

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Χαρακτηρισμός προτύπων δράσης μικρών RNA στην
αρσενική γαμετική σειρά της *Drosophila melanogaster*»**

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΒΡΕΤΤΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2009

Η παρούσα διδακτορική διατριβή διεκπεραιώθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας Φυτών του Τμήματος Βιολογίας και το εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας Εντόμων του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας. Χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα ΠΕΝΕΔ 2003 [κωδικός υποέργου: 03 ΕΔ 555].

Επιβλέπων Καθηγητής:

Κ. ΚΑΛΑΝΤΙΔΗΣ, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Κ. ΚΑΛΑΝΤΙΔΗΣ, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Χ. ΔΕΛΙΔΑΚΗΣ, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ε. ΤΣΑΓΡΗ, Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Κ. ΚΑΛΑΝΤΙΔΗΣ, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Χ. ΔΕΛΙΔΑΚΗΣ, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ε. ΤΣΑΓΡΗ, Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Μ. ΑΒΕΡΩΦ, Ερευνητής Α', Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας

Ι. ΒΟΝΤΑΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Δ. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΚΗ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Κ. ΚΟΤΖΑΜΠΑΣΗΣ, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

*Στους γονείς μου, Λευτέρη και Χρυσούλα
Που ακολουθώντας το παράδειγμά τους
Έμαθα να αγωνίζομαι...*

Ευχαριστίες

Η ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής σηματοδοτεί το τέλος μιας μακράς διαδικασίας πειραματικών δοκιμών και αναλύσεων, απόκτησης και παραγωγής γνώσης, που με βρίσκει βαθιά ικανοποιημένο και χαρούμενο. Φυσικά δεν αποτελεί μια αμιγώς προσωπική επιτυχία. Η συμβολή ορισμένων ανθρώπων διατέλεσε αποφασιστικό ρόλο στην επίτευξή της.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθοδηγητές μου. Τον Martin Tabler που ήταν ένας εξαιρετικός άνθρωπος και επιστήμονας. Συνέβαλε στο να αγαπήσω το πεδίο των ρυθμιστικών RNA, μου έδειξε πίστη και εμπιστοσύνη και αποτελεί για εμένα πρότυπο τρόπου σκέψης και συμπεριφοράς. Τον Κρίτωνα Καλαντίδη για την καθοδήγησή του όχι μόνο σε πειραματικές διαδικασίες αλλά και στον επιστημονικό κόσμο γενικότερα. Μου έμαθε να προετοιμάζω παρουσιάσεις, να γράφω δημοσιεύσεις και προτάσεις και με βοήθησε να παραβρεθώ σε συνέδρια στο εξωτερικό για να διευρύνω τους επιστημονικούς μου ορίζοντες. Τον Χρήστο Δελιδάκη που ήταν μεγάλη τύχη για εμένα να γίνω άτυπα μέλος της ομάδας του και να δανειστώ λίγη από την μαγεία με την οποία σχεδιάζει πειράματα και διασταυρώσεις. Η συμβολή του στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας είναι ανυπολόγιστη. Την Μίνα Τσαγρή για τις πολύτιμες συμβουλές της και το ενδιαφέρον που έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας. Ήταν πάντα πρόθυμη να με βοηθήσει και να συζητήσει μαζί μου προβλήματα και προβληματισμούς που προέκυπταν. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, Κυριάκο Κοτζαμπάση, Δέσποινα Αλεξανδράκη, Μιχάλη Αβέρωφ και Ιωάννη Βόντα για το χρόνο που δίεθσαν για εμένα, το ειλικρινές τους ενδιαφέρον και τις συμβουλές τους σε μια περίοδο πολλών υποχρεώσεων για αυτούς.

Στο ξεκίνημα της απόκτησης εργαστηριακής εμπειρίας υιοθετεί κανείς τις μεθόδους εργασίας του δασκάλου του. Σε αυτό το επίπεδο στάθηκα πολύ τυχερός γιατί πραγματικά έμαθα από τους καλύτερους. Ευχαριστώ πολύ την Αλεξάνδρα Μπούτλα, την Σεργία Τζωρτζακάκη και την Χρυσούλα Πιτσούλη. Θέλω επίσης να ευχαριστήσω την Mireille Schafer και τον Holger Stark που με βοήθησαν να εκπληρώσω την πειραματική αποστολή μου στο εργαστήριό τους και συνάμα διευκόλυναν την διαμονή μου στο Κάσσελ της Γερμανίας. Πολλά ευχαριστώ χρωστώ στους φίλους και καλούς συναδέλφους μου, παρόντα και παρελθόντα μέλη των εργαστηρίων Καλαντίδη, Τσαγρή, Δελιδάκη, Αβέρωφ και fly-room για τις συμβουλές τους, την συντροφιά τους και τις αναρίθμητες αστείες στιγμές που μοιραστήκαμε. Ευχαριστώ επίσης τις μαθητευόμενες μου Βαρβάρα Αρσένη και Ισμήνη Καρακασιλιώτη για την άψογη συνεργασία τους και το αμέριστο ενδιαφέρον τους που συχνά ξεπερνούσε τα όρια των υποχρεώσεων της δικής τους εργασίας.

Κλείνοντας θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη και την αγάπη μου στους γονείς μου και τα αδέρφια μου που τόσα χρόνια με στηρίζουν ηθικά και υλικά και είναι περήφανοι για εμένα. Επίσης οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου, που στάθηκαν στο πλάι μου σε όλη αυτή την προσπάθεια και ομόρφυναν την ζωή μου. Τζένη Σιδέρη, Χρήστο Κωτάκη, Γιούλη Σπηλιωτοπούλου, Κατερίνα Πετράκη, Γιάννη Ζαφειρόπουλο, Meriem Takarli, Εύα Ζαχαριουδάκη, Kathryn Melzak, Βάσω Μάνη, Τάσο Ζέρβα, Λιλίκα Σαραφίδου, Jutta Helm, Μαριάνθη Κηπαράκη, Edyta Koscianska, Μυρτώ Δεληγιαννάκη, Τάσο Αλεξιάδη, Petja Kalajdzic, Έλενα Νταντάμη και Ισμήνη Καρακασιλιώτη.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	3
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1.1 Βασικά στοιχεία της RNA σίγησης στην <i>Drosophila</i>	6
1.1.1 Το μονοπάτι των siRNA.....	6
1.1.2 Το μονοπάτι των miRNA	9
1.1.2.1 Η βιογένεση των miRNA	9
1.1.2.2 Ο μηχανισμός δράσης των miRNA	11
1.1.2.3 Η ανίχνευση των miRNA και των στόχων τους.....	14
1.1.2.4 Ο βιολογικός ρόλος των miRNA.....	16
1.1.2.5 Η υποοικογένεια <i>miR-2/miR-13</i> και το <i>CG10222</i>	17
1.2 Η σπερματογένεση στην <i>Drosophila</i>	19
1.2.1 Η μορφή και η σύσταση των όρχεων	19
1.2.2 Τα στάδια της σπερματογένεσης.....	21
1.2.3 Γονίδια και σηματοδότηση στην σπερματογένεση.....	25
1.2.3.1 Αρχέγονα κύτταρα και μιτωτικοί απόγονοι.....	25
1.2.3.2 Η ωρίμανση των σπερματοκυττάρων προς την μείωση	29
1.3 Μονοπάτια σίγησης στην σπερματογένεση	34
1.4 Στόχοι	41
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	43
2.1 Πρωτόκολλα μοριακής βιολογίας	43
2.1.1 Στελέχη βακτηρίων και θρεπτικά υλικά	43
2.1.2 Πηκτώματα και διαλύματα ηλεκτροφόρησης για νουκλεϊκά οξέα.....	43
2.1.3 Απομόνωση πλασμιδίων από μικρής κλίμακας καλλιέργειες.....	43
2.1.4 Απομόνωση πλασμιδίων από μεσαίας κλίμακας καλλιέργειες.....	44
2.1.5 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης	45
2.1.6 Πέψη και σύνδεση τμημάτων DNA-Πλασμιδιακές κατασκευές.....	46
2.1.7 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων.....	50
2.1.8 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων	50
2.1.9 Απομόνωση DNA και RNA από ενήλικα άτομα <i>Drosophila</i>	51
2.1.10 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	52
2.1.11 Μεταφορά κατά Southern.....	53
2.1.12 Υβριδοποίηση κατά Southern.....	54
2.1.13 Διαμόλυνση κυτταρικής σειράς S2.....	55
2.1.14 Μέτρηση ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης	56
2.1.15 Μεταφορά Western.....	57
2.1.16 Παραγωγή DNA ιχνηθέτη σημασμένου με διγοξιγενίνη (DIG).....	59
2.1.17 Έλεγχος σήμανσης ιχνηθέτη με την μέθοδο dot-blot	59
2.1.18 Υπολογιστικά προγράμματα και βάσεις δεδομένων.....	60
2.2 Πρωτόκολλα χειρισμού και χρώσης στην <i>Drosophila</i>	61
2.2.1 Στελέχη <i>Drosophila</i> , διαχείριση και μετασηματισμός.....	61
2.2.2 Παραγωγή κλώνων κυττάρων χωρίς Dcr-1 ενεργότητα	65
2.2.3 Ανατομική αφαίρεση όρχεων από ενήλικα άτομα.....	65
2.2.4 Ανατομική αφαίρεση όρχεων ή αναπτυξιακών δίσκων από προνύμφες τρίτου σταδίου	66

2.2.5 Ανοσο-ιστοχημικές χρώσεις σε όρχεις ή αναπτυξιακούς δίσκους.....	67
2.2.6 In-situ υβριδοποίηση σε όρχεις από ενήλικα άτομα	69
2.2.7 Μικροσκοπία, φωτογράφιση	71

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ 72

3.1 Το γονίδιο <i>CG10222</i> ρυθμίζεται αρνητικά από το <i>miR-13</i>	72
3.1.1 Μια θέση δέσμευσης για miRNA εντοπίζεται στο <i>CG10222</i> -3' UTR.....	72
3.1.2 Η <i>in-vivo miR-13:CG10222</i> αλληλεπίδραση τεκμηριώνεται με EGFP αισθητήρες	76
3.1.3 Τα επίπεδα έκφρασης της EGFP ανεβαίνουν σε κλώνους κυττάρων που απουσιάζει η Dcr-1	81
3.1.4 Η παραγωγή του αισθητήρα από τον ενδογενή <i>CG10222</i> υποκινητή δεν ξεπερνά την <i>miR-13</i> αρνητική ρύθμιση	82
3.1.5 Η αυθόρμητη σίγηση των διαγονιδίων στην <i>Drosophila</i> γίνεται σε κλώνους κυττάρων	84
3.2 Τα πρώιμα γαμετικά κύτταρα των αρσενικών παρουσιάζουν υψηλή miRNA ενεργότητα.....	87
3.2.1 miRNA ενεργότητα στα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα των προνυμφικών όρχεων	88
3.2.2 miRNA ενεργότητα στα μιτωτικά κύτταρα των ενηλίκων όρχεων	91
3.2.3 Ανάλυση αισθητήρων που παράγονται από τον υποκινητή <i>hsp83</i>	94
3.2.4 Η miRNA ενεργότητα σταματά πριν την μείωση κατά την σπερματογένεση.....	96
3.3 Τα γονίδια <i>sa</i> και <i>ofs</i> οριοθετούν έμμεσα το μοτίβο ενεργότητας των miRNA	100
3.3.1 Τα ώριμα miRNA εκφράζονται και σε κυτταρικούς τύπους που δεν παρουσιάζουν σίγηση.....	100
3.3.2 Το <i>sa</i> άλλα όχι το <i>bol</i> έμμεσα αναστέλλει την δράση των miRNA.....	101
3.3.3 Το <i>ofs</i> προσπερνά την δράση των miRNA	106
3.3.4 Η miRNA ενεργότητα δεν επηρεάζεται από το <i>mei-P26</i>	112

4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 114

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 117

Περίληψη

Τα miRNA είναι μικρά ρυθμιστικά RNA μόρια που προσδένονται σε μερικώς συμπληρωματικές αλληλουχίες του 3'UTR των mRNA και παρεμποδίζουν την μετάφρασή τους. Κάθε miRNA στοχεύει ένα μεγάλο αριθμό μεταγράφων ασκώντας με αυτόν τον τρόπο πλειοτροπικό έλεγχο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Σήμερα η εύρεση και η περαιτέρω πειραματική απόδειξη των miRNA:mRNA αλληλεπιδράσεων συγκεντρώνει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον. Πρόσφατες εργασίες εμπλέκουν βασικούς παράγοντες της βιογένεσης των miRNA στη ρύθμιση της διαίρεσης και την διατήρηση της ταυτότητας των αρχέγονων γαμετικών κυττάρων στην *Drosophila melanogaster*.

Στην παρούσα εργασία αρχικά παρουσιάζεται η *in-vivo* πειραματική απόδειξη της αρνητικής μετα-μεταγραφικής ρύθμισης που επιβάλλει το *miR-13* στο γονίδιο *CG10222* μέσω του 3'UTR του, στην *Drosophila*. Για τον σκοπό αυτό παρήχθησαν και αναλύθηκαν διαγονιδιακές σειρές «αισθητήρες» στις οποίες το γονίδιο ανταποκριτής EGFP συνδέθηκε με το αγρίου τύπου *CG10222-3'UTR* ή με κατάλληλα τροποποιημένες παραλλαγές του. Η έκφραση της EGFP σε προνύμφες τρίτου σταδίου παρέμεινε χαμηλή παρουσία του αγρίου τύπου *CG10222-3'UTR*, ενώ αντίθετα ανήλθε σε φυσιολογικά επίπεδα όταν το σημείο πρόσδεσης για το *miR-13* είχε αλλοιωθεί. Αντίστοιχα, η παραγωγή κλώνων κυττάρων όπου απουσίαζαν τα miRNA συντέλεσε στην άνοδο των επιπέδων έκφρασης του αισθητήρα. Επιπροσθέτως παρατηρήθηκε ότι η μετα-μεταγραφική αρνητική ρύθμιση που επέβαλε το *miR-13* στο *CG10222* υπερίσχυε του ρυθμού μεταγραφής από τον ενδογενή υποκινητή. Παράλληλα με τα παραπάνω, μελετήθηκε το φαινόμενο της αυθόρμητης σίγησης των διαγονιδίων ως παραπροϊόν του γενετικού μετασχηματισμού της *Drosophila*.

Με οδηγό την απόκριση της χίμαιρας EGFP/CG10222-3'UTR απέναντι στο *miR-13* οι σειρές αισθητήρες αποτέλεσαν ένα βασικό εργαλείο για τη μελέτη του προτύπου ενεργότητας των miRNA στην αρσενική γαμετική σειρά. Η ανάλυση της έκφρασης της EGFP σε όρχεις από προνύμφες τρίτου σταδίου και ενήλικα άτομα αποκάλυψε υψηλή *miR-13* ενεργότητα στα πρώιμα προ-μειωτικά γαμετικά κύτταρα. Κατά την ωρίμανση των σπερματοκυττάρων, πριν την είσοδό τους στην μείωση, η ενεργότητα του *miR-13* σταδιακά αναιρέθηκε. Το ίδιο πρότυπο ενεργότητας καταγράφηκε κατά την ανάλυση σειρών αισθητήρων και για άλλα miRNA προτείνοντας την γενίκευση των παρατηρήσεων για όλα συνολικά τα γαμετικά εκφραζόμενα miRNA.

Η ανίχνευση του προτύπου έκφρασης ενός miRNA από την υποοικογένεια *miR-2/miR-13* έδειξε ότι παράγονταν και σε ωριμότερους πληθυσμούς προ-μειωτικών σπερματοκυττάρων όπου δεν ήταν πλέον ενεργό. Βάση αυτής της παρατήρησης δημιουργήθηκαν ενδείξεις για την ύπαρξη ενός ενεργού μηχανισμού αναχαίτισης της δράσης των miRNA κατά την περίοδο ωρίμανσης των σπερματοκυττάρων. Η miRNA-ελεγχόμενη σίγηση του ανταποκριτή έγινε καθολική όταν οι σειρές αισθητήρες συνδυάστηκαν γενετικά με τα μεταλλάγματα των *spermatocyte arrest, sa* και *off-schedule, ofs*. Αντίθετα το πρότυπο σίγησης δεν αλλοιώθηκε στα μεταλλάγματα των *always early* και *boule*, τα οποία φυσιολογικά δραστηριοποιούνται στον ίδιο κυτταρικό πληθυσμό. Η συσχέτιση των ευρημάτων της παρούσας εργασίας οδηγεί σε ένα μοντέλο κατά το οποίο τα miRNA εκφράζονται και δρουν στα πρώιμα γαμετικά κύτταρα της αρσενικής σειράς. Κατά την πρόοδο της σπερματογένεσης, στο στάδιο των ωριμαζόντων σπερματοκυττάρων, τα γονίδια *sa* και *ofs* ακυρώνουν την δράση των miRNA μέχρι που τα miRNA παύουν να παράγονται.

Abstract

miRNAs are small regulatory RNA molecules that bind to partially complementary sequences at the 3'UTR of mRNAs and impair their translation. Each miRNA is able to target multiple transcripts exerting in this way a pleiotropic effect on the regulation of gene expression. Nowadays, the identification and further experimental justification of miRNA:mRNA interactions attract intense scientific interest. It has recently been reported that key-factors of miRNA biogenesis are involved in the control of germ stem cell division and maintenance in *Drosophila melanogaster*.

Initially, this study provides *in-vivo* experimental evidence for the negative post-transcriptional regulation of gene *CG10222* in *Drosophila* by *miR-13* through the 3'UTR sequence. "Sensor" transgenic lines were therefore produced and analyzed, where the reporter gene EGFP was fused to the wild type or appropriately mutated versions of *CG10222*-3'UTR. EGFP expression in third instar larvae remained low in the presence of the wild type *CG10222*-3'UTR, while it was restored to normal levels when the binding site for *miR-13* was mutated. Correspondingly, miRNA-free cell clones exhibited high sensor expression levels. It was also observed that the post-transcriptional negative regulation imposed by *miR-13* on *CG10222* prevailed over the endogenous transcriptional rate. In parallel, transgene spontaneous silencing, as a by-product of the genetic transformation of *Drosophila*, was also studied.

Based on the response of EGFP/*CG10222*-3'UTR towards *miR-13*, sensor lines became a valuable tool in investigating the miRNA activity pattern in the male germ line. Through the analysis of EGFP expression in testes taken from third instar larvae and adult individuals, it was observed that *miR-13* was highly active only in the early pre-meiotic sperm progenitor cells. As spermatogenesis reached the spermatocyte

growth stage, *miR-13* activity gradually disappeared. The same activity pattern was revealed after analyzing sensor lines for other miRNA implying that all germ line expressed miRNA exhibit this general activity profile.

The detection of the expression pattern for one member of the *miR-2/miR-13* subfamily revealed that it was further produced in late pro-meiotic spermatocyte populations, where it was no longer active. This observation suggested the presence of an active mechanism that intercepted miRNA activity during the spermatocyte growth period. When the sensor lines were tested under *spermatocyte arrest (sa)* and *off-schedule (ofs)* mutant backgrounds, the reporter exhibited silencing in all cell types. On the contrary, the silencing pattern was not affected in *always early* and *boule* mutants, although these genes are activated during the same spermatogenesis stage. The combined findings of this study lead to a model where miRNAs are expressed and act in the early sperm progenitor cells. As germ line differentiation proceeds through the spermatocyte growth period, *sa* and *ofs* genes gradually block miRNA activity until the point where miRNA expression ceases.

1 Εισαγωγή

Σύμφωνα με το βασικό «δόγμα» της βιολογίας το RNA είναι ο μεσάζων παράγοντας στην μεταφορά της γενετικής πληροφορίας από το DNA στις πρωτεΐνες. Επίσης αποτελεί το βασικό συστατικό των ριβοσωμάτων, αποκωδικοποιεί την γενετική πληροφορία μέσω των tRNA και σε κάποιες περιπτώσεις παρουσιάζει καταλυτική ενεργότητα. Η ανακάλυψη του φαινομένου της RNA σίγησης (RNA silencing) ανέδειξε μια ακόμα αρμοδιότητα του RNA, αυτήν της αρνητικής ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης με τρόπο ειδικό προς την αλληλουχία σε επίπεδο μεταγραφικό ή κυρίως μετα-μεταγραφικό. Βασικοί τελεστές της RNA-σίγησης είναι μικρά μόρια RNA, με κατά μέσο όρο 22 νουκλεοτίδια, που δεν μεταφράζονται προς αμινοξικά κατάλοιπα και προέρχονται από μεγαλύτερα δίκλινα μόρια RNA. Τα μικρά ρυθμιστικά RNA σχηματίζουν συμπλέγματα σίγησης με τις πρωτεΐνες της υπεροικογένειας των Αργοναυτών (Argonaute, Ago) και προσδένονται σε mRNA-στόχους με απόλυτη ή μερική συμπληρωματικότητα. Το αποτέλεσμα αυτής της πρόσδεσης επηρεάζει αρνητικά την σταθερότητα ή την μετάφραση των mRNA στο κυτταρόπλασμα ή σε κάποιες περιπτώσεις επάγει φαινόμενα μεθυλίωσης του DNA ή των ιστονών στον πυρήνα.

Η αποκάλυψη του ρυθμιστικού ρόλου του RNA στην τελική έκφραση της γενετικής πληροφορίας αποτέλεσε ένα καινούργιο πεδίο παρατήρησης στην μελέτη της βιολογίας των οργανισμών. Συνάμα δημιουργήθηκαν οι προϋποθέσεις για μια νέα μέθοδο ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης που βασίζεται σε απλούς κανόνες υβριδισμού RNA μορίων και όχι σε πολύπλοκες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Σήμερα η έρευνα για τα μικρά ρυθμιστικά RNA προσελκύει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας σε μεγάλο βαθμό και είναι ήδη αντιληπτό ότι αποτελούν έναν αρκετά ετερογενή πληθυσμό. Διακρίνονται πλέον σε επιμέρους ομάδες ανάλογα

με την προέλευσή τους, τον τρόπο παραγωγής, τον τρόπο δράσης και τις λειτουργίες που συντονίζουν.

Η παρούσα διατριβή επικεντρώνεται σε θέματα RNA ρύθμισης που διαμεσολαβούνται από την ομάδα των microRNA (miRNAs) και παρατηρούνται στο δίπτερο *Drosophila melanogaster* (*Drosophila*). Ο μικρός κύκλος ζωής της *Drosophila*, η εύκολη σχετικά δυνατότητα καλλιέργειάς της, η πλήρης αλληλούχιση του γονιδιώματος και η μεγάλη διαθεσιμότητα στελεχών ποικίλων γονοτύπων είναι μερικά μόνο από τα γνωρίσματα που την ανέδειξαν σε ένα δημοφιλές αντικείμενο έρευνας. Η χρήση της *Drosophila* ως οργανισμός μοντέλο είναι ευρεία και η μελέτη των φυσικών διαδικασιών οντογένεσής της έχει συμβάλει σημαντικά στην πρόοδο της γενετικής και αναπτυξιακής βιολογίας.

1.1 Βασικά στοιχεία της RNA σίγησης στην *Drosophila*

1.1.1 Το μονοπάτι των siRNA

Το εναρκτήριο σήμα επαγωγής της RNA σίγησης είναι ένα μακρύ δίκλωνο μόριο RNA με εξωγενή ή ενδογενή προέλευση. Αυτό μπορεί να αποτελεί το ενδιάμεσο παράγωγο στον κύκλο ζωής ενός ιού ή ενός μεταθετού στοιχείου, το αποτέλεσμα της μεταγραφής μιας παλίνδρομης αλληλουχίας του γονιδιώματος ή του υβριδισμού δυο συμπληρωματικών μεταγράφων, ή ακόμα το προϊόν δράσης μιας ενδογενούς RNA-εξαρτώμενης πολυμεράσης (RdRP ή RDR) σε mRNA με ασυνήθιστα χαρακτηριστικά (Baulcombe, 2004; Zamore and Haley, 2005; Matranga and Zamore, 2007). Η πρωτεΐνη Dicer είναι μια ειδική για dsRNA ενδονουκλέαση συγγενής των ριβο-νουκλεασών τύπου III των βακτηρίων (RNaseIII-like). Έχει βρεθεί σε μονοκύτταρους και πολυκύτταρους οργανισμούς και δρα τέμνοντας τα dsRNA σε μικρότερα μόρια αφήνοντας μια φωσφορική ομάδα στα 5' άκρα και δύο

προεξέχοντα νουκλεοτίδια στα 3' (Bernstein et al., 2001; Elbashir et al., 2001; Nykanen et al., 2001; Margis et al., 2006). Οι Dicer στην *Drosophila* είναι δύο και φέρουν αμφότερες τις περιοχές Helicase-C, Duf283, PAZ, RNaseIIIa, RNaseIIIb και dsRBD. Η Dicer-2 (Dcr-2) έχει επιπρόσθετα την περιοχή DExD στο αμινοτελικό της άκρο και είναι το ένζυμο που καταλύει την κατάτμηση των μακριών dsRNA σε μικρότερα μέσω του καταλυτικού της κέντρου που δομείται από τις δύο περιοχές RNaseIII. Τα προϊόντα της Dcr-2 είναι dsRNA μόρια μήκους 21-23 νουκλεοτίδια που ονομάζονται μικρά παρεμποδιστικά RNA ή siRNAs (Lee et al., 2004; Pham et al., 2004). Η παρουσία τους σε ένα κύτταρο είναι η βασικότερη ένδειξη ενεργοποίησης του μονοπατιού της σίγησης (Hamilton and Baulcombe, 1999).

Κατόπιν της παραγωγής των siRNA η μια αλυσίδα (οδηγός) θα καταλήξει στο ριβο-πρωτεϊνικό σύμπλεγμα σίγησης, RNA-Induced Silencing Complex (RISC) ενώ η συμπληρωματική της (συνοδός) θα αποικοδομηθεί. Το βασικό πρωτεϊνικό συστατικό του RISC είναι μέλη της υπεροικογένειας των Ago πρωτεϊνών που απαντούν όπως οι Dicer σε πλήθος οργανισμών. Οι διακριτές δομικές περιοχές των Ago είναι οι N-terminal, MID, PAZ και PIWI (Carmell et al., 2002).

Η διαδικασία της διαλογής της οδηγού siRNA αλυσίδας και της μεταφοράς της στο RISC εξυπηρετείται από την Dcr-2 και την dsRNA-δεσμευόμενη R2D2. Η θερμοδυναμική σταθερότητα των 5' άκρων των δύο αλυσίδων είναι καθοριστικός κανόνας διαλογής. Η αλυσίδα που το 5' άκρο της είναι πιο χαλαρά συνδεδεμένο με το συμπληρωματικό κρίνεται ως η οδηγός αλυσίδα και θα προσδεθεί σταθερά στην πρωτεΐνη Ago2 (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003; Tomari et al., 2004). Επί των Ago2 δεσμευμένων siRNA δρα η μεθυλάση Hen1 και προσθέτει μια μεθυλομάδα στο 3' άκρο (Horwich et al., 2007). Αντίθετα η συνοδός αλυσίδα τέμνεται εσωτερικά από την Ago2 και απομακρύνεται οδηγούμενη προς ολική αποικοδόμηση (Matranga

et al., 2005). Με αυτήν την διαδικασία παράγονται συμπλέγματα Ago2 με siRNA προερχόμενα από διαφορετικές θέσεις του αρχικού μακριού dsRNA. Αυτά θα συναντηθούν με περιοχές των mRNA απολύτως συμπληρωματικές και θα επαχθεί ενδονουκλεόλυση, καταλυόμενη από την RNase-H ενεργότητα που έχει η PIWI περιοχή της Ago2 (Song et al., 2004). Τα προϊόντα της κοπής ύστερα θα αποικοδομηθούν πλήρως από κυτταρικές εξω-ριβο-νουκλεάσες.

Στην *Drosophila* το μοναδικό σχεδόν φυσικό παράδειγμα παρουσίας dsRNA εξωγενούς προέλευσης προέρχεται από τον κύκλο αντιγραφής του ιού Flock House Virus (FHV). Τα dsRNA ενδιάμεσα του FHV εισέρχονται στο μονοπάτι σίγησης Dcr-2/Ago2 και στις περισσότερες περιπτώσεις καταστέλλεται η ιϊκή μόλυνση μέσω της αποικοδόμησης των FHV mRNA από ειδικά siRNA 21 νουκλεοτιδίων (Flynt et al., 2009). Πρόσφατα όμως εντοπίστηκαν και dsRNA ενδογενούς προέλευσης τα οποία διακρίνονται σε δύο κατηγορίες. Αυτά που προκύπτουν από την μεταγραφή παλίνδρομων αλληλουχιών και έχουν μορφή φουρκέτας (stem-loop) και αυτά που παράγονται από την μεταγραφή και από τις δύο κατευθύνσεις ετεροχρωματικών περιοχών που περιέχουν κατάλοιπα μεταθετών στοιχείων (Kawamura et al., 2008). Και στις δύο περιπτώσεις η δράση της Dcr-2 μαζί την ισομορφή D της dsRNA-δεσμευόμενης πρωτεΐνης Loquacious (Loqs) οδηγεί στην παραγωγή των ενδογενών siRNA (esiRNAs) με μήκος 20-22 νουκλεοτίδια τα οποία προσδένονται στην Ago2 (Kawamura et al., 2008; Zhou et al., 2009). Τα esiRNA παράγονται σε σωματικά και γαμετικά κύτταρα στοχεύοντας πρωτεϊνικά γονίδια ή μεταθετά στοιχεία (Czech et al., 2008). Στην γαμετική σειρά της *Drosophila* δρα ένα επιπλέον μονοπάτι καταστολής των μεταθετών στοιχείων, μέσω μιας ανεξάρτητης ομάδας μικρών RNA, για το οποίο θα γίνει λόγος σε ξεχωριστή υποενότητα.

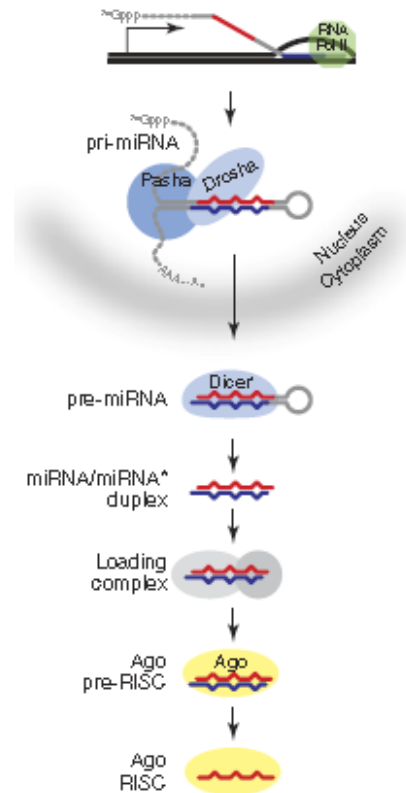
1.1.2 Το μονοπάτι των miRNA

1.1.2.1 Η βιογένεση των miRNA

Τα miRNA είναι ενδογενή μικρά ρυθμιστικά RNA με κατά μέσο όρο 22 νουκλεοτίδια μήκος (Bartel, 2004). Τα γονίδια τους μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II σε πρώιμες δομές που ονομάζονται πρωτογενή miRNA (primary miRNAs, pri-miRNAs) (Cai et al., 2004). Η κατανομή των miRNA-γονιδίων στο γονιδίωμα ποικίλει. Τα περισσότερα εντοπίζονται σε περιοχές μεταξύ «πρωτεϊνικών» γονιδίων ενώ άλλα σε εσώνια ακολουθώντας τους μεταγραφικούς ρυθμούς των γονιδίων ξενιστών. Ένα miRNA γονίδιο μπορεί να υφίστανται ως ανεξάρτητη μεταγραφική μονάδα μέσα στο γονιδίωμα ή να βρίσκεται οργανωμένο μαζί με άλλα σε μια συστοιχία που παράγει πολυκιστρονικά μετάγραφα (Rodriguez et al., 2004).

Ένα τυπικό μονοκιστρονικό pri-miRNA αποτελείται από μια ατελώς δίκλωνη περιοχή που καταλήγει σε μια θηλιά και περιβάλλεται από δύο ακραία μονόκλιωνα τμήματα (Εικ. 1). Η RNaseIII-like νουκλεάση Drosha μαζί με την dsRNA-δεσμευόμενη πρωτεΐνη Pasha είναι τα βασικά συστατικά του συμπλέγματος microprocessor που αναλαμβάνει να κόψει την δίκλωνη περιοχή 11 βάσεις πριν από τα τελευταία ταιριασμένα νουκλεοτιδιά της, απομακρύνοντας έτσι τις ακραίες μονόκλωνες αλληλουχίες. Με αυτό τον τρόπο απελευθερώνεται μια δομή φουρκέτας περίπου 65 νουκλεοτιδίων, που καλείται πρόδρομο miRNA (miRNA precursors, pre-miRNAs) (Lee et al., 2003; Han et al., 2004; Han et al., 2006). Ορισμένα ιντρονικά miRNA προσπερνούν το στάδιο επεξεργασίας από το microprocessor διότι ο ίδιος ο μηχανισμός ματίσματος των εξωνίων παράγει ένα έτοιμο pre-miRNA. Τέτοια miRNA ονομάζονται mirtrons (Okamura et al., 2007). Η διαδικασία παραγωγής των pre-miRNA με τον κύριο ή τον δευτερεύοντα τρόπο ολοκληρώνεται στον πυρήνα και

κατόπιν αυτά εξέρχονται στο κυτταρόπλασμα με τη βοήθεια της Exportin-5 και της RanGTP (Bohnsack et al., 2004).



Εικόνα 1. Η βιογένεση των miRNA στους ζωικούς οργανισμούς.

Η RNA πολυμεράση II παράγει τα πρωτογενή μετάγραφα των miRNA (pri-miRNAs). Η συνιστάμενη δράση των Drosha και Pasha στον πυρήνα αφαιρεί τις ακραίες μονόκλωνες αλληλουχίες, παράγοντας το πρόδρομο miRNA (pre-miRNA). Το pre-miRNA εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα όπου η Dicer εκτέμνει την περιοχή της θηλιάς. Το miRNA (κόκκινο χρώμα) μαζί με την συνοδό αλυσίδα του (μπλε χρώμα) προσδένονται στην Ago με τη βοήθεια ενός πρωτεϊνικού συμπλέγματος άγνωστης μέχρι τώρα σύστασης. Η συνοδός αλυσίδα απομακρύνεται και το miRNA μαζί με την Ago συνθέτουν το ενεργοποιημένο σύμπλεγμα σίγησης (RISC). Τροποποιημένη από Matranga and Zamore, 2007.

Η βιογένεση των miRNA συνεχίζεται στο κυτταρόπλασμα όπου η Dicer-1 (Dcr-1) με τη συμμετοχή της ισομορφής B της Loqs αποκόπτει την περιοχή της θηλιάς από το pre-miRNA (Lee et al., 2004; Forstemann et al., 2005). Η εναπομένουσα δίκλωνη περιοχή αποτελείται από το ώριμο πλέον miRNA και την αλυσίδα συνοδό του. Στις περισσότερες περιπτώσεις η αλυσίδα του miRNA είναι μερικώς συμπληρωματική με

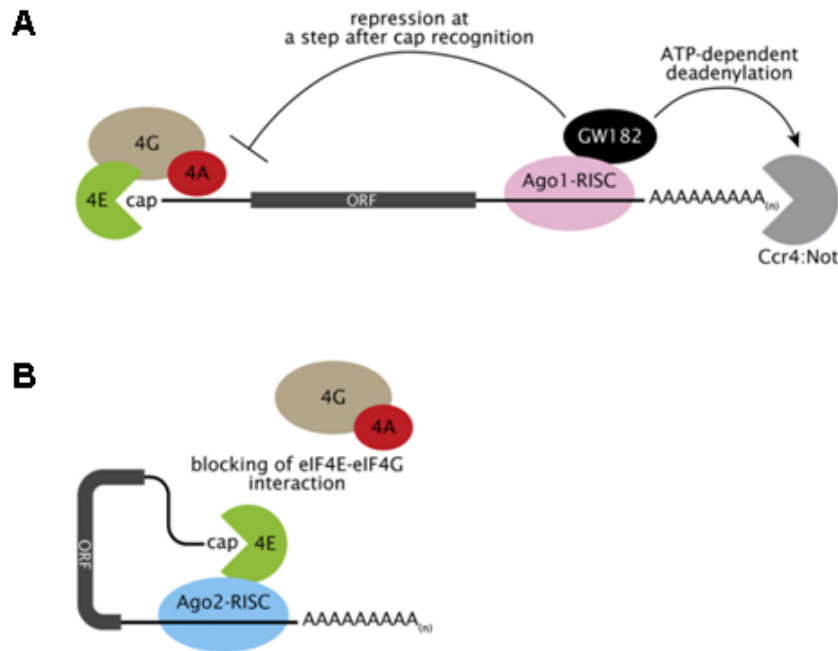
την συνοδό της και εντοπίζονται μονόκλωνοι βρόγχοι στην κεντρική τους περιοχή. Με έναν άγνωστο ακόμα μηχανισμό, ανάλογο της Dcr-2/R2D2, γίνεται διαλογή των δύο αλυσίδων με θερμοδυναμικά κριτήρια και κατόπιν πρόσδεση στην Ago1. Αντίθετα στην περίπτωση που η κεντρική περιοχή μεταξύ miRNA και συνοδού αλυσίδας είναι απόλυτα συμπληρωματική το σύμπλεγμα Dcr-2/R2D2 αναλαμβάνει δράση από το σημείο αυτό και έπειτα. Όπως και με το μονοπάτι των siRNA, επιτελείται διαλογή και πρόσδεση του miRNA στην Ago2 ενώ η συνοδός αλυσίδα τέμνεται και αποικοδομείται. Είναι λοιπόν ο βαθμός συμπληρωματικότητας στο κέντρο των αλυσίδων του δίκλωνου miRNA το κριτήριο που καθορίζει το είδος της Ago που θα το προσδέσει (Forstemann et al., 2007; Tomari et al., 2007).

1.1.2.2 Ο μηχανισμός δράσης των miRNA

Η αρνητική επίδραση που επιβάλλουν τα miRNA στην γονιδιακή έκφραση συχνά παρουσιάζεται μέσω της μείωσης στην έκφραση των πρωτεϊνών που ρυθμίζουν. Ωστόσο, ο τρόπος με τον οποίο αυτά δρουν στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο παραμένει υπό διερεύνηση. Τα ζωικά miRNA βάσει της αλληλουχίας τους οδηγούν τις Ago σε σημεία πρόσδεσης που εντοπίζονται στην μη-μεταφραζόμενη περιοχή του 3' άκρου (3' UTR) των mRNA. Ο βαθμός συμπληρωματικότητας μεταξύ miRNA και στόχου καθορίζει το μηχανισμό καταστολής. Αν υπάρχει πλήρης συμπληρωματικότητα, τα miRNA μπορούν να δράσουν ως siRNA επάγοντας ενδονουκλεόλυση του στόχου, μέσω της RNaseH ενεργότητας που έχει η Ago2 και σε μικρότερο βαθμό η Ago1 (Okamura et al., 2004; Parker et al., 2004; Miyoshi et al., 2005; Forstemann et al., 2007). Κατά κανόνα όμως τα miRNA προσδένονται σε μερικώς συμπληρωματικούς στόχους και επάγουν καταστολή της μετάφρασης με μηχανισμούς που μόλις πρόσφατα έχουν αρχίσει να αποσαφηνίζονται.

Κεντρικό ερώτημα για την κατανόηση του μηχανισμού καταστολής της μετάφρασης από τα miRNA είναι ο εντοπισμός του σταδίου της πρωτεϊνοσύνθεσης που αυτά παρεμποδίζουν. Η μελέτη της έναρξης της μετάφρασης στα ευκαρυωτικά κύτταρα έχει δείξει ότι ο eIF4E συνδέεται στο κάλυμμα του 5' άκρου των mRNA, ο eIF4A ξεδιπλώνει την δευτεροταγή δομή των 5' UTR και ο eIF4G αποτελεί την πρωτεΐνη ικρίωμα που φέρνει κοντά τις 4A και 4E. Επιπροσθέτως ο παράγοντας eIF4G προσδέεται στην polyA-δεσμευόμενη πρωτεΐνη (PABP) του 3' άκρου (Tarun and Sachs, 1996). Παλιότερες αναλύσεις με διαδικασίες κυτταρικής κλασμάτωσης παρείχαν ενδείξεις ότι τα miRNA συνεντοπίζονται με ενεργά ριβοσώματα δηλώνοντας έτσι ότι τα αρχικά στάδια γεινίασης mRNA και ριβοσωμάτων εκτελούνται κανονικά παρουσία των miRNA (Seggerson et al., 2002). Μετέπειτα μελέτες όμως αμφισβήτησαν αυτά τα αποτελέσματα και υποστήριξαν ένα μοντέλο δράσης όπου τα miRNA αναστέλλουν τα αρχικά στάδια της πρωτεϊνοσύνθεσης (Pillai et al., 2005; Thermann and Hentze, 2007).

Συγκεκριμένα η Ago1 αλληλεπιδρά με την GW182 και επάγεται αποαδενυλίωση στα στοχευμένα mRNA (Εικ. 2A). Αυτό σε πρώτη φάση ακυρώνει το πλησίασμα του 3' με το 5' άκρο του mRNA μέσω της PABP και του eIF4G. Παράλληλα προσελκύονται πρωτεΐνες όπως η DCP2 που αποικοδομούν το κάλυμμα του 5' άκρου με αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση του mRNA οδηγώντας το προς ολική αποικοδόμηση (Eulalio et al., 2008). Στην περίπτωση που τα miRNA είναι προσδεμένα στην Ago2 το μοντέλο καταστολής ακολουθεί διαφορετικό δρόμο (Εικ. 2B). Η Ago2 προσδέεται στον eIF4E παρεμποδίζοντας έτσι την αλληλεπίδραση του με το eIF4G. Έτσι το σύμπλεγμα έναρξης της μεταγραφής αδυνατεί να σχηματιστεί και η μετάφραση δεν ξεκινά (Iwasaki et al., 2009).



Εικόνα 2. Οι πρωτεΐνες Ago στην *Drosophila* παρεμποδίζουν την μετάφραση των mRNA με δύο διακριτούς μηχανισμούς.

(A) Η Ago1 αλληλεπιδρά με την GW182 η οποία προσελκύει παράγοντες που αποσταθεροποιούν τα mRNA. Η αποαδενυλίωση του 3' άκρου είναι ATP-εξαρτώμενη. Εικάζεται ότι δευτερογενώς, η GW182 παρεμποδίζει την μετάφραση σε ένα στάδιο μετά την πρόσδεση του συμπλέγματος έναρξης της μετάφρασης (4G, 4E, 4A) στο κάλυμα του 5' άκρου. (B) Η στόχευση της Ago2 στο 3'UTR αυξάνει την συγγένεια πρόσδεσής της για τον eIF4E στη θέση που φυσιολογικά δεσμεύεται ο eIF4G. Έτσι παρεμποδίζεται ο σχηματισμός του συμπλέγματος έναρξης της μετάφρασης. Από Iwasaki et al., 2009.

Το αποτέλεσμα της δράσης των miRNA εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό και από το στοχευόμενο mRNA. Ο αριθμός και οι θέσεις πρόσδεσης για miRNA μέσα στο 3'UTR, η απόσταση μεταξύ τους και το ποσοστό συμπληρωματικότητας είναι παράγοντες που εξειδικεύουν το μοτίβο αναστολής που θα ακολουθηθεί (Grimson et al., 2007). Ένα πρόσθετο επίπεδο ελέγχου της δράσης των miRNA γεννάται και από το γεγονός ότι τα mRNA στόχοι δεν είναι «γυμνά» μέσα στο κύτταρο, απεναντίας είναι συχνά προσδεμένα σε ειδικές για αυτά πρωτεΐνες. Έχουν αναφερθεί εργασίες όπου μια mRNA-δεσμευόμενη πρωτεΐνη αποτρέπει την προσβασιμότητα των miRNA στις θέσεις πρόσδεσης τους, ακυρώνοντας έτσι την δράση τους (Kedde and Agami, 2008). Αντίθετα στην περίπτωση της πρωτεΐνης Pumilio (Pum), η πρόσδεσή της στο

mRNA προκαλεί αλλαγή στην δευτεροταγή δομή του 3'UTR με τρόπο ώστε να αναδεικνύονται οι θέσεις δέσμευσης για miRNA, επάγοντας έτσι έμμεσα αναστολή της μετάφρασης (Nolde et al., 2007; Li, Y. et al., 2009).

1.1.2.3 Η ανίχνευση των miRNA και των στόχων τους

Η αλληλούχιση βιβλιοθηκών μικρών RNA οδήγησε στην ανακάλυψη των πρώτων miRNA σε πολλούς οργανισμούς συμπεριλαμβανομένης και της *Drosophila* (Lagos-Quintana et al., 2001). Η αναγνώριση της δομής φουρκέτας που παράγουν οι γονιδιακοί τόποι των miRNA αλλά και ο βαθμός συντήρησης που επιδεικνύουν μεταξύ συγγενικών ειδών βοήθησε στην ανάπτυξη πολλών υπολογιστικών προγραμμάτων που συνέβαλαν στην αποκάλυψη ακόμα περισσότερων (Lai et al., 2003; Lim et al., 2003). Παράλληλα τροποποιήθηκαν πρωτόκολλα Northern blot και *in situ* υβριδοποίησης με σκοπό την ανίχνευση των miRNA σε διαφορετικούς ιστούς και στάδια ανάπτυξης (Aravin et al., 2003; Aboobaker et al., 2005). Σήμερα οι παραπάνω μέθοδοι συμπληρώνονται από υψηλής τεχνολογίας διαδικασίες αλληλούχισης που φέρνουν στο φως όλο και πιο πολλές νέες αλληλουχίες miRNA (Ruby et al., 2007).

