



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ – BACHELOR THESIS

Λειτουργική γενετική ανάλυση του καρκινοειδούς οργανισμού μοντέλου *Parhyale hawaiiensis*.

Functional genetic analyses of the crustacean model organism *Parhyale hawaiiensis*.

Παπαρηγοράκη Ευαγγελία
(του Θεοδώρου)



Επιβλέπων Ερευνητής: Δρ. Παυλόπουλος Αναστάσιος
Εργαστήριο Ανάπτυξης και Μορφογένεσης IMBB-ITE

Συνεπιβλέπων: Καθ. Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος
Μέλος Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: Καθ. Μούτου Αικατερίνη

Ιούνιος 2023

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	3
Περίληψη - Abstract (Ελληνικά & Αγγλικά).....	4
1. Εισαγωγή.....	6
1.1 Η μορφογένεση των άκρων στα αρθρόποδα.....	6
1.2 Το αμφίποδο καρκινοειδές <i>Parhyale hawaiensis</i> ως αναδυόμενο μοντέλο στην αναπτυξιακή βιολογία.....	8
1.3 Το γονίδιο <i>Distal-less</i> ως καθοριστικός ρυθμιστής την ανάπτυξης των άκρων.....	11
1.4 Η πολύπλοκη ρύθμιση του γονιδίου <i>Distal-less</i> και ο κρίσιμος ρόλος των ενισχυτών.....	14
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	20
2.1 Δημιουργία πλασμιδίων αναφοράς.....	20
2.2 Συλλογή και μικροενέσεις G0 εμβρύων <i>P.hawaiensis</i>	22
2.3 Διαλογή ενεμένων G0 εμβρύων <i>P.hawaiensis</i> με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού.....	23
2.4 Χρώση αντισωμάτων σε έμβρυα <i>P.hawaiensis</i> G0 και G2.....	23
2.5 Πρωτόκολλα.....	23
3. Αποτελέσματα.....	31
3.1 Ταυτοποίηση υποψήφιων <i>Dll cis</i> -ρυθμιστικών στοιχείων στο <i>Parhyale hawaiensis</i>	31
3.2 Δημιουργία πλασμιδίων αναφοράς και διαγονιδιακών φορέων ελέγχου υποψήφιων <i>Dll cis</i> -ρυθμιστικών στοιχείων στο <i>Parhyale hawaiensis</i>	32
3.3 Ανάλυση του χωροχρονικού προτύπου έκφρασης των υποψήφιων CREs σε ενεμένα G0 έμβρυα <i>Parhyale hawaiensis</i>	38
3.4 Χρώση αντισωμάτων και ανάλυση προτύπου έκφρασης των υποψήφιων ενισχυτών σε G0 και G2 έμβρυα <i>P.hawaiensis</i>	42
4. Συζήτηση.....	45
5. Βιβλιογραφία.....	48

Ευχαριστίες

Θα ήθελα πρώτα από όλα, να ευχαριστήσω στο σημείο αυτό τον επιβλέποντά μου, Δρ. Αναστάσιο Παυλόπουλο για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία όντας μέλος της εργαστηριακής του ομάδας. Τον ευχαριστώ για την αμέριστη εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για την παρότρυνσή του να αναλαμβάνω πρωτοβουλίες και να λειτουργώ με βάση τους κανόνες ενός εργαστηρίου, αλλά και με γνώμονα την κριτική μου σκέψη. Με τη συνεχή καθοδήγηση και στήριξή του, απέκτησα κατά την πρώτη μου εργαστηριακή εμπειρία ικανότητες και δεξιότητες, έμαθα να λειτουργώ σε επαγγελματικά πλαίσια και να βρίσκω λύσεις, με υπομονή, σε δυσκολίες που προκύπτουν καθημερινά στον εργαστηριακό χώρο. Τον ευχαριστώ επίσης, διότι αποτέλεσε έμπνευση για εμένα η αγάπη του για την αναπτυξιακή βιολογία, η αισιόδοξη στάση του απέναντι σε μικρές πειραματικές αποτυχίες και η σταθερή παρότρυνση του απέναντι σε όλη την εργαστηριακή ομάδα για διαρκή προσπάθεια προς την επίτευξη των στόχων μας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης θερμά, τον υποψήφιο διδάκτορα Γιάννη Ράλλη, με τον οποίο συνεργάστηκα στενά, καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας. Με τη συνεχή καθοδήγησή του έμαθα τις περισσότερες εργαστηριακές τεχνικές που χρησιμοποίησα, αλλά και τον τρόπο να σκέφτομαι τις βιολογικές διεργασίες πίσω από τη διεκπεραίωση ενός πρωτοκόλλου. Τον ευχαριστώ επίσης, για τη βοήθεια που μου προσέφερε στην επίλυση πειραματικών προβλημάτων, αλλά και για τον τρόπο σκέψης που μου μετέδωσε, ώστε να μπορώ αυτόνομα να αναλύω αποτελέσματα και να σχεδιάζω βάσει αυτών τα επόμενα πειραματικά μου βήματα.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια του εργαστηρίου Βάλια Σταματάκη, για την εκμάθηση εργαστηριακών τεχνικών, για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων και τη λήψη σημαντικών αποφάσεων. Μου μεταλαμπάδευσε τον τρόπο να εργάζομαι με υπομονή και ηρεμία, και ο τρόπος σκέψης της αποτέλεσε έμπνευση για εμένα. Ευχαριστώ επίσης θερμά, την τεχνικό του εργαστηρίου Μαρίνα Ιωάννου, διότι πέραν της βοήθειας που μου προσέφερε σε τεχνικά και οργανωτικά θέματα, ήταν πάντα δίπλα μου σε συμβουλευτικό επίπεδο για επαγγελματικά θέματα και μη.

Πολύτιμη ήταν επίσης, η βοήθεια και στήριξη των υπόλοιπων μελών του εργαστηρίου, του Θέμη Αρχοντίδη, της Μαρίας Καλογερίδη, της Ειρήνης Καραπιδάκη, του Ιωάννη Λιάσκα, διότι εκτός της συμβουλής και καθοδήγησής τους, συνέβαλλαν όλοι καθημερινά στη διαμόρφωση ενός εξαιρετικά θετικού και παραγωγικού κλίματος. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια και φίλη Νιόβη Ραφαϊλίδου, διότι ήταν παρούσα και εξαιρετικά υποστηρικτική σε όλα τα βήματά μου, με συμβούλευσε και με παρότρυνε σε πολλές δύσκολες στιγμές, εντός και εκτός εργαστηρίου.

Τέλος, ευχαριστώ τους φίλους και την οικογένεια μου για την αδιάκοπη στήριξη που μου έδειξαν και γιατί με βοήθησαν να αισιοδοξώ, καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

Περίληψη

Οι μοριακοί και κυτταρικοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν τις διαδικασίες της ανάπτυξης έχουν μελετηθεί διεξοδικά σε οργανισμούς μοντέλα. Οι μελέτες αυτές έχουν αποκρυπτογραφήσει σηματοδοτικά μονοπάτια και αναπτυξιακά γονίδια που είναι βαθιά συντηρημένα στα σπονδυλωτά και ασπόνδυλα ζώα καθοδηγώντας της ανάπτυξη του σώματος κατά τον πρόσθιο-οπίθιο, τον ραχιαίο-κοιλιακό και τον εγγύ-άπω άξονα. Οι οργανισμοί μοντέλα όντας ταξινομικά απομακρυσμένοι και λίγοι σε αριθμό, καλύπτουν ένα πολύ μικρό μέρος της τεράστιας ποικιλομορφίας των ζώων. Οι αναπτυξιακές μελέτες σε μη-μοντέλα οργανισμούς που γεφυρώνουν αυτό το χάσμα περιορίζονται συνήθως στην ταυτοποίηση συντηρημένων αναπτυξιακών γονιδίων και σπάνια προχωρούν σε λειτουργικές αναλύσεις. Η ανάπτυξη των άκρων, ως μία παραδοσιακά γόνιμη για αναπτυξιακές και εξελικτικές αναλύσεις διαδικασία, έχει μελετηθεί εκτενώς στο ολομετάβολο έντομο *Drosophila melanogaster*, το οποίο χαρακτηρίζεται από την έμμεση ανάπτυξη των άκρων από εσωτερικούς αναπτυξιακούς δίσκους. Η άμεση ανάπτυξη των άκρων ως εξωτερικές εκφύσεις από το τοίχωμα του σώματος κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης έχει μελετηθεί εκτενώς σε μοντέλα σπονδυλωτών, κυρίως στην όρνιθα και στο ποντίκι, αλλά πολύ λίγο στα αρθρόποδα, παρ'όλο που η πλειοψηφία των εντόμων, καρκινοειδών, μυριάποδων και χηληκεραιωτών επιδεικνύει άμεση ανάπτυξη των άκρων. Στις πιο λεπτομερείς μελέτες άμεσης ανάπτυξης άκρων στα αρθρόποδα συγκαταλέγονται αυτές που έχουν πραγματοποιηθεί στο αμφίποδο καρκινοειδές *Parhyale hawaiiensis*. Το *Parhyale* συνιστά αναδυόμενο μοντέλο οργανισμό στην αναπτυξιακή βιολογία με διαρκώς διευρυνόμενα γενετικά και άλλα εργαστηριακά εργαλεία. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία αξιοποιήθηκε ο οργανισμός *Parhyale* για τη μελέτη της ρύθμισης του κομβικού και εξελικτικά συντηρημένου γονιδίου στη μορφογένεση των άκρων, *Distal-less (Dll)*. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν ως προς τη ρυθμιστική τους ενεργότητα, μη κωδικές περιοχές ανοιχτής χρωματίνης του *Dll*, οι οποίες ταυτοποιήθηκαν μέσω ATAC-sequencing σε έμβρυα *Parhyale* διαφορετικών σταδίων. Δημιουργήθηκαν κασσέτες αναφοράς φθορισμού των υποψήφιων *cis*-ρυθμιστικών περιοχών και εισήχθησαν στο γονιδίωμα του *Parhyale* με τη βοήθεια διαγονιδιακών φορέων που μικροενέθηκαν σε γονιμοποιημένα αυγά. Με τη βοήθεια τεχνικών μικροσκοπίας φθορισμού αναλύθηκαν τα χωροχρονικά πρότυπα έκφρασης των γονιδίων αναφοράς σε ζωντανά και μονιμοποιημένα έμβρυα. Οι μελέτες αυτές αποκάλυψαν δύο *cis*-ρυθμιστικές περιοχές οι οποίες ενδέχεται να καθοδηγούν την έκφραση του *Dll* στα άκρα του *Parhyale* σε όψιμα στάδια της εμβρυογένεσης. Σε συνδυασμό με προηγούμενα ευρύματα ενισχυτών του *Dll* σε πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης, αλλά και με μελλοντικές προσεγγίσεις προσδιορισμού των σηματοδοτικών μονοπατιών και μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν τις συγκεκριμένες περιοχές, τα αποτελέσματα αυτά θα διαφωτίσουν τη ρύθμιση του *Dll* στο *Parhyale*, καθώς και τη συντήρηση και διαφοροποίηση των μηχανισμών ανάπτυξης μεταξύ άμεσων και έμμεσων άκρων.

Abstract

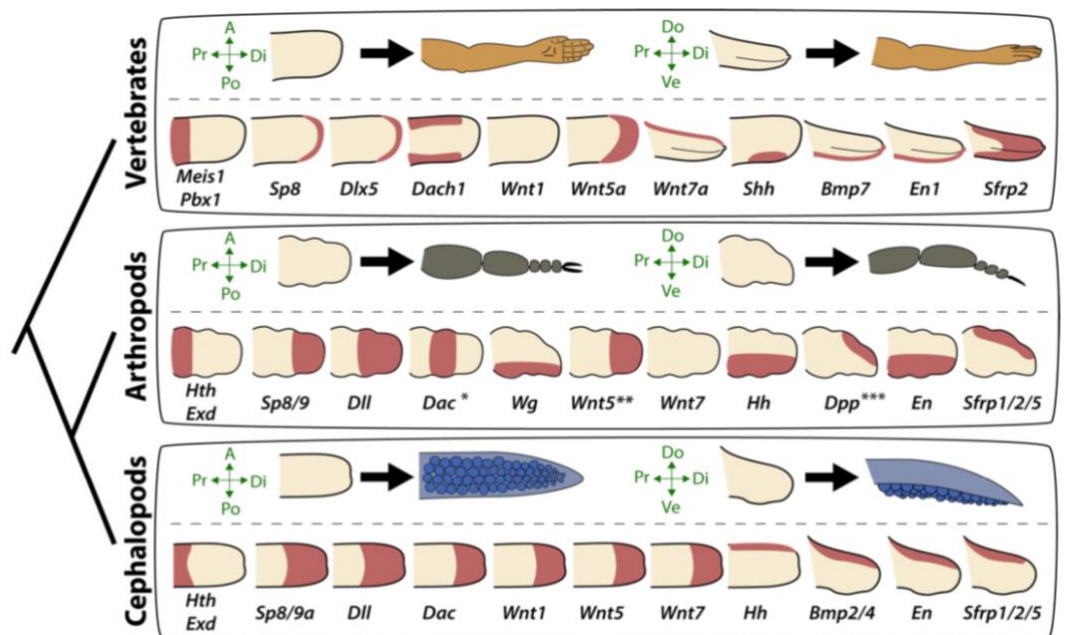
The molecular and cellular mechanisms that regulate developmental processes have been studied in model extensively organisms. These studies have deciphered signalling pathways and devopmental genes that are deeply conserved in vertebrate and invertebrate animals controlling body patterning along the anterior-posterior, dorsal-ventral and proximal-distal

axes. Model organisms, being taxonomically distant and few in number, cover a tiny part of the broad animal diversity. Developmental studies in non-model organisms that bridge this gap are normally limited to the identification of conserved developmental genes and rarely involve functional analyses. Limb development, as a classic and fertile case study for developmental and evolutionary purposes, has been extensively studied in the holometabolous insect *Drosophila melanogaster*, which is characterized by indirect limb development from internal imaginal discs. Direct development of limbs as external projections from the body wall during embryogenesis has been studied extensively in vertebrate models, mainly the chick and the mouse, but very little in arthropods, although the majority of insects, crustaceans, myriapods and chelicerates exhibit direct limb development. The most detailed studies of direct limb development in arthropods include those conducted in the amphipod crustacean *Parhyale hawaiiensis*. *Parhyale* represents an emerging model organism in developmental biology, with ever-expanding genetic and other laboratory tools. In this thesis, *Parhyale* was utilized to study the regulation of a key and evolutionarily conserved gene in limb morphogenesis, called *Distal-less (Dll)*. Specifically, non-coding open-chromatin regions of *Dll* identified by ATAC-sequencing were assayed for their regulatory activity in *Parhyale* embryos of different stages. Fluorescence reporter cassettes of the candidate cis-regulatory regions were generated and inserted into the *Parhyale* genome using transgenic vectors microinjected into fertilized eggs. Fluorescence microscopy techniques were used to analyze the spatiotemporal expression patterns of the reporter genes in live and fixed embryos. These studies identified two cis-regulatory regions that may drive *Dll* expression in *Parhyale* limbs at late stages of embryogenesis. Combined with previous findings of *Dll* enhancers acting at early stages of embryogenesis and future approaches to identify the signaling pathways and transcription factors that regulate these regions, these results will elucidate the regulation of *Dll* in *Parhyale*, as well as the conservation and divergence of developmental mechanisms between direct and indirect limbs.

1. Εισαγωγή

1.1 Η μορφογένεση των άκρων στα αρθρόποδα

Ένα από τα πιο καίρια και διαχρονικά ερωτήματα των αναπτυξιακών βιολόγων αφορά το πώς η γενετική πληροφορία μεταφράζεται στο σχήμα και τη μορφή των ιστών κατά την ανάπτυξη των οργανισμών (Rallis & Pανιουριος, 2022). Οι κυτταρικές συμπεριφορές που μεσολαβούν μεταξύ των γενετικών προγραμμάτων και της μορφογένεσης ιστών ή οργάνων, περιλαμβάνουν υψηλής οργάνωσης κυτταρικές διαιρέσεις και κυτταρικούς θανάτους, κυτταρικές διαφοροποιήσεις και ανακατανομές, αλλαγές στο σχήμα των κυττάρων, αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων, όπως επίσης και μεταξύ κυττάρων και εξωκυττάρου χώρου. Για τη διερεύνηση των μορφογενετικών αυτών διαδικασιών και των μοριακών μηχανισμών που τις ελέγχουν αξιοποιείται παραδοσιακά η μορφογένεση των άκρων στα ζώα και ιδιαίτερα στα αρθρόποδα διότι περιλαμβάνουν τεράστιο αριθμό ειδών με εξαιρετική ποικιλομορφία στο σώμα τους, τις υποδιαιρέσεις τους και τα εξαρτήματα/άκρα που αυτά φέρουν (Panganiban et al., 1995). Τα αρθρόποδα καλύπτουν περισσότερο από το 80% των ζώων του πλανήτη και έχουν παγκόσμια κατανομή σε γήινα, υδάτινα και αέρια περιβάλλοντα, την οποία οφείλουν σε σημαντικό βαθμό στη διαφοροποίηση των άκρων τους μέσω των οποίων κατάφεραν να εποικίσουν νέα περιβάλλοντα και να εκτελέσουν ποικίλες λειτουργίες (Panganiban et al., 1995).



