

Διατμηματικό πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών  
Μοριακής Βιολογίας και Βιοϊατρικής  
Πανεπιστήμιο Κρήτης -Τμήμα Βιολογίας  
Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας

Εργασία για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Τίτλου Εξειδίκευσης

**Συγκριτική μελέτη των γονιδίων *apterous*, *fringe* και *serrate*  
στα Έντομα και στα Μαλακόστρακα Καρκινοειδή**

**Σαριδάκη Θεοδώρα**

Επιβλέπων ερευνητής : **Μιχάλης Αβέρωφ**

Επιβλέπων καθηγητής : **Χρήστος Δελιδάκης**

Ηράκλειο, Σεπτέμβριος 2002

***Εισαγωγή***

Μοριακές και γενετικές μελέτες σε οργανισμούς μοντέλα όπως είναι η Δροσόφιλα, το ποντίκι, ο νηματώδης, έχουν δείξει ότι βασικοί μηχανισμοί στην οργάνωση του προτύπου σώματος είναι κοινοί ανάμεσα σε πολύ διαφορετικούς οργανισμούς και μάλιστα βασίζονται σε ομόλογες ομάδες αναπτυξιακών ρυθμιστικών γονιδίων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα ομοιοτικά ή Hox γονίδια, μία οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων, υπεύθυνη για τον καθορισμό της ταυτότητας συγκεκριμένων περιοχών του σώματος ενός οργανισμού. Τα γονίδια αυτά αρχικά μελετήθηκαν στην Δροσόφιλα, αλλά δεν άργησε να γίνει αντιληπτό ότι η ίδια οικογένεια γονιδίων βρίσκεται σε όλα τα ζώα που τέθηκαν υπό μελέτη. Συγκριτικές μελέτες των Hox γονιδίων σε αυτούς τους οργανισμούς φανέρωσε την ύπαρξη μίας πολύ στενής συσχέτισης μεταξύ των προτύπων έκφρασης των Hox γονιδίων και τον καθορισμό της ανάπτυξης των σωματικών περιοχών το οποίο φάνηκε ιδανική βάση για περαιτέρω φυλογενετικές και αναπτυξιακές συγκριτικές μελέτες (Averof and Akam, 1995, Averof et al, 1996, Gellon and McGinnis, 1998).

Καρπός αυτών των παρατηρήσεων ήταν η ιδέα ότι μπορεί να συγκρίνει κανείς ομόλογα ρυθμιστικά αναπτυξιακά γονίδια διαφορετικών οργανισμών, για να κατανοήσει πώς αλλαγές στο πρότυπο έκφρασης και λειτουργίας αυτών των γονιδίων, μπορούν να οδηγήσουν στην ποικιλία των μορφολογιών που συναντάμε σήμερα στη φύση. Έτσι άρχισε να αναπτύσσεται ο καινούριος κλάδος της αναπτυξιακής εξελικτικής βιολογίας, που υπόσχεται να προσφέρει πολλά στην κατανόηση βασικών ερωτημάτων της εξελικτικής βιολογίας (Raff, 2000).

Ένα από τα πιο ενδιαφέροντα ερωτήματα στον κλάδο της εξελικτικής βιολογίας και συνάμα μία σημαντική πρόκληση, είναι η κατανόηση της εξελικτικής προέλευσης των μορφολογικών νεωτερισμών. Τέτοιες δομικές καινοτομίες είναι άφθονες στην ιστορία της εξέλιξης, συχνά είναι κρίσιμες για την επιτυχία της επιβίωσης των οργανισμών που τις φέρουν, ενώ αποτελούν την βάση για περαιτέρω διαφοροποίηση καινούριων δομών. Ένα τέτοιο από παράδειγμα συναντάμε στην εξελικτική πορεία των σπονδυλωτών. Τα βασικά χαρακτηριστικά του φύλου των σπονδυλωτών αποτελούν η παρουσία πρόσθιου εγκεφάλου, νευρικής ακρολοφίας και χόνδρου. Πρόκειται για βασικές καινοτομίες οι οποίες υπήρξαν απαραίτητες για την επιτυχία της συγγενικής σειράς των σπονδυλωτών, ενώ επέτρεψαν την εξέλιξη και άλλων νεωτερισμών όπως είναι η γνάθος και τα δόντια (Shimeld and Holland, 2000).

Δομικοί νεωτερισμοί, εμφανίζονται σε περιπτώσεις που οι οργανισμοί καλούνται να προσαρμοστούν σε νέες οικολογικές συνθήκες και γενικότερα σε αλλαγές στις συνθήκες διαβίωσής τους. Μια τέτοια αλλαγή αποτελεί και η μετάβαση των οργανισμών από την υδρόβια στη χερσαία ζωή, κατά την οποία οι οργανισμοί πρέπει να προσαρμοστούν σε νέα δεδομένα κίνησης, αναπαραγωγής, αναπνοής και συλλογή τροφής. Πολύ ενδιαφέρουσα από πλευρά εξέλιξης δομικών νεωτερισμών, ήταν η μετάβαση του φύλου των αρθροπόδων από το υγρό στοιχείο στην ξηρά. Μορφολογικές και παλαιοντολογικές μελέτες συμφωνούν ότι οι τελευταίοι κοινοί πρόγονοι των σημερινών αρθροπόδων ήταν όλοι υδρόβια ζώα των οποίων η μετάβαση στην ξηρά έγινε πολλές φορές και ανεξάρτητα ανάμεσα στις διαφορετικές τάξεις των αρθροπόδων. Κατά την μετάβασή τους αυτή, επιτεύχθηκαν πολλές μορφολογικές αλλαγές, κυρίως στην δομή των εξαρτημάτων τους, που αποτελούν το κύριο μέσο με το οποίο τα αρθρόποδα αλληλεπιδρούν με το περιβάλλον τους (Shear, 1990).

Τα προγονικά υδρόβια αρθρόποδα είχαν εξαρτήματα τα οποία αποτελούνταν από πολλούς λοβούς/διακλαδώσεις. Οι λοβοί που βρίσκονταν στο κοιλιακό μέρος του εξαρτήματος και ονομάζονταν ενδοποδίτες χρησιμοποιούνταν ως πόδια, ενώ οι λοβοί που βρίσκονταν στο νωτιαίο μέρος και ονομάζονταν εξωποδίτες ή επιποδίτες, χρησίμευαν ως αναπνευστικά όργανα/ βράγχια. Οι ενδοποδίτες έχουν διατηρηθεί σε όλα τα σημερινά, σε αντίθεση με τους επιποδίτες/ βράγχια τα οποία έχουν διατηρηθεί στα υδρόβια καρκινοειδή αλλά όπως είναι

φυσικό, λόγω του προβλήματος της εξάτμισης, έχουν τροποποιηθεί ή τελειώς χαθεί στα χερσαία αρθρόποδα (Brusca and Brusca, 1990, Xianguang and Bergstrom, 1997).

Μια σημαντική καινοτομία, όμως, που εμφανίστηκε στην διάρκεια αυτής της μετάβασης ήταν η εξέλιξη των φτερών των εντόμων. Η εξέλιξη των φτερών και κατ' επέκταση η ικανότητα της πτήσης αποτελούν το κλειδί της εξελικτικής επιτυχίας της συγγενικής σειράς των εντόμων, στην οποία ο αριθμός των ειδών ξεπερνά το 75% όλων των γνωστών ειδών στο ζωικό βασίλειο. Έδωσε τη δυνατότητα στα έντομα να αποφεύγουν θηρευτές, να πιάουν πιο εύκολα τη λεία τους και να μετακινούνται σε διαφορετικά οικοσυστήματα.

Η ερμηνεία απολιθωμάτων, καθώς και μορφολογικές μελέτες, σχετικά πρώιμων εντόμων που έχουν υδρόβιες προνυμφικές μορφές, οδήγησε τους ερευνητές σε δύο υποθέσεις για την εξελικτική προέλευση των φτερών των εντόμων. Η πρώτη υπόθεση υποστηρίζει ότι τα φτερά έχουν προκύψει ως νέες προεξοχές από το σώμα των εντόμων και δεν σχετίζονται με καμία προϋπάρχουσα δομή (Snodgrass, 1935). Η δεύτερη υπόθεση υποστηρίζει ότι τα φτερά εξελίχθηκαν μετά από τροποποίηση του επιποδίτη / βράγχιο των προγονικών υδρόβιων αρθροπόδων (Wigglesworth, 1976, Kukalova-Peck, 1991)

Η κατανόηση της εξελικτικής προέλευσης τέτοιων δομικών καινοτομιών που λαμβάνουν χώρα σε διάστημα εκατομμυρίων ετών, αποτελεί μία δύσκολη πρόκληση, καθώς πολλές φορές συγκαλύπτεται από δευτερογενείς αλλαγές που συνέβησαν στο μεσοδιάστημα, ή από φαινόμενα ομοπλασίας, όπου πολλές φορές υπάρχει ομοιότητα ανάμεσα σε άσχετες μεταξύ τους δομές. Για τον λόγο αυτό παράλληλα με τις παλαιοντολογικές και μορφολογικές πληροφορίες, για την εξακρίβωση τέτοιων απομακρυσμένων εξελικτικών σχέσεων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν συγκριτικές μελέτες των προτύπων έκφρασης ρυθμιστικών αναπτυξιακών γονιδίων τα οποία φαίνεται να έχουν συντηρημένη λειτουργία στην ανάπτυξη συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων και δομών.

Οι Averof και Cohen, προκειμένου να κατανοήσουν την προέλευση των φτερών των εντόμων, μελέτησαν το πρότυπο έκφρασης δύο ρυθμιστικών γονιδίων, του *apterous* και του *pubbin* γνωστά από μελέτες στην Δροσόφιλα για την ειδική λειτουργία τους στην ανάπτυξη του φτερού, σε δύο είδη σημερινών υδρόβιων καρκινοειδών, στο βραχιόποδο *Artemia franciscana* και στο μαλακόστρακο *Pasifastacus leniusculus*. Η ιδέα ήταν ότι αν τα φτερά των εντόμων προήλθαν από τα βράγχια των προγονικών υδρόβιων αρθροπόδων, θα πρέπει κάποια από τα στοιχεία της γενετικής πληροφορίας και των μηχανισμών ανάπτυξης του φτερού να προϋπήρχαν σε αυτές τις πρώιμες δομές, καθώς και σε ομόλογες δομές, όπως είναι τα βράγχια/ επιποδίτες των σημερινών καρκινοειδών (Averof and Cohen, 1997).

Πράγματι, στην *Artemia franciscana*, όπου μελετήθηκε το πρότυπο έκφρασης και των δύο γονιδίων, φάνηκε ότι και το *apterous* και το *pubbin*, κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των εξαρτημάτων του οργανισμού, παρουσιάζουν δυναμικό πρότυπο έκφρασης, το οποίο πριν την τελική διαφοροποίηση του ιστού, περιορίζεται αποκλειστικά στον πιο απομακρυσμένο νωτιαίο επιποδίτη/ βράγχιο. Παρομοίως και στο μαλακόστρακο, βρέθηκε ότι η έκφραση του *pubbin* περιορίζεται στον επιποδίτη/ βράγχιο των θωρακικών εξαρτημάτων. Η περιορισμένη και συνδυασμένη έκφραση αυτών των γονιδίων στον επιποδίτη της Αρτέμιας, καθώς και η συντήρηση του προτύπου έκφρασης του *pubbin* ανάμεσα σε διαφορετικές και απομακρυσμένες τάξεις καρκινοειδών, σε συνδυασμό με τα μορφολογικά και παλαιοντολογικά στοιχεία, ισχυροποιούν την υπόθεση ότι τα φτερά των εντόμων προήλθαν από τροποποίηση των βράγχιων των προγόνων τους κατά την μετάβασή τους στην ξηρά.

Πρόσφατα, το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *apterous* και *pubbin*, χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της τύχης αυτών των προγονικών βραγχίων σε μία άλλη μεγάλη ομάδα αρθροπόδων, τα χηλικεραιωτά (Damen et al, 2002). Στο πρώιμο υδρόβιο χηλικεραιωτό *Limulus polyphemus*, η έκφραση του *pubbin* περιορίζεται σε εξαρτήματα του οπίσθιου μέρους του σώματος, τα οποία λειτουργούν ως βράγχια και ονομάζονται book gills (βιβλιοβράγχια). Στην αράχνη *Cupenius salei*, αντιπρόσωπο των χερσαίων χηλικεραιωτών,

παρατηρήθηκε συνδυασμένη έκφραση του *apterous* και του *pubbin* σε μία σειρά ομόλογων εξαρτημάτων στο οπίσθιο πάλι μέρος του σώματος, τα οποία φαίνεται να έχουν προσαρμοστεί στο χειρσαίο τρόπο ζωής και λειτουργούν ως αναπνευστικά όργανα, βιβλιοπνεύμονες και τραχείες, καθώς και ως όργανα με τα οποία οι αράχνες υφάνουν τον ιστό τους. Τα μοριακά αυτά δεδομένα, σε συνδυασμό με παλαιοντολογικές και μορφολογικές παρατηρήσεις του 19<sup>ου</sup> αιώνα (Lankester, 1885), σύμφωνα με τις οποίες οι βιβλιοπνεύμονες των χειρσαίων χηλικεραιωτών προήλθαν από την εγκόλπωση των βραγχίων των υδρόβιων προγόνων τους, υποστηρίζουν την υπόθεση ότι τα φτερά των εντόμων, τα οπίσθια εξαρτήματα των χηλικεραιωτών και τα βράγχια των καρκινοειδών είναι ομόλογες δομές που έχουν την προέλευσή τους στους επιποδίτες/ βράγχια των προγονικών υδρόβιων αρθροπόδων της Καμβρίου.