Στην *Drosophila* έχουν αναγνωριστεί περισσότερα από 100 miRNA μέχρι σήμερα πολλά από τα οποία κατατάσσονται σε οικογένειες λόγω της εκτενούς ομοιότητας που παρουσιάζουν (Lai et al., 2003; Sandmann and Cohen, 2007). Το επόμενο ερώτημα που προέκυψε ήταν η εύρεση των γονιδίων-στόχων που ρυθμίζει το κάθε miRNA. Με δεδομένο ότι τα miRNA υβριδίζουν με μερική συμπληρωματικότητα στους στόχους τους, το εγχείρημα εύρεσης των θέσεων δέσμευσης στα 3'UTR γίνονταν πιο δύσκολο. Λίγο καιρό πριν να ανακαλυφθούν τα miRNA είχεδειχθεί ότι μια ομάδα γονιδίων-στόχοι του μονοπατιού σηματοδότησης

Notch ονομαζόμενα *bHLH* και *Bearded*, καταστέλλονται μετα-μεταγραφικά μέσω αλληλουχιών περίπου 7 νουκλεοτιδίων που εντοπίζονται στο 3'UTR τους. Αυτές οι αλληλουχίες αρνητικής ρύθμισης ονομάστηκαν αντίστοιχα μοτίβα K-box, Btd-box και GY-box και μεταγενέστερα βρέθηκε ότι είναι συμπληρωματικές προς τα νουκλεοτίδια 2-8 του 5' άκρου τριών κατηγοριών miRNA (Lai and Posakony, 1997; Leviten et al., 1997; Lai et al., 1998; Lai, 2002; Lai et al., 2005). Έτσι όχι μόνο παρουσιάστηκαν πρώιμα παραδείγματα αλληλεπίδρασης μεταξύ miRNA και mRNA, αλλά συνάμα έγινε αντιληπτό ότι τα πρώτα 7-8 νουκλεοτίδια ενός miRNA πρέπει να συνδέονται με απόλυτη συμπληρωματικότητα στους στόχους τους προκειμένου να είναι λειτουργικά. Η περιοχή αυτή σε κάθε miRNA αναφέρεται πλέον ως seed region (Lewis et al., 2003).

Η ανακάλυψη των περιοχών seed βοήθησε κατά πολύ στον σχεδιασμό υπολογιστικών προγραμμάτων ανίχνευσης miRNA-στόχων κάνοντας χρήση κατάλληλων αλγορίθμων και φίλτρων. Βασικά κριτήρια ανάδειξης ενός μεταγράφου ως miRNA-στόχο είναι: Η απόλυτη συμπληρωματικότητα προς την περιοχή seed, η τιμή της ελεύθερης ενέργειας αλληλεπίδρασης των δύο RNA που είναι ανάλογη του βαθμού συμπληρωματικότητας που παρουσιάζουν, ο βαθμός συντήρησης της θέσης δέσμευσης σε συγγενικά είδη και η δευτεροταγής δομή του 3'UTR που στοχεύεται (Stark et al., 2003; Brennecke et al., 2005). Για την αποφυγή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων θα πρέπει τα *in silico* αποτελέσματα να συνοδεύονται από αντιπροσωπευτικές εργαστηριακές δοκιμές.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι δεν είναι απαραίτητο να ισχύουν ταυτόχρονα όλες οι παραπάνω προϋποθέσεις προκειμένου να ισχύει *in vivo* μια miRNA:mRNA αλληλεπίδραση. Για παράδειγμα υπάρχουν περιπτώσεις που το σημείο πρόσδεσης στο 3'UTR δεν είναι συντηρημένο γιατί προέκυψε αργότερα κατά την εξέλιξη (Pek et

al., 2009). Επίσης έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου η περιοχή seed δεν είναι καλά προσδεμένη στο 3'UTR αλλά παρόλα αυτά συμβαίνει αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο RNA γιατί υπάρχει εκτενής συμπληρωματικότητα στο 3' άκρο του miRNA (Brennecke et al., 2005; Pek et al., 2009). Έτσι για να μην εξαιρεθούν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα από μια υπολογιστική ανάλυση καλό είναι τα προγράμματα να διαθέτουν ευελιξία στην εφαρμογή των κριτηρίων επιλογής.

Άλλες μέθοδοι μαζικής ανίχνευσης miRNA-στόχων προσβλέπουν στην ανάλυση του συνόλου των μεταγράφων ή των πρωτεϊνών που η έκφραση τους τροποποιείται από ένα miRNA. Τέτοιες είναι οι μικροσυστοιχίες, η φασματομετρία μάζας και η ανοσοκατακρύμνιση (Sood et al., 2006; Grosshans and Filipowicz, 2008; Hsu et al., 2009).

1.1.2.4 Ο βιολογικός ρόλος των miRNA

Ένα miRNA είναι σε θέση να ρυθμίζει πολλούς γονιδιακούς στόχους και αντίστοιχα ένα mRNA δύναται να διαθέτει περισσότερες από μια θέσεις δέσμευσης για miRNA. Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί δεκάδες παραδείγματα miRNA-ρύθμισης που αφορούν συνολικά σε μονοπάτια ανάπτυξης, ρύθμισης της κυτταρικής διαίρεσης, απόκρισης σε στρες και διατήρησης της κυτταρικής ομοιόστασης. Για το λόγο αυτό τα miRNA γρήγορα συνδέθηκαν με την παθογένεια πολλών γενετικών ασθενειών (Zhao and Srivastava, 2007).

Στις περιπτώσεις που το miRNA και ο στόχος του συνεκφράζονται χρονικά και τοπικά η καταστολή σκοπεύει στην διατήρηση των επιπέδων της αντίστοιχης πρωτεΐνης κάτω από μια ορισμένη ουδό εξασφαλίζοντας έτσι την ομαλότητα των κυτταρικών διαδικασιών που συντονίζει. Πολύ συχνά αυτός ο τύπος ρύθμισης είναι αμφίδρομος και το ίδιο το miRNA βρίσκεται κάτω από τον άμεσο ή έμμεσο

μεταγραφικό έλεγχο του μονοπατιού που το ίδιο συντονίζει. Με αυτόν τον τρόπο miRNA και στόχος συμμετέχουν σε μια λειτουργική ισορροπία (Li, X. et al., 2009). Αντίθετα, δύναται το μοτίβο έκφρασης του miRNA να είναι τοπικά συμπληρωματικό με αυτό του στόχου, σε γειτονικά κύτταρα (Stark et al., 2005; Li et al., 2006). Αυτή η κατανομή οριοθετεί την περιοχική έκφρασης μιας πρωτεΐνης συμβάλλοντας στην ακριβή και πιστή διεξαγωγή των προγραμμάτων ανάπτυξης. Μια τυχαία έκτοπη έκφραση ενός παράγοντα σε απαγορευτικό για την ανάπτυξη περιβάλλον μπορεί έτσι να αποφευχθεί. Συνάμα είναι και μια άμεση μέθοδος κάθαρσης υπολλειμάτων μεταγράφων που είναι προϊόντα προγενέστερων διαδικασιών (Bushati et al., 2008). Συμπερασματικά η βιολογία των miRNA δεν ακυρώνει τα μέχρι τώρα δεδομένα ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, απεναντίας ενσωματώνεται και η ίδια στο ήδη πολύπλοκα δίκτυα αλληλεπιδράσεων που απαρτίζουν ένα γενετικό πρόγραμμα.

1.1.2.5 Η υποοικογένεια *miR-2/miR-13* και το *CG10222*

Η οικογένεια των K-box miRNA στην *Drosophila* περιλαμβάνει τα *miR-2*, *miR-6*, *miR-11* και *miR-13*, σε όλα από τα οποία η περιοχική seed είναι συμπληρωματική του K-box μοτίβου (Lai, 2002). Μεταξύ αυτών, τα *miR-2* και *miR-13* μοιράζονται υψηλή ομολογία σε όλη τους την έκταση για αυτό και συστήνουν μια μικρότερη ανεξάρτητη ομάδα, την υποοικογένεια *miR-2/miR-13*. Κατά την εξέλιξη των εντόμων πολλά miRNA υπέστησαν διπλασιασμό, μεταλλάξεις και διασπορά μέσα στο γονιδίωμα. Τα *miR-2* και *miR-13* δεν αποτελούν εξαίρεση σε αυτήν την παρατήρηση. Η υποοικογένεια διαθέτει οκτώ μέλη από τα οποία τα έξι οργανώνονται σε δύο συστοιχίες (Εικ. 3) (Lai et al., 2003). Η *in situ* υβριδοποίηση με ιχνηθέτες ειδικούς για τα pri-miRNA των *miR-2* και *miR-13* απεκάλυψε ένα δυναμικό πρότυπο παραγωγής τους κατά την εμβρυογένεση. Έτσι η συστοιχία *miR-2a-2/2a-1/2b* εκφράζεται στην

επιδερμίδα και το οπίσθιο έντερο, η συστοιχία *miR-13b-1/13b-2/2c* στον εγκέφαλο και την κοιλιακή χορδή και το *miR-13b-2* σε σωματικούς μύες και το έντερο (Aboobaker et al., 2005).



Εικόνα 3. Η κατανομή των μελών της υποοικογένειας *miR-2/miR-13* στο γονιδίωμα της *Drosophila*.

Τα οκτώ γονίδια της υποοικογένειας *miR-2/miR-13* εντοπίζονται σε τέσσερις περιοχές του γονιδιώματος και τρία χρωμοσώματα. Από αυτά, το *miR-13b-2* εδρεύει στο εσώνιο «πρωτεϊνικού» γονιδίου, το *miR-2b-1* είναι μονοκιστρονικό και τα υπόλοιπα έξι οργανώνονται σε δύο συστοιχίες. Με κίτρινο χρωματίζεται η περιοχή που παράγει το ώριμο miRNA. Τροποποιημένη από Lai et al., 2003.

Μια πρωτοποριακή μέθοδος ανίχνευσης miRNA στόχων σε μια cDNA βιβλιοθήκη πρώιμων εμβρύων *Drosophila*, συνδύασε μοριακές και υπολογιστικές εφαρμογές και κατέληξε στην αναγνώριση του γονιδίου *CG10222* ως στόχο για το *miR-13* (Boutla et al., 2003). Το γονίδιο *CG10222* εδρεύει στο χρωμόσωμα 3L, αποτελείται από 924 νουκλεοτίδια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους περίπου 35KDa. Αναλύσεις μικροσυστοιχιών δείχνουν ότι το *CG10222* είναι μετάγραφο μητρικής συνεισφοράς στο πρώιμο έμβryo. Επίσης φαίνεται να είναι παρόν σε όλους τους ιστούς της προνύμφης τρίτου σταδίου και του ενηλίκου οργανισμού με διπλάσια έκφραση στις ωοθήκες. Η λειτουργία της *CG10222* παραμένει άγνωστη, ωστόσο η υπολογιστική πρόβλεψη της στερεοδομής της, την κατατάσσει στις P-loop πρωτεΐνες με ενεργότητα υδρόλυσης τρινουκλεοτιδίων ATP ή GTP. Μια μεγάλης κλίμακας ανάλυση του συστήματος δύο υβριδίων ζύμης έδειξε ότι αλληλεπιδρά με την *CG3704*, που είναι επίσης μια ATPάση ή GTPάση και την *CG32683*, ένα κυτταρικό υποδοχέα συζευγμένο με το σύστημα των G-πρωτεϊνών (Giot et al., 2003). Αργότερα το *CG10222* βρέθηκε ανάμεσα στα γονίδια που

συμμετέχουν στην μεταγωγή σήματος των Rho κατά την διαίρεση του κυτταροπλάσματος (Gregory et al., 2007). Οι ενδείξεις αυτές εμπλέκουν την CG10222 σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος των μικρών G-πρωτεϊνών κατά την κυτταρική διαίρεση. Ορθόλογα μέλη της CG10222 έχουν βρεθεί σε πολλούς οργανισμούς από τον σακχαρομύκητα μέχρι τα φυτά και τον άνθρωπο, χωρίς όμως να είναι διευκρινισμένη η δράση τους.

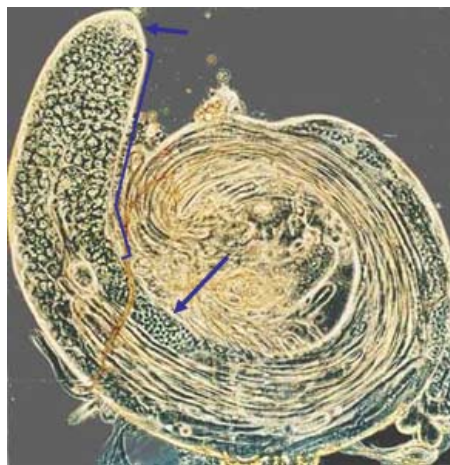
1.2 Η σπερματογένεση στην *Drosophila*

Η μελέτη της σπερματογένεσης στην *Drosophila* αρχικά βασίστηκε σε παρατηρήσεις στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο που αποκάλυψαν με λεπτομέρεια το σύνολο των μορφογενετικών αλλαγών που συμβαίνουν από την αρχική διαίρεση των αρχέγονων κυττάρων μέχρι και την παραγωγή του ώριμου σπέρματος. Η ανάλυση αυτή συμπληρώθηκε από αναλύσεις παρασκευασμάτων όρχεων με εφαρμογή ήπιας πίεσης (testis squash) και παρατήρηση στο φωτονικό μικροσκόπιο. Σήμερα είναι διαθέσιμο μεγάλο πλήθος μεταλλαγμάτων της σπερματογένεσης που εμπλουτίζουν ακόμα περισσότερο αυτήν την μελέτη (Fuller, 1998).

1.2.1 Η μορφή και η σύσταση των όρχεων

Οι όρχεις των ενηλίκων αρσενικών της *Drosophila* είναι μακριοί, τυφλοί σωλήνες με ευθύ άκρο και λυγισμένη βάση (Εικ. 4). Στο τυφλό άκρο τους εδρεύει το κέντρο παραγωγής των γαμετικών κυττάρων (germinal proliferation center). Στο σημείο αυτό συμβαίνουν συνεχείς μιτωτικές διαιρέσεις που εξαναγκάζουν τα απόγονα γαμετικά κύτταρα να κινηθούν προς τα τοιχώματα του σωλήνα. Ακολουθεί είσοδος στην μείωση και παραγωγή απλοειδών σφαιρικών σπερματιδίων. Αυτές επιμηκύνουν το μαστίγιό τους προς τον αυλό του σωλήνα πλησιάζοντας το τυφλό

άκρο του, ενώ παράλληλα το πρόσθιο μέρος τους κινείται προς την βάση του όρχι. Επί της βάσης γίνεται σύνδεση με τον σπερματικό σάκο (seminal vesicle). Εκτός των κυττάρων της γαμετικής σειράς εντός των όρχεων εντοπίζονται και κύτταρα σωματικής προέλευσης με ουσιαστικό ρόλο στην καθοδήγηση και την διαφοροποίηση των πρώτων (Fuller, 1998). Επίσης οι όρχεις περιβάλλονται από μυϊκά και επιθηλιακά κύτταρα, ο χρωματισμός των οποίων επηρεάζεται πρωτίστως από το γονιδιακό τόπο w (Lloyd et al., 1999).



Εικόνα 4. Φωτογραφία όρχι από ενήλικη *Drosophila* με μικροσκοπία αντίθεσης φάσης.

Στο άκρο του όρχι εδρεύει το κέντρο παραγωγής γαμετικών κυττάρων (μικρό βέλος) με τα κύτταρα του κόμβου, τα αρχέγονα κύτταρα και τους μιτωτικούς απογόνους τους. Τα θυγατρικά μιτωτικά κύτταρα εισέρχονται στο στάδιο των πρωτοταγών σπερματοκυττάρων τα οποία καθώς ωριμάζουν μετατοπίζονται προς τα τοιχώματα του όρχι μέχρι την περιοχή κάμψης του (αγκύλη). Στο σημείο αυτό εκτελείται η μείωση και παράγονται οι σφαιρικές σπερματίδες με χαρακτηριστικούς ανοιχτόχρωμους πυρήνες και σκοτεινά μιτοχονδριακά παράγωγα (μακρύ βέλος). Καθώς οι σπερματίδες εισέρχονται στο τελικό πρόγραμμα διαφοροποίησής τους, επιμηκύνονται καταλαμβάνοντας τον κύριο μέρος του αυλού του όρχι. Ο πυρήνας τους προσανατολίζεται προς την βάση του όρχι και το μαστίγιό τους προς το τυφλό άκρο του. Τροποποιημένη από Fuller, 1998.

Πριν γίνει η περιγραφή των σταδίων της σπερματογένεσης θα γίνει αναφορά στην δομή και τη σύσταση των όρχεων από προνύμφες τρίτου σταδίου. Σε αυτό το στάδιο της μεταμόρφωσης οι όρχεις έχουν ωοειδές σχήμα και εντοπίζονται στα 2/3 του μήκους της προνύμφης περιβαλλόμενοι από λιπώδη σωματίδια. Στον πρόσθιο πόλο

του όρχι εντοπίζεται μια σφιχτά συνδεμένη συστάδα σωματικών μετα-μιτωτικών κυττάρων γνωστή ως κόμβος (hub) που περιτριγυρίζεται από 16-18 αρχέγονα γαμετικά κύτταρα. Πιο μέσα βρίσκονται οι μιτωτικοί κυτταρικοί απόγονοι των αρχέγονων κυττάρων, γονιοβλάστες και σπερματογόνια. Το υπόλοιπο και μεγαλύτερο μέρος του όρχι καταλαμβάνεται από ανώριμα πρωτοταγή σπερματοκύτταρα. Αυτά συναντούν μια συστάδα από σωματικά κύτταρα, που καλούνται τελικά κύτταρα (terminal cells), στον οπίσθιο πόλο του όρχι. Οι προνυμφικοί όρχεις περιέρχονται σε μια μεταμορφωτική διαδικασία κατά το στάδιο της νύμφης στο οποίο και λαμβάνουν το τελικό τους σχήμα πριν την έκδυση (Bate and Martinez-Arias, 1993).

1.2.2 Τα στάδια της σπερματογένεσης

Σε ιστούς όπως το δέρμα, το σπέρμα και τον πεπτικό σωλήνα που συνίστανται από μικρής διάρκειας ζωής-κύτταρα υπάρχει η ανάγκη συνεχούς αναπλήρωσης. Αυτό επιτυγχάνεται με κατάλληλα εγκατεστημένα αρχέγονα κύτταρα (adult stem cells) που διαιρούνται συνεχώς κάτω από ένα αυστηρά ρυθμιζόμενο πρόγραμμα. Πιο συχνά η διαίρεση ενός αρχέγονου κυττάρου είναι ασύμμετρη παράγοντας ένα νέο αρχέγονο κύτταρο και ένα θυγατρικό του, το οποίο θα εισέλθει στο μονοπάτι διαφοροποίησης. Σε περιπτώσεις τραυματισμού τα αρχέγονα κύτταρα δύναται να διαιρεθούν συμμετρικά παράγοντας δυο εκ νέου πολυδύναμα κύτταρα (Yamashita et al., 2005). Η διερεύνηση των σταδίων της σπερματογένεσης στην *Drosophila* αποτέλεσε ένα εξαιρετο μοντέλο μελέτης της διατήρησης της ταυτότητας των αρχέγονων κυττάρων καθώς και της μετέπειτα διαφοροποίησης των απογόνων τους (Εικ. 5) (Fuller, 1998).

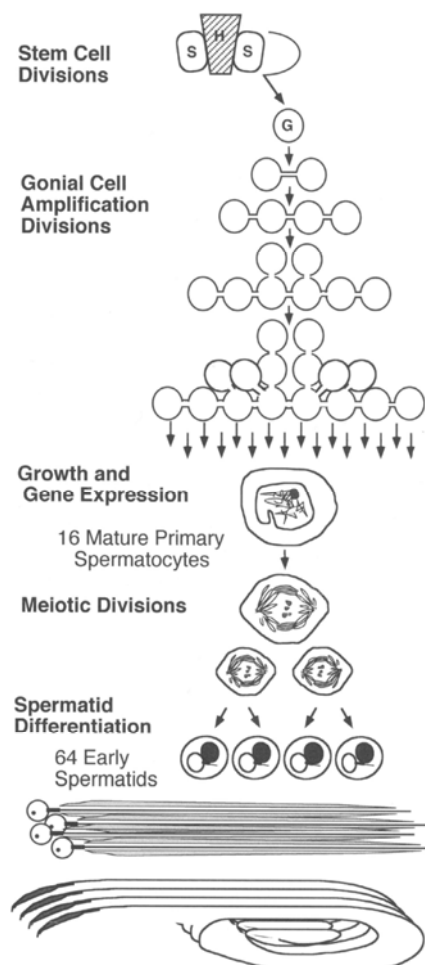
Σε κάθε όρχι εντοπίζονται 5-9 αρχέγονα γαμετικά κύτταρα που αγκυροβολούν γύρω από τα κύτταρα του κόμβου. Ένα αρχέγονο γαμετικό κύτταρο διαιρείται ασύμμετρα αναπληρώνοντας τον εαυτό του, που παραμένει συνδεδεμένο στον κόμβο,

και παράγοντας ένα θυγατρικό κύτταρο που ξεκινά να διαφοροποιείται, επονομαζόμενο γονιοβλάστης (gonialblast). Τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα περιβάλλονται και τα ίδια από δύο σωματικά αρχέγονα κύτταρα, γνωστά ως πρόδρομοι των κυττάρων της κύστης (cyst progenitor cells), τα οποία επίσης βρίσκονται σε επαφή με τον κόμβο. Κατά αναλογία με τα γαμετικά, τα σωματικά αρχέγονα κύτταρα διαιρούνται ασύμμετρα παράγοντας ένα νέο ζεύγος πρόδρομων κυττάρων και τα δύο κύτταρα της κύστης. Τα κύτταρα της κύστης περιβάλλουν τους γονιοβλάστες, δεν διαιρούνται ξανά και παραμένουν γύρω από τα γαμετικά κύτταρα μέχρι την ολοκλήρωση της σπερματογένεσης. Το σύνολο των δυο κυττάρων της κύστης μαζί με τα γαμετικά κύτταρα που περιβάλλουν, ορίζουν μια κύστη που αποτελεί την βασική μονάδα διαφοροποίησης στην σπερματογένεση.

Κάθε γονιοβλάστης διαιρείται μιτωτικά τέσσερις φορές παράγοντας διαδοχικά κύστεις από 2, 4, 8, και 16 σπερματογόνια (spermatogonia). Η κυτταρική διαίρεση είναι ατελής με αποτέλεσμα την διατήρηση κυτταροπλασματικής επικοινωνίας μεταξύ των σπερματογονίων. Οι διάλυτοι επικοινωνίας των γαμετικών κυττάρων διαπερνούνται από ένα υποκυτταρικό σχηματισμό ονομαζόμενο συντηκτοσωμάτιο (fusome) πλούσιο στις πρωτεΐνες α -σπεκτρίνη και Adducin-like (Hts) (Hime et al., 1996). Ο σχηματισμός αυτός προκύπτει από συσσωρεύσεις καταλοίπων της μιτωτικής ατράκτου μετά το πέρας της κυτταρικής διαίρεσης και λαμβάνει όλο και πιο διακλαδισμένη όψη κατά την εξέλιξη των κυτταρικών διπλασιασμών. Ανάλογης προέλευσης και σύστασης προς το συντηκτοσωμάτιο είναι και το σπεκτροσωμάτιο (spectrosome) που απαντάται στα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα και τους γονιοβλάστες και έχει σφαιρικό σχήμα.

Στο επόμενο βήμα του μονοπατιού διαφοροποίησης στην σπερματογένεση τα 16 επικοινωνούντα σπερματογόνια εισέρχονται συγχρόνως στην φάση S,

διπλασιάζουν το γενετικό τους υλικό και περνούν σε μια παρατεταμένη φάση G_2 . Τα κύτταρα στο στάδιο αυτό, που ονομάζονται πρωτοταγή σπερματοκύτταρα (primary spermatocytes), ωριμάζουν για περίπου 90h, αυξάνουν τον όγκο τους κατά 25 φορές και χαρακτηρίζονται από έντονη μεταγραφική δραστηριότητα. Η δομή του συντηκτοσωματίου βαθμιαία εκφυλίζεται στο στάδιο αυτό, ωστόσο τα κύτταρα εξακολουθούν να επικοινωνούν.



Εικόνα 5. Απλοποιημένο σχεδιάγραμμα που αναπαριστά τα στάδια της σπερματογένεσης στη *Drosophila*.

Τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα (S) αγκυροβολούν γύρω από τα κύτταρα του κόμβου (H) και διαιρούνται ασύμμετρα αναπληρώνοντας τον εαυτό τους και παράγοντας θυγατρικά κύτταρα που ονομάζονται γονιοβλάστες (G). Οι γονιοβλάστες διαιρούνται μιτωτικά τέσσερις συνολικά φορές και αποδίδουν αντίστοιχα 2, 4, 8 και 16 σπερματογόνια (gonial cells) τα οποία επικοινωνούν κυτταροπλασματικά. Τα 16 σπερματογόνια διπλασιάζουν γρήγορα το γενετικό υλικό τους και εισέρχονται στο στάδιο των πρωτοταγών σπερματοκυττάρων (primary spermatocytes). Πρόκειται για μια παρατεταμένη G_2 φάση της μειωτικής πρόφασης όπου τα κύτταρα αυξάνουν αισθητά τον όγκο

τους και παρουσιάζουν έντονη μεταγραφική δραστηριότητα. Ακολουθεί είσοδος στην μείωση I και II και παραγωγή 64 ανώριμων σφαιρικών σπερματιδών (early spermatids) με χαρακτηριστικούς ανοιχτόχρωμους πυρήνες και σκοτεινά μιτοχονδριακά παράγωγα. Έπεται η διαφοροποίηση των σπερματιδών που συνοδεύεται από δραματικές αλλαγές στο σχήμα τους, με τελική κατάληξη την παραγωγή των ώριμων σπερμάτων. Από Fuller, 1998.

Αφού η ωρίμαση των σπερματοκυττάρων ολοκληρωθεί, ο μεταγραφικός μηχανισμός παύει και τα κύτταρα εισέρχονται στην μείωση I και II. Έτσι παράγονται 64 απλοειδείς σφαιρικές σπερματίδες που εξακολουθούν να είναι συγκύτια. Με το τέλος της τελόφασης II όλα τα μιτοχόνδρια σε κάθε ανώριμη σπερματίδα συντήκονται σε δύο μεγάλα μιτοχόνδρια που τυλίγονται μεταξύ τους δημιουργώντας το επονομαζόμενο μιτοχονδριακό παράγωγο (mitochondrial derivative, Nebenkern). Η δομή αυτή είναι διακριτή σαν ένας σκοτεινός σχηματισμός στο φωτονικό μικροσκόπιο και σε εγκάρσια τομή μοιάζει με κομμάτι από κρεμμύδι λόγω της ομόκεντρης διάταξης των μιτοχονδριακών μεμβρανών. Αντίθετα στο στάδιο αυτό, οι πυρήνες είναι διακριτοί ως ανοιχτόχρωμες σφαιρικές δομές.

Ακολουθεί το στάδιο της επιμήκυνσης όπου συμβαίνουν δραματικές αλλαγές στο σχήμα και τη σύσταση των σπερματιδών. Ξεκινά ο πολυμερισμός της τουμπουλίνης για τον σχηματισμό του μακριού αξονήματος που δομεί το μαστίγιο κάθε ωριμάζουσας σπερματίδας. Τα δύο μιτοχόνδρια ξεδιπλώνονται και επιμηκύνονται κατά μήκος του μαστιγίου. Το μικρότερο από τα δύο αποβάλλεται ενώ το άλλο τοποθετείται στη βάση του μαστιγίου. Τα κύτταρα της κύστης ακολουθούν τις αλλαγές στο σχήμα της σπερματίδας. Το πρόσθιο που περιβάλλει τον πυρήνα κινείται προς τη βάση του όρχι και το οπίσθιο επιμηκύνεται συγχρόνως με το μαστίγιο προς το άκρο του όρχι. Το DNA στον πυρήνα συμπυκνώνεται ισχυρά με τη βοήθεια των πρωταμινών που αντικαθιστούν τις ιστόνες (Jayaramaiah Raja and Renkawitz-Pohl, 2005). Καθεμιά από τις ωριμάζουσες σπερματίδες επενδύεται μέσα

στη δική της κυτταροπλασματική μεμβράνη ενώ παράλληλα απορρίπτεται ένα μεγάλο μέρος του κυτταροπλάσματος από την περιοχή της ουράς. Η διαδικασία αυτή καταργεί την κυτταροπλασματική επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων μιας κύστης και καλείται εξατομίκευση (individualization). Επιτελείται με ένα δίκτυο ινιδίων ακτίνης που μετατοπίζεται από την κεφαλή προς την ουρά των σπερμάτων συγχρόνως για όλα τα κύτταρα μιας κύστης (Noguchi et al., 2008). Έτσι τα ώριμα πλέον σπέρματα έχουν λάβει το τελικό σχήμα τους και συστήνουν μια δεσμίδα όπου αργότερα θα απελευθερωθεί προς τον σπερματικό σάκο.

1.2.3 Γονίδια και σηματοδότηση στην σπερματογένεση

Επόμενο βήμα μετά την αποκάλυψη των σταδίων της σπερματογένεσης στην *Drosophila* αποτέλεσε η αποκρυπτογράφηση του γενετικού προγράμματος που συντονίζει αυτήν την διαδικασία. Η εφαρμογή βασικών εργαλείων της γενετικής ανάλυσης σε συνδυασμό με ένα πλήθος μεταλλαγμάτων που αποδίδουν στειρότητα βοήθησε πολύ στην κατανόηση τέτοιων μηχανισμών. Πολλές πληροφορίες εξήχθησαν και από συγκρίσεις που έγιναν με ήδη γνωστές γονιδιακές αλληλεπιδράσεις στην θηλυκή γαμετική σειρά αλλά και στα σωματικά κύτταρα. Παρακάτω θα γίνει περιγραφή γονιδιακών λειτουργιών και σηματοδοτικών μονοπατιών που έχει δειχθεί ότι απαντούν στην σπερματογένεση.

1.2.3.1 Αρχέγονα κύτταρα και μιτωτικοί απόγονοι

Τα αρχέγονα γαμετικά και σωματικά κύτταρα του όρχι παραμένουν στενά συνδεδεμένα με τα κύτταρα του κόμβου που αποτελούν το μικροπεριβάλλον παροχής μηνυμάτων διατήρησης της πολυδυναμικότητας. Το προϊόν του γονιδίου *unpaired* (*upd*) παράγεται από τα κύτταρα του κόμβου και συναντά τον υποδοχέα του στα

γαμετικά και σωματικά αρχέγονα κύτταρα (Εικ. 6). Η σύνδεση αυτή ενεργοποιεί την κινάση Janus που κωδικοποιείται από το *hopscotch* (*hop*) και φωσφορυλιώνει τον παράγοντα Stat92E. Το γεγονός αυτό συνεπάγεται την ενεργοποίηση του Stat92E που με τη σειρά του επάγει την μεταγραφή διαφόρων γονιδιακών στόχων (Kiger et al., 2001). Η απουσία δράσης για ένα από τα *hop* ή *Stat92E* έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια των αρχέγονων κυττάρων από τους όρχεις των μεταλλαγμάτων προφανώς επειδή αδυνατούν να παραμείνουν αρχέγονα και διαφοροποιούνται. Αντίθετα η έκτοπη παραγωγή του συνδέτη Upd προκαλεί ένα υπερσυνωστισμό από αρχέγονα κύτταρα, συνέπεια της ενεργοποίησης του μονοπατιού JAK-STAT (Kiger et al., 2001). Ο συνδέτης Upd είναι γλυκοζυλιωμένος και αλληλεπιδρά με στοιχεία της εξωκυττάριας ύλης με αποτέλεσμα να περιορίζεται η διάχυση του σε μικρή έκταση. Έτσι μόνο τα αρχέγονα κύτταρα λαμβάνουν το σήμα για την ανανέωση της ταυτότητάς τους (Harrison et al., 1998).

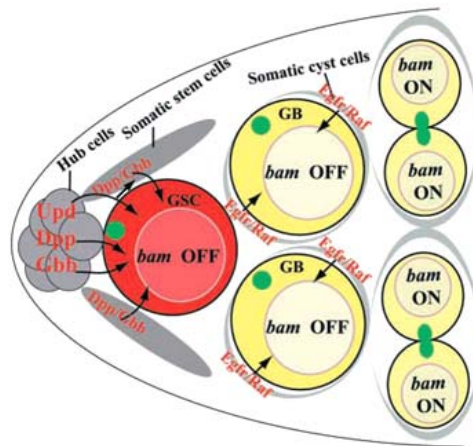
Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος μέσω του Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) δραστηριοποιείται στην αρσενική γαμετική σειρά μεταξύ των κυττάρων της κύστης και των απογόνων των αρχέγονων γαμετικών κυττάρων (Εικ. 6). Ένας άγνωστος ακόμα συνδέτης παράγεται και ωριμάζει μέσα στους γονιοβλάστες και τα σπερματογόνια με την δράση της *Stet*, που είναι η παρα-ομόλογη της σωματικά εκφραζόμενης Rhomboid (*Rho*). Ο ώριμος συνδέτης προσδένεται στον υποδοχέα των κυττάρων της κύστης και εκκινεί το μονοπάτι σηματοδότησης EGFR μέσω της *Raf* με αποτέλεσμα την παραγωγή σημάτων που επιστρέφουν στα γαμετικά κύτταρα και συντονίζουν την διαφοροποίησή τους. Σε μεταλλάγματα για το *stet* ή το *raf* τα κύτταρα της κύστης αποτυγχάνουν να περιβάλουν τα γαμετικά κύτταρα με συνέπεια την διακοπή της σπερματογένεσης στο στάδιο των σπερματογονίων (Schulz et al., 2002). Η διατήρηση των γαμετικών και σωματικών κυττάρων σε επαφή

προφανώς εξυπηρετεί την ανταλλαγή σημάτων με ζωτική σημασία για την μετέπειτα διαφοροποίηση.

Καθοριστικό ρόλο στην διατήρηση της ταυτότητας των αρχέγονων γαμετικών κυττάρων και στη ρύθμιση των κύκλων πολλαπλασιασμού των σπερματογονίων διαδραματίζει το σηματοδοτικό μονοπάτι του Transforming Growth Factor- β (TGF- β). Τα ορθόλογα μέλη της ανθρώπινης Bone Morphogenetic Protein (BMP) *decapentaplegic (dpp)* και *glass bottom boat (gbb)* εκφράζονται στα κύτταρα του κόμβου και τα αρχέγονα σωματικά κύτταρα (Εικ. 6). Τα σήματα λαμβάνονται από τα γαμετικά κύτταρα μέσω των υποδοχέων τύπου I Thick veins (Tkv) και II Punt (Pnt) οι οποίοι είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης (Shivdasani and Ingham, 2003; Kawase et al., 2004). Το γεινίασμα των δύο υποδοχέων οδηγεί στην φωσφορυλίωση του Tkv από τον Pnt με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή του. Ο Tkv με την σειρά του θα φωσφορυλιώσει τον ενεργοποιητή Mothers against *dpp* (Mad) ο οποίος θα διευκολύνει την πρόσδεση του Medea (Med) στους υποκινητές των γονιδίων στόχων (Yamashita et al., 2005).

Ο πιο χαρακτηρισμένος στόχος αυτού του μονοπατιού σηματοδότησης είναι η καταστολή του *bag of marbles (bam)*. Το γονίδιο αυτό τείνει να επάγει την διαφοροποίηση των αρχέγονων γαμετικών κυττάρων γι' αυτό και καταστέλλεται στο σημείο αυτό (Εικ. 6). Αντίθετα η πρωτεΐνη Bam πρέπει να παραχθεί πάνω από μια ορισμένη ουδό προκειμένου να επιβάλλει στα σπερματογόνια να διακόψουν τις μιτωτικές διαιρέσεις και να εισέλθουν στο στάδιο των πρωτοταγών σπερματοκυττάρων. Η διάχυση των σημάτων Dpp και Gbb από το σημείο παραγωγής τους επιτρέπουν την δημιουργία μιας διαβάθμισης συγκέντρωσης που σταδιακά αίρει την καταστολή του *bam*. Στο στάδιο των 16 σπερματογονίων η έκφραση του *bam* αγγίζει τα αναγκαία όρια προκειμένου αυτά να πάψουν να διαιρούνται (Gonczy et al.,

1997; Shivdasani and Ingham, 2003). Όταν ο συνδέτης Dpp εκφραστεί έκτοπα με τον ειδικό για την γαμετική σειρά υποκινητή *nanos* (*nos*) παράγονται όρχεις γεμάτοι με συνεχώς διαιρούμενα σπερματογόνια πέρα από το στάδιο των 16 κυττάρων, συνέπεια της καθολικής καταστολής του *bam* (Εικ. 7B) (Shivdasani and Ingham, 2003).



Εικόνα 6. Μονοπάτια σηματοδότησης που δραστηριοποιούνται στα πρώιμα γαμετικά κύτταρα. Τα κύτταρα του κόμβου (Hub cells) παράγουν τον συνδέτη Urd που ενεργοποιεί το μονοπάτι σηματοδότησης JAK-STAT στα αρχέγονα γαμετικά και σωματικά κύτταρα (GSC και Somatic stem cells), με στόχο την καταστολή της διαφοροποίησή τους. Από τα κύτταρα του κόμβου και τα αρχέγονα σωματικά κύτταρα ξεκινά η διάχυση των παραγόντων Dpp και Gbb που καταστέλλουν την έκφραση του *bam* στα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα και τους γονιοβλάστες (GB). Οι κύστες των σπερματογόνιων δέχονται λιγότερο Dpp/Gbb σήμα με αποτέλεσμα την έναρξη έκφρασης του *bam* που επάγει διαφοροποίηση και ελέγχει τις μετέπειτα κυτταρικές διαιρέσεις. Ένα άγνωστο ακόμα σήμα ωριμάζει στους γονιοβλάστες και τα σπερματογόνια και ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι του EGFR στα περιβάλλοντα κύτταρα της κύστης. Αυτά με την σειρά τους αποκρίνονται, παράγοντας σήματα που συντονίζουν την διαφοροποίηση των γαμετικών κυττάρων. Με πράσινο χρωματίζεται η δομή των σφαιρικών σπεκτροσωματίων και των επιμηκυνόμενων συντηκτοσωματίων. Τροποποιημένη από Kawase et al., 2004.

Μελέτες που έγιναν στην θηλυκή γαμετική σειρά συνδέουν την δράση του *bam* με το *benign gonial cell neoplasm* (*bgn*). Το προϊόν του *bgn* περιέχει το μοτίβο DEXH-box και αποτελεί απαραίτητο συμπράγοντα της Bam (Ohlstein et al., 2000). Οι Bam και Bgn συνθέτουν ένα σύμπλεγμα καταστολής της μετάφρασης που άμεσα ή έμμεσα στοχεύει το μετάγραφο του *nos* μέσω του 3'UTR του (Li, Y. et al., 2009).

Οι Nos και Pum εκφράζονται στα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα των θηλυκών και συστήνουν ένα σύμπλεγμα καταστολής της μετάφρασης για μετάγραφα γονιδίων που οδηγούν σε διαφοροποίηση (Lin and Spradling, 1997; Forbes and Lehmann, 1998). Η καταστολή της δράσης του συμπλέγματος Nos-Pum από το σύμπλεγμα Bam-Bgcn στους θυγατρικούς απογόνους των αρχέγονων κυττάρων οδηγεί στην απελευθέρωση των παραγόντων διαφοροποίησης. Αντίθετα η καταστολή της έκφρασης του *bam* από το μονοπάτι TGF- β στα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα επιτρέπει σε αυτά να διατηρούν την ταυτότητα τους και να μην διαφοροποιούνται. Πρόσφατα εντοπίστηκε και ένα δεύτερο σημείο ελέγχου για την καταστολή της έκφρασης του *bam* στα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα. Ο παράγοντας έναρξης της μετάφρασης eIF4A αλληλεπιδρά άμεσα με την πρωτεΐνη Bam, η οποία εντοπίζεται σε χαμηλά επίπεδα και αποτρέπει τη δράση της (Shen et al., 2009).

1.2.3.2 Η ωρίμανση των σπερματοκυττάρων προς την μείωση

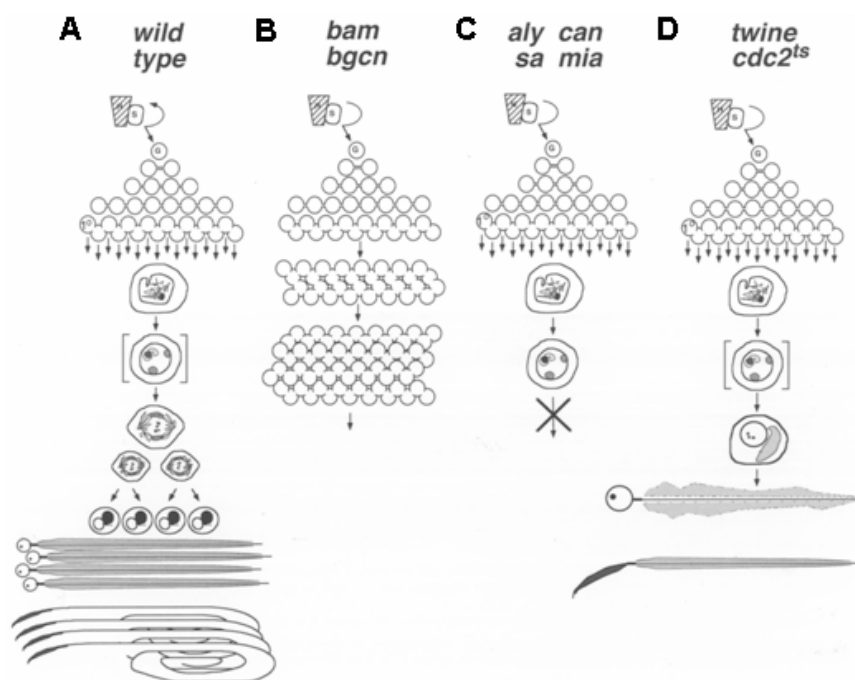
Το πέρασμα της σπερματογένεσης από τα μιτωτικά στα μειωτικά στάδια σηματοδοτεί μια μεγάλη αλλαγή στην μεταγραφή των γονιδίων ποιοτικά και ποσοτικά. Σχεδόν όλα τα γονίδια που θα χρειαστούν στα μετέπειτα στάδια της σπερματογένεσης πρέπει να μεταγραφούν από τα πρωτοταγή σπερματοκύτταρα. Στο στάδιο αυτό θα εκφραστούν ειδικές ισομορφές πολλών σωματικά απαντώμενων γονιδίων όπως η $\beta 2$ τουμπουλίνη (Michiels et al., 1989). Τα γονίδια αυτά μεταγράφονται από ορχεο-ειδικούς υποκινητές που τείνουν να έχουν πολύ μικρή έκταση και είναι σιγημένοι στα σωματικά κύτταρα (Nurminsky et al., 1998). Επιπροσθέτως πολλά «νέα» γονίδια με αποκλειστική ή κυριότερη έκφραση στους όρχεις θα μεταγραφούν για πρώτη φορά (Dorus et al., 2006).

Σημαντική πρόοδο στην κατανόηση της σπερματογένεσης παρείχε η ανακάλυψη μεταλλαγμάτων γονιδίων με φαινότυπο την αναστολή της μείωσης (meiotic arrest genes). Τα αρσενικά άτομα τέτοιων στελεχών είναι στείρα με όρχεις που περιέχουν όλα τα στάδια της σπερματογένεσης μέχρι τα πρωτοταγή σπερματοκύτταρα (Εικ. 7C). Ο κυτταρικός κύκλος σταματά κατά την μετάβαση G₂-M. Στο σημείο αναστολής οι πυρήνες εμφανίζονται κυκλικοί με χρωμοσώματα μερικώς συμπυκνωμένα, ο πυρηνίσκος παραμένει παρών και η μειωτική άτρακτος δεν σχηματίζεται. Τα σπερματοκύτταρα αδυνατούν να εισέλθουν στην μείωση ή να διαφοροποιηθούν με αποτέλεσμα τη συσσώρευση και τελικά τον εκφυλισμό τους (Lin et al., 1996).

Τα meiotic arrest γονίδια είναι βασικοί διακόπτες ρύθμισης των παραγόντων που θα εξασφαλίσουν επιτυχή είσοδο στην μείωση, αλλά και της παραγωγής μεταγράφων που θα χρειαστούν σε μετα-μειωτικά στάδια της διαφοροποίησης. Ιδρυτικά γονίδια-μέλη της ομάδας meiotic arrest είναι τα *always early (aly)*, *cannonball (can)*, *meiosis I arrest (mia)* και *spermatocyte arrest (sa)*. Η παρατήρηση όρχεων από τα εν λόγω μεταλλάγματα στο μικροσκόπιο έδειξε παρόμοιο κυτταρολογικό φαινότυπο αναστολής της μείωσης με τη διαφορά ότι το *aly* παρουσίαζε συμπύκνωση χρωμοσωμάτων σε μικρότερο βαθμό από τα υπόλοιπα. Προέκυψε έτσι ένας πρόσθετος ρόλος για το *aly*, αυτός της ρύθμισης ανώτερων επίπεδων οργάνωσης της χρωματίνης (Lin et al., 1996).

