

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ

ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΕΡΕΥΝΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ανάπτυξη και Εφαρμογή της Διαγονιδιακής Τεχνολογίας στην
Εξελικτική Αναπτυξιακή Βιολογία Αρθροπόδων

ΠΑΥΛΟΠΟΥΛΟΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ

Ηράκλειο, Ιούνιος 2004

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Μοριακής Βιολογίας-Βιοϊατρικής των Τμημάτων Βιολογίας και Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Το ερευνητικό έργο πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του Μιχάλη Αβέρωφ στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας & Βιοτεχνολογίας και υποστηρίχθηκε από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών, το European Molecular Biology Organization και ερευνητικά προγράμματα του Μιχάλη Αβέρωφ.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Μιχάλης Αβέρωφ-Επιβλέπων Ερευνητής (Ερευνητής Β' βαθμίδας Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας & Βιοτεχνολογίας του Ι.Τ.Ε.)

Χαράλαμπος Σαββάκης-Επιβλέπων Καθηγητής (Καθηγητής Α' βαθμίδας Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης)

Χρήστος Δελιδάκης (Καθηγητής Β' βαθμίδας Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης)

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Μιχάλης Αβέρωφ-Επιβλέπων Ερευνητής (Ερευνητής Β' βαθμίδας Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας & Βιοτεχνολογίας του Ι.Τ.Ε.)

Χαράλαμπος Σαββάκης-Επιβλέπων Καθηγητής (Καθηγητής Α' βαθμίδας Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης)

Χρήστος Δελιδάκης (Καθηγητής Β' βαθμίδας Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης)

Ιωσήφ Παπαματθαϊάκης (Καθηγητής Α' βαθμίδας Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης)

Ελευθέριος Ζούρος (Καθηγητής Α' βαθμίδας Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης)

Δόμνα Καραγωγέως (Καθηγήτρια Β' βαθμίδας Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης)

Γιώργος Χαλεπάκης (Καθηγητής Β' βαθμίδας Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
SUMMARY	2

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΚΟΛΕΟΠΤΕΡΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ *Tribolium castaneum* ΚΑΙ ΤΟΥ ΑΜΦΙΠΟΔΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΕΙΔΟΥΣ *Parhyale hawaiiensis*

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ	3
1.2. ΜΕΤΑΘΕΣΙΜΑ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	4
1.3. ΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑ ΣΤΗΝ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΑΡΘΡΟΠΟΔΩΝ	6
1.3.1. Η υπερ-οικογένεια <i>P</i>	7
1.3.2. Η υπερ-οικογένεια <i>hAT</i>	11
1.3.3. Η υπερ-οικογένεια <i>riggyBac</i>	11
1.3.4. Η υπερ-οικογένεια <i>Tc1/mariner</i>	13
1.3.4.1. Η δομή της τρانشποζάσης των στοιχείων <i>Tc1/mariner</i>	14
1.3.4.2. Η δομή των άκρων των στοιχείων <i>Tc1/mariner</i>	16
1.3.4.3. Ο μηχανισμός μετάθεσης των στοιχείων <i>Tc1/mariner</i>	16
1.3.4.4. Στοιχεία <i>mariner</i> ως φορείς μετασχηματισμού	18
1.3.4.5. Το στοιχείο <i>Minos</i> ως φορέας μετασχηματισμού	18
1.4. Η ΒΑΣΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ ΣΤΗΝ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΤΗΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ	21
1.4.1. Γονίδια διάκρισης (<i>marker genes</i>)	21
1.4.2. Ρυθμιστικές αλληλουχίες των γονιδίων διάκρισης	23
1.4.3. Πηγές τρانشποζάσης	25
1.5. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	26
2. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΚΟΛΕΟΠΤΕΡΟΥ <i>Tribolium castaneum</i> ΜΕ ΤΟ ΜΕΤΑΘΕΣΙΜΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΣΤΟΙΧΕΙΟ <i>Minos</i>	29
2.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	29
2.1.1. <i>Tribolium castaneum</i> : ένα αναδυόμενο σκαθάρι-μοντέλο	29
2.1.2. Υψηλές αποδόσεις μετασχηματισμού με τη χρήση DNA και mRNA βοηθών	31
2.1.3. Μοριακή ανάλυση των ενθέσεων του <i>Minos</i> στο γονιδίωμα	31
2.1.4. Ποσοστό μετασχηματισμένων απογόνων ανά G_0	33
2.1.5. Αριθμός ενθέσεων στη γαμετική σειρά των ενεμένων ατόμων G_0	34
2.1.6. Αριθμός ενθέσεων στο γονιδίωμα των μετασχηματισμένων ατόμων G_1	36
2.1.7. Ανάλυση έντασης φθορισμού στα διαγονιδιακά άτομα	40
2.1.8. Παγίδευση ενισχυτών με το τρانشποζόνιο $Mi\{3xP3-EGFP\}$	40
2.2. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	42
2.2.1. Ποιοτικές και ποσοτικές παράμετροι του μετασχηματισμού του <i>Tribolium</i> με το στοιχείο <i>Minos</i>	42
2.2.2. Σύγκριση των πηγών τρانشποζάσης	43
2.2.3. Επέκταση των γενετικών χειρισμών στο <i>Tribolium</i>	43
3. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΜΦΙΠΟΔΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΕΙΔΟΥΣ <i>Parhyale hawaiiensis</i> ΜΕ ΤΟ ΜΕΤΑΘΕΣΙΜΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΣΤΟΙΧΕΙΟ <i>Minos</i>	45
3.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	45
3.1.1. <i>Parhyale hawaiiensis</i> : χτίζοντας έναν πειραματικό οργανισμό	45
3.1.2. Δοκιμασίες ενεργότητας του στοιχείου <i>Minos</i> σε έμβρυα <i>P. hawaiiensis</i>	49
3.1.3. Χρήση της <i>dsredt1</i> ως γονιδίου διάκρισης	53

3.1.4. Μετασχηματισμός του <i>P. hawaiiensis</i> με το τρανσποζόνιο $Mi\{3xP3-DsRed\}$	54
3.2. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	61
3.2.1. Οι διαπλασμαδικές δοκιμασίες προάγγελος της υψηλής ενεργότητας του <i>Minos</i> στα έμβρυα του <i>P. hawaiiensis</i>	61
3.2.2. Πρότυπο έκφρασης του υποκινητή <i>3xP3</i> στον <i>P. hawaiiensis</i>	61
3.2.3. Συχνότητες μετασχηματισμού	62
3.2.4. Σύγκριση του μετασχηματισμού εντόμων και αμφιπόδου.....	64
3.2.5. Εφαρμογές της διαγονιδιακής τεχνολογίας στη γενετική ανάλυση του <i>Parhyale</i>	65

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ *cis*-ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΤΗΣ *Drosophila* ΣΤΟ *Tribolium* ΚΑΙ ΤΟΝ *Parhyale* & ΓΙΑ ΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ *cis*-ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *hsp70* ΣΤΟΝ *Parhyale*

4. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	66
4.1. ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ (Evo-Devo): Ο 'ΓΟΝΙΜΟΣ' ΑΠΟΓΟΝΟΣ ΔΥΟ ΣΥΓΓΕΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΚΛΑΔΩΝ.....	66
4.2. Η ΣΩΜΑΤΟΔΟΜΗ ΤΩΝ ΑΡΘΡΟΠΟΔΩΝ.....	69
4.3. ΟΙ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΕΣ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΟΔΟΜΗΣ: ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ <i>HOX</i>	71
4.4. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>HOX</i>	73
4.5. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΚΟΡΜΟΥ ΤΩΝ ΑΡΘΡΟΠΟΔΩΝ ΑΠΟ ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>HOX</i>	75
4.5.1. Εκτεταμένες αλλαγές του προτύπου έκφρασης των γονιδίων <i>Hox</i>	75
4.5.2. Μετατοπίσεις της έκφρασης των γονιδίων <i>Hox</i> εύρους λίγων μεταμερών.....	75
4.5.3. Αλλαγές στο πρότυπο έκφρασης των γονιδίων <i>Hox</i> μέσα σε ένα μεταμερές	76
4.6. <i>Cis</i> -ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΕ ΓΟΝΙΔΙΑ-ΣΤΟΧΟΥΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ <i>HOX</i>	77
4.7. ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ <i>HOX</i>	80
5. ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΕΝΙΣΧΥΤΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>Distal-less</i> ΤΗΣ <i>D. melanogaster</i> ΣΤΟ <i>Tribolium</i> ΚΑΙ ΤΟΝ <i>Parhyale</i>	83
5.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	83
5.1.1. Ρύθμιση του γονιδίου <i>Distal-less</i> στο έμβρυο της <i>D. melanogaster</i>	83
5.1.2. Το εννοιολογικό πλαίσιο της συγκριτικής ανάλυσης της λειτουργίας των ενισχυτών <i>Dll304</i> και <i>Dll215</i>	86
5.1.3. Έλεγχος των διαγονιδιακών κατασκευών στη <i>Drosophila</i>	89
5.1.4. Έλεγχος της ενεργότητας των ενισχυτών <i>Dll304</i> και <i>Dll215</i> στο <i>Tribolium</i>	93
5.1.5. Έλεγχος της ενεργότητας τεχνητών ενισχυτών με θέσεις πρόσδεσης για τις πρωτεΐνες <i>BX-C</i>	95
5.1.6. Έλεγχος της ενεργότητας των ενισχυτών <i>Dll304</i> και <i>Dll215</i> στον <i>Parhyale</i>	99
5.2. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	100
5.2.1. Συμπεράσματα από τη συγκριτική μελέτη της ενεργότητας των <i>cis</i> -ρυθμιστικών αλληλουχιών.....	100
5.2.2. Ανατομία της εξέλιξης του εξάποδου θώρακα των εντόμων.....	100
5.2.3. Εξέλιξη σε επίπεδο <i>cis</i> -ρυθμιστικών αλληλουχιών	102

6. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ cis-PYΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>hsp70</i> ΤΟΥ <i>Parhyale</i>	104
6.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	104
6.1.1. Θερμο-επαγώμενα γονίδια: διασώστες του οργανισμού και εργαλεία εκτοπικής υπερέκφρασης γονιδίων.....	104
6.1.2. Κλωνοποίηση των cis-ρυθμιστικών περιοχών γονιδίων <i>hsp70</i> του <i>Parhyale hawaiiensis</i> με τη χρήση <i>inversePCR</i>	105
6.1.3. Έλεγχος της ενεργότητας της cis-ρυθμιστικής αλληλουχίας του γονιδίου <i>Phhsp70a</i> στον <i>Parhyale</i>	115
6.1.4. Κλωνοποίηση της cis-ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου <i>Phhsp70b</i> ..	116
6.1.5. Έλεγχος της ενεργότητας της cis-ρυθμιστικής αλληλουχίας του γονιδίου <i>Phhsp70b</i> στον <i>Parhyale</i>	120
6.2. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	125
6.2.1. <i>Phhsp70a</i> και <i>Phhsp70b</i> : Ίδια οικογένεια, διαφορετικοί ρόλοι.....	125
6.2.2. Εμπλουτίζοντας την εμπειρία μας στο μετασχηματισμό του <i>Parhyale</i>	126
6.2.3. Μελλοντικές κατευθύνσεις.....	126
7. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	128
7.1 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ.....	128
7.1.1. Θεμελιώδη πλασμίδια.....	128
7.1.2. Πλασμίδια-μήτρες για τη σύνθεση mRNA φθορίζουσών πρωτεϊνών..	129
7.1.3. Πλασμίδια αναφοράς (<i>reporter constructs</i>)	129
7.1.4. Τελικές πλασμιδιακές κατασκευές γενετικού μετασχηματισμού για τη λειτουργική ανάλυση φυσικών και τεχνητών ενισχυτών του γονιδίου <i>Dll</i> της <i>D. melanogaster</i>	130
7.1.5. Τελικές πλασμιδιακές κατασκευές γενετικού μετασχηματισμού για τη λειτουργική ανάλυση cis-ρυθμιστικών περιοχών των γονιδίων <i>hsp70</i> του <i>P. hawaiiensis</i>	132
7.2. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ.....	134
7.2.1. Βακτηριακά στελέχη και θρεπτικά μέσα.....	134
7.2.2. Απομόνωση γενωμικού DNA	134
7.2.3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (<i>mini-prep</i>)	134
7.2.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία/μεγάλη κλίμακα (<i>medi/maxi-prep</i>).....	135
7.2.5. Χειρισμός DNA.....	135
7.2.6. Δοκιμασίες ενεργότητας του στοιχείου <i>Minos</i> ..	135
7.2.7. <i>In vitro</i> σύνθεση <i>capped mRNA</i>	136
7.2.8. Ανάλυση κατά <i>Southern</i>	136
7.2.9. Κλωνοποίηση παρακείμενων χρωμοσωμικών αλληλουχιών στις θέσεις ένθεσης του <i>Minos</i>	137
7.2.10. Κλωνοποίηση cis-ρυθμιστικών αλληλουχιών των γονιδίων <i>hsp70</i> του <i>Parhyale</i>	137
7.3. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ & ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΖΩΩΝ.....	140
7.3.1. <i>Drosophila melanogaster</i>	140
7.3.2. <i>Tribolium castaneum</i>	141
7.3.3. <i>Parhyale hawaiiensis</i>	143
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	144
Κατευόδιο.....	153

*Στη Μιμικά, τον Κωστή,
το Θάνο, τον Κώστα,
την Ειρήνη, τη Βάλια
και το Μιχάλη*

*“Παρ’ όλα αυτά: την εσωτερική κόπωση και την εξωτερική φθορά,
τη βιολογική κούραση και την ψυχική τριβή...
...τώρα πιο νέος, πιο ζωντανός, πιο ερωτευμένος!
Παρ’ όλα αυτά: την ύπουλη, υποσυνείδητη διάβρωση με «μη», «αρχές» και «πρέπει»,
το πότισμα με νερό της υποταγής, τους πειρασμούς της εξουσίας και της δύναμης...
...σήμερα πιο επαναστάτης, πιο εικονοκλάστης, πιο αναρχικός!
Παρ’ όλα αυτά: την εκμετάλλευση της ανάγκης, την καταδυνάστευση της επιθυμίας,
τον οικονομικό εξανδραποδισμό, τον εξαναγκασμό σε συμβιβασμούς...
...πιο ανεξάρτητος, πιο ασυμβίβαστος, πιο ανυποχώρητος!
Παρ’ όλα όσα με δίδαξαν:
γκρέμισα, κατεδάφισα και αυτοδίδακτος ξανάχτισα χρόνο με χρόνο τον κόσμο μου!”*

Νίκος Δήμου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μοριακές γενετικές μελέτες σε οργανισμούς-μοντέλα (ποντίκι, *Drosophila*, *Caenorhabditis*) φανέρωσαν ότι, παρά τις εκτεταμένες διαφορές στη μορφολογία τους, χτίζονται βάση κοινών αναπτυξιακών προγραμμάτων. Η ανακάλυψη αυτή έθεσε ένα πλαίσιο για τη μελέτη της εξέλιξης της μορφολογίας των οργανισμών μέσω της ανάλυσης της λειτουργίας και της εξέλιξης των συντηρημένων ρυθμιστικών γονιδίων και αναπτυξιακών μονοπατιών. Τα αρθρόποδα (έντομα, καρκινοειδή, μυριάποδα, χηληκερωτά) αποτελούν πρόσφορο πεδίο για την πραγματοποίηση εξελικτικών-αναπτυξιακών συγκρίσεων, χάρη στην τεράστια ποικιλομορφία τους, τις εκτεταμένες γνώσεις μας για τη *Drosophila* και τη σχετικά καλή κατανόηση των φυλογενετικών τους σχέσεων. Οι μελέτες αυτές συνίστανται συνήθως στην κλωνοποίηση ομόλογων γονιδίων, τη σύγκριση της αλληλουχίας και του προτύπου έκφρασής τους μεταξύ των οργανισμών και τη σύγκριση της λειτουργίας τους αποκλειστικά στη *Drosophila*. Η παραπάνω προσέγγιση έχει συνεισφέρει μέχρι τώρα σημαντικές πληροφορίες για τους μοριακούς μηχανισμούς που ευθύνονται για τη μορφολογική διαφοροποίηση των ζώων. Εντούτοις, δεν επιτρέπει την ανάλυση της γονιδιακής λειτουργίας σε μη μοντέλα-οργανισμούς και την αποκάλυψη νέων γονιδίων ή νέων γονιδιακών λειτουργιών. Ο περιορισμός αυτός μπορεί να ξεπεραστεί με τη βοήθεια της διαγονιδιακής τεχνολογίας, που βρίσκει πολλές εφαρμογές στη γενετική ανάλυση.

Το πρώτο μέρος της παρούσας διατριβής πραγματεύεται την επέκταση της διαγονιδιακής τεχνολογίας σε δύο μη μοντέλα-αρθρόποδα, το κολεόπτερο έντομο (σκαθάρι) *Tribolium castaneum*, και το πρώτο καρκινοειδές που μετασχηματίζεται, το αμφίποδο *Parhyale hawaiensis*. Ο γενετικός μετασχηματισμός αυτών των ειδών επιτεύχθηκε με τη χρήση του μεταθέσιμου γενετικού στοιχείου *Minos* και με τη χρήση γενετικών εργαλείων (γονίδια διάκρισης, πηγές τρανσποζάσης) ευρείας εφαρμογής. Και στις δύο περιπτώσεις ελέγχθηκαν ποιοτικές και ποσοτικές παράμετροι που απέδειξαν την πιστότητα του μηχανισμού μετάθεσης του *Minos* και την πρακτικότητά του ως φορέα διαγονιδίων. Παρά τις εκτεταμένες τροποποιήσεις στα πρωτόκολλα μικροένεσης και καλλιέργειας των δύο οργανισμών, που ήταν απαραίτητες λόγω του διαφορετικού τρόπου ζωής και ανάπτυξής τους, οι συχνότητες μετασχηματισμού κυμάνθηκαν σε υψηλά επίπεδα και στα δύο είδη.

Το δεύτερο μέρος της διατριβής πραγματεύεται την πρώτη εφαρμογή της παραπάνω τεχνολογίας για τη συγκριτική μελέτη της ενεργότητας *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών του δροσοφιλικού γονιδίου *Distal-less* στο *Tribolium* και τον *Parhyale*. Το γονίδιο *Distal-less* έχει έναν πολύ συντηρημένο ρόλο στην ανάπτυξη των εξαρτημάτων του σώματος και με την παραπάνω προσέγγιση επιχειρήθηκε η διελεύκανση των μοριακών αλλαγών, που ευθύνονται για την εξέλιξη του αριθμού των ποδιών μέσα στα αρθρόποδα. Τέλος, περιγράφεται η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός *cis*-ρυθμιστικών περιοχών από γονίδια *hsp70* του *Parhyale*, οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν στο άμεσο μέλλον για τη λειτουργική ανάλυση αναπτυξιακών παραγόντων μέσω της εκτοπικής έκφρασής τους στο αμφίποδο.

SUMMARY

Molecular genetic analysis in model organisms, including nematodes (*Caenorhabditis*), insects (*Drosophila*) and vertebrates (mouse), have revealed that key aspects of body patterning are regulated by similar developmental genes and genetic circuits in these diverse animals. The developmental function and evolution of these conserved genes and regulatory pathways has provided a framework for studying morphological evolution. Arthropods (insects, crustacea, myriapods, chelicerates) are favored as testing ground for evolutionary-developmental comparisons, because of their incredible diversity, our in-depth knowledge of *Drosophila* and their relatively well-known phylogenies. Such studies have relied so far on the isolation and comparison of homologous genes and their expression patterns among different species, together with their functional comparison, albeit exclusively in *Drosophila*. This approach has produced valuable information concerning the molecular mechanisms that underlie morphological diversity. However, it does not allow functional analysis in non-model species, thus precluding the isolation of new genes or the identification of new gene functions. The establishment of broadly applicable genetic transformation systems allows manipulations in species, that have not been genetically tractable in the past.

The first part of this thesis describes the application of transgenic technology to two non-model arthropod species, the red flour beetle *Tribolium castaneum* and, for the first time, to a crustacean species, the amphipod *Parhyale hawaiiensis*. The genetic transformation of these species was achieved by using the transposable element *Minos*, combined with a set of versatile genetic tools including a selection of marker genes and transposase sources. A number of quantitative and qualitative parameters were examined, that confirmed the specificity of *Minos* transposition mechanism and its utility as a transformation vector. Although the protocols for microinjections and breeding varied considerably, depending on the lifestyle and mode of development of each organism, transformation efficiencies were high in both species.

The second part of the thesis describes the use of transgenic technology for the functional comparison of *cis*-regulatory elements from the *Drosophila Distal-less* gene in *Tribolium* and *Parhyale*. Given that *Distal-less* displays a conserved role in the formation of animal limbs, this study aimed to decipher the molecular changes that are responsible for the evolution of arthropod limb number. In addition, the latter section describes the isolation and characterization of active *cis*-regulatory sequences from *Parhyale hsp70* genes, that will be used in the near future to conditionally mis-express genes of interest in the amphipod.

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

**ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΚΟΛΕΟΠΤΕΡΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ
Tribolium castaneum ΚΑΙ ΤΟΥ ΑΜΦΙΠΟΔΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΕΙΔΟΥΣ
*Parhyale hawaiiensis***

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Εισαγωγή στη διαγονιδιακή τεχνολογία

Ο γενετικός μετασχηματισμός των οργανισμών αποτελεί ισχυρό εργαλείο της Μοριακής Βιολογίας. Τεχνικές για την εισαγωγή εξωγενούς DNA στο γονιδίωμα των οργανισμών αναπτύχθηκαν αρχικά σε προκαρυωτικά είδη, ενώ στη συνέχεια επεκτάθηκαν με επιτυχία και σε ευκαρυωτικά είδη, μύκητες, φυτά και ζώα, οργανισμούς-μοντέλα ή μη. Αν και τα πρωτόκολλα διαφέρουν ανάλογα με το είδος και την πειραματική διάταξη, σε γενικές γραμμές το εισαγόμενο DNA μπορεί να παραμένει στο κύτταρο ως ανεξάρτητα αντιγραφόμενη μονάδα, να εισάγεται σε συγκεκριμένη χρωμοσωμική θέση, συχνά αντικαθιστώντας την ενδογενή αλληλουχία, ή να εντίθεται εκτοπικά σε τυχαίες θέσεις στο γονιδίωμα.

Η παρούσα εργασία καταπιάνεται με το γενετικό μετασχηματισμό ειδών που ανήκουν στα αρθρόποδα. Σε αυτό το φύλο περιλαμβάνονται οι κλάσεις των χηληκερωτών, των εντόμων, των καρκινοειδών και των μυριαπόδων, στις οποίες ταξινομείται η συντριπτική πλειοψηφία των γνωστών ζωικών ειδών (BRUSCA & BRUSCA 1990) (Εικόνα 25). Την ευφορία που προκάλεσε ο μετασχηματισμός του πρώτου αρθροπόδου το 1982, του μοντέλου-εντόμου *Drosophila melanogaster* (RUBIN & SPRADLING 1982), διαδέχτηκε μια μακρά περίοδος προσπαθειών και καινοτόμων προσεγγίσεων, που καρποφόρησαν μόλις τα τελευταία οχτώ χρόνια με την επέκταση της διαγονιδιακής τεχνολογίας σε δεκάδες έντομα (ATKINSON *et al.* 2001; HANDLER 2001). Μετασχηματισμένοι αντιπρόσωποι των χηληκερωτών και των μυριαπόδων δεν έχουν δημοσιευτεί. Ο μετασχηματισμός του πρώτου καρκινοειδούς, του αμφιπόδου *Parhyale hawaiensis*, αποτελεί μέρος της παρούσας διατριβής.

Η επίτευξη μόνιμου γενετικού μετασχηματισμού, ώστε το εξωγενές γονίδιο (διαγονίδιο) να μεταφέρεται κάθετα στις επόμενες γενιές, προϋποθέτει την εισαγωγή του DNA στη γαμετική σειρά, συνεπώς και στο γενετικό υλικό των γαμετών του αρθροπόδου. Μέθοδοι εισαγωγής *in vivo* αποτελούν η μικροέγχυση DNA με μικροβελόνες (μικροένεση; microinjection), ο βομβαρδισμός με σφαιρίδια καλυμμένα με DNA (biolistics) και η ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) γονιμοποιημένων εμβρύων (ATKINSON *et al.* 2001). Η πιο αποδοτική και ευρέως διαδεδομένη μέθοδος στα αρθρόποδα παραμένει η μικροένεση και χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα που περιγράφονται. Η μικροένεση πραγματοποιείται σε εκείνη την περιοχή του πρώιμου εμβρύου, όπου θα σχηματιστούν τα πρόδρομα γαμετικά κύτταρα, ώστε κάποιος από τους πυρήνες τους να προσλάβουν το 'ξένο' DNA (βλέπε Εικόνα 3). Σε κάποιους από αυτούς τους πυρήνες το διαγονίδιο θα εντεθεί σε μία ή περισσότερες χρωμοσωμικές θέσεις, με αποτέλεσμα ένα υποσύνολο των γαμετών του αναπτυσσόμενου ενήλικου να είναι μετασχηματισμένοι. Ο απόγονος που θα προκύψει από την γονιμοποίηση ενός τέτοιου γαμέτη θα είναι μετασχηματισμένος (διαγονιδιακός). Δεδομένου ότι η συχνότητα ένθεσης του εξωγενούς DNA είναι συνήθως χαμηλή (μικρό ποσοστό των ενεμένων ζώων φέρει ένα μικρό ποσοστό μετασχηματισμένων γαμετών), αυτό θα πρέπει να είναι 'μαρκαρισμένο' με ένα γονίδιο διάκρισης (marker gene), ώστε να διευκολύνεται η αναγνώριση των διαγονιδιακών ζώων βάση φαινοτύπου. Σε επόμενη ενότητα αναλύονται εκτενώς τα γονίδια διάκρισης που επιστρατεύονται στο μετασχηματισμό αρθροπόδων.

Διαγονιδιακά έντομα (*Drosophila*, κουνούπια) έχουν επιτευχθεί σποραδικά με τη μικροέγχυση 'γυμνού' DNA και συνακόλουθη ενσωμάτωσή του μέσω μη ομόλογου ανασυνδυασμού σε τυχαίες γενωμικές περιοχές (ASHBURNER *et al.* 1998). Δυτυχώς η μέθοδος αυτή στερείται της επαναληψιμότητας που επιδεικνύει σε άλλους ευκαρυώτες (σακχαρομύκητα, ποντίκι) και αντικαταστάθηκε από την κλωνοποίηση του εξωγενούς DNA σε φορείς οι οποίοι ενσωματώνονται στο

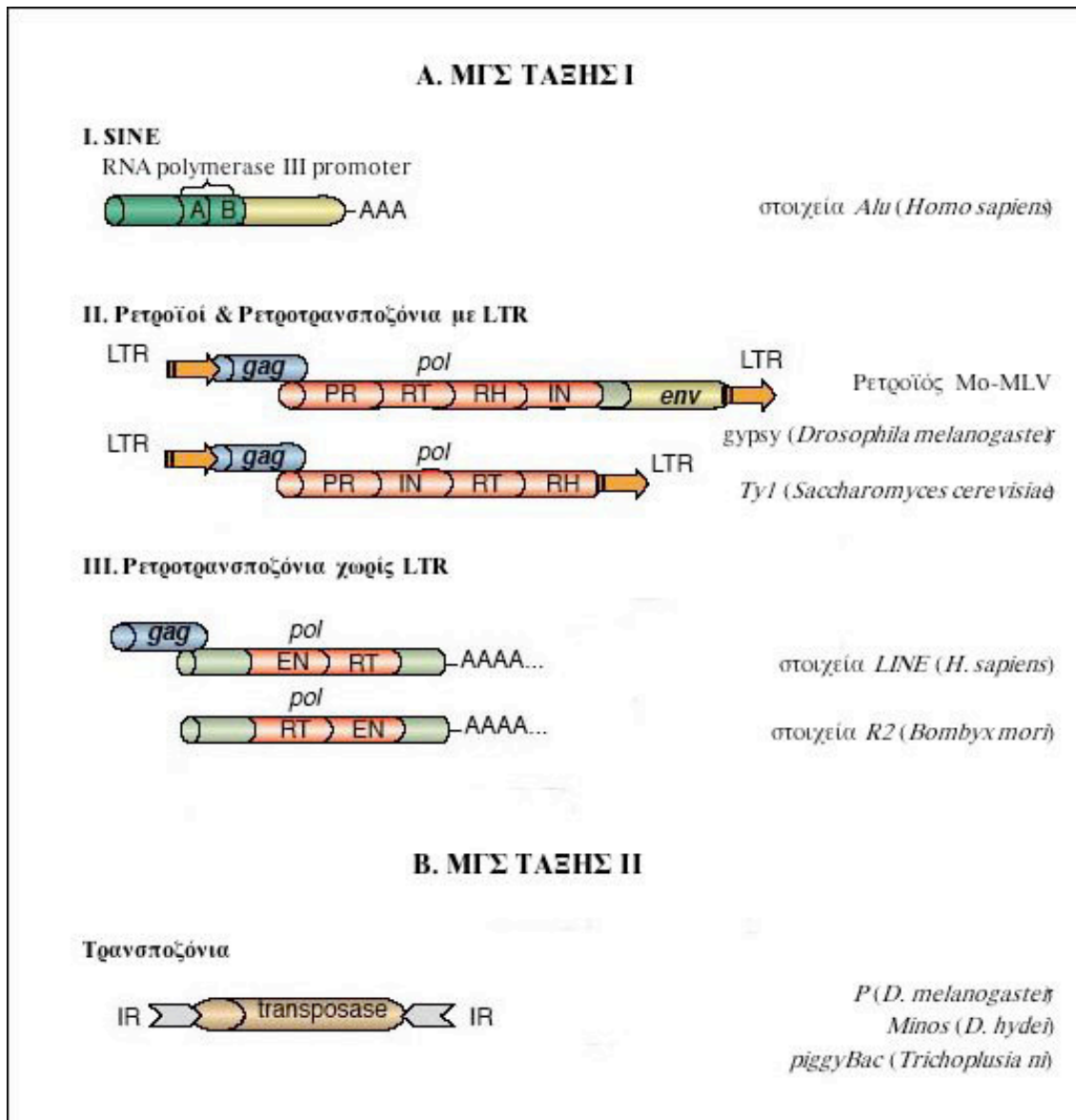
γονιδίωμα με ειδικούς μοριακούς μηχανισμούς. Η χρήση των μεταθέσιμων γενετικών στοιχείων (mobile genetic elements) ως φορέων διαγονιδίων θεμελίωσε το γενετικό μετασχηματισμό των εντόμων και υπόσχεται να πράξει το ίδιο και σε άλλες ομάδες αρθροπόδων. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί συνοπτικά και ο λεγόμενος παρα-μετασχηματισμός, δηλαδή η γενετική τροποποίηση όχι καθεαυτού του εντόμου, αλλά ενός συμβιώτη του (έξω- ή ένδοκυττάρου) (HANDLER 2001).

1.2. Μεταθέσιμα γενετικά στοιχεία

Κάθε τμήμα DNA που έχει την ικανότητα να αλλάζει θέσεις μέσα στο γονιδίωμα θεωρείται εξ' ορισμού μεταθέσιμο γενετικό στοιχείο (ΜΓΣ). Ο Marcus Rhoades και η Barbara McClintock ανακάλυψαν την ύπαρξη των ΜΓΣ αποκλειστικά με γενετικά πειράματα στο καλαμπόκι. Αργότερα, η κλωνοποίησή τους οδήγησε όχι μόνο στη λεπτομερή μελέτη τους αλλά και στη συνειδητοποίηση ότι αποτελούν συστατικά στοιχεία των γονιδιωμάτων όλων των οργανισμών, από τα βακτήρια μέχρι τον άνθρωπο. Ένα σεβαστό ποσοστό των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών των γονιδιωμάτων αποτελείται από ΜΓΣ, ενώ οι γνώμες σχετικά με την ωφελιμότητα ή τη βλαπτικότητα της ύπαρξής τους δίστανται (KIDWELL & LISCH 2001). Πολλοί επιστήμονες υποστηρίζουν ότι πρόκειται για παρασιτικές 'εγωιστικές' οντότητες που κωδικοποιούν την απαραίτητη πληροφορία για τη διαίωσή τους. Σε κάθε περίπτωση, είναι κοινά αποδεκτό ότι τα ΜΓΣ τροποποιούν, ποσοτικά και ποιοτικά, τα γονιδιώματα των ξενιστών τους, αλλάζοντας την προσαρμοστικότητα των πληθυσμών και την εξελικτική τους δυναμική (KAZAZIAN 2004; KIDWELL & LISCH 1997). Η παρουσία και η δράση τους μπορεί να επιφέρει ποικίλες μεταλλάξεις στα γονιδιώματα που ενδημούν, τόσο γονιδιακές όσο και χρωμοσωμικές (KIDWELL & LISCH 2001). Θα επανέλθουμε στο θέμα αυτό κουβεντιάζοντας τις εφαρμογές των ΜΓΣ στη γενετική ανάλυση.

Συγκριτικές μελέτες φανερώνουν ότι τα είδη διαφοροποιούνται ως προς τον αριθμό των ΜΓΣ που 'ανέχονται' στο γονιδίωμά τους, εξηγώντας εν μέρει το παράδοξο της τιμής C (αναντιστοιχία μεταξύ μεγέθους γονιδιώματος και αριθμού γονιδίων στους οργανισμούς; KIDWELL 2002; PETROV *et al.* 2000). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι το 45% του ανθρώπινου γονιδιώματος απαρτίζεται από ΜΓΣ (LANDER *et al.* 2001), ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στη *Drosophila* είναι 9% (KAMINKER *et al.* 2002). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ορισμένα ΜΓΣ έχουν 'εξημερωθεί' (molecular domestication), αναλαμβάνοντας σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου, όπως η συντήρηση των τελομερικών άκρων στη *Drosophila* (LEVIS *et al.* 1993) και ο ανασυνδυασμός V(D)J των ανοσοσφαιρινών στο ανοσοποιητικό σύστημα των σπονδυλωτών (AGRAWAL *et al.* 1998).

Ανάλογα με τη μετατιθέμενη διάμεση (εξωχρωμοσωμική) μορφή του στοιχείου, τα μεταθετά κατηγοριοποιούνται σε δύο κύριες τάξεις, τις I και II (BRINDLEY *et al.* 2003). Τα στοιχεία της τάξης I μετατίθενται με τη βοήθεια διάμεσων RNA μεταγράφων τους, δημιουργώντας σε κάθε κινητοποίησή τους πολλαπλά θυγατρικά αντίγραφα του στοιχείου στο γονιδίωμα του ξενιστή, ενώ το πατρικό παραμένει σταθερό στην ίδια θέση. Σε αυτά περιλαμβάνονται οι ρετροϊοί, τα ρετροτρανσποζόνια (με ή χωρίς επιμήκεις ευθείες τελικές επαναλήψεις; Long Terminal Repeats) και τα μικρά διάσπαρτα πυρηνικά στοιχεία (SINEs) (Εικόνα 1). Τα μεταθετά τάξης II χρησιμοποιούν διάμεσες μορφές DNA και αποκαλούνται τρανσποζόνια (transposons) (Εικόνα 1). Τρανσποζόνια 'παρασιτούν' σε γονιδιώματα προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών, ενώ η κινητοποίησή τους γίνεται τόσο με πολλαπλασιαστικούς (replicative) όσο και μη πολλαπλασιαστικούς μηχανισμούς (ATKINSON *et al.* 2001). Στην πολλαπλασιαστική μετάθεση το στοιχείο διπλασιάζεται και ένα αντίγραφο παραμένει στην αρχική θέση, ενώ το άλλο εντίθεται σε διαφορετική. Αντίθετα, στη



Εικόνα1: Μεταθέσιμα γενετικά στοιχεία τάξης I και τάξης II (BRINDLEY *et al.* 2003). Τα μικρά διάσπαρτα πυρηνικά στοιχεία (SINE) έχουν μέγεθος >600 bp με πολυ-A ουρές στο 3' άκρο τους. Η μεταγραφή των SINE γίνεται από την RNA πολυμεράση III, ακολουθεί αντίστροφη μεταγραφή τους και ένθεσή τους στο γονιδίωμα. Τα ρετροτρανσποζόνια με επιμήκεις ευθείες τελικές επαναλήψεις (LTR; 200-600 bp) έχουν μέγεθος 5-10 kb και μοιάζουν δομικά και λειτουργικά με τους ρετροϊούς. Περιλαμβάνουν δύο ή τρία αναγνωστικά πλαίσια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες *env* (envelope; γλυκοπρωτεΐνη εξωτερικού φακέλου), *gag* (δομική πρωτεΐνη που περιβάλλει το RNA) και *pol* (πολυπρωτεΐνη με ενεργότητες πρωτεάσης (PR), αντίστροφης μεταγραφάσης (RT), RNAseH (RH) και ιντεγκράσης (IN)). Τα ρετροτρανσποζόνια χωρίς LTR έχουν μέγεθος 4-6 kb και περιλαμβάνουν συνήθως δύο πλαίσια ανάγνωσης (*gag* και *pol*) και πολυ-A ουρά. Η πρωτεΐνη *pol* έχει ενεργότητες αντίστροφης μεταγραφάσης (RT) και ενδονουκλεάσης (EN). Τα τρανσποζόνια κυμαίνονται μεταξύ 1.3-3 kb και πλαισιώνονται από κατοπτρικά ανεστραμμένες επαναλήψεις (IR) που περιβάλλουν το γονίδιο της τρανσποζάσης (*transposase*). Οι τρανσποζάσες ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών των ρεκομπινασών (*recombinases*).

μη πολλαπλασιαστική μετάθεση το στοιχείο εγκαταλείπει την αρχική του θέση και επανεισάγεται σε μία καινούρια. Τα άκρα όλων των τρανσποζονίων πλαισιώνονται από κατοπτρικά ανεστραμμένες επαναλήψεις (*inverted terminal repeats*), οι οποίες περιβάλλουν συνήθως ένα γονίδιο υπεύθυνο για την ενεργότητα μετάθεσης. Τα τρανσποζόνια αναγνωρίζουν συνήθως θέσεις-στόχους με συγκεκριμένη για κάθε στοιχείο αλληλουχία, η οποία διπλασιάζεται μετά την

ένθεση του στοιχείου. Συνεπώς, τα ανεστραμμένα άκρα των στοιχείων περιβάλλονται από την ίδια ευθεία επανάληψη της αλληλουχίας-στόχου. Το χαρακτηριστικό αυτό είναι έμφυτο του τρόπου μετάθεσής τους και θα αναλυθεί λεπτομερώς παρακάτω.

Συνήθως, ένα ΜΓΣ βρίσκεται σε πολλά αντίγραφα μέσα σε ένα γονιδίωμα. Η πλειοψηφία τους παρουσιάζει ελλείματα τα οποία δημιουργούνται είτε από το μηχανισμό μετάθεσης καθ'αυτόν είτε από γεγονότα που έπονται της μετάθεσης. Τρανσποζόνια με έστω και ένα ελλειματικό άκρο είναι καταδικασμένα σε αιώνια ακινησία. Τα ανεστραμμένα άκρα λοιπόν είναι απαραίτητες *cis*-δραστικές αλληλουχίες για την κινητικότητα των τρανσποζονίων. Εσωτερικά ελλείματα μπορεί επίσης να καταστήσουν ένα στοιχείο ανίκανο να μετατίθεται από μόνο του, με τη διαφορά όμως ότι αυτό μπορεί να κινηθεί με τη βοήθεια των *trans*-δραστικών πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από άρτια στοιχεία που ενδημούν στο ίδιο γονιδίωμα. Τα ελαττωματικά στοιχεία αυτού του είδους ονομάζονται μη αυτόνομα (nonautonomous), σε αντίδιαστολή με τα αυτόνομα στοιχεία που αυτοκαταλύουν τη μετάθεσή τους. Η χρήση ανασυνδυασμένων μη αυτόνομων στοιχείων στη διαγονιδιακή τεχνολογία συντελεί στη σταθερότητα των ενθέσεων.

Η ανάπτυξη ανασυνδυασμένων ρετροϊών και άλλων ιών ως φορέων μόνιμου μετασχηματισμού αρθροπόδων είναι περιορισμένη, σε αντίθεση με τα θηλαστικά όπου χρησιμοποιούνται ευρέως για την εισαγωγή και έκφραση γονιδίων *in vitro* και *in vivo* (ANDERSON 1998). Προς το παρόν, φορείς βασισμένοι στους ιούς Moloney murine leukemia (MoMLV; FRANCO *et al.* 1998) και Sindbis (SIN; FOY *et al.* 2004; LEWIS *et al.* 1999) αποτελούν καλές επιλογές για την παροδική έκφραση παραγόντων σε υψηλά επίπεδα σε σωματικούς ιστούς κουνουπιών, πεταλούδων και σκαθαριών. Για το γενετικό μετασχηματισμό των αρθροπόδων έχει αξιοποιηθεί ένα υποσύνολο των στοιχείων της τάξης II, τα οποία χαρακτηρίζονται από σχετικά μικρό μέγεθος και απλή δομή.

1.3. Τρανσποζόνια στην υπηρεσία του μετασχηματισμού αρθροπόδων

Τα τρανσποζόνια που αξιοποιούνται στο μετασχηματισμό των αρθροπόδων οριοθετούνται από σχετικά μικρά ανεστραμμένα άκρα, τα οποία περιβάλλουν ένα μοναδικό γονίδιο υπεύθυνο για τη μετάθεσή τους, το γονίδιο της τρανσποζάσης (transposase). Η τρανσποζάση μαζί με τα άκρα συμμετέχουν σε μία αλληλουχία μοριακών μηχανισμών, οι οποίοι οδηγούν στην πλήρη εκτομή του στοιχείου από την αρχική του θέση και επανένθεση της εξωχρωμοσωμικής διάμεσης μονάδας σε διαφορετική περιοχή. Ο μη πολλαπλασιαστικός αυτός τρόπος κινητοποίησης είναι γνωστός ως μετάθεση μέσω εκτομής και ένθεσης (cut and paste transposition).

Τα τρανσποζόνια-φορείς μετασχηματισμού ταξινομούνται σε τέσσερις κύριες υπεροικογένειες (superfamilies): i) την *P*, ii) τη *hAT*, iii) την *piggyBac* και iv) την *Tc1/mariner*. Αξίζει να σημειωθεί ότι η φυλογενετική εξάπλωση των μελών των παραπάνω οικογενειών (όπως και άλλων ΜΓΣ) είναι ασυνεχής. Το ίδιο στοιχείο μπορεί να απουσιάζει από τα γονιδιώματα συγγενικών ειδών και, αντίστροφα, να ενδημεί σε εξελικτικά απομακρυσμένες ομάδες. Δύο διαφορετικές εξηγήσεις έχουν προταθεί για την παρατηρούμενη ασυνέχεια: i) το στοιχείο προϋπήρχε στον κοινό πρόγονο συγγενικών ειδών και χάθηκε δευτερογενώς σε κάποια από αυτά κατά την κατακόρυφη (μεσω ειδογένεσης) μεταφορά του ή/και ii) το στοιχείο μεταδόθηκε οριζοντίως από το ένα είδος στο άλλο (KIDWELL 1992). Έχουν βρεθεί αρκετοί αμυντικοί μηχανισμοί που προστατεύουν τους ξενιστές από αλληλουχίες-εισβολείς, καταδικάζοντάς τες σε προοδευτική αδρανοποίηση, εκφυλισμό και εν τέλει αφανισμό τους από επιμέρους εξελικτικές γραμμές (MATZKE *et al.* 1999). Μία από τις οδούς διαφυγής για τα τρανσποζόνια αποτελεί ο εποικισμός νέων, παρθένων γονιδιωμάτων. Η οριζόντια μετάδοση προϋποθέτει τη σύμπτωση της γεωγραφικής και οικολογικής εξάπλωσης του είδους-δότη με το είδος-δέκτη και πιθανώς την ύπαρξη κάποιου ενδιάμεσου, μολυσμένου με το

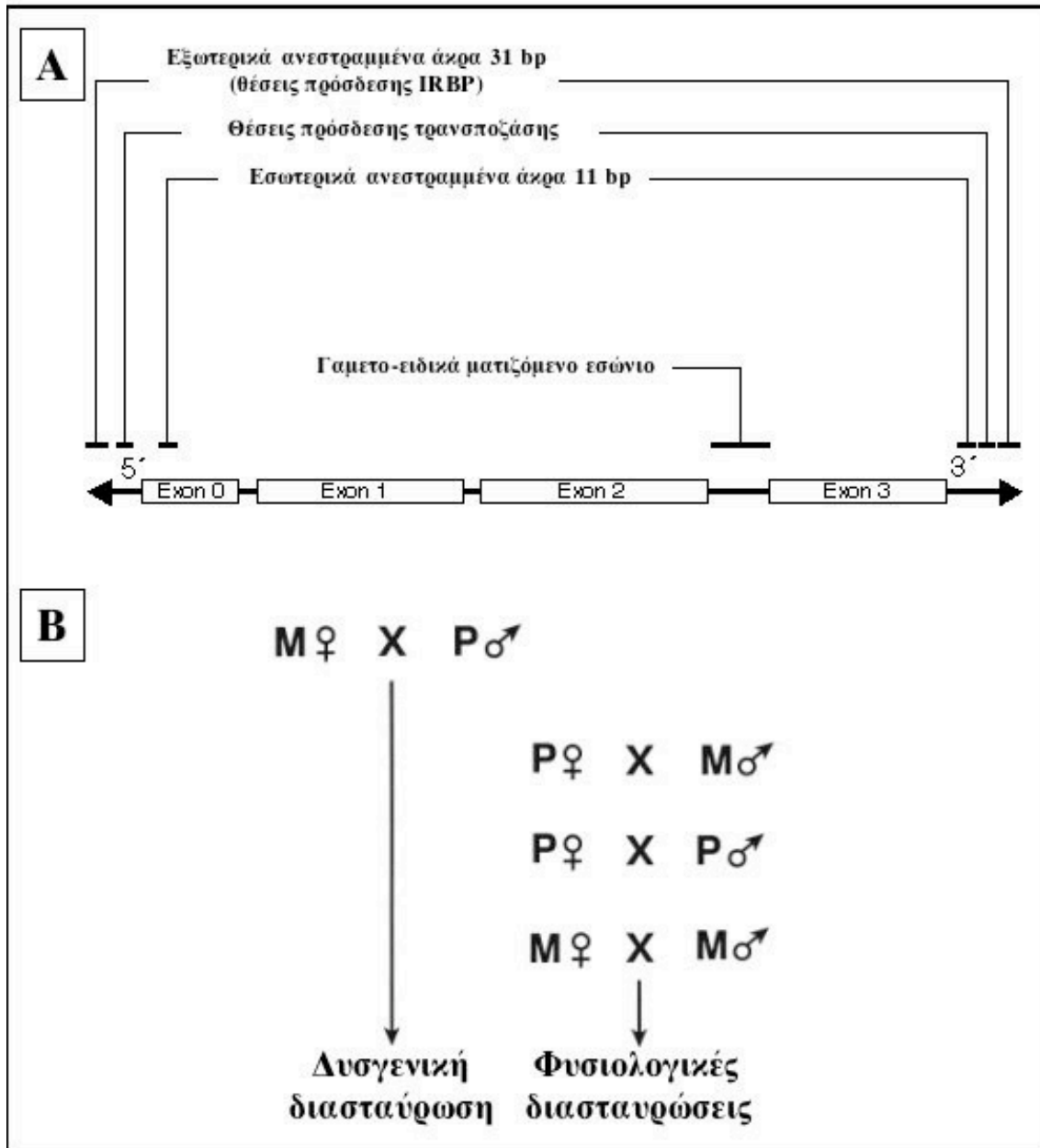
μεταθέσιμο στοιχείο, οργανισμού (π.χ. παρασίτου) που θα γεφυρώσει τα δύο είδη. Αν και τα ερωτήματα που αφορούν τη συχνότητα και τους διαμεσολαβητές της οριζόντιας μετάδοσης είναι δύσκολο να ελεγχθούν πειραματικά, ορισμένα είδη παρασιτικών ακάρεων, το διαδεδομένο στα αρθρόποδα ενδοκυτταρικό παράσιτο *Wolbachia* και διάφοροι ιοί εξετάζονται ως πιθανοί υποψήφιοι ενδιάμεσοι φορείς για τη μετάδοση τρανσποζονίων (HOUCK *et al.* 1991; JEYAPRAKASH & HOY 2000).

1.3.1. Η υπερ-οικογένεια *P*

Τα στοιχεία *P* προσέλκυσαν το ενδιαφέρον των εξελικτικών βιολόγων εξαιτίας της ξαφνικής και ραγδαίας εισβολής τους στους πληθυσμούς της *Drosophila melanogaster* παγκοσμίως, και των γενετιστών για την χρησιμότητά τους ως εργαλεία στη γενετική μοριακή ανάλυση. Η ανακάλυψή τους προήλθε από τη μελέτη του φαινομένου της δυσγενεσίας υβριδίων (hybrid dysgenesis), το οποίο εκδηλώνεται όταν διασταυρωθούν αρσενικές μύγες που φέρουν στο γονιδίωμά τους στοιχεία *P* (γνωστά ως στελέχη *P*) με θηλυκές 'καθαρών' στελεχών (στελέχη *M*) (BINGHAM *et al.* 1982). Οι απόγονοι μιας τέτοιας δυσγενικής διασταύρωσης παρουσιάζουν μια σειρά ανωμαλιών, όπως στειρότητα, μεταλλαγές και χρωμοσωμικά ρήγματα (Εικόνα 2B). Η υψηλή κινητικότητα των στοιχείων *P* στη γαμετική σειρά των υβριδικών απογόνων είναι υπεύθυνη για τις παραπάνω ανωμαλίες. Η αντίστροφη διασταύρωση (Αρσ *M* X Θηλ *P*), όπως και οι διασταυρώσεις μεταξύ ατόμων *P*, είναι φυσιολογικές (Εικόνα 2B). Φαίνεται δηλαδή ότι ο μητρικός κυτταρότυπος *P* δρα ανασταλτικά στη μετάθεση του στοιχείου. Γενετικά πειράματα έδειξαν ότι η κατασταλτική αυτή δράση κληρονομείται μητρικά στους απογόνους για μία μόνο γενιά και η διατήρησή της και στις επόμενες γενιές προϋποθέτει την κληρονόμηση στοιχείων *P*.

Η κατανόηση του φαινομένου της δυσγενεσίας στηρίχτηκε στη μοριακή ανάλυση του στοιχείου (O'HARE & RUBIN 1983). Τα αυτόνομα στοιχεία *P* έχουν μέγεθος 2.9 kb εκ των οποίων τα τελικά 150 bp σε κάθε άκρο είναι απαραίτητες *cis*-κείμενες αλληλουχίες για τη μετάθεσή τους. Οι αλληλουχίες αυτές περιλαμβάνουν, από έξω προς τα μέσα, εξωτερικά αναστραμμένα άκρα μήκους 31 bp, τις εσωτερικές θέσεις πρόσδεσης της τρανσποζάσης και εσωτερικά αναστραμμένα άκρα 11 bp, και πλαισιώνουν το γονίδιο της τρανσποζάσης που οργανώνεται σε τέσσερα εξόνια (αριθμούνται από 0 έως 3) (Εικόνα 2A). Με εναλλακτικό, ιστοειδικά ρυθμιζόμενο μάτισμα (alternative splicing) παράγονται δύο διαφορετικές πρωτεΐνες: η πρώτη είναι η λειτουργική τρανσποζάση μεγέθους 87 kD, προέρχεται από μάτισμα όλων των εσώνιων και εκφράζεται αποκλειστικά στα γαμετικά κύτταρα, ενώ η δεύτερη κωδικοποιείται από μετάγραφα που διατηρούν το τρίτο εσώνιο (Εικόνα 2A) (LASKI *et al.* 1986; RIO *et al.* 1986). Ένα κωδικόνιο λήξης στο τρίτο εσώνιο οδηγεί στην παραγωγή μιας μικρότερης πρωτεΐνης 66 kD που δρα ως καταστολέας της μετάθεσης σε σωματικά κύτταρα (MISRA & RIO 1990). Επιπλέον, αποτίθεται σε υψηλά ποσά και στα αυγά των θηλυκών *P* ατόμων, εμποδίζοντας την κινητοποίηση των στοιχείων. Προφανώς, ο καταστολέας απουσιάζει από τα αυγά θηλυκών *M* ατόμων, επιτρέποντας στα στοιχεία *P* ενός αρσενικού γαμέτη που θα τα γονιμοποιήσει να προκαλέσουν το δυσγενικό φαινόμενο μέσω της δράσης τους. Η καταστολή γίνεται σε μεταγραφικό επίπεδο, καθώς η πρωτεΐνη 66 kD προσδένεται σε μία περιοχή του άκρου, που επικαλύπτεται με το στοιχείο TATA του υποκινητή του γονιδίου της τρανσποζάσης (KAUFMAN *et al.* 1989). Η διατήρηση της καταστολής και σε επόμενες γενιές απαιτεί τη συνεχή παραγωγή της πρωτεΐνης 66 kD από κληρονομούμενα στοιχεία *P*. Τέλος, μηχανισμοί όπως η μετα-μεταγραφική καταστολή μέσω της έκφρασης συμπληρωματικών (antisense) mRNA του *P* (SIMMONS *et al.* 1996) και η επιγενετική αποσιώπηση των στοιχείων μέσω

τροποποιήσεων της χρωματίνης (trans-silencing) (ROCHE & RIO 1998) φαίνεται να συνεπικουρούν στην αδρανοποίησή τους.



Εικόνα 2: (A) Δομή στοιχείου P. (B) Το φαινόμενο της δυσγενείας υβριδίων. Οι χαρακτήρες P και M αναφέρονται στον κυτταρότυπο του αρσενικού ή θηλυκού ατόμου.

Οι σύγχρονοι εργαστηριακοί πληθυσμοί της *D. melanogaster* κατάγονται από στελέχη που συλλέχθηκαν στις αρχές του 20^{ου} αιώνα και είναι σχεδόν αποκλειστικά τύπου M. Η εξάπλωση του στοιχείου P σε φυσικούς πληθυσμούς *D. melanogaster* άρχισε από τη Βόρεια Αμερική 50 χρόνια πριν (πιθανότατα μέσω οριζόντιας μετάδοσης από το εκεί ενδημικό είδος *Drosophila willistoni*) και επεκτάθηκε ταχύτατα σε όλες τις ηπείρους (DANIELS *et al.* 1990). Ένα τυπικό στέλεχος P περιέχει 40-50 στοιχεία, εκ των οποίων περίπου το 1/3 είναι λειτουργικά. Στοιχεία P υψηλής ομολογίας σε νουκλεοτιδικό επίπεδο (>90%) με αυτό της *D. melanogaster* έχουν βρεθεί και σε άλλες ταξινομικές ομάδες του γένους *Drosophila* και όλα μαζί συγκροτούν την υποοικογένεια των κανονικών (canonical) στοιχείων P (CLARK & KIDWELL 1997). Εκτός από αυτή υπάρχουν και

άλλες τρεις τουλάχιστον καλά χαρακτηρισμένες υποοικογένειες, γνωστές ως τύπου M, O και T αντίστοιχα, με διαφορές σε επίπεδο DNA περίπου 30% (PINSKER *et al.* 2001). Και οι δύο μηχανισμοί που περιγράφηκαν παραπάνω (κατακόρυφη μετάδοση-απώλεια και οριζόντια μεταβίβαση) έχουν εμπλακεί στην κατανομή των στοιχείων *P* στο γένος *Drosophila* (PINSKER *et al.* 2001). Έξω από το γένος αυτό, έχουν ανακαλυφθεί ελαττωματικά, αδρανή στοιχεία σε δύο μόνο είδη Διπτέρων.

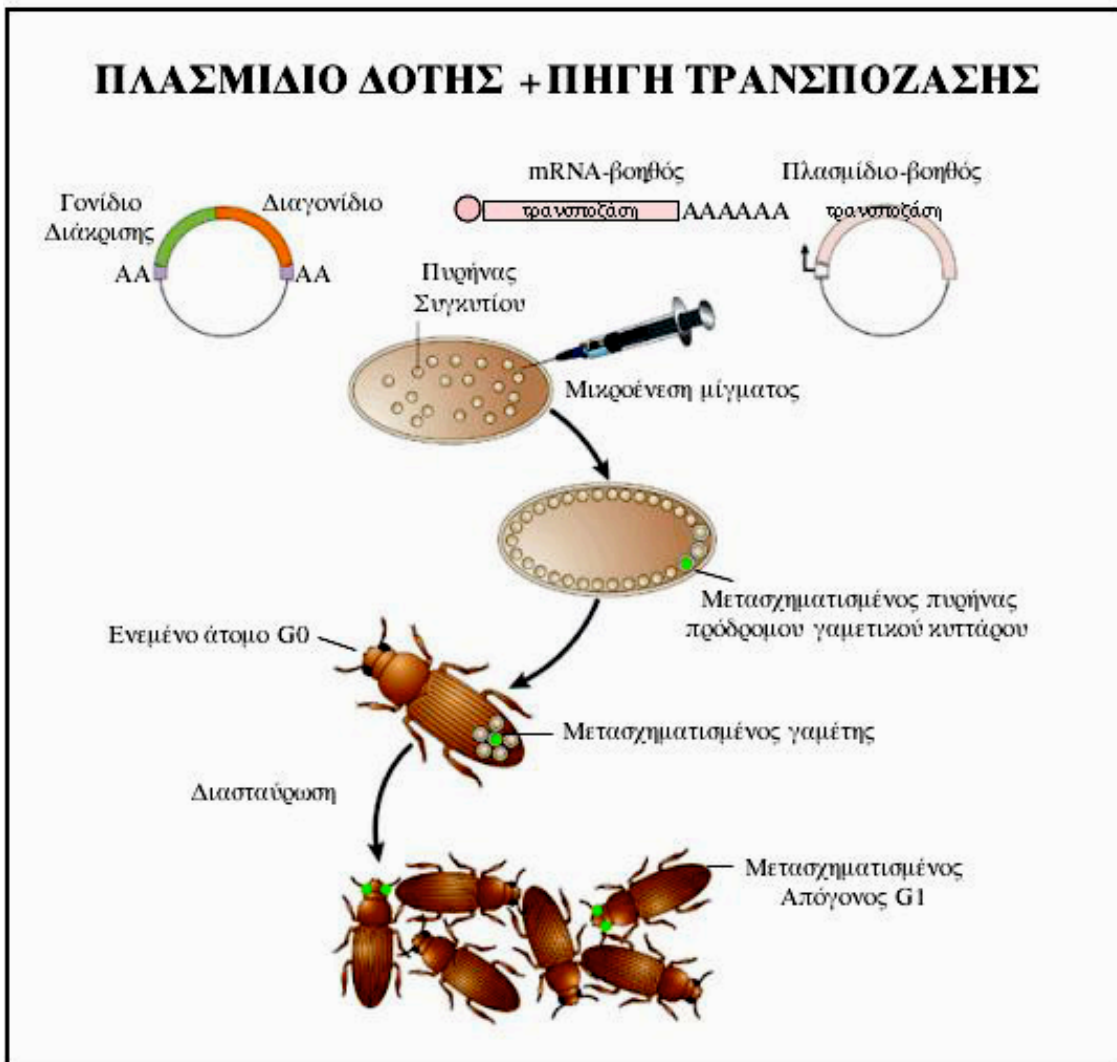
Ο παραπάνω φυλογενετικός περιορισμός αντανακλάται και στη χρήση του στοιχείου *P* ως φορέα μετασχηματισμού. Η μετάθεση του στοιχείου χρειάζεται, εκτός από την τρικοζύαση, και την πρωτεΐνη IRBP (Inverted Repeat Binding Protein; προσδένεται στα εξωτερικά αναστραμμένα άκρα) του ξενιστή (RIO & RUBIN 1988), και η εξάρτηση αυτή περιορίζει την κινητικότητα του *P* μόνο σε δροσοφιλοειδή (HANDLER *et al.* 1993). Εντούτοις, η χρήση του *P* στη *Drosophila* έθεσε το θεωρητικό και πρακτικό πλαίσιο για όλα τα σύγχρονα συστήματα μετασχηματισμού αρθροπόδων, καθιστώντας το στοιχείο *P* ένα σύστημα μοντέλο.

Τα πρώτα πειράματα έδειξαν ότι ένα αυτόνομο στοιχείο, κλωνοποιημένο σε ένα πλασμίδιο, μπορούσε να μετατεθεί στο γονιδίωμα, ύστερα από μικροένεση του πλασμιδίου σε πρόιμα έμβρυα *D. melanogaster* (SPRADLING & RUBIN 1982). Παρενθετικά να σημειωθεί ότι τα αυγά των εντόμων είναι κεντρολεκτιικά και ότι οι πρώτες μιτωτικές διαιρέσεις του ζυγωτικού πυρήνα δε συνοδεύονται από κυτταρικές διαιρέσεις, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός συγκύτιου. Οι πυρήνες ακολούθως μεταναστεύουν στην περιφέρεια του εμβρύου (συγκυτιακό βλαστόδεσμα), όπου κυτταροποιούνται φτιάχνοντας ένα μονόστιβο επιθήλιο γύρω από τη λέκιθο (κυτταρικό βλαστόδεσμα). Τα πρόδρομα κύτταρα της γαμετικής σειράς, τα πολικά κύτταρα στον οπίσθιο πόλο του εμβρύου, είναι τα πρώτα που σχηματίζονται. Προκειμένου να επιτευχθεί ο γενετικός μετασχηματισμός της *Drosophila*, η μικροέγχυση του πλασμιδίου πραγματοποιήθηκε στον οπίσθιο πόλο μη κυτταροποιημένων εμβρύων. Η επόμενη διαπίστωση ήταν ότι η τρικοζύαση ενός αυτόνομου στοιχείου *P* μπορούσε να καταλύσει σε *trans* διάταξη την μετάθεση ενός μη αυτόνομου στοιχείου με ανέπαφα άκρα (RUBIN & SPRADLING 1982). Έτσι επινοήθηκε η ακόλουθη ζευγαρωτή διάταξη που χρησιμοποιείται σε όλα τα διαγονιδιακά συστήματα: το πλασμίδιο-βοηθός (helper), που εκφράζει το γονίδιο της τρικοζύασης, συνενιεται με το πλασμίδιο-δότη (donor), που φέρει ένα μη αυτόνομο τρικοζόνιο 'μαρκαρισμένο' με κάποιο γονίδιο διάκρισης (Εικόνα 3). Τα πρώτα πλασμίδιο-βοηθοί περιείχαν ανέπαφα στοιχεία *P*, τα οποία μπορούσαν να εντεθούν στο γονιδίωμα μαζί με το μη αυτόνομο στοιχείο, αυξάνοντας την πιθανότητα επανακινητοποίησής του. Η πιθανότητα αυτή εξανεμίστηκε με τη χρήση βοηθών όπου τουλάχιστον το ένα άκρο του στοιχείου είχε απομακρυνθεί ('wings clipped' helpers; KARESS & RUBIN 1984). Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, διαγονιδιακά άτομα ανιχνεύονται μεταξύ των απογόνων ορισμένων ενεμένων ατόμων βάση της έκφρασης του γονιδίου διάκρισης.

Στο στοιχείο *P* στηρίχτηκε και η ανάπτυξη διαπλασμιακών δοκιμασιών για τη γρήγορη και έγκυρη αξιολόγηση της επάρκειας ενός στοιχείου να χρησιμοποιηθεί ως φορέας μετασχηματισμού σε ένα νέο είδος (RIO *et al.* 1986). Σε αυτές τις δοκιμασίες ελέγχεται η ικανότητα του τρικοζονίου να εκτέμνεται από ένα πλασμίδιο-δότη (δοκιμασία εκτομής) και να εντίθεται σε ένα πλασμίδιο-στόχο (δοκιμασία μετάθεσης). Μίγμα των τριών πλασμιδίων (δότης, βοηθός και στόχος) εισάγεται σε έμβρυα ή κυτταρικές σειρές του υπο εξέταση είδους και στη συνέχεια αναλύονται τα απομονωμένα πλασμιακά προϊόντα (βλέπε Εικόνες 17 & 18). Εκτός από την αξιολόγηση του στοιχείου-φορέα, οι δοκιμασίες αυτές αποκάλυψαν πολύτιμες λεπτομέρειες του μηχανισμού μετάθεσης και συνέβαλλαν στη βελτιστοποίηση αρκετών παραμέτρων του μετασχηματισμού.

Όπως θα δούμε παρακάτω, εκλεπτισμένες τεχνικές βασισμένες στο στοιχείο *P*, έφεραν επανάσταση στη γενετική ανάλυση του μοντέλου-εντόμου *D.*

melanogaster και έριξαν φως στους μοριακούς μηχανισμούς της ανάπτυξης. Η αξιοποίηση άλλων τρανσποζονίων, με μεγαλύτερο εύρος ξενιστών, συνίσταται ακριβώς στη μεταφορά της τεχνολογίας αυτής σε άλλα είδη.



Εικόνα 3: Γενετικός μετασχηματισμός εντόμων. Για την εισαγωγή στο γονιδίωμα του εντόμου (στην προκειμένη περίπτωση του κολεοπτέρου *Tribolium castaneum*) του επιθυμητού διαγονιδίου (πορτοκαλί) χρησιμοποιείται ένα πλασμίδιο-δότης, που εκτός από το διαγονίδιο φέρει και ένα γονίδιο διάκρισης (πράσινο), πλαισιωμένα από τα ανεστραμμένα άκρα (AA) του μεταθετού στοιχείου. Το πλασμίδιο-δότης μικροενιέται σε πρώιμα μη κυτταροποιημένα αυγά μαζί με μία πηγή τρανσποζάσης: είτε ένα πλασμίδιο-βοηθό που φέρει το γονίδιο της τρανσποζάσης του στοιχείου (ροζ) υπό τον έλεγχο ενός λειτουργικού υποκινητή, είτε *in vitro* παρηγμένο capped mRNA που κωδικοποιεί την τρανσποζάση. Η μικροένεση πραγματοποιείται στον οπίσθιο πόλο του αυγού, όπου μεταναστεύουν οι πυρήνες των πρόδρομων γαμετικών κυττάρων (πυρήνες σε κύκλο). Στα ενεμένα έμβρυα (G₀) η εκφρασμένη τρανσποζάση θα καταλύσει την μετάθεση του τρανσποζονίου (με το διαγονίδιο και το γονίδιο διάκρισης) από το πλασμίδιο-δότη σε κάποιους πυρήνες (πράσινο) πρόδρομων γαμετικών κυττάρων, με αποτέλεσμα ένα υποσύνολο των γαμετών του ενήλικου G₀ να είναι μετασχηματισμένοι (πράσινο). Διασταυρώνοντας το ενεμένο γόνιμο G₀ με κάποιο μη ενεμένο άτομο, οι απόγονοι G₁ που θα προκύψουν από τη γονιμοποίηση των μετασχηματισμένων γαμετών θα είναι μόνιμα μετασχηματισμένοι (διαγονιδιακοί) και αναγνωρίζονται βάση της έκφρασης του γονιδίου διάκρισης (στην προκειμένη περίπτωση έχουν πράσινους φθορίζοντες οφθαλμούς; βλέπε Ενότητα 1.4.1).

1.3.2. Η υπερ-οικογένεια *hAT*

Η ονομασία αυτής της υπερ-οικογένειας προέρχεται από το ακρωνύμιο των 'ιδρυτικών' μελών της *hobo* (ανακαλύφθηκε στη *D. melanogaster*), *Activator/Dissociation* (*Zea mays*) και *Tam3* (*Antirrhinum majus*) (CALVI *et al.* 1991). Μέλη της έχουν ανακαλυφθεί στις περισσότερες ομάδες των ευκαρυωτικών οργανισμών, σε μύκητες, φυτά και ζώα, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου. Τα περισσότερα στοιχεία *hAT* είναι μικρά σε μέγεθος (>4 kb) και αναγνωρίζονται βάση τριών συντηρημένων αμινοξικών περιοχών των τρανσποζασών τους, και της ιδιότητάς τους να αναγνωρίζουν θέσεις-στόχους μήκους 8 bp, οι οποίες διπλασιάζονται μετά την ένθεση (KEMPKEN & WINDHOFER 2001). Η πλειοψηφία των στοιχείων που ενδημούν σε ένα γονιδίωμα είναι μη αυτόνομα; οι περισσότερες ποικιλίες καλαμποκιού περιέχουν το πολύ ένα λειτουργικό στοιχείο *Ac* και περισσότερα από εκατό ελλειματικά *Ds*.

Σε αντίθεση με το *P*, τα στοιχεία *hAT* είναι ενεργά και σε είδη αρκετά απομακρυσμένα από τον αρχικό ξενιστή τους. Για παράδειγμα, το *Ac* μετατίθεται στο γονιδίωμα πολλών φυτών, μεταξύ των οποίων και το φυτό-μοντέλο *Arabidopsis thaliana* (GREVELDING *et al.* 1992). Σε ότι αφορά τα έντομα, το στοιχείο *hobo* απαντάται σε ορισμένους πληθυσμούς της *D. melanogaster* και προκαλεί επίσης δυσγενεσία υβριδίων (YANNOPOULOS *et al.* 1987). Αν και αποτέλεσε το δεύτερο φορέα μετασχηματισμού στο είδος αυτό (BLACKMAN *et al.* 1989) με συχνότητα παραπλήσια του *P* (10-30% των ενεμένων ατόμων δίνουν διαγονιδιακούς απογόνους), η χρήση του δεν καρποφόρησε σε άλλα είδη.

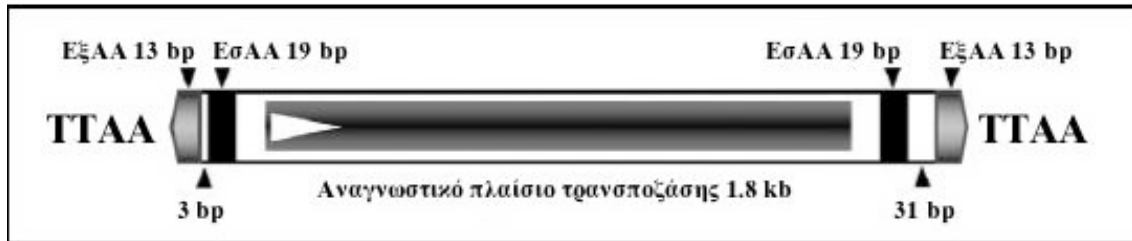
Με τη χρήση εκφυλισμένων εκκινητών που υβριδοποιούν σε συντηρημένες περιοχές των *hAT* τρανσποζασών, απομονώθηκαν με PCR συγγενικά στοιχεία από πολλά είδη εντόμων. Λειτουργικά αντίτυπα βρέθηκαν μόνο για το στοιχείο *Hermes* της οικιακής μύγας *Musca domestica*, το οποίο είναι ευρύτατα διαδεδομένο σε όλους τους φυσικούς πληθυσμούς της (O'BROCHTA *et al.* 1996). Το αυτόνομο στοιχείο έχει μέγεθος 2.75 kb και χαρακτηρίζεται από ατελή ανεστραμμένα άκρα 17 bp και ένα συνεχόμενο πλαίσιο ανάγνωσης που κωδικοποιεί την τρανσποζάση. Φορείς βασισμένοι στο *Hermes* μετασχημάτισαν με μεγάλη αποτελεσματικότητα (30-50%) τη *D. melanogaster* και με μικρότερη (1-10%) τέσσερα ακόμη είδη διπτέρων και ένα είδος κολεοπτέρου, το σκαθάρι *Tribolium castaneum* (ATKINSON *et al.* 2001; HANDLER 2001). Ένα αναπάντεχο εύρημα ήταν η ετερο-κινητοποίηση (cross-mobilization) του στοιχείου *Hermes* από το *hobo*, και αντίστροφα (SUNDARARAJAN *et al.* 1999). Τα τρανσποζόνια αυτά παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία, τόσο στο αμινοξικό επίπεδο των τρανσποζασών τους όσο και στο νουκλεοτιδικό επίπεδο των άκρων τους.

Η ετερο-κινητοποίηση των ανασυνδυασμένων φορέων μετασχηματισμού από ενδογενή στοιχεία υπονομεύει τη σταθερότητα των διαγονιδίων και η πιθανότητά της πρέπει να ελέγχεται όταν ένα τρανσποζόνιο εισάγεται για πρώτη φορά σε ένα νέο οργανισμό. Οι διαπλασμιδιακές δοκιμασίες αποτελούν και σε αυτή την περίπτωση ένα πρόσφορο εργαλείο. Μέσα από αυτό το πρίσμα, γίνεται αντιληπτή η αναγκαιότητα εμπλουτισμού του οπλοστασίου της διαγονιδιακής τεχνολογίας με λειτουργικά στοιχεία, που ανήκουν σε διαφορετικές ταξινομικές ομάδες και προέρχονται από φυλογενετικά απομακρυσμένους οργανισμούς.

1.3.3. Η υπερ-οικογένεια *piggyBac*

Όπως συνέβη στις προηγούμενες περιπτώσεις, έτσι και το πρωτότυπο μέλος αυτής της υπερ-οικογένειας ταυτοποιήθηκε ως η γενεσιουργός αιτία κάποιας μεταλλαγής. Με τη διαφορά ότι ο μεταλλαγμένος φαινότυπος δεν αφορούσε κάποιο έντομο, αλλά τη μορφολογία των πλακών που δημιουργούσε ένας βακυλοϊός που έφερε το στοιχείο (baculovirus), μολύνοντας μία κυτταρική καλλιέργεια του λεπιδοπτέρου εντόμου *Trichoplusia ni* (θυμηθείτε την οριζόντια

μετάδοση!) (HANDLER 2002). Το στοιχείο *piggyBac* έχει μήκος 2.47 kb με εξωτερικά ανεστραμμένα άκρα μεγέθους 13 bp και εσωτερικά ανεστραμμένα άκρα 19 bp. Ανάμεσα στα εσωτερικά άκρα υπάρχει μία μεταγραφική μονάδα μεγέθους 2.1 kb με ένα συνεχόμενο πλαίσιο ανάγνωσης 1.8 kb, που κωδικοποιεί την τρानσποζάση μήκους 594 αα (Εικόνα 4). Το στοιχείο εντίθεται αποκλειστικά στην αλληλουχία-στόχο TTAA, την οποία και διπλασιάζει (GROSSMAN *et al.* 2000). Μία ιδιαιτερότητα του *piggyBac*, που δεν απαντάται συχνά σε άλλα τρानσποζόνια, είναι η ακριβής εκτομή του στοιχείου. Αντίθετα, τα περισσότερα στοιχεία τροποποιούν την εγκαταλειμμένη χρωμοσωμική θέση, είτε αφήνοντας ένα αποτύπωμα (footprint) που περιλαμβάνει τη διπλασιασμένη θέση-στόχο και συχνά αλληλουχίες του ίδιου του μεταθετού, είτε προκαλώντας χρωμοσωμικά ελλείματα.



Εικόνα 4: Δομή του στοιχείου *piggyBac*. Υποδεικνύονται τα εξωτερικά (ΕξΑΑ) και εσωτερικά (ΕσΑΑ) ανεστραμμένα άκρα του στοιχείου, το αναγνωστικό πλαίσιο της τρानσποζάσης και η διπλασιασμένη θέση-ένθεσης TTAA.

Σάρωση των βάσεων δεδομένων για πρωτεΐνες όμοιες με την τρानσποζάση *piggyBac* (SARKAR *et al.* 2003), αποκάλυψε αλληλουχίες στα γονιδιώματα μυκήτων, φυτών, εντόμων (Δίπτερα και Λεπιδόπτερα), καρκινοειδών (στοιχείο *Pokey* στη *Daphnia pulex*), ουροχορδωτών, αμφιβίων, ψαριών και θηλαστικών (*Looper* στον άνθρωπο). Αρκετές από αυτές μάλιστα, αντιστοιχούν σε γονίδια των οργανισμών με άγνωστη προς το παρόν βιολογική δράση. Τα περισσότερα στοιχεία τύπου *piggyBac*, που ανέδειξε η παραπάνω έρευνα, είναι ελλειματικά και εκφυλισμένα, ενώ χρήζει περαιτέρω ανάλυσης ένα πιθανό λειτουργικό στοιχείο στο γονιδίωμα του κουνουπιού *Anopheles gambiae*. Αν και τα δεδομένα δεν είναι επαρκή προς το παρόν, ώστε να εξακριβωθούν οι υπεύθυνοι μηχανισμοί για την ευρύτατη φυλογενετική εξάπλωση των στοιχείων, η υψηλή ομολογία των στοιχείων *piggyBac* των απομακρυσμένων εντόμων *T. ni* (Λεπιδόπτερο) και *Bactrocera dorsalis* (Δίπτερο) προδίδει την οριζόντια μετάδοσή του.

Η σύγκριση 50 αμέραιων αμινοξικών αλληλουχιών ομόλογων της τρानσποζάσης *piggyBac* διέκρινε, βάση του βαθμού συντήρησής τους, την ύπαρξη ξεχωριστών περιοχών στην πρωτεΐνη (SARKAR *et al.* 2003). Η N-τελική περιοχή (αα 1-129 του πρωτότυπου μέλους) δεν είναι υψηλής ομολογίας, αλλά όπως συμβαίνει σε άλλες τρानσποζάσες, ίσως συμμετέχει στην πρόσδεση των ανεστραμμένων άκρων. Η κεντρική περιοχή (αα 130-522 του πρωτότυπου μέλους) περιέχει αρκετές, υψηλά συντηρημένες, αμινοξικές αλληλουχίες. Οι πιο σπουδαίες αφορούν δύο ασπαρτικά οξέα (D268 και D346 της τρानσποζάσης *piggyBac*), των οποίων η θέση αναλογεί στην καταλυτική περιοχή DDE των τρानσποζασών *Tc1/mariner* (DOAK *et al.* 1994). Η C-τελική περιοχή (αα 523-594 του πρωτότυπου μέλους) παρουσιάζει τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση, με αξιοσημείωτη την παρουσία ενός σήματος πυρηνικού εντοπισμού σε αρκετά μέλη.

Δεδομένης της μικρής εξειδίκευσης ως προς τον ξενιστή, αλλά και της ευρείας χρήσης που απολαμβάνει το *piggyBac*, η μεγάλη πλειοψηφία των διαγονιδιακών εντόμων έχει προέλθει από φορείς βασισμένους σε αυτό το στοιχείο. Αν και πρωτοδοκιμάστηκε μόλις το 1998, τα τελευταία πέντε χρόνια αυξάνει συνεχώς η λίστα των εντόμων που έχουν μετασηματιστεί με αυτό το

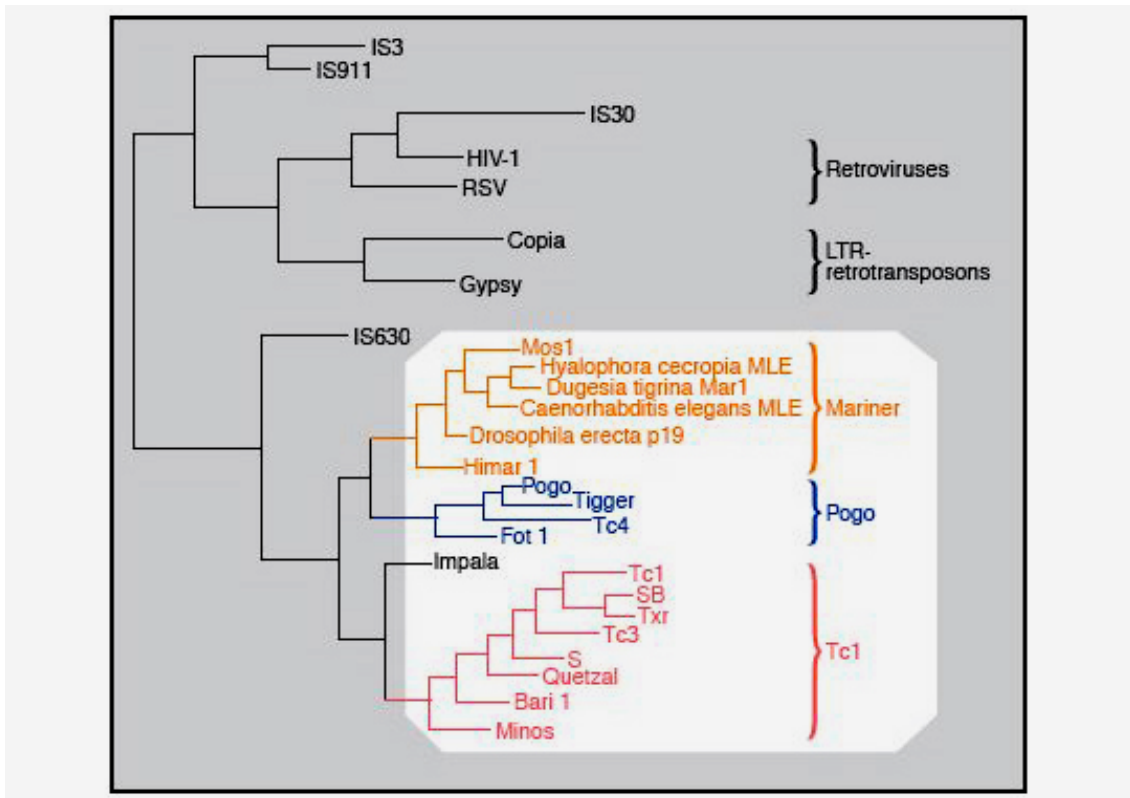
στοιχείο (ATKINSON *et al.* 2001; HANDLER 2001; HANDLER 2002). Οι συχνότητες μετασχηματισμού κυμαίνονται από ισχνές έως εντυπωσιακές, ανάλογα με το είδος (π.χ. είδη με επιβραδυμένο σχηματισμό των γαμετικών κυττάρων επιδεικνύουν υψηλότερες συχνότητες), το μέγεθος του μετατιθέμενου τραπεζοζονίου (αντιστρόφως ανάλογο προς τη συχνότητα), την πηγή της παρεχόμενης τραπεζοζάσης (βλέπε Ενότητα 1.4.3) και άλλους αστάθμητους παράγοντες.

Σε συνεργασία με το εργαστήριο του Martin Klingler, χρησιμοποίησα το στοιχείο *piggyBac* για την εισαγωγή διαγονιδίων στο γονιδίωμα του κολεοπτέρου εντόμου *Tribolium castaneum*. Τα πειράματα αυτά θα περιγραφούν στο δεύτερο μέρος της διατριβής.

1.3.4. Η υπερ-οικογένεια *Tc1/mariner*

Η ανακάλυψη των στοιχείων *Tc1* στον *Caenorhabditis elegans* (EMMONS *et al.* 1983) και *mariner* στη *Drosophila mauritiana* (JACOBSON *et al.* 1986) δεν προϋδέαζε ότι τα στοιχεία αυτά θα αποτελούσαν την κορυφή μόνο ενός πελώριου παγόβουνου. Σήμερα γνωρίζουμε ότι η υπερ-οικογένεια τραπεζοζονίων *Tc1/mariner* είναι η πιο διαδεδομένη στη φύση (PLASTERK *et al.* 1999). Πρωτόζωα, μύκητες, φυτά, σκώληκες, αρθρόποδα, ψάρια, αμφίβια και άνθρωποι, όλοι 'φιλοξενούν' το δικό τους αντιπρόσωπο της υπερ-οικογένειας. Εκτεταμένες αναλύσεις PCR με τη χρήση εκφυλισμένων εκκινήτων σε ταξινομικές ομάδες σπονδυλωτών και ασπονδύλων έχουν επιτρέψει τη μελέτη της εξέλιξης αυτών των στοιχείων. Σε πολλές περιπτώσεις η φυλογένεση των στοιχείων στοιχίζεται επαρκώς με τη φυλογένεση των ξενιστών τους, υποδηλώνοντας την αρχέγονη καταγωγή τους και την κάθετη μετάδοσή τους. Σε άλλες όμως περιπτώσεις φαίνεται ότι τα τραπεζοζόνια έχουν ακολουθήσει τους δικούς τους δρόμους, είτε με την οριζόντια μεταφορά τους, είτε φτιάχνοντας νέους τύπους στοιχείων με την ανταλλαγή αλληλουχιών μεταξύ τους.

Τα στοιχεία της οικογένειας *mariner* διαφοροποιούνται από τα στοιχεία *Tc1* στο συνολικό μέγεθος (1.3 kb έναντι 1.6-1.7 kb), στο μήκος των τελικών αναστραμμένων άκρων (30 bp έναντι 20-460 bp) και σε ορισμένα συντηρημένα αμινοξέα των τραπεζοζασών τους. Ανεξάρτητα από τις αποκλίσεις αυτές, ταυτίζονται εξαιρετικά στη δομή τους και το μηχανισμό της μετάθεσής τους, ώστε να θεωρούνται (μαζί με τα στοιχεία *rogo*) μονοφυλετικής προέλευσης (CAPY *et al.* 1996). Όπως φαίνεται και στο φυλογενετικό δέντρο της Εικόνας 5, οι τραπεζοζάσες τύπου *Tc1/mariner* παρουσιάζουν μακρινή συγγένεια με τις προκαρυωτικές τραπεζοζάσες και τις ρετροϊικές ιντεγκράσες (integrases). Στην οικογένεια *Tc1* ανήκει και το στοιχείο *Minos*, που χρησιμοποίησα για το μετασχηματισμό του κολεοπτέρου *Tribolium castaneum* και του αμφιπόδου καρκινοειδούς *Parhyale hawaiiensis*, αντικείμενα που πραγματεύεται το πρώτο μέρος της διατριβής.



Εικόνα 5: Φυλογένεση της υπερ-οικογένειας *Tc1/mariner* (PLASTERK *et al.* 1999). Οι ρεκομπινάσες με το χαρακτηριστικό ενεργό κέντρο DDE (ή DDD στην περίπτωση των *mariner* και *pogo* στοιχείων) κατηγοριοποιούνται σε δύο κύριους κλάδους: τα DNA τρανσποζόνια και τα ρετρο-στοιχεία. Παράδοξως, τα βακτηριακά μεταθέσιμα στοιχεία (στοιχεία IS), παρόλο που συμπεριλαμβάνονται στα DNA τρανσποζόνια, τοποθετούνται (εκτός από το IS630) με τα ρετρο-στοιχεία. Μέσα στην υπερ-οικογένεια *Tc1/mariner* (άσπρο φόντο) διακρίνονται τρεις ξεχωριστοί κλάδοι, οι *Tc1* (ροζ), *mariner* (πορτοκαλί) και *pogo* (μπλε). Κάθε οικογένεια στοιχείων είναι πιθανότατα μονοφυλετική.

1.3.4.1. Η δομή της τρανσποζάσης των στοιχείων *Tc1/mariner*

Δοκιμασίες ενεργότητας *in vitro* με ανασυνδυασμένες τρανσποζάσες *Tc1* (Vos *et al.* 1996) και *mariner* (LAMPE *et al.* 1996) απέδειξαν την ικανότητά τους να καταλύουν αυτόνομα (χωρίς τη βοήθεια ειδο-ειδικών παραγόντων) την εκτομή και ένθεση των στοιχείων αυτών. Η N-τελική περιοχή της τρανσποζάσης είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση στο DNA. Συγκρίσεις αλληλουχιών, προβλέψεις δευτεροταγούς δομής και κρυσταλλογραφικά δεδομένα συμπίπτουν σε μία διμερή (bipartite) δομή, αποτελούμενη από δύο μοτίβα helix-turn-helix (HTH) (Vos & PLASTERK 1994; PIETROKOVSKI & HENIKOFF 1997). Στις τρανσποζάσες τύπου *Tc1*, το πρώτο μοτίβο HTH έχει παρόμοια στερεοδομή με αυτό της περιοχής paired των συντηρημένων μεταγραφικών παραγόντων Pax/paired (FRANZ *et al.* 1994) (Εικόνα 6). Το δεύτερο μοτίβο, σε όλες τις τρανσποζάσες, έχει στερεοδομή ομοιοδομής (homeodomain), με ένα χαρακτηριστικό τετραπεπτίδιο GRPR να προηγείται της περιοχής HTH (Εικόνα 6). Το N-τελικό τμήμα της τρανσποζάσης *Tc3* παρουσιάζεται διμερισμένο, όταν συγκρυσταλλωθεί με μόρια DNA που αντιστοιχούν στα άκρα του στοιχείου, φέροντας σε γεινίαση δύο DNA άκρα (VAN POUDEROYEN *et al.* 1997). Η δομή αυτή συμφωνεί με το προτεινόμενο μοντέλο δράσης της τρανσποζάσης, που θα περιγραφεί παρακάτω. Με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA επικαλύπτεται μερικώς και το σήμα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal; NLS), που αποτελείται από δύο συναθροισμούς βασικών αμινοξέων (IVICS *et al.* 1996). Μεταλλαγή σε ένα μόνο

συντηρημένο κατάλοιπο αυτής της περιοχής στην τρανσποζάση *Mos1* (*mariner*), αναστέλλει την είσοδο της πρωτεΐνης στον πυρήνα (LOHE *et al.* 1997). Το NLS περιβάλλεται από πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης από την κινάση καζεΐνης II (CKII). Η ρύθμιση της τρανσποζάσης μέσω φωσφορυλίωσης δεν έχει αποδειχτεί ακόμη πειραματικά.

Η C-τελική περιοχή της τρανσποζάσης εμπεριέχει την καταλυτική δράση του μορίου. Η χαρακτηριστική αμινοξική αλληλουχία που ενοποιεί όλες τις ρεκομπινάσες της Εικόνας 5 είναι γνωστή ως μοτίβο DDE. Αποτελείται από δύο γειτονικά αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα (ένα ασπαρτικό και ένα γλουταμικό οξύ), ένα ασπαρτικό οξύ σε μεταβλητή απόσταση (συνήθως >90 αμινοξέα) και ένα γλουταμικό οξύ σε σταθερή απόσταση, 34 ή 35 αμινοξέα παρακάτω (Εικόνα 6). Στις ευκαρυωτικές τρανσποζάσες το διάστημα μεταξύ των τελευταίων αμινοξέων είναι 34 αμινοξέα. Οι τρανσποζάσες τύπου *mariner* (με μοτίβο DD(34)D) διαφοροποιούνται από τις συγγενικές τους *Tc1* (με μοτίβο DD(34)E) στο τελευταίο αμινοξύ, που είναι ασπαρτικό αντί για γλουταμικό οξύ. Ανεξάρτητα από την παραλλαγή του, το παραπάνω μοτίβο θεωρείται ότι συμμετέχει στον καταλυτικό πυρήνα των ενζύμων, πιθανά στρατολογώντας ένα διαθενές κατιόν. Κατευθυνόμενες μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε από τα παραπάνω αμινοξέα εξουδετερώνουν τη δράση όλων των τρανσποζασών που έχουν δοκιμαστεί, *in vivo* και *in vitro* (LOHE *et al.* 1997; VAN LUENEN *et al.* 1994).

A. ΠΕΡΙΟΧΗ HTH ΤΥΠΟΥ PAIRED								
MINOS	1	MVRGKPISKEIRVLRDYFKSGKLT	TEISKQLNLPKSSVHGVIOIFK	KNGNIENNIAN				
SB	1	MGKSKEISQDLRKKIVDLHKS	GSSLGAISKRLKVPRSSVQ	TIVRKYKHHGTTQPSYRS				
TC1	4	SVGCKNLSLDVKKAI	VAGFEQGIPTKMLALQIQRS	PSTIWKVIKKYQTEKSVALLRISP				
PAIRED	38	FINGRPLPNNIRLKIVEMAAD	GIRPCVISRQLRVSHGCVSKILNRY	QETGSIIRPGVIG				
		Helix 1	Helix 2	Helix 3				
B. ΠΕΡΙΟΧΗ HTH ΤΥΠΟΥ HOMEODOMAIN								
MINOS	57	ANRGRTSAITPRDKRQLAKIV	KADRRQSLRN	LASKWSQLTIGKTVKREWTRHELK	SIGY			
SB	57	RS-GRRRVLSPRDE	RTLVRKVQINPR	TAKDLVKMLEETG	TKV-SISTV	KRVLYRHN		
TC1	60	SP-GRPRVT	THRMDRNLRSAREDP	HRDTAD	IQMI	ISSPNEPVP	KRTVRRRLQOAGL	
MOS1	64	EH-GKPEK---	RYEDAELQALL	DEDDAOTOKOLAE	Q---	LEV-SQO	AVSNRLREMGK	
		GRPR	Helix 1	Helix 2	Helix 3			
Γ. ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ DDE(D)								
MINOS	148	WDTIIFS	DEAKF...					
SB	146	WRNVLWSD	ETKI...					
TC1	150	WAKHIWSD	ESKF...					
MOS1	149	LHRIVTG	DEKWI...					
			DE					
MINOS	238	GEFTFOQD	GASSHTAKRTKNWLQYNQMEVLDWPSNSPD	LSPIEN-IW	WLMKNQLR			
SB	237	RKWVFQMD	NNDPKHTSKVVAKWLKDNKV	KVLEWPSQSPDLNPIEN-LW	AELKRRVR			
TC1	240	RGFVFOQD	NNDPKHTSLHVR	SWFQRRRVRLLDWPSQSPDLNPIEH-LW	EELERRLG			
MOS1	242	HRVIFLH	DNAPSHTARAVRDTLET	LNWEVLP	PHAAYS	PD	LAPSYHLFASMGH	ALA
			D			E/D		

Εικόνα 6: Λειτουργικές περιοχές των τρανσποζασών *Tc1/mariner*. Οι τρανσποζάσες των στοιχείων *Minos*, *Sleeping Beauty* (*SB*), *Tc1* και *mariner* (*Mos1*) και η πρωτεΐνη *paired* της *Drosophila* στοιχίστηκαν με το πρόγραμμα *clustalw* και η πρόβλεψη των α-ελίκων των περιοχών HTH (Helix-Turn-Helix) έγινε με το πρόγραμμα PredictProtein (EMBL server). Η αρίθμηση του πρώτου αμινοξέος κάθε αλληλουχίας σε σχέση με την ολόκληρη πρωτεΐνη διακρίνεται αριστερά. (A) Σε κίτρινο φόντο διακρίνονται τα αμινοξέα των τριών α-ελίκων της περιοχής πρόσδεσης στο DNA τύπου HTH *paired*. (B) Σε θαλασσί φόντο διακρίνονται τα αμινοξέα των τριών α-ελίκων της περιοχής πρόσδεσης στο DNA τύπου HTH *homeodomain* και το χαρακτηριστικό τετραπεπτιδίο GRPR (ή παραλλαγές του) που προηγείται. (Γ) Σε πράσινο φόντο διακρίνονται τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου των ρεκομπινασών DDE.

1.3.4.2. Η δομή των άκρων των στοιχείων *Tc1/mariner*

Τα ανεστραμμένα άκρα περιέχουν τις θέσεις πρόσδεσης της τρανσποζάσης. Ο αριθμός και η διάταξη των θέσεων πρόσδεσης διαφέρουν ανάμεσα στα μέλη της υπερ-οικογένειας (PLASTERK *et al.* 1999). Τα 'ιδρυτικά' μέλη *Tc1* και *mariner* έχουν την απλούστερη δομή, με μικρά άκρα που το καθένα περιέχει μία θέση πρόσδεσης. Άλλα στοιχεία, όπως το *Tc3*, οριοθετούνται από μεγάλα άκρα (>400 bp) με δύο θέσεις πρόσδεσης της τρανσποζάσης, εκ των οποίων το εσωτερικό ζευγάρι δεν είναι αναγκαίο για τη μετάθεση των στοιχείων. Μία τρίτη ομάδα στοιχείων παρουσιάζει μία δομή γνωστή ως IR-DR, όπου στην αρχή και στο τέλος κάθε ανεστραμμένου άκρου, μεγέθους 200-250 bp, βρίσκεται μία ευθεία επανάληψη μεγέθους 15-20 bp. Μεταξύ άλλων, τη δομή αυτή μοιράζονται το στοιχείο *Minos* (FRANZ & SAVAKIS 1991) και το ανασυντιθέμενο από ελλειματικά αντίγραφα στοιχείο *Sleeping Beauty* (IVICS *et al.* 1997). Πειράματα προστασίας από πέψη με DNaseI (DNaseI Footprinting) της τρανσποζάσης με τα άκρα του *Minos*, έδειξαν ότι οι ευθείες επαναλήψεις αποτελούν τις θέσεις πρόσδεσης της τρανσποζάσης (Α.Π. & Χ. Σαββάκης, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Επιπλέον, δοκιμασίες κινητικότητάς τόσο με το *Minos* όσο και με το *Sleeping Beauty* μαρτυρούν την αναγκαιότητα και των δύο επαναλήψεων για τη μετάθεση των στοιχείων (CUI *et al.* 2002; Α. Κλινάκης & Χ. Σαββάκης, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Οι θέσεις πρόσδεσης, όπως έδειξαν πειράματα με την τρανσποζάση *Tc1*, έχουν επίσης διμερή δομή (VOS & PLASTERK 1994). Το 5' τμήμα κάθε θέσης αναγνωρίζεται από την τύπου ομοιοδομής HTH περιοχή της τρανσποζάσης, ενώ το 3' τμήμα από την τύπου paired HTH περιοχή.

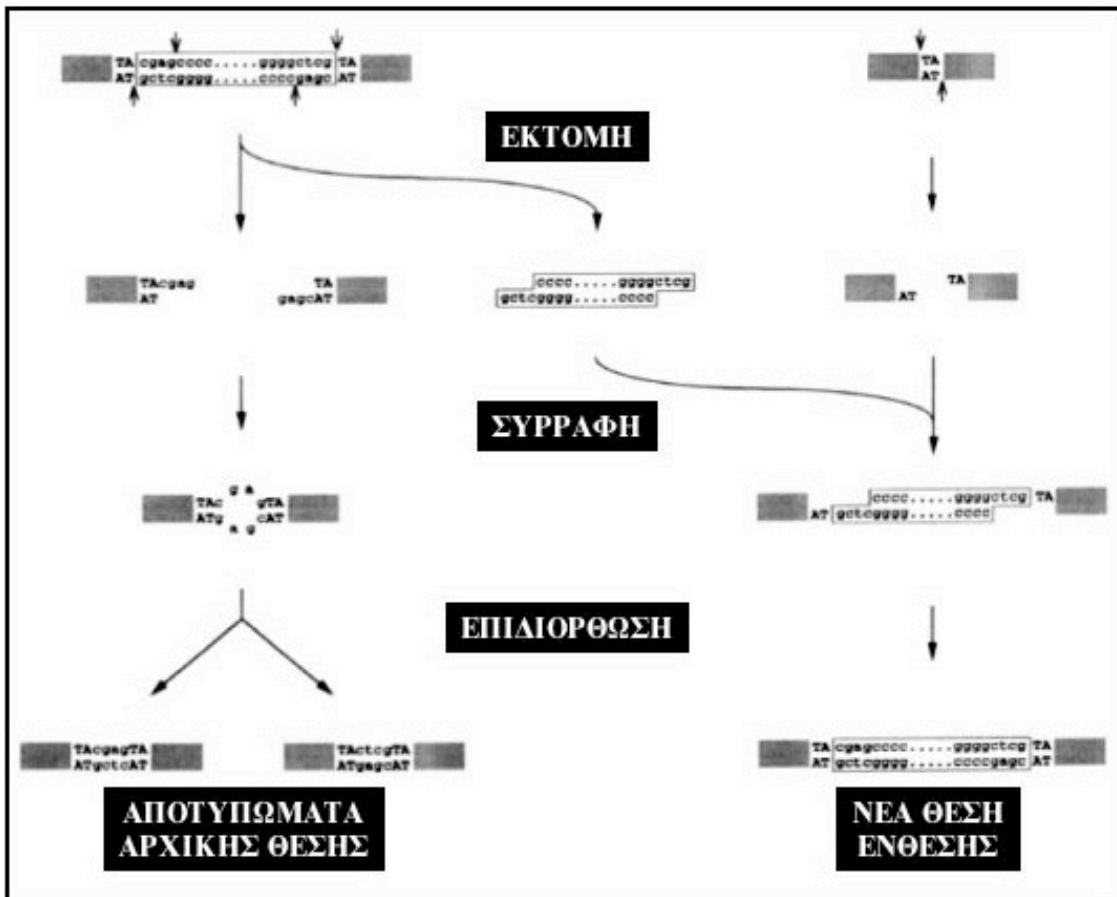
1.3.4.3. Ο μηχανισμός μετάθεσης των στοιχείων *Tc1/mariner*

Η αποκρυπτογράφηση του μηχανισμού μετάθεσης των στοιχείων *Tc1/mariner* στηρίχτηκε σε βιοχημικά πειράματα *in vitro* με ανασυνδυασμένες τρανσποζάσες και σε γενετικά πειράματα κινητοποίησης χρωμοσωμικών ή εξωχρωμοσωμικών αντιτύπων των τρανσποζονίων (PLASTERK *et al.* 1999).

Όλα τα στοιχεία εκτέμνονται από την αρχική θέση τους μέσω ασύμμετρων εγχοπών (staggered nicks) στο δίκλωνο DNA στην περιοχή των άκρων τους, που καταλύονται από την τρανσποζάση. Για να πραγματοποιηθεί αυτή η ενδονουκλεολυτική πέψη πρέπει η τρανσποζάση να προσδέθει σε καθένα των ανεστραμμένων άκρων και να τα φέρει μαζί σε ένα συναπτικό σύμπλεγμα. Η εγχοπή στη μία αλυσίδα κάθε άκρου εισάγεται ακριβώς στα όρια του στοιχείου, ενώ η εγχοπή στην άλλη αλυσίδα εισάγεται λίγα νουκλεοτίδια πιο εσωτερικά, μέσα στα άκρα του στοιχείου (Εικόνα 7). Η τρανσποζάση *Tc1* κόβει δύο νουκλεοτίδια πιο εσωτερικά (VOS *et al.* 1996), η *mariner* τρία (LAMPE *et al.* 1996), ενώ η *Minos* τέσσερα (ARCA *et al.* 1997). Σε κάθε περίπτωση, η μετατιθέμενη διάμεση μορφή περιέχει 3' εξέχοντα άκρα, τα οποία με μία αντίδραση *trans*-εστεροποίησης συγκολλούνται με τις δύο αλυσίδες της θέσης-στόχου. Η αλληλουχία-στόχος για τη συντριπτική πλειοψηφία των στοιχείων *Tc1/mariner* είναι το δινουκλεοτίδιο TA, το οποίο κόβεται συμμετρικά από την τρανσποζάση, ώστε τα δύο εξέχοντα 5' άκρα της να συγκολληθούν με τα 3' άκρα του τρανσποζονίου (Εικόνα 7). Τα δύο χάσματα (gaps) που δημιουργούνται εκατέρωθεν της καινούριας ένθεσης, συμπληρώνονται από την πολυμεράση του ξενιστή, αναγεννώντας τα 5' τελικά νουκλεοτίδια των άκρων και διπλασιάζοντας το δινουκλεοτίδιο TA (ARCA *et al.* 1997; VAN LUENEN *et al.* 1994)(Εικόνα 7). Ανάλογα με το στοιχείο, το χάσμα που συμπληρώνεται σε κάθε άκρο του έχει χαρακτηριστικό μήκος και αλληλουχία (4 νουκλεοτίδια στην περίπτωση του *Tc1*, 5 του *mariner* και 6 του *Minos*).