Εικόνα 1. Σχεδιαγραμματική απεικόνιση και αναπτυξιακή ρύθμιση των αναπτυσσόμενων άκρων στα σπονδυλωτά, τα αρθρόποδα και τα κεφαλόποδα. Σε κάθε κλάδο, η πάνω σειρά παρουσιάζει για κάθε γενεαλογία, τα πρώιμα εκβλαστήματα (αριστερά) και τα πλήρως διαφοροποιημένα άκρα (δεξιά) σε δύο προσανατολισμούς. Στην κάτω σειρά παρουσιάζονται οι περιοχές έκφρασης συντηρημένων αναπτυξιακών γονιδίων στα αναπτυσσόμενα άκρα. Αναπαραγωγή εικόνας από Tarazona et al., 2019.

Τα άκρα των σπονδυλωτών και των αρθροπόδων διαφέρουν σημαντικά στη μορφολογία και την ανάπτυξη τους, ενώ εξελικτικές μελέτες καταδεικνύουν ότι δεν είναι ομόλογες δομές (Pueyo & Couso, 2005). Παρ' όλα αυτά, τα γενετικά προγράμματα που ρυθμίζουν την ανάπτυξη των άκρων παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα που πιθανότατα δεν είναι τυχαία (Tabin & Carroll, 1999). Συγκεκριμένα, πάρα πολλά αναπτυξιακά γονίδια επιδεικνύουν συντηρημένους ρόλους κατά την ανάπτυξη των άκρων σε αρθρόποδα, μαλάκια και

σπονδυλωτά (Εικόνα 1). Η πιο πιθανή εξήγηση για αυτή τη συντήρηση είναι ότι ο κοινός πρόγονος όλων των αμφίπλευρων ζώων χρησιμοποίησε έναν αρχέγονο μηχανισμό ανάπτυξης εκφύσεων από το σώμα του, ο οποίος εξελίχθηκε παράλληλα στους τρεις κυρίως κλάδους των αμφίπλευρων ζώων, τα εκδυσόζωα (π.χ. αρθρόποδα), τα λοφοτροχόζωα (π.χ. μαλάκια) και τα δευτεροστόμια (π.χ. σπονδυλωτά) (Abzhanov & Kaufman, 2000; Prpic et al., 2001; Pueyo & Couso, 2005; Tarazona et al., 2019; Williams et al., 2002).

Μεταξύ αρθροπόδων, η *Drosophila melanogaster* προσέφερε τη βασική κατανόηση της κυτταρικής διαφοροποίησης και συμπεριφοράς κατά τη ανάπτυξη και μορφοποίηση ενός ιστού (Estella et al., 2012; Morata, 2001). Εκεί ταυτοποιήθηκαν μεταγραφικοί παράγοντες και σηματοδοτικά μονοπάτια που ενορχηστρώνουν την ανάπτυξη των άκρων και είναι συντηρημένα μεταξύ της *Drosophila*, των αρθροπόδων και άλλων αμφίπλευρων ζώων (Pueyo & Couso, 2005; Tarazona et al., 2019). Παρ' όλη τη συντήρηση των γενετικών προγραμμάτων, η τεράστια μορφολογική ποικιλομορφία των άκρων των αρθροπόδων πιθανολογείται ότι οφείλεται σε μορφογενετικές συμπεριφορές των κυττάρων οι οποίες διαφέρουν μεταξύ της *Drosophila* και των υπόλοιπων αρθροπόδων (Rallis & Pavlouroulos, 2022). Σε αντίθεση με τη *Drosophila* η οποία χαρακτηρίζεται από έμμεση ανάπτυξη των άκρων μέσω αναπτυξιακών δίσκων, στο μεγαλύτερο μέρος των εντόμων, των καρκινοειδών και ευρύτερα των αρθροπόδων, τα άκρα αναπτύσσονται άμεσα ως δομές που εκφύονται κατά τον εγγύς-άπω άξονα από το σώμα του εμβρύου (Rallis & Pavlouroulos, 2022). Λόγω των περιορισμένων πειραματικών εργαλείων, η γνώση για την άμεση ανάπτυξη των άκρων που αφορά ένα τεράστιο μέρος των ζώων είναι περιορισμένη. Η ανάπτυξη πειραματικών εργαλείων για τις συγκριτικές μελέτες σε περισσότερα είδη αρθροπόδων, εκτός της *Drosophila*, θα διαλευκάνει τα συντηρημένα γενετικά και μοριακά μονοπάτια που κωδικοποιούν τη μορφογένεση τόσο ποικιλόμορφων άκρων (Rallis & Pavlouroulos, 2022). Ακόμη, επιτρέποντας συγκρίσεις με τους αντίστοιχους μηχανισμούς σε οργανισμούς μοντέλα που ανήκουν στα σπονδυλωτά θα καλύψει «ταξινομικά κενά» και θα εμβαθύνει την κατανόηση της εξέλιξης των άκρων στους τρεις κλάδους των αμφίπλευρων ζώων.

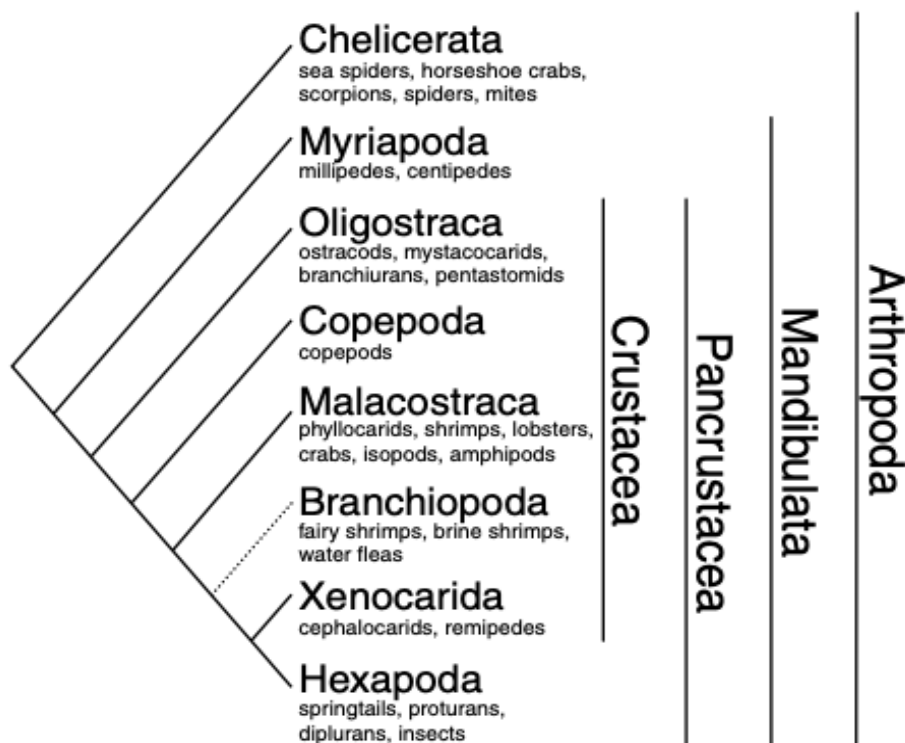
Μεταξύ των αρθροπόδων, τα καρκινοειδή αποτελούν ίσως την πιο γόνιμη ερευνητικά ομάδα οργανισμών για τη διερεύνηση της μορφογένεσης των άκρων (Paris et al., 2022), διότι φέρουν άκρα ποικίλα ως προς τον αριθμό, τη μορφή και τη λειτουργία, και τα οποία χαρακτηρίζονται, στα περισσότερα είδη, από άμεση ανάπτυξη (Pavlouroulos & Wolff, 2021). Η διαφορετική σωματοδομή τους από τα έντομα συσχετίστηκε με διαφορές στην έκφραση αναπτυξιακών γονιδίων και στους τρόπους με τους οποίους τα γονίδια αυτά ρυθμίζουν τις κυτταρικές συμπεριφορές κατά την ανάπτυξη των άκρων (Panganiban et al., 1995). Επομένως, η μελέτη τους είναι κομβική για να διερευνηθεί το πώς συντηρημένα γονίδια ή μονοπάτια της ανάπτυξης των άκρων, καθοδηγούν κυτταρικές συμπεριφορές και δημιουργούν όλη αυτή την ποικιλομορφία στα άκρα των αρθροπόδων (Rallis & Pavlouroulos, 2022).

Η περιορισμένη παλέτα των εργαλείων που έχουν αναπτυχθεί για τα καρκινοειδή αποτέλεσε εμπόδιο για τη μελέτη πολλών ειδών και έτσι το μοναδικό είδος στο οποίο έχουν πραγματοποιηθεί ολοκληρωμένες μελέτες της ανάπτυξης των άκρων είναι το αμφίποδο καρκινοειδές *Parhyale hawaiensis* (Patel, 1994; Pavlouroulos & Wolff, 2021; Stamatakis & Pavlouroulos, 2016). Εκεί διαφωτίστηκαν μορφογενετικές κυτταρικές

συμπεριφορές που μεσολαβούν στη μετάβαση από το μονόστιβο επιθηλίο εκτοδερμικών κυττάρων στις τριασδιάστατες δομές των άκρων (Wolff et al., 2018). Δείχθηκε ότι η ακολουθία των κυτταρικών συμπεριφορών της μορφογένεσης παρουσιάζει υψηλού βαθμού οργάνωση και εκτυλίσσεται σε στάδια που περιλαμβάνουν την πρώιμη διαφοροποίηση των θέσεων των άκρων στην κοιλιακή πλευρά του εμβρύου, την ανάπτυξη εκφύσεων των άκρων (limb buds), την επιμήκυνση αυτών κατά των εγγύ-άπω άξονα, τη σταδιακή υποδιαίρεση των αναπτυσσόμενων άκρων σε τμήματα και την τελική διαφοροποίηση αυτών των τμημάτων (Münster et al., 2019; Wolff et al., 2018).

1.2 Το αμφίποδο καρκινοειδές *Parhyale hawaiiensis* ως αναδυόμενο μοντέλο στην αναπτυξιακή βιολογία

Το αμφίποδο καρκινοειδές *Parhyale hawaiiensis* αποτελεί έναν αναδυόμενο οργανισμό μοντέλο μεγάλης ερευνητικής σημασίας για τη μελέτη της εξέλιξης και της διαφοροποίησης των αρθροπόδων που εισήχθη στο εργαστήριο από τους Browne και Patel το 1997 (Browne et al., 2005; Paris et al., 2022). Αποτελεί έναν από τους λίγους οργανισμούς μοντέλα στα καρκινοειδή, έναν πολυφυλετικό κλάδο των αρθροπόδων που περιλαμβάνει και τα έντομα και προσφέρεται για τη μελέτη της βιοποικιλότητας μέσω μορφολογικών και λειτουργικών αναλύσεων (Paris et al., 2022; Stamatakis & Pavliopoulos, 2016). Ως συγγενικό είδος των εντόμων, το *Parhyale hawaiiensis* διαφέρει σημαντικά στους αναπτυξιακούς μηχανισμούς του από την εκτενώς μελετημένη *Drosophila melanogaster*, και η μελέτη του επιδιώκει να διευρύνει το μικρό φάσμα μελέτης των αναπτυξιακών μηχανισμών και της οργανισμικής ποικιλομορφίας που καλύπτουν μέχρι τώρα τα έντομα μοντέλα (Sun & Patel, 2019). Ως αμφίποδο, ανήκει ευρύτερα στα μαλακόστρακα και είναι κοντινός συγγενής με τη γαρίδα, τον αστακό, το καβούρι και άλλα ζώα οικονομικού ενδιαφέροντος (Kao et al., 2016) (Εικόνα 2).

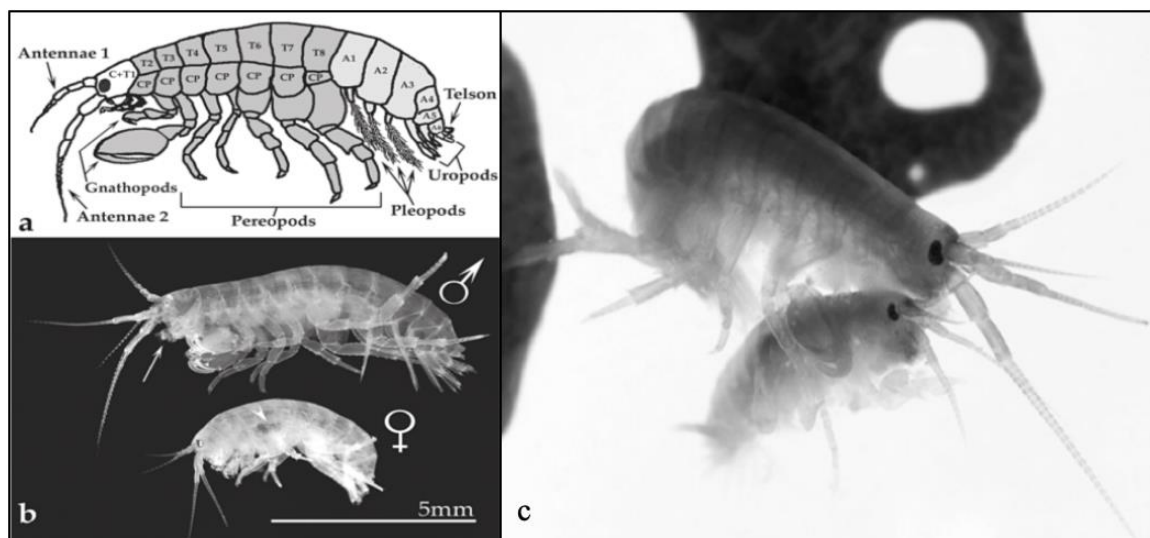


Εικόνα 2. Φυλογένεση αρθροπόδων. Τα αμφίποδα ανήκουν στα μαλακόστρακα και ευρύτερα στα καρκινοειδή, τα οποία μαζί με τα εξάποδα συνιστούν τα πανκαρκινοειδή. Αναπαραγωγή εικόνας από Stamatakis & Pavliopoulos, 2016.

Το *Parhyale hawaiensis* είναι ένα σαπροφάγο αμφίποδο με παγκόσμια κατανομή σε ρηχά νερά παλιρροιακών ζωνών τροπικών και υποτροπικών θαλασσών, ενώ έχει επίσης βρεθεί σε βυθούς όπου συσσωρεύεται μεγάλη ποσότητα αποσυντιθέμενης φυτικής βιομάζας (Rehm et al., 2009). Οι μεγάλες αλλαγές αλατότητας και θερμοκρασίας που αντιμετωπίζει το είδος σε αυτά τα περιβάλλοντα, καθιστούν εύκολη και εύρωστη τη διατήρησή του σε σταθερό εργαστηριακό περιβάλλον (Rehm et al., 2009). Αποτελεί οργανισμό που λόγω της άμεσης ανάπτυξής του, της αξιοσημείωτης ποικιλομορφίας των άκρων του και της δυνατότητας αναγέννησης αυτών, προσφέρεται για τη διερεύνηση σημαντικών μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών που ενέχονται σε θεμελιώδεις αναπτυξιακές διαδικασίες (Stamatakis & Pavlouros, 2016). Η αξιοποίησή του στην έρευνα διευκολύνεται από διαρκώς διευρυνόμενα εργαλεία για γενετικές, γονιδιωματικές και μικροσκοπικές μελέτες, καθώς και τη λεπτομερή κατανόηση των κυτταρικών γενεαλογιών του εμβρύου και τις κυτταρικές συμπεριφορές που καθορίζουν την ανάπτυξη (Stamatakis & Pavlouros, 2016).

