



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΦΥΤΩΝ**

ΒΡΕΤΤΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΙΤΛΟΥ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**‘ΤΕΚΜΗΡΙΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΥ
ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ *miR-13*’**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: Δρ ΕΥΘΥΜΙΑ ΤΣΑΓΓΡΗ
ΔΕΥΤΕΡΟΣ ΕΞΕΤΑΣΤΗΣ: Dr MARTIN TABLER**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2004

*στους γονείς μου
Λευτέρη και Χρυσούλα
που στηρίζουν αδιαμαρτύρητα
κάθε επιλογή μου*

Πρώτον απ' όλους θέλω να ευχαριστήσω τον Δρ Martin Tabler που πίστεψε σε μένα και μου εμπιστεύτηκε αυτό το project. Η καθοδήγηση μου από αυτόν ήταν περισσότερο από άψογη. Πρόκειται για ένα σπουδαίο επιστήμονα που καταλαβαίνει και στηρίζει τους φοιτητές του.

Στη συνέχεια θα ευχαριστήσω τον Δρ Χρήστο Δελιδάκη και την Δρ Ευθυμία Τσάγρη για τις συμβουλές τους, την εμπιστοσύνη τους και το χρόνο που αφιέρωσαν στη διόρθωση αυτής της εργασίας.

Πολλά ευχαριστώ χρωστάω στην Αλεξάνδρα Μπούτλα, τον Κρίτωνα Καλαντίδη, την Σεργία Τζωρτζακάκη, τη Χρυσούλα Πιτσούλη και τον Γιάννη Λειβαδάρα που ξόδεψαν χρόνο από τα πειράματά τους, προκειμένου να με μάθουν να στέκομαι στα πόδια μου μέσα σε ένα εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας (ή ένα fly-room κατά περίπτωση).

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω όλα τα παιδιά που συνάντησα στα εργαστήρια, τους νέους και παλιούς μου φίλους και την οικογένειά μου.

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα.....	4
Περίληψη	6
Abstract.....	7
Εισαγωγή	8
Ο μηχανισμός της γονιδιακής σίγησης	9
MicroRNAs.....	10
Ωρίμανση των miRNAs.....	11
Ενεργοποίηση των miRNAs	12
Δράση των miRNAs	14
Ανακάλυψη, γενωμικός εντοπισμός και ρύθμιση των γονιδίων των miRNAs.	14
Διαπιστευμένα παραδείγματα αλληλεπίδρασης μεταξύ miRNAs και γονιδίων.....	16
Οι προσπάθειες αναγνώρισης νέων στόχων	18
Χρησιμότητα των miRNAs	18
Η οικογένεια των K-box miRNAs στη Drosophila	19
Η υποοικογένεια miR-2/miR-13 K-box στη Drosophila	20
Απαλοιφή των miR-2 και miR-13 από έμβρυα Drosophila.....	22
Εύρεση πιθανών γονιδίων-στόχων για τα miR-2 και miR-13	23
Το γονίδιο CG10222.....	24
Enhanced Green Fluorescent Protein.....	25
Σκοπός της εργασίας.....	26
Υλικά και μέθοδοι.....	27
Θρεπτικά υλικά.....	27
Στελέχη βακτηρίων και πλασμιδιακοί φορείς.....	27
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	27
Απομόνωση πλασμιδίων από υγρές καλλιέργειες των 2 ml	27
Απομόνωση πλασμιδίων από υγρές καλλιέργειες των 100 mL.....	28
Απομόνωση DNA από πήκτωμα αгарόζης	28
Παρασκευή διαλύματος ουδέτερης φαινόλης.....	29
Παρασκευή δεκτικών κυττάρων	29
Κλωνοποίηση.....	30
Αντίδραση σύνδεσης (ligation).....	30
Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων	30
In vitro μεταγραφή RNA σε μεγάλες ποσότητες	31
RNAi σε έμβρυα Drosophila	31
In situ υβριδοποίηση σε έμβρυα Drosophila melanogaster	32
Παραγωγή σημαντών	32
Dot blot	33
Προετοιμασία και υβριδοποίηση εμβρύων.....	33
Στελέχη Drosophila melanogaster κ' φορείς μετασχηματισμού.....	35
Μετασχηματισμός και παραγωγή σταθερών ομόζυγων σειρών στη Drosophila melanogaster	37
Απομόνωση και προετοιμασία εμβρυϊκών δίσκων φτερού	38
Μικροσκοπία, φωτογράφιση	38
Αποτελέσματα-Συζήτηση	39
Παραγωγή κατασκευών-αισθητήρων EGFP-3' UTR (CG10222).....	39
Παραγωγή διαγονιδιακών σειρών Drosophila.....	41
Παραγωγή διαγονιδιακών σειρών Drosophila.....	42
Ανάλυση της έκφρασης της EGFP	44

Προνύμφες 3 ^{ου} σταδίου.....	44
Εμβρυϊκοί δίσκοι φτερού	47
In situ υβριδοποίηση.....	48
Καταστολή της έκφρασης του CG10222 μέσω γονιδιακής σίγησης.....	49
Συμπεράσματα	51
Μελλοντική προοπτική.....	52
Παράρτημα	53
Βιβλιογραφία	55

Περίληψη

Τα MicroRNAs είναι μικρά μονόκλιωνα RNA μόρια, 22 νουκλεοτιδίων περίπου, που δύναται να συντονίζουν σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες σε ζώα και φυτά. Επιτελούν ρύθμιση στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Στοχεύουν mRNA και τα οδηγούν στο μονοπάτι παρεμπόδισης της πρωτεϊνοσύνθεσης ή σε αυτό της ενδονουκλεόλυσης (RNAi). Η υποοικογένεια των miRNAs K-box miR-2/miR-13 στη *Drosophila* περιέχει μέλη με υψηλή ομολογία και πιθανώς συγγενή λειτουργικό ρόλο. Το γονίδιο *CG10222* είναι φορέας της αλληλουχίας K-box στο 3'UTR του μέσω του οποίου δύναται να ρυθμίζεται αρνητικά από μέλη της υποοικογένειας miR-2/miR-13.

Στην παρούσα εργασία κατασκευάστηκαν ετερόλογα πλασμίδια αισθητήρες που περιείχαν την κωδική περιοχή της EGFP ενωμένη με το 3'UTR του γονιδίου *CG10222* καθώς και με τροποποιημένες εκδόσεις του στην περιοχή του K-box. Οι τροποποιήσεις είχαν γίνει με τρόπο ώστε να αίρεται ή να υποβοηθάται η αλληλεπίδραση μεταξύ miRNA και mRNA. Όλα τα μετάγραφα βρίσκονταν υπό τον έλεγχο μεταγραφής ενός συστατικού υποκινητή τουμπουλίνης.

Οι κατασκευές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή σταθερών διαγονιδιακών σειρών *Drosophila*. Ακολούθησε η ανάλυση του φθορισμού της EGFP σε προνύμφες 3^{ου} σταδίου και εμβρυϊκούς δίσκους φτερών. Το συμπέρασμα που εξάγεται είναι ότι το *miR-13b* είναι αρνητικός ρυθμιστής της έκφρασης του γονιδίου *CG10222* μέσω της αλληλεπίδρασης με την περιοχή 11-24 νουκλεοτίδια μετά του κωδικού λήξης, στο 3'UTR του μεταγράφου του. Επιπλέον φάνηκε ότι το *miR-13b* εκφράζεται σε όλα τα σωματικά μέρη της προνύμφης εκτός των αρσενικών γονάδων.

Η λειτουργία του *CG10222* είναι άγνωστη. Πειράματα εφαρμογής RNAi έναντι του σε έμβρυα *Drosophila* δείχνουν ότι επιτελεί κάποια ζωτικής σημασίας λειτουργία.. Ενδείξεις επίσης δημιουργούνται για πιθανή ιστοειδική έκφραση στους όρχεις.

Abstract

MicroRNAs are small single stranded RNA molecules, of about 22 nucleotides, that can regulate important cellular functions in animals and plants. They exert their regulatory role by targeting mRNAs for cleavage or translational impairment. Hence they are regulators of gene expression at the post-transcriptional level. The subfamily of K-box miR-2/miR-13 in *Drosophila* contains members with almost identical sequence, and consequently similar functional roles. The gene *CG10222* carries a K-box motif at its 3'UTR with which it is potentially down regulated by members of the K-box subfamily.

During this project heterologous sensor plasmids were constructed containing fusions between EGFP protein and the wild type 3'UTR of *CG10222* as well as mutated versions of it. These mutations aimed either to weaken or reinforce the interaction between miRNA and mRNA. All transcripts were under the control of a constitutively active tubulin promoter.

The sensor constructs were used for the generation of stable *Drosophila* transgenic lines. EGFP fluorescence analysis at 3rd instar larvae and wing imaginal discs was followed. It was concluded that indeed *miR-13b* is a negative regulator of *CG10222*. The region between 11-24 nucleotides after the stop codon at the 3'UTR was found to be a regulatory element that interacts with *miR-13b*. Additionally, it was observed that *miR-13b* is present throughout the body of the larva except for the male gonads.

CG10222 has an unidentified function. RNAi strategies against it show that it is indispensable for embryo physiology. Finally there is evidence for a testis specific expression.

Εισαγωγή

Η περιγραφή των γνωρισμάτων και των μηχανισμών της ζωής των έμβιων όντων, ως αντικείμενο μελέτης της Βιολογίας, πηγάζει κυρίως από την ενδεδειγμένη έρευνα ελάχιστου συγκριτικά αριθμού οργανισμών μοντέλων. Ένας από αυτούς, ο πιο διάσημος, είναι η φρουτόμυγα ή επιστημονικώς *Drosophila melanogaster*. Πρόκειται για ένα μικρό έντομο, μόλις 3 mm μήκους που χρησιμοποιείται στην έρευνα για περίπου ένα αιώνα. Η συμβολή της στη πρόοδο της γενετικής και της αναπτυξιακής βιολογίας είναι σπουδαία.

Τα κριτήρια ανάδειξης της *Drosophila* σε οργανισμό μοντέλο ήταν το μικρό μέγεθος της, ο μικρός κύκλος ζωής της και η δυνατότητα καλλιέργειας της σε μεγάλους αριθμούς με σχετικά μικρά χρηματικά έξοδα. Στα παραπάνω προστίθενται το γεγονός ότι σήμερα έχει αλληλουχηθεί πλήρως το γονιδιόμα της και συνάμα διατίθενται συλλογές με στελέχη φορείς-μεταλλάξεων για χιλιάδες γονίδια.

Ο κύκλος ζωής της *Drosophila* διαρκεί 10 περίπου ημέρες στους 25°C. Το πρώιμο έμβρυο περνά από τα στάδια συνκύτιο, κυτταροποιημένο βλαστόδερμα και γαστρίδιο. Ακολουθεί το όψιμο στάδιο ανάπτυξης κατά το οποίο το εμβρυϊκό σώμα χωρίζεται σε 14 παραμεταμερή που σύντομα συγχωνεύονται σε 14 μεταμερή. Καθένα από αυτά κατέχει ήδη προγραμματισμένη αναπτυξιακή τύχη προς κεφαλικές δομές, θωρακικά ή κοιλιακά τμήματα. Η ανάπτυξη του εμβρύου ολοκληρώνεται με την εκκόλαψη σε προνύμφη πρώτου σταδίου. Αυτή τρέφεται συνεχώς, αυξάνει δραματικά τον όγκο της και αφού περάσει από δύο προνυμφικά στάδια μετατρέπεται σε νύμφη. Τα πρότυπα των φτερών και των άκρων είναι παρόντα στα προνυμφικά στάδια σε άμορφους ειδικούς σχηματισμούς που ονομάζονται εμβρυϊκοί δίσκοι. Η επαγόμενη από ορμόνες μεταμόρφωση της νύμφης οδηγεί στην έκδυση ενός ενήλικου ατόμου.

Το έμβρυο περιβάλλεται από το χόριο και τη βιτελλινική μεμβράνη ενώ κατά την πρόοδο της ανάπτυξης η επιδερμίδα εκκρίνει ένα χιτινώδες περίβλημα, το δερμάτιδιο. Το τελευταίο σχηματίζει παραφυάδες σε κάθε πρόσθιο τμήμα των τμημάτων της κοιλιακής πλευράς του εμβρύου ή της προνύμφης, που ονομάζονται οδοντικές ζώνες.

Οι εμβρυϊκοί δίσκοι του φτερού προκύπτουν από εγκολπώσεις του εξωδέρματος στο σημείο που θα σχηματιστεί το δεύτερο θωρακικό τμήμα. Αρχικά συνίστανται από 40 περίπου κύτταρα και αναπτύσσονται ραγδαία σε 1000πλάσιο αριθμό κατά τα

προνυμφικά στάδια ανάπτυξης. Αποτελούνται από το πρόσθιο, οπίσθιο, ραχιαίο και κοιλιακό διαμέρισμα καθένα από τα οποία είναι απόγονοι διαφορετικής κυτταρικής σειράς. Δομές όπως οι δίσκοι του φτερού, έχουν αποδειχτεί εξαιρετικά συστήματα μελέτης της μορφοποίησης των οργάνων της *Drosophila*.

Ο μηχανισμός της γονιδιακής σίγησης

Μια από τις πιο επαναστατικές ανακαλύψεις της σύγχρονης μοριακής βιολογίας είναι το φαινόμενο της γονιδιακής σίγησης. Στους ζωικούς οργανισμούς είναι γνωστό ως παρεμβολή μέσω RNA (RNAi) ενώ στους φυτικούς μετα-μεταγραφική γονιδιακή σίγηση (PTGS). Μέσω του μηχανισμού αυτού επιτυγχάνεται ειδική προς την αλληλουχία, καταστολή της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο μετα-μεταγραφικό επηρεάζοντας τη σταθερότητα των mRNA. Η εξελικτική συντήρηση του μηχανισμού από τους μύκητες ως τον άνθρωπο υπογραμμίζει τη σπουδαιότητά του.

Το μόριο κλειδί στην επαγωγή του RNAi είναι ένα δίκλωνο RNA (dsRNA), ομόλογο προς τον στόχο που καταστέλλει (Fire et al., 1998). Ένα τέτοιο μόριο μπορεί να παράγεται από την αντιγραφή των RNA-ιών, τη μετάθεση τρανσποσονίων, τη μεταγραφή γονιδίων ή διαγονιδίων με παλίνδρομες αλληλουχίες, την υπερέκφραση διαγονιδίων ή να αποτίθεται μέσα στον οργανισμό σε ενέσιμη συνθετική μορφή.

Στη συνέχεια ένα μέλος των RNAsών τύπου III, γνωστό ως Dicer (Hammond et al., 2000; Bernstein et al., 2001), αναλαμβάνει τον ATP-εξαρτώμενο κατακερματισμό του dsRNA. Τα μικρά δίκλιωνα κομμάτια μήκους 21-25 νουκλεοτιδίων που προκύπτουν, φέρουν φωσφορικές ομάδες στο 5' άκρο και 2 προεξέχοντα νουκλεοτίδια στο 3'. Ονομάστηκαν μικρά παρεμποδιστικά RNA (siRNAs). Αποτελούν τελεστές του φαινομένου της καταστολής και συνάμα τη μοριακή πιστοποίηση της επαγωγής του φαινομένου της σίγησης (Nykanen et al., 2001; Elbashir et al. 2001a; Hamilton και Baulcombe, 1999).

Τα siRNAs συναντούν ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών γνωστό ως RISC (Rna Induced Silencing Complex). Λίγα πρωτεϊνικά συστατικά του RISC έχουν αναγνωριστεί και ένα από αυτά είναι οι πρωτεΐνες Argonaute με ορθόλογους αντιπροσώπους σε όλους τους οργανισμούς. Χαρακτηρίζονται από μια PAZ και μια PIWI περιοχή, από τις οποίες η πρώτη φαίνεται να προσδένεται με τα προεξέχοντα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο (Ma et al., 2004). Το RISC αναλαμβάνει τη μεταφορά, το

ζετύλιγμα και την ενεργοποίησή των siRNAs. Το ATP-εξαρτώμενο ζετύλιγμα των siRNAs και η πρόσδεση στο RISC γίνεται από το 5' άκρο της αλυσίδας που είναι χαλαρότερα συνδεδεμένη με τη συμπληρωματική της (Nykanen et al., 2001; Khvorovna et al., 2003). Αυτό σηματοδοτεί και την ενεργοποίησή της. Η ενεργοποιημένη siRNA αλυσίδα προσδένεται με το mRNA-στόχο και δίνει την εντολή της ενδονουκλεόλυσής του, στο μέσο της αλληλουχίας οδηγού. Το mRNA υφίσταται πλέον σε δύο κομμάτια που γίνονται στόχοι για αποικοδόμηση (Elbashir et al., 2001a,b).

Ο μηχανισμός της γονιδιακής σίγησης επιστρατεύεται από το κύτταρο σε περιπτώσεις εισβολής ξένων νουκλεϊκών οξέων. Αυτό συνιστά προστασία από ιούς με dsRNA ενδιάμεσα αντίγραφα, μεταθέσιμα τρανσποσόνια και έντονα εκφραζόμενα διαγονίδια. Η εξέλιξη έχει οπλίσει πολλούς φυτικούς ιούς με πρωτεΐνες ειδικές στην παρεμπόδιση διαφόρων σταδίων του μηχανισμού της σίγησης (ανασκόπηση σε Lecellier και Voinnet, 2004). Πολλές από αυτές έχουν γίνει απαραίτητα εργαλεία για την μελέτη της γονιδιακής σίγησης.

MicroRNAs

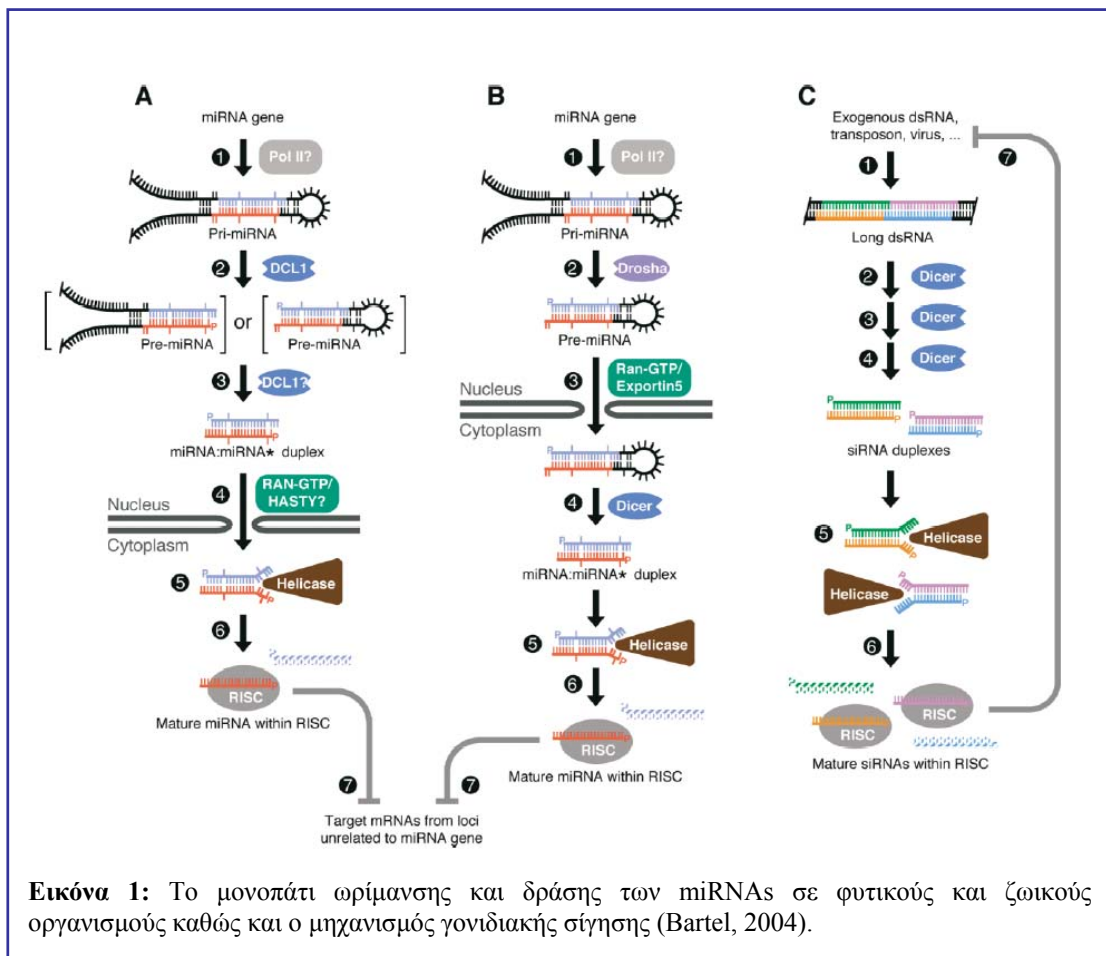
Τα MicroRNAs (miRNAs) ανήκουν σε μια καινούργια τάξη μικρών, μονόκλωνων μορίων RNA, με μόλις 22 νουκλεοτίδια μήκος, κατά μέσο όρο, τα οποία δεν κωδικοποιούν πεπτίδια. Λειτουργικός τους ρόλος είναι ο υβριδισμός με αγγελιοφόρα RNA (mRNA), σε ένα μοτίβο μερικής ή πλήρους συμπληρωματικότητας που οδηγεί σε παρεμπόδιση της μετάφρασης ή ενδονουκλεοτιδική διάσπαση. Η παρουσία τους σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς και η ρύθμιση που επιτελούν στη γονιδιακή έκφραση κατά το μετα-μεταγραφικό επίπεδο, τα καθιστούν ως ένα πολύ δημοφιλές αντικείμενο μελέτης στη Βιολογία.

