

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ

ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΕΡΓΑΛΕΙΩΝ
ΣΤΟ ΑΡΘΡΟΠΟΔΟ ΚΑΡΚΙΝΟΕΙΔΕΣ
Parhyale hawaiiensis

ΚΟΝΤΑΡΑΚΗΣ ΖΑΧΑΡΙΑΣ
ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΙΟΥΛΙΟΣ 2011

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Μιχάλης Αβέρωφ - Επιβλέπων Ερευνητής (Ερευνητής Α' Βαθμίδας, Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας)
- Χρήστος Δελιδάκης - Επιβλέπων Καθηγητής (Καθηγητής Α' Βαθμίδας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης)
- Δόμνα Καραγωγέως (Καθηγήτρια Α' Βαθμίδας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Μιχάλης Αβέρωφ - Επιβλέπων Ερευνητής (Ερευνητής Α' Βαθμίδας, Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας)
- Χρήστος Δελιδάκης - Επιβλέπων Καθηγητής (Καθηγητής Α' Βαθμίδας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης)
- Δόμνα Καραγωγέως (Καθηγήτρια Α' Βαθμίδας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)
- Γιώργος Χαλεπάκης (Καθηγητής Α' Βαθμίδας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης)
- Δημήτρης Τζαμαρίας (Καθηγητής Β' Βαθμίδας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης)
- Νίκος Πουλακάκης (Καθηγητής Γ' Βαθμίδας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης)
- Αποστόλης Κλινάκης (Ερευνητής Γ' Βαθμίδας, Ίδρυμα Βιοϊατρικών Ερευνών, Ακαδημία Αθηνών)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	8
ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
-ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΜΟΝΤΕΛΑ	10
-ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ (EVO-DEVO)	11
-ΤΟ ΦΥΛΟ ΤΩΝ ΑΡΘΡΟΠΟΔΩΝ	12
-ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ ΜΗ-ΜΟΝΤΕΛΑ	15
-ΤΟ ΑΜΦΙΠΟΔΟ <i>Parhyale hawaiensis</i>	16
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ	18
-Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΕΡΓΑΛΕΙΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΟΟΔΟ ΤΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ	18
-ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ	19
-ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	20
-ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	21
-ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ	22
<i>ΕΛΕΓΧΟ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ cis-PΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ</i>	23
<i>ΕΚΤΟΠΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ</i>	23
<i>ΠΑΓΙΔΕΥΣΗ ΕΝΙΣΧΥΤΩΝ/ΓΟΝΙΔΙΩΝ</i>	24
<i>ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ</i>	24
-ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΠΑΓΙΔΕΥΣΗ ΕΝΙΣΧΥΤΩΝ	24
-ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΠΑΓΙΔΕΥΣΗ ΕΞΟΝΙΩΝ	26
-ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΓΙΔΕΥΣΕΩΝ	28
<i>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ/ΑΠΟΔΕΚΤΗ ΜΑΤΙΣΜΑΤΟΣ</i>	28
<i>2. ΧΡΗΣΗ ΕΣΩΤΕΡΙΚΩΝ ΘΕΣΕΩΝ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΡΙΒΟΣΩΜΑΤΩΝ (IRES)</i>	28
<i>3. ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ 2A ΤΟΥ ΙΟΥ FMDV</i>	29
<i>4. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΝΕΟΥ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΟΥ ΜΕ ΕΙΔΙΚΟ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟ</i>	29
-ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΕΙΔΙΚΟΥ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ	31
-ΡΕΚΟΜΠΙΝΑΣΕΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ	33
-ΡΕΚΟΜΠΙΝΑΣΕΣ ΣΕΡΙΝΗΣ	34
-ΟΙ ΡΕΚΟΜΠΙΝΑΣΕΣ ΣΕΡΙΝΗΣ ΩΣ ΕΡΓΑΛΕΙΟ	34
-ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΟΥ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ	36

-Η ιντεγκράση του φάγου φC31	36
-ΣΤΟΧΟΣ	38
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	39
-ΔΙΑΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΙΝΤΕΓΚΡΑΣΗΣ	39
-ΠΑΓΙΔΕΥΣΗ ΕΞΟΝΙΩΝ ΣΤΟ ΑΜΦΙΠΟΔΟ <i>Parhyale hawaiiensis</i>	42
-Ο ΦΟΡΕΑΣ ΠΑΓΙΔΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ (ΔΕΚΤΗΣ)	44
-ΕΝΘΕΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ ΣΤΟ ΓΕΝΩΜΑ ΜΕ ΕΙΔΙΚΟ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟ	45
-ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΠΑΓΙΔΕΥΣΗΣ	47
-ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΠΑΓΙΔΕΥΜΕΝΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>distal</i>	52
-ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΜΑΤΙΣΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑΞΥ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΜΑΡΤΥΡΑ	58
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	61
-ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΠΑΓΙΔΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ <i>uTRAP-ITRAC</i>	61
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ	63
-ΟΜΟΙΩΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ (HOX)	63
-ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ HOX	65
-ΕΚΤΟΠΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΟ ΑΜΦΙΠΟΔΟ	68
-ΣΤΟΧΟΙ	69
-ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΑΚΡΩΝ ΣΤΑ ΚΑΡΚΙΝΟΕΙΔΗ	70
-ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>Distal-less</i>	72
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	75
-ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΑΜΦΙΠΟΔΟΥ <i>Parhyale hawaiiensis</i>	75
-ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ UBX ΣΤΟ <i>P.hawaiiensis</i>	75
-ΕΚΤΟΠΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ PhUBXI ΚΑΙ PhUBXII	79
-ΟΜΟΙΩΤΙΚΟΙ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΑΜΦΙΠΟΔΟ	83
-ΚΕΡΑΙΕΣ	85
-ΓΝΑΘΙΚΑ ΑΚΡΑ/ΕΞΑΡΤΗΜΑΤΑ	85
-MAXILLIPEDS	88
-ΓΝΑΘΟΠΟΔΙΑ	88
-ΑΛΛΟΙ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΙ	90
-ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ UBX ΚΑΙ SCR ΣΤΟ ΑΜΦΙΠΟΔΟ	95
-ΕΚΤΟΠΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ <i>DmUBX</i>	97

-ΕΚΤΟΠΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ DmUbx ΣΕ ΜΩΣΑΪΚΑ ΕΜΒΡΥΑ	98
-ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ DmUbx ΣΕ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΑΜΦΙΠΟΔΩΝ	99
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	102
-ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ PhUBX-I ΚΑΙ PhUBX-II ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΑΚΡΩΝ ΣΤΟ P.hawaiensis	102
-ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΟΜΟΙΩΤΙΚΩΝ	103
-ΟΜΟΙΩΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ	103
-(ΜΗ) ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΤΟΥ Distal-less ΣΤΟ ΑΜΦΙΠΟΔΟ	104
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	106
-ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΜΒΡΥΩΝ Parhyale ΓΙΑ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΜΕ ΤΟ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ FP6.87	106
-ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΜΒΡΥΩΝ Parhyale ΓΙΑ IN SITU ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΪΚΑ ΟΞΕΑ	106
-ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΣΕ ΕΜΒΡΥΑ Parhyale hawaiensis ΜΕ ΤΟ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ FP6.87	107
-IN SITU ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΪΚΑ ΟΞΕΑ ΣΕ ΕΜΒΡΥΑ Parhyale hawaiensis	108
-ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΕΜΒΡΥΩΝ	109
-ΑΝΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΖΩΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΜΒΡΥΩΝ	110
-ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ	110
<i>Πλασμίδιο pBS MiL-attB-hsp70a2R1-eGFP-SV40 (attB1 και attB6)</i>	110
<i>Πλασμίδιο pBS MiL-attB-hsp70a2R1-eGFP-SV40 Δ Splice Donor (attBX)</i>	111
<i>Πλασμίδιο pBS MiL-attB-hsp70a-eGFP-SV40 (attB8)</i>	111
-Προετοιμασία capped mRNA	111
-ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (total RNA) ΑΠΟ ΕΜΒΡΥΑ Parhyale hawaiensis	111
-ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ (DNA) ΑΠΟ ΕΜΒΡΥΑ Parhyale hawaiensis	112
-ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (ΜΕΘΟΔΟΣ HOLMES-BONNER)	113
-ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΥΛΙΚΟΥ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΣΑΡΩΣΗΣ	113
-ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΜΙΚΡΗ ΚΛΙΜΑΚΑ (MINI PREP)	113
-ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ	114
-ΛΙΣΤΑ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	114
-ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ/ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΕΞΩΣΚΕΛΕΤΟΥ	115
-ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ ΓΙΑ in situ ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ	115
-ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (qPCR)	115
-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	117

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η ανάπτυξη ενός συστήματος ειδικού ανασυνδυασμού στο αρθρόποδο καρκινοειδές *Parhyale hawaiiensis* με σκοπό την αξιοποίηση της τεχνολογίας μετασχηματισμού και γονιδιακής παγίδευσης, για την διεξαγωγή λειτουργικών συγκριτικών μελετών στα αρθρόποδα. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε το σύστημα του φάγου φC31, που έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στη δροσόφιλα και σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. Ο φάγος φC31 ενθέτει το γονιδίωμά του στο γένωμα του ξενιστή με την χρήση ειδικού ανασυνδυασμού ανάμεσα στις περιοχές attB (βακτηριακό σημείο πρόσδεσης) και attP (φαγικό σημείο πρόσδεσης). Την αναγνώριση των περιοχών αυτών και την κατάλυση της αντίδρασης ανασυνδυασμού, αναλαμβάνει μια ιντεγκράση που κωδικοποιείται από το γονιδίωμα του φάγου.

Αφού δημιουργήθηκαν διαγονιδιακά άτομα που φέρουν την περιοχή attP στο γένωμα, ελέγχθηκε η δυνατότητα εισαγωγής με ειδικό ανασυνδυασμό ενός θερμοεπαγόμενου γονιδίου μάρτυρα. Μετά την επιβεβαίωση του ειδικού ανασυνδυασμού, επιχειρήθηκε η αντικατάσταση του γονιδίου μάρτυρα μιας γονιδιακής παγίδευσης. Η υψηλή συχνότητα μετατροπής μιας παγίδευσης (distal) από DsRed σε eGFP, ανοίγει τον δρόμο στην χρήση του συστήματος του φάγου φC31 στην αξιοποίηση των παγιδεύσεων που θα προκύψουν από τη σάρωση του γονιδιώματος του *Parhyale hawaiiensis*.

Επιπλέον, η ενσωμάτωση εργαλείων με αποδεδειγμένη ενεργότητα σε διαφορετικά είδη (3xP3, φθορίζουσες πρωτεΐνες, ιντεγράση φC31, αλληλουχίες αποδοχής ματίσματος) καθιστούν την τελική κατασκευή έναν πιθανά οικουμενικό φορέα, για την εύκολη παγίδευση και κλωνοποίηση νέων γονιδίων και την διεξαγωγή λειτουργικών πειραμάτων σε νέους οργανισμούς.

Στο δεύτερο μέρος της διατριβής, που έγινε σε συνεργασία με τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Δρ. Τάσο Παυλόπουλο του πανεπιστημίου του Κέημπριτζ, παρουσιάζεται ο ρόλος του ομοιωτικού γονιδίου Ubx στην ανάπτυξη και εξέλιξη των άκρων στα καρκινοειδή. Η ποικιλομορφία που παρατηρούμε σήμερα στην μορφολογία των άκρων στα καρκινοειδή, είναι προϊόν της εξέλιξής τους ώστε να ανταποκριθούν σε νέες ανάγκες και να καλύψουν καλύτερα παλαιότερες. Οι γενετικοί μηχανισμοί με τους οποίους μπορεί να παραχθεί αυτή η ποικιλομορφία ήταν μέχρι σήμερα άγνωστοι. Βασιζόμενοι στην συσχέτιση της απουσίας του ομοιωτικού γονιδίου Ubx με την ανάπτυξη των maxillipeds, που αποτελούν θωρακικά άκρα διαφοροποιημένα να επιτελούν λειτουργίες χειρισμού τροφής, οι Averof και Patel πρότειναν το 1997 την υποχώριση της έκφρασης του Ubx από τα πρώτα θωρακικά μεταμερίδια ως πιθανό μηχανισμό εμφάνισης αυτού του τύπου άκρου.

Εκμεταλλευόμενοι τα νέα εργαλεία μετασχηματισμού και θερμοεπαγώμενης υπερέκφρασης, καθώς και την ευκολία γενετικού χειρισμού στο αμφίποδο *Parhyale hawaiiensis*, θελήσαμε να ελέγξουμε αυτή την υπόθεση προσφέροντας εκτοπικά Ubx στο πρώτο θωρακικό μεταμερίδιο που αναπτύσσει maxillipeds. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν πως το Ubx είναι ικανό να “επαναφέρει” στα maxillipeds τη μορφολογία θωρακικών άκρων, ενώ συμπληρωματικά πειράματα καταστολής του Ubx (από το εργαστήριο του NH Patel) υποδεικνύουν και την αναγκαιότητά του στον καθορισμό της “θωρακικής ταυτότητας”.

Για να εξηγήσουμε το αναπάντεχο αποτέλεσμα της εμφάνισης maxillipeds από την εκτοπική έκφραση του Ubx σε κεφαλικά μεταμερίδια, μελετήσαμε την αλληλεπίδραση του Ubx με ένα άλλο ομοιωτικό γονίδιο (Scr), και δείξαμε πως ο φαινότυπος των maxillipeds μπορεί να προκύψει και με διαφορετικό μηχανισμό. Τέλος, ο μεγάλος αριθμός μετασχηματισμών, μας έδωσε την δυνατότητα να περιγράψουμε ένα ευρύ φάσμα φαινοτύπων μετατροπής ενός κεφαλικού εξαρτήματος (maxilla) σε ένα βαδιστικό άκρο, υποδεικνύοντας την ποικιλομορφία που μπορούν να προσφέρουν για φυσική επιλογή, μικρές μόνο αλλαγές στην έκφραση ενός γονιδίου όπως το Ubx.

ABSTRACT

The main goal in the first part of this thesis was to develop a site specific recombination system in the arthropod crustacean *Parhyale hawaiiensis* in order to exploit the recently developed transformation and gene trapping technology for functional comparative studies in arthropods. For that reason, I chose the PhiC31 integration system, which has been successfully used in *Drosophila* and in human cell lines. The PhiC31 bacteriophage inserts its genome into the host's DNA by using specific recombination between two sites: attB (bacterial attachment point) and attP (phage attachment point). The recognition and recombination of these sites is catalysed by a site specific integrase, encoded by the phage's genome.

First, I created transgenic amphipods carrying the attP site and tested the possibility of introducing a heat inducible reporter gene through site specific recombination. After confirming that specific recombination occurs in *Parhyale*, I replaced the fluorescent marker gene of a gene trap. The conversion of a DsRed trap (distal) to a GFP expressing trap was highly efficient, suggesting that the integrase system could be used as a means of routinely converting gene traps into various genetic tools in *Parhyale hawaiiensis*.

The gene trapping and trap conversion constructs used in this study incorporate elements with proven activity in different species (3xP3, fluorescent proteins, PhiC31 integrase, splice acceptor sequence). Therefore, these same constructs could serve as a universal platform for gene trapping and trap conversion in diverse organisms.

In the second part of the thesis, done in collaboration with the postdoctoral researcher Dr. Tasos Pavlopoulos from the University of Cambridge, we studied the role of the homeotic gene Ubx on appendage development and specialisation in crustaceans. The diversity of appendage morphology seen in crustaceans today, is the outcome of the evolution of an ancient homogenous trunk into specialised regions adapted for distinct functions. Various genetic mechanisms that could produce this diversity have been proposed, but functional evidence to test many of these hypotheses is still missing. The evolution of maxillipeds, which are thoracic limbs differentiated for feeding in crustaceans, represents one such example. Based on the correlation between the absence of the homeotic gene Ubx and the development of maxillipeds in several crustacean species, Averof and Patel proposed in 1997 that a shift of Ubx expression from anterior thoracic segments could serve as a mechanism for the specification of the maxilliped fate.

The establishment of heat inducible gene expression in *Parhyale hawaiiensis* gave us the opportunity to test this hypothesis directly in the amphipod by ectopically expressing Ubx in the first thoracic appendages, that normally develop into maxillipeds. Our results show that Ubx is sufficient to induce the transformation of maxillipeds into thoracic limbs, while complementary experiments of Ubx repression (from the laboratory of NH Patel) indicate its necessity to define thoracic identity.

To explain the unexpected transformation of the maxillary appendages into maxillipeds by ectopic expression of Ubx, we studied the effect of Ubx on another homeotic gene *Sex combs reduced* (*Scr*), showing that this transformation was an indirect effect of the Ubx misexpression. Finally, this study allowed us to describe a large range of partial transformations of the maxillary appendages towards the thoracic fate, indicating that changes in the expression of a homeotic gene (like Ubx) can provide a great morphological diversity for natural selection to act upon.

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΜΟΝΤΕΛΑ

Ακόμα και το πιο απλό φυσικό φαινόμενο, είναι στην πραγματικότητα αρκετά πολύπλοκο για να περιγραφεί και να εξηγηθεί εξ'αρχής με απόλυτη ακρίβεια. Για τον σκοπό αυτό όλες οι επιστήμες χρησιμοποιούν τα μοντέλα, που αποτελούν απλοποιημένα συστήματα για την περιγραφή και μελέτη ενός φαινομένου. Με την κατανόηση ενός απλοποιημένου συστήματος εμφανίζεται η ανάγκη για την δημιουργία ενός πολυπλοκότερου μοντέλου, που να καλύπτει περισσότερες παραμέτρους και να εξηγεί το υπό μελέτη φαινόμενο καλύτερα και ακριβέστερα.

Η επιστήμη της βιολογίας, ασχολείται με την περιγραφή και κατανόηση των κανόνων που διέπουν το φαινόμενο της ζωής. Η κοινή προέλευση των ειδών προσφέρει την δυνατότητα μελέτης οποιουδήποτε οργανισμού για αυτό το σκοπό. Όλοι οι οργανισμοί χρησιμοποιούν ως γενετικό υλικό νουκλεϊκά οξέα, τα οποία περιέχουν τις πληροφορίες για την επιβίωση και την αναπαραγωγή τους. Η βασική βιοχημεία της ζωής είναι ίδια, είτε πρόκειται για ένα βακτήριο, είτε πρόκειται για ένα ποντίκι. Ωστόσο, κάποιοι οργανισμοί έχουν επιλεχθεί για τα ιδιαίτερα πλεονεκτήματα που προσφέρουν στην μελέτη και κατανόηση συγκεκριμένων φαινομένων. Οι οργανισμοί αυτοί ονομάζονται οργανισμοί μοντέλα.

Μερικά χαρακτηριστικά, όπως είναι ο μικρός κύκλος ζωής και η εύκολη διατήρηση σε περιβάλλον εργαστηρίου, αποτελούν σημαντικά κριτήρια για την επιλογή ενός οργανισμού μοντέλου. Οι πρώτοι οργανισμοί που συγκέντρωσαν το ανθρώπινο ενδιαφέρον ήταν οργανισμοί οικονομικής και ιατρικής σημασίας. Παράλληλα όμως, μεμονωμένοι ερευνητές, επέλεξαν να ασχοληθούν με κάποιους άλλους οργανισμούς που εμφάνιζαν πλεονεκτήματα στην μελέτη των βιολογικών φαινομένων του ενδιαφέροντός τους, όπως ο κυτταρικός κύκλος, η κυτταρική επικοινωνία και η εμβρυϊκή ανάπτυξη. Η συσσώρευση γνώσης σε αυτούς τους οργανισμούς αποτέλεσε ένα επιπλέον κίνητρο για την μελέτη τους ενώ η ανάπτυξη εξειδικευμένων εργαλείων εδραίωσε την θέση τους ως οργανισμούς μοντέλα.

Γρήγορα ωστόσο, έγινε αντιληπτό, πως τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των οργανισμών μοντέλων -μικρό σχετικά μέγεθος, μεγάλος αριθμός απογόνων και μικρός κύκλος ζωής- ακολουθούνται από ιδιαίτερους βιολογικούς μηχανισμούς με περιορισμένη εφαρμογή σε άλλα είδη. Αυτό δεν μείωσε την χρησιμότητα των οργανισμών μοντέλων, όπου η συντονισμένη προσπάθεια και έρευνα βοήθησε στην διατύπωση βασικών αρχών σχετικά με τον κυτταρικό κύκλο και την ανάπτυξη του εμβρύου. Αντιθέτως, αποκάλυψε την

αξία της μελέτης περισσότερων οργανισμών για την κατανόηση της βιολογικής ποικιλομορφίας στο σύνολό της.

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ (EVO-DEVO)

Όλοι οι πολυκύτταροι οργανισμοί που ακολουθούν φυλετική αναπαραγωγή ξεκινάνε την ζωή τους ως ένα μοναδικό κύτταρο, το ζυγωτό, που προέρχεται από την σύντηξη των αρσενικών και θηλυκών γαμετικών κυττάρων. Το σύνολο των φαινομένων σε μοριακό, κυτταρικό και φυσιολογικό επίπεδο που ευθύνονται για την μεταμόρφωση του ζυγωτού σε ώριμο πολυκύτταρο οργανισμό καλείται ανάπτυξη.

Η εντυπωσιακή ποικιλομορφία που παρατηρούμε στην φύση είναι προϊόν της μακράς εξελικτικής πορείας των οργανισμών. Αυτή η ποικιλομορφία είναι λογικό να βασίζεται σε διαφορές στην ανάπτυξη.

Η συγκριτική μελέτη της εμβρυογένεσης, απασχόλησε τον άνθρωπο από αρκετά παλιά. Τον 19ο αιώνα, ο Ernst Haeckel συγκρίνοντας έμβρυα απομακρυσμένων ειδών διατύπωσε την θεωρία, ότι τα διάφορα στάδια της οντογένεσης, δηλαδή της ανάπτυξης και ωρίμανσης ενός οργανισμού, αποτελούν αναπαράσταση της εξέλιξής του (φυλογένεση). Πράγματι, στην εργασία που δημοσίευσε, τα εμβρυϊκά στάδια των διαφόρων ειδών παρουσίαζαν σημαντικές ομοιότητες και η διαφοροποίηση της μορφολογίας τους εμφανιζόταν αργότερα κατά την εμβρυογένεση. Αν και τα αποτελέσματα αυτά κρίθηκαν ως παραπλανητικά και υπερβολικά, και η θεωρία του Haeckel τελικά απορρίφθηκε, η δουλειά του συγκέντρωσε το επιστημονικό ενδιαφέρον γύρω από τη νέα τότε θεωρία του Δαρβινισμού και την σχέση της με την εμβρυϊκή ανάπτυξη.

Αντίθετα με την θεωρία του Haeckel, η εμβρυογένεση αποτελεί απλώς την διαδικασία μέσα από την οποία ο οργανισμός παίρνει την τελική του μορφή. Αργότερα, έγινε σαφές πως οι απαραίτητες οδηγίες που περιγράφουν και καθορίζουν αυτή τη διαδικασία βρίσκονται κωδικοποιημένες στο γενετικό υλικό του κάθε οργανισμού. Η εξελικτική σύνδεση μεταξύ των οργανισμών κρύβεται στις διαφοροποιήσεις στο γενετικό τους υλικό, που μεταφράζονται σε διαφοροποιήσεις στην ανάπτυξή τους και άρα της μορφολογίας τους.

Η εξέλιξη αποτελεί μοναδικό χαρακτηριστικό της ζωής. Οι κανόνες και οι μηχανισμοί που σχετίζονται με την εξέλιξη εμφανίζουν μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον. Η μελέτη της ανάπτυξης ειδών, με μικρές ή μεγάλες μορφολογικές διαφορές, μπορεί να οδηγήσει στην ταυτοποίηση των μοριακών αλλαγών, που είναι υπεύθυνες γι' αυτές τις διαφορές. Ταυτόχρονα, τέτοιες συγκριτικές μελέτες μας προσφέρουν τη δυνατότητα να εκτιμήσουμε τους μηχανισμούς δημιουργίας και επιλογής της εντυπωσιακής ποικιλομορφίας που παρατηρούμε στην φύση.

ΤΟ ΦΥΛΟ ΤΩΝ ΑΡΘΡΟΠΟΔΩΝ

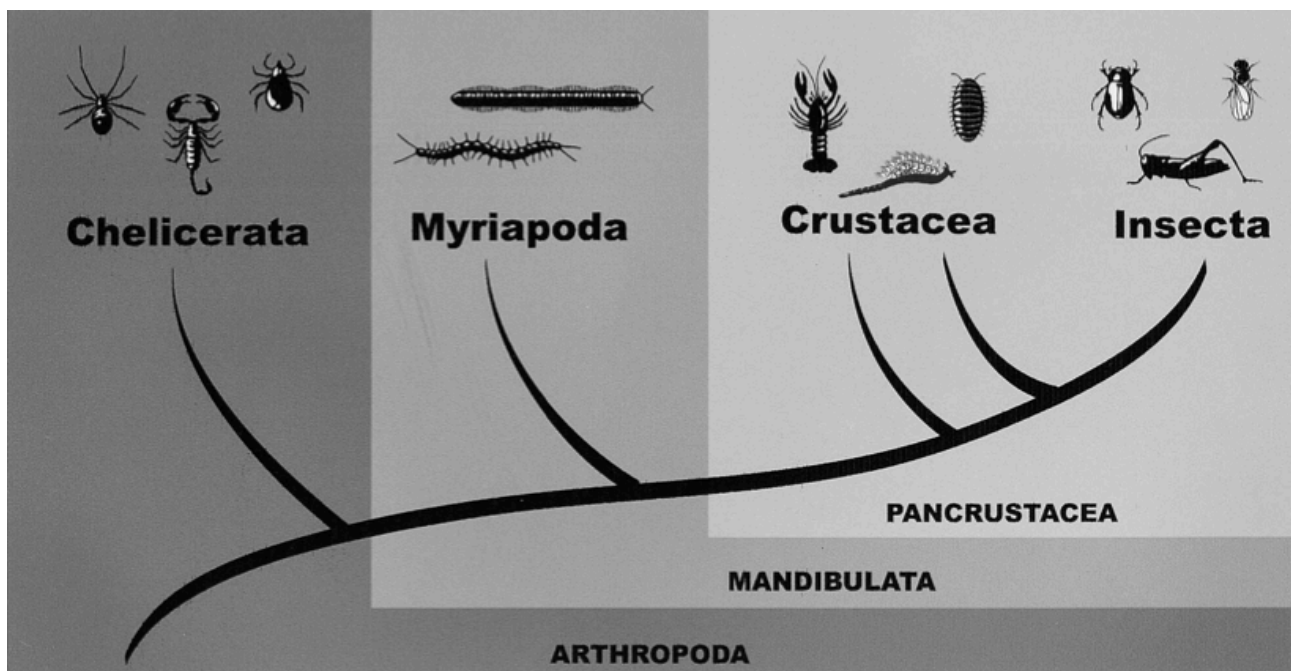
Τα αρθρώποδα είναι το πολυπληθέστερο σε αριθμό ειδών φύλο των μεταζώων. Επιπλέον, αποτελεί την πιο πετυχημένη ομάδα μεταζώων, αφού περιλαμβάνει είδη που κυριαρχούν σε αέρια, υδάτινα, θαλάσσια και χερσαία οικοσυστήματα. Το σώμα των αρθροπόδων περιβάλλεται από εξωσκελετό και χωρίζεται σε μεταμερίδια που φέρουν αρθρωτά εξαρτήματα. Τα εξαρτήματα αυτά μπορεί να είναι πόδια, κεραιές, φτερά, στοματικά μόρια και άλλα εξειδικευμένα άκρα. Ο αριθμός και τύπος των εξαρτημάτων ποικίλει σημαντικά ανάμεσα στα διάφορα είδη και αντικατοπτρίζει την προσαρμογή τους σε διαφορετικές συνθήκες και ανάγκες.

Γενικά, το σώμα κάθε αρθροπόδου χωρίζεται σε λειτουργικές περιοχές ή τάγματα. Ανάλογα με τον αριθμό και μέγεθος των ταγμάτων, καθώς και τον αριθμό των μεταμεριδίων σε αυτά, διακρίνουμε τέσσερις βασικές σωματοδομές που αντιστοιχούν στα τέσσερα υποφύλα των αρθροπόδων (χηληκέρατα, μυριάποδα, εξάποδα και καρκινοειδή) (ΣΧΗΜΑ 1)(Hughes and Kaufman 2002). Έτσι για παράδειγμα, τα μεταμερίδια του θωρακικού τάγματος, που αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του σώματος των μυριάποδων, ποικίλουν σε αριθμό και φέρουν γενικά όμοια βαδιστικά πόδια. Αντιθέτως στα χηληκέρατα και τα εξάποδα, όπου διακρίνουμε δύο (το πρόσωμα και το οπισθόσωμα) και τρία τάγματα (κεφάλι, θώρακα, κοιλιά) αντίστοιχα, ο αριθμός των βαδιστικών ποδιών είναι σταθερός (τέσσερα και τρία ζεύγη αντίστοιχα). Τα καρκινοειδή από την άλλη, εμφανίζουν τρία τάγματα (κεφάλι, πέρειον και πλέον) και από τα θωρακικά τους μεταμερίδια εκφύονται άκρα με πολύ διαφορετική μορφολογία και λειτουργία όπως ο χειρισμός της τροφής, η άμυνα, η αναπαραγωγή, το κολύμπι και άλλα (ΣΧΗΜΑ 2).

Ο κοινός πρόγονος όλων των αρθροπόδων αποτελούνταν από όμοια μεταμερίδια με μικρή εξειδίκευση. Η παραγωγή της σημερινής ποικιλομορφίας από μία τέτοια απλή σωματοδομή μπορεί να κατανοηθεί/εξηγηθεί σε τρία στάδια/επίπεδα. Στο πρώτο στάδιο, αλλαγές στην μορφολογία προήλθαν από την αλλαγή του αριθμού και τη λειτουργική ομαδοποίηση ή/και σύντηξη μεταμεριδίων (εμφάνιση ταγμάτων). Σε ένα δεύτερο στάδιο, η διαφοροποίηση κάθε μεταμεριδίου για την περαιτέρω εξειδίκευση της λειτουργίας του, και η εμφάνιση ή/και εξειδίκευση των εξαρτημάτων που εκφύονται από αυτά, ευθύνονται για τις μικρότερες διαφορές που παρατηρούνται εντός των υποφύλων. Τέλος, ακόμα μικρότερες μορφολογικές αλλαγές (π.χ. αριθμός τριχιδίων, χρωματικά πρότυπα) που μπορεί να σχετίζονται με την αναγνώριση και αναπαραγωγή ή την χρωματική προσαρμογή στο περιβάλλον είναι συνήθως υπεύθυνες για τις διαφορές σε επίπεδο γενών ή ακόμα και κοντινών ειδών.

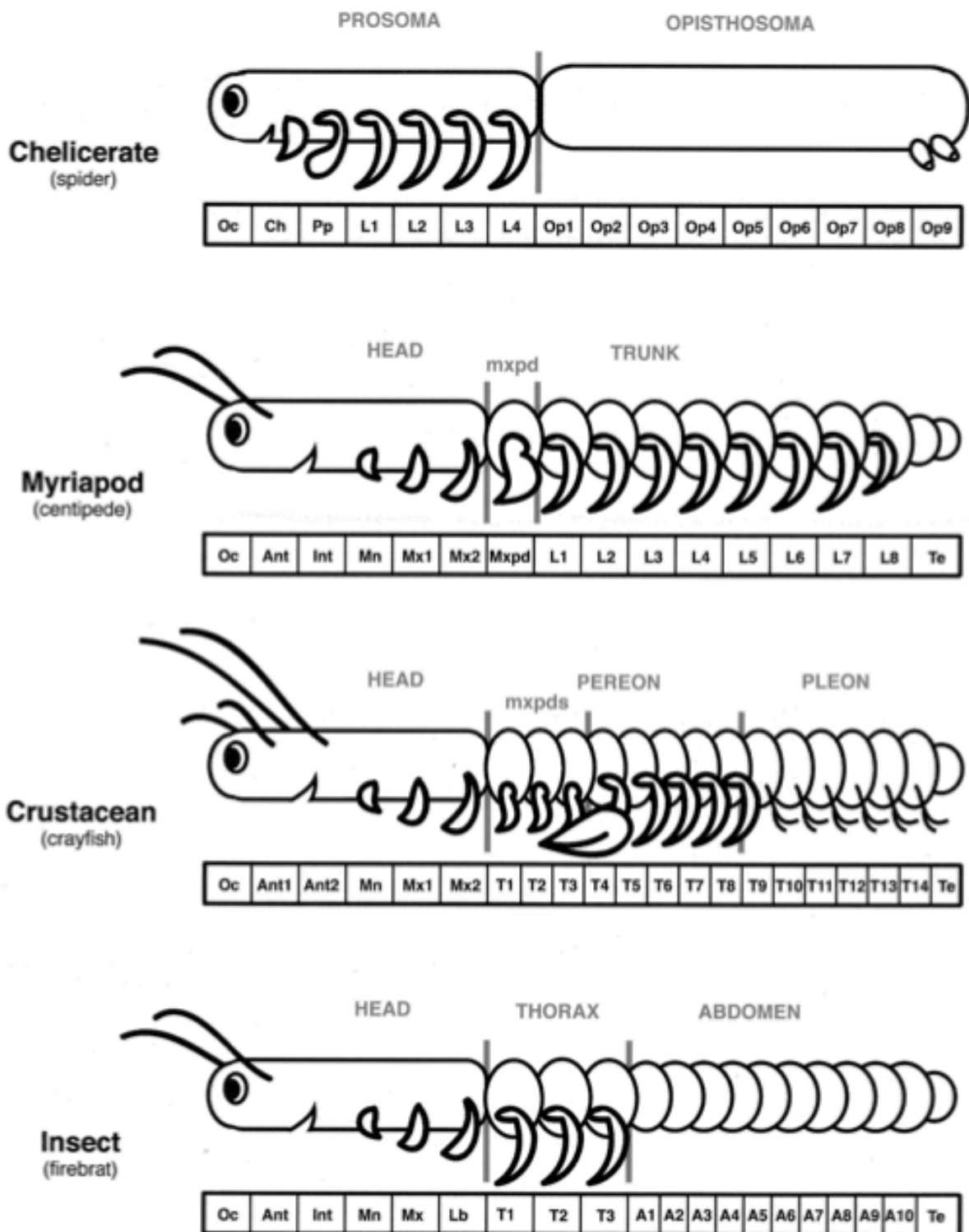
Οι μηχανισμοί με τους οποίους έγιναν κάποιες από αυτές τις αλλαγές έχουν αρχίσει τα τελευταία μόλις χρόνια να διερευνώνται. Η μύγα *Drosophila melanogaster*, που ανήκει στα δίπτερα, είναι ο οργανισμός για την ανάπτυξη του οποίου γνωρίζουμε περισσότερα από κάθε άλλο είδος. Η συγκριτική ανάλυση γονιδιωμάτων από το γένος *Drosophila*, που περιλαμβάνει πάνω από 1500 είδη, έχει δώσει πολύτιμες πληροφορίες για την φυλογένεση των δροσοφιλίδων (Clark, Eisen et al. 2007). Για παράδειγμα, μελέτες της έκφρασης και ρύθμισης του γονιδίου *yellow*, που συμμετέχει στο καθορισμό του χρωματικού προτύπου των φτερών σε κοντινά είδη δροσόφιλας, έχουν αρχίσει να ξεδιπλώνουν τον ρόλο των *cis* και *trans* ρυθμιστικών στοιχείων/παραγόντων στην εξέλιξη των μορφολογικών χαρακτηριστικών (Wittkopp, Vaccaro et al. 2002; Gompel, Prud'homme et al. 2005; Jeong, Rokas et al. 2006).

Η ποικιλομορφία ωστόσο που περιλαμβάνει το γένος *Drosophila* αποτελεί ένα μικρό μόνο κλάσμα της συνολικής ποικιλότητας των εντόμων, και πολύ περισσότερο του φύλου των αρθροπόδων και έτσι μπορεί να δώσει πληροφορίες για μικρές μόνο αλλαγές στη μορφολογία (χρωματικά πρότυπα, αριθμό τριχιδίων κλπ). Η μελέτη της ανάπτυξης και άλλων αρθροπόδων, αποτελεί μονόδρομο για την κατανόηση της εξέλιξης των μεγάλων μορφολογικών αλλαγών που οδήγησαν στον σχηματισμό των βασικών σωματοδομών κατά τη φυλογένεση των αρθροπόδων.



ΣΧΗΜΑ 1: Το φύλο των αρθροπόδων (Hughes and Kaufman 2002)

Διακρίνουμε τέσσερις βασικές ομάδες (υποφύλα): τα χηληκέρτα, τα μυριάποδα, τα εξάποδα και τα καρκινοειδή.



ΣΧΗΜΑ 2: Βασικές σωματοδομές αρθροπόδων (Hughes and Kaufman 2002)

Η διαφορετική λειτουργική ομαδοποίηση των μεταμεριδίων και η παραπέρα εμφάνιση εξειδικευμένων εξαρτημάτων συνθέτουν την βασική μορφολογική ποικιλομορφία στο φύλο των αρθροπόδων.

ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ ΜΗ-ΜΟΝΤΕΛΑ

Από τα πρώτα μυστήρια σχετικά με την ανάπτυξη ενός οργανισμού, ήταν ο καθορισμός των αξόνων του εμβρύου. Με την απομόνωση και μελέτη των γονιδίων που συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία, αποκαλύφθηκαν οι σύνθετοι μηχανισμοί μεταφραστικής και μέτα-μεταφραστικής ρύθμισης και η αξία τους στην εδραίωση και διατήρηση των προτύπων έκφρασης.

Γενετικά και βιοχημικά πειράματα, σε συνδυασμό με δεδομένα ανοσοϊστοχημικών χρώσεων και υβριδοποιήσεων RNA μπορούν να δώσουν μια ολοκληρωμένη εικόνα για την ρύθμιση και λειτουργία ενός γονιδίου κατά τη διάρκεια μιας βιολογικής διαδικασίας. Ο περιορισμός των συγκριτικών μελετών σε υβριδοποιήσεις RNA δίνει μόνο έμμεσα πληροφορίες για τον ρόλο μεμονωμένων γονιδίων σε ένα νέο είδος. Επιπλέον, οι περιορισμένες, συγκριτικά με την δροσόφιλα, γνώσεις για την ανάπτυξη του οργανισμού, δυσκολεύουν την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η ανάλυση της έκφρασης πολλαπλών γονιδίων, και επομένως η σύγκριση ολόκληρων γονιδιακών δικτύων, βελτιώνει αυτό το πρόβλημα. Η αξία των λειτουργικών πειραμάτων παραμένει όμως αξεπέραστη.

Μοναδικής αξίας εργαλείο για την μελέτη των γονιδίων που συμμετέχουν στην ανάπτυξη οργανισμών μη-μοντέλων, αποτελεί η RNA παρεμπόδιση (RNAi), επιτρέποντας την διεξαγωγή πειραμάτων απώλειας ενεργότητας σε πολλούς οργανισμούς. Ωστόσο, το μεγάλο εύρος φαινοτύπων λόγω της πλειοτροπικής δράσης του RNAi επιβάλλει προσεκτική μελέτη των φαινοτύπων, στατιστική ανάλυση και καλή περιγραφή της φυσιολογικής ανάπτυξης του υπό μελέτη οργανισμού. Έτσι, άρχισε να μελετάται σε βάθος η ανάπτυξη νέων οργανισμών, που αντιπροσωπεύουν διαφορετικές φυλογενετικές ομάδες και εμφανίζουν ενδιαφέροντα αναπτυξιακά χαρακτηριστικά, όπως για παράδειγμα το κολεόπτερο *Tribolium castaneum*, και νέα εξειδικευμένα εργαλεία αναπτύχθηκαν για να υποστηρίξουν αυτό το σκοπό.

Ολοένα και περισσότεροι οργανισμοί, μη-μοντέλα, επιλέγονται για τα ιδιαίτερά τους χαρακτηριστικά (φυλογενετική θέση, τύπος εμβρυογένεσης, μορφολογικά χαρακτηριστικά) με σκοπό να προσεγγιστούν αναπτυξιακά προβλήματα και να ελεγχθούν συγκεκριμένες θεωρίες. Οι νέες αυτές πληροφορίες θα συμβάλλουν στην καλύτερη κατανόηση των γενικών και ειδικών μηχανισμών που διέπουν την ανάπτυξη και εξέλιξη του φύλου των αρθροπόδων.

ΤΟ ΑΜΦΙΠΟΔΟ *Parhyale hawaiiensis*

Τα καρκινοειδή αποτελούν ένα από τα τέσσερα υποφύλα των αρθροπόδων και περιλαμβάνουν οργανισμούς όπως είναι οι γαρίδες, οι αστακοί άλλα και μικροσκοπικά είδη του ζωοπλακτού όπως τα κωπήποδα. Αποτελούν αδελφή ομάδα των εξαπόδων, και έτσι τα καρκινοειδή είναι ιδανικοί υποψήφιοι για συγκριτικές αναπτυξιακές μελέτες με τα έντομα.

Το αμφίποδο *Parhyale hawaiiensis* είναι ένα μικρό θαλάσσιο καρκινοειδές με τροπική κατανομή. Ο συνδυασμός του σχετικά μικρού κύκλου ζωής του (διαρκεί περίπου 2 μήνες στους 25°C) και της εύκολης διατήρησής του σε εργαστηριακό περιβάλλον, οδήγησε τους William Browne και Niram Patel να το επιλέξουν ως πειραματικό μοντέλο για την ανάπτυξη των καρκινοειδών. Το αμφίποδο αναπαράγεται όλο το χρόνο και τα θηλυκά άτομα μεταφέρουν τα έμβρυα σε ένα εξωτερικό κοιλιακό χώρο, καθόλη την διάρκεια της εμβρυογένεσης (περίπου 10 μέρες στους 25°C), κάνοντας την απομόνωση εμβρύων σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης εξαιρετικά εύκολη.

Η εμβρυογένεσή του έχει περιγραφεί με αρκετή λεπτομέρεια και χωρίζεται σε 30 στάδια (S1-S30). Ο χρόνος ανάμεσα στην γονιμοποίηση και την πρώτη διαίρεση, είναι περίπου τέσσερις ώρες (στους 25°C), αρκετός για την απομόνωση και ένεση των εμβρύων για την δημιουργία διαγονιδιακών ατόμων.

Οι πρώτες τρεις διαιρέσεις είναι ολοβλαστικές καταλήγοντας στο στάδιο S4 που περιλαμβάνει οκτώ κύτταρα. Κάθε ένα από τα κύτταρα αυτά αποτελεί τον πρόδρομο μιας μόνο εμβρυϊκής στοιβάδας (από 3 κύτταρα για το εκτόδερμα και μεσόδερμα, ένα κύτταρο για τον ενδόδερμα και ένα για την γαμετική σειρά). Αυτό το χαρακτηριστικό επιτρέπει το εύκολο μαρκάρισμα ενός κυττάρου και επομένως τον μετασχηματισμό μιας μόνο εμβρυϊκής στοιβάδας σε μωσαϊκά έμβρυα. Επιπλέον, στο στάδιο των δύο κυττάρων (S2) το καθένα από τα δύο βλαστομερίδια αντιστοιχεί στο μισό (αριστερό ή δεξί τμήμα) του μετέπειτα εμβρύου (ΣΧΗΜΑ 27), επιτρέποντας έτσι τον μετασχηματισμό και την μελέτη της επίδρασης ενός γονιδίου στο μισό μόνο έμβρυο. Το τελευταίο αυτό χαρακτηριστικό αποτέλεσε πολύτιμο σύμμαχό μας στην ανάλυση του ρόλου του ομοιοτικού γονιδίου *Ubx* στην ανάπτυξη των άκρων (δεύτερο μέρος της διατριβής).

Εκτός των παραπάνω φυσικών χαρακτηριστικών του αμφιπόδου *Parhyale hawaiiensis*, η συντονισμένη προσπάθεια ανάπτυξης και προσαρμογής μοριακών τεχνικών για την μελέτη του αμφιπόδου, έχει εμφανίσει σημαντική πρόοδο τα τελευταία χρόνια. Έτσι πλέον, υπάρχουν αξιόπιστα πρωτόκολλα για ανοσοϊστοχημεία και *in situ* υβριδοποίηση, χρήση morpholinos και siRNA για την καταστολή γονιδίων καθώς και για την απομόνωση ή την εξάλειψη βλαστομεριδίων σε πρώιμα έμβρυα (Extavour 2005; Rehm, Hannibal et al. 2009). Επιπλέον, ο μετασχηματισμός του αμφιπόδου με την χρήση του μεταθετού στοιχείου *Minos* (Pavliopoulos and Averof 2005) άνοιξε τον δρόμο για την εκτοπική έκφραση γονιδίων, την

παγίδευση ενισχυτών και εξονίων και την χρήση μεταλλαξιγένεσης για την μελέτη της κυτταρικής συμπεριφοράς και λειτουργίας, όχι μόνο κατά την ανάπτυξη, αλλά και σε άλλες φυσιολογικές λειτουργίες, όπως πχ η γήρανση και αναγέννηση.

Τέλος, ο συνεχώς αυξανόμενος αριθμός αλληλουχιών ESTs από διάφορους ιστούς και αναπτυξιακά στάδια, σε συνδυασμό με την ύπαρξη BAC βιβλιοθηκών και την προσπάθεια να αλληλουχηθεί το γονιδίωμα του αμφιπόδου, συνθέτουν ένα ιδανικό προφίλ ενός αναδυόμενου οργανισμού μοντέλο.

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΕΡΓΑΛΕΙΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΟΟΔΟ ΤΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ

Οι εμπειρικές επιστήμες βασίζονται στην παρατήρηση, το πείραμα και τη λογική, για την κατανόηση των φαινομένων με τα οποία ασχολούνται. Αναπόφευκτα, τα φαινόμενα αυτά καθορίζονται από την ικανότητα του ανθρώπου να αντιλαμβάνεται το περιβάλλον του. Η ικανότητά του αυτή έχει επεκταθεί σε πολύ μεγάλο βαθμό με την βοήθεια της τεχνολογίας. Η εφεύρεση του μικροσκοπίου το επιβεβαιώνει με τον καλύτερο τρόπο.

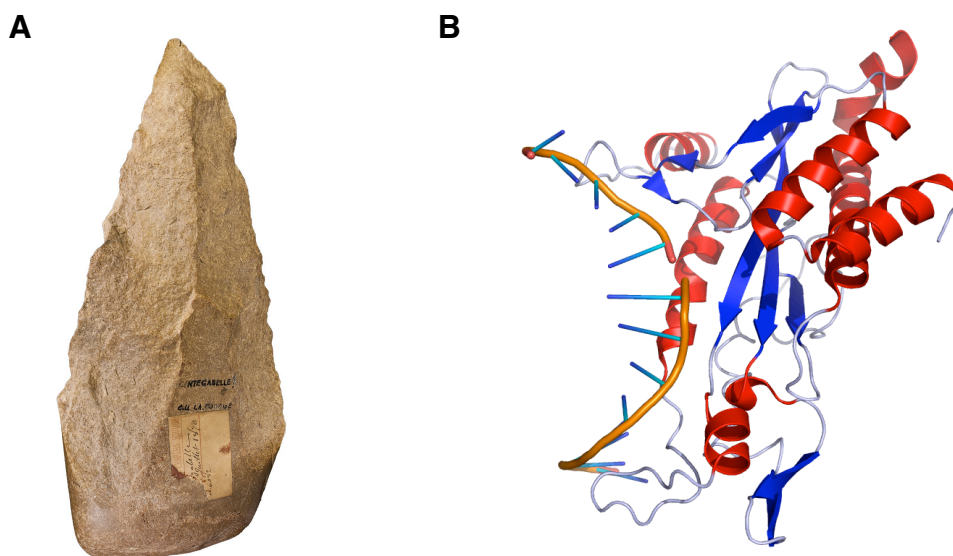
Όταν ο Antonie van Leeuwenhoek χρησιμοποίησε το αυτοσχέδιο μικροσκόπιό του στα τέλη του 17ου αιώνα για να παρατηρήσει για πρώτη φορά μονοκύτταρους οργανισμούς, ένας νέος κόσμος ανοίχτηκε για την επιστήμη της βιολογίας. Ο μέχρι τότε εντελώς ανεξερεύνητος κόσμος των μικροοργανισμών έγινε ξαφνικά ορατός στο ανθρώπινο μάτι. Η μικροσκοπική παρατήρηση γέννησε νέα ερωτήματα, ενώ παλαιότερα ανεξήγητα φαινόμενα βρήκαν ερμηνεία. Αργότερα, η ηλεκτρονική μικροσκοπία έφερε την διακριτική ικανότητα στο υποκυτταρικό επίπεδο, ενώ η κρυσταλλογραφία επέτρεψε την απεικόνιση της δομής μεμονωμένων μορίων όπως το DNA και η αιμοσφαιρίνη.

Η τεχνολογία όμως δεν προσφέρει μόνο εργαλεία που βοηθάνε τον άνθρωπο να αντιληφθεί καλύτερα το περιβάλλον του. Κυρίως προσφέρει εργαλεία που τον βοηθάνε να το χειριστεί με καλύτερο και ταχύτερο τρόπο. Από τα πρώτα πέτρινα εργαλεία, που χρησίμευαν στον τεμαχισμό καρπών και την επεξεργασία των θηραμάτων, μέχρι τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες για την επιλεκτική πέψη και τον ανασυνδυασμό τμημάτων γενετικού υλικού, είναι σαφές πως η πολυπλοκότητα και εξειδίκευση των εργαλείων συμβαδίζει με την ανάπτυξη του πολιτισμού και της επιστήμης (ΣΧΗΜΑ 3). Η αποτελεσματικότητα των διαθέσιμων εργαλείων καθορίζει σε σημαντικό βαθμό την πολυπλοκότητα και ακρίβεια των πειραμάτων που μπορούν να σχεδιαστούν και επομένως την προσέγγιση και τον έλεγχο πολυπλοκότερων φαινομένων και θεωριών.

Για την ανάπτυξη της τεχνολογίας, χρειάζεται γνώση. Είναι σαφές πως η εξέλιξη των επιστημών βοήθησε στην ανάπτυξη της τεχνολογίας, αλλά και το ότι η ανάπτυξη της τεχνολογίας προσέφερε εργαλεία στις επιστήμες για να συνεχίσουν την παραγωγή γνώσης. Η ανάγκη για νέα εργαλεία, που θα ανταποκρίνονται στις σύγχρονες απαιτήσεις της επιστήμης είναι συνεχής και έτσι ένα μεγάλο κομμάτι της έρευνας επικεντρώνεται στο σκοπό αυτό.

Με αυτό ακριβώς το αντικείμενο πραγματεύεται και το πρώτο μέρος αυτής της διατριβής. Η έλλειψη γενετικών εργαλείων για τη διεξαγωγή λειτουργικών πειραμάτων αποτελεί έναν βασικό περιοριστικό παράγοντα για την μελέτη της βιολογίας ενός οργανισμού. Το πρώτο βήμα προς αυτό το στόχο είναι αναμφισβήτητο ο γενετικός

μετασχηματισμός του οργανισμού. Πάνω σε αυτή τη τεχνολογία, μπορούν να εφαρμοστούν δεκάδες γενετικά τεχνάσματα για το χειρισμό και μελέτη της γονιδιακής ρύθμισης ενός οργανισμού καθώς και την παρατήρηση και τροποποίηση της μορφολογίας και συμπεριφοράς του. Ένα από αυτά τα εργαλεία είναι η στόχευση αλληλουχιών σε προκαθορισμένες θέσεις στο γονιδίωμα του οργανισμού μέσω ειδικού ανασυνδυασμού. Η ανάπτυξη αυτού του συστήματος στο αμφίποδο *Parhyale hawaiiensis* αποτελεί μέρος αυτής της εργασίας.



ΣΧΗΜΑ 3: Εξέλιξη εργαλείων

A. Πέτρινο εργαλείο από την λίθινη εποχή, 500-300 χιλιάδων χρόνων

B. Αναπαράσταση της δομής ενός μορίου της περιοριστικής ενδονουκλεάσης EcoRI, πολύτιμου εργαλείου της μοριακής βιολογίας σήμερα, δίπλα σε ένα κλώνο DNA (πορτοκαλί).

(πηγή: commons.wikimedia.org)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

Μια από τις σημαντικότερες προόδους στην βιολογία, ήταν η ανάπτυξη της διαγονιδιακής τεχνολογίας. Με τον όρο αυτό, αναφερόμαστε στην εισαγωγή ενός τμήματος DNA (διαγονίδιο) σε ένα κύτταρο, έτσι ώστε το διαγονίδιο να πολλαπλασιάζεται και να μεταφέρεται σταθερά κατά τις επόμενες κυτταρικές διαιρέσεις. Η κληρονόμηση του διαγονιδίου αυτού μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους. Στον μετασχηματισμό των προκαρυωτικών οργανισμών χρησιμοποιούνται ευρέως τα πλασμίδια, κατασκευές που αντιγράφονται ανεξάρτητα από το γονιδίωμα και διατηρούνται σε μεγάλο αριθμό μέσα στο κύτταρο. Τη σταθερή ένθεση στο γονιδίωμα και κληρονόμηση στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς εξασφαλίζει η χρήση μεταθετών στοιχείων ή ανασυνδυασμού. Τέλος, για την διατήρηση μεγάλων τμημάτων DNA (εκατοντάδων χιλιάδων ζευγών βάσεων) έχουν αναπτυχθεί τα τεχνητά χρωμοσώματα, σε βακτήρια και στον ζαχαρομύκητα (BACs και YACs αντίστοιχα) που αντιγράφονται και μεταφέρονται όπως τα ενδογενή.

Η μεγαλύτερη ίσως πρόκληση για τον μετασχηματισμό ενός οργανισμού είναι η εισαγωγή του διαγονιδίου στο κύτταρο. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται ποικίλουν ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του οργανισμού: από θερμικό ή ηλεκτρικό σοκ σε βακτήρια, μέχρι βιολιστικές μεθόδους και μικροενέσεις σε φυτά και ζώα. Άλλες πιο εξειδικευμένες μέθοδοι περιλαμβάνουν χρήση γενετικά τροποποιημένων ιών που μεταφέρουν την κατασκευή της αρεσκείας μας. Ο βασικός τρόπος εισαγωγής διαγονιδίων σε ζωικούς οργανισμούς είναι η μικροένεση. Ωστόσο, για να επιτευχθεί μεταφορά στην επόμενη γενιά, δεν αρκεί η εισαγωγή του διαγονιδίου σε οποιοδήποτε κύτταρο του οργανισμού, αλλά πρέπει να μετασχηματιστεί η γαμετική σειρά. Για τον σκοπό αυτό συνήθως η μικροένεση γίνεται στο ζυγωτό ή σε πολύ πρώιμα έμβρυα.

Για την ανίχνευση και διατήρηση του μετασχηματισμού, έχουν αναπτυχθεί τα γονίδια επιλογής. Τα πρώτα γονίδια επιλογής αποτελούσαν αγρίου τύπου γονίδια που επαναφέρουν ένα χαρακτηριστικό (πχ χρώμα ματιών) ή προσφέρουν επιβίωση κάτω από ορισμένες συνθήκες (αυξοτροφίες, αντιβιοτικά) σε μεταλλαγμένα στελέχη του οργανισμού. Ωστόσο, η χρήση τέτοιων γονιδίων επιλογής είναι δύσκολο να εφαρμοστεί σε νέους οργανισμούς, καθώς απαιτεί την απομόνωση κατάλληλων μεταλλαγμένων στελεχών και την ταυτοποίηση των αντίστοιχων γονιδίων. Η ανακάλυψη και χρήση των φθορίζουσων πρωτεϊνών, που τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ χημείας το 2008, έδωσε την λύση σε αυτό το πρόβλημα και άνοιξε τον δρόμο για τον μετασχηματισμό δεκάδων ειδών μέχρι σήμερα.

ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Φθορισμός είναι το φαινόμενο κατά το οποίο όταν ένα μόριο απορροφά ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, εκπέμπει ακτινοβολία μικρότερης ενέργειας (μεγαλύτερου μήκους κύματος). Περιγράφηκε για πρώτη φορά στα μέσα του 19ου αιώνα από τον Sir George Stokes σε δείγματα φθοριούχου ασβεστίου. Προς τιμήν του, η διαφορά μεταξύ του μέγιστου του φάσματος απορρόφησης και του μέγιστου του φάσματος εκπομπής ονομάζεται μετατόπιση Stokes (Stokes shift).

Η απομόνωση της πρώτης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) από την μέδουσα *Aequorea victoria* (Shimomura, Johnson et al. 1962) άνοιξε τον δρόμο στην αξιοποίηση του φαινομένου του φθορισμού σε διαγονιδιακές κατασκευές. Χρειάστηκαν ωστόσο τρεις δεκαετίες και αρκετές προόδους στην μοριακή βιολογία για να εκφραστεί η GFP στο βακτήριο *E.coli* και στον νηματώδη *C.elegans* (Chalfie, Tu et al. 1994). Γρήγορα, η χρήση της βρήκε πολλές εφαρμογές στην αναπτυξιακή και κυτταρική βιολογία: από την ζωντανή απεικόνιση κυττάρων μέχρι την υποκυτταρική κίνηση οργανιδίων και την αλληλεπίδραση μορίων.

Έκτοτε, απομονώθηκαν ή αναπτύχθηκαν νέες φθορίζουσες πρωτεΐνες με διαφορετικά φάσματα εκπομπής, επιτρέποντας την ταυτόχρονη παρακολούθηση δύο ή και

περισσότερων μορίων ή κυτταρικών τύπων. Πλέον, είναι διαθέσιμο ένα πλήθος από φθορίζουσες πρωτεΐνες, των οποίων τα ειδικά χαρακτηριστικά, όπως ο χρόνος ημιζωής και η φωτοσταθερότητα, ανταποκρίνονται σε εξειδικευμένες πειραματικές ανάγκες (Shaner, Steinbach et al. 2005) (ΣΧΗΜΑ 4).

