

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΩΝ
ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΩΝ ENHANCER OF SPLIT ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΑ
ΕΝΤΟΜΑ ΚΑΙ ΤΑ ΚΑΡΚΙΝΟΕΙΔΗ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ»

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Χαράλαμπος-Χρυσοβαλάντης Γαλουζής

Βιολόγος

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, Οκτώβριος 2015

Τα μέλη της
Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

Δέσποινα Αλεξανδράκη Χρήστος Δελιδάκης Κωνσταντίνος Τσιγγενόπουλος

Ο Επιβλέπων Καθηγητής

Χρήστος Δελιδάκης

Η έγκριση της διατριβής για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

Ν. 5343/1392, άρθρο 202

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	12
Φυλογενετική ανάλυση	12
Μοριακές κατασκευές	12
Δοκιμασία δύο υβριδίων σε κύτταρα S2 Schneider της <i>Drosophila melanogaster</i>	14
Στελέχη <i>Drosophila melanogaster</i>	14
Ιστοχημική ανίχνευση δραστικότητας β-γαλακτοζιδάσης	15
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	17
Εύρεση του μοτίβου αλληλεπίδρασης μεταξύ των E(spl) και του Scute	17
Φυλογένεση	19
Αλληλεπίδραση μεταξύ του Scute και των E(spl) των <i>Apis mellifera</i> και <i>Daphnia pulex</i>	21
Ετερόλογη έκφραση των <i>Apis mellifera</i> και <i>Daphnia pulex</i> UAS-E(spl) στη <i>Drosophila melanogaster</i>	23
Δοκιμασία της ικανότητας πρόσδεσης στο DNA σε E _C -μοτίβο	24
Δοκιμασία της <i>in-vivo</i> ικανότητας αλληλεπίδρασης με τις προνευρικές πρωτεΐνες	25
Δοκιμασία της ικανότητας καταστολής δημιουργίας των φλεβών του φτερού	26
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	27
Δημιουργία κι εξέλιξη του E(spl)-C	27
Συντήρηση της λειτουργίας των πρωτεϊνών E(spl) της <i>Apis mellifera</i>	29
Συντήρησης της λειτουργίας των πρωτεϊνών E(spl) της <i>Daphnia pulex</i>	29
Συμπεράσματα	30
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	32

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το σύμπλεγμα *Enhancer of split* (*E(spl)*) της *Drosophila melanogaster* αποτελεί ένα καλά μελετημένο σύστημα ομάδας γονιδίων. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται σε αυτό το σύμπλεγμα ανήκουν σε δύο διαφορετικές κλάσεις, τη basic Helix-Loop-Helix-Orange (bHLH-O) και τη Bearded, και συμμετέχουν στη ρύθμιση αλλά και τέλεση της Notch σηματοδότησης. Οι bHLH-O πρωτεΐνες του συμπλόκου παίζουν αξιοσημείο ρόλο κατά την πρόδρομη ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, όπου μέσω της διαδικασίας της πλευρικής αναστολής καθορίζουν τον αριθμό και τη χωρική οργάνωση κυττάρων του νευρικού συστήματος. Το σύμπλεγμα εμφανίζεται συντηρημένο στα Τετρακωνιωτά, αποτελούμενο στα Καρκινοειδή από τέσσερα γονίδια, τρία bHLH-O και δεκατρία στη *Drosophila melanogaster*, όπου λόγω διπλασιασμών περιέχει επτά bHLH-O. Σε αυτή την εργασία, μελετάμε τις φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των πρωτεϊνών, που κωδικοποιούνται στο σύμπλεγμα στα Τετρακωνιωτά όπως επίσης, και τη λειτουργική συντήρηση των πρωτεϊνών *E(spl)*, των *Apis mellifera* και *Daphnia pulex*. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των *E(spl)* και των προνευρικών πρωτεϊνών είναι συντηρημένη για όλες τις πρωτεΐνες της *Apis mellifera* και για δύο από τις τρεις στη *Daphnia pulex*. Επίσης, προσδένονται στο ίδιο μοτίβο στο DNA και τέλος, μιμούνται φαινοτύπους υπερέκφρασης των *E(spl)*, σε διαγονιδιακά στελέχη *Drosophila melanogaster*. Έτσι, καταδεικνύουμε πως το γονιδιακό ρυθμιστικό δίκτυο υπεύθυνο για τις νευροαναπτυξιακές διαδικασίες είναι συντηρημένο τόσο σε επίπεδο αλληλουχιών όσο και σε επίπεδο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.

ABSTRACT

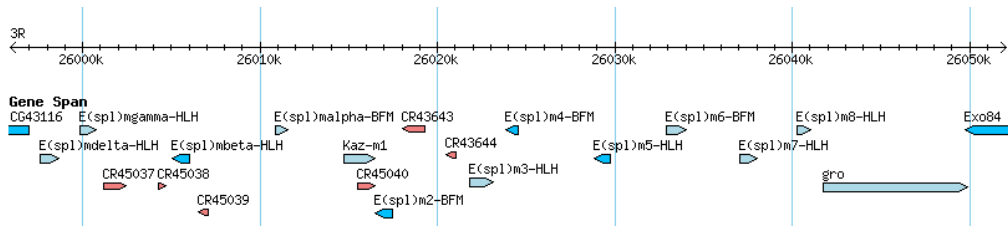
The *Enhancer of split complex* of *Drosophila melanogaster* constitutes a very well studied system of a gene cluster. The proteins that are encoded in that complex belong to two different groups, the basic-Helix-Loop-Helix-Orange and Bearded, and participate in the regulation and execution of Notch signaling. The bHLH-O proteins of the complex play a significant role in the early development of the nervous system, where through the procedure of lateral inhibition, they specify the number and the spatial organization of the cells of the nervous system. The complex is conserved in Tetraconata, consisted of four genes in Crustaceans, three of which are bHLH-O and thirteen in *Drosophila melanogaster*, in which due to duplication it consists of seven bHLH-O. In this paper, we study the phylogenetic relationships between the proteins encoded in the complex in Tetraconata as well as the functional conservation of E(spl) proteins of *Apis mellifera* and *Daphnia pulex*. The interactions between the E(spl) and the proneural proteins is conserved for all the *Apis mellifera* proteins and for the two out of the three of *Daphnia pulex*. Also, they bind in the same motif on the DNA and at last, they mimic phenotypes of E(spl) overexpression in transgenic lines of *Drosophila melanogaster*. Thus, we demonstrate that the gene regulatory network responsible for the neurodevelopmental processes are conserved both at the sequence level and at the level of protein interactions.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η υπερικογένεια πρωτεϊνών βασική έλικα-βρόχος-έλικα (basic Helix-Loop-Helix, bHLH) αποτελούν μια θεμελιώδη ομάδα μεταγραφικών παραγόντων, η οποία είναι παρούσα σε ολόκληρη την επικράτεια των ευκαρυωτικών οργανισμών. Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες χαρακτηρίζονται, δομικά, από την ύπαρξη μίας bHLH επικράτειας, η βασική περιοχή της οποίας έχει την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA, κι ακολουθείται από δύο α-έλικες, διαχωριζόμενες από μία ποικίλλουσα θηλιά, που έχουν την ικανότητα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων και τη δημιουργία διμερών (Jones 2004). Μεταξύ αυτών, δύο οικογένειες, οι HES (Hairy/ Enhancer of Split) και HEY (Hairy/ Enhancer of Split related with YRPW motif) διαθέτουν, επιπλέον μία, την Orange επικράτεια, απαραίτητη για τη λειτουργία τους ως μεταγραφικοί ρυθμιστές κι επίσης, στο καρβοξυτελικό τους άκρο το τετραπεπτίδιο WRPW ή YRPW, υπεύθυνο για τη συστράτευση συγκαταστολέων της οικογένειας groucho/TLE1-4 (Gazave et al, 2014).

Στη *Drosophila melanogaster* οι bHLH-Orange (bHLH-O) οικογένειες εκπροσωπούνται από τις Enhancer of split (*E(spl)*), Protein hairy (*h*), Protein deadpan (*dpn*), Clockwork orange (*cwo*), Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein (*Hey*), Zinc finger protein HER (*Hesr*), similar to deadpan (*Sidpn*) πρωτεΐνες.

Το σύμπλεγμα *Enhancer of Split* (Enhancer-of-split complex, *E(spl)-C*) αποτελεί μια περιοχή γύρω στα 60kb, η οποία περιέχει 13 γονίδια (Delidakis & Artavanis-Tsakonas, 1992; Klämbt, C. et al, 1989). Τα 7 γονίδια του συμπλέγματος, *E(spl) mδ, mγ, mβ, m3, m5, m7 & m8*, κωδικοποιούν για παράλογες bHLH-O πρωτεΐνες. Τα 4 γονίδια του συμπλέγματος, *BFM-mα, mβ, m4 & m2*, κωδικοποιούν για παράλογες πρωτεΐνες της οικογένειας Bearded (Bearded Family Members, BFM). Επίσης, στο σύμπλεγμα υπάρχει το γονίδιο *Kaz-m1*, το οποίο κωδικοποιεί για έναν αναστολέα πρωτεασών τύπου Kazal, και το γονίδιο *groucho*, το οποίο κωδικοποιεί για έναν πρωτεϊνικό συγκαταστολέα, απαραίτητο για τη δράση των *E(spl)* πρωτεϊνών (Monastirioti et al, 2014). Όλα τα γονίδια του συμπλέγματος, εκτός από το *Kaz-m1*, αποκρίνονται στη Notch σηματοδότηση (Wurmbach, E. et al, 1999).



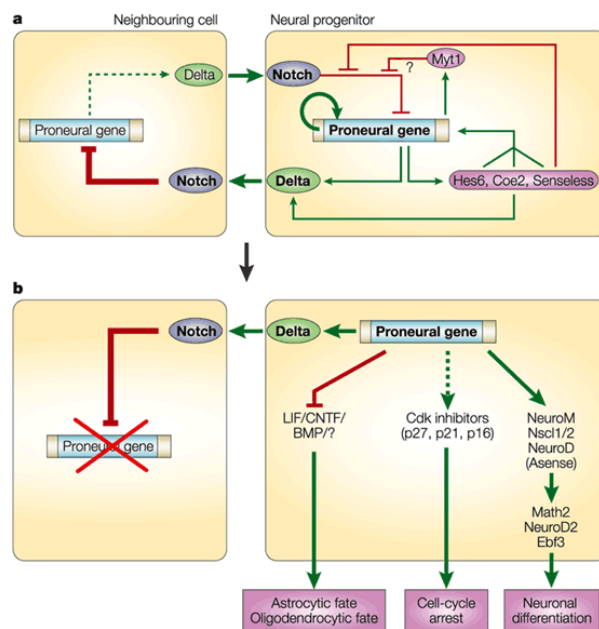
Εικόνα 1. Το *E(spl)-C* της *Drosophila melanogaster*. Διακρίνονται όλα τα γονίδια του συμπλέγματος. Πηγή :flybase.org

Οι BFM πρωτεΐνες, οι οποίες κωδικοποιούνται στο *E(spl)-C*, λειτουργούν κατά τη δημιουργία των πρόδρομων αισθητήριων δομών του ενηλίκου (adult sensory precursors) σαν ανταγωνιστές της Notch σηματοδότησης. Έχει, επίσης,δειχθεί ότι αλληλεπιδρούν με την E3 λγάση ουβικιτίνης, Neuralized, με στόχο την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης Delta (Lai, E. C. et al, 2000).