Ιδρυτικά μέλη αυτής της ομάδας μικρού μήκους RNA μορίων αποτελούν τα miRNAs *lin-4* και *let-7*. Αυτά βρέθηκε να παρεμποδίζουν τη μετάφραση των μεταγράφων *lin-14* και *lin-41* αντίστοιχα. Τα γονίδια αυτά ελέγχουν την μετάπτωση από το ένα προνυμφικό στάδιο στο επόμενο, στον οργανισμό *Caenorhabditis elegans* και καλούνται ετεροχρονικά (Lee and Ambros, 2001; Reinhart et al., 2000). Μαζί με την ανακάλυψη του *lin-4* μήκους 22 νουκλεοτιδίων, εντοπιζόταν και ένα μεγαλύτερο συγγενές RNA μόριο μήκους 62. Αυτό διέθετε δευτεροταγή δομή τύπου φουρκέτας

και προτάθηκε ως η πρόδρομη μορφή του *lin-4* (Lee et al., 1993). Έκτοτε πολλά βήματα από την διαδικασία ωρίμανσης των miRNAs έχουν διαλευκανθεί που περιγράφονται παρακάτω και συνοψίζονται στην Εικόνα 1.

Ωρίμανση των miRNAs

Αρχικά από το γονίδιο ενός miRNA παράγει το πρωτογενές μετάγραφο που καλείται πρώιμο miRNA (pri-miRNA) και έχει δευτεροταγή δομή φουρκέτας με μακριούς βραχίονες. Στα ζώα, το ένζυμο Droscha αναλαμβάνει να κόψει το pri-miRNA κοντά στη βάση του, αφήνοντας μια φωσφορική ομάδα στο 5' άκρο και 2 προεξέχοντα νουκλεοτίδια στο 3', μοτίβο που τηρείται πάντα κατά τη δράση των τύπου III RNAσών (Lee et al., 2003). Με τον τρόπο αυτό ορίζεται το ένα άκρο του ώριμου miRNA. Το αποτέλεσμα της δράσης της Droscha είναι μια μικρότερου μήκους, δομή φουρκέτας μήκους 65-70 νουκλεοτίδια, στον ένα βραχίονα της οποίας εδρεύει το ώριμο miRNA. Η δομή αυτή λέγεται πρόδρομο miRNA (pre-miRNA) και



η εξαγωγή της από τον πυρήνα, σύμφωνα με πειράματα στο *Xenopus*, διαμεσολαβείται από την Exportin-5 σε συνεργασία με το σύστημα RanGTP (Bohnsack et al., 2004).

Επόμενο στάδιο της διαδικασίας ωρίμανσης είναι η άφιξη των pre-miRNAs στο κυτταρόπλασμα. Εκεί το ένζυμο Dicer αποκόπτει τα τελευταία ζεύγη βάσεων των βραχιόνων και τη δομή θηλιάς αφήνοντας φωσφορικές ομάδες στο 5' άκρο και 2 προεξέχοντα νουκλεοτίδια στο 3' (Hutvagner et al., 2001; Wienholds et al., 2003; Bernstein et al., 2003). Με τον τρόπο αυτό οριοθετείται και το δεύτερο άκρο του ώριμου miRNA. Η δομή που προκύπτει είναι ένα μερικώς συμπληρωματικό δίκλωνο μόριο που φέρει το ώριμο και μια άλλη ίσου μήκους αλυσίδα.

Στα φυτά το pri-miRNA είναι υπόστρωμα της Dicer like protein 1 (DCL1), ένα ορθόλογο της Dicer στα φυτά με μοτίβο πυρηνικού εντοπισμού (Reinhart et al., 2002). Το ίδιο ένζυμο φαίνεται να καταλύει και τη δεύτερη αντίδραση ενδονουκλεόλυσης μέσα στον πυρήνα, που μετατρέπει το pre-miRNA στην ατελώς δίκλωνη μορφή (Kurihara και Watanabe, 2004). Η αντίδραση αυτή εικάζεται ότι γίνεται πολύ γρήγορα αφού τα pre-miRNAs δεν εντοπίζονται πειραματικά ούτε σε εκχυλίσματα πυρήνων. Πρόσφατα όμως, αυτό έγινε τεχνικά δυνατό (Denti et al., 2004). Στη συνέχεια το ατελώς δίκλωνο μόριο, εξέρχεται του πυρήνα πιθανώς με το ομόλογο της Exportin-5 στα φυτά που λέγεται Hasty (Yi et al., 2003). Δύο πυρηνικές πρωτεΐνες στο *Arabidopsis*, οι HEN1 και HLY1, προκαλούν με την έλλειψή τους αδυναμία συσσώρευσης ώριμων miRNAs στο κυτταρόπλασμα. Ο ακριβής λειτουργικός τους ρόλος δεν έχει όμως ακόμα διευκρινιστεί (Boutet et al., 2003; Han et al., 2004).

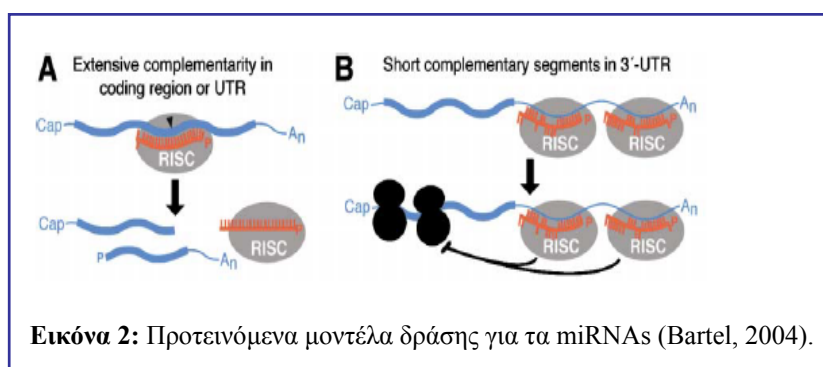
Ενεργοποίηση των miRNAs

Το μερικώς δίκλωνο miRNA μόριο που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, είναι λειτουργικά ασύμμετρο (Schwarz et al., 2003). Η μια αλυσίδα του αντιστοιχεί στο ώριμο miRNA που θα εκτελέσει την καταστολή και ξεκινά σχεδόν πάντα με μια ουριδίνη σε ζώα και φυτά (Bartel and Bartel, 2003), ενώ η άλλη διατελεί μεταφορικό και προστατευτικό ρόλο και συμβολίζεται ως miRNA*. Η φυσική επιλογή ανταμείβει το χρήσιμο miRNA με την ιδιότητα να φορτώνεται στο ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλεγμα RISC με ευνοούμενους θερμοδυναμικά κανόνες. Το 5' άκρο του είναι

ασθενέστερα συνδεδεμένο στο συμπληρωματικό του, οπότε και ξετυλίγεται και προσδένεται από το RISC ευκολότερα (Khvorovna et al., 2003). Το miRNA* απομένει μονόκλωνο και αποικοδομείται αφού η πρόσδεσή του στο RISC είναι στατιστικά σπάνια. Ο παραπάνω συλλογισμός δεν αποκλείει το ενδεχόμενο να ευνοούνται και οι δυο αλυσίδες για ξετύλιγμα και πρόσδεση. Σε τέτοιες περιπτώσεις ανιχνεύονται πειραματικά και οι δυο αλυσίδες (Lai et al., 2003; Aravin et al., 2003).

Πρόσφατα δείχθηκε ότι ιϊκές πρωτεΐνες p21 και p19 ειδικές στην αναστολή της γονιδιακής σίγησης, συμμετέχουν και στην αναστολή του μονοπατιού δράσης των miRNAs. Δρουν δεσμεύοντας τα διμερή miRNA/miRNA* που τα κρατά έτσι μακριά από το σύμπλεγμα RISC. Στην ίδια εργασία φαίνεται ότι ο αναστολέας p1/HC-Pro εμποδίζει τη πρόσδεση του miRNA στο RISC, με τρόπο διαφορετικό από πριν αλλά όχι διευκρινισμένο. Τα παραπάνω φαινόμενα αναστολής πιθανώς δικαιολογούν κάποια από τα συμπτώματα ιϊκής μόλυνσης σε φυτά (Charman et al., 2004).

Η γνώση σχετικά με τα miRNAs και την πρόσδεσή τους στο RISC έχει ακολουθήσει διάφορες κατευθύνσεις. Αρχικά πιστευόταν ότι το σύμπλεγμα στο οποίο προσδένονται τα miRNAs είναι ανεξάρτητο αλλά ανάλογο του RISC και ονομάζονταν miRNP. Αργότερα φάνηκε ότι μοιράζονταν κοινά πρωτεϊνικά συστατικά όπως τις πρωτεΐνες Argonaute αλλά και κοινούς λειτουργικούς ρόλους, αφού miRNAs προσδεδεμένα σε miRNP μπορούσαν να καταλύσουν την ενδονουκλεόλυση τεχνητών στόχων (Hutvagner και Zamore, 2002). Αυτό οδήγησε στη ταύτιση των δύο όρων και τη συγχώνευση τους προς RISC. Τα πράγματα αλλάζουν ξανά με την πρόσφατη ανακάλυψη ότι στη *Drosophila* οι δύο Dicer, Dcr1 και Dcr2 αποτελούν συστατικά του RISC και συγκεκριμένα η πρώτη αλλά όχι η δεύτερη συμμετέχει στο μονοπάτι δράσης των miRNAs. Αυτό συνιστά ότι το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που συμμετέχει στην ενδονουκλεόλυση διαφέρει από αυτό της παρεμπόδισης της μετάφρασης σε τουλάχιστον ένα συστατικό (Lee et al., 2004).



Δράση των miRNAs

Τα miRNAs καθοδηγούν τα συστατικά του RISC στο mRNA-στόχο. Εκεί γίνεται εκτίμηση του βαθμού συμπληρωματικότητας της αλληλεπίδρασης. Στις περιπτώσεις που ο υβριδισμός είναι ατελής συντελείται παρεμπόδιση της μετάφρασης του μεταγράφου. Αντίθετα όταν παρέχεται μια πλήρως συμπληρωματική αλληλουχία πρόσδεσης για το miRNA, το μετάγραφο οδηγείται στο μονοπάτι ενδονουκλεόλυσης, ίδιο με αυτό που καταλύουν τα siRNAs. Οι ζωικοί οργανισμοί έχουν υιοθετήσει τον πρώτο μηχανισμό και οι φυτικοί αντίθετα, το δεύτερο. Επιπλέον στα ζώα η περιοχή του μεταγράφου που αλληλεπιδρά με το miRNA είναι το 3'UTR ενώ στα φυτά όλο το μετάγραφο (Bartel, 2004). Ωστόσο, οι παραπάνω διαφορές ισχύουν μόνο για το παρόν. Ήδη έχουν αναφερθεί περιπτώσεις παρεμπόδισης της μετάφρασης και για τα φυτά (Aukerman και Sakai, 2003) και πιθανώς το ανάλογο να δειχθεί σε ζωικούς οργανισμούς.

Πρόσφατα παρατηρήθηκε ότι διαφορετικά miRNAs στη *Drosophila* μπορούν να υβριδίζουν μεταξύ τους με συμπληρωματικότητα της τάξης του 21/22 νουκλεοτίδια που ξεπερνά και αυτή που υφίσταται για κάθε miRNA με το μερικώς συμπληρωματικό του στην pre-miRNA δομή. Με τον τρόπο αυτό ίσως τα miRNAs να αναστέλλονται αμοιβαία ή αντίθετα να προφυλάσσονται από την αποικοδόμηση πριν ξαναφορτωθούν στο RISC (Lai et al., 2004).

Ανακάλυψη, γενωμικός εντοπισμός και ρύθμιση των γονιδίων των miRNAs.

Σήμερα, οι διαδικασίες αλληλούχισης των γενωμάτων συμπληρώνονται με τη συνεχή ανακάλυψη γονιδίων που κωδικοποιούν miRNAs. Στο σκοπό αυτό βοηθούν υπολογιστικά προγράμματα που αποκαλύπτουν γονιδιακές περιοχές που μεταγραφόμενες να αποδίδουν δομές φουρκέτας ανάλογες με τα pre-miRNAs. Για τα γενώματα των εντόμων έχει σχεδιαστεί το miRseeker που προβλέπει την ύπαρξη 110 miRNA-γονιδίων στη *Drosophila*, το 1% δηλαδή του πλήθους των γονιδίων που παράγουν πρωτεΐνες. Τα δεδομένα από υπολογιστικές προσεγγίσεις ενισχύονται όταν συνδυάζονται με δεδομένα για εξελικτική συντήρηση του βραχίονα του λειτουργικού miRNA καθώς και με πειραματικά δεδομένα (Lai et al., 2003). Πειραματικές

προσεγγίσεις τεκμηρίωσης είναι η ανάλυση Northern και η PCR σε βιβλιοθήκες μικρών μορίων RNA. Από την άλλη, η απευθείας κλωνοποίηση miRNAs όχι μόνο προηγείται χρονικά της βιοπληροφορικής, αλλά προσφέρει και δεδομένα για τον τόπο και το χρόνο έκφρασης (Aravin et al., 2003).

Στα φυτά η κλωνοποίηση των miRNAs δεν φαίνεται να είναι και πολύ εύκολη υπόθεση αφού η πλειοψηφία των μικρών RNA μορίων που αποκαλύπτονται μετά από κλωνοποίηση και αλληλούχιση αντιστοιχούν σε siRNAs ή άγνωστες ακόμα μορφές μικρών RNA (Llave et al., 2002; Reinhart et al., 2002; Bartel and Bartel, 2003). Πρόσφατα όμως, η εφαρμογή υπολογιστικών μεθόδων βελτίωσε κατά πολύ την ανακάλυψη miRNA-γονιδίων στους φυτικούς οργανισμούς, και αποκάλυψε για το *Arabidopsis* συνολικά 92 γονίδια που μοιράζονται σε 22 οικογένειες. Ο αριθμός αυτός αντιστοιχεί στο 0,4% του υπολογιζόμενου αριθμού γονιδίων στο *Arabidopsis* (Jones-Rhoades και Bartel, 2004).

Τα miRNAs που έχουν ανακαλυφθεί και δημοσιευτεί μέχρι τώρα, πρέπει να τηρούν τα κριτήρια διαχωρισμού τους, από άλλα είδη ‘μικρών’ RNA μορίων όπως αυτό καθορίστηκε από μια ομάδα αρμόδιων ερευνητών (Ambros et al., 2003). Κατόπιν καταχωρούνται στη βάση δεδομένων <http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/> αφού αποφασιστεί το όνομα και η συστηματική κατάταξή τους σε σχέση με ορθόλογες και παράλογες ομάδες (Griffiths-Jones, 2004).

Τα γονίδια των miRNAs εντοπίζονται σε ‘ανεξάρτητες’ των κλασσικών γονιδίων, μεταγραφικές μονάδες που εδρεύουν σε περιοχές μεταξύ ανοιχτών αναγνωστικών πλαισίων (ORF) (Lee and Ambros, 2001). Από τον παραπάνω κανόνα εξαιρούνται περιπτώσεις αρκετών miRNAs-γονιδίων που βρίσκονται εντός ιντρονίων και πιθανότατα μεταγράφονται με τους ρυθμιστικούς όρους στους οποίους υπόκειται και το ίδιο το γονίδιο (Aravin et al., 2003). Πολύ συχνά αναφέρονται περιπτώσεις για miRNAs-γονίδια που συμμετέχουν στην ίδια μεταγραφική μονάδα που παράγουν πολυσιστρονικά μετάγραφα κάτω από τον έλεγχο ενός υποκινητή. Οι μονάδες αυτές καλούνται συστοιχίες ή clusters (Lagos Quintana et al., 2001; Jones-Rhoades και Bartel, 2004)

Η ρύθμιση της μεταγραφής των miRNAs είναι μέχρι τώρα άγνωστη. Στη *Drosophila* υπάρχουν ενδείξεις για πιθανή μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων συγκεκριμένων miRNAs από αναπτυξιακούς παράγοντες που συμμετέχουν στη μορφογένεση του εμβρύου. Τα ίδια miRNAs υποστηρίζεται ότι καταστέλλουν γονίδια καθορισμού του εμβρυικού άξονα, όπως τα *fushi-tarazu*, *odd skipped* και *hairy*. Με

λίγα λόγια τα miRNAs φαίνεται να ελέγχουν την μετάφραση πρωτεϊνών ανάλογων με αυτές που ρυθμίζουν την μεταγραφή των γονιδίων τους (Rajewsky και Succi, 2004). Μια εργασία στον *Caenorhabditis* αποκαλύπτει την ύπαρξη μιας ρυθμιστικής αλληλουχίας, 1200 νουκλεοτίδια πριν από το γονίδιο *let-7*, που είναι στόχος πρόσδεσης ετεροχρονικών παραγόντων. Σημαντικό λειτουργικά, κομμάτι αυτής της περιοχής είναι μια 22 νουκλεοτιδίων ανεστραμμένη αλληλουχία (Johnson et al., 2003).

Διαπιστευμένα παραδείγματα αλληλεπίδρασης μεταξύ miRNAs και γονιδίων

Το παράδειγμα των *let-7*, *lin-4* ήταν μόνο η αρχή της ανακάλυψης μιας σειράς από αλληλεπιδράσεις μεταξύ miRNAs και μεταγράφων. Πειράματα κλασσικής γενετικής ανάλυσης στη *Drosophila* αποκάλυψαν τον γονιδιακό τόπο *bantam* που παράγει ένα miRNA 21 νουκλεοτιδίων. Μεταλλάγματα απαλοιφής ή υπερέκφρασης του *bantam* απέδειξαν τη συμμετοχή του σε διαδικασίες ελέγχου του κυτταρικού αριθμού. Συγκεκριμένα το *bantam* βρέθηκε να εμποδίζει τη μετάφραση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης HID και με τον τρόπο αυτό να προωθεί την κυτταρική διαίρεση. Το μετάγραφο του *hid* φέρει 5 περιοχές αλληλεπίδρασης με το *bantam* στο 3'UTR. Διαγονίδια αισθητήρες σύντηξης GFP με το 3'UTR του *hid* γίνονταν στόχοι έντονης καταστολής (Brennecke et al., 2003).

Ακολουθώντας τη στρατηγική σχεδιασμού κατασκευών-αισθητήρων και με τη συμβολή υπολογιστικών μεθόδων αναγνωρίστηκαν και επιβεβαιώθηκαν στόχοι για δύο ακόμα miRNAs στη *Drosophila*. Το miR-7 λοιπόν, βρέθηκε να καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων *HLHm3*, *HLHm4* και *hairy* και έτσι αποκτά λειτουργικό ρόλο ρυθμιστή στο μονοπάτι Notch. Το miR-2 από την άλλη, φαίνεται να συντονίζει διαδικασίες προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, αφού στοχεύει αποπτωτικά γονίδια όπως τα *reaper*, *grim* και *sickle* (Stark et al., 2003).