Class	Protein	Source laboratory (references)	Excitation ^c (nm)	Emission ^d (nm)	Brightness ^e	Photostability ^f	pKa	Oligomerization
Far-red	mPlum ^g	Tsien (5)	590	649	4.1	53	<4.5	Monomer
Red	mCherry ^g	Tsien (4)	587	610	16	96	<4.5	Monomer
	tdTomato ^g	Tsien (4)	554	581	95	98	4.7	Tandem dimer
	mStrawberry ^g	Tsien (4)	574	596	26	15	<4.5	Monomer
	J-Red ^h	Evrogen	584	610	8.8*	13	5.0	Dimer
	DsRed-monomer ^h	Clontech	556	586	3.5	16	4.5	Monomer
Orange	mOrange ^g	Tsien (4)	548	562	49	9.0	6.5	Monomer
	mKO	MBL Intl. (10)	548	559	31*	122	5.0	Monomer
Yellow-green	mCitrine ⁱ	Tsien (16,23)	516	529	59	49	5.7	Monomer
	Venus	Miyawaki (1)	515	528	53*	15	6.0	Weak dimer ^j
	YPet ^g	Daugherty (2)	517	530	80*	49	5.6	Weak dimer ^j
	EYFP	Invitrogen (18)	514	527	51	60	6.9	Weak dimer ^j
Green	Emerald ^g	Invitrogen (18)	487	509	39	0.69 ^k	6.0	Weak dimer ^j
	EGFP	Clontech ^l	488	507	34	174	6.0	Weak dimer ^j
Cyan	CyPet	Daugherty (2)	435	477	18*	59	5.0	Weak dimer ^j
	mCFPm ^m	Tsien (23)	433	475	13	64	4.7	Monomer
	Cerulean ^g	Piston (3)	433	475	27*	36	4.7	Weak dimer ^j
UV-excitable green	T-Sapphire ^g	Griesbeck (6)	399	511	26*	25	4.9	Weak dimer ^j

ΣΧΗΜΑ 4: Λίστα με διαθέσιμες φθορίζουσες πρωτεΐνες (Shaner 2005)

Τα διαφορετικά φάσματα εκπομπής επιτρέπουν την ταυτόχρονη χρήση πολλαπλών φθορίζουσων πρωτεϊνών. Παράγοντες όπως η αυξημένη φωτεινότητα και φωτοσταθερότητα αποτελούν σημαντικούς για πειράματα ζωντανής απεικόνισης ή FRAP (Fluorescent Recovery After Photobleaching). Η ενεργότητα κάποιων πρωτεϊνών σε μονομερή από την άλλη, είναι χρήσιμη για την δημιουργία χιμαιρικών πρωτεϊνών.

ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Τα μεταθετά στοιχεία, είναι τμήματα DNA που έχουν την ικανότητα να μετακινούνται αυτόνομα μέσα στο γονιδίωμα ενός οργανισμού. Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με τον μηχανισμό μετακίνησής τους: τα μεταθετά στοιχεία τάξης I και τάξης II.

Τα μεταθετά στοιχεία τάξης I μεταγράφονται πρώτα σε ένα ενδιάμεσο RNA μόριο, και μετά από αντίστροφη μεταγραφή εισάγονται σε νέα θέση. Κάποια από αυτά τα μεταθετά φέρουν μακριά επαναλαμβανόμενα άκρα (Long Terminal Repeats). Με εξαίρεση τα SINEs (Short interspersed repetitive elements), τα μεταθετά στοιχεία τάξης I κωδικοποιούν την σύνθεση της αντίστροφης μεταγραφάσης που απαιτείται για την μετακίνησή τους. Ο τρόπος με τον οποίο μετακινούνται ονομάζεται πολλαπλασιαστικός, καθώς η μεταγραφή τους οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των μεταθετών στο γονιδίωμα (Atkinson, Pinkerton et al. 2001).

Από την άλλη, τα μεταθετά στοιχεία τάξης II μετακινούνται με την αποκοπή και μετάθεσή τους στο νέο σημείο, χωρίς ενδιάμεση μορφή RNA. Τα άκρα τους αποτελούνται από σχετικά σύντομες ανάστροφες αλληλουχίες (Inverted Repeats). Ανάμεσα σε αυτές υπάρχει το γονίδιο που κωδικοποιεί ένα ένζυμο, την τρανσποζάση, που είναι απαραίτητο για την κατάλυση της αντίδρασης μετακίνησης του μεταθετού στοιχείου. Η μετακίνηση των μεταθετών στοιχείων τάξης II είναι κατά κανόνα συντηρητική, καθώς το μεταθετό αποκόπεται πρώτου μετακινηθεί. Ωστόσο, σε κάποιες περιπτώσεις, η ατελής αποκοπή μπορεί να οδηγήσει τελικά σε πολλαπλασιασμό του μεταθετού.

Το πρώτο μεταθετό στοιχείο, το Ac/Ds, ανακαλύφθηκε και μελετήθηκε στο καλαμπόκι *Zea mays* από την Barbara McClintock στα μέσα του 20ου αιώνα (McClintock 1953). Η αναγνώριση της αξίας των μεταθετών στοιχείων ωστόσο ήρθε αρκετά χρόνια αργότερα και επισφραγίστηκε με την βράβευσή της με το Νόμπελ Ιατρικής και Φυσιολογίας το 1983. Ένα χρόνο νωρίτερα, με την αντικατάσταση του γονιδίου της τρανσποζάσης του μεταθετού στοιχείου P με ένα γονίδιο επιλογής και την εξωγενή παροχή τρανσποζάσης είχε επιτευχθεί ο μετασχηματισμός του πρώτου αρθροπόδου, της *Drosophila melanogaster* (Spradling and Rubin 1982).

Ωστόσο η ενεργότητα του μεταθετού στοιχείου P σε άλλα έντομα/αρθρόποδα αποδείχθηκε πολύ περιορισμένη (Handler, Gomez et al. 1993) και έτσι αναζητήθηκαν άλλα μεταθετά για να καλύψουν αυτή την ανάγκη. Το μεταθετό στοιχείο Minos, που είναι μέλος της υπερικογένειας των Tc1/mariner και απομονώθηκε από την *Drosophila hydei* (Franz and Savakis 1991; Plasterk, Izsvak et al. 1999), εμφανίζει ενεργότητα σε ένα μεγάλο εύρος οργανισμών, μεταξύ των οποίων η *Drosophila melanogaster*, το *Tribolium castaneum* καθώς και ανθρώπινες κυτταρικές σειρές (Klinakis, Loukeris et al. 2000; Klinakis, Zagoraiou et al. 2000; Pavlopoulos, Berghammer et al. 2004).

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Η μελέτη της ανάπτυξης των οργανισμών αρχικά βασιζόταν εξολοκλήρου στην παρατήρηση, κάποιες φορές με την βοήθεια ιστολογικών χρώσεων. Αργότερα, η επαγωγή και μελέτη μεταλλαγών επέτρεψε την χαρτογράφηση και απομόνωση συγκεκριμένων γονιδίων. Επιπλέον, τεχνολογικές εξελίξεις, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και η RNA σίγαση βοήθησαν στην κλωνοποίηση γονιδίων και τη μελέτη της λειτουργίας τους. Ωστόσο η διαγονιδιακή τεχνολογία διευκολύνει ακόμα περισσότερο τη μελέτη της ανάπτυξης ενός οργανισμού με τις πολλαπλές εφαρμογές που προσφέρει:

ΕΛΕΓΧΟ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ cis-ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ

Η μελέτη της ενεργότητας cis ρυθμιστικών στοιχείων αποτελεί πολύ σημαντικό εργαλείο για την μελέτη της λειτουργίας τους. Η χρήση ενός γονιδίου μάρτυρα υπό τον έλεγχο μιας πιθανής ρυθμιστικής περιοχής, μπορεί να δώσει μια ολοκληρωμένη εικόνα για τη χρονική και τοπική του ενεργότητα. Επιπλέον μας επιτρέπει την τμηματική ανάλυση της αλληλουχίας άνωθεν ενός ενδογενούς γονιδίου, για την απομόνωση και μελέτη των ρυθμιστικών του στοιχείων. Παραπέρα, με την εισαγωγή σημειακών μεταλλαγών στα τμήματα που εμφανίζουν ενεργότητα, μπορούμε να ταυτοποιήσουμε τις ακριβείς περιοχές πρόσδεσης των σημαντικών για την ενεργότητα μεταγραφικών παραγόντων.

Εκτός όμως από την μελέτη ενδογενών ρυθμιστικών στοιχείων, ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει η σύγκριση cis-ρυθμιστικών στοιχείων ανάμεσα σε κοντινά ή μακρυνά είδη. Έτσι, στοιχεία με γνωστή ενεργότητα σε κάποιον οργανισμό, μπορούν να ελεγχθούν για την ενεργότητά τους σε άλλα είδη, δίνοντας πληροφορίες απαραίτητες για την κατανόηση της συνεξέλιξης των cis και trans ρυθμιστικών στοιχείων.

Τέλος, οι σύγχρονες μέθοδοι βιοπληροφορικής ανάλυσης και σύγκρισης γονιδιωμάτων παράγουν μεγάλο όγκο από δεδομένα για πιθανά ρυθμιστικά στοιχεία σε διάφορους οργανισμούς. Ο *in vivo* έλεγχος αυτών των δεδομένων είναι απαραίτητος για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων και την αποκάλυψη των πιθανών λαθών, βοηθώντας παράλληλα στον σχεδιασμό ακριβέστερων προγραμμάτων *in silico* ταυτοποίησης και πρόβλεψης cis-ρυθμιστικών στοιχείων.

ΕΚΤΟΠΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Η απομόνωση cis-ρυθμιστικών στοιχείων ενός ενδογενούς γονιδίου μπορεί να είναι από μόνη της μια πολύ επίπονη διαδικασία. Μετέπειτα όμως, τα στοιχεία αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτοπική έκφραση οποιουδήποτε γονιδίου του ενδιαφέροντός μας με εξαιρετική ακρίβεια. Μάλιστα με την χρήση δυαδικών συστημάτων όπως το GAL4 (Brand and Perrimon 1993) μπορεί να επιτευχθεί ενίσχυση της έκφρασης του διαγονιδίου σε σχέση με τα ενδογενή επίπεδα.

Από την άλλη, ενισχυτές από θερμοεπαγώμενα γονίδια (πχ. οικογένεια *hsp70a*), συστήματα καταστολής της έκφρασης (*LexA* και *GAL80*) και τεχνητοί υποκινητές, όπως το σύστημα *tTA/tetO* (Lycett, Kafatos et al. 2004) δίνουν την δυνατότητα ελέγχου του χρόνου επαγωγής της έκφρασης του διαγονιδίου.

ΠΑΓΙΔΕΥΣΗ ΕΝΙΣΧΥΤΩΝ/ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Με τη χρήση ειδικών κατασκευών, είναι εφικτή η σάρωση ενός γονιδιώματος και η παγίδευση ενισχυτών και γονιδίων. Οι παγιδεύσεις αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη λεπτομερή μελέτη των προτύπων έκφρασης γονιδίων καθώς και για την παρακολούθηση των κυτταρικών κινήσεων κατά την ανάπτυξη. Ειδικά η παγίδευση γονιδίων, επιτρέπει την εύκολη κλωνοποίηση του παγιδευμένου γονιδίου, βοηθώντας στην ανακάλυψη νέων γονιδίων.

ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ

Η εισαγωγή των μεταθετών στοιχείων σε διάφορα σημεία του γονιδιώματος είναι σχεδόν τυχαία. Το μεταθετό στοιχείο *Minos* για παράδειγμα, χρειάζεται για την ένθεσή του ένα δινουκλεοτίδιο TA, που είναι διαθέσιμο στατιστικά κάθε 16 βάσεις σε μία τυχαία αλληλουχία. Εκτός από την παγίδευση ενισχυτών και γονιδίων λοιπόν, μια κατασκευή μπορεί να εισαχθεί στη μέση της κωδικής περιοχής ενός γονιδίου, διακόπτοντας την μετάφρασή του. Επίσης, εισαγωγή σε περιοχές του υποκινητή, απαραίτητες για την ομαλή λειτουργία του μπορούν να έχουν αρνητικές επιπτώσεις στην μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου. Το γεγονός αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τυχαία μεταλλαξιγένεση σε ένα οργανισμό, προσφέροντας επιπλέον το πλεονέκτημα της εύκολης κλωνοποίησης του αντίστοιχου γονιδίου.

Για τον ίδιο σκοπό έχουν αναπτυχθεί και ειδικοί φορείς που περιέχουν κωδικόνια λήξης ή αλληλουχίες αποσιώπησης, που αυξάνουν την πιθανότητα μεταλλαξιγένεσης σε κάθε ένθεση του μεταθετού στοιχείου. Τέλος, η κινητοποίηση ενός μεταθετού στοιχείου κάποιες φορές προκαλεί ελλείματα παρακείμενων περιοχών. Τα ελλείματα αυτά αποτελούν άλλο ένα τρόπο δημιουργίας μεταλλαγών μετά από παγίδευση γονιδίων και μπορούν να βοηθήσουν στον χαρακτηρισμό ενός γονιδίου.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΠΑΓΙΔΕΥΣΗ ΕΝΙΣΧΥΤΩΝ

Οι ενισχυτές είναι αλληλουχίες του γονιδιώματος των ευκαρυωτικών οργανισμών που επάγουν την έκφραση των γονιδίων. Η επαγωγή αυτή γίνεται μέσω της αναγνώρισης και δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι με την σειρά τους στρατολογούν πρωτεΐνες υπεύθυνες για την συγκρότηση και ενεργοποίηση της μεταγραφικής μηχανής.

Τα δύο βασικά χαρακτηριστικά των ενισχυτών είναι η δράση τους ανεξαρτήτως φοράς και η ικανότητα ενεργοποίησης γονιδίων σε μεγάλες αποστάσεις (Levine). Για παράδειγμα, ο ενισχυτής του γονιδίου *cut* στην *Drosophila melanogaster*, που είναι υπεύθυνος για την έκφραση στο φτερό, βρίσκεται 85kb άνωθεν του υποκινητή του, ο

βασικός ενισχυτής της ανοσοσφαιρίνης Ημ στο ποντίκι, βρίσκεται μέσα στο δεύτερο ιντρόνιο του γονιδίου, ενώ ο ενισχυτής του γονιδίου της α-αλυσίδας του υποδοχέα των T λεμφοκυττάρων, εκτείνεται μέχρι και 69kb μετά το γονίδιο (Blackwood and Kadonaga 1998). Επιπλέον, σε κάποιες περιπτώσεις, οι ενισχυτές μπορούν να δράσουν και σε trans, ενεργοποιώντας το αλληλόμορφο γονίδιο που βρίσκεται στο άλλο χρωμόσωμα (Wu 1993).

Το σύνθετο και δυναμικό πρότυπο έκφρασης κάθε γονιδίου κατά την ανάπτυξη ενός οργανισμού, ελέγχεται συνήθως από περισσότερους από έναν ενισχυτές, που δρουν ανεξάρτητα ή/και συνεργατικά. Κάθε ενισχυτής μπορεί να είναι υπεύθυνος για μέρος του προτύπου έκφρασης (χρονικά ή/και τοπικά) (Gray and Levine 1996; Rivera-Pomar and Jackle 1996), ενώ πολλές φορές οι ενισχυτές εμφανίζουν πλεονασματική δράση, που μπορεί να εξυπηρετεί την διασφάλιση του ακριβούς προτύπου έκφρασης ενάντια σε γονιδιακές και περιβαλλοντολογικές διακυμάνσεις (Frankel, Davis et al. ; Perry, Boettiger et al.).

Εκμεταλλευόμενοι τους ενδογενείς ενισχυτές ενός οργανισμού, μπορούμε να εκφράσουμε ένα διαγονίδιο σε μια πληθώρα από συγκεκριμένα πρότυπα κατά την ανάπτυξή του. Το γονίδιο μάρτυρας (συνήθως μιας φθορίζουσας πρωτεΐνης) τοποθετείται υπό τον έλεγχο ενός βασικού υποκινητή και εισάγεται στο γονιδίωμα. Εάν η ένθεση του διαγονιδίου γίνει σε μια περιοχή που βρίσκεται υπό την επίδραση ενός ενδογενούς ενισχυτή, το γονίδιο μάρτυρας θα εκφραστεί (ΣΧΗΜΑ 5). Η απεικόνιση του γονιδίου μάρτυρα (ανάλογα με την περίπτωση: ζωντανή απεικόνιση, ανοσοιστοχημεία, κ.α) μας επιτρέπει να ακολουθήσουμε την έκφραση του γονιδίου καθόλη την διάρκεια της ανάπτυξης και να την μελετήσουμε με λεπτομέρεια σε όλους τους ιστούς.

Με την παγίδευση ενισχυτών μπορούμε να αναπαράγουμε θεωρητικά τα πρότυπα έκφρασης όλων των γονιδίων ενός οργανισμού. Μάλιστα, αντιθέτως με τους υποκινητές των ενδογενών γονιδίων, που ενσωματώνουν τη δράση πολλών ενισχυτών, ο βασικός υποκινητής του διαγονιδίου που εισάγουμε μπορεί να βρεθεί υπό την επίδραση και ενός μόνο ενισχυτή. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την μελέτη και κατανόηση της μεμονωμένης και συνεργατικής λειτουργίας των ενισχυτών. Επιπλέον, με τη χρήση ανάστροφης αλισυδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (inverse PCR) μπορούμε να ανακτήσουμε την γενωμική αλληλουχία του σημείου της ένθεσης και σε περίπτωση που το γονιδίωμα του οργανισμού είναι διαθέσιμο να επιχειρήσουμε να αναγνωρίσουμε τα ρυθμιστικά στοιχεία της περιοχής. Ωστόσο, η μεγάλη εμβέλεια της δράσης των ενισχυτών μπορεί να δυσκολέψει ένα τέτοιο εγχείρημα.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΠΑΓΙΔΕΥΣΗ ΕΞΟΝΙΩΝ

Αντίθετα με την παγίδευση ενισχυτών, όπου η κατασκευή παγίδευσης αποτελεί μια νέα μεταγραφική μονάδα, κατά τη γονιδιακή παγίδευση, το γονίδιο μάρτυρας παρεμβάλλεται στην αλληλουχία ενός ενδογενούς γονιδίου, με αποτέλεσμα την παραγωγή χιμαιρικών μεταγράφων που οδηγούν στην έκφρασή του.

Προϋπόθεση αποτελεί η εισαγωγή του διαγονιδίου σε μεταγραφόμενη περιοχή στην φορά μεταγραφής του ενδογενούς γονιδίου. Καθώς η μεταγραφή γίνεται από τον ενδογενή υποκινητή του στοχευμένου γονιδίου, δεν χρειάζεται να προσφέρουμε βασικό υποκινητή στο μάρτυρα. Κατά την ωρίμανση του μεταγράφου, οι αλληλουχίες προσφοράς και αποδοχής ματίσματος αναγνωρίζονται και τα άκρα των εξονίων συνδέονται, αποκόπτοντας τις ενδιάμεσες ιντρονικές περιοχές. Για να εξασφαλιστεί η παρουσία του διαγονιδίου στο ώριμο μετάγραφο, χρειάζεται να αναγνωρισθεί από τον μηχανισμό ματίσματος ως εξόνιο. Αρκεί η παρουσία μιας αλληλουχίας αποδοχής ματίσματος πριν από το γονίδιο μάρτυρα, ώστε να περάσει η αλληλουχία του διαγονιδίου στο τελικό προϊόν του ματίσματος.

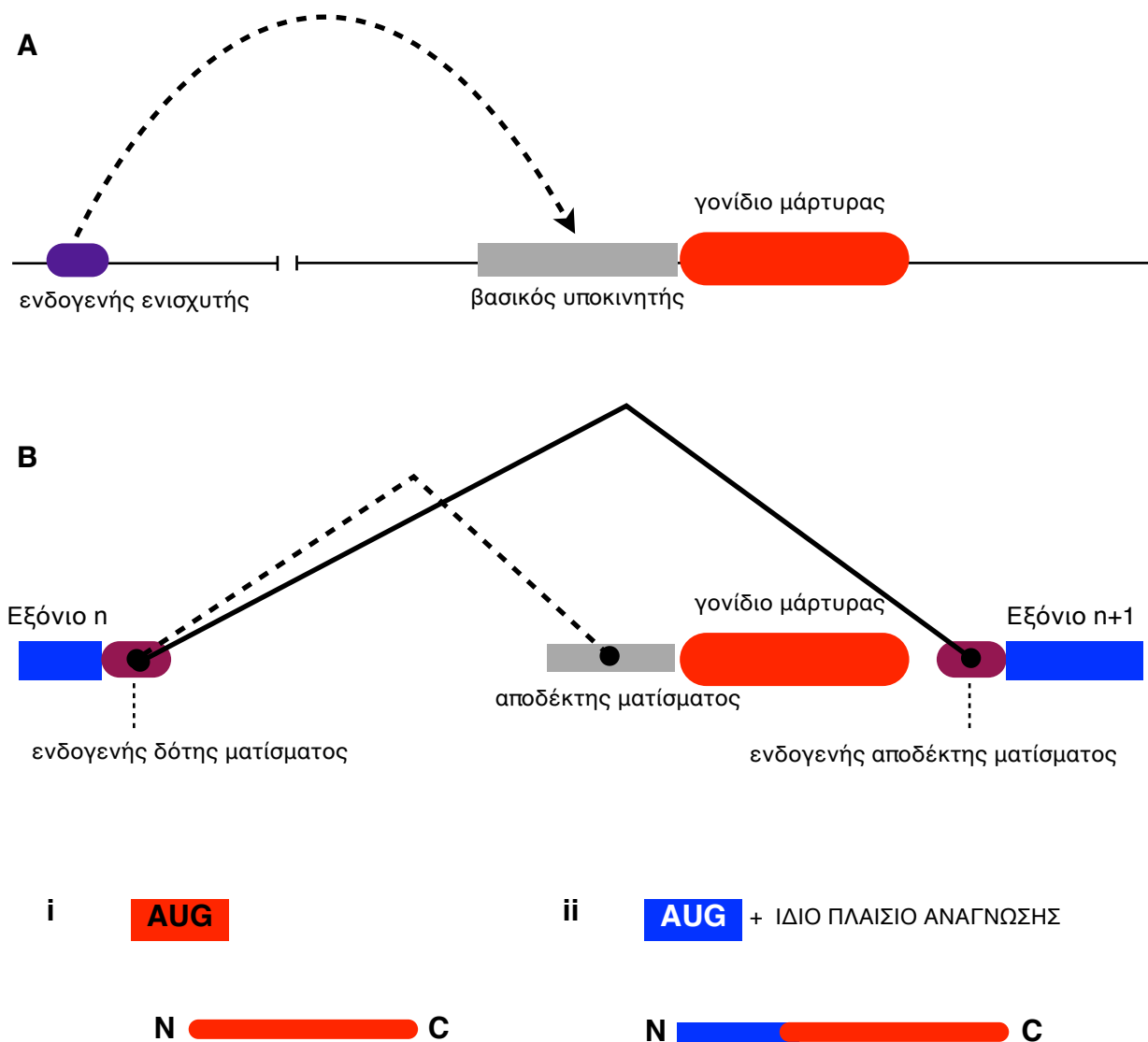
Εάν το διαγονίδιο προηγείται της έναρξης της μετάφρασης του ενδογενούς γονιδίου, τότε θα παραχθεί το προϊόν που το διαγονίδιο κωδικοποιεί. Σε περίπτωση που ακολουθεί την έναρξη, θα παραχθεί μια χιμαιρική πρωτεΐνη με αμινοτελικό άκρο τμήμα του ενδογενούς προϊόντος και καρβοξυτελικό το διαγονιδιακό, υπό την προϋπόθεση να συμπίπτουν τα πλαίσια ανάγνωσης (στατιστικά, μια στις τρεις) (ΣΧΗΜΑ 5).

Όταν παράγεται λειτουργικό προϊόν, αυτό μπορεί να ανιχνευτεί με κατάλληλες μεθόδους, ανάλογα με το γονίδιο μάρτυρα (μικροσκοπία, ενζυματική δράση κλπ). Αξίζει να σημειωθεί, πως η παραγωγή μη λειτουργικής πρωτεΐνης, λόγω ελλατωματικής αναδίπλωσης της χιμαιρικής πρωτεΐνης, μπορεί να ανιχνευτεί με ανοσοϊστοχημεία. Η παγίδευση γονιδίων με διαφορετικό πλαίσιο διαβάσματος μπορεί να ανιχνευτεί με υβριδοποίηση ή 5'RACE.

Ένα από τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματα που προσφέρει η παγίδευση εξονίων, είναι η δυνατότητα εύκολης κλωνοποίησης του παγιδευμένου γονιδίου. Το γονίδιο μάρτυρας, δρα ως ετικέτα πάνω στα μετάγραφα του ενδογενούς γονιδίου, επιτρέποντας την χρήση 5' RACE για την κλωνοποίηση της 5' ενδογενούς αλληλουχίας. Με τη χρήση αυτής της πληροφορίας μπορούμε κατόπιν να κλωνοποιήσουμε το πλήρες ενδογενές μετάγραφο από αγρίου τύπου άτομα. Η μέθοδος αυτή είναι χρήσιμη για την ανακάλυψη νέων γονιδίων, καθώς δεν βασίζεται σε ομολογία αλληλουχίας με ήδη γνωστά γονίδια, αλλά στην επιλογή προτύπων έκφρασης που μας ενδιαφέρουν.

Πέραν της κλωνοποίησης νέων γονιδίων, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τις διαγονιδιακές σειρές για λεπτομερή μελέτη των δυναμικών προτύπων έκφρασης των

παγιδευμένων γονιδίων. Συχνά μάλιστα, το χιμαιρικό προϊόν μπορεί να περιλαμβάνει αλληλουχίες υπεύθυνες για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της ενδογενούς πρωτεΐνης (κυτταροπλασματική μεμβράνη, πυρήνας, εξωκυτταρικός χώρος κλπ) αποκαλύπτοντας έτσι πληροφορίες για την λειτουργία του παγιδευμένου γονιδίου (Morin, Daneman et al. 2001). Τέλος, η δυνατότητα ζωντανής απεικόνισης μας προσφέρει την ευκαιρία μέτρησης και παρακολούθησης των κυττάρων που εκφράζουν το παγιδευμένο γονίδιο, κατά τη διάρκεια των πολύπλοκων αναπτυξιακών κινήσεών τους.



ΣΧΗΜΑ 5: Γονιδιακή παγίδευση

A. Παγίδευση ενισχυτών: ο βασικός υποκινητής ενεργοποιείται από ενδογενή ενισχυτή(-ές) με αποτέλεσμα την μεταγραφή του γονιδίου μάρτυρα.

B. Παγίδευση εξονίων: το γονίδιο μάρτυρας εισάγεται σε ιντρόνιο, στην φορά της μεταγραφής ενός ενδογενούς γονιδίου. Κάποια μετάγραφα ματίζονται στην αλληλουχία αποδοχής του διαγονιδίου και μεταφράζονται σε λειτουργική πρωτεΐνη μάρτυρα **i**) αν το γονίδιο μάρτυρας βρίσκεται πριν το AUG του παγιδευμένου γονιδίου και **ii**) αν βρίσκεται μετά το AUG και στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης.

ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΓΙΔΕΥΣΕΩΝ

Ο συνδυασμός παγιδεύσεων γονιδίων και ενισχυτών, μπορεί να δώσει ένα ευρύ φάσμα προτύπων έκφρασης στο αναπτυσσόμενο έμβρυο. Η χρήση αυτών των προτύπων έκφρασης για την υπερέκφραση γονιδίων του ενδιαφέροντός μας, προσφέρει νέα εργαλεία για την μελέτη του αναπτυξιακού τους ρόλου.

Με δεδομένο πως κάθε παγίδευση ενισχυτή/γονιδίου δεν μπορεί να αναπαραχθεί κατά βούληση, είναι απαραίτητο να υπάρχει η δυνατότητα αξιοποίησης των ίδιων ενθέσεων για την έκφραση του γονιδίου μάρτυρα (αναγνώριση και περιγραφή) και του γονιδίου του ενδιαφέροντός μας (βιολογικό ερώτημα/πείραμα).

Ο στόχος αυτός μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους (ΣΧΗΜΑ 6-7).

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ/ΑΠΟΔΕΚΤΗ ΜΑΤΙΣΜΑΤΟΣ

Εάν στην ίδια κατασκευή εισάγουμε το δεύτερο γονίδιο (γονίδιο ενδιαφέροντος) υπό τον έλεγχο ενός δεύτερου υποκινητή/αποδοχέα ματίσματος, θα περιμέναμε την ταυτόσημη έκφρασή του με τον μάρτυρα. Ωστόσο, ο ανταγωνισμός μεταξύ των δύο στοιχείων (υποκινητών ή αποδοχέων ματίσματος) μπορεί να επηρεάσει την έκφραση και έτσι η ακριβής έκφραση του δεύτερου γονιδίου θα πρέπει να επιβεβαιωθεί με χρονοβόρες ανοσοϊστοχημικές μεθόδους. Ακόμα και σε περίπτωση που τα πρότυπα έκφρασης των δύο διαγονιδίων ταυτίζονται, λόγω ανταγωνισμού, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου του ενδιαφέροντος μπορεί να είναι χαμηλότερα από τα επιθυμητά.

2. ΧΡΗΣΗ ΕΣΩΤΕΡΙΚΩΝ ΘΕΣΕΩΝ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΡΙΒΟΣΩΜΑΤΩΝ (IRES)

Η αναγνώριση του τροποποιημένου 5' άκρου του μεταγράφου από το ριβόσωμα είναι το πρώτο στάδιο για την μετάφραση του μηνύματος. Σε πολλούς ιούς η μετάφραση των πολυκυστρονικών μηνυμάτων επιτυγχάνεται με τη συναρμολόγηση του ριβοσώματος και σε ενδιάμεσα σημεία του μεταγράφου. Τα IRES (Internal Ribosomal Entry Site) είναι αλληλουχίες που έχουν "εφεύρει" οι ιοί για αυτό ακριβώς το σκοπό (Hellen and Sarnow 2001). Οι αλληλουχίες αυτές βρίσκονται πριν από κάθε ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης πάνω στο πολυκυστρονικό μήνυμα, αναγνωρίζονται από το ριβόσωμα και επιτρέπουν την ανεξάρτητη έναρξη της μετάφρασης. Παρότι ο μηχανισμός αυτός χρησιμοποιείται από τους ιούς με επιτυχία, η χρήση των IRES σε ετερόλογα συστήματα, για την έκφραση πολλαπλών πρωτεϊνών από το ίδιο μετάγραφο, εμφανίζει κάποια προβλήματα. Για την αποτελεσματική μετάφραση μέσω IRES απαιτούνται ειδικοί συμπαράγοντες, η διαθεσιμότητα των οποίων μπορεί να διαφέρει μεταξύ κυτταρικών τύπων ή ειδών (Balvay, Soto Rifo et al. 2009). Έτσι,

χρειάζεται να γίνει προσεκτικός έλεγχος της ενεργότητας ενός IRES πριν την επιλογή του για χρήση.

3. ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ 2Α ΤΟΥ ΙΟΥ FMDV

Ένα ενδιαφέρον σύστημα για την ισομοριακή έκφραση δύο ή περισσότερων γονιδίων στην σειρά είναι αυτό του ιού του αφρώδους πυρετού (FMDV - Foot and Mouth Disease Virus). Ο ιός αυτός κωδικοποιεί πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες από ένα μετάγραφο με συνεχές ανοικτό πλαίσιο διαβάσματος. Τα διάφορα γονίδια διαχωρίζονται από μία αλληλουχία που κωδικοποιεί ένα πεπτίδιο δεκαοκτώ αμινοξέων, που λόγω της δευτερογενούς δομής που λαμβάνει κατά την μετάφρασή του, παρεμποδίζει την πρόσβαση του ενζύμου της πεπτιδύλτρανσφεράσης σε ένα συγκεκριμένο σημείο κατά την σύνθεση του πεπτιδίου (Donnelly, Luke et al. 2001; de Felipe 2004). Έτσι, ανακόπτεται η δημιουργία του πεπτιδικού δεσμού ανάμεσα στα δύο τελευταία αμινοξέα του πεπτιδίου, απελευθερώνοντας την ήδη σχηματισμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα. Το ριβόσωμα συνεχίζει κανονικά την μετάφραση, παράγοντας πρακτικά ισομοριακές ποσότητες των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το ενιαίο αγγελιοφόρο ριβονουκλεϊκό οξύ. Το πεπτίδιο 2Α έχει ήδη χρησιμοποιηθεί σε κυτταρικές σειρές και στο ποντίκι, επιβεβαιώνοντας την ανεξάρτητη και ίση παραγωγή των συνδεδεμένων γονιδίων (Szymczak, Workman et al. 2004; Trichas, Begbie et al. 2008).

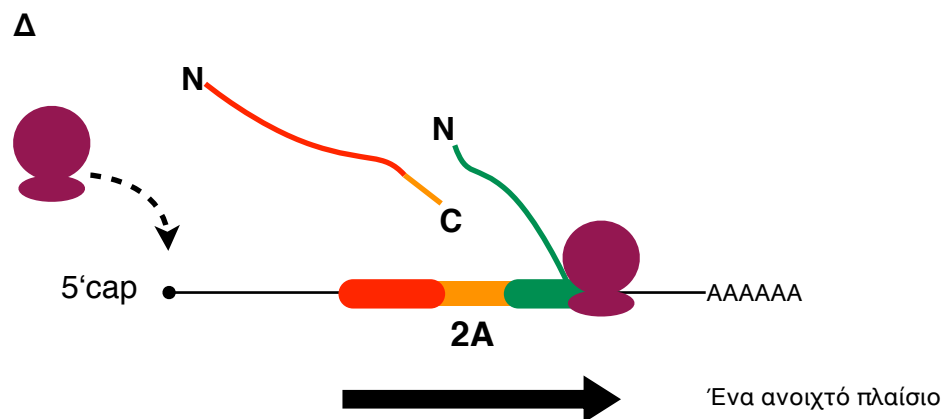
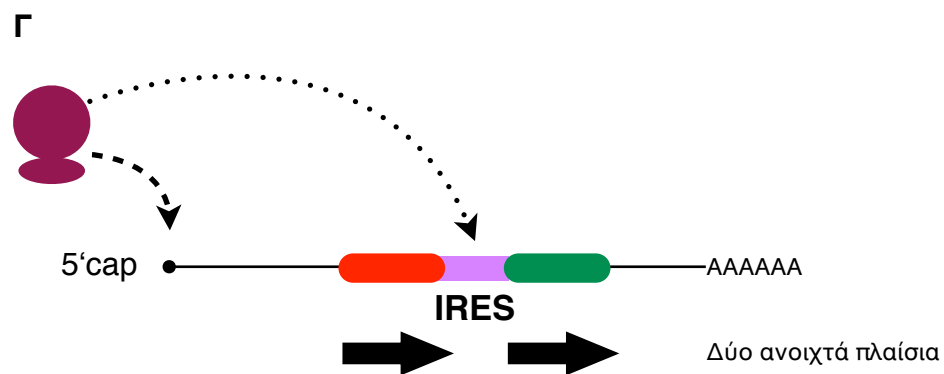
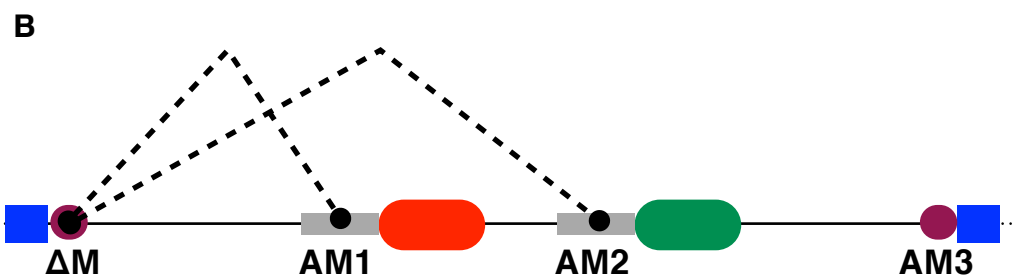
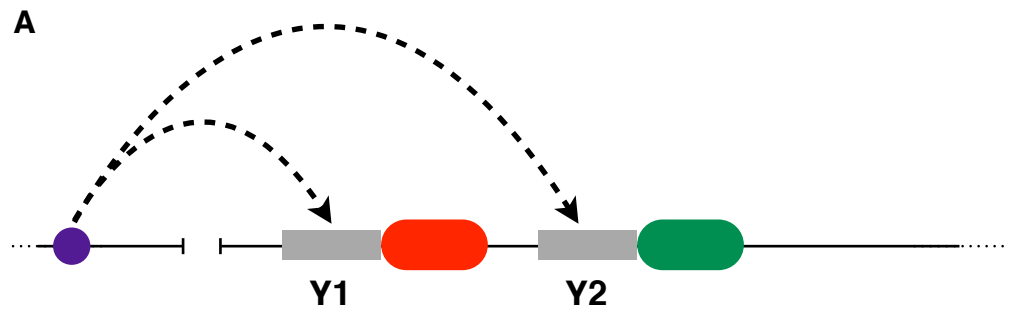
4. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΝΕΟΥ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΟΥ ΜΕ ΕΙΔΙΚΟ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟ

Το κοινό χαρακτηριστικό όλων των παραπάνω προσεγγίσεων, είναι η εισαγωγή του γονιδίου του ενδιαφέροντος ταυτοχρόνως μαζί με το γονίδιο μάρτυρα. Η παρουσία του διαγονιδίου εξαρχής μπορεί να επηρεάσει την φυσιολογική κυτταρική συμπεριφορά ή ακόμα και να είναι θνησιγόνος για τα κύτταρα που το εκφράζουν. Κυρίως όμως, μας περιορίζει στο να χρησιμοποιήσουμε την παγίδευση για την έκφραση ενός μόνο προεπιλεγμένου γονιδίου.

Αντιθέτως, ένα σύστημα ειδικού ανασυνδυασμού, μας προσφέρει την ευελιξία της επιλογής του γονιδίου προς έκφραση μετά την παγίδευση. Τοποθετώντας μια αλληλουχία ανασυνδυασμού στο φορέα παγίδευσης, μπορούμε αργότερα να εισάγουμε με ανασυνδυασμό κάποια καινούργια κατασκευή. Έτσι μπορούμε να εισάγουμε το γονίδιο της επιλογής μας ή κάποια άλλη αλληλουχία (ενισχυτής, καταστολέας) και να προσαρμόσουμε το σύστημα έκφρασης σε μελλοντικές ανάγκες και δεδομένα (ΣΧΗΜΑ 7).

Η χρήση ειδικού ανασυνδυασμού είναι η προσέγγιση που επιλέξαμε για την αξιοποίηση των γονιδιακών παγιδεύσεων στο *Parhyale hawaiiensis*. Για το σκοπό αυτό,

ανέλαβα να επιλέξω το κατάλληλο σύστημα ανασυνδυασμού και να το προσαρμόσω για χρήση στο αμφίποδο. Λεπτομέρειες για τα διάφορα συστήματα και τις μέχρι τώρα εφαρμογές τους παρουσιάζονται παρακάτω.



ΣΧΗΜΑ 6: Αξιοποίηση παγιδεύσεων

A-B. Ταυτόχρονη εισαγωγή δεύτερου υποκινητή/αποδέκτη ματίσματος: **A.** Οι δύο υποκινητές (Y1 και Y2) ενεργοποιούνται από τον ίδιο ενισχυτή. Η μικρή διαφορά στην θέση τους καθώς και ο ανταγωνισμός μεταξύ τους μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδα έκφρασης των δύο διαγονιδίων. **B.** Ο ενδογενής δότης ματίσματος (ΔM) μπορεί να ματιστεί σε τρεις διαφορετικούς αποδέκτες (AM1, AM2 των δύο διαγονιδίων και τον ενδογενή AM3). Έτσι, ο αριθμός των ώριμων μεταγράφων που κωδικοποιούν τελικά για το κάθε γονίδιο αποτελεί ποσοστό μόνο της συνολικής μεταγραφής στον παγιδευμένο γενετικό τόπο. **Γ.** Χρήση εσωτερικών θέσεων εισαγωγής ριβοσωμάτων (IRES): Το ριβόσωμα κανονικά αναγνωρίζει την 5' τροποποιημένη γουανίνη (5'cap) στο μετάγραφο και σαρώνοντας συναντάει πρώτα το AUG του κόκκινου διαγονιδίου, με αποτέλεσμα την έναρξη της μετάφρασης. Η αλληλουχία IRES, που βρίσκεται μετά το πρώτο διαγονίδιο, μπορεί να στρατολογήσει το ριβόσωμα σε εσωτερική θέση στο μετάγραφο και έτσι να επιτευχθεί μετάφραση του δεύτερου διαγονιδίου. **Δ.** Χρήση του πεπτιδίου 2A: Το ριβόσωμα ξεκινάει να σαρώνει το μετάγραφο κανονικά από το 5'cap και αρχίζει την μετάφραση στο AUG του πρώτου διαγονιδίου. Τα τελευταία δύο κατάλοιπα του πεπτιδίου 2A (γλυκίνη και προλίνη) δεν σχηματίζουν πεπτιδικό δεσμό και μια χιμαιρική πρωτεΐνη (κόκκινη πολυπεπτιδική αλυσίδα με το 2A πεπτιδίο στο καρβοξυτελικό άκρο) απελευθερώνεται. Το ριβόσωμα συνεχίζει κανονικά την μετάφραση και παράγει το προϊόν του πράσινου διαγονιδίου (με το κατάλοιπο προλίνης του 2A στο αμινοτελικό του άκρο). Τα δύο προϊόντα είναι ανεξάρτητα και παράγονται σε ίσες ποσότητες.

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΕΙΔΙΚΟΥ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ

Ο κύκλος ζωής των φάγων παρουσιάζει μεγάλο επιστημονικό και βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. Κατά τον λυτικό κύκλο, χρησιμοποιούν τους μηχανισμούς του ξενιστή τους και παράγουν τις δομικές τους πρωτεΐνες για να πακετάρουν το πολλαπλασιασμένο γενετικό τους υλικό πριν απελευθερωθούν καταστρέφοντας το κύτταρο ξενιστή. Κάποιες φορές ωστόσο ακολουθούν τον κύκλο της λυσιγονίας, και ενθέτουν το γονιδίωμα τους στο γονιδίωμα του ξενιστή τους για μερικές γενιές πρώτου ξεκινήσουν τη διαδικασία του λυτικού κύκλου.

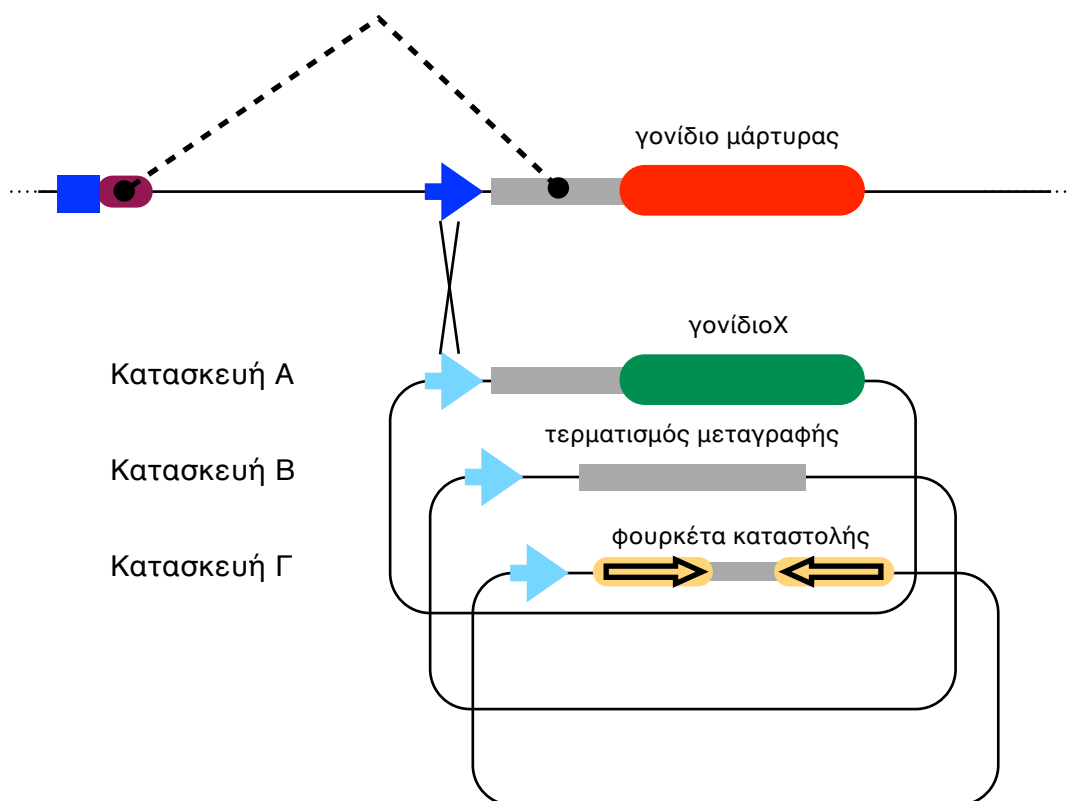
Η συμπεριφορά αυτή των φάγων κωδικοποιείται στο σχετικά μικρό τους γονιδίωμα (από 2.4kb στον φάγο L5 του *Leuconostoc oenos* μέχρι 168.9kb για τον βακτηριοφάγο T4 του *E.coli*) (Hatfull and Sarkis 1993; Miller, Kutter et al. 2003) γεγονός που τους καθιστά πολύ καλά συστήματα για την μελέτη αυτών των μηχανισμών.

Για τον κύκλο της λυσιγονίας, χρειάζονται ένα αξιόπιστο σύστημα αναγνώρισης για την ένθεση και απόσχιση του γονιδιώματός τους στο γονιδίωμα του βακτηρίου-ξενιστή. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτύξει συστήματα ειδικού ανασυνδυασμού. Έτσι, εκφράζουν ένα ειδικό ένζυμο που αναγνωρίζει δύο (συνήθως διαφορετικές) περιοχές, μια στο γονιδίωμα του φάγου και μια σε αυτό του ξενιστή και τις ανασυνδυάζει. Το ένζυμο αυτό καλείται ιντεγκράση και οι δυο περιοχές attP και attB, από το Phage attachment point και Bacterium attachment point αντίστοιχα (ΣΧΗΜΑ 8) (Thorpe and Smith 1998).

Οι ιντεγκράσεις των φάγων δεν έχουν καμία εξελικτική σχέση με τις ιντεγκράσεις των ρετροϊών, οι οποίες γενικά εμφανίζουν λίγη έως καθόλου ειδικότητα στην αντίδραση ανασυνδυασμού. Αντιθέτως, κατατάσσονται σε μία κατηγορία ενζύμων, γνωστές ως ρεκομπινάσες, που περιλαμβάνει ένζυμα που προέρχονται από προκαρυωτικούς και

ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι ρεκομπινάσες, μπορούν να χωριστούν σε δύο βασικές οικογένειες, τις ρεκομπινάσες τυροσίνης και τις ρεκομπινάσες σερίνης, με βάση το κατάλοιπο που χρησιμοποιούν για την υδρόλυση του φωσφοδιεστερικού δεσμού του DNA κατά τον ανασυνδυασμό. Οι διαφορές τους όμως δεν περιορίζονται μόνο εκεί. Διαφορές σε ολόκληρη την αλληλουχία της πρωτεΐνης καθώς και διαφορές στον μηχανισμό δράσης και την αναγνώριση των αλληλουχιών ανασυνδυασμού ενισχύουν την άποψη πως αποτελούν προϊόντα παράλληλης εξέλιξης (Groth and Calos 2004).

Ο ανασυνδυασμός που επιτελούν οι ρεκομπινάσες και των δύο ομάδων μπορεί να υποστηρίξει διάφορες βιολογικές λειτουργίες. Αυτές περιλαμβάνουν την εισαγωγή φαγικών γονιδιωμάτων, την επεξεργασία επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών και την αναστροφή γενωμικών περιοχών για την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.



ΣΧΗΜΑ 7: Αξιοποίηση παγίδευσης με ειδικό ανασυνδυασμό

Στον φορέα παγίδευσης υπάρχει μια αλληλουχία ανασυνδυασμού (μπλέ βέλος). Αφού επιτευχθεί γονιδιακή παγίδευση, μπορεί να στοχευτεί στον ίδιο γενετικό τόπο κάποια καινούργια κατασκευή. Η νέα κατασκευή εισάγεται με ανασυνδυασμό ανάμεσα στις δύο ειδικές αλληλουχίες (μπλέ και γαλάζιο βέλος). Με αυτό τον τρόπο μπορεί να εκφραστεί ένα γονίδιο X στο πρότυπο της παγίδευσης, να δημιουργηθεί knock out του παγιδευμένου γονιδίου με εισαγωγή αλληλουχίας τερματισμού της μεταγραφής, να εκφραστεί φουρκέτα για την καταστολή ενός γονιδίου και πολλά άλλα.

ΡΕΚΟΜΠΙΝΑΣΕΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ

Οι ρεκομπινάσες τυροσίνης, με γνωστότερους αντιπροσώπους αυτές του φάγου λ, του φάγου P1 (Cre recombinase) (Abremski and Hoess 1984) και την FLP του *Saccharomyces cerevisiae* (Andrews, Proteau et al. 1985) απαριθμούν συνολικά πάνω από 300 μέλη. Με βάση την σύγκριση αλληλουχιών αλλά και κάποια πειραματικά δεδομένα υπολογίζεται πως τουλάχιστον το 15% αυτών αποτελούν ιντεγκράσες που προέρχονται από φάγους.

Τα ένζυμα που δεν λειτουργούν ως ιντεγκράσες (όπως Cre και FLP) αναγνωρίζουν και ανασυνδυάζουν ταυτόσημες αλληλουχίες μέχρι 50bp. Αντιθέτως οι αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τις ιντεγκράσες τυροσίνης είναι αρκετά διαφορετικές και πιο σύνθετες. Συνήθως η αλληλουχία attB αποτελείται από δύο παλίνδρομα εκατέρωθεν μιας κεντρικής περιοχής, που είναι το σημείο όπου συμβαίνει ο ανασυνδυασμός και έχει μήκος 6-8bp. Η αλληλουχία attP από την άλλη έχει πιο σύνθετη δομή. Περιέχει εκτός των παλινδρόμων και της κεντρικής περιοχής, πλήθος από συμπληρωματικές περιοχές αναγνώρισης από την ιντεγκράση καθώς και αλληλουχίες πρόσδεσης άλλων παραγόντων απαραίτητων για την αντίδραση ένθεσης και απόσχισης.

Η απαραίτητη συμμετοχή άλλων παραγόντων κατά τη διαδικασία του ανασυνδυασμού αποτελεί ιδιαιτερότητα των ιντεγκρασών τυροσίνης. Οι παράγοντες αυτοί, που μπορεί να κωδικοποιούνται από τον ίδιο τον φάγο ή από το κύτταρο ξενιστή, φαίνεται πως αυξάνουν τη συγγένεια με την αλληλουχία attP και προσφέρουν ειδικότητα στην αναγνώριση της κεντρικής περιοχής.

Χαρακτηριστικό του μηχανισμού δράσης των ρεκομπινασών τυροσίνης είναι η διάσπαση του φωσφοδιεστερικού δεσμού με τη χρήση ενός καταλοίπου τυροσίνης και η δημιουργία ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ του ενζύμου και του 3' άκρου του ενός κλώνου DNA κάθε αλληλουχίας ανασυνδυασμού. Τα 5' υδροξύλια είναι έτσι ελεύθερα να αντιδράσουν με τον δεσμό μεταξύ ενζύμου-DNA της άλλης αλληλουχίας ανασυνδυασμού, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μίας δομής Holliday (Lee, Tribble et al. 2000). Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τους άλλους δύο κλώνους έτσι ώστε να επιλυθεί η δομή Holliday, οδηγώντας στον ανασυνδυασμό των δύο μορίων.

Εκτός από την καταλυτική τυροσίνη, πέντε ακόμα αμινοξέα έχουν χαρακτηριστεί ως σημαντικά για την ενεργότητά τους, σχηματίζοντας ένα RKHRH(W) μοτίβο χαρακτηριστικό για την μεγάλη πλειοψηφία των μελών της οικογένειας. Το μοτίβο αυτό μαζί με το κατάλοιπο της τυροσίνης αποτελούν το ενεργό κέντρο του ενζύμου της ρεκομπινάσης. Σε όλες τις αντιδράσεις που καταλύονται από ρεκομπινάσες προσδένονται δύο μόρια ενζύμου ανά αλληλουχία ανασυνδυασμού. Η ρεκομπινάση του λ φάγου σχηματίζει το ενεργό κέντρο μέσα στο ίδιο μόριο (cis cleavage), ενώ στην περίπτωση της ρεκομπινάσης FLP ο

σχηματισμός του ενεργού κέντρου γίνεται με την προσφορά του μοτίβου RKHRH(W) και του καταλοίπου τυροσίνης από διαφορετικά μόρια (trans cleavage).

ΡΕΚΟΜΠΙΝΑΣΕΣ ΣΕΡΙΝΗΣ

Οι ιντεγκράσες των φάγων που χρησιμοποιούν σερίνη για την υδρόλυση του DNA αποτελούν ένα μικρό ποσοστό του συνόλου των μελών της οικογένειας των ρεκομπινασών στην οποία ανήκουν. Οι πιο καλά μελετημένες ιντεγκράσες αυτής της κατηγορίας είναι αυτές των φάγων φC31, TP901-1, R4 και φFC1 (Groth and Calos 2004). Γενικά είναι πιο μεγάλες από τις μη-ιντεγκράσες (ρεζολβάσες γδ και Tn3 και ινβερτάση Gin) της οικογένειας και η ομολογία τους περιορίζεται στην αμινοτελική καταλυτική περιοχή.

Οι αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τις ιντεγκράσες σερίνης είναι γενικά απλές. Επίσης, αντίθετα με τις ιντεγκράσες τυροσίνης, οι ιντεγκράσες σερίνης δρουν απουσία συμπαραγόντων. Η μικρή κεντρική περιοχή ανασυνδυασμού (3bp στην περίπτωση του φC31, 5bp για τον TP901) βρίσκεται στη μέση ενός συνήθως ατελούς παλινδρόμου και το συνολικό μέγεθος της αλληλουχίας attP ή attB δεν ξεπερνάει τα 60bp.

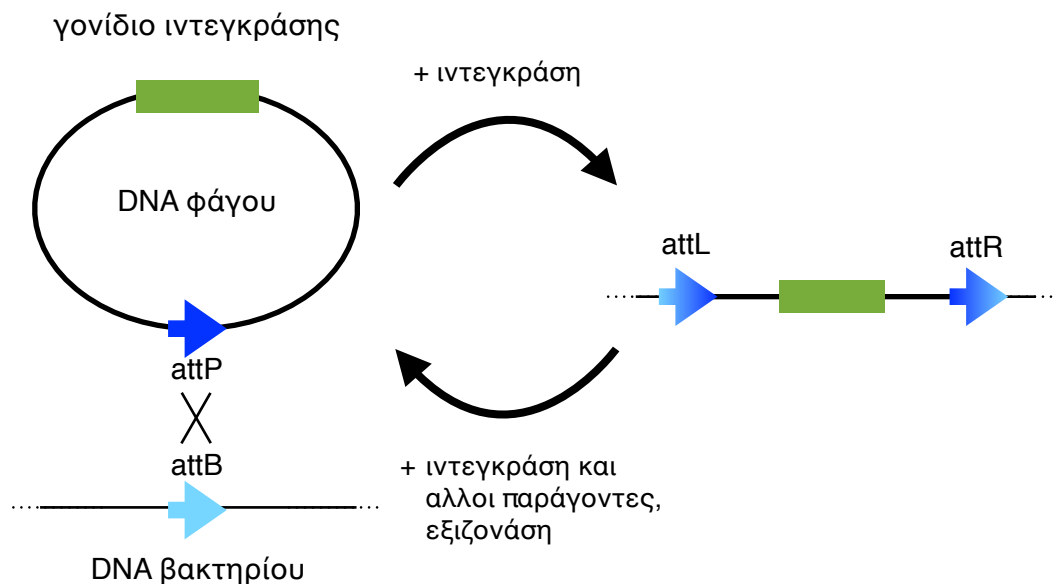
Ο μηχανισμός του ανασυνδυασμού, πέραν της χρήσης του καταλοίπου σερίνης, απ' όπου η οικογένεια παίρνει το όνομά της, εμφανίζει και άλλες σημαντικές διαφορές σε σχέση με την οικογένεια των ρεκομπινασών τυροσίνης. Δύο μόρια ενζύμου δεσμεύονται στις θέσεις ανασυνδυασμού (attP και attB) και τα σύμπλοκα DNA-πρωτεϊνών πλησιάζουν σχηματίζοντας μια περιοχή συναπτοσώματος. Η διάσπαση του φωσφοδιεστερικού δεσμού από την υδροξυλική ομάδα της σερίνης έχει ως συνέπεια τη δημιουργία ενός ενδιάμεσου ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ του ενζύμου και του 5' άκρου του DNA αφήνοντας ελεύθερο το 3' υδροξύλιο. Σε αντίθεση με της ρεκομπινάσες τυροσίνης, η διάσπαση των τεσσάρων κλώνων των δύο μορίων DNA γίνεται ταυτόχρονα και καταλήγει σε προεξέχοντα άκρα 2bp σε κάθε μόριο. Ακολουθεί περιστροφή του συναπτοσώματος κατά 180 μοίρες και σύνδεση των άκρων.

