση της ουβικουΐτινυλίωσης της πρωτεΐνης DI με ανάλυση western, κάτω από αυξανόμενες ποσότητες των αντίστοιχων E3 λιγασών. Τα ουβικουΐτινυλιωμένα μόρια ανιχνεύθηκαν με το αντίσωμα  $\alpha$ -mouse-Xpress.

Τα αποτελέσματα των παραπάνω βιοχημικών πειραμάτων υποδυκνείουν πως εκτός από τις E3 λιγασές Neur και Mib1, η πρωτεΐνη Cbl-S χρησιμοποιεί επίσης το DI για ουβικουΐτινυλίωση στα S2 κύτταρα (Εικ. 20). Παρόμοια αποτελέσματα είχαμε και για την μικρή ισομορφή του Neur, Neur-C (Εικόνα 21). Ενώ, η E3 λιγάση Dlx δεν χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα για ουβικουΐτινυλίωση το DI.

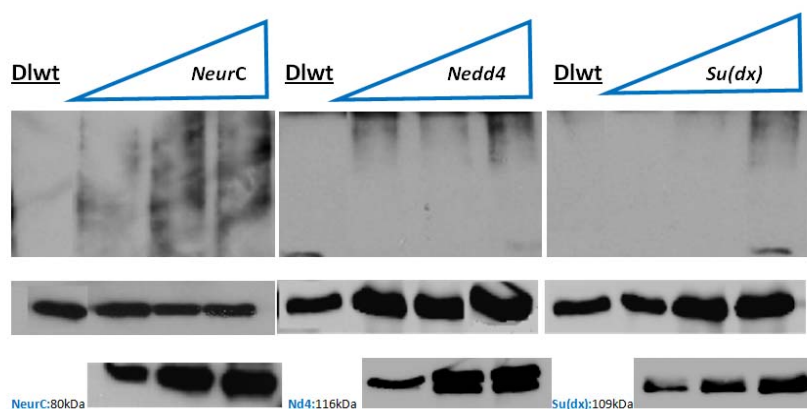
Μάλιστα, έως τώρα ήταν γνωστό πως οι πρωτεΐνες Neur και Mib1 μονο-ουβικουΐτινυλιώνουν το DI. Παρόλο αυτά η ανάλυση μας έδειξε πως το DI πόλυ-/multi-ουβικουΐτινυλιώνεται, από τις E3 λιγασές Neur, Mib1 και Cbl-S. Αυτό διαπιστώνεται από το έντονο σήμα ουβικουΐτινυλίωσης (Εικ. 20) που πήραμε σε υψηλότερα μοριακά βάρη (175 KDa), από αυτό του DI (80 KDa). Επιπλέον τα ουβικουΐτινυλιωμένα τροποποιημένα μόρια φαίνονται διαφορετικά για κάθε E3 λιγάση. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στην ύπαρξη ενδογενούς έκφρασης των E3 λιγασών στα S2 κύτταρα, που πραγματοποιήθηκε όλη η βιοχημική μελέτη (Πιν. 2). Μελλοντικά θα μπορούσαμε να μελετήσουμε με πειράματα RNA σίγασης (dsRNA) την απώλεια λειτουργίας (LOF) των αντίστοιχων E3 λιγασών στα S2 κύτταρα, για να επαληθεύσουμε τα δεδομένα του παρακάτω πίνακα.

<u>E3 λιγάση</u>	<u>Επίπεδα ενδογενούς έκφρασης στα S2 Κύτταρα</u>
Neuralized	7.31458
Cbl-S	-
Deltex	10.9271
Mindbomb1	61.3232