Η cdc25-φωσφατάση Twine (Twe) είναι απαραίτητη για την αφαίρεση ανασταλτικών φωσφορικών ομάδων από την κινάση cdc2 ενεργοποιώντας έτσι το σύμπλοκο κινάσης-κυκλίνης B για την προώθηση της μείωσης (Alphey et al., 1992). Στο μετάλλαγμα *twe* τα σπερματοκύτταρα προσπερνούν τα στάδια της μείωσης και παρόλα αυτά τείνουν να διαφοροποιηθούν ως τετραπλοειδείς σπερματίδες (Εικ. 7D)

(White-Cooper et al., 1993). Το *twe* mRNA απουσιάζει πλήρως στο μετάλλαγμα *aly*, ενώ αντίθετα στα *can*, *mia* και *sa* τα επίπεδα μεταγραφής του *twe* δεν φαίνεται να αλλάζουν, παρόλα αυτά δεν εντοπίζεται καθόλου πρωτεΐνη (White-Cooper et al., 1998). Συνεπώς το *aly* ελέγχει μεταγραφικά το *twe* ενώ τα *can*, *mia* και *sa* στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Το γεγονός ότι στο μετάλλαγμα *twe* παρουσιάζονται φαινόμενα διαφοροποίησης παρόλο που δεν πραγματοποιήθηκε μείωση, δείχνει ότι τα meiotic arrest γονίδια έχουν μεταγράψει επιτυχώς μηνύματα για την εξέλιξη των μετα-μειωτικών κυττάρων (White-Cooper et al., 1998). Η ρύθμιση του *twe* από τα meiotic arrest γονίδια διαμεσολαβείται από την RNA-δεσμευόμενη πρωτεΐνη Boule (Bol) που και η ίδια εξαρτάται μεταγραφικά από το *aly* και μετα-μεταγραφικά από τα *mia* και *sa* (Maines and Wasserman, 1999).



Εικόνα 7. Γονίδια με κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της σπερματογένεσης.

(A) Τα στάδια της σπερματογένεσης σε άγριο τύπου γενετικό περιβάλλον. (B) Στα μεταλλάγματα *bam* ή *bgcn* τα σπερματογόνια συνεχίζουν να διαιρούνται μιτωτικά και έπειτα του σταδίου των 16 κυττάρων. Παράλληλα αδυνατούν να διαφοροποιηθούν προς πρωτοταγή σπερματοκύτταρα με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται σε μεγάλους αριθμούς. (C) Στα μεταλλάγματα *aly*, *can*, *mia* ή *sa* τα πρώιμα στάδια της σπερματογένεσης εξελίσσονται φυσιολογικά. Ωστόσο τα πρωτοταγή σπερματοκύτταρα αποτυγχάνουν να μεταγράψουν σημαντικούς παράγοντες για την μετέπειτα

διαφοροποίηση και μείωση με συνέπεια να διακόπτεται η ωρίμανσή τους κατά την μετάβαση G₂-M. Στους όρχεις των μεταλλάγματων συσσωρεύονται προ-μειωτικά πρωτοταγή σπερματοκύτταρα που τελικά εκφυλίζονται. **(D)** Στα μεταλλάγματα *twine* ή *cdc2^{ts}* τα πρωτοταγή σπερματοκύτταρα προσπερνούν διάφορα σημαντικά στάδια της μείωσης, ωστόσο συνεχίζουν να διαφοροποιούνται αποδίδοντας ανώμαλα σχηματισμένες τετραπλοειδείς σπερματίδες. Η αγκύλη υποδεικνύει την μετάβαση G₂-M πριν την μείωση. Από Fuller, 1998.

Τα meiotic arrest γονίδια διαχωρίζονται σε δύο τάξεις ανάλογα με τον βαθμό ποιοτικής και ποσοτικής επιρροής που επιβάλλουν στους μεταγραφικούς τους στόχους που προωθούν την μείωση ή την διαφοροποίηση. Την τάξη-*aly* που ελέγχει μεγάλο αριθμό γονιδίων και την τάξη-*can* που ασκεί μικρότερο φάσμα επιρροής. Είναι αξιοσημείωτο ότι στα μεταλλάγματα της πρώτης τάξης τα μετάγραφα στόχοι εξαφανίζονται πλήρως, ενώ στην άλλη περίπτωση η έκφραση των στόχων παρουσιάζεται απλώς εξασθενησμένη (White-Cooper et al., 1998; White-Cooper, 2009).

Σήμερα είναι γνωστά πέντε μέλη της τάξης *aly* που κωδικοποιούν παράγοντες τροποποίησης της χρωματίνης ή DNA-δεσμευόμενες πρωτεΐνες και ονομάζονται ως εξής: *aly*, *cookie monster (comr)*, *tombola (tomb)*, *matotopetli (topi)*, και *achintia-vismay (achis-vis)* (Lin et al., 1996; Jiang and White-Cooper, 2003; Wang and Mann, 2003; Perezgasga et al., 2004; Jiang et al., 2007). Τα γονίδια της *aly*-τάξης μαζί με το *Myb interacting protein-40 (mip40)* συνθέτουν το πρόσφατα ανακαλυφθέν σύμπλεγμα αναστολής της μείωσης (testis Meiotic Arrest Complex, tMAC) το οποίο εντοπίζεται σε περιοχές της ευχρωματίνης και πιθανότατα ενεργοποιεί μεταγραφικούς στόχους (Beall et al., 2007).

Η *can*-τάξη περιλαμβάνει τέσσερα τουλάχιστον μέλη από τα οποία έχει ήδη γίνει αναφορά στα *can*, *mia* και *sa* συν ένα πιο πρόσφατα ανακαλυφθέν γνωστό ως *no hitter (nht)*. Όλα τα γονίδια αυτής της τάξης κωδικοποιούν παρα-ομόλογα μέλη των βασικών μεταγραφικών παραγόντων TATA binding protein-Associated Factors

(TAFs). Η έκφρασή τους είναι έντονη κατά την μετάβαση των σπερματογονίων σε πρωτοταγή σπερματοκύτταρα και μειώνεται καθώς τα σπερματοκύτταρα ωριμάζουν. Τα *can*-γονιδια είτε δρουν όλα μαζί ή συμμετέχουν σε ένα κοινό μονοπάτι που στοχεύει στην μεταγραφική ενεργοποίηση ενός εξειδικευμένου γενετικού προγράμματος (Hiller et al., 2001; Hiller et al., 2004). Οι Can, Mia και Sa συγκεντρώνονται σε μεγάλες ποσότητες στον πυρηνίσκο των σπερματοκυττάρων. Εκεί συμπαρασύρουν το σύμπλεγμα Polycomb Repression (PRC1), εμποδίζοντας το να ασκεί την κατασταλτική του δράση στους υποκινητές στόχους του. Ένα μικρό μόνο ποσοστό των Can, Mia και Sa εντοπίζεται στην ευχρωματίνη, όπου υπάρχουν ενδείξεις ότι προσελκύει το ενεργοποιητικό σύμπλεγμα Trithorax για την έναρξη μεταγραφής (Chen et al., 2005).

Στην αρσενική γαμετική σειρά της *Drosophila* πρόσφατα μελετήθηκε η δράση του γονιδίου *off-schedule* (*ofs*). Το *ofs* κωδικοποιεί τον eIF4G2 που είναι παραμόλογος του βασικού παράγοντα έναρξης της μεταγραφής eIF4G. Το μετάγραφο του *eIF4G* είναι παρόν στα μιτωτικά κύτταρα του όρχι και λιγότερο στα πρωτοταγή σπερματοκύτταρα, από όπου ξεκινά να μεταγράφεται το *ofs* μέχρι το στάδιο των επιμηκυνόμενων σπερματιδίων (Baker and Fuller, 2007; Franklin-Dumont et al., 2007). Τα μεταλλάγματα του *ofs* παρουσιάζουν όρχεις με συσσωρευμένα πρωτοταγή σπερματοκύτταρα με μικρότερο μέγεθος από το φυσιολογικό. Λίγα από αυτά προσπερνούν στάδια της μείωσης αποδίδοντας ανώμαλα διαφοροποιημένες σπερματίδες. Η δράση του eIF4G2 αναλύθηκε ακολουθώντας δύο διαφορετικές προσεγγίσεις. Πρώτον δείχτηκε η σημασία της συμβολής του στην αύξηση του μεγέθους των πρωτοταγών σπερματοκυττάρων. Όταν αυτά αποκτήσουν κατάλληλο μέγεθος ξεπερνούν το σημείο ελέγχου G₂-M και εισέρχονται στην μείωση (Franklin-Dumont et al., 2007). Δεύτερον κατατάχθηκε στο ευρύτερο δίκτυο παραγόντων που

συντονίζουν την ελεγχόμενη μετάφραση γονιδίων σχετικών με την μείωση και τη διαφοροποίηση, χωρίς να είναι σαφής η φύση των μεταγράφων που προσεγγίζει (Baker and Fuller, 2007).

Το μέχρι πρόσφατα «δόγμα» προέβλεπε πως όλα τα μετάγραφα που θα χρειαστούν στην σπερματογένεση παράγονται στο στάδιο των πρωτοταγών σπερματοκυττάρων και αποθηκεύονται μέχρι να χρειαστούν (Schafer et al., 1995). Έτσι για παράδειγμα το μετάγραφο της πρωτεΐνης Don juan (Dj) που είναι βασικό συστατικό της ουράς των σπερμάτων, παράγεται στα πρωτοταγή σπερματοκύτταρα και παραμένει αμετάφραστο για πολλές μέρες μέχρι το στάδιο επιμήκυνσης των σπερματιδίων (Blumer et al., 2002). Ομοίως συμβαίνει και για την πρωτεΐνη Fuzzy onions (Fzo) που κωδικοποιεί έναν βασικό παράγοντα για την σύντηξη των δύο μεγάλων μιτοχονδρίων (Hwa et al., 2002). Πρόσφατα αποκαλύφθηκε ότι υπάρχει ένα μικρό ποσοστό μεταγραφής και στα μετα-μειωτικά στάδια παρόλη την διαδοχική συμπύκνωση της χρωματίνης. Συγκεκριμένα χρώσεις με *in situ* υβριδοποίηση και ανίχνευση με Real-Time PCR αποκάλυψαν μια ομάδα γονιδίων που λέγονται comets and cups τα οποία μεταγράφονται κατά τελικά υποστάδια των ωριμαζόντων σπερματιδίων λίγο πριν την εμφάνιση των πρωταμινών (Barreau et al., 2008).

1.3 Μονοπάτια σίγησης στην σπερματογένεση

Η μελέτη της RNA-σίγησης στην *Drosophila* κινείται με καλπάζοντες ρυθμούς και αποκαλύπτει όλο και περισσότερες πληροφορίες για την σύσταση του μηχανισμού και τους βιολογικούς ρόλους που επιτελεί. Οι μέχρι πρόσφατα εργασίες επικεντρώνονταν σε συστήματα σωματικών κυττάρων ή κυτταροκαλλιιεργειών. Κατά την εξέλιξη αυτής της διατριβής άρχισαν να παρουσιάζονται ανάλογες εργασίες και στα γαμετικά κύτταρα σε αμφοτέρως την αρσενική και θηλυκή σειρά. Στην παρούσα

υποενότητα συνοψίζονται τα δεδομένα που περιγράφουν την παρουσία και δράση διαφόρων σημαντικών παραγόντων της σίγησης στις γαμετικές σειρές της *Drosophila*.

Τα μεταλλάγματα της Dcr-1, που είναι υπεύθυνα για την ωρίμανση των miRNA, πεθαίνουν κατά την εμβρυογένεση όταν βρεθούν σε ομόζυγη κατάσταση (Meyer et al., 2006). Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της Dcr-1 στην γαμετογένεση παρήχθησαν κλώνοι κυττάρων που απουσίαζε πλήρως η πρωτεΐνη, σε ετερόζυγα άτομα. Βρέθηκε έτσι, ότι τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα της αρσενικής και θηλυκής σειράς διαιρούνται με πιο αργό ρυθμό απουσία της Dcr-1, υπογραμμίζοντας την σημασία των miRNA στον έλεγχο του ρυθμού διαίρεσης των αρχέγονων κυττάρων στην γαμετογένεση (Hatfield et al., 2005). Ο αναστολέας Dacapo (Dap) δρα στο σύμπλεγμα κυκλίνης-κινάσης (CycE-cdc2) και διακόπτει την μετάβαση G₁-S πριν την μίτωση (Lane et al., 1996). Σε αγρίου τύπου συνθήκες τα *miR-7*, *miR-278* και *miR-309* ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση της Dap εξασφαλίζοντας έτσι φυσιολογικούς ρυθμούς διαίρεσης για τα αρχέγονα κύτταρα. Επιπροσθέτως δείχτηκε ότι τα συγκεκριμένα miRNA βρίσκονται κάτω από την επιρροή του μονοπατιού σηματοδότησης που διαμεσολαβείται από τον υποδοχέα ινσουλίνης (Insulin Receptor, InR) (Yu et al., 2009).

Παράλληλες μελέτες για την δράση της Dcr-1 στην γαμετογένεση έδειξαν ότι εκτός από τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, κατέχει και εξέχοντα ρόλο στην διατήρηση της αρχέγονης ταυτότητας σε γαμετικά και σωματικά κύτταρα της θηλυκής γαμετικής σειράς (Jin and Xie, 2007). Όπως ήδη έχει αναφερθεί τον σκοπό αυτό καλύπτει και το TGF- β επαγόμενο μονοπάτι καταστολής του *bam* και όπως δείχτηκε στην ίδια εργασία δρα παράλληλα με τα miRNA. Επίσης αξίζει να αναφερθεί ότι τα γαμετικά κύτταρα των θηλυκών που ωριμάζουν απουσία της Dcr-1

εμφανίζονται μικρότερα και αναπτυξιακά καθυστερημένα. Καταφέρνουν να φτάσουν μέχρι ένα μέσο στάδιο ωρίμανσης και μετά εκφυλίζονται. Αυτό δηλώνει ότι τα miRNA διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο και στα μετέπειτα στάδια της γαμετογένεσης (Jin and Xie, 2007).

Σε απόλυτη αναλογία προς την μελέτη του ρόλου της Dcr-1 στην γαμετογένεση έχουν εξεταστεί και άλλοι παράγοντες του μονοπατιού των miRNA (Forstemann et al., 2005; Park et al., 2007; Yang et al., 2007). Η Ago1 είναι απαραίτητη για την διατήρηση της σταθερότητας των miRNA και βασικός τελεστής της δράσης τους (Lee et al., 2004; Okamura et al., 2004). Η υπερέκφραση της Ago1 στην θηλυκή γαμετική σειρά προκαλεί μεγάλη αύξηση στην παραγωγή αρχέγονων κυττάρων αντιθέτως τα ίδια κύτταρα χάνουν την ταυτότητά τους γρήγορα σε κλώνους όπου απουσιάζει (Yang et al., 2007). Η παρατήρηση αυτή ισχυροποιεί και συμπληρώνει τις παρατηρήσεις που έχουν ήδη γίνει για το ρόλο των miRNA στην θηλυκή γαμετική σειρά.

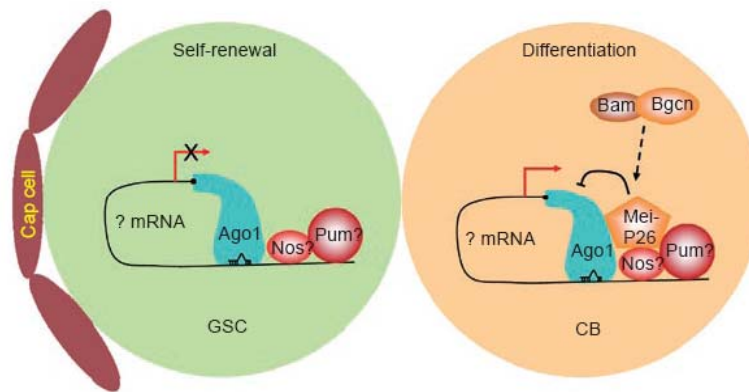
Η πρωτεΐνη Mei-P26 φέρει τα μοτίβα RING και NHL και αποτελεί την γαμετικά εκφραζόμενη παρα-ομόλογη της Brain tumor (Brat), που είναι βασικός παράγοντας ρύθμισης της διαφοροποίησης για τα θυγατρικά κύτταρα των αρχέγονων νευρικών κυττάρων. Αρχικά η Mei-P26 χαρακτηρίστηκε ως απαραίτητη για τον μειωτικό ανασυνδυασμό αργότερα όμως δείχτηκε ότι επιπλέον συμβάλλει στην διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των μιτωτικών απογόνων της θηλυκής γαμετικής σειράς. Τα μεταλλάγματά της προκαλούν ανώμαλη παραγωγή αρχέγονων κυττάρων και κυστοβλαστών με μεγάλους πυρηνίσκους (Page et al., 2000; Neumuller et al., 2008). Παράλληλα δείχτηκε ότι η έκφραση του *mei-P26* εξαρτάται από την παρουσία του *bam* (Neumuller et al., 2008). Το μοτίβο RING εμπλέκει την Mei-P26 σε μονοπάτια ουβικουΐτινυλίωσης, χωρίς προς το παρόν να είναι γνωστοί οι στόχοι

της. Αντίστοιχα μέσω του μοτίβου NHL αλληλεπιδρά με την Ago1. Απουσία της Meι-P26, τα επίπεδα έκφρασης πολλών miRNA ανέρχονται ενώ αντίθετα αποτελέσματα προκύπτουν με την υπερέκφρασή της. Φαίνεται λοιπόν ότι η αλληλεπίδραση της Meι-P26 με την Ago1 επηρεάζει αρνητικά τη σταθερότητα ορισμένων miRNA (Neumuller et al., 2008). Αυτή η παρατήρηση συνδέει τα μέχρι τώρα παράλληλα μονοπάτια ρύθμισης από τα miRNA και το *bam* για την διατήρηση της αρχέγονης ιδιότητας και τη διαφοροποίηση στην θηλυκή γαμετική σειρά (Εικ. 9) (Shen and Xie, 2008).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι έχει απομονωθεί ένα μετάλλαγμα που προκαλεί στειρότητα και στα αρσενικά άτομα. Στην περίπτωση αυτή ο φαινότυπος φαίνεται να διαφέρει. Οι όρχεις παράγουν όλους τους πρώιμους κυτταρικούς τύπους μέχρι την ολοκλήρωση της μείωσης, ωστόσο οι επιμηκυνόμενες σπερματίδες παρουσιάζονται αποδιοργανωμένες (Page et al., 2000).

Η πρωτεΐνη Maelstrom (Mael) φέρει το μοτίβο High Mobility Group (HMG) και αποτελεί ένα ακόμα πιο πρόσφατο παράδειγμα σύνδεσης της δράσης των miRNA με το μονοπάτι διαφοροποίησης του *bam*. Συγκεκριμένα η Mael δρα ως καταστολέας της παραγωγής του *miR-7* το οποίο με τη σειρά βρέθηκε να ελέγχει τα επίπεδα έκφρασης της Bam στην αρσενική γαμετική σειρά. Στα μεταλλάγματα του *mael* οι όρχεις εμφανίζουν κύστεις με σπερματογόνια που δεν σταματούν την μίτωση μετά το στάδιο των 16. Λίγα από αυτά καταφέρνουν να διαφοροποιηθούν προς σπερματοκύτταρα και να ολοκληρώσουν τον κύκλο της σπερματογένεσης με αποτέλεσμα τα αρσενικά να εμφανίζουν μειωμένη γονιμότητα. Ανάμεσα στα ανώμαλα διαιρούμενα πρώιμα κύτταρα εντοπίζονται και αρχέγονα κύτταρα μακριά από τον κόμβο, που θα εντοπίζονταν σε φυσιολογικές συνθήκες (Pek et al., 2009). Αυτό οφείλεται στην έκτοπη καταστολή του *bam* από το *miR-7* με αποτέλεσμα την

αποδιαφοροποίηση των σπερματογονίων. Η διαδικασία της αποδιαφοροποίησης συμβαίνει σε σπάνιες περιπτώσεις και φαίνεται ότι ένα ταχέως δραστικό σήμα όπως ένα miRNA αναλαμβάνει τέτοιο ρόλο (Kai and Spradling, 2004; Pek et al., 2009).



Εικόνα 8. Ο ρόλος των miRNA στη ρύθμιση της ισορροπίας μεταξύ πολυδυναμικότητας και διαφοροποίησης στη θηλυκή γαμετική σειρά.

Στα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα (GSC) τα miRNA καταστέλλουν μηνύματα διαφοροποίησης με την συμμετοχή του συμπλέγματος Nos-Pum. Στα θυγατρικά κύτταρα (CB) το σύμπλεγμα Bam-Bgcn κινητοποιεί την MeI-P26 η οποία αλληλεπιδρά με την Ago1 και εμποδίζει την δράση των miRNA. Με αυτόν τον τρόπο επιτρέπεται στα μηνύματα διαφοροποίησης να μεταφραστούν. Τροποποιημένη από Shen and Xie, 2008.

Κλείνοντας αυτή την υποενότητα θα γίνει αναφορά σε ένα πρόσφατα ανακαλυφθέν μονοπάτι σίγησης που απαντά σχεδόν αποκλειστικά στην γαμετική σειρά και καλείται piRNA μονοπάτι. Τα γονίδια *P-element induced wimpy testes* (*piwi*) και *aubergine* (*aub*) αρχικά χαρακτηρίστηκαν μέσω των φαινοτύπων στειρότητας που απέδιδαν και στα δύο φύλα (Schupbach and Wieschaus, 1991; Lin and Spradling, 1997; Schmidt et al., 1999). Μετέπειτα συνδέθηκαν με την βιολογία των μονοπατιών της RNA σίγησης λόγω των περιοχών τύπου PIWI που έφεραν στην κωδική τους αλληλουχία (Pal-Bhadra et al., 2002). Μαζί με την Ago3 αποτελούν ένα ξεχωριστό κλάδο στην υπεροικογένεια των Ago πρωτεϊνών που ονομάζεται Piwi-κλάδος. Πρόσφατα δείχτηκε ότι είναι τα μόρια τελεστές για την βιογένεση και δράση των piRNA (Carmell et al., 2002).

Οι Piwi πρωτεΐνες εκφράζονται στην αρσενική και γαμετική σειρά και σε ορισμένες περιπτώσεις σε σωματικούς περιβάλλοντες ιστούς των γονάδων (Malone et al., 2009). Προσδένονται στα Piwi-interacting RNA (piRNAs) τα οποία είναι μονόκλωνα μικρά RNA με μήκος 25-31 νουκλεοτίδια και αλληλουχία συγγενή με μεταθετά στοιχεία (Aravin et al., 2003). Τα piRNA έχουν μεθυλιωμένα 3' άκρα και δεν εμφανίζουν συγγένεια πρόσδεσης για τις Ago1 ή Ago2 (Gunawardane et al., 2007; Saito et al., 2007). Οι Piwi και Aub βρίσκονται πιο συχνά συνδεδεμένες με piRNA συμπληρωματικά προς την αλληλουχία των μεταθετών στοιχείων, ενώ αντίθετα η Ago3 με θετικής κατεύθυνσης. Η πιο βασική πηγή των piRNA είναι διακριτοί ετεροχρωματικοί τόποι στο γονιδίωμα που καλούνται piRNA συστοιχίες. Αυτές χαρακτηρίζονται από μια υψηλής πυκνότητας περιεκτικότητα σε ακίνητα και τεμαχισμένα απομεινάρια μεταθετών στοιχείων (Brennecke et al., 2007).

Το πρώτο βήμα στην παραγωγή των piRNA από τις συστοιχίες είναι ακόμα άγνωστο, εικάζεται όμως ότι η Piwi διαδραματίζει κάποιο ρόλο σε αυτό. Μια δεύτερη πηγή piRNA είναι αυτά που κληρονομούνται από τις μητέρες. Όταν ένα ενεργό μεταθετό στοιχείο εισβάλλει στο γονιδίωμα παράγει μετάγραφα που στοχεύονται από συμπληρωματικά piRNA συνδεδεμένα στην Piwi ή την Aub. Ακολουθεί πέψη του μεταγράφου στην αντίστοιχη του piRNA θέση 10 και απενεργοποίηση του. Το 3' τμήμα του μεταγράφου θα υποστεί μια ακόμα πέψη 25 με 31 νουκλεοτίδια πιο πέρα από μια άγνωστη μέχρι τώρα πρωτεΐνη με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός piRNA θετικής κατεύθυνσης που θα προσδεθεί στην Ago3. Το σύμπλεγμα Ago3-piRNA θα στοχεύσει ένα συμπληρωματικής κατεύθυνσης μετάγραφο της piRNA συστοιχίας και αναλόγως θα παράγει ένα piRNA που θα προσδεθεί στην Aub και θα εκκινήσει ένα νέο κύκλο πολλαπλασιασμού. Το μοντέλο αυτό ονομάστηκε ping-pong και προέκυψε από την παρατήρηση ότι τα πρώτα 10 νουκλεοτίδια των piRNA που προσδένονται

στις Piwi και Aub είναι συμπληρωματικά με τα 10 πρώτα αυτών της Ago3 (Brennecke et al., 2007; Gunawardane et al., 2007).

Η ανακάλυψη του μονοπατιού των piRNA ρίχνει φως στους φαινοτύπους δυσγένεσης υβριδίου, ένα φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί πολλά χρόνια πριν. Οι απόγονοι μιας αρσενικής *Drosophila* από τη φύση με ένα θηλυκό εργαστηριακού στελέχους είναι στειροί με υποπλασμένους γονάδες. Αυτό οφείλεται στην παρουσία ενεργών μεταθετών στοιχείων που συνεισφέρει το αρσενικό στον πυρήνα του ζυγωτού. Η αντίθετη διασταύρωση αγρίων θηλυκών με αρσενικά εργαστηρίου δεν αποδίδει δυσγένεση γιατί το κυτταρόπλασμα των γαμετών περιέχει παράγοντες άγνωστους μέχρι τώρα που καταστέλλουν τα μεταθετά στοιχεία και μεταβιβάζονται στο κυτταρόπλασμα του ζυγωτού (Picard, 1976). Σήμερα πλέον γνωρίζουμε ότι οι καθοριστές ανθεκτικότητας απέναντι στα μεταθετά στοιχεία δεν είναι άλλοι από τα piRNA (Brennecke et al., 2008).

Παράλληλα με την χρησιμότητα των Piwi πρωτεϊνών για την άμυνα του οργανισμού από τα εισβάλλοντα νουκλεϊκά οξέα είναι πιθανό να εκτελούν και άλλες ρυθμιστικές διεργασίες μέσα στα γαμετικά κύτταρα. Ήδη έχει δειχθεί ότι η Piwi είναι απαραίτητη στην διατήρηση της αρχέγονης ιδιότητας των κυττάρων με το να καταστέλλει το *bam* (Szakmary et al., 2005). Η ομαλή λειτουργία των Piwi πρωτεϊνών εξαρτάται από την δράση της Capsuleen (Csu1) που είναι μια συμμετρική μεθυλάση αργινινών και την μετέπειτα πρόσδεσή της στην Tudor (Tud) (Kirino et al., 2009). Η Tud είναι βασικός παράγοντας καθορισμού των πολικών κυττάρων κατά την εμβρυογένεση (Boswell and Mahowald, 1985). Θα έχει ενδιαφέρον στο μέλλον να διαλευκανθεί ο τρόπος με τον οποίο οι Piwi πρωτεΐνες συμβάλλουν στην σύσταση του κυτταροπλάσματος των εμβρυικών και ενηλίκων γαμετικών κυττάρων.

1.4 Στόχοι

Αρχικός στόχος της παρούσας διδακτορικής εργασίας αποτέλεσε η *in vivo* πειραματική απόδειξη της αλληλεπίδρασης του *miR-13* με το γονίδιο *CG10222* μέσω της πρόσδεσης στο 3'UTR. Ο έλεγχος αυτής της υπόθεσης επιβεβαιώθηκε με τον σχεδιασμό, την παραγωγή και την ανάλυση κατάλληλων EGFP-εκφραζόντων στελεχών *Drosophila*, που ονομάστηκαν «αισθητήρες» της δράσης του *miR-13*. Έτσι δημιουργήθηκε ένα απλό μοντέλο μετα-μεταγραφικού ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης το οποίο αποτέλεσε το υπόστρωμα για να μελετηθούν επιμέρους θέματα της miRNA-επαγόμενης ρύθμισης. Αρχικά, ελέγχθηκε η έκφραση της EGFP σε περιβάλλον απουσίας των miRNA σε αναπτυξιακά όργανα προνυμφών *Drosophila*. Έπειτα, τροποποιήθηκε το μοντέλο σχεδιασμού των αισθητήρων ώστε να συμπεριληφθεί ο ενδογενής υποκινητής του *CG10222* και το τελικό αποτέλεσμα στην έκφραση της EGFP αναλύθηκε σε καλλιέργεια κυττάρων της *Drosophila*.

Η ανάλυση της *in vivo miR-13:CG10222* αλληλεπίδρασης πρόσφερε και ένα ακόμα δεδομένο που διατέλεσε καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη της διατριβής. Εντοπίστηκε ένα χαρακτηριστικό πρότυπο ενεργότητας για το *miR-13* στην αρσενική γαμετική σειρά, των προνυμφών τρίτου σταδίου. Τα πρόδρομα γαμετικά κύτταρα παρουσίασαν υψηλή *miR-13* ενεργότητα που σταδιακά αναστέλλονταν κατά την πρόοδο της σπερματογένεσης, γεγονός που είχε ισχύ και στους όρχεις των ενήλικων ατόμων. Ακολούθησε έλεγχος του προτύπου ενεργότητας και για άλλα miRNA, με κατάλληλες σειρές αισθητήρες, που είχε ως αποτέλεσμα την γενίκευση της παρατήρησης πέραν του *miR-13*. Επόμενος στόχος ήταν ο εντοπισμός του σταδίου της σπερματογένεσης που επέρχεται η παύση της ενεργότητας των miRNA. Την ανάλυση αυτή διευκόλυνε η χρήση κατάλληλων γενετικών συνδυασμών από μεταλλάγματα της σπερματογένεσης, που παράγουν λιγότερους κυτταρικούς τύπους.

Στην συνέχεια και εφόσον παρατηρήθηκε ότι τα πρότυπα παραγωγής και ενεργότητας ενός μέλους της υποοικογένειας *miR-2/miR-13* δεν συνέπιπταν, η μελέτη προσανατολίστηκε προς την εύρεση μηχανισμών που θα αναχαιτίζαν την δράση των miRNA σε κυτταρικούς τύπους που εξακολουθούσαν να παράγονται. Για το σκοπό αυτό εξετάστηκε η απόκριση των αισθητήρων σε μεταλλάγματα γονιδίων με φυσιολογικό πρότυπο έκφρασης την περιοχή αναστολής της miRNA ενεργότητας και κεντρικό λειτουργικό ρόλο στη ρύθμιση της μετάφρασης κατά την σπερματογένεση. Κατόπιν αυτής της ανάλυσης παρέχονται ενδείξεις ότι η δράση των γονιδίων *sa* και *ofs* αποσκοπεί στον καθορισμό των ορίων δράσης των miRNA στην αρσενική γαμετική σειρά.

2 Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Πρωτόκολλα μοριακής βιολογίας

2.1.1 Στελέχη βακτηρίων και θρεπτικά υλικά

Για τις διαδικασίες πολλαπλασιασμού και απομόνωσης πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες *Escherichia coli* (*E. coli*) από τα παρακάτω στελέχη: JM83, DH5a και DB3.1. Το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης (Luria-Bertani, LB) συνίστανται από 10% τρυπτόνη, 5% εκχύλισμα ζύμης και 10% NaCl. Το pH ρυθμίστηκε στο 7 με πυκνό NaOH και οι στερεές καλλιέργειες περιείχαν επιπλέον 15% άγαρ.

2.1.2 Πηκτώματα και διαλύματα ηλεκτροφόρησης για νουκλεϊκά οξέα

Η συγκέντρωση αγαρόζης στα πηκτώματα διακυμάνθηκε από 0,75% έως και 1,8% ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που αναλύονταν. Τα πηκτώματα περιείχαν 0,5x TBE (45mM Tris-borate, 1mM EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid, pH 8), ενώ το DNA ή το RNA μεταφέρονταν στα φρεάτια μαζί με διάλυμα φόρτωσης 6x Orange G (15% φυκόλλη, 0,15% χρωστική Orange G). Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης ήταν επίσης 0,5x TBE. Στα δείγματα πάντα συμπεριλαμβάνονταν και ένας μάρτυρας μεγέθους που προέκυπτε από την πέψη λ φαγικού DNA με το ένζυμο *Pst*I (Minotech).

2.1.3 Απομόνωση πλασμιδίων από μικρής κλίμακας καλλιέργειες

Υγρές καλλιέργειες *E. coli* στελέχους JM83 επώαστηκαν σε LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής με συνεχή ανακίνηση, στους 37°C, για 14-16h.

1,5ml της καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκε για 2min και το κυτταρικό ίζημα επανναδιαλύθηκε σε 100μl διαλύματος I (50mM γλυκόζη, 25mM Tris-Cl, 10mM EDTA pH 8). Κατόπιν προστέθηκαν 200μl φρέσκου διαλύματος II (0,2N NaOH, 1% SDS, sodium dodecyl sulfate) και μετά από ήπια ανάμιξη το μίγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5min. Ακολούθησε προσθήκη 150μl κρύου διαλύματος III (3M CH₃COOK, 11,5% καθαρό CH₃COOH), ήπια ανάδευση και επώαση στον πάγο για 5min. Αμέσως μετά το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 10min. Το υπερκείμενο αναμίχθηκε μια φορά με ίσο όγκο διαλύματος ουδέτερης φαινόλης και μια φορά με ίσο όγκο διαλύματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1). Στη συνέχεια το πλασμιδιακό DNA ιζηματοποιήθηκε με 2,5 όγκους απόλυτης αιθανόλης και φυγοκέντρωση για 10min. Ακολούθησε πλύση του ιζήματος με 1ml διαλύματος 70% αιθανόλης και φυγοκέντρωση για 7min. Τελικά το πλασμιδιακό DNA στέγνωσε σε θερμοκρασία δωματίου για 10min και έπειτα επανναδιαλύθηκε σε 30μl νερού. Στο παραπάνω πρωτόκολλο όλες οι φυγοκεντρήσεις πραγματοποιήθηκαν στις 12.000rpm και σε θερμοκρασία δωματίου. Για τα στελέχη DH5a και DB3.1. ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με την εξής τροποποίηση: Παραλήφθηκε το στάδιο ανάμιξης με ουδέτερη φαινόλη και χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη και αντί αυτού έγινε μια επιπλέον φυγοκέντρωση του υπερκειμένου για 5min.

2.1.4 Απομόνωση πλασμιδίων από μεσαίας κλίμακας καλλιέργειες

Στην περίπτωση της διαμόλυνσης κυτταρικών σειρών και της ένεσης πλασμιδίων μετασχηματισμού σε έμβρυα *Drosophila* απαιτήθηκε DNA υψηλής συγκέντρωσης και καθαρότητας. Για τον σκοπό αυτό έγινε χρήση των συστημάτων tip 100 (QIAGEN) και Nucleobond Xtra Midi kit (Machery-Nagel) ακολουθώντας τις οδηγίες των κατασκευαστών.

2.1.5 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Το προς απομόνωση DNA αναλύθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης κατάλληλης περιεκτικότητας. Στη συνέχεια αποκόπηκε το αντίστοιχο κομμάτι αγαρόζης με τη βοήθεια νυστεριού κάτω από UV φωτισμό, τοποθετήθηκε σε σωληνάκι τύπου erpendorf και ζυγίστηκε. Κάθε μονάδα mg αντιστοιχίστηκε σε όγκο ίσο με 1μl. Ακολούθησε προσθήκη 4,5 όγκων διαλύματος NaI, 0,5 όγκων διαλύματος «TBE modifier» και επώαση στους 50°C μέχρι τήξης της αγαρόζης. Κατόπιν προστέθηκαν 5μl επαρκώς ενυδατωμένου διαλύματος σφαιριδίων πυριτίου «glass milk» και μετά από καλή ανακίνηση έγινε επώαση στον πάγο για 6min. Στο βήμα αυτό επήλθε η πρόσδεση του DNA στα σφαιρίδια πυριτίου. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 30s και το ίζημα σφαιριδίων και DNA πλύθηκε με 700μl διαλύματος «NEW WASH» με τρεις κύκλους επανναδιάλυσης-φυγοκέντρωσης. Στη συνέχεια το ίζημα στέγνωσε στον αέρα για 8-10min και επανναδιάλυθηκε σε 6μl νερού. Το μίγμα επώαστηκε στους 50°C για 3min και φυγοκεντρήθηκε για 1min. Το υπερκείμενο υγρό που περιείχε το απομονωμένο DNA μεταφέρθηκε σε καθαρό σωληνάκι και η διαδικασία της έκλουσης επαναλήφθηκε μία φορά.

Όλες οι φυγοκεντρήσεις πραγματοποιήθηκαν στις 12.000rpm και σε θερμοκρασία δωματίου. Τα προαναφερθέντα διαλύματα και υλικά προήλθαν από το σύστημα BIO101 GENE CLEAN (Q-BIOgene). Στην περίπτωση απομόνωσης κομματιών DNA μικρότερα των 250bp το πρωτόκολλο τροποποιήθηκε: Στο αρχικό διάλυμα τήξης της αγαρόζης προστέθηκαν 1/200 όγκοι του διαλύματος NaI από διάλυμα 10% CH₃COOH και η επώαση με τα σφαιρίδια πυριτίου πραγματοποιήθηκε στους 50°C αντί στον πάγο.

2.1.6 Πέψη και σύνδεση τμημάτων DNA-Πλασμιδιακές κατασκευές

Στις διαδικασίες κοπής τμημάτων DNA έγινε χρήση των περιοριστικών ενδονουκλεασών *Bam*HI, *Eco*RI, *Kpn*I, *Not*I, *Stu*I (*Sse*BI), *Xho*I (*Sla*I) και *Xba*I (Minotech) σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και παρουσία RNaseA (Qiagen) σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml. Οι ποσότητες φορέα και ενθέματος προσδιορίζονταν πάντα σε πήκτωμα αγαρόζης. Οι αντιδράσεις σύνδεσης γίνονταν σε ενός τύπου ρυθμιστικό διάλυμα (Promega) με 3U ενζύμου T4 DNA λιγάση (Promega ή Minotech) στους 16°C για 2h και σπανιότερα για 16h.

Σε κάποιες περιπτώσεις ένα από τα δύο περιοριστικά ένζυμα δεν παρείχαν συμβατά άκρα με τον φορέα κλωνοποίησης. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αποικοδόμησης ή του πολυμερισμού των προεξέχοντων μονόκλωνων άκρων με το ένζυμο Klenow Large Fragment (New England Biolabs). Οι αντιδράσεις τέτοιου τύπου πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης (Promega) παρουσία 100μM dNTPs και 1U ενζύμου. Η επώαση γίνονταν στους 25°C, αυστηρά για 15min. Ακολουθούσε επώαση στους 75°C για 20min προκειμένου να γίνει απενεργοποίηση του ενζύμου. Ήταν πάντα προτιμότερο να προηγηθεί ένα βήμα σύνδεσης των συμβατών άκρων, μετά η επίδραση με Klenow και κατόπιν το δεύτερο στάδιο σύνδεσης. Με αυτή τη μέθοδο τέτοιου τύπου κλωνοποιήσεις ήταν με ασφάλεια επιτυχείς.

Το αγρίου τύπου *CG10222-3'UTR*, οι τροποποιημένες παραλλαγές του, *mut1* και *mut3* και το *SV40-3'UTR* προήλθαν αντίστοιχα μετά από πέψη των πλασμιδίων *pactGL3-wt*, *pactGL3-mut1*, *pactGL3-mut3* και *pactGL3* (Boutla et al., 2003) με τα ένζυμα *Xba*I και *Bam*HI. Αρχικά οι αλληλουχίες υποκλωνοποιήθηκαν στις ίδιες περιοριστικές θέσεις του φορέα *pBluescript KS* (Stratagene). Εκεί η πέψη με το ένζυμο *Not*I απελευθέρωσε τις *wt*, *mut1*, και *mut3* παραλλαγές του *CG10222-3'UTR*,

οι οποίες στη συνέχεια κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pCASPER4 tub-EGFP (Brennecke et al., 2003) στην θέση *NotI*. Ο έλεγχος για τον προσανατολισμό των ενθεμάτων έγινε με το ένζυμο *XbaI*. Το SV40-3'UTR μεταφέρθηκε από τις περιοριστικές θέσεις *NotI* και *XhoI* της κατασκευής στον pBluescript KS, στις αντίστοιχες θέσεις του pCASPER4 tub-EGFP. Έτσι παρήχθησαν συνολικά οι ακόλουθες πλασμιδιακές κατασκευές: pCASPER4 tub-EGFP-CGwt, pCASPER4 tub-EGFP-CGmut1, pCASPER4 tub-EGFP-CGmut3 και pCASPER4 tub-EGFP-SV40.

Για την παραγωγή μιας τεχνητής 3'UTR DNA αλληλουχίας 88bp χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια. Αυτά σχημάτιζαν μια τριπλασιασμένη θέση δέσμευσης για το *miR-13* προερχόμενη από το *CG10222*-3'UTR που διακόπτονταν από την αλληλουχία συνδέτη AAAGATTT (Εικ. 9). Αρχικά προστέθηκε ενζυμικά μια φωσφορική ομάδα στο 5' άκρο κάθε ολιγονουκλεοτιδίου. Στην αντίδραση φωσφορυλίωσης χρησιμοποιήθηκαν 10pmol από το κάθε ολιγονουκλεοτίδιο μαζί με 10U του ενζύμου T4 πολυνουκλεοτιδική κινάση (New England Biolabs), σε ρυθμιστικό διάλυμα λιγάνης (Promega). Ο όγκος ρυθμίστηκε στα 20μl και η αντίδραση επώαστηκε στους 37°C για 45min. Ακολούθησε μίξη των τεσσάρων αντιδράσεων και βρασμός για 5min. Κατόπιν το μίγμα φυγοκεντρήθηκε σύντομα και αφέθηκε να κρυώσει μέχρι να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου. Σε αυτό το στάδιο τα ολιγονουκλεοτίδια είχαν υβριδίσει με τα συμπληρωματικά τους σχηματίζοντας ένα δίκλωνο DNA μόριο 88bp με προεξέχοντα άκρα, κατάλληλα για κλωνοποίηση στη θέση *NotI*. Το μίγμα αραιώθηκε σε 25 όγκους νερού και χρησιμοποιήθηκε στην μετέπειτα αντίδραση σύνδεσης με το πλασμίδιο pCASPER4 tub-EGFP-SV40 για την παραγωγή της επονομαζόμενης pCASPER4 tub-EGFP-triple-SV40 κατασκευής.

με δύο βήματα σύνδεσης και επίδραση με Klenow. Στη συνέχεια από το παραχθέν πλασμίδιο αποκόπηκε το τμήμα της EGFP με πέψη από τα ένζυμα *XhoI* και *NotI* και ενώθηκε στις ίδιες περιοριστικές θέσεις του φορέα pCASPER4-hsp83 (Horabin and Schedl, 1993). Προέκυψε έτσι η κατασκευή pCASPER4 hsp83-EGFP που διαθέτει καθοδικά ένα μικρό 3'UTR από το μεταθετό στοιχείο P, που είναι παρόν σε όλους τους φορείς τύπου pCASPER4. Έπειτα στην παραπάνω κατασκευή προστέθηκε η αλληλουχία του *CG10222*-3'UTR ως ένα *NotI* τμήμα από το πλασμίδιο pCASPER4 tub-EGFP-CGwt παράγοντας έτσι την επονομαζόμενη pCASPER4 hsp83-EGFP-CGwt κατασκευή.

Τα πλασμίδια pENTR-FLS και pENTR-INS έφεραν αντιστοίχως την πλήρη αλληλουχία των δύο εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *ofs* και ήταν μια ευγενική χορηγία του S. DiNardo (University of Pennsylvania, School of Medicine, Philadelphia, USA). Τα εν λόγω μεταγράφα διαφέρουν κατά ενός εσωτερικού τμήματος 117bp που απουσιάζει από το *ins* (Baker and Fuller, 2007; Franklin-Dumont et al., 2007). Εντός του φορέα pENTR τα ενθέματα FLS και INS βρίσκονταν μεταξύ των αλληλουχιών L1 και L2 οπότε και ήταν δυνατός ο ανασυνδυασμός τους στις αντίστοιχες θέσεις R1 και R2 του φορέα υποδοχής pTMW (DGRC-T. Murphy). Ο pTMW είναι ένας τροποποιημένος φορέας τύπου pUASt που επίσης διαθέτει έξι συνεχείς αμινοτελικά τοποθετημένους επιτόπους Myc. Η αντίδραση ανασυνδυασμού πραγματοποιήθηκε με το σύστημα GATEWAY LR Clonase II (Invitrogen) βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή. Με αυτή τη μέθοδο παρήχθησαν οι πλασμιδιακές κατασκευές UAS-6xMyc:fls και UAS-6xMyc:ins.

2.1.7 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων

5ml υγρής καλλιέργειας *E. coli* επώαστηκαν στους 37°C, για 14-16h. Την επόμενη μέρα ακολούθησε επιμόλυνση 100ml LB με 1ml από την προηγούμενη καλλιέργεια μέσα σε κωνική φιάλη χωρητικότητας 2L. Τα κύτταρα επώαστηκαν με ισχυρή ανάδευση στους 37°C μέχρι που η οπτική απορρόφηση στα 600nm έφτασε τιμή μεταξύ του 0,6 και 0,8. Κατόπιν η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε στις 2500rpm, στους 4°C, για 10min και το κυτταρικό ίζημα επανναδιαλύθηκε με προσοχή και υπομονή σε 30ml διαλύματος TfbI (30mM CH₃COOK, 50mM MgCl₂, 100mM KCl, 10mM CaCl₂ και 15% γλυκερόλη), χωρίς vortex. Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 30min και φυγοκέντρωση στις 2000rpm, για 10min, στους 4°C. Στη συνέχεια τα κύτταρα επανναδιαλύθηκαν σε 4ml διαλύματος TfbII (10mM MOPS pH 7, 75mM CaCl₂, 10mM KCl και 15% γλυκερόλη), μοιράστηκαν σε ομάδες των 100μl και ψύχθηκαν σε υγρό άζωτο πριν να αποθηκευτούν στους -80°C.