Οι ασύμμετρη πέψη των άκρων έχει ως αποτέλεσμα την εγκατάλειψη αλληλουχιών του τρανσποζονίου (ως 3' εξέχοντα άκρα) στο δίκλωνο ρήγμα της

αρχικής θέσης ένθεσης (Εικόνα 7). Η επιδιόρθωση του ρήγματος μπορεί να γίνει με δύο διαφορετικούς τρόπους: συγκόλληση των άκρων ή επιδιόρθωσή τους με το μηχανισμό επιδιόρθωσης χάσματος (gap repair) (ARCA *et al.* 1997). Στην πρώτη περίπτωση, αν τα άκρα συγκολληθούν απευθείας, θα δημιουργηθεί μία τοπική ετεροδίπλη δομή (heteroduplex), η οποία με επιδιόρθωση λόγω μη συμπληρωματικότητας (mismatch repair) ή ύστερα από την αντιγραφή του μορίου, θα δώσει δύο εναλλακτικά αποτυπώματα του στοιχείου (Εικόνα 7). Αυτή είναι η πλειοψηφία των αποτυπωμάτων που αφήνουν πίσω τους τα τρανποζόνια *Minos* και περιλαμβάνουν το διπλασιασμένο TA εκατέρωθεν των τεσσάρων τελευταίων νουκλεοτιδίων του αριστερού ή του δεξιού άκρου (TAcgagTA ή TAgtcTA). Σε ό,τι αφορά την επιδιόρθωση χάσματος, αυτή μπορεί να γίνει με μήτρα την αδελφή



Εικόνα 7: Μοντέλο μηχανισμού μετάθεσης και δημιουργίας αποτυπωμάτων του στοιχείου *Minos* (ARCA *et al.* 1997). Το στοιχείο *Minos* (μικρά γράμματα σε πλαίσιο) εκτέμνεται από την αρχική χρωμοσωμική του θέση μέσω ασύμμετρων εγκοπών που εισάγει η τρανσποζάση στα άκρα του (βέλη). Στις περισσότερες περιπτώσεις, η επιδιόρθωση του ρήγματος της αρχικής θέσης πραγματοποιείται με απευθείας συγκόλληση των χρωμοσωμικών άκρων και δημιουργία τοπικού ετεροδιμερούς 2 bp. Με επιδιόρθωση λόγω μη συμπληρωματικότητας ή ύστερα από αντιγραφή του ετεροδιμερούς προκύπτουν τα δύο χαρακτηριστικά αποτυπώματα μεγέθους 6 bp. Κατά την ένθεση του στοιχείου *Minos* το δινουκλεοτίδιο TA της θέσης-στόχου κόβεται συμμετρικά (βέλη) και τα 5' άκρα της συγκολλούνται με τα 3' άκρα της μετατιθέμενης διάμεσης μορφής. Τα δύο χάσματα μεγέθους 6 bp που δημιουργούνται εκατέρωθεν του στοιχείου συμπληρώνονται από την DNA πολυμεράση του ξενιστή, αναγεννώντας τα άκρα του *Minos* και διπλασιάζοντας την αλληλουχία-στόχο TA. Τα γκρι κουτιά αναπαριστούν τις χρωμοσωμικές αλληλουχίες του ξενιστή.

χρωματίδα ή το ομόλογο χρωμόσωμα (ARCA *et al.* 1997). Ανάλογα με την αλληλουχία της μήτρας (αγρίου τύπου ή με ένθεση) η επιδιόρθωση καταλήγει είτε σε πλήρη αποκατάσταση της αρχικής θέσης ένθεσης, είτε σε αναγέννηση του στοιχείου (γονιδιακή μετατροπή). Έτσι κατανοείται η αύξηση του αριθμού των

τρανσποζονίων στο γονιδίωμα των ξενιστών τους, παρα το μη πολλαπλασιαστικό τρόπο μετάθεσής τους. Πλημμελής γονιδιακή μετατροπή δημιουργεί τα μη αυτόνομα στοιχεία με εσωτερικά ελλείματα, που ανιχνεύονται στα γονιδιώματα (ENGELS *et al.* 1990).

1.3.4.4. Στοιχεία *mariner* ως φορείς μετασχηματισμού

Το πρώτο στοιχείο *mariner*, γνωστό ως *peach*, ανακαλύφθηκε ως ένθεση σε ένα σωματικά ασταθές αλληλόμορφο του γονιδίου *white*, που προκαλούσε ένα μωσαϊκό χρώμα ματιού στη *D. mauritiana* (JACOBSON *et al.* 1986). Το *peach* είναι μη αυτόνομο και ο σωματικός μωσαϊκισμός προκαλείται από την ετερο-κινητοποίησή του από ένα άλλο λειτουργικό στοιχείο *mariner*, το *Mos1* (MEDHORA *et al.* 1988). Και τα δύο τρανσποζόνια έχουν μέγεθος 1.29 kb με αναστραμμένα άκρα μήκους 28 bp. Οι διαφορές μεταξύ τους εντοπίζονται σε 11 μόνο νουκλεοτίδια, και η αμινοξική αλλαγή F344L στην τρανσποζάση του *peach* ευθύνεται για την έλλειψη αυτονομίας του (MARUYAMA *et al.* 1991). Παρά την υψηλή ενεργότητα που επιδεικνύει το *Mos1* στην *D. mauritiana*, καθώς και την ανεξαρτησία του από άλλους συμπαραγόντες για τη μετάθεσή του *in vitro*, η χρήση του ως φορέα μετασχηματισμού εντόμων προβληματίζει. Σε όλες τις περιπτώσεις διπτέρων εντόμων που έχει δοκιμαστεί, η συχνότητα μετασχηματισμού είναι πολύ χαμηλή (ATKINSON *et al.* 2001; HANDLER 2001). Εντυπωσιάζει όμως το εύρος των ξενιστών του, αφού έχει δοκιμαστεί με επιτυχία και στο μετασχηματισμό ενός πρωτόζωου (*Leishmania major*) (GUEIROS-FILHO & BEVERLEY 1997) και δύο σπονδυλωτών (κοτόπουλο και zebrafish) (FADOOL *et al.* 1998; SHERMAN *et al.* 1998).

Άξιο σχολιασμού είναι και το στοιχείο *Himar1*, που ανασυστάθηκε ως η κοινή αλληλουχία (consensus) πολλών αντιγράφων που βρέθηκαν στο γονιδίωμα της μύγας *Haematobia irritans* (LAMPE *et al.* 1996). Αν και δεν έχει συνεισφέρει στη λίστα των διαγονιδιακών εντόμων, έχει μεσολαβήσει στο μετασχηματισμό κυττάρων ευβακτηρίων, αρχαιοβακτηρίων και θηλαστικών (ATKINSON *et al.* 2001; HANDLER 2001). Η ενεργότητά του στην *Escherichia coli* επέτρεψε την ανάπτυξη ενός συστήματος επιλογής τροποποιημένων μορφών της τρανσποζάσης με αυξημένη καταλυτική ικανότητα (LAMPE *et al.* 1999). Αν θεωρήσουμε ότι η δράση των μεταθέσιμων στοιχείων μπορεί να αποβεί καταστροφική για τον ξενιστή τους, είναι λογικό η φυσική επιλογή να ευνοεί άτομα με στοιχεία μετριασμένης μεταθετικής ικανότητας. Συνεπώς, σε όλα τα στοιχεία που απομονώνονται είναι δυνατό να αντιστρέψουμε τις συσσωρευμένες μεταλλάξεις με ανάλογες πειραματικές διατάξεις και να αποκτήσουμε συστήματα μετασχηματισμού υψηλής απόδοσης.

1.3.4.5. Το στοιχείο *Minos* ως φορέας μετασχηματισμού

Το στοιχείο *Minos* απομονώθηκε τυχαία σε ένα από τα αντίτυπα του ριβοσωμικού DNA, στο γονιδίωμα του εντόμου *Drosophila hydei* (FRANZ & SAVAKIS 1991). Το πλήρες στοιχείο, μεγέθους 1777 bp, χαρακτηρίζεται από τέλεια αναστραμμένα άκρα μήκους 254 bp, που περιβάλλουν δύο πλαίσια ανάγνωσης (354 και 669 bp αντίστοιχα) χωρισμένα από ένα εσώνιο 60 bp (FRANZ *et al.* 1994) (Εικόνα 8). Με την εκτομή του εσωνίου τα δύο πλαίσια συντήκονται και κωδικοποιούν την τρανσποζάση *Minos* μεγέθους 341 aa. Στην αρχή και στο τέλος κάθε αναστραμμένου άκρου υπάρχουν δύο όμοιες ευθείες επαναλήψεις, που προσδέονται από την τρανσποζάση *in vitro* (Εικόνα 8). Ο πυρήνας (TATTAAT) της αλληλουχίας αυτής στο αριστερό άκρο μοιάζει επίσης με την αλληλουχία TATA των ευκαρυωτικών υποκινητών. Στο δεξί άκρο συναντάται δύο φορές η αλληλουχία AATAAA, που μπορεί να αποτελεί σήμα πολυαδενυλίωσης.

Στο γονιδίωμα της *D. hydei*, το *Minos* αντιπροσωπεύεται με 5 έως 30 αντίγραφα, ανάλογα με το στέλεχος, ενώ αντίθετα απουσιάζει από τη *D. melanogaster* (FRANZ *et al.* 1994). Συγκριτικά πάντως με τα τρανσποζόνια *P*, *hobo* και *mariner*, που επίσης πρωτοανιχνεύθηκαν σε κάποιο δροσοφιλοειδές, το στοιχείο *Minos* παρουσιάζει την ευρύτερη κατανομή στο γένος *Drosophila* (ARCA & SAVAKIS 2000). Η οριζόντια μεταβίβαση μεταξύ φυλογενετικά απομακρυσμένων δροσοφιλοειδών (π.χ. *D. saltans* και *D. mojavensis*) φαίνεται να έχει συνδράμει στην παρατηρούμενη εξάπλωσή του (ARCA & SAVAKIS 2000).

Η χρησιμότητα του στοιχείου ως διαγονιδιακού φορέα πιστοποιήθηκε αρχικά με το μετασχηματισμό της *D. melanogaster* (LOUKERIS *et al.* 1995a). Ο μετασχηματισμός όμως του πρώτου μη δροσοφιλοειδούς, της μεσογειακής μύγας *Ceratitis capitata* (LOUKERIS *et al.* 1995b), και του ανωφελούς κουνουπιού *Anopheles stephensi* (CATTERUCCIA *et al.* 2000), καθιέρωσαν το *Minos* μεταξύ των πιο ελπιδοφόρων φορέων της διαγονιδιακής τεχνολογίας. Η παρούσα εργασία, μαζί με τις επιτυχείς διαπλασμαδικές δοκιμασίες του στοιχείου σε έμβρυα λεπιδοπτέρων και ορθοπτέρων (KLINAKIS *et al.* 2000a; SHIMIZU *et al.* 2000; ZHANG *et al.* 2002), έρχεται να επισφραγίσει την ισχύ της βασισμένης στο *Minos* διαγονιδιακής τεχνολογίας μέσα στα αρθρόποδα. Τέλος, ο μετασχηματισμός του ουροχορδωτού *Ciona intestinalis* (SASAKURA *et al.* 2003) και η μεταθεσιμότητα του στοιχείου *Minos* σε ιστούς και κυτταρικές σειρές θηλαστικών (DRABEK *et al.* 2003; KLINAKIS *et al.* 2000b; ZAGORAIOU *et al.* 2001), επεκτείνουν τις εφαρμογές της παραπάνω τεχνολογίας και στη γενετική μοριακή ανάλυση των σπονδυλωτών.

1	cga gcc cca acc act att aat tcg aac agc atg ttt ttt ttg cag tgc gca atg ttt aac
61	aca cta tat tat caa tac tac taa aga taa cac ata cca atg cat ttc gtc tca aag aga
121	att tta ttc tct tca cga cga aaa aaa aag ttt tgc tct att tcc aac aac aac aaa aat
181	atg agt aat tta ttc aaa cgg ttt gct taa gag ata aga aaa aag tga cca cta tta att
241	cga acg cgg cgt aag ctt acc tta atc tca aga aga gca aaa caa aag caa cta atg taa
301	cgg aat cat tat cta gtt atg atc tgc aaa taa tgt cac aat aca gca tgc aaa aaa att
361	tta gaa ttg ctg cag atc agt aga agt tta gca acg ATG GTT CGT GGT AAA CCT ATT TCT
1	M V R G K P I S
421	AAA GAA ATC AGA GTA TTG ATT AGG GAT TAT TTT AAA TCT GGA AAG ACA CTT ACG GAG ATA
9	K E I R V L I R D Y F K S G K T L T E I
481	AGC AAG CAA TTA AAT TTG CCT AAG TCG TCT GTG CAT GGG GTG ATA CAA ATT TTC AAA AAA
29	S K Q L N L P K S S V H G V I Q I F K K
541	AAT GGG AAT ATT GAA AAT AAC ATT GCG AAT AGA GGC CGA ACA TCA GCA ATA ACA CCC CGC
49	N G N I E N N I A N R G R T S A I T P R
601	GAC AAA AGA CAA CTG GCC AAA ATT GTT AAG GCT GAT CGT CGC CAA TCT TTG AGA AAT TTG
69	D K R Q L A K I V K A D R R Q S L R N L
661	GCT TCT AAG TGG TCG CAG ACA ATT GGC AAA ACT GTC AAG CGA GAG TGG ACG CGA CAC GAA
89	A S K W S Q T I G K T V K R E W T R H E
721	TTA AAA AGT ATT GGA TAT GGT TTT TAT AAA gta tgt ttt gtt att acc tgt gca tcg tac
109	L K S I G Y G F Y K
781	cca ata act tac tcg taa tct tac tcg tag GCC AAG GAA AAA CCC TTG CTT ACG ctt cgt
119	A K E K P L L T L R
841	CAA AAA AAG AAG CGT TTG CAA TGG GCT CGG GAA AGG ATG TCT TGG ACT CAA AGG CAA TGG
129	Q K K K R L Q W A R E R M S W T Q R Q W
901	GAT ACC ATC ATA TTC AGC GAT GAA GCT AAA TTT GAT GTT AGT GTC GGC GAT ACG AGA AAA
149	D T I I F S D E A K F D V S V G D T R K
961	CGC GTC ATC CGT AAG AGG TCA GAA ACA TAC CAT AAA GAC TGC CTT AAA AGA ACA ACA AAG
169	R V I R K R S E T Y H K D C L K R T T K
1021	TTT CCT GCG AGC ACT ATG GTA TGG GGA TGT ATG TCT GCC AAA GGA TTA GGA AAA CTT CAT
189	F P A S T M V W G C M S A K G L G K L H
1081	TTC ATT GAA GGG ACA GTT AAT GCT GAA AAA TAT ATT AAT ATT TTA CAA GAT AGT TTG TTG
209	F I E G T V N A E K Y I N I L Q D S L L
1141	CCA TCA ATA CCA AAA CTA TTA GAT TGC GGT GAA TTC ACT TTT CAG CAG GAC GGA GCA TCA
229	P S I P K L L D C G E F T F Q Q D G A S
1201	TCG CAC ACA GCC AAG CGA ACC AAA AAT TGG CTG CAA TAT AAT CAA ATG GAG GTT TTA GAT
249	S H T A K R T K N W L Q Y N Q M E V L D
1261	TGG CCA TCA AAT AGT CCA GAT CTA AGC CCA ATT GAA AAT ATT TGG TGG CTA ATG AAA AAC
269	W P S N S P D L S P I E N I W W L M K N
1321	CAG CTT CGA AAT GAG CCA CAA AGG AAT ATT TCT GAC TTG AAA ATC AAG TTG CAA GAG ATG
289	Q L R N E P Q R N I S D L K I K L Q E M
1381	TGG GAC TCA ATT TCT CAA GAG CAT TGC AAA AAT TTG TTA AGC TCA ATG CCA AAA CGA GTT
309	W D S I S Q E H C K N L L S S M P K R V
1441	AAA TGC GTA ATG CAG GCC AAG GGC GAC GTT ACA CAA TTC TAA tat taa tta aat tat tgt
329	K C V M Q A K G D V T Q F *
1501	ttt aag tat gat agt aaa tca ca t tac gcc gcg ttc gaa tta ata gtg gtc act ttt ttc
1561	tta tct ctt aag caa acc gtt tga ata aat tac tca tat ttt tgt tgt tgt tgg aaa tag
1621	agc aaa act ttt ttt ttc gtc gtg aag aga ata aaa ttc tct ttg aga cga aat gca ttg
1681	gta tgt gtt atc ttt agt agt att gat aat ata gtg tgt taa aca ttg cgc act gca aaa
1741	aaa aca tgc tgt tcg aat taa tag tgg ttg ggg ctc g

Εικόνα 8: Νουκλεοτιδική αλληλουχία του στοιχείου *Minos* και αμινοξική αλληλουχία της τρανσποζάσης του. Με κανονικούς χαρακτήρες σημειώνεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία και η αρίθμησή της (αριστερά). Τα αναστραμμένα άκρα του στοιχείου είναι σε πλαίσια, μέσα σε κάθε άκρο υποδεικνύονται σε γκρι φόντο οι δύο ευθείες επαναλήψεις-θέσεις πρόσδεσης της τρανσποζάσης, ενώ η κωδική περιοχή της τρανσποζάσης σημειώνεται με κεφαλαία γράμματα. Κάτω από την κωδική περιοχή παρατίθενται με σκούρους χαρακτήρες τα αμινοξέα της τρανσποζάσης και η αρίθμησή τους (αριστερά).

1.4. Η βασική έρευνα στην υπηρεσία της διαγονιδιακής τεχνολογίας

1.4.1. Γονίδια διάκρισης (marker genes)

Η επιλογή του κατάλληλου γονιδίου διάκρισης, που θα κλωνοποιηθεί στο φορέα μετασχηματισμού, είναι κομβικής σημασίας για την ανίχνευση των διαγονιδιακών ατόμων. Τα πρώτα γονίδια διάκρισης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα αγρίου τύπου φυσιολογικά γονίδια. Το στέλεχος του εντόμου που μετασχηματίζονταν έπρεπε οπωσδήποτε να είναι ομόζυγο για μία υπολειπόμενη μεταλλαγή του ίδιου γονιδίου, η οποία να μην επηρεάζει τη βιωσιμότητα των ατόμων και να έχει φυσικά έναν ευδιάκριτο φαινότυπο. Η επιλογή των διαγονιδιακών ατόμων στηρίζονταν συνελπώς στη συμπλήρωση (complementation) της μεταλλαγής από το αγρίου τύπου διαγονίδιο και στη μεταστροφή του φαινοτύπου.

Τα χαρακτηριστικά αυτά πληρούνται από τα γονίδια που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των οφθαλμικών χρωστικών, αφού οι μεταλλαγές τους προκαλούν ορατούς φαινοτύπους και τα μεταλλαγμένα στελέχη καλλιεργούνται ικανοποιητικά σε εργαστηριακές συνθήκες (ASHBURNER *et al.* 1998). Επιπλέον, το σχετικά μικρό μέγεθός τους (~3 kb) συμβαδίζει με τις ανάγκες περιορισμού του συνολικού μήκους του μετατιθέμενου τρानσποζονίου, ώστε να παραμένουν αξιοπρεπείς οι συχνότητες μετασχηματισμού. Τα παραπάνω γονίδια είναι τριών ειδών, ανάλογα με το αν ελέγχουν τη βιοσύνθεση των ομοχρωμών (ommochrome; καφέ χρωστικές), των πτεριδινών (pteridine; κόκκινες χρωστικές) ή συμμετέχουν στη σύνθεση και των δύο. Το γονίδιο *white* των εντόμων εμπίπτει στην τελευταία κατηγορία, κωδικοποιεί έναν μεταφορέα (transporter) τύπου ABC αναγκαίο για τη μεταφορά των προδρόμων χρωστικών στα κύτταρα και η μεταλλαγή του δημιουργεί ένα άχρωμο λευκό μάτι. Μεταλλαγές σε γονίδια που ελέγχουν πρώιμα μεταβολικά στάδια (π.χ. *rosy*, *cinnabar*, *vermilion*) έχουν το επιπλέον πλεονέκτημα ότι δρουν μη αυτόνομα σε κυτταρικό επίπεδο. Αυτό σημαίνει ότι δεν είναι επιτακτική η ιστοειδική έκφραση του γονιδίου διάκρισης για τη μεταστροφή του φαινοτύπου, σε αντίθεση για παράδειγμα με το *white* που χρειάζεται τον ενδογενή υποκινητή για την ορθή λειτουργία του.

Για τα πρώτα έντομα που μετασχηματίστηκαν, υπήρχαν διαθέσιμα στελέχη με τέτοιου είδους μεταλλαγές και χαρακτηρισμένα τα αντίστοιχα γονίδια (ASHBURNER *et al.* 1998; HORN *et al.* 2002). Σε πολλές περιπτώσεις μάλιστα δε χρειάστηκε η κλωνοποίηση του αγρίου τύπου αλληλομόρφου, καθώς το ομόλογο χαρακτηρισμένο γονίδιο ενός συγγενικού είδους μπορούσε να το υποκαταστήσει. Η διαδικασία αυτή μπορεί όμως να αποδειχθεί πολύ χρονοβόρα στην περίπτωση που στο υπό μελέτη είδος δεν υπάρχουν τα κατάλληλα μεταλλαγμένα στελέχη ή δεν είναι γνωστά τα αντίστοιχα φυσιολογικά γονίδια. Με δεδομένη λοιπόν την ύπαρξη τρानσποζονίων με μεγάλο εύρος ξενιστών, η επιστημονική κοινότητα αναζήτησε γονίδια διάκρισης με εφάμιλλη πρακτικότητα.

Τα χαρακτηριστικά που πρέπει να συγκεντρώνει ένα γονίδιο διάκρισης ευρείας εφαρμογής είναι η επικρατής δράση του ακόμη και σε γονοτύπους αγρίου τύπου. Με τα παραπάνω κριτήρια, αρχικά επιλέχθηκαν γονίδια βακτηριακής προέλευσης, τα οποία προσδίδουν στον κάτοχό τους ανθεκτικότητα σε τοξικές ουσίες (ASHBURNER *et al.* 1998). Ενδεικτικά αναφέρονται τα γονίδια *neo*, *opd* και *rdl*, που επιφέρουν ανθεκτικότητα στις ουσίες G418, paraoxon και dieldrin αντίστοιχα. Με την εξαίρεση κάποιων σποραδικών περιπτώσεων, η εφαρμογή τους δεν έτυχε ευρείας αποδοχής για πολλούς λόγους. Καταρχάς, υπήρχε μεγάλος προβληματισμός σχετικά με την κρίσιμη συγκέντρωση του φαρμάκου (αντιβιοτικά, εντομοκτόνα), ώστε να επιβιώνουν μόνο τα μετασχηματισμένα άτομα. Ο μετασχηματισμός με τη χρήση τρानσποζονίων δε μας επιτρέπει να εισάγουμε τα διαγονίδια σε προκαθορισμένες θέσεις στο γονιδίωμα. Τα διαγονιδιακά άτομα που προκύπτουν σε κάθε πείραμα διαφέρουν ως προς τον αριθμό και τη θέση των ενθέσεών τους. Τα επίπεδα έκφρασης των διαγονιδίων

επηρεάζονται από τις γειτονικές χρωμοσωμικές περιοχές και ποικίλλουν μεταξύ ανεξάρτητων διαγονιδιακών σειρών. Συνεπώς, η επιλογή με βάση την ανθεκτικότητα σε φάρμακα είναι επιρρεπής σε σφάλματα (false positives και false negatives). Επιπλέον, η κρίσιμη συγκέντρωση του φαρμάκου διέφερε ανάλογα με το εκάστοτε στέλεχος και είδος. Τέλος, σημαντικός παράγοντας είναι η επικινδυνότητα αρκετών τοξικών ουσιών για το ερευνητικό προσωπικό, αλλά και για τη δημόσια υγεία λόγω πιθανής δημιουργίας στελεχών βακτηρίων και εντόμων, ανθεκτικών σε αντιβιοτικά και εντομοκτόνα αντίστοιχα.

Την επανάσταση στα γονίδια διάκρισης έφερε η χρησιμοποίηση των φθορίζουσών πρωτεϊνών (TSIEN 1998), που απομονώθηκαν από είδη υδροζών (μέδουσες, πολύποδες) και ανθοζών (θαλάσσιες ανεμώνες, κοράλλια). Το ενεργό κέντρο των πρωτεϊνών αυτών (χρωμοφόρο) έχει την ικανότητα να διεγείρεται, απορροφώντας ακτινοβολίες συγκεκριμένου μήκους κύματος (excitation). Επανερχόμενο στη φυσιολογική του κατάσταση εκπέμπει ακτινοβολία σε μεγαλύτερο μήκος κύματος, ορατή σε κάποιο σημείο του φάσματος (emission). Με την προσαρμογή σε στερεοσκοπία και μικροσκοπία μίας πηγής υπεριώδους ακτινοβολίας και των κατάλληλων φίλτρων διέγερσης και εκπομπής, η έκφραση των φθορίζουσών πρωτεϊνών ανιχνεύεται σε κύτταρα ή ζωντανούς οργανισμούς. Το πρώτο γονίδιο απομονώθηκε από τη μέδουσα *Aequorea victoria* (PRASHER *et al.* 1992) και κωδικοποιεί την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green Fluorescent Protein). Η *gfp* πρωτοχρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς (reporter gene) και ως προσαρτημένος επίτοπος (fused tag) για τον εντοπισμό πρωτεϊνών *in vivo* (CHALFIE *et al.* 1994). Η αξιοποίηση της αγρίου τύπου *gfp* ως γονιδίου διάκρισης παρουσίαζε δύο μειονεκτήματα, αφού η αντίστοιχη πρωτεΐνη ήταν αρκετά αδιάλυτη (ανενεργή) και το μήκος κύματος διέγερσής της εντόπιζονταν μέσα στο υπερ-ιώδες φάσμα, θέτοντας σε κίνδυνο τον εκτεθειμένο ζωντανό οργανισμό. Η λύση δόθηκε με την κατασκευή μεταλλαγμένων παραγώγων της GFP, με αυξημένη διαλυτότητα και μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής μετατοπισμένα προς το κόκκινο (CORMACK *et al.* 1996; PATTERSON *et al.* 2001). Τα παράγωγα αυτά είναι γνωστά ως EGFP (Enhanced GFP), ECFP (Enhanced Cyan FP) και EYFP (Enhanced Yellow FP), και επιδεικνύουν πολλαπλάσια ένταση φθορισμού σε σχέση με τη GFP (Πίνακας 1). Η *egfp* επιστρατεύθηκε ευρύτατα ως γονίδιο διάκρισης σε έντομα που είχαν μετασχηματιστεί στο παρελθόν και με τον παραδοσιακό τρόπο, και το κυριότερο, σε έντομα που μέχρι τότε δεν ήταν προσιτά σε διαγονιδιακούς χειρισμούς (HORN *et al.* 2002). Τα πειράματα στους πρώτους οργανισμούς κατέδειξαν την αυξημένη ευαισθησία της επιλογής με *egfp* έναντι άλλων κοινών γονιδίων διάκρισης (π.χ. *white*), καθώς οι φθορίζουσες πρωτεΐνες διακρίνονται σε μικρά ποσά ακόμη και σε άτομα αγρίου τύπου (BERGHAMMER *et al.* 1999; HORN *et al.* 2000; HORN *et al.* 2002).

Πίνακας 1
Φασματικά χαρακτηριστικά φθορίζουσών πρωτεϊνών

Φθορίζουσα πρωτεΐνη	Μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης (nm)	Μήκος κύματος μέγιστης εκπομπής (nm)
wtGFP	395	508
EGFP	488	507
ECFP	434	477
EYFP	514	527
wtDsRed	558	583
DsRedT1	554	586

Τα μοναδικά προβλήματα που ενδέχεται να περιπλέξουν τη χρήση τους είναι ο αυτοφθορισμός του βιολογικού υλικού και η έντονη μελανοποίηση του

ενήλικου εξωσκελετού ορισμένων αρθροπόδων. Η λέκιθος πολλών εμβρύων, η τροφή στο έντερο, ο εξωσκελετός και ο νεκρωτικός ιστός είναι πηγές παραπλανητικού αυτοφθορισμού, που μπορεί να δυσκολεύουν την αναγνώριση του οφειλόμενου στο γονίδιο διάκρισης φθορισμού. Η δοκιμή εναλλακτικών φθορίζουσών πρωτεϊνών, που ενεργοποιούνται σε διαφορετικά μήκη κύματος, και φίλτρων με διαφορετικά τεχνικά χαρακτηριστικά, μπορεί να προσφέρει λύση στο πρόβλημα αυτό. Η μελανοποίηση των ενηλίκων, που συχνά δεν επιτρέπει την ανίχνευση του φθορισμού σε εσωτερικές δομές, αντιμετωπίζεται συνήθως με τη χρήση κατάλληλων ρυθμιστικών αλληλουχιών, ώστε η έκφραση της φθορίζουσας πρωτεΐνης να επάγεται σε πιο πρόωμα αναπτυξιακά στάδια ή σε προσιτές δομές του ενήλικου (π.χ. οφθαλμοί, βλέπε παρακάτω). Σε αρκετά είδη αρθροπόδων, τα διαγονιδιακά άτομα αναγνωρίζονται σε εμβρυικό, προνυμφικό ή νυμφικό στάδιο, που συνήθως είναι πιο διαφανή από τα ενήλικα άτομα.

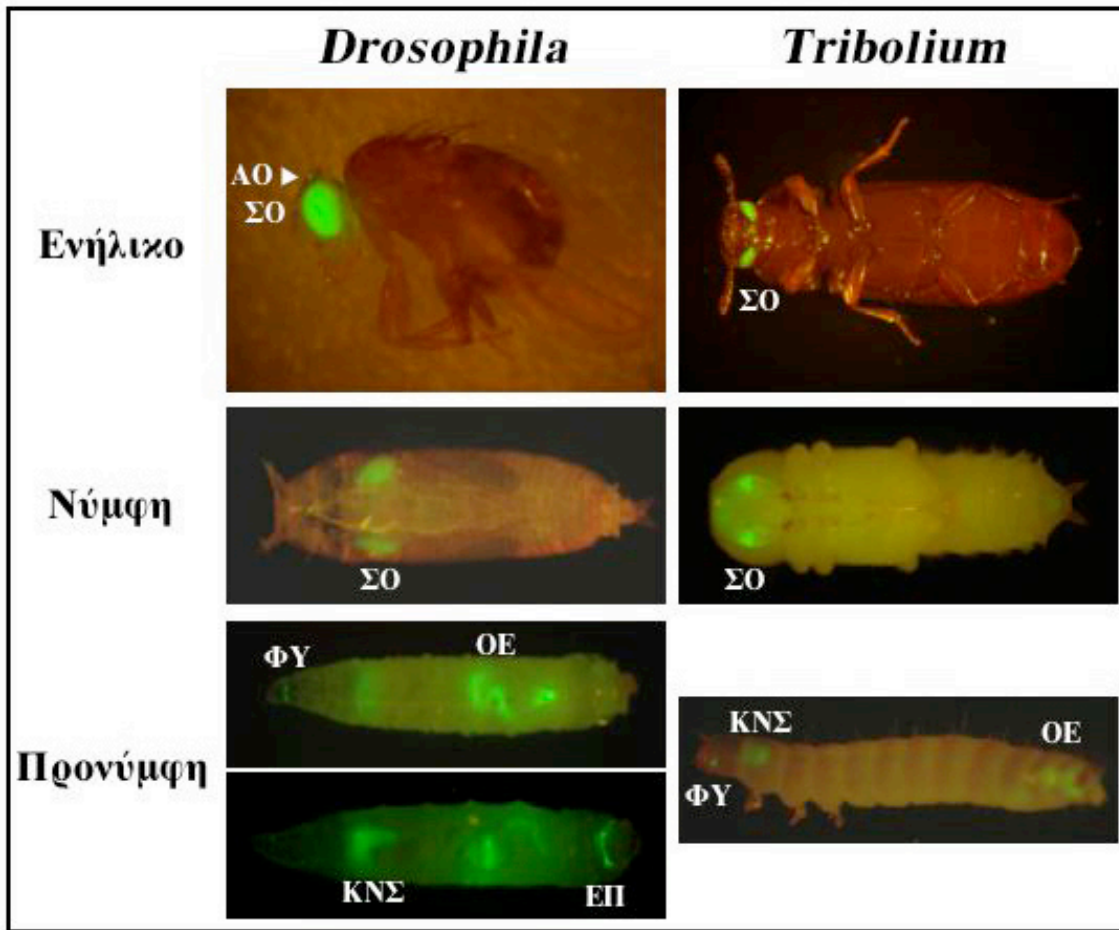
Κάποιες πειραματικές διατάξεις (βλέπε Ενότητα 1.5) επιβάλλουν την ύπαρξη δύο ή περισσότερων τρανσποζονίων στο ίδιο άτομο, καθένα εκ των οποίων αναγνωρίζεται χάρη στο γονίδιο διάκρισης που περιέχει. Από τις φθορίζουσες πρωτεΐνες που αναφέρθηκαν, αυτές που διακρίνονται αναμφισβήτητα μεταξύ τους και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα στο ίδιο άτομο, είναι η ECFP και η EYFP (HORN & WIMMER 2000) (HACKER *et al.* 2003). Η EGFP μπορεί να συνδυαστεί σε τέτοιες διατάξεις και με μία άλλη φθορίζουσα πρωτεΐνη, την DsRed, το γονίδιο της οποίας απομονώθηκε από το κοράλι *Discosoma* (MATZ *et al.* 1999). Η DsRed ενεργοποιείται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος τα οποία δεν επάγουν έντονο ενδογενή αυτοφθορισμό (Πίνακας 1). Και στην περίπτωση της DsRed έχουν επιλεγεί μεταλλαγμένες μορφές που επιταχύνουν την ωρίμανση της πρωτεΐνης και αποφεύγουν τη δημιουργία συσσωμάτων (BEVIS & GLICK 2002). Η πιο κοινή, γνωστή ως DsRedT1, ωριμάζει σε λιγότερο από δύο ώρες και βρίσκει εφαρμογή ως γονίδιο διάκρισης και αναφοράς. Τέλος, το γονίδιο *dsred* έχει χρησιμοποιηθεί ταυτόχρονα με τα *ecfp* και *eyfp* σε ένα τριπλό σύστημα γονιδίων διάκρισης, με πιθανή εφαρμογή σε πολλά αρθρόποδα (HORN *et al.* 2003).

1.4.2. Ρυθμιστικές αλληλουχίες των γονιδίων διάκρισης

Τα γονίδια ελέγχου της βιοσύνθεσης των οφθαλμικών χρωστικών που πρωτοχρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα μετασχηματισμού συνοδεύονταν από τους ενδογενείς υποκινητές τους. Αργότερα, οι κωδικές περιοχές των γονιδίων συνδυάστηκαν και με υποκινητές επαγόμενων (*hsp70*) και συστατικών (*polyubiquitin*, *actin*) γονιδίων (ASHBURNER *et al.* 1998; HORN *et al.* 2002). Οι ίδιοι συστατικοί υποκινητές ήταν οι πρώτοι που συνδυάστηκαν και με τις φθορίζουσες πρωτεΐνες. Η ενεργότητά τους σε όλα τα κύτταρα επιτρέπει τη διάκριση των μετασχηματισμένων ατόμων σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια. Ο υποκινητής του γονιδίου *polyubiquitin* της *D. melanogaster* συνδυασμένος με την *egfp* εφαρμόστηκε επιτυχώς σε πολλά είδη διπτέρων (HORN *et al.* 2002). Εξίσου λειτουργικός αποδείχτηκε και ο υποκινητής του γονιδίου *actin5C* της *D. melanogaster* (HORN *et al.* 2002). Αντίθετα, οι δροσοφιλικό υποκινητές δεν ήταν επαρκείς σε φυλογενετικά απομακρυσμένα είδη λεπιδοπτέρων (TAMURA *et al.* 2000), καθιστώντας αναγκαία την κλωνοποίηση και το χαρακτηρισμό των ρυθμιστικών αλληλουχιών των ομόλογων γονιδίων. Η περιορισμένη φυλογενετικά λειτουργία ενός φυσικού υποκινητή είναι αναμενόμενη, καθώς η πολύπλοκη δομή και λειτουργία του προϋποθέτει τη συντηρημένη δράση πλήθους μεταγραφικών παραγόντων. Μπορεί να υποθεθεί ότι όσο απλούστερη δομή έχει μία ρυθμιστική περιοχή, τόσο αυξάνεται η πιθανότητα ενεργότητάς της σε ένα ευρύ πεδίο οργανισμών.

Η καινοτομία στους υποκινητές των γονιδίων διάκρισης προήλθε από την κατασκευή μιας τεχνητής αλληλουχίας που αναγνωρίζεται από τον συντηρημένο μεταγραφικό ενεργοποιητή Pax-6/eyeless. Το γονίδιο *pax-6* παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των οφθαλμών σε σπονδυλωτά και ασπόνδυλα (CALLAERTS *et al.* 1997). Με επιλογή *in vitro* βρέθηκε μία εξιδανικευμένη αλληλουχία πρόσδεσης ομοδιμερών του Pax-6, γνωστή ως P3 (SHENG *et al.* 1997). Συνδυάζοντας τρεις συνεχόμενες επαναλήψεις της P3 με την αλληλουχία TATA του δροσοφιλικού γονιδίου *hsp70*, φτιάχτηκε ο τεχνητός υποκινητής 3xP3 (HORN & WIMMER 2000). Ο υποκινητής αυτός πρωτοδοκιμάστηκε στο δίπτερο *D. melanogaster* και το κολεόπτερο *T. castaneum*, όπου κατηύθυνε με επιτυχία την έκφραση της *egfp* σε υψηλά επίπεδα στους οφθαλμούς και των δύο ειδών (BERGHAMMER *et al.* 1999). Το γονίδιο 3xP3-EGFP χρησιμοποιήθηκε έκτοτε στη διάκριση μετασχηματισμένων ατόμων σε δεκάδες έντομα προερχόμενα από τέσσερις διαφορετικές ομάδες εντόμων (Δίπτερα, Λεπιδόπτερα, Κολεόπτερα, Υμενόπτερα) (HORN *et al.* 2002; SUMITANI *et al.* 2003). Συνακόλουθα με το ρόλο του *pax-6* στη διαφοροποίηση των φωτοϋποδοχέων, το 3xP3-EGFP εκφράζεται στους φωτοϋποδοχείς των προνυμφών, των νυμφών και των ενήλικων σταδίων όλων των διαγονιδιακών εντόμων (Εικόνα 9). Επιπλέον, στα προνυμφικά στάδια ορισμένων εντόμων ο φθορισμός εντοπίζεται και σε κύτταρα του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος (CNS και PNS), στις εδρικές πλάκες (anal pads) και στο οπίσθιο έντερο (hindgut) (Εικόνα 9). Στα ενήλικα εκφράζεται τόσο στους απλούς οφθαλμούς (π.χ. ocelli της *Drosophila*), όσο και στα ομματίδια των σύνθετων οφθαλμών. Τα ομματίδια των εντόμων αγρίου τύπου είναι οπτικά μονωμένα από τα γειτονικά τους με τις χρωστικές που προαναφέρθηκαν. Επειδή οι οφθαλμικές χρωστικές καταπνίγουν το φθορισμό, ο τελευταίος διακρίνεται μόνο στα ομματίδια που είναι στραμμένα ('κοιτούν') προς τον ερευνητή (BERGHAMMER *et al.* 1999). Αντίθετα, τα μεταλλαγμένα στελέχη με άχρωμους οφθαλμούς επιδεικνύουν έναν εντυπωσιακό φθορισμό σε όλα τα ομματίδια (Εικόνα 9). Σε κάθε περίπτωση, η επιλογή του στελέχους που θα μετασχηματιστεί και το αναπτυξιακό στάδιο διάκρισης των διαγονιδιακών ατόμων προσαρμόζεται στις ιδιαιτερότητες του εξεταζόμενου είδους.

Το εκτεταμένο πεδίο εφαρμογών του και το μικρό μέγεθός του (μόλις 1.3 kb) καθιστούν το 3xP3-EGFP ένα ευρείας χρήσης γονίδιο διάκρισης. Με την ίδια επιτυχία ο υποκινητής 3xP3 έχει συνδυαστεί με όλες τις διαθέσιμες φθορίζουσες πρωτεΐνες (HORN *et al.* 2002). Στα πειράματα που περιγράφονται, χρησιμοποιήσα το 3xP3-EGFP και το 3xP3-DsRedT1 για το μετασχηματισμό του *T. castaneum* και του *P. hawaiiensis*, αντίστοιχα.



Εικόνα 9: Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου διάκρισης *3xP3-EGFP* στη *Drosophila* και το *Tribolium*. Το *3xP3-EGFP* εκφράζεται στους φωτοϊποδοχείς και των δύο οργανισμών σε όλα τα μετεμβρυικά αναπτυξιακά στάδια: στις προνύμφες (ΦΥ), στα ομματίδια των σύνθετων οφθαλμών (ΣΟ) στις νύμφες και τα ενήλικα, και στους απλούς οφθαλμούς (ΑΟ) της ενήλικης *Drosophila*. Κατά το προνυμφικό στάδιο, η έκφρασή του ανιχνεύεται και στο πρόσθιο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), στο οπίσθιο έντερο (ΟΕ) και στις εδρικές πλάκες (ΕΠ) της *Drosophila*. Όλες οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν σε στερεοσκόπιο φθορισμού με οπτικά φίλτρα ανίχνευσης της EGFP. Τα άτομα είναι διατεταγμένα με το πρόσθιο άκρο τους προς τα αριστερά. Πλευρική άποψη: ενήλιζο *Drosophila* και προνύμφη *Tribolium*. Ραχιαία άποψη: προνύμφη *Drosophila* (πάνω φωτο). Κουλιακή άποψη: προνύμφη *Drosophila* (κάτω φωτο), νύμφες *Drosophila* και *Tribolium* και ενήλιζο *Tribolium*.

1.4.3. Πηγές τρανσποζάσης

Η παραδοσιακή μεθοδολογία για την ετερο-κινητοποίηση ενός μη αυτόνομου τρανσποζονίου από το πλασμίδιο-δότη στο γονιδίωμα του ξενιστή χρησιμοποιεί ένα πλασμίδιο-βοηθό για την έκφραση της τρανσποζάσης (Εικόνα 3). Στις αρχικές κατασκευές, η κωδική περιοχή της τρανσποζάσης ήταν κάτω από τον έλεγχο των δικών της ρυθμιστικών αλληλουχιών που παρουσίαζαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης. Για το λόγο αυτό σύντομα αντικαταστάθηκαν από τον υποκινητή του γονιδίου *hsp70* της *D. melanogaster*, που αποδείχτηκε ότι είναι λειτουργικός για αυτό το σκοπό ακόμη και σε φυλογενετικά απομακρυσμένα από τα δίπτερα είδη (π.χ. κολεόπτερα; BERGHAMMER *et al.* 1999). Φαίνεται δηλαδή ότι ο υποκινητής *hsp70* διατηρούσε κάποια βασικά επίπεδα έκφρασης ικανά να παράγουν τα αναγκαία μόρια τρανσποζάσης, ακόμη και χωρίς θερμοκή επαγωγή σε αρκετές περιπτώσεις. Ωστόσο, η καθολικότητα της δράσης του αμφισβητήθηκε από ανεπιτυχείς διαπλασμιδιακές δοκιμασίες και απόπειρες μετασχηματισμού που

πραγματοποιήθηκαν σε ορισμένα είδη (π.χ. ορθόπτερα; ZHANG *et al.* 2002), οπότε αναζητήθηκαν άλλες πηγές τρoσποζάσης.

Η εναλλακτική μεθοδολογία, που αναπτύχθηκε αρχικά για το στοιχείο *Tc3* (RAZ *et al.* 1998) και αργότερα για το *Minos* (ΚΑΡΕΤΑΝΑΚΙ *et al.* 2002), περιελάμβανε τη σύνθεση *in vitro* capped mRNA, που κωδικοποιεί την τρoσποζάση του στοιχείου. Στην περίπτωση του *Minos*, η κωδική περιοχή της τρoσποζάσης πλαισιωνόταν από τις 5' και 3' μη μεταφραζόμενες αλληλουχίες των δροσοφιλικών γονιδίων *hsp70* και *inflated* (α_{PS2} integrin subunit), αντίστοιχα. Αυτό το mRNA-βοηθός κατέλυσε με πρωτοφανή επιτυχία το μετασχηματισμό των εντόμων *D. melanogaster* και *C. capitata*, υπερδιπλασιάζοντας, συγκριτικά με το πλασμίδιο-βοηθό, τις συχνότητες μετασχηματισμού (ΚΑΡΕΤΑΝΑΚΙ *et al.* 2002). Όπως πιστοποιεί και η παρούσα εργασία, αυτή η 'ετοιμοπαράδοτη' μορφή τρoσποζάσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί απαράλλαχτη σε μεγάλο εύρος αρθροπόδων, καταργώντας την ανάγκη χαρακτηρισμού καινούριων υποκινητών ή ελέγχου της ενεργότητας προϋπάρχοντων υποκινητών σε νέα είδη.

Με την ίδια λογική, δοκιμάστηκε και ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη-βοηθός στο μετασχηματισμό της *D. melanogaster* με το στοιχείο *Minos*, αποδίδοντας όμως ένα πολύ χαμηλό ποσοστό μετασχηματισμού (1%, Α.Π. & Χ. Σαββάκης αδημοσίευτα αποτελέσματα).

1.5. Εφαρμογές της διαγονιδιακής τεχνολογίας στη γενετική ανάλυση

Ο μετασχηματισμός της *D. melanogaster* με το στοιχείο *P* επέτρεψε την ανάπτυξη καινοτόμων πειραματικών διατάξεων, που εμβάθυναν τη γενετική ανάλυση σε αυτόν τον οργανισμό-μοντέλο (ADAMS & SEKELSKY 2002). Η πρόσφατη εγκαθίδρυση συστημάτων μετασχηματισμού ευρείας εφαρμογής φιλοδοξεί να μεταφέρει τις μεθοδολογίες αυτές και σε άλλα είδη αρθροπόδων.

Παγίδευση γονιδίων (gene tagging/trapping): Η κλασική γενετική ανάλυση εκμεταλλεύεται τις μεταλλάξεις με ορατό φαινότυπο για να αντλήσει πληροφορίες για τη λειτουργία των υπεύθυνων γονιδίων. Η μεταλλαξογόνες ενθέσεις (insertional mutagenesis) απλοποιούν πολύ τη διαδικασία χαρτογράφησης, καθώς τα τρoσποζόνια, μεταλλάσσοντας ένα γονίδιο, το μαρκάρουν ταυτόχρονα (SPRADLING *et al.* 1995). Το προσβλημένο γονίδιο μπορεί να κλωνοποιηθεί με inverse PCR ή plasmid rescue, να αλληλουχηθεί και να ταυτοποιηθεί εύκολα, ειδικά σε οργανισμούς-μοντέλα με ολοκληρωμένα γονιδιωματικά προγράμματα. Αν και μπορεί να χρησιμοποιηθεί η γνωστή μεθοδολογία της συν-ένεσης των πλασμιδίων βοηθού και δότη, τα πειράματα μεγάλης κλίμακας γίνονται συχνά με μία άλλη διάταξη (COOLEY *et al.* 1988). Ένα στέλεχος μετασχηματισμένο με ένα τροποποιημένο στοιχείο A που κωδικοποιεί την τρoσποζάση ενός διαφορετικού στοιχείου B ('jumpstarter') διασταυρώνεται με ένα στέλεχος που φέρει ένα μη αυτόνομο στοιχείο B ('mutator'). Η κινητοποίηση του στοιχείου B οδηγεί σε τυχαίες ενθέσεις του στο γονιδίωμα, οι οποίες ελέγχονται ξεχωριστά για τις μεταλλάξεις που πιθανώς έχουν προκληθεί. Η προσέγγιση αυτή προϋποθέτει τη χρήση δύο διαφορετικών τρoσποζονίων, που να έχουν διαφορετικά γονίδια διάκρισης και να μην ετερο-κινητοποιούνται (στη συγκεκριμένο παράδειγμα η τρoσποζάση B να μην κινητοποιεί το στοιχείο A).

Για αποδοτικότερη μεταλλαξογένεση, έχουν κατασκευαστεί παραλλαγές του τρoσποζονίου B, ώστε να διακόπτεται η φυσιολογική λειτουργία των ενδογενών γονιδίων με διαφορετικούς τρόπους. Τα ανασυνδυασμένα τρoσποζόνια B μπορεί να περιλαμβάνουν: i) εσωνιακές αλληλουχίες μάτισης (splice donor/acceptor sites) ώστε να τροποποιούν το μάτισμα των μεταγράφων των στοχευμένων γονιδίων (παγίδευση εξονίων; exon trapping) (KLINAKIS *et al.* 2000b), ii) σήματα πολυαδενυλίωσης ή κωδικόνια λήξης για πρόωρο τερματισμό του γονιδιακού προϊόντος, iii) μονωτές (insulators) ώστε να διακόπτεται η

επικοινωνία ενισχυτών-υποκινητή (ROSEMAN *et al.* 1995). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα περισσότερα τρoσποζόνια εντίθενται με μεγαλύτερη συχνότητα σε ορισμένες περιοχές του γονιδιώματος απ' ότι σε άλλες. Για παράδειγμα, το *P* προτιμά το 5' άκρο των γονιδίων (SPRADLING *et al.* 1995), ενώ το *piggyBac* και το *Minos* προτιμούν τα εσώνια (THIBAUT *et al.* 2004; Α. Μεταξάκης & Χ. Σαββάκης, προς δημοσίευση). Η ιδιαιτερότητα κάθε στοιχείου επηρεάζει προφανώς την επιλογή της κατασκευής και υπογραμμίζει, για μία ακόμη φορά, τη σπουδαιότητα χρήσης εναλλακτικών τρoσποζονίων για την πλήρη σάρωση του γονιδιώματος.

Παγίδευση ενισχυτών (enhancer trapping): Το παραπάνω γενετικό σχήμα μπορεί να προσαρμοστεί έτσι ώστε να ανακαλυφθούν οι ρυθμιστικές αλληλουχίες και το πρότυπο έκφρασης ενδογενών γονιδίων (BELLEN *et al.* 1989; BIER *et al.* 1989; O'KANE & GEHRING 1987). Στο τρoσποζόνιο κλωνοποιείται ένα γονίδιο αναφοράς (συνήθως *lacZ* ή *egfp*) κάτω από έναν ασθενή υποκινητή (basal promoter). Αν το στοιχείο εντεθεί κοντά σε κάποια ρυθμιστική περιοχή, αυτή μπορεί να θέσει υπό τον έλεγχο της τον υποκινητή. Στην περίπτωση αυτή, το γονίδιο αναφοράς αναπαράγει το πρότυπο έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου που φυσιολογικά ρυθμίζεται από τον παγιδευμένο ενισχυτή.

Εκτοπική έκφραση γονιδίων (ectopic mis-expression): Η γενετική ανάλυση δεν αντλεί πληροφορίες μόνο από την αναστολή της λειτουργίας των γονιδίων (loss-of-function mutations), αλλά και από την επαγωγή της έκφρασής τους σε ιστούς και αναπτυξιακά στάδια όπου φυσιολογικά παραμένουν σιωπηλά (gain-of-function mutations). Η επαγωγή της εκτοπικής έκφρασης πρέπει να γίνεται ελεγχόμενα, αφού συχνά προκαλεί θνησιμότητα ή στειρότητα. Ο πιο απλός τρόπος ομοιόμορφης εκτοπικής έκφρασης σε όλους τους ιστούς, είναι να εισαχθεί ο αναπτυξιακός παράγοντας στο γονιδίωμα κάτω από έναν επαγωγίμο υποκινητή, συνήθως τον θερμοεξααρτώμενο *hsp70* υποκινητή (BONNER *et al.* 1984).

Ο περιορισμός της εκτοπικής έκφρασης σε συγκεκριμένο τόπο και χρόνο επιτυγχάνεται με μία άλλη ζευγαρωτή διάταξη (BELLO *et al.* 1998; BRAND & PERRIMON 1993). Το ένα τρoσποζόνιο (activator) φέρει έναν ετερόλογο ενεργοποιητή (Gal4 ή tTA) κάτω από έναν ενδογενή υποκινητή, ενώ το άλλο τρoσποζόνιο (effector) περιέχει το επιθυμητό γονίδιο κάτω από τον έλεγχο των αλληλουχιών που ρυθμίζονται από τον ετερόλογο ενεργοποιητή (*UAS* και *TRE* αντίστοιχα). Με τα ανασυνδυασμένα αυτά στοιχεία φτιάχνονται δύο ανεξάρτητα διαγονιδιακά στελέχη, τα οποία διασταυρούμενα επιτρέπουν την εκτοπική έκφραση του γονιδίου στο πρότυπο του ενδογενή υποκινητή.

Τέλος, μία άλλη διαθέσιμη μεθοδολογία συστατικής επαγωγής στηρίζεται στο σύστημα Flp/*FRT* του ζυμομύκητα. Η ρεκομπινάση Flp έχει την ιδιότητα να απομακρύνει μέσω ανασυνδυασμού οποιοδήποτε τμήμα DNA πλαισιώνεται από δύο ομόροπες αλληλουχίες *FRT* (flip recombinase target). Ανάμεσα στην κωδική περιοχή του υπο μελέτη γονιδίου και ένα συστατικό υποκινητή κλωνοποιείται ένα σήμα πολυαδενυλίωσης πλαισιωμένο από *FRT* (BASLER & STRUHL 1994). Αν ένα διαγονιδιακό στέλεχος με την παραπάνω κατασκευή διασταυρωθεί με ένα άλλο που παράγει τη ρεκομπινάση Flp, η αλληλουχία λήξης της μεταγραφής εκτέμνεται και το γονίδιο μπορεί να εκφραστεί σε συγκεκριμένους κλώνους κυττάρων.

Επαγωγή ελλειμμάτων και άλλων χρωμοσωμικών αναδιατάξεων: Οι ενθέσεις των τρoσποζονίων κοντά σε γονίδια είναι αξιοποιήσιμες ακόμη και όταν δεν είναι μεταλλοξογόνες. Όπως είδαμε, η κινητοποίηση μιας ένθεσης αφήνει πίσω της ένα δίκλωνο ρήγμα, το οποίο μπορεί να επισκευαστεί με ποικίλους τρόπους. Αν τα άκρα του ρήγματος νουκλεολυθούν πριν την επιδιόρθωση, είναι δυνατό να προκύψει ένα έλλειμμα που να εκτείνεται αρκετά kb προς τη μία ή και τις δύο κατευθύνσεις. Σε περίπτωση που χαθούν ζωτικές για τη λειτουργία του γονιδίου αλληλουχίες, αποκτώνται πολύ χρήσιμες για τη γενετική ανάλυση μηδενικές μεταλλάξεις (null mutations). Το στοιχείο *P* δημιουργεί συχνά τέτοια ελλείμματα (DANIELS *et al.* 1985), σε αντίθεση με το *piggyBac* που εκτέμνεται πάντα με ακρίβεια. Εναλλακτικά, μπορούν να επαχθούν κοντινές μεταθέσεις ('local jumps')

με μεγάλη συχνότητα, ώστε να απομονωθούν νέες μεταλλάξεις (ZHANG & SPRADLING 1993).

Χρωμοσωμικές αναδιατάξεις μπορούν επίσης να επαχθούν με αντικανονική κινητοποίηση δύο ενθέσεων ενός στοιχείου (ADAMS & SEKELSKY 2002; GRAY 2000). Η τρσνσποζάση δε χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα τα δύο άκρο του ίδιου στοιχείου, αλλά το 5' άκρο του ενός και το 3' άκρο του άλλου αντιτύπου. Η τελική χρωμοσωμική αναδιάταξη εξαρτάται από πολλούς παράγοντες: i) τη διάταξη των στοιχείων, δηλαδή αν βρίσκονται σε διαφορετικές περιοχές στο ίδιο ή σε ξεχωριστά χρωμοσώματα, ii) τον προσανατολισμό των στοιχείων, δηλαδή αν είναι ομόρροπα ή αντίρροπα και iii) τη θέση ένθεσης του υβριδικού τρσνσποζονίου.

Επαγωγή μιτωτικού ανασυνδυασμού για μωσαϊκή ανάλυση: Ένας τρόπος για να ελεγχθεί η λειτουργία ενός γονιδίου σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια, είναι η επαγωγή μιτωτικού ανασυνδυασμού σε άτομα ετερόζυγα για το φυσιολογικό και το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο. Και εδώ βρίσκει εφαρμογή το σύστημα Flp/FRT (GOLIC & LINDQUIST 1989). Το κλειδί της μεθόδου είναι η παρουσία (μέσω μετασχηματισμού) ομόρροπων αλληλουχιών *FRT* στην ίδια θέση των ομόλογων χρωμοσωμάτων. Το ετερόζυγο στέλεχος με τις αλληλουχίες *FRT* διασταυρώνεται με ένα στέλεχος μετασχηματισμένο με το γονίδιο της ρεκομπινάσης Flp κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή *hsp70*. Αν, ύστερα από θερμοεπαγωγή του ενζύμου στο επιθυμητό στάδιο, ανασυνδυαστούν στις θέσεις *FRT* δύο μη αδελφές χρωματίδες θα προκύψουν στις μισές περιπτώσεις κλώνοι κυττάρων ομόζυγοι για τη μεταλλαγή.

Μετα-μεταγραφική αποσιώπηση γονιδίων: Η μετα-μεταγραφική αποσιώπηση γονιδίων μέσω RNAi (RNA interference) αποτελεί μια πολύτιμη εναλλακτική προσέγγιση, στην περίπτωση που δεν υπάρχουν χαρακτηρισμένες μεταλλάξεις του εξεταζόμενου γονιδίου. RNAi μπορεί να επιτευχθεί παροδικά με την ένεση δίκλωνων μορίων RNA στα έμβρυα αρθροπόδων (BUCHER *et al.* 2002; MISQUITTA & PATERSON 1999). Για λεπτομερειακή ανάλυση ενδείκνυται η δημιουργία διαγονιδιακών στελεχών, στα οποία δύο κατοπτρικά ανεστραμμένα αντίτυπα της αλληλουχίας-στόχου, χωρισμένα από ένα συνδέτη (linker), τίθενται υπό τον έλεγχο της ρυθμιστικής περιοχής *UAS*. Η διασταύρωση με ένα στέλεχος που παράγει Gal4 θα επάγει τη δημιουργία δίκλωνου RNA, που θα πυροδοτήσει την αποσιώπηση του γονιδίου στα κύτταρα που εκφράζεται ο ενεργοποιητής (PICCINI *et al.* 2001).

Μελέτη *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών: Η απομονωμένη *cis*-ρυθμιστική αλληλουχία κλωνοποιείται μπροστά από έναν ασθενή υποκινητή (basal promoter) που ελέγχει την έκφραση ενός γονιδίου αναφοράς (συνήθως *lacZ* ή *egfp*), και εισάγεται στο γονιδίωμα με ένα φορέα μετασχηματισμού. Η δράση του ρυθμιστικού στοιχείου συμπεραίνεται από το χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης του γονιδίου αναφοράς (LUDWIG *et al.* 2000a).

Χαρτογράφηση μεταλλαγών: Στα πλαίσια του Berkeley *Drosophila* Genome Project και με τη συνδρομή πολλών δροσοφιλιστών έχει φτιαχτεί μια μεγάλη βιβλιοθήκη, αποτελούμενη από στελέχη με διαφορετικές ενθέσεις του στοιχείου *P*. Οι ενθέσεις αυτές είναι καλά χαρακτηρισμένες και καλύπτουν μεγάλο μέρος του γονιδιώματος. Συνεπώς, χρησιμεύουν ως γενετικοί μάρτυρες για την λεπτομερή χαρτογράφηση μέσω ανασυνδυασμού των μεταλλαγών που έχουν προκύψει με χημικά μεταλλαξογόνα (ZHAI *et al.* 2003).

2. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΚΟΛΕΟΠΤΕΡΟΥ *Tribolium castaneum* ΜΕ ΤΟ ΜΕΤΑΘΕΣΙΜΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΣΤΟΙΧΕΙΟ *Minos*

2.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

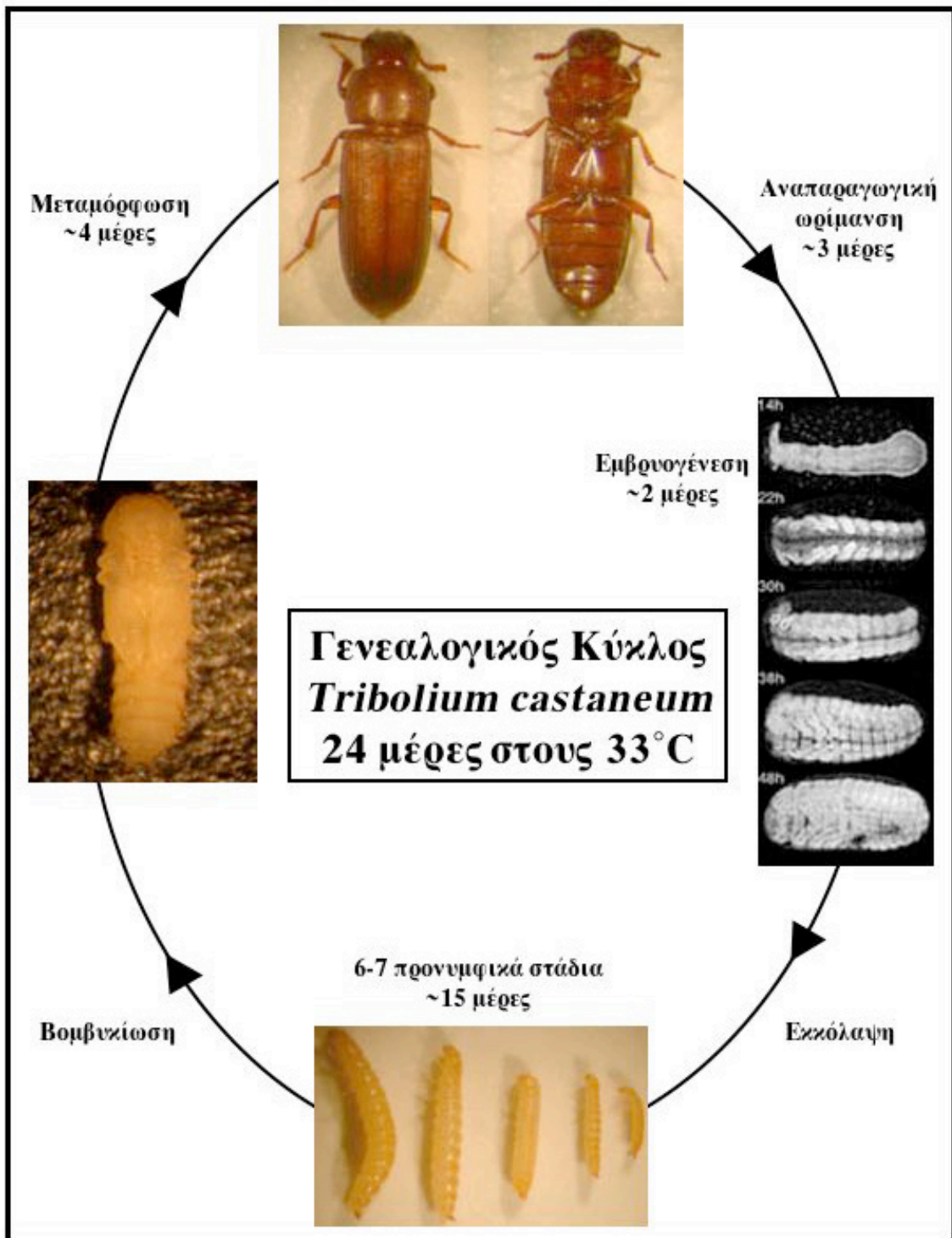
2.1.1. *Tribolium castaneum*: ένα αναδύομενο σκαθάρι-μοντέλο

Το πορφυρό σκαθάρι του αλευριού (red flour beetle) *Tribolium castaneum* είναι ίσως το δεύτερο καλύτερα μελετημένο έντομο μετά τη *D. melanogaster*. Ως πειραματικό μοντέλο χρησιμοποιείται εκτενώς σε αναπτυξιακές μελέτες, εξελικτικές συγκρίσεις και στην ανάπτυξη εφαρμογών καταπολέμησης βλαβερών εντόμων. Το *T. castaneum* συγκαταλέγεται στα ολομετάβολα έντομα, καλλιεργείται εύκολα σε εργαστηριακές συνθήκες και έχει χρόνο γενεάς 24 ημέρες στους 33°C (Εικόνα 10). Τα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης, μέχρι την ολοκλήρωση του κυτταρικού βλαστοδέρματος, συμφωνούν με το γενικότερο πρότυπο ανάπτυξης των εντόμων και διαρκούν περίπου 10 ώρες. Σε σχέση με τη *Drosophila*, η βλαστική ζώνη (germband) του *Tribolium* περιβάλλεται από πολύ πιο εκτεταμένες εμβρυϊκές μεμβράνες (άμνιο και σερόζα), ενώ στον οπίσθιο πόλο δεν είναι εμφανή τα πρόδρομα γαμετικά κύτταρα (HANDEL *et al.* 2000). Η σημαντικότερη όμως διαφορά τους αφορά το πρότυπο μεταμεριδίωσής τους (segmentation). Η *Drosophila* ανήκει στην εξελικτικά πιο πρόσφατη τάξη εντόμων, τα δίπτερα, και αναπτύσσεται ως μακρο-βλαστικό (long-germ) έμβρυο, δηλαδή όλα τα μεταμερή του σώματος σχηματίζονται ταυτόχρονα στο στάδιο του βλαστοδέρματος. Αντίθετα, το *Tribolium*, όπως και η πλειοψηφία των αρχέγονων εντόμων, αναπτύσσεται ως βραχυ-βλαστικό (short-germ) έμβρυο, όπου μόνο τα πρόσθια μεταμερή σχηματίζονται στο βλαστοδερμικό στάδιο, ενώ τα οπίσθια προστίθενται διαδοχικά από μία αυξητική περιοχή πολλαπλασιασμού, στο οπίσθιο μέρος της βλαστικής ζώνης (BUCHER & KLINGLER 2004). Από αυτή τη σκοπιά, το *Tribolium* προσομοιάζει περισσότερο τη σωματογένεση στα έμβρυα των χορδωτών.

Το γονιδίωμα του *Tribolium* έχει παραπλήσιο μέγεθος με της *Drosophila* (200 Mbp) και οργανώνεται σε δέκα χρωμοσώματα (BEEMAN & BROWN 1999). Η γενετική και μοριακή ανάλυση του οργανισμού είναι αρκετά πρόσφορη, αν και στερείται ορισμένα χρήσιμα εργαλεία (π.χ. πολυταινικά χρωμοσώματα και αναστραμμένα χρωμοσώματα εξισορρόπησης (balancer chromosomes)). Εκτός από τη διαθεσιμότητα παραδοσιακών μεθοδολογιών, όπως είναι η απομόνωση μεταλλαγών με χημικά μεταλλαξογόνα και η ανίχνευση του προτύπου έκφρασης αναπτυξιακών παραγόντων (SULSTON & ANDERSON 1996), τα τελευταία χρόνια προσφέρεται και για λειτουργικές γενετικές αναλύσεις. Ειδικότερα, έχει επιτευχθεί ο γενετικός μετασχηματισμός του *Tribolium* με το στοιχείο *piggyBac* (BERGHAMMER *et al.* 1999; LORENZEN *et al.* 2003) και η μετα-μεταγραφική αποσιώπηση γονιδίων με την ένεση μορίων dsRNA σε έμβρυα και γονείς (embryonic/parental RNAi) (BUCHER *et al.* 2002; SCHRODER 2003). Ο εμπλουτισμός του διαγονιδιακού οπλοστασίου και με το στοιχείο *Minos*, ανοίγει το δρόμο στην εφαρμογή ζευγαρωτών διατάξεων (βλέπε Ενότητα 1.5) στη γενετική ανάλυση του *Tribolium*.

Στόχοι της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν i) η επίδειξη της χρησιμότητας του στοιχείου *Minos* ως φορέα μετασχηματισμού του *Tribolium* και ii) η μοριακή γενετική ανάλυση μεγάλου αριθμού ενθέσεων του στοιχείου, ώστε να ελεγχθούν ποιοτικές και ποσοτικές παράμετροι που προσδιορίζουν την πιστότητα του

μηχανισμού μετάθεσης του *Mipus* και την πρακτικότητά του ως εργαλείο μετασχηματισμού.



Εικόνα 10: Γενεαλογικός κύκλος του πορφυρού σκαθαριού του αλευριού *Tribolium castaneum*.

2.1.2. Υψηλές αποδόσεις μετασχηματισμού με τη χρήση DNA και mRNA βοηθών

Ο μετασχηματισμός της γαμετικής σειράς του σκαθαριού *T. castaneum* επιτεύχθηκε με τη χρήση του τρανσποζονίου *Mi{3xP3-EGFP}*. Το ανασυνδυασμένο αυτό τρανσποζόνιο αποτελούνταν από το γονίδιο διάκρισης *3xP3-EGFP* πλαισιωμένο από το αριστερό και το δεξί ανεστραμμένο άκρο του *Minos* (Εικόνα 11A). Τα διαγονιδιακά ενήλικα άτομα διακρίνονταν βάση του φθορισμού που παράγει το γονίδιο *3xP3-EGFP* στα ομματίδια των σύνθετων οφθαλμών (Εικόνα 14B & Γ). Η ανίχνευση του φθορισμού διευκολύνεται σε σκαθάκια που στερούνται οφθαλμικών χρωστικών, όπως το ομόζυγο στέλεχος για τη μεταλλαγή *pearl* που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα (Εικόνα 14A). Ο συγκεκριμένος συνδυασμός γονιδίου διάκρισης και μεταλλαγμένου στελέχους είχε δοκιμαστεί επιτυχώς στο παρελθόν σε πειράματα μετασχηματισμού με το στοιχείο *piggyBac* (BERGHAMMER *et al.* 1999).

Το πλασμίδιο-δότης *pMi{3xP3-EGFP}* με το παραπάνω τρανσποζόνιο συν-ενέθηκε με δύο εναλλακτικές πηγές τρανσποζάσης: i) το πλασμίδιο-βοηθός *pHSS6hsILMi20*, που έφερε την κωδική περιοχή της τρανσποζάσης υπό τον έλεγχο του δροσοφιλικού υποκινητή *hsp70* (χρησιμοποιήθηκε χωρίς θερμοϊκή επαγωγή) ή ii) *in vitro* παρηγμένο capped mRNA που κωδικοποιούσε την τρανσποζάση *Minos*. Σε κάθε περίπτωση μικροενέθηκαν περίπου 600 προβλαστοδεσμικά (μη κυτταροποιημένα) έμβρυα *pearl* (Πίνακας 2). Τα ενήλικα που επέζησαν της διαδικασίας (άτομα G_0) επαναδιασταυρώθηκαν μεμονωμένα με σκαθάκια *pearl* και οι απόγονοί τους (άτομα G_1) ελέγχθηκαν για φθορισμό στα μάτια. Από τα 167 γόνιμα G_0 που είχαν ενεθεί με το πλασμίδιο-βοηθό, 19 έδωσαν διαγονιδιακούς απογόνους (DNA σειρές), ενώ 67 εκ των 207 γόνιμων G_0 που ενέθηκαν με το βοηθό-mRNA γέννησαν διαγονιδιακά άτομα (RNA σειρές) (Πίνακας 2). Η συχνότητα μετασχηματισμού ανέρχεται σε 11.4% με το βοηθό-DNA και 32.4% με το βοηθό-RNA. Η ανάλυση χ^2 επιβεβαιώνει τη σημαντικότητα της παρατηρούμενης (2.8 φορές) διαφοράς στις συχνότητες μετασχηματισμού ($p < 0.001$).

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

Σύνοψη πειραμάτων μετασχηματισμού *Tribolium*

Πλασμίδιο-δότης ^α	Πηγή τρανσποζάσης ^β	Αρ. ενεμένων εμβρύων	Αρ. επιζώντων ενηλίκων G_0	Αρ. γόνιμων ενηλίκων G_0	Αρ. G_0 με διαγονιδιακούς απογόνους	Συχνότητα μετασχηματισμού ^α (%)
<i>pMi{3xP3-EGFP}</i>	DNA	~ 600	171	167	19	11.4
<i>pMi{3xP3-EGFP}</i>	RNA	~ 600	210	207	67	32.4

^α Μικροενέθηκε σε συγκέντρωση 500 ng/μl.

^β Μικροενέθηκε σε συγκέντρωση 375 ng/μl.

^γ Ποσοστό γόνιμων G_0 που δίνουν διαγονιδιακούς απογόνους.

2.1.3. Μοριακή ανάλυση των ενθέσεων του *Minos* στο γονιδίωμα

Η ένθεση του στοιχείου *Minos* στο γονιδίωμα του εντόμου επιβεβαιώθηκε με ανάλυση κατά Southern. Κάθε δείγμα γενομικού DNA περιελάμβανε 12 διαγονιδιακά αδελφικά σκαθάκια G_1 (προερχόμενα από τον ίδιο ενεμένο γονέα G_0). Συνολικά αναλύθηκαν 36 τέτοια δείγματα, 12 από τις DNA και 24 από τις RNA σειρές (Πίνακες 3 και 4). Ο αριθμός των ενσωματωμένων αντιτύπων του *Mi{3xP3-EGFP}* προσδιορίστηκε με δύο διαφορετικούς συνδυασμούς πέψης/ανιχνευτή (restriction enzyme/probe). Τα δείγματα DNA που κόπηκαν με *PvuII* υβριδοποιήθηκαν με την κωδική περιοχή της *egfp* (ανιχνευτής E), ενώ αυτά

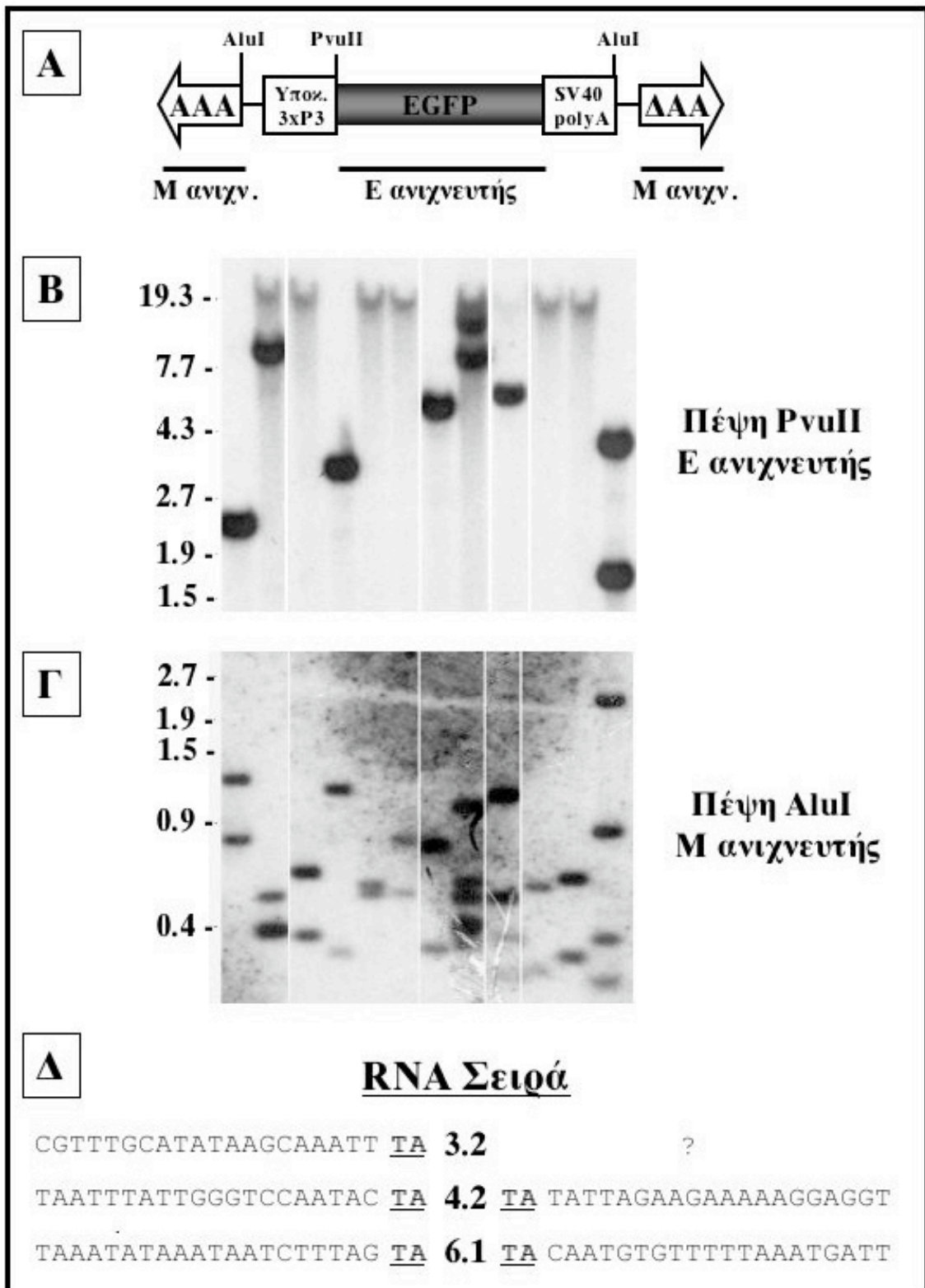
που κόπηκαν με AluI υβριδοποιήθηκαν με τα άκρα του *Minos* (ανιχνευτής M). Ο πρώτος συνδυασμός αποκαλύπτει μία ζώνη ανά ένθεση (Εικόνα 11B) και ο δεύτερος δύο ζώνες ανά ένθεση (Εικόνα 11Γ). Αξίζει να σημειωθεί ότι αλληλουχίες ομόλογες του *Minos* δε βρέθηκαν σε γενωμικό DNA μη μετασηματισμένων σκαθαριών *pearl*, ούτε με τον ανιχνευτή M στην ανάλυση κατά Southern, ούτε χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικούς για τα άκρα σε αντίδραση PCR. Η απουσία στοιχείων συγγενικών του *Minos* από το γονιδίωμα του κολεοπτέρου είναι πολύ σημαντική για τη σταθερότητα των ενθέσεων, καθώς περιορίζει τον κίνδυνο επανακινητοποίησής τους από ενδογενείς πηγές τρानσποζάσης.

Η ανάλυση κατά Southern ανίχνευσε στις DNA και RNA σειρές ένα σύνολο 63 ενθέσεων. Όλες χαρακτηρίζονται από ζώνες μεγαλύτερες από 1.45 kb με τον ανιχνευτή E και μεγαλύτερες από 0.26 kb και 0.38 kb με τον ανιχνευτή M. Δεδομένου ότι τα μεγέθη αυτά είναι τα μικρότερα που αναμένονται για ακέραια αντίγραφα του *Mi{3xP3-EGFP}*, συμπεραίνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις εντέθηκαν στο γονιδίωμα άρτια τρानσποζόνια.

Οι ενθέσεις που περιέχουν αλληλουχίες του πλασμιδίου-δότη (εκτός του τρानσποζονίου) αναμένεται να δώσουν μία ζώνη 1.58 kb με τον ανιχνευτή E και δύο ζώνες 0.27 kb και 0.4 kb με τον ανιχνευτή M, χάρη στην παρουσία θέσεων αναγνώρισης για τα δύο ένζυμα και στον κορμό του πλασμιδίου. Τα μεγέθη αυτά ανιχνεύτηκαν σε τρεις περιπτώσεις, αποκλειστικά σε σειρές με πολλαπλά αντίτυπα του *Mi{3xP3-EGFP}* (Πίνακες 3 και 4). Η ύπαρξη των εξωτερικών αλληλουχιών και στις τρεις σειρές επιβεβαιώθηκε υβριδοποιώντας με ανιχνευτή τον κορμό του πλασμιδίου. Η συντριπτική πλειοψηφία των ενθέσεων δεν περιείχε τέτοιες αλληλουχίες, συνηγορώντας υπέρ της μετάθεσής τους με το φυσιολογικό μηχανισμό εκτομής και ένθεσης.

Περαιτέρω επιβεβαίωση στηρίχτηκε στην απομόνωση με inverse PCR και στην αλληλούχηση του γενωμικού DNA, που πλαισιώνει τις ενθέσεις του *Minos* σε τρεις ανεξάρτητες σειρές RNA. Και στις τρεις ενθέσεις βρέθηκε ότι τα ανεστραμμένα άκρα του *Mi{3xP3-EGFP}* πλαισιώνονταν από τη χαρακτηριστική διπλασιασμένη αλληλουχία-στόχο TA, και παρακείμενες αλληλουχίες άσχετες με αυτές του πλασμιδίου-δότη (Εικόνα 11Δ). Αναζήτηση στις βάσεις δεδομένων αποκάλυψε ότι σε μία από αυτές τις περιπτώσεις (σειρά 4.2), το στοιχείο *Minos* είχε εντεθεί σε μία από τις επαναλήψεις του δορυφορικού DNA του *Tribolium* (UGARKOVIC *et al.* 1996).

Εικόνα 11 (επόμενη σελίδα): Μοριακή ανάλυση των ενθέσεων του *Minos* στο γονιδίωμα του *Tribolium castaneum*. (A) Σχηματική αναπαράσταση του τρानσποζονίου *Mi{3xP3-EGFP}*. Οριοθετείται από το αριστερό και το δεξί ανεστραμμένο άκρο του *Minos* (AAA και ΔAA αντίστοιχα). Η κωδική περιοχή του γονιδίου *egfp* είναι υπό τον έλεγχο του τεχνητού υποκινητή *3xP3* και ακολουθείται από την περιοχή πολυαδενυλίωσης του ιού SV40 (SV40 polyA). (B) Ανάλυση κατά Southern δειγμάτων γενωμικού DNA, που έχουν επωαστεί με PvuII και υβριδοποιηθεί με ανιχνευτή την κωδική περιοχή του γονιδίου *egfp* (E ανιχνευτής). Κάθε διαδρομή αντιστοιχεί σε γενωμικό DNA απομονωμένο από 12 διαγονιδιακά άτομα G₁, που έχουν προέλθει από τον ίδιο γονέα G₀. Αναμένεται μία ζώνη ανά ένθεση του *Minos*. (Γ) Ανάλυση κατά Southern των ίδιων δειγμάτων γενωμικού DNA, που έχουν επωαστεί με AluI και υβριδοποιηθεί με ανιχνευτή το άκρο του στοιχείου *Minos* (M ανιχνευτής). Αναμένονται δύο ζώνες ανά ένθεση. (Δ) Γενωμικές αλληλουχίες του *Tribolium*, που πλαισιώνουν τρεις ενθέσεις του *Minos* (RNA σειρές 3.2, 4.2 και 6.1; Πίνακας 4). Το διπλασιασμένο δινουκλεοτίδιο-στόχος TA (με σκούρους χαρακτήρες και υπογραμμισμένο) πλαισιώνει τα άκρα του *Minos* σε κάθε ένθεση.



2.1.4. Ποσοστό μετασχηματισμένων απογόνων ανά G₀

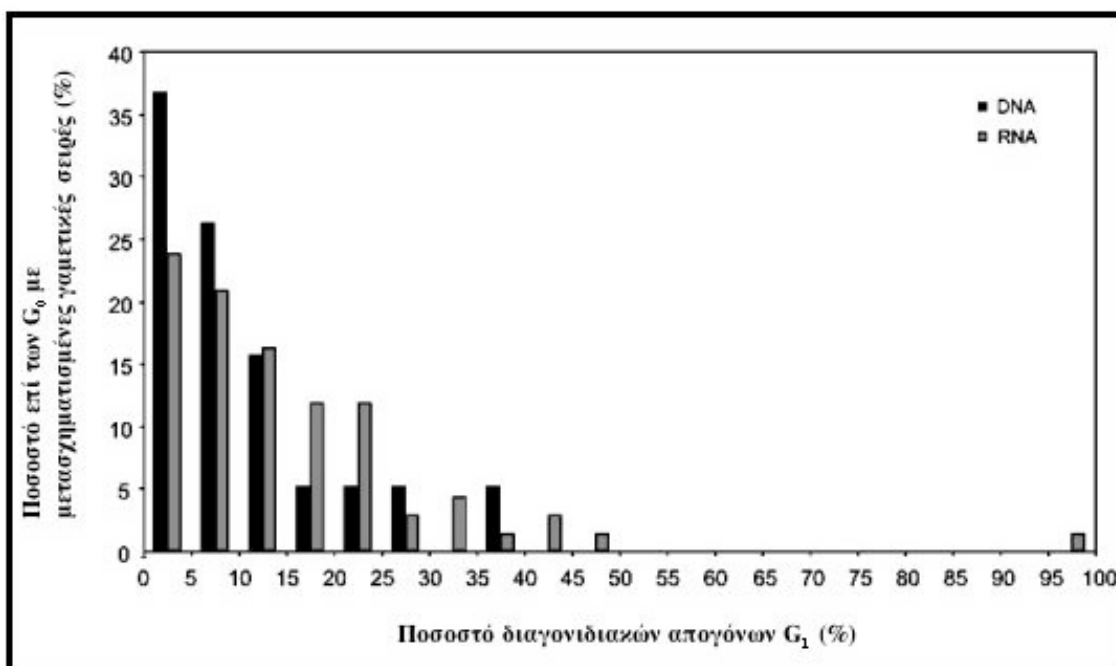
Σε όλες τις διαγονιδιακές σειρές, DNA και RNA, υπολογίστηκε το ποσοστό των μετασχηματισμένων απογόνων που έδωσε κάθε G₀. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 12, η κατανομή των ποσοστών είναι πλατιά. Τα ποσοστά για τους γονείς που

ενέθηκαν με το πλασμίδιο-βοηθό κυμαίνονταν μεταξύ 1% και 35% και είχαν μέση τιμή 10.3%. Η διασπορά των ποσοστών για τους γονείς που ενέθηκαν με το mRNA-βοηθό ήταν μεγαλύτερη: μεταξύ 1% και 96%, με μέση τιμή 15.2%. Τα ποσοστά αυτά δείχνουν ότι, ενώ το βοηθό-RNA συγκριτικά με το βοηθό-DNA τριπλασιάζει σχεδόν το ποσοστό των ενεμένων ατόμων που παράγουν διαγονιδιακούς απογόνους, η αύξηση αυτή ανέρχεται μόλις στο 50% σε ότι αφορά το ποσοστό των διαγονιδιακών απογόνων. Ο αριθμός των ατόμων G_1 που πρέπει να ελεγχθεί κατά μέσο όρο για την ανεύρεση ενός διαγονιδιακού σκαθαριού είναι παραπλήσιος και για τις δύο πηγές τρανσποζάσης (7-10 άτομα).

2.1.5. Αριθμός ενθέσεων στη γαμετική σειρά των ενεμένων ατόμων G_0

Αναλύοντας κατά Southern 12 διαγονιδιακούς απογόνους από ένα G_0 (βλέπε παραπάνω), ουσιαστικά ελέγξαμε ένα δείγμα 12 μετασχηματισμένων γαμετών της γαμετικής σειράς του συγκεκριμένου G_0 . Πιλοτικά πειράματα έδειξαν ότι στις συνθήκες υβριδοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν, η ανάλυση ήταν αρκετά ευαίσθητη, ώστε να ανιχνεύονται ενθέσεις σε ένα μόνο από τα δώδεκα άτομα του δείγματος.

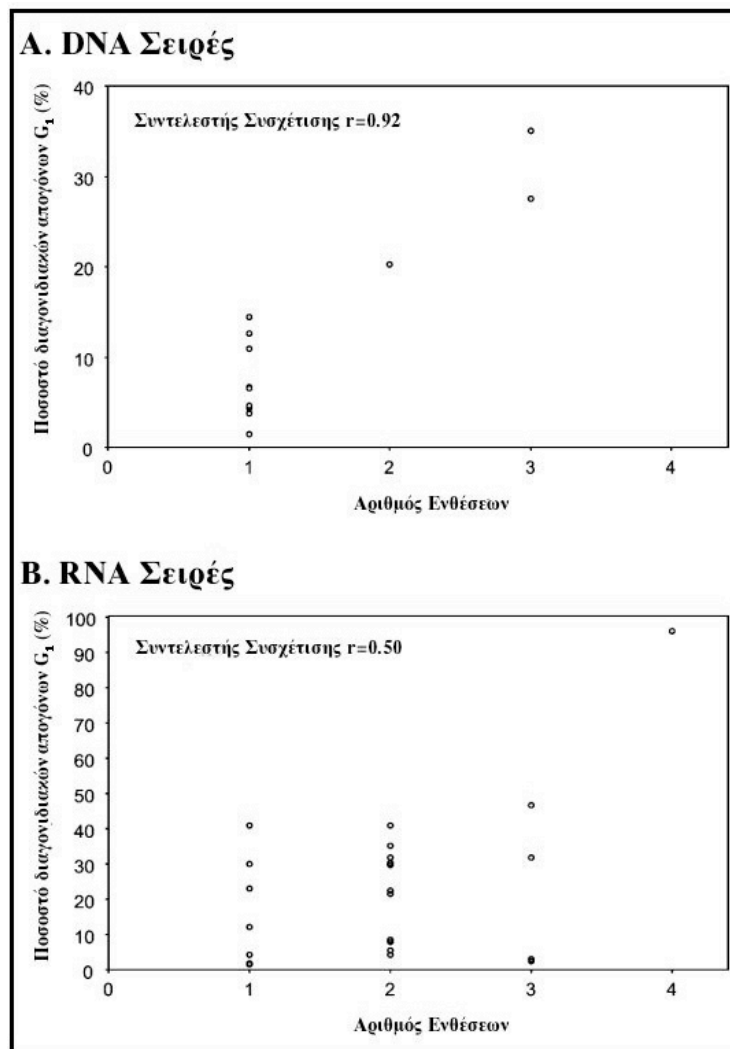
Μεταξύ των 12 DNA σειρών που αναλύθηκαν, 9 σειρές περιείχαν μία μοναδική ένθεση, 1 σειρά δύο ενθέσεις και 2 σειρές τρεις ενθέσεις (Πίνακας 3). Τα αντίστοιχα νούμερα για τις RNA σειρές ήταν 8 με μία ένθεση, 11 με δύο και 5 με τρεις ή περισσότερες ενθέσεις (Πίνακας 4). Είναι προφανές ότι το βοηθό-RNA, συγκριτικά με το βοηθό-DNA, δεν αυξάνει απλώς τη συχνότητα μετασχηματισμού, αλλά καταλύει την εισαγωγή περισσότερων ενθέσεων του *Minos* σε κάθε γαμετική σειρά (πολλαπλές ενθέσεις στο 67% έναντι του 25% των σειρών).



Εικόνα 12: Κατανομή των ποσοστών των διαγονιδιακών απογόνων G_1 στις DNA (μαύρες ράβδους) και RNA (γκρι ράβδους) σειρές. Τα άτομα G_0 ομαδοποιήθηκαν με βάση το ποσοστό των διαγονιδιακών απογόνων τους (εύρος κλάσης 5%) και κάθε κλάση εκφράστηκε ως κλάσμα επί τοις εκατό του συνόλου των G_0 με διαγονιδιακούς απογόνους. Παρόμοιος αριθμός απογόνων G_1 αναλύθηκε στις DNA και RNA σειρές.

Για να απαντηθεί το ερώτημα αν υπάρχει σχέση μεταξύ του αριθμού των ενθέσεων στη γαμετική σειρά κάθε γονέα G_0 και στο ποσοστό των

μετασηματισμένων απόγονων G_1 που αυτός παράγει, υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης μεταξύ των δύο μεταβλητών, ξεχωριστά για τις DNA και RNA σειρές (Εικόνα 13). Ο συντελεστής συσχέτισης είναι υψηλός για τις DNA σειρές ($r=0.92$), επιβεβαιώνοντας την υπόθεση ότι οι μεταβλητές αυτές σχετίζονται μεταξύ τους και εξαρτώνται από την ενεργότητα της τρικοζύσης σε κάθε ενεμένο άτομο G_0 . Παραδόξως, ο συντελεστής συσχέτισης που υπολογίστηκε για τις RNA σειρές είναι αρκετά μικρότερος ($r=0.50$). Η ανακολουθία αυτή φαίνεται καθαρά σε ενεμένα G_0 που περιείχαν πολλά τρικοζόνια αλλά λιγότερο από το 5% των απογόνων τους ήταν μετασηματισμένοι και, αντίστροφα, σε άτομα G_0 με μοναδικές ενθέσεις που έδωσαν υψηλά ποσοστά (>20%) διαγονιδιακών απογόνων. Οι τελευταίες περιπτώσεις εξηγούνται, αν υποθέσουμε ότι το βοηθό-RNA μπορεί να επάγει τη μετάθεση του *Mi{3xP3-EGFP}* σε πολύ πρόωμα αναπτυξιακά στάδια, δημιουργώντας μεγάλους κλώνους γαμετικών κυττάρων μετασηματισμένων με την ίδια ένθεση.



Εικόνα 13: Συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των ενθέσεων της γαμετικής σειράς και του ποσοστού διαγονιδιακών απογόνων G_1 ανά άτομο G_0 . **(Α)** Διάγραμμα DNA σειρών, που επιδεικνύουν υψηλή συσχέτιση μεταξύ των δύο τιμών. **(Β)** Διάγραμμα RNA σειρών, που επιδεικνύουν χαμηλότερη συσχέτιση μεταξύ των δύο τιμών. Τα δύο διαγράμματα έχουν διαφορετική κλίμακα στον άξονα y.

2.1.6. Αριθμός ενθέσεων στο γονιδίωμα των μετασχηματισμένων ατόμων G_1

Ορισμένοι γονείς G_0 περιέχουν πολλαπλά αντίτυπα του στοιχείου *Minos* στη γαμετική τους σειρά. Ανάλογα με το αν βρίσκονται στον ίδιο ή σε διαφορετικούς γαμέτες, τα αντίτυπα αυτά μπορεί να κληρονομηθούν ως πολλαπλές ενθέσεις σε ένα άτομο G_1 ή ως μοναδικές ενθέσεις σε διαφορετικούς απογόνους G_1 . Για να διακρίνουμε αυτές δύο περιπτώσεις, προσδιορίστηκε ο αριθμός των τρανσποζονίων στο γονιδίωμα ατόμων G_1 . Αυτό έγινε έμμεσα με την ανάλυση κατά Southern δειγμάτων, που το καθένα περιελάμβανε 12 διαγονιδιακά αδελφικά άτομα G_2 , που προέκυψαν από επαναδιασταυρώσεις μεμονωμένων ατόμων G_1 με σκαθάκια *pearl*. Παράλληλα, στις ίδιες διασταυρώσεις μετρήθηκε το ποσοστό διαχωρισμού (segregation ratio) του διαγονιδίου *Mi{3xP3-EGFP}* στους απογόνους G_2 (λόγος μετασχηματισμένων προς μη μετασχηματισμένων ατόμων), ώστε να εξαχθεί ο αριθμός των μη συνδεδεμένων ενθέσεων σε κάθε G_1 . Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο αριθμός των ενθέσεων που αποκαλύπτει η υβριδοποίηση συμφωνεί με εκείνο που εξάγεται από το λόγο διαχωρισμού, εκτός τριών εξαιρέσεων, οι οποίες πιθανά αντιστοιχούν σε συνδεδεμένες ενθέσεις (Πίνακες 3 και 4).

Τα άτομα G_1 που προέρχονταν από G_0 με μοναδικές ενθέσεις (σύμφωνα με την ανάλυση κατά Southern) περιείχαν όλα, όπως αναμενόταν, το ίδιο ακριβώς αντίτυπο. Σημαντικό ποσοστό όμως και των G_1 που προέρχονταν από G_0 με πολλαπλά τρανσποζόνια, περιείχαν ένα μόνο από τα πολλά αντίτυπα των γονέων τους (Πίνακες 2 και 3). Συνολικά, στις διαγονιδιακές σειρές που αναλύθηκαν βρέθηκε ότι η πλειοψηφία των διαγονιδιακών ατόμων G_1 προκύπτει από γαμέτες μετασχηματισμένους με ένα στοιχείο *Minos*.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3
Ανάλυση κατά Southern και ανάλυση διαχωρισμού DNA σειρών

# G ₀	Φύλο	Αρ. φθοριζόντων απογόνων G ₁	Σύνολο απογόνων G ₁	Ποσοστό (%) διαγονιδιακών G ₁	Αρ. ενθέσεων στη γαμετική σειρά του G ₀ ^α	Διασταύρωση G ₁ ^β	Ανάλυση διαχωρισμού ^γ	Αρ. ενθέσεων στο άτομο G ₁ ^δ	Φύση των ενθέσεων ^ε
1	A	33	228	14.47	1	1.1	1		
2	A	5	352	1.42	1	2.1	1		
3	A	23	344	6.69	1	3.1	1		
4	A	60	297	20.20	2	4.1	1		
5	A	13	297	4.38	1	5.1	1		
6	A	13	283	4.59	1	6.1	1		
						6.2	1		
7	A	39	310	12.58	1	7.1	1		
8	A	118	337	35.01	3	8.1	2	3	2 συνδεδεμένες, πλασμιδ. αλλ.
						8.2	1	2	
9	Θ	15	231	6.49	1	9.1	1		
10	Θ	78	283	27.56	3	10.1	3	3	
						10.2	1		
						10.3	1	1	
11	Θ	8	213	3.76	1	11.1	1		
12	Θ	20	184	10.87	1	12.1	1		

^α Συμπεραίνεται από την ανάλυση κατά Southern των διαγονιδιακών απογόνων του G₁.

^β Ένας ή περισσότεροι διαγονιδιακοί απόγονοι κάθε G₀ επαναδιασταυρώθηκαν κατά μονάς με άτομα *pearl*.

^γ Ο αριθμός των ενθέσεων που συμπεραίνεται από το λόγο διαχωρισμού (segregation ratio) του γονιδίου διάκρισης *3xP3-EGFP* στην επόμενη γενιά G₂ (π.χ. 1:1⇒1 ένθεση; 3:1⇒2 ενθέσεις κ.ο.κ.).

^δ Συμπεραίνεται από την ανάλυση κατά Southern των διαγονιδιακών απογόνων του G₂.

^ε Η πλειοψηφία των ενθέσεων του *Minos* που αναλύθηκαν ήταν κατά μονάς και μη συνδεδεμένες. Στη στήλη καταγράφονται είτε οι περιπτώσεις συνδεδεμένων ενθέσεων (όπως συμπεραίνεται από τη διαφορά μεταξύ των πραγματικών και των ανεξάρτητα διαχωριζόμενων ενθέσεων) είτε οι ενθέσεις που φέρουν πλασμιδιακές αλληλουχίες (όπως συμπεραίνεται από την ανάλυση κατά Southern).

ΠΙΝΑΚΑΣ 4
Ανάλυση κατά Southern και ανάλυση διαχωρισμού RNA σειρών

# G ₀	Φύλο	Αρ. φθοριζόντων απογόνων G ₁	Σύνολο απογόνων G ₁	Ποσοστό (%) διαγονιδιακών G ₁	Αρ. ενθέσεων στη γαμετική σειρά του G ₀ ^α	Διασταύρωση G ₁ ^β	Ανάλυση διαχωρισμού ^γ	Αρ ενθέσεων στο άτομο G ₁ ^δ	Φύση των ενθέσεων ^ε
1	A	93	311	29.90	1	1.1	1	1	
						1.2	1	1	
2	A	74	249	29.72	2	2.1	2	2	
						2.2	1	1	
3	A	33	273	12.09	1	3.1	1	1	
						3.2	1	1	
4	A	69	322	21.43	2	4.1	1	1	
						4.2	1	1	
5	A	62	204	30.39	2	5.1	1	1	
6	A	108	264	40.91	1	6.1	1	1	
						6.2	1	1	
7	A	261	272	95.96	≥4	7.1	3	4	2 συνδεμένες
						7.2	1	2	
						7.3	2	3	
						7.4	1	1	
8	A	12	222	5.41	2	8.1	2	2	
						8.2	1	1	
9	A	14	175	8.00	2	9.1	1	1	
10	A	89	191	46.60	≥3	10.1	1	1	2 συνδεμένες πλάσμιδ. αλλ.
						10.2	1	2	
11	A	6	330	1.82	1				
12	Θ	14	167	8.38	2				

13	Θ	11	256	4.30	2	
14	Θ	44	190	23.16	1	
15	Θ	44	197	22.34	2	
16	Θ	66	207	31.88	2	
17	Θ	11	267	4.12	1	
18	A	9	283	3.18	3	
19	A	103	292	35.27	2	
20	Θ	66	207	31.88	3	πλασμιδ. αλλ.
21	Θ	11	268	4.10	1	
22	Θ	64	157	40.76	2	
23	A	8	316	2.53	3	
24	A	5	334	1.50	1	

^{α-ε} Βλέπε υποσημειώσεις στον Πίνακα 3.