Όσον αφορά τη λειτουργία των bHLH-O πρωτεϊνών του *E(spl)-C*, η κλασσική γενετική ανάλυση έχει δείξει ότι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας (μεταλλάσσοντας μέχρι και 2 γονίδια) μπορούν να μην έχουν επίδραση στη βιωσιμότητα του οργανισμού είτε, επίσης, να μη φέρουν κάποιον σχετικά ιδιαίτερο φαινότυπο. (Monastirioti et al, 2014). Παρόλα αυτά φαίνεται ότι τα γονίδια του συμπλέγματος, ιδιαίτερα κατά την ανάπτυξη, έχουν διακριτά πρότυπα έκφρασης (Cooper, M. T. et al, 2000), πράγμα που δείχνει ότι τα γονίδια είναι προϊόν πρόσφατων διπλασιασμών με αποτέλεσμα να μην έχουν προλάβει να ποικιλοποιηθούν ακόμη.

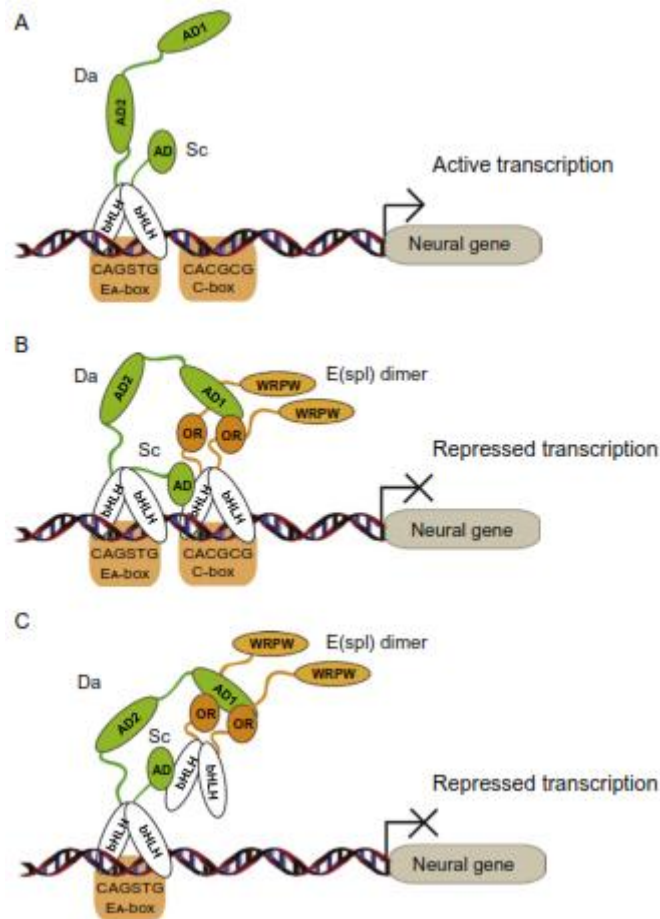
Οι E(spl) πρωτεΐνες έχουν εμπλακεί σε διάφορες αναπτυξιακές διαδικασίες, σημαντικότερη συνεισφορά, όμως, έχουν στις υπεύθυνες διαδικασίες για τη μορφογένεση του νευρικού συστήματος της *Drosophila melanogaster*. Μια από τις σπουδαιότερες διαδικασίες είναι η πλευρική αναστολή (lateral inhibition) κατά τα πρόδρομα στάδια του καθορισμού και της δέσμησης των κυττάρων του νευρικού συστήματος. Σε αυτό το στάδιο άλλη μία ομάδα bHLH πρωτεϊνών παίζει καθοριστικό ρόλο, που κωδικοποιούνται από το σύμπλεγμα *achaete-scute* (*achaete-scute* complex, AS-C), το οποίο αποτελείται από τέσσερα γονίδια, τα *achaete* (ac), *scute* (sc), *lethal of scute* (lsc), και *asense* (as). Τα τρία πρώτα λέγονται και προνευρικά λόγω της λειτουργίας τους και προσδέονται στο DNA σε A E-μοτίβο, που περιέχει το CAGSTG (García-Bellido, A. 1979). Κατά τη διάρκεια της πλευρικής αναστολής η

Notch σηματοδότηση εξασφαλίζει ότι μόνο ένα κύτταρο, μίας ομάδας κυττάρων με την ίδια πιθανότητα απόκτησης μιας συγκεκριμένης μοίρας, έχει τη δυνατότητα απόκτησης αυτής της μοίρας. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της νευρογένεσης στη *Drosophila melanogaster* εκφράζονται τα προνευρικά γονίδια σε μικρές ομάδες κυττάρων, που ονομάζονται προνευρικές συστάδες (Proneural Clusters). Οι προνευρικοί παράγοντες οδηγούν την έκφραση ή/και τη διευκόλυνση του, προσδέτη του Notch, Delta. Έτσι, όταν τα κύτταρα εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα έναν προνευρικό παράγοντα, γίνονται προοδευτικά καλύτερα στο να ενεργοποιήσουν το Notch στα γειτονικά κύτταρα. Όταν, λοιπόν, το Delta ενεργοποιήσει το Notch σε ένα γειτονικό κύτταρο της προνευρικής συστάδας, υπόκειται σε μία σειρά πέψεων κι έτσι η ενδοκυτταρική επικράτεια του υποδοχέα (Notch Intracellular Domain, NICD) μεταναστεύει στο πυρήνα, όπου δημιουργώντας μεταγραφικά συμπλέγματα με πρωτεΐνες, όπως η Suppressor of Hairless (Su(H)) και η Mastermind, ενεργοποιεί την έκφραση των γονιδίων του *E(spl)-C*. Αυτοί οι μεταγραφικοί καταστολείς αλληλεπιδρούν με τους προνευρικούς, προσδενόμενοι και μη στο DNA σε E (CACGTG), C (CACGCG), N-κουτιά (CACNAG), κι έτσι, καταστέλλεται η έκφραση των γονιδίων, που είναι απαραίτητα για την απόκτηση της νευρικής μοίρας (Kiparaki, M. et al. 2015; Lemke, G. 2010; Hori, K. et al. 2013).



Nature Reviews | Neuroscience

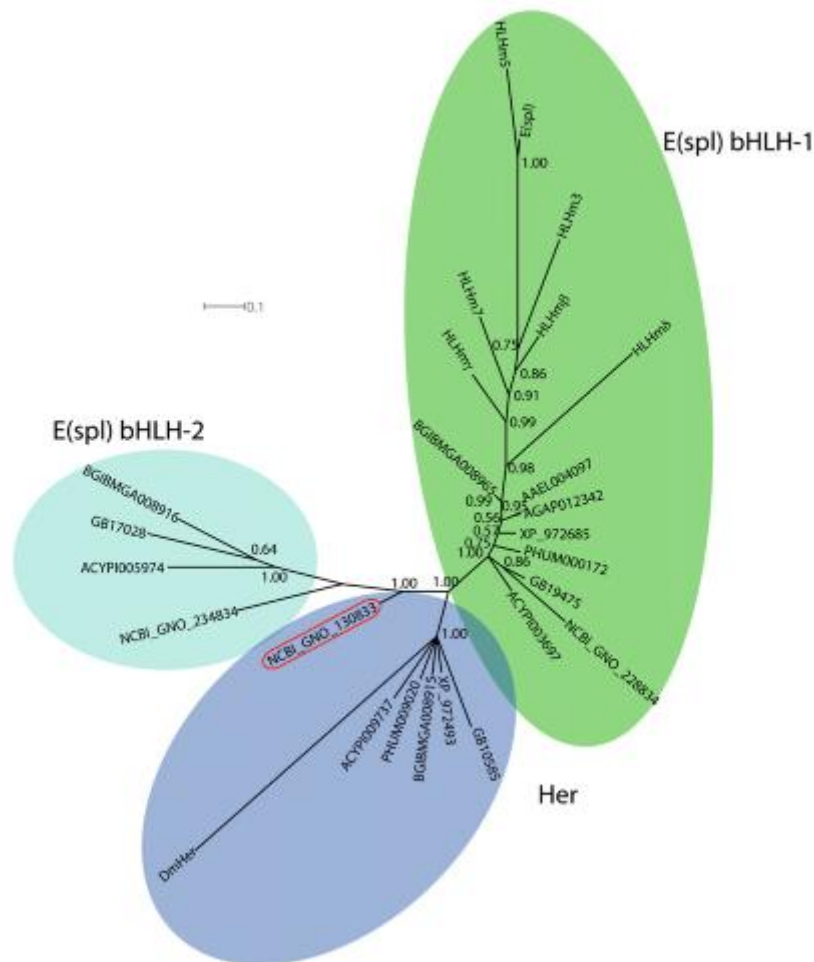
Εικόνα 2. Η διαδικασία της πλευρικής αναστολής όπως πραγματοποιείται κατά τη πρόδρομη διαφοροποίηση του νευρικού συστήματος. Πηγή: Bertrand, N. et al. 2002.



Εικόνα 3. Αλληλεπίδραση της προνευρικής πρωτεΐνης, Scute, με τη Daughterless και η (A) επικείμενη μεταγραφική ενεργοποίηση των νευρικών γονιδίων. Αλληλεπίδραση με τις E(spl) κι επικείμενη καταστολή της έκφρασης των νευρικών γονιδίων με (B) πρόσδεση και (C) μη στο DNA. Πηγή: Monastrioti, M. et al. 2014.

Το *E(spl)-C* φαίνεται να είναι συντηρημένο ως σύμπλεγμα στα Τετρακωνιωτά (Tetraconata) ή Πανκαρκινοειδή (Pancrustaceans), όπου αποτελούν ένα κλάδο που περιλαμβάνει τα υπόφυλα, Καρκινοειδή κι Εξάποδα. Μαζί με τα Μυριάποδα και τα Χηληκεραιωτά συνιστούν το φύλο Αρθρόποδα (Richter, S. 2002). Φυλογενετικές αναλύσεις συμπεραίνουν ότι το *E(spl)-C* προέκυψε από ένα αρχέγονο “*Urcomplex*”, αποτελούμενο από ένα *E(spl)* κι ένα *bearded* γονίδιο. Το ενδιαφέρον στοιχείο του συμπλέγματος είναι ότι οποιοδήποτε γονίδιο εισέρχεται σε αυτό, ρυθμίζεται και ρυθμίζει τη Notch σηματοδότηση, ακόμη και γονίδια που είναι φαινομενικά άσχετα μεταξύ τους στη λειτουργία, όπως ένα *E(spl)* κι ένα *bearded*. Η ανάλυση των E(spl) πρωτεϊνών στα Τετρακωνιωτά δημιουργεί τρεις ομάδες τις bHLH1, bHLH2 και HER. Το *Hesr* στη *Drosophila melanogaster* δε βρίσκεται εντός του συμπλέγματος αλλά

ομαδοποιείται, μεταξύ όλων των bHLH-O των Τετρακωνιωτών, με τις E(spl). Συνεπώς, το σύμπλεγμα που περιλαμβάνει τα τέσσερα γονίδια φαίνεται να έχει μεγάλη εξελικτική ιστορία, που πάει πίσω στο κοινό τους πρόγονο, δηλαδή περίπου 420 εκατομμύρια χρόνια πριν, και το οποίο φαίνεται να έχει δημιουργηθεί μεταξύ των 550 και 420 εκατομμυρίων χρόνων πριν, δηλαδή μετά το διαχωρισμό των Τετρακωνιωτών και του κλάδου των Χηληκεραιωτών και Μυριαπόδων.



