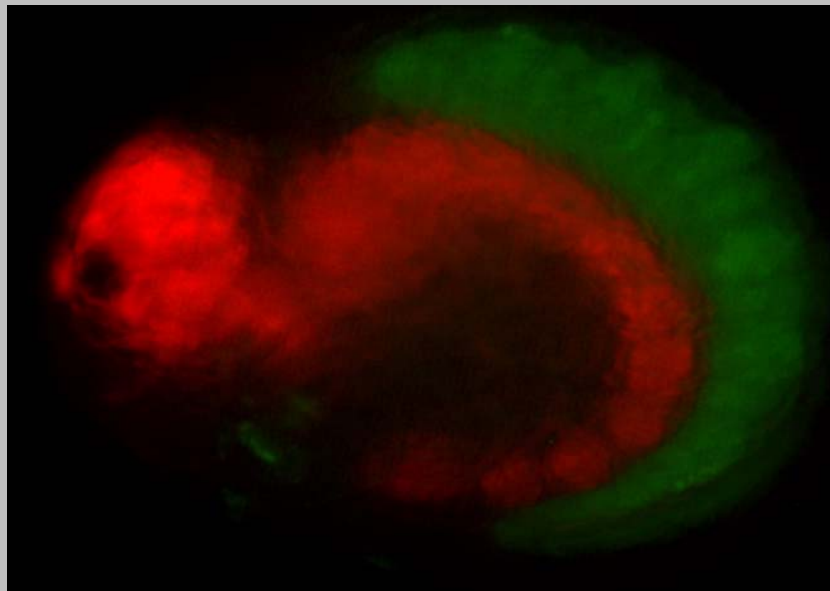


Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας
Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα «Μοριακή Βιολογία – Βιοϊατρική»

«Χαρακτηρισμός της δομής και δράσης
βασικών υποκινητών
του αμφίποδου καρκινοειδούς
Parhyale hawaiiensis»



Μεταπτυχιακή Εργασία του
Νικόλαου Κωνσταντινίδη

Υπό την επίβλεψη του Δρ. Μιχάλη Αβέρωφ

Title:

Characterization of core promoters' structure and function in the amphipod crustacean *Parhyale hawaiensis*

**Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε υπό την επίβλεψη
Διμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής την οποία
απαρτίζουν οι:**

Μιχάλης Αβέρωφ, Ερευνητής Β', IMBB, ΙΤΕ

Χρήστος Δελιδάκης, Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Be realistic,
demand the impossible.
- Che Guevara

Πίνακας Περιεχομένων

Αντί προλόγου	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
ABSTRACT	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1. Το καρκινοειδές <i>Parhyale hawaiensis</i>	10
1.1 Ο κύκλος ζωής του <i>Parhyale hawaiensis</i>	12
1.2 Η εμβρυογένεση στον <i>Parhyale hawaiensis</i>	13
1.3 Ανάπτυξη εργαλείων για το γενετικό χειρισμό του <i>Parhyale hawaiensis</i>	15
2. Το ρυθμιστικό στοιχείο 3xP3	17
3. Το ρυθμιστικό στοιχείο DC5	19
4. Hypoxia Response Element (HRE)	21
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
1. Τεχνικές μοριακής βιολογίας	23
1.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή/μεσαία κλίμακα (mini/medi prep)	23
1.2 Απομόνωση ολικού RNA από έμβρυα και ενήλικα άτομα <i>Parhyale</i>	23
1.3 5' Rapid Amplification of cDNA Ends (5' RACE)	23
1.4 Χειρισμός νουκλεϊκών οξέων	26
1.5 In vitro σύνθεση capped Minos transposase mRNA	26
2. Δημιουργία πλασμιδιακών κατασκευών για έλεγχο της ενεργότητας του βασικού υποκινητή του PhHS	26
2.1 Η πλασμιδιακή κατασκευή ρMi{3xP3(Dm basal promoter).EGFP.SV40-3xP3(Ph basal promoter).DsRed.SV40}	28
2.2 Η πλασμιδιακή κατασκευή ρMi{3xP3(Dm basal promoter).DsRed.SV40-DC5(Ph basal promoter).DsRed.SV40}	30
2.3 Η πλασμιδιακή κατασκευή ρMi{3xP3(Dm basal promoter).DsRed.SV40-HRE(Ph basal promoter).DsRed.SV40}	32
3. Χειρισμός ατόμων <i>Parhyale hawaiensis</i>	33
3.1 Καλλιέργεια	33
1. Χαρτογράφηση των βασικών υποκινητών του θερμοεπαγόμενου PhHS και του μυοειδικού PhMS	35
1.2 Συζήτηση αποτελεσμάτων 5'RACE	40
2. Μετασχηματισμός ατόμων <i>Parhyale hawaiensis</i> και ανάλυση των προτύπων ενεργοποίησης των ρυθμιστικών στοιχείων 3xP3 και DC5 σε αυτά	41
2.1 Μετασχηματισμός ατόμων <i>Parhyale hawaiensis</i> με το μεταθετό στοιχείο Mi{3xP3(Dm basal promoter).EGFP.SV40-3xP3(Ph basal promoter).DsRed.SV40}	41
2.2 Μετασχηματισμός ατόμων <i>Parhyale hawaiensis</i> με το μεταθετό στοιχείο Mi{3xP3(Dm basal promoter).DsRed.SV40-DC5(Ph basal promoter).DsRed.SV40}	42
2.3 Συζήτηση	44
2.4 Μελλοντικά πειράματα	46
Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	48

Αντί προλόγου

Έχοντας ολοκληρώσει τη μεταπτυχιακή εργασία και οδεύοντας στην έναρξη της διδακτορικής διατριβής, και παρ' όλο που η επίκληση στο συναίσθημα δεν ήταν ποτέ μία από τις «συγγραφικές αρετές» μου (όπως και πολλές άλλες, άλλωστε), δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω ορισμένα άτομα που με βοήθησαν και με στήριξαν, με την ελπίδα να τους έχω κοντά μου και τα επόμενα χρόνια.

Πρώτο από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω το Μιχάλη Αβέρωφ, τον υπεύθυνο της εργασίας μου, και όχι μόνο. Αρχικά, θέλω να τον ευχαριστήσω που μου πρόσφερε την ευκαιρία να δουλέψω στο εργαστήριό του, με καλωσόρισε και με έκανε εξ' αρχής να αισθανθώ κομμάτι της ερευνητικής του ομάδας. Αποτέλεσε για μένα παράδειγμα ως προς τον τρόπο σκέψης του, τον τρόπο αντιμετώπισης των προβλημάτων και τη «δίψα» του για την επιστήμη. Φυσικά, θέλω να τον ευχαριστήσω για την επιστημονική του καθοδήγηση και την ενεργή συμμετοχή του στα «απλοϊκά προβλήματα» που προέκυπταν κατά τη διάρκεια της εργασίας μου· η πόρτα του ήταν πάντα ανοιχτή κι αυτός έτοιμος για συζήτηση. Για όλα αυτά και για πολλά άλλα που δε χωράνε εδώ, τον ευχαριστώ.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, επίσης, τον Καθηγητή Χρήστο Δελιδάκη για όλα όσα έκανε ως επίσημος επιβλέπων καθηγητής της μεταπτυχιακής μου εργασίας, αλλά και για τις συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια της χρονιάς.

Στο εργαστήριό, ο πρώτος που ανέλαβε να με «μυήσει» στα κατατόπια ήταν ο Αλέξανδρος· γι' αυτές τις πρώτες (και τις επόμενες και τις μεθεπόμενες...) καθοδηγήσεις αλλά και για τη δίψα του για μάθηση που (ελπίζω να) μου μετέδωσε τον ευχαριστώ και ελπίζω ειλικρινά να ξανασυνεργαστούμε. Στη συνέχεια, θέλω να ευχαριστήσω το Χάρη, στον οποίο οφείλω τις «βελούδινες ενέσεις» (ούτε που το αισθάνονται...) αλλά και τον επικοινωνιακό διάλογο σε όποιο πρόβλημα προέκυπτε. Φυσικά, θα έσφαλλα αν δεν ευχαριστούσα και τα υπόλοιπα παιδιά του εργαστηρίου, τον Andrew, τον Βασίλη, την Claudia και την Meriem για την, πάντα με το χαμόγελο, βοήθειά τους σε κάθε επιστημονική, ή μη, ερώτηση μου. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα παιδιά του εργαστηρίου Δελιδάκη για την άψογη συνεργασία, παρέα και βοήθεια.

Εκτός εργαστηρίου, οι φίλοι μου, ο Γιάννης, ο Μεθόδιος, ο Παναγιώτης, η Γεωργία, η Ειρήνη και η Ρίτσα, ήταν υπεύθυνοι για πολλές ευχάριστες στιγμές. Το ξαναχτίσαμε το Σέλας, αλλά άξιζε...

Ένα ευχαριστώ δε θα ήταν αρκετό για να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην Ιωάννα, για την ανοχή της, αλλά και τη συντροφικότητά της, όλο αυτό τον καιρό, μα, κυρίως, για την ψυχική ηρεμία που μου προσέφερε. *Τα καλύτερα έρχονται...*

Νομίζω ότι δεν φτάνουν μερικές λέξεις για να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που ευθύνονται για όλα όσα έχω κάνει στη ζωή μου: τη μητέρα μου, της οποίας η επιμονή και η υποστήριξη στις δυσκολίες μου δε με άφησαν ποτέ να τα παρατήσω, τον πατέρα μου, του οποίου οι συμβουλές, από τότε που θυμάμαι τον εαυτό μου και μέχρι τώρα, χαράζουν ένα σταθερό μονοπάτι στη ζωή μου, και, φυσικά, τον αδερφό μου, με τον οποίο οι κοινές «πνευματικές μας ανησυχίες» (αυτή η φάβα δεν τρώγεται με τίποτα, ε;) μας κρατούν σε διαρκή, διασκεδαστική επαφή.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανάπτυξη νέων οργανισμών-μοντέλων είναι απαραίτητη για τη σύγκριση των πληροφοριών που προκύπτουν από τα ήδη διαδεδομένα μοντέλα (*D. melanogaster*, *C. elegans*, ποντίκι) και για την απόκτηση πληροφοριών σχετικά με την εξέλιξη των ειδών. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ανάπτυξη γενετικών εργαλείων για το χειρισμό των οργανισμών αυτών. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο χαρακτηρισμός της δομής και της λειτουργικότητας δύο βασικών υποκινητών του αναδυόμενου οργανισμού-μοντέλου *Parhyale hawaiiensis* για τη μετέπειτα χρήση τους σε πειράματα σταθερού μετασχηματισμού ατόμων. Χαρτογραφήθηκαν με 5' RACE οι βασικοί υποκινητές των *PhHS* και *PhMS* στοιχείων της οικογένειας των *hsp70* γονιδίων. Ταυτοποιήθηκε σε αυτά τα στοιχεία η θέση έναρξης της μεταγραφής, τα TATA boxes, τα splice acceptors και τα splice donors σε σχέση με τα σημεία πρόσδεσης του HSF και των μεταγραφικών παραγόντων bHLH. Στη συνέχεια, κατασκευάστηκαν και ενέθηκαν σε έμβρυα σταδίου ενός κυττάρου δύο πλασμιδιακές κατασκευές: αυτές έφεραν, ανάμεσα στα άκρα του μεταθετού στοιχείου Minos, ένα γονίδιο μάρτυρα (DsRed ή EGFP) υπό τον έλεγχο του ρυθμιστικού στοιχείου 3xP3 σε συνδυασμό με το βασικό υποκινητή *hsp70* της *Drosophila* και ένα άλλο γονίδιο μάρτυρα υπό τον έλεγχο των ρυθμιστικών στοιχείων 3xP3 και DC5 σε συνδυασμό με το βασικό υποκινητή *hsp70* του *Parhyale*. Η ανάλυση της G1 γενιάς των σταθερά μετασχηματισμένων ατόμων οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο βασικός υποκινητής της *Drosophila* δεν είναι πλήρως λειτουργικός όταν χρησιμοποιείται στο αμφίποδο εν αντιθέσει με τον ενδογενή βασικό υποκινητή. Επίσης, συγκρίθηκαν τα πρότυπα ενεργοποίησης των ρυθμιστικών στοιχείων 3xP3 και DC5 στον *Parhyale hawaiiensis* με απώτερο σκόπο τη χρήση αυτών ως μάρτύρων σταθερού μετασχηματισμού ατόμων.

ABSTRACT

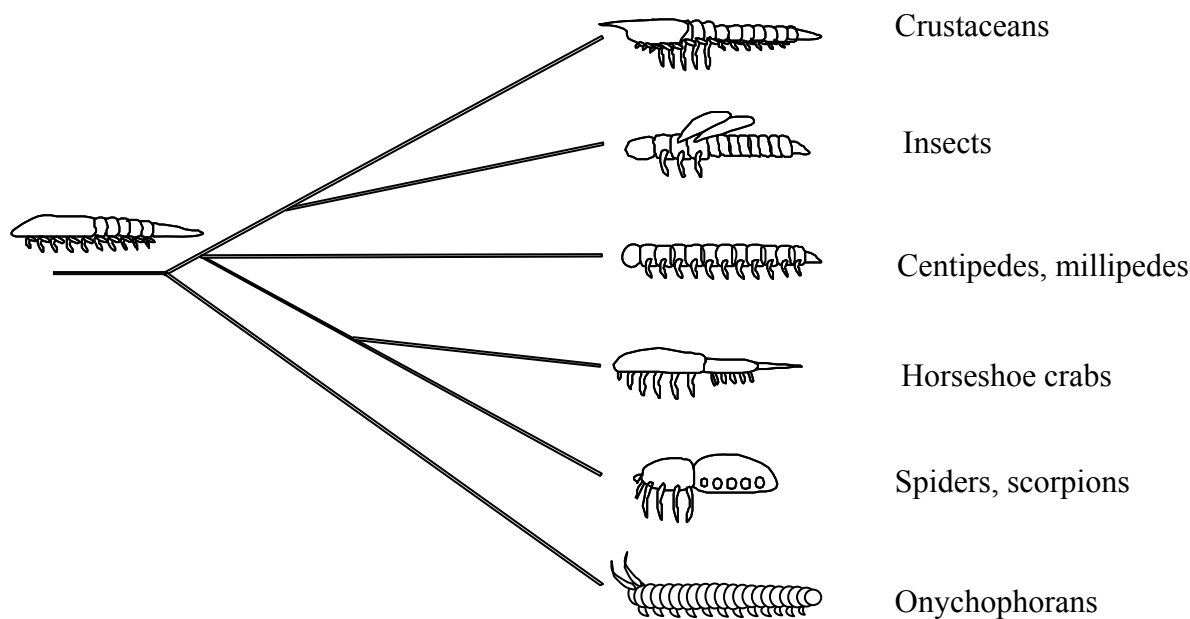
The advancement of new model organisms is necessary for the comparison of information derived from already established ones (*D. melanogaster*, *C. elegans*, mouse) and for the acquisition of information concerning the evolution of these species. As a prerequisite, genetic tools for the manipulation of these organisms should be developed. The primary aim of this thesis is the characterization of the structure and function of two basal promoters from the emerging model crustacean *Parhyale hawaiiensis*, for their future utilization in transformation experiments. We used 5' RACE to map the basal promoters of the *PhHS* and *PhMS* elements of the *hsp70* gene family. We identified the position of the transcription start site, the TATA boxes, splice acceptors and splice donors relative to the HSF and bHLH binding sites positions. We then prepared and injected one cell-stage embryos with two plasmid constructs; these constructs carried, between the ends of the Minos transposable element, a marker gene (DsRed or EGFP) under the transcriptional control of the 3xP3 regulatory element in conjunction with the *Drosophila hsp70* basal promoter and another marker gene under the control of the 3xP3 or DC5 regulatory elements in conjunction with the *Parhyale hsp70* basal promoter. After analysis of first generation embryos (G1), we came to the conclusion that the *Drosophila* basal promoter is not as functional as the endogenous one when used in *Parhyale*. We also compared the activation patterns of 3xP3 and DC5 regulatory elements in *Parhyale hawaiiensis* in order to determine their utility as markers of stable transformation.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι περισσότερες πληροφορίες στον τομέα της αναπτυξιακής βιολογίας προέρχονται από εργασίες πάνω σε οργανισμούς-μοντέλα, όπως η *Drosophila melanogaster* κι ο *Caenorhabditis elegans*. Οι οργανισμοί αυτοί έχουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που τους καθιστούν ιδανικούς για εφαρμογή πειραματικών διαδικασιών, όπως η μαζική καλλιέργεια στο εργαστήριο, ο μικρός κύκλος ζωής κ.ο.κ. Τα ιδιαίτερα αυτά χαρακτηριστικά, όμως, καθιστούν τους οργανισμούς αυτούς όχι πάντα αντιπροσωπευτικούς. Έτσι, δεδομένα που προκύπτουν από έρευνες σε τέτοιους οργανισμούς-μοντέλα *συνίσταται να ελέγχονται σχετικά με την ομοιότητα τους με άλλους οργανισμούς*.

Όλα όσα γνωρίζουμε για την ανάπτυξη των αρθροπόδων έχουν προκύψει από έρευνες στη *Drosophila*. Σε άλλα αρθρόποδα, οι μελέτες περιορίζονται κυρίως σε συγκριτικές μελέτες έκφρασης και RNAi αποσιώπηση γονιδίων ήδη γνωστών από τη *Drosophila*. Η *Drosophila* εμφανίζει πολλές ομοιότητες αλλά και μεγάλες διαφορές από τα άλλα αρθρόποδα. Γι' αυτό θεωρείται αναγκαία η ανάπτυξη και άλλων οργανισμών-μοντέλων, οι οποίοι να προσφέρουν τη δυνατότητα γενετικού χειρισμού. Παράλληλα, η σύγκριση δεδομένων από διαφορετικούς οργανισμούς μπορεί να οδηγήσει στην εξαγωγή πληροφοριών και συμπερασμάτων σχετικά με την εξέλιξη του πολυπληθούς φύλου των αρθροπόδων.

Σε αυτό το πλαίσιο, τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια για **ανάπτυξη γενετικών εργαλείων στο αρθρόποδο καρκινοειδές *Parhyale hawaiensis***. Τα καρκινοειδή είναι οι *κοντινότεροι συγγενείς των εντόμων* κι έτσι η σύγκριση των πληροφοριών που προέρχονται από τη *Drosophila* με αυτές που προέρχονται από τα καρκινοειδή μπορεί να αποβεί εξαιρετικά χρήσιμη.