1.2.1 Δομή σώματος και εμβρυογένεση του *Parhyale hawaiensis*

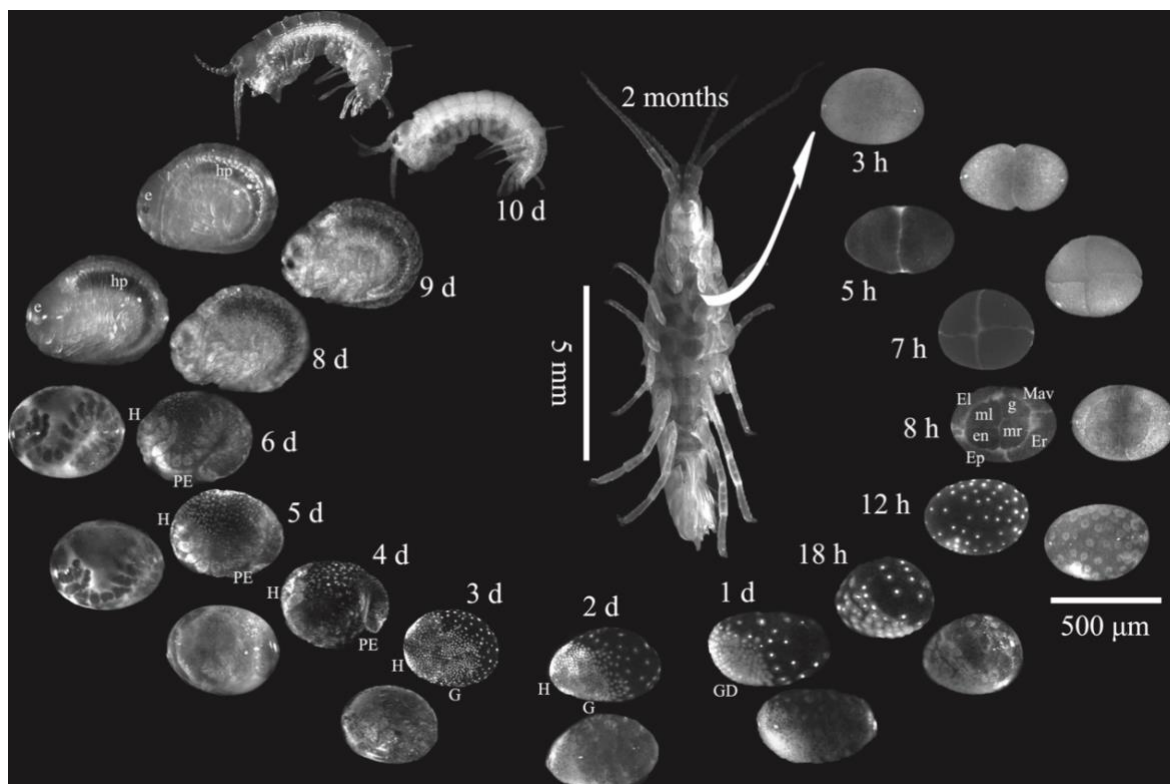
Όπως όλα τα μαλακόστρακα, το *P. hawaiensis* διαθέτει 19 ζεύγη εξαρτημάτων οργανωμένων στο κεφάλι, το θώρακα και την κοιλιά, τα οποία χαρακτηρίζονται από μεγάλη μορφολογική και λειτουργική ποικιλομορφία και εξυπηρετούν την αίσθηση, τη θρέψη, το βάδισμα, το κολύμπι και την αναπαραγωγή (Pavlouros et al., 2009; Rehm et al., 2009; Stamatakis & Pavlouros, 2016) (Εικόνα 3a). Είναι σεξουαλικά διμορφικό είδος, καθώς τα αρσενικά είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος από τα θηλυκά (Εικόνα 3b) και τα 3^ο θωρακικό άκρα των αρσενικών (T3 γναθοπόδια) είναι μεγενθυμένα σε σχέση με αυτά των θηλυκών (Browne et al., 2005; Rehm et al., 2009; Stamatakis & Pavlouros, 2016). Κατά την αναπαραγωγική διαδικασία, το αρσενικό συλλαμβάνει μέσω των T2 γναθοποδίων του το θηλυκό και το μεταφέρει μέχρι να ολοκληρωθεί η συνουσία (Εικόνα 3) (Browne et al., 2005; Rehm et al., 2009; Stamatakis & Pavlouros, 2016).



Εικόνα 3. Σωματική δομή του *Parhyale hawaiensis*. a) Σχεδιαγραμματική απεικόνιση των σωματικών υποδιαίρεσεων του *Parhyale hawaiensis*. Ο κεφαλοθώρακας αποτελείται από το κεφάλι (Cephalon – C) που φέρει 2 ζεύγη κεραιών (antennae 1 και 2) και 3 ζεύγη μασητικών εξαρτημάτων (mandibles, maxillae 1 και 2) και το 1^ο θωρακομερές (T1) που φέρει ένα ζεύγος μασητικών άκρων (maxillipeds). Τα υπόλοιπα 7 θωρακομερή T2-T8 φέρουν 2 ζεύγη άκρων με δαγκάνες (T2-T3 gnathopods) και 5 ζεύγη βαδιστικών άκρων (T4-T8 pereopods) που έχουν στη βάση τους βράγχια και προστατευτικές πλάκες (coxal-plates – CP). Τα 6 κοιλιακά μεταμερή A1-A6 φέρουν δισχιδή ζεύγη άκρων για κολύμβηση (A1-A3 pleopods)

και στήριξη (A4-A6 uropods).b) Σεξουαλικός διμορφισμός στα ώριμα αρσενικά και θηλυκά *Parhyale hawaiiensis*. Τα αρσενικά ζώα έχουν μεγαλύτερο μέγεθος από τα θηλυκά και μεγενθυμένα T3 θωρακικά άκρα, τα θηλυκά φέρουν κοιλιακά ένα «μάρσιπο» όπου αποθέτουν και κρατούν τα γονιμοποιημένα αυγά καθόλη τη διάρκεια της εμβρυογένεσης (λευκός βέλος. c) Ζεύγος αρσενικού και θηλυκού *Parhyale hawaiiensis* κατά την αναπαραγωγική διαδικασία. Αναπαραγωγή εικόνων (a,b) από Browne et al., 2005 και (c) από Paris et al., 2022.

Ανάλογα με την ηλικία τους, τα θηλυκά αποθέτουν 5 έως 30 γονιμοποιημένα αυγά κάθε φορά, τα οποία αναπτύσσονται συγχρονισμένα μέχρι την εκκόλαψή τους μέσα σε ένα κοιλιακό μάρσιπο. Η ηθολογία αυτή καθιστά εύκολη τη συλλογή εμβρύων και τη χρήση τους σε πειραματικές διαδικασίες (Browne et al., 2005; Rehm et al., 2009; Stamatakis & Pανloroulois, 2016). Τα ζώα *Parhyale* γεννούν όλο το χρόνο, επιτρέποντας καθημερινά την πρόσβαση σε εκατοντάδες εμβρύων (Kao et al., 2016). Τα έβρυα του *Parhyale* χαρακτηρίζονται από άμεση ανάπτυξη, δηλαδή τα νεαρά εκκολαπτόμενα ζώα αποτελούν μικρογραφία των ενηλίκων (Browne et al., 2005). Σε αντίθεση με το ολομετάβολο έντομο *Drosophila melanogaster* που χαρακτηρίζεται από έμμεση ανάπτυξη, η άμεση ανάπτυξη του *Parhyale* παρέχει τη δυνατότητα μελέτης των σχηματιζόμενων ενήλικων δομών ως μία συνεχή διαδικασία κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης (Rehm et al., 2009; Stamatakis & Pανloroulois, 2016). Τα έβρυα του *Parhyale* είναι οπτικά διαυγή επιτρέποντας τη λεπτομερή μικροσκοπική παρατήρηση και την in-vivo χρήση φθορίζουσών ουσιών (Rehm et al., 2009). Η εμβρυογένεση διαρκεί 10 μέρες και έχει χωριστεί σε 30 διακριτά στάδια τα οποία έχουν περιγραφεί εκτενώς (Browne et al., 2005; Kao et al., 2016) (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Εμβρυογένεση του *Parhyale hawaiiensis*. Εικόνες εμβρύων φωτεινού πεδίου (εξωτερικά) και φθορισμού (εσωτερικά), τραβήχτηκαν σε συγκεκριμένες ώρες (h) ή μέρες (d) μετά τη γονιμοποίηση. Οι διαιρέσεις του ζυγωτού αρχίζουν περίπου 3 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Μετά από 3 άνισες διαιρέσεις το έμβρυο αποτελείται από 8 βλαστομερίδια, 4 μεγάλα μακρομερή (El, Er, Ep, Mav) και 4 μικρά μικρομερή (ml, mr, en, g) με στερεοτυπική οργάνωση και γενεαλογία. Τα νεαρά εκκολαπτόμενα ζώα αποτελούν μικρογραφίες των ενηλίκων που αυξάνουν σε μέγεθος μέσα από διαδοχικές εκδύσεις και ωριμάζουν αναπαραγωγικά σε περίπου 2 μήνες στους 26°C. Οι συντομογραφίες αντιστοιχούν σε: GD – germ disc, H – Head, G – Grid, PE – posterior end, hp – hematopancreatic caecum, e - eye. Αναπαραγωγή εικόνας από Rallis et al., 2021.

1.2.2 Εργαλεία γενετικής τροποποίησης στον *Parhyale hawaiiensis*

Παρόλο που ο *Parhyale hawaiiensis* αποτελεί οργανισμό μοντέλο με σχετικά μικρόχρονη εργαστηριακή χρήση, έχει αναπτυχθεί ένας επαρκής αριθμός γενετικών εργαλείων που προσφέρουν τη δυνατότητα πραγματοποίησης λειτουργικών και αναπτυξιακών μελετών. Η πρώτη γενετική τροποποίηση του *Parhyale* κατέστη δυνατή με τη χρήση του *Minos* τρανσποζονίου το 2005 (Pavloroulos & Averof, 2005). Το στοιχείο *Minos* πρωτοχαρακτηρίστηκε στη *Drosophila hydei* (Franz & Savakis, 1991) και με τη χρήση του επιτεύχθηκε για πρώτη φορά γενετικός μετασχηματισμός σε κάποιο έντομο εκτός της *Drosophila* (Franz et al., 1994; Loukeris et al., 1995). Το *Minos* αποτελεί ένα τάξης II μεταθετό στοιχείο της υπερικογένειας Tc1/mariner που πραγματοποιεί σχεδόν τυχαίες ενθέσεις στο γονιδίωμα και χρησιμοποιεί έναν “cut and paste” μηχανισμό για τη μετάθεσή του που καταλύεται από τη *Minos* τρανσποζάση (Pavloroulos et al., 2007). Για το γενετικό μετασχηματισμό στον *Parhyale*, πραγματοποιούνται μικροενέσεις σε γονιμοποιημένα αυγά διαγονιδιακών φορέων βασισμένων στο στοιχείο *Minos* μαζί με μία παροδική πηγή *Minos* τρανσποζάσης, συνήθως με τη μορφή mRNA. Οι ενθέσεις στο γονιδίωμα είναι σταθερές, επιτρέποντας τη δημιουργία σταθερών διαγονιδιακών σειρών για πολλές γενιές (Kontarakis & Pavloroulos, 2014; Pavloroulos & Averof, 2005). Επιπλέον, η πρόσβαση σε γονιμοποιημένα αυγά και ο σχετικά αργός ρυθμός των αυλακώσεων στα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης οδηγεί σε υψηλά ποσοστά ενθέσεων στα πολύ αρχικά στάδια της ανάπτυξης και σε χαμηλά επίπεδα μωσαϊκισμού στα ενεμένα άτομα G0 (Kao et al., 2016; Serano et al., 2016). Λόγω των παραπάνω πλεονεκτημάτων, το *Minos* σύστημα αποτελεί πλέον τη βάση ποικίλων γενετικών εφαρμογών στο *Parhyale*, όπως είναι η λειτουργική ανάλυση *cis*-ρυθμιστικών περιοχών με τη χρήση γονιδίων αναφοράς (reporter genes) (Kontarakis & Pavloroulos, 2014; Pavloroulos & Averof, 2005). Άλλες gain-of-function προσεγγίσεις στον *Parhyale*, επιτεύχθηκαν μέσω του συστήματος ιντεγκράσης ΦC31 που πραγματοποιεί στοχευμένες ενθέσεις μέσω ανασυνδυασμού (Kontarakis et al., 2011), αλλά και μέσω της δημιουργίας συστημάτων παροδικής έκφρασης που αξιοποιούν ενδογενείς θερμοεπαγόμενους υποκινητές του *Parhyale* (Pavloroulos et al., 2009). Για τις loss-of-function προσεγγίσεις αξιοποιούνται στον *Parhyale* τα συστήματα σίγησης RNAi (RNA interference) και morpholinos (Liubicich et al., 2009). Τέλος, το σύστημα CRISPR/Cas9 έχει εφαρμοστεί στον *Parhyale* τόσο για τη δημιουργία γονιδιακών ενθέσεων (gene knock-in), όσο και για την εξουδετέρωση γονιδίων (gene knock-out) (Kao et al., 2016; Serano et al., 2016).

1.3 Το γονίδιο *Distal-less (Dll/Dlx)* ως καθοριστικός ρυθμιστής την ανάπτυξης των άκρων

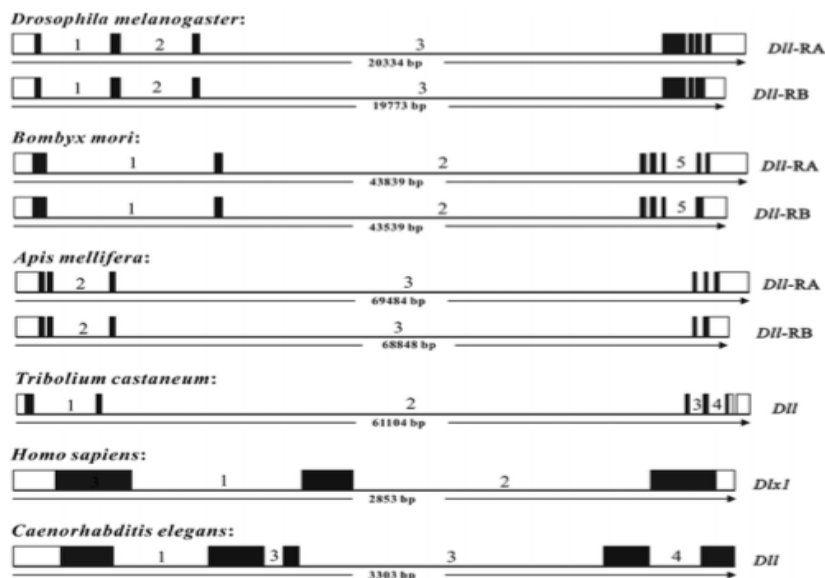
Παρόλο που τα άκρα των σπονδυλωτών και των αρθρόποδων διαφέρουν πολύ μορφολογικά και αναπτυξιακά, τα ορθόλογα homeobox γονίδια *Distal-less - Dll* στα αρθρόποδα και *Dlx* στα σπονδυλωτά - κωδικοποιούν συντηρημένους homeodomain μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι ρυθμίζουν την ανάπτυξη των άκρων και στα δύο αυτά ζωικά φύλα (Chen et al., 2016; Zerucha & Ekker, 2000)(Chen et al., 2016; Zerucha & Ekker, 2000).

1.3.1 Γενωμική οργάνωση και πρωτεϊνική αλληλουχία του *Distal-less*

Σε μελέτη του γενετικού τόπου του *Dll* σε 6 διαφορετικά είδη εντόμων, στο νηματώδη *Caenorhabditis elegans* και στον άνθρωπο δείχθηκε ότι τα πρωτοστόμια φέρουν συνήθως ένα μόνο αντίγραφο του *Dll*, ενώ κατά την εξέλιξη των δευτεροστόμιων προέκυψαν διπλασιασμοί του γονιδίου και έτσι έχουν εντοπιστεί 6 *Dlx* γονίδια στο ποντίκι και τον άνθρωπο, και 8 *Dlx* γονίδια στο zebrafish (Chen et al., 2016). Βρέθηκε ότι το συνολικό μήκος του γονιδίου είναι πολύ μεγαλύτερο στα έντομα κυρίως λόγω ενός ιντρονίου, το οποίο έχει χαρακτηριστεί ως «αρχέγονο». Σε όλα τα είδη στα οποία έχει μελετηθεί φέρει δύο βαθιά συντηρημένες θέσεις ματίσματος, πιθανότατα διότι βρίσκεται μεταξύ των δύο εξονίων που κωδικοποιούν το μεγαλύτερο μέρος της homeodomain περιοχής του *Dll* (Εικόνα 4) (Chen et al., 2016). Οι αλληλουχίες των εξονίων που κωδικοποιούν τη homeodomain περιοχή εμφανίζουν μεγάλη ομολογία αλληλουχίας μεταξύ των οργανισμών (Chen et al., 2016).

Υπάρχουν δύο εναλλακτικά μετάγραφα του *Dll*, ονόματι RA και RB στα περισσότερα δίπτερα, τα υμενόπτερα και τα λεπιδόπτερα, ενώ στο κολεόπτερο *Tribolium castaneum* και το λεπιδόπτερο *Bombyx mori* έχει εντοπιστεί ένα μόνο μετάγραφο (Chen et al., 2016). Τα *Dlx* γονίδια αντίθετα, δίνουν μεγάλο αριθμό μεταγράφων λόγω εναλλακτικού ματίσματος αλλά και λόγω της διαφορετικής οργάνωσης των *Dlx* παράλογων γονιδίων *Dlx1*, *Dlx2* κ.α. (Εικόνα 5) (Chen et al., 2016).