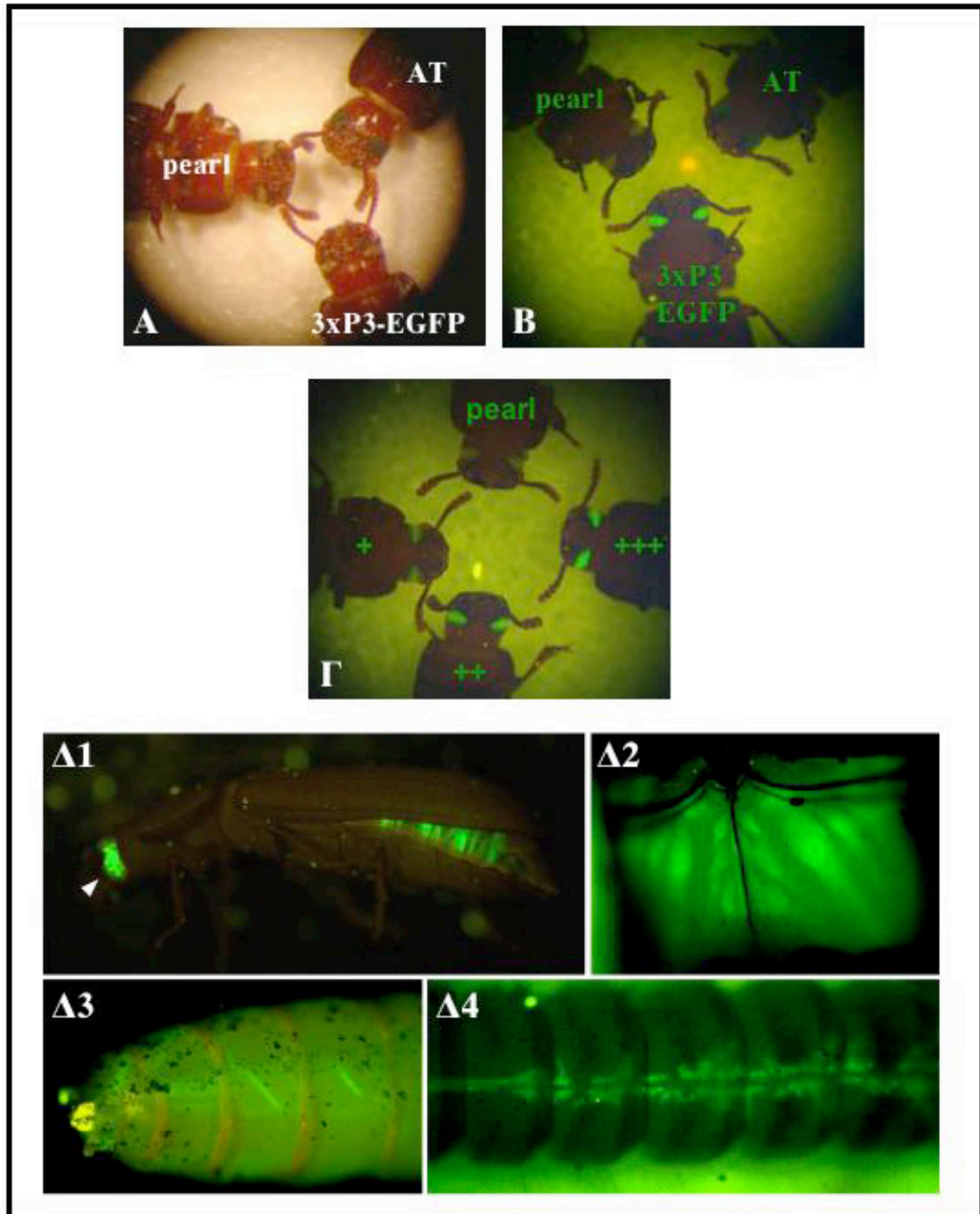
2.1.7. Ανάλυση έντασης φθορισμού στα διαγονιδιακά άτομα

Είναι γνωστό ότι η έκφραση των διαγονιδίων επηρεάζεται από τη χρωμοσωμική περιοχή όπου εντίθενται. Και στα πειράματα που περιγράφονται εδώ παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές στην εκφραστικότητα του γονιδίου διάκρισης *3xP3-EGFP* μεταξύ των διαγονιδιακών σειρών (Εικόνα 14Γ). Η έκφραση κυμαίνονταν από ισχυρό φθορισμό σε όλο τον οφθαλμό έως αδύναμο φθορισμό σε λίγα ομμάτια.

Επιπλέον, εξετάστηκε κατά πόσο οι διαγονιδιακοί απόγονοι G_1 ενός G_0 επεδείκνυν ομοιόμορφους οφθαλμικούς φθορισμούς ή όχι. Ανομοιογενείς απόγονοι ανιχνεύτηκαν στο 1/4 των DNA και RNA διαγονιδιακών σειρών που εξετάστηκαν. Η πλειοψηφία αυτών των G_0 περιείχε πολλαπλές ενθέσεις, οι οποίες διαχωριζόμενες στους απογόνους προκαλούν φθορισμούς διαφορετικής έντασης. Βέβαια, υπήρχαν και άτομα G_0 με ομοιόμορφους απογόνους, που η ανάλυση κατά Southern έδειξε ότι δεν είχαν ένα μόνο στοιχείο *Minos* στη γαμετική τους σειρά. Συνεπώς, ο διαχωρισμός ενθέσεων *Mi{3xP3-EGFP}* με διαφορετική εκφραστικότητα επιτρέπει, σε κάποιο βαθμό, τον εντοπισμό των ενεμένων G_0 που κληροδοτούν πολλαπλές ενθέσεις, όπως άλλωστε συμβαίνει και με άλλα γονίδια διάκρισης (π.χ. *white*).

2.1.8. Παγίδευση ενισχυτών με το τρανσποζόνιο *Mi{3xP3-EGFP}*

Το γονίδιο διάκρισης *3xP3-EGFP* περιλαμβάνει ένα βασικό υποκινητή και τις θέσεις πρόσδεσης του αναπτυξιακού παράγοντα Pax-6, που κατευθύνουν την έκφραση της *egfp* ειδικά στους οφθαλμούς και το κεντρικό νευρικό σύστημα των διαγονιδιακών σκαθαριών. Ανάλογα με τη περιοχή ένθεσης του τρανσποζονίου στο γονιδίωμα, είναι πιθανό να παγιδευτεί κάποιος ενισχυτής και η *egfp* να εκφραστεί επιπρόσθετα και σε κάποιον άλλο ιστό (βλέπε Ενότητα 1.5). Πρόσφατα δημοσιεύτηκε η παγίδευση ενισχυτών με ένα τρανσποζόνιο *piggyBac*, που έφερε το ίδιο γονίδιο διάκρισης, τόσο στο *Tribolium* όσο και στη *Drosophila* (HORN *et al.* 2003; LORENZEN *et al.* 2003). Εξετάσαμε τη συχνότητα παγίδευσης ενισχυτών με το τρανσποζόνιο *Mi{3xP3-EGFP}*, παρατηρώντας το πρότυπο φθορισμού σε προνύμφες, νύμφες και ενήλικα και των 86 διαγονιδιακών σειρών. Τουλάχιστον 10 σειρές παρουσίαζαν μοναδικά πρότυπα έκφρασης της *egfp*, υποστηρίζοντας την καταλληλότητα του στοιχείου *Minos* για την εκτέλεση πειραμάτων παγίδευσης ενισχυτών στο *Tribolium* (Εικόνα 14Δ).



Εικόνα 14: Πρότυπα φθορισμού σε διαγονιδιακά άτομα *Tribolium*. **(Α-Β)** Διάκριση μεταξύ μετασηματισμένων και μη μετασηματισμένων σκαθαριών. Εικονίζονται ένα άτομο με χρώμα οφθαλμών αγρίου τύπου (AT; πάνω δεξιά), ένα άτομο ομόζυγο για τη μεταλλαγή *pearl* που στερείται οφθαλμικών χρωστικών (αριστερά) και ένα άτομο ίδιου γονοτύπου *pearl* μετασηματισμένο με το τρανσποζόνιο *Mi{3xP3-EGFP}* (*3xP3-EGFP*; κάτω). Τα άτομα ‘*pearl*’ και ‘*3xP3-EGFP*’, που στο ορατό φως φαίνονται πανομοιότυπα (Α), διακρίνονται ξεκάθαρα μεταξύ τους στο στερεοσκόπιο φθορισμού (με οπτικά φίλτρα ανίχνευσης της EGFP) βάσει του οφθαλμικού φθορισμού του διαγονιδιακού μόνο ατόμου (Β). **(Γ)** Διαφορές στην ένταση του φθορισμού μεταξύ διαγονιδιακών σειρών (+ < ++ < +++). **(Δ1-4)** Παραδείγματα παγίδευσης ενισχυτών. Στα άτομα αυτά η έκφραση της EGFP δεν ελέγχεται μόνο από τον υποκινητή *3xP3*, αλλά και από κάποιο ενδογενή ενισχυτή: (1) έκφραση σε μύες της κοιλίας του ενήλικου; το βέλος υποδεικνύει το αναμενόμενο πρότυπο λόγω του *3xP3* στους οφθαλμούς, (2) έκφραση σε θωρακικούς μύες του ενήλικου (κοιλιακή άποψη), (3) έκφραση σε πλευρο-κοιλιακές λωρίδες (πιθανότατα μύες) της προνύμφης, και (4) έκφραση στο ραχιαίο αιμολεμφικό αγγείο της προνύμφης.

2.2. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

2.2.1. Ποιοτικές και ποσοτικές παράμετροι του μετασχηματισμού του *Tribolium* με το στοιχείο *Minos*

Η επίδειξη του μετασχηματισμού του *Tribolium* με το στοιχείο *Minos* συνοδεύτηκε από την ανάλυση αρκετών παραμέτρων, που συνηγορούν στη χρησιμότητα του στοιχείου για γενετικούς χειρισμούς σε αυτό το είδος.

Πρώτα υπολογίστηκε το ποσοστό των ενεμένων σκαθαριών G_0 , που έδωσαν διαγονιδιακούς απογόνους. Οι συχνότητες μετασχηματισμού ήταν 11.4% με το βοηθό-πλασμίδιο και 32.4% με το βοηθό-mRNA. Οι αποδόσεις αυτές επαρκούν για τα συνήθη διαγονιδιακά πειράματα. Μάλιστα, στην περίπτωση του βοηθού-mRNA, η συχνότητα συγκαταλέγεται μεταξύ των υψηλότερων που έχουν δημοσιευτεί στα έντομα (ATKINSON *et al.* 2001; HANDLER 2001).

Η δεύτερη παράμετρος που μελετήθηκε ήταν η συχνότητα με την οποία ανακτώνται διαγονιδιακοί απόγονοι από γονείς με μετασχηματισμένες γαμετικές σειρές. Η παράμετρος αυτή δίνει μία εκτίμηση του αριθμού των ατόμων G_1 που πρέπει να ελεγχθούν στο στερεοσκόπιο φθορισμού, ώστε να βρεθεί ένας διαγονιδιακός απόγονος. Όπως προκύπτει από την ανάλυση των δεδομένων της Εικόνας 12, με το βοηθό-RNA μπορεί να αναγνωριστεί το 55% των διαγονιδιακών σειρών, ελέγχοντας μόνο 10 άτομα G_1 από κάθε G_0 , και το 75% των σειρών εξετάζοντας 20 άτομα G_1 . Οι αριθμοί αυτοί επιτρέπουν τον άνετο χειρισμό μεγάλου αριθμού ενεμένων σκαθαριών.

Ένα τρίτο σημαντικό στοιχείο είναι ο αριθμός των ενθέσεων στη γαμετική σειρά κάθε ενεμένου ατόμου. Τα πολλαπλά αντίτυπα συμφέρουν σε ορισμένες πειραματικές διατάξεις, στις οποίες κάθε ξεχωριστό τρानσποζόνιο μπορεί να προσφέρει καινούρια πληροφορία (π.χ. παγίδευση ενισχυτών), αλλά αποτελούν μειονέκτημα στις περιπτώσεις όπου ένας φαινότυπος πρέπει να αποδοθεί σε μία μοναδική ένθεση (π.χ. μεταλλαξογόνες ενθέσεις). Η πιο χρήσιμη κατάσταση είναι όταν πολλές ενθέσεις σε ένα γονέα G_0 κληροδοτούνται κατά μονάς σε διαφορετικούς απογόνους G_1 . Στην παρούσα μελέτη, το 25% των DNA σειρών και το 67% των RNA σειρών περιείχαν δύο ή παραπάνω αντίτυπα του *Mi{3xP3-EGFP}*, τα οποία όμως σε πολλές περιπτώσεις διαχωρίζονταν στους απογόνους. Αρκετά συχνά αυτό γινόταν αντιληπτό από τη διαφορετική ένταση φθορισμού σε αδελφικά G_1 . Συνολικά, τα γονιδιώματα των ατόμων G_1 που αναλύθηκαν κατά Southern, είχαν στην πλειοψηφία τους μία μόνο ένθεση του στοιχείου *Minos*.

Άλλοι παράγοντες που στοιχειοθετούν τη χρησιμότητα ενός φορέα μετασχηματισμού είναι η σταθερότητα των ενθέσεών του, η ιδιότητά του να εντίθεται σόλο ή σε διαδοχικές επαναλήψεις στο γονιδίωμα, η ακρίβεια του μηχανισμού μετάθεσής του και η προτίμησή του για συγκεκριμένες θέσεις-στόχους. Σε όλα τα δημοσιευμένα πειράματα ως τώρα, οι ενθέσεις του στοιχείου *Minos* είναι απόλυτα σταθερές απουσία της τρानσποζάσης του (LOUKERIS *et al.* 1995a; ΚΑΡΕΤΑΝΑΚΙ *et al.* 2002). Στην περίπτωση του *Tribolium* αυτό φάνηκε ξεκάθαρα στην ανάλυση κατά Southern, καθώς οι ενθέσεις των ατόμων G_1 και των απογόνων τους G_2 έδειχναν πάντοτε το ίδιο πρότυπο ζωνών. Η συντριπτική πλειοψηφία των ενθέσεων του τρानσποζονίου *Mi{3xP3-EGFP}* ήταν σόλο, μη συνδεδεμένες και δεν πλαισιώνονταν από αλληλουχίες του πλασμιδίου-δότη (Πίνακες 3 και 4). Το μικρό δείγμα θέσεων-στόχων που αλληλουχήθηκε δε φάνερωσε άλλη προτίμηση του στοιχείου *Minos*, πέρα του δινουκλεοτιδίου TA (ARCA *et al.* 1997).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στις δύο από τις τρεις διαγονιδιακές σειρές που φέρουν συνδεδεμένες ενθέσεις, ανιχνεύονται επίσης πλασμιδιακές αλληλουχίες ενσωματωμένες στο γονιδίωμα (Πίνακες 3 και 4). Δύο

εναλλακτικοί μηχανισμοί μπορούν να εξηγήσουν αυτή την παρατήρηση: i) ένθεση ενός τραπεζοζονίου *Mi{3xP3-EGFP}* σε ένα άλλο πλασμιδίο-δότη, ακολουθούμενη από μια δεύτερη μετάθεση του σύνθετου τραπεζοζονίου στο γονιδίωμα ή ii) πολλαπλασιαστικός τρόπος μετάθεσης του στοιχείου *Minos*. Ο πρώτος μηχανισμός έχει προταθεί για να εξηγήσει μία διπλή ένθεση του στοιχείου *Minos* στη *D. melanogaster* (LOUKERIS *et al.* 1995a), ενώ ο δεύτερος για να ερμηνεύσει ορισμένες ενθέσεις του *Minos* και άλλων στοιχείων στα κουνούπια (ATKINSON *et al.* 2001).

Τέλος, μία ουσιώδης παράμετρος σε όλα τα πειράματα μετασχηματισμού είναι το μέγεθος του εξωγενούς DNA που μπορεί να μεταφέρει ο φορέας. Αν και όλα τα πειράματα στο *Tribolium* διεξήχθησαν με το τραπεζοζόνιο *Mi{3xP3-EGFP}*, μεγέθους 2 kb, σχετικές πληροφορίες είναι διαθέσιμες από πειράματα στη *Drosophila*. Με τη χρήση του βοηθού-mRNA και του ίδιου γονιδίου διάκρισης έχουν επιτευχθεί συχνότητες μετασχηματισμού 32% με ένα τραπεζοζόνιο μεγέθους 5.8 kb, 12% με τραπεζοζόνιο 7 kb και 25% με τραπεζοζόνιο 9.1 kb (Α. Μεταξάκης & Χ. Σαββάκης και Α.Π. προσωπικές παρατηρήσεις). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η μεταθεσιμότητα του *Minos* δεν επηρεάζεται σημαντικά από το μέγεθος του τραπεζοζονίου στη *Drosophila*. Δεδομένης της ανεξαρτησίας του στοιχείου *Minos* από ειδο-ειδικούς παράγοντες, όπως αυτή αποτυπώνεται στο ευρύ πεδίο δράσης του, είναι πιθανό ότι τραπεζοζόνια μεγάλου μεγέθους θα μετατίθενται εξίσου αποδοτικά τόσο στο *Tribolium* όσο και σε άλλα αρθρόποδα.

Οι επιμέρους ποσοτικές παράμετροι που μετρήθηκαν, μπορεί να διαφέρουν σε ξεχωριστά πειράματα, ανάλογα με το μέγεθος του τραπεζοζονίου, τη συγκέντρωση και την ποιότητα του πλασμιδίου-δότη και της πηγής τραπεζοζάσης, το πρωτόκολλο των ενέσεων και άλλους αστάθμητους παράγοντες. Στα συγκεκριμένα πιλοτικά πειράματα όμως πιστοποιήθηκε ότι το στοιχείο *Minos* διαθέτει τις απαραίτητες βασικές ιδιότητες, για να καθιερωθεί ως φορέας μετασχηματισμού στο *Tribolium*.

2.2.2. Σύγκριση των πηγών τραπεζοζάσης

Συγκρίνοντας τις αποδόσεις των δύο εναλλακτικών πηγών τραπεζοζάσης, του βοηθού-mRNA και του βοηθού-πλασμιδίου, συμπεραίνεται ότι το mRNA είναι πολύ πιο αποτελεσματικό: τριπλασιάζει σχεδόν τη συχνότητα μετασχηματισμού των ενεμένων γαμετικών σειρών (32.4% έναντι 11.4%), αυξάνει το ποσοστό των μετασχηματισμένων ατόμων στις διαγονιδιακές σειρές (15.2% έναντι 10.3%) και αυξάνει τον αριθμό των ενθέσεων που ανακτώνται από ένα γονέα G_0 . Αν συνεκτιμηθεί και το γεγονός ότι δεν ελαττώνει τη βιωσιμότητα και τη γονιμότητα των ενεμένων ατόμων (Πίνακας 2), το βοηθό-mRNA προβάλλει ως η καταλληλότερη πηγή τραπεζοζάσης σε πειράματα μεγάλης κλίμακας. Τα μοναδικά μειονεκτήματα που συνεπάγεται η χρήση του είναι η λήψη επιπλέον μέτρων προστασίας, ώστε να αποφευχθεί η νουκλεόλυση του mRNA, καθώς και η παρουσία πολλαπλών ενθέσεων σε μεγάλο ποσοστό διαγονιδιακών ατόμων.

2.2.3. Επέκταση των γενετικών χειρισμών στο *Tribolium*

Η εφαρμογή της διαγονιδιακής τεχνολογίας στο *Tribolium* επιτρέπει την ανάπτυξη πολύτιμων μεθοδολογιών, που μέχρι πρόσφατα ήταν διαθέσιμες μόνο στη *Drosophila* (βλέπε Ενότητα 1.5). Σε αυτές περιλαμβάνονται η γονιδιακή ανάλυση με τη βοήθεια μεταλλαξογόνων ενθέσεων και παγιδευμένων γονιδίων και ενισχυτών, η εκποπική έκφραση παραγόντων με τα συστήματα *UAS/Gal4* και *tTA/TRE*, η μωσαϊκή ανάλυση με το σύστημα *Flp/FRT* και η λειτουργική ανάλυση *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών με τη χρήση γονιδίων αναφοράς. Η εκμετάλλευση

από κοινού των στοιχείων *Minos* και *piggyBac*, που επίσης επιδεικνύει υψηλές συχνότητες μετασχηματισμού στο *Tribolium*, πλεονεκτεί έναντι της χρήσης ενός μόνο τρανσποζονίου. Το γονιδίωμα μπορεί να σαρωθεί ευρύτερα, δεδομένης της εκλεκτικότητας των φορέων για ορισμένες χρωμοσωμικές θέσεις έναντι άλλων, ενώ είναι εφικτή η εγκαθίδρυση ζευγαρωτών πειραματικών διατάξεων σε μεγάλη κλίμακα. Υπενθυμίζεται, ότι οι ζευγαρωτές διατάξεις προϋποθέτουν τη διαθεσιμότητα δύο διαφορετικών φορέων μετασχηματισμού, που να μην ετεροκινητοποιούνται, καθώς και γονιδίων διάκρισης που να αναγνωρίζονται εύκολα μεταξύ τους. Όλα τα παραπάνω γενετικά εργαλεία είναι διαθέσιμα πια στο *Tribolium* και αναμένονται σύντομα οι καρποί της εφαρμογής τους.

3. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΜΦΙΠΟΔΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΕΙΔΟΥΣ *Parhyale hawaiiensis* ΜΕ ΤΟ ΜΕΤΑΘΕΣΙΜΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΣΤΟΙΧΕΙΟ *Minos*

3.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1.1. *Parhyale hawaiiensis*: χτίζοντας έναν πειραματικό οργανισμό

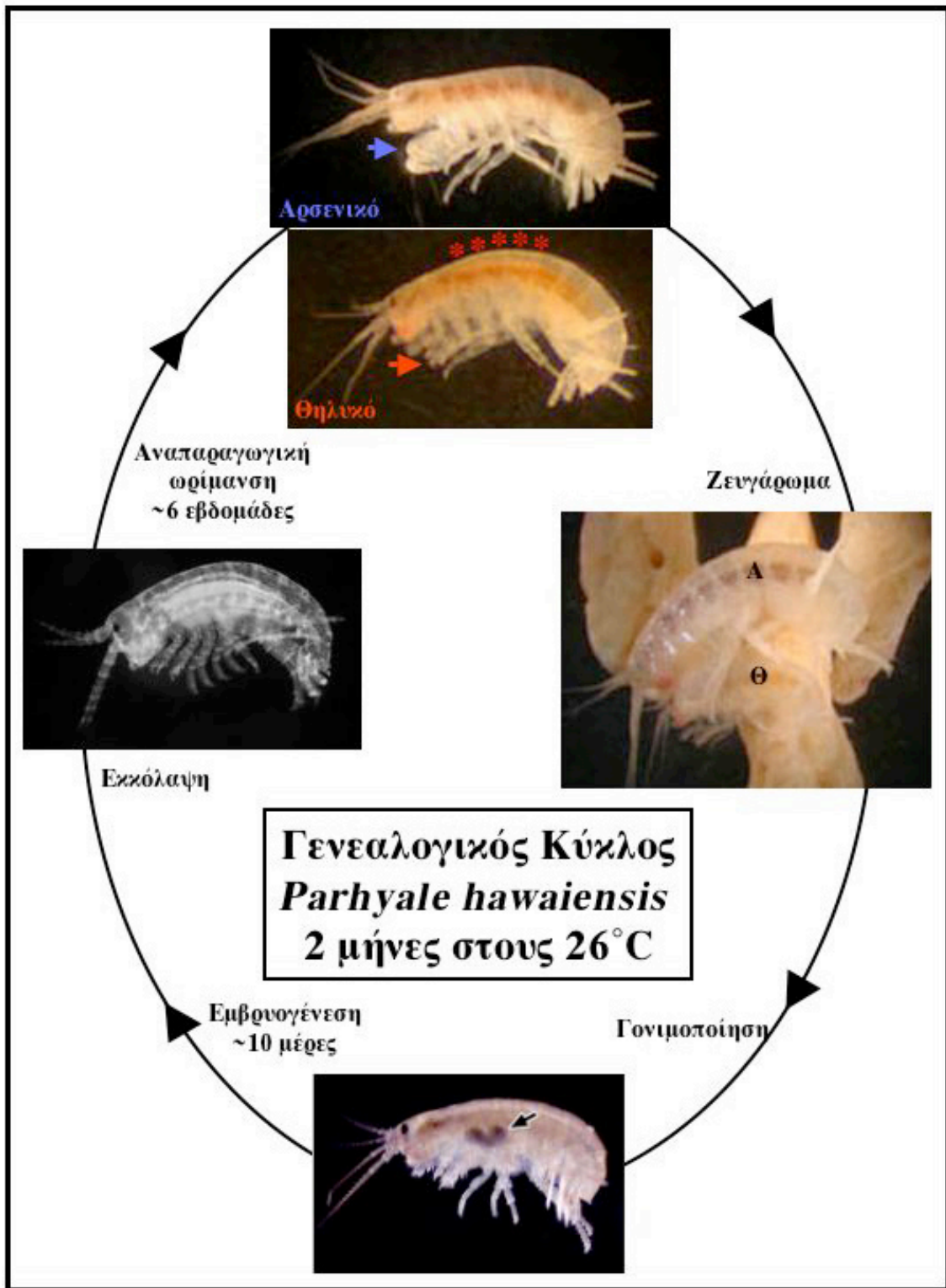
Τα καρκινοειδή θεωρούνται οι κοντινότεροι φυλογενετικά συγγενείς των εντόμων και προσφέρονται για συγκριτικές αναπτυξιακές μελέτες με αυτά. Με πρωτοβουλία του εργαστηρίου του Niram Patel έχει ξεκινήσει τα τελευταία τρία χρόνια μία συστηματική προσπάθεια κατασκευής εργαλείων για τη μελέτη της ανάπτυξης του αμφιπόδου καρκινοειδούς *Parhyale hawaiiensis*. Η εύκολη καλλιέργειά του στο εργαστήριο και μια σειρά από άλλα πλεονεκτήματα το καθιστούν ελπιδοφόρο πειραματικό μοντέλο.

Ο *Parhyale* είναι ένας θαλασσοβίος οργανισμός με χρόνο γενεάς 7-8 εβδομάδες στους 25°C (Εικόνα 15). Την εμβρυϊκή ανάπτυξή του, διάρκειας 9-10 ημέρες, διαδέχεται η άμεση ανάπτυξη των εκκολαπτόμενων ζώων, τα οποία μέσω μίας σειράς εκδύσεων αυξάνουν σε μέγεθος και ωριμάζουν αναπαραγωγικά. Τα ώριμα θηλυκά συλλαμβάνονται, συγκροτούνται και γονιμοποιούνται από τα αρσενικά, και ακολούθως απελευθερώνονται (με ταυτόχρονη έκδυση) και ωοαποθέτουν τα γονιμοποιημένα αυγά τους σε έναν κοιλιακό επωαστικό θάλαμο, που σχηματίζεται από ελάσματα των θωρακικών εξαρτημάτων, τους ωοστεγίτες. Ανάλογα με την ηλικία της μητέρας αποτίθενται 1-15 αυγά σε κάθε κύκλο γονιμοποίησης, που μπορεί να επαναλαμβάνεται κάθε δύο εβδομάδες. Τα έμβρυα δεν έχουν καμία άλλη φυσιολογική επαφή με τα θηλυκά και μπορούν να απομονωθούν από τον κοιλιακό θάλαμο και να αναπτυχθούν σε τρυβλία petri με θαλασσινό νερό. Συνεπώς, υπάρχει πάντα εύκολη πρόσβαση σε όλα τα στάδια εμβρύων.

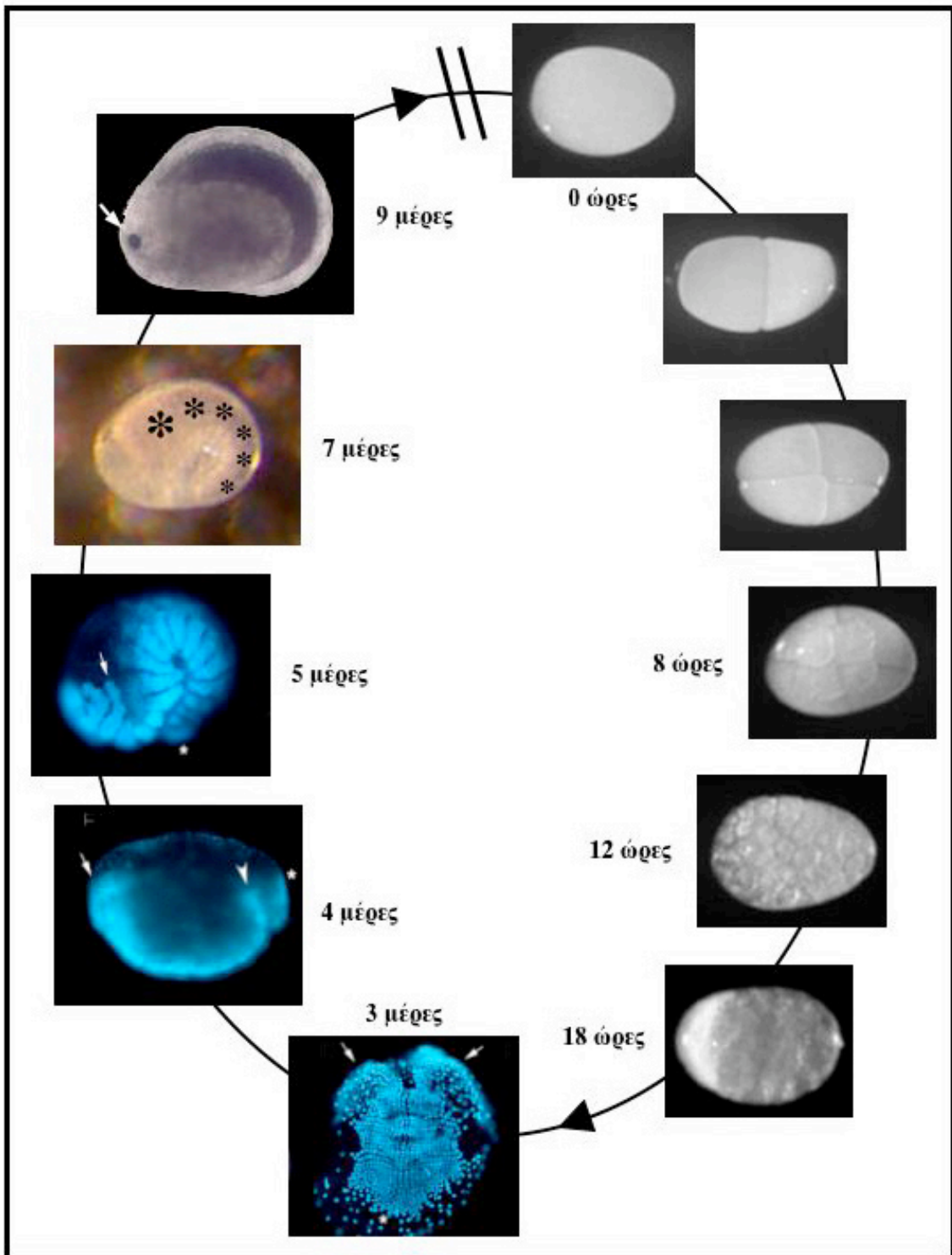
Η πρόωμη εμβρυογένεση του *Parhyale* (Εικόνα 16) περιλαμβάνει ολοβλαστικές αυλακώσεις του ζυγωτού. Οι δύο πρώτες αυλακώσεις είναι ελαφρά ασύμμετρες, ενώ η τρίτη είναι εξαιρετικά ασύμμετρη και δημιουργεί μία στερεότυπη διάταξη τεσσάρων μακρομεριδίων και τεσσάρων μικρομεριδίων (έμβρυο 8 ωρών). Τα βλαστομερίδια ξεχωρίζουν εύκολα με βάση το μέγεθος και τη σχετική τους θέση στο έμβρυο. Ανάλυση της γενεαλογίας τους (GERBERDING *et al.* 2002) έδειξε ότι κάθε βλαστομερίδιο σε αυτό το στάδιο συνεισφέρει σε μία μόνο βλαστική στιβάδα (germ layer): το εξώδεσμα συντίθεται από τρία μακρομερίδια, το σπλαχνικό μεσόδεσμα από το τέταρτο μακρομερίδιο, το σωματικό μεσόδεσμα από δύο μικρομερίδια, το ενδόδεσμα από ένα μικρομερίδιο και τα γαμετικά κύτταρα από το τέταρτο μικρομερίδιο. Τέσσερις μόνο ώρες αργότερα διακρίνονται εκατό περίπου ισομεγέθη κύτταρα (τα μακρομερίδια διαιρούνται πιο συχνά από τα μικρομερίδια) ομοιόμορφα διατεταγμένα στην επιφάνεια του εμβρύου. Η γαστριδίωση ξεκινά λίγο μετά τις 18 ώρες, όταν τα κύτταρα έχουν συγκεντρωθεί σε υποπεριοχές του αυγού και αρχίζουν να μεταναστεύουν προς το εσωτερικό του (Εικόνα 16). Την τρίτη μέρα διακρίνεται καθαρά η βλαστική ζώνη (germband), ενώ μία μέρα αργότερα παρουσιάζεται σημαντικά επιμηκυσμένη. Η οργανογένεση είναι σε πλήρη εξέλιξη την έκτη μέρα, όπου το νεοσχηματιζόμενο έντερο και όλα τα άλλα είναι ορατά, και ολοκληρώνεται την ένατη περίπου μέρα.

Εκτός από το χαρακτηρισμό της εμβρυϊκής ανάπτυξης, είναι διαθέσιμα τα απαραίτητα εργαλεία για την κλωνοποίηση και ανάλυση του προτύπου έκφρασης αναπτυξιακών γονιδίων, όπως βιβλιοθήκες cDNA και πρωτόκολλα για ανοσοϊστοχημεία. Σε εξέλιξη βρίσκονται η συλλογή και αλληλούχιση EST και η

εγκαθίδρυση μικροσυστοιχιών (microarrays) για την ανάλυση σε επίπεδο γονιδιώματος (N. Patel, προσωπική επικοινωνία). Τέλος, ο γενετικός μετασχηματισμός του *Parhyale* με το στοιχείο *Minos*, που περιγράφεται παρακάτω, καθώς και η αποσιώπηση γονιδίων με RNAi (N. Patel, προσωπική επικοινωνία), δείχνουν ότι ο οργανισμός προσφέρεται και για λειτουργικές μελέτες.



Εικόνα 15: Γενεαλογικός κύκλος του θαλασσόβιου αμφιπόδου καρκινοειδούς *Parhyale hawaiiensis*. Τα αναπαραγωγικά ώριμα αρσενικά διακρίνονται από τα εμμεγέθη συληπητήρια εξαρτήματά τους (έγχρωμα βέλη), ενώ στα θηλυκά ξεχωρίζουν οι άσπρες ωοθήκες τους κατά μήκος της ράχης (αστερίσκοι). Το αρσενικό (Α) συλλαμβάνει και συγκρατεί το θηλυκό (Θ) μέχρι τη γονιμοποίησή του, οπότε το τελευταίο ωοποθεί τα αυγά του (σκουρόχρωμα; μαύρο βέλος) σε έναν κοιλιακό επωαστικό θάλαμο. Τα έμβρυα παραμένουν εκεί σε όλη τη διάρκεια της εμβρυογένεσης μέχρι την εκκόλαψή τους. Οι νεοσσοί έχουν παρόμοια μορφολογία με τα ενήλικα, αφού ο *Parhyale* χαρακτηρίζεται από άμεση ανάπτυξη, και με διαδοχικές εκδύσεις αυξάνουν σε μέγεθος και ωριμάζουν αναπαραγωγικά.



Εικόνα 16: Εμβρυογένεση του αμφιπόδου καρκινοειδούς *Parhyale hawaiiensis*. Σε αντίθεση με τα αυγά των εντόμων, η πρόωμη εμβρυογένεση του *Parhyale* συνοδεύεται από ολοβλαστικές διαιρέσεις. **(0-18 ώρες)** Κατά τις 8 πρώτες ώρες πραγματοποιούνται τρεις ανισόμορες διαιρέσεις που δημιουργούν μία στερεότυπη διάταξη 4 μακρομεριδίων και 4 μικρομεριδίων. Στη συνέχεια ο ρυθμός των διαιρέσεων αυξάνει και 4 ώρες αργότερα το έμβryo αποτελείται από 100 περίπου ισομεγέθη κύτταρα. Στις 18 ώρες τα κύτταρα του βλαστικού δίσκου συγκεντρώνονται σε μία υποπεριοχή του αυγού (άσπρη απόχρωση) και ξεκινά η γαστροιδίωση. **(3-5 μέρες;** πυρηνικές χρώσεις DAPI) Μία ευδιάκριτη βλαστική ζώνη σχηματίζεται στις 3 μέρες (κοιλιακή άποψη εμβρύου) με ορατούς τους κεφαλικούς λοβούς (βέλη) στο πρόσθιο μέρος και την προσθήκη νέων κυττάρων στην οπίσθια αυξητική ζώνη (αστερίσκος). **(4-9 μέρες;** πλευρική άποψη εμβρύου; πρόσθιο μέρος αριστερά, κοιλιακή επιφάνεια κάτω) Στις 4 μέρες η βλαστική ζώνη έχει επιμηκυνθεί

σχηματίζοντας μία πτύχωση (αιχμή βέλους) στο οπίσθιο μέρος. Η αναπτυσσόμενη κεφαλή υποδεικνύεται με βέλος και το τέλος (ακραία οπίσθια δομή) με αστερίσκο. Στις 5 μέρες η πτύχωση έχει αυξηθεί σημαντικά, σε σημείο που μόνο το τέλος (αστερίσκος) και τα μεταμερή της κεφαλής να εφάπτονται στην κοιλιακή επιφάνεια του αυγού. Τα εξαρτήματα (appendages) είναι πλέον ορατά, όπως για παράδειγμα το πρώτο και δεύτερο ζεύγος κεραιών (βέλος). Την 7^η μέρα η οργανογένεση είναι σε εξέλιξη: υπάρχει σαφής διάκριση μεταξύ της κεφαλής και του κορμού και εσωτερικές δομές όπως το έντερο, όπου συγκεντρώνεται η λέκιθος, είναι ορατές (αστερίσκοι). Η οργανογένεση δείχνει πλήρη την 9^η μέρα καθώς έχει ολοκληρωθεί η μορφολογία του νεοεκκολαπτόμενου αμφιπόδου. Με το βέλος υποδεικνύεται ο σκουρόχρωμος σύνθετος οφθαλμός.

3.1.2. Δοκιμασίες ενεργότητας του στοιχείου *Minos* σε έμβρυα *P. hawaiiensis*

Ο γενετικός μετασχηματισμός του *P. hawaiiensis* στηρίχτηκε σε πιλοτικά πειράματα αξιολόγησης του φορέα και του γονιδίου διάκρισης που χρησιμοποιήσα. Σε πρώτη φάση ήλεγξα, με τη βοήθεια διαπλασμαδικών δοκιμασιών ενεργότητας (KLINAKIS *et al.* 2000a), την ικανότητα του στοιχείου *Minos* να εκτέμνεται και να μετατίθεται στο κυτταρικό περιβάλλον πρώιμων εμβρύων του *Parhyale*

Στη δοκιμασία εκτομής ελέγχεται η ικανότητα ενός μη αυτόνομου τρανσποζονίου *Minos*, που φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη (Tet^R), να εκτέμνεται από ένα πλασμίδιο-δότη (pMiLRTet^RL) (Εικόνα 17A). Η ευαισθησία της πειραματικής διάταξης είναι μεγάλη, γιατί στηρίζεται στην τεχνική PCR με εκκινητές που υβριδοποιούν εκατέρωθεν του τρανσποζονίου. Η εκτομή του τρανσποζονίου και η επακόλουθη επιδιόρθωση του πλασμιδίου-δότη οδηγεί στον πολλαπλασιασμό μίας χαρακτηριστικής ζώνης μεγέθους 211 bp, ενώ αντίθετα, τα άθικτα πλασμίδια, λόγω της εμβόλιμης αλληλουχίας του τρανσποζονίου, δίνουν μία ζώνη μεγέθους 2.2 kb (Εικόνα 17A).

Η δοκιμασία μετάθεσης ελέγχει τόσο την εκτομή του τρανσποζονίου από το πλασμίδιο-δότη, όσο και την ένθεσή του σε ένα πλασμίδιο-στόχο (pBC/SacRB) (Εικόνα 18A). Το τελευταίο φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας στη χλωραμφενικόλη (Cam) για θετική επιλογή και το γονίδιο της σουκράσης του *Bacillus subtilis* για αρνητική επιλογή παρουσία σουκρόζης (παράγεται ένα τοξικό παραπροϊόν). Η ενθέσεις του τρανσποζονίου *Minos* στο γονίδιο της σουκράσης ανιχνεύονται ως πλασμιδικές μορφές που προσδίδουν σε βακτήρια *E. coli* τριπλή ανθεκτικότητα σε τετρακυκλίνη, χλωραμφενικόλη και σουκρόζη (Εικόνα 18A).

Για την κινητοποίηση του στοιχείου *Minos* δοκιμάστηκαν οι δύο εναλλακτικές πηγές τρανσποζάσης που χρησιμοποιήθηκαν στο γενετικό μετασχηματισμό του *Tribolium*: το βοηθό-πλασμίδιο pHSS6hsILMi20, που φέρει την κωδική περιοχή της τρανσποζάσης υπό τον έλεγχο του δροσοφιλικού υποκινητή *hsp70*, και το *in vitro* παρηγμένο capped mRNA που κωδικοποιεί την τρανσποζάση *Minos*. Για την έκφραση της τρανσποζάσης από το πλασμίδιο-βοηθό δεν έγινε θερμική επαγωγή του υποκινητή *hsp70*. Εκτός από έμβρυα του *Parhyale* μικροενέθηκαν και έμβρυα της *Drosophila*, στα οποία πρωτοεφαρμόστηκαν επιτυχώς αυτές οι δοκιμασίες (KLINAKIS *et al.* 2000a). Οι διαφορετικοί συνδυασμοί πλασμιδίων και τρανσποζάσης που ενέθηκαν, σημειώνονται αναλυτικά στον Πίνακα 5.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5

Πειράματα διαπλασμιδιακών δοκιμασιών ενεργότητας

#	Έμβρυα	Πλασμίδιο-δότης (150 ng/μl)	Πλασμίδιο-στόχος (300 ng/μl)	Πηγή τρानσποζάσης
1	<i>D. mel.</i>	-	-	-
2	<i>D. mel.</i>	+	+	-
3	<i>D. mel.</i>	+	+	mRNA (75 ng/μl)
4	<i>P. haw.</i>	-	-	-
5	<i>P. haw.</i>	+	+	-
6	<i>P. haw.</i>	+	+	mRNA (75 ng/μl)
7	<i>P. haw.</i>	+	+	mRNA (150 ng/μl)
8	<i>P. haw.</i>	+	+	mRNA (300 ng/μl)
9	<i>P. haw.</i>	+	+	Πλασμίδιο (280 ng/μl)

Μία ημέρα μετά τις ενέσεις απομονώθηκαν από κάθε δείγμα τα νουκλεϊκά οξέα που περιείχονταν στα ζωντανά έμβρυα. Ίση ποσότητα υλικού χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα στις αντιδράσεις PCR της δοκιμασίας εκτομής. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 17B, η διαγνωστική της εκτομής ζώνη 211 bp ανιχνεύτηκε στα έμβρυα του *Parhyale* μόνο παρουσία της τρानσποζάσης, και μάλιστα μόνο όταν αυτή παρεχόταν από το βοηθό-mRNA. Η δράση της τρानσποζάσης ήταν δόσοεξαρτώμενη, αφού υψηλότερες συγκεντρώσεις του βοηθού-mRNA οδήγησαν σε προοδευτική αύξηση της έντασης της διαγνωστικής ζώνης και παράλληλη μείωση της έντασης της ζώνης 2.1 kb. Οι υπόλοιπες ζώνες που ανιχνεύτηκαν πιθανολογείται ότι είναι προϊόντα της αντίδρασης, τα οποία περιέχουν τις ανεστραμμένες αλληλουχίες των άκρων του *Minos* και δημιουργούν δευτεροταγείς δομές με διαφορετική κινητικότητα. Τα προϊόντα αυτά εξαφανίζονται καθώς πληθαίνουν τα μόρια του πλασμιδίου-δότη που έχουν χάσει το τρानσποζόνιό τους.

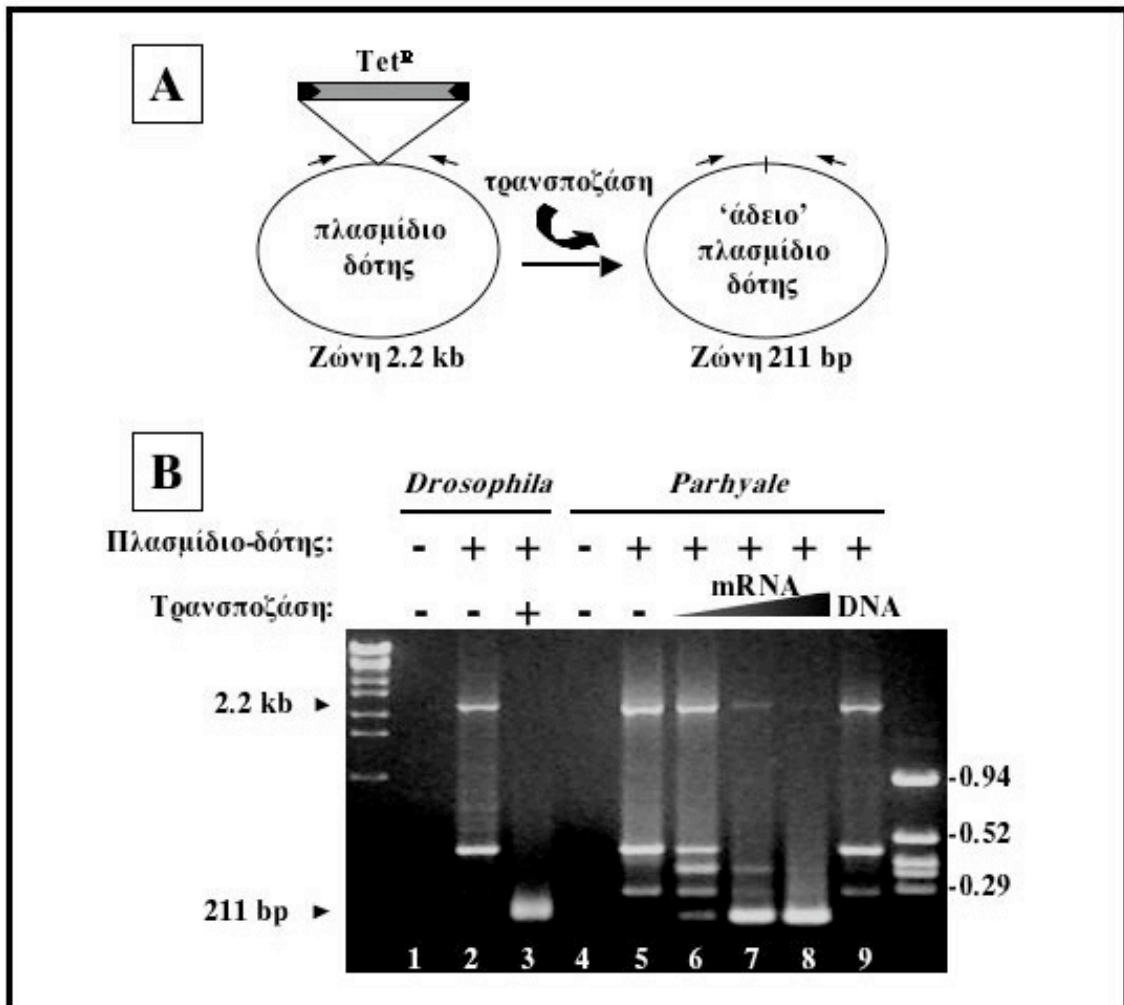
Ο έλεγχος της διαπλασμιδιακής μετάθεσης του τρानσποζονίου *Minos* στο πλασμίδιο-στόχο πραγματοποιήθηκε για τα δείγματα 5, 6, 7 και 8. Βακτηριακά κύτταρα *E. coli* μετασχηματίστηκαν με νουκλεϊκά οξέα από τα παραπάνω δείγματα και αναπτύχθηκαν σε δύο διαφορετικά στερεά μέσα. Το 5% των κυττάρων αναπτύχθηκε σε τρυβλία petri με LB(Cm) και το υπόλοιπο 95% σε τρυβλία petri με LB(Cm/10% Sucrose). Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν στα δεύτερα τρυβλία μεταφέρθηκαν στη συνέχεια σε petri με LB(Cm/Tet), ώστε να υπολογιστεί για κάθε δείγμα ο αριθμός των τριπλά ανθεκτικών κλώνων. Η συχνότητα μετάθεσης υπολογίστηκε ξεχωριστά για κάθε δείγμα, διαιρώντας τον αριθμό των ανθεκτικών κλώνων με το συνολικό αριθμό των πλασμιδίων-στόχων που αναλύθηκαν (αναγωγή του 5% στο 100% των κυττάρων) (Πίνακας 6).

ΠΙΝΑΚΑΣ 6

Αποτελέσματα διαπλασμιδιακής δοκιμασίας μετάθεσης

#	Αριθμός αποικιών LB(Cm)	Αριθμός αποικιών LB(Cm/Suc)	Αριθμός αποικιών LB(Cm/Tet)	Αριθμός πλασμιδίων-στόχων	Συχνότητα μετάθεσης ^a
5	1432	17	0	28640	0
6	1872	47	2	37440	5.6x10 ⁻⁵
7	808	12	6	16160	3.9x10 ⁻⁴
8	1080	135	85	21600	4.1x10 ⁻³

^a Ποσοστό 'πληγμένων' πλασμιδίων-στόχων.

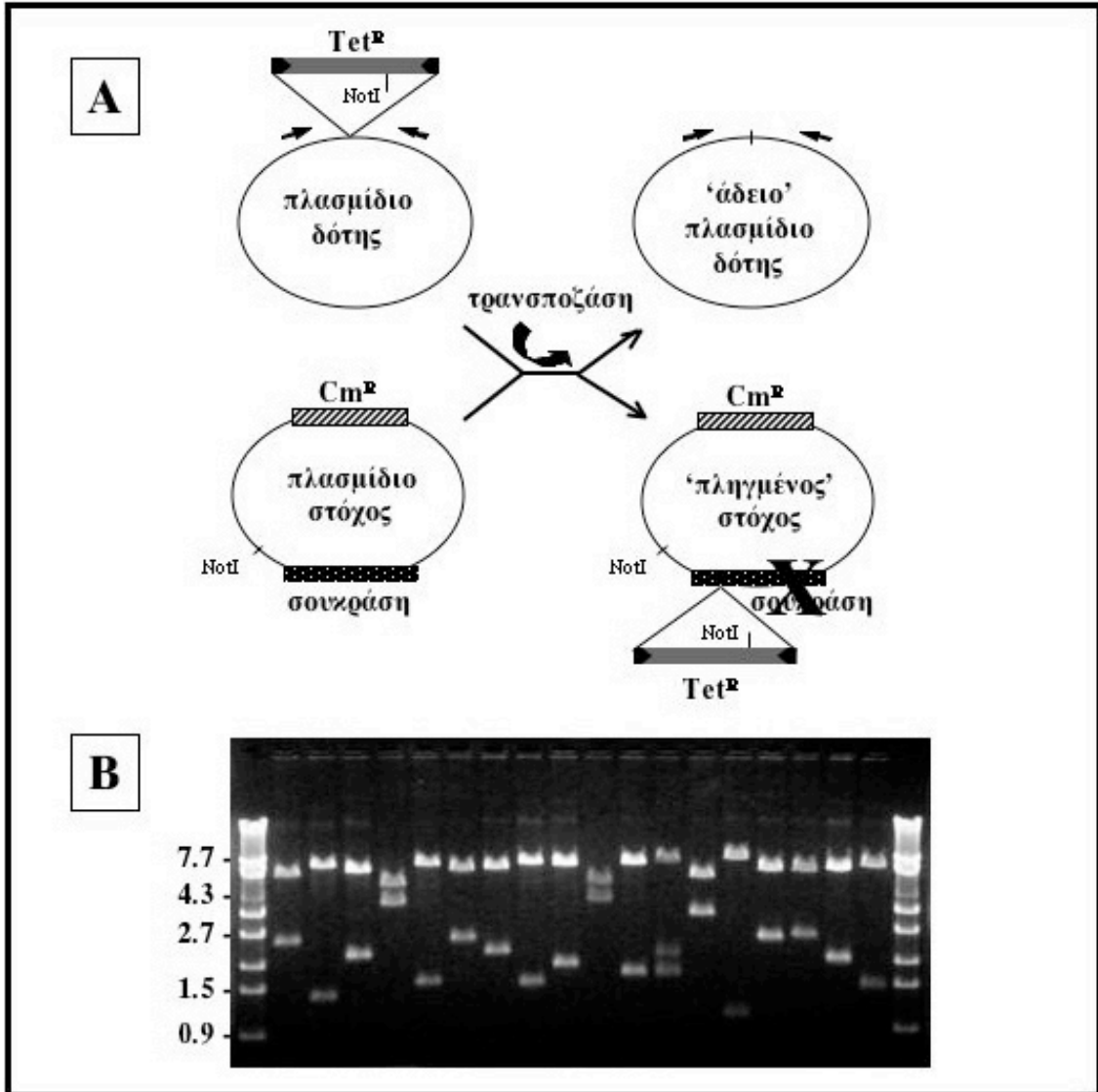


Εικόνα 17: Διαπλασμιδιακή δοκιμασία εκτομής του στοιχείου *Minos* σε πρώιμα έμβρυα *Parhyale*. **(Α)** Σχηματική απεικόνιση της δοκιμασίας εκτομής. **(Β)** Ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων της PCR. Νοικλεία οξέα από τα δείγματα 1-9 του Πίνακα 5 χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα σε αντίδραση PCR με εκκινητές που υβριδοποιούν εκατέρωθεν του τρανσποζονίου *Minos*. Τα δείγματα 1-9 διακρίνονται ανάμεσα στην πρώτη και την τελευταία διαδρομή, που περιέχουν τους δείκτες μοριακών μεγεθών, από αριστερά προς τα δεξιά. Τα βέλη υποδεικνύουν το προϊόν μεγέθους 2.2 kb, που πολλαπλασιάζεται με υπόστρωμα τα άθικτα πλασμίδια-δότες, και το ενδεικτικό της εκτομής του στοιχείου προϊόν μεγέθους 211 bp.

Και σε αυτή την περίπτωση ήταν απαραίτητη η πηγή τρανσποζάσης για την ανίχνευση γεγονότων μετάθεσης. Όπως είχαν δείξει και οι δοκιμασίες εκτομής, η δράση της τρανσποζάσης ήταν δόσοεξαρτώμενη. Έχοντας το πλεονέκτημα της ποσοτικοποίησης, οι δοκιμασίες μετάθεσης αποκάλυψαν ότι ο διπλασιασμός της συγκέντρωσης της τρανσποζάσης οδηγούσε σε αύξηση μιας τάξης μεγέθους των πλασμιδίων-στόχων που προσβάλλονταν από κάποιο τρανσποζόνιο (Πίνακας 6). Δεδομένου ότι με το συγκεκριμένο σύστημα επιλογής χάνονται οι ενθέσεις εκτός του γονιδίου της σουκράσης, οι υπολογισμένες συχνότητες μετάθεσης είναι υποτιμημένες. Ορισμένοι βακτηριακοί κλώνοι που φέρουν το πλασμίδιο-στόχο ακέραιο, χωρίς κάποια μεταλλαξογόνο ένθεση του *Minos* στο γονίδιο της σουκράσης, επιβιώνουν παρουσία σουκρόζης (sucrase escapers) και ευθύνονται για την ανάπτυξη μεγάλου αριθμού διπλά ανθεκτικών κλώνων Cm/Suc.

Η διαπλασμιδιακή μετάθεση του στοιχείου *Minos* επιβεβαιώθηκε με την απομόνωση και πέψη πλασμιδιακού DNA από τους τριπλά ανθεκτικούς κλώνους με την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI, που αναγνωρίζει μία θέση στο τρανσποζόνιο και μία θέση στο πλασμίδιο-στόχο. Με βάση το πρότυπο της πέψης

μπορούν να ταυτοποιηθούν ανεξάρτητα γεγονότα μετάθεσης (Εικόνα 18Α). Όλοι οι κλώνοι επέδειξαν το χαρακτηριστικό πρότυπο των δύο ζωνών, που το συνολικό μέγεθός τους ισούνταν με το άθροισμα του πλασμιδίου-στόχου και του τρανσποζονίου (6.2 kb+2.2 kb) (Εικόνα 18B).



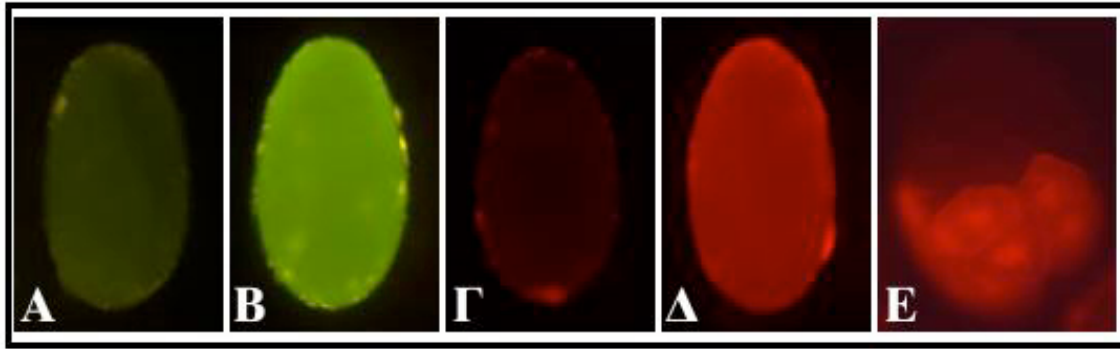
Εικόνα 18: Διαπλασμιδιακή δοκιμασία μετάθεσης του στοιχείου *Minos* σε πρώιμα έμβρυα *Parhyale*. **(Α)** Σχηματική απεικόνιση της δοκιμασίας μετάθεσης. **(Β)** Ηλεκτροφορητική ανάλυση διαγνωστικών πέψων 'πληγμένων' πλασμιδίων-στόχων. Ανεξάρτητα γεγονότα μετάθεσης του τρανσποζονίου *Minos* από το πλασμίδιο-δότη στο γονίδιο της συνκράσης του πλασμιδίου-στόχου απομονώθηκαν από βακτηριακούς κλώνους τριπλά ανθεκτικούς σε χλωραμφενικόλη (Cm), τετρακυκλίνη (Tet) και συνκρόζη. Όλοι οι κλώνοι είχαν το αναμενόμενο συνολικό μέγεθος 8.4 kb και έφεραν τις δύο διαγνωστικές θέσεις αναγνώρισης από την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI. Στον κλώνο της διαδρομής 13 φαίνεται ότι έχουν εντεθεί δύο αντίτυπα του *Minos* σε ένα πλασμίδιο-στόχο.

3.1.3. Χρήση της *dsredt1* ως γονιδίου διάκρισης

Το δεύτερο βήμα προς το μετασηματισμό του *P. hawaiiensis* ήταν η επιλογή κατάλληλου γονιδίου διάκρισης. Η απουσία χαρακτηρισμένων μεταλλαγών στον καινούριο αυτό πειραματικό οργανισμό, έστρεψε το ενδιαφέρον μας ευθύς εξαρχής στις φθορίζουσες πρωτεΐνες. Ο φθορισμός που οφείλεται στην έκφρασή τους, μπορεί να συγκαλυφθεί μόνο από τον ενδογενή φθορισμό, ο οποίος διεγείρεται σε πολλούς οργανισμούς με την ακτινοβολήσή τους στα ίδια μήκη κύματος. Ένας εύκολος τρόπος για να ελεγχθεί μια φθορίζουσα πρωτεΐνη σε ένα καινούριο εμβρυϊκό περιβάλλον, είναι η μικροέγχυση *in vitro* παρηγμένου capped mRNA που την κωδικοποιεί.

Το πρώτο γονίδιο διάκρισης που δοκιμάστηκε ήταν η *egfp*. Το *in vitro* μετάγραφο που την κωδικοποιούσε περιελάμβανε τις 5' και 3' μη μεταφραζόμενες αλληλουχίες των δροσοφιλικών γονιδίων *hsp70* και *inflated*, αντίστοιχα. Η λειτουργικότητα των παραπάνω αλληλουχιών ήταν πρόδηλη από τις διαπλασμαδικές δοκιμασίες ενεργότητας που είχαν προηγηθεί, αφού περιέχονταν και στο βοηθό-mRNA της τρανσποζάσης. Η εξέταση στο μικροσκόπιο μη ενεμένων εμβρύων του *Parhyale* με τα φίλτρα που ανιχνεύεται η EGFP, φανέρωσε έναν αχνοπράσινο φθορισμό διάχυτο σε όλο το αυγό κατά τα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης, που στη συνέχεια εντοπιζόνταν κυρίως στο σχηματιζόμενο έντερο. Ο ενδογενής αυτός 'θόρυβος' οφείλονταν πιθανότατα στη λέκιθο και δεν επέτρεψε να διακριθούν τα ενεμένα έμβρυα από τα μη ενεμένα. Αντίθετα, η ένεση του ίδιου *egfp* mRNA σε αυγά *Drosophila* και *Tribolium*, που επιδεικνύουν πολύ χαμηλότερα επίπεδα αυτοφθορισμού, πυροδότησε σε λιγότερο από μία ώρα έναν έντονο και ευδιάκριτο φθορισμό της EGFP (Εικόνα 19A-B).

Η επιτυχής χρήση της DsRedT1 ως ιχνηλάτη (tracer) στην ανάλυση της γενεαλογίας των βλαστομεριδίων του *Parhyale* (GERBERDING *et al.* 2002), ενέπνευσε την επιλογή της ως γονιδίου διάκρισης. Η DsRedT1 ενεργοποιείται με ακτινοβολία μικρότερης ενέργειας (μεγαλύτερου μήκους κύματος), συγκριτικά με την EGFP. Τα έμβρυα του αμφιπόδου δεν παρουσιάζουν καθόλου αυτοφθορισμό με τα αντίστοιχα φίλτρα, παρά μόνο σε μία ημισέληνο που αντιστοιχεί στο έντερο, όταν όλη η λέκιθος κατά την οργανογένεση είναι συγκεντρωμένη εκεί (Εικόνα 20). Στην περίπτωση της DsRedT1 δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικά *in vitro* μετάγραφα: στο πρώτο, η κωδική περιοχή της πρωτεΐνης πλαισιώνονταν από τις ίδιες αλληλουχίες όπως και η EGFP νωρίτερα, ενώ στο δεύτερο από τις 5' και 3' μη μεταφραζόμενες αλληλουχίες του γονιδίου της β-σφαιρίνης που είχαν ήδη δοκιμαστεί (GERBERDING *et al.* 2002). Πρώιμα έμβρυα (1-4 κύτταρα) μικροενέθηκαν ξεχωριστά με τα δύο μετάγραφα και ελέγχθηκαν για την έκφραση της DsRedT1 κατά τις επόμενες οκτώ ώρες. Και στις δύο περιπτώσεις, τα ενεμένα έμβρυα διακρίνονταν ξεκάθαρα τόσο από τα μη ενεμένα όσο και από τα ενεμένα χωρίς mRNA, χάρη σε ένα φθορισμό που ξεκίνησε δύο ώρες μετά την ένεση και διατηρήθηκε σε όλο το διάστημα της παρατήρησης. Επιπλέον, ήταν σαφής η διάκριση μεταξύ των κυττάρων που προήλθαν από το ενεμένο βλαστομερίδιο και των υπόλοιπων κυττάρων μέσα στο ίδιο έμβρυο (Εικόνα 19E). Αν και οι διαφορές των δύο *dsredt1* mRNA που δοκιμάστηκαν δεν ήταν σημαντικές, αυτό με τις αιμοσφαιρινικές αλληλουχίες είχε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα.



Εικόνα 19: Έλεγχος των φθορίζουσών πρωτεϊνών EGFP και DsRedT1 σε έμβρυα αρθροπόδων. (A-Δ) Έμβρυα *Tribolium*. (A & Γ) Μη ενεμένα έμβρυα. (B) Έμβρυο ενεμένο σε πρώιμο (μη κυτταροποιημένο) στάδιο με *in vitro* παρηγμένο capped mRNA που κωδικοποιούσε την EGFP. (Δ) Έμβρυο ενεμένο σε πρώιμο στάδιο με *in vitro* παρηγμένο capped mRNA που κωδικοποιούσε την DsRedT1. Η έκφραση και των δύο φθορίζουσών πρωτεϊνών στα ενεμένα έμβρυα *Tribolium* τα καθιστά σαφώς διακριτά από τα μη ενεμένα αργητικά τους control (σύγκριση B με A και Δ με Γ). (E) Έμβρυο *Parhyale* ενεμένο σε ένα εκ των δύο βλαστομεριδίων στο στάδιο των δύο κυττάρων με *in vitro* παρηγμένο capped mRNA που κωδικοποιούσε την DsRedT1. Τα κύτταρα που έχουν προέλθει από το ενεμένο βλαστομερίδιο διακρίνονται από τον κλώνο του μη ενεμένου βλαστομεριδίου. Η κατανομή των φθορίζουσών πρωτεϊνών αντανακλά το διαφορετικό τρόπο πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης μεταξύ του *Tribolium* (συγκυτιακός) και του *Parhyale* (κυτταρικός). Όλα τα έμβρυα φωτογραφήθηκαν 5 ώρες μετά τη μικροένεσή τους. Τα έμβρυα A και B φωτογραφήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού με φίλτρα ανίχνευσης FITC, ενώ τα Γ, Δ και E με φίλτρα ανίχνευσης TRITC.

3.1.4. Μετασχηματισμός του *P. hawaiiensis* με το τρανσποζόνιο *Mi{3xP3-DsRed}*

Το τρίτο βήμα προς το μετασχηματισμό του *P. hawaiiensis*, αφορούσε την επιλογή της ρυθμιστικής αλληλουχίας για την έκφραση της *DsRedT1*, ώστε να διακρίνονται αξιόπιστα τα διαγονιδιακά άτομα. Μεταξύ της κλωνοποίησης ενός ενδογενούς συστατικού υποκινητή και της χρήσης του τεχνητού *3xP3* επιλέχθηκε το δεύτερο. Όλα τα κατοπινά πειράματα εκτελέστηκαν με συν-ένεση σε πρώιμα έμβρυα του βοηθού- mRNA και του πλασμιδίου-δότη *pMi{3xP3-DsRed}* που έφερε το τρανσποζόνιο *Mi{3xP3-DsRed}* (Εικόνα 22A), σε συγκεντρώσεις 300 ng/μl και 500 ng/μl, αντίστοιχα.

Τα πρωτόκολλα μικροένεσης, καλλιέργειας και διασταύρωσης των αμφιπόδων διαφοροποιούνταν εξαιρετικά σε σχέση με αυτά των εντόμων (βλέπε Υλικά & Μέθοδοι). Καταρχάς υπήρχε πολύ μικρότερη διαθεσιμότητα κατάλληλων εμβρύων, δηλαδή εμβρύων που βρίσκονταν στο στάδιο του ενός, των δύο ή των τεσσάρων βλαστομεριδίων. Σε αυτά τα στάδια η μικροέγχυση μπορούσε να κατευθυνθεί με σχετική ασφάλεια στο βλαστομερίδιο που θα γεννούσε τη γαμετική σειρά (το μικρότερο εκ των δύο ή τεσσάρων βλαστομεριδίων) (GERBERDING *et al.* 2002). Η απευθείας στόχευση του μικρομεριδίου-προδρόμου της γαμετικής σειράς, σε έμβρυα οκτώ βλαστομεριδίων, ήταν εξαιρετικά πιο δύσκολη και χρονοβόρα και δεν υιοθετήθηκε. Η χαμηλή προσφορά εμβρύων έθετε εκβιαστικά την απαίτηση για υψηλή βιωσιμότητα των ενεμένων ατόμων και/ή για υψηλή συχνότητα ενθέσεων του *Minos* στη γαμετική τους σειράς, ώστε να έχει τύχη η απόπειρα μετασχηματισμού του *P. hawaiiensis*.

ΠΙΝΑΚΑΣ 7

Σύνοψη πειραμάτων μετασχηματισμού *Parhyale*

#	Έμβρυα που ενέθηκαν (στάδιο)	Έμβρυα που εκκολάφθηκαν ^α (φθορίζοντα)	Γόνιμα ενήλικα G ₀ (φύλο)	Τρόπος διασταύρωσης	G ₀ με φθορίζοντες απογόνους G ₁	Συχνότητες μετασχηματισμού ^β (%)
1 ^ο	98 (1-2-4 κυττάρων)	35 (8 αμφιπλευρικά/ μονόπλευρα)	7 (3 θηλυκά/ 4 αρσενικά)	G ₀ μεταξύ τους	≥1	≥14.3
2 ^ο	60 (1-2-4 κυττάρων)	23 (δεν ελέγχθηκαν)	5 (1 θηλυκό/ 4 αρσενικά)	Σόλο επαναδιασταύρωση	1 αρσενικό	20
3 ^ο	41 (1- κυττάρου)	11 (10 αμφιπλευρικά)	3 (1 θηλυκό/ 2 αρσενικά)	Σόλο επαναδιασταύρωση	2 αρσενικά	66.7
	13 (2-κυττάρων)	5 (2 μονόπλευρα)	0	Σόλο επαναδιασταύρωση	0	
	35 (4-κυττάρων)	17 (1 μονόπλευρα)	1 αρσενικό	Σόλο επαναδιασταύρωση	0	
ΣΥ ΝΟ ΛΟ	247	91	16		≥4	≥25

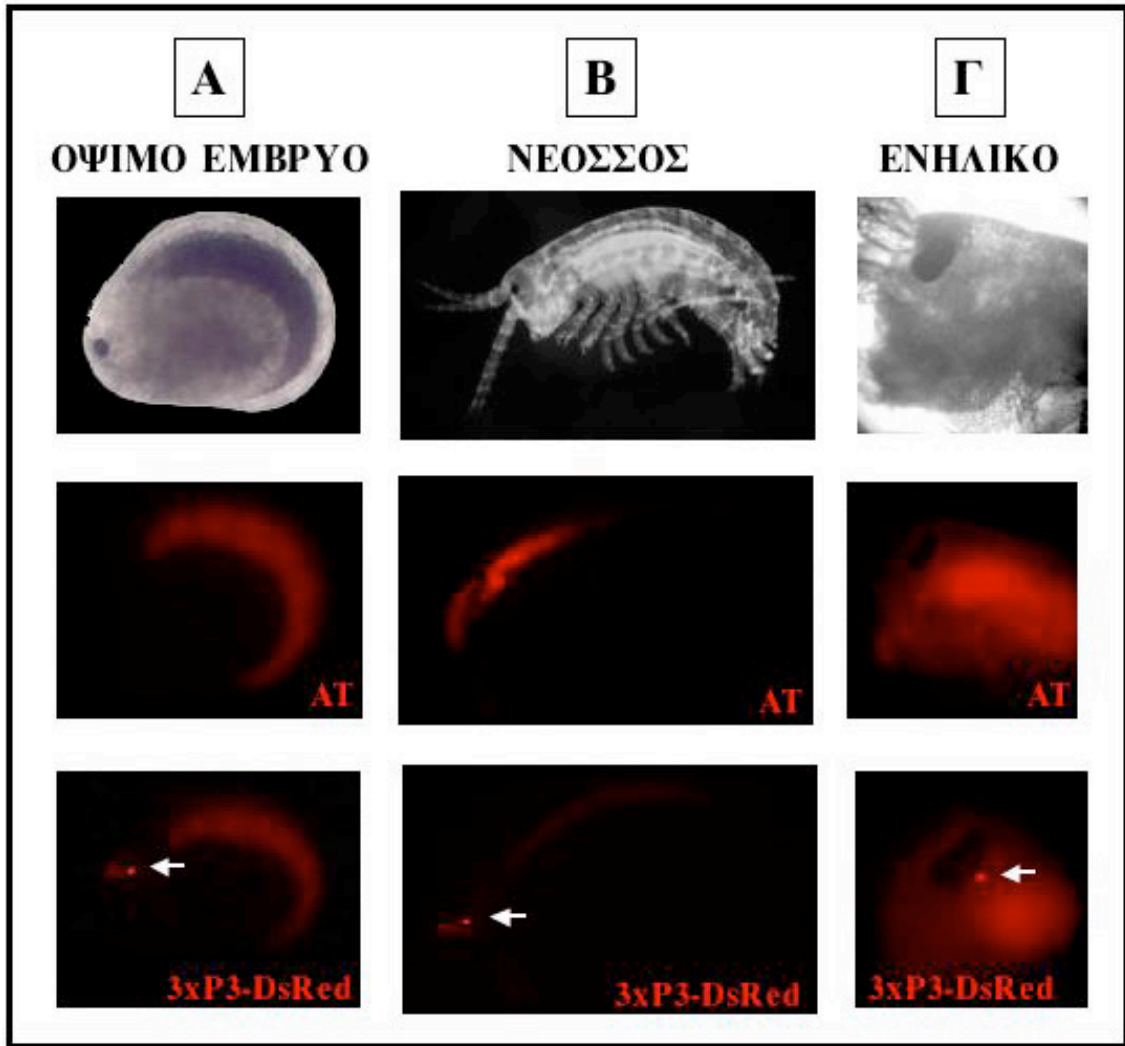
^αΤα έμβρυα που εκκολάπτονταν σε κάθε πείραμα καλλιεργούνταν ομαδικά μέχρι την αναπαραγωγική τους ωριμότητα.

^βΠοσοστό γόνιμων G₀ που δίνουν διαγονιδιακούς απογόνους.

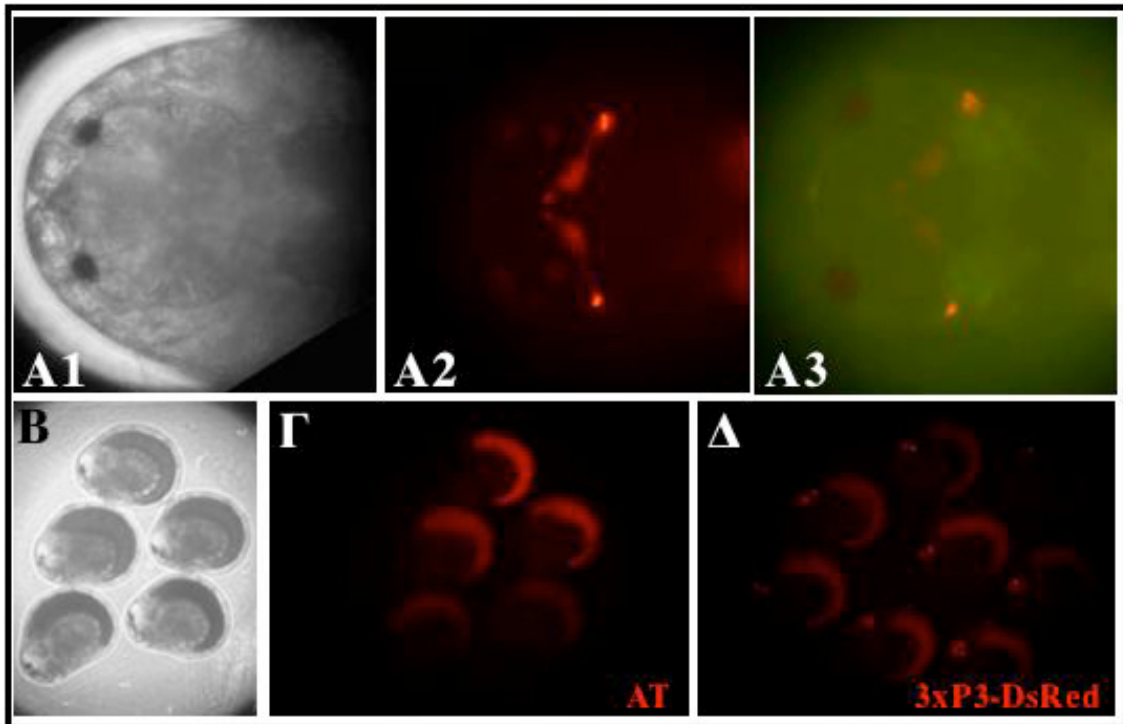
Συνολικά έγιναν τρεις σειρές πειραμάτων που συνοψίζονται στον Πίνακα 7. Στην **πρώτη προσπάθεια** μικροενέθηκαν 98 έμβρυα 1, 2 ή 4 κυττάρων, εκ των οποίων εκκολάφθηκαν τα 35. Πέρα από το ικανοποιητικό ποσοστό επιβίωσης, η καθημερινή παρατήρηση των αναπτυσσόμενων εμβρύων στο φθορίζον μικροσκόπιο, αποκάλυψε μία πολύ σημαντική πληροφορία. Οχτώ έμβρυα εμφάνισαν από την όγδοη μέρα της ανάπτυξης τους έναν εντοπισμένο φθορισμό πλευρικά της κεφαλής, λίγο πιο πίσω από το σχηματιζόμενο οφθαλμό. Ο φθορισμός στα περισσότερα έμβρυα ήταν αμφιπλευροσυμμετρικός, ενώ σε λίγα περιοριζόνταν στη μία πλευρά (Εικόνα 23). Ο φθορισμός αυτός αποδόθηκε σε ενθέσεις του διαγονιδίου *3xP3-DsRed* σε σωματικά κύτταρα των ενμενών αμφιπόδων G₀.

Τα 35 άτομα καλλιεργήθηκαν ομαδικά, ώστε να ωριμάσουν αναπαραγωγικά. Οι μεγαλύτερες απώλειες παρατηρήθηκαν σε αυτό το στάδιο, καθώς επέζησαν μόνο 7 ενήλικα άτομα, 4 αρσενικά και 3 θηλυκά (Πίνακας 7). Τα άτομα αυτά διασταυρώθηκαν μεταξύ τους και εξετάστηκε το πρότυπο φθορισμού στους απογόνους τους G₁. Με τον τρόπο που έγινε η διασταύρωση δεν ήταν γνωστό, αν τα θηλυκά γονιμοποιήθηκαν από το ίδιο ή διαφορετικά αρσενικά. Από τα τρία θηλυκά, το ένα δεν έδωσε φθορίζοντες απογόνους (4/4 έμβρυα), ενώ όλα τα έμβρυα των δύο άλλων θηλυκών (6 και 3 αντίστοιχα) εμφάνισαν με διαφορετικές εντάσεις το χαρακτηριστικό φθορισμό στο κεφάλι (Εικόνες 20 & 21). Το απόλυτο ποσοστό 100% των διαγονιδιακών ατόμων G₁ ήταν ιδιαίτερα ανήθιστο, συγκριτικά με τα δεδομένα των εντόμων, και έδειχνε ότι ολόκληρη η γαμετική σειρά του/των γονέων ήταν μετασχηματισμένη. Ο οφειλόμενος στο γονίδιο διάκρισης φθορισμός πρωτοανιχνεύθηκε στα διαγονιδιακά άτομα την όγδοη μέρα της εμβρυογένεσης (την ίδια μέρα πρωτοανιχνεύονται και οι αναπτυσσόμενοι οφθαλμοί), σε δύο αμφιπλευροσυμμετρικούς πληθυσμούς κυττάρων οπίσθια και ραχιαίοπλευρικά της κεφαλής (Εικόνα 20). Τα κύτταρα αυτά είχαν τη χαρακτηριστική δομή νευρικών κυττάρων και εντοπίζονταν πίσω από τους οφθαλμούς (Εικόνα 21). Η έκφραση του *3xP3-DsRed* συνεχίστηκε με το ίδιο πρότυπο και στα επόμενα αναπτυξιακά στάδια, καθόλη τη διάρκεια της ζωής

των ατόμων (Εικόνα 20). Σε αντίθεση με τα έντομα, ο υποκινητής *3xP3* δεν ενεργοποιήθηκε στους φωτοϊποδοχείς των σύνθετων οφθαλμών.



Εικόνα 20: Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου διάκρισης *3xP3-DsRed* στο αμφίποδο *Parhyale hawaiiensis*. **(Στήλη Α)** Όψιμα έμβρυα. **(Στήλη Β)** Νεοσσοί. **(Στήλη Γ)** Κεφαλές από ενήλικα. Στην πρώτη σειρά παρατίθενται φωτογραφίες ατόμων που τραβήχτηκαν στο ορατό φως. Δεν μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ μετασχηματισμένων και μη μετασχηματισμένων ζώων. Στο φθορίζον μικροσκόπιο, τα διαγονιδιακά αμφίποδα (3^η σειρά; *3xP3-DsRed*) επιδεικνύουν διαφορετικό πρότυπο φθορισμού από τα φυσιολογικά (2^η σειρά; Αγρίου Τύπου). Σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια ανιχνεύεται αποκλειστικά στα διαγονιδιακά άτομα ένας εντοπισμένος φθορισμός πλευρικά της κεφαλής, που είναι σαφώς διακριτός από τον ενδογενή αυτοφθορισμό του εντέρου. Οι φωτογραφίες των αμφιπόδων (πλευρικές απόψεις; πρόσθιο άκρο αριστερά; κοιλιακή επιφάνεια κάτω) τραβήχτηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (κανονικό ή ανεστραμμένο) με φίλτρα ανίχνευσης TRITC.



Εικόνα 21: (A1-3) Το γονίδιο διάκρισης *3xP3-DsRed* εκφράζεται σε δύο αμφιπλευροσυμμετρικούς πληθυσμούς νευρικών κυττάρων ραχαιοπλευρικά της κεφαλής και πίσω από τους σκουρόχρωμους σύνθετους οφθαλμούς. Οι φωτογραφίες είναι ραχιαίες απόψεις σε μεγάλη μεγέθυνση ενός μετασχηματισμένου όψιμου εμβρύου που επιδεικνύει έντονο φθορισμό: (A1) στο ορατό φως, (A2) σε φθορίζουσα ακτινοβολία με φίλτρα ανίχνευσης TRITC και (A3) σε φθορίζουσα ακτινοβολία με φίλτρα ανίχνευσης EGFP (ο αυτοφθορισμός επιτρέπει να διακρίνουμε τη μορφολογία του εμβρύου και τους σκουρόχρωμους σύνθετους οφθαλμούς). (B-Δ) Όλοι οι γονείς που μετασχηματίστηκαν με το τριανσποζόνιο *Mi{3xP3-DsRed}* έδωσαν διαγονιδιακούς απογόνους σε ποσοστό 100%. Οι φωτογραφίες είναι πλευρικές απόψεις συναθροισμών όψιμων εμβρύων που τραβήχτηκαν σε ανεστραμμένο μικροσκόπιο φθορισμού: (B) στο ορατό φως, όπου δε γίνεται διάκριση μεταξύ μετασχηματισμένων και μη ατόμων, (Γ και Δ) σε φθορίζουσα ακτινοβολία με φίλτρα ανίχνευσης TRITC, όπου φαίνεται ότι όλοι οι απόγονοι ενός γονέα με μετασχηματισμένη γαμετική σειρά ήταν διαγονιδιακοί (*3xP3-DsRed*) και επεδείκνυαν το χαρακτηριστικό πρότυπο φθορισμού, που τα διαφοροποιεί από τα φυσιολογικά άτομα (AT, αγρίου τύπου).

Τα 9 διαγονιδιακά άτομα G_1 καλλιεργήθηκαν μέχρι την ενηλικίωσή τους και τα 5 που επιβίωσαν (3/6 και 2/3 αντίστοιχα) επαναδιασταυρώθηκαν ξεχωριστά με άτομα αγρίου τύπου. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ένθεση του στοιχείου *Minos* στο γονιδίωμα των αμφιπόδων, απομονώθηκε γενωμικό DNA από τους πέντε συναθροισμούς ατόμων G_2 , που έδειχναν όλα ανεξαιρέτως το χαρακτηριστικό πρότυπο φθορισμού, και αναλύθηκε κατά Southern. Το DNA κόπηκε με *SacI* και υβριδοποιήθηκε με ανιχνευτή την κωδική περιοχή του γονιδίου *dsred1*, που αποκαλύπτει μία ζώνη ανά ένθεση (Εικόνα 22A). Σε όλα τα δείγματα ανιχνεύθηκαν πολλαπλά αντίτυπα του τριανσποζόνιου *Mi{3xP3-DsRed}* (Εικόνα 22B). Για να μελετηθεί ευκρινέστερα ο διαχωρισμός αυτών των ενθέσεων από τα διαγονιδιακά άτομα G_1 στους απογόνους τους, απομονώθηκε γενωμικό DNA ξεχωριστά από 2 G_1 και από μεμονωμένους ενήλικους αρσενικούς απογόνους τους G_2 . Η ανάλυση κατά Southern έδειξε καθαρά ότι ένα διαφορετικό υποσύνολο των ενθέσεων του *Minos*, που φέρει στο γονιδίωμα του κάθε γονέας G_1 , μεταβιβάζεται σε καθένα διαφορετικό άτομο G_2 (Εικόνα 22Γ). Επιπλέον, οι ενθέσεις αυτές φαίνονταν απόλυτα σταθερές, καθώς δεν ανιχνεύθηκαν νέες ζώνες στα άτομα G_2 συγκριτικά με αυτές των γονέων G_1 .

Αξίζει να σημειωθεί ότι στην πορεία αυτών των πειραμάτων βελτιώνονταν παράλληλα τα πρωτόκολλα χειρισμού των ατόμων G_0 . Στη **δεύτερη σειρά**

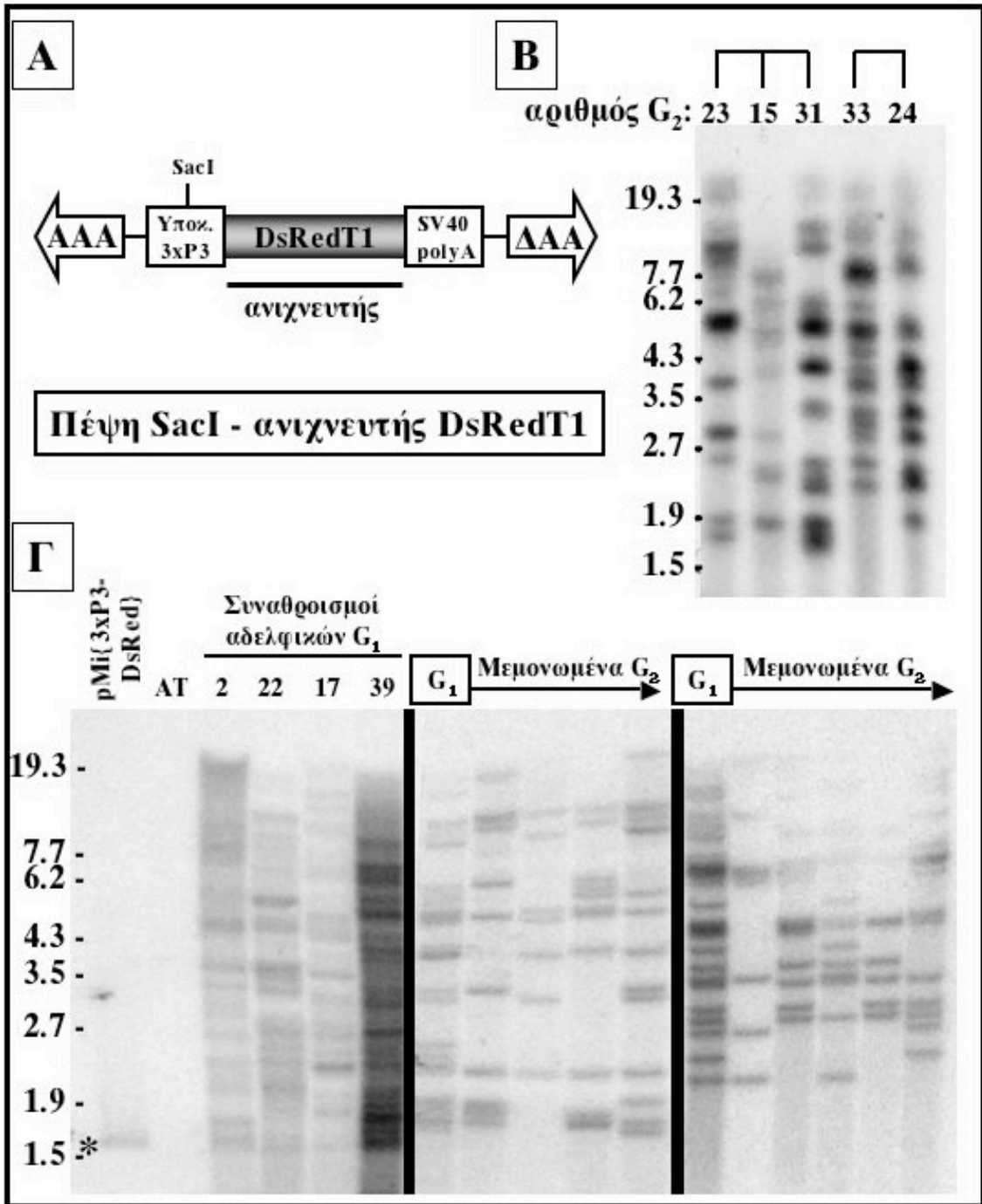
πειραμάτων, η διασταύρωση μεμονωμένων G_0 με άτομα αγρίου τύπου επέτρεψε την ξεχωριστή ανάλυση της γαμετικής σειράς κάθε αμφιπόδου G_0 (Πίνακας 7). Τα αναπτυσσόμενα έμβρυα δεν εξετάστηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού, για να μην υποστούν το στρες της ακτινοβολήσης. Και σε αυτή την περίπτωση όμως, ενώ το ποσοστό εκκόλαψης των ενεμένων εμβρύων ήταν ικανοποιητικό (23/60), η υψηλή θνησιμότητα στην κατοπινή μαζική καλλιέργειά τους, περιορίσε τον αριθμό τους σε 5 μόνο ενήλικα G_0 . Ένα αρσενικό εξ αυτών, επαναδιασταυρούμενο με θηλυκά αγρίου τύπου, έδωσε αποκλειστικά φθορίζοντες απογόνους G_1 , οι οποίοι υποβλήθηκαν ομαδικά σε ανάλυση Southern (Εικόνα 22Γ). Ο ενεμένος γονέας περιείχε δεκάδες (>50) αντίτυπα του τρानσποζόνιου *Mi{3xP3-DsRed}* στη γαμετική του σειρά.

Στο **τρίτο πείραμα** αντλήθηκαν πληροφορίες ξεχωριστά για κάθε στάδιο εμβρύων που ενέθηκε (Πίνακας 7). Από τα μονοκύτταρα έμβρυα που ενέθηκαν, εκκολάφθηκαν 11, εκ των οποίων τα 10 φθόριζαν αμφιπλευρικά. Από τα 3 G_0 που επέζησαν ως την ενηλικίωση και επαναδιασταυρώθηκαν με άτομα αγρίου τύπου, 2 έδωσαν διαγονιδιακούς απογόνους σε ποσοστό 100%, ενώ το τρίτο δεν έδωσε φθορίζοντες απογόνους. Με δεδομένο το υψηλό ποσοστό μετασχηματισμού των ατόμων που επιβίωσαν (66.7%) και ότι 10 στα 11 έμβρυα G_0 που ενέθηκαν στο στάδιο του ενός κυττάρου φθόριζαν αμφιπλευρικά, υποθέτουμε ότι και ένα μεγάλο μέρος των εμβρύων που δεν επιβίωσαν, θα πρέπει επίσης να είχε μετασχηματισμένες γαμετικές σειρές. Οι δύο συναθροισμοί μετασχηματισμένων απογόνων G_1 υποβλήθηκαν σε ανάλυση κατά Southern και φανέρωσαν, όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, την ύπαρξη δεκάδων ενθέσεων στις γαμετικές σειρές των δύο G_0 (Εικόνα 22Γ).

Σύμφωνα με τη γενεαλογία των βλαστομεριδίων (GERBERDING *et al.* 2002), τα δικύτταρα έμβρυα που ενέθηκαν (η μικροένεση πραγματοποιούνταν στο ένα εκ των δύο βλαστομεριδίων), δε θα μπορούσαν να φθορίζουν αμφιπλευρικά, αλλά μόνο στο δεξί ή το αριστερό μέρος (Εικόνα 23). Κάθε βλαστομερίδιο στο στάδιο των δύο κυττάρων συμμετέχει στο σχηματισμό του εξωδέρματος μόνο μίας πλευράς και τα κύτταρα στα οποία ενεργοποιείται ο υποκινητής *3xP3* είναι πιθανότατα εξωδερμικής προέλευσης (βλέπε Συζήτηση). Η εξέταση των 5 αναπτυσσόμενων εμβρύων που ενέθηκαν σε αυτό το στάδιο επιβεβαίωσε αυτές τις προσδοκίες, αφού ο φθορισμός που ανιχνεύθηκε σε 2 από αυτά ήταν μονόπλευρος (Πίνακας 7 & Εικόνα 23). Δεδομένου ότι σε αυτό το στάδιο, το ένα εκ των δύο βλαστομεριδίων δίνει τη γαμετική σειρά, η πιθανότητα το βλαστομερίδιο που γέννησε τα φθορίζοντα κύτταρα να έδωσε και τη γαμετική σειρά είναι τουλάχιστον 50%. Δυστυχώς, και τα 5 άτομα G_0 απεβίωσαν πριν την ενηλικίωση.

Τα έμβρυα που ενέθηκαν στο στάδιο των τεσσάρων κυττάρων επέδειξαν το υψηλότερο ποσοστό εκκόλαψης (Πίνακας 7). Το μειονέκτημα όμως των μικροενέσεων σε αυτό το στάδιο είναι ότι το βλαστομερίδιο που δίνει τη γαμετική σειρά, δε συμμετέχει στο σχηματισμό του εξωδέρματος. Συνεπώς, η ανίχνευση φθορισμού σε κάποιο αναπτυσσόμενο έμβρυο αποτελεί αρνητική και όχι θετική ένδειξη για το μετασχηματισμό της γαμετικής του σειράς. Η επιβίωση και ο έλεγχος ενός μόνο (μη μετασχηματισμένου) ενηλικίου G_0 δεν επέτρεψε επί της ουσίας την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την αποδοτικότητα των ενέσεων σε αυτό το στάδιο.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η περιοριστική ενδονουκλεάση *SacI*, που χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση κατά Southern όλων των δειγμάτων, αναγνωρίζει μία θέση πρόσδεσης μέσα στο τρानσποζόνιο και μία στον κορμό του πλασμιδίου-δότη, ακριβώς δίπλα στο δεξί ανεστραμμένο άκρο του *Minos*. Το μέγεθος 1.6 kb της μεταξύ τους απόστασης είναι το μικρότερο που αναμενόταν για αχέραιες ενθέσεις του *Minos* στο γονιδίωμα του *Parhyale*. Καμία ένθεση από τις εκατοντάδες που φανέρωσε η ανάλυση δεν χαρακτηριζόταν από μικρότερο μέγεθος (Εικόνα 22), συνηγορώντας υπέρ της δημιουργίας τους με το φυσιολογικό μηχανισμό εκτομής και ένθεσης.



Εικόνα 22: Μοριακή ανάλυση των ενθέσεων του *Minos* στο γονιδίωμα του *Parhyale hawaiensis*. **(Α)** Σχηματική αναπαράσταση του τραπεζοζονίου *Mi{3xP3-DsRed}*. Οριοθετείται από το αριστερό και το δεξί ανεστραμμένο άκρο του *Minos* (AAA και ΔAA αντίστοιχα). Η κωδική περιοχή του γονιδίου *dsredt1* είναι υπό τον έλεγχο του τεχνητού υποκινητή *3xP3* και ακολουθείται από την περιοχή πολυαδενυλίωσης του ιού *SV40* (*SV40 polyA*). **(Β-Γ)** Ανάλυση κατά Southern δειγμάτων γενωμικού DNA, που έχουν επωαστεί με *SacI* και υβριδοποιηθεί με ανιχνευτή την κωδική περιοχή του γονιδίου *dsredt1*. Αναμένεται μία ζώνη ανά ένθεση του *Minos*. **(Β)** Κάθε διαδρομή αντιστοιχεί σε γενωμικό DNA απομονωμένο από συναθροισμούς αδελφικών διαγονιδιακών ατόμων G_2 (ο αριθμός τους φαίνεται πάνω από κάθε διαδρομή), που έχουν προέλθει από τον ίδιο μετασχηματισμένο γονέα G_1 . Οι γονείς G_1 είναι αυτοί που επιβίωσαν στην 1^η σειρά πειραμάτων και είναι (από αριστερά προς τα δεξιά) τα 3 από τα 6 άτομα της δεύτερης ωσαπτόθεσης και τα 2 από τα 3 άτομα της τρίτης ωσαπτόθεσης. **(Γ) Διαδρομή 1:** Το πλασμίδιο-δότης *pMi{3xP3-DsRed}* κομμένο με *SacI*; η ζώνη 1.6 kb (αστερίσκος) οριοθετεί το μικρότερο μέγεθος αναμενόμενης ζώνης για ακέραιες ενθέσεις του *Minos* (υπάρχει θέση αναγνώρισης *SacI* στο

πλασμίδιο-δότη αμέσως μετά το ΔΑΑ), **Διαδρομή 2:** Γενομικό DNA από φυσιολογικά άτομα (AT, αγρίου τύπου); δεν ανιχνεύεται καμία ζώνη, **Διαδρομή 3:** Συναθροισμός διαγονιδιακών ατόμων G_1 από την 1^η σειρά πειραμάτων, **Διαδρομές 4-5:** Συναθροισμοί διαγονιδιακών ατόμων G_1 από τους δύο γονείς G_0 με μετασηματισμένη γαμετική σειρά της 3^{ης} σειράς πειραμάτων, **Διαδρομή 6:** Συναθροισμός διαγονιδιακών ατόμων G_1 από το γονέα G_0 με μετασηματισμένη γαμετική σειρά της 2^{ης} σειράς πειραμάτων, **Διαδρομή 7:** Διαγονιδιακό άτομο G_1 από την 1^η σειρά πειραμάτων, **Διαδρομές 8-11:** Μεμονωμένοι διαγονιδιακοί απόγονοι G_2 του γονέα G_1 της διαδρομής 7; ένα υποσύνολο των ενθέσεων του γονέα μεταβιβάζεται σε κάθε απόγονό του, **Διαδρομή 12:** Διαγονιδιακό άτομο G_1 από την 1^η σειρά πειραμάτων, **Διαδρομές 13-17:** Μεμονωμένοι διαγονιδιακοί απόγονοι G_2 του γονέα G_1 της διαδρομής 12; ένα υποσύνολο των ενθέσεων του γονέα μεταβιβάζεται σε κάθε απόγονό του.

3.2. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.2.1. Οι διαπλασμιδιακές δοκιμασίες προάγγελος της υψηλής ενεργότητας του *Minos* στα έμβρυα του *P. hawaiiensis*

Οι διαπλασμιδιακές δοκιμασίες έδωσαν τις πρώτες ισχυρές ενδείξεις ότι το στοιχείο *Minos* μπορεί να αξιοποιηθεί στο μετασχηματισμό του *P. hawaiiensis*. Η ενεργότητα του στοιχείου σύμφωνα και με τις δύο δοκιμασίες απαιτούσε την παρουσία της τρανσποζάσης. Εκτομή και μετάθεση του τρανσποζονίου δεν ανιχνεύθηκε απουσία του ενζύμου (Εικόνα 17 & Πίνακας 6), υποστηρίζοντας ότι από το γονιδίωμα του αμφιπόδου απουσιάζουν στοιχεία που θα μπορούσαν να ετερο-κινητοποιήσουν το *Minos*. Από τις δύο πηγές τρανσποζάσης που δοκιμάστηκαν, μόνο το βοηθό-mRNA ήταν λειτουργικό (Εικόνα 17). Η ευαισθησία της δοκιμασίας εκτομής επιτρέπει την εξαγωγή του συμπεράσματος ότι ο δροσοφιλικός υποκινητής *hsp70* πιθανότατα δεν είναι λειτουργικός στο αμφίποδο. Η δράση της τρανσποζάσης ήταν δόσοεξαρτώμενη, τουλάχιστον μέσα στο εύρος των συγκεντρώσεων του βοηθού-mRNA που ενέθηκαν (Πίνακες 5 & 6). Σύμφωνα με τις μετρήσεις της δοκιμασίας μετάθεσης, ο διπλασιασμός της συγκέντρωσης του βοηθού-mRNA δεκαπλασίαζε τον αριθμό των πληγμένων πλασμιδίων-στόχων. Η συχνότητα μετάθεσης που παρατηρήθηκε στην υψηλότερη συγκέντρωση (300 ng/μl) ισοδυναμούσε με την καλύτερη επίδοση που έχουν σημειώσει οι δοκιμασίες ενεργότητας του *Minos* σε έμβρυα της *D. melanogaster* (KLINAKIS *et al.* 2000a).

3.2.2. Πρότυπο έκφρασης του υποκινητή *3xP3* στον *P. hawaiiensis*

Ο υποκινητής *3xP3* επιλέχθηκε για την έκφραση της φθορίζουσας πρωτεΐνης DsRedT1, ώστε να διακριθούν τα διαγονιδιακά αμφίποδα. Η ενεργότητα του υποκινητή ήταν αποδεδειγμένη σε όλα σχεδόν τα μετασχηματισμένα είδη εντόμων (HORN *et al.* 2002), αλλά αυτή ήταν η πρώτη φορά που δοκιμάζονταν στα καρχινοειδή. Η παρατήρηση στο φθορίζον μικροσκόπιο φανέρωσε ότι μερίδα των ενεμένων εμβρύων G₀ (Πίνακας 7 & Εικόνα 23), καθώς και το σύνολο των απογόνων ορισμένων G₀ (Εικόνες 20 & 21), επέδειξαν ένα διακριτό φθορισμό πλευρικά της κεφαλής.

Μια σειρά στοιχείων μας πείθουν ότι ο φθορισμός αυτός αντιστοιχεί στο πρότυπο έκφρασης του διαγονιδίου *3xP3-DsRed*:

- i) δεν παρατηρήθηκε σε κανένα έμβρυο αγρίου τύπου (Εικόνα 20),
- ii) αν και δεν εντοπίζονταν στα κύτταρα των οφθαλμών καθεαυτά, τα φθορίζοντα κύτταρα είχαν τη χαρακτηριστική δομή νευρικών κυττάρων (φαινόταν καθαρά σε διαγονιδιακές σειρές με υψηλά επίπεδα φθορισμού) και η επαγωγή της έκφρασής του συνέπιπτε χρονικά με το σχηματισμό των οφθαλμών (Εικόνα 21),
- iii) το πρότυπο στα αναπτυσσόμενα έμβρυα G₀ ταίριαζε με τη γενεαλογία των ενεμένων βλαστομεριδίων (Εικόνα 23), και το σημαντικότερο,
- iv) η ανάλυση κατά Southern σε άτομα που επιλέχθηκαν βάση αυτού του φαινοτύπου, επιβεβαίωσε ότι τα άτομα αυτά έφεραν πολλαπλές ενθέσεις του τρανσποζονίου *Mi{3xP3-DsRed}* στο γονιδίωμά τους (Εικόνα 22).