2.1.8 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων

Το διάλυμα των δεκτικών κυττάρων μεταφέρθηκε στον πάγο μέχρι να τηχθεί. Κατόπιν προστέθηκαν 0,5 όγκοι από την αντίδραση σύνδεσης ή 0,2 όγκοι από την αντίδραση ανασυνδυασμού. Το μίγμα αναμίχθηκε ελαφρώς και παρέμεινε στον πάγο για 20min. Ακολούθησε θερμικό σοκ με επώαση των κυττάρων στους 40 °C για 75s και απότομη μεταφορά στον πάγο. Μετά από 5min προστέθηκαν 800μl LB και το μίγμα επώαστηκε στους 37°C για 45min. Στη συνέχεια τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 8.000rpm, σε θερμοκρασία δωματίου, για 2min, απορρίφθηκε το περισσότερο του υπερκειμένου και στο υπόλοιπο επανναδιαλύθηκε το κυτταρικό ίζημα. Τελικώς τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε στερεό LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής. Στην περίπτωση του φορέα pGEM και pBluescript, πριν την επίστρωση προστέθηκαν 40μl

διαλύματος X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- beta-D-galactopyranoside, 20mg/ml σε διμεθυλ-φορμαμίδιο) στο κυτταρικό ίζημα για την χρώση των μη-ανασυνδυσασμένων αποικιών.

2.1.9 Απομόνωση DNA και RNA από ενήλικα άτομα *Drosophila*

20 νεαρές ενήλικες *Drosophila* συλλέχθηκαν σε αποστειρωμένα σωληνάκια και ψύχθηκαν στο υγρό άζωτο. Ακολούθησε προσθήκη 200μl διαλύματος λύσης (Holmes-Bonner: 2% SDS, 350mM NaCl, 7M ουρία, 100mM Tris-Cl, 10mM EDTA pH 8) και λειοτρίβηση. Το μίγμα λυμένων ιστών και εξωσκελετού φυγοκεντρήθηκε για 10min. Το υπερκείμενο εμπλουτίστηκε με ακόμα 250μl από το διάλυμα λύσης και επωάστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10min. Στο υπερκείμενο προστέθηκαν 150μl 5M CH₃COOK, το μίγμα ανακινήθηκε ελαφρά και επωάστηκε στον πάγο για 15min. Έπειτα έγινε φυγοκέντρηση για 10min και μεταφορά του υπερκειμένου σε σωληνάκι χωρητικότητας 2ml. Εκεί προστέθηκαν ίσοι όγκοι από διάλυμα ουδέτερης φαινόλης και χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (αναλογία 24:1). Στη συνέχεια έγινε ήπιο vortex για 1min με μικρά διαλλείματα. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 10min και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε σωληνάκι χωρητικότητας 1,5ml. Ακολούθησαν δύο κύκλοι καθαρισμού των οργανικών καταλοίπων με προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και φυγοκέντρηση για 10min. Στο τελευταίο υπερκείμενο προστέθηκαν 1/15 όγκοι διαλύματος 3M CH₃COOK pH 5,3 και 2,5 όγκοι απόλυτη αιθανόλη. Το μίγμα ανακινήθηκε ελαφρά και τοποθετήθηκε στους -80°C για 20min. Στη συνέχεια τα νουκλεϊκά οξέα κατακρημνιστήκαν με φυγοκέντρηση για 20min. Έπειτα έγινε πλύση του ιζήματος με 1ml διαλύματος 70% αιθανόλη και φυγοκέντρηση για 7min. Τελικά το ίζημα στέγνωσε για 10min στον

αέρα και διαλύθηκε σε 50μl νερού. Στο παραπάνω πρωτόκολλο όλες οι φυγοκεντρήσεις πραγματοποιήθηκαν στις 12.000rpm και σε θερμοκρασία 4°C. Το διάλυμα Holmes-Bonner φυλασσόταν μοιρασμένο σε όγκους των 2ml στους -20°C πριν χρησιμοποιηθεί. Επειδή σύμφωνα με το παραπάνω πρωτόκολλο απομονώνονταν αμφότερα DNA και RNA ακολουθούσε αντίδραση πέψης με το κατάλληλο ένζυμο αποικοδόμησης RNaseA (Qiagen) ή DNaseI (RocheI), κατά περίπτωση.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία από το 5' στο 3' άκρο	Εντοπισμός
pro_for	CGGAATTCCTGTTTGGTTTGAATTTGTT ATGTATG	3L chromosome arm 13407053-13407079
pro_rev	CCGGTACCCTTGCGGAAAATGAAAAATA TAAAC	3L chromosome arm 13405554-13405530
CSP-EGFP_for	CCAACGAGAAGCGCGATCACA	EGFP CDS 635-655
test_rev	CCGTACCTTAATCCCTCACTCTC	CG10222-3'UTR 93-71

Πίνακας 1 Προβολή του ονόματος, της αλληλουχίας και της θέσης εντοπισμού των εκκινητών.

2.1.10 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Έγινε χρήση της μεθόδου PCR προκειμένου να πολλαπλασιαστεί ειδικά ο υποκινητής του *CG10222* από γονιδιωματικό DNA της *Drosophila*. Η αντίδραση περιείχε 1,25mM MgCl₂, 200μM dNTPs, ρυθμιστικό διάλυμα (Minotech), 10pmol από κάθε εκκινητή και 1U ενζύμου DNA Taq polymerase (Minotech). Στο παραπάνω μίγμα προστέθηκαν περίπου 200ng γονιδιωματικού DNA ως εκμαγείο. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ρυθμίστηκε στα 50μl. Στη μηχανή της PCR ορίστηκε το εξής πρόγραμμα: 5min στους 94°C, 34 κύκλοι με 45s στους 94°C – 30s στους 54°C – 100s στους 72°C και ένα τελικό βήμα 10min στους 72°C. Στον πίνακα 1 παρατίθενται η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό κομματιών DNA ή την αλληλούχιση πλασμιδιακών κατασκευών.

2.1.11 Μεταφορά κατά Southern

20μg γονιδιωματικού DNA επωάστηκαν με 80U ενζύμου *XhoI* (Minotech) σε τελικό όγκο 150μl, στους 37°C, για 6h. Μικρό μέρος της αντίδρασης πέψης ελέγχθηκε σε πήκτωμα 1% αραρόζης. Το υπόλοιπο της αντίδρασης υπεβλήθη σε φυγοκέντρηση υπό κενό μέχρι ο όγκος του να κατέλθει στα 30μl. Στη συνέχεια προστέθηκαν 6μl διαλύματος φόρτωσης (Orange-G) και το κομματιασμένο DNA αναλύθηκε σε πήκτωμα 0,75% αραρόζης για 12h, στα 22V.

Την επόμενη μέρα το πήκτωμα φωτογραφήθηκε υπό UV και έπειτα εμβαπτίστηκε σε διάλυμα 0,2N HCl για 10min. Ακολούθησε πλύση σε νερό για 10min και εμποτισμός σε διάλυμα αποδιάταξης (1,5M NaCl, 0,5N NaOH) για 45min. Στη συνέχεια το πήκτωμα πλύθηκε άλλη μια φορά με νερό για 10min και έπειτα εμβαπτίστηκε δύο φορές σε διάλυμα εξουδετέρωσης (1,5M NaCl, 10mM Tris-Cl, pH 7,4) για 30 και 15min, αντίστοιχα. Κατόπιν μεταφέρθηκε σε διάλυμα 10x SSC για 10min. Το διάλυμα SSC παρασκευάστηκε σε συγκέντρωση 20x με την εξής σύσταση: 3M NaCl, 300mM κιτρικό νάτριο, pH 7. Τέλος το πήκτωμα μετρήθηκε προκειμένου να κοπούν 3 απορροφητικά χαρτιά (Whatman) και ένα κομμάτι Nylon μεμβράνης υβριδοποίησης 0,45μm (Nytran, Schleicher and Schuell) στις ίδιες διαστάσεις. Ακολούθησε μεταφορά του DNA από το πήκτωμα στην μεμβράνη με τη μέθοδο της τριχοειδούς μεταφοράς για περίπου 16h (Sambrook et al., 1989).

Την επόμενη μέρα η μεμβράνη πλύθηκε σε διάλυμα 2x SSC προκειμένου να απομακρυνθούν υπολείματα αραρόζης και στη συνέχεια στέγνωσε κάτω από τον απαγωγό για 1h. Τελικά ακτινοβολήθηκε με 120mJ UV φωτός και αποθηκεύτηκε μεταξύ δυο απορροφητικών χαρτιών.

2.1.12 Υβριδοποίηση κατά Southern

Η μεμβράνη εμποτίστηκε σε διάλυμα 2x SSC και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε κύλινδρο υβριδοποίησης. Προστέθηκαν 20ml διαλύματος υβριδοποίησης (5x SSC, 1% SDS, 1x διάλυμα Denhardt's, 0,25mg/ml tRNA) και ακολούθησε επώαση σε περιστρεφόμενο φούρνο στους 60°C για 3h. Εν τω μεταξύ παρασκευάστηκε ο ραδιενεργός ιχνηθέτης με την μέθοδο της σήμανσης με τυχαίους εκκινητές (random primer labeling). Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε ολόκληρο το γονίδιο της EGFP από τον φορέα pCASPER4 tub-EGFP. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε πέψη με τα ένζυμα *KpnI* και *XbaI* και απομόνωση του αντίστοιχου τμήματος DNA από πήκτωμα αγαρόζης. 100ng από το DNA εκμαγείο αραιώθηκαν σε 15μl νερού και αποδιατάχθηκαν με βρασμό για 5min και απότομη μεταφορά στον πάγο. Η αντίδραση σήμανσης περιείχε 2μl [α - 32 P]dATP και 2μl [α - 32 P]dCTP το καθένα 3000Ci/mmol, 10mM dGTP, 10mM dTTP, 20U ενζύμου Klenow Large fragment (New England Biolabs), ρυθμιστικό διάλυμα (New England Biolabs), 3μg τυχαίων εκκινητών (Invitrogen), το αποδιαταγμένο DNA εκμαγείο και νερό μέχρι των όγκο των 50μl. Το μίγμα επώαστηκε στους 37°C για 1h και κατόπιν υπεβλήθη σε μοριακή διήθηση μέσω σφαιριδίων αγαρόζης (IBAGAR) σε σιφόνιο τύπου Pasteur προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια των μη ενσωματωμένων ραδιο-νουκλεοτιδίων. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε το ποσό ραδιενέργειας που ενσωμάτωσε το προϊόν της αντίδρασης ανά μl σε μετρητή κρούσεων. Ακολούθησε βρασμός του ραδιενεργού ιχνηθέτη για 5min και απότομη μεταφορά στον πάγο προκειμένου να επιτευχθεί πλήρης και μόνιμη αποδιάταξη. Στη συνέχεια απομακρύνθηκαν 13ml από το διάλυμα υβριδοποίησης της μεμβράνης και στα εναπομείναντα προστέθηκε ο ραδιοσημασμένος ιχνηθέτης σε τελική συγκέντρωση 10^6 κρούσεων ανά ml

διαλύματος υβριδοποίησης. Ακολούθησε επώαση στο φούρνο υβριδοποίησης στους 60°C για 16h.

Την επόμενη μέρα απομακρύνθηκε το διάλυμα υβριδοποίησης με τον ιχνηθέτη και η μεμβράνη πλύθηκε πρώτα για 5min με 15ml διαλύματος 2x SSC και έπειτα για 30min με διάλυμα 2x SSC και 0,1% SDS στην θερμοκρασία υβριδισμού. Στη συνέχεια η μεμβράνη αφαιρέθηκε από τον κύλινδρο υβριδισμού και πλύθηκε στιγμιαία με διάλυμα 2x SSC προκειμένου να απομακρυνθεί και η τελευταία μη-προσδεμένη ποσότητα ραδιενέργειας. Η μεμβράνη εγκλείστηκε σε πλαστική σακούλα και τοποθετήθηκε σε κασέτα έκθεσης μαζί με φιλμ αυτοραδιογραφίας (Fuji Super RX). Ακολούθησε επώαση της κασέτας στους -80°C και εμφάνιση του φιλμ δύο και πέντε μέρες μετά.

2.1.13 Διαμόλυνση κυτταρικής σειράς S2

Η κυτταρική σειρά Schneider-2 (S2) διαθέτει κύτταρα με στρογγυλό σχήμα και μεγάλο πυρήνα που δεν επικάθονται στο τρυβλίο ανάπτυξης. Διατηρούνται και ανακαλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο M3 (Sigma) στους 25°C. Μια μέρα πριν την διαμόλυνση τα κύτταρα συλλέχθηκαν, φυγοκεντρήθηκαν και προσδιορίστηκε η πυκνότητα τους σε αιμοκυτταρόμετρο. Στη συνέχεια αραιώθηκαν με θρεπτικό μέσο προκειμένου να λάβουν συγκέντρωση 10⁶/ml και μοιράστηκαν στα πηγάδια του τρυβλίου σε ομάδες των 2,5ml.

Την επόμενη μέρα έγινε η προετοιμασία του DNA και η διαμόλυνση. Προστέθηκαν 4μg του υπό μελέτη πλασμιδίου, μαζί με 0,5μg του πλασμιδίου hs-lacZ και 0,5μg του κενού πλασμιδιακού φορέα Ract. Ο όγκος ρυθμίστηκε στα 112,5μl με νερό. Κατόπιν προστέθηκαν στάγδην 12,5μl κρούου διαλύματος 2,5M CaCl₂. Το μίγμα ανακατεύθηκε αμέσως με μικροπιπέτα και προστέθηκε στάγδην σε 125μl διαλύματος

2x HBS (280mM NaCl, 10mM KCl, 1,5mM Na₂HPO₄, 12mM D⁺glucose, 50mM HEPES, pH 7,0). Ακολούθησε ήπιο vortex και επώαση του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου για συνολικά 20min μετά την προσθήκη του CaCl₂. Στη συνέχεια το μίγμα που περιείχε το ίζημα DNA και ασβεστίου προστέθηκε στην περιφέρεια του κάθε πηγαδιού που αναπτύσσονταν τα κύτταρα. Ακολούθησε επώαση στους 25°C για 40h.

Μετά από δύο μέρες περίπου έγινε η συλλογή των κυττάρων από τα πηγάδια του τρυβλίου με τη χρήση μικροπιπέτας και την προσθήκη 1,4ml PBS. Το κάθε μίγμα μεταφέρθηκε σε σωλήνα τύπου falcon και φυγοκεντρήθηκε στις 2.500rpm, σε θερμοκρασία δωματίου, για 5min. Έπειτα έγινε επαναδιάλυση του κυτταρικού ιζήματος σε 1ml PBS και μεταφορά του μίγματος σε σωληνάκι χωρητικότητας 1,5ml. Ακολούθησε σύντομη φυγοκέντρηση στις 12.000rpm σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιάλυση του κυτταρικού ιζήματος σε 100μl διαλύματος λύσης (50mM Tris-Cl pH 8, 300mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 0,5% NP40). Τα κύτταρα εντός του διαλύματος λύσης υπέστησαν τρεις κύκλους ψύξης σε ξηρό πάγο και τήξης στους 37°C προκειμένου να γίνει ολοκληρωτική λύση. Κατόπιν έγινε φυγοκέντρηση στις 12.000rpm, στους 4°C, για 10min. Τελικά το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάκι και αποθηκεύτηκε στους -20°C.

2.1.14 Μέτρηση ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης

Οποιαδήποτε απόκλιση μεταξύ δειγμάτων στο ποσό επιτυχίας της διαμόλυνσης κατά την συλλογή ή λύση των κυττάρων μπορεί να διορθωθεί με την μέτρηση της ενεργότητας για τη β-γαλακτοσιδάση. Στο μίγμα του DNA συμπεριλήφθηκε και σταθερή ποσότητα από το πλασμίδιο hs-lacZ το οποίο έκφραζε την πρωτεΐνη β-γαλακτοσιδάση από ένα συστατικό υποκινητή. Σε 10μl από το προϊόν λύσης των κυττάρων προστέθηκαν 300μl lacZ buffer (60mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, 10mM

KCl, 1mM MgSO₄, 37.8mM β-μερκαπτοαιθανόλη) και 60μl διαλύματος ONPG, (ortho-nitrophenyl-β-galactoside, 4mg/ml). Η αντίδραση επώαστηκε στους 37°C μέχρι να εμφανιστεί ένα υποκίτρινο χρώμα και στη συνέχεια διακόπηκε με 500μl διαλύματος 1M Na₂CO₃, το οποίο προστέθηκε σε ακριβώς τον ίδιο χρόνο για κάθε δείγμα. Τελικά 200μl από κάθε αντίδραση φορτώθηκαν σε πιάτο τύπου ELISA και φωτομετρήθηκαν στα 420nm.

2.1.15 Μεταφορά Western

Περίπου η μισή ποσότητα από το προϊόν λύσης των κυττάρων αναμίχθηκε με 2x διαλύματος φόρτωσης (4% SDS, 20% γλυκερόλη, 0,2% μπλε της βρωμοφαινόλης, 100mM Tris-Cl pH 6,8). Στο μίγμα αυτό προστέθηκε DTT (dithiothreitol) σε τελική συγκέντρωση 100mM. Ακολούθησε βρασμός για 8min και σύντομη φυγοκέντρηση των δειγμάτων. Στη συνέχεια έγινε φόρτωση των δειγμάτων σε πήκτωμα ακρυλαμίδης πάχους 1,5mm που διέθετε στην αρχή μια μικρή περιοχή επιστοίβασης (stacking: 5% 29/1 διάλυμα ακρυλαμιδίου/bis-ακρυλαμιδίου, 0,1% SDS, 0,1% APS, ammonium persulfate, 0,1% TEMED, tetramethylethylenediamine, 165mM Tris-Cl pH 6,8) και μετέπειτα την κυρίως περιοχή διαχωρισμού (separating: 12,5% 29/1 διάλυμα ακρυλαμιδίου/bis-ακρυλαμιδίου, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,1% TEMED, 375mM Tris-Cl pH 8,8). Στα δείγματα συμπεριλήφθηκε και ένας προ-χρωματισμένος μάρτυρας μεγέθους (Fermentas). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε για λίγο στα 50V και στη συνέχεια στα 150V μέχρι που η χρωστική εγκατέλειψε πλήρως το πήκτωμα. Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης είχε την εξής σύσταση: 25mM Tris-base, 192mM γλυκίνη, 0,1% SDS.

Στη συνέχεια το πήκτωμα απελευθερώθηκε από τα γυάλινο καλούπι του και αποκόπηκε η περιοχή επιστοίβασης. Μετρήθηκαν οι διαστάσεις του και

τοποθετήθηκε για 15min σε διάλυμα μεταφοράς (50mM Tris-base, 380mM γλυκίνη, 0,1% SDS, 20% μεθανόλη) για να εξισορροπηθεί. Κόπηκαν 4 απορροφητικά χαρτιά (Whatman) και ένα τμήμα μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με πόρους 0,2μm (Protran, Schleicher and Schuell) στις ίδιες διαστάσεις. Από τον αρνητικό πόλο της συσκευής μεταφοράς (BIORAD) προς τον θετικό τοποθετήθηκαν ένας σπόγγος, 2 απορροφητικά χαρτιά, το πήκτωμα, η μεμβράνη, 2 απορροφητικά χαρτιά και ένας ακόμη σπόγγος. Όλα τα υλικά ήταν διαβρεγμένα σε διάλυμα μεταφοράς και απομακρύνθηκαν οποιεσδήποτε φυσαλίδες αέρα μεταξύ τους. Ακολούθησε ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στην μεμβράνη στα 350mA, στους 4°C, για 60min.

Έπειτα η μεμβράνη απομακρύνθηκε από το σύστημα μεταφοράς και επώαστηκε σε PBS για 5min. Στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε διάλυμα Ponceau-S (0,1% σε 5% CH₃COOH) για 5-8min προκειμένου να γίνει έλεγχος της επιτυχίας μεταφοράς και της ισόποσης φόρτωσης των δειγμάτων. Η μεμβράνη αποχρωματίστηκε σε λίγο νερό και μεταφέρθηκε σε διάλυμα παρεμπόδισης (blocking: 5% άπαχο γάλα σε σκόνη και 0,1% Tween 20 σε 1xPBS) με έντονη ανακίνηση για 60min. Κατόπιν ακολούθησε επώαση της μεμβράνης με αντίσωμα rabbit anti-GFP (MoBiTech) αραιωμένο σε 2.500 όγκους διαλύματος παρεμπόδισης, στους 4°C για 14h.

Την επόμενη μέρα απομακρύνθηκε το διάλυμα του αντισώματος και η μεμβράνη πλύθηκε τρεις φορές σε θερμοκρασία δωματίου για 15min με διάλυμα PTw (0,1% Tween 20 σε 1xPBS). Ακολούθησε επώαση με το δευτερεύον αντίσωμα, anti-rabbit HRP (Jackson Immunoresearch), αραιωμένο σε 10.000 όγκους διαλύματος παρεμπόδισης σε θερμοκρασία δωματίου για 60min. Στη συνέχεια έγιναν τρεις πλύσεις με PTw ομοίως με το πρωτεύον αντίσωμα. Ακολούθησε η διαδικασία εμφάνισης του σήματος με το σύστημα χημειο-φωταύγειας (Thermo Scientific)

ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το σήμα αποτυπώθηκε σε φιλμ (Fuji Super RX) μετά από σύντομες εκθέσεις διάρκειας 1-5min.

2.1.16 Παραγωγή DNA ιχνηθέτη σημασμένου με διγοξigenίνη (DIG)

Το γονίδιο της EGFP απομονώθηκε από τον φορέα pCASPER4 tub-EGFP όμοια με το πρωτόκολο υβριδοποίησης κατά Southern και χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την παραγωγή του DIG-σημασμένου ιχνηθέτη. 500ng του DNA τμήματος αραιώθηκαν σε 15μl νερού και αποδιατάχθηκαν με βρασμό για 5min και απότομη μεταφορά στον πάγο. Μετά από σύντομη φυγοκέντρηση προστέθηκαν 2μl διαλύματος σήμανσης (10x dNTP-Mix, Roche), 4μg τυχαίων εκκινητών (Roche) και 2U ενζύμου Klenow Large Fragment (Roche), σε τελικό όγκο 20μl. Το μίγμα επώαστηκε στους 37°C για 60min και στη συνέχεια η αντίδραση διακόπηκε με την προσθήκη 2μl διαλύματος 0,2M EDTA pH 8. Ακολούθησε προσθήκη 4,5μl διαλύματος 4M LiCl και 75μl απόλυτης αιθανόλης, επώαση στους -20°C για 2h και έπειτα φυγοκέντρηση στις 12.000rpm για 15min. Το παραχθέν ίζημα περιείχε το σημασμένο ιχνηθέτη απαλλαγμένο από μη-ενσωματωμένα νουκλεοτίδια που στη συνέχεια πλύθηκε με 80μl διαλύματος 70% αιθανόλης και φυγοκέντρηση στις 12.000rpm για 8min. Τελικά το ίζημα στέγνωσε στον αέρα για 10min και επανναδιαλύθηκε σε 30μl νερού.

2.1.17 Έλεγχος σήμανσης ιχνηθέτη με την μέθοδο dot-blot

Ο ιχνηθέτης αραιώθηκε σε 10 και 100 όγκους νερού. Στη συνέχεια 1μl από κάθε αραιώση μεταφέρθηκε σε θετικά φορτισμένη μεμβράνη (Nytran, Schleicher and Schuell) και στέγνωσε επί αυτής για 10min. Ακολούθησε εμποτισμός της μεμβράνης σε διάλυμα πλύσης (3% Tween-20 σε 100mM cis-C₄H₄O₄ και 100mM NaCl, pH 7,5) για 5min και έπειτα επώαση σε διάλυμα παρεμπόδισης (1% προϊόν παρεμπόδισης,

Roche σε 100mM cis-C₄H₄O₄ και 100mM NaCl, pH 7,5) με ανακίνηση για 30min. Παράλληλα το αντίσωμα anti-DIG συζευγμένο με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (AP) αραιώθηκε σε 10.000 όγκους διαλύματος παρεμπόδισης. Κατόπιν η μεμβράνη εμβαπτίστηκε στο διάλυμα του αντισώματος και επώαστηκε με ανακίνηση για 30min. Ακολούθησαν δύο πλύσεις με ανακίνηση, διάρκειας 15min και στη συνέχεια εξισορρόπηση σε διάλυμα εμφάνισης (100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 100mM Tris-Cl pH 9,5) για 5min. Έπειτα η μεμβράνη μεταφέρθηκε στο διάλυμα χρώσης (200μl NBT, nitro blue tetrazolium /BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, Roche σε 10ml διαλύματος εμφάνισης) και επώαστηκε στο σκοτάδι χωρίς ανακίνηση. Σε διάστημα 15min το σήμα είχε ήδη εμφανιστεί επιβεβαιώνοντας την επιτυχή ενσωμάτωση της DIG στον ιχνηθέτη. Τέλος η χρώση διακόπηκε με μεταφορά σε διάλυμα πλύσης.

2.1.18 Υπολογιστικά προγράμματα και βάσεις δεδομένων

Το χρωματογράφημα της αλληλούχισης των ενθεμάτων αναλύθηκε με το πρόγραμμα Chromas (Griffith University, Australia). Για την σύγκριση, ευθυγράμμιση και ταυτοποίηση των αλληλουχιών έγινε χρήση διαδικτυακών προγραμμάτων που παρέχονται από τα ινστιτούτα EBI (<http://www.ebi.ac.uk>) και NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ενώ η αναγνώριση περιοριστικών θέσεων κοπής έγινε με το πρόγραμμα NEBcutter V2.0 (Vincze et al., 2003). Ο σχεδιασμός των εκκινητών πραγματοποιήθηκε με τα προγράμματα OLIGO 6 (Molecular Biology Insights Inc) και Primer 3 Plus (Untergasser et al., 2007).

Οι αλληλουχίες των miRNA εντοπίστηκαν στο μητρώο καταγραφής miRNA Registry (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences>). Για την ανάλυση των δευτεροταγών δομών αλληλεπιδρώντων RNA χρησιμοποιήθηκε η έκδοση 2.3 του προγράμματος mFOLD ρυθμίζοντας την θερμοκρασία στους 25°C (Zuker, 2003). Η

ανίχνευση θέσεων δέσμευσης για miRNA επί του 3'UTR των μεταγράφων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα microInspector και την βάση δεδομένων Microcosm Targets (Rusinov et al., 2005; Griffiths-Jones et al., 2008).

Η εύρεση πληροφοριών για γονιδιακούς τόπους της *Drosophila* έγινε μέσω της βάσης δεδομένων Flybase (<http://flybase.org>) σε συνδυασμό με την μελέτη χαρακτήρων από διάφορα στελέχη της συλλογής Bloomington (<http://flystocks.bio.indiana.edu>). Τέλος η ανάλυση και επεξεργασία των φωτογραφιών από τα συστήματα απεικόνισης έγινε με τα υπολογιστικά προγράμματα Leica Confocal Software Lite, Adobe Photoshop CS3 και ACDSsee 10 Photo manager.

2.2 Πρωτόκολλα χειρισμού και χρώσης στην *Drosophila*

2.2.1 Στελέχη *Drosophila*, διαχείριση και μετασχηματισμός

Όλα τα στελέχη και οι διασταυρώσεις καλλιεργήθηκαν στους 25°C σε τροφή με βάση το καλαμποκάλευρο. Οι αγρίου τύπου *Drosophila* ήταν γονοτύπου *yw* (κίτρινο σώμα και λευκά μάτια). Οι διαγονιδιακές σειρές *Drosophila* παρήχθησαν με μετασχηματισμό διαμεσολαβούμενο από μεταθετά στοιχεία τύπου P μέσω ένεσης εμβρύων σταδίου 30-90min (Rubin and Spradling, 1982). Ο πλασμιδιακός φορέας μετασχηματισμού περιείχε ένα μεταθετό στοιχείο P εντός του οποίου βρίσκονταν το γονίδιο επιλογής w^+ και η DNA αλληλουχία που έμελε να ενσωματωθεί στο γονιδίωμα. Το διάλυμα ένεσης περιείχε 400ng/μl του φορέα μετασχηματισμού, 120ng/μl του αρωγού φορέα $\rho\Delta(2,3)$, που ήταν η πηγή μεταθετάσης (transposase), 5mM KCl και 0,1mM Na_2PO_4 pH 6,8. Όλες οι διασταυρώσεις πραγματοποιήθηκαν βάσει θεμελιωδών κανόνων γενετικής ανάλυσης. Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται τα στελέχη *Drosophila* που χρησιμοποιήθηκαν ή κατασκευάστηκαν κατά τη διάρκεια της διατριβής.

Γονότυπος στελέχους	Προέλευση
<i>tub-EGFP-CG10222 3'UTR</i> , chr. 2, line 1.92,	N. Βρεττός
<i>tub-EGFP-CG10222^{mut1} 3'UTR</i> , chr. 3, line 3.32	N. Βρεττός
<i>tub-EGFP-CG10222^{mut3} 3'UTR</i> , chr. 2, line 4.42	N. Βρεττός
<i>tub-EGFP-SV40 3'UTR</i> , chr. 3, line 7.2	N. Βρεττός
<i>tub-EGFP-SV40 3'UTR</i> , chr. 1, line 7.5	N. Βρεττός
<i>tub-EGFP-SV40 3'UTR/CyO</i> , chr. 2, line 7.7	N. Βρεττός
<i>tub-EGFP-SV40 3'UTR/CyO</i> , chr. 2, line 7.16	N. Βρεττός
<i>tub-EGFP-triple:SV40 3'UTR</i> , chr. 2, line t31	N. Βρεττός
<i>tub-EGFP-hairy 3'UTR</i> , chr. 3, line mir-57	S.M. Cohen
<i>tub-EGFP-hid 3'UTR/CyO</i> , chr. 2, line mir-38	S.M. Cohen
<i>tub-EGFP-hid 3'UTR/TM6B</i> , chr. 3 line mir-42	S.M. Cohen
<i>tub-EGFP-sickle 3'UTR/TM6B</i> , chr. 3, line mir-50	S.M. Cohen
<i>tub-EGFP-P element 3'UTR</i> , chr. 3, line mir-26	S.M. Cohen
<i>tub-RFP-m7 3'UTR</i> , chr. 2, line 4B3	P. Piwko
<i>tub-RFP-m7 3'UTR</i> , chr. 3 line 4B2	P.Piwko
<i>tub-RFP-Adh 3'UTR</i> , chr. 2, line 12A3	P.Piwko
<i>tub-RFP-Adh 3'UTR</i> , chr. 3 line 6A2	P.Piwko
<i>tub-EGFP-CG10222 3'UTR, tub-RFP m7 3'UTR</i> , chr. 2	N. Βρεττός
<i>hsp83-EGFP-CG10222 3'UTR/TM3Sb</i> , chr. 3, line A10	N. Βρεττός
<i>hsp83-EGFP-CG10222 3'UTR/CyO</i> , chr. 2, line A11	N. Βρεττός
<i>hsp83-EGFP-P element 3'UTR/CyO</i> , chr.2, line B8	N. Βρεττός
<i>hsp83-EGFP-P element 3'UTR/TM6B</i> , chr. 1;3, line B9	N. Βρεττός
<i>tub-EGFP-CG10222 3'UTR;FRT82Bdcr-1^{Q1147X}/T(2,3)</i> , chr. 2;3	N. Βρεττός
<i>tub-EGFP-CG10222^{mut3} 3'UTR;FRT82Bdcr-1^{Q1147X}/T(2,3)</i> , chr.2;3	N. Βρεττός

Γονότυπος στελέχους	Προέλευση
<i>tub-EGFP-SV40 3'UTR;FRT82Bdcr-1^{Q1147X}/T(2,3)</i> , chr. 2;3	N. Βρεττός
<i>hs-FLP;FRT82Barm-lacZ/TM6B</i> , chr 1;3	N. Baker
<i>ey-FLP;FRT82Bdcr-1^{Q1147X}/TM3Sb</i> , chr.1;3	R.W. Carthew
<i>FRT42Ddcr2^{L811fsX};tub-EGFP-SV40 3'UTR</i> , chr 2,3	N. Βρεττός
<i>eyFLP;FRT42Ddcr2^{L811fsX}/CyO</i> , chr 1,2	R.W. Carthew
<i>tub-EGFP-CG10222 3'UTR;nos-Gal4:VP16</i> chr. 2;3	N. Βρεττός
<i>tub-EGFP-SV40 3'UTR;nos-Gal4:VP16/T(2,3)</i> chr. 2;3	N. Βρεττός
<i>tub-EGFP-P element 3'UTR,UAS-dpp⁵/TM3</i> chr. 3	N. Βρεττός
<i>tub-EGFP-P element 3'UTR,UAS-dpp⁵/TM6B</i> chr. 3	N. Βρεττός
<i>nos-Gal4:VP16</i> , chr. 3	A. Ephrussi
<i>UAS-dpp⁵/TM3Sb</i> , chr. 3	A. Ephrussi
<i>tub-EGFP-CG10222 3'UTR;aly¹/T(2,3)</i> , chr. 2;3	N. Βρεττός
<i>tub-EGFP-SV40 3'UTR;aly¹/T(2,3)</i> , chr. 2;3	N. Βρεττός
<i>tub-EGFP-P element 3'UTR,aly¹/TM3Sb</i> , chr. 3, line 4	N. Βρεττός
<i>tub-EGFP-P element 3'UTR,aly¹/TM3Sb</i> , chr. 3, line 8	N. Βρεττός
<i>aly¹/TM3Sb</i> , chr. 3	Bloomington
<i>tub-EGFP-CG10222 3'UTR;sa¹/T(2,3)</i> , chr. 2;3	N. Βρεττός
<i>tub-EGFP-SV40 3'UTR;sa¹/T(2,3)</i> , chr. 2;3	N. Βρεττός
<i>tub-EGFP-P element 3'UTR,sa¹/TM3Sb</i> , chr. 3, line 15	N. Βρεττός
<i>tub-EGFP-P element 3'UTR,sa¹/TM3Sb</i> , chr. 3, line 16	N. Βρεττός
<i>tub-RFP-m7 3'UTR;sa¹/T(2,3)</i> , chr. 2;3	N. Βρεττός
<i>tub-RFP-Adh 3'UTR;sa¹/T(2,3)</i> , chr. 2;3	N. Βρεττός
<i>sa¹,red¹/TM3Sb</i> , chr. 3	Bloomington
<i>tub-EGFP-CG10222 3'UTR;bol¹/T(2,3)</i> , chr. 2;3	N. Βρεττός

Γονότυπος στελέχους	Προέλευση
<i>tub-EGFP-P element 3'UTR,bol¹/TM3Sb</i> , chr. 3	N. Βρεττός
<i>tub-RFP-m7 3'UTR;bol¹/T(2,3)</i> , chr. 2;3	N. Βρεττός
<i>tub-RFP-Adh 3'UTR;bol¹/T(2,3)</i> , chr. 2;3	N. Βρεττός
<i>bol¹/TM3Sb</i> , chr. 3	Bloomington
<i>tub-EGFP-CG10222 3'UTR;ofs^{Z3-3283}/T(2,3)</i> , chr. 2;3	N. Βρεττός
<i>tub-EGFP-P element 3'UTR,ofs^{BR-21-37}/TM3Sb</i> , chr. 3	N. Βρεττός
<i>tub-RFP-m7 3'UTR;ofs^{Z3-3283}/T(2,3)</i> , chr. 2;3	N. Βρεττός
<i>tub-RFP-Adh 3'UTR;ofs^{Z3-3283}/T(2,3)</i> , chr. 2;3	N. Βρεττός
<i>HA:ofs;sa¹/TM3Ser</i> , chr. 1;3	N. Βρεττός
<i>w;ofs^{Z3-3283}/TM6B</i> , chr. 1;3	M. Fuller
<i>w,HA:ofs</i> , chr. 1	M. Fuller
<i>w;HA:ofs</i> , chr. 3	M. Fuller
<i>w,ofs^{BR21-37}/TM3Sb</i> , chr. 1;3	N. Βρεττός
<i>w,ofs^{BR21-37}/TM6B</i> , chr. 1;3	N. Βρεττός
<i>w;twe-lacZ;ofs^{BR21-37}/TM6B</i> , chr. 1;2;3	H. W-Cooper
<i>UAS-myc6x:ofs^{fls}</i> , chr. 2, line 8	N. Βρεττός
<i>UAS-myc6x:ofs^{fls}</i> , chr. 2, line 31	N. Βρεττός
<i>UAS-myc6x:ofs^{ins}</i> , chr. 2, line 15	N. Βρεττός
<i>UAS-myc6x:ofs^{ins}</i> , chr. 2, line 20	N. Βρεττός
<i>UAS-myc6x:ofs^{ins}</i> , chr. 2, line 28	N. Βρεττός
<i>UAS-myc6x:ofs^{ins}</i> , chr. 2, line 32	N. Βρεττός
<i>UAS-myc6x:ofs^{ins}</i> , chr. 2, line 33	N. Βρεττός
<i>tub-EGFP-CG10222 3'UTR;dpp-Gal4^{40CG}/T(2,3)</i> , chr. 2;3	N. Βρεττός
<i>tub-EGFP-P element 3'UTR,dpp-Gal4^{40CG}/TM6B</i> , chr. 3	N. Βρεττός

Γονότυπος στελέχους	Προέλευση
<i>tub-RFP-m7 3'UTR;dpp-Gal4^{40CG}/T(2,3)</i> , chr. 2;3	N. Βρεττός
<i>tub-RFP-Adh 3'UTR;dpp-Gal4^{40CG}/T(2,3)</i> , chr. 2;3	N. Βρεττός
<i>w;CyO/Sp;dpp-Gal4/TM6B</i> , chr. 1;2;3, line 40C6	F.M. Hoffmann
<i>yw,mei-P26^{mfs1};Dp(1;4)A17/sv^{spa-pol}</i> , chr. 1;4	S. Page

Πίνακας 2 Καταγραφή του γονοτύπου και της προέλευσης των στελεχών *Drosophila*.

2.2.2 Παραγωγή κλώνων κυττάρων χωρίς Dcr-1 ενεργότητα

Παρήχθησαν μιτωτικοί κλώνοι βάσει του συστήματος Flp-FRT σε κύτταρα των αναπτυξιακών δίσκων θώρακα-φερού με επαγωγή στους 37°C (Xu and Rubin, 1993). Συγκεκριμένα, 12-14 θηλυκές παρθένες *Drosophila* του στελέχους *hsFlp;FRT82Barm-lacZ/TM6B* διασταυρώθηκαν με 5-6 αρσενικές του στελέχους *y,w;tub-EGFP-192 3'UTR,FRT82Bdcr-1^{Q1147X}/T(2,3)* και κάθε 48h οι γονείς μεταφέρονταν σε νέα δοχείο τροφής. Τα έμβρυα ωρίμασαν για 48h μέχρι που προνύμφες πρώτου με δευτέρου σταδίου εμφανίστηκαν να περιπλανιούνται επί της τροφής. Ακολούθησε μεταφορά των καλλιιεργειών σε υδατόλουτρο στους 37°C, για 2h. Στη συνέχεια η διασταύρωση μεταφέρθηκε στους 25°C για να ολοκληρωθεί η μεταμόρφωση μέχρι το τρίτο προνυμφικό στάδιο. Κατόπιν έγινε ανατομία στις προνύμφες που δεν έφεραν το χαρακτήρα Tubby.

2.2.3 Ανατομική αφαίρεση όρχεων από ενήλικα άτομα

8-10 νεαρές αρσενικές ενήλικες *Drosophila* μεταφέρθηκαν από την τράπεζα αναισθησίας σε μικρά πλαστικά δοχεία τύπου Petri τοποθετημένα επί του πάγου. Εντός διαλύματος PBS και κάτω από το στερεοσκόπιο αποκόπηκε η κεφαλή και ένα μικρό μέρος της τελικής κοιλιακής περιοχής. Ασκώντας πίεση στην κοιλιακή χώρα

αφαιρέθηκαν οι όρχεις όπου συχνά παρέμεναν συνδεδεμένοι με τους σπερματικούς σάκους και τους παραγόνιους αδένες. Τα όργανα μεταφέρθηκαν μέσα σε μικρό μεταλλικό κλουβί εμβαπτισμένο σε φρέσκο διάλυμα PBS εντός πηγαδιού τρυβλίου ανάπτυξης κυττάρων (24 θέσεων), που βρίσκονταν στον πάγο. Ακολούθησε μια στιγμιαία πλύση σε PBS και έπειτα η διαδικασία της μονιμοποίησης.

Για την προετοιμασία testis squash παρασκευασμάτων, μετά την στιγμιαία πλύση σε PBS, ομάδες από 2-3 όρχεις εμβαπτίστηκαν σε 5μl PBS, πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Κάτω από το στερεοσκόπιο και με τη βοήθεια μιας λεπτής βελόνας βολφραμίου δημιουργήθηκε μια οπή κοντά στη βάση κάθε όρχι. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε η καλυπτρίδα και απομακρύνθηκε η περίσσεια του PBS με απορροφητικό χαρτί. Ακολούθησε άμεση παρατήρηση των παρασκευασμάτων στο μικροσκόπιο.

2.2.4 Ανατομική αφαίρεση όρχεων ή αναπτυξιακών δίσκων από προνύμφες τρίτου σταδίου

8-10 προνύμφες τρίτου σταδίου που κινούνταν στα τοιχώματα του δοχείου ανάπτυξης μεταφέρθηκαν σε δοχείο με PBS. Στη συνέχεια χωρίστηκαν με λαβίδες σε δυο τμήματα κάτω από το στερεοσκόπιο, το πρόσθιο τμήμα που περιείχε τους αναπτυξιακούς δίσκους θώρακα-πτερού και το οπίσθιο που έφερε τους όρχεις. Αναλόγως με τον σκοπό της ανατομίας κρατήθηκε το κατάλληλο τμήμα το οποίο και αναστράφηκε με την βοήθεια των λαβιδών. Ακολούθησε μεταφορά των ιστών σε δοχείο PBS που βρίσκονταν στον πάγο. Στην περίπτωση των όρχεων το δοχείο συλλογής ήταν όμοιο με την περιγραφή για τους ενηλίκους όρχεις, ενώ για τους αναπτυξιακούς δίσκους προτιμήθηκε σωληνάκι χωρητικότητας 2ml. Ακολούθησε πλύση με PBS μια φορά και έπειτα η διαδικασία της μονιμοποίησης.

2.2.5 Ανοσο-ιστοχημικές χρώσεις σε όρχεις ή αναπτυξιακούς δίσκους

Τα όργανα ή οι προνύμφες εμβαπτίστηκαν σε 400μl διαλύματος μονιμοποίησης (4% φορμαλδεΰδη σε 1xPEM) χωρίς ανακίνηση για 20min. Το διάλυμα 2x PEM συνίσταται από 2mM MgCl₂, 2mM EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid), και 200mM PIPES (2-ethanesulfonic acid) pH 6,9. Η φορμαλδεΰδη μονιμοποιεί τους ιστούς σχηματίζοντας ομοιοπολικούς δεσμούς με τις αμινομάδες των πρωτεϊνών. Ακολούθησαν τρεις στιγμιαίες πλύσεις με ίσο όγκο PBS. Έπειτα έγινε προσθήκη 400μl διαλύματος PBT (0,5% BSA και 0,2% Triton X-100 σε 1xPBS) και επώαση με ανακίνηση (50rpm/min) για 90min. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το PBT και τα όργανα ή οι προνύμφες επώαστηκαν με διάλυμα πρωτεύοντος αντισώματος αραιωμένο σε 250μl φρέσκο PBT, χωρίς ανακίνηση στους 4°C για τουλάχιστον 16h. Στον πίνακα 3 παρατίθενται τα αντισώματα και οι χρωστικές που χρησιμοποιήθηκαν στις ανοσο-ιστοχημικές χρώσεις με την εκάστοτε αραιώση.

Την επόμενη μέρα απομακρύνθηκε το πρωτεΐον αντίσωμα και μετά από μια στιγμιαία πλύση σε 400μl διαλύματος PT (0,2% Triton X-100 σε 1xPBS), πραγματοποιήθηκαν τρεις κύκλοι πλύσεων με ανακίνηση, διάρκειας 14min με το ίδιο διάλυμα. Κατόπιν έγινε επώαση με το δευτερεύον αντίσωμα αραιωμένο κατάλληλα σε PBT με ανακίνηση για 120min. Ακολούθησε η διαδικασία πλύσεων του αντισώματος σε PT ομοίως με το πρωτεΐον αντίσωμα. Στην περίπτωση της χρώσης πυρήνων με Propidium Iodide (PI) στο διάλυμα του δευτερεύοντος αντισώματος προστέθηκε RNaseA σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml και μετά των πλύσεων του δευτερεύοντος αντισώματος έγινε επώαση σε διάλυμα PI με ανακίνηση για 10min. Έπειτα πραγματοποιήθηκαν τρεις στιγμιαίες πλύσεις με PBS. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι εκτός από το στάδιο του πρωτεύοντος αντισώματος όλες οι επώσεις και πλύσεις έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου. Επειδή οι ιστοί ήταν φθορίζοντες άρα και

φωτοευαίσθητοι, σε όλα τα στάδια τα δοχεία επώασης ή πλύσης ήταν καλυμμένα με αλουμινόχαρτο.