Εικόνα 1: Φυλογενετική σχέση των κυριότερων ομάδων των αρθροπόδων

Σκοπός της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας είναι ο χαρακτηρισμός της δομής και της λειτουργικότητας δύο βασικών υποκινητών του αμφίποδου καρκινοειδούς *Parhyale hawaiiensis*. Η χρήση ενός βασικού υποκινητή του *Parhyale hawaiiensis* σε πειράματα σταθερού μετασχηματισμού ατόμων κρίνεται απαραίτητη, όπως θα συζητηθεί και παρακάτω. Στα πλαίσια της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας, χαρτογραφήθηκαν και περιγράφηκαν δύο βασικοί υποκινητές της οικογένειας των γονιδίων hsp70· ένας του θερμοεπαγόμενου στοιχείου *PhHS* και ένας του μυοειδικού *PhMS*. Στη συνέχεια, ένας εξ αυτών, ο βασικός υποκινητής του *PhHS*, χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή νέων εργαλείων για το γενετικό χειρισμό ατόμων. Συγκεκριμένα, στόχος ήταν να κατασκευαστούν τρεις διαγονιδιακές σειρές του καρκινοειδούς *Parhyale hawaiiensis*. Δύο από αυτές έχουν ως στόχο τη μελέτη υποκινητών για τη μελλοντική χρήση αυτών ως μαρτύρων του σταθερού μετασχηματισμού ατόμων. Η τρίτη θα χρησιμοποιηθεί μελλοντικά για τη μελέτη της αντίδρασης των ατόμων σε συνθήκες υποξίας.

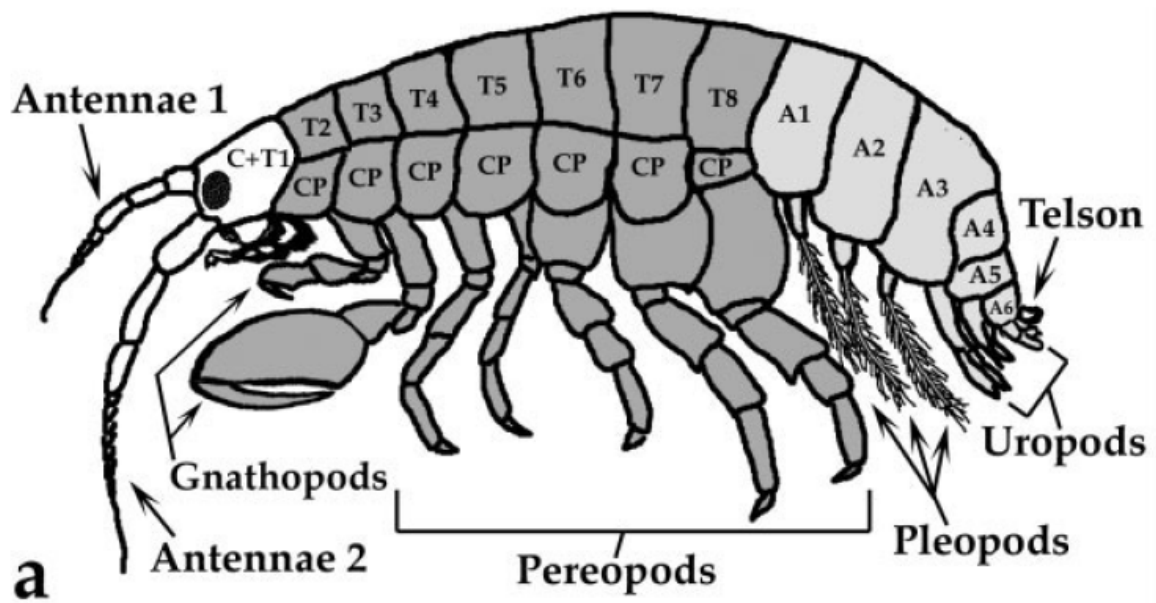
Η διαδικασία που ακολουθήθηκε συνίσταται στη δημιουργία πλασμιδιακών κατασκευών που φέρουν ένα γονίδιο μάρτυρα (DsRed ή EGFP) υπό τον έλεγχο του ρυθμιστικού στοιχείου 3xP3 σε συνδυασμό με το βασικό υποκινητή hsp70 της *Drosophila* και ένα άλλο γονίδιο μάρτυρα υπό τον έλεγχο των υπό μελέτη ρυθμιστικών στοιχείων σε συνδυασμό με το βασικό υποκινητή hsp70 του *Parhyale*. Οι αλληλουχίες αυτές τοποθετήθηκαν ανάμεσα στα άκρα του μεταθετού στοιχείου Minos και ενέθηκαν σε

έμβρυα σταδίου ενός ή δύο κυττάρων μαζί με το mRNA της τρανσποζάσης του Μίνος. Τα εκκολαφθέντα ενεμένα άτομα διατηρήθηκαν μέχρι να ωριμάσουν και στη συνέχεια διασταυρώθηκαν με αγρίου τύπου άτομα. Η ανάλυση έγινε στην G1 γενιά.

1. Το καρκινοειδές *Parhyale hawaiiensis*

Το σώμα του *Parhyale hawaiiensis* είναι οργανωμένο σε μία σειρά επαναλαμβανόμενων μεταμερών κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα. Ο *Parhyale* εμφανίζει τα βασικά χαρακτηριστικά των Αμφιπόδων: την πλευρική συμπίεση του σώματος, τα σύνθετα μάτια, τη χαρακτηριστική κατεύθυνση των περεοποδίων (άκρα των θωρακικών τμημάτων T4-T8) σε σχέση με τον άξονα του σώματος (τα περεοπόδια T4 και T5 εκτείνονται εμπρός ενώ τα T6-T8 οπίσθια, από όπου προέρχεται και η ονομασία Αμφίποδα), καθώς και μεγάλους ισχιακούς δίσκους (coxal plates) προσκολλημένους κοιλιακά στη βάση των θωρακικών άκρων.

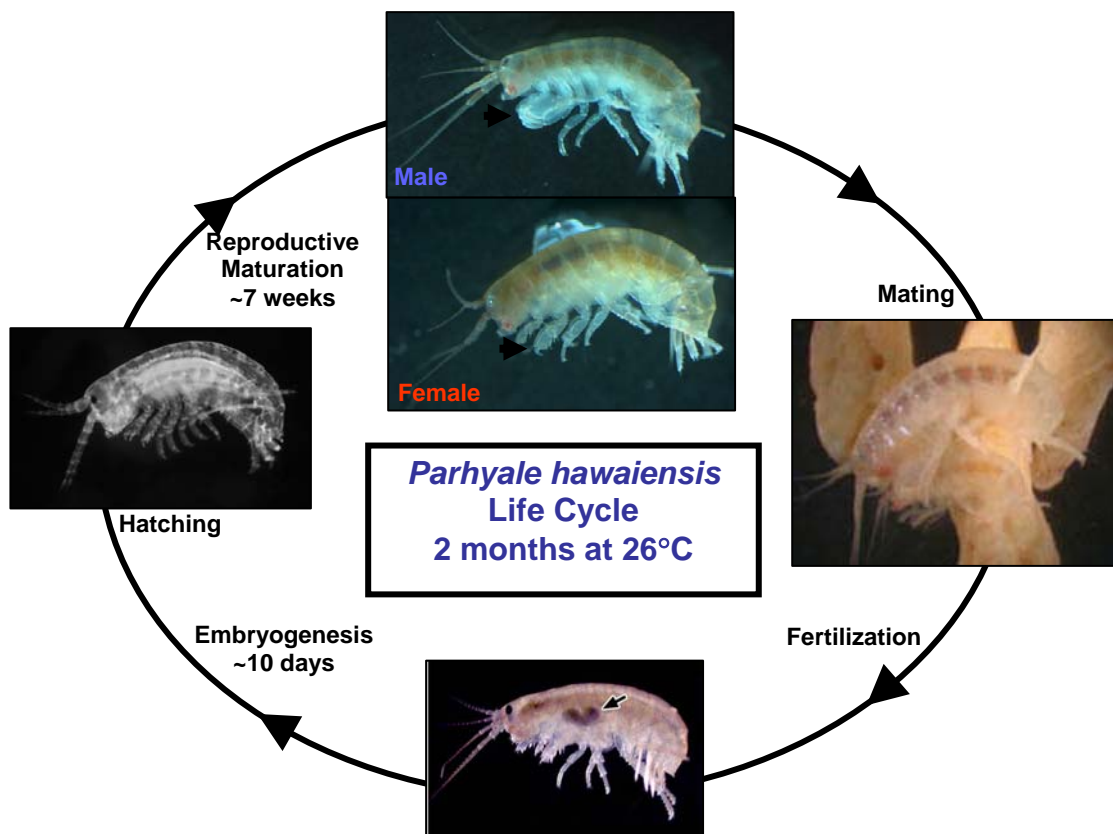
Η **κεφαλική περιοχή** αποτελείται από έξι μεταμερή. Το πρώτο δεν φέρει εξαρτήματα, ενώ τα επόμενα φέρουν κατά σειρά τις πρώτες αντένες (An1), τις δεύτερες αντένες (An2), τις σιαγόνες (mandibles-Mn), τα πρώτα γναθικά εξαρτήματα (maxillae-Mx1) και τα δεύτερα γναθικά εξαρτήματα (Mx2). Επίσης, το πρώτο θωρακικό μεταμερές είναι συντηγμένο στην κεφαλική περιοχή και φέρει τα γναθικά πόδια (maxillipeds-T1). Τα **θωρακικά μεταμερή** (T2-T8) φέρουν από δύο άκρα το καθένα. Τα άκρα των μεταμερών T2 και T3 ονομάζονται γναθοπόδια και συμμετέχουν στο ζευγάριωμα. Το άκρο T3 είναι φυλετικά διμορφικό (μεγαλύτερο στα ώριμα αρσενικά). Τα άκρα T4-T8 ονομάζονται περεοπόδια και συμμετέχουν στην κίνηση. Η **κοιλιακή περιοχή** αποτελείται από τα επόμενα έξι μεταμερή και είναι χωρισμένη σε δύο περιοχές. Τα μεταμερή A1-A3 αποτελούν το πλέον. Τα άκρα τους ονομάζονται πλεοπόδια και συμμετέχουν στην κολυμβητική κίνηση καθώς και στη μεταφορά νερού στα θωρακικά βράγχια. Τα μεταμερή A4-A6 αποτελούν το ουρόσωμα. Τα άκρα τους ονομάζονται ουροπόδια. Στο άκρο του σώματος είναι το τέλσον που είναι σχετικά μικρό συγκριτικά με άλλους τύπους καρκινοειδών. [1]



Εικόνα 2: Το αμφίποδο καρκινοειδές *Parhyale hawaiensis* (από Browne et al, 2005)

1.1 Ο κύκλος ζωής του *Parhyale hawaiiensis*

Ο κύκλος ζωής του αμφίποδου καρκινοειδούς *Parhyale hawaiiensis* διαρκεί περίπου 2 μήνες στους 26°C. Τα ώριμα ενήλικα άτομα αναπαράγονται περίπου κάθε 2-3 εβδομάδες καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου. Τα αναπαραγωγικά ώριμα αρσενικά και θηλυκά άτομα σχηματίζουν ζευγάρια, στα οποία τα αρσενικά κρατούν τα θηλυκά με τα άκρα του μεταμερούς T2. Αφού γονιμοποιηθεί το θηλυκό απομακρύνεται από το αρσενικό με μία έκδυση. Μετά το ζευγάρωμα και τη γονιμοποίηση, το θηλυκό επωάζει τα έμβρυα σε ένα κοιλιακό θύλακα κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, η οποία διαρκεί περίπου 250 ώρες (~10 ημέρες). Ένα θηλυκό άτομο μπορεί να φέρει από 1-25 έμβρυα στο θύλακα με το μέσο όρο να είναι περίπου 6. Αμέσως μετά την εκκόλαψη, τα ζώα φέρουν όλα τα μεταμερή και εξαρτήματα, τα οποία είναι μορφολογικά όμοια με αυτά των ενήλικων ατόμων. Εφτά περίπου εβδομάδες μετά την εκκόλαψη τα αμφίποδα είναι αναπαραγωγικά ώριμα και μπορούν να ζευγαρώσουν. (Εικόνα 3)

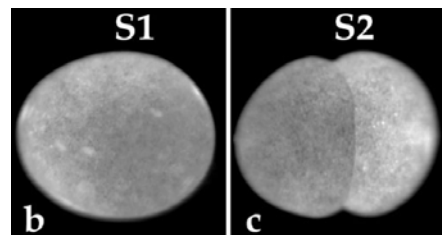


Εικόνα 3: Ο κύκλος ζωής του *Parhyale hawaiiensis*

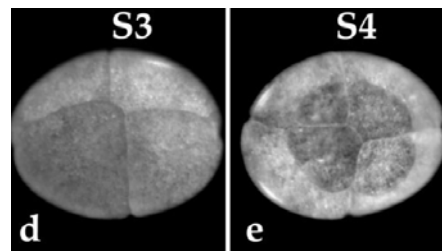
1.2 Η εμβρυογένεση στον *Parhyale hawaiiensis*

Τα αναπτυσσόμενα έμβρυα είναι διαφανή, επιτρέποντας έτσι την εφαρμογή μικροσκοπικών αναλύσεων, ιστοχημικών μεθόδων και τη χρήση φθορίζοντων μορίων μαρτύρων (DsRed, EGFP). Ακόμη, η λέκιθος αποσύρεται νωρίς κατά την εμβρυική ανάπτυξη στο κέντρο του εμβρύου και στη συνέχεια στο έντερο (midgut). Η παρουσία της έγχρωμης λέκιθου δημιουργεί την απαραίτητη αντίθεση για τον εντοπισμό εμβρυικών κυττάρων κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης. Τέλος, η *πλήρης περιγραφή της εμβρυικής ανάπτυξης του *Parhyale hawaiiensis** [1] επιτρέπει τον εύκολο διαχωρισμό των εμβρύων όλων των σταδίων της εμβρυογένεσης.

Στο στάδιο του ενός κυττάρου (0-4 ώρες), το χόριο που περιβάλλει το αυγό σκληραίνει και το αυγό αποκτά ελλειπτικό σχήμα. Η πρώτη διαίρεση είναι καθολική, κάθετη στον μεγάλο άξονα του αυγού και ελαφρώς άνιση οδηγώντας στο σχηματισμό του εμβρύου σταδίου δύο κυττάρων (4-6 ώρες).



Στη συνέχεια ακολουθούν δύο ακόμη καθολικές διαιρέσεις: μία ελαφρώς άνιση και κάθετη στην πρώτη, η οποία οδηγεί στο έμβryo σταδίου τεσσάρων κυττάρων (6-7.5 ώρες), και μία πολύ άνιση και κάθετη στο επίπεδο των δύο πρώτων, που οδηγεί στο σχηματισμό του εμβρύου σταδίου οκτώ κυττάρων (7.5-9 ώρες). Σ' αυτή τη χρονική στιγμή, το έμβryo αποτελείται από τέσσερα μικρομερή και τέσσερα βλαστομερή [1].

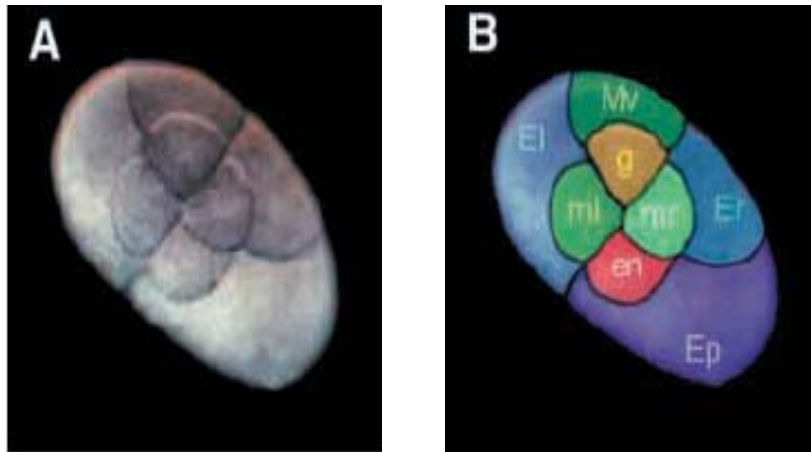


Εικόνα 4: Στάδια εμβρυογένεσης S1-S4 (από Browne et al, 2005)

Στο στάδιο των οκτώ κυττάρων, ο *Parhyale* εμφανίζει ένα αξιοποιήσιμο χαρακτηριστικό. Συγκεκριμένα, μετά από τις τρεις πρώτες διαιρέσεις, υπάρχουν τέσσερα μακρομερή και τέσσερα μικρομερή, τα οποία μπορούν να διαχωριστούν μεταξύ τους σύμφωνα με το μέγεθός τους, τη μορφολογία τους και τις επαφές τους με τα γειτονικά κύτταρα. Καθένα από αυτά τα κύτταρα έχει, ήδη από αυτό το στάδιο, αποκτήσει συγκεκριμένη κυτταρική μοίρα. [2]

Το εκτόδερμα προέρχεται από τρία μακρομερή, ενώ το άλλο μακρομερές δίνει το σπλαχνικό μεσόδερμα. Δύο μικρομερή παράγουν το σωματικό μεσόδερμα, ενώ το τρίτο

δίνει το ενδόδερμα και το τελευταίο τη γαμετική σειρά. Συγκεκριμένα, το μικρότερο μακρομερές είναι το Mv (Mesoderm visceral). Τα άλλα τρία, όπως φαίνονται από την ραχιαία πλευρά και σύμφωνα με τη φορά του ρολογιού, είναι τα Er (Ectoderm right), Ep (Ectoderm posterior) και El (Ectoderm left). Αντίστοιχα, το μικρότερο μικρομερές (και αδερφό κύτταρο του Mv) είναι το g (germ cells). Τα άλλα τρία, όπως φαίνονται από την ραχιαία πλευρά και σύμφωνα με τη φορά του ρολογιού, είναι τα mr (mesoderm right), en (endoderm) και ml (mesoderm left) [2].



Εικόνα 5: (A) Έμβρυο σταδίου οκτώ κυττάρων. Διακρίνονται τα μικρομερή και τα μακρομερή. (B) Αναπαράσταση των βλαστομερών της εικόνας A, ονομασμένα ανάλογα με τη βλαστική στιβάδα στην οποία θα συμμετάσχουν (από Gerberding et al, 2002)

Στα επόμενα στάδια, ακολουθούν μια σειρά από ασύμμετρες διαιρέσεις που οδηγούν στη μεταφορά της λεκίθου στο κέντρο του αναπτυσσόμενου εμβρύου. Σταδιακά, όλα τα κύτταρα αποκτούν παρόμοιο μέγεθος (soccerball stage-S6) και ακολουθούν οι πρώτες μεταναστεύσεις κυττάρων (rosette stage-S7). Έπεται η ανάπτυξη του βλαστικού δίσκου στην εμπρόσθια κοιλιακή περιοχή και, στη συνέχεια, η εμφάνιση των κεφαλικών λοβών. Σ' αυτό το στάδιο έχει ήδη γίνει ο καθορισμός του εμπροσθοπίσθιου και ραχαιοκοιλιακού άξονα σε σχέση με τον άξονα του εμβρύου.