Ανεξάρτητη μελέτη έδειξε ότι το *miR-14* της *Drosophila*, ρυθμίζει αρνητικά μονοπάτια απόπτωσης στα οποία συμμετέχουν οι παράγοντες Reaper, Hid, Grim, Drone και DICE. Επίσης εμπλέκεται στο μεταβολισμό των λιπών και συγκεκριμένα στη χημική μετατροπή της δι-ακυλογλυκερόλης και τρι-ακυλογλυκερόλης. Στις παρατηρήσεις αυτές δεν βρέθηκε κάποιο πειστικό στοιχείο άμεσης αλληλεπίδρασης

του *miR-14* είτε με τα γνωστά αποπτωτικά γονίδια, είτε με μεταβολικά ένζυμα. Αναμένεται λοιπόν να βρεθούν τα γονίδια-στόχοι για το εν λόγω miRNA που ίσως να είναι και επαγωγείς των παραπάνω παραγόντων ή ενζύμων (Xu et al., 2003).

Μελέτες που γίνονται στον άνθρωπο μαρτυρούν ότι για πολλές γενετικές ασθένειες πιθανόν να ευθύνονται τα miRNAs. Περισσότερα από τα μισά περιστατικά χρόνιας Β-λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας συσχετίζονται θετικά με την απαλοιφή των *miR-15* και *miR-16* από τη χρωμοσωμική ζώνη 13q14 (Calin et al., 2002). Μεγάλο ενδιαφέρον κρύβει η αποκάλυψη των γονιδίων στόχων για αυτά τα miRNAs. Αντίστοιχα το γονίδιο *miR-175* βρίσκεται στο Χ χρωμόσωμα σε μια περιοχή που ευθύνεται για τις ασθένειες: σύνδρομο του Waisman και διανοητική καθυστέρηση σχετιζόμενη με το Χ (Dostie et al., 2003).

Στους φυτικούς οργανισμούς κυριαρχεί το μοντέλο δράσης της ενδονουκλεοτιδικής διάσπασης και ήδη υπάρχουν παραδείγματα διαπιστευμένων αλληλεπιδράσεων. Οι μεταγραφικοί παράγοντες τύπου HD-Zip PHABULOSA, PHAVOLUTA και REVOLUTA καταστέλλονται από τα MIR165 και MIR166. Μεταλλάξεις που αποτρέπουν την αλληλεπίδραση μεταξύ στόχων και miRNAs οδηγούν σε σοβαρές αναπτυξιακές δυσμορφίες στα φύλλα (Kidner και Martienssen, 2004). Το παραπάνω μοντέλο ρύθμισης βρέθηκε συντηρημένο σε μονοκότυλα αγγειόσπερμα, γυμνόσπερμα, φτέρες και βρυόφυτα, που μαρτυρεί τη σπουδαιότητα διατήρησης ενός τέτοιου μηχανισμού για πάνω από 400 εκατομμύρια χρόνια εξέλιξης (Floyd και Bowman, 2004; Juarez et al., 2004). Ανάλογα φαινόμενα παρατηρούνται και σε 4 μεταγραφικούς παράγοντες τύπου TCP, που επίσης συμμετέχουν στη ανάπτυξη του φύλλου. Σιωπηλές μεταλλάξεις που απωθούν τη ρύθμιση από το miRNA JAW αποδίδουν φύλλα με ανώμαλο σχήμα (Palatnik et al., 2003). Με έκπληξη βρέθηκε ότι το MIR172 καταστέλλει την οικογένεια ομοιοτικών γονιδίων APETALA2 μέσω του μονοπατιού παρεμπόδισης της παραγωγής πρωτεΐνης (Aukerman και Sakai, 2003). Οι μεταγραφικοί παράγοντες όμως δεν είναι οι μοναδικοί στόχοι για τα miRNAs στα φυτά. Έχει ήδη αρχίσει να αποκαλύπτεται η αλληλεπίδραση των miRNAs με γονίδια αφομοίωσης θρεπτικών συστατικών, απόκρισης σε αβιοτικό στρες και ορμονικής ρύθμισης (Jones-Rhoades και Bartel, 2004).

Οι προσπάθειες αναγνώρισης νέων στόχων

Είναι λοιπόν δυσανάλογος ο αριθμός των miRNAs που έχουν ανακαλυφθεί με τις περιπτώσεις αναγνώρισης των στόχων τους και αποκάλυψης της λειτουργίας τους. Προς την κατεύθυνση της αυτή γίνονται διάφορες προσπάθειες που βασίζονται σε υπολογιστικές μεθόδους και αλγόριθμους που αναζητούν σε mRNAs ή 3'UTR συμπληρωματικές προς τα miRNAs αλληλουχίες, τόσο σε ζωικούς όσο και φυτικούς οργανισμούς (Stark et al., 2003; Rajewsky και Soccì, 2004 Jones-Rhoades και Bartel, 2004).

Με δεδομένο ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ miRNA και στόχου στη *Drosophila* γίνεται με ατελώς συμπληρωματικό τρόπο, η αναγνώριση πιθανών στόχων γίνεται δύσκολη. Όμως από τις μέχρι τώρα αναγνωρισμένες αλληλεπιδράσεις στη *Drosophila* και το *C. elegans*, προκύπτει ότι τα πρώτα 6-8 πιο κοντινά στο 5' άκρο νουκλεοτίδια ενός miRNA, υβριδίζουν με σχεδόν απόλυτη συμπληρωματικότητα στο στόχο (Lai, 2002). Μια αρκετά επιτυχημένη υπολογιστική μέθοδος βασίστηκε στην παραπάνω αρχή, την αναζήτηση δηλαδή αλληλουχιών στο μεταγραφώσωμα συμπληρωματικών προς τα 6-8 πρώτα νουκλεοτίδια γνωστών miRNAs. Από τα δεδομένα που προέκυψαν, επελέγησαν οι αλληλουχίες που παρέχουν θέση δέσμευσης για ολόκληρο το miRNA. Στη συνέχεια τα αποτελέσματα αυτά πέρασαν από δυο κατηγορίες φίλτρων. Πρώτον αναγνωρίστηκαν ως πραγματικοί στόχοι, οι περιπτώσεις όπου η αλληλεπιδρούσα περιοχή του 3'UTR είναι συντηρημένη σε συγγενικά είδη (*Drosophila pseudoobscura*). Δεύτερον θεωρήθηκαν πιο πιθανές οι περιπτώσεις εύρεσης περισσότερων της μιας αλληλεπιδρούσες περιοχές μεταξύ miRNA και 3'UTR (Stark et al., 2003). Παρόλο που τα κριτήρια διαχωρισμού των δεδομένων μπορούν να κρύβουν τον κίνδυνο της απαλοιφής κάποιων θετικών αποτελεσμάτων, η μέθοδος αυτή αποδείχτηκε αρκετά προσοδοφόρα, παρέχοντας νέα ζευγάρια αλληλεπίδρασης miRNAs και γονιδίων στόχων. Κάποια από αυτά αποδείχθηκαν και πειραματικά ενώ τα περισσότερα αναμένουν ανάλογη τεκμηρίωση.

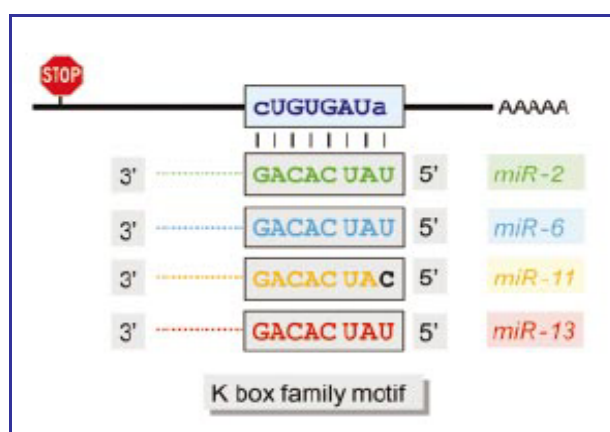
Χρησιμότητα των miRNAs

Η απήχηση που έχει ο miRNA-εξαρτώμενος έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να ποικίλει. Τα miRNAs μπορούν να δρουν είτε ως βασικοί διακόπτες

διακοπής της παραγωγής πρωτεϊνών είτε ως λεπτοί ρυθμιστές προγραμματισμένοι να κρατούν το επίπεδο των πρωτεϊνών κάτω από μια μέγιστη τιμή (Bartel, 2004). Η ρύθμιση που επιτελούν τα miRNAs συνιστά ένα πολύπλοκο δίκτυο αλληλεπιδράσεων το οποίο βασίζεται στην αρχή: ένα miRNA προσδένεται σε διαφορετικά mRNA και αντίστοιχα ένα συγκεκριμένο mRNA αποτελεί πολλαπλό στόχο για το ίδιο ή διαφορετικά miRNAs. Αν σε αυτό προστεθεί και ο μεταγραφικός έλεγχος στον οποίο υπόκεινται τόσο τα miRNAs όσο και τα μετάγραφα στόχοι, τότε συντίθεται το απαιτούμενο πρόγραμμα ελέγχου που θα συντονίσει με ακρίβεια τις κυτταρικές λειτουργίες.

Η οικογένεια των K-box miRNAs στη *Drosophila*

Λίγο πριν την ανακάλυψη των miRNAs και την καθιέρωση τους ως ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης, ανεξάρτητες μελέτες στη *Drosophila* αποκάλυψαν διάφορες μικρές αλληλουχίες στο 3'UTR μεταγράφων υπεύθυνες για αρνητική ρύθμιση στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Πρόκειται για τα μοτίβα **cUGUGAUa**, **AGCUUUA**, και **uGUCUUC** τα οποία ονομάστηκαν αντιστοίχως, K-box, Brd box και GY box. Τα μοτίβα



Εικόνα 3: MiRNAs της οικογένειας K-box (Boutla et al., 2003).

αυτά, βρέθηκαν πρώτα σε γονίδια που επάγονται από το μονοπάτι του Notch και ανήκουν στις ομάδες γονιδίων E(spl) και Brd (Lai et al., 1998). Η μετέπειτα ανακάλυψη miRNAs όπου τα πρώτα 6-8 νουκλεοτίδια του 5' άκρου τους, ήταν πλήρως συμπληρωματικά προς τα παραπάνω μοτίβα αιτιολογεί ικανοποιητικά τη λειτουργία της αρνητικής ρύθμισης. Κατάλληλα miRNAs προσδένονται με τέλεια συμπληρωματικότητα προς το μοτίβο και με λιγότερο καλό ταίριασμα στα νουκλεοτίδια που προηγούνται αυτό. Έτσι επάγεται παρεμπόδιση της μετάφρασης στο μετάγραφο (Lai, 1998).

Σήμερα γνωρίζουμε ότι σε αντιστοιχία με το K-box μοτίβο που βρίσκεται στο 3'UTR πολλών μεταγράφων υπάρχουν miRNAs που φέρουν την συμπληρωματική αλληλουχία uAUCACAG στο 5' άκρο τους. Η αλληλουχία αυτή χαρακτηρίζει τα μέλη μιας ολόκληρης οικογένειας. 4 μέλη από την οικογένεια K-box φαίνονται στην Εικόνα 3.

Η υποοικογένεια miR-2/miR-13 K-box στη *Drosophila*

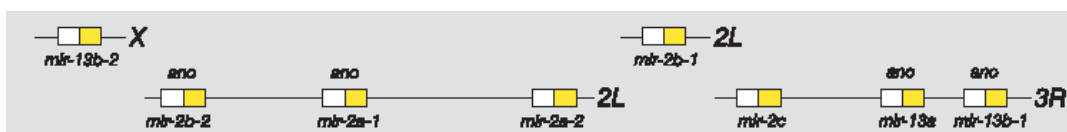
Τα μέλη 2 και 13 και τα παράλογα τους, της οικογένειας των K-box miRNAs, εμπίπτουν σε μια ξεχωριστή ομάδα miRNAs γνωστή ως υποοικογένεια miR-2/miR-13 K-box (Lai, 2002). Τα μέλη της, μοιράζονται ομολογία πέραν του K-box, σε

Πίνακας 1: Τα 8 μέλη της υποοικογένειας miR-2/miR-13 K-box και οι νουκλεοτιδικές διαφορές τους.

<i>miR-2a-1</i>	UAUCACAGCCAGCUUUGAUGAGCU
<i>miR-2a-2</i>	UAUCACAGCGAGCUUUGAUGAGCU
<i>miR-2b-1</i>	UAUCACAGCCAGCUUUGAGGAGCG
<i>miR-2b-2</i>	UAUCACAGCCAGCUUUGAGGAGCG
<i>miR-2c</i>	UAUCACAGCCAGCUUUGAUGGGC
<i>miR-13a</i>	UAUCACAGCCA <u>U</u> UUUGAUGAGU
<i>miR-13b-1</i>	UAUCACAGCCA <u>U</u> UUUGA <u>C</u> GAGU
<i>miR-13b-2</i>	UAUCACAGCCA <u>U</u> UUUGA <u>C</u> GAGU

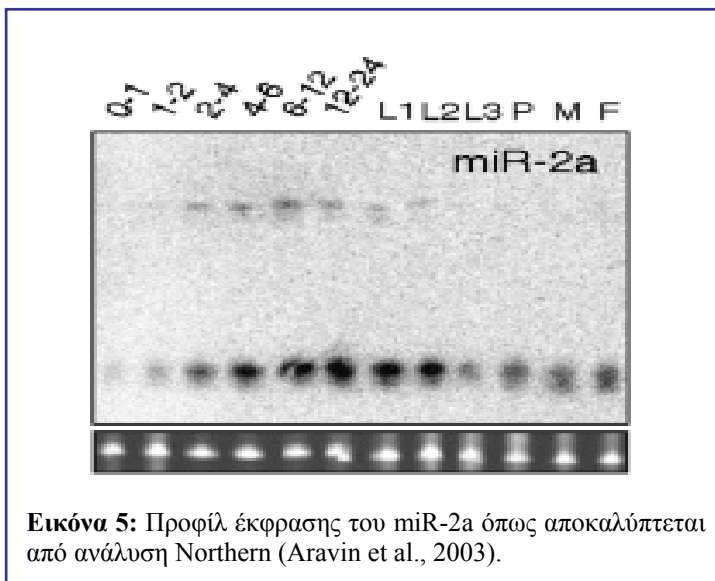
βαθμό που είναι πανομοιότυπα, με διαφορές σε 1 ή 2 νουκλεοτίδια. Τα γονίδια τους εντοπίζονται σε 4 περιοχές του γενώματος της *Drosophila* και 3 διαφορετικούς χρωμοσωμικούς βραχίονες. Έξι μέλη μοιράζονται σε 2

συστοιχίες και δύο γονίδια είναι μονήρη. Αντίθετα στο γένωμα του *Anopheles gambiae* βρίσκονται πέντε ορθόλογα μέλη τα οποία εντοπίζονται στην ίδια συστοιχία. Παρατηρείται λοιπόν εξελικτική απόκλιση μεταξύ *Drosophila* και *Anopheles* ως προς τα μέλη της υποοικογένειας miR-2/miR-13 K-box. Συγκεκριμένα τα αντίστοιχα γονίδια στη *Drosophila* έχουν υποστεί διπλασιασμό και διασπορά εντός του γενώματος το οποίο είναι αναμενόμενο με δεδομένο τον ταχύ εξελικτικό ρυθμό που χαρακτηρίζει οργανισμούς με μικρό κύκλο ζωής και πολλές γενεές (Lai et al., 2003; Aravin et al., 2003). Οι νουκλεοτιδικές διαφορές των 8 μελών καθώς και η διασπορά τους στο γένωμα φαίνονται στον Πίνακα 1 και στην Εικόνα 4, αντίστοιχα.



Εικόνα 4: Τα γονίδια των μελών της υποοικογένειας miR-2/miR-13 K-box και η διασπορά τους στο γένωμα της *Drosophila* (Lai et al., 2003)

Η τοπική και η χρονική έκφραση των μελών της υποοικογένειας miR-2/miR-13 K-box αποκαλύφθηκε από προσπάθειες κλωνοποίησης μικρών μορίων RNA από διάφορα αναπτυξιακά στάδια της *Drosophila* και από την κυτταρική σειρά S2 (Lagos-Quintana et al.,



2001; Aravin et al., 2003). Τα αποτελέσματα των εργασιών αυτών φαίνονται στους Πίνακες 2 και 3. Πρέπει να τονιστεί ότι δεν μπορεί να υπάρχει απόλυτη συσχέτιση μεταξύ της συχνότητας κλωνοποίησης ενός miRNA και της *in vivo* συγκέντρωσης του. Αυτό είναι ένα μειονέκτημα της διαδικασίας κλωνοποίησης. Επιπλέον πάντα αναζητείται τεκμηρίωση των κλωνοποιημένων miRNAs με μια Northern ανάλυση (Εικόνα 5). Για τα μέλη της συγκεκριμένης υποοικογένειας όμως, ένας ανιχνευτής ειδικός για το miR-2 προσδέεται σίγουρα και στο miR-13 δημιουργώντας σύγχυση στα αποτελέσματα.

Πίνακας 2: Συχνότητα κλωνοποίησης των μελών της υποοικογένειας miR-2/miR-13 K-box στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια και στα κύτταρα S2, σύμφωνα με Lagos-Quintana et al.

miRNA	Έμβρυο		προνύμφη		Νύμφη	Ενήλικα	S2
	0-3	0-6	1+2	3			
<i>miR-2b</i>	++	++	++	+++	++	+	+++
<i>miR-13a</i>	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++

Πίνακας 3: Συχνότητα κλωνοποίησης των μελών της υποοικογένειας miR-2/miR-13 K-box στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια σύμφωνα με Aravin et al.

miRNA	Έμβryo (ώρες)					Προνύμφη			Ενήλικα	Όρχεις	Σύνολο
	0-2	2-4	4-6	6-12	12-24	1	1+2	3			
<i>miR-2a-1</i>	3	3	2			1			4	2	15
<i>miR-2a-2</i>	3	3	2			1			4	2	15
<i>miR-2b-1</i>	4	1		2					5		12
<i>miR-2b-2</i>	3					1					4
<i>miR-2c</i>											0
<i>miR-13a</i>											0
<i>miR-13b-1</i>	3					1					4
<i>miR-13b-2</i>	3					1					4

Απαλοιφή των *miR-2* και *miR-13* από έμβρυα *Drosophila*

Με δεδομένο τον μεγάλο πλήθος των miRNAs και το μικρό τους μέγεθος η εύρεση μεταλλάξεων γι' αυτά δεν είναι στατιστικά πιθανή (Boutla et al., 2003). Στις σπάνιες περιπτώσεις που κάτι τέτοιο συνέβη, σπουδαίες ανακαλύψεις ήρθαν στο φως (Lee et al., 1993; Brennecke et al., 2003). Για τον παραπάνω λόγο επιχειρήθηκε αποτροπή των ενδογενών συγκεντρώσεων των *miR-2a* και *miR-13a* από την πρόσδεση στους φυσικούς τους στόχους. Αυτό έγινε δυνατό με την εισαγωγή σε έμβρυα *Drosophila*, μικροποσότητας DNA ολιγονουκλεοτιδίων απολύτως συμπληρωματικών προς τα miRNAs. Η μετέπειτα ανάλυση των φαινοτύπων του δερματίου αποκάλυψε σοβαρές αναπτυξιακές αλλοιώσεις. Πρόκειται για τρύπες στο δερματίδιο και αποδιοργανωμένες οδοντικές ζώνες (Boutla et al., 2003).

Παρατηρήθηκε ότι το αποτέλεσμα της απενεργοποίησης των *miR-2a* και *miR-13a* είναι πανομοιότυπο υποδηλώνοντας την ταύτιση των λειτουργιών τους. Η διαφορά τους κατά 1 νουκλεοτίδιο προφανώς δεν τα αποτρέπει από το να στοχεύουν τα ίδια μετάγραφα (Boutla et al., 2003). Οι αποδιοργανωμένες οδοντικές ζώνες πιθανώς είναι αποτέλεσμα διαταραχής της ρύθμισης γονιδίων που ελέγχουν την πολικότητα των μεταμεριδίων γνωστά ως segment polarity genes.

