#### ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη του ρόλου ενός Πολυδύναμου Μεταγραφικού Ρυθμιστή στην ανάπτυξη της Drosophila melanogaster

Γιαννιός Παναγιώτης



Αθήνα 2013

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΕΚΠΑ

Επιμέλεια εξωφύλλου Λέανδρος Κατσούρης

Γιαννιός Παναγιώτης

# Διδακτορική Διατριβή

# Μελέτη του ρόλου ενός πολυδύναμου μεταγραφικού ρυθμιστή στην ανάπτυξη της Drosophila melanogaster

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ



### AOHNA, 2013

Η παρούσα Δ.Δ. εκπονήθηκε υπο την επίβλεψη τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής που απαρτίζεται από τους:

- Σ. Τσιτήλου, Αναπλ. Καθηγήτρια, ΕΚΠΑ (Επιβλέπουσα)
- Χ. Δελιδάκης, Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- **Δ. Σίδερης**, Αναπλ. Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής συμπληρώθηκαν από τους:

- **Γ. Γιαννόπουλος**, Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών
- **Χ. Ζέρβας**, Ερευνητής Γ΄, ΙΙΒΕΑΑ
- **Λ. Μαργαρίτης**, Καθηγητής, ΕΚΠΑ
- **Δ. Στραβοπόδης**, Επικ. Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Τίτλος εργασίας στα Αγγλικά / English title:

Study of the role of a multipotent transcriptional regulator in the development of the Drosophila melanogaster

-Η έγκριση της διατριβής από τη Σχολή Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών, δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα [Ν.5343/32 άρ. 202]-

#### ENOIKIAZETAI

μέσα σ' αυτό τό δωμάτιο παρέδωσε τό πνεύμα ή φραία άθηναία κόρη ξαπλωμένη στά μεταξωτά χιράμια — τά ξανθά μαλλιά ξέπλεκα γύρω στήν κερένια κεφαλή ένῶ ἀπ' τ' ἀνοιχτό παράθυρο ἀκούγονταν οἰ καμπάνες τῆς 'Αγια-Σωτήρας πού βάραγαν έσπερινό ὡς τήν ἐπομένη ξημέρωνε ἡ ἑορτή τοῦ προφήτη Σαμουήλ

σ' αυτό μέσα τό δωμάτιο συνουσιάστηκαν τά δυό φοβερά τέρατα κι' εθφραίνονταν μ' ἀγκομαχητά κι' ἅγρια γρυλίσματα κι' ἀγριοφωνάρες λές καί βουργάροι ύλοτόμοι τά βάλανε μέ θεώρατα ἐλάτια ή μᾶλλον (κ α λ ύ τ ε ρ ο) νά ἐγκρεμιζόντουσαν Βουνά

μέσα σ' αδτό τό δωμάτιο ή γηραιά δέσποινα πέρασε χρόνια καί χρόνια άνίας : κουνοδσε άνεπαίσθητα τά τρεμάμενα χέρια προσπαθώντας στό σκοτεινιασμένο καί θολό μυαλό νά ξαναφέρη εἰκόνας τῶν παλαιῶν της μεγαλείων ίσαμε τή μέρα πού μέ βηματάκια ἀργά ἀργά ξεκίνησε — τήν ἐξεκίνησαν γιά τό γεροκομεῖο

μέσα έδῶ ἐγεννηθῆκαν τρία παιδιά — γόνοι τιμίας κι' εὐυπολήπτου οἰκογενείας πού χάθηκαν — τόπο δέν Επιασε κανένας τους ό ἕνας πῆγε στήν 'Αμερική ό ἄλλος πέθανε κακήν κακῶς — μπεκρής κι' ὁ τρίτος είναι κάπου ἀκόμη φαροφύλακας έδδ — ναί έδδ μέσα : σέ τοῦτο τό δωμάτιο σκότωσε χέρι ἄτιμο ἐκεῖνο τόν παλληκαρū «νά τιμωρήση — λέει — ἐν τῷ προσώπω του τὴν ἀναρχία» κι' ἔγειρ' ἡ λεύκα καί σωριάστηκε χαμαί καί κείνη ἡ μουντή κηλίδα τοῦ πατώματος κεῖ πέρα στή γωνιά εἶναι τό αίμα πού ποτάμι χύνονταν ἀπ' τὴν πληγή καί τίποτα ποτέ δέν εἶταν δυνατό νά τηνέ καθαρίση ἀπ' τά σανίδια

δμως ἀρκεϊ ὡς ἐδῶ : τί πάω νά κάμω ; πόσο δέ θάτανε κοπιαστικό Ισως κι' ἀδύνατο πάντως ἀτέλειωτο καί μάταιο ἀκόμη κι' ἀνιαρό νά σημειώσω τώρα μέ τόση λεπτομέρεια τήν ἰστορία τήν ἀτέλειωτη αὐτοῦ τοῦ δωματίου

(άλλοτε ξμπαζαν κρεββάτια άλλοτε ταβγαζαν άλλοτε κεί ήτανε σκρίνιο Οστερα ντουλάτα Έπειτα κασσέλα άλλοτε στά παράθυρα είχανε βαρειά παραπετάσματα άλλοτε τά τζάμια ξμεναν γυμνά μέ μόνα τά παντζούρια σέ κείνη τή γωνιά μιά είχανε τά είκονίσματα άλλες φορές παντοῦ κρέμονταν κάντρα)

νά : ἄνθρωποι κι' ἄνθρωποι περάσανε καί φύγανε κι' άλλοι — πολλοί — έδῶ μέσα γεννηθῆκαν κι' άλλους πάλι έδῶ μέσα τούς βάλανε στήν κάσσα καί τί δέν ἄκουσαν οί τοῖχοι αὐτοἰ φωνές δδύνης καί φωνές χαρᾶς είδανε καί βαφτίσια μουγγές ἀπελπισιές καί στεφανώματα

(θά τό ξεχνοῦσα: καί πιάνο ἐδῶ μέσα ἀντήχησε παίζοντας άβρά τή Romance du Mal-Aimé)

Εζησα καί γώ — ό γράφων — μέσ' σέ τοῦτο τό δωμάτιο χρόνια πολλά — φτωχά — κι' ὡς πάντα
κι' ἐδῶ γιομάτος πάθος ἀσχολήθηκα μέ τή ζωγραφική τήν ποίηση
τή γλυπτική ἀλλά καί τή φιλοσοφία καί τόν ἔρωτα
κι' ἕμεινα ὡρες καθισμένος
– νά καπνίζω —
σέ κεί δά τό παράθυρο
κυττάζοντας
άλλοτε τό δρόμο

καί τώρα πρέπει — φεῦ — κι' ἐγώ νά φεύγω — δέν ἀποκλείεται ἄλλωστε νά μοῦ μέλλονται καλύτερα —

πάλι το ένοικιάζουν τό δωμάτιο

Bruges, 1956

Ν. Εγγονόπουλου, Εν Ανθηρώ Ελλήνι λόγω, 1957

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Προ - λογος	
Περίληψη	- 13 -
Summary	
Εισαγωγικά Στοιχεία	
1.1 Μεταγραφικοί παράγοντες με δακτύλους ψευδαργύρου	- 19 -
1.2 Ο μεταγραφικός παράγοντας ΖΕLDA. Δομικά στοιχεία	- 21 -
<ul> <li>H Drosophila melanogaster</li> <li>1.3.1 Εμβρυϊκή ανάπτυξη της Drosophila melanogaster</li> <li>1.3.2 Γονιδιακή ρύθμιση της εμβρυϊκής ανάπτυξης της Drosophila melanogaster</li> </ul>	<b>- 24 -</b> - 26 - - 27 -
1.4 Εμβρυϊκοί δίσκοι στη Drosophila melanogaster, η ανάπτυξη του εμβρυϊκού δίσκου του φτε	ρού - 30 -
1.5. Γονιδιακός έλεγχος της ανάπτυξης του φτερού	- 33 -
1.6. Σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την ανάπτυξη του φτερού 1.6.1 Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch	<b>- 35 -</b> - <i>35 -</i>

1.6.1 Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch	- 35 -
1.6.2 Το σηματοδοτικό μονοπάτι Dpp	- 36 -
1.7 Ο ρόλος της Zelda στην ανάπτυξη της <i>Drosophila melanogaster</i>	- 39 -
1.8 Στόχοι της διδακτορικής διατριβής	- 44 -

## Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Καλλιέργεια στελεχών Drosophila melanogaster	- 46 -
2.2 Στελέχη	- 46 -
2.3 Συλλογή εμβρύων	- 46 -
2.4 Αποχοριοποίηση και μονιμοποίηση εμβρύων	- 47 -
2.5 Ανατομία προνυμφών	- 48 -
2.6 Απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από δείγματα βιολογικού υλικού 2.6.1 Απομόνωση πυρηνικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων 2.6.2 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών 2.6.3. Κατακρήμνιση πρωτεϊνών	<b>- 48 -</b> - 48 - - 49 - - 50 -
<b>2.7 Απομόνωση RNA από δείγματα βιολογικού υλικού</b> 2.7.1 Απομόνωση ολικού RNA με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRIZOL® 2.7.2 Απομόνωση ολικού RNA με τη χρήση του RNeasy Mini Kit της QIAGEN	<b>- 50 -</b> - 50 - - 51 -
2.8 Σύνθεση cDNA με την αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription, RT)	- 51 -
2.9 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)	- 52 -
2.10 Παρασκευή φορέα κλωνοποίησης και αντίδραση τεχνητής σύνδεσης	- 54 -
2.11 Παρασκευή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων	- 55 -

2.12 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων	- 56 -
<b>2.13 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA</b> 2.13.1 Απομόνωση με τη χρήση του QIAGEN Plasmid mini kit 2.13.2 Απομόνωση με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης	<b>- 58 -</b> - 58 - - 58 -
2.14 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	- 59 -
2.15 Εκχύλιση DNA από πήκτωμα αγαρόζης	- 60 -
2.16 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA	- 61 -
2.17 Ανάλυση πρωτοδιάταξης του DNA	- 61 -
2.18 Έκφραση και καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από ετερόλογο βακτηριακό σύστημ	α- 61 -
2.19 Πειράματα μείωσης της κινητικότητας του συμπλόκου (Electrophoretic Mobility Shift Assays)	- 64 -
2.20 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blotting)	- 65 -
2.21 Ανάλυση κατά Northern	- 67 -
2.22 Ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης (ChIP)	- 67 -
2.23 Μονιμοποίηση προνυμφών	- 69 -
2.24 Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις	- 70 -
2.25 Χρώση σε ιστούς που επωάστηκαν με δευτερεύον αντίσωμα συνδεδεμένο με HRP	- 71 -
2.26 Μέθοδος εκτοπικής έκφρασης GAL4/UAS	- 72 -
2.27 Το σύστημα μιτωτικών κλώνων FLP/FRT	- 73 -
2.28 Το σύστημα TARGET	- 74 -
2.29 Δημιουργία διαγονιδιακών εντόμων και χαρτογράφηση των ενθέσεων.	- 74 -

## Αποτελέσματα - Συζήτηση

3.1 'Εκφραση του γονιδίου zelda στα στάδια ανάπτυξης της Drosophila	- 78 -
3.2. Παραγωγή, καθαρισμός και τιτλοποίηση αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης Zelda (ZLD)	- 81 -
3.3. Σύνθεση της ZELDA στα αναπτυξιακά στάδια της Drosophila 3.3.1 Σύνθεση της ZELDA στο στάδιο της προνύμφης.	<b>- 84 -</b> - 86 -
3.4. Πρότυπο παραγωγής της ZELDA κατά την εμβρυογένεση της <i>Drosophila</i>	- 89 -
3.5. Πρότυπο παραγωγής της ZELDA στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα και σε εμβρυϊκούς δίσκους τα φτερών προνυμφών 3ου σταδίου της Drosophila	υν - 92 -
<ul> <li>3.6. Μελέτες πρόσδεσης της ZELDA σε αλληλουχίες DNA</li> <li>3.6.1. Πειράματα Μείωσης της Κινητικότητας Συμπλόκου (Electrophoretic Mobility Shift Assays)</li> <li>3.6.1. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης (Chromatin Immumoprecipitation - ChIP -</li> </ul>	<b>- 94 -</b> - 94 - assays) - 95 -
<ul> <li>3.6. Ιη νίνο μελέτες υπερέκφρασης και απώλειας λειτουργικότητας της Zelda</li> <li>3.6.1 Φαινότυποι υπερέκφρασης του γονιδίου με το σύστημα GAL4-UAS (UAS-Zld)</li> <li>3.6.1.1 Υπερέκφραση της Zelda με τους οδηγούς en, ap, salm και pnrGAL4</li> <li>3.6.1.2 Υπερέκφραση της Zelda με τον οδηγό ptcGAL4</li> <li>3.6.1.3 Υπερέκφραση της Zelda με τον οδηγό dppGAL4</li> <li>3.6.1.4 Υπερέκφραση της Zelda με τον οδηγό ombGAL4</li> <li>3.6.1.5 Υπερέκφραση της Zelda με τον οδηγό vgGAL4</li> <li>3.6.2 Φαινότυποι της καταστολής της έκφρασης του γονιδίου με χρήση του συστήματος GAL4-UA</li> </ul>	- 99 - - 99 - - 100 - - 101 - - 102 - - 102 - - 103 - S (UAS- - 103 -

3.6.2.1 Καταστολή της έκφρασης της Zelda με τους οδηγούς en, ap, salm και pnrGAL4	- 105 -
3.6.2.2 Καταστολή της έκφρασης της Zelda με τον οδηγό ptcGAL4	- 105 -
3.6.2.3 Καταστολή της έκφρασης της Zelda με τον οδηγό dppGAL4	- 106 -
3.6.2.4 Καταστολή της έκφρασης της Zelda με τον οδηγό ombGAL4	- 107 -
3.6.2.5 Καταστολή της έκφρασης της Zelda με τον οδηγό vgGAL4	- 107 -
3.6.2.6 Καταστολή της έκφρασης της Zelda με τον οδηγό Dcr-2/DVGAL4	- 108 -
3.6.3 Γενετική αλληλεπίδραση μεταξύ της Zelda και του Notch.	- 108 -
3.7. Ανάλυση των μεταβολών στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στην ανάι	πτυξη του
φτερού μετά από υπερέκφραση και καταστολή της έκφρασης του γονιδίου zelda	- 111 -
3.8. Ανάλυση των μεταβολών στα πρότυπα παραγωγής πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην α	χνάπτυξη του
φτερού μετά από υπερέκφραση και καταστολή της έκφρασης του γονιδίου <i>zelda</i>	- 114 -
3.8.1 Καταστολή έκφρασης της Zelda με τον οδηγό Dcr-2/DVGAL4	- 117 -
3.8.2 Καταστολή της έκφρασης της Zelda με τον οδηγό vgGAL4	- 118 -
3.8.3 Καταστολή έκφρασης της Zelda με τον οδηγό dppGAL4	- 120 -
Εικόνα 38α. Περιοχή έκφρασης του dppGAL4. Εμβρυϊκός δίσκος του φτερού στον οποίο το	UAS/GFP
εκφράζεται υπό τον έλεγχο του dppGAL4 κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα.	- 122 -
3.8.3 Υπερέκφραση της Zelda με τον οδηγό ombGAL4.	- 122 -
3.8.4 Υπερέκφραση της Zelda με τον οδηγό vgGAL4	- 124 -

3.9 Τα γονίδια *cut, omb, vg* και *wg*. Η εμπλοκή τους στην ανάπτυξη του φτερού της *Drosophila* και οι αλληλεπιδράσεις τους με τη Zelda - 126 -

## Συμπεράσματα

4.1 Η συμμετοχή της Zelda στο σχηματισμό του προτύπου ανάπτυξης του εμβρυϊκού δίσκου του φτερού.	- 130 -
4.2 Η υπόθεση του μηχανισμού δράσης της Zelda στο στάδιο ανάπτυξης της προνύμφης	- 131 -
4.3 Η μετάβαση από το γονιδίωμα των αρθροπόδων στο γονιδίωμα των θηλαστικών	- 132 -

- 134 -

## Βιβλιογραφία

## Παραρτήματα

Παράρτημα 1. Εκκινητές των αντιδράσεων PCR	- 147 -
Παράρτημα 2. Χάρτες των φορέων κλωνοποίησης	- 150 -
Παράρτημα 3. Πρωτόκολλα απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων απο kit εμπορίου	- 153 -
Παράρτημα 4. GAL4 και στελέχη UAS	- 166 -
Παράρτημα 5. Αντισώματα	- 167 -

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ (PEER REVIEWED) } - 168 -

## Προ - λογος

Προσπαθώ ν' αρχίσω και προσπαθώ να τελειώσω. Έμαθα να περιμένω, έμαθα πως η αρχή και το τέλος είναι σχετικά όσο υπάρχει πορεία, έμαθα πως με θυμάμαι μικρό, έμαθα πως ωριμάζω στο τέλος μόνο, έμαθα πως η αρχή της αβεβαιότητας είναι μια φράση προσδιορισμού της βεβαιότητας, έμαθα θεωρίες, έμαθα πράξεις, έμαθα πως οι πράξεις με καθορίζουν, έμαθα πως τα αυτονόητα είναι μόνο κτήμα του εαυτού μας και έμαθα πως χωρίς εμένα δεν υπάρχει εμείς, μόνο αύριο.

Όλα ξεκίνησαν από μία ανάγκη, χειμώνας του 2004, έπειτα γνώρισα τη Σ. Τσιτήλου. Μου έδωσε χώρο, χρόνο, μ' εμπιστεύθηκε και επέμεινε. Μετά από 8 και πλέον έτη, η σχέση με τον Έπιβλέποντα της διατριβής' δε μπορεί να περιγραφεί εύκολα σ' ένα προ – λογο. Απλά την ευχαριστώ για όλα.

Χ. Δελιδάκης, εκτίμηση και θαυμασμός. Τα γενετικώς τροποποημένα έντομα, οι balancers, τα signaling pathways, η εμβρυϊκή ανάπτυξη, τα mind-bombs, ...., συνοψίζονται στο 'οι μυγούλες'. Στο εργαστήριό του έμαθα να ξεχωρίζω τα αρσενικά από τα θηλυκά μυγάκια και ήρθα σε επαφή με τον τρόπο δουλειάς σε μία ερευνητική παρέα.

Ο Δ. Σίδερης ήταν εκεί από την πρώτη μου ημέρα στο Βιολογικό της Αθήνας, στη συνέντευξη, στις παρουσιάσεις του Τομέα, στα μικρά μυστικά των πρωτεϊνών. Τον ευχαριστώ γιατί είναι πάντα πρόθυμος να βοηθήσει με όποιο τρόπο μπορεί.

Αποτελεί πραγματικά τιμή για εμένα η συγκρότηση της συγκεκριμένης επταμελούς εξεταστικής επιτροπής. Ιδιαίτερες ευχαριστίες χρωστώ σε όλα τα μέλη της.

Από το Γ. Γιαννόπουλο και το 'σακάτη' του απλά ξεκίνησαν όλα. Τη Δ. Βασιλακοπούλου, το Δ. Στραβοπόδη, το Χ. Ζέρβα, την Κ. Λάμνησου, το Γ. Ροδάκη, τη Ρ. Λεκανίδου, το Μ. Σκουλάκη, την Α. Μαμαλάκη, τον Κ. Ιατρού, τη Μ. Κηπαράκη, την Κ. Βακαλόγλου, τον Π. και το Θ. Βελέντζα τους ευχαριστώ όλους θερμά γιατί μοιράστηκαν μαζί μας ιδέες, υλικά, χώρους και φυσικά μυγούλες.

Ευχαριστίες χρωστώ φυσικά και στον αποβιώσαντα πλέον Β. Κωνσταντακόπουλο χωρίς την οικονομική αρωγή του οποίου, η συνέχιση της παρούσας διατριβής θα ήταν μάλλον αδύνατη.

Τους ανθρώπους που όλον αυτό τον καιρό γνώρισα στο εργαστήριο και στο Τμήμα και μοιραστήκαμε χρόνο και συναισθήματα, εντός και εκτός κτηρίων, τους ευχαριστώ που με ανέχτηκαν. Ο καθένας απ' αυτούς πια γνωρίζει καλά τι και πόσα ακόμη έχουμε να μοιραστούμε.

Μάιρα, ...σαν μεσ' σ' αυτά τα δάση μας πλανέψουνε τα βήματά μας και χαθούμε, τότες είν' ακριβώς που βρίσκουμε τον εαυτόνε μας και ζούμε. Κι όσο από μακριά ακούμε νάρχονται οι μπόρες ή και μας φέρνει ο άνεμος τις μουσικές και τους θορύβους της γιορτής ή τις φλογέρες του κινδύνου, τίποτε -φυσικά- δεν μπορεί να μας φοβίση, ως οι πυκνές οι φυλλωσιές ασφαλώς μας προστατεύουν...

Συγγνώμη σε όλους και σε μένα για όσα δεν ήθελα, δεν πρόλαβα, δεν μπορούσα, δεν κατάφερα.

Προ – λογος ή αλλιώς,

στους γονείς μου,

που σιωπηλά μου δίνουν μόνο αγάπη

και

στο Δημήτρη και τη Βασιλική,

που φύγαν πρίν το τέλος.

#### Περίληψη

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, μελετήθηκε το γονίδιο *CG12701* (FlyBase), συνώνυμο των *vfl* (vielfältig) και zld (zelda – Zinc-finger early Drosophila activator) της Drosophila melanogaster που κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα που αναφέρεται ως Zelda. Η ωρίμανση του αρχικού μεταγράφου του γονιδίου δίνει τέσσερα mRNA (RA, RB, RC και RD) τα οποία μεταφράζονται σε τρία πρωτεϊνικά προϊόντα 1596 a,a, (PA και PB κοινή αμινοξική αλληλουχία), 1367 a.a. (PC) και 1373 a.a. (PD) αντίστοιχα. Η πλήρους μήκους πρωτεΐνη των 1596 a.a. διαθέτει έξι δακτύλους ψευδαργύρου (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> τύπου), οι τέσσερις από τους οποίους βρίσκονται ομαδοποιημένοι στην καρβοξυτελική της περιοχή, ενώ από τις ισομορφές PC και PD απουσιάζουν τρεις από τους τέσσερις ομαδοποιημένους δακτύλους.

Ο μεταγραφικός παράγοντας Zelda, εμφανίζει κύρια δράση στην ενεργοποίηση του ζυγωτικού γονιδιώματος της *Drosophila*. Κατά την εμβρυογένεση, έχει δειχθεί ότι μπορεί να προσδένεται σε ένα επταμερές μοτίβο αλληλουχιών (TAGteam sites) το οποίο εντοπίζεται σε ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων με κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη του εμβρύου. Η Zelda ελέγχει την παραπάνω διαδικασία (MZT – maternal-to-zygotic transition) και «υποδεικνύει» σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, που δρούν αργότερα κατά την ανάπτυξη, περιοχές της χρωματίνης, τις οποίες διατηρεί σε προσβάσιμη κατάσταση για αυτούς.

Η έκφραση του γονιδίου ανιχνεύθηκε με RT-PCR και στα τέσσερα αναπτυξιακά στάδια της *Drosophila*. Τα πειράματα αυτά, έδειξαν συνεχή έκφραση των μεταγράφων RB (7318 bp) και RD (7632 bp), ενώ το μετάγραφο RA (6610 bp) ανιχνεύεται μόνο στο στάδιο της νύμφης και το RC (5876 bp) στα στάδια του εμβρύου, της προνύμφης και του ενηλίκου. Σε εμβρυϊκούς δίσκους φτερού προνύμφης τρίτου σταδίου, έγινε ανίχνευση των μεταγράφων RB, RC και RD. Επιπλέον, με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της Zelda προσδιορίστηκε με ανάλυση κατά Western η παραγωγή της πρωτεΐνης σε όλα τα στάδια ανάπτυξης και με πειράματα ανοσοϊστοχημείας εντοπίστηκε το πρότυπό της σε ιστούς εμβρύου και προνύμφης. Σε πρωτεΐνικά εκχυλίσματα που προήλθαν από δίσκους φτερών προνύμφης 3<sup>ου</sup> σταδίου καθώς και τους εναπομείναντες ιστούς της προνύμφης, ανιχνεύθηκε η πλήρους μήκους πρωτεΐνη της ZLD (~180kD) καθώς και μία επιπλέον ισομορφή της, η οποία αντιστοιχεί στα ~70 kD. Αυτή η ισομορφή των 70kD μπορεί να προκύπτει από μία πιθανή μεταμεταφραστική τροποποίηση στην οποία υπόκειται η πρωτεΐνη στο συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο ή η λιγότερο πιθανή εκδοχή να είναι προϊόν ενός ακόμη εναλλακτικού μεταγράφου του γονιδίου.

Η υπερέκφραση ή η καταστολή της έκφρασης του γονιδίου zelda στον αναπτυσσόμενο ιστό του φτερού της Drosophila, υπέδειξαν ένα σαφή ρόλο στη διαδικασία καθορισμού του αναπτυξιακού προτύπου, ενώ οι φαινότυποι των αντιστοίχων πειραμάτων συνέτειναν στη δράση του στο σηματοδοτικό μονοπάτι Notch. Για τη μελέτη της in vivo δράσης του γονιδίου δημιουργήθηκαν διαγονιδιακά στελέχη Drosophila με ένθεση της κατασκευής UAS/Zelda στο  $3^\circ$ χρωμόσωμα. Μέσω του συστήματος GAL4/UAS καθίσταται δυνατή η τεχνητή έκφραση ή η καταστολή της έκφρασης γονιδίων σε οργανισμούς που φέρουν τόσο την κατασκευή του GAL4 όσο και εκείνη της αλληλουχίας UAS. Κάτι τέτοιο επιτυγχάνεται με τη διασταύρωση ατόμων που εκφράζουν τον παράγοντα GAL4 υπο τον έλεγχο κάποιου ενδογενούς υποκινητή με άτομα που φέρουν την κατασκευή UAS. Μετά από μία σειρά ανοσοϊστοχημικών χρώσεων σε δίσκους φτερού προνυμφών που προήλθαν από τις διασταυρώσεις των στελεχών GAL4 με τα στελέχη UAS/Zelda και UAS/Zelda RNAi (Vienna Drosophila RNAi Center), παρατηρήθηκε μεταβολή των προτύπων παραγωγής των πρωτεϊνών Cut και Wg. Επιπλέον, έγινε έλεγχος στα πρότυπα παραγωγής πρωτεϊνών όπως οι Patched, Smoothened, Engrailed, Delta, Notch, τα οποία δεν παρουσίασαν αξιοσημείωτες μεταβολές. Στην περίπτωση καταστολής και υπερέκφρασης του γονιδίου υπό τον έλεγχο του vgGAL4, με PCR σε cDNA από δίσκους φτερού προνυμφών, έγινε ανίχνευση των σχετικών επιπέδων έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν σε διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια κατά την ανάπτυξη του φτερού. Τα γονίδια που μελετήθηκαν ήταν τα brinker, optomotor blind, cabut, wingless, vestigial, delta, cubitus interruptus, spalt major, και patched. Από τα αποτελέσματα των PCR προέκυψε πως μείωση των επιπέδων της Zelda οδηγεί σε καταστολή του vg, ενώ διαφοροποιήσεις στα επίπεδα έκφρασής της, οδηγούν σε καταστολή του wq.

Για την εύρεση πιθανών θέσεων πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα στο γενετικό υλικό στο στάδιο της προνύμφης, έγιναν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης (ChIP) σε εμβρυϊκούς δίσκους φτερού προνύμφης 3<sup>ου</sup> σταδίου. Χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της Zelda και στα θραύσματα γενετικού υλικού που κατακρημνίστηκαν έγινε PCR με εκκινητές για ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων *dpp, ptc, en* και *omb*. Από τα πειράματα της ChIP ανιχνεύθηκε πρόσδεση της Zelda στην επιλεγμένη περιοχή του γονιδίου *omb*, ~1000bp αναρροϊκά της 5' UTR των μεταγράφων bi-RD, bi-RC και bi-RE. Η περιοχή στην οποία ανιχνεύθηκε πρόσδεση της Zelda αναφέρεται ως HOT (highly occupied transcription factor region), ενώ αναφορές από μελέτες στην εμβρυογένεση.

Τα αποτελέσματα της διατριβής δείχνουν ένα σαφή ρόλο του υπό μελέτη γονιδίου στις

διαδικασίες ανάπτυξης του φτερού και υποδεικνύουν τη συμμετοχή του στο σηματοδοτικό μονοπάτι Notch. Ωστόσο, η εύρεση της πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα σε περιοχή εσωνίου του γονιδίου *omb*, δεν μπορεί να αποκλείσει την ταυτόχρονη συμμετοχή του σε περισσότερα του ενός σηματοδοτικά μονοπάτια. Η υπόθεση για τον τρόπο δράσης της Zelda στο στάδιο της προνύμφης με μηχανισμό παρόμοιο με εκείνο που χρησιμοποιεί στην εμβρυογένεση, δηλαδή ως καθολικός ενεργοποιητής γονιδίων με κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη δομών του σώματος, παραμένει σε ισχύ σύμφωνα και με τα δεδομένα αυτής της μελέτης.

#### Λέξεις κλειδιά:

Δροσόφιλα, αναπτυξιακή βιολογία, μεταγραφική ρύθμιση, μεταγραφικός παράγοντας, zelda, vfl, εμβρυϊκός δίσκος του φτερού

#### Summary

In the present study, we studied the gene *CG12701* (FlyBase) synonym to *vielfältig*) and *zld* (*zelda* – Zinc-finger early *Drosophila* activator) of the *Drosophila* melanogaster, that codes for a transcription factor reported as Zelda. The primary transcript of the gene is spliced to four alternative transcripts (RA,RB, RC and RD) that are translated to 3 protein products of 1596 a.a. (PA and PB share a common amino acid sequence), 1367 a.a. (PC) and 1373 a.a. (PD) respectively. The full length protein of 1596 a.a. includes 6 zinc fingers (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> type), four of which are clustered near its carboxy-terminal region, while the isoforms PC and PD are lacking 3 out of four zinc-fingers.

The transcription factor Zelda is involved in the activation of the *Drosophila* zygotic genome. During embryogenesis, is shown to binds to a heptamer sequence motif (TAGteam site) found within regulatory regions of genes that play pivotal roles during embryonic development. Zelda controls the maternal-to-zygotic transition, MZT, while it can keep chromatin regions accessible to other factors that act later during development.

The transcription of the gene *zelda* was detected in all four developmental stages of *Drosophila* by RT-PCR experiments. Those experiments showed continuous expression of the RB (7318 bp) and RD (7632 bp) transcripts, while the RA (6610 bp) transcript was detected only during the pupal stage and the RC (5876 bp) during the stages of the *Drosophila* embryo, larva and adult. In embryonic wing discs of L3 larvae the transcripts RB, RC and RD were amplified. Moreover, using specific antibody raised against Zelda, Western Blotting experiments showed production of the protein throughout development while immunohistochemical experiments revealed the pattern of production of Zelda in embryonic and larval tissues. In protein extracts from larval wing discs and the remaining larval tissues, the full length Zelda protein was detected (~180kD) together with an isoform of ~70 kD. This ~70 kD isoform could be the product of a posttranslational modification proceeding during this specific stage or less likely, the product of a novel unknown alternative transcript of the gene.

Overexpressing or knocking down Zelda in the developing wing tissue, showed a certain role of the gene in patterning processes. The phenotypes of several of these experiments indicated its action within the Notch signaling pathway. After crossing GAL4 lines to UAS/Zelda and UAS/ZeldaRNAi lines, immunohistochemical stainings of larval wing discs showed altered production patterns of the proteins Cut and Wg. Moreover, after studying the production patterns of proteins such as Ptc, Smo, En, DI and N, no significant change was observed. PCR experiments with cDNA template coming from larval wing disc tissues after knocking down and overexpressing the gene under the *vg*GAL4 driver were used for the detection of the expression levels of genes that are involved in different signaling pathways during wing development. The results of these experiments revealed reduction of the *vg* gene's expression levels in the case of *zelda* knock down, while reduction of the *wg* gene's expression levels was observed either by knocking down or overexpressing *zelda*.

ChIP experiments, using anti-Zelda Ab followed by PCR amplification of the precipitated fragments with specific primers for regulatory regions of the genes *dpp, ptc, en* and *omb* were performed in wing discs from L3 larvae. The results revealed binding of Zelda to the *omb* region ~1000 bp upstream the 5'UTR pf bi-RD, bi-RC and bi-RE transcripts. This region is reported as HOT (highly occupied transcription factor region) while other reports from embryonic development studies, show binding of Zelda within such regions during embryogenesis.

The results of this study show a certain role of the gene in wing development and consider it as possible candidate to be involved in the Notch cascade. However, the results that showed binding of Zelda on an intronic region of *omb* cannot exclude the fact of its involvement in more than one signaling pathways. The hypothesis that considers Zelda playing a role in the larval stage with a similar mechanism to the one the factor plays during embryogenesis, as an ubiquitous activator of genes that have crucial roles in body patterning, is still valid considering the results of this study.

#### Key words:

Drosophila melanogaster, developmental biology, transcriptional regulation, transcription factor, *zelda, vfl*, imaginal wing disc

Κεφάλαιο 1 | Εισαγωγικά στοιχεία

#### 1.1 Μεταγραφικοί παράγοντες με δακτύλους ψευδαργύρου

Κάθε πρωτεΐνη που είναι απαραίτητη για την έναρξη της μεταγραφής και δεν αποτελεί τμήμα της RNA πολυμεράσης, χαρακτηρίζεται ως μεταγραφικός παράγοντας. Πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες προσδένονται κατευθείαν σε αλληλουχίες υποκινητών ή και ενισχυτών. Η απευθείας πρόσδεση στο DNA, δεν είναι ο μοναδικός τρόπος δράσης ενός μεταγραφικού παράγοντα. Ένας μεταγραφικός παράγοντας μπορεί να αναγνωρίσει έναν άλλο ή την ίδια την RNA πολυμεράση ή να ενσωματωθεί σε ένα σύμπλοκο έναρξης, μόνο παρουσία άλλων πρωτεϊνών. Σε οποιαδήποτε περίπτωση, μία πρωτεΐνη χαρακτηρίζεται ως μεταγραφικός παράγοντας εάν η παρουσία της είναι απαραίτητη για τη μεταγραφή από ένα συγκεκριμένο υποκινητή.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες μπορεί να ενεργοποιούν τη μεταγραφή των γονιδίων (ενεργοποιητές) ή να την καταστέλουν (καταστολείς). Είναι σαφές, ως εκ τούτου, πως ο ρόλος τους στις διαδικασίες λειτουργίας του κυττάρου και του οργανισμού είναι πολύ σημαντικός, καθώς ρυθμίζουν βασικές διαδικασίες όπως η ανάπτυξη και ο μεταβολισμός.

Η μελέτη της αμινοξικής αλληλουχίας των περιοχών των μεταγραφικών παραγόντων που προσδένονται στο DNA έδειξε ότι σε γενικές γραμμές ανήκουν σε οικογένειες πρωτεϊνικών δομικών μοτίβων. Ένα από αυτά τα μοτίβα είναι οι δάκτυλοι ψευδαργύρου (Zn fingers) που εντοπίζονται σε αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες και έχουν ως βασικό χαρακτηριστικό την εξάρτηση της δομικής τους σταθερότητας από την πρόσδεση ενός ιόντος ψευδαργύρου. Η οικογένεια πρωτεϊνών που χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη δακτύλων ψευδαργύρου, περιλαμβάνει αρκετές υποοικογένειες με βάση τα συντηρημένα αμινοξέα που απαιτούνται για την πρόσδεση του ψευδαργύρου κυστεΐνης-ιστιδίνης (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) και τα δάκτυλα κυστεΐνης-κυστεΐνης (C<sub>4</sub>). Το μοτίβο C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στο μεταγραφικό παράγοντα TFIIIA των γονιδίων του 5S RNA στον *Xenopus laevis*. (Miller, McLachlan and Klug, 1985). Οι αρχικές μελέτες στον TFIIIA έδειξαν πως η δομή ενός δακτύλου ψευδαργύρου αποτελείται από 30 αμινοξέα περίπου, ενώ η αντίστοιχη αμινοξική αλληλουχία είναι η κάτωθι:

 $(Tyr, Phe) - X - \frac{Cys}{Cys} - X_{2-5} - \frac{Cys}{Cys} - X_3 - (Tyr, Phe) - X_5 - Leu - X_2 - \frac{His}{Cys} - X_{3-5} - \frac{His}{Cys}$ 

Στην παραπάνω αλληλουχία με X αντιπροσωπεύεται οποιοδήποτε αμινοξύ, ενώ με κίτρινο και γαλάζιο τα αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με το  $Zn^{++}$ .



**Εικόνα 1.** Σχηματική απεικόνιση ενός δακτύλου ψευδαργύρου τύπου C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (Tadepally H.D. et al. 2008)

Οι Lee et al., (1989) έδειξαν τελικά πως 30 αμινοξέα και το ιόν του ψευδαργύρου σχηματίζουν ένα ανεξάρτητο μοτίβο που αποτελείται από μία μικρή α-έλικα και δύο αντιπαράλληλα β-φύλλα, ενώ οι δύο κυστεΐνες εντοπίζονται στα β-φύλλα και οι ιστιδίνες στην αέλικα (Εικ.1).

Αποτελέσματα κρυσταλλογραφίας του συμπλόκου του Zif268, ενός μεταγραφικού παράγοντα με 3 δάκτυλα ψευδαργύρου τύπου  $C_2H_2$ , και της αλληλουχίας των 9 bp του DNA στην οποία προσδένεται, έδειξαν πως τα αμινοξέα στις θέσεις -1, +3 και +6 της α-έλικας αλληλεπιδρούν με τη μία αλυσίδα του DNA. Το αμινοξύ στη θέση +2 της έλικας παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην εξειδίκευση της σύνδεσης, καθώς αλληλεπιδρά με τη συμπληρωματική αλυσίδα του DNA και έτσι αποδεικνύεται ότι ο κάθε δάκτυλος αναγνωρίζει 4 bp. Τα 3 bp βρίσκονται στη μία αλυσίδα ενώ το τέταρτο στη συμπληρωματική της (Pavletich and Pabo, 1991,

Isalan et al., 1998). Αυτό το χαρακτηριστικό έχει ως αποτέλεσμα την επικάλυψη της θέσης αναγνώρισης από περισσότερους του ενός δακτύλους (Εικ. 2).

Είναι ακόμη γνωστό πως η πρόσδεση των παραγόντων C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> δεν περιορίζεται μόνο στο δίκλωνο DNA αλλά μπορούν επιπλέον να προσδένονται και σε RNA ή και πρωτεΐνες. Υπάρχει μάλιστα συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των δακτύλων C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> που διαθέτει ένας παράγοντας και της ικανότητας του να αναγνωρίζει διαφορετικούς προσδέτες. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των δακτύλων ψευδαργύρου, τόσο αυξάνεται η πιθανότητα να υπάρχουν δάκτυλοι οι οποίοι προσδένονται εξειδικευμένα σε διαφορετικού τύπου αλληλουχίες (luchi, 2001).



**Εικόνα 2.** Αναγνώριση μίας αλληλουχίας DNA από τρία συνεχόμενα δάκτυλα ψευδαργύρου. (Andrew et al. 2003)

#### 1.2 Ο μεταγραφικός παράγοντας ZELDA. Δομικά στοιχεία

Το γονίδιο *CG12701* (FlyBase), συνώνυμο των *vfl* (vielfältig) και zld (zelda – Zinc-finger early Drosophila activator) (Staudt et al., 2006, Liang et al., 2008), εντοπίζεται στην περιοχή 18F του X χρωμοσώματος. Η ωρίμανση του αρχικού μεταγράφου δίνει τέσσερα mRNA, τα RA - 6610 nt, RB - 7318 nt, RC - 5876 nt και RD - 7638 nt, τα οποία μεταφράζονται σε τρία πρωτεϊνικά προϊόντα 1596 a.a. (PA και PB), 1367 a.a. (PC) και 1373 a.a. (PD) αντίστοιχα. Η πλήρης πρωτεΐνη των 1596 a.a. διαθέτει έξη δακτύλους ψευδαργύρου (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> τύπου), οι τέσσερις από τους οποίους βρίσκονται ομαδοποιημένοι στην καρβοξυτελική της περιοχή, ενώ στις ισομορφές PC και PD απουσιάζουν τρεις από τους τέσσερις ομαδοποιημένους δακτύλους (Εικ. 3). Ένας από τους δύο δακτύλους που βρίσκονται κοντά στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης (554 - 576 α.α.) ανήκει στην κατηγορία εκείνων που εντοπίζονται στο μεταγραφικό παράγοντα JAZ. Έχει δειχθεί ότι οι δάκτυλοι αυτοί προσδένονται σε δίκλωνα μόρια RNA ή σε υβριδικά μόρια DNA/RNA αντί για δίκλωνα μόρια DNA και αποτελούν περιοχές της πρωτεΐνης που χρησιμεύουν ως σήματα πυρηνικού εντοπισμού (Yang et al. 1999).

Ομόλογες μορφές της πρωτεΐνης εντοπίζονται σε οργανισμούς της Συνομοταξίας των Αρθρόποδων, ενώ οι λειτουργικές περιοχές της που φέρουν τους δακτύλους ψευδαργύρου, εμφανίζονται ιδιαίτερα συντηρημένες μεταξύ των μελών της οικογένειας των Drosophillidae. Ομόλογη μορφή της πρωτεΐνης εμφανίζεται και σε ένα είδος καρκινοειδών και συγκεκριμένα στο Daphnia pulex (Εικ. 4).