Εικόνα 4. Μη ριζωμένο φυλογενετικό δέντρο που περιλαμβάνει τις E(spl) μελών των Τετρακωνιωτών. Δημιουργήθηκε με τη Bayesian στατιστική χρησιμοποιώντας ολόκληρες τις αλληλουχίες των πρωτεϊνών. Πηγή: Duncan, E. et al. 2011.

Η *Drosophila melanogaster* έχει 7 E(spl), που είναι διπλασιασμοί του *bHLH1*, καθώς τα *bHLH2* και *Hesr* απουσιάζουν από όλα τα δίπτερα, με την εξαίρεση ότι το *Hesr* στη *Drosophila melanogaster* είναι εκτός του συμπλέγματος (Duncan, E. J., & Dearden, P. K. 2010; Dearden, P. K. 2015).

Στο επίπεδο της λειτουργίας τα γονίδια του *E(spl)-C*, σε όσους οργανισμούς έχουν μελετηθεί είτε στο επίπεδο του προτύπου έκφρασης είτε στο επίπεδο ακόμη και πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων φαίνεται πως είναι συντηρημένα λειτουργικά. Για παράδειγμα, στο *Tribolium castaneum* οι *E(spl)* αλληλεπιδρούν με τις προνευρικές πρωτεΐνες όπως, επίσης, μιμούνται και τους φαινοτύπους που προκαλούνται από υπερέκφραση των *E(spl)* σε διαγονιδιακές *Drosophila melanogaster* (Kux, K. et al. 2013). Στην *Apis mellifera*, το πρότυπο έκφρασης των *E(spl) mRNA* προτείνει ρόλο στην ανάπτυξη του εγκεφάλου, του στοματικού συστήματος και της τραχείας (Duncan, E. J., & Dearden, P. K. 2010). Η έκφραση των γονιδίων, που είναι μελετημένα στη *Drosophila melanogaster* με πιστοποιημένο ρόλο στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, όπως είναι οι προνευρικές πρωτεΐνες, ο μεταγραφικός παράγοντας με δάκτυλο ψευδαργύρου snail και ο ομοιοτικός μεταγραφικός παράγοντας prospero, στη *Daphnia magna* υποδεικνύουν σημαντικό ρόλο και παρόμοια χρονική αλληλουχία έκφρασης κατά την οντογένεση του νευρικού συστήματος του καρκινοειδούς (Ungerer, P. et al. 2011; Ungerer, P. et al. 2012).

Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιώντας υπολογιστικές φυλογενετικές μεθόδους καταδεικνύουμε τις σχέσεις μεταξύ των πρωτεϊνών των Τετρακωνιωτών που κωδικοποιούνται στο σύμπλεγμα. Επίσης, με δοκιμασίες βασισμένες σε κυτταροκαλλιέργειες προσπαθούμε να πιστοποιήσουμε τη συντήρηση των αλληλεπιδράσεων των *E(spl)* με τις προνευρικές πρωτεΐνες, κάτι που το πιστοποιούμε κι από γενετικές δοκιμασίες έπειτα από εκτοπική έκφραση σε στελέχη *Drosophila melanogaster* καθώς και να εντοπίσουμε τα σημαντικά αμινοξέα για αυτή την αλληλεπίδραση. Επιπλέον, ελέγχουμε την συντήρηση της πρόσδεσης στο DNA στα ίδια μοτίβα καθώς και την ικανότητα δημιουργίας των ίδιων φαινοτυπικών διαφορών, που προκαλούνται από υπερέκφραση των *E(spl)* της *Drosophila melanogaster*. Στόχος, είναι η κατανόηση της ανάπτυξης και της εξέλιξης του νευρικού συστήματος των Τετρακωνιωτών.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Φυλογενετική ανάλυση

Για τη φυλογενετική ανάλυση απομονώθηκαν οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες από την ENSEMBL βάση δεδομένων μέσω του εργαλείου blast χρησιμοποιώντας ως query αλληλουχία την E(spl) m7 της *Drosophila melanogaster* και e-value=10⁻⁹. Έπειτα οι αλληλουχίες, ελέγχθηκαν για την ταυτόχρονη ύπαρξη και των bHLH και Orange επικρατειών και χρησιμοποιήθηκαν αυτές, που διέθεταν και τις δύο. Η στοίχιση πραγματοποιήθηκε με το MAFFT λογισμικό κι επεξεργάστηκε με τη βοήθεια του Jalview. Η παράλληλη έκδοση του PhyML-3.1 χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία των φυλογενετικών δέντρων. Η επεξεργασία των δέντρων έγινε με το Dendroscope και η οπτική επεξεργασία με το Adobe Illustrator CC 2015.

Μοριακές κατασκευές

Τα γονίδια της *Daphnia pulex*, *bHLH2* και *bHLH3*, συντέθηκαν χημικά και κλωνοποιήθηκαν στον pUC57 φορέα από την Genscript, με τροποποιημένη κωδική αλληλουχία με στόχο τη βέλτιστη έκφρασή τους σε κύτταρα *Drosophila melanogaster*. Κλωνοποιήθηκαν στον pUAST φορέα, καθοδικά της επικράτειας πρόσδεσης του GAL4, με τα *EcoRI* και *XhoI*. Στον RactHAdh κλωνοποιήθηκαν, καθοδικά του actin5C υποκινητή, με τα *BamHI* και *PstI* αφότου κλωνοποιήθηκαν με PCR με εκκινήτες: 5'-ATAGGATCCATGCCCTCCCACCC-3' και 5'-ATCTGCAGTTACCAGGGGCGC-3' για το *bHLH2* και 5'- ATAGGATCCATGGCCTCCAC-3' και 5'- ATCTGCAGTTACCAGGGGC-3' για το *bHLH3*. Το *bHLH1* της *Daphnia pulex* στάλθηκε κλωνοποιημένο από τον P.Dearden στον pBlueScript KS+ και διορθώθηκε η 3' κωδική περιοχή του με το ολιγονουκλεοτίδιο 5'-ACTTAGAATTCTTACCACGGGCGCCACACGCTGCTGGTGGACGAGGTCTTGGACGACGGGCGCTCCATGGCGT-3' και θέσεις αναγνώρισης τα *EcoRI* και *NcoI*. Το κωδικόνιο έναρξης διορθώθηκε με PCR με το site directed mutagenesis kit της SIGMA κι ακολουθώντας το αντίστοιχο πρωτόκολλο

της εταιρίας με εκκινητή 5'- CGAGAGTCACAACCTGGAGCCATATGAAGCTTATCG -3'.

Το γονίδιο, της *Apis mellifera*, *bHLH2* στάλθηκε κλωνοποιημένο από τον P.Dearden στον pBlueScript KS+ και διορθώθηκε με ένα ολιγονουκλεοτίδιο με θέσεις αναγνώρισης για το *PstI*: 5'- AACTGCAGATGATGTCATACGAATTTCCATCAGTTTTCAAAGACATATCGGTATAAAAAGATAACGAAGCCATTGTTGGAAAGAAAACGGCGTGCGGCATAAATAAATGTCTGGATGAGTTGAAAAATCTTATGATAGATGCATTAGAGACGGAAGGGGAGGACATAAGCAAGCTGGAGAAAGCGGACATTCTGGAGTTGACCGTGCGCCATTTACAAAGACTGCAGGG -3'.

Το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης διορθώθηκε με μεταλλαξιγένεση με το kit της SIGMA, όπως παραπάνω, με τον εκκινητή 5'- GATCCTATGTGGCGGCCATGGTGATTATCGATACCGTCGACC -3'. Για τη διόρθωση του γονιδίου, της *Apis mellifera*, *bHLH1* χρησιμοποιήθηκε, αντίστοιχα, ο εκκινητής 5'-CGAGCCAATTTGAGACCATGGTAATCATGCAGCCCGGGG -3'. Για τη διόρθωση του γονιδίου, της *Apis mellifera*, *bHLH3* κλωνοποιήθηκε τμήμα από γενωμικό DNA και στη συνέχεια κλωνοποιήθηκε με τα *AsuII* και *HindIII*, με τους εκκινητές: 5'-GAGTCTTCGAAGGCAGCCACCG-3' και 5'-ATGAAGCTTATGGCACCAGCA CACCAGCTAC -3'.

Για τη μεταλλαξιγένεση του *E(spl) m7* της *Drosophila melanogaster* χρησιμοποιήθηκε το kit της SIGMA με τους παρακάτω εκκινητές:

5'-CGAAAACCTATCAGTACGCCAAGGTCATGAAGCCC-3'
(R56A)

5'-CGAGATGTTCGAAAACAGCTGCGTACCGCAAGGTGATGAAGCCC-3'
(Y53A;Q54A)

5'-CGAGATGTTCGAAAACAGCAGCGGCCCGCCAAGGTGATGAAGCC-3'
(Y53A;Q54A;Y55A;R56A)

Δοκιμασία δύο υβριδίων σε κύτταρα S2 Schneider της *Drosophila melanogaster*

Η δοκιμασία δύο υβριδίων πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα S2 (Schneider 1971) της *Drosophila melanogaster*, ο χειρισμός των οποίων έγινε με βάση το πρωτόκολλο που παρέχει το Drosophila Genomics Resource Center. Στη δοκιμασία χρησιμοποιήθηκαν όλα τα κλωνοποιημένα *E(spl)* γονίδια στον RacthAdh φορέα. Επίσης, μια χιμαιρική μορφή του *Scute* ενωμένη με την επικράτεια πρόσδεσης του GAL4 και ως γονίδιο αναφοράς, το γονίδιο της λουσιφεράσης, όπου κλωνοποιήθηκε με το στοιχείο απόκρισης UAS ανοδικά του. Τα συγκεκριμένα πλασμίδια έχουν περιγραφεί στα Giagtzoglu et al. (Giagtzoglu et al., 2005) and Zarifi et al. (Zarifi et al., 2012).

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στους 25 °C σε M3 θρεπτικό μέσο, που περιλάμβανε 10% θερμικά απενεργοποιημένο ορό εμβρύου βοοειδούς και γενταμυκίνη ως αντιβιοτικό. Περίπου 5×10^5 κύτταρα/0,5 ml χρησιμοποιήθηκαν για παροδική διαμόλυνση με τη μέθοδο καθίζησης φωσφορικού ασβεστίου. Τα κύτταρα συλλέγονταν μία ημέρα μετά τη διαμόλυνση και λύονταν σε διάλυμα 0,25M Tris – HCl pH:7,8 με τη βοήθεια υπερήχων. Σε κάθε δοκιμασία τα κύτταρα διαμολύνονταν με 1μg συνολικού DNA από το οποίο το 0,1μg ήταν hs-lacZ για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Για τη μέτρηση της ενεργότητας λουσιφεράσης καθώς και γαλακτοζιδάσης χρησιμοποιήθηκαν 20μl από τα 100μl λύματος, από το κάθε δείγμα. Η ενεργότητα λουσιφεράσης μετρήθηκε σε ένα TD-20/20 λουμινόμετρο. Κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον τρεις ανεξάρτητες φορές. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αναπαριστούν την μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα των τριών ανεξάρτητων φορών για μία δοκιμασία.