Συμπερασματικά, το γονίδιο διάκρισης *3xP3-DsRedT1* μπορεί να υπηρετήσει με ασφάλεια και ευαισθησία την ανίχνευση των διαγονιδιακών αμφιπόδων. Ως πιο βολικό στάδιο επιλογής προτείνονται οι τελευταίες δύο

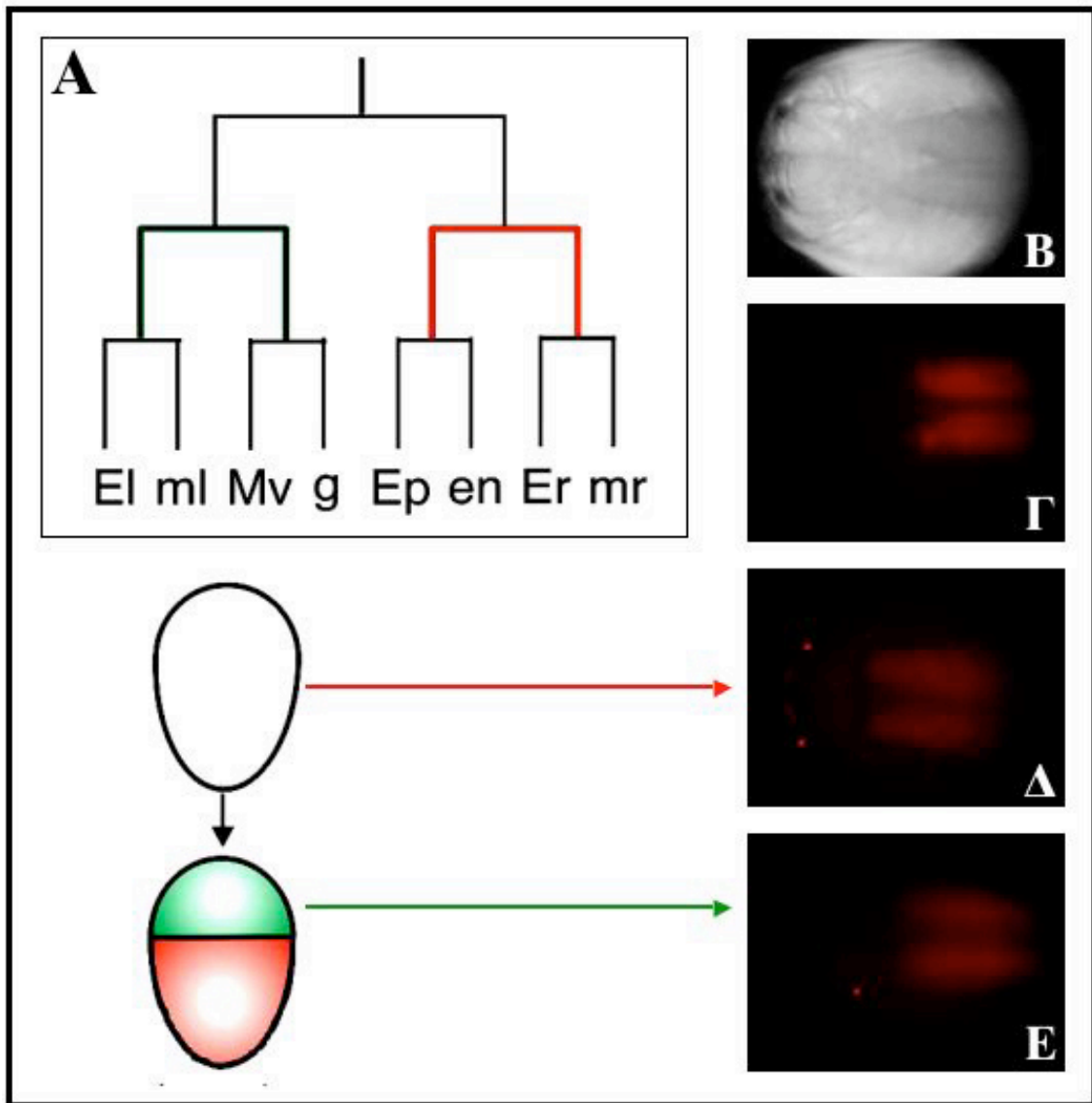
ημέρες της εμβρυογένεσης, όταν τα άτομα είναι ακόμη ακινητοποιημένα από τις περιβάλλουσες μεμβράνες. Σε μεγαλύτερα στάδια απαιτείται η ακινητοποίηση των ζώων. Επιπλέον, λόγω του αυτοφθορισμού της λαμβανόμενης τροφής δυσχεραίνεται η διάκριση των φθορίζοντων κυττάρων, ειδικά στα νεαρά άτομα.

3.2.3. Συχνότητες μετασχηματισμού

Ο υπολογισμός των συχνοτήτων μετασχηματισμού, και στα τρία ανεξάρτητα πειράματα, στηρίχτηκε σε πολύ μικρό δείγμα ενηλίκων G_0 (Πίνακας 7). Στο πρώτο πείραμα, που η ομαδική διασταύρωση περιορίζει την ακρίβεια, υπολογίζεται τουλάχιστον 14.3% (αν όλοι οι μετασχηματισμένοι γαμέτες προέρχονταν από ένα γονέα), στο δεύτερο πείραμα 20% και στο τρίτο 66.7% για τα ενεμένα στο στάδιο του ενός κυττάρου και 50% για το σύνολο των G_0 . Αν συμψηφιστούν όλες οι ανεξάρτητες προσπάθειες, το ποσοστό μετασχηματισμού κυμαίνεται στο 25%. Σε κάθε περίπτωση, εντυπωσιάζει το γεγονός ότι σε τρία διαφορετικά πειράματα, ο μικρός αριθμός των ατόμων G_0 δε στάθηκε απαγορευτικός στην απόκτηση μίας τουλάχιστον διαγονιδιακής σειράς.

Αν και δεν μπορεί να απαντηθεί ξεκάθαρα σε ποιο στάδιο εμβρύων είναι αποδοτικότερες οι ενέσεις, τα μονο-κύτταρα και δι-κύτταρα έμβρυα παρέχουν το συγκριτικό πλεονέκτημα της πρόβλεψης της επιτυχίας του πειράματος βάση της ανίχνευσης φθορισμού στα ενεμένα G_0 (Εικόνα 23). Δεδομένου ότι ο χρόνος γενεάς του *Parhyale* προσεγγίζει τους δύο μήνες, η πληροφορία αυτή είναι πολύτιμη για την επανάληψη ή όχι του πειράματος στο μεσοδιάστημα. Στον αντίποδα, τα έμβρυα των τεσσάρων βλαστομεριδίων επιδεικνύουν υψηλότερο ποσοστό εκκόλαψης (Πίνακας 7). Ο μελλοντικός χαρακτηρισμός συστατικών ενδογενών υποκινητών και η χρήση τους σε καινούρια γονίδια διάκρισης, θα μπορούσε ίσως να καταστήσει και αυτό το στάδιο εξίσου ελκυστικό για μικροενέσεις.

Το υψηλό ποσοστό θνησιμότητας (70%-95%) των νεαρών G_0 παραμένει το σημαντικότερο πρόβλημα στο μετασχηματισμό του *Parhyale* (Πίνακας 7). Η πιο κρίσιμη παράμετρος για την επιβίωση των ενεμένων G_0 , τόσο κατά την εμβρυογένεση όσο και μετά την εκκόλαψή τους, είναι η χρήση οξύληκτων μικροβελόνων. Το στρες της φθορίζουσας ακτινοβολίας δε φαίνεται να επηρεάζει τη βιωσιμότητα των G_0 , ενώ αντίθετα, αρνητικό ρόλο έχει διαπιστωθεί ότι παίζουν η κατακρήμνιση του συνθετικού άλατος που χρησιμοποιείται για την παρασκευή θαλασσινού νερού, καθώς και η ανάπτυξη μικροοργανισμών στα τρυβλία όπου αναπτύσσονται τα ενεμένα έμβρυα. Ακόμη και στα μη ενεμένα φυσιολογικά έμβρυα που καλλιεργούνται σε τρυβλία καθόλη την εμβρυογένεση, έχουν παρατηρηθεί ποσοστά θνησιμότητας που κυμαίνονται μεταξύ 20-50%. Η συχνές μεταφορές των επιζώντων εμβρύων, η προσθήκη αντιβιοτικών στο νερό και η αντικατάσταση της ομαδικής καλλιέργειας με ατομικές καλλιέργειες των εκκολαπτόμενων G_0 βελτιώνουν σε μικρό βαθμό τα ποσοστά επιβίωσης. Τέλος, η ανακάλυψη πολλαπλών ενθέσεων στο γονιδίωμα των μετασχηματισμένων αμφιπόδων αφήνει ανοικτό το ενδεχόμενο, η υψηλή θνησιμότητα των γονέων G_0 να συνδέεται με την υψηλή κινητικότητα του στοιχείου *Mipos* και την πρόκληση θνησιγόνων μεταλλάξεων.



Εικόνα 23: Έκφραση του γονιδίου διάκρισης *3xP3-DsRedT1* στα ενεμένα άτομα G_0 . **(Α)** Γενεαλογία των βλαστομεριδίων του πρώιμου εμβρύου. Με μικρούς χαρακτήρες υποδεικνύονται οι βλαστικές στιβάδες που θα προκύψουν από τα 4 μικρομερίδια και με κεφαλαία αυτές που θα προκύψουν από τα 4 μακρομερίδια (GERBERDING *et al.* 2002); Συντμήσεις: αριστερό πρόσθιο εξώδερμα (El), αριστερό σωματικό μεσόδερμα (ml), σπλαχνικό μεσόδερμα (Mv), γαμετική σειρά (g), οπίσθιο εξώδερμα (Ep), ενδόδερμα (en), δεξί πρόσθιο εξώδερμα (Er), δεξί σωματικό μεσόδερμα (mr). **(Β)** Ραχιαία άποψη ενός όψιμου εμβρύου στο ορατό φως. **(Γ-Ε)** Ραχιαίες απόψεις όψιμων εμβρύων σε φθορίζουσα ακτινοβολία με φίλτρα ανίχνευσης TRITC: **(Γ)** Φυσιολογικό μη ενεμένο έμβryo, **(Δ)** Έμβryo ενεμένο στο στάδιο του ενός κυττάρου; η πρόιμη ένθεση του στοιχείου *Minos* οδηγεί στο μετασχηματισμό και του αριστερού και του δεξιού πρόσθιου εξωδέματος, και την ανίχνευση του αμφιπλευροσυμμετρικού φθορισμού, **(Ε)** Έμβryo ενεμένο στο ένα εκ των δύο βλαστομεριδίων (πράσινο) στο στάδιο των δύο κυττάρων; η ένθεση του *Minos* σε αυτό το στάδιο οδηγεί στη μονόπλευρη έκφραση του γονιδίου διάκρισης. Το πρότυπο αυτό συμφωνεί με τη γενεαλογία του ενεμένου βλαστομεριδίου, το οποίο θα δώσει μεταξύ άλλων και το αριστερό πρόσθιο εξώδερμα.

3.2.4. Σύγκριση του μετασχηματισμού εντόμων και αμφιπόδου

Η τροποποίηση στα πρωτόκολλα μικροένεσης, καλλιέργειας και διασταύρωσης του *Parhyale*, σε σχέση με αυτά που χρησιμοποιούνται στα έντομα, ήταν απαραίτητη λόγω του διαφορετικού τρόπου ζωής και ανάπτυξης του οργανισμού. Οι διαφορές αυτές όμως είχαν μεγάλη επίπτωση και σε σημαντικές παραμέτρους του μετασχηματισμού. Η ανίχνευση της έκφρασης του γονιδίου διάκρισης στα ενεμένα άτομα G_0 , ο μετασχηματισμός της γαμετικής τους σειράς με ένα τεράστιο αριθμό ενθέσεων του *Minos* και η γέννηση διαγονιδιακών απογόνων σε ποσοστό 100% ήταν οι κυριότερες εξ αυτών.

Στα έντομα, η μικροέγχυση του κινητοποιούμενου φορέα μετασχηματισμού πραγματοποιείται σε ένα έμβρυο με πολλά αντίγραφα (>500 πυρήνες) του γονιδιώματος, όπου έχουν ήδη διαχωριστεί οι πυρήνες που θα συμμετέχουν στη γαμετική και τη σωματική σειρά. Με τις σπάνιες εξαιρέσεις ορισμένων γονιδίων διάκρισης που δρουν μη αυτόνομα σε κυτταρικό επίπεδο (π.χ. *rosy* στη *Drosophila*), ο φαινότυπος του γονιδίου διάκρισης ανιχνεύεται μόνο στους απογόνους G_1 . Ενίοντας τα έμβρυα του αμφιπόδου, που περιείχαν ένα ή δύο μόνο κύτταρα, θεωρήθηκε πιθανός ο συν-μετασχηματισμός και της γαμετικής σειράς και των βλαστικών στιβάδων που προκύπτουν από το ίδιο ενεμένο βλαστομερίδιο. Η παραπάνω υπόθεση φαίνεται να επαληθεύεται από την εξέταση των αναπτυσσόμενων G_0 και των απογόνων τους G_1 (Πίνακας 7 και Εικόνα 23). Σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν, οι φθορίζοντες γονείς G_0 έδωσαν διαγονιδιακούς απογόνους, σε αντίθεση με τους μη φθορίζοντες που είχαν φυσιολογικούς απογόνους. Συμπερασματικά, ο αμφίπλευρος ή μονόπλευρος φθορισμός των ατόμων G_0 αποτελεί καλή ένδειξη μετασχηματισμού της γαμετικής τους σειράς.

Τα (μετασχηματισμένα) κύτταρα των G_0 , σε αντίθεση με τα κύτταρα των διαγονιδιακών G_1 , είναι πιθανότατα ετερογενή σε ό,τι αφορά τον αριθμό και τις χρωμοσωμικές περιοχές των ενθέσεων του *Minos*. Συνεπώς, ενώ τα μωσαϊκά άτομα G_0 προσφέρονται για έναν πρώτο έλεγχο της ενεργότητας διαγονιδίων σε γενετικά πειράματα, η οριστική εξαγωγή συμπερασμάτων θα πρέπει να στηρίζεται στην ανάλυση των διαγονιδιακών απογόνων τους.

Η δεύτερη διαφοροποίηση σχετιζόταν με την ιδιαίτερα υψηλή ενεργότητα του στοιχείου *Minos* στη γαμετική σειρά των γονέων G_0 που παράγουν διαγονιδιακούς απογόνους. Στα έντομα μετασχηματίζεται ένα υποσύνολο μόνο των γαμετικών κυττάρων. Το ποσοστό των διαγονιδιακών G_1 ποικίλει (π.χ. 1%-96% στην περίπτωση του *Tribolium*), ανάλογα με το πλήθος των μετασχηματισμένων πρόδρομων γαμετικών κυττάρων και το στάδιο της γαμετογένεσης όπου πραγματοποιούνται οι ενθέσεις του στοιχείου. Στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων δεν ανιχνεύονται περισσότερες από 5 ενθέσεις ανά γαμετική σειρά. Αντίθετα, στο αμφίποδο ανιχνεύθηκαν δεκάδες ενθέσεις του *Minos* ανά μετασχηματισμένη γαμετική σειρά, μέρος των οποίων κληρονομούνταν σε καθένα από τους απογόνους (Εικόνα 22). Ο συνδυασμός της υψηλής μεταθεσιμότητας του τραπεζοζονίου *Mi{3xP3-DsRed}* και ο πρώιμος μετασχηματισμός του βλαστομεριδίου που δίνει τη γαμετική σειρά (βλαστομερίδιο g) είναι η πιο προφανής ερμηνεία. Δεδομένου ότι οι τρεις πρώτες αυλακώσεις διαρκούν περίπου 8 ώρες, τα ενεμένα στο στάδιο του ενός ή δύο κυττάρων τραπεζοζονία μπορούν να μετατεθούν στα πρόδρομα του g βλαστομερίδια. Ο ασυνήθιστα υψηλός αριθμός ενθέσεων μπορεί να οφείλεται σε αυξημένη ενεργότητα της τραπεζοζάσης ή σε παρατεταμένη καταλυτική της ικανότητα λόγω σταθερότητας του βοηθού-mRNA και της πρωτεΐνης στις συγκεκριμένες συνθήκες. Ίσως τέλος, το μεγάλο γονιδίωμα του *Parhyale* (>3000 Mbp; N. Patel, προσωπική επικοινωνία) να αυξάνει την πιθανότητα χρωμοσωμικής ένθεσης του *Minos*.

3.2.5. Εφαρμογές της διαγονιδιακής τεχνολογίας στη γενετική ανάλυση του *Parhyale*

Οι συγκριτικές αναπτυξιακές μελέτες μεταξύ οργανισμών μοντέλων και μη περιορίζονται προς το παρόν στην απομόνωση ομόλογων γονιδίων και στη σύγκριση της αλληλουχίας και του προτύπου έκφρασής τους στα διαφορετικά είδη. Αναμφισβήτητα, η προσέγγιση αυτή συνέβαλε στην ανακάλυψη πολλών μοριακών διαφορών, που πιθανότατα βρίσκονται πίσω από την εξέλιξη των οργανισμών (ορισμένα παραδείγματα θα περιγραφούν εκτενώς στο 2^ο Μέρος). Οι οργανισμοί-μοντέλα όμως εξακολουθούν να είναι το μοναδικό πεδίο λειτουργικών συγκρίσεων και η αποκλειστική εστία χαρακτηρισμού της βιολογικής δράσης των γονιδίων. Εκ προοιμίου λοιπόν είναι δύσκολη η ανακάλυψη νέων γονιδίων ή νέων βιολογικών λειτουργιών σε άλλους οργανισμούς.

Η εξάπλωση της διαγονιδιακής τεχνολογίας σε μη μοντέλα-οργανισμούς έρχεται να εκπληρώσει την ανάγκη για λειτουργικές μελέτες σε αυτά τα είδη. Οι πρώτες εφαρμογές στον *Parhyale* περιλαμβάνουν τη χρήση διαγονιδίων για τον έλεγχο της ενεργότητας *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών και αναπτυξιακών παραγόντων (βλέπε 2^ο Μέρος). Η ενεργότητα ρυθμιστικών αλληλουχιών μπορεί να ανιχνευτεί με τη χρήση της *dsred1* ως γονιδίου αναφοράς, ενώ η βιολογική δράση των αναπτυξιακών παραγόντων μπορεί να μελετηθεί μέσα από τους φαινοτύπους της εκτοπικής έκφρασής τους ή και της καταστολής τους. Σε δεύτερη φάση, σχεδιάζονται πειραματικές διατάξεις μεγάλης κλίμακας για την παγίδευση γονιδίων και ενισχυτών. Ήδη στο εργαστήριο του συνεργάτη μας Nipam Patel επιχειρείται ο μετασχηματισμός του αμφιπόδου και με το στοιχείο *piggyBac*, ώστε να αναπτυχθούν οι απαραίτητες ζευγαρωτές διατάξεις (βλέπε Ενότητα 1.5).

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

**ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ *cis*-ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΤΗΣ
Drosophila ΣΤΟ *Tribolium* ΚΑΙ ΤΟΝ *Parhyale*,
ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ *cis*-ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ
ΓΟΝΙΔΙΩΝ *hsp70* ΣΤΟΝ *Parhyale***

4. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

4.1. Αναπτυξιακή εξελικτική βιολογία (Evo-Devo): ο 'γόνιμος' απόγονος δύο συγγενικών επιστημονικών κλάδων

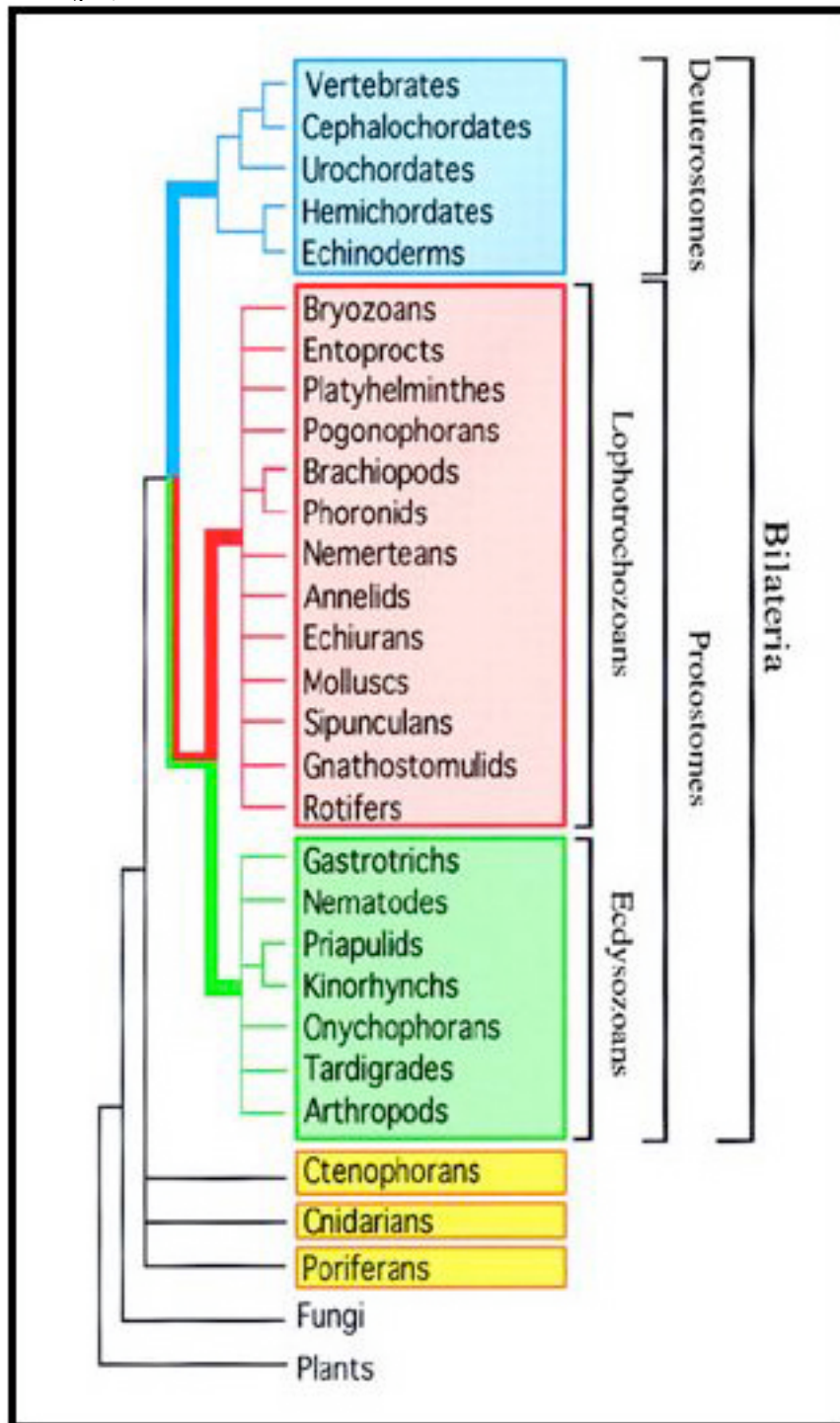
Κατά το μεγαλύτερο μέρος του 20ου αιώνα η εξελικτική βιολογία και η αναπτυξιακή βιολογία καθιερώθηκαν ως δύο ξεχωριστοί κλάδοι με διακριτές επιδιώξεις: η πρώτη να εξιστορήσει όσο το δυνατόν ακριβέστερα το παρελθόν της ζωής και να διελευκάνει τους μηχανισμούς που ευθύνονται για την εξέλιξη των οργανισμών, ενώ η δεύτερη να κατανοήσει τους κυτταρικούς και μοριακούς μηχανισμούς της προοδευτικής δόμησης ενός πολυκύτταρου οργανισμού από το γονιμοποιημένο ωάριο. Υπό μία ευρεία έννοια, και οι δύο κλάδοι ερευνούν τις μορφολογικές αλλαγές των οργανισμών μέσα στο χρόνο. Με τη διαφορά ότι η ανάπτυξη είναι μία προγραμματισμένη διαδικασία που επαναλαμβάνεται κυκλικά σε κάθε γενιά ενός είδους (οντογένεση), ενώ η εξέλιξη είναι περισσότερο συμπτωματική και συντελείται με το διαχωρισμό των ειδών από κοινούς προγόνους (φυλογένεση). Αφού όμως η μορφολογία των οργανισμών εξελίσσεται, το ίδιο πρέπει να ισχύει και για τους αναπτυξιακούς μηχανισμούς που ευθύνονται για τη μορφολογία.

Μέσα από αυτό το πρίσμα, η αναπτυξιακή βιολογία θεωρήθηκε ως ο συμπληρωματικός κρίκος της εξελικτικής θεωρίας (ARTHUR 2002; RAFF 2000). Η κινητήρια δύναμη της εξέλιξης είναι η γενετική ποικιλότητα των πληθυσμών, η οποία προκαλείται από τις μεταλλαγές και αποτελεί πεδίο δράσης της φυσικής επιλογής. Επειδή όμως η τελευταία δρα στο φαινοτυπικό επίπεδο, η αναπτυξιακή διάσταση είναι απαραίτητη, ώστε να ερμηνευθεί η επίδραση των μεταλλαγμένων γονιδίων στον καινούριο φαινότυπο. Σκοπός των αναπτυξιακών εξελικτικών μελετών (Evo-Devo) είναι να αποκαλυφθούν εκείνες οι μικροεξελικτικές αλλαγές στο DNA (μέσα στα άτομα ενός πληθυσμού), οι οποίες οδηγούν αρχικά στον αναπρογραμματισμό (developmental reprogramming) της οντογένεσης ορισμένων ατόμων, και ακολούθως, κάτω από τη δράση της φυσικής επιλογής και της αναπαραγωγικής απομόνωσης, σε μακροεξελικτικές αλλαγές (ειδογένεση/φυλογένεση).

Η ξεχωριστή μελέτη της ανάπτυξης ζωικών οργανισμών-μοντέλων (ποντίκι, *Drosophila*, *Caenorhabditis*) φανέρωσε την ύπαρξη κοινών συντηρημένων ρυθμιστικών γονιδίων και αναπτυξιακών μονοπατιών (CARROLL *et al.* 2001). Έγινε δηλαδή αντιληπτό, ότι είδη που χωρίζονται από μεγάλες εξελικτικές αποστάσεις και που επιδεικνύουν εκτεταμένες διαφορές στη σωματοδομή τους (body plan), χτίζονται βάση συντηρημένων αναπτυξιακών προγραμμάτων. Την τελευταία δεκαετία αναζητήθηκαν οι γενετικές διαφορές που ευθύνονται για την παρατηρούμενη ποικιλότητα στην ανάπτυξη και μορφολογία των ζωικών οργανισμών. Ως πιθανές εστίες αλλαγών εξετάστηκαν ο αριθμός και η αλληλουχία συντηρημένων αναπτυξιακών γονιδίων, ο τρόπος ρύθμισής τους (όπως αντανακλάται στο χωροχρονικό πρότυπο έκφρασής τους) και η αλληλεπίδραση τους με άλλα γονίδια που συμμετέχουν στα ρυθμιστικά αναπτυξιακά κυκλώματα. Οι αλλαγές αυτές είναι καλύτερα μελετημένες στην περίπτωση των γονιδίων με ομοιωτικό κουτί (homeobox genes), και ειδικότερα στην περίπτωση των γονιδίων *Hox* (HUGHES & KAUFMAN 2002b) που θα χρησιμοποιηθεί παρακάτω ως αναλυτικό παράδειγμα.

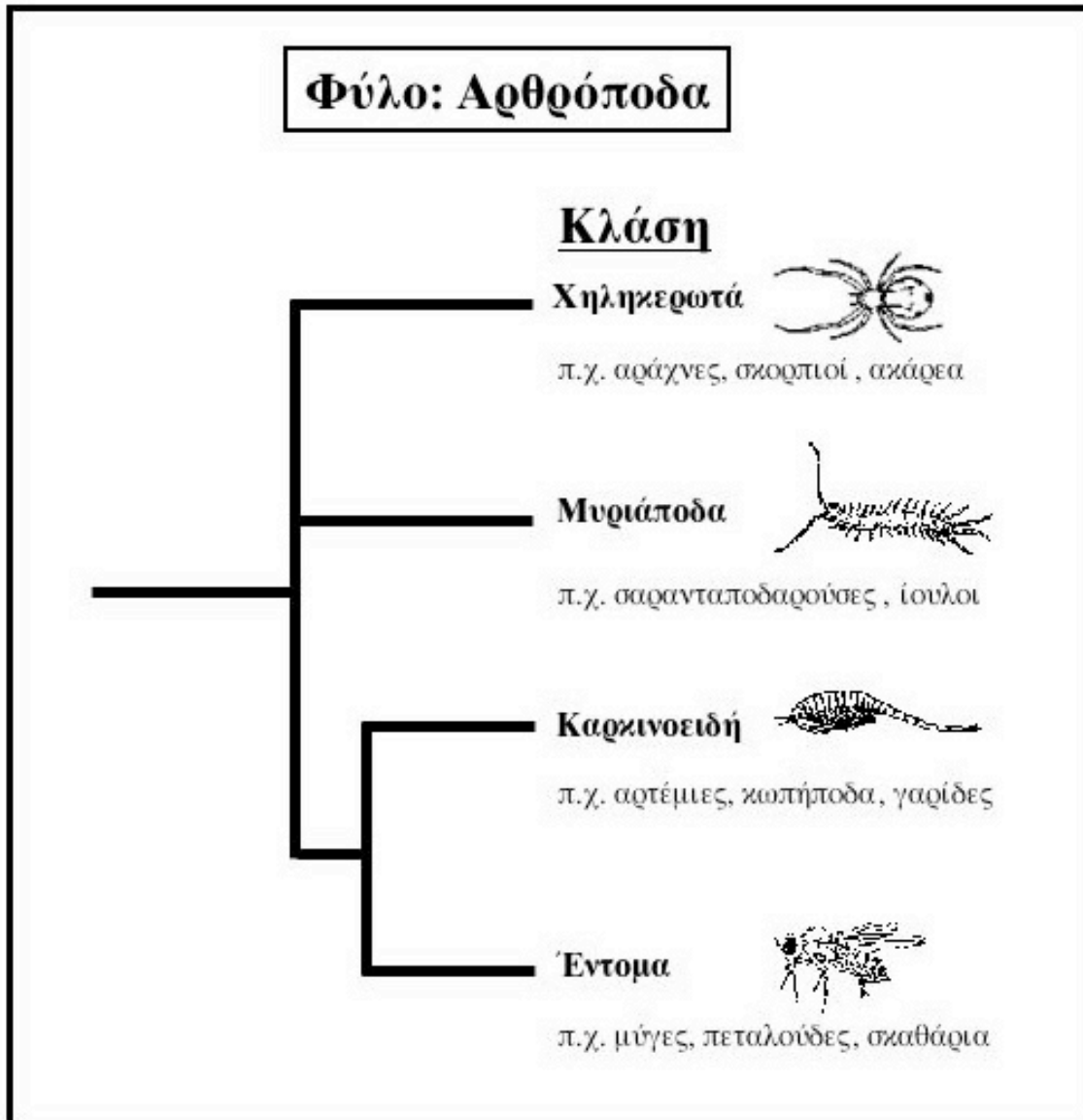
Η κατανόηση της προέλευσης και της εξέλιξης ενός μορφολογικού χαρακτήρα προϋποθέτει την καλή γνώση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των εξεταζόμενων ειδών. Οι συσσωρευμένες αλληλουχίες συντηρημένων γονιδίων (π.χ. 18S rRNA, γονίδια *Hox*) χρησιμοποιήθηκαν για την ακριβέστερη αναπαράσταση του φυλογενετικού δέντρου των μεταζώων, που προηγουμένως στηρίζονταν μόνο σε ανατομικές και εμβρυολογικές συγκρίσεις (AGUINALDO *et al.*

1997; DE ROSA *et al.* 1999). Στη βάση του δέντρου τοποθετούνται τα ποροφόρα, τα κνιδόζωα και τα κτενοφόρα. Τα δύο τελευταία φύλα αποτελούνται από διπλοβλαστικούς οργανισμούς με ακτινωτή συμμετρία. Τα υπόλοιπα 32 φύλα μεταζώων (Bilateria) είναι τριπλοβλαστικά, παρουσιάζουν αμφίπλευρη συμμετρία και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τα πρωτοστόμια και τα δευτεροστόμια (περιλαμβάνουν τα χορδωτά). Σύμφωνα με τις τελευταίες φυλογενετικές μελέτες (ADOUTTE *et al.* 2000), τα πρωτοστόμια διακρίνονται στα εκδυσόζωα (καλύπτονται από εξωσκελετό και αυξάνονται με εκδύσεις) και τα λοφοτροχοζώα (χωρίς εξωσκελετό, πολλά μοιράζονται ένα κοινό προνομφικό στάδιο, την τροχοφόρο λάρβα).



Εικόνα 24: Φυλογενετικό δέντρο των μεταζώων (ADOUTTE *et al.* 2000).

Τα αρθρόποδα ανήκουν στα εκδυσόζωα και μεταξύ των κοντινότερων συγγενών τους συγκαταλέγονται τα ονυχοφόρα. Σύμφωνα με τα διαθέσιμα απολιθώματα, προγονικές μορφές, αντιπροσωπευτικές της πλειοψηφίας των σημερινών φύλων είχαν ήδη εξελιχθεί πριν 490-545 Myr (Κάμβριο) (VALENTINE *et al.* 1999). Εκτιμήσεις που προκύπτουν από τη συσχέτιση του παλαιοντολογικού χρόνου με το ρυθμό εξέλιξης μοριακών αλληλουχιών (μοριακά ρολόγια) τοποθετούν την απόκλιση (divergence) των ζωικών φύλων ακόμη παλαιότερα, πριν 650-1000 Myr (AYALA & RZHETSKY 1998).



Εικόνα 25: Το ζωικό φύλο των αρθροπόδων.

Το γενετικό και αναπτυξιακό υπόβαθρο της μορφολογικής ποικιλότητας γίνεται ευκολότερα κατανοητό εστιάζοντας σε συγκεκριμένα φύλα, που παρουσιάζουν παραλλαγές (ακόμη και σημαντικές) ενός βασικού προτύπου σωματοδομής. Οι εκτεταμένες γνώσεις μας γύρω από την ανάπτυξη της *Drosophila*, η τεράστια ποικιλία μορφολογικών χαρακτήρων που επιδεικνύουν τα αρθρόποδα και η λεπτομερής κατανόηση των φυλογενετικών σχέσεών τους, κατέστησαν εξασχίς αυτό το φύλο ως πρόσφορο πεδίο μελετών Evo-Devo (AKAM 2000) (Εικόνα 25). Ανάλογα με τον εξελισσόμενο χαρακτήρα που ελέγχεται, οι

συγκρίσεις πραγματοποιούνται μεταξύ πληθυσμών του ίδιου είδους, μεταξύ ειδών του ίδιου γένους, μεταξύ οικογενειών εντόμων ή και μεταξύ διαφορετικών τάξεων αρθροπόδων (CARROLL 2000).

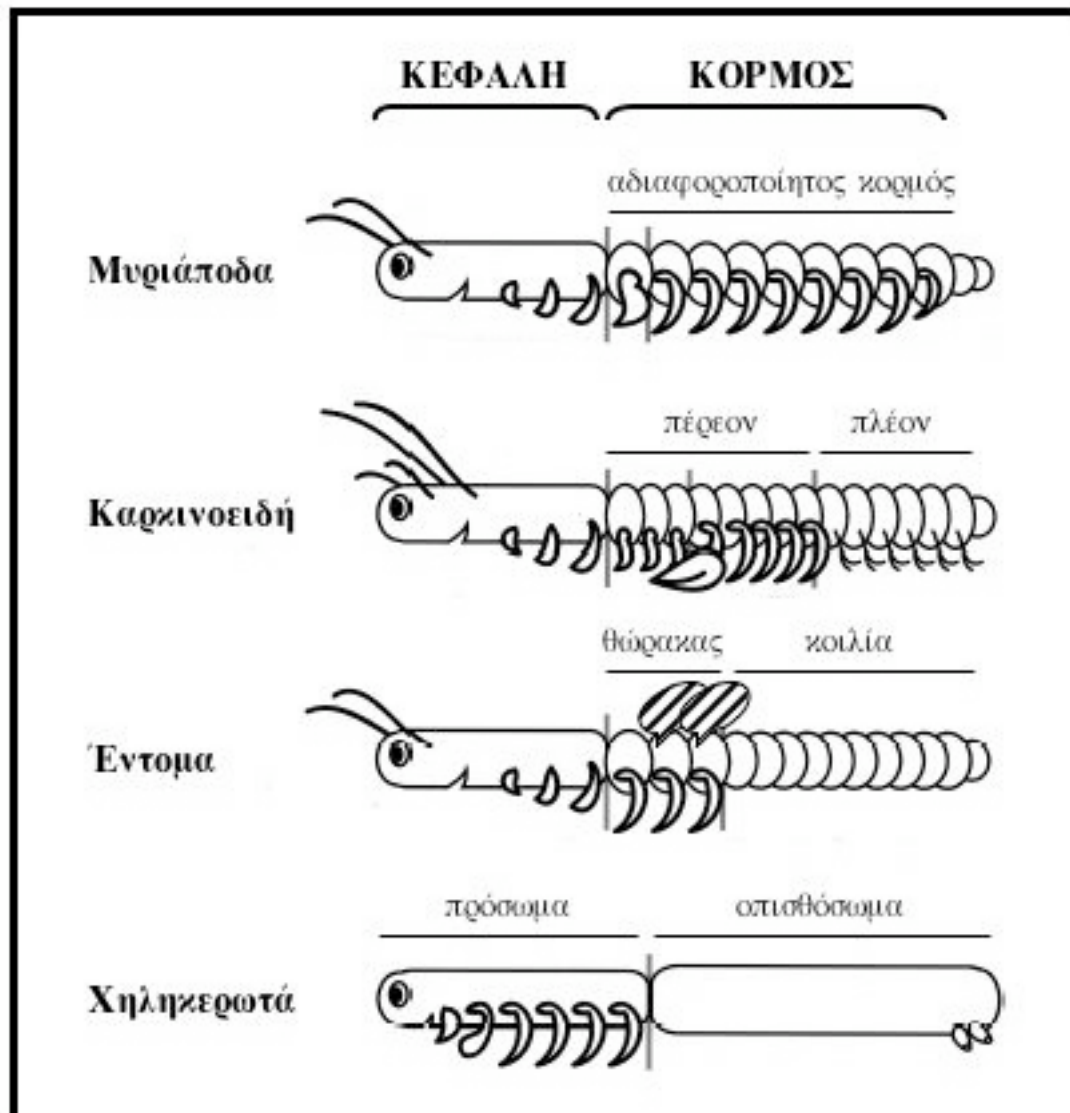
Επειδή οι κλασικές γενετικές μέθοδοι είναι αποκλειστικό προνόμιο των οργανισμών-μοντέλων, στους περιφερειακούς της *Drosophila* οργανισμούς αναπτύσσονται εναλλακτικές προσεγγίσεις για γονιδιακή ανάλυση, όπως η διαγονιδιακή τεχνολογία που περιγράφηκε στο πρώτο μέρος της διατριβής. Το δεύτερο μέρος της διατριβής πραγματεύεται την πρώτη εφαρμογή της παραπάνω τεχνολογίας για τη συγκριτική μελέτη της ενεργότητας *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών της *Drosophila* στο *Tribolium* και τον *Parhyale*. Επιπλέον, περιγράφεται η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός *cis*-ρυθμιστικών περιοχών από θερμοεπαγόμενα γονίδια του *Parhyale*, οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν στο άμεσο μέλλον για τη συγκριτική μελέτη της δράσης *trans*-δραστικών αναπτυξιακών παραγόντων μέσω της εκτοπικής έκφρασής τους στο αμφίποδο.

4.2. Η σωματοδομή των αρθροπόδων

Τα σώματα των αρθροπόδων, όπως και όλων των οργανισμών με αμφίπλευρη συμμετρία, δομούνται από επαναλαμβανόμενες μονάδες (modules) κατά μήκος του προσθιοπίσθιου (anterior-posterior) άξονα, τα μεταμερή (segments) (BRUSCA & BRUSCA 1990; CARROLL *et al.* 2001). Τα πρόσθια μεταμερή, στα οποία είναι συγκεντρωμένα το στόμα με τα μασητικά εξαρτήματα, αρκετά αισθητήρια όργανα και η κύρια μάζα του νευρικού ιστού, συντήκονται και σχηματίζουν την κεφαλή. Τα υπόλοιπα μεταμερή του κορμού (trunk) του σώματος μπορεί να είναι πανομοιότυπα (ομόνομη μεταμέρεια) ή να διαφοροποιούνται μεταξύ τους (ετερόνομη μεταμέρεια) (Εικόνα 26). Τα οπίσθια μεταμερή του σώματος, όπου εδράζει το πεπτικό σύστημα, είναι συχνά υποπλασμένα ή και συντηγμένα, και καταλήγουν σε αρκετές ομάδες σε μία τελική μη μεταμερική δομή, το τέλος. Η διαφοροποίηση του κορμού αφορά την οργάνωση και τη μορφολογία των μεταμερών, καθώς και των εξαρτημάτων (appendages) που εκφύονται από αυτά. Τονίζεται, ότι η ποικιλομορφία έχει εξελιχθεί τόσο μεταξύ των μεταμερών και εξαρτημάτων που συγκροτούν το σώμα του ίδιου ατόμου (serially homologous body parts), όσο και μεταξύ ομόλογων δομών (homologous structures) διαφορετικών ειδών.

Η ομόνομη μεταμέρεια που επιδεικνύουν τα μυριάποδα (Εικόνα 26), τα ρεμπεδία (ομάδα καρκινοειδών) και τα ονυχοφόρα (οι πλησιέστεροι ζωνάτανοι συγγενείς των αρθροπόδων) θεωρείται βάση των απολιθωμάτων η προγονική (ancestral) κατάσταση της σωματοδομής (AVEROF & AKAM 1993; BRUSCA & BRUSCA 1990). Οι υπόλοιπες ομάδες αρθροπόδων αποκλίνουν, σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό, από το αδιαφοροποίητο αυτό πρότυπο (Εικόνα 26). Τα έντομα επιδεικνύουν μια στερεότυπη δομή αποτελούμενη από τρεις διακριτές περιοχές (τάγματα), την κεφαλή, το θώρακα (thorax) και την κοιλία (abdomen). Ο θώρακας συγκροτείται από τρία μεταμερή (προ-, μεσο-, μεταθωρακικό), καθένα εκ των οποίων φέρει κοιλιακά (ventrally) ένα ζεύγος βαδιστικών ποδιών, ενώ από τα δύο τελευταία μεταμερή εκφύονται ραχιαία (dorsally) από ένα ζεύγος φτερών. Η κοιλία των ενήλικων ατόμων περιλαμβάνει ποικίλο αριθμό μεταμερών (8-11) που δε φέρουν εξαρτήματα. Τα καρκινοειδή παρουσιάζουν εξαιρετική ποικιλομορφία σωματοδομών, που αποτυπώνεται στον αριθμό των μεταμερών, τη διάκριση των ταγμάτων, το σχήμα και τη λειτουργία των εξαρτημάτων. Οι πιο 'πρωτόγονες' ομάδες (βραγχιόποδα; π.χ. *Artemia*) αποτελούνται από έναν ομόνομο κορμό με φυλλοειδή πολυσχιδή εξαρτήματα (phyllorodia), που τον διαδέχονται η γεννητική και η μεταγεννητική (postgenital) περιοχή. Στα μαλακόστρακα καρκινοειδή (π.χ. *Parhyale*), ο κορμός υποδιαιρείται σε δύο διακριτά τμήματα, το πέρειον ('θώρακας'

καρκινοειδών) και το πλέον ('κοιλία'), που φέρουν διαφορετικούς τύπους εξαρτημάτων. Τέλος, το σώμα των χηληκερωτών υποδιαιρείται σε δύο μέρη, το πρόσωμα, με έξι ζεύγη μασητικών και κινητικών εξαρτημάτων, και το οπισθόσωμα.



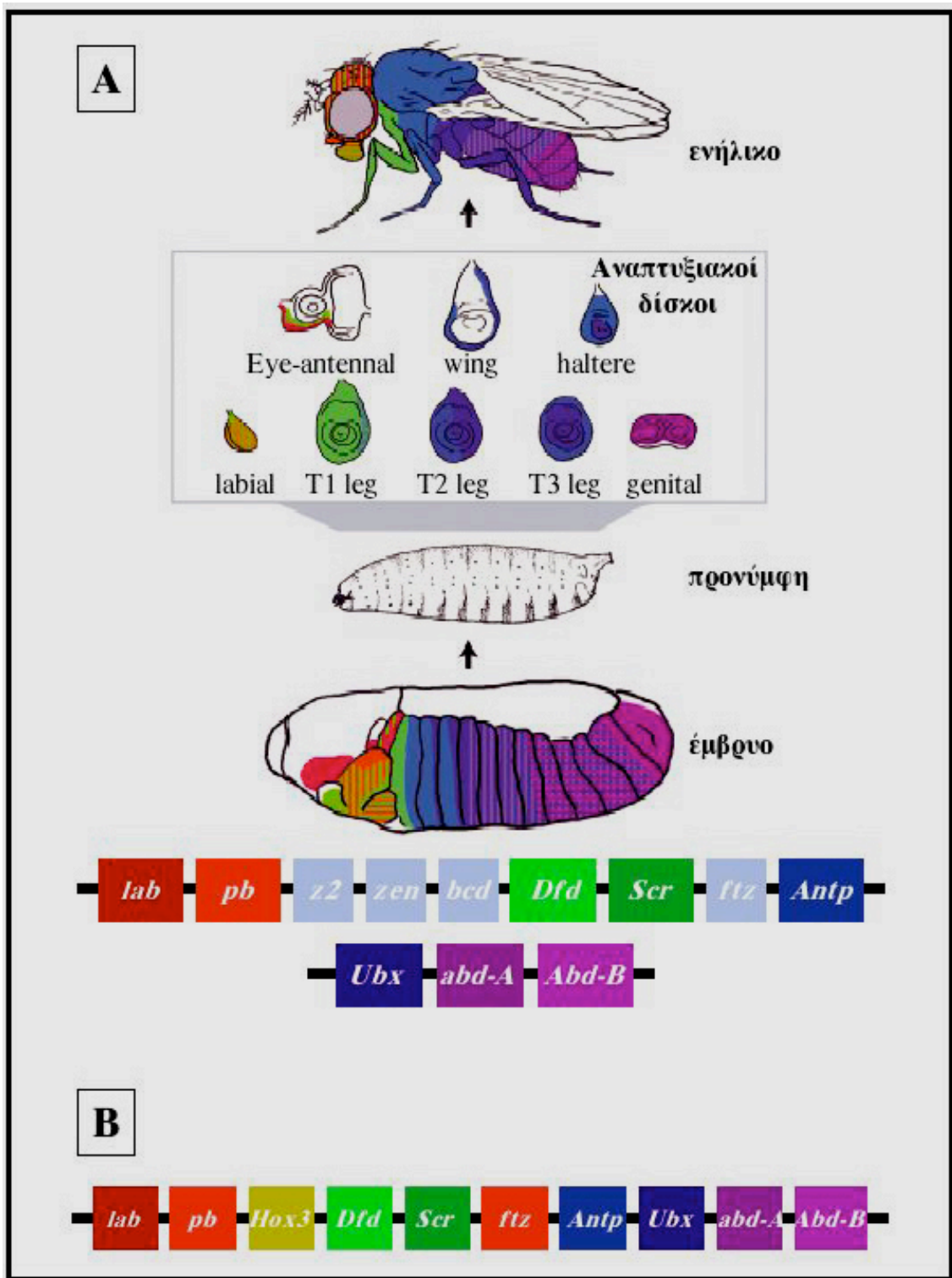
Εικόνα 26: Οι σωματοδομές των αρθροπόδων και τα μεταμερή τους (HUGHES & KAUFMAN 2002b). Κάθε τάξη των αρθροπόδων παρουσιάζει μία χαρακτηριστική κατασκευή σώματος. Τα **μυριάποδα** δομούνται από την κεφαλή και ένα μεταβλητό αριθμό πανομοιότυπων μεταμερών του κορμού (ομόνομη μεταμέρεια). Σε ορισμένα είδη (π.χ. σαρανταποδαρούσες) από το πρώτο μεταμερές του κορμού εκφύεται ένα ζεύγος δηλητηριωδών αγκίστρων. Τα **καρκινοειδή** επιδεικνύουν μια τεράστια ποικιλία μορφών. Ορισμένοι κλάδοι (π.χ. ρεμπιέδια, βραγχιόποδα) δομούνται από την κεφαλή και έναν αδιαφοροποίητο κορμό. Στη μεγάλη όμως πλειοψηφία των τάξεων των καρκινοειδών ο κορμός υποδιαιρείται σε μορφολογικά και λειτουργικά διακριτά τμήματα, όπως για παράδειγμα στα μαλακόστρακων (στην εικόνα), στο πέρεον και το πλέον (ετερόνομη μεταμέρεια). Ακόμη και μέσα στο ίδιο τάγμα, πολύ συχνά παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των μεταμερών και των εξαρτημάτων που εκφύονται από αυτά. Για παράδειγμα, σε αρκετά είδη τα εξαρτήματα του πρόσθιου κορμού είναι τροποποιημένα σε σχέση με τα πιο πίσω και ονομάζονται γναθοπόδια. Τα **έντομα** είναι σε γενικές γραμμές ομοιογενή ως προς την κατασκευή τους. Χαρακτηρίζονται από μία στερεότυπη σωματοδομή, αποτελούμενη από την κεφαλή, το θώρακα και την κοιλία. Από τα μεταμερή του θώρακα εκφύονται τρία ζεύγη ποδιών και δύο ζεύγη φτερών, ενώ η κοιλία δε φέρει εξαρτήματα. Το σώμα των **χηληκερωτών** έχει μία πολύ ιδιαίτερη δομή και σε αντίθεση με τις υπόλοιπες κλάσεις των αρθροπόδων δεν έχουν ούτε διακριτή κεφαλή, αλλά ούτε και κεραίες. Το σώμα τους υποδιαιρείται στο πρόσωμα, που φέρει έξι ζεύγη εξαρτημάτων, και το οπισθόσωμα.

4.3. Οι αρχιτέκτονες της σωματοδομής: τα γονίδια *Hox*

Η ποικιλομορφία των μεταμερών και των εξαρτημάτων των αρθροπόδων συνδέεται άρρηκτα με το πρότυπο έκφρασης των ομοιωτικών γονιδίων (*Hox*). Τα γονίδια *Hox* ανακαλύφθηκαν στη *Drosophila* βάση των ομοιωτικών μετασχηματισμών (homeotic transformations) που προκαλούν οι μεταλλαγές τους (KAUFMAN *et al.* 1980; LEWIS 1978). Μεταλλαγή ενός μόνο γονιδίου είναι ικανή να αλλάξει το αναπτυξιακό πρόγραμμα των μεταμερών που επηρεάζονται από αυτό, τα οποία αποκτούν την ταυτότητα κάποιου άλλου μεταμερούς του σώματος (MCGINNIS 1994). Τα γονίδια *Hox* έχουν κομβική θέση στη γενετική ιεραρχία της εμβρυογένεσης και καθορίζουν την ταυτότητα των μεταμερών κατά μήκος του προσθιοπίσθιου άξονα. Η ιεραρχία αυτή είναι υπεύθυνη για την προοδευτική διαμερισματοποίηση του εμβρύου στις δομικές μονάδες του και εκτελείται κατά σειρά από τα γονίδια μητρικής δράσης (maternal effect), χάσματος (gap), κανόνα ζεύγους (pair-rule), και τέλος, πολικότητας μεταμερούς (segment polarity) και ομοιωτικά (GILBERT 2001).

Στο γονιδίωμα της *Drosophila* υπάρχουν οχτώ ομοιωτικά γονίδια, τα *labial (lab)*, *proboscipedia (pb)*, *Deformed (Dfd)*, *Sex combs reduced (Scr)*, *Antennapedia (Antp)*, *Ultrabithorax (Ubx)*, *abdominal-A (abd-A)* και *Abdominal-B (Abd-B)*, που διατάσσονται σε δύο γονιδιακά σύμπλοκα (complexes) (Εικόνα 27Α). Τα πέντε πρώτα ανήκουν στο σύμπλοκο Antennapedia (ANT-C) (GARBER *et al.* 1983; SCOTT *et al.* 1983) και τα υπόλοιπα τρία στο σύμπλοκο Bithorax (BX-C) (BENDER *et al.* 1983; KARCH *et al.* 1985). Όλα τα γονίδια *Hox* χαρακτηρίζονται από μία αλληλουχία μεγέθους 180 bp, το ομοιωτικό κουτί (homeobox), που κωδικοποιεί μία πρωτεϊνική δομή τύπου helix-turn-helix (ομοιωδομή; homeodomain) υπεύθυνη για την πρόσδεση στο DNA (BILLETER *et al.* 1993; MCGINNIS *et al.* 1984). Η ομοιότητα των αλληλουχιών τους κοντά και μέσα στο ομοιωτικό κουτί και η στενή χρωμοσωμική τους σύνδεση υποδεικνύουν την κοινή καταγωγή των γονιδίων *Hox* μέσω επαναλαμβανόμενων σειριακών διπλασιασμών (tandem duplication) ενός προγονικού γονιδίου και επακόλουθη δομική, λειτουργική και ρυθμιστική απόκλιση (divergence) των θυγατρικών αντιγράφων (AVEROF *et al.* 1996; LEWIS 1978). Σύμπλοκα γονιδίων *Hox* με εξίσου συντηρημένο αναπτυξιακό ρόλο στον καθορισμό περιοχών του σώματος έχουν ανακαλυφθεί σε όλους τους αμφιπλευροσυμμετρικούς οργανισμούς (CARROLL *et al.* 2001; MCGINNIS & KRUMLAUF 1992). Συνεπώς, η ανάλυση της εξελικτικής ιστορίας τους (όπως βέβαια και πολλών άλλων αναπτυξιακών γονιδίων) είναι κομβικής σημασίας για την κατανόηση της εξέλιξης των σωματοδομών.

Πολλά από τα μέλη κάθε συμπλόκου (παράλογα γονίδια) επιδεικνύουν μεγαλύτερη ομολογία με μέλη άλλων συμπλόκων (με τα λεγόμενα ορθόλογά τους γονίδια), παρά μεταξύ τους (AVEROF *et al.* 1996). Από τα γονίδια που συνθέτουν κάθε σύμπλοκο *Hox*, ορισμένα προέκλυαν από διπλασιασμούς σε πολύ αρχέγονους προγόνους και συντηρήθηκαν στα περισσότερα ζωικά φύλα, ενώ άλλα δημιουργήθηκαν αργότερα και συναντώνται σε επιμέρους φύλα (AVEROF *et al.* 1996; CARROLL *et al.* 2001). Επιπλέον, σε αρκετές εξελικτικές γραμμές παρατηρούνται επιλεκτικές διαφοροποιήσεις ή και απώλειες μεμονομένων γονιδίων. Τα πρώτα πέντε γονίδια *Hox (lab/Hox1, pb/Hox2, Hox3, Dfd/Hox4, Scr/Hox5)* καθορίζουν την ταυτότητα των κεφαλικών μεταμερών και του πρόσθιου κορμού και είναι ιδιαίτερα συντηρημένα μέσα στα Bilateria. Τα γονίδια του κορμού (*Antp, Ubx, abd-A* και *Hox6* έως 8) και του οπίσθιου άκρου (*Abd-B* και *Hox9* έως 13) έχουν αποκλίσει περισσότερο και δεν υπάρχει ενκρινής στοίχιση συγκεκριμένων γονιδίων ανάμεσα στα πρωτοστόμια και τα δευτεροστόμια. Μέσα στα πρωτοστόμια διακρίνονται κεντρικά και οπίσθια γονίδια χαρακτηριστικά κάθε κλάδου, τα *Ubx, abd-A* και *Abd-B* στα εκδυσόζωα και τα *Lox5, Lox2, Lox4* και *Post1, Post2* στα λοφοτροχόζωα (DE ROSA *et al.* 1999). Στις περισσότερες



Εικόνα 27: Οργάνωση και έκφραση των γονιδίων *Hox* (HUGHES & KAUFMAN 2002b). **(A)** Τα γονίδια *Hox* οργανώνονται όλα μαζί σε ένα σύμπλοκο και εκφράζονται κατά μήκος του προσθιοπίσθιου άξονα με την ίδια σειρά με την οποία βρίσκονται στο χρωμόσωμα. Ειδικά στη *Drosophila melanogaster* τα γονίδια *Hox* έχουν χωριστεί σε δύο γειτονικά σύμπλοκα, το Antennapedia (ANT-C; *lab* μέχρι *Antp*) και το Bithorax (BX-C; *Ubx* μέχρι *Abd-B*). Με το χρωματικό κώδικα υποδεικνύεται η περιοχή έκφρασης κάθε γονιδίου στο έμβρυο και τους αναπτυξιακούς δίσκους, καθώς και οι δομές του ενήλικου που ελέγχονται από αυτό. Τα γονίδια *zen*, *z2*, *bcd* (τύπου *Hox3*) και *ftz* έχασαν στον κλάδο των εντόμων την ομοιοτική δράση τους. **(B)** Το πιθανό σύμπλοκο γονιδίων *Hox* του τελευταίου κοινού προγόνου όλων των αρθροπόδων. Συμπεραίνεται από τη σύγκριση της αλληλουχίας και του προτύπου έκφρασης των γονιδίων *Hox* μεταξύ αντιπροσώπων των τεσσάρων κλάσεων των αρθροπόδων.

περιπτώσεις που έχουν μελετηθεί, η διαδοχή των παράλογων γονιδίων *Hox* πάνω στο χρωμόσωμα δεν είναι τυχαία, καθώς συγγραμμίζεται με τη σειρά έκφρασής τους κατά μήκος του σώματος (colinearity) (KAUFMAN *et al.* 1990; SANCHEZ-HERRERO *et al.* 1985) (Εικόνα 27Α). Τα ορθόλογα γονίδια βρίσκονται σε αντίστοιχες θέσεις των συμπλόκων και ελέγχουν συνήθως αντίστοιχες περιοχές του σώματος.

Από τη σύγκριση των γονιδίων *Hox* που μοιράζονται οι απόγονοι κάθε εξελικτικής γραμμής μπορούμε να υποθέσουμε τον αριθμό και τον τύπο των γονιδίων που είχε ο κοινός τους πρόγονος. Η διαστολή (σε αριθμό γονιδίων) του συμπλόκου *Hox* και η διαφοροποίηση των μελών του πραγματοποιήθηκε πριν την απόκλιση των βασικών κλάδων των Bilateria (εκδυσόζωα, λοφοτροχοζώα, δευτεροστόμια). Ο κοινός πρόγονος των Bilateria (Urbilaterian ancestor) είχε τουλάχιστον επτά γονίδια *Hox* (*Hox1* έως 5, ένα κεντρικό και ένα οπίσθιο), των εκδυσοζών τουλάχιστον οχτώ (*Hox1* έως 5, *Ubx*, *abd-A* και *Abd-B*), των λοφοτροχοζών τουλάχιστον δέκα (*Hox1* έως 5, *Lox5*, *Lox2*, *Lox4*, *Post1* και 2) και των δευτεροστόμιων 13 (*Hox1* έως 13 λόγω εκλεκτικού πολλαπλασιασμού των οπίσθιων γονιδίων) (DE ROSA *et al.* 1999). Μέσα στα δευτεροστόμια, η εξέλιξη των σπονδυλωτών συνοδεύτηκε από δύο ή περισσότερους διπλασιασμούς ολόκληρου του συμπλόκου.

Ολοκληρώνοντας την περιήγηση στην οικογένεια των γονιδίων *Hox* αξίζει τον κόπο η αναφορά σε γονίδια που μοιράζονται με τα 'κανονικά' μέλη κοινή καταγωγή, αλλά έχουν αποκτήσει εντελώς διαφορετικούς ρόλους κατά την ανάπτυξη. Τα γονίδια αυτά, ανάλογα με το είδος, απαντώνται μέσα στο σύμπλοκο *Hox*, δίπλα σε αυτό ή και διάσπαρτα στο γονιδίωμα. Στη *Drosophila* ανάμεσα στα *pb* και *Dfd* παρεμβάλλονται τα γονίδια *zerknult* (*zen*), *zen2* και *bicoid* (*bcd*), ενώ ανάμεσα στα *Scr* και *Antp* το γονίδιο *fushi tarazu* (*ftz*) (Εικόνα 27Α). Τα γονίδια *zen1* και 2 θεωρούνται ορθόλογα του *Hox3*, έχουν όμως χάσει τον ομοιωτικό ρόλο τους και εκφράζονται στις εξτρα-εμβρυϊκές μεμβράνες (HUGHES & KAUFMAN 2002b). Το *ftz* δρα νωρίς στην εμβρυογένεση στο σχηματισμό των μεταμερών, ενώ αργότερα ελέγχει τη διαφοροποίηση κυττάρων του κεντρικού νευρικού συστήματος (ευρύτερα συντηρημένη λειτουργία) (ALONSO *et al.* 2001; LOHR *et al.* 2001). Ο λιγότερο συντηρημένος ρόλος είναι του *bcd*, που η μητρικής προέλευσης δράση του περιορίζεται μέσα στα δίπτερα. Προέρχεται επίσης από το γονίδιο *Hox3* και φαίνεται ότι στα δίπτερα αντικαθιστά εν μέρει τη λειτουργία ενός άλλου γονιδίου, του *orthodenticle* (*otd*) (SCHRODER 2003). Άλλα αξιοσημείωτα γονίδια είναι το *even-skipped* (*eve*) και το *empty spiracles* (*ems*), που στη *Drosophila* βρίσκονται διάσπαρτα, ενώ στα σπονδυλωτά γειτονεύουν με το σύμπλοκο *Hox* (CARROLL *et al.* 2001), καθώς και τα *Gsx*, *Xlox*, *Cdx/caudal*, που στον αμφίοξο (κεφαλοχορδωτό) οργανώνονται σε ένα σύμπλοκο ('ParaHox') και εκφράζονται συγγραμμικά στο αναπτυσσόμενο έντερο (BROOKE *et al.* 1998).

4.4. Ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων *Hox*

Το πεδίο δράσης κάθε γονιδίου *Hox* περιορίζεται σε συγκεκριμένο αριθμό μεταμερών και επικαλύπτεται σε ποικίλο βαθμό με τα άλλα γονίδια *Hox* (Εικόνα 27Α). Στη *Drosophila*, το πρότυπο αυτό δεν εντοπίζεται μόνο στο αναπτυσσόμενο έμβρυο, που καταλήγει στο σχηματισμό της προνύμφης, αλλά και στους προνυμφικούς αναπτυξιακούς ιστούς (imaginal tissues). Οι αναπτυξιακοί ιστοί είναι κυτταρικά αθροίσματα, τα οποία 'φιλοξενούνται' στο εσωτερικό της προνύμφης χωρίς να συνεισφέρουν στη δομή της, και τα οποία πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται κατά τη διάρκεια των προνυμφικών και των νυμφικών σταδίων, ώστε να συγκροτήσουν την ενήλικη δομή.

Το πολυσύνθετο χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης κάθε γονιδίου *Hox* επιτυγχάνεται χάρη στον πολύπλοκο έλεγχο του από εκτεταμένες *cis*-ρυθμιστικές

αλληλουχίες και *trans*-δραστικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, από τα 300 kb που καταλαμβάνει το BX-C, μόλις τα 5 kb αντιστοιχούν στις κωδικές περιοχές των τριών γονιδίων (DUNCAN & MONTGOMERY 2002). Η κωδική περιοχή περιβάλλεται από πολυάριθμους ενισχυτές ή αποσιωπητές (*enhancers/silencers*), όπου καθένας ρυθμίζει αυτόνομα την έκφραση του γονιδίου σε διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς, των οποίων η θέση (δηλαδή σε ποιο μεταμερές), εξαρτάται από τη σχετική θέση του ενισχυτή/αποσιωπητή στις ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου (BROWN *et al.* 2003). Η αλληλεπίδραση γειτονικών ρυθμιστικών περιοχών παρεμποδίζεται από μονωτικές αλληλουχίες (*insulators; boundary elements*) που παρεμβάλλονται μεταξύ τους (MIHALY *et al.* 1997; ΖΗΟΥ *et al.* 1996). Την πολυπλοκότητα της ρύθμισης ενδέχεται να επιτείνουν και τα μη κωδικά RNA που μεταγράφονται από το BX-C, με άγνωστη προς το παρόν βιολογική λειτουργία.

Η ενεργοποίηση των ομοιωτικών γονιδίων στη *Drosophila* πραγματοποιείται κατά τη μετάβαση από το συγκυτιακό στο κυτταρικό βλαστόδερμα. Σε αυτό το στάδιο, το έμβryo χαρακτηρίζεται από την ασύμμετρη κατανομή σε επικλινή (*gradients*) και λωρίδες (*stripes*) δεκάδων προϊόντων των γονιδίων που βρίσκονται υψηλότερα στην ιεραρχία, εκθέτοντας τους πυρήνες κατά μήκος του προσθιοπίσθιου άξονα σε διαφορετικούς συνδυασμούς μεταγραφικών παραγόντων. Οι αρχικές λωρίδες έκφρασης των γονιδίων *Hox* ελέγχονται από τις πρωτεΐνες χάσματος και κανόνα-ζεύγους, ενώ στη συνέχεια τελειοποιούνται με τη δράση των πρωτεϊνών πολικότητας μεταμερούς και των ίδιων των ομοιωτικών πρωτεϊνών (GELLON & MCGINNIS 1998; QIAN *et al.* 1993). Ειδικότερα, ορισμένα γονίδια *Hox* αυτο-ενεργοποιούνται από τα προϊόντα τους, ενώ άλλα ρυθμίζονται θετικά ή αρνητικά από άλλες πρωτεΐνες *Hox*. Η διατήρηση του προτύπου έκφρασης των ομοιωτικών γονιδίων είναι κομβικής σημασίας, ώστε τα κύτταρα να 'θυμούνται' τη θέση τους στον προσθιοπίσθιο άξονα (άρα και την ταυτότητά τους) καθώς συνεχίζεται η ανάπτυξη. Με το καθήκον αυτό είναι επιφορτισμένα τα μέλη δύο διαφορετικών ομάδων πρωτεϊνών, γνωστά ως Polycomb (Pc) και trithorax (trx). Τα πρώτα καταστέλλουν τη μεταγραφή των γονιδίων *Hox* έξω από τα φυσιολογικά όρια της έκφρασής τους, ενώ τα δεύτερα έχουν ανταγωνιστική δράση και διατηρούν ενεργή τη μεταγραφή τους (SIMON & TAMKUN 2002). Τα μέλη και των δύο ομάδων προσδένονται σε ρυθμιστικά στοιχεία των γονιδίων *Hox* ως σύμπλοκα με πρωτεΐνες της ίδιας ομάδας ή με άλλα λειτουργικά σύμπλοκα του κυττάρου, τα οποία καθορίζουν μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων το μεταγραφικό δυναμικό της χρωματίνης (MULLER *et al.* 2002; PETRUK *et al.* 2001). Τέλος, με την πρόοδο της ανάπτυξης παρατηρούνται δυναμικές αλλαγές στα επίπεδα και τις περιοχές έκφρασης των ομοιωτικών γονιδίων.

Όλα τα έντομα που έχουν μελετηθεί μοιράζονται το ίδιο σετ των οχτώ γονιδίων *Hox* της *Drosophila* και επιδεικνύουν σε γενικές γραμμές παραπλήσια πρότυπα έκφρασης για τα γονίδια αυτά (HUGHES & KAUFMAN 2002b). Η συνάφεια αυτή αντανακλάται και στην ομοιομορφία των σωματοδομών τους. Η έκπληξη προήλθε από την ανακάλυψη ότι και όλα τα υπόλοιπα αρθρόποδα, καθώς και η παραομάδα των ονυχοφόρων, έχουν ακριβώς τα ίδια γονίδια *Hox* με τα έντομα (AVEROF & AKAM 1993; GRENIER *et al.* 1997) (Εικόνα 27B). Η πολυπλοκότητα της σωματοδομής στις διαφορετικές τάξεις των αρθροπόδων δε συμβαδίζει με τον αριθμό των ομοιωτικών γονιδίων που κατέχουν, αλλά με το βαθμό διαφοροποίησης της ρύθμισης και της λειτουργίας των παράλογων μελών του συμπλόκου και την εξέλιξη νέων ρυθμιστικών σχέσεων με γονίδια-στόχους τους. Τα επόμενα κεφάλαια πραγματεύονται την εξέλιξη της ταυτότητας των μεταμερών και των συναφών εξαρτημάτων του κορμού, εστιάζοντας στα κεντρικά γονίδια *Antennapedia* (*Antp*), *Ultrabithorax* (*Ubx*) και *abdominal-A* (*abd-A*).

4.5. Μορφολογική διαφοροποίηση του κορμού των αρθροπόδων από αλλαγές στη ρύθμιση των γονιδίων *Hox*

Οι ρυθμιστικές περιοχές *Hox* έχουν σπονδυλωτή (modular) δομή, όπου κάθε υπομονάδα (module; π.χ. ενισχυτής) ελέγχει μία εξειδικευμένη περιοχή δράσης του γονιδίου. Κάθε ενισχυτής μπορεί να εξελιχθεί αυτόνομα με την απόκτηση ή απώλεια θέσεων πρόσδεσης για μεταγραφικούς παράγοντες, χωρίς να επηρεάζεται η λειτουργία των υπόλοιπων υπομονάδων. Αρκετές από τις μορφολογικές διαφορές που παρατηρούνται μέσα στον κλάδο των αρθροπόδων συμβαδίζουν με αλλαγές στο χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *Hox*, δηλαδή είναι προϊόν διαφοροποίησης των ρυθμιστικών τους αλληλουχιών. Ανάλογα με την εξελικτική απόσταση των εξεταζόμενων ειδών, οι αλλαγές αυτές εκτείνονται σε ευρείες περιοχές του κορμού, σε μικρό αριθμό μεταμερών ή και σε κυτταρικά αθροίσματα μέσα σε ένα μεταμερές.

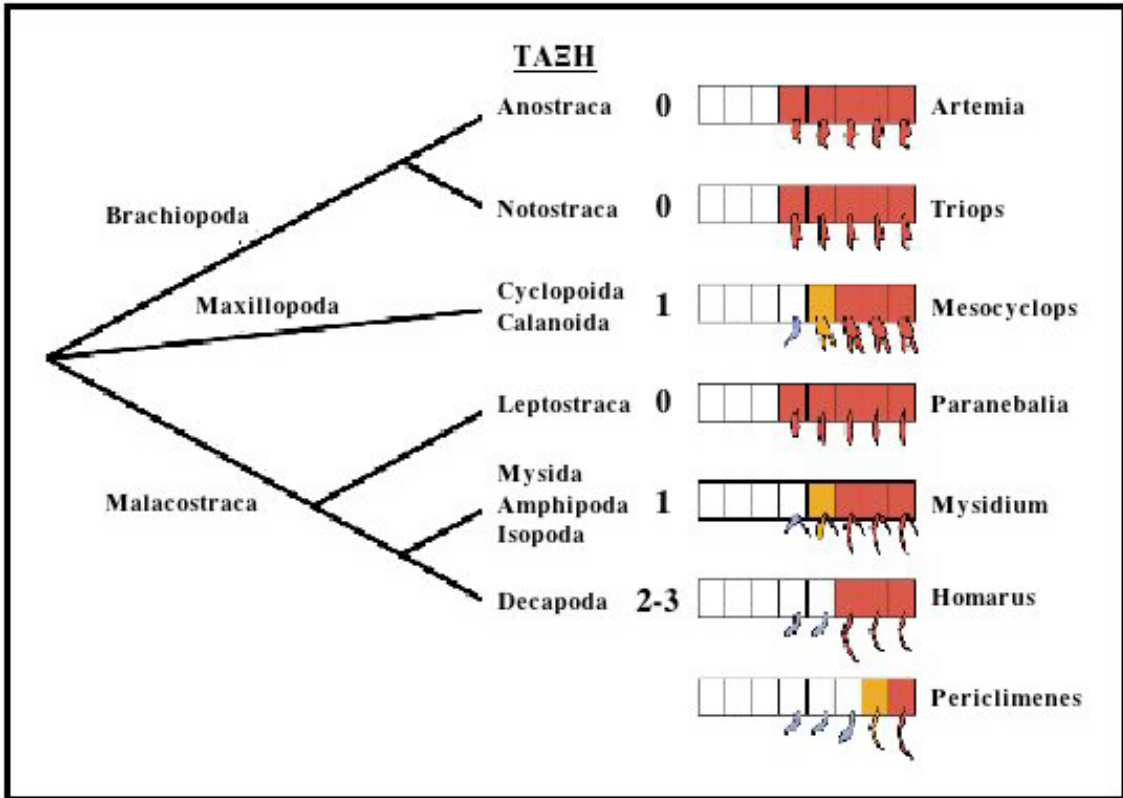
4.5.1. Εκτεταμένες αλλαγές του προτύπου έκφρασης των γονιδίων *Hox*

Ο κορμός των περισσότερων αρθροπόδων υποδιαιρείται σε τμήματα. Σε πολλές περιπτώσεις, τα σύνορα των τμημάτων ταιριάζουν απόλυτα με τα όρια της έκφρασης των κεντρικών γονιδίων *Hox* (HUGHES & KAUFMAN 2002b). Στα έντομα, το γονίδιο *Antp* εκφράζεται και καθορίζει την ταυτότητα του θώρακα, ενώ τα *Ubx* και *abd-A* ευθύνονται κυρίως για το σχηματισμό της κοιλίας. Στα μαλακόστρακα, τα γονίδια *Antp* και *Ubx* συνεκφράζονται στο πέρεον, ενώ το *abd-A* ανιχνεύεται μόνο στο πλέον (ABZHANOV & KAUFMAN 2000a; ABZHANOV & KAUFMAN 2000b). Μέσω αλλαγών της ρύθμισής τους, τα γονίδια *Hox* έπλασαν καινοτόμες σωματοδομές, αποκλίνοντας από το πρότυπο που ανιχνεύεται σε αρθρόποδα με ομοιόμορφους κορμούς. Στο πρωτόγονο καρκινοειδές *Artemia*, τα τρία κεντρικά γονίδια *Antp*, *Ubx* και *abd-A* εκφράζονται σε σχεδόν επικαλυπτόμενες περιοχές κατά μήκος των 11 ομόνομων μεταμερών, που παρεμβάλλονται ανάμεσα στην κεφαλή και τη γεννητική περιοχή (AVEROF & AKAM 1995). Ομοίως, στα μυριάποδα το πρόσθιο όριο έκφρασης των γονιδίων *Ubx* και *abd-A* καλύπτει όλο σχεδόν το αδιαφοροποίητο σώμα (HUGHES & KAUFMAN 2002a). Στα χηληκερωτά, το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *Hox* έδειξε ότι το πρόσωπο αντιστοιχεί στην κεφαλή, ενώ το οπισθόσωμα, όπου έχουν επικαλυπτόμενα πεδία δράσης τα *Antp*, *Ubx* και *abd-A*, στον κορμό των υπολοίπων αρθροπόδων (DAMEN *et al.* 1998; TELFORD & THOMAS 1998).

4.5.2. Μετατοπίσεις της έκφρασης των γονιδίων *Hox* εύρους λίγων μεταμερών

Μικρές μετατοπίσεις της έκφρασης των γονιδίων *Hox* κατά μήκος του προσθιοπίσθιου άξονα έχουν συσχετιστεί με μορφολογικές διαφορές μεταξύ ζωικών ομάδων που ανήκουν στην ίδια τάξη. Σε ορισμένα καρκινοειδή, τα εξαρτήματα που εκφύονται από τα πρόσθια μεταμερή του κορμού, δεν εξυπηρετούν την κίνηση, όπως ισχύει συνήθως, αλλά την επεξεργασία της τροφής (BRUSCA & BRUSCA 1990). Τα τροποποιημένα αυτά εξαρτήματα ονομάζονται γναθοπόδια (maxillipeds) και μοιάζουν, μορφολογικά και λειτουργικά, περισσότερο με τα κεφαλικά γναθικά εξαρτήματα και λιγότερο με τα πιο οπίσθια κινητικά. Ανάλυση του προτύπου έκφρασης των γονιδίων *Ubx* και *abd-A* (με μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει έναν κοινό συντηρημένο επίτοπό τους) σε είδη αντιπροσωπευτικά των κυριότερων κλάδων των καρκινοειδών, έδειξε ότι κανένα από τα δύο γονίδια δεν εκφραζόταν σε μεταμερή με γναθοπόδια (AVEROF & PATEL 1997). Ενώ η ανοσοϊστοχημική χρώση κάλυπτε όλο τον κορμό σε είδη που έφεραν μόνο κινητικά εξαρτήματα, σε είδη με γναθοπόδια ήταν

μετατοπισμένη προς τα πίσω κατά ίσο αριθμό μεταμερών, όσα και τα ζεύγη των γναθοποδίων (Εικόνα 28). Εικάζεται ότι τα γναθοπόδια είναι ένας παράγωγος (derived) χαρακτήρας, που αποκτήθηκε ανεξάρτητα σε διαφορετικές γραμμές των καρκινοειδών μέσω συγκλίνουσας εξέλιξης (convergent evolution), καθώς απουσιάζει από τα παλαιότερα απολιθώματα καρκινοειδών και έχει ασυνεχή φυλογενετική κατανομή. Αν ισχύει αυτή η υπόθεση, τότε ανεξάρτητες αλλαγές στη ρύθμιση των *Ubx* και *abd-A* συνέκλιναν στο ίδιο μορφολογικό αποτέλεσμα.



Εικόνα 28: Μετατοπίσεις του πεδίου έκφρασης των γονιδίων *Ubx/Abd-A* συσχετίζονται με την ανάπτυξη των γναθοποδίων στα καρκινοειδή (AVEROF & PATEL 1997). Στο φυλογενετικό δέντρο φαίνεται η κλάση και η τάξη των ειδών που εξετάστηκαν, καθώς επίσης και ο αριθμός των γναθοποδίων που αναπτύσσει κάθε ομάδα. Το κάθε είδος, το όνομα του οποίου παρατίθεται δεξιά, συνοδεύεται από μία σχηματική απεικόνιση της μορφολογίας του. Τα πρώτα τρία κουτάκια (από αριστερά) αναπαριστούν τα γναθικά μεταμερή (χωρίς τα εξαρτήματά τους), ακολουθούμενα από τα πέντε πρώτα μεταμερή του κορμού. Τα γναθοπόδια αναπαριστώνται με θαλασσί χρώμα. Η ισχυρή ανοσοϊστοχημική χρώση υποδεικνύεται με κόκκινο χρώμα, η ασθενής με πορτοκαλί και η απουσία χρώσης με λευκό. Σε όλες τις περιπτώσεις, η απουσία έκφρασης των γονιδίων *Ubx/Abd-A* από τα πρόσθια μεταμερή συμβαδίζει με την ανάπτυξη γναθοποδίων σε αυτά.

4.5.3. Αλλαγές στο πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *Hox* μέσα σε ένα μεταμερές

Το γονίδιο *Distal-less (Dll)* έχει συντηρημένο ρόλο μεταξύ των μεταζώων στην ανάπτυξη των εξαρτημάτων του σώματος (PANGANIBAN *et al.* 1997). Όπως θα αναλυθεί παρακάτω εκτενώς, στα δίπτερα (και πιθανώς τα λεπιδόπτερα) η έκφραση του *Dll* καταστέλλεται στα κοιλιακά μεταμερή του εμβρύου από τα γονίδια *Ubx* και *abd-A* (VACHON *et al.* 1992). Σε αντίθεση όμως με τις προνύμφες της *Drosophila*, οι κάμπιες (προνύμφες) των πεταλούδων έχουν τέσσερα ζεύγη ατροφικών ποδιών (prolegs) στα κοιλιακά μεταμερή (3ο έως 6ο), τα οποία σχηματίζονται από αθροίσματα κυττάρων που εκφράζεται το *Dll*. Ενώ αρχικά η έκφραση των *Ubx* και *abd-A* είναι ομοιόμορφη σε όλη την κοιλία, στη συνέχεια

καταστέλλεται ειδικά στους κυτταρικούς πληθυσμούς, που θα σχηματίσουν τα άκρα της κοιλίας (WARREN *et al.* 1994). Πιθανότατα, η καταστολή επιτρέπει την ενεργοποίηση του *Dll* και την ανάπτυξη αυτών των άκρων.

Ένα δεύτερο παράδειγμα αφορά το πρότυπο τριχοφυΐας του δεύτερου θωρακικού ποδιού σε είδη του γένους *Drosophila*. Χάρη στη δυνατότητα διαειδικών διασταυρώσεων και τη φαινοτυπική ανάλυση των υβριδικών ατόμων, αποκαλύφθηκε ότι η μορφολογική αυτή διαφορά οφείλεται στα επίπεδα και το πρότυπο έκφρασης του *Ubx* (STERN 1998). Τα υψηλά επίπεδα του *Ubx* στη *D. melanogaster* καταστέλλουν την ανάπτυξη τριχιδίων (trichomes) στην οπίσθια περιοχή του άκρου, δημιουργώντας μία φαλακρή κηλίδα. Η κηλίδα αυτή είναι μεγαλύτερη στη *D. simulans* που επιδεικνύει ευρύτερη κατανομή υψηλών επιπέδων του δικού της (ορθόλογου) *Ubx*, ενώ απουσιάζει από την *D. virilis*, όπου ανιχνεύονται χαμηλότερα επίπεδα της πρωτεΐνης.

Η σπουδαιότητα συγκρίσεων μεταξύ κοντινών ειδών (του ίδιου γένους), όπως και η μελέτη της ποικιλότητας μέσα σε ένα είδος/πληθυσμό, έγκειται στην ταυτοποίηση των μικρών εξελικτικών αλλαγών, που συσσωρευόμενες οδηγούν σε μεγάλες μορφολογικές διαφορές. Ένα συνθετικό πλαίσιο εργασίας, όπου οι συγκριτικές μελέτες Eno-Devo συνδυάστηκαν με παραδοσιακές γενετικές προσεγγίσεις (π.χ. χαρτογράφηση Quantitative Trait Loci, τεχνητή επιλογή επιθυμητών χαρακτήρων), αποκάλυψε ότι κάτω από τη φαινοτυπική ομοιομορφία ενός πληθυσμού κρύβονται εκπληκτικοί γενετικοί πολυμορφισμοί σε αναπτυξιακά μονοπάτια (cryptic variation). Τροποποίηση των περιβαλλοντικών συνθηκών ή/και εισαγωγή νέων μεταλλαγών σε έναν πληθυσμό μπορούν σε σύντομο διάστημα να ξεσκεπάσουν τη γενετική ποικιλότητα και να τη μετουσιώσουν σε φαινοτυπική ποικιλομορφία (GIBSON & HOGNESS 1996; GIBSON *et al.* 1999).

4.6. Cis-ρυθμιστικές αλλαγές σε γονίδια-στόχους των πρωτεϊνών Hox

Αλλαγές στις cis-ρυθμιστικές αλληλουχίες, οι οποίες σχετίζονται με την εξέλιξη της σωματοδομής των αρθροπόδων, δεν εντοπίζονται μόνο στα γονίδια *Hox*, αλλά και σε γονίδια-στόχους τους. Τα βαθύτερα μελετημένα σε μοριακό επίπεδο παραδείγματα, αφορούν την εξέλιξη του αριθμού και της μορφολογίας των εξαρτημάτων μέσα στα έντομα. Και σε αυτή την περίπτωση θα χρησιμοποιηθούν ως εφαλτήριο οι γνώσεις μας πάνω στην ανάπτυξη της *Drosophila*.

Τα εξαρτήματα του ενήλικου ατόμου σχηματίζονται από τους αναπτυξιακούς δίσκους, που διακρίνονται μεταξύ τους από τη θέση τους στο σώμα της προνύμφης, το μέγεθος και το σχήμα τους, και ονοματίζονται σύμφωνα με τη δομή που καθορίζουν (π.χ. δίσκος φτερού, δίσκος ποδιού κ.ο.κ.; Εικόνα 27A). Τα πρόδρομα κύτταρα των θωρακικών δίσκων δημιουργούνται κατά την εμβρυογένεση από μικρές ομάδες (~20) επιδερμικών κυττάρων (βλέπε Εικόνα 31). Η θέση τους στον προσθιοπίσθιο και νωτιοκοιλιακό (dorsal-ventral) άξονα προσδιορίζεται από ένα σύστημα μοριακών συντεταγμένων, με τη μορφή λωρίδων κυττάρων που εκφράζουν συγκεκριμένα σηματοδοτικά μόρια. Στο εν λόγω αναπτυξιακό στάδιο, κάθε πλευρά του εμβρύου διατρέχεται από μεταμερικώς επαναλαμβανόμενες κάθετες λωρίδες του Wingless (*wg*; οικογένεια πρωτεϊνών Wnt) και μία οριζόντια πλευρική λωρίδα του Decapentaplegic (*dpp*; οικογένεια TGF-β). Τα πρόδρομα κύτταρα των δίσκων σχηματίζονται ακριβώς δίπλα στα σημεία που τέμνονται οι παραπάνω λωρίδες και χαρακτηρίζονται από την εντοπισμένη ενεργοποίηση σε αυτά του γονιδίου *Distal-less (Dll)* (COHEN *et al.* 1993; COHEN *et al.* 1989). Η επαγωγική δράση του Wg και οι κατασταλτικοί ρόλοι νωτιοπλευρικά του Dpp και κοιλιακά (ventrally) του Spitz (EGFR ligand; διαχέεται από τη μέση κοιλιακή γραμμή), περιορίζουν την έκφραση του *Dll* σε ένα ζεύγος κυτταρικών αθροισμάτων ανά θωρακικό μεταμερές (GOTO & HAYASHI 1997). Την ενεργοποίηση του *Dll* φαίνεται να μεσολαβούν δύο μεταγραφικοί

παράγοντες με δακτύλους ψευδαργύρου (zinc-finger), οι Buttonhead (btd) και Sp1 (ESTELLA *et al.* 2003). Μετά την επαγωγή, υποπληθυσμοί των κυττάρων που εκφράζουν *Dll* μεταναστεύουν προς τη ραχιαία πλευρά, εκφράζουν αποκρινόμενοι σε υψηλά επίπεδα *Dpp* και χαμηλά επίπεδα *Spitz* τους αναπτυξιακούς παράγοντες *vestigial*, *escargot* και *snail*, και σχηματίζουν τα πρόδρομα κύτταρα των δίσκων των φτερών (FUSE *et al.* 1996). Θα επανέλθουμε στα φτερά αργότερα, σχολιάζοντας την εξέλιξη του αριθμού και της μορφολογίας τους.

Με τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυτταρικών πεδίων που εκφράζουν *Dll*, θα προκύψουν τα τρία ζεύγη αισθητηρίων οργάνων της προνύμφης (όργανα του Keilin) και οι αναπτυξιακοί δίσκοι των ποδιών, που θα σχηματίσουν τα τρία ζεύγη βαδιστικών εξαρτημάτων στο θώρακα του ενήλικου (COHEN & JURGENS 1989). Ενώ τα μεταμερή της κοιλίας (abdomen) λαμβάνουν επίσης όλα τα απαραίτητα σήματα για την ανάπτυξη ποδιών, η έκφραση του *Dll* στα αντίστοιχα εμβρυικά κύτταρα καταστέλλεται σε μεταγραφικό επίπεδο από τα προϊόντα των γονιδίων *Ubx* και *Abd-A* (του συμπλόκου Bithorax; BX-C) (VACHON *et al.* 1992). Ειδικότερα, οι πρωτεΐνες *Ubx* και *Abd-A* προσδένονται άμεσα σε ένα πρόωμο (early) ενισχυτή του *Dll*, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την πυροδότηση της έκφρασης του γονιδίου, καταστέλλοντας την ανάπτυξη άκρων στην κοιλία των προνυμφικών και ενήλικων ατόμων (βλέπε Εικόνα 32).

Τα άκρα της *Drosophila*, όπως και όλων των οργανισμών, αναπτύσσονται ως προεκβολές του κορμού κατά μήκος ενός προσω-άπω άξονα (proximal-distal), ο οποίος είναι κάθετος στους κύριους άξονες του σώματος. Το γονίδιο *Dll* κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα με ομοιοδομή, που εκφράζεται στις απόμακρες (distal) δομές του αναπτυσσόμενου άκρου, οι οποίες απουσιάζουν σε μεταλλαγές του γονιδίου στα έντομα (COHEN *et al.* 1989). Η δράση του *Dll* είναι πολύ συντηρημένη και φαίνεται να συμμετέχει σε όλα τα ζωικά φύλα για τη δημιουργία ποικίλων προεκβολών (outgrowths) του σώματος (PANGANIBAN *et al.* 1997).

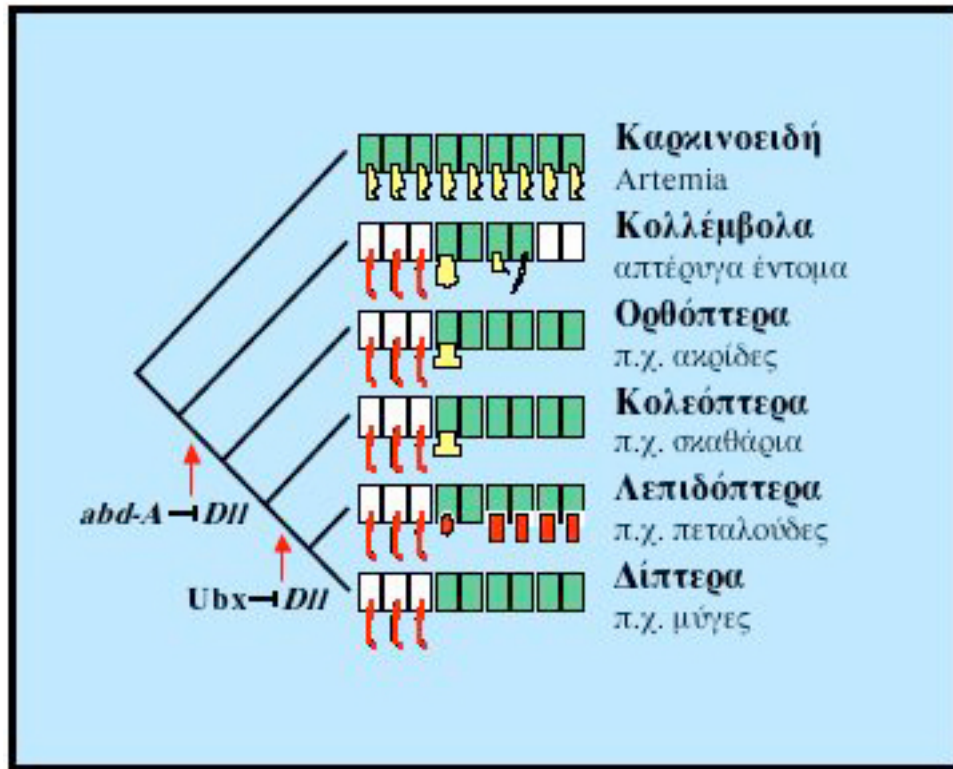
Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις με τη βοήθεια ενός δια-ειδικού (cross-species) αντισώματος σε αντιπροσώπους και των υπολοίπων τάξεων των αρθροπόδων επιβεβαίωσαν ότι το *Dll* εκφράζεται στα αναπτυσσόμενα άκρα τους, ανεξαρτήτως μορφολογίας (μονοσκελή, διχαλωτά, πολυσχιδή) (PANGANIBAN *et al.* 1995). Μάλιστα, στα διακλαδιζόμενα άκρα που έχουν περισσότερους από έναν προσω-άπω άξονες, η πρωτεΐνη *Dll* ανιχνεύεται σε καθένα ξεχωριστό αναπτυσσόμενο σκέλος. Στα καρκινοειδή και τα μυριάποδα, η έκφραση του *Dll* πρωτοανιχνεύεται σε κύτταρα παρουσία των πρωτεϊνών *Ubx* και *Abd-A*, οι οποίες δεν αναστέλλουν την ανάπτυξη των άκρων (GRENIER *et al.* 1997; PANGANIBAN *et al.* 1995) (Εικόνα 29). Το ίδιο ισχύει και στα κολλέμβολα (πρωτόγονα απτέρυγα έντομα), τα οποία αναπτύσσουν τρία κοιλιακά εξαρτήματα (PALOPOLI & PATEL 1998) (Εικόνα 29). Τονίζεται, ότι τα κολλέμβολα επιδεικνύουν την ίδια τάγμωση (θώρακας-κοιλία) και τα ίδια πρότυπα έκφρασης των γονιδίων *Hox* με τα πιο πρόσφατα έντομα. Συνεπώς, η καταστολή του γονιδίου *Dll* από τις πρωτεΐνες BX-C, που παρατηρείται στα δίπτερα και τα λεπιδόπτερα, και η έλλειψη άκρων από την κοιλία των πτερυγωτών εντόμων, εξελίχθηκαν μετά το διαχωρισμό τους από τα κολλέμβολα. Η ύπαρξη άκρων σε όλα τα μεταμερή του κορμού σε πρωτόγονα έντομα (θωρακικά και κοιλιακά) επαληθεύεται και από τα απολιθώματα.

Η καταστολή του *Dll* από τις πρωτεΐνες BX-C φαίνεται να εξελίχθηκε σε δύο φάσεις (PALOPOLI & PATEL 1998). Την ιδιότητα αυτή απέκτησε πρώτα το *Abd-A* στη βάση των πτερυγωτών εντόμων και ακολούθως και το *Ubx* πριν το διαχωρισμό των πιο εξελιγμένων ομάδων (λεπιδόπτερα, δίπτερα) (Εικόνα 29). Οι εμβρυικές μορφές των ορθοπτέρων και των κολεοπτέρων, αναπτύσσουν παροδικά ένα ζεύγος ατροφικών άκρων στο πρώτο κοιλιακό μεταμερές (pleuropodia). Στα κύτταρα των εν λόγω άκρων, το *Dll* ενεργοποιείται παρουσία της πρωτεΐνης *Ubx*, αλλά όχι και της *Abd-A*, που καταστέλλει τα άκρα από το δεύτερο κοιλιακό

μεταμερές και πίσω. Το *Ubx* σε αυτές τις ομάδες εντόμων τροποποιεί τη μορφολογία των αναπτυσσόμενων ποδιών χωρίς να τα καταστέλλει (LEWIS *et al.* 2000). Στα δίπτερα αντίθετα, η ανάπτυξη εμβρυικών κοιλιακών άκρων καταστέλλεται εν τη γενέση της και από το *Ubx* και από το *Abd-A* (VACHON *et al.* 1992), ενώ στα λεπιδόπτερα επιτρέπεται μόνο σε πεδία κυττάρων που χάνουν την έκφραση αυτών των πρωτεϊνών (WARREN *et al.* 1994) (Εικόνα 29). Η πρωτεΐνη *Antp*, που σε όλα τα έντομα εντοπίζεται στο θώρακα και δεν αναστέλλει την ανάπτυξη των άκρων, ανιχνεύεται και σε εκείνα τα κοιλιακά κύτταρα των ορθοπτέρων, κολεοπτέρων και λεπιδοπτέρων, που εκφράζουν *Dll* (PALOPOLI & PATEL 1998; WARREN *et al.* 1994).

Η εξελικτική ιστορία των ποδιών των εντόμων έχει αρκετά κοινά στοιχεία με την εξέλιξη των φτερών τους. Η αντιστοιχία αυτή δεν είναι αναπάντεχη, αφού πιθανότατα οι δύο δομές έλκουν την καταγωγή τους σε διαφορετικά σκέλη (*branches*) του ίδιου πολυσχιδούς εξαρτήματος, που πιθανότατα κατείχε ο πρόγονος των εντόμων (AVEROF & COHEN 1997). Ακόμη και στη *Drosophila*, που ανήκει στην εξελικτικά πρόσφατη ομάδα των διπτέρων, οι αναπτυξιακοί δίσκοι του φτερού και του ποδιού προέρχονται από τον ίδιο εμβρυικό πληθυσμό κυττάρων (COHEN *et al.* 1993). Σύμφωνα λοιπόν με τα απολιθώματα, η προγονική των εντόμων κατάσταση περιελάμβανε μικρά φτερά σε όλα τα μεταμερή του κορμού (CARROLL *et al.* 2001; CARROLL *et al.* 1995). Οι δομές αυτές προοδευτικά ατρόφησαν και τελικά εξαφανίστηκαν από την κοιλία και το προθωρακικό μεταμερές των σύγχρονων πτερυγωτών εντόμων. Γενετικά πειράματα στη *Drosophila* υποδεικνύουν, ότι ο περιορισμός των φτερών στο μεσο- και μεταθωρακικό μεταμερές οφείλεται σε καταστολή της ανάπτυξής τους στο προθωρακικό μεταμερές από το *Scr* και στα κοιλιακά μεταμερή από τα *Ubx* και *abd-A* (CARROLL *et al.* 1995). Η απόκτηση *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών ευαίσθητων στις παραπάνω ομοιωτικές πρωτεΐνες από τα γονίδια που ελέγχουν το σχηματισμό των φτερών, έχει προταθεί ως η υπεύθυνη εξελικτική αλλαγή.

Περισσότερα είναι γνωστά, σε μοριακό επίπεδο, για την εξέλιξη της διαφοροποίησης των φτερών στα πτερυγωτά έντομα. Όλες οι ομάδες εντόμων διαθέτουν ένα πρόσθιο και ένα οπίσθιο ζεύγος φτερών (*fore-*, *hindwings*), που στις παλαιότερες τάξεις εντόμων είναι πανομοιότυπα μεταξύ τους, ενώ στις πιο πρόσφατες διαφέρουν στη δομή και τη μορφολογία τους. Για παράδειγμα, τα πρόσθια φτερά των κολεοπτέρων έχουν μετατραπεί σε καλυπτήρια όργανα (έλυτρα; Εικόνα 10), ενώ τα οπίσθια φτερά των διπτέρων έχουν ατροφήσει δραματικά και εξελιχθεί σε σφαιρικά όργανα ισορροπίας (αλτήρες; Εικόνα 32A). Η δυναμική έκφραση του *Ubx*, που προοδευτικά επεκτείνεται στον οπίσθιο θώρακα του εμβρύου, ευθύνεται για τη διαφοροποιημένη μορφολογία του οπίσθιου φτερού σε όλα τα έντομα. Απόρροια διαφορετικής ρύθμισης από το *Ubx* των αναπτυξιακών γονιδίων που συμμετέχουν στο σχηματισμό του φτερού, η μορφολογική διαφοροποίηση των οπίσθιων από τα πρόσθια φτερά ποικίλει μεταξύ ομάδων εντόμων. Στους αλτήρες των διπτέρων, το *Ubx* καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων που απαιτούνται για την αύξηση και πλάτυνση του φτερού και για την ανάπτυξη των φλεβών και αισθητηρίων οργάνων του (WEATHERBEE *et al.* 1998). Αντίθετα, το *Ubx* τροποποιεί απλά τη δράση ορισμένων ορθόλογων γονιδίων στις πεταλούδες (π.χ. του γονιδίου *Dll*), με αποτέλεσμα τα οπίσθια φτερά τους να είναι μεγάλα και πεπλατυσμένα όπως τα πρόσθια, αλλά να αποκτούν διαφορετικό σχήμα και σχέδιο (WEATHERBEE *et al.* 1999). Η εξέλιξη των *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων (και των αναπτυξιακών γονιδίων του φτερού, επέτρεψε τη διαφορετική και εξειδικευμένη τροποποίηση της έκφρασής τους από το *Ubx* σε ξεχωριστές εξελικτικές γραμμές.



Εικόνα 29: Φυλογενετική κατανομή της καταστολής του γονιδίου *Dll* από τις πρωτεΐνες BX-C (PALOPOLI & PATEL 1998). Απεικονίζονται σχηματικά τα μεταμερή του κορμού πέντε τάξεων εντόμων και μίας τάξης αντιπροσωπευτικής των καρκινοειδών (Βραγχιόποδα; *Artemia*). Με πράσινο χρώμα υποδεικνύονται τα μεταμερή όπου ανιχνεύονται με ανοσοϊστοχημική χρώση οι πρωτεΐνες BX-C νωρίς κατά την εμβρυογένεση. Οι πρωτεΐνες BX-C εκφράζονται σε όλο το μήκος του κορμού της *Artemia*, ενώ στα έντομα εκφράζονται μόνο στα μεταμερή της κοιλίας και όχι στα τρία πρώτα θωρακικά μεταμερή (λευκό χρώμα). Τα αναπτυσσόμενα άκρα παρουσιάζονται με κίτρινο χρώμα, όταν η έκφραση του γονιδίου *Dll* πρωτοανιχνεύεται σε αυτά παρουσία των πρωτεϊνών BX-C, και με κόκκινο χρώμα, όταν η έκφραση του γονιδίου *Dll* πρωτοανιχνεύεται σε αυτά απουσία των πρωτεϊνών BX-C. Στα καρκινοειδή, η έκφραση του *Dll* και συνεπώς η ανάπτυξη των άκρων δεν καταστέλλεται ούτε από την πρωτεΐνη *Ubx* ούτε από την *Abd-A*. Το ίδιο ισχύει και για τα άκρα που αναπτύσσονται στο 1^ο, 2^ο και 4^ο μεταμερές της κοιλίας στα κολλέμβοια. Στα ορθόπτερα και τα κολεόπτερα, η πρωτεΐνη *Ubx* δεν καταστέλλει το γονίδιο *Dll* και την ανάπτυξη των pleuropodia στο πρώτο μεταμερές της κοιλίας, σε αντίθεση με την *Abd-A* που εμποδίζει την ανάπτυξη άκρων (καταστέλλοντας το *Dll*) από το δεύτερο μεταμερές της κοιλίας και πιο πίσω. Και οι δύο πρωτεΐνες BX-C ασκούν κατασταλτική δράση πάνω στο *Dll* στα λεπιδόπτερα και τα δίπτερα. Τα prolegs, που εκφύονται από τα μεταμερή της κοιλίας (των εμβρύων και προνυμφών) των λεπιδοπτέρων, αναπτύσσονται από πεδία κυττάρων στα οποία πρώτα καταστέλλεται η έκφραση των γονιδίων *Ubx* και *abd-A* και ύστερα ενεργοποιείται το *Dll*. Συμμεραίνεται ότι την ιδιότητα καταστολής του γονιδίου *Dll* απέκτησε πρώτα η πρωτεΐνη *Abd-A* στη βάση των πτερυγωτών εντόμων και ακολούθως και το *Ubx* πριν το διαχωρισμό των πιο εξελιγμένων ομάδων.