- 22 - Κεφάλαιο 1 | Εισαγωγικά Στοιχεία

DROYA	526	SSVLPANSITAKAATWKSNEARRPKTYNCTACNKWFTSSGHLKRHYNTTLHKNAVKSSGO
DROSI	1	
DROER	525	SS <mark>VLPANSLTAKAA</mark> TWKSNEARRPKTYNCTACNKWFTSSGHLKRHYNTTLHKNAVKSSG <u>O</u>
DROME	526	SS <mark>VLPANSLTAKA</mark> A <mark>T</mark> WKSNEARRPKTYNCTACNKWFTSSGHLKRHYNTTLHKNAVKSSGQ
DROSE	525	SS <mark>VLPANSLTAKA</mark> ATWKSNEARRPKTYNCTACNKWFTSSGHLKRHYNTTLHKNAVKSSGQ
DROAN	532	SS <mark>VLPANSLTAKAATWKSNEARRPKTYNCTACNKWFTSSGHLKRHYNTTLHKNAVKSSGQ</mark>
DROVI	544	SSVLPANSLTAKAATWKSNEARRPKTYNCTACNKWFTSSGHLKRHYNTTLHKNAVKSSGQ
DROGR	628	SSWLPANSLTAKAATWKSNEARRPKTYNCTACNKWFTSSGHLKRHYNTTLHKNAVKSSGO
NASVI	435	LMOONPKPPPLGNOSWKSNEARRPKTYNCTACNKWFTSSGHLKRHYNTTLHKNAVKOSNO
APIME	430	LLOUPPRPPLANOSWKSNEARKPKTINCTACHKWFTSSGHLKKHINTTLHKNAVKUSNO
CULPT	490	SSIDENNALF-SAUTAWASNEARREATINGTACNAWETSSUDLARDINITLERNAVASSUU
TRICA	378	Spir than 1 - Skot Andre Salakki ki in Ciacuk i i Soudaka i i i in ka kwa Sou
BOMMO	337	STSSNLPTIGGKGANWKSNEARRPKTYNCTACNKWFTSSGHLKRHYNTTLHKNAVRSSG
PEDHC	381	NSLPHSGMSATKGDSWKSNEARRPKTYNCSACNKWFTSSGHLKRHYNTTLHKNAVKOSGO
DAPPU	298	APSNGNAOPSGGGNHGGGSEARRPKTYNCEACNKWFTSSGHLKRHYNTTLHKNAIKASGG
DROMO	27	FLPLVTDVVPLMDMLYMHPSVKGFSWKATGGAGRGLRIHCMDLDTVNAVLSVLQQEK
DROMO	1	
DROYA	586	PDPATERISAHHHPARDPVTKPSRRGNAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
DROSI	505	
DROER	506	PDPATLPISAHHPPAKDPVTKPSKKGNAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
DROME	505	PDPATLPISAHBHPAKDPVIKPSKKUNAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
DROAN	502	PROMINE SAULUS AND A LAS RECARAGA A A A A A A A A A A A A A A A A A
DROVT	604	PDPAVIAPISAHHHPARDEVTKTSRRGNAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
DROGR	688	PDPATLP I SAHIHPARD EVTKTS RRGNAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGTTVGDV - P
NASVI	495	PDPANMPISAHHHPGRDNNSRGAGAAASRHSPELSSSSSPPNLMAGPSGEATRGLLHTPT
APIME	490	<b>PDPANLPISAHHHPG</b> RDSHSGGRAGGPPPRSPELSSSGSPPNLMAGPSGEAARGLLHTPT
AEDAE	555	PDPATLPISIHHHPGRDFNYGNKGRRGSALQIQQPIQQPVPPPDPPRSPDYG
CULPI	563	PDPATLPISVHHHPGRDFNYANKGRRGTTAQIQQPIQQPVPPPDPPRSPDYG
TRICA	438	PDPASMPISAHHHPARDSASNKEDANNSPGDEDTNSMPMPAP
воммо	397	PDPATMPISSHHHPSRDAIQNRAQQQNADSNTQSPVPSEDGRSVDESAMQSP
PEDHC	441	PDPATLPISSHHHPNRDPNYIHSSKTPMGMSNPPPNLSGVTKAKKAKSISPQ
DAPPU	358	NT <u>PAAGDGRRSTTESSRSTGTPTVNSPAGSDEKTMDEMPIPRPSLNSSPKIIPSSPGDYH</u>
DROMO	84	
DROVA	1225	STRUCTTONNESSISS VERCORCERED SEDVETTINGER TODEPHOLIC PROCE
DROST	479	FTKNCYLTOHNKSFHSGDYOFRCOKCGKBEOSEDVYTTHLGRHBTODKPHKWS
DROER	1330	FTKNCYLTOHNKSFHSGEVPFRCONCGKRFOSEDWYTTHLGRHRTODKPHKCELCPKOFH
DROME	1335	FIKNCYLTŐHNKSFHSGEYPFRCÓMCGKRFÖSEDVYTTHLGRHRTÓDKPHKCELCPKŐFH
DROSE	1304	F <u>TKNCYLTQHNKSFHSGEYPFRCQKCGKRFQS</u> EDVY <u>TTHLGRHRTQDKPHKCELCPKQF</u> H
DROAN	1432	F <mark>TKN</mark> CYLTQHNKSFHSGEYPFRCQKCGKRFQS <mark>EDVYTTHL</mark> GRHRTQDKPHKCDQCPKQFH
DROVI	1424	FTKNCYLTQHNKSFHSGEYPYRCQKCGKRFQCEEIYTTHLGRHRTQDKPHKCELCPKQFH
DROGR	1535	FTKNCYLTQHNKSFHSGEYPWRCOKCGKRFOCEDVYTTHLGRHRTODKPHKCELCPKOFH
NASVI	906	FINKACYLTOHNKSFHSGDKPFKCNMCGKRFPHEYLHAEHLOKHAG-DKPYKCEICFKOFN
APIME	982	FINAACILTOHNASFHSGDAPPACNOCGARREPLEILHAEHLORHAG-DAPIKCEICPAOFA
CULRI	960	
TRICA	683	ENKACYLTON NKTE HOGDK PEKOTROGK BESNEETHEEHASKHAG - DKEKODROPKOFN
BOMMO	852	FNKACY LTOHNKTFH SGAKPFKCDRCGKRFSDDVSVEGHVIKHTE - NKPFKCSECPKSFN
PEDHC	904	FNRICYLTOHNKSFHSGEKPFKCDRCGKRFHSEIRARDHSKKHGG-EKPYKCEICPKSFN
DAPPU	696	FNRVCYLTOHNNTFHKGDKPFKCHMCGKRFPNAELFDOHOOKHAG-DKPYKCPLCPKOFN
DROMO	174	MQQQIQVKLNKYSKISNNKYKYNKHNNNKYRYSKYSKSKINKLLKQGGSINIIIWWTSTN
DROMO	1	
DROYA	1395	HANDLERGEVE ALLENGELEO HMOLDIGERGE CERCERCEREN NEVERVVGRE SAAAAMA
DROSI	1200	THE REPORT OF TH
DROLK	1205	HKTDIJKKUVLA I HTGIJNUMODI GICIKUG CKKOPILKANI BETTUNDEVUGKA SAAAAAAA
DROSE	1364	HKTDLEBHUFATHTGLKOHMCDICEKGECEKDHIRKHLETHNERV GKE_SAAAAAAA
DROAN	1492	HKTD GREHVEATHTGLEOHMODICEKGECREDHLEKHTETHNEPEVVGKKSAAAAAAAAAAA
DROVI	1484	HKTDLRRHVEAIHTGLKOHMCDICEKGFCRKDHLRKHLETHNRPRVVGKKAAAVAAAKAT
DROGR	1595	HKTDLRRHVEAIHTGLKOHMCDICEKGFCRKDHLRKHLETHNRPRVVGKKAAAVAAAKAA
NASVI	965	HKTDLRRH-MCLHTGEKPYACDKCGKGFIRKDHMMKHLETHKKKSNNHHKVHLRA
APIME	1041	HKTDLRRH-LCLHTGEKPYACDNCGKGFIRKDHMMKHLETHKKK-NNNHNVHLRA
AEDAE	828	HKTDLRRH-MCLHSGSKPYACDQCGKGFIRKDEMLKHCETHRKKS-VAVMKRPLNGKLTN
CULPI	928	HKTDLRRH-MCLHNGSKPYACTOCGKGFIRKDHMLKHCETTHRKRTNSSAAKKAAIGKFGM
TRICA	742	HKUTDISKIH-MCLHUGOKIPFVCDTCGKGFIIKKDHMLKHCETTHFRKTONKNRG
BOWWO	911	HANDLAND MCLINSD CAPF ACDHOGACGFTINADHMVAHFDUILKAN SRSSSSTSLSWSRMV
PEDHC	755	HAT DIALAN - DEDISE LAFI ACONOMICATINA DIMENNY GONA KAGA KATANA VIDDELV <u>A</u> K
DROMO	234	SWAWTINSS
DROMO	1	
-		

**Εικόνα 4**. Συντηρημένες περιοχές της Zelda μεταξύ διαφορετικών ειδών αρθροπόδων και του *Daphnia pulex*. Στις παραπάνω αλληλουχίες εμφανίζεται η στοίχιση των περιοχών του δακτύλου ψευδαργύρου τύπου JAZ (554-576 α.α.) και των τεσσάρων ομαδοποιημένων δακτύλων του καρβοξυτελικού άκρου (1290-1520 α.α.) της πλήρους μήκους πρωτεΐνης. Η εύρεση ορθόλογων έγινε με τη χρήση του metaPhOrs (Pryszcz et al. 2011) και η στοίχιση των αλληλουχιών με τη χρήση των προγραμμάτων του ClustalW και του ExPAsy.



**Εικόνα 5**. Αλληλουχία της ισομορφής PB της πρωτεΐνης Zelda. Με γαλάζια σκίαση σημειώνεται η ακολουθία που αντιστοιχεί σε έναν από τους μοναδικούς δακτύλους (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> JAZ-like) ενώ με κόκκινη οι ακολουθίες των ομαδοποιημένων δακτύλων ψευδαργύρου (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> Zinc fingers).

### **1.2** H Drosophila melanogaster

Η Drosophila melanogaster -στο εξής θα αναφέρεται και ως Drosophila- είναι ένα δίπτερο έντομο που ανήκει στην Οικογένεια Drosophillidae. Γνωστή και ως μύγα των φρούτων, αποτελεί έναν από τους πιο καλά μελετημένους οργανισμούς - μοντέλο σε γονιδιακό και αναπτυξιακό επίπεδο. Ο συγκεκριμένος οργανισμός έχει μία σειρά χαρακτηριστικών τα οποία οδήγησαν στην ευρύτατη χρήση του ως πειραματόζωο. Συνοπτικά αναφέρονται: α) Ο κύκλος ζωής του είναι σύντομος, β) Παρουσιάζει ευκολία στη διατήρηση διαφορετικών στελεχών σε περιορισμένο χώρο και με μικρό κόστος, γ) Ο αριθμός των απογόνων του είναι μεγάλος, δ) Διατίθενται πολλές και ποικίλες μεταλλάξεις σε μεγάλο αριθμό γονιδίων και υπάρχει η δυνατότητα επαγωγής ειδικών

μεταλλάξεων, ε) Υπάρχει μεγάλη ποικιλία γενετικών μεθοδολογιών που καθιστούν δυνατή τη γενετική ανάλυση. Η αλληλούχιση του γονιδιώματος του οργανισμού έχει ολοκληρωθεί (Adams et al. 2000), κάτι που επιτρέπει τη δυνατότητα ενδελεχούς μελέτης των γονιδίων σε μοριακό επίπεδο με σκοπό την κατανόηση βασικών διαδικασιών ανάπτυξης και ομοιόστασης του οργανισμού. Η χρησιμοποίηση της *Drosophila* για τη διεξαγωγή φυλογενετικών μελετών και εξελικτικών μηχανισμών είναι επίσης ευρεία.

Η Drosophila είναι έντομο ολομετάβολο. Ο κύκλος της παρουσιάζεται στην Εικόνα 6. Η διάρκεια του κύκλου επηρεάζεται από τη θερμοκρασία και τη σχετική υγρασία και ολοκληρώνεται σε 12-14 ημέρες στους 25°C και σε περίπου 25 ημέρες στους 18°C. Αναλυτικά τα στάδια ανάπτυξης της *Drosophila* είναι:

Έμβρυο: Αρχίζει με τη γονιμοποίηση του ωαρίου και ολοκληρώνεται με την εκκόλαψη της προνύμφης. Η διάρκειά του είναι περίπου 24 ώρες στους 25°C.

*Προνύμφη*: Διακρίνεται σε προνύμφη πρώτου, δευτέρου και τρίτου σταδίου. Η συνολική διάρκειά του είναι περίπου 5 ημέρες.

*Νύμφη*: Αποτελεί το στάδιο της μεταμόρφωσης της προνύμφης σε μύγα και διαρκεί περίπου 5 ημέρες. Κατά το στάδιο αυτό οι δομές της προνύμφης λύονται και αντικαθίστανται από τις δομές του ενήλικου ατόμου.



Ενήλικο - ακμαίο άτομο: Το στάδιο αυτό ξεκινά με την εκκόλαψη του ακμαίου ατόμου.

**Εικόνα 6.** Ο κύκλος ζωής της *Drosophila melanogaster*. Από Zoology Dpt, UBC. CA Η *Drosophila* διαθέτει 4 ζεύγη χρωμοσωμάτων, το ζεύγος των φυλετικών (ΧΧ στα θηλυκά και ΧΥ στα αρσενικά) και 3 ζεύγη αυτοσωμικών (2°, 3° και 4°). Το Υ και το 4° χρωμόσωμα είναι μικρά και αποτελούνται κυρίως από ετεροχρωματίνη, κάτι που κάνει τη μελέτη των γονιδίων τους σχετικά δύσκολη. (Εικ.7)



#### 1.3.1 Εμβρυϊκή ανάπτυξη της Drosophila melanogaster

Το ωοθυλάκιο της *Drosophila* μετατρέπεται σε ένα μεγάλο συγκύτιο αμέσως μετά τη γονομοποίηση. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με συνεχείς μιτωτικές διαιρέσεις, απουσία κυτταροκίνησης ενώ οι θυγατρικοί πυρήνες που προκύπτουν έως και 70 λεπτά μετά τη γονιμοποίηση παραμένουν σε κοινό κυτταρόπλασμα. Μετά την 9η διαίρεση, οι περισσότεροι από τους πυρήνες μεταναστεύουν προς την επιφάνεια του εμβρύου, άλλοι παραμένουν στο κέντρο, ενώ μερικοί μετακινούνται στον οπίσθιο πόλο σχηματίζοντας τα πολικά σωμάτια.

Ακολουθεί συγχρονισμένη διαίρεση όλων των πυρήνων με αποτέλεσμα 2 ώρες μετά τη γονιμοποίηση να δημιουργηθεί το συγκυτιακό βλαστόδερμα. Την 3η ώρα μετά τη γονιμοποίηση, η κυτταροπλασματική μεμβράνη του εμβρύου εγκολπώνεται και περικλείει καθένα πυρήνα σε ξεχωριστή μεμβράνη, σχηματίζοντας το κυτταρικό βλαστόδερμα. Κατά τη δημιουργία του κυτταρικού βλαστοδέρματος, τα πολικά κοκκία περικλείονται από πλασματική μεμβράνη και αποχωρίζονται από το συγκυτιακό βλαστόδερμα, συνεχίζοντας να διαιρούνται ασύγχρονα και δημιουργώντας τα πολικά κύτταρα από τα οποία προκύπτουν τα γεννητικά κύτταρα και οι γαμέτες του οργανισμού (Sullivan et al. 1995).

Τα σχηματιζόμενα από τους περιφεριακούς πυρήνες κύτταρα, παραμένουν ενωμένα με κυτταροπλασματικές γέφυρες οι οποίες αποκόπτονται κατά τη γαστριδίωση. Η γαστριδίωση είναι η επόμενη διαδικασία της εμβρυογένεσης κατά την οποία δημιουργούνται τρείς βλαστικές στοιβάδες (ενδόδερμα, μεσόδερμα, εξώδερμα) από τις οποίες προέρχονται στη συνέχεια όλες οι βασικές δομές του σώματος της *Drosophila*. Παράλληλα με τη γαστριδίωση, λαμβάνει χώρα η διαδικασία της μεταμεριδίωσης η οποία οδηγεί στο σχηματισμό 3 γναθικών, 3 θωρακικών και 9 κοιλιακών τμημάτων. Κάθε μεταμερίδιο έχει την ίδια οργάνωση και αποτελείται από επιδερμικά, νευρικά και μεσοδερμικά στοιχεία (Campos Ortega , 1993), (Εικ. 8).

Παράλληλα με τη μεταμεριδίωση βρίσκεται σε εξέλιξη ο διαχωρισμός των εμβρυικών δίσκων οι οποίοι αποτελούν και χαρακτηριστικό του αμέσως επόμενου αναπτυξιακού σταδίου, αυτού της προνύμφης. Το εμβρυϊκό στάδιο του κύκλου ζωής της *Drosophila* ολοκληρώνεται με την έναρξη εκκόλαψης της προνύμφης.

#### 1.3.2 Γονιδιακή ρύθμιση της εμβρυϊκής ανάπτυξης της Drosophila melanogaster

Σε όλα τα ζώα, τα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης ελέγχονται από το μητρικό γονιδίωμα και συγκεκριμένα από τα γονιδιακά του προϊόντα τα οποία εναποτίθενται στο αναπτυσσόμενο ωοκύτταρο. Στη *Drosophila*, τα γονίδια της μητρικής επίδρασης εκφράζονται κατά την ωογένεση στα τροφοκύτταρα του ωοθυλακίου και μέσω των κυτταροπλασματικών γεφυρών μεταφέρονται στο ωοκύτταρο. Τα πρώτα μετάγραφα που αποθηκεύονται στο ωοκύτταρο προκύπτουν ως εκ τούτου από το μητρικό γονιδίωμα.

Τα περισσότερα μετάγραφα στο ωοκύτταρο διαμερισματοποιούνται σε συγκεκριμένες θέσεις και η ρύθμιση της έκφρασής τους γίνεται στο επίπεδο της μετάφρασης (Richter and Theuerkauf, 2001, Johnstone and Lasko, 2001). Η κατανομή των προϊόντων αυτών σε διαμερίσματα αποτελεί το πρώτο βήμα στη διαμόρφωση του προσθοπίσθιου και του ραχοκοιλιακού άξονα του εμβρύου. Σε κάποιο στάδιο της εμβρυογένεσης, η ρύθμιση της μεταγραφής περνά από το μητρικό στο ζυγωτικό γονιδίωμα, με μία διαδικασία η οποία ονομάζεται μητρική σε ζυγωτική μετάβαση (MZT - maternal-to-zygotic transition), η οποία πραγματοποιείται κατά τη μετάβαση του εμβρύου από το συγκυτιακό στο κυτταρικό βλαστόδερμα (Johnstone and Lasko, 2001). (Εικ.9). Στο στάδιο αυτό οι πρωτεΐνες και τα μετάγραφα μητρικής προέλευσης αποικοδομούνται και αρχίζει η έκφραση των ζυγωτικών γονιδίων. Τα χασματικά γονίδια (gap genes) είναι τα πρώτα που μεταγράφονται απο το ζυγωτικό γονιδίωμα (Ingham and Martinez-Arias, 1992), ακολουθούν τα γονίδια pair rule με χαρακτηριστικό πρότυπο έκφρασης σε συγκεκριμένες περιοχές του εμβρύου και τα γονίδια πολικότητας των μεταμεριδίων (segment polarity genes) που καθορίζουν τα όρια κάθε μεταμεριδίου. Στο τελικό στάδιο εκφράζονται τα ομοιοτικά γονίδια (homeotic genes) τα οποία ορίζουν και τον τύπο διαφοροποίησης κάθε μεταμεριδίου (Εικ. 10).



**Εικόνα 8**. Σύνοψη του κύκλου ανάπτυξης της *Drosophila* από το στάδιο του γονιμοποιημένου αυγού ως το στάδιο της μεταμεριδίωσης (segmentation). Από Purves et al. 1998.





**Εικόνα 9**. Η μητρική σε ζυγωτική μετάβαση σε διαφορετικά ζώα. Τα μητρικά RNA σημειώνονται με κόκκινο. Με γαλάζιο και μπλέ χρώμα σημειώνονται τα μικρότερα και τα κύρια "κύματα" ενεργοποίησης των ζυγωτικών γονιδίων αντίστοιχα, σε συνάρτηση με το χρόνο. Από Tadros and Lipshitz, 2009.



**Εικόνα 10.** Ιεραρχία της γονιδιακής έκφρασης κατα την εμβρυογένεση της *Drosophila melanogaster*. Από Ε. Jarvis, 2012.

## 1.4 Εμβρυϊκοί δίσκοι στη *Drosophila melanogaster,* η ανάπτυξη του εμβρυϊκού δίσκου του φτερού

Οι επιδερμικές δομές των ενήλικων ατόμων της *Drosophila* (φτερά, αλτήρες, κεραίες, μάτια, πόδια) προκύπτουν από τους εμβρυϊκούς δίσκους. Οι εμβρυϊκοί δίσκοι προκύπτουν ως ομάδες 10-40 κυττάρων κατά την ανάπτυξη του εμβρύου, τα οποία αρχίζουν να διαιρούνται από τα πρώτα στάδια της προνύμφης και να σχηματίζουν μεγάλους επιθηλιακούς σάκους που παίρνουν την τελική τους μορφή στις προνύμφες του τρίτου σταδίου. Υπάρχουν δέκα ζεύγη εμβρυϊκών δίσκων. Το κάθε ζεύγος έχει συγκεκριμένο σχήμα και μέγεθος και παίρνει το όνομά

Ο εμβρυϊκός δίσκος του φτερού αποτελεί ένα ιδανικό μοντέλο για την ανίχνευση γονιδίων τα οποία τροποποιούν το φαινότυπο σε άτομα που έχουν υποστεί γνωστές γενετικές τροποποιήσεις στο συγκεκριμένο ιστό. Πρόκειται για ένα απλό μονόστοιβο επιθήλιο με ευκρινή κύτταρα, επομένως, ένα χαμηλής πολυπλοκότητας ιστό. Οι μηχανισμοί μορφογένεσής του και τα μονοπάτια που συμμετέχουν σε αυτή είναι καλά συντηρημένα και μελετημένα, επομένως μπορεί με σχετική ευκολία να υπάρξει συσχέτιση των αποτελεσμάτων που παρατηρούνται με ήδη υπάρχοντα δεδομένα και να μελετηθούν περαιτέρω αλληλεπιδράσεις μορίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του ιστού.

Οι εμβρυϊκοί δίσκοι υποδιαιρούνται σε διαμερίσματα που καθορίζονται από τους εμβρυϊκούς άξονες. Στον εμβρυϊκό δίσκο του φτερού υπάρχουν δύο κύριοι άξονες, ο προσθοπίσθιος (Anterior/Posterior, A/P) και ο ραχοκοιλιακός (Dorsal/Ventral, D/V). Ο πρώτος αναπτύσσεται κατά το πρώτο στάδιο της προνύμφης και χωρίζει το δίσκο σε εμπρόσθιο (A) και οπίσθιο διαμέρισμα (P). Ο δεύτερος σχηματίζεται κατά το δεύτερο στάδιο της προνύμφης και χωρίζει το δίσκο σε εμπρόσθιο (D) και κοιλιακό (V) διαμέρισμα. Η επιφάνεια επαφής μεταξύ δύο γειτονικών διαμερισμάτων ονομάζεται όριο (Εικ. 12). Χαρακτηριστικό των ορίων είναι η λειτουργία σε αυτά μηχανισμών κυτταρικού διαχωρισμού με αποτέλεσμα τα κύτταρα του ενός τμήματος να μην αναμειγνύονται με τα κύτταρα του γειτονικού.



**Εικόνα 11**. Οι εμβρυϊκοί δίσκοι της *Drosophila* και τα όργανα του ενήλικου που προκύπτουν από αυτούς. Συνολικά υπάρχουν 9 ζεύγη δίσκων και ένας μοναδικός από τον οποίο προκύπτουν τα γεννητικά όργανα του ατόμου. Από Lew Held Jr. 2005.



**Εικόνα 12**. Άξονες συμμετρίας και όρια στον εμβρυϊκό δίσκο φτερού και στο φτερό των ενήλικων ατόμων. Από Thomas Schaffter, 2011.

#### 1.5. Γονιδιακός έλεγχος της ανάπτυξης του φτερού

Η ανάπτυξη του φτερού ελέγχεται από μία σειρά γονιδίων με *πιο* σημαντικά τα engrailed (en), apterous (ap) και vestigial (vg), καθώς και γονίδια τα οποία εμπλέκονται στη ρύθμιση των μονοπατιών σηματοδότησης Notch (N), Decapentaplegic (Dpp), Wingless και Hedgehog (Hh) (Klein 2001).

Το πρώτο στάδιο στην ανάπτυξη του φτερού αποτελεί ο καθορισμός της περιοχής του δίσκου από την οποία θα προκύψει αυτό, διακρίνοντάς τη από τα υπόλοιπα τμήματα των ορίων ένωσης με το θώρακα και τις θωρακικές δομές. Καίριο ρόλο στον καθορισμό αυτό παίζει το γονίδιο *wg*, το οποίο στο δεύτερο στάδιο ανάπτυξης της προνύμφης εκφράζεται στην κοιλιακή περιοχή του δίσκου και ελέγχεται από το μονοπάτι Hh. Το μονοπάτι αυτό είναι επίσης απαραίτητο για τον καθορισμό του εμπροσθοοπίσθιου άξονα (Basler and Stuhl. 1994). Ο δίσκος του φτερού δεν είναι υπεύθυνος μόνο για τον καθορισμό της δομής του φτερού αλλά και για μία περιοχή του θώρακα. Ο σχηματισμός της περιοχής αυτής ελέγχεται από το μονοπάτι EGF-R, το οποίο ενεργοποιείται μέσω της πρωτεΐνης Vein. Η πρωτεΐνη Vein, στο δεύτερο στάδιο ανάπτυξης της προνύμφης εκφράζεται στο ραχιαίο τμήμα του δίσκου σε συμπληρωματικό με το *wg* πρότυπο, καθορίζοντας τις θωρακικές δομές και παρουσιάζει ανταγωνιστική δράση με την πρωτεΐνη Wg (Baonza et al. 2000, Wang et al. 2000, Simcox et al. 1996).

Μετά τον καθορισμό της περιοχής του δίσκου από την οποία θα προκύψει το φτερό, η ανάπτυξή του βασίζεται κυρίως στην αρχή σχηματισμού των αξόνων συμμετρίας, γύρω από τους οποίους εντοπίζονται διαφορετικοί κυτταρικοί πληθυσμοί. Για το σχηματισμό του Α/Ρ άξονα του δίσκου του φτερού, υπεύθυνο αρχικά είναι το γονίδιο *en*. Το γονίδιο αυτό μαζί με το *invected (inv)* δρουν ως γονίδια επιλογείς (selector genes) στα κύτταρα του οπίσθιου άξονα ενεργοποιώντας σε αυτά την έκφραση του Hh (Strigini and Cohen, 1999). Τα γονίδια επιλογής εκφράζονται στα κύτταρα του ενός μόνο διαμερίσματος ελέγχοντας με τον τρόπο αυτό την ταυτότητα των κυττάρων καθενός απ' αυτά. Τα γονίδια *en* και *inv* καταστέλλουν επίσης την απόκριση των οπίσθιων κυττάρων στο σήμα του *Hh* με την καταστολή από το *en* του μεταγραφικού παράγοντα Cubitus interruptus (Ci) στα κύτταρα του οπίσθιου άξονα (Gullien et al., 1995). Στα κύτταρα του εμπρόσθιου άξονα ο Ci, ο οποίος είναι απαραίτητος για τη μεταγωγή του σήματος του Hh (Tabata et al., 1992), εκφράζεται και στα κύτταρα που αποκρίνονται στο Hh που φτάνει από τα κύτταρα του οπίσθιου τμήματος. Η απόκριση των κυττάρων του εμπρόσθιου τμήματος στο Hh, τα οδηγεί στην ανάπτυξη διαφορετικής συνάφειας δεσμών μεταξύ τους από εκείνα του οπίσθιου, κάτι που έχει ως έμμεσο αποτέλεσμα το διαχωρισμό των δύο τμημάτων (Rodriguez and Basler, 1997).

Το Hh επάγει και την έκφραση του *dpp* σε μία λωρίδα κυττάρων του εμπρόσθιου διαμερίσματος κατά μήκος του A/P άξονα (Basler and Struhl, 1994). Το Dpp δρά ως μορφογόνο καθορίζοντας την κυτταρική τύχη και στα δύο διαμερίσματα μέσω της διαβαθμισμένης συγκέντρωσής του (Lecuit et al. 1996).

Ο σχηματισμός του ραχοκοιλιακού άξονα καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από το γονίδιοεπιλογέα apterous (ap). Το apterous κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος εκφράζεται μόνο στα κύτταρα του ραχιαίου διαμερίσματος το οποίο και καθορίζει. Στον καθορισμό του άξονα D/V εμπλέκονται επίσης τα γονίδια Serrate (Ser) και Delta (DI) τα οποία κωδικοποιούν προσδέτες του υποδοχέα Notch και ρυθμίζουν την έκφρασή του. Η έκφραση του Notch ενεργοποιεί με τη σειρά του την παραγωγή του Wg στα κύτταρα του άξονα D/V, το οποίο δρα σε μεγάλη απόσταση για τη ρύθμιση των γονιδίων στόχων του (Milan and Cohen, 2002).



**Εικόνα 13**. Σύνοψη αλληλεπιδράσεων μεταξύ μορίων που καθορίζουν τη διαμερισματοποίηση του εμβρυϊκού δίσκου του φτερού. Από Molecular and Developmental Biology, B.Staveley, 2011.

#### 1.6. Σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την ανάπτυξη του φτερού

#### 1.6.1 Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch

Το γονίδιο Notch της *Drosophila* πήρε την ονομασία του από το φαινότυπο που προκαλεί η μερική έλλειψη λειτουργίας του που οδηγεί σε τομές στο περιθώριο των φτερών του ενήλικου εντόμου (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Περαιτέρω απώλεια λειτουργίας του γονιδίου δημιουργεί νευρογόνο φαινότυπο σε έμβρυα, δηλαδή την αλλαγή της τύχης των κυττάρων της επιδερμίδας τα οποία μετατρέπονται σε νευρικά και το έμβρυο πεθαίνει από υπερπλασία του νευρικού συστήματος.

Η σηματοδότηση μέσω του Notch αποτελεί ένα συντηρημένο μηχανισμό ο οποίος χρησιμοποιείται για να ρυθμίζει την κυτταρική τύχη μέσω διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων. Τα σήματα που μεταδίδονται μέσω του υποδοχέα Notch επηρεάζουν τη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης.

Η πρωτεΐνη Notch είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας που αποτελείται από τρεις περιοχές, την εξωκυττάρια, τη διαμεμβρανική και την ενδοκυττάρια. Η σηματοδότηση μέσω του Notch επιτυγχάνεται με άμεσο τρόπο. Το κύτταρο που στέλνει το σήμα για την ενεργοποίηση του N εκφράζει στην επιφάνειά του ένα προσδέτη που ανήκει είτε στην οικογένεια *Delta* ή στην οικογένεια *Serrate*. Ο προσδέτης δεσμεύεται στον υποδοχέα Notch που βρίσκεται στη μεμβράνη του κυττάρου που λαμβάνει το σήμα. Ακολουθεί η αποκοπή της ενδοκυτταρικής περιοχής του N και η μεταφορά της στον πυρήνα όπου και δρα ως μεταγραφικός ρυθμιστής των γονιδίων στόχων του (Εικ. 14). Τα κύρια γονίδια που ρυθμίζονται από την ενδοκυτταρική περιοχή του N είναι αυτά της οικογένειας *Hairy/Enhancer of split {E(spl}).* Αυτά κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες της δομής basic Helix-Loop-Helix (bHLH) οι οποίοι ελέγχουν την έκφραση δευτερογενών γονιδίων στόχων, μεταξύ άλλων και των γονιδίων που κωδικοποιούν τους προσδέτες του N αλλά και αυτών καθεαυτών των *Hairy/E(spl).* 



Εικόνα 14. Σηματοδότηση Notch. Από Bray S.J., 2006.

#### 1.6.2 Το σηματοδοτικό μονοπάτι Dpp

Το γονίδιο *dpp* το οποίο ανήκει στην υπεροικογένεια των αυξητικών παραγόντων, TGF-β, κωδικοποιεί μία εκκρινόμενη πρωτεΐνη με δράση μορφογόνου με σημαντική δράση στο σχηματισμό του άξονα A/P του δίσκου του φτερού της *Drosophila* (Singer et al., 1997). Στις λειτουργίες του μορίου περιλαμβάνονται ο έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της επαγωγής της κυτταρικής επιβίωσης και πολλαπλασιασμού στην περιοχή του δίσκου (wing pouch) από την οποία θα προκύψει το φτερό της *Drosophila* (Capdevila and Guerrero, 1994). Η παραγωγή της πρωτεΐνης γίνεται από κύτταρα του πρόσθιου τμήματος του εμβρυϊκού δίσκου του φτερού που βρίσκονται στο όριο του Α/P άξονα , δρά όμως συμμετρικά και στα δύο διαμερίσματα σχηματίζοντας διαβαθμισμένη κλίση συγκέντρωσης (Teleman and Cohen, 2000).

Η πρωτεΐνη Dpp δεσμεύεται σε υποδοχείς που μεταβιβάζουν το σήμα του Dpp εντός των κυττάρων. Οι υποδοχείς του είναι δύο, ο Thickveins (Tkv) ή τύπου Ι και ο Punt ή τύπου ΙΙ (Brummel et al. 1994, Letsou et al. 1995). Ο Tkv που φωσφορυλιώνεται από τον Punt, φωσφορυλιώνει το μεταγραφικό παράγοντα Mothers against dpp (Mad) ο οποίος πλέον συμβολίζεται ως pMad. Ο pMad προσδένει την πρωτεΐνη Medea (Med) και ως σύμπλοκο
μετατοπίζονται στον πυρήνα για να ρυθμίσουν την έκφραση των γονιδίων στόχων του Dpp (Raftery and Sutherland, 1999). Το σύμπλοκο pMad/Med και η πρωτεΐνη Schnurri (Shn) καταστέλλουν την έκφραση του *brinker (brk)*, ενός γονιδίου καταστολέα στόχων του Dpp (Arora et al. 1995, Jazwinska et al. 1999). Ο Brk κατανέμεται σε αντίστροφη κλίση συγκέντρωσης από αυτή του Dpp και καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων *spalt-major (salm), spalt-related (salr)* και του *optomotor-blind (omb)* (Minami et al. 1999, Muller et al. 2003) (Εικ. 15).

Το γονίδιο omb το οποίο αποτελεί στόχο του Dpp συμμετέχει στη διατήρηση του ορίου του άξονα A/P και δρα στα κύτταρα του πρόσθιου διαμερίσματος. Στις λειτουργίες του συμπεριλαμβάνονται επίσης η ενεργοποίηση των γονιδίων sal και vg, καθώς όμως και η καταστολή του ap στο κοιλιακό διαμέρισμα. (del Alamo Rodriguez et al., 2004, Shen and Dahmann, 2005).

Το μονοπάτι σηματοδότησης Dpp εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου *collier (col)*, έναν από τους στόχους του Hh, και καταστολέα των N και wg εκτός των ορίων του άξονα D/V. Είναι επίσης απαραίτητο για τη διατήρηση της κανονικής έκφρασης του *en* και όπως ήδη αναφέρθηκε για την έμμεση καταστολή του *ap*.

Για την ανάπτυξη και το σχεδιασμό της περιοχής από την οποία θα προκύψει το φτερό, υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των μονοπατιών Hh, Dpp, Notch και Wg, όπως προκύπτει από τα δεδομένα που αναφέρθηκαν μέχρι στιγμής.



**Εικόνα 15.** Μεταγωγή του σήματος Dpp κατά μήκος του άξονα Α/Ρ του εμβρυϊκού δίσκου του φτερού.

## 1.7 Ο ρόλος της Zelda στην ανάπτυξη της Drosophila melanogaster

Μελέτες του εργαστηρίου Γενετικής του Πανεπιστημίου Πατρών, υπό τον Καθηγητή Γ. Γιαννόπουλο, που αφορούσαν τη γενετική ανάλυση στελεχών με ένθεση ενός μεταθετού στοιχείου Ρ στην περιοχή 18F του X χρωμοσώματος της *Drosophila*, έδειξαν ότι η μετάλλαξη (*Is lethal sakatis*) που προκαλείται από την ένθεση αυτή είναι υπολειπόμενη θανατογόνος και παρουσιάζει διαρροή. Οι αρσενικοί ημιζυγώτες που διαφεύγουν περιστασιακά το θάνατο παρουσιάζουν έντονες σωματικές ανωμαλίες όπως έλλειψη του ενός ματιού ή έλλειψη του μισού θώρακα, ανωμαλίες στο μέγεθος των αλτήρων καθώς και ανωμαλίες των φτερών (Εικ. 16) Η μετάλλαξη *Is* ήταν το αποτέλεσμα της ένθεσης ελλειματικού μεταθετού στοιχείου P στη ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου *CG12701*, 290 bp από το σημείο έναρξης της μεταγραφής του (Α. Πάλμου, 2003).



Εικόνα 16. Αρσενικό άτομο που διαφεύγει το θάνατο, με μετάλλαξη λόγω ένθεσης μεταθετού στοιχείου P στην περιοχή 18F του X χρωμοσώματος. Η ταυτοποίηση του γονιδίου του οποίου η μετάλλαξη με την ένθεση του μεταθετού στοιχείου P προκαλούσε τους παραπάνω φαινοτύπους έγινε με inverse PCR και δείχθηκε ότι είναι το *CG12701*. Η θέση ένθεσης εντοπίστηκε 290bp αναρροϊκά του προβλεπόμενου σημείου έναρξης της μεταγραφής, πιθανότατα εντός της ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου. Απόσχιση του μεταθετού στοιχείου P από την περιοχή αυτή επανέφερε το φυσιολογικό φαινότυπο. (Α. Πάλμου, 2003)

Παρατηρείται έλλειψη ματιού και προβλήματα στους αλτήρες

Τα παραπάνω δεδομένα οδήγησαν στην υπόθεση της άμεσης και σημαίνουσας εμπλοκής του γονιδίου στην ανάπτυξη της *Drosophila* και αποτέλεσαν το ουσιαστικό κίνητρο για την παρούσα μελέτη που αφορά το λειτουργικό χαρακτηρισμό του γονιδίου.

Η πρώτη βιβλιογραφική αναφορά η οποία δημοσιεύτηκε παράλληλα με την παρούσα μελέτη και αφορά το γονίδιο *CG12701* και το ρόλο του στην ανάπτυξη της *Drosophila melanogaster,* έγινε από τους Staudt et al. (2006), οι οποίοι το ονόμασαν *vielfaltig-vfl.* Στην εργασία τους, αναφέρθηκε έντονη έκφραση του γονιδίου στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα του οργανισμού, τον εγκέφαλο, καθώς και σε άλλους μιτωτικά ενεργούς ιστούς. Το *vfl* είναι απαραίτητο για τις κανονικές μιτωτικές διαιρέσεις των κυττάρων ενώ κατά τη διάρκεια της

μεσόφασης η πρωτεΐνη εντοπίζεται στους πυρήνες και στη διάρκεια της μίτωσης εμφανίζεται στο κυτταρόπλασμα. Η παρατήρηση αυτή ενίσχυσε την υπόθεση χαρακτηρισμού της ως ενεργοποιητή της μεταγραφής, καθώς κατά τη μιτωτική διαίρεση παρατηρείται παύση της μεταγραφικής δραστηριότητας.

Σε μία δεύτερη μελέτη του 2008, οι Liang et al. έδειξαν ότι ο Vfl προσδένεται ειδικά σε ένα cis-ρυθμιστικό επταμερές μοτίβο αλληλουχιών οι οποίες εντοπίζονται στην αρχή αρκετών γονιδίων που εκφράζονται στα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης. Τα μοτίβα αυτά αναφέρονται ως TAGteam sites (ten Bosch et al., 2006, De Renzis et al., 2007). Απο τους ίδιους ερευνητές δείχθηκε ότι ο Vfl παίζει κεντρικό ρόλο στην ενεργοποίηση του ζυγωτικού γονιδιώματος και στην αποικοδόμηση των μητρικών mRNA. Λόγω του τρόπου δράσης του, το γονίδιο μετονομάστηκε σε zelda (zinc-finger early Drosophila activator).



Εικόνα 17. Ποσοστά γονιδίων από ανάλυση μικροσυστοιχιών που εμφανίζουν καταστολή (downregulated) ή υπερέκφραση (upregulated) σε περίπτωση απώλειας λειτουργικότητας της Zelda στα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης. Ζ (Ζυγωτικά γονίδια), Μ (Μητρικής προέλευσης), MZ (γονίδια και των 2 κατηγοριών). Από Liang et al., 2008

**Εικόνα 18.** Αλληλουχίες της ομάδας TAG στις οποίες έχει προσδιοριστεί πρόσδεση της Zelda κατά την εμβρυογένεση. (Liang et al., 2008, Nien et al., 2011, Harrison et al., 2011, Satija and Bradley, 2012) Οι έως τώρα μελέτες έχουν δείξει ότι η Zelda προσδένεται σε ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων που εμπλέκονται στις διαδικασίες του φυλοκαθορισμού, της νευρογένεσης, της κυτταροποίησης και του καθορισμού του προτύπου του οργανισμού. Η απώλεια της Zelda προκαλεί καθυστερημένη έκφραση των γονιδίων καθορισμού του προτύπου του εμβρύου,



**Εικόνα 19.** Η Zelda ρυθμίζει το χρόνο έκφρασης των χασματικών γονιδίων. Έμβρυα φυσικού τύπου (A,C,E,G) και *zld*- (B,D,F,H). Σε έμβρυα *zld*- παρατηρείται καθυστέρηση έκφρασης των γονιδίων κατα 1-2 κύκλους διαίρεσης. (Nien et al., 2011)

γεγονός που οδηγεί σε διαφορετικά χωροταξικά πρότυπα έκφρασης παρεμποδίζοντας την εμβρυϊκή ανάπτυξη (Nien et al., 2011) (Εικ. 19). Δρα επομένως καθορίζοντας τη συγχρονισμένη

έκφραση των πρώιμων γονιδίων της εμβρυϊκής ανάπτυξης, παίζει έτσι καθοριστικό ρόλο στην τύχη των κυττάρων νωρίς κατά την ανάπτυξη. Ο μηχανισμός δράσης της μπορεί να επιτρέπει είτε την πρόσβαση άλλων παραγόντων στο DNA ή την αλληλεπίδραση των παραγόντων αυτών με τα μεταγραφικά σύμπλοκα. Ένας εναλλακτικός τρόπος δράσης της Zelda που προτείνεται είναι η εμπλοκή της στην παύση της μεταγραφικής δραστηριότητας μέσω της RNA pol II (Nien et al. 2011, Satija et al. 2012, Saunders et al. 2013). Τα αποτελέσματα αυτής της διαδικασίας αυτής έχουν αντίκτυπο περισσότερο στην ποσοτική παρά στη χρονική έκφραση των γονιδίων (Saunders et al., 2013), καθιστώντας την παρουσία της Zelda απαραίτητη τόσο για τη συντονισμένη χρονική έκφραση των πρώϊμων γονιδίων όσο και για την απαραίτητη διαβαθμισμένη συγκέντρωσή τους στον αναπτυσσόμενο οργανισμό. Είναι σαφές από τις παραπάνω παρατηρήσεις ότι και ο έλεγχος έκφρασης της ίδιας της *zelda* υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο, καθώς η παρουσία της σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις και σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές κατά την ανάπτυξη είναι σημαντική για τη συντονισμένη λειτουργία των κυττάρων. Ωστόσο, δεδομένα που αφορούν τη μεταγραφική ρύθμιση της *zelda* δεν είναι ακόμη διαθέσιμα.



**Εικόνα 20**. RNA-seq δεδομένα της έκφρασης της zelda κατά τα στάδια ανάπτυξης της *Drosophila*. Ο ρόλος της Zelda κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης μελετάται εκτενώς, ο τρόπος δράσης της όμως σε μετέπειτα αναπτυξιακά στάδια παραμένει σε πρώιμο επίπεδο. Το γονίδιο της *zelda* εκφράζεται σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια της *Drosophila* (έμβρυο, προνύμφη, νύμφη και ακμαίο άτομο) (Εικ. 20) και τα δικά μας δεδομένα, δείχνουν πως η παρουσία του είναι απαραίτητη για τη σωστή ανάπτυξη του εντόμου.

## 1.8 Στόχοι της διδακτορικής διατριβής

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματεύεται ερωτήματα βασικής έρευνας στα πεδία της μοριακής και της αναπτυξιακής βιολογίας. Κατά τον αρχικό σχεδιασμό της διατριβής στόχος ήταν η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *zelda* στα αναπτυξιακά στάδια της *Drosophila*, η εύρεση πιθανών θέσεων πρόσδεσης της πρωτεΐνης στο DNA και η μελέτη της δράσης του γονιδίου in vivo με πειράματα καταστολής και υπερέκφρασής του, κατά κύριο λόγο σε ιστούς εμβρυϊκών δίσκων του φτερού του αναπτυσσόμενου εντόμου.

Τα ερωτήματα αυτά, που αρχικά αφορούσαν ένα γονίδιο άγνωστης λειτουργίας, στη συνέχεια εξειδικεύτηκαν και εστιάστηκαν στη μελέτη του κυρίως κατά τη διάρκεια του σταδίου της προνύμφης με έμφαση στην ανάπτυξη του εμβρυϊκού δίσκου του φτερού.

Οι απαντήσεις στα πιο πάνω ερωτήματα σκοπεύουν- να συμβάλλουν στη διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης σε ένα σύστημα όπως ο εμβρυϊκός δίσκος του φτερού, που μελετάται εκτενώς για τις αλληλεπιδράσεις σηματοδοτικών μονοπατιών και παραγόντων μορφογένεσης του αναπτυσσόμενου οργανισμού. Κεφάλαιο 2 | Υλικά και Μέθοδοι

## 2.1 Καλλιέργεια στελεχών Drosophila melanogaster

Τα έντομα αναπτύχθηκαν σε πλαστικά, κυλινδρικά, διαφανή δοχεία με πώμα από βαμβάκι. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε στους 25°C και στους 19°C με συνθήκες υγρασίας εύρους 65-75% σε ειδικό επωαστικό θάλαμο (Elvem). Το θρεπτικό υλικό καλλιέργειας αποτελείται από ζάχαρη, γλυκόζη, καλαμποκάλευρο, ξηρή ζύμη, άγαρ, νερό και προπιονικό οξύ σε αιθανόλη.

## 2.2 Στελέχη

- Oregon-R: εργαστηριακό στέλεχος φυσικού τύπου
- Canton-S: εργαστηριακό στέλεχος φυσικού τύπου
- yw: εργαστηριακό στέλεχος ομόζυγο για τις υποτελείς μεταλλάξεις y (yellow):κίτρινο χρώμα
   σώματος, w (white): άσπρο χρώμα ματιών. Χρησιμοποιήθηκε για την ένθεση όλων των
   διαγονιδίων που κατασκευάστηκαν με σκοπό τη δημιουργία διαγονιδιακών ατόμων.