Εύρεση πιθανών γονιδίων-στόχων για τα *miR-2* και *miR-13*

Στην εργασία των Boutla et al, 2003 παρουσιάζεται μια πολύ έξυπνη προσέγγιση αναγνώρισης στόχων για miRNAs, που συνδυάζει πειραματικές δραστηριότητες και βιοπληροφορική. Συγκεκριμένα 2 cDNA βιβλιοθήκες από έμβρυα πρώιμου (4-8 h) και προχωρημένου (12-24 h) σταδίου υποβλήθηκαν σε PCR χρησιμοποιώντας ως εκκινητή το συμπληρωματικό προς το *miR-13a* ολιγονουκλεοτίδιο μαζί με ένα εκκινητή που προσδέεται στον πολυσυνδέτη του φορέα. Ο ειδικός για το σημείο πρόσδεσης του *miR-13a*, εκκινητής προσδέεται με απόλυτη συμπληρωματικότητα με τα 6-8 τελευταία νουκλεοτίδιά του, σε ένα πιθανό στόχο και έτσι επιτρέπεται η έναρξη της PCR. Τα προϊόντα που παρήχθησαν, κλωνοποιήθηκαν και κατόπιν αναγνώστηκε και αναγνωρίστηκε η αλληλουχία τους.

Πρόέκυψαν λοιπόν δεδομένα με γονίδια που στο 3'UTR τους είχαν πιθανές περιοχές αλληλεπίδρασης με το *miR-13a* και όλα τα παράλογά του. Στη συνέχεια και προκειμένου να τεκμηριωθούν οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις υπολογίστηκε η ελεύθερη ενέργεια συγκρότησης των υβριδίων miRNA:mRNA με τη βοήθεια ενός αλγορίθμου που προβλέπει την δευτεροταγή δομή νουκλεϊκών οξέων, γνωστό ως mfold (Zuker, 2003).

Από τη λίστα των πιθανών γονιδίων-στόχων επελέγη το *CG10222* το οποίο ανιχνεύτηκε από τη cDNA βιβλιοθήκη των εμβρύων πρώιμου σταδίου. Το 3'UTR του έχει μήκος 142 νουκλεοτιδίων και η περιοχή 11-34 νουκλεοτίδια μετά του κωδικού λήξης είναι πιθανώς στόχος αλληλεπίδρασης με το *miR-13b*, σύμφωνα με την πρόβλεψη του προγράμματος mfold. Με τη βοήθεια κατάλληλων εκκινητών και PCR εισήχθησαν μεταλλάξεις που βελτιώνουν ή αποτρέπουν την αλληλεπίδραση με το *miR-13b*. Έτσι φτιάχτηκαν 3 τροποποιημένες εκδόσεις για το 3'UTR. Η πρώτη (Mut1) περιέχει 2 σημειακές μεταλλαγές στο K-box που εξασθενούν την αλληλεπίδραση με το *miR-13b*, η δεύτερη (Mut2) καταστρέφει ολοκληρωτικά το K-box και η τρίτη (Mut3) μετατρέπει την περιοχή αλληλεπίδρασης σε πλήρως συμπληρωματικό στόχο.

Το αγρίου τύπου 3'UTR καθώς και οι 3 εκδόσεις του, κλωνοποιήθηκαν αμέσως μετά τη κωδική περιοχή του γονιδίου λουσιφεράση που μεταγράφεται από συστατικό υποκινητή ακτίνης (φορέας pGL3). Στη συνέχεια αυτές οι πλασμαδικές κατασκευές διεμόλυναν την κυτταρική σειρά S2, στην οποία εκφράζεται το *miR-13*. Κατόπιν

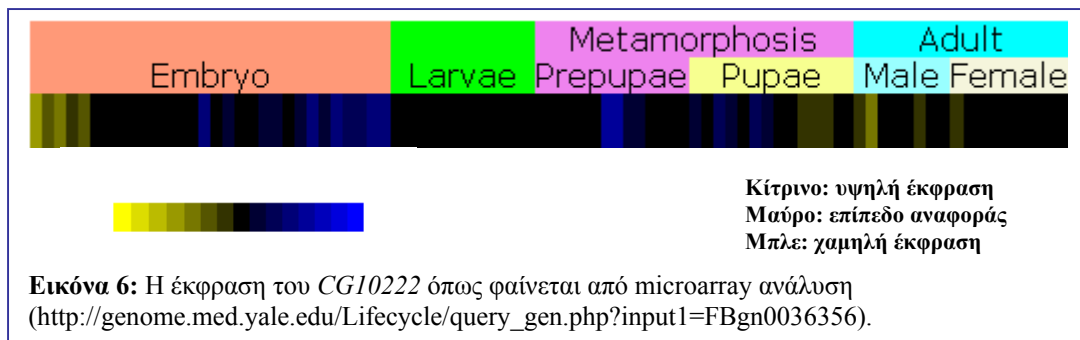
μετρήθηκε και κανονικοποιήθηκε η παραγωγή της λουσιφεράσης σε συνάρτηση με το γενετικό υπόβαθρο του 3'UTR που έφερε το γονίδιο της σε κάθε περίπτωση. Βρέθηκε ότι οι κατασκευές Mut1 και Mut2 παρήγαγαν περισσότερη λουσιφεράση σε σύγκριση με το αγρίου τύπου 3'UTR. Αυτό εξηγείται με την διαπίστωση ότι ο αποκλεισμός του *miR-13b* από τα σημεία αλληλεπίδρασης οδηγεί σε αναστολή της παρεμπόδισης της μετάφρασης. Αντίθετα η κατασκευή Mut3 παράγει λιγότερη πρωτεΐνη προφανώς γιατί το μετάγραφο γίνεται στόχος του μονοπατιού της ενδονουκλεόλυσης. Η παραπάνω πειραματική προσέγγιση αποδεικνύει ικανοποιητικά την αλληλεπίδραση μεταξύ *miR-13b* και γονιδίου *CG10222*.

Το γονίδιο CG10222

Το γονίδιο *CG10222* είναι ένα ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο, καταχωρημένο στις βάσεις δεδομένων αλληλούχισης του γενώματος της *Drosophila*, με όχι εξακριβωμένη ακόμα δράση (Flybase ID: FBgn0036356). Βρίσκεται στον αριστερό βραχίονα του χρωμοσώματος 3 και συνίσταται από ένα μόνο εξόνιο. Το *CG10222* εκφράζεται σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια αλλά εντονότερα στο στάδιο του πρώιμου εμβρύου και στα νεαρά αρσενικά ενήλικα άτομα (Εικόνα 3). Παράγει μετάγραφα 924 νουκλεοτιδίων που κωδικεύουν μια πρωτεΐνη 306 αμινοξέων και μοριακού βάρους 39,7 kDa.

Παρόλο που η λειτουργία της πρωτεΐνης είναι άγνωστη, η ανάλυση της στερεοδιάταξης φανερώνει ότι ανήκει στην υπερικογένεια των P-loop πρωτεϊνών και διαθέτει καταλυτικές περιοχές υδρόλυσης τρινουκλεοτιδίων. Πρόσφατα κατασκευάστηκε ένας τεράστιος χάρτης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων για τη *Drosophila* που βασίζεται στο σύστημα των δύο υβριδίων. Σύμφωνα με αυτό η πρωτεΐνη *CG10222* φαίνεται να αλληλεπιδρά με τις *CG3704* και *CG32683* (Giot et al., 2003). Η πρώτη λειτουργεί ως ATPάση και GTPάση, έχει δηλαδή ανάλογο ρόλο με την *CG10222*, ενώ η δεύτερη είναι ένας κυτταρικός υποδοχέας συζευγμένος με το σύστημα των G-πρωτεϊνών. Το παραπάνω παρέχει ενδείξεις για πιθανή συμμετοχή της πρωτεΐνης *CG10222* σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος.

Παρόμοιες με το *CG10222* αλληλουχίες, έχουν βρεθεί στο *Arabidopsis thaliana*, το νηματώδη *Caenorhabditis elegans*, τον άνθρωπο και το σακχαρομύκητα.



Enhanced Green Fluorescent Protein

Η μελέτη και η αξιοποίηση της GFP δίνει μια τεράστια ώθηση στη βιολογική έρευνα. Η GFP κυριαρχεί ανάμεσα σε άλλα συστήματα σήμανσης υποκυτταρικών δομών, πρωτεϊνών ή αισθητήρων-γονιδιακής έκφρασης, για μια σειρά από ξεχωριστά χαρακτηριστικά. Είναι μικρή, μόλις 27 kDa, μονομερής, σταθερή, ανεξάρτητη από οποιοδήποτε συμπάγοντα και μπορεί να εκφραστεί σε σχεδόν οποιοδήποτε οργανισμό. Απομονώθηκε από τον οργανισμό *Aequorea victoria* και έκτοτε με μεταλλαξιγένεση προέκυψαν παραλλαγές της με βελτιωμένα χαρακτηριστικά. Μια από αυτές, η EGFP (Enhanced-GFP) προκύπτει με 2 αμινοξικές υποκαταστάσεις (Phe-64 σε Leu και Ser-65 σε Thr) με τις οποίες επιτυγχάνεται εντονότερος φθορισμός. Παράλληλα έχουν προστεθεί σιωπηλές μεταλλάξεις και ρυθμιστικά στοιχεία ενίσχυσης της μετάφρασης με τα οποία εξασφαλίζεται ισχυρότερη έκφραση σε ευκαρυωτικά κύτταρα (ανασκόπηση σε Tsien, 1998; Verkhusha και Lukyanov, 2004). Η χρησιμοποίηση της GFP ως ένα σύστημα παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο αποδείχθηκε πολύτιμη για την διαλεύκανση άγνωστων λεπτομερειών του μηχανισμών RNA σίγησης σε φυτικούς οργανισμούς, *Drosophila* και *Caenorhabditis*.

Σκοπός της εργασίας

Τα πειράματα στην κυτταρική σειρά S2 αναδεικνύουν το γονίδιο *CG10222* ως στόχο μετα-μεταγραφικής ρύθμισης από τουλάχιστον ένα miRNA της υποοικογένειας K-box miR-2/miR-13. Σκοπός αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η τεκμηρίωση της παραπάνω παρατήρησης και σε επίπεδο οργανισμού.

Αρχικά κατασκευάστηκαν πλασμίδια-αισθητήρες που παράγουν από συστατικό υποκινητή τουμπουλίνης την πρωτεΐνη EGFP μαζί με το αγρίου τύπου 3'UTR του γονιδίου *CG10222*, τις 3 τροποποιημένες εκδοχές του καθώς και το 3'UTR του ιού SV40. Στη συνέχεια οι κατασκευές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή σταθερών διαγονιδιακών σειρών *Drosophila*. Το συστατικά παραγόμενο μετάγραφο της EGFP βρέθηκε κάτω από τον μετα-μεταγραφικό έλεγχο που ορίζουν τα ρυθμιστικά στοιχεία του 3'UTR που θα φέρει κάθε φορά. Παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης της, στις περιπτώσεις του αγρίου τύπου 3'UTR και αυτού που φέρει το πλήρως συμπληρωματικό μοτίβο. Αντίθετα στα τροποποιημένα στην περιοχή του K-box 3'UTR, η παρεμπόδιση της μετάφρασης αναστάλθηκε με συνέπεια την πιο έντονη έκφραση της EGFP. Το 3'UTR του ιού SV40 εξυπηρέτησε σκοπούς μάρτυρα καθώς δεν αντιδρά με οποιοδήποτε miRNA της *Drosophila*.

Η ανάλυση του φθορισμού της EGFP σε διάφορους ιστούς και αναπτυξιακά στάδια απέδωσε στοιχεία για την τεκμηρίωση της αλληλεπίδρασης μεταξύ *miR-13b* και *CG10222*. Επιπροσθέτως η σειρά από το τροποποιημένο 3'UTR που είναι απολύτως συμπληρωματικό προς το ενδογενές *miR-13b* έδρασε ως αισθητήρας της τοπικής και χρονικής έκφρασης του, γιατί είναι παρόν όπου απουσιάζει η EGFP.

Παράλληλα εφαρμόστηκε *in situ* υβριδοποίηση προκειμένου να ανακαλυφθεί το προφίλ έκφρασης του γονιδίου *CG10222* και επιδιώχθηκε γονιδιακή σίγηση εναντίον του για να διαπιστωθεί η λειτουργία του.

Υλικά και μέθοδοι

Θρεπτικά υλικά

Για την ανάπτυξη του βακτηρίου *Escherichia coli* στέλεχος JM83 χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο LB (Luria-Bertani) η σύσταση του οποίου είναι: 0,5% εκχύλισμα ζύμης, 1% τρυπτόνη, 0,5% NaCl και 1,5% άγαρ (Sambrook et al., 1989).

Στελέχη βακτηρίων και πλασμιδιακοί φορείς

Το στέλεχος JM83 $\{F^+ara \Delta(lac-proAB) rpsL(Str^+) [\phi 30dlac\Delta(lacZ)M15] thi\}$ χρησιμοποιήθηκε για όλα τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που κατασκευάστηκαν (Yanisch-Perron et al., 1985). Πρόκειται για ένα στέλεχος με ταχεία ανάπτυξη που επιτρέπει τη χρήση πλασμιδιακών φορέων με σύστημα επιλογής *LacZ* (διακοπή του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης).

Στις πλασμιδιακές κατασκευές χρησιμοποιήθηκαν οι εξής φορείς.

- pBluescript KS⁺
- pT20 που αποτελεί μια τροποποιημένη έκδοση του φορέα pT3T7,
- pGEM T-Easy (Promega)
- pCaSpeR4/Tub-EGFP

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Απομόνωση πλασμιδίων από υγρές καλλιέργειες των 2 ml

Υγρές καλλιέργειες *E. coli* επωάζονται με το κατάλληλο αντιβιοτικό για 14-16 ώρες στους 37° C, με συνεχή ανακίνηση. 1,5 ml της καλλιέργειας φυγοκεντρείται στις 12.000 στροφές για 2 λεπτά και η πελέτα των κυττάρων επανναδιαλύεται με vortex σε 100 μl από κρύο διάλυμα I. Κατόπιν προστίθενται 200 μl διαλύματος II και μετά από ήπια ανάμιξη το μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.

Ακολουθεί πρόσθεση 150 μl διαλύματος III, ήπια ανάδευση και επώαση στον πάγο για 3-5 λεπτά. Αμέσως μετά, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 12.000 στροφές για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο πλένεται μια φορά με ίσο όγκο (450μl) διαλύματος ουδέτερης φαινόλης και μια φορά με ίσο όγκο διαλύματος χλωροφορμίου ισοαμλικής αλκοόλης (24:1). Στη συνέχεια το πλασμιδιακό DNA ιζηματοποιείται με 2,5 όγκους απόλυτης αιθανόλης και φυγοκέντριση στις 12.000 στροφές, για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά η πελέτα του DNA πλένεται με 1 ml διαλύματος 70% αιθανόλης και φυγοκεντρείται για 6 -7 λεπτά στις ίδιες συνθήκες όπως παραπάνω. Τελικώς η πελέτα του DNA επανναδιαλύεται σε 30 μl αποσταγμένου νερού αφού πρώτα στεγνώσει για 10-20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Τα διαλύματα I, II και III συνίστανται από τις παρακάτω ουσίες:

- **Διάλυμα I:** 50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA pH 8.
- **Διάλυμα II:** 0,2 N NaOH, 1% SDS.
- **Διάλυμα III:** 3 M CH₃COOK, 11,5% καθαρό CH₃COOH

Απομόνωση πλασμιδίων από υγρές καλλιέργειες των 100 mL

Προκειμένου να απομονωθεί DNA σε μεγάλη ποσότητα, με υψηλή καθαρότητα χρησιμοποιήθηκαν στήλες QIAGEN-tip 100 μαζί με τα ανάλογα διαλύματα που παρέχονται από την εταιρεία Qiagen.

Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

DNA που έχει κοπεί με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης. Στη συνέχεια κόβεται με προσοχή η ζώνη που πρόκειται να απομονωθεί, κάτω από το UV, τοποθετείται σε σωληνάκι erpendorf και ζυγίζεται. Κάθε mg αντιστοιχίζεται σε όγκο 1 μl. Κατόπιν ακολουθείται το πρωτόκολλο που προβλέπει το σύστημα “BIO101 GENE CLEAN” της εταιρείας Q-BIOgene. Οι κατάλληλες τροποποιήσεις υιοθετούνται για περιπτώσεις απομόνωσης κομματιών DNA μικρότερων από 200 νουκλεοτίδια.

Παρασκευή διαλύματος ουδέτερης φαινόλης

Σε σκοτεινό δοχείο προστίθενται 500g στερεής φαινόλης, 125ml χλωροφόρμιο, 150ml διάλυμα TEMS (10mM EDTA pH 8, 100mM NaCl, 100mM Tris-Cl pH 7,5-8) και 0,5g 8-υδροξυκινολίνη. Το μίγμα αναδεύεται μέχρι όλα τα στερεά στοιχεία να διαλυθούν και κατόπιν πλένεται 2 φορές με διάλυμα 0,1M Tris-Cl και pH 8.

Παρασκευή δεκτικών κυττάρων

Αρχικά επωάζονται 5ml υγρής καλλιέργειας *E. coli* του στελέχους JM83 σε θρεπτικό μέσο LB για 14-16 ώρες. Κατόπιν 100 ml LB που φυλάσσονται σε φιάσκα των 2 L μολύνονται με 1 ml της προηγούμενη φρέσκιας καλλιέργειας. Ακολουθεί επώαση με ισχυρή ανάδευση στους 37° C μέχρι η οπτική απορρόφηση στα 600 nm να είναι μεταξύ 0,6 και 0,8. Για αυτό απαιτούνται περίπου 2-3 ώρες. Στη συνέχεια η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 2500 στροφές, στους 4° C, για δέκα λεπτά. Κατόπιν απορρίπτεται το υπερκείμενο και η βακτηριακή πελέτα επανναδιαλύεται με προσοχή και υπομονή σε 30ml διαλύματος TfbI χωρίς vortex και τοποθετείται στον πάγο. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 30' και φυγοκέντριση των κυττάρων στις 2000 στροφές για 10' στους 4° C. Τέλος τα κύτταρα επανναδιαλύονται σε 4 ml διαλύματος TfbII, μοιράζονται σε 40 erpendorf (100μl το καθένα) και ψύχονται σε υγρό άζωτο πριν αποθηκευτούν στους -80° C.

Τονίζεται ότι σε όλα τα στάδια χειρισμού των κυττάρων, αυτά δεν παραμένουν για περισσότερο από ένα λεπτό εκτός του πάγου. Πριν χρησιμοποιηθούν σε πρωτόκολλα μετασχηματισμού, ελέγχεται η δεκτικότητά τους με 100 pg ενός κοινού υπερ-ελικωμένου πλασμιδίου.

Τα διαλύματα TfbI και TfbII συνίστανται από τις παρακάτω ουσίες:

- **Tfb I:** 30 mM CH₃COOK, 50 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 10 mM CaCl₂ και 15% γλυκερόλη.
- **Tfb II:** 10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl και 15% γλυκερόλη.

Κλωνοποίηση

Κατά τις διαδικασίες παραγωγής ανασυνδυασμένων πλασμιδίων χρησιμοποιούνται τα παρακάτω ένζυμα: *Bam*HI, *Xba*I, *Not*I, *Acc*I και *Xho*I (Minotech, Biolabs) μαζί με τα κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα. Όλοι οι κομμένοι φορείς και τα ενθέματα καθαρίζονται με το σύστημα BIO101 GENE CLEAN (Q-BIOgene) και σε όσες κλωνοποιήσεις ο φορέας κόβεται με ένα ένζυμο προστίθεται το ένζυμο CIP (Biolabs) για την απομάκρυνση των φωσφορικών ομάδων. Τέλος σε κάθε αντίδραση σύνδεσης δεν χρησιμοποιούνται περισσότερα από 100 μg φορέα. Για όλα τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που κατασκευάζονται υπάρχουν καλλιέργειες σε 12% γλυκερόλη, αποθηκευμένες τους -80°C.

Αντίδραση σύνδεσης (ligation)

Πρόκειται για την αντίδραση συγκόλλησης μορίων DNA με συνεκτικά ή τυφλά άκρα. Η αντίδραση γίνεται σε όγκο 10 μl και περιέχει κομμάτια πλασμιδιακού φορέα με κομμάτια ενθέματος σε μοριακή αναλογία 1:3 έως 1:5, ανάλογα με το βαθμό δυσκολίας και γATP σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Προστίθενται 10 μονάδες από το ένζυμο λιγάση του φάγου T4 (Minotech ή Promega) μαζί με τα κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα (Biolabs, Promega). Το μίγμα επωάζεται για 3 ώρες στους 16°C.

Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων

Τα σωληνάκια που περιέχουν τα δεκτικά κύτταρα μεταφέρονται από τους -80 °C, που φυλάσσονται, σε πάγο προκειμένου να ξεπαγώσουν. Στη συνέχεια προστίθεται το ένα τρίτο του όγκου της αντίδρασης σύνδεσης DNA ή εναλλακτικά 100 μg υπερελικωμένου πλασμιδίου. Ακολουθεί ήπια ανάμιξη. Το μίγμα επωάζεται στον πάγο για περίπου 20'. Έπεται θερμικό σοκ με μεταφορά στους 42 °C για περίπου 80'' και απότομη μεταφορά σε πάγο για 5 λεπτά. Κατόπιν προστίθενται σε ασηπτικές συνθήκες 800-900 μl θρεπτικό μέσο LB χωρίς αντιβιοτικό και το μίγμα επωάζεται

στους 37 ° C για 45 λεπτά. Κατόπιν τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται για μισό λεπτό σε 12.000 στροφές, επαναδιαλύονται σε 100 μl LB και επιστρώνονται σε στερεό θρεπτικό μέσο με τα κατάλληλα αντιβιοτικά και υποστρώματα επιλογής.

***In vitro* μεταγραφή RNA σε μεγάλες ποσότητες**

Πρόκειται για την αντίδραση παραγωγής RNA από DNA. Ως μήτρα χρησιμοποιείται το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που περιέχει το φαγικό υποκινητή T3 ή T7, το ένθεμα που θα μεταγραφεί και μια θέση περιορισμού πιο πέρα, επί της οποίας θα γίνει πέψη στο πλασμίδιο ώστε να είναι γραμμικό. Στο μίγμα της αντίδρασης βρίσκονται τα εξής: 5-6 μg DNA μήτρα, ρυθμιστικό διάλυμα RNA πολυμεράσης (HT), 10 mM διθειοθρεϊτόλη, rATP, rCTP, rGTP, rUTP (SIGMA) σε τελική συγκέντρωση 1,5 mM, 30 μονάδες αναστολέα RNAsών (HT), 150 μονάδες T3/T7 RNA πολυμεράση (Mitotech, HT) και νερό μέχρι τα 100 μl. Το μίγμα επωάζεται για 2 ώρες στους 37°C και κατόπιν προστίθενται 50 μονάδες ενζύμου για ακόμη μισή ώρα. Μετά αφαιρείται η DNA μήτρα με 30 μονάδες ενζύμου DNAάση (Biolabs) για 15-25 λεπτά. Τελικά το μίγμα καθαρίζεται με εκχυλίσες φαινόλης/χλωροφορμίου, ιζηματοποιείται με απόλυτη αιθανόλη, πλένεται με 70% αιθανόλη, επαναδιαλύεται σε 50 μl αποστειρωμένο νερό και αποθηκεύεται στους -20°C.

Προκειμένου να προετοιμαστεί διάλυμα δίκλωνου RNA σε συγκέντρωση 5 μM απαιτείται η παραγωγή, με την παραπάνω μέθοδο, RNA θετικής και αρνητικής πολικότητας. Αφού προσδιοριστεί φωτομετρικά η απόδοση της κάθε αντίδρασης 100 pmol από καθένα προστίθενται σε τελικό όγκο 20 μl, το μίγμα θερμαίνεται στους 95°C για 2 λεπτά και αφήνεται να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου σταδιακά (30 λεπτά). Κατόπιν αποθηκεύεται στους -20°C.

RNAi* σε έμβρυα *Drosophila

Δίκλωνο RNA συγκέντρωσης 5 μM μεταφέρεται με ένεση στο οπίσθιο τμήμα εμβρύων *Drosophila* αναπτυξιακού σταδίου 30 λεπτών. Μετά από 48 ώρες

συλλέγονται τα έμβρυα όπου η ανάπτυξη τους έχει διακοπεί, μεταφέρονται σε γυάλινο σωλήνα που περιέχει επτάνιο και πλένονται επί 2 φορές για 10 λεπτά, με έντονη ανακίνηση. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε ένα μικρό πιάτο Petri που περιέχει 1 X PBS (1,86 mM NaH₂PO₄, 8,41 mM Na₂HPO₄, 175 mM, NaCl, pH 7,4) και παραμένουν εκεί μέχρι να εξατμιστεί το επτάνιο. Μετά και αφού τα έμβρυα ξεπλυθούν με νερό, τοποθετούνται με ένα μικρό πινέλο σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Απομακρύνεται το νερό και προστίθενται 45-50 μl διαλύματος Hoyers. Τοποθετείται η καλυπτρίδα και το παρασκεύασμα επωάζεται για 24 ώρες σε θερμοκρασία 65-70°C. Το διάλυμα Hoyers και η θερμοκρασία συμμετέχουν στη λύση όλων των μαλακών τμημάτων των εμβρύων αφήνοντας μόνο ένα σκληρό δερματίδιο (cuticle). Τελικώς το παρασκεύασμα σφραγίζεται με σιλβωτικό νυχιών και παρατηρείται στο μικροσκόπιο.

In situ* υβριδοποίηση σε έμβρυα *Drosophila melanogaster

Παραγωγή ιχνηθετών

Αρχικά παράγεται RNA θετικής και αρνητικής πολικότητας με όλες τις ουριδίνες του σημασμένες με διγοξιγενίνη. Σε 20 μl αντίδρασης περιέχονται 2 μg γραμμικό πλασμίδιο-μήτρα κομμένο με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού, ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης (HT), 10 mM διθειοθρεϊτόλη, 2 μl από το μίγμα νουκλεοτιδίων που παρέχεται από την εταιρεία Roche, 10 μονάδες αναστολέα RNάσης (HT) και 50 μονάδες RNA πολυμεράση (Minotech, HT). Το μίγμα επωάζεται στους 37°C για 2 ώρες και ύστερα απομακρύνεται το DNA με 10 μονάδες DNάση (Biolabs) για 15 λεπτά. Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη 2 μl EDTA 0,2 M pH 8. Στη συνέχεια το RNA ιζηματοποιείται με 2,5 μl LiCl 4M, 2,5 όγκους παγωμένης απόλυτης αιθανόλης, παραμονή στους -70°C για 20 λεπτά και φυγοκέντριση στις 13.000 στροφές για 15 λεπτά. Η πελέτα που προκύπτει ξεπλένεται με 70% αιθανόλη, επαναδιαλύεται σε 30-50 μl αποστειρωμένο νερό και αποθηκεύεται στους -20 ή -80°C.

Dot blot

Με την dot blot ανάλυση ελέγχεται η επιτυχία ενσωμάτωσης ουριδινών σημασμένων με διγοξιγενίνη στους ιχνηθέτες. Ο ανιχνευτής και το RNA αναφοράς (Roche) αραιώνονται 10 και 100 φορές σε φρέσκο διάλυμα 10X SSC (1,5 M NaCl και 0,15M κιτρικό νάτριο, pH 7), φορμαλδεΰδης και νερού (αναλογία 5:3:2), τοποθετούνται σε Nylon μεμβράνη και εκτίθενται σε 30 mJ υπεριώδους ακτινοβολίας. Ακολουθούν πλύσεις με ανακίνηση με τα εξής διαλύματα:

- 2-3 λεπτά στο διάλυμα I (100 mM Tris-Cl pH 7,5 και 150 mM NaCl)
- 30 λεπτά στο διάλυμα I με 0,5% παρεμποδιστικού αντιδραστηρίου (Boehringer Mannheim)
- 5 λεπτά στο διάλυμα I
- 15 λεπτά στο διάλυμα I που περιέχει αντίσωμα έναντι διγοξιγενίνης συζευγμένο με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση, με αραιώση 1/5000
- 2 φορές από 15 λεπτά στο διάλυμα I
- 2 λεπτά στο διάλυμα IV (100 mM Tris-Cl pH 9,5 και 100 mM NaCl)
- 10 λεπτά, χωρίς ανακίνηση, στο σκοτάδι με διάλυμα IV που περιέχει τα υποστρώματα (BCIP, NBT) της αλκαλικής φωσφατάσης
- 5 λεπτά στο διάλυμα I για τη διακοπή της αντίδρασης

Η ποιότητα του ανιχνευτή καθορίζεται από το αποτέλεσμα του dot blot. Η Roche προβλέπει ενσωμάτωση μέχρι 37% του συνόλου των ουριδινών του RNA ανιχνευτή.

Προετοιμασία και υβριδοποίηση εμβρύων

Έμβρυα συλλέγονται από το ζητούμενο αναπτυξιακό στάδιο και αποχωριώνονται. Τοποθετούνται σε γυάλινο σωλήνα που περιέχει ίσους όγκους επτανίου και διαλύματος μονιμοποίησης (4% φορμαλδεΰδη σε 1X PEM) και ανακινούνται ήπια για 15 λεπτά. Κατόπιν αφαιρείται η υδάτινη φάση (διάλυμα μονιμοποίησης) και προστίθενται μεθανόλη σε ίσο ή λίγο μικρότερο όγκο. Το μίγμα ανακινείται βίαια για μισό λεπτό. Με αυτή την κατεργασία τα έμβρυα αποχωρίζονται τις βιτελλινικές μεμβράνες που παραμένουν στη μεσόφαση, ενώ τα ίδια

καταβυθίζονται. Στη συνέχεια μεταγγίζονται σε erpendorf των 2 ml και πλένονται με τα παρακάτω διαλύματα.

- 5 λεπτά σε διάλυμα 700 μl μεθανόλη/ 300 μl 1X PBS
- 5 λεπτά σε διάλυμα 500 μl μεθανόλη/ 500 μl 1X PBS
- 5 λεπτά σε διάλυμα 300 μl μεθανόλη/ 700 μl 1X PBS
- 20 λεπτά σε διάλυμα FP (3,7% φορμαλδεΰδη σε 1X PBS)

Στο σημείο αυτό τα έμβρυα μπορούν να αποθηκευτούν στους -20°C για αρκετά χρόνια.

Τα στάδια που ακολουθούν συνίσταται να γίνουν σε περιβάλλον ελεύθερο RNAσών. Τα έμβρυα πλένονται ανακινούμενα 3 φορές για 5 λεπτά με διάλυμα PTw (0,1% Tween σε 1X PBS), 1 φορά για 30 λεπτά με διάλυμα απορρυπαντικού και 7 (!) φορές για 5 λεπτά με PTw.

Ακολουθεί πλύση με ίσο όγκο διαλυμάτων SDS-Hyb (διάλυμα υβριδοποίησης με 0,3% SDS) / PTw για 10 λεπτά και στη συνέχεια με SDS-Hyb για ακόμα 10. Στη συνέχεια το SDS-Hyb θερμαίνεται στους 95°C για 2 λεπτά, μεταφέρεται απότομα σε πάγο παραμένοντας για 1 λεπτό και χρησιμοποιείται για την προ-υβριδοποίηση των εμβρύων για 1 ώρα, στους 65°C . Σε 400 μl διαλύματος SDS-Hyb προστίθενται 600 ng RNA ιχνηθέτη, θερμαίνονται και ψύχονται απότομα σε πάγο και με αυτά υβριδοποιούνται τα έμβρυα στους 65°C , για όλη τη νύχτα.

Την επόμενη μέρα, τα έμβρυα πλένονται με φρέσκο διάλυμα SDS-Hyb, για 20 λεπτά και ακολουθεί σειρά πλύσεων, δις, στους 65°C με 10 λεπτά ανακίνηση και 10 λεπτά ανάπαυση με:

- 80% διάλυμα Hyb/ 20% PT
- 50% διάλυμα Hyb/ 50% PTw
- 20% διάλυμα Hyb/ 80% PTw
- 100% PTw

Ακολουθούν 2 πλύσεις σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα PBT (0,1% BSA και 0,1% Triton X-100 σε 1X PBS), για 20 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται το ειδικό έναντι της διγοξιγενίνης αντίσωμα (Roche), συζευγμένο με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση, σε αραιώση 1:2000 σε 400 μl διαλύματος PBT, για 1 ώρα με ήπια ανάδευση. Έπεται πλύση από το αντίσωμα με διάλυμα PBT 4 φορές για 20 λεπτά, επώαση 3 φορές, για 5 λεπτά στο διάλυμα IV (100 mM Tris-Cl pH 9,5 και 100 mM NaCl) και προσθήκη των υποστρωμάτων BCIP/NBT (Promega) της αλκαλικής

φωσφατάσης. Η αντίδραση πραγματοποιείται στο σκοτάδι όπου το σήμα εμφανίζεται μεταξύ 5 και 240 λεπτών. Αυτό εξαρτάται από την ποσότητα έκφρασης του RNA-στόχου. Η αντίδραση διακόπτεται με πλύσεις σε διάλυμα PBT. Ακολουθεί μεταφορά σε διάλυμα 50% γλυκερόλης για 2 ώρες και κατόπιν σε διάλυμα 70%. Τελικώς τα έμβρυα τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρο πλάκα, προστίθεται καλυπτρίδα και αποθηκεύονται στους -20°C .

Πρέπει να τονιστεί ότι η διαδικασία προβλέπει τη χρήση RNA ιχνηθέτη συμπληρωματικού προς το RNA στόχο (αρνητική πολικότητα) καθώς και RNA ιχνηθέτη θετικής πολικότητας για τον έλεγχο του θορύβου. Σημειώνεται ότι ο λόγος σήματος προς θόρυβο μειώνεται ικανοποιητικά με περαιτέρω αραίωση του ιχνηθέτη στο διάλυμα υβριδοποίησης (SDS-Hyb).

- **Διάλυμα απορρυπαντικού:** 1% SDS, 0,5% Tween, 50mM Tris-Cl, 1mM EDTA pH 8 και 150 mM NaCl
- **Διάλυμα υβριδοποίησης:** 50% φορμαμίδιο, 5X SSC (0,75 M NaCl και 0,075 M κιτρικό νάτριο, pH 4,5), 0,1% Tween, 0,3% SDS, 100 µg/ml μονόκλωνο DNA

Στελέχη *Drosophila melanogaster* κ' φορείς μετασχηματισμού

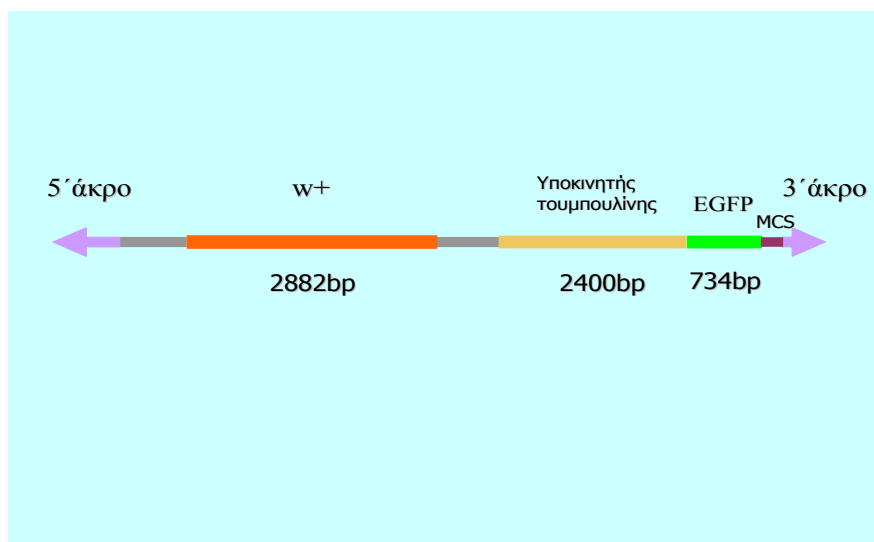
Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται τα στελέχη *Drosophila* που χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό και την ομοζυγοποίηση.

Πίνακας 4: Περιγραφή εργαστηριακών στελεχών *Drosophila*.

Όνομα στελέχους	Γενετικοί δείκτες	Φαινότυπος
<i>yw</i>	<i>y,w</i>	κίτρινο σώμα, λευκά μάτια
<i>yw_i; CyO*/Sco</i>	<i>Cy/Sco</i>	σγουρά φτερά/ πλήρης ή μη, έλλειψη σμηρρίγων από τον νωτιαίο θώρακα (με γενετικό υπόβαθρο: κίτρινο σώμα-λευκά μάτια)
<i>yw_i; TM3*/TM6B*</i>	<i>Sb/Hu, Tb</i>	Κοντές θωρακικές σμήριγγες/ 5-6 σμήριγγες στον προθώρακα, κοντόχοντρο σώμα (με γενετικό υπόβαθρο: κίτρινο σώμα-λευκά μάτια)
<i>FM7*/DC701</i>	<i>B, w^a/y⁺, w⁺</i>	Νεφροειδές μάτι/ κόκκινου χρώματος

* υπογραμμισμένο κωμόσπωμα

Για το μετασχηματισμό του στελέχους *yw* της *Drosophila* χρησιμοποιείται ένα ελλειμματικό μεταθετό στοιχείο, που διατηρεί την ικανότητα να μετατίθεται μόνο όταν του παρέχεται το ένζυμο τρανσποζάση. Εντός του, έχει κλωνοποιηθεί με κατεύθυνση 5' προς 3' άκρο, ένας συστατικής δραστηριότητας υποκινητής τουμπουλίνης, το γονίδιο για την πρωτεΐνη EGFP και μια περιοχή πολυσυνδέτη. Αριστερά του υποκινητή βρίσκεται το γονίδιο w^+ με το δικό του υποκινητή, που είναι ο γενετικός δείκτης με τον οποίο αναγνωρίζονται τα μετασχηματισμένα άτομα, αφού προσδίδει φαινότυπο «κόκκινα μάτια». Τα παραπάνω φαίνονται και στην εικόνα που ακολουθεί.



Εικόνα 7: Τροποποιημένο τρανσποσόνιο, κατάλληλο για την παραγωγή GFP-*Drosophilas*.

Το ανασυνδυασμένο τρανσποσόνιο είναι κλωνοποιημένο σε ένα πλασμιδιακό φορέα (pUC) και όλη η κατασκευή είναι γνωστή με το όνομα pCaSpeR4/Tub-EGFP. Στο εξής η κατασκευή pCaSpeR4/Tub-EGFP θα αναφέρεται ως pCaSpeR4, για λόγους απλοποίησης. Ο φορέας αυτός τοποθετείται με ένεση στο οπίσθιο τμήμα των εμβρύων συγχρόνως με ένα «αρωγό» φορέα (p π 25.7wc Δ 2-3), ο οποίος παράγει τρανσποζάση από ένα μεταθετό στοιχείο που δεν δύναται να μετατεθεί γιατί έχει κατεστραμμένα άκρα. Για τον επιτυχή μετασχηματισμό της *Drosophila*

παρασκευάζεται διάλυμα ένεσης που περιέχει 0,1 mM Na₂PO₄ pH 7,8, 5 mM KCl, 300-400 ng/μl pCaSpeR4 και 80-120 ng/μl pΔ(2,3).

Μετασηματισμός και παραγωγή σταθερών ομόζυγων σειρών στη *Drosophila melanogaster*

Μικροποσότητα από το διάλυμα ένεσης μεταφέρεται στο οπίσθιο τμήμα αποχωριωμένων εμβρύων *Drosophila*, γονοτύπου *yw* και αναπτυξιακού σταδίου 30-90 λεπτά. Το σημείο αυτό αποτελεί τον τόπο σχηματισμού των πολικών κυττάρων που είναι τα αρχέγονα γαμετικά. Τα έμβρυα είναι καλυμμένα με ειδικό λάδι (halocarbon oil, SIGMA) και φυλάσσονται σε τρυβλίο με υγρασία για 48 ώρες στους 25 °C. Σε χρονικό σημείο 24 και 48 ωρών συλλέγονται όσες προνύμφες εκκολαφθούν και μεταφέρονται σε θρεπτικό υλικό. Από τις ενήλικες μύγες που θα εκδυθούν, κάποιες φέρουν γαμετικά κύτταρα που είναι φορείς της ένθεσης του μεταθετού στοιχείου. Το μεταθετό στοιχείο φέρει το 'ξένο' DNA, που ζητείται να εισαχθεί και το γονίδιο-μάρτυρα *w*⁺ που προσδίδει φαινότυπο «κόκκινα μάτια».