Στελέχη *Drosophila melanogaster*

Όλα τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία καλλιεργούνται σύμφωνα με τα γνωστά πρωτόκολλα (Ashburner 1989).

Τα διαγονιδιακά στελέχη δημιουργήθηκαν με την ένεση των πλασμιδίων που κλωνοποιήθηκαν στους φορείς pUAST (Brand and Perimon, 1993) στο στέλεχος yw^{67c23} . Στον φορέα pUAST το ένθεμα κλωνοποιείται μεταξύ των άκρων του μεταθετού στοιχείου P, όπου βρίσκεται και το γονίδιο μάρτυρας *mini-white*, για τη θετική επιλογή των μετασχηματισμένων μυγών. Για την ένεση του παραπάνω

τμήματος στο γονιδίωμα της *Drosophila melanogaster* απαιτείται και η τρανσποζάση P, η οποία παρέχεται μέσω του πλασμιδίου-βοηθού, το οποίο, επίσης, ενίεται.

Η εκτοπική έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων βασίστηκε στο σύστημα UAS-GAL4, τα στελέχη GAL4, που χρησιμοποιήσαμε στην παρούσα εργασία ήταν τα εξής:

1) $\frac{EE4-lacZ; pnr-Gal4}{T(2;3)}$, είναι ένας τεχνητός μάρτυρας, που καθοδηγείται από μία παράλληλη συστοιχία E_A κουτιών (υψηλής συνάφειας πρόσδεση Daughterless/Scute) κι ενεργοποιείται ισχυρά από την ενδογενή κι εκτοπική έκφραση του Scute. Ο καθοδηγητής pnr οδηγεί την έκφραση του GAL4 στο νωτιαίο τμήμα του αναπτυξιακού δίσκου φτερού, που θα δώσει το μελλοντικό ημιθώρακα.

2) $\frac{en-Gal4; vgQ\mu2-lacZ}{T(2;3)}$, είναι ένας τεχνητός μάρτυρας, που καθοδηγείται από τον ενισχυτή *vestigial quadrant* (vgQ) κι οδηγεί την έκφραση των αλληλουχιών που ελέγχει σε όλη τη περιοχή του αναπτυξιακού δίσκου, που θα δώσει το φτερό στο ενήλικο άτομο. Το συγκεκριμένο μετάλλαγμα του ενισχυτή, περιλαμβάνει το πυρήνα του κουτιού E_C, πλαισιωμένο από τις ιδανικές τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες (tgCACGCGcca), το οποίο αποτελεί τη βέλτιστη θέση πρόσδεσης για τις E(spl) και δημιουργήθηκε από τον Κ. Κουμπανάκη (αδημοσίευτα αποτελέσματα). Ο καθοδηγητής en οδηγεί την έκφραση του GAL4 σε όλο το οπίσθιο διαμέρισμα του αναπτυξιακού δίσκου φτερού.

3) $\frac{Omb-Gal4}{FM7}$, είναι ένας τεχνητός μάρτυρας για τις φλέβες του φτερού. Το Omb οδηγεί την έκφραση του GAL4 στη κεντρική περιοχή εκατέρωθεν του προσθοπίσθιου άξονα του αναπτυξιακού δίσκου φτερού, με την έκφραση, των αλληλουχιών που ελέγχει, να εξασθενεί όσο απομακρύνεται από αυτή.

Ιστοχημική ανίχνευση δραστηριότητας β-γαλακτοζιδάσης

Η ανατομία περιπλανώμενων προνυμφών τρίτου σταδίου γίνεται σε διάλυμα 1XPBS. Αφού απομακρυνθούν οι δίσκοι του φτερού (η συλλογή τους δεν πρέπει να διαρκέσει περισσότερο από 20 λεπτά), μονιμοποιούνται για 10 λεπτά σε διάλυμα 1% γλουταραλδεΐδης σε 1XPBS σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν τρία γρήγορα

πλυσίματα με 1XPBS και ακολουθεί η αντίδραση χρώσης, η οποία πραγματοποιείται στο εξής διάλυμα:

pH 7,2

150mM NaCl

1mM MgCl₂

10mM NaPO₄

3mM K₄[FeII(CN)₆]

3mM K₄[FeIII(CN)₆]

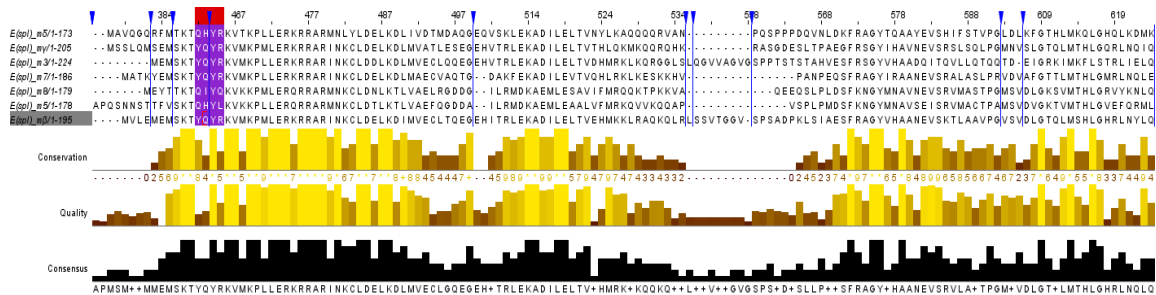
0,3% Triton X-100

Στο παραπάνω διάλυμα γίνεται προσθήκη X-gal σε τελική συγκέντρωση 0,2% (20μl 5% ανά 500μl διαλύματος χρώσης). Η αντίδραση πραγματοποιείται σε σκοτεινό θάλαμο στους 37°C για όσο χρόνο κρίνεται απαραίτητο. Η αντίδραση τερματίζεται μεταφέροντας τους δίσκους σε διάλυμα 1XPBS κι ακολουθεί η τοποθέτηση των δίσκων σε αντικειμενοφόρο πλάκα σε διάλυμα 80% γλυκερόλης σε 1XPBS και άμεση φωτογράφιση, για να αποφευχθεί η διάχυση της χρώσης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Εύρεση του μοτίβου αλληλεπίδρασης μεταξύ των E(spl) και του Scute

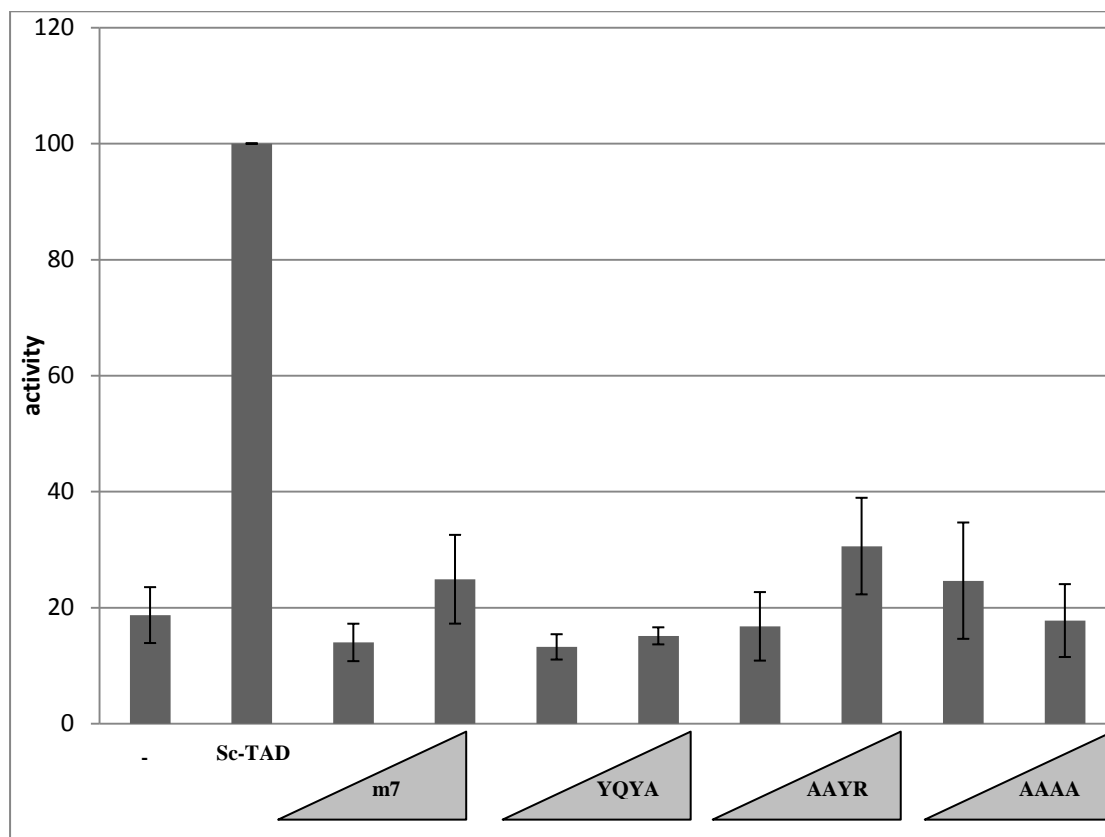
Όπως έχει αναφερθεί στην εισαγωγή για την πλευρική αναστολή είναι απαραίτητη η αλληλεπίδραση μεταξύ των E(spl) πρωτεϊνών και των προνευρικών, όπως του Scute. Σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου μας έχει χαρτογραφηθεί, μέσω της δημιουργίας κλώνων με διαδοχικά ελλείμματα, πως στην αλληλεπίδραση μεταξύ τους λαμβάνει μέρος το τμήμα του αμινοτελικού άκρου της bHLH επικράτειας (Kiraraki, M. 2015). Αυτά τα αποτελέσματα σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η πρωτεΐνη, E(spl) mδ, δεν αλληλεπιδρά με το Scute μας οδήγησε στην υπόθεση ότι το τετραπεπτίδιο YQYR, το οποίο βρίσκεται στην αρχή της bHLH επικράτειας, είναι υπεύθυνο για την αλληλεπίδραση. Έτσι, δημιουργήσαμε τους εξής, τρεις, μεταλλαγμένους κλώνους του E(spl) m7: R56A, Y53A;Q54A και Y53A;Q54A;Y55A;R56A, δημιουργώντας δηλαδή τα τετραπεπτίδια, YQYA, AAYR και AAAA, αντίστοιχα.



Εικόνα 5. Στοιχισμός των επικρατειών bHLH και Orange των πρωτεϊνών του E(spl)-C της *Drosophila melanogaster*. Δημιουργήθηκε με το mafft λογισμικό χρησιμοποιώντας την επαναληπτική μέθοδο βελτισποίησης E-INS-i και μήτρα βαθμολόγησης BLOSUM 62. Επεξεργάστηκε και οπτικοποιήθηκε στο Jalview λογισμικό.