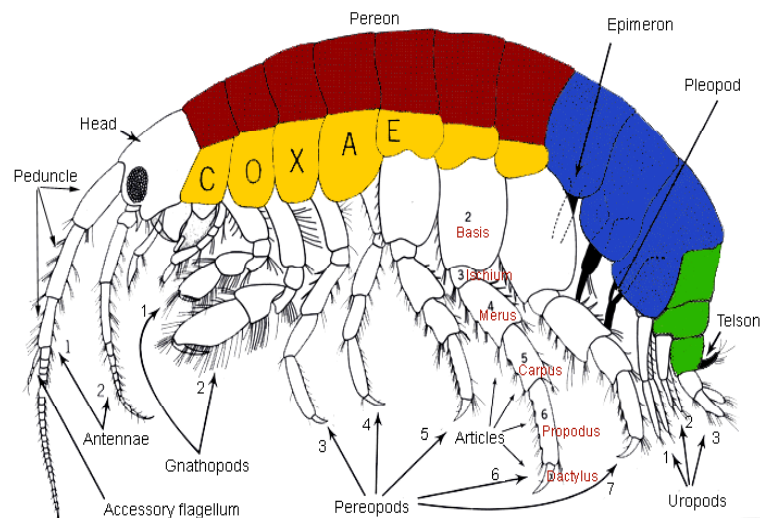
Ένα πολύ ενδιαφέρον στοιχείο που προκύπτει από τις παραπάνω μελέτες είναι ότι η εξέλιξη των φτερών των εντόμων από τα βράγχια προγονικών υδρόβιων αρθροπόδων, θα πρέπει να συνδυάστηκε με μία σειρά γενετικών και αναπτυξιακών αλλαγών απαραίτητων για την διαφοροποίηση και τον σχηματισμό του προτύπου του φτερού. Τα προγονικά βράγχια των υδρόβιων αρθροπόδων, όπως φαίνεται στα απολιθώματά τους, καθώς και τα βράγχια πολλών σημερινών υδρόβιων καρκινοειδών, είναι δομές χωρίς κανένα ίχνος διαφοροποίησης κυρίως όσον αφορά τον νωτιαίο/κοιλιακό τους άξονα. Αντίθετα, όπως θα αναφερθώ και στην συνέχεια τα φτερά των εντόμων είναι διαφοροποιημένα νωτιαίο/κοιλιακά, αποτελούνται από επίπεδες και διακριτές νωτιαίες και κοιλιακές επιφάνειες και ένα επίσης διαφοροποιημένο περιθώριο. Το νωτιαίο/κοιλιακό αυτό πρότυπο, καθορίζεται από μία ιεραρχία γονιδίων, η οποία είναι πολύ καλά μελετημένη στον οργανισμό μοντέλο *Drosophila melanogaster*, και από πολύ αρχικά αναπτυξιακά στάδια διαφοροποιεί τον εμβρυϊκό δίσκο του φτερού σε νωτιαίο και κοιλιακό διαμέρισμα.

Το ερώτημα που θέλω να μελετήσω στην εργασία μου είναι το πότε και το πώς προέκυψε αυτή η ιεραρχία γονιδίων που οδήγησε στο νωτιαίο/κοιλιακό πρότυπο των φτερών των εντόμων. Για τον σκοπό αυτό θα μελετήσω το πρότυπο έκφρασης ομόλογων γονιδίων της ιεραρχίας αυτής, σε διαφορετικά είδη καρκινοειδών, τους πιο κοντινούς ζωντανούς συγγενείς των εντόμων. Η μελέτη αυτή θα μας δώσει πληροφορίες για το ποια από αυτά τα γονίδια συνεκφράζονταν ήδη στα βράγχια των κοινών προγόνων των εντόμων και των καρκινοειδών καθώς και για το ποια από αυτά χρειάστηκε η επιπλέον στρατολόγησή της έκφρασής τους στα φτερά κατά την διάρκεια της εξέλιξης του κλάδου των εντόμων. Επιπλέον η χρονικοτοποπική έκφραση των γονιδίων που θα βρεθεί να συνεκφράζονται στα βράγχια των καρκινοειδών ίσως θα μας δώσει πληροφορίες για τον βαθμό στον οποίο προϋπήρχε η ρυθμιστική ιεραρχία που συναντάμε σήμερα στα φτερά καθώς και για τους επιπλέον ρυθμιστικούς μηχανισμούς που πρέπει να 'ανακαλύφθηκαν' στον κλάδο των εντόμων προκειμένου να πάρουμε το διαφοροποιημένο νωτιαίο/κοιλιακό πρότυπο του φτερού. Τα γονίδια που επέλεξα να μελετήσω σε μία πρώτη φάση είναι τα ομόλογα των *apterous*, *fringe* και *serrate*, τα οποία όπως θα αναφέρω στη συνέχεια έχουν καθορισμένο χρονικό και τοπικό πρότυπο έκφρασης στο νωτιαίο διαμέρισμα του δίσκου του φτερού της Δροσόφιλας, και είναι απαραίτητα για την δημιουργία του νωτιαίο/κοιλιακού προτύπου. Αλλά υποψήφια γονίδια είναι τα ομόλογα των *tartan*, *capricious* και *msh*.

Η κλωνοποίηση των ομόλογων των γονιδίων αυτών και ο έλεγχος του προτύπου έκφρασής τους, αρχικά επιλέχτηκε να γίνει στο καρκινοειδές μαλακόστρακο *Parhyale hawaiiensis*. Το υδρόβιο αυτό αμφίποδο σε αντίθεση με την Αρτέμια στην οποία είχαν γίνει οι προηγούμενες μελέτες, έχει επιποδίτες/ βράγχια, τα οποία παρουσιάζουν κάπως διαφοροποιημένη μορφολογία. Δεν μοιάζουν με σάκους αλλά αποτελούνται από δύο επίπεδες επιφάνειες στο περιθώριο των οποίων υπάρχει μία ζώνη κυττάρων με διαφορετική μορφολογία. Το αμφίποδο αυτό, είναι ένας οργανισμός που έχει αρχίσει να προσελκύει το ενδιαφέρον για τέτοιου είδους

συγκριτικές μελέτες. Χαρακτηρίζεται από μεγάλη ποικιλία εξαρτημάτων καθ' όλο το μήκος του σώματός του, γεγονός που το καθιστά ιδανικό οργανισμό για μελέτες τις εξέλιξης των εξαρτημάτων στα αρθρόποδα. Καλλιεργείται και αναπαράγεται εύκολα στο εργαστήριο, έχοντας σχετικά μικρό χρόνο κάθε γενιάς, ενώ είναι δυνατή η μελέτη όλων των εμβρυϊκών σταδίων ανάπτυξής του. Στο αμφίποδο αυτό έχουν ήδη γίνει πειράματα lineage tracing των εμβρυϊκών του σταδίων (Gerberding et al), ενώ έχουν αρχίσει να αναπτύσσονται στο εργαστήριο από τον Τάσο Παυλόπουλο τεχνικές γενετικής τροποποίησης του, οι οποίες θα φανούν πολύτιμες για περαιτέρω διερεύνηση του ερωτήματος που έθεσα, καθώς και για την συστηματική ανάλυση πολλών άλλων πτυχών της ανάπτυξης και εξέλιξης των καρκινοειδών.

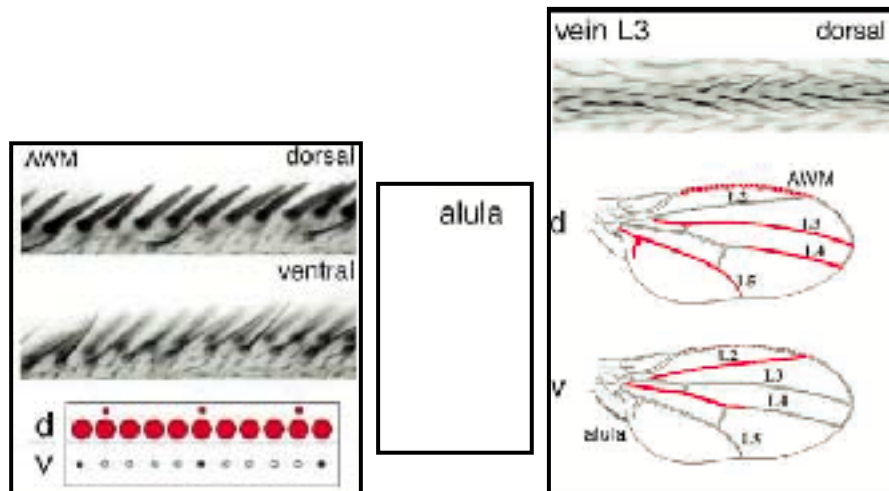
Οι φυλογενετικές σχέσεις στο φύλο των αρθροπόδων δεν έχουν επακριβώς διελευκανθεί. Μοριακές φυλογενετικές μελέτες των τελευταίων ετών, υποστηρίζουν την συγγενική σχέση των εντόμων και των καρκινοειδών και τοποθετούν την ομάδα των μυριάποδων πιο κοντά στα χηλικεραιωτά. Κάποιες μάλιστα από αυτές, υποστηρίζουν, ότι η συγγένεια των εντόμων με τα μαλακόστρακα είναι μεγαλύτερη από αυτή των μαλακόστρακων με τα υπόλοιπα καρκινοειδή (Wilson et al, 2000). Στην υπόθεση αυτή συνηγορούν και συγκριτικές μορφολογικές μελέτες που έχουν γίνει στο νευρικό σύστημα και τα ματιών των δύο αυτών ομάδων (Averof and Akam, 1993). Τα στοιχεία αυτά, πιστεύω ότι προσθέτουν ένα επιπλέον ενδιαφέρον στη ιδέα να ξεκινήσει η μελέτη της εξελικτικής προέλευσης του νωτιαίο/κοιλιακού προτύπου των φτερών των εντόμων σε έναν αντιπρόσωπο της ομάδας των μαλακόστρακων, όπως είναι το αμφίποδο *Parhyale hawaiiensis*



Βασικά δομικά χαρακτηριστικά του αμφίποδου *Parhyale hawaiiensis*

## Καθορισμός του νωτιαίο/κοιλιακού προτύπου στο φτερό της Δροσόφιλας

Τα φτερά της ενήλικης Δροσόφιλας, παρουσιάζουν μορφολογική διαφοροποίηση στον νωτιαίο/κοιλιακό άξονα. Αποτελούνται από δύο επίπεδες επιφάνειες οι οποίες διακρίνονται με βάση τέσσερα δομικά χαρακτηριστικά σε νωτιαία και κοιλιακή. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι η μορφολογία των τριχών στο πρόσθιο μέρος του περιθωρίου του φτερού και η θέση συγκεκριμένων αισθητήριων οργάνων σε αυτό, η παρουσία ή απουσία τριχών στην alula και τέλος ο προσανατολισμός των πτυχώσεων που παρατηρούνται στις φλεβώσεις κατά μήκος του φτερού.



Δομικά χαρακτηριστικά με τα οποία διακρίνονται η νωτιαία και κοιλιακή επιφάνεια του ενήλικου φτερού της Δροσόφιλας.

Στο πρόσθιο μέρος τους περιθωρίου του φτερού υπάρχουν τρεις σειρές τριχών από τις οποίες δύο βρίσκονται στη νωτιαία επιφάνεια του φτερού και η τρίτη βρίσκεται στην κοιλιακή επιφάνεια. Στη νωτιαία επιφάνεια η μία σειρά τριχών αποτελείται από παχιές μηχανοαισθητήριες τρίχες, ενώ η δεύτερη από λεπτές και καμπυλωτές χημειοαισθητικές. Στην κοιλιακή επιφάνεια του χείλους η σειρά τριχών αποτελείται από λεπτές τρίχες ανάμεσα στις οποίες και συγκεκριμένα σε κάθε πέμπτη θέση υπάρχει μία χημειοαισθητική. Στην alula του φτερού υπάρχει μόνο μία σειρά τριχών, η οποία βρίσκεται αποκλειστικά στην κοιλιακή επιφάνεια. Στο φτερό υπάρχουν επίσης διαφοροποιημένες 5 διαμήκειες φλεβώσεις (L1-L5). Η L1 βρίσκεται ταυτόχρονα και στην κοιλιακή και στη νωτιαία επιφάνεια, ενώ οι υπόλοιπες βρίσκονται τοποθετημένες και πτυχώνονται ασύμμετρα πάνω στις δύο επιφάνειες του φτερού. Η πτυχωμένη επιφάνεια της φλέβωσης αποτελείται από δύο με τρεις σειρές κυττάρων που έχουν διαφορετικό χρωματισμό, ενώ η απέναντι μη πτυχωμένη επιφάνεια αποτελείται από μία μόνο σειρά κυττάρων. Είναι χαρακτηριστικό ότι οι φλεβώσεις L3 και L5, καθώς και το πιο απομακρυσμένο κομμάτι της L4 πτυχώνονται στην νωτιαία επιφάνεια του φτερού, ενώ η L2 και το υπόλοιπο κομμάτι της L4 πτυχώνονται στην κοιλιακή (Milan et al, 2001a).

Οι παραπάνω μορφολογικές παρατηρήσεις, βοηθούν τους ερευνητές στην μελέτη του καθορισμού του νωτιαίο/κοιλιακού προτύπου, αλλά παράλληλα αποτελούν μία ένδειξη για το πόσο αυστηρά καθορισμένο είναι αυτό το πρότυπο στο φτερό της Δροσόφιλας.

Το νωτιαίο/κοιλιακό αυτό πρότυπο του ενήλικου φτερού καθορίζεται στα πολύ πρώιμα αναπτυξιακά στάδια της Δροσόφιλας, στον εμβρυϊκό δίσκο του φτερού, ο οποίος στα μέσα περίπου της ανάπτυξής του έχει διαχωριστεί σε δύο διακριτά διαμερίσματα το νωτιαίο και κοιλιακό. Πειράματα γενετικών μωσαϊκών στον δίσκο του φτερού, έχουν δείξει ότι από την στιγμή που καθορίζονται αυτά τα διαμερίσματα, τα όρια μεταξύ τους είναι ευθεία και αυστηρά καθορισμένα με αποτέλεσμα να μην παραβιάζονται ποτέ από κλώνους κυττάρων που προέρχονται από το ένα ή το άλλο διαμέρισμα (Garcia-Bellido, 1973). Στο όριο αυτών των διαμερισμάτων σχηματίζεται σε μία σειρά ειδικευμένων κυττάρων ένα σηματοδοτικό κέντρο το οποίο είναι υπεύθυνο για την αύξηση του ιστού καθώς και για τον καθορισμό του νωτιαίο/κοιλιακού προτύπου στο ενήλικο φτερό. Είναι προφανές ότι παραβίαση αυτών των ορίων και ανάμειξη κυττάρων στην περιοχή αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την αποδιοργάνωση του σηματοδοτικού κέντρου, με σοβαρές συνέπειες στον έλεγχο της αύξησης και τον σχηματισμό του προτύπου στο φτερό. Τέλος τα κύτταρα του δίσκου του φτερού, ανάλογα με την το διαμέρισμα στο οποίο ανήκουν, προγραμματίζονται έτσι ώστε να διαφοροποιούνται σε κύτταρα με κοιλιακή ή νωτιαία ταυτότητα.

Το νωτιαίο/κοιλιακό αυτό πρότυπο του δίσκου του φτερού, ρυθμίζεται από μία ιεραρχία γονιδίων και αναπτυξιακών μηχανισμών, στην οποία κυρίαρχη θέση κατέχει το γονίδιο *apterous*.