Προκειμένου να διαπιστωθεί ποιες από τις μύγες έχουν μετασηματισμένα γενετικά κύτταρα, γίνεται διασταύρωση με μύγες *yw*. Στους απογόνους αυτής της διασταύρωσης αναζητούνται μύγες με κόκκινα μάτια. Αυτές θα είναι ετερόζυγες για το διαγονίδιο και στην καλύτερη περίπτωση φορείς μιας μόνο ένθεσης. Για να ελεγχθεί το τελευταίο, προετοιμάζεται δεύτερη διασταύρωση με *yw* μύγες και ελέγχεται η τήρηση ή μη της αναλογίας 1:1 στους απογόνους. Κατ' αυτή τη διασταύρωση θα διαπιστωθεί επίσης, το ενδεχόμενο η ένθεση να έγινε στο χρωμόσωμα X.

Στη συνέχεια οι ετερόζυγες μύγες πρέπει να περάσουν από το στάδιο της εξισορρόπησης το οποίο είναι ο ασφαλής τρόπος παραγωγής ομόζυγων σειρών, χωρίς το κίνδυνο δράσης φαινομένων γενετικού ανασυνδυασμού. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται στελέχη γνωστά ως εξισορροπητές, τα οποία έχουν ένα ή περισσότερα ισορροπημένα χρωμοσώματα. Αυτά φέρουν αλληλο-επικαλυπτόμενες αναστροφές, που καταπνίγουν το διασκελισμό, υπερέχουσες μεταλλάξεις για εύκολη αναγνώριση και την ιδιότητα να γίνονται θνησιγόνα σε ομοζυγωτία. Η διασταύρωση των ετερόζυγων διαγονιδιακών μυγών με στελέχη εξισορροπητές θα αποδώσει, σε 2 γενιές, ομόζυγα για το ένθεμα άτομα και συγχρόνως θα αποκαλύψει το χρωμόσωμα

στο οποίο έγινε η ενσωμάτωση. Αν η ένθεση είναι θνησιγόνος σε ομόζυγα άτομα, τότε θα διατηρηθεί σε ετεροζυγωτία «κάτω» από ένα ισορροπημένο χρωμόσωμα.

Απομόνωση και προετοιμασία εμβρυϊκών δίσκων φτερού

Δίσκοι φτερού από προνύμφες *Drosophila* (προχωρημένου) 3^{ου} σταδίου απομονώνονται με προσοχή και μονιμοποιούνται με 500 μl διαλύματος 4% φορμαλδεΰδης σε 1X PEM (100mM Pipes, 1mM MgCl₂, 1mM EGTA, pH 6,9). Στη συνέχεια πλένονται με PBS και υποβάλλονται σε χρώση είτε με τη χρωστική DAPI ή με την Propidium Iodine. Η DAPI βάφει με αραιώση 1/1000, σε διάλυμα PBS, για 2 λεπτά ενώ η Propidium Iodide προβλέπει επεξεργασία των δίσκων με RNάση (1μg/μl), σε διάλυμα PT για 30-45 λεπτά και χρώση με αραιώση 1/1000 για 2-5 λεπτά. Αμφότερες οι χρωστικές χρησιμοποιούνται για τη χρώση των πυρήνων. Κατόπιν οι δίσκοι μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρο πλάκα, προστίθεται 14 μl διαλύματος N-propylgalate σε 80% γλυκερόλη, καλυπτρίδα και αποθηκεύονται στους -20°C.

Μικροσκοπία, φωτογράφιση

Οι προνύμφες παρατηρήθηκαν σε στερεοσκόπιο τύπου Leica με την παροχή υπεριώδους ακτινοβολίας από λάμπα υδραργύρου 100W και η μελέτη των παρασκευασμάτων των εμβρύων έγινε σε μικροσκόπιο (Leica) διερχόμενου φωτός ή φθορισμού, κατά περίπτωση. Η λήψη φωτογραφιών έγινε με την ψηφιακή μηχανή Nikon COOLPIX 900. Τέλος τα παρασκευάσματα των εμβρυϊκών δίσκων παρατηρήθηκαν και φωτογραφήθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία (Radiance 2100, BIORAD).

Αποτελέσματα-Συζήτηση

Παραγωγή κατασκευών-αισθητήρων EGFP-3'UTR (CG10222)

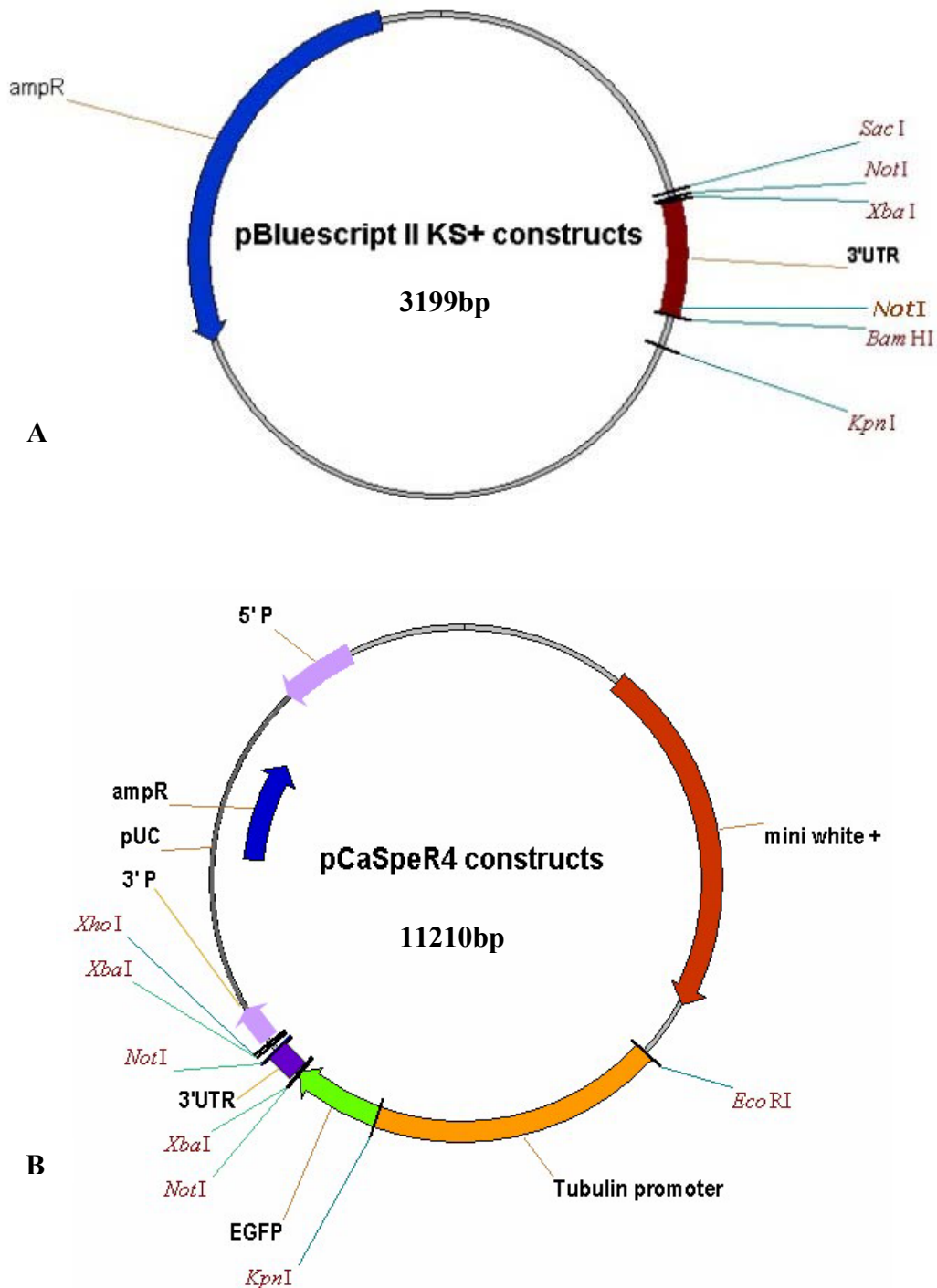
Το αγρίου τύπου 3'UTR του γονιδίου *CG10222* καθώς και οι διάφορες τροποποιημένες εκδόσεις του, παρελήφθησαν κλωνοποιημένα στο φορέα έκφρασης λουσιφεράσης pGL3 (Boutla et al., 2003). Η περιοχή αλληλεπίδρασης του 3'UTR με το *miR-13b* καθώς και οι μεταλλαγές που έχουν εισαχθεί περιγράφονται στον Πίνακα.

Πίνακας 5: Τα πρώτα 11-34 νουκλεοτίδια μετά του κωδικού λήξης του *CG10222* 3'UTR και οι 3 μεταλλαγμένες εκδοχές του.

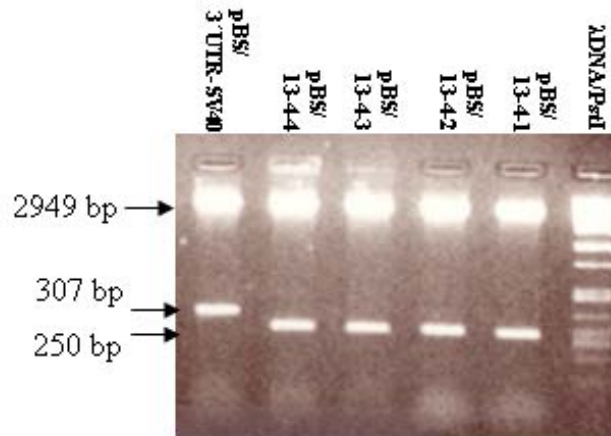
Όνομα 3'UTR	Περιοχή αλληλεπίδρασης με <i>miR-13b</i> και K-box	Χαρακτηριστικά 3'UTR
13-4-1	ACTAATCGAAAATAGCCTGTGATA	Άγριου τύπου
13-4-2	ACTAATCGAAAATAGCGACACTAT	Με ολοκληρωτικά κατεστραμμένο K-box
13-4-3	ACTAATCGAAAATAGCCTGGGAAA	Με 2 σημειακές μεταλλαγές στο K-box
13-4-4	ACTCGTCAAAAATGGCTGTGATA	Απολύτως συμπληρωματικό προς το <i>miR-13b</i>

Ακολούθησε διαδοχική υποκλωνοποίηση των ενθεμάτων μήκους περίπου 250 νουκλεοτιδίων στον φορέα pBluescript KS⁺ μεταξύ των περιοριστικών θέσεων *Xba*I και *Bam*HI και κατόπιν στο φορέα pCaSpeR4 αμέσως μετά την κωδική περιοχή της EGFP, με τη χρήση της περιοριστικής θέσης *Not*I. Έλεγχος για τον προσανατολισμό του ενθέματος έγινε με το ένζυμο *Xba*I. Ως 3'UTR αναφοράς χρησιμοποιήθηκε αυτό του ιού SV40 μήκους 307 νουκλεοτιδίων το οποίο κλωνοποιήθηκε με τα ένζυμα *Xba*I, *Bam*HI στον pBluescript KS⁺ και με τα *Not*I, *Xho*I στον pCaSpeR4.

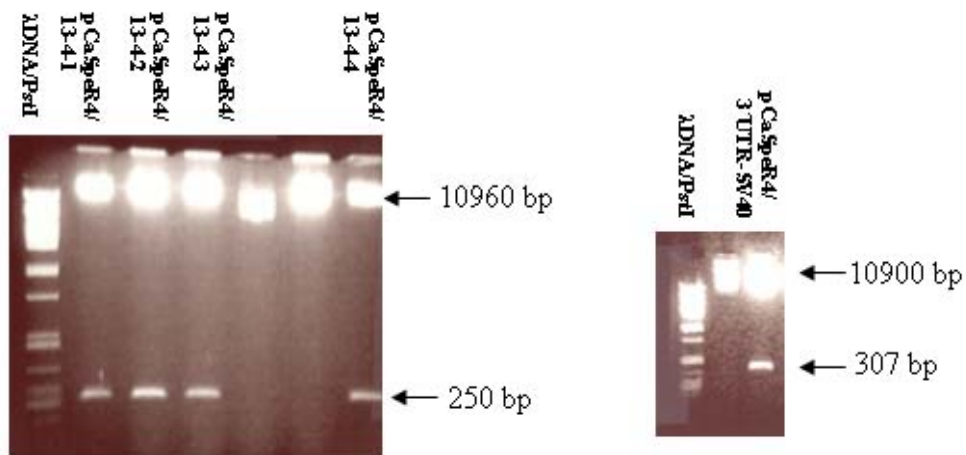
Στην Εικόνα 8, αναπαρίσταται η δομή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που κατασκευάστηκαν και στην 9 φαίνονται οι πέψεις ελέγχου με τα ένζυμα της κλωνοποίησης.



Εικόνα 8: Αναπαράσταση των πλασμιδιακών κατασκευών στους φορείς pBluescript KS⁺ και pCaSpeR4. **A** Κλωνοποίηση στο φορέα pBluescript KS⁺ μεταξύ των θέσεων XbaI και BamHI για τα 3'UTR του CG10222 και του SV40. **B** Υποκλωνοποίηση στο φορέα pCaSpeR4 μεταξύ της NotI για τα 3'UTR του CG10222 και μεταξύ των NotI και XhoI για το 3'UTR του SV40.



Εικόνα 9Α: Πέψη ελέγχου με τα *Xba*I και *Bam*HI των κατασκευών στον pBluescript KS⁺, σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%.



Εικόνα 9Β: Πέψη ελέγχου με το *Xba*I των κατασκευών στον pCaSpeR4. Η ζώνη του 3'UTR του SV40 απελευθερώνεται με πέψη από τα *Nsi*I και *Xho*I. Η ανάλυση των DNA κομματιών έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%.

Παραγωγή διαγονιδιακών σειρών *Drosophila*

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pCaSpeR4/13-4-1, pCaSpeR4/13-4-2, pCaSpeR4/13-4-3, pCaSpeR4/13-4-4 και pCaSpeR4/3'UTR-SV40 απομονώθηκαν σε μεγάλη ποσότητα και με υψηλή καθαρότητα (Qiagen) και χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό της *Drosophila* μαζί με τον αρωγό φορέα p λ 25.7wc Δ2-3. Η αλληλούχηση από κατάλληλο εκκινητή που προσδένεται στο τέλος του γονιδίου της EGFP, απέδειξε την ορθότητα των βημάτων κλωνοποίησης τους. Τα δεδομένα αναγράφονται στο Παράρτημα.

Τον μετασχηματισμό διαδέχτηκε σειρά από καθιερωμένα βήματα γενετικής ανάλυσης από τα οποία παρήχθησαν σταθερές διαγονιδιακές σειρές, ομόζυγες ή ετερόζυγες. Ο Πίνακας 6 συνοψίζει τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της κάθε σειράς.

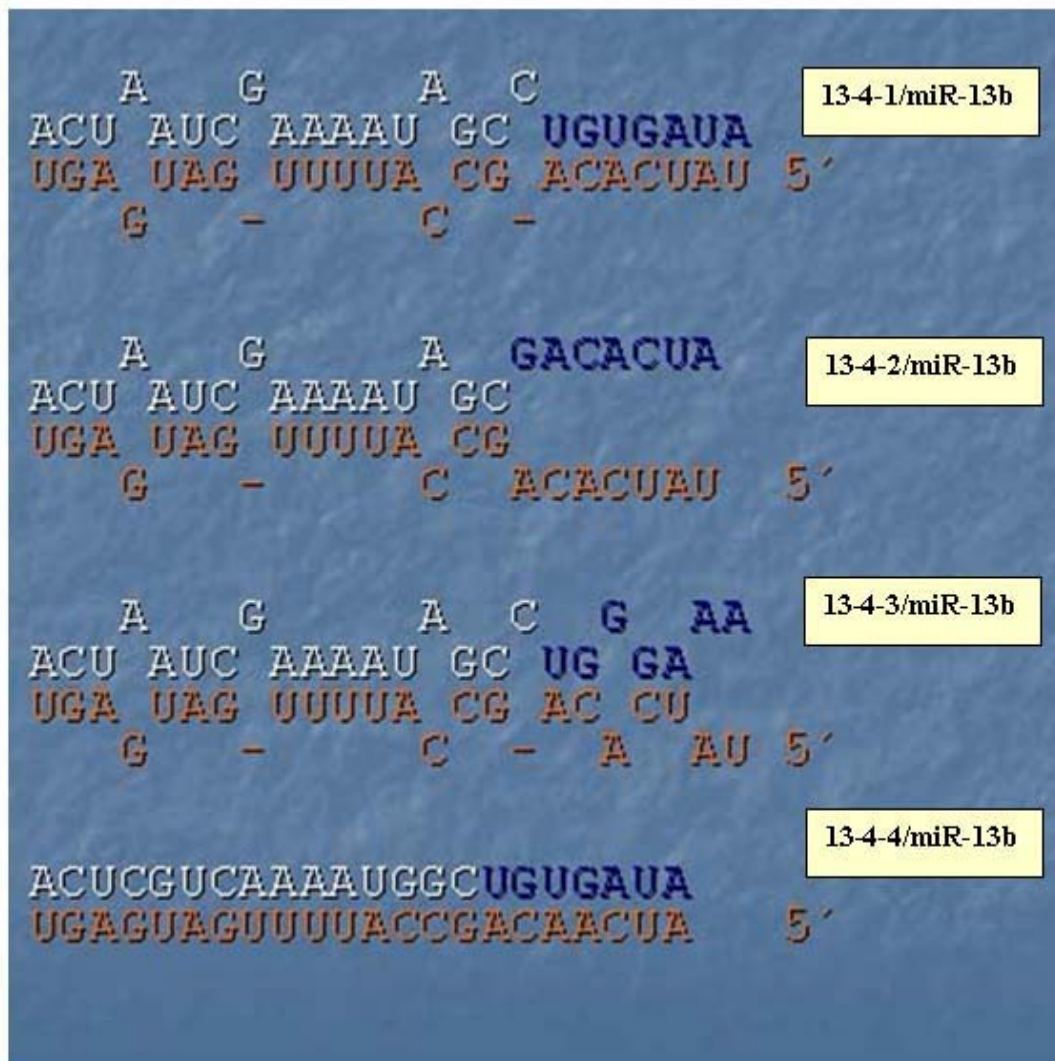
Πίνακας 6: Περιγραφή κάθε διαγονιδιακού EGFP στελέχους

Στελέχη	Σειρές	Χρωμόσωμα ένθεσης	Χαρακτηρισμός ατόμων ως προς το διαγονίδιο
13-4-1	1.9.1	2 ^ο	ομόζυγα θνησιγόνα
	1.9.2	2 ^ο	ομόζυγα
13-4-2	2.7	X	ομόζυγα θνησιγόνα
	2.26	3 ^ο	ομόζυγα στείρα
13-4-3	3.32	3 ^ο	ομόζυγα
13-4-4	4.42	2 ^ο	ομόζυγα
	4.45	2 ^ο	ομόζυγα
	4.46	2 ^ο	ομόζυγα
3'UTR-SV40	7.2	3 ^ο	ομόζυγα
	7.5	X	ομόζυγα, ημίζυγα
	7.7	2 ^ο	ομόζυγα θνησιγόνα
	7.16	2 ^ο	ομόζυγα θνησιγόνα

Καθένα από τα παραπάνω στελέχη είναι φορείς έκφρασης της πρωτεΐνης EGFP. Η διαφορά τους έγκειται στον διαφορετικό μετα-μεταγραφικό έλεγχο που υπόκεινται τα μετάγραφα της ανάλογα με την έκδοση του 3'UTR του γονιδίου *CG10222* που φέρουν. Θεμιτή είναι η παραγωγή περισσότερων σειρών της μιας από κάθε στέλεχος, προκειμένου ο παρατηρούμενος φαινότυπος να αποτελεί στατιστικά σημαντικό

γεγονός δεδομένων των διακυμάνσεων της έκφραση ενός διαγονιδίου, ανάλογα με το σημείο ένθεσης στο γένωμα.

Στην Εικόνα 10 αναπαρίσταται η δευτεροταγής δομή αλληλεπίδρασης μεταξύ του 3'UTR του γονιδίου *CG10222* και του ενδογενούς *miR-13b*, όπως προβλέπεται από το πρόγραμμα mfold για τη θερμοκρασία ανάπτυξης της *Drosophila* (Zuker, 2003).