Για να ελέγξουμε την αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών πραγματοποιήσαμε δοκιμασία δύο υβριδίων σε κύτταρα Schneider της *Drosophila melanogaster*, τα οποία δεν εκφράζουν ούτε το Scute ούτε τα E(spl). Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια που περιείχαν: 1) το γονίδιο της λουσιφεράσης, όπου ανοδικά του υπήρχε το UAS (Upstream Activation Sequence) στοιχείο, 2) ένα χιμαιρικό γονίδιο που

περιείχε, τμήμα του γονιδίου *scute*, το οποίο κωδικοποιεί την επικράτεια μεταγραφικής ενεργοποίησης (260-345) (Sc-TAD) και την επικράτεια πρόσδεσης GAL4, 3) καθένα από τα μεταλλάγματα του *E(spl) m7*.

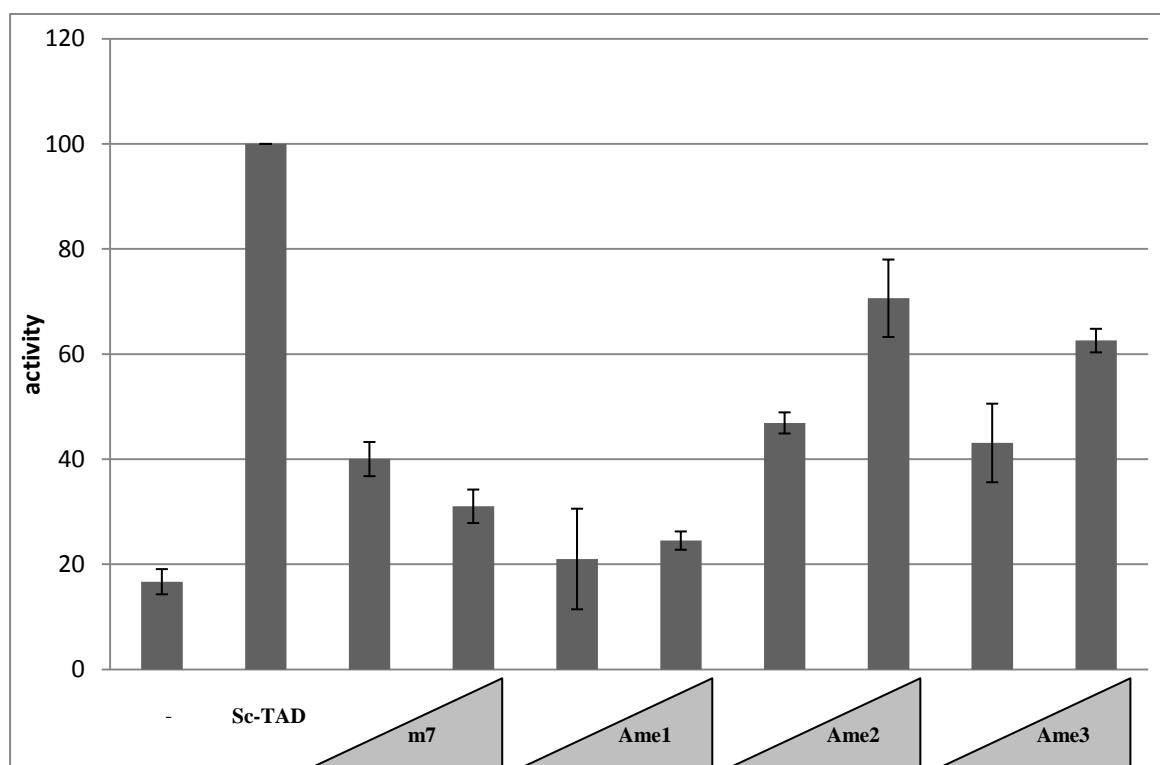


Εικόνα 6. Οι μεταλλαγμένες μορφές *E(spl) m7* R56A, Y53A;Q54A και Y53A;Q54A;Y55A;R56A αλληλεπιδρούν με το Scute. Μετρήθηκε ενεργότητα λουσιφεράσης σε κύτταρα Schneider, τα οποία διαμολύνθηκαν παροδικά με τα *UAS-tk-luc*, με την επικράτεια ενεργοποίησης του Scute ενωμένη με την επικράτεια πρόσδεσης του GAL4 και τις αντίστοιχες μορφές της *E(spl) m7*. Η πρώτη στήλη (-) αντιπροσωπεύει τη βασική ενεργότητα της λουσιφεράσης. Η δεύτερη στήλη αντιπροσωπεύει την ενεργοποίηση από τη χμαιρική μορφή του Sc-TAD με την επικράτεια πρόσδεσης στο DNA του GAL4. Οι υπόλοιπες στήλες έχουν διαμολυνθεί, εκτός από τα προαναφερθέντα, με το *E(spl) m7* και τα διάφορα μεταλλάγματά του σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Οι τιμές που φαίνονται είναι μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα από τρεις ανεξάρτητες δοκιμές.

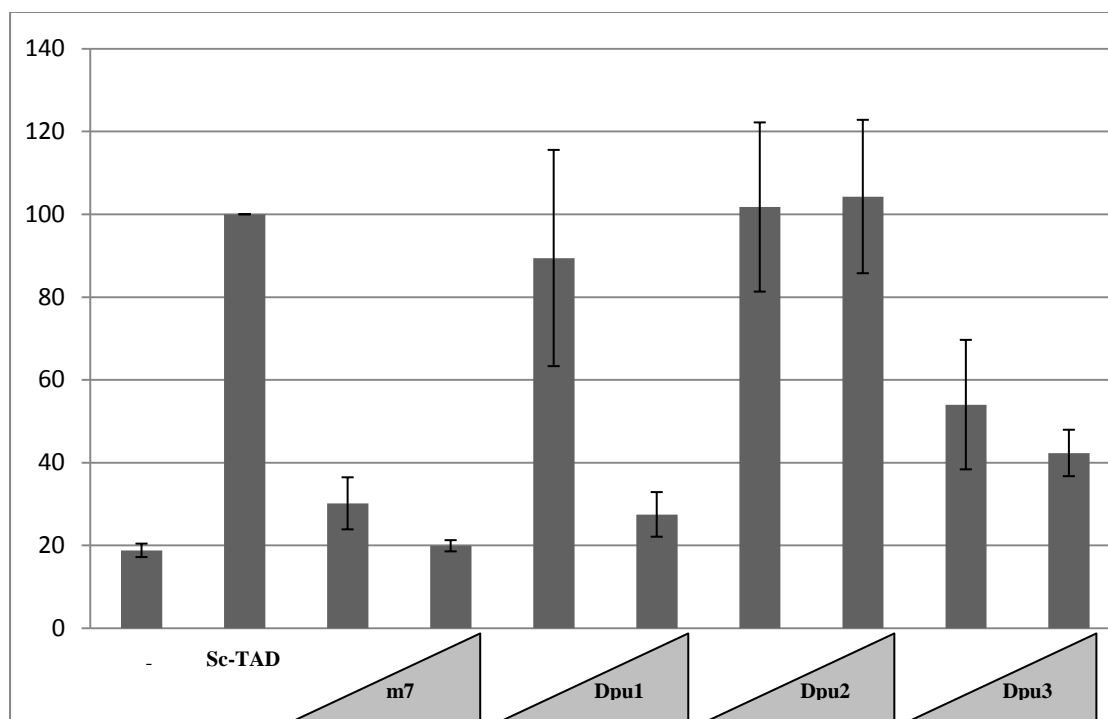
Με το σύστημα των δύο υβριδίων επιβεβαιώσαμε ότι οι μεταλλάξεις, που δημιουργήσαμε, δεν διατάραξαν την αλληλεπίδραση μεταξύ των *E(spl) m7* και του Scute.

Αλληλεπίδραση μεταξύ του Scute και των E(spl) των Apis mellifera και Daphnia pulex

Χρησιμοποιώντας το σύστημα των δύο υβριδίων, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, εξετάσαμε την ικανότητα αλληλεπίδρασης των E(spl) των *Apis mellifera* και *Daphnia pulex*, προσπαθώντας να βγάλουμε συμπεράσματα σε σχέση με τη συντήρηση της αναπτυξιακής διαδικασίας, στην οποία εμπλέκονται. Έτσι, κλωνοποιήθηκαν τα *bHLH1*, *bHLH2* και *HER*, κι από τους δύο οργανισμούς, σε φορέα έκφρασης για κυτταροκαλλιέργειες και διαμολύνθηκαν με το αντίστοιχο πρότυπο που αναφέρθηκε και παραπάνω.

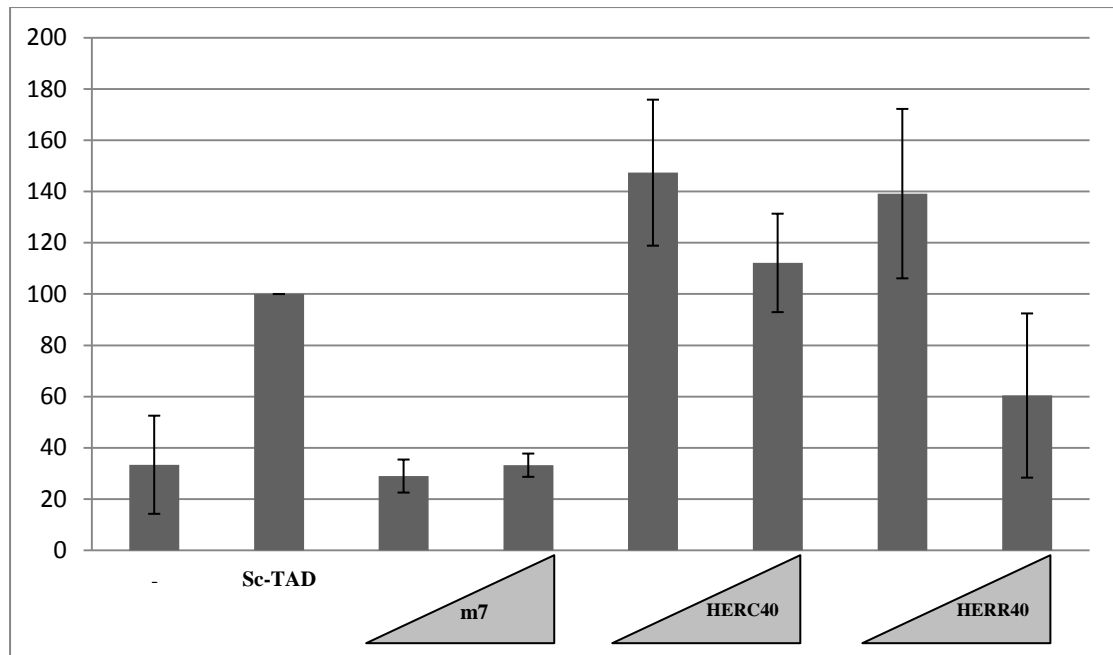


Εικόνα 9. Οι *bHLH1*, *bHLH2* και *HER* της *Apis mellifera* αλληλεπιδρούν με το Scute. Μετρήθηκε ενεργότητα λουσιφεράσης σε κύτταρα Schneider, τα οποία διαμολύνθηκαν παροδικά με τα *UAS-tk-luc*, με την επικράτεια ενεργοποίησης του Scute (Sc-TAD) ενωμένη με την επικράτεια πρόσδεσης του GAL4 και τις αντίστοιχες μορφές των E(spl). Η πρώτη στήλη (-) αντιπροσωπεύει τη βασική ενεργότητα της λουσιφεράσης. Η δεύτερη στήλη αντιπροσωπεύει την ενεργοποίηση από τη χμιαρική μορφή του Sc-TAD με την επικράτεια πρόσδεσης στο DNA του GAL4. Οι υπόλοιπες στήλες έχουν διαμολυνθεί, εκτός από τα προαναφερθέντα, με το E(spl) m7 και τα Ame E(spl) σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Οι τιμές που φαίνονται είναι μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα από τρεις ανεξάρτητες δοκιμές.