ΟΙ ΡΕΚΟΜΠΙΝΑΣΕΣ ΣΕΡΙΝΗΣ ΩΣ ΕΡΓΑΛΕΙΟ

Όπως είναι αναμενόμενο οι ρεκομπινάσες σερίνης, εμφανίζουν μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον, καθότι δεν χρειάζονται συμπαραγόντες κατά τον ανασυνδυασμό και έτσι η πιθανότητα να είναι λειτουργικές σε οργανισμούς πέραν των φυσιολογικών ξενιστών των φάγων τους είναι αυξημένη. Οι τρεις ιντεγκράσες σερίνης (φC31, TP901-1 και R4) που έχουν δοκιμαστεί μέχρι σήμερα σε κύτταρα θηλαστικών, εμφάνισαν υψηλή ενεργότητα και ειδικότητα ανασυνδυασμού (Brown, Lee et al. ; Groth, Olivares et al. 2000; Olivares, Hollis et al. 2001; Stoll, Ginsburg et al. 2002).

Επιπλέον, οι χιμαιρικές αλληλουχίες attL και attR (από το Left attachment point και Right attachment point αντίστοιχα) που σχηματίζονται μετά τον ανασυνδυασμό των attP και attB δεν αποτελούν υπόστρωμα για την ίδια ρεκομπινάση άλλα για ένα άλλο ένζυμο που καλείται εξιζονάση. Το γεγονός αυτό εξασφαλίζει την σταθερότητα της ένθεσης.

Οι FLP και Cre ρεκομπινάσες, που έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές εφαρμογές στη *Drosophila melanogaster* και στο *Mus musculus* (Theodosiou and Xu 1998; Branda and Dymecki 2004), αναγνωρίζουν δύο πανομοιότυπες περιοχές και οι αλληλουχίες που προκύπτουν μετά τον ανασυνδυασμό αποτελούν απευθείας υποστρώματα για νέο κύκλο ανασυνδυασμού. Γενικά δύο θέσεις που βρίσκονται cis πάνω στο γονιδίωμα είναι πιθανότερο να “συναντηθούν” και να αντιδράσουν παρά όταν βρίσκονται trans. Έτσι, στην περίπτωση των FLP και Cre, η αντίδραση της απόσχισης (διάταξη cis) ευνοείται θερμοδυναμικά έναντι αυτής της ένθεσης (διάταξη trans). Αντίθετα για τις ιντεγκράσες σερίνης, η αντίδραση ανασυνδυασμού είναι πρακτικά μονόδρομη (ΣΧΗΜΑ 8).



ΣΧΗΜΑ 8: Εισαγωγή φαγικού γονιδιώματος στο γονιδίωμα του ξενιστή με ειδικό ανασυνδυασμό

Κατα την λυσιγονία, η ιντεγκράση του φάγου, αναγνωρίζει τις δύο ειδικές αλληλουχίες attP και attB και τις ανασυνδυάζει με αποτέλεσμα το κυκλικό φαγικό γενετικό υλικό να εισαχθεί στο γονιδίωμα του ξενιστή. Οι δύο νέες αλληλουχίες που προκύπτουν από τον ανασυνδυασμό, attL και attR, θα ανασυνδυαστούν για την απόσχιση του φάγου όταν οι συνθήκες είναι κατάλληλες. Για αυτό, η αντίδραση απόσχισης είτε καταλύεται από την ιντεγκράση παρουσία από συμπληρωματικούς παράγοντες είτε από άλλο ειδικό ένζυμο (εξιζονάση).

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΟΥ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ

Στόχος της παρούσας διατριβής αποτελεί η ανάπτυξη ενός συστήματος ειδικού ανασυνδυασμού για το καρκινοειδές *Parhyale hawaiensis*. Η ανάγκη για ένα τέτοιο εργαλείο απορρέει από την πρόσφατη επίτευξη γονιδιακής παγίδευσης στο αμφίποδο. Η πιλοτική σάρωση προσέφερε ποικίλες και ενδιαφέρουσες παγιδεύσεις γονιδίων. Προτού επιχειρηθεί μια μεγάλη έκταση σάρωση είναι απαραίτητο να υπάρχει μια σαφής στρατηγική αξιοποίησης των παγιδεύσεων που θα προκύψουν. Ο ειδικός ανασυνδυασμός προσφέρει την ευελιξία της τροποποίησης μιας παγίδευσης με την μετέπειτα εισαγωγή των κατάλληλων κατασκευών και γι' αυτό το λόγο προτιμήθηκε έναντι άλλων προσεγγίσεων.

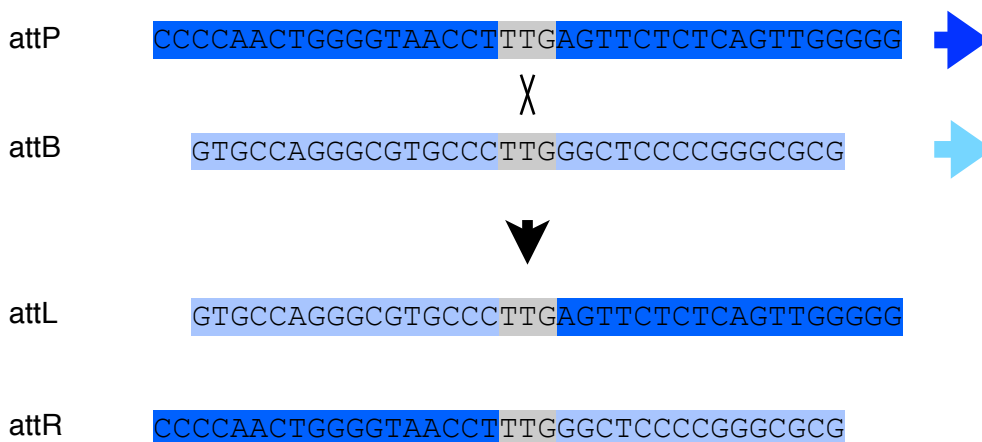
Η δυνατότητα στόχευσης σε επιλεγμένα σημεία που προσφέρει ένα σύστημα ειδικού ανασυνδυασμού μπορεί να αξιοποιηθεί όμως και σε άλλες εφαρμογές, όπως είναι ο έλεγχος της ενεργότητας *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων. Η αξία της στόχευσης κατασκευών ανταπόκρισης σε προκαθορισμένα σημεία στο γονιδίωμα γίνεται αντιληπτή από τις μεγάλες διαφορές που μπορεί να εμφανίζει η ενεργότητα του ίδιου στοιχείου σε διαφορετικά σημεία του γενώματος ενός οργανισμού. Για να ελέγξει την γονιδιακή του έκφραση, κάθε κύτταρο έχει αναπτύξει τόσο εξειδικευμένους όσο και γενικούς μηχανισμούς ρύθμισης. Έτσι πέρα από την ειδική ενεργοποίηση ή καταστολή ενός γονιδίου, υπάρχουν τρόποι καταστολής της έκφρασης ολόκληρων περιοχών ενός χρωμοσώματος. Εξάλλου, η ομαδοποίηση γονιδίων με παρόμοια πρότυπα έκφρασης επιτρέπει τη χρήση τέτοιων γενικών μηχανισμών για τον έλεγχο ολόκληρων γονιδιακών συμπλόκων. Όπως είναι ευκολα αντιληπτό, αυτοί οι μηχανισμοί μπορούν να επηρεάσουν την ενεργότητα κατασκευών ανταπόκρισης, σε τέτοιο βαθμό, ώστε η σύγκριση μεταξύ διαφορετικών ρυθμιστικών στοιχείων να γίνεται εξαιρετικά δύσκολη. Μόνο η ανάλυση πολλαπλών ανεξάρτητων ενθέσεων, για την αποκάλυψη στατιστικά σημαντικών διαφορών ενεργότητας μεταξύ δύο στοιχείων, μπορεί να υπερβεί αυτό το πρόβλημα. Κάτι τέτοιο ωστόσο αποτελεί επίπονη και πολλές φορές χρονοβόρα διαδικασία. Το σύστημα ειδικού ανασυνδυασμού όμως, μας επιτρέπει να στοχεύσουμε διαφορετικές κατασκευές στην ίδια επιλεγμένη θέση στο γονιδίωμα και να μετρήσουμε διαφορές στην ενεργότητά τους γρήγορα, εύκολα και άμεσα.

Η ιντεγκράση του φάγου φC31

Ψάχνοντας ανάμεσα στα διαθέσιμα εργαλεία για ένα κατάλληλο σύστημα ειδικού ανασυνδυασμού αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε το σύστημα του φάγου φC31. Ο φάγος φC31 μολύνει το βακτήριο *Streptomyces ambofaciens* και το σύστημα ανασυνδυασμού του εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα για χρήση σε ετερόλογους οργανισμούς.

Καθώς ο πρωταρχικός μας στόχος είναι η στόχευση αλληλουχιών σε προκαθορισμένα σημεία στο γονιδίωμα, χρειαζόμαστε ένα σύστημα μονόδρομου ανασυνδυασμού. Οι χιμαιρικές αλληλουχίες attL και attR δεν αποτελούν απευθείας υπόστρωμα για την ιντεγκράση του φC31, εξασφαλίζοντας σταθερή ένθεση της αλληλουχίας στο γονιδίωμα. Επιπλέον, το γονίδιο της ιντεγκράσης του φC31 κωδικοποιεί μία σχετικά μικρή πρωτεΐνη (605 αμινοξέα) που ανήκει στην οικογένεια των ρεκομπινασών σερίνης και λειτουργεί απουσία συμπαραγόντων. Οι μικρές και απλές αλληλουχίες ανασυνδυασμού διευκολύνουν την εισαγωγή τους στις ήδη υπάρχουσες κατασκευές εξασφαλίζοντας παράλληλα ελάχιστη παρεμπόδιση. Η ελάχιστη αλληλουχία των περιοχών attP και attB έχει υπολογιστεί πειραματικά σε 39 και 34bp αντίστοιχα (Groth, Olivares et al. 2000)(ΣΧΗΜΑ 9).

Τέλος, σημαντικό γεγονός αποτελεί η ήδη επιτυχημένη εφαρμογή του συστήματος του φάγου φC31 σε ένα πλήθος διαφορετικών συστημάτων, όπως η δροσόφιλα, το ποντίκι και οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές (Groth and Calos 2004). Τα υψηλά ποσοστά ανασυνδυασμού και η έλλειψη παρενεργειών (τοξικότητα, μη ειδική ένθεση) σε αυτά τα συστήματα αποτελούν προτρεπτικούς παράγοντες για την προσαρμογή του και σε άλλους οργανισμούς.



ΣΧΗΜΑ 9: Το σύστημα ανασυνδυασμού του φάγου φC31

Η ελάχιστες αλληλουχίες, attP και attB, που αναγνωρίζει και ανασυνδυάζει η ιντεγκράση του φC31 έχουν υπολογιστεί πειραματικά στα 39bp και 34bp αντίστοιχα.

Ο ανασυνδυασμός γίνεται ανάμεσα στην κεντρική περιοχή TTG με αποτέλεσμα να σχηματιστούν οι δύο χιμαιρικές αλληλουχίες attL και attR.

ΣΤΟΧΟΣ

Τελικό στόχο αυτού του μέρους της διατριβής αποτέλεσε η ανάπτυξη ενός αξιόπιστου συστήματος ειδικού ανασυνδυασμού στο αμφίποδο καρκινοειδές *Parhyale hawaiiensis*. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε το σύστημα του φάγου φC31. Η ολοκληρωμένη μελέτη αυτού του συστήματος στο αμφίποδο περιλαμβάνει τα εξής:

1. Έλεγχο της ενεργότητας και ειδικότητας του συστήματος ανασυνδυασμού στο αμφίποδο.
2. Τροποποίηση των διαθέσιμων κατασκευών παγίδευσης για το σύστημα ανασυνδυασμού.
3. Επιβεβαίωση της λειτουργίας των τροποποιημένων κατασκευών με την απομόνωση γονιδιακών παγιδεύσεων και την εγκαθίδρυση σταθερών διαγονιδιακών σειρών.
4. Στόχευση κατασκευών σε αυτές τις διαγονιδιακές σειρές με ειδικό ανασυνδυασμό.
5. Μετατροπή παγιδεύσεων με την αντικατάσταση του γονιδίου μάρτυρα.
6. Έκτιμηση της αποδοτικότητας του ανασυνδυασμού.

Οι προσεγγίσεις που επιλέχθηκαν για την διεκπεραίωση των παραπάνω καθώς και τα αποτελέσματα αυτών παρουσιάζονται εκτενώς παρακάτω.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

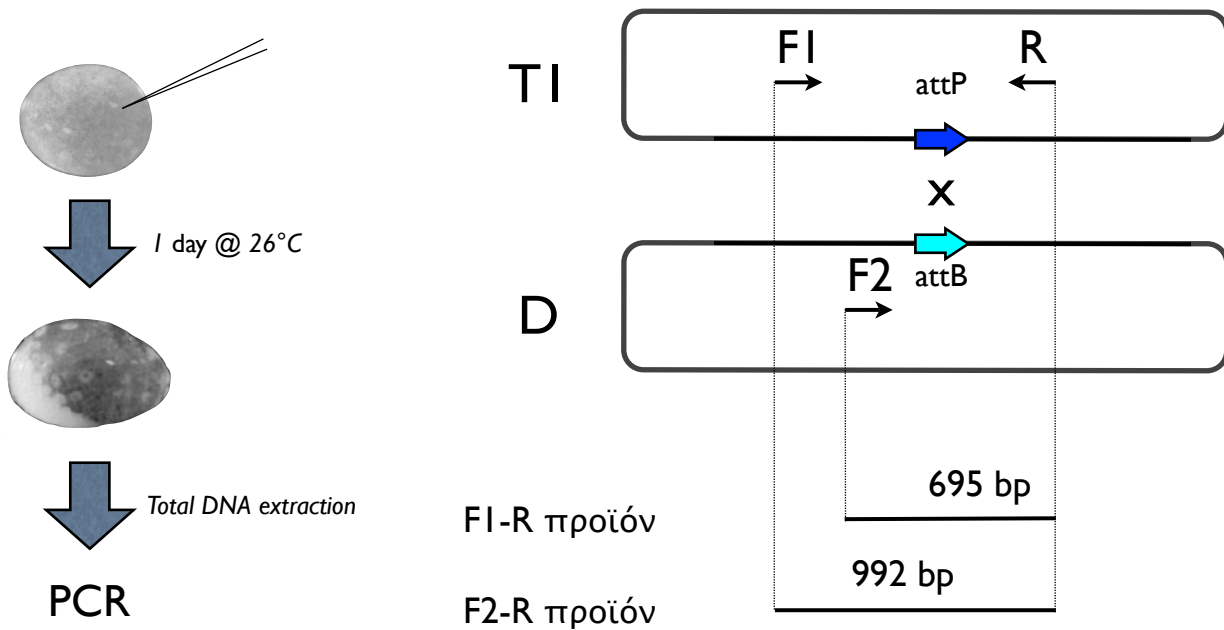
ΔΙΑΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΙΝΤΕΓΚΡΑΣΗΣ

Εάν θέλουμε να χρησιμοποιήσουμε το σύστημα της ιντεγκράσης του φάγου φC31 για την μετατροπή των παγιδεύσεων ενισχυτών και εξονίων, στο αμφίποδο *Parhyale hawaiiensis*, χρειάζεται να έχουμε *a priori* τροποποιήσει κατάλληλα τον φορέα παγίδευσης με την εισαγωγή των απαραίτητων αλληλουχιών ανασυνδυασμού. Καθότι η δημιουργία διαγονιδιακών ατόμων είναι μια χρονοβόρα διαδικασία, είναι χρήσιμο να αξιολογήσουμε πρώτα την ενεργότητα του συστήματος στο αμφίποδο.

Για τον σκοπό αυτό σχεδίασα ένα διαπλασμιδιακό πείραμα ανασυνδυασμού σε έμβρυα. Παρόμοιες προσεγγίσεις έχουν χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της ενεργότητας του μεταθετού στοιχείου Minos στο αμφίποδο *Parhyale hawaiiensis* και αλλού (Pavliopoulos and Averof 2005), και βασίζονται στην ανίχνευση των διαφορετικών προϊόντων της αντίδρασης απόσχισης και ένθεσης με την χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (ΣΧΗΜΑ 10).

Για την ανίχνευση του ανασυνδυασμού, χρησιμοποίησα δύο πλασμίδια (T1 και D) που φέρουν τις περιοχές attP και attB αντίστοιχα. Σχεδίασα τρεις εκκινητές (hsp70F, DsRedR και pTAF), δύο εκατέρωθεν της περιοχής ανασυνδυασμού attP στο πλασμίδιο T1 και έναν στο πλασμίδιο D (που φέρει την αλληλουχία attB), έτσι ώστε το προϊόντα τους να είναι εύκολα διακριτά. Το προϊόν των εκκινητών hsp70F και DsRedR έχει μέγεθος 992 ζεύγη βάσεων και ανιχνεύει την παρουσία του πλασμιδίου T1, ενώ οι εκκινητές DsRedR και pTAF παράγουν προϊόν 695 ζεύγων βάσεων παρουσία του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου T1-D.

Μια μέρα μετά την ένεση των πλασμιδίων (500ng/ul για το καθένα) παρουσία του mRNA της ιντεγκράσης του φάγου φC31 (100ng/ul), σε αγρίου τύπου έμβρυα (σταδίου ενός ή δύο κυττάρων), απομόνωσα ολικά νουκλεϊκά οξέα, τα οποία χρησιμοποίησα για αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (ΣΧΗΜΑ 10). Η ζώνη των 695 ζεύγων βάσεων μαρτυρά τον ειδικό ανασυνδυασμό μεταξύ των πλασμιδίων T1 και D, μόνο παρουσία ιντεγκράσης. Επιπλέον, απομόνωσα τη ζώνη αυτή από πήκτωμα αγαρόζης και μετά από αλληλούχιση με την χρήση του εκκινητή pSLR επιβεβαίωσα το σημείο ανασυνδυασμού (ΣΧΗΜΑ 11).



ΣΧΗΜΑ 10: Διαπλασμιδιακός έλεγχος ενεργότητας ιντεγκράσης

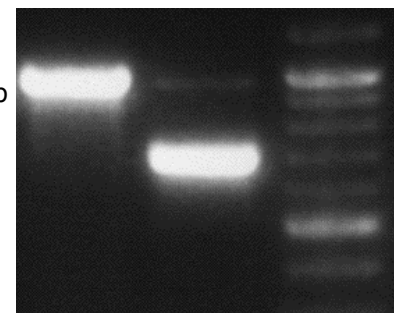
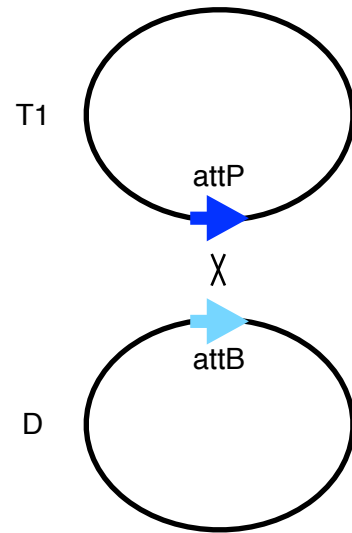
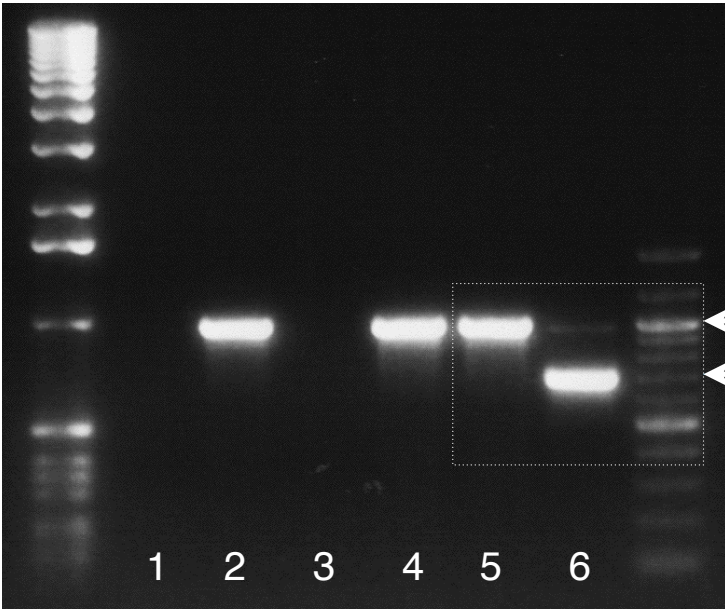
Τα δύο πλασμίδια T1 και D συνεννύονται μαζί με το mRNA της ιντεγκράσης του φάγου σε έμβρυα στο στάδιο του ενός κυττάρου. Την επόμενη μέρα τα ολικά νουκλεϊκά οξέα υποβάλλονται σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με τους εκκινητές F1, F2 και R. Τα διαφορετικά προϊόντα F1-R και F2-R υποδεικνύουν την παρουσία του T1 και του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου (δεν δείχνεται) αντίστοιχα και είναι εύκολα διακριτά σε μέγεθος.

Ο διαπλασμιδιακός έλεγχος έδειξε ενεργότητα της ιντεγκράσης του φάγου φC31 στο αμφίποδο *Parhyale hawaiensis*. Ο ανασυνδυασμός ανάμεσα στα δύο πλασμίδια ήταν ειδικός για τις αλληλουχίες attP/attB, ακριβής (δεν προκάλεσε μεταλλάξεις) και ανιχνεύτηκε μόνο παρουσία της ιντεγκράσης. Επειδή τα αποτελέσματα της αντίδρασης πολυμεράσης δεν είναι ποσοτικά, η σύγκριση της έντασης δύο ζωνών δεν μπορεί να δώσει ασφαλή συμπεράσματα για τις αρχικές ποσότητες των πλασμιδίων που αντιπροσωπεύουν. Ωστόσο, η οριακή ανίχνευση της χαρακτηριστικής για το πλασμίδιο T1 ζώνης (992bp) υποδηλώνει υψηλό βαθμό ανασυνδυασμού μεταξύ των T1 και D πλασμιδίων.

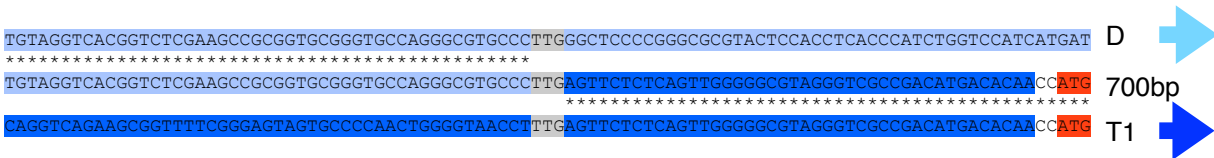
Η ανίχνευση ανασυνδυασμού κατά το διαπλασμιδιακό έλεγχο υποδεικνύει επίσης πως το προσφερόμενο mRNA της ιντεγκράσης μεταφράζεται αποτελεσματικά σε λειτουργική πρωτεΐνη. Η μετάφραση αυτή, γίνεται μέσα στις 24ώρες που μεσολαμβάν μεταξύ της ένεσης και της συλλογής των νουκλεϊκών οξέων. Η πιθανότητα κληρονόμησης της στόχευσης στην γαμετική σειρά αυξάνεται όσο νωρίτερα γίνει η έκφραση του ενζύμου της ιντεγκράσης (και επομένως ο ανασυνδυασμός). Από τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού, δεν μπορούμε να γνωρίζουμε σε ποιο στάδιο ακριβώς γίνεται η μετάφραση του παρεχόμενου mRNA.

A

DNA: D	T1	διαπλασμιδιακός έλεγχος			
T1 :		-	+	+	+
D :		-	-	+	+
int :		-	-	-	+



B



ΣΧΗΜΑ 11: Αποτελέσματα διαπλασμιδιακού ελέγχου

A Πήκτωμα αγαρόζης με μάρτυρες σκάλας 1kb και 100bp στο πρώτο και τελευταίο πηγάδι αντίστοιχα. Τα έξι πειραματικά πηγάδια (1-6) αντιπροσωπεύουν τα εξής:

1-2. Αντίδραση των πλασμιδίων D και T1 με τους τρεις ειδικούς εκκινητές ως αρνητικό και θετικό έλεγχο αντίστοιχα. Το πλασμίδιο D δεν δίνει κανένα προϊόν, ενώ το πλασμίδιο T1 εμφανίζει την ειδική ζώνη 1000bp.

3-6. Αντίδραση ολικών νουκλεϊκών οξέων απομονωμένα από: **3.** Αγρίου τύπου έμβρυα **4.** Ενεμένα με το T1 **5.** Ενεμένα με T1 και D **6.** Ενεμένα με T1, D και το mRNA της ιντεγκράσης. Στα δείγματα που προέρχονται από έμβρυα ενεμένα με T1 εμφανίζεται η χαρακτηριστική για αυτό το πλασμίδιο ζώνη των 1000bp. Εξάιρεση αποτελεί το δείγμα του πηγαδιού 6, όπου παρουσία της ιντεγκράσης εμφανίζεται η ειδική για τον ανασυνδυασμό ζώνης των 700bp. Μάλιστα η σχεδόν εξαφάνιση της χαρακτηριστικής για το T1 πλασμίδιο ζώνης των 1000bp (σε μεγένθυση στην ένθετη εικόνα) υποδεικνύει πως μόνο λίγη ποσότητα του πλασμιδίου T1 δεν έχει ανασυνδυαστεί.

B Τμήμα της αλληλουχίας της ειδικής για τον ανασυνδυασμό ζώνης (700bp) και σύγκρισή της με τις αλληλουχίες των δύο πλασμιδίων D και T1. Η ζώνη των 700bp αντιπροσωπεύει την αλληλουχία attL.

Είναι σημαντικό να λάβουμε υπόψιν πως ο διαπλασμιδιακός έλεγχος αποτελεί ένα απλοποιημένο σύστημα γρήγορου ελέγχου της ενεργότητας της ιντεγκράσης σε ένα οργανισμό και για αυτό το λόγο η ερμηνεία των αποτελεσμάτων εμφανίζει κάποιους περιορισμούς. Η στόχευση μιας κατασκευής (πλασμίδιο δότης) σε προκαθορισμένη θέση (δέκτης) στο γονιδίωμα ενός οργανισμού, περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση μεταξύ ενός μεγάλου αριθμού πλασμιδίων δότη και μίας (ή δύο σε ομόζυγα άτομα) θέσης ανασυνδυασμού στο γονιδίωμα. Αντιθέτως, κατά τον διαπλασμιδιακό έλεγχο ανιχνεύουμε ανασυνδυασμό μεταξύ μεγάλου αριθμού πλασμιδίων δότη και δέκτη. Πέραν όμως της ποσοτικής διαφοράς, υπάρχει και ποιοτική διαφορά ανάμεσα στην στόχευση στο γονιδίωμα και τον διαπλασμιδιακό ανασυνδυασμό. Η προσβασιμότητα μιας θέσης ανασυνδυασμού στο γονιδίωμα είναι σαφώς μικρότερη από μια θέση ανασυνδυασμού που βρίσκεται πάνω σε συνενυόμενο, με την στοχευόμενη κατασκευή, πλασμίδιο. Επιπλέον, η πυρηνική μεμβράνη μπορεί να αποτελέσει φυσικό εμπόδιο για την είσοδο του πλασμιδίου δότη ή/και του απαραίτητου για την κατάλυση της αντίδρασης ενζύμου.

Συνολικά, τα αποτελέσματα του διαπλασμιδιακού ελέγχου είναι ενθαρρυντικά. Η δημιουργία διαγονιδιακών ατόμων που θα φέρουν την αλληλουχία δέκτη είναι το επόμενο βήμα για τον ακριβή έλεγχο του συστήματος ανασυνδυασμού στο αμφίποδο.

ΠΑΓΙΔΕΥΣΗ ΕΞΟΝΙΩΝ ΣΤΟ ΑΜΦΙΠΟΔΟ *Parhyale hawaiensis*

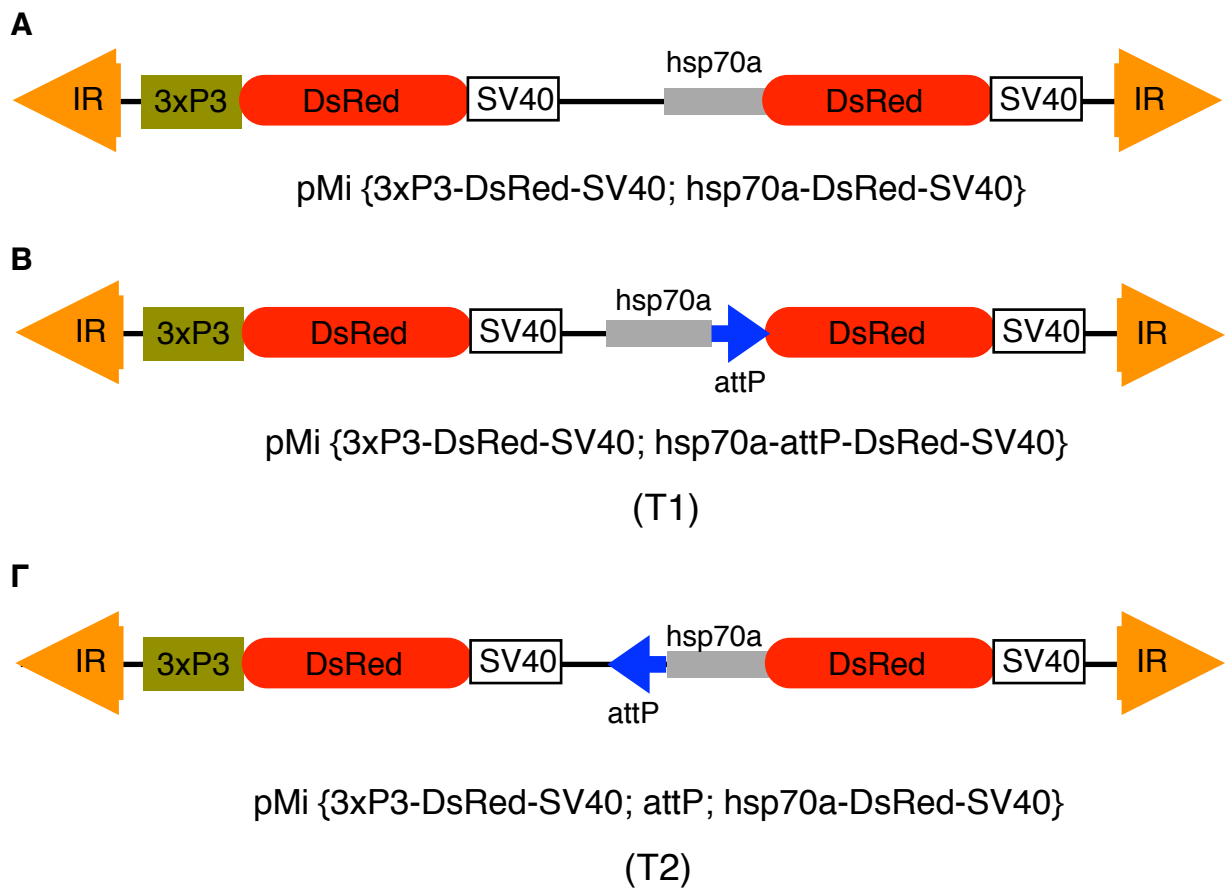
Η παγίδευση γονιδίων στο αμφίποδο *Parhyale hawaiensis* βασίζεται στο μεταθετό στοιχείο Minos, της υπεροικογένειας Tc1/mariner, που έχει ήδη χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στον μετασχηματισμό του αμφιπόδου και πολλών άλλων ειδών (Pavlopoulos, Oehler et al. 2007; Sasakura, Oogai et al. 2007).

Η κατασκευή παγίδευσης pMi {3xP3-DsRed-SV40; hsp70a-DsRed-SV40} φέρει δύο αντίγραφα του γονιδίου της κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (DsRed), ένα υπό τον έλεγχο του τεχνητού υποκινητή 3xP3 και ένα υπό τον έλεγχο της αλληλουχίας hsp70a (ΣΧΗΜΑ 12). Ο υποκινητής 3xP3 αποτελείται από έναν βασικό υποκινητή δροσόφιλας που φέρει πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης για το μεταγραφικό παράγοντα Pax6 που εκφράζεται στους φωτοϋποδοχείς και σε άλλα νευρικά κύτταρα σε ένα μεγάλο εύρος οργανισμών (από τα αρθρόποδα μέχρι τον άνθρωπο) (Harris 1997). Η αλληλουχία hsp70a, αποτελεί τμήμα μεγέθους 1315 ζευγών βάσεων άνωθεν του AUG της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής ενός hsp70 γονιδίου (Παυλόπουλος, Διδακτορική Διατριβή 2004) και περιέχει μια αλληλουχία αποδοχής ματίσματος.

Ο φορέας αυτός ενύεται μαζί με το mRNA της τρανσποζάσης του Minos σε αγρίου τύπου έμβρυα στο στάδιο του ενός κυττάρου, σε συγκέντρωση 300 και 100 ng/ul αντίστοιχα. Τα έμβρυα που βρίσκονται θετικά σε έκφραση του γονιδίου επιλογής (3xP3

DsRed) διασταυρώνονται μετά την ενηλικίωση με αγρίου τύπου άτομα και οι απόγονοι (γενιά F1) ελέγχονται για έκφραση του γονιδίου μάρτυρα. Κατά την πιλοτική σάρωση (Τάσος Παυλόπουλος και Μιχάλης Αβέρωφ) διάφορα πρότυπα έκφρασης απομονώθηκαν (κεντρικό νευρικό σύστημα, βράγχια και άλλα) και μετά από επαναδιασταύρωση, και επιλογή, δημιουργήθηκαν διαγονιδιακές σειρές.

Ωστόσο, αυτές οι διαγονιδιακές σειρές, δεν φέρουν κάποια αλληλουχία ανασυνδυασμού (attP ή attB) και επομένως η τροποποίηση του φορέα παγίδευσης και η ανάκτηση νέων διαγονιδιακών σειρών αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τον έλεγχο της δυνατότητας ανασυνδυασμού στο γονιδίωμα.



ΣΧΗΜΑ 12: Φορείς παγίδευσης γονιδίων για το αμφίποδο

A. Ο αρχικός φορέας παγίδευσης εξονίων pMi {3xP3-DsRed-SV40; hsp70a-DsRed-SV40}

B-Γ. Δύο εναλλακτικές θέσεις για την αλληλουχία ανασυνδυασμού attP. **B.** Μετά τον αποδέκτη ματίσματος hsp70a. Το πλασμίδιο pMi {3xP3-DsRed-SV40; hsp70a-attP-DsRed-SV40} που ονομάστηκε T1 χρησιμοποιήθηκε για το διαπλασμιδιακό πείραμα. **Γ.** Πρίν τον αποδέκτη ματίσματος hsp70a. Το πλασμίδιο pMi {3xP3-DsRed-SV40; attP; hsp70a-DsRed-SV40} ονομάστηκε T2 και χρησιμοποιήθηκε για γονιδιακή παγίδευση και ειδικό ανασυνδυασμό σε αυτή τη διατριβή. Λεπτομέρεια: Η αντίστροφη φορά του μπλέ βέλους υποδεικνύει την “αντίθετη” κατεύθυνση της αλληλουχίας attP στον φορέα T2. Η φορά της αλληλουχίας ανασυνδυασμού είναι σημαντική για τον σχεδιασμό των κατασκευών προς ένθεση.

Ο ΦΟΡΕΑΣ ΠΑΓΙΔΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ (ΔΕΚΤΗΣ)

Η ιντεγκράση του φάγου φC31 αναγνωρίζει και ανασυνδυάζει τις δύο αλληλουχίες attP και attB με αποτέλεσμα την γραμμοποίηση και εισαγωγή του φαγικού γενετικού υλικού μέσα στο γονιδίωμα του βακτηρίου ξενιστή. Φυσιολογικά, η αλληλουχία attB βρίσκεται στο γονιδίωμα του βακτηρίου και το εξωγενές γενετικό υλικό φέρει την αλληλουχία attP. Παρόλα ταύτα, προηγούμενη έρευνα έδειξε υψηλότερη επιτυχία ανασυνδυασμού όταν το attP χρησιμοποιείται ως αλληλουχία δέκτης στο γονιδίωμα και το attB ως αλληλουχία δότης (Thyagarajan, Olivares et al. 2001; Belteki, Gertsenstein et al. 2003). Για αυτό το λόγο αποφάσισα να εισάγω την αλληλουχία attP στον φορέα παγίδευσης.

Παρότι το ελάχιστο μέγεθος της αλληλουχίας ανασυνδυασμού attP έχει υπολογιστεί πειραματικά στα 39bp μόνο, στο φορέα παγίδευσης χρησιμοποίησα το πλήρους μεγέθους attP (234bp) για να αποφύγω πιθανή παρεμπόδιση από τις γύρω αλληλουχίες στην τελική κατασκευή.

Σημαντικό στοιχείο που έπρεπε να λάβω υπόψιν, ήταν η σχετική θέση και κατεύθυνση της αλληλουχίας attP στον φορέα. Η θέση ανασυνδυασμού πρέπει από την μια να μην παρεμποδίζει την λειτουργία του φορέα (παγίδευση και έκφραση του γονιδίου μάρτυρα) και από την άλλη να προσφέρει το κατάλληλο σημείο εισόδου της στοχευόμενης κατασκευής.

Ωστόσο, για την μετατροπή των παγιδεύσεων εξονίων, το σημείο ανασυνδυασμού πρέπει να προηγείται του αρχικού γονιδίου μάρτυρα και η εισαγωγή του νέου διαγονιδίου πρέπει να γίνει στην ίδια κατεύθυνση. Επομένως, η αλληλουχία attP μπορεί να εισαχθεί πριν ή αμέσως μετά τη αλληλουχία αποδοχής ματίσματος hsp70a στον φορέα παγίδευσης (ΣΧΗΜΑ 12). Αν εισαχθεί πριν από την hsp70a, για την μετατροπή χρειάζεται να προσφέρουμε μαζί με το καινούργιο διαγονίδιο μια κανούργια αλληλουχία ματίσματος. Από την άλλη, όταν εισάγουμε την attP μετά την hsp70a, αρκεί να στοχεύσουμε μόνο το διαγονίδιο κατά την μετατροπή, τηρώντας όμως το πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου μάρτυρα. Σε αυτή τη περίπτωση είναι επίσης σημαντικό να ελέγξουμε για πιθανά κωδικόνια τερματισμού στην αλληλουχία attP καθώς και στην αλληλουχία attR που θα προκύψει μετά τον ανασυνδυασμό.

Με βάση αυτά τα στοιχεία, επέλεξα να ακολουθήσω την πρώτη προσέγγιση. Έτσι κλωνοποίησα τη θέση ανασυνδυασμού attP πριν από την αλληλουχία ματίσματος στον φορέα παγίδευσης. Η τελική κατασκευή pMi {3xP3-DsRed-SV40; attP; hsp70a-DsRed-SV40} (T2) (ΣΧΗΜΑ 12) χρησιμοποιήθηκε σε μια μικρής κλίμακας σάρωση για γονιδιακή παγίδευση στο αμφίποδο. Απομονώθηκαν δύο διαγονιδιακές σειρές, με έκφραση στα άκρα των ποδιών και σε μεταμερικό πρότυπο στα τελευταία στάδια της εμβρυογένεσης, που ονομάσαμε distal και segments αντίστοιχα.

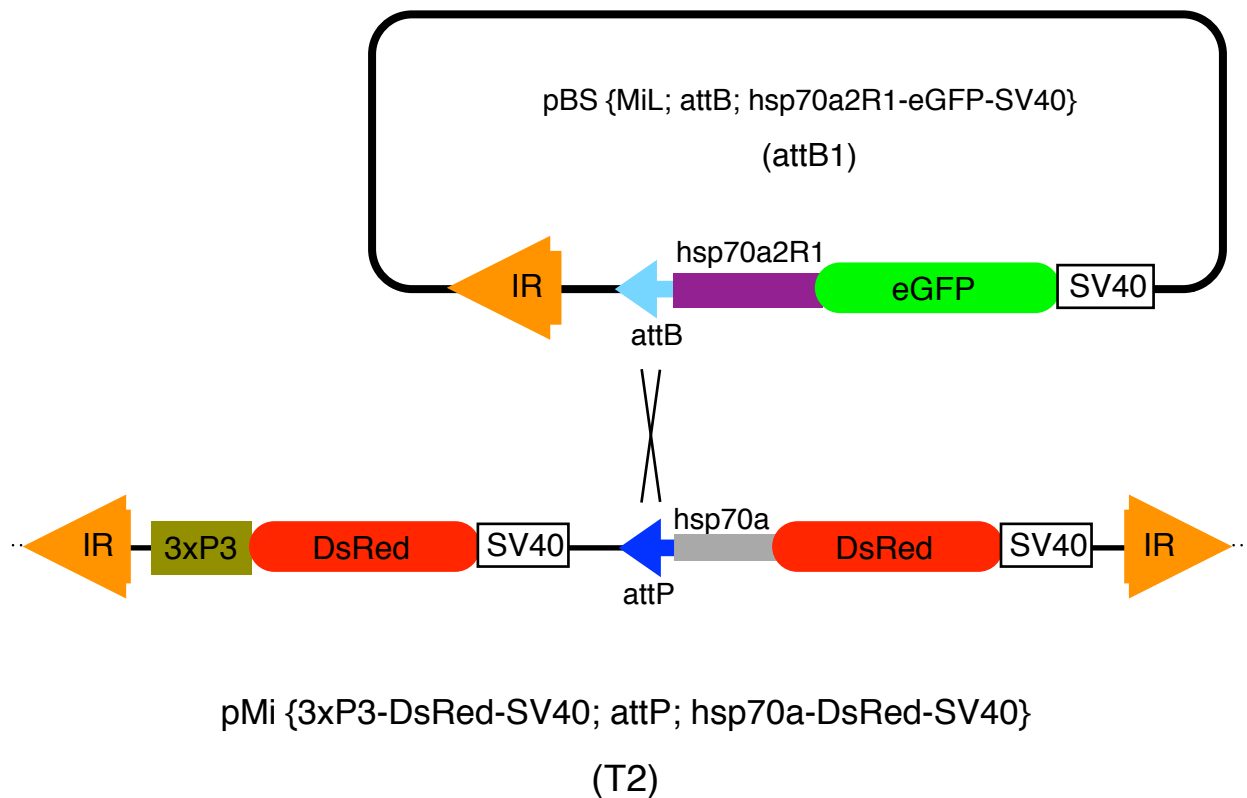
Αυτές οι διαγονιδιακές σειρές φέρουν πολλαπλές ενθέσεις του φορέα παγίδευσης και επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να μελετηθεί η στόχευση κατασκευών με ειδικό ανασυνδυασμό στις θέσεις αυτές. Τελικός όμως στόχος είναι η μετατροπή της ίδιας της παγίδευσης με την αντικατάσταση του γονιδίου μάρτυρα (σε αυτή τη περίπτωση της DsRed). Για αυτό το σκοπό επέλεξα την παγίδευση distal, καθώς εμφανίζει ισχυρότερη έκφραση, νωρίτερα κατά την ανάπτυξη καθιστώντας τον έλεγχο και την απεικόνιση των εμβρύων ευκολότερη.

ΕΝΘΕΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ ΣΤΟ ΓΕΝΩΜΑ ΜΕ ΕΙΔΙΚΟ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟ

Μετά την εξακρίβωση της ενεργότητας της εντεγκράσης φC31 στο αμφίποδο και της δημιουργίας ατόμων με πολλαπλές θέσεις attP στο γονιδίωμα, επιχείρησα να ενθέσω μία καινούργια κατασκευή σε διαγονιδιακά αμφίποδα distal. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποίησα για μάρτυρα, το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (eGFP) κάτω από τον έλεγχο του θερμοεπαγόμενου στοιχείου hsp70a2R1 (που ονομάζεται και PhHS) (Pavliopoulos, Kontarakis et al. 2009), σε πλασμίδιο που φέρει την πλήρη (285bp) αλληλουχία ανασυνδυασμού attB. Το στοιχείο hsp70a2R1 έχει μέγεθος 2488bp και αποτελεί τμήμα της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής ενός hsp70 γονιδίου. Περιέχει ένα ιντρόνιο και έναν υποκινητή που επάγει ισχυρή έκφραση μετά από θερμικό σοκ για λίγα λεπτά (15'-30') στους 37°C.

Επειδή η στοχευόμενη κατασκευή αποτελεί ανεξάρτητη μεταγραφική μονάδα, η κατεύθυνση της εισαγωγής δεν επηρεάζει την έκφραση της eGFP. Για να ελέγξω όμως ταυτόχρονα την περίπτωση να εντεθεί στον γενετικό τόπο distal σχεδίασα την θέση ανασυνδυασμού κατάλληλα ώστε να εισαχθεί στην ίδια φορά με το γονίδιο μάρτυρα DsRed (ΣΧΗΜΑ 13).

Η τελική κατασκευή pBS {MiL; attB; hsp70a2R1-eGFP-SV40} (attB1) ενέθηκε μαζί με το mRNA της εντεγκράσης σε διαγονιδιακά έμβρυα distal και σε αγρίου τύπου έμβρυα που δεν φέρουν τις αλληλουχίες attP (αρνητικός έλεγχος). Ο αρνητικός έλεγχος είναι ιδιαίτερα σημαντικός καθώς έχει αναφερθεί στόχευση κατασκευών με attB σε ενδογενής θέσεις γονιδιωμάτων άλλων οργανισμών (Thyagarajan, Olivares et al. 2001). Οι θέσεις αυτές εμφανίζουν μικρή ομοιότητα με την αγρίου τύπου attP αλληλουχία και ονομάζονται pseudo-attP. Το μεγάλο εκτιμώμενο μέγεθος του γονιδιώματος του αμφιπόδου αυξάνει την πιθανότητα ύπαρξης pseudo-attP θέσεων και για αυτό το λόγο ο έλεγχος για τέτοια γεγονότα ανασυνδυασμού είναι επιτακτικός.



ΣΧΗΜΑ 13: Ένθεση πλασμιδίου στο γένωμα με ειδικό ανασυνδυασμό

Το πλασμιδίο attB1 ενέθηκε στη διαγονιδιακή σειρά distal που φέρει πολλαπλές ενθέσεις του πλασμιδίου T2 και επομένως θέσεις ανασυνδυασμού attP. Για μάρτυρα της ένθεσης χρησιμοποίησα την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (eGFP) υπο τον έλεγχο του θερμοεπαγόμενου υποκινητή hsp70a2R1.

Μια περίπου εβδομάδα μετά την ένεση, υπέβαλα τα έμβρυα σε θερμικό σοκ στους 37°C για μία ώρα και την επόμενη μέρα έλεγξα για έκφραση της eGFP σε στερεοσκόπιο φθορισμού. Από τα 512 ενεμένα διαγονιδιακά έμβρυα, 207 επέζησαν μέχρι και μετά το θερμικό σοκ. Από αυτά, πάνω από τα μισά (104/207) εμφάνισαν αμφίπλευρη (40/207) ή μονόπλευρη (64/207) έκφραση της eGFP ενώ 43 έμβρυα εμφάνισαν μωσαϊκή έκφραση. Αντιθέτως, κανένα (0/255) από τα αγρίου τύπου ενεμένα έμβρυα δεν εμφάνισε έκφραση της eGFP, υποδεικνύοντας ότι η έκφραση της eGFP στα διαγονιδιακά ενεμένα ζώα είναι προϊόν στόχευσης των attP θέσεων (ΠΙΝΑΚΑΣ 1).

Για να επιβεβαιώσω τον ειδικό ανασυνδυασμό απομόνωσα γενωμικό υλικό από έμβρυα θετικά για eGFP (μονόπλευρη και μωσαϊκή έκφραση) και με την χρήση ειδικών εκκινητών (attL2, HSR1) εκατέρωθεν των αλληλουχιών ανασυνδυασμού, έλεγξα για ειδικό ανασυνδυασμό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ειδικό ανασυνδυασμό μεταξύ των αλληλουχιών attP και attB, αποκλείοντας ένθεση στο γονιδίωμα μέσω κάποιου άλλου μηχανισμού (πχ ομόλογος ανασυνδυασμός μεταξύ αλληλουχιών των δυο πλασμιδίων) (ΣΧΗΜΑ 14).

Αριθμός ενεμένων distal	Επιζώντα μετά από θερμικό σοκ	Αμφίπλευρη έκφραση eGFP	Μονόπλευρη έκφραση eGFP	Μωσαϊκή έκφραση eGFP
512	207	40 (19%)	64 (31%)	43 (21%)
Αριθμός ενεμένων WT	Επιζώντα μετά από θερμικό σοκ	Αμφίπλευρη έκφραση eGFP	Μονόπλευρη έκφραση eGFP	Μωσαϊκή έκφραση eGFP
619	255	0	0	0

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Ενέσεις για την ένθεση του πλασμιδίου attB1 σε distal και WT έμβρυα

Όλα τα έμβρυα με αμφίπλευρη έκφραση eGFP (17/17) έδωσαν απογόνους επίσης θετικούς σε θερμοεπαγόμενη έκφραση eGFP, δείχνοντας σταθερή ένθεση του πλασμιδίου και στη γαμετική σειρά. Μάλιστα, το ποσοστό κληρονομίσης του νέου μάρτυρα ήταν σε κάποιες περιπτώσεις 100%, υποδεικνύοντας πολλαπλές ενθέσεις στο γονιδίωμα (ΠΙΝΑΚΑΣ 2).

ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΠΑΓΙΔΕΥΣΗΣ

Η υψηλή απόδοση στην ένθεση πλασμιδίων με attB σε προκαθορισμένες θέσεις attP στο γονιδίωμα ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντική. Τα διαγονιδιακά άτομα όμως που χρησιμοποιήθηκαν, φέρουν δεκάδες ενθέσεις και επομένως δεκάδες αλληλουχίες-στόχους. Στην περίπτωση της μετατροπής μιας γονιδιακής παγίδευσης, μας ενδιαφέρει να στοχεύσουμε μία μόνο ένθεση και έτσι η απόδοση ενδέχεται να είναι αρκετά μικρότερη.

Συνολικά 147 έμβρυα εμφάνισαν θερμοεπαγόμενη έκφραση eGFP (αμφίπλευρη, μονόπλευρη ή μωσαϊκή). Μάλιστα τα αποτελέσματα των διασταυρώσεων υποδεικνύουν πως κάποια eGFP θετικά άτομα έφεραν πολλαπλές ενθέσεις της στοχευόμενης κατασκευής. Είναι επομένως πολύ πιθανό κάποια από τις ενθέσεις αυτές να έχει γίνει στον γονιδιακό τόπο distal. Καθώς είχα σχεδιάσει το στοχευόμενο πλασμίδιο ώστε να εισαχθεί στην ίδια φορά με τη μεταγραφή του παγιδευμένου γονιδίου, περίμενα με αυτό το τρόπο να πετύχω παγίδευση του distal με την eGFP. Το ιντρόνιο του θερμοεπαγόμενου υποκινητή hsp70a2R1 θα μπορούσε να παραπλανήσει το φυσιολογικό μάτισμα του distal γονιδίου προς την eGFP. Ελέγχοντας για έκφραση της eGFP πριν από το θερμικό σοκ δεν εντόπισα σε καμία περίπτωση έκφραση της eGFP στα πρότυπα του distal. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο επιλεκτικό μάτισμα των αλληλουχιών προσφοράς και αποδοχής ματίσματος του ιντρονίου του hsp70a2R1 μεταξύ τους, σε σχέση με το μάτισμα της αλληλουχίας αποδοχής του hsp70a2R1 με την ενδογενή αλληλουχία προσφοράς (ΣΧΗΜΑ 13).

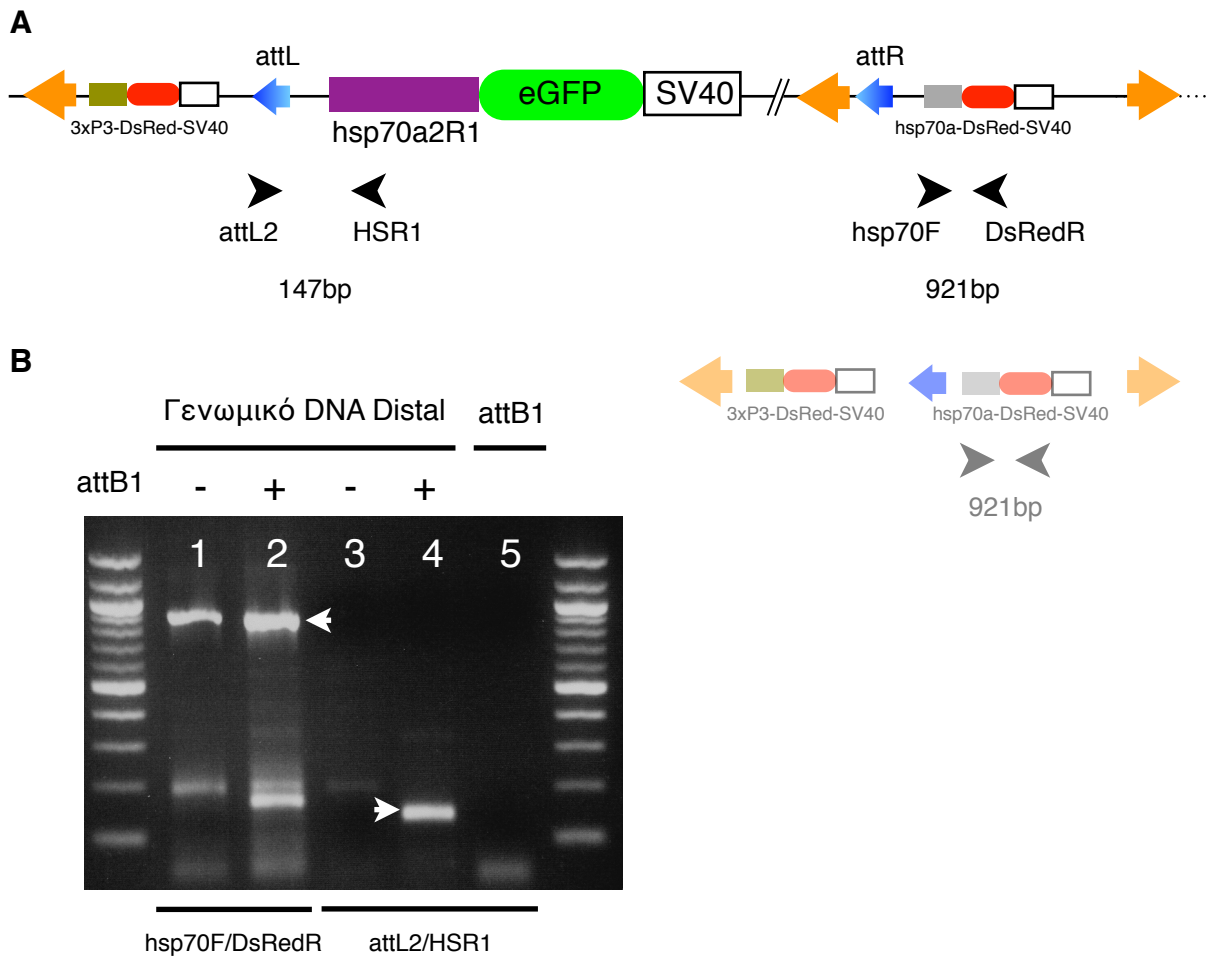
ID ατόμου G0	Φύλο	Έκφραση eGFP στην G1 γενιά			
		+++	++	+	-
D1	♂	25			0
A	♀	24			11
X.1	♀	1	1	0	0
X.2	♀	4	2	2	0
X.3	♀	2	0	0	0
X.5	♀	6	0	0	0
X.6	♀	3	0	0	0
X.7	♀	3	0	0	0
X.8	♀	3	0	0	0
X.9	♂	6	0	0	3
X.10	♂	5	0	0	4
X.11	♂	5	0	5	0
X.12	♂	7	0	0	0
X.13	♂	9	0	0	0
X.14	♂	9	7	0	0
X.15	♂	2	3	0	0
X.16	♂	7	2	0	0

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Κληρονομία της ένθεσης του πλασμιδίου attB1 στην επόμενη γενιά

Ενεμένα άτομα G0 που εμφάνισαν αμφίπλευρη έκφραση της eGFP μετά από θερμικό σοκ, διασταυρώθηκαν με αγρίου τύπου αμφίποδα και οι απόγονοί τους (G1) ελέχθηκαν για έκφραση της eGFP. Στις περισσότερες περιπτώσεις έγινε διάκριση ανάμεσα σε ισχυρή έκφραση (+++), μέτρια (++) και ασθενή (+) έκφραση της eGFP. Πολλά άτομα G0 δίνουν αποκλειστικά απογόνους με τουλάχιστον ασθενή έκφραση του διαγονιδίου, υποδηλώνοντας πως φέρουν πολλαπλές ενθέσεις του πλασμιδίου attB1 στο γονιδιώμα τους.