-*w;Bl/CyO:* εργαστηριακό στέλεχος ισορροπημένο για το 2° χρωμόσωμα, ομόζυγο για τη φυλοσύνδετη υποτελή μετάλλαξη w (white). Φέρει τις επικρατείς θνησιγόνες μεταλλάξεις Bl (bristle): κοντές σμήριγγες, Cy (curly): κυρτά φτερά. Το στέλεχος χρησιμοποιήθηκε για τη χρωμοσωμική χαρτογράφηση των ενθέσεων των διαγονιδίων.

-*w;TM3/TM6B:* εργαστηριακό στέλεχος ισορροπημένο για το 3<sup>°</sup> χρωμόσωμα, ομόζυγο για τη φυλοσύνδετη υποτελή μετάλλαξη w (white). Φέρει τις επικρατείς θνησιγόνες μεταλλάξεις Sb (Stubble): κοντές σμήριγγες, Hu (humeral): αυξημένες σμήριγγες στη ράχη. Tb (Tubby): κοντές και παχύτερες παρονύμφες, νύμφες και ακμαία άτομα σε σχέση με τα στελέχη αγρίου τύπου. Το στέλεχος χρησιμοποιήθηκε για τη χρωμοσωμική χαρτογράφηση των ενθέσεων των διαγονιδίων.

# 2.3 Συλλογή εμβρύων

Θρεπτικό υλικό για τη συλλογή εμβρύων: τρυβλία Petri με 4% άγαρ σε χυμό φρούτων.
 Διαδικασία:

- 1. Παρασκευή τρυβλίων Petri με θρεπτικό υλικό για τη συλλογή των εμβρύων.
- 2. Τοποθέτηση στο κέντρο των τρυβλίων νωπής ζύμης αραιωμένης με νερό.

- Τοποθέτηση των τρυβλίων εντός ειδικού κλουβιού μέσα στο οποίο τοποθετούνται μύγες και αφήνονται να αποθέσουν πάνω τους τα αυγά τους.
- Αλλαγή των τρυβλίων σε χρονικά διαστήματα που απαιτούνται για τη συλλογή εμβρύων συγκεκριμένων αναπτυξιακών σταδίων.

# 2.4 Αποχοριοποίηση και μονιμοποίηση εμβρύων

## Διαλύματα:

- Διάλυμα μονιμοποίησης φορμαλδεϋδης 37%-επτανίου (1:1)
- 1X PBS
- 50% υδατικό διάλυμα χλωρίνης
- μεθανόλη
- διάλυμα PBT (1X PBS-0.1% TritonX 100- 1% BSA)

```
-
```

## Διαδικασία:

- 1. Συλλογή των εμβρύων από τα τρυβλία Petri με πινέλο και ταυτόχρονο ξέπλυμά τους με dH<sub>2</sub>O.
- Μεταφορά εμβρύων σε μικρό καλαθάκι με βάση ύφασμα με μικρούς πόρους από το οποίο μπορεί να περνά το νερό αλλά όχι τα έμβρυα.
- Επώαση των εμβρύων εντός του καλαθιού σε 50% υδατικό διάλυμα χλωρίνης για 4 min, με σκοπό την αφαίρεση του χορίου τους.
- 4. Πλύση των εμβρύων με άφθονο dH2O.
- 5. Μεταφορά των εμβρύων σε γυάλινα κυλινδρικά μπουκαλάκια που περιέχουν το διάλυμα μονιμοποίησης με τη χρήση πινέλου που πρώτα βυθίζεται εντός του διαλύματος μονιμοποίησης. Τα έμβρυα επικάθονται στη μεσόφαση.
- 6. Μονιμοποίηση με ανάδευση σε RT για 30 min.
- Απομάκρυνση με πιπέτα Pasteur της κάτω φάσης που περιέχει φορμαλδεϋδη και έπειτα της πάνω φάσης που περιέχει επτάνιο.
- Προσθήκη 3 ml επτανίου και 6 ml μεθανόλης και έντονη ανακίνηση για περίπου 30 sec, ώστε να αφαιρεθούν οι βιτελινικές μεμβράνες.
- 9. Συλλογή με πιπέτα Pasteur των εμβρύων που βρίσκονται στον πυθμένα του δοχείου και μεταφορά τους σε σωλήνα τύπου eppendorf.
- 10. Πλύση των εμβρύων με μεθανόλη 4 φορές για 2 min υπό ανάδευση.

Σε αυτό το στάδιο τα έμβρυα είτε διατηρούνται στους -70°C είτε πλένονται εκτενώς με PBT
 για να εφαρμοστεί έπειτα πρωτόκολλο χρώσης τους με αντισώματα.

#### 2.5 Ανατομία προνυμφών

Οι ανατομίες πραγματοποιήθηκαν κατά κανόνα σε προνύμφες 3ου σταδίου, ποικίλων γονοτύπων, με σκοπό την αφαίρεση εμβρυϊκών δίσκων για τη χρησιμοποίησή τους είτε σε πειράματα ανοσοϊστοχημείας ή σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης είτε για την απομόνωση ολικού RNA ή πρωτεϊνών από αυτούς. Σε περίπτωση που απαιτείται διάκριση αρσενικών από θηλυκές προνύμφες για τις ανατομίες, η διάκριση επιτυγχάνεται με την παρατήρηση των γονάδων τους, οι οποίες εντοπίζονται κοντά στο πέμπτο μεταμερίδιο και είναι διακριτές ως διαφανή σφαιρικά όργανα εντός του λιπώδους ιστού των αρσενικών. Στα θηλυκά άτομα είναι πολύ μικρότερες και είναι δύσκολο να διακριθούν.

Οι ανατομίες πραγματοποιούνται με τη βοήθεια στερεοσκοπίου και ψυχρού φωτισμού (μέσω οπτικών ινών), σε κρύο διάλυμα 1X PBS. Η συνολική διάρκεια ενός κύκλου ανατομιών δεν πρέπει σε κάθε περίπτωση να υπερβαίνει κατά πολύ τα 20 min ώστε να αποφεύγεται η αποικοδόμηση των ιστών που αφαιρούνται. Στην περίπτωση που οι ανατομίες προορίζονται για την απομόνωση RNA από τους ιστούς, οι αφαιρούμενοι δίσκοι τοποθετούνται αμέσως μετά τις ανατομίες σε αποστειρωμένο διάλυμα 1X PBS με dH<sub>2</sub>O το οποίο έχει επεξεργαστεί με DEPC.

Οι ανατομίες πραγματοποιούνται με ειδικές λαβίδες ανατομίας ενώ η πιο κοινή διαδικασία περιλαμβάνει την αποκοπή του οπίσθιου τμήματος της προνύμφης και η εισαγωγή της λαβίδας στην περιοχή του στόματος με σκοπό την αναστροφή του εσωτερικού τμήματος της προνύμφης προς τα έξω και τον άμεσο χειρισμό-αφαίρεση των εμβρυϊκών δίσκων.

#### 2.6 Απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από δείγματα βιολογικού υλικού

#### 2.6.1 Απομόνωση πυρηνικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

Πυρηνικές πρωτεΐνες απομονώθηκαν από περίπου 100 ενήλικα άτομα, 100 προνύμφες, 100 νύμφες και 500 έμβρυα κατά περίπτωση.

Διαδικασία:

- Ομογενοποίηση των δειγμάτων σε διάλυμα 1X RSB (10mM Tris-HCl pH 7.8, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT), 1mM PMSF, 0,5% NP-40.
- 2. Σύντομη φυγοκέντρηση (1 min, 13000rpm, 4°C) για απομάκρυνση μη ομογενοποιημένων ιστών.
- 3. Συλλογή υπερκειμένου και φυγοκέντρηση για 15min σε 2000g (4°C).
- 4. Αναδιάλυση ιζήματος σε 2 ml 1X RSB/0.25M Sucrose.
- 5. Μεταφορά σε γυάλινο σωλήνα που περιέχει 10 ml 1X RSB/1.5M Sucrose.
- 6. Φυγοκέντρηση για 15 min σε 2000g ( $4^{\circ}$ C).
- 7. Αναδιάλυση ιζήματος σε 4 ml διαλύματος I (10mM HEPES pH 7.9, 10mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM EGTA, 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF). Φυγοκέντρηση όπως στο βήμα 6.
- 8. Απόρριψη του υπερκειμένου και αναδιάλυση του ιζήματος σε 100-200μl διαλύματος Ι. Προσθήκη 7 όγκων διαλύματος ΙΙ (διάλυμα Ι με επιπλέον 0.4M NaCl και 10% v/v γλυκερόλη) και εκχύλιση των πρωτεϊνών υπό συνεχή ανάδευση για 30 min στους 4°C.
- 9. Ακολουθεί υπερφυγοκέντρηση των εκχυλισμάτων σε 100.000g για 1 h στους 4°C.
- Το υπερκείμενο μοιράζεται σε μικρές ποσότητες των 50 μl σε σωλήνες τύπου eppendorf.
   Ακολουθεί απότομη ψύξη σε υγρό άζωτο και διατήρηση στους -70°C.

#### 2.6.2 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών

Μετά το βήμα 2, οι πρωτεΐνες μοιράζονται σε μικρές ποσότητες των 50 μl σε σωλήνες τύπου eppendorf και ακολουθεί απότομη ψύξη σε υγρό άζωτο και διατήρηση στους -70°C. Κατά περίπτωση, στο 1X RSB γίνεται προσθήκη αντιπρωτεασικών παραγόντων Leupeptin (100µg/ml) και Aprotinin (20 µg/ml) (Sigma).

Για τον προσδιορισμό της τελικής συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιείται η μέθοδος Bradford (Bradford, 1976). Ποσότητα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος αραιώνεται στο διάλυμα απομόνωσης. Προστίθεται διάλυμα Bradford και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min και φωτομέτρηση στα 560nm. Η τιμή της οπτικής πυκνότητας ανάγεται σε συγκέντρωση με βάση πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων αλβουμίνης (BSA).

### 2.6.3. Κατακρήμνιση πρωτεϊνών

Κατακρήμνιση με τη χρήση 50% TCA (tri-chloroacetic acid)

- Στον επιθυμητό όγκο πρωτεϊνικού εκχυλίσματος προστίθεται ΤCA με σκοπό η τελική του συγκέντρωση να είναι 10%.
- 2. Επώαση για 30 min σε RT.
- 3. Φυγοκέντρούμε για 30 min σε RT.
- 4. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε το ίζημα με 750 μl 100% παγωμένη ακετόνη
- 5. Φυγοκεντρούμε για 15 min σε RT.
- 6. Επανάληψη των βημάτων 4, 5.
- 7. Στεγνώνουμε το ίζημα σε αντλία κενού.
- 8. Αραιώνουμε στον επιθυμητό όγκο 1X Sample Buffer και ακολουθεί ανάλυση σε πήκτωμα SDS-PAGE.

## 2.7 Απομόνωση RNA από δείγματα βιολογικού υλικού

Όλα τα βήματα πραγματοποιούνται με γάντια σε καθαρό εργαστηριακό περιβάλλον για την αποφυγή επιμολύνσεων των δειγμάτων και αποικοδόμησης του RNA. Για την απομόνωση του RNA χρησιμοποιείται υλικό από περίπου 25 άτομα του κάθε αναπτυξιακού σταδίου εκτός από την περίπτωση των εμβρύων για τα οποία απαιτείται αριθμός άνω των 100.

#### 2.7.1 Απομόνωση ολικού RNA με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRIZOL®

- 1. Ομογενοποιούμε το υλικό σε 1ml διαλύματος TRIZOL<sup>®</sup> με τη χρήση ειδικού εμβόλου σε γυάλινο ομογενοποιητή.
- 2. Επωάζουμε για 5 min σε RT.
- Τοποθετούμε το ομογενοποίημα σε σωλήνα τύπου eppendorf και προσθέτουμε 0.2 ml χλωροφόρμιο.
- 4. Αναδεύουμε έντονα με το χέρι για περίπου 15 sec.
- 5. Επωάζουμε για 2-3 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούμε στις 15000rpm, 2 min, 4°C.

- Μεταφέρουμε την υδατική φάση σε νέο σωλήνα eppendorf και προσθέτουμε ίση ποσότητα ισοαμυλικής αλκοόλης. Αναδεύουμε με το χέρι και επωάζουμε για 10 min σε RT. Φυγοκεντρούμε σε 12000g, 10 min, 4°C.
- 7. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και αναδιαλύουμε το ίζημα σε 1 ml 70% αιθανόλης σε dH<sub>2</sub>O με DEPC 0.1% . Κάνουμε vortex και φυγοκεντρούμε στα 7500g, 5min, 4°C.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και αφήνουμε το σωλήνα eppendorf ανοιχτό για να στεγνώσει το ίζημα. Υπολείμματα αιθανόλης στα τοιχώματα του σωλήνα αφαιρούνται προσεκτικά με πιπέτα Pasteur.
- 9. Μετά το στέγνωμα του ιζήματος προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα dH<sub>2</sub>O-RNAse free (50-100 μl) και αναδεύουμε μέχρι την αναδιάλυση του ιζήματος. Το δείγμα φυλάσσεται στους -70°C.

#### 2.7.2 Απομόνωση ολικού RNA με τη χρήση του RNeasy Mini Kit της QIAGEN

Σε περίπτωση που απαιτείται περαιτέρω καθαρισμός του απομονωμένου RNA από υπολείμματα γενομικού DNA ή και πρωτεϊνών, γίνεται απομόνωση RNA με το αντιδραστήριο TRIZOL<sup>®</sup> σε συνδυασμό με το RNeasy Mini Kit της QIAGEN. Στην περίπτωση αυτή, η διαδικασία πραγματοποιείται σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (Purification of total RNA from Animal Cells or tissues) με τις παρακάτω τροποποιήσεις:

- Στο βήμα 1, στο δείγμα που προκύπτει από το βήμα 9 του 2.7.1 προστίθενται 350μl RLT Plus + β-μερκαπτοαιθανόλη.
- 2. Στο βήμα 5 χρησιμοποιείται 70% αιθανόλη σε dH2O με DEPC 0.1% .
- 3. Συμπεριλαμβάνεται το προαιρετικό βήμα 10.

## 2.8 Σύνθεση cDNA με την αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription, RT)

Η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιείται με ολογονουκλεοτίδια δεοξυθυμίνης (oligo dTs) ως εκκινητές, τα οποία υβριδοποιούνται στην ουρά polyA η οποία υπάρχει στο 3' άκρο των mRNA. Το cDNA παρασκευάζεται μόνο από τα mRNA, με καλούπι ολικό RNA που απομονώνεται από ιστούς του επιθυμητού αναπτυξιακού σταδίου και είναι μονόκλωνο.

Οι αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής έγιναν με βάση το παρακάτω πρωτόκολλο. Με Χ σημειώνεται ο όγκος του αναδιαλυμένου RNA που προστίθεται για να εξασφαλιστεί 1μg ολικού RNA ανά αντίδραση.

A. Αποδιάταξη RNA - 10 min, 70°C
RNA : X (1µg) µl
oligodTs (40 ng/µλ): 1.0 µl
0,1% DEPC dH<sub>2</sub>O: 15- (X+1) µl
Σύνολο-MixA: 15 µl

B. Αντίστροφη μεταγραφή - 60 min, 42°C. Ακολουθείται από απενεργοποίηση της AMV-RT (Finnzymes) στους 90°C για 10 min.

Mix A: 15 μ/ dNTPs (10mM): 2.0 μl 10X Buffer για την AMV-RT: 2.0 μl RNase inibitor (40 u/μl): 0.5 μl AMV-RT (20u/μl): 1 μl Σύνολο: 20.5 μl

Η παραπάνω αντίδραση μπορεί να τροποποιηθεί για την παρασκευή μεγαλύτερης ποσότητας cDNA.

## 2.9 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η PCR βασίζεται στον ενζυμικό πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA που οριοθετείται δεξιά και αριστερά από δύο εκκινητές - ολιγονουκλεοτίδια (primers). Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή είναι συμπληρωματική προς τη μία από τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA-μήτρας. Η αντίδραση περιλαμβάνει συνύθως 25-35 επαναλαμβανόμενους κύκλους. Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία στάδια:

Αποδιάταξη της μήτρας DNA (denaturation of DNA template)

Πρόσδεση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες (primer annealing).

3. Επιμήκυνση των συνδεδεμένων εκκινητών και σύνθεση DNA με κατεύθυνση

5'→3' (elongation).

Η απόδοση της αντίδρασης εξαρτάται από παραμέτρους όπως η συγκέντρωση και η καθαρότητα του υποστρώματος, η ποσότητα των εκκινητών σε συνάρτηση με την ποσότητα του DNA, η συγκέντρωση του MgCl<sub>2</sub>, ο χρόνος και η θερμοκρασία στα βήματα του κάθε κύκλου.

Στην παρούσα διατριβή, ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το γενετικό υλικό της *Drosophila*, πλασμιδιακό DNA καθώς και cDNA από ιστούς όλων των αναπτυξιακών σταδίων του εντόμου. Η ποσότητα DNA που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση εξαρτάται κυρίως από το βαθμό αντιπροσώπευσης του επιθυμητού τμήματος στο δείγμα που υπάρχει διαθέσιμο και συνήθως απαιτείται ποσότητα από 0.1-1 μg. Η Taq πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ανήκει στις εταιρίες Roche (High Fidelity DNA Polymerase) και Finnzymes (Phusion High Fidelity DNA polymerase - DyNAzyme EXT DNA Polymerase). Για τον πολλαπλασιασμό μεγάλων τμημάτων DNA (>4kb) χρησιμοποιήθηκαν τόσο η Phusion High Fidelity DNA polymerase (Finnzymes) όσο και η High Fidelity DNA Polymerase (Roche).

Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκε μείγμα τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) σε τελική συγκέντρωση 200 μM το καθένα και MgCl<sub>2</sub> σε τελική συγκέντρωση από 1-2 mM. Η συγκέντρωση του MgCl<sub>2</sub> καθορίζει και την ειδικότητα της αντίδρασης. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (Invitrogen, MWG Biotech - Παράρτημα 1) βρίσκονται σε τελική συγκέντρωση 0,5 pmoles/μl αντίδρασης και το μήκος τους κυμαίνεται από 18-30 νουκλεοτίδια περίπου. Το σημείο τήξης του κάθε εκκινητή προσδιορίζεται από τον Tm Calculator (Finnzymes) ενώ σχεδιάζονται με το Primer designing tool (NCBI) λαμβάνοντας υπόψιν παραμέτρους όπως: επιλογή εκκινητών με παραπλήσιο σημείο τήξης, ελάττωση της πιθανότητας σχηματισμού διμερών δομών, επιλογή εκκινητών στα σημεία συρραφής των mRNA στην περίπτωση εφαρμογής PCR με υπόστρωμα DNA για την ελάττωση της πιθανότητας πολλαπλασιασμού περιοχών γενομικού DNA.

Οι συνθήκες της θερμοκρασίας και του χρόνου που επιλέγεται σε κάθε βήμα μπορεί να ποικίλουν, ανάλογα με τις απαιτήσεις της κάθε αντίδρασης. Κατά κανόνα κάθε αντίδραση περιλαμβάνει αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 1-2 min και 27-35 κύκλους αντίδρασης. Οι κύκλοι περιλαμβάνουν αποδιάταξη στην ίδια θερμοκρασία για 1 min, πρόσδεση εκκινητών σε θερμοκρασία συνήθως 5 βαθμούς χαμηλότερη από το προβλεπόμενο σημείο τήξης τους, για 30

sec έως 1 min και επιμήκυνση στους 72°C για 2-3 min, η οποία καθορίζεται από το μήκος του μορίου που επιθυμούμε να πολλαπλασιαστεί. Το τελευταίο στάδιο της αντίδρασης περιλαμβάνει την τελική επιμήκυνση η οποία πραγματοποιείται στους 72°C για 3-10 min. Τα παραπάνω συστατικά αναμιγνύονται σε σωλήνα τύπου eppendorf των 0.5 ή των 0.25ml.

## 2.10 Παρασκευή φορέα κλωνοποίησης και αντίδραση τεχνητής σύνδεσης

Στη διαδικασία περιλαμβάνεται η πέψη του πλασμιδίου με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού και η επίδραση με αλκαλική φωσφατάση προκειμένου να αποφευχθεί η επανακυκλοποίηση του γραμμικού μορίου. Στην παρούσα διατριβή, ως φορείς κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια: pBluescript II (Stratagene), pET29b και pET20b (NOVAGEN), pUAST και pCR2.1 (Invitrogen - Παράρτημα 2). Ο τελευταίος φορέας διαθέτει μονόκλωνα αζευγάρωτα άκρα ενός νουκλεοτιδίου θυμίνης και χρησιμοποιείται για την απευθείας κλωνοποίηση προϊόντων PCR τα οποία πολλαπλασιάστηκαν με πολυμεράσες που πολυαδενυλιώνουν το 5' άκρο των αλληλουχιών.

Τα στάδια της διαδικασίας περιλαμβάνουν:

- 1. Πέψη της επιθυμητής ποσότητας πλασμιδιακού DNA με το κατάλληλο ένζυμο περιορισμού.
- Ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας των προϊόντων της πέψης για να διαπιστωθεί η πλήρης πέψη του μορίου.
- 3. Απενεργοποίηση του ενζύμου με θέρμανση στους  $65^{\circ}$ C για 10 min.
- Προσθήκη 1/10 του όγκου ρυθμιστικού διαλύματος 1M Tris-HCl pH 8.8 και 20 u του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση (CIP). Επώαση στους 37°C για 45 min.
- 5. Μεταφορά στους  $65^{\circ}$ C και επώαση 10 min για απενεργοποίηση της CIP.
- 6. Προσθήκη 1/10 του όγκου 0.5Μ EDTA pH 8.0 και εκχύλιση με φαινόλη:χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1) για την πλήρη απομάκρυνση των πρωτεϊνών.
- Κατακρήμνιση του απομονωμένου DNA και αναδιάλυση στον επιθυμητό όγκο TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0).
- 8. Φωτομετρικός προσδιορισμός της ποσότητας του DNA.

Η σύνδεση των άκρων του DNA γίνεται με τη βοήθεια του ενζύμου T4 λιγάση και μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο μεταξύ τμημάτων με μονόκλωνα συμπληρωματικά άκρα, όσο και μεταξύ δίκλωνων τυφλών άκρων (blunt ends). Οι ποσότητες του φορέα και του ενθέματος σε κάθε αντίδραση σύνδεσης είναι κατά κανόνα ισομοριακές. Η αντίδραση πραγματοποιείται για 12-16 h στους 14°C σε τελικό όγκο 20μl. Η T4 DNA ligase (TAKARA) χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 10u/ στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο διατίθεται.

# 2.11 Παρασκευή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων

Τα βακτηριακά στελέχη E.coli που χρησιμοποιήθηκαν για μετασχηματισμό είναι: DH5a, NOVA, BL21(DE3)pLys(S), BL21(DE3)pLys(E).

Διαλύματα:

Στερεό θρεπτικό υλικό για ανάπτυξη βακτηρίων – LB-agar

Άγαρ (bacto-agar) 1.5% κ.β. σε θρεπτικό υλικό LB

Το διάλυμα αποστειρώνεται για 20 min σε αυτόκαυστο και μοιράζεται στα τρυβλία ανάπτυξης των βακτηρίων. Το θρεπτικό υλικό στερεοποιείται όταν η θερμοκρασία του φθάσει στους 40°C.

Υγρό θρεπτικό υλικό LB (Luria-Bertani) για ανάπτυξη βακτηρίων 0.5% κ.β. Εκχύλισμα ζύμης 1% κ.β.Βακτο-τρυπτόνη 1% κ.β.NaCl Ανάδευση μέχρι να διαλυθούν. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7.0 με καυστικό νάτριο (NaOH) 1M και το διάλυμα αποστειρώνεται για 20 min σε αυτόκαυστο.

Διάλυμα ΤΒ 10 mM HEPES pH 6.7 15 mM CaCl2 55 mM MnCl2 250 mM KCl Τα υλικά πλην του MnCl2 αναδεύονται και το pH ρυθμίζεται με καυστικό κάλιο (KOH) στο 6.9. Ακολουθεί προσθήκη MnCl2 και αποστείρωση με χρήση βακτηριοστατικού φίλτρου 0.2μm.

#### Διαδικασία:

 Επιστρώνεται τρυβλίο ανάπτυξης βακτηρίων με στερεό θρεπτικό υλικό LB-άγαρ και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου να στερεοποιηθεί.

Πραγματοποιείται εμβολιασμός του τρυβλίου με κύτταρα του βακτηρίου Ε. coli του επιθυμητού στελέχους και επώαση στους 37°C για 16 ώρες.

3. Μια μονήρης αποικία από το τρυβλίο μεταφέρεται υπό άσηπτες συνθήκες σε

αποστειρωμένο σωληνάριο με 5 ml υγρό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας βακτηρίων και επωάζεται υπό ανάδευση στους 37°C για 16 h.

4. Σε 200 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB προστίθενται 2 ml αποστειρωμένο MgCl2, πραγματοποιείται εμβολιασμός με 2 ml από την υγρή καλλιέργεια και ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στους 37°C ώστε η οπτική απορρόφηση της καλλιέργειας να φθάσει 0.5-0.6 στα 600 nm.

5. Η καλλιέργεια τοποθετείται στον πάγο για 10 min.

Ακολουθεί συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση της καλλιέργειας στα 2.500 g για 10 λεπτά στους 4°C.

7. Το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων επαναιωρείται σε 30 ml παγωμένου διαλύματος TB και επωάζεται στον πάγο για 10 min.

8. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται πάλι στα 2.500 g για 10 min στους 4οC.

9. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 8 ml TB με DMSO 7% με ήπια ανάδευση και επωάζεται στον πάγο για 10 min.

Τα κύτταρα μοιράζονται σε κλάσματα των 100 μl σε παγωμένα σωληνάρια τύπου eppendorf και αποθηκεύονται στους -80°C.

## 2.12 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων

Διαλύματα:

Στερεό θρεπτικό υλικό για ανάπτυξη βακτηρίων – LB-agar

Άγαρ (bacto-agar) 1.5% κ.β. σε θρεπτικό υλικό LB

Το διάλυμα αποστειρώνεται για 20 min σε αυτόκαυστο και μοιράζεται στα τρυβλία ανάπτυξης των βακτηρίων. Το θρεπτικό υλικό στερεοποιείται όταν η θερμοκρασία του φθάσει στους 40°C.

Υγρό θρεπτικό υλικό LB (Luria-Bertani) για ανάπτυξη βακτηρίων 0.5% κ.β. Εκχύλισμα ζύμης 1% κ.β.Βακτο-τρυπτόνη 1% κ.β.NaCl Ανάδευση μέχρι να διαλυθούν. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7.0 με NaOH 1M και το διάλυμα αποστειρώνεται για 20 min σε αυτόκαυστο.

Υγρό θρεπτικό υλικό SOB για ανάπτυξη βακτηρίων 2% κ.β.Βακτο-τρυπτόνη 0.5% κ.β.Εκχύλισμα ζύμης 0.05% NaCl 2.5 mM KCl 10 mM MgCl<sup>2</sup> Ανάδευση όλων πλην του MgCl<sup>2</sup> μέχρι να διαλυθούν. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται με NaOH 1M στο 7.0 και το διάλυμα αποστειρώνεται για 20 min σε αυτόκαυστο. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C και λίγο πριν τη χρήση γίνεται προσθήκη αποστειρωμένου διαλύματος MgCl<sup>2</sup> με τελική

Υγρό θρεπτικό υλικό SOC για ανάπτυξη βακτηρίων

Γλυκόζη 1Μ

συγκέντρωση 10 mM.

Προσθήκη στο SOB 20 ml αποστειρωμένου διαλύματος γλυκόζης 1M ανά λίτρο καλλιέργειας. Το διάλυμα της γλυκόζης αποστειρώνεται με τη χρήση βακτηριοστατικού φίλτρου και το διάλυμα SOB πρέπει να βρίσκεται σε θερμοκρασία ≤ 60°C κατά την προσθήκη του διαλύματος γλυκόζης. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

## Διαδικασία

Σωληνάριο που περιέχει 100 μ<br/>Ι δεκτικών βακτηρίων μεταφέρεται από τους -80°C σε πάγο.

2. Στο σωληνάριο μεταφέρεται 1 μΙ πλασμιδιακού DNA.

- 3. Πραγματοποιείται ήπια ανάδευση με το χέρι.
- 5. Το σωληνάριο επωάζεται στον πάγο για 30 min.
- 6. Στη συνέχεια μεταφέρεται σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 42°C. Επωάζεται για 90 sec.
- 7. Αμέσως μεταφέρεται στον πάγο, όπου επωάζεται για 2 min.

8. Σε αποστειρωμένο σωληνάριο των 1,5 ml που περιέχει 1 ml υγρού θρεπτικού μέσου SOC προστίθεται το εναιώρημα των κυττάρων.

9. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 1 h υπό ανάδευση.

10. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των βακτηρίων στα 4000 g για 10 min, απόρριψη του

υπερκειμένου και επαναιώρηση των κυττάρων σε 100 μl υγρού θρεπτικού υλικού LB.

11. Επίστρωση του εναιωρήματος των βακτηρίων σε τρυβλία Petri – LB agar που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό. Το τρυβλίο τοποθετείται ανεστραμμένο σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C για 16 h.

Το τρυβλίο ελέγχεται μακροσκοπικά για την ανάπτυξη αποικιών βακτηρίων ανθεκτικών στο αντιβιοτικό επιλογής.

# 2.13 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

## 2.13.1 Απομόνωση με τη χρήση του QIAGEN Plasmid mini kit

Οι διαφορές σε σχέση με το πρωτόκολλο που προτείνεται από την εταιρία συνοψίζονται στα εξής:

βήμα 4: 15min αντί 10 min. βήμα 6: 3min. βήμα 7: 3min. βήμα 8: 3 x 3min.

# 2.13.2 Απομόνωση με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης

Ανάπτυξη 3ml υγρής βακτηριακής καλλιέργειας με το επιθυμητό πλασμίδιο σε υγρό LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό, στους 37°C για 12-16 h.

Μεταφορά 1.5ml της καλλιέργειας σε σωλήνα τύπου eppendorf και φυγοκέντρηση στις 8000rpm για 2min.

Αναδιάλυση του ιζήματος σε 100 μl διαλύματος l (50mM γλυκόζη, 10mM EDTA, 25mM Tris-HCl pH 8.0) με vortex και παραμονή για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.

Προσθήκη φρέσκου διαλύματος ΙΙ (0.2N NaOH, 1%SDS), ήπια ανάδευση και διατήρηση στον πάγο για 5 min.

Προσθήκη 150 μΙ διαλύματος ΙΙΙ (3Μ οξικό κάλιο), στιγμιαία μηχανική ανακίνηση και παραμονή στον πάγο για 5 min.

Φυγοκέντρηση στις 12000rpm στους 4°C για 10 min και μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωλήνα.

Εκχύλιση με φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1) και μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο σωλήνα.

Προσθήκη 2 όγκων παγωμένης αιθανόλης και διατήρηση στον πάγο για 10 min. Φυγοκέντρηση στις 12000rpm στους 4°C για 15 min και ξέπλυμα του ιζήματος με 80% αιθανόλη.

Στέγνωμα του ιζήματος και αναδιάλυση στην επιθυμητή ποσότητα ΤΕ.

Το πλασμιδιακό DNA που απομονώνεται με αυτή τη μέθοδο είναι κατάλληλο για πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες με σκοπό τη χαρτογράφηση ή και την απομόνωση του κλωνοποιημένου ενθέματος. Σε περίπτωση που επιθυμούμε μεγαλύτερης καθαρότητας DNA προτιμούμε τη μέθοδο απομόνωσης με το QIAGEN Plasmid mini kit.

## 2.14 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Διαλύματα: 1%-2% w/v αγαρόζη 0.5x TBE (Tris-HCl, Borate, EDTA) Βρωμιούχο αιθίδιο 0.5μg/ml Χρωστική δειγμάτων: 6X Loading Buffer (30% v/v glycerol, 0.25% w/v bromophenol blue σε dH<sub>2</sub>O)

#### Παρασκευή διαλύματος:

Σε γυάλινη κωνική φιάλη μεταφέρεται η απαιτούμενη ποσότητα αγαρόζης και κατόπιν προστίθεται το TBE και το dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα θερμαίνεται υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και να γίνει διαυγές. Στη συνέχεια αφήνεται να κρυώσει και προστίθεται σε αυτό το βρωμιούχο αιθίδιο. Ακολουθεί καλή ανάδευση και τοποθέτηση του διαλύματος στο κατάλληλο εκμαγείο. Τέλος προστίθεται το καλούπι δημιουργίας των φρεατίων φόρτωσης των δειγμάτων (χτένι). Το πήκτωμα αφήνεται να πήξει για τουλάχιστον 20 min στους 4°C. Τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση αναμιγνύονται με τις κατάλληλες χρωστικές και τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις του πηκτώματος. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.5X TBE υπο την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου (50-150V).

Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης τα πηκτώματα φωτογραφίζονται με τη χρήση ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής και φίλτρου για τη διερχόμενη υπεριώδη ακτινοβολία, σε ειδική UVφωτοτράπεζα.

## 2.15 Εκχύλιση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Μετά την ηλεκτροφόρηση και ταυτοποίηση του επιθυμητού προϊόντος DNA, πραγματοποιείται εκχύλιση από το πήκτωμα αγαρόζης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται το kit Nucleospin Extract II (Macherey- Nagel, Germany). Τα διαλύματα αναφέρονται όπως είναι στο kit.

Αναλυτικά:

1. Αφαιρείται με τομή το τμήμα του πηκτώματος που περιέχει την επιθυμητή ζώνη DNA, ζυγίζεται και τοποθετείται σε σωλήνα τύπου eppendorf 1.5 ml. Προστίθενται 200 μl διαλύματος NT ανά 100 mg πηκτώματος αγαρόζης και το δείγμα επωάζεται στους 50<sup>0</sup>C, με ανάδευση ανά 3 min, ως την πλήρη διάλυση του πηκτώματος.

2. Το διάλυμα μεταφέρεται σε στήλη Nucleospin Extract II, η οποία έχει προσαρμοστεί σε σωληνάριο συλλογής 2 ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min, 11.000 g και το έκλουσμα απομακρύνεται.

3. Η μεμβράνη σίλικας της στήλης εκπλένεται με προσθήκη 600 μl διαλύματος NT3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min, 11.000 g και απόρριψη του εκλούσματος.

4. Η μεμβράνη ξηραίνεται με φυγοκέντρηση για 2 min, 11.000 g και η στήλη μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάριο 1.5 ml.

Προστίθενται 30 μΙ διαλύματος έκλουσης ΤΕ, που έχει προθερμανθεί στους 70<sup>0</sup>C, ακολουθεί επώαση για 2 min σε RT και φυγοκέντρηση για 1 min, 11.000 g.

## 2.16 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA

1. Σε αποστειρωμένο σωληνάριο eppendorf, τοποθετείται 1 ml αποστειρωμένου dH<sub>2</sub>O και 4 μl από το διάλυμα του νουκλεϊκού οξέος.

2. Το διάλυμα μεταφέρεται σε κυψελίδα φωτομέτρου κατασκευασμένη από χαλαζία. Σε δεύτερη κυψελίδα τοποθετείται 1 ml αποστειρωμένου dH<sub>2</sub>O, που χρησιμοποιείται ως τυφλό για το μηδενισμό του φωτομέτρου, κάθε φορά πριν τη φωτομέτρηση του δείγματος. Το δείγμα φωτομετρείται σε δύο διαφορετικά μήκη κύματος, στα 260 nm και στα 280 nm.

Η συγκέντρωση DNA υπολογίζεται από τον τύπο : Συγκέντρωση DNA = O.A. 260 nm x 50 x αραίωση.

Η συγκέντρωση δίνεται σε ng/μl. Ο συντελεστής 50 για το DNA εξάγεται από την παρατήρηση ότι ένα διάλυμα DNA, συγκέντρωσης 50ng/μl έχει απορρόφηση 1 OD στα 260 nm. Ο λόγος της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm ως προς την οπτική απορρόφηση στα 280 nm αποτελεί δείκτη καθαρότητας του δείγματος. Αν ο λόγος αυτός είναι μικρότερος του 1.8, τότε η καθαρότητα του δείγματος είναι χαμηλή και μπορεί να προκληθούν προβλήματα στις περαιτέρω αναλύσεις.

#### 2.17 Ανάλυση πρωτοδιάταξης του DNA

Οι αλληλουχίες των δειγμάτων DNA διαβάστηκαν μέσω αυτόματου αναλυτή από την εταιρία MWG Biotech σε αρχεία κειμένου αλληλουχίας (.txt).

# 2.18 Έκφραση και καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από ετερόλογο βακτηριακό σύστημα

Η μεθοδολογία που περιγράφεται στη συγκεκριμένη παράγραφο χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση και τον καθαρισμό ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που προέρχονται από τμήματα της πλήρους μήκους πρωτεΐνης της Zelda και χρησιμοποιήθηκαν είτε ως αντιγόνα για την κατασκευή πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης και το μετέπειτα χαρακτηρισμό της δράσης των αντισωμάτων αυτών ή σε πειράματα μείωσης κινητικότητας συμπλόκου για τον έλεγχο πρόσδεσης της περιοχής των ομαδοποιημένων δακτύλων ψευδαργύρου σε συγκεκριμένη αλληλουχία DNA. Οι πρωτεΐνες αυτές αντιστοιχούν στα τμήματα 413-545 α.α. -πρωτεΐνη SP- και 1290-1520 α.α. -πρωτεΐνη ZNF- του πολυπεπτιδίου PB της Zelda.

Οι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι pET-29b (+) και pET-20b (+) (Novagen) και οι θέσεις κλωνοποίησης η Ncol και η HindIII. Οι φορείς διαθέτουν αλληλουχία 6 ιστιδινών (His-Tag) που ακολουθείται από τη θέση τομής του ενζύμου θρομβίνη και μία αλληλουχία κλωνοποίησης, επομένως η ενσωμάτωση του ενθέματος στο φορέα επιτρέπει την παραγωγή υβριδικής πρωτεΐνης. Ο αρχικός μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα NOVA και έπειτα σε κύτταρα που επιτρέπουν τη δυνατότητα έκφρασης. Στα κύτταρα έκφρασης BL21(DE3), διατίθεται ένα χρωμοσωμικό αντίγραφο της T7 RNA πολυμεράσης υπό τον έλεγχο του lacU5 υποκινητή, με επακόλουθο την επαγωγή της έκφρασης παρουσία IPTG.

Η διαδικασία επαγωγής περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

Εμβολιασμός καλλιέργειας LB παρουσία καναμυκίνης (30μg/ml) ή αμπικιλλίνης (100μg/ml) με μοναδική αποικία από φρέσκο τρυβλίο μετασχηματισμού του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου σε κύτταρα έκφρασης. Επώαση για 12 h στους 37°C.

Εμβολιασμός 30 ml θρεπτικού υλικού LB παρουσία αντιβιοτικού με 250μl από την εναρκτήρια καλλιέργεια. Επώαση στους 37° C υπο ανάδευση μέχρι η OD<sub>600</sub> της καλλιέργειας να βρίσκεται εντός των ορίων 0.4-0.6.

Φωτομέτρηση στα 600nm και συλλογή δύο δειγμάτων του 1 ml. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 5000g για 5 min και αποθήκευση των ιζημάτων στους -80° C.

Προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM και επώαση για 90 min στους 37°C.

Επανάληψη του βήματος 3.

Επιστροφή της καλλιέργειας στους 37° C για 90 min.

Επανάληψη του βήματος 3.

Η εναπομείνουσα καλλιέργεια φυγοκεντρείται στα 5000g για 5 min και το ίζημα των κυττάρων φυλάσσεται στους -80° C.

Για το διαχωρισμό του κυτταροπλασματικού υλικού από τα έγκλειστα σωμάτια (inclusion bodies) πραγματοποιούνται τα ακόλουθα βήματα σε ιζήματα βακτηριακής καλλιέργειας 1ml.

Προσθήκη διαλύματος 20 mM Tris-HCl pH 7.5 σε ποσότητα 50 φορές την OD<sub>600</sub> της καλλιέργειας και αναδιάλυση

Λύση των κυττάρων με τη χρήση sonicator (0.4 κύκλους και 50% εύρος δόνησης) για 15 sec. Αναμονή στον πάγο για 1 min.

#### Επανάληψη του βήματος 2

Φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 10 min. Το υπερκείμενο αντιστοιχεί στο κυτταροπλασματικό κλάσμα και το ίζημα στα έγκλειστα σωμάτια

Μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρό σωλήνα eppendorf και προσθήκη διαλύματος 5X Sample Buffer (0.2 M Tris-HCl pH 6.8, 25% μερκαπτοαιθανόλη, 10% SDS, 50% γλυκερόλη, 0.2% μπλέ της βρωμοφαινόλης) ώστε η τελική συγκέντρωση να γίνει 1X.

Προσθήκη στους σωλήνες των ιζημάτων ποσότητα 1X Sample Buffer πενήντα φορές την OD<sub>600</sub> και αναδιάλυση.

Βρασμός των υπερκειμένων και των ιζημάτων για 10 min στους 100° C Φυγοκέντρηση για 10 min σε 13000rpm.

Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE). Ο έλεγχος της πρωτεΐνης γίνεται με χρώση του πηκτώματος με Coomassie Blue (0.1% Coomassie blue R250, 10% οξικό οξύ, 50% μεθανόλη) και αποχρωματισμός σε διάλυμα 10% οξικού οξέος. Τα πηκτώματα αποτελούνται από: το πήκτωμα διαχωρισμού στο οποίο λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των πρωτεΐνών με βάση το μοριακό τους βάρος (resolving gel) 10-15% stock acrylamide (30:1 ακρυλαμίδη προς bis-ακρυλαμίδη), 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, ddH<sub>2</sub>O, 0.04% APS, 0.08% TEMED και το πήκτωμα συμπύκνωσης (stacking gel) 5% stock acrylamide (30:1 ακρυλαμίδη), 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, ddH<sub>2</sub>O, 0.05% APS, 0.1% TEMED. Παράλληλα με τα δείγματα ηλεκτροφορείται πρότυπος δείκτης μοριακών βαρών. Χρησιμοποιήθηκαν Prestained Protein Ladders της Fermentas, της Invitrogen και της NEB.

Στάδιο καθαρισμού:

Ο καθαρισμός των επαγόμενων πρωτεΐνών από το σύνολο του εκχυλίσματος πραγματοποιήθηκε μέσω χρωματογραφίας συγγένειας σε στήλη ρητίνης-νικελίου (Novagen). Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε σε αποδιατακτικές συνθήκες, εξαιτίας της μη διαλυτότητας των επαγόμενων πρωτεΐνών, παρουσία ουρίας 6M σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου (10-200mM). Τα κλάσματα των εκλούσεων ελέγχονται ηλεκτροφορητικά και τα *πιο* πυκνά επιλέγονται ωστε να υποστούν διαπίδυση έναντι διαλύματος 350mM NaCl, 10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EGTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 10% γλυκερόλη. Τα παρασκευάσματα φυλάσσονται στους -80°C.

# 2.19 Πειράματα μείωσης της κινητικότητας του συμπλόκου (Electrophoretic Mobility Shift Assays)

Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που είχε παραχθεί σε βακτηριακά κύτταρα και αντιστοιχεί στην περιοχή των τεσσάρων δακτύλων ψευδαργύρου της Zelda χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα μείωσης της κινητικότητας του συμπλόκου για εύρεση πιθανής αλληλεπίδρασης της με συγκεκριμένο ολιγονουκλεοτίδιο, η αλληλουχία του οποίου προσδιορίστηκε in silico (Kaplan et al. The Hebrew University of Jerusalem). Η αλληλουχία που χρησιμοποιήθηκε ήταν η κάτωθι:

#### 

#### 5' -TGTACACCCCCCCCTGAT - 3' - PREZNR

Με κόκκινο σημειώνονται επιπλέον νουκλεοτίδια που προστέθηκαν στην αλληλουχία πρόβλεψης -σημειώνεται με μαύρο- για διευκόλυνση της αλληλεπίδρασης της αλληλουχίας με την περιοχή των δακτύλων ψευδαργύρου.

Η μέθοδος της μείωσης κινητικότητας του συμπλόκου στηρίζεται στο γεγονός ότι τα σύμπλοκα DNA-πρωτεϊνών αποκτούν μειωμένη κινητικότητα σε σύγκριση με το μη δεσμευμένο τμήμα DNA σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (Garner and Revsin, 1981).

Στην εφαρμογή της μεθόδου λαμβάνονται υπόψιν αρκετές παράμετροι καθώς η μείωση της κινητικότητας του συμπλόκου επηρεάζεται από το μέγεθος των πρωτεϊνών, το φορτίο τους, τη στερεοδιάταξη που αποκτούν και τις πειραματικές συνθήκες. Η συγκέντρωση αλάτων, το pH, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης και του DNA, η συγκέντρωση του μη ειδικού DNA και οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης μπορούν να επηρεάσουν άμεσα το πειραματικό αποτέλεσμα.