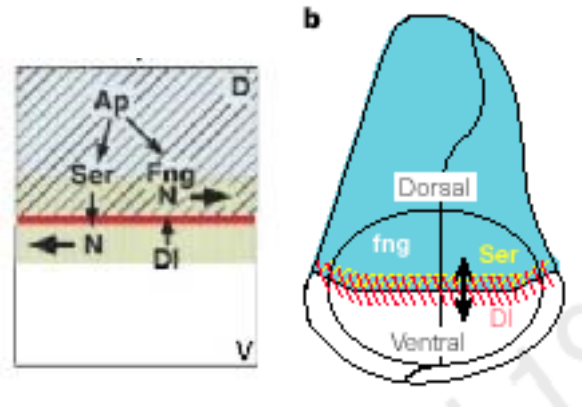
Το γονίδιο *apterous* ανήκει στην οικογένεια των LIM-homeodomain μεταγραφικών παραγόντων και είναι το γονίδιο επιλογέας (*selector gene*), για τον διαχωρισμό του δίσκου του φτερού σε νωτιαίο και κοιλιακό διαμέρισμα. Στα μέσα της ανάπτυξης του δίσκου αρχίζει η έκφραση του *apterous* σε μία ομάδα κυττάρων από τα οποία θα προκύψει το νωτιαίο διαμέρισμα. Καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης του φτερού, η έκφραση του *apterous*, περιορίζεται στο διαμέρισμα αυτό. Από τα κύτταρα που δεν θα εκφράσουν *apterous*, θα προκύψει το κοιλιακό διαμέρισμα. Το *apterous*, ως γονίδιο επιλογέας έχει τρεις βασικές λειτουργίες: είναι υπεύθυνο για την δημιουργία του σηματοδοτικού κέντρου στο όριο των δύο διαμερισμάτων (Irvine, 1999), για την εξασφάλιση του ορίου συνάφειας ανάμεσα στα δύο διαμερίσματα (Milan and Cohen, 1999) και τέλος για τον καθορισμό της νωτιαίας ταυτότητας στα κύτταρα όπου εκφράζεται (Milan et al 2001a).

Η δημιουργία του σηματοδοτικού κέντρου στο όριο των δύο διαμερισμάτων επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση του Notch σηματοδοτικού μονοπατιού σε μία πολύ μικρή λωρίδα κυττάρων, γύρω από το όριο αυτό. Το μονοπάτι αυτό επάγει με την σειρά του την έκφραση γονιδίων στόχων όπως το *wg*, *vg* και *cut*, τα οποία είναι υπεύθυνα για την αύξηση του ιστού και την οργάνωση του νωτιαίο/κοιλιακού προτύπου. Για την περιορισμένη ενεργοποίηση του Notch σε αυτή την λωρίδα των κυττάρων, είναι απαραίτητη η δράση του γονιδίου *apterous*, το οποίο ρυθμίζει την τοπική και χρονική έκφραση τριών γονιδίων, του *fringe*, του *serrate* και του *delta*. Το *serrate* και το *delta*, κωδικοποιούν δύο διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, πλούσιες σε EGF repeats, οι οποίες λειτουργούν ως προσδέτες του υποδοχέα Notch. Το *fringe* κωδικοποιεί για μία γλυκοζυλτρανσφεράση, η οποία έχει την ικανότητα να τροποποιεί την ευαισθησία του Notch ως προς την ενεργοποίησή του από τους δύο προσδέτες καθιστώντας το περισσότερο ευαίσθητο για ενεργοποίηση από το *delta* και λιγότερο από το *serrate* (Bruckner et al, 2000).

Αρχικά, τόσο ο υποδοχέας Notch, όσο και ο προσδέτης του *delta*, εκφράζονται ομοιόμορφα και στα δύο διαμερίσματα του δίσκου. Στο νωτιαίο διαμέρισμα του δίσκου, όμως η πρωτεΐνη *apterous*, καταστέλλει την έκφραση του *delta* και επάγει την έκφραση των *serrate* και *fringe*. Έτσι διαχωρίζεται το πρότυπο της έκφρασης των προσδετών του Notch στα δύο διαμερίσματα του δίσκου. Το *serrate* εκφράζεται στο νωτιαίο διαμέρισμα και το *delta* στο κοιλιακό. Παράλληλα, ο Notch υποδοχέας τροποποιείται στο νωτιαίο διαμέρισμα από το



fringe, έτσι ώστε να είναι περισσότερο ευαίσθητος για σηματοδότηση από το Delta και όχι από το Serrate. Το αποτέλεσμα είναι το Serrate να μπορεί να σηματοδοτεί μόνο προς το κοιλιακό διαμέρισμα, το Delta μόνο προς το νωτιαίο και επομένως το σηματοδοτικό μονοπάτι του Notch να ενεργοποιείται ισχυρά μόνο σε μία στενή λωρίδα κυττάρων κατά μήκος του ορίου (Panin et al, 1997).



Σχηματική, περιληπτική, αναπαράσταση του ρυθμιστικού μηχανισμού για τον περιορισμό της ενεργοποίησης του Notch μονοπατιού στο όριο των δύο διαμερισμάτων στον δίσκο του φτερού.

Υπάρχουν και άλλοι ρυθμιστικοί μηχανισμοί που περιορίζουν το σηματοδοτικό κέντρο στο νωτιαίο/κοιλιακό όριο, όπως είναι η ενεργοποίηση του Dsh από το wg, το οποίο προσδένεται στον υποδοχέα Notch και μειώνει την ενεργότητά του (Axelrod et al, 1996), καθώς και η δράση της πρωτεΐνης nubbin η οποία περιορίζει το εύρος στο οποίο η ενεργοποίηση του Notch μπορεί να επάγει την έκφραση του wg (Neumann and Cohen, 1998). Επίσης από την στιγμή που εγκαθιδρυθεί το σηματοδοτικό κέντρο, ξεκινά μία σειρά αμφίδρομων ρυθμιστικών μηχανισμών μεταξύ του wg και των προσδετών serrate και delta με σκοπό την διατήρηση της έκφρασής τους στο όριο των διαμερισμάτων (deCelis and Bray, 1997). Τέλος, τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει αρκετές μελέτες που φανερώνουν ότι υπάρχει μία πολύ αυστηρή χρονική ρύθμιση της ενεργότητας του ίδιου του apterous, η οποία είναι απαραίτητη για την δημιουργία ενός φυσιολογικού φτερού (Milan and Cohen, 2000, Weihe et al, 2001).

Παράλληλα με την δημιουργία του σηματοδοτικού αυτού κέντρου, μεγάλη σημασία έχει και η δημιουργία του ορίου συνάφειας ανάμεσα στα δύο αυτά διαμερίσματα, προκειμένου να αποφευχθεί η ανάμειξη κυτταρικών πληθυσμών. Και στην περίπτωση αυτή φαίνεται να είναι καταλυτική η δράση του επιλογέα γονιδίου apterous. Οι παρατηρήσεις των Milan και Cohen, 1999, οι οποίοι έδειξαν ότι η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μηχανισμού δεν είναι από μόνη της ικανή να υποστηρίξει το όριο συνάφειας, καθώς και το γεγονός ότι η σηματοδότηση του Notch είναι συμμετρική και προς τις δύο κατευθύνσεις του ορίου, οδήγησε τους ερευνητές προς την αναζήτηση άλλων παραγόντων εξαρτώμενων από την πρωτεΐνη apterous. Πρόσφατα βρέθηκαν δύο γονίδια τα tartan και capricious, τα οποία φαίνεται να είναι υπεύθυνα για την ρύθμιση του ορίου συνάφειας. Η έκφραση των γονιδίων αυτών επάγεται από την πρωτεΐνη apterous και περιορίζεται στο νωτιαίο διαμέρισμα. Κωδικοποιούν για δύο διαμεμβρανικές πρωτεΐνες πλούσιες σε εξωκυττάρια LRR repeats, οι οποίες είναι ικανές να παρέχουν στα κύτταρα που εκφράζονται συνάφεια για κύτταρα του νωτιαίου διαμερίσματος (Milan et al, 2001b).

Τέλος όσον αφορά την ιδιότητα του apterous να προσφέρει νωτιαία τύχη στα κύτταρα που το εκφράζουν, πρόσφατα βρέθηκε ότι επιτυγχάνεται μέσω της επαγωγής της έκφρασης της

homeodomain πρωτεΐνης *msh* στα κύτταρα του νωτιαίου διαμερίσματος του φτερού. (Milan et al, 2001a).

Ελπίζω, ότι μέσα από αυτή την αναφορά των ρυθμιστικών μηχανισμών που καθορίζουν το νωτιαίο/κοιλιακό πρότυπο στο φτερό της Δροσόφιλας, να έγινε κατανοητή η αρχική επιλογή των γονιδίων *apterous*, *fringe* και *serrate* προκειμένου να μελετήσω την εξελικτική προέλευση του προτύπου αυτού. Τα γονίδια αυτά έχουν σαφώς καθορισμένο τοπικό και χρονικό πρότυπο έκφρασης στον δίσκο του φτερού της Δροσόφιλας η ακεραιότητα του οποίου είναι απαραίτητη για τον φυσιολογικό σχηματισμό του ενήλικου φτερού.

***Υλικά και Μέθοδοι***

### **Κατασκευή εκκινητών**

Για την απομόνωση και κλωνοποίηση των γονιδίων *apterous*, *serrate* και *fringe* από το αμφίποδο *P.hawaiensis*, δημιουργήθηκαν εκφυλισμένοι εκκινητές οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στην συνέχεια σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Αρχικά έγινε σύγκριση γνωστών αμινοξικών αλληλουχιών από ομόλογα γονίδια που έχουν απομονωθεί από διαφορετικούς οργανισμούς, με το πρόγραμμα CLUSTALW. Βρέθηκαν περιοχές που παρουσιάζουν μεγαλύτερο βαθμό συντήρησης και οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για τον σχεδιασμό των εκφυλισμένων εκκινητών.

Από τη αμινοξική αλληλουχία μπορούμε να συμπεράνουμε τη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Ωστόσο, λόγω εκφυλισμού του γενετικού κώδικα κάθε αμινοξύ αντιπροσωπεύεται από περισσότερες από μία τριπλέτες. Έτσι σε θέσεις όπου υπήρχαν δύο πιθανά νουκλεοτίδια τοποθετήθηκαν και τα δύο, ενώ σε θέσεις που υπήρχαν τρία ή τέσσερα πιθανά νουκλεοτίδια τοποθετήθηκε ινοσίνη.

### **Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**

Κάθε αντίδραση PCR είχε τελικό όγκο 25μl και την παρακάτω σύσταση: 10mM Tris-HCl (pH 8.5), 50mM KCl, 0,1% Triton X-100, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 200mM από κάθε dNTP και 25 pmoles από κάθε εκκινητή. Για τις αντιδράσεις αυτές χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση Taq2000™ της εταιρείας STRATAGENE. Οι συνθήκες υβριδοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση PCR, επιλέχθηκαν με βάση τις ανώτατες και κατώτατες T<sub>m</sub> θερμοκρασίες των εκκινητών, οι οποίες υπολογίστηκαν με τον απλό τύπο  $T_m = 2^{\circ}\text{C}(\text{A}+\text{T})+4^{\circ}\text{C}(\text{G}+\text{C})$ . Οι πέντε πρώτοι κύκλοι PCR γίνονται σε χαμηλή θερμοκρασία υβριδοποίησης, γιατί δεν λαμβάνονται υπόψη οι θέσεις περιορισμού στο 5'-άκρο των εκκινητών, ενώ στους υπόλοιπους κύκλους η θερμοκρασία αυξάνεται γιατί συμπεριλαμβάνεται και το T<sub>m</sub> των θέσεων περιορισμού

### **Σύνθεση first strand cDNA από *P.hawaiensis***

Τα αμφίποδα καλλιεργούνται στο εργαστήριο σε νερό με 3% θαλασσινό αλάτι και συνεχή παροχή αέρα. Στην καλλιέργεια αυτή τα αμφίποδα αναπαράγονται κατά την διάρκεια όλου του χρόνου. Τα θηλυκά αμφίποδα μετά την γονιμοποίησή τους, διατηρούν τα έμβρυα πάνω στο σώμα τους, μέχρι τη στιγμή που αυτά θα εκκολαφθούν. Η εμβρυϊκή ανάπτυξη των αμφιπόδων είναι άμεση και διαρκεί 10.5 μέρες στους 26°C. Για την συλλογή των εμβρύων, θηλυκά άτομα ακινητοποιούνται σε θαλασσινό νερό με 1% γαρυφαλλέλαιο και τα έμβρυα απομακρύνονται από το σώμα τους με την χρήση λαβίδων με γυρτά άκρα.

Για την κατασκευή first strand cDNA απομονώθηκε ολικό mRNA από έμβρυα αμφιπόδων σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης, εφόσον δεν είναι γνωστό το στάδιο στο οποίο στο οποίο εκφράζονται τα γονίδια που θέλω να απομονώσω. Η απομόνωση του ολικού mRNA έγινε με την χρήση μαγνητικών κόκκων που φέρουν επάνω τους ολιγονουκλεοτίδια oligo-dT(25), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (Dynabeads mRNA DIRECT™ Kit). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν περίπου 100μg εμβρύων, που αντιστοιχούν σε όγκο 50μl, και τα οποία ομογενοποιήθηκαν σε 500μl lysis/binding διάλυμα.

Για τη σύνθεση του first strand cDNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα το ολικό mRNA, το οποίο ήταν προσδεμένο πάνω στα oligo-dTs των μαγνητικών κόκκων και πραγματοποιήθηκε με την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης, όπως προτείνεται στο kit SuperscriptII (GIBCOBRL). Η αποτελεσματικότητα της σύνθεσης του first strand cDNA ελέγχθηκε με αντίδραση PCR, όπου χρησιμοποιήθηκαν εκφυλισμένοι εκκινητές σχεδιασμένοι για την απομόνωση του γονιδίου *collier*. Οι αντιδράσεις έγιναν με βάση τις συνθήκες που προτείνονται στην πτυχιακή της Βάλιας Σταματάκη, οπότε και κατάφερα να κλωνοποιήσω ένα κομμάτι ~900 βάσεων, το οποίο αλληλουχίστηκε και βρέθηκε ότι είναι το ομόλογο του *collier* στο αμφίποδο *P.hawaiensis*.

Αυτή η first strand cDNA βιβλιοθήκη χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση ενός μικρού κομματιού του Ph apterous.