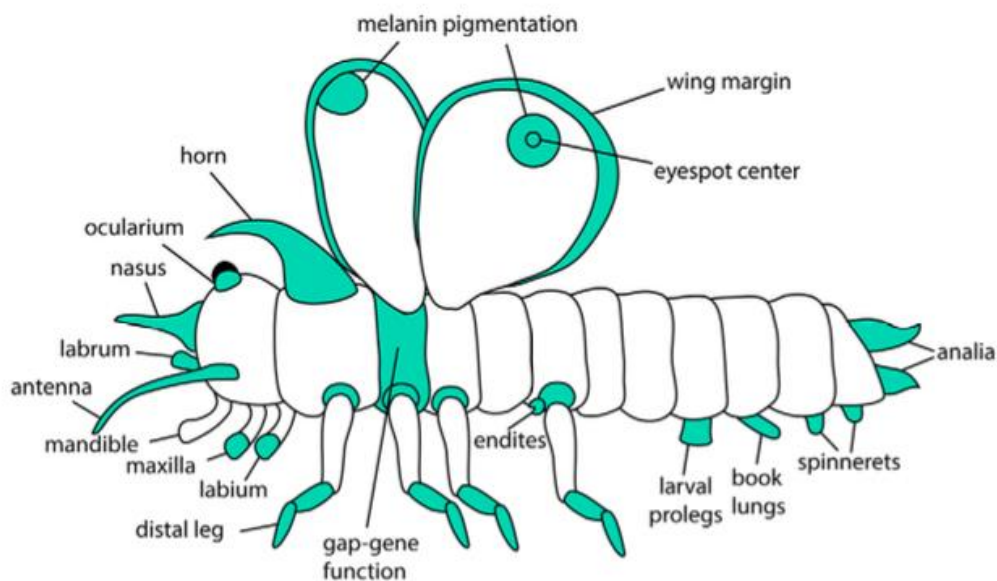
Σε ό,τι αφορά την πρωτεϊνική homeodomain περιοχή του *Dll*, αποδεικνύεται ότι είναι σχεδόν αμετάβλητη ανάμεσα στα αρθρόποδα, αφού μόνο 20 από τα 60 κατάλοιπα του καρβοξυ-τελικού άκρου, φέρουν διαφορές (Chen et al., 2016). Η συντήρηση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας της homeodomain περιοχής και κατ'έκταση της δομής της, συνδέεται με το συντηρημένο ρόλο του *Dll* στην ανάπτυξη.



Εικόνα 5. Σχεδιαγραμματική αναπαράσταση της μεταγραφικής μονάδας γονιδίων *Dll* και *Dlx*. Τα μαύρα κουτιά συμβολίζουν τα εξόνια, ενώ τα άσπρα κουτιά, τις 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές. Οι αριθμημένες γραμμές μεταξύ των μαύρων κουτιών συμβολίζουν τα ιντρόνια. Αναπαριστώνται τα εναλλακτικά μετάγραφα RA και RB των *D.melanogaster*, *B.mori* και *A.mellifera*, τα μοναδικά μετάγραφα των *T.castaneum* και *C.elegans* και το *Dlx1* γονίδιο του ανθρώπου. Το ιντρόνιο 3 στα είδη *D.melanogaster* και *A.mellifera* και το ιντρόνιο 2 στα είδη *B.mori* και *T.castaneum*, χωρίζουν τα δύο εξόνια που κωδικοποιούν τη homeodomain περιοχή. Συγκριτικά με τα έντομα, τα εξόνια στον άνθρωπο και τον *C.elegans* είναι λιγότερα σε αριθμό και μεγαλύτερα σε μέγεθος. Αναπαραγωγή εικόνας από Chen et al., 2016.

1.3..2 Αναπτυξιακοί ρόλοι του *Distal-less* στα αρθρόποδα

Εκτός από το ρόλο του στην ανάπτυξη των άκρων, το *Dll* έχει και άλλους αναπτυξιακούς ρόλους. Μάλιστα έχει προταθεί ότι νωρίς στην εξέλιξη, ο πρώτος ρόλος του *Dll* αφορούσε την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος και στη συνέχεια, πριν ακόμη το διαχωρισμό πρωτοστόμιων και δευτεροστόμιων ζώων, επεκτάθηκε σε νέες λειτουργίες (Panganiban & Rubenstein, 2002). Ακόμη, έχει δειχθεί ότι η πρώιμη έκφραση του *Dll* σε κνιδόζωα (Ryan et al., 2007), μαλάκια (Lee & Jacobs, 1999), ημιχορδωτά (Lowe et al., 2003) και αράχνες (Pechmann et al., 2011) αφορούσε τον καθορισμό του προσθοπίσθιου άξονα και ότι αργότερα κατά την εξέλιξη η λειτουργία αυτή συνδυάστηκε με το ρόλο του στην εγκαθίδρυση του εγγύ-άπω άξονα των άκρων (Lemons et al., 2010). Στα καρκινοειδή, το *Dll* συμμετέχει στην εγκαθίδρυση του εγγύ-άπω άξονα των άκρων (ποδιών, κεραιών και φτερών), στο σχηματισμό αισθητήριων δομών και στην ανάπτυξη του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος (Williams et al., 2002). Μελέτες σε έντομα και αράχνες αποδεικνύουν ότι το *Dll* συμμετέχει στην εγκαθίδρυση του εμπροσθοπίσθιου άξονα του κεφαλιού, στην ανάπτυξη όλων των κοιλιακών άκρων εκτός των γναθικών εξαρτημάτων (mandibles) και των ραχιαίων άκρων (Chen et al., 2016) (Εικόνα 5). Ακόμη, λειτουργεί σαν gap gene σε ένα είδος αράχνης, όμως ο ρόλος αυτός μένει να αποσαφηνιστεί (Pechmann et al., 2011) (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Σωματικές δομές που εκφράζουν το *Dll* σε ένα ιδεατό αρθρόποδο με χαρακτηριστικά εντόμων και αραχνών. Οι δομές με γαλάζιο εκφράζουν το *Dll* κατά την ανάπτυξη και τη διαφοροποίησή τους. Φαίνεται ότι το *Dll* είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των κοιλιακών άκρων (εκτός των mandibles) καθόλη τη διάρκεια της ανάπτυξης, καθώς και των ραχιαίων άκρων σε πιο όψιμα στάδια της ανάπτυξης. Για παράδειγμα, το *Dll* ρυθμίζει την ανάπτυξη εξαρτημάτων/άκρων στο εμπρόσθιο και οπίσθιο μέρος του σώματος, την ανάπτυξη των φτερών στις μύγες, το μέγεθος των οφθαλμικών κηλίδων στις πεταλούδες και τη σύνθεση μελανίνης σε φτερά μυγών και πεταλούδων. Δεν απεικονίζονται οι δομές του νευρικού συστήματος και οι αισθητήριες δομές στις οποίες το *Dll* είναι απαραίτητο. Αναπαράγωγή εικόνας από Chen et al., 2016.

Το *Dll* λειτουργεί επίσης σαν γονίδιο επιλογής (selector gene) των κεραιών της *Drosophila*, αφού στον δίσκο που αναπτύσσει τα μάτια και τις κεραιές, φαίνεται ότι ο τομέας των κυττάρων που δημιουργεί τις κεραιές εκφράζει αποκλειστικά *Dll*, ενώ στον τομέα που

σηματίζει τα μάτια, η έκφραση του γονιδίου καταστέλλεται (Chen et al., 2016). Αργότερα, στα όψιμα στάδια της νύμφης, το *Dll* διαφοροποιεί τις άπω δομές των κεραιών.

Σε ό,τι αφορά την εγκαθίδρυση του εγγύ-άπω άξονα των άκρων, έχει δειχθεί ότι ευρύτερα στα αρθρόποδα και ειδικότερα στα καρκινοειδή βασίζεται στην αλληλεπίδραση των γονιδίων *Distal-less* και *Extradenticle (exd)*, των οποίων η έκφραση οριοθετείται σε δύο περιοχές: αυτή που χαρακτηρίζεται από έκφραση του *exd* διαμορφώνει την εγγύ περιοχή κοντά στο σώμα και η περιοχή με έκφραση του *Dll* διαμορφώνει το κύριο μέρος των άκρων (Williams et al., 2002). Θα πρέπει να διευκρινιστεί, ότι τα τμήματα της έκφρασης παραγόντων όπως το *Dll* δεν αντιστοιχούνται επακριβώς σε τμήματα των τελικά διαμορφωμένων άκρων, ούτε στα διάφορα καρκινοειδή που έχουν μελετηθεί, αλλά ούτε και στη *Drosophila* (Williams et al., 2002; Williams & Nagy, 2001).

Οι ρόλοι του *Dll* στα αρθρόποδα συνοψίζονται στον καθορισμό των κυττάρων που θα σχηματίσουν άκρα, στη διαμόρφωση του εγγύ-άπω άξονα, τη μορφογένεση των άκρων και το σχηματισμό περιφερικών αισθητήριων οργάνων (Panganiban et al., 1997). Στη *Drosophila*, στα καρκινοειδή και σε όλα τα αρθρόποδα που έχουν μελετηθεί, αναδείχθηκε ότι το *Dll* αποτελεί γονίδιο κλειδί της ανάπτυξης όλων των άκρων (Angelini & Kaufman, 2005; Cohen & Jurgens, 1989; Panganiban et al., 1995). Με δεδομένο ότι η ποικιλομορφία των άκρων των αθροπόδων υπήρξε καθοριστικός παράγοντας της εξελικτικής τους πορείας και εξάπλωσης, διαφαίνεται ότι το *Dll* συντέλεσε σε μεγάλο βαθμό στην επιτυχία αυτού του φύλου (Pechmann et al., 2010). Στη *Drosophila*, φαίνεται ότι ρυθμίζει τον καθορισμό της θέσης των άκρων νωρίς κατά την εμβρυογένεση, ενώ στην πορεία της η έκφρασή του φθίνει (Chen et al., 2016). Στους λαρβικούς δίσκους των ποδιών, η έκφραση του *Dll* διατηρείται αμείωτη στα κύτταρα που διαμορφώνουν τις άπω-δομές των ποδιών (Chen et al., 2016). Αντίθετα, στους λαρβικούς δίσκους των φτερών της *Drosophila*, το *Dll* περιορίζεται στην περιφέρεια (wing margin), ενώ κατά τον σχηματισμό των φτερών η έκφραση του χάνεται (Chen et al., 2016). Γενικά, το *Dll* εκφράζεται παροδικά στα κύτταρα του θώρακα που θα δώσουν τα κοιλιακά και τα ραχιαία άκρα στα πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης, ενώ εκφράζεται σταθερά στα κύτταρα που θα δώσουν το άπω-μέρος των άκρων στα όψιμα στάδια της εμβρυογένεσης και στη λαρβα, και καθοδηγεί διαρκώς το σχηματισμό τους (Estella & Mann, 2010).

Ευρύτερα, όλα τα αρθρόποδα στα οποία το *Dll* έχει εξουδετερωθεί, αναπτύσσουν περικομμένα άκρα, τα οποία διαθέτουν τις εγγύς αλλά όχι τις άπω δομές (Panganiban, 2000). Με άλλα λόγια, σε αντίθεση με τις εγγύς-δομές κατά την ανάπτυξη των οποίων η έκφραση του *Dll* εκμηδενίζεται, οι άπω-δομές των άκρων απαιτούν τη συνεχή έκφρασή του. Διαφαίνεται λοιπόν ότι στα αρθρόποδα, ο ρόλος του *Dll* ως καθοριστής της μορφογένεσης του άπω-μέρους των άκρων είναι συντηρημένος (Chen et al., 2016).

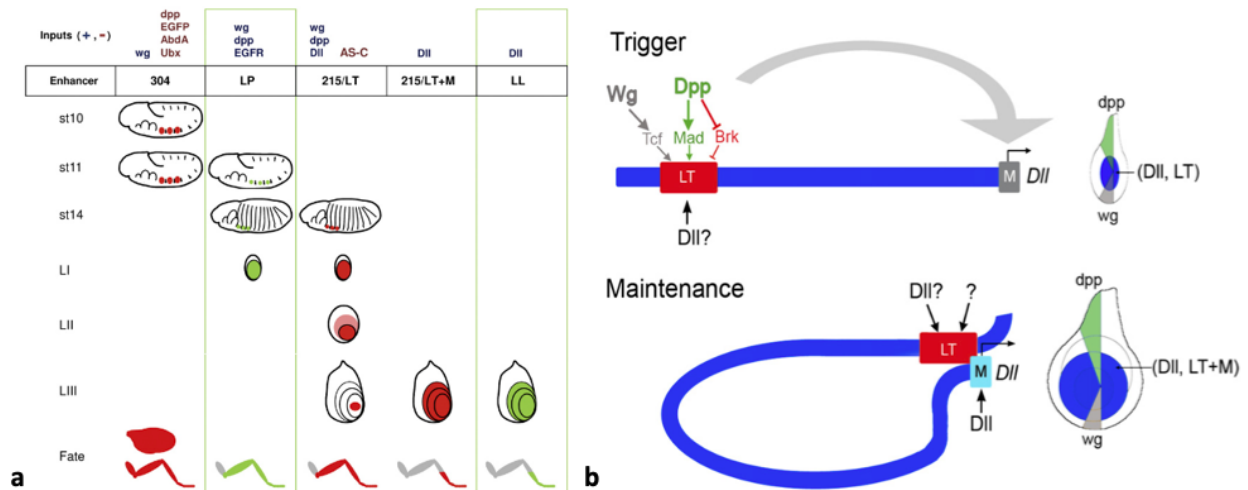
1.4 Η πολύπλοκη ρύθμιση του γονιδίου *Distal-less* και ο κρίσιμος ρόλος των ενισχυτών

Οι ενισχυτές (enhancers) είναι *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία (*cis*-response elements; CREs) που έχουν χαρακτηριστεί ως οι λογικοί επαγωγείς των ποικίλων σημάτων που δέχονται τα γονίδια. Οι ενισχυτές ρυθμίζουν το χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης των γονιδίων μέσω θέσεων πρόσδεσης (binding sites) για μεταγραφικούς παράγοντες που επάγουν

(ενεργοποιητές) ή καταστέλλουν (καταστολείς) τη μεταγραφή (Istrail & Davidson, 2005). Μέχρι σήμερα, οι ενισχυτές που ρυθμίζουν τη έκφραση του *Dll* στα αρθρόποδα έχει μελετηθεί μόνο στη *Drosophila melanogaster*. Με τη σειρά του, το *Dll* ως μεταγραφικός παράγοντας προσδένεται μέσω της homeodomain περιοχής του σε *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία πολλών γονιδίων τα οποία ελέγχει. Σε συνεργασία με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και ρυθμιστικά μονοπάτια σηματοδότησης, όπως τα *Wingless (wg)*, *Decapentaplegic (dpp)*, *Epidermal growth factor receptor (EGFR)*, *Homothorax (hth)*, *Extradenticle*, *Buttonhead (btd)*, τα γονίδια *Hox* και άλλα, το *Dll* συμμετέχει στην εκτέλεση ποικίλων αναπτυξιακών προγραμμάτων (Chen et al., 2016).