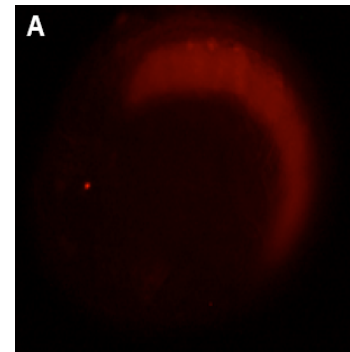
Αργότερα, κατά το στάδιο S13, οι 'οφθαλμοί' (buds) των άκρων αρχίζουν να προβάλλουν εμφανώς από την επιφάνεια του ραχιαίου εκτοδέρματος, από το εμπρόσθιο προς το οπίσθιο τμήμα, ξεκινώντας από την πρώτη αντέννα (An1). Σταδιακά, ακολουθεί ο σχηματισμός όλων των άκρων. Στα στάδια S25-S26, η καρδιά αρχίζει να πάλλεται, η συσσώρευση του εξωσκελετού γίνεται εμφανής και προσδίδει ένα χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα στο έμβρυο και τα άκρα αποκτούν την τελική μορφολογία τους. Επίσης, τα μάτια αποκτούν κόκκινο χρώμα και το έμβρυο φαίνεται να κινεί τους μύες του [1].

Το έμβρυο είναι έτοιμο να εκκολαφθεί μετά από τις 250 περίπου ώρες της εμβρυογένεσης. Είναι χαρακτηριστικό ότι το έμβρυο συνεχίζει να μεγαλώνει κατά τη διάρκεια της εκκόλαψης, πιθανότατα λόγω πρόσληψης νερού.

1.3 Ανάπτυξη εργαλείων για το γενετικό χειρισμό του *Parhyale hawaiiensis*

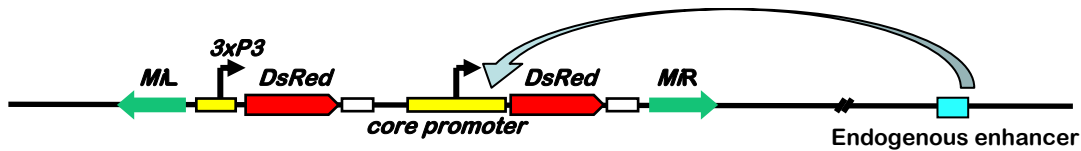
Απαραίτητη προϋπόθεση για τη χρήση ενός οργανισμού ως μοντέλου είναι η ύπαρξη τεχνικών για το γενετικό χειρισμό των ατόμων, οι οποίες θα επιτρέψουν τη μελέτη της λειτουργίας γονιδίων στον οργανισμό αυτό.

Στα πλαίσια της ανάπτυξης τέτοιων μεθόδων, οι Pavlourou & Averof (2005) [3] προχώρησαν στο σταθερό μετασχηματισμό ατόμων *Parhyale* με το μεταθετό στοιχείο Minos, χρησιμοποιώντας την αντίστοιχη τρανσποζάση παρεχόμενη παροδικά με τη μορφή mRNA κι ένα γονίδιο μάρτυρα (DsRed) υπό τον έλεγχο του υποκινητή 3xP3. Όλα αυτά παρέχονται σε έμβρυα σταδίου ενός ή δύο κυττάρων με τη χρήση μικροενέσεων. Τα μετασχηματισμένα άτομα διακρίνονται λόγω της ύπαρξης εντοπισμένου φθορισμού λίγο πιο πίσω από το σχηματιζόμενο μάτι, μετά την όγδοη περίπου ημέρα της εμβρυογένεσης, όπως φαίνεται και στην εικόνα (υπεύθυνο για αυτό το φθορισμό είναι ο συνδυασμός του 3xP3 με το βασικό υποκινητή *hsp70* της *Drosophila*). Η συχνότητα μετασχηματισμού ήταν ιδιαίτερα υψηλή (20-30%) [4].

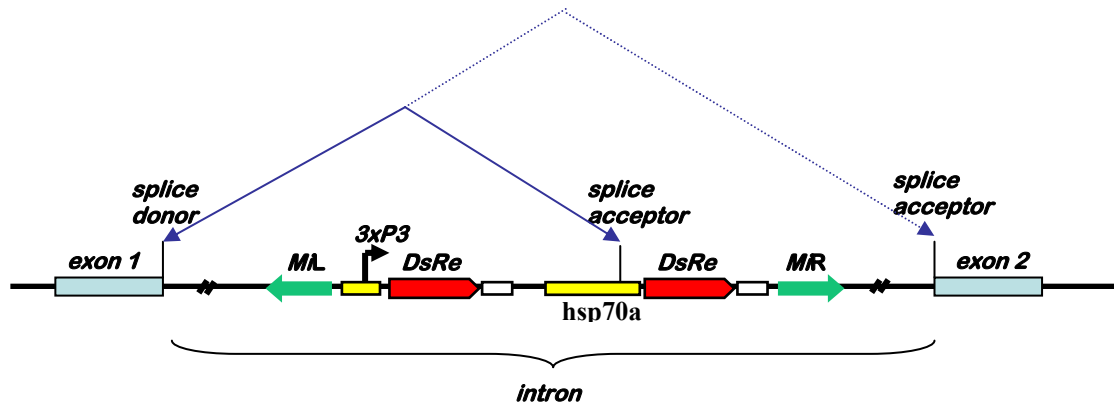


Εικόνα 6: Φθορισμός σε μετασχηματισμένο με το γονίδιο αναφοράς 3xP3-DsRed έμβρυο. Παρατηρείται έκφραση της DsRed στο πίσω μέρος του κεφαλιού καθώς και ο αυτοφθορισμός της λεκίθου. (από διδακτορική διατριβή Παυλόπουλου, 2004)

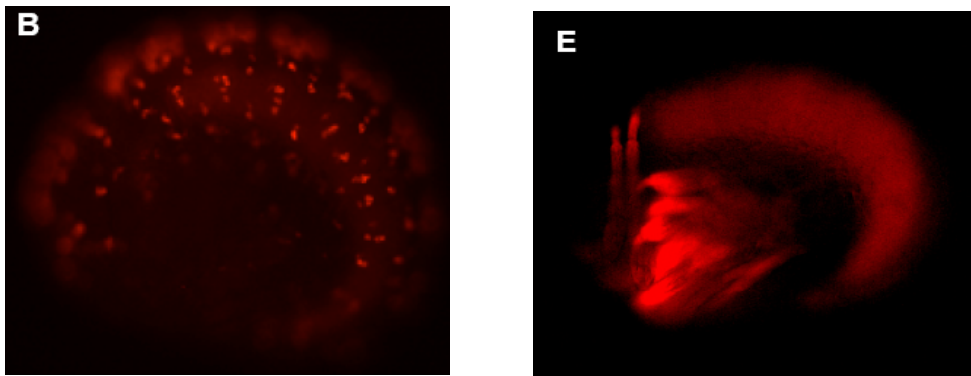
Επίσης, έχουν κατασκευαστεί εργαλεία για παγίδευση ενισχυτών ή/και εξωνίων. Δύο από αυτά φέρουν την DsRed υπό τον έλεγχο των βασικών υποκινητών Ph-*hsp70a* και του θερμοεπαγόμενου στοιχείου PhHS. Οι δύο αυτοί υποκινητές δίνουν υψηλά ποσοστά παγίδευσης ενισχυτών ή/και εξωνίων (περίπου στο 20% των διαγονιδιακών σειρών). Ο τρόπος που γίνεται η παγίδευση ενισχυτών και εξωνίων, όπως επίσης και αντίστοιχα παραδείγματα παγίδευσης, φαίνονται στις παρακάτω εικόνες:



Εικόνα 7: Παγίδευση ενισχυτών. Αν το μεταθετό στοιχείο ενσωματωθεί μέσα στο πεδίο δράσης ενός ενισχυτή, μπορεί να τον “παγιδεύσει” και η πρωτεΐνη-μάρτυρας θα παρουσιάζει πρότυπο έκφρασης ανάλογα με την επίδραση του ενισχυτή στο βασικό της υποκινητή.



Εικόνα 8: Παγίδευση εξωνίων. Αν το μεταθετό στοιχείο φέρει ένα splice acceptor και ενσωματωθεί μέσα στο ιντρόνιο ενός γονιδίου, μπορεί να εκφράσει το γονίδιο-μάρτυρα (της DsRed εν προκειμένω) παράλληλα με το γονίδιο στο ιντρόνιο του οποίου έχει μετατεθεί.



Εικόνα 9: Παγίδευση εξωνίων με χρήση του υποκινητή Ph-hsp70a. Παρατηρείται πρότυπο έκφρασης της πρωτεΐνης-μάρτυρα στο περιφερικό νευρικό σύστημα (αριστερά) και στα άκρα των ποδιών (δεξιά). (Παυλόπουλος και Αβέρωφ, αδημοσίευτα αποτελέσματα)

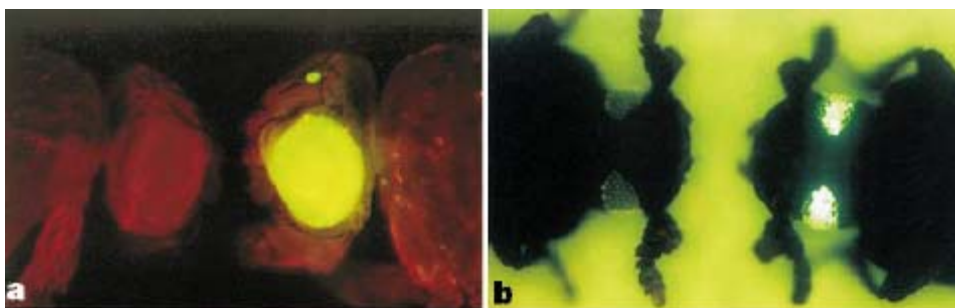
Ακόμη, έχουν ταυτοποιηθεί cis-ρυθμιστικά στοιχεία, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για κατευθυνόμενη έκφραση των επιθυμητών γονιδίων, όπως ο υποκινητής PhHS που κατευθύνει τη θερμοεπαγόμενη έκφραση γονιδίων και ο υποκινητής PhMS που κατευθύνει την ιστοειδική έκφραση γονιδίων στο μυϊκό σύστημα.

Ο υποκινητής PhHS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για εκτοπική έκφραση των επιθυμητών γονιδίων, ελέγχοντας το χρόνο της έκφρασης τους.

2. Το ρυθμιστικό στοιχείο 3xP3

Ο γενετικός χειρισμός των αρθροπόδων απαιτεί το σταθερό μετασχηματισμό της γαμετικής σειράς. Ο τρόπος με τον οποίο γίνεται ο μετασχηματισμός είναι η χρήση μεταθετών στοιχείων για την εισαγωγή του διαγονιδίου στο γονιδίωμα και ο εντοπισμός των μετασχηματισμένων ατόμων με τη βοήθεια μαρτύρων μετασχηματισμού. Η αποτελεσματικότητα, λοιπόν, του μετασχηματισμού εξαρτάται *αφ' ενός από την κινητικότητα του μεταθετού στοιχείου και αφ' ετέρου από την ανιχνευσιμότητα του μάρτυρα μετασχηματισμού.*

Ο μετασχηματισμός με τη χρήση μεταθετών στοιχείων είναι μια τεχνολογία χρησιμοποιημένη τόσο στη *Drosophila* όσο και σε άλλα έντομα, όπως οι μύγες *Ceratitis capitata* [5] και *Musca domestica* [6], τα κουνούπια *Aedes aegypti* [7] και *Anopheles stephensi* [8], το σκαθάρι *Tribolium castaneum* [9] και ο μεταξοσκώληκας *Bombyx mori* [10]. Η πρώτη πρωτεΐνη-μάρτυρας μετασχηματισμού που χρησιμοποιήθηκε ήταν η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (EGFP-Enhanced Green Fluorescent Protein) [11], ενώ αργότερα χρησιμοποιήθηκε και η κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη DsRed [12]. Ένας τεχνητός υποκινητής ο οποίος είναι ιδιαίτερα ενεργός και τοπικά περιορισμένος είναι ο 3xP3, ο οποίος αποτελείται από τρεις θέσεις πρόσδεσης ομοδιμερών του Pax-6. Όπως έχει δειχτεί, το ρυθμιστικό αυτό στοιχείο, το οποίο τοποθετείται άνωθεν του TATA box, μπορεί να κατευθύνει την έκφραση της πρωτεΐνης μάρτυρα στο μάτι τόσο της *Drosophila melanogaster* όσο και του *Tribolium castaneum* [5].



Εικόνα 10: *Drosophila* (a) και *Tribolium* (b) μετασχηματισμένα με το μάρτυρα 3xP3-EGFP. Φαίνεται η έκφραση της EGFP στο μάτι των διαγονιδιακών ατόμων. (από Berghammer AJ et al, 1999)

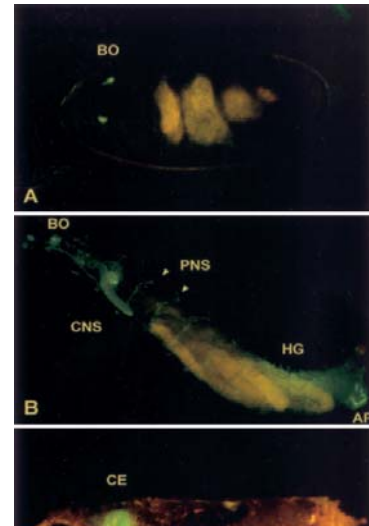
Ο μεταγραφικός παράγοντας Pax-6/Eyeless είναι ο βασικός ρυθμιστής της ανάπτυξης του οφθαλμού στα μετάρζωα. Είναι μέλος της οικογένειας των γονιδίων Pax. Κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που περιέχει ένα paired domain κι ένα homeodomain. Ο μοριακός χαρακτηρισμός των γονιδίων Pax-6 από διαφορετικά είδη διαφόρων φύλων ζώων, καθώς και η ανάλυση της λειτουργίας τους στα αναπτυσσόμενα μάτια και το κεντρικό νευρικό σύστημα των σπονδυλωτών, της *Drosophila* αλλά και του *Caenorhabditis elegans* υποδηλώνουν ότι η πρωτεΐνη Pax-6 είναι ιδιαίτερα συντηρημένη [13].

Το 3xP3 άνωθεν μιας πρωτεΐνης-μάρτυρα (EGFP ή DsRed) αποτελεί ένα ιδιαίτερα ευαίσθητο μάρτυρα μετασχηματισμού. Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί σε μια ευρεία γκάμα εντόμων, στην οποία, εκτός από τα Δίπτερα (*Drosophila*, *Ceratitis*, *Anopheles*) και τα Κολεόπτερα (*Tribolium*) περιλαμβάνονται ένα Λεπιδόπτερο (*Bombyx*) και Υμενόπτερα.

Η κατευθυνόμενη από το 3xP3 έκφραση της πρωτεΐνης EGFP (ή DsRed) παρατηρείται σε προνυμφικά, νυμφικά και ενήλικα στάδια. Στη *Drosophila*, συγκεκριμένα, ο φθορισμός εμφανίζεται πρώτη φορά στο στάδιο 16 του εμβρύου στο αναπτυσσόμενο μάτι (bolwig organ-BO). Επιπρόσθετος φθορισμός στο κεντρικό και στο περιφερικό νευρικό σύστημα (CNS, PNS), καθώς και στο οπίσθιο έντερο (hindgut-HG) και στα anal plates (AP), εμφανίζεται στο στάδιο 17 πριν την εκκόλαψη και διατηρείται κατά τα τρία προνυμφικά στάδια. Στα όψιμα νυμφικά στάδια, ο φθορισμός περιορίζεται στο αναπτυσσόμενο σύνθετο μάτι [14].

Σε μια προσπάθεια να πιστοποιηθεί η χρήση του 3xP3-(γονίδιο μάρτυρας) σε άλλα είδη εκτός των εντόμων,

αλλά και να δημιουργηθούν εργαλεία χειρισμού του *Parhyale hawaiiensis* (όπως είδαμε παραπάνω), έγινε προσπάθεια μετασχηματισμού του αμφιπόδου με το 3xP3-DsRed. Το αποτέλεσμα φαίνεται στην εικόνα 12. Η διαφορά με το πρότυπο έκφρασης που είχε παρατηρηθεί στη μύγα και στο σκαθάρι είναι εμφανής. Στην προκειμένη περίπτωση ο φθορισμός παρουσιάζεται εντοπισμένος σε ένα σημείο στο πίσω μέρος του κεφαλιού [4]. Ο πιθανότερος λόγος για τον οποίο μπορεί να συμβαίνει αυτό είναι το γεγονός ότι μεταξύ του ρυθμιστικού στοιχείου 3xP3 και της πρωτεΐνης DsRed υπάρχει ο βασικός υποκινητής



Εικόνα 11: Το πρότυπο ενεργοποίησης του 3xP3 σε εμβρυικά, πρώιμα και όψιμα νυμφικά στάδια στη *Drosophila*. (από Horn C et al, 2000)

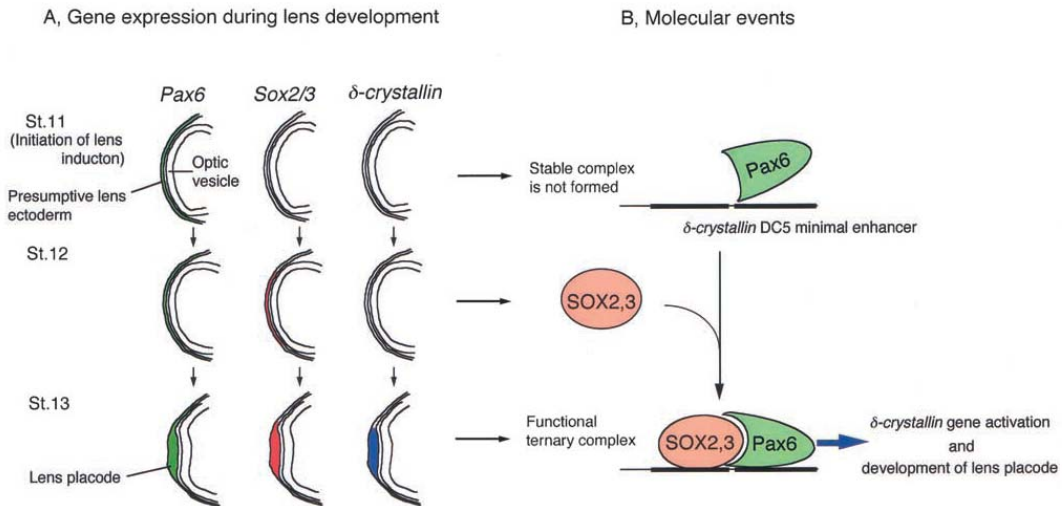
hsp70 της *Drosophila*, ο οποίος, πιθανότατα, δεν είναι πλήρως λειτουργικός στο αμφίποδο. Το θέμα αυτό θα συζητηθεί εκτενέστερα παρακάτω.