#### Πήκτωμα:

Διαστάσεις 14.5 x 14.5 cm. Συστατικά : 5% μίγμα ακρυλαμίδης (39% ακρυλαμίδη : 1% bisακρυλαμίδη), 0.25X TBE, 3% γλυκερόλη. Μέσα πολυμερισμού: 0.4% APS και 0.02% TEMED. Το πήκτωμα πολυμερίζεται για περίπου δύο ώρες ενώ τα χτενάκια έχουν πλυθεί με αιθανόλη η οποία απομακρύνεται σχολαστικά από αυτά.

#### Διαδικασία Μείωσης της Κινητικότητας του Συμπλόκου:

Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε όγκο 30 μl σε διάλυμα 1x BB (12 mm HEPES pH 7.9, 4 mM Tris pH 8.0, 60 mM KCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 1 mM DTT, 14% γλυκερόλη) που περιείχε: 2-4μg poly(dIdC), 100-300cps ραδιοσημασμένου DNA (0.1-2ng), 3-5 μg πρωτεΐνης και τελική συγκέντρωση 50-100 mM NaCl. Στις αντιδράσεις προστίθεται τελευταία η ποσότητα των πρωτεϊνών και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20-30 min. Πρίν τη φόρτωση των δειγμάτων το πήκτωμα ηλεκτροφορείται για μισή h στα 100V. Κατόπιν 20 μl της αντίδρασης φορτώνεται στο πήκτωμα και ηλεκτροφορείται σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.25X TBE στους  $4^{0}$ C και σε τάση 180V. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα μεταφέρεται σε χαρτί τύπου Whatman 3 mm, στεγνώνει σε ξηραντήρα (BioRad) και τοποθετείται σε ειδικούς φακέλους με φίλμ αυτοραδιογραφίας και οθόνης (screen) στους -70 <sup>0</sup>C για 12 h.

#### Ραδιοσήμανση και καθαρισμός DNA:

Για τη σήμανση των ανιχνευτών, χρησιμοποιήθηκαν τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια [γ-<sup>32</sup>P]dATP με ειδική ενεργότητα 800Ci/mmol (IZOTOP). Η ραδιοσήμανση πραγματοποιείται με τη βοήθεια της πολυνουκλεοτιδικής κινάσης T4 (Ambion) η οποία καταλύει τη μεταφορά της γ-P στο 5' άκρο κάθε ολιγονουκλεοτιδίου απελευθερώνοτας ADP. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 20μl με το ένζυμο να προστίθεται τελευταίο και επωάζεται σε RT για 30min. Στο τέλος της επώασης προστίθεται 5μl διαλύματος χρωστικής (0.025% μπλέ της βρωμοφαινόλης, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0) και 80μl ΤΕ. Η αντίδραση προστίθεται σε κολώνα Sephadex G50 για να πραγματοποιηθεί η απομάκρυνση των μη ενσωματωμένων νουκλεοτιδίων.

Για τον καθαρισμό στο άκρο σύριγγας 1 ml τοποθετείται μικρή ποσότητα υαλοβάμβακα. Η σύριγγα συμπληρώνεται με υλικό Sephadex G-50 και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε RT στις 2000rpm. Προστίθεται εκ νέου υλικό Sephadex G-50 και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση μέχρι ο όγκος του στη σύριγγα να φτάσει τα 0.9 ml. Στη στήλη προστίθεται 100 μl TE και φυγοκεντρείται δύο φορές μέσα σε σωλήνα τύπου falcon. Το δείγμα φορτώνεται στην κολώνα και μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα στη βάση του οποίου τοποθετείται σωλήνας συλλογής τύπου eppendorf. Το δείγμα φυγοκεντρείται εκ νέου και συλλέγεται στο σωλήνα eppendorf σε όγκο 100 μl. Στο τέλος της διαδικασίας ο ακριβής όγκος του κλάσματος και της ραδιενέργειας σε αυτό μετράται με ανιχνευτή τύπου Geiger για τον προσδιορισμό των cps/μl.

#### 2.20 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blotting)

Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προερχόμενα από διάφορους ιστούς της *Drosophila* καθώς και ανασυνδυασμένες πρωτείνες που προέρχονται από επαγωγή έκφρασης βακτηριακών κυττάρων

ηλεκτροφορούνται σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης της κατάλληλης πυκνότητας, ανάλογα με τα μεγέθη των πρωτεϊνών που θέλουμε να ανιχνεύσουμε. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε 1x διάλυμα ηλεκτροφόρησης (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS) υπό σταθερή τάση 175V.

Μετά την ηλεκτροφόρηση, ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (GenScript) με τη χρήση κατάλληλης συσκευής (BioRad), η οποία γίνεται σε RT στα 15V για μία ώρα σε διάλυμα μεταφοράς (1x διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς: 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.01% SDS, 20% methanol). Οι πρωτεΐνες εξαιτίας του αρνητικού φορτίου τους, λόγω του SDS, μετακινούνται προς τον θετικό πόλο. Η διάρκεια και η τάση που εφαρμόζεται κατά τη μεταφορά εξαρτώνται από την πυκνότητα του πηκτώματος και το μέγεθος των πρωτεΐνών που μεταφέρονται. Η επιτυχία της μεταφοράς διαπιστώνεται με τη χρώση των πρωτεϊνών πάνω στη μεμβράνη με διάλυμα Ponceaux. Ακολουθεί επώαση με διάλυμα PBT (1x PBS, 0.1% TritonX-100) με 2% BSA για 1 h σε RT με ανακίνηση. Η επώαση με το πρωτεύον αντίσωμα γίνεται για περίπου 14 h στους 4°C με ανακίνηση. Ακολουθούν 3 πλύσεις με ανακίνηση των 10 λεπτών με διάλυμα PT (1x PBS, 0.1% TritonX-100) και επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με HRP ή AP (Alkaline phosphatase), στην κατάλληλη αραίωση σε διάλυμα PBT με 2% BSA για περίπου 2 h σε RT με ανακίνηση. Ακολουθούν 4 πλύσεις με PT και εμφάνιση με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας (Lumisensor - GenScript) και απεικόνιση σε φιλμ. Εναλλακτικές μέθοδοι απεικόνισης περιλαμβάνουν τα αντιδραστήρια NBT/BCIP τα οποία χρησιμοποιούνται στην περίπτωση δευτέρου αντισώματος συζευγμένου με αλκαλική φωσφατάση καθώς και τη χρήση DAB ως εναλλακτικής μεθόδου εμφάνισης σήματος της HRP.

Με τη χρήση του αντιδραστηρίου DAB για την εμφάνιση του σήματος, η μεμβράνη επωάζεται για 5 min σε διάλυμα 0.3 mg/mL DAB, 1.5 mM Ni<sup>2+</sup>/Co<sup>2+</sup> σε PBT και έπειτα προστίθενται 30 μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Το σήμα εμφανίζεται περίπου 10 sec. μετά την προσθήκη H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Το διάλυμα χρώσης απομακρύνεται και η μεμβράνη πλενεται με dH<sub>2</sub>O. Για την εμφάνιση σήματος με τη χρήση των NBT/BCIP η μεμβράνη επωάζεται για 15 min σε 10 ml διάλυμα αλκαλικής φωσφατάσης (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) στο οποίο προστίθενται 66 μl NBT και 33 μl BCIP. Μετά την εμφάνιση του σήματος η μεμβράνη πλένεται με άφθονο dH<sub>2</sub>O. Οι δύο τελευταίες μέθοδοι εμφάνισης αν και έχουν χαμηλότερο κόστος, μειονεκτούν ως προς τη χρήση ECL κυρίως διότι ευνοούν την εμφάνιση μh ειδικού σήματος στην ανάλυση. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση κατά Western:

Πρωτεύοντα:

Rabbit Anti-Sp: 1:1000 σε PBT (πολυκλωνικό έναντι της περιοχής 413-545 α.α. της Zelda) Rabbit Anti-Znf: 1:2000 σε PBT (πολυκλωνικό έναντι της περιοχής 1290-1520 α.α. της Zelda) Mouse Anti-Zelda: 1:300 σε PBT (πολυκλωνικό έναντι της περιοχής 446-460 α.α. της Zelda) Δευτερεύοντα:

goat - anti mouse IgGs HRP conjugated (Chemicon) : 1:4000  $\sigma\epsilon$  PBT

goat - anti rabbit IgGs HRP conjugated (Sigma): 1:3000 σε PBT

goat - anti rabbit IgGs AP conjugated (Sigma): 1:2000 σε PBT

## 2.21 Ανάλυση κατά Northern

Για την ανάλυση κατά Northern, απομονώθηκε ολικό RNA από έμβρυα, προνύμφες, νύμφες και ενήλικα άτομα *Drosophila* και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση του RNA σε πήκτωμα αγαρόζης/φορμαλδεΰδης μαζί με μάρτυρα high range RNA marker (Fermentas). Στο πήκτωμα εφαρμόστηκαν πλύσεις κατά σειρά σε αποστειρωμένο dH<sub>2</sub>O, 5X SSC και 10 mM NaOH και ακολούθησε μεταφορά του RNA σε νάυλον μεμβράνες, σε συσκευή δημιουργίας αντλίας κενού στα 55-60 mBar για διάστημα 1.5 h.

Η αντίδραση σήμανσης του ανιχνευτή πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Decaprime Kit (Ambion) με [α-<sup>32</sup>P]dCTP ραδιενεργά νουκλεοτίδια. Ως μόριο ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε η κωδική περιοχή του μεταγράφου RB της *zelda*.

Ο υβριδισμός του ανιχνευτή στις μεμβράνες πραγματοποιήθηκε για 17 h στους 65°C σε διάλυμα 0.25 M NaHPO<sub>4</sub>, 7% SDS, 1% BSA, 1 mM EDTA. Ακολούθησαν πλύσεις των μεμβρανών (x5) σε διάλυμα 40 mM NaHPO<sub>4</sub>, 0,1% SDS και έκθεσή τους σε φίλμ αυτοραδιογραφίας (KODAK) στους -80<sup>0</sup>C με οθόνη (screen) για ενίσχυση του σήματος.

## 2.22 Ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης (ChIP)

Διαλύματα:

Διάλυμα αραίωσης: 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0

1X PBS: 0.8% w/v NaCl, 0.02% w/v KCl, 0.14% w/v Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.024% w/v KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2 Διάλυμα λύσης ChIP: 1% SDS, 10 mM EDTA pH 8.0, 50 mM Tris-HCl pH 8.0 Διάλυμα ξεπλυμάτων: 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0 Τελικό διάλυμα ξεπλυμάτων: 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0

Διάλυμα έκλουσης: 1% SDS, 100 mM NaHCO<sub>3</sub>

Όλα τα διαλύματα συμπληρώνονται με καταστολείς πρωτεασών (PMSF 1 mM, Leupeptin 0.5 μg/ml, Aprotinin 50 μg/ml)

Αντισώματα:

mouse anti-Zelda, affinity purified (GenScript) mouse anti Frizzled (DSHB)

#### Διαδικασία:

- Ανατομίες προνυμφών σε κρύο διάλυμα 1Χ PBS για μέγιστο διάστημα 20 min. Αφαίρεση λιπώδους ιστού και παραμονή των δίσκων επ; του σώματος. Ανατέμνονται περίπου 100 προνύμφες ανά κύκλο.
- 2. Τοποθέτηση προνυμφών στο διάλυμα διασύνδεσης (1.8 % formaldehyde, 50 mM Hepes pH 8.1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 100 mM NaCl) για 20 min σε RT. Κατά τη διάρκεια της μονιμοποίησης το διάλυμα αντικαθίσταται 3 φορές. Η διαδικασία της διασύνδεσης σταματά με πλύσεις σε διάλυμα 1 ml PBS /0.01 % Triton X-100/ 125 mM glycine για 3 φορές.
- 3. Ακολουθούν πλύσεις των δειγμάτων για 10 λεπτά σε διάλυμα 10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.25 % Triton X-100 και για άλλα 10 λεπτά σε διάλυμα 10 mM Hepes pH 7.9, 200 mM NaCl, 1m M EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.01 % Triton X-100. Στο διάλυμα αυτό τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν ο/n στους 4<sup>0</sup>C.
- Αφαίρεση των εμβρυϊκών δίσκων στο ίδιο διάλυμα. Χρησιμοποιούνται περίπου 180 δίσκοι ανά δείγμα χρωματίνης.

- 5. Λύση των ιστών σε διάλυμα λύσης ChIP και θραύση της χρωματίνης σε δύο βήματα (amplitude 40, cycle 0.3, 2x20 sec, UP200 S Sonicator). Από τη διαδικασία αυτή προκύπτουν τμήματα χρωματίνης 500-1000 bp.
- 6. Απομάκρυνση 100 μl από κάθε δείγμα και επώασή τους με 5 μl πρωτεϊνάσης K (20mg/ml Macherey Nagel) και 5 μl RNase A (10 mg/ml, Macherey Nagel) για >5 h στους 65<sup>0</sup>C προκειμένου να αντιστραφεί η δράση του μονιμοποιητικού.

Ακολουθεί εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1),κατακρήμνιση και αναδιάλυση σε 50 μl ΤΕ. Ποσότητα 5 μl αραιώνεται 200 φορές και φωτομετρείται στα 260 nm. Σε 40 μg υποστρώματος DNA προστίθεται διάλυμα λύσης ChIP ώστε να ισοσταθμιστεί ο όγκος όλων των δειγμάτων και στη συνέχεια αραιώνονται με διάλυμα αραίωσης ChIP (1:10). Τα δείγματα υπόκεινται σε καθαρισμό με προσθήκη 50 μl σφαιριδίων πρωτεΐνης-Α (ROCHE) η οποία προεπεξεργάζεται με BSA (1 mg/100μl σφαιριδίων) και μένουν υπό ανάδευση για 2 h στους  $4^{0}$ C. Το υπερκείμενο διαχωρίζεται από τα σφαιρίδια και προστίθεται το κατάλληλο αντίσωμα (περίπου 1 μg). Η ανοσοκατακρήμνιση πραγματοποιείται υπό ανάδευση στους 4<sup>0</sup>C o/n και ακολουθεί προσθήκη 35 μl σφαιριδίων πρωτεΐνης-Α για 4 ώρες. Τα σφαιρίδια κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση στα 8000g για 1 min και ξεπλένονται διαδοχικά με 1 ml διάλυμα πλύσης για 3 φορές και με 1 ml διάλυμα τελικής πλύσης για μία φορά. Η έκλουση των συμπλόκων από τα σφαιρίδια γίνεται με προσθήκη 450ml φρέσκου διαλύματος έκλουσης για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η σύνδεση των συμπλόκων τερματίζεται με θέρμανση στους 65 <sup>0</sup>C για τουλάχιστον 5 h και οι πρωτεΐνες απομακρύνονται παρουσία πρωτεϊνάσης K / RNase A. Το DNA κατακρημνίζεται με EtOH και αναδιαλύεται στην κατάλληλη ποσότητα ΤΕ ώστε να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα σε αντιδράσεις PCR.

Οι αντιδράσεις PCR που ακολούθησαν πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν σε διαφορετικά υποστρώματα, με 27 κύκλους για να αποφευχθεί ο κορεσμός της αντίδρασης.

#### 2.23 Μονιμοποίηση προνυμφών

#### Διαλύματα:

2x PEM: 200mM PIPES, 2mM EGTA, 2mM MgCl<sub>2</sub> και ρύθμιση pH στο 6.9 με KOH, φιλτράρισμα και διατήρηση στους 4<sup>0</sup>C

-Συλλογή προνυμφών Δροσόφιλας σε 1x PBS (1x PBS: 130 mM NaCl, 70 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) και ανατομία αυτών σε διάστημα λιγότερο των 20 min. Μετά την ανατομία οι προνύμφες διατηρούνται στον πάγο, ώστε να αποφεύγεται η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών.

- Μονιμοποίηση σε διάλυμα 4% φορμαλδεΰδης (Polyscienses 10% methanol free) / 1x PEM για 20
 min σε RT δωματίου χωρίς ανακίνηση.

-Απομάκρυνση διαλύματος μονιμοποίησης. Τρεις σύντομες πλύσεις με 1x PBS. Οι ιστοί είναι τώρα έτοιμοι για ανοσοϊστοχημεία.

Ο παραπάνω τρόπος μονιμοποίησης χρησιμοποιήθηκε για την πλειονότητα των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων. Οι όποιες τροποποιήσεις εφαρμόστηκαν στο χρόνο μονιμοποίησης (17-20min).

## 2.24 Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις

Μετά τη μονιμοποίηση των ιστών, ακολουθεί ανοσοϊστοχημική χρώση, η οποία συνίσταται στην χρήση κατάλληλων αντισωμάτων (Παράρτημα 5) για την ανίχνευση πρωτεϊνών στον ιστό. Συγκεκριμένα:

Ο υπό μελέτη μονιμοποιημένος ιστός (έμβρυο, προνύμφη) επωάζεται σε διάλυμα PBT (1x PBS,
 0.5% BSA, 0.2% TritonX-100) με ανακίνηση σε RT για 1 h (σε αυτό το διάστημα οι μη ειδικές
 θέσεις πιθανής προσκόλλησης του αντισώματος παρεμποδίζονται από την αλβουμίνη και τα κύτταρα γίνονται διαπερατά με τη βοήθεια του απορρυπαντικού).

2. Επώαση με το/τα πρωτεύοντα αντισώματα για περίπου 16 h με ανακίνηση στους 4<sup>0</sup>C. Η αραίωση των αντισωμάτων γίνεται σε διάλυμα PBT και διαφέρει κατά περίπτωση.

3. Πλύση με διάλυμα PT (1x PBS, 0.2% TritonX-100) για 10 min με ανακίνηση σε RT. Επανάληψη 2 επιπλέον φορές.

4. Επώαση με το/τα δευτερεύον/τα αντίσωμα για 1-2 h σε RT με ανακίνηση. Η αραίωση των αντισωμάτων αυτών ήταν σε κάθε περίπτωση 1:500 σε PBT.

5. Πλύση με διάλυμα PT (1x PBS, 0.2% TritonX-100) για 10 min με ανακίνηση σε RT. Επανάληψη 2 επιπλέον φορές.

6. Τοποθέτηση του ιστού που μας ενδιαφέρει μετά από ανατομία σε αντικειμενοφόρο πλάκα σε μια σταγόνα γλυκερόλης 80%, αν η χρώση είναι χημική ή 0.5% n-propy-gallate σε 80% γλυκερόλη αν η χρώση είναι φθορίζουσα.

Τροποποιήσεις στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο εφαρμόστηκαν στα βήματα: Επώαση στους 4<sup>0</sup>C για διάστημα από 2 - 12 h. Επώαση για διάστημα 3 h. Ένα επιπλέον βήμα πλύσης. 5. Ένα επιπλέον βήμα πλύσης.

Οι τροποποιήσεις αυτές εφαρμόζονται κατά περίπτωση όταν τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται δίνουν έντονο μη ειδικό σήμα που αλλοιώνει την εικόνα της χρώσης.

# 2.25 Χρώση σε ιστούς που επωάστηκαν με δευτερεύον αντίσωμα συνδεδεμένο με HRP

Η HRP (horseradish peroxidase) είναι ένα ένζυμο που καταλύει την οξείδωση της διαμινοβενζιδίνης (DAB) και ως προϊόν της αντίδρασης παρατηρείται καφέ παρασκεύασμα το οποίο μπορεί εύκολα να παρατηρηθεί με τη χρήση μικροσκοπίου ευρέος πεδίου.

Παρατηρήσεις: Η DAB είναι καρκινογόνος και πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή.

Η HRP αναστέλλεται ισχυρά από το NaN<sub>3</sub>, το οποίο αποτελεί τοξική ένωση με ευρεία χρήση σε διαλύματα αντισωμάτων στα οποία εμποδίζει τη βακτηριακή ανάπτυξη. Σε αυτή τη διαδικασία δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται διαλύματα που περιέχουν NaN<sub>3</sub>.

Παρασκευή διαλύματος χρώσης με σύσταση:

Φρέσκο διάλυμα 0.3 mg/ml DAB

1.5 mM Ni<sup>2+</sup>/Co<sup>2+</sup>, (30 μl από στοκ 50 mM) - χρησιμοποιείται προαιρετικά; μετατρέπει το καφέ παρασκεύασμα σε μαύρο διευκολύνοντας την παρατήρηση-

Συμπληρώνουμε με διάλυμα ΡΤ μέχρι τον επιθυμητό όγκο.

Επώαση του ιστού σε 500 μl διαλύματος χρώσης για 5 min. Προσθήκη 5-30 μl 0.3%  $H_2O_2$ για έναρξη της αντίδρασης. Παρατήρηση σε στερεοσκόπιο μέχρι την ανάπτυξη του χρωματισμού. Η ανάπτυξη θα πρέπει να συμβεί άμεσα ή εντός 15 min από την προσθήκη του  $H_2O_2$ . Η αντίδραση σταματά με την απόρριψη του διαλύματος χρώσης και το ξέπλυμα του ιστού σε 1X PBS.

## 2.26 Μέθοδος εκτοπικής έκφρασης GAL4/UAS

Για την εκτοπική έκφραση και την καταστολή του γονιδίου zelda καθώς και την έκφραση διαφόρων άλλων διαγονιδίων στον εμβρυϊκό δίσκο του φτερού, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα GAL4/UAS (Brand and Perrimon, 1993). Το σύστημα GAL4/UAS επιτρέπει την στοχευμένη έκφραση γονιδίων στη *Drosophila* με τη χρησιμοποίηση του μεταγραφικού ρυθμιστή GAL4 του ζυμομύκητα. Ένας υποκινητής ή ενισχυτής οδηγεί την έκφραση του GAL4 με συγκεκριμένο πρότυπο, ο οποίος με τη σειρά του οδηγεί τη μεταγραφή του αποκρινόμενου σε αυτόν γονιδίουστόχου κατά το ίδιο ακριβώς πρότυπο, μέσω της περιοχής UAS (upstream activating sequence). Το βασικό σημείο του συστήματος είναι ο εξαρχής διαχωρισμός των γονιδίων που συνδέονται με τον GAL4 και την UAS σε δύο διαφορετικές διαγονιδιακές κατασκευές. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η μεταγραφή του γονιδίου-στόχου μόνο όταν διασταυρωθούν τα δύο διαφορετικά διαγονιδιακά στελέχη δίνοντας στην πρώτη γενιά άτομα με έκφραση του γονιδίου στόχου κατά το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου στου οποίου τον υποκινητή ή ενισχυτή βρίσκεται συνδεδεμένη η περιοχή του GAL4 (Εικ.1).



**Εικόνα 1.** Το σύστημα GAL4/UAS. Από D. St Johnston, 2002
# 2.27 Το σύστημα μιτωτικών κλώνων FLP/FRT

Το ένζυμο flipase έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει και να ανασυνδυάζει συγκεκριμένες αλληλουχίες (flipase recognition targets-FRT) και με τη χρησιμοποίησή του επιτυγχάνεται μιτωτικός ανασυνδυασμός. Η φλιπάση βρίσκεται υπό τον έλεγχο θερμοεπαγόμενου υποκινητή και αφού εκφραστεί, ανασυνδυάζει σε τυχαία κύτταρα τα FRT. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η δημιουργία κυτταρικών κλώνων που φέρουν μία μεταλλαγή σε ομοζυγωτία (Xu and Rubin, 1993).

Για τη δημιουργία μιτωτικών κλώνων υπερέκφρασης και αποσιώπησης της *zelda* (de Celis and Bray, 1997), χρησιμοποιήθηκαν προνύμφες 3ου σταδίου των ακόλουθων γονοτύπων: yw hsFLP<sup>122</sup>/+; UAS-GFP-zelda/+; act>CD2stop>GAL4/+ yw hsFLP<sup>122</sup>/+; UAS-GFP-zeldai/+; act>CD2stop>GAL4/+

Η επαγωγή των μιτωτικών κλώνων έγινε σε προνύμφες πρώτου ή δευτέρου σταδίου, με θερμικό σόκ στους 37°C για 50 min και παύση του σοκ στα 25 min για μεσοδιάστημα 10 min, κατά το οποίο οι προνύμφες παρέμειναν σε RT.



**Εικόνα 2.** Μιτωτικοί κλώνοι FLP-out. Στο μητρικό κύτταρο οι FRT βρίσκονται in-cis μεταξύ ενός υποκινητή ακτίνης και του ενεργοποιητή GAL4. Με τον τρόπο αυτό ο GAL4 δεν εκφράζεται. Όταν πραγματοποιηθεί αποκοπή των FRT από την FLP, ο GAL4 έρχεται υπο τον έλεγχο του υποκινητή της ακτίνης και οι συνδεδεμένες με την UAS αλληλουχίες εκφράζονται στο κύτταρο. Στην περίπτωση αυτή οι κλώνοι μαρκάρονται είτε με την παρουσία GFP η οποία βρίσκεται συνήθως συζευγμένη σε συνοδή αλληλουχία του ίδιου στελέχους είτε την απουσία του αντιγονικού πεπτιδίου CD2 το οποίο χρησιμοποιείται ως μάρτυρας.

# 2.28 Το σύστημα TARGET

Το σύστημα TARGET περιλαμβάνει την πλήρη έκφραση ενός θερμοευαίσθητου καταστολέα του GAL4, τον GAL80<sup>ts</sup>, σε επιτρεπτά όρια θερμοκρασίας. Το σύστημα αυτό επιτρέπει την έκφραση ενός διαγονιδίου σε συγκεκριμένο χρόνο και τόπο, καθώς ο GAL4 εκφράζεται μόνο όταν ο GAL80<sup>ts</sup> αποικοδομείται σε θερμοκρασία 30°C ενώ σε θερμοκρασία 19°C η έκφραση του διαγονιδίου παραμένει σε καταστολή. (Εικ. 3)

Για τη μελέτη της υπερέκφρασης ή της καταστολής της *zelda* σε χρονο-ιστοειδικό πρότυπο με το σύστημα TARGET, χρησιμοποιήθηκαν προνύμφες γενοτύπων:

GAL80<sup>ts</sup>>apGAL4;UAS-UbiGFP;UASzelda

GAL80<sup>ts</sup>>apGAL4;UAS-UbiGFP;UASzeldaRNAi

Τα στελέχη διατηρήθηκαν στους  $19^{\circ}$ C και για την επαγωγή του διαγονιδίου μεταφέρθηκαν σε θερμοκρασία  $30^{\circ}$ C για 10 h.



**Εικόνα 3.** Το σύστημα TARGET. Από Busto et al, 2010

# 2.29 Δημιουργία διαγονιδιακών εντόμων και χαρτογράφηση των ενθέσεων.

Για τη δημιουργία διαγονιδιακών εντόμων η κωδική περιοχή του μεταγράφου RB της zelda από το οποίο προκύπτει η πλήρης πρωτεΐνη κλωνοποιήθηκε στο φορέα pUAST μεταξύ των θέσεων EcoRI και HindIII του πολυσυνδέσμου. Για τις ενέσεις σε έμβρυα Drosophila του στελέχους yw παρασκευάστηκαν 10 μg πλασμιδίου με το αντίστοιχο ένθεμα. Η διαδικασία κατασκευής διαγονιδιακών στελεχών πραγματοποιήθηκε συνολικά 3 φορές εξαιτίας απώλειας των στελεχών που προέκυψαν. Οι δύο πρώτες πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ηρακλείου Κρήτης και η τελευταία πραγματοποιήθηκε από την εταιρία The BestGene στην οποία εστάλη η κατάλληλη ποσότητα ανασυνδυασμένου πλασμιδίου.

Για τη χαρτογράφηση των ενθέσεων μετά τις ενέσεις σε έμβρυα ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

Μετά τις ενέσεις σε έμβρυα, προκύπτουν ακμαία άτομα (G<sub>0</sub>) τα οποία διασταυρώνονται με *yw* του αντίθετου φύλου. Στη γενιά που προκύπτει γίνεται έλεγχος για παρουσία ατόμων με χρωματισμό ματιών που ποικίλει απο ελαφρώς κίτρινο μέχρι σκούρο κεραμιδί, ανάλογα με τη θέση και τον αριθμό των ενθέσεων και φέρουν τη διαγονιδιακή κατασκευή P[w<sup>+</sup>]. Για τις διασταυρώσεις που ακολουθούν επιλέχθηκαν άτομα με πορτοκαλί χρωματισμό ματιών.

Ακολουθούν οι διασταυρώσεις:

# *G*<sub>1</sub>: *w/w;BI/CyO* ♀♀ *x w/P[w<sup>+</sup>]/Y* ♂♂

Εφόσον στη G<sub>1</sub> παρατηρηθεί πως όλα τα  $\bigcirc \bigcirc$  άτομα είναι w<sup>+</sup> και όλα τα  $\bigcirc \bigcirc \land$  w<sup>-</sup>, τότε η ένθεση είναι στο χρωμόσωμα Χ.

Για τις ενθέσεις στα χρωμοσώματα 2 και 3 ακολουθούν οι διασταυρώσεις το (?) αντιστοιχεί στο P[w<sup>+</sup>]:

Ελέγχονται οι απόγονοι της G<sub>3</sub>, εφόσον παρατηρηθεί πως τα Cy+ και Cy- άτομα είναι όλα  $P[w^{+}]$ , η ένθεση είναι στο 2° χρωμόσωμα. Εφόσον παρατηρούνται και w<sup>-</sup> απόγονοι, η ένθεση είναι στο 3° χρωμόσωμα και ακολουθεί η διασταύρωση από την οποία επιλέγονται  $P[w^{+}]/TM3$  άτομα για τη διατήρηση του στελέχους:

# Κεφάλαιο 3 | Αποτελέσματα – Συζήτηση

# 3.1 Έκφραση του γονιδίου zelda στα στάδια ανάπτυξης της Drosophila

Στην αρχή της μελέτης, από την ωρίμανση του αρχικού μεταγράφου του γονιδίου της zelda εμφανιζόταν να προκύπτουν δύο εναλλακτικά μετάγραφα, τα RA και RB με διαφορά 13 bp στην 5' αμετάφραστη περιοχή τους. Η αναφορά δύο επιπλέον μεταγράφων προέκυψε από μελέτες έκφρασης στα πλαίσια του modENCODE (The modENCODE consortium, 2010). Στη βιβλιογραφία, έως πρόσφατα, αναφερόταν πειραματική επιβεβαίωση για την ανίχνευση των μεταγράφων RB και RD, σε εμβρυϊκούς ιστούς και στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα της *Drosophila* (Pearson et al., 2012), ενώ για το μετάγραφο RC δεν υπήρχαν επαρκή δεδομένα ανίχνευσής του πριν τη δημοσίευση δεδομένων της παρούσας μελέτης (Giannios and Tsitilou, 2013). Στα δύο νέα μετάγραφα (RC και RD) απουσιάζουν 3 από τους 4 ομαδοποιημένους δακτύλους ψευδαργύρου, ενώ διατηρούν τους 2 μοναδικούς, μεταξύ των οποίων και ένα JAZ like Zn-finger, περιοχή που θεωρείται υπεύθυνη για την πρόσδεση δίκλωνου RNA (dsRNA) και την είσοδο της πρωτεΐνης στον πυρήνα. Οι διαφορά στα πρωτεϊνικά προϊόντα των RC και RD εντοπίζεται σε 13 αμινοξέα στην καρβοξυτελική τους περιοχή.

Για την ανίχνευση των μεταγραφικών προϊόντων του γονιδίου πραγματοποιήθηκαν δύο κύκλοι πειραμάτων, βασιζόμενοι στην παραδοχή της ύπαρξης δύο μεταγράφων του γονιδίου σε πρώτη φάση (RA, RB) και τεσσάρων στη συνέχεια (RA, RB, RC, RD). Τα αρχικά πειράματα RT-PCR που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν συνεχή έκφραση του γονιδίου της *zelda* καθόλη τη διάρκεια των αναπτυξιακών σταδίων της *Drosophila*, ενώ παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα έκφρασης στα στάδια του εμβρύου και του ενήλικου ατόμου. Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που αναγνωρίζουν ένα τμήμα μήκους 920 bp, μεταξύ των 3868 bp και 4788 bp της κωδικής περιοχής των RA και RB (Εικ. 1).



**Εικόνα 1**. RT-PCR για το γονίδιο *Zelda* (920bp). Παρατηρείται εντονότερη έκφραση των μεταγράφων του γονιδίου στα στάδια του εμβρύου και του ενήλικου ατόμου (δείγματα embryo και adult). Οι ζώνες των 770bp αντιπροσωπεύουν το γονίδιο της β-ακτίνης που χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς.

Η αλληλουχία αυτή αντιστοιχεί και στα τέσσερα, έως τώρα γνωστά, μετάγραφα του γονιδίου και οι συγκεκριμένοι εκκινητές δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση διαφορών στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ τους.

Για το λόγο αυτό σχεδιάστηκαν νέοι εκκινητές που μπορούν να αναγνωρίσουν ειδικά περιοχές όλων των γνωστών μεταγράφων και πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις RT-PCR μέσω των οποίων προσδιορίστηκε το πρότυπο έκφρασης τους στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης, καθώς και στον ιστό του εμβρυϊκού δίσκου του φτερού σε προνύμφες τρίτου σταδίου.

Με τον τρόπο αυτό, παρατηρήθηκε συνεχής έκφραση των RB (7318bp) και RD (7632bp), ενώ το μετάγραφο RA (6610bp) ανιχνεύεται στο στάδιο της νύμφης και το RC (5876bp) στα στάδια του εμβρύου, της προνύμφης και του ενηλίκου ατόμου (Εικ.2). Σε εμβρυϊκούς δίσκους του φτερού προνύμφης τρίτου σταδίου, έγινε ανίχνευση των μεταγράφων RB, RC και RD (Εικ.3). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν δεν δίνουν την πλήρους μήκους αλληλουχία των μεταγράφων αλλά τμήματα αυτής.

	έμβρυο		προνύμφη		νύμφη	ακμαίο
Ξ	-	Ξ	-	Ξ	-	-
1000 bp	-	1000 bp		1000 bp	-	
	-	-	-	-	-	-
	RD RB/RC RA	A	RD RB/RC RA		RD RB/RC RA	RD RB/RC RA

**Εικόνα 2.** RT-PCR για τα μετάγραφα RA, RB, RC και RD στα στάδια ανάπτυξης της *Drosophila*. Παρατηρείται συνεχής έκφραση των μεταγράφων RD (609 bp) και RB (2252 bp). Το μετάγραφο RC (954 bp) ανιχνεύεται στα στάδια του εμβρύου, της προνύμφης και του ενήλικου ατόμου, ενώ το RA (956 bp) ανιχνεύεται μόνο στο στάδιο της νύμφης.



**Εικόνα 3.** (α) Σχηματική απεικόνιση των μεταγράφων του γονιδίου στην οποία σημειώνεται η σχετική θέση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις RT-PCR . (β) RT-PCR για τα μετάγραφα RA, RB, RC και RD σε εμβρυϊκούς δίσκους του φτερού προνυμφών 3ου σταδίου και στους εναπομείναντες ιστούς των προνυμφών. Παρατηρείται έκφραση των μεταγράφων RD (609 bp), RB (2252 bp) και RC (954 bp) και στις 2 περιπτώσεις. Τα μετάγραφα RB και RC εμφανίζουν μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης στην περίπτωση των εμβρυϊκών δίσκων του φτερού.

Συμπεραίνουμε από τα παραπάνω δεδομένα ότι τα μετάγραφα που προκύπτουν μέσω της εναλλακτικής συρραφής του αρχικού μεταγράφου του γονιδίου της *zelda*, παρουσιάζουν διαφορές στα επίπεδα έκφρασής τους σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια. Η σταθερή και έντονη έκφραση του μεταγράφου RD καθόλη τη διάρκεια της ανάπτυξης, υποδεικνύει έναν εξίσου σημαντικό ρόλο με εκείνο των RB και RA που κωδικοποιούν την πλήρους μήκους πρωτεΐνη Zelda. Η έλλειψη 3 από τους 4 ομαδοποιημένους δακτύλους στο μετάγραφο RD, περιοχή που θεωρείται υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με το DNA και ως εκ τούτου για τη λειτουργία της όπως μαρτυρούν τα δεδομένα μελετών στην εμβρυογένεση, οδηγεί στο συμπέρασμα πως ο ρόλος της δεν περιορίζεται στην αλληλεπίδραση με τις αλληλουχίες TAGteam αλλά είναι πιθανό να παρουσιάζει αρκετά μεγαλύτερο εύρος δράσης.

Σε μία μελέτη των Pearson et al. (2012), οι ερευνητές ανίχνευσαν το μετάγραφο RB στα πρώιμα και στα τελικά στάδια της εμβρυογένεσης, ενώ το μετάγραφο RD κυρίως στα μεσαία στάδια της εμβρυογένεσης και στο αναπτυσσόμενο ΚΝΣ. Στα τελικά στάδια το μετάγραφο RB εντοπίστηκε κατά κύριο λόγο στις δομές των αναπτυσσόμενων εμβρυϊκών δίσκων. Από τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν μέχρι στιγμής συμπεραίνουμε πως μία υπόθεση εξειδίκευσης του RB στον καθορισμό γεγονότων που αφορούν την ανάπτυξη των εμβρυϊκών δίσκων δεν μπορεί να ισχύει απόλυτα, καθώς το μετάγραφο RD ανιχνεύεται σε υψηλά επίπεδα και στους αναπτυσσόμενους εμβρυϊκούς δίσκους του φτερού της προνύμφης.

# 3.2. Παραγωγή, καθαρισμός και τιτλοποίηση αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης Zelda (ZLD)

Με στόχο την ανίχνευση των προτύπων παραγωγής της Zelda σε ιστούς και στάδια ανάπτυξης της *Drosophila*, έγινε προσπάθεια κατασκευής δύο πολυκλωνικών αντισωμάτων, των Rabbit anti-SP και Rabbit anti-ZNF. Ως ξενιστές χρησιμοποιήθηκαν κουνέλια τα οποία ανοσοποιήθηκαν με 5 επαναλαμβανόμενες δόσεις αντιγόνου. Ως αντιγόνα χρησιμοποιήθηκαν οι περιοχές της πρωτεΐνης 413-545 α.α. και 1290-1520 α.α., οι οποίες απομονώθηκαν ως ανασυνδυασμένα πεπτίδια από ετερόλογο βακτηριακό σύστημα (Εικ. 4,5,6) και οι ίδιες περιοχές χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό των ορών των αντισωμάτων μέσω χρωματογραφίας συγγένειας. Τα κριτήρια για την επιλογή των συγκεκριμένων περιοχών ήταν για τη μεν SP η πολύ χαμηλή ομολογία της με άλλες περιοχές πρωτεϊνών της *Drosophila* ενώ για την ZNF, ότι αποτελεί το χαρακτηριστικό μοτίβο των τεσσάρων ομαδοποιημένων δακτύλων της Zelda και αυτό το αντίσωμα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα ανίχνευσης της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης με το DNA. Το μειονέκτημα του anti-ZNF αντισώματος, αποτελεί κυρίως η αναγνώριση μίας περιοχής η οποία εμφανίζει αρκετά μεγάλη ομολογία με άλλες περιοχές πρωτεϊνών με δάκτυλα ψευδαργύρου.

Πριν τις ανοσοποιήσεις και μετά από κάθε μια από αυτές ελήφθησαν 10ml ορού αίματος από κάθε ζώο. Ο ορός φυλάσσεται σε θερμοκρασία -80°C, ενώ εκείνα τα κλάσματα ορού που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα που ακολουθούν υπέστησαν καθαρισμό για την τελική αύξηση του τίτλου των αντισωμάτων σε αυτά και την αφαίρεση προϊόντων του ορού που θα οδηγούσαν σε εμφάνιση μη ειδικού σήματος κατά τη χρησιμοποίησή τους στα πειράματα που ακολουθούν.

Για τον προσδιορισμό της ενδεικτικής συγκέντρωσης χρήσης των αντισωμάτων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western στα οποία ελέγχθηκε και η ειδικότητα των αντισωμάτων έναντι των πρωτεΐνών που χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνα για την παραγωγή τους. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν οι πρωτεΐνες SP και ZNF μετά την επαγωγή και το χρωματογραφικό καθαρισμό τους. Οι βακτηριακές πρωτεΐνες επωάστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις αντισωμάτων και προσδιορίστηκαν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις χρήσης (1:500 για το rabbit-anti ZNF και 1:200 για το rabbit-anti SP) με βάση την ελαχιστοποίηση της μη ειδικής πρόσδεσης σε πειράματα Western Blotting. (Εικ. 7).



## επαγωγή έκφρασης

υποκυτταρικός εντοπισμός\_

**Εικόνα 4.** Ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης ZNF με αμινική ακολουθία έξη αμινοξέων ιστιδίνης. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE κατά την επαγωγή της πρωτεΐνης σε κλώνο κυττάρων μετά από 1.5 και 3 h. Η πρωτεΐνη απελευθερώνεται κυρίως στο αδιάλυτο κλάσμα (A), το οποίο περιέχει έγκλειστα σωμάτια, και όχι στο διαλυτό (Δ).



επαγωγή έκφρασης υποκυτταρικός εντοπισμός

**Εικόνα 5.** Ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης SP με αμινική ακολουθία έξη καταλοίπων ιστιδίνης. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE κατά την επαγωγή της πρωτεΐνης σε κλώνο κυττάρων μετά από 3 h. Η πρωτεΐνη απελευθερώνεται κυρίως στο αδιάλυτο κλάσμα (A), το οποίο περιέχει έγκλειστα σωμάτια, και όχι στο διαλυτό (Δ).



## χρωματογραφικός καθαρισμός

**Εικόνα 6.** Το αδιάλυτο κλάσμα υπόκειται σε χρωματογραφικό καθαρισμό σε στήλη νικελίου όπου εκλούεται ειδικά η πρωτεΐνη σύντηξης παρουσία 250mM ιμιδαζολίου και 6M ουρίας. Παρουσιάζονται ενδεικτικά σε SDS-PAGE, οι ζώνες των 29 και 19kD που αντιστοιχούν σε κλάσματα του καθαρισμού των πρωτεϊνών ZNF και SP, μετά τη διαπίδυση.



**Εικόνα 7.** Ανοσοαποτύπωση κατά Western στις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες SP και ZNF μετά το χρωματογραφικό καθαρισμό τους, με αντισώματα rabbit anti-SP (1:200) αριστερά και rabbit anti-ZNF (1:500) δεξιά.

# 3.3. Σύνθεση της ZELDA στα αναπτυξιακά στάδια της Drosophila

Ο αρχικός στόχος της μελέτης ήταν η προσπάθεια ανίχνευσης της παραγωγής της ZELDA με πειράματα Western Blotting σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από έμβρυα, προνύμφες, νύμφες και ενήλικα άτομα εντόμων και στη συνέχεια ο υποκυτταρικός εντοπισμός της με την εφαρμογή των ίδιων πειραμάτων σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των αντίστοιχων σταδίων ανάπτυξης.

Με τη χρησιμοποίηση των πολυκλωνικών αντισωμάτων rabbit-anti ZNF και rabbit anti-SP η προσπάθεια αυτή δεν ήταν επιτυχής, καθώς σε μία σειρά πειραμάτων στα οποία ελέγχθηκαν αρκετές παράμετροι, μεταξύ των οποίων οι ποσότητες των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν και οι συγκεντρώσεις των αντισωμάτων, η εμφάνιση μη ειδικής πρόσδεσης ήταν αρκετή ώστε να μην επιτρέπει το σαφή εντοπισμό της πρωτεΐνης στους ιστούς που χρησιμοποιήθηκαν (Εικ. 8).



**Εικόνα 8.** Western Blotting σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα εμβρύων με τα αντισώματα rabbit anti-SP, 1:200 (α) και rabbit anti-ZNF, 1:500 (β). Δεν παρατηρείται σαφής διάκριση των ζωνών που μπορεί να αντιστοιχούν στη ZELDA.

Τα παραπάνω δεδομένα μας οδήγησαν στη χρησιμοποίηση ενός τρίτου αντισώματος έναντι της ZELDA, το οποίο κατασκευάστηκε από τη GenScript Corp., έναντι ενός ολιγοπεπτιδίου 14 α.α. που αντιστοιχεί στην περιοχή 460-473 α.α. της πρωτεΐνης. Ως ξενιστής για την κατασκευή του αντισώματος χρησιμοποιήθηκε το ποντίκι και ακολούθησε χρωματογραφικός καθαρισμός του από την ίδια εταιρεία. Η επιλογή του συγκεκριμένου επιτόπου προτάθηκε από την εταιρεία με βάση δεδομένα υδροφοβικότητας της περιοχής και προσβασιμότητάς της με μοντέλα τρισδιάστατης απεικόνισης, επιπλέον εντοπίζεται εντός της ακολουθίας SP, που είχε ήδη επιλεγεί με βάση την έλλειψη ομολογίας με άλλες πρωτεΐνες της *Drosophila* (Εικ. 9).