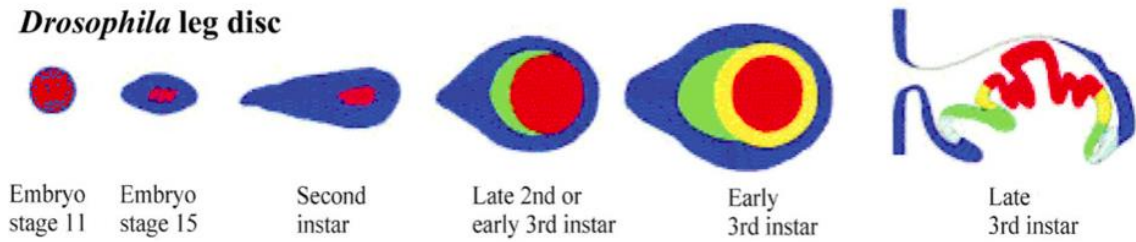
1.4.1 Η ρύθμιση του *Distal-less* κατά την ανάπτυξη των άκρων στη *Drosophila*

Στη *Drosophila* έχουν ταυτοποιηθεί ενισχυτές του γονιδίου *Dll*, οι οποίοι ενεργοποιούνται σε διαφορετικά στάδια της ανάπτυξης από διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια (Εικόνα 7a). Νωρίς κατά την εμβρυογένεση της *Drosophila*, τα *Wg*, *Dpp* και *EGFR* δρουν ανταγωνιστικά μεταξύ τους, αφού το *Wg* ρυθμίζει θετικά, ενώ τα *Dpp* και *EGFR* αρνητικά την έκφραση του *Dll* μέσω του πρώιμου ενισχυτή *Dll304* (Cohen & Jürgens, 1990; Goto & Hayashi, 1997; O'Hara et al., 1993). Αρχικά, ο ενισχυτής *Dll304* ενεργοποιεί το *Dll* σε δύο ομάδες 30 κυττάρων σε κάθε θωρακικό μεταμερές του εμβρύου, τα οποία αποτελούν τα πρόδρομα κύτταρα των δίσκων των ποδιών και των φτερών/αλτήρων (Estella et al., 2012; Pavlopoulos & Wolff, 2021). Η έκφραση του *Dll* περιορίζεται στα τρία θωρακικά μεταμερή λόγω καταστολής του μέσω του ενισχυτή *Dll304* στα κοιλιακά μεταμερή από τα *Hox* γονίδια *Ubx* και *Abd-A* (Estella et al., 2012; Vachon et al., 1992). Στα επόμενα εμβρυικά στάδια, η ρύθμιση του *Dll* περνάει από τον *Dll304* σε άλλους ενισχυτές, τον *LP* και τον *LT/215*, των οποίων η δράση επικαλύπτεται (redundant function) κατά την όψιμη εμβρυογένεση και τα αρχικά λαρβικά στάδια. Ο ενισχυτής *LP* ρυθμίζεται θετικά από τα *Wg*, *Dpp* και *EGFR* μονοπάτια και παραμένει ενεργός μέχρι το 1^ο λαρβικό στάδιο (Estella et al., 2012; Galindo et al., 2011). Ο πιο καλά χαρακτηρισμένος ενισχυτής *LT* συντηρεί την έκφραση του *Dll* σε 15 κύτταρα (από τα 30 κύτταρα του *Dll304*) τα οποία θα δώσουν γένεση στις άπω δομές των ενήλικων άκρων (τελοπόδια) και στα υποτυπώδη λαρβικά άκρα (όργανα του Keilin) (Estella et al., 2012; Pavlopoulos & Wolff, 2021). Ο *LT* παραμένει ενεργός έως το 3^ο λαρβικό στάδιο και καθοδηγεί την έκφραση του *Dll* στο κεντρικό μέρος των αναπτυξιακών δίσκων των ποδιών (Εικόνα 7a) (Estella et al., 2008). Τα σήματα *Wg* και *Dpp* ρυθμίζουν θετικά τον *LT* ενισχυτή με την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων *Pangolin* και *Mad* (Estella et al., 2008; Estella & Mann, 2010). Καθώς το μέγεθος του δίσκου αυξάνεται, ο *LT*-ενισχυτής σε συνεργασία με έναν δεύτερο στοιχείο *M* και θετική αυτορρύθμιση από το ίδιο το *Dll* συντηρούν την έκφραση του *Dll* στο κεντρικό μέρος του δίσκου του ποδιού ανεξάρτητα από τα *Wg* και *Dpp* (Estella et al., 2008). Ο μηχανισμός αυτός έχει περιγραφεί ως πυροδότηση-διατήρηση (Trigger-Maintenance) της γονιδιακής έκφρασης μέσω της δράσης διαφορετικών ενισχυτών (Εικόνα 7b). Ένας ακόμη ενισχυτής του *Dll*, ο *LL*, ενεργοποιείται κατά το 3^ο λαρβικό στάδιο και αυτορρυθμίζεται θετικά από το ίδιο το *Dll* (Estella et al., 2012). Προτείνεται λοιπόν, ότι ο ρόλος διαφορετικών και σε μεγάλο βαθμό λειτουργικά επικαλυπτόμενων ενισχυτών είναι κομβικός για τη δράση του γονιδίου σε διαφορετικά στάδια και τμήματα του αναπτυσσόμενου άκρου (Estella & Mann, 2010; Estella et al., 2008).



Εικόνα 7. Ρύθμιση του *Dll* κατά την ανάπτυξη των άκρων της *Drosophila*. a) Οι περιοχές έκφρασης του *Dll* απεικονίζονται σχεδιαστικά στα εμβρυικά στάδια 10, 11, 14, στα τρία λαμβικά στάδια L-I-III και στην ενήλικη *Drosophila*. Στο πάνω μέρος της εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των ενισχυτών που ρυθμίζουν την έκφραση του *Dll* σε κάθε στάδιο σε συνδυασμό με τους παράγοντες που ενεργοποιούν (+) ή καταστέλλουν (-) τον κάθε ενισχυτή. b) Μηχανισμός πυροδότησης και διατήρησης του *Dll* μέσω των LT και M ενισχυτών. Με μπλε φαίνεται το DNA ανοδικά της μεταγραφικής μονάδας του *Dll* με τις LT (κόκκινο) και M (γκρι) *cis*-ρυθμιστικές περιοχές. Στις εικόνες δεξιά παρουσιάζονται αναπτυξιακοί δίσκοι ποδιών με τις περιοχές έκφρασης των *Dll* (μπλε), του *dpp* (πράσινο) και *Wg* (γκρι). (Πάνω) Ο LT ενισχυτής ενεργοποιείται στο κέντρο του δίσκου από τα *Wg* και *Dpp* σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω θέσεων πρόσδεσης για τους Tcf και Mad παράγοντες. Με έναν άγνωστο μηχανισμό το ίδιο το *Dll* αυτορυθμίζεται επίσης θετικά μέσω του LT ενισχυτή. Η καταστολή του LT από το *Brk* στα πλευρικά μέρη του δίσκου λόγω της απουσίας του *Dpp* οριοθετεί το *Dll* στο κέντρο. Ο LT ενισχυτής επάγει την έκφραση του *Dll* μέσω αλληλεπίδρασης με το στοιχείο M, το οποίο περιέχει και τον υποκινητή του γονιδίου. (Κάτω) Καθώς ο δίσκος αυξάνεται σε μέγεθος, το LT ανεξαρτητοποιείται από τα *Wg*/*Dpp* σήματα και συνεργατικά με το M και τη θετική αυτορρύθμιση μέσω *Dll*, διατηρεί την έκφραση του *Dll* στο κέντρο του δίσκου. Αναπαραγωγή εικόνας (a) από Galindo et al., 2011. και (b) από Estella et al., 2008.

Όπως προαναφέρθηκε, στα λαμβικά στάδια, η έκφραση του *Dll* ρυθμίζεται από τη συνεργασία *Wg* και *Dpp* σημάτων, αλλά και από την αυτορρύθμιση του ίδιου του γονιδίου (Goto & Hayashi, 1997; Lecuit & Cohen, 1997). Τα *Wg* και *Dpp* λειτουργούν ως θετικά εναρκτήρια σήματα για την εγκαθίδρυση του εγγύ-άπω άξονα στους δίσκους του ποδιού (Chen et al., 2016). Συγκεκριμένα, υψηλά επίπεδα των *Wg* και *Dpp* στα ραχιαία και κοιλιακά μέρη του δίσκου του ποδιού (Williams et al., 2002) ενεργοποιούν το *Dll* στο κεντρικό τμήμα αυτού, το οποίο θα δώσει τελικά το άπω-μέρος του ποδιού (Brower, 1986). Χαμηλότερα επίπεδα των *Wg* και *Dpp* ενεργοποιούν το γονίδιο *Dachshund* (*dac*) στη μέση του δίσκου, που θα δώσει τελικά το ενδιάμεσο μέρος του ποδιού, ενώ περιορίζουν την έκφραση του *Hth* στην περιφέρεια του δίσκου, που θα δώσει τελικά την εγγύ περιοχή του ποδιού (Chen et al., 2016; Estella et al., 2008; Estella & Mann, 2008). Τα σήματα *Dll*, *Dac* και *Hth* αλληλεπιδρούν ανταγωνιστικά μεταξύ τους σχηματίζοντας τομείς έκφρασης στον δίσκο οι οποίοι διαμορφώνουν τον εγγύ-άπω άξονα του ποδιού (Εικόνα 8). Ταυτόχρονα, το *Hox* γονίδιο *Antennapedia* (*Antp*) σε συνεργασία με το *Dll* καταστέλλουν το *Hth* στο άπω άκρο, αποτρέποντας το συνεντοπισμό των *Dll* και *Hth* που θα καθοδηγούσε τη διαφοροποίηση του άκρου σε κεραία (Si Dong et al., 2000).



Εικόνα 8. Περιοχές έκφρασης των *Dll*, *Dac*, *Hth* που καθορίζουν τον εγγύ-άπω άξονα του ποδιού στη *Drosophila*. Οι περιοχές που εκφράζουν *Dll* φαίνονται με κόκκινο, *Dac* με πράσινο, *Hth* με μπλε, *Dll+Dac* με κίτρινο, και *Dll+Dac+Hth* με γκρι. Στο εμβρυικό στάδιο 11, το *Dll* εκφράζεται σε όλα τα πρόδρομα κύτταρα του θώρακα, αλλά από το στάδιο 15 και μετά η έκφραση περιορίζεται στο κέντρο του πρόδρομου ποδιού. Στα επόμενα λαρβικά στάδια, οι τομείς έκφρασης των *Dll*, *Dac* και *Hth* διαμορφώνουν το ακριανό, το ενδιάμεσο και το εγγύ μέρος του ποδιού, αντίστοιχα. Αναπαραγωγή εικόνας από Chen et al., 2016.

1.4.2 Η ρύθμιση του *Distal-less* στα καρκινοειδή

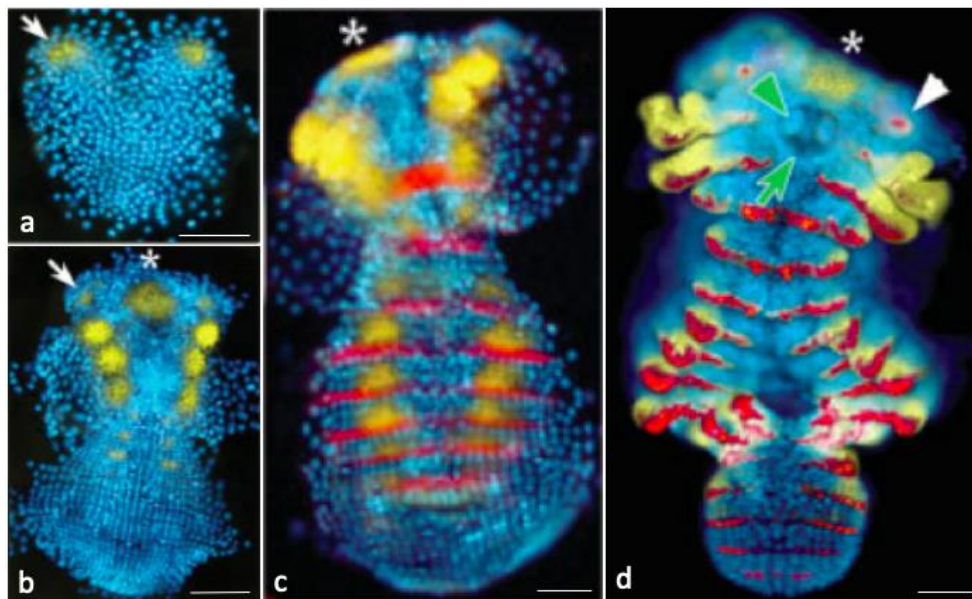
Η έκφραση του γονιδίου *Dll* έχει μελετηθεί σε ποικιλία αρθροπόδων, συμπεριλαμβανομένων κάποιων καρκινοειδών. Όσο εξελίσσεται η μεταμεριδίωση (segmentation) κατά τον προσθοπίσθιο άξονα, η έκφραση του *Dll* ξεκινάει κοιλιακά σε ομάδες εκτοδερμικών κυττάρων που είναι εξαρχής χωρισμένα σε πρόσθια (anterior) και οπίσθια (posterior) κύτταρα που εκφράζουν το γονίδιο μεταμερικής πολικότητας (segment polarity) *Engrailed (en)* (Browne et al., 2005)(Wolff et al., 2018; Pavlopoulos and Wolff, 2020). Σε ό,τι αφορά τα ακριβή σηματοδοτικά μονοπάτια που συνδράμουν στην έναρξη την ανάπτυξης των άκρων και στην εγκαθίδρυση του εγγύ-άπω άξονα, υπάρχουν ενδείξεις για το συντηρημένο ρόλο του *Wg* στα πανκαρκινοειδή (Williams & Nagy, 2004). Τα πράγματα δεν είναι ξεκάθαρα για το ρόλο του *Dpp* (Ober & Jockusch, 2006). Τα πρότυπα έκφρασης στα αναπτυσσόμενα άκρα των καρκινοειδών και γενικότερα των αρθροπόδων ποικίλλουν και διαφέρουν σε σχέση με αυτά στη *Drosophila*. Επιπλέον, χωρίς να έχουν γίνει αξιόπιστες λειτουργικές μελέτες αυτών των πλειοτροπικών σηματοδοτικών μονοπατιών εκτός της *Drosophila*, παραμένει άγνωστο πόσο συντηρημένη είναι η δράση τους.

Έτσι, η καλύτερη γνώση των ενισχυτών του *Dll* και η συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών ρυθμιστικών περιοχών μεγάλου αριθμού αρθροπόδων θα αποδώσει μία πιο καθαρή εικόνα της ρύθμισης του *Dll* κατά τη μορφογένεση των άκρων (Chen et al., 2016). Οι λειτουργικές συγκρίσεις cis-ρυθμιστικών στοιχείων των αρθροπόδων, θα δια φωτίσουν το κατά πόσο οι μηχανισμοί ρύθμισης και τα πρότυπα έκφρασης συντηρημένων γονιδίων της μορφογένεσης διατηρούνται ή παραλλάσσονται μεταξύ ειδών με έμμεση και άμεση ανάπτυξη των άκρων. Στα πλαίσια αυτά, η λειτουργική ανάλυση cis-ρυθμιστικών στοιχείων στον *Parhyale hawaiiensis* θα δια φωτίσει για πρώτη φορά τη ρύθμιση των ενισχυτών του *Dll*, εκτός της *Drosophila*.

1.4.3 Γονίδιο *Distal-less* στον *Parhyale hawaiiensis*

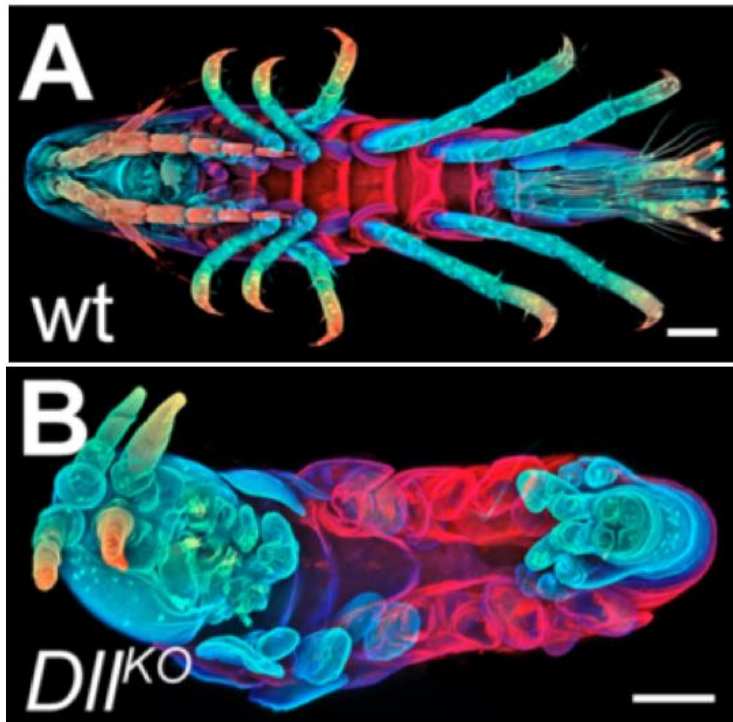
Στο γονιδίωμα του *Parhyale hawaiiensis* υπάρχουν τρία παράλογα γονίδια *Dll* (Liubicich et al., 2009), ενώ όπως και σε άλλα καρκινοειδή, έχει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη και μορφογένεση των άκρων. Το αναφερόμενο ως «αρχέγονο» ιντρόνιο 3 μεταξύ των εξονίων που κωδικοποιούν τη homeodomain περιοχή (Chen et al., 2016), υπάρχει και στα *Parhyale Dll* γονίδια ως ιντρόνιο 2. Ένα από τα τρία παράλογα γονίδια *Distal-less* του *Parhyale*

hawaiensis, γνωστό ως *Distal-less early* (*Dlle*; αναφέρεται ως *Dll* στην υπόλοιπη εργασία) ενεργοποιείται πρώιμα και είναι υπεύθυνο για την ανάπτυξη των άκρων στην εμβρυογένεση (Bruce & Patel, 2020; Kao et al., 2016; Liubicich et al., 2009). Σε ό,τι αφορά το πρότυπο έκφρασής του στο *Parhyale*, ξεκινάει να εκφράζεται στις 60 ώρες της εμβρυογένεσης (S11) κοιλιακά του εμβρύου, στους κεφαλικούς λοβούς που βρίσκονται στο εμπρόσθιο μέρος του σώματος. Μέχρι τις 80 ώρες της εμβρυογένεσης (S15), ενεργοποιείται στα κύτταρα που σχηματίζουν τις κεραίες και τα μασητικά εξαρτήματα της κεφαλής (Browne et al., 2005). Καθώς προστίθενται και ωριμάζουν τα καινούρια θωρακικά και κοιλιακά μεταμερή από μία δεξαμενή αδιαφοροποίητων εκτοδερμικών κυττάρων στο οπίσθιο άκρο του εμβρύου, το *Dll* ενεργοποιείται προοδευτικά σε ολοένα περισσότερα μεταμερή και συνεχίζει να εκφράζεται σε όλα τα αναπτυσσόμενα άκρα στις άπω δομές τους (Browne et al., 2005) (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Έκφραση του *Dll* και του *Engrailed* στο *Parhyale hawaiensis*. Ανίχνευση με ανοσοφθορισμό του *Dll* (κίτρινο), του *En* (κόκκινο) και των πυρήνων (DAPI μπλε). Οι εικόνες δείχνουν κοιλιακές όψεις εμβρύων προσανατολισμένα με το εμπρόσθιο μέρος προς τα πάνω. (a) Η έκφραση του *Dll* εντοπίζεται αρχικά στο στάδιο S11 στους οπτικούς λοβούς (άσπρα βέλη). (b) Στο στάδιο S15 το *Dll* ανιχνεύεται στις αντένες και τα μασητικά εξαρτήματα του κεφαλιού, (c) στο στάδιο S17 ανιχνεύεται επίσης στα πρόδρομα άκρα των θωρακικών μεταμερών T1-T4, και (d) στο στάδιο S19 ανιχνεύεται στα πρόδρομα άκρα όλων των θωρακικών μεταμερών και μερικών κοιλιακών μεταμερών. Το *Dll* ανιχνεύεται και στο labrum (b-d) μπροστά από το σχηματιζόμενο στόμα (πράσινα βέλη). Scale bars 100μm. Αναπαραγωγή εικόνας από Browne et al., 2005.