### **cDNA φαγική βιβλιοθήκη του *P. hawaiiensis***

Για την απομόνωση των γονιδίων apterous, fringe και serrate, χρησιμοποιήθηκε και cDNA φαγική βιβλιοθήκη του αμφιπόδου *P.hawaiiensis* η οποία ήταν μία ευγενική προσφορά από τον N.Patel. Υλικό από την βιβλιοθήκη αυτή χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις PCR, καθώς και για την σάρωσή της με ειδικούς και ετερόλογους ανιχνευτές των παραπάνω γονιδίων. Η βιβλιοθήκη αυτή κατασκευάστηκε από την εταιρία CLONTECH με το SMART™ kit σε λTriplEX2 φαγμιδιακό φορέα στον οποίο η κλωνοποίηση των cDNA είναι προσανατολισμένη. Η μετατροπή των λTriplEX2 φαγμιδιακών φορέων σε pTriplEX πλασμιδιακούς φορείς, δεν χρειάζεται την χρήση φάγων βοηθών, αλλά βασίζεται στον cre-recombinase mediated ομόλογο ανασυνδυασμό των loxP θέσεων που βρίσκονται εκατέρωθεν της θέσης κλωνοποίησης των cDNA κομματιών. Ως κύτταρα ξενιστές των φάγων λTriplex2 χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος XL1-Blue. Για την τιτλοδότηση, καθώς και για την σάρωση της βιβλιοθήκης χρησιμοποιήθηκαν τα πρωτόκολλα της εταιρείας CLONTECH (λTriplEX & λTriplEX2 Libraries User Manual). Για τις συνθήκες υβριδοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν για την σάρωση της βιβλιοθήκης θα αναφερθώ πιο αναλυτικά για κάθε ένα από τα γονίδια που μελετήθηκαν.

### **Κλωνοποίηση των PCR προϊόντων**

Η κλωνοποίηση των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, έγινε στον φορέα pGEM-Teasy της εταιρείας Promega. Όπως είναι γνωστό οι κοινές Taq πολυμεράσες προσθέτουν ανεξάρτητα από το υπόστρωμα μία δεοξυ-αδενοσίνη στο 3' άκρο των PCR προϊόντων. Ο φορέας pGEM-Teasy είναι γραμμικός και έχει 3'-T άκρα στην θέση κλωνοποίησης των PCR προϊόντων, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης σύνδεσης. Επίσης η κλωνοποίηση στον φορέα αυτό έχει το πλεονέκτημα της μπλε/λευκής επιλογής. Ο έλεγχος της ένθεσης των PCR προϊόντων στον φορέα αυτό, μπορεί να γίνει εύκολα με διαγνωστικές πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI ή NotI, περιοριστικές θέσεις των οποίων βρίσκονται εκατέρωθεν της θέσης κλωνοποίησης.

### **Ραδιοσήμανση ανιχνευτών**

Η ραδιοσήμανση των αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν ως ανιχνευτές για την σάρωση της φαγικής βιβλιοθήκης έγινε με την διαδικασία του nick-transcription, η οποία περιγράφεται στο κεφ.10 των Sambrook et al. Επίσης σε μικρότερα κομμάτια για τα οποία είχα κατάλληλους εκκινητές, επιλέχθηκε να γίνει ραδιοσήμανση με PCR. Στην διαδικασία αυτή χρησιμοποιούνται περίπου 100ng του κομματιού που θέλουμε να ραδιοσημανθεί. Η αντίδραση πολυμερισμού έχει την εξής σύσταση: 80μM dCTP, dGTP και dTTP, 25pmole από κάθε εκκινητή, 2U Taq πολυμεράσης και 3μl P<sup>32</sup> dATP. Ακολουθούν 5 κύκλοι αντίδρασης στις κατάλληλες συνθήκες υβριδοποίησης, στο τέλος των οποίων προσθέτουμε 80μM dATP και 1U Taq πολυμεράσης. Μετά την προσθήκη αυτή ακολουθούν 2 ακόμα κύκλοι και ένα τελευταίο βήμα επέκτασης πέντε λεπτών. Η προσθήκη του κρύου dATP στο τέλος του πέμπτου κύκλου, γίνεται για να αποφευχθεί η περίπτωση στην οποία θα έχουν εξαντληθεί όλα τα ραδιοσημασμένα νουκλεοτίδια, προκειμένου να πάρουμε ένα μόνο ραδιοσημασμένο προϊόν στην αντίδραση αυτή, το οποίο θα έχει το σωστό μέγεθος.

***Αποτελέσματα***

## Κλωνοποίηση μέρους της αλληλουχίας του *Ph apterous*.

**PCR με εκφυλισμένους εκκινητές:** Για την κλωνοποίηση μέρους της συντηρημένης αλληλουχίας του *apterous* από το αμφίποδο *P. hawaiiensis*, έγιναν PCR αντιδράσεις με εκφυλισμένους εκκινητές που είχαν ήδη κατασκευαστεί από τον Μ.Αβέρωφ στα πλαίσια προηγούμενης μελέτης του προτύπου έκφρασης του *apterous* στην *Artemia franciscana*. Ως μήτρα για αυτές τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε η first strand cDNA βιβλιοθήκη που κατασκεύασα από τα αμφίποδα καθώς και η φαγική cDNA βιβλιοθήκη που μας προσέφερε ο Ν. Patel.

Η επιλογή των εκφυλισμένων εκκινητών για το *apterous* έγινε με βάση συντηρημένες περιοχές που προέκυψαν από την σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας των πρωτεϊνών *apterous* του ανθρώπου και της Δροσόφιας. Στην Εικόνα 1, φαίνεται η σύγκριση των αλληλουχιών αυτών καθώς και οι συντηρημένες περιοχές με βάση τις οποίες κατασκευάστηκαν οι εκφυλισμένοι εκκινητές. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

**ap-F1 (AVeKrWH):** 5'-GGAATTC GCI GTI GAI AA(AG) C(AG)I TGG CA -3'  
**ap-F2 (IYCKnDYY):** 5'-GGAATTC ATI TAT TGT AA(AG) (AG)AI GA(TC) TA(TC) TA-3'  
**ap-F3 (TMKSYFA):** 5'-GGAATTC ACI ATGAA(AG) TCI TA(TC) TT(TC) GC -3'  
**ap-R2 (WFQNARA):** 5'-GCTCTAGA C(GT)I GC(AG) TT(TC) TG(AG) AAC CA-3'

Με υπογράμμιση είναι σημειωμένα τα νουκλεοτίδια που σχηματίζουν τις θέσεις περιορισμού του εκκινητή, σε παρένθεση βρίσκονται οι θέσεις στις οποίες λόγω εκφυλισμού του γενετικού κώδικα έπρεπε να χρησιμοποιηθούν δύο νουκλεοτίδια. Ινοσίνη (I) έχει μπει στις θέσεις, όπου έπρεπε να χρησιμοποιηθούν τρία ή τέσσερα νουκλεοτίδια.

Μέχρι σήμερα έχουν δοκιμαστεί όλα τα ζεύγη εκκινητών και με τις δύο μήτρες (first strand cDNA και φαγική cDNA βιβλιοθήκη), σε διαφορετικές συνθήκες υβριδοποίησης, οι οποίες υπολογίστηκαν με βάση τα  $T_m$  των εκκινητών. Για τους πέντε πρώτους κύκλους η υβριδοποίηση γίνεται σε χαμηλότερη θερμοκρασία, εφόσον δεν συμπεριλαμβάνεται το  $T_m$  των θέσεων περιορισμού, ενώ για του υπόλοιπους τριάντα κύκλους η θερμοκρασία υβριδοποίησης αυξάνεται. Ο χρόνος της επέκτασης σε κάθε αντίδραση PCR κυμαίνεται από ένα με ενάμιση λεπτό ανάλογα με το μέγεθος της αλληλουχίας του προϊόντος που αναμένω.

Το ζεύγος των εκκινητών που έχει δώσει προϊόν μέχρι σήμερα είναι το apF3/R2. Οι εκκινητές αυτοί έχουν σχεδιαστεί πάνω στην ομοιοτική περιοχή (homeodomain) του γονιδίου *apterous* η οποία χαρακτηρίζεται από μεγάλο βαθμό συντήρησης. Το μέγεθος της αλληλουχίας που περιμένω είναι ακριβώς 137 βάσεις

Το πρόγραμμα PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής:

95 <sup>0</sup> C, 5min	}	x5
95 <sup>0</sup> C, 1min		
42 <sup>0</sup> C, 1min		
72 <sup>0</sup> C, 1min		
95 <sup>0</sup> C, 1min	}	x30
60 <sup>0</sup> C, 1min		
72 <sup>0</sup> C, 1min		
72 <sup>0</sup> C, 10min		

Η αντίδραση αυτή μου έδωσε ένα μεγάλο αριθμό ζωνών, από τις οποίες η μία είχε το αναμενόμενο μέγεθος. Η ζώνη αυτή κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEM-Teasy και έγινε το διάβασμα της αλληλουχίας. Πράγματι διαπιστώθηκε ότι η περιοχή αυτή είναι η ομοιοτική περιοχή του *apterous* του αμφιπόδου. Στην Εικόνα 2 φαίνεται η σύγκριση της αμινοξικής

αλληλουχίας της περιοχής αυτή του Ph apterous, με τις αντίστοιχες περιοχές των ομόλογων πρωτεϊνών από την Δροσόφιλα, την Αρτέμια και τον Άνθρωπο.

Το κομμάτι αυτό της αλληλουχίας είναι πολύ μικρό για να χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής για in situ υβριδοποίηση προκειμένου να μελετηθεί το πρότυπο έκφρασης του apterous στο αμφίποδο. Με σκοπό να απομονώσω ένα μεγαλύτερο κομμάτι αλληλουχίας, έχω ξεκινήσει δύο εναλλακτικές προσεγγίσεις, σάρωση και 5'RACE PCR στην cDNA φαγική βιβλιοθήκη

**5'RACE PCR στην cDNA φαγική βιβλιοθήκη:** Με βάση την νουκλεοτιδική αλληλουχία του Ph apterous, σχεδιάστηκε ένας ειδικός εσωτερικός reverse εκκινητής. Η αλληλουχία του είναι η εξής:

**Ph apHD: 5'- CGGGATCCTAGATCTTTTGCGTCTGG- 3'**

Ο φορέας λTriplex2 της cDNA φαγικής βιβλιοθήκης έχει εκατέρωθεν της θέσης κλωνοποίησης των cDNA ενθεμάτων, αλληλουχίες δύο εκκινητών των λTriplex 3'LD-Insert Screening Amplimer (TriplexR1) και λTriplex 5'LD-Insert Screening Amplimer (TriplexF1) οι οποίοι λόγω του μεγέθους και της νουκλεοτιδικής τους σύστασης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για απομόνωση ενθεμάτων μεγάλου μεγέθους. Οι εκκινητές αυτοί χρησιμοποιήθηκαν για 5'RACE PCR σε συνδυασμό με τον ειδικό εκκινητή. Επειδή η κλωνοποίηση των ενθεμάτων στο φορέα αυτό είναι προσανατολισμένη, μπορώ να γνωρίζω εξαρχής τα ζευγάρια εκκινητών που πρέπει να χρησιμοποιήσω στις PCR αντιδράσεις.

Αρχικά έγινε μία πρωτογενής αντίδραση PCR με τον συνδυασμό εκκινητών TriplexF1/apR2, η οποία δεν έδωσε κανένα προϊόν. Υλικό από αυτή την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε σε ένα semi-nested PCR TriplexF1/Ph apHD, το οποίο έδωσε ζώνες, οι οποίες αυτή την στιγμή εξετάζονται. Προς το παρόν δεν έχω πάρει ένα μεγαλύτερο κομμάτι της αλληλουχίας του Ph apterous, αλλά η ανάλυση των κλώνων και των συνθηκών PCR, δεν έχει ακόμα ολοκληρωθεί.

Προκειμένου να πάρω καλύτερα αποτελέσματα από την τεχνική αυτή ίσως να χρειαστεί να σχεδιάσω και έναν δεύτερο εσωτερικό ειδικό εκκινητή από την γνωστή αλληλουχία του apterous. Με τον τρόπο αυτό θα επιτύχω τόσο οι πρωτογενείς όσο και οι δευτερογενείς αντιδράσεις να έχουν μεγαλύτερη ειδικότητα.

**Σάρωση της φαγικής βιβλιοθήκης:** Μία εναλλακτική προσέγγιση προκειμένου να απομονώσω ένα μεγαλύτερο κομμάτι αλληλουχίας του Ph apterous είναι η σάρωση της φαγικής βιβλιοθήκης χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή το γνωστό κομμάτι της ομοιοτικής περιοχής του γονιδίου που έχω καταφέρει να κλωνοποιήσω. Η ραδιοσήμανση του ανιχνευτή γίνεται με αντίδραση PCR, χρησιμοποιώντας  $P^{32}$  dATP και το ζεύγος εκκινητών apF3/R2. Η διαδικασία της σάρωσης γίνεται με βάση το πρωτόκολλο της CLONTECH (λTriplex & λTriplex2 Libraries User Manual) και τα φίλτρα που χρησιμοποιώ είναι τα Hybond-N της εταιρείας Amersham, Pharmacia. Η σάρωση έγινε σε περίπου 300.000 πλάκες (6 πιάτα των 150mm γεμάτα με φαγικές πλάκες που μόλις η μία ακουμπά την άλλη). Επειδή ο ανιχνευτής έχει πολύ μικρό μέγεθος (120bp), η υβριδοποίηση των φίλτρων γίνεται με βάση το πρωτόκολλο της Clontech για υβριδοποίηση χρησιμοποιώντας ανιχνευτές- ολιγονουκλεοτίδια μικρότερα από 200bp. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο αυτό, υπολογίζεται η θερμοκρασία αποσύνδεσης (dissociation Td) του ανιχνευτή με βάση τον τύπο  $Td = 81.5^{\circ}C + 16.6 \log_{10} [Na^+] + 0.41(\%G/C) - 500/n$ , όπου n είναι ο αριθμός των νουκλεοτιδίων.

Η υβριδοποίηση των φίλτρων προτείνεται να γίνει σε θερμοκρασία 20°C μικρότερη από την θερμοκρασία αποσύνδεσης του ανιχνευτή και σε διάλυμα 6xSSPE. Εφόσον η θερμοκρασία



Td του ανιχνευτή ξεπερνά τους 80°C, όπως στην δική μου περίπτωση όπου Td(apHD)=94,7°C η υβριδοποίηση πρέπει να γίνει σε διάλυμα 1xSSPE, το οποίο έχει μικρότερη συγκέντρωση αλάτων Na<sup>+</sup> και μειώνει την Td του ανιχνευτή περίπου κατά 13°C. Τα φίλτρα στην συνέχεια πλένονται σε ήπιες συνθήκες με διάλυμα 2xSSC και 0,05% SDS για μία ώρα, και σε θερμοκρασία 10°C πιο χαμηλή από την θερμοκρασία υβριδοποίησης.