**Εικόνα 9.** Σχηματική απεικόνιση της πρωτεΐνης ZLD. Σημειώνονται οι περιοχές που αντιστοιχούν στους δακτύλους ψευδαργύρου, όπως και οι περιοχές που επιλέχθηκαν ως επίτοποι για τη δημιουργία αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης. Το συγκεκριμένο σχήμα αντιστοιχεί στην πλήρους μήκους πρωτεΐνη (PA και PB) που προκύπτει από τη μετάφραση των μεταγράφων RA και RB. Το αντίσωμα rabbit anti-ZNF δημιουργήθηκε έναντι επιτόπου που δεν εμφανίζεται στα πρωτεΐνικά προϊόντα PC και PD από τα οποία απουσιάζουν 3 από τους 4 ομαδοποιημένους δακτύλους ψευδαργύρου.

Η ZLD αντιχνεύθηκε με το αντίσωμα mouse anti-ZLD σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western, σε μέγεθος περίπου 175 kD σε όλα τα κύρια αναπτυξιακά στάδια, τόσο σε εκχυλίσματα πυρήνων όσο και σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυτταροπλάσματος (Εικ. 10). Τα δεδομένα του υποκυτταρικού εντοπισμού συμφωνούν με τη μελέτη των Staudt et al. (2006) οι οποίοι ανέφεραν ότι κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, η ZLD εντοπίζεται συνδεδεμένη με

τη χρωματίνη σε μεσοφασικούς πυρήνες ενώ κατά τη διάρκεια της μίτωσης σε κυτταροπλασματικά κοκκιώδη σωμάτια.



**Εικόνα 10.** Ανοσοαποτύπωση κατά Western σε κυτταροπλασματικά (α) και πυρηνικά (β) πρωτεϊνικά εκχυλίσματα εμβρύων, προνυμφών, νυμφών και ενήλικων ατόμων (Ε,Π,Ν,Ε) ατόμων *Drosophila*. Ως πρωτεύον αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε το mouse anti-ZLD (1:500), ενώ δεξιά στις εικόνες απεικονίζεται επώαση των μεμβρανών με ορό πριν την ανοσοποίηση. Παρατηρείται παραγωγή της πρωτεΐνης σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια ενώ τα επίπεδά της εμφανίζονται αυξημένα στα στάδια του εμβρύου και των ενηλίκων ατόμων.

#### 3.3.1 Σύνθεση της ΖΕLDΑ στο στάδιο της προνύμφης.

Ο προσανατολισμός της συγκεκριμένης μελέτης στον προσδιορισμό του ρόλου της Zelda κυρίως στο στάδιο της προνύμφης, οδήγησε στην προσπάθεια ανίχνευσης της παραγωγής της πρωτεΐνης σε συγκεκριμένους ιστούς αυτού του σταδίου ανάπτυξης. Η βελτιστοποίηση των συνθηκών των πειραμάτων Western Blot. έδωσε πληρέστερη εικόνα της έκφρασης και των χαρακτηριστικών της πρωτεΐνης που παράγεται σε προνύμφες 3ου σταδίου και αποκάλυψε μία νέα ισομορφή της σε μέγεθος ~70 kD. Η ισομορφή αυτή δεν αντιστοιχεί στα θεωρητικά μεγέθη των πολυπεπτιδίων που αναμένονται από τη μετάφραση των μεταγράφων του γονιδίου, τα οποία υπολογίζονται στα ~180 kD και ~140 kD για τις πρωτεΐνες RA, RB και RC, RD αντίστοιχα.

Πειράματα Western Blot σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από εμβρυϊκούς δίσκους φτερού προνυμφών 3ου σταδίου και στους εναπομείναντες ιστούς της προνύμφης με το αντίσωμα mouse anti-ZLD, αποκάλυψαν 2 ζώνες, μία στα ~180 kD, το αναμενόμενο μοριακό μέγεθος του πολυπεπτιδίου PB που αντιστοιχεί στην πλήρη πρωτεΐνη και μία στα ~70 kD. Η ένταση των ζωνών εμφανίζεται μειωμένη στους ιστούς της προνύμφης οι οποίοι δεν συμπεριλαμβάνουν τους - 86 - Κεφάλαιο 3 | Αποτελέσματα - Συζήτηση εμβρυϊκούς δίσκους του φτερού. (Εικ. 11). Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα σιελογόνων αδένων προνυμφών του ίδου σταδίου, στους οποίους η *zld* δεν εκφράζεται, τα οποία επωάστηκαν με το ίδιο αντίσωμα καθώς και ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προνυμφών 3ου σταδίου τα οποία επωάστηκαν με ορό πριν την ανοσοποίηση. Και στις δύο περιπτώσεις δεν ανιχνεύθηκε σήμα με την ολοκλήρωση του πειράματος. Επιπροσθέτως σε πείραμα ανοσοαποτύπωσης κατά Western με το αντίσωμα rabbit anti-ZLD σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αράλληλα και άλλων ζωνών που πιθανότατα αντιστοιχούν σε μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος (Εικ. 12).

Το προϊόν των ~70 kD που ανιχνεύθηκε είναι πιθανό να αποτελεί ειδικό πρωτεολυτικό θραύσμα της πρωτεΐνης που κωδικοποιούν τα μετάγραφα RC και RD η οποία υπολογίζεται στα ~140 kD καθώς η έκφραση, ειδικότερα του μεταγράφου RD, εμφανίζεται αυξημένη στις προνύμφες (βλ. Εικ. 2). Σε διαφορετική περίπτωση, που ωστόσο δεν είναι αρκετά πιθανή, το πολυπεπτίδιο που ανιχνεύεται είναι πιθανό να αποτελεί προϊόν ενός νέου εναλλακτικού μεταγράφου το οποίο δεν κατορθώσαμε ως τώρα να ανιχνεύσουμε μέσω πειραμάτων RT-PCR.



**Εικόνα 11.** Σύνθεση της πρωτεΐνης ZLD σε ιστούς προνύμφης 3ου σταδίου. Σε κάθε περίπτωση 40 μg πρωτεϊνών διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα 10% SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης η οποία επωάστηκε με mouse anti-ZLD (1:300) α) Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα εμβρυϊκών δίσκων του φτερού. β) πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ιστών προνυμφών από τους οποίους απουσιάζουν οι εμβρυϊκοί δίσκοι των φτερών. γ) πρωτεϊνικά εκχυλίσματα σιελογόνων αδένων. δ) ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα σε επώαση με ορό πριν την ανοσοποίηση. Στα α και β, παρατηρούμε την ανίχνευση 2 ισομορφών της πρωτεΐνης με μοριακά μεγέθη ~180 και ~70 kD.



**Εικόνα 12.** Σύνθεση της πρωτεΐνης ZLD σε ιστούς προνύμφης 3ου σταδίου. 40 μg πρωτεϊνών διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα 10% SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (α) η οποία επωάστηκε με rabbit anti-ZNF (1:500). α) ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προνυμφών 3ου σταδίου. β) ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα σε επώαση με ορό πριν την ανοσοποίηση. Παρατηρούμε και εδώ όπως και στην Εικ. 11 την εμφάνιση 2 ζωνών (\*) στα μοριακά μεγέθη των ~180 και ~70 kD. Η εμφάνιση επιπλέον ζωνών αποδίδεται σε μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος.

Σε κάθε περίπτωση, η ύπαρξη ισομορφής της Zelda με μοριακό μέγεθος που δεν ξεπερνά το μισό των γνωστών πολυπεπτιδίων της αποτελεί ένδειξη η οποία παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς μπορεί να υποδείξει ένα ρόλο της πρωτεΐνης αρκετά διαφορετικό από εκείνο που επιτελούν τα πολυπεπτίδια PA, PB, PC και PD κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Αντίστοιχα παραδείγματα μεταγραφικών παραγόντων που υπόκεινται σε τέτοιου είδους τροποποιήσεις, δείχνουν πως αν και οι ιδιότητες των μορίων να προσδένονται στο DNA και να αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες παραμένουν ανέπαφες, η ικανότητά τους να επάγουν τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων χάνεται (Watt and Molloy, 1993). Στη *Drosophila*, χαρακτηριστικό παράδειγμα μεταγραφικού παράγοντα που η δράση του ρυθμίζεται με παρόμοιο τρόπο, αποτελεί ένας από τους κύριους ρυθμιστές του μονοπατιού Hedgehog (Hh). Σε κύτταρα τα οποία δε λαμβάνουν το σήμα Hh, η πλήρης πρωτεΐνη των 155 kD του Ci (Cubitus interruptus), υπόκειται σε πρωτεολυτική θραύση από την οποία προκύπτει μία ισομορφή των 75 kD, η οποία δρα ως καταστολέας της μεταγραφής (Aza-Blanc et al. 1997). Στην περίπτωση που το μονοπάτι παραμένει ενεργό, η παραγωγή της ισομορφής αυτής παρεμποδίζεται και ενεργοποιείται η πλήρους μήκους πρωτεΐνη Ci, η οποία επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων (Methot and Basler, 1999). Ο συγκεκριμένος μηχανισμός θα μπορούσε να αποτελέσει έναν άμεσο τρόπο ρύθμισης της μεταγραφικής δραστηριότητας της Zelda σε συγκεκριμένους ιστούς ή αναπτυξιακά στάδια, μέσω του οποίου, η Zelda μπορεί να αποτελεί ταυτόχρονα ενεργοποιητή και καταστολέα των γονιδίων-στόχων της, σε συνάρτηση πάντα με τα μηνύματα των μονοπατιών στα οποία εμπλέκεται.

Οι περιοχές της Zelda που εντοπίζονται στη συγκεκριμένη ισομορφή δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστούν με ακρίβεια από τα δεδομένα της μελέτης. Παρόλα αυτά, το γεγονός ότι ανιχνεύεται τόσο με αντίσωμα που αναγνωρίζει τα αμινοξέα 460-473 (mouse anti-ZLD) όσο και με εκείνο που αναγνωρίζει τα αμινοξέα 1290-1520 (rabbit anti-ZNF), αποκαλύπτει την παρουσία σε αυτή των λειτουργικών περιοχών που συμπεριλαμβάνουν τον μοναδικό -JAZ-like- δάκτυλο καθώς και τμήμα ή ολόκληρη την αμινοξική ακολουθία των τεσσάρων ομαδοποιημένων δακτύλων του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης.

# 3.4. Πρότυπο παραγωγής της ZELDA κατά την εμβρυογένεση της Drosophila

Το πρότυπο παραγωγής της πρωτεΐνης ZLD προσδιορίστηκε με ανοσοϊστοχημικές τεχνικές σε έμβρυα σταδίων 2-16 της *Drosophila*. Για τα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν έμβρυα του στελέχους *Canton-S*. Ως πρωτεύον αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε το mouse anti-ZLD (1:50) ενώ ως δευτερεύον αντίσωμα το Anti mouse IgGs HRP conjugated (Chemicon) (1:500). Στις περιπτώσεις των χρώσεων του μάρτυρα για έλεγχο ειδικής πρόσδεσης του αντισώματος, χρησιμοποιήθηκε ορός πριν την ανοσοποίηση (1:50).

Η εμβρυϊκή ανάπτυξη της Drosophila διακρίνεται σε 17 στάδια κατά τη διάρκεια των οποίων το έμβρυο μορφοποιείται και προχωρά μέχρι την εκκόλαψη του σε προνύμφη. Περιληπτικά, στη διάρκεια των σταδίων 2-5 λαμβάνουν χώρα τα γεγονότα των πρώϊμων μιτωτικών διαιρέσεων, ο σχηματισμός των πολικών σωματίων και του συγκυτιακού βλαστοδέρματος καθώς και η κυτταριδιοποίηση του βλαστοδέρματος. Τα στάδια 6-9 που ακολουθούν περιλαμβάνουν τις διαδικασίες της γαστριδίωσης και του σχηματισμού της κεφαλικής αύλακας, ενώ μέχρι και το 12ο στάδιο λαμβάνει χώρα ο σχηματισμός των μεταμεριδίων. Στα τελικά στάδια πραγματοποιείται ο σχηματισμός και η διαφοροποίηση του κεντρικού και του περιφερικού νευρικού συστήματος καθώς και ο σχηματισμός των εμβρυϊκών δίσκων.

Η χρώση εμβρύων 2-12 σταδίων με αντίσωμα έναντι της ZLD έδειξε έντονη και καθολική παρουσία της πρωτεΐνης σε ολόκληρο το έμβρυο (Εικ.14α, 14β), ενώ το πρότυπό της περιορίζεται αρκετά και εντοπίζεται σε συγκεκριμένες αναπτυσσόμενες δομές κατά τα στάδια 13-16 (Εικ.14γ).









- 90 - Κεφάλαιο 3 | Αποτελέσματα - Συζήτηση



**Εικόνα 14.** Πρότυπο παραγωγής της ZLD σε έμβρυα σταδίων 2-16 του στελέχους Canton-S. Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις με mouse anti-ZLD (1:50). Αριστερά στις εικόνες απεικονίζονται χρώσεις με ορό πρίν την ανοσοποίηση (1:50). α) έμβρυα σταδίων 2-5, παρατηρείται καθολική παραγωγή της πρωτεΐνης β) έμβρυα σταδίων 6-9 και 10-12, παρατηρέιται καθολική παραγωγή της πρωτεΐνης γ) έμβρυα σταδίων 13-16. Το πρότυπο παραγωγής περιορίζεται σε νεοσχηματιζόμενες δομές του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος, καθώς και σε περιοχές που αντιστοιχούν στους αναπτυσσόμενους εμβρυϊκούς δίσκους δ) σχηματική απεικόνιση των σταδίων της εμβρυογένεσης (Bownes stages), από "The Interactive Fly".

Τα παραπάνω δεδομένα παρουσιάζουν μία αδρή εικόνα του προτύπου παραγωγής της ZLD κατά την εμβρυογένεση. Επιπλέον, εξαιτίας του γεγονότος ότι το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε αναγνωρίζει επίτοπο ο οποίος εμφανίζεται και στα 4 πρωτεϊνικά προϊόντα του γονιδίου δεν είναι δυνατή η διάκριση μεταξύ τους ώστε να χαρακτηριστεί η ακριβής θέση παραγωγής του καθενός από αυτά κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, συμφωνούν όμως με δεδομένα και άλλων μελετών (Staudt et al., 2006, Pearson et al., 2012).

- 91 - Κεφάλαιο 3 | Αποτελέσματα - Συζήτηση

# 3.5. Πρότυπο παραγωγής της ZELDA στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα και σε εμβρυϊκούς δίσκους των φτερών προνυμφών 3ου σταδίου της *Drosophila*

Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος προνυμφών 3ου σταδίου, ανίχνευσαν την παραγωγή της ZLD σε αυτόν τον ιστό. Η πρωτεΐνη εντοπίζεται κυρίως σε δευτερεύοντες νευρώνες του οπτικού λοβού και του κοιλιακού γαγγλίου (Εικ. 15).



**Εικόνα 15**. Πρότυπο παραγωγής της ZELDA, Κεντρικό Νευρικό Σύστημα προνύμφης 3ου σταδίου (Mouse Anti-Zelda 1:30)

Για τον καθορισμό του προτύπου παραγωγής της ZLD στον εμβρυϊκό δίσκο του φτερού, έγιναν πολλές προσπάθειες χωρίς ωστόσο τα αποτελέσματα των πειραμάτων να είναι απολύτως επαναλήψιμα και να δίνουν ένα σαφές πρότυπο. Στις περισσότερες περιπτώσεις η ZLD ανιχνεύεται σε ένα ευρύ πρότυπο καλύπτοντας μεγάλο τμήμα του δίσκου και κυρίως την περιοχή από την οποία προκύπτει η δομή του φτερού (wing pouch) κατά το τελευταίο στάδιο της ανάπτυξης.

Ο επίτοπος που αναγνωρίζει το αντίσωμα mouse anti-ZLD είναι κοινός μεταξύ των διαφορετικών ισομορφών της πρωτεΐνης. Είναι αρκετά πιθανό όλες οι ισομορφές της Zelda να συντίθενται ταυτόχρονα κατά την ανάπτυξη του εμβρυϊκού δίσκου του φτερού. Το γεγονός αυτό υποστηρίζεται από την ανίχνευση στο δίσκο του φτερού των μεταγράφων RB, RC και RD καθώς και δύο πρωτεϊνών διαφορετικών μοριακών μεγεθών όπως αναφέρεται σε προηγούμενα εδάφια (Εικ. 3, Εικ. 11). Το αντίσωμα που χρησιμοποιείται, μη έχοντας τη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ των ισομορφών της πρωτεΐνης, είναι πιθανό να δίνει ασαφές πρότυπο σε πειράματα ανοσοϊστοχημείας καθώς οι πρωτεΐνες PB, PC και PD, μπορεί να έχουν διαφορετική κυτταρική τοπολογία μεταξύ τους και κάποιες από αυτές, διαμόρφωση που δεν ευνοεί την πρόσβαση του στον επίτοπο έναντι του οποίου παράχθηκε.

Η λειτουργία των διαθέσιμων αντισωμάτων δεν είναι ιδανική σε επίπεδο κυρίως προνυμφικών ιστών, στους οποίους τα δεδομένα RNAseq αναφέρουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης της *zelda* (Graveley et al. 2011). Το γεγονός αυτό δυσχέραινε και την πραγματοποίηση των λειτουργικών μελετών του γονιδίου οι οποίες περιγράφονται στη συνέχεια.



**Εικόνα 16.** Πρότυπο παραγωγής της ZELDA, εμβρυϊκός δίσκος φτερού προνύμφης 3ου σταδίου (Mouse Anti-Zelda 1:30). Παρατηρείται ευρύ πρότυπο παραγωγής της πρωτεΐνης, η οποία εντοπίζεται σε όλη την περιοχή του θύλακα του φτερού (wing pouch), με εντονότερη παρουσία στο ραχιαίο τμήμα του θύλακα.

# 3.6. Μελέτες πρόσδεσης της ZELDA σε αλληλουχίες DNA

# 3.6.1. Πειράματα Μείωσης της Κινητικότητας Συμπλόκου (Electrophoretic Mobility Shift Assays)

Η (οι) αλληλουχία(ες) πρόσδεσης της ZLD στο DNA δεν ήταν γνωστή ως τη δημοσίευση της εργασίας των Liang et al. (2008), στην οποία για πρώτη φορά γινόταν σχετική αναφορά. Σε πειράματα που προηγήθηκαν της παραπάνω μελέτης προσπαθήσαμε να προσδιορίσουμε τις πιθανές αλληλουχίες πρόσδεσης της στο DNA, μέσω της χρήσης υπολογιστικών προγραμμάτων πρόβλεψης τέτοιων τμημάτων. Για το λόγο αυτό, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που είχε παραχθεί σε βακτηριακά κύτταρα και αντιστοιχεί στην περιοχή των τεσσάρων δακτύλων ψευδαργύρου της Zelda χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα μείωσης της κινητικότητας συμπλόκου για εύρεση πιθανής αλληλεπίδρασης της με συγκεκριμένο ολιγονουκλεοτίδιο, η αλληλουχία του οποίου προσδιορίστηκε in silico (Kaplan et al., The Hebrew University of Jerusalem). Η αλληλουχία που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ακόλουθη: 5'- ATCAGGGGGGGGGGGGGGTGTACA - 3' – PREZNF.

Στα πειράματα EMSA που ακολούθησαν έγινε έλεγχος μίας σειράς παραμέτρων (συγκέντρωση της πρωτεΐνης και των αλάτων της αντίδρασης πρόσδεσης και άλλα), χωρίς

ωστόσο να ανιχνευθεί πρόσδεση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στο συγκεκριμένο ολιγονουκλεοτίδιο (Εικ. 17).



**Εικόνα 17.** Ενδεικτική παράθεση αυτοραδιογραφίας πειράματος Μείωσης της Κινητικότητας Συμπλόκου. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε αυξανόμενη ποσότητα ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στις αντιδράσεις σύνδεσης με το επιλεγμένο ραδιοσημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο χωρίς να παρατηρηθεί δημιουργία συμπλόκου. Οι ζώνες που παρατηρούνται στην κορυφή της εικόνας αντιστοιχούν στα πηγάδια του πηκτώματος.

# 3.6.1. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης (Chromatin Immumoprecipitation - ChIP - assays)

Ορισμένα από τα δεδομένα των πειραμάτων που αφορούν τη μελέτη λειτουργικότητας του

γονιδίου στην ανάπτυξη και θα περιγραφούν στη συνέχεια, μας οδήγησαν στην υπόθεση πως η ZLD εμπλέκεται στις διαδικασίες καθορισμού του προτύπου ανάπτυξης του φτερού της *Drosophila*. Ως αποτέλεσμα αυτής της υπόθεσης η πρωτεΐνη θα ήταν πολύ πιθανό να προσδένεται άμεσα ή σε συνεργασία με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες σε αλληλουχίες DNA που αποτελούν ρυθμιστικά στοιχεία γονιδίων με καθοριστικούς ρόλους στην ανάπτυξη αυτού του ιστού.

Οι Liang et al. (2008) χρησιμοποίησαν αλληλουχίες του ενισχυτή του γονιδίου zerknullt (zen) και έδειξαν ότι η ZLD προσδένεται σε επταμερή μοτίβα της ομάδας TAG (TAGteam heptamer motifs), με διαφορετική συγγένεια πρόσδεσης για το καθένα από αυτά. Χρησιμοποιώντας τα δεδομένα αυτά, επιλέχθηκαν για την παρούσα μελέτη δύο από τα μοτίβα που εντοπίζονται σε αλληλουχίες του ενισχυτή του zen (CTGCCTG και CTACCTG) και αναζητήσαμε την παρουσία τους σε γενομικές περιοχές γονιδίων που θεωρήθηκαν ως πιθανοί στόχοι ρύθμισης από τη ZLD. Η επιλογή των περιοχών έγινε με δεδομένα που υποστήριζαν είτε ισχυρή παρουσία και πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων σε αυτές, ή θεωρούνται πιθανές ρυθμιστικές αλληλουχίες της μεταγραφής (Negre et al. 2011). Η αλληλουχία CTGCCTG βρέθηκε σε μία περιοχή ~1000 bp αναρροϊκά της 5'-UTR των μεταγράφων omb-RD,RC και RE του γονιδίου *bifid (bi, optomotor-blind, omb)* καθώς και ~500 bp αναρροϊκά του μεταγράφου dpp-RA του γονιδίου *decapentaplegic*. Η αλληλουχία CTACCTG βρέθηκε σε μία περιοχή εζωνισίου του, ενώ μία περιοχή ενός πιθανού ενισχυτή του γονιδίου engrailed (en), η οποία εντοπίζεται εντός της 5'-UTR του μεταγράφων en-RB του γονιδίου και δεν περιέχει αλληλουχίες TAGteam, επιλέχθηκε ως αρνητικός μάρτυρας.

Ακολούθησαν πειράματα ChIP με το mouse anti-ZLD και τον πολλαπλασιασμό της χρωματίνης που κατακρημνίστηκε με ειδικούς εκκινητές για τις παραπάνω αλληλουχίες. Τα αναμενόμενα μεγέθη των προϊόντων των αντιδράσεων PCR υπολογίστηκαν σε: 349 bp (*ptc*), 233 bp (*omb*), 574 bp (*dpp*) και 314 bp (*en*). Οι αντιδράσεις που ακολούθησαν την ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης έδωσαν προϊόντα μόνο στην περίπτωση της χρησιμοποίησης εκκινητών για την περιοχή του *omb* (Εικ. 18). Η ίδια περιοχή αντιστοιχεί επίσης σε ένα τμήμα εσωνίου του γονιδίου Dmel/CG32773, το οποίο ωστόσο δεν εκφράζεται σε ιστούς προνύμφης (Graveley et al., 2011).





**Εικόνα 18.** Πειράματα ChIP έναντι της πρωτεΐνης ZLD. Για κάθε επιλεγμένη αλληλουχία από τις *dpp, ptc, omb, en,* παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αντιδράσεων low cycle PCR με υπόστρωμα χρωματίνη εμβρυϊκών δίσκων του φτερού, απομονωμένη με το αντίσωμα (α-ZLD) ή ολική (input). Οι αντιδράσεις ελέγχου μη ειδικού αντισώματος (α-Fz) ή απουσία αντισώματος (no-Ab) παρουσιάζονται στις εικόνες δεξιά. Προϊόντα των αντιδράσεων ανιχνεύθηκαν μόνο σην περίπτωση των εκκινητών για την περιοχή του *omb*.

Εντός της αλληλουχίας του γονιδίου *omb* που ενισχύθηκε (233 bp) καθώς και σε επικαλυπτόμενες γειτονικές αλληλουχίες, αναφέρεται η ύπαρξη θέσεων πρόσδεσης μίας σειράς άλλων μεταγραφικών παραγόντων μεταξύ των οποίων οι Zinc finger homeodomain 1 (zfh1), Twist (twi), Senseless (sens), Disconnected (disco) και Medea (Med) (Negre et al., 2011, The modENCODE Consortium, 2010) (Εικ. 19). Ο ακριβής ρόλος παρόμοιων περιοχών οι οποίες προσελκύουν μεγάλο αριθμό μεταγραφικών παραγόντων (HOT - Highly Occupied TF regions) δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί ωστόσο προτείνεται η πιθανή λειτουργία τους σε διαδικασίες αντιγραφής του DNA ή αλληλεπίδρασης μεταξύ συνοριακών αλληλουχιών (The modENCODE Consortium, 2010). Σε μία μελέτη της εμβρυϊκής ανάπτυξης της *Drosophila* (Kvon et al., 2012), γίνεται αναφορά για τη λειτουργία των περιοχών αυτών (HOT regions) ως ενισχυτών με ποικίλα πρότυπα δράσης και επίσης περιέχουν μοτίβα που αναγνωρίζονται από τη ZLD. Η έκφραση του γονιδίου *omb* ελέγχεται από το Dpp και το Wg και είναι γονίδιο απαραίτητο για την ανάπτυξη του φτερού της *Drosophila* (Grimm and Pflugfelder, 1996, Cook et al. 2004, del Alamo Rodriguez et al. 2004). Η αλληλεπίδραση της Zelda με αυτό το γονίδιο υποδεικνύει τη συμμετοχή της στα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται το *omb*, χωρίς ωστόσο να μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια ο μηχανισμός δράσης της σε αυτά.

Επιπλέον, η ανίχνευση πρόσδεσής της στην αλληλουχία που ενισχύθηκε με τις αντιδράσεις PCR μπορεί να προκύπτει είτε εξαιτίας άμεσης αλληλεπίδρασης της Zelda με τη χρωματίνη ή μέσω άλλων μεταγραφικών παραγόντων. Δεν μπορεί επίσης να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ταυτόχρονης πρόσδεσής της και σε άλλες αλληλουχίες γονιδίων που συμμετέχουν στα ίδια ή και σε άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια κατά την ανάπτυξη της προνύμφης κατ' αντιστοιχία της δράσης της στην εμβρυογένεση όπου η πρόσδεση της Zelda εντοπίζεται σε εκατοντάδες γονίδια με διαφορετικές λειτουργίες.



**Εικόνα 19.** Σχηματική απεικόνιση της γενομικής περιοχής η οποία περιέχει την αλληλουχία CTGCCTG και η οποία ενισχύθηκε σε πειράματα ChIP με τη χρήση αντισώματος έναντι της ZLD. Η επιλεγμένη περιοχή εμφανίζεται με πράσινη σκίαση. Στο σχήμα παρατίθενται επικαλυπτόμενες περιοχές εντός και εκατέρωθεν της αλληλουχίας, που χαρακτηρίζονται ως HOT regions καθώς και περιοχές με πιθανές θέσεις πρόσδεσης άλλων μεταγραφικών παραγόντων.

# 3.6. In vivo μελέτες υπερέκφρασης και απώλειας λειτουργικότητας της Zelda

Το γονίδιο της Zelda υπερεκφράστηκε και έγινε καταστολή της έκφρασής του, με μία σειρά οδηγών GAL4 που αναφέρονται συνοπτικά μαζί με τους φαινοτύπους που προέκυψαν σε κάθε περίπτωση (Πίνακες 1, 2) και αναλύονται στη συνέχεια. Οι φαινότυποι στον ιστό του φτερού εξετάστηκαν και σε κυτταρικό επίπεδο ώστε να διερευνηθεί ο μηχανισμός δράσης των υψηλών επιπέδων της πρωτεΐνης και η πιθανή συμμετοχή της σε σηματοδοτικά μονοπάτια που καθορίζουν την ανάπτυξη. Επιπλέον επιλέχθηκαν δύο φαινότυποι σε ενήλικα άτομα οι οποίοι μπορούν να διακριθούν μακροσκοπικά και οι οποίοι επιδέχονται τροποποίησης όταν εισαχθεί μία πρόσθετη γενετική αλλαγή. Οι φαινότυποι αυτοί προήλθαν από την εκτοπική έκφραση του γονιδίου, καθώς και με RNAi με στόχο την καταστολή του, υπό τον έλεγχο του οδηγού vgGAL4 και τα άτομα που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτόχρονη τροποποίηση των επιπέδων του υποδοχέα Notch σε αυτά, με σκοπό τη μελέτη μεταβολής του αρχικού αποτελέσματος, μέσω των γενετικών αλληλεπιδράσεων που ενδέχεται να συμβαίνουν.

Οδηγός	Ιστοί έκφρασης του οδηγού GAL4	Φαινότυποι
GAL4		
omb	εμβρυϊκός δίσκος του φτερού, θύλακας	μερική έως ολική απώλεια του ιστού στο
	του φτερού	ενήλικο άτομο.
dpp	εμβρυϊκός δίσκος του φτερού, όριο Α/Ρ	ελάττωση του μεσοδιαστήματος των
		φλεβών L3-L4, εκτοπικά αισθητήρια
pnr	εμβρυϊκός δίσκος του φτερού, περιοχή	θνησιγόνος στο στάδιο της προνύμφης
	έκφρασης του γονιδίου pnr, ραχιαίο	
	τμήμα από το οποίο προκύπτουν	
	θωρακικές δομές	
ptc	εμβρυϊκός δίσκος του φτερού, όριο	ελαττωματικά φτερά μικρότερου του

3.6.1 Φαινότυποι υπερέκφρασης του γονιδίου με το σύστημα GAL4-UAS (UAS-Zld)

	Α/Ρ, πρόσθιο τμήμα του δίσκου	φυσιολογικού μεγέθους, ελλείψεις στην	
		περιοχή του θώρακα, θνησιγόνος κατά	
		περίπτωση	
salm	εμβρυϊκός δίσκος του φτερού, θύλακας	θνησιγόνος στο στάδιο της προνύμφης	
	του φτερού		
vg	εμβρυϊκός δίσκος του φτερού, όριο D/V	απώλεια ιστού, φαινότυπος 'Notched'	
32547	εμβρυϊκός δίσκος του φτερού, σε	μη ανιχνεύσιμος	
	διακριτά σημεία		
2077	καθολική έκφραση έπειτα από θερμικό	μη ανιχνεύσιμος	
	σοκ στο στάδιο L1 της προνύμφης		
ар	εμβρυϊκός δίσκος του φτερού, ραχιαίο	απώλεια ιστού, θνησιγόνος	
	διαμέρισμα, στο πρότυπο έκφρασης		
	του apterous		
8760	νευρικό σύστημα	μη ανιχνεύσιμος	
en	στο πρότυπο έκφρασης του γονιδίου	θνησιγόνος	
	engrailed σε ολόκληρο το οπίσθιο		
	διαμέρισμα του δίσκου του φτερού		

**Πίνακας 1.** Υπερέκφραση / εκτοπική έκφραση της ZLD με το σύστημα GAL4/UAS. Αναφέρονται οι οδηγοί GAL4 που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και η συνοπτική περιγραφή των φαινοτύπων που προέκυψαν από τις αντίστοιχες διασταυρώσεις με στελέχη UAS/Zelda.

# 3.6.1.1 Υπερέκφραση της Zelda με τους οδηγούς en, ap, salm και pnrGAL4

Η υπερέκφραση της Zelda υπό τον έλεγχο των *en, ap, salm* και *pnr*GAL4 είχε ως αποτέλεσμα την πρόκληση θνησιμότητας στα στάδια της νύμφης ή της προνύμφης. Ο οδηγός *en*GAL4 προκάλεσε θνησιμότητα κατά την ανάπτυξη του σταδίου L1 της προνύμφης, ενώ ο οδηγός

pnrGAL4 στα στάδια L2 και L3. Οι προνύμφες αυτές εμφάνιζαν αδυναμία κίνησης και μικρότερο μέγεθος. Οι προνύμφες που προέκυψαν από την υπερέκφραση υπό τον έλεγχο του salmGAL4 παρέμεναν ζωντανές μέχρι το στάδιο L3, ήταν φυσιολογικού μεγέθους αλλά εμφάνιζαν αργή κίνηση. Η έκφραση της πρωτεΐνης υπό τον οδηγό του apGAL4, είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ατόμων που επιβιώνουν ως το στάδιο της νύμφης, αποτυγχάνουν όμως να εκκολαφθούν πιθανώς εξαιτίας της έλλειψης ιστών του φτερού και του θώρακα που παρατηρήθηκαν μετά από ανατομίες τους.

# 3.6.1.2 Υπερέκφραση της Zelda με τον οδηγό ptcGAL4

Η υπερέκφραση της Zelda σε ιστούς σύμφωνα με το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *ptc* είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μίας ποικιλίας φαινοτύπων. Η πλειονότητα αυτών εμφανίστηκε στα φτερά των ενηλίκων τα οποία δεν ξεδιπλώνονταν κανονικά, ήταν ατροφικά, κυρτά και 'τσαλακωμένα'. Το ποσοστό εμφάνισης τέτοιων φαινοτύπων ξεπερνούσε το 90% των απογόνων. Η πλειοψηφία των ατόμων αυτών κατέληγε στο θάνατο λίγες ώρες έως και μία μέρα μετά την εκκόλαψη, καθώς αδυνατούσαν να περπατήσουν ή να πετάξουν, χωρίς ωστόσο να παρουσιάζονται ορατές μορφολογικές ανωμαλίες στα πόδια τους. Σε ποσοστό 5% προέκυπταν μύγες με ελλείψεις περιοχών του θώρακα και κυρίως της μεταθωρακικής περιοχής (Εικ. 20). Σε όλα τα ποσοστά που αναφέρονται από εδώ και στη συνέχεια, οι μετρήσεις έγιναν σε σύνολο 150 ατόμων.



**Εικόνα 20.** Με βέλη υποδεικνύονται ατροφικά φτερά και μερική έλλειψη της μεσοθωρακικής περιοχής σε άτομο που υπερεκφράζει τη Zelda υπό τον έλεγχο του *ptc*GAL4.

## 3.6.1.3 Υπερέκφραση της Zelda με τον οδηγό dppGAL4

Στην περίπτωση υπερέκφρασης της πρωτεΐνης στην περιοχή έκφρασης του *dpp*, παρατηρήθηκαν φαινότυποι ελαττωματικής ανάπτυξης του φτερού των ενηλίκων σε ποσοστό 80%. Στις περισσότερες περιπτώσεις (60%) είχαμε την εμφάνιση ελάττωσης του μεσοδιαστήματος μεταξύ των φλεβών L3 και L4 και την πλάτυνση του φλεβικού ιστού L3, ενώ σε μικρότερο ποσοστό συνυπήρχαν ανωμαλίες όπως εμφάνιση εκτοπικού φλεβικού ιστού και αισθητηρίων στο φτερό των ενηλίκων ατόμων (Εικ. 21).



**Εικόνα 21**. Φτερά ατόμων που υπερεκφράζουν τη Zelda υπό τον έλεγχο του *dpp*GAL4. α) Φαινότυπος φυσιολογικού φτερού. Με βέλη υποδεικνύονται (β) στένωση μεσοδιαστήματος φλεβών L3-L4 και πλάτυνση της L3, (γ) εκτοπικός φλεβικός ιστός και αισθητήρια.

#### 3.6.1.4 Υπερέκφραση της Zelda με τον οδηγό ombGAL4

Η υπερέκφραση της Zelda στην περιοχή έκφρασης του *omb*, οδήγησε στην εμφάνιση ατόμων με σημαντικές ελλείψεις του ιστού των φτερών. Οι φαινότυποι που παρατηρήθηκαν στο 100% των ατόμων είχαν μία ποικιλία βαρύτητας που κυμαινόταν από ολική απώλεια των φτερών μέχρι και σημαντική έλλειψη του κεντρικού τμήματος του φτερού μεταξύ των L1 και L5 (Εικ. 22) Η βιωσιμότητα των ατόμων αυτών, όπως και στην περίπτωση του ptcGAL4 περιοριζόταν σε λίγες ώρες έως και 3 ημέρες μετά την εκκόλαψη.



**Εικόνα 22.** Υπερέκφραση της Zelda υπό τον έλεγχο του οδηγού *omb*GAL4 α) Απώλεια ιστού του κεντρικού τμήματος του φτερού β) Ολική απώλεια φτερού.

# 3.6.1.5 Υπερέκφραση της Zelda με τον οδηγό vgGAL4

Στην περίπτωση αυτή παρουσιάστηκαν στο 100% των ατόμων χαρακτηριστικοί φαινότυποι κομμένων φτερών που έμοιαζαν με εκείνους που παρατηρούνται σε περιπτώσεις έλλειψης λειτουργικότητας του *Notch*. Σε ποσοστό 20% συνυπήρχαν ελλείψεις φλεβικού ιστού σε όλες τις φλέβες του φτερού των ενηλίκων (Εικ. 23).



**Εικόνα 23.** Υπερέκφραση της Zelda υπό τον έλεγχο του οδηγού *vg*GAL4. (α,β) Εμφανίζεται φαινότυπος κομμένων φτερών. (α) Τα βέλη σημειώνουν μερική απώλεια φλεβών ταυτόχρονα με το φαινότυπο των κομμένων φτερών.

# 3.6.2 Φαινότυποι της καταστολής της έκφρασης του γονιδίου με χρήση του συστήματος GAL4-UAS (UAS-*Zld*RNAi)

Οδηγός GAL4	Ιστοί έκφρασης του	Φαινότυποι
	οδηγού GAL4	
Omb	εμβρυϊκός δίσκος του	θνησιγόνος στο στάδιο της
	φτερού, θύλακας του	νύμφης, φτερά διπλωμένα
	φτερού	υπολειπόμενου μεγέθους.
Dpp	εμβρυϊκός δίσκος του	ελάττωση του
	φτερού, όριο Α/Ρ	μεσοδιαστήματος των
		φλεβών L3-L4, μερική
		απώλεια φλεβών,
		φαινότυπος 'Notched',
		ελάττωση του μεγέθους
		των φτερών
ptc	εμβρυϊκός δίσκος του	ελαττωματικά φτερά
	φτερού, όριο Α/Ρ, πρόσθιο	υπολειπόμενου μεγέθους
	τμήμα του δίσκου	
salm	εμβρυϊκός δίσκος του	θνησιγόνος στο στάδιο της
	φτερού, θύλακας του	προνύμφης
	φτερού	
Vg	εμβρυϊκός δίσκος του	επιπλέον φλεβικός ιστός,
	φτερού, όριο D/V	τσαλακωμένα φτερά. Ο
		φαινότυπος παρουσίαζε
		ποικιλία στην ένταση.
32547	εμβρυϊκός δίσκος του	μη ανιχνεύσιμος
	φτερού, σε διακριτά σημεία	
2077	καθολική έκφραση έπειτα	μη ανιχνεύσιμος
	από θερμικό σοκ στο	
	στάδιο L1 της προνύμφης	
ар	εμβρυϊκός δίσκος του	απώλεια ιστού, θνησιγόνος
	φτερού, ραχιαίο	
	διαμέρισμα, στο πρότυπο	
	έκφρασης του <i>apterous</i>	
8760	Νευρικό σύστημα	μη ανιχνεύσιμος

en	στο πρότυπο έκφρασης του	θνησιγόνος
	γονιδίου engrailed σε	
	έμβρυα	
Dv	στα κύτταρα του ορίου DV	χαρακτηριστικός 'notched'
		φαινότυπος

**Πίνακας 2.** Καταστολή της έκφρασης της ZLD με το σύστημα GAL4/UAS. Αναφέρονται οι οδηγοί GAL4 που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και η συνοπτική περιγραφή των φαινοτύπων που προέκυψαν από τις αντίστοιχες διασταυρώσεις με στελέχη UAS/ZeldaRNAi.

# 3.6.2.1 Καταστολή της έκφρασης της Zelda με τους οδηγούς *en, ap, salm* και *pnr*GAL4

Η καταστολή της έκφρασης της Zelda υπό τον έλεγχο των en, ap, salm και pnrGAL4 είχε ως αποτέλεσμα την πρόκληση θνησιμότητας στα στάδια της νύμφης ή της προνύμφης με παρόμοιο τρόπο αυτού της υπερέκφρασης. Ο οδηγός enGAL4 προκάλεσε θνησιμότητα κατά την ανάπτυξη του σταδίου L1 της προνύμφης, ενώ ο οδηγός pnrGAL4 στα στάδια L2 και L3. Οι προνύμφες που προέκυψαν από την υπερέκφραση υπό τον έλεγχο του salmGAL4 παρέμεναν ζωντανές μέχρι το στάδιο L3. Η έκφραση της πρωτεΐνης υπό τον οδηγό apGAL4, έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ατόμων που επιβιώνουν ως το στάδιο της νύμφης, αποτυγχάνουν όμως να εκκολαφθούν πιθανώς εξαιτίας της έλλειψης ιστών του φτερού και του θώρακα που παρατηρήθηκαν μετά από ανατομίες τους όπως και στην περίπτωση της υπερέκφρασης του γονιδίου με τον ίδιο οδηγό GAL4.

# 3.6.2.2 Καταστολή της έκφρασης της Zelda με τον οδηγό *ptc*GAL4

Η καταστολή της Zelda σε ιστούς σύμφωνα με το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *ptc* είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση φαινοτύπων ατροφικών και τσαλακωμένων φτερών. Παρόλα αυτά, το ποσοστό εμφάνισης τους δεν ξεπερνούσε το 20%. Τα άτομα με ελαττωματικούς φαινοτύπους δεν επιβίωναν για διάστημα μεγαλύτερο των 2 ημερών (Εικ.24).



**Εικόνα 24.** Ατροφικό, τσαλακωμένο φτερό υπολειπόμενου μεγέθους σε άτομο στο οποίο έχει γίνει καταστολή της Zelda στο πρότυπο έκφρασης του *ptc* στον εμβρυϊκό δίσκο του φτερού.

# 3.6.2.3 Καταστολή της έκφρασης της Zelda με τον οδηγό dppGAL4

Στην περίπτωση καταστολής της Zelda στην περιοχή έκφρασης του dpp, παρατηρήθηκαν φαινότυποι ελαττωματικής ανάπτυξης του φτερού των ενηλίκων σε ποσοστό 70%. Στις περισσότερες περιπτώσεις είχαμε την εμφάνιση της ελάττωσης του μεσοδιαστήματος μεταξύ των φλεβών L3 και L4, όπως και στην περίπτωση της υπερέκφρασης και την εμφάνιση φαινοτύπου κομμένου φτερού. Σε μικρότερο ποσοστό παρατηρήθηκε μερική απώλεια φλεβικού ιστού και εκτοπικά αισθητήρια. Το μέγεθος των φτερών των ατόμων που προέκυψαν ήταν μικρότερο του φυσιολογικού (Εικ. 25). Τόσο στην περίπτωση χρησιμοποίησης του οδηγού dppGAL4 όσο και σε εκείνη του vgGAL4 που περιγράφεται στη συνέχεια, οι φαινότυποι που παρατηρήθηκαν από την καταστολή του γονιδίου μέσω RNAi, αντιστράφηκαν στο φυσιολογικό πρότυπο με την ταυτόχρονη έκφραση του UAS-zld στις ίδιες περιοχές. Σε ποσοστό που δεν ξεπέρασε το 5%, η αντιστροφή των φαινοτύπων οδήγησε σε εμφάνιση χαρακτηριστικών που παρέπεμπαν στην υπερέκφραση της Zelda υπό τον έλεγχο των dppGAL4 και vgGAL4.