4.7. Εξελικτικές αλλαγές στη δομή και τη λειτουργία των πρωτεϊνών Hox

Οι *cis*-ρυθμιστικές αλληλουχίες των αναπτυξιακών γονιδίων, συγκριτικά με τις κωδικές περιοχές τους, επιδεικνύουν πολύ ταχύτερους ρυθμούς εξέλιξης (LUDWIG *et al.* 2000b). Η διαφορά αυτή δεν είναι παράδοξη, δεδομένου ότι οι δύο αυτοί τύποι μοριακών αλλαγών υπόκεινται σε ανόμοιους περιορισμούς και εμπεριέχουν διαφορετική εξελικτική δυναμική. Οι *cis*-ρυθμιστικές αλληλουχίες ενός γονιδίου έχουν περισσότερους βαθμούς ελευθερίας και η αλλαγή τους οδηγεί θεωρητικά σε περιορισμένη τροποποίηση των αναπτυξιακών μηχανισμών, ανάλογα βέβαια και με τη θέση του γονιδίου στη γενετική ιεραρχία (GELLON & MCGINNIS 1998). Ένας εξελισσόμενος ενισχυτής επηρεάζει μόνο ένα ειδικό μέρος του συνολικού προτύπου έκφρασης του γονιδίου που ελέγχει. Αντίθετα, η δομή και η λειτουργία

των αλληλουχιών που κωδικοποιούν *trans*-δραστικούς παράγοντες τελούν υπό πιο αυστηρή επιλογική πίεση (διατήρηση πλαισίου ανάγνωσης, συντηρημένων αμινοξέων) και κάθε αλλαγή του θα περιμένε κανείς να επηρεάζει ταυτόχρονα την έκφραση πολλών γονιδίων-στόχων, πιθανώς με ολέθριες συνέπειες. Εύλογα, η εξέλιξη των μορφολογικών χαρακτήρων αποδίδεται πρωτίστως σε αλλαγές των *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων των αναπτυξιακών γονιδίων (CARROLL *et al.* 2001).

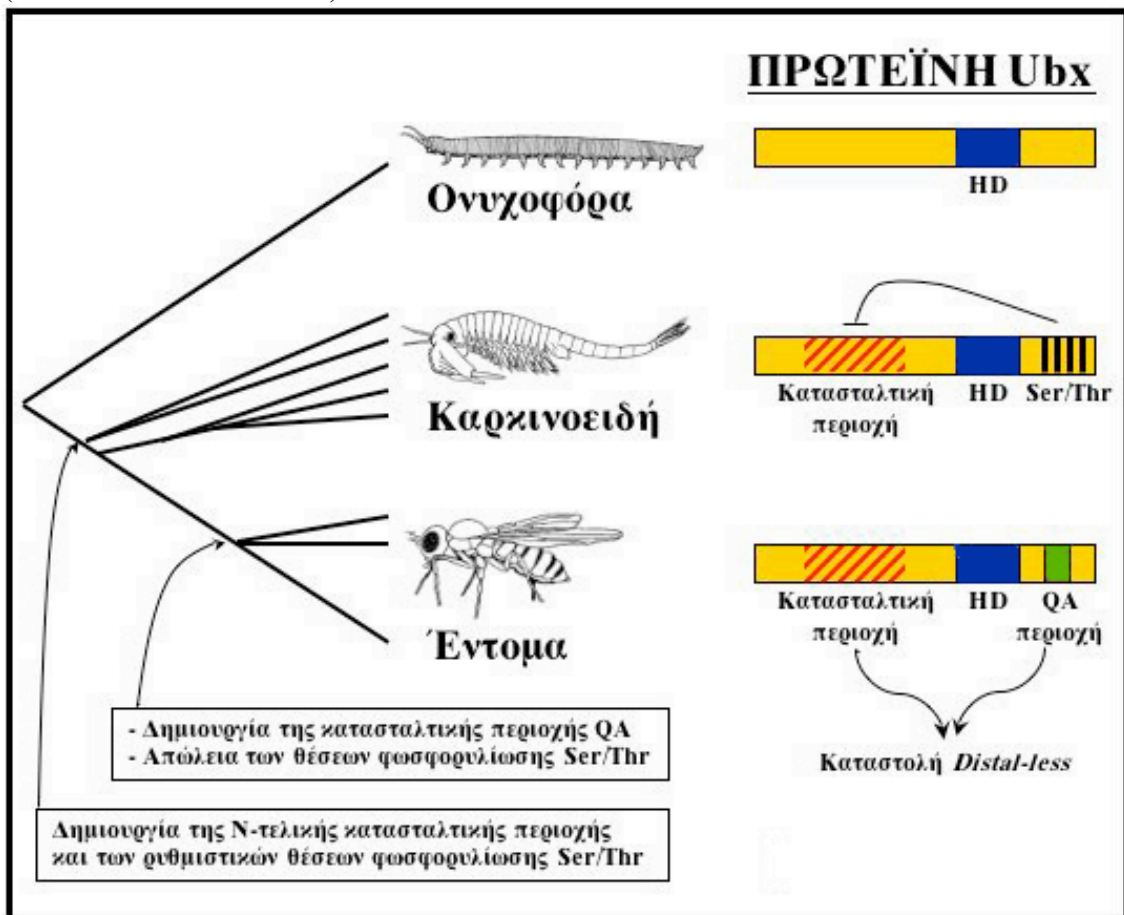
Η πεποίθηση αυτή κλονίστηκε από την αποκάλυψη, ότι αλλαγές στην κωδική αλληλουχία ενός κομβικού αναπτυξιακού γονιδίου, όπως το *Ubx*, έχουν παίξει σημαντικό ρόλο στη μορφολογική διαφοροποίηση του κορμού των αρθροπόδων (Εικόνα 30). Τα γονίδια *Ubx* του ονυχοφόρου (*OUBx*) και της *Artemia* (*AUBx*) συγκρίθηκαν με το δροσοφιλικό ορθόλογό τους (*DUBx*), ώστε να διαπιστωθεί αν μπορούν να μιμηθούν τις δράσεις του εκφραζόμενα εκτοπικά στη *Drosophila* (GALANT & CARROLL 2002; RONSHAUGEN *et al.* 2002). Το *OUBx* μπορούσε να επάγει πολλούς ομοιωτικούς μετασχηματισμούς (κεραία σε πόδι, φτερό σε αλήτρα) όπως το *DUBx*, ρυθμίζοντας με ανάλογο τρόπο γονίδια-στόχους του (GRENIER & CARROLL 2000). Απέτυχε όμως να καταστείλει τον πρώιμο ενισχυτή του *Dll* και να προσδώσει στις εξωδεσμικές δομές του θώρακα της προνύμφης (πρότυπο denticle belts, Keilin's organs) κοιλιακά χαρακτηριστικά (GRENIER & CARROLL 2000). Ανταλλάσσοντας δομικές περιοχές των *DUBx* και *OUBx* και εκφράζοντας εκτοπικά στη *Drosophila* τις χμιαϊρικές πρωτεΐνες, η κατασταλτική δράση του *DUBx* χαρτογραφήθηκε σε μία διακριτή περιοχή στο C-τελικό άκρο του (GALANT & CARROLL 2002). Η εν λόγω περιοχή, γνωστή ως QA, αποτελείται από την αμινοξική αλληλουχία QAQAQK και μία σειρά αλανίνες, και εμφανίζεται εξαιρετικά συντηρημένη στις πρωτεΐνες *Ubx* των εντόμων, ενώ απουσιάζει ή είναι ελλιπής στα υπόλοιπα αρθρόποδα και τα ονυχοφόρα. Περιοχές όμοιες με την QA έχουν βρεθεί σε πολλούς ακόμη μεταγραφικούς παράγοντες με κατασταλτική δράση (π.χ. engrailed και even-skipped) (GALANT & CARROLL 2002).

Το *DUBx* περιέχει μία ακόμη περιοχή με ισχυρή κατασταλτική δράση, η οποία εντοπίζεται στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης (Εικόνα 30). Η λειτουργική σύγκριση (με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω) του *DUBx* με το *AUBx* αποκάλυψε ότι η N-τελική κατασταλτική περιοχή υπάρχει και στο καρκινοειδές, τοποθετώντας την εξελικτική καταγωγή της πριν το διαχωρισμό των εντόμων από τα καρκινοειδή (RONSHAUGEN *et al.* 2002). Εντούτοις, η εκτοπική έκφραση του *AUBx* δεν κατέστειλε τον υποκινητή του *Dll* στη *Drosophila* (RONSHAUGEN *et al.* 2002), όπως άλλωστε δεν καταστέλλει την ανάπτυξη των άκρων σε όλα τα μεταμερή του κορμού της *Artemia*, όπου συν-εκφράζεται φυσιολογικά με το *Dll* (AVEROF & AKAM 1995; PANGANIBAN *et al.* 1995). Η κατασταλτική δράση της *AUBx* εμποδίζεται από μία άλλη περιοχή της πρωτεΐνης, που εντοπίζεται στο C-τελικό άκρο της και αποτελείται από πολλαπλές σερίνες και θρεονίνες (Ser/Thr). Τα αμινοξέα αυτά αντιστοιχούν σε πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης από διάφορες κινάσες (CKII, GSK-3) και η μεταλλαγή τους οδηγεί σε μία παραλλαγή της *AUBx* με πλήρη κατασταλτική ικανότητα στη *Drosophila* (RONSHAUGEN *et al.* 2002). Όλες οι πρωτεΐνες *Ubx* που χαρακτηρίζονται από την αδυναμία καταστολής της ανάπτυξης των άκρων στα είδη όπου εκφράζονται, έχουν C-τελικές περιοχές πλούσιες σε Ser/Thr. Οι ίδιες θέσεις φωσφορυλίωσης ρυθμίζουν με ανάλογο τρόπο και τη δράση της πρωτεΐνης *Antrp* στη *Drosophila*, ώστε να μην καταστέλλει την ανάπτυξη των άκρων στο θώρακα (JAFFE *et al.* 1997).

Συνοψίζοντας, ο μηχανισμός ρύθμισης της N-τελικής κατασταλτικής περιοχής μέσω φωσφορυλίωσης του C-τελικού πρωτεϊνικού άκρου, έχει εξελιχθεί τόσο μεταξύ παράλογων, όσο και μεταξύ ορθόλογων γονιδίων *Hox*. Εικάζεται, ότι η ενδομοριακή ρυθμιστική περιοχή Ser/Thr συντηρήθηκε στο *Antrp*, ενώ χάθηκε προοδευτικά από το *Ubx* στη βάση του κλάδου των εντόμων και αντικαταστάθηκε από μία δεύτερη κατασταλτική περιοχή, την QA (Εικόνα 30). Σε συνδυασμό με τον περιορισμό της έκφρασης του *Antrp* στον πρόσθιο κορμό και των *Ubx/abd-A*

στον οπίσθιο κορμό σφυρηλατήθηκε μία καινούρια διαφοροποιημένη σωματοδομή, ο εξάποδος θώρακας και η χωρίς άκρα κοιλία των εντόμων. Προφανώς, οι παραπάνω αλλαγές δεν είναι οι μοναδικές που συνετέλεσαν στην εξέλιξη της μορφολογίας των εντόμων. Ένα άλλο σημαντικό κομμάτι του παζλ, άγνωστο προς το παρόν, αφορά την εξέλιξη της πρωτεΐνης Abd-A, που πιθανότατα ήταν η πρώτη που απέκτησε την ιδιότητα καταστολής του *Dll*.

Όπως συμβαίνει συχνά στην επιστήμη, οι νέες ανακαλύψεις κλονίζουν παγιωμένες αντιλήψεις και επαναπροσδιορίζουν τη θέση μας απέναντι στα ίδια ερωτήματα. Μία πρωτεΐνη, όσο συντηρημένη και αν εμφανίζεται, μπορεί να ιδωθεί ως ένα σύνολο διακριτών λειτουργικών περιοχών, όπου κάθε μία μπορεί να εξελιχθεί αυτόνομα από τις υπόλοιπες. Η διαδικασία αυτή ενδέχεται να προσδώσει στο πρωτεϊνικό μόριο καινούριους ρόλους συντηρώντας παράλληλα άλλες δράσεις του, να τροποποιήσει παλαιότερους ρόλους του ή να αλλάξει τη ρύθμιση της λειτουργίας του. Στα πλαίσια των μελετών Evo-Devo είναι σημαντικό να αποκαλυφθούν οι περιοχές των αναπτυξιακών παραγόντων που επιδεικνύουν συντηρημένες λειτουργίες, έναντι εκείνων που έχουν συνεισφέρει στη λειτουργική διαφοροποίηση μεταξύ ορθόλογων και παράλογων γονιδίων (HSIA & MCGINNIS 2003).



Εικόνα 30: Αλλαγές της πρωτεΐνης Ubx ευθύνονται για την εξέλιξη της ρύθμισης του γονιδίου *Dll*. Η υπεύθυνη για τη δέσμευση στο DNA ομοιοδομή (HD; μπλε κουτί) είναι εξαιρετικά συντηρημένη και δεν είναι υπεύθυνη για τη διαφορική δράση των πρωτεϊνών Ubx. Μετά το διαχωρισμό των καρκινοειδών και εντόμων από τα ονυχοφόρα δημιουργήθηκε η N-τελική κατασταλτική περιοχή (κόκκινες λωρίδες). Στα καρκινοειδή, η περιοχή αυτή δεν μπορεί να καταστείλει την έκφραση του γονιδίου *Dll*, καθώς ρυθμίζεται αρνητικά από τις θέσεις φωσφορυλίωσης σερίνης/θρεονίνης (μαύρες λωρίδες) στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης Ubx. Η προοδευτική απώλεια των θέσεων φωσφορυλίωσης στον κλάδο των εντόμων και η αντικατάστασή τους από τη δεύτερη κατασταλτική περιοχή QA (πράσινο κουτί), σε συνδυασμό με τον περιορισμό της έκφρασης των πρωτεϊνών Ubx και Abd-A στα οπίσθια μόνο μεταμερή του κορμού, συνέβαλλαν στην εξέλιξη της χωρίς εξαρτήματα κοιλίας των εντόμων.

5. ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΕΝΙΣΧΥΤΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *Distal-less* ΤΗΣ *D. melanogaster* ΣΤΟ *Tribolium* ΚΑΙ ΤΟΝ *Parhyale*

5.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

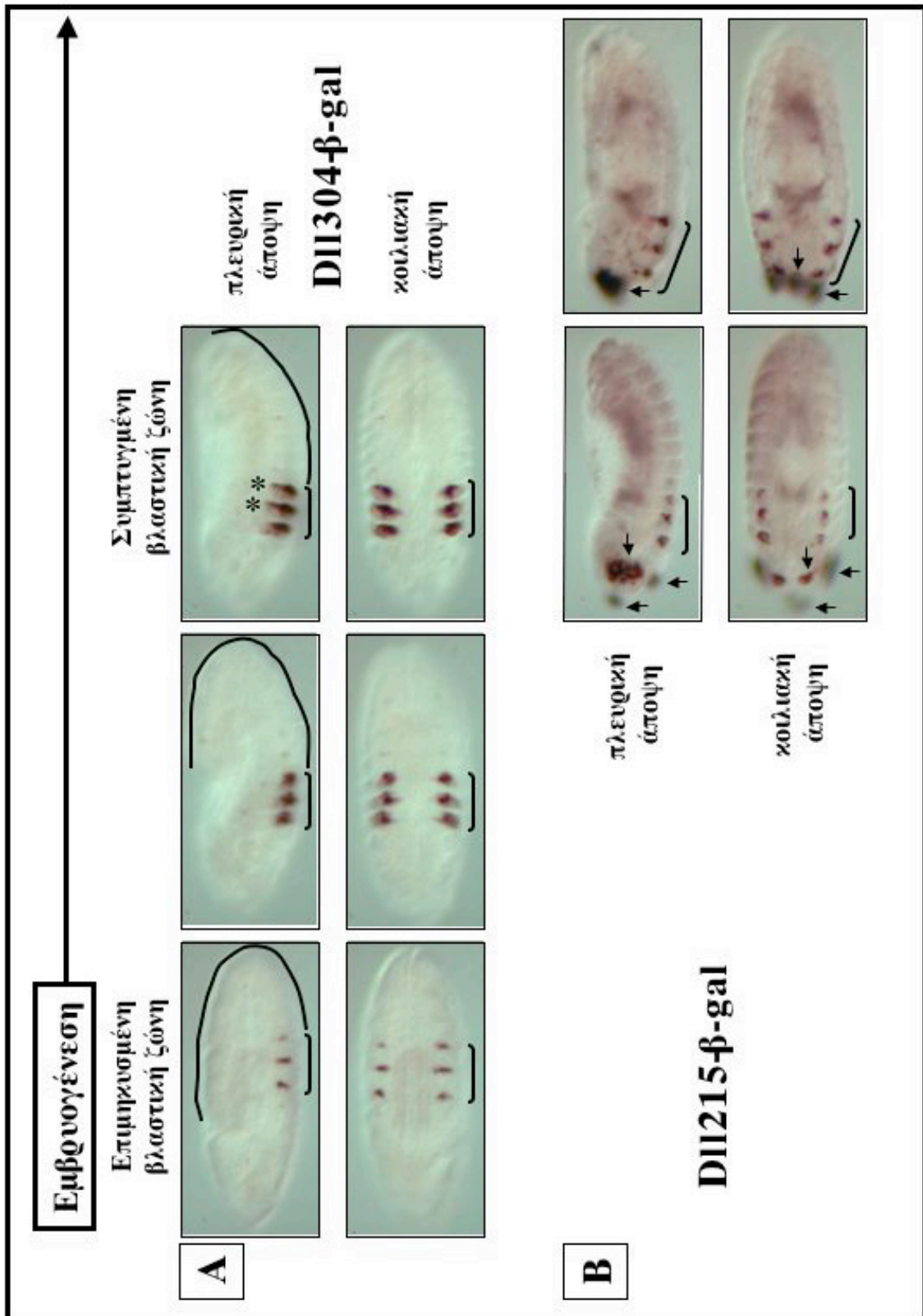
5.1.1. Ρύθμιση του γονιδίου *Distal-less* στο έμβρυο της *D. melanogaster*

Το γονίδιο *Distal-less* (*Dll*) είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των εξαρτημάτων της *D. melanogaster*. Ελέγχοντας την ενεργότητα τμημάτων της ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου *Dll* με τη βοήθεια γονιδίων αναφοράς, ο Vachon και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν δύο ενισχυτές που κατευθύνουν την έκφραση του γονιδίου στα πρόδρομα κύτταρα των τριών θωρακικών ζευγών αισθητηρίων οργάνων της προνύμφης (όργανα του Keilin) και ποδιών του ενήλικου (VACHON *et al.* 1992). Οι ενισχυτές αυτοί ενεργοποιούνται σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια (Εικόνα 31). Ο πρώτος ενισχυτής *Dll304* ενεργοποιείται πρώτος, όταν η βλαστική ζώνη του εμβρύου είναι επιμηκυσμένη (*germband extended*), και σβήνει λίγο αργότερα, όταν η βλαστική ζώνη συμπύσσεται (*germband retracted*). Από αυτό το στάδιο και μετά, ο όψιμος ενισχυτής *Dll215* ενεργοποιείται και ελέγχει την έκφραση του γονιδίου στα πρόδρομα κύτταρα των περισσότερων αναπτυσσόμενων εξαρτημάτων (θώρακα και κεφαλής).

Το *Dll* αποτελεί στόχο των πρωτεϊνών *Ubx* και *Abd-A* (πρωτεΐνες BX-C) και κατά την εμβρυογένεση ρυθμίζεται από αυτές με δύο διαφορετικούς τρόπους, έναν άμεσο και έναν έμμεσο (CASTELLI-GAIR & AKAM 1995; VACHON *et al.* 1992). Ο πρώτος ενισχυτής *Dll304* αποκρίνεται σε όλα τα αναγκαία μοριακά σήματα για τον καθορισμό της θέσης των ποδιών (βλέπε Εισαγωγή), μεταξύ των οποίων και στην άμεση κατασταλτική δράση των πρωτεϊνών BX-C. Με τη βοήθεια δύο άλλων πρωτεϊνών με ομοιοδομή, των συμπαραγόντων *Extradenticle* (*Exd*) και *Homothorax* (*Hth*) (GEBELEIN *et al.* 2002), οι πρωτεΐνες BX-C προσδένονται σε δύο θέσεις του *Dll304* (VACHON *et al.* 1992) καταστέλλοντας την έκφραση του *Dll*, συνεπώς και την ανάπτυξη άκρων, στα μεταμερή της κοιλίας (Εικόνα 32Γ). Μεταλλαγές που εξαλείφουν τις θέσεις πρόσδεσης (BX1-2) των καταστολέων, καθώς και μεταλλαγές των γονιδίων BX-C, οδηγούν σε αποκαταστολή του *Dll304* στα μεταμερή της κοιλίας, σε πεδία κυττάρων αντίστοιχης θέσης με αυτά του θώρακα (VACHON *et al.* 1992) (Εικόνα 32Δ). Αντίθετα, εκτοπική έκφραση του *Ubx/Abd-A* στα θωρακικά μεταμερή του εμβρύου οδηγεί σε καταστολή του ενισχυτή *Dll304* (CASTELLI-GAIR & AKAM 1995; VACHON *et al.* 1992) (Εικόνα 32Ε). Τα πειράματα αυτά δείχνουν ότι τα πρώτα 680 hr του πρώιμου ενισχυτή φέρουν όλες τις απαραίτητες αλληλουχίες για την ενεργοποίησή του σε ένα ζεύγος κυτταρικών συναθροισμών ανά μεταμερές, ενώ τα τελευταία 200 hr του ενισχυτή φέρουν αλληλουχίες απαραίτητες για την καταστολή του ειδικά στα κοιλιακά μεταμερή, όπου εκφράζονται τα γονίδια BX-C.

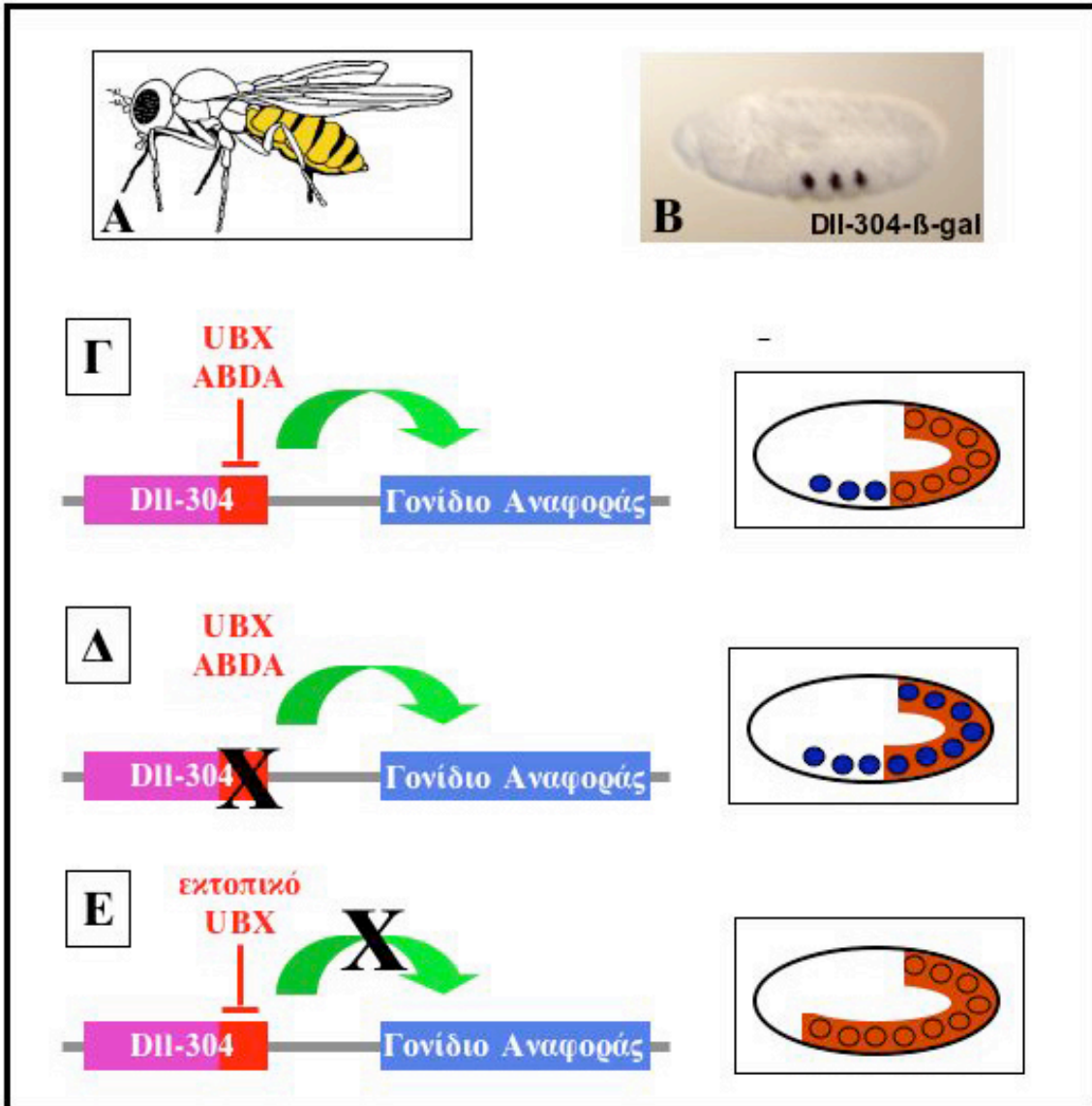
Ο όψιμος ενισχυτής *Dll215* δεν είναι άμεσα, αλλά έμμεσα ρυθμιζόμενος από τις πρωτεΐνες BX-C. Γενετικά πειράματα έδειξαν ότι ενεργοποιείται αυτοκαταλυτικά από το ίδιο το προϊόν του γονιδίου *Dll* σε όλα τα πρόδρομα κύτταρα των άκρων, όπου η έκφραση του *Dll* έχει πυροδοτηθεί νωρίτερα από τον πρώιμο ενισχυτή *Dll304* στο θώρακα και από άλλους ενισχυτές στην κεφαλή (CASTELLI-GAIR & AKAM 1995) (Εικόνα 31). Από το αναπτυξιακό αυτό στάδιο και ύστερα, η διατήρηση των κυτταρικών πεδίων των άκρων επιτυγχάνεται χάρη στη δράση του όψιμου ενισχυτή, και η συνακόλουθη συσσώρευση της πρωτεΐνης *Ubx* στα άκρα του οπίσθιου θώρακα δεν είναι ικανή να αναχαιτίσει την ανάπτυξή

τους. Αντίθετα, ο ενισχυτής *Dll215* δεν ενεργοποιείται στα κοιλιακά μεταμερή λόγω της προηγηθείσας καταστολής του πρώιμου ενισχυτή *Dll304* σε αυτά.



Εικόνα 31: Πρότυπο έκφρασης των ενισχυτών *Dll304* και *Dll215* στη *Drosophila*. Οι δύο ενισχυτές κλωνοποιήθηκαν μπροστά από το γονίδιο αναφοράς *lacZ*, εισήχθησαν στο γονιδίωμα της *Drosophila* και το πρότυπο έκφρασής τους ανιχνεύθηκε με ανοσοϊστοχημική χρώση για β-gal. (A) *Dll304-β-gal*: Ο πρώιμος ενισχυτής ενεργοποιείται σε τρία ζεύγη κυταρικών πληθυσμών στα

θωρακικά μεταμερή (αγκύλη) όταν η βλαστική ζώνη είναι επιμηκυσμένη (τα κοιλιακά μεταμερή υποδεικνύονται με την καμπύλη γραμμή). Καθώς η βλαστική ζώνη συμπύσσεται προοδευτικά, ο αριθμός των κυττάρων κάθε πεδίου αυξάνει και κάποια κύτταρα (αστερίσκοι) μεταναστεύουν ραχιαία για να σχηματίσουν τους αναπτυξιακούς δίσκους του φτερού και του αλτήρα. Η πρωτεΐνη β-gal είναι αρκετά σταθερή και εξακολουθεί να ανιχνεύεται σε αυτό το στάδιο, ενώ η έκφραση του πρώιμου ενισχυτή έχει σταματήσει. **(B) Dll215-β-gal:** Καθώς ολοκληρώνεται η σύμπτυξη της βλαστικής ζώνης ενεργοποιείται ο όψιμος ενισχυτής στα κεντρικά κύτταρα κάθε θωρακικού πεδίου (αγκύλη), καθώς και στα αναπτυσσόμενα κεφαλικά εξαρτήματα (βέλη). Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν με οπτικά Nomarski. Τα έμβρυα είναι διαταγμένα με το πρόσθιο άκρο αριστερά.



Εικόνα 32: Η ανάπτυξη άκρων στην κοιλία της *Drosophila* καταστέλλεται σε εμβρυικό στάδιο. **(A)** Η ενήλικη *Drosophila* δεν φέρει εξαρτήματα στα μεταμερή της κοιλίας (κίτρινο χρώμα). **(B)** Ο πρώιμος ενισχυτής *Dll304* ενεργοποιείται μόνο στα θωρακικά μεταμερή. **(Γ)** Η έκφραση του *Dll304* (μπλε δίσκοι) καταστέλλεται στα μεταμερή της κοιλίας από τις πρωτεΐνες *Ubx/Abd-A* (κόκκινη λωρίδα). **(Δ)** Εξάλειψη των θέσεων πρόοδσης των πρωτεϊνών *BX-C* (κόκκινο κουτί) από τον *Dll304* οδηγεί σε αποκαταστολή της έκφρασής του (μπλε δίσκοι) στα κοιλιακά μεταμερή, παρουσία των πρωτεϊνών *BX-C* (κόκκινη λωρίδα). **(Ε)** Εκτοπική έκφραση του γονιδίου *Ubx/abd-A* (κόκκινη λωρίδα) στα θωρακικά μεταμερή καταστέλλει τη φυσιολογική έκφραση του *Dll304*.

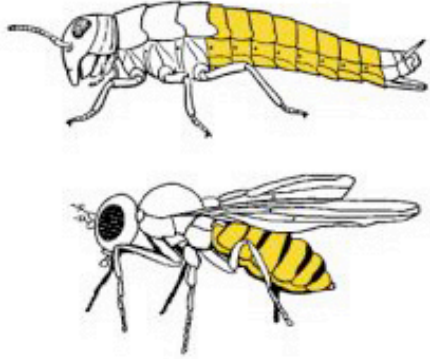
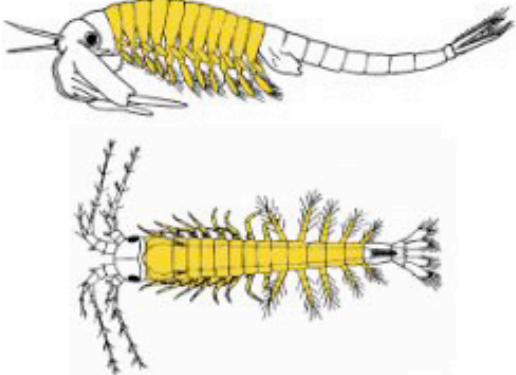


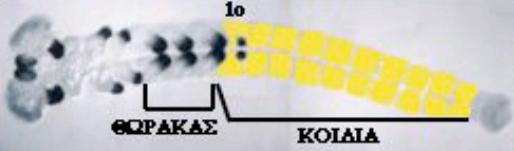
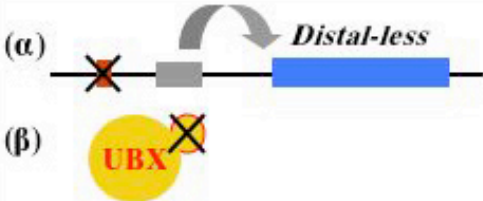
5.1.2. Το εννοιολογικό πλαίσιο της συγκριτικής ανάλυσης της λειτουργίας των ενισχυτών *Dll304* και *Dll215*

Όπως περιγράφηκε στην Ενότητα 4.6, στα έμβρυα του κολεοπτέρου *Tribolium castaneum* αναπτύσσεται παροδικά ένα ζεύγος άκρων (pleuropodia) στο πρώτο μόνο μεταμερές της κοιλίας. Στα πιο οπίσθια κοιλιακά μεταμερή εκφράζεται το γονίδιο *abd-A* του *Tribolium* (*Tcabd-A*) και καταστέλλει το *Dll* (*TcDll*) και συνεπώς την ανάπτυξη άκρων. Στο πρώτο όμως κοιλιακό μεταμερές, το γονίδιο *Ubx* (*TcUbx*) συνεκφράζεται (τουλάχιστον στα αρχικά στάδια) με το *TcDll* στα κύτταρα των pleuropodia (Εικόνα 33). Ο ρόλος του *TcUbx* φαίνεται ότι δεν είναι κατασταλτικός σε ό,τι αφορά την ανάπτυξη κοιλιακών άκρων, αλλά τροποποιητικός, αφού χρειάζεται για την ακόλουθη εγκόλπωση των pleuropodia και τη διαφοροποίησή τους σε αδένες (LEWIS *et al.* 2000). Παραδόξως, το *TcUbx* μπορεί να καταστείλει την έκφραση του *Dll* (και τον ενισχυτή *Dll304*) όταν εκφραστεί εκτοπικά στο θώρακα της *D. melanogaster* (GALANT & CARROLL 2002). Πιθανές ερμηνείες είναι ότι οι *cis*-ρυθμιστικές αλληλουχίες του *Dll* στη *Drosophila* διαφέρουν από αυτές του *TcDll* (προς το παρόν παραμένουν άγνωστες), ή ότι κάποιοι συμπαράγοντες που απαιτούνται για τη φυσιολογική λειτουργία του *TcUbx* απουσιάζουν από το έμβρυο της *Drosophila* (PAVLOPOULOS & AVEROF 2002). Η ασυμφωνία αυτή στη δράση του *TcUbx* υποδηλώνει την ανάγκη πραγματοποίησης των συγκριτικών μελετών Eno/Devo στο ενδογενές κυτταρικό περιβάλλον του αναπτυξιακού παράγοντα που ερευνάται, καθώς η δράση του ενδέχεται να επηρεάζεται από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του οργανισμού ή του κυττάρου όπου ελέγχεται η δράση του.

Σε αντίθεση με τα ενήλικα έντομα, τα καρκινοειδή φέρουν καλά ανεπτυγμένα εξαρτήματα σε όλα τα μεταμερή του κορμού (Εικόνα 33). Η έκφραση των γονιδίων *Ubx* και *abd-A* ανιχνεύεται στα κύτταρα των αναπτυσσόμενων άκρων ταυτόχρονα με την πρόωμη έκφραση του *Dll* σε αυτά (PANGANIBAN *et al.* 1995). Όπως και στην περίπτωση της πρωτεΐνης *TcUbx*, οι πρωτεΐνες *Ubx* και *Abd-A* των καρκινοειδών δεν έχουν την ικανότητα να καταστέλλουν το γονίδιο *Dll*. Η διαφορά αυτή σε σχέση με την καταστολή του *Dll* από τις ορθόλογες πρωτεΐνες BX-C στη *Drosophila* μπορεί να είναι το αποτέλεσμα δύο εντελώς διαφορετικών τύπων αλλαγών κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των εντόμων (Εικόνα 33):

(α) Αλλαγή των *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών του γονιδίου *Dll*, όπως για παράδειγμα η απόκτηση θέσεων πρόσδεσης για τις πρωτεΐνες BX-C.

(β) Αλλαγή της κατασταλτικής ικανότητας των *trans*-δραστικών αναπτυξιακών παραγόντων *Ubx* και *Abd-A*. Η αλλαγή αυτού του είδους μπορεί να εντοπίζεται είτε στο μόριο καθεαυτής της πρωτεΐνης BX-C (όπως υποστηρίζουν οι μελέτες που περιγράφηκαν στην Ενότητα 4.7; Εικόνα 30), είτε σε ένα συμπαράγοντα απαραίτητο για την κατασταλτική λειτουργία της. Υπογραμμίζεται ότι οι δύο αυτοί τύποι εξελικτικών αλλαγών δεν είναι αμοιβαία αποκλειόμενοι και θα μπορούσαν κάλλιστα να έχουν σφυρηλατίσει από κοινού τη μορφολογία της κοιλίας των εντόμων.

ENTOMA	ΚΑΡΚΙΝΟΕΙΔΗ
Οι πρωτεΐνες Ubx και Abd-A καταστέλλουν την ανάπτυξη άκρων στα μεταμερή της κοιλίας των ενηλίκων	Τα γονίδια <i>Ubx</i> και <i>abd-A</i> εκφράζονται σε μεταμερή με καλά ανεπτυγμένα άκρα
	
Οι πρωτεΐνες Ubx και Abd-A καταστέλλουν άμεσα την έκφραση του <i>Distal-less</i> στα έμβρυα της <i>Drosophila</i>	Οι πρωτεΐνες Ubx και Abd-A δεν καταστέλλουν την έκφραση του <i>Distal-less</i>
	
Τα έμβρυα του <i>Tribolium</i> αναπτύσσουν παροδικά ένα ζεύγος ποδιών στο πρώτο μεταμερές της κοιλίας	
	
Η πρωτεΐνη Abd-A καταστέλλει την ανάπτυξη άκρων στην κοιλία, ενώ η Ubx όχι	
	

Εικόνα 33: Διαφορετικές ρυθμιστικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις πρωτεΐνες Ubx/Abd-A και το γονίδιο *Dll* μεταξύ *Drosophila*, *Tribolium* και καρκινοειδών. Οι πρωτεΐνες BX-C (κίτρινο χρώμα) εκφράζονται στα μεταμερή της κοιλίας των εντόμων και καταστέλλουν την ανάπτυξη άκρων στην κοιλία των ενηλίκων. Στη *Drosophila*, η καταστολή αυτή πραγματοποιείται στο εμβρυϊκό στάδιο μέσω καταστολής του πρώιμου ενισχυτή *Dll304*. Στο έμβρυο του *Tribolium*, αναπτύσσεται παροδικά ένα ζεύγος ποδιών (pleuropodia) στο πρώτο κοιλιακό μεταμερές, όπου τα γονίδια *Dll* (μαύρη χρώση) και *Ubx* συνεκφράζονται. Στα καρκινοειδή, οι πρωτεΐνες BX-C

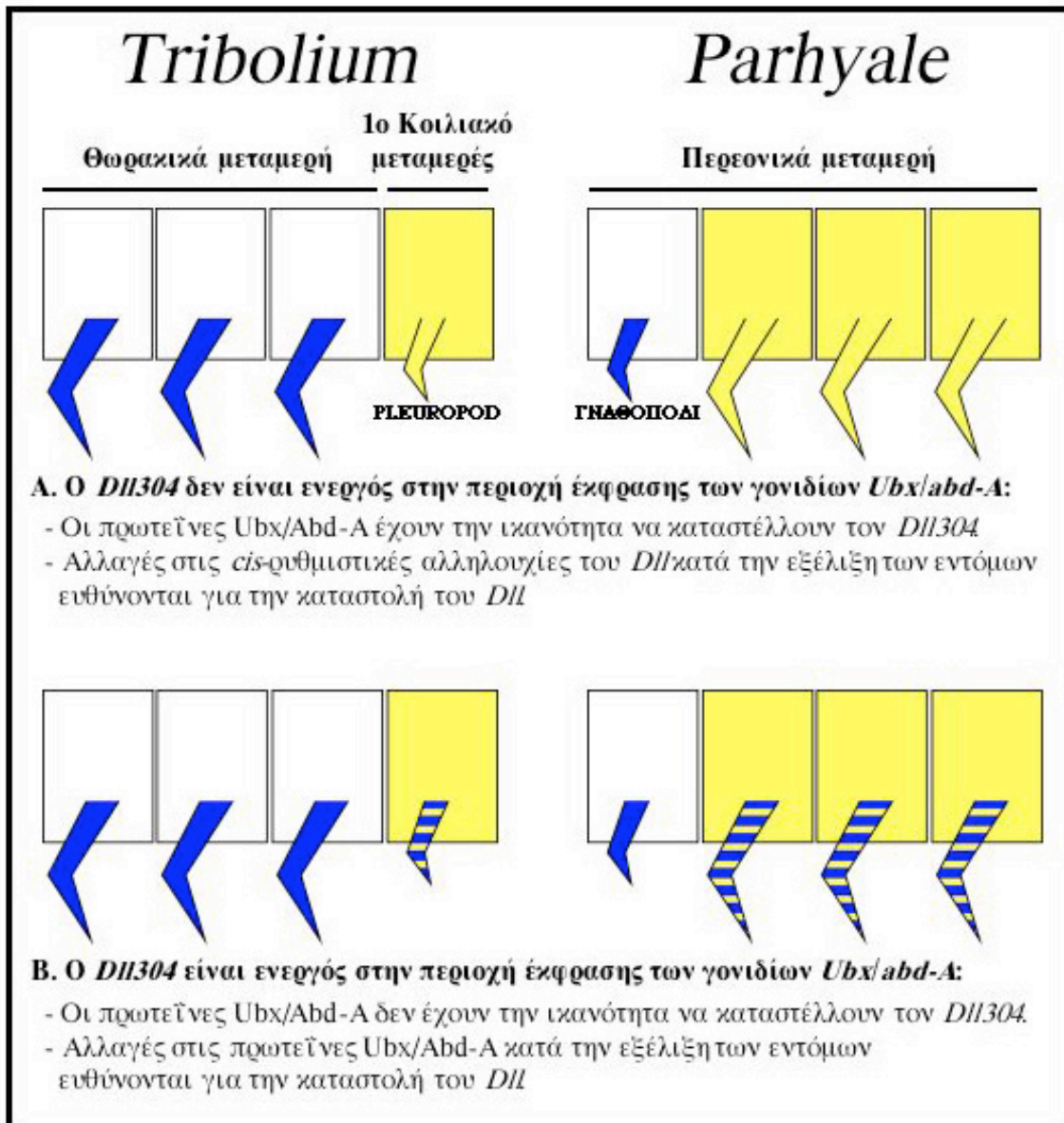
(κίτρινο χρώμα) εκφράζονται σε μεταμερή του κορμού με καλά ανεπτυγμένα άκρα. Σε αντίθεση με τα δροσοφιλικά ορθόλογά τους, οι πρωτεΐνες Ubx του *Tribolium* και Ubx/Abd-A των καρκινοειδών δεν μπορούν να καταστείλουν το γονίδιο *Dll*. Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται (α) στις *cis*-ρυθμιστικές αλληλουχίες του γονιδίου *Dll* (π.χ. απουσία θέσεων πρόσδεσης για τις πρωτεΐνες BX-C) ή/και (β) στις ιδιότητες των πρωτεϊνών BX-C.

Προκειμένου να διακριθούν οι δύο περιπτώσεις μεταξύ τους, κλωνοποιήσαμε τους ενισχυτές *Dll304* και *Dll215* μπροστά από γονίδια αναφοράς (reporter genes) και τους εισάγαμε με τη βοήθεια των φορέων μετασχηματισμού που περιγράφηκαν στο πρώτο μέρος στο γονιδίωμα του *Tribolium castaneum* και του *Parhyale hawaiiensis*. Σύμφωνα με αυτή την πειραματική προσέγγιση, ο χαρακτηρισμός της υπεύθυνης εξελικτικής αλλαγής βασιζόταν στη σύγκριση του χωροχρονικού προτύπου έκφρασης του γονιδίου αναφοράς (υπό τον έλεγχο των δροσοφιλικών ενισχυτών) με το πρότυπο έκφρασης των ενδογενών γονιδίων *BX-C* και *Dll* σε κάθε είδος (Εικόνα 34).

Στο κολεόπτερο *T. castaneum*, το κομβικό σημείο ήταν η έκφραση ή όχι του γονιδίου αναφοράς υπό τον έλεγχο του πρώιμου ενισχυτή *Dll304* στα αναπτυσσόμενα pleurorodia. Αν ο ενισχυτής *Dll304* ήταν ενεργός μόνο στα αναπτυσσόμενα άκρα του θώρακα (όπως συμβαίνει στη *Drosophila*), αλλά όχι στα pleurorodia, θα συμπεραίναμε ότι η πρωτεΐνη TcUbx έχει την ικανότητα να καταστέλλει τον ενισχυτή *Dll304*, όπως το δροσοφιλικό της ορθόλογο. Συνεπώς, αυτό που άλλαξε μετά το διαχωρισμό των διπτέρων από τα κολεόπτερα ήταν οι *cis*-ρυθμιστικές αλληλουχίες του γονιδίου *Dll*, οι οποίες έγιναν ευαίσθητες στη ρύθμιση από την πρωτεΐνη Ubx, μέσω της απόκτησης για παράδειγμα θέσεων πρόσδεσης για αυτή (Εικόνες 33 & 34, μοντέλο α). Αν αντίθετα, ο ενισχυτής *Dll304* ήταν ενεργός τόσο στα θωρακικά όσο και στα κοιλιακά άκρα (pleurorodia), θα συμπεραίναμε ότι η πρωτεΐνη TcUbx δεν έχει την ικανότητα να καταστέλλει τον ενισχυτή *Dll304* (σε αντίθεση με το δροσοφιλικό της ορθόλογο). Σε αυτή την περίπτωση, αυτό που άλλαξε μετά το διαχωρισμό των διπτέρων από τα κολεόπτερα ήταν κάποια ιδιότητα του *trans*-δραστικού παράγοντα Ubx (ή/και κάποιων συμπαράγοντων του), που του έδωσε την ικανότητα να καταστέλλει το γονίδιο *Dll* (Εικόνες 33 & 34; μοντέλο β).

Η υπόθεση εργασίας μας ήταν η ίδια και στην περίπτωση του αμφιπόδου *P. hawaiiensis*, με τη διαφορά ότι τροποποιούνταν τα αναμενόμενα πρότυπα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς υπό τον έλεγχο του ενισχυτή *Dll304*. Αν οι πρωτεΐνες Ubx και Abd-A του καρκινοειδούς ασκούν παρόμοια κατασταλτική δράση στο γονίδιο *Dll* όπως τα δροσοφιλικά τους ορθόλογα, θα αναμέναμε ο ενισχυτής *Dll304* να είναι ενεργός μόνο στο πρώτο περνεονικό μεταμερές και να καταστέλλεται σε όλα τα υπόλοιπα μεταμερή του κορμού (Εικόνες 33 & 34, μοντέλο α). Το πρώτο περνεονικό είναι το μοναδικό μεταμερές που στερείται της έκφρασης των πρωτεϊνών BX-C στα αμφιπόδα (AVEROF & PATEL 1997) και φέρει ένα ζεύγος γναθοποδίων. Το Ubx εκφράζεται στα επτά υπόλοιπα μεταμερή του πέρνεον και το *abd-A* στα έξι μεταμερή του πλέον (ABZHANOV & KAUFMAN 2000a). Αν όμως, σε αντίθεση με τα δροσοφιλικά τους ορθόλογα, οι πρωτεΐνες Ubx και Abd-A του *Parhyale* δεν έχουν την ικανότητα να καταστέλλουν το γονίδιο *Dll*, θα αναμέναμε ο ενισχυτής *Dll304* να είναι ενεργός σε όλα τα περνεονικά και πλεονικά άκρα (Εικόνες 33 & 34, μοντέλο β).

Απαραίτητη προϋπόθεση για τα πειράματα αυτά αποτελούσε βέβαια η διατήρηση της ενεργότητας του ενισχυτή *Dll304* στα είδη που μελετήθηκαν, ώστε να επιτυγχάνονταν η παρατήρηση της καταστολής του (ή μη) από τη δράση των Ubx και Abd-A. Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο όσιμος ενισχυτής *Dll215* ρυθμίζεται αυτοκαταλυτικά από την ίδια την πρωτεΐνη Dll στη *Drosophila*, υποθέσαμε ότι το γονίδιο αναφοράς υπό τον έλεγχό του θα ενεργοποιούνταν σε όλα τα αναπτυσσόμενα άκρα του σώματος του *Tribolium* και του *Parhyale*.

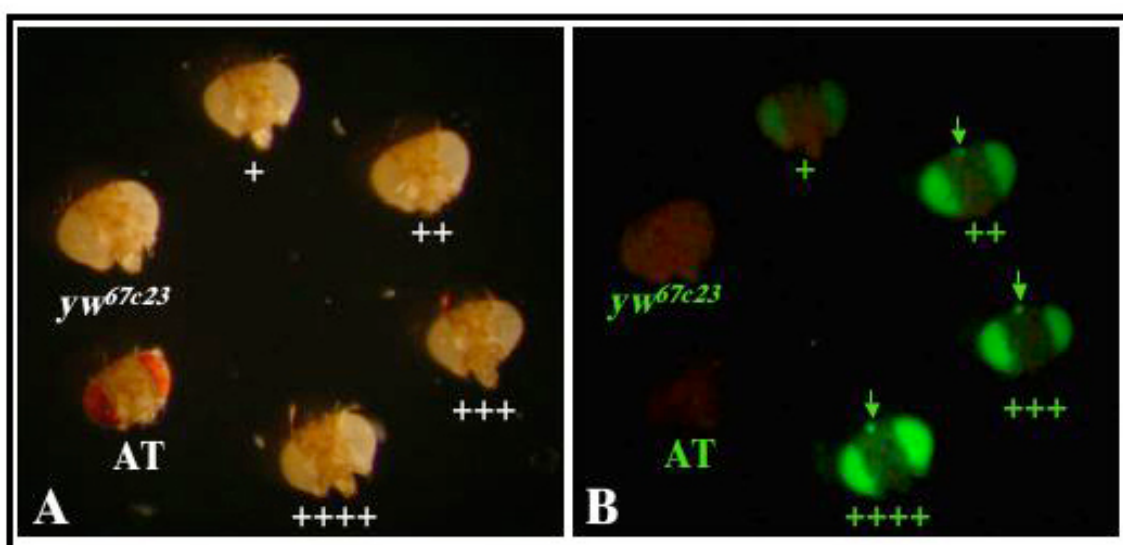


Εικόνα 34: Υποθετικά πρότυπα έκφρασης του διαγονιδίου *Dll304-reporter* (μπλε) σε σχέση με το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *Ubx/abd-A* (κίτρινο) στο *Tribolium* (αριστερά) και τον *Parhyale* (δεξιά), αν η διαφορά στη δράση τους σε σχέση με τα δροσοφιλικά ορθόλογα γονίδια οφείλεται (A) στις *cis*-ρυθμιστικές αλληλουχίες του γονιδίου *Dll* ή (B) στις ιδιότητες των πρωτεϊνών BX-C.

5.1.3. Έλεγχος των διαγονιδιακών κατασκευών στη *Drosophila*

Σε πρώτη φάση, για την ανίχνευση του προτύπου έκφρασης των ενισχυτών *Dll304* και *Dll215* χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο αναφοράς *lacZ*. Σε δύο ξεχωριστές κατασκευές οι δροσοφιλικοί ενισχυτές κλωνοποιήθηκαν άνωθεν μίας μεταγραφικής μονάδας, η οποία αποτελούνταν από το βασικό υποκινητή του γονιδίου *hsp43* της *D. melanogaster*, την 5' μη μεταγραφόμενη περιοχή και το κωδικόνιο έναρξης του γονιδίου *Adh* της *D. melanogaster*, την κωδική περιοχή του γονιδίου *lacZ* και την περιοχή πολυαδενυλίωσης *SV40*. Για την εισαγωγή τους στο γονιδίωμα των αρθροπόδων, οι κατασκευές αυτές κλωνοποιήθηκαν με τη σειρά τους σε φορείς μετασχηματισμού βασισμένους στα μεταθέσιμα γενετικά στοιχεία *Minos* (*Mi*) και *piggyBac* (*Bac*), που έφεραν το γονίδιο διάκρισης *3xP3-EGFP*.

Όλες οι διαγονιδιακές κατασκευές ελέγχθηκαν αρχικά για την ενεργότητα τους στη *Drosophila*, δεδομένου ότι σε αυτό τον οργανισμό ήταν ήδη γνωστό το πρότυπο έκφρασης των ενισχυτών *Dll304* και *Dll215*. Συνολικά μικροενέθηκαν 4 διαφορετικά πλασμίδια-δότες (οι δύο διαφορετικοί ενισχυτές στους δύο διαφορετικούς φορείς μετασχηματισμού) (Πίνακας 8) στο στέλεχος yw^{67c23} της *D. melanogaster* που στερείται οφθαλμικών χρωστικών και διευκολύνει την ανίχνευση διαγονιδιακών ατόμων. Για την κινητοποίηση και των δύο στοιχείων *Minos* και *piggyBac* χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια-βοηθοί που έφεραν την κωδική περιοχή της τρανσποζάσης κάθε στοιχείου υπό τον έλεγχο του δροσοφιλικού υποκινητή *hsp70*. Σε κάθε πείραμα, το πλασμίδιο-δότης και το πλασμίδιο-βοηθός μικροενέθηκαν σε συγκέντρωση 400 ng/μl και 100 ng/μl, αντίστοιχα. Όλοι οι ενεμένοι γονείς G_0 επαναδιασταυρώθηκαν μεμονωμένα με άτομα yw^{67c23} του αντίθετου φύλου και τα διαγονιδιακά άτομα επιλέχθηκαν μεταξύ των απογόνων τους βάση του φθορισμού τους στους σύνθετους και τους απλούς οφθαλμούς (Εικόνα 35).



Εικόνα 35: Διάκριση μεταξύ μετασχηματισμένων και μη μετασχηματισμένων ενηλίκων *Drosophila*. Εικονίζονται κεφαλές από ένα άτομο με χρώμα οφθαλμών αγρίου τύπου (AT, *Oregon-R*), από ένα άτομο στελέχους yw^{67c23} που στερείται οφθαλμικών χρωστικών και από μετασχηματισμένα άτομα ίδιου γονοτύπου yw^{67c23} με διαφορετικές εντάσεις του γονιδίου διάκρισης *3xP3-EGFP* (+ < ++ < +++ < ++++). Τα φυσιολογικά και μετασχηματισμένα άτομα yw^{67c23} , που στο ορατό φως φαίνονται πανομοιότυπα (A), διακρίνονται ξεκάθαρα μεταξύ τους στο φθορίζον στερεοσκόπιο (με οπτικά φίλτρα ανίχνευσης της EGFP) βάση του φθορισμού των σύνθετων και απλών οφθαλμών (βέλη) των διαγονιδιακών μόνο ατόμων (B).

Ανεξάρτητες διαγονιδιακές σειρές, που φέρουν το ίδιο διαγονίδιο σε διαφορετικές θέσεις στο γονιδίωμα, διαφέρουν συχνά ως προς τα επίπεδα ή ακόμα και το πρότυπο έκφρασης (στην περίπτωση παγίδευσης κάποιου ενδογενούς ενισχυτή) του διαγονιδίου. Για το λόγο αυτό, σε κάθε πείραμα μετασχηματισμού αναλύονται πάντα περισσότερες της μίας διαγονιδιακές σειρές, ώστε να επαληθευτεί η βιολογική δράση του διαγονιδίου που ελέγχεται.

Στην προκειμένη περίπτωση ελέγχθηκαν συνολικά 7 διαγονιδιακές σειρές που έφεραν το διαγονίδιο *Dll304-lacZ* και 9 σειρές που έφεραν το διαγονίδιο *Dll215-lacZ*. Από κάθε σειρά συλλέχθηκαν έμβρυα που αντιπροσώπευαν όλα τα στάδια της εμβρυογένεσης (0-24 hrs μετά την ωοαπόθεση) και αναλύθηκε ανοσοϊστοχημικά το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου αναφοράς *lacZ* υπό τον έλεγχο των δύο ενισχυτών (Εικόνες 31 & 36). Σε όλες τις σειρές παρατηρήθηκε το αναμενόμενο πρότυπο, ενώ σε λίγες από αυτές το γονίδιο αναφοράς εκφραζόταν

επιπρόσθετα και σε μη αναμενόμενους ιστούς, πιθανά λόγω παγίδευσης ενδογενών ενισχυτών. Ο πρώιμος ενισχυτής *Dll304* ενεργοποιείται όταν η βλαστική ζώνη είναι επιμηκυσμένη σε τρία ζεύγη κυτταρικών πληθυσμών στο θώρακα του εμβρύου. Η ενεργοποίηση γίνεται αποκλειστικά σε πεδία κυττάρων στα οποία απουσιάζει ο καταστολέας *Ubx* ή βρίσκεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα (οπίσθιο 2^ο και 3^ο θωρακικό μεταμερές). Καθώς αρχίζει προοδευτικά η σύμπτυξη της βλαστικής ζώνης, αυξάνονται τα κύτταρα που εκφράζεται το διαγονίδιο *Dll304-lacZ*. Παράλληλα, το πεδίο έκφρασης του *Ubx* επεκτείνεται στο 2^ο και 3^ο θωρακικό μεταμερές και επικαλύπτεται ολοένα και περισσότερο με τα πρόδρομα κύτταρα των ποδιών/οργάνων του Keilin. Σε αυτό το στάδιο 'σβήνει' η έκφραση του πρώιμου ενισχυτή *Dll304* και ενεργοποιείται ο όψιμος ενισχυτής *Dll215*. Η πρωτεΐνη β-γαλακτοσιδάση (β-gal) που παράγεται από το γονίδιο αναφοράς *lacZ* είναι αρκετά σταθερή και εξακολουθεί να ανιχνεύεται υπό τον έλεγχο του *Dll304*, παρόλο που ο τελευταίος δεν είναι πια ενεργός (σύγκριση με υβριδισμό *in situ* για ανίχνευση *lacZ*-mRNA (COHEN *et al.* 1993)). Αξίζει επίσης να σημειωθεί, ότι από το αρχικό πεδίο κυττάρων όπου ενεργοποιείται ο πρώιμος ενισχυτής, μόνο σε ένα υποσύνολο κυττάρων στο κέντρο του πεδίου ενεργοποιείται ο όψιμος ενισχυτής και συντηρείται η έκφραση του *Dll* (GOTO & HAYASHI 1997). Τα κύτταρα αυτά θα σχηματίσουν τα όργανα του Keilin και τις ακραίες (distal) δομές του ενήλικου ποδιού (COHEN 1993). Στα περιφερειακά κύτταρα κάθε πεδίου θα εκφραστεί το γονίδιο *escargot* (*esg*) και θα σχηματίσουν τελικά τις κοντινές στο σώμα (proximal) δομές του ποδιού (GOTO & HAYASHI 1997). Επιπλέον, ομάδες κυττάρων από το 2^ο και το 3^ο θωρακικό ζεύγος κυτταρικών συναθροισμών, που αρχικά εκφράζουν το διαγονίδιο *Dll304*, μεταναστεύουν προς τη ραχιαία πλευρά και θα σχηματίσουν τους αναπτυξιακούς δίσκους των φτερών και των αλτήρων (COHEN *et al.* 1993).

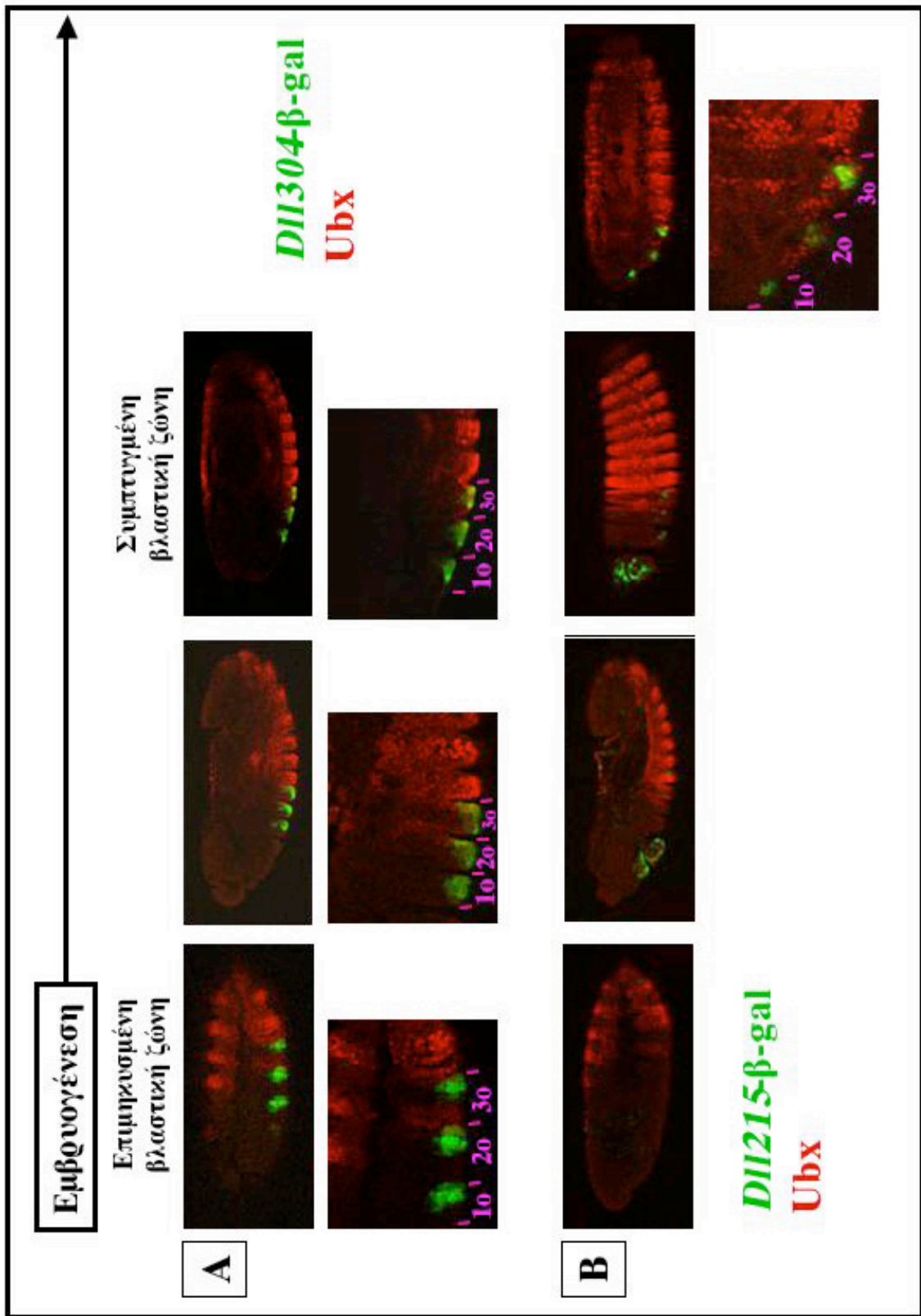
ΠΙΝΑΚΑΣ 8

Εισαγωγή των ενισχυτών *Dll304* και *Dll215* στο γονιδίωμα της *Drosophila*

Τρανσποζόνιο ^α	Αρ. ενεμένων εμβρύων	Αρ. γόνιμων ενήλικων G ₀	Αρ. G ₀ με διαγονιδιακούς απογόνους	Αρ. διαγονιδιακών σειρών ^β
<i>Bac</i> {3xP3-EGFP, <i>Dll304-lacZ</i> }	~ 200	25	6	6
<i>Mi</i> {3xP3-EGFP, <i>Dll304-lacZ</i> }	~ 100	17	1	1
<i>Bac</i> {3xP3-EGFP, <i>Dll215-lacZ</i> }	~ 200	27	5	6
<i>Mi</i> {3xP3-EGFP, <i>Dll215-lacZ</i> }	~ 100	11	1	3

^α Σε κάθε τρανσποζόνιο οι πρώτοι χαρακτήρες συμβολίζουν το μεταθετό στοιχείο (*Bac* για το *piggyBac* και *Mi* για το *Minos*), ενώ μέσα σε αγκύλες υποδεικνύονται τα διαγονίδια που εισάγονται στο γονιδίωμα. Όλα τα τρανσποζόνια περιέχουν το γονίδιο διάκρισης 3xP3-EGFP και το γονίδιο αναφοράς *lacZ* υπό τον έλεγχο είτε του *Dll304* είτε του *Dll215*.

^β Ορισμένοι γονείς έφεραν περισσότερες από μία ενθέσεις στη γαμετική τους σειρά που διαχωρίστηκαν στους απογόνους τους και αναλύθηκαν ως ξεχωριστές διαγονιδιακές σειρές.



Εικόνα 36: Σύγκριση με ανοσοφθορισμό του προτύπου έκφρασης των διαγονιδίων (A) *Dll304-lacZ* (πράσινο) και (B) *Dll215-lacZ* (πράσινο) με το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *Ubx* (κόκκινο) στη *Drosophila*. Κάτω από τις φωτογραφίες ολόκληρων των εμβρύων παρατίθενται μεγεθυμένα πλάνα των θωρακικών μεταμερών (αριθμούνται 1°, 2° και 3°), ώστε να διακριθεί ο συνεντοπισμός (κίτρινο) ή μη των πρωτεϊνών β-gal και *Ubx*. (A) Ο πρώιμος ενισχυτής *Dll304* ενεργοποιείται σε πεδία κυττάρων στα θωρακικά μεταμερή όπου απουσιάζει η πρωτεΐνη *Ubx*. Προοδευτικά το πεδίο έκφρασης του γονιδίου *Ubx* επεκτείνεται στο 2° και το 3° θωρακικό

μεταμερές και ανιχνεύεται στα πρόδρομα κύτταρα των άκρων (στις συγκεκριμένες τομές ο συνεντοπισμός είναι εμφανής στο 3^ο θωρακικό μεταμερές). Η πρωτεΐνη β-gal έχει μεγάλη σταθερότητα και συνεντοπίζεται με τη Ubx, παρόλο που ο ενισχυτής *Dll304* δεν είναι πια ενεργός. (B) Ο όψιμος ενισχυτής *Dll215* εκφράζεται σε ένα κεντρικό υποσύνολο των κυττάρων κάθε πεδίου, όπου πριν ήταν ενεργός ο *Dll304*, καθώς και στα αναπτυσσόμενα κεφαλικά εξαρτήματα. Στο 2^ο και το 3^ο θωρακικό μεταμερές, ο *Dll215* ενεργοποιείται και συντηρεί την έκφρασή του μέχρι το πέρας της εμβρυογένεσης παρουσία της πρωτεΐνης Ubx (ο συνεντοπισμός είναι εμφανής στο 3^ο). Οι φωτογραφίες είναι επιμήκεις τομές εμβρύων που τραβήχτηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού και είναι διατεταγμένες με το πρόσθιο άκρο αριστερά και την κοιλιακή επιφάνεια κάτω.

5.1.4. Έλεγχος της ενεργότητας των ενισχυτών *Dll304* και *Dll215* στο *Tribolium*

Μετά την επιβεβαίωση της λειτουργικότητας των διαγονιδιακών κατασκευών στη *Drosophila*, τα διαγονίδια *Dll304-lacZ* και *Dll215-lacZ* εισήχθησαν στο γονιδίωμα του *Tribolium*. Η ανάλυση αυτή προηγήθηκε χρονικά του μετασχηματισμού του *Tribolium* με το στοιχείο *Minos* και για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι κατασκευές που βασιζόνταν στο φορέα *piggyBac* (Πίνακας 9). Κάθε πλασμίδιο-δότης συν-ενέθηκε μαζί με το πλασμίδιο-βοηθό που παράγει την τρικοζίαση *piggyBac* υπό τον έλεγχο του δροσοφιλικού υποκινητή *hsp70* σε συγκεντρώσεις 500 ng/μl και 375 ng/μl, αντίστοιχα (Πίνακας 9). Οι μικροενέσεις πραγματοποιήθηκαν σε πρώιμα έμβρυα του μεταλλαγμένου στελέχους *pearl*, που στερείται οφθαλμικών χρωστικών και διευκολύνει την ανίχνευση των φθορίζοντων διαγονιδιακών σκαθαριών. Σε αυτή την περίπτωση, τα ενήλικα άτομα G₀ επαναδιασταυρώθηκαν κατά ομάδες με άτομα *pearl* αντίθετου φύλου, καθώς δε μας ενδιέφεραν τα ποσοστά μετασχηματισμού, αλλά η απόκτηση και η ανάλυση των διαγονιδιακών σειρών. Τα αρσενικά G₀ επαναδιασταυρώθηκαν σε ομάδες των δέκα ατόμων με τριάντα θηλυκά *pearl* και τα θηλυκά G₀ ανά δεκαπέντε με τριάντα αρσενικά *pearl*.

ΠΙΝΑΚΑΣ 9

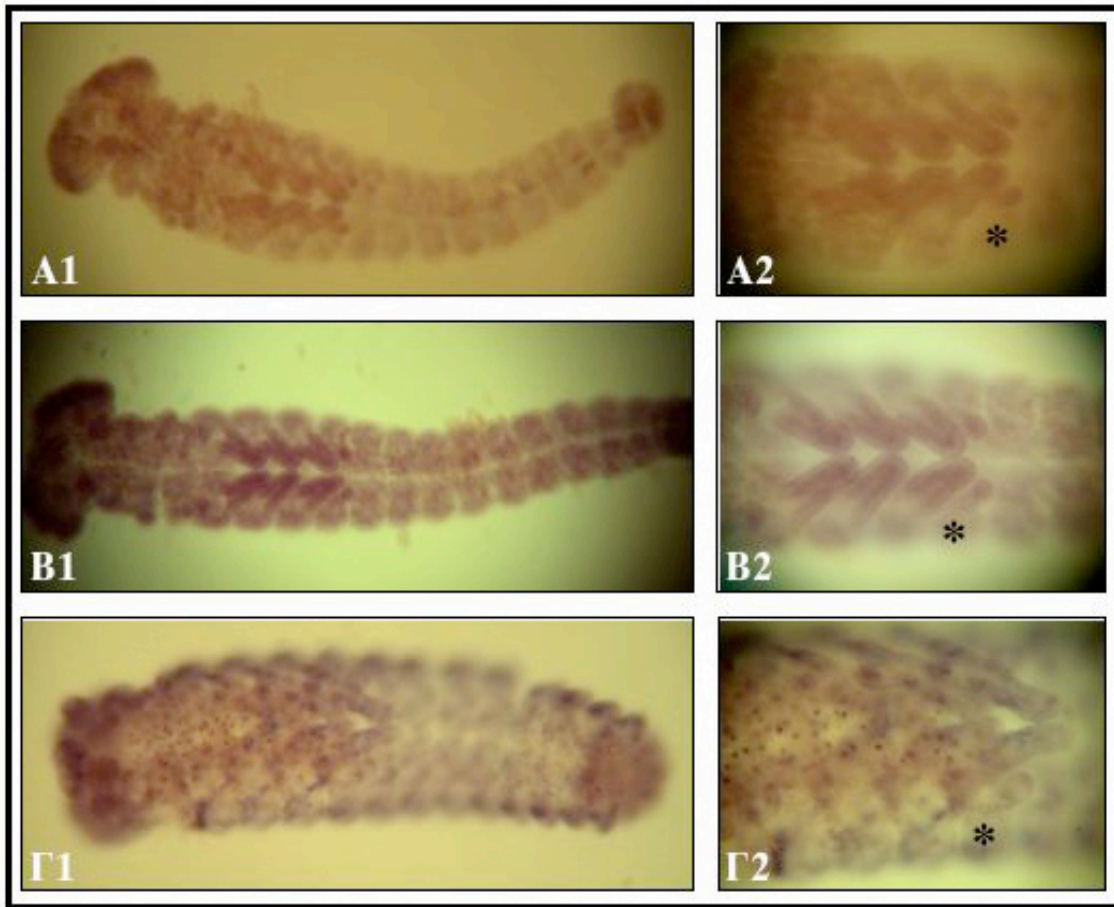
Εισαγωγή των ενισχυτών *Dll304* και *Dll215* στο γονιδίωμα του *Tribolium*

Τρικοζιόνια	Αρ. ενεμένων εμβρύων	Αρ. γόνιμων ενηλίκων G ₀	Αρ. διαγονιδιακών σειρών ^a
<i>Bac</i> {3xP3-EGFP, <i>Dll304-lacZ</i> }	~ 1300	164	9
<i>Bac</i> {3xP3-EGFP, <i>Dll215-lacZ</i> }	~ 1400	141	8
<i>Mi</i> {3xP3-EGFP, <i>Dll304-DsRed</i> }	~ 240	142	4
<i>Mi</i> {3xP3-EGFP, <i>Dll215-DsRed</i> }	~ 280	187	2

^a Από κάθε ομαδική διασταύρωση που έδωσε διαγονιδιακούς απογόνους επιλέχθηκε ένα μόνο μετασχηματισμένο άτομο G₁ για τη δημιουργία διαγονιδιακής σειράς.

Από 9 διαγονιδιακές σειρές που έφεραν το διαγονίδιο *Dll304-lacZ* και από 8 σειρές που έφεραν το διαγονίδιο *Dll215-lacZ* συλλέχθηκαν έμβρυα που κάλυπταν όλα τα στάδια της εμβρυογένεσης (0-60 ώρες μετά την ωοαπόθεση). Το πρότυπο του γονιδίου αναφοράς υπό τον έλεγχο των δύο ενισχυτών ελέγχθηκε ανοσοϊστοχημικά με τη χρήση αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης β-gal, καθώς και με υβριδισμό *in situ* με τη χρήση ριβοανιχνευτή συμπληρωματικού για το *lacZ*-mRNA. Κανένα από τα δύο διαγονίδια δεν ήταν ενεργό στο *Tribolium*, καθώς δεν ανιχνεύθηκε κάποιο σταθερά επαναλαμβανόμενο πρότυπο σε κανένα εμβρυικό

στάδιο. Λίγες μόνο σειρές επέδειξαν κάποια μοναδικά πρότυπα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς, τα οποία αποδόθηκαν σε παγίδευση ενδογενών ενισχυτών (Εικόνα 37).



Εικόνα 37: Πρότυπα υβριδισμών *in situ* με ριβοανιχνευτή συμπληρωματικό για *lacZ*-mRNA σε έμβρυα *Tribolium*. Στην αριστερή στήλη διακρίνονται ολόκληρα τα έμβρυα (κοιλιακές απόψεις, πρόσθιο άκρο αριστερά), ενώ στις μεγεθύνσεις τους της δεξιάς στήλης διακρίνονται τα τρία ζεύγη θωρακικών ποδιών και το πρώτο κοιλιακό μεταμερές (αστερίσκος), από το οποίο εκφύονται τα pleuropodia. **(A1-2)** Μη μετασηματισμένο έμβρυο *pearl*. Την ίδια έλλειψη χρώσης επέδειξε και η πλειοψηφία των διαγονιδιακών σειρών. **(B1-2)** Μετασηματισμένο έμβρυο με το διαγονίδιο *Dil304-lacZ*. Η ομοιόμορφη χρώση οφείλεται πιθανότατα σε παγίδευση κάποιου ενδογενή υποκινητή. **(Γ1-2)** Πιο όψιμο, σε σχέση με τα προηγούμενα, μετασηματισμένο έμβρυο με το διαγονίδιο *Dil215-lacZ*. Η χρώση εντοπίζεται πιθανότατα στα φαγοκύτταρα της λεκίθου και είναι αποτέλεσμα παγίδευσης κάποιου ενδογενούς υποκινητή.

Για να αποκλειστεί η πιθανότητα της έλλειψης ενεργότητας λόγω μη λειτουργικότητας του γονιδίου αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε (π.χ. ανεπάρκεια του βασικού υποκινητή *hsp43* ή ακαταλληλότητα του codon usage της κωδικής περιοχής του *lacZ* στο *Tribolium*), δοκιμάστηκε ένα δεύτερο γονίδιο αναφοράς. Ειδικότερα, οι ενισχυτές *Dil304* και *Dil215* κλωνοποιήθηκαν ξεχωριστά άνωθεν μίας μεταγραφικής μονάδας που περιελάμβανε το βασικό υποκινητή και την 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου *hsp70* της *D. melanogaster*, την κωδική περιοχή του γονιδίου *DsRedT1* και την περιοχή πολυαδενυλίωσης *SV40*. Αυτή η μεταγραφική μονάδα είναι αποδεδειγμένα λειτουργική στο *Tribolium* και σε άλλα αρθρόποδα (π.χ. *Drosophila*, *Parhyale*) υπό τον έλεγχο του τεχνητού ενισχυτή *3xP3* (βλέπε Αποτελέσματα 1^{ου} Μέρους). Τα διαγονίδια *Dil304-DsRed* και *Dil215-DsRed* εισήχθησαν στο γονιδίωμα μέσω του φορέα μετασηματισμού *Mi{3xP3-EGFP}*, που είχε στο μεσοδιάστημα δοκιμαστεί επιτυχώς στο μετασηματισμό του

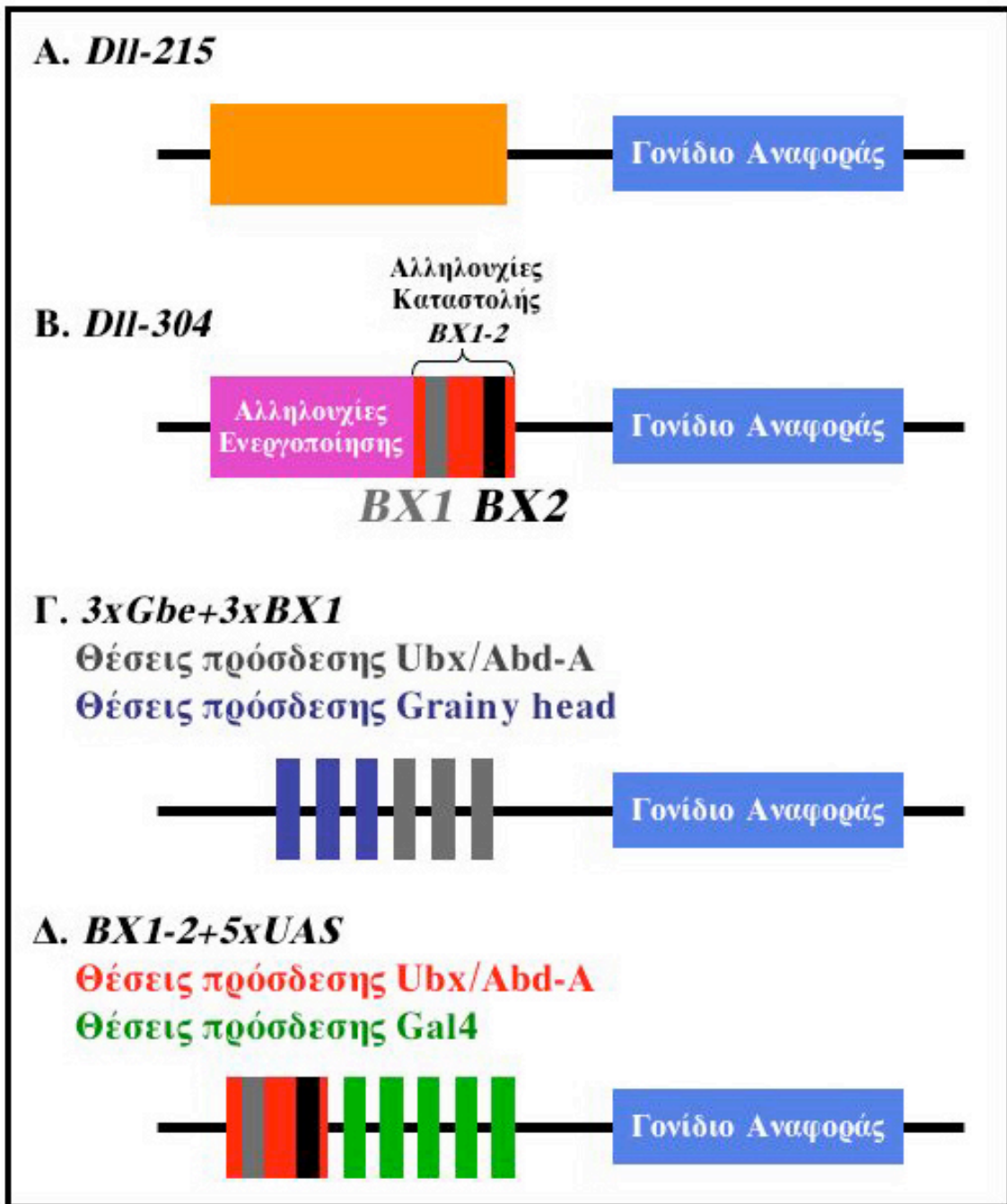
Tribolium. Κάθε πλασμίδιο-δότης συν-ενέθη με *in vitro* παρηγμένο capped mRNA που κωδικοποιούσε την τρικοζίαση *Minos* σε συγκεντρώσεις 500 ng/μl και 300 ng/μl, αντίστοιχα (Πίνακας 9). Και σε αυτή την περίπτωση μικροενέθηκαν πρώιμα έμβρυα του στελέχους *pearl* και τα ενήλικα G₀ επαναδιασταυρώθηκαν κατά ομάδες (6 αρσενικά G₀ με 18 θηλυκά *pearl* και 8 θηλυκά G₀ με 16 αρσενικά *pearl*).

Βάση του οφθαλμικού φθορισμού της EGFP αποκτήθηκαν 4 ανεξάρτητες σειρές με το διαγονίδιο *Dll304-DsRed* και 2 σειρές με το διαγονίδιο *Dll215-DsRed*. Από κάθε σειρά συλλέχθηκαν έμβρυα όλων των σταδίων και εξετάστηκαν για το πρότυπο φθορισμού του γονιδίου αναφοράς. Σε καμία σειρά και σε κανένα εμβρυϊκό στάδιο δεν ανιχνεύθηκε φθορισμός οφειλόμενος στη DsRedT1. Το συμπέρασμα που προέκυψε, σε συνδυασμό και με τα προηγούμενα πειράματα, ήταν ότι οι δροσοφιλικοί ενισχυτές *Dll304* και *Dll215* δεν είναι λειτουργικοί στο *Tribolium*.

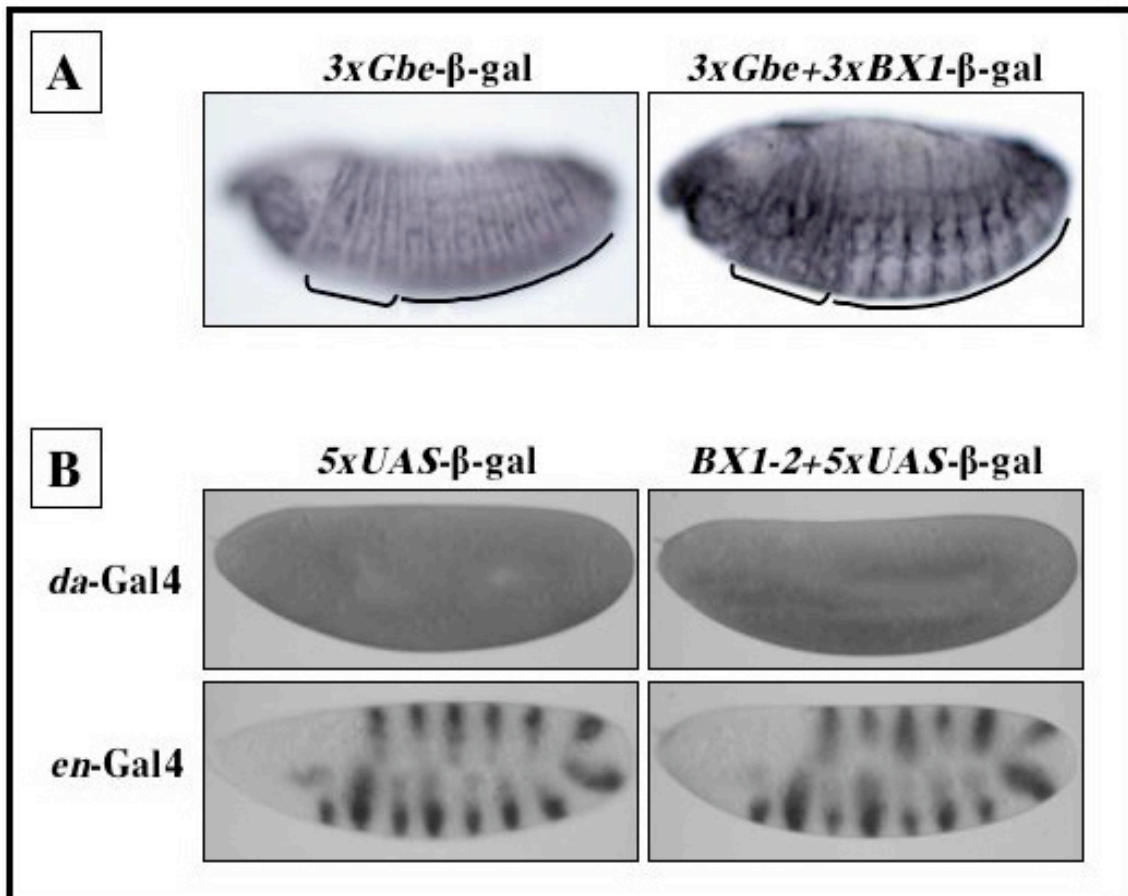
5.1.5. Έλεγχος της ενεργότητας τεχνητών ενισχυτών με θέσεις πρόσδεσης για τις πρωτεΐνες BX-C

Η έλλειψη ενεργότητας του ενισχυτή *Dll304* οφειλόταν προφανώς στην αδυναμία των αλληλουχιών του που μεσολαβούν την ενεργοποίησή του στη *Drosophila*, να συντηρούν τη δράση τους και στο *Tribolium*. Απουσία ενεργοποίησης δεν ήταν δυνατό να μελετηθεί η κατασταλτική ικανότητα της πρωτεΐνης TcUbx, που αποτέλεσε το ζητούμενο της παρούσας εργασίας. Δεδομένου ότι είναι διακριτές οι αλληλουχίες που ευθύνονται για την ενεργοποίηση (680 bp) και την καταστολή (200 bp) του πρώιμου ενισχυτή, δοκιμάστηκε ως εναλλακτική προσέγγιση η χρήση τεχνητών απλούστερων ενισχυτών, στους οποίους οι θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών BX-C συνδυάστηκαν με θέσεις πρόσδεσης για ένα μόνο ενεργοποιητή (Εικόνα 38Γ & Δ). Τα τελευταία 200 bp του *Dll304* (κατασταλτική περιοχή BX1-2) περιλαμβάνουν δύο θέσεις πρόσδεσης για τις πρωτεΐνες Ubx/Abd-A, γνωστές ως BX1 και BX2 (VACHON *et al.* 1992) (Εικόνα 38B). Η καταστολή του *Dll* στα μεταμερή της κοιλίας στη *Drosophila* οφείλεται κυρίως στην αλληλουχία BX1.

Ο πρώτος τεχνητός ενισχυτής που χρησιμοποιήθηκε ήταν δώρο του Robert White και περιελάμβανε τρία αντίτυπα ενός ολιγονουκλεοτιδίου 21 bp με θέσεις πρόσδεσης για το μεταγραφικό ενεργοποιητή Grainy head (*3xGbe*) της *Drosophila* (UV *et al.* 1997; WHITE *et al.* 2000b). Ο ενισχυτής αυτός, όταν κλωνοποιηθεί μπροστά από το βασικό υποκινητή και την 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου *hsp70* της *D. melanogaster*, την κωδική περιοχή του γονιδίου αναφοράς *lacZ* και την περιοχή πολυαδενυλίωσης του γονιδίου *hsp70* της *D. melanogaster* (*3xGbe-lacZ*), επιφέρει μία σχετικά ομοιόμορφη έκφραση της πρωτεΐνης β-gal στην επιδερμίδα, σε διαγονιδιακά έμβρυα *Drosophila* (Εικόνα 39A). Αν σε αυτή την κατασκευή προστεθούν τρία αντίτυπα της αλληλουχίας BX1 (*3xGbe +3xBX1-lacZ*) (Εικόνα 38Γ), παρατηρείται μία μικρή, αλλά αισθητή μείωση της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς *lacZ* στα μεταμερή της κοιλίας διαγονιδιακών εμβρύων (WHITE *et al.* 2000b) (Εικόνα 39A).



Εικόνα 38: Φυσικοί και τεχνητοί ενισχυτές που η ενεργότητά τους ελέγχθηκε με τη βοήθεια γονιδίων αναφοράς σε *Drosophila*, *Tribolium* ή/και *Parhyale*.



Εικόνα 39: Πρότυπο έκφρασης των τεχνητών ενισχυτών στη *Drosophila*. **(Α)** Το διαγονίδιο *3xGbe-lacZ* εκφράζεται ομοιόμορφα σε όλα τα μεταμερή του εμβρύου, κεφαλικά, θωρακικά (αγκύλη) και κοιλιακά (καμπύλη γραμμή). Αντίθετα, το διαγονίδιο *3xGbe+3xBX1-lacZ* καταστέλλεται μερικώς στα μεταμερή της κοιλίας, όπου εκφράζονται οι πρωτεΐνες *Ubx/Abd-A*. **(Β)** Στελέχη που έφεραν είτε το διαγονίδιο *5xUAS-lacZ* (αριστερή στήλη) είτε το διαγονίδιο *BX1-2+5xUAS-lacZ* (δεξιά στήλη) διασταυρώθηκαν με στελέχη που παράγουν τον ενεργοποιητή Gal4 είτε στο πρότυπο του γονιδίου *daughterless* (ομοιόμορφη έκφραση, πρώτη σειρά *da-Gal4*) είτε στο πρότυπο του γονιδίου *engrailed* (λωρίδες κυττάρων στο οπίσθιο διαμέρισμα κάθε μεταμερούς, δεύτερη σειρά *en-Gal4*). Η πρωτεΐνη β-gal ανιχνεύθηκε ιστοχημικά (χρώση X-gal) σε έμβρυα των παραπάνω διασταυρώσεων και δε φάνερωσε κάποια διαφορά στο πρότυπο έκφρασης των δύο διαγονιδίων.

Η ικανότητα της αλληλουχίας *BX1* να ρυθμίζεται από τους καταστολείς *Ubx* και *Abd-A* της *Drosophila* ακόμη και στα πλαίσια ενός ετερόλογου ενισχυτή, σε συνδυασμό με τη συντήρηση του γονιδίου *grainy head*, μας ώθησε να εισάγουμε το διαγονίδιο *3xGbe +3xBX1-lacZ* (και το *3xGbe-lacZ* ως control) στο γονιδίωμα του *Tribolium*, ώστε να μελετήσουμε την κατασταλτική ικανότητα της πρωτεΐνης *TcUbx*. Το καθένα διαγονίδιο κλωνοποιήθηκε στο φορέα μετασχηματισμού *Mi{3xP3-EGFP}* και συν-ενέθηκε ξεχωριστά μαζί με το βοηθό-mRNA σε πρόωμα έμβρυα *pearl* σε συγκέντρώσεις 500 ng/μl και 300 ng/μl, αντίστοιχα (Πίνακας 10). Τα αρσενικά G_0 επαναδιασταυρώθηκαν κατά ομάδες των πέντε ατόμων με δεκαπέντε θηλυκά *pearl* και τα θηλυκά G_0 ανά δέκα με είκοσι αρσενικά *pearl*.

ΠΙΝΑΚΑΣ 10

Εισαγωγή τεχνητών ενισχυτών στο γονιδίωμα του *Tribolium*

Τρανσποζόνια	Αρ. ενεμένων εμβρύων	Αρ. γόνιμων ενήλικων G ₀	Αρ. διαγονιδιακών σειρών ^a
<i>Mi{3xP3-EGFP, 3xGbe-lacZ}</i>	~ 400	158	2
<i>Mi{3xP3-EGFP, 3xGbe+3xBX1-lacZ}</i>	~ 400	161	2

^a Από κάθε ομαδική διασταύρωση που έδωσε διαγονιδιακούς απογόνους επιλέχθηκε ένα μόνο μετασηματισμένο άτομο G₁ για τη δημιουργία διαγονιδιακής σειράς.

Από τις 2 διαγονιδιακές σειρές που έφεραν το διαγονίδιο *3xGbe-lacZ* και τις 2 σειρές που έφεραν το διαγονίδιο *3xGbe+3xBX1-lacZ* συλλέχθηκαν έμβρυα όλων των σταδίων της εμβρυογένεσης και ελέγχθηκαν ανοσοϊστοχημικά για το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου αναφοράς με τη χρήση τόσο αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης β-gal, όσο και ριβοανιχνευτή συμπληρωματικού για το lacZ-mRNA. Όπως και οι φυσικοί δροσοφιλικόι ενισχυτές που περιγράφηκαν νωρίτερα, έτσι και οι τεχνητοί ενισχυτές δεν ήταν ενεργοί στο *Tribolium*, καθώς δεν ανιχνεύθηκε κάποιο πρότυπο του γονιδίου αναφοράς σε οποιοδήποτε εμβρυϊκό στάδιο.

Ως μία ύστατη προσπάθεια κατασκευής ενός τεχνητού ενισχυτή που να ενεργοποιείται αφενός σε ένα ευρύ φάσμα αρθροπόδων, αφετέρου να είναι ευαίσθητος στις πρωτεΐνες BX-C, η αλληλουχία *BX1-2* του *Dll304* (που περιλαμβάνει και τις δύο γνωστές θέσεις πρόσδεσης για Ubx/Abd-A) συνδυάστηκε με 5 θέσεις πρόσδεσης (*5xUAS*) του μεταγραφικού παράγοντα του ζυμομύκητα Gal4 (Εικόνα 38Δ). Υπενθυμίζεται ότι το ετερόλογο σύστημα *UAS/Gal4* χρησιμοποιείται ευρύτατα στη *Drosophila* για την εκτοπική έκφραση γονιδίων σε συγκεκριμένο χωροχρονικό πρότυπο. Το διαγονίδιο *5xUAS-lacZ*, που περιελάμβανε κατά σειρά τον τεχνητό ενισχυτή *5xUAS*, το βασικό υποκινητή και την 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου *hsp70* της *D. melanogaster*, την κωδική περιοχή του γονιδίου αναφοράς *lacZ* και την περιοχή πολυαδενυλίωσης SV40, εκφραζόταν σε όλα τα κύτταρα των εμβρύων *Drosophila*, όπου παραγόταν ο ενεργοποιητής Gal4 (Εικόνα 39B). Στην παραπάνω κατασκευή συμπεριλήφθηκε (άνωθεν της *5xUAS*) η αλληλουχία *BX1-2* (Εικόνα 38Δ), και το διαγονίδιο *BX1-2+5xUAS-lacZ* εισήχθηκε με το φορέα μετασηματισμού *Mi{3xP3-EGFP}* στο γονιδίωμα του στελέχους *yw^{67c23}* της *D. melanogaster*. Οι 4 διαγονιδιακές σειρές που αποκτήθηκαν διασταυρώθηκαν ξεχωριστά με στελέχη που εξέφραζαν τον ενεργοποιητή Gal4 σε όλα τα μεταμερή κατά μήκος του προσθιοπίσθιου άξονα (*daughterless-Gal4*, *engrailed-Gal4*). Το ζητούμενο ήταν να καταστέλλεται η έκφραση του γονιδίου αναφοράς *lacZ* μόνο στα μεταμερή της κοιλίας (abdomen), όπου παράγονται οι πρωτεΐνες BX-C, όχι όμως στα πιο πρόσθια μεταμερή του εμβρύου. Το πρότυπο αυτό δεν ανιχνεύθηκε σε καμία διασταύρωση, αντίθετα το διαγονίδιο *BX1-2+5xUAS-lacZ* είχε το ίδιο ακριβώς πρότυπο έκφρασης με το διαγονίδιο *5xUAS-lacZ* (Εικόνα 39B). Κατά συνέπεια ο τεχνητός ενισχυτής *BX1-2+5xUAS* δε δοκιμάστηκε σε κάποιο άλλο αρθρόποδο.

5.1.6. Έλεγχος της ενεργότητας των ενισχυτών *Dll304* και *Dll215* στον *Parhyale*

Ένα από τα πλεονεκτήματα του *Parhyale*, όπως αναλύθηκε στο πρώτο μέρος και θα φανεί ξανά και στην επόμενη ενότητα, είναι ότι επιτρέπει τη γρήγορη αξιολόγηση της ενεργότητας των διαγονιδίων στα ίδια τα ενεμένα άτομα G_0 . Μικροενιόντας τα πλασμίδια-δότες με το βοηθό-mRNA σε πρώιμα έμβρυα επιτυγχάνεται σε αρκετά άτομα ο μετασχηματισμός των σωματικών τους κυττάρων και η ανίχνευση του προτύπου έκφρασης των διαγονιδίων. Τα διαγονίδια *Dll304-DsRed* και *Dll215-DsRed* που δοκιμάστηκαν στο *Tribolium* εισήχθησαν και στο γονιδίωμα του *Parhyale* μέσω του φορέα μετασχηματισμού *Mi{3xP3-DsRed}*. Κάθε πλασμίδιο-δότης μικροενέθηκε με το βοηθό-mRNA σε έμβρυα ενός ή δύο κυττάρων σε συγκεντρώσεις 500 ng/μl και 300 ng/μl, αντίστοιχα (Πίνακας 11).

ΠΙΝΑΚΑΣ 11
Εισαγωγή των ενισχυτών *Dll304* και *Dll215* στο γονιδίωμα του *Parhyale*

Τρανσποζόνια	Αρ. ενεμένων εμβρύων	Αρ. εμβρύων που εκκολάφθηκαν	Αρ. φθοριζόντων εμβρύων ^α
<i>Mi{3xP3-DsRed, Dll304-DsRed}</i>	127	23	6
<i>Mi{3xP3-DsRed, Dll215-DsRed}</i>	40	6	3

^α Έμβρυα με μονόπλευρο ή αμφίπλευρο φθορισμό οφειλόμενο στο γονίδιο διάκρισης *3xP3-DsRed*.

Όλα τα ενεμένα έμβρυα ελέγχθηκαν συστηματικά καθόλη τη διάρκεια της εμβρυογένεσης για τον εντοπισμό φθορισμού της *DsRedT1*. Αρκετά άτομα G_0 επέδειξαν τις τελευταίες μέρες της εμβρυογένεσης το χαρακτηριστικό μονόπλευρο ή αμφίπλευρο φθορισμό που οφείλεται στην έκφραση του γονιδίου διάκρισης *3xP3-DsRed*, ένδειξη του μετασχηματισμού της σωματικής τους σειράς (Πίνακας 11). Εντούτοις, ούτε σε αυτά τα άτομα ούτε και στα μη φθορίζοντα ανιχνεύθηκαν άλλες εστίες φθορισμού, που θα μπορούσαν να αποδοθούν στην ενεργότητα των διαγονιδίων *Dll304-DsRed* και *Dll215-DsRed*. Αν και δεν μπορεί κανείς να είναι κατηγορηματικός, καθώς δεν αναλύθηκαν διαγονιδιακά άτομα G_1 , φαίνεται ότι οι δροσοφιλικοί ενισχυτές δεν είναι ενεργοί ούτε στο αμφίποδο.

5.2. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.2.1. Συμπεράσματα από τη συγκριτική μελέτη της ενεργότητας των *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών

Ο έλεγχος των *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών του γονιδίου *Dll* της *Drosophila*, αποτέλεσε την πρώτη εφαρμογή της διαγονιδιακής τεχνολογίας που αναπτύχθηκε στα μη-μοντέλα αρθρόποδα *Tribolium castaneum* και *Parhyale hawaiiensis*. Η πραγματοποίηση μίας τέτοιας συγκριτικής ανάλυσης, που μέχρι πρόσφατα φάνταζε αδύνατη, είναι πλέον εφικτή χάρη στην ανάπτυξη γενετικών εργαλείων με ευρύ πεδίο χρήσης. Η ιδιότητα των στοιχείων *Minos* και *piggyBac* να μετατίθενται σε ένα ευρύ φάσμα ξενιστών και η ικανότητά τους να μεταφέρουν τμήματα DNA μεγάλου μεγέθους (με γονίδια διάκρισης και γονίδια αναφοράς) χωρίς να μειώνονται σημαντικά τα ποσοστά μετασηματισμού, προσέφεραν το τεχνολογικό υπόβαθρο της παρούσας εργασίας.

Η σύγκριση *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών μεταξύ διαφορετικών κλάσεων αρθροπόδων δεν έχει αναφερθεί στο παρελθόν. Επιπλέον, είναι η πρώτη φορά που οι ρυθμιστικές αλληλουχίες προέρχονταν από το έντομο-μοντέλο *D. melanogaster* και δοκιμάστηκαν σε μη-μοντέλα αρθρόποδα. Σε όλες τις ανάλυτες λειτουργικές συγκρίσεις που είχαν προηγηθεί, αποτελούσε μονόδρομο η αντίστροφη στρατηγική του ελέγχου αλληλουχιών άλλων εντόμων στη *Drosophila* (ARNOSTI 2003). Βασική προϋπόθεση της πειραματικής μου προσέγγισης ήταν, οι ενισχυτές *Dll304* και *Dll215* να διατηρούν την ενεργότητά τους στα εξελικτικά απομακρυσμένα είδη που δοκιμάστηκαν. Η συντήρηση του ρόλου και του προτύπου έκφρασης του γονιδίου *Dll* στα αρθρόποδα (PANGANIBAN *et al.* 1994; PANGANIBAN *et al.* 1995; BEERMANN *et al.* 2001), καθώς και η συντήρηση των ρυθμιστικών μηχανισμών που ελέγχουν την έκφρασή του (JOCKUSCH *et al.* 2000; NAGY & CARROLL 1994), δημιουρούσαν αρκετές προσδοκίες ότι η παραπάνω προϋπόθεση θα πληρούνταν. Δυστυχώς, οι προσδοκίες αυτές δεν επαληθεύτηκαν.

Ωστόσο, σε κάποιες άλλες περιπτώσεις μοιάζει να έχει συντηρηθεί σε μεγάλο βαθμό η δράση *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων, ακόμη και σε εξελικτικές αποστάσεις που προσεγγίζουν ή και ξεπερνούν ακόμη το διαχωρισμό της *Drosophila* από το *Tribolium* (>250 Myr) και τον *Parhyale* (>400 Myr). Για παράδειγμα, διατηρούν την ενεργότητά τους στο ποντίκι ο πρώιμος ενισχυτής του γονιδίου *Hoxc8* των ψαριών (απέκλιναν πριν >450 Myr; ANAND *et al.* 2003), ρυθμιστικά στοιχεία των γονιδίων *Hox1-3* του αμφιόξου (απέκλιναν πριν >500 Myr; MANZANARES *et al.* 2000), ακόμη και ένας ενισχυτής του γονιδίου *rx6/eyeless* της *Drosophila* (απέκλιναν πριν >700 Myr; XU *et al.* 1999). Συμπερασματικά, η ενεργότητα μίας ρυθμιστικής περιοχής μεταξύ λιγότερο ή περισσότερο απομακρυσμένων ειδών, μπορεί να επιβεβαιωθεί μόνο ύστερα από τον έλεγχό της με τη βοήθεια γονιδίων αναφοράς.

5.2.2. Ανατομία της εξέλιξης του εξάποδου θώρακα των εντόμων

Ο Edward B. Lewis στη μνημειώδη εργασία του όπου συμπύκνωνε τα αποτελέσματα τριών δεκαετιών γενετικής ανάλυσης του συμπλόκου *Bithorax* (BX-C) της *Drosophila*, έγραφε στην εισαγωγική παράγραφο (LEWIS 1978):
'...Flies almost certainly evolved from insects with four wings instead of two and insects are believed to have come from arthropod forms with many legs instead of six. During the evolution of the fly, two major groups of genes must have evolved: leg-suppressing genes which removed legs from abdominal segments of milliped-like ancestors followed by haltere-promoting genes which suppressed the second pair of wings of four-winged ancestors...'