Εικόνα 12: Το πρότυπο έκφρασης του μάρτυρα 3xP3-DsRed, όπως φαίνεται σε άτομα *Parhyale* (από Pavlopoulos & Averof, 2005)

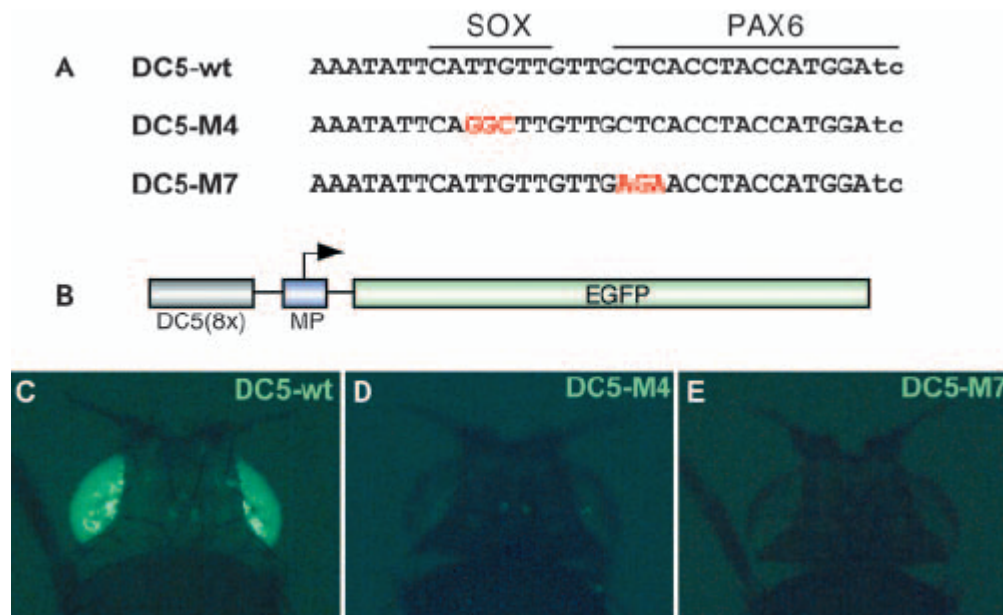
3. Το ρυθμιστικό στοιχείο DC5

Το DC5 είναι ένας τεχνητός υποκινητής, ο οποίος αποτελείται από οκτώ επαναλήψεις θέσεων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων που βρίσκονται στο γονίδιο της δ-κρυσταλλίνης στο κοτόπουλο. Η έκφραση της δ-κρυσταλλίνης στο φακό του ματιού, υπό τον έλεγχο του DC5, βρέθηκε για πρώτη φορά στο κοτόπουλο. Ο Pax-6 προσδένεται συνεργατικά με το μεταγραφικό παράγοντα Sox-2 στο DC5, οδηγώντας στο σχηματισμό ενός λειτουργικού τριμερούς συμπλόκου. Αυτό το σύμπλοκο με τη σειρά του οδηγεί στην έκφραση του γονιδίου της δ-κρυσταλλίνης και, ως εκ τούτου, στην έναρξη της διαφοροποίησης των κυττάρων του φακού [15]



Εικόνα 13: (Α) Έκφραση των Pax-6, Sox-2 και δ-κρυσταλλίνης κατά τη διαφοροποίηση των κυττάρων του φακού και (Β) τα αντίστοιχα μοριακά γεγονότα. Πρώτο χρονικά εκφράζεται το Pax-6 το οποίο προσδένεται, αν και όχι σταθερά, στο DC5. Στο επόμενο στάδιο ακολουθεί η έκφραση του Sox-2 που προκαλεί το σχηματισμό του τριμερούς συμπλόκου και, ακολούθως, την έκφραση της δ-κρυσταλλίνης. Ο σχηματισμός του συμπλόκου πιθανότατα συμπεριλαμβάνει αλλαγές στη διαμόρφωση των Pax-6 και Sox-2. (από Kamachi Y et al, 2001)

Αυτό που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι το DC5 χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία στη *Drosophila*. Είναι χαρακτηριστικό ότι τα γονίδια των κρυσταλλινών, αν και παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια ως προς την προέλευσή τους, ρυθμίζονται αναπτυξιακά από λίγους μεταγραφικούς παράγοντες. Έτσι, όταν εισήχθη το κομμάτι DC5 στη *Drosophila*, φάνηκε ότι, όχι μόνο είναι ενεργό στο σύνθετο μάτι της μύγας, αλλά, ειδικότερα, στα κύτταρα που σχηματίζουν το φακό των ομματιδίων (crystalline cone cells). Επίσης, μεταλλαγή στα σημεία πρόσδεσης, είτε του μεταγραφικού παράγοντα Sox είτε του Pax, δεν επέτρεψε την ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου μάρτυρα (EGFP) που βρισκόταν κάτωθεν του DC5, υποδεικνύοντας ότι και στη *Drosophila* είναι απαραίτητη η ακεραιότητα των θέσεων πρόσδεσης και των δύο μελών του τριμερούς συμπλόκου (Εικόνα 20). Μία σημαντική διαφορά είναι ότι στην ενεργοποίηση του DC5 δε συμμετέχει ο Pax-6, αλλά ο συγγενής παράγοντας Pax-2, ο οποίος αλληλεπιδρά με το Sox-2 για να ενεργοποιήσει την έκφραση της κρυσταλλίνης [16].



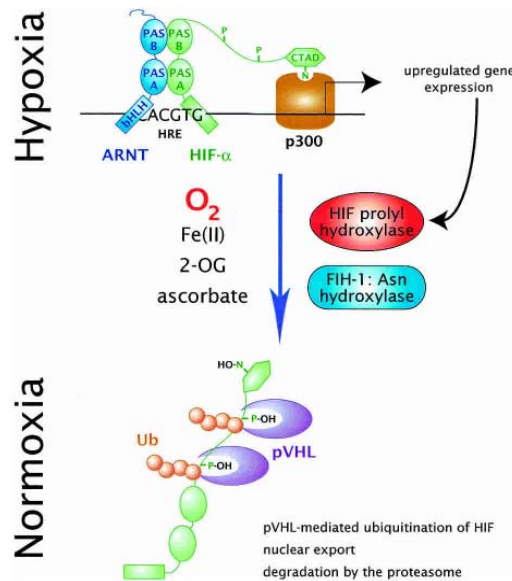
Εικόνα 14: Το αγρίου τύπου ρυθμιστικό στοιχείο DC5 είναι ενεργό στο σύνθετο μάτι της *Drosophila*. Επίσης, οι μεταλλαγμένες μορφές του DC5 δεν έδειξαν καμία ενεργότητα. (από Blanco J et al, 2005).

4. Hypoxia Response Element (HRE)

Ο HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) είναι ένας ετεροδιμερής μεταγραφικός παράγοντας που αποτελείται από δύο υπομονάδες της οικογένειας των πρωτεϊνών bHLH. Ο HIF-1 προσδένεται στα ρυθμιστικά στοιχεία HRE, που βρίσκονται σε μια ευρεία γκάμα γονιδίων που ρυθμίζονται από συνθήκες υποξίας, επάγοντας έτσι την εξαρτώμενη από υποξία μεταγραφή.

Ο τρόπος που γίνεται αυτό στα θηλαστικά συνίσταται στην *συνεχόμενη έκφραση της υπομονάδας HIF-β και στη ρύθμιση της συσσώρευσης της υπομονάδας HIF-α από την παρουσία οξυγόνου*. Πιο αναλυτικά, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνωσης, δύο κατάλοιπα προλίνης μέσα στην περιοχή ODD της υπομονάδας HIF-α τροποποιούνται από την οικογένεια EGLN/HPH/PHD των HIF-προλυλυδροξυλασών, επιτρέποντας την αναγνώριση του HIF από ένα σύμπλοκο ουβικουτινιλίωσης που οδηγεί στην αποικοδόμηση της υπομονάδας HIF-α. Εν τω μεταξύ, η ασπαραγινυλυδροξυλάση FIH-1 τροποποιεί τη περιοχή CTAD της HIF-α, εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση της με μεταγραφικούς ενεργοποιητές, όπως είναι ο p300. Όταν τα επίπεδα οξυγόνου μειωθούν (συνθήκες υποξίας), τόσο η προλύλ- όσο και η ασπαραγινύλ-υδροξυλίωση παρεμποδίζονται. Η υπομονάδα HIF-α συσσωρεύεται και

αλληλεπιδρά με την υπομονάδα HIF-β και τη μεταγραφική μηχανή, επάγοντας έτσι τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων του HIF [17].



Εικόνα 15: Ρύθμιση της σταθερότητας και ενεργότητας του HIF μεταγραφικού παράγοντα από την υποξία (από Bruick RK, 2003)

Αντίστοιχη είναι και η διαδικασία που ακολουθείται στη *Drosophila*. Οι πρωτεΐνες Sima και Tango αποτελούν τις υπομονάδες HIF-α και HIF-β αντίστοιχα. Για τη μελέτη του συστήματος στη *Drosophila* και τη σύγκριση του με αυτό των θηλαστικών χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες HRE του γονιδίου LDH-A (Lactate DeHydrogenase-A) των θηλαστικών, που αποκρίνεται σε συνθήκες υποξίας και είναι συντηρημένο στις μύγες. Ο υποξικός ενισχυτής του LDH-A αποτελείται από δύο HREs, διαχωρισμένα από 8 ζεύγη βάσεων, και ένα CRE (Cyclic AMP Response Element) 16 βάσεις παρακάτω. Η κατασκευή που χρησιμοποιήθηκε περιέχει ένα διμερές του ενισχυτή του LDH-A, όπως φαίνεται και στην εικόνα 16 [18].



Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση του τεχνητού υποκινητή, ο οποίος αποτελείται από δύο επαναλήψεις ενός τμήματος 51 ζευγών βάσεων το οποίο προέρχεται από τον ενισχυτή της γαλακτικής αφυδρογονάσης του ποντικού. Το τμήμα αυτό περιέχει δύο HREs (Hypoxia Response Elements) και ένα CRE (Cyclic AMP Responsive Element). (από Lavista-Llanos S et al, 2002)

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Τεχνικές μοριακής βιολογίας

1.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή/μεσαία κλίμακα (mini/medi prep)

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Merlin, που δίνει άριστης ποιότητας πλασμιδιακό DNA [http://130.15.90.245/methods/merlin_miniprep.html].

Για απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα, χρησιμοποιήθηκαν εμπορικές ιοντοανταλλακτικές στήλες (Nucleobond), οι οποίες προσφέρουν άριστης ποιότητας πλασμιδιακό DNA για όλες τις χρήσεις.

1.2 Απομόνωση ολικού RNA από έμβρυα και ενήλικα άτομα *Parhyale*

Για την απομόνωση ολικού RNA από έμβρυα και ενήλικα άτομα *Parhyale*, χρησιμοποιήθηκε το RNAqueous-Micro Scale kit της Ambion. Χρησιμοποιήθηκαν 10 έμβρυα ή ένα ενήλικο σε κάθε διαδικασία απομόνωσης ολικού RNA.

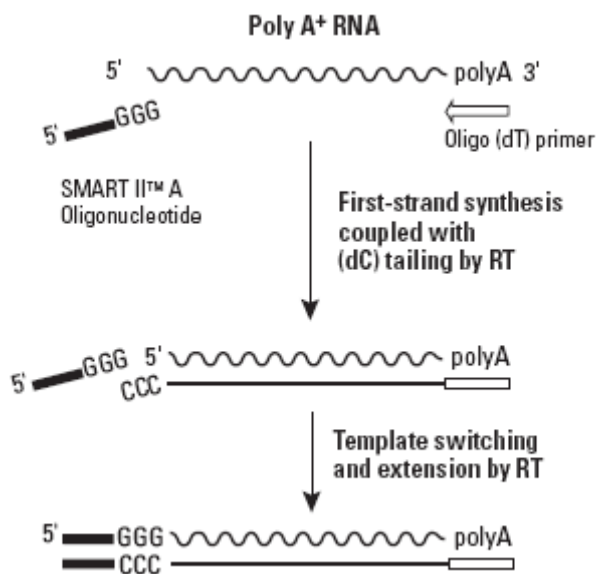
1.3 5' Rapid Amplification of cDNA Ends (5' RACE)

Οι αντιδράσεις του 5' RACE έγιναν με το SMART RACE cDNA amplification kit της Clontech σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αρχικά, συγκεντρώθηκαν 10 έμβρυα (κατά την όγδοη περίπου ημέρα της εμβρυογένεσης), τα οποία προέρχονταν από τη διαγονιδιακή σειρά που φέρει την κατασκευή PhHS-DsRed και ένα ενήλικο άτομο από τη διαγονιδιακή σειρά που φέρει την κατασκευή PhMS-DsRed. Επελέγησαν τα άτομα τα οποία έφεραν το σημείο φθορισμού πίσω από το μάτι, χαρακτηριστικό του δείκτη 3xP3-DsRed. Τα έμβρυα της διαγονιδιακής σειράς που έφεραν το θερμοεπαγόμενο στοιχείο υπέστησαν θερμικό σοκ (1 ώρα στους 37°C) και μετά από δύο ώρες (χρόνος που απαιτείται για εμφάνιση του μεταγράφου) καταψύχθηκαν σε ξηρό πάγο. Αντίστοιχα, το άτομο της άλλης σειράς καταψύχθηκε σε ξηρό πάγο.

Στη συνέχεια, ακολούθησε η απομόνωση ολικού RNA με τη χρήση του RNAqueous-MicroScale kit. Το ολικό RNA που απομονώθηκε ήταν 3 μg από δέκα

έμβρυα της διαγονιδιακής σειράς PhHS-DsRed και 440 ng από ένα άτομο της διαγονιδιακής σειράς PhMS-DsRed.

Μια ποσότητα του ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής που οδηγεί στη σύνθεση της πρώτης αλυσίδας του cDNA, η οποία με τη σειρά της χρησιμοποιείται στην αντίδραση PCR για τον πολλαπλασιασμό των άκρων του επιθυμητού cDNA. Ο τρόπος που γίνεται η σύνθεση του cDNA περιγράφεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 17: Μηχανισμός σύνθεσης του cDNA. Η αντίστροφη μεταγραφάση χρησιμοποιεί ως εκκινήτη το oligo dT για τη σύνθεση του cDNA. Όταν τελειώσει η αντίστροφη μεταγραφάση, η αντίστροφη μεταγραφάση MMLV προσθέτει 3 κατάλοιπα κυτοσίνης στο συντιθέμενο 3' άκρο. Εκεί προσδένεται το ολιγονουκλεοτίδιο που έχουμε προσθέσει στην αντίδραση, το οποίο φέρει 3 κατάλοιπα γουανίνης στο 3' άκρο του. Στη συνέχεια, η αντίστροφη μεταγραφάση MMLV προσθέτει τα υπόλοιπα νουκλεοτίδια σύμφωνα με το νέο υπόστρωμα DNA. Στην αντίδραση PCR που ακολουθεί, χρησιμοποιείται ένας ειδικός, για το επιθυμητό cDNA, εκκινήτης και ο εκκινήτης που αντιστοιχεί στο ολιγονουκλεοτίδιο που προαναφέρθηκε και το οποίο υπάρχει σε όλα τα cDNA.

Οι αντιδράσεις που έγιναν για το RACE είναι οι παρακάτω:

Σύνθεση cDNA

ολικό RNA	290ng/μl (PhHS) / 40ng/μl (PhMS)	3 μl
oligo-dT εκκινητής	12μM	1 μl
SMART ολιγονουκλεοτίδιο	12μM	1 μl
ρυθμιστικό διάλυμα	2X	2 μl
DTT	20μM	1 μl
μείγμα dNTPs	10μM	1 μl
MMLV αντίστροφη μεταγραφάση	200U/μl	1 μl
τελικός όγκος αντίδρασης		10 μl

5' RACE (Rapid Amplification of cDNA ends)

cDNA		2.5 μl
κοινός εκκινητής (universal primer)	10X	5 μl
ειδικός εκκινητής (DsRedSMART)	10μM	1 μl
ρυθμιστικό διάλυμα	10X	5 μl
μείγμα dNTPs	10μM	1 μl
πολυμεράση	50X	1 μl
νερό		34.5 μl
τελικός όγκος αντίδρασης		50 μl

Πρόγραμμα PCR		
Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
94°C	30 δευτερόλεπτα	5
72°C	3 λεπτά	
94°C	30 δευτερόλεπτα	5
70°C	30 δευτερόλεπτα	
72°C	3 λεπτά	25
94°C	30 δευτερόλεπτα	
68°C	30 δευτερόλεπτα	
72°C	3 λεπτά	

Στη συνέχεια, αφού απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν τα τμήματα DNA από το πήκτωμα της αγαρόζης, εισήχθησαν στον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T easy και κλωνοποιήθηκαν σε δεκτικά κύτταρα DH5α. Ακολούθησε επιλογή των κλώνων οι οποίοι έφεραν τις επιθυμητές αλληλουχίες στο πλασμίδιο και, μετά την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, πραγματοποιήθηκε nested PCR για να πιστοποιηθεί ότι αυτές είναι πράγματι οι επιθυμητές αλληλουχίες και να σταλούν κατόπιν για αλληλούχιση.

1.4 Χειρισμός νουκλεϊκών οξέων

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

1.5 In vitro σύνθεση capped Minos transposase mRNA

Το *in vitro* μετάγραφο της Minos τρανσποζάσης συντέθηκε με το kit T7mMESSAGEMACHINE (Ambion), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Κάθε αντίδραση 20 μl οδηγούσε στην παραγωγή ~30μg mRNA. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pBlueSKMimRNA [19] ευθυγραμμισμένο με NotI. Όλες οι αντιδράσεις επωάζονταν στο τέλος με TURBO DNaseI, ακολουθούσε εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση του mRNA με ισοπροπανόλη. Το mRNA διατηρούταν αδιάλυτο στην ισοπροπανόλη στους -20°C. Πριν τη χρήση του, ένα μικρό κλάσμα φυγοκεντρούταν στους 4°C (13000 στροφές για 30 λεπτά), πλενόταν με 70% αιθανόλη, αναδιαλυόταν σε νερό και ποσοτικοποιούνταν φωτομετρικά.