Η συντηρημένη και καθοριστική λειτουργία του *Dll* στον καθορισμό του άπω μέρους των άκρων, έχει επιβεβαιώνεται και σε πειράματα εξουδετέρωσης του *Distal-less* με CRISPR/Cas9 knock-out (Kao et al., 2016). Τα μεταλλαγμένα ζώα φέρουν περικομμένα άκρα, τα οποία διαθέτουν τις εγγύς αλλά όχι τις άπω δομές (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. *Parhyale hawaiensis* αγρίου τύπου και μεταλλαγμένο για το γονίδιο *Dll*. Α) Φαινότυπος αγρίου-τύπου και Β) μεταλλαγμένος φαινότυπος ύστερα από *Dll* knock-out με CRISPR/Cas9, όπου όλα τα άκρα είναι κουτσουρεμένα. Οι εικόνες δείχνουν κοιλιακές όψεις νεαρών ατόμων *Parhyale* (προσανατολισμένα με το εμπρόσθιο μέρος προς τα αριστερά) που έχουν υποστεί χρώση του εξωσκελετού, έχουν απεικονιστεί με συνεστιακή μικροσκοπία και οι οπτικές τομές έχουν χρωματιστεί ανάλογα με το βάθος τους. Scale bar 100μm. Αναπαραγωγή εικόνας από Kao et al., 2016.

Στόχος της εργασίας αυτής ήταν να χαρακτηριστούν οι *cis*-ρυθμιστικές περιοχές στο *Distal-less early (Dll)* γονίδιο. Το αναφερόμενο ως «αρχέγονο» ιντρόνιο μεταξύ των εξονίων που κωδικοποιούν τη homeodomain περιοχή του *Dll* υπάρχει και στον *Dll*, επομένως η ύπαρξη ρυθμιστικών στοιχείων εντός της ιντρονικής αυτής περιοχής ελέγχθηκε στα πλαίσια αυτής της εργασίας. Η βασική υπόθεση, ότι οι περιοχές ανοιχτής χρωματίνης που αποκαλύπτονται σε ATAC-seq πειράματα λειτουργούν ως *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία του *Dll* έχει επιβεβαιωθεί από την εύρεση ενός ενισχυτή (E1) που ενεργοποιεί το *Dll* στα πρόδρομα κύτταρα των άκρων σε έμβρυα *Parhyale* (Msc Thesis - Γιάννης Ράλλης, 2020). ATAC-seq πειράματα σε έμβρυα S13, S17 και S19 του *Parhyale*, αποκάλυψαν ανοιχτές περιοχές χρωματίνης ανοδικά της 5' UTR περιοχής αλλά και εντός της περιοχής του συντηρημένου ιντρονίου. Επιλεκτικά, κάποιες από αυτές της περιοχές ελέγχθηκαν ως υποψήφιας *cis*-ρυθμιστικές περιοχές του *Dll*, μέσω κατασκευών αναφοράς σε διαγονιδιακούς φορείς. Αυτές ενσωματώθηκαν στο γονιδίωμα του *Parhyale* και ελέγχθηκαν για το αν αναπαράγουν το αναμενόμενο πρότυπο έκφρασης του *Dll* στα αναπτυσσόμενα άκρα και σε ποια στάδια της εμβρυογένεσης.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Δημιουργία πλασμιδίων αναφοράς

Όλα τα πλασμίδια αναφοράς που κατασκευάστηκαν στα πλαίσια της πτυχιακής αυτής εργασίας δημιουργήθηκαν μέσω των παρακάτω βημάτων. Αρχικά, επιλεγμένες υποψήφιες cis-ρυθμιστικές περιοχές (cis-regulatory elements – CREs) μήκους 1-3kb, που περιείχαν ATAC-seq κορυφές του γονιδίου *Dll*, ενισχύθηκαν με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR) από το γενωμικό DNA ενήλικων ζώων *Parhyale* αγρίου τύπου. Στη συνέχεια κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pGTZ{Ph5UTR-Dlleprom-PhH2B-mCherry} ανοδικά από τον ενδογενή *Parhyale Dll* υποκινητή (Dlleprom) μήκους 200bp, ο οποίος ακολουθείται από την 5'-UTR περιοχή του *Dll* (Ph5UTR) μήκους 500bp και από την ταχείας ωρίμανσης κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry. Οι υποψήφιοι ενισχυτές ρυθμίζουν μέσω του φορέα αυτού, το πρότυπο έκφρασης της mCherry η αλληλουχία της οποίας έχει συντηχθεί με την ιστόνη H2B του *Parhyale* για πυρηνικό εντοπισμό. Δημιουργήθηκαν έτσι κασέτες αναφοράς για τους υποψήφιους ενισχυτές, η ενεργότητα των οποίων αντικατοπτρίζεται στο χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης της φθορίζουσας πρωτεΐνης mCherry. Μικρή ποσότητα βακτηριών κάθε pGTZ{CRE-Ph5UTR-Dlleprom-PhH2B-mCherry} θετικού κλώνου εμβολιάστηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο και μία ποσότητα βακτηριών αποθηκεύτηκε σε διάλυμα γλυκερόλης 30% στους -80°C (Bacterial Stab). Πλασμιδιακό DNA από κάθε θετικό κλώνο pGTZ{CRE-Ph5UTR-Dlleprom-PhH2B-mCherry} καθαρίστηκε με το QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) για τα επόμενα πειράματα. Κάθε κασέτα αναφοράς CRE-mCherry κλωνοποιήθηκε στη συνέχεια στον φορέα pMi{PhOps-EGFP} που φέρει την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη EGFP υπό τον έλεγχο του cis-ρυθμιστικού στοιχείου PhOpsin1, καθοδηγώντας την έκφραση στα ομμάτια του οφθαλμού και λειτουργώντας ως δείκτης διαγονιδιακών ατόμων (Ramos et al., 2019). Η συνολική αλληλουχία {PhOps-EGFP; CRE-mCherry} τοποθετήθηκε εντός δύο ανεστραμμένων επαναλήψεων που εξυπηρετούν τη δράση της *Minos* τρανσποζάσης και την εισαγωγή της κατασκευής στο γονιδίωμα. Μικρή ποσότητα βακτηριών από κάθε θετικό κλώνο pMi{PhOps-EGFP; CRE-mCherry} εμβολιάστηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο και μία ποσότητα βακτηριών αποθηκεύτηκε σε διάλυμα γλυκερόλης 30% στους -80°C (Bacterial Stab). Το DNA όλων των πλασμιδίων αναφοράς απομονώθηκε με μεσαίας κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Midipreps) μέσω του ZymoPURE plasmid Midiprep Kit και χρησιμοποιήθηκε μετέπειτα στις μικροενέσεις G0 εμβρύων *Parhyale* αγρίου τύπου. Ως δείκτης θετικής επιλογής κατά τη διαδικασία κλωνοποίησης λειτούργησε το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, που περιλαμβάνεται στον κορμό των δύο πλασμιδιακών φορέων που χρησιμοποιήθηκαν.

2.1.1 E7-mCherry

Το πρώτο βήμα για τη δημιουργία του πλασμιδίου αναφοράς του υποψήφιου ενισχυτή E7 ήταν η απομόνωση μιας αλληλουχίας μήκους 2021bp, η οποία χαρτογραφείται ακριβώς ανοδικά του υποκινητή *Dll* και συμπεριλαμβάνει μια ATAC-seq κορυφή (Εικόνα 10). Η περιοχή αυτή ενισχύθηκε από γενωμικό DNA *Parhyale* αγρίου τύπου μέσω μιας PCR αντίδρασης χρησιμοποιώντας τους εκκινητές F_E7(5'-ATTCATCCCCGACTGAGG-3') και Phaw_Dll_5UTR_Nested_F1(5'-TGCACGCTCGTATCGCTAC-3'). Στη συνέχεια εκκινητές που περιείχαν ως προεξέχοντα άκρα NcoI-θέσεις περιορισμού F_E7_Nested_NcoI(5'-TACCATGGCGCACCAACACATGAAATTCTC-3') και R_E7_Nested_NcoI(5'-

TACCATGGTCTCGGCCAATCAGGCT-3') χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση μίας περιοχής 382bp που περιείχε μόνο την κορυφή ATAC-seq του υποψήφιου E7 ενισχυτή, από προηγούμενο PCR προϊόν E7 (αραιωμένο 1:10) μέσω μίας Nested PCR αντίδρασης.

2.1.2 Ei3-mCherry

Το υπήφιο cis-ρυθμιστικό στοιχείο Ei3 αντιστοιχεί σε μια ιντρονική περιοχή με κορυφές ATAC-seq που απομονώθηκε ως θραύσμα 2007bp με PCR αντίδραση από γενωμικό DNA αγρίου τύπου *Parhyale* χρησιμοποιώντας τους εκκινητές F_Eintr3_NEW (5'-TAACGGTGCCATGCTAC-3') και R_Eintr3_NEW (5'-ATCTCGCTGCGCGCTCTCAT-3'). Στη συνέχεια εκκινητές με προεξοχουσές αλληλουχίες NcoI-θέσεις περιορισμού, F_Eintr3_nested_NEW_NcoI (5'-TACCATGGTAACGGCTGCCATGCCTAC-3') και R_Eintr3_nested_NEW_NcoI (5'-TACCATGGTCTCGCTGAACGCTTCC-3') χρησιμοποιήθηκαν σε Nested PCR αντίδραση με μήτρα το προηγούμενο PCR προϊόν 2007bp (αραιωμένο 1:5) για την απομόνωση ενός τμήματος 1605bp, το οποίο περιλαμβάνει μόνο τις κορυφές ATAC-seq.

2.1.3 Ei5-mCherry

Ο υποψήφιος ενισχυτής Ei5 αντιπροσωπεύει μια ιντρονική περιοχή με κορυφές ATACseq κοντά στο τελευταίο εξώνιο του *Dll* που απομονώθηκε μέσω PCR από γενωμικό DNA αγρίου τύπου *Parhyale*, ως θραύσμα 3928bp, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές F_Eintr_5 (5'-TTTGCATGCCATCTAAGG-3') και R_Eintr_5 (5'-CCTCTGGAAGAGAGGAGGAGGAC-3'). Το μέγεθος του Ei5 CRE μειώθηκε σε ένα θραύσμα 3015bp που ενισχύθηκε από το προηγούμενο PCR προϊόν, μέσω μίας Nested PCR αντίδρασης με τους εκκινητές Ei5_J_F_Nested (5'-ATTACCATGGAAGCACGCATCATCTCTTACG-3') και Ei5_J_R_Nested (5'-ATTACCATGGAAGCATTCTTTGCATCATCG-3') που είχαν προεξέχοντα άκρα με NcoI θέσεις περιορισμού.

2.1.4 E6-mCherry

Ο υποψήφιος ενισχυτής E6 αντιστοιχεί σε μια περιοχή με υψηλή ATAC-seq κορυφή ανοδικά του ενδογενούς *Dll* υποκινητή, η οποία ενισχύθηκε αρχικά από γενωμικό DNA αγρίου τύπου *Parhyale* ως θραύσμα 3592bp, μέσω μιας PCR αντίδρασης με τους εκκινητές E6_J_F1 (5'-ACCACCAGCGTACAGAAGAAG-3') και E6_J_R1 (5'-CGTTGTGGGCCATTTTCATG-3'). Λόγω της επαναλαμβανόμενης χαμηλής αποτελεσματικότητας των Nested PCR αντιδράσεων για την απομόνωση μίας μικρότερης αλληλουχίας από το 3592bp αμπλικόνιο, παρά τους διαφορετικούς εκκινητές που σχεδιάστηκαν και τους συνδυασμούς εκκινητών που δοκιμάστηκαν, αποφασίσαμε να κλωνοποιήσουμε το E6 PCR προϊόν σε ένα PCR-blunt-II TOPO φορέα. Λόγω της ύπαρξης μη-ειδικών προϊόντων, το E6 PCR προϊόν μήκους 3592bp απομονώθηκε από πηκτή αγαρόζης, καθαρίστηκε με το Zymoclean Large Fragment DNA Recovery Kit και εισήχθη στον φορέα TOPO, δημιουργώντας το πλασμίδιο PCR_Blunt_II_TOPO_E6. Στη συνέχεια κύτταρα NEB 10b competent κύτταρα μετασηματίστηκαν με το PCR_Blunt_II_TOPO_E6 DNA και 9 κλώνοι εμβολιάστηκαν σε υγρό μέσο LB. Οι 6 από τους 9 κλώνους υποβλήθηκαν σε μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA (alkaline minipreps) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πέψεις με BspHI, EcoRI, NcoI, PciI για τον έλεγχο του προσανατολισμού του ενθέματος σε καθέναν από τους κλώνους. Ένας κλώνος με ευθύ και ένας με ανάστροφο προσανατολισμό του ενθέματος αλληλουχήθηκε για περαιτέρω επικύρωση. Το πλασμιδιακό DNA TOPO-E6, με κανονικό προσανατολισμό του ενθέματος, χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα σε 2 Nested PCR

αντιδράσεις με δύο διαφορετικά ζεύγη εκκινητών F_E6_nested_BspHI (5'-TTATCATGAACCTCCTTGGCGGCGGAGGTA-3') & R_E6_nested (5'-CACGTTGTGGGCCATTTTCATG-3') που ενισχύουν ένα μεγάλο θραύσμα E6, και F_E6_nested_NEW(BspHI) (5'-TTATCATGACATCTCCCCCTCTGCTGTGC-3') & R_E6_nested_NEW(BspHI) (5'-TTATCATGATTTGGTCCTGTGGCAG-3') που δίνουν ένα μικρότερου μήκους θραύσμα E6 που περιέχει μόνο την ATAC-seq κορυφή. Παρά το γεγονός ότι και τα δύο ζεύγη εκκινητών υβριδοποιούνταν πλήρως με τον κλώνο DNA που αλληλουχήθηκε, καμία αντίδραση PCR δεν έδωσε το αναμενόμενο προϊόν. Έτσι, η PciI ήταν η καλύτερη λύση για να κλωνοποιήσουμε την περιοχή της κορυφής ATAC-seq από το E6-TOPO στον κομμένο με NcoI και αποφωσφορυλιωμένο με quick-CIP φορέα pGTZ{Ph5UTR-DIIeprom-PhHB-mCherry}, δεδομένου ότι οι PciI και NcoI έχουν συμβατά άκρα

2.1.4 Κλωνοποίηση των υποψήφιων ενισχυτών σε πλασμίδια αναφοράς και διαγένεσης.