Εικόνα 10. Τα bHLH1 και HER, εν αντιθέσει με το bHLH2 της *Daphnia pulex* αλληλεπιδρούν με το Scute. Μετρήθηκε ενεργότητα λουσιφεράσης σε κύτταρα Schneider, τα οποία διαμολύνθηκαν παροδικά με τα UAS-*tk-luc*, με την επικράτεια ενεργοποίησης του Scute (Sc-TAD) ενωμένη με την επικράτεια πρόσδεσης του GAL4 και τις αντίστοιχες μορφές των E(spl). Η πρώτη στήλη (-) αντιπροσωπεύει τη βασική ενεργότητα της λουσιφεράσης. Η δεύτερη στήλη αντιπροσωπεύει την ενεργοποίηση από τη χμαιρική μορφή του Sc-TAD με την επικράτεια πρόσδεσης στο DNA του GAL4. Οι υπόλοιπες στήλες έχουν διαμολυνθεί, εκτός από τα προαναφερθέντα, με το E(spl) m7 και τα Dru E(spl) σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Οι τιμές που φαίνονται είναι μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα από τρεις ανεξάρτητες δοκιμές.

Με αυτό το σύστημα επιβεβαιώσαμε την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών στα Υμενόπτερα, όπου είναι πιο συγγενικός κλάδος με τη *Drosophila melanogaster*. Παρ' όλα αυτά φαίνεται πως η αλληλεπίδραση του bHLH2 της *Apis mellifera* δεν αλληλεπιδρά τόσο ισχυρά όσο τα υπόλοιπα. Από τα αποτελέσματα, φαίνεται, επίσης, ότι οι bHLH1 και bHLH3 της *Daphnia pulex* αλληλεπιδρούν με το Scute, εν αντιθέσει με το bHLH2, το οποίο φαίνεται πως δεν αλληλεπιδρά καθόλου. Επιπλέον, ελέγξαμε και την πιθανότητα αλληλεπίδρασης του HER της *Drosophila melanogaster* με το Scute, κάτι το οποίο δεν επιβεβαιώσαμε.



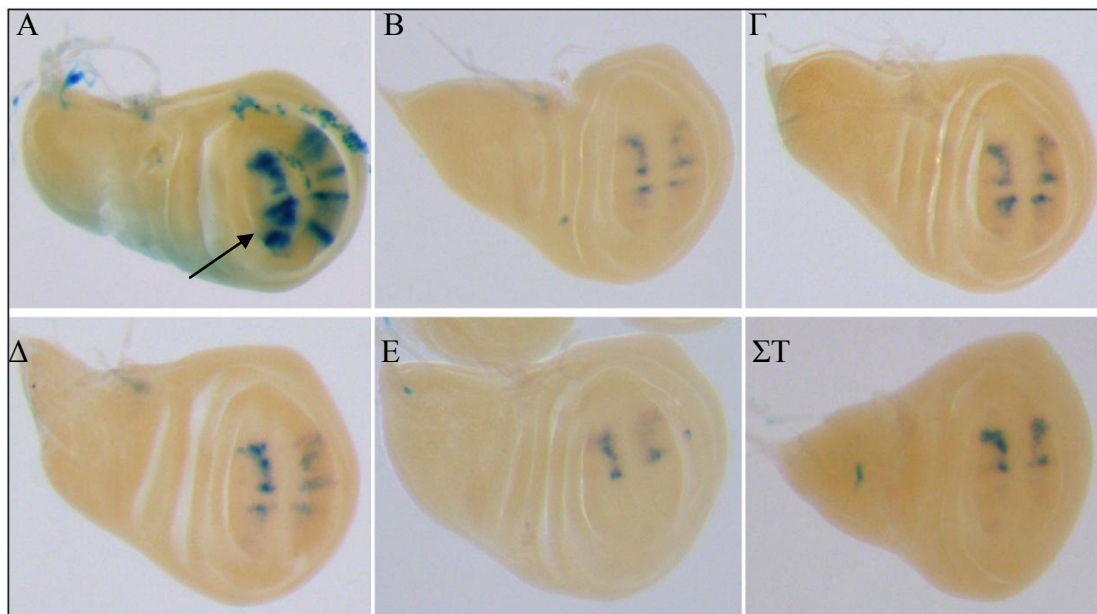
Εικόνα 11. Οι δύο ισομορφές του HER της *Drosophila melanogaster* δεν αλληλεπιδρούν με το Scute. Μετρήθηκε ενεργότητα λουσιφεράσης σε κύτταρα Schneider, τα οποία διαμολύνθηκαν παροδικά με τα UAS-tk-luc, με την επικράτεια ενεργοποίησης του Scute (Sc-TAD) ενωμένη με την επικράτεια πρόσδεσης στο DNA του GAL4 και τις αντίστοιχες μορφές των E(spl). Η πρώτη στήλη (-) αντιπροσωπεύει τη βασική ενεργότητα της λουσιφεράσης. Η δεύτερη στήλη αντιπροσωπεύει την ενεργοποίηση από τη χημαιρική μορφή του Sc-TAD με τη GAL4 επικράτεια πρόσδεσης στο DNA. Οι υπόλοιπες στήλες έχουν διαμολυνθεί, εκτός από τα προαναφερθέντα, με το E(spl) m7 και τις δύο ισομορφές του HER (C40 και R40) σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Οι τιμές που φαίνονται είναι μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα από τρεις ανεξάρτητες δοκιμές.

Ετερόλογη έκφραση των *Apis mellifera* και *Daphnia pulex* UAS-E(spl) στη *Drosophila melanogaster*

Με στόχο να αποκτήσουμε καλύτερη εικόνα για τη λειτουργική συντήρηση των E(spl) στα Τετρακωνιωτά δημιουργήσαμε διαγονιδιακές μύγες με τα γονίδια που μας ενδιαφέρουν, τα οποία εκφράσαμε εκτοπικά χρησιμοποιώντας το UAS-GAL4 σύστημα.

1) Δοκιμασία της ικανότητας πρόσδεσης στο DNA σε E_C-μοτίβο

Το γονίδιο *vestigial* (*vg*) εκφράζεται στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού και είναι απαραίτητο για την φυσιολογική ανάπτυξη των φτερών της *Drosophila melanogaster*. Η έκφραση του ενισχυτή *Quadrant*, *vgQ*, ο οποίος βρίσκεται στο τέταρτο ιντρόνιο του γονιδίου, ξεκινά στο πρώιμο τρίτο προνουμφικό στάδιο, από τα κύτταρα που βρίσκονται κοντά στη τομή του νωτοκοιλιακού και προσθοπίσθιου άξονα. Στη συνέχεια, η έκφρασή του εξαπλώνεται σε όλη τη περιοχή του δίσκου, από όπου θα αναπτυχθεί το φτερό του ενήλικου. Σε αποτελέσματα του εργαστηρίου μας δείχθηκε ότι η εκτοπική έκφραση γονιδίων του *E(spl)-C*, τα οποία εκφράζονται σε απόκριση Notch σηματοδότησης, οδηγούν σε καταστολή της έκφρασης από τον ενισχυτή. Στον ενισχυτή υπάρχει ένα E_C-μοτίβο, το οποίο έχει βελτιστοποιηθεί στο επίπεδο της αλληλουχίας από τον Κ. Κουμπανάκη (Ligoxygakis, P. et al. 1999). Με αυτή τη δοκιμασία ελέγχουμε την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA των E(*spl*) των *Apis mellifera* και *Daphnia pulex*.

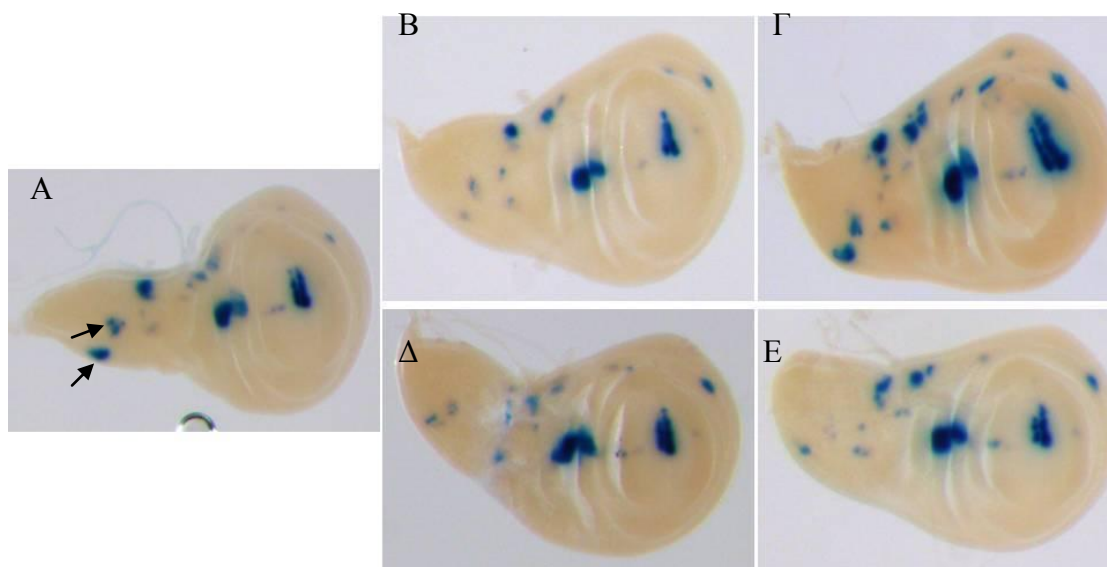


Εικόνα 12. Χρώση για β-γαλακτοζιδάση αναπτυξιακών δίσκων φτερού των απογόνων της διασταύρωσης των διαγονιδίων μας με στελέχη $\frac{en-Gal4;vgQ\mu2-lacZ}{T(2;3)}$. A) *en-Gal4; vgQμ2-lacZ* (control), B) *Ame UAS-bHLH1; en-Gal4; vgQμ2-lacZ*, Γ) *Ame UAS-Hesr; en-Gal4; vgQμ2-lacZ*, Δ) *Dpu UAS-bHLH1; en-Gal4; vgQμ2-lacZ*, E) *Dpu UAS-bHLH2; en-Gal4; vgQμ2-lacZ*, ΣΤ) *Dpu UAS-Hesr; en-Gal4; vgQμ2-lacZ*.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα , τα bHLH1, bHLH2 και HER κι από τους δύο οργανισμούς έχουν την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA. Ο οδηγός engrailed κατευθύνει την έκφραση του διαγονιδίου μας στο οπίσθιο άκρο του αναπτυξιακού δίσκου φτερού (Guillén, I. et al. 1995).