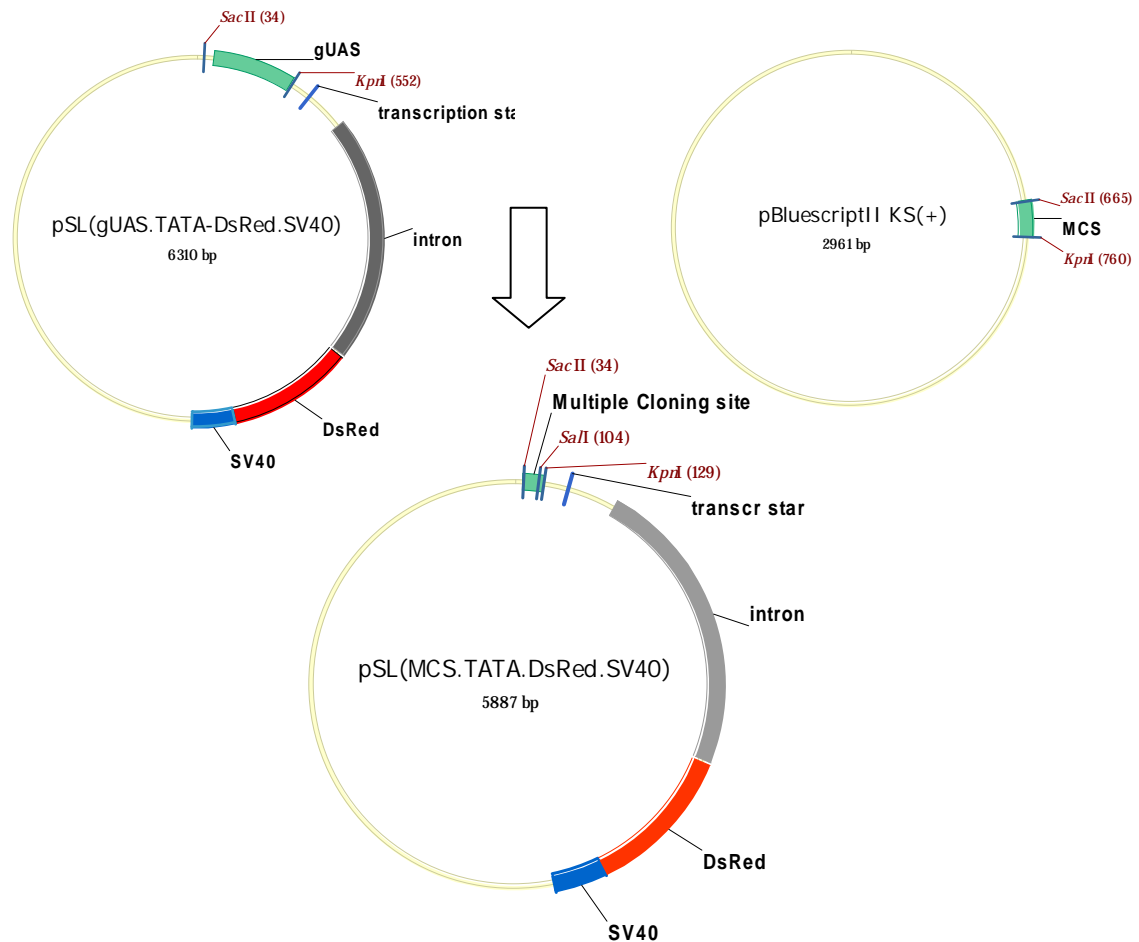
2. Δημιουργία πλασμιδιακών κατασκευών για έλεγχο της ενεργότητας του βασικού υποκινητή του PhHS

Οι πλασμιδιακές κατασκευές οι οποίες κατασκευάστηκαν για τις μικροενέσεις σε έμβρυα *Parhyale* είναι οι παρακάτω:

- A) pMi{3xP3(*Dm* basal promoter).EGFP.SV40pA-3xP3(*Ph* basal promoter).DsRed.SV40pA}
- B) pMi{3xP3(*Dm* basal promoter).DsRed.SV40pA-DC5(*Ph* basal promoter).DsRed.SV40pA }

Γ) pMi{3xP3(*Dm* basal promoter).DsRed.SV40 pA -HRE(*Ph* basal promoter). DsRed. SV40pA }

Αρχικά, για πρακτικούς λόγους, κατασκευάστηκε ένα πλασμίδιο το οποίο φέρει την κατασκευή {*Ph* basal promoter.DsRed.SV40} και στο οποίο κλωνοποιήθηκαν τα ρυθμιστικά στοιχεία 3xP3, DC5 και HRE. Για την κατασκευή αυτού το πλασμιδίου, χρησιμοποιήθηκε το ήδη υπάρχον pSL{gUAS.TATA.DsRed.SV40} το οποίο είχε σχηματιστεί με αντικατάσταση των σημείων πρόσδεσης του HSF με τα gUAS. Η σχεδίαση των επόμενων βημάτων περιελάμβανε την αντικατάσταση των gUAS στοιχείων από ένα Multiple Cloning Site (MCS), ώστε να διευκολυνθούν οι επόμενες υποκλωνοποιήσεις. Έτσι, με χρήση των περιοριστικών ενζύμων SacII και KpnI, απομονώθηκαν τα στοιχεία gUAS και στη θέση τους εισήχθη το MCS του pBluescriptII KS(+), όπως φαίνεται και στην εικόνα:

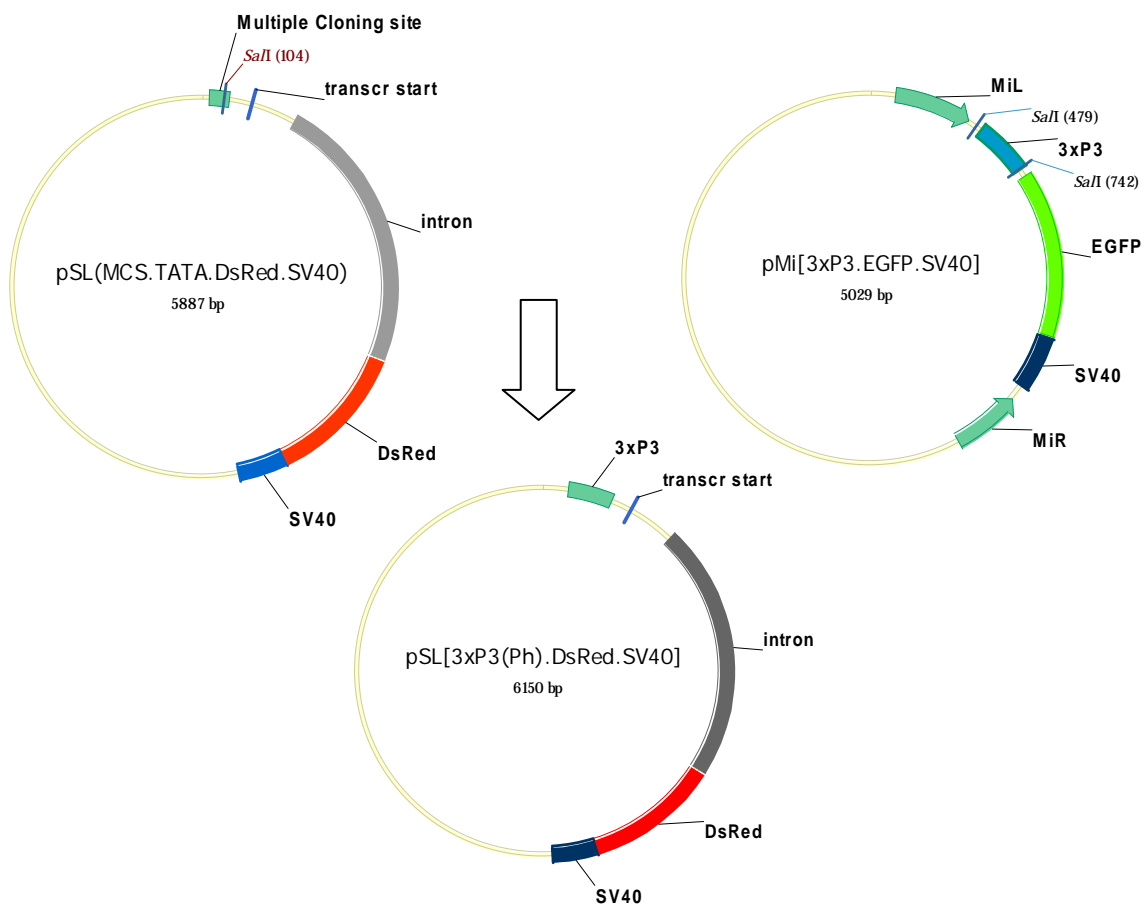


2.1 Η πλασμιδιακή κατασκευή pMi{3xP3(Dm basal promoter).EGFP.SV40-3xP3(Ph basal promoter).DsRed.SV40}

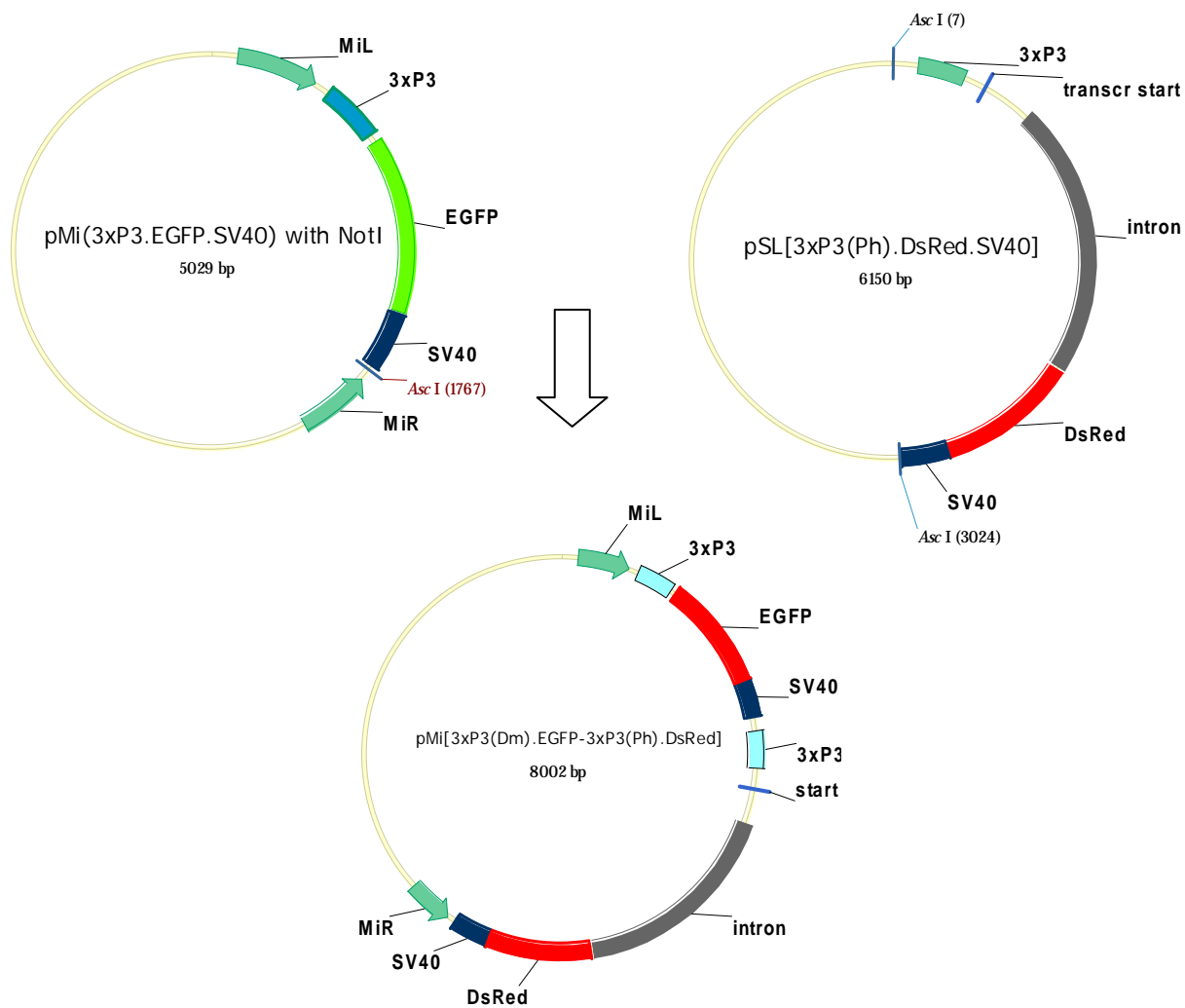
Για τη μελέτη της δράσης του βασικού υποκινητή του *Parhyale hawaiiensis* έναντι αυτού της *Drosophila melanogaster*, τοποθετήθηκε η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη υπό τον έλεγχο του 3xP3 και του βασικού υποκινητή της μύγας και η κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη DsRed υπό τον έλεγχο του 3xP3 και του βασικού υποκινητή του αμφιπόδου. Αυτό επιτρέπει τη σύγκριση των προτύπων έκφρασης των δύο φθορίζουσών πρωτεϊνών και ως εκ τούτου των αντίστοιχων βασικών υποκινητών.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για το σχηματισμό αυτής της πλασμιδιακής κατασκευής ήταν η παρακάτω:

Αρχικά, απομονώθηκε το ρυθμιστικό στοιχείο 3xP3 από το προϋπάρχον πλασμίδιο pMi{3xP3.EGFP.SV40} με τη χρήση του περιοριστικού ενζύμου SalI και υποκλωνοποιήθηκε στην αντίστοιχη θέση της κατασκευής που περιγράφηκε προηγουμένως pSL{MCS.TATA.DsRed.SV40}.



Ακολούθησε υποκλωνοποίηση του *AscI* τμήματος της παραθρείσας κατασκευής στο πλασμίδιο pMi{3xP3.EGFP.SV40}, που οδήγησε στο σχηματισμό της πλασμιδιακής κατασκευής pMi{3xP3(*Dm* basal promoter).EGFP.SV40-3xP3(*Ph* basal promoter).DsRed.SV40}, που ενέθηκε στα έμβρυα.

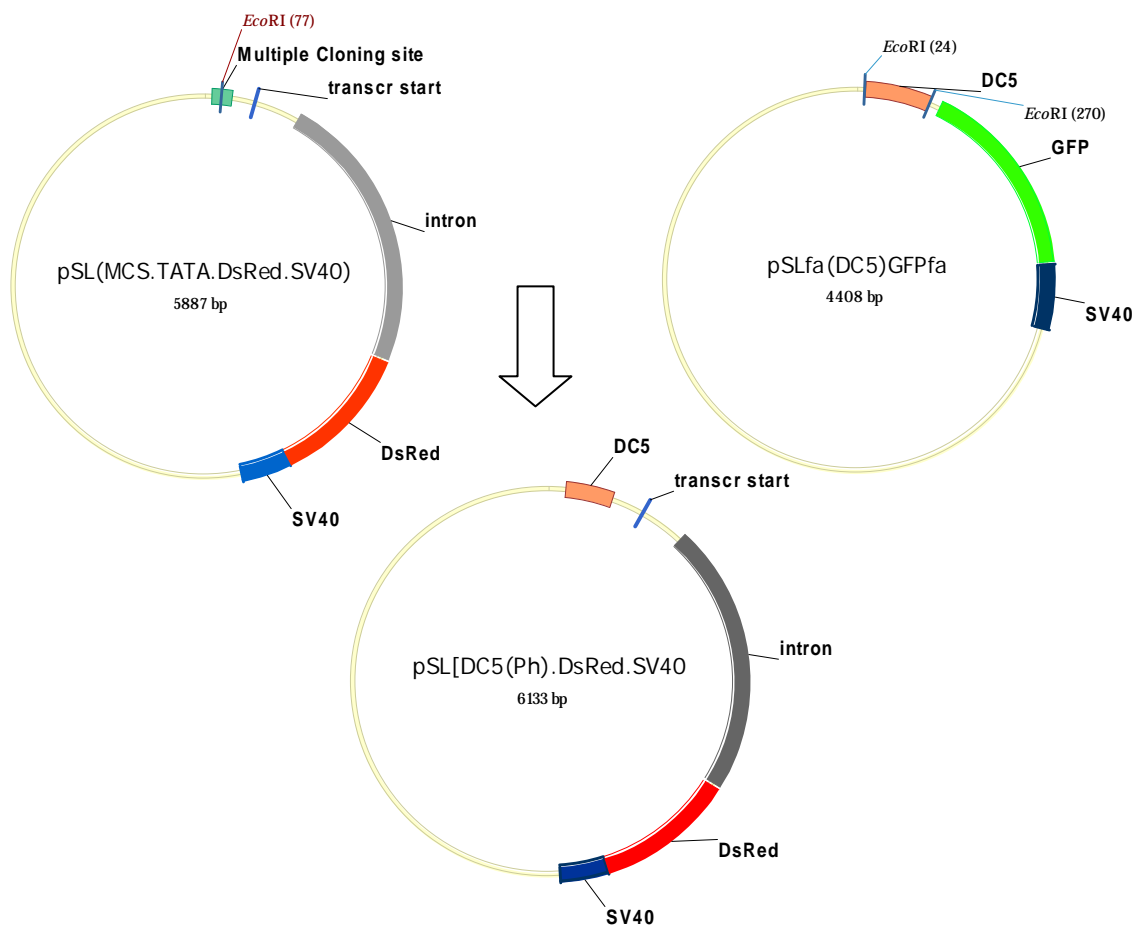


2.2 Η πλασμιδιακή κατασκευή pMi{3xP3(Dm basal promoter).DsRed.SV40-DC5(Ph basal promoter).DsRed.SV40}

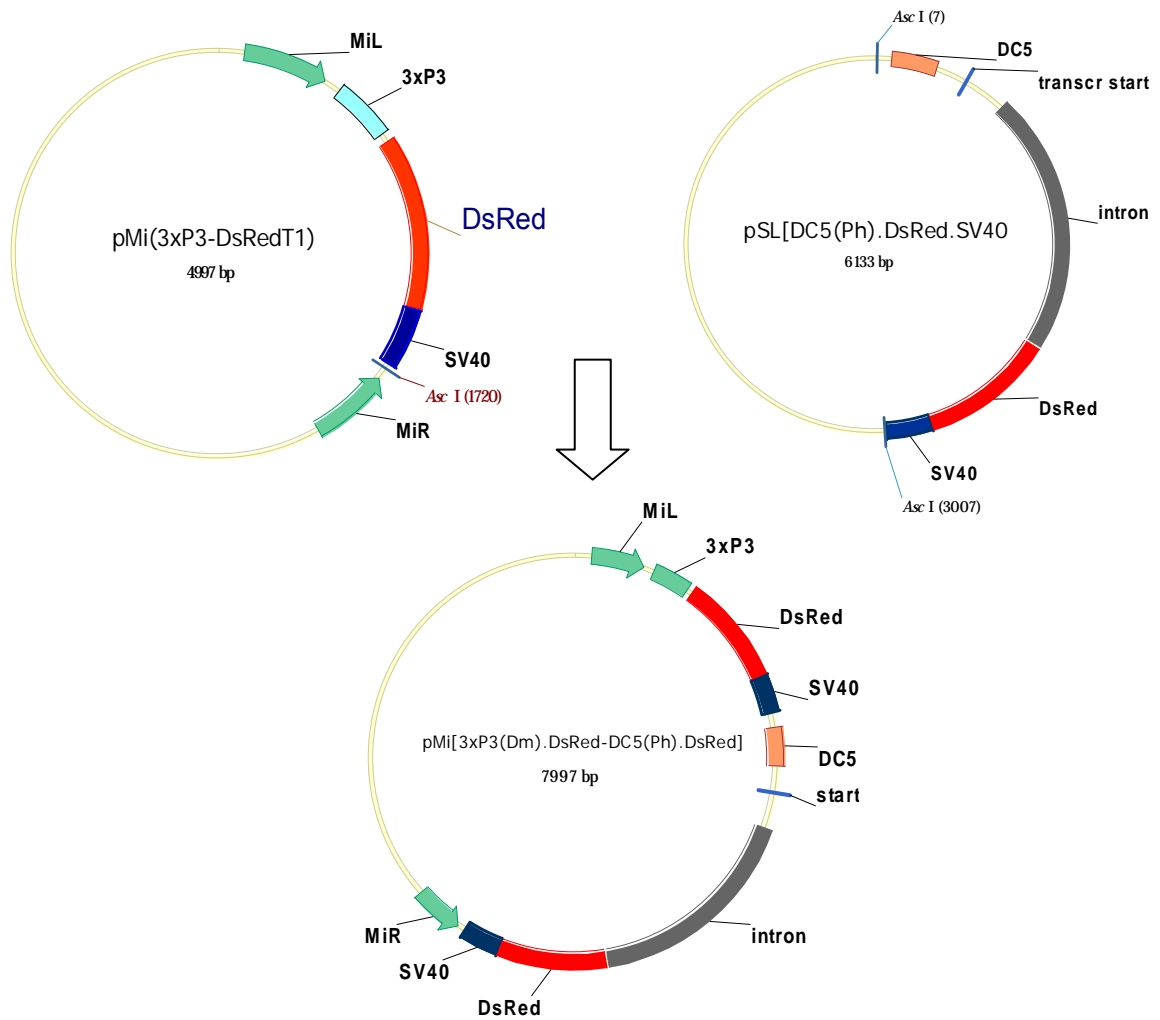
Για τη μελέτη του ενισχυτή της κρυσταλλίνης DC5 και της πιθανής χρήσης του ως μάρτυρα για τον επιτυχημένο μετασχηματισμό ατόμων, παρήχθη μία πλασμιδιακή κατασκευή, η οποία φέρει δύο αντίγραφα της κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης, ένα υπό τον έλεγχο του 3xP3 (ως μάρτυρα μετασχηματισμού) και ένα υπό τον έλεγχο του ρυθμιστικού στοιχείου DC5. Το πλασμίδιο pSLfa(DC5)GFPfa, το οποίο φέρει τον minimal enhancer DC5 με θέσεις περιορισμού της EcoRI εκατέρωθεν, μας δόθηκε από το εργαστήριο του WJ Gehring [16].