Πρωτεύον αντίσωμα (προέλευση)	Αραίωση
Rabbit anti-bGal (Cappel)	1/500 σε PBT από 1/20 προσροφημένο
Mouse anti-FasIII (DSHB)	1/100 σε PBT
Mouse anti-Hts 1B1 (DSHB)	1/30 σε PBT
Mouse ascites anti-HA (Covance)	1/100 σε PBT
Rabbit anti-Mei-P26 (J.A. Knoblich)	1/250 σε PBT
Mouse anti-Myc (DSHB)	1/100 σε PBT
Δευτερεύον αντίσωμα	Αραίωση
Anti-mouse Alexa-488 (Molecular Probes)	1/100 σε PBT από 1/20 προσροφημένο
Anti-mouse Alexa-568 (Molecular Probes)	1/400 σε PBT από 1/20 προσροφημένο
Anti-mouse Alexa-647 (Molecular Probes)	1/100 σε PBT από 1/10 προσροφημένο
Sheep anti-Digoxigenin AP (Roche)	1/2 σε PTw από 1/1000 προσροφημένο
Χρωστική πυρήνων	Αραίωση
DAPI (Sigma-Aldrich)	1/1000 σε PT από 100μg/ml σε νερό
Propidium Iodide (Sigma-Aldrich)	1/500 σε PT από 10mg/ml σε νερό

Πίνακας 3 Καταγραφή των αντισωμάτων και των χρωστικών στις αραιώσεις εργασίας.

Αφού η διαδικασία χρώσης είχε ολοκληρωθεί τα όργανα ή οι προνύμφες, μεταφέρθηκαν σε PBS και απομονώθηκαν οι όρχεις ή οι αναπτυξιακοί δίσκοι θώρακα-φτερού κάτω από το στερεοσκόπιο. Στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν σε μια σταγόνα διαλύματος συντήρησης (0,5% N-Propyl gallate σε 80% γλυκερόλη) πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Κατόπιν τοποθετήθηκε η καλυπτρίδα και τα άκρα της

σφραγίστηκαν με βερνίκι νυχιών. Τελικά τα παρασκευάσματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την στιγμή της παρατήρησής τους στο μικροσκόπιο.

Για την ανάλυση του φθορισμού όρχεων από ενήλικα άτομα χωρίς την ανάγκη ανοσο-ιστοχημικής χρώσης, τη διαδικασία μονιμοποίησης διαδέχτηκε ένα βήμα χρώσης των πυρήνων με DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Πραγματοποιήθηκε επώαση σε διάλυμα DAPI με ήπια ανακίνηση για 8min, χωρίς να προηγηθεί επίδραση με RNaseA. Έπειτα έγιναν τρεις στιγμιαίες πλύσεις σε PT και τρεις ακόμα σε PBS. Κατόπιν ακολούθησε η διαδικασία προετοιμασίας των παρασκευασμάτων όμοια με παραπάνω.

2.2.6 In-situ υβριδοποίηση σε όρχεις από ενήλικα άτομα

15-20 νεαρές ενήλικες αρσενικές *Drosophila* απομονώθηκαν από τις θηλυκές σε ξεχωριστό δοχείο καλλιέργειας το οποίο διέθετε επιπλέον ξηρή ζύμη. Μετά από 48h ανάπτυξης και καλής θρέψης πραγματοποιήθηκε η ανατομική αφαίρεση των όρχεων, οι οποίοι συλλέχθηκαν σε σωληνάκι με αποστειρωμένο διάλυμα PBS, εντός του πάγου. Ακολούθησε το στάδιο της μονιμοποίησης των όρχεων με 4% φορμαλδεΰδη σε PBS για 20min. Έπειτα έγιναν δύο στιγμιαίες πλύσεις με PTw (0,1% Tween 20 σε 1xPBS), μία πλύση διάρκειας 5min και μία ακόμα στιγμιαία, προκειμένου να απομακρυνθεί το διάλυμα μονιμοποίησης. Κατόπιν έγινε επώαση σε 1000μl διαλύματος πρωτεΐνης K (50μg/ml σε PTw) για 3min ακριβώς. Η αντίδραση διεκόπη με δύο στιγμιαίες πλύσεις με 1000μl διαλύματος γλυκίνης (2mg/ml σε PTw). Ακολούθησαν δύο στιγμιαίες πλύσεις με PTw, ένας δεύτερος κύκλος μονιμοποίησης για 20min και πλύσεις με PTw όπως παραπάνω.

Στη συνέχεια οι όρχεις επώαστηκαν σε 125μl διαλύματος υβριδοποίησης HS (50% φορμαμίδιο, 5xSSC, 100μg/ml tRNA, 50 μg/ml ηπαρίνη, 0,1% Tween-20)

αραιωμένο με ίσο όγκο PTw για 5min. Έγιναν δύο στιγμιαίες πλύσεις με 250μl διαλύματος HS και ακολούθησε προ-υβριδοποίηση σε νέο διάλυμα HS στους 50°C για 60min. Παράλληλα ο DIG-σημασμένος ιχνηθέτης αποδιατάχθηκε με βρασμό για 15min και απότομη μεταφορά στον πάγο. Έπειτα αραιώθηκε σε συνολικά 30μl διαλύματος HS. Τελικά απομακρύνθηκε το διάλυμα προ-υβριδοποίησης και έγινε επώαση με το διάλυμα του ιχνηθέτη στους 50°C για τουλάχιστον 16h.

Την επόμενη μέρα απομακρύνθηκε το διάλυμα του ιχνηθέτη και αποθηκεύτηκε στους -20°C προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ξανά. Κατόπιν έγιναν δύο πλύσεις με ζεστό (49°C) διάλυμα HS, διάρκειας 5 και 15min. Ακολούθησαν τρεις διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα HB (50% φορμαμίδιο, 5xSSC) αραιωμένο σε αναλογία 70, 50 και 30% αντίστοιχα με PTw για 5min. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πλύσεις σε 1000μl PTw, δύο στιγμιαίες και τρεις διάρκειας 5, 10 και 15min. Έπειτα οι όρχεις επώαστηκαν με προσροφημένο αντίσωμα anti-DIG, συζευγμένο με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (Roche) σε τελική αραιώση 1/2000 σε PTw για 2h. Κατόπιν έγιναν πλύσεις σε PTw, δύο στιγμιαίες και τρεις διάρκειας 5, 10 και 15min.

Στη συνέχεια οι όρχεις εξισορροπήθηκαν σε 1000μl διαλύματος εμφάνισης (100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 100mM Tris-Cl pH 9,5) με μια στιγμιαία πλύση, μια διάρκειας 5min και μια ακόμα στιγμιαία. Στην τελευταία πλύση προστέθηκαν 20μl των υποστρωμάτων NBT/BCIP (Roche). Ακολούθησε επώαση χωρίς ανακίνηση στους 25°C και στο σκοτάδι για 16h περίπου ενώ γίνονταν έλεγχος της χρώσης σε τακτά διαστήματα. Τελικά η εμφάνιση διεκόπη με πλύσεις σε PTw. Όλες οι πλύσεις και οι επώσεις πραγματοποιήθηκαν σε κυκλικό αναδευτήρα, σε θερμοκρασία δωματίου με όγκο 500μl (εκτός τροποποιήσεων που αναφέρονται χωριστά στο κείμενο). Η προσρόφηση του αντισώματος πραγματοποιήθηκε με την επώαση 20 μονιμοποιημένων όρχεων σε διάλυμα αραιώσεως 1/1000 με PTw για 2h.

2.2.7 Μικροσκοπία, φωτογράφιση

Οι διαδικασίες ανατομίας εκτελέστηκαν κάτω από φωτιζόμενο στερεοσκόπιο (Olympus, SZ30 και Leica, MZ6). Οι ζωντανές προνύμφες τρίτου σταδίου ακινητοποιήθηκαν με επώαση στον πάγο για 15min και φωτογραφήθηκαν σε στερεοσκόπιο φθορισμού (Leica, MZFL III) με ψηφιακή κάμερα (Nikon, COOLPIX 900) σε 1s ή 0,5s έκθεση. Τα παρασκευάσματα ενηλίκων όρχεων με χρώση DAPI και φθορισμό EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) ή RFP (Red Fluorescent Protein) παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss, Axioscope 2 Plus). Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με εγκατεστημένη κάμερα λήψης τύπου CCD (Zeiss, AxioCam HRC) σε 1600ms έκθεση. Στην ίδια εγκατάσταση αλλά με διερχόμενο φως και κατάλληλες ρυθμίσεις αντίθεσης έγινε και η φωτογράφιση των παρασκευασμάτων της *in situ* υβριδοποίησης. Για τα παρασκευάσματα όρχεων ή αναπτυξιακών δίσκων φτερού που προηγήθηκε ανοσο-ιστοχημική χρώση χρησιμοποιήθηκε συνεστιακή μικροσκοπία (BIO-RAD, Radiance 2100 και Leica, TCS-SP).

Πέρα από τις ανάγκες ποιοτικού εντοπισμού της έκφρασης RNA ή πρωτεϊνών, πολλές πειραματικές διαδικασίες αποσκοπούσαν στην ημιποσοτική σύγκριση της έκφρασης της EGFP ή της RFP σε προνύμφες, αναπτυξιακούς δίσκους ή όρχεις. Για το σκοπό αυτό τα παρασκευάσματα για τα κυρίως δείγματα ανάλυσης και τους μάρτυρες προετοιμάζονταν με κοινά υλικά μονιμοποίησης και χρώσης, την ίδια ή την επόμενη μέρα. Η λήψη φωτογραφιών γίνονταν πάντα την ίδια μέρα με ταυτόσημες ρυθμίσεις στα συστήματα απεικόνισης.

3 Αποτελέσματα και Συζήτηση

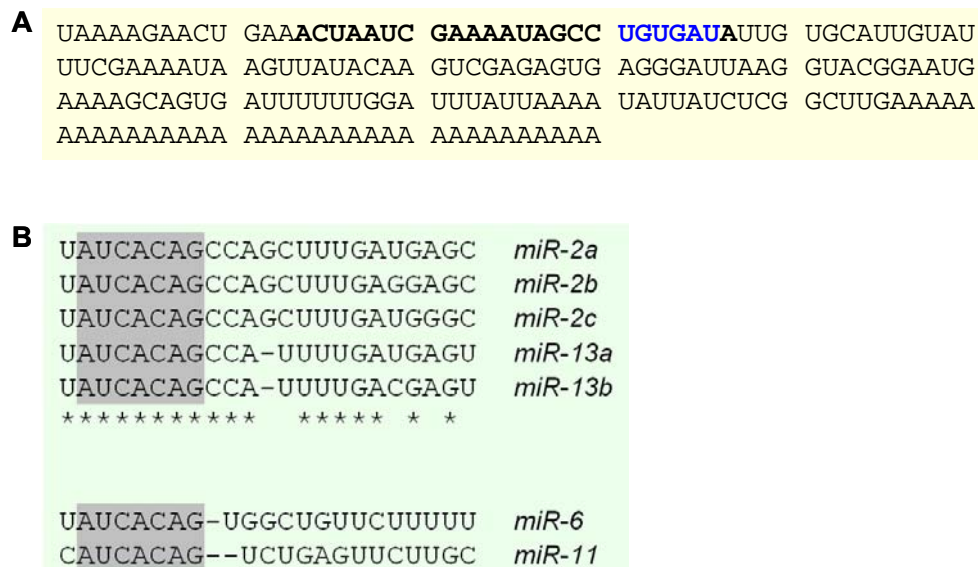
3.1 Το γονίδιο *CG10222* ρυθμίζεται αρνητικά από το *miR-13*

Η εφαρμογή PCR επί cDNA βιβλιοθήκης από πρώιμα έμβρυα *Drosophila* με πρόσθιο εκκινητή την συμπληρωματική DNA αλληλουχία του *miR-13a* ανέδειξε μια σειρά από υποψήφια *miR-13*-ρυθμιζόμενα γονίδια. Ανάμεσα σε αυτά εντοπίστηκε και το *CG10222*, δεδομένο που εξετάστηκε αναλυτικότερα με την πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής αλληλεπίδρασής του με το *miR-13*, όπως επίσης και με τη σύντηξη του αγρίου τύπου 3'UTR και μιας σειράς τροποποιημένων παραλλαγών του στο γονίδιο της λουσιφεράσης. Οι χημικικές κατασκευές λουσιφεράσης-3'UTR δοκιμάστηκαν σε καλλιέργεια κυττάρων S2, όπου εκφράζεται το *miR-13*, και μέσω της μέτρησης του εκλυόμενου φωτός δείχτηκε η αρνητική ρύθμιση που επιβάλλει το *miR-13* στο *CG10222* (Boutla et al., 2003). Στην ενότητα αυτή εξετάστηκε η αλληλεπίδραση *miR-13:CG10222* σε επίπεδο οργανισμού αποφέροντας δεδομένα που επιβεβαιώνουν την πρόσφατη ανακάλυψη. Στη συνέχεια περιγράφονται τα *in-vivo* αποτελέσματα που συμπληρώνουν και εμπλουτίζουν την μελέτη της αρνητικής ρύθμισης του *CG10222* από το *miR-13*.

3.1.1 Μια θέση δέσμευσης για miRNA εντοπίζεται στο *CG10222*-3'UTR

Το μετάγραφο *CG10222* διαθέτει 142 νουκλεοτίδια στο 3'UTR του μεταξύ του κωδικού λήξης της μετάφρασης και της ουράς poly-A. Στα νουκλεοτίδια 11-34 εντοπίστηκε μια θέση δέσμευσης για miRNA η οποία φέρει το μοτίβο K-box κοντά στο 3' άκρο της (Εικ. 10A) (Boutla et al., 2003). Με δεδομένο ότι τα miRNA της οικογένειας K-box έχουν την ίδια περιοχή seed και μοιράζονται υψηλό ποσοστό

ομολογίας (Εικ. 10B) πραγματοποιήθηκε *in silico* ανάλυση της δευτεροταγούς δομής δέσμησης του καθένα στην θέση αλληλεπίδρασης με το 3'UTR. Έτσι ελέγχθηκε το ενδεχόμενο να υπάρχουν και άλλοι δυνατώτεροι ρυθμιστές του *CG10222*, εκτός του *miR-13*. Για το σκοπό αυτό έγινε χρήση του αλγορίθμου mfold, στην φυσιολογική θερμοκρασία ανάπτυξης της *Drosophila*, τους 25°C (Zuker, 2003). Η συγγένεια μεταξύ στόχου και miRNA εκφράζεται μέσω των τιμών ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης (ΔG) και είναι ο πρωταρχικός κανόνας εύρεσης miRNA:mRNA αλληλεπιδράσεων. Όσο χαμηλότερη είναι η τιμή ΔG , τόσο μεγαλύτερη συγγένεια υπάρχει.



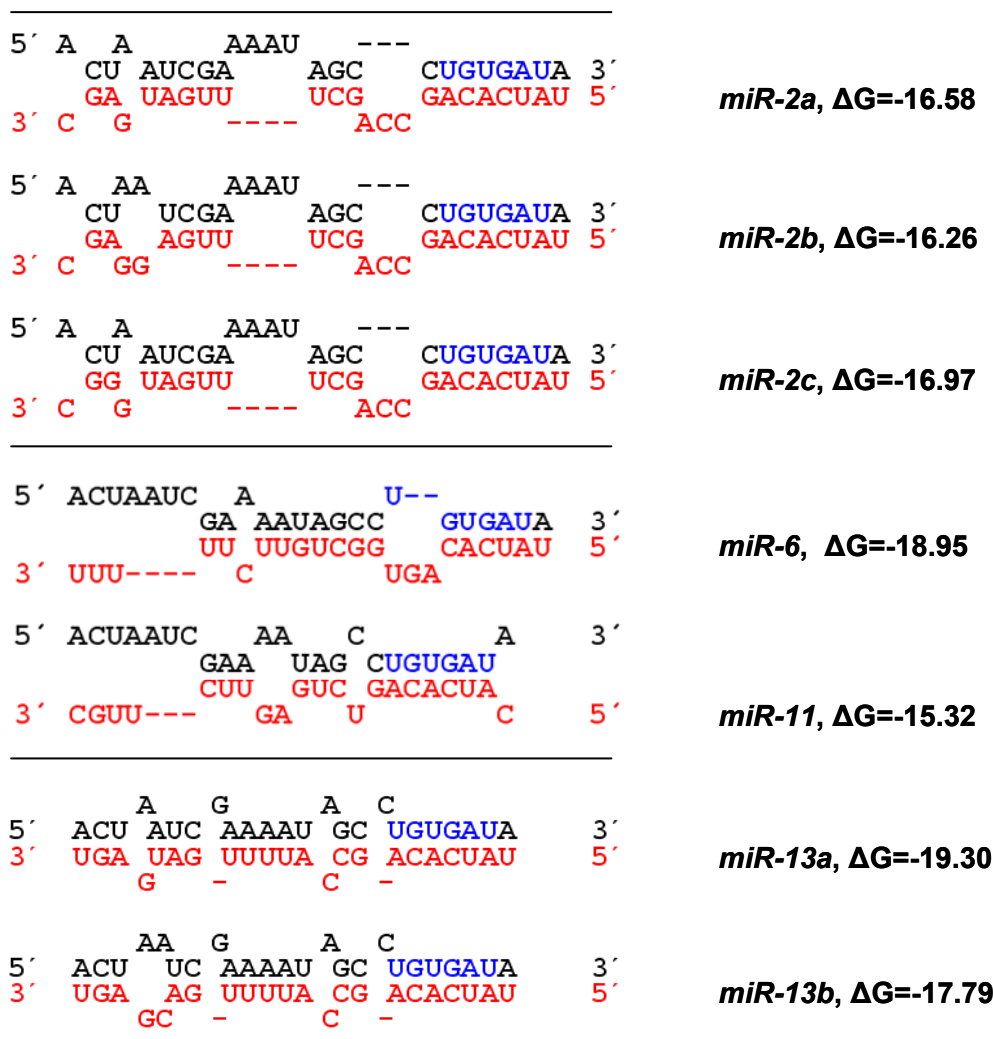
Εικόνα 10. Αναγνώριση μιας θέσης δέσμησης για miRNA στο 3'UTR του *CG10222*.
(A) Η αλληλουχία του *CG10222*-3'UTR όπως πολλαπλασιάστηκε από cDNA πρώιμων εμβρύων *Drosophila* συμπεριλαμβανομένου και του κωδικού λήξης (Boutla et al., 2003). Με έντονα γράμματα σημειώνεται η θέση πρόσδεσης για miRNA και με μπλε η αλληλουχία του K-box. **(B)** Ευθυγράμμιση των μελών της K-box οικογένειας. Η γκρι περιοχή αντιστοιχεί στην περιοχή seed. Τα πρώτα 5 μέλη μοιράζονται την υψηλότερη ομολογία και συνθέτουν την υποοικογένεια *miR-2/13*.

Η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε έδειξε ότι τα *miR-13a* και *miR-13b* ήταν οι πιθανότεροι προσδέτες του *CG10222*-3'UTR βάσει των τιμών ΔG που παρουσίασαν. Ακολούθησε το *miR-6*, τα παρα-ομόλογα του *miR-2* και τελευταίο το *miR-11* που

έδειξε λίγες πιθανότητες να στοχεύει πραγματικά το *CG10222* (Εικ. 11). Θα πρέπει να τονιστεί ότι δεν υπάρχει ασφαλές ανώτατο όριο ΔG που να κατατάσσει τις προβλέψεις των miRNA:mRNA αλληλεπιδράσεων σε αληθείς και μη. Για αυτό η πιο λεπτομερής μελέτη της θέσης και της έκτασης των δίκλωνων περιοχών βοηθά στην ασφαλέστερη πρόβλεψη των πραγματικών γεγονότων αλληλεπίδρασης που συμβαίνουν μέσα στο κύτταρο. Νεότερες μελέτες απέδειξαν ότι η ισχυρή δέσμευση των 7-8 νουκλεοτιδίων της περιοχής seed, στον στόχο είναι βασική προϋπόθεση των miRNA:mRNA αλληλεπιδράσεων. Στο ενδεχόμενο που κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει απαιτείται εκτενής συμπληρωματικότητα σε όλη την υπόλοιπη περιοχή προκειμένου ένα miRNA να είναι λειτουργικό (Brennecke et al., 2005). Στην περίπτωση της *miR-6:CG10222* αλληλεπίδρασης, παρόλο που θεωρητικά και τα 8 νουκλεοτίδια της περιοχής seed ήταν συμπληρωματικά με τον στόχο, 6 μόνο διαδοχικά νουκλεοτίδια δύναται να προσδεθούν ισχυρά. Παράλληλα η υπόλοιπη περιοχή δεν παρουσίασε μεγάλη έκταση υβριδισμού, μειώνοντας έτσι την πιθανότητα το *miR-6* να είναι ρυθμιστής του *CG10222*.

Λαμβάνοντας υπόψη τις τιμές ΔG και την πρόσδεση στην περιοχή seed φαίνεται ότι ο πιο δυνατός ρυθμιστής του *CG10222*-3'UTR παραμένει το *miR-13a* δεδομένο που συμφωνεί και με το υπολογιστικό πρόγραμμα ανίχνευσης miRNA-στόχων, microInspector όπως επίσης και με τη βάση δεδομένων MicroCosm Targets (Rusinov et al., 2005; Griffiths-Jones et al., 2008). Έπειτα ακολουθεί το *miR-13b* που διαφέρει από το *miR-13a* μόλις σε ένα νουκλεοτίδιο και τα παρα-ομόλογα μέλη του *miR-2*. Πρέπει να τονιστεί ότι τα μέλη μιας υποοικογένειας miRNA συχνά προβλέπεται να στοχεύουν το ίδιο γονίδιο χωρίς όμως να είναι δυνατή η διάκριση για το ποιά πραγματικά εξασκεί το ρυθμιστικό ρόλο, λόγω της υψηλής ομολογίας που έχουν μεταξύ τους και των περιορισμών που επιβάλλουν οι πειραματικές μέθοδοι ανάλυσης

(Stark et al., 2003). Το ίδιο ισχύει και σε αυτήν την περίπτωση οπότε στο εξής τα *miR-13a* και *miR-13b* θα αναφέρονται απλώς ως *miR-13*. Επίσης παρόλο που το ενδεχόμενο τα *miR-2a* και *miR-2b* να ρυθμίζουν το *CG10222-3'UTR* είναι ανοιχτό, για λόγους απλοποίησης και βάσει των υψηλότερων τιμών ΔG που παρουσίασαν η πιθανή συμβολή τους δεν θα ληφθεί υπόψη. Ωστόσο η ανίχνευση του προτύπου έκφρασης συγγενών miRNA στους διάφορους ιστούς και αναπτυξιακά στάδια μπορεί να συμβάλλει στο ξεκαθάρισμα αυτής της σύγχυσης (Aboobaker et al., 2005).



Εικόνα 11. Το *miR-13* είναι ο πιο πιθανός ρυθμιστής του *CG10222*.

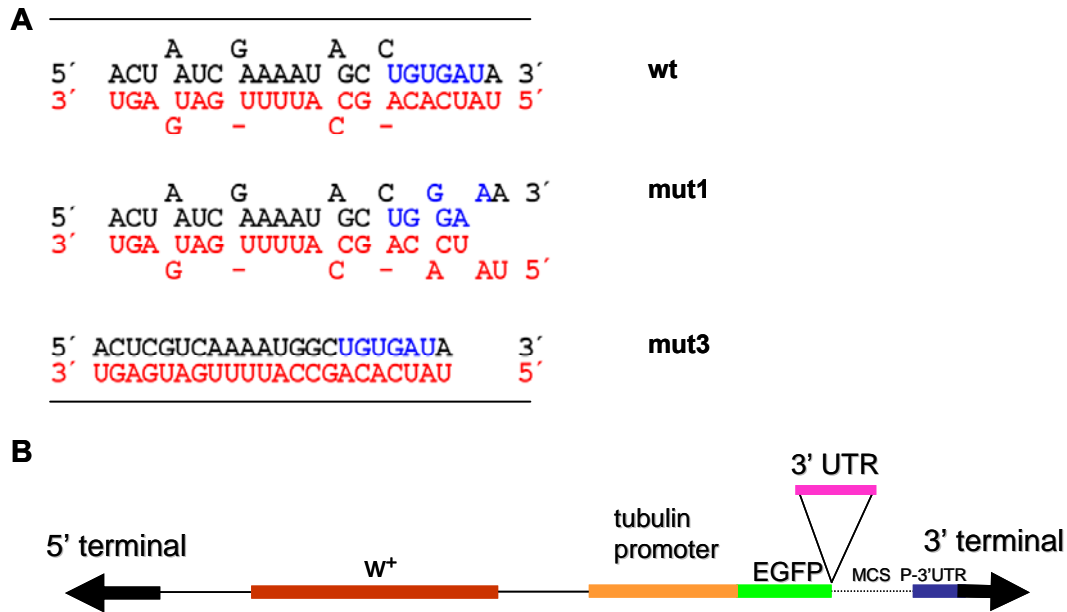
Η πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής αλληλεπίδρασης των K-box miRNA με τη θέση δέσμευσης του *CG10222-3'UTR*. Με κόκκινα γράμματα σημειώνονται τα miRNA και με μπλε η αλληλουχία του K-box. Δεξιά αναγράφεται το κάθε miRNA μαζί με την ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης. Τα *miR-13a* και *miR-13b* προσδένουν ισχυρά 7 νουκλεοτίδια της περιοχής seed και εμφανίζουν τις χαμηλότερες τιμές ελεύθερης ενέργειας.

3.1.2 Η *in-vivo* *miR-13:CG10222* αλληλεπίδραση τεκμηριώνεται με EGFP αισθητήρες

Η χρήση κατασκευών «αισθητήρων» είναι απαραίτητη για την μελέτη και απόδειξη των miRNA:mRNA αλληλεπιδράσεων στην *Drosophila* (Brennecke et al., 2003; Stark et al., 2003; Lai et al., 2005). Το 3'UTR που αξιώνεται ως αρνητικός ρυθμιστής της γονιδιακής έκφρασης κλωνοποιείται στον φορέα pCASPER4 tub-EGFP αμέσως μετά το κωδικόνιο λήξης της EGFP, η οποία μεταγράφεται από ένα συστατικά ενεργό υποκινητή (τουμπουλίνη-α1). Παράλληλα κατασκευάζονται με PCR-μεταλλαξιγένεση και κλωνοποιούνται τροποποιημένες παραλλαγές του 3'UTR που εμποδίζουν ή ενισχύουν την δέσμευση με miRNA. Στο σύνολο των κατασκευών προστίθεται και μια που φέρει ένα 3'UTR χωρίς θέσεις δέσμευσης για miRNA και λειτουργεί ως αρνητικός μάρτυρας. Κατόπιν, όλες οι κατασκευές αισθητήρες εισάγονται στο γονιδίωμα της *Drosophila* και έπεται η ανάλυση της έκφρασης της EGFP. Αν πράγματι το 3'UTR ρυθμίζεται από miRNA, τότε τα επίπεδα έκφρασης της EGFP εμφανίζονται χαμηλότερα σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Οι τροποποιημένες παραλλαγές των 3'UTR βοηθούν επιπλέον στην χαρτογράφηση της ακριβής θέσης πρόσδεσης των miRNA, μέσω του φαινοτύπου που αποδίδουν.

Βάσει της αρχής αυτής κατασκευάστηκαν αισθητήρες με διάφορες παραλλαγές του 3'UTR του *CG10222*. Το αγρίου τύπου (wt), ένα στο οποίο είχαν μεταλλαχθεί 2 νουκλεοτίδια (mut1) αδυνατίζοντας την πρόσδεση με την περιοχή seed του *miR-13*, ένα με απολύτως συμπληρωματική αλληλουχία προς το *miR-13* (mut3) και το 3'UTR του ιού SV40. Το συγκεκριμένο 3'UTR δεν αναμένονταν να διαθέτει θέσεις δέσμευσης για miRNA από την *Drosophila* εφόσον ανήκει σε ένα ιό που μολύνει πρωτεύοντα και χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. Στην εικόνα 12 παρουσιάζεται η πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής αλληλεπίδρασης των τριών παραλλαγών του *CG10222*-3'UTR με το *miR-13* (A) καθώς και ένα διάγραμμα της

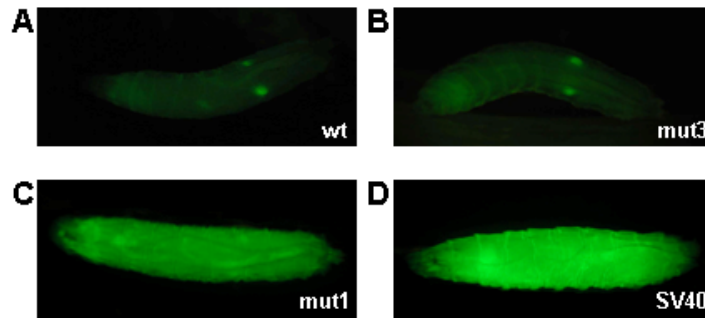
γενικής δομή του αισθητήρα που χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό της *Drosophila* (B).



Εικόνα 12. Βασικό εργαλείο μελέτης της miRNA-ρύθμισης, οι κατασκευές αισθητήρες.
 (A) Η πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής αλληλεπίδρασης των τριών παραλλαγών του *CG10222*-3'UTR (wt, mut1 και mut3) με το *miR-13*. (B) Σχεδιάγραμμα του μεταθετού στοιχείου P που χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό της *Drosophila* όπου εντοπίζονται: Ο γενετικός δείκτης αναγνώρισης *w*, ο υποκινητής της τουμπουλίνης α1, η EGFP και ο πολυσυνδέτης ακολουθούμενος από τμήμα του 3'UTR της μεταθετάσης του στοιχείου P (P-3'UTR). Στην περιοχή του πολυσυνδέτη κλωνοποιήθηκαν τα διαφορετικά 3'UTR που μελετήθηκαν.

Οι κατασκευές αισθητήρες χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή σταθερών διαγονιδιακών σειρών *Drosophila*, όπου ακολούθησε ανάλυση της έκφρασης της EGFP σε προνύμφες τρίτου σταδίου. Στις προνύμφες με το αγρίου τύπου *CG10222*-3'UTR η έκφραση της EGFP παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα σε όλους τους ιστούς εκτός των όρχεων (Εικ. 13A). Ο ίδιος φαινότυπος προέκυψε και από τις σειρές που έφεραν το συμπληρωματικό 3'UTR (mut3) τροποποίηση που λειτούργησε ως θετικός μάρτυρας (Εικ. 13B). Αντιθέτως στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε το 3'UTR που εμπόδιζε την ισχυρή δέσμευση της περιοχής seed με το *miR-13* (mut1) η έκφραση της EGFP ανήλθε σε επίπεδα αντίστοιχα με τον αρνητικό μάρτυρα (SV40

3'UTR) (Εικ. 13C,D). Οι παρατηρηθέντες φαινότυποι επιβεβαίωσαν την *in vivo* αρνητική ρύθμιση του *CG10222* από το *miR-13* και επιπροσθέτως πιστοποίησαν ότι η εν λόγω ρύθμιση γίνεται μέσω της συγκεκριμένης περιοχής πρόσδεσης. Επίσης βάσει του φαινοτύπου *mut1* δεν φαίνεται να εντοπίζεται κάποια άλλη θέση δέσμευσης για miRNA επί του *CG10222*-3'UTR.



Εικόνα 13. Η ανάλυση των αισθητήρων σε προνύμφες τρίτου σταδίου τεκμηριώνουν την *in-vivo* *miR-13:CG10222* αλληλεπίδραση.

(A,B) Οι σειρές που φέρουν το αγρίου τύπου *CG10222*-3'UTR (*wt*) και το συμπληρωματικό του *miR-13* (*mut3*) εμφανίζουν έντονη σίγηση και χαμηλά επίπεδα EGFP έκφρασης σε όλο το σώμα, εκτός των όρχεων. (C,D) Η σειρά με το τροποποιημένο K-box (*mut1*) και αυτή που φέρει το *SV40*-3'UTR διαθέτουν πολύ υψηλά επίπεδα EGFP έκφρασης σε όλο το σώμα. Το πρόσθιο τμήμα των προνυμφών βρίσκεται στα αριστερά.

Η χρήση ενός απολύτως συμπληρωματικού 3'UTR απέναντι στο εξεταζόμενο miRNA, ως θετικός μάρτυρας, είναι συνήθης τακτική που εφαρμόστηκε σε παλιότερες εργασίες και πάντα ο ανταποκριτής εμφάνιζε έντονη καταστολή (Boutla et al., 2003; Brennecke et al., 2003; Koscianska et al., 2007). Όλες οι *pre-miR-13* δομές παρουσιάζουν μονόκλωνους βρόγχους στην κεντρική περιοχή τους με συνέπεια το *miR-13* να προσδέεται αποκλειστικά στην Ago1. Η συνάντηση ενός συμπλέγματος Ago1-*miR-13* με μια απολύτως συμπληρωματική θέση δέσμευσης αναμένεται να οδηγεί στην ενδονουκλεόλυση του στόχου ανάλογα με την δράση ενός siRNA (Okamura et al., 2004; Miyoshi et al., 2005). Νεότερα όμως ευρήματα αμφισβητούν την δυνατότητα της Ago1 να δρα αποτελεσματικά ως ενδονουκλεάση

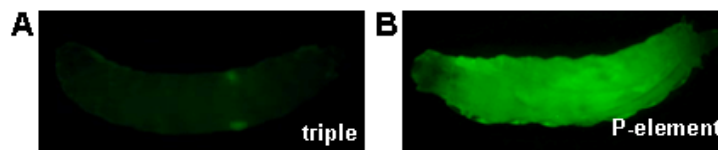
(Forstemann et al., 2007). Είναι πιθανό στις περιπτώσεις του θετικού μάρτυρα το *miR-13* να δρα περισσότερο ως ένα πολύ αποτελεσματικό miRNA και λιγότερο ως ένα siRNA όταν συναντά τον απολύτως συμπληρωματικό στόχο του στην έκδοση *mut3*.

Πολύ συχνά στην βιβλιογραφία δεν χρησιμοποιούνται ολόκληρα τα 3'UTR των γονιδίων που εξετάζονται για miRNA ρύθμιση αλλά μόνο η περιοχή δέσμευσης πολλαπλασιασμένη 3-5 φορές. Η δομή αυτή βρίσκεται αμέσως μετά από ένα γονίδιο ανταποκριτή και ακολουθείται από μια αλληλουχία τερματισμού και πολύ-αδενυλίωσης. Οι κατασκευές αυτές αποτελούν πιο αποτελεσματικούς στόχους για ένα miRNA, υστερούν όμως στο γεγονός ότι είναι πλασματικές σε μεγάλο βαθμό.

Όταν προστέθηκε μια τριπλή αλληλουχία δέσμευσης, από το 3'UTR του γονιδίου *nos1*, αποκρινόμενη στο *miR-430* σε έμβρυα *Zebrafish* η καταστολή του ανταποκριτή ήταν καθολική. Αντιθέτως στην περίπτωση χρήσης ολόκληρου του 3'UTR παρατηρήθηκε σίγηση σε όλα τα σωματικά κύτταρα όχι όμως και στα πρόδρομα των γαμετών (Mishima et al., 2006). Αυτή η παρατήρηση θύμιζε κατά πολύ το φαινότυπο του αισθητήρα με το αγρίου τύπου *CG10222-3'UTR* όπου η καταστολή της EGFP υφίστανται μόνο στους σωματικούς ιστούς και όχι στους όρχεις. Ίσως η ενίσχυση του 3'UTR με τρεις θέσεις δέσμευσης για το *miR-13* να οδηγούσε σε καθολική καταστολή της έκφρασης της EGFP. Για το σκοπό αυτό ενσωματώθηκε μια αλληλουχία 88bp στη θέση *NotI* στο πλασμίδιο pCASPER4 tub-EGFP-SV40 μεταξύ της EGFP και του SV40-3'UTR, η οποία περιείχε τρία αντίγραφα της περιοχής δέσμευσης του *CG10222-3'UTR* για το *miR-13* διακοπτόμενα από την αλληλουχία συνδέτη AAAGATTT. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στο σχεδιασμό αυτό δεν λήφθηκαν υπόψη αλλοστερικά φαινόμενα αναστολής που ενδεχομένως να παρουσιάστηκαν λόγω της μεγάλης γειννίας των περιοχών

δέσμευσης εφόσον χρησιμοποιήθηκε συνδέτης μόλις 8 νουκλεοτιδίων. Σε κάθε περίπτωση αυτή η κατασκευή μπορούσε να δράσει μέσω των δύο ακραίων θέσεων δέσμευσης.

Ακολούθησε μετασηματισμός και ανάλυση της EGFP. Σε αυτή την περίπτωση (Εικ. 14A) τα επίπεδα της EGFP ήταν πολύ χαμηλά στους σωματικούς ιστούς παρέμειναν όμως υψηλά στους όρχεις δείχνοντας διαφορετικό αποτέλεσμα από αυτό που συμβαίνει στο *Zebrafish*. Παρόλα αυτά, η καταστολή της EGFP ήταν ισχυρή επιβεβαιώνοντας ακόμα μια φορά ότι η εν λόγω περιοχή δέσμευσης είναι αρνητικός ρυθμιστής της γονιδιακής έκφρασης, παρουσία μάλιστα του SV40-3'UTR. Επίσης με αυτόν τον τρόπο μπορεί να αποκλιστεί το ενδεχόμενο της ύπαρξης μιας 3'UTR-δεσμευόμενης πρωτεΐνης που αλλάζει τη δευτεροταγή δομή του RNA με τρόπο έτσι ώστε να κρύβει τη θέση πρόσδεσης του *miR-13*.



Εικόνα 14. Ο τριπλασιασμός της περιοχής δέσμευσης αρκεί για να σιγήσει τα σωματικά κύτταρα αλλά όχι τους όρχεις.

(A) Ο φαινότυπος σίγησης της σειράς *Tub-EGFP-triple:SV40 3'UTR*. Η σίγηση είναι έντονη σε όλα τα σωματικά κύτταρα εκτός από τους όρχεις. (B) Πείραμα αρνητικού μάρτυρα με τη σειρά που φέρει μόνο το 3'UTR του μεταθετού στοιχείου P. Το πρόσθιο τμήμα των προνυμφών βρίσκεται στα αριστερά.

Επιπρόσθετα με τα προαναφερθέντα στελέχη αναλύθηκε και μια ακόμα σειρά η *tub-EGFP-P element 3'UTR* (χορηγία του S. M. Cohen, Temasek Life Sciences Laboratory, Singapore). Η σειρά αυτή φέρει τις τελευταίες 72 βάσεις από το 3'UTR της μεταθετάσης του στοιχείου P μετά την EGFP. Δε φέρει θέσεις δέσμευσης για miRNA γι' αυτό και λειτουργεί σαν αρνητικός μάρτυρας, υπερτερώντας του SV40 σε αυτόν το ρόλο γιατί είναι ενδογενής αλληλουχία του γονιδιώματος της *Drosophila*. Οι

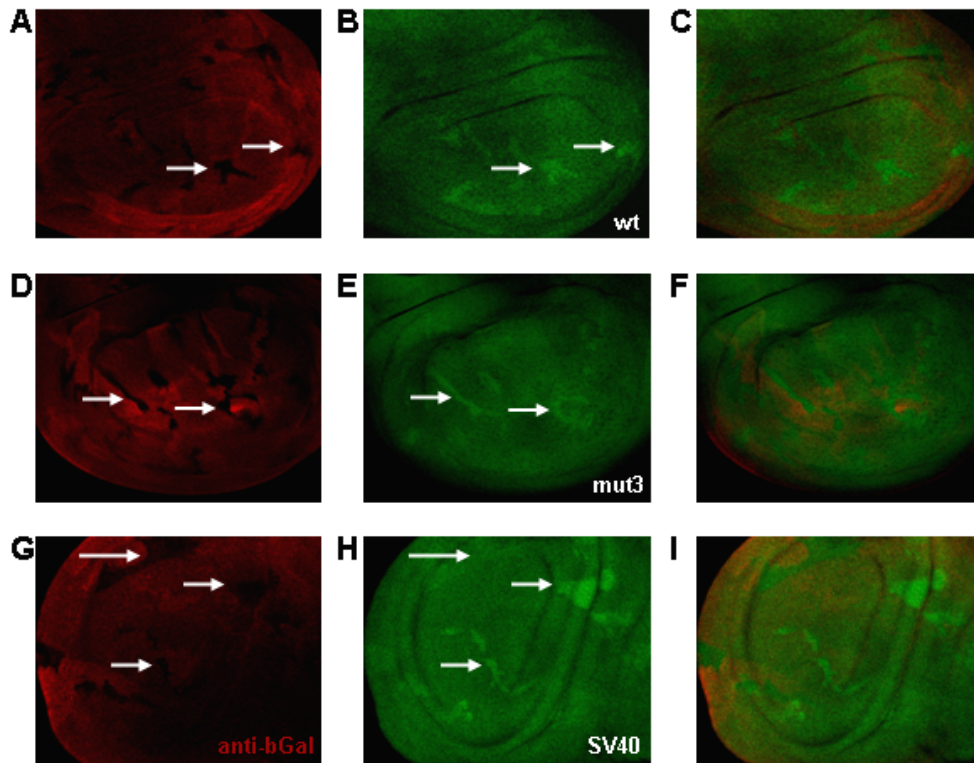
προνύμφες αυτής της σειράς εκφράζουν EGFP σε υψηλά επίπεδα σε όλο το σώμα τους (Εικ. 14B).

3.1.3 Τα επίπεδα έκφρασης της EGFP ανεβαίνουν σε κλώνους κυττάρων που απουσιάζει η Dcr-1

Προκειμένου να μελετηθεί η συμπεριφορά των αισθητήρων σε γενετικό περιβάλλον έλλειψης των miRNA προκλήθηκαν κλώνοι κυττάρων όπου απουσίαζε η Dcr-1 με τη βοήθεια του συστήματος επαγόμενης παραγωγής κλώνων Flp-FRT (Xu and Rubin, 1993). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το αλληλόμορφο *Q1147X* που φέρει ένα πρώιμο κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης στο *dcr-1* και παράγει μια ελλειμματική και αποσταθεροποιημένη έκδοση της πρωτεΐνης (Lee et al., 2004). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε σειρές που έφεραν το αγρίου τύπου και το συμπληρωματικό *CG10222-3'UTR* και οι κλώνοι δημιουργήθηκαν σε κύτταρα αναπτυξιακών δίσκων θώρακα-φτερού από προνύμφες τρίτου σταδίου. Τα κύτταρα με το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο του *dcr-1* αναγνωρίστηκαν από την απουσία χρώσης για το αντίσωμα της β-γαλακτοσιδάσης (Εικ. 15A,D). Εντός αυτών των περιοχών και στα δύο γενετικά περιβάλλοντα αισθητήρων παρατηρήθηκε άνοδος των επιπέδων φθορισμού (Εικ. 15B,E). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαίωσε το γεγονός ότι το *CG10222* υπόκειται σε ρύθμιση από παράγοντες που εξαρτώνται από την Dcr-1, δηλαδή από miRNA.

Κατ' αντιστοιχία με παραπάνω παρήχθησαν κλώνοι *dcr-1^{Q1147X}* στη σειρά SV40-3'UTR που μέχρι τότε δεν φαίνονταν να ρυθμίζεται από miRNA. Με έκπληξη παρατηρήθηκε ότι ακόμα και σε αυτό το γενετικό περιβάλλον οι κλώνοι παρουσίασαν μικρή έως μεγάλη αύξηση του φθορισμού της EGFP (Εικ. 15H). Απεναντίας η παραγωγή κλώνων *dcr-1^{Q1147X}* σε περιβάλλον P element 3'UTR δεν αλλάζει τα

επίπεδα φθορισμού (Brennecke et al., 2005). Από το παραπάνω συνάγεται ότι ενδεχομένως το SV40-3'UTR να υπόκειται σε ένα βαθμό ρύθμισης από miRNA. Συνεπώς δεν είναι κατάλληλο μέσο ανάλυσης των πειραμάτων αρνητικού μάρτυρα, σε τουλάχιστον ορισμένους ιστούς ή κυτταρικούς τύπους.