Επειδή η αλληλουχία προσφοράς ματίσματος του hsp70a2R1 φαίνεται να δρα ανασταλτικά στην παγίδευση του distal από τη eGFP, τροποποίησα την κατασκευή pBS {MiL; attB; hsp70a2R1-eGFP-SV40} αφαιρώντας την αλληλουχία προσφοράς (ΣΧΗΜΑ 13). Η κατασκευή pBS {MiL; attB; hsp70a2R1ΔSD-eGFP-SV40} (attBX) που προέκυψε ενέθηκε μαζί με το mRNA της ιντεγκράσης σε διαγονιδιακά έμβρυα distal. Από τα συνολικά 222 έμβρυα, που ένεσα κανένα δεν εμφάνισε έκφραση της eGFP στο πρότυπο του distal. Για να επιβεβαιώσω πως η αποτυχία παγίδευσης δεν οφείλεται σε αποτυχία στόχευσης υπέβαλα τα ενεμένα έμβρυα σε θερμικό σοκ για την επαγωγή της eGFP μέσω του θερμοεπαγόμενου υποκινητή. Με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα, περίμενα να έχω

ένθεση της κατασκευής, σε οποιαδήποτε θέση attP, σε περίπου 50% των εμβρύων. Ωστόσο, κανένα από τα 53 έμβρυα που επέζησαν μετά το θερμικό σοκ, δεν ήταν θετικό σε eGFP.



ΣΧΗΜΑ 14: Έλεγχος ειδικού ανασυνδυασμού στο γονιδίωμα

A. Απεικόνιση μιας ειδικής ένθεσης του πλασμιδίου attB1 στο γονιδίωμα. Το ζεύγος ειδικών εκκινητών attL2, HSR1 προσδένονται εκατέρωθεν του σημείου ανασυνδυασμού attL και παράγουν ένα προϊόν μεγέθους 147bp ειδικό μόνο για τις στοχευμένες με το πλασμίδιο attB1 ενθέσεις. Από την άλλη οι εκκινητές hsp70F, DsRedR αναγνωρίζουν τμήμα της κατασκευής hsp70a-DsRed και χρησιμεύουν ως θετικό έλεγχο στο πείραμα, παράγοντας προϊόν 921bp. Το τμήμα hsp70a-DsRed υπάρχει και στις ενθέσεις που δεν έχουν στοχευτεί με το πλασμίδιο attB1 με αποτέλεσμα η ζώνη 921bp να αποτελεί γενικό μάρτυρα διαγονιδιακών ατόμων που φέρουν τον φορέα παγίδευσης T2. **B.** Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Τα πηγάδια 1-4 φέρουν δείγματα γενωμικού υλικού από διαγονιδιακά άτομα distal και το πηγάδι 5 το πλασμίδιο attB1 ως αρνητικό έλεγχο. Η ειδική για τον φορέα ένθεσης ζώνη εμφανίζεται και σε ενεμένα με το πλασμίδιο attB1 άτομα και σε μη ενεμένα άτομα (1-2). Αντιθέτως η ζώνη του ανασυνδυασμού εμφανίζεται αποκλειστικά στα άτομα που έχουν ενεθεί με το πλασμίδιο attB1 και την ιντεγκράση.

Η μη έκφραση της eGFP μπορεί να οφείλεται είτε στην έλλειψη ανασυνδυασμού της κατασκευής στο γένωμα, είτε σε κάποιο πρόβλημα της κατασκευής. Κοιτάζοντας προσεκτικά την αλληλουχία του hsp70a2R1 παρατήρησα πως το τμήμα του ιντρονίου, που δεν αφαιρείται πλέον κατά την ωρίμανση, φέρει αρκετά κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης (ΣΧΗΜΑ 14). Αυτά τα πρώιμα κωδικόνια έναρξης πιθανότατα παρεμποδίζουν

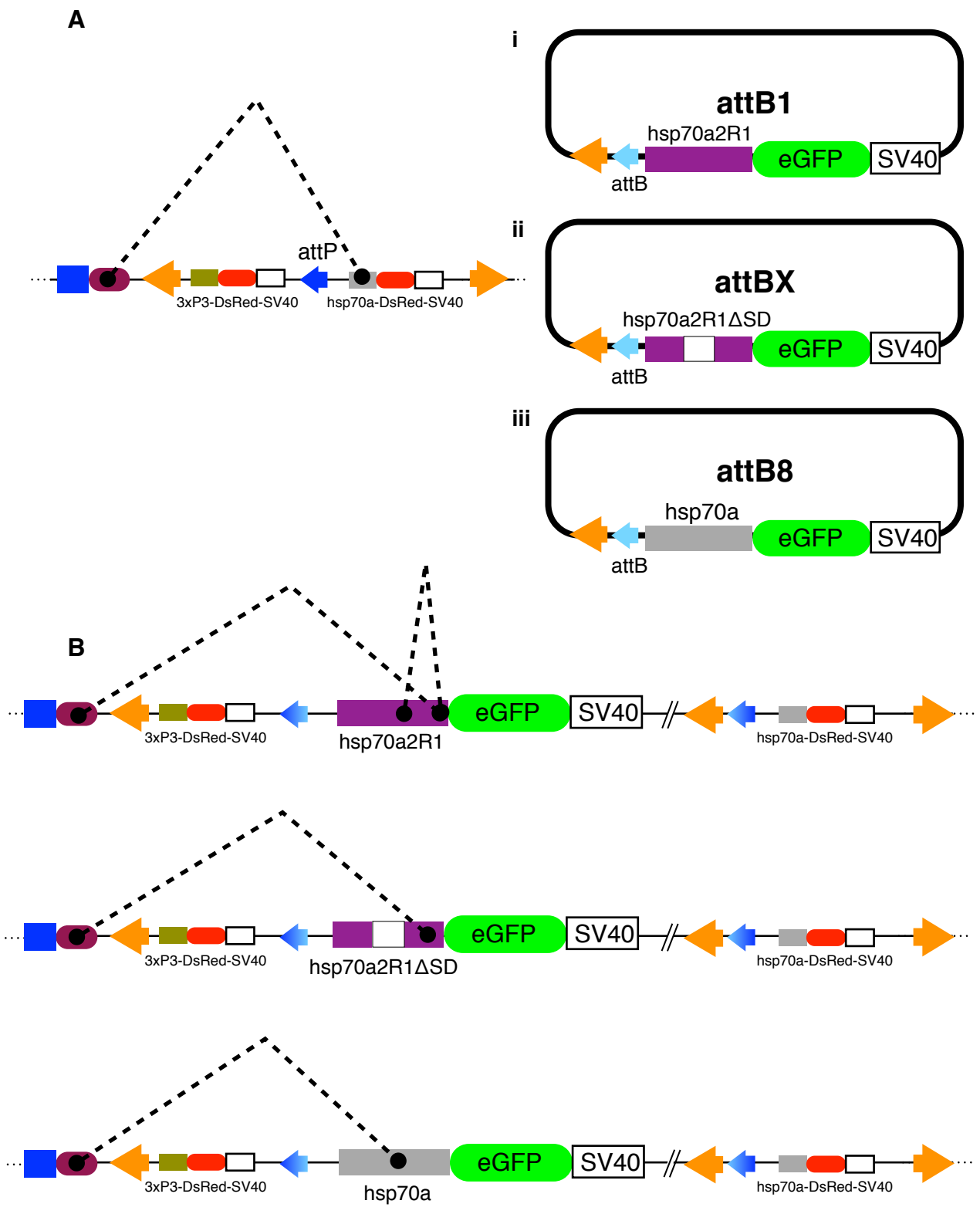
την σωστή μετάφραση του μεταγράφου, δίνοντας μια εξήγηση γιατί δεν παρατηρήθηκε έκφραση μετά από θερμοεπαγόμενο σοκ σε κανένα έμβρυο.

Στη συνέχεια, αποφάσισα να αντικαταστήσω τον θερμοεπαγόμενο υποκινητή hsp70a2R1 της κατασκευής attB1 με το στοιχείο hsp70a που χρησιμοποίησα αρχικά και για την παγίδευση distal (και segments) με τον φορέα T2. Με τη νέα κατασκευή pBS {MiL; attB; hsp70a-eGFP-SV40} (attB8) δεν υπάρχει η δυνατότητα επαγωγής της eGFP παρά μόνο με ένθεσή της στο attP του γενετικού τόπου distal (ΣΧΗΜΑ 13). Έτσι, ένεσα 389 distal έμβρυα και έλεγξα για παγίδευση του distal με την eGFP. Από τα 90 έμβρυα που επιβίωσαν μέχρι το κατάλληλο στάδιο, 26 παρουσίασαν αμφίπλευρη (12/90) ή μονόπλευρη (14/90) έκφραση της eGFP στα αναπτυσσόμενα άκρα και 21 έκφραση σε κάποια μεμονωμένα άκρα (ΠΙΝΑΚΑΣ 3 και ΣΧΗΜΑ 15).

Το πρότυπο έκφρασης της eGFP ήταν σχεδόν ταυτόσημο με το πρότυπο της DsRed στην παγίδευση distal. Τη μόνη διαφορά αποτελεί η πιο εκτενής έκφραση της eGFP στο κάθε άκρο. Αυτή η διαφορά πιθανότατα οφείλεται στην μεγαλύτερη ημιζωή της eGFP σε σχέση με την DsRed και επομένως στην παραμονή πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης σε τμήματα του αναπτυσσόμενου άκρου, όπου η έκφραση του distal έχει ήδη σταματήσει. Η εξήγηση αυτή υποστηρίζεται και από το γεγονός, πως αυτή η διαφορά στην έκφραση μεταξύ των δύο παγιδεύσεων (distal-DsRed και distal-eGFP) δεν παρατηρείται σε ενήλικα άτομα, όπου η ανάπτυξη των ποδιών έχει σταματήσει.

Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση αποτελεί η ταυτόχρονη έκφραση και των δύο γονιδίων μαρτύρων (DsRed και eGFP) στο ίδιο άκρο. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να οφείλεται στο μάτισμα των χιμαιρικών μεταγράφων distal-eGFP-DsRed κάποιες φορές στο πρώτο hsp70a (eGFP) και άλλες στο δεύτερο (DsRed). Μπορεί όμως να οφείλεται και στην ετερόζυγη κατάσταση ενός ατόμου (distal-DsRed / distal-eGFP). Η δημιουργία ατόμων που φέρουν μία μόνο ένθεση στο γενετικό τόπο distal, με την διασταύρωση distal-eGFP ατόμων με αγρίου τύπου αμφίποδα, έδωσε την απάντηση σε αυτό το ερώτημα. Η DsRed δεν ήταν ανιχνεύσιμη σε αυτά τα άτομα υποδηλώνοντας πως το μετάγραφο distal-eGFP-DsRed ματίζεται στη πρώτη αλληλουχία αποδοχής εκφράζοντας την eGFP.

Από τα θετικά distal-eGFP έμβρυα τέσσερα επιβίωσαν έως την αναπαραγωγική ωρίμανση. Η διασταύρωσή τους με αγρίου τύπου άτομα έδωσε άτομα με distal-eGFP πρότυπο, υποδεικνύοντας πως η στόχευση έχει γίνει και στην γαμετική σειρά (3/4 ενήλικα).



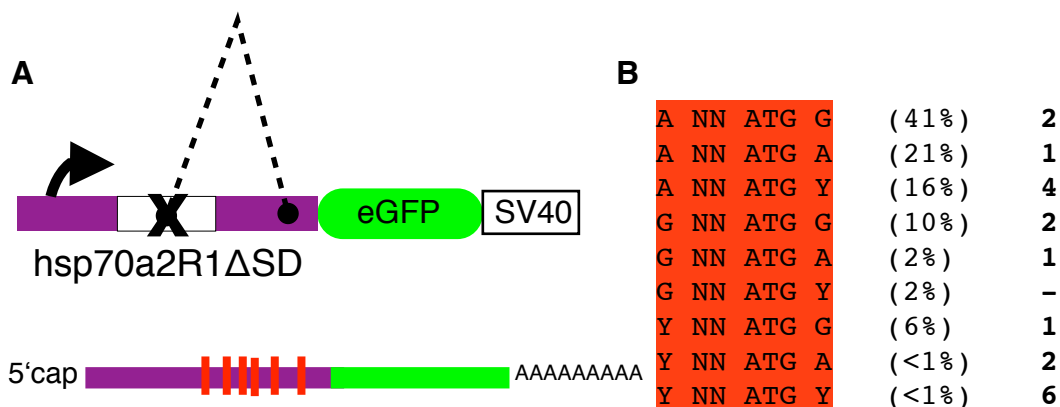
ΣΧΗΜΑ 15: Μετατροπή γονιδιακής παγίδευσης

A. Ο γενετικός τόπος *distal* και η παγίδευσή του με DsRed. **i-iii)** Οι τρεις κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντικατάσταση της παγίδευσης. Και στις τρεις περιπτώσεις εισάγεται η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη για μάρτυρας. **i.** Το πλασμίδιο *attB1* περιέχει τον θερμοεπαγόμενο υποκινητή *hsp70a2R1*. Ενεργοποιώντας με θερμικό σοκ την *eGFP* μπορούμε να ελέγξουμε για ένθεση σε άλλη θέση στο γονιδίωμα (η διαγονιδιακή σειρά *distal* περιέχει πολλές ενθέσεις *attP*). **ii.** Το πλασμίδιο *attBX* περιέχει τον *hsp70a2R1* από τον οποίο έχει αφαιρεθεί ένα τμήμα που περιέχει τον δότη ματίσματος (SD) και το ονομάζουμε *hsp70a2R1ΔSD*. **iii.** Το πλασμίδιο *attB8* περιέχει τον δέκτη ματίσματος *hsp70a*. Ο *hsp70a* χρησιμοποιήθηκε και στην αρχική παγίδευση του *distal*.

B. Το αποτέλεσμα της ένθεσης του κάθε πλασμιδίου στον γενετικό τόπο *distal*. Ο υποκινητής *hsp70a2R1* περιέχει ένα ιντρόνιο που ανταγωνίζεται για μάτισμα με τον ενδογενή δότη ματίσματος του *distal*. Ο *hsp70a2R1ΔSD* στερείται μια περιοχή που περιλαμβάνει τον δότη ματίσματος με αποτέλεσμα να είναι εφικτό το μάτισμα του.

ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΠΑΓΙΔΕΥΜΕΝΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *distal*

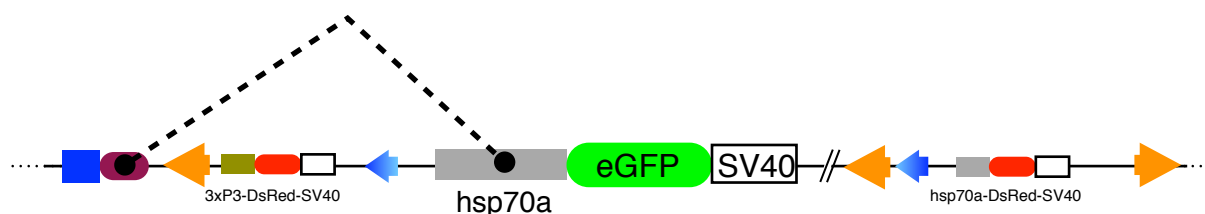
Η γονιδιακή παγίδευση *distal* παρουσιάζει έκφραση του γονιδίου μάρτυρα στο απομακρυσμένο τμήμα όλων των άκρων (αντέννες, μασητικά εξαρτήματα, θωρακικά πόδια, κοιλιακά άκρα και ουρά). Η έκφραση της DsRed εμφανίζεται αρκετά νωρίς στην ανάπτυξη των ποδιών, περίπου 100 ώρες μετά την γονιμοποίηση (S20 κατά Browne) και διατηρείται καθόλη την διάρκεια της ζωής του ατόμου (ΣΧΗΜΑ 16). Η παγίδευση μπορεί να ομοζυγωθεί και δεν εμφανίζει κάποιο εμφανή φαινότυπο (μορφολογικό, βασικής συμπεριφοράς ή επιβίωσης). Αυτό υποδηλώνει πως είτε η ένθεση δεν επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα του ενδογενούς γονιδίου, είτε πως η απώλεια του παγιδευμένου γονιδίου δεν εμφανίζει κάποιο φαινότυπο.



ΣΧΗΜΑ 16: Κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης στον υποκινητή *hsp70a2R1ΔSD*

A. Η κατασκευή *hsp70a2R1ΔSD-eGFP-SV40*. Ο δότης ματίσματος του υποκινητή *hsp70a2R1* έχει αφαιρεθεί με αποτέλεσμα το ιντρόνιο που βρίσκεται πριν το AUG της *eGFP* να μην αποκόπεται κατά το μάτισμα. Έτσι το ώριμο μετάγραφο θα περιλαμβάνει μια περιοχή που φέρει πιθανά σήματα έναρξης την μετάφρασης. **B.** Τα Kozak consensuses και η συχνότητα που χρησιμοποιούνται στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Ο αριθμός δίπλα σε κάθε consensus δείχνει πόσες φορές υπάρχει το κάθε ένα στην περιοχή πριν το AUG στα μετάγραφα που παράγονται από το *hsp70a2R1ΔSD-eGFP-SV40*.

Βασικό πλεονέκτημα της παγίδευσης εξονίων αποτελεί η δυνατότητα κλωνοποίησης του παγιδευμένου γονιδίου με την χρήση 5'RACE πάνω στο χιμαιρικό μετάγραφο. Όπως έχει προαναφερθεί, κατά τη γονιδιακή παγίδευση ενδέχεται να έχουμε φαινόμενα παγιδεύσεων που δεν παράγουν τελικό λειτουργικό προϊόν, είτε λόγω διαφορετικού πλαισίου ανάγνωσης, είτε λόγω ελλατωματικής αναδίπλωσης της παραγόμενης πρωτεΐνης. Τα μετάγραφα αυτά όμως ανιχνεύονται με ευαίσθητες μοριακές μεθόδους όπως η 5'RACE. Μάλιστα γνωρίζουμε ότι σε πολλές περιπτώσεις η κάθε διαγονιδιακή σειρά περιέχει δεκάδες τυχαίες ενθέσεις εκτός από την ένθεση που ανιχνεύουμε ως παγίδευση (Pavliopoulos and Averof 2005). Η ανάλυση των γονιδιακών παγιδεύσεων στο αμφίποδο, που έγινε από τους Αλέξανδρο Κιουπάκη και Βασίλη Δουρή, έδωσε πολλαπλά προϊόντα για κάθε διαγονιδιακή σειρά. Για την παγίδευση distal απομονώθηκαν δύο αλληλουχίες με κοινή 5' περιοχή, που πιθανότατα αποτελούν διαφορετικά μετάγραφα που ματίζονται με το ίδιο εξόνιο κατά το φαινόμενο του trans-splicing (Douris, Telford et al. 2010).



Αριθμός ενεμένων distal	Επιζώντα κατά τον έλεγχο	Αμφίπλευρη έκφραση eGFP	Μονόπλευρη έκφραση eGFP	Μωσαϊκή έκφραση eGFP
389	90	12 (13%)	14 (16%)	21 (23%)

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Στόχευση στο γενετικό τόπο distal και παγίδευση με eGFP

Από τα 389 distal έμβρυα που ενέθηκαν με το πλασμίδιο attB8 τα 90 επέζησαν μέχρι τον έλεγχο για παγίδευση με eGFP. 13% εμφάνισε αμφίπλευρη έκφραση της eGFP στο πρότυπο distal, 16% μονόπλευρη και 23% έκφραση σε κάποια πόδια.

Για να εξακριβώσω αν κάποια από τις δύο αλληλουχίες αντιστοιχεί στο γονίδιο που παρατηρούμε με την έκφραση της DsRed στην παγίδευση distal, κλωνοποίησα τις μη ομόλογες περιοχές από τα δύο τμήματα (Distal A και Distal B) και προετοίμασα ανιχνευτές ειδικούς για το κάθε ένα από αυτά.

Μετά από *in situ* υβριδοποίηση σε αγρίου τύπου έμβρυα με τους ειδικούς ανιχνευτές, ένας από αυτούς (Distal A) έδωσε πρότυπο όμοιο με εκείνο που επιδεικνύει η έκφραση της DsRed στην διαγονιδιακή σειρά distal, ενώ ο άλλος (DistalB) δεν έδωσε κανένα πρότυπο έκφρασης (ΣΧΗΜΑ 17). Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει πως η αλληλουχία του DistalA αποτελεί τμήμα του παγιδευμένου γονιδίου στην παγίδευση distal.

Σχεδιάζοντας ειδικό εκκινητή για το DistalA επιχειρήσα να κλωνοποιήσω το πλήρες μετάγραφο του παγιδευμένου γονιδίου. Απομόνωσα ολικά ριβονουκλεϊκά οξέα από αγρίου τύπου έμβρυα κατάλληλου σταδίου (μεγαλύτερα από S20) και μετά από αντίστροφη

μεταγραφή με τη χρήση εκκινητή πολυθυμιδίνης προχώρησα σε 3'RACE. Με τη μέθοδο αυτή κατάφερα να ανακτήσω επιπλέον αλληλουχία μεγέθους μόλις 98bp. Ακολούθησαν πολλαπλές απόπειρες να κλωνοποιηθεί μεγαλύτερο τμήμα του γονιδίου.

Βασικό εμπόδιο στην προσπάθεια κλωνοποίησης ενός γονιδίου με 3'RACE αποτελεί η μη ειδική πρόσδεση των εκκινητών. Από τη μια, η μη ειδική πρόσδεση του εκκινητή πολυθυμιδίνης κατά την αντίστοιχη μεταγραφή έχει ως συνέπεια την παραγωγή μικρότερων προϊόντων cDNA. Από την άλλη, οι εκκινητές μπορούν να δώσουν μη ειδικά προϊόντα κατά τον πολλαπλασιασμό. Στη περίπτωση του distal η προσπάθεια κλωνοποίησής του υπέφερε και από τα δυο αυτά φαινόμενα. Κλωνοποίησα αρκετά προϊόντα, που μετά από αλληλούχηση αποδείχτηκαν μη ειδικά. Επιπλέον, σύγκριση της παλαιάς αλληλουχίας (DistalA) με την νέα αλληλουχία που απομόνωσα (περίπου 300bp κοινή και 98bp επιπλέον αλληλουχία) υποδεικνύει πως ο εκκινητής πολυθυμιδίνης είχε προσδεθεί κατά την παλαιά αντίδραση σε μια ακολουθία με πέντε μόλις θυμιδίνες. Γι' αυτό το λόγο σχεδίασα καινούργιο εκκινητή με υψηλότερο σημείο τήξης και εκτέλεσα την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής και τον πολλαπλασιασμό του cDNA σε υψηλότερη θερμοκρασία για να αποφύγω τα παραπροϊόντα και να ανακτήσω πλήρους μεγέθους κλώνους. Ωστόσο, παρά τις προσπάθειες αυτές δεν κατάφερα να απομονώσω μεγαλύτερο τμήμα του distal γονιδίου.

Αφού απέτυχα να κλωνοποιήσω το πλήρες γονίδιο, επικεντρώθηκα στην ανάλυση του τμήματος του distal που έχουμε ήδη απομονώσει. Συνολικά, το τμήμα αυτό έχει μήκος 1131bp και περιλαμβάνει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 308 αμινοξέων, χωρίς κωδικόνιο τερματισμού. Μετά από σύγκριση της πρωτεϊνικής αυτής αλληλουχίας σε βάσεις δεδομένων (BLAST), δεν προέκυψε σημαντική ομοιότητα με κάποια γνωστή αλληλουχία, υποδεικνύοντας πως είτε πρόκειται για κάποιο καινούργιο γονίδιο, είτε η μερική αλληλουχία που έχουμε στα χέρια μας, δεν είναι αρκετή για να αποκαλύψει πιθανή ομολογία.

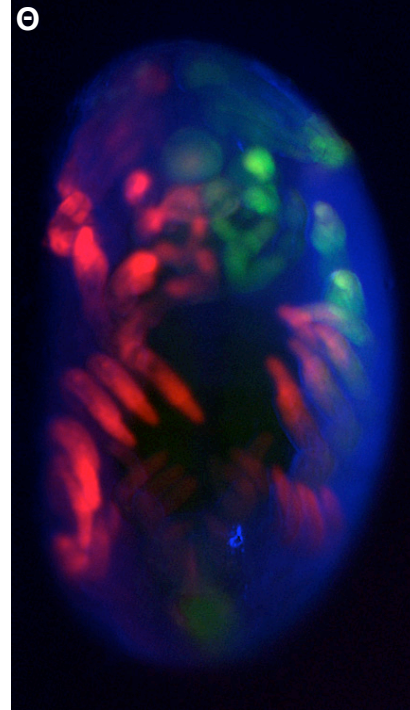
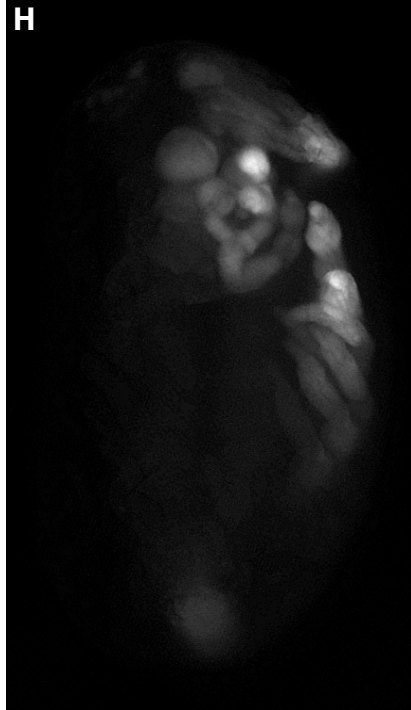
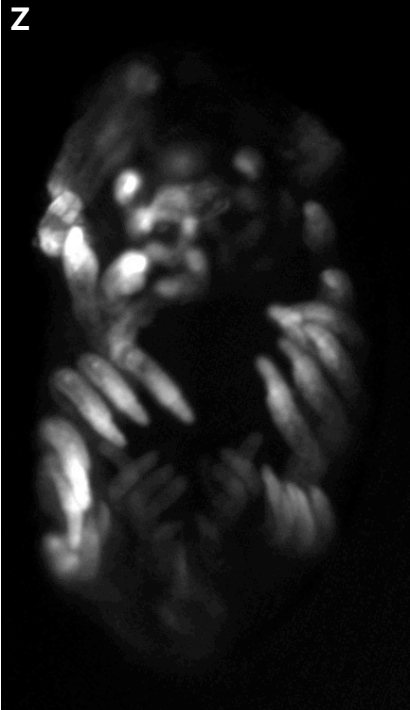
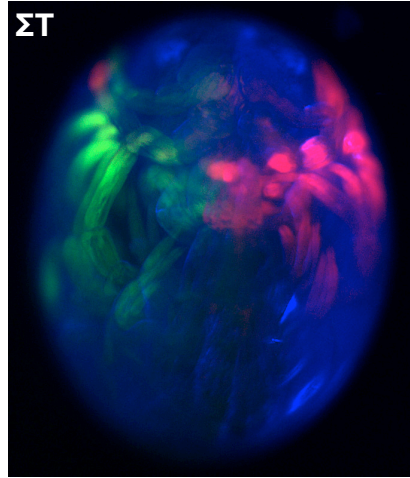
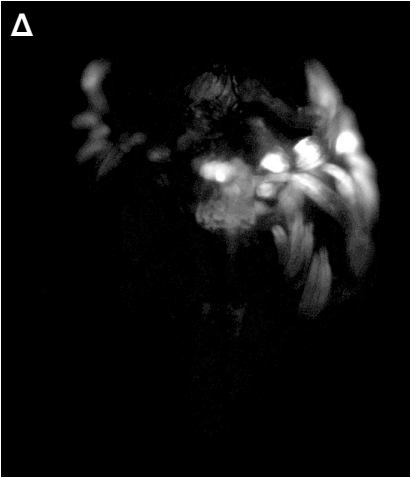
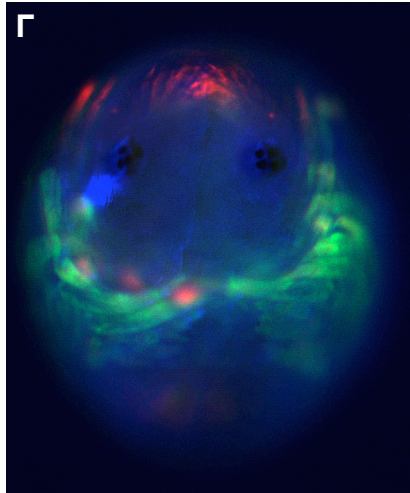
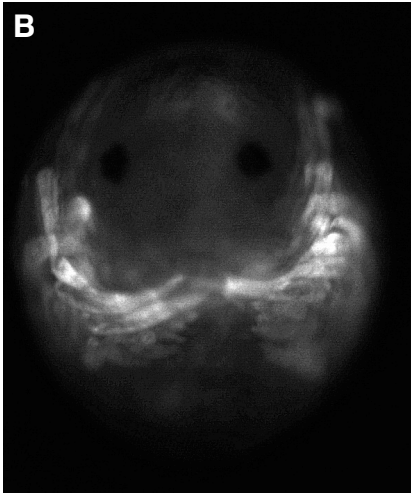
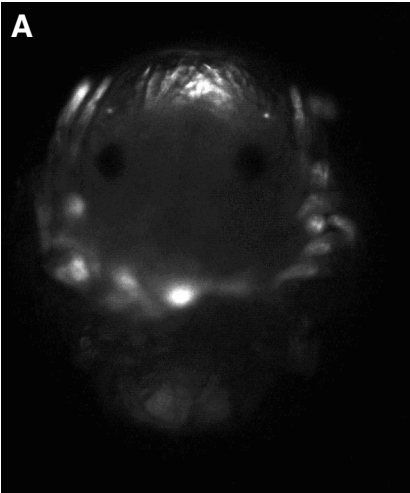
ΣΧΗΜΑ 17: Στόχευση στο γενετικό τόπο distal και παγίδευση με eGFP

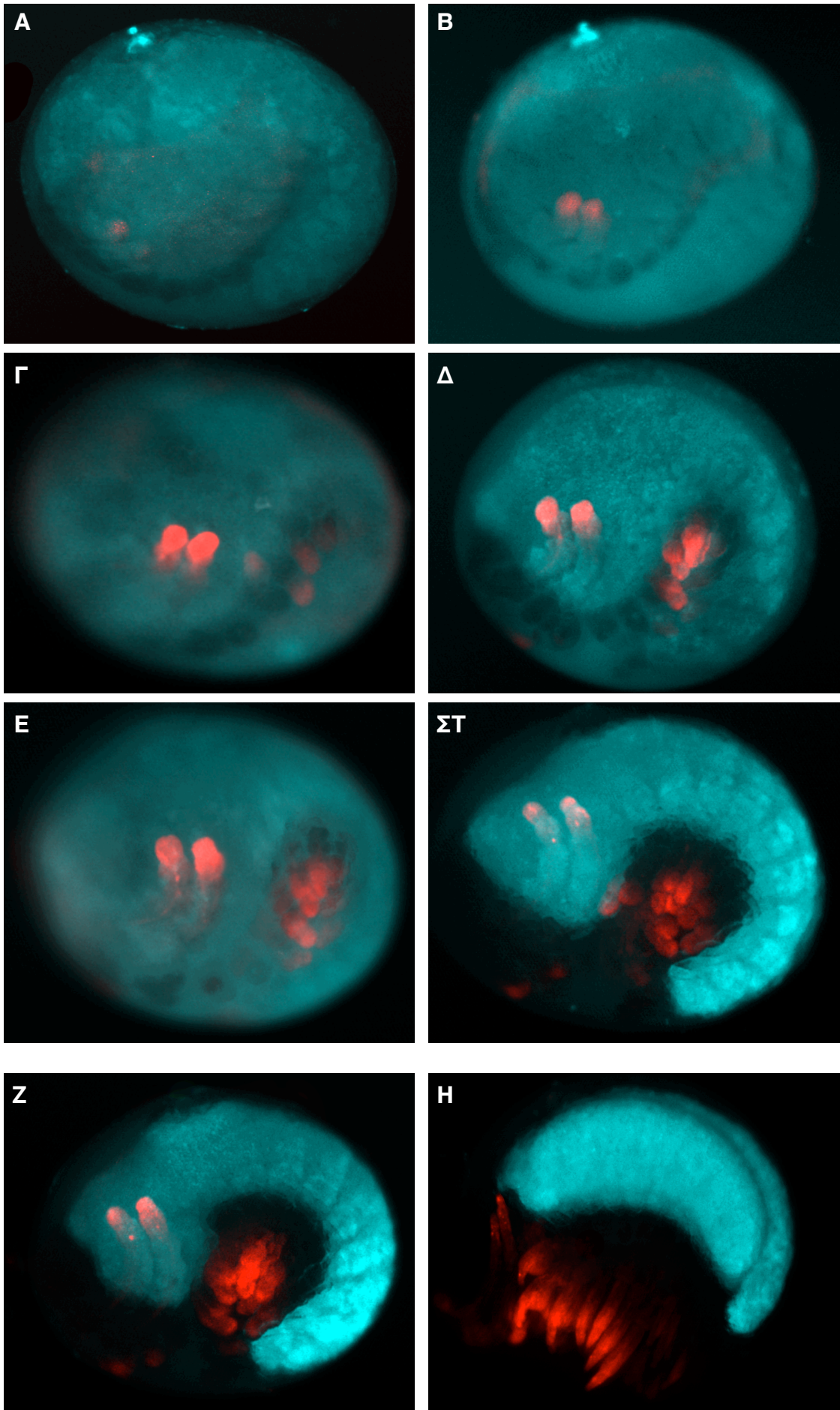
A-Θ Κοιλιακή άποψη τριών G0 distal εμβρύων που έχουν ενεθεί με το πλασμίδιο attB8 και την ιντεγκράση του φάγου φC31. **A-Γ** Αμφίπλευρη παγίδευση. **Δ-ΣΤ** Μονόπλευρη παγίδευση **Z-Θ** Μωσαϊκή παγίδευση του distal με eGFP. Σε κάθε μια από τις τρεις περιπτώσεις, δείχνονται ξεχωριστά τα δύο κανάλια για DsRed και eGFP και συνχώνευσή τους μαζί με φωτογραφία στο ορατό φώς ως μπλέ κανάλι.

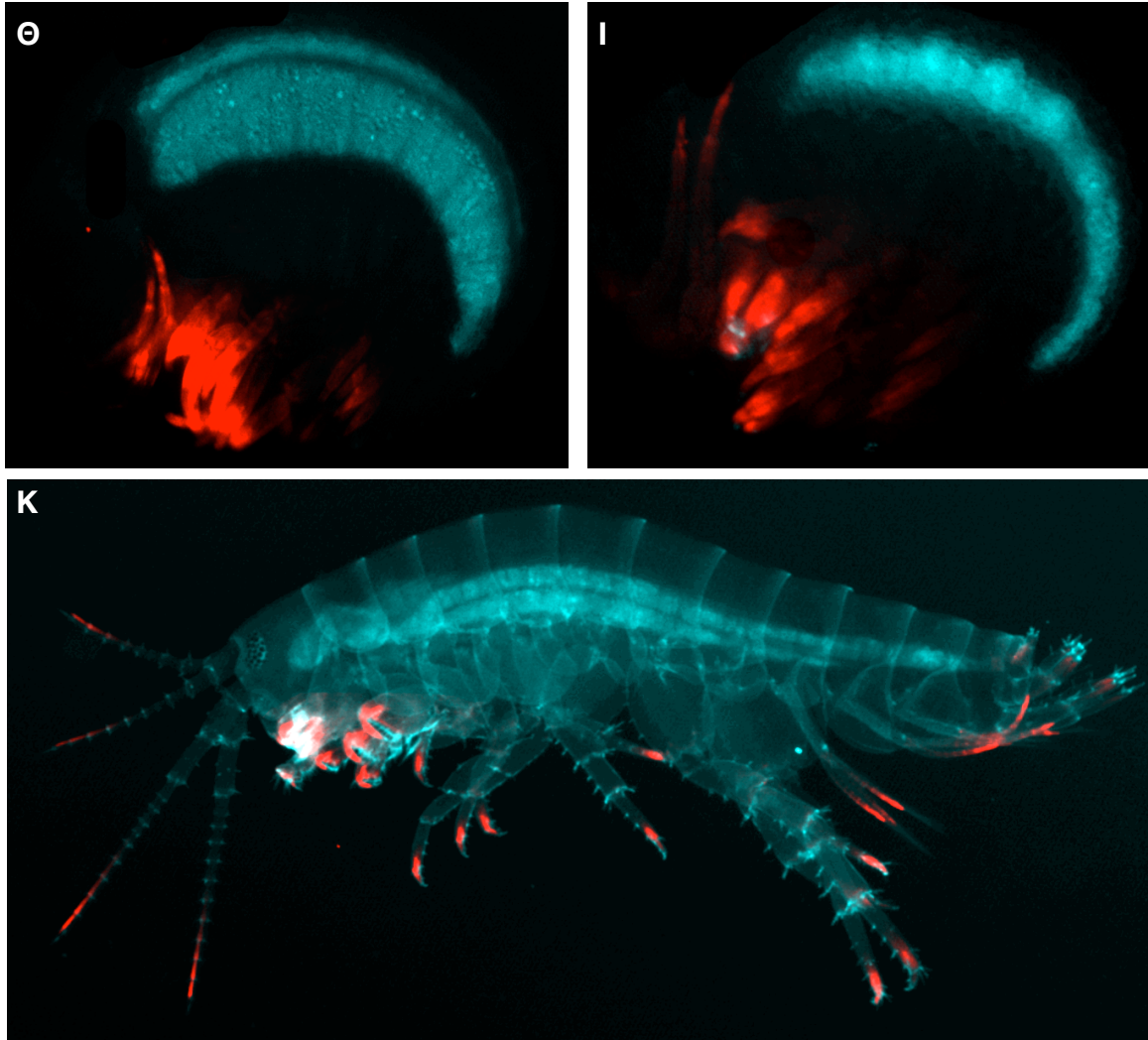
κόκκινο

πράσινο

συγχώνευση







ΣΧΗΜΑ 16: Πρότυπο έκφρασης παγίδευσης distal-DsRed

A-I Έκφραση του γονιδίου μάρτυρα κατά την ανάπτυξη του αμφιπόδου. Με κόκκινο η έκφραση της DsRed. Με γαλάζιο φαίνεται ο αυτοφθορισμός της λεκίθου στο πράσινο κανάλι. Σε όλες τις φωτογραφίες το κεφάλι βρίσκεται στα αριστερά. Οι εικόνες δεν είναι σε κλίμακα. **A-B**. Στο στάδιο S20 (περίπου 112ώρες μετά την γονιμοποίηση) παρατηρείται η πρώτη έκφραση της DsRed. Αρχικά εμφανίζεται στις κεραίες, που είναι τα άκρα που σχηματίζονται πρώτα. **Γ-E**. Μέσα σε 24 ώρες (S21-S22, περίπου 120-140 ώρες μετά την γονιμοποίηση) η έκφραση του γονιδίου έχει ξεκινήσει και στα αναπτυσσόμενα θωρακικά πόδια. **ΣΤ-Η**. Έμβρυα σταδίου S23-25 (144-168 ώρες μετά την γονιμοποίηση). **Η**. Προς το τέλος της επέκτασης των εντερικών σάκων (digestive caecae) η DsRed είναι εμφανής και στα άκρα των πλεοποδίων. **Θ-Ι**. Το πρότυπο έκφρασης της DsRed είναι καλά εμφανές σε όλα τα άκρα καθώς αυτά ωριμάζουν (180-240 ώρες, στάδια S26-S29). **Κ**. Ενήλικο άτομο distal. Η DsRed εκφράζεται καθόλη τη διάρκεια της ζωής του ατόμου στο τέρμα όλων των άκρων. Με γαλάζιο φαίνεται ο αυτοφθορισμός του εξωσκελετού στο πράσινο κανάλι. Ο αυτοφθορισμός του εντέρου στο κόκκινο μπορεί να είναι πολύ έντονος και για αυτό το λόγο εδώ έχει αφαιρεθεί υπολογιστικά.

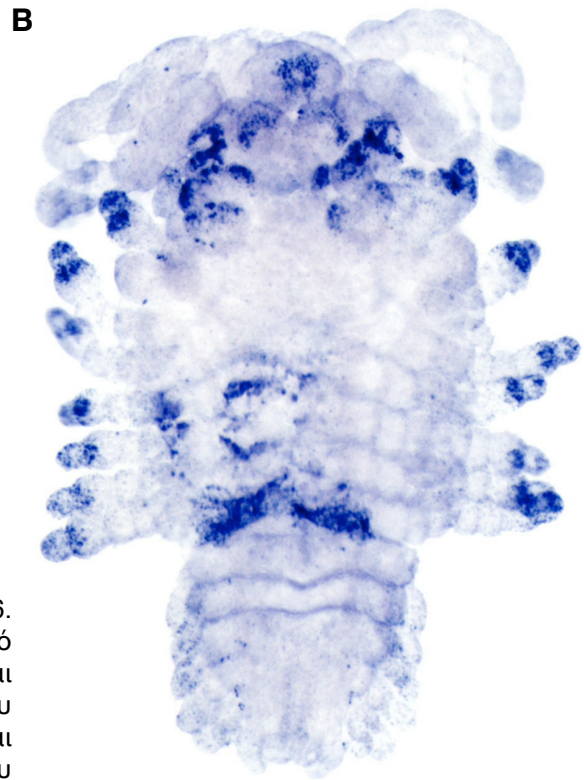
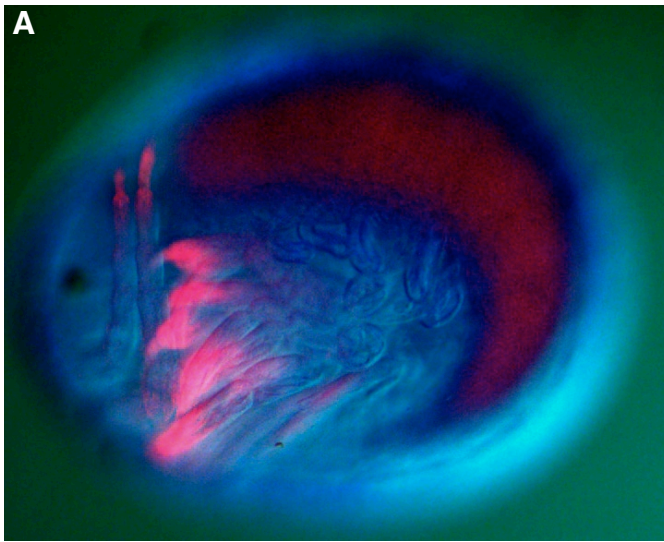
ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΜΑΤΙΣΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑΞΥ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΜΑΡΤΥΡΑ

Η παγίδευση των ενδογενών γονιδίων από τον φορέα T2 που χρησιμοποίησα, βασίζεται στην ικανότητα του στοιχείου hsp70a να ανταγωνίζεται ενδογενείς αλληλουχίες αποδοχής κατά την διαδικασία του ματίσματος. Όπως γίνεται αντιληπτό, η σχετική συχνότητα ματίσματος μεταξύ του hsp70a και του ενδογενούς αποδοχέα επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης του παγιδευμένου γονιδίου και του γονιδίου μάρτυρα. Έτσι, στην ακραία περίπτωση που όλα τα μετάγραφα ματίζονται στο γονίδιο μάρτυρα, έχουμε πρακτικά απενεργοποίηση του ενδογενούς γονιδίου (ΣΧΗΜΑ 18).

Για να σχηματίσω μια εικόνα για το ποσοστό των μεταγράφων που ματίζονται στο γονίδιο μάρτυρα, σε σχέση με το ενδογενές γονίδιο, σχεδίασα ένα πείραμα ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (qPCR) για τη διαγονιδιακή σειρά distal. Σχεδίασα τρεις εκκινήτες, έναν για την κοινή 5' αλληλουχία των μεταγράφων, και δύο ειδικούς για την DsRed και το γονίδιο distal (ΣΧΗΜΑ 18). Απομόνωσα ολικά ριβονουκλεϊκά οξέα από ομόζυγα και ετερόζυγα distal έμβρυα και μετά από αντίστροφη μεταγραφή με εκκινήτη πολυθυμιδίνης ποσοτικοποίησα τους δύο τύπους μεταγράφων με qPCR.

Η ποσοτικοποίηση έδειξε πως τα μετάγραφα που φέρουν DsRed αποτελούν το 15% (± 32) των μεταγράφων του ενδογενούς γονιδίου στα ομόζυγα και το 9% (± 18) στα ετερόζυγα άτομα. Παρότι το σφάλμα είναι αρκετά υψηλό και για τις δυο μετρήσεις, μας δίνει μια γενική εικόνα για τη σχετική ποσότητα του γονιδίου αναφοράς μας σε σχέση με το παγιδευμένο γονίδιο. Αυτή η σχέση δεν φαίνεται να είναι μεγαλύτερη από 50% στην ομόζυγη κατάσταση.

Τα ποσοστά αυτά αντικατοπτρίζουν την τελική αναλογία των δύο μεταγράφων στο κάθε δείγμα και ενσωματώνουν το σύνολο των φαινομένων/παραγόντων που επηρεάζουν και καθορίζουν αυτή την αναλογία. Η μεταγραφή στον γενετικό τόπο distal αποτελεί έναν από τους παράγοντες αυτούς. Ο φορέας T2 φέρει δύο αλληλουχίες πολυαδενυλίωσης του ιού SV40, μια μετά το γονίδιο επιλογής (3xP3-DsRed-SV40) και μια μετά το γονίδιο μάρτυρα (hsp70a-DsRed-SV40). Το σήμα πολυαδενυλίωσης αναγνωρίζεται από τους κυτταρικούς μηχανισμούς και οδηγεί κανονικά σε κόψιμο του μεταγράφου και προσθήκη συστοιχίας αδενινών. Κάθε τέτοιο γεγονός έχει ως συνέπεια την παραγωγή ακρωτηριασμένων μεταγράφων. Στην περίπτωση αυτή, το παραγόμενο μετάγραφο θα μπορεί να ματιστεί μονάχα στο hsp70a. Αυτό έχει ως συνέπεια την παραγωγή μεταγράφων DsRed έναντι μεταγράφων distal ανεξαρτήτως του ανταγωνισμού μεταξύ του hsp70a και του ενδογενούς σημείου ματίσματος.



ΣΧΗΜΑ 17: Επιβεβαίωση του παγιδευμένου γονιδίου.

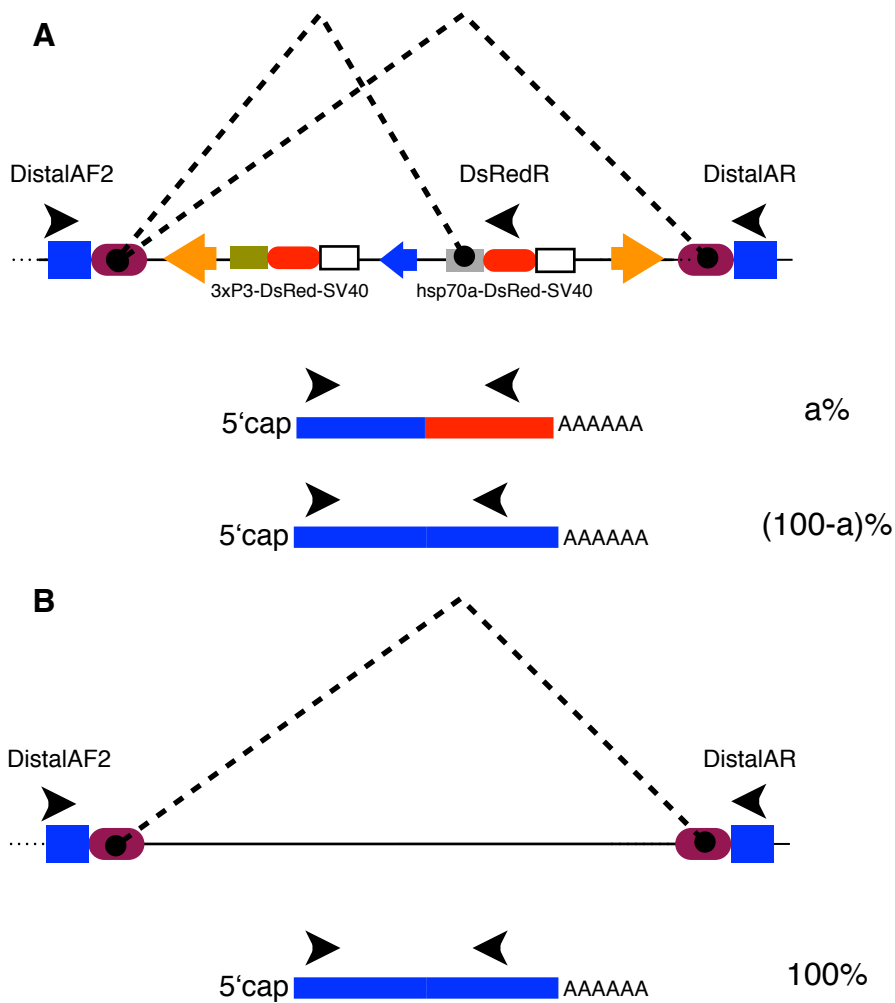
A. Πλάγια άποψη ενός distal εμβρύου σταδίου S25-26. Η έκφραση της DsRed από τον παγιδευμένο γενετικό τόπο distal στα άκρα των θωρακικών ποδιών και κεραίων είναι εμφανής. **B.** Κοιλιακή όψη από αγρίου τύπου έμβρυο σταδίου S22. Το μπλέ σήμα είναι αποτέλεσμα in situ υβριδιποίησης με τμήμα του γονιδίου distal.

Πέραν του βιολογικού αυτού μηχανισμού, υπάρχει και ένα τεχνικό στοιχείο που είναι πιθανό να επηρεάζει την τελική αναλογία των δύο μεταγράφων. Κατά την αντίστροφη μεταγραφή ο εκκινητής πολυθιμιδίνης δεσμεύεται θεωρητικά με ίδια αποτελεσματικότητα στα δύο μετάγραφα (DsRed και distal). Ωστόσο οι δυσκολίες που αντιμετώπισα στην κλωνοποίηση του distal με 3'RACE υποδεικνύουν πως το μετάγραφο του distal είτε είναι πολύ μεγάλο, είτε δεν είναι πολυαδενυλιωμένο. Και στις δύο περιπτώσεις η απόδοση της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής θα μπορούσε να είναι σημαντικά μικρότερη για το παγιδευμένο γονίδιο distal σε σχέση με το γονίδιο μάρτυρα DsRed.

Και οι δυο αυτοί μηχανισμοί παράγουν συγκριτικό πλεονέκτημα για τα μετάγραφα της DsRed. Ειδικά στην δεύτερη περίπτωση, όπου η αλλοίωση του αποτελέσματος είναι τεχνική, αυτό θα μπορούσε να επηρεάσει σημαντικά την τελική μας εικόνα. Ωστόσο, το μικρό ποσοστό των μεταγράφων της DsRed σε σχέση με το ενδογενές γονίδιο υποδηλώνει πως η γενική τάση του φορέα παγίδευσης T2 είναι να “κλέβει” μόνο λίγα από τα ενδογενή μετάγραφα.

ΣΧΗΜΑ 18: Ανάλυση ματίσματος μεταξύ ενδογενούς εξονίου distal και του διαγονιδίου DsRed.

A. Σχέδιο του παγιδευμένου γενετικού τόπου distal. Η μεταγραφή παράγει χιμαιρικά mRNA που μπορούν να ματιστούν με δύο τρόπους, δίνοντας αγρίου τύπου ώριμα μετάγραφα (μόνο μπλέ εξόνια) και παγιδευμένα μετάγραφα (5' μπλέ εξόνια και κόκκινο εξόνιο DsRed). **B.** Σχέδιο αγρίου τύπου γενετικού τόπου distal. Παράγονται μόνο αγρίου τύπου μετάγραφα. Οι εκκινητές DistalAF2-DsRed και DistalAF2-DistalR ξεχωρίζουν ανάμεσα στα δύο αυτά μετάγραφα. Έτσι ποσοτική ανάλυση των προϊόντων τους μας προσφέρει την πληροφορία για την σχετική ποσότητα των δύο μεταγράφων στο κύτταρο.



Για να ελεγχθεί η επίδραση της ένθεσης στην έκφραση του παγιδευμένου γονιδίου άμεσα χρειάζεται να συγκρίνουμε τα επίπεδα του distal μεταξύ δειγμάτων, χρησιμοποιώντας ένα γονίδιο αναφοράς. Χρησιμοποιώντας τα ριβοσωμικά γονίδια RpL21 και RpL32, που έχουν ξαναχρησιμοποιηθεί ως γονίδια αναφοράς (Pavlopoulos, Kontarakis et al. 2009), επιχείρησα να ελέγξω για διαφορές στην έκφραση του distal μεταξύ ετερόζυγων και ομόζυγων ατόμων. Τα αποτελέσματα για τα δύο γονίδια αναφοράς ήταν αρκετά διαφορετικά και τα σφάλματα υπερβολικά μεγάλα για την εξαγωγή κάποιου συμπεράσματος (DATA NOT SHOWN).

Τέλος, η απόδοση της παγίδευσης μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την ένθεση και επομένως η ανάλυση και άλλων παγιδεύσεων είναι απαραίτητη πριν την γενίκευση των συμπερασμάτων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΠΑΓΙΔΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ uTRAP-iTRAC

Συγκεντρωτικά, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτή τη διατριβή “πιστοποιούν” το σύστημα του φάγου φC31 για χρήση στο αμφίποδο *Parhyale hawaiiensis*. Εκτός από την ειδική ένθεση αλληλουχιών στο γονιδίωμα του αμφιπόδου, περιγράφεται και η μετατροπή γονιδιακών παγιδεύσεων με υψηλή συχνότητα. Ο συνδυασμός αυτών των δύο ανοίγει το δρόμο για την δημιουργία συστημάτων ειδικής έκφρασης με την αξιοποίηση των γονιδιακών παγιδεύσεων στο αμφίποδο. Επιπλέον ο ειδικός ανασυνδυασμός αποτελεί ισχυρό εργαλείο για τη στόχευση κατασκευών ανταπόκρισης (reporter constructs) σε προκαθορισμένα σημεία στο γονιδίωμα με σκοπό την μελέτη και σύγκριση της ενεργότητας cis-ρυθμιστικών στοιχείων.

Η μετατροπή παγιδεύσεων, προσφέρει τη δυνατότητα έκφρασης γονιδίων σε καλά μελετημένα και αυστηρά καθορισμένα πρότυπα. Ο μόνος περιορισμός σε αυτό το στόχο είναι η ποικιλία των διαθέσιμων παγιδεύσεων. Η αντικατάσταση του γονιδίου μάρτυρα με το γονίδιο προς μελέτη όμως, αποτελεί μόνο μία από τις αμέτρητες δυνατότητες που προσφέρει η χρήση του συστήματος ειδικού ανασυνδυασμού. Ουσιαστικά, το σύστημα ανασυνδυασμού μας προσφέρει πρόσβαση σε μια γενετική περιοχή. Επομένως, μπορούμε να εισάγουμε και να συνδυάσουμε θεωρητικά οποιοδήποτε άλλο γενετικό εργαλείο και να επιτύχουμε: υπερ-έκφραση ενός γονιδίου (μέσω του δυαδικού συστήματος UAS/GAL4), έλεγχο στην χρονική έκφραση του διαγονιδίου (χρησιμοποιώντας τον θερμοευαίσθητο καταστολέα GAL80), παρεμπόδιση της έκφρασης ενός ενδογενούς γονιδίου (με την εκτοπική έκφραση τεχνητών ριβονουκλεϊκών φουρκετών ή ενδογενών miRNAs), επαγωγή χρωμοσωμικών ανασυνδυασμών ή απόπτωσης σε συγκεκριμένους κυτταρικούς πληθυσμούς (με την εισαγωγή FRTs ή την έκφραση τοξικών παραγόντων αντίστοιχα) και πολλά άλλα.

Το αμφίποδο *Parhyale hawaiiensis* αποτελεί το πρώτο καρκινοειδές που αποκτά μια τόσο εκτενή γενετική εργαλειοθήκη. Το σύστημα παγίδευσης και μετατροπής δεν περιέχει, εκτός του στοιχείου αποδοχής ματίσματος hsp70a, καμία άλλη αλληλουχία από το αμφίποδο. Αντιθέτως βασίζεται στο συνδυασμό διαφορετικών γενετικών εργαλείων με ενεργότητα σε ένα ευρύ φάσμα οργανισμών: για την ένθεση χρησιμοποιείται το μεταθετό στοιχείο Mimos, για τον έλεγχο της ένθεσης ο τεχνητός υποκινητής 3xP3, για τον ανασυνδυασμό το σύστημα του φάγου φC31, για μάρτυρες τα γονίδια GFP και DsRed από τη μέδουσα *Aequorea victoria* και το κοράλλι *Discosoma sp.*, για την παύση της μεταγραφής και την σταθερότητα του μεταγράφου η αλληλουχία πολυαδενυλίωσης του ιού SV40.

Σε οργανισμούς μοντέλα οι γενετικές τεχνολογίες έχουν προσαρμοστεί για να αντιμετωπίσουν συγκεκριμένες ανάγκες με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Ωστόσο, σε οργανισμούς, όπου τα γενετικά εργαλεία είναι περιορισμένα, ένα σύστημα για την παγίδευση γονιδίων και τη μετέπειτα απενεργοποίηση ή υπερέκφρασή τους θα βελτίωνε σημαντικά τη δυνατότητα μελέτης των οργανισμών, δίχως την προϋπόθεση γνώσης του γονιδιώματός τους.