**Εικόνα 25.** α) Φτερό *Oregon-R.* β,γ) Φτερά ατόμων στα οποία έχει γίνει καταστολή της Zelda στο πρότυπο έκφρασης του *dpp* στον εμβρυϊκό δίσκο του φτερού. Παρατηρείται: μείωση του μεσοδιαστήματος των φλεβών L3-L4, κόψιμο των φτερών, εκτοπικά αισθητήρια (β,γ) και μερική απώλεια φλεβών (β).

# 3.6.2.4 Καταστολή της έκφρασης της Zelda με τον οδηγό ombGAL4

Η καταστολή της Zelda στην περιοχή έκφρασης του *omb* ήταν θνησιγόνος στο στάδιο της προνύμφης καθώς η πλειονότητα των ατόμων δεν κατόρθωναν να εκκολαφθούν. Όσα ενήλικα άτομα κατόρθωναν να εκκολαφθούν παρουσίαζαν ελαττωματική ανάπτυξη του φτερού και πέθαιναν έως και 2 ημέρες αργότερα (Εικ. 26). Τα φτερά τους ήταν διπλωμένα και παρατηρήθηκε και μερική απώλεια αισθητήρων. Οι φαινότυποι εμφανίστηκαν στο 80% των ατόμων.



**Εικόνα 26.** Φτερό ατόμου στο οποίο έχει γίνει καταστολή της Zelda στο πρότυπο έκφρασης του *omb* στον εμβρυϊκό δίσκο του φτερού.

# 3.6.2.5 Καταστολή της έκφρασης της Zelda με τον οδηγό vgGAL4

Στην περίπτωση αυτή και στο 70% των ατόμων, εμφανίστηκαν φαινότυποι τσαλακωμένων φτερών με επιπλέον φλεβικό ιστό. Παρατηρείται ανωμαλία σχηματισμού του φτερού και απώλεια περιοχών του ορίου του οπίσθιου διαμερίσματος. Το 50% των ατόμων με ελαττωματικά φτερά παρουσίαζε μεγαλύτερη ένταση του φαινοτύπου με ταυτόχρονη πλάτυνση των φλεβών τους (Εικ.27).



**Εικόνα 27.** Φτερά ατόμων στα οποία έχει γίνει καταστολή της Zelda στο πρότυπο έκφρασης του *vg* στον εμβρυϊκό δίσκο του φτερού. Παρατηρούνται φαινότυποι διαφορετικής έντασης. Ο ανώμαλος σχηματισμός

- 107 - Κεφάλαιο 3 | Αποτελέσματα - Συζήτηση

του φτερού και ο εκτοπικός φλεβικός ιστός είναι χαρακτηριστικά παρόντα σε όλες τις περιπτώσεις.

# 3.6.2.6 Καταστολή της έκφρασης της Zelda με τον οδηγό Dcr-2/DVGAL4

Ο συγκεκριμένος οδηγός GAL4 εκφράζει το ένζυμο Dicer στα κύτταρα του ραχοκοιλιακού άξονα, ενισχύοντας έτσι τη δράση του RNAi που καταστέλλει τα mRNA του γονιδίου της Zelda. Στην περίπτωση αυτή και στο 100% των ατόμων εμφανίστηκε 'notched' φαινότυπος (Εικ. 28) ο οποίος δεν παρουσίασε διακυμάνσεις στην έντασή του.



**Εικόνα 28.** Φτερό ατόμου στο οποίο έχει γίνει καταστολή της Zelda κατά μήκος του ραχοκοιλιακού άξονα στον εμβρυϊκό δίσκο του φτερού. Παρατηρούνται τομές στο φτερό και απώλεια αισθητήρων.

# 3.6.3 Γενετική αλληλεπίδραση μεταξύ της Zelda και του Notch.

Η εκτοπική έκφραση της *zelda* υπό τον έλεγχο του *vg*GAL4 οδήγησε στην εμφάνιση φαινοτύπων που περιελάμβαναν μερική απώλεια φλεβών, τομές στα φτερά και απώλεια αισθητήρων (Εικ 29 α). Στην περίπτωση καταστολής της Zelda με τον ίδιο οδηγό GAL4, τα κύρια χαρακτηριστικά που παρατηρήθηκαν ήταν η εκτοπική εμφάνιση φλεβών και η αδυναμία ανάπτυξης ομαλού προτύπου του φτερού, το οποίο είχε μικρότερο μέγεθος του φυσιολογικού και με ελλείψεις κυρίως στην οπίσθια περιοχή του ορίου του (Εικ. 29 β). Τα χαρακτηριστικά αυτά μελετήθηκαν και μετά από ταυτόχρονη μεταβολή των επιπέδων του *Notch*, σε μία προσπάθεια διερεύνησης της γενετικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο γονιδίων.

Σε ταυτόχρονη υπερέκφραση των Zelda και Notch υπό τον έλεγχο του vgGAL4, οι φαινότυποι δεν παρουσίαζαν διαφορά σε σχέση με εκείνους που εμφανίστηκαν όταν υπήρξε υπερέκφραση της Zelda στο ίδιο πρότυπο και σε φυσιολογικό γενετικό υπόβαθρο (Εικ. ). Στην περίπτωση της υπερέκφρασης της Zelda και της μειωμένης έκφραση του N με το στέλεχος UAS-N RNAi, στα φτερά παρατηρήθηκε αύξηση του μεγέθους των φλεβών, μικρής έκτασης ελλείψεις - 108 - Κεφάλαιο 3 | Αποτελέσματα - Συζήτηση
του ορίου τόσο στο πρόσθιο όσο και στο οπίσθιο τμήμα με συνεπακόλουθη απώλεια αισθητήρων καθώς και περιορισμένης έκτασης τομές κυρίως στην περιοχή μεταξύ των φλεβών L3 και L4 (Εικ. 29δ). Και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις της εκτοπικής έκφρασης της Zelda, η αύξηση των επιπέδων έκφρασής της δεν εμφάνισε δραματικές αλλαγές σε σχέση με την περίπτωση που το γονίδιο υπερεκφράστηκε αυτόνομα, υποδεικνύοντας πως οι μεταβολές του προτύπου ανάπτυξης του φτερού που προκαλούνται από την υπερπαραγωγή της Zelda, δεν αντισταθμίζονται από την τροποποίηση των επιπέδων έκφρασης του Ν.

Η καταστολή της έκφρασης της Zelda με ταυτόχρονη συνεχή ενεργοποίηση του Ν, οδήγησε σε εμφάνιση ήπιων φαινοτύπων με κύριο χαρακτηριστικό την εκτοπική εμφάνιση αισθητήρων στα φλεβικά μεσοδιαστήματα (Εικ. 29γ). Η ταυτόχρονη καταστολή των Zelda και Ν είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση εκτοπικής ανάπτυξης φλεβών καθώς και την καθολική σχεδόν απώλεια των αισθητήρων του ορίου του φτερού, η οποία συνοδευόταν από τομές στον ιστό (Εικ. 29β). Παρατηρούμε πως στις περιπτώσεις καταστολής της Zelda, η ένταση των φαινοτύπων μειώνεται όταν έχουμε συνεχή ενεργοποίηση του Ν και αυξάνει στην περίπτωση ταυτόχρονης καταστολής και των δύο.



**Εικόνα 29**. Φαινότυποι φτερών ενηλίκων ατόμων στα οποία υπό τον έλεγχο του *vg*GAL4 έχουμε κατά περίπτωση, α) Υπερέκφραση της Zelda, β) Καταστολή της Zelda, γ) Συνεχή ενεργοποίηση του Ν, με τη χρησιμοποίηση του UAS/*N*<sup>ΔE</sup> στελέχους, δ) Καταστολή του Ν, με τη χρησιμοποίηση του UAS/*N* RNAi στελέχους.



**Εικόνα 30.** Φαινότυποι καταστολής της Zelda με ταυτόχρονη μεταβολή των επιπέδων του Ν. α) Ταυτόχρονη καταστολή των Zelda και Ν, εντείνει τους φαινοτύπους που παρατηρούνται στην αυτόνομη καταστολή της Zelda (Εικ. 29 β). β) Καταστολή της Zelda και συνεχής ενεργοποίηση του Ν. Μείωση της έντασης των φαινοτύπων καταστολής της Zelda. Εμφάνιση εκτοπικών αισθητήρων.







**Εικόνα 31.** Φαινότυποι υπερέκφρασης της Zelda με ταυτόχρονη μεταβολή των επιπέδων του Ν. α) Υπερέκφραση της Zelda με ταυτόχρονη καταστολή του Ν. Παρατηρούνται τομές στα φτερά και αύξηση του μεγέθους των φλεβών. β) Υπερέκφραση της Zelda και ταυτόχρονη συνεχής ενεργοποίηση του Ν, έχει ως αποτέλεσμα εμφάνιση φαινοτύπου παρόμοιου με εκείνο της υπερέκφρασης της Zelda με τον ίδιο οδηγό GAL4 σε φυσιολογικό υπόβαθρο

Η σύνοψη των παραπάνω παρατηρήσεων, μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως τα αποτελέσματα της υπερέκφρασης της Zelda στην περιοχή του ορίου του ραχοκοιλιακού άξονα, δεν μπορούν να αντισταθμιστούν από καταστολή ή διαρκή ενεργοποίηση του Notch. Επιπλέον, η ταυτόχρονη καταστολή των Zelda και Notch έχει ως αποτέλεσμα την ένταση των φαινοτύπων που

παρατηρούνται στην καταστολή της Zelda, ενώ η καταστολή της και η υπερέκφραση του Notch συγχρόνως, οδηγεί σε μερική επαναφορά του φυσιολογικού φαινοτύπου.

Τα αποτελέσματα αυτά δεν μπορούν να στοιχειοθετήσουν την υπόθεση της άμεσης και αυτόνομης αλληλεπίδρασης μεταξύ της Zelda και του μονοπατιού Notch, ωστόσο φαίνεται πως η υπερέκφρασή της παρουσιάζει επιστατική δράση έναντι του Notch και η απουσία της μπορεί να αντισταθμιστεί μερικώς από την υπερέκφρασή του. Οι δύο αυτές παρατηρήσεις, μπορούν να οδηγήσουν στην υπόθεση της ταυτόχρονης δράσης της ως καταστολέα και ενεργοποιητή γονιδίων-στόχων του μονοπατιού, σε συνάρτηση με τα επίπεδα έκφρασής της σε κύτταρα που συμμετέχουν στη μεταγωγή του σήματος Notch.

# 3.7. Ανάλυση των μεταβολών στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στην ανάπτυξη του φτερού μετά από υπερέκφραση και καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *zelda*

Ανίχνευση ημιποσοτικών μεταβολών στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στη διαδικασία ανάπτυξης του εμβρυϊκού δίσκου του φτερού, επιχειρήθηκε στην περίπτωση υπερέκφρασης και καταστολής της έκφρασης του γονιδίου σε περιοχή αυτού του ιστού με οδηγό το *vg*GAL4. Η ανίχνευση τέτοιων μεταβολών θα μπορούσε να αποτελέσει ένδειξη για τον τρόπο με τον οποίο η Zelda αλληλεπιδρά με τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν τον καθορισμό του προτύπου ανάπτυξης του φτερού και να ερμηνεύσει σε πρώτο επίπεδο τους φαινοτύπους που παρατηρούνται μετά την εκτοπική έκφραση και την καταστολή της.

Οι αντιδράσεις PCR που πραγματοποιήθηκαν έγιναν σε cDNA που απομονώθηκε από εμβρυϊκούς δίσκους του φτερού ατόμων, των στελεχών UAS-*Zld*, UAS-*Zld RNAi*, *vg*GAL4>UAS-*Zld* και *vg*GAL4>UAS-*Zld RNAi*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν για περιοχές των γονιδίων *ptc, ci, salm, wg, vg, dl, cbt, omb, brk* και *zld*.

Τα γονίδια *ptc* και *ci*, εμπλέκονται άμεσα στη σηματοδότηση του μονοπατιού Hh. To *ci*, κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος δρα ως ενεργοποιητής ή καταστολέας γονιδίων-στόχων του Hh και εκφράζεται στο πρόσθιο τμήμα του δίσκου του φτερού (Aza-Blanc et al. 1997, Methot and Basler, 1999, Ohimeyer and Kalderon, 1998, Alexandre et al. 1996). Το *ptc* κωδικοποιεί μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία αποτελεί υποδοχέα του Hh και η έκφρασή του

εντοπίζεται στον προσθοπίσθιο άξονα του δίσκου καθώς και στην πρόσθια περιοχή του σε χαμηλότερα επίπεδα (Ingham, 2001, Ingham et al., 1991, Tabata and Kornberg, 1994, Capdevilla and Guerrero, 1994). Ο μεταγραφικός παράγοντας Spalt-major κωδικοποιείται από το γονίδιο *salm* και παράγεται σε μία ευρεία ζώνη που συμπεριλαμβάνει τη ζώνη έκφρασης του *dpp* στο θύλακα του αναπτυσσόμενου δίσκου (Nellen et al. 1996, Lecuit et al. 1996). Μαζί με τα γονίδια *omb, brk* και vg, αποτελούν άμεσους ή έμμεσους στόχους ρύθμισης μέσω της σηματοδότησης από το μονοπάτι Dpp (Zecca et al. 1995, Grimm and Pflugfelder, 1996, Kim et al. 1996, Singer et al. 1997, Jazwinska et al. 1999, Minami et al. 1999, Muller et al. 2003). Στη ρύθμιση της έκφρασης του vg συμμετέχουν και τα μονοπάτια Notch και Wg/Wnt (Koelzer and Klein, 2003, Klein, 2001, Kourso et al., 1995). Το γονίδιο *cabut (cbt)* κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα που ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων των μονοπατιών JAK/STAT και JNK (Munoz-Descalzo et al.,2005, Rodriguez, 2011), ενώ τα γονίδια wg και *Dl* αποτελούν καλά μελετημένα συστατικά των μονοπατιών Wg/Wnt και Notch (Seto and Bellen, 2004, Strigini and Cohen, 1999, Buceta et al., 2007, Crozatier et al., 2003).

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων, έγινε στάθμιση των ποσοτήτων ολικού RNA που απομονώθηκε από τους εμβρυϊκούς δίσκους κάθε στελέχους (1μg) καθώς και του cDNA που δημιουργήθηκε μετά την αντίστροφη μεταγραφή των mRNA (1μl), ενώ σε κάθε πηγαδάκι των πηκτωμάτων αγαρόζης ηλεκτροφορήθηκαν, για κάθε περίπτωση, ίσες ποσότητες (25μl) των προϊόντων των αντιδράσεων PCR. Τα διαγράμματα που παρουσιάζονται (Εικ. 33) προέκυψαν με το πρόγραμμα ImageJ με το οποίο μετρήθηκε η σχετική αναλογία των pixels των ζωνών της κάθε εικόνας, μετά τη φωτογράφηση των πηκτωμάτων υπό την επίδραση ακτινοβολίας UV.

Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων, τα οποία έγιναν εις διπλούν, έδειξαν πως με τη συγκεκριμένη μεθοδολογία, ανιχνεύεται μείωση των επιπέδων έκφρασης του *wg* στην καταστολή και στην υπερέκφραση της Zelda με τον οδηγό *vg*GAL4. Επιπλέον ανιχνεύεται μείωση των επιπέδων έκφρασης του *vg* μόνο στην περίπτωση υπερέκφρασης της *zelda* (Εικ. 32).

Στην περιοχή του ορίου του ραχοκοιλιακού άξονα του φτερού, στην οποία κυρίως επάγει την έκφραση των διαγονιδιακών κατασκευών ο οδηγός *vg*GAL4, η έκφραση των γονιδίων *wg* και *vg*, ελέγχεται κατά κύριο λόγο από τη σηματοδότηση του Notch (Couso et al. 1995, Kim et al. 1995, Rulifson and Blair, 1995, Kim et al. 1996, Neumann and Cohen, 1996). Οι μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης της Zelda σε αυτή την περιοχή του δίσκου του φτερού οδηγούν σε καταστολή της έκφρασης δύο γονιδίων-στόχων του Notch χωρίς να παρατηρείται ταυτόχρονη μεταβολή των επιπέδων έκφρασης γονιδίων άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών. Συμπεραίνουμε δε, πως η Zelda είναι πιθανό να δρα ως καταστολέας της έκφρασης του *vg* ενώ δρα ταυτόχρονα ως επαγωγέας και καταστολέας, σε συνάρτηση με τα επίπεδα έκφρασής της, για το *wg*. Ωστόσο, στη συγκεκριμένη περίπτωση, πρέπει να ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι η μέθοδος που εφαρμόστηκε είναι ημιποσοτική και δεν μπορεί να δώσει ακριβή ένδειξη ποσοτικών μεταβολών που μπορεί να παρατηρούνται και στην έκφραση άλλων γονιδίων.



**Εικόνα 32.** PCR αντιδράσεις σε cDNA από εμβρυϊκούς δίσκους φτερού, στελεχών που υπερεκφράζουν ή καταστέλλουν τη ZLD υπό τον έλεγχο του vgGAL4. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για 9 διαφορετικά γονίδια που εκφράζονται στο συγκεκριμένο ιστό. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της ακτίνης. PCR με εκκινητές που αναγνωρίζουν και τα 4 μετάγραφα της zld έδειξαν ελάττωση της ποσότητας των προϊόντων στο στέλεχος καταστολής της και αύξηση στο στέλεχος υπερέκφρασής της.

Παρατηρούμε μείωση στα επίπεδα έκφρασης του wg στα στελέχη vgGAL4>UAS-zld, vgGAL4>UAS-zldRNAi και μείωση επιπέδων έκφρασης του vg στο στέλεχος vgGAL4>UAS-zld.



**Εικόνα 33.** Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων με τη χρήση του ImageJ, όπως προκύπτει από τις αντιδράσεις PCR που απεικονίζονται παραπάνω (Εικ. 32). Με γαλάζιο και κόκκινο χρώμα εμφανίζονται οι περιπτώσεις υπερέκφρασης και καταστολής της Zld αντίστοιχα, με τον οδηγό *vg*GAL4.

# 3.8. Ανάλυση των μεταβολών στα πρότυπα παραγωγής πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του φτερού μετά από υπερέκφραση και καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *zelda*

Έγινε μελέτη εμβρυϊκών δίσκων φτερού με ανοσοϊστοχημικές χρώσεις, με στόχο την κατανόηση σε κυτταρικό επίπεδο των επιπτώσεων της μεταβολής των επιπέδων έκφρασης της Zelda οι οποίες οδηγούν σε φαινοτύπους που περιγράφηκαν παραπάνω. Οι δίσκοι αφαιρέθηκαν από προνύμφες τρίτου σταδίου και πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός για την ανίχνευση μορίων στον ιστό, τα οποία κατέχουν διακριτούς ρόλους στης διαδικασίες ανάπτυξής του (Εικ. 34).



**Εικόνα 34**. Πρότυπα παραγωγής πρωτεϊνών σε εμβρυϊκούς δίσκους του φτερού προνύμφης τρίτου σταδίου του στελέχους Oregon-R. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι των Patched, Engrailed και Smoothened (επάνω σειρά) καθώς και των Wg, Delta και Cut (κάτω σειρά).

Με τον τρόπο αυτό μελετήθηκαν δίσκοι προνυμφών από όλες τις περιπτώσεις υπερέκφρασης και καταστολής της Zelda με τους οδηγούς GAL4 που αναφέρονται σε προηγούμενα εδάφια, στους οποίους έγινε ανίχνευση των πρωτεϊνικών προτύπων που απεικονίζονται στην Εικ. 34. Στη συνέχεια θα παρουσιαστούν τα δεδομένα εκείνα για τα οποία υπήρχε πλήρης επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων που παρατηρήθηκαν, καθώς στις υπόλοιπες περιπτώσεις αν και υπήρξαν χρώσεις μέσω των οποίων εμφανίστηκαν τροποποιήσεις στα πρότυπα παραγωγής των μορίων που εξετάστηκαν, η συχνότητά τους ήταν σποραδική επομένως δε μπορεί να εκτιμηθεί η πιθανότητα εμφάνισης τους ως πειραματικού σφάλματος που μπορεί να οφείλεται σε μία πλειάδα παραγόντων.

Οι κύριες μεταβολές που παρατηρήθηκαν αφορούν τις πρωτεΐνες Cut και Wg, η παραγωγή των οποίων καταστέλλεται τόσο στην περίπτωση υπερέκφρασης όσο και αποσιώπησης των μεταγραφικών προϊόντων της Zelda. Η καταστολή των πρωτεΐνών αυτών παρατηρήθηκε στις περιπτώσεις αποσιώπησης της *zelda* στην περιοχή του ραχοκοιλιακού ορίου του δίσκου μέσω των οδηγών Dcr-2/DV GAL4 (Εικ 35α) και *vg*GAL4 (Εικ. 36α), καθώς και με τον οδηγό *dpp*GAL4 (Εικ. 38α) μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η έκφραση της καταστευής UAS κατά μήκος του εμπροσθοοπίσθιου άξονα. Στην περίπτωση αυτή παρατηρήθηκε καταστολή των Cut και Wg, προέκυψαν και στις περιπτώσεις υπερέκφρασης της Zelda με τους οδηγούς *omb*GAL4 (Εικ. 39α) και *vg*GAL4.

Η διαφοροποίηση των επιπέδων έκφρασης της Zelda σε περιοχές του δίσκου του φτερού, έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή γονιδίων-στόχων του Notch, χωρίς να παρατηρείται ταυτόχρονη μεταβολή των προτύπων σύνθεσης όσων πρωτεϊνών μελετήθηκαν και οι οποίες ανήκουν σε άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια. Παρατηρείται επίσης πως η Zelda δεν έχει δράση αποκλειστικά καταστολέα ή επαγωγέα της σύνθεσης των πρωτεϊνών αυτών, αλλά απαιτείται η έκφρασή της σε συγκεκριμένα επίπεδα για την ομαλή έκφραση γονιδίων που ελέγχουν το πρότυπο ανάπτυξης του φτερού.

### 3.8.1 Καταστολή έκφρασης της Zelda με τον οδηγό Dcr-2/DVGAL4

Η καταστολή της έκφρασης της Zelda στα κύτταρα του ραχοκοιλιακού άξονα του εμβρυϊκού δίσκου του φτερού, είχε ως αποτέλεσμα διακοπή των προτύπων παραγωγής των Wg και Cut κατά μήκος του άξονα οι οποίες δεν εντοπίζονται σε συγκεκριμένα σημεία αυτού (Εικ. 35).





**Εικόνα 35.** Καταστολή της Zelda στα κύτταρα του ραχοκοιλιακού άξονα.

Παρατηρούνται ανωμαλίες των προτύπων παραγωγής των Wg και Cut (τα σημεία διακοπής τους σημειώνονται με λευκά βέλη).

Τα πρότυπα παραγωγής πρωτεϊνών όπως η Patched παραμένουν ανεπηρρέαστα.









στα κύτταρα του ραχοκοιλιακού άξονα. Εμβρυϊκός δίσκος του φτερού στον οποίο το UAS/GFP εκφράζεται υπό τον έλεγχο του Dcr-2/DVGAL4.

Εικόνα 35α. Περιοχή έκφρασης του Dcr-2/DVGAL4 (DV margin GAL4)

### 3.8.2 Καταστολή της έκφρασης της Zelda με τον οδηγό vgGAL4

Ο οδηγός vgGAL4 επάγει την έκφραση της κατασκευής που συνδέεται με την αλληλουχία UAS στα κύτταρα του ραχοκοιλιακού άξονα, σύμφωνα με το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου vg σε αυτή την περιοχή. Η αποσιώπηση της Zelda στην περίπτωση αυτή έχει ως αποτέλεσμα διαφοροποιήσεις στην παραγωγή μόνο της πρωτεΐνης Wg (Εικ. 36). Οι παρατηρήσεις αυτές αφορούν το 60% των δίσκων που εξετάστηκαν, καθώς το υπόλοιπο ποσοστό αφορά διπλωμένους δίσκους (ήπιος έως σοβαρός φαινότυπος) κατά μήκος και εκατέρωθεν του ραχοκοιλιακού άξονα, με ανώμαλη μορφολογία από την αρχή του δευτέρου σταδίου της προνύμφης. Σε αυτούς τους δίσκους, δεν μπορούν να διακριθούν με σαφήνεια τα πρότυπα παραγωγής των πρωτεϊνών του ιστού (Εικ. 37).



**Εικόνα 36.** Καταστολή της Zelda με τον οδηγό *vg*GAL4. Παρατηρούμε διακοπή του προτύπου παραγωγής της πρωτεΐνης Wg (οι αλλαγές στο πρότυπό της σημειώνονται με λευκά βέλη στην εικόνα). Τα πρότυπα των Cut και Ptc παραμένουν ανέπαφα.



**Εικόνα 36α.** Περιοχή έκφρασης του *vg*GAL4. Εμβρυϊκός δίσκος του φτερού στον οποίο το UAS/GFP εκφράζεται υπό τον έλεγχο του *vg*GAL4. Το πρότυπο έκφρασης του *vg*GAL4 δεν περιορίζεται στα κύτταρα του ραχοκοιλιακού άξονα, αλλά και σε κύτταρα τόσο του πρόσθιου όσο και του οπίσθιου διαμερίσματος, εντός του ραχιαίου διαμερίσματος του εμβρυϊκού δίσκου του φτερού.



**Εικόνα 37.** Εμβρυϊκός δίσκος φτερού προνύμφης τρίτου σταδίο από άτομο στο οποίο υπάρχει καταστολή της Zelda με τον οδηγό *vg*GAL4. Ο δίσκος έχει υποστεί ανοσοϊστοχημική χρώση με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης Dl. Παρατηρούμε την παραγωγή της Dl κατά μήκος των φλεβών L3 και L4. Ο δίσκος αυτός αποτελεί παράδειγμα με ήπια αναδίπλωση, που παρατηρείται στα συγκεκριμένα στελέχη.

Ο οδηγός vgGAL4 επάγει την έκφραση της κατασκευής UAS σε περιοχή η οποία παρουσιάζει επικάλυψη με εκείνη του οδηγού Dcr-2/DVGAL4 και ο οποίος περιγράφεται στο 3.8.1., δεν ταυτίζεται όμως με την περιοχή του Dcr-2/DVGAL4 (Εικ. 36α). Σε αυτή την περίπτωση όμως, παρατηρούμε μεταβολή στο πρότυπο σύνθεσης μόνο της πρωτεΐνης Wg ενώ το πρότυπο σύνθεσης της Cut εμφανίζεται αμετάβλητο. Κατά μήκος του ραχοκοιλιακού άξονα του δίσκου του φτερού, το Notch επάγει την έκφραση των *cut* και *wg*, ενώ τα μονοπάτια Notch και Wingless παρουσιάζουν συνεργειακή δράση στη ρύθμιση της έκφρασης του *cut* (Neumann and Cohen, 1996). Επιπλέον, στην περίπτωση της χρησιμοποίησης του οδηγού Dcr-2/DVGAL4, το αποτέλεσμα της καταστολής της Zelda μέσω του UAS/ZeldaRNAi στελέχους που χρησιμοποιείται, ενισχύεται εξαιτίας της ταυτόχρονης έκφρασης του Dcr-2. Συμπεραίνουμε με αυτό τον τρόπο πως χαμηλά

επίπεδα έκφρασης της Zelda κατά μήκος του ραχοκοιλιακού άξονα έχουν ως αποτέλεσμα καταστολή του *wg* και περαιτέρω μείωση των επιπέδων έκφρασής της οδηγεί σε ταυτόχρονη καταστολή και του *cut*. Από τις παρατηρήσεις αυτές, μπορούμε να υποθέσουμε είτε πως η Zelda είναι απαραίτητη για την έκφραση του *wg* και η καταστολή του έχει ως έμμεσο αποτέλεσμα και την καταστολή του *cut* ή πως δρα ταυτόχρονα στην επαγωγή της έκφρασης και των δύο αυτών γονιδίων. Στη δεύτερη περίπτωση η επαγωγή έκφρασης του *cut* από τη Zelda είναι πιθανό να αντισταθμίζεται μερικώς και από άλλους παράγοντες.

### 3.8.3 Καταστολή έκφρασης της Zelda με τον οδηγό dppGAL4

Σε κυτταρικό επίπεδο, η καταστολή της Zelda κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα του εμβρυϊκού δίσκου του φτερού είχε ως αποτέλεσμα τη διακοπή του προτύπου παραγωγής της πρωτεΐνης Cut. Σποραδικά, όπως και στους φαινοτύπους φτερών ενηλίκων που μελετήθηκαν, παρατηρήθηκε απώλεια χρώσης στην περιοχή έκφρασης του *DI* στις περιοχές από τις οποίες προκύπτουν οι φλέβες του φτερού (Εικ. 38). Επιπλέον, στους φαινοτύπους φτερών ενηλίκων μετά απο καταστολή της έκφρασης της Zelda με τον οδηγό dppGAL4, παρατηρείται μείωση του μεσοδιαστήματος των φλεβών L3-L4 (Εδάφιο 3.6.2.3), κάτι που παραπέμπει σε μερική απώλεια λειτουργίας του μονοπατιού Hh (Mullor et al. 1997, Crozatier et al. 2002), χωρίς ωστόσο να παρατηρηθεί μεταβολή στα πρότυπα παραγωγής πρωτεϊνών του μονοπατιού όπως οι Ptc, Smo και Εη που μελετήθηκαν.

Σε αυτή την περίπτωση καταστολής της Zelda κατά μήκος του εμπροσθοοπίσθιου άξονα, παρατηρούμε πως το πρότυπο έκφρασης της πρωτεΐνης Wg δεν μεταβάλλεται. Αντιθέτως, το πρότυπο έκφρασης της Cut διακόπτεται στο σημείο τομής των αξόνων A/P και D/V. Σε χρώσεις εμβρυϊκών δίσκων του φτερού από προνύμφες προχωρημένου 3ου σταδίου, παρατηρήθηκε μείωση στην έντασης και της ζώνης που αντιστοιχεί στη Wg στο σημείο τομής των αξόνων, πιθανότατα ως έμμεσο αποτέλεσμα της καταστολής της Cut στην ίδια περιοχή. Οι παρατηρήσεις αυτές σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της καταστολής της Ζelda με τον οδηγό *vg*GAL4, ενισχύουν την υπόθεση της ταυτόχρονης δράσης της στην επαγωγή της έκφρασης των *wg* και *cut*.



**Εικόνα 38.** Εμβρυϊκοί δίσκοι φτερού προνυμφών στις οποίες η Zelda καταστέλλεται κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα με τη χρήση του *dpp*GAL4. Παρατηρούμε διακοπή του προτύπου Cut στην περιοχή τομής των αξόνων DV/AP. Στις χρώσεις με αντίσωμα έναντι της DI παρατηρήθηκαν κατά περίπτωση ελλείψεις της πρωτεΐνης, κυρίως στην περιοχή που αντιστοιχεί στην φλέβα L3.



**Εικόνα 38α.** Περιοχή έκφρασης του *dpp*GAL4. Εμβρυϊκός δίσκος του φτερού στον οποίο το UAS/GFP εκφράζεται υπό τον έλεγχο του *dpp*GAL4 κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα.

### 3.8.3 Υπερέκφραση της Zelda με τον οδηγό ombGAL4.

Η εκτοπική έφραση της Zelda με τον οδηγό *omb*GAL4, είχε ως αποτέλεσμα την καταστολή των πρωτεϊνών Cut και Wg. Χαρακτηριστικό των δίσκων που μελετήθηκαν στην περίπτωση αυτή, αποτελούσε ο σχηματισμός αναδίπλωσης του ιστού εντός του θύλακα. Η αναδίπλωση παρατηρήθηκε μέσα στην περιοχή του εμπρόσθιου διαμερίσματος όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της χρώσης για την πρωτεΐνη Ptc (Εικ. 39).



**Εικόνα 39.** Υπερέκφραση της Zelda με τον οδηγό *omb*GAL4. Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις για τις πρωτεΐνες Wg, Cut, Smo και Ptc. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρούμε το σχηματισμό αναδίπλωσης στο όριο του εμπροσθοπίσθιου άξονα. Στη χρώση για την πρωτεΐνη Ptc (κάτω δεξιά στην εικόνα) παρατηρούμε πως η αναδίπλωση συμβαίνει στην περιοχή του εμπρόσθιου διαμερίσματος του φτερού, καθώς η περιοχή του ορίου του άξονα στην οποία εκφράζεται το *ptc* και η περιοχή του οπίσθιου διαμερίσματος παραμένουν ανέπαφες. Και στην περίπτωση αυτή το πρότυπο των πρωτεϊνών Cut και Wg διακόπτεται στα σημεία που υποδεικνύονται με βέλη (χρώσεις για Wg και Cut στο επάνω τμήμα της εικόνας).



**Εικόνα 39α.** Περιοχή έκφρασης του *omb*GAL4. Εμβρυϊκός δίσκος του φτερού στον οποίο το UAS/GFP εκφράζεται υπό τον έλεγχο του *omb*GAL4 στην περιοχή έκφρασης του γονιδίου *optomotor-blind*.

Και στην περίπτωση υπερέκφρασης της Zelda με τον οδηγό *omb*GAL4 παρατηρήθηκε καταστολή των γονιδίων-στόχων του Notch, *wg* και *cut*. Η παρατήρηση αυτή και σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα των πειραμάτων καταστολής της Zelda, ενισχύει το συμπέρασμα που προκύπτει από τα φαινοτυπικά αποτελέσματα που περιγράφονται στο 3.6.3, σύμφωνα με το οποίο η Zelda μπορεί να δράσει ταυτόχρονα ως ενεργοποιητής ή καταστολέας του μονοπατιού σηματοδότησης Notch ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασής της κατά την ανάπτυξη του δίσκου του φτερού. Σε μία τέτοια περίπτωση, είναι αρκετά πιθανό να ανταγωνίζεται για την πρόσδεσή της στο DNA ή σε μεταγραφικούς παράγοντες που βρίσκονται ήδη προσδεδεμένοι σε αυτό, με άλλες πρωτεϊνες.

Η δημιουργία αναδιπλώσεων στο θύλακα του φτερού κατά μήκος του εμπροσθοοπίσθιου άξονα έχει παρατηρηθεί στην περίπτωση απώλειας λειτουργικότητας του γονιδίου *omb* στην περιοχή αυτή και σχετίζεται με δυσλειτουργία του δικτύου των μικροσωληνίσκων (Shen et al. 2008). Όπως έχει ήδη αναφερθεί στα αποτελέσματα των πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης, ανιχνεύθηκε πρόσδεση της Zelda σε περιοχή εσωνίου του *omb*, υποδεικνύοντας μία άμεση μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα απώλειας λειτουργικότητας του *omb*, οι φαινότυποι που παρατηρήθηκαν στη συγκεκριμένη περίπτωση υπερέκφρασης της Zelda θα μπορούσαν να αποτελέσουν μία ένδειξη της δράσης της ως καταστολέα του *omb*. Για τη διερεύνηση αυτής της υπόθεσης, έγιναν πειράματα ανοσοϊστοχημικών χρώσεων με αντίσωμα έναντι της Omb (από τον G.O. Pflugfelder), τα οποία όμως δεν έδωσαν σαφή εικόνα του προτύπου παραγωγής της πρωτεΐνης στους εμβρυϊκούς δίσκους των φτερών που εξετάστηκαν.

### 3.8.4 Υπερέκφραση της Zelda με τον οδηγό vgGAL4

Η υπερέκφραση της Zelda με τον οδηγό *vg*GAL4 είχε ως αποτέλεσμα τη διακοπή των προτύπων των Wg και Cut (Εικ. 40). Τα σημεία καταστολής των πρωτεϊνών δεν εστιάζονταν σε συγκεκριμένες θέσεις αλλά σε διαφορετικές περιοχές κατά μήκος του ραχοκοιλιακού άξονα.



**Εικόνα 40.** Χρώσεις για Wg και Cut σε εμβρυϊκούς δίσκους στελεχών που υπερεκφράζουν τη Zelda με τη χρήση του οδηγού *vg*GAL4. Παρατηρούνται διακοπές στα πρότυπα των πρωτεϊνών κατά μήκος του ραχοκοιλιακού άξονα οι οποίες υποδεικνύονται με λευκά βέλη στις εικόνες. Όπως και στην περίπτωση υπερέκφρασης της Zelda με τον οδηγό *omb*GAL4, παρατηρείται καταστολή των δύο γονιδίων-στόχων του Notch. Τα πρότυπα πρωτεϊνών όπως οι Ptc, En και DI που μελετήθηκαν στα ίδια στελέχη δεν παρουσίαζαν αξιοσημείωτες μεταβολές.

Το σύστημα GAL4/UAS το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη in vivo της δράσης της Zelda, έδωσε σημαντικές πληροφορίες σε σχέση με την εμπλοκή της στην ανάπτυξη του φτερού της *Drosophila*, έχει όμως σημαντικά μειονεκτήματα καθώς δεν επιτρέπει τον απόλυτο έλεγχο της χρονικής έκφρασης των UAS-Zld και UAS-ZldRNAi και τα πρότυπα έκφρασης των διαθέσιμων οδηγών GAL4 έχουν σε αρκετές περιπτώσεις που αφορούν τη Zelda ως αποτέλεσμα ανωμαλίες που οδηγούν σε εκτεταμένες βλάβες του ιστού που μελετάται ή σε θνησιμότητα. Τα γεγονότα αυτά δυσχεραίνουν σημαντικά την εξαγωγή συμπερασμάτων που μπορεί να αφορούν την επιμέρους δράση του γονιδίου στους μηχανισμούς της ανάπτυξης. Για το λόγο αυτό έγινε μεγάλη προσπάθεια επαγωγής μιτωτικών κλώνων κυττάρων σε εμβρυϊκούς δίσκους του φτερού στους οποίους γινόταν έκφραση των UAS-Zld και UAS-ZldRNAi, χωρίς ωστόσο να παρατηρήσουμε σαφή αποτελέσματα. Τα πειράματα αυτά τα οποία θα βοηθούσαν και στη διερεύνηση της υπόθεσης της κυτταρικής αυτονομίας ή μη της δράσης της Zelda, παρουσίαζαν δυσκολίες κατά κύριο λόγο στην επαγωγή των κλώνων, ανεξαρτήτως των συνθηκών και των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν. Σποραδικά και σε ποσοστό 2-3%, σε περιπτώσεις επαγωγής μιτωτικών κλώνων υπερέκφρασης της Zelda, παρατηρήθηκαν ενήλικα άτομα τα οποία εμφάνιζαν τρύπες στα φτερά και εκτοπικό φλεβικό ιστό στο μεσοδιάστημα L1-L2. Τα αποτελέσματα αυτά δεν μπορούν όμως να επιβεβαιωθούν καθώς δεν υπήρξε ορατός φαινοτυπικός δείκτης που να υποδεικνύει την περιοχή ανάπτυξης των κλώνων στο φτερό των ενηλίκων.

## 3.9 Τα γονίδια *cut, omb, vg* και *wg*. Η εμπλοκή τους στην ανάπτυξη του φτερού της *Drosophila* και οι αλληλεπιδράσεις τους με τη Zelda

Το wg, ένα απο τα μορφογόνα της ανάπτυξης του φτερού, εμφανίζει δράση σε περιοχές απομακρυσμένες απο τα κύτταρα στα οποία συντίθεται η πρωτεΐνη του και κατέχει κεντρικό ρόλο στον καθορισμό του ραχοκοιλιακού άξονα του φτερού (Zecca et al. 1996, Neumann and Cohen, 1997). Στα γονίδια-στόχους της σηματοδότησης Wg συμπεριλαμβάνονται τα Achaete-Scute, Distal-less και ο ενισχυτής τεταρτημορίου του vq (vqQE). Ο σχηματισμός και η διατήρηση της σταθερότητας του ραχοκοιλιακού άξονα του εμβρυϊκού δίσκου του φτερού έχει ως βάση την ενεργοποίηση κατά μήκος του, του υποδοχέα Notch. Αυτός με τη σειρά του και σε συνδυασμό με τη δραστηριότητα των προσδετών του στα γειτονικά κύτταρα, ενεργοποιεί την έκφραση του wa στα κύτταρα του άξονα (Rulifson and Blair, 1995). Το wq διατηρεί την έκφραση των προσδετών του Notch εκατέρωθεν του άξονα, σχηματίζοντας με αυτό τον τρόπο ένα κύκλο θετικής ανατροφοδότησης και διασφαλίζοντας την υψηλή ενεργότητα του Notch κατα μήκος των ορίων (de Celis and Bray, 1997, Micchelli and Blair, 1999, Giraldez and Cohen, 2003). Η ενεργότητα του *wq* στα κύτταρα του ραχοκοιλιακού άξονα καθορίζει επίσης τον περιορισμό της δραστηριότητας του Notch σε μία γραμμή πλάτους δύο-τριών κυττάρων. Ο περιορισμός αυτός επιτυγχάνεται με την ταυτόχρονη ενεργοποίηση των προσδετών Serrate και Delta και τη συνεπακόλουθη καταστολή της σηματοδότησης Notch (Rauskolb et al. 1999, Sakamoto et al. 2002). Στα κύτταρα του ορίου, η επαγόμενη από το Notch έκφραση του *cut*, καταστέλλει την έκφραση των Delta και Serrate, αίροντας με αυτό τον τρόπο τη δράση καταστολής των προσδετών αυτών για το Notch κατά μήκος του άξονα. Η δράση του cut δεν περιορίζεται στην καταστολή των DI και Ser στα κύτταρα του άξονα αλλά επεκτείνεται στον αποκλεισμό των μηνυμάτων αρνητικής ανατροφοδότησης μέσω του Wg σε αυτά, διασφαλίζοντας έτσι σταθερά επίπεδα ενεργότητας του Notch στην περιοχή αυτή (de Celis and Bray, 1997, Micchelli et al. 1997, Εικ. 41) Η έκφραση του cut επάγεται με αυτόνομο τρόπο μόνο από τη σηματοδότηση του Notch και το ίδιο το cut - 126 - Κεφάλαιο 3 | Αποτελέσματα - Συζήτηση

λειτουργεί διατηρώντας την έκφραση του *wg* στην περιοχή του ορίου του ραχοκοιλιακού άξονα (Micchelli et al. 1997).

Το vg εμπλέκεται άμεσα στη διαμόρφωση της μορφολογίας του φτερού καθορίζοντας επιπλέον το μέγεθός του. Η ρύθμιση της έκφρασής του στον εμβρυϊκό δίσκο του φτερού επιτυγχάνεται μέσω δύο ενισχυτών, του ενισχυτή του ορίου (vg Boundary Enhancer - BE) και του ενισχυτή του τεταρτημορίου (vg Quadrant Enhancer – QE). Οι ενισχυτές αυτοί λαμβάνουν μηνύματα απο τρία σηματοδοτικά μονοπάτια (Wingless, Dpp και Notch). Επιπλέον το ίδιο το vg ρυθμίζει την έκφραση του vgQE, δρώντας έτσι συνεργειακά με τα Wingless και Dpp (Klein and Martinez Arias, 1999).



**Εικόνα 41.** Σχηματική αναπαράσταση των γενετικών αλληλεπιδράσεων σε κύτταρα εκατέρωθεν του ραχοκοιλιακού άξονα του εμβρυϊκού δίσκου του φτερού (Τροποποιημένα σχήματα από Neumann and Cohen, 1996 και Buceta et al. 2007). α) Το Notch καθορίζει το σχηματισμό του ραχοκοιλιακού επάγοντας την έκφραση του *wg* και του ενισχυτή του ορίου του *vg*. Στη συνέχεια το *wg* μεσολαβεί για τη μετάδοση των μηνυμάτων ενεργοποιώντας τα *cut* και *achaete scute complex* και σε απομακρυσμένη περιοχή τον ενισχυτή τεταρτημορίου του *vg*. Το Notch παρουσιάζει συνεργειακή δράση με το Wg για την ενεργοποίηση του *cut*. β) Η δράση του Wg σε ραχιαία (D) και κοιλιακά (V) κύτταρα, έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των *Dl, Sens* και *naked*. Η έκφραση του υποδοχέα Notch περιορίζεται σε μία λεπτή γραμμή κυττάρων εκατέρωθεν του ορίου ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των στόχων του Wg. γ) Η έκφραση των προσδετών του Notch είναι συμμετρική ως προς τα κύτταρα του ορίου και ο θετικός κύκλος ανατροφοδότησης μεταξύ των κυττάρων που εκφράζουν τα *wg* και τα *Ser/Dl* διατηρεί το κέντρο της σηματοδότησης κατα μήκος του ραχοκοιλιακού άξονα. Η δραστηριότητα του Notch στην περιοχή αυτή επάγει το cut το οποίο καταστέλλει τα *Dl* και *Ser* στα κύτταρα του ορίου.