Σήμερα γνωρίζουμε με βεβαιότητα ότι τα επωνομαζόμενα ‘leg-suppressing genes’ είναι τα *Ubx* και *abd-A*, τα οποία εκπληρώνουν το ρόλο τους καταστέλλοντας (μεταξύ άλλων) το γονίδιο *Dll* (VACHON *et al.* 1992). Τα γονίδια αυτά δε δημιουργήθηκαν ειδικά κατά την εξέλιξη των διπτέρων, όπως πίστευε ο Lewis, αλλά προϋπήρχαν και απέκτησαν προοδευτικά την κατασταλτική τους ιδιότητα. Οι πρόσφατες φυλογενετικές μελέτες συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι τα έντομα και τα καρκινοειδή είναι αδελφικές ομάδες (sister taxa) μονοφυλετικής προέλευσης (Panarthropoda) και ότι τα έντομα προήλθαν από ένα προγονικό καρκινοειδές, που πιθανότατα έφερε πόδια σε όλα τα μεταμερή του κορμού του (BOORE *et al.* 1998; COOK *et al.* 2001; DELSUC *et al.* 2003; FRIEDRICH & TAUTZ 1995). Επιπλέον, είμαστε σε θέση να εικάζουμε με σχετική ακρίβεια αρκετά από τα εξελικτικά βήματα που μεσολάβησαν ανάμεσα στον εξάποδο θώρακα των εντόμων και τον ‘μυριάποδο’ κορμό του προγόνου τους. Σε πρώτη φάση, αλλαγές στη ρύθμιση των γονιδίων *Ubx* και *abd-A* περιόρισαν την έκφρασή τους στον οπίσθιο κορμό, δηλαδή στην κοιλία (AVEROF & AKAM 1995). Σε δεύτερη φάση, η τροποποίηση των ρυθμιστικών σχέσεων ανάμεσα στις πρωτεΐνες *Ubx/Abd-A* και στα γονίδια-στόχους τους (π.χ. *Dll*) οδήγησε στην καταστολή της ανάπτυξης άκρων στην κοιλία. Η τροποποίηση αυτή στηρίχτηκε πιθανότατα σε αλλαγές των κωδικών περιοχών των γονιδίων *Ubx* και *abd-A*, των *cis*-ρυθμιστικών ή/και κωδικών περιοχών κάποιων συμπαραγόντων τους και των *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών ή/και κωδικών περιοχών των γονιδίων-στόχων τους (CARROLL *et al.* 2001; GALANT & CARROLL 2002; PALOPOLI & PATEL 1998; RONSHAUGEN *et al.* 2002).

Γίνεται αντιληπτό, ότι η μελέτη της εξέλιξης ενός μορφολογικού χαρακτήρα (του αριθμού των ποδιών) περιλαμβάνει την ανάλυση του ρόλου των εμπλεκόμενων γονιδίων (*Ubx*, *abd-A*, *Dll*) σε πολλά διαφορετικά επίπεδα. Το πρώτο συνήθως επίπεδο είναι η ανάλυση του προτύπου έκφρασης των γονιδίων σε διαφορετικές ομάδες αρθροπόδων (έντομα, καρκινοειδή), οι οποίες επιδεικνύουν διαφορετικές εκδοχές του εξελισσόμενου χαρακτήρα. Σε δεύτερο επίπεδο, έπεται η λειτουργική ανάλυση των κωδικών και *cis*-ρυθμιστικών περιοχών των γονιδίων. Η βιοχημική δράση κάθε πρωτεΐνης μπορεί να ελεγχθεί είτε *in vitro* είτε *in vivo* και να συγκριθεί με τις αντίστοιχες επιδόσεις των ορθόλογων πρωτεϊνών της. Οι *in vivo* λειτουργικές συγκρίσεις αυτού του είδους ήταν εφικτές μέχρι πρόσφατα μόνο στον οργανισμό-μοντέλο *D. melanogaster*, εγείροντας όπως είδαμε κάποια ερωτηματικά σχετικά με τα συμπεράσματά τους. Πως μπορεί κανείς για παράδειγμα να ερμηνεύσει με ασφάλεια τα αποτελέσματα της εκτοπικής έκφρασης ενός γονιδίου καρκινοειδούς στη *Drosophila*, τη στιγμή που γνωρίζουμε ότι συμπαραγόντες που είναι απαραίτητοι για τη δράση αυτών των γονιδίων απέκλιναν στα είδη αυτά πριν από 400 Myr; Η λειτουργική ανάλυση δυσχεραίνεται ακόμη περισσότερο στην περίπτωση των *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών των γονιδίων, οι οποίες εξελίσσονται με ταχύτερους ρυθμούς σε σχέση με τις κωδικές αλληλουχίες (βλέπε παρακάτω).

Για να ξεπεραστούν οι ενδογενείς αδυναμίες παρόμοιων λειτουργικών μελετών, ακολουθήσαμε τη διαφορετική προσέγγιση που περιγράφηκε. Βασική φιλοδοξία αυτής της προσέγγισης ήταν ότι θα επέτρεπε την αξιολόγηση της κατασταλτικής ικανότητας των πρωτεϊνών *Ubx* και *Abd-A* του *Tribolium* και του *Parhyale* στο δικό τους κυτταρικό περιβάλλον. Η επίτευξη αυτού του στόχου δεν κατέστη δυνατή επί της ουσίας, επειδή όλοι οι ενισχυτές του γονιδίου *Dll* της *Drosophila* που δοκιμάστηκαν, φυσικοί και τεχνητοί, δε διατηρούσαν την ενεργότητά τους σε εξελικτικά απομακρυσμένους οργανισμούς. Έχοντας όμως αναπτύξει τη μεθοδολογία για το γενετικό μετασχηματισμό του *Tribolium* και του *Parhyale*, είναι πια εφικτή η ανάλυση με τη βοήθεια γονιδίων αναφοράς των *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών του γονιδίου *Dll* στα δύο αυτά είδη.

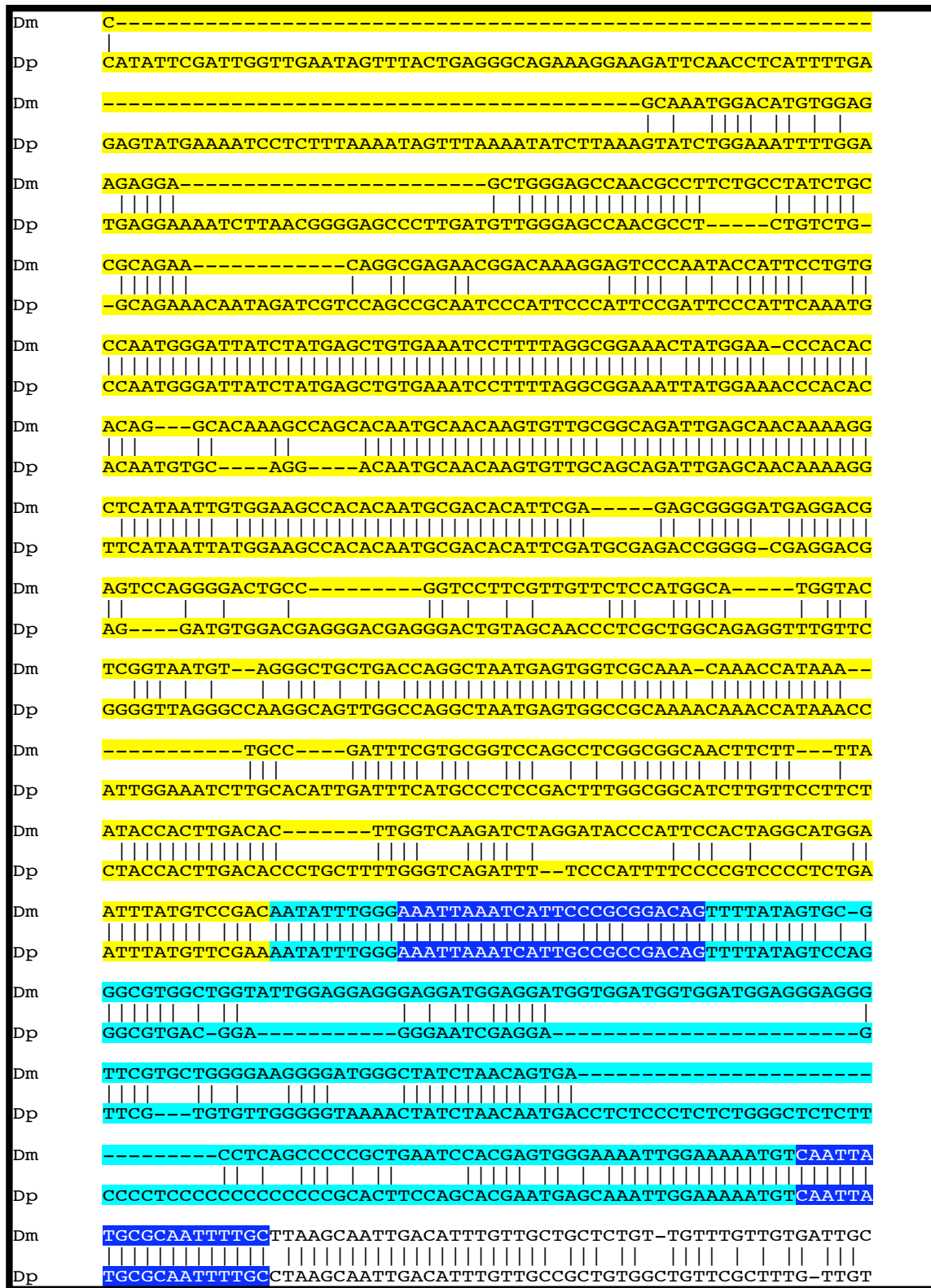
5.2.3. Εξέλιξη σε επίπεδο *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών

Η αλλαγή των *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών των αναπτυξιακών γονιδίων ευθύνεται πιθανότατα για το μεγαλύτερο μέρος της μορφολογικής διαφοροποίησης που παρατηρείται σε όλο το φάσμα της εξέλιξης, από την ποικιλομορφία μέσα σε ένα πληθυσμό (μικροεξέλιξη) μέχρι τις εκτεταμένες διαφορές των σωματοδομών μεταξύ ανώτερων ταξινομικών ομάδων (μακροεξέλιξη). Η ιδιότητα του ρυθμιστικού DNA (*cis*-ρυθμιστικές αλληλουχίες) να εξελίσσεται με ταχύτερους ρυθμούς από το κωδικό DNA (κωδικές αλληλουχίες) οφείλεται σε τρεις παράγοντες:

- i) Τη μεγαλύτερη ανοχή του σε ποικίλους τύπους αλλαγών. Το ρυθμιστικό DNA δε χρειάζεται να διατηρήσει κάποιο πλαίσιο ανάγνωσης και μπορεί να δράσει από ποικίλες αποστάσεις και με οποιοδήποτε προσανατολισμό σε σχέση με τον υποκινητή.
- ii) Τη σπονδυλωτή (modular) δομή του. Οι *cis*-ρυθμιστικές περιοχές των αναπτυξιακών γονιδίων αποτελούνται συχνά από ξεχωριστές υπομονάδες (ενισχυτές), καθεμία εκ των οποίων μπορεί να εξελιχθεί ανεξάρτητα (με την απόκτηση, απώλεια ή ανακατανομή θέσεων πρόσδεσης για μεταγραφικούς παράγοντες) από τις υπόλοιπες.
- iii) Τη συνεργιστικότητα (combinatorial nature) της μεταγραφικής ρύθμισης. Σε έναν ενισχυτή, παρατηρείται συχνά ότι ο αριθμός και η συγγένεια των θέσεων πρόσδεσης για τους μεταγραφικούς παράγοντες που τον ρυθμίζουν μπορούν να εξελίσσονται με ταχείς ρυθμούς.

Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν το ρυθμιστικό DNA μία πλούσια και αέναη πηγή γενετικής ποικιλότητας, καθώς οι αλλαγές σε αυτό τροποποιούν τα επίπεδα, το χρόνο και το πεδίο έκφρασης των γονιδίων και επιτρέπουν τη δημιουργία νέων ρυθμιστικών σχέσεων στα αναπτυξιακά μονοπάτια.

Δεδομένου ότι αλληλουχίες που δεν υπόκεινται σε καμία εξελικτική πίεση έχουν υψηλή μεταλλακτικότητα (mutation rate), η σύγκριση ομόλογων *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών μεταξύ απομακρυσμένων ειδών μπορεί να αποκαλύψει τις περιοχές εκείνες, οι οποίες έχουν λειτουργική σημασία (π.χ. θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων) και έχουν συντηρηθεί (phylogenetic footprint). Συγκρίνοντας για παράδειγμα τον ενισχυτή *Dll304* της *D. melanogaster* με την ομόλογη αλληλουχία της *D. pseudoobscura* (διαχωρίστηκαν πριν από ~45 Myr) διακρίνονται ξεκάθαρα νησίδες συντηρημένων νουκλεοτιδίων (Εικόνα 40). Ανάμεσα σε αυτές είναι και οι χαρακτηρισμένες θέσεις πρόσδεσης των καταστολέων *Ubx* και *Abd-A*. Ο μεγαλύτερος βαθμός απόκλισης μεταξύ των ρυθμιστικών αλληλουχιών σε πολύ απομακρυσμένα είδη δυσκολεύει πολύ την ανίχνευση λειτουργικών περιοχών με απλή στοίχισή τους. Για παράδειγμα, ο ενισχυτής *Dll304* δεν επιδεικνύει ιδιαίτερη ομοιότητα με καμία από τις *cis*-ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου *Dll* στο κουνούπι (διαχωρισμός *Drosophila* από *Anopheles* >200 Myr). Ακόμη όμως και σε περιπτώσεις, όπου η νουκλεοτιδική αλληλουχία των *cis*-ρυθμιστικών περιοχών δύο ορθόλογων γονιδίων διαφέρει σε μεγάλο βαθμό, η δράση τους μπορεί να παραμένει συντηρημένη και να καθοδηγούν το ίδιο πρότυπο έκφρασης. Η παρατήρηση αυτή συνεπάγεται ότι διαφορετικές διατάξεις των μεταγραφικών παραγόντων μπορούν να έχουν το ίδιο τελικό αποτέλεσμα, επιτρέποντας σε έναν ενισχυτή να εξελίσσεται με αντισταθμιστικές αλλαγές στις θέσεις πρόσδεσης για αυτούς, διατηρώντας παράλληλα τη δράση του (stabilizing selection) (LUDWIG *et al.* 2000b; LUDWIG *et al.* 1998). Παρόλο που εφαρμογές της βιοπληροφορικής (bioinformatics) και της γονιδιωματικής (genomics) μπορούν να επιταχύνουν την ανίχνευση *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων, η επαλήθευση της λειτουργίας τους και ο χαρακτηρισμός τους με τη βοήθεια της διαγονιδιακής τεχνολογίας είναι επιβεβλημένοι.



Εικόνα 40: Νουκλεοτιδική σύγκριση του ενισχυτή *Dll304* της *D. melanogaster* (Dm) και της αντίστοιχης *cis*-ρυθμιστικής περιοχής της *D. pseudoobscura* (Dp). Σε κίτρινο φόντο διακρίνεται το μεγαλύτερο μέρος της περιοχής που είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση, και σε θαλασσί φόντο η περιοχή που είναι απαραίτητη για την καταστολή του *Dll304*. Με λευκούς χαρακτήρες σε μπλε φόντο σημειώνονται οι γνωστές θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών Ubx και Abd-A (VACHON *et al.* 1992).

6. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ *cis*-ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *hsp70* ΤΟΥ *Parhyale*

6.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1.1. Θερμο-επαγόμενα γονίδια: διασώστες του οργανισμού και εργαλεία εκτοπικής υπερέκφρασης γονιδίων

Η αντίδραση στο θερμικό στρες (heat shock response) πρωτοπαρατηρήθηκε στη *Drosophila* ως αλλαγή του προτύπου συμπύκνωσης των πολυταινικών χρωμοσωμάτων προνυμφών που επωάζονταν σε υψηλές θερμοκρασίες (RITOSSA 1962). Σήμερα είναι γνωστό ότι όλοι οι οργανισμοί (Αρχαιοβακτήρια, Ευβακτήρια και Ευκαρυώτες), καθώς επίσης και τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες, μοιράζονται κοινούς μηχανισμούς αντίδρασης στο θερμικό (και όχι μόνο) στρες, οι οποίοι περιλαμβάνουν μία δραματική αλλαγή στο φυσιολογικό πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης και αυξημένη έκφραση θερμο-επαγόμενων γονιδίων. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν μέλη διαφόρων οικογενειών θερμο-επαγόμενων πρωτεϊνών (Heat shock proteins), κάποιες από τις οποίες είναι εξαιρετικά συντηρημένες (LINDQUIST & CRAIG 1988). Η έκφραση των Hsp βοηθά στη διατήρηση της ομοιόστασης του κυττάρου, κυρίως μέσω της δράσης τους ως σαπερόνες (chaperones) στην επαναδίπλωση αποδιαταγμένων πρωτεϊνών (NETZER & HARTL 1998). Επιπλέον, υποβοηθούν την επιβίωση του κυττάρου ανταγωνιζόμενες τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούν τον αποπτωτικό ή νεκρωτικό θάνατό του (GABAI & SHERMAN 2002).

Οι οικογένειες των γονιδίων *hsp* ονοματίζονται ανάλογα με το μοριακό βάρος της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης. Η οικογένεια *hsp70* (με μοριακό βάρος ~70 kDa) είναι μία από τις πιο συντηρημένες οικογένειες και κάποια από τα μέλη της επάγονται σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα κάτω από στρεσογόνες συνθήκες (FEIGE & POLLA 1994). Εκτός από τα θερμο-επαγόμενα γονίδια *hsp70*, υπάρχουν και εκείνα τα οποία ενεργοποιούνται σε φυσιολογικές συνθήκες κατά την ανάπτυξη (γνωστά και ως *hsc70*). Η έκφραση των επαγόμενων γονιδίων *hsp70* ρυθμίζεται από πολύ συντηρημένους μεταγραφικούς παράγοντες, τους Heat shock transcription factors (Hsf; ΠΙΡΚΚΑΛΑ *et al.* 2001). Στη *Drosophila* και τα θηλαστικά, οι πρωτεΐνες Hsf διατηρούνται ανενεργές σε φυσιολογικές συνθήκες ως μονομερή. Κατά την αντίδραση στο θερμικό στρες τριμερίζονται και προσδένονται σε αλληλουχίες των υποκινητών των γονιδίων *hsp70*, που είναι γνωστές ως HSE (heat shock elements) και αποτελούνται από ανεστραμμένες επαναλήψεις του πεντανουκλεοτιδίου nGAAn (JEDLICKA *et al.* 1997). Η πρόσδεση των τριμερών Hsf στον υποκινητή πυροδοτεί την ενεργοποίηση της RNA Pol II (μέσω φωσφορυλίωση του C-τελικού άκρου της μεγάλης υπομονάδας της), που σε φυσιολογικές συνθήκες παραμένει καθηλωμένη στον υποκινητή (promoter proximal pausing; WU *et al.* 2003).

Η ιδιότητα των *cis*-ρυθμιστικών περιοχών των γονιδίων *hsp70* να παραμένουν ανενεργές σε φυσιολογικές συνθήκες και να ενεργοποιούνται με ένα απλό ερέθισμα, όπως είναι το θερμικό στρες, αξιοποιήθηκε από τους γενετιστές για την ομοιόμορφη εκτοπική έκφραση γονιδίων στη *D. melanogaster* (ectopic mis-expression). Όπως είδαμε στην Ενότητα 1.5, η γενετική ανάλυση αντλεί πληροφορίες από την έκφραση των γονιδίων σε ιστούς και αναπτυξιακά στάδια, όπου φυσιολογικά παραμένουν σιωπηλά (BONNER *et al.* 1984). Δεδομένου ότι η επαγωγή της εκτοπικής έκφρασης πρέπει να γίνεται ελεγχόμενα, καθώς συχνά

προκαλεί θνησιμότητα ή στειρότητα, ο πιο απλός τρόπος ομοιόμορφης επαγωγής σε όλους τους ιστούς, είναι να εισαχθεί ο αναπτυξιακός παράγοντας στο γονιδίωμα υπό τον έλεγχο του υποκινητή *hsp70*. Εκθέτοντας τον οργανισμό που φέρει αυτό το διαγονίδιο στην κατάλληλη υψηλή θερμοκρασία (που ποικίλει ανάμεσα σε διαφορετικά είδη), επιτυγχάνεται η εκτοπική έκφραση του υπό μελέτη γονιδίου σε υψηλά επίπεδα και σε αυστηρά ελεγχόμενα αναπτυξιακά στάδια.

6.1.2. Κλωνοποίηση των *cis*-ρυθμιστικών περιοχών γονιδίων *hsp70* του *Parhyale hawaiiensis* με τη χρήση *inversePCR*

Σε αντίθεση με την ανάλυση *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών, η ανάλυση της λειτουργίας κωδικών περιοχών προϋποθέτει την ανάπτυξη ενός συστήματος εκτοπικής έκφρασης γονιδίων. Χάρη στην απλότητα της χρήσης τους σε σχέση με άλλα συστήματα, στραφήκαμε εξ αρχής στην αξιοποίηση των *cis*-ρυθμιστικών περιοχών των γονιδίων *hsp70*. Οι διαπλασμαδικές δοκιμασίες εκτομής και μετάθεσης του στοιχείου *Minos* στον *Parhyale*, στις οποίες είχε χρησιμοποιηθεί ο υποκινητής *hsp70* της *D. melanogaster* για την έκφραση της τρανσποζάσης, είχαν δείξει ότι ο δροσοφιλικός υποκινητής δεν είναι λειτουργικός στο αμφίποδο. Συνεπώς, προχώρησα στην κλωνοποίηση *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών ενδογενών γονιδίων *hsp70* του *Parhyale*.

Σε πρώτη φάση, σχεδιάστηκε ένα ζευγάρι εκφυλισμένων εκκινητών, που υβριδοποιούσαν σε δύο πολύ συντηρημένες περιοχές της πρωτεΐνης Hsp70 (Εικόνα 41B). Με μήτρα γενωμικό DNA πολλαπλασιάστηκε σε αντίδραση PCR και αλληλουχίστηκε ένα προϊόν αναμενόμενου μεγέθους 240 bp (Εικόνα 41A). Η πιθανολογούμενη αμινοξική του αλληλουχία παρουσίαζε πολύ μεγάλη ομοιότητα με άλλες πρωτεΐνες Hsp70 (Εικόνα 41B, ταυτότητα 87-88%, ομοιότητα 92-94%).

Ξεκινώντας από ένα μικρό τμήμα ενός γονιδίου γνωστής αλληλουχίας, υπάρχουν πολλές διαφορετικές μεθοδολογίες για την απομόνωση των άγνωστων γειτονικών του αλληλουχιών (π.χ. σάρωση βιβλιοθηκών, *inversePCR* με υπόστρωμα γενωμικό DNA). Στην προκειμένη περίπτωση επιστρατεύθηκε η τεχνική *inversePCR* (iPCR), η οποία στηρίζεται στην ιδιότητα δύο αποκλίνοντων εκκινητών (με ανεστραμμένο προσανατολισμό προς τα έξω) να κατευθύνουν τον πολυμερισμό γύρω από ένα κυκλικό μόριο DNA (Εικόνα 42).

Ως πιθανά υποστρώματα για iPCR ελέγχθηκαν 34 δείγματα γενωμικού DNA, που το καθένα είχε επωαστεί με διαφορετική περιοριστική ενδονουκλέαση (6-cutter). Για να αξιολογηθούν οι διαφορετικές πέψεις-υποστρώματα και να προγνωθεί το μέγεθος των αναμενόμενων προϊόντων της iPCR, τα κομμένα δείγματα γενωμικού DNA αναλύθηκαν κατά Southern με ανιχνευτή τα 240 bp της κωδικής περιοχής. Σε όλα τα δείγματα ανιχνεύθηκαν πολλαπλές ζώνες (5-8), ενδεικτικές της ύπαρξης πολλών συντηρημένων αντιτύπων γονιδίων *hsp70* στο γονιδίωμα του *Parhyale*, όπως άλλωστε συμβαίνει και στους περισσότερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Τα 15 δείγματα που έδωσαν τα πιο ξεκάθαρα σήματα στην υβριδοποίηση, μεγέθους μεγαλύτερου από 500 bp (ώστε να αποκτηθεί σχετικά μεγάλο τμήμα νέας αλληλουχίας) και μικρότερου από 4 kb (ώστε να μπορούν να πολλαπλασιαστούν από την πολυμεράση), επώαστηκαν με δεσμάση (ligase). Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν σχεδιασμένες έτσι, ώστε να ευνοείται η δημιουργία ενδομοριακών φωσφοδιεστερικών δεσμών κατά την κυκλοποίηση των τμημάτων του γενωμικού DNA, που θα αποτελούσαν το υπόστρωμα στην πρώτη αντίδραση iPCR.

Με βάση τη νουκλεοτιδική αλληλουχία 240 bp σχεδιάστηκαν δύο ζεύγη εκκινητών (Εικόνα 41), ένα για την πρώτη αντίδραση iPCR με υπόστρωμα το γενωμικό DNA, και ένα για τη δεύτερη αντίδραση iPCR (nested) με υπόστρωμα τα προϊόντα της πρώτης αντίδρασης (Υλικά & Μέθοδοι). Η χρήση και δεύτερης αντίδρασης iPCR εξυπηρέτησε την αύξηση της ευαισθησίας και της εξειδίκευσης

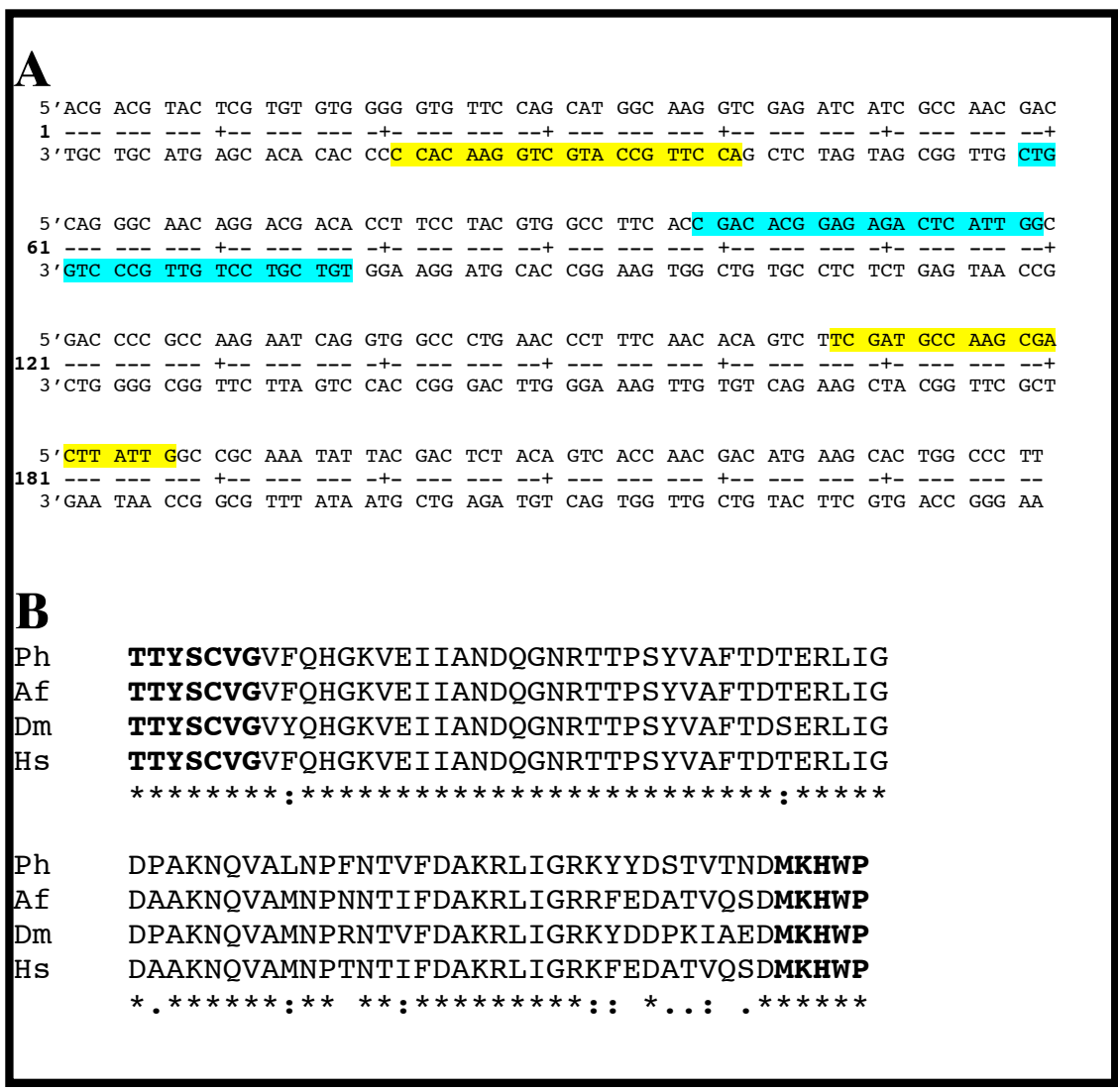
της μεθόδου. Το μέγεθος των προϊόντων της δεύτερης αντίδρασης από τα δείγματα που είχαν κοπεί με τα ένζυμα ApoI, HaeII, HindIII και ScaI συμφωνούσε με την ανάλυση κατά Southern. Οι κλώνοι αυτοί, που συνοψίζονται στον Πίνακα 12, αλληλουχίστηκαν και συγκρίθηκαν μεταξύ τους για να διαπιστωθεί αν αντιπροσώπευαν διαφορετικά γονίδια (Εικόνες 43 & 44). Επιπλέον, η πιθανολογούμενη αμινοξική αλληλουχία που κωδικοποιούνταν από κάθε κλώνο, συγκρίθηκε τόσο με τις υπόλοιπες (Εικόνα 45) όσο και με τις κατατεθειμένες αλληλουχίες στις γονιδιακές τράπεζες (BLAST).

ΠΙΝΑΚΑΣ 12
Προϊόντα αντίδρασης inversePCR

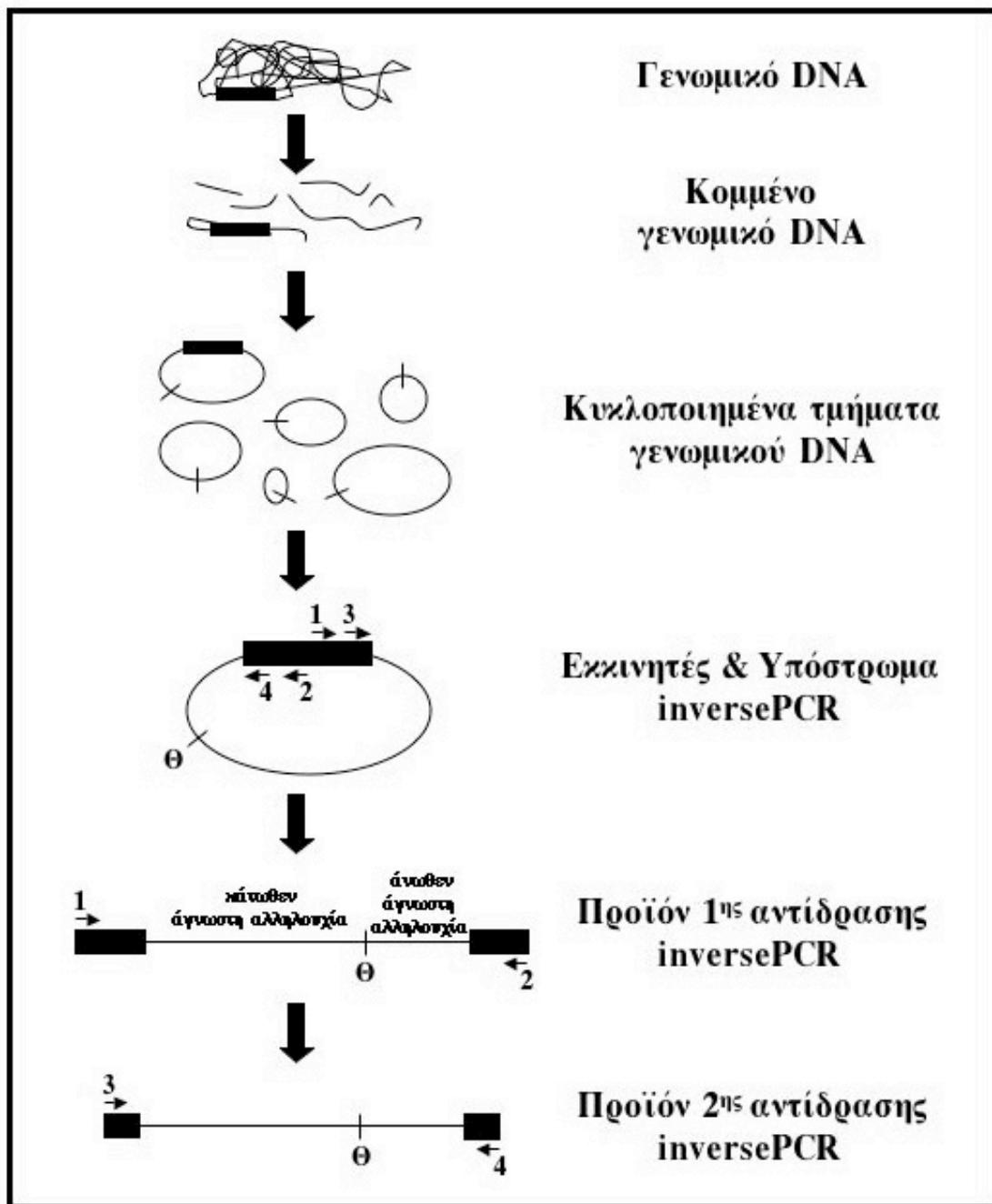
Περιοριστική ενδονουκλεάση	Κλώνος	Μέγεθος κλώνου (kb)
ApoI	pPhhsp70ApoF3R3(0.9)	0.9
ApoI	pPhhsp70ApoF3R3(1.9)	1.9
HaeII	pPhhsp70HaeF3R3	0.9
HindIII	pPhhsp70HindF3R3	0.75
ScaI	pPhhsp70ScaF3R3	0.65

Από τις συγκρίσεις αλληλουχιών προκύπτει ότι οι 5 κλώνοι αντιπροσωπεύουν πιθανότατα 4 διαφορετικά γονίδια. Τα γονίδια αυτά επιδεικνύουν μεταξύ τους πολύ υψηλές ομολογίες μέσα στις κωδικές τους περιοχές, >90% σε νουκλεοτιδικό επίπεδο και >91% ταυτότητα σε αμινοξικό επίπεδο (ομοιότητα >97%). Η περισσότερο αποκλίνουσα αλληλουχία είναι αυτή του κλώνου ApoI(0.9). Οι κλώνοι ApoI(1.9) και HaeII είναι εκείνοι που αντιπροσωπεύουν πιθανότατα το ίδιο γονίδιο. Μεταξύ τους βρέθηκαν μόνο 3 διαφορές στην αλληλουχία άνωθεν του κωδικονίου έναρξης (3/445 bp), ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική ομοιότητα με τις αντίστοιχες αλληλουχίες των υπόλοιπων γονιδίων. Μέσα στις κωδικές αλληλουχίες των κλώνων ApoI(1.9) και HaeII εντοπίζονται 4 αντικαταστάσεις βάσεων, εκ των οποίων οι 3 είναι συνώνυμες. Δε μπορούμε να πούμε με σιγουριά αν οι συνολικές διαφορές τους οφείλονται σε πραγματικούς πολυμορφισμούς ή σε λάθη των αντιδράσεων iPCR και αλληλουχίησης, δεδομένου ότι αλληλουχίστηκε μόνο ένα αντίγραφο από κάθε κλώνο.

Οι πιθανολογούμενες αμινοξικές αλληλουχίες και των 4 γονιδίων παρουσιάζουν υψηλές ομολογίες με ήδη γνωστά μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών Hsp70. Το γονίδιο *Phhsp70a*, όπως ονομάσαμε το γονίδιο που αντιπροσωπεύεται από τους κλώνους ApoI(1.9) και HaeII, έχει πολύ μεγάλη ομολογία (ταυτότητα 85%, ομοιότητα 92%) με άλλα γνωστά γονίδια *hsp70* καρκινοειδών (π.χ. *Artemia*, *Macrobrachium*, *Penaeus*) και εντόμων. Λίγο χαμηλότερη ομολογία με τις πρωτεΐνες Hsp70 των αρθροπόδων (ταυτότητα 80%, ομοιότητα 88%) επιδεικνύει το γονίδιο του κλώνου ApoI(0.9). Το γονίδιο του κλώνου ScaI δείχνει υψηλή ομολογία (ταυτότητα 83%, ομοιότητα 92%) με γνωστά γονίδια *hsc70* των εντόμων (*Manduca*, *Bombyx*, *Trichoplusia ni*, *Drosophila*). Μόνο το γονίδιο του κλώνου HindIII (για το οποίο αποκτήθηκε μόνο ένα πολύ μικρό μέρος της κωδικής περιοχής), επέδειξε λίγο μεγαλύτερα σκορ με τις πρωτεΐνες Hsp70 των σπονδυλωτών (κυρίως ψαριών, ταυτότητα 75%, ομοιότητα 89%) σε σχέση με αυτές των καρκινοειδών (ταυτότητα 69-74%, ομοιότητα 89%). Η μικρή διαφορά δε μας επιτρέπει να συμπεράνουμε αν πρόκειται για μόλυνση (τα αμφίποδα ταΐζονται με ψαροτροφία) ή για πραγματικό γονίδιο *hsp70* του αμφίποδου. Καμία από τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες άνωθεν των κωδικών περιοχών δεν είχε σημαντική ομολογία με κατατεθειμένες στις βάσεις δεδομένων νουκλεοτιδικές αλληλουχίες.



Εικόνα 41: Νουκλεοτιδική αλληλουχία τμήματος της κωδικής περιοχής των γονιδίων *hsp70* του *Parhyale* (A) και σύγκριση της πιθανολογούμενης αμινοξικής αλληλουχίας με πρωτεΐνες Hsp70 άλλων οργανισμών (B). Στη νουκλεοτιδική αλληλουχία σημειώνονται σε θαλασσί φόντο οι εκκινητές της πρώτης αντίδρασης iPCR και σε κίτρινο φόντο οι εκκινητές της δεύτερης αντίδρασης iPCR. Η πιθανολογούμενη αμινοξική αλληλουχία (Ph) επιδεικνύει υψηλή ομολογία με με τα αντίστοιχα τμήματα των πρωτεΐνων Hsp70 της *Artemia franciscana* (Af), της *Drosophila melanogaster* (Dm) και του ανθρώπου (Hs). Με σκούρους χαρακτήρες σημειώνονται τα συντηρημένα αμινοξέα βάση των οποίων σχεδιάστηκαν οι εκφυλισμένοι εκκινητές. Η αλληλουχία των κωδικονίων τους δεν αντιστοιχεί απαραίτητα με την αλληλουχία του γονιδίου. Η στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα clustalw.



Εικόνα 42: Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής inversePCR. Η γνωστή αλληλουχία συμβολίζεται με το μαύρο κουτί και η θέση αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση με το 'Θ'. Στην πρώτη αντίδραση iPCR χρησιμοποιούνται οι εκκινητές 1 και 2, ενώ στη δεύτερη αντίδραση iPCR οι 3 και 4. Υπογραμμίζεται ότι η τελική διάταξη των αλληλουχιών στο προϊόν της αντίδρασης iPCR είναι διαφορετική από τη φυσιολογική διάταξη στο γονιδίωμα.

```

SCAI      TTCGATGCCAAGCGACTTATTGGCCGCAAATATTACGACTCTACAGTCACCAACGACATG
HINDIII   TTCGATGCCAAGCGACTTATTGGCCGCAAATATTACGACTCTACAGTCACCAACGACATG
APOI (1.9) TTCGATGCCAAGCGACTTATTGGCCGCAAATATTACGACTCTACAGTCATCAACGACATG
HAЕII     TTCGATGCCAAGCGACTTATTGGCCGCAAATATTACGACTCTACAGTCACCAATGACATG
APOI (0.9) TTCGATGCCAAGCGACTTATTGGCCGCAAATATTACGACTCTACAGTCGCCAGCGACATG
***** ** *****

SCAI      AAACATTGGCCCTTCAAAGTCATCGATGACAATGGCAAACCAAAGATCACGATTGAATAC
HINDIII   AAACATTGGCCCTTCAAAGTCATCGATGACAATGGCAAACCAAAGATCAAGATTGAATAC
APOI (1.9) AAACATTGGCCCTTCAAAGTCATCGATGACAATGGCAAACCAAAGATCAAGATTGAATAC
HAЕII     AAGCATTGGCCCTTAAAGTCATCGATGACAATGGCAAACCAAAGATCAAGATTGAATAC
APOI (0.9) AAGCATTGGCCCTTCAAAGTCATCGATGACAATGGCAAACCAAAGATCAAGATTGAATAC
** * ***** ***** ***** ***** *****

SCAI      AAGGGCGAGAACAAGACATTCTCTCTGAAGAAATTTCTCGATGGTCCTCATCAAGATG
HINDIII   AAGGGTGAGAACAGGACATTCTCTCTGAAGAAATTTCTCAATGGTCCTCATCAAGATG
APOI (1.9) AAGGGCGAGAACAAGACATTCTCTCTGAAGAAATTTCTCGATGGTCCTCATCAAGATG
HAЕII     AAGGGCGAGAACAAGACATTCTCTCTGAAGAAATTTCTCGATGGTCCTCATCAAGATG
APOI (0.9) AAGGGCGAAAACAAGACATTCTCTCTGAAGAAATTTCTCGATGGTCCTCATCAAGATG
***** ** **** ***** ***** ***** ***** *****

SCAI      AAGGAGATCGCTGAAGCTTATCTTGGAGGAGACGTGAAGGATGCTGTATCACAGTGCCA
HINDIII   AAGGAGATCGCTGAAGCTT-----
APOI (1.9) AAGGAGATCGCTGAAGCTTATCTTGGAGGAGACGTGAAGGATGCTGTATCACAGTGCCA
HAЕII     AAGGAGATCGCTGAAGCTTATCTTGGAGGAGACGTGAAGGATGCTGTATCACAGTGCCA
APOI (0.9) AAGGAGATCGCTGAAGCTTATCTTGGAGGAGACGTGAAGGATGCTGTATCACAGTGCCA
***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

SCAI      GCTTACTTCAACGACTCCCAGCGCCAGGCAACCAAGGACGCTGGCACCATCGCTGGGCTT
APOI (1.9) GCTTACTTCAACGACTCCCAGCGCCAGGCAACCAAGGACGCTGGCACCATCGCTGGGCTT
HAЕII     GCTTACTTCAACGACTCCCAGCGCC-----
APOI (0.9) GCTTACTTCAACGACTCCCAGCGCCAGGCAACCAAGGACGCTGGCACCATCGCTGGGCTT
***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

SCAI      AATGTCTTGAGGATAATCAACGAGCCGACGGCAGCAGCCATTGCTTACGGTCTGGACAAG
APOI (1.9) AATGTCTTGAGGATAATCAACGAGCCGACGGCAGCAGCCATTGCTTACGGTCTGGACAAG
APOI (0.9) AATGTCTTGAGGATAATCAACGAGCCGACGGCAGCAGCCATTGCTTACGGTCTGGACAAG
***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

SCAI      AAGGGGAGCGGAGAACGCAACATTCTGATCTTCGACTTGGGCGGCGGTACCTTCGATGTC
APOI (1.9) AAGGGGAGCGGAGAACGCAACATTCTGATCTTCGACTTGGGCGGCGGTACCTTCGATGTC
APOI (0.9) AAGGGGAGCGGAGAACGCAACATTCTGATCTTCGATTTAGGCGGTGATTTCTTTAGCGTC
***** ***** ** ***** * * *** **

SCAI      TCCATTCTCTCCATTGATGATGGCATAATTCGAAGTGAAGGCCACGGCTGGTGACACTCAC
APOI (1.9) TCCATTCTCTCCATTGATGATGGCATAATTCGAAGTGAAGGCCACGGCCGGTGACACTCAC
APOI (0.9) ACCGTTCTCACAATTGATGATGGCATAATTCGAAGTGAAGGCCACGGCCGGTGACACTCAC
** ***** * ***** ***** ***** ***** *****

SCAI      CTTGGAGGAGAGGATTTTCGATAACCGCTTGGTTACTCACTTCGCTCAAGAGTTCAAGAGA
APOI (1.9) CTTGGAGGAGAGGATTTTCGATAACCGCTTGGTTACTCACTTCGCTCAAGAGTTCAAGAGA
APOI (0.9) CTTGGAGGAGAGGATTTTCGATTTCCGCTTGGTTACTCACTTCGCTCATGAGTTCAAGAGA
** ***** ***** ***** ***** ***** *****

SCAI      AAGTTCAAGAAAGACATCACTGAGAACAACGAGCTCTACAACGCTTGAGGACCGCGTGT
APOI (1.9) AAGTTCAAGAAAGACATCACTGAGAACAACGAGCTCTACGACGCCTAAGGACGGCGTGT
APOI (0.9) AAATAAAGAAGGACATCACTGAGAACAACGAGCTTCGCAAAAGACTAAGAACGACATCT
** * ***** ***** ***** ***** * * * * * * * * * *

SCAI      GAGC-----
APOI (1.9) GAGAGAGCCAAGCGAACGCTGTCCTCGTCTGCACAAGCCAGCATTGAGATCGACTCCCTC
APOI (0.9) GAGAAAGCCAAGCGAACGCTGTCCTCCTCTGCACAAGCCAGCATTGAGATCGACTCCCTA
*** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *

```

Εικόνα 43 (συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα)

ΑΡΟΙ (1.9)	GATCTCTTCAGAGGCACACTGGACCCTGTGGAGAAAGCTCTGCGGGATGCCAAGATGGAC
ΑΡΟΙ (0.9)	GATCTCTTCAGATGCACACTGGACCCTGTGGAGAAAGCTCTGCGGGATGCCAAGATGGAC

ΑΡΟΙ (1.9)	AAGGGCCAAATTTCATGAGATAGTTCTCGTCGGGAGATCTACCAGAATTCCCAAAATTC
ΑΡΟΙ (0.9)	AAGGGCCAAATTC-----

Εικόνα 43: Σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (κωδικές αλυσίδες) των κλώνων του Πίνακα 12. Περιλαμβάνονται οι αλληλουχίες κάθε κλώνου που βρίσκονται **κάτωθεν** της ήδη γνωστής κωδικής περιοχής. Σε κίτρινο φόντο διακρίνεται η αλληλουχία που υβριδοποιεί ο ένας εκ των δύο εκκινητών (στο 3' άκρο της ήδη γνωστής περιοχής) στη δεύτερη αντίδραση iPCR. Με άσπρους χαρακτήρες σε μπλε φόντο διακρίνονται οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών στο τέλος κάθε αλληλουχίας. Στην περίπτωση της ScaI δε βρέθηκε η αντίστοιχη θέση, οπότε θεωρήθηκε ότι το ένζυμο έκοψε μη ειδικά. Η στοίχιση των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα clustalw.

HAEII	AGCGCC	TACAGTGGAGGTCTCTGTTATTTTCATCTATGTTTTAGTCCTTCAAGCCGTGCCAG
HAEII		GATTGGACTTGTAGCCGAGTCTTCATTTGCCAACCCCTTCACATTTTACATTTGTAATAAT
APOI (1.9)		-----AAAT
HAEII		TCTGCTGTTGAAATATTTAATATTTCTAAAATGTTTATTTATGCAATTGCAGCAATCACGT
APOI (1.9)	TC	TCTGCTGTTGAAAAATTTAATATTTCTAAAATGTTTATTTATGCAATTGCAGCAATCACGT
HAEII		CCTTATTTTTATTTCCAATGGAGAAAAAATATATTTCCCTGCAATTTGAGTGAATTACT
APOI (1.9)		CCTTATTTTTATTTCCAATGGAGAAAAAATATATTTCCCTGCAATTTGAGTGAATTACT
HAEII		TGAATAATACTAAGAAATTCGTGACTAGAAGCTGTGTAATGGGCTTCGGCATTAAATATT
APOI (1.9)		TGAATAATACTAAGAAATTCGTGACTAGAAGCTGTGTAATGGGCTTCGGCATTAAATATT
HINDIII		-----AAGCTTGAGATGAATGATAGCCTCGTA-TCTTCATAGATGTAACAGGTT
HAEII		TTTATTTTTCAGTGCAGGTACACTTCTAAAATACTGAACATAAAAAACGGTAGAATGCAAA
APOI (1.9)		TTTATTTTTCAGTGCAGGTACACTTCTAAAATACTGAACATAAAAAACGGTAGAATGCAAA
HINDIII		ATAAAATGTGAAATAGGTG---ATAAGAGCTGATTTCAGCTTACTTATTTCCCGCTGTCTC
HAEII		GTACTGCAAATCTTACGAAGAAAATAATTATTTCTAAAATTTAGCATAACTGAGTTATAA
APOI (1.9)		GTACTGCAAATCTTACGAAGAAAATAATTATTTCTAAAATTTAGCATAACTGAGTTATAA
HINDIII		TTATGGTGAACATGACGAAAATGGTAAAT-TCCTGCATGGTTC-TATCAGCGTCTACGAG
HAEII		GTCATCCTTCATGCCATGGAAGCGTATGTGGGACATTAATTTTTTTTCTGTGAATGTATA
APOI (1.9)		GTCATCCTTCATGTGCATGGAAGCGTATGTGGGACATTAATTTTTTTTCTGTGAATGTATA
HINDIII		GTTGATTTTGTATACCAACACAAAAGTTACTCCACATCTACGTTTATATGTAAGCGTA
HAEII		T-TGTTCTTAACTTAAGACCAATATGATTTTTACGACGTTTCTTATGTTCTGTTTTTTTT
APOI (1.9)		T-TGTTCTTAACTTAAGACCAATATGATTTTTACGACGTTTCTTATGTTCTGTTTTTTTT
APOI (0.9)		-----AAATTC
HINDIII		TGTGCTGTTTAC-----AATTGTTTTCTAGGGCTAGATTTTAATGTTATTTTCTTT
HAEII		C'TTACAGAACAATCCACAACCATGAGAACCAAGGGAGCGACCGCAGTGGGCATCGACCT
APOI (1.9)		C'TTACAGAACAATCCACAACCATGAGAACCAAGGGAGCGACCGCAGTGGGCATCGACCT
APOI (0.9)		GTTTAGAACCTTTTTCGTTGCAGGAAACATGCCAGAAGCGACCGCAGTGGGCATTGACCT
HINDIII		TCTTGCAGAGCA-CCTGTGAACATGAGAACCAAGGGAGCGACCGCTGTGGGTATCGACCT
		* * * * *
HAEII		GGGCACCACCTACTCCTGCCTGGGGGTGTTCCAGCATGGCAAGGT
APOI (1.9)		GGGCACCACCTACTCCTGCCTGGGGGTGTTCCAGCATGGCAAGGT
APOI (0.9)		GGGCACATCCTACTCCTGCCTGGGGGTGTTCCAGCATGGCAAGGT
HINDIII		GGGCACCACCTACTCCTGCCTGGGGGTGTTCCAGCATGGCAAGGT

Εικόνα 44: Σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (κωδικές αλυσίδες) των κλώνων του Πίνακα 12. Περιλαμβάνονται οι αλληλουχίες κάθε κλώνου που βρίσκονται **άνοθεν** της ήδη γνωστής κωδικής περιοχής (εκτός του κλώνου Scal που η αλληλουχία του σταμάταγε αμέσως μετά τον εκκινητή). Σε πράσινο φόντο διακρίνεται η αλληλουχία του ενός εκ των δύο εκκινητών (στο 5' άκρο της ήδη γνωστής περιοχής) που χρησιμοποιήθηκε στη δεύτερη αντίδραση iPCR. Σε γαλάζιο φόντο υποδεικνύεται το πιθανό κωδικόνιο έναρξης κάθε γονιδίου. Με άσπρους χαρακτήρες σε μπλε φόντο διακρίνονται οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών στην αρχή κάθε αλληλουχίας. Τα όμοια νουκλεοτίδια σημειώνονται με αστερίσκους μόνο εντός της κωδικής περιοχής.

APOI (0.9)	MP--EATAVGIDLGTSYSCVGVFQHGKveiiandqgnrttpsyvaftdterligdpaknqvalnpfntv
HINDIII	MRTKGATAVGIDLGTTYSCVGVFQHGKveiiandqgnrttpsyvaftdterligdpaknqvalnpfntv
HAЕII	MRTKGATAVGIDLGTTYSCVGVFQHGKveiiandqgnrttpsyvaftdterligdpaknqvalnpfntv
APOI (1.9)	MRTKGATAVGIDLGTTYSCVGVFQHGKveiiandqgnrttpsyvaftdterligdpaknqvalnpfntv
	* *****;*****
SCAI	FDAKRLIGRKYDSTVTNDMKHWPFKVIDDNGKPKIKIEYKGENKTFSP EEISSMVLIKM
HINDIII	FDAKRLIGRKYDSTVTNDMKHWPFKVIDDNGKPKIKIEYKGENRTFSP EEISSMVLIKM
APOI (0.9)	FDAKRLIGRKYDSTVASDMKRWPFKVIDDNGKAKIKIEYKGENKTFSP EEISSMVLIKM
HAЕII	FDAKRLIGRKYDSTVTNDMKHWPFKVIDDNGKPKIKIEYKGENKTFSP EEISSMVLIKM
APOI (1.9)	FDAKRLIGRKYDSTVINDMKHWPFKVIDDNGKPKIKIEYKGENKTFSP EEISSMVLIKM
	***** . **;***** . ** . *****;*****
SCAI	KEIAEAYLGGDVKDAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLNLVRIINEPTAAAIAYGLDK
HINDIII	KEIAEA-----
APOI (0.9)	KEIAEAYLGGDVKDAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLNLVRIINEPTAAAIAYGLDK
HAЕII	KEIAEAYLGGDVKDAVITVPAYFNDSQR-----
APOI (1.9)	KEIAEAYLGGDVKDAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLNLVRIINEPTAAAIAYGLDK

SCAI	KSGERNLIFDLGGGTFDVSILSIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVTHFAQEFKR
APOI (0.9)	KSGERNLIFDLGGDFFSVTVLTIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVTHSAHEFKR
APOI (1.9)	KSGERNLIFDLGGGTFDVSILSIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVTHFAQEFKR
	***** . *;*:::***** ***** *;***
SCAI	KFKKDITENKRALQRLRTACE-----
APOI (0.9)	KYKKDITENKRASQRLRTASEKAKRTLSSSAQASIEIDSLSEGTFYTSITRARFEELCS
APOI (1.9)	KFKKDITENKRALRRLRTACERAKRTLSSSAQASIEIDSLYEGADFYTSITRARFEELCS
	*;***** :*****.*;***** **;*****
APOI (0.9)	DLFRCTLDPVEKALRDAKMDKGQI-----
APOI (1.9)	DLFRGTLDPVEKALRDAKMDKGQIHEIVLVGRSTRIPKI
	**** *****

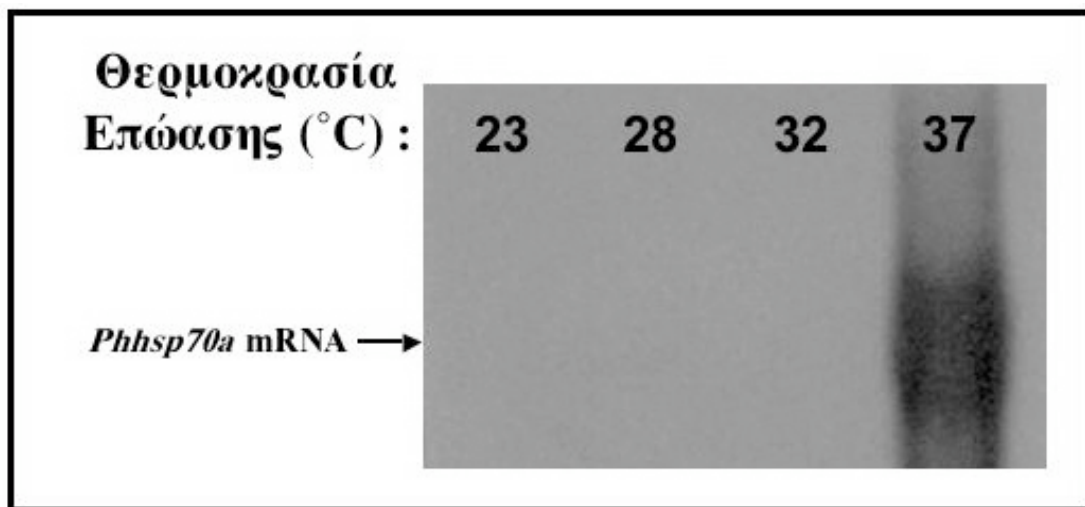
Εικόνα 45: Σύγκριση των πιθανολογούμενων αμινοξικών αλληλουχιών των κλώνων του Πίνακα 12. Λόγω της μεθοδολογίας της αντίδρασης inversePCR, η αμινοξική αλληλουχία που παρεμβάλλεται μεταξύ των δύο εκκινητών (τα αμινοξέα που αντιστοιχούν σε αυτούς διακρίνονται σε κίτρινο φόντο) δεν είναι γνωστή για κανένα κλώνο (με μικρούς χαρακτήρες υποδεικνύονται αυτά που είναι γνωστά από την αρχική αντίδραση PCR με τους εκφυλισμένους εκκινητές).

Για μία σειρά από λόγους, εστίασαμε την προσοχή μας για την απομόνωση μίας λειτουργικής θερμο-επαγώμενης *cis*-ρυθμιστικής περιοχής στο γονίδιο *Phhsp70a*:

- 1) Έδειχνε μεγάλη ομολογία με γνωστά γονίδια *hsp70* καρκινοειδών και εντόμων.
- 2) Αντιπροσωπευόταν από δύο διαφορετικούς επικαλυπτόμενους κλώνους, που συνολικά περιείχαν 562 bp μη κωδικής αλληλουχίας (την 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή και μέρος της ρυθμιστικής περιοχής) και 1044 bp από την κωδική περιοχή του.
- 3) Ανάλυση κατά Northern με ανιχνευτή μέρος της κωδικής περιοχής του φανέρωσε ότι ενεργοποιείται ειδικά στους 37 °C και όχι σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (Εικόνα 46).

Στα περισσότερα γονίδια *hsp70* που έχουν μελετηθεί, φαίνεται ότι ρυθμιστικές αλληλουχίες μεγέθους 1000 bp άνωθεν του βασικού υποκινητή είναι ικανές και αναγκαίες για την θερμο-επαγωγή τους (ARNOSTI 2003; LAWSON *et al.* 1984). Για να απομονωθεί ένα μεγαλύτερο τμήμα άνωθεν της ήδη γνωστής ρυθμιστικής περιοχής, επαναλήφθηκε ένας δεύτερος γύρος iPCR με δύο ζεύγη εκκινητών που υβριδοποιούσαν ειδικά στη μη κωδική περιοχή των 562 bp του γονιδίου *Phhsp70a* (βλέπε Υλικά & Μέθοδοι). Τα δείγματα γενωμικού DNA-υποστρώματα της πρώτης αντίδρασης iPCR επωάστησαν με περιοριστικές ενδονουκλεάσες που

αναγνωρίζαν θέσεις μέσα στην ήδη γνωστή αλληλουχία του γονιδίου, ώστε να απομονωθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερο τμήμα της άγνωστης άνωθεν περιοχής (στο σχήμα της Εικόνας 42 η θέση πέψης 'Θ' βρίσκεται μέσα στο μαύρο κουτί δεξιά του εκκινητή 3). Η όλη διαδικασία εκτελέστηκε όπως περιγράφηκε προηγούμενα και στη δεύτερη αντίδραση iPCR, από το δείγμα που είχε κοπεί αρχικά με το ένζυμο ScaI, πολλαπλασιάστηκε ένα προϊόν μεγέθους 866 bp. Η αλληλούχηση του κλώνου έδειξε ότι η αλληλουχία του επικαλύπτονταν κατά 96 bp με την ήδη γνωστή ρυθμιστική περιοχή, ενώ επεκτείνονταν και κατά 745 bp άνωθεν της. Συνολικά απομονώθηκαν ~1.3 kb άνωθεν του κωδικονίου έναρξης, στα οποία περιλαμβάνονταν οι αλληλουχίες της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής και της ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου *Phhsp70a*. Ανάμεσά τους διακρίνονταν η αλληλουχία Kozak (ACC, βοηθά στην πρόσδεση του μεταγράφου στη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα) ακριβώς πριν το κωδικόνιο έναρξης, ένα πιθανό κουτί TATA (TATAA) 140 bp μακρύτερα και διάσπαρτες παλίνδρομες αλληλουχίες της θέσης πρόσδεσης pGAAn των μεταγραφικών παραγόντων Hsf (Εικόνα 47).



Εικόνα 46: Θερμο-επαγωγή του γονιδίου *Phhsp70a* στους 37 °C. Ενήλικα αμφίποδα επωάστηκαν για 2 ώρες στις αναγραφόμενες θερμοκρασίες και στη συνέχεια απομονώθηκε polyA mRNA από κάθε δείγμα και αναλύθηκε κατά Northern με ανιχνευτή τη γνωστή κωδική περιοχή του γονιδίου *Phhsp70a*. Η έκφραση του γονιδίου *Phhsp70a* ανιχνεύτηκε σε πολύ υψηλά επίπεδα αποκλειστικά στα άτομα που επωάστηκαν στους 37 °C. Υπογραμμίζεται, ότι σε λίγο υψηλότερη θερμοκρασία (40 °C) τα άτομα πεθαίνουν σε λιγότερο από 30 min.

5 ' GAATTACTAGTACAGCTGTTCTTTGAAGCAATTATTTTCCTAAATGGTAGAAAACAGTTA	60
5 ' CATATTTATCAACATGGCAAAGCTGAAGAGAAGAAAAGTTGTAAATAATTTATTTATTC	120
5 ' CTTTAACTTCAGGCATTTAATTCTTCAAGAATCACATTCAGGAAAATTATATATTCAGAT	180
5 ' GTTTTCAACTGAGACGCACGAACTGTCTGTCTATGCCAAGAGCCAAAATTTGCCATTACA	240
5 ' TCCAACAGTTCAAATAAAAAGTTTCAGTGAAAGAAGTACGATCGTTTATGTATGAATATT	300
5 ' GTTCACTAATAAGTAATTGGTTAATATACTGACGAAAGTAACTAAATTAATAATAGATTGG	360
5 ' TAAACAATAGCCGTGGGTGTCAATACTGAGACTTGATAAGCTCTGTCTGCTGGTTTTATA	420
5 ' TACGTATATGAGATTGAAATTACGACACTGAATTATGAACGATGTTTCGTTAGCGAGTATA	480
5 ' CTGAGCTATGAAGCTGTTATTGCTTCATTCCAAAATCCAACGATCGCTGGCCGTGGGTGT	540
5 ' CGACTTACAGTAGGTTGTGTGTGGCTTACCAGAGATTCAGCTATAATATATGTGCCATA	600
5 ' CATACTTAAGTTAAGCACCAATTTCTATCTTAGCCCAACCTATCCTACTCTACCTTAAC	660
5 ' CCAACACTCTTAAGTGGAAGATACCTAATAGGCTGGATCCAAACGTTTCGAATTATTAGT	720
5 ' ACATTTGTAACACGCGTCAGAAATTGCATGGGCGCCTACAGTGGAGGTCTCTGTTATTTT	780
5 ' ATCTATGTTTTAGTCCTTCAAGCCGTGCCAGGATTGGACTTGTAGCCGAGTCTTCATTTG	840
5 ' CCAACCCCTTCACATTTTACATTTGTAAAATTTCTGCTGTTGAAATATTTAATATTTCTAAA	900
5 ' ATGTTTATTTATGCAATTGCAGCAATCACGTCCTTTATTTTTATTTCCAATGGAGAAAA	960
5 ' AATATATTTTCTGCAATTTGAGTGAATTACTTGAATAATACTAAGAAATTCGTGACTAGA	1020
5 ' AGCTGTGTAATGGGCTTCGGCATTAAATATTTTTATTTTTCAGTGCAGGTACACTTCCTAA	1080
5 ' AATACTGAACATAAAAACGGTAGAATGCAAAGTACTGCAAATCTTACGAAGAAAAATAATT	1140
5 ' ATTCTAAATTATTAGCATAACTGAGTTATAAGTGCATCCTTCATGCCATGGAAGCGTATGT	1200
5 ' GGGACATTAATTTTTTTTTCTGTGAATGTATATGTTCTTAACTTAAGACCAATATGATTT	1260
5 ' TTACGACGTTTCTTATGTTCTGTTTTTTTTCTTTACAGAACAATCCACAACCATG	1315

Εικόνα 47: Η περιοχή άνωθεν του πιθανολογούμενου κωδικονίου έναρξης (σκούροι χαρακτήρες) του γονιδίου *Phhsp70a*. Η πιθανή αλληλουχία Kozak υποδεικνύεται με πράσινο χρώμα, το πιθανό κουτί TATA με κίτρινο και οι πιθανές θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων Hsf με θαλασσί.

6.1.3. Έλεγχος της ενεργότητας της *cis*-ρυθμιστικής αλληλουχίας του γονιδίου *Phhsp70a* στον *Parhyale*

Η απομονωμένη *cis*-ρυθμιστική αλληλουχία του γονιδίου *Phhsp70a* ελέγχθηκε με τη χρήση του γονιδίου αναφοράς *DsRedT1* για την ικανότητά της να ενεργοποιείται με θερμο-επαγωγή σε έμβρυα *Parhyale*. Ειδικότερα, η αλληλουχία της Εικόνας 47 κλωνοποιήθηκε άνωθεν του γονιδίου *DsRedT1*, το οποίο ακολουθούνταν από την περιοχή πολυαδενυλίωσης *SV40*, και η κατασκευή αυτή κλωνοποιήθηκε με τη σειρά της στο φορέα μετασχηματισμού *Mi{3xP3-DsRed}*. Έμβρυα που βρίσκονταν στο στάδιο του ενός ή των δύο κυττάρων μικροενέθηκαν με το πλασμιδίο-δότη και το βοηθό-mRNA σε συγκεντρώσεις 300 ng/μl και 100 ng/μl, αντίστοιχα (Πίνακας 13). Η ενεργότητα του διαγονιδίου *Phhsp70a-DsRed* ελέγχθηκε στα ίδια τα ενεμένα έμβρυα G₀, πριν και μετά από θερμοκή επαγωγή.

ΠΙΝΑΚΑΣ 13

Εισαγωγή του διαγονιδίου *Phhsp70a-DsRed* στο γονιδίωμα του *Parhyale*

Αρ. ενεμένων εμβρύων	Αρ. όψιμων εμβρύων	Αρ. φθοριζόντων <i>3xP3</i> εμβρύων ^α	Αρ. φθοριζόντων <i>Phhsp70a</i> εμβρύων χωρίς θερμοικό σοκ ^β	Αρ. φθοριζόντων <i>Phhsp70a</i> εμβρύων με θερμοικό σοκ ^γ
182	44	10	3	12

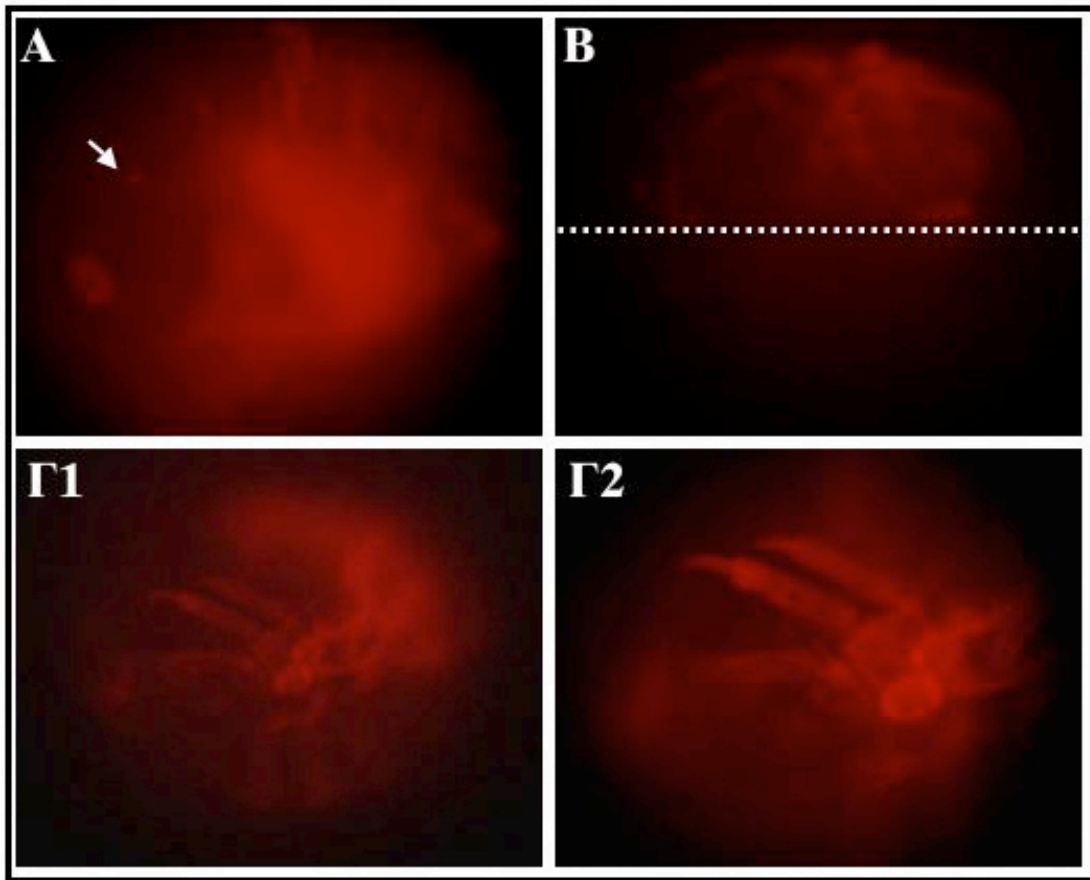
^α Έμβρυα με μονόπλευρο ή αμφίπλευρο φθορισμό οφειλόμενο στο γονίδιο διάκρισης *3xP3-DsRed*.

^β Έμβρυα με πρόσθετο φθορισμό, πιθανότατα οφειλόμενο στο διαγονίδιο *Phhsp70a-DsRed*, πριν επωαστούν στους 37°C.

^γ Έμβρυα με πρόσθετο φθορισμό, πιθανότατα οφειλόμενο στο διαγονίδιο *Phhsp70a-DsRed*, μετά την επώασή τους στους 37°C.

Όλα τα έμβρυα που επιβίωσαν μέχρι την 8^η-9^η ημέρα της εμβρυογένεσης (σχηματισμένοι οφθαλμοί) ελέγχθηκαν για το πρότυπο φθορισμού τους πριν υποστούν οποιοδήποτε στρες (Πίνακας 13). Από τα 44 έμβρυα, τα 10 επέδειξαν το χαρακτηριστικό μονόπλευρο ή αμφίπλευρο φθορισμό που προκαλεί η ένθεση του γονιδίου διάκρισης *3xP3-DsRed* στο γονιδίωμα σωματικών κυττάρων του εμβρύου. Τρία όμως από αυτά φθόριζαν και σε άλλους ιστούς χωρίς να έχει προηγηθεί θερμοικό σοκ και ο φθορισμός αυτός αποδόθηκε σε μη επαγόμενη έκφραση του διαγονιδίου *Phhsp70a-DsRed* (βλέπε Συζήτηση). Τα 44 έμβρυα επώαστηκαν για 2 ώρες σε θαλασσινό νερό προθερμασμένο στους 37°C και το πρότυπο φθορισμού τους ελέγχθηκε ~5 ώρες αργότερα (Εικόνα 48). Στα 3 έμβρυα που φθόριζαν πριν τη θερμοκή επαγωγή, η ένταση του φθορισμού είχε αυξηθεί σημαντικά στους ιστούς όπου είχε ήδη ανιχνευθεί. Από τα υπόλοιπα 7 έμβρυα με φθορισμό οφειλόμενο στο γονίδιο διάκρισης *3xP3-DsRed*, στα 4 η *DsRedT1* είχε εκφραστεί και σε άλλα μέρη του εμβρύου, ενώ σε 3 όχι. Ο πρόσθετος φθορισμός (πιθανά λόγω δράσης του *Phhsp70a*) αναπτύσσονταν πάντα στην πλευρά του εμβρύου που εντοπιζόνταν τα φθορίζοντα νευρικά κύτταρα (λόγω δράσης του *3xP3*). Μεταξύ των 34 εμβρύων όπου αρχικά δεν είχε ανιχνευθεί η *DsRedT1*, 5 εμφάνισαν ένα θερμοεξαρτώμενο φθορισμό σε ποικίλα πρότυπα. Στα άτομα που το διαγονίδιο *Phhsp70a-DsRed* ήταν ενεργό και πριν το θερμοικό σοκ, ο φθορισμός ήταν πιο έντονος συγκριτικά με τα άτομα που το εξέφρασαν μόνο θερμοεξαρτώμενα. Δυστυχώς, από το σύνολο των εμβρύων ενηλικιώθηκαν μόνο 2 (μη φθορίζοντα) που δεν έδωσαν μετασχηματισμένους απογόνους. Παρολαυτά, ο προκαταρκτικός αυτός έλεγχος ενεργότητας μας έδωσε σαφείς ενδείξεις ότι η απομονωμένη περιοχή του γονιδίου *Phhsp70a* είναι λειτουργική και πιθανότατα κατά ένα θερμο-εξαρτώμενο τρόπο. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι ένα μικρότερο

τιμήμα του γονιδίου, που στερούνταν των πιθανολογούμενων θέσεων πρόσδεσης των παραγόντων Hsf, δεν επέδειξε καμία ενεργότητα σε μία παρόμοια σειρά πειραμάτων.

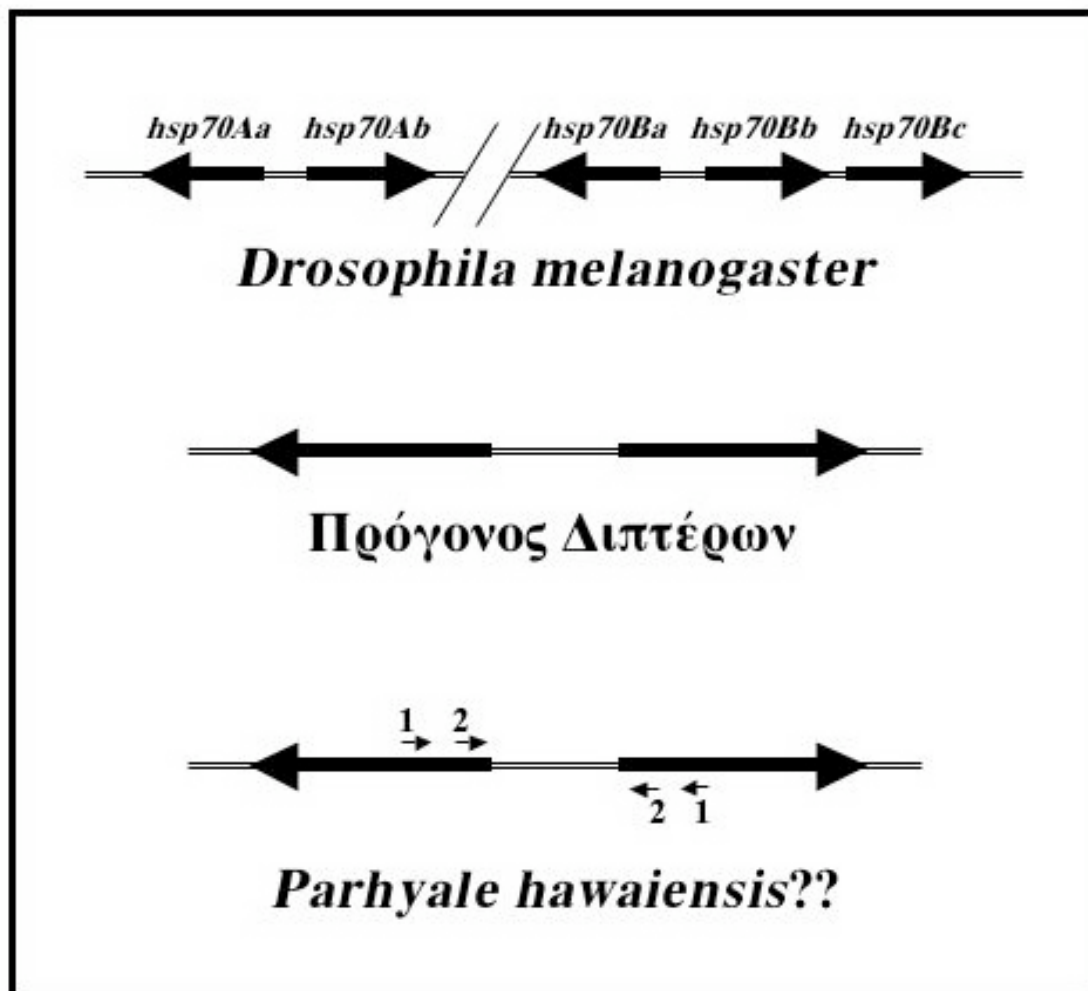


Εικόνα 48: Πρότυπα φθορισμού σε μωσαϊκά έμβρυα *Parhyale* που πιθανότατα φέρουν σωματικές ενθέσεις του τρानσποζονίου *Mi/3xP3-DsRed, Phhsp70a-DsRed*. **(A)** Πλευρική άποψη εμβρύου (πρόσθιο άκρο αριστερά, κοιλιακή επιφάνεια κάτω): ο εστιασμένος φθορισμός οφείλεται στο γονίδιο διάκρισης *3xP3-DsRed* (βέλος) και ο διάχυτος φθορισμός στο διαγονίδιο *Phhsp70a-DsRed*. **(B)** Κοιλιακή άποψη εμβρύου (πρόσθιο άκρο αριστερά). Η λευκή γραμμή υποδεικνύει τον επιμήκη άξονα συμμετρίας του σώματος. Το διαγονίδιο *Phhsp70a-DsRed* θερμο-επάγεται μόνο στο αριστερό ήμισυ του εμβρύου. **(Γ1)** Πλευρική άποψη εμβρύου (πρόσθιο άκρο αριστερά, κοιλιακή επιφάνεια κάτω): Το διαγονίδιο *Phhsp70a-DsRed* εκφράζεται σε τμήματα του κορμού και σε ορισμένα άκρα (μεγέθυνση στο **Γ2**).

6.1.4. Κλωνοποίηση της *cis*-ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου *Phhsp70b*

Στο γονιδίωμα της *Drosophila melanogaster* υπάρχουν 5 γονίδια *hsp70* τα οποία είναι οργανωμένα σε δύο γειτονικά σύμπλοκα. Στο πρώτο σύμπλοκο περιλαμβάνονται δύο αντίτυπα σε αναστραμμένη διάταξη, ενώ στο δεύτερο σύμπλοκο υπάρχουν τρία αντίτυπα, εκ των οποίων τα δύο βρίσκονται επίσης σε αναστραμμένη διάταξη (Εικόνα 49). Η αναστραμμένη διάταξη των γονιδίων *hsp70* είναι συντηρημένη μέσα στο γένος *Drosophila* (BETTENCOURT & FEDER 2001; LEIGH BROWN & ISH-HOROWICZ 1981) και πιθανώς να είναι και η προγονική κατάσταση όλων των Διπτέρων, καθώς συντηρείται και στο κουνούπι (BENEDICT *et al.* 1993). Επιπλέον, οι κωδικές περιοχές των γονιδίων *hsp70* κάθε συμπλόκου είναι πανομοιότυπες σε νουκλεοτιδικό επίπεδο, πιθανότατα λόγω της ομογενοποιητικής δράσης της γονιδιακής μετατροπής (gene conversion) (BETTENCOURT & FEDER 2002).

Στα καρκινοειδή δεν είναι γνωστός ο αριθμός και η οργάνωση των γονιδίων *hsp70* στο γονιδίωμα. Βάση της συλλογής των γονιδίων *hsp70* που απομονώσαμε από τον *Parhyale* με τη μεθοδολογία inversePCR, φάνηκε ότι και στον οργανισμό αυτό υπάρχουν πολλά αντίτυπα, τα οποία παρουσιάζονται αρκετά ομογενοποιημένα ως προς τις νουκλεοτιδικές τους αλληλουχίες. Αν διατηρούσαν και την ανεστραμμένη διάταξη που επιδεικνύουν τα δίπτερα, υποθέσαμε ότι θα μπορούσαμε με απλή αντίδραση PCR, χρησιμοποιώντας μόνο έναν εκκινητή που υβριδοποιεί στη συντηρημένη κωδική περιοχή με προσανατολισμό προς το 5' άκρο της, να απομονώσουμε τη *cis*-ρυθμιστική περιοχή που παρεμβάλλεται μεταξύ δύο γονιδίων (Εικόνα 49). Σε μία πρώτη αντίδραση PCR, χρησιμοποιήσαμε ως υπόστρωμα άκοπο γενωμικό DNA του *Parhyale* και ως εκκινητή, τον ένα μόνο από τους δύο εκκινητές (που είχε προσανατολισμό προς το 5' άκρο της κωδικής περιοχής) που είχαν δοκιμαστεί επιτυχώς στην iPCR. Η πρώτη αντίδραση, που δεν έδωσε ορατά προϊόντα, χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα σε δεύτερη αντίδραση PCR (nested), πάλι με ένα μόνο από τους δύο εκκινητές (που υβριδοποιούσε πιο κοντά στο 5' άκρο της κωδικής περιοχής) της δεύτερης αντίδρασης iPCR. Στην περίπτωση αυτή πολλαπλασιάστηκε ένα προϊόν μεγέθους ~2.5 kb, το οποίο αλληλουχήθηκε.



Εικόνα 49: Ανεστραμμένη διάταξη των γονιδίων *hsp70* στα δίπτερα και μεθοδολογία απομόνωσης του γονιδίου *Phhsp70b*. Σε κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε ένας μόνο εκκινητής, ο '1' στην πρώτη και ο '2' στη δεύτερη αντίδραση.

Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του προϊόντος φανέρωσε ότι στο ένα άκρο του εκτείνονταν άνωθεν της κωδικής περιοχής ενός γονιδίου *hsp70*, ενώ στο άλλο δεν ανιχνεύθηκε κάποιο πλαίσιο ανάγνωσης. Πιθανότατα, οι εκκινητές είχαν υβριδοποιηθεί ειδικά στη μία θέση πρόσδεσης και μη ειδικά στην άλλη. Η σύγκριση με τα γονίδια που είχαν απομονωθεί προηγούμενα με iPCR έδειξε ότι ο κλώνος αυτός αποτελούσε ένα διαφορετικό γονίδιο, το οποίο ονομάσαμε *Phhsp70b*. Η πιθανολογούμενη αμινοξική του αλληλουχία είχε ομολογία 89% με κατατεθειμένες στις βάσεις δεδομένων πρωτεΐνες Hsc70 σπονδυλωτών. Η στατιστική βαρύτητα της σύγκρισης ήταν βέβαια πολύ χαμηλή, καθώς διαθέταμε πολύ λίγα αμινοξέα από το N-τελικό άκρο της πιθανολογούμενης πρωτεΐνης (Εικόνα 50). Αξιωματικό εύρημα ήταν 11 σειριακές, σχεδόν τέλειες, επαναλήψεις (tandem repeats) μίας αλληλουχίας 16 bp σε απόσταση ~2.2 kb από το κωδικόνιο έναρξης (Εικόνα 50), της οποίας ο πυρήνας έμοιζε με τη θέση πρόσδεσης (CA_nTTG) αναπτυξιακών παραγόντων με περιοχή bHLH (basic helix-loop-helix) (MASSARI & MURRE 2000).

1 GTCGTCCTGTTGCCCTGGTCGTCCATCTACCCCAGCTGCCTAAATTCACCTGATGTGTCC
61 TCTGCTGCTGTGATTGCCTTC CAGTCAGTTGACTTAA CAGTCAGTGACTTAA CAGTCAGT
121 TGACTTAA CAGTCAGTTGACTTAA CAGTCTGTTGACTTAA GTCAGTTGACTTAA CAGTCA
181 GTTGACTTAA CAGTCTGTTGACTTAA CAATCTGTTGACTTAA CAATCTGTTCACTTAGCA
241 GTCAGTTGACTTAA TGGACAGAGCTATTATAGTAAAAATTTCCGGATATGGCTTCAAATTTG
301 GAGAGAATGAGGACTTGGAGGCTCTGCACTTTTTTCGCTGTTTTGACGAACGCGCCTTCGG
361 ACGCTGAACAATTCATACGTGTGAACGCCATAAGACGGACGTGTGGACCCCTCTATAGTG
421 TTGCTGTTCTTTCCCGGTGTGCCTCAGAAATGAATGAAATCCCATTCTTCTATTACACC
481 TCTTGATATTGCTTTCTTTTTAATTCTTAGGAACGCAAGGATATCTACCGGCAAATAGGC
541 ATTCCTGAAAATCCATACTAATAATTATCTTGGTCTGAATTACTACATTTTCAATTTGGAAA
601 TGTTGTTGAGCTCACGAGCTCTGGGTCAGTAAATAATGGCAACAACCGCCCGGGGGTGA
661 GCCGCGCCACCGCTACGGCAGGAAGTCTATAGCCACCCACCACCTCCCGCCACCGGC
721 ATATGATGCCGGCACCAAATATCTGCCCGGGGGCGGGCTTTGGCAGCGGTGGCAGCTT
781 CTAGAACTTTGGCTGCCACTTGGCGGCATCTGCTATCTCTGTTTCGTGCGTGTGTGCGGGG
841 CGAGGGTATTTAACACACAGCTCTATCAAATCAGGTCAATCTTGTACAGACCTGCGATCG
901 ATACGAGCATCACCTGTCGATAGTAACAATAATCAGCAGCAGCAGCTGATTCTGTGAGTG
961 ACAGTGATCACTGAAGAGACCAACCGGCTCACGCAACCAAACCTACACGAAGCCTGCAGA
1021 TCTTCTGCGAGATTTTTTTACAGCGAAAAGTGGTAAGTAGATTTTGCAGTGAAGAAGAAA
1081 AGTGCTTTGAATAGGAATTAATAAAAAAAAAATGTTTTAGCTTCTAGCACGAAGTTTGAGTGTA
1141 GCGTTTGCATCATTTCCGATTAGCTCAGAGTGATCCGCCCTGAATGTGTTGTTGGGAACAG
1201 TATGCACAAGACCCAATTAATGTGTTTTGTTCTATCATAGTCTCCTTAAATAATGACAAA
1261 GTCAATATCCAGCACAGAGGAACCCCTCGAGATTTATATTTGCCAAATGTTGTTTAAATAA
1321 GAGTTTCCTTTGAGATGCATTTCCCGTTCATGAGCAGTCACCCAAGAAAACGTTCAATATT
1381 CCAACATTTCTTAAAGTATTCTTTCTATTTGATTTGGAAAGGTAGATTTTAGAGGTGACA

Εικόνα 50 (συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα)

```

1441 AAGATACGCCCATTCGAATAGGGAGTATCCACGGCATTGACAGGTGTGTTCCCTCTTGCTT
1501 CAAAGTGGTATACCGTTCGCGTATCGCCAGAGACTTTCAGTTTCATTTATGGACAGTTTT
1561 ATATTTACATCTAGAATTTTTTTCTTACTTATGCAGCCAGAGCGATTATGTCATTATCAG
1621 AATGTCAGCAACTGATAGTCTTTCTCAATGTCCAGAACTACATATGCTGCTCTTTTGAT
1681 AAATTTATTTCTCAATTTAATTTGTACAATTTGATGCCAATTTGGGAGGCCACTATACAGCT
1741 GTCCCGGGTAAAAGCTACATTCACTAGGAACTAGGAAACGACATGCTAACGAACTCTAC
1801 AGGGAGGGGATGAGGGGACATTAGGAAATGTATGTAAAAAATACTGTCAAGTCCACAGAG
1861 TGCACACCATTGTGTGGTGCAAGAGCTCTCAGTTAAGTACTTTAACTGCACGCCTACTTA
1921 TCTTTATCTGATAAAGCAATTAGAAGCATCTGATATAGCTAACATTTGACAGGGAAGAAG
1981 GACAACGGGCTGAGTGACAGATTATTTTCCCATGACGCAGCGCTTACCCCTCCGTAAACCC
2041 TTTGCGGGCCACTGCAAAAAGTGATTTTCGTAGGAATAGCATTTGTA AAAAGTAACTAAATATG
2101 AGCACTTGCCCTGTAAATGAGTAATAAAAAATGTGTTACCGGATGATCCCCCTGTCTTTGTT
2161 TCAATGCACGATCAAAC TCAATAAAAAATGAAATTTGCAACTAACATAGGCCCCAAGCAACA
2221 CAATCTTAATCATTAGGAGAA TAGGCGCTGTATATTTAGCAGCGCACCCCTGAACGTATCT
2281 GAAGTACATCATTTGTACCACGCAGTGAATTTGGACCGCTCTGATCGACTTTGGAATTATT
2341 AATGGTTGTGCCTAAAAGTACCGCCCATCCGGATCATATTCACA AACTGGCTTTACTCCAC
2401 AGGTAATCAGCCGTAATGTCCAAGGGGAGCGCAGTGGGCAGCGACCTGGGCACCACCTAC
      M S K G S A V G S D L G T T Y
2461 TCCTGCGTGGG GGTGTTCCAGCATGGCAAG
      S C V G V F Q H G K

```

Εικόνα 50: Η απομονωμένη αλληλουχία του γονιδίου *Phhsp70b*. Με τη μεθοδολογία που ακολουθήσαμε αποκτήθηκε μόνο ένα μικρό μέρος της πιθανολογούμενης κωδικής του περιοχής. Η αμινοξική αλληλουχία παρατίθεται κάτω από τη νουκλεοτιδική. Σε πράσινο και κίτρινο φόντο εναλλάξ διακρίνονται οι 11 σειριακές επαναλήψεις της αλληλουχίας που περιλαμβάνει πιθανές θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων με περιοχή bHLH. Η αλληλουχία των εκκινητών στα δύο άκρα υποδεικνύεται σε θαλασσί φόντο.

6.1.5. Έλεγχος της ενεργότητας της *cis*-ρυθμιστικής αλληλουχίας του γονιδίου *Phhsp70b* στον *Parhyale*

Η ενεργότητα της *cis*-ρυθμιστικής αλληλουχίας του γονιδίου *Phhsp70b* (άνωθεν του κωδικονίου έναρξης) ελέγχθηκε, όπως προηγουμένως, με τη βοήθεια του γονιδίου αναφοράς *DsRedT1*. Το διαγονίδιο *Phhsp70b-DsRed* κλωνοποιήθηκε στο φορέα μετασηματισμού *Mi{3xP3-DsRed}* (Εικόνα 52A) και συν-ενέθηκε με το βοηθό-mRNA σε έμβρυα ενός ή δύο κυττάρων σε συγκεντρώσεις 300 ng/μl και 100 ng/μl, αντίστοιχα (Πίνακας 14).

ΠΙΝΑΚΑΣ 14

Εισαγωγή του διαγονιδίου *Phhsp70b-DsRed* στο γονιδίωμα του *Parhyale*

Αρ. ενεμένων εμβρύων	Αρ. εμβρύων που εκκολάφθηκαν	Αρ. φθοριζόντων εμβρύων ^α	Αρ. γόνιμων ενήλικων G ₀	Αρ. G ₀ με διαγονιδιακούς απογόνους	Συχνότητα μετασχηματισμού (%)
203	53	>7	10	3	30

^α Έμβρυα με μονόπλευρο ή αμφίπλευρο φθορισμό λόγω συν-έκφρασης του γονιδίου διάκρισης *3xP3-DsRed* και του διαγονιδίου *Phhsp70b-DsRed*.

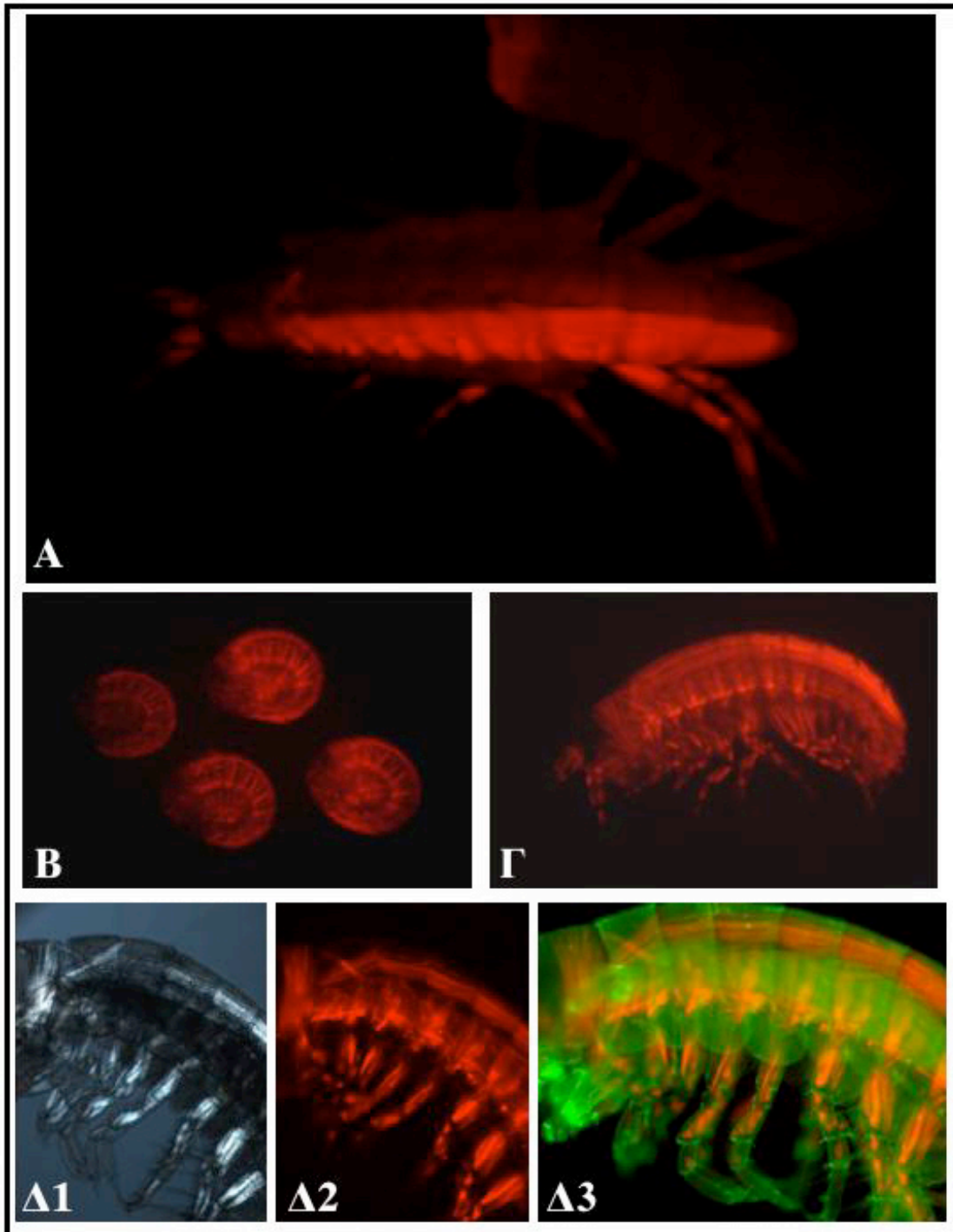
Ένα υποσύνολο των ενεμένων ατόμων G₀ εμφάνισε τις τελευταίες δύο ημέρες της εμβρυογένεσης το χαρακτηριστικό πρότυπο έκφρασης του γονιδίου διάκρισης *3xP3-DsRed*. Με τη διαφορά ότι η έκφραση της DsRedT1 δεν περιοριζόταν μόνο στα νευρικά κύτταρα πίσω από τους οφθαλμούς, αλλά ανιχνευόταν και σε πολλές ακόμη περιοχές του εμβρύου, σε ιστούς που είχαν τη χαρακτηριστική δομή των μυών (Εικόνα 51B). Η ενεργότητα αυτή, που αποδόθηκε στο διαγονίδιο *Phhsp70b-DsRed*, δεν έδειχνε να είναι θερμοεξααρτώμενη, καθώς η ένταση του φθορισμού δεν αυξανόταν ύστερα από επώαση των εμβρύων στους 37°C, ούτε και πυροδοτούνταν σε έμβρυα που δεν φθόριζαν (σε αντίθεση με τον *Phhsp70a*). Η ρυθμιστική αλληλουχία *Phhsp70b* ενεργοποιούνταν στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο με τον ενισχυτή *3xP3* και διατηρούσε την ενεργότητά της σε όλα τα κατοπινά στάδια (Εικόνα 51). Μάλιστα σε ορισμένα ζώα επικάλυπτε το πρότυπο έκφρασης του *3xP3* λόγω της έκφρασής της σε μύες που διατρέχουν κάθετα το οπίσθιο μέρος της κεφαλής. Όπως ακριβώς και το γονίδιο διάκρισης *3xP3-DsRed*, η έκφραση του διαγονιδίου *Phhsp70b-DsRed* ανιχνεύθηκε σε ένα υποσύνολο των ατόμων G₀, είτε μονόπλευρα είτε αμφίπλευρικά. Στην πρώτη περίπτωση, ο μωσαϊκός ημιφθορισμός του ζώου κατά μήκος του επιμήκη άξονα ήταν εντυπωσιακός (Εικόνα 51A).

Τα 53 έμβρυα που εκκολάφθηκαν, αναπτύχθηκαν ξεχωριστά σε τρυβλία petri και 10 από αυτά ενηλικιώθηκαν και επαναδιασταυρώθηκαν με άτομα αγρίου τύπου (Πίνακας 14). Τρεις γονείς G₀ είχαν μετασχηματισμένες γαμετικές σειρές και έδωσαν διαγονιδιακούς απογόνους. Σε αντίθεση με τις αρχικές διαγονιακές σειρές του *Parhyale* (Ενότητα 3.1.4), το ποσοστό των διαγονιδιακών ατόμων G₁ ήταν 100% μόνο σε μία διασταύρωση. Στις άλλες δύο το ποσοστό μειώθηκε στο 31% (8 στα 26) και στο 35% (39 στα 110), αντίστοιχα. Υπενθυμίζεται, ότι στα πειράματα της Ενότητας 3.1.4 αποκτήθηκαν διαγονιδιακοί απόγονοι αποκλειστικά από γονείς G₀ που εξέφραζαν στα σωματικά τους κύτταρα το γονίδιο διάκρισης *3xP3-DsRed*. Στην προκειμένη περίπτωση, ο γονέας με το απόλυτο ποσοστό φθόριζε μονόπλευρα, αυτός με το 35% δε φθόριζε, ενώ ο γονέας με το μικρότερο ποσοστό φθόριζε αμφίπλευρικά. Μεταξύ των ατόμων G₀ που δεν είχαν μετασχηματισμένες γαμετικές σειρές συγκαταλέγονταν και ένα που φθόριζε μονόπλευρα.

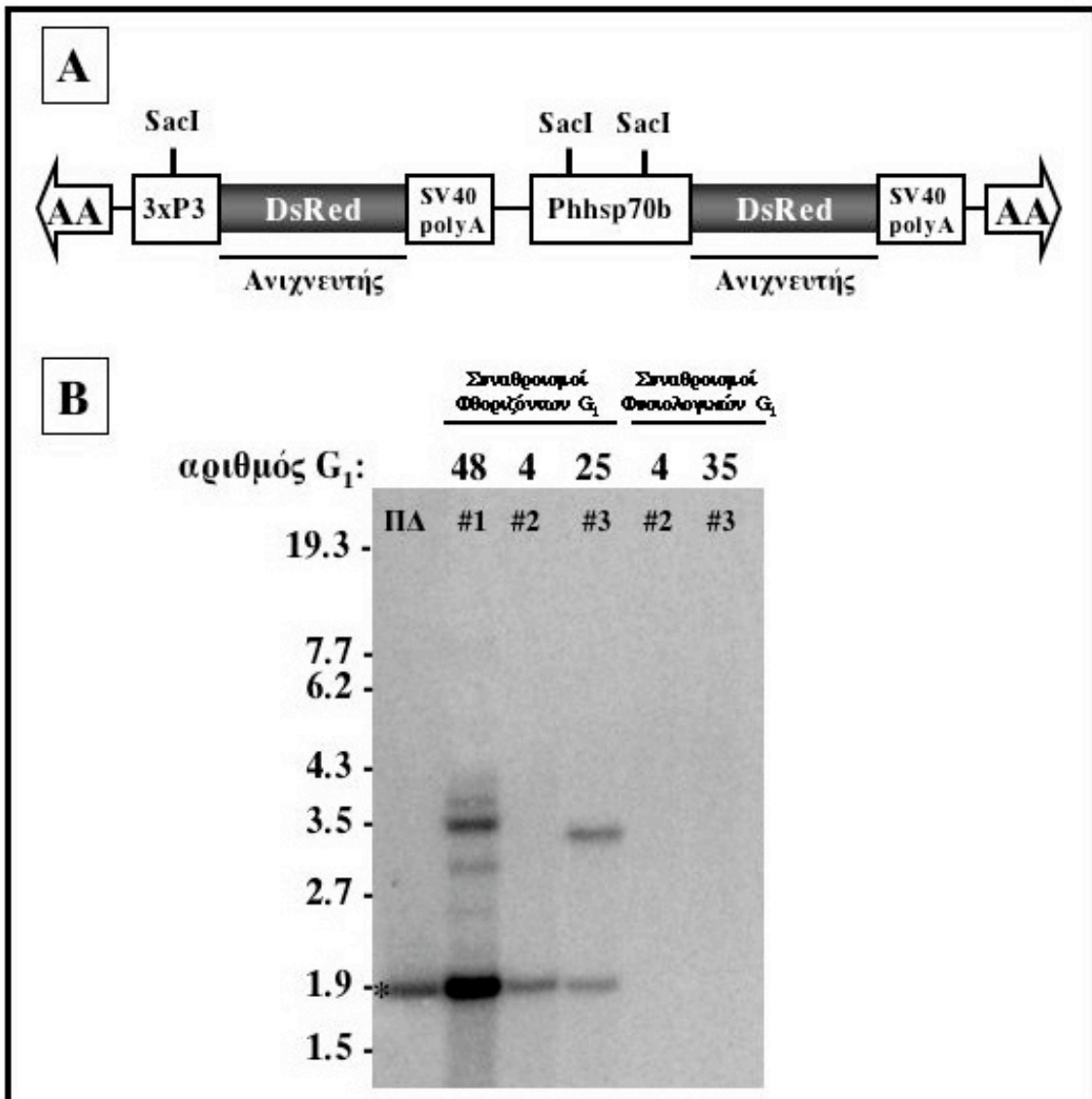
Η ανάλυση των διαγονιδιακών ατόμων επιβεβαίωσε τις αρχικές ενδείξεις που είχαμε, ότι ο ενισχυτής *Phhsp70b* είναι αναπτυξιακά ρυθμιζόμενος και όχι θερμικά. Η ενεργότητά του πρωτοανιχνεύεται την 8^η ημέρα της εμβρυογένεσης, καθώς ολοκληρώνεται η εμβρυογένεση, πιθανότατα σε ήδη διαφοροποιημένες μυϊκές ίνες. Η συσσώρευση της DsRedT1 από αυτό το στάδιο και ύστερα σε όλους τους μύες των διαγονιδιακών αμφιπόδων, δε μειώνει τη βιωσιμότητα και τη γονιμότητά τους.