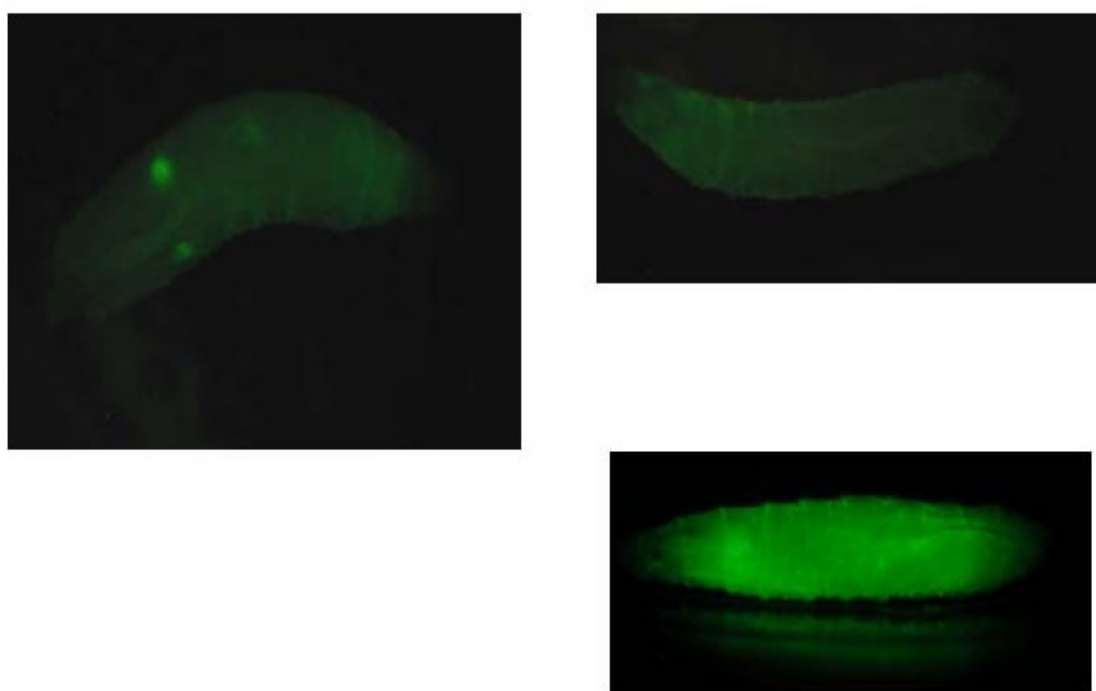


Εικόνα 60: Η πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής αλληλεπίδρασης μεταξύ κάθε 3'UTR και του miR-13b σύμφωνα με το πρόγραμμα mfold στους 25°C. Το k-box χρωματίζεται μοβ και το miR-13b πορτοκαλί.

Ανάλυση της έκφρασης της EGFP

Προνύμφες 3^{ου} σταδίου

Η παρατήρηση προνυμφών τρίτου σταδίου στο στερεοσκόπιο με φωτισμό UV αποκάλυψε σημαντικές διαφορές στην έκφραση της EGFP μεταξύ των διαφορετικών στελεχών. Από κάθε σειρά εξετάστηκαν 5 αρσενικές και 5 θηλυκές προνύμφες. Άτομα του ίδιου φύλου και της ίδιας σειράς ήταν πανομοιότυπα γι' αυτό και η φωτογράφιση της μιας, αρκούσε για την περιγραφή του φαινοτύπου. Οι προνύμφες φωτογραφήθηκαν με μεγέθυνση 1,8-2 σε απαράλλακτες ρυθμίσεις της κάμερας.

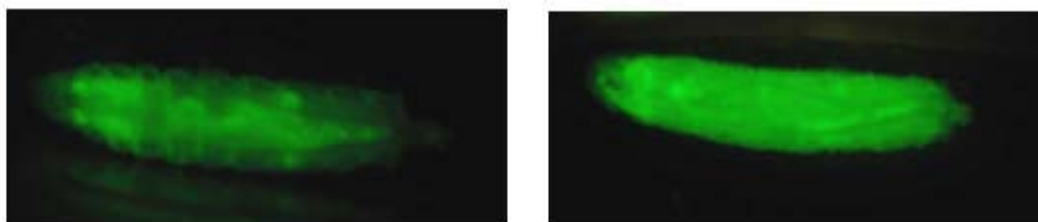


Εικόνα 11: Η έκφραση της EGFP σε αρσενική και θηλυκή προνύμφη 3^{ου} σταδίου από την σειρά που φέρει το αγρίου τύπου 3' UTR του γονιδίου *CG10222* (πάνω αριστερά και πάνω δεξιά αντίστοιχα). Παρατηρείται πολύ χαμηλή έκφραση σε όλα τα σωματικά μέρη εκτός των αρσενικών γονάδων. Η εικόνα κάτω δεξιά δείχνει την έκφραση της EGFP σε αρσενικό άτομο της σειράς αναφοράς 7.2

Η σειρά 1.9.2 είναι φορέας της κατασκευής 13-4-1 όπου το μετάγραφο της EGFP φέρει το 3' UTR του γονιδίου *CG10222*. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 11 η έκφρασή της, παρεμποδίζεται σε μεγάλο βαθμό. Στα θηλυκά το επίπεδο έκφρασης είναι πολύ χαμηλό καθ' όλα τα σωματικά μέρη, ενώ το ίδιο ισχύει και για τα αρσενικά άτομα με εξαίρεση τις γονάδες. Η έκφραση της EGFP στους όρχεις είναι

πολύ ισχυρή. Η σειρά 7.2 παράγει μετάγραφα που δεν υπόκεινται στο ρυθμιστικό έλεγχο των miRNAs. Για το λόγο αυτό η EGFP εκφράζεται ισχυρά και σε όλα τα σωματικά μέρη. Η σύγκριση με τη σειρά αναφοράς οδηγεί σε δύο διαπιστώσεις. Στο 3'UTR του ετερόλογου μεταγράφου εδρεύουν αρνητικά στοιχεία ρύθμισης και η αλληλεπίδρασή τους με ενδογενείς παράγοντες συντελεί στην καταστολή της μετάφρασης. Οι εν λόγω παράγοντες φαίνεται να απουσιάζουν από τους όρχεις.

Οι σειρές 2.26 και 3.32 είναι φορείς των κατασκευών 13-4-2 και 13-4-3, αντίστοιχα. Παράγουν EGFP ενωμένη με ένα 3'UTR μεταλλαγμένο στην περιοχή του K-box. Με τον τρόπο αυτό αποτρέπεται η αλληλεπίδραση με μέλη της υποοικογένειας K-box miR-2/miR-13. Στην περίπτωση που το K-box καταστρέφεται ολοκληρωτικά (σειρά 2.26) παρατηρείται ανομοιογενής αύξηση στην παραγωγή της EGFP, δίνοντας ένα νέο πρότυπο έκφρασης, σε σχέση με αυτό του αγρίου τύπου 3'UTR. Περιέργως η εισαγωγή 2 μόνο σημειακών μεταλλάξεων στο K-box (σειρά 3.32) προκαλεί πλήρη άρση της μεταφραστικής παρεμπόδισης. Η EGFP παράγεται σε υψηλά ποσά σε όλο το σώμα της προνύμφης. Τα επίπεδα έκφρασης της EGFP είναι εφάμιλλα της σειράς αναφοράς.

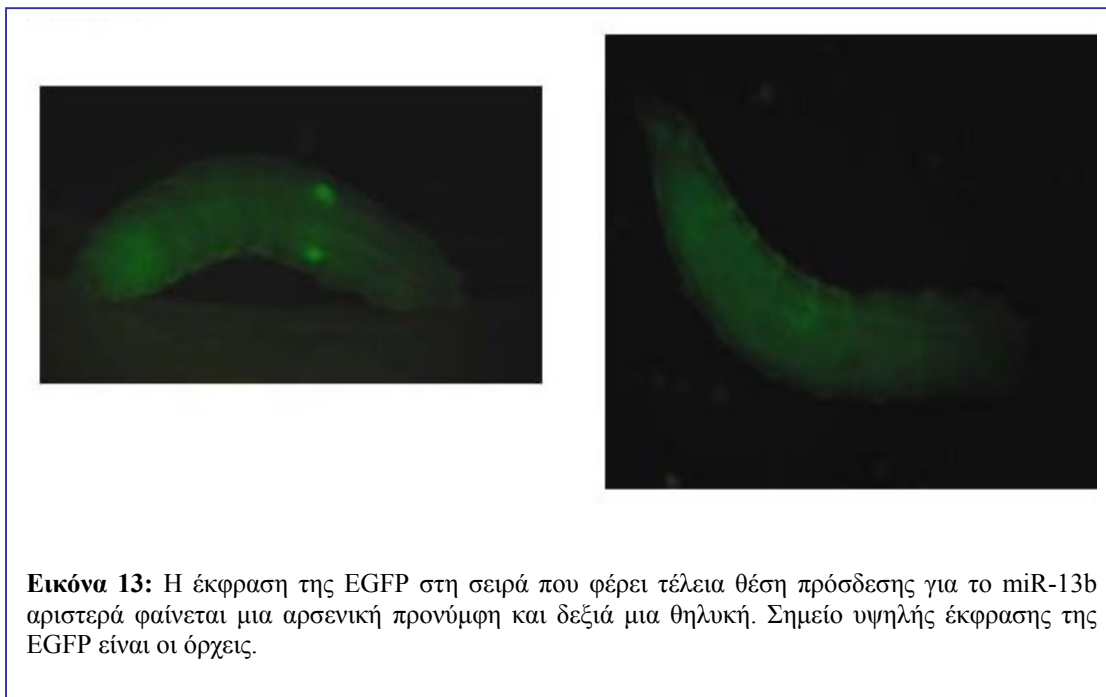


Εικόνα 12: Η έκφραση της EGFP στις σειρές 2.26 και 3.32 (αριστερά και δεξιά αντίστοιχως). Η ολική καταστροφή του k-box προκαλεί ανομοιογενής αύξηση στην παραγωγή της EGFP ενώ η μερική, καθολική έκφραση σε υψηλά ποσά. Και τα δύο άτομα είναι αρσενικά.

Τα παραπάνω καταδεικνύουν το γεγονός ότι η περιοχή του K-box είναι ένα ευαίσθητο ρυθμιστικό στοιχείο της μετάφρασης της EGFP και κατά συνέπεια και της CG10222. Η σειρά 2.26 θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει τον φορέα ενός ετερόλογου μεταγράφου όπου συμπτωματικά η καταστροφή του K-box συντέλεσε στη δημιουργία μιας νέας θέσης δέσμησης για ένα διαφορετικό, μη αναγνωρισμένο miRNA. Η σειρά 3.32 αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι το 3'UTR του γονιδίου CG10222 ρυθμίζεται από το *miR-13b*.

Η διαπίστωση αυτή ισχυροποιείται από την EGFP ανάλυση στην κατασκευή 13-4-4 όπου το 3'UTR φέρει μια περιοχή τέλειας πρόσδεσης με το *miR-13b*. Εδώ τα

ετερόλογα μετάγραφα οδηγούνται στο μονοπάτι ενδονουκλεοτιδικής διάσπασης του RNAi. Στην περίπτωση αυτή παρατηρείται μια πλήρης μίμηση με το φαινότυπο των σειρών που φέρουν το άγριου τύπου 3'UTR παρόλο που διαφέρουν κατά 4 νουκλεοτίδια. Το παραπάνω αποδεικνύει ότι η περιοχή 11-43 νουκλεοτίδια μετά του κωδικού λήξης στο 3'UTR του *CG10222* είναι στόχος δέσμευσης, αλληλεπίδρασης και ρύθμισης από το *miR-13b* και πιθανότατα και τα υπόλοιπα μέλη της υποοικογένειας.

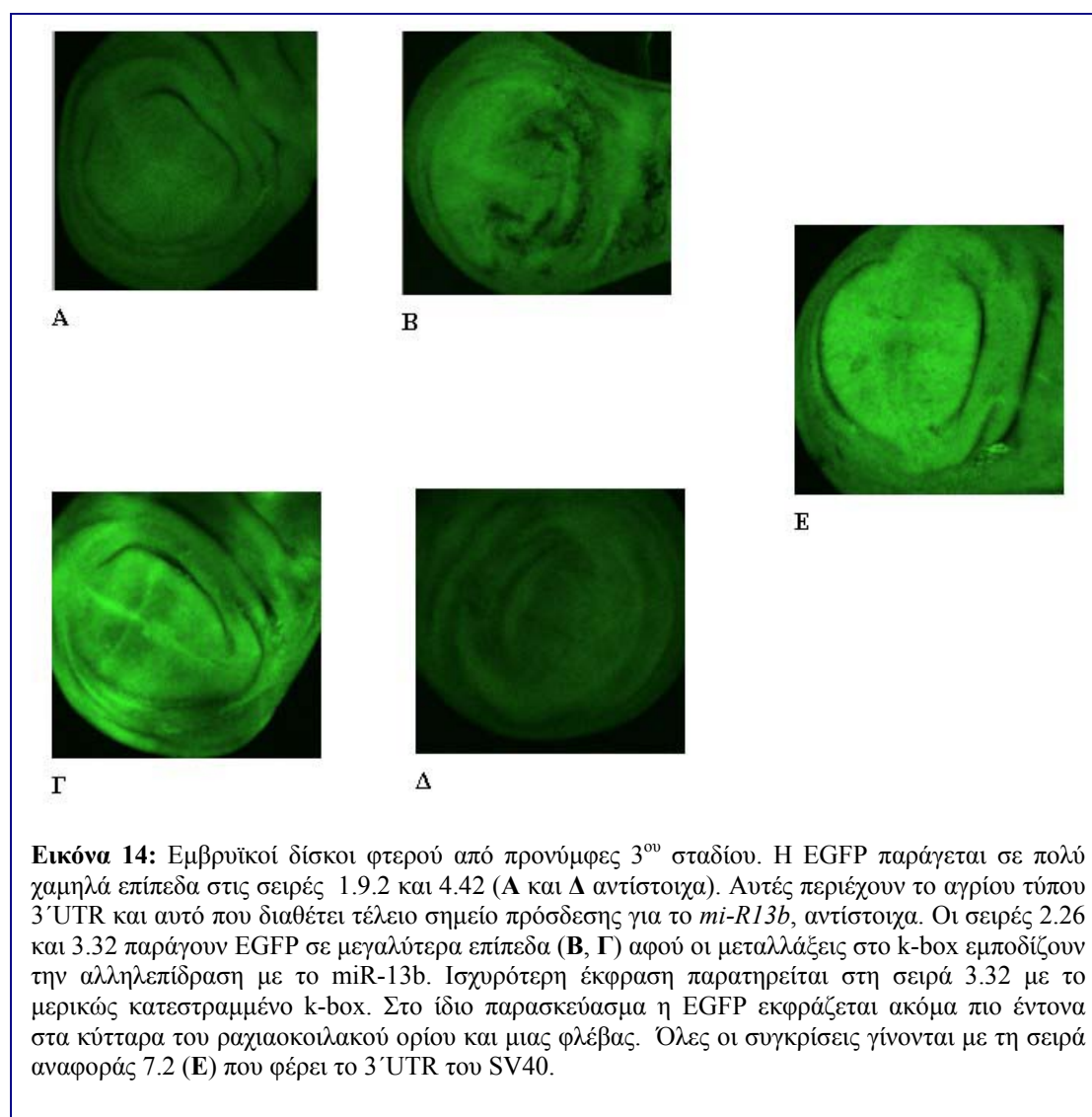


Ξανά το μοναδικό σημείο όπου η EGFP παράγεται ανενόχλητα είναι οι όρχεις. Αυτό σημαίνει ότι ο μοναδικός ιστός στον οποίο το γονίδιο *CG10222* μπορεί να εκφράζεται ανενόχλητα είναι αυτός των αρσενικών γονάδων. Αν είναι μεταγραφικά ενεργό στους όρχεις, τότε πολύ πιθανόν να διατελεί φυλοειδικό ρόλο. Αν όμως, μεταγράφεται σε άλλους ιστούς, τότε σίγουρα το *miR-13b* φροντίζει να διατηρεί την πρωτεΐνη σε αρκετά χαμηλά επίπεδα.

Εμβρυϊκοί δίσκοι φτερού

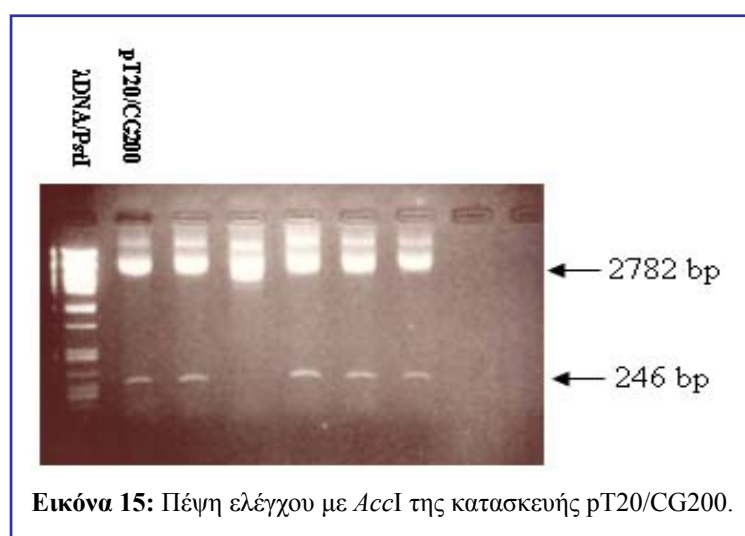
Στη συνέχεια η ανάλυση του φθορισμού της EGFP εστιάστηκε στους εμβρυϊκούς δίσκους φτερού από προνύμφες 3^{ου} σταδίου. Η έρευνα γύρω από την οργανογένεση των φτερών είναι επαρκής ώστε να είναι εύκολη η αναγνώριση των κυτταρικών ομάδων που συστήνουν το δίσκο. Με τον τρόπο αυτό οποιοδήποτε μοτίβο έκφρασης της EGFP μπορεί να εξηγηθεί και να αντιστοιχηθεί στις ανάλογες κυτταρικές σειρές.

Την αφαίρεση 10 δίσκων από κάθε διαγενετική σειρά, διαδέχτηκε χρώση με Propidium Iodide και παρατήρηση με μέσα συνεστιακής μικροσκοπίας χρησιμοποιώντας απαράλλακτες ρυθμίσεις. Στις εικόνες που ακολουθούν φαίνεται η έκφραση της EGFP σε εμβρυϊκούς δίσκους φτερού από αντιπροσωπευτικές σειρές του κάθε στελέχους.



Όμοια με την ανάλυση στις προνύμφες, η έκφραση της EGFP στους δίσκους είναι συνάρτηση του γενετικού περιεχομένου κάθε σειράς και συγκεκριμένα της σύστασης του 3'UTR που συνοδεύει το ετερόλογο μετάγραφο. Έτσι παρατηρείται χαμηλότερη έκφραση στις σειρές που φέρουν το αγρίου τύπου 3'UTR ή αυτό με το σημείο τέλειας πρόσδεσης για το *miR-13b* σε σχέση με την σειρά αναφοράς. Οι σειρές που έχουν μεταλλάξεις στο K-box παρουσιάζουν υψηλότερη έκφραση αφήνοντας όμως πάλι ανοιχτό το ερώτημα. Γιατί η πλήρης καταστροφή του K-box ανεβάζει λίγο τα επίπεδα της EGFP ενώ η μερική αναστρέφει πλήρως το φαινότυπο προς υψηλή έκφραση της EGFP; Τέλος πρέπει να προστεθεί η παρατήρηση ότι στη σειρά 3.32 παρατηρείται ένα μοτίβο υψηλότερης έκφρασης EGFP σχήματος «σταυρού» που αντιστοιχεί στο ραχαιοκοιλιακό όριο και μια από τις φλέβες του φτερού.

***In situ* υβριδοποίηση**



Εικόνα 15: Πέψη ελέγχου με *AccI* της κατασκευής pT20/CG200.