Μετά την πραγματοποίηση των παραπάνω αντιδράσεων και την απόκτηση των αλληλουχιών των υποψήφιων ενισχυτών που έφεραν NcoI προεξέχοντα άκρα, ακολούθησε κλωνοποίηση των τεσσάρων περιοχών στον φορέα pGTZ{Ph5UTR-DIIeprom-PhH2B-mCherry} που φέρει το γονίδιο αναφοράς της mCherry. Κάθε PCR προϊόν υποβλήθηκε σε καθαρισμό με το Zymo DNA clean & concentrator-5 kit, υπέστη πέψη με NcoI και κλωνοποιήθηκε στο 5' άκρο της 5' UTR-περιοχής του φορέα pGTZ{Ph5UTR-DIIeprom-PhHB-mCherry}, ο οποίος είχε προηγουμένως κοπεί με NcoI και αποφωσφορυλιωθεί με quick-CIP για τη αποφυγή επανακυκλοποίησης. Στη συνέχεια, οι κασσέτες αναφοράς των ενισχυτών {CRE-Ph5UTR-DIIeprom-PhHB-mCherry} κλωνοποιήθηκαν ως AscI θραύσματα στον επεξεργασμένο με AscI και αποφωσφορυλιωμένο με quick-CIP φορέα pMi{PhOps-EGFP}. Δημιουργήθηκαν έτσι τα πλασμίδια διαγένεσης pMi{PhOps-EGFP-CRE-mCherry} για καθέναν από τους τέσσερις υποψήφιους ενισχυτές, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για μικροενέσεις σε G0 έμβρυα *Parhyale*.

2.2 Συλλογή και μικροενέσεις G0 εμβρύων *P.hawaiensis*

Όλες οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τη συλλογή και τις μικροενέσεις των εμβρύων πραγματοποιήθηκαν όπως έχει προηγουμένως περιγραφεί (Kontarakis and Pavlopoulos 2014). Την ημέρα πριν από τις μικροενέσεις, αγρίου τύπου ζευγάρια μεταφέρονταν από τις καλλιέργειες σε τρυβλία Petri 150mm που περιείχαν τεχνητό θαλασσινό νερό (Artificial Sea Water - ASW) και μικρές πέτρες, με τη χρήση μιας πλαστικής Pasteur πιπέτας. Την επόμενη ημέρα κυοφορούσες θηλυκές που είχαν αποχωριστεί από τα αρσενικά, μεταφέρονταν σε νέο τρυβλίο Petri με ASW και αναισθητοποιούνταν με την προσθήκη αερίου CO₂, για 30-60s. Μόνο τα γονιμοποιημένα αυγά που βρίσκονταν στο στάδιο του 1-κυττάρου απομακρύνονταν από τα θηλυκά με τη χρήση λαβίδων και συλλέγονταν σε τρυβλίο Petri 35mm με φιλτραρισμένο τεχνητό θαλασσινό νερό όπου προστίθενται πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και αμφοτερικίνη B (Filtered Artificial Sea Water with Antibiotics – FASWA). Στη συνέχεια τα έμβρυα 1-κυττάρου ενύονταν με τη χρήση ενός εγχυτήρα, ενός μικροχειριστή και ενός μικροσκοπίου για τη συγκράτηση και τη μετακίνηση της μικροβελόνας. Τόσο η κατακρήμνιση mRNA που κωδικοποιούσε τη τρανσποζάση *Minos* όσο και η παρασκευή «steps» με σύσταση 2% αγαρόζη-FASW, ολοκληρώνονταν την ημέρα πριν από τις ενέσεις, ενώ η προετοιμασία του μίγματος πραγματοποιούνταν με ιδιαίτερη προσοχή συνήθως τη μέρα των ενέσεων, μεγιστοποιώντας τη δραστηριότητά του και αποφεύγοντας την απόφραξη του άκρου της βελόνας. Τα πλασμίδια δότες χορηγούνταν

μαζί με in-vitro συντεθειμένο mRNA της *Minos* τρανσποζάσης σε δόσεις 500 και 300ng/μl αντίστοιχα (Pavloroulos and Averof 2005). Το μίγμα περιλάμβανε επίσης την αδρανή χρωστική Phenol Red αραιωμένη 1:10 (Sigma) και απιονισμένο ddH₂O (RNase-Dnase free). Τα έμβρυα που ενύονταν διατηρούνταν καθαρά με αλλαγή πιάτου Petri και νερού κάθε δεύτερη ημέρα μέχρι την εκκόλαψη και προστατεύονταν από μικροβιακές μολύνσεις με την απομάκρυνση των νεκρών εμβρύων από τα πιάτα (Kontarakis and Pavloroulos 2014).

2.3 Διαλογή ενεμένων G0 εμβρύων *P.hawaiensis* με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού

Η διαλογή των ενεμένων G0 εμβρύων τις πρώτες ημέρες της εμβρυογένεσης δίνει μια πρώιμη και ακριβή ένδειξη σχετικά με την αποτελεσματικότητα των διαγονιδιακών ενθέσεων αλλά και την ενεργότητα των διαγονιδίων, επομένως συνιστά ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο της διαγονιδιακής τεχνολογίας στον οργανισμό *Parhyale hawaiensis* (Kontarakis and Pavloroulos 2014). Τα ενεμένα έμβρυα ελέγχονταν καθημερινά στο στερεοσκόπιο για θνησιμότητα και κάτω από ένα μικροσκόπιο φθορισμού σε ορισμένα στάδια της εμβρυογένεσης, για την έκφραση του γονιδίου αναφοράς ως δείκτη ενεργότητας των CREs. Πιο συγκεκριμένα, ελέγχονταν μετά την 4η ημέρα της εμβρυογένεσης για την επαγόμενη από το εκάστοτε CRE έκφραση της mCherry στα εκβλαστήματα των άκρων, με χρήση του φίλτρου DSR και επίσης την 9η-10η ημέρα, όταν τα μάτια είχαν αναπτυχθεί πλήρως, για την επαγόμενη από την PhOrsin1 έκφραση EGFP στα ομματίδια και το οπτικό νεύρο, με χρήση του φίλτρου GFP, που είναι δείκτης διαγονιδιακών ενθέσεων. Τα εκκολαπτόμενα G0 νεαρά άτομα που ήταν θετικά για DSR ή EGFP φθορισμό, μεγαλώνονταν χωριστά για περίπου 2 μήνες και όταν ωρίμαζαν αναπαραγωγικά διασταυρώνονταν με αγρίου τύπου ζώα του αντίθετου φύλου για την εύρεση διαγονιδιακών απογόνων G1. Ο φθορισμός στους απογόνους G1 ελέγχονταν με την ίδια στρατηγική, ενώ ο λόγος των διαγονιδιακών προς μη διαγονιδιακών G1 απογόνων από κάθε G0 έδινε μία πρώτη ένδειξη για τον αριθμό των ενθέσεων που κληροδοτούσε ο εν λόγω G0.

2.4 Διαδικασία ανοσοφθορισμού σε G0 και G2 έμβρυα *P.hawaiensis*

Ο φθορισμός που προκαλεί το γονίδιο αναφοράς H2B-mCherry ενδέχεται να είναι χαμηλός ή μη ανιχνεύσιμος σε ζωντανά ζώα που ελέγχονται σε στερεοσκόπιο φθορισμού λόγω της χαμηλής ενεργότητας του CRE που ελέγχεται. Για την ενίσχυση του σήματος, μονιμοποιήθηκαν G0 ή G2 έμβρυα από τις διαγονιδιακές σειρές E7 και E6, υποβλήθηκαν σε ανοσοφθορισμό με anti-mCherry αντίσωμα σε διάφορα στάδια της εμβρυογένεσης (S17,S19,S20,S21,S23) και ελέγχθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού. Η σταδιοποίηση των εμβρύων έγινε με βάση τις ώρες ανάπτυξης σε σταθερή θερμοκρασία των 26°C μετά τη γονιμοποίηση των αυγών (Browne et al. 2005). Τα έμβρυα τοποθετούνταν σε μια σταγόνα μονιμοποιητικού διαλύματος (4% φορμαλδεΐδη σε FASW) σε ένα sylvard-coated plate, οι εξωτερικές μεμβράνες απομακρύνονταν με ακονισμένες βελόνες βολφραμίου κάτω από ένα στερεοσκόπιο, και τα έμβρυα μονιμοποιούνταν για 30 λεπτά (Patel 1994, Extavour 2005). Οι πλύσεις, η επεξεργασία και η τοποθέτηση των εμβρύων για μικροσκοπία, πραγματοποιούνταν όπως έχει προηγουμένως περιγραφεί (Rehm et al. 2009-Patel 1994).

2.5 Πρωτόκολλα

Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Μάρτυρες μοριακού βάρους που χρησιμοποιήθηκαν: 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, NEB).

Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Alkaline Minipreps)

Πρωτόκολλο:

- Διανομή 2 ml LB & αντιβιοτικό σε αποστειρωμένο σωλήνα και εμβολιάστε με μικρή ποσότητα μίας βακτηριακής αποικίας.
- Ανακίνηση για 16 ώρες στους 37°C.
- Μεταφορά 1,5 ml από κάθε βακτηριακή καλλιέργεια σε μικροσωλήνα 1,5 ml και φυγοκέντρηση για 12 δευτερόλεπτα στις 13000 στροφές ανά λεπτό.
- Απόρριψη υπερκειμένου, επαναδιάλυση βακτηρίων σε 100 µl GTE Buffer (προσθέστε RNase A πριν από τη χρήση) και επώαση σε RT για 3 λεπτά.
- Προσθήκη 200 µl Lysis Buffer και ανάδευση με ήπια αναστροφή.
- Προσθήκη 200 µl KOAc Buffer, ανάμιξη με αναστροφή και επώαση για 2-3 λεπτά σε RT.
- Φυγοκέντρηση για 10-15 λεπτά στις 13000 στροφές ανά λεπτό. Μεταφορά υπερκειμένου σε μικροσωλήνα 1,5 ml που περιέχει 2 όγκους (900 µl) παγωμένης αιθανόλης 100% και ανάδευση με έντονη ανακίνηση.
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13000 rpm στους 4°C και αφαίρεση αιθανόλης.
- Προσθήκη 200 µl αιθανόλης 70%, φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13000 rpm στους 4°C και αφαίρεση αιθανόλης.
- Στέγνωμα πελέτας DNA και επαναδιάλυση σε 50 µl νερού ddH₂O (RNase/DNase free).

Buffers:

GTE Buffer (10ml)

- 0.5 ml 20% glucose
- 0.25 ml 1M Tris/HCL pH 7.5 - 0.2 ml 0.5M EDTA pH 8
- 9.3 ml sterile distilled H₂O

Lysis Buffer (10ml)

- 8.8 ml sterile distilled H₂O
- 200 µl 10N NaOH
- 1 ml 10% SDS
(Προσθέστε με τη σειρά για να αποφύγετε την καθίζηση)

3M KOAc (10ml)

- 6 ml 5M KOAc
- 1.15 ml acetic acid
- 2.85 ml H₂O

Μετασηματισμός χημειοδεκτικών DH5a κυττάρων E.coli

- Τοποθέτηση επαρκούς αριθμού aliquots χημειοδεκτικών DH5a βακτηρίων από τους -80°C στον πάγο (αναμονή ~3min).
- Προσθήκη του μισού ligation μείγματος (5 uL) στα βακτήρια.
- Επώαση βακτηρίων για 20-30min στον πάγο.
- Επαγωγή θερμικού shock στα βακτήρια για 1min στους 42°C.
- Επώαση βακτηρίων για 1min στον πάγο.
- Προσθήκη 900uL LB χωρίς αντιβιοτικό στα βακτήρια.
- Επώαση βακτηρίων στους 37°C με περιστροφή στις 550RPM-700RPM για 30-45min.
- Άπλωμα βακτηρίων σε πιάτα LB-αμπικιλλίνης υπό αποστειρωμένες συνθήκες.
- Επώαση πιάτων στους 37°C για 16 ώρες.

Πρωτόκολλο PCR αντιδράσεων με Phusion DNA Πολυμεράση (New England BioLabs)

Συστατικά	Αντίδραση 20μl	Τελική Συγκέντρωση
Nuclease-free water	to 20 μl	
5X Phusion HF or GC Buffer	4 μl	1X
10 mM dNTPs	0.4 μl	200 μM
10 μM Εμπρόσθιος Υποκινητής	1 μl	0.5 μM
10 μM Ανάστροφος Υποκινητής	1 μl	0.5 μM
Πρότυπο DNA	variable	< 250 ng
DMSO (optional)	(0.6 μl)	3%
Phusion DNA Polymerase	0.2 μl	1.0 units/50 μl PCR

E7-CRE

Πρόγραμμα gradient (Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης) PCR αντίδρασης

(30x κύκλοι, γενωμικό *Parhyale* DNA ως μήτρα, Phusion DNA πολυμεράση)

- 1min, 98°C (Αρχική Αποδιάταξη)
- 15sec, 98°C (Αποδιάταξη)
- 20sec, 55-60-65°C (Υβριδοποίηση εκκινητών)
- 1min 10sec, 72°C (Επιμήκυνση)
- 5min, 72°C (Τελική Επιμήκυνση)
- 4°C (Αποθήκευση)

Πρόγραμμα gradient Nested(Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης) PCR αντίδρασης

(35x κύκλοι, προϊόν E7 PCR ως μήτρα, Phusion DNA πολυμεράση)

- 1min, 98°C (Αρχική Αποδιάταξη)
(Επανάληψη x4 φορές)
- 15sec, 98°C (Αποδιάταξη)
- 20sec, 55°C (Υβριδοποίηση εκκινητών)
- 20sec, 72°C (Επιμήκυνση)
(Επανάληψη x4 φορές)
- 15sec, 98°C (Αποδιάταξη)

- 20sec, 59,65,69°C (Υβριδοποίηση εκκινητών)
- 20sec, 72°C (Επιμήκυνση)
- 5min, 72°C (Τελική Επιμήκυνση)
- 4 °C (Αποθήκευση)

Ei3-CRE

Πρόγραμμα (Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης) PCR αντίδρασης

(30x κύκλοι, γενωμικό DNA ως μήτρα, Phusion DNA πολυμεράση)

- 1min, 98°C (Αρχική Αποδιάταξη)
- 15sec, 98°C (Αποδιάταξη)
- 20sec, 66°C (Υβριδοποίηση εκκινητών)
- 1min 5sec, 72°C (Επιμήκυνση)
- 5min, 72°C (Τελική Επιμήκυνση)
- 4°C (Αποθήκευση)

Πρόγραμμα gradient Nested (Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης) PCR αντίδρασης

(35x κύκλοι, προϊόν Ei3 PCR ως μήτρα, Phusion DNA πολυμεράση)

- 1min, 98°C (Αρχική Αποδιάταξη)
- (Επανάληψη x4 φορές)
- 15sec, 98°C (Αποδιάταξη)
- 20sec, 64°C (Υβριδοποίηση εκκινητών)
- 40sec, 72°C (Επιμήκυνση)
- (Επανάληψη x24 φορές)
- 15sec, 98°C (Αποδιάταξη)
- 20sec, 72°C (Υβριδοποίηση εκκινητών)
- 40sec, 72°C (Επιμήκυνση)
- 5min, 72°C (Τελική Επιμήκυνση)
- 4°C (Αποθήκευση)

Ei5-CRE

Πρόγραμμα (Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης) PCR αντίδρασης

(30x κύκλοι, γονιδιωματικό DNA ως μήτρα, Phusion DNA πολυμεράση)

- 1min, 98°C (Αρχική Αποδιάταξη)
- 15sec, 98°C (Αποδιάταξη)
- 20sec, 60°C (Υβριδοποίηση εκκινητών)
- 2min 30sec, 72°C (Επιμήκυνση)
- 5min, 72°C (Τελική Επιμήκυνση)
- 4°C (Αποθήκευση)

Πρόγραμμα Gradient Nested (Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης) PCR αντίδρασης

(35x κύκλοι, προϊόν Ei5 PCR ως μήτρα, Phusion DNA πολυμεράση)

- 1min, 98°C (Αρχική Αποδιάταξη)
- (Επανάληψη x4 φορές)

- 15sec, 98°C (Αποδιάταξη)
 - 20sec, 52-57-62°C (Υβριδοποίηση εκκινητών)
 - 1min 30sec, 72°C (Επιμήκυνση)
- (Επανάληψη x24 φορές)
- 15sec, 98°C (Αποδιάταξη)
 - 20sec, 62-67-72°C (Υβριδοποίηση εκκινητών)
 - 1min 30sec, 72°C (Επιμήκυνση)
 - 5min, 72°C (Τελική Επιμήκυνση)
 - 4°C (Αποθήκευση)

E6-CRE

Πρόγραμμα Gradient (Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης) PCR αντίδρασης

(30x κύκλοι, γενωμικό DNA ως μήτρα, Phusion DNA πολυμεράση)