2) Δοκιμασία της *in-vivo* ικανότητας αλληλεπίδρασης με τις προνευρικές πρωτεΐνες

Έπειτα ελέγξαμε την *in-vivo* ικανότητα των πρωτεϊνών μας με στελέχη *EE4-lacZ*, τα οποία αποτελούνται από 8 E_A-μοτίβα ανοδικά ενός στοιχειώδους υποκινητή (Giagtzoglou, N. et al. 2003; Culi, J., & Modolell, J. 1998), κι αποκρίνονται στις προνευρικές πρωτεΐνες όπου ανάβουν σε όλες τις προνευρικές συστάδες στον αναπτυξιακό δίσκο φτερού. Ο οδηγός *pnr* καθοδηγεί την έκφραση του διαγονιδίου στο νότο, όπου θα αναπτυχθεί στο ραχιαίο μεσοθώρακα.

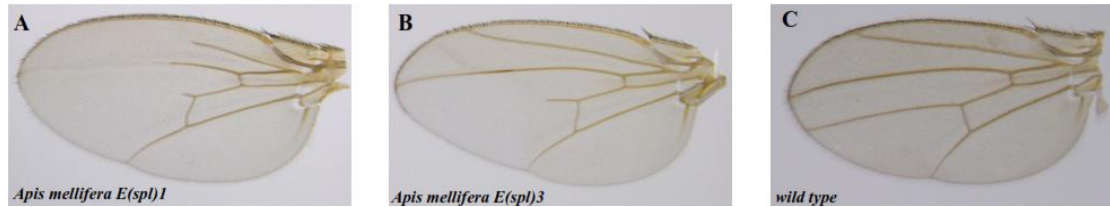


Εικόνα 13. Χρώση για β-γαλακτοζιδάση αναπτυξιακών δίσκων φτερού των απογόνων των διασταυρώσεων των διαγονιδίων μας με στελέχη $\frac{EE4-lacZ; pnr-Gal4}{T(2;3)}$. Α) *EE4-lacZ; pnr-Gal4* (control), Β) *Ame UAS-bHLH1; EE4-lacZ; pnr-Gal4*, Γ) *Ame UAS-Hesr; EE4-lacZ; pnr-Gal4*, Δ) *Dpu UAS-bHLH1; EE4-lacZ; pnr-Gal4*, Ε) *Dpu UAS-Hesr; EE4-lacZ; pnr-Gal4*.

Συμπεραίνουμε πως, και *in vivo*, οι E(spl) και από τους δύο οργανισμούς έχουν την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τις προνευρικές πρωτεΐνες και στη συνέχεια, καταστολής των γονιδίων, που ενεργοποιούν μεταγραφικά

3) Δοκιμασία της ικανότητας καταστολής δημιουργίας των φλεβών του φτερού

Έπειτα ελέγξαμε την ανάπτυξη των φλεβών στα φτερά ενηλίκων ατόμων *Drosophila melanogaster*, όπου εκφράσαμε τα διαγονίδια μας υπό τον οδηγό *Omb-Gal4*.



Εικόνα 14. Καταστολή της ανάπτυξης των φλεβών του φτερού από τις *E(spl)* της *Apis mellifera*.

Παρατηρούμε υποπλασία έπειτα από υπερέκφραση των *bHLH1* και *HER* της *Apis mellifera*. Στην ανάπτυξη των φτερών παίζει ρόλο η Notch σηματοδότηση, όπου αυξάνει η έκφραση των στόχων του πιθανότητα λόγω EGFR σηματοδότησης (Blair, S. S. 2007).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δημιουργία κι εξέλιξη του *E(spl)*-C

Το σύμπλεγμα, *E(spl)*-C, εμφανίζεται σαν ομάδα γονιδίων στο κοινό πρόγονο των Τετρακωνιωτών. Η συντήρηση του συμπλέγματος σε αυτό το κλάδο συμβαδίζει τόσο με τη σύγχρονη εξελικτική υπόθεση της μονοφυλετικότητας των Τετρακωνιωτών όσο και με πρόσφατες μελέτες που καταδεικνύουν την ομοιότητα σε ανατομικό και μοριακό επίπεδο των νευρογενετικών διαδικασιών σε Εξάποδα και Καρκινοειδή (Ungerer, P., & Scholtz, G. 2008; Schachtner, J. et al. 2005; Stegner, M. E. et al. 2014; Lavrov, D. V. et al. 2004). Το σύμπλεγμα δημιουργήθηκε λοιπόν μεταξύ των 550 και 440 χιλιάδων ετών πριν καθώς επίσης, δεν έχουν εντοπιστεί ορθόλογα γονίδια με τα *E(spl)* στα Χηληκεραιωτά. Στο πρόσφατα αλληλουχημένο γονιδίωμα του *Strigamia maritima*, που αποτελεί εκπρόσωπο του Υποφύλου των Μυριάποδων, εντοπίστηκαν ορθόλογα γονίδια *E(spl)*, τα οποία όμως δεν οργανώνονται σε σύμπλεγμα όπως στα άλλα δύο Υπόφυλα (Chirpman, A. D., & Akam, M. 2008; Dearden P.K. 2015).

Το σύμπλεγμα εμφανίζεται σαν ένα σύστημα τεσσάρων γονιδίων, τρία από τα οποία ανήκουν στην ίδια ομάδα μεταγραφικών παραγόντων καθώς μοιράζονται κοινές δομικές επικράτειες, τις bHLH και Orange. Το άλλο γονίδιο του συμπλέγματος ανήκει στην οικογένεια *bearded*, η συντήρηση των οποίων δεν εμφανίζεται υψηλή αν και παραμένουν στο σύμπλεγμα τονίζοντας ότι στο επίπεδο της έκφρασης τους ρυθμίζονται από τη Notch σηματοδότηση. Οι bHLH-O πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το σύμπλεγμα ομαδοποιούνται με ισχυρή πιθανότητα, έπειτα από φυλογενετική ανάλυση με Bayesian στατιστική, σε τρεις ομάδες, τις bHLH1, bHLH2 και HER, η τελευταία πήρε το όνομά της καθώς στο κλάδο ομαδοποιείται το *Hesr* αν και βρίσκεται σε άλλο χρωμόσωμα. Σε προηγούμενες εργασίες έγινε η υπόθεση ότι το *Hesr* βρισκόταν εντός του συμπλέγματος μέχρι το κοινό πρόγονο των Λεπιδοπτέρων και Διπτέρων. Φυσικά, και στη δική μας φυλογενετική ανάλυση, με τη μεθοδολογία μέγιστης πιθανότητας, η HER πρωτεΐνη ομαδοποιείται με τις υπόλοιπες *E(spl)* και στην ανάλυση με τα Βραχύκερα που παρουσιάζεται παραπάνω αλλά και στην ανάλυση Υμενοπτέρων και Τετρακωνιωτών (αποτελέσματα που δεν

παρουσιάζονται). Βέβαια στη *Drosophila melanogaster* φαίνεται ότι η έκφραση του γονιδίου *Hesr* δε ρυθμίζεται από τη Notch σηματοδότηση κι όπως επίσης, παρουσιάζουμε σε αυτή την εργασία δεν έχει την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τις προνευρικές πρωτεΐνες, και συγκεκριμένα με το Scute, όπου όλες οι HER που εξετάσαμε κι από τα Υμενόπτερα αλλά και τα Καρκινοειδή έχουν τη συγκεκριμένη ικανότητα αλληλεπίδρασης. Συμπεραίνουμε, λοιπόν, πως έχει έντονα ποικιλοποιηθεί σε λειτουργικό επίπεδο από την στιγμή που «ξέφυγε» από το σύμπλεγμα. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν εργασίες, οι οποίες να καταδεικνύουν τις λειτουργικές διαδικασίες στις οποίες εμπλέκεται.

Επίσης, δείχνουμε στη φυλογενετική ανάλυση πως στην Υπόταξη των Βραχύκερων υπάρχουν έντονες εξελικτικές διαδικασίες στο σύμπλεγμα μιας και υπάρχουν αρκετοί διπλασιασμοί των γονιδίων του συμπλέγματος, οι οποίοι είναι ειδικοί για τους επιμέρους κλάδους των Βραχύκερων και δεν βρίσκονται στο κοινό πρόγονο, κατάσταση η οποία είναι αντίθετη με την Υπόταξη των Νηματόκερων, όπου ανήκουν τα κουνούπια κι έχουν ένα μόνο γονίδιο *bHLH-O* στο σύμπλεγμα και πιο συγκεκριμένα, το *bHLH1* από το οποίο, έχουν προκύψει κι όλοι οι διπλασιασμοί γονιδίων στα Βραχύκερα. Για ποιά λόγο υπάρχουν αυτοί οι διπλασιασμοί στα Βραχύκερα δεν είναι γνωστό. Παρ' όλα αυτά μπορούμε να υποθέσουμε, μιας και ο ρόλος των γονιδίων του συμπλέγματος έγκειται στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, ότι πραγματοποιείται πιο συντονισμένος έλεγχος αυτών των αναπτυξιακών διαδικασιών. Επίσης, δεν έχει παρέλθει ικανοποιητικός εξελικτικός χρόνος για τη ποικιλοποίηση των γονιδίων, τουλάχιστον στη *Drosophila melanogaster*, μιας και μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας ακόμη και σε δύο γονίδια του συμπλέγματος ταυτόχρονα δεν οδηγούν σε σοβαρές φαινοτυπικές διαφορές.

Ένας αξιοσημείωτος παράγοντας είναι ότι τα γονίδια του συμπλέγματος σε όλα τα Τετρακωνιωτά ρυθμίζονται από και ρυθμίζουν την απόκριση της Notch σηματοδότησης. Έχουν εντοπιστεί μοτίβα για τη πρόσδεση του Suppressor of Hairless μεταγραφικού παράγοντα, απαραίτητου για τη τέλεση της Notch σηματοδότησης.

Συντήρηση της λειτουργίας των πρωτεϊνών E(spl) της *Apis mellifera*

Πρόσφατες εργασίες, κατέδειξαν τη συντήρηση των γονιδιακών ρυθμιστικών δικτύων, που είναι υπεύθυνα για την εμβρυική νευρογένεση τόσο στη *Drosophila melanogaster* όσο και στη *Daphnia magna*. Μοιράζονται πολλά κοινά μοριακά χαρακτηριστικά αλλά είναι και οι δύο κλάδοι των Αρθροπόδων που αναπτύσσουν το νευρικό τους σύστημα με νευρικά βλαστικά κύτταρα. Η μέχρι τώρα μελέτη έδειξε γενικότερη συντήρηση στην έκφραση των γονιδίων μεταξύ των κλάδων αλλά απουσιάζουν οι γενετικές μελέτες στη *Daphnia magna*, οι οποίες θα καταδείξουν το πραγματικό ρόλο των συγκεκριμένων γονιδίων και τη σημαντικότητά τους κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος.