Σύμφωνα, με το πρωτόκολλο αυτό η υβριδοποίηση του apterous ανιχνευτή στα φίλτρα, πρέπει να γίνει σε 1xSSPE διάλυμα στους 60°C και τα πλυσίματα στον φίλτρων σε 50°C

Φαγικές πλάκες που δίνουν θετικό σήμα στην διαδικασία της πρώτης υβριδοποίησης συλλέγονται από τα μεγάλα πιάτα με την φαρδιά πλευρά ενός μπλε tip. Οι φάγοι εκχειρίζονται σε διάλυμα SM με την προσθήκη χλωροφόρμιου τιτλοδοτούνται και απλώνονται σε νέα πιάτα όπου σαρώνονται για δεύτερη φορά. Η δεύτερη σάρωση γίνεται σε 500-1000 αποικίες. Στην δεύτερη αυτή σάρωση περιμένει κανείς να δει από 1 έως 3 θετικά σήματα. Πολύ προσεκτικά με την λεπτή πλευρά μιας γυάλινης Pasteur, αφαιρούνται από το πιάτο μεμονωμένες θετικές πλάκες και γίνεται δεύτερη έκλουση του φάγου σε μικρό αυτή την φορά όγκο. Στην συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία της μετατροπής του φάγου σε πλασμίδιο (excision assay). Στις λTriplEX φαγικές βιβλιοθήκες η μετατροπή αυτή, όπως ανέφερα και στα υλικά-μέθοδοι γίνεται με ομόλογο ανασυνδυασμό.

Μέχρι αυτή την στιγμή, έχω προλάβει να δοκιμάσω διαφορετικές συνθήκες υβριδοποίησης, ενώ παράλληλα ελέγχονται κάποια σήματα που μπορεί να είναι αληθινά σε δεύτερη σάρωση. Ούτε και με αυτή την μέθοδο δεν έχω καταλήξει ακόμα σε μεγαλύτερη αλληλουχία του Ph apterous.

### Κλωνοποίηση μέρους της αλληλουχίας του *Ph fringe*

**PCR με εκφυλισμένους εκκινητές:** Για την κλωνοποίηση μέρους της συντηρημένης αλληλουχίας του fringe από το αμφίποδο *P. hawaiiensis*, έγιναν αρχικά PCR αντιδράσεις με εκφυλισμένους εκκινητές χρησιμοποιώντας ως μήτρα, υλικό από την φαγική cDNA βιβλιοθήκη που μας προσέφερε ο N.Patel.

Η επιλογή των εκφυλισμένων εκκινητών για το fringe έγινε με βάση συντηρημένες περιοχές που προέκυψαν από την σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας των πρωτεϊνών Fringe της Δροσόφιλας, της Ακρίδας, του Ποντικού και του Zebrafish με το πρόγραμμα CLUSTALW. Στην Εικόνα3, φαίνεται η σύγκριση των αλληλουχιών αυτών καθώς και οι συντηρημένες περιοχές με βάση τις οποίες κατασκευάστηκαν οι εκφυλισμένοι εκκινητές. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

**fng-F1a (FIAVKTT):** 5'-CGGGATCC TT(CT) ATI GCI GTI AA(AG) ACI AC -3'  
**fng-F1s (FISVKTT):** 5'-CGGGATCC TT(CT) ATI AG(CT) GTI AA(AG) ACI AC-3'  
**fng-Frace1 (FWFATGG):** 5'-CGGGATCC TT(CT) TGG TT(CT) GCI ACI GGI GG -3'  
**fng-Frace2 (DDDNYVN):** 5'-CGGGATCC GAT GA(CT) GA(CT) AA(CT) TA(CT) GTI AA-3'  
**fng-R1 (FHSLE):** 5'-GGAATTC TC IAG (GA)TG IGA (GA)TG (GA)AA-3'

Με υπογράμμιση είναι σημειωμένα τα νουκλεοτίδια που σχηματίζουν τις θέσεις περιορισμού του εκκινητή, σε παρένθεση βρίσκονται οι θέσεις στις οποίες λόγω εκφυλισμού του γενετικού κώδικα έπρεπε να χρησιμοποιηθούν δύο νουκλεοτίδια. Ινοσίνη (I) έχει μπει στις θέσεις, όπου έπρεπε να χρησιμοποιηθούν τρία ή τέσσερα νουκλεοτίδια.

Οι εκκινητές fng-F1a και fng-F1s είναι σχεδιασμένοι πάνω στην ίδια συντηρημένη περιοχή. Επειδή όμως το αμινοξύ S (σερίνη) που υπάρχει μόνο στην αμινοξική αλληλουχία του fringe της Δροσόφιλας κωδικοποιείται από μία τριπλέτα τελείως διαφορετική από αυτή της A (αλανίνης) των υπόλοιπων αλληλουχιών, θεωρήθηκε σωστό να κατασκευαστούν δύο

εκκινητές για την ίδια περιοχή προκειμένου να μην αυξηθεί πολύ ο βαθμός εκφυλισμού τους. Οι forward εκκινητές fng-Frace1 και fng-Frace2, ονομάστηκαν έτσι γιατί έχουν σχετικά μεγάλο T<sub>m</sub> (54±3 και 50±5 αντίστοιχα) και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε 3' RACE PCR.

Μέχρι σήμερα έχουν δοκιμαστεί όλα τα ζεύγη εκκινητών στην φαγική cDNA βιβλιοθήκη, σε διαφορετικές συνθήκες υβριδοποίησης, οι οποίες υπολογίστηκαν με βάση τα T<sub>m</sub> των εκκινητών. Για τους πέντε πρώτους κύκλους η υβριδοποίηση γίνεται σε χαμηλότερη θερμοκρασία, εφόσον δεν συμπεριλαμβάνεται το T<sub>m</sub> των θέσεων περιορισμού, ενώ για του υπόλοιπους τριάντα κύκλους η θερμοκρασία υβριδοποίησης αυξάνεται. Ο χρόνος της επέκτασης σε κάθε αντίδραση PCR κυμαίνεται από ένα με ενάμιση λεπτό ανάλογα με το μέγεθος της αλληλουχίας του προϊόντος που αναμένω.

Ο συνδυασμός των εκκινητών fng-Frace2/R1, χρησιμοποιήθηκε για πρωτογενή αντίδραση PCR σε 1μl από την φαγική βιβλιοθήκη σε ένα εύρος θερμοκρασιών υβριδοποίησης και δεν έδωσε καθόλου προϊόν. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

95 <sup>0</sup> C, 5min	
95 <sup>0</sup> C, 1min	}
31-41 <sup>0</sup> C, 1min	
72 <sup>0</sup> C, 1min	
95 <sup>0</sup> C, 1min	
55-65 <sup>0</sup> C, 1min	}
72 <sup>0</sup> C, 1min	
72 <sup>0</sup> C, 10min	

Από την αντίδραση που έλαβε χώρα στις πιο ήπιες συνθήκες χρησιμοποιήθηκε 1μl για μία ημι-δευτερογενή αντίδραση (semi-nested) με τον συνδυασμό εκκινητών fng-Frace1/R1. Στο προϊόν της αντίδρασης αυτής υπήρχαν αρκετές ζώνες μία από τις οποίες είχε το αναμενόμενο μέγεθος ~200bp. Η ζώνη αυτή κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEM-Teasy και έγινε το διάγραμμα της αλληλουχίας. Πράγματι διαπιστώθηκε ότι η περιοχή αυτή αποτελεί μέρος του γονιδίου Ph fringe. Στην Εικόνα 4 φαίνεται η σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας της περιοχής αυτή του Ph fringe, με τις αντίστοιχες περιοχές των ομόλογων πρωτεϊνών από την Δροσόφιλα, την Ακρίδα και τον Άνθρωπο.

Παράλληλα με εμάς, μια περιοχή του Ph fringe, απομονώθηκε στο εργαστήριο του N.Patel, η νουκλεοτιδική αλληλουχία της οποίας μας προσφέρθηκε για σύγκριση. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 5 οι δύο αυτές αλληλουχίες επικαλύπτονται σε ένα μεγάλο κομμάτι τους.

Όπως και στην περίπτωση του apterous, το κομμάτι αυτό της αλληλουχίας είναι πολύ μικρό (200bp) για να χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής για in situ υβριδοποίηση προκειμένου να μελετηθεί το πρότυπο έκφρασης του fringe στο αμφίποδο. Με ανάλογο τρόπο προκειμένου να απομονώσω ένα μεγαλύτερο κομμάτι αλληλουχίας, έχω ξεκινήσει σάρωση και 3'/5' RACE PCR στην cDNA φαγική βιβλιοθήκη

**3' και 5' RACE PCR στην cDNA φαγική βιβλιοθήκη:** Όπως και στην περίπτωση του Phapterous, σχεδίασα πάνω στη γνωστή αλληλουχία του Ph fringe, δύο ειδικούς εκκινητές, έναν forward και ένα reversed. Οι αλληλουχίες των εκκινητών αυτών είναι οι εξής:

**fng-spF1: 5'- GACGTCCATCCGCGCTCCTCTCA- 3'**

**fng-spR1: 5'- CCAGCAATAGGCATCATGCGAAGGCC-3'**

Οι εκκινητές αυτοί σχεδιάστηκαν χωρίς θέσεις περιορισμού και με τέτοιο τρόπο ώστε οι συνθήκες υβριδισμού τους να ταιριάζουν με αυτούς των εκκινητών της cDNA βιβλιοθήκης.

Όπως και στην περίπτωση του *apterous*, δοκίμασα μία σειρά PCR αντιδράσεων χρησιμοποιώντας τους εκκινητές της βιβλιοθήκης TriplexF1 και TriplexR1 σε συνδυασμό με τους εκφυλισμένους και ειδικούς εκκινητές του *fringe*. Οι θέσεις των εκκινητών πάνω στην αλληλουχία του *fringe* φαίνονται στην Εικόνα 5.

Όσον αφορά την 5' περιοχή του γονιδίου, δοκιμάστηκε αρχικά μία πρωτογενής αντίδραση με το ζεύγος εκκινητών TriplexF1/*fng*-R1, η οποία μου έδωσε πάνω από μία ζώνες. Σε διαφορετικές αραιώσεις από το προϊόν της αντίδρασης αυτής έγιναν semi-nested αντιδράσεις PCR, με τον συνδυασμό εκκινητών TriplexF1/*fng*-spR1. Και στην περίπτωση αυτή πήρα στο προϊόν περισσότερες από μία ζώνες. Κάποιες από αυτές τις ζώνες έχουν κλωνοποιηθεί και έχουν διαβαστεί, αλλά προκύπτει ότι δεν αντιστοιχούν στο γονίδιο *fringe*. Παρόλα αυτά λόγω του τρόπου της κατασκευής των cDNA βιβλιοθηκών, πολλές φορές η επέκταση κατά την αντίστροφη μεταγραφή προς το 5' των cDNA δεν είναι ολοκληρωμένη, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατός ο υπολογισμός του αναμενόμενου μεγέθους του κομματιού που προσπαθεί κανείς να απομονώσει. Η ανάλυση όλων των ζωνών δεν έχει ολοκληρωθεί ακόμα. Ένα θετικό στοιχείο είναι ότι όταν κάνω semi-nested PCR, στην πρωτογενή αντίδραση TriplexF1/*fng*-spR1 με τους ειδικούς εκκινητές *fng*-spF1/*fng*-spR1, παίρνω μία μόνο ζώνη ακριβώς στο αναμενόμενο μέγεθος.

Όσον αφορά την 3' περιοχή του γονιδίου, δοκιμάστηκε αρχικά ο συνδυασμός *fng*-spF1/TriplexR1, στο προϊόν του οποίου έγινε semi-nested PCR με τους εκκινητές *fng*-Frac1/TriplexR1. Και σε αυτή την περίπτωση έχουν προκύψει ζώνες από τις οποίες κάποιες έχουν αναλυθεί χωρίς θετικό αποτέλεσμα., όμως και σε αυτή την περίπτωση η διαδικασία δεν έχει ολοκληρωθεί.

Παρόλα αυτά πιστεύω, ότι θα πρέπει όπως και στην περίπτωση του *apterous*, να σχεδιαστούν και εσωτερικοί ειδικοί εκκινητές, ώστε οι πρωτογενείς και δευτερογενείς αντιδράσεις PCR να έχουν μεγαλύτερη ειδικότητα.

**Σάρωση της φαγικής βιβλιοθήκης:** Όπως και στην περίπτωση του *apterous* εναλλακτικά προκειμένου να απομονώσω ένα μεγαλύτερο κομμάτι αλληλουχίας του Ph *fringe* έχω αρχίσει την διαδικασία της σάρωσης της φαγικής βιβλιοθήκης χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή το γνωστό κομμάτι του γονιδίου που έχω καταφέρει να κλωνοποιήσω. Η ραδιοσήμανση του ανιχνευτή γίνεται με αντίδραση PCR, χρησιμοποιώντας  $P^{32}$  dATP και το ζεύγος εκκινητών *fng*-Frac1/*fng*R1. Η διαδικασία της σάρωσης είναι η ίδια με αυτήν που περιγράφεται και για το *apterous*. Και στην περίπτωση αυτή η υβριδοποίηση των φίλτρων γίνεται με βάση το πρωτόκολλο της Clontech για υβριδοποίηση χρησιμοποιώντας ανιχνευτές- ολιγονουκλεοτίδια μικρότερα από 200bp.

Η θερμοκρασία  $T_d$  του *fringe* ανιχνευτή είναι αρκετά μεγάλη  $T_d(\text{fng})=98^{\circ}\text{C}$ , εφόσον το μέγεθος του ανιχνευτή βρίσκεται στο ανώτατο όριο των 200bp. Επομένως σύμφωνα, με το πρωτόκολλο αυτό η υβριδοποίηση του *fringe* ανιχνευτή στα φίλτρα, πρέπει να γίνει σε 1xSSPE διάλυμα στους  $65^{\circ}\text{C}$  και τα πλυσίματα στον φίλτρων στους  $55^{\circ}\text{C}$  και σε ήπιες συνθήκες με διάλυμα 2xSSC και 0,05% SDS για μία ώρα

Μέχρι αυτή την στιγμή, έχω προλάβει να δοκιμάσω διαφορετικές συνθήκες υβριδοποίησης, ενώ παράλληλα ελέγχονται κάποια σήματα που μπορεί να είναι αληθινά σε δεύτερη σάρωση. Ούτε και με αυτή την μέθοδο δεν έχω καταλήξει ακόμα σε μεγαλύτερη αλληλουχία του Ph *fringe*.

## Κλωνοποίηση μέρους της αλληλουχίας του *Ph serrate*

**PCR με εκφυλισμένους εκκινητές:** Για την κλωνοποίηση μέρους της συντηρημένης αλληλουχίας του serrate από το αμφίποδο *P. hawaiiensis*, έγιναν αρχικά PCR αντιδράσεις με εκφυλισμένους εκκινητές χρησιμοποιώντας ως μήτρα υλικό από την φαγική cDNA βιβλιοθήκη που μας προσέφερε ο N.Patel.