Εικόνα 15. Ο φθορισμός της EGFP ανεβαίνει σε κλώνους κυττάρων που απουσιάζει η Dcr-1. (A, D, G) Παραγωγή *dcr-1* κλώνων με μιτωτικό ανασυνδυασμό σε δίσκους θώρακα-πτερού που διαγράφονται από την απουσία χρώσης για το anti-bGal. (B, E) Η έκφραση της EGFP ανέρχεται σε όλους τους *dcr-1* κλώνους των σειρών wt και mut3 (βέλη). (H) Η άνοδος στα επίπεδα της EGFP εντός των *dcr-1* κλώνων ποικίλει από ελάχιστη (μακρύ βέλος) έως ισχυρή (μικρό βέλος)

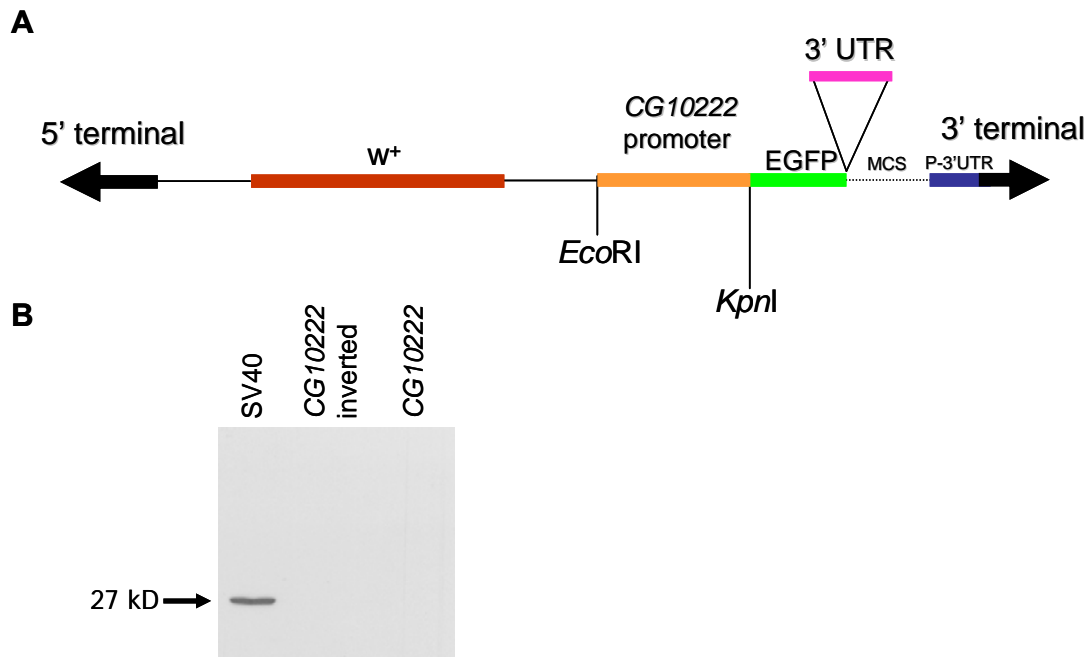
3.1.4 Η παραγωγή του αισθητήρα από τον ενδογενή CG10222 υποκινητή δεν ξεπερνά την miR-13 αρνητική ρύθμιση

Σε μέχρι τώρα δημοσιευμένα παραδείγματα εργασιών οι κατασκευές αισθητήρες που χρησιμοποιούνται για την μελέτη της miRNA-επιβαλλόμενης ρύθμισης παράγονται από ετερόλογους και συχνά ισχυρούς υποκινητές. Προέκυψε το ερώτημα της συνολικής μεταφραστικής απόδοσης των miRNA-εξαρτώμενων

μεταγράφων αν αυτά παράγονται από τον ενδογενή υποκινητή τους άρα και σε ποσότητες πιο κοντά στις φυσιολογικές. Για το σκοπό αυτό ενισχυθήκαν με PCR οι 1500bp πριν από το σημείο έναρξης της μεταγραφής του *CG10222*. Αυτή η αλληλουχία DNA περιείχε, αν όχι όλα, τα πιο σημαντικά ρυθμιστικά στοιχεία για την ενεργοποίηση του γονιδίου (minimal promoter). Στη συνέχεια ο υποκινητής τουμπουλίνης των πλασμιδιακών κατασκευών pCASPER4 tub-EGFP-CGwt και pCASPER4 tub-EGFP-SV40 αντικαταστάθηκε με αυτόν του *CG10222* (Εικ. 16Α). Στην ανάλυση που ακολούθησε συμπεριλήφθηκε και μια κατάλληλα τροποποιημένη πλασμιδιακή παραλλαγή που έφερε το *CG10222*-3'UTR σε αντίθετη κατεύθυνση (antisense), προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως ένας επιπλέον αρνητικός μάρτυρας.

Ακολούθησε διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς S2 και μέτρηση των επιπέδων έκφρασης της EGFP με Western blot δύο μέρες μετά. Όπως φαίνεται στην εικόνα 16B μόνο η κατασκευή που έφερε το SV40-3'UTR παρήγαγε πρωτεΐνη σε ανιχνεύσιμα επίπεδα. Το αγρίου τύπου *CG10222*-3'UTR εμπόδισε την παραγωγή EGFP μέσω της δράσης του *miR-13* που είναι γνωστό ότι παράγεται στα S2 κύτταρα (Lagos-Quintana et al., 2001). Με έκπληξη παρατηρήθηκε ότι το ίδιο συνέβη και στο αντίθετης κατεύθυνσης 3'UTR. Η ανεστραμμένη αλληλουχία εξετάστηκε με το πρόγραμμα microInspector και εκεί αποκαλύφθηκαν δύο ισχυρές περιοχές πρόσδεσης για το *miR-7* που επίσης είναι παρόν στην κυτταρική σειρά. Αυτή η παρατήρηση πιθανώς δικαιολογεί και την απουσία της EGFP ζώνης στο Western blot.

Συνολικά το παραπάνω πείραμα δείχνει ότι η αρνητική ρύθμιση που επιβάλλει το *miR-13* στο *CG10222* είναι ισχυρότερη του ρυθμού παραγωγής του μεταγράφου από τον ενδογενή υποκινητή. Ενδεχομένως τα γονίδια μέσω της χρήσης απομακρυσμένων ενισχυτών της γονιδιακής έκφρασης υπερκερνούν την miRNA-επιβαλλόμενη ρύθμιση όπου αυτό απαιτείται.



Εικόνα 16. Η έκφραση της EGFP από τον ενδογενή υποκινητή *CG10222* υποσκελίζεται από την *miR-13* αρνητική ρύθμιση.

(A) Η δομή της κατασκευής αισθητήρα μετά την αντικατάσταση του υποκινητή τουμπουλίνης *a1* από τον υποκινητή του *CG10222* στις περιοριστικές θέσεις *EcoRI* και *KpnI*. (B) Τρία διαφορετικά 3'UTR (SV40, *CG10222* και ανεστραμμένο *CG10222*) δοκιμάστηκαν με διαμόλυνση στην κυτταρική σειρά S2. Στην ανάλυση της έκφρασης της EGFP με Western blot ανιχνεύθηκε σήμα μόνο στην περίπτωση του SV40-3'UTR

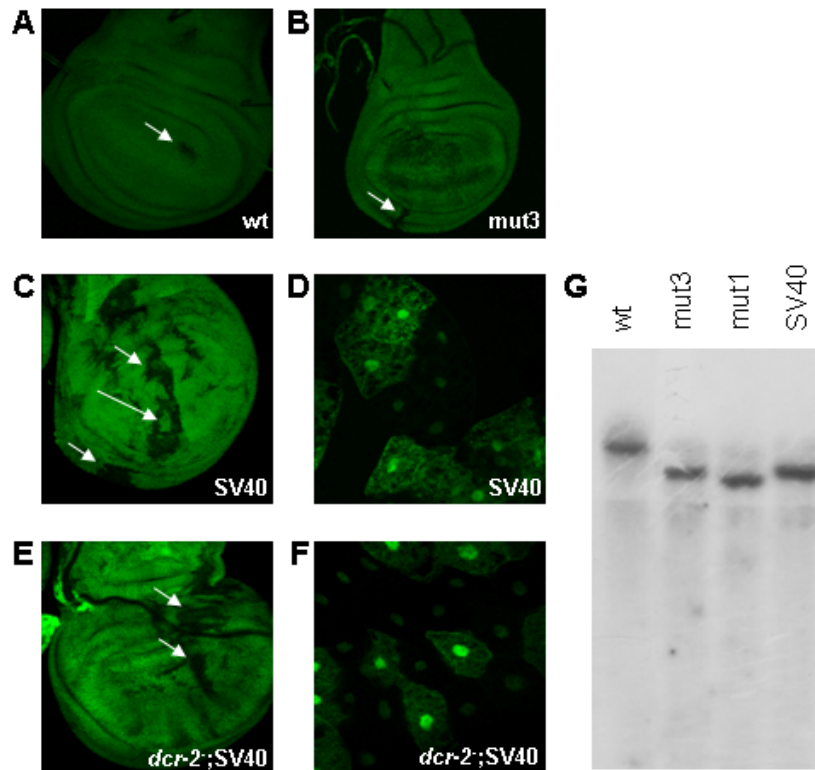
3.1.5 Η αυθόρμητη σίγηση των διαγονιδίων στην *Drosophila* γίνεται σε κλώνους κυττάρων

Το παρόν υποκεφάλαιο ασχολήθηκε με την μελέτη της miRNA-επιβαλλόμενης ρύθμισης σε σωματικούς ιστούς. Πριν την ολοκλήρωση αυτού του μέρους θα γίνει αναφορά σε μια παρατήρηση που δεν σχετίζεται άμεσα με τα miRNA, ωστόσο παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Κατά την ανάλυση της έκφρασης της EGFP στις σειρές αισθητήρες παρατηρήθηκαν συχνά μικρές ομάδες κυττάρων με σίγηση σε διάφορους σωματικούς ιστούς. Το μοτίβο εμφάνισης των σιγημένων περιοχών ήταν τυχαίο και απαντούσε σε όλες τις EGFP σειρές (Εικ. 17A,B,C) γι' αυτό και δεν συσχετίστηκε με την δράση των miRNA.

Οι σειρές που έφεραν το SV40-3'UTR και κατά συνέπεια εξέφραζαν EGFP σε μεγαλύτερα επίπεδα, εμφάνιζαν σιγημένες περιοχές με μεγαλύτερη έκταση και σε μεγαλύτερη συχνότητα (Εικ. 17C). Για το λόγο αυτό δόθηκε περισσότερη προσοχή στον γονότυπο *tub-EGFP-SV40 3'UTR* και συγκεκριμένα στη σειρά 7.2. Μελετήθηκαν ιστοί από δίσκους θώρακα-φερού και λιπόδη σωματίδια όπου διαπιστώθηκε ότι φαινόμενο της σίγησης εμφανίζονταν σε περιοχές που θύμιζαν κυτταρικούς κλώνους (Εικ. 17C,D). Η σειρά 7.2 παρουσίαζε σίγηση πιο συχνά όταν βρισκόταν σε ομόζυγη κατάσταση απ' ότι σε ετερόζυγη. Η παρατήρηση της αυθόρμητης και τυχαίας εμφάνισης σιγημένων περιοχών μοιάζει με ένα μηχανισμό άμυνας του γονιδιώματος απέναντι σε ξένα νουκλεϊκά οξέα που πιθανότατα διαμεσολαβείται από siRNA. Ο εν λόγω μηχανισμός ενεργοποιείται πιο συχνά σε διαγονίδια με υψηλή έκφραση τα οποία βρίσκονται σε ομόζυγη κατάσταση. Ανάλογες παρατηρήσεις έχουν διαπιστωθεί και σε φυτικά συστήματα (Kalantidis et al., 2006). Η καταστολή του διαγονιδίου ξεκινά από ένα κύτταρο και μεταδίδεται στους απογόνους του. Το φαινόμενο παρατηρήθηκε σε διπλοειδείς και πολυπλοειδείς κυτταρικούς πληθυσμούς. Σε ορισμένες περιπτώσεις εντός ενός σιγημένου κλώνου εμφανίζονταν κύτταρα όπου η έκφραση της EGFP έχει αποκατασταθεί (Εικ. 17C), δηλώνοντας ότι αυτό το είδος της καταστολής είναι αναστρέψιμο.

Το φαινόμενο της τυχαίας σίγησης δεν σταμάτησε όταν η συγκεκριμένη σειρά συνδυάστηκε με το ομόζυγο μετάλλαγμα *dcr-2^{L811fsX}* (Εικ. 17E,F), όπου λόγω ενός πρόωρου κωδικού λήξης δεν παράγεται λειτουργική Dcr-2, που είναι υπεύθυνη για την παραγωγή των siRNA. Ωστόσο θα πρέπει επιπλέον να εξεταστεί η πιθανή συμβολή της Dcr-1, με δεδομένο ότι υπάρχουν ενδείξεις ότι συμμετέχει και στο μονοπάτι των siRNA (Lee et al., 2004). Επίσης η ελεγχόμενη έκφραση μιας

πρωτεΐνης προσδέτη dsRNA όπως ο FHV-B2 καταστολέας της σίγησης ενδεχομένως να βοηθούσε στην βαθύτερη κατανόηση του φαινομένου (Chou et al., 2007).



Εικόνα 17. Η σίγηση της EGFP συμβαίνει σε κλώνους κυττάρων.

(A,B) Σειρές χαμηλής έκφρασης της EGFP με μικρές περιοχές σίγησης (μικρά βέλη) σε αναπτυξιακούς δίσκους θώρακα-πτερού. (C,D) Κλώνοι σιγημένων κυττάρων σε δίσκους θώρακα-πτερού και λιπώδη σωματίδια από μια σειρά υψηλής EGFP έκφρασης. Το μεγάλο βέλος υποδεικνύει μια περιοχή αναιρέσεως της σίγησης εντός ενός ευρύτερου κλώνου με σιγημένα κύτταρα. (E,F) Οι κλώνοι σίγησης εμφανίζονται και σε περιβάλλον που απουσιάζει η Dcr-2. (G) Η ανάλυση κατά Southern δείχνει την παρουσία ενός μόνο αντιγράφου του διαγονιδίου σε καθεμιά από τις EGFP σειρές.

Βιβλιογραφικά έχει δείχτει ότι η μεταγραφική σίγηση των διαγονιδίων στην *Drosophila* συσχετίζεται θετικά με τον αριθμό των αντιγράφων που έχουν τοποθετηθεί στο γονιδίωμα και επηρεάζονται από την δράση των καταστολέων της ομάδας Polycomb (Pal-Bhadra et al., 1997; Pal-Bhadra et al., 2002). Πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Southern προκειμένου να διαπιστωθεί ο αριθμός των αντιγράφων της εκάστοτε κατασκευής που ενσωματώθηκε στο γονιδίωμα (Εικ. 17G). Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι όλες οι σειρές έφεραν ένα αντίγραφο του

διαγονιδίου, κάτι που επιβεβαιώθηκε και γενετικά με διασταυρώσεις. Από ότι φαίνεται η σίγηση είναι φαινόμενο που μπορεί να παρατηρηθεί ακόμα και σε γενετικά περιβάλλοντα παρουσίας ενός διαγονιδίου. Είναι πιθανό ότι αυξανόμενου του αριθμού των αντιγράφων η σίγηση παύει να συμβαίνει σε κλώνους και γίνεται καθολική. Εναλλακτικά, η αυξημένη συχνότητα φαινομένων σίγησης στη σειρά 7.2 θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει το αποτέλεσμα ένθεσης του διαγονιδίου κοντά σε μια ετεροχρωματινική περιοχή του γονιδιώματος. Ωστόσο με αυτήν την ερμηνεία δεν εξηγείται γιατί και οι υπόλοιπες EGFP σειρές παρουσιάζουν ανάλογα φαινόμενα.

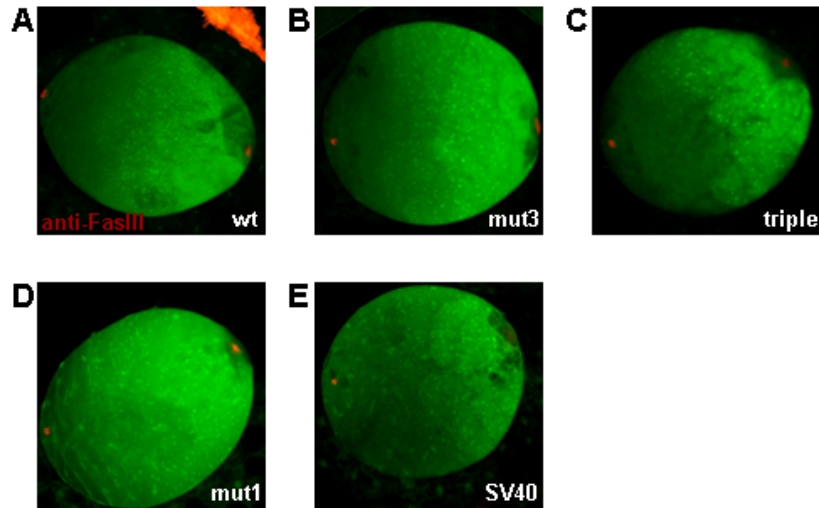
3.2 Τα πρώιμα γαμετικά κύτταρα των αρσενικών παρουσιάζουν υψηλή miRNA ενεργότητα

Στην προηγούμενη ενότητα των αποτελεσμάτων παρουσιάστηκε μια σειρά πειραμάτων που επιβεβαιώνουν την αρνητική ρύθμιση που εξασκεί το *miR-13* στο *CG10222* μέσω της δέσμευσης του στο 3'UTR σε σωματικούς ιστούς και στην κυτταρική σειρά S2. Εφόσον η θεώρηση αυτή είναι σωστή, τότε ο αισθητήρας με το αγρίου τύπου *CG10222-3'UTR* μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ένας οδηγός που θα υποδεικνύει την δράση του *miR-13* σε ποικίλους ιστούς και αναπτυξιακά στάδια μέσω της καταστολής στην έκφραση της EGFP. Για αυτό στο εξής η εν λόγω σειρά θα αναφέρεται και ως *miR-13-αισθητήρας*. Η ανάλυση της έκφρασης της EGFP σε προνύμφες τρίτου σταδίου απεκάλυψε ένα ενδιαφέρον μοτίβο δράσης για το *miR-13*. Παρουσιάζεται να δρα ισχυρά στους σωματικούς ιστούς ενώ αφήνει ανενόχλητη την έκφραση της EGFP στους αρσενικούς γονάδες. Εξαιτίας αυτής της παρατήρησης ακολούθησε λεπτομερής ανάλυση του φθορισμού των σειρών αισθητήρων σε όρχεις από προνύμφες τρίτου σταδίου.

3.2.1 miRNA ενεργότητα στα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα των προνυμφικών όρχεων

Όρχεις από προνύμφες τρίτου σταδίου εξετάστηκαν μετά από ανοσο-ιστοχημεία στο συνεστιακό μικροσκόπιο. Η ανάλυση του *miR-13*-αισθητήρα (wt) έδειξε ότι οι όρχεις δεν φθορίζουν έντονα σε όλη την έκτασή τους όπως φαίνονταν μακροσκοπικά. Αντιθέτως, οι κυτταρικοί τύποι που βρίσκονταν πιο κοντά στον πρόσθιο πόλο του όρχι, παρουσίαζαν χαμηλότερα επίπεδα φθορισμού (Εικ. 18Α) και κατά συνέπεια υψηλότερα επίπεδα ενεργότητας για το *miR-13*. Στη διαδικασία χρώσης χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα αντί της πρωτεΐνης FasIII (κόκκινη χρώση) που εδρεύει στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων του κόμβου, στον πρόσθιο πόλο. Γύρω από τον κόμβο βρίσκονται αγκυροβολημένα 16-18 αρχέγονα γαμετικά κύτταρα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι πολύ συχνά ελήφθη ένα λιγότερο έντονο σήμα FasIII και στις κυτταρικές μεμβράνες των σωματικής προέλευσης τελικών κυττάρων του οπίσθιου πόλου. Γύρω από τα τελικά κύτταρα εντοπίζονται ανώριμα σπερματοκύτταρα.

Αναλύοντας τις σειρές wt, mut3 και triple παρατηρήθηκε μια διαβάθμιση στην ενεργότητα του *miR-13* από τον πρόσθιο προς τον οπίσθιο πόλο (Εικ. 18Α,Β,С). Η κλίση της διαβάθμισης διέφερε σε αυτές τις σειρές με τη σειρά triple και mut3 να υπερτερούν της wt, πιθανά υποδεικνύοντας και την δύναμη ανίχνευσης της δράσης του ενδογενούς *miR-13* λόγω του σχεδιασμού των αισθητήρων. Απεναντίας μηδενική έως μικρή διαβάθμιση παρατηρήθηκε στις σειρές αρνητικού μάρτυρα, mut1 και SV40 (Εικ. 18D,Ε). Ο φθορισμός στην σειρά SV40 ήταν συνολικά χαμηλότερος των υπολοίπων δεδομένου ότι είναι η μόνη ετερόζυγη σειρά. Το πρώτο και σύντομο συμπέρασμα που προέκυψε είναι ότι τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα παρουσιάζουν *miR-13* ενεργότητα.

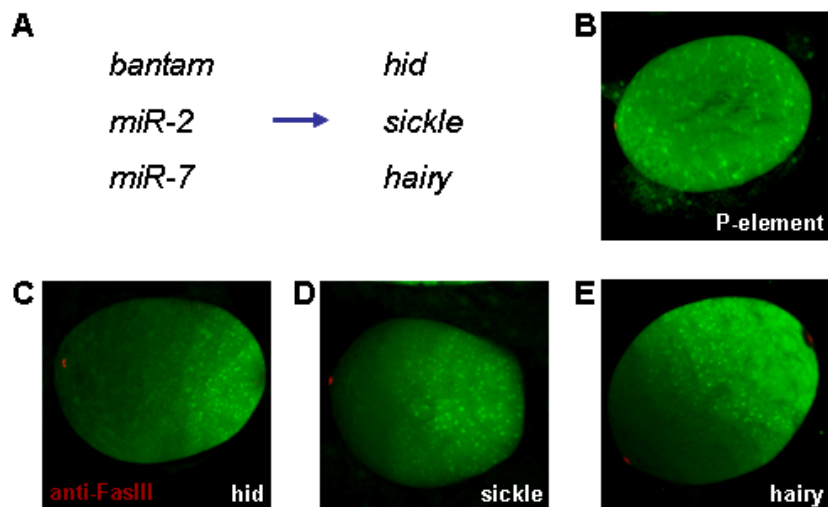


Εικόνα 18. Τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα των προνυμφικών όρχεων παρουσιάζουν υψηλή *miR-13* ενεργότητα.

(A,B,C) Οι σειρές αισθητήρες παρουσιάζουν σίγηση στην περιοχή του πρόσθιου πόλου, γύρω από τα κύτταρα του κόμβου (κόκκινη χρώση με anti-FasIII) όπου αγκυροβολούν τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα. (D,E) Οι σειρές αρνητικού μάρτυρα παραμένουν φθορίζουσες στην ίδια περιοχή. Οι όρχεις είναι διαταγμένοι από τον πρόσθιο (αριστερά) στον οπίσθιο πόλο (δεξιά). Ο οπίσθιος πόλος εμφανίζει και αυτός FasIII χρώση, αντιπροσωπεύει όμως ένα σωματικής προέλευσης πληθυσμό κυττάρων, χωρίς αρχέγονα κύτταρα γύρω του.

Τέθηκε στη συνέχεια το εύλογο ερώτημα αν η παρατήρηση αυτή έχει ισχύ μόνο για το *miR-13* ή αφορά και άλλα miRNA. Για το σκοπό αυτό έγινε χρήση και ανάλυση περισσότερων σειρών αισθητήρων οι οποίες αποκρίνονται σε διαφορετικά miRNA (Εικ. 19A) και έχουν κατασκευαστεί με ακριβώς την ίδια λογική (χορηγία του S.M. Cohen). Συγκεκριμένα αναλύθηκε η σειρά που φέρει το 3'UTR του *head involution defective (hid)* και αποκρίνεται στο *bantam*, η σειρά *sickle* για το *miR-2*, η σειρά *hairy* για το *miR-7* και τέλος η σειρά P-element σαν αρνητικός μάρτυρας (Brennecke et al., 2003; Stark et al., 2003). Εφόσον οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των μεταγράφων και των αντίστοιχων miRNA είναι ήδη αποδεδειγμένη οι σειρές αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν οδηγοί υπόδειξης της δράσης των αντίστοιχων miRNA. Η χρώση με Fas-III αντίσωμα έδειξε ότι πράγματι και τα συγκεκριμένα miRNA διατηρούν υψηλά επίπεδα ενεργότητας στην περιοχή που

εδρεύουν τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα (Εικ. 19C,D,F) γενικεύοντας την αρχική παρατήρηση. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι για τις περιπτώσεις των *sickle* και *hairy* δεν μπορεί αποκλειστεί το ενδεχόμενο να ρυθμίζονται και από άλλα miRNA πέραν των *miR-2* και *miR-7* βάσει της μεθόδου απόδειξης της αλληλεπίδρασης που ακολουθήθηκε (Stark et al., 2003). Νεότερα δεδομένα για την δράση του *miR-7* στην αρσενική γαμετική σειρά προβλέπουν εμμέσως ότι καταστέλλεται μεταγραφικά από την Mael στους μιτωτικούς απογόνους των αρχέγονων κυττάρων (Pek et al., 2009). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με το φαινότυπο σίγησης που παρουσίασε το *hairy* 3'UTR (Εικ.19E, 21D). Ωστόσο οι αισθητήρες δράσης του *miR-7*, μέσω του *bam* 3'UTR, που χρησιμοποιήθηκαν δεν παρέχουν σαφείς ενδείξεις για αυτόν τον ισχυρισμό (Pek et al., 2009).



Εικόνα 19. Τα *bantam*, *miR-2* και *miR-7* εμφανίζουν ανάλογο πρότυπο ενεργότητας με το *miR-13* στους προνυμφικούς όρχεις.

(A) Υπόμνημα της ρυθμιστικής δράσης που επιβάλλουν τα *bantam*, *miR-2* και *miR-7* στα γονίδια *hid*, *sickle* και *hairy*, αντίστοιχα. (B) Αρνητικός μάρτυρας με υψηλά επίπεδα EGFP έκφρασης σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. (C,D,E) Οι φαινότυποι δράσης των *bantam*, *miR-2* και *miR-7*, αντίστοιχα στον πρόσθιο πόλο του όρχι. Η χρώση με anti-FasIII στα αριστερά ξεχωρίζει την ομάδα των κυττάρων του κόμβου.

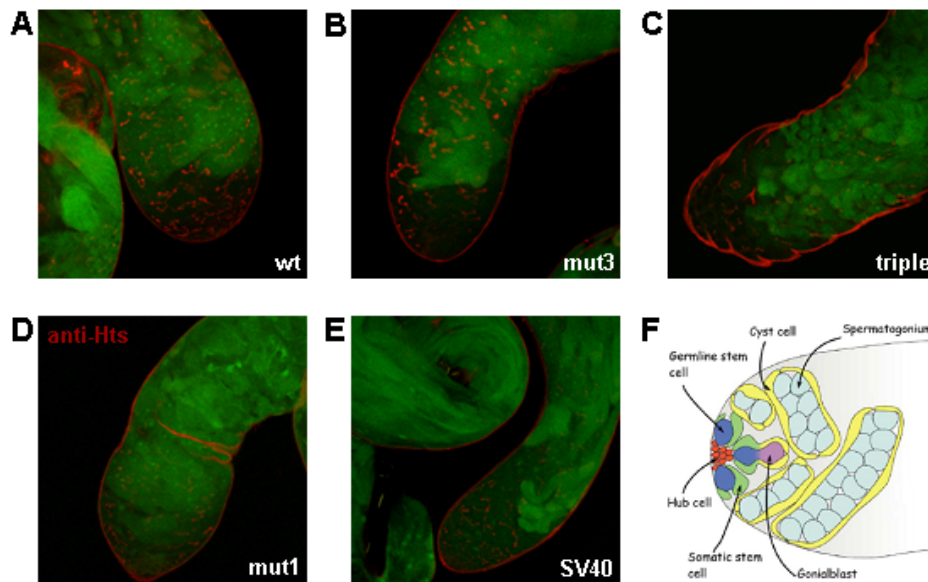
3.2.2 miRNA ενεργότητα στα μιτωτικά κύτταρα των ενηλίκων όρχεων

Η περιοχή σίγησης γύρω από τον πρόσθιο πόλο του προνυμφικού όρχι εκτός από τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα περιλαμβάνει και τους απόγονους κυτταρικούς τύπους των μιτωτικών διαιρέσεων. Προκειμένου να ληφθεί μια πιο σαφή εικόνα των κυττάρων που περιέχουν miRNA ενεργότητα η μελέτη των αισθητήρων μετατοπίστηκε προς τους όρχεις ενηλίκων ατόμων εκεί που οι μελέτες των σπερματογένεσης είναι πιο αναπτυγμένες και υπάρχει περισσότερη πληροφορία διαθέσιμη.

Για το σκοπό αυτό οι σειρές αισθητήρες με τις παραλλαγές του *CG10222-3'UTR* καθώς και οι σειρές αισθητήρες για τα *bantam*, *miR-2* και *miR-7* χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της δράσης των miRNA στους ενηλίκους όρχεις. Σε αυτές προστέθηκαν δύο ακόμη σειρές που αντί της EGFP έχουν αντιστοίχως την RFP ως πρωτεΐνη ανταποκριτή, ευγενική χορηγία από τον συνάδελφο Pawel Piwko (Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Iraklio, Greece). Μια που φέρει το 3'UTR του *m7* και αποκρίνεται στα *miR-4/79* της οικογένειας των Brd-box και μια που φέρει το 3'UTR του *Alcohol dehydrogenase (Adh)* και δεν αναμένεται να ρυθμίζεται από miRNA (Lai et al., 2005). Σε αυτό το πρωτόκολο χρώσης χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης Hts που εντοπίζεται στα κανάλια που διαπερνούν τις κυτταροπλασματικές γέφυρες που ενώνουν τα σπερματογόνια.

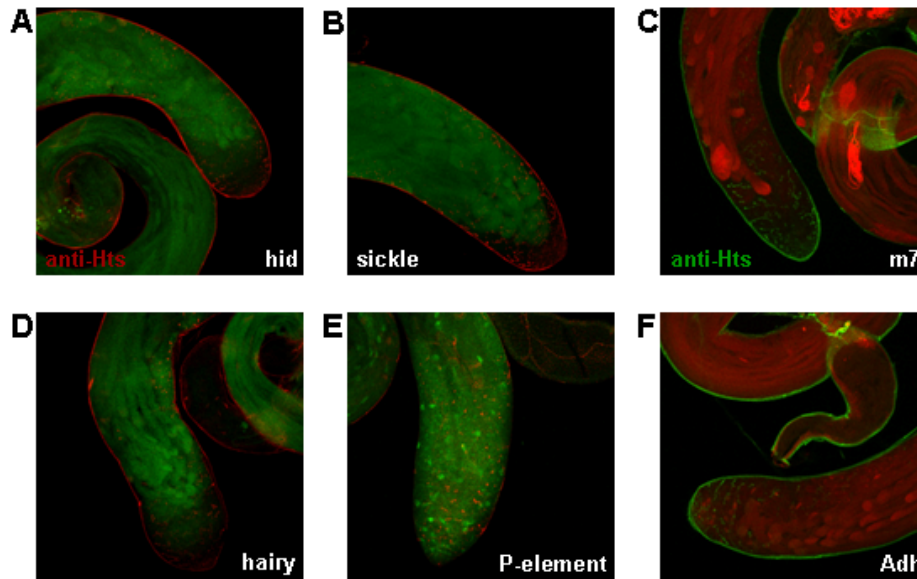
Όλες οι σειρές αισθητήρες παρουσίασαν σίγηση στο άκρο του όρχι εκεί που εδρεύει ο μιτωτικά διαιρούμενος κυτταρικός πληθυσμός της σπερματογένεσης, τα αρχέγονα κύτταρα, οι γονιοβλάστες και τα σπερματογόνια (Εικ. 20A-C, Εικ. 21A-D). Οι σειρές αρνητικού μάρτυρα όπως η *mut1* και *SV40* αναμένονταν να παραμένουν πράσινες μέχρι το άκρο του όρχι, παρουσίασαν όμως μια μικρής κλίμακας καταστολή (Εικ. 20D,E). Ενδεχομένως ένα μικρό ποσοστό από *miR-13* να καταφέρνει να

προσδεθεί στο τροποποιημένο 3'UTR της σειράς *mut1*. Το SV40-3'UTR από την άλλη έχει συζητηθεί ήδη ως ένα μη-κατάλληλο δείγμα αρνητικού μάρτυρα. Το ίδιο φαίνεται να ισχύει αλλά σε μικρότερο βαθμό και για την περίπτωση του *Adh-3*'UTR καθώς στο άκρο των όρχεων εντοπίστηκαν ελαφρά χαμηλότερα επίπεδα RFP απ' ότι στις υπόλοιπες περιοχές (Εικ. 21F). Απεναντίας το 3'UTR του μεταθετού στοιχείου P παράγει όρχεις με μηδενικά επίπεδα σίγησης της EGFP (Εικ. 21E). Στα πειράματα που ακολούθησαν αυτή η σειρά χρησιμοποιήθηκε ως το πιο αξιόπιστο πείραμα αρνητικού μάρτυρα.



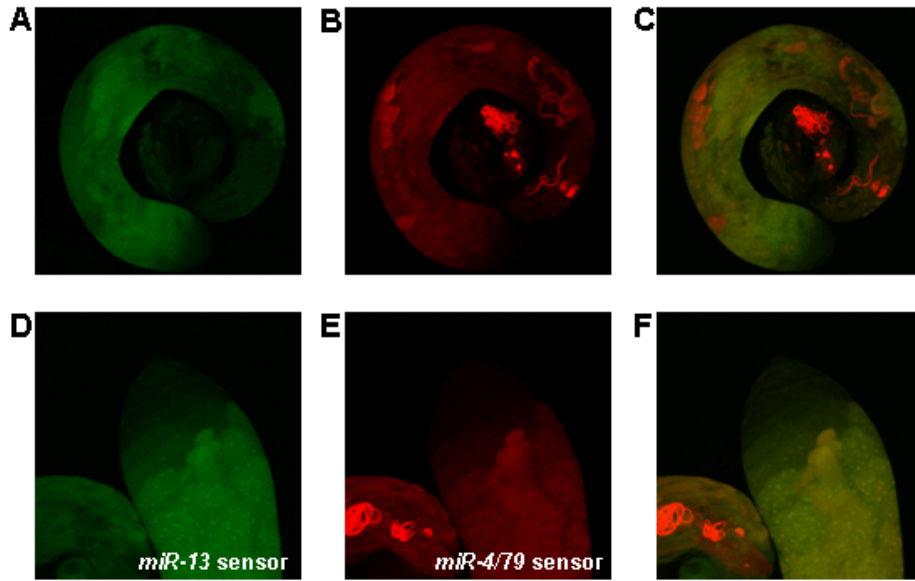
Εικόνα 20. *miR-13* ενεργότητα στο άκρο των ενηλίκων όρχεων.

(A,B,C) Σειρές *miR-13*-αισθητήρες με σιγημένα τα κύτταρα που εδρεύουν στο άκρο των όρχεων. (D,E) Οι σειρές αρνητικού μάρτυρα παρουσιάζουν μικρή έως ελάχιστη μείωση στην έκφραση της EGFP. Οι συγκοινωνούντες κυτταρικοί πληθυσμοί σημαίνονται με το anti-Hts (κόκκινη χρώση). (F) Σχεδιάγραμμα των κυτταρικών τύπων που εντοπίζονται στο άκρο του ενηλίκου όρχι (Shivdasani and Ingham, 2003). Τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα (germline stem cells) παραμένουν προσκολλημένα στα κύτταρα του κόμβου (hub cells) και διαιρούνται ασύμμετρα αναπληρώνοντας τον εαυτό τους και παράγοντας ένα γονιοβλάστη (gonialblast). Ο γονιοβλάστης διαιρείται μιτωτικά τέσσερις φορές για να παράγει διαδοχικά 2, 4, 8 και 16 σπερματογόνια (spermatogonia) τα οποία επικοινωνούν με κυτταροπλασματικές γέφυρες. Σε αυτές τις δομές εντοπίζεται η Hts. Τα αρχέγονα σωματικά κύτταρα (somatic stem cell) προσδένονται και αυτά στον κόμβο. Διαιρούνται παράγοντας τα κύτταρα της κύστης (cyst cell) που θα περιβάλλουν τα γαμετικά κύτταρα μέχρι την ολοκλήρωση της γαμετογένεσης.



Εικόνα 21. Στο άκρο των ενήλικων όρχεων εντοπίζεται υψηλή ενεργότητα σε διάφορα miRNA. Ενήλικοι όρχεις από σειρές με ανταποκριτή την EGFP (A,B,D,E) ή την RFP (C,F). Η χρώση του anti-Hts παρουσιάζεται κόκκινη και πράσινη αντίστοιχα. (A,B,C,D) Ενήλικοι όρχεις με σίγηση στο άκρο τους από την δράση των *bantam*, *miR-2*, *miR-7/306*, και *miR4/79* στις σειρές που περιέχουν το αντίστοιχα αποκρινόμενο 3'UTR *hid*, *sickle*, *hairy* και *m7*. (E,F) Αρνητικοί μάρτυρες με 3'UTR από το μεταθετό στοιχείο P και το *Adh* 3'UTR.

Οι κυτταρικοί τύποι που απαντούν σε έναν ενήλικο όρχι είναι πολλοί και το μοτίβο έκφρασης των ανταποκριτών δεν ήταν απολύτως ξεκάθαρο. Επιπροσθέτως το αντίσωμα για την Hts δεν προσδένεται αποκλειστικά στα μιτωτικά κύτταρα αλλά ακολουθεί τις εκφυλιζόμενες δομές των συντηκτοσωματίων στα πρώτα στάδια ωρίμανσης των πρωτοταγών σπερματοκυττάρων. Το ερώτημα που προέκυψε είναι αν το πρότυπο διαβάθμισης του φθορισμού είναι ίδιο σε όλες τις σειρές αισθητήρες για την ενεργότητα του εκάστοτε miRNA. Για το σκοπό αυτό ανασυνδυάστηκαν γενετικά η σειρά αισθητήρας για το *miR-13* που είναι φτιαγμένη με EGFP και η σειρά αισθητήρας για τα *miR-4/79* που διαθέτει την RFP. Όπως φαίνεται από την εικόνα 22 τα πρότυπα ενεργότητας και παύσης της ενεργότητας των εν λόγω miRNA είναι πανομοιότυπα διευκολύνοντας την γενίκευση των παρατηρήσεων.



Εικόνα 22. Τα πρότυπα ενεργότητας είναι πανομοιότυπα για τα *miR-13* και *miR-4/79* στο άκρο του όρχι.

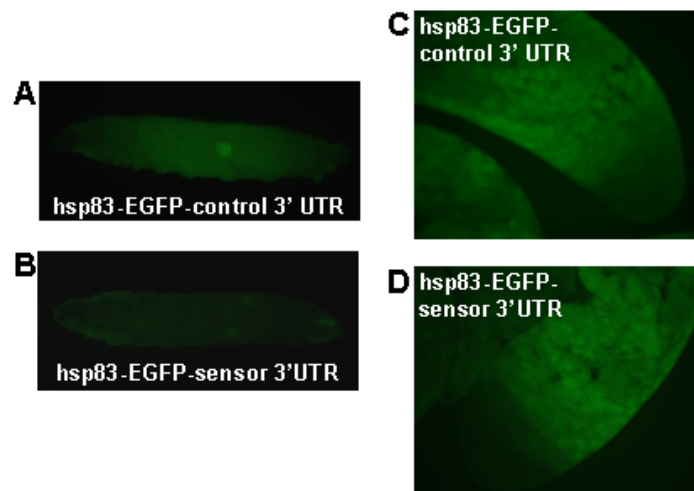
Η σύγκριση στην σίγηση και μετέπειτα έκφραση του γονιδίου ανταποκριτή στις σειρές *miR-13*-αισθητήρα και *miR-4/79*-αισθητήρα δείχνει απόλυτη ταύτιση. 20x και 40x μεγέθυνση αντίστοιχα.

3.2.3 Ανάλυση αισθητήρων που παράγονται από τον υποκινητή *hsp83*

Η μέχρι τώρα ανάλυση έγινε με γονίδια ανταποκριτές που μεταγράφονται από ένα συστατικό υποκινητή τουμπουλίνης $\alpha 1$. Ο υποκινητής αυτός ενεργοποιείται ισχυρά και με σταθερό τρόπο σε ιστούς και στάδια ανάπτυξης. Αυτά τα χαρακτηριστικά τον καθιστούν κατάλληλο για την απομόνωση των μεταγραφικών μονοπατιών ενεργοποίησης ενός γονιδίου από τα μετα-μεταγραφικά. Ο υποκινητής *hsp83* έχει χρησιμοποιηθεί σε μελέτες της σπερματογένεσης και θεωρείται ότι είναι συστατικά ενεργός σε όλα τα κύτταρα του όρχι, στους 25°C (Horabin and Schedl, 1993; Franklin-Dumont et al., 2007). Με σκοπό να ενισχυθεί η εγκυρότητα των μέχρι τώρα παρατηρήσεων έγινε αντικατάσταση του υποκινητή τουμπουλίνης $\alpha 1$ με τον *hsp83* στις πλασμιδιακές κατασκευές που έφεραν το αγρίου τύπου *CG10222*-3'UTR

και το 3'UTR του μεταθετού στοιχείου P. Ακολούθησε παραγωγή μετασχηματισμένων σειρών *Drosophila* και ανάλυση της έκφρασης της EGFP.

Η μελέτη της σειράς *hsp83-EGFP-P element 3'UTR* σε προνύμφες τρίτου σταδίου και ενήλικους όρχεις έδειξε ότι ο νέος υποκινητής δεν είναι συστατικός διότι η EGFP δεν εκφράζονταν στο πρόσθιο τμήμα των προνυμφών όπως επίσης και στο άκρο του ενήλικου όρχι (Εικ. 23A,C). Η σύγκριση με την σειρά αισθητήρα στις προνύμφες (Εικ. 23B) παρείχε ακόμη μια απόδειξη της ρύθμισης του *CG10222* από το *miR-13*. Δεν ήταν εύκολο όμως να εξαχθεί κάποιο ασφαλές συμπέρασμα από την ανάλυση των ενήλικων όρχεων (Εικ. 23D). Απ' ότι φαίνεται ο υποκινητής *hsp83* δεν είναι η μέθοδος επιλογής για μελέτες στους μιτωτικούς πληθυσμούς των γαμετικών κυττάρων στον ενήλικο όρχι.



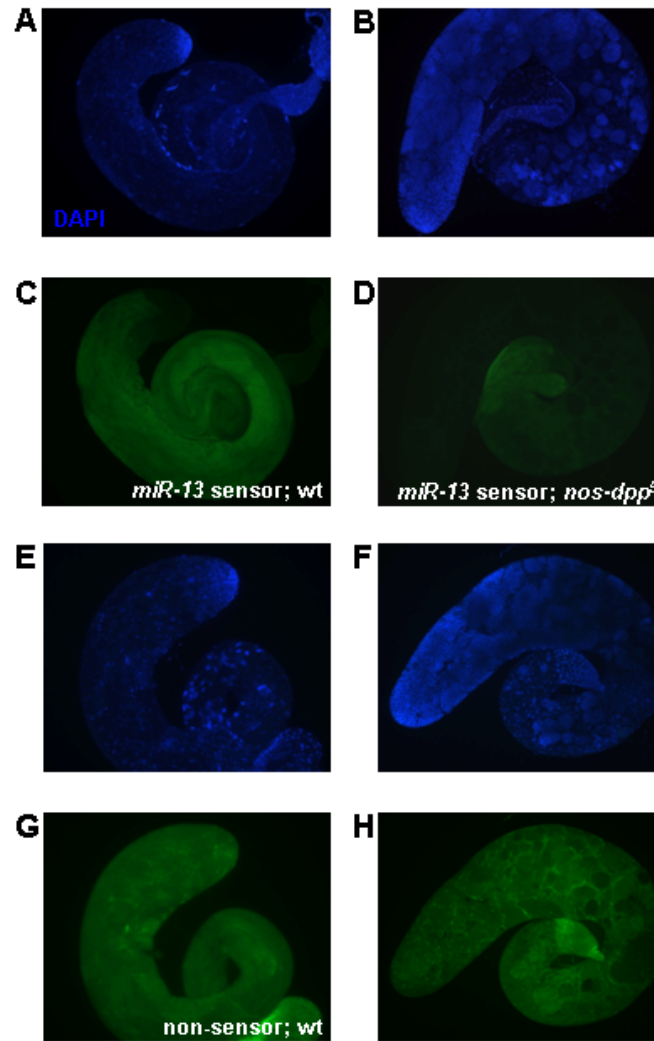
Εικόνα 23. Η χρήση του υποκινητή *hsp83* στην μελέτη της *miR-13* ενεργότητας δεν παρέχει ασφαλείς ενδείξεις.

Δύο σειρές EGFP που μεταγράφονται από τον *hsp83* υποκινητή και ακολουθούνται από το 3'UTR του μεταθετού στοιχείου P (control) και του *CG10222* (sensor). (A,C) Ο υποκινητής δεν είναι ενεργός στο πρόσθιο τμήμα των προνυμφών και στα κύτταρα στο άκρο του όρχι, αντίστοιχα. Επομένως η σειρά μάρτυρα δεν παρουσιάζει ομοιόμορφη έκφραση. (B) Τα επίπεδα της EGFP στην προνύμφη είναι σαφώς χαμηλότερα στην σειρά αισθητήρα. (D) Το πρότυπο σίγησης στην σειρά αισθητήρα δεν μπορεί να αναλυθεί.

3.2.4 Η miRNA ενεργότητα σταματά πριν την μείωση κατά την σπερματογένεση

Μέχρι τώρα έχει δειχθεί ότι τα κύτταρα που εδρεύουν στο άκρο των ενηλίκων όρχεων παρουσιάζουν έντονη ενεργότητα για πολλά miRNA, η οποία αναιρείται ολοκληρωτικά καθώς αυτά απομακρύνονται από το κέντρο παραγωγής τους. Το βασικό ερώτημα που έμελε να διαλευκανθεί είναι ποιοί ακριβώς είναι αυτοί οι κυτταρικοί τύποι και σε ποιο στάδιο της σπερματογένεσης παύει να συμβαίνει σίγηση από τα miRNA. Η ανάλυση του φθορισμού των όρχεων από τις σειρές αισθητήρες σε αγρίου τύπου γενετικό περιβάλλον είχε το μειονέκτημα του ότι οι ουρές των ώριμων σπερμάτων εκτείνονταν μέχρι το άκρο του όρχι εκτοπίζοντας και καλύπτοντας τους πρώιμους κυτταρικούς τύπους που εντοπίζονταν εκεί. Για το λόγο αυτό η σειρά αισθητήρας για το *miR-13* συνδυάστηκε με σειρές μεταλλαγμένου γενετικού υποβάθρου σε γονίδια που ελέγχουν την σπερματογένεση. Έτσι παρήχθησαν στείροι όρχεις με λιγότερους κυτταρικούς τύπους όπου τα φθορίζοντα από τα μη-φθορίζοντα κύτταρα ήταν πιο εύκολα διακριτά.