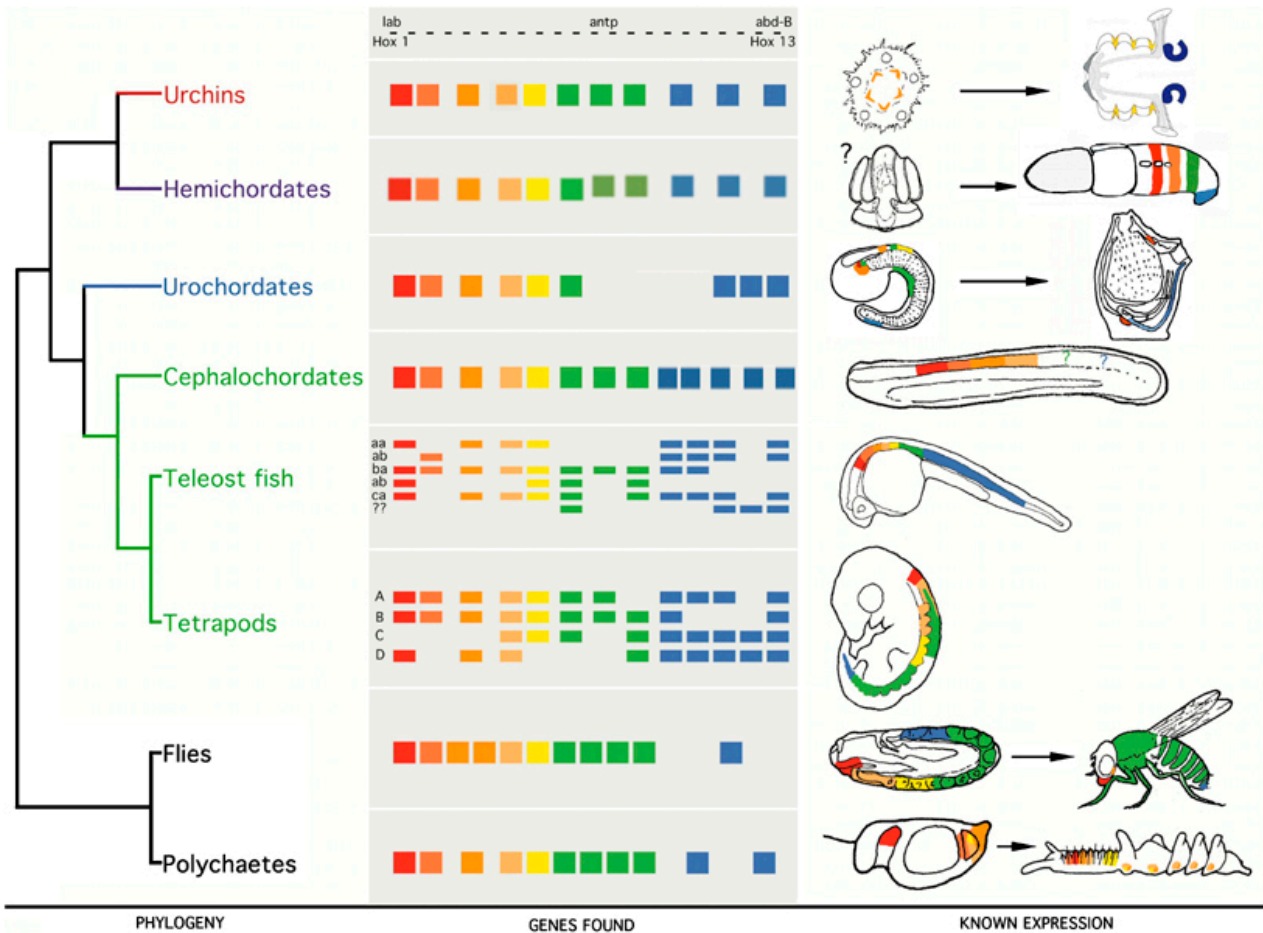
Ο φορέας T2 θα μπορούσε να λειτουργήσει ως ένα τέτοιο οικουμενικό σύστημα παγίδευσης και μετατροπής μέσω ιντεγκράσης (**universal Trapping and integrase mediated Trap conversion**). Η ικανότητα του στοιχείου hsp70a να “κλέβει” εξόνια από ενδογενή γονίδια, σε άλλους οργανισμούς πέρα του αμφιπόδου, φαίνεται να αποτελεί τον μόνο περιοριστικό παράγοντα προς αυτό το σκοπό. Η πρόσφατη πετυχημένη παγίδευση εξονίων με τον φορέα T2 στην *Drosophila melanogaster* (Μιχάλης Αβέρωφ) αποτελεί ενθαρρυντικό στοιχείο και σε συνδυασμό με την υψηλή συντήρηση των αλληλουχιών ματίσματος υποδεικνύει πως ο φορέας αυτός θα μπορούσε να εξυπηρετήσει αυτό το σκοπό.

Η διαθεσιμότητα ενός οικουμενικού εργαλείου γονιδιακής παγίδευσης και μετατροπής θα επιτρέψει τον γενετικό χειρισμό πολλών οργανισμών με ενδιαφέροντα αναπτυξιακά χαρακτηριστικά και ενδιαφέρουσα φυλογενετική θέση. Αυτό μπορεί να δώσει σημαντική ώθηση στο πεδίο του *eno-devo*, ενισχύοντας την προσπάθεια κατανόησης των μηχανισμών παραγωγής και επιλογής της ποικιλομορφίας στην φύση.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΟΜΟΙΩΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ (HOX)

Το δεύτερο μέρος αυτής της διατριβής πραγματεύεται με το ρόλο των ομοιωτικών γονιδίων στην εξέλιξη της μορφολογίας των αρθροπόδων. Τα ομοιωτικά γονίδια κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες που συμμετέχουν στον καθορισμό τμημάτων του αναπτυσσόμενου εμβρύου κατά μήκος του προσοπίσθιου άξονα. Βρίσκονται ομαδοποιημένα στο γονιδίωμα σχηματίζοντας το σύμπλοκο Hox και είναι συντηρημένα σε όλα τα μετόζωα (ΣΧΗΜΑ 19). Μάλιστα, η σειρά με την οποία εμφανίζονται πάνω στο χρωμόσωμα, ταυτίζεται με την σειρά έκφρασής τους στο έμβρυο. Τα σπονδυλωτά φέρουν τέσσερα σύμπλοκα Hox, μαρτυρώντας τους δύο διπλασιασμούς γονιδιώματος κατά την εξέλιξή τους (Karpen, Schughart et al. 1989; Prince 2002; Wagner, Amemiya et al. 2003).



ΣΧΗΜΑ 19: Ομοιωτικά γονίδια στα μετόζωα (Swalla 2006)

Τα χρώματα αντιπροσωπεύουν τα ορθόλογα γονίδια στις διάφορες ομάδες. Τα τετράποδα και τα τελεόστεα ψάρια έχουν υποστεί διπλασιασμούς του γονιδιώματός τους και για αυτό το λόγο εμφανίζουν πολλαπλά σύμπλοκα ομοιωτικών γονιδίων, ενώ κάποια από τα πολλαπλασιασμένα ομοιωτικά γονίδια χάθηκαν δευτερογενώς.

Στη δροσόφιλα, η έκφραση των Hox γονιδίων ενεργοποιείται νωρίς κατά την ανάπτυξη, από την συνδυαστική δράση των γονιδίων χάσματος και των γονιδίων κανόνα ζεύγους (pair-rule) (Scott and Carroll 1987). Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην οργάνωση της χρωματίνης και κωδικοποιούνται από τα σύμπλοκα Polycomb και trithorax είναι υπεύθυνες για την διατήρηση της έκφρασης των Hox μέχρι και την μεταμόρφωση της προνύμφης (Gellon and McGinnis 1998). Πέραν της μεταγραφικής τους ενεργοποίησης, η δράση των ομοιωτικών ενδέχεται να ρυθμίζεται και στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Οι Hox πρωτεΐνες από μόνες τους εμφανίζουν περιορισμένη ειδικότητα πρόσδεσης στο DNA. Συμπαράγοντες, όπως το extradenticle και το homothorax, είναι απαραίτητοι για τη σταθερή πρόσδεση και επιλεκτική δράση των Hox. Ενδιαφέρον στοιχείο αποτελεί το γεγονός, πως η ίδια λειτουργία ενός ομοιωτικού μπορεί να επιτυγχάνεται με την χρήση διαφορετικών συμπαραγόντων. Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η συνεργασία του Ubx με τις πρωτεΐνες sloppy paired και engrailed για την καταστολή του γονιδίου distalless στο πρόσθιο και οπίσθιο τμήμα του μεταμεριδίου αντίστοιχα (Gebelein, Culi et al. 2002; Gebelein, McKay et al. 2004).

Το όνομα των ομοιωτικών προέρχεται από τους ομοιωτικούς μετασχηματισμούς που προκαλούν οι μεταλλαγές τους στην ενήλικη μύγα. Εκτοπική έκφραση του γονιδίου Antennapedia για παράδειγμα προκαλεί μετασχηματισμό της κεραίας σε πόδι (Schneuwly, Klemenz et al. 1987) ενώ μεταλλαγή στο γονίδιο Ultrabithorax ευθύνεται για τη δημιουργία της γνωστής δροσόφιλας του Ed Lewis με τα τέσσερα φτερά. Η ικανότητα που έχουν να ελέγχουν την ταυτότητα ολόκληρων μεταμεριδίων και να αλλάζουν την μορφολογία τους επιτυγχάνεται με δύο συμπληρωματικούς τρόπους. Από την μία, ρυθμίζουν την έκφραση άλλων μεταγραφικών παραγόντων, ενεργοποιώντας μια ακολουθία ρύθμισης που καθορίζει τη μεταγραφική ταυτότητα του κυττάρου. Από την άλλη, το ευρύ φάσμα των άμεσων στόχων των ομοιωτικών έχει βρεθεί πως περιλαμβάνει έκτος από άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και γονίδια τελικής διαφοροποίησης, πχ γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα που συμμετέχουν στη παραγωγή και έκκριση εξωσκελετού (Pavlopoulos and Akam 2011). Μάλιστα οι στόχοι ενός ομοιωτικού μπορεί να αλλάζουν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και μεταμόρφωσης, μέσω μηχανισμών που ακόμα δεν είναι γνωστοί.

Εκτός της σειριακής έκφρασης κατά μήκος του προσοπισθίου άξονα του εμβρύου, στη *Drosophila melanogaster*, παρατηρείται και το φαινόμενο της οπίσθιας κυριαρχίας (γνωστό και ως οπίσθια επικράτηση ή φαινοτυπική καταστολή) των ομοιωτικών (Hafen, Levine et al. 1984; Struhl and White 1985; Gonzalez-Reyes, Urquia et al. 1990; Miller, Rogers et al. 2001). Αυτό σημαίνει πως συνήθως ένα ομοιωτικό γονίδιο καταστέλλει τη δράση των πιο πρόσθιων σε αυτό (ή αλλιώς, επιβάλλει την δική του δράση). Ο τρόπος με τον οποίο γίνεται κάτι τέτοιο δεν είναι εντελώς γνωστός και μπορεί σε κάθε περίπτωση να είναι διαφορετικός. Εκτοπική έκφραση ενός ομοιωτικού έχουν ως αποτέλεσμα την επικράτηση του οπίσθιου φαινοτύπου ενώ πειράματα απώλειας ενεργότητας οδηγούν σε

μετασχηματισμό προς χαρακτηριστικά πιο πρόσθιων μεταμεριδίων. Για παράδειγμα, εκτοπική έκφραση του *Antp* στο κεφάλι της μύγας προκαλεί μετασχηματισμό της κεραίας σε πόδι, ενώ σε μεταλλαγές του *Ubx* το τρίτο πόδι της δροσόφιλας μετασχηματίζεται σε μορφολογία T2, και οι αλτήρες (T3) σε φτερά (T2).

Εξαιτίας όλων αυτών των χαρακτηριστικών των ομοιωτικών, αλλαγή στη χρονική και τοπική τους ενεργότητα θα μπορούσε να συνεισφέρει στη δημιουργία και εξέλιξη νέων σωματοδομών. Μάλιστα τα πολλαπλά επίπεδα ρύθμισης της ενεργότητάς τους, προσφέρουν αντίστοιχα πολλαπλές δυνατότητες για αλλαγή.

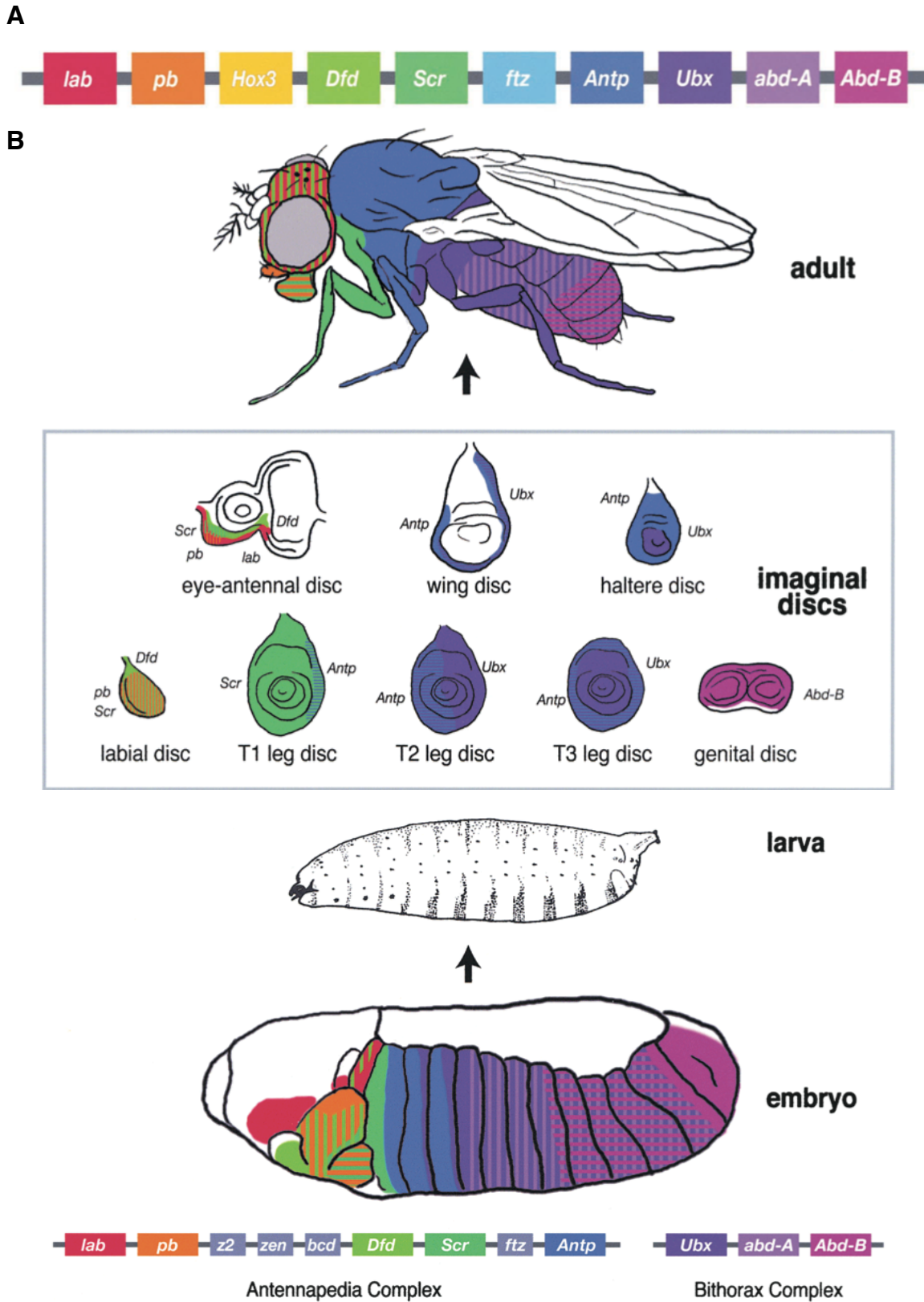
ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ HOX

Η ικανότητα των ομοιωτικών γονιδίων να ελέγχουν την ταυτότητα ολόκληρων μεταμεριδίων τα καθιστά ιδανικούς υποψηφίους για τη μελέτη της μορφολογικής εξέλιξης στα αρθρόποδα. Ωστόσο, οι μηχανισμοί που διέπουν αυτές τις αλλαγές στη μορφολογία μεταξύ διαφορετικών αρθροπόδων ήταν αρχικά εντελώς άγνωστοι. Γι' αυτό το λόγο η πολυπλοκότητα της μορφολογίας συνδέθηκε αρχικά με τον αριθμό των ομοιωτικών που έχει κάθε είδος στο γονιδίωμα. Έτσι, θεωρήθηκε πως στον καθορισμό απλών σχετικά σωματοδομών, όπως αυτή των μυριαπόδων με επαναλαμβανόμενα μεταμερίδια που φέρουν όμοια εξαρτήματα, συμμετέχουν λίγα μόνο ομοιωτικά. Η διαφοροποίηση/εξειδίκευση μεταμεριδίων και εξαρτημάτων αποδόθηκε στην εμφάνιση νέων ομοιωτικών γονιδίων που να ελέγχουν αυτά τα χαρακτηριστικά. Ωστόσο, σύντομα έγινε αντιληπτό πως κάτι τέτοιο δεν ισχύει.

Το σύμπλοκο Hox του κοινού προγόνου όλων των αρθροπόδων φέρεται να αποτελούταν από δέκα γονίδια (Akam, Averof et al. 1994) (ΣΧΗΜΑ 20). Αυτά τα δέκα γονίδια έχει βρεθεί ότι εκφράζονται με χαρακτηριστικά Hox πρότυπα σε χηληκέρατα και μυριάποδα. Στα έντομα ωστόσο, δύο από τα γονίδια αυτά, τα ομόλογα του *Hox3* και το *fushi tarazu*, έχουν αποκτήσει νέους αναπτυξιακούς ρόλους και δεν εμφανίζουν τις χαρακτηριστικές λειτουργίες των Hox. Επομένως η ανάπτυξη της πιο "πολύπλοκης" σωματοδομής των εντόμων ελέγχεται από οκτώ μόνο ομοιωτικά. Καθώς η έκφραση των ομολόγων των *Hox3* και *fushi tarazu* δεν έχει μελετηθεί στα καρκινοειδή, δεν είναι γνωστό σε ποίο σημείο της φυλογένεσης των αρθροπόδων έγινε αυτή η αλλαγή.

Η πληρέστερη εικόνα για την έκφραση, ρύθμιση και λειτουργία των Hox προέρχεται από μελέτες στην δροσόφιλα. Το σύμπλοκο Hox στα έντομα αποτελείται από οκτώ γονίδια. Στη δροσόφιλα, βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3R και έχει διαχωριστεί περαιτέρω σε δύο μικρότερα σύμπλοκα, το Antennapedia και το Bithorax, που περιλαμβάνουν πέντε (*labial*, *proboscipedia*, *deformed*, *sex combs reduced* και *Antennapedia*) και τρία (*Ultrabithorax*, *Abdominal-A* και *Abdominal-B*) γονίδια αντίστοιχα. Ως ολομετάβολο έντομο, η δροσόφιλα

υφίσταται μεγάλες μορφολογικές αλλαγές μέσα από τη διαδικασία της μεταμόρφωσής της. Η έκφραση των ομοιωτικών γονιδίων έχει μελετηθεί με λεπτομέρεια τόσο στο έμβρυο όσο και στους αναπτυξιακούς δίσκους, που αποτελούν τους προγόνους του σώματος της ενήλικης μύγας (ΣΧΗΜΑ 20).



ΣΧΗΜΑ 20: Το παρελθόν και παρόν του συμπλόκου Hox στα αρθρόποδα (Hughes and Kaufman 2002)

A. Ο πρόγονος όλων των αρθροπόδων φέρεται να είχε ένα σύμπλοκο με δέκα ομοιωτικά γονίδια (από αριστερά προς τα δεξιά: *lab*, *labial*; *pb*, *proboscipedia*; *Hox3*, *Hox3*; *Dfd*, *Deformed*; *Scr*, *Sex combs reduced*; *ftz*, *fushi tarazu*; *Antp*, *Antennapedia*; *Ubx*, *Ultrabithorax*; *abd-A*, *abdominal-A*; *Abd-B*, *Abdominal-B*).

B. Το σύμπλοκο των ομοιωτικών στην μύγα *Drosophila melanogaster* είναι χωρισμένο στα δύο σύμπλοκα *Antennapedia* και *Bithorax*. Τα τρία γονίδια *z2*, *zen* και *bcd* έχουν προέλθει από διπλασιασμό του γονιδίου *Hox3* και μαζί με το *ftz* δεν εμφανίζουν τις χαρακτηριστικές λειτουργίες των Hox. Αντιθέτως το *bcd* έχει στρατολογηθεί στον πρώιμο καθορισμό του προσοπίσθιου άξονα, τα *zen* και *z2* εκφράζονται κυρίως σε εξωεμβρυονικούς ιστούς και το *ftz* σε πρότυπο των γονιδίων κανόνα ζεύγους (pair-rule).

Εκτός από τη δροσόφιλα, τα ομόλογα των Hox έχουν ήδη μελετηθεί σε άλλους αντιπροσώπους των εντόμων, καθώς επίσης και σε αντιπροσώπους των υπόλοιπων αρθροπόδων. Οι μελέτες αυτές μεμονωμένα αλλά και στο σύνολό τους, προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες για τον πιθανό ρόλο των ομοιωτικών στην εξέλιξη των αρθροπόδων: εκτός από την διαπίστωση πως ο ίδιος αριθμός ομοιωτικών ελέγχει σωματοδομές διαφορετικές όσο ένα μυριάποδο και μια πεταλούδα, αποκαλύπτονται σιγά σιγά και κάποιοι από τους μηχανισμούς που ευθύνονται για τις διαφορές αυτές.

Αρχικά, παρατηρήθηκαν διαφορές στα πρότυπα έκφρασης των ομοιωτικών γονιδίων μεταξύ ειδών. Οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται σε αλλαγές στα ρυθμιστικά στοιχεία των Hox γονιδίων, ή/και σε αλλαγές στα πρότυπα έκφρασης των παραγόντων που τα ενεργοποιούν. Ταυτόχρονα, πολλές φορές η περιοχή όπου εντοπίζεται η πρωτεΐνη ενός γονιδίου αποτελεί τμήμα της περιοχής μεταγραφής του, υποδηλώνοντας πως η μεταγραφική ρύθμιση ενός γονιδίου αποτελεί άλλο ένα πολύ σημαντικό επίπεδο ελέγχου της λειτουργίας του.

Για τη λειτουργία των ομοιωτικών είναι επίσης απαραίτητη και η παρουσία κατάλληλων συμπαραγόντων. Η παρουσία ή απουσία αυτών των παραγόντων είναι άλλος ένας τρόπος ρύθμισης της ενεργότητας των ομοιωτικών. Έτσι η ενεργότητα των ομοιωτικών μπορεί να επιτευχθεί με την μεταγραφική ή μεταφραστική ρύθμιση των συμπαραγόντων, ή ακόμα και με τον ανταγωνισμό γι' αυτούς με άλλα ομοιωτικά γονίδια. Η αμινοξική αλληλουχία των περιοχών αναγνώρισης του DNA (homeodomain) μεταξύ ορθόλογων ομοιωτικών είναι εξαιρετικά συντηρημένη ακόμα και ανάμεσα σε οργανισμούς με μακρινή εξελικτική συγγένεια, όπως το ποντίκι και η μύγα. Μάλιστα σε κάποιες περιπτώσεις η μία πρωτεΐνη μπορεί να αντικαταστήσει λειτουργικά την άλλη (Lutz, Lu et al. 1996). Ωστόσο, εκτός της πρόσδεσης με το DNA, η διαφοροποίηση της αμινοξικής αλληλουχίας μπορεί να συμβάλλει σε αλλαγές στην αλληλεπίδραση με απαραίτητους συμπάροντες, επηρεάζοντας την ειδικότητα της πρόσδεσης ή το αποτέλεσμα αυτής (ενεργοποίηση/καταστολή). Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση του ομοιωτικού γονιδίου *Ubx* και η εξέλιξη της καταστολής του γονιδίου *distal-less* σε καρκινοειδή και έντομα (Galant and Carroll 2002; Ronshaugen, McGinnis et al. 2002). Η μελέτη και

επιβεβαίωση αυτής της σχέσης αποτελεί δευτερεύοντα στόχο αυτής της διατριβής και γι'αυτό παρουσιάζεται αναλυτικότερα παρακάτω.

Τέλος, ο ρόλος των ομοιωτικών στη δροσόφιλα, και οι μεταλλαγές τους, συνέδεσε κάποια από αυτά με υποθέσεις για την εμφάνιση ενός συγκεκριμένου χαρακτηριστικού. Το γονίδιο *Ubx* αποτελεί το καλύτερο παράδειγμα για αυτό. Λόγω της συμμετοχής του στην καταστολή της μορφολογίας των φτερών και την επαγωγή αλτήρων στο τρίτο θωρακικό μεταμερίδιο (T3) των διπτέρων, είχε υποθεθεί ότι δεν θα εκφράζεται στο T3 των λεπιδοπτέρων ή των κολεόπττερων που φέρουν φτερά σε εκείνο το σημείο. Ωστόσο, η έκφρασή του σε αυτό το μεταμερίδιο υποδεικνύει πως ολόκληρο το αναπτυξιακό πρόγραμμα που ενεργοποιείται με την παρουσία του είναι διαφορετικό σε αυτές τις ομάδες.

Στο σύνολό τους, οι μελέτες που έχουν γίνει πάνω στα ομοιωτικά, μας έχουν προσφέρει σημαντικά μαθήματα για τους πολλούς διαφορετικούς τρόπους με τους οποίους μπορούν να “χρησιμοποιηθούν” για την παραγωγή και εξέλιξη της ποικιλομορφίας στην φύση. Τα συμπεράσματα από αυτές τις έρευνες ωστόσο έχουν βασιστεί κυρίως στην σύγκριση προτύπων έκφρασης και έτσι η έλευση λειτουργικών δεδομένων αναμένεται να συμπληρώσει, να τροποποιήσει ή ακόμα και να καταρρίψει τις απόψεις αυτές.

ΕΚΤΟΠΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΟ ΑΜΦΙΠΟΔΟ

Τα γενετικά εργαλεία αποτελούν αναμφισβήτητα ισχυρούς συμμάχους στην προσπάθεια κατανόησης της λειτουργίας ενός γονιδίου στην ανάπτυξη ενός οργανισμού. Τα αποτελέσματα από πειράματα απώλειας ή/και κέρδους λειτουργίας ενός γονιδίου συμπληρώνουν ιδανικά τα δεδομένα ανοσοϊστοχημείας και *in situ* υβριδοποιήσεων, προσφέροντας μια ολοκληρωμένη εικόνα της συμμετοχής του γονιδίου σε διαδικασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διακυτταρική επικοινωνία και η κυτταρική μετανάστευση και διαφοροποίηση. Η συντονισμένη ενορχήστρωση αυτών των κυτταρικών διαδικασιών συνθέτει την τελική μορφή του αναπτυσσόμενου εμβρύου.

Οργανισμοί όπως η δροσόφιλα και το ποντίκι χρησιμοποιούνται εδώ και πολλά χρόνια ως μοντέλα για τη μελέτη της εμβρυϊκής ανάπτυξης και έτσι πολλά εξειδικευμένα γενετικά εργαλεία έχουν αναπτυχθεί σε αυτούς τους οργανισμούς για να εξυπηρετήσουν αυτόν τον σκοπό. Ωστόσο, η έλλειψη αντίστοιχων γενετικών εργαλείων σε άλλους οργανισμούς αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για τη μελέτη της παραγωγής και εξέλιξης των μορφολογικών διαφοροποιήσεων ανάμεσα στους οργανισμούς.

Η ανάπτυξη διαγονιδιακής τεχνολογίας στο αμφίποδο *Parhyale hawaiensis* (Pavlopoulos and Averof 2005), ανοίγει το δρόμο στην διεξαγωγή λειτουργικών πειραμάτων για πρώτη φορά σε αντιπρόσωπο των καρκινοειδών. Σε αυτό το μέρος της διατριβής που

έγινε σε συνεργασία με τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Δρ. Τάσο Παυλόπουλο του πανεπιστημίου του Κέμπεριτζ, εκμεταλλευόμεστε τη δυνατότητα εκτοπικής έκφρασης γονιδίων για την ανάλυση του ρόλου του Ubx στην ανάπτυξη του αμφιπόδου.

Το κύτταρο ανταποκρίνεται στις αλλαγές των περιβαλλοντικών συνθηκών, ρυθμίζοντας την έκφραση των γονιδίων του. Οι αλλαγές αυτές σχετίζονται τόσο με τον μεταβολισμό, όσο και την αντιμετώπιση ακραίων τιμών θερμοκρασίας και οσμωτικής πίεσης. Το lac οπερόνιο στο βακτήριο *E.coli*, που κωδικοποιεί ένζυμα απαραίτητα για τον καταβολισμό της λακτόζης, αποτελεί ένα απλό και καλά μελετημένο παράδειγμα για την γονιδιακή ρύθμιση ως απόκριση στη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών (Jacob and Monod 1961; Beckwith 1967).

Η απομόνωση ρυθμιστικών στοιχείων, που να αποκρίνονται σε παράγοντες που μπορούν να ελεγχθούν εύκολα πειραματικά, όπως η θερμοκρασία ή η οσμωτική πίεση, αποτελεί σημαντικό μέσο για τη δημιουργία ενός συστήματος ελεγχόμενης εκτοπικής έκφρασης γονιδίων σε ένα οργανισμό. Με αυτό το στόχο ο Τάσος Παυλόπουλος και βασιζόμενος στη συντήρηση των γονιδίων hsp70 (heat shock proteins) απομόνωσε το στοιχείο hsp70a2R1 από το γονιδίωμα του αμφιπόδου.

Το στοιχείο hsp70a2R1 λειτουργεί ως θερμοεπαγόμενος υποκινητής επάγοντας, μετά από επώαση των διαγονιδιακών εμβρύων στους 37°C, ισχυρή έκφραση σε όλους τους ιστούς. Τα στοιχεία της κινητικής του έχουν αναληθεί με *in situ* υβριδοποίηση και qPCR υποδεικνύοντας πως επώαση για 30 λεπτά είναι αρκετή για την ενεργοποίηση της μεταγραφής στο μέγιστο (Παυλόπουλος Διαδακτορική διατριβή 2004).

ΣΤΟΧΟΙ

Η ανάπτυξη του συστήματος επαγόμενης έκφρασης στο αμφίποδο *Parhyale hawaiiensis* μας δίνει για πρώτη φορά τη δυνατότητα διεξαγωγής λειτουργικών πειραμάτων σε ένα καρκινοειδές. Έτσι, μπορούμε να μελετήσουμε από τη μία τους μηχανισμούς μέσω των οποίων έχει παραχθεί η τεράστια μορφολογική ποικιλομορφία της ομάδας των καρκινοειδών, και από την άλλη τις αλλαγές που οδήγησαν στην εμφάνιση και εξέλιξη της σωματοδομής των εντόμων. Η εργασία αυτή πραγματεύεται τη πρώτη εφαρμογή του εργαλείου εκτοπικής έκφρασης στο αμφίποδο.

Βασικό στόχο αποτέλεσε η μελέτη του ρόλου του γονιδίου Ubx στον καθορισμό θωρακικής ταυτότητας στα αναπτυσσόμενα άκρα του αμφιπόδου. Η ανάλυση αυτού του ρόλου απορρέει από την εμπλοκή του Ubx στην εξέλιξη του χαρακτηριστικού άκρου των maxillipeds στα καρκινοειδή και παρουσιάζεται αναλυτικότερα παρακάτω.

Ένα δευτερεύοντα στόχο, που επίσης σχετίζεται με τον ομοιωτικό γονίδιο Ubx, αποτέλεσε ο έλεγχος της ικανότητας του Ubx της δροσόφιλας να καταστέλει την ανάπτυξη

άκρων στο αμφίποδο, όπως συμβαίνει στα κοιλιακά μεταμερίδια της *Drosophila melanogaster*. Η εμφάνιση αυτής της καταστολής, που γίνεται μέσω της αρνητικής ρύθμισης του γονιδίου *distal* από το *Ubx*, έχει συνδεθεί με την εξέλιξη της πρωτεϊνικής αλληλουχίας του *Ubx*. Καθώς τα δεδομένα αυτά βασίζονται σε πειράματα στη δροσόφιλα, θελήσαμε να ακολουθήσουμε τον αντίθετο μονοπάτι, ελέγχοντας αυτήν την υπόθεση στο αμφίποδο *Parhyale hawaiensis*.

ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΑΚΡΩΝ ΣΤΑ ΚΑΡΚΙΝΟΕΙΔΗ

Τα καρκινοειδή φέρουν άκρα με εντυπωσιακή ποικιλότητα στη μορφολογία αλλά και τη λειτουργία τους: τα δύο ζεύγη των κεραιών χρησιμεύουν ως αισθητήρια όργανα, τα γναθικά μεταμερίδια φέρουν εξαρτήματα για τον τεμαχισμό και προώθηση της τροφής στο στόμα, τα θωρακικά άκρα συμμετέχουν στην άμυνα, την αναπαραγωγή, τη μετακίνηση και την ανταλλαγή αερίων και τα κοιλιακά στο κολύμπι και στην αναπαραγωγή.

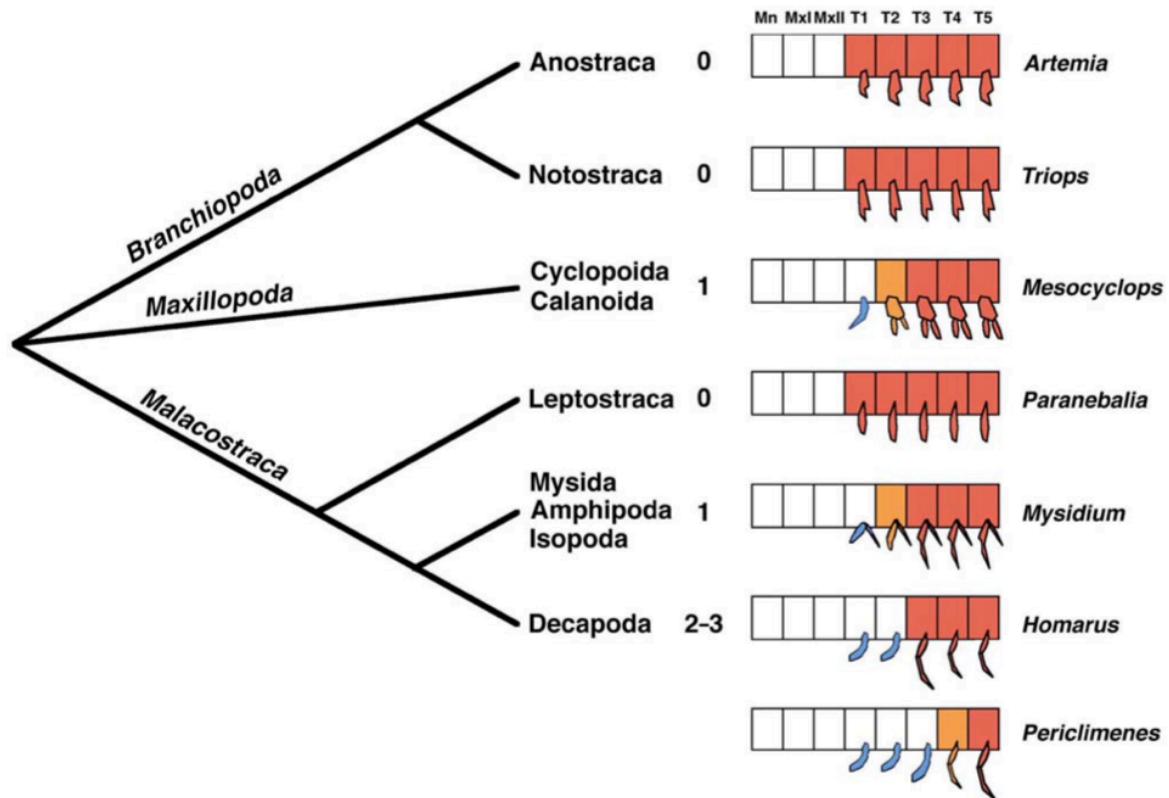
Ο κοινός πρόγονος όλων των αρthropόδων πιθανότατα παρουσίαζε μια σωματοδομή, με όμοια μεταμερίδια που έφεραν άκρα με μικρή εξειδίκευση. Η λειτουργική ομαδοποίηση και εξειδίκευση μεταμεριδίων και άκρων οδήγησε στην διαφοροποίηση και εξέλιξη των αρthropόδων. Η ικανότητα των ομοιωτικών γονιδίων να καθορίζουν την ταυτότητα ολόκληρων μεταμεριδίων, τα καθιστά εξαιρετικούς υποψηφίους ελεγκτές αυτών των αλλαγών (Hughes and Kaufman 2002).

Ένα case study για τον ρόλο των ομοιωτικών γονιδίων στην εμφάνιση νέων μορφολογιών αποτελεί η εξέλιξη των maxillipeds. Σε πολλές ομάδες καρκινοειδών τα πρώτα (1, 2 ή και 3) θωρακικά μεταμερίδια φέρουν ένα ιδιαίτερο είδος άκρων που ονομάζονται maxillipeds, τα οποία συμμετέχουν στην επεξεργασία και το χειρισμό της τροφής, υποδηλώνοντας την υβριδική τους μορφολογία και προέλευση.

Η διάσπαρτη κατανομή των maxillipeds στο φυλογενετικό δέντρο των καρκινοειδών υποδηλώνει ότι εμφανίστηκαν ανεξάρτητα σε διάφορες ομάδες. Ωστόσο, η παρουσία (ή απουσία) maxillipeds συνδέεται με την απουσία (ή παρουσία αντίστοιχα) του ομοιωτικού γονιδίου Ultrabithorax (*Ubx*) στα συγκεκριμένα μεταμερίδια κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη σε όλα τα είδη που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα.

Η πρώτη μελέτη έγινε με την χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος FP6.87, που αναγνωρίζει μια συντηρημένη περιοχή των πρωτεϊνών *Ubx* και *AbdA* (Averof and Patel 1997) και περιλάμβανε δεκατρία είδη καλύπτοντας εννέα διαφορετικές τάξεις των καρκινοειδών (ΣΧΗΜΑ 21). Στα είδη που έφεραν κορμό με όμοια άκρα, όπως τα βραχιόποδα *Artemia* και *Triops* και το μαλακόστρακο *Paranebalia*, όλα τα θωρακικά μεταμερίδια αναπτύσσονται παρουσία των *Ubx/AbdA*. Αντίθετα σε οργανισμούς όπως το μαξιλόποδο *Mesocyclops* και τα μαλακόστρακα *Mysidium*, *Homarus* και *Periclimenes* τα *Ubx/AbdA* απουσιάζουν κατά την

ανάπτυξη των πρόσθιων μεταμεριδίων, που αντιστοιχούν σε αυτά που φέρουν maxillipeds. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, η μετακίνηση των ορίων έκφρασης των Ubx/AbdA προς τα πίσω θεωρήθηκε πιθανός κοινός μηχανισμός για την εμφάνιση των maxillipeds κατά την εξέλιξη των καρκινοειδών (Averof and Patel 1997).



ΣΧΗΜΑ 21: Κατανομή των maxillipeds στα καρκινοειδή και έκφραση του ομοιωτικού γονιδίου Ubx (Averof and Patel 1997)

Συσχετισμός της μορφολογίας των maxillipeds με την απουσία του Ubx σε εννέα τάξεις των καρκινοειδών (Anostraca, Notostraca, Cyclopoida, Calanoida, Leptostraca, Mysida, Amphipoda, Isopoda, Decapoda). Ανάμεσα στα δεκατρία είδη που μελετήθηκαν περιλαμβάνονται είδη με 0,1,2 και 3 ζεύγη maxillipeds.

Ωστόσο, η διαφορετικότητα των θωρακικών άκρων των ειδών που αναλύθηκαν, δεν περιορίζεται μόνο στην παρουσία ή απουσία maxillipeds. Κάποια είδη φέρουν πέραν από maxillipeds και άλλου είδους άκρα που διαφοροποιούνται σε σχέση με τα βαδιστικά πόδια. Πολλές φορές, τα άκρα αυτά φαίνεται να αναπτύσσονται εκφράζοντας διαφορετικά επίπεδα Ubx/AbdA. Επιπλέον, στην *Artemia*, παρότι και τα οκτώ ζεύγη θωρακικών άκρων εμφανίζουν όμοια μορφολογία και λειτουργία, το πρώτο ζεύγος έχει ελαφρώς μικρότερο μέγεθος σε σχέση με τα υπόλοιπα άκρα. Η διαφορά αυτή συνδυάζεται με την υποχώρηση των Ubx/AbdA από το πρώτο θωρακικό μεταμερίδιο, αργότερα κατά την ανάπτυξη (Averof and Patel 1997).

Συνολικά, αυτά τα αποτελέσματα έθεσαν το πλαίσιο σχετικά με την πιθανή συμμετοχή των Ubx/AbdA στην ανάπτυξη όχι μόνο των maxillipeds, αλλά γενικότερα του καθορισμού των θωρακικών άκρων. Η εμφάνιση διαφορετικών μορφολογιών στα άκρα,

φαίνεται να καθορίζεται τόσο από την έκφραση των *Ubx/AbdA*, το επίπεδο και τη διάρκεια της έκφρασής τους. Μάλιστα η επίδραση των *Ubx/AbdA* φαίνεται να λειτουργεί σε δύο συνιστώσες. Τα επίπεδα της έκφρασής τους νωρίς καθορίζουν τη μορφολογία του σχηματιζόμενου άκρου και αργότερα ρυθμίζουν την αύξησή του στο επιθυμητό μέγεθος.

Αργότερα, μελέτη στο ισόποδο *Porcellio scaber*, που εμφανίζει ένα ζεύγος *maxillipeds*, αποκάλυψε πως εκτός της υποχώρησης του *Ubx* από το πρώτο θωρακικό μεταμερίδιο, τα αναπτυσσόμενα *maxillipeds* σε αυτό το είδος εκφράζουν και το πιο πρόσθιο ομοιωτικό γονίδιο *Sex combs reduced (Scr)*. Μετάγραφα του *Scr* εντοπίζονται από νωρίς στα αναπτυσσόμενα *maxillipeds*. Η μετάφρασή τους όμως καθυστερεί μέχρι αργότερα κατά την εμβρυογένεση και συμπίπτει με τη μορφολογική διαφοροποίηση των *maxillipeds* από τα άλλα θωρακικά άκρα (Abzhanov and Kaufman 1999). Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, η μετακίνηση του *Scr* στο πρώτο θωρακικό μεταμερίδιο, προτάθηκε ως συμπληρωματικός μηχανισμός στον καθορισμό των *maxillipeds*, τουλάχιστον σε κάποιες περιπτώσεις, όπως αυτή του ισόποδου.

Όλα αυτά τα αποτελέσματα βασίστηκαν αποκλειστικά σε παρατηρήσεις προτύπων έκφρασης. Με τέτοια δεδομένα μπορούμε να κάνουμε μόνο υποθέσεις σχετικά με τον αναπτυξιακό ρόλο ενός γονιδίου. Στην περίπτωση των ομοιωτικών, οι υποθέσεις αυτές στηρίζονται στον ρόλο των ομοιωτικών γονιδίων στην δροσόφιλα, όπου είναι γνωστό ότι ελέγχουν/καθορίζουν την ταυτότητα ολόκληρων μεταμεριδίων, κάτι που δεν είχε αποδειχτεί πειραματικά μέχρι πριν μερικά χρόνια για άλλα αρθρόποδα πέραν των εντόμων (Stuart, Brown et al. 1991)(Tomoyasu, Wheeler et al. 2005). Σαφώς και η συσχέτιση των προτύπων έκφρασης ενός γονιδίου σε παραπάνω από ένα οργανισμό αυξάνει τη βεβαιότητα της συμμετοχής του σε μία διαδικασία, ωστόσο η έλλειψη δεδομένων σχετικά με το λειτουργικό ρόλο του γονιδίου αποτελεί σημαντικό περιορισμό για την ασφαλή εξαγωγή συμπερασμάτων.

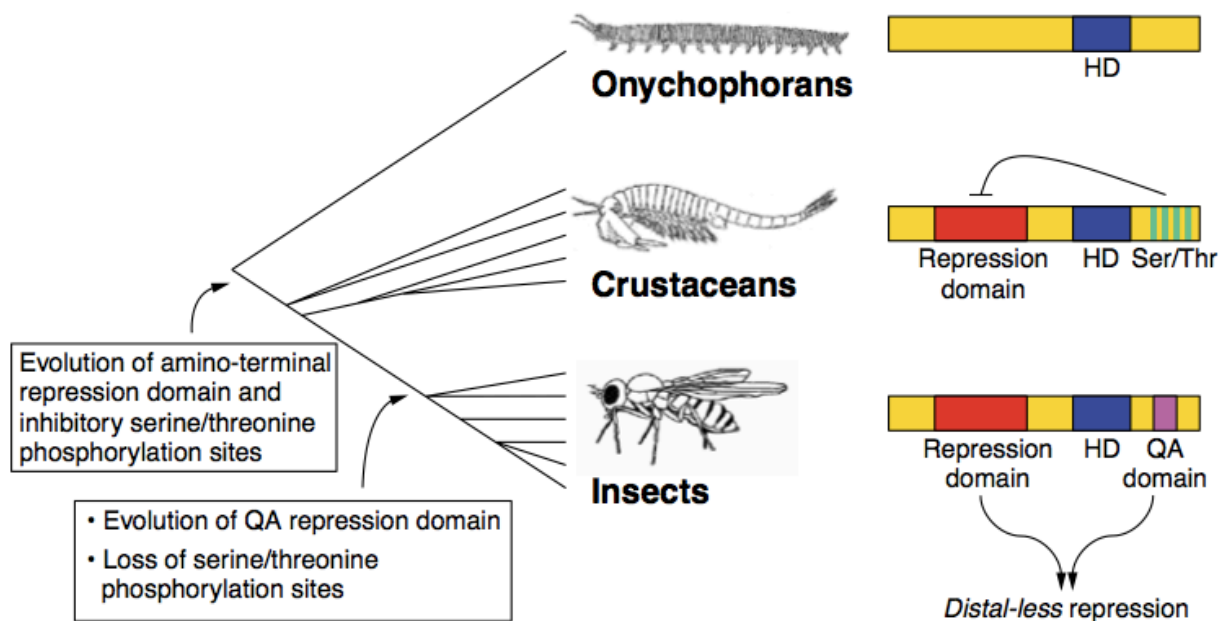
Με την ανάπτυξη του συστήματος θερμοεπαγόμενης έκφρασης στο αμφίποδο, είναι πλέον εφικτή η επαλήθευση τέτοιων υποθέσεων. Επάγωντας εκτοπικό *Ubx* στα αναπτυσσόμενα *maxillipeds*, μπορούμε να ελέγξουμε για την ικανότητα του *Ubx* να προάγει θωρακική ταυτότητα. Ένα τέτοιο αποτέλεσμα θα αποτελούσε ισχυρό στοιχείο πως η υποχώρηση του *Ubx* δημιουργεί τις κατάλληλες συνθήκες για την εξέλιξη των *maxillipeds*.

ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *Distal-less*

Το γονίδιο *distal-less* φαίνεται να συμμετέχει στην ανάπτυξη των άκρων σε όλα τα αρθρόποδα (Panganiban, Sebring et al. 1995; Panganiban, Irvine et al. 1997). Στη δροσόφιλα, η έκφρασή του καταστέλεται στα κοιλιακά μεταμερίδια μέσω της πρόσδεσης του *Ubx* στην ρυθμιστική αλληλουχία *Dll304* (Vachon, Cohen et al. 1992). Από την άλλη, στο ανόστρακο

Artemia franciscana το *Ubx* εκφράζεται στα μεταμερίδια του θώρακα, που αναπτύσσουν κανονικά άκρα, υποδεικνύοντας πως δεν αποτελεί καταστολέα του *distal-less* στα καρκινοειδή. Καθώς ο κοινός πρόγονος των πανκαρκινοειδών (έντομα + καρκινοειδή), πιθανότατα έμοιαζε περισσότερο με τα καρκινοειδή, η εμφάνιση της καταστολής του *distal-less* από το *Ubx* αποτέλεσε σημαντικό γεγονός για την παραγωγή της εξάποδης σωματοδομής και την εξέλιξη των εντόμων.

Η εξέλιξη της καταστολής αυτής θεωρήθηκε πως συνέβει σε δύο στάδια. Πρώτα, η περιοχή έκφρασης του *Ubx* περιορίστηκε στα πιο οπίσθια μεταμερίδια (που αντιστοιχούν στο κοιλιακό τάγμα των εντόμων), και μετέπειτα μεταλλαγές στο στοιχείο *Dll304* επέτρεψαν την καταστολή του γονιδίου *distal-less* (Averof and Akam 1993; Pavlopoulos and Averof 2002). Ο προτεινόμενος αυτός μηχανισμός βασίζεται και στο γεγονός ότι αλλαγές σε ρυθμιστικές αλληλουχίες επηρεάζουν την έκφραση μεμονωμένων γονιδίων, ενώ αλλαγές στην πρωτεϊνική αλληλουχία ενός γονιδίου αναμένεται να επιδρούν σε πολλά γονίδια με καταστροφικές συνήθως συνέπειες για το έμβρυο. Αυτό υποστηρίζεται και από την υψηλή συντήρηση των κωδικών περιοχών, σε σχέση με την σχεδόν τυχαία συσσώρευση μεταλλάξεων σε μη κωδικές αλληλουχίες.



ΣΧΗΜΑ 22: Εξέλιξη της καταστολής του γονιδίου *distal-less* μέσω αλλαγών της πρωτεϊνικής αλληλουχίας του *Ubx* (Pavlopoulos and Averof 2002)

Η απώλεια της περιοχής σερινών/θρεονινών απελευθερώνει την ικανότητα καταστολής του *distal-less* ενώ το πεπτιδίο QA ενισχύει επιπλέον αυτή την καταστολή. Τα δύο αυτά βήματα αποτελούν σημαντικά γεγονότα στην εξέλιξη της εξάποδης σωματοδομής.

Τα ομοιωτικά γονίδια εμφανίζουν υψηλή συντήρηση στην περιοχή του homeodomain τους, που σχετίζεται με την πρόσδεση στο DNA, αλλά η υπόλοιπη κωδική αλληλουχία μπορεί να διαφέρει σημαντικά μεταξύ ορθόλογων γονιδίων. Παρότι κάποιες ομοιωτικές πρωτεΐνες σπονδυλωτών έχει δειχθεί πως μπορούν να μιμηθούν σε λειτουργία τις

ορθόλογες τους στην μύγα (Lutz, Lu et al. 1996), δεν μπορεί να αποκλειστεί οι αμινοξικές τους διαφορές να έχουν κάποιο ανεξακρίβωτο ρόλο. Θέλοντας να μελετήσουν τον πιθανό λειτουργικό ρόλο των διαφορών που απαντώνται μεταξύ των ορθολόγων του γονιδίου *Ubx*, δυο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες έλεγξαν για την ικανότητα του *Ubx* από δύο είδη (του ανόστρακου καρκινοειδούς *Artemia franciscana* και του ονυχοφόρου *Akanthokara kaputensis*) να καταστείλει το γονίδιο *distal-less* στη δροσόφιλα (Galant and Carroll 2002; Ronshaugen, McGinnis et al. 2002).

Εκφράζοντας στα θωρακικά μεταμερίδια του εμβρύου τα Af-*Ubx* και Ak-*Ubx* αντίστοιχα, οι δύο ομάδες παρατήρησαν πως αυτά δεν ήταν ικανά να καταστείλουν το *distal-less* στον ίδιο βαθμό με το εκτοπικό Dm-*Ubx*. Παραπέρα ανάλυση με τη δημιουργία χιμαιρικών πρωτεϊνών έδειξε πως αυτό οφειλόταν σε μια περιοχή καρβοξυτελικά του homeodomain, που εντοπίζεται στο Af-*Ubx* αλλά όχι στα Ak-*Ubx* και Dm-*Ubx*, είναι πλούσια σε σερίνες/θρεονίνες και εμποδίζει την καταστολή. Μεταλλαγή ή αφαίρεση της στο Af-*Ubx* οδηγεί σε καταστολή του *distal-less* σε παρόμοιο βαθμό με το Dm-*Ubx*. Ταυτόχρονα, μια άλλη περιοχή, που αποτελείται από κατάλοιπα γλυταμίνης και αλανίνης (QAQAQKAAAA..) και βρίσκεται στο Dm-*Ubx* και όχι στα Af-*Ubx* και Ak-*Ubx*, ενισχύει την καταστολή του *distal-less*. Με τη προσθήκη του πεπτιδίου αυτού στο Ak-*Ubx*, το τελευταίο, που κανονικά δεν εμφανίζει καταστολή του *distal-less*, αποκτά ικανότητα μερικής καταστολής.

Συγκεντρωτικά, τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πως αλλαγές στην πρωτεϊνική αλληλουχία του *Ubx* μπορεί να συνέβαλαν στην εξέλιξη της καταστολής του γονιδίου *distal-less* στα έντομα. Από την μία, η περιοχή σερινών και θρεονινών (S/TP domain) που βρίσκουμε στο *Ubx* του καρκινοειδούς *Artemia franciscana* χάθηκε στο κλάδο των εντόμων, απελευθερώνοντας την κατασταλτική ικανότητα του *Ubx*. Από την άλλη, εμφανίστηκε η αλληλουχία QAQAQKAAAA, ενισχύοντας ακόμα περισσότερο την ικανότητα του *Ubx* να καταστέλλει αποτελεσματικά το γονίδιο *distal-less* (ΣΧΗΜΑ 22).

Τι λειτουργία έχει όμως η περιοχή S/TP στα καρκινοειδή; Παρεμποδίζει την καταστολή του *distal-less*; Είναι ευαίσθητο το *distal-less* των καρκινοειδών στο Dm-*Ubx*, που στερείται του S/TP domain και επιπλέον φέρει το πεπτίδιο καταστολής QA; Για την προσέγγιση αυτών των ερωτημάτων είναι απαραίτητη η διεξαγωγή του πειράματος καταστολής σε ένα καρκινοειδές. Εκμεταλλευόμενοι το σύστημα θερμοεπαγόμενης έκφρασης ελέγξαμε λοιπόν για την ικανότητα του Dm-*Ubx* να καταστείλει το γονίδιο *distal-less* στο αμφίποδο *Parhyale hawaiensis*.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΑΜΦΙΠΟΔΟΥ *Parhyale hawaiiensis*

Το σώμα του αμφιπόδου, χωρίζεται σε τρία τμήματα: το κεφάλι, τον θώρακα (πέρεον) και την κοιλιά (πλέον). Το κεφάλι αποτελείται από έξι μεταμερίδια από όπου εκφύονται δύο ζεύγη κεραίες (An1 και An2) και τρία ζεύγη γναθικών εξαρτημάτων (Mn, MxI και MxII) (ΣΧΗΜΑ 23).

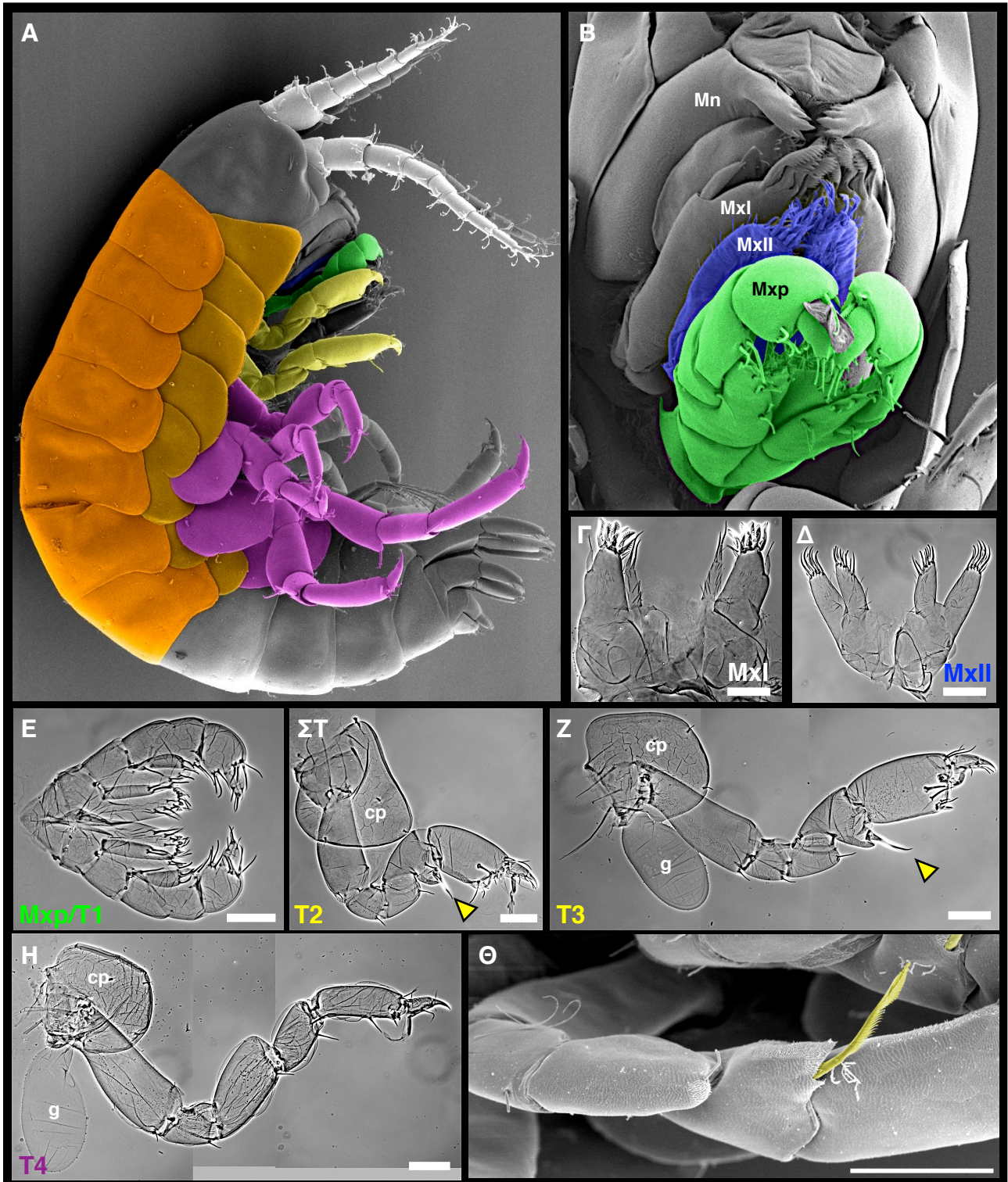
Ο θώρακας του αμφιπόδου *Parhyale hawaiiensis* αποτελείται από οκτώ θωρακικά μεταμερίδια, που φέρουν ένα ζεύγος maxillipeds (1ο θωρακικό/ T1), δυο ζεύγη τροποποιημένων ποδιών (T2-T3), που ονομάζονται γναθοπόδια, και πέντε ζεύγη βαδιστικών ποδιών (T4-T8) (ΣΧΗΜΑ 23). Το ζεύγος στο τρίτο θωρακικό (T3) εμφανίζει έντονο φυλετικό διμορφισμό και είναι πολύ μεγαλύτερο στα αρσενικά απότι στα θηλυκά άτομα.