Προκειμένου να διερευνηθεί ο αριθμός και η αριτιότητα των ενθέσεων του τρानσποζονίου *Minos* στο γονιδίωμα των γονέων G₀ με μετασχηματισμένες γαμετικές σειρές, απομονώθηκε γενωμικό DNA από τους τρεις συναθροισμούς των διαγονιδιακών απογόνων τους G₁ και αναλύθηκε κατά Southern. Όλα τα

δείγματα επώαστηκαν με SacI και υβριδοποιήθηκαν με ανιχνευτή την κωδική περιοχή του γονιδίου *dsredt1* (Εικόνα 52A). Ο συνδυασμός αυτός αποκαλύπτει δύο ζώνες ανά ένθεση, ένα εσωτερικό τμήμα του τρανσποζονίου με αναμενόμενο μέγεθος 1.9 kb και ένα μεταβλητό τμήμα, με μικρότερο αναμενόμενο μέγεθος για ακέραιες ενθέσεις επίσης 1.9 kb (η ενδονουκλεάση SacI αναγνωρίζει και μία θέση στον κορμό του πλασμιδίου-δότη, ακριβώς δίπλα στο δεξί ανεστραμμένο άκρο του *Minos*). Ο γονέας G₀ (#1) που έδωσε αποκλειστικά διαγονιδιακούς απογόνους περιείχε πολλαπλά αντίτυπα (≥5) του στοιχείου *Minos* στη γαμετική του σειρά, ενώ τα δύο άτομα G₀ (#2 και #3) με τα μικρότερα ποσοστά διαγονιδιακών απογόνων έφεραν ο καθένας από μία ένθεση (Εικόνα 52B). Η ανάλυση κατά Southern σε συναθροισμούς μη φθοριζόντων απογόνων G₁ των δύο γονέων δε φανέρωσε την ύπαρξη ενθέσεων στο γονιδιώμα τους. Και στις τρεις περιπτώσεις, το μέγεθος των ζωνών συνηγορούσε υπέρ της ένθεσης ακέραιων τρανσποζονίων στο γονιδίωμα των αμφιπόδων.



Εικόνα 51: Πρότυπο έκφρασης του διαγονιδίου *Phhsp70b-DsRed* στον *Parhyale*. **(Α)** Μωσαϊκός γονέας G_0 με έκφραση του διαγονιδίου στο αριστερό ήμισυ του σώματός του. **(Β)** Διαγονιδιακά όψιμα έμβρυα με διαφορετική ένταση φθορισμού. **(Γ)** Μετασχηματισμένος νεοσσός με έκφραση του διαγονιδίου στους μύες του σώματός του. **(Δ1-3)** Μεγαλύτερη μεγέθυνση μετασχηματισμένου νεοσσού **(1)** σε πολωμένο φως, όπου οι μύες διακρίνονται με λευκό χρώμα, **(2)** με φίλτρα ανίχνευσης TRITC, όπου οι μύες διακρίνονται από το φθορισμό τους και **(3)** ύστερα από συνένωση (merge) των φωτογραφιών με φίλτρα ανίχνευσης EGFP και TRITC, όπου οι κόκκινοι φθορίζοντες μύες διακρίνονται σε σχέση με τον πράσινο αυτοφθορίζοντα εξωσκελετό. Η πρώτη φωτογραφία τραβήχτηκε σε στερεοσκόπιο φθορισμού με φίλτρα ανίχνευσης DsRedT1 (ραχιαία άποψη, πρόσθιο άκρο αριστερά) και οι υπόλοιπες φωτογραφίες σε μικροσκόπιο φθορισμού (πλευρικές απόψεις, πρόσθιο άκρο αριστερά, κοιλιακή επιφάνεια κάτω).



Εικόνα 52: Μοριακή ανάλυση των ενθέσεων του *Minos* στο γονιδίωμα του *Parhyale*. **(A)** Σχηματική αναπαράσταση του τραπεζοζονίου *Mi* (*3xP3-DsRed, Phhsp70b-DsRed*). Πλαισιώνεται από το αριστερό και το δεξί ανεστραμμένο άκρο (AA) του *Minos*. Η *dsred1* χρησιμοποιείται τόσο ως γονίδιο διάκρισης υπό τον έλεγχο του τεχνητού υποκινητή *3xP3*, όσο και ως γονίδιο αναφοράς υπό τον έλεγχο της *cis*-ρυθμιστικής αλληλουχίας *Phhsp70b*. **(B)** Ανάλυση κατά Southern δειγμάτων που επωάστησαν με *SacI* και υβριδοποιήθηκαν με ανιχνευτή την κωδική περιοχή του γονιδίου *dsred1*. Αναμένονται δύο ζώνες ανά ένθεση. **Διαδρομή 1:** Το πλασμίδιο-δότης *rMi* (*3xP3-DsRed, Phhsp70b-DsRed*) κομμένο με *SacI*; η (διπλή) ζώνη 1.9 kb (αστερίσκος) οριοθετεί τα αναμενόμενα μεγέθη ζωνών για ακέραιες ενθέσεις του *Minos*, **Διαδρομή 2:** Συναθροισμός φθοριζόντων απογόνων G₁ από το γονέα G₀ (#1) με 100% διαγονιδιακούς απογόνους, **Διαδρομές 3-4:** Συναθροισμοί φθοριζόντων απογόνων G₁ από τους δύο γονείς G₀ (#2 και #3) με ποσοστά διαγονιδιακών απογόνων 31% και 35% αντίστοιχα, **Διαδρομές 5-6:** Συναθροισμοί φυσιολογικών/μη φθοριζόντων απογόνων G₁ από τους γονείς G₀ (#2 και #3). Ο αριθμός των ατόμων κάθε συναθροισμού φαίνεται πάνω από κάθε διαδρομή.

6.2. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.2.1. *Phhsp70a* και *Phhsp70b*: Ίδια οικογένεια, διαφορετικοί ρόλοι

Το βασικό κίνητρο της τελευταίας σειράς πειραμάτων της διατριβής μου ήταν η απομόνωση μίας θερμο-επαγόμενης *cis*-ρυθμιστικής περιοχής από το γονιδίωμα του αμφιπόδου *Parhyale hawaiensis*. Με δύο παραλλαγές της PCR απομονώθηκαν αλληλουχίες από πέντε διαφορετικά γονίδια της οικογένειας *hsp70*. Το ενδιαφέρον μας επικεντρώθηκε σε δύο εξ αυτών, τα *Phhsp70a* και *Phhsp70b*. Συνολικά αποκτήθηκαν ~1 kb κωδικής και ~1.3 kb μη κωδικής αλληλουχίας από το γονίδιο *Phhsp70a* και ~2.5 kb σχεδόν αποκλειστικά μη κωδικής αλληλουχίας από το γονίδιο *Phhsp70b*. Οι μη κωδικές περιοχές ελέγχθηκαν για την ενεργότητα τους στο αμφίποδο με τη βοήθεια κατασκευών, στις οποίες το *dsred1* χρησιμοποιήθηκε ταυτόχρονα ως γονίδιο διάκρισης και ως γονίδιο αναφοράς. Χάρη στην εντοπισμένη έκφραση του *3xP3-DsRed* σε λίγα μόνο νευρικά κύτταρα της κεφαλής δεν προκλήθηκε, όπως αναμενόταν, σύγχυση στην ερμηνεία των προτύπων φθορισμού.

Τα αποτελέσματά μας ήταν ξεκάθαρα στην περίπτωση της ρυθμιστικής περιοχής *Phhsp70b*. Η ανάλυση διαγονιδιακών απογόνων από τρεις ανεξάρτητους γονείς με μετασχηματισμένες γαμετικές σειρές φανέρωσε ένα σταθερά επαναλαμβανόμενο πρότυπο φθορισμού στους διαφοροποιημένους μύες. Η αναπτυξιακή ρύθμιση του γονιδίου *Phhsp70b* βρίσκεται σε συμφωνία με την ομολογία που επιδεικνύει η πιθανολογούμενη αμινοξική του αλληλουχία με τις πρωτεΐνες Hsc70, καθώς και με την ύπαρξη των σειριακών επαναλήψεων στη ρυθμιστική περιοχή του. Μυογόνοι αναπτυξιακοί παράγοντες bHLH, όπως οι MyoD και myogenin, προσδένονται σε θέσεις όμοιες με την κεντρική αλληλουχία των επαναλήψεων (PURI & SARTORELLI 2000). Προφανώς, η ρυθμιστική αλληλουχία *Phhsp70b* δε μπορεί να αξιοποιηθεί για την ομοιόμορφη εκτοπική έκφραση γονιδίων. Ο συνδυασμός της όμως με μία φθορίζουσα πρωτεΐνη και η χρήση της ως εναλλακτικού γονιδίου διάκρισης στον *Parhyale* θα διευκολύνει στο μέλλον τους γενετικούς χειρισμούς σε αυτό τον οργανισμό.

Τα συμπεράσματα για την ενεργότητα της ρυθμιστικής περιοχής *Phhsp70a* στηρίχτηκαν αποκλειστικά στη μελέτη των ενεμένων εμβρύων G₀. Η ανάλυση αυτή δεν είναι αυθαίρετη, αν ληφθεί υπόψη ότι το πρότυπο των δύο άλλων ρυθμιστικών αλληλουχιών *3xP3* και *Phhsp70b* δε διαφοροποιούνταν μεταξύ των μωσαϊκών ατόμων G₀ και των διαγονιδιακών ατόμων G₁. Η ανάλυση κατά Northern επιβεβαίωσε ότι το γονίδιο *Phhsp70a* είναι θερμο-ρυθμιζόμενο, ανενεργό σε θερμοκρασίες μέχρι 32°C και ενεργό σε πολύ υψηλά επίπεδα στους 37°C. Η αναπαραγωγή αυτού του προτύπου από το διαγονίδιο *Phhsp70a-DsRed* ήταν το κομβικό σημείο της ανάλυσης. Η διαφορά στα επίπεδα φθορισμού που επέδειξαν πολλά έμβρυα πριν και μετά την επώασή τους στους 37°C αποτελεί ισχυρή ένδειξη, ότι η ρυθμιστική περιοχή που απομονώθηκε αποκρίνεται στο θερμοϊκό στρες. Επιπλέον, η ενεργοποίησή της δεν περιορίζονταν σε κάποιους συγκεκριμένους ιστούς, αλλά ήταν διάσπαρτη σε πολλές διαφορετικές περιοχές του εμβρύου, όπως θα ανέμενε κανείς για έναν ομοιόμορφα θερμο-επαγόμενο ενισχυτή.

Αυτό που προβληματίζει περισσότερο στην περίπτωση του ενισχυτή *Phhsp70a*, είναι αν θα παραμένει ανενεργός σε φυσιολογικές θερμοκρασίες. Σε ορισμένα έμβρυα G₀, η έκφραση του *Phhsp70a-DsRed* ανιχνεύτηκε και χωρίς θερμοεπαγωγή. Στα πειράματα που θέλουμε να αξιοποιηθεί μελλοντικά, δηλαδή στη χρονικά ελεγχόμενη εκτοπική έκφραση αναπτυξιακών παραγόντων, η προοπτική της μη επαγόμενης έκφρασης των διαγονιδίων θα ήταν ολέθρια, καθώς θα οδηγούσε πιθανότατα στη θανάτωση των μετασχηματισμένων ατόμων

G₀. Μέσα από αυτό το πρίσμα κρίνεται επιτακτική η μελέτη της ενεργότητας της *cis*-ρυθμιστικής περιοχής και σε διαγονιδιακά άτομα. Μέχρι να επαναληφθεί το πείραμα, δε μπορεί να αξιολογηθεί αν η θνησιμότητα των ατόμων G₀ σχετιζόταν με τη δράση του διαγονιδίου *Phhsp70a-DsRed*.

6.2.2. Εμπλουτίζοντας την εμπειρία μας στο μετασχηματισμό του *Parhyale*

Στα αρχικά πειράματα μετασχηματισμού του *Parhyale* είχαν ανιχνευθεί δεκάδες αντίτυπα του στοιχείου *Minos* σε όλες τις μετασχηματισμένες γαμετικές σειρές των ατόμων G₀. Άμεση συνέπεια ήταν ότι το 100% των απογόνων τους G₁ ήταν διαγονιδιακοί. Για να περιοριστεί ο αριθμός των ενθέσεων, σε αυτή τη σειρά των πειραμάτων μειώθηκαν οι συγκεντρώσεις του πλασμιδίου-δότη (300 ng/μl αντί 500 ng/μl) και της τρानσποζάσης (100 ng/μl αντί 300 ng/μl). Παράλληλα, τα μετατιθέμενα τρानσποζόνια *Mi{3xP3-DsRed, Phhsp70a-DsRed}* και *Mi{3xP3-DsRed, Phhsp70b-DsRed}* είχαν αρκετά μεγαλύτερο μέγεθος (4.2 kb και 5.3 kb, αντίστοιχα) έναντι του 'άδειου' φορέα *Mi{3xP3-DsRed}* (μεγέθους 2 kb). Οι δύο αυτοί παράμετροι οδήγησαν σε μικρότερο αριθμό ενθέσεων του *Minos* στη γαμετική σειρά του *Parhyale*, όπως φάνηκε από τα ποσοστά διαγονιδιακών απογόνων στην περίπτωση του *Mi{3xP3-DsRed, Phhsp70b-DsRed}* και επιβεβαιώθηκε από την ανάλυση κατά Southern των διαγονιδιακών ατόμων G₁. Ακόμη και ο γονέας G₀ που έδωσε αποκλειστικά διαγονιδιακούς απογόνους, έφερε στη γαμετική του σειρά σημαντικά χαμηλότερο αριθμό ενθέσεων συγκριτικά με τα πρώτα πειράματα. Επιπλέον, η ξεχωριστή ανάλυση των φθοριζόντων και μη φθοριζόντων απογόνων από τους δύο άλλους γονείς με μία μόνο ένθεση στη γαμετική τους σειρά, έδειξε ότι και ένα μόνο αντίτυπο του γονιδίου διάκρισης *3xP3-DsRed* (ή/και του διαγονιδίου *Phhsp70b-DsRed*) είναι αρκετό για το διαχωρισμό των διαγονιδιακών αμφιπόδων από τα φυσιολογικά.

Στην περίπτωση του *Mi{3xP3-DsRed}* μόνο οι γονείς που εξέφραζαν μονόπλευρα ή αμφιπλευρικά το γονίδιο διάκρισης έδωσαν διαγονιδιακούς απογόνους. Αντίθετα, με το τρानσποζόνιο *Mi{3xP3-DsRed, Phhsp70b-DsRed}* αποκτήθηκαν διαγονιδιακοί απόγονοι από ένα μη φθοριζόντα γονέα και αντίστροφα, δεν έδωσε διαγονιδιακούς απογόνους ένας ημιφθοριζόντας γονέας. Συνεπώς, η έκφραση των διαγονιδίων στα σωματικά κύτταρα των ενεμένων ατόμων G₀ μπορεί να θεωρηθεί ως μία καλή ένδειξη μετασχηματισμού της γαμετικής τους σειράς, αλλά όχι ως ασφαλής απόδειξη.

Ενίοντας στα στάδια του ενός η των δύο κυττάρων παρατηρήθηκαν γονείς με μονόπλευρο φθορισμό, τόσο με το *3xP3-DsRed* που εκφράζεται σε κύτταρα εξωδερμικής προέλευσης, όσο και με το *Phhsp70b-DsRed* που εκφράζεται στο σωματικό μεσόδερμα. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τη γενεαλογία των βλαστομεριδίων που έχει περιγραφεί, σύμφωνα με την οποία ήδη από το εμβρυϊκό στάδιο των δύο κυττάρων διαχωρίζεται το δεξί από το αριστερό μέρος του σώματος (GERBERDING *et al.* 2002).

Τέλος, το μεγαλύτερο μέγεθος του τρानσποζονίου *Mi{3xP3-DsRed, Phhsp70b-DsRed}* δεν είχε επίπτωση στη συχνότητα μετασχηματισμού η οποία κυμάνθηκε στο 30%. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι το στοιχείο *Minos* είναι ικανό να μεταφέρει μεγάλα τμήματα εξωγενούς DNA στο γονιδίωμα του *Parhyale*, όπως ακριβώς συμβαίνει και στα έντομα.

6.2.3. Μελλοντικές κατευθύνσεις

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, βασική προτεραιότητα αποτελεί ο έλεγχος της ενεργότητας της απομονωμένης περιοχής *Phhsp70a* σε διαγονιδιακά άτομα. Αν αποδειχθεί ότι παραμένει ανενεργή στις φυσιολογικές θερμοκρασίες ανάπτυξης του οργανισμού και ότι ενεργοποιείται αποκλειστικά με θερμικό σοκ, τότε θα

χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της λειτουργίας γονιδίων μέσω της εκτοπικής έκφρασής τους στον *Parhyale*. Η μελέτη αυτή θα εστιαστεί τόσο σε ενδογενή αναπτυξιακά γονίδια του αμφιπόδου, όσο και σε αναπτυξιακά γονίδια άλλων αρθροπόδων. Ήδη στο εργαστήριο του συνεργάτη μας Nipam Patel έχουν απομονώσει κλώνους cDNA για αρκετά γονίδια *Hox* του *Parhyale*, τα οποία είναι και οι πρώτοι υποψήφιοι για εκτοπική έκφραση. Οι φαινοτυπικές αλλαγές στις περιπτώσεις εκτοπικής έκφρασης των γονιδίων *Hox* είναι, συγκριτικά με άλλων γονιδίων, πιο εύκολα ερμηνεύσιμες, καθώς οδηγούν συχνά στον ομοιωτικό μετασχηματισμό των μεταμερών και των εξαρτημάτων που επηρεάζονται. Επεκτείνοντας μία τέτοιου είδους ανάλυση και σε ορθόλογα γονίδια *Hox* άλλων αρθροπόδων, θα μπορέσουν να αντληθούν συμπεράσματα σχετικά με τη συντήρηση αφενός, και την απόκλιση αφετέρου της λειτουργίας τους κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Επιπλέον, θα μπορούν εφεξής να πραγματοποιούνται αμφίδρομες λειτουργικές συγκρίσεις μεταξύ της *Drosophila* και του *Parhyale*, ώστε να διασφαλίζεται σε μεγάλο βαθμό η εγκυρότητα των εξελικτικών συμπερασμάτων.

Στην περίπτωση που οι αλληλουχίες του γονιδίου *Phhsp70a* δεν αποδειχτούν χρήσιμες για τους παραπάνω σκοπούς, θα υπάρχουν δύο εναλλακτικές: είτε να προχωρήσουμε στην απομόνωση και το χαρακτηρισμό των ρυθμιστικών περιοχών άλλων γονιδίων *hsp70* του *Parhyale*, είτε να επενδύσουμε στην ανάπτυξη των ζευγαρωτών διατάξεων που περιγράφηκαν στην Ενότητα 1.5 (π.χ. σύστημα Gal4/UAS). Στο δεύτερο ενδεχόμενο, οι ρυθμιστικές αλληλουχίες του γονιδίου *Phhsp70b* θα μας είναι εξαιρετικά πολύτιμες για τα προκαταρκτικά πειράματα εφαρμογής της μεθόδου.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

7. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

7.1 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ

7.1.1. Θεμελιώδη πλασμίδια

Ο βασισμένος στο στοιχείο *Minos* φορέας μετασχηματισμού pMi{3xP3-EGFP} (δώρο X. Σαββάκη).

Το γονίδιο διάκρισης *3xP3-EGFP*, που αποτελείται από τον τεχνητό ενισχυτή *3xP3*, το βασικό υποκινητή και την 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (MMΠ) του γονιδίου *hsp70* της *D. melanogaster* (nt -40 έως +70 σε σχέση με τη θέση έναρξης της μεταγραφής), την κωδική περιοχή του γονιδίου *egfp* και την περιοχή πολυαδενυλίωσης *SV40*, απομονώθηκε ως τμήμα EcoRI/FseI (αφαίρεση 3' μονόκλωνων άκρων με T4 πολυμεράση) από το πλασμίδιο pSL3xP3-EGFPaf (HORN & WIMMER 2000) και υποκλωνοποιήθηκε στο φορέα pBluescriptKSII(+) (Stratagene) κομμένο με EcoRI/SmaI. Από εκεί εξήχθη ως τμήμα XbaI/XhoI και αντικατέστησε το γονίδιο ανθεκτικότητας στη τετρακυκλίνη στο πλασμίδιο pMiLR-Tet^R (KLINAKIS *et al.* 2000a) που είχε κοπεί με τα ίδια ένζυμα περιορισμού. Το πλασμίδιο pMi{3xP3-EGFP} περιέχει μία μοναδική θέση κλωνοποίησης AscI μεταξύ της *SV40polyA* και του δεξιού άκρου του *Minos*.

Ο βασισμένος στο στοιχείο *Minos* φορέας μετασχηματισμού pMi{3xP3-DsRed}.

Η κωδική περιοχή του γονιδίου *dsred1* απομονώθηκε ως τμήμα NcoI/NotI από το πλασμίδιο pSPDsRedT1 (δώρο N. Patel) και αντικατέστησε το πλαίσιο ανάγνωσης της EGFP στο φορέα μετασχηματισμού pMi{3xP3-EGFP} που κόπηκε με τα ίδια ένζυμα. Η πέψη με το ένζυμο NotI προσηγήθηκε εκείνης με NcoI και ήταν ατελής (partial), καθώς υπάρχει και δεύτερη θέση NotI μεταξύ της *SV40polyA* και του δεξιού άκρου του *Minos*.

Το πλασμίδιο-βοηθός pHSS6hsILMi20 (KLINAKIS *et al.* 2000a).

Περιλαμβάνει την κωδική περιοχή του γονιδίου της τρικοζίνης *Minos* κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *hsp70* της *D. melanogaster*. Ο υποκινητής αυτός διαθέτει όλα τα απαραίτητα *cis*-στοιχεία για θερμική επαγωγή στη *Drosophila*, αλλά παρέχει χαμηλά επίπεδα έκφρασης και χωρίς επαγωγή. Είναι λειτουργικός και σε άλλα είδη Διπτέρων και στο *Tribolium*.

Το πλασμίδιο-μήτρα pBlueSKMimRNA για τη σύνθεση του βοηθού mRNA.

Από το πλασμίδιο pNB40ILT (KAPETANAKI *et al.* 2002) απομονώθηκε τμήμα DNA μεγέθους 1.9 kb με άκρα PstI (αφαίρεση 3' μονόκλωνων άκρων με T4 πολυμεράση)/NotI, που περιλαμβάνει την 5' MMΠ του γονιδίου *hsp70* της *D. melanogaster* (nt 1596-1716 της κατατεθειμένης αλληλουχίας J01104), την κωδική περιοχή του γονιδίου της τρικοζίνης *Minos* και την 3' MMΠ του γονιδίου *if* της *D. melanogaster* (*inflated*= α_{PS2} integrin subunit; nt 5026-5726 της κατατεθειμένης αλληλουχίας M19059). Ακολούθως κλωνοποιήθηκε στο φορέα pBluescriptSKII(+) (Stratagene) κομμένο με KpnI(αφαίρεση 3' μονόκλωνων άκρων με T4 πολυμεράση)/NotI, τοποθετώντας την παραπάνω μεταγραφική μονάδα υπό τον έλεγχο του υποκινητή T7.

Ο βασισμένος στο στοιχείο *piggyBac* φορέας μετασχηματισμού pBac{3xP3-EGFPaf} (HORN & WIMMER 2000).

Φέρει το γονίδιο διάκρισης *3xP3-EGFP* και τις μοναδικές θέσεις κλωνοποίησης AscI και FseI.

Το πλασμίδιο-βοηθός phsp-pBac (HANDLER & HARRELL 1999).

Περιλαμβάνει την κωδική περιοχή του γονιδίου της τρικοζίνης *piggyBac* κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *hsp70* της *D. melanogaster*.

Ο ενδιάμεσος φορέας κλωνοποίησης pSLfa1180fa (HORN & WIMMER 2000). Φέρει ένα μεγάλο πολυσυνδέτη (polylinker) με πληθώρα θέσεων αναγνώρισης από ένζυμα περιορισμού, ιδανικό για τη σύνθεση πολύπλοκων κατασκευών. Ο πολυσυνδέτης περιβάλλεται εκατέρωθεν από δύο θέσεις AscI και FseI (8-cutters), που εξυπηρετούν την εξαγωγή των ενδιάμεσων αλληλουχιών και την κλωνοποίησή τους στους φορείς μετασχηματισμού.

7.1.2. Πλασμίδια-μήτρες για τη σύνθεση mRNA φθορίζουσών πρωτεϊνών

Το πλασμίδιο-μήτρα pEGFPmRNA για τη σύνθεση mRNA της πρωτεΐνης EGFP.

Η κωδική περιοχή του γονιδίου *egfp* πολλαπλασιασθήκε με μήτρα το πλασμίδιο pEGFP-C1 (Clontech) και τους εκκινητές FEGFPCla (5'-CCATCGATGGTGAGCAAGGGCGAG-3'; φέρει θέση ClaI) και REGFPCla (5'-CCATCGATTATCTAGATCCGGTGGATC-3'; φέρει θέση ClaI), επώαστηκε με ClaI και αντικατέστησε το αναγνωστικό πλαίσιο της τρानσποζάσης *Minos* στο πλασμίδιο pBlueSKMimRNA που κόπηκε με το ίδιο ένζυμο.

Θερμοκινητικό πρόγραμμα PCR:	94°C για 3'	
Πολυμεράση Pfu (Stratagene)	94°C για 30''	94°C για 30''
	42°C για 30'' 5X	⇒ 58°C για 30'' 25X
	72°C για 2'	72°C για 2'
	72°C για 10'	

Η κωδική περιοχή *egfp* πλαισιώνεται από την 5' ΜΜΠ του γονιδίου *hsp70* της *D. melanogaster* και την 3' ΜΜΠ του γονιδίου *if* της *D. melanogaster*.

Το πλασμίδιο-μήτρα pDsRedT1mRNA για τη σύνθεση mRNA της πρωτεΐνης DsRedT1.

Η κωδική περιοχή του γονιδίου *DsRedT1* απομονώθηκε ως τμήμα NcoI/NotI από το πλασμίδιο pSPDsRedT1 (γέμισμα 5' μονόκλωνων άκρων και των δύο θέσεων με Klenow) και αντικατέστησε το αναγνωστικό πλαίσιο της τρानσποζάσης *Minos* στο φορέα μετασχηματισμού pBlueSKMimRNA που κόπηκε με ClaI (γέμισμα 5' μονόκλωνων άκρων με Klenow). Η κωδική περιοχή *dsredt1* πλαισιώνεται από την 5' ΜΜΠ του γονιδίου *hsp70* της *D. melanogaster* και την 3' ΜΜΠ του γονιδίου *if* της *D. melanogaster*.

Το πλασμίδιο-μήτρα pβglobinDsRedT1mRNA για τη σύνθεση mRNA της πρωτεΐνης DsRedT1.

Ύστερα από πέψη του πλασμιδίου pSPDsRedT1 με HindIII (γέμισμα 5' μονόκλωνων άκρων με Klenow)/EcoRI απομονώθηκε τμήμα DNA 950 bp, που περιείχε την κωδική περιοχή του γονιδίου *dsredt1* πλαισιωμένη από την 5' και 3' ΜΜΠ (50 bp και 200 bp αντίστοιχα) του γονιδίου της β-σφαιρίνης. Ακολούθως κλωνοποιήθηκε στο φορέα pBluescriptSKII(+) (Stratagene) κομμένο με KpnI (αφαίρεση 3' μονόκλωνων άκρων με T4 πολυμεράση)/EcoRI, τοποθετώντας την παραπάνω μεταγραφική μονάδα υπό τον έλεγχο του υποκινητή T7.

7.1.3. Πλασμίδια αναφοράς (reporter constructs)

Το πλασμίδιο pSLhsp43-lacZ με το γονίδιο αναφοράς lacZ.

Από το πλασμίδιο pCasperAUGβgal (Flybase) απομονώθηκε τμήμα μεγέθους 4.5 kb με άκρα XhoI/HindIII, που περιλαμβάνει το βασικό υποκινητή του γονιδίου *hsp43* της *D. melanogaster*, την 5' ΜΜΠ και το κωδικόνιο έναρξης του γονιδίου *Adh* της *D. melanogaster*, την κωδική περιοχή του γονιδίου *lacZ* και την περιοχή πολυαδενυλίωσης *SV40*, και κλωνοποιήθηκε στον ενδιάμεσο φορέα pSLfa1180fa κομμένο με τα ίδια ένζυμα. Η περιοχή του πολυσυνδέτη μεταξύ των θέσεων XhoI και EcoRI είναι διαθέσιμη για την κλωνοποίηση *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών άνωθεν του βασικού υποκινητή.

Το πλασμίδιο pSLhsp70-DsRed με το γονίδιο αναφοράς DsRedT1.

Ύστερα από πέψη του πλασμιδίου pMi{3xP3-DsRed} με το ένζυμο HindIII απομονώθηκε τμήμα μεγέθους 1.15 kb, που περιέχει το βασικό υποκινητή και την 5' ΜΜΠ του γονιδίου *hsp70* της *D. melanogaster* (nt -40 έως +70 σε σχέση με τη θέση έναρξης της μεταγραφής), την κωδική περιοχή του γονιδίου *dsredt1* και την περιοχή πολυαδενυλίωσης *SV40*, και κλωνοποιήθηκε στη θέση HindIII του ενδιάμεσου φορέα pSLfa1180fa. Η περιοχή του πολυσυνδέτη μεταξύ των θέσεων HindIII και EcoRI είναι διαθέσιμη για την κλωνοποίηση *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών άνωθεν του βασικού υποκινητή.

7.1.4. Τελικές πλασμιδιακές κατασκευές γενετικού μετασχηματισμού για τη λειτουργική ανάλυση φυσικών και τεχνητών ενισχυτών του γονιδίου *Dll* της *D. melanogaster*

Ο φορέας μετασχηματισμού pBac{3xP3-EGFP, Dll304-lacZ}.

Ο πρώιμος ενισχυτής 304 του γονιδίου *Dll* της *D. melanogaster* (*Dll304*) απομονώθηκε ως τμήμα μεγέθους 877 bp με άκρα EcoRI/XhoI από τον κλώνο plasmid350 (δώρο S. Cohen), και κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο αναφοράς pSLhsp43-lacZ κομμένο με τα ίδια ένζυμα. Στην ενδιάμεση αυτή κατασκευή, που ονομάζεται pSL304-lacZ, ο *Dll304* διατηρεί το φυσικό προσανατολισμό του σε σχέση με τον υποκινητή. Η μεταγραφική μονάδα *Dll304-hsp43-lacZ-SV40* απομονώθηκε ύστερα από πέψη με AscI του pSL304-lacZ και κλωνοποιήθηκε στη θέση AscI του φορέα μετασχηματισμού pBac{3xP3-EGFPaf} με προσανατολισμό αντίθετο του γονιδίου *3xP3-EGFP* (και τα δύο γονίδια μεταγράφονται από το εξωτερικό του τρανσποζονίου προς το εσωτερικό του).

Ο φορέας μετασχηματισμού pMi{3xP3-EGFP, Dll304-lacZ}.

Η προηγούμενη μεταγραφική μονάδα *Dll304-hsp43-lacZ-SV40* κλωνοποιήθηκε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο στο φορέα μετασχηματισμού pMi{3xP3-EGFP}.

Ο φορέας μετασχηματισμού pBac{3xP3-EGFP, Dll215-lacZ}.

Ο όψιμος ενισχυτής 215 του γονιδίου *Dll* της *D. melanogaster* (*Dll215*) απομονώθηκε ως τμήμα μεγέθους 935 bp ύστερα από πέψη του κλώνου p215A (δώρο S. Cohen) με EcoRI, και κλωνοποιήθηκε στη θέση EcoRI του πλασμιδίου αναφοράς pSLhsp43-lacZ. Στην ενδιάμεση αυτή κατασκευή, που ονομάζεται p215-lacZ, ο *Dll215* διατηρεί το φυσικό προσανατολισμό του σε σχέση με τον υποκινητή. Η μεταγραφική μονάδα *Dll215-hsp43-lacZ-SV40* απομονώθηκε ύστερα από πέψη του pSL215-lacZ με AscI και κλωνοποιήθηκε στη θέση AscI του φορέα μετασχηματισμού pBac{3xP3-EGFP} με προσανατολισμό αντίθετο του γονιδίου *3xP3-EGFP* (και τα δύο γονίδια μεταγράφονται από το εξωτερικό του τρανσποζονίου προς το εσωτερικό του).

Ο φορέας μετασχηματισμού pMi{3xP3-EGFP, Dll215-lacZ}.

Η προηγούμενη μεταγραφική μονάδα *Dll215-hsp43-lacZ-SV40* κλωνοποιήθηκε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο στο φορέα μετασχηματισμού pMi{3xP3-EGFP}.

Ο φορέας μετασχηματισμού pMi{3xP3-EGFP, Dll304-DsRed}.

Ο πρώιμος ενισχυτής 304 του γονιδίου *Dll* της *D. melanogaster* (*Dll304*) απομονώθηκε ως τμήμα μεγέθους 935 bp με άκρα EcoRI/XhoI από τον κλώνο plasmid350, και κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο αναφοράς pSLhsp70-DsRed κομμένο με τα ίδια ένζυμα. Στην ενδιάμεση αυτή κατασκευή, που ονομάζεται pSL304-DsRed, ο *Dll304* διατηρεί το φυσικό προσανατολισμό του σε σχέση με τον υποκινητή. Η μεταγραφική μονάδα *Dll304-hsp70-DsRed-SV40* απομονώθηκε ύστερα από πέψη με AscI του pSL304-DsRed και κλωνοποιήθηκε στη θέση AscI του φορέα μετασχηματισμού pMi{3xP3-EGFP} με προσανατολισμό ίδιο με εκείνο του γονιδίου *3xP3-EGFP* (το γονίδιο *Dll304-DsRed* έπεται του γονιδίου *3xP3-EGFP*).

Ο φορέας μετασχηματισμού pMi{3xP3-DsRed, Dll304-DsRed}.

Η προηγούμενη μεταγραφική μονάδα *Dll304-hsp70-DsRed-SV40* κλωνοποιήθηκε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο στο φορέα μετασχηματισμού pMi{3xP3-DsRed}.

Ο φορέας μετασχηματισμού pMi{3xP3-EGFP, Dll215-DsRed}.

Ο όφιμος ενισχυτής 215 του γονιδίου *Dll* της *D. melanogaster* (*Dll215*) απομονώθηκε ως τμήμα μεγέθους 935 bp ύστερα από πέψη του κλώνου p215A με EcoRI, και κλωνοποιήθηκε στη θέση EcoRI του πλασμιδίου αναφοράς pSLhsp70-DsRed. Στην ενδιάμεση αυτή κατασκευή, που ονομάζεται pSL215-DsRed, ο *Dll215* διατηρεί το φυσικό προσανατολισμό του σε σχέση με τον υποκινητή. Η μεταγραφική μονάδα *Dll215-hsp70-DsRed-SV40* απομονώθηκε ύστερα από πέψη με AscI του pSL215-DsRed και κλωνοποιήθηκε στη θέση AscI του φορέα μετασχηματισμού pMi{3xP3-EGFP} με προσανατολισμό ίδιο με εκείνο του γονιδίου *3xP3-EGFP* (το γονίδιο *Dll215-DsRed* έπεται του γονιδίου *3xP3-EGFP*).

Ο φορέας μετασχηματισμού pMi{3xP3-DsRed, Dll215-DsRed}.

Η προηγούμενη μεταγραφική μονάδα *Dll215-hsp70-DsRed-SV40* κλωνοποιήθηκε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο στο φορέα μετασχηματισμού pMi{3xP3-DsRed}.

Ο φορέας μετασχηματισμού pMi{3xP3-EGFP, 3xGbe-lacZ}.

Από μία παραλλαγή του πλασμιδίου pHZ50PL (Flybase), που περιελάμβανε στη θέση XbaI του πολυσυνδέτη 3 αντίτυπα ενός ολιγονουκλεοτιδίου 21 bp με θέσεις πρόσδεσης για το μεταγραφικό ενεργοποιητή Grainy head (*3xGbe*) (Uv *et al.* 1997), απομονώθηκε ύστερα από πέψη με EcoRI και HindIII ένα τμήμα μεγέθους 4.4 kb (υπάρχει και εσωτερική θέση EcoRI σε απόσταση 950 bp από την εξωτερική). Το τμήμα αυτό, που αποτελούνταν από τον τεχνητό ενισχυτή *3xGbe*, το βασικό υποκινητή και την 5' ΜΜΠ του γονιδίου *hsp70* της *D. melanogaster*, την κωδική περιοχή του γονιδίου αναφοράς *lacZ* και την περιοχή πολυαδενυλίωσης του γονιδίου *hsp70* της *D. melanogaster*, κλωνοποιήθηκε μεταξύ των θέσεων EcoRI/XbaI του ενδιάμεσου φορέα pSLfa1 180fa (κατασκευή pSL3xGbe-lacZ). Ακολούθως, η παραπάνω μεταγραφική μονάδα απομονώθηκε ύστερα από πέψη με AscI του pSL3xGbe-lacZ και κλωνοποιήθηκε στη θέση AscI του φορέα μετασχηματισμού pMi{3xP3-EGFP} με προσανατολισμό αντίθετο του γονιδίου *3xP3-EGFP* (και τα δύο γονίδια μεταγράφονται από το εξωτερικό του τρानσποζονίου προς το εσωτερικό του).

Ο φορέας μετασχηματισμού pMi{3xP3-EGFP, 3xGbe+3xBX1-lacZ}.

Για την κατασκευή αυτή επαναλήφθηκαν τα ίδια ακριβώς βήματα με παραπάνω, με τη διαφορά ότι η αρχική παραλλαγή του pHZ50PL περιελάμβανε (εκτός από τον ενισχυτή *3xGbe*) στη θέση KpnI του πολυσυνδέτη 3 αντίτυπα 26 bp της αλληλουχίας *BX1* (*3xBX1*) του ενισχυτή *Dll304*, όπου προσδένονται οι πρωτεΐνες Ubx και Abd-A (White *et al.* 2000a).

Ο φορέας μετασχηματισμού pMi{3xP3-EGFP, BX1-2+5xUAS-lacZ}.

Η κατασκευή αυτή απαιτήσε μία μεγάλη αλληλουχία υποκλωνοποιήσεων. Από τον ενισχυτή *Dll304* απομονώθηκαν, ύστερα από πέψη με SspI/XhoI (γέμισμα 5' μονόκλωνων άκρων με T4 πολυμεράση), τα τελευταία 200 bp (*BX1-2*), που περιέχουν τις κατασταλτικές ρυθμιστικές αλληλουχίες *bx1* και *bx2*. Η περιοχή *BX1-2* υποκλωνοποιήθηκε στη θέση BclI (γέμισμα 5' μονόκλωνων άκρων με T4 πολυμεράση) του ενδιάμεσου φορέα pSLfa1 180fa. Στην θέση BamHI της κατασκευής αυτής κλωνοποιήθηκε ακολούθως ένα τμήμα μεγέθους 1.2 kb, που απομονώθηκε ύστερα από πέψη του πλασμιδίου pPUAST (Flybase) με BamHI και περιελάμβανε 5 αντίτυπα της ρυθμιστικής περιοχής *UAS* (*5xUAS*), το βασικό υποκινητή και την 5' ΜΜΠ του γονιδίου *hsp70* της *D. melanogaster*, τον πολυσυνδέτη του pPUAST και την περιοχή πολυαδενυλίωσης SV40. Η εμβόλιμη περιοχή μεταξύ των αλληλουχιών *BX1-2* και *5xUAS* αφαιρέθηκε ύστερα από πέψη της νέας κατασκευής με NheI/SpeI (γέμισμα 5' μονόκλωνων άκρων και των δύο θέσεων με T4 πολυμεράση) και επανακυκλοποίηση του πλασμιδίου, ώστε να μπορούν να αξιοποιηθούν αρκετές θέσεις του πολυσυνδέτη του pPUAST. Στις θέσεις KpnI/XbaI του πολυσυνδέτη κλωνοποιήθηκε η κωδική περιοχή του

γονιδίου *lacZ*, που εξήχθη με τα ίδια ένζυμα από το φορέα pCasperAUGβgal. Στο τελευταίο βήμα, η μεταγραφική μονάδα που αποτελούνταν κατά σειρά από την κατασταλτική ρυθμιστική περιοχή *BX1-2*, τις θέσεις πρόσδεσης του ενεργοποιητή Gal4 5xUAS, το βασικό υποκινητή και την 5' ΜΜΠ του γονιδίου *hsp70* της *D. melanogaster*, το γονίδιο αναφοράς *lacZ* και την περιοχή πολυαδενυλίωσης SV40, απομονώθηκε ύστερα από πέψη με AscI και κλωνοποιήθηκε στην θέση AscI του φορέα μετασχηματισμού pMi{3xP3-EGFP} με προσανατολισμό αντίθετο του γονιδίου 3xP3-EGFP (και τα δύο γονίδια μεταγράφονται από το εξωτερικό του τρानσποζονίου προς το εσωτερικό του).

7.1.5. Τελικές πλασμιδιακές κατασκευές γενετικού μετασχηματισμού για τη λειτουργική ανάλυση *cis*-ρυθμιστικών περιοχών των γονιδίων *hsp70* του *P. hawaiiensis*

Ο φορέας μετασχηματισμού pMi{3xP3-DsRed, Phhsp70a-DsRed}.

Με μήτρα το πλασμίδιο pPhhsp70HaeF3R3 (βλέπε Ενότητα 7.2.10) και με τους εκκινητές *hsproF* (5'-CGGAATTCTACAGTGGAGGTCTCTG-3'; φέρει θέση EcoRI) και *hsproR* (5'-CATGCCATGGTTGTGGATTGTTC-3'; φέρει θέση NcoI) πολλαπλασιάστηκε με PCR τμήμα DNA μεγέθους 560 bp, που περιελάμβανε ένα μικρό τμήμα της *cis*-ρυθμιστικής περιοχής και την 5' ΜΜΠ του γονιδίου *hsp70a* του *P. hawaiiensis* (*Phhsp70a*), που αντιπροσωπευόταν στους κλώνους pPhhsp70HaeF3R3 και pPhhsp70Apo(1.9)F3R3.

Θερμοκινητικό πρόγραμμα PCR:	94°C για 3'	
Πολυμεράση Pfu Turbo (Stratagene)	94°C για 30''	94°C για 30''
	50°C για 30'' 5X	⇒ 65°C για 30'' 25X
	72°C για 1'	72°C για 1'
	72°C για 10'	

Το απομονωμένο προϊόν επώαστηκε με EcoRI/NcoI (υπάρχει και δεύτερη θέση NcoI σε απόσταση 126 bp από την εξωτερική) και κλωνοποιήθηκε σε δύο βήματα (πρώτα το τμήμα EcoRI/NcoI μεγέθους 434 bp και ακολούθως το τμήμα NcoI/NcoI μεγέθους 126 bp) στο πλασμίδιο αναφοράς pSLhsp70-DsRed που επώαστηκε με τα αντίστοιχα ένζυμα σε κάθε βήμα (κατασκευή pSLPhhsp70a-DsRed short). Με τον τρόπο αυτό η *cis*-ρυθμιστική περιοχή και η 5' ΜΜΠ του γονιδίου *Phhsp70a* κλωνοποιήθηκε άνωθεν του γονιδίου αναφοράς *dsred1* (η εξωτερική θέση NcoI περιέχει το κωδικόνιο έναρξης). Σε δεύτερη φάση ενσωματώθηκαν στο πλασμίδιο pSLPhhsp70a-DsRed short 750 bp που αποτελούσαν τη συνέχεια (5') της ήδη κλωνοποιημένης ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου *Phhsp70a*. Η αλληλουχία αυτή απομονώθηκε από το πλασμίδιο pPhhsp70HaeF2R2Sca (βλέπε ενότητα 7.2.10) ύστερα από πέψη με ScaI/BsaI. Στο πλασμίδιο pSLPhhsp70a-DsRed short το ένζυμο BsaI κόβει 15 bp εσωτερικά της EcoRI, που οριοθετεί το 5' άκρο της ρυθμιστικής περιοχής *Phhsp70a*, αλλά και μία φορά στον κορμό του πλασμιδίου. Το πλασμίδιο pSLPhhsp70a-DsRed short επώαστηκε αρχικά με EcoRI (γέμισμα 5' μονόκλωνων άκρων με Kleow), ακολούθως κόπηκε ατελώς με BsaI και απομονώθηκε ο γραμμικός φορέας μεγέθους 4.6 kb, όπου και κλωνοποιήθηκε η αλληλουχία 750 bp (κατασκευή pSLPhhsp70a-DsRed). Από το πλασμίδιο pSLPhhsp70a-DsRed απομονώθηκε ύστερα από πέψη με AscI τμήμα DNA 2.25 kb, που περιελάμβανε τη ρυθμιστική και 5' ΜΜΠ του γονιδίου *Phhsp70a*, το γονίδιο αναφοράς *dsred1* και την περιοχή πολυαδενυλίωσης SV40, και κλωνοποιήθηκε στη θέση AscI του φορέα pMi{3xP3-DsRed} με προσανατολισμό ίδιο με εκείνο του γονιδίου 3xP3-DsRed (το γονίδιο *Phhsp70a-DsRed* έπεται του γονιδίου 3xP3-DsRed).

Ο φορέας μετασχηματισμού pMi{3xP3-DsRed, Phhsp70b-DsRed}.

Με μήτρα το πλασμίδιο pPhhspintergenic και με τους εκκινητές M13rev (5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3') και hspinterNco (5'-GCTACCATGGCGGCTGATTACCTGTGG-3'; φέρει θέση NcoI) πολλαπλασιάστηκε με PCR η εκεί κλωνοποιημένη *cis*-ρυθμιστική περιοχή και 5' ΜΜΠ του γονιδίου *Phhsp70b*, μεγέθους 2.49 kb (βλέπε ενότητα 7.2.10).

Θερμοκνκλικό πρόγραμμα PCR:	94°C για 3'
Πολυμεράση Pfu Turbo	94°C για 30''
(Stratagene)	55°C για 30'' 30X
	72°C για 4'
	72°C για 10'

Το απομονωμένο προϊόν επώαστηκε με EcoRI/NcoI και κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο αναφοράς pSLhsp70-DsRed που είχε κοπεί με τα ίδια ένζυμα (κατασκευή pSLPhhsp70b-DsRed). Με τον τρόπο αυτό η *cis*-ρυθμιστική περιοχή και η 5' ΜΜΠ του γονιδίου Phhsp70b κλωνοποιήθηκε άνωθεν του γονιδίου αναφοράς *dsred1* (η θέση NcoI περιέχει το κωδικόνιο έναρξης). Από το πλασμίδιο pSLPhhsp70b-DsRed απομονώθηκε ύστερα από πέψη με AscI τμήμα DNA 2.95 kb, που περιελάμβανε τη ρυθμιστική και 5' ΜΜΠ του γονιδίου *Phhsp70b*, το γονίδιο αναφοράς *dsred1* και την περιοχή πολυαδενυλίωσης *SV40*, και κλωνοποιήθηκε στη θέση AscI του φορέα pMi{3xP3-DsRed} με προσανατολισμό ίδιο με εκείνο του γονιδίου *3xP3-DsRed* (το γονίδιο *Phhsp70b-DsRed* έπεται του γονιδίου *3xP3-DsRed*).

7.2. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

7.2.1. Βακτηριακά στελέχη και θρεπτικά μέσα

Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στις κλωνοποιήσεις ήταν το DH5a. Στις λίγες περιπτώσεις που χρειάστηκε η απομόνωση μη μεθυλιωμένου πλασμιδιακού DNA από τη μεθυλάση Dam (για πέψεις με BclI, ClaI) χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος NEB316. Η προετοιμασία και η χρήση ηλεκτροδεκτικών (electrocompetent) κυττάρων των παραπάνω στελεχών, καθώς και τα θρεπτικά μέσα, υγρά και στερεά, που απαιτήθηκαν για τις βακτηριακές καλλιέργειες παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των εργαστηριακών εγχειριδίων (AUSUBEL *et al.* 2001; SAMBROOK *et al.* 1989).

7.2.2. Απομόνωση γενωμικού DNA

Το πρωτόκολλο αυτό επιστρατεύθηκε για την απομόνωση καλής ποιότητας γενωμικού DNA από όλους τους οργανισμούς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία (*Drosophila*, *Tribolium*, *Parhyale*) και από διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Οι παρακάτω ποσότητες διαλυμάτων ενδείκνυνται για μάζα ιστού που αντιστοιχεί σε 30 ενήλικες μύγες/σκαθάρια ή 10 ενήλικα αμφίποδα:

- Το δείγμα των αρθροπόδων συλλέγεται σε erpendorf tube και καταψύχεται ακαριαία σε λουτρό αιθανόλης με ξηρό πάγο. Ύστερα μπορεί να συντηρηθεί για μεγάλα χρονικά διαστήματα στους -80°C .
- Στο δείγμα προστίθενται 200 μl ρυθμιστικού δ/τος A και τα αρθρόποδα κονιοροτοποιούνται με ομογενοποιητή για 1'. Προστίθενται 200 μl ακόμη ρυθμιστικού δ/τος A και η ομογενοποίηση συνεχίζεται για 1'.
- Επώαση για 30' στους 65°C .
- Προσθήκη 800 μl δ/τος LiCl/KAc και επώαση στον πάγο για τουλάχιστον 10'.
- Φυγοκέντρηση 13.000 rpm, 15' στους 25°C .
- Μεταφορά υπερκείμενου 1 ml σε νέο erpendorf tube (επανάληψη φυγοκέντρησης σε περίπτωση που συνμεταφερθεί και αδιάλυτο υλικό).
- Προσθήκη 600 μl ισοπροπανόλης, ανάμιξη, φυγοκέντρηση 13.000 rpm, 15' στους 25°C (αν το γενωμικό DNA σχοινιάσει μπορεί να συλλεχθεί απευθείας).
- Πλύση με 70% αιθανόλη και στέγνωμα DNA.
- Διαλυτοποίηση σε 150 μl H_2O . Αποθήκευση στους -20°C .

<u>Ρυθμιστικό διάλυμα A</u> 100 mM Tris-HCl, pH 7.5 100 mM EDTA 100 mM NaCl 0.5% SDS
--

<u>Διάλυμα LiCl/KAc</u> 1 μέρος 5 M KAc stock : 2.5 μέρη 6 M LiCl
--

7.2.3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini-prep)

Για γρήγορη ανάλυση μεγάλου αριθμού κλώνων επιλέχτηκε η μέθοδος της λύσης με βρασμό (SAMBROOK *et al.* 1989), που δίνει μέτριας ποιότητας και καθαρότητας πλασμιδιακό DNA. Εναλλακτικά επιλέγονταν η μέθοδος Merlin (http://130.15.90.245/methods/merlin_miniprep.html), που καταλήγει σε άριστης ποιότητας πλασμιδιακό DNA.

7.2.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία/μεγάλη κλίμακα (medi/maxi-prep)

Χρησιμοποιήθηκαν είτε εμπορικές ιονανταλλακτικές στήλες (Qiagen, Nucleobond) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, είτε η μέθοδος Merlin (http://130.15.90.245/methods/merlin_miniprep.html). Όλες αυτές οι μέθοδοι προσφέρουν άριστης ποιότητας πλασμιδιακό DNA για όλες τις χρήσεις, συμπεριλαμβανομένων και των διαγονιδιακών πειραμάτων. Στην τελευταία περίπτωση το πλασμιδιακό DNA αποθηκεύονταν στους -20°C σε μικρά κλάσματα, ώστε να αποφεύγεται η επαναλαμβανόμενη ψύξη-απόψυξη που καταστρέφει την υπερελικωμένη δομή του.

7.2.5. Χειρισμός DNA

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης εφαρμόστηκε κατ' επανάληψη για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση, την ποσοτικοποίηση και την απομόνωση τμημάτων DNA. Η χρώση του DNA έγινε με βρωμιούχο αιθίδιο και ο καθαρισμός του από την αγαρόζη με εμπορικά kit (Qiagen, Nucleobond). Η συγκέντρωση διαλυμάτων DNA προσδιορίστηκε φωτομετρικά με τη συσκευή GeneQuant (PharmaciaBiotech). Τα περιοριστικά και τροποποιητικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από τις εταιρίες Minotech, New England Biolabs, Promega, Stratagene και Boehringer. Οι συνθήκες αντίδρασης που ακολουθήθηκαν ήταν οι προτεινόμενες από τους κατασκευαστές. Η αλληλούχηση (sequencing) τμημάτων DNA πραγματοποιήθηκε από το Εργαστήριο Μικροχημείας και το Εργαστήριο Γονιδιωματικής του IMBB.

7.2.6. Δοκιμασίες ενεργότητας του στοιχείου *Minos* (KLINAKIS *et al.* 2000a)

Στις διαπλασμιδιακές δοκιμασίες ενεργότητας χρησιμοποιήθηκαν το πλασμιδιο-δότης pMiLR TetR(L) (σε συγκέντρωση 150 ng/μl), το πλασμιδιο-στόχος pBC/SacRB (σε συγκέντρωση 300 ng/μl) και το πλασμιδιο-βοηθός pHSS6hsILMi20 (σε συγκέντρωση 280 ng/μl) ή *in vitro* capped mRNA παρηγμένο με υπόστρωμα το πλασμιδιο pBlueSKMimRNA (σε συγκέντρωση 75, 150 ή 300 ng/μl). Με κάθε διαφορετικό μίγμα μικροενέθηκαν περίπου 100 μη κυτταροποιημένα έμβρυα *D. melanogaster* ή 100 έμβρυα 1-16 βλαστομεριδίων *P.hawaiensis*. Μία ημέρα αργότερα, από τα έμβρυα κάθε δείγματος που επέζησαν της μικροένεσης απομονώθηκαν νουκλεϊκά οξέα με τη μέθοδο Holmes-Bonper:

- Το δείγμα των εμβρύων συλλέγεται σε eppendorf tube και καταψύχεται ακαριαία σε λουτρό αιθανόλης με ξηρό πάγο. Ύστερα μπορεί να συντηρηθεί για μεγάλα χρονικά διαστήματα στους -80°C .
- Στο δείγμα προστίθενται 100 μl δ/τος HB και τα έμβρυα κονιορτοποιούνται με ομογενοποιητή για 1'. Προστίθενται 100 μl ακόμη δ/τος HB και 200 μl φαινόλη/χλωροφόρμιο και ακολουθεί ήπια ανάδευση για 10'.
- Φυγοκέντρωση 13.000 rpm, 5' στους 25°C και μεταφορά υδατικής φάσης σε νέο eppendorf tube.
- Ακολουθούν με τον ίδιο τρόπο 3 ακόμη εκχυλίσεις με φαινόλη/χλωροφόρμιο και 2 με χλωροφόρμιο.
- Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη.
- Πλύση 2 φορές με 70% αιθανόλη και στέγνωμα νουκλεϊκών οξέων.
- Διαλυτοποίηση σε 20 μl H_2O .

Διάλυμα HB (αποθήκευση στους -20°C)

100 mM Tris-HCl, pH 7.5

10 mM EDTA

350 mM NaCl

2% SDS

7 M Urea

Τα νουκλεϊκά οξέα κάθε δείγματος ποσοτικοποιήθηκαν συγκριτικά σε πήκτωμα αγαρόζης. Στη δοκιμασία εκτομής, ίση ποσότητα υλικού (~20 ng) χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα σε αντίδραση PCR με τους εκκινητές MiR-hydei (5'-TGCATTCTCTATGCT-3') και MiL-Lorist (5'-CCAGCTGGCTTATCGAAA-3') και αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

Θερμοκυκλικό πρόγραμμα PCR:	94°C για 3'
Πολυμεράση MinoTaq (MINOTECH)	94°C για 30'' 55°C για 30'' 35X 72°C για 30'' 72°C για 5'

Στη δοκιμασία μετάθεσης, ~50 ng από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό ηλεκτροδεκτικών κυττάρων DH5a. Το 5% των κυττάρων αναπτύχθηκε σε τρυβλία petri με LB(Cm 30 µg/ml) και το υπόλοιπο 95% σε τρυβλία petri με LB(Cm 30 µg/ml /10% Sucrose). Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν στα δεύτερα τρυβλία μεταφέρθηκαν στη συνέχεια σε petri με LB(Cm 30 µg/ml /Tet 12 µg/ml). Οι κλώνοι που αναπτύχθηκαν στα τελευταία τρυβλία αξιολογήθηκαν ως τριπλά ανθεκτικοί σε Cm/Tet/Sucrose, και αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA.

7.2.7. *In vitro* σύνθεση capped mRNA

Όλα τα *in vitro* μετάγραφα συντέθηκαν με το kit T7mMESSAGEMACHINE (Ambion) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Κάθε αντίδραση 20 µl οδηγούσε στην παραγωγή ~30 µg mRNA. Για την *in vitro* σύνθεση του mRNA που κωδικοποιούσε την τρικοζάση *Minos* χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το πλασμίδιο pBlueSKMimRNA ευθυγραμμισμένο με NotI, του mRNA που κωδικοποιούσε την EGFP το πλασμίδιο pEGFPmRNA ευθυγραμμισμένο με NotI, και του mRNA που κωδικοποιούσε την DsRedT1 είτε το πλασμίδιο pDsRedT1mRNA ευθυγραμμισμένο με NotI, είτε το πλασμίδιο pβglobinDsRedT1mRNA ευθυγραμμισμένο με EcoRI. Όλες οι αντιδράσεις επωάζονταν στο τέλος με DNase I, ακολουθούσε εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση του mRNA με ισοπροπανόλη. Το mRNA συντηρούνταν αδιάλυτο στην ισοπροπανόλη στους -20°C (συνολικός όγκος 300 µl). Πριν τη χρήση του, ένα μικρό κλάσμα (20 µl) φυγοκεντρώνταν στους 4°C (13.000 rpm για 20'), πλενόταν με 70% αιθανόλη, επαναδιαλύονταν σε H₂O και ποσοτικοποιούνταν φωτομετρικά.

7.2.8. Ανάλυση κατά Southern

Δείγματα γενωμικού DNA 2-5 µg επωάζονταν με την κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση για 3 ώρες (προσθήκη επιπλέον ενζύμου και RNaseA την τελευταία ώρα της πέψης), εκχυλίζονταν με φαινόλη/χλωροφόρμιο, κατακρημνίζονταν και πλένονταν με αιθανόλη και επαναδιαλύονταν σε H₂O. Ακολούθως αναλύονταν σε πήκτωμα αγαρόζης, μεταφέρονταν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (PROTRAN; Schleicher & Schuell) και ακινητοποιούνταν όπως έχει περιγραφεί (SAMBROOK *et al.* 1989). Οι μεμβράνες επωάζονταν για 2 ώρες σε διάλυμα προϋβριδοποίησης σε ειδικούς κυλίνδρους στους 65°C και ακολουθούσε προσθήκη του ραδιενεργού ανιχνευτή και ολονύκτια υβριδοποίηση. Οι ραδιενεργοί ανιχνευτές συνθέτονταν με τη μέθοδο των τυχαίων εκκινητών (random priming). Οι υβριδοποιημένες μεμβράνες υποβάλλονταν σε διαδοχικά 15λεπτα ξεπλύματα με ανάδευση στους 25°C, κατά σειρά με τα προθερμασμένα στους 65°C διαλύματα 3xSSC, 0.1% SDS (2 φορές), 0.3xSSC, 0.1% SDS (2 φορές) και, μόνο στην περίπτωση υψηλού background, με 0.1xSSC, 0.1% SDS (2 φορές).

Οι εκθέσεις της μεμβρανών γίνονται είτε σε κασέτες αυτοραδιογραφίας είτε στις κασέτες του phosphorimager (Molecular Dynamics).

Διάλυμα προϋβριδοποίησης (αποθήκευση στους -20°C)

3 X SSC

10 X Denhardt's (stock 50X: 1% Ficoll, 1% BSA (fraction V), 1% Polyvinyl pyrrolidone)

0.1% SDS

10% Dextran sulfate

50 µg/ml αποδιαταγμένο DNA σπέρματος σολομού

7.2.9. Κλωνοποίηση παρακείμενων χρωμοσωμικών αλληλουχιών στις θέσεις ένθεσης του *Minos*

Γενομικό DNA από διαγονιδιακά άτομα κόπηκε με AluI και 150 ng επωάστηκαν με δεσμάση (0.2 µl NEB Ligase) σε όγκο 150 µl, στους 4°C ολονυκτίως. Αφού προστέθηκε γλυκογόνο (10 µg), το DNA κατακρημνίστηκε και πλύθηκε με αιθανόλη, και επαναδιαλύθηκε σε 30 µl H₂O. Από αυτά, 1 µl χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα σε αντίδραση inversePCR (iPCR) με τους εκκινητές IMio1 (5'-AAGAGAATAAAATTCTCTTTGAGACG-3') και IMii1 (5'-CAAAAATATGAGTAATTTATTCAACGG-3'). Από το προϊόν της πρώτης αντίδρασης iPCR, 1 µl χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα σε δεύτερη αντίδραση iPCR (nested) με τους εκκινητές IMio2 (5'-GATAATATAGTGTGTTAAACATTGCGC-3') και IMii2 (5'-GCTTAAGAGATAAGAAAAAAGTGACC-3').

Θερμοκινητικό πρόγραμμα iPCR

(1^η και 2^η αντίδραση):

94°C για 3'

Πολυμεράση Taq2000

94°C για 30''

(Stratagene)

58°C για 30'' 30X

72°C για 2'

72°C για 5'

Οι εκκινητές IMio1, IMii1, IMio2 και IMii2 υβριδοποιούν στα ανεστραμμένα άκρα του στοιχείου *Minos* και ιδανικά οδηγούν στον πολλαπλασιασμό δύο προϊόντων ανά ένθεση (αλληλουχίες παρακείμενες του αριστερού και του δεξιού άκρου αντίστοιχα). Η διάκριση των ειδικών προϊόντων της αντίδρασης από τα μη ειδικά (που συνήθως παράγονται), διευκολύνονταν σημαντικά από την ανάλυση κατά Southern του ίδιου δείγματος γενομικού DNA, ύστερα από πέψη του με AluI και υβριδοποίηση με το άκρο του *Minos* ως ανιχνευτή. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των ειδικών προϊόντων καθορίζονταν, είτε απευθείας με αλυσιδωτή αλληλούχηση (cycling sequencing) με τον εκκινητή IMio2, είτε ύστερα από κλωνοποίησή τους στον φορέα pGEM-T Easy και αλληλούχηση με τους εκκινητές M13For (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') και M13Rev (5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3').

7.2.10. Κλωνοποίηση *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών των γονιδίων *hsp70* του *Parhyale*

Με τη βοήθεια των εκφυλισμένων εκκινητών

Hsp70F1 (5'-ACIACITAT/CTCITGT/CGTIGG-3') και

Hsp70R1 (5'-AAIGGCCAA/GTGT/CTTCAT-3') και με υπόστρωμα 50 ng γενομικού

DNA, πολλαπλασιάστηκαν 240 hr του N-τελικού άκρου της κωδικής περιοχής των γονιδίων *hsp70* του *Parhyale*, κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pGEM-T Easy (pPhhsp70F1R1) και αλληλουχίστηκαν.

Θερμοκυκλικό πρόγραμμα PCR:	94°C για 3'
Πολυμεράση MinoTaq (MINOTECH)	94°C για 30'' 40°C για 30'' 30X 72°C για 1' 72°C για 5'

Η κλωνοποίηση των αλληλουχιών που βρίσκονται άνωθεν της κωδικής περιοχής που αλληλουχήθηκε, έγινε με τη χρήση inversePCR με τους εκκινητές PhhsF2 (5'-CGACACGGAGAGACTCATTGG-3') και PhhsR2 (5'-TGTCGTCCTGTTGCCCTGGTC-3') για την πρώτη αντίδραση iPCR, και τους εκκινητές PhhsF3 (5'-TCGATGCCAAGCGACTTATTG-3') και PhhsR3 (5'-ACCTTGCCATGCTGGAACACC-3') για τη δεύτερη αντίδραση iPCR (nested). Για να αξιολογηθούν οι διαφορετικές πέψεις-υποστρώματα της iPCR και να προγνωθεί το μέγεθος των αναμενόμενων προϊόντων της iPCR, δείγματα γενωμικού DNA που κόπηκαν με 34 διαφορετικά ένζυμα περιορισμού (6-cutters) αναλύθηκαν κατά Southern με ανιχνευτή τα 240 bp της κωδικής περιοχής. Το κομμένο γενωμικό DNA από τα 15 δείγματα που έδωσαν τα πιο ξεκάθαρα σήματα στην υβριδοποίηση με μέγεθος < 4 kb, επωάστηκε με δεσμάση (0.2 μl NEB Ligase τα δείγματα που είχαν μονόκλιωνα άκρα και 1 μl NEB Ligase αυτά που είχαν δίκλιωνα άκρα) όπως ακριβώς περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα. Από τα 30 μl του DNA κάθε δείγματος, 5 μl χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα στην πρώτη αντίδραση iPCR, και 0.25 μl της πρώτης αντίδρασης (που συνήθως δεν έδινε κάποιο ανιχνεύσιμο προϊόν) ως υπόστρωμα στη δεύτερη αντίδραση iPCR.

Θερμοκυκλικό πρόγραμμα iPCR (1 ^η αντίδραση):	94°C για 3'
Πολυμεράση Taq2000 (Stratagene)	94°C για 30'' 60°C για 30'' 30X 72°C για 2' 30'' 72°C για 5'
Θερμοκυκλικό πρόγραμμα iPCR (2 ^η αντίδραση):	94°C για 3'
Πολυμεράση Taq2000 (Stratagene)	94°C για 30'' 65°C για 30'' 30X 72°C για 2' 30'' 72°C για 5'

Τα προϊόντα της δεύτερης αντίδρασης από τα δείγματα που είχαν κοπεί με τα ένζυμα ApoI, HaeII, HindIII και ScaI (είχε κόψει μη ειδικά; star activity) είχαν το αναμενόμενο μέγεθος, κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pGEM-T Easy και αλληλουχήθηκαν:

Κλώνος pPhhsp70ApoF3R3(0.9) με κλωνοποιημένο προϊόν 0.9 kb

Κλώνος pPhhsp70ApoF3R3(1.9) με κλωνοποιημένο προϊόν 1.9 kb

Κλώνος pPhhsp70HaeF3R3 με κλωνοποιημένο προϊόν 0.9 kb

Κλώνος pPhhsp70HindF3R3 με κλωνοποιημένο προϊόν 0.75 kb

Κλώνος pPhhsp70ScaF3R3 με κλωνοποιημένο προϊόν 0.65 kb

Το γονίδιο που αντιπροσωπευόταν στους κλώνους pPhhsp70ApoF3R3(1.9) και pPhhsp70HaeF3R3 ονομάστηκε *Phhsp70a* και ένα μεγαλύτερο τμήμα της ρυθμιστικής του περιοχής (άνωθεν της ήδη γνωστής) απομονώθηκε με μία δεύτερη σειρά αντιδράσεων iPCR με εκκινητές που υβριδοποιούσαν στη γνωστή αλληλουχία του κλώνου pPhhsp70HaeF3R3. Στην πρώτη αντίδραση iPCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές hsHaeF1 (5'-TCCTTTATTTTATTTCCAA-3') και hsHaeR1 (5'-TGAAGGGGTTGGCAAATGAA-3'), ενώ στη δεύτερη αντίδραση iPCR οι εκκινητές hsHaeF2 (5'-ACATAAAAACGGTAGAATGC-3') και hsHaeR2 (5'-GGTTGGCAAATGAAGACTCG-3'). Ως υποστρώματα των αντιδράσεων επιλέχθηκαν δείγματα γενωμικού DNA κομμένα με 6 περιοριστικά

ένζυμα (6-cutters) που είχαν όλα από μία θέση αναγνώρισης μέσα στην ήδη γνωστή αλληλουχία του γονιδίου. Κάθε δείγμα επωάστηκε με δεσμάση και χρησιμοποιήθηκε όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Θερμοκινκλικό πρόγραμμα iPCR (1 ^η αντίδραση):	94°C για 3'	
Πολυμεράση Taq2000 (Stratagene)	94°C για 30''	
	50°C για 30''	30X
	72°C για 4'	
	72°C για 5'	
Θερμοκινκλικό πρόγραμμα iPCR (2 ^η αντίδραση):	94°C για 3'	
Πολυμεράση Taq2000 (Stratagene)	94°C για 30''	
	55°C για 30''	30X
	72°C για 4'	
	72°C για 5'	

Στη δεύτερη αντίδραση, με υπόστρωμα το γενομικό DNA που είχε επωαστεί με ScaI, πολλαπλασιάστηκε ένα προϊόν μεγέθους 0.9 kb, που κλωνοποιήθηκε στο φορέα pGEM-T Easy (pPhhsp70HaeF2R2Sca) και η αλληλούχησή του έδειξε ότι περιελάμβανε τη συνέχεια (5') της ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου *Phhsp70a*.

Για την απομόνωση της ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου *Phhsp70b*, 400 ng γενομικού DNA χρησιμοποιήθηκαν αρχικά ως υπόστρωμα σε αντίδραση PCR με μοναδικό εκκινητή τον PhhsR2 (5'-TGTCGTCCTGTTGCCCTGGTC-3') και ακολούθως, 1 μl από την πρώτη αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα σε δεύτερη αντίδραση PCR με μοναδικό εκκινητή τον PhhsR3 (5'-ACCTTGCCATGCTGGAACACC-3').

Θερμοκινκλικό πρόγραμμα PCR (1 ^η αντίδραση):	94°C για 3'	
Πολυμεράση Elongase (Invitrogen)	94°C για 30''	
	60°C για 30''	35X
	68°C για 10'	
	68°C για 15'	
Θερμοκινκλικό πρόγραμμα PCR (2 ^η αντίδραση):	94°C για 3'	
Πολυμεράση Elongase (Invitrogen)	94°C για 30''	
	65°C για 30''	35X
	68°C για 10'	
	68°C για 15'	

Το προϊόν της δεύτερης αντίδρασης, μεγέθους 2.5 kb, κλωνοποιήθηκε στο φορέα pGEM-T Easy και αλληλουχήθηκε (pPhhspintergenic).

7.3. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ & ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΖΩΩΝ

7.3.1. *Drosophila melanogaster*

Καλλιέργεια

Οι καλλιέργειες όλων των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν έγιναν σύμφωνα με εργαστηριακό εγχειρίδιο (ASHBURNER 1989). Οι συλλογές εμβρύων γίνονταν για τον ενδεδειγμένο χρόνο σε τρυβλία με στερεοποιημένο χυμό φρούτου (3% άγαρ, 0.3% Nipagen M) και λίγη ποσότητα νωπής μαγιάς.

Μικροενέσεις-Δημιουργία διαγονιδιακών σειρών

Η μικροενέσεις πραγματοποιούνταν στους 18°C, ώστε να επιβραδύνεται η κυτταροποίηση των εμβρύων. Όλες οι διαγονιδιακές κατασκευές εισήχθησαν στο γονιδίωμα του στελέχους yw^{67c23} , που στερείται οφθαλμικών χρωστικών και διευκολύνει την ανίχνευση μετασχηματισμένων ατόμων. Η συλλογή (κάθε 30'-40'), αποχοριοποίηση (1' σε 50% χλωρίνη εμπορίου = 2.5% υποχλωριώδες νάτριο), διάταξη σε καλυπτρίδες και αφυδάτωση των εμβρύων (8'-11') έγινε όπως περιγράφεται σε εργαστηριακό εγχειρίδιο (SULLIVAN *et al.* 2000). Τα αφυδατωμένα έμβρυα καλύπτονταν με συνθετικό λάδι (Halocarbon oil 700, Sigma #H-8898). Οι μικροβελόνες φτιάχνονταν από γυάλινα τριχοειδή (Harvard Apparatus, No 30-0019, 1.0 mm O.D. x 0.58 mm I.D.) σε ειδική συσκευή (Sutter Instrument Co Puller: Heat 300, Pull 160, Vel. 60, Time 150). Τα μίγματα πλασμιδίου-δότη και τρανσποζάσης παρασκευάζονταν σε ρυθμιστικό διάλυμα (0.1 mM NaPhosphate pH 7.4, 5 mM KCl), που περιείχε και την αδρανή χρωστική phenol red (Sigma P0290, 10X) για καλύτερο έλεγχο της ενιόμενης ποσότητας. Η μικροβελόνα προσαρμοζόταν στο μικροχειριστήριο (Leitz), η ροή ελέγχονταν με τη βοήθεια αυτόματης αντλίας (Narishige IM 300 Microinjector) και οι μικροενέσεις των εμβρύων πραγματοποιούνταν σε κανονικό οπτικό μικροσκόπιο. Τα ενεμένα έμβρυα μεταφέρονταν σε τρυβλία petri με νωπό Whatmann και επωάζονταν μέχρι την εκκόλαψη των προνυμφών στους 25°C. Οι προνύμφες μεταφέρονταν σε κανονική τροφή και αναπτύσσονταν μέχρι την ενηλικίωσή τους στους 25°C.

Τα ενήλικα άτομα G_0 επαναδιασταυρώνονταν με άτομα yw^{67c23} του αντίθετου φύλου (1 αρσενικό G_0 με 4 θηλυκά yw^{67c23} και 1 θηλυκό G_0 με 2 αρσενικά yw^{67c23}) και μεταγγίζονταν δύο φορές (ανά 5 μέρες) σε καινούρια τροφή. Τα διαγονιδιακά άτομα G_1 επιλέγονταν βάση του οφθαλμικού φθορισμού τους και κάθε αρσενικό άτομο διασταυρώνονταν με 3 θηλυκά yw ; Cyo/Sco (2^ο χρωμόσωμα εξισορρόπησης) και 3 θηλυκά yw ; $TM3, Sb/TM6B, Tb, Hu$ (3^ο χρωμόσωμα εξισορρόπησης). Από την αναλογία των μετασχηματισμένων προς μη μετασχηματισμένων απογόνων G_2 συμπεραίνονταν ο αριθμός των (μη συνδεδεμένων) ενθέσεων. Στην περίπτωση μοναδικών ενθέσεων (αναλογία 1:1) διασταυρώνονταν ξεχωριστά αρσενικά με θηλυκά άτομα φαινοτύπου yw ; Cyo ; $EGFP^+$ και αρσενικά με θηλυκά άτομα φαινοτύπου yw ; $TM3, Sb$; $EGFP^+$. Η διασταύρωση που έδινε αποκλειστικά φθορίζοντες απογόνους, ήταν εκείνη όπου το χρωμόσωμα που έφερε το διαγονίδιο βρισκόταν απέναντι από το εξισορροπημένο ομόλογό του. Η διασταύρωση αυτή χρησιμοποιούνταν στον πειραματικό έλεγχο της ενεργότητας του διαγονιδίου και συντηρούνταν στο διηνεκές στους 18°C. Αν όλοι οι φθορίζοντες απόγονοι G_2 ήταν θηλυκοί, τότε το διαγονίδιο βρισκόταν στο χρωμόσωμα X και ο αρσενικός διαγονιδιακός γονέας G_1 διασταυρώνονταν με θηλυκά άτομα $FM7, ywB/DC701$. Οι απόγονοι $EGFP^+/Y$ (αρσενικοί) και $EGFP^+/FM7, ywB$ (θηλυκοί) διασταυρώνονταν μεταξύ τους για τη δημιουργία της εξισορροπημένης διαγονιδιακής σειράς. Τα θηλυκά διαγονιδιακά άτομα G_1 επαναδιασταυρώνονταν πρώτα με αρσενικά yw^{67c23} και ένας αρσενικός

διαγονιδιακός απόγονος G_2 διασταυρωνόταν όπως τα διαγονιδιακά αρσενικά άτομα G_1 .

Ανοσο-ιστοχημικές Χρώσεις

Οι ιστοχημικές χρώσεις για ενεργότητα β-γαλακτοσιδάσης (χρώσεις X-gal) και οι ανοσο-ιστοχημικές χρώσεις για β-gal και Ubx έγιναν όπως περιγράφονται σε εργαστηριακό εγχειρίδιο (ASHBURNER 1989). Το πρωτογενές πολυκλωνικό αντίσωμα rabbit α-β-gal (Cappel) χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1/10.000, ενώ το μονοκλωνικό αντίσωμα α-Ubx3-38 σε συγκέντρωση 1/10. Το δευτερογενές αντίσωμα goat α-rabbitHRP (Jackson ImmunoResearch) χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1/500, ενώ τα φθορίζοντα δευτερογενή α-rabbitAlexa488 και α-mouseAlexa555 (Molecular Probes) σε συγκέντρωση 1/1000.

7.3.2. *Tribolium castaneum*

Καλλιέργεια

Οι καλλιέργειες του στελέχους *pearl* και των διαγονιδιακών σειρών γίνονται σε αλεύρι σίτου ολικής άλεσης (οργανικά παρηγμένο, Bioforum) εμπλουτισμένο με ξηρή σκόνη ζύμης (5%) και το παρασιτοκτόνο Fumidil B ($3 \times 10^{-4}\%$, διαθέσιμο σε μελισσοκομεία). Όλα τα συστατικά αποθηκεύονται πριν τη χρήση τους στους -20°C για 2 ημέρες και στη συνέχεια περνούν από κόσκινο που είχε πόρους μεγέθους 700 μm . Οι καλλιέργειες διατηρούνται είτε στους 33°C για να έχουν γρήγορη ανάπτυξη (γενεαλογικός κύκλος ~24 μέρες), είτε σε θερμοκρασία δωματίου ($20-25^\circ\text{C}$) για να έχουν αργή ανάπτυξη (γενεαλογικός κύκλος ~2 μήνες). Όλα τα σκεύη (ανοξείδωτα και πλαστικά κόσκινα, πλαστικά και γυάλινα δοχεία) καθαρίζονται με ηλεκτρική σκούπα και τοποθετούνται πριν τη χρήση τους στους 65°C για 2 τουλάχιστον ώρες, ώστε να αποφεύγονται οι μολύνσεις. Για περισσότερες πληροφορίες σε ο,τιδήποτε αφορά το *Tribolium* απευθυνθείτε στις ιστοσελίδες <http://bru.gmpc.ksu.edu/proj/tribolium/index.asp> (Beeman laboratory) και <http://www.zi.biologie.uni-muenchen.de/science/tribolium/klingler/frames.html> (Klingler laboratory).

Μικροενέσεις-Δημιουργία διαγονιδιακών σειρών

Η μικροενέσεις πραγματοποιούνται στους 25°C , ώστε να επιβραδύνεται η κυτταροποίηση των εμβρύων. Όλες οι διαγονιδιακές κατασκευές εισήχθησαν στο γονιδίωμα του στελέχους *pearl*, που στερείται οφθαλμικών χρωστικών και διευκολύνει την ανίχνευση μετασηματισμένων ατόμων.

- 1) Ένας μεγάλος πληθυσμός ατόμων *pearl* (>1000 άτομα) αφήνεται να ωοαποθέσει για 2-3 ώρες σε άσπρο αλεύρι εμπλουτισμένο με σκόνη ζύμης και Fumidil B (συγκεντρώσεις όπως παραπάνω, όλα τα υλικά περασμένα από κόσκινο με μέγεθος πόρων 250 μm).
- 2) Το αλεύρι με τα αυγά διαχωρίζεται από τα ενήλικα (τοποθετούνται για νέα ωοαπόθεση αν χρειάζεται) με κόσκινο (πόρους 700 μm) και τα αυγά απομονώνονται από το αλεύρι με κόσκινο (πόρους 250 μm) και μεταφέρονται σε γυάλινο petri.
- 3) Μέρος των εμβρύων μεταφέρεται σε ειδικό πλαστικό καλαθάκι με πλέγμα, αποχοριοποιείται (και απαλευρώνεται ταυτόχρονα) για 1' με χλωρίνη εμπορίου (0.2% υποχλωριώδες νάτριο), ξεπλένεται με νερό και μεταφέρεται με πινέλο σε τρυβλία με στερεοποιημένο χυμό φρούτου. Όσο διατηρούν την υγρασία τους, τα αυγά πρέπει να διαχωριστούν με απαλές κινήσεις το ένα από το άλλο.
- 4) Τα αυγά που διατηρούν τη σφριγηλότητά τους και έχουν μία γαλακτώδη απόχρωση διατάσσονται σε καλυπτρίδες. Ο οπίσθιος πόλος του εμβρύου, όπου θα πραγματοποιηθεί η μικροένεση, είναι ο περισσότερο οξύληκτος (σε αντίθεση με τη *Drosophila*). Το αλεύρι που έχει απομείνει στην

επιφάνειά των αυγών χρησιμεύει για την προσκόλλησή τους στην καλυπτρίδα. Τα βήματα 3 και 4 επαναλαμβάνονται αρκετές φορές σε διάστημα δύο ωρών.

- 5) Τα έμβρυα μικροενίονται χωρίς άλλη επεξεργασία (δεν αφυδατώνονται και δεν εμβαπτίζονται σε λάδι) όπως περιγράφηκε στην περίπτωση της *Drosophila*. Τα μίγματα πλασμιδίου-δότη και τρανσποζάσης παρασκευάζονται σε νερό, που περιέχει την αδρανή χρωστική phenol red για καλύτερο έλεγχο της ενιόμενης ποσότητας.
- 6) Οι καλυπτρίδες με τα ενεμένα έμβρυα μεταφέρονται σε τρυβλία petri με στερεοποιημένο άγαρ (3% άγαρ, 2.4% σουκρόζη, 25% χυμό φρούτου, 0.15% Nipagen M) ώστε τα έμβρυα να διατηρούν την υγρασία τους. Κλείνουμε τα καπάκια και τοποθετούμε μέσα σε πλαστικά τάπερ στους 33°C. Δύο μέρες αργότερα (~1 μέρα πριν την εκκόλαψη), ανοίγουμε τα καπάκια των τρυβλίων, ώστε να εξατμιστούν τα σταγονίδια νερού (παγιδεύονται και πεθαίνουν οι προνύμφες) και να σκληρύνει το περιβλήμα των εμβρύων (διευκολύνει την εκκόλαψη).
- 7) Οι προνύμφες μεταφέρονται σε εμπλουτισμένο αλεύρι ολικής άλεσης στους 33°C. Ύστερα από 14-16 μέρες απομακρύνεται το αλεύρι με κόσκινο (πόρους 700 μm) και διαχωρίζονται τα αρσενικά από τα θηλυκά άτομα G₀ στο στάδιο της νύμφης.
- 8) Μία εβδομάδα αργότερα τα άτομα έχουν ενηλικιωθεί και είναι σε αναπαραγωγική ωριμότητα. Κάθε αρσενικό G₀ επαναδιασταυρώνεται με 3 θηλυκά *pearl* και κάθε θηλυκό G₀ με 2 αρσενικά *pearl*. Οι διασταυρώσεις των G₀ μπορεί να γίνουν είτε ομαδικά είτε κατά μονάς και τα άτομα μεταφέρονται δύο φορές (ανά 6-7 μέρες) σε καινούριο αλεύρι ολικής άλεσης. Τα άτομα G₁ μπορούν να διαχωριστούν σε αρσενικά και θηλυκά στο στάδιο της νύμφης, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, είτε να ενηλικιωθούν όλα μαζί και να επιλεγθούν μόνο τα αρσενικά διαγονιδιακά G₁ για συντομία χρόνου.
- 9) Τα διαγονιδιακά άτομα G₁ επιλέγονται βάση του οφθαλμικού φθορισμού τους και κάθε αρσενικό άτομο διασταυρώνεται με 3 θηλυκά *pearl* για τη δημιουργία της διαγονιδιακής σειράς. Από την αναλογία των μεταχηματισμένων προς μη μετασηματισμένων απογόνων G₂ συμπεραίνεται ο αριθμός των (μη συνδεδεμένων) ενθέσεων. Για την ανάλυση της ενεργότητας των διαγονιδίων μπορεί να χρησιμοποιηθούν είτε όλα τα άτομα G₂ (για συντομία χρόνου), είτε μόνο τα φθορίζοντα G₂ (για εμπλουτισμό των διαγονιδιακών ατόμων της επόμενης γενιάς). Στην περίπτωση του *Tribolium*, δεν υπάρχουν διαθέσιμα χρωμοσώματα εξισορρόπησης, οπότε για τη διατήρηση της σειράς συνίσταται η περιοδική ανά εξάμηνο απομάκρυνση των μη μετασηματισμένων ατόμων.

Ανοσο-ιστοχημικές χρώσεις και *in situ* υβριδισμοί

Οι ανοσο-ιστοχημικές χρώσεις για ανίχνευση β-gal (συγκεντρώσεις αντισωμάτων όπως στη *Drosophila*) και οι *in situ* υβριδισμοί για ανίχνευση του lacZ-mRNA πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφονται στην ιστοσελίδα <http://www.zi.biologie.unimuenchen.de/science/tribolium/klingler/frames.html>. Ο ριβοανιχνευτής που ήταν συμπληρωματικός στο lacZ-mRNA συντέθηκε με το kit T7 MEGAscript (Ambion) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο ευθυγραμμισμένο με EcoRI, που περιείχε κλωνοποιημένη την κωδική περιοχή του γονιδίου lacZ υπό τον έλεγχο του υποκινητή T7.

7.3.3. *Parhyale hawaiiensis*

Καλλιέργεια

Τα αμφίποδα όλων των σταδίων καλλιεργούνται σε τεχνητό θαλασσινό νερό (αλατότητα ~4%, ειδική βαρύτητα 1.022). Η κεντρική καλλιέργεια του *Parhyale* συντηρούνταν σε μεγάλο πλαστικό δοχείο (όγκου ~10 lt) και όγκο νερού ~2.5 lt, που βρισκόταν σε συνεχή κυκλοφορία με τη χρήση αντλίας και σε σταθερή θερμοκρασία 26-28°C. Ο πάτος του δοχείου καλυπτόταν από μικρές πέτρες (πάχος ~1 cm) και τα μεταβολικά προϊόντα των αμφιπόδων συλλέγονταν από ειδικό απορροφητικό υλικό. Το νερό ανανεωνόταν περιοδικά ανά 15 μέρες και ειδικά την περίοδο συλλογής εμβρύων για μικροενέσεις ανά εβδομάδα. Τα ενεμένα νεαρά αμφίποδα ταΐζονταν με φυτοπλαγκτόν (*Artemia* food), ενώ τα μεγαλύτερα αμφίποδα και η κεντρική καλλιέργεια με τροφή για θαλασσινά ψάρια.

Μικροενέσεις-Δημιουργία διαγονιδιακών σειρών

- 1) Την προηγούμενη μέρα των μικροενέσεων συλλέγονται ζεύγη αμφιπόδων από την κεντρική καλλιέργεια και τοποθετούνται σε μεγάλα τρυβλία petri.
- 2) Τη μέρα των μικροενέσεων, τα γονιμοποιημένα θηλυκά αμφίποδα μπορούν να αναγνωριστούν με γυμνό μάτι, επειδή έχουν αποδεσμευτεί από τα αρσενικά και φέρουν σκουρόχρωμα αυγά στον κοιλιακό επωαστικό θάλαμο. Τα θηλυκά αυτά συλλέγονται σε μικρό πλαστικό δοχείο με πλέγμα στον πάτο.
- 3) Τα θηλυκά αναισθητοποιούνται σε θαλασσινό νερό με γαρυφαλλέλαιο (αραιωμένο 1/1000), ξεπλένονται σε καθαρό θαλασσινό νερό και τα αυγά τους αφαιρούνται με μικρολαβίδες προσεχτικά από τον κοιλιακό θάλαμο σε τρυβλία petri για κυτταροκαλλιέργειες.
- 4) Η μικροένεση των αυγών πραγματοποιείται σε ειδικά κατασκευασμένα αυλάκια άγαρ (διαλυμένου σε 4% θαλασσινό νερό), όπου τα έμβρυα μεταφέρονται με μικροπιπέτα σε μικρές ομάδες (2-4 κάθε φορά). Η διαδικασία των μικροενέσεων είναι όπως περιγράφηκε για το *Tribolium*, με τη διαφορά ότι οι μικροβελόνες είναι πιο οξύληκτες (πρόγραμμα Puller: Heat 310-320, Pull 160, Vel. 60, Time 150) και ακονισμένες σε ειδική επίπεδη πλατφόρμα (Narishige EG-40).
- 5) Τα ενεμένα έμβρυα μεταφέρονται με λεπτό πινέλο σε τρυβλία petri (για κυτταροκαλλιέργειες) με θαλασσινό νερό.
- 6) Τα βήματα 2-5 επαναλαμβάνονται δύο φορές κατά τη διάρκεια της μέρας ανά 5 ώρες. Για τη συνολική απόκτηση 200-300 εμβρύων, κάθε διαφορετικό πλασμίδιο-δότης μικροενέεται για τουλάχιστον 4 διαδοχικές μέρες. Κάθε μέρα, μέχρι την εκκόλαψή τους, τα ζωντανά έμβρυα μεταφέρονται σε καινούρια petri.
- 7) Τα ενεμένα G_0 καλλιεργούνται μέχρι την ενηλικίωσή τους σε (φθινά) petri με διαδοχικές αλλαγές ανά 4 ημέρες. Τα αναπαραγωγικώς ώριμα άτομα διασταυρώνονται με άτομα αγρίου τύπου (1 αρσενικό G_0 με 4 θηλυκά και 1 θηλυκό G_0 με 2 αρσενικά) σε μεσαία petri με πετρούλες. Τα έμβρυα προς ανάλυση αφαιρούνται από τα θηλυκά άτομα μετά την 7^η ημέρα της εμβρυογένεσης και καλλιεργούνται σε τρυβλία κυτταροκαλλιεργειών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ABZHANOV, A., and T. C. KAUFMAN, 2000a Crustacean (malacostracan) Hox genes and the evolution of the arthropod trunk. *Development* **127**: 2239-2249.
- ABZHANOV, A., and T. C. KAUFMAN, 2000b Embryonic expression patterns of the Hox genes of the crayfish *Procambarus clarkii* (Crustacea, Decapoda). *Evol Dev* **2**: 271-283.
- ADAMS, M. D., and J. J. SEKELSKY, 2002 From sequence to phenotype: reverse genetics in *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* **3**: 189-198.
- ADOUTTE, A., G. BALAVOINE, N. LARTILLOT, O. LESPINET, B. PRUD'HOMME *et al.*, 2000 The new animal phylogeny: reliability and implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4453-4456.
- AGRAWAL, A., Q. M. EASTMAN and D. G. SCHATZ, 1998 Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and its implications for the evolution of the immune system. *Nature* **394**: 744-751.
- AGUINALDO, A. M., J. M. TURBEVILLE, L. S. LINFORD, M. C. RIVERA, J. R. GAREY *et al.*, 1997 Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* **387**: 489-493.
- AKAM, M., 2000 Arthropods: developmental diversity within a (super) phylum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4438-4441.
- ALONSO, C. R., J. MAXTON-KUECHENMEISTER and M. AKAM, 2001 Evolution of Ftz protein function in insects. *Curr Biol* **11**: 1473-1478.
- ANAND, S., W. C. WANG, D. R. POWELL, S. A. BOLANOWSKI, J. ZHANG *et al.*, 2003 Divergence of Hoxc8 early enhancer parallels diverged axial morphologies between mammals and fishes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 15666-15669. Epub 12003 Dec 15612.
- ANDERSON, W. F., 1998 Human gene therapy. *Nature* **392**: 25-30.
- ARCA, B., and C. SAVAKIS, 2000 Distribution of the transposable element Minos in the genus *Drosophila*. *Genetica* **108**: 263-267.
- ARCA, B., S. ZABALOU, T. G. LOUKERIS and C. SAVAKIS, 1997 Mobilization of a *Minos* transposon in *Drosophila melanogaster* chromosomes and chromatid repair by heteroduplex formation. *Genetics* **145**: 267-279.
- ARNOSTI, D. N., 2003 Analysis and function of transcriptional regulatory elements: insights from *Drosophila*. *Annu Rev Entomol* **48**: 579-602. Epub 2001 Sep 2028.
- ARTHUR, W., 2002 The emerging conceptual framework of evolutionary developmental biology. *Nature* **415**: 757-764.
- ASHBURNER, M., 1989 *Drosophila: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- ASHBURNER, M., M. A. HOY and J. J. PELOQUIN, 1998 Prospects for the genetic transformation of arthropods. *Insect Mol Biol* **7**: 201-213.
- ATKINSON, P. W., A. C. PINKERTON and D. A. O'BROCHTA, 2001 Genetic transformation systems in insects. *Annu Rev Entomol* **46**: 317-346.
- AUSUBEL, F. M., R. BRENT, R. E. KINGSTON, D. D. MOORE, J. G. SEIDMAN *et al.*, 2001 *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Cambridge, Massachusetts.
- AVEROF, M., and M. AKAM, 1993 HOM/Hox genes of *Artemia*: implications for the origin of insect and crustacean body plans. *Current Biology* **3**: 73-78.
- AVEROF, M., and M. AKAM, 1995 Hox genes and the diversification of insect and crustacean body plans. *Nature* **376**: 420-423.
- AVEROF, M., and S. M. COHEN, 1997 Evolutionary origin of insect wings from ancestral gills. *Nature* **385**: 627-630.
- AVEROF, M., R. DAWES and D. FERRIER, 1996 Diversification of arthropod Hox genes as a paradigm for the evolution of gene functions. *Semin Cell Dev Biol* **7**: 539-551.
- AVEROF, M., and N. H. PATEL, 1997 Crustacean appendage evolution associated with changes in Hox gene expression. *Nature* **388**: 682-686.
- AYALA, F. J., and A. RZHETSKY, 1998 Origin of the metazoan phyla: molecular clocks confirm paleontological estimates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 606-611.
- BASLER, K., and G. STRUHL, 1994 Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by hedgehog protein. *Nature* **368**: 208-214.
- BEEMAN, R. W., and S. J. BROWN, 1999 RAPD-based genetic linkage maps of *Tribolium castaneum*. *Genetics* **153**: 333-338.
- BEERMANN, A., D. G. JAY, R. W. BEEMAN, M. HULSKAMP, D. TAUTZ *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**: 287-297.
- BELLEN, H. J., C. J. O'KANE, C. WILSON, U. GROSSNIKLAS, R. K. PEARSON *et al.*, 1989 P-element-mediated enhancer detection: a versatile method to study development in *Drosophila*. *Genes Dev* **3**: 1288-1300.
- BELLO, B., D. RESENDEZ-PEREZ and W. J. GEHRING, 1998 Spatial and temporal targeting of gene expression in *Drosophila* by means of a tetracycline-dependent transactivator system. *Development* **125**: 2193-2202.

- BENDER, W., M. AKAM, F. KARCH, P. BEACHY, M. PEIFER *et al.*, 1983 Molecular genetics of the Bithorax Complex of *Drosophila melanogaster*. *Science* **221**: 23-29.
- BENEDICT, M. Q., A. F. COCKBURN and J. A. SEAWRIGHT, 1993 The Hsp70 heat-shock gene family of the mosquito *Anopheles albimanus*. *Insect Mol Biol* **2**: 93-102.
- BERGHAMMER, A. J., M. KLINGLER and E. A. WIMMER, 1999 A universal marker for transgenic insects. *Nature* **402**: 370-371.
- BETTENCOURT, B. R., and M. E. FEDER, 2001 Hsp70 duplication in the *Drosophila melanogaster* species group: how and when did two become five? *Mol Biol Evol* **18**: 1272-1282.
- BETTENCOURT, B. R., and M. E. FEDER, 2002 Rapid concerted evolution via gene conversion at the *Drosophila hsp70* genes. *J Mol Evol* **54**: 569-586.
- BEVIS, B. J., and B. S. GLICK, 2002 Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). *Nat Biotechnol* **20**: 83-87.
- BIER, E., H. VAESSIN, S. SHEPHERD, K. LEE, K. MCCALL *et al.*, 1989 Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a P-lacZ vector. *Genes Dev* **3**: 1273-1287.
- BILLETER, M., Y. Q. QIAN, G. OTTING, M. MULLER, W. GEHRING *et al.*, 1993 Determination of the nuclear magnetic resonance solution structure of an Antennapedia homeodomain-DNA complex. *J Mol Bio* **234**: 1084-1093.
- BINGHAM, P. M., M. G. KIDWELL and G. M. RUBIN, 1982 The molecular basis of P-M hybrid dysgenesis: the role of the P element, a P-strain-specific transposon family. *Cell* **29**: 995-1004.
- BLACKMAN, R. K., M. M. KOEHLER, R. GRMAILA and W. M. GELBART, 1989 Identification of a fully-functional hobo-transposable element and its use for germ-line transformation of *Drosophila*. *Embo J* **8**: 211-217.
- BONNER, J. J., C. PARKS, J. PARKER-THORNBURG, M. A. MORTIN and H. R. PELHAM, 1984 The use of promoter fusions in *Drosophila* genetics: isolation of mutations affecting the heat shock response. *Cell* **37**: 979-991.
- BOORE, J., D. LAVROV and W. BROWN, 1998 Gene translocation links insects and crustaceans. *Nature* **392**: 667-668.
- BRAND, A. H., and N. PERRIMON, 1993 Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**: 401-415.
- BRINDLEY, P. J., T. LAHA, D. P. MCMANUS and A. LOUKAS, 2003 Mobile genetic elements colonizing the genomes of metazoan parasites. *Trends Parasitol* **19**: 79-87.
- BROOKE, N. M., J. GARCIA-FERNANDEZ and P. W. HOLLAND, 1998 The ParaHox gene cluster is an evolutionary sister of the Hox gene cluster. *Nature* **392**: 920-922.
- BROWN, J. P., P. B. SINGH and I. G. COWELL, 2003 Composite cis-acting epigenetic switches in eukaryotes: lessons from *Drosophila Fab-7* for the Igf2-H19 imprinted domain. *Genetica* **117**: 199-207.
- BRUSCA, R. C., and G. J. BRUSCA, 1990 *Invertebrates*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- BUCHER, G., and M. KLINGLER, 2004 Divergent segmentation mechanism in the short germ insect *Tribolium* revealed by giant expression and function. *Development* **131**: 1729-1740. Epub 2004 Mar 1717.
- BUCHER, G., J. SCHOLTEN and M. KLINGLER, 2002 Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Curr Biol* **12**: R85-86.
- CALLAERTS, P., G. HALDER and W. J. GEHRING, 1997 PAX-6 in development and evolution. *Annu Rev Neurosci* **20**: 483-532.
- CALVI, B. R., T. J. HONG, S. D. FINDLEY and W. M. GELBART, 1991 Evidence for a common evolutionary origin of inverted repeat transposons in *Drosophila* and plants: hobo, Activator, and Tam3. *Cell* **66**: 465-471.
- CAPY, P., R. VITALIS, T. LANGIN, D. HIGUET and C. BAZIN, 1996 Relationships between transposable elements based upon the integrase-transposase domains: is there a common ancestor? *J Mol Evol* **42**: 359-368.
- CARROLL, S. B., 2000 Endless forms: the evolution of gene regulation and morphological diversity. *Cell* **101**: 577-580.
- CARROLL, S. B., J. K. GRENIER and S. D. WEATHERBEE, 2001 *From DNA To Diversity*. Blackwell Science Ltd, Malden, Massachusetts.
- CARROLL, S. B., S. D. WEATHERBEE and J. A. LANGELAND, 1995 Homeotic genes and the regulation and evolution of insect wing number. *Nature* **375**: 58-61.
- CASTELLI-GAIR, J., and M. AKAM, 1995 How the Hox gene Ultrabithorax specifies two different segments: the significance of spatial and temporal regulation within metameres. *Development* **121**: 2973-2982.
- CATTERUCCIA, F., T. NOLAN, T. G. LOUKERIS, C. BLASS, C. SAVAKIS *et al.*, 2000 Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nature* **405**: 959-962.
- CHALFIE, M., Y. TU, G. EUSKIRCHEN, W. W. WARD and D. C. PRASHER, 1994 Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802-805.