Πιν. 2 Επίπεδα έκφρασης E3 λιγασών στα S2 κύτταρα

Περαιτέρω μελέτη των μεταλλαγμάτων του DI για το ενδοκυττάριο τμήμα του, i1,i2,i3 και i4, παρουσία της έκφρασης της E3 λιγασής Cbl-S, θα δώσει μία πιο σαφή εικόνα για την ουβικουΐτινυλίωση των αμινοξέων λυσίνης του ενδοκυττάριου τμήματος της πρωτεΐνης DI. Άλλα μελλοντικά πειράματα που θα απαντήσουν στο κατά πόσο ειδική είναι η συγκεκριμένη ουβικουΐτινυλίωση του DI και από πόσες διαφορετικές E3 λιγασές γίνεται, είναι η χρήση και μελέτη νέων E3 λιγασών. Ήδη στο εργαστήριο μας μπορούμε να υπερεκφράσουμε στα S2 κύτταρα δύο άλλες μεμβρανικές E3 λιγασές, που εμπλέκονται με τη σηματοδότηση Notch, τις Nedd4

(πλασμίδιο pRmHa3-Nedd4-myc, MT υποκινητής) και Su(dx) (Supressor of Deltex) (πλασμίδιο pMT-HA-Su(dx), MT υποκινητής) [Ευχαριστούμε τα εργαστήρια των Guy Tear και Martin Baron για την ευγενική χορηγία των παραπάνω πλασμιδίων, αντίστοιχα]. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 21 προχωρήσαμε σε βιοχημική μελέτη ουβικουΐτινυλίωσης του D1 για τις πρωτεΐνες Nedd4 και Su(dx). Όπως δείχνουν αυτά τα πρώιμα αποτελέσματα οι E3 λιγάσες Nedd4 και Su(dx) φαίνεται να χρησιμοποιούν ως στόχο ουβικουΐτινυλίωσης την πρωτεΐνη D1. Επανάληψη όμως των παρακάτω πειραμάτων κρίνεται απαραίτητη.



Εικ. 21 Ανάλυση Western για ανίχνευση ουβικουΐτινυλίωσης του προσδέτη D1 σε S2 κύτταρα. Υπερέκφραση τόσο D1, Xpress-Ubi σε αύξουσα ποσότητα των αντίστοιχων E3 λιγασών (0, 0.2, 0.4 και 1μg pAMW πλασμίδιο-εκάστοτε E3 λιγάση)

Ανάλυση με φασματομετρία μάζας της πρωτεΐνης D1, ίσως απαντήσει με τη μέγιστη ακρίβεια για τα συγκεκριμένα κατάλοιπα λυσίνης τα οποία ουβικουΐτινυλιώνονται στο ενδοκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης και από ποιες E3 λιγάσες.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Sorkin A, and von Zastrow M. (2009). Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **10**, 609-22.
2. Acconcia, F., Sigismund, S., and Polo, S. (2009). Ubiquitin in trafficking: the network at work. *Exp Cell Res* **315**, 1610-1618.
3. 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.
4. Pitsouli, C., and Delidakis, C. (2005). The interplay between DSL proteins and ubiquitin ligases in Notch signaling. *Development* **132**, 4041-4050.
5. Le Borgne, R. (2006). Regulation of Notch signalling by endocytosis and endosomal sorting. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 213-222.
6. Daskalaki, A., Shalaby, N.A., Kux, K., Tsoumpekou, G., Muskavitch, M.A.T. and Delidakis C. 2011. Distinct intracellular motifs of Delta mediate its ubiquitylation and activation by Mindbomb1 and Neuralized. *J. Cell Biol.* (under revision)
7. Raiborg, C., and Stenmark, H. (2009). The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* **458**, 445-452.
8. Kopan, R., and Ilgan, M. X. (2009). The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* **137**, 216-233.
9. Fürthauer M, González-Gaitán M. (2009). Endocytic regulation of Notch signalling during development. *Traffic* **10**, 792-802.
10. Benhra N, Vignaux F, Dussert A, Schweisguth F, Le Borgne R. (2010). Neuralized promotes basal to apical transcytosis of delta in epithelial cells. *Mol Biol Cell.* **21**, 2078-86
11. Jafar-Nejad H, Andrews HK, Acar M, Bayat V, Wirtz-Peitz F, Mehta SQ, Knoblich JA, Bellen HJ. (2005) Sec15, a component of the exocyst, promotes notch signaling during the asymmetric division of Drosophila sensory organ precursors. *Dev Cell.* **9**, 351-63.
12. Pavlopoulos, E., Pitsouli, C., Klueg, K., Muskavitch, M.A.T., Moschonas, N.K. and Delidakis, C. (2001). neuralized encodes a peripheral membrane protein involved in Delta signaling and endocytosis. *Dev. Cell* **1**, 807-816
13. Gerry Weinmaster, Janice A. Fischer (2011). Notch Ligand Ubiquitylation: What Is It Good For?. *Dev. Cell*, **134**-144
14. Bland, C.E., P. Kimberly, and M.D. Rand. 2003. Notch-induced proteolysis and nuclear localization of the Delta ligand. *J Biol Chem.* **278**:13607-10
15. Eric Marois, Ali Mahmoud and Suzanne Eaton. The endocytic pathway and formation of the Wingless morphogen gradient. *Development.* **133**, 307-317
16. Bokel, C., A. Schwabedissen, E. Entchev, O. Renaud, and M. Gonzalez-Gaitan. 2006. Sara endosomes and the maintenance of Dpp signaling levels across mitosis. *Science.* **314**:1135-9
17. Dollar, G., E. Struckhoff, J. Michaud, and R.S. Cohen. 2002. Rab11 polarization of the Drosophila oocyte: a novel link between membrane trafficking, 33 microtubule organization, and oskar mRNA localization and translation. *Development.* **129**:517-26