Τέλος, στη κοιλιά διακρίνουμε έξι μεταμερίδια. Τα τρία πρώτα φέρουν πλεοπόδια, που χρησιμεύουν στο κολύμπι και στη προώθηση νερού στα βράγχια. Από την άλλη, τα τρία τελευταία εμφανίζουν μικρά άκρα που ονομάζονται ουροπόδια.

ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ UBΧ ΣΤΟ *P.hawaiiensis*

Το σύνολο των ομοιωτικών γονιδίων του αμφιπόδου *Parhyale hawaiiensis* έχει κλωνοποιηθεί από το εργαστήριο του N.H.Patel στο Μπέρκλεϋ. Ανάμεσα σε αυτά έχει απομονωθεί και ένα γονίδιο που εμφανίζει ομολογία με το Ubx της δροσόφιλας και ονομάστηκε Ph-Ubx-I. Στην δροσόφιλα το Ubx εμφανίζει έξι ισομορφές, αποτέλεσμα διαφορετικού ματίσματος του ίδιου μεταγράφου (ΣΧΗΜΑ 24). Οι ισομορφές του Ubx εκφράζονται σε διαφορετικούς ιστούς και σε πολλές περιπτώσεις η λειτουργία τους δεν μπορεί να αντικατασταθεί από κάποια άλλη ισομορφή (Subramaniam, Bomze et al. 1994).

Θέλοντας να εξετάσω την πιθανή ύπαρξη άλλων ισομορφών στο αμφίποδο σχεδίασα δύο ειδικούς εκκινητές (PhUbxF 5-TCAAGCTTATCGCTTCCCTCCACT-3 και PhUbxR 5-TCTTCAGCTTCATCCGCCTGTTCT-3) που αναγνωρίζουν μια περιοχή 623bp στο Ph-Ubx-I (από τα νουκλεοτίδια 54 μέχρι 676 μετά το ATG). Απομόνωσα ολικό RNA από έμβρυα κατάλληλου σταδίου (S20-S26 όπου είναι γνωστό ότι εκφράζεται το Ubx σε υψηλά επίπεδα) και μετά από αντίστροφη μεταγραφή με τη χρήση εκκινητή πολυθυμιδίνης (polyT primer) εξέτασα για διαφορετικού μεγέθους προϊόντα PCR με τους εκκινητές PhUbxF και PhUbxR. Η ειδική για το Ph-Ubx-I ζώνη των 623bp αποτέλεσε το μοναδικό προϊόν της αντίδρασης PCR, υποδεικνύοντας πως δεν υπάρχουν μετάγραφα με εναλλακτικό μάτισμα στην περιοχή αυτή.



ΣΧΗΜΑ 23: Μορφολογία του αμφιπόδου *P.hawaiensis*

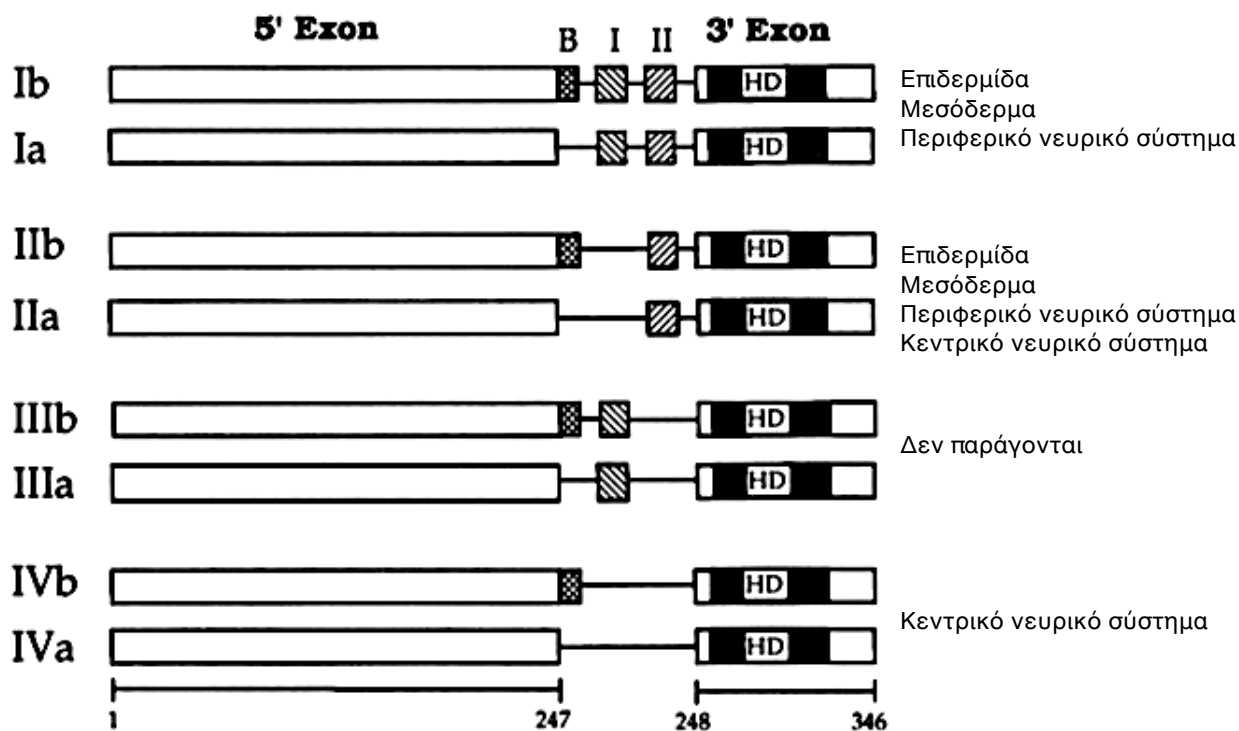
A. Πλάγια όψη ενός αμφιπόδου. Διακρίνονται τα δύο ζεύγη κεραιών (τονισμένα με άσπρο χρώμα), τα maxillipeds/T1 (τονισμένα με πράσινο) τα γναθοπόδια (T2 και T3) σε κίτρινο και τα υπόλοιπα βαδιστικά πόδια (T4-T8) σε μωβ. Οι ισχιακές (coxal plates) και ραχιαίες πλάκες (tergal plates) που αντιστοιχούν στα θωρακικά μεταμερίδια εμφανίζονται εδώ σε αποχρώσεις του πορτοκαλί. **B.** Κοντινή άποψη των μασητικών εξαρτημάτων (Mn, MxI, MxII και Maxillipeds) και **Γ-Δ.** Παρασκευάσματα εξωσκελετού για αυτά (σε ζεύγη). **E-H.** Παρασκευάσματα εξωσκελετού για τα θωρακικά άκρα. **E.** Ζευγάρι Maxillipeds/T1. **ΣΤ-Η.** Δεξί άκρο για το T2, T3 και T4 αντίστοιχα. Τα άκρα αυτά εκφύονται πλαγίως αντίθετα με τα Maxillipeds που εκφύονται κοιλιακά. Διαθέτουν ισχιακές πλάκες (cp) ενώ από την βάση των T3 και T4 εκφύονται και βράγχια (g). **Θ.** Χαρακτηριστική τρίχα που εντοπίζεται στα T2 και T3 (κίτρινο βελάκι στις φωτογραφίες **ΣΤ** και **Ζ**)

Διάσταση κλίμακας 55μm.

Σε μια δεύτερη προσπάθεια ελέγχου για άλλες ισομορφές του Ubx στο αμφίποδο, εφάρμοσα 5'RACE με τη χρήση του εκκινητή PhUbxR. Το αναμενόμενο προϊόν στην περίπτωση του Ph-Ubx-I ήταν 893bp. Απομόνωσα ένα προϊόν μεγέθους περίπου 1000bp το οποίο μετά από κλωνοποίηση σε πλασμίδιο pGEM-T easy αλληλουχήθηκε επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη μιας δεύτερης ισομορφής του Ubx, που ονομάσαμε Ph-Ubx-II.

Οι δύο ισομορφές του Ubx στο αμφίποδο (Ph-Ubx-I και Ph-Ubx-II) αποτελούν μάλλον προϊόντα διαφορετικού ματίσματος του πρώτου μεταφραζόμενου εξονίου. Έτσι, η διαφορά μεταξύ των δύο ισομορφών περιορίζεται στα πρώτα μόνο αμινοξέα τους (ΣΧΗΜΑ 25).

Σύγκρισή τους με ορθόλογα του Ubx από άλλα αρθρόποδα, αναδεικνύει τρεις περιοχές συντήρησης (ΣΧΗΜΑ 25). Η μεγάλη περιοχή έκτασης 60 αμινοξέων, που αντιστοιχεί στην ομοιωτική περιοχή, εμφανίζει απόλυτη συντήρηση σε όλα τα είδη εκτός από μια αντικατάσταση αλανίνης σε σερίνη στα βραχιόποδα *Artemia franciscana* και *Moina magna*. Επίσης συντηρημένο σε όλα τα ορθόλογα γονίδια είναι το τετραπεπίδιο YPWM που εντοπίζεται και στα ομοιωτικά γονίδια Antennapedia και Abdominal-A και φαίνεται να συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με το extradenticle και άλλους συμπαραγόντες (Tour, Hittinger et al. 2005). Τέλος, τα ορθόλογα του Ubx σε όλα τα αρθρόποδα (για το αμφίποδο το PhUbx-II) έχουν ένα κοινό επταπεπίδιο στο αμινοτελικό άκρο (MNSYFE/DQ) (στους αντιπροσώπους των μυριαπόδων και χηληκεράτων *Strigamia maritima* και *Endeis spinosa* αντίστοιχα στην θέση του γλουταμινικού οξέος υπάρχει ασπαραγινικό οξύ). Αυτό το πεπίδιο αποτελεί και τη διαφορά μεταξύ των δύο ισομορφών του Ubx στο αμφίποδο (υπάρχει στο Ph-Ubx-II και απουσιάζει από το Ph-Ubx-I).



ΣΧΗΜΑ 24: Ισομορφές του Ubx στην δροσόφιλα (Subramaniam et al 1994)

Τα θεωρητικά προϊόντα του εναλλακτικού ματίσματος του Ubx στην δροσόφιλα και οι ιστοί, όπου εκφράζονται. Από τις οκτώ θεωρητικές ισομορφές του Ubx οι IIIb και IIIa δεν παράγονται.

Χρησιμοποιώντας ειδικούς ανιχνευτές για τις δύο ισομορφές μελετήσαμε ξεχωριστά το πρότυπο έκφρασής τους σε έμβρυα. Ωστόσο, το μικρό μέγεθος των ανιχνευτών δεν επέτρεψε την ανάκτηση ξεκάθαρων προτύπων μετά από *in situ* υβριδοποίηση. Με βάση αυτά τα δεδομένα, οι δύο ισομορφές δεν φαίνεται να παρουσιάζουν κάποια μεγάλη διαφορά στην έκφρασή τους κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη του αμφιπόδου.

Τα πρώτα μετάγραφα του Ubx (Ph-Ubx-I και Ph-Ubx-II) γίνονται διακριτά στο στάδιο S12, 60 περίπου ώρες μετά τη γονιμοποίηση, σε κύτταρα που αποτελούν προδρόμους των μεταμεριδίων T2 μέχρι T4. Αργότερα, η έκφραση του Ubx επεκτείνεται προς τα πίσω σε όλα τα θωρακικά μεταμερίδια καθώς και σε μερικά κύτταρα του οπίσθιου νευροεκτοδέρματος του πρώτου θωρακικού. Στο στάδιο S23 (140 περίπου ώρες μετά τη γονιμοποίηση) το Ubx εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στα T2 και T3 και σε υψηλά επίπεδα στα μεταμερίδια T4 έως T8 (ΣΧΗΜΑ 26). Το πρώτο θωρακικό μεταμερίδιο αναπτύσσεται απουσία Ubx σε όλη τη διάρκεια της εμβρυογένεσης.

Το μονοκλωνικό αντίσωμα FP6.87 μας επέτρεψε να μελετήσουμε και την έκφραση της πρωτεΐνης Ubx κατά την ανάπτυξη του *Parhyale hawaiensis*. Λόγω της καλύτερης αντίδρασής του σε ελαφρά μονιμοποιημένο ιστό, δεν μπορέσαμε να το χρησιμοποιήσουμε για στάδια νωρίτερα του σταδίου S22-23, για τα οποία η αφαίρεση των εμβρυϊκών μεμβρανών είναι πολύ δύσκολη χωρίς καλή μονιμοποίηση. Η ανάπτυξη πολυκλωνικού

αντισώματος ειδικού για το PhUbx από το εργαστήριο του N.H.Patel έδωσε μια εικόνα για την κατανομή του PhUbx και σε πιο πρώιμα έμβρυα. Επιπλέον αποκάλυψε πως παρότι μετάγραφα του Ubx παράγονται από το στάδιο S12 κατά την εμβρυογένεση, η μετάφρασή τους καθυστερεί αρκετές ώρες με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη Ubx να μην είναι ανιχνεύσιμη πριν το στάδιο S15-16 (περίπου 20 ώρες αργότερα).

ΕΚΤΟΠΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ PhUBXI ΚΑΙ PhUBXII

Σε συμφωνία με τα δεδομένα από άλλα είδη καρκινοειδών, το PhUbx δεν εκφράζεται καθόλου στα αναπτυσσόμενα maxillipeds, ενώ στα μεταμερίδια T2 και T3, που φέρουν τα γναθοπόδια, εκφράζεται σε χαμηλότερα επίπεδα από ότι στα μεταμερίδια των βαδιστικών ποδιών (T4-T8). Τα στοιχεία αυτά μας οδηγούν στην υπόθεση πως οι διαφορές αυτές ευθύνονται για τον καθορισμό των τριών βασικών τύπων θωρακικών άκρων (maxillipes, gnathopods, pereopods). Η διαγονιδιακή τεχνολογία ωστόσο μας επιτρέπει να προχωρήσουμε ένα βήμα παραπέρα και να ελέγξουμε άμεσα αυτή την υπόθεση στο αμφίποδο *Parhyale hawaiiensis*.

Η πρώτη προσπάθεια προς αυτό το σκοπό, έγινε από τον Τάσο Παυλόπουλο με την δημιουργία διαγονιδιακών σειρών, που φέρουν το Ubx κάτω από τον έλεγχο του hsp70a2R1 υποκινητή. Υποβάλλοντας τους απόγονους αυτών σε καθημερινά θερμικά σοκ κατά την περίοδο της ανάπτυξης, όπου σχηματίζονται τα άκρα (S12-S26), παράγεται εκτοπικά Ubx σε όλα τα αναπτυσσόμενα μεταμερίδια. Με αυτό το τρόπο, θέλησε να ελέγξει για ομοιωτικούς μετασχηματισμούς σε αναπτυσσόμενα μεταμερίδια που υπό φυσιολογικές συνθήκες αναπτύσσονται απουσία του Ubx. Ωστόσο, οι χαμηλές συχνότητες μετασχηματισμού, σε συνδυασμό με την υψηλή θνησιμότητα των εμβρύων αποτέλεσαν εμπόδιο στη συλλογή ικανοποιητικών πληροφοριών για τη λειτουργία του Ubx.

ΣΧΗΜΑ 25: Σύγκριση αμινοξικής αλληλουχίας του Ubx από διάφορα αρθρόποδα

A. Η σύγκριση του Ubx διαφόρων αρθροπόδων αποκαλύπτει τις τρεις βασικές συντηρημένες περιοχές: το επταπεπτίδιο **MNSYFEQ**, το πενταπεπτίδιο **YPWMA** και το **homeodomain**. Για το Ph χρησιμοποιήθηκε το PhUbx-I.

(συντομεύσεις: Af: *Artemia franciscana*, Ph: *Parhyale hawaiiensis*, Es: *Endeis spinosa*, Dm: *Daphnia magna*, Mm: *Moina macrocopa*, Sm: *Strigamia maritima*, Ag: *Anopheles gambiae*, Tc: *Tribolium castaneum*, Jc: *Junonia coenia*, Bm: *Bombyx mori*)

B. Σύγκριση των πρώτων αμινοξέων μεταξύ των δύο ισομορφών του PhUbx (PhUbx-I και PhUbx-II) και του DmUbx. Η διαφορά τους περιορίζεται στην έλλειψη του χαρακτηριστικού MNSYFE από το PhUbx-I.

A

Af -----MNSYFEQNGFYGSHPAS-----APDQ-----AYR-FPLGL--NPYSATAALANIRQTGHEQ-----PYDTANPAA
Ph MSSSSTMDNFRALLQGGFYGGGS-----GGDQ-----AYRFPLGLSVGHYQGP-----APRQD-----AYDPSAS--
Es -----MNSYFDQSGFYNGTSQSSA-----VAGDQ-----SYR-FPOGL-IVPSAASASCPOQPGSARPDGS---TYDSG----
Dm -----MNSYFEQSGFYGGHGQT-----GAEQ-----AYR-FPLGLGVNYPGPPSGVTRQVDSYDQSTAAAAA
Mm -----MNSYFEQSGFYGGHGQT-----GAEQ-----AYR-FPLGLGVNYPGPPSGGVAR-QVESYDQAT-AAAAA
Sm -----MNSYFDQGGFYGSQG-----SGEQ-----AYR-FPLGLTVPPYPQP-----QTRAHQDS---SYDSPATGS
Ag -----MNSYFEQTGFYGHPHQAAAGMMTTTGTTHHDQTAAAAAAYRGFPLSLGMSPTYN----HLLHQTRTAQES---PYDASIQA
Tc -----MNSYFEQSGFYGSHHHQSGS----VAGHHHEQSAAAAAAYRSFPLSLGMSPTYASSQHHLHLQARPPQDS---PYDASVAAA
Jc -----MNSYFEQGGFYGAHGVHQQG----GGGDQ-----YRGFPLGL---TYAQP---HALHQPR-PQDS---PYDASVAAA
Bm -----MNSYFEQGGFYGAHGVHQQG----GGGDQ-----YRGFPLGL---TYAQP---HALHQPR-PQDS---PYDASVAAA
 *.:.: * ** . . : ** * . *

Af PCK-LYEQ-----Y-KLPIDLQSSKE----QNAVGLP-----SKDTNLAW-----LQQQLDPTRTT-
Ph -CK-LYPTHQDHMTPNP-F-KVDCS--GGKD---QNGYG-----AKDMSVGW-----GQSARPV-
Es -GK-LYSSPM-----VAECMAAAVKDHHHHQNGYSNMTK----DTGGIGSW-----PGSNPLSNGL-
Dm SCK-LYEQ-----Y-KLDCSK---ND---QNGYSTGINVKSDNNSAISSWAQAAAAAAGATQQGGVNDRGVGVSVGHG
Mm SCK-LYEQ-----Y-KLDCTK---TD---QNAVYSTGI---VKADNNSISSW-----AAAAVAAAADRSTNGH-
Sm PCK-LYSSSTASTDQPAY-KSDCAA--KD---QNGYSS-----TAKEVTAW-----PGGSLPVRPA-
Ag -CKQIYEGS-----YSSKDCGKTGTSG---NNGTDT-----SNGYKDVNNSGATNGATTGGTGSNVPQONSVPVRS-
Tc -CK-LYSEGGQNSNYSSNSKPCSK-GNAD---QNGYASVVA---AAAVKDVW---QSATSGGANLNTSLTGPVRPA-
Jc -CK-LYAGEQ-----YAKADCSKAGGEQ---QNGYG-----GKEAW-----GSGLGALVRPA-
Bm -CK-LYAGEQ-----YPKADCSKPGGEQ---QNGYG-----GKEAW-----GSGLGALVRPA-
 * : * : * . *

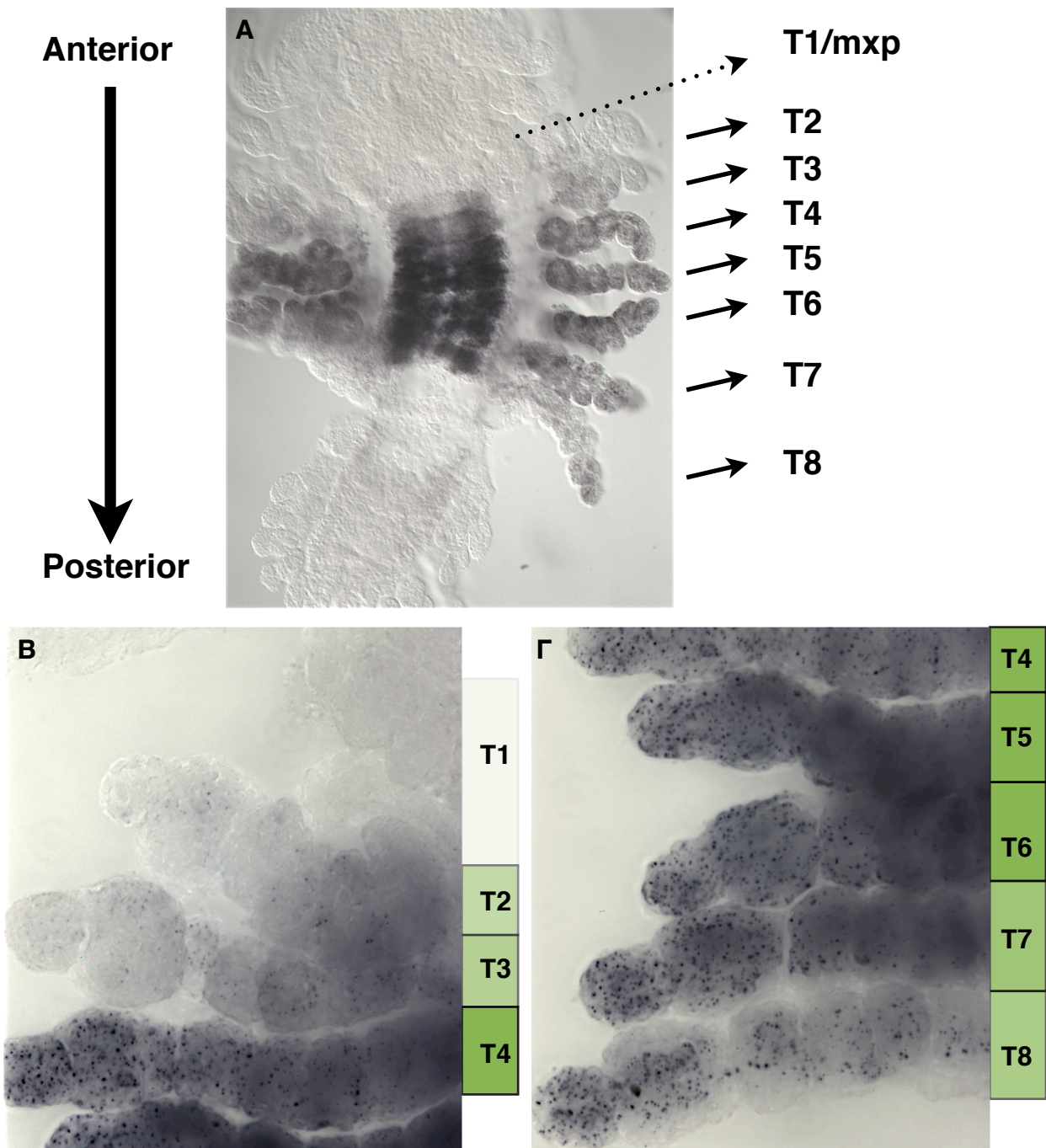
Af -----DLSQGGP-----RYPESNAMRNVSQGPW--SPCSLANNNSNAS-----
Ph ---CTPDPISG-----RGYP-----PDPSTSPRDRAHAGAGW--NTCGMTAVQHQQH-----
Es --RSDATMMR-----SSFP-----AATSTMPEQVAARVSDVW--STCCQNSMAP-----
Dm HNNINNRGVGGGGYGGGGYPGVSNVSGVGVGPEAAISAVTPRANSGVGNPNPW--SPCSLNATAAVQAPVSHQHG--GVISQHNT
Mm --HVSHNNINNRG--VGVGGYPVNSV-----PETAVVAPRNSGASSVGNPNPW--SPCSINTGSNVPS-MPQHGGNAGVVPQH-T
Sm --AYTPDSVRS--FAGETGASP-----RDRVPSW--TQCCQNTNSSTA-----
Ag --ACTPDSRVG-GYIDASGGSP-----VSRGSAATGVPGSWNTNQCSTLGTGGQA-----
Tc --ACTPDSRVGYSVGLVGGDP-----ASSPGAAGRTGNSLSWN-NPCSINSTSSQPV-----
Jc --ACTPEARYS-----ESSP-----GRALPWG-NQCALPGAAASAQ-----
Bm --ACTPEARYS-----ESSP-----GRALPWG-NQCALPGSAASAA-----
 . * * . *

Af -----NGSRPQTVPGQGTPEQQHSPSQPA--AFYPWMAIA----GANGLRRRGRQTYTRYQTLELEKEFHTNHYLTRRRRIE
Ph -----HQQQPQNPGMQGQNTTTFYPWMAIA----GANGLRRRGRQTYTRYQTLELEKEFHTNHYLTRRRRIE
Es -----PPHPNSFYPWMAIA----GANGLRRRGRQTYTRYQTLELEKEFHTNHYLTRRRRIE
Dm QHSQHQHNSVQHSNHNTGGQHAISQQQSPQSSAHTFYPWMAIA----GANGLRRRGRQTYTRYQTLELEKEFHTNHYLTRRRRIE
Mm QHTQLQQQQQQQHHSSSGQHAVSQSSPQSSSHTFYPWMAIA----GANGLRRRGRQTYTRYQTLELEKEFHTNHYLTRRRRIE
Sm -----SPVQQPATNHTFYPWMAIA----GANGLRRRGRQTYTRYQTLELEKEFHTNHYLTRRRRIE
Ag -----APSTGLHQSNTFYPWMAIA----GANGLRRRGRQTYTRYQTLELEKEFHTNHYLTRRRRIE
Tc -----GTQIHQQTNHTFYPWMAIADSMTFGANGLRRRGRQTYTRYQTLELEKEFHTNHYLTRRRRIE
Jc -----PVQHQPNTHTFYPWMAIA----GANGLRRRGRQTYTRYQTLELEKEFHTNHYLTRRRRIE
Bm -----QPVHQPTNHTFYPWMAIA----GANGLRRRGRQTYTRYQTLELEKEFHTNHYLTRRRRIE
 :*****: *****

Af MAHSLCLTERQIKIWFQNRMRMLKKEIQAIKELNEQDKRITPSKLHS-----NCSSP-----TGDISDD-----
Ph MAHALCLTERQIKIWFQNRMRMLKKEIQAIKELNEQEKAQNQKLMQQQQQQPQPAPQQTQPTVPPNMTSPQAGGGVPDHTGQNP
Es MAHALCLTERQIKIWFQNRMRMLKKEIQAIKELNDQEKQAHKTKTSNQSSRODGETP-----KKESHQS-----
Dm MAHALCLTERQIKIWFQNRMRMLKKEIQAIKELNEQDKASHTKGGI-----SSNSS-----NASTTPN-----
Mm MAHSLCLTERQIKIWFQNRMRMLKKEIQAIKELNEQEKATLKG-----SSSS-----TSSTTPN-----
Sm MAHALCLTERQIKIWFQNRMRMLKKEIQAIKELNEQEKAQATKATAATLQPTNSQGT-----DSTPTPN-----
Ag MAHALCLTERQIKIWFQNRMRMLKKEIQAIKELNEQEKAQAQK-----AAAA-----AAAAALH-----
Tc MAHALCLTERQIKIWFQNRMRMLKKEIQAIKELNEQEKAQAQKAAA-----AAAAV-----AAQVDPN-----
Jc MAHALCLTERQIKIWFQNRMRMLKKEIQAIKELNEQEKAQAQKAAA-----AAAA-----AAAAQGH-----
Bm MAHALCLTERQIKIWFQNRMRMLKKEIQAIKELNEQEKAQAQKAAA-----AAAA-----AAAAQGH-----
 :**:*****

Af EKDEKL
Ph GQN---
Es IST---
Dm GGD---
Mm GLD---
Sm QAN---
Ag EQN---
Tc -----
Jc PEH---
Bm PEH---



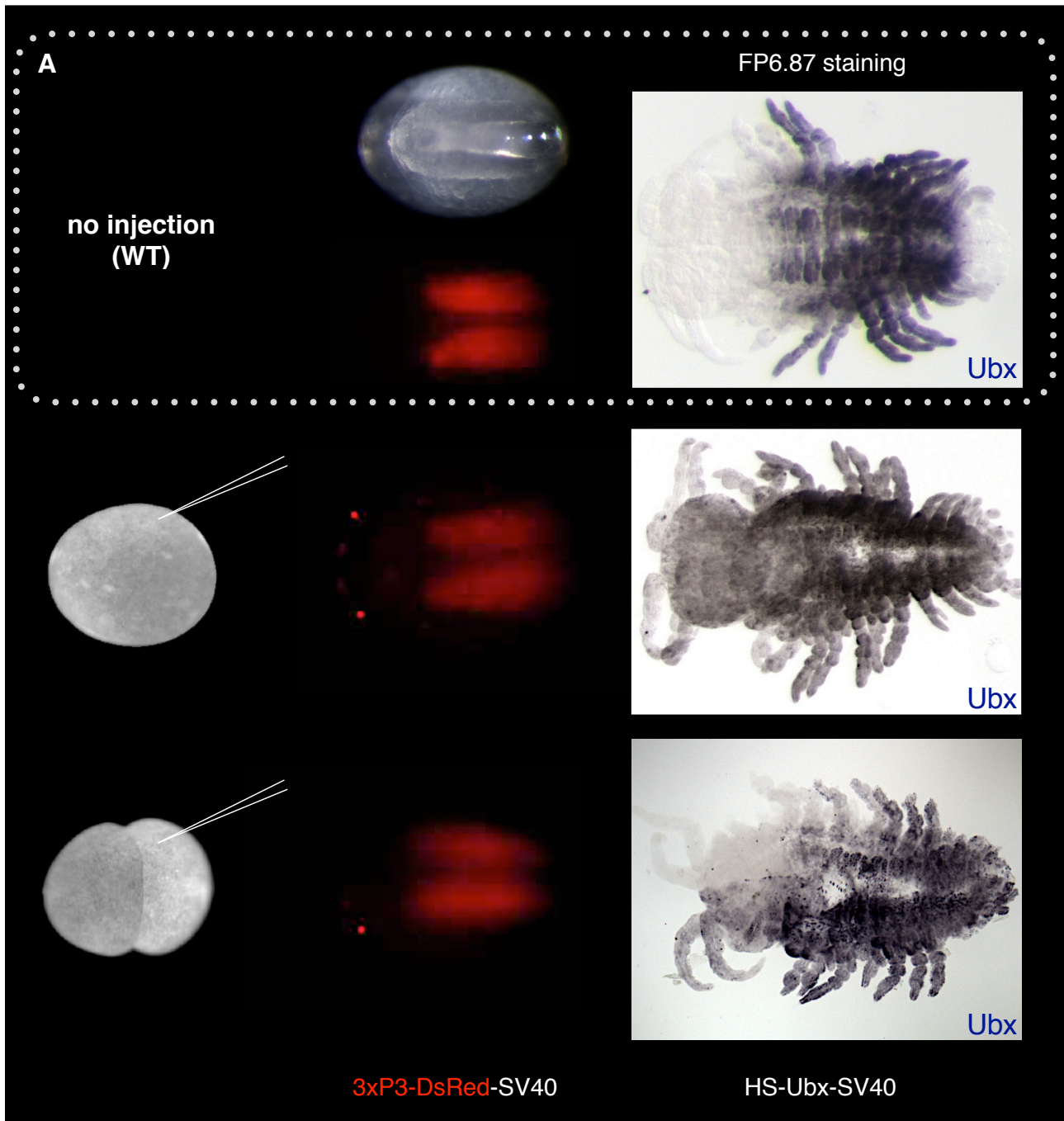


ΣΧΗΜΑ 26: Έκφραση του Ubx κατά την ανάπτυξη του αμφιπόδου

A-Γ. In situ υβριδοποίηση με κοινό ανιχνευτή και για τις δύο ισομορφές του PhUbx.

A. Κοιλιακή άποψη εμβρύου S23-24. Το Ubx εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στο δεύτερο και τρίτο θωρακικό μεταμερίδιο και τα αναπτυσσόμενα T2-T3 άκρα. Σε υψηλά επίπεδα φαίνεται να εκφράζεται στα T4-T6 και σε λίγο χαμηλότερα επίπεδα στα δύο τελευταία θωρακικά T7-T8 (πιθανόν λόγω της έκφρασης του Abd-A). Στο πρώτο θωρακικό μεταμερίδιο, όπου αναπτύσσονται τα maxillipeds, δεν εντοπίζεται καθόλου Ubx.

B-Γ. Κοντινή άποψη των αναπτυσσόμενων άκρων. Ο πυρηνικός εντοπισμός του σήματος υποδεικνύει πως το Ubx μεταγράφεται ενεργά σε αυτό το στάδιο. Τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης στα άκρα T1-T8 φαίνονται εδώ πιο καθαρά.



ΣΧΗΜΑ 27: Ανίχνευση διαγονιδίου σε ενεμένα έμβρυα

A. Ραχιαία όψη από έμβρυο αγρίου τύπου (μικροσκοπία φωτός και φθορισμού). Φαίνεται ο αυτοφθορισμός του εντέρου. Ανοσοϊστοχημεία με το αντίσωμα FP6.87 υποδεικνύει την έκφραση του ενδογενούς Ubx.

B. Ραχιαία όψη από έμβρυο ενεμένο στο στάδιο του ενός κυττάρου. Πέραν του αυτοφθορισμού του εντέρου, εντοπίζουμε την έκφραση της DsRed σε κύτταρα των αναπτυσσόμενων ματιών (αμφίπλευρος μετασχηματισμός). Ομοίως, μετά από επαγωγή του θερμοεπαγόμενου στοιχείου HS-Ubx-SV40 εντοπίζουμε το Ubx σε όλους τους ιστούς.

Γ. Ένεση και ένθεση του διαγονιδίου στο στάδιο των δύο κυττάρων. Κάθε ένα από τα βλαστομερίδια θα συμμετέχει στον σχηματισμό μιας πλευράς του εμβρύου. Έτσι, η DsRed εκφράζεται στα κύτταρα του ενός μόνο ματιού (μονόπλευρος μετασχηματισμός). Ανοσοϊστοχημεία με το αντίσωμα FP6.87 δείχνει την εκτοπική έκφραση του Ubx στην μία πλευρά και αγρίου τύπου πρότυπο έκφρασης στην άλλη (μη μετασχηματισμένη) μεριά του εμβρύου.

Η υψηλή θνησιμότητα των εμβρύων ήταν πιθανότατα αποτέλεσμα του συστήματος θερμοεπαγόμενης έκφρασης. Βασικό μειονέκτημα αυτού του συστήματος είναι πως, παρότι μπορούμε να ελέγξουμε το πότε επάγουμε το γονίδιο του ενδιαφέροντός μας καθώς και, ως ένα βαθμό, τα επίπεδα επαγωγής του, δεν μπορούμε να το επάγουμε ιστοειδικά. Στην περίπτωση που υπερεκφράζουμε ένα πλειοτροπικό μεταγραφικό παράγοντα όπως το Ubx, αυτή η έκφρασή του έχει ως αποτέλεσμα να έχουμε την παρεμπόδιση του φυσιολογικού αναπτυξιακού προγράμματος σε ιστούς και όργανα απαραίτητα για τη ζωή και επομένως υψηλή εμβρυϊκή θνησιμότητα. Πράγματι, το έντερο που είναι απαραίτητο για τον μεταβολισμό της λεκίθου κατά την όψιμη εβρουγένεση και επιτελεί μορφογενετικές κινήσεις κατά τη διάρκεια του σχηματισμού των άκρων, φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά από την υπερέκφραση του Ubx. Επιπλέον, το πιθανό leakiness του στοιχείου PhHS (Ph-hsp70a2R1), δηλ ενεργοποίηση της μεταγραφής χωρίς θερμικό σοκ, έχει ως αποτέλεσμα να επιβιώνουν καλύτερα άτομα με λίγες ενθέσεις του διαγονιδίου Ph-Ubx και επομένως να εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα εκτοπικής έκφρασης. Η ίδρυση διαγονιδιακών σειρών με αυτά τα άτομα και η συνεχής επιλογή για άτομα με μικρό leakiness (στις παραπέρα διασταυρώσεις) εξηγεί τα χαμηλά επίπεδα εκτοπικής έκφρασης του Ubx που παρατηρήθηκαν στα μετέπειτα πειράματα χρησιμοποιώντας αυτές τις σειρές.

Για να αντιμετωπίσουμε το πρόβλημα της χαμηλής εκτοπικής έκφρασης εκμεταλλευτήκαμε το γεγονός ότι στο αμφίποδο *Parhyale hawaiiensis* στο στάδιο των δύο κυττάρων, το κάθε βλαστομερίδιο συμμετέχει στον σχηματισμό μίας πλευράς του εμβρύου. Έτσι, ενύοντας σε αυτό το στάδιο μόνο το ένα βλαστομερίδιο με το μεταθετό στοιχείο Minos και το mRNA της τρανσποζάσης του, μετασχηματίζουμε με το θερμοεπαγόμενο διαγονίδιο (hsp70a2R1-PhUbx-SV40) μόνο το μισό έμβρυο (δεξιά ή αριστερή πλευρά) (ΣΧΗΜΑ 27). Υποβάλλοντας τα ενεμένα έμβρυα σε καθημερινά θερμικά σοκ, εκφράζουμε εκτοπικά το Ubx μόνο σε μία από τις δύο πλευρές (σε κάθε έμβρυο), χρησιμοποιώντας παράλληλα την άλλη για εσωτερικό αρνητικό έλεγχο (control). Επιπλέον, όπως παρατηρήσαμε, ο μωσαϊκισμός του εμβρύου αυξάνει τα επίπεδα βιωσιμότητας μέχρι την εκκόλαψη.

ΟΜΟΙΩΤΙΚΟΙ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΑΜΦΙΠΟΔΟ

Χρησιμοποιώντας την στρατηγική των μωσαϊκών εμβρύων, προχωρήσαμε σε ένα πείραμα μεγάλης κλίμακας, με σκοπό την μελέτη της λειτουργίας του Ubx στο αμφίποδο. Οι δύο κατασκευές, pMi {3xP3-eGFP-SV40; hsp70a2R1-PhUbx-I-SV40} και pMi {3xP3-eGFP-SV40; hsp70a2R1-PhUbx-II-SV40}, ενέθηκαν μαζί με το mRNA της τρανσποζάσης του Minos σε συνολικά 3871 έμβρυα στο στάδιο των δύο κυττάρων. Από αυτά, 3343 έμβρυα υποβλήθηκαν σε καθημερινά heatshocks (1 ώρα στους 37°C) κατά την περίοδο της

ανάπτυξης, όπου σχηματίζονται τα άκρα (S12-S26), ενώ τα υπόλοιπα 528 αφέθηκαν να αναπτυχθούν χωρίς επαγωγή του διαγονιδίου, ως αρνητικός έλεγχος (control). Σε κάθε περίπτωση, ελέγξαμε και περιγράψαμε τους μετασχηματισμούς στα νεαρά αμφίποδα στο τέλος της εμβρυογένεσής τους. Ο αρχικός έλεγχος για όλα τα δείγματα έγινε στο στερεοσκόπιο, ενώ για κάποια δείγματα επιλέχθηκε η περαιτέρω ανάλυσή τους με παρασκευάσματα εξωσκελετού ή ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης. Οι δύο τελευταίες τεχνικές χαρακτηρίζονται από εξαιρετική διακριτική ικανότητα και επιπλέον επιτρέπουν τη λεπτομερή απεικόνιση των φαινοτύπων.

Και οι δύο ισομορφές εμφάνισαν τους ίδιους μετασχηματισμούς, ωστόσο η ισομορφή Ph-Ubx-II παρουσίασε μεγαλύτερη διεισδυτικότητα (ΠΙΝΑΚΑΣ 4). Οι διάφοροι μετασχηματισμοί αναλύονται λεπτομερώς παρακάτω.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Αποτελέσματα ενέσεων με τις κατασκευές HS-PhUbx-I και HS-Ubx-II.

Η μεγαλύτερη διεισδυτικότητα του PhUbx-II φαίνεται από το μεγαλύτερο ποσοστό μετασχηματισμένων ατόμων (41% έναντι 16% του PhUbx-I). Μετασχηματισμοί κεραίας προς πόδι ($An > T$) παρατηρήθηκαν και στην περίπτωση του PhUbx-I, αλλά δεν μετρήθηκαν.

Κανένας μετασχηματισμός δεν βρέθηκε σε εννεμένα άτομα που δεν υπέστησαν θερμικά σοκ.

	PhUbx-I	PhUbx-II	Σχετική συχνότητα
ΕΝΕΣΕΙΣ ΚΑΙ ΘΕΡΜΙΚΟ ΣΟΚ			
Ενέθηκαν	1849	1494	
Εκκολάφθηκαν	554	516	
Άτομα με ομοιωτικούς μετασχηματισμούς	86/554 (16%)	209/516 (41%)	
$Mx2 > Mxp$	47	80	43
Εκτοπκές ισχιακές πλάκες	11	53	25
Εκτοπκές ραχιαίες πλάκες	21	50	
$An > T$	δεν μετρήθηκαν	46	22
$Mx2 > T2/3$	6	13	10
$Mxp > T2/3$	5	18	
Εκτοπκά βράγχια	7	20	9
$Mx2 > T$	2	6	4
$Mxp > T$	1	5	

	PhUbx-I	PhUbx-II	Σχετική συχνότητα
Mx2 > T4	2	6	3
Mxp > T4	1	4	
T2/3 > T4	0	4	
ΕΝΕΣΕΙΣ ΧΩΡΙΣ ΘΕΡΜΙΚΟ ΣΟΚ			
Ενέθηκαν	324	204	
Εκκολάφθηκαν	134	83	
Άτομα με ομοιωτικούς μετασχηματισμούς	0	0	

ΚΕΡΑΙΕΣ

Το αμφίποδο φέρει δύο ζεύγη κεραιών που διαφέρουν μεταξύ τους κυρίως ως προς το μέγεθος (το πρώτο ζεύγος είναι μικρότερο από το δεύτερο). Κάθε κεραία αποτελείται από επτά όμοια τμήματα που μικραίνουν σε διατομή θυμίζοντας τηλεσκοπικό σωλήνα σε έκταση. Στα όρια ανάμεσα στα τμήματα αυτά, εμφανίζονται τριχίδια που εξυπηρετούν τις αισθητήριες ανάγκες του αμφίποδου (ΣΧΗΜΑ 28).

Η ιδιαίτερη θέση των κεραιών μακριά από εξαρτήματα ανάλογου μεγέθους επιτρέπει τον εύκολο έλεγχο της μορφολογίας τους ακόμα και σε αρκετά παραμορφωμένα αμφίποδα. Επειδή ο έλεγχος του μετασχηματισμού τους δεν αποτελούσε αρχικά σκοπό του πειράματος υπερέκφρασης Ubx, τελικά περιγράψαμε μετασχηματισμούς των κεραιών μόνο για το Ph-Ubx-II (46/209), παρότι μετασχηματισμοί παρατηρήθηκαν και με το Ph-Ubx-I.

Η πλειοψηφία των μετασχηματισμών στις κεραίες περιλάμβανε μερικό μετασχηματισμό τους σε θωρακικά άκρα. Ο μετασχηματισμός αυτός είναι φανερός από την αλλαγή της μορφολογίας των τμημάτων της κεραίας ώστε αυτά να ομοιάζουν με τα τμήματα των θωρακικών άκρων (ΣΧΗΜΑ 28) αλλά και από την συνολική αναδίπλωση της μετασχηματισμένης κεραίας (ΣΧΗΜΑ 28). Εκτός αυτών των περιπτώσεων, παρατηρήθηκαν και πλήρεις μετασχηματισμοί, στους οποίους το μετασχηματισμένο άκρο εμφάνιζε όλα τα χαρακτηριστικά ενός θωρακικού άκρου (ΣΧΗΜΑ 28).

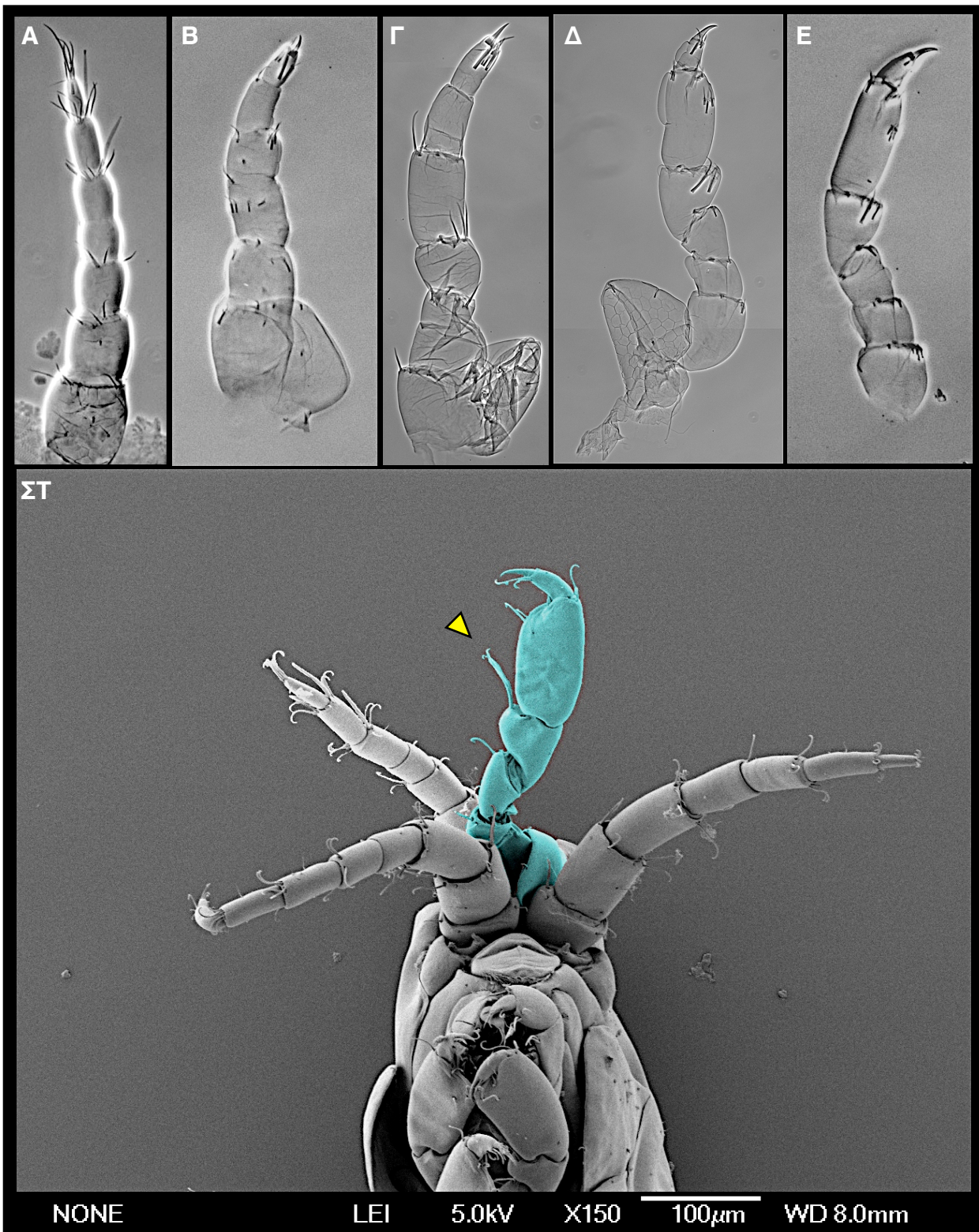
ΓΝΑΘΙΚΑ ΑΚΡΑ/ΕΞΑΡΤΗΜΑΤΑ

Τα γναθικά άκρα στο αμφίποδο περιλαμβάνουν ένα ζεύγος γνάθων (mandibles) και δύο ζεύγη σιαγόνων (maxilla I και maxilla II). Γενικά τα εξαρτήματα αυτά εμφανίζουν

πληθώρα αιχμηρών επιφανειών, που εξυπηρετούν στην επεξεργασία της τροφής, και μεγάλο αριθμό από χημειοαισθητήρες αλλά και μηχανοαισθητήρες που πιθανότατα σχετίζονται με τη γεύση.

Ομοιωτικοί μετασχηματισμοί παρατηρήθηκαν και στους τρεις τύπους εξαρτημάτων. Σε αυτούς περιλαμβάνονται μετασχηματισμοί σε γναθοπόδια T2-3 καθώς και σε βαδιστικά πόδια T4 (ΣΧΗΜΑ 29). Ο πλέον συχνός φαινότυπος για τα mxII ωστόσο ήταν ο μετασχηματισμός τους σε maxillipeds (127/162 περιπτώσεις μετασχηματισμού mxII). Κατατάσσοντας του μετασχηματισμούς αυτούς (mxII > mxr) ανάλογα με την βαρύτητά τους, αποκτάμε μια εικόνα για το βαθμιαίο μετασχηματισμό της μορφολογίας του mxII σε maxilliped (ΣΧΗΜΑ 30).

Από εκεί προκύπτει, πως ο μετασχηματισμός της mxII σε mxr γίνεται μέσω της βαθμιαίας εμφάνισης των απομακρυσμένων δομών (distal parts) του mxr πάνω στο mxII, ενώ το ίδιο το mxII δεν μετασχηματίζεται αρχικά. Αυτό υποδεικνύει πως το mxII αποτελεί ομόλογο της βάσης (basis) του mxr, και στερείται των υπολοίπων τμημάτων (ischium, merus carpus, propodus, dactyl) (ΣΧΗΜΑ 31).



ΣΧΗΜΑ 28: Μετασχηματισμοί της κεραίας προς θωρακικά πόδια

A. Αγρίου τύπου κεραία. Αποτελείται από όμοια τμήματα που μικραίνουν σταδιακά σε μέγεθος. **B-E.** Διαβαθμίσεις μετασχηματισμού της κεραίας σε θωρακικό άκρο. Το σχετικό μέγεθος και η μορφολογία των διαφόρων τμημάτων της κεραίας αλλάζει με τρόπο που να θυμίζουν θωρακικό άκρο. Επιπλέον, εμφανίζονται θωρακικές δομές, όπως οι ισχιακές πλάκες και χάνονται τα χαρακτηριστικά τριχίδια της κεραίας. **Δ-E.** Η συνολική μορφολογία μοιάζει αρκετά σε θωρακικά άκρα T2/3. **ΣΤ.** Εικόνα της κεφαλικής περιοχής ενός αμφιπόδου σε μικροσκόπιο σάρωσης. Ο μετασχηματισμός της μιας κεραίας (σημειώνεται με γαλάζιο) σε άκρο T2/3 είναι ξεκάθαρος. Η χαρακτηριστική τρίχα T2/3 (κίτρινο βέλος) υποδεικνύει πως ακόμα και κάποιες από τις λεπτομέρειες των άκρων T2/3 έχουν καθοριστεί σωστά.

MAXILLIPEDS

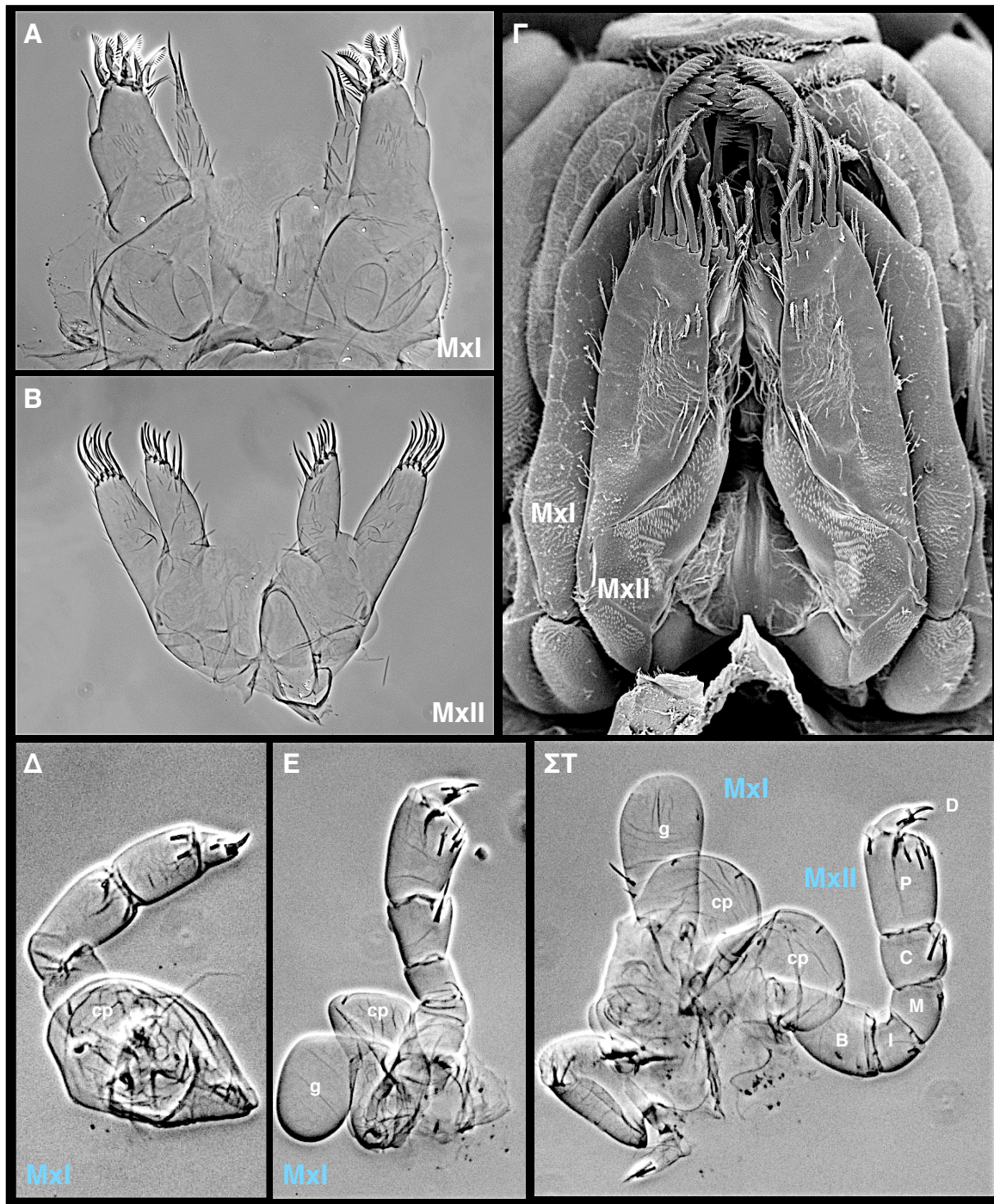
Το αμφίποδο φέρει ένα μονάχα ζεύγος maxillipeds που εκφύεται από το πρώτο θωρακικό μεταμερίδιο. Είναι σαφές ότι τα maxillipeds μοιράζονται χαρακτηριστικά τόσο με τα πιο οπίσθια θωρακικά πόδια, από τα οποία εξάλλου προέρχονται, όσο και με τα γναθικά εξαρτήματα, τα οποία συμπληρώνουν στην λειτουργία του χειρισμού και της προώθησης της τροφής. Έτσι, σε αντίθεση με τα θωρακικά άκρα, τα οποία εκφύονται από πλάγια θέση του σώματος του αμφίποδου, τα maxillipeds εκφύονται κοιλιακά, εμφανίζονται συνολικά μειωμένα σε μέγεθος (ΣΧΗΜΑ 31) και βρίσκονται ομαδοποιημένα με τα εξαρτήματα των στοματικών μεταμεριδίων. Επιπλέον, τα τμήματα basis και ischium (ΣΧΗΜΑ 31) των maxillipeds εμφανίζουν χαρακτηριστικές προεκβολές (endites) που μοιάζουν με την μορφολογία των mxII.

Οι φαινότυποι που παρατηρήθηκαν στα maxillipeds περιλάμβαναν τον μετασχηματισμό τους σε μορφολογία πιο οπίσθιων θωρακικών ποδιών, από T2-3 μέχρι και την μορφολογία T4. Μέσα από το πλήθος των μετασχηματισμών αυτών παρατηρούμε την βαθμιαία απώλεια των γναθικών τους χαρακτηριστικών (endites σε basis και ischium), την αύξηση του μεγέθους τους και την ταυτόχρονη εμφάνιση θωρακικών γνωρισμάτων (χαρακτηριστική τρίχα T2-3, πλάγια έκφυση και απομάκρυνση από τα στοματικά εξαρτήματα και άλλα) (ΣΧΗΜΑ 32).