Η επιλογή των εκφυλισμένων εκκινητών για το serrate έγινε με βάση συντηρημένες περιοχές που προέκυψαν από την σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας των ομόλογων πρωτεϊνών Serrate της Δροσόφιλας, του Xenopus και του Ποντικού με το πρόγραμμα CLUSTALW. Στην Εικόνα 6, φαίνεται η σύγκριση των αλληλουχιών αυτών καθώς και οι συντηρημένες περιοχές με βάση τις οποίες κατασκευάστηκαν οι εκφυλισμένοι εκκινητές. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

**ser-F1 (GnFELEI):** 5'-CGGGATCC GGI (AC)AI TT(CT) GA(AG) TTI GA(AG) AT -3'  
**ser-F2 (CLKEYQ):** 5'-CGGGATCC TG(CT) TTI AA(AG) GA(AG) TA(CT) CA-3'  
**ser-F3 (vCdTNW):** 5'-CGGGATCC TI TG(TC) GAI ACI AA(TC) TGG G -3'  
**ser-R1 (DvNECE):** 5'-GGAATTC TC (GA)CA (TC)TC (GA)TT IGC (GA)TC -3'  
**ser-R2 (CdTNWG):** 5'-GGAATTC CC CCA (GA)TT IGT ITC (GA)CA -3'  
**ser-R3 (CqNGGT):** 5'-GGAATTC GT ICC ICC (GA)TT IT(GT) (GA)CA-3'

Με υπογράμμιση είναι σημειωμένα τα νουκλεοτίδια που σχηματίζουν τις θέσεις περιορισμού του εκκινητή, σε παρένθεση βρίσκονται οι θέσεις στις οποίες λόγω εκφυλισμού του γενετικού κώδικα έπρεπε να χρησιμοποιηθούν δύο νουκλεοτίδια. Ινοσίνη (I) έχει μπει στις θέσεις, όπου έπρεπε να χρησιμοποιηθούν τρία ή τέσσερα νουκλεοτίδια.

Μέχρι σήμερα έχουν δοκιμαστεί όλα τα ζεύγη εκκινητών στην φαγική cDNA βιβλιοθήκη, σε διαφορετικές συνθήκες υβριδοποίησης, οι οποίες υπολογίστηκαν με βάση τα Tm των εκκινητών. Κάποιες ζώνες έχουν κλωνοποιηθεί και σταλεί για αλληλούχιση, χωρίς κάποιο θετικό αποτέλεσμα. Παρόλα αυτά η ανάλυση δεν έχει ακόμα ολοκληρωθεί.

Όπως μπορεί να δει κανείς, αν εξαιρέσουμε την DSL (Delta/Serrate/Lag-2) περιοχή του serrate, η οποία είναι περισσότερο συντηρημένη, οι υπόλοιπες περιοχές των ομόλογων serrate πρωτεϊνών, δεν παρουσιάζουν πολύ μεγάλο βαθμό συντήρησης και η επιλογή των εκκινητών ήταν αρκετά δύσκολη. Ο βαθμός εκφυλισμού τους είναι αρκετά μεγάλος και η θερμοκρασίες υβριδισμού για αυτόν τον λόγο είναι χαμηλές. Επομένως αν και θα συνεχιστούν οι προσπάθειες κλωνοποίησης του γονιδίου αυτού με εκφυλισμένο PCR, έχω ξεκινήσει μία εναλλακτική προσέγγιση με σάρωση της φαγικής cDNA βιβλιοθήκης.

**Σάρωση της φαγικής βιβλιοθήκης:** Η διαδικασία της σάρωσης γίνεται, όπως περιγράφεται στην περίπτωση του apterous. Επειδή, όμως δεν έχει επιτευχθεί μέχρι σήμερα η κλωνοποίηση μέρους της αλληλουχίας του *Ph serrate* από το αμφίποδο, ως ανιχνευτής έχει χρησιμοποιηθεί κομμάτι της αλληλουχίας του γονιδίου serrate από την Δροσόφιλα.

Ο S.Cohen, μας προσέφερε το cDNA του serrate (5546bp) από την Δροσόφιλα κλωνοποιημένο σε pBluescript πλασμιδιακό φορέα. Από την κατασκευή αυτή απομόνωσα μετά από πέψη με Kpn περιοριστικό ένζυμο ένα κομμάτι 2410bp το οποίο θα χρησιμοποιήσω ως ανιχνευτή. Το κομμάτι ξεκινά από την θέση 567 μέχρι την θέση 2978 του serrate cDNA και περιέχει την συντηρημένη DSL περιοχή του γονιδίου. Η ραδιοσήμανση του κομματιού αυτού έγινε με nick-translation (Sambrook et al.).

Επειδή ο ανιχνευτής είναι ετερόλογος, οι συνθήκες υβριδοποίησης και πλυσίματος των φίλτρων θα πρέπει να είναι ήπιες. Έχουν δοκιμαστεί και δοκιμάζονται αρκετές συνθήκες στον πρώτο γύρο της σάρωσης.

## Δοκιμή RNA in situ υβριδοποίησης στο αμφίποδο *P.hawaiensis*.

Η τεχνική της RNA in situ υβριδοποίησης χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του προτύπου έκφρασης του mRNA υπό μελέτη γονιδίων πάνω στον ιστό ενός οργανισμού. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε τομές ιστού ή και σε ολόκληρο τον οργανισμό και βασίζεται στην κατασκευή DIG-σημασμένων anti-sense RNA ανιχνευτών, οι οποίοι υβριδοποιούνται με το mRNA του γονιδίου στόχου. Η ανάλυση που μπορεί να πάρει κανείς με την τεχνική αυτή είναι σε επίπεδο κυττάρου.

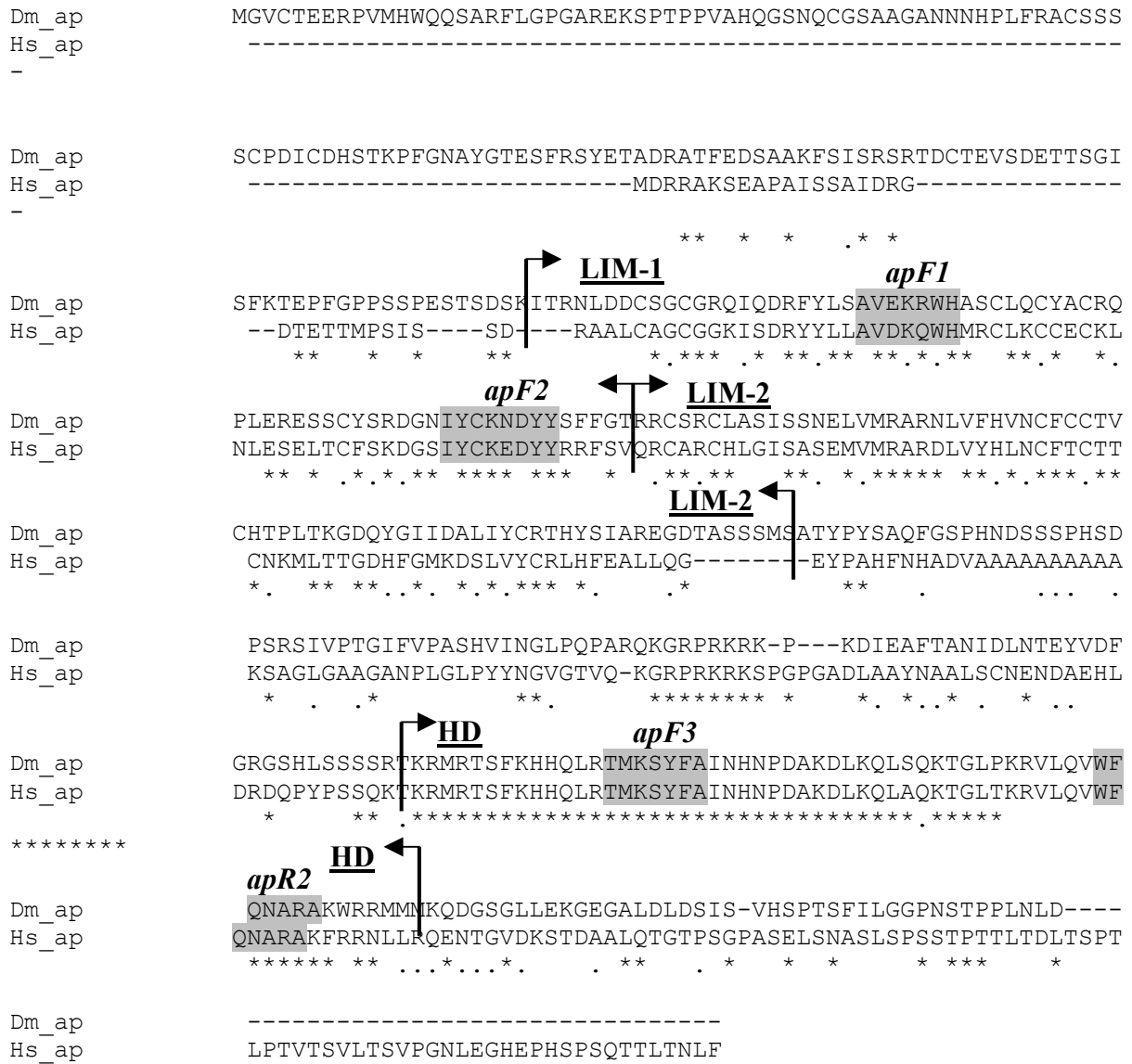
Με αυτή την τεχνική, σκοπεύω να αναλύσω το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *arterous*, *fringe* και *serrate* στο αμφίποδο *P.hawaiensis*, από την στιγμή που καταφέρω να κλωνοποιήσω αλληλουχίες κατάλληλου μεγέθους για την κατασκευή RNA ανιχνευτών (>500bp).

Όπως αναφέρω στα Υλικά και Μέθοδοι, κατά την διάρκεια του ελέγχου της ποιότητας της first strand cDNA βιβλιοθήκης που κατασκεύασα από το αμφίποδο, είχα την τύχη να απομονώσω μία μεγάλη περιοχή του γονιδίου *Ph collier* (~900bp), με εκφυλισμένους εκκινητές που είχε σχεδιάσει η Βάλια Σταματάκη, κατά την διάρκεια της Πτυχιακής της. Το κομμάτι αυτό κλωνοποιήθηκε κατάλληλα στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript και χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση RNA ανιχνευτή προκειμένου να δοκιμάσω την τεχνική της in situ υβριδοποίησης στα αμφίποδα. Παράλληλα, και για τον ίδιο λόγο μας προσφέρθηκε από τον N.Patel, ένα κομμάτι της αλληλουχίας του γονιδίου *Ph hairy* από το αμφίποδο, το πρότυπο έκφρασης του οποίου είχε ήδη αναλυθεί με την τεχνική αυτή στο εργαστήριο του.

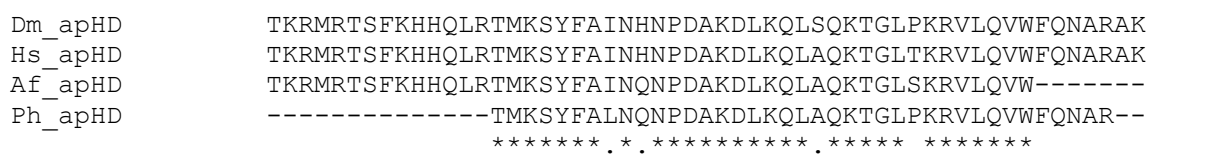
Και για τα δύο αυτά γονίδια κατασκεύασα sense (για τον έλεγχο της ειδικότητας της υβριδοποίησης) και anti-sense RNA ανιχνευτές χρησιμοποιώντας τα MEGAscript T3 και T7 kit της Ambion και δοκίμασα το πρωτόκολλο για in situ υβριδοποίηση με DIG-σημασμένους RNA ανιχνευτές και SDS το οποίο έχει τροποποιηθεί κατάλληλα για έμβρυα αμφιπόδων (Gleich et al.). Πράγματι, κατάφερα να αναπαράγω το πρότυπο μεταμεριδίωσης του *Ph hairy*, το οποίο παρατηρείται σε πολύ πρώιμα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης του αμφιπόδου ενώ για το *Ph collier*, παίρνω ένα πρότυπο έκφρασης σε πρώιμα επίσης στάδια το οποίο φαίνεται ειδικό, αλλά δεν έχει γίνει ακόμα αναλυτική μελέτη του.

Με τις δοκιμές αυτές κατάφερα να εξοικειωθώ περισσότερο με τον οργανισμό αυτό, τόσο στην συλλογή εμβρύων, όσο και για την προετοιμασία που χρειάζονται πριν χρησιμοποιηθούν για in situ. Τα έμβρυα αυτά περιβάλλονται από μία με δύο μεμβράνες, ανάλογα με το στάδιο στο οποίο βρίσκονται. Προκειμένου να γίνει αποτελεσματική μονιμοποίηση του ιστού οι μεμβράνες αυτές πρέπει να αφαιρεθούν. Σε έμβρυα που βρίσκονται σε νωρίς στάδια ανάπτυξης η αφαίρεση πρέπει να γίνει με πολύ προσεκτικούς χειρισμούς, ώστε να μην τραυματιστεί ο ιστός, χρησιμοποιώντας πολύ μυτερές λαβίδες ή και tungsten βελόνες. Σε έμβρυα που βρίσκονται σε μεγαλύτερα στάδια ανάπτυξης, η αφαίρεση των μεμβρανών μπορεί να γίνει με το ίδιο πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση της βιτελλινικής μεμβράνης στα έμβρυα Δροσόφιλας, με την χρήση επτανίου και μεθανόλης.

**Εικόνα 1:** Σύγκριση αμινοξικών αλληλουχιών ομόλογων *apterous* γονιδίων και θέσεις εκφυλισμένων εκκινήτων



**Εικόνα 2:** Σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας της ομοιοτικής περιοχής του *Ph apterous*, με τις ομοιοτικές περιοχές ομόλογων *apterous* γονιδίων.