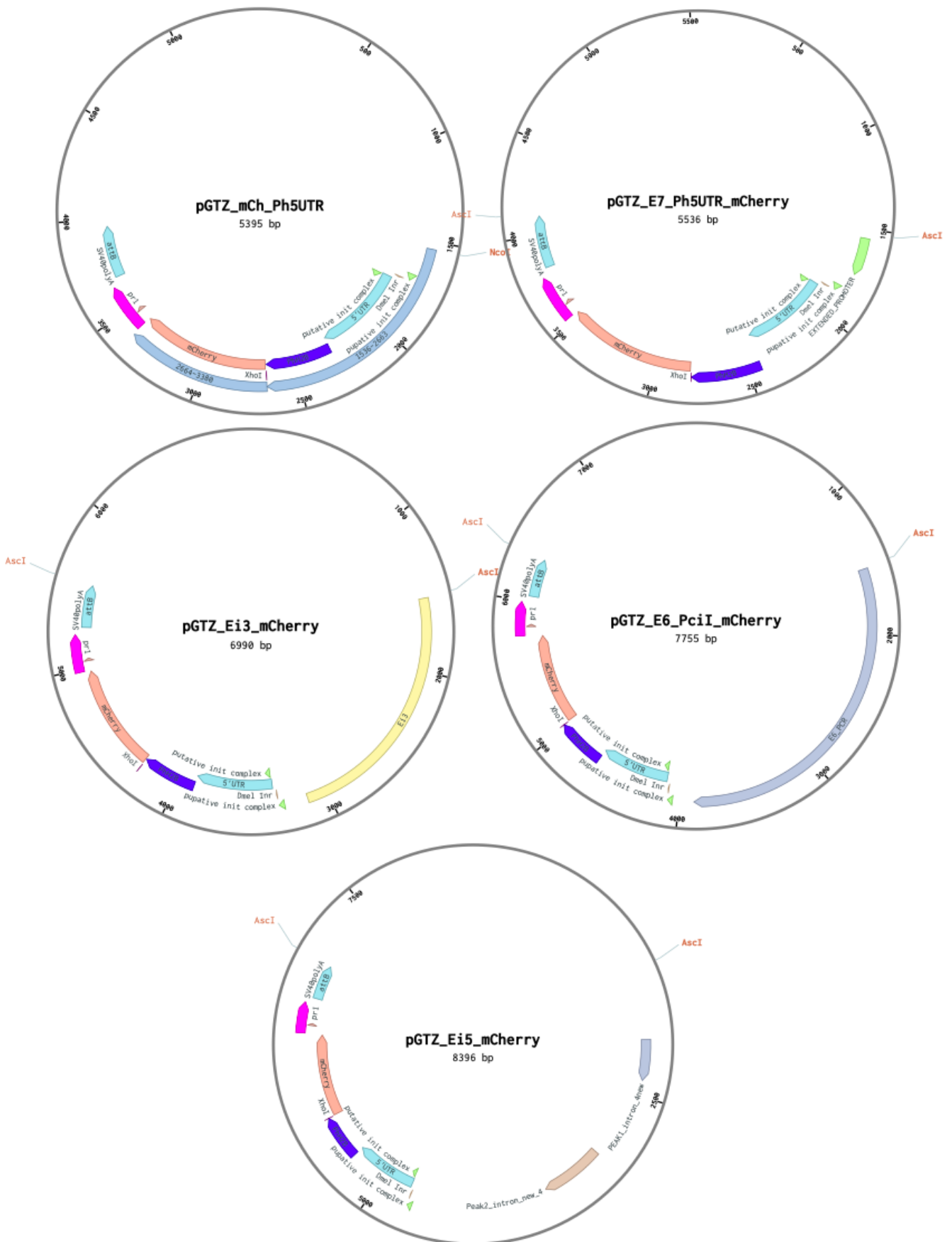
- 1min, 98°C (Αρχική Αποδιάταξη)
- 15sec, 98°C (Αποδιάταξη)
- 20sec, 52,62,67°C (Υβριδοποίηση εκκινητών)
- 1min 50sec, 72°C (Επιμήκυνση)
- 5min, 72°C (Τελική Επιμήκυνση)
- 4°C (Αποθήκευση)

Πρωτόκολλο Ανοσοφθορισμού

- Αφαίρεση του κελυφους των εμβρύων σε 4% PFA (σε FASW) και επώαση για 30 λεπτά.
- Τοποθέτηση εμβρύων που έχουν μονιμοποιηθεί σε γυάλινο πιάτο με PT κατά την αφαίρεση των μεμβρανών των υπόλοιπων εμβρύων.
- Πλύσεις 3x σε PT (5-15 λεπτά η κάθε πλύση).
- Επώαση σε PBT για 30 λεπτά.
- Επώαση σε PBT-NGS (5% NGS) για 30 λεπτά.
- Επώαση σε διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος overnight στους 4°C (περιστροφή).
- (1:200 από κάθε αντίσωμα σε διάλυμα PBT-NGS)
- Πλύσεις 3x σε PT (5-15 λεπτά το καθένα) για την απομάκρυνση των αντισωμάτων.
- Επώαση σε PBT για 30 λεπτά.
- Επώαση PBT-NGS (5% NGS) για 30 λεπτά.
- Επώαση σε διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος για 2 ώρες RT (περιστροφή) στο σκοτάδι.
- (1:500 κάθε αντισώματος σε διάλυμα PBT-NGS)
- Πλύση 2x σε PT (5-15 λεπτά το καθένα) για την απομάκρυνση των αντισωμάτων.
- Πλύση σε PT-DAPI (1:500) για 20 - 30 λεπτά.
- Πλύσεις 3x σε PT (5-15 λεπτά το καθένα) για την απομάκρυνση του DAPI.
- Τοποθέτηση σε διάλυμα γλυκερόλης 50% έως ότου όλα τα έμβρυα φτάσουν στη βάση της γυάλινης πλάκας.
- Τοποθέτηση σε διάλυμα γλυκερόλης 70% έως ότου όλα τα έμβρυα φτάσουν στη βάση της γυάλινης πλάκας.
- Διατήρηση σε 70% γλυκερόλη μέχρι το μοντάρισμα.

Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν:

Πρωτογενή αντισώματα (1:200)	Δευτερογενή αντισώματα (1:500)
Mouse anti-engrailed (M4D9)	Anti-Mouse-Alexa488
Rabbit anti-mCherry (Rockland, 600-401-P16)	Anti-Rabbit-Alexa647

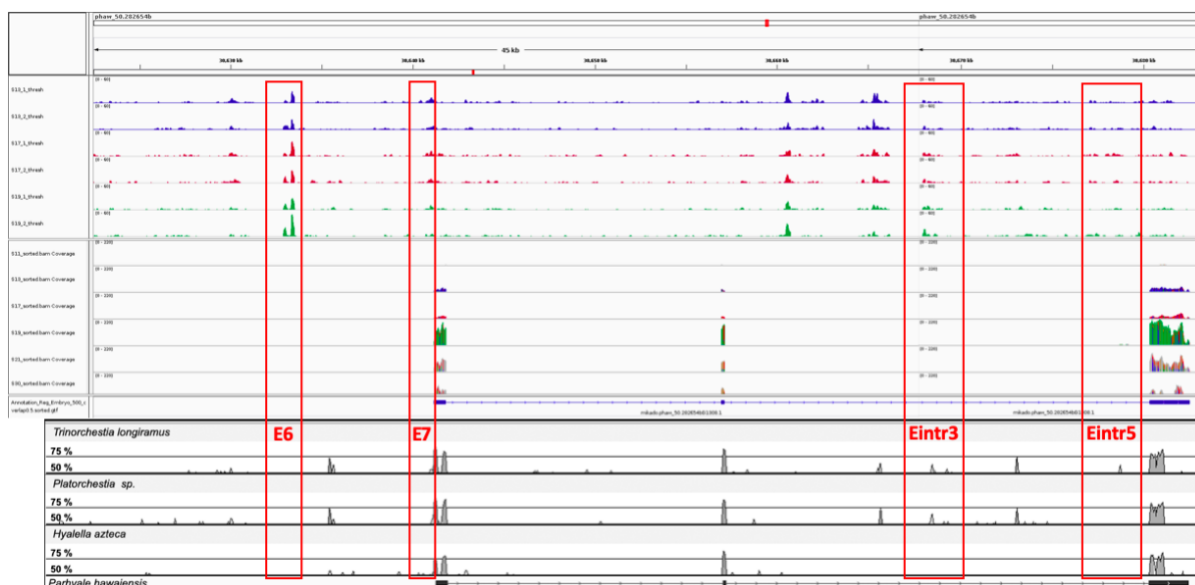


Εικόνα 11. Χάρτες πλασμιδιακών κατασκευών αναφοράς. Οι περιοχές των υποψήφιων *cis*-ρυθμιστικών περιοχών E7, Ei3 και Ei5 κλωνοποιήθηκαν ως NcoI θραύσματα και η E6 περιοχή κλωνοποιήθηκε ως PciI θραύσμα στο πλασμίδιο pGTZ ακριβώς ανοδικά μίας κασέτας αναφοράς. Η κασέτα αναφοράς περιέχει τον ενδογενή υποκινητή και την 5'UTR περιοχή του *Parhyale Dll*, την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry με πυρηνικό εντοπισμό μέσω σύντηξης με το γονίδιο ιστόνης H2B του *Parhyale*, και την αλληλουχία τερματισμού μεταγραφής και πολυαδενυλίωσης SV40polyA από τον Simian virus 40. Φαίνονται επίσης οι θέσεις κοπής της AscI οι οποίες αξιοποιήθηκαν στο επόμενο βήμα κλωνοποίησης.

3. Αποτελέσματα

3.1 Ταυτοποίηση υποψήφιων *Dll* cis-ρυθμιστικών στοιχείων στο *Parhyale hawaiiensis*

Η βάση εκκίνησης αυτής της εργασίας ήταν προηγούμενες λειτουργικές γονιδιωματικές αναλύσεις του γενετικού τόπου του *Parhyale Dll* σε διαφορετικά εμβρυικά στάδια ανάπτυξης των άκρων με τη χρήση 3 συμπληρωματικών μεθόδων (Εικόνα 12) (Rallis et al., unpublished): i) Μεταγραφωματικές αναλύσεις RNA-seq της έκφρασης γονιδίων, ii) επιγενωμικές αναλύσεις ATAC-seq της ανοιχτής χρωματίνης, και iii) συγκριτικές αναλύσεις μεταξύ των γονιδιωμάτων του *Parhyale hawaiiensis* και των αμφίποδων καρκινοειδών *Trinorchestia longiramus*, *Platorchestia sp.* και *Hyalella azteca* για την εύρεση συντηρημένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με πιθανό λειτουργικό ρόλο. Οι μελέτες αυτές αποκάλυψαν πιθανές cis-ρυθμιστικές περιοχές που ελέγχθηκαν σε αυτή την εργασία για την εμπλοκή τους στην έκφραση του *Dll*. Ειδικότερα, οι περιοχές που ελέγχθηκαν σε αυτή την εργασία ήταν οι E6 και E7 ανοδικά του *Dll* υποκινητή και οι Ein3 και Ein5 εντός του δεύτερου ιντρονίου (Εικόνα 12).



Εικόνα 13. Λειτουργική γενωμική ανάλυση του γενετικού τόπου του *Dll*. Τα μπλε/μαύρα κουτιά υποδεικνύουν τα εξόνια και οι μπλε/μαύρες γραμμές τα ιντρόνια του γονιδίου *Dll*. Οι πρώτες 6 σειρές απεικονίζουν τις ATAC-seq κορυφές ανοιχτής χρωματίνης από δείγματα εμβρύων σταδίου S13 (μπλε), S17 (κόκκινο) και S19 (πράσινο). Μεγάλες και μικρές ATAC-seq κορυφές παρατηρούνται σε κωδικές περιοχές (εντός εξονίων) και σε μη κωδικές περιοχές (εντός ιντρονίων και των άνωθεν ρυθμιστικών περιοχών). Στις επόμενες 6 σειρές παρουσιάζονται οι RNA-seq κορυφές, οι οποίες δείχνουν τα επίπεδα έκφρασης του *Dll* στα μεταγραφώματα εμβρύων σταδίου S13 (μπλε), S17 (κόκκινο), S19 (πράσινο). Στις τελευταίες 3 σειρές απεικονίζονται οι Vista-plot κορυφές που αντικατοπτρίζουν το ποσοστό ομολογίας νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γενετικού τόπου *Dll* μεταξύ των γονιδιωμάτων του *Parhyale hawaiiensis* και των αμφίποδων καρκινοειδών *Trinorchestia longiramus*, *Platorchestia sp.* και *Hyalella azteca*. Υψηλή ομολογία παρατηρείται στα εξόνια και σε ορισμένες μη κωδικές περιοχές, συμπεριλαμβανομένου του υποκινητή και κάποιων υποψήφιων CREs. Τα προς μελέτη CREs που εξετάστηκαν για τη ρύθμιση της έκφρασης του *Dll* επισημαίνονται με κόκκινα πλαίσια. Και τα 4 CREs αντιστοιχούν σε περιοχές με ATAC-seq κορυφές, ενώ 3 από αυτά εμφανίζουν επίσης συντήρηση σε νουκλεοτιδικό επίπεδο στα Vista-plots: (**E6**) χαρτογραφείται ανοδικά του *Dll* υποκινητή; (**E7**) αντιστοιχεί στην περιοχή ακριβώς άνωθεν του πρώτου εξονίου; (**Eintr3 και Eintr5**) εντοπίζονται στο δεύτερο ιντρόνιο.

Οι αλληλουχίες των υποψήφιων ενισχυτών απομονώθηκαν με PCR αντιδράσεις από γενωμικό DNA και κλωνοποιήθηκαν πρώτα στο πλασμίδιο αναφοράς *pGTZ{Ph5UTR-Dllprom-PhH2B-mCherry}* και στη συνέχεια στο διαγονιδιακό φορέα *pMi{PhOps-EGFP}*. Η

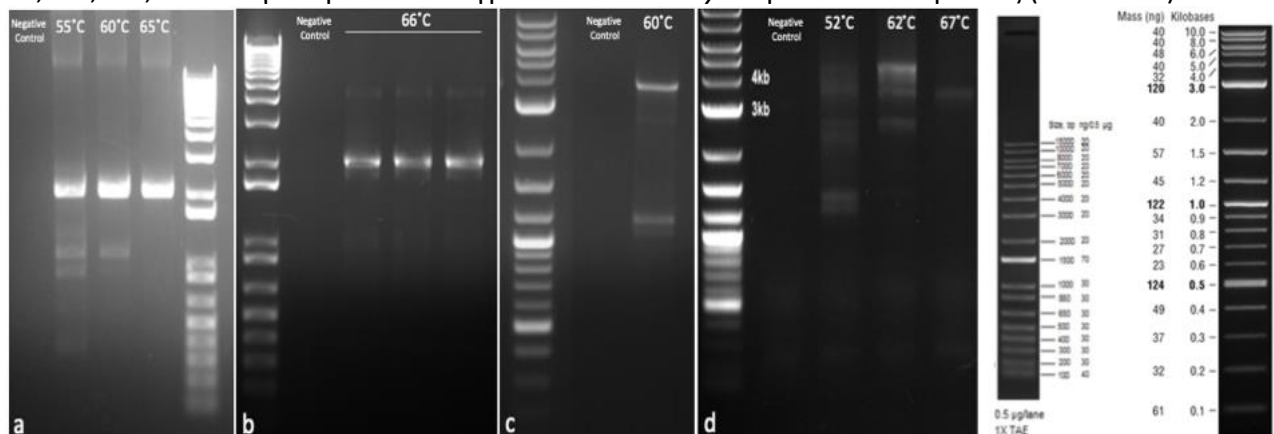
καθεμία από τις 4 τελικές κατασκευές περιλάμβανε: το γονίδιο αναφοράς που κωδικοποιεί την πυρηνική κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη H2B-mCherry υπό τον έλεγχο του εκάστοτε *Dll* CRE (CRE-mCherry) και το γονίδιο δείκτη PhOrs-EGFP για την αναγνώριση διαγονιδιακών ατόμων μέσω έκφρασης της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης στους οφθαλμούς.

3.2 Δημιουργία πλασμιδίων αναφοράς και διαγονιδιακών φορέων ελέγχου υποψήφιων *Dll* cis-ρυθμιστικών στοιχείων στο *Parhyale hawaiensis*

Ο αναφερόμενος, στη συνέχεια, ως «κανονικός προσανατολισμός» των CREs στον φορέα pGTZ, ορίζεται όταν το εκάστοτε CRE έχει την ίδια φορά με τον υποκινητή του *Dll* και το γονίδιο αναφοράς H2B-mCherry, όπως στο *Dll* locus του γονιδιώματος του *Parhyale*. Αντίστοιχα, ο «κανονικός προσανατολισμός» των κασσετών αναφοράς των CREs στον φορέα pMi, ορίζεται όταν το γονίδιο αναφοράς H2B-mCherry της εκάστοτε κασσέτας αναφοράς έχει την ίδια φορά με το γονίδιο διαγένεσης Orsin-EGFP.

PCR αντιδράσεις σε γενωμικό DNA *Parhyale*