- CLARK, J. B., and M. G. KIDWELL, 1997 A phylogenetic perspective on P transposable element evolution in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 11428-11433.
- COHEN, B., A. A. SIMCOX and S. M. COHEN, 1993 Allocation of the thoracic imaginal primordia in the *Drosophila* embryo. *Development* **117**: 597-608.
- COHEN, S. M., 1993 Imaginal Disc Development, pp. 747-842 in *The Development of Drosophila melanogaster*, edited by M. BATE and A. MARTINEZ ARIAS. CSH Lab Press, Cold Spring Harbor, NY.
- COHEN, S. M., G. BRONNER, F. KUTTNER, G. JURGENS and H. JACKLE, 1989 Distal-less encodes a homoeodomain protein required for limb development in *Drosophila*. *Nature* **338**: 432-434.
- COHEN, S. M., and G. JURGENS, 1989 Proximal-distal pattern formation in *Drosophila*: cell autonomous requirement for *Disal-less* gene activity in limb development. *EMBO J* **8**: 2045-2055.
- COOK, C. E., M. L. SMITH, M. J. TELFORD, A. BASTIANELLO and M. AKAM, 2001 Hox genes and the phylogeny of the arthropods. *Curr Biol* **11**: 759-763.
- COOLEY, L., R. KELLEY and A. SPRADLING, 1988 Insertional mutagenesis of the *Drosophila* genome with single P elements. *Science* **239**: 1121-1128.
- CORMACK, B. P., R. H. VALDIVIA and S. FALKOW, 1996 FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**: 33-38.
- CUI, Z., A. M. GEURTS, G. LIU, C. D. KAUFMAN and P. B. HACKETT, 2002 Structure-function analysis of the inverted terminal repeats of the sleeping beauty transposon. *J Mol Biol* **318**: 1221-1235.
- DAMEN, W. G., M. HAUSDORF, E. A. SEYFARTH and D. TAUTZ, 1998 A conserved mode of head segmentation in arthropods revealed by the expression pattern of Hox genes in a spider. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10665-10670.
- DANIELS, S. B., M. MCCARRON, C. LOVE and A. CHOVNICK, 1985 Dysgenesis-induced instability of rosy locus transformation in *Drosophila melanogaster*: analysis of excision events and the selective recovery of control element deletions. *Genetics* **109**: 95-117.
- DANIELS, S. B., K. R. PETERSON, L. D. STRAUSBAUGH, M. G. KIDWELL and A. CHOVNICK, 1990 Evidence for horizontal transmission of the P transposable element between *Drosophila* species. *Genetics* **124**: 339-355.
- DE ROSA, R., J. K. GRENIER, T. ANDREEVA, C. E. COOK, A. ADOUTTE *et al.*, 1999 Hox genes in brachiopods and priapulids and protostome evolution. *Nature* **399**: 772-776.
- DELSUC, F., M. J. PHILLIPS and D. PENNY, 2003 Comment on "Hexapod origins: monophyletic or paraphyletic?" *Science* **301**: 1482; author reply 1482.
- DOAK, T. G., F. P. DOERDER, C. L. JAHN and G. HERRICK, 1994 A proposed superfamily of transposase genes: transposon-like elements in ciliated protozoa and a common "D35E" motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 942-946.
- DRABEK, D., L. ZAGORAIOU, T. DEWIT, A. LANGEVELD, C. ROUMPAKI *et al.*, 2003 Transposition of the *drosophila hydei minos* transposon in the mouse germ line. *Genomics* **81**: 108-111.
- DUNCAN, I., and G. MONTGOMERY, 2002 E. B. Lewis and the bithorax complex: part II. From cis-trans test to the genetic control of development. *Genetics* **161**: 1-10.
- EMMONS, S. W., L. YESNER, K. S. RUAN and D. KATZENBERG, 1983 Evidence for a transposon in *Caenorhabditis elegans*. *Cell* **32**: 55-65.
- ENGELS, W. R., D. M. JOHNSON-SCHLITZ, W. B. EGGLESTON and J. SVED, 1990 High-frequency P element loss in *Drosophila* is homolog dependent. *Cell* **62**: 515-525.
- ESTELLA, C., G. RIECKHOF, M. CALLEJA and G. MORATA, 2003 The role of buttonhead and Sp1 in the development of the ventral imaginal discs of *Drosophila*. *Development* **130**: 5929-5941. Epub 2003 Oct 5915.
- FADOOL, J. M., D. L. HARTL and J. E. DOWLING, 1998 Transposition of the mariner element from *Drosophila mauritiana* in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5182-5186.
- FEIGE, U., and B. S. POLLA, 1994 Hsp70--a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications. *Experientia* **50**: 979-986.
- FOY, B. D., K. M. MYLES, D. J. PIERRO, I. SANCHEZ-VARGAS, M. UHLIROVA *et al.*, 2004 Development of a new Sindbis virus transducing system and its characterization in three Culicine mosquitoes and two Lepidopteran species. *Insect Mol Biol* **13**: 89-100.
- FRANCO, M., M. E. ROGERS, C. SHIMIZU, H. SHIKE, R. G. VOGT *et al.*, 1998 Infection of lepidoptera with a pseudotyped retroviral vector. *Insect Biochem Mol Biol* **28**: 819-825.
- FRANZ, G., T. G. LOUKERIS, G. DIALEKTAKI, C. R. THOMPSON and C. SAVAKIS, 1994 Mobile *Minos* elements from *Drosophila hydei* encode a two-exon transposase with similarity to the paired DNA-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 4746-4750.
- 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**: 6646.
- FRIEDRICH, M., and D. TAUTZ, 1995 Ribosomal DNA phylogeny of the major extant arthropod classes and the evolution of myriapods. *Nature* **376**: 165-167.

- FUSE, N., S. HIROSE and S. HAYASHI, 1996 Determination of wing cell fate by the escargot and snail genes in *Drosophila*. *Development* **122**: 1059-1067.
- GABAI, V. L., and M. Y. SHERMAN, 2002 Invited review: Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. *J Appl Physiol* **92**: 1743-1748.
- GALANT, R., and S. B. CARROLL, 2002 Evolution of a transcriptional repression domain in an insect Hox protein. *Nature* **415**: 910-913.
- GARBER, R. L., A. KUROIWA and W. J. GEHRING, 1983 Genomic and cDNA clones of the homeotic locus *Antennapedia* in *Drosophila*. *EMBO J* **2**: 2027-2036.
- GEBELEIN, B., J. CULI, H. D. RYOO, W. ZHANG and R. S. MANN, 2002 Specificity of Distalless repression and limb primordia development by abdominal Hox proteins. *Dev Cell* **3**: 487-498.
- GELLON, G., and W. MCGINNIS, 1998 Shaping animal body plans in development and evolution by modulation of Hox expression patterns. *Bioessays* **20**: 116-125.
- GERBERDING, M., W. E. BROWNE and N. H. PATEL, 2002 Cell lineage analysis of the amphipod crustacean *Parhyale hawaiiensis* reveals an early restriction of cell fates. *Development* **129**: 5789-5801.
- GIBSON, G., and D. S. HOGNESS, 1996 Effect of polymorphism in the *Drosophila* regulatory gene *Ultrabithorax* on homeotic stability. *Science* **271**: 200-203.
- GIBSON, G., M. WEMPLE and S. VAN HELDEN, 1999 Potential variance affecting homeotic *Ultrabithorax* and *Antennapedia* phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **151**: 1081-1091.
- GILBERT, S. F., 2001 *Developmental Biology* (Sixth Edition). Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- GOLIC, K. G., and S. LINDQUIST, 1989 The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* **59**: 499-509.
- GOTO, S., and S. HAYASHI, 1997 Specification of the embryonic limb primordium by graded activity of Decapentaplegic. *Development* **124**: 125-132.
- GRAY, Y. H., 2000 It takes two transposons to tango: transposable-element-mediated chromosomal rearrangements. *Trends Genet* **16**: 461-468.
- GRENIER, J. K., and S. B. CARROLL, 2000 Functional evolution of the *Ultrabithorax* protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 704-709.
- GRENIER, J. K., T. L. GARBER, R. WARREN, P. M. WHITINGTON and S. B. CARROLL, 1997 Evolution of the entire arthropod Hox gene set predated the origin and radiation of the onychophoran/arthropod clade. *Curr Biol* **7**: 547-553.
- GREVELDING, C., D. BECKER, R. KUNZE, A. VON MENGES, V. FANTES *et al.*, 1992 High rates of Ac/Ds germinal transposition in *Arabidopsis* suitable for gene isolation by insertional mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 6085-6089.
- GROSSMAN, G. L., C. S. RAFFERTY, M. J. FRASER and M. Q. BENEDICT, 2000 The piggyBac element is capable of precise excision and transposition in cells and embryos of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem Mol Biol* **30**: 909-914.
- GUEIROS-FILHO, F. J., and S. M. BEVERLEY, 1997 Trans-kingdom transposition of the *Drosophila* element mariner within the protozoan *Leishmania*. *Science* **276**: 1716-1719.
- HACKER, U., S. NYSTEDT, M. P. BARMCHI, C. HORN and E. A. WIMMER, 2003 *piggyBac*-based insertional mutagenesis in the presence of stably integrated *P* elements in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 7720-7725.
- HANDEL, K., C. G. GRUNFELDER, S. ROTH and K. SANDER, 2000 *Tribolium* embryogenesis: a SEM study of cell shapes and movements from blastoderm to serosal closure. *Dev Genes Evol* **210**: 167-179.
- HANDLER, A. M., 2001 A current perspective on insect gene transformation. *Insect Biochem Mol Biol* **31**: 111-128.
- HANDLER, A. M., 2002 Use of the piggyBac transposon for germ-line transformation of insects. *Insect Biochem Mol Biol* **32**: 1211-1220.
- HANDLER, A. M., S. P. GOMEZ and D. A. O'BROCHTA, 1993 A functional analysis of the *P*-element gene-transfer vector in insects. *Arch Insect Biochem Physiol* **22**: 373-384.
- HANDLER, A. M., and R. A. HARRELL, 2ND, 1999 Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the piggyBac transposon vector. *Insect Mol Biol* **8**: 449-457.
- HORN, C., B. JAUNICH and E. A. WIMMER, 2000 Highly sensitive, fluorescent transformation marker for *Drosophila* transgenesis. *Dev Genes Evol* **210**: 623-629.
- HORN, C., N. OFFEN, S. NYSTEDT, U. HACKER and E. A. WIMMER, 2003 *piggyBac*-Based Insertional Mutagenesis and Enhancer Detection as a Tool for Functional Insect Genomics. *Genetics* **163**: 647-661.
- HORN, C., B. G. SCHMID, F. S. POGODA and E. A. WIMMER, 2002 Fluorescent transformation markers for insect transgenesis. *Insect Biochem Mol Biol* **32**: 1221-1235.
- HORN, C., and E. A. WIMMER, 2000 A versatile vector set for animal transgenesis. *Dev Genes Evol* **210**: 630-637.

- HOUCK, M. A., J. B. CLARK, K. R. PETERSON and M. G. KIDWELL, 1991 Possible horizontal transfer of *Drosophila* genes by the mite *Proctolaelaps regalis*. *Science* **253**: 1125-1128.
- HSIA, C. C., and W. MCGINNIS, 2003 Evolution of transcription factor function. *Curr Opin Genet Dev* **13**: 199-206.
- HUGHES, C. L., and T. C. KAUFMAN, 2002a Exploring the myriapod body plan: expression patterns of the ten Hox genes in a centipede. *Development* **129**: 1225-1238.
- HUGHES, C. L., and T. C. KAUFMAN, 2002b Hox genes and the evolution of the arthropod body plan. *Evol Dev* **4**: 459-499.
- IVICS, Z., P. B. HACKETT, R. H. PLASTERK and Z. IZSVAK, 1997 Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell* **91**: 501-510.
- IVICS, Z., Z. IZSVAK, A. MINTER and P. B. HACKETT, 1996 Identification of functional domains and evolution of Tc1-like transposable elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 5008-5013.
- JACOBSON, J. W., M. M. MEDHORA and D. L. HARTL, 1986 Molecular structure of a somatically unstable transposable element in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 8684-8688.
- JAFFE, L., H. D. RYOO and R. S. MANN, 1997 A role for phosphorylation by casein kinase 2 in modulating Antennapedia function in *Drosophila*. *Genes Dev* **11**: 1327-1340.
- JEDLICKA, P., M. A. MORTIN and C. WU, 1997 Multiple functions of *Drosophila* heat shock transcription factor in vivo. *Embo J* **16**: 2452-2462.
- JEYAPRAKASH, A., and M. A. HOY, 2000 Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol Biol* **9**: 393-405.
- JOCKUSCH, E. L., C. NULSEN, S. J. NEWFELD and L. M. NAGY, 2000 Leg development in flies versus grasshoppers: differences in dpp expression do not lead to differences in the expression of downstream components of the leg patterning pathway. *Development* **127**: 1617-1626.
- KAMINKER, J. S., C. M. BERGMAN, B. KRONMILLER, J. CARLSON, R. SVIRSKAS *et al.*, 2002 The transposable elements of the *Drosophila melanogaster* euchromatin: a genomics perspective. *Genome Biol* **3**: RESEARCH0084. Epub 2002 Dec 0023.
- KAPETANAKI, M. G., T. G. LOUKERIS, I. LIVADARAS and C. SAVAKIS, 2002 High frequencies of *Minos* transposon mobilization are obtained in insects by using in vitro synthesized mRNA as a source of transposase. *Nucleic Acids Res* **30**: 3333-3340.
- KARCH, F., B. WEIFFENBACH, M. PEIFER, W. BENDER, I. DUNCAN *et al.*, 1985 The abdominal region of the bithorax complex. *Cell* **43**: 81-96.
- KARESS, R. E., and G. M. RUBIN, 1984 Analysis of P transposable element functions in *Drosophila*. *Cell* **38**: 135-146.
- KAUFMAN, P. D., R. F. DOLL and D. C. RIO, 1989 *Drosophila* P element transposase recognizes internal P element DNA sequences. *Cell* **59**: 359-371.
- KAUFMAN, T. C., R. LEWIS and B. T. WAKIMOTO, 1980 Cytogenetic analysis of chromosome 3 in *Drosophila melanogaster*: the homoeotic gene complex in polytene chromosome interval 84A-B. *Genetics* **94**: 115-133.
- KAUFMAN, T. C., M. A. SEEGER and G. OLSEN, 1990 Molecular and genetic organization of the antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Adv Genet* **27**: 309-362.
- KAZAZIAN, H. H., Jr., 2004 Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* **303**: 1626-1632.
- KEMPKEN, F., and F. WINDHOFER, 2001 The hAT family: a versatile transposon group common to plants, fungi, animals, and man. *Chromosoma* **110**: 1-9.
- KIDWELL, M. G., 1992 Horizontal transfer. *Curr Opin Genet Dev* **2**: 868-873.
- KIDWELL, M. G., 2002 Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* **115**: 49-63.
- KIDWELL, M. G., and D. LISCH, 1997 Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 7704-7711.
- KIDWELL, M. G., and D. R. LISCH, 2001 Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution Int J Org Evolution* **55**: 1-24.
- KLINAKIS, A. G., T. G. LOUKERIS, A. PAVLOPOULOS and C. SAVAKIS, 2000a Mobility assays confirm the broad host-range activity of the *Minos* transposable element and validate new transformation tools. *Insect Mol Biol* **9**: 269-275.
- KLINAKIS, A. G., L. ZAGORAIOU, D. K. VASSILATIS and C. SAVAKIS, 2000b Genome-wide insertional mutagenesis in human cells by the *Drosophila* mobile element *Minos*. *EMBO Rep* **1**: 416-421.
- LAMPE, D. J., B. J. AKERLEY, E. J. RUBIN, J. J. MEKALANOS and H. M. ROBERTSON, 1999 Hyperactive transposase mutants of the Himar1 mariner transposon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 11428-11433.
- LAMPE, D. J., M. E. CHURCHILL and H. M. ROBERTSON, 1996 A purified mariner transposase is sufficient to mediate transposition in vitro. *Embo J* **15**: 5470-5479.
- LANDER, E. S., L. M. LINTON, B. BIRREN, C. NUSBAUM, M. C. ZODY *et al.*, 2001 Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860-921.

- LASKI, F. A., D. C. RIO and G. M. RUBIN, 1986 Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *Cell* **44**: 7-19.
- LAWSON, R., R. MESTRIL, P. SCHILLER and R. VOELLMY, 1984 Expression of heat shock-beta-galactosidase hybrid genes in cultured *Drosophila* cells. *Mol Gen Genet* **198**: 116-124.
- LEIGH BROWN, A. J., and D. ISH-HOROWICZ, 1981 Evolution of the 87A and 87C heat-shock loci in *Drosophila*. *Nature* **290**: 677-682.
- LEVIS, R. W., R. GANESAN, K. HOUTCHENS, L. A. TOLAR and F. M. SHEEN, 1993 Transposons in place of telomeric repeats at a *Drosophila* telomere. *Cell* **75**: 1083-1093.
- LEWIS, D. L., M. DECAMILLIS and R. L. BENNETT, 2000 Distinct roles of the homeotic genes *Ubx* and *abd-A* in beetle embryonic abdominal appendage development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4504-4509.
- LEWIS, D. L., M. A. DECAMILLIS, C. R. BRUNETTI, G. HALDER, V. A. KASSNER *et al.*, 1999 Ectopic gene expression and homeotic transformations in arthropods using recombinant Sindbis viruses. *Curr Biol* **9**: 1279-1287.
- LEWIS, E. B., 1978 A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**: 565-570.
- LINDQUIST, S., and E. A. CRAIG, 1988 The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* **22**: 631-677.
- LOHE, A. R., D. DE AGUIAR and D. L. HARTL, 1997 Mutations in the mariner transposase: the D,D(35)E consensus sequence is nonfunctional. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 1293-1297.
- LOHR, U., M. YUSSA and L. PICK, 2001 *Drosophila fushi tarazu*, a gene on the border of homeotic function. *Curr Biol* **11**: 1403-1412.
- LORENZEN, M. D., A. J. BERGHAMMER, S. J. BROWN, R. E. DENELL, M. KLINGLER *et al.*, 2003 *piggyBac*-mediated germline transformation in the beetle *Tribolium castaneum*. *Insect Mol Biol* **12**: 433-440.
- LOUKERIS, T. G., B. ARCA, I. LIVADARAS, G. DIALEKTAKI and C. SAVAKIS, 1995a Introduction of the transposable element *Minos* into the germ line of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 9485-9489.
- LOUKERIS, T. G., I. LIVADARAS, B. ARCA, S. ZABALOU and C. SAVAKIS, 1995b Gene transfer into the medfly, *Ceratitis capitata*, with a *Drosophila hydei* transposable element. *Science* **270**: 2002-2005.
- LUDWIG, M. Z., C. BERGMAN, N. H. PATEL and M. KREITMAN, 2000a Evidence for stabilizing selection in a eukaryotic enhancer element. *Nature* **403**: 564-567.
- LUDWIG, M. Z., C. BERGMAN, N. H. PATEL and M. KREITMAN, 2000b Evidence for stabilizing selection in a eukaryotic enhancer element. *Nature* **403**: 564-567.
- LUDWIG, M. Z., N. H. PATEL and M. KREITMAN, 1998 Functional analysis of eve stripe 2 enhancer evolution in *Drosophila*: rules governing conservation and change. *Development* **125**: 949-958.
- MANZANARES, M., H. WADA, N. ITASAKI, P. A. TRAINOR, R. KRUMLAUF *et al.*, 2000 Conservation and elaboration of Hox gene regulation during evolution of the vertebrate head. *Nature* **408**: 854-857.
- MARUYAMA, K., K. D. SCHOOR and D. L. HARTL, 1991 Identification of nucleotide substitutions necessary for trans-activation of mariner transposable elements in *Drosophila*: analysis of naturally occurring elements. *Genetics* **128**: 777-784.
- MASSARI, M. E., and C. MURRE, 2000 Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* **20**: 429-440.
- MATZ, M. V., A. F. FRADKOV, Y. A. LABAS, A. P. SAVITSKY, A. G. ZARAISKY *et al.*, 1999 Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol* **17**: 969-973.
- MATZKE, M. A., M. F. METTE, W. AUFSATZ, J. JAKOWITSCH and A. J. MATZKE, 1999 Host defenses to parasitic sequences and the evolution of epigenetic control mechanisms. *Genetica* **107**: 271-287.
- MCGINNIS, W., 1994 A century of homeosis, a decade of homeoboxes. *Genetics* **137**: 607-611.
- MCGINNIS, W., and R. KRUMLAUF, 1992 Homeobox genes and axial patterning. *Cell* **68**: 283-302.
- MCGINNIS, W., M. S. LEVINE, E. HAFEN, A. KUROIWA and W. J. GEHRING, 1984 A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes. *Nature* **308**: 428-433.
- MEDHORA, M. M., A. H. MACPEEK and D. L. HARTL, 1988 Excision of the *Drosophila* transposable element mariner: identification and characterization of the Mos factor. *Embo J* **7**: 2185-2189.
- MIHALY, J., I. HOGGA, J. GAUSZ, H. GYURKOVICS and F. KARCH, 1997 In situ dissection of the Fab-7 region of the bithorax complex into a chromatin domain boundary and a Polycomb-response element. *Development* **124**: 1809-1820.
- MISQUITTA, L., and B. M. PATERSON, 1999 Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 1451-1456.
- MISRA, S., and D. C. RIO, 1990 Cytotype control of *Drosophila* P element transposition: the 66 kd protein is a repressor of transposase activity. *Cell* **62**: 269-284.

- MULLER, J., C. M. HART, N. J. FRANCIS, M. L. VARGAS, A. SENGUPTA *et al.*, 2002 Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* Polycomb group repressor complex. *Cell* **111**: 197-208.
- NAGY, L. M., and S. CARROLL, 1994 Conservation of wingless patterning functions in the short-germ embryos of *Tribolium castaneum*. *Nature* **367**: 460-463.
- NETZER, W. J., and F. U. HARTL, 1998 Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms. *Trends Biochem Sci* **23**: 68-73.
- O'BROCHTA, D. A., W. D. WARREN, K. J. SAVILLE and P. W. ATKINSON, 1996 Hermes, a functional non-*Drosophilid* insect gene vector from *Musca domestica*. *Genetics* **142**: 907-914.
- O'HARE, K., and G. M. RUBIN, 1983 Structures of P transposable elements and their sites of insertion and excision in the *Drosophila melanogaster* genome. *Cell* **34**: 25-35.
- O'KANE, C. J., and W. J. GEHRING, 1987 Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 9123-9127.
- PALOPOLI, M. F., and N. H. PATEL, 1998 Evolution of the interaction between *Hox* genes and a downstream target. *Current Biology* **8**: 587-590.
- PANGANIBAN, G., S. M. IRVINE, C. LOWE, H. ROEHL, L. S. CORLEY *et al.*, 1997 The origin and evolution of animal appendages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 5162-5166.
- PANGANIBAN, G., L. NAGY and S. B. CARROLL, 1994 The role of the Distal-less gene in the development and evolution of insect limbs. *Current Biology* **4**: 671-675.
- PANGANIBAN, G., A. SEBRING, L. NAGY and S. CARROLL, 1995 The development of crustacean limbs and the evolution of arthropods. *Science* **270**: 1363-1366.
- PATTERSON, G., R. N. DAY and D. PISTON, 2001 Fluorescent protein spectra. *J Cell Sci* **114**: 837-838.
- PAVLOPOULOS, A., and M. AVEROF, 2002 Developmental evolution: Hox proteins ring the changes. *Curr Biol* **12**: R291-293.
- PETROV, D. A., T. A. SANGSTER, J. S. JOHNSTON, D. L. HARTL and K. L. SHAW, 2000 Evidence for DNA loss as a determinant of genome size. *Science* **287**: 1060-1062.
- PETRUK, S., Y. SEDKOV, S. SMITH, S. TILLIB, V. KRAEVSKI *et al.*, 2001 Trithorax and dCBP acting in a complex to maintain expression of a homeotic gene. *Science* **294**: 1331-1334.
- PICCIN, A., A. SALAMEH, C. BENNA, F. SANDRELLI, G. MAZZOTTA *et al.*, 2001 Efficient and heritable functional knock-out of an adult phenotype in *Drosophila* using a GAL4-driven hairpin RNA incorporating a heterologous spacer. *Nucleic Acids Res* **29**: E55-55.
- PIETROKOVSKI, S., and S. HENIKOFF, 1997 A helix-turn-helix DNA-binding motif predicted for transposases of DNA transposons. *Mol Gen Genet* **254**: 689-695.
- PINSKER, W., E. HARING, S. HAGEMANN and W. J. MILLER, 2001 The evolutionary life history of P transposons: from horizontal invaders to domesticated neogenes. *Chromosoma* **110**: 148-158.
- PIRKKALA, L., P. NYKANEN and L. SISTONEN, 2001 Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *Faseb J* **15**: 1118-1131.
- PLASTERK, R. H., Z. IZSVAK and Z. IVICS, 1999 Resident aliens: the *Tc1/mariner* superfamily of transposable elements. *Trends Genet* **15**: 326-332.
- PRASHER, D. C., V. K. ECKENRODE, W. W. WARD, F. G. PRENDERGAST and M. J. CORMIER, 1992 Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**: 229-233.
- PURI, P. L., and V. SARTORELLI, 2000 Regulation of muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications. *J Cell Physiol* **185**: 155-173.
- QIAN, S., M. CAPOVILLA and V. PIRROTTA, 1993 Molecular mechanisms of pattern formation by the BRE enhancer of the *Ubx* gene. *Embo J* **12**: 3865-3877.
- RAFF, R. A., 2000 Evo-devo: the evolution of a new discipline. *Nat Rev Genet* **1**: 74-79.
- RAZ, E., H. G. VAN LUENEN, B. SCHAEERRINGER, R. H. PLASTERK and W. DRIEVER, 1998 Transposition of the nematode *Caenorhabditis elegans* Tc3 element in the zebrafish *Danio rerio*. *Curr Biol* **8**: 82-88.
- RIO, D. C., F. A. LASKI and G. M. RUBIN, 1986 Identification and immunochemical analysis of biologically active *Drosophila* P element transposase. *Cell* **44**: 21-32.
- RIO, D. C., and G. M. RUBIN, 1988 Identification and purification of a *Drosophila* protein that binds to the terminal 31-base-pair inverted repeats of the P transposable element. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 8929-8933.
- RITOSSA, F., 1962 A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **18**: 571-573.
- ROCHE, S. E., and D. C. RIO, 1998 Trans-silencing by P elements inserted in subtelomeric heterochromatin involves the *Drosophila* Polycomb group gene, Enhancer of zeste. *Genetics* **149**: 1839-1855.
- RONSHAUGEN, M., N. MCGINNIS and W. MCGINNIS, 2002 Hox protein mutation and macroevolution of the insect body plan. *Nature* **415**: 914-917.
- ROSEMAN, R. R., E. A. JOHNSON, C. K. RODESCH, M. BJERKE, R. N. NAGOSHI *et al.*, 1995 A P element containing suppressor of hairy-wing binding regions has novel properties for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **141**: 1061-1074.

- RUBIN, G. M., and A. C. SPRADLING, 1982 Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**: 348-353.
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH and T. MANIATIS, 1989 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY.
- SANCHEZ-HERRERO, E., I. VERNOS, R. MARCO and G. MORATA, 1985 Genetic organization of *Drosophila* bithorax complex. *Nature* **313**: 108-113.
- SARKAR, A., C. SIM, Y. S. HONG, J. R. HOGAN, M. J. FRASER *et al.*, 2003 Molecular evolutionary analysis of the widespread piggyBac transposon family and related "domesticated" sequences. *Mol Genet Genomics* **270**: 173-180. Epub 2003 Aug 2029.
- SASAKURA, Y., S. AWAZU, S. CHIBA and N. SATOH, 2003 Germ-line transgenesis of the *Tc1/mariner* superfamily transposon *Minos* in *Ciona intestinalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 7726-7730.
- SCHRODER, R., 2003 The genes orthodenticle and hunchback substitute for bicoid in the beetle *Tribolium*. *Nature* **422**: 621-625.
- SCOTT, M. P., A. J. WEINER, T. I. HAZELRIGG, B. A. POLISKY, V. PIRROTTA *et al.*, 1983 The molecular organization of the Antennapedia locus of *Drosophila*. *Cell* **35**: 2.
- SHENG, G., E. THOUVENOT, D. SCHMUCKER, D. S. WILSON and C. DESPLAN, 1997 Direct regulation of *rhodopsin 1* by Pax-6/eyeless in *Drosophila*: evidence for a conserved function in photoreceptors. *Genes Dev* **11**: 1122-1131.
- SHERMAN, A., A. DAWSON, C. MATHER, H. GILHOOLEY, Y. LI *et al.*, 1998 Transposition of the *Drosophila* element mariner into the chicken germ line. *Nat Biotechnol* **16**: 1050-1053.
- SHIMIZU, K., M. KAMBA, H. SONOBE, T. KANDA, A. G. KLINAKIS *et al.*, 2000 Extrachromosomal transposition of the transposable element *Minos* occurs in embryos of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Mol Biol* **9**: 277-281.
- SIMMONS, M. J., J. D. RAYMOND, C. D. GRIMES, C. BELINCO, B. C. HAAKE *et al.*, 1996 Repression of hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster* by heat-shock-inducible sense and antisense P-element constructs. *Genetics* **144**: 1529-1544.
- SIMON, J. A., and J. W. TAMKUN, 2002 Programming off and on states in chromatin: mechanisms of Polycomb and trithorax group complexes. *Curr Opin Genet Dev* **12**: 210-218.
- SPRADLING, A. C., and G. M. RUBIN, 1982 Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* **218**: 341-347.
- SPRADLING, A. C., D. M. STERN, I. KISS, J. ROOTE, T. LAVERTY *et al.*, 1995 Gene disruptions using P transposable elements: an integral component of the *Drosophila* genome project. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 10824-10830.
- STERN, D. L., 1998 A role of Ultrabithorax in morphological differences between *Drosophila* species. *Nature* **396**: 463-466.
- SULLIVAN, W., M. ASHBURNER and S. R. HAWLEY, 2000 *Drosophila Protocols*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SULSTON, I. A., and K. V. ANDERSON, 1996 Embryonic patterning mutants of *Tribolium castaneum*. *Development* **122**: 805-814.
- SUMITANI, M., D. S. YAMAMOTO, K. OISHI, J. M. LEE and M. HATAKEYAMA, 2003 Germline transformation of the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera: Symphyta), mediated by a piggyBac-derived vector. *Insect Biochem Mol Biol* **33**: 449-458.
- SUNDARARAJAN, P., P. W. ATKINSON and D. A. O'BROCHTA, 1999 Transposable element interactions in insects: crossmobilization of hobo and Hermes. *Insect Mol Biol* **8**: 359-368.
- TAMURA, T., C. THIBERT, C. ROYER, T. KANDA, E. ABRAHAM *et al.*, 2000 Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nat Biotechnol* **18**: 81-84.
- TELFORD, M. J., and R. H. THOMAS, 1998 Expression of homeobox genes shows chelicerate arthropods retain their deutocerebral segment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10671-10675.
- THIBAUT, S. T., M. A. SINGER, W. Y. MIYAZAKI, B. MILASH, N. A. DOMPE *et al.*, 2004 A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. *Nat Genet* **36**: 283-287. Epub 2004 Feb 2022.
- TSIEN, R. Y., 1998 The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**: 509-544.
- UGARKOVIC, D., M. PODNAR and M. PLOHL, 1996 Satellite DNA of the red flour beetle *Tribolium castaneum*--comparative study of satellites from the genus *Tribolium*. *Mol Biol Evol* **13**: 1059-1066.
- UV, A. E., E. J. HARRISON and S. J. BRAY, 1997 Tissue-specific splicing and functions of the *Drosophila* transcription factor Grainyhead. *Mol Cell Biol* **17**: 6727-6735.
- VACHON, G., B. COHEN, C. PFEIFLE, M. E. MCGUFFIN, J. BOTAS *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**: 437-450.
- VALENTINE, J. W., D. JABLONSKI and D. H. ERWIN, 1999 Fossils, molecules and embryos: new perspectives on the Cambrian explosion. *Development* **126**: 851-859.

- VAN LUENEN, H. G., S. D. COLLOMS and R. H. PLASTERK, 1994 The mechanism of transposition of Tc3 in *C. elegans*. *Cell* **79**: 293-301.
- VAN POUDEROYEN, G., R. F. KETTING, A. PERRAKIS, R. H. PLASTERK and T. K. SIXMA, 1997 Crystal structure of the specific DNA-binding domain of Tc3 transposase of *C.elegans* in complex with transposon DNA. *Embo J* **16**: 6044-6054.
- VOS, J. C., I. DE BAERE and R. H. PLASTERK, 1996 Transposase is the only nematode protein required for in vitro transposition of *Tc1*. *Genes Dev* **10**: 755-761.
- VOS, J. C., and R. H. PLASTERK, 1994 Tc1 transposase of *Caenorhabditis elegans* is an endonuclease with a bipartite DNA binding domain. *Embo J* **13**: 6125-6132.
- WARREN, R. W., L. NAGY, J. SELEGUE, J. GATES and S. CARROLL, 1994 Evolution of homeotic gene regulation and function in flies and butterflies. *Nature* **372**: 458-461.
- WEATHERBEE, S., G. HALDER, J. KIM, A. HUDSON and S. CARROLL, 1998 Ultrabithorax Regulates Genes at Several Levels of the Wing-Patterning Hierarchy to Shape the Development of the *Drosophila* Haltere. *Genes Dev.* **12**: 1474-1482.
- WEATHERBEE, S. D., H. F. NIJHOUT, L. W. GRUNERT, G. HALDER, R. GALANT *et al.*, 1999 Ultrabithorax function in butterfly wings and the evolution of insect wing patterns. *Curr Biol* **9**: 109-115.
- WHITE, R. A., S. E. ASPLAND, J. J. BROOKMAN, L. CLAYTON and G. SPROAT, 2000a The design and analysis of a homeotic response element. *Mech Dev* **91**: 217-226.
- WHITE, R. A., S. E. ASPLAND, J. J. BROOKMAN, L. CLAYTON and G. SPROAT, 2000b The design and analysis of a homeotic response element. *Mech Dev* **91**: 217-226.
- WU, C. H., Y. YAMAGUCHI, L. R. BENJAMIN, M. HORVAT-GORDON, J. WASHINSKY *et al.*, 2003 NELF and DSIF cause promoter proximal pausing on the hsp70 promoter in *Drosophila*. *Genes Dev* **17**: 1402-1414.
- XU, P. X., X. ZHANG, S. HEANEY, A. YOON, A. M. MICHELSON *et al.*, 1999 Regulation of Pax6 expression is conserved between mice and flies. *Development* **126**: 383-395.
- YANNOPOULOS, G., N. STAMATIS, M. MONASTIRIOTI, P. HATZOPOULOS and C. LOUIS, 1987 hobo is responsible for the induction of hybrid dysgenesis by strains of *Drosophila melanogaster* bearing the male recombination factor 23.5MRF. *Cell* **49**: 487-495.
- ZAGORAIOU, L., D. DRABEK, S. ALEXAKI, J. A. GUY, A. G. KLINAKIS *et al.*, 2001 In vivo transposition of *Minos*, a *Drosophila* mobile element, in mammalian tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 11474-11478.
- ZHAI, R. G., P. R. HIESINGER, T. W. KOH, P. VERSTREKEN, K. L. SCHULZE *et al.*, 2003 Mapping *Drosophila* mutations with molecularly defined P element insertions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10860-10865. Epub 12003 Sep 10865.
- ZHANG, H., Y. SHINMYO, A. HIROSE, T. MITO, Y. INOUE *et al.*, 2002 Extrachromosomal transposition of the transposable element *Minos* in embryos of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Dev Growth Differ* **44**: 409-417.
- ZHANG, P., and A. C. SPRADLING, 1993 Efficient and dispersed local P element transposition from *Drosophila* females. *Genetics* **133**: 361-373.
- ZHOU, J., S. BAROLO, P. SZYMANSKI and M. LEVINE, 1996 The Fab-7 element of the bithorax complex attenuates enhancer promoter interactions in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **10**: 3195-3201.

Κατευόδιο...

Αν μου έλεγε κανείς λίγα χρόνια πριν ότι για να πάρω διδακτορικό θα έπρεπε η πανάθα να σαρώσει όλες τις κούπες επί ελληνικού εδάφους και η εθνική ομάδα ποδοσφαίρου να κατακτήσει το ευρωπαϊκό πρωτάθλημα, πιθανότατα θα αναθεωρούσα τον επαγγελματικό μου προσανατολισμό. Τελικά απ' ό,τι φαίνεται, όλα είναι δυνατά σε αυτή τη ζωή, και έτσι η βουβή ευτυχία του (ανακουφισμένου) διδάκτορα συνδυάστηκε με τις απανωτές κρίσεις ηδονής του (υστερικού) οπαδού.

Η ερευνητική εμπειρία, υπέροχα μαζοχιστική και μοναχική διαδρομή, θα ήταν ανυπόφορη χωρίς τους δικούς μου ανθρώπους, που ο καθένας ομόρφηγε με μοναδικό τρόπο τη ζωή μου όλα αυτά τα χρόνια:

Η μάνα μου Δήμητρα, η θεία Κούλα, ο θείος Τάσος, η θεία Όλγα, η Όλγα, ο Κώστας, ο Άλκης και η Μυρτώ; μπορεί να βρισκόμαστε ολοένα και πιο σπάνια, αλλά δεν παύουν να δημιουργούν με την αγάπη τους και τη ζεστασιά τους το απόλυτο καταφύγιο χαλάρωσης και περισυλλογής.

Ο Κωστής, ο καρπερότατος κουμπάρος μου με την απύθμενη γοητεία, ο θάναος, ο δίδυμος αδελφός μου με την πιο μεγάλη καρδιά, ο Κώστας, ο παντός καιρού σύντροφος με την απίστευτη σοφία του, και η Ειρήνη, η αδελφούλα που πάντα ήθελα και απέκτησα στα 20φεύγα μου.

Οι κολλητοί φίλοι, ο αυθεντικά καλόψυχος Παντελής, ο 'Big Ben' Μιχάλης, ο ανατρεπτικός Βασίλης, ο 'english mutant' Gareth, ο 'οδοστρωτήρας' Νίκος, η ναζιάρα Ψίκη...

Η Βάλια, το πιο όμορφο και τρυφερό πλάσμα του κόσμου μου.

Ο Μιχάλης, ένας πραγματικός γαλαζοαίματος της επιστήμης, μία αστείρευτη πηγή έμπνευσης και ελευθερίας.

Σε όλα τα υπόλοιπα παιδιά του εργαστηρίου-γυναικωνίτη Αβέρωφ & Δελιδάκη, τη Χρυσούλα, την Τίλινα, τη Θεodώρα, την Ιωάννα... στα παιδιά των υπόλοιπων εργαστηρίων του Insect Group, τη Μαίρη, τη Μαρία, το θάναο, τον Αλέξανδρο, το Stefan... στη μεγάλη μου αδυναμία τη Στέλλα, την Κατερίνα, το Γιάννη και τον Αλέκο... στους φίλους και συνεργάτες των άλλων εργαστηρίων του IMBB και της Ιατρικής... στο Martin Klingler και τον Andreas Berghammer... στα μέλη της Συμβουλευτικής και Εξεταστικής επιτροπής μου... στο Γιώργο Θηραίο, το Θανάση Λουκέρη και το Γιάννη Βόντα... σε όλο το προσωπικό του Ινστιτούτου που διευκόλυνε την καθημερινότητά μου... ένα μεγάλο ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου.-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Δημοσιεύσεις

Developmental Evolution: Hox Proteins Ring the Changes

Dispatch

Anastasios Pavlopoulos and Michalis Averof

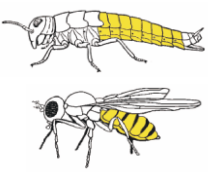
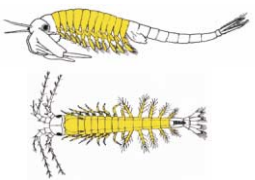

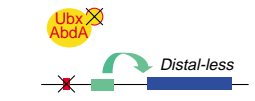
The evolution of body form is believed to involve changes in expression of developmental genes, largely through changes in *cis*-regulatory elements. Recent studies suggest that changes in the sequences of key developmental regulators, such as the Hox proteins, may also play an important role.

The generation of morphological diversity in animals and plants is presumably based on changes in the developmental processes that control morphology. Comparative developmental studies have shown that many of these changes are regulatory, affecting the expression of developmental genes [1–4]. These can be achieved by changes in *cis*-regulatory elements or in the properties of *trans*-acting regulatory proteins — two types of change that are likely to have intrinsically different properties and evolutionary dynamics. Changes in *cis*-regulatory sequences are likely to have specific effects restricted to the expression of individual genes, while changes in regulatory proteins would be expected to affect the expression of multiple target genes, with potentially devastating effects.

Accordingly, *cis*-regulatory sequences show rapid evolutionary turnover [5], while regulatory proteins are often highly conserved in primary sequence and biochemical functions. For these reasons, changes in *cis*-regulatory elements are thought likely to play the larger part in morphological evolution. Two recent studies [6,7] now challenge this idea, suggesting that changes in important regulatory proteins, with multiple target genes, are also likely to play an important role in this process.

The two new studies [6,7] focus on one of the best understood interactions between a Hox protein and one of its targets: the regulation of *Distal-less* (*Dll*) by the Ultrabithorax (Ubx) protein in insects [8]. The insect body is typically subdivided into three regions: a head bearing sensory and feeding appendages (antennae and mouthparts); a thorax bearing locomotory appendages (legs and wings); and an abdomen that is typically devoid of limbs (Figure 1). Early expression of two Hox genes, *Ubx* and *Abdominal-A* (*AbdA*), in the abdomen is responsible for the suppression of limbs in this body region. This is achieved, at least in part, by direct repression of the gene *Distal-less*, which is required for limb specification and growth.

In flies, Ubx and AbdA proteins are known to bind directly to an early enhancer of *Distal-less*, called *Dll-304*, and prevent it from activating *Distal-less* expression in abdominal segments [8,9]. This ability of Ubx

Insects	Crustaceans
<i>Ubx</i> and <i>AbdA</i> repress limb development in abdominal segments	<i>Ubx</i> and <i>AbdA</i> are expressed in body regions with well-developed limbs
	
Ubx and AbdA proteins directly repress <i>Distal-less</i> expression in <i>Drosophila</i>	Ubx and AbdA proteins do not repress <i>Distal-less</i> expression
	

Current Biology

Figure 1. Different regulatory interactions between Hox proteins and a target gene.

In insects, *Ubx* and *AbdA* are expressed in the abdominal region (yellow), where they suppress the development of limbs. This is achieved by direct repression of the *Distal-less* gene. In crustaceans, *Ubx* and *AbdA* are expressed in regions of the trunk that bear well-developed appendages (yellow); *Distal-less* is not repressed, either because of differences in the crustacean Ubx and AbdA proteins (or their cofactors) that make them unable to exert this repression, or because of differences in the *Distal-less* *cis*-regulatory elements — such as the absence of Ubx/AbdA binding sites — that render the gene insensitive to this repression.

and AbdA to repress *Distal-less* appears to have evolved specifically in the insect lineage, to create the limb-less abdominal region [10]. In crustaceans, the closest relatives of insects, Ubx and AbdA are produced in body regions that bear the most prominent and well-developed appendages (Figure 1), and are co-expressed with *Distal-less* throughout the development of appendages [1,11–13]. Thus, Ubx and AbdA proteins appear unable to repress *Distal-less* in these animals.

Is this difference the result of changes in the *cis*-regulatory elements of the *Distal-less* gene — for example, the presence or absence of Ubx/AbdA binding sites in a *Dll* enhancer — or of changes in the repressive ability of the Ubx and AbdA proteins themselves? Considering that these proteins are likely to regulate directly tens or hundreds of target genes [14,15], changes in their properties could affect the expression of multiple genes, with dramatic consequences on morphology. The creation of simple Ubx/AbdA binding sites in the *Distal-less* enhancer would appear to be an easier and less hazardous way to achieve this change.

To approach this question, Ronshaugen *et al.* [6] and Galant and Carroll [7] cloned the *Ubx* homologues from different species and directly tested their ability to repress the *Dll-304* enhancer when expressed in

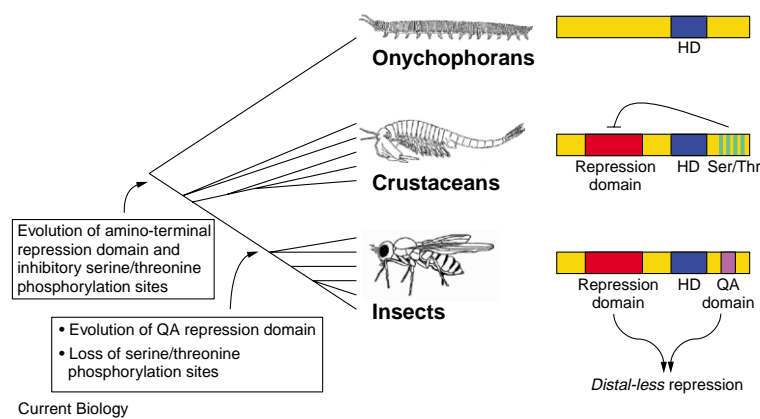


Figure 2. Changes in Ubx protein account for a change in the regulation of *Distal-less*.

The evolution of a QA repression domain and the loss of serine/threonine phosphorylation sites, which unmask a repressive activity of the amino terminus of the protein, explain the repression of *Distal-less* and the evolution of a limb-less abdomen in insects.

flies. Galant and Carroll [7] looked in particular at the Ubx of an onychophoran, the most distant segmented relative of insects that still has a clearly recognisable Ubx homologue. In an earlier study [16] it was shown that onychophoran Ubx is unable to repress *Dll-304* in flies — although it is able to mimic other effects of the *Drosophila* Ubx protein — suggesting that some property of the protein has changed. Now, by testing the activity of chimeric Ubx proteins, where different domains have been swapped between the onychophoran and the *Drosophila* homologues, Galant and Carroll [7] identified a specific domain near the carboxyl terminus of *Drosophila* Ubx that is important for the repression of *Dll-304*. This so-called QA domain, consisting of a QAQAQK motif and a stretch of Ala residues, is conserved among insect Ubx proteins but absent or incomplete in other arthropod or onychophoran Ubx proteins. This domain is sufficient to confer repression activity when fused to onychophoran Ubx.

Ronshaugen *et al.* [6] went further, examining the Ubx protein of a crustacean. In similar domain-swapping experiments they found that, apart from the QA repression domain, insect Ubx has a second strongly repressive domain near its amino terminus. Strikingly, crustacean Ubx also has this amino-terminal repressive activity, but in crustaceans this is inhibited by a carboxy-terminal region that contains a series of putative serine/threonine phosphorylation sites (Figure 2). Mutation of the putative phosphorylation sites was found to generate a crustacean Ubx that strongly suppresses limbs.

Thus, insect Ubx proteins apparently acquired the ability to repress *Dll* not only by the evolution of the QA domain, but also by the gradual loss of phosphorylation sites that inhibit the intrinsic repressive ability of all — insect and crustacean — Ubx proteins (Figure 2). Interestingly, similar phosphorylation sites are also present in another Hox protein, Antp, which is produced in thoracic segments in insects. The presence of these sites in Antp prevents the protein from repressing *Dll* in the thorax [17], suggesting that this mechanism of controlling repression could be an ancient property shared by many Hox proteins.

These changes in the Ubx protein account very nicely for the evolution of *Distal-less* repression by

Ubx and the suppression of limbs in the abdominal region of insects. Thus, a major morphological change, the creation of a limb-less abdominal region in insects, can be understood in terms of two simple steps in the evolution of Hox genes: the restriction of *Ubx* and *AbdA* expression to the posterior region of the trunk [11], and a change in the properties of their protein products that enables them to repress limbs [6,7]. This does not, of course, exclude the possibility that additional changes have taken place in the *cis*-regulatory elements of Hox target genes, but it does show that significant changes have taken place in the Ubx protein itself. An issue that remains open is what has happened to *AbdA*, the other Hox protein that represses *Distal-less* in the abdomen of insects (some studies suggest *AbdA* is the major player in this repression [9]). Has the *AbdA* protein, like Ubx, acquired new properties during the evolution of insects? Similar studies will have to be carried out on *AbdA* to answer this question.

As often happens in science, clever experiments raise new questions and force us to look at old problems in different ways. Crustacean Ubx has an amino-terminal repression domain that must presumably have a function when it is not inhibited by phosphorylation of the carboxy-terminal region. What are the circumstances in which this happens? More generally, how can a Hox protein have different repressive or activating effects in the context of different enhancers or different cell types [6,16,18]? Presumably different *cis*-regulatory elements can recruit different cofactors or activity modifiers, such as kinases, or some of these factors could be restricted to particular cell types. Bearing this in mind, can we be sure that *Drosophila* embryos and the *Drosophila Dll-304* enhancer provide the relevant context for assaying the activity of crustacean Ubx? To answer this question, one would love to be able to do the converse experiments in crustaceans, testing the activity of crustacean and insect Ubx proteins on a responsive *Dll* reporter. These questions apart, the papers of Ronshaugen *et al.* [6] and Galant and Carroll [7] provide an elegant example of how a regulatory change with important morphological consequences can be attributed to specific molecular changes in a regulatory protein.

References

1. Averof, M. and Patel, N.H. (1997). Crustacean appendage evolution associated with changes in Hox gene expression. *Nature* **388**, 682–686.
2. Sucena, E. and Stern, D.L. (2000). Divergence of larval morphology between *Drosophila sechellia* and its sibling species caused by cis-regulatory evolution of ovo/shaven-baby. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 4530–4534.
3. Doebley, J., Stec, A. and Hubbard, L. (1997). The evolution of apical dominance in maize. *Nature* **386**, 485–488.
4. Carroll, S.B., Grenier, J.K. and Weatherbee, S.D. (2001). *From DNA to Diversity* (London: Blackwell Science).
5. Ludwig, M.Z., Bergman, C., Patel, N.H. and Kreitman, M. (2000). Evidence for stabilizing selection in a eukaryotic enhancer element. *Nature* **403**, 564–567.
6. Ronshaugen, M., McGinnis, N. and McGinnis, W. (2002). Hox protein mutation and macroevolution of the insect body plan. *Nature* **415**, 914–917.
7. Galant, R. and Carroll, S.B. (2002). Evolution of a transcriptional repression domain in an insect Hox protein. *Nature* **415**, 910–913.
8. Vachon, G., Cohen, B., Pfeifle, C., McGuffin, M., Botas, J. and Cohen, S.M. (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**, 437–450.
9. Lewis, D.L., DeCamillis, M. and Bennett, R.L. (2000). Distinct roles of the homeotic genes *Ubx* and *abdA* in beetle embryonic abdominal appendage development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 4504–4509.
10. Palopoli, M.F. and Patel, N.H. (1998). Evolution of the interaction between Hox genes and a downstream target. *Curr. Biol.* **8**, 587–590.
11. Averof, M. and Akam, M. (1995). Hox genes and the diversification of insect and crustacean body plans. *Nature* **376**, 420–423.
12. Abzhanov, A. and Kaufman, T.C. (2000). Crustacean (malacostracan) Hox genes and the evolution of the arthropod trunk. *Development* **127**, 2239–2249.
13. Panganiban, G., Sebring, A., Nagy, L. and Carroll, S.B. (1995). The development of crustacean limbs and the evolution of arthropods. *Science* **270**, 1363–1366.
14. Botas, J. and Auwers, L. (1996). Chromosomal binding sites of Ultrabithorax homeotic proteins. *Mech. Dev.* **56**, 129–138.
15. Weatherbee, S.D., Halder, G., Kim, J., Hudson, A. and Carroll, S. (1998). Ultrabithorax regulates genes at several levels of the wing-patterning hierarchy to shape the development of the *Drosophila* haltere. *Genes Dev.* **12**, 1474–1482.
16. Grenier, J.K. and Carroll, S.B. (2000). Functional evolution of the Ultrabithorax protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 704–709.
17. Jaffe, L., Ryoo, H. and Mann, R.S. (1997). A role for phosphorylation by casein kinase II in modulating Antennapedia activity in *Drosophila*. *Genes Dev.* **11**, 1327–1340.
18. Li, X. and McGinnis, W. (1999). Activity regulation of Hox proteins, a mechanism for altering functional specificity in development and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 6802–6807.

Efficient Transformation of the Beetle *Tribolium castaneum* Using the *Minos* Transposable Element: Quantitative and Qualitative Analysis of Genomic Integration Events

Anastasios Pavlopoulos,^{*,1,2} Andreas J. Berghammer,^{†,1} Michalis Averof^{*} and Martin Klingler[†]

^{*}Institute of Molecular Biology and Biotechnology (IMBB-FORTH), 711 10 Iraklio Crete, Greece and [†]Zoologisches Institut, Ludwig-Maximilians-Universität München, 80333 München, Germany

Manuscript received October 9, 2003
Accepted for publication February 16, 2004

ABSTRACT

Genetic transformation in insects holds great promise as a tool for genetic manipulation in species of particular scientific, economic, or medical interest. A number of transposable elements have been tested recently as potential vectors for transformation in a range of insects. *Minos* is one of the most promising elements because it appears to be active in diverse species and has the capacity to carry large inserts. We report here the use of the *Minos* element as a transformation vector in the red flour beetle *Tribolium castaneum* (Coleoptera), an important species for comparative developmental and pest management studies. Transgenic G₁ beetles were recovered from 32.4% of fertile G₀'s injected with a plasmid carrying a *3xP3-EGFP*-marked transposon and *in vitro* synthesized mRNA encoding the *Minos* transposase. This transformation efficiency is 2.8-fold higher than that observed when using a plasmid helper. Molecular and genetic analyses show that several independent insertions can be recovered from a single injected parent, but that the majority of transformed individuals carry single *Minos* insertions. These results establish *Minos* as one of the most efficient vectors for genetic transformation in insects. In combination with *piggyBac*-based transgenesis, our work allows the introduction of sophisticated multicomponent genetic tools in *Tribolium*.

THE use of transposable elements for genetic transformation in insects has attracted wide interest as a valuable tool for developmental studies, for biotechnological purposes, and for designing strategies to control important disease vectors and agricultural pests (ADAMS and SEKELSKY 2002; ITO *et al.* 2002; TOMITA *et al.* 2003). In 1982, the landmark transformation of *Drosophila melanogaster* using the *P* element (RUBIN and SPRADLING 1982) raised the false expectation that genetic manipulation of other insects was close at hand. However, the *P* element proved to be inactive in non-drosophilid insects (HANDLER *et al.* 1993), and it took more than a decade to realize that other insect transposons have a broader host range. Using such transposons, it has been possible during the last 8 years to expand transgenic technology to several other insect taxa. Representatives of four insect orders (Diptera, Lepidoptera, Coleoptera, and Hymenoptera) have been genetically transformed by a handful of type II transposable elements: *Hermes*, *mariner*, *piggyBac*, and *Minos* (reviewed in ATKINSON *et al.* 2001; HANDLER 2001; see also SUMITANI *et al.* 2003).

Minos was originally identified in *D. hydei* and belongs to the *Tc1/mariner* superfamily of transposable elements (FRANZ and SAVAKIS 1991). It is 1.8 kb long, with two

255-bp inverted terminal repeats flanking a two-exon transposase gene (FRANZ *et al.* 1994). Recombinant purified transposases encoded by members of this superfamily are able to catalyze transposition *in vitro* (reviewed in PLASTERK *et al.* 1999). This independence from species-specific factors has been proposed to account for their widespread occurrence among metazoa and for their usefulness as DNA delivery vectors (VOS *et al.* 1996). In agreement with this, *Minos*-based vectors have been used for the genetic transformation of the dipteran species *D. melanogaster* (LOUKERIS *et al.* 1995a), *Ceratitidis capitata* (LOUKERIS *et al.* 1995b), and *Anopheles stephensi* (CATTERUCCIA *et al.* 2000) and most recently for the germline transformation of the ascidian *Ciona intestinalis* (SASAKURA *et al.* 2003). Furthermore, *Minos* activity has been demonstrated in divergent groups of insects (SHIMIZU *et al.* 2000; ZHANG *et al.* 2002) and in mammalian tissues and cell lines (KLINAKIS *et al.* 2000b; ZAGORAIOU *et al.* 2001; DRABEK *et al.* 2003). In this article we report the transformation of the red flour beetle *Tribolium castaneum* using the *Minos* element as a vector.

The spectrum of insect species amenable to transformation has also been significantly broadened by the development of new marker genes that allow the straightforward identification of transgenic animals. Earlier selection systems were based on the rescue of mutants affecting eye pigmentation (reviewed in ASHBURNER *et al.* 1998). These genetic markers were easy to score, but required a serious investment of time when applied to new species,

¹These authors contributed equally to this work.

²Corresponding author: IMBB-FORTH, Vassilika Vouton, 711 10 Iraklio Crete, Greece. E-mail: pavlopou@imbb.forth.gr

since an eye-color gene had to be molecularly characterized and a corresponding loss-of-function mutant isolated each time. This laborious procedure is circumvented by the use of fluorescent proteins as dominant markers, which enable scoring of transgenic progeny in wild-type backgrounds (TSIEN 1998). Until recently, however, the use of these markers was restricted by the lack of functional regulatory sequences able to drive their expression in diverse species. A breakthrough toward general transformation markers active in multiple species was achieved by the utilization of artificial promoters responsive to well-conserved transcription factors. An artificial Pax6-dependent promoter, known as *3xP3* (SHENG *et al.* 1997), combined with an enhanced version of the green fluorescent protein (*EGFP*), was first used successfully in *Tribolium* and *Drosophila* (BERGHAMMER *et al.* 1999b). This marker has subsequently allowed the rapid identification of transgenic individuals, at various developmental stages, in at least three different orders of insects (reviewed in HORN *et al.* 2002).

A further level of improvement can be achieved by engineering new sources of transposase that are not dependent on the existence of characterized active promoters in the particular species of interest. During the transformation procedure, eggs are usually injected with two plasmids, one carrying the marked transposon vector (referred to as the donor) and the other expressing the transposase (referred to as the helper). The transposase is usually under the control of a *Drosophila* promoter (*e.g.*, *hsp70*). However, these promoters may not be sufficiently active in all species (ZHANG *et al.* 2002). Substitution of the helper plasmid by *in vitro* synthesized capped mRNA alleviates the need for testing already established promoters or characterizing new ones to drive expression of the transposase gene in the targeted species. In the case of *Minos*-mediated transgenesis, this "ready-to-use" transposase has been shown to increase transformation rates significantly in both *D. melanogaster* and *C. capitata* (KAPETANAKI *et al.* 2002). Here we show that this improvement is more generally applicable and extends to *T. castaneum*.

We report here an effective method for the stable genetic transformation of the red flour beetle *T. castaneum*, using the *Minos* transposable element. We present a molecular analysis of *Minos* integration events into the host genome and provide quantitative measures for several parameters that determine the usefulness of this element as an effective tool for genetic manipulation in *Tribolium*. Given the increasing attention that *Tribolium* receives as an experimental organism for developmental studies, evolutionary comparisons, and pest control, the availability of a second highly active transformation vector, in addition to *piggyBac* (BERGHAMMER *et al.* 1999b; LORENZEN *et al.* 2003), is an important step toward the introduction of sophisticated genetic techniques (insertional mutagenesis, enhancer trapping, and gene trapping) in this organism.

MATERIALS AND METHODS

***T. castaneum* rearing and micro-injections:** A nonisogenized strain of *T. castaneum*, homozygous for the recessive eye-color mutation *pearl* (*p*; LORENZEN *et al.* 2002), was used throughout these experiments. The lack of eye pigments in this strain facilitates the detection of fluorescence in the eyes of transformed individuals.

Beetles were reared under standard laboratory conditions and processed as previously described (BERGHAMMER *et al.* 1999a; LORENZEN *et al.* 2003; and <http://www.zi.biologie.uni-muenchen.de/science/tribolium/klingler/frames.html>). For injections, beetles were allowed to lay eggs for 3 hr at 24°. Eggs were treated with 0.2% bleach for 1 min; transferred to coverslips; and injected with a mixture containing 500 ng/ μ l of the donor plasmid pMi{3xP3-EGFP}, 375 ng/ μ l of the helper plasmid pHSS6hsILMi20 or 375 ng/ μ l of transposase-capped mRNA, and 0.05% of the inert dye phenol red (Sigma, St. Louis) in water. Coverslips with injected embryos were then transferred to apple juice agar plates at 33°, within sealed plastic containers, to avoid desiccation. Male and female survivors (G_0 's) were backcrossed individually to three female or two male *pearl* beetles, respectively. A detailed protocol is available on request.

Plasmids: Throughout these experiments we used the pMi{3xP3-EGFP} donor plasmid (kindly provided by A. Klinakis, A. Babaratsas, and C. Savakis), containing a *Minos* transposon with the *EGFP* coding sequence under control of the *3xP3* promoter (HORN and WIMMER 2000; Figure 1C). The *3xP3-EGFP* gene cassette produces green fluorescence in the eyes of individuals carrying this construct (BERGHAMMER *et al.* 1999b).

The helper plasmid pHSS6hsILMi20, containing the *Minos* transposase-coding sequence under the control of the *Drosophila hsp70* promoter, has been described previously (KLINAKIS *et al.* 2000a). The plasmid pBlueSKMimRNA, used for the *in vitro* synthesis of *Minos* transposase mRNA, is a derivative of pNB40ILTMi (KAPETANAKI *et al.* 2002). A *Pst*I (blunt)/*Not*I fragment of pNB40ILTMi, containing the *Minos* transposase transcription unit, was cloned into *Kpn*I (blunt)/*Not*I-cut pBlueScriptSK II+ (Stratagene, La Jolla, CA), placing the *Minos* transposase under the T7 promoter.

***In vitro* synthesis of *Minos* transposase mRNA:** Capped *Minos* transposase mRNA was prepared from the pBlueSKMimRNA vector (linearized with *Not*I), using the mMESSAGE mMACHINE kit (Ambion, Austin, TX). The transcription reaction was carried out using T7 RNA polymerase, according to the manufacturer's instructions, followed by phenol-chloroform extraction and isopropanol precipitation of the mRNA. Small aliquots of the mRNA were stored in isopropanol at -20°. Before micro-injection, the mRNA was precipitated, washed with ethanol, resuspended in water, and quantitated using a spectrophotometer.

Southern blot analysis and inverse PCR: Genomic DNA was prepared from pools of adult beetles using the Puregene DNA isolation kit (Gentra Systems, Research Triangle Park, NC). About 2 μ g of genomic DNA was digested with either *Pvu*II or *Aha*I, size separated by agarose gel electrophoresis, and blotted onto PROTRAN nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell, Keene, NH). Radiolabeled probes and hybridizations were carried out using standard techniques (SAMBROOK *et al.* 1989). Inverse PCR was carried out with *Aha*I-digested genomic DNA and *Minos*-specific primers, as described previously (KLINAKIS *et al.* 2000b). Amplified DNA fragments were cycle sequenced and subjected to BLAST analysis in the EMBL/GenBank databases.

Epifluorescence microscopy: EGFP fluorescence was observed using a Leica MZ12 fluorescence stereomicroscope, equipped with Plan apo 1.6 \times objective, a 100-W Hg lamp,

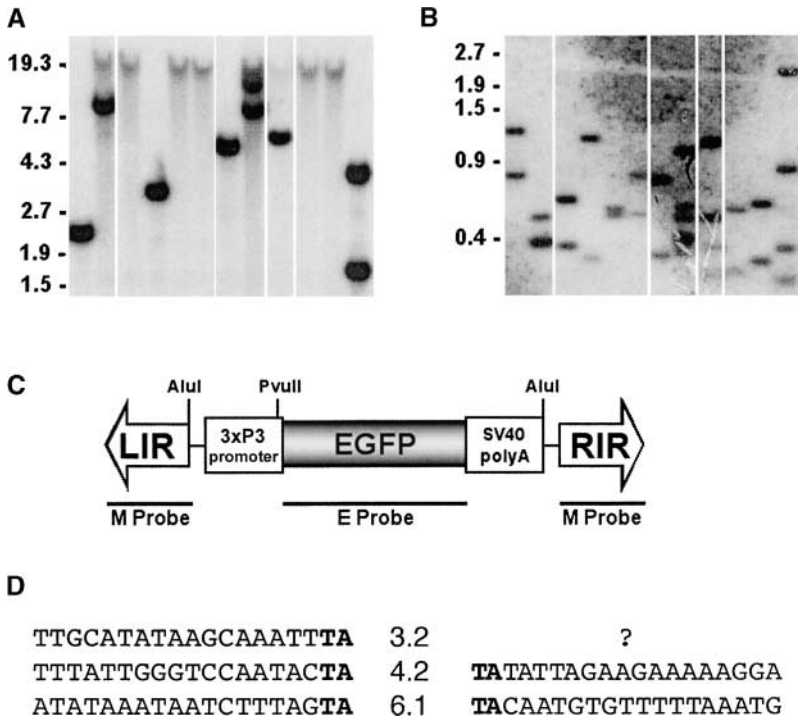


FIGURE 1.—Molecular analysis of *Minos* insertions. (A) Southern analysis of *PvuII*-digested genomic DNA probed with sequences corresponding to the *EGFP* coding region (E probe). Each lane represents genomic DNA isolated from a pool of 12 transgenic beetles that derive from a single transformed parent. A single band is expected per *Minos* insertion. (B) Southern analysis of *AluI*-digested genomic DNA from the same pools of beetles as in A, probed with sequences corresponding to the *Minos* inverted repeats (M probe). Two bands per *Minos* insertion are expected. (C) Map of the *Mi{3xP3-EGFP}* transposon construct used in this work (not to scale). LIR and RIR correspond to the left and right inverted repeats of *Minos*, respectively. The *EGFP* coding sequence is placed under the control of an artificial promoter containing three Pax-6 binding sites and the *Drosophila hsp70* basal promoter. (D) Flanking sequences of three independent *Minos* insertions in the *Tribolium* genome (from RNA lines 3.2, 4.2, and 6.1), recovered by inverse PCR. The characteristic duplicated TA dinucleotide (in boldface type) is found on either side of the integration site.

and a GFP filter set (excitation filter 480/40 nm, emission filter 510 nm). Photography was performed using a Wild MPS 51S camera or a ProgRes C14 digital camera.

RESULTS

High-efficiency of transformation using DNA or mRNA helpers: The ability of the *Minos* element to transpose into the germline of *T. castaneum* was tested by co-injecting a plasmid carrying the *Mi{3xP3-EGFP}* transposon (Figure 1C) with either of two sources of *Minos* transposase: a helper plasmid or capped mRNA encoding the *Minos* transposase (see MATERIALS AND METHODS). Approximately 600 preblastoderm embryos of a white-eyed *pearl* strain were injected in each case. The vast majority of surviving G_0 individuals were fertile and their offspring (G_1 's) were scored for fluorescence in their eyes to identify transgenic animals.

Among the 167 fertile G_0 's injected with the helper plasmid, 19 produced transgenic offspring ("DNA lines"), while 67 of 207 fertile G_0 's injected with the helper mRNA produced transgenic offspring ("RNA lines"). Thus, the deduced transformation efficiencies are 11.4% for the DNA helper and 32.4% for the RNA helper (Table 1). Chi-square analysis shows that this 2.8-fold difference in transformation rates is highly significant ($P < 0.001$). No difference in transformation efficiency was observed between male and female G_0 's.

Transposition of *Minos* into the host genome: Integration of the *Minos* element into the host genome was confirmed by Southern hybridization. Genomic DNA was prepared from pools, each composed of ~12 fluorescent sibling G_1 beetles (derived from the same in-

jected G_0). Twelve such samples were prepared from G_0 's injected with the helper plasmid and 24 from G_0 's injected with helper mRNA. Each pool was tested for the number of integrated copies of *Minos*, using two different restriction enzyme/probe combinations. *PvuII*-digested DNA was probed for the *EGFP* coding sequence (E probe), resulting in one band per insertion (Figure 1, A and C), while *AluI*-digested DNA was probed for the *Minos* inverted repeats (M probe), resulting in two bands per insertion (Figure 1, B and C). The M probe used did not hybridize to genomic DNA from untransformed *pearl* beetles (nor do specific primers for the *Minos* terminal repeats amplify any product), suggesting that no *Minos*-related transposable elements were already present in the coleopteran genome.

Sixty-three insertions were detected in total among the transformed DNA and RNA lines subjected to Southern analysis (Tables 2 and 3). All detected insertions are characterized by bands >1.45 kb with the E probe and bands >0.26 and 0.38 kb with the M probe (these are the minimum sizes expected for integral copies of the *Mi{3xP3-EGFP}* element), suggesting that these represent insertions of the entire *Mi{3xP3-EGFP}* element into the host genome.

Insertions carrying sequences of the donor plasmid (external to the transposon) are expected to produce a 1.58-kb band with the E probe and 0.27- and 0.4-kb bands with the M probe, due to the presence of additional *PvuII* and *AluI* sites in the donor plasmid. These fragment sizes were detected on just three occasions, exclusively in lines carrying multiple *Minos* insertions (Tables 2 and 3). The presence of external sequences

TABLE 1
Summary of transformation experiments

Donor	Helper	No. of embryos injected	No. of surviving G ₀ 's	No. of fertile G ₀ 's	No. of transformants producing G ₀ 's	% transformation efficiency ^a
pMi{3xP3-EGFP}	DNA	~600	171	167	19	11.4
pMi{3xP3-EGFP}	RNA	~600	210	207	67	32.4

^a Percentage of fertile G₀'s producing transformed G₁ progeny.

was confirmed by probing with the plasmid backbone of pMi{3xP3-EGFP} (data not shown). The vast majority of insertions did not show these bands and are thus thought to derive from genuine transposition events of the *Minos* element into the *Tribolium* genome.

To confirm this, we carried out inverse PCR and sequenced the DNA flanking the *Minos* element in three independent RNA lines. Like other members of the *Tc1/mariner* superfamily, *Minos* is known to insert in a TA dinucleotide, which is duplicated upon insertion (ARCA *et al.* 1997). In the three lines that we sequenced, the inverted terminal repeats of the *Mi{3xP3-EGFP}* element were flanked by this characteristic TA dinucleotide, followed by sequences that were unrelated to those

of the donor plasmid (Figure 1D). Database searches revealed that in one of these lines (line 4.2), the *Minos* element was inserted within a previously identified 360-bp satellite DNA element present in the *Tribolium* genome (UGARKOVIC *et al.* 1996).

Number of transformed progeny per G₀ (cluster size): The percentage of fluorescent progeny (transformed G₁'s) obtained per G₀, referred to as cluster size, was determined for beetles injected with the DNA and RNA helpers, respectively (Figure 2). The distributions of these values are broad (Figure 2), with the mean cluster size per transformant-producing G₀ being 10.3% for the DNA helper (ranging between 1 and 35%) and 15.2% for the RNA helper (ranging between 1 and 96%). Thus,

TABLE 2
DNA lines subjected to Southern and segregation analysis

G ₀ cross	Gender	Fluorescent-eyed G ₁ progeny	Total G ₁ progeny	Cluster size ^a (%)	G ₀ insertions ^b	G ₁ cross ^c	Segregation analysis ^d	G ₁ insertions ^e	Nature of insertions ^f
1	M	33	228	14.47	1	1.1	1		
2	M	5	352	1.42	1	2.1	1		
3	M	23	344	6.69	1	3.1	1		
4	M	60	297	20.20	2	4.1	1		
5	M	13	297	4.38	1	5.1	1		
6	M	13	283	4.59	1	6.1	1		
						6.2	1		
7	M	39	310	12.58	1	7.1	1		
8	M	118	337	35.01	3	8.1	2	3	Two linked, plasmid sequence
						8.2	1	2	
9	F	15	231	6.49	1	9.1	1		
10	F	78	283	27.56	3	10.1	3	3	
						10.2	1		
						10.3	1	1	
11	F	8	213	3.76	1	11.1	1		
12	F	20	184	10.87	1	12.1	1		

^a Cluster size is the percentage of transformed G₁'s produced by individual G₀'s backcrossed to *pearl* beetles.

^b Number of *Minos* insertions in the germline of each G₀, as inferred from transformed G₁ progeny subjected to Southern analysis.

^c Fluorescent G₁ siblings backcrossed individually to *pearl* beetles.

^d Number of *Minos* insertions in the germline of each G₁, as inferred from the segregation ratios of the *3xP3-EGFP* marker in the G₂ generation.

^e Number of *Minos* insertions in the germline of each G₁, as inferred from transformed G₂ progeny subjected to Southern analysis.

^f The majority of integration events are single unlinked *Minos* insertions. Only lines displaying either linked insertions (deduced from a difference between the number of actual and independently segregating insertions) or insertions carrying plasmid sequences (deduced by Southern analysis) are shown.

TABLE 3
RNA lines subjected to Southern and segregation analysis

G ₀ cross	Gender	Fluorescent-eyed G ₁ progeny	Total G ₁ progeny	Cluster size ^a (%)	G ₀ insertions ^b	G ₁ cross ^c	Segregation analysis ^d	G ₁ insertions ^e	Nature of insertions ^f
1	M	93	311	29.90	1	1.1	1	1	
						1.2	1	1	
2	M	74	249	29.72	2	2.1	2	2	
						2.2	1	1	
3	M	33	273	12.09	1	3.1	1	1	
						3.2	1	1	
4	M	69	322	21.43	2	4.1	1	1	
						4.2	1	1	
5	M	62	204	30.39	2	5.1	1	1	
6	M	108	264	40.91	1	6.1	1	1	
						6.2	1	1	
7	M	261	272	95.96	≥4	7.1	3	4	Two linked
						7.2	1	2	
						7.3	2	3	
						7.4	1	1	
8	M	12	222	5.41	2	8.1	2	2	
						8.2	1	1	
9	M	14	175	8.00	2	9.1	1	1	
10	M	89	191	46.60	≥3	10.1	1	1	Two linked, plasmid sequence
						10.2	1	2	
11	M	6	330	1.82	1				
12	F	14	167	8.38	2				
13	F	11	256	4.30	2				
14	F	44	190	23.16	1				
15	F	44	197	22.34	2				
16	F	66	207	31.88	2				
17	F	11	267	4.12	1				
18	M	9	283	3.18	3				
19	M	103	292	35.27	2				
20	F	66	207	31.88	3				Plasmid sequence
21	F	11	268	4.10	1				
22	F	64	157	40.76	2				
23	M	8	316	2.53	3				
24	M	5	334	1.50	1				

^a Cluster size is the percentage of transformed G₁'s produced by individual G₀'s backcrossed to *pearl* beetles.

^b Number of *Minos* insertions in the germline of each G₀, as inferred from transformed G₁ progeny subjected to Southern analysis.

^c Fluorescent G₁ siblings backcrossed individually to *pearl* beetles.

^d Number of *Minos* insertions in the germline of each G₁, as inferred from the segregation ratios of the *3xP3-EGFP* marker in the G₂ generation.

^e Number of *Minos* insertions in the germline of each G₁, as inferred from transformed G₂ progeny subjected to Southern analysis.

^f The majority of integration events are single unlinked *Minos* insertions. Only lines displaying either linked insertions (deduced from a difference between the number of actual and independently segregating insertions) or insertions carrying plasmid sequences (deduced by Southern analysis) are shown.

while the RNA helper almost triples the transformation frequency (see above), cluster size increases by only ~50%. Consequently, the number of G₁ progeny that need to be screened per G₀ to detect a transformant is similar for RNA and DNA helpers.

Number of independent insertions obtained per G₀:

We used Southern analysis in pools of 12 transgenic G₁ progeny per G₀ (described above) to measure the number of independent *Minos* insertions that can be

obtained from the germline of a single injected G₀; *i.e.*, sampling 12 transformed gametes from each germline. Pilot experiments indicated that the hybridization conditions used were sensitive enough to detect insertion(s) present even in only 1 of the 12 beetles constituting each sample (data not shown).

Among the 12 DNA lines subjected to this analysis, 9 lines carried a single insertion, 1 carried two insertions, and 2 carried three insertions (Table 2). Among the 24

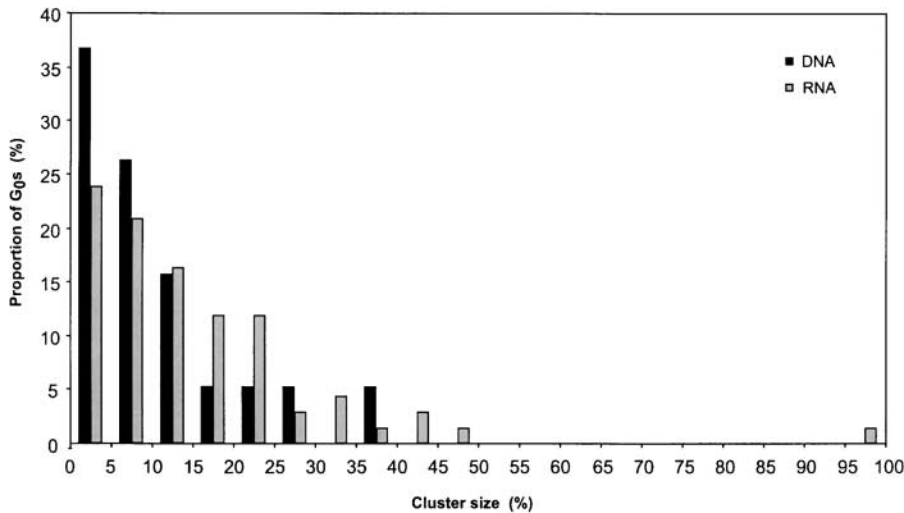


FIGURE 2.—Distribution of cluster sizes (percentage of transformed G_1 's obtained per G_0) in DNA *vs.* RNA lines. The number of G_0 's with a given cluster size is expressed as a fraction (%) of the total number of transformant-producing G_0 's. DNA and RNA lines produced similar numbers of offspring.

RNA lines that were analyzed, 8 carried a single insertion, 11 carried two insertions, and 5 carried three or more insertions (Table 3). It is evident that the RNA helper is capable not only of transforming a higher proportion of injected animals, but also of generating a larger number of independent insertions per germline, in comparison to the DNA helper (multiple insertions in 67% *vs.* 25% of the lines tested).

To address whether there is a direct relation between the number of insertions per G_0 germline and the proportion of transformed G_1 progeny produced per G_0 (cluster size), we examined whether there is a correlation between these values for individual DNA and RNA lines. The correlation coefficient is high for the DNA lines (Figure 3A, $r = 0.92$), supporting the expectation that these values should be directly related to each other and to the level of activity of the transposase in individual injected G_0 's. The correlation coefficient for the RNA lines, however, was found to be significantly lower (Figure 3B, $r = 0.50$). This is illustrated by RNA-injected G_0 's carrying multiple insertions but giving rise to <5% transformed progeny and, conversely, by G_0 's carrying a single insertion but giving rise to >20% transformed progeny. The latter may be explained if the RNA helper can drive transposition at earlier stages, giving rise to larger clones of germ cells marked by the same insertion.

Most transformed (G_1) individuals carry single *Minos* insertions: We have shown that individual G_0 beetles can carry multiple independent insertions of a *Minos* element in their germline. Depending on whether these insertions have hit the same or independent germ cells, these can be recovered as multiple insertions in a single G_1 or as single insertions in several different G_1 progeny. To resolve this, we performed Southern analysis in pools of 12 G_2 transformants produced by individual G_1 beetles (backcrossed to *pearl* beetles), to deduce the number of insertions present in the genome of these G_1 's. We also used the segregation ratio of transformed to non-

transformed progeny of individual G_1 beetles, to estimate the number of unlinked insertions present in these G_1 's. In most cases, the number of insertions determined by Southern hybridization was consistent with that deduced from segregation ratios, with three exceptions, which presumably correspond to linked insertions (Tables 2 and 3).

As expected, for G_0 's giving rise to single inserts, all G_1 's were found to contain the same single insertion of the transposon. However, also in the case of G_0 's giving rise to multiple insertions, a significant proportion of their G_1 offspring were found to each carry only a single copy of the transposon (Tables 2 and 3), suggesting that in many cases different germ cells had been targeted in one G_0 animal. Overall, the majority of transformed G_1 's are inferred to carry single insertions of the transposon.

Eye fluorescence phenotypes: It is well known that the expression of transformation markers can be influenced by the particular locus where a mobile element is inserted (LOUKERIS *et al.* 1995a; HORN *et al.* 2000). In our experiments, significant differences were observed in the expression of the *3xP3-EGFP* marker among different lines of transformants, ranging from strong expression in the entire eye to weak expression in a small number of ommatidia. A significant number of DNA and RNA lines (about one-quarter of the lines examined) produced G_1 's with distinct eye fluorescence phenotypes. The majority of these lines contained different *Minos* insertions. Similarly, distinct eye phenotypes were observed segregating in the progeny of G_1 's carrying more than one *Minos* insertion. This behavior is similar to that observed with other transformation markers (*e.g.*, *white* in *Drosophila*) and may help to distinguish individuals that carry different *Minos* insertions.

Enhancer trapping by *Mi(3xP3-EGFP)*: The *3xP3-EGFP* marker used in these experiments is regulated by a minimal promoter and a number of upstream Pax-6 binding sites that activate expression specifically in the eyes and in parts of the central nervous system in

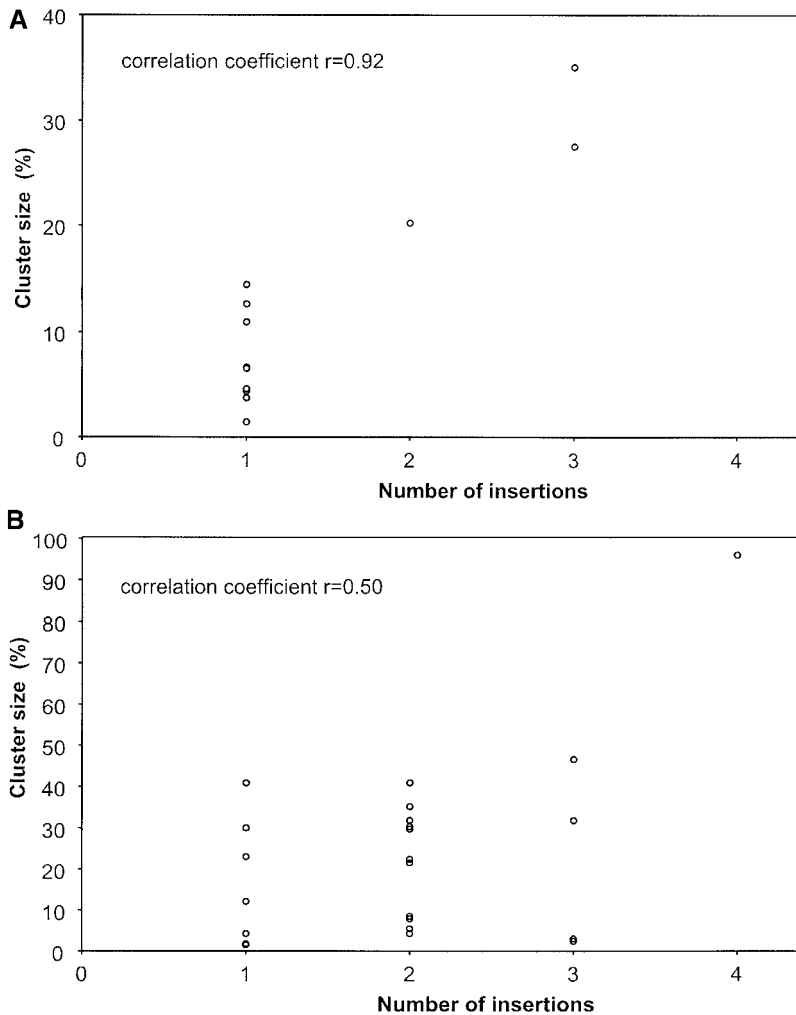


FIGURE 3.—Correlation between the number of insertions recovered per G_0 germline and the proportion of transformed G_1 progeny produced per G_0 (cluster size). (A) Plot of cluster size *vs.* number of insertions for DNA lines, showing a high positive correlation between these values ($r = 0.92$). (B) Plot of cluster size *vs.* number of insertions for RNA lines, showing a lower correlation between these values ($r = 0.50$). Note difference in scale in the y-axis for DNA *vs.* RNA lines.

Tribolium (BERGHAMMER *et al.* 1999b; LORENZEN *et al.* 2003). Depending on the site of integration of the transposon in the host genome, it is conceivable that *EGFP* expression could also be activated by nearby enhancers, an effect that is widely known as “enhancer trapping” (O’KANE and GEHRING 1987; BELLEN *et al.* 1989; BIER *et al.* 1989). Enhancer trapping has been reported recently, using the *piggyBac* element in *Drosophila* and *Tribolium* (HORN *et al.* 2003; LORENZEN *et al.* 2003). To determine whether this occurs at an appreciable frequency with the *Mi{3xP3-EGFP}* element, we looked at the patterns of *EGFP* fluorescence in larvae, pupae, and adults of all 86 transformed lines. Enhancer traps were identified as novel *EGFP* expression patterns in at least 10 lines (Figure 4). This suggests that enhancer trap screens could be carried out in *Tribolium* using *Minos*-based vectors.

DISCUSSION

High-efficiency transformation of *Tribolium* using *Minos*: We have tested the ability of the *Minos* element to transpose in the beetle *T. castaneum* and examined

a number of quantitative and qualitative parameters that bear on its utility as a tool for genetic manipulations in this species.

First, we determined the frequency at which the surviving G_0 (injected) beetles give rise to transformed progeny. Transformation frequencies were 11.4% using plasmid DNA as a helper and 32.4% using mRNA as helper. These frequencies are sufficiently high for routine transgenic experiments and, in the case of the RNA helper, the transformation rate is among the highest reported in insects (ATKINSON *et al.* 2001; HANDLER 2001). Equally impressive transformation rates in *Tribolium* have been achieved using *piggyBac*-based vectors as well (BERGHAMMER *et al.* 1999b; LORENZEN *et al.* 2003).

The second parameter we examined is the frequency at which transformed G_1 progeny are recovered from transformant-producing G_0 's, the so-called cluster size. This gives an estimate of the number of G_1 progeny that need to be screened per G_0 to recover a transformation event. Cluster sizes have a broad distribution (Figure 2) with mean values of 10.3% for the DNA helper and 15.2% for the RNA helper. Using the RNA helper, it seems possible to recover $\sim 55\%$ of transformed lines

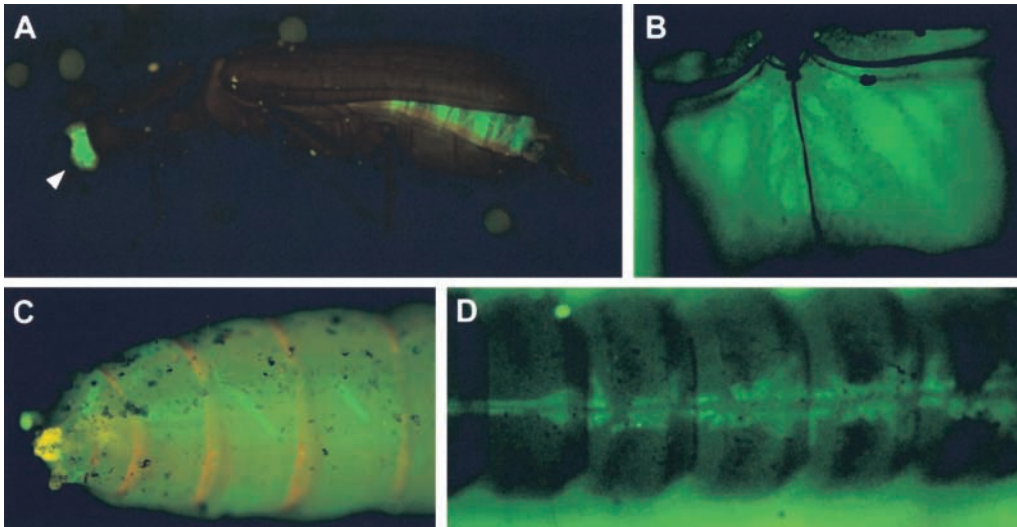


FIGURE 4.—Enhancer trap lines recovered from *Mi{3xP3-EGFP}* insertions. Lines show new patterns of EGFP fluorescence, in addition to those driven by the *3xP3* element. (A) Expression in adult abdominal muscles (arrowhead marks the expected *3xP3*-driven expression in the eye), (B) expression in adult thoracic muscles (ventral view), (C) expression in ventro-lateral stripes in the larva, (D) expression in the dorsal hemolymph vessel of the larva.

by screening just 10 individuals (G_1 's) per G_0 and $\sim 75\%$ of transformed lines by screening ~ 20 individuals per G_0 . These numbers are sufficiently high to allow for comfortable screening of large numbers of injected beetles and are comparable to those obtained with the *piggyBac* element (LORENZEN *et al.* 2003).

A third parameter of interest is the number of independent *Minos* insertions that can be recovered per injected individual. Multiple insertions recovered per G_0 may be an advantage in screens where each independent insertion has the potential to reveal new information (*e.g.*, enhancer trap screens), but they may be a disadvantage in screens where single insertional events need to be recovered (*e.g.*, insertional mutagenesis screens). The most useful situation is when independent insertions can be recovered in different G_1 progeny arising from a single G_0 . In our experiments, 25% of the DNA lines and 67% of the RNA lines tested contained more than one *Minos* insertion, but in a significant proportion of these cases single insertions were recovered in individual G_1 beetles. These could often be recognized by different eye fluorescence phenotypes. Overall, the majority of transformed G_1 's that were recovered carried single *Minos* insertions within their genome.

Other important parameters that influence the use of transposon vectors are the stability of insertions, the tendency of the element to insert as single or tandem copies within the genome, and the specificity of transposition events, *i.e.*, whether the mobile element is cleanly excised from its flanking sequences and whether it has a preference for particular target sequences. In all studies that have been carried out to date *Minos* insertions appear to be extremely stable in the absence of a source of transposase (LOUKERIS *et al.* 1995a; KAPETANAKI *et al.* 2002). In our experiments this was seen most clearly in the Southern analysis, where we consistently recovered the same bands in G_1 individuals and in their G_2 progeny (data not shown). We have also confirmed that

the great majority of *Minos* insertions are single unlinked insertions, that most of them do not carry the flanking plasmid sequences, and that the only obvious preference for target sites is the presence of the TA dinucleotide at the site of insertion (ARCA *et al.* 1997). Interestingly, two of the three lines carrying linked insertions correspond to cases where plasmid sequences were also found incorporated into the genome. A two-step mechanism, involving the integration of a second *Mi{3xP3-EGFP}* transposon into the donor plasmid, followed by transposition of the resulting compound transposon into the genome, could explain these results (LOUKERIS *et al.* 1995a).

Finally, an important parameter for many transformation experiments is the ability of the vector to carry large inserts. While we have not tested the effect of insert size on transformation efficiency in *Tribolium* (all our experiments were carried out with the 2-kb *Mi{3xP3-EGFP}* element), a number of relevant observations are available from *Drosophila*: using the same RNA helper, transformation frequencies of 32% were obtained with a 5.8-kb transposon, 12% with a 7-kb transposon, and 25% with a 9.1-kb transposon (A. METAXAKIS and C. SAVAKIS, personal communication; A. PAVLOPOULOS, unpublished observations). These results suggest that the transposition activity of *Minos* in *Drosophila* is not severely affected by large insert sizes. Given that *Minos* activity is unlikely to depend on host-specific factors (as deduced from the broad host specificity of this element), it is likely that these vectors will be able to carry relatively large inserts also in *Tribolium* and in other species of interest. A similar ability to carry large insert sizes (up to 9.5 kb) has also been demonstrated for *piggyBac*-based transposons (LORENZEN *et al.* 2003).

Overall, these results demonstrate that *Minos* has the ability to transpose very efficiently in *T. castaneum* and can be used as a vector for routine transformation experiments in this species. Although particular quantitative

parameters may vary in different experiments (depending on variations in the injection protocol, amount and quality of the helper, overall size of the transposable element, etc.), the performance measured in these pilot experiments suggests that *Minos* will be an excellent tool for most applications (see below).

DNA vs. RNA helper: Comparing the results obtained using DNA and RNA helpers suggests that the RNA helper is a more efficient source of transposase: it gives an almost three-fold increase in the frequency of transformation (32.4% vs. 11.4%), increases somewhat the cluster size (15.2% vs. 10.3%), and increases the number of independent insertions obtained per G_0 . All this is achieved without lowering the survival or fertility rates of injected G_0 's (Table 1), indicating that the RNA helper could be more useful for generating transformants in large-scale projects. The main drawbacks of using the RNA helper are the additional steps required to synthesize the mRNA, the extra precautions that must be taken to prevent RNA degradation, and in some cases the need to deal with multiple insertions that are obtained in a larger proportion of the G_1 's.

Prospects for genetic manipulation in Tribolium: Efficient transformation in *Tribolium* allows powerful new tools and techniques to be used in this species. These include the use of insertional mutagenesis, enhancer trapping, and gene trapping for the identification of new genes (O'KANE and GEHRING 1987; COOLEY *et al.* 1988; BELLEN *et al.* 1989; BIER *et al.* 1989; SPRADLING *et al.* 1995); the use of the *UAS/GAL4* and *FLP/FRT* systems for targeted misexpression and mosaic analysis (GOLIC and LINDQUIST 1989; BRAND and PERRIMON 1993); and the use of reporter constructs for studying *cis*-regulatory elements (LUDWIG *et al.* 2000), techniques that have so far been available only in model organisms like *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, and the mouse.

Besides *Minos*, another transposable element, *piggyBac*, has been shown to mediate transformation and enhancer detection with high efficiency in *Tribolium* (BERGHAMMER *et al.* 1999b; LORENZEN *et al.* 2003). Having two different vectors for transformation offers several advantages and greatly expands the possibilities for genetic manipulation in a species: it helps overcome problems of insertional biases of individual elements (SPRADLING *et al.* 1999), allows efficient dual transposon systems to be used for insertional screens (with separate helper and mobile/mutator elements integrated into the genome; COOLEY *et al.* 1988; HORN *et al.* 2003), allows the use of compound transposons to facilitate the detection of excision events and to generate chromosomal deletions (HUET *et al.* 2002), and allows the generation of new insertions in genetic backgrounds where other transposable elements remain stable (HACKER *et al.* 2003). Thus, powerful genetics and reverse-genetic technologies that were once available only in *Drosophila* can now be applied to *Tribolium*.

We are grateful to Charalambos Savakis and Ernst Wimmer for providing constructs and advice, Alekos Babaratsas and Apostolos Klinakis for the pMi{3xP3-EGFP} construct, and Thanos Metaxakis for communicating results prior to publication. This work was supported by a European Molecular Biology Organization short-term fellowship to A.P., a Deutsche Forschungsgemeinschaft SFB190 grant to M.K., a European Molecular Biology Organization Young Investigators' award to M.A., and by Institute of Molecular Biology and Biotechnology intramural funds.

LITERATURE CITED

- ADAMS, M. D., and J. J. SEKELSKY, 2002 From sequence to phenotype: reverse genetics in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Rev. Genet.* **3**: 189–198.
- ARCA, B., S. ZABALOU, T. G. LOUKERIS and C. SAVAKIS, 1997 Mobilization of a *Minos* transposon in *Drosophila melanogaster* chromosomes and chromatid repair by heteroduplex formation. *Genetics* **145**: 267–279.
- ASHBURNER, M., M. A. HOY and J. J. PELOQUIN, 1998 Prospects for the genetic transformation of arthropods. *Insect Mol. Biol.* **7**: 201–213.
- ATKINSON, P. W., A. C. PINKERTON and D. A. O'BROCHTA, 2001 Genetic transformation systems in insects. *Annu. Rev. Entomol.* **46**: 317–346.
- BELLEN, H. J., C. J. O'KANE, C. WILSON, U. GROSSNIKLUS, R. K. PEARSON *et al.*, 1989 *P*-element-mediated enhancer detection: a versatile method to study development in *Drosophila*. *Genes Dev.* **3**: 1288–1300.
- BERGHAMMER, A., G. BUCHER, F. MADERSPACHER and M. KLINGLER, 1999a A system to efficiently maintain embryonic lethal mutations in the flour beetle *Tribolium castaneum*. *Dev. Genes Evol.* **209**: 382–389.
- BERGHAMMER, A. J., M. KLINGLER and E. A. WIMMER, 1999b A universal marker for transgenic insects. *Nature* **402**: 370–371.
- BIER, E., H. VAESSIN, S. SHEPHERD, K. LEE, K. MCCALL *et al.*, 1989 Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a *P-lacZ* vector. *Genes Dev.* **3**: 1273–1287.
- BRAND, A. H., and N. PERRIMON, 1993 Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**: 401–415.
- CATTERUCCIA, F., T. NOLAN, T. G. LOUKERIS, C. BLASS, C. SAVAKIS *et al.*, 2000 Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nature* **405**: 959–962.
- COOLEY, L., R. KELLEY and A. SPRADLING, 1988 Insertional mutagenesis of the *Drosophila* genome with single *P* elements. *Science* **239**: 1121–1128.
- DRABEK, D., L. ZAGORAIOU, T. DEWIT, A. LANGEVELD, C. ROUMPAKI *et al.*, 2003 Transposition of the *drosophila hydei minos* transposon in the mouse germ line. *Genomics* **81**: 108–111.
- 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**: 6646.
- FRANZ, G., T. G. LOUKERIS, G. DIALEKTAKI, C. R. THOMPSON and C. SAVAKIS, 1994 Mobile *Minos* elements from *Drosophila hydei* encode a two-exon transposase with similarity to the paired DNA-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 4746–4750.
- GOLIC, K. G., and S. LINDQUIST, 1989 The *FLP* recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* **59**: 499–509.
- HACKER, U., S. NYSTEDT, M. P. BARMCHI, C. HORN and E. A. WIMMER, 2003 *piggyBac*-based insertional mutagenesis in the presence of stably integrated *P* elements in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 7720–7725.
- HANDLER, A. M., 2001 A current perspective on insect gene transformation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**: 111–128.
- HANDLER, A. M., S. P. GOMEZ and D. A. O'BROCHTA, 1993 A functional analysis of the *P*-element gene-transfer vector in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **22**: 373–384.
- HORN, C., and E. A. WIMMER, 2000 A versatile vector set for animal transgenesis. *Dev. Genes Evol.* **210**: 630–637.
- HORN, C., B. JAUNICH and E. A. WIMMER, 2000 Highly sensitive,

- fluorescent transformation marker for *Drosophila* transgenesis. *Dev. Genes Evol.* **210**: 623–629.
- HORN, C., B. G. SCHMID, F. S. POGODA and E. A. WIMMER, 2002 Fluorescent transformation markers for insect transgenesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**: 1221–1235.
- HORN, C., N. OFFEN, S. NYSTEDT, U. HACKER and E. A. WIMMER, 2003 *piggyBac*-based insertional mutagenesis and enhancer detection as a tool for functional insect genomics. *Genetics* **163**: 647–661.
- HUET, F., J. T. LU, K. V. MYRICK, L. R. BAUGH, M. A. CROSBY *et al.*, 2002 A deletion-generator compound element allows deletion saturation analysis for genomewide phenotypic annotation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 9948–9953.
- ITO, J., A. GHOSH, L. A. MOREIRA, E. A. WIMMER and M. JACOBS-LORENA, 2002 Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature* **417**: 452–455.
- KAPETANAKI, M. G., T. G. LOUKERIS, I. LIVADARAS and C. SAVAKIS, 2002 High frequencies of *Minos* transposon mobilization are obtained in insects by using in vitro synthesized mRNA as a source of transposase. *Nucleic Acids Res.* **30**: 3333–3340.
- KLINAKIS, A. G., T. G. LOUKERIS, A. PAVLOPOULOS and C. SAVAKIS, 2000a Mobility assays confirm the broad host-range activity of the *Minos* transposable element and validate new transformation tools. *Insect Mol. Biol.* **9**: 269–275.
- KLINAKIS, A. G., L. ZAGORAIYOU, D. K. VASSILATIS and C. SAVAKIS, 2000b Genome-wide insertional mutagenesis in human cells by the *Drosophila* mobile element *Minos*. *EMBO Rep.* **1**: 416–421.
- LORENZEN, M. D., S. J. BROWN, R. E. DENELL and R. W. BEEMAN, 2002 Cloning and characterization of the *Tribolium castaneum* eye-color genes encoding tryptophan oxygenase and kynurenine 3-mono-oxygenase. *Genetics* **160**: 225–234.
- LORENZEN, M. D., A. J. BERGHAMMER, S. J. BROWN, R. E. DENELL, M. KLINGLER *et al.*, 2003 *piggyBac*-mediated germline transformation in the beetle *Tribolium castaneum*. *Insect Mol. Biol.* **12**: 433–440.
- LOUKERIS, T. G., B. ARCA, I. LIVADARAS, G. DIALEKTAKI and C. SAVAKIS, 1995a Introduction of the transposable element *Minos* into the germ line of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 9485–9489.
- LOUKERIS, T. G., I. LIVADARAS, B. ARCA, S. ZABALOU and C. SAVAKIS, 1995b Gene transfer into the medfly, *Ceratitis capitata*, with a *Drosophila hydei* transposable element. *Science* **270**: 2002–2005.
- LUDWIG, M. Z., C. BERGMAN, N. H. PATEL and M. KREITMAN, 2000 Evidence for stabilizing selection in a eukaryotic enhancer element. *Nature* **403**: 564–567.
- O'KANE, C. J., and W. J. GEHRING, 1987 Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 9123–9127.
- PLASTERK, R. H., Z. IZSVAK and Z. IVICS, 1999 Resident aliens: the *Tc1/mariner* superfamily of transposable elements. *Trends Genet.* **15**: 326–332.
- RUBIN, G. M., and A. C. SPRADLING, 1982 Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**: 348–353.
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH and T. MANIATIS, 1989 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.
- SASAKURA, Y., S. AWAZU, S. CHIBA and N. SATOH, 2003 Germ-line transgenesis of the *Tc1/mariner* superfamily transposon *Minos* in *Ciona intestinalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 7726–7730.
- SHENG, G., E. THOUVENOT, D. SCHMUCKER, D. S. WILSON and C. DESPLAN, 1997 Direct regulation of *rhodopsin 1* by Pax-6/eyeless in *Drosophila*: evidence for a conserved function in photoreceptors. *Genes Dev.* **11**: 1122–1131.
- SHIMIZU, K., M. KAMBA, H. SONOBE, T. KANDA, A. G. KLINAKIS *et al.*, 2000 Extrachromosomal transposition of the transposable element *Minos* occurs in embryos of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.* **9**: 277–281.
- SPRADLING, A. C., D. M. STERN, I. KISS, J. ROOTE, T. LAVERTY *et al.*, 1995 Gene disruptions using *P* transposable elements: an integral component of the *Drosophila* genome project. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 10824–10830.
- SPRADLING, A. C., D. STERN, A. BEATON, E. J. RHEM, T. LAVERTY *et al.*, 1999 The Berkeley *Drosophila* Genome Project gene disruption project: single *P*-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes. *Genetics* **153**: 135–177.
- SUMITANI, M., D. S. YAMAMOTO, K. OISHI, J. M. LEE and M. HATAKEYAMA, 2003 Germline transformation of the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera: Symphyta), mediated by a *piggyBac*-derived vector. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **33**: 449–458.
- TOMITA, M., H. MUNETSUNA, T. SATO, T. ADACHI, R. HINO *et al.*, 2003 Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nat. Biotechnol.* **21**: 52–56.
- TSIEN, R. Y., 1998 The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 509–544.
- UGAROVIC, D., M. PODNAR and M. PLOHL, 1996 Satellite DNA of the red flour beetle *Tribolium castaneum*—comparative study of satellites from the genus *Tribolium*. *Mol. Biol. Evol.* **13**: 1059–1066.
- VOS, J. C., I. DE BAERE and R. H. PLASTERK, 1996 Transposase is the only nematode protein required for in vitro transposition of *Tc1*. *Genes Dev.* **10**: 755–761.
- ZAGORAIYOU, L., D. DRABEK, S. ALEXAKI, J. A. GUY, A. G. KLINAKIS *et al.*, 2001 In vivo transposition of *Minos*, a *Drosophila* mobile element, in mammalian tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 11474–11478.
- ZHANG, H., Y. SHINMYO, A. HIROSE, T. MITO, Y. INOUE *et al.*, 2002 Extrachromosomal transposition of the transposable element *Minos* in embryos of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Dev. Growth Differ.* **44**: 409–417.

Communicating editor: K. V. ANDERSON