**Εικόνα 3:** Σύγκριση αμινοξικών αλληλουχιών ομόλογων fringe γονιδίων και θέσεις εκφυλισμένων εκκινητών.

Dm\_fng MMSLTVLSPPQRFKRILQAMMLAVAVVYMTLLLYQSAYGYPGIQVPHSQVDALASEAVTT  
Sg\_fng -----  
Mm\_mfng -----MHCRLFRGMAGALFTLLCVGLLSLRYHSSLSQRMIG-----ALRLN---  
Dr\_lfng ---MLKTYRGKVVVSLAGATVTCLGFLLFLSQHQRIQADGMQNESEVGLRSLQSLGDSE

Dm\_fng HRDQLLQDYVQSSTPTQPGAGAPAASPTTVIIRKDIRSFNFSDIEVSRPTATLLTELAR  
Sg\_fng -----  
Mm\_mfng -----  
Dr\_lfng T-----DDGAQPEQNAKKGFSAYFSKLT

**fng-F1a/s**

Dm\_fng RSRNGELLRDLSQRAVTATPQPPVTELDIDFISVKTITKNYHDTLALIIKTFWQLARDQT  
Sg\_fng -----  
Mm\_mfng --QR-----NPGPLELQLGDI FIAVKTTWAFHRSRLDLLLDTWVSRIRQQT  
Dr\_lfng RSRREADKPSSEAPGAATDAPPAEDISADDI FIAVKTTKKFHRSRLLDLLLDTWISRNRQT

**Fng-Frace2**

Dm\_fng WFFTDTDDHYYQEKTGHLINTKCSQGHFRKALCCKMSAEILDVFLSGLKWFCHVDDDNY  
Sg\_fng -----GIRHETNCSSSHNRKALCCKMSVEFDVFLSNKKWFCHVDDDNY  
Mm\_mfng FIFTDSPDERLQERLGPLVVTNCSAEHSHPALSCKMAAEFDVFLSGLRWVCHVDDDNY  
Dr\_lfng YIFTDGEDEELKKKIGSHAINTCNSAAHSRQALSCKMAVEYDKFIESGKKWFCHVDDDNY  
\* \* \* \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \*

**fng-Frace2**

Dm\_fng VNVPRVLKLLDEYSPVDWYLGKPSISSPLEIHLDSKNTTTNKKITFWFATGGAGFCLSR  
Sg\_fng VNVPRVLRVLSGYNPQQDWYLGKPSIRAPLEILN--RDNTAQKISFWFATGGAGFCLSR  
Mm\_mfng VNPKALLQLLKTFFPQDRDVYVGKPSLNRP IHASELQSKNRTKLVRWFATGGAGFCINR  
Dr\_lfng VNTKTLVKLLSNYPHTQDMYIGKPSLDRPIEATERLGDNKM RPVNEFWFATGGAGFCISR  
\* \* \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \*

**fng-R1**

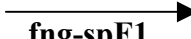
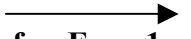
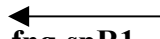

Dm\_fng ALTLKMLPIAGGGKFISIGDKIRFPDDVTMGFIEHLLKVPLTVVDNFHSHLEPMEFIRQ  
Sg\_fng ALALKMMPVASGGKFISIGEKIRLPDDVTMGYIEHMLQKPLTVIEQFHSHLEPMKFLRP  
Mm\_mfng QLALKMVPWASGSHFVDT SALIRLPDDCTVGYIECKLGGRLQPSPLFHSHLETLQLLGA  
Dr\_lfng GLALKMSPWASGGHFMNTAEKIRLPDDCTIGYIE SVLGVSLTRSSLFHSHLENLQQVSK  
\* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \*

Dm\_fng DTFQDQVSFSYAHMKN-QWNVIKVDG-FDMKTDPKRFYSLHCQLFPYFSCPPR---  
Sg\_fng DTIQDQITFSYSHYSKDEMNVVKIDG-FDKRIDPTRFLSIHCFLFPYFSCPPR----  
Mm\_mfng AQLPEQVTL SYGVFEG-KLNVIKLPGPSHEEDPSRFRSLHCLLYPDTWCPPLAAP  
Dr\_lfng SEVHKQITLSYGMFEN-KRNIINMKGAFSVEEDPSRFSVHCLLYPDTWCPQPQVAY  
\* . . \* \* \* . \* . . \* \* \* \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \* . \*

**Εικόνα 4:** Σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας της περιοχής του Ph fringe, με αντίστοιχες περιοχές ομόλογων fringe γονιδίων.

Drome_fng	FWFATGGAGFCLSRALTLKMLPIAGGGKFISIGDKIRFPDDVTMGFIEHLLKVPLTVVD
Sch_fng	FWFATGGAGFCLSRALALKMMPVASGGKFISIGEKIRLPDDVTMGYIEHMLQKPLTVIE
Homo_m_fng	FWFATGGAGFCINRKLALKMAPWASGRFMDTSALIRLPDDCTMGYIECKLGGRLQPSP
Ph_fng	FWFATGGAGFCISRSLGLRMMPIAGGGKLVSIGDKIRLPDDVTIGYVIEHLLRQKLTVVD
	*****. * * * . * * * * . . * * * * * . * * * * * . * * * * * . * * * * *
Drome_fng	NFHSLE
Sch_fng	QFHSLE
Homo_m_fng	LFHSLE
Ph_fng	LFHSLE
	*****

**Εικόνα 5:** Σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του Ph fringe που απομονώθηκε κατά την διάρκεια της εργασίας μου, με την αλληλουχία του Ph fringe που μας προσφέρθηκε από τον N. Patel

PhfngNP	CATCAATGCCCTTGTGATACTCTGGGCAGCTATGATCACAAAAAATATTGGTATTTGGG
PhfngTS	-----
	 <b>fng-spF1</b>
PhfngNP	ACGGACGTCATCCGCGCTCCTCTCAAAATTCTCAATAGAGATGATGTCACTCAACACAT
PhfngTS	-----
	 <b>fng-Fracel</b>
PhfngNP	TGTGTTTTGGTTTTGCTACGGGTGGTGCTGGCTTCTGTATATCTCGCTCGCTGGCCTTCG
PhfngTS	----TTTTGGTTTTGCTACGGGTGGTGCTGGCTTCTGTATATCTCGCTCGCTGGCCTTCG
	*****
	 <b>fng-spR1</b>
PhfngNP	CATGATGCCTATTGCTGGAGGTGGAAAGCTGGTCAGTATTGGCGACAAGATACGTCTC--
PhfngTS	CATGATGCCTATTGCTGGAGGTGGAAAGCTGGTCAGTATTGGCGACAAGATACGTCTCCC
	*****
PhfngNP	-----
PhfngTS	TGATGACGTCACCATTGGCTACGTTATTGAGCATTATTGCGGCAGAAGCTGACGGTCGT
	 <b>fng-R1</b>
PhfngNP	-----
PhfngTS	CGATCTCTTCCATTCCCACCTCGA



**Εικόνα 6:** Σύγκριση αμινοξικών αλληλουχιών ομόλογων serrate γονιδίων και θέσεις εκφυλισμένων εκκινήτων

```

Dm_ser      MFRKHFRKRPATSSSSLSLESTIESPDSLGMSSKKTATKRQRPRHRVPKIATLPSTIRDC
Xl_ser      -----MRFPRRALSP-----
Mm_ser      -----MRSRTRGRPRGP-----
                                           * * . *

                                serF1
Dm_ser      RSLKSACNLIALILILLVHKISAAGNFELEILEISNTNSHLLNGYCCGMPAELRATKTIG
Xl_ser      -----LLVSALLCLLRIKVSIASQFELEILSMQNPNQELQSGNCCDG---QRNPTDRK
Mm_ser      -----LSLLLALLCALRAKVCGSQFELEILSMQNVNDELQNGNCCGG---VRNPGDRK
                . ** . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *

                                serF2
Dm_ser      CS--PCTTAFRLCLKEYQTTEQGASISTGCSFGNATTKILGGSSFVLSDP--GVGAIVL
Xl_ser      CSRDECDTYFKVCLKEYQSRVSAG--GACSFGTGYTPVIGNSFNLYSRNNERNRIVL
Mm_ser      CTRDECDTYFKVCLKEYQSRVTAG--GPCSFGSGSTPVIGNTFNLKASRGNDRNRIVL
                * . * * * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *

Dm_ser      PFTFRWTKSFTLILQALDMYNTSYPDAERLIEETSYSGVILPSPWKTLDHIGRNARITY
Xl_ser      PFSFAWPRSYYTLVVEAWDYNNDTNDPGDLIDKALHSGMINPSRQWQTLKQAGMTYFEY
Mm_ser      PFSFAWPRSYYTLVVEAWDSSNDTIQPSDII EKASHSGMINPSRQWQTLKQNTGIAHFEY
                ** . * * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *

Dm_ser      RVRVQCAVYYNTTCTTFCRPRDDQFGHYACGSEGQKLCNLGWQGVNCEEAI CKAGCDPV
Xl_ser      QIRVICDEHYGFGCNKFCRPRDDFFGHYTCDLNGNKTCLGWMGPECSTAICRQGCSSK
Mm_ser      QIRVTCDDHYGFGCNKFCRPRDDFFGHYACQNGNKTCEGWMGPDCKAICRQGCSPK
                . . * * * * * . * . * . * . * . * . * . * . * . *

                                                serF3/serR2
Dm_ser      HGKCDRPGECECRPGWRGPLCNECMVYPGCKHGSCNGSAWKCVCDTNWGGIILCDQDLNFC
Xl_ser      HGTCKTPGECRCQYGWQGYCDKCI PHPGCVHGT CNEPWQCLCETNWGGQLCDKDLNYC
Mm_ser      HGSKLPGDCRCQYGWQGLYCDKCI PHPGCVHGT CNEPWQCLCETNWGGQLCDKDLNYC
                * * * * * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *

Dm_ser      GTHEPCKHGGTCENTAPDKYRCTCAEGLSGEQCEIVEHPCATRPCRNGGTCTLKTSNRTO
Xl_ser      GTYQPCLNGGTCSNTGPDKYQCSCPEGYSQGNCEIAEHACLSDPCHNGGSCLETSVG---
Mm_ser      GTHQPCLNRGTCSTNTGPDKYQCSCPEGYSQGNCEIAEHACLSDPCHNRGSKCKETSSG---
                * * . * * . * * * * * . * . * * * . * * * * * . * . * * * . * .

Dm_ser      AQVYRTSHGRSNMGRPVRSSSMRSLDHLRPEGQALNGSSSSGLVSLGSLQLQQQLAPDF
Xl_ser      -----F
Mm_ser      -----F
                                           *

                                                serR1
Dm_ser      TCDCAAGWTGPTCEINIDECAGGPCEHGGTCIDLIGGFRCECPPEWHGDVCQVVDNECEA
Xl_ser      ECQCARGWTGPTCSINIDECSPNPGYGGTCQDLIDGFKCICPSQWTGKTCQIDANECEA
Mm_ser      ECCESPGWTGPTCSTNIDDCSPNNCSHGGTCQDLVNGFKVCPPQWTGKTCQL DANECEA
                * * . * * * * * * * * . * * * * * * * * . * * * * * * * *

Dm_ser      PHSAGIAANALLTTTATAIIGSNLSSTALLAALTSAVASTSLAIGPCINAKECRNQPGSF
Xl_ser      -----KPCVNANSCRNLIGSY
Mm_ser      -----KPCVNARSCKNLIASY
                                           * * . * * * . * . *

Dm_ser      ACICKEGWGGVTCAENLDDCVGQCRNGATCIDLVNDYRCACASGFTGRDCETDIDECATS
Xl_ser      YCNCLPGWTGQNCININDCLGQCQNGGTCKDLVNGFRICPPGYAGERCEKDVNECVSN
Mm_ser      YCDCLPGWMGQNCININDCLGQCQNDASCRDLVNGYRCICPPGYAGDH CERDIDECASN
                * * * * * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *

```

Dm\_ser PCRNGGECVDMVGKFNICPLGYSGSLCEEAKENCTPSPCLEGHCLNTPEGYCHCPPD  
Xl\_ser PCLNGGHCQDEINGFQCLCPAGFSGNLCQLDIDYCEPDPCQNGAQCFNLATDYFCNCSED  
Mm\_ser PCLNGGHCQNEINRFQCLCPTGFSGNLCQLDIDYCEPNPCQNGAQCYNRASDYFCKCPED  
\*\* \*\*\* \* .. \*.\*\*.\* \*\*.\* \*\* . \* \* \* \* \* . \* \* \* \* . \* \* \* \*

Dm\_ser RAGKHCEQLRPLCSQPPCNEGCFANVSLATSATTTTTTTTTTATTTTRKMAKP---SG---  
Xl\_ser YEGKNCSHLKDHCRTTTPCEVIDSCTVAVASNSTPEGVRYISSNVCBPHGKCRSQSGGKFT  
Mm\_ser YEGKNCSHLKDHCRTTTTCEVIDSCTVAMASNDTPEGVRYISSNVCBPHGKCKSQSGGKFT  
\*\*.\* \*.\* \* \* \* ..\*.\* \* \* . . . \* \*\*

Dm\_ser -----LPCSGHSGCEMSDVGTFCCKHVGHGTGTFCEHNLNECSPN  
Xl\_ser CECKKGFTGTYCHENINDCESNPCNNGGTCIDGVNSYKICISNGWEGIYCETNINDCSKN  
Mm\_ser CDCNKGFTGTYCHENINDCESNPCNNGGTCIDGVNSYKICISDGEWAHCENNINDCSQN  
\* \* . \*.\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* . \* \* \* \*

**serR3**

Dm\_ser PCRNGGICLDGDGDFTECMSGWTGKRCSERATGICYAGQCQNGGTCMPG-----  
Xl\_ser PCYNGGTCRDLVNDIFYCECKNGWKGKTCCHSRDSQCDEATCNNGGTCYDEGDTFKCICSPG  
Mm\_ser PCHYGGTCRDLVNDIFYCDCKNGWKGKTCCHSRDSQCDEATCNNGGTCYDEVDTFKCMCPGG  
\*\* \* \* \* \* .\*\* \*.\* \*\* \* \* \* \* \* \* . \* \* .\*\*\*\*\*

Dm\_ser -----APDKALQP-----HRCAPGWTGLFCAEAIDQCRGQPCHNG  
Xl\_ser WEGATCNIAARNSSCLPNPCFNGGTCVVRGDSFTCVCKEGWEGPTCSQNTNDCSPHPCYNS  
Mm\_ser WEGTTCNIAARNSSCLPNPCHNGGTCVVRGDSFTCVCKEGWEGP ICTQNTNDCSPHPCYNS  
\* . \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* . \* . \* \* \*

Dm\_ser GTCESGAGWFRVCVAQGFSGPDCRINVNECSPQPCQGGATCIDGIGGYSCICPPGRHGLR  
Xl\_ser GTCVDGDNWYRCECAPGFAGPDCRININECQSSPCAFGATCIDEINGYRCTCPPGRSGPR  
Mm\_ser GTCVDGDNWYRCECAPGFAGPDCRININECQSSPCAFGATCVDEINGYQCICPPGHSGAK  
\*\*\* \* .\*.\*\* \*\* \*.\*\*\*\*\*\*.\*\*\* \* \* \* \* . \* . \* \* \* \* . \* .