ΓΝΑΘΟΠΟΔΙΑ

Τα θωρακικά άκρα T2 και T3, εμφανίζουν ξεχωριστή μορφολογία, σε σχέση με τα πιο οπίσθια θωρακικά πόδια, για να ανταποκριθούν σε λειτουργίες όπως η άμυνα και η σύζευξη. Η βασική τους διαφορά με τη μορφολογία του T4 βρίσκεται στην πεπλατισμένη εμφάνιση των τμημάτων carpus και propodus με αποτέλεσμα τα γναθοπόδια να παρουσιάζουν πιο στοιβαρή κατασκευή (απαραίτητη για την άμυνα) και αντιτακτό dactylus σχηματίζοντας subchelate (τύπος λαβής). Η λαβή αυτή χρησιμεύει εκτός των άλλων στη δέσμευση του θυληκού από το αρσενικό κατά την σύζευξη.

Οι φαινότυποι στα γναθοπόδια παρατηρήθηκαν πολύ πιο σπάνια από τους μετασχηματισμούς σε πιο πρόσθια άκρα. Ωστόσο, σε όλες τις περιπτώσεις περιλάμβαναν μετασχηματισμό προς μορφολογία βαδιστικού ποδιού T4 που γίνεται αντιληπτός από την διαφοροποίηση της μορφολογίας των τμημάτων merus, carpus και κυρίως propodus και τον μετασχηματισμό της χαρακτηριστικής τρίχας T2/3 (ΣΧΗΜΑ 33).



ΣΧΗΜΑ 29: Μετασχηματισμοί των γναθικών εξαρτημάτων MxI και MxII

A-B. Αγρίου τύπου MxI και MxII. **Γ.** Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης για την γναθική περιοχή του αμφιπόδου. Τα maxillipeds έχουν αφαιρεθεί χειρουργικά, αποκαλύπτοντας τις MxII. Οι MxI βρίσκονται από πίσω και προεξέχουν στα πλάγια και στην κορυφή, λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους τους. **Δ-Ε.** Μετασχηματισμοί MxI σε θωρακικά άκρα. Ο ενδοποδίτης και χαρακτηρισικά, όπως οι ισχιακές πλάκες και ο επιποδίτης βράγχιο φαίνονται σε κάποιες περιπτώσεις. **ΣΤ.** Μετασχηματισμένα MxI και MxII. Ο ενδοποδίτης που αντιστοιχεί στο MxI έχει χαθεί κατά την ανατομία. Φαίνονται ο επιποδίτης και η ισχιακή πλάκα. Η MxII έχει μετασχηματιστεί σε θωρακικό πόδι T2/3, με ισχιακή πλάκα και χαρακτηρισική μορφολογία για τα τμήματα του επιποδίτη (basis, ischium, merus, carpus, propodus, dactylus)

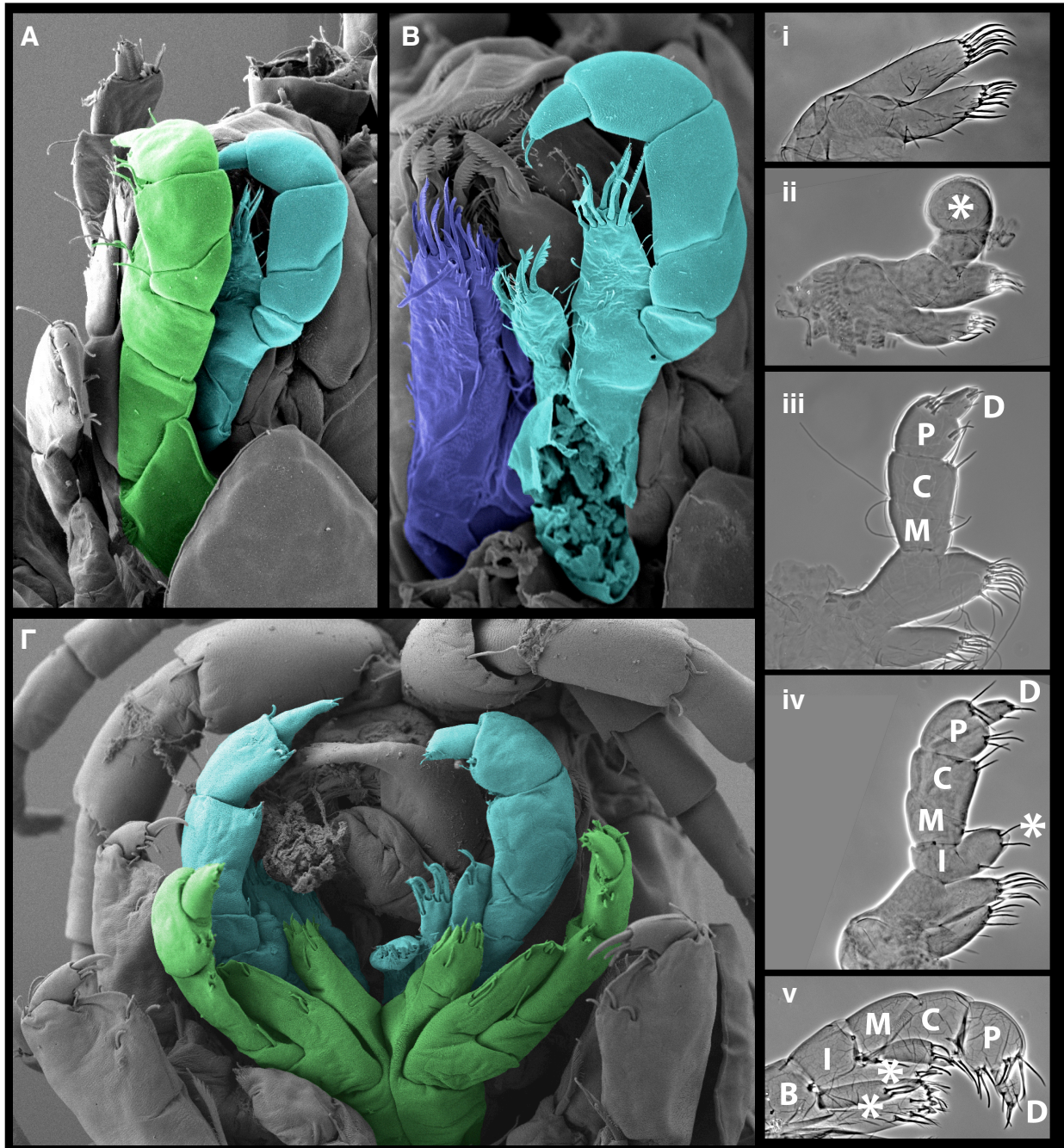
ΑΛΛΟΙ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΙ

Οι μετασχηματισμοί που περιγράφηκαν παραπάνω περιορίζονται στην μορφολογία του ενδοποδίτη, που αποτελεί το κύριο και μεγαλύτερο τμήμα του άκρου των καρκινοειδών. Ωστόσο, άλλα δομικά και λειτουργικά στοιχεία, που άλλοτε είναι μέρος του άκρου, όπως τα βράγχια, διαφοροποιημένοι επιποδίτες που εξυπηρετούν στην ανταλλαγή των αερίων ή οι ισχιακές και ραχιαίες πλάκες, αποτελούν επίσης χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση των μεταμεριδίων.

Τα βράγχια είναι πεπλατισμένες δομές που εκφύονται από την coxa του άκρου των μεταμεριδίων T3-T7 και αποτελούν τα αναπνευστικά όργανα του αμφιπόδου. Η έλλειψή τους από το δεύτερο θωρακικό άκρο είναι χαρακτηριστική, καθώς μαζί με το ιδιαίτερο σχήμα της ισχιακής πλάκας του T2 αποτελούν τα μόνα στοιχεία για την μορφολογική διάκριση των δύο γναθοποδίων. Από τα 295 μωσαϊκά έμβρυα που παρουσίασαν μετασχηματισμούς 27 (9%) εμφάνισαν εκτοπικά βράγχια στο δεύτερο θωρακικό άκρο, σε maxillipeds ή σε μετασχηματισμένα mxII.

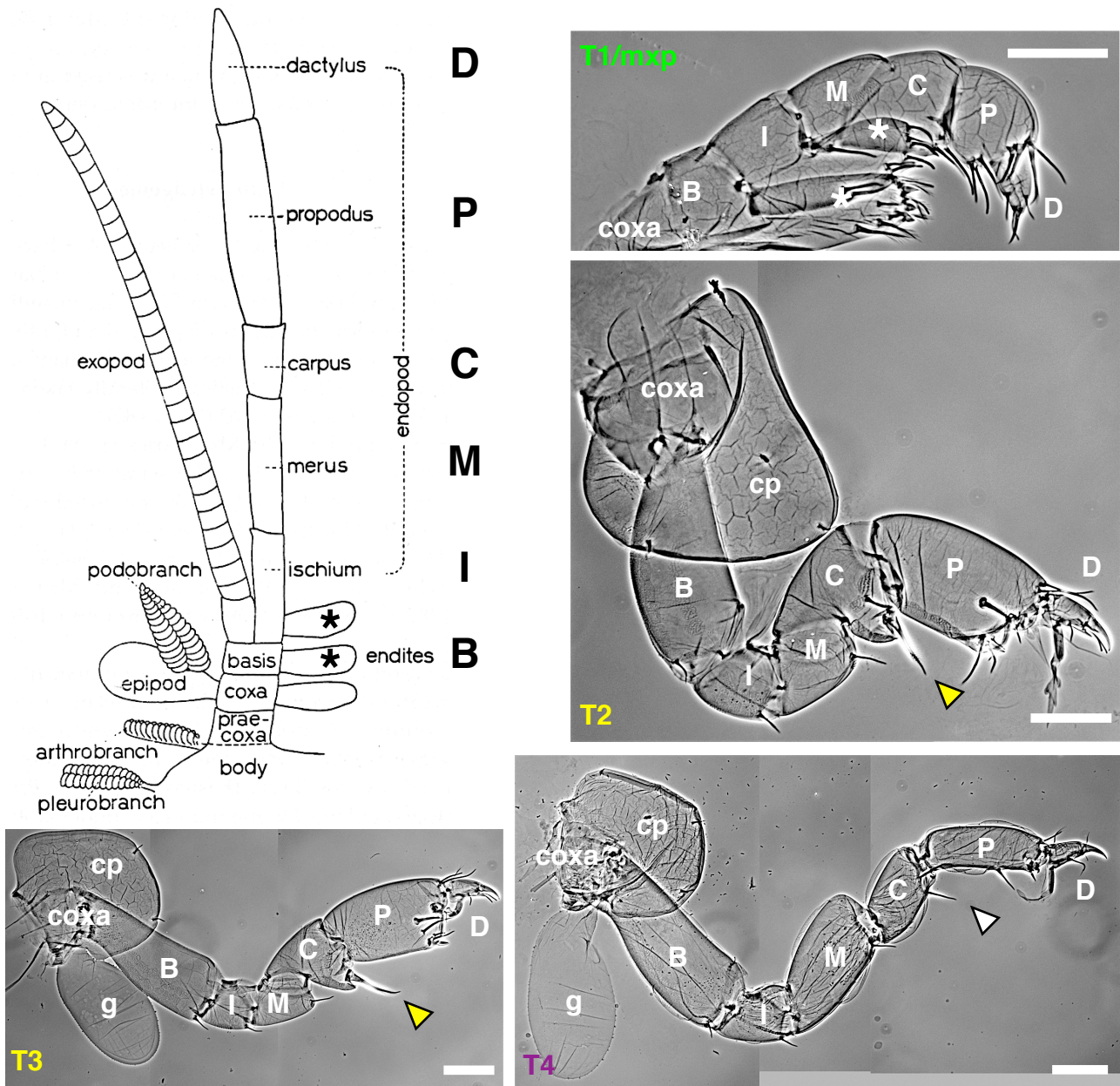
Οι ισχιακές πλάκες είναι προστατευτικοί δισκοειδείς σχηματισμοί που προσφέρουν επιπλέον πλευρική κάλυψη στα μεταμερίδια T2-T8 και απουσιάζουν από το maxilliped και τα κεφαλικά μεταμερίδια. Επιπλέον, εμφανίζουν κάποιες διαφοροποιήσεις στο σχήμα τους ανάλογα με το μεταμερίδιο, όπως για παράδειγμα το δελτοειδές σχήμα της ισχιακής πλάκας στο T2 και η διχαλωτή μορφολογία της στο T6. Η εκτοπική εμφάνιση ισχιακών πλακών στις κεραίες καθώς και σε μετασχηματισμένα mxII και maxilliped αποτέλεσε συχνό φαινόμενο μεταξύ των μετασχηματισμένων ατόμων (64/295).

Τέλος, οι ραχιαίες πλάκες είναι σχηματισμοί που καλύπτουν τη νωτιαία πλευρά του σώματος του αμφιπόδου, υποδιαιρώντας το εξωτερικά σε μεταμερίδια. Οι δομές αυτές κανονικά απουσιάζουν από το κεφαλικό τάγμα και το πρώτο θωρακικό μεταμερίδιο, όμως σε 71 περιπτώσεις, ένα τουλάχιστον μεταμερίδιο από αυτά εμφάνισε ραχιαία πλάκα (ΣΧΗΜΑ 33).



ΣΧΗΜΑ 30: Μετασχηματισμός MxII προς Mxp

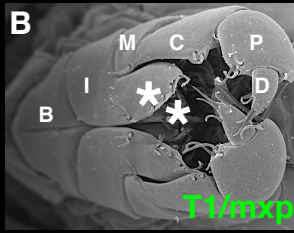
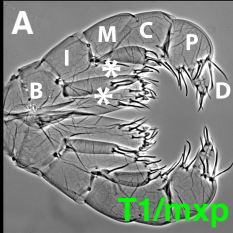
A. Με πράσινο φαίνεται το αγρίου τύπου T1/mxp και με γαλάζιο το μετασχηματισμένο MxII. Η ομοιότητα του “εκβλαστήματος” της MxII με το T1/mxp είναι εμφανής. **B.** Μετά από χειρουργική αφαίρεση του T1/mxp στο ίδιο δείγμα (**A**) φαίνεται πως το τμήμα της MxII δεν έχει μετασχηματιστεί. **Γ.** Αμφίπλευρος μετασχηματισμός MxII προς T1/mxp. Το συγκεκριμένο άτομο προέρχεται από διαγονιδιακή σειρά που φέρει τη κατασκευή $\rho Mi \{3xP3-eGFP-SV40; HS-PhUbx-I-SV40\}$. **i.** Αγρίου τύπου MxII. **ii-iv.** Σταδιακός μετασχηματισμός της μορφολογίας MxII προς T1/mxp. Σημειώνεται η ταυτότητα των τμημάτων του άκρου που είναι αναγνωρίσιμα. **iv.** Το τμήμα του ischium εμφανίζει το χαρακτηριστικό endite (αστερίσκος) όπως στο T1/mxp. **v.** Αγρίου τύπου T1/mxp με σημειωμένα τα τμήματα του άκρου και τα δύο endites (αστερίσκοι).



ΣΧΗΜΑ 31: Γενικευμένη αναπαράσταση ενός θωρακικού άκρου καρκινοειδούς (Holthuis, L.B. 1993) και σύγκρισή του με τα άκρα T1-T4 του αμφίποδου

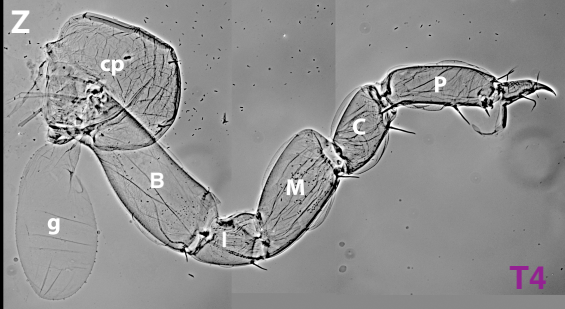
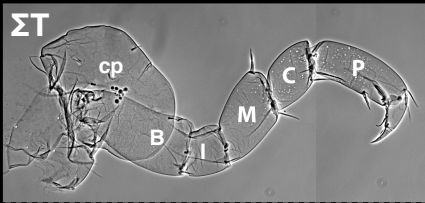
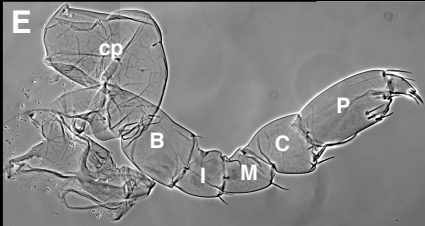
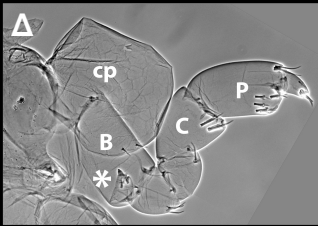
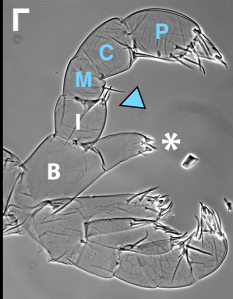
Στην γενικευμένη αναπαράσταση φαίνεται το σύνολο των χαρακτηριστικών/δομών που μπορεί να συναντήσει κανείς σε ένα θωρακικό άκρο καρκινοειδούς.

Το maxilliped στο αμφίποδο δεν έχει εξωποδίτη (εξωποδίτης παρατηρείται μόνο στα biramous άκρα, το αμφίποδο *P.hawaiensis* έχει μόνο uniramous άκρα), έχει μειωμένο σε μέγεθος (σε σχέση με τα υπόλοιπα θωρακικά άκρα) ενδοποδίτη και εμφανίζει δύο ενδίτες στο basis και ischium (σημειωμένοι με αστερίσκο). Τα T2-T3 έχουν μεγαλύτερο σε μέγεθος ενδοποδίτη (συγκρίσιμο με το T4) αλλά παρουσιάζουν πεπλατισμένο propodus και διαφοροποιημένα merus και carpus τμήματα. Η στοιβαρή κατασκευή μαζί με το πεπλατισμένο propodus, που σχηματίζει subchelate χηλή (λαβή) με το dactyl, εξυπηρετούν στην άμυνα και στην περίπτωση του T2 στα αρσενικά στην ακινητοποίηση του θηλυκού κατά την αναπαραγωγή. Οι ισχιακές πλάκες (coxal plates - cp) είναι πεπλατισμένες προεκτάσεις του τμήματος του coxa στα T2-T4 (η coxa στο maxilliped δεν εμφανίζει coxal plate). Η διαφοροποίηση μεταξύ T2 και T3 εντοπίζεται κυρίως στην διαφορετική μορφολογία του coxal plate στο T2 και στην παρουσία βραγχίου (διαφοροποιημένος επιποδίτης) στο T3. Ανάμεσα στα χαρακτηριστικά των T2-T3 είναι και η τρίχα στο τμήμα του carpus (κίτρινο βέλος) που είναι διαφοροποιημένη σε σχέση με τις αντίστοιχες σε T1/mxp και T4 (άσπρο βέλος). Το μεγαλύτερο μέγεθος του T4 σε σχέση με τα άκρα T2-T3 οφείλεται κυρίως στα μακρύτερα merus και carpus τμήματα.



ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ T1/mxp

- τα διάφορα τμήματα του mxp και τα χαρακτηριστικά endites (αστερίσκοι) φαίνονται στις δύο εικόνες (προετοιμασία εξωσκελετού και SEM)



ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΑ T1/mxp

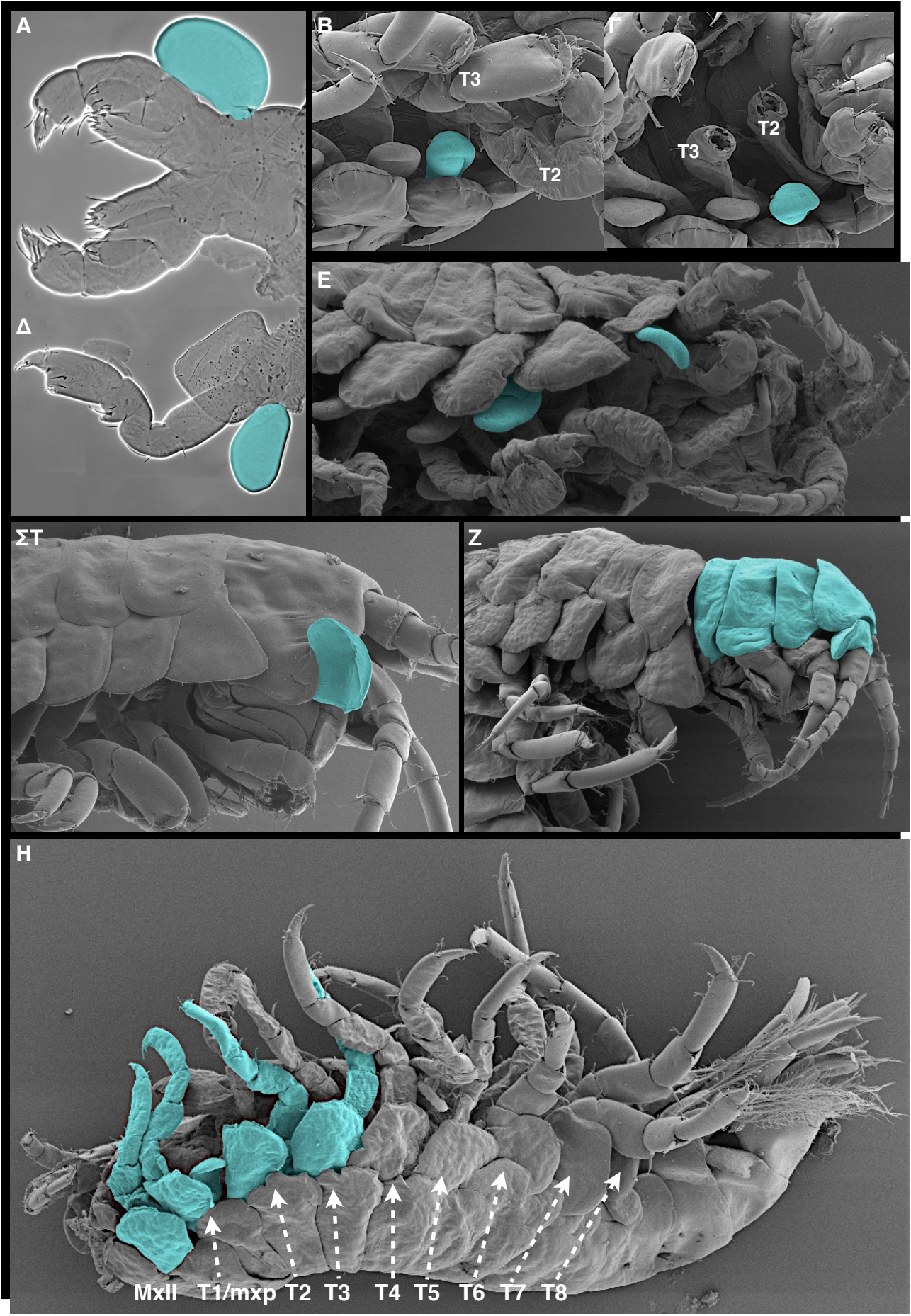
- απώλεια endite τμήματος ischium (γαλάζιο βέλος)
- μερικός μετασχηματισμός merus, carpus και proodus (γαλάζιο χρώμα)
- μερική απώλεια endite τμήματος ischium (αστερίσκος)
- μετασχηματισμός ischium, merus, carpus και basis
- εμφάνιση ισχιακής πλάκας (cp)
- ολική απώλεια endites τμήματος basis και ischium
- μετασχηματισμός όλων των τμημάτων προς χαρακτηριστικά T2/3
- πλάγια έκφυση του άκρου
- μετασχηματισμός όλων των τμημάτων προς χαρακτηριστικά T4

Βαθμιαίος μετασχηματισμός προς οπίσθια θωρακικά άκρα

ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ T4

- τα διάφορα τμήματα του T4 καθώς και η ισχιακή πλάκα (cp) και ο επιποδίτης-βράγχιο (g) φαίνονται για σύγκριση με τους παραπάνω μετασχηματισμούς

ΣΧΗΜΑ 32



ΣΧΗΜΑ 33: Εμφάνιση εκτοπικών βραγχίων, ισχιακών και ραχιακών πλακών και μετασχηματισμοί προς μορφολογία T4

A-E. Με γαλάζιο τονισμένα τα εκτοπικά βράγχια σε T1/mxp (**A**) και T2 (**B-Δ**) άκρα, που φυσιολογικά δεν φέρουν βράγχια. **B-Γ.** Εκτοπικό βράγχιο στο T2 τονισμένο με γαλάζιο χρώμα. **Γ.** Αφαίρεση των T2-3 σε αυτό το δείγμα για καλύτερη απεικόνιση. **Ε.** Εκτοπικά βράγχια σε T1/mxp και T2 στο ίδιο άτομο. **ΣΤ.** Εκτοπική ισχιακή πλάκα στην βάση της κεραίας. **Ζ.** Εκτοπικές ραχιαίες πλάκες στο κεφάλι. **Η.** Μετασχηματισμός των MxII, T1/mxp, T2 και T3 σε θωρακικά άκρα τύπου T4. Τα μετασχηματισμένα άκρα έχουν χαρακτηριστική μορφολογία και ακολουθούνται από ισχιακές και ραχιαίες πλάκες καθώς και εκτοπικά βράγχια (φανερό εδώ για το T1/mxp)

ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ Ubx ΚΑΙ SCR ΣΤΟ ΑΜΦΙΠΟΔΟ

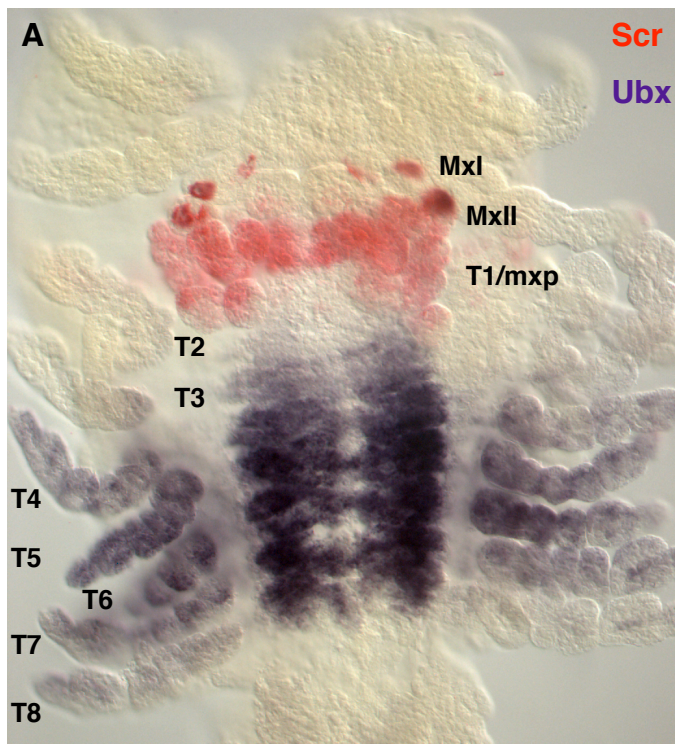
Ο μετασχηματισμός των εξαρτημάτων του δεύτερου γναθικού μεταμεριδίου (maxilla II) σε maxillipeds αποτελεί αναπάντεχο φαινότυπο, καθώς κανονικά τα maxillipeds φαίνεται να αναπτύσσονται απουσία Ubx. Μια πιθανή εξήγηση αυτού του φαινοτύπου είναι να μας έχει διαφύγει φυσιολογική έκφραση του Ubx στο T1/mxp σε εμβρυικά στάδια νωρίτερα αυτών που έχουν ήδη μελετηθεί. Για να ελέγξουμε αυτό το ενδεχόμενο, μελετήσαμε προσεκτικά με *in situ* υβριδοποίηση την έκφραση του Ubx σε αγρίου τύπου αμφίποδα στο στάδιο S12 της εμβρυογένεσης, που αποτελεί και το στάδιο επαγωγής του Ubx στα πειράματα εκτοπικής έκφρασης. Δεν παρατηρήσαμε ποτέ έκφραση του Ubx στα maxillipeds και σε αυτό το στάδιο.

Μια άλλη εξήγηση του μετασχηματισμού MxII προς T1/mxp είναι ο φαινότυπος αυτός να αποτελεί έμμεσο αποτέλεσμα της εκτοπικής έκφρασης του Ubx. Η ρύθμιση άλλων ομοιωτικών γονιδίων από το Ubx θα μπορούσε να αλλάξει το Hox code (κώδικας ομοιωτικών) ενός μεταμεριδίου. Η αλλαγή αυτή θα επηρεάσει με την σειρά της την έκφραση των γονιδίων στόχων αυτών των ομοιωτικών και τελικά την ταυτότητα του μεταμεριδίου και των εξαρτημάτων που αυτό φέρει. Για αυτό το λόγο θελήσαμε να ελέγξουμε την επίδραση του (εκτοπικού) Ubx σε άλλα ομοιωτικά στο MxII. Η δεύτερη maxilla (MxII) στο αμφίποδο αναπτύσσεται παρουσία του ομοιωτικού γονιδίου Sex combs reduced (Scr). Το Scr εκφράζεται επίσης σε χαμηλά επίπεδα στη πρώτη maxilla (MxI) και στο αναπτυσσόμενο άκρο του πρώτου θωρακικού μεταμεριδίου (T1/mxp).

Για να ελέγξουμε αν το εκτοπικό Ubx επηρεάζει την έκφραση του Scr στο αμφίποδο, ενέσαμε έμβρυα στο στάδιο των δύο κυττάρων με την κατασκευή έκφρασης του Ph-Ubx-II και μελετήσαμε με *in situ* υβριδοποίηση το πρότυπο του Scr σε αυτά μετά από θερμικό σοκ στους 37°C. Ένα σημαντικό ποσοστό των εμβρύων (32/182) παρουσίασε μερική μονόπλευρη καταστολή του Scr μέχρι και 12 ώρες μετά την επαγωγή του Ubx, ενώ η καταστολή αυτή μπορούσε να ανιχνευτεί σε κάποιες περιπτώσεις ακόμα και 24 ώρες μετά (3/22 έμβρυα) (ΣΧΗΜΑ 15).

Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν την υπόθεση πως ο φαινότυπος mxII σε mxp μπορεί να μην είναι άμεσο αποτέλεσμα της έκφρασης του Ubx, αλλά συνέπεια της ρύθμισης του Scr. Το Scr φαίνεται να είναι πολύ ευαίσθητο στο Ubx. Η επαγωγή οριακά

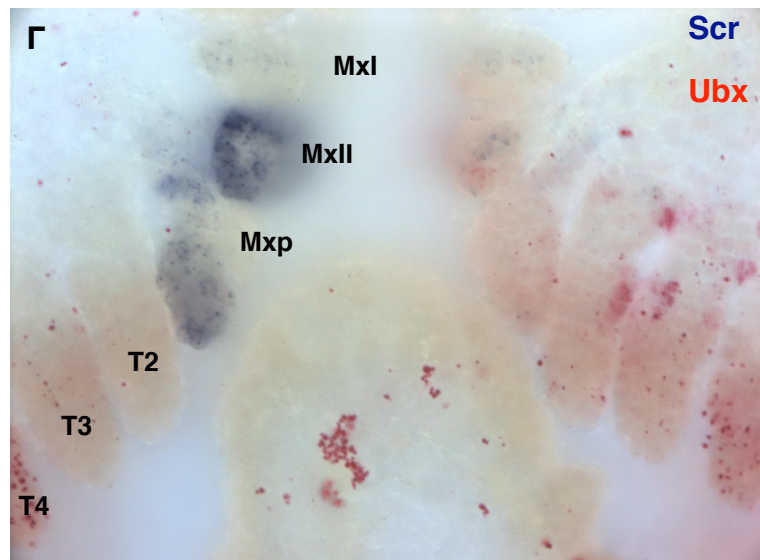
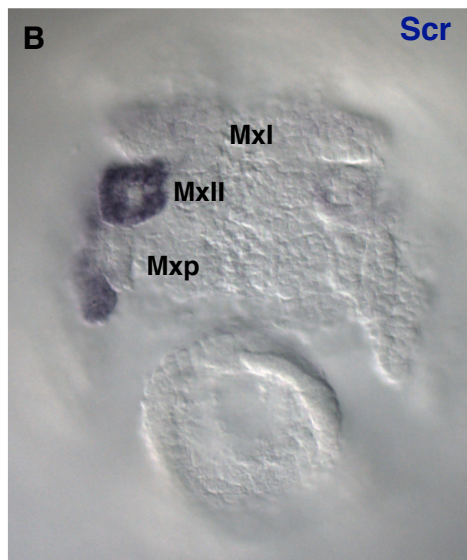
ανιχνεύσιμων ποσοτήτων Ubx είναι ικανή να καταστείλει την έκφραση του Scr. Ταυτόχρονα, η μονόπλευρη καταστολή υποδεικνύει την ειδικότητα του φαινοτύπου στο εκτοπικό Ubx. Έτσι, η καθημερινή επαγωγή Ubx στα πειράματά μας, σε συνδυασμό με το μωσαϊκισμό των εμβρύων, μπορεί να δημιουργεί ένα πρότυπο Scr παρόμοιο με αυτό που “βλέπει” κανονικά το αναπτυσσόμενο T1/mxp. Ένα επιπλέον στοιχείο, που συσχετίζει το Scr με τον μετασχηματισμό της MxII προς T1/Mxp, είναι πως το ποσοστό των εμβρύων που εμφάνισαν καταστολή (32/182) είναι συγκρίσιμο με το ποσοστό των εμβρύων με κάποιο φαινότυπο μετασχηματισμού του mxII (105/516). Συμπληρωματικά, το γεγονός πως οι κεραίες δεν μετασχηματίζονται σε maxillipeds, παρουσία Ubx, αλλά απευθείας σε άκρα T2-T4 ενισχύει την υπόθεση πως για το μετασχηματισμό της maxilla II σε maxilliped είναι απαραίτητο το Scr (σε χαμηλά επίπεδα ή/και μωσαϊκό πρότυπο), χωρίς να αποκλείονται φυσικά και άλλες αλληλεπιδράσεις.



ΣΧΗΜΑ 34: Καταστολή του Scr από το Ubx στο αμφίποδο

A. Υβριδοποίηση για Scr και Ubx σε αγρίου τύπου έμβryo σταδίου S23. Το Scr εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στο MxI και σε υψηλά επίπεδα στο MxII. Στο T1/mxp εμφανίζει μέτρια έκφραση στο αναπτυσσόμενο άκρο.

B-Γ. Ενεμένα έμβρυα στο στάδιο των δύο κυττάρων με την κατασκευή HS-PhUbx-II. Μετά από επαγωγή του Ubx, έγινε υβριδοποίηση για Scr (**B**) ή Scr και Ubx (**Γ**). Η ισχυρή μονόπλευρη καταστολή στα τρία μεταμερίδια που κανονικά εκφράζουν Scr είναι εμφανής. **Γ.** Το μονόπλευρα επαγόμενο Ubx επιβεβαιώνει την ειδική καταστολή. Αξίζει να σημειωθεί πως τα εκτοπικά επίπεδα έκφρασης του Ubx είναι χαμηλά.



ΕΚΤΟΠΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ DmUBX

Η σύγκριση του DmUbx (ισομορφή Ib) με τα PhUbx-I και PhUbx-II (θα αποκαλούνται μαζί PhUbx για συντομία) αποκαλύπτει τις ίδιες πρωτεϊνικές περιοχές συντήρησης που παρατηρήθηκαν και στη σύγκριση των Ubx στα υπόλοιπα αρθρόποδα (ΣΧΗΜΑ 16): το επταπεπτιδίο MNSYFEQ (εκτός της ισομορφής PhUbx-I), το πενταπεπτιδίο YPWMA και το homeodomain. Επιπλέον φαίνεται πως οι δύο πρωτεΐνες διαφέρουν στο καβοξυτελικό τους άκρο, μετά το homeodomain. Από την μια το DmUbx φέρει την περιοχή QA που σχετίζεται με την ενίσχυση της καταστολή του *distal-less*, ενώ στο PhUbx αυτή η περιοχή απουσιάζει. Από την άλλη στο PhUbx μπορούμε να αναγνωρίσουμε μερικές σερίνες και θρεονίνες καθώς και δύο αλληλουχίες φωσφορυλίωσης από MAP κινάσες (S/TP), που σύμφωνα με τις προηγούμενες μελέτες ευθύνονται για την παρεμπόδιση της κατασταλτικής δράσης του Ubx στην δροσόφιλα. Αντιθέτως δεν υπάρχει καμία περιοχή φωσφορυλίωσης από GSK-3 (S/TXXXS/TP) ή CK-II (SXXE/D) όπως στο Ubx της αρτέμια (*Artemia franciscana*) και σε άλλα καρκινοειδή (Ronshaugen, McGinnis et al. 2002).

Θέλοντας να ελέγξουμε την σημασία των περιοχών S/TP και QA στη ρύθμιση του *distal-less* στα καρκινοειδή αποφασίσαμε να ελέγξουμε την ικανότητα του DmUbx να καταστείλει το γονίδιο *distal-less* στο αμφίποδο. Στο *P.hawaiensis* έχουν κλωνοποιηθεί τρία γονίδια με ομολογία στο *distal-less*: *PhDII-early*, *PhDII-late1* και *PhDII-late2* (Liubicich, Serano et al. 2009). Από αυτά το *PhDII-early* εκφράζεται στα αναπτυσσόμενα άκρα σε πρότυπο ίδιο με αυτό του cross-reactive αντισώματος για την πρωτεΐνη *Distal-less*. Τα *PhDII-late1* και *PhDII-late2* εκφράζονται αργότερα σε τμήμα του προτύπου του *PhDII-early*.

Η καταστολή του *distal-less* έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ακρωτηριασμένων άκρων σε πολλά αρθρόποδα, όπως τη *Drosophila*, το *Tribolium* και την αράχνη *Cupiennius salei* (Cohen, Bronner et al. 1989; Beermann, Jay et al. 2001; Schoppmeier and Damen 2001). Χρήση RNA παρεμπόδισης για το *PhDII-early* στο αμφίποδο παρουσίασε τον ίδιο φαινότυπο (Liubicich, Serano et al. 2009). Έτσι, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το φαινότυπο αυτό για να ελέγξουμε εμμέσως την επίδραση του DmUbx στο γονίδιο *PhDII-early*.

Για τον σκοπό αυτό ακολουθήσαμε την ίδια στρατηγική των μωσαϊκών εμβρύων που χρησιμοποιήσαμε και στην περίπτωση του *PhUbx*, ενώ ταυτόχρονα δημιουργήσαμε και διαγονιδιακά ζώα για να αναλύσουμε παραπέρα την επίδραση του *DmUbx*. Τα αποτελέσματα των δύο προσεγγίσεων παρουσιάζονται παρακάτω.

ΣΧΗΜΑ 35: Σύγκριση των PhUbx-I και PhUbx-II με την ισομορφή Ib του Ubx της *Drosophila melanogaster*

Στο DmUbx, καρβοξυτελικά του homeodomain βρίσκουμε την αλληλουχία QA, που σχετίζεται με την ενίσχυση της καταστολής του γονιδίου *distal-less* στη δροσόφιλα. Η αλληλουχία αυτή απουσιάζει από το PhUbx (οι δύο ισομορφές είναι πρακτικά ίδιες μετά το MNSYFEQ). Ψάχνοντας για την περιοχή S/TP στο PhUbx βρίσκουμε περιοχές φωσφορυλίωσης για MAP κινάσες, σύμφωνα με αυτές που παρουσιάζονται από τους Ronshaugen et al.

Ph-I	MSSSSTMDNFRALLQGGFYGG-----GSGGDQ-----AYR-FPP-LGLS--V	38
Ph-II	-----MNSY-FEQ-GGFYGG-----GSGGDQ-----AYR-FPP-LGLS--V	30
DmUbx Ib	-----MNSY-FEQASGFYGHPHQATGMAMGSGGHHDTASAAAAAYRGFPLSLGMSPYA	53
	*::: .**** *****: *** ** **:* .	
Ph-I	GHYGGPAPRQDAYDP--SASC-KLYPT----HQDHMTFNPFKVD-----CSGGKDQNG	84
Ph-II	GHYGGPAPRQDAYDP--SASC-KLYPT----HQDHMTFNPFKVD-----CSGGKDQNG	76
DmUbx Ib	NHHLQRTTQDSPYDASITAACNKIYGDGAGAYKQDCLNIKADAVNGYKDIWNTGGSNNGG	113
	.*: * :.:...*. ::* *:* :** :. :. *: :***: .*	
Ph-I	YG-----AKDMSVG-----WGQSARP-VCTPD-----	105
Ph-II	YG-----AKDMSVG-----WGQSARP-VCTPD-----	97
DmUbx Ib	GGGGGGGGGAGGTGGAGNANGGNAANANGQNNPAGGMPVRPSACTPDSRVGGYLDTSGG	173
	* : . * * ..** .****	
Ph-I	-PISGRGYPPDPSTSPRDR-----AHAGAGWNTCGMTAVQHQQHHQQQPQONPGQMGQG	158
Ph-II	-PISGRGYPPDPSTSPRDR-----AHAGAGWNTCGMTAVQHQQHHQQQPQONPGQMGQG	150
DmUbx Ib	SPVSHRGGGAGGNVSVSGNGNAGGVQSGVGVAGAGTAWNANCTISGAAQTAAASSLHQ	233
	: *** . ::*.* .* : : .* ... :	
Ph-I	QNTTTFYPWMA LA-----GANG	175
Ph-II	QNTTTFYPWMA LA-----GANG	167
DmUbx Ib	ASNHTFYPWMAIAGECPEDPTKSKIRSDLTQYGGISTDMGKRYSESLAGSLLPDWLGTNG	293
	.. *****:* **:*	
Ph-I	LRRRGRQTYTRYQTLELEKEFHTNHYLTRRRRIEMAHALCLTERQIKIWFQNRMKLKEE	235
Ph-II	LRRRGRQTYTRYQTLELEKEFHTNHYLTRRRRIEMAHALCLTERQIKIWFQNRMKLKEE	227
DmUbx Ib	LRRRGRQTYTRYQTLELEKEFHTNHYLTRRRRIEMAHALCLTERQIKIWFQNRMKLKEE	353

Ph-I	IQAIKELNEQEKAQNQKLMQQQQQQPQQPAPQQTQQTPTVPPNMTPSQAGGGVPDHTG	295
Ph-II	IQAIKELNEQEKAQNQKLMQQQQQQPQQPAPQQTQQTPTVPPNMTPSQAGGGVPDHTG	287
DmUbx Ib	IQAIKELNEQEKAQAQAQAAAAAAAAAVQ-----GG----HLD	388
	***** ** ** . * ** *	
Ph-I	QNPQQN	301
Ph-II	QNPQQN	293
DmUbx Ib	Q-----	389
	*	

ΕΚΤΟΠΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ DmUbx ΣΕ ΜΩΣΑΪΚΑ ΕΜΒΡΥΑ

Η πλασμιδιακή κατασκευή pMi {3xP3-eGFP-SV40; hsp70a2R1-DmUbx-SV40} ενέθηκε μαζί με το mRNA της τρανσποζάσης σε συνολικά 743 έμβρυα στο στάδιο των δύο κυττάρων. Τα έμβρυα αυτά υποβλήθηκαν σε καθημερινά θερμικά σοκ κατά τη διάρκεια της έκφρασης του γονιδίου *PhDII-early* (από το στάδιο S12 μέχρι και αργά κατά την εμβρυογένεση S26) και τα εκκολαπτόμενα αμφίποδα ελέγχθηκαν στο στερεοσκόπιο για ακρωτηριασμό. Σε καμία περίπτωση από τα 387 έμβρυα που επιβίωσαν δεν παρατηρήσαμε ακρωτηριασμό κάποιου εξαρτήματος (κεραίες, γναθικά, θωρακικά πόδια και πτεροπόδια).

Αντιθέτως, το 15% των εμβρύων που επιβίωσαν εμφάνισαν ομοιωτικούς μετασχηματισμούς αντίστοιχους με αυτούς που παρατηρούμε κατά την εκτοπική έκφραση του PhUbx (ΠΙΝΑΚΑΣ 5) (ΣΧΗΜΑ 36). Με εξαίρεση τον μετασχηματισμό άκρων προς T2-4 και την εμφάνιση εκτοπικών βραχίων, το DmUbx είναι ικανό να προάγει όλους τους υπόλοιπους μετασχηματισμούς. Μάλιστα τα ποσοστά των μετασχηματισμένων ατόμων σε κάθε περίπτωση είναι συγκρίσιμα με τα αντίστοιχα ποσοστά για το PhUbx. Έτσι, ο πιο συχνός φαινότυπος ήταν ο μετασχηματισμός mx2 προς mxp, ενώ οι μετασχηματισμοί σε πιο οπίσθια μορφολογία ήταν πιο σπάνιοι.

ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ DmUbx ΣΕ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΑΜΦΙΠΟΔΩΝ

Για να αποκτήσουμε διαγονιδιακές σειρές με σταθερή ένθεση του διαγονιδίου hsp70a2R1-DmUbx-SV40 ενέθηκαν 191 έμβρυα στο στάδιο του ενός κυττάρου και αφέθηκαν να αναπτυχθούν χωρίς θερμικό σοκ. Κανένας ομοιωτικός μετασχηματισμός δεν παρατηρήθηκε στα 77 έμβρυα που επιβίωσαν. Τα θετικά άτομα για το 3xP3-eGFP-SV40 διασταυρώθηκαν μεταξύ τους για την δημιουργία διαγονιδιακών σειρών.

Τα διαγονιδιακά άτομα της επόμενης γενεάς (F1) που φέρουν το διαγονίδιο σε όλα τα σωματικά και γαμετικά τους κύτταρα διασταυρώθηκαν μεταξύ τους και οι απόγονοί τους υποβλήθηκαν σε καθημερινά θερμικά σοκ κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των άκρων. Όπως και στην περίπτωση του PhUbx η εκτοπική έκφραση του DmUbx προκάλεσε υψηλή θνησιμότητα στα διαγονιδιακά έμβρυα (ΠΙΝΑΚΑΣ 6).

		MALES			
FEMALES	M1	M2	M3	M4	
F1	9/10 DEAD 1 An>T+coxa, mx2>mxp				
F2			18/19 DEAD 1 mx2>mxp		
F3			11/12 DEAD 1 WT		
F4				13/14 DEAD 1 An>T+coxa, mx2>mxp	
F5	11/11 DEAD				
F6		33/36 DEAD 2 ectopic coxa 1WT			

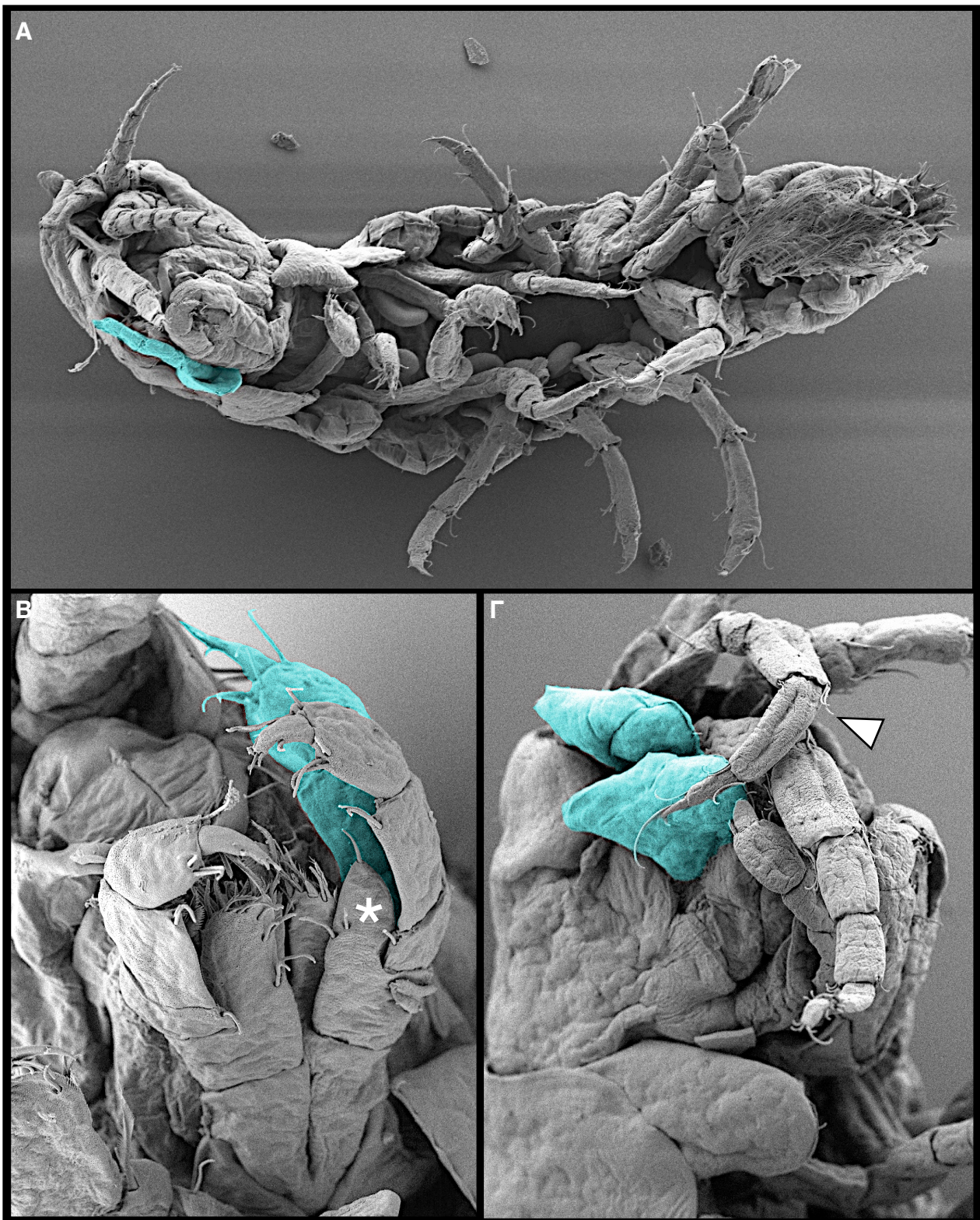
ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Θνησιμότητα σε διαγονιδιακά έμβρυα μετά από επαγωγή του DmUbx

Κάθε άτομο φέρει πολλαπλές ενθέσεις για το διαγονίδιο hsp70a2R1-DmUbx-SV40. Από τα συνολικά 102 έμβρυα, μόνο επτά επιβίωσαν (2 χωρίς φαινότυπο και 5 με τους φαινοτύπους που φαίνονται στον πίνακα).

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Ομοιοτικοί μετασχηματισμοί σε μωσαϊκά έμβρυα, λόγω εκτοπικής έκφρασης του DmUbx και σύγκρισή με τους μετασχηματισμούς του PhUbx

Εκτός από τους μετασχηματισμούς προς T2-4 και τα εκτοπικά βράγχια, που δεν παρατηρήθηκαν, οι υπόλοιποι μετασχηματισμοί εμφανίζονται σε παρόμοια ποσοστά με τους αντίστοιχους μετασχηματισμούς του PhUbx.

	DmUbx	Σχετική συχνότητα	Συχνότητα για PhUbx
ΕΝΕΣΕΙΣ ΚΑΙ ΘΕΡΜΙΚΟ ΣΟΚ			
Ενέθηκαν	743		
Εκκολάφθηκαν	387		
Άτομα με ομοιωτικούς μετασχηματισμούς	59/387 (15%)		16%
Mx2 > Mxp	25	42	43
Εκτοπικές ισχιακές πλάκες	16	27	25
Εκτοπικές ραχιαίες πλάκες	12		
An > T	10	17	22
Mx2 > T2/3	0	-	10
Mxp > T2/3	0	-	
Εκτοπικά βράγχια	0	-	9
Mx2 > T	2	3	4
Mxp > T	0	-	
Mx2 > T4	0	-	3
Mxp > T4	0	-	
T2/3 > T4	0	-	
ΕΝΕΣΕΙΣ ΧΩΡΙΣ ΘΕΡΜΙΚΟ ΣΟΚ			
Ενέθηκαν	191		
Εκκολάφθηκαν	77		
Άτομα με ομοιωτικούς μετασχηματισμούς	0		



ΣΧΗΜΑ 36: Ομοιωτικοί μετασχηματισμοί από επαγωγή του DmUbx σε μωσαϊκά έμβρυα

A. Μετασχηματισμός $\times 2$ προς T. Το μετασχηματισμένο άκρο, που είναι τονισμένο με γαλάζιο, εμφανίζει και ισχιακή πλάκα. **B.** Μετασχηματισμός $\times 2$ προς m^{chr} . Επιπλέον, το m^{chr} από την ίδια μεριά εμφανίζει μερικό μετασχηματισμό. Μεγαλύτερο συνολικά σε μέγεθος σε σχέση με το αγρίου τύπου m^{chr} της άλλης μεριάς και μικρή διαφοροποίηση του endite του τμήματος ischium (αστερίσκος). **Γ.** Εκτοπικές ισχιακές πλάκες (γαλάζιο) και μερικός μετασχηματισμός κεραίας (βέλος). Η κεραία εμφανίζει μερικό μετασχηματισμό των τμημάτων της με αποτέλεσμα να θυμίζει θωρακικό άκρο.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ PhUBX-I ΚΑΙ PhUBX-II ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΑΚΡΩΝ ΣΤΟ *P.hawaiensis*

Η χρήση μωσαϊκών εμβρύων, για την ανάλυση της λειτουργίας του Ubx στο αμφίποδο, σίγουρα προσθέτει θόρυβο στα αποτελέσματά μας. Κάθε έμβρυο εξάλλου αποτελεί ένα ξεχωριστό συμβάν πολλαπλών, τυχαίων ενθέσεων της κατασκευής έκφρασης. Ωστόσο, ο μεγάλος αριθμός του πειραματικού μας δείγματος μας επιτρέπει να αντισταθμίσουμε τις επιπτώσεις του μωσαϊκισμού και των διαφορετικών επιπέδων έκφρασης του Ubx μεταξύ των εμβρύων.

Η ειδικότητα των φαινοτύπων που παρατηρήθηκαν είναι σαφής για πολλούς λόγους. Πρώτον, κανένας ομοιωτικός μετασχηματισμός δεν παρατηρήθηκε σε ενεμένα έμβρυα (508) που αναπτύχθηκαν χωρίς θερμικά σοκ. Αντίστοιχα, διαγονιδιακά άτομα που φέρουν το γονίδιο της DsRed κάτω από τον θερμοεπαγόμενο υποκινητή hsp70a2R1, δεν εμφάνισαν κανένα μετασχηματισμό μετά από πολλαπλά θερμικά σοκ κατά την ανάπτυξη. Δεύτερον, η μονόπλευρη έκφραση του εκτοπικού Ubx μας επιτρέπει να χρησιμοποιήσουμε την αγρίου τύπου πλευρά του εμβρύου για εσωτερικό αρνητικό έλεγχο των μετασχηματισμών μας. Τέλος, η συχνότητα εμφάνισης του κάθε φαινοτύπου σχετίζεται με την ευαισθησία του κάθε χαρακτηριστικού στην επίδραση του Ubx. Έτσι, χαρακτηριστικά όπως οι ραχιακές και ισχιακές πλάκες, που εμφανίζονται σε μεταμερίδια με χαμηλά επίπεδα Ubx (από το δεύτερο θωρακικό και πίσω), παρατηρήθηκαν σε συγκρίσιμα ποσοστά μεταξύ τους (71 και 64 περιπτώσεις αντίστοιχα). Από την άλλη, χαρακτηριστικά που παρατηρούνται σε πιο οπίσθια μεταμερίδια όπως τα βράγχια, που αναπτύσσονται κάτω από υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του Ubx (από το τρίτο θωρακικό και πίσω), ήταν σαφώς πιο σπάνια μεταξύ των μετασχηματισμών που αναλύθηκαν (27 μόνο περιπτώσεις).

Συγκεντρωτικά, τα αποτελέσματα των πειραμάτων εκτοπικής έκφρασης των Ph-Ubx-I και Ph-Ubx-II δείχνουν ξεκάθαρα πως η παρουσία ή απουσία του Ubx καθώς και τα επίπεδα έκφρασής του, ελέγχουν διάφορα χαρακτηριστικά των αναπτυσσόμενων άκρων στο αμφίποδο *Parhyale hawaiensis*. Εκτός από τον καθορισμό των βαδιστικών ποδιών (τύπου T4), το Ubx φαίνεται να συμμετέχει στον καθορισμό της μορφολογίας των γναθοποδίων T2-T3, που χρησιμοποιούνται κυρίως στην άμυνα και την αναπαραγωγή/σύζευξη. Η διαφοροποίηση μεταξύ των δύο αυτών τύπων άκρων (γναθοποδίων και βαδιστικών) μπορεί να οφείλεται στην μειωμένη έκφραση του Ubx στα μεταμερίδια T2-T3. Η παραπέρα διαφοροποίηση μεταξύ T2 και T3 πιθανότατα σχετίζεται με την χαμηλότερη έκφραση του Ubx στο T2 (σε σχέση με το T3) αργότερα κατά την εμβρυογένεση (Liubicich, Serano et al. 2009). Τέλος, άλλα μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως τα βράγχια, κι οι ισχιακές και

ραχιαίες πλάκες συμπληρώνουν ένα σύνολο θωρακικών γνωρισμάτων που βρίσκονται υπό τον έλεγχο του Ubx και το ορίζουν ως προαγωγό θωρακικής ταυτότητας στα καρκινοειδή.

ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΟΜΟΙΩΤΙΚΩΝ

Με αφορμή τον αναπάντεχο μετασχηματισμό της *mxII* σε *mxr*, μελετήσαμε την πιθανή ρύθμιση του Scr από το Ubx. Τα δύο αυτά ομοιωτικά, εκφράζονται σε μη επικαλυπτόμενες περιοχές, από το πρώτο γναθικό (*mxI*) για το Scr μέχρι το τελευταίο θωρακικό (T8) για το Ubx, με σύνορα το πρώτο και δεύτερο θωρακικό μεταμερίδιο. Η διαθεσιμότητα των εργαλείων εκτοπικής υπερέκφρασης, μας επέτρεψε τον άμεσο έλεγχο της επίδρασης του εκτοπικού Ubx στην έκφραση του Scr.

Επάγοντας την έκφραση του Ubx σε μωσαϊκά έμβρυα, ελέγξαμε το πρότυπο έκφρασης του Scr σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα μετά την επαγωγή και αποκαλύψαμε σημαντικά στοιχεία για την σχέση των δύο αυτών ομοιωτικών. Καταρχήν, η ισχυρή μονόπλευρη καταστολή του Scr στα μωσαϊκά έμβρυα υποδεικνύει την αρνητική ρύθμισή του από το Ubx. Δεύτερον, η εμφάνιση της καταστολής αυτής αμέσως μετά το θερμικό σοκ (σε κάποιες περιπτώσεις έγινε ανάλυση αμέσως μετά από 4hr θερμικό σοκ) υποδηλώνει πως μάλλον το Scr αποτελεί άμεσο στόχο του Ubx. Τέλος, το γεγονός ότι κάποια έμβρυα παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα Scr ακόμα και υπο οριακά ανιχνεύσιμη έκφραση του Ubx, μας οδηγεί να υποθέσουμε πως το Scr είναι ευαίσθητος στόχος του Ubx. Το σημείο αυτό υποστηρίζεται και από το υψηλό ποσοστό μετασχηματισμών *mxII* προς *mxr* μεταξύ των μωσαϊκών εμβρύων, καθώς και την παρατήρηση πως ο μετασχηματισμός αυτός ήταν, μαζί με τις εκτοπικές ισχιακές πλάκες, οι μόνοι φαινότυποι που παρατηρήσαμε από την επαγωγή του Ubx σε σταθερά μετασχηματισμένα διαγονιδιακά ζώα, όπου τα επίπεδα έκφρασης ήταν χαμηλά.

Η άμεση ρύθμιση του Scr από το Ubx είναι γνωστή εδώ και αρκετό καιρό στην δροσόφιλα (Struhl 1982) και αποτελεί παράδειγμα μηχανισμού οπίσθιας επικράτησης. Τα αποτελέσματά μας αποτελούν το πρώτο δείγμα αυτής της σχέσης στα καρκινοειδή και αναδεικνύουν κάποιες από τις πολλές δυνατότητες που ανοίγονται με τα νέα γενετικά εργαλεία στο αμφίποδο *Parhyale hawaiensis*.

ΟΜΟΙΩΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ

Εκτός από τις πληροφορίες που προσφέρουν για τη λειτουργία του Ubx στο αμφίποδο, τα πειράματά μας αποτελούν και την πρώτη πλήρη μελέτη ενός γονιδίου σε αντιπρόσωπο των καρκινοειδών. Τα πειράματα αυτά επιτρέπουν την εξαγωγή

ασφαλέστερων συμπερασμάτων για τον εξελικτικό ρόλο του Ubx καθώς και για κάποιους γενικότερους μηχανισμούς εξέλιξης της μορφολογίας στην φύση.

Πρώτον, παρουσιάζεται με λεπτομέρεια η ικανότητα του Ubx να μετασχηματίζει τα maxillipeds σε θωρακικά άκρα πιο οπίσθιας μορφολογίας και λειτουργίας. Επιβεβαιώνεται έτσι η άποψη πως υποχώρηση της έκφρασής του από τα πρώτα θωρακικά μεταμερίδια (1, 2 ή και 3 σε κάποιες ομάδες) μπορεί να έχει συνεισφέρει στην εξέλιξη των maxillipeds στα καρκινοειδή.

Δεύτερον, αποδεικνύεται η κατασταλτική δράση του Ubx στο Scr και η δυνατότητα σχηματισμού maxilliped παρουσία Ubx. Η καταστολή αυτή του Scr στην δεύτερη maxilla δημιουργεί εμμέσως συνθήκες κατάλληλες για το σχηματισμό της μορφολογίας του maxilliped, υποδεικνύοντας πως η παρουσία του Ubx σε χαμηλά επίπεδα δεν είναι απαγορευτική. Αυτό επαναπροσδιορίζει κάπως την άποψη πως τα maxillipeds είναι ασύμβατα με το Ubx και ενισχύει την άποψη πως αποτελούν μια υβριδική μορφολογία που συνδυάζει γναθικά και θωρακικά στοιχεία που μπορεί να επιτευχθεί με διαφορετικούς τρόπους.

Τέλος, ο μεγάλος αριθμός των ενεμένων ζώων, επέτρεψε την κατάταξη των φαινοτύπων με βάση την ένταση/σοβαρότητά τους, δίνοντας αρκετούς ενδιάμεσους μετασχηματισμούς, μεταξύ της μορφολογίας του maxilliped και των T2-T4 άκρων. Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με αποτελέσματα από πειράματα καταστολής του Ubx στον ίδιο οργανισμό, υποδεικνύουν πως το αναπτυξιακό πρόγραμμα του αμφιπόδου μπορεί να αποκριθεί σε μικρές αλλαγές στην έκφραση του Ubx, και ενδεχομένως άλλων ομοιωτικών (πχ Scr), παράγοντας νέους τύπους άκρων/εξαρτημάτων. Γενικεύοντας έναν τέτοιο μηχανισμό και για άλλα καρκινοειδή, μπορούμε να εξηγήσουμε τη σταδιακή εξέλιξη άκρων με χαρακτηριστικά όπως αυτά που βλέπουμε στα maxillipeds σήμερα χωρίς ενδιάμεσα “hopeful monsters”.

(ΜΗ) ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΤΟΥ Distal-less ΣΤΟ ΑΜΦΙΠΟΔΟ

Τα πειράματα εκτοπικής έκφρασης του DmUbx δείχνουν ότι, κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες (επίπεδα έκφρασης) η πρωτεΐνη DmUbx δεν έχει την ικανότητα να καταστείλει τη έκφραση στοθ Dista-less στο αμφίποδο. Η εμφάνιση φαινοτύπων παρόμοιων με αυτούς στα πειράματα εκτοπικής έκφρασης του PhUbx υποδεικνύουν την παραγωγή λειτουργικής πρωτεΐνης για το DmUbx. Ωστόσο, η έλλειψη της ανασταλτικής περιοχής S/TP και η παρουσία της περιοχής QA στην πρωτεΐνη Ubx δεν φαίνονται ικανές να προάγουν την καταστολή του distal-less στο αμφίποδο.

Αυτό μπορεί να συμβαίνει για δύο κυρίως λόγους. Πρώτον, τα ρυθμιστικά στοιχεία του Dll στο αμφίποδο δεν είναι ευαίσθητα στην καταστολή από Ubx (δεν έχουν αντίστοιχες

θέσεις πρόσδεσης όπως το Dll304 στη δροσόφιλα). Η εμφάνιση αυτής της καταστολής στον κλάδο των εντόμων έχει εξάλλου προταθεί για την εξέλιξη της εξάποδης σωματοδομής. Δεύτερον, άλλοι πρωτεϊνικοί παράγοντες που αλληλεπιδρούν με το Ubx και συμμετέχουν στην καταστολή του *distal-less* στη δροσόφιλα μπορεί να απουσιάζουν στο αμφίποδο. Σε αυτή τη περίπτωση, η διαφοροποίηση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας στο DmUbx μπορεί να αποτελεί προϊόν συνεξέλιξης της με αυτούς τους συμπάγοντες για την καλύτερη και αποτελεσματικότερη καταστολή του *distal-less*.

Επιπλέον, δείχνεται για ακόμη μια φορά, η συντηρημένη λειτουργία μιας πρωτεΐνης όπως το Ubx, σε απομακρυσμένα είδη. Το γενετικό πρόγραμμα που ενεργοποιείται από το PhUbx στο αμφίποδο μπορεί να ενεργοποιηθεί και από το DmUbx σε μεγάλο βαθμό. Ειδικότερα, ο κοινός “αναπάντεχος” φαινότυπος του μετασχηματισμού *mx2* προς *mxr*, για τον οποίο προτείναμε την προαγωγή του μέσω της καταστολής του *Scr* από το Ubx σε αυτό το μεταμερίδιο, υποδεικνύει πως το DmUbx διατηρεί την ικανότητα καταστολής του *Scr* στο αμφίποδο.

Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτά μας υπενθυμίζουν την μικρή συνεισφορά των πρωτεϊνικών έναντι των ρυθμιστικών αλλαγών στην εμφάνιση νέων χαρακτηριστικών και την εξέλιξη της μορφολογίας των ειδών. Εξάλλου, η αδυναμία του DmUbx να καθορίσει το σύνολο των θωρακικών δομών στο αμφίποδο, μπορεί να οφείλεται και στις πρωτεϊνικές διαφορές μεταξύ των δύο ορθολόγων (DmUbx και PhUbx). Παρότι τέτοιες διαφοροποιήσεις στην πρωτεϊνική αλληλουχία δεν αποκλείεται να συνυπάρχουν με *cis*-ρυθμιστικές αλλαγές, ο ρόλος τους φαίνεται να καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από την ικανότητα των υποκείμενων γονιδίων να αποκριθούν ομαλά σε αυτές τις αλλαγές.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΜΒΡΥΩΝ *Parhyale* ΓΙΑ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΜΕ ΤΟ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ FP6.87

Για την μελέτη της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα UBX χρησιμοποιήσαμε το μονοκλωνικό αντίσωμα FP6.87, που αναγνωρίζει ένα συντηρημένο επίτοπο στην ομοιωτική περιοχή των UBX και ABDA. Η προετοιμασία των εμβρύων για ανοσοϊστοχημεία περιλαμβάνει την αφαίρεση των μεμβρανών που εμποδίζουν την εισχώριση του αντισώματος και την μονιμοποίηση του ιστού για την διατήρηση της μορφολογίας του. Επειδή το αντίσωμα FP6.87 δίνει καλύτερα αποτελέσματα σε ελαφρώς μονιμοποιημένο ιστό (10-15 λεπτά μονιμοποίηση σε 4% φορμαλδεύδη), διαχωρίζουμε και προετοιμάζουμε τα έμβρυα σε σταγόνες διαλύματος μονιμοποίησης ανα τρία. Η όλη διαδικασία γίνεται πάνω σε τρυβλίο πετρί με επιφάνεια σιλικόνης (SYLGARD®) για την προστασία των πολύ λεπτών και ευαίσθητων εργαλείων που χρησιμοποιούνται.

Για κάθε σταγόνα, αντικαθιστούμε το αλατόνερο με διάλυμα μονιμοποίησης (4% φορμαλδεύδη σε αλατόνερο). Με την μια βελόνα ακινητοποιούμε το έμβρυο ενώ με την άλλη τρυπάμε ραχιαία, στην περιοχή του εντέρου ακριβώς πίσω από το κεφάλι έτσι ώστε να απελευθερωθεί λέκιθος. Επαναλαμβάνουμε για όλα τα έμβρυα της σταγόνας και αφήνουμε στο διάλυμα μονιμοποίησης περίπου ένα με δύο λεπτά. Αυτό το σημείο είναι ιδιαίτερα σημαντικό ώστε να αρχίσει η μονιμοποίηση του ευαίσθητου εμβρυϊκού ιστού διασφαλίζοντας την ακεραιότητά του στην συνέχεια της διαδικασίας.

Στην συνέχεια, αφαιρούμε προσεκτικά την μεμβράνη με αργές κινήσεις έτσι ώστε να αποκαλυφτεί όλο το έμβρυο και συγκεντρώνουμε τα έτοιμα έμβρυα σε διάλυμα PTx. Η όλη διαδικασία πρέπει να ολοκληρωθεί σε 10 με 15 λεπτά ανα σταγόνα.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΜΒΡΥΩΝ *Parhyale* ΓΙΑ IN SITU ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΪΚΑ ΟΞΕΑ

Μαζεύουμε έμβρυα κατάλληλου σταδίου σε ένα σωληνάριο των 2ml και ξεπλένουμε τρεις φορές με απιονισμένο νερό. Αφαιρούμε όσο το δυνατό περισσότερο νερό και προσθέτουμε 2ml διάλυμα 4% φορμαλδεύδης σε απιονισμένο νερό (που προηγουμένως έχουμε κρυσάσει στον πάγο) για μονιμοποίηση στους 4°C με οριζόντια ανάδευση για όλο το βράδυ (O/N).

Ξεπλένουμε τρεις φορές το διάλυμα μονιμοποίησης με 1x PBS και αφήνουμε σε οριζόντια ανάδευση για τουλάχιστον 6 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Αντικαθιστούμε με

φρέσκο PBS και ελέγχουμε στο στερεοσκόπιο. Αν οι μεμβράνες δεν έχουν αποκολληθεί από τα έμβρυα, αφήνουμε σε PBS για όλο το βράδυ.

Διαφορετικά, τοποθετούμε τα έμβρυα σε δοχείο πετρί με επιφάνεια σιλικόνης και αφαιρούμε προσεκτικά τις μεμβράνες χρησιμοποιώντας λεπτές βελόνες βολφραμίου.

Αφού συλλέξουμε τα έμβρυα σε ένα σωληνάριο 2ml ακολουθεί μονιμοποίηση με μεθανόλη. Αντικαθιστούμε σταδιακά το PBS ξεπλένοντας με διαλύματα 50%, 70%, 90% και τέλος 100% μεθανόλης. Στην 100% μεθανόλη ανακινούμε τα δείγματα με το χέρι πολύ προσεκτικά και αφού αντικαταστήσουμε με φρέσκια 100% μεθανόλη, αποθηκεύουμε στους -20°C μέχρι το πείραμα (μπορούν για διατηρηθούν σε αυτή τη μορφή για πολλούς μήνες).

ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΣΕ ΕΜΒΡΥΑ *Parhyale hawaiiensis* ΜΕ ΤΟ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ FP6.87

ΜΕΡΑ 1η

10-20 έμβρυα μεταφέρονται προσεκτικά σε tube των 2ml μέσα σε διάλυμα PTx.

Γίνεται επώαση για 30 με 60 λεπτά σε διάλυμα PTx + 5% NGS (Normal Goat Serum) στους 4°C σε τελικό όγκο 150-200μl και κατόπιν αντικατάσταση με το αντίσωμα FP6.87 (διαλυμένο σε PTx + 5% NGS σε συγκέντρωση 1/20) και επώαση στους 4°C για περίπου 16 ώρες (O/N).

ΜΕΡΑ 2η

Αφαιρούμε και αποθηκεύουμε το αντίσωμα (μπορεί να ξαναχρησιμοποιηθεί αρκετές φορές) και πλένουμε με 2ml PTx (με όρθια ανάδευση) για 30 λεπτά. Επαναλαμβάνουμε το πλύσιμο 3 φορές. Γίνεται επώαση σε διάλυμα PTx + 5% NGS για 30 με 60 λεπτά στους 4°C σε τελικό όγκο 150μl και κατόπιν προστίθεται 50μl PTx + 5% NGS με αντίσωμα a-mouse HRP ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1/500 και επώαζουμε στους 4°C για περίπου 16 ώρες (O/N).

ΜΕΡΑ 3η

Πλένουμε με 2ml PTx (με όρθια ανάδευση) για 30 λεπτά (επαναλαμβάνουμε 3 φορές) και εμφανίζουμε.

ΕΜΦΑΝΙΣΗ

-Αντικαθιστούμε με 300μl διάλυμα DAB (0.3μg/μl DAB σε PTw)

-Προσθέτουμε 15μl διαλύματος 1% χλωριούχου λιθίου (NiCl) και αναδεύουμε ελαφρά

-Προσθέτουμε 15μl φρέσκου διαλύματος 0.3% υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και εμφανίζουμε στο σκοτάδι 5-15 λεπτά.

Ελέγχουμε τακτικά στο στερεοσκόπιο και σταματάμε την αντίδραση με PTx.

Κατόπιν πλένουμε καλά με ΡΤx και αφήνουμε Ο/Ν στους 4°C.

IN SITU ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΪΚΑ ΟΞΕΑ ΣΕ ΕΜΒΡΥΑ *Parhyale hawaiiensis*

ΜΕΡΑ 1η

Διαλέγουμε τα στάδια των εμβρύων που θα χρειαστούμε (αποθηκευμένα στους -20°C σε μεθανόλη) και αντικαθιστούμε σταδιακά την 100% μεθανόλη με ΡΤw. Περνάμε τα δείγματα μας σε σειρά από 70%, 50% και 30% μεθανόλη σε ΡΤw και έπειτα ξεπλένουμε δύο φορές με ΡΤw.

Μονιμοποιούμε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα 4% φορμαλδεύδης σε ΡΤw, ξεπλένουμε 2 φορές και πλένουμε 2x 10 λεπτά με ΡΤw.

Αντικαθιστούμε με 500μl διάλυμα απορρυπαντικού και επωάζουμε για 30 περίπου λεπτά. Ο χρόνος εδώ εξαρτάται από το στάδιο των εμβρύων. Πρώιμα στάδια (<S18) χρειάζονται λιγότερο χρόνο αλλιώς θα διαλυθούν από το απορρυπαντικό.

Ξεπλένουμε δύο φορές και πλένουμε τέσσερις φορές (από 10 λεπτά) με ΡΤw και μεταφέρουμε σε ειδικά καλάθια μέσα σε τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας με 12 θέσεις. Χρησιμοποιούμε τόσα καλάθια όσος ο αριθμός των διαφορετικών συνδυασμών ανιχνευτών που θα χρησιμοποιήσουμε (περίπου 20-30 έμβρυα ανα καλάθι).

Η αλλαγή των διαλυμάτων γίνεται ως εξής: Έχοντας προσθέσει 1.5ml διαλύματος στην επόμενη θέση του τρυβλίου, αφαιρούμε το μισό (750μl) με μια πιπέτα, μεταφέρουμε το καλάθι στη καινούργια θέση και προσθέτουμε το διάλυμα σιγά σιγά στα τοιχώματα περιστρέφοντας το καλάθι για να αποφευχθεί προσκόλληση εμβρύων στο πλαστικό.

Πλένουμε 10 λεπτά με διάλυμα 50% διάλυμα υβριδισμού (Hyb)/50% ΡΤw και κατόπιν 10 λεπτά Hyb.

Επωάζουμε σε φρέσκο διάλυμα υβριδισμού για τουλάχιστον 3 ώρες στους 65°C.

Επιλέγουμε τον ριβονουκλεϊκό ανιχνευτή μας (διαλυμένος σε συγκέντρωση 100ng/μl σε Hyb) και τον επωάζουμε στους 37-42°C για 10 λεπτά. Φυγοκεντρούμε ελαφρά και διαλύουμε σε τελική συγκέντρωση 0.1-10ng/μl (ανάλογα με τον ανιχνευτή) σε 1.5ml Hyb. Αποδιατάσσουμε στους 80-90°C για 20 λεπτά και μοιράζουμε σε κενές θέσεις στο τριβλίο. Μεταφέρουμε τα έμβρυα στην θέση με τον ανιχνευτή και επωάζουμε στους 65°C για 30-40 ώρες.

ΜΕΡΑ 3η

Πλένουμε τα δείγματά μας για 3 περίπου ώρες (3 φορές από 20 λεπτά και 4 φορές από 30 λεπτά) με προθερμασμένο Hyb στους 65°C και μετέπειτα 2 φορές (5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.

Αντικαθιστούμε το Hyb σταδιακά με TBST κάνοντας 3 μισές πλύσεις με TBST (κάθε φορά 50% από το προηγούμενο διάλυμα και 50% TBST) σε διάστημα 20 λεπτών και μετά 3 πλύσεις TBST από 20 λεπτά.

Επωάζουμε στους 4°C με TBST + 0.1% BSA για 60 λεπτά και κατόπιν μεταφέρουμε στο αντίσωμα και επωάζουμε στους 4°C για όλο το βράδυ.

MEPA 4η

Πλένουμε 4 φορές από 30 λεπτά και μια φορά 60 λεπτά TBST. Στην συνέχεια κάνουμε τρεις γρήγορες πλύσεις (5 λεπτά η κάθε μια) με φρέσκο διάλυμα αντίδρασης της αλκαλικής φωσφατάσης (AP buffer) και ετοιμάζουμε το αντιδραστήριο BCIP/NBT.

Μεταφέρουμε στο αντιδραστήριο και εμφανίζουμε στο σκοτάδι. Ελέγχουμε για σήμα μετά από 15 με 30 λεπτά στο στερεοσκόπιο. Η αντίδραση μπορεί να διαρκέσει μέχρι 4 ώρες. Αν θέλουμε να την συνεχίσουμε για περισσότερο, μεταφέρουμε σε νέο αντιδραστήριο. Για πολύ ασθενές σήμα μπορούμε να αφήσουμε την εμφάνιση για όλο το βράδυ στους 4°C.

Σταματάμε με πλύσεις TBST (2 ξεπλύματα και 2 δεκάλεπτα πλυσηματα είναι συνήθως αρκετά).

Άμα έχουμε και δεύτερο ανιχνευτή στο ίδιο δείγμα (διπλή ανίχνευση) και χρησιμοποιούμε πάλι αντίσωμα με ενεργότητα αλκαλικής φωσφατάσης, πρέπει να απενεργοποιήσουμε/ξεπλύνουμε το πρώτο.

ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

Ξεπλένουμε μια φορά και πλένουμε για 10 λεπτά σε διάλυμα γλυκίνης και ξαναφέρνουμε σε διάλυμα TBST με 3 γρήγορες πλύσεις (από 5 λεπτά).

Κατόπιν επωάζουμε με TBST + 0.1% BSA και προσθέτουμε το δεύτερο αντίσωμα.

ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΕΜΒΡΥΩΝ

Για την καλλιέργεια και διατήρηση των εμβρύων, χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένα τρυβλία της εταιρίας Nunc (Nuncion™ Δ Surface) που έχουν επικαλυμμένη επιφάνεια για να μειώνουν την πιθανότητα προσκόλλησης των εμβρύων. Η απομόνωση και συλλογή των εμβρύων για ένεση γινόταν σε μεγάλα τρυβλία (60x15mm) ενώ για μικρότερες ομάδες εμβρύων από μοναδικές θυληκές καθώς και για έμβρυα μετά από ένεση χρησιμοποιήθηκαν μικρά τρυβλία (35x10mm).

Σε κάθε περίπτωση χειρισμού εμβρύων χρησιμοποιούταν τεχνητό αλατόνερο, το οποίο είχε προηγουμένως φιλτραριστεί.

Στα ενεμένα έμβρυα, χρησιμοποιούταν προληπτικά μείγμα αντιβιοτικού (GIBCO® Penicillin/Streptomycin, liquid Cat.No. 15140-122) και αντιμυκητιακού (GIBCO® Fungizone® Antimycotic, liquid Cat.No.15290-018) της εταιρίας Invitrogen σε αραιώση 1/100 (τελική συγκέντρωση 100u/ml) και 1/200 (τελική συγκέντρωση 1.25μg/ml) αντίστοιχα.

ΑΝΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΖΩΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΜΒΡΥΩΝ

Για την αναισθητοποίηση των ζώων χρησιμοποιήθηκε διοξίδιο του άνθρακα. Σε ένα πετρί με φιλτραρισμένο τεχνητό αλατόνερο εισάγουμε μέσω της παροχής διοξειδίου του άνθρακα αέριο για διάστημα περίπου 20 δευτερόλεπτων. Τοποθετώντας τα ζώα μέσα, αναισθητοποιούνται μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα.

Εναλλακτικά, τα ζώα τοποθετούνται σε αλατόνερο με 0.04% γαρυφαλέλαιο (HUMCO Clove Oil) για αναισθητοποίηση, ξεπλένονται με αλατόνερο και ακολουθεί ο κατάλληλος χειρισμός τους (απομόνωση εμβρύων, παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθωρισμού κλπ).

Οι θηλυκές που φέρουν έμβρυα, αφού αναισθητοποιηθούν, μεταφέρονται σε τρυβλίο με φιλτραρισμένο αλατόνερο όπου κάτω από το στερεοσκόπιο με την χρήση λαβίδων γίνεται προσεκτικά η απομόνωση των εμβρύων.

ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ

Πλασμίδιο pBS MiL-attB-hsp70a2R1-eGFP-SV40 (attB1 και attB6)

Αντικαταστήσαμε την DsRed στο πλασμίδιο pSL hsp70a2R1-DsRed-SV40 με την eGFP του πλασμιδίου pMi 3xP3-eGFP-SV40 χρησιμοποιώντας τα ένζυμα NcoI και NotI (pSL hsp70a2R1-eGFP-SV40).

Αφαιρέσαμε το δεξί άκρο του Μίνωα (MiR) από το πλασμίδιο pMi 3xP3-DsRed T1 μετα από πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα AvrII και NheI, διαχωρισμό τους σε πήκτη αγαρόζης και επανασύνδεση του απομονωμένου πλασμιδίου (pBS MiL-3xP3-DsRed-SV40).

Με πέψη με τα ένζυμα SgrBI και NotI αντικαταστήσαμε την DsRed του pBS MiL-3xP3-DsRed-SV40 με το hsp70a2R1-eGFP από το pSL hsp70a2R1-DsRed-SV40 (pBS MiL-3xP3-hsp70a2R1-eGFP-SV40).

Αντικαθιστώντας την 3xP3 του pBS MiL-3xP3-hsp70a2R1-eGFP-SV40 με το attB του pTA attB (ένζυμο Sall) παίρνουμε το πλασμίδιο pBS MiL-attB-hsp70a2R1-eGFP-SV40 σε δύο διαμορφώσεις (attB1 και attB6) ανάλογα με τον προσανατολισμό του attB (βλ. ΣΧΗΜΑ 15 και ΣΧΗΜΑ 11).

Πλασμίδιο pBS MiL-attB-hsp70a2R1-eGFP-SV40 Δ Splice Donor (attBX)

Αφαιρέσαμε το τμήμα του υποκινητή hsp70a2R1 που φέρει τον δότη ματίσματος κόβοντας το πλασμίδιο pBS MiL-attB-hsp70a2R1-eGFP-SV40 με τα περιοριστικά ένζυμα NruI και SpeI. Μετά από απομόνωση του πλασμιδίου από πήκτωμα αγαρόζης, έγινε γέμισμα των 5' μονόκλωνων άκρων (της θέσης SpeI) με πολυμεράση Klenow και επανασύνδεση του πλασμιδίου.

Πλασμίδιο pBS MiL-attB-hsp70a-eGFP-SV40 (attB8)

Το τμήμα hsp70a απομονώθηκε από το πλασμίδιο pMi 3xP3 DsRed SV40 attP hsp70a DsRed SV40 με διαδοχικές πέψεις με τα περιοριστικά ένζυμα SmaI και NcoI. Μετά την ευθυγράμμιση του πλασμιδίου pMi 3xP3 DsRed SV40 attP hsp70a DsRed SV40 (T2) και τον καθαρισμό του με κολώνα Nucleospin ExtractII, έγινε μερική πέψη με NcoI και απομόνωση της ζώνης 1434 βάσεων (τμήμα hsp70a) από πήκτωμα αγαρόζης.

Χρησιμοποιώντας τα ίδια ένζυμα (SmaI και NcoI) αντικαταστήσαμε το θερμοεπαγόμενο στοιχείο hsp70a2R1 στο το πλασμίδιο pBS MiL-attB-hsp70a2R1-eGFP-SV40 και κατασκευάσαμε το pBS MiL-attB-hsp70a-eGFP-SV40 (attB8).

Προετοιμασία capped mRNA

Για την σύνθεση capped mRNA χρησιμοποιήθηκε το κιτ T7 mMessage-mMachine της εταιρίας Ambion. Για κάθε αντίδραση (20μl) χρησιμοποιήθηκε περίπου 1γ ευθυγραμμισμένου πλασμιδίου (pET11 PhiC31int-polyA με BamHI και NotI για την ιντεργκράση και την τρανσποζάση αντίστοιχα). Μετά την αντίδραση ακολουθούσε επώαση 15 λεπτών με DNaseI στους 37°C, διπλή εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο, κατακρήμνιση με ισο όγκο ισοπροπανόλης (τελικός όγκος περίπου 250μl) και αποθήκευση στους -20°C.

Για την προετοιμασία του μείγματος προς ένεση γινόταν φυγοκέντριση 20μl στους 4°C για 30 λεπτά, και μετά από πεντάλεπτη πλύση με 70% αιθανόλη, επαναδιάλυση σε 6,5μl ddH₂O. 1,5μl από αυτά χρησιμοποιούνταν για τον καθορισμό της συγκέντρωσης σε φωτόμετρο nanodrop ND-100.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (total RNA) ΑΠΟ ΕΜΒΡΥΑ *Parhyale hawaiiensis*

Η απομόνωση ριβονουκλεϊκών οξέων έγινε με TRI Reagent της Ambion ακολούθως:

(20-350 έμβρυα)

Μαζεύουμε το υλικό σε ένα tube των 1.5ml και αφαιρούμε όσο περισσότερο νερό μπορούμε. Κατόπιν προσθέτουμε 150μl TRI Reagent και ομογενοποιούμε καλά για ένα περίπου λεπτό. Προσθέτουμε άλλα 150μl TRI Reagent και αφού ολοκληρώσουμε την ομογενοποίηση, αναδεύουμε έντονα για περίπου ένα λεπτό.

Σε αυτο το σημείο, εάν θέλουμε μπορούμε να παγώσουμε το δείγμα σε λουτρό ξηρού πάγου και να το αποθηκεύσουμε στους -80°C.

Προσθέτουμε 1/5 (60ul) του όγκου χλωροφόρμιο, αναδεύουμε έντονα και φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στους 4°C (μεταφέρουμε το υπερκείμενο προσεκτικά σε καθαρό erpendorf). Επαναλαμβάνουμε αν στο υπερκείμενο έχουν μεταφερθεί και αδιάλυτες ουσίες. Προσθέτουμε στο καθαρό υπερκείμενο 1/2 (150μl) του αρχικού όγκου ισοπροπανόλη και αναμιγνύουμε καλά (μπορούμε να κρατήσουμε σε ισοπροπανόλη στους -20°C για αρκετό καιρό). Για την κατακρύμνηση, φυγοκεντρούμε για 30 λεπτά στους 4°C, πλένουμε με 100ul nuclease free 70% αιθανόλη και αφού στεγνώσουμε στεγνώνουμε την πελέτα, επαναδιαλύουμε σε 10ul nuclease free ddH₂O.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ (DNA) ΑΠΟ ΕΜΒΡΥΑ *Parhyale hawaiiensis*

(20-30 έμβρυα ή ένα ενήλικο)

Συλλέγουμε το υλικό σε ένα tube των 1.5ml και αφαιρούμε όσο περισσότερο νερό μπορούμε (Σε αυτό το σημείο μπορούμε να παγώσουμε το υλικό και να το διατηρήσουμε στους -80°C).

Προσθέτουμε 150μl buffer A (100mM Tris-HCl, pH 7.5, 100mM EDTA, 100mM NaCl, 0.5% SDS) και ομογενοποιούμε καλά για ένα περίπου λεπτό. Κατόπιν, προσθέτουμε άλλα 150μl buffer A και συνεχίζουμε την ομογενοποίηση. Μετά από επώαση στους 65°C για 30 λεπτά, προσθέτουμε 600μl 5M οξικό κάλιο (potassium acetate) και αφήνουμε στον πάγο για 10 λεπτά. Φυγοκεντρούμε 15 λεπτά στους 4°C, μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καθαρό tube και αφού προσθέσουμε 400μl ισοπροπανόλη κατακρυμνίζουμε με φυγοκέντριση για 15 λεπτά στους 4°C. (μπορούμε να κρατήσουμε σε ισοπροπανόλη στους -20°C για αρκετό καιρό).

Στην συνέχεια, πλένουμε με 70% αιθανόλη, στεγνώνουμε την πελέτα και επαναδιαλύουμε σε 80μl ddH₂O.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (ΜΕΘΟΔΟΣ HOLMES-BONNER)

Ομογενοποιούμε τον ιστό σε 100μl Holmes-Bonner (100mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM EDTA, 300mM NaCl, 2% SDS, 7M ουρία). Προσθέτουμε ακόμα 100μl Holmes-Bonner και 200μl φαινόλη/χλωροφόρμιο και ανακινούμε ελαφρά για 10 λεπτά. Έπειτα, φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καθαρό tube. Επαναλαμβάνουμε 3 φορές εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρυμνίζουμε με 100% αιθανόλη. Πλένουμε την πελέτα δύο φορές με 70% αιθανόλη και μετά το στέγνωμα επαναδιαλύουμε σε 20μl ddH₂O.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΥΛΙΚΟΥ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΣΑΡΩΣΗΣ

Μονιμοποιούμε το υλικό με διάλυμα 1% γλουτεραλδεύδης (σε αλατόνερο) για περίπου μία ώρα με ελάχιστη κάθετη ανακίνηση.

Ξεπλένουμε τρεις φορές με διάλυμα αλατόνερου και μονιμοποιούμε με διάλυμα 1% τετραοξειδίου του οσμίου για τουλάχιστον μια ώρα.

Ξεπλένουμε τρεις φορές με διάλυμα αλατόνερου, και μετά από δεκάλεπτη πλύση με αλατόνερο ξεκινάμε την σταδιακή αφυδάτωση του δείγματος με αιθανόλη.

Κάνουμε τρεις πλύσεις (από 30 λεπτά) με 50%, 70% και 90% αιθανόλη και μετά από δύο πλύσεις 100% αιθανόλη αποθηκεύουμε στους -20°C.

Ακολουθεί στέγνωμα των δειγμάτων σε critical point dryer και τοποθέτησή τους με την κατάλληλη κατεύθυνση πάνω σε ειδική αυτοκόλλητη ταινία διπλής όψης. Μετά από επικάλυψη με χρυσό ή πλατίνα, τα δείγματα είναι έτοιμα για απεικόνιση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΜΙΚΡΗ ΚΛΙΜΑΚΑ (MINI PREP)

Βακτηριακή καλλιέργεια LB 3ml επώαζεται στους 37°C με ανάδευση για 12-16 ώρες. Τα βακτήρια συλλέγονται με φυγοκέντρωση (1 λεπτό, μέγιστη ταχύτητα) και μετά από αφαίρεση του υπερκείμενου θρεπτικού, επαναδιαλύονται σε 100μl Solution 1 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA,). Ακολουθεί αλκαλική λύση με τη προσθήκη 100μl Solution 2 (1% SDS, 0.2 M NaOH) και ελαφρά ανάδευση και απενεργοποίηση με 150μl Solution 3 (3.0 M potassium acetate, pH 5.5). Μετά από πεντάλεπτη επώαση στο πάγο, ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα, μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό eppendorf και κατακρίμνηση με ίσο όγκο ισοπροπανόλης. Μετά από ξέπλυμα της πελέτας με 70% αιθανόλη και στέγνωμα, τα νουκλεϊκά οξέα επαναδιαλύονται σε μικρό όγκο (20-30μl) ddH₂O.

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Για τον διαπλασμιδιακό έλεγχο απομονώθηκαν ολικά νουκλεϊκά οξέα με την μέθοδο Holmes-Bonner. Για τον έλεγχο ειδικού ανασυνδυασμού στο γένωμα, απομονώθηκε DNA από έμβρυα (ή ενήλικα άτομα) με μια τροποποιημένη μέθοδο του Quick fly Genomic DNA Prep.

Οι συνθήκες της αντίδρασης πολυμεράσης σε κάθε περίπτωση φαίνονται στο παρακάτω σχήμα:

	Διαπλασμιδιακός έλεγχος	Έλεγχος ανασυνδυασμού στο γένωμα
Δείγμα DNA	1ul	1ul
Εκκινητές	0.2 μM (ο καθένας)	0.2 μM (ο καθένας)
Minotech Taq Polymerase	0.8 units/25ul	0.8 units/25ul
dNTPs	0.5mM	0.5mM
MgCl ₂	1.5mM	1.5mM
Annealing temp	53 °C	53 °C
Extension time	1 λεπτό	1 λεπτό
Κύκλοι	28	35

ΛΙΣΤΑ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία 5-3	Χρήση
PhUbxF	TCAAGCTTATCGCTTCCCTCCACT	Ubx isoforms
PhUbxR	TCTTCAGCTTCATCCGCCTGTTCT	Ubx isoforms
pTAF	AGGAAGGGAAGAAAGCGAAA	iplasmid
hsp70F	CCAATTTCTATCTTAGCCCAACC	iplasmid/genomic rec.
DsRedR	GGGTGCTTCACGTACACCTT	iplasmid/genomic rec./ qPCR
attL-2	CACAACCCCTTGTGTCATGT	genomic recombination

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία 5-3	Χρήση
HSR1	CCCCTGCGGTTACAGTAAAA	genomic recombination
DistalAF	TACACCCACCGTCTGAACAA	distal cloning
DistalAF2	TGACAGTCGCTGCGAAATAG	distal cloning/ qPCR
DistalAF3	GTCCCAGCATCTGCAAACACCGTCC	distal cloning
DistalAR	GTCTGCTCGTCTTCCTTTGC	distal cloning/ qPCR

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ/ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΕΞΩΣΚΕΛΕΤΟΥ

Νεαρά αμφίποδα μονιμοποιήθηκαν σε 4% φορμαλδεΰδη σε αλατόνερο για περίπου μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν ξεπλύθηκαν με PTx και ακολούθησε αφαίρεση των άκρων. Το κάθε άκρο επώαστηκε σε διάλυμα 70% γλυκερόλης - 30% αιθανόλης για μισό λεπτό και έπειτα τοποθετήθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Η περίσσεια διαλύματος αφαιρέθηκε προσεκτικά και το δείγμα αφυδατώθηκε με διπλό ξέπλυμα με 100% αιθανόλη. Κατόπιν, προστέθηκε μικρή ποσότητα (περίπου 10ul) διάλυμα Hoyer's και αφού καλύφθηκε με επικαλυππίδα, το δείγμα τοποθετήθηκε σε μεταλλική πλάκα στους 60°C O/N. Για την άσκηση πίεσης στο δείγμα χρησιμοποιήθηκε μικρός μαγνήτης πάνω στην επικαλυππίδα.

ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ ΓΙΑ *in situ* ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

Πλασμίδια pGEM-T easy με κλωνοποιημένα τμήματα από 5' RACE σε διάφορες διαγονιδιακές σειρές γραμμοποιήθηκαν με πέψη με SspI και μετά από διπλή εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο φωτομετρήθηκαν για τον υπολογισμό της συγκέντρωσής τους. Ένα περίπου μικρογραμμάριο από κάθε πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε για την *in vitro* παραγωγή antisense RNA (Ambion T7 Megascript kit) με την προσθήκη τροποποιημένων dNTPs με κατάλληλο επίτοπο (DIG, FITC, Biotin).

Το antisense-RNA κατακρημνίστηκε με LiCl και αιθανόλη και μετά από υπολογισμό της συγκέντρωσής του σε φωτόμετρο, αραιώθηκε με διάλυμα υβριδοποίησης (HYB) σε τελική συγκέντρωση 100ng/ul.

ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (qPCR)

Απομόνωσα ολικό RNA από 20-30 έμβρυα για την κάθε κατάσταση (ομόζυγη, ετερόζυγη για την παγίδευση distal) και μετά από αντίστροφη μεταγραφή με oligo(dT),

χρησιμοποίησα το cDNA για τον υπολογισμό της σχετικής ποσότητας των δύο μεταγράφων (Distal, DsRed). Όλες οι αντιδράσεις έγιναν σε τριπλέτες και σύμφωνα με τα πρωτόκολα των εταιριών που διαθέτουν τις πολυμεράσες (Invitrogen Platinum®Taq Polymerase και Roche LightCycler® 480 DNA SYBR Green I Master). Το βήμα της υβριδοποίησης (annealing) έγινε στους 60°C και ο πολυμερισμός (extension) έγινε για 30”.

Για την εκτίμηση της απόδοσης (efficiency) του κάθε ζεύγους εκκινητών, ετοίμασα 5 αραιώσεις (από 1x έως 0.0675x του αρχικού δείγματος) και υπολόγισα για κάθε περίπτωση το Ct. Η λειτουργία SLOPE του προγράμματος υπολογιστικών φύλλων (Numbers '08) βγάζει από αυτά τα δεδομένα την απόδοση της αντίδρασης για το ζεύγος των εκκινητών. Οι αποδόσεις βρέθηκαν ίσες με 1.98 (DsRed) και 1.72 (Distal).

Ως σχετική ποσότητα των DsRed/Distal θεώρησα το αντίστοιχο του λόγου του συνολικού πολλαπλασιασμού του κάθε μεταγράφου μέχρι το σημείο Ct του. Το Ct εκφράζει το σημείο όπου ο συνολικός φθορισμός ενός δείγματος περνάει ένα προκαθορισμένο όριο. Το όριο αυτό είναι ίδιο για όλα τα δείγματα και επομένως τα δείγματα που φτάνουν σε αυτό το σημείο γρηγορότερα (μικρότερο Ct) περιέχουν μεγαλύτερη αρχική ποσότητα του πολλαπλασιαζόμενου τμήματος DNA. Η αύξηση του φθορισμού ενός δείγματος γίνεται εκθετικά με βάση την απόδοση του πολλαπλασιασμού του σε κάθε κύκλο (απόδοση εκκινητών) και εκθέτη τον σημείο Ct.

Επειδή στο συγκεκριμένο πείραμα συγκρίνω τις σχετικές ποσότητες δύο μεταγράφων στο ίδιο δείγμα, δεν χρειάζεται να χρησιμοποιήσω γονίδιο αναφοράς. Από την άλλη, πρέπει να λάβω υπόψιν πως ο συνολικός φθορισμός ενός δείγματος οφείλεται στην πρόσδεση της SYBR-Green σε δίκλινα τμήματα DNA και έτσι επηρεάζεται όχι μόνο από τον αριθμό των μορίων στο δείγμα, αλλά και από το μήκος τους. Για το λόγο αυτό διαίρεσα σε κάθε περίπτωση με το μήκος του τμήματος DNA που παράγεται κατά τον πολλαπλασιασμό (327bp για DsRed και 221bp για Distal).

Επειδή οι πειραματικές τιμές στον τελικό υπολογισμό του λόγου των δύο μεταγράφων βρίσκονται στις δυνάμεις (βάση και Ct) το υπολογιζόμενο σφάλμα είναι πολύ μεγάλο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abremski, K. and R. Hoess (1984). "Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein." J Biol Chem **259**(3): 1509-14.
- Abzhanov, A. and T. C. Kaufman (1999). "Novel regulation of the homeotic gene Scr associated with a crustacean leg-to-maxilliped appendage transformation." Development **126**(6): 1121-8.
- Akam, M., M. Averof, et al. (1994). "The evolving role of Hox genes in arthropods." Dev Suppl: 209-15.
- Andrews, B. J., G. A. Proteau, et al. (1985). "The FLP recombinase of the 2 micron circle DNA of yeast: interaction with its target sequences." Cell **40**(4): 795-803.
- Atkinson, P. W., A. C. Pinkerton, et al. (2001). "Genetic transformation systems in insects." Annu Rev Entomol **46**: 317-46.
- Averof, M. and M. Akam (1993). "HOM/Hox genes of Artemia: implications for the origin of insect and crustacean body plans." Curr Biol **3**(2): 73-8.
- Averof, M. and N. H. Patel (1997). "Crustacean appendage evolution associated with changes in Hox gene expression." Nature **388**(6643): 682-6.
- Balvay, L., R. Soto Rifo, et al. (2009). "Structural and functional diversity of viral IRESes." Biochim Biophys Acta **1789**(9-10): 542-57.
- Beckwith, J. R. (1967). "Regulation of the lac operon. Recent studies on the regulation of lactose metabolism in Escherichia coli support the operon model." Science **156**(3775): 597-604.
- Beermann, A., D. G. Jay, et al. (2001). "The Short antennae gene of Tribolium is required for limb development and encodes the orthologue of the Drosophila Distal-less protein." Development **128**(2): 287-97.
- Belteki, G., M. Gertsenstein, et al. (2003). "Site-specific cassette exchange and germline transmission with mouse ES cells expressing phiC31 integrase." Nat Biotechnol **21**(3): 321-4.
- Blackwood, E. M. and J. T. Kadonaga (1998). "Going the distance: a current view of enhancer action." Science **281**(5373): 60-3.
- Brand, A. H. and N. Perrimon (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." Development **118**(2): 401-15.
- Branda, C. S. and S. M. Dymecki (2004). "Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice." Dev Cell **6**(1): 7-28.
- Brown, W. R., N. C. Lee, et al. "Serine recombinases as tools for genome engineering." Methods **53**(4): 372-9.
- Chalfie, M., Y. Tu, et al. (1994). "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." Science **263**(5148): 802-5.

- Clark, A. G., M. B. Eisen, et al. (2007). "Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny." *Nature* **450**(7167): 203-18.
- Cohen, S. M., G. Bronner, et al. (1989). "Distal-less encodes a homoeodomain protein required for limb development in *Drosophila*." *Nature* **338**(6214): 432-4.
- de Felipe, P. (2004). "Skipping the co-expression problem: the new 2A "CHYSEL" technology." *Genet Vaccines Ther* **2**(1): 13.
- Donnelly, M. L., G. Luke, et al. (2001). "Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip'." *J Gen Virol* **82**(Pt 5): 1013-25.
- Douris, V., M. J. Telford, et al. (2010). "Evidence for multiple independent origins of trans-splicing in Metazoa." *Mol Biol Evol* **27**: 684-693.
- Extavour, C. G. (2005). "The fate of isolated blastomeres with respect to germ cell formation in the amphipod crustacean *Parhyale hawaiiensis*." *Dev Biol* **277**(2): 387-402.
- Frankel, N., G. K. Davis, et al. "Phenotypic robustness conferred by apparently redundant transcriptional enhancers." *Nature* **466**(7305): 490-3.
- Franz, G. and C. Savakis (1991). "Minos, a new transposable element from *Drosophila hydei*, is a member of the Tc1-like family of transposons." *Nucleic Acids Res* **19**(23): 6646.
- Galant, R. and S. B. Carroll (2002). "Evolution of a transcriptional repression domain in an insect Hox protein." *Nature* **415**(6874): 910-3.
- Gebelein, B., J. Culi, et al. (2002). "Specificity of Distalless repression and limb primordia development by abdominal Hox proteins." *Dev Cell* **3**(4): 487-98.
- Gebelein, B., D. J. McKay, et al. (2004). "Direct integration of Hox and segmentation gene inputs during *Drosophila* development." *Nature* **431**(7009): 653-9.
- Gellon, G. and W. McGinnis (1998). "Shaping animal body plans in development and evolution by modulation of Hox expression patterns." *Bioessays* **20**(2): 116-25.
- Gompel, N., B. Prud'homme, et al. (2005). "Chance caught on the wing: cis-regulatory evolution and the origin of pigment patterns in *Drosophila*." *Nature* **433**(7025): 481-7.
- Gonzalez-Reyes, A., N. Urquia, et al. (1990). "Are cross-regulatory interactions between homoeotic genes functionally significant?" *Nature* **344**(6261): 78-80.
- Gray, S. and M. Levine (1996). "Short-range transcriptional repressors mediate both quenching and direct repression within complex loci in *Drosophila*." *Genes Dev* **10**(6): 700-10.
- Groth, A. C. and M. P. Calos (2004). "Phage integrases: biology and applications." *J Mol Biol* **335**(3): 667-78.
- Groth, A. C., E. C. Olivares, et al. (2000). "A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(11): 5995-6000.
- Hafen, E., M. Levine, et al. (1984). "Regulation of Antennapedia transcript distribution by the bithorax complex in *Drosophila*." *Nature* **307**(5948): 287-9.

- Handler, A. M., S. P. Gomez, et al. (1993). "A functional analysis of the P-element gene-transfer vector in insects." Arch Insect Biochem Physiol **22**(3-4): 373-84.
- Harris, W. A. (1997). "Pax-6: where to be conserved is not conservative." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(6): 2098-100.
- Hatfull, G. F. and G. J. Sarkis (1993). "DNA sequence, structure and gene expression of mycobacteriophage L5: a phage system for mycobacterial genetics." Mol Microbiol **7**(3): 395-405.
- Hellen, C. U. and P. Sarnow (2001). "Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules." Genes Dev **15**(13): 1593-612.
- Hughes, C. L. and T. C. Kaufman (2002). "Hox genes and the evolution of the arthropod body plan." Evol Dev **4**(6): 459-99.
- Jacob, F. and J. Monod (1961). "Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins." J Mol Biol **3**: 318-56.
- Jeong, S., A. Rokas, et al. (2006). "Regulation of body pigmentation by the Abdominal-B Hox protein and its gain and loss in Drosophila evolution." Cell **125**(7): 1387-99.
- Kappen, C., K. Schughart, et al. (1989). "Two steps in the evolution of Antennapedia-class vertebrate homeobox genes." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(14): 5459-63.
- Klinakis, A. G., T. G. Loukeris, et al. (2000). "Mobility assays confirm the broad host-range activity of the Minos transposable element and validate new transformation tools." Insect Mol Biol **9**(3): 269-75.
- Klinakis, A. G., L. Zagoraiou, et al. (2000). "Genome-wide insertional mutagenesis in human cells by the Drosophila mobile element Minos." EMBO Rep **1**(5): 416-21.
- Lee, J., G. Tribble, et al. (2000). "Resolution of tethered antiparallel and parallel holliday junctions by the Flp site-specific recombinase." J Mol Biol **296**(2): 403-19.
- Levine, M. "Transcriptional enhancers in animal development and evolution." Curr Biol **20**(17): R754-63.
- Liubicich, D. M., J. M. Serano, et al. (2009). "Knockdown of Parhyale Ultrabithorax recapitulates evolutionary changes in crustacean appendage morphology." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(33): 13892-6.
- Lutz, B., H. C. Lu, et al. (1996). "Rescue of Drosophila labial null mutant by the chicken ortholog Hoxb-1 demonstrates that the function of Hox genes is phylogenetically conserved." Genes Dev **10**(2): 176-84.
- Lycett, G. J., F. C. Kafatos, et al. (2004). "Conditional expression in the malaria mosquito Anopheles stephensi with Tet-On and Tet-Off systems." Genetics **167**(4): 1781-90.
- McClintock, B. (1953). "Induction of Instability at Selected Loci in Maize." Genetics **38**(6): 579-99.
- Miller, D. F., B. T. Rogers, et al. (2001). "Cross-regulation of Hox genes in the Drosophila melanogaster embryo." Mech Dev **102**(1-2): 3-16.

- Miller, E. S., E. Kutter, et al. (2003). "Bacteriophage T4 genome." Microbiol Mol Biol Rev **67**(1): 86-156, table of contents.
- Morin, X., R. Daneman, et al. (2001). "A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 15050-5.
- Olivares, E. C., R. P. Hollis, et al. (2001). "Phage R4 integrase mediates site-specific integration in human cells." Gene **278**(1-2): 167-76.
- Panganiban, G., S. M. Irvine, et al. (1997). "The origin and evolution of animal appendages." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 5162-6.
- Panganiban, G., A. Sebring, et al. (1995). "The development of crustacean limbs and the evolution of arthropods." Science **270**(5240): 1363-6.
- Pavlopoulos, A. and M. Akam (2011). "Hox gene Ultrabithorax regulates distinct sets of target genes at successive stages of *Drosophila* haltere morphogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(7): 2855-60.
- Pavlopoulos, A. and M. Averof (2002). "Developmental evolution: Hox proteins ring the changes." Curr Biol **12**(8): R291-3.
- Pavlopoulos, A. and M. Averof (2005). "Establishing genetic transformation for comparative developmental studies in the crustacean *Parhyale hawaiiensis*." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(22): 7888-93.
- Pavlopoulos, A., A. J. Berghammer, et al. (2004). "Efficient transformation of the beetle *Tribolium castaneum* using the Minos transposable element: quantitative and qualitative analysis of genomic integration events." Genetics **167**: 737-746.
- Pavlopoulos, A., Z. Kontarakis, et al. (2009). "Probing the evolution of appendage specialization by Hox gene misexpression in an emerging model crustacean." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(33): 13897-902.
- Pavlopoulos, A., S. Oehler, et al. (2007). "The DNA transposon Minos as a tool for transgenesis and functional genomic analysis in vertebrates and invertebrates." Genome Biol **8 Suppl 1**: S2.
- Perry, M. W., A. N. Boettiger, et al. "Shadow enhancers foster robustness of *Drosophila* gastrulation." Curr Biol **20**(17): 1562-7.
- Plasterk, R. H., Z. Izsvak, et al. (1999). "Resident aliens: the Tc1/mariner superfamily of transposable elements." Trends Genet **15**(8): 326-32.
- Prince, V. (2002). "The Hox Paradox: More complex(es) than imagined." Dev Biol **249**(1): 1-15.
- Rehm, E. J., R. L. Hannibal, et al. (2009). *The Crustacean Parhyale hawaiiensis: A New Model for Arthropod Development. Emerging Model Organisms: A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. **1**: 592.

- Rivera-Pomar, R. and H. Jackle (1996). "From gradients to stripes in *Drosophila* embryogenesis: filling in the gaps." Trends Genet **12**(11): 478-83.
- Ronshaugen, M., N. McGinnis, et al. (2002). "Hox protein mutation and macroevolution of the insect body plan." Nature **415**(6874): 914-7.
- Sasakura, Y., Y. Oogai, et al. (2007). "Transposon mediated transgenesis in a marine invertebrate chordate: *Ciona intestinalis*." Genome Biol **8 Suppl 1**: S3.
- Schneuwly, S., R. Klemenz, et al. (1987). "Redesigning the body plan of *Drosophila* by ectopic expression of the homeotic gene *Antennapedia*." Nature **325**(6107): 816-8.
- Schoppmeier, M. and W. G. Damen (2001). "Double-stranded RNA interference in the spider *Cupiennius salei*: the role of *Distal-less* is evolutionarily conserved in arthropod appendage formation." Dev Genes Evol **211**(2): 76-82.
- Scott, M. P. and S. B. Carroll (1987). "The segmentation and homeotic gene network in early *Drosophila* development." Cell **51**(5): 689-98.
- Shaner, N. C., P. A. Steinbach, et al. (2005). "A guide to choosing fluorescent proteins." Nat Methods **2**(12): 905-9.
- Shimomura, O., F. H. Johnson, et al. (1962). "Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*." J Cell Comp Physiol **59**: 223-39.
- Spradling, A. C. and G. M. Rubin (1982). "Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes." Science **218**(4570): 341-7.
- Stoll, S. M., D. S. Ginsburg, et al. (2002). "Phage TP901-1 site-specific integrase functions in human cells." J Bacteriol **184**(13): 3657-63.
- Struhl, G. (1982). "Genes controlling segmental specification in the *Drosophila* thorax." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **79**(23): 7380-4.
- Struhl, G. and R. A. White (1985). "Regulation of the *Ultrabithorax* gene of *Drosophila* by other bithorax complex genes." Cell **43**(2 Pt 1): 507-19.
- Stuart, J. J., S. J. Brown, et al. (1991). "A deficiency of the homeotic complex of the beetle *Tribolium*." Nature **350**(6313): 72-4.
- Subramaniam, V., H. M. Bomze, et al. (1994). "Functional differences between *Ultrabithorax* protein isoforms in *Drosophila melanogaster*: evidence from elimination, substitution and ectopic expression of specific isoforms." Genetics **136**(3): 979-91.
- Szymczak, A. L., C. J. Workman, et al. (2004). "Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector." Nat Biotechnol **22**(5): 589-94.
- Theodosiou, N. A. and T. Xu (1998). "Use of FLP/FRT system to study *Drosophila* development." Methods **14**(4): 355-65.

- Thorpe, H. M. and M. C. Smith (1998). "In vitro site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(10): 5505-10.
- Thyagarajan, B., E. C. Olivares, et al. (2001). "Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage phiC31 integrase." Mol Cell Biol **21**(12): 3926-34.
- Tomoyasu, Y., S. R. Wheeler, et al. (2005). "Ultrabithorax is required for membranous wing identity in the beetle *Tribolium castaneum*." Nature **433**(7026): 643-7.
- Tour, E., C. T. Hittinger, et al. (2005). "Evolutionarily conserved domains required for activation and repression functions of the *Drosophila* Hox protein Ultrabithorax." Development **132**(23): 5271-81.
- Trichas, G., J. Begbie, et al. (2008). "Use of the viral 2A peptide for bicistronic expression in transgenic mice." BMC Biol **6**: 40.
- Vachon, G., B. Cohen, et al. (1992). "Homeotic genes of the Bithorax complex repress limb development in the abdomen of the *Drosophila* embryo through the target gene *Distal-less*." Cell **71**(3): 437-50.
- Wagner, G. P., C. Amemiya, et al. (2003). "Hox cluster duplications and the opportunity for evolutionary novelties." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(25): 14603-6.
- Wittkopp, P. J., K. Vaccaro, et al. (2002). "Evolution of yellow gene regulation and pigmentation in *Drosophila*." Curr Biol **12**(18): 1547-56.
- Wu, C. T. (1993). "Transvection, nuclear structure, and chromatin proteins." J Cell Biol **120**(3): 587-90.