18. Lloyd, T.E., R. Atkinson, M.N. Wu, Y. Zhou, G. Pannetta, and H.J. Bellen. 2002. Hrs regulates endosome membrane invagination and tyrosine kinase receptor signaling in *Drosophila*. *Cell*. **108**:261-9
19. Rock, K.L., C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang, and A.L. Goldberg. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*. **78**:761-71
20. Le Borgne, R., and F. Schweisguth. 2003. Unequal segregation of Neuralized biases. Notch activation during asymmetric cell division. *Dev Cell*. **5**:139-48
21. Coumailleau, F., M. Furthauer, J.A. Knoblich, and M. Gonzalez-Gaitan. 2009. Directional Delta and Notch trafficking in Sara endosomes during asymmetric cell division. *Nature*. **458**:1051-5
22. Banks, S.M., B. Cho, S.H. Eun, J.H. Lee, S.L. Windler, X. Xie, D. Bilder, and J.A. Fischer. 2011. The functions of auxilin and Rab11 in *Drosophila* suggest that the fundamental role of ligand endocytosis in notch signaling cells is not recycling. *PLoS One*. **6**:e18259
23. Emery, G., A. Hutterer, D. Berdnik, B. Mayer, F. Wirtz-Peitz, M.G. Gaitan, and J.A. Knoblich. 2005. Asymmetric Rab 11 endosomes regulate delta recycling and specify cell fate in the *Drosophila* nervous system. *Cell*. **122**:763-73
24. Jafar-Nejad, H., H.K. Andrews, M. Acar, V. Bayat, F. Wirtz-Peitz, S.Q. Mehta, J.A. Knoblich, and H.J. Bellen. 2005. Sec15, a component of the exocyst, promotes notch signaling during the asymmetric division of *Drosophila* sensory organ precursors. *Dev Cell*. **9**:351-63
25. Jekely, G., and P. Rorth. 2003. Hrs mediates downregulation of multiple signaling receptors in *Drosophila*. *EMBO Rep*. **4**:1163-8
26. Lai, E.C., G.A. Deblandre, C. Kintner, and G.M. Rubin. 2001. *Drosophila* Neuralized is a ubiquitin ligase that promotes the internalization and degradation of Delta. *Dev Cell*. **1**:783-94
27. Wang Y, Chen Z and Bergmann A (2010) Regulation of EGFR and Notch signaling by distinct isoforms of D-cbl during *Drosophila* development *Dev. Biol.* **342**, 1–10