Dm\_ser CEILLSDPKSACQNASNTISPYTALNRSQNWLDIALTGRTEDDENCNACVCENGTSRCTN  
Xl\_ser CQEVTRGP---CITNGHMP-----DGEKWDDCNSCQCLNGKVTCSK  
Mm\_ser CHEVSGRS---CITMGRVIL-----DGAKWDDD-CNTCQCLNGRVACSK  
\* . \* . \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

Dm\_ser LWCGLPNCYKVDPLSKSSNLGCVCKQHEVCVPALSETCLSSPCNVRGDCRALEPSRRVAP  
Xl\_ser VWCG-PQRCDING-----DSECPAGQTCVPVRDNHCFVPPCTGLGECWPTNQP-----  
Mm\_ser VWCG-PRPCRLHKS-----HNECPSGQSCIPVLDQCFVRPCTGVGECRSSSLQ-----  
.\*\*\* \* . \* . \*.\* \* \* \* . \* . \*

Dm\_ser PRLPAKSSCWPNQAVVNENCARLTILLALERVGKGASVEGLCSLVRVLLAAQLIKKPAST  
Xl\_ser --PVKTKCNANASYQDASCANITFTFNKEMMSPGLTTESICNELRNLNILKNVSAEYSI  
Mm\_ser ---PVKTKCTSDSYQDNCANITFTFNKEMMSPGLTTEHICSELRNLNILKNVSAEYSI  
\* \* . \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* . . \*

Dm\_ser FGQDPGMLMVLCDLKTGTNDTVELTVSSSKLNDPQLPVAVGLLGGELLSSRQLNGIQRRKE  
Xl\_ser Y-----ITCELSPASNEIHVAISVEENGDRNPVKD-----ITERIIDLVSKRD-  
Mm\_ser Y-----IACEPSLSANNEIHVAISAEDIRDDGNPVKE-----ITDKIIDLVSKRD-  
. \* . \* . \* . . . \* \* \* \* \* . . . . \*

Dm\_ser LELQHAKLAALTSIVEVKLETARVADGSGHSLIGVLCGVFIVLVGFSVFISLYWKQRLA  
Xl\_ser -----ANNTFIASVAEVRVQTRHTKNGT-DFLVPLLSSILTVAWICCLVTAFYWCIRKR  
Mm\_ser -----GNSSLIAAAVAEVRVQRRPLKNRT-DFLVPLLSSVLTVAWVCCCLVTAFYWCVRKR  
. . . . \* \* . . . \* . \* . \* \* \* \* \* . . \* \* \*

Dm\_ser YRTSSGMNLTPLDALRHEEEKSNLQNEENLRRYTNPLKGSTSSLRAATGMELSLNPAP  
Xl\_ser RKQSSHSHTAS-----EDNTTNNVR--EQLNQIKNPIEKHGANTVPIKDYENKN----  
Mm\_ser RKPSSHTHSAP-----EDNTTNNVR--EQLNQIKNPIEKHGANTVPIKDYENKN----  
. \* \* . . \* . \* \* . \* \* . \* \* . \*

Dm\_ser ELAASAASSALHRSQPLFPPCDFERELDSSTGLKQAHKRTSQILLHKTQNSDMRKNTVG  
Xl\_ser ----SKIAKIRTHNS-----EVEEDDMDKHQQKSRYVKQPAYSLVDRDEKPPNSTP  
Mm\_ser ----SKMSKIRTHNS-----EVEEDDMDKHQQKVRFAKQPVYTLVDREEKAPSGTP  
\* . \* \* \* \* \* . \* . \*

Dm\_ser SLDSPRKDFGKRSINCKSMPPSSGDEGSDVLATTVMV  
Xl\_ser SK-QP--NWTNKQDNRDLETAQSLNRMEYIV-----  
Mm\_ser TK-HP--NWTNKQDNRDLESAQSLNRMEYIV-----  
. \* . \* \* ..

**Συζήτηση**

Το ερώτημα που θέλω να απαντήσω στην εργασία μου είναι το πώς και πότε στην εξέλιξη εμφανίστηκε η ιεραρχία των γονιδίων που είναι υπεύθυνη για την δημιουργία του νωτιαίο/κοιλιακού προτύπου των φτερών των εντόμων, τα οποία είναι γνωστό ότι προήλθαν από τους αδιαφοροποίητους επιποδίτες/ βράγγια προγονικών υδρόβιων αρθροπόδων. Η ιεραρχία αυτή είναι πολύ καλά μελετημένη στον οργανισμό μοντέλο *Drosophila melanogaster*, όπου έχουν βρεθεί γονίδια των οποίων η τοπικό-χρονική έκφραση, καθώς και οι μεταξύ τους ρυθμιστικές σχέσεις είναι καθοριστικές για τον σχηματισμό και την ακεραιότητα του προτύπου αυτού. Προκειμένου να μελετήσω αυτό το ερώτημα, σε μία πρώτη φάση θέλω να απομονώσω συντηρημένες περιοχές των ομόλογων γονιδίων *apterous*, *serrate* και *fringe* από το μαλακόστρακο καρκινοειδές *P.hawaiensis* και να ελέγξω το πρότυπο έκφρασής τους με RNA in situ υβριδοποίηση.

Όπως έγινε κατανοητό, βρίσκομαι ακόμα σε ένα πολύ αρχικό στάδιο της εργασίας αυτής, εφόσον δεν έχω καταφέρει ακόμα να μαζέψω τα αρχικά εργαλεία της μελέτης μου. Μέχρι αυτή την στιγμή έχω καταφέρει να κλωνοποιήσω μόνο δύο περιοχές από τα γονίδια *apterous* και *fringe*, χρησιμοποιώντας PCR με εκφυλισμένους εκκινητές. Οι περιοχές αυτές, όμως, είναι πολύ μικρές για να χρησιμοποιηθούν ως ανιχνευτές για in situ υβριδοποίηση.

Προκειμένου να αποκτήσω μεγαλύτερες αλληλουχίες από τα γονίδια αυτά, έχω ήδη ξεκινήσει εναλλακτικές προσεγγίσεις όπως είναι η πραγματοποίηση 3' και 5' PCR αντιδράσεων χρησιμοποιώντας την φαγική cDNA βιβλιοθήκη του *P.hawaiensis* η οποία μας προσφέρθηκε σχετικά πρόσφατα από τον N.Patel. Για τον σκοπό αυτό έχω κατασκευάσει ειδικούς εκκινητές για τις γνωστές αυτές αλληλουχίες, τους οποίους χρησιμοποιώ σε συνδυασμό με τους εκφυλισμένους εκκινητές καθώς και με τους 3' και 5' ειδικούς εκκινητές που προσφέρονται από την κατασκευάστρια εταιρεία της βιβλιοθήκης (CLONTECH). Η ανάλυση όλων των προϊόντων των PCR αντιδράσεων δεν έχει ακόμα ολοκληρωθεί. Από τις πρώτες ενδείξεις, όμως που έχω, πιστεύω ότι για να πάρω μεγαλύτερες αλληλουχίες, είναι απαραίτητος ο σχεδιασμός και κάποιων άλλων ειδικών εσωτερικών εκκινητών. Με τον τρόπο αυτό θα μπορώ να χρησιμοποιώ περισσότερο αυστηρές συνθήκες στις PCR αντιδράσεις και θα μπορέσω να απαλλαγώ από πολλά μη-ειδικά προϊόντα.

Μία δεύτερη εναλλακτική προσέγγιση, είναι και η σάρωση της φαγικής cDNA βιβλιοθήκης, χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτές τις γνωστές αυτές αλληλουχίες. Το μικρό μέγεθος των αλληλουχιών αυτών, βέβαια, αποτελεί πρόβλημα τόσο για την επιτυχημένη τους ραδιοσήμανση, όσο και για την εύρεση των κατάλληλων συνθηκών υβριδοποίησης. Σε αυτή την φάση χρησιμοποιώ την τεχνική της ραδιοσήμανσης με PCR, η οποία φαίνεται να είναι πολύ αποτελεσματική, ενώ παράλληλα δοκιμάζω διαφορετικές συνθήκες υβριδοποίησης που θα μου δώσουν θετικά σήματα κατά την σάρωση.

Μια άλλη προσέγγιση, την οποία δεν έχω ξεκινήσει αυτή την στιγμή είναι αυτή του inverse PCR. Στην τεχνική αυτή, αρχικά γίνεται πέψη με περιοριστικά ένζυμα του γενωμικού DNA σε κατάλληλου μεγέθους κομμάτια τα οποία στη συνέχεια κυκλοποιούνται με μία αντίδραση αυτό-σύνδεσης. Με την χρήση ειδικών εκκινητών οι οποίοι σχεδιάζονται έτσι ώστε να 'κοιτούν' έξω από το κομμάτι της γνωστής αλληλουχίας, μπορεί κανείς με αντιδράσεις PCR, να απομονώσει και να διαβάσει αλληλουχίες γύρω από το κομμάτι που ήδη διαθέτει. Με την τεχνική αυτή ίσως να καταφέρω να κλωνοποιήσω μεγαλύτερες περιοχές των γονιδίων που ψάχνω, τις οποίες να μπορώ στη συνέχεια να χρησιμοποιήσω σε in situ υβριδοποίηση ή και για ανιχνευτές για πιο εύκολη και ειδική σάρωση της βιβλιοθήκης.

Για το γονίδιο *serrate*, τέλος για το οποίο δεν έχω καταφέρει ακόμα να κλωνοποιήσω τμήμα της αλληλουχίας από το αμφίποδο, έχω ξεκινήσει την σάρωση της cDNA βιβλιοθήκης, χρησιμοποιώντας ετερόλογο ανιχνευτή. Προς το παρόν δοκιμάζω διαφορετικές συνθήκες υβριδοποίησης, προκειμένου να πάρω πραγματικά θετικά σήματα στην πρώτη σάρωση.

Στο ενδιάμεσο, εξοικειώνομαι με τον χειρισμό των εμβρύων των αμφιπόδων και της τεχνικής της RNA in situ υβριδοποίησης, χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτές περιοχές του

γονιδίου Ph collier που απομόνωσα κατά την διάρκεια του ελέγχου της first strand cDNA βιβλιοθήκης που κατασκεύασα από το αμφίποδο, καθώς και του Ph hairy, το οποίο μας προσφέρθηκε από τον N. Patel.

Ελπίζω μέσα σε ένα σύντομο χρονικό διάστημα, να έχω καταφέρει να μαζέψω τα απαραίτητα εργαλεία προκειμένου να προχωρήσω στο πολύ ενδιαφέρον κομμάτι της ανάλυσης τους προτύπου της έκφρασης των γονιδίων αυτών, στο αμφίποδο.

## ***Βιβλιογραφία***

Averof, M. and Akam, M. (1995). Hox genes and the diversification of insect and crustacean body plans. *Nature*, **376**, 420-423.

Averof, M. and Akam, M. (1993) Insect-crustacean relationships: Insights from comparative developmental and molecular studies, *Phil.Trans.R.Soc.Lond*, **347**, 293-303.

Averof, M. and Cohen, S. (1997) Evolutionary origin of insect wings from ancestral gills. *Nature*, **385**, 627-630.

Averof, M., Dawes, R. and Ferrier, D. (1996) Diversification of arthropod Hox genes as a paradigm for the evolution of gene functions. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **7**, 539-551.

Axelrod, J.D., Matsuno, K., Artavanis-Tsakonas, S. and Perrimon, N. (1996) Interaction between wingless and Notch signaling pathways mediated by Dishelved. *Science*, **271**, 1826-1832.

Bruckner, K., Perez, L., Clause, H. and Cohen, S.M. (2000) Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature*, **406**, 411-415  
Brusca, R.C. and Brusca G.J. (1990) *Invertebrates* (Sinauer Associates, Sunderland, MA).

Damen, W.G.M., Saridaki, T. and Averof, M. (2002) Diverse adaptations of an ancestral gill: A common evolutionary origin for wings, breathing organs and spinnerets. *Current Biology*, in press.

DeCelis, J.F. and Bray, S. (1997) Feed-back mechanisms affecting Notch activation at the dorsoventral boundary in the *Drosophila* wing. *Development*, **124**, 3241-3251.

Garcia-Bellido, A. Ripoll, P. and Morata, M. (1973) Developmental compartmentalization of the wing disk of *Drosophila*, *Nature*, **245**, 251-253.

Gellon, G. and McGinnis, W. (1998). Shaping animal body plans in development and evolution by modulation of Hox expression patterns. *BioEssays*, **20**, 116-125.

Gerberding, M., Browne, W. and Patel, N. Cell lineage analysis of the amphipod crustacean *Paryale hawaiiensis*, reveals an early restriction of cell fates. Submitted

Gleich, N.R., Browne, W. and Patel, N.H. In situ Hybridization to whole mount embryos using an RNA probe and SDS.

Irvine, K.D. (1999) Fringe, Notch, and making developmental boundaries. *Curr. Opin. Genet. Dev*, **9**, 434-441.

Kukalova-Peck, J. (1991) in *The Insects of Australia*, ed. Naumann, I.D. 141-179 (Melbourne University Press, CSIRO)

Lankester, E.R. (1885) *Quart. J. Microsc. Sci.*, **21**, 504-548.

Milan, M. and Cohen, S. (1999) Notch signaling is not sufficient to define the affinity boundary between dorsal and ventral compartments. *Molecular Cell*, **4**, 1073-1078.



- Milan, M. and Cohen, S.M. (2000) Temporal regulation of Apterous activity during development of the *Drosophila* wing. *Development*, **127**, 3069-3078.
- Milan, M., Weihe, U., Perez, L. and Cohen, S.M. (2001b) The LRR proteins Capricious and Tartan mediate cell interactions during DV boundary formation in the *Drosophila* wing. *Cell*, **106**, 785-794
- Milan, M., Weihe, U., Tiong, S., Bender, W. and Cohen, S. (2001a) *msh* specifies dorsal cell fate in the *Drosophila* wing. *Development*, **128**, 3263-3268.
- Neumann, C.J. and Cohen, S.M. (1998) Boundary formation in the *Drosophila* wing: the POU-domain protein nubbin attenuates Notch activity. *Science*, **281**, 409-413
- Panin, V.M., Papayannopoulos, V., Wilson, R. and Irvine, K.D. (1997) Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature*, **387**, 908-913.
- Raff, R. (2000). Evo-devo: The evolution of a new discipline. *Nature Review in Genetics*, **1**, 74-79.
- Shear, W.A. (1990) in *Arthropod paleobiology*, ed. Mikulic, D.G. (the Paleontological Society), pp. 197-213.
- Shimeld, S.M. and Holland, P.W.H. (2000) Vertebrate innovations. *PNAS*, **97**, 4434-4437.
- Snodgrass, R.E. (1935) *Principles of Insect Morphology* (McGraw Hill, New York)
- Weihe, U., Milan, M. and Cohen, S.M. (2001) Regulation of Apterous activity in *Drosophila* wing development. *Development*, **128**, 4615-4622.
- Wigglesworth, V.B. (1976) in *Insect Flight*, ed Rainey, R.C. 255-269 (Blackwell Scientific, Oxford)
- Wilson, K., Cahil, V., Ballment, E. and Benzie, J. (2000) The complete sequence of the mitochondrial genome of the crustacean *Penaeus monodon*: Are Malacostracan Crustaceans more closely related to Insects than to Branchiopods? *Mol.Biol.Evol*, **17**, 863-874
- Xianguang, H. and Bergstrom, J. (1997) *Fossils and Srata*, **45**, 1-116.