Η υπερέκφραση του παράγοντα Dpp από τον υποκινητή του γονιδίου *nos* προκαλεί αναστολή της διαφοροποίησης των σπερματογονίων και παράταση των μιτωτικών διαιρέσεων πέρα από το στάδιο των 16 κυττάρων (Shivdasani and Ingham, 2003). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός καρκινικού φαινοτύπου όπου ο όρχις αποτελείται μόνο από αρχέγονα κύτταρα, γονιοβλάστες και αναρίθμητα σπερματογόνια. Η σειρά *miR-13*-αισθητήρας σε αυτό το γενετικό περιβάλλον παρουσίασε πλήρη σίγηση αποδεικνύοντας ότι όλοι οι παραπάνω κυτταρικοί τύποι διαθέτουν *miR-13* ενεργότητα (Εικ. 24D). Αντιθέτως οι όρχεις από την αντίστοιχη σειρά αρνητικού μάρτυρα με το 3'UTR του μεταθετού στοιχείου P παρέμειναν φθορίζοντες σε όλη τους την έκταση (Εικ. 24H).



Εικόνα 24. Έντονη miRNA ενεργότητα στα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα και τους μιτωτικούς τους απογόνους.

Όρχεις από τις σειρές του *miR-13*-αισθητήρα (A-D) και του P element 3'UTR αρνητικού μάρτυρα (E-H). Αριστερά παρουσιάζεται ο αγρίου τύπου φαινότυπος (wt) και δεξιά το αποτέλεσμα της υπερέκφρασης του *dpp* από τον *nos* υποκινητή. Οι όρχεις έχουν φυσιολογικό αριθμό αρχέγονων κυττάρων και γονιοβλαστών αλλά ατάκτως διαιρούμενα σπερματογόνια. (A,B) DAPI χρώση σε wt και *nos-dpp*⁵ όρχεις αντίστοιχα. Ο πληθυσμός των σπερματογονίων βάφεται έντονα με DAPI στο άκρο του wt όρχι (A) ενώ κυριαρχεί σε όλο τον όρχι του *nos-dpp*⁵ γονοτύπου (B). (C,D) Η σίγηση της EGFP περιορίζεται στο άκρο του wt όρχι (C) και αντίστοιχα εξαπλώνεται σε όλο τον *nos-dpp*⁵ όρχι ακολουθώντας την υπερπαραγωγή των σπερματογονίων (D). (E,F,G,H) Στο πείραμα αρνητικού μάρτυρα με τη σειρά P element 3'UTR, που δεν αποκρίνεται σε miRNA, η έκφραση της EGFP παραμένει υψηλή σε όλα τα κύτταρα και στους δύο γονοτύπους.

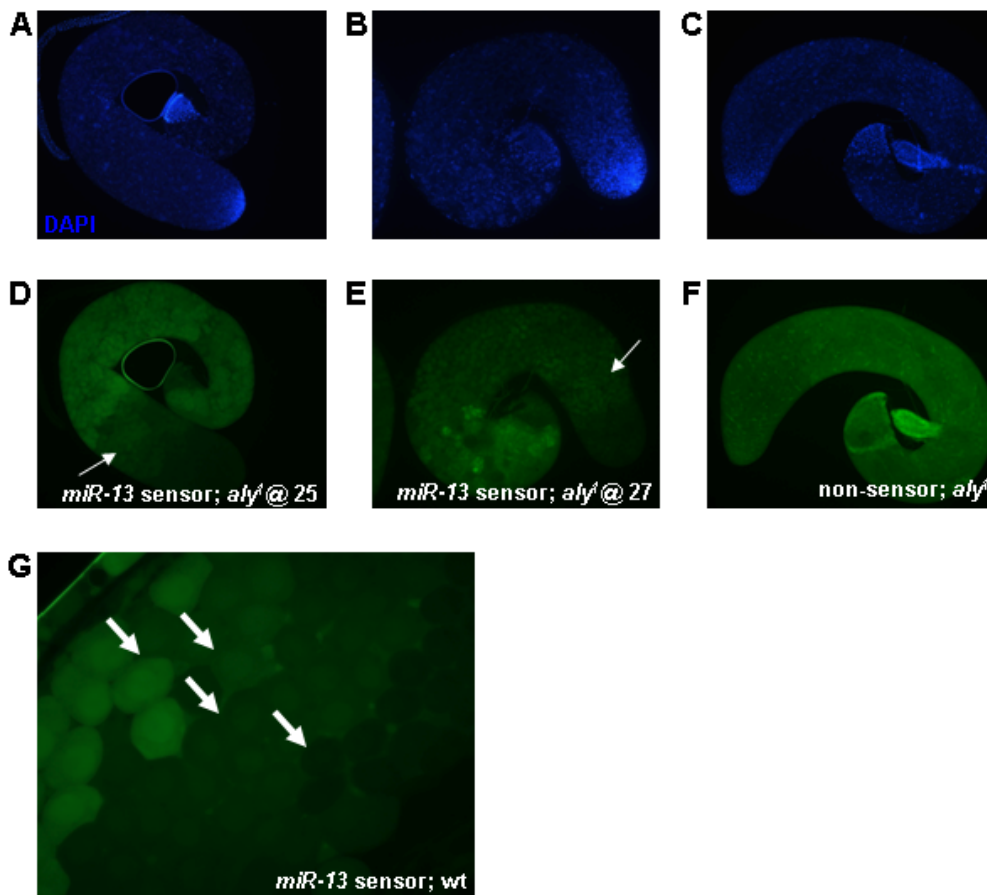
Κατόπιν η ανάλυση στόχευσε στην διακοπή της σπερματογένεσης σε ένα στάδιο μετά τα σπερματογόνια, αυτό των πρωτοταγών σπερματοκυττάρων. Για το

σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το μετάλλαγμα *aly*¹ όπου παράγονται όλοι οι πρώιμοι κυτταρικοί τύποι μέχρι το στάδιο των πρωτοταγών σπερματοκυττάρων. Αυτά αδυνατούν να διαφοροποιηθούν και να εισέλθουν στη μείωση με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται σε διάφορα υποστάδια ωρίμανσης (Lin et al., 1996). Ο συνδυασμός του *aly*¹ με την σειρά *miR-13*-αισθητήρα αποκάλυψε ότι πλέον σε αυτό το στάδιο επέρχεται η αλλαγή από τα σιγημένα προς τα μη-σιγημένα κύτταρα (Εικ. 25D). Βρέθηκε λοιπόν ότι η αναστολή της δράσης του *miR-13* συμβαίνει κατά την διάρκεια της ωρίμανσης των πρωτοταγών σπερματοκυττάρων. Στο πείραμα αρνητικού μάρτυρα τα επίπεδα φθορισμού ήταν σε όλα τα κύτταρα υψηλά (Εικ. 25F). Επιπροσθέτως η συσσώρευση των σπερματοκυττάρων στο *aly*¹ επέτρεψε την αποκάλυψη μιας ενδιάμεσης κατάστασης σίγησης (Εικ. 25D, βέλος), που ήταν πιο σπάνια ορατή σε αγρίου τύπου όρχεις με τη συνήθη προετοιμασία των παρασκευασμάτων. Πράγματι, η προετοιμασία ζωντανών μη-μονιμοποιημένων παρασκευασμάτων όρχεων του *miR-13*-αισθητήρα, με άσκηση ήπιας πίεσης, αποκάλυψε τέσσερις κατηγορίες φθοριζόντων σπερματοκυττάρων. Καθώς τα σπερματοκύτταρα ωρίμαζαν αυξάνοντας το μέγεθός τους αναιρούσαν την σίγηση σε τρία διαδοχικά βήματα (Εικ. 25G).

Ο αρχικός χαρακτηρισμός του αλληλομόρφου *aly*¹ έδειξε ότι είναι απολύτως ανενεργό στην θερμοκρασία των 27°C (Lin et al., 1996). Μετέπειτα ανάλυση έδειξε ότι ήδη από τους 25°C δεν ανιχνεύεται καθόλου Aly πρωτεΐνη (White-Cooper et al., 2000). Εντούτοις το πείραμα επαναλήφθηκε στους 27°C όπου ομοίως παρατηρήθηκαν διαβαθμίσεις σίγησης στα σπερματοκύτταρα με την διαφορά ότι η ενδιάμεση κατάσταση κυριάρχησε σε πλήθος (Εικ. 25E, βέλος). Ενδεχομένως να υφίσταται μια θετική συσχέτιση μεταξύ θερμοκρασίας και παράτασης της σίγησης ανεξάρτητη από τον φαινότυπο *aly*. Ένα τέτοιο είδος εξάρτησης της σίγησης από την

θερμοκρασία έχει δειχθεί στην *Drosophila* αλλά και σε φυτικά συστήματα (Fortier and Belote, 2000; Kalantidis et al., 2002).

Με τα πειράματα που προηγήθηκαν δείχτηκε ότι τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα, οι μιτωτικοί τους απόγονοι και τα πρώτα μειωτικά υποστάδια των σπερματοκυττάρων διαθέτουν υψηλή *miR-13* ενεργότητα η οποία σταματά πριν την μείωση. Αντίστοιχα το ίδιο αναμένεται να ισχύει και για τους υπόλοιπους πληθυσμούς από miRNA που δραστηριοποιούνται στο άκρο του όρχι, όπως το *bantam*, τα *miR-4/79* και πιθανότατα τα *miR-2*, και *miR-7*.



Εικόνα 25. Η miRNA ενεργότητα σταματά πριν την μείωση κατά την σπερματογένεση. Όρχεις από τις σειρές του *miR-13*-αισθητήρα (A,B,D,E) και του P element 3'UTR αρνητικού μάρτυρα (C,F) σε θερμοκρασία ανάπτυξης 25°C (A,C,D,F) ή 27°C (B,E). Στο γονότυπο *aly¹* παρατηρούνται πρωτοταγή σπερματοκύτταρα σε διάφορα υποστάδια τα οποία συσσωρεύονται χωρίς να προχωρούν στην μείωση. (A,B,C) Τα πρωτοταγή σπερματοκύτταρα καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος του όρχι και παρουσιάζουν ένα στικτό αλλά ασθενές πρότυπο χρώσης με DAPI. (D) Στους 25°C ο *miR-13*-αισθητήρας εμφανίζει σίγηση στο στάδιο των σπερματοκυττάρων που αναιρείται μερικώς αρχικά

(βέλος) και κατόπιν ολοκληρωτικά. (E) Στους 27°C η ενδιάμεση κατάσταση σίγησης απαντά στα περισσότερα από τα σπερματοκύτταρα (βέλος). (F) Στο πείραμα αρνητικού μάρτυρα η έκφραση της EGFP παραμένει υψηλή σε όλα τα κύτταρα. (G) Ζωντανό παρασκεύασμα (testis-squash) αγρίου τύπου όρχι από την σειρά *miR-13*-αισθητήρα με ωριμάζοντα σπερματοκύτταρα που αυξάνουν σε μέγεθος και σταδιακά αναιρούν την σίγηση (βέλη).

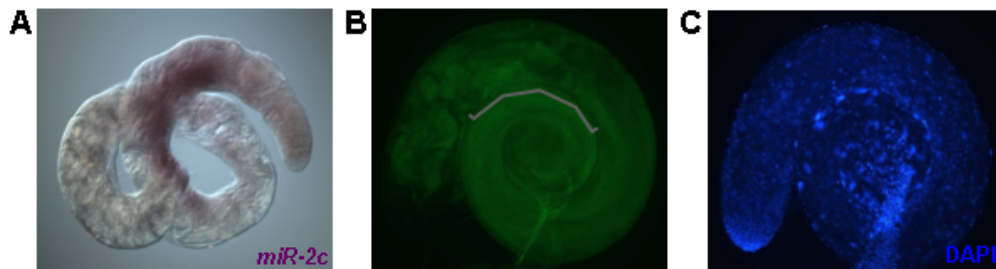
3.3 Τα γονίδια *sa* και *ofs* οριοθετούν έμμεσα το μοτίβο ενεργότητας των miRNA

3.3.1 Τα ώριμα miRNA εκφράζονται και σε κυτταρικούς τύπους που δεν παρουσιάζουν σίγηση

Το πρότυπο ενεργότητας των miRNA στην αρσενική γαμετική σειρά παρουσιάζεται υψηλό στους μιτωτικά διαιρούμενους κυτταρικούς πληθυσμούς και φθίνει κατά την ωρίμανση των σπερματοκυττάρων. Κατόπιν αυτής της παρατήρησης κρίθηκε αναγκαίο να διερευνηθεί παράλληλα και το μοτίβο έκφρασης των αντίστοιχων miRNA. Τρεις εκδοχές προτάθηκαν: (α) Πλήρης ταύτιση παρουσίας και ενεργότητας των miRNA, (β) παραγωγή των miRNA σε περιορισμένο πληθυσμό κυττάρων και μετέπειτα κληροδότηση σε απόγονα κύτταρα συναρτήσει του χρόνου ημιζωής τους ή (γ) παραγωγή των miRNA σε μεγάλο αριθμό κυττάρων και συνάμα ελεγχόμενη αναχαίτιση και περιορισμός της δράσης τους.

Προκειμένου να εξεταστούν αυτές οι υποθέσεις πραγματοποιήθηκε *in situ* υβριδοποίηση σε αγρίου τύπου όρχεις με DIG-σημασμένο LNA (Locked Nucleic Acid) ιχνηθέτη ειδικό για το *miR-2c* (χορηγία της A. Boutla, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Iraklio, Greece). Σύμφωνα με τη χρώση εντοπίστηκαν ανιχνεύσιμα επίπεδα παραγωγής του ώριμου *miR-2c* στο άκρο του όρχι και ιδιαιτέρως υψηλά στην εσωτερική καμπύλη του, σημείο που εδρεύουν τα πιο ώριμα πρωτογενή σπερματοκύτταρα (Εικ. 26Α). Φαίνεται λοιπόν ότι το *miR-2c* είναι παρόν ακόμα και σε κυτταρικούς τύπους όπου ο αισθητήρας του μαρτυρεί την απουσία ενεργότητάς

του (Εικ. 26B,C). Αυτή η παρατήρηση ισχυροποιεί την τρίτη εκδοχή κατά την οποία η έκταση παραγωγής ενός miRNA στον όρχι υπερκαλύπτει το μοτίβο ενεργότητας του. Αξίζει να αναφερθεί ότι το *miR-2c* και ενδεχομένως και τα υπόλοιπα υπό διερεύνηση miRNA ακολουθούν την έντονη μεταγραφική δραστηριότητα που παρατηρείται για τα «πρωτεϊνικά» γονίδια στο στάδιο των πρωτοταγών σπερματοκυττάρων (Fuller, 1998). Ενδεχομένως κάποιος μηχανισμός φροντίζει να καθιστά τα miRNA ανενεργά κατά τα πρώιμα στάδια ωρίμανσης των πρωτοταγών σπερματοκυττάρων παρόλο που τα γονίδια τους συνεχίζουν να μεταγράφονται μέχρι και πριν την είσοδο στην μείωση.

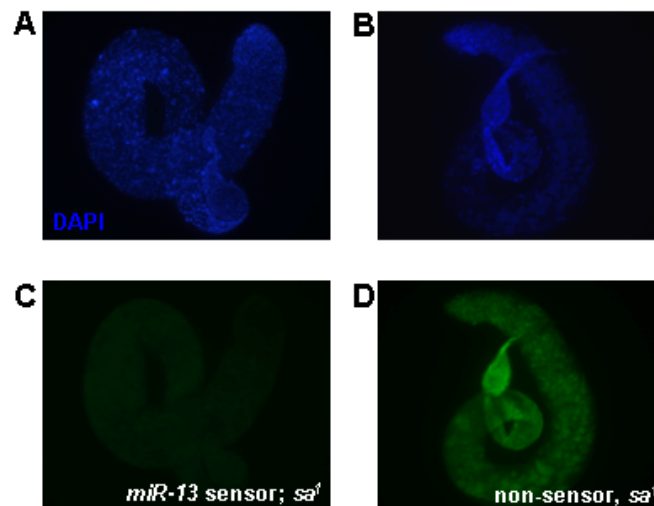


Εικόνα 26. Τα μοτίβο έκφρασης των miRNA είναι πιο ευρύ από την περιοχή δράσης τους. (A) *In situ* υβριδοποίηση σε όρχι αγρίου τύπου με LNA-ιχνηθέτη ειδικό για το *miR-2c*. Ανιχνεύεται ασθενές σήμα στο άκρο του όρχι και πιο έντονο στην εσωτερική καμπύλη του. (B,C) Η δράση του *miR-2c* περιορίζεται στο άκρο του όρχι και ανιχνεύεται μέσω της σύγκλισης του αισθητήρα που φέρει το *sickle* 3'UTR. Στην εσωτερική καμπύλη του όρχι (αγκύλη) ο αισθητήρας δεν παρουσιάζει σύγκλιση παρόλο που το *miR-2c* εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα (B). Τα ακριβή όρια του όρχι γίνονται διακριτά με την DAPI χρώση (C).

3.3.2 Το *sa* άλλα όχι το *bol* έμμεσα αναστέλλει την δράση των miRNA

Το γονίδιο *sa* κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος ελέγχει την μεταγραφή ή έμμεσα την μετάφραση ορισμένων σημαντικών για την σπερματογένεση γονιδίων (White-Cooper et al., 1998; Hiller et al., 2004). Απουσία του *sa* οι όρχεις παρουσιάζουν κυτταρολογικό φαινότυπο ανάλογο με την περίπτωση

του *aly¹*, πρωτοταγή σπερματοκύτταρα που αδυνατούν να εισέλθουν στην μείωση ή να διαφοροποιηθούν με αποτέλεσμα την συσσώρευσή τους (Lin et al., 1996). Ο συνδυασμός της σειράς *miR-13*-αισθητήρα με όρχεις του γονοτύπου *sa¹* δεν έδωσε αποτέλεσμα αντίστοιχο με το *aly¹* όπως θα αναμενόταν. Ενώ στο *aly¹* γενετικό περιβάλλον η έκφραση της EGFP σταδιακά αποκαθιστούνταν (Εικ. 25D), στους *sa¹* όρχεις όλοι οι κυτταρικοί τύποι συμπεριλαμβανομένων και των προ-μειωτικών σπερματοκυττάρων ήταν σιγημένοι (Εικ. 27C). Στην περίπτωση του αρνητικού μάρτυρα με το μη miRNA-εξαρτώμενο EGFP μετάγραφο, τα επίπεδα έκφρασης παρέμειναν σε υψηλά επίπεδα σε αμφοτέρους τους αγρίου τύπου και *sa¹* όρχεις (Εικ. 27D).

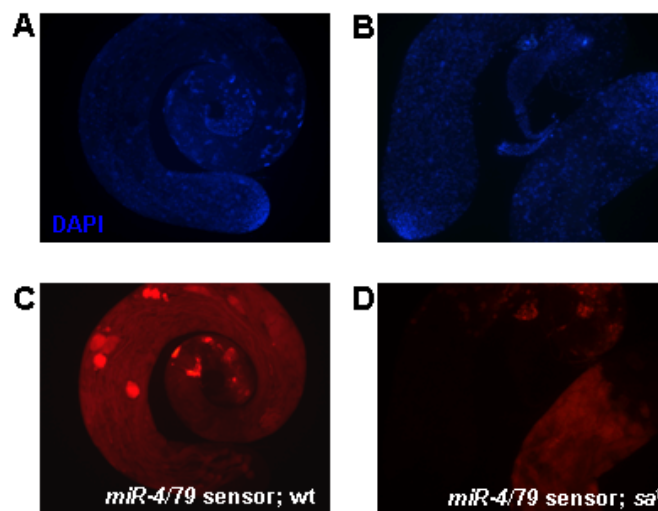


Εικόνα 27. Το γονίδιο *sa* είναι απαραίτητο για την αναίρεση της *miR-13*-εξαρτώμενης σίγησης στα σπερματοκύτταρα.

Όρχεις από τις σειρές του *miR-13*-αισθητήρα (A,C) και του P element 3'UTR αρνητικού μάρτυρα (B,D). Στο γονότυπο *sa¹* παράγονται όλοι οι πρώιμοι κυτταρικοί τύποι μέχρι το στάδιο των πρωτοταγών σπερματοκυττάρων. (A,B) Τα πρωτοταγή σπερματοκύτταρα είναι ο κυρίαρχος κυτταρικός τύπος στους όρχεις του γονοτύπου *sa¹*. (C) Η σειρά *miR-13*-αισθητήρας αδυνατεί να επαναφέρει την έκφραση της EGFP στα πιο ώριμα σπερματοκύτταρα απουσία της Sa. (D) Στο μη miRNA-εξαρτώμενο μετάγραφο τα επίπεδα της EGFP παραμένουν υψηλά σε όλα τα κύτταρα και στους δύο γονοτύπους.

Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και με τον «κόκκινο» αισθητήρα που αναγνωρίζει την δράση των *miR-4/79*. Όλα τα γαμετικά κύτταρα στην RFP σειρά του

miR-4/79-αισθητήρα ήταν σιγημένα στον *sa¹* γονότυπο (Εικ. 28D). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ορισμένες περιοχές έντονου φθορισμού στις RFP σειρές αντιστοιχούν σε συσσωματώματα της ίδιας της RFP και δε λήφθηκαν υπόψη στην ανάλυση. Επίσης εξετάστηκαν και ολόκληρες προνύμφες τρίτου σταδίου φορείς των αισθητήρων *miR-13* και *miR-4/79* σε γενετικό περιβάλλον αγρίου τύπου και *sa¹*. Ομοίως ο φθορισμός των *sa¹* όρχεων ήταν πάντα χαμηλότερος απ' ό τι στην κατάσταση αγρίου τύπου και στις δυο κατηγορίες αισθητήρων (Εικ. 29).

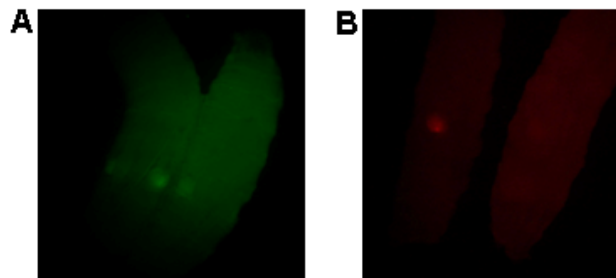


Εικόνα 28. Το γονίδιο *sa* είναι απαραίτητο για την αναίρεση της *miR-4/79*-εξαρτώμενης σίγησης στα σπερματοκύτταρα.

Όρχεις από την σειρά του *miR-4/79*-αισθητήρα (A-D). (A,B) Στον αγρίου τύπου όρχι εντοπίζονται όλοι οι κυτταρικοί τύποι μέχρι τα ώριμα σπέρματα (A) ενώ στον *sa¹* γονότυπο η σπερματογένεση σταματά στο στάδιο των σπερματοκυττάρων που γίνεται ο κυρίαρχος κυτταρικός τύπος (B). (C) Η σίγηση της RFP από τα *miR-4/79* ξεκινά στα πρώιμα γαμετικά κύτταρα στο άκρο του αγρίου τύπου όρχι και αναιρείται κατά την ωρίμανση των σπερματοκυττάρων. (D) Στον φαινότυπο *sa¹* δεν παρατηρείται η αναίρεση της σίγησης. Τα επίπεδα έκφρασης της RFP είναι μηδενικά εκτός ορισμένων περιπτώσεων ανώμαλης συσσώρευσης χρωστικής. Στα δεξιά φαίνεται το άκρο ενός όρχι από αγρίου τύπου αισθητήρα.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε *in situ* υβριδοποίηση για την ανίχνευση του EGFP mRNA σε όρχεις των σειρών *miR-13*-αισθητήρα αγρίου τύπου και *sa¹*. Σε αγρίου τύπου περιβάλλον (*sa⁺*) δεν εντοπίστηκε καθόλου σήμα στο άκρο του όρχι

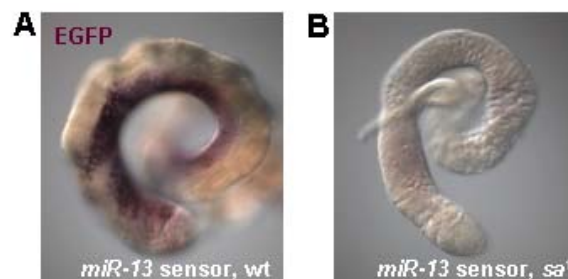
υποδεικνύοντας ότι η συγκεκριμένη miRNA ρύθμιση καταλήγει σε αποικοδόμηση του mRNA. Αντίθετα τα μετάγραφα συσσωρεύτηκαν σε μεγάλες ποσότητες στην εσωτερική καμπύλη του όρχι όπως συμβαίνει συνήθως με το μεταγραφικό πρόγραμμα της σπερματογένεσης (Εικ. 30Α). Στην περίπτωση των *sa*¹ αισθητήρων ανιχνεύτηκε μηδενικό ως ελάχιστο σήμα (Εικ. 30Β).



Εικόνα 29. Οι προνυμφικοί όρχεις εμφανίζονται περισσότερο σιγημένοι απουσία της Sa. Προνύμφες τρίτου σταδίου από τα δύο είδη αισθητήρων, για το *miR-13* (A) και τα *miR-4/79* (B). Αριστερά προβάλλεται το αγρίου τύπου στέλεχος και δεξιά του γονοτύπου *sa*¹. Τα επίπεδα φθορισμού του ανταποκριτή στους όρχεις και των δύο σειρών είναι χαμηλότερα στο γονότυπο *sa*¹.

Από όλα τα παραπάνω φαίνεται ότι το *sa*, αντίθετα με το *aly* είναι απαραίτητο για την έκφραση τουλάχιστον των τεχνητών miRNA-εξαρτώμενων μεταγράφων ενώ δεν χρειάζεται σε μετάγραφα που δεν υπόκεινται σε miRNA-έλεγχο. Το *sa* ανήκει στην *can*-τάξη των meiotic arrest γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν ορχεο-ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Συμμετέχουν στην ενεργοποίηση κοινών μεταγραφικών στόχων χωρίς να είναι λειτουργικά ανταλλάξιμα και εκφράζονται έντονα στα πρώτα στάδια ωρίμανσης των σπερματοκυττάρων (Lin et al., 1996; Hiller et al., 2004). Στα μεταλλάγματά τους οι μεταγραφικοί τους στόχοι παρουσιάζουν εξασθενημένα επίπεδα έκφρασης ή εμμέσως κάποια μετάγραφα όπως το *bol* και του *twe* αδυνατούν να μεταφραστούν (White-Cooper et al., 1998; White-Cooper, 2009). Τα παραπάνω δεδομένα επιτρέπουν την επινόηση ενός μοντέλου όπου το *sa* και ενδεχομένως και τα υπόλοιπα μέλη της *can*-τάξης συμβάλλουν στην μεταγραφή ενός άγνωστου ακόμα

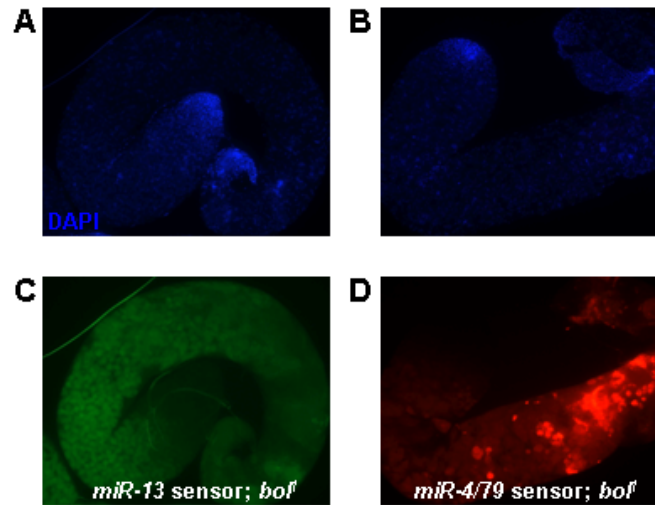
παράγοντα που εκφράζεται στα ωριμάζοντα σπερματοκύτταρα και αναχαιτίζει την δράση των miRNA. Συνεπώς σε ένα *sa*¹ περιβάλλον τα miRNA δρουν ελεύθερα προς τους ενδογενείς στόχους τους. Έτσι εκτός από την Polycomb ή Trithorax διαμεσολαβούμενη οδό ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης ενδεχομένως τα *cap*-γονίδια να ελέγχουν έμμεσα την μετάφραση ή τη σταθερότητα των στόχων τους μέσω των miRNA. Η επιβεβαίωση ενός τέτοιου μοντέλου απαιτεί την απόδειξη ότι ορισμένα Sa-εξαρτώμενα γονίδια ρυθμίζονται από miRNA και αντίθετα.



Εικόνα 30. Η *miR-13*-εξαρτώμενη καταστολή της EGFP οδηγεί σε αποικοδόμηση του mRNA. *In situ* ανίχνευση του EGFP μεταγράφου σε όρχεις από την σειρά του *miR-13*-αισθητήρα, σε γενετικό περιβάλλον αγρίου τύπου και *sa*¹. (A) Στην κατάσταση αγρίου τύπου το EGFP mRNA απουσιάζει πλήρως από το άκρο του όρχι και παράγεται έντονα στην περιοχή των σπερματοκυττάρων. (B) Στο γονότυπο *sa*¹ ανιχνεύεται ελάχιστο σήμα.

Έπειτα έγινε έλεγχος της συμπεριφοράς των αισθητήρων σε γενετικό περιβάλλον του μεταλλάγματος για το γονίδιο *bol*. Το προϊόν του *bol* είναι μια RNA-δεσμευόμενη πρωτεΐνη απαραίτητη για την μετάφραση του *twe* (Maines and Wasserman, 1999). Η μεταγραφή του *bol* mRNA είναι Aly-εξαρτώμενη, ενώ η μετάφρασή του απαιτεί την Sa (White-Cooper et al., 1998). Στο μετάλλαγμα *bol*¹ τα σπερματοκύτταρα σταματούν την ωρίμανση σε ένα υποστάδιο μεταγενέστερο των *aly* και *sa* νωρίτερα όμως από την είσοδο τους στην μείωση ως αποτέλεσμα της έλλειψης της πρωτεΐνης Twe. Οι αισθητήρες για τα *miR-13* και *miR-4/79* συνδυασμένοι με το μετάλλαγμα *bol*¹ έδειξαν φαινότυπο παρόμοιο με το *aly*¹. Η σίγηση ήταν ισχυρή στο

άκρο του όρχι υποχωρούσε όμως γρήγορα καθώς τα σπερματοκύτταρα ωρίμαζαν (Εικ. 31C,D).



Εικόνα 31. Το *bol* δεν συμβάλλει στην αναίρεση της σίγησης.

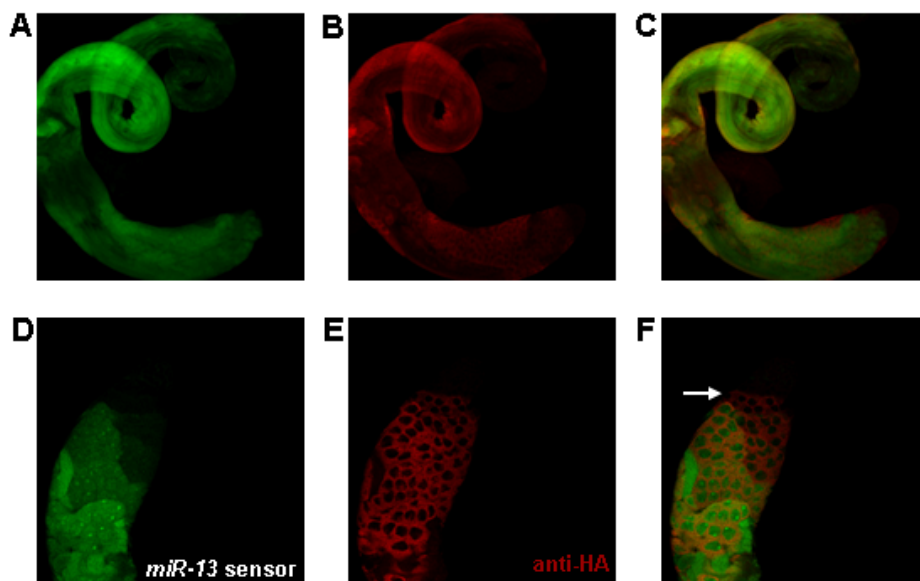
Όρχεις από τις δύο σειρές αισθητήρων, για το *miR-13* (A,C) και τα *miR-4/79* (B,D) γονοτύπου *bol¹*. (A,B) Στους όρχεις που απουσιάζει η Bol τα πρωτοταγή σπερματοκύτταρα σταματούν σε ένα υποστάδιο μετέπειτα από τα μεταλλάγματα *aly* και *sa*, δεν εισέρχονται όμως και σε αυτή την περίπτωση στη μείωση. (C,D) Στο γονότυπο *bol¹* οι σειρές αισθητήρες των miRNA παρουσιάζουν σίγηση στα πρώιμα γαμετικά κύτταρα, η οποία σταδιακά αναιρείται όπως στην περίπτωση του *aly¹*.

3.3.3 Το *ofs* προσπερνά την δράση των miRNA

Η χρήση των μεταλλαγμάτων των meiotic arrest γονιδίων διευκόλυνε τον εντοπισμό του σταδίου της σπερματογένεσης όπου αναχαιτίζεται η δράση των miRNA. Συγχρόνως αναδείχθηκε ο έμμεσος ρόλος του *sa* στον έλεγχο αυτής της διαδικασίας. Επόμενος στόχος της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η αναζήτηση παραγόντων που σχετίζονται πιο στενά με την miRNA-εξαρτώμενη ρύθμιση της μετάφρασης και πιθανώς συμμετέχουν στον καθορισμό των προτύπων ενεργότητας των miRNA στην αρσενική γαμετική σειρά..

Το γονίδιο *ofs*, εκφράζεται στην αρσενική γαμετική σειρά από το στάδιο των ωριμαζόντων σπερματοκυττάρων μέχρι και αυτό των επιμηκυνόμενων σπερματιδίων

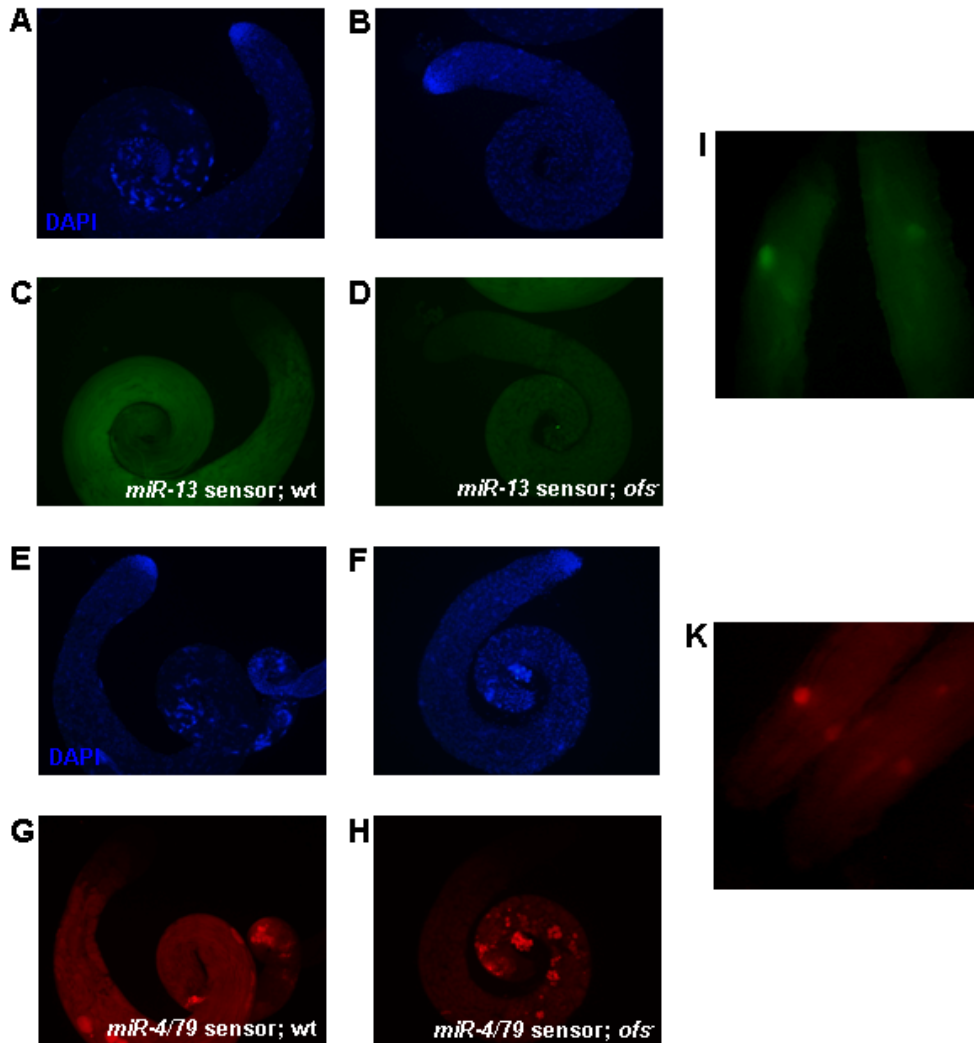
(Baker and Fuller, 2007; Franklin-Dumont et al., 2007). Το προϊόν του *ofs* είναι ο παράγοντας eIF4G2 που είναι παρα-ομόλογος με τον eIF4G και αποτελεί το κρίωμα δέσμευσης για τους παράγοντες eIF4E, eIF4A και PABP κατά την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης στα σωματικά κύτταρα (Tarun and Sachs, 1996). Το στέλεχος *w,HA:ofs* φέρει τρεις συνεχείς επιτόπους (αιμαγλουτινίνης) HA στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης σε ένα γονιδιωματικό κλώνο που περιλαμβάνει τον υποκινητή και όλη την κωδική αλληλουχία του γονιδίου (χορηγία της M. Fuller, Stanford University, School of Medicine, Stanford, USA). Το παραπάνω στέλεχος διασταυρώθηκε με τον *miR-13*-αισθητήρα και η ανάλυση στο συνεστιακό μικροσκόπιο έδειξε ότι τα πρότυπα έκφρασης του eIF4G2 με την EGFP συμπίπτουν σε μεγάλο βαθμό (Εικ. 32). Φάνηκε λοιπόν ότι ο eIF4G2 δραστηριοποιείται στα κύτταρα που παύουν να είναι ενεργά τα miRNA.



Εικόνα 32. Το πρότυπο αναίρεσης της σίγησης συμπίπτει με την έκφραση του eIF4G2.
(A,D) Η καταστολή της EGFP από την δράση του *miR-13* αναιρείται κατά το στάδιο των ωριμαζόντων σπερματοκυττάρων. **(B,E)** Ανοσο-ιστοχημική χρώση εντοπισμού του παράγοντα eIF4G2 μέσω των HA επιτόπων (κόκκινη χρώση). **(C,F)** Ο eIF4G2 ξεκινά να εκφράζεται λίγα κύτταρα πριν το βαθμιαίο σταμάτημα της σίγησης (F, βέλος). 20x και 40x μεγεθύνσεις αντίστοιχα.

Ακολούθησε συνδυασμός των σειρών αισθητήρες για τα *miR-13* και *miR-4/79* με το ετεροαλλημορφικό μετάλλαγμα *ofs*^{Z3-3283/BR21-37}. Η ανάλυση του φθορισμού στο μικροσκόπιο έδειξε σαφώς χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του ανταποκριτή σε όλα τα κύτταρα του όρχι (Εικ. 33D,H), υποδεικνύοντας ότι αυτά τα μετάγραφα δεν εκφράστηκαν επαρκώς απουσία του παράγοντα eIF4G2. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα επίπεδα φθορισμού των αισθητήρων στον γονότυπο *ofs*^{Z3-3283/BR21-37} είναι υψηλότερα από ότι στον *sa*¹ εξακολουθούν όμως να θεωρούνται στα όρια δράσης της σίγησης. Ενδεχομένως να συμπίπτουν με την ενδιάμεση κατάσταση σίγησης που παρατηρήθηκε στα testis squash παρασκευάσματα του αισθητήρα (Εικ. 25G). Αναλόγως με τους ενηλικούς όρχεις, οι προνυμφικοί όρχεις φθόριζαν λιγότερο όταν δοκιμάστηκαν σε γενετικό περιβάλλον *ofs*^{Z3-3283/BR21-37} (Εικ. 33I,K). Το παραπάνω αποτέλεσμα μαζί με το πρότυπο έκφρασης του eIF4G2 αποτελούν μια πρώτη γραμμή ένδειξης του ότι ο εν λόγω παράγοντας είναι απαραίτητος για την αναστολή της σίγησης miRNA-εξαρτώμενων μεταγράφων κατά το στάδιο των σπερματοκυττάρων.

Η ανασταλτική δράση των miRNA στην πρωτεϊνοσύνθεση στοχεύει συνολικά στην παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης του eIF4G με τον eIF4E και την PABP κατά την έναρξη της μετάφρασης (Eulalio et al., 2008; Iwasaki et al., 2009). Ο eIF4G2 παρουσιάζει μια εξειδίκευση στο είδος των μεταγράφων που προσεγγίζει χωρίς αυτή να έχει διαλευκανθεί μέχρι τώρα και επίσης στερείται των τυπικών (canonical) θέσεων δέσμευσης για τον eIF4E και την PABP (Baker and Fuller, 2007). Ενδεχομένως να συστήνει ένα εναλλακτικό τρόπο έναρξης της πρωτεϊνοσύνθεσης που επιτρέπει στα miRNA-ρυθμιζόμενα μετάγραφα να διαφεύγουν αυτό το σημείο ελέγχου και να μεταφράζονται επιτυχώς.

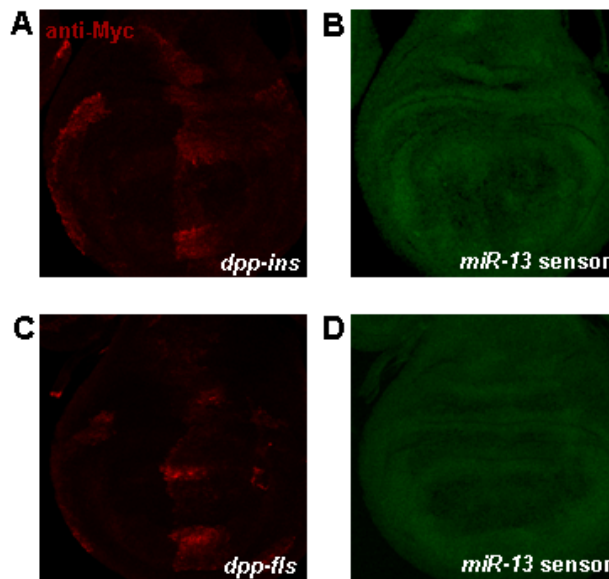


Εικόνα 33. Το *ofs* προσπερνά την δράση των miRNA

Όρχεις από τις δύο σειρές αισθητήρων, για το *miR-13* (A-D) και τα *miR-4/79* (E-H). Αριστερά παρουσιάζονται οι αγρίου τύπου όρχεις (wt) και δεξιά του γονοτύπου *ofs*^{Z3-3283/BR21-37}. Απουσία του παράγοντα eIF4G2 οι διαδικασίες της μείωσης και της διαφοροποίησης διαταράσσονται. (A,B,E,F) Στους αγρίου τύπου όρχεις εντοπίζονται όλοι οι κυτταρικοί τύποι μέχρι τα ώριμα σπέρματα (A,E) ενώ στον γονότυπο *ofs*^{Z3-3283/BR21-37} συσσωρεύονται πρωτοταγή σπερματοκύτταρα λίγα από τα οποία εξελίσσονται σε ανώμαλα σχηματισμένες σπερματίδες (B,F). (C,D,G,H) Η έκφραση των ανταποκριτών στους αγρίου τύπου όρχεις ξεκινά από το στάδιο των πρωτοταγών σπερματοκυττάρων (C,G) ενώ διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα σε όλους τους κυτταρικούς τύπους απουσία του παράγοντα eIF4G2 (D,H). (I,K) Προνύμφες τρίτου σταδίου από τα δύο είδη αισθητήρων, για το *miR-13* (I) και τα *miR-4/79* (K). Τα επίπεδα φθορισμού των ανταποκριτών στους αγρίου τύπου όρχεις (αριστερά) είναι ανώτερα από του γονοτύπου *ofs*^{Z3-3283/BR21-37} (δεξιά).