Προκειμένου να παραχθεί σημαντής που θα αποκαλύψει την τοπική και χρονική έκφραση του *CG10222* ένα εσωτερικό τμήμα από την κωδική του αλληλουχία του, μήκους 214 νουκλεοτίδια κλωνοποιήθηκε στο φορέα

pGEM T-Easy. Η αλληλουχία αυτή αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια 330 ως 543 του γονιδίου και αναγράφεται στο παράρτημα. Το ίδιο ένθεμα υποκλωνοποιήθηκε στο φορέα pT20 χρησιμοποιώντας την περιοριστική θέση του *NotI*, ανάμεσα στις αλληλουχίες των T3 και T7 ιικών υποκινητών. Ο προσανατολισμός του κομματιού ελέγχθηκε με το ένζυμο *AccI*. Η προκύπτουσα πλασμιδιακή κατασκευή ονομάζεται pT20/CG200 και έχει απομονωθεί DNA ποιότητας Qiagen από αυτή.

Την παραγωγή σημαντών αρνητικής και θετικής πολικότητας, διαδέχτηκε η δοκιμή dot blot και η εφαρμογή του πρωτοκόλλου *in situ* υβριδοποίησης σε έμβρυα *Drosophila* αναπτυξιακού σταδίου 3-6 ώρες. Στην Εικόνα 16 παρατηρείται έντονη χρώση με τα υποστρώματα της αλκαλικής φωσφατάσης πράγμα που καταδεικνύει ότι το mRNA του *CG10222* είναι πανταχού παρόν σε μεγάλη ποσότητα κατά αυτό το αναπτυξιακό στάδιο. Η παρατήρηση αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με το γεγονός ότι το *CG10222* αντιπροσωπεύεται στη cDNA βιβλιοθήκη των πρώιμων εμβρύων απ' όπου και κλωνοποιήθηκε το 3' UTR του (Boutla et al., 2003). Άμεσα θα πρέπει να επαναληφθεί το πρωτόκολλο και για τα υπόλοιπα αναπτυξιακά στάδια.



Εικόνα 16: *In situ* υβριδοποίηση σε έμβρυα σταδίου 3-6 ώρες, έναντι του *CG10222*.

Καταστολή της έκφρασης του *CG10222* μέσω γονιδιακής σίγησης

Το πλασμίδιο pT20/CG200 χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή RNA, θετικής και αρνητικής πολικότητας. Δίκλωνο RNA συγκέντρωσης 5 μ M, ομόλογο προς την εσωτερική περιοχή του *CG10222* μεταφέρθηκε με ένεση σε 500-600 έμβρυα σταδίου 30-90 λεπτά προκειμένου να επαχθεί ο μηχανισμός νουκλεοτιδικής διάσπασης (RNAi).



Εικόνα 17: Έμβρυο αγρίου τύπου (πάνω) και έμβρυο χωρίς κεφαλικές δομές (κάτω).

Το ποσοστό των εμβρύων που κατάφεραν να ολοκληρώσουν την ανάπτυξη και να εκκολαφθούν σε προνύμφες είναι μόλις 13%. Στα υπόλοιπα ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο ανίχνευσης του φαινοτύπου του δερματιδίου. Η παρατήρηση στο μικροσκόπιο αποκάλυψε αγρίου τύπου (ως προς τη δομή του δερματιδίου) έμβρυα και μεταξύ τους

κάποια με απώλειες κεφαλικών δομών, περίπτωση που καταλογίζεται ως μη ειδική

δυσμορφία, σπάνιο παραπροϊόν της διαδικασίας της ένεσης. Στην Εικόνα 17 φαίνεται ένα αγρίου τύπου έμβρυο μαζί με ένα που απουσιάζουν οι κεφαλικές δομές.

Το 87% των εμβρύων αναπτύσσεται κανονικά χωρίς όμως να εκκολάπτεται προς προνούμφη. Αυτό υποδηλώνει το ότι η απαλοιφή της έκφρασης του *CG10222* προκαλεί κάποια σοβαρής φύσης φυσιολογική βλάβη. Προφανώς η βλάβη αυτή δεν σχετίζεται με το φαινότυπο έκκρισης του δερματιδίου. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η αλλαγή προσέγγισης της ανάλυσης των αποτελεσμάτων του RNAi προκειμένου να εντοπιστεί επακριβώς η φυσιολογική λειτουργία που διακόπτεται. Αυτό στη συνέχεια θα οδηγήσει και σε σαφή συμπεράσματα για το λειτουργικό ρόλο του *CG10222*.

Από την άλλη ο υβριδισμός του ενδογενούς *miR-13b* με συμπληρωματικά DNA ολιγονουκλεοτίδια προκαλεί σοβαρές δυσμορφίες στο δερματίδιο (αποδιοργανωμένες οδοντικές πλάκες και τρύπες) (Boutla et al., 2003). Στο μέλλον θα μπορούσε να ελεγχθεί το ενδεχόμενο συσχέτισης της υπερέκφρασης του *CG10222* με το φαινότυπο αυτό.

Συμπεράσματα

- Συγκρίνοντας το ποσό και το πρότυπο έκφρασης της EGFP μεταξύ των διαφορετικών διαγενετικών στελεχών επαληθεύεται η αρχική διαπίστωση (Boutla et al., 2003) ότι το *miR-13b* ρυθμίζει αρνητικά της έκφραση του γονιδίου *CG10222*, επιδρώντας στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο μέσω του μηχανισμού παρεμπόδισης της παραγωγής πρωτεΐνης. Ταυτόσημο ρόλο πιθανότατα έχουν και τα υπόλοιπα μέλη της υποοικογένειας K-box miR-2/miR-13.
- Η ίδια ανάλυση αποκαλύπτει το τοπικό μοτίβο έκφρασης του *miR-13b* σε προνύμφες τρίτου σταδίου. Φαίνεται να εκφράζεται σε όλους τους ιστούς συμπεριλαμβανόμενων και των εμβρυϊκών δίσκων φτερού. Εξαίρεση αποτελούν οι αρσενικοί γονάδες, όπου το ετερόλογο μετάγραφο μεταφράζεται χωρίς εμπόδια. Οπότε το *miR-13b* απουσιάζει από τους όρχεις.
- Το γονίδιο *CG10222* μεταγράφεται σε μεγάλο βαθμό κατά το πρώιμο έμβρυο. Η απαλοιφή του κατά την ανάπτυξη κρίνεται θνησιγόνος, αλλά η λειτουργία του παραμένει άγνωστη. Η παρούσα εργασία δημιουργεί ενδείξεις για πιθανή ιστοειδική έκφραση του γονιδίου στους όρχεις.

Μελλοντική προοπτική

Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο μηχανισμός δράσης των miRNAs διαφέρει μεταξύ ζωικών και φυτικών οργανισμών (Bartel, 2004). Η πιθανότητα συντήρησης του μηχανισμού μεταξύ των δύο βασιλείων είναι άξια διερεύνησης. Για το σκοπό αυτό προτείνεται ο μετασχηματισμός 2 ομάδων φυτών *Nicotiana benthamiana*. Η πρώτη θα είναι φορέας έκφρασης της πρόδρομης δομής (pre-miRNA) του *miR-13b* της *Drosophila* ενώ η δεύτερη θα εκφράζει την κατασκευή-αισθητήρα (EGFP-CG1022) που παράχθηκε στα πλαίσια αυτής της εργασίας. Στη συνέχεια οι δυο διαφορετικές διαγονιδιακές σειρές θα διασταυρωθούν. Το υβρίδιο των δύο σειρών θα γίνει αντικείμενο ανάλυσης του φθορισμού της EGFP. Αν διαπιστωθεί μείωση στο προ-μεταφραστικό επίπεδο της παραγωγής της EGFP αυτό θα αποτελέσει ισχυρή ένδειξη συντήρησης ή εξελικτικής σύγκλισης του μηχανισμού δράσης των miRNAs σε ζώα και φυτά. Την ισχύ αυτής της παρατήρησης θα υποστηρίξουν κατάλληλα πειράματα αναφοράς (control).

Παράρτημα

Η αλληλουχία των ενθεμάτων στις κατασκευές-αισθητήρες. Σημειώνεται ότι το πραγματικό μέγεθος των κομματιών είναι περισσότερο των 214 αλλά είναι αδύνατη τεχνικά, η ανάγνωση των περιοχών που έπονται επαναλαμβανόμενων νουκλεοτιδίων (PolyA). Με μπλε σημειώνεται η περιοριστική θέση του *NotI*, με πορτοκαλί του *XbaI* και με έντονα γράμματα η αλληλεπιδρούσα με το *miR-13b* περιοχή.

- **pCaSpeR4/13-4-1, 213nts (άγριου τύπου 3'UTR)**

GCGGCCGCTC TAGAGAAACT AATCGAAAAT AGCCTGTGAT ATTGTGCATT GTATTCGAA AATAAGTTAT
ACAAGTCGAG AGTGAGGGAT TAAGGTACGG AATGAAAAGC AGTGATTTTT TGGATTATT AAAATATTAT
CTCGGCTTGA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
AAA

- **pCaSpeR4/13-4-2, 213nts**

GCGGCCGCTC TAGAGAAACT AATCGAAAAT AGCGACACTA TTTGTGCATT GTATTCGAA AATAAGTTAT
ACAAGTCGAG AGTGAGGGAT TAAGGTACGG AATGAAAAGC AGTGATTTTT TGGATTATT AAAATATTAT
CTCGGCTTGA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
AAA

- **pCaSpeR4/13-4-3, 213nts**

GCGGCCGCTC TAGAGAAACT AATCGAAAAT AGCCTGGGAA ATTGTGCATT GTATTCGAA AATAAGTTAT
ACAAGTCGAG AGTGAGGGAT TAAGGTACGG AATGAAAAGC AGTGATTTTT TGGATTATT AAAATATTAT
CTCGGCTTGA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
AAA

- **pCaSpeR4/13-4-4, 213nts**

GCGGCCGCTC TAGAGAAACA CTCGTCAAAA TGGCTGTGAT ATTGTGCATT GTATTCGAA AATAAGTTAT
ACAAGTCGAG AGTGAGGGAT TAAGGTACGG AATGAAAAGC AGTGATTTTT TGGATTATT AAAATATTAT
CTCGGCTTGA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
AAA

Η κωδική αλληλουχία του γονιδίου *CG10222*. Τα έντονα γράμματα οριοθετούν την περιοχή που χρησιμοποιήθηκε στα πρωτόκολλα του *in situ* και RNAi.

ATGATGCAA AGATTTCCGA CGCAGGCGAC CGTGGAGAAT CCACGTTATG GACAGCTAAT CATAGGACCT
CCTGGTCTG GGAAAACCAC CTATTGCGGT GAGGCCCTTA AGTTCTATCG CGAACTGGGC CGTCAGGTGG
GCGTTGTGAA TCTGGATCCA GCCAACGAAA ACATGTCTTA CGAACCAGTG CTAAGTGTGA TGGAGCTAAT
CACTGTGGAG GATTCGATGG AGCACCTGAA GCTGGGACCA AACGGAGCTC TAATGCACTG CGCTGAGTAT
CTGGCCGACC ATTTGGAGGA TTGGCTGTTG CCGGCACTGC GCAAACCTAAG CGCCACTTAC AACTACTTCC
TGTTCCGACTG TCCCGGCCAA GTTGAGCTAT ATACCCATCA CAACGCTATG GCCCGGATTT TCGAGCGTTT
GGAGCGTGAA AGATATAGCC TGGTCACCGT TAACCTTATA GATTCCTATT ACTGCTCGGA GCCTGCCAAA
TTCATTGCCA CTTTGTGAT GGCATTGAAC ACCATGTTGC GGATGAGTCT ACCCCACGTT AATGTGCTTT
CCAAGGCCGA TCTGCTAAAAG AAGCACGAGA CCAAGTTACA CTTTAAACGTG GACTATTATA CGGACGTCC
GGACCTCAAG TATCTGCTGG ACAAACCTGGA CGATGATCCC GCCATGCGCA AGTATCGAAA ACTGAATGCA
GCCATCTGCT CCATGGTGGA GGACTACGCT CTCGTTTCGT TCCAACGCT GGACGTCTTC AGCACGGACA
GCATGCTCCG CTTGCGCAAT CACATCGACA AGGCTAATGG ATACGTCTAC AAGGCAGGTG AGGAGCAGAC

GGTCAACTCA CTACTAGCCT GCGCCGTGGG TGCAGAACT GAGGCCGCTC GCATGGAGCA TGATGTCCAA
CCCTATATGG AATAA

Βιβλιογραφία

- Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D.P., Burge, C.B., Carrington, J.C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., Matzke, M., Ruvkun, G. and Tuschl, T. (2003) A uniform system for microRNA annotation. *RNA*, **9**, 277-279
- Aravin, A., Lagos-Quintana, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., Snyder, B., Gaasterland, T., Meyer, J. and Tuschl, T. (2003) The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev. Cell*, **5**, 337-350
- Aukerman, M.J. and Sakai, H. (2003) Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell*, **15**, 2730-2745
- Bartel, B. and Bartel, D.P. (2003) MicroRNAs: at the root of plant development? *Plant Physiol.*, **132**, 709-717
- Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: Genomics: Biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **116**, 281-297
- Bernstein, E., Kim, S.Y., Carmell, M.A., Murchison, E.P., Alcorn, H., Li, M.Z., Mills, A.A., Elledge, S.J., Anderson, K.V. and Hannon, G.J. (2003) Dicer is essential for mouse development. *Nat. Genet.*, **35**, 215-217
- Bohnsack, M.T., Czaplinski, K. and Gorlich, D. (2004) Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, **10**, 185-191
- Boutet, S., Vasquez, F., Liu, J., Belcin, C., Fagard, M., Gratias, A., Morel, J.B., Crete, P., Chen, X. and Vaucheret, H. Arabidopsis HEN1: A genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance. *Curr. Biol.*, **13**, 843-848
- Boutla, A., Delidakis, C. and Tabler, M. (2003) Developmental defects by antisense-mediated inactivation of micro-RNAs 2 and 13 in *Drosophila* and the identification of putative target genes. *Nucleic Acid Res.*, **31**, 4973-4980
- Brennecke, J., Hipfner, D.R., Stark, A., Russel, R.B. and Cohen, S.M. (2003) *bantam* encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell*, **113**, 25-36
- Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F. and Croce, C.M. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *PNAS*, **99**, 15524-15529
- Chapman, E.J., Prokhnovsky, A.I., Gopinath, K., Dolja, V.V. and Carrington, J.C. (2004) Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev.*, **15**, 1179-1186
- Denti, M.A., Boutla, A., Tsagris, M. and Tabler, M. (2004) Short interfering RNAs specific for potato spindle tuber viroid are found in the cytoplasm but not in the nucleus. *Plant J.*, **37**, 762-769
- Dostie, J., Mourelatos, Z., Yang, M., Sharma, A. and Dreyfuss, G. (2003) Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *RNA*, **9**, 180-186

- Elbashir, S.M., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001a) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes and Dev.*, **15**,188-200
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. and Tuschl T. (2001b) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.*, **3**, 6877-6888
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811
- Floyd S.K. and Bowman, J.L. (2004) Ancient microRNA target sequences in plants. *Nature*, **428**, 485-486
- Giot, L., Bader, J.S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y.L., Ooi, C.E., Godwin, B., Vitols, E., Vijayadamar, G., Pochart, P., Machineni, H., Welsh, M., Kong, Y., Zerhusen, B., Malcolm, R., Varrone, Z., Collis, A., Minto, M., Burgess, S., McDaniel, L., Stimpson, E., Spriggs, F., Williams, J., Neurath, K., Ioime, N., Agee, M., Voss, E., Furtak, K., Renzulli, R., Aanensen, N., Carrola, S., Bickelhaupt, E., Lazovatsky, Y., DaSilva, A., Zhong, J., Stanyon, C.A., Finley, R.L. Jr, White, K.P., Braverman, M., Jarvie, T., Gold, S., Leach, M., Knight, J., Shimkets, R.A., McKenna, M.P., Chant, J. and Rothberg, J.M. (2003) A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science*, **302**, 1727-1736
- Griffiths-Jones, S. (2004) The microRNA registry. *Nucleic Acid Res.*, **32**, 109-111
- Hamilton, A.J. and Baulcombe, D.C. (1999) A species of small RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, **286**, 950-952
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G.J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, **404**, 293-296
- Han, M.H., Goud, S., Song L. and Fedoroff, N. (2004) The *Arabidopsis* double-stranded RNA-binding protein HYL-1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *PNAS*, **101**, 1093-1098
- Hutvagner, G. and Zamore, P.D. (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, **297**, 2056-2060
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T. and Zamore, P.D. (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science*, **293**, 834-838
- Johnson, S.M., Lin, S.Y. and Slack, F.J. (2003) The time of appearance of the *C. elegans let-7* microRNA is transcriptionally controlled utilizing a temporal regulatory element in its promoter. *Develop. Biol.*, **259**, 364-379
- Jones-Rhoades, M.W. and Bartel, D.P. (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol. Cell*, **14**, 787-799
- Juarez, M.T., Kui, J.S., Thomas, J., Heller, B.A. and Timmermans, M.C. (2004) MicroRNA-mediated repression of rolled leaf1 specifies maize leaf polarity. *Nature*, **428**, 84-88
- Khvorova, A., Reynolds, A. and Jayasena, S. (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, **115**, 209-216
- Kidner C.A. and Martienssen, R.A. (2004) Spatially restricted microRNA directs polarity through ARGONAUTE1. *Nature*, **428**, 81-84

- Kurihara, Y. and Watanabe Y. (2004) Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *PNAS*, **101**, 12753-8
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, **294**, 853-858
- Lai, E.C. (2002) Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat. genet.* **30**, 363-364
- Lai, E.C., Burks, C. and Posakony, J.W. (1998) The k box, a conserved 3'UTR sequence motif, negatively regulates accumulation of *Enhancer of split Complex* transcripts. *Develop.*, **125**, 4077-4088
- Lai, E.C., Tomancak, P., Williams, R.W. and Rubin, G.M. (2003) Computational identification of *Drosophila* microRNA genes. *Genome Biol.*, **4**, R42
- Lai, E.C., Wiel, C. and Rubin, G.M. (2004) Complementary miRNA pairs suggest a regulatory role for miRNA:miRNA duplexes. *RNA*, **10**, 171-175
- Lecellier, C.H. and Voinnet, O. (2004) RNA silencing: no mercy for viruses? *Immunol. Rev.*, **198**, 285-303
- Lee, R.C. and Ambros, V. (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **294**, 862-864
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, **75**, 843-854
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S. and Kim, V.N. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, **425**, 415-419
- Lee, Y.S., Nakahara, K., Pham, J.W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E.J., and Carthew, R.W. (2004) Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathway. *Cell* **117**, 69-81
- Llave, C., Kasschau, K.D., Rector, M.A. and Carrington, J.C. (2002) Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell*, **14**, 1605-1619
- Ma, J.B., Ye, K. and Patel, D.J. (2004) Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature*, **429**, 318-322
- Nykanen, A., Haley, B. and Zamore, P.D. (2001) ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*, **107**, 309-321
- Palatnik, J.F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J.C. and Weigel, D. (2003) Control of leaf morphology by microRNAs. *Nature*, **425**, 257- 263
- Rajewsky, N. and Socci, N.D. (2004) Computational identification of microRNA targets. *Develop. Biol.*, **267**, 529-535
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B. and Bartel, D.P. (2002) MicroRNAs in plants. *Genes and Dev.*, **16**, 1616-1626
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. and Zamore, P. (2003) Assymetry in the assembly of the RNAi complex. *Cell*, **115**, 199-208

- Stark, A., Brennecke, J., Russel, R.B. and Cohen, S.M. (2003) Identification of *Drosophila* microRNA targets. *PLoS Biol.*, **1**, E60
- Tsien, R.Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem.*, **67**, 509-544
- Verkhusha, V.V. and Lukyanov, K. (2004) The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins. *Nature Biotechnol.*, **22**, 289-296
- Wienholds, E., Koudijs, M.J., Eeden, F.J.M., Cuppen, E. and Plasterk R.H.A. (2003) The microRNA-producing enzyme Dicer-1 is essential for zebrafish development. *Nat. Genet.*, **35**, 217-218
- Xu, P., Vernooy, S.Y., Guo, M. and Hay, B.A. (2003) The *Drosophila* microRNA mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol.*, **29**, 790-795
- Yanisch-Perron, C., J. Vicira, and J. Messing (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*. **33**, 103-119
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G. and Cullen, B.R. (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.*, **17**, 3011-3016
- Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acid Res.*, **31**, 3406-3415