Το omb αποτελεί ένα απο τα γονίδια-στόχους της σηματοδότησης του Dpp και είναι απαραίτητο για την έκφραση των sal και vg και την καταστολή των tkv και mtv (del Alamo-Rodriguez et al. 2003). Η αλληλεπίδραση των omb και vg συμβαίνει νωρίς κατά την ανάπτυξη του

δίσκου του φτερού, όταν το omb είναι απαραίτητο για την αρχική ενεργοποίηση του vgQE. Η απώλεια λειτουργικότητας του omb έχει ως αποτέλεσμα μαζικό κυτταρικό θάνατο στον εμβρυϊκό δίσκο του φτερού και συνεπακόλουθη απώλεια ιστού στο φτερό των ενήλικου άτομου ενω η παρουσία του είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της σταθερότητας του εμπροσθοοπίσθιου άξονα (del Alamo Rodriguez et al. 2003, Shen et al. 2008).

Η παραπάνω συνοπτική αναφορά των χαρακτηριστικών και της λειτουργίας των συγκεκριμένων γονιδίων, πραγματοποιείται δεδομένης της ανίχνευσης μεταβολών των επιπέδων έκφρασής τους σε περιπτώσεις καταστολής και υπερέκφρασης της Zelda ή της αλληλεπίδρασης της Zelda με αυτά. Δεδομένης της πολυπλοκότητας του δικτύου των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των γονιδίων αυτών, ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων που παρατηρήθηκαν στα πειράματα τροποποίησης in vivo των επιπέδων έκφρασης της Zelda, δέν μπορεί να καθορίσει με σαφήνεια τον ακριβή μηχανισμό δράσης της σε κάποιο απο τα σηματοδοτικά μονοπάτια που επηρρεάζει την έκφρασή τους.

Η καταστολή της Zelda σε κύτταρα του ραχοκοιλιακού άξονα, έχει ώς αποτέλεσμα τη διακοπή των προτύπων σύνθεσης των Cut και Wg υποδεικνύοντας την απαραίτητη συμμετοχή της στην ενεργοποίηση των γονιδίων αυτών απο το Notch. Παρόμοια αποτελέσματα όμως παρατηρούμε και στην περίπτωση υπερέκφρασης της Zelda στα ίδια κύτταρα. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως τα γονίδια τα οποία επάγονται απο την παρουσία της Zelda, εκφράζονται αποκρινόμενα σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης, κατ' αναλογία με τα γονίδια στόχους των μορφογόνων όπως τα Wg και Dpp (Strigini and Cohen, 1999).

### Κεφάλαιο 4 | Συμπεράσματα

Η μελέτη αυτή αποτελεί την πρώτη έως αυτή τη στιγμή προσπάθεια διερεύνησης του ρόλου της Zelda στο στάδιο της προνύμφης και συγκεκριμένα στο σχηματισμό του φτερού. Επομένως εδώ θα συνοψιστούν τα κύρια αποτελέσματα και θα συζητηθούν με όσα υπάρχουν για το ρόλο της στην εμβρυογένεση όπου έχουν εστιαστεί οι περισσότερες μελέτες.

# 4.1 Η συμμετοχή της Zelda στο σχηματισμό του προτύπου ανάπτυξης του εμβρυϊκού δίσκου του φτερού.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων in vivo, έδειξαν ότι η απώλεια έκφρασης ή η εκτοπική έκφραση της Zelda σε περιοχές του εμβρυϊκού δίσκου του φτερού, έχει ως συνέπεια την ελαττωματική ανάπτυξη της συγκεκριμένης δομής του επιθηλιακού ιστού. Οι φαινότυποι που παρατηρούνται σε ενήλικα άτομα καθώς και η κυτταρική ανάλυση μορίων που επηρεάζονται από τις μεταβολές της ποσοτικής έκφρασης του γονιδίου, συγκλίνουν στο χαρακτηρισμό της Zelda ως μεταγραφικού παράγοντα, η παρουσία του οποίου σε καθορισμένα επίπεδα έκφρασης, είναι απαραίτητη για τη σωστή ανάπτυξη του φτερού.

### 4.1.1 Ο καθορισμός της ανάπτυξης του δίσκου

Ο εμβρυϊκός δίσκος του φτερού της *Drosophila* αποτελείται από μονήρη στοιβάδα επιθηλιακών κυττάρων. Για το σχηματισμό του φτερού σε τρισδιάστατο επίπεδο, απαιτείται η οργάνωση του δίσκου με έκκεντρο τρόπο, όπου οι απομακρυσμένες από το θώρακα δομές (blade, margin) βρίσκονται στο κέντρο του δίσκου, ενώ η περιοχή ένωσης του φτερού με το θώρακα (hinge) εντοπίζεται στην περιφέρεια του δίσκου (Εικ. 1).



**Εικόνα 1.** Συσχετισμός των αξόνων οργάνωσης στον εμβρυϊκό δίσκο του φτερού και στις δομές που προκύπτουν απο αυτόν στο ενήλικο άτομο.

### - 130 - Κεφάλαιο 4 | Συμπεράσματα

Ο προσθοπίσθιος άξονας καθορίζεται από την έκφραση του γονιδίου engrailed στα κύτταρα του οπίσθιου διαμερίσματος και ο ραχοκοιλιακός από την έκφραση του γονιδίου apterous στα κύτταρα του ραχιαίου διαμερίσματος. Η καταστολή και η υπερέκφραση της Zelda στα πρότυπα έκφρασης αυτών των γονιδίων, έχει ως αποτέλεσμα θνησιγόνο φαινότυπο. Ελάχιστα άτομα που εκκολάφθηκαν από το στέλεχος καταστολής της Zelda με τον οδηγό apGAL4, ήταν έντομα τα οποία παρουσίαζαν μικρή θωρακική περιοχή και ελάχιστη ανάπτυξη φτερών τα οποία πέθαιναν λίγες ώρες μετά την εκκόλαψη. Οι φαινότυποι έμοιαζαν με εκείνους που περιγράφονται σε περίπτωση μεταλλάξεων του γονιδίου apterous (Lindsley and Zimm, 1992). Η παρουσία της Zelda σε ελεγχόμενα επίπεδα έκφρασης στις περιοχές έκφρασης των ap και en είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του οργανισμού. Ως εκ τούτου, δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο συμβολής της στον καθορισμό των αξόνων συμμετρίας νωρίς κατά την ανάπτυξη των εμβρυϊκών δίσκων, μέσω άμεσου ή έμμεσου ελέγχου έκφρασης γονιδίων επιλογής όπως τα ap και en.

## 4.2 Η υπόθεση του μηχανισμού δράσης της Zelda στο στάδιο ανάπτυξης της προνύμφης

Η Zelda έχει περιγραφεί κατά την εμβρυογένεση ως ένας μεταγραφικός παράγοντας με πρωταρχική δράση, ο οποίος προσδένεται σε ένα μεγάλο αριθμό ενισχυτών γονιδίων καθορίζοντας ή διατηρώντας περιοχές της χρωματίνης προσβάσιμες σε άλλους παράγοντες οι οποίοι οδηγούν στην ενεργοποίηση του ζυγωτικού γονιδιώματος (Harrison et al. 2011). Ο μεταγραφικοί παράγοντες με παρόμοια πρωταρχική λειτουργία μπορούν να δράσουν ενεργά στο άνοιγμα περιοχών της χρωματίνης επιτρέποντας την πρόσδεση άλλων παραγόντων σε αυτή (Zaret and Carroll, 2011). Στη μελέτη των Saunders et al. (2013) αποκαλύφθηκε πως η έκφραση ενός μεγάλου ποσοστού των γονιδίων που ρυθμίζονται απο τη Zelda κατά την εμβρυογένεση, ρυθμίζεται είτε στο επίπεδο της στρατολόγησης της πολυμεράσης για την έναρξη της μεταγραφής ή στην απελευθέρωση των παραγόντων που οδηγούν σε παύση της δραστηριότητάς της. Ο ακριβής μηχανισμός παράλληλης δράσης της Zelda με εκείνο της παύσης της RNA Pol II δεν έχει διαλευκανθεί. Ωστόσο, η παύση της RNA Pol II έχει προσδιοριστεί ως ένας αρκετά διαδεδομένος τρόπος μεταγραφικής ρύθμισης στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς που επιτρέπει την ταχεία και συντονισμένη έκφραση των γονιδίων ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου. Σε περιοχές του γονιδιώματος της *Drosophila*, του ποντικού αλλά και ανθρώπινων κυττάρων, εντοπίστηκε η συσσώρευση μορίων RNA Pol II καθοδικά των υποκινητών χιλιάδων γονιδίων (Guenther et al. 2007, Core et al. 2008, Lee et al. 2008, Gilchrist et al. 2010, Rahl et al. 2010) και επιβεβαιώθηκε η διατήρησή της σε κατάσταση παύσης απο τη μεταγραφική δραστηριότητα (Core et al. 2008, Min et al. 2011).

Η αποδοχή της υπόθεσης της συμμετοχής της Zelda στη ρύθμιση της μεταγραφής με ένα γενικό μηχανισμό δράσης που επηρεάζει την έκφραση μεγάλου αριθμού γονιδίων, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η Zelda θα μπορούσε με παρόμοιο τρόπο να δράσει είτε στην περίπτωση απουσίας της ή στην περίπτωση υπερέκφρασης ή εκτοπικής έκφρασής της. Η απουσία της Zelda θα μπορούσε να οδηγήσει σε 'κλείσιμο' περιοχών της χρωματίνης που παίζουν ρόλο ενισχυτών, οι οποίες θα έπρεπε σε φυσιολογικές συνθήκες να είναι προσβάσιμες σε μεταγραφικούς παράγοντες για την έναρξη της μεταγραφικής δραστηριότητας. Στην περίπτωση της υπερέκφρασης της Zelda, η συνεχής παρουσία της σε αλληλουχίες οι οποίες στη συνέχεια θα έπρεπε να γίνουν προσβάσιμες σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες θα οδηγούσε επίσης στην καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας. Η ένταση των φαινοτύπων που παρατηρούνται σε in vivo πειράματα απώλειας της λειτουργικότητας και υπερέκφρασης της Zelda στο στάδιο της προνύμφης, καθώς και τα αποτελέσματα στη σύνθεση πρωτεϊνών όπως η Wg και στις δύο περιπτώσεις, αποτελούν μία αρχική ένδειξη που συνηγορεί στην ισχύ μίας τέτοιας υπόθεσης. Ο σχηματισμός του εμβρυϊκού δίσκου του φτερού της Drosophila απαιτεί τη συντονισμένη χρονική και ποσοτική έκφραση αρκετών γονιδίων και η Zelda θα μπορούσε να είναι υποψήφια για τη ρύθμιση της έκφρασής τους στο στάδιο ανάπτυξης της προνύμφης.

### 4.3 Η μετάβαση από το γονιδίωμα των αρθροπόδων στο γονιδίωμα των θηλαστικών

Η μελέτη της λειτουργίας ενός παράγοντα όπως η Zelda κατά την ανάπτυξη της Drosophila και κατ' επέκταση των αρθροπόδων στα οποία εντοπίζονται ομόλογες με αυτή πρωτεΐνες παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Η διαδικασία της μετάβασης απο το μητρικό στο ζυγωτικό γονιδίωμα και ο καθορισμός του προτύπου των δομών του σώματος δεν αφορούν όμως μόνο τα αρθρόποδα αλλα και τους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς ως τον άνθρωπο. Πολύ πρόσφατα αναφέρθηκε (Leichsenring et al. 2013) ότι ο μεταγραφικός παράγοντας Pou5f1 του Danio rerio (ψάρι-ζέβρα), ομόλογος του μεταγραφικού παράγοντα Oct4 των θηλαστικών, προσδένεται σε περιοχές της χρωματίνης με αλληλουχίες SOX-POU πριν από την έναρξη της μεταγραφικής δραστηριότητας του ζυγωτικού γονιδιώματος και ενεργοποιεί με τον τρόπο αυτό τη μεταγραφή των πρώιμων ζυγωτικών γονιδίων. Η λειτουργία αυτού του παράγοντα στην ανάπτυξη του *Danio rerio* παρουσιάζει πάρα πολλές ομοιότητες με τη λειτουργία της Zelda στην ανάπτυξη της *Drosophila,* όπως αναφέρεται από τους ίδιους ερευνητές. Ιδιαίτερη σημασία στη μελέτη των Leichsenring et al. (2013) παρουσιάζει η παρατήρηση ότι ο μηχανισμός της μετάβασης στο ζυγωτικό γονιδίωμα και ο έλεγχος της συγχρονισμένης γονιδιακής έκφρασης από συγκεκριμένους παράγοντες σε οργανισμούς κατώτερης εξελικτικής κλίμακας, έχει εξελιχθεί σε μηχανισμό ελέγχου του γονιδιώματος των βλαστικών κυττάρων των θηλαστικών.

Βιβλιογραφία |

- Adams MD et al., The genome sequence of Drosophila melanogaster. Science. 2000 vol. 287 (5461) pp. 2185-95.
- Alexandre C, A Jacinto, P W Ingham. Transcriptional activation of hedgehog target genes in Drosophila is mediated directly by the cubitus interruptus protein, a member of the GLI family of zinc finger DNA-binding proteins. Genes Dev. 1996 vol. 10 (16) pp. 2003-13
- 3. Andrew C. Jamieson, Jeffrey C. Miller & Carl O. Pabo. Drug discovery with engineered zincfinger proteins. 2003. *Nature Reviews Drug Discovery* 2, 361-368
- 4. Arora K, H Dai, S G Kazuko, J Jamal, M B O'Connor, A Letsou, R Warrior. The Drosophila schnurri gene acts in the Dpp/TGF beta signaling pathway and encodes a transcription factor homologous to the human MBP family. Cell. 1995 vol. 81 (5) pp. 781-90
- 5. Artavanis-Tsakonas S, M D Rand, R J Lake. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. Science. 1999 vol. 284 (5415) pp. 770-6
- Aza-Blanc, F A Ramírez-Weber, M P Laget, C Schwartz, T B Kornberg. Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. Cell. 1997 vol. 89 (7) pp. 1043-53
- 7. Basler K., Struhl G. Compartment boundaries and the control of Drosophila limb pattern by hedgehog protein. 1994. Nature 368, 208 214
- Blair S.S. Compartments and appendage development in Drosophila. Bioessays.1995. 7 (4)
   299-309
- Busto GU, Cervantes-Sandoval I, Davis RL. Olfactory learning in Drosophila. Physiology.
   2010. vol 25 (6) pp. 338-346
- 10. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976 vol. 72 pp. 248-54
- 11. Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and

generating dominant phenotypes. 1993. Development. 118(2) 401-15.

- 12. Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006 vol. 7 (9) pp. 678-89
- 13. Brummel TJ, V Twombly, G Marqués, J L Wrana, S J Newfeld, L Attisano, J Massagué, M B O'Connor, W M Gelbart. Characterization and relationship of Dpp receptors encoded by the saxophone and thick veins genes in Drosophila. Cell. 1994 vol. 78 (2) pp. 251-61
- 14. Buceta Javier, Héctor Herranz, Oriol Canela-Xandri, Ramon Reigada, Francesc Sagués, Marco Milán. Robustness and stability of the gene regulatory network involved in DV boundary formation in the Drosophila wing. PLoS ONE. 2007 vol. 2 (7) pp. e602
- 15. Campos-Ortega JA. Mechanisms of early neurogenesis in Drosophila melanogaster. J Neurobiol. 1993 vol. 24 (10) pp. 1305-27
- 16. Capdevila J, I Guerrero. Targeted expression of the signaling molecule decapentaplegic induces pattern duplications and growth alterations in Drosophila wings. EMBO J. 1994 vol. 13 (19) pp. 4459-68
- 17. Cohen, S. M. (1993). Imaginal disc development. In Drosophila Development, A. Martinez-Arias and M. Bate, eds. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press), 747-841.
- 18. Couso JP, Knust E, Martinez Arias A. Serrate and Wingless cooperate to induce vestigial gene expression and wing formation in Drosophila. Curr. Biol. 1995. vol 5. pp 1437-1448
- Crozatier M, Bruno Glise, Vanessa Khemici, Alain Vincent. Vein-positioning in the Drosophila wing in response to Hh; new roles of Notch signaling. Mech Dev. 2003 vol. 120 (5) pp. 529-35
- 20. de Celis JF, Bray S. Feed-back mechanisms affecting Notch activation at the dorsoventral boundary in the Drosophila wing. Development. 1997 vol. 124 (17) pp. 3241-51
- 21. De Renzis S, Olivier Elemento, Saeed Tavazoie, Eric F Wieschaus. Unmasking activation of the zygotic genome using chromosomal deletions in the Drosophila embryo. PLoS Biol.

2007 vol. 5 (5) pp. e117

- 22. Garner MM, Revsin A. Interaction of catabolite activator protein of Escherichia coli with single-stranded deoxyribonucleic acid. Biochemistry. 1981 vol. 20 (2) pp. 306-12
- 23. Giannios P, Sonia G Tsitilou. The embryonic transcription factor Zelda of Drosophila melanogaster is also expressed in larvae and may regulate developmentally important genes. BBRC. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.07.071
- 24. Giraldez AJ, Cohen SM. Wingless and Notch signaling provide cell survival cues and control cell proliferation during wing development. Development. 2003. 130 pp 6533-6543
- Graveley, B.R., Brooks, A.N., Carlson, J.W., Duff, M.O., Landolin, J.M., Yang, L., Artieri, C.G., van Baren, M.J., Boley, N., Booth, B.W., Brown, J.B., Cherbas, L., Davis, C.A., Dobin, A., Li, R., Lin, W., Malone, J.H., Mattiuzzo, N.R., Miller, D., Sturgill, D., Tuch, B.B., Zaleski, C., Zhang, D., Blanchette, M., Dudoit, S., Eads, B., Green, R.E., Hammonds, A., Jiang, L., Kapranov, P., Langton, L., Perrimon, N., Sandler, J.E., Wan, K.H., Willingham, A., Zhang, Y., Zou, Y., Andrews, J., Bickel, P.J., Brenner, S.E., Brent, M.R., Cherbas, P., Gingeras, T.R., Hoskins, R.A., Kaufman, T.C., Oliver, B., Celniker, S.E. 2011. The developmental transcriptome of Drosophila melanogaster. Nature 471(7339): 473- 479.
- 26. Grimm S, G O Pflugfelder. Control of the gene optomotor-blind in Drosophila wing development by decapentaplegic and wingless. Science. 1996 vol. 271 (5255) pp. 1601-4
- 27. Harrison, M.M., Li, X.Y., Kaplan, T., Botchan, M.R., Eisen, M.B. 2011. Zelda binding in the early *Drosophila melanogaster* embryo marks regions subsequently activated at the maternal-to-zygotic transition. PLoS Genet. 7, e1002266
- 28. Ingham PW, A M Taylor, Y Nakano. Role of the Drosophila patched gene in positional signaling. Nature. 1991 vol. 353 (6340) pp. 184-7
- 29. Ingham PW, Martinez Arias A. Boundaries and fields in early embryos. Cell. 1992 vol. 68 (2) pp. 221-35

### - 137 - Βιβλιογραφία

- 30. Ingham PW. Hedgehog signaling: a tale of two lipids. Science. 2001 vol. 294 (5548) pp. 1879-81
- 31. Isalan M, Klug A, Choo Y. Comprehensive DNA recognition through concerted interactions from adjacent zinc fingers. Biochemistry. 1998 vol. 37 (35) pp. 12026-33
- 32. Iuchi S. Three classes of C2H2 zinc finger proteins. Cell Mol Life Sci. 2001 vol. 58 (4) pp. 625-35
- 33. Jarvis E, Bruce HS, Patel NH. Evolving specialization of the arthropod nervous system. PNAS. 2012 vol. 109. (Suppl. 1.) pp. 10607-10611
- 34. Jaźwińska A, N Kirov, E Wieschaus, S Roth, C Rushlow. The Drosophila gene brinker reveals a novel mechanism of Dpp target gene regulation. Cell. 1999 vol. 96 (4) pp. 563-73
- 35. Johnstone O, Lasko P. Translational regulation and RNA localization in Drosophila oocytes and embryos. Annu Rev Genet. 2001 vol. 35 pp. 365-406.
- 36. Johnstone D. St. The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. Nature Rev. Gen. 2002. vol. 3 pp. 176-188
- 37. Kaplan T, Nir Friedman, Hanah Margalit. Ab initio prediction of transcription factor targets using structural knowledge. PLoS Comput Biol. 2005 vol. 1 (1) pp. e1
- Kim J, K D Irvine, S B Carroll. Cell recognition, signal induction, and symmetrical gene activation at the dorsal-ventral boundary of the developing Drosophila wing. Cell. 1995 vol. 82 (5) pp. 795-802
- 39. Kim J, A Sebring, J J Esch, M E Kraus, K Vorwerk, J Magee, S B Carroll. Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by Drosophila vestigial gene. Nature. 1996 vol. 382 (6587) pp. 133-8
- 40. Klein T, Martinez-Arias A. Different spatial and temporal interactions between Notch, wingless and vestigial specify proximal and distal pattern elements of the wing in Drosophila. Dev Biol. 1998. 194 pp 196-212

- 41. Klein T. Wing disc development in the fly: the early stages. Curr Opin Genet Dev. 2001 vol.11 (4) pp. 470-5
- 42. Klein T. Wing disc development in the fly: the early stages. Curr Opin Genet Dev. 2001 vol. 11 (4) pp. 470-5
- 43. Koelzer S, Thomas Klein. A Notch-independent function of Suppressor of Hairless during the development of the bristle sensory organ precursor cell of Drosophila. Development. 2003 vol. 130 (9) pp. 1973-88
- 44. Kvon, E.Z., Stampfel, G., Yáñez-Cuna, J.O., Dickson, B.J., Stark, A. 2012. HOT regions function as patterned developmental enhancers and have a distinct cis-regulatory signature. Genes Dev. 26, 908-913
- 45. Lecuit T, W J Brook, M Ng, M Calleja, H Sun, S M Cohen. Two distinct mechanisms for longrange patterning by Decapentaplegic in the Drosophila wing. Nature. 1996 vol. 381 (6581) pp. 387-93
- 46. Lee M.S., Cavanagh J, Wright P.E. Complete assignment of the 1H NMR spectrum of a synthetic zinc finger from Xfin. Sequential resonance assignments and secondary structure. FEBS Lett. 1989 vol. 254 (1-2) pp. 159-64
- 47. Leichsenring M, Maes J, Mossner R, Driever W, Onichtchouk D. Pou5f1 transcription factor controls zygotic gene activation in vertebrates. Science. 2013. 341 pp 1005-1009
- 48. Liang, H.L, Nien, C.Y., Liu, H.Y., Metzstein, M.M., Kirov, N., Rushlow C. 2008. The zinc-finger protein Zelda is a key activator of the early zygotic genome in *Drosophila*. Nature 456, 400-403
- 49. Méthot N, K Basler. Hedgehog controls limb development by regulating the activities of distinct transcriptional activator and repressor forms of Cubitus interruptus. Cell. 1999 vol.
  96 (6) pp. 819-31
- 50. Micchelli CA, Rulifson EJ, Blair SS. The function and regulation of cut expression on the

wing margin of Drosophila: Notch, Wingless and the dominant negative role for Delta and Serrate. Development. 1997. 124 pp 1485-1495

- 51. Micchelli CA, Blair SS. Dorsoventral lineage restriction in wing imaginal discs requires Notch. Nature. 401 pp 473-476
- 52. Milán Marco, Lidia Pérez, Stephen M Cohen. Short-range cell interactions and cell survival in the Drosophila wing. Dev Cell. 2002 vol. 2 (6) pp. 797-805
- 53. Miller J, McLachlan A.D., Klug A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from Xenopus oocytes. EMBO J 1985 vol. 4 (6) pp. 1609-14
- 54. Minami M, N Kinoshita, Y Kamoshida, H Tanimoto, T Tabata. brinker is a target of Dpp in Drosophila that negatively regulates Dpp-dependent genes. Nature. 1999 vol. 398 (6724)pp. 242-6
- 55. Müller Bruno , Britta Hartmann, George Pyrowolakis, Markus Affolter, Konrad Basler. Conversion of an extracellular Dpp/BMP morphogen gradient into an inverse transcriptional gradient. Cell. 2003 vol. 113 (2) pp. 221-33
- 56. Muñoz-Descalzo S, Javier Terol, Nuria Paricio. Cabut, a C2H2 zinc finger transcription factor, is required during Drosophila dorsal closure downstream of JNK signaling. Dev Biol. 2005 vol. 287 (1) pp. 168-79
- 57. Nègre, N., Brown, C.D., Ma, L., Bristow, C.A., Miller, S.W., Wagner, U., Kheradpour, P., . Eaton, M.L., Loriaux, P., Sealfon, R., Li, Z., Ishii, H., Spokony, R.F., Chen, J., Hwang, L., Cheng, C., Auburn, R.P., Davis, M.B., Domanus, M., Shah, P.K., Morrison, A., Zieba, J., Suchy, S., Senderowicz, L., Victorsen, A., Bild, N.A., Grundstad, A.J., Hanley, D., Macalpine, D.M., Mannervik, M., Venken, K., Bellen, H., White, R., Gerstein, M., . Russell, S., Grossman, R.L., Ren, B., Posakony, J.W., Kellis, M., White, K.P. 2011. A cis-regulatory map of the *Drosophila* genome. Nature 471, 527-531
- 58. Nellen D, R Burke, G Struhl, K Basler. Direct and long-range action of a DPP morphogen

gradient. Cell. 1996 vol. 85 (3) pp. 357-68

- 59. Neumann CJ, S M Cohen. A hierarchy of cross-regulation involving Notch, wingless, vestigial and cut organizes the dorsal/ventral axis of the Drosophila wing. Development. 1996 vol. 122 (11) pp. 3477-85
- 60. Neumann CJ, SM Cohen. Long range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the Drosophila wing. Development. 1997. vol 124 pp. 871-880
- 61. Nien, C.Y., Liang, H.L., Butcher, S., Sun, Y., Fu, S., Gocha, T., Kirov, N., Manak, J.R., Rushlow,
  C. 2011. Temporal coordination of gene networks by zelda in the early *Drosophila* embryo.
  PLoS Genet. 7, e1002339
- 62. Ohlmeyer JT, D Kalderon. Hedgehog stimulates maturation of Cubitus interruptus into a labile transcriptional activator. Nature. 1998 vol. 396 (6713) pp. 749-53
- 63. Pavletich NP, Pabo CO. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 A. Science. 1991 vol. 252 (5007) pp. 809-17
- 64. Pearson, J.C., Watson, J.D., Crews S.T. 2012. *Drosophila melanogaster* Zelda and Singleminded collaborate to regulate an evolutionarily dynamic CNS midline cell enhancer. Dev. Biol. 366, 420-432
- 65. Pflugfelder, G.O., Schwarz, H., Roth, H., Poeck, B., Sigl, A., Kerscher, S., Jonschker, B. Pak, W.
  L., Heisenberg, M. 1990. Genetic and molecular characterization of the optomotor-blind gene locus in *Drosophila melanogaster*. Genetics 126, 91-104
- 66. Phelps C.B., Brand A.H. Ectopic gene expression in Drosophila using GAL4 system. 1998. Methods 14(4) 367-79
- 67. Purves et al., 1998. LIFE: The Science of Biology.
- 68. Raftery LA, D J Sutherland. TGF-beta family signal transduction in Drosophila development: from Mad to Smads. Dev Biol. 1999 vol. 210 (2) pp. 251-68
- 69. Rauskolb C, Correia T, Irvine KD. Fringe dependent separation of dorsal and ventral cells in

the Drosophila wing. Nature. 1999. 401 pp 476-480

- 70. Richter JD, Theurkauf WE. Development. The message is in the translation. Science. 2001 vol. 293 (5527) pp. 60-2
- 71. Rodríguez del Alamo D, Javier Terriente Felix, Fernando J Díaz-Benjumea. The role of the Tbox gene optomotor-blind in patterning the Drosophila wing. Dev Biol. 2004 vol. 268 (2) pp. 481-92
- 72. Rodriguez I. Drosophila TIEG is a modulator of different signalling pathways involved in wing patterning and cell proliferation. PLoS ONE. 2011 vol. 6 (4) pp. e18418
- 73. Rodríguez, D. d. A., Terriente F. J., Díaz-Benjumea, F.J. 2004. The role of the T-box gene optomotor-blind in patterning the *Drosophila* wing. Dev. Biol. 268, 481-492
- 74. Rulifson EJ, S S Blair. Notch regulates wingless expression and is not required for reception of the paracrine wingless signal during wing margin neurogenesis in Drosophila. Development. 1995 vol. 121 (9) pp. 2813-24
- 75. Sakamoto K, Ohara O, Takagi M, Takeda S, Katsube K. Intracellular cell-autonomous association of Notch and its ligands: a novel mechanism of Notch signal modification. Dev. Biol. 2002. 241 pp 313-326
- 76. Satija R, Bradley RK. The TAGteam motif facilitates binding of 21 sequence-specific transcription factors in the Drosophila embryo. Genome research. doi: 10.1101/gr.130682.111
- 77. Saunders A, Leighton J Core, Catherine Sutcliffe, John T Lis, Hilary L Ashe. Extensive polymerase pausing during Drosophila axis patterning enables high-level and pliable transcription. Genes Dev. 2013 vol. 27 (10) pp. 1146-58
- 78. Schaffter Tomas. Wing J project. EPFL. 2012.
- 79. Seto ES, Hugo J Bellen. The ins and outs of Wingless signaling. Trends Cell Biol. 2004 vol. 14(1) pp. 45-53

### - 142 - Βιβλιογραφία

- 80. Shen Jie and Christian Dahmann. The role of Dpp signaling in maintaining the Drosophila anteroposterior compartment boundary. Dev Biol. 2005 vol. 279 (1) pp. 31-43
- 81. Shen, J., Dorner, C., Bahlo, A., Pflugfelder, G.O. 2008. optomotor-blind suppresses instability at the A/P compartment boundary of the *Drosophila* wing. Mech. Dev. 125, 233-246
- 82. Shen J, Christian Dahmann, Gert O Pflugfelder. 2010. Spatial discontinuity of Optomotorblind expression in the Drosophila wing imaginal disc disrupts epithelial architecture and promotes cell sorting. BMC Dev Biol. 2010 vol. 10 pp. 23
- 83. Singer MA, A Penton, V Twombly, F M Hoffmann, W M Gelbart. Signaling through both type I DPP receptors is required for anterior-posterior patterning of the entire Drosophila wing. Development. 1997 vol. 124 (1) pp. 79-89
- 84. Sivasankaran, R., Vigano, M.A., Müller, B. Affolter, M. Basler, K. 2000. Direct transcriptional control of the Dpp target omb by the DNA binding protein Brinker. EMBO J. 19, 6162-6172
- 85. Staudt, N., Fellert, S., Chung, H.R., Jäckle, H., Vorbrüggen G. 2006. Mutations of the Drosophila zinc finger-encoding gene vielfältig impair mitotic cell divisions and cause improper chromosome segregation. Mol. Biol. Cell 17, 2356-2365
- 86. Staveley B.E. Molecular and Developmental Biology Course. BIOL3530. Memorial University of Newfoundland. 2011.
- 87. Strigini M, Cohen SM. Formation of morphogen gradients in the Drosophila wing. Semin Cell Dev Biol. 1999 vol. 10 (3) pp. 335-44
- 88. Sullivan W, Theurkauf WE. The cytoskeleton and morphogenesis of the early Drosophila embryo. Curr Opin Cell Biol. 1995 vol. 7 (1) pp. 18-22
- 89. Tabata T, S Eaton, T B Kornberg. The Drosophila hedgehog gene is expressed specifically in posterior compartment cells and is a target of engrailed regulation. Genes Dev. 1992 vol. 6 (12B) pp. 2635-45

- 90. Tabata T, T B Kornberg. Hedgehog is a signaling protein with a key role in patterning Drosophila imaginal discs. Cell. 1994 vol. 76 (1) pp. 89-102
- 91. Tabata, T., 2001. Genetics of morphogen gradients. Nat. Rev., Genet. 2, 620 630
- 92. Tadepally H.D., Burger G. and Aubry M. Evolution of C2H2-zinc finger genes and subfamilies in mammals: Species-specific duplication and loss of clusters, genes and effector domains. *BMC Evolutionary Biology* 2008, 8:176
- 93. Tadros W, Lipshitz HD. The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. Development.2009 vol. 136 (18) pp. 3033-42
- 94. Teleman AA, S M Cohen. Dpp gradient formation in the Drosophila wing imaginal disc. Cell. 2000 vol. 103 (6) pp. 971-80
- 95. ten Bosch JR, Benavides JA, Cline TW. The TAGteam DNA motif controls the timing of Drosophila pre-blastoderm transcription. Development. 2006 vol. 133 (10) pp. 1967-77
- 96. The modENCODE Consortium 2010. Identification of Functional Elements and Regulatory Circuits by Drosophila modENCODE. Science 330, 1787-1797
- 97. Watt F, Molloy PL. Specific cleavage of transcription factors by the thiol protease, mcalpain. Nucleic Acids Res. 1993 vol. 21(22) pp. 5092-100.
- 98. Xu T, Rubin GM. Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues. Development. 1993 vol. 117 (4) pp. 1223-37
- 99. Yang M, May WS, Ito T. JAZ requires the double-stranded RNA-binding zinc finger motifs for nuclear localization. J Biol Chem. 1999 vol. 274 (39) pp. 27399-406.
- 100. Zecca M, K Basler, G Struhl. Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the Drosophila wing. Development. 1995 vol. 121 (8) pp. 2265-78
- 101. Zecca M, K Basler, G Struhl. Direct and long-range action of a Wingless morphogen gradient. Cell. 1996. vol 87 pp. 833-844
- 102. Πάλμου Ακριβή. Μοριακή και γενετική ανάλυση του γονιδίου *ls* (lethal Sakatis) στη
Drosophila melanogaster. Διατριβή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης. Πανεπιστήμιο Πατρών. Τμήμα Βιολογίας. Τομέας Γενετικής, Βιολογίας κυττάρου και Ανάπτυξης. 2003.

# Χρήσιμες διευθύνσεις του διαδικτύου:

The Interactive Fly: <u>http://www.sdbonline.org/fly/aimain/1aahome.htm</u>

FlyBase: <u>http://flybase.org/</u>

SIB Bioinformatics Research Portal: <a href="http://www.expasy.org/">http://www.expasy.org/</a>

Sequence alignment tools/Bioinformatics portal: <u>http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/</u>

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

# Παραρτήματα |

# Παράρτημα 1. Εκκινητές των αντιδράσεων PCR

Λίστα εκκινητών	5'> 3'
Μετάγραφα Zelda	
ZldA	CATATGCACCGCTCTCGCCGTA
ZldB	TCTGGGCGTTCGCTGGGTACAT
ZldC	CGTGTGTTGTTCGTTCCTCCCG
ZldD	CAGTGTGCATGTGTTTGTTTTTTTCCG
ZIdE	TTGGAATGCCTCCCAGTCCG
Κλωνοποίηση <i>Zelda</i> σε φορέα pUAST	
LSF	GCCGGAATTCATGACGAGCATTAAGACCGAGATG
LSR	GCGGGGTACCTCAGTAGAGCTCTATGCTCTTCTCGATCAT
LSF2	ATAGGGAATTGGGAATTCATGACGAGCATTAAGACC
LSR2	GGAGATCTGCGGGGTACCTCAGTAGAGCTCTATGCTCTTCTCG
	АТ
Κλωνοποίηση περιοχών της ZELDA	
σε φορεις εκφρασης	
SPF	CCATGGGATTGGGCGTGGGGCTG
SPR	AAGCTTCTCGTTCGACTTCCAGGTGGC
EXPZF	CCATGGCCAAGAAGCGGCGTGGC
EXPZR	AAGCTTATTGACGGCCTGGACAAGAGC

EXPZ1F	CCATGGTGCTGCCGGCCAACAGC
EXPZ1R	AAGCTTTGAGGCCGAGTACTGGGACATGG
ChIP	
PTC F	GAATTCGATGCGTGATGCGAAGATTTC
PTC R	AAGCTTATGAAGACGGACTCAGAAGAA
OMB F	GAATTCGTGCTTCTCGCAGCCGCTTAA
OMBR	AAGCTTAGGTGGCAGAATCGCAAAGAA
DPP F	GAATTCTGGCTTTGGCTCGAAGAGAGA
DPP R	AAGCTTAAAACTGAATGAGCGTCCAAA
FTZ F	GAATTCAATGTTATCCTTTGGCCGCCC
FTZ R	AAGCTTATATTACCTACCCATCGCGCC
EN PROM F	GAATTCATTGGCAAGAGAGAGAGAGAG
EN PROM R	AAGCTTATAACGCGAGAGCCGATTGAA
RT-PCR ελέγχου έκφρασης γονιδίων	
εμβρυϊκών δίσκων φτερού	
SALF	CAGCGCCGACAAAGACATCGGT
SALR	CAGTCGAGGGCACCGCACTG
DLF	CAACGAGGGTCGCTGCA
DLR	AGCGAGAAGGTACCCGGCCA
DPPF	GCCTTGGCTCCAACCTTTTGGC
DPPR	GCGCATGGTCGCTTGCAACTATCT
PTCF	GCAGACGAACGGCAGGCACT

PTCR	TGCCACGCGCTTTGCCCTTA
CIF	ACAGGCGGTTGGGTAGCCCT
CIR	TCAACGAGAATGCTGCCGCTGG
CBTF	TAGGCAAACAGGCCAAGCCCC
CBTR	GCGGCTGACAAGGCCGTTCA
OMBF	ACCAGCACTCCGCAGCTCTGG
OMBR	GGCAACAAATGCGGCGACGG
WGF	AAACGCCGCGATCGAACCGAT
WGR	GGCAATGCCCCACCATGG
VGF	GCAGCGAAGCTGAAGCACGC
VGR	AGGGCGCGGGAAAAGTGCTC
BRKF	CGACGTCGCTGCTTTGGGGA
BRKR	CTGGCCGTGGCCCGTTGATT
Εκκινητές ακτίνης (Act42A)	
ACTF	ATGACGCACCGCGTGCAGTT
ACTR	GAGTTGTAGGTGGTCTCGTGAATG

# Παράρτημα 2. Χάρτες των φορέων κλωνοποίησης







# - 151 - Παραρτήματα



...KS primer binding site SK primer binding site SK primer binding site

# Παράρτημα 3. Πρωτόκολλα απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων απο kit εμπορίου



# Protocol: Plasmid or Cosmid DNA Purification using QIAGEN Plasmid Mini Kit

This protocol is designed for preparation of up to 20 µg of high-copy plasmid or cosmid DNA using the QIAGEN Plasmid Mini Kit. For additional protocols, such as for cosmid, low-copy-number plasmid, BACs, PACs, P1s, and double-stranded M13 replicative form purification, see the recommendations at <u>www.qiagen.com/goto/plasmidinfo</u>.

# Important notes before starting

- New users are advised to familiarize themselves with the detailed protocol provided in this handbook. In addition, extensive background information is provided on our plasmid resource page <u>www.qiagen.com/goto/plasmidinfo</u>.
- Optional: Remove samples at indicated steps to monitor the procedure on an analytical gel (see page 41)

# Things to do before starting

- Add the provided RNase A solution to Buffer P1 before use. Use 1 vial RNase A (centrifuge briefly before use) per bottle Buffer P1 for final concentration of 100 µg/ml.
- Check Buffer P2 for SDS precipitation due to low storage temperatures. If necessary, dissolve the SDS by warming to 37°C.
- Pre-chill Buffer P3 at 4°C.
- Optional: Add the provided LyseBlue reagent to Buffer P1 and mix before use. Use 1 vial LyseBlue reagent per bottle Buffer P1 for a final dilution of 1:1000 (e.g., 10 µl LyseBlue into 10 ml Buffer P1). LyseBlue provides visual identification of optimum buffer mixing thereby preventing the common handling errors that lead to inefficient cell lysis and incomplete precipitation of SDS, genomic DNA, and cell debris. For more details see "Using LyseBlue reagent" on page 14.

# Procedure

 Pick a single colony from a freshly streaked selective plate and inoculate a starter culture of 2–5 ml LB medium containing the appropriate selective antibiotic. Incubate for approximately 8 h at 37°C with vigorous shaking (approx. 300 rpm).

Use a tube or flask with a volume of at least 4 times the volume of the culture.

 Dilute the starter culture 1/500 to 1/1000 into 3 ml selective LB medium. Grow at 37°C for 12–16 h with vigorous shaking (approx. 300 rpm).

Use a flask or vessel with a volume of at least 4 times the volume of the culture. The culture should reach a cell density of approximately  $3-4 \times 10^{\circ}$  cells per milliliter, which typically corresponds to a pellet wet weight of approximately 3 g/liter medium.

- Harvest the bacterial cells by centrifugation at 6000 x g for 15 min at 4°C.
  - If you wish to stop the protocol and continue later, freeze the cell pellets at -20°C.
- Resuspend the bacterial pellet in 0.3 ml of Buffer P1.

Ensure that RNase A has been added to Buffer P1.

If LyseBlue reagent has been added to Buffer P1, vigorously shake the buffer bottle before use to ensure LyseBlue particles are completely resuspended. The bacteria should be resuspended completely by vortexing or pipetting up and down until no cell clumps remain.

 Add 0.3 ml of Buffer P2, mix thoroughly by vigorously inverting the sealed tube 4–6 times, and incubate at room temperature (15–25°C) for 5 min.

Do not vortex, as this will result in shearing of genomic DNA. The lysate should appear viscous. Do not allow the lysis reaction to proceed for more than 5 min. After use, the bottle containing Buffer P2 should be closed immediately to avoid acidification from CO<sub>2</sub> in the air.

If LyseBlue has been added to Buffer P1, the cell suspension will turn blue after addition of Buffer P2. Mixing should result in a homogeneously colored suspension. If the suspension contains localized colorless regions or if brownish cell clumps are still visible, continue mixing the solution until a homogeneously colored suspension is achieved.

 Add 0.3 ml of chilled Buffer P3, mix immediately and thoroughly by vigorously inverting 4–6 times, and incubate on ice for 5 min.

Precipitation is enhanced by using chilled Buffer P3 and incubating on ice. After addition of Buffer P3, a fluffy white material forms and the lysate becomes less viscous. The precipitated material contains genomic DNA, proteins, cell debris, and KDS. The lysate should be mixed thoroughly to ensure even potassium clodecyl sulphate precipitation. If the mixture still appears viscous, more mixing is required to completely neutralize the solution.

If LyseBlue reagent has been used, the suspension should be mixed until all trace of blue has gone and the suspension is colorless. A homogeneous colorless suspension indicates that the SDS has been effectively precipitated.

QIAGEN Plasmid Purification Handbook 04/2012

 Centrifuge at maximum speed in a microcentrifuge for 10 min. Remove supernatant containing plasmid DNA promptly.

Before loading the centrifuge, the sample should be mixed again. Centrifugation should be performed at maximum speed in 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tubes (e.g., 10,000-13,000 rpm in a microcentrifuge). Maximum speed corresponds to  $14,000-18,000 \times g$  for most microcentrifuges. After centrifugation, the supernatant should be clear. If the supernatant is not clear, a second, shorter centrifugation should be carried out to avoid applying any suspended or particulate material to the column. Suspended material (which causes the sample to appear turbid) will clog the column and reduce or eliminate flow.

Optional: Remove a 50 µl sample from the cleared lysate and save it for an analytical gel (sample 1).

 Equilibrate a QIAGEN-tip 20 by applying 1 ml Buffer QBT, and allow the column to empty by gravity flow.

Place QLAGEN-tips into a QLArack over the waste tray or use the tip holders provided with each kit (see "Setup of QLAGEN-tips" page 13). Flow of buffer will begin automatically by reduction in surface tension due to the presence of detergent in the equilibration buffer. Allow the QLAGEN-tip to drain completely. QLAGEN-tips can be left unattended, since the flow of buffer will stop when the meniscus reaches the upper frit in the column.

Apply the supernatant from step 7 to the QIAGEN-tip 20 and allow it to enter the resin by gravity flow.

The supernatant should be loaded onto the QLAGEN4tip promptly. If it is left too long and becomes cloudy due to further precipitation of protein, it must be centrifuged again before loading to prevent clogging of the QLAGEN4tip.

Optional: Remove a 50 µl sample of the flow-through and save for an analytical gel (sample 2).

10. Wash the QIAGEN-tip 20 with 2 x 2 ml Buffer QC.

Allow Buffer QC to move through the QIAGEN tip by gravity flow.

Optional: Remove a 220 µl sample of the combined wash fractions and save for an analytical gel (sample 3).

11. Elute DNA with 0.8 ml Buffer QF.

Collect the eluate in a 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tubes (not supplied).

Note: For constructs larger than 45–50 kb, prewarming the elution buffer to 65°C may help to increase yield.