Εφόσον ο eIF4G2 κρίθηκε απαραίτητος για την μετάφραση miRNA-εξαρτώμενων μεταγράφων ερευνήθηκε η πιθανότητα να επαρκεί για την καταστολή

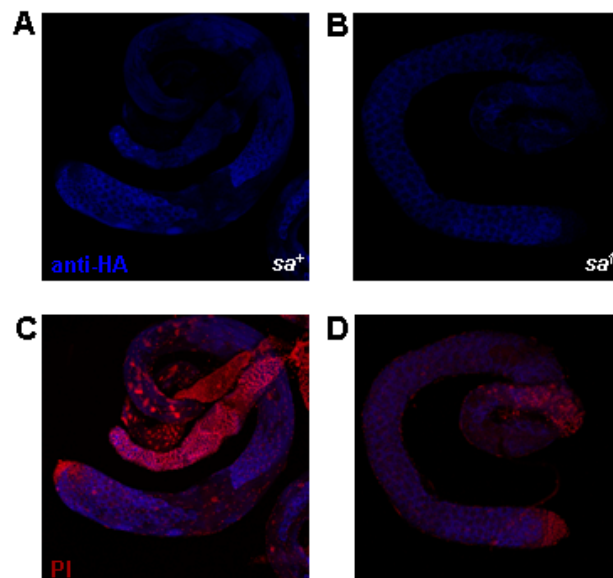
της σίγησης σε κυτταρικούς πληθυσμούς που δρα το *miR-13*. Για το σκοπό αυτό τα δύο εναλλακτικά μετάγραφα του *ofs* (*fls* και *ins*) συνδέθηκαν με έξι συνεχείς Myc επιτόπους στο 5' άκρο τους και υπερέκφραστηκαν από τον υποκινητή του *dpp* σε αναπτυξιακούς δίσκους θώρακα-φτερού με γονότυπο *miR-13*-αισθητήρα. Ακολούθησε ανάλυση στο συνεστιακό μικροσκόπιο όπου έδειξε ότι τα επίπεδα φθορισμού της EGFP δεν άλλαξαν στις περιοχές που υπερέκφραστηκε ο eIF4G2 και οι οποίες ήταν ορατές με την χρήση του anti-Myc αντισώματος (κόκκινη χρώση) (Εικ. 34B,D). Ενδεχομένως να πρέπει να χρησιμοποιηθεί ένας πιο ισχυρός υποκινητής προκειμένου να προκύψει μια ανιχνεύσιμη διαφορά στα επίπεδα σίγησης. Ωστόσο είναι πιθανό τα σωματικά κύτταρα να μην αποτελούν το κατάλληλο σύστημα δοκιμής γιατί στερούνται απαραίτητων συμπαραγόντων του eIF4G2.



Εικόνα 34. Η υπερέκφραση του *ofs* σε δίσκους θώρακα-φτερού δεν καταστέλλει τη σίγηση της EGFP.

Παραγωγή των δύο εναλλακτικών μεταγράφων του *ofs*, *ins* και *fls*, από τον υποκινητή του *dpp* σε δίσκους θώρακα-φτερού από την σειρά *miR-13*-αισθητήρα. (A,C) Η ανίχνευση της υπερέκφρασης των δύο ισομορφών του eIF4G2 γίνεται με τους επιτόπους Myc που φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο (κόκκινη χρώση). (B,D) Τα επίπεδα σίγησης δεν αλλάζουν στις περιοχές υπερέκφρασης του eIF4G2 σε σύγκριση με τις γειτονικές περιοχές.

Τα *sa* και *ofs* μοιράζονται ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά. Ξεκινούν την έκφρασή τους από τα ωριμάζοντα σπερματοκύτταρα και αναστέλλουν την σίγηση τουλάχιστον τεχνητών μεταγράφων που ρυθμίζονται από miRNA. Με δεδομένο ότι το *sa* ελέγχει την μεταγραφή πολλών γονιδίων εξετάστηκε το ενδεχόμενο να ενεργοποιεί το ίδιο το *ofs*. Η σειρά *w,HA:ofs* συνδυάστηκε γενετικά με το μετάλλαγμα *sa¹* και ελέγχθηκε η έκφραση του eIF4G2 μέσω του HA επιτόπου. Το αποτέλεσμα αυτής της υπόθεσης ήταν αρνητικό διότι εντοπίστηκε άφθονη HA-χρώση στο περιβάλλον *sa¹* (Εικ. 35B,D). Παρατηρείται λοιπόν ότι στον γονότυπο *sa¹* οι όρχεις παρουσιάζουν καθολική σίγηση (Εικ. 27C, Εικ 28D) παρόλο που ο eIF4G2 εκφράζεται φυσιολογικά (Εικ. 35B,D) και θεωρητικά θα έπρεπε να διευκολύνει την μετάφραση των miRNA-εξαρτώμενων ανταποκριτών. Βάση της επιστατικής δράση που ασκεί το *sa* στο *ofs* είναι πιθανό ο eIF4G2 να δρα μαζί με ένα Sa-εξαρτώμενο συμπράγοντα.

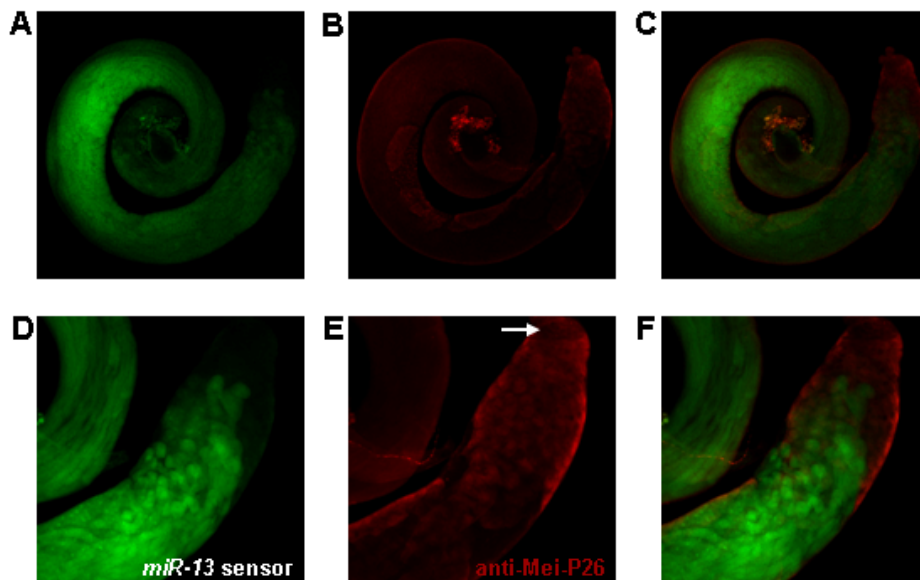


Εικόνα 35. Το *ofs* δεν αποτελεί μεταγραφικός στόχος του *sa*.

Όρχεις από τη σειρά σήμανσης του eIF4G2 με τον HA επίτοπο σε αγρίου τύπου (*sa⁺*) και *sa¹* γονοτύπους. (A,B) Ο eIF4G2 ανιχνεύεται από το στάδιο των σπερματοκυττάρων και έπειτα σε αμφότερα τα γενετικά περιβάλλοντα (μπλε χρώση). (C,D) Τα ακριβή όρια των όρχεων και τα χαρακτηριστικά του φαινοτύπου *sa¹* διακρίνονται με την χρώση PI των πυρήνων (κόκκινη χρώση).

3.3.4 Η miRNA ενεργότητα δεν επηρεάζεται από το *mei-P26*

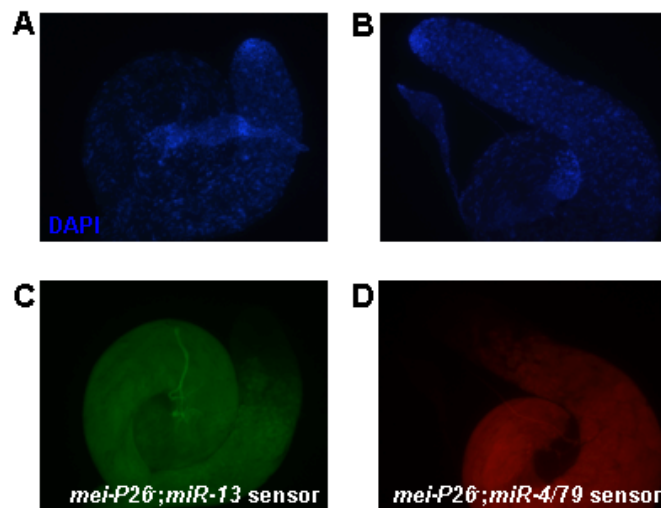
Η Meι-P26 εκφράζεται στους μιτωτικούς απογόνους των αρχέγονων γαμετικών κυττάρων της θηλυκής γαμετικής σειράς, αλληλεπιδρά με την Ago1 και χαμηλώνει τα επίπεδα έκφρασης σε πολλά miRNA (Neumuller et al., 2008). Ένα από μεταλλάγματά του, το *mei-P26^{msf1}* βρέθηκε να προκαλεί στειρότητα και στα δύο φύλα. Απουσία της Meι-P26, οι όρχεις παρουσιάζουν ανωμαλίες στην διαφοροποίηση της γαμετικής σειράς με αποτέλεσμα την παραγωγή ανώμαλα αναπτυγμένων σπερματιδών (Page et al., 2000).



Εικόνα 36. Η έκφραση της Meι-P26 δεν περιορίζεται στους μη σιγημένους τύπους κυττάρων. (A,D) Η καταστολή της EGFP από την δράση του *miR-13* αναιρείται κατά το στάδιο των ωριμαζόντων σπερματοκυττάρων. (B,E) Ανοσο-ιστοχημική χρώση εντοπισμού της στην αρσενική γαμετική σειρά (κόκκινη χρώση). Η Meι-P26 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των μιτωτικών κυττάρων (E, βέλος) και μετέπειτα συγκεντρώνεται στον πυρήνα των σπερματοκυττάρων ακολουθώντας όλα τα στάδια της μείωσης. (C,F) Τα πρότυπα έκφρασης EGFP και Meι-P26 δεν δείχνουν να συσχετίζονται χρονικά. 20x και 40x μεγεθύνσεις αντίστοιχα.

Με δεδομένη τη δράση της Meι-P26 ως καταστολέα του μονοπατιού των miRNA στη θηλυκή γαμετική σειρά, αναζητήθηκε το πρότυπο έκφρασης και ο βιολογικός ρόλος της Meι-P26 στα αρσενικά άτομα. Όρχεις του *miR-13*-αισθητήρα

υποβλήθηκαν σε χρώση με αντίσωμα για την εν λόγω πρωτεΐνη (χορηγία του J.A. Knoblich, Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Sciences, Vienna, Austria). Το αποτέλεσμα της χρώσης δεν έδωσε αρκετά σαφή εικόνα, ίσως λόγω των περιορισμών που συνοδεύουν συχνά τα πολυκλωνικά αντισώματα. Εντοπίστηκε σήμα στο κυτταρόπλασμα των μιτωτικών κυττάρων και μετέπειτα στον πυρήνα των πρωτοταγών και δευτεροταγών σπερματοκυττάρων (Εικ. 36B,E). Κατά συνέπεια το πρότυπο έκφρασης της Meι-P26 δεν παρείχε κάποια προφανή συσχέτιση με αυτό της EGFP. Εντούτοις το μετάλλαγμα *mei-P26^{mfs1}* διασταυρώθηκε με τις δύο σειρές των αισθητήρων. Τα πρότυπα σίγησης των ανταποκριτών δεν έδειξαν κάποιο στοιχείο αλλοίωσης απουσία της Meι-P26 (Εικ. 37C,D). Είναι πιθανό η Meι-P26 να εξυπηρετεί διαφορετικές λειτουργίες σε αρσενικά και θηλυκά άτομα με δεδομένο ότι διαφέρουν τα πρότυπα έκφρασής της στους ομόλογους κυτταρικούς πληθυσμούς όπως επίσης και ο φαινότυπος των μεταλλαγμάτων τους.



Εικόνα 37. Το μετάλλαγμα *mei-P26^{mfs1}* δεν φαίνεται να τροποποιεί τα πρότυπα δράσης των *miR-13* και *miR-4/79*.

Όρχεις από τις δύο σειρές αισθητήρων, για το *miR-13* (A,C) και τα *miR-4/79* (B,D) γονότυπου *mei-P26^{mfs1}*. (A,B) Στο γονότυπο *mei-P26^{mfs1}* όλοι οι κυτταρικοί τύποι είναι παρόντες εκτός των ώριμων σπερμάτων. (C,D) Οι σειρές αισθητήρες των miRNA παρουσιάζουν φυσιολογικό πρότυπο σίγησης των ανταποκριτών στο γονότυπο *mei-P26^{mfs1}*.

4 Συμπεράσματα

Η ανάλυση της έκφρασης της EGFP υπό τον μετα-μεταγραφικό έλεγχο διαφορετικών παραλλαγών του *CG10222*-3'UTR επιβεβαίωσε την αλληλεπίδραση μεταξύ των *CG10222* και *miR-13*. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε *in-vivo* σε διαγονιδιακές σειρές *Drosophila*, φορείς των κατασκευών αισθητήρων. Αξίζει να σημειωθεί ότι έγινε χρήση ολόκληρης της 3'UTR αλληλουχίας αντί μόνο της υποτιθέμενης θέσης πρόσδεσης για το *miR-13*. Επίσης η ανάλυση της έκφρασης του αισθητήρα δοκιμάστηκε απέναντι σε φυσικά επίπεδα έκφρασης των miRNA όπως επίσης και σε περιβάλλον απώλειας αυτών.

Οι κατασκευές αισθητήρες συντέλεσαν στην ανακάλυψη ενός γενικού προτύπου ενεργότητας που μοιράζονται ενδεχομένως όλα τα miRNA στην αρσενική γαμετική σειρά. Τα κύτταρα του κόμβου, τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα και οι μιτωτικοί τους απόγονοι παρουσιάζουν υψηλή miRNA ενεργότητα. Κατά το στάδιο της ωρίμανσης των πρωτοταγών σπερματοκυττάρων η εν λόγω ενεργότητα σταδιακά ακυρώνεται. Πρόσφατες εργασίες έδειξαν ότι βασικοί παράγοντες της βιογένεσης και δράσης των miRNA είναι απαραίτητοι για τον έλεγχο της παραγωγής και της διατήρησης των αρχέγονων γαμετικών κυττάρων (Jin and Xie, 2007; Yang et al., 2007; Yu et al., 2009). Βάσει της παρούσας μελέτης η δράση των miRNA δεν περιορίζεται στο στάδιο των αρχέγονων κυττάρων αλλά εκτείνεται σε όλους τους θυγατρικούς κυτταρικούς τύπους μέχρι και πριν την μείωση. Συνεπώς αναμένεται τα miRNA να εμπλέκονται και σε μετέπειτα στάδια συντονισμού της σπερματογένεσης.

Το στάδιο των πρωτοταγών σπερματοκυττάρων χαρακτηρίζεται από έντονη παραγωγή mRNA που ολοκληρώνεται πριν την είσοδο στη μείωση. Στον ίδιο κανόνα φαίνεται να υπακούουν και τα γονίδια των miRNA με συνέπεια το πρότυπο έκφρασής τους να εκτείνεται και σε πληθυσμούς πρωτοταγών σπερματοκυττάρων που δεν

παρουσιάζουν πλέον miRNA ενεργότητα. Το mRNA του miRNA-εξαρτώμενου μεταγράφου της EGFP ανιχνεύεται σε μεγάλες ποσότητες στα πρωτοταγή σπερματοκύτταρα ακολουθώντας τον έντονο μεταγραφικό ρυθμό αυτού του σταδίου. Η ασυμφωνία στα πρότυπα έκφρασης και δράσης των miRNA θα μπορούσε να οφείλεται στην μεταγραφική υπερ-ενεργοποίηση της EGFP σε επίπεδα που ξεπερνούν την κατασταλτική ισχύ των miRNA. Μια εναλλακτική ερμηνεία του φαινομένου προβλέπει την ύπαρξη ενός ενεργού μηχανισμού αναχαίτισης της miRNA ενεργότητας σε κύτταρα που προετοιμάζονται να εισέλθουν στην μείωση. Εξετάζοντας αυτήν την υπόθεση ελέγχθηκε το πρότυπο σίγησης των αισθητήρων σε μεταλλάγματα γονιδίων που δραστηριοποιούνται φυσιολογικά στο στάδιο των πρωτοταγών σπερματοκυττάρων. Η έρευνα αυτή απέδειξε ότι οι παράγοντες Sa και eIF4G2 έχουν καθοριστικό ρόλο στην παύση της δράσης των miRNA. Επόμενο βήμα αυτής της μελέτης θα είναι η εύρεση ενδογενών γονιδίων που στοχεύονται από miRNA και ταυτόχρονα ανήκουν στο φάσμα επιρροής των Sa και eIF4G2.

Εκτός των miRNA στην αρσενική γαμετική σειρά παράγονται και δρουν τα piRNA τα οποία ανιχνεύονται σε μεγάλες ποσότητες. Οι μέχρι τώρα μελέτες συνδέουν τα piRNA με την σίγηση μεταθετών στοιχείων και γονιδιακών τόπων (Schmidt et al., 1999; Brennecke et al., 2007; Malone et al., 2009). Ωστόσο πολλά βασικά στοιχεία για τον τρόπο παραγωγής και δράσης τους αναμένεται ακόμα να αποσαφηνιστούν. Είναι πιθανό το μονοπάτι των piRNA να διασταυρώνεται με αυτό των miRNA μέσω του ανταγωνισμού για κοινούς τελεστές δράσης, πέρα από τις πρωτεΐνες των τάξεων Ago και Piwi που παρουσιάζουν εξειδίκευση απέναντι στους δύο τύπους σίγησης (Okamura et al., 2004). Έτσι η απουσία δράσης των miRNA κατά το στάδιο των πρωτοταγών σπερματοκυττάρων θα μπορούσε οφείλεται στην υπερ-δραστηριοποίηση του μονοπατιού των piRNA.

Τα miRNA σταματούν να λειτουργούν και ακολούθως παύουν να παράγονται καθώς τα πρωτοταγή σπερματοκύτταρα προετοιμάζουν την είσοδό τους στην μείωση. Εύλογα τίθεται το ερώτημα της βιολογικής σημασίας αυτού του αποκλεισμού. Μια εκδοχή είναι τα miRNA να αποσυντονίζουν το μετα-μειωτικό πρόγραμμα διαφοροποίησης των σπερματιδών, καθώς στο στάδιο αυτό μεταφράζονται τα περισσότερα από τα mRNA που παρήχθησαν πριν την μείωση (Schafer et al., 1995). Η έκτοπη παραγωγή των miRNA σε μετα-μειωτικούς κυτταρικούς πληθυσμούς θα μπορούσε να βοηθήσει στην κατανόηση του λόγου για τον οποίο τα miRNA απουσιάζουν φυσιολογικά από αυτά τα κύτταρα. Για τον σκοπό αυτό θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν υποκινητές από γονίδια των πρωταμινών τα οποία αποτελούν μέχρι τώρα το μόνο παράδειγμα μετα-μειωτικής μεταγραφής (Barreau et al., 2008).

5 Βιβλιογραφία

- Aboobaker, A. A., Tomancak, P., Patel, N., Rubin, G. M. and Lai, E. C.** (2005). *Drosophila* microRNAs exhibit diverse spatial expression patterns during embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18017-18022.
- Alphay, L., Jimenez, J., White-Cooper, H., Dawson, I., Nurse, P. and Glover, D. M.** (1992). *twine*, a *cdc25* homolog that functions in the male and female germline of *Drosophila*. *Cell* **69**, 977-988.
- Aravin, A. 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.
- Baker, C. C. and Fuller, M. T.** (2007). Translational control of meiotic cell cycle progression and spermatid differentiation in male germ cells by a novel eIF4G homolog. *Development (Cambridge, England)* **134**, 2863-2869.
- Barreau, C., Benson, E., Gudmannsdottir, E., Newton, F. and White-Cooper, H.** (2008). Post-meiotic transcription in *Drosophila* testes. *Development (Cambridge, England)* **135**, 1897-1902.
- Bartel, D. P.** (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-297.
- Bate, M. and Martinez-Arias, A.** (1993). The Development of *Drosophila melanogaster*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Baulcombe, D.** (2004). RNA silencing in plants. *Nature* **431**, 356-363.
- Beall, E. L., Lewis, P. W., Bell, M., Rocha, M., Jones, D. L. and Botchan, M. R.** (2007). Discovery of tMAC: a *Drosophila* testis-specific meiotic arrest complex paralogous to Myb-Muv B. *Genes & development* **21**, 904-919.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. and Hannon, G. J.** (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-366.
- Blumer, N., Schreiter, K., Hempel, L., Santel, A., Hollmann, M., Schafer, M. A. and Renkawitz-Pohl, R.** (2002). A new translational repression element and unusual transcriptional control regulate expression of *don juan* during *Drosophila* spermatogenesis. *Mech Dev* **110**, 97-112.
- 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 (New York, N.Y)* **10**, 185-191.
- Boswell, R. E. and Mahowald, A. P.** (1985). *tudor*, a gene required for assembly of the germ plasm in *Drosophila melanogaster*. *Cell* **43**, 97-104.
- 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 Acids Res* **31**, 4973-4980.
- Brand, A. H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)* **118**, 401-415.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B. and Cohen, S. M.** (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS biology* **3**, e85.
- Brennecke, J., Hipfner, D. R., Stark, A., Russell, 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.

- Brennecke, J., Malone, C. D., Aravin, A. A., Sachidanandam, R., Stark, A. and Hannon, G. J.** (2008). An epigenetic role for maternally inherited piRNAs in transposon silencing. *Science* **322**, 1387-1392.
- Brennecke, J., Aravin, A. A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R. and Hannon, G. J.** (2007). Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* **128**, 1089-1103.
- Bushati, N., Stark, A., Brennecke, J. and Cohen, S. M.** (2008). Temporal reciprocity of miRNAs and their targets during the maternal-to-zygotic transition in *Drosophila*. *Curr Biol* **18**, 501-506.
- Cai, X., Hagedorn, C. H. and Cullen, B. R.** (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA (New York, N.Y)* **10**, 1957-1966.
- Carmell, M. A., Xuan, Z., Zhang, M. Q. and Hannon, G. J.** (2002). The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes & development* **16**, 2733-2742.
- Chen, X., Hiller, M., Sancak, Y. and Fuller, M. T.** (2005). Tissue-specific TAFs counteract Polycomb to turn on terminal differentiation. *Science* **310**, 869-872.
- Chou, Y. T., Tam, B., Linay, F. and Lai, E. C.** (2007). Transgenic inhibitors of RNA interference in *Drosophila*. *Fly (Austin)* **1**, 311-316.
- Czech, B., Malone, C. D., Zhou, R., Stark, A., Schlingeheyde, C., Dus, M., Perrimon, N., Kellis, M., Wohlschlegel, J. A., Sachidanandam, R. et al.** (2008). An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature* **453**, 798-802.
- Dorus, S., Busby, S. A., Gerike, U., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. and Karr, T. L.** (2006). Genomic and functional evolution of the *Drosophila melanogaster* sperm proteome. *Nat Genet* **38**, 1440-1445.
- Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. and Tuschl, T.** (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J* **20**, 6877-6888.
- Eulalio, A., Huntzinger, E. and Izaurralde, E.** (2008). Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* **132**, 9-14.
- Flynt, A., Liu, N., Martin, R. and Lai, E. C.** (2009). Dicing of viral replication intermediates during silencing of latent *Drosophila* viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 5270-5275.
- Forbes, A. and Lehmann, R.** (1998). Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of *Drosophila* germline stem cells. *Development (Cambridge, England)* **125**, 679-690.
- Forstemann, K., Horwich, M. D., Wee, L., Tomari, Y. and Zamore, P. D.** (2007). *Drosophila* microRNAs are sorted into functionally distinct argonaute complexes after production by Dicer-1. *Cell* **130**, 287-297.
- Forstemann, K., Tomari, Y., Du, T., Vagin, V. V., Denli, A. M., Bratu, D. P., Klattenhoff, C., Theurkauf, W. E. and Zamore, P. D.** (2005). Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS biology* **3**, e236.
- Fortier, E. and Belote, J. M.** (2000). Temperature-dependent gene silencing by an expressed inverted repeat in *Drosophila*. *Genesis* **26**, 240-244.
- Franklin-Dumont, T. M., Chatterjee, C., Wasserman, S. A. and Dinardo, S.** (2007). A novel eIF4G homolog, Off-schedule, couples translational control to meiosis and differentiation in *Drosophila* spermatocytes. *Development (Cambridge, England)* **134**, 2851-2861.

- Fuller, M. T.** (1998). Genetic control of cell proliferation and differentiation in *Drosophila* spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* **9**, 433-444.
- Giot, L., Bader, J. S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y. L., Ooi, C. E., Godwin, B., Vitols, E. et al.** (2003). A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* **302**, 1727-1736.
- Gonczy, P., Matunis, E. and DiNardo, S.** (1997). *bag-of-marbles* and *benign gonial cell neoplasm* act in the germline to restrict proliferation during *Drosophila* spermatogenesis. *Development (Cambridge, England)* **124**, 4361-4371.
- Gregory, S. L., Shandala, T., O'Keefe, L., Jones, L., Murray, M. J. and Saint, R.** (2007). A *Drosophila* overexpression screen for modifiers of Rho signalling in cytokinesis. *Fly (Austin)* **1**, 13-22.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., van Dongen, S. and Enright, A. J.** (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* **36**, D154-158.
- Grimson, A., Farh, K. K., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P. and Bartel, D. P.** (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* **27**, 91-105.
- Grosshans, H. and Filipowicz, W.** (2008). Proteomics joins the search for microRNA targets. *Cell* **134**, 560-562.
- Gunawardane, L. S., Saito, K., Nishida, K. M., Miyoshi, K., Kawamura, Y., Nagami, T., Siomi, H. and Siomi, M. C.** (2007). A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science* **315**, 1587-1590.
- Hamilton, A. J. and Baulcombe, D. C.** (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**, 950-952.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Kim, Y. K., Jin, H. and Kim, V. N.** (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & development* **18**, 3016-3027.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Nam, J. W., Heo, I., Rhee, J. K., Sohn, S. Y., Cho, Y., Zhang, B. T. and Kim, V. N.** (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* **125**, 887-901.
- Harrison, D. A., McCoon, P. E., Binari, R., Gilman, M. and Perrimon, N.** (1998). *Drosophila unpaired* encodes a secreted protein that activates the JAK signaling pathway. *Genes & development* **12**, 3252-3263.
- Hatfield, S. D., Shcherbata, H. R., Fischer, K. A., Nakahara, K., Carthew, R. W. and Ruohola-Baker, H.** (2005). Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. *Nature* **435**, 974-978.
- Hiller, M., Chen, X., Pringle, M. J., Suchorolski, M., Sancak, Y., Viswanathan, S., Bolival, B., Lin, T. Y., Marino, S. and Fuller, M. T.** (2004). Testis-specific TAF homologs collaborate to control a tissue-specific transcription program. *Development (Cambridge, England)* **131**, 5297-5308.
- Hiller, M. A., Lin, T. Y., Wood, C. and Fuller, M. T.** (2001). Developmental regulation of transcription by a tissue-specific TAF homolog. *Genes & development* **15**, 1021-1030.
- Hime, G. R., Brill, J. A. and Fuller, M. T.** (1996). Assembly of ring canals in the male germ line from structural components of the contractile ring. *J Cell Sci* **109** (Pt 12), 2779-2788.
- Horabin, J. I. and Schedl, P.** (1993). Sex-lethal autoregulation requires multiple cis-acting elements upstream and downstream of the male exon and appears to depend largely on controlling the use of the male exon 5' splice site. *Mol Cell Biol* **13**, 7734-7746.

- Horwich, M. D., Li, C., Matranga, C., Vagin, V., Farley, G., Wang, P. and Zamore, P. D.** (2007). The *Drosophila* RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC. *Curr Biol* **17**, 1265-1272.
- Hsu, R. J., Yang, H. J. and Tsai, H. J.** (2009). Labeled microRNA pull-down assay system: an experimental approach for high-throughput identification of microRNA-target mRNAs. *Nucleic Acids Res* **37**, e77.
- Hwa, J. J., Hiller, M. A., Fuller, M. T. and Santel, A.** (2002). Differential expression of the *Drosophila* mitofusin genes *fuzzy onions (fzo)* and *dmfn*. *Mech Dev* **116**, 213-216.
- Iwasaki, S., Kawamata, T. and Tomari, Y.** (2009). *Drosophila argonaute1* and *argonaute2* employ distinct mechanisms for translational repression. *Mol Cell* **34**, 58-67.
- Jayaramaiah Raja, S. and Renkawitz-Pohl, R.** (2005). Replacement by *Drosophila melanogaster* protamines and Mst77F of histones during chromatin condensation in late spermatids and role of Sesame in the removal of these proteins from the male pronucleus. *Mol Cell Biol* **25**, 6165-6177.
- Jiang, J. and White-Cooper, H.** (2003). Transcriptional activation in *Drosophila* spermatogenesis involves the mutually dependent function of *aly* and a novel meiotic arrest gene *cookie monster*. *Development (Cambridge, England)* **130**, 563-573.
- Jiang, J., Benson, E., Bausek, N., Doggett, K. and White-Cooper, H.** (2007). *tombola*, a tesmin/TSO1-family protein, regulates transcriptional activation in the *Drosophila* male germline and physically interacts with Always early. *Development (Cambridge, England)* **134**, 1549-1559.
- Jin, Z. and Xie, T.** (2007). Dcr-1 maintains *Drosophila* ovarian stem cells. *Curr Biol* **17**, 539-544.
- Kai, T. and Spradling, A.** (2004). Differentiating germ cells can revert into functional stem cells in *Drosophila melanogaster* ovaries. *Nature* **428**, 564-569.
- Kalantidis, K., Tsagris, M. and Tabler, M.** (2006). Spontaneous short-range silencing of a GFP transgene in *Nicotiana benthamiana* is possibly mediated by small quantities of siRNA that do not trigger systemic silencing. *Plant J* **45**, 1006-1016.
- Kalantidis, K., Psaradakis, S., Tabler, M. and Tsagris, M.** (2002). The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 826-833.
- Kawamura, Y., Saito, K., Kin, T., Ono, Y., Asai, K., Sunohara, T., Okada, T. N., Siomi, M. C. and Siomi, H.** (2008). *Drosophila* endogenous small RNAs bind to Argonaute 2 in somatic cells. *Nature* **453**, 793-797.
- Kawase, E., Wong, M. D., Ding, B. C. and Xie, T.** (2004). Gbb/Bmp signaling is essential for maintaining germline stem cells and for repressing *bam* transcription in the *Drosophila* testis. *Development (Cambridge, England)* **131**, 1365-1375.
- Kedde, M. and Agami, R.** (2008). Interplay between microRNAs and RNA-binding proteins determines developmental processes. *Cell Cycle* **7**, 899-903.
- Khvorova, A., Reynolds, A. and Jayasena, S. D.** (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115**, 209-216.
- Kiger, A. A., Jones, D. L., Schulz, C., Rogers, M. B. and Fuller, M. T.** (2001). Stem cell self-renewal specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue. *Science* **294**, 2542-2545.

- Kirino, Y., Kim, N., de Planell-Sagner, M., Khandros, E., Chiorean, S., Klein, P. S., Rigoutsos, I., Jongens, T. A. and Mourelatos, Z. (2009). Arginine methylation of Piwi proteins catalysed by dPRMT5 is required for Ago3 and Aub stability. *Nat Cell Biol* **11**, 652-658.
- Koscianska, E., Baev, V., Skreka, K., Oikonomaki, K., Rusinov, V., Tabler, M. and Kalantidis, K. (2007). Prediction and preliminary validation of oncogene regulation by miRNAs. *BMC Mol Biol* **8**, 79.
- 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. and Posakony, J. W. (1997). The Bearded box, a novel 3' UTR sequence motif, mediates negative post-transcriptional regulation of *Bearded* and *Enhancer of split* Complex gene expression. *Development (Cambridge, England)* **124**, 4847-4856.
- 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. *Development (Cambridge, England)* **125**, 4077-4088.
- Lai, E. C., Tam, B. and Rubin, G. M. (2005). Pervasive regulation of *Drosophila* Notch target genes by GY-box-, Brd-box-, and K-box-class microRNAs. *Genes & development* **19**, 1067-1080.
- Lai, E. C., Tomancak, P., Williams, R. W. and Rubin, G. M. (2003). Computational identification of *Drosophila* microRNA genes. *Genome Biol* **4**, R42.
- Lane, M. E., Sauer, K., Wallace, K., Jan, Y. N., Lehner, C. F. and Vaessin, H. (1996). Dacapo, a cyclin-dependent kinase inhibitor, stops cell proliferation during *Drosophila* development. *Cell* **87**, 1225-1235.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S. et al. (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 pathways. *Cell* **117**, 69-81.
- Leviton, M. W., Lai, E. C. and Posakony, J. W. (1997). The *Drosophila* gene *Bearded* encodes a novel small protein and shares 3' UTR sequence motifs with multiple *Enhancer of split* complex genes. *Development (Cambridge, England)* **124**, 4039-4051.
- Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P. and Burge, C. B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* **115**, 787-798.
- Li, X., Cassidy, J. J., Reinke, C. A., Fischboeck, S. and Carthew, R. W. (2009). A microRNA imparts robustness against environmental fluctuation during development. *Cell* **137**, 273-282.
- Li, Y., Wang, F., Lee, J. A. and Gao, F. B. (2006). *MicroRNA-9a* ensures the precise specification of sensory organ precursors in *Drosophila*. *Genes & development* **20**, 2793-2805.
- Li, Y., Minor, N. T., Park, J. K., McKearin, D. M. and Maines, J. Z. (2009). Bam and Bgcn antagonize Nanos-dependent germ-line stem cell maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 9304-9309.

- Lim, L. P., Glasner, M. E., Yekta, S., Burge, C. B. and Bartel, D. P.** (2003). Vertebrate microRNA genes. *Science* **299**, 1540.
- Lin, H. and Spradling, A. C.** (1997). A novel group of *pumilio* mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development (Cambridge, England)* **124**, 2463-2476.
- Lin, T. Y., Viswanathan, S., Wood, C., Wilson, P. G., Wolf, N. and Fuller, M. T.** (1996). Coordinate developmental control of the meiotic cell cycle and spermatid differentiation in *Drosophila* males. *Development (Cambridge, England)* **122**, 1331-1341.
- Lloyd, V. K., Sinclair, D. A., Wennberg, R., Warner, T. S., Honda, B. M. and Grigliatti, T. A.** (1999). A genetic and molecular characterization of the *garnet* gene of *Drosophila melanogaster*. *Genome* **42**, 1183-1193.
- Maines, J. Z. and Wasserman, S. A.** (1999). Post-transcriptional regulation of the meiotic Cdc25 protein Twine by the Dazl orthologue Boule. *Nat Cell Biol* **1**, 171-174.
- Malone, C. D., Brennecke, J., Dus, M., Stark, A., McCombie, W. R., Sachidanandam, R. and Hannon, G. J.** (2009). Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary. *Cell* **137**, 522-535.
- Margis, R., Fusaro, A. F., Smith, N. A., Curtin, S. J., Watson, J. M., Finnegan, E. J. and Waterhouse, P. M.** (2006). The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS letters* **580**, 2442-2450.
- Matranga, C. and Zamore, P. D.** (2007). Small silencing RNAs. *Curr Biol* **17**, R789-793.
- Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D. P. and Zamore, P. D.** (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* **123**, 607-620.
- Meyer, W. J., Schreiber, S., Guo, Y., Volkmann, T., Welte, M. A. and Muller, H. A.** (2006). Overlapping functions of Argonaute proteins in patterning and morphogenesis of *Drosophila* embryos. *PLoS Genet* **2**, e134.
- Michiels, F., Gasch, A., Kaltschmidt, B. and Renkawitz-Pohl, R.** (1989). A 14 bp promoter element directs the testis specificity of the *Drosophila* beta 2 tubulin gene. *Embo J* **8**, 1559-1565.
- Mishima, Y., Giraldez, A. J., Takeda, Y., Fujiwara, T., Sakamoto, H., Schier, A. F. and Inoue, K.** (2006). Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish *miR-430*. *Curr Biol* **16**, 2135-2142.
- Miyoshi, K., Tsukumo, H., Nagami, T., Siomi, H. and Siomi, M. C.** (2005). Slicer function of *Drosophila* Argonautes and its involvement in RISC formation. *Genes & development* **19**, 2837-2848.
- Neumuller, R. A., Betschinger, J., Fischer, A., Bushati, N., Poernbacher, I., Mechtler, K., Cohen, S. M. and Knoblich, J. A.** (2008). Mei-P26 regulates microRNAs and cell growth in the *Drosophila* ovarian stem cell lineage. *Nature* **454**, 241-245.
- Noguchi, T., Lenartowska, M., Rogat, A. D., Frank, D. J. and Miller, K. G.** (2008). Proper cellular reorganization during *Drosophila* spermatid individualization depends on actin structures composed of two domains, bundles and meshwork, that are differentially regulated and have different functions. *Mol Biol Cell* **19**, 2363-2372.
- Nolde, M. J., Saka, N., Reinert, K. L. and Slack, F. J.** (2007). The *Caenorhabditis elegans pumilio* homolog, *puf-9*, is required for the 3'UTR-mediated repression of the *let-7* microRNA target gene, *hbl-1*. *Dev Biol* **305**, 551-563.

- Nurminsky, D. I., Nurminskaya, M. V., De Aguiar, D. and Hartl, D. L. (1998). Selective sweep of a newly evolved sperm-specific gene in *Drosophila*. *Nature* **396**, 572-575.
- 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.
- Ohlstein, B., Lavoie, C. A., Vef, O., Gateff, E. and McKearin, D. M. (2000). The *Drosophila* cystoblast differentiation factor, *benign gonial cell neoplasm*, is related to DExH-box proteins and interacts genetically with *bag-of-marbles*. *Genetics* **155**, 1809-1819.
- Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H. and Siomi, M. C. (2004). Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes & development* **18**, 1655-1666.
- Okamura, K., Hagen, J. W., Duan, H., Tyler, D. M. and Lai, E. C. (2007). The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* **130**, 89-100.
- Page, S. L., McKim, K. S., Deneen, B., Van Hook, T. L. and Hawley, R. S. (2000). Genetic studies of *mei-P26* reveal a link between the processes that control germ cell proliferation in both sexes and those that control meiotic exchange in *Drosophila*. *Genetics* **155**, 1757-1772.
- Pal-Bhadra, M., Bhadra, U. and Birchler, J. A. (1997). Cosuppression in *Drosophila*: gene silencing of *Alcohol dehydrogenase* by *white-Adh* transgenes is Polycomb dependent. *Cell* **90**, 479-490.
- Pal-Bhadra, M., Bhadra, U. and Birchler, J. A. (2002). RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Drosophila*. *Mol Cell* **9**, 315-327.
- Park, J. K., Liu, X., Strauss, T. J., McKearin, D. M. and Liu, Q. (2007). The miRNA pathway intrinsically controls self-renewal of *Drosophila* germline stem cells. *Curr Biol* **17**, 533-538.
- Parker, J. S., Roe, S. M. and Barford, D. (2004). Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *Embo J* **23**, 4727-4737.
- Pek, J. W., Lim, A. K. and Kai, T. (2009). *Drosophila* Maelstrom ensures proper germline stem cell lineage differentiation by repressing *microRNA-7*. *Dev Cell* **17**, 417-424.
- Perezgasga, L., Jiang, J., Bolival, B., Jr., Hiller, M., Benson, E., Fuller, M. T. and White-Cooper, H. (2004). Regulation of transcription of meiotic cell cycle and terminal differentiation genes by the testis-specific Zn-finger protein *matotopetli*. *Development (Cambridge, England)* **131**, 1691-1702.
- Pham, J. W., Pellino, J. L., Lee, Y. S., Carthew, R. W. and Sontheimer, E. J. (2004). A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell* **117**, 83-94.
- Picard, G. (1976). Non-mendelian female sterility in *Drosophila melanogaster*: hereditary transmission of I factor. *Genetics* **83**, 107-123.
- Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N., Artus, C. G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E. and Filipowicz, W. (2005). Inhibition of translational initiation by *Let-7* MicroRNA in human cells. *Science* **309**, 1573-1576.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L. and Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* **14**, 1902-1910.

- Rubin, G. M. and Spradling, A. C.** (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**, 348-353.
- Ruby, J. G., Stark, A., Johnston, W. K., Kellis, M., Bartel, D. P. and Lai, E. C.** (2007). Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs. *Genome Res* **17**, 1850-1864.
- Rusinov, V., Baev, V., Minkov, I. N. and Tabler, M.** (2005). MicroInspector: a web tool for detection of miRNA binding sites in an RNA sequence. *Nucleic Acids Res* **33**, W696-700.
- Saito, K., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Suzuki, T., Siomi, H. and Siomi, M. C.** (2007). Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi- interacting RNAs at their 3' ends. *Genes & development* **21**, 1603-1608.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989). Molecular Cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandmann, T. and Cohen, S. M.** (2007). Identification of novel *Drosophila melanogaster* microRNAs. *PLoS One* **2**, e1265.
- Schafer, M., Nayernia, K., Engel, W. and Schafer, U.** (1995). Translational control in spermatogenesis. *Dev Biol* **172**, 344-352.
- Schmidt, A., Palumbo, G., Bozzetti, M. P., Tritto, P., Pimpinelli, S. and Schafer, U.** (1999). Genetic and molecular characterization of *sting*, a gene involved in crystal formation and meiotic drive in the male germ line of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **151**, 749-760.
- Schulz, C., Wood, C. G., Jones, D. L., Tazuke, S. I. and Fuller, M. T.** (2002). Signaling from germ cells mediated by the *rhomboid* homolog *stet* organizes encapsulation by somatic support cells. *Development (Cambridge, England)* **129**, 4523-4534.
- Schupbach, T. and Wieschaus, E.** (1991). Female sterile mutations on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. II. Mutations blocking oogenesis or altering egg morphology. *Genetics* **129**, 1119-1136.
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. and Zamore, P. D.** (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, 199-208.
- Seggerson, K., Tang, L. and Moss, E. G.** (2002). Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev Biol* **243**, 215-225.
- Shen, R. and Xie, T.** (2008). Stem cell self-renewal versus differentiation: tumor suppressor Mei-P26 and miRNAs control the balance. *Cell Res* **18**, 713-715.
- Shen, R., Weng, C., Yu, J. and Xie, T.** (2009). eIF4A controls germline stem cell self-renewal by directly inhibiting BAM function in the *Drosophila* ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 11623-11628.
- Shivdasani, A. A. and Ingham, P. W.** (2003). Regulation of stem cell maintenance and transit amplifying cell proliferation by *tgf-beta* signaling in *Drosophila* spermatogenesis. *Curr Biol* **13**, 2065-2072.
- Song, J. J., Smith, S. K., Hannon, G. J. and Joshua-Tor, L.** (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* **305**, 1434-1437.
- Sood, P., Krek, A., Zavolan, M., Macino, G. and Rajewsky, N.** (2006). Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2746-2751.
- Stark, A., Brennecke, J., Russell, R. B. and Cohen, S. M.** (2003). Identification of *Drosophila* MicroRNA targets. *PLoS biology* **1**, E60.

- Stark, A., Brennecke, J., Bushati, N., Russell, R. B. and Cohen, S. M.** (2005). Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell* **123**, 1133-1146.
- Szkmarmy, A., Cox, D. N., Wang, Z. and Lin, H.** (2005). Regulatory relationship among *piwi*, *pumilio*, and *bag-of-marbles* in *Drosophila* germline stem cell self-renewal and differentiation. *Curr Biol* **15**, 171-178.
- Tarun, S. Z., Jr. and Sachs, A. B.** (1996). Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *Embo J* **15**, 7168-7177.
- Thermann, R. and Hentze, M. W.** (2007). *Drosophila miR2* induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature* **447**, 875-878.
- Tomari, Y., Du, T. and Zamore, P. D.** (2007). Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. *Cell* **130**, 299-308.
- Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N. and Zamore, P. D.** (2004). A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* **306**, 1377-1380.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R. and Leunissen, J. A.** (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* **35**, W71-74.
- Vincze, T., Posfai, J. and Roberts, R. J.** (2003). NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* **31**, 3688-3691.
- Wang, Z. and Mann, R. S.** (2003). Requirement for two nearly identical TGIF-related homeobox genes in *Drosophila* spermatogenesis. *Development (Cambridge, England)* **130**, 2853-2865.
- White-Cooper, H.** (2009). Molecular mechanisms of gene regulation during *Drosophila* spermatogenesis. *Reproduction*.
- White-Cooper, H., Alphey, L. and Glover, D. M.** (1993). The *cdc25* homologue *twine* is required for only some aspects of the entry into meiosis in *Drosophila*. *J Cell Sci* **106 (Pt 4)**, 1035-1044.
- White-Cooper, H., Schafer, M. A., Alphey, L. S. and Fuller, M. T.** (1998). Transcriptional and post-transcriptional control mechanisms coordinate the onset of spermatid differentiation with meiosis I in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)* **125**, 125-134.
- White-Cooper, H., Leroy, D., MacQueen, A. and Fuller, M. T.** (2000). Transcription of meiotic cell cycle and terminal differentiation genes depends on a conserved chromatin associated protein, whose nuclear localisation is regulated. *Development (Cambridge, England)* **127**, 5463-5473.
- Xu, T. and Rubin, G. M.** (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development (Cambridge, England)* **117**, 1223-1237.
- Yamashita, Y. M., Fuller, M. T. and Jones, D. L.** (2005). Signaling in stem cell niches: lessons from the *Drosophila* germline. *J Cell Sci* **118**, 665-672.
- Yang, L., Chen, D., Duan, R., Xia, L., Wang, J., Qurashi, A., Jin, P. and Chen, D.** (2007). Argonaute 1 regulates the fate of germline stem cells in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)* **134**, 4265-4272.
- Yu, J. Y., Reynolds, S. H., Hatfield, S. D., Shcherbata, H. R., Fischer, K. A., Ward, E. J., Long, D., Ding, Y. and Ruohola-Baker, H.** (2009). Dicer-1-dependent Dacapo suppression acts downstream of Insulin receptor in regulating cell division of *Drosophila* germline stem cells. *Development (Cambridge, England)* **136**, 1497-1507.
- Zamore, P. D. and Haley, B.** (2005). Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science* **309**, 1519-1524.

- Zhao, Y. and Srivastava, D.** (2007). A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem Sci* **32**, 189-197.
- Zhou, R., Czech, B., Brennecke, J., Sachidanandam, R., Wohlschlegel, J. A., Perrimon, N. and Hannon, G. J.** (2009). Processing of *Drosophila* endo-siRNAs depends on a specific Loquacious isoform. *RNA (New York, N.Y)* **15**, 1886-1895.
- Zuker, M.** (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**, 3406-3415.