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η παρακάτω:

Απομονώθηκε ο ενισχυτής DC5 από το πλασμίδιο pSLfaGFPfa με τη χρήση του περιοριστικού ενζύμου EcoRI και υποκλωνοποιήθηκε στην αντίστοιχη θέση της κατασκευής pSL{MCS.TATA.DsRed.SV40} στο Multiple Cloning Site.



Ακολούθησε υποκλωνοποίηση του AscI τμήματος της παραχθείσας κατασκευής στο πλασμίδιο pMi{3xP3.DsRed.SV40}, που οδήγησε και στο σχηματισμό της πλασμιδιακής κατασκευής pMi{3xP3(*Dm* basal promoter).DsRed.SV40-DC5(*Ph* basal promoter).DsRed.SV40}, που ενέθηκε στα έμβρυα.

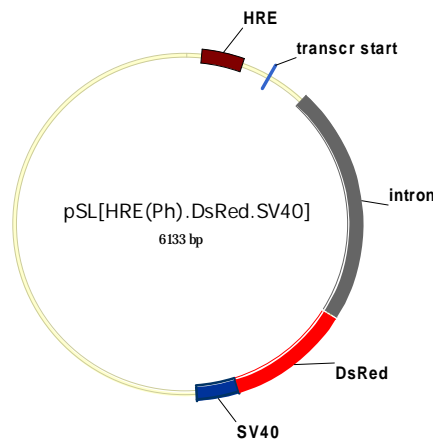


2.3 Η πλασμιδιακή κατασκευή pMi{3xP3(Dm basal promoter).DsRed.SV40-HRE(Ph basal promoter).DsRed.SV40}

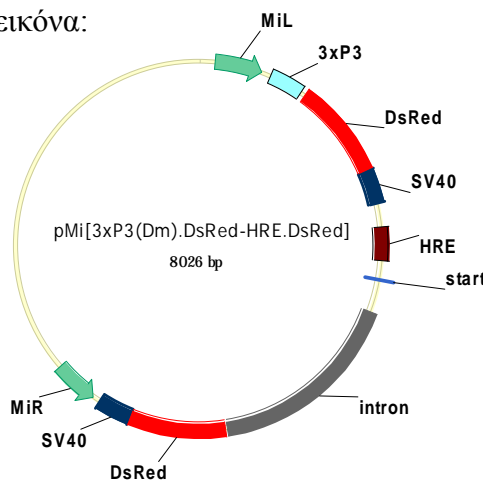
Τέλος, κατασκευάστηκε ένα πλασμίδιο για ένεση σε έμβρυα *Parhyale*, το οποίο έφερε το στοιχείο που ενεργοποιείται σε συνθήκες χαμηλής οξυγόνωσης, το HRE. Το πλασμίδιο που περιέχει το διμερές του ενισχυτή του LDH-A, που συζητήθηκε στην εισαγωγή, μας προσφέρθηκε από το εργαστήριο του Pablo Warrner [20]. Η πλασμιδιακή αυτή κατασκευή δεν ενέθηκε κατά τη διάρκεια αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η παρακάτω:

Απομονώθηκε το ρυθμιστικό στοιχείο HRE από το πλασμίδιο pGL3-HRE με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων KpnI και BglIII και υποκλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις της κατασκευής pSL{MCS.TATA.DsRed.SV40}. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Στη συνέχεια, ακολούθησε η ίδια, όπως και στα προηγούμενα, διαδικασία υποκλωνοποίησης του AscI τμήματος στο πλασμίδιο pMi{3xP3.DsRed.SV40}, που οδήγησε και στο σχηματισμό της πλασμιδιακής κατασκευής pMi{3xP3(Dm basal promoter).DsRed.SV40-HRE(Ph basal promoter).DsRed.SV40}. Η κατασκευή αυτή φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



3. Χειρισμός ατόμων *Parhyale hawaiiensis*

3.1 Καλλιέργεια

Τα αμφίποδα όλων των σταδίων καλλιεργούνται σε τεχνητό θαλασσινό νερό (αλατότητα ~3%, ειδική βαρύτητα 1.021). Οι κεντρικές καλλιέργειες αγρίου τύπου συντηρούνταν σε μεγάλα πλαστικά δοχεία και όγκο νερού ~4 λίτρα και βρίσκονταν σε συνεχή κυκλοφορία με τη χρήση αντλίας και σε θερμοκρασία 26°C. Ο πάτος του δοχείου καλυπτόταν από μικρές πέτρες. Το νερό ανανεωνόταν περιοδικά ανά 7 μέρες. Τα αμφίποδα ταΐζονταν με τροφή για θαλασσινά ψάρια

3.2 Μικροενέσεις

Την προηγούμενη μέρα των μικροενέσεων συλλέγονται ζεύγη αμφιπόδων από τις κεντρικές καλλιέργειες και τοποθετούνται σε μεγάλα τρυβλία Petri. Τη μέρα των μικροενέσεων, τα γονιμοποιημένα θηλυκά αμφίποδα (τα οποία ξεχωρίζουν γιατί έχουν αποδεσμευτεί από τα αρσενικά και φέρουν σκουρόχρωμα αυγά στον κοιλιακό επωαστικό θύλακα) συλλέγονται και αναισθητοποιούνται σε θαλασσινό νερό με γαρυφαλέλαιο (αραιωμένο 1:2500), ξεπλένονται σε καθαρό θαλασσινό νερό και τα αυγά τους αφαιρούνται προσεκτικά με μικρολαβίδες από τον κοιλιακό θύλακα.

Η μικροένεση των αυγών πραγματοποιείται σε ειδικά κατασκευασμένα αυλάκια άγαρ (διαλυμένου σε 3% θαλασσινό νερό), όπου τα έμβρυα μεταφέρονται με μικροπιπέτα (2-4 κάθε φορά). Τα άτομα μικροενιούνται με ένα μείγμα που περιέχει το πλασμίδιο-δότη, το mRNA της τρικοζιάσης και την αδρανή χρωστική phenol red για καλύτερο έλεγχο της ενιόμενης ποσότητας. Οι μικροβελόνες που χρησιμοποιούνται είναι είτε γυάλινες τριχοειδείς οξύληκτες βελόνες (πρόγραμμα Puller:Heat 527, Pull 30, Velocity 140, Time 200, Pressure 700) είτε aluminosilicate τριχοειδείς οξύληκτες βελόνες (πρόγραμμα Puller:Heat 587, Pull 60, Velocity 90, Time 250, Pressure 400) και ακονισμένες σε ειδική επίπεδη πλατφόρμα (Narishige EG-40) υπό γωνία 30°. Τα ενεμένα έμβρυα μεταφέρονται με λεπτό πινέλο σε τρυβλία Petri με θαλασσινό νερό. Η διαδικασία των μικροενέσεων επαναλαμβάνεται τρεις φορές κατά τη διάρκεια της ημέρας, ανά 4 ώρες.

Κάθε δεύτερη μέρα, μέχρι την εκκόλαψη τους, τα ζωντανά έμβρυα μεταφέρονται σε νέα τρυβλία. Τα ενεμένα G₀ καλλιεργούνται μέχρι την ενηλικίωση τους με διαδοχικές

αλλαγές νερού κάθε 4 μέρες. Τα αναπαραγωγικώς ώριμα άτομα διασταυρώνονται με άτομα αγρίου τύπου. Τα προς ανάλυση έμβρυα της G₁ γενιάς αφαιρούνται από τα θηλυκά άτομα την κατάλληλη στιγμή της εμβρυογένεσης και καλλιεργούνται σε τρυβλία.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Χαρτογράφηση των βασικών υποκινητών του θερμοεπαγόμενου PhHS και του μυοειδικού PhMS

Ο βασικός υποκινητής είναι η αλληλουχία του DNA που βρίσκεται άνωθεν του σημείου έναρξης της μεταγραφής και είναι *ικανή και αναγκαία για να κατευθύνει την ακριβή έναρξη της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση*. Οι βασικοί υποκινητές θεωρούνταν στο παρελθόν απλά υποστρώματα για τη μεταγραφική μηχανή. Παρόλ' αυτά, οι βασικοί υποκινητές αποτελούν *σημαντικά στοιχεία στη ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας* [21, 22, 23].

Με δεδομένη, λοιπόν, τη σημασία των βασικών υποκινητών θέλαμε να χαρτογραφήσουμε τη θέση του βασικού υποκινητή καθώς και το σημείο έναρξης της μεταγραφής σε δύο στοιχεία της οικογένειας των hsp70· του θερμοεπαγόμενου στοιχείου PhHS και του μυοειδικού PhMS. Απώτερος στόχος της χαρτογράφησης των βασικών υποκινητών των δύο αυτών στοιχείων, ήταν η *αντικατάσταση του βασικού υποκινητή hsp70 της Drosophila στις πλασμιδιακές κατασκευές-μάρτυρες 3xP3(hsp70).DsRed(ή EGFP) από αυτόν του Parhyale και η χρήση τους σε μελλοντικά πειράματα μετασχηματισμού του αμφιπόδου*.

Ταυτόχρονα, τα πειράματα αυτά θα μας έδιναν τη δυνατότητα να αποσαφηνίσουμε την παρατήρηση που περιγράφηκε στην Εισαγωγή (Εικόνα 12)· τον περιορισμό, δηλαδή, του, προκαλούμενου από το 3xP3(Dmhsp70)-DsRed, φθορισμού σε ένα σημείο πίσω από το μάτι κι όχι σε όλο το μάτι, όπως ήταν γνωστό ότι συνέβαινε σε άλλα είδη [9].

1.1 Πειραματική διαδικασία και αποτελέσματα

Για τη χαρτογράφηση των βασικών υποκινητών του θερμοεπαγόμενου PhHS και του μυοειδικού PhMS, ακολουθήθηκε η διαδικασία του 5'RACE, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο *Υλικά και Μέθοδοι*. Το τελικό προϊόν αλληλουχίστηκε και συγκρίθηκε με την αλληλουχία των ρυθμιστικών στοιχείων PhHS και PhMS.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης του 5'RACE του PhHS-DsRed σε σύγκριση με τη γενωμική αλληλουχία είναι τα παρακάτω:

5' RACE	-----	
PhHS-DsRed	TAGACCGTCCTGCAACA TTCCCGAACATTC GTTTTCTTCTACGGCA TTCTCGAAAATTTCG	60
	Heat Shock Factor binding sites	
5' RACE	-----A	1
PhHS-DsRed	AGAA TGCTCGGCGTGAAGGGGAGACTGAGAT TATAA GAAGCTGCTTCGCCGCCAGCCTCTCA	120
		*
	TATA box	transcription start
5' RACE	GTTTATCCTGAGCTTCTAATCGCGATACATACTACCATTTTTGCTCACACGAAAGTAGAGA	61
PhHS-DsRed	GTTTATCCTGAGCTTCTAATCGCGATACATACTACCATTTTTGCTCACACGAAAGTAGAGA	180

5' RACE	AAGGACTGGAATTTATTTCTGTACCCCTGTGAATAAATTTGCTGAAGTGTAGTTATTGTCAAG	121
PhHS-DsRed	AAGGACTGGAATTTATTTCTGTACCCCTGTGAATAAATTTGCTGAAGTGTAGTTATTGTCAAG	240

5' RACE	AAAACCAATTTTATACTGTTTGATACCTGTTTCGAAAGACGCGAGTTCTGCGAAGTGATTT	181
PhHS-DsRed	AAAACCAATTTTATACTGTTTGATACCTGTTTCGAAAGACGCGAGTTCTGCGAAGTGATTT	300

5' RACE	TTTAAGTCCTCTACATCACTTCAGCGCTACTGTGTTTGTATTATTGAAG-----	229
PhHS-DsRed	TTTAAGTCCTCTACATCACTTCAGCGCTACTGTGTTTGTATTATTGAAG GT AAGCTTGAAT	360

	splice donor	
5' RACE	-----	
PhHS-DsRed	TGAATTGCATTATGTTGCTAAATTTTGTGTAAACTGAAGCTTAAGGAACTGATTAGGGCT	420
5' RACE	-----	
PhHS-DsRed	CTGTAGCTACTAGTACAGCTGTTCTTCTTTCTGAAGCAATTATTTTCCATAATGGTGGAA	480
5' RACE	-----	
PhHS-DsRed	AACAGTTACATATTTATCAACATGGCAAAAGCTGAAAAGAAAAAAAAAAATTTCTAAAT	540
5' RACE	-----	
PhHS-DsRed	AATTTATTTATTCCTTCAACTTCAGGCATTTTATTCTTCAAGAATAACCTTCAGGAAAAT	600
5' RACE	-----	
PhHS-DsRed	TACATTCAGATGTTTTCAACTGAGACGTAACAAACTGTC'TTTCATGCCAAGAGCCAAAAT	660
5' RACE	-----	
PhHS-DsRed	TGTCTCATTATATCCAACAGTTCAGAATAAAAAGTTCAGTGAAAGAAGTACGATCGTTTA	720
5' RACE	-----	
PhHS-DsRed	AGTTTGAATATTTGTTTACTAATAAGTAATTGATTAATATACTGACCAAAGTAACTAAAAT	780
5' RACE	-----	
PhHS-DsRed	AGAATAGATTGGTAAACAATAACTGTGAGTGTCAACTCTGAGACTGTATAAGCTCTGTCT	840
5' RACE	-----	
PhHS-DsRed	GCTGTTTTATATATGTAATGAGTTTGAAATTACGACACTGAATTATGAACAATGTGCCGT	900
5' RACE	-----	
PhHS-DsRed	TAGCGAGTGTACTGAGCTATGAAGCTGCTATTGCTTCATTCCAAATTTCTACGATCGCTG	960
5' RACE	-----	
PhHS-DsRed	GCCGTGAGTGTGACTTACAGTAGGAAGTGTGTGGTTTACCCGAGATTCAGTTATAATGT	1020

5' RACE	-----	
PhHS-DsRed	GTGTCTATACATACCTTAAGTTAGACACCTATTTCTATCTTACCCCAACCTATATATCCT	1080
5' RACE	-----	
PhHS-DsRed	ATTCTAACCTAACCCAACACTCTAAGTTAACAGACCTAATAGGCTGGGTTACTACGTTT	1140
5' RACE	-----	
PhHS-DsRed	CGAATATTTAGTACCTTTGTAAAAATCGTCAGAAAATTGCGCGGGCGCCTACAATGGAGGT	1200
5' RACE	-----	
PhHS-DsRed	CTCTGTTATTTTCATTGATGTTTTAGTCCTTCAAGCCGTGCAAGGATTGGACTTGTAGCCG	1260
5' RACE	-----	
PhHS-DsRed	AGTCTACATTTGCCAAACTCTTCCCATTATACATTTGTAAAAATCTGCTGGTGAAGTGCCT	1320
5' RACE	-----	
PhHS-DsRed	TAATATTCTGAAAAGTTTATTTATGCAACTGCACAAATCACGTTGGTTCTCTTTATTTCC	1380
5' RACE	-----	
PhHS-DsRed	AATGAAGGAAAAAATCGATTTCTGCAATTTGGGTGAATTACTTGAATAATACTAAGAAA	1440
5' RACE	-----	
PhHS-DsRed	TTCGTGACTGGAAGCTGTGTAATGGCTTTCGGCAGTAAATATTTGTATTTTCAGTGCAGT	1500
5' RACE	-----	
PhHS-DsRed	TACTTCTCTAAAATACTGAACATAAAAACGGCAGAATGCAAATTACTGCAAATCTTTTG	1560
5' RACE	-----	
PhHS-DsRed	AAGAAAATAATTATTCATGTCATGGAAGCGTAAGTGGAAACATCAATTTATTAATTATCTT	1620
5' RACE	-----	
PhHS-DsRed	GTGAATATTTATTGTTTCATAATTTACAATCGATTTTCTTTTAGTGACGTTGCTTATTATG	1680
5' RACE	-----AACAAATCCACAACCATGGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTT	275
PhHS-DsRed	TTTTTTGTTTACAGAACAAATCCACAACCATGGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTT	1740

	splice acceptor start codon	
5' RACE	CATGCGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGG	335
PhHS-DsRed	CATGCGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGG	1800

5' RACE	CGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAG	393
PhHS-DsRed	CGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAG	1858

Τα αντίστοιχα αποτελέσματα για την PhMS-DsRed σειρά είναι τα παρακάτω:

5' RACE PhMS-DsRed	----- CTGCTGTGATTGCCTTC CAGTCAGTTGACTTAAACAGTCAGTGACTTAAACAGTCAGTTGAC 60
5' RACE PhMS-DsRed	----- TTAACAGTCAGTTGACTTAAACAGTCTGTTGACTTAAAGTCAGTTGACTTAAACAGTCAGTTG 120
5' RACE PhMS-DsRed	----- ACTTAAACAGTCGTTGACTTAAACAATCTGTTGACTTAAACAATCTGTTCACTTAGCAGTCA 180
5' RACE PhMS-DsRed	----- GTTGACTTAA TGGACAGAGCTATTATAGTAAAATTTTCGGATATGGCTTCAAATTTGGAGA 240
	bHLH binding sites
5' RACE PhMS-DsRed	----- GAATGAGGACTTGGAGGCTCTGCACTTTTTTCGCTGTTTTTGACGAACGCGCCTTCGGACGC 300
5' RACE PhMS-DsRed	----- TGAACAATTCATACGTGTGAACGCCATAAGACGGACGTGTGGACCCCTCTATAGTGTTC 360
5' RACE PhMS-DsRed	----- TGTTCTTTCCCGGTGTGCCTCAGAAATGAATGAAATCCCATCTTCTATTACACCTCTT 420
5' RACE PhMS-DsRed	----- GTATTGTCTTTCTTTTAAATCTTAGGAACGCAAGGATATCTACCGCAAATAGGCATTC 480
5' RACE PhMS-DsRed	----- CTGAAAATCCATACTAATAATTATCTTGGTCTGAATTACTACATTTTCATTTGGAAATGTT 540
5' RACE PhMS-DsRed	----- GTTGAGCTCACGAGCTCTGGGTCAGTAAATAATGGCAACAACCGCCCGGGGTGCAGCCG 600
5' RACE PhMS-DsRed	----- CGGCCACCGCTACGGCAGGAAGTCTATAGCCACCACCACCCCTCCCGCCACCGGCATAT 660
5' RACE PhMS-DsRed	----- GATGCCGGCACCAAAATATCTGCCCGGGGGCGGCGTTTGGCAGCGGTGGCAGCTTCTAG 720
5' RACE PhMS-DsRed	----- AACTTTGGCTGCCACTTGGCGGCATCTGCTATCTCTGTTCTGCTGTGTGCGGGGCGAG 780
5' RACE PhMS-DsRed	----- GG TATTTAA CACACAGCTCTATCAAATCAGGTC ATTCTTGTACAGACCTGCGATCGATAC 27 840 *****
	TATA box transcription start
5' RACE PhMS-DsRed	GAGCATCACCTGTCGATAGTAACAATAATCAGCAGCAGCAGCTGATTCTGTGAGTGACAG 87 GAGCATCACCTGTCGATAGTAACAATAATCAGCAGCAGCAGCTGATTCTGTGAGTGACAG 900 *****
5' RACE PhMS-DsRed	TGATCACTGAAGAGCACCAACCGGCTCACGCAACCAAACCTACACGAAGCCTGCAGATCTT 147 TGATCACTGAAGAGCACCAACCGGCTCACGCAACCAAACCTACACGAAGCCTGCAGATCTT 960 *****
5' RACE PhMS-DsRed	CTGCGAGATTTTTTTACAGCGAAAAGTG----- 175 CTGCGAGATTTTTTTACAGCGAAAAGTG TAAGTAGATTTTGCAGTGAAGAAGAAAAGTG 1020 *****
	splice donor
5' RACE PhMS-DsRed	----- CTTTGAATAGGAATTAAAAAAAATGTTTTAGCTTCTAGCACGAAGTTTGAGTGTAGCGT 1080
5' RACE PhMS-DsRed	----- TTGCATCATTCGATTAGCTCAGAGTGATCCGCCCTGAATGTGTTGTTGGGAACAGTATG 1140
5' RACE PhMS-DsRed	----- CACAAGACCCAATTAATGTGTTTTGTTCTATCATAGTCTCCTTAAATAATGACAAAGTCA 1200

```

5 ' RACE -----
PhMS-DsRed ATATCCAGCACAGAGGAACCCCTCGAGATTTATATTTGCCAAATGTTGTTTAAATAAGAGT 1260

5 ' RACE -----
PhMS-DsRed TTCCTTTGAGATGCATTCCTCGTTCATGAGCAGTCACCCAAGAAAACGTTCAATATTTCCAA 1320

5 ' RACE -----
PhMS-DsRed CATTTCTTAAAGTATTCTTTCTATTTGATTTGGAAAGGTAGATTTTAGAGGTGACAAAGA 1380

5 ' RACE -----
PhMS-DsRed TACGCCATTCGAATAGGGAGTATCCACGGCATTGACAGGTGTGTTCCCTCTTGCTTCAA 1440

5 ' RACE -----
PhMS-DsRed GTGGTATACCGTTCGCGTATCGCCAGAGACTTTCAGTTTCATTTATGGACAGTTTTATAT 1500

5 ' RACE -----
PhMS-DsRed TTACATCTAGAATTTTTTTCTTACTTATGCAGCCAGAGCGATTATGTCATTATCAGAATG 1560

5 ' RACE -----
PhMS-DsRed TCAGCAACTGATAGTCTTTCTCAATGTCCAGAACTACATATGCTGCTCTTTTGATAAAT 1620

5 ' RACE -----
PhMS-DsRed TATTTCTCAATTTAATTTGTACAATTGATGCCAATTTGGGAGGCCACTATACAGCTGTCC 1680

5 ' RACE -----
PhMS-DsRed CGGGGTAAAAGCTACATTCCTAGGAACTAGGAAACGACATGCTAACGAACTCTACAGGG 1740

5 ' RACE -----
PhMS-DsRed AGGGGATGAGGGGACATTAGGAAATGTATGTAAAAAATACTGTCAAGTCCACAGAGTGCA 1800

5 ' RACE -----
PhMS-DsRed CACCATTGTGTGGTGCAAGAGCTCTCAGTTAAGTACTTTAACTGCACGCCTACTTATCTT 1860

5 ' RACE -----
PhMS-DsRed TATCTGATAAAAGCAATTAGAAGCATCTGATATAGCTAACATTTGACAGGGAAGAAGGACA 1920

5 ' RACE -----
PhMS-DsRed ACGGGCTGAGTGACAGATTATTTCCCATGACGCAGCGCTTACCCTCCGTTAACCCCTTTG 1980

5 ' RACE -----
PhMS-DsRed CGGGCCACTGCAAAAAGTGATTTTCGTAGGAATAGCATTGTAAAAGTAACTAAATATGAGCA 2040

5 ' RACE -----
PhMS-DsRed CTTGCCCTGTAAATGAGTAATAAAAAATGTGTTACCGGATGATCCCCTGTCTTTGTTTCAA 2100

5 ' RACE -----
PhMS-DsRed TGCACGATCAAACCTCAATAAAAAATGAAATTGCAACTAACATAGGCCCCAAGCAACACAAT 2160

5 ' RACE -----
PhMS-DsRed CTTAATCATTAGGAGAATAGGCGCTGTATATTTAGCAGCGCACCCCTGAACGTATCTGAAG 2220

5 ' RACE -----
PhMS-DsRed TACATCATTTGTACCACGCAGTGAATTGGACCGCTCTGATCGACTTTGGAATTATTAATG 2280

5 ' RACE -----
PhMS-DsRed GTTGTGCCTAAAAGTACCGCCATCCGGATCATATTCACAACTGGCTTTACTCCACAGGT 2340
**

5 ' RACE -----
PhMS-DsRed AATCAGCCGCCATGCGCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGC 237
AATCAGCCGCCATGCGCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGC 2400
*****
splice acceptor

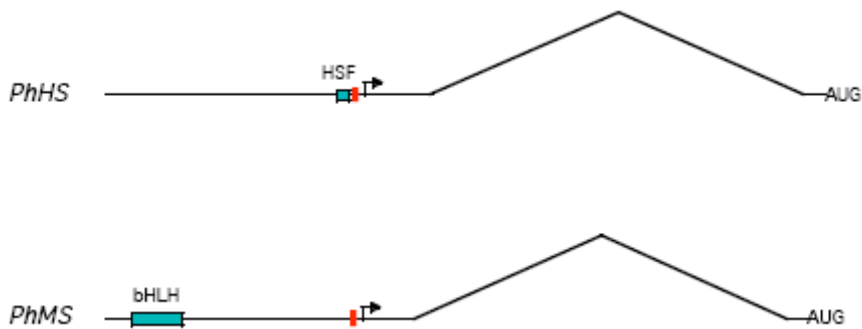
5 ' RACE -----
PhMS-DsRed GCATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCC 297
GCATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCC 2460
*****
start codon

5 ' RACE -----
PhMS-DsRed CCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAG 338
CCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAG 2501
*****

```

1.2 Συζήτηση αποτελεσμάτων 5'RACE

Με τα πειράματα αυτά μπορέσαμε να ταυτοποιήσουμε τη θέση έναρξης της μεταγραφής, τα TATA boxes, τα splice acceptors και τα splice donors σε σχέση με τα σημεία πρόσδεσης του HSF και των μεταγραφικών παραγόντων bHLH. Η δομή των στοιχείων *PhHS* και *PhMS* φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 18: Στο στοιχείο *PhHS*, τα σημεία πρόσδεσης του παράγοντα θερμικού σοκ (HSF-Heat Shock Factor) βρίσκονται μόλις 50 βάσεις ανωθεν του σημείου έναρξης της μεταγραφής. Το TATA box βρίσκεται ακριβώς στη μέση της απόστασης των σημείων πρόσδεσης του HSF και του σημείου έναρξης της μεταγραφής. Χαρακτηριστική είναι η παρουσία ενός μεγάλου σε μήκος ιντρονίου (1346 ζεύγη βάσεων), 250 βάσεις κάτωθεν του σημείου έναρξης της μεταγραφής και μόλις 15 άνωθεν του σημείου έναρξης της μετάφρασης. Η δομή του στοιχείου *PhMS* είναι πολύ όμοια. Η μεγαλύτερη διαφορά είναι ότι τα σημεία πρόσδεσης των μυογόνων παραγόντων bHLH είναι 620 ζεύγη βάσεων άνωθεν του σημείου έναρξης της μεταγραφής. Και σε αυτή την περίπτωση εντοπίσαμε την παρουσία ενός ιντρονίου αντίστοιχου μεγέθους (1350 ζεύγη βάσεων) σε αντίστοιχη θέση.

Ο βασικός υποκινητής που αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί στα επόμενα πειράματα είναι αυτός του HS στοιχείου. Στα πειράματα που είχαν γίνει στη *Drosophila* με τη χρήση του 3xP3-DsRed χρησιμοποιήθηκε ο βασικός υποκινητής *hsp70*. Έτσι, θα μπορούμε να έχουμε μια άμεση σύγκριση της ενεργότητας του βασικού υποκινητή θερμοεπαγόμενου στοιχείου της μύγας με αυτό του αμφίποδου καρκινοειδούς. Επίσης, θεωρήσαμε καλύτερο να διατηρήσουμε τη δομή της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής ως έχει, δηλαδή παρουσία του μεγάλου ιντρονίου, καθώς η παρουσία του και στα δύο στοιχεία που εξετάσαμε θα μπορούσε να υποδηλώνει κάποια λειτουργικότητα.

2. Μετασχηματισμός ατόμων *Parhyale hawaiiensis* και ανάλυση των προτύπων ενεργοποίησης των ρυθμιστικών στοιχείων 3xP3 και DC5 σε αυτά

2.1 Μετασχηματισμός ατόμων *Parhyale hawaiiensis* με το μεταθετό στοιχείο $Mi\{3xP3(Dm\ basal\ promoter).EGFP.SV40-3xP3(Ph\ basal\ promoter).DsRed.SV40\}$

Οι πρώτες μικροενέσεις που έγιναν αφορούσαν στην πλασμιδιακή κατασκευή που έφερε το ρυθμιστικό στοιχείο 3xP3 σε δύο αντίγραφα άνωθεν των βασικών υποκινητών της μύγας και του αμφιπόδου.

Δεδομένου ότι ήταν οι πρώτες ενέσεις που γίνονταν, ήταν απαραίτητη μία βελτιστοποίηση των μεθόδων μικροένεσης με στόχο την μέγιστη βιωσιμότητα και το μέγιστο ποσοστό μετασχηματισμού. Δοκιμάστηκαν διαφορετικές βελόνες (γυάλινες τριχοειδείς οξύληκτες βελόνες και aluminosilicate τριχοειδείς οξύληκτες βελόνες - βλ. Υλικά και Μέθοδοι), διαφορετικά προγράμματα σχηματισμού των aluminosilicate βελονών, διαφορετικοί τρόποι διατήρησης των αυλακιών άγαρ (απλό ή θαλασσινό νερό) και διαφορετική γωνία ακόνισης των βελονών (διαφορετικές γωνίες μεταξύ 25° και 30°).

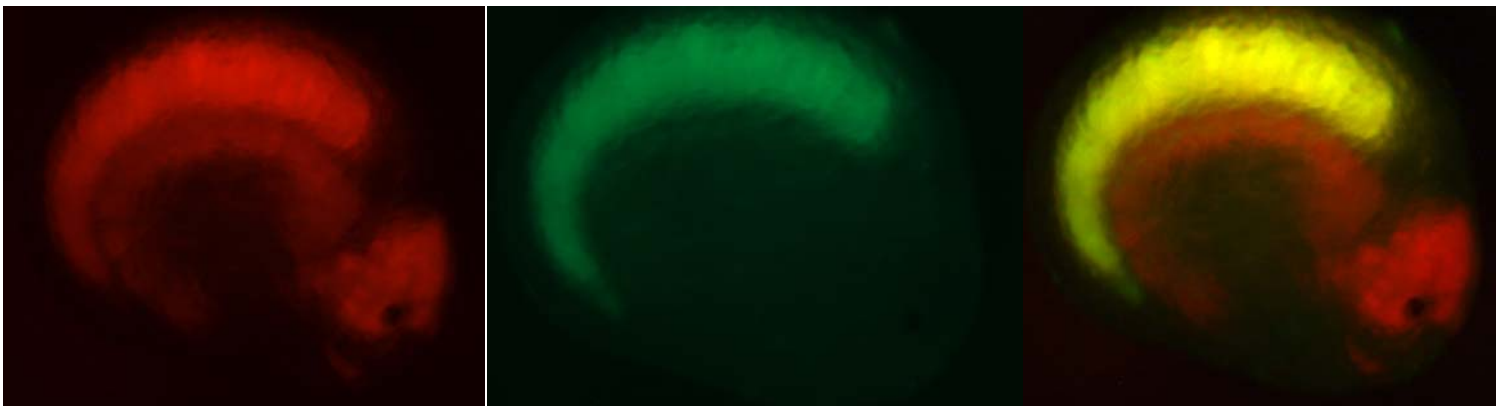
Καταλήξαμε στις βέλτιστες συνθήκες μικροενέσεων που περιγράφονται στα Υλικά και Μέθοδοι. Τα αποτελέσματα των τριών αυτών προσπαθειών συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Επιβίωση 1-12 μέρες μετά την μικροένεση

	Έμβρυα που ενέθηκαν	1	3	6	9	12	Βιωσιμότητα	Μωσαϊκά μετασχηματισμένα άτομα	Ποσοστό μετασχηματισμού
1η προσπάθεια	81	32	11	0	0	0	0%	0	0%
2η προσπάθεια	183	134	57	13	10	9	5%	0	0%
3η προσπάθεια	58	41	19	12	9	8	14%	2	25%

Πίνακας 1: Στην πρώτη προσπάθεια μικροενέθηκαν 81 άτομα χρησιμοποιώντας τις γυάλινες βελόνες και ακονίζοντας τις σε κλίση 25°-27°. Κανένα από τα έμβρυα δεν επιβίωσε μετά την πάροδο 5 ημερών. Στη δεύτερη προσπάθεια, αλλάχθηκαν οι βελόνες και χρησιμοποιήθηκαν οι aluminosilicate. Παρ' όλο που η βιωσιμότητα αυξήθηκε (όχι στα επιθυμητά επίπεδα), κανένα από τα άτομα που εκκολάφθηκαν δεν είχε μετασχηματιστεί. Στην τρίτη προσπάθεια, καταφέραμε να πάρουμε δύο μετασχηματισμένα άτομα, ενώ και η βιωσιμότητα έφτασε σε περισσότερο αποδεκτά επίπεδα.

Στη συνέχεια, κι όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι, όταν τα μετασηματισμένα άτομα (ένα αρσενικό και ένα θηλυκό) έφτασαν σε αναπαραγωγικώς ώριμη ηλικία, αφέθηκαν να διασταυρωθούν με αγρίου τύπου άτομα και έγινε η ανάλυση της G1 γενιάς. Το αρσενικό έδωσε τρεις απογόνους, εκ των οποίων και οι τρεις ήταν μετασηματισμένοι, ενώ το θηλυκό έδωσε δύο, οι οποίοι ήταν επίσης μετασηματισμένοι. Ο φθορισμός εντοπίστηκε πρώτη φορά σε έμβρυα κατά την όγδοη ημέρα (την ημέρα πρωτοανίχνευσης των αναπτυσσόμενων οφθαλμών), γεγονός που ήταν συμβατό με προηγούμενα πειράματα μετασηματισμού ατόμων *Parhyale* με το ρυθμιστικό στοιχείο 3xP3 [4]. Η διαφορά που παρατηρήθηκε με τη χρήση του βασικού υποκινητή του αμφιπόδου ήταν ότι, αντί ο φθορισμός να περιορίζεται σε δύο αμφιπλευροσυμμετρικούς πληθυσμούς κυττάρων οπίσθια και ραχαιοπλευρικά του κεφαλιού, εκτεινόταν σε όλο το κεντρικό νευρικό σύστημα. Επίσης, δεν εντοπίστηκε φθορισμός που να οφείλεται στο ρυθμιστικό στοιχείο 3xP3 (*Dm basal promoter*), που θα έπρεπε να φαίνεται με GFP.



Εικόνα 19: Φαίνεται ένα από τα άτομα της G1 γενιάς κατά τη δέκατη ημέρα της εμβρυογένεσης. Το άτομο αυτό προήλθε από διασταύρωση του αρσενικού μετασηματισμένου G0 ατόμου με θηλυκό αγρίου τύπου. Τα υπόλοιπα τέσσερα άτομα της G1 γενιάς έχουν ακριβώς το ίδιο πρότυπο έκφρασης της DsRed και καμία ένδειξη φθορισμού στο πράσινο φίλτρο.

2.2 Μετασηματισμός ατόμων *Parhyale hawaiensis* με το μεταθετό στοιχείο $Mi\{3xP3(Dm\ basal\ promoter).DsRed.SV40-DC5(Ph\ basal\ promoter).DsRed.SV40\}$

Κατόπιν, ακολούθησαν οι ενέσεις της δεύτερης πλασμιδιακής κατασκευής, η οποία έφερε το ρυθμιστικό στοιχείο DC5.