Στην *Apis mellifera* δείχνουμε πως οι πρωτεΐνες, που κωδικοποιούνται από το σύμπλεγμα, έχουν την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τις προνευρικές πρωτεΐνες τόσο σε κυτταροκαλλιέργειες όσο και *in-vivo*. Η bHLH1 αλληλεπιδρά εντονότερα με το Scute, αποτέλεσμα που συνάδει με τη φυλογενετική υπόθεση ότι τα E(spl) της *Drosophila melanogaster* είναι όλα bHLH1. Γεγονός που μας κάνει να υποθέτουμε πως ο ρόλος των E(spl) στα Υμενόπτερα κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια είναι ίδιος με το ρόλο στη *Drosophila melanogaster*. Επίσης, δείχνουμε πως η πρόσδεση στο DNA των E(spl) της *Apis mellifera*, είναι συντηρημένη στο ίδιο E_C-μοτίβο. Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα, συμπεραίνουμε ότι ασκεί μεταγραφική καταστολή στους στόχους των προνευρικών πρωτεϊνών με φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ τους, με πρόσδεση και μη στο DNA. Οι μορφογενετικές διαδικασίες κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος της *Apis mellifera*, συμφωνούν με αυτές της *Drosophila melanogaster* γεγονός που υποδεικνύει γενικότερη συντήρηση της όλης διαδικασίας στα Ολομετάβολα έντομα. Τέλος, δείχνουμε ότι η εκτοπική έκφραση τους μιμείται το φαινότυπο από υπερέκφραση των E(spl) στις φλέβες του φτερού. Βέβαια, δε γνωρίζουμε το ακριβές γονιδιακό δίκτυο, που είναι υπεύθυνο για αυτό το φαινότυπο.

Συντήρηση της λειτουργίας των πρωτεϊνών E(spl) της *Daphnia pulex*

Στη *Daphnia pulex* δείχνουμε ότι οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το σύμπλεγμα της έχουν την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τις προνευρικές πρωτεΐνες,

και πιο συγκεκριμένα, οι bHLH1 και HER. Η bHLH1, όπως και στην *Apis mellifera*, αλληλεπιδρά εντονότερα με το Scute σε σχέση με τη HER. Η bHLH2 φαίνεται να μην αλληλεπιδρά με το Scute, παρ, όλα αυτά το συγκεκριμένο πλασμίδιο δεν έχει αλληλουχηθεί για τη πιθανότητα μετάλλαξης αλλαγής ή καταστροφής αναγνωστικού πλαισίου. Δείξαμε, επίσης, ότι και οι τρεις bHLH της *Daphnia pulex* έχουν την ικανότητα πρόσδεσης στο E_C-μοτίβο, συντηρημένη ικανότητα σε όλα τα Τετρακωνιώτα. Επιπλέον, για τις bHLH1 και HER δείξαμε ότι αλληλεπιδρούν και οι δύο με τις προνευρικές πρωτεΐνες στις προνευρικές συστάδες στον αναπτυξιακό δίσκο φτερού *in-vivo*. Για την bHLH2 δεν έχει πραγματοποιηθεί ακόμη η δοκιμασία. Όσον αφορά το φαινότυπο της υποπλασίας των φτερών η εκτοπική έκφραση της bHLH1 οδηγεί σε μικρή υποπλασία των φτερών ενώ όσα στελέχη έχουν ελεγχθεί από τις bHLH2 και HER δεν δίνουν τον αντίστοιχο φαινότυπο, γεγονός που μας κάνει να υποθέτουμε πως η συντήρηση της συγκεκριμένης λειτουργίας έχει να κάνει με την εμπλοκή των πρωτεϊνών μας σε γονιδιακά ρυθμιστικά δίκτυα ειδικά για την ανάπτυξη του φτερού και των υποκείμενων δομών του, πράγμα το οποίο εικάζεται λογικώς να μην είναι συντηρημένο.

Ποιος μπορεί να είναι ο ουσιαστικός ρόλος όμως των E(spl) της *Daphnia pulex* κατά τη πλευρική αναστολή; Μία από τις σημαντικότερες διαφορές κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος στα Καρκινοειδή είναι ότι μετά το καθορισμό των νευρικών βλαστικών κυττάρων, αυτά παραμένουν στο νευροεκτόδερμα εν αντιθέσει με τα έντομα, στα οποία μεταναστεύουν σε κατώτερα στρώματα δημιουργώντας εκεί στιβάδες. Συνεπώς, κατά τη διαδικασία του καθορισμού στη *Daphnia pulex* παρατηρούμε πως οι νευροβλάστες αναπτύσσονται δίπλα-δίπλα. Ένας από τους πιθανούς παράγοντες που θα μπορούσε να εξηγήσει αυτό το γεγονός είναι η cis-αναστολή του Notch από τη Delta, πράγμα που θα μπορούσε να καθορίσει τοπικά την ευαισθησία στη σηματοδότηση και συνεπώς, να επιτρέψει την ικανότητα ανάπτυξης δύο νευρικών βλαστικών κυττάρων δίπλα-δίπλα.

Συμπεράσματα

Το E(spl)-C αποτελεί ένα παράδειγμα συμπλέγματος όπου ισχυρές εξελικτικές πιέσεις έχουν δημιουργήσει μία ομάδα γονιδίων, που αποκρίνονται και ρυθμίζουν ένα σηματοδοτικό μονοπάτι υπεύθυνο για πολλαπλές αναπτυξιακές διαδικασίες (Notch)

όπως αυτή της ανάπτυξης του νευρικού συστήματος. Η γενικότερη συντήρηση σε επίπεδο κωδικής αλλά και μη κωδικής αλληλουχίας αλλά και σε επίπεδο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων υποστηρίζει τη συντήρηση του υποκείμενου γονιδιακού ρυθμιστικού δικτύου στα Τετρακωνιωτά. Μελλοντικές γενετικές αναλύσεις θα καταδείξουν τη σημαντικότητα αλλά και τη τοποθέτηση εντός του δικτύου των γονιδίων του *E(spl)-C*, καθώς και πως οι ίδιες πρωτεΐνες συμμετέχουν στην ίδια αναπτυξιακή διαδικασία με διαφορετικές, όμως, μορφογενετικές διαδικασίες.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Jones, S. (2004). An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *GENOME BIOLOGY.*, 5(6), 226-226.
- Gazave, E., Guillou, A., & Balavoine, G. (2014). History of a prolific family: the Hes/Hey-related genes of the annelid Platynereis. *EvoDevo*, 5(1), 29.
- Delidakis, C., & Artavanis-Tsakonas, S. (1992). The Enhancer of split [E (spl)] locus of *Drosophila* encodes seven independent helix-loop-helix proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(18), 8731-8735.
- Klämbt, C., Knust, E., Tietze, K., & Campos-Ortega, J. A. (1989). Closely related transcripts encoded by the neurogenic gene complex enhancer of split of *Drosophila melanogaster*. *The EMBO journal*, 8(1), 203.
- Delidakis, C., Monastirioti, M., & Magadi, S. S. (2014). E (spl): genetic, developmental, and evolutionary aspects of a group of invertebrate Hes proteins with close ties to Notch signaling. *Curr. Top Dev. Biol*, 110, 217-262.
- Lai, E. C., Bodner, R., & Posakony, J. W. (2000). The enhancer of split complex of *Drosophila* includes four Notch-regulated members of the bearded gene family. *Development*, 127(16), 3441-3455.
- Wurmbach, E., Wech, I., & Preiss, A. (1999). The Enhancer of split complex of *Drosophila melanogaster* harbors three classes of Notch responsive genes. *Mechanisms of development*, 80(2), 171-180.
- Cooper, M. T., Tyler, D. M., Furriols, M., Chalkiadaki, A., Delidakis, C., & Bray, S. (2000). Spatially restricted factors cooperate with notch in the regulation of Enhancer of split genes. *Developmental biology*, 221(2), 390-403.
- García-Bellido, A. (1979). Genetic analysis of the achaete-scute system of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 91(3), 491-520.
- Kiparaki, M., Zarifi, I., & Delidakis, C. (2015). bHLH proteins involved in *Drosophila* neurogenesis are mutually regulated at the level of stability. *Nucleic acids research*, gkv083.
- Lemke, G. (Ed.). (2010). *Developmental neurobiology*. Academic Press.

- Hori, K., Sen, A., & Artavanis-Tsakonas, S. (2013). Notch signaling at a glance. *Journal of cell science*, 126(10), 2135-2140.
- Bertrand, N., Castro, D. S., & Guillemot, F. (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(7), 517-530.
- Richter, S. (2002). The Tetraconata concept: hexapod-crustacean relationships and the phylogeny of Crustacea. *Organisms Diversity & Evolution*, 2(3), 217-237.
- Duncan, E. J., & Dearden, P. K. (2010). Evolution of a genomic regulatory domain: the role of gene co-option and gene duplication in the Enhancer of split complex. *Genome research*, 20(7), 917-928.
- Dearden, P. K. (2015). Origin and evolution of the enhancer of split complex. *BMC genomics*, 16(1), 712.
- Kux, K., Kiparaki, M., & Delidakis, C. (2013). The two Tribolium E (spl) genes show evolutionarily conserved expression and function during embryonic neurogenesis. *Mechanisms of development*, 130(4), 207-225.
- Ungerer, P., Eriksson, B. J., & Stollewerk, A. (2011). Neurogenesis in the water flea *Daphnia magna* (Crustacea, Branchiopoda) suggests different mechanisms of neuroblast formation in insects and crustaceans. *Developmental biology*, 357(1), 42-52.
- Ungerer, P., Eriksson, B. J., & Stollewerk, A. (2012). Unravelling the evolution of neural stem cells in arthropods: Notch signalling in neural stem cell development in the crustacean *Daphnia magna*. *Developmental biology*, 371(2), 302-311.
- Schneider, I. (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *Journal of embryology and experimental morphology*, 27(2), 353-365.
- Ligoxygakis, P., Bray, S. J., Apidianakis, Y., & Delidakis, C. (1999). Ectopic expression of individual E (spl) genes has differential effects on different cell fate decisions and underscores the biphasic requirement for notch activity in wing margin establishment in *Drosophila*. *Development*, 126(10), 2205-2214.

- Guillén, I., Mullor, J. L., Capdevila, J., Sánchez-Herrero, E., Morata, G., & Guerrero, I. (1995). The function of engrailed and the specification of *Drosophila* wing pattern. *Development*, *121*(10), 3447-3456.
- Giagtzoglou, N., Alifragis, P., Koumbanakis, K. A., & Delidakis, C. (2003). Two modes of recruitment of E (spl) repressors onto target genes. *Development*, *130*(2), 259-270.
- Culi, J., & Modolell, J. (1998). Proneural gene self-stimulation in neural precursors: an essential mechanism for sense organ development that is regulated by Notch signaling. *Genes & development*, *12*(13), 2036-2047.
- Blair, S. S. (2007). Wing vein patterning in *Drosophila* and the analysis of intercellular signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, *23*, 293-319.
- Ungerer, P., & Scholtz, G. (2008). Filling the gap between identified neuroblasts and neurons in crustaceans adds new support for Tetraconata. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *275*(1633), 369-376.
- Schachtner, J., Schmidt, M., & Homberg, U. (2005). Organization and evolutionary trends of primary olfactory brain centers in Tetraconata (Crustacea+ Hexapoda). *Arthropod Structure & Development*, *34*(3), 257-299.
- Stegner, M. E., Brenneis, G., & Richter, S. (2014). The ventral nerve cord in Cephalocarida (Crustacea): new insights into the ground pattern of Tetraconata. *Journal of morphology*, *275*(3), 269-294.
- Lavrov, D. V., Brown, W. M., & Boore, J. L. (2004). Phylogenetic position of the Pentastomida and (pan) crustacean relationships. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *271*(1538), 537-544.
- Chipman, A. D., & Akam, M. (2008). The segmentation cascade in the centipede *Strigamia maritima*: involvement of the Notch pathway and pair-rule gene homologues. *Developmental biology*, *319*(1), 160-169.