Optional: Remove a 45 µl sample of the eluate and save for an analytical gel (sample 4).

GIAGEN Plasmid Purification Handbook 04/2012

 Precipitate DNA by adding 0.7 volumes (0.56 ml per 0.8 ml of elution volume) of room-temperature isopropanol to the eluted DNA. Mix and centrifuge immediately at ≥15,000 x g rpm for 30 min in a microcentrifuge. Carefully decant the supernatant.

All solutions should be at room temperature to minimize salt precipitation. Isopropanol pellets have a glassy appearance and may be more difficult to see than the fluffy, salt-containing pellets that result from ethanol precipitation. Marking the outside of the tube before centrifugation allows the pellet to be easily located. Isopropanol pellets are also more locsely attached to the side of the tube, and care should be taken when removing the supernatant.

 Wash DNA pellet with 1 ml of 70% ethanol and centrifuge at 15,000 x g for 10 min. Carefully decant the supernatant without disturbing the pellet.

The 70% ethanol removes precipitated salt and replaces isopropanol with the more volatile ethanol, making the DNA easier to redissolve.

 Air-dry the pellet for 5–10 min, and redissolve the DNA in a suitable volume of buffer (e.g., TE buffer, pH 8.0, or 10mM Tris-Cl, pH 8.5)

Redissolve the DNA pellet by rinsing the walls to recover the DNA. Pipetting the DNA up and down to promote resuspension may cause shearing and should be avoided. Overdrying the pellet will make the DNA difficult to redissolve. DNA dissolves best under slightly alkaline conditions; it does not easily dissolve in acidic buffers.

### Determination of yield

To determine the yield, DNA concentration should be determined by both UV spectrophotometry at 260 nm and quantitative analysis on an agarose gel. For reliable spectrophotometric DNA quantification, A<sub>250</sub> readings should lie between 0.1 and 1.0.

### Agarose gel analysis

We recommend removing and saving aliquots during the purification procedure (samples 1–4). If the plasmid DNA is of low yield or quality, the samples can be analyzed by agarose gel electrophoresis to determine the stage of the purification procedure where the problem occurred (see page 41).

# Protocol: Purification of Total RNA from Animal Tissues

This protocol requires the RNeasy Mini Kit or RNeasy Protect Mini Kit.

### Determining the correct amount of starting material

It is essential to use the correct amount of starting material in order to obtain optimal RNA yield and purity. A maximum amount of 30 mg fresh or frozen tissue or 15–20 mg RNA/ater stabilized tissue (which is partially dehydrated) can generally be processed. For most tissues, the RNA binding capacity of the RNeasy spin column and the lysing capacity of Buffer RLT will not be exceeded by these amounts. Average RNA yields from various tissues are given in Table 2 (page 19).

Some tissues, such as spleen, parts of brain, lung, and thymus are more difficult to lyse or tend to form precipitates during RNA purification. The volume of Buffer RLT may need to be increased to facilitate complete homogenization and to avoid significantly reduced RNA yields, DNA contamination, or clogging of the RNeasy spin column. See the procedure below for details.

RNA yields from fibrous tissues, such as skeletal muscle, heart, and skin, may be low due to the abundance of contractile proteins, connective tissue, and collagen. For maximum RNA yields from these tissues, we recommend using the RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit instead. See page 76 for ordering information.

Greater RNA yields from fatty tissues, such as brain and adipose tissue, can be achieved using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit, which uses QIAzol Lysis Reagent for optimal tissue lysis. See page 76 for ordering information.

If there is no information about the nature of your starting material, we recommend starting with no more than 10 mg tissue. Depending on RNA yield and purity, it may be possible to use up to 30 mg tissue in subsequent preparations.

# Do not overload the RNeasy spin column, as this will significantly reduce RNA yield and quality.

Weighing tissue is the most accurate way to quantitate the amount of starting material. As a guide, a 3 mm cube (27 mm²) of most animal tissues weighs 30–35 mg.

### Important points before starting

- If using the RNeasy Kit for the first time, read "Important Notes" (page 18).
- If working with RNA for the first time, read Appendix A (page 63).
- For optimal results, stabilize harvested tissues immediately in RNA/ater RNA Stabilization Reagent (see protocol on page 36). Tissues can be stored in the reagent for up to 1 day at 37°C, 7 days at 15–25°C, or 4 weeks at 2–8°C, or archived at –20°C or –80°C.

39

Animal Tissues

- Fresh, frozen, or RNA/ater stabilized tissues can be used. Tissues can be stored at -70°C for several months. Flash-freeze tissues in liquid nitrogen, and immediately transfer to -70°C. Do not allow tissues to thaw during weighing or handling prior to disruption in Buffer RLT. Homogenized tissue lysates from step 4 can also be stored at -70°C for several months. Incubate frozen lysates at 37°C in a water bath until completely thawed and salts are dissolved before continuing with step 5. Avoid prolonged incubation, which may compromise RNA integrity.
- If desired, more than 30 mg tissue can be disrupted and homogenized at the start of the procedure (increase the volume of Buffer RLT proportionately). Use a portion of the homogenate corresponding to no more than 30 mg tissue for RNA purification, and store the rest at -80°C.
- Buffer RLT may form a precipitate upon storage. If necessary, redissolve by warming, and then place at room temperature (15–25°C).
- Buffer RLT and Buffer RW1 contain a guanidine salt and are therefore not compatible with disinfecting reagents containing bleach. See page 8 for safety information.
- Perform all steps of the procedure at room temperature. During the procedure, work quickly.
- Perform all centrifugation steps at 20–25°C in a standard microcentrifuge. Ensure that the centrifuge does not cool below 20°C.

### Things to do before starting

β-Mercaptoethanol (β-ME) must be added to Buffer RLT before use. Add 10 µl β-ME per 1 ml Buffer RLT. Dispense in a fume hood and wear appropriate protective clothing. Buffer RLT containing β-ME can be stored at room temperature for up to 1 month.

Alternatively, add 20 µl of 2 M dithiothreitol (DTT) per 1 ml Buffer RLT. The stock solution of 2 M DTT in water should be prepared fresh or frozen in single-use aliquots. Buffer RLT containing DTT can be stored at room temperature for up to 1 month.

- Buffer RPE is supplied as a concentrate. Before using for the first time, add 4 volumes of ethanol (96–100%) as indicated on the bottle to obtain a working solution.
- If performing optional on-column DNase digestion, prepare DNase I stock solution as described in Appendix D (page 69).

# - 160 - Παραρτήματα

 Excise the tissue sample from the animal or remove it from storage. Remove RNA*later* stabilized tissues from the reagent using forceps. Determine the amount of tissue. Do not use more than 30 mg.

Weighing tissue is the most accurate way to determine the amount.

Note: If the tissues were stored in RNA*lat*er Reagent at -20°C, be sure to remove any crystals that may have formed.

- Follow either step 2a or 2b.
- 2a. For RNA/ater stabilized tissues:

If using the entire tissue, place it directly into a suitably sized vessel for disruption and homogenization, and proceed to step 3.

If using only a portion of the tissue, cut it on a clean surface. Weigh the piece to be used, and place it into a suitably sized vessel for disruption and homogenization. Proceed to step 3.

RNA in RNA/ater stabilized tissues is protected during cutting and weighing of tissues at ambient temperature (15–25°C). It is not necessary to cut the tissues on ice or dry ice or in a refrigerated room. Remaining tissues can be stored in RNA/ater RNA Stabilization Reagent. Previously stabilized tissues can be stored at –80°C without the reagent.

### 2b. For unstabilized fresh or frozen tissues:

If using the entire tissue, place it directly into a suitably sized vessel for disruption and homogenization, and proceed immediately to step 3.

If using only a portion of the tissue, weigh the piece to be used, and place it into a suitably sized vessel for disruption and homogenization. Proceed immediately to step 3.

RNA in harvested tissues is not protected until the tissues are treated with RNA*later* RNA Stabilization Reagent, flash-frozen, or disrupted and homogenized in step 3. Frozen tissues should not be allowed to thaw during handling. The relevant procedures should be carried out as quickly as possible.

Note: Remaining fresh tissues can be placed into RNA/ater RNA Stabilization Reagent to stabilize RNA (see protocol on page 36). However, previously frozen tissues thaw too slowly in the reagent, preventing the reagent from diffusing into the tissues quickly enough to prevent RNA degradation.

 Disrupt the tissue and homogenize the lysate in Buffer RLT (do not use more than 30 mg tissue) according to step 3a, 3b, 3c, or 3d.

See "Disrupting and homogenizing starting material", pages 20–23, for more details on disruption and homogenization.

Note: Ensure that β-ME is added to Buffer RLT before use (see "Things to do before starting").

After storage in RNA*later* RNA Stabilization Reagent, tissues may become slightly harder than fresh or thawed tissues. Disruption and homogenization using standard methods is usually not a problem. For easier disruption and homogenization, we recommend using 600 µl Buffer RLT.

Note: Incomplete homogenization leads to significantly reduced RNA yields and can cause clogging of the RNeasy spin column. Homogenization with the Tissuelyser and rotor-stator homogenizers generally results in higher RNA yields than with other methods.

### Table 8. Volumes of Buffer RLT for Tissue Disruption and Homogenization

Amount of starting material (mg)	Volume of Buffer RLT (µl)
<20	350 or 600*
20–30	600

\* Use 600 µl Buffer RLT for tissues stabilized in RNA/ater RNA Stabilization Reagent or for difficultto-lyse tissues.

3a. Disruption and homogenization using a rotor-stator homogenizer:

Place the weighed (fresh, frozen, or RNA*later* stabilized) tissue in a suitably sized vessel. Add the appropriate volume of Buffer RLT (see Table 8). Immediately disrupt and homogenize the tissue using a conventional rotor–stator homogenizer until it is uniformly homogeneous (usually 20–40 s). Proceed to step 4.

3b. Disruption using a mortar and pestle followed by homogenization using a QIAshredder homogenizer:

Immediately place the weighed (fresh, frozen, or RNA/ater stabilized) tissue in liquid nitrogen, and grind thoroughly with a mortar and pestle. Decant tissue powder and liquid nitrogen into an RNase-free, liquid-nitrogen-cooled, 2 ml microcentrifuge tube (not supplied). Allow the liquid nitrogen to evaporate, but do not allow the tissue to thaw.

Add the appropriate volume of Buffer RLT (see Table 8). Pipet the lysate directly into a QIAshredder spin column placed in a 2 ml collection tube, and centrifuge for 2 min at full speed. Proceed to step 4.

3c. Disruption using a mortar and pestle followed by homogenization using a needle and syringe:

Immediately place the weighed (fresh, frozen, or RNA/ater stabilized) tissue in liquid nitrogen, and grind thoroughly with a mortar and pestle. Decant tissue powder and liquid nitrogen into an RNase-free, liquid-nitrogen-cooled, 2 ml microcentrifuge tube (not supplied). Allow the liquid nitrogen to evaporate, but do not allow the tissue to thaw.

- 162 - Παραρτήματα

Add the appropriate volume of Buffer RLT (see Table 8), and homogenize by passing the lysate at least 5 times through a blunt 20-gauge needle fitted to an RNase-free syringe. Proceed to step 4.

- Disruption and homogenization using the TissueLyser: See the TissueLyser Handbook. Then proceed to step 4.
- Centrifuge the lysate for 3 min at full speed. Carefully remove the supernatant by pipetting, and transfer it to a new microcentrifuge tube (not supplied). Use only this supernatant (lysate) in subsequent steps.

In some preparations, very small amounts of insoluble material will be present after the 3 min centrifugation, making the pellet invisible.

 Add 1 volume of 70% ethanol\* to the cleared lysate, and mix immediately by pipetting. <u>Do not centrifuge</u>. Proceed immediately to step 6.

Note: The volume of lysate may be less than 350 µl or 600 µl due to loss during homogenization and centrifugation in steps 3 and 4.

Note: Precipitates may be visible after addition of ethanol. This does not affect the procedure.

6. Transfer up to 700 µl of the sample, including any precipitate that may have formed, to an RNeasy spin column placed in a 2 ml collection tube (supplied). Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at ≥8000 x g (≥10,000 rpm). Discard the flow-through.<sup>†</sup>

Reuse the collection tube in step 7.

If the sample volume exceeds 700 µl, centrifuge successive aliquots in the same RNeasy spin column. Discard the flow-through after each centrifugation.<sup>†</sup>

**Optional**: If performing optional on-column DNase digestion (see "Eliminating genomic DNA contamination", page 23), follow steps D1–D4 (page 69) after performing this step.

 Add 700 µl Buffer RW1 to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at ≥8000 x g (≥10,000 rpm) to wash the spin column membrane. Discard the flow-through.<sup>†</sup>

Reuse the collection tube in step 8.

Note: After centrifugation, carefully remove the RNeasy spin column from the collection tube so that the column does not contact the flow-through. Be sure to empty the collection tube completely.

Skip this step if performing optional on-column DN ase digestion (page 69).

\* Using 50% ethanol (instead of 70% ethanol) may increase RNA yields from liver samples.

Flow-through contains Buffer RLT or Buffer RW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 8 for safety information.

RNeasy Mini Handbook 09/2010

 Add 500 µl Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at ≥8000 x g (≥10,000 rpm) to wash the spin column membrane. Discard the flow-through.

Reuse the collection tube in step 9.

Note: Buffer RPE is supplied as a concentrate. Ensure that ethanol is added to Buffer RPE before use (see "Things to do before starting").

 Add 500 µl Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 2 min at ≥8000 x g (≥10,000 rpm) to wash the spin column membrane.

The long centrifugation dries the spin column membrane, ensuring that no ethanol is carried over during RNA elution. Residual ethanol may interfere with downstream reactions.

Note: After centrifugation, carefully remove the RNeasy spin column from the collection tube so that the column does not contact the flow-through. Otherwise, carryover of ethanol will occur.

 Optional: Place the RNeasy spin column in a new 2 ml collection tube (supplied), and discard the old collection tube with the flow-through. Close the lid gently, and centrifuge at full speed for 1 min.

Perform this step to eliminate any possible carryover of Buffer RPE, or if residual flow-through remains on the outside of the RNeasy spin column after step 9.

- Place the RNeasy spin column in a new 1.5 ml collection tube (supplied). Add 30-50 µl RNase-free water directly to the spin column membrane. Close the lid gently, and centrifuge for 1 min at ≥8000 x g (≥10,000 rpm) to elute the RNA.
- If the expected RNA yield is >30 µg, repeat step 11 using another 30–50 µl RNasefree water, or using the eluate from step 11 (if high RNA concentration is required). Reuse the collection tube from step 11.

If using the eluate from step 11, the RNA yield will be 15–30% less than that obtained using a second volume of RNase-free water, but the final RNA concentration will be higher.

44

RNeasy Mini Handbook 09/2010

MACHEREY-NAGEL - 01/2012, Rev. 02

### 5.2DNA extraction from agarose gels

## Before starting the preparation:

Check if Wash Buffer NT3 was prepared according to section 3.

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up

#### Excise DNA fragment/solubilize gel slice 1

Note: Minimize UV exposure time to avoid damaging the DNA. Refer to section 2.5 for more tips on agarose gel extraction.

Take a clean scalpel to excise the DNA fragment from an agarose gel. Remove all excess agarose.

Determine the weight of the gel slice and transfer it to a clean tube.

For each 100 mg of agarose gel < 2% add 200 µL Buffer NTL

For gels containing > 2% agarose, double the volume of Buffer NTI.

Incubate sample for 5-10 min at 50 °C. Vortex the sample briefly every 2-3 min until the gel slice is completely dissolved!

#### Bind DNA 2

Place a NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column into a Collection Tube (2 mL) and load up to 700 µL sample.

Centrifuge for 30 s at 11,000 x g. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.

Load remaining sample if necessary and repeat the centrifugation step.

#### 3 Wash silica membrane

Add 700 µL Buffer NT3 to the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column. Centrifuge for 30 s at 11,000 x g. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.



+ 200 µL NTI per 100 mg gel

50 °C 5-10 min



Load sample



+ 700 µL NT3







MACHEREY-NAGEL - 01/2012, Rev. 02

# Παράρτημα 4. GAL4 και στελέχη UAS

# GAL4 (Bloomington Drosophila Stock Center):

3045: P{w[+mW.hs]=GawB}bi[md653], y[1] w[1118]. Expresses GAL4 in a bi[+] (= omb[+]) pattern.

1553: w[\*]; wg[Sp-1]/CyO; P{w[+mW.hs]=GAL4-dpp.blk1}40C.6/TM6B, Tb[1]. Expresses GAL4 in dpp[+] pattern.

3039: y[1] w[1118]; P{w[+mW.hs]=GawB}pnr[MD237]/TM3, P{w[+mC]=UAS-y.C}MC2, Ser[1]. Expresses GAL4 in dorsal cells along the length of the fly in the **pnr[+] pattern**.

2017: w[\*]; P{w[+mW.hs]=GawB}ptc[559.1]. Expresses GAL4 in **ptc[+] pattern.** 

5818: w[\*]; P{w[+mW.hs]=GawB}459.2. GAL4 expressed in **salm pattern**: broad stripe across wing disc perpendicular to prospective wing margin.

8222: y[1] w[1118]; P{w[+mC]=vgM-GAL4.Exel}2. Expresses GAL4 in the wing imaginal disc in the region of the future wing margin (=**vestigial gene "margin" enhancer**).

25757: P{w[+mC]=UAS-Dcr-2.D}1, w[1118]; P{w[+mW.hs]=GawB}bbg[C96]. Expresses Dcr-2 in the portion of the wing imaginal disc that gives rise to the **dorsal-ventral margin**.

32547: w[\*]; P{w[+mW.hs]=GawB}c556/CyO. Expresses GAL4 in wing disc in discrete spots.

2077: w[\*]; P{w[+mC]=GAL4-Hsp70.PB}2. Heat shock inducible GAL4.

3041: y[1] w[1118]; P{w[+mW.hs]=GawB}ap[md544]/CyO. Expresses GAL4 in an ap[+] pattern.

8760: w[\*]; P{w[+mC]=GAL4-elav.L}3. Expresses GAL4 in the nervous system.

30564: w[\*]; P{w[+mW.hs]=en2.4-GAL4}e16E. Expresses GAL4 in the posterior compartment of embryonic segments in the pattern of the engrailed gene.

# Στελέχη UAS

UAS-Zelda, ένθεση στο χρωμόσωμα 3. (The Best Gene Co.) UAS-Zelda RNAi, ένθεση στο χρωμόσωμα 3. (VDRC, Transformant ID: 38707) UAS-NΔE[B7D]/CyO, activated Notch, χρωμόσωμα 2. UAS-NRNAi[14E], χρωμόσωμα X. UAS-actin GFP, χρωμόσωμα 2.

# Παράρτημα 5. Αντισώματα

Αντίσωμα Πρωτογενές	Συγκέντρωση. (Ανεφέρεται σε πειράματα ανοσοφθορισμού, εκτός αν διευκρινίζεται διαφορετικά)
mouse anti-zelda (GenScript)	1:30 / 1:300 ανοσοαποτύπωση κατά Western
rabbit anti-zelda (znf)	1:300 ανοσοαποτύπωση κατά Western
rabbit anti-zelda (sp)	1:300 ανοσοαποτύπωση κατά Western
mouse anti-Patched (DSHB)	1:200
mouse anti-Wingless (DSHB)	1:50
mouse anti-Smoothened (DSHB)	1:200
mouse anti-Delta (DSHB)	1:100
mouse anti-Notch(IC) (C. Delidakis)	1:100
mouse anti-Cut (DSHB)	1:100
mouse anti-Frizzled (DSHB)	1:100
rabbit anti-omb (G.O. Pflugfelder)	1:10

 $\Delta HMO\Sigma IEY\Sigma EI\Sigma \Sigma E \Pi EPIO\Delta IKA (PEER REVIEWED) \}$ 

### Biochemical and Biophysical Research Communications 438 (2013) 329-333



# The embryonic transcription factor Zelda of Drosophila melanogaster is also expressed in larvae and may regulate developmentally important genes

### Panagiotis Giannios, Sonia G. Tsitilou\*

Department of Biochemistry & Molecular Biology, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, 15701 Athens, Greece

ARTICLE INFO	A B S T R A C T
Article history: Received 7 July 2013 Available online 24 July 2013	The transcription factor Zelda plays a pivotal role in promoting the maternal to zygotic transition during embryogenesis in <i>Drosophila melanogaster</i> . However, little is known about its role later in development Here we are showing that Zelda is essential for proper wing development through gain and loss of functions of the transmission of the providence of the providen
Keywords: Drosophila melanogaster Zelda (Zld) Larval wing disc	instar larvae and the production of 2 protein isoforms of ~180 and ~70 kD was detected in the same tissue. In ChIP experiments using larval wing discs, Zelda was found to bind to a region of the <i>optomotorblind</i> gene, suggesting an interaction with a Dpp target that promotes wing growth and patterning. © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

# 1. Introduction

The Drosophila zinc finger transcription factor Zelda (Zygotic early Drosophila activator, Zld) appears to play a major role as a regulator of genome activation in the earliest stages of Drosophila development. It was shown to bind to a sequence motif referred to as a TAGteam site and it was demonstrated to function as a key transcriptional activator during the maternal-to-zygotic transition - MZT [1]. ChIP-Seq data revealed Zld's binding to a significant number of these sites during embryonic development and marks regions that are later bound by zygotically expressed transcription factors, suggesting that it can also be part of the machinery that controls the sequence of events following the MZT [2,3]. Moreover, it has also been proposed that Zelda ensures coordinated gene expression during embryonic development either by increasing chromatin accessibility for several other transcription factors, or by being involved in the polymerase pausing mechanism [3]. However, its exact mechanism of action during embryogenesis remains to be further elucidated.

Zelda was also shown to be expressed in larval and pupal stages [4] indicating a possible involvement in the regulation of molecular events throughout the developmental process. However, no data exist to date regarding its potential function in post embryonic development.

In this study, we found that overexpression or knock down of zld in larval wing discs using the GAL4/UAS system, resulted in

strong impaired phenotypes, an indication of its essential role in wing growth. For this reason we analyzed zld's expression in the developing larval wing discs. Alternatively spliced transcripts of zld encoding proteins lacking the 3 of 4 C-terminal zinc fingers, that were previously reported to be CNS specific variants [5], are shown here to be also produced in wing discs, together with the full length transcripts and a previously annotated transcript RC, that is not currently listed in FlyBase. Western blot analysis in wing discs and other larval tissue extracts, revealed the presence of two protein isoforms of about 180 and 70 kD. Their production is prominent in the imaginal wing discs.

CrossMark

Chromatin immunoprecipitation assays using larval wing discs revealed that Zelda binds to an intronic region of the optomotorblind (omb) gene, a downstream target of the Dpp pathway which is involved in tissue growth and patterning processes in larvae [6-9]

Thus, the paradigm of Zelda function during embryogenesis where it coordinates the activity of many genes could also apply later in development, however more data would be necessary to support this hypothesis.

### 2. Materials and methods

### 2.1. Flv stocks

P{GawB}bi[md653] stock that expresses GAL4 in an omb[+] pattern was obtained from the Bloomington stock center. The Zelda RNAi stock (Transformant ID 38707) was obtained from the Vienna Drosophila RNAi center (VDRC). The full length open reading frame for Zelda was cloned into the pUAST vector and the UAS-Zelda

<sup>\*</sup> Corresponding author.

<sup>-</sup>mail addresses: pangiannios@biol.uoa.gr (P. Giannios), tsitilou@biol.uoa.g (S.G. Tsitilou).

<sup>0006-291</sup>X/\$ - see front matter © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.07.071

stock was established after injecting the construct into w<sup>1118</sup> embryos by the BestGene Inc (CA, USA). For the expression of the UAS constructs in the imaginal wing discs, flies carrying UAS-*zelda* and UAS-*zelda* RNAi were crossed to P{GawB}bi[md653] flies. The biological effects of these crosses were observed in the adult flies. *Oregon-R* was the wild type control. Flies were maintained on standard corn meal-agar media at 25° C.

### 2.2. Anti-Zld antibody

A mouse polyclonal antibody was raised against a chemically synthesized 14 a.a. peptide corresponding to the 460–473 a.a. region of ZLD protein and purified by Protein-A column, by GenScript (Piscataway, NJ, USA).

### 2.3. RNA extraction and RT-PCR (reverse transcription-PCR)

Total RNA was extracted from 30 wing discs or 15 L3 larvae with the TRIZOL reagent. The extracted RNA was further purified using the RNeasy Kit (Qiagen). 1 µg of total RNA was reverse transcribed using AMV RT (Finnzymes) and oligo(dT) primers in a final reaction volume of 20 µl. The PCR reactions were performed using 1 µl of cDNA per reaction mixture, 1.5 µM of each primer and 1U of DynaZyme polymerase (Finnzymes). The thermal cycle conditions consisted of an initial denaturation step and 35 cycles. (5 min 95° C and each cycle at 94° C for 30 s, 70° C for 30 s, 72° C for 1 min) followed by a final extension at 72° C for 10 min. The primer sequences used for detection of regions of the four annotated *zld* transcripts were:

RAf: 5'-CAGTGTGCATGTGTTTGTTTTTTCCG-3', RABCDr: 5'-TTGGAATGCCTCCCAGTCCG-3' RABCDf: 5'-CATATGCACCGCTCTCGCCGTA-3' RABCr: 5'-CGTGTGTTGTTCGTTCCTCCCCG-3' RDr: 5'-TCTGGGCGTTCGCTGGGTACAT-3' It should be noted that the above primers do not amplify the full length of each transcript.

#### 2.4. Total protein extracts from larval tissues - Western blotting

Wing discs and salivary glands dissected from L3 larvae as well as the remaining larval tissues were homogenized separately in cell lysis buffer containing 50 mM Tris–HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 125  $\mu$ M DTT, 1 mM PMSF, 100  $\mu$ g/ml Leupeptin (SIGMA), 20  $\mu$ g/ml Aprotinin (SIGMA). Cellular debris were subsequently removed by centrifugation. A total 40  $\mu$ g of protein extracts per lane were loaded on a 5% stacking – 10% resolving, SDS–polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose membrane (Macherey–Nagel). Membranes were blocked in a PBT (1× PBS, 2% BSA, 0,1% Triton-X100) solution. Anti-ZLD antibody was used at 1:300. Horseradish peroxidase – conjugated goat anti-mouse antibody (Chemicon) was used at 1:4.000. The Western blot signals were detected using LumiSensor (GenScript).

### 2.5. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments

The ChIP protocol used is modified from Papantonis and Lecanidou [10] and Oktaba et al. [11]. Third instar *Oregon-R* larvae were dissected in ice-cold 1× PBS for a maximum of 20 min and guts and fat body were removed. Carcasses with discs attached were fixed for 20 min at RT by gently mixing in 1 ml cross linking solution. Cross linking reaction was stopped and carcasses remained in wash solution overnight at 4°C. 180 discs approximately were used per chromatin sample. The isolated wing discs, yielded 500– 1000 bp chromatin fragments after sonication and subjected to ChIP using mouse anti-Zld and mouse anti-Frizzled (anti-Fz, DSHB) antibodies. Input and IP samples were subjected to low cycle PCR amplification with primers designed to amplify selected regions of the genes *decapentaplergic* (*dpp*), *engrailed* (*en*), *omb*, and *patched* (*ptc*), containing TAGteam related sequences. PCR products of amplified regions were cloned to a PCR 2.1 cloning vector (Invitrogen) and sequenced (Macrogen).

### 3. Results and discussion

### 3.1. Zelda affects growth of the developing wing

The primordium of *Drosophila* wing discs is established when a set of cells are set aside during embryogenesis and remain in a state of low transcriptional activity until larval development when they start to proliferate and differentiate extensively [12–14]. For this reason *Drosophila*'s imaginal wing discs represent a model for the study and modeling of the developmental patterning and the interactions between signaling pathways that control tissue growth and differentiation. As already mentioned earlier, during embryonic development Zld functions as a major coordinator of gene networks required to promote MZT at earlier stages and of patterning decisions during later stages of embryogenesis [1–3]. Wing disc patterning could also require this type of control in order to establish the transcription of the proper set of genes that would promote development.

In order to study the functional role of Zelda in the imaginal wing discs development, we used the GAL4/UAS system, to express ectopically *zelda* in an *omb* pattern. The GAL4 system allows the selective expression of any gene construct inserted in a transgenic line, in a wide variety of tissue-specific patterns. A promoter or enhancer (GAL4 driver) directs expression of the yeast transcriptional activator GAL4 in a particular pattern and GAL4 in turn directs transcription of the UAS-target gene in the same pattern. When the GAL4 line is crossed to the UAS-target gene line, the target gene is turned on in the progeny [15,16].

The expression of *omb* occupies a central sector in the wing imaginal disc from second instar larval stage, when *omb* covers the whole presumptive wing domain, to third instar larval stage when its expression becomes restricted to the central most domain [8]. For this reason selection of the omb GAL4 driver is optimal for studying the possible effects of genes that are involved in wing growth processes. Ectopic expression of *zelda* in an *omb* pattern resulted in extensive loss of the adult wing tissue (Fig. 1), while expression of the *zelda* RNAi construct in the same region resulted in lethality during the pupal stage as the flies failed to eclose. These results showed that *zld* is essential for proper wing development, possibly affecting a number of genes that are necessary for this process.

### 3.2. Alternative spliced transcripts of zelda in larval tissues

It was already indicated by several previous studies, that *zld's* expression throughout embryogenesis shows a broad pattern during blastoderm formation while postblastoderm tissues that express *zld* are the developing CNS, the tracheal primordium and a set of midline neurons [1,4,5]. In FlyBase, *zelda* appears to have 3 transcripts RA (6610 nt), RB (7318 nt) and RD (7638 nt) and 3 annotated polypeptides PA (1596 a.a.), PB (1596 a.a.) and PD (1373 a.a.), respectively. The RC (5876 nt) transcript, listed previously in FlyBase, needes a protein product PC (1367 a.a.) very similar to PD, their difference being in 6 a.a. Pearson et al. [5], studied the expression of the RB and RD transcript variants in the developing CNS, epidermis and imaginal disc primordia. Their study revealed that RB transcripts are reduced in the CNS, while the RD is present. On the contrary, the RD transcript was not detected in the imaginal disc primordia, where only the RB was present.



Fig. 1. Drosophila's adult wings. Zelda's ectopic expression induced by an ombGAL4 driver shows a defective phenotype with extensive tissue loss compared to the wild type strain.

In our study we designed specific primers that could amplify regions of all four annotated zld transcripts (Fig. 2A) and used them in PCR experiments with cDNA from Drosophila L3 larva wing discs as well as the rest of the remaining carcass which includes other imaginal discs and the CNS (Fig. 2B). The primer pair RAf and RAB-CDr was used to amplify the RA variant with an expected product size of 956 bp. RABCDf and RABCr primers were designed to recognize a region that corresponds to RA, RB, and RC transcripts. The expected PCR products are 2250 bp for both RA and RB variants while the RC variant, if present, would yield a product of 954 bp. RABCDf and RBCDr primers were used to amplify the RD transcript with an expected size of 609 bp. Staudt et al. [4], detected zld transcripts in mitotically active regions of the wing and eye imaginal discs in the larval stages of the fly. Our RT-PCR experiments revealed that transcripts RB, RC and RD are present in L3 wing discs while RA was not amplified (Fig. 2B). It should be noted though, that we detected RA transcript with the same pair of primers in pupae (Fig. S1), therefore its absence in larvae is not due to the PCR conditions e.g., primers. Interestingly, the RC transcript (954 bp), which is not currently listed in FlyBase, was expressed in the larval L3 stage, albeit we only detected it as a minor band in the isolated wing disc RNA. We therefore believe that RD is not an exclusively CNS transcript, since it is also present in the wing disc.

### 3.3. Zelda protein in larval tissues

In L3 larvae, the detected RB transcript variant is expected to be translated into the full length ZLD protein of 1596 a.a., while the RC and RD variants to 1367 and 1373 a.a. respectively, lacking the region coding for 3 of the 4 C-terminal zinc fingers. The theoretically deduced mass of these 3 protein products would be ~180 kD for PB and ~140 kD for PC and PD, respectively. Western blot experiments on total protein extract from L3 wing discs and the rest of

the larval tissues using anti-Zld antibody, showed 2 bands estimated at  $\sim 180$  kD, the expected MW for the protein coded by the RB transcript and one at ~70 kD. The intensity of both bands is reduced in the total larval extracts excluding the wing disc tissues (Fig. 3). Protein products around 140 kD that would correspond to the PC and PD isoforms of ZLD were not detected, instead a band at  ${\sim}70$  kD was detected. Protein extracts from larval salivary glands that were used as negative control, since zelda is not expressed in this tissue [17], gave no signal. Protein extracts from total larval tissues probed with preimmune serum showed no detectable signal as well (Fig. 3), therefore the band that appears at ~70 kD is not likely to be an unrelated product. Furthermore, the same two bands of  $\sim$ 180 and  $\sim$ 70 kD, are also detected in a Western Blot on total protein extracts from L3 larvae, using an antibody (rabbit anti-ZLD) raised against the 4-zinc finger region of ZLD protein (Fig. S2).

The above results suggest that a ZLD isoform (~70 kD) is prominently produced in the larval stage, which may be a specific proteolytic fragment of the protein (~140 kD) coded by the RC and RD transcripts, since the expression, especially, of the RD transcript is quite prominent in larvae (Fig. 2B). Alternatively, but less likely, this band could be the product of translation of a novel unknown *zld* transcript, although we failed to detect one with various combinations of primers in RT experiments. Thus, it is very likely, that this ~70 kD product could have a molecular function different from that of the PB polypeptide, an issue that is further investigated.

# 3.4. Chromatin Immunoprecipitation revealed Zelda's binding to an omb putative regulatory element

Our results from gain and loss of function experiments on the involvement of ZLD in the wing development, as well as other pre-



Fig. 2. Zelda's transcripts (A) and PCR products amplified from cDNA of larval wing discs and total larval tissues minus the wing discs (B). (A) Schematic representation of the annotated transcripts. The relative position of the primers used to specifically amplify zld's transcripts is shown by arrows. The transcript RC, not currently listed in the FlyBase, was detected in this study in tissues of the *Drosophila* larval stage. (B) The RB transcript appears at 2252 bp, the RC at 954 bp and the RD at 609 bp. The RA transcript was not detected in the larval stage. The RD transcript shows prominent expression in both cases, while RB and RC variants show lower amplification levels when the amplified cDNA from total larval tissues is compared to larval wing discs. Marker of the sizes is shown on the left.



Fig. 3. Production of ZLD protein isoforms in larval tissues. For each lane, equal amounts (40 µg) of total protein extracts were separated on 10% SDS-PAGE and blotted onto nitrocellulose membrane. The blots were probed with mouse anti-ZLD at a dilution of 1:300. (A) Protein extracts from larval wing discs. 2 bands of ~180 and ~70 kD were detected. (B) Protein extracts from total larval tissues without the wing discs. The proteins detected show reduced production compared to wing disc protein extracts. (C) Protein extracts from larval salivary glands, used as negative control, since Zelda is not expressed in this tissue, gave no signal (see text). (D) Protein extracts from total larval tissues serum showed no detectable signal. The MW marker is shown on the right.

liminary results, led us to the hypothesis that ZLD could bind to genomic regions considered to be regulatory elements of genes essential for wing development. Liang et al. [1], using zerknullt (zen) enhancer sequences, have shown that in the embryo, ZLD binds with different affinities on TAGteam heptamer motifs. We have chosen two of the motifs found in zen enhancer (CTGCCTG and CTACCTG) and searched for their presence in the genomic regions of genes that we considered as probable candidates for regulation by ZLD. Selection of the regions was mainly based on data either supporting dense binding of transcription factors to chromatin or validated as putative regulatory elements [18]. The CTGCCTG sequence was found in a region ~1000 bp upstream of the 5' UTR of omb-RD, omb-RC and omb-RE transcript variants of the omb gene and  $\sim$ 500 bp upstream of the 5' UTR of the dpp-RA transcript. The CTACCTG sequence was found within a patched (ptc) intronic region ~2000 bp upstream its second exon, while a



Fig. 4. ChIP assays on larval wing discs. The results display occupancy of an *omb* region by ZLD. IP samples were loaded on lanes 2, 3 and 4. Lane 2 represents a sample immunoprecipitated with the anti-ZLD antibody while lanes 3 and 4 correspond to negative controls, anti-Fz (Frizzled) and no antibody, respectively. Marker of the sizes is shown on the right.

sequence of a putative enhancer of the *engrailed* (*en*) gene within its 5' UTR of the en-RB transcript variant, lacking TAGteam heptamers, was chosen as a negative control.

Chromatin immunoprecipitation assays with the anti-Zld antibody, followed by amplification of the precipitated chromatin with specific primers designed for the above selected regions, with expected sizes for: ptc 349 bp, omb 233 bp, dpp 574 bp and en 314 bp showed amplification only for the omb locus (Fig. 4). The locus where we detected Zelda's binding belongs also to an intron of the Dmel/CG32773 gene, which however is not expressed in larval tissues as it is reported in FlyBase [17]. Within the amplified sequence (233 bp) and the overlapping adjacent sequences, recent findings report binding sites for a number of transcription factors such as Zinc finger homeodomain 1 (zfh1), Twist (twi), Senseless (sens), Disconnected (disco), Medea (Med) and others [18,19]. The exact role of these highly occupied transcription factor regions (HOT regions) remains obscure, however it was proposed that their putative functions could include a role in DNA replication and an interplay with boundary elements [19]. In a study of Drosophila embryonic development, Kvon et al. [20], reported that HOT regions, including motifs recognized by ZLD, can function as enhancers with diverse activity patterns.

Interaction of Zelda with omb indicates its involvement in the Dpp signaling pathway during wing disc growth. Dpp acts through binding to a receptor complex of Thickveins (*tkv*) and Punt (*put*) and it regulates expression of many target genes in a concentration dependent manner. The genes spalt (sal), omb, Daughters against dpp (Dad) and vestigial (vg) are activated in different distances from the Anterior/Posterior compartment border, while brinker (brk) is repressed [21]. The exact mechanism of zld action to a specific gene(s) in the Dpp pathway cannot be deduced by the data presented in this study. Moreover, the severe phenotypes observed by knocking down or overexpressing zelda using the omb GAL4 driver do not allow us to investigate the possibility of altered expression levels of the omb gene, where Zelda's binding was found, due to absence or lack of wing tissues after loss and gain of function experiments. However, our preliminary results using alternate GAL4 drivers in the imaginal wing discs show altered expression of the gene vestigial (vg), a Dpp target whose expression is Omb dependent [8], in the case of *zelda* knock down.

The observed ZLD's binding to the above region could be due either to a direct interaction with chromatin or through other(s) transcription factor(s). It is very likely though, that ZLD's binding to chromatin during larval development is not restricted to a small set of genes and leaves open the possibility of its involvement and in other signaling pathways.

### Acknowledgments

We thank Drs. C. Delidakis and K. latrou for critical reading of the manuscript. This work was supported from the Special account of research grants of the University of Athens. P.G. was supported by the late Captain V. Constantacopoulos.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.07.071.

### References

- H.L. Liang, C.Y. Nien, H.Y. Liu, M.M. Metzstein, N. Kirov, C. Rushlow, The zinc-finger protein Zelda is a key activator of the early zygotic genome in Drosophila, Nature 456 (2008) 400–403.
   M.M. Harrison, X.Y. Li, T. Kaplan, M.R. Botchan, M.B. Eisen, Zelda binding in the
- [2] M.M. Harrison, X.Y. Li, T. Kaplan, M.R. Botchan, M.B. Eisen, Zelda binding in the early Drosophila melanogaster embryo marks regions subsequently activated at the maternal-to-zygotic transition, PLoS Genet. 7 (2011) e1002266.

- [3] C.Y. Nien, H.L. Liang, S. Butcher, Y. Sun, S. Fu, T. Gocha, N. Kirov, I.R. Manak, C.
- C.Y. Nien, H.L. Liang, S. Butcher, Y. Sun, S. Fu, I. Gocha, N. Kirov, J.K. Manak, C. Rushlow, Temporal coordination of gene networks by Zelda in the early *Drosophila* embryo, PLoS Genet. 7 (2011) e1002339.
   N. Staudt, S. Fellert, H.R. Chung, H. Jäckle, G. Vorbrüggen, Mutations of the *Drosophila* zinc finger-encoding gene vielfältig impair mitotic cell divisions and cause improper chromosome segregation. Mol. Biol. Cell 17 (2006) 2356–2365.
   J.C. Pearson, J.D. Watson, S.T. Crews, *Drosophila melanogaster Zelda* and single-vield ulter encoding the survey of the division of the second structure of the division of the d
- [6] J. C. Curson, D. Watson, S. F. Crews, Dissonant inclination of the single-minded collaborate to regulate an evolutionarily dynamic CNS midline cell enhancer, Dev. Biol. 366 (2012) 420–432.
  [6] G.O. Pflugfelder, H. Schwarz, H. Roth, B. Poeck, A. Sigl, S. Kerscher, B. Jonschker,
- W.L. Pak, M. Heisenberg, Genetic and molecular characterization of the optomot 91-104. motor-blind gene locus in Drosophila melanogaster, Genetics 126 (1990)
- [7] R. Sivasankaran, M.A. Vigano, B. Müller, M. Affolter, K. Basler, Direct K. Stydanikali, M.A. Vigano, B. Muller, M. Anoler, K. Basler, Direct transcriptional control of the Dpp target omb by the DNA binding protein Brinker, EMBO J. 19 (2000) 6162–6172.
   D.d.A. Rodríguez, F.J. Terriente, F.J. Díaz-Benjumea, The role of the T-box gene
- optomotor-blind in patterning the Drosophila wing, Dev. Biol. 268 (2004) 481-
- [9] J. Shen, C. Dorner, A. Bahlo, G.O. Pflugfelder, Optomotor-blind suppresses
- [9] J. Sheli, C. Dohler, A. Saho, G.O. Fuggelder, Optimior-Juna Suppresses instability at the A/P compartment boundary of the Drosophila wing, Mech. Dev. 125 (2008) 233–246.
   [10] A. Papantonis, R. Lecanidou, A modified chromatin-immunoprecipitation protocol for silkmoth ovarian follicular cells reveals C/EBP and GATA binding modes on an early chorion gene promoter, Mol. Biol. Rep. 36 (2009) 733–736.
   [11] K. Oktaba, L. Gutiérrez, J. Gagneur, C. Girardot, A.K. Sengupta, E.E.M. Furlong, J. Möller, Dunamic regulation by polycomb group protein complexes controls
- Müller, Dynamic regulation by polycomb group protein complexes controls pattern formation and the cell cycle in Drosophila, Dev. Cell 15 (2008) 877-
- [12] K. Basler, G. Struhl, Compartment boundaries and the control of Drosophila
- Imb pattern by hedgehog protein, Nature 368 (1994) 208–214.
   S.S. Blair, Compartments and appendage development in *Drosophila*, BioEssays 7 (4) (1995) 299–309.

- [14] S.M. Cohen, Imaginal disc development, in: A. Martinez-Arias, M. Bate (Eds.). Drosophila Development, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Press, 1993, pp. 747–841.
- A.H. Brand, N. Perrimon, Targeted gene expression as a means of altering cell [15] fates and generating dominant phenotypes, Development 118 (2) (1993) 401-415
- and generating community previous period p
- 4/1 (7339) (2011) 4/3-4/9.
  [18] N. Nègre, C.D. Brown, L. Ma, C.A. Bristow, S.W. Miller, U. Wagner, P. Kheradpour, M.L. Eaton, P. Loriaux, R. Sealfon, Z. Li, H. Ishii, R.F. Spokony, J. Chen, L. Hwang, C. Cheng, R.P. Auburn, M.B. Davis, M. Domanus, P.K. Shah, A. Morrison, J. Zieba, S. Suchy, L. Senderowicz, A. Victorsen, N.A. Bild, A.J. Grundstad, D. Hanley, D.M. Macalpine, M. Mannervik, K. Venken, H. Bellen, R. White, M. Gerstein, S. Russell, R.L. Grossman, B. Ren, J.W. Posakony, M. Kellis, K.P. White, A cis-creatilatron uno of the Drossmin Barne A11 (2011) K.P. White, A cis-regulatory map of the Drosophila genome, Nature 471 (2011) 527-531.
- The modENCODE Consortium, Identification of functional elements and regulatory circuits by Drosophila modENCODE, Science 330 (2010) 1787–1797. [19]
- [20] E.Z. Kvon, G. Stampfel, J.O. Yáňez-Cuna, B.J. Dickson, A. Stark, HOT regions function as patterned developmental enhancers and have a distinct cis-regulatory signature, Genes Dev. 26 (2012) 908–913. [21] T. Tabata, Genetics of morphogen gradients, Nat. Rev. Genet. 2 (2001) 620-630