Έχοντας αποκτήσει εμπειρία από τις σειρές μικροενέσεων της πρώτης πλασμιδιακής κατασκευής, δεν χρειάστηκε παραπάνω από μία προσπάθεια για να αποκτήσουμε μετασχηματισμένα G0 άτομα. Οι μικροενέσεις έγιναν με τον τρόπο που περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Η βιωσιμότητα αυξήθηκε εμφανώς (από τα 165 άτομα που ενέθηκαν τα 35 επιβίωσαν, ποσοστό 21%) ενώ και το ποσοστό μετασχηματισμού ήταν ικανοποιητικό. Τελικώς, αποκτήσαμε εννιά μετασχηματισμένα άτομα. Τα αποτελέσματα των μικροενέσεων αυτής της πλασμιδιακής κατασκευής φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Επιβίωση 1- 12 μέρες μετά την μικροένεση								
Έμβρυα που ενέθηκαν	1	3	6	9	12	Βιωσιμότητα	Μωσαϊκά μετασχηματισμένα άτομα	Ποσοστό μετασχηματισμού
165	103	70	43	38	35	21%	9	26%

Πίνακας 2

Από τα εννιά μετασχηματισμένα άτομα, τα πέντε ήταν θηλυκά και τα τέσσερα αρσενικά. Ακολούθησε διασταύρωση των ατόμων αυτών με άτομα αγρίου τύπου. Παραδόξως, μόλις ένα αρσενικό άτομο της G0 γενιάς έδωσε μετασχηματισμένους απογόνους. Τα αποτελέσματα των διασταυρώσεων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

άτομο	αριθμός απογόνων	αριθμός μετασχηματισμένων απογόνων
A (♂)	2	2
B (♂)	7	0
C (♂)	6	0
D (♂)	3	0
E (♀)	5	0
F (♀)	2	0
G (♀)	3	0
H (♀)	6	0
I (♀)	4	0

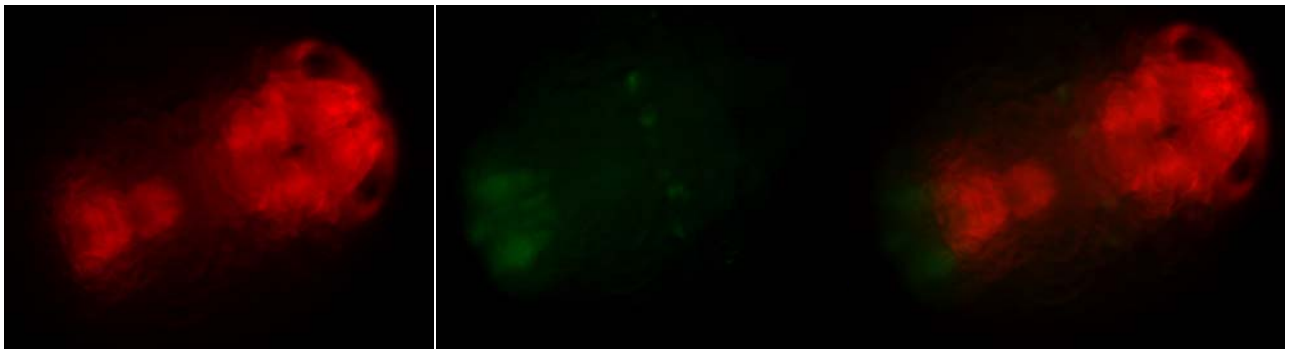
Πίνακας 3: Ο αριθμός των (μετασχηματισμένων ή μη) απογόνων από κάθε άτομο της G0 γενιάς.

Ο φθορισμός των ατόμων της G1 γενιάς εντοπίστηκε και σε αυτή την περίπτωση πρώτη φορά κατά την όγδοη μέρα της εμβρυογένεσης. Ο φθορισμός εντοπίζεται σε όλο το κεντρικό νευρικό σύστημα του διαγονιδιακού ζώου. Κάτι τέτοιο δεν ήταν αναμενόμενο, τουλάχιστον από ότι γνωρίζουμε από τους άλλους οργανισμούς

(κοτόπουλο και *Drosophila*), όπου το ρυθμιστικό στοιχείο DC5 είναι ενεργό μόνο στους οφθαλμούς και, συγκεκριμένα, στα κύτταρα του φακού του ματιού. Οι λόγοι για τους οποίους συμβαίνει αυτό θα συζητηθούν παρακάτω. Άτομα της G1 γενιάς και ο φθορισμός αυτών κατά τη δέκατη ημέρα της εμβρυογένεσης, όπου η έκφραση των πρωτεϊνών-μαρτύρων είναι υψηλότερη φαίνονται στις παρακάτω εικόνες:



Εικόνα 20: Εικόνα του διαγονιδιακού ατόμου της G1 γενιάς κατά τη δέκατη ημέρα της εμβρυογένεσης. Παρατηρείται φθορισμός σε όλο το ΚΝΣ, ακριβώς όπως και στην περίπτωση του ρυθμιστικού στοιχείου 3xP3.



Εικόνα 21: Εικόνα του ίδιου ατόμου από την κοιλιακή πλευρά.

2.3 Συζήτηση

Όπως έχει συζητηθεί προηγουμένως, το πρότυπο ενεργοποίησης του 3xP3 σε συνδυασμό με τον βασικό υποκινητή hsp70 της *Drosophila melanogaster* στο *Parhyale hawaiiensis* παρουσιάζει σημαντική διαφορά έναντι του προτύπου αυτού σε διάφορα έντομα που έχει χρησιμοποιηθεί. Για να μελετηθεί αν αυτό οφείλεται στον ίδιο το βασικό υποκινητή, αυτός αντικαταστάθηκε από το βασικό υποκινητή hsp70 του αμφίποδου καρκινοειδούς.

Το αποτέλεσμα των πειραμάτων αυτών υποδεικνύει ότι, πράγματι, ο βασικός υποκινητής της *Drosophila* δεν είναι πλήρως λειτουργικός όταν χρησιμοποιείται στο αμφίποδο. Απεναντίας, ο ενδογενής βασικός υποκινητής φαίνεται να ενεργοποιείται σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό. Ο φθορισμός που παρατηρείται στο κεντρικό νευρικό σύστημα των ατόμων είναι συμβατός με την παρουσία του μεταγραφικού παράγοντα Pax-6 σ' αυτό, όπως ήδη γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία ότι συμβαίνει σε άλλα είδη διαφορετικών φύλων ζώων. Έτσι, φαίνεται ότι ο Pax-6 προσδένεται στις τρεις επαναλήψεις του P3 και κατευθύνει μέσω του βασικού υποκινητή τη μεταγραφή του γονιδίου της πρωτεΐνης μάρτυρα, στην προκειμένη περίπτωση της DsRed. Ο συνδυασμός του ρυθμιστικού στοιχείου 3xP3 και του βασικού υποκινητή hsp70 του *Parhyale* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση διαγονιδιακών ατόμων, πιθανότατα με μεγαλύτερη ευαισθησία και ακρίβεια απ' ότι αυτός του 3xP3 με τον hsp70 της *Drosophila*.

Παράλληλα με τη μελέτη του βασικού υποκινητή του αμφιπόδου, θέλαμε να μελετήσουμε την πιθανότητα χρήσης ενός άλλου ρυθμιστικού στοιχείου, του ενισχυτή της κρυσταλλίνης DC5, ως μάρτυρα μετασχηματισμού. Το πλεονέκτημα που μπορεί να παρέχει αυτό το ρυθμιστικό στοιχείο είναι ότι η ενεργοποίηση του περιορίζεται στα μάτια του ατόμου και δεν εκτείνεται σε όλο το κεντρικό νευρικό σύστημα, διευκολύνοντας έτσι την ανίχνευση άλλων πιθανών προτύπων έκφρασης (πχ κατά τη διάρκεια σάρωσης για παγίδευση ενισχυτών ή γονιδίων). Επίσης, η επιτυχημένη χρήση του σε οργανισμούς τόσο μακρινούς όσο το κοτόπουλο και η μύγα, δίνει την ελπίδα ότι ο DC5 θα είναι λειτουργικός και στο αμφίποδο.

Η έκφραση της πρωτεΐνης-μάρτυρα σε όλο το κεντρικό νευρικό σύστημα και με πρότυπο παρόμοιο, αν όχι πανομοιότυπο με αυτό του 3xP3, δεν ήταν αναμενόμενη. Υπενθυμίζουμε ότι ο ενισχυτής της κρυσταλλίνης απαιτεί την παρουσία δύο μεταγραφικών παραγόντων για την ενεργοποίησή του, του Pax-6 και του Sox-2. Οι λόγοι που προκαλούν την έκφραση της πρωτεΐνης-μάρτυρα σε όλο το ΚΝΣ θα μπορούσε να είναι πολλοί.

A) Ένας λόγος για τον οποίο τα δύο μεταθετά στοιχεία μετά την ένθεση τους στο γονιδίωμα προκαλούν παρόμοια πρότυπα έκφρασης θα μπορούσε να είναι η εξ' αποστάσεως δράση του ρυθμιστικού στοιχείου 3xP3 στο βασικό υποκινητή του αμφιπόδου. Σε αυτή την περίπτωση, στο μεταθετό στοιχείο που φέρει το DC5, η έκφραση της DsRed στο ΚΝΣ μπορεί να οφείλεται στην ενεργοποίηση του γονιδίου της DsRed μέσω του βασικού υποκινητή του *Parhyale* από το στοιχείο 3xP3.

Β) Σε αρκετούς οργανισμούς, έχει περιγραφεί η συνεργατική δράση ρυθμιστικών στοιχείων άνωθεν του σημείου έναρξης της μεταγραφής και άλλων κάτωθεν αυτού και εντός του πρώτου ιντρονίου [24, 25, 26]. Μια δεύτερη, λοιπόν, πιθανότητα θα μπορούσε να είναι ότι το πρώτο ιντρόνιο φέρει κάποιο ρυθμιστικό στοιχείο, το οποίο σε συνδυασμό με το βασικό υποκινητή και το εκάστοτε ρυθμιστικό στοιχείο να καθορίζει την έκφραση του γονιδίου-μάρτυρα στο ΚΝΣ.

Ένα στοιχείο που συνάδει με τις δύο προηγούμενες περιπτώσεις είναι ότι σε μια διαγονιδιακή σειρά με το μεταθετό στοιχείο $Mi\{3xP3(Dm)DsRed-UAS(Ph)DsRed\}$ εμφανίζεται παρόμοιο πρότυπο έκφρασης στο ΚΝΣ.

Γ) Μία τρίτη περίπτωση είναι η πιθανότητα ο DC5 να είναι πράγματι ενεργός στο ΚΝΣ στο αμφίποδο. Αυτό θα σήμαινε ότι ο Pax-6 μπορεί και προσδένεται ισχυρά στο ρυθμιστικό αυτό στοιχείο, ακόμα και απουσία του Sox-2. Αυτή η πιθανότητα δεν μπορεί να αποκλειστεί καθώς οι αλληλουχίες P3 και DC5 έχουν ομοιότητες και ο Pax-6 προσδένεται, έστω και ασταθώς, στο DC5.

Ένα στοιχείο που αξίζει να αναφερθεί είναι ότι δεν παρατηρήθηκε η έκφραση πρωτεΐνης-μάρτυρα από το $3xP3(Dm \text{ basal promoter}).EGFP.SV40$. Αν παρατηρούνταν, θα έπρεπε να βρίσκεται στα δύο σημεία ραχαιοπλευρικά του κεφαλιού και πίσω από τα μάτια. Η πιο πιθανή εξήγηση αυτού του γεγονότος είναι ο συναγωνισμός μεταξύ των δύο βασικών υποκινητών για τη δράση του $3xP3$. Έχει δειχθεί στο παρελθόν [21] ότι αν δύο ή περισσότεροι βασικοί υποκινητές βρίσκονται στο πεδίο δράσης ρυθμιστικών στοιχείων, η δράση των στοιχείων αυτών μπορεί να περιοριστεί σε κάποιους συγκεκριμένους βασικούς υποκινητές. Έτσι, φαίνεται λογικό ότι αν ο $3xP3$, εν προκειμένω, έπρεπε να «διαλέξει» ανάμεσα στο βασικό υποκινητή της *Drosophila* και αυτόν του *Parhyale*, να «επιλέξει» τον δεύτερο.

2.4 Μελλοντικά πειράματα

Ο πειραματικός σχεδιασμός για τη συνέχεια περιλαμβάνει τη διαλεύκανση των τριών παραπάνω περιπτώσεων. Αρχικά, θα γίνουν μικροενέσεις σε έμβρυα με την τρίτη πλασμιδιακή κατασκευή $pMi\{3xP3(Dm \text{ basal promoter}).DsRed.SV40-HRE(Ph \text{ basal promoter}).DsRed.SV40\}$. Η πλασμιδιακή αυτή κατασκευή δεν ενέθηκε κατά τη διάρκεια αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας, λόγω χαμηλής διαθεσιμότητας εμβρύων. Αυτό, αφ' ενός, θα επιτρέψει τη διεξαγωγή πειραμάτων σχετικά με την απόκριση του οργανισμού σε συνθήκες υποξίας και τη σύγκριση αυτής με τις αποκρίσεις που παρατηρούνται σε

οργανισμούς όπως η *Drosophila*. Αφ' ετέρου, αν το πρότυπο έκφρασης της DsRed δεν είναι ίδιο με αυτό στις μικροενέσεις των άλλων μεταθετών στοιχείων, θα μπορέσουμε να καταλήξουμε στην τρίτη πιθανότητα που αναφέρθηκε προηγουμένως. Διαφορετικά, θα χρειαστεί να μελετήσουμε τις άλλες δύο πιθανότητες. Επίσης, θα μας δώσει τη δυνατότητα να εξαχθεί το συμπέρασμα αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο 3xP3 σε συνδυασμό με το βασικό υποκινητή hsp70 του *Parhyale* ως ανεξάρτητος μάρτυρας για την ανίχνευση διαγονιδιακών ζώων.

Αν το πρότυπο έκφρασης της DsRed υπό τη ρύθμιση του HRE είναι ίδιο με αυτό στις μικροενέσεις των άλλων μεταθετών στοιχείων, θα προχωρήσουμε στην αφαίρεση του ιντρονίου από τις πλασμιδιακές κατασκευές και τη μικροένεση του μεταθετού στοιχείου χωρίς αυτό. Σε αυτή την περίπτωση, αν το πρότυπο έκφρασης της DsRed είναι διαφορετικό, θα μας υποδείξει ότι το ιντρόνιο φέρει κάποιες ρυθμιστικές περιοχές που το επηρεάζουν. Διαφορετικά, θα μπορέσουμε να απορρίψουμε και αυτή την πιθανότητα και να καταλήξουμε στην πιθανή δράση του 3xP3 εξ' αποστάσεως.

Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Browne WE, Prixe AL, Gerberding M and Patel NH. Stages of embryonic development in the amphipod crustacean, *Parhyale hawaiiensis*. *Genesis* 42(3):124-49 (2005)
2. Gerberding M, Browne WE. and Patel NH. Cell lineage analysis of the amphipod crustacean *Parhyale hawaiiensis* reveals an early restriction of cell fates. *Development* 129(24):5789-801 (2002)
3. Pavlopoulos A. and Averof M. Establishing genetic transformation for comparative developmental studies in the crustacean *Parhyale hawaiiensis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(22):7888-93 (2005)
4. Παυλόπουλος Α. Ανάπτυξη και εφαρμογή της διαγονιδιακής τεχνολογίας στην εξελικτική αναπτυξιακή βιολογία αρθροπόδων. Διδακτορική διατριβή (2004)
5. Loukeris TG, Livaras I, Arca B, Zabalou S, Savakis C. Gene transfer into the medfly, *Ceratitis capitata*, with a *Drosophila hydei* transposable element. *Science* 270(5244):2002-5 (1995)
6. Hediger M, Niessen M, Wimmer EA, Dubendorfer A, Bopp D. Genetic transformation of the housefly *Musca domestica* with the lepidopteran derived transposon piggyBac. *Insect Mol Biol* 10(2):113-9 (2001)
7. Coates CJ, Turney CL, Frommer M, O'Brochta DA, Atkinson PW. Interplasmid transposition of the mariner transposable element in non-drosophilid insects. *Mol Gen Genet* 253(6):728-33 (1997)
8. Catteruccia F, Nolan T, Loukeris TG, Blass C, Savakis C, Kafatos FC, Crisanti A. Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nature* 405(6789):959-62 (2000)
9. Berghammer AJ, Klingler M and Wimmer EA. A universal marker for transgenic insects. *Nature* 402(6760):370-1 (1999)
10. Tamura T, Thibert C, Royer C, Kanda T, Abraham E, Kamba M, Komoto N, Thomas JL, Mauchamp B, Chavancy G, Shirk P, Fraser M, Prudhomme JC, Couble P. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nat Biotechnol* 18(1):81-4 (2000)

-
11. Handler AM, Harrell RA 2nd. Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the piggyBac transposon vector. *Insect Mol Biol* 8(4):449-57 (1999)
 12. Horn C, Schmid BG, Pogoda FS, Wimmer EA. Fluorescent transformation markers for insect transgenesis. *Insect Biochem Mol Biol* 32(10):1221-35 (2002)
 13. Callaerts P, Halder G and Gehring WJ. PAX-6 in development and evolution. *Annu Rev Neurosci*, 20:483-532 (1997)
 14. Horn C, Jaunich B and Wimmer EA. Highly sensitive, fluorescent transformation marker for *Drosophila* transgenesis. *Dev Genes Evol* 210(12):623-9 (2000)
 15. Kamachi Y, Uchikawa M, Tanouchi A, Sekido R and Kondoh H. Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes Dev* 15(10): 1272-86 (2001)
 16. Blanco J, Girard F, Kamachi Y, Kondoh H and Gehring WJ. Functional analysis of the chicken delta1-crystallin enhancer activity in *Drosophila* reveals remarkable evolutionary conservation between chicken and fly. *Development* 132(8):1895-905 (2005)
 17. Bruick RK. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *Genes Dev* 17(21):2614-23 (2003)
 18. Lavista-Llanos S, Centanin L, Irisarri M, Russo DM, Gleadle JM, Bocca SN, Muzzopappa M, Ratcliffe PJ and Wappner P. Control of the hypoxic response in *Drosophila melanogaster* by the basic helix-loop-helix PAS protein similar. *Mol Cell Biol* 22(19):6842-53 (2002)
 19. Pavlopoulos A, Berghammer AJ, Averof M, Klingler M. Efficient transformation of the beetle *Tribolium castaneum* using the Minos transposable element: quantitative and qualitative analysis of genomic integration events. *Genetics* 167(2):737-46 (2004)
 20. Dekanty A, Lavista Llanos S, IrisarriM, Oldham S and Wappner P. The insulin-PI3K/TOR pathway induces a HIF-dependent transcriptional response in *Drosophila* by promoting nuclear localization of HIF-alpha/Sima. *J Cell Sci* 118(23):5431-41 (2005)
 21. Butler JE, Kadonaga JT. Enhancer-promoter specificity mediated by DPE or TATA core promoter motifs. *Genes Dev* 15(19):2515-9 (2001)
 22. Butler JE, Kadonaga JT. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev* 16(20):2583-92 (2002)
-

-
23. Li XY, Bhaumik SR, Zhu X, Li L, Shen WC, Dixit BL, Green MR. Selective recruitment of TAFs by yeast upstream activating sequences. Implications for eukaryotic promoter structure. *Curr Biol* 12(14):1240-4 (2002)
 24. Rippe RA, Lorenzen SI, Brenner DA, Breindl M. Regulatory elements in the 5'-flanking region and the first intron contribute to transcriptional control of the mouse alpha 1 type I collagen gene. *Mol Cell Biol* 9(5):2224-7 (1989)
 25. Bruhat A, Tourmente S, Chapel S, Sobrier ML, Couderc JL, Dastugue B. Regulatory elements in the first intron contribute to transcriptional regulation of the beta 3 tubulin gene by 20-hydroxyecdysone in *Drosophila* Kc cells. *Nucleic Acids Res* 18(10):2861-7 (1990)
 26. Bossu JP, Chartier FL, Fruchart JC, Auwerx J, Staels B, Laine B. Two regulatory elements of similar structure and placed in tandem account for the repressive activity of the first intron of the human apolipoprotein A-II gene. *Biochem J* 318(Pt 2):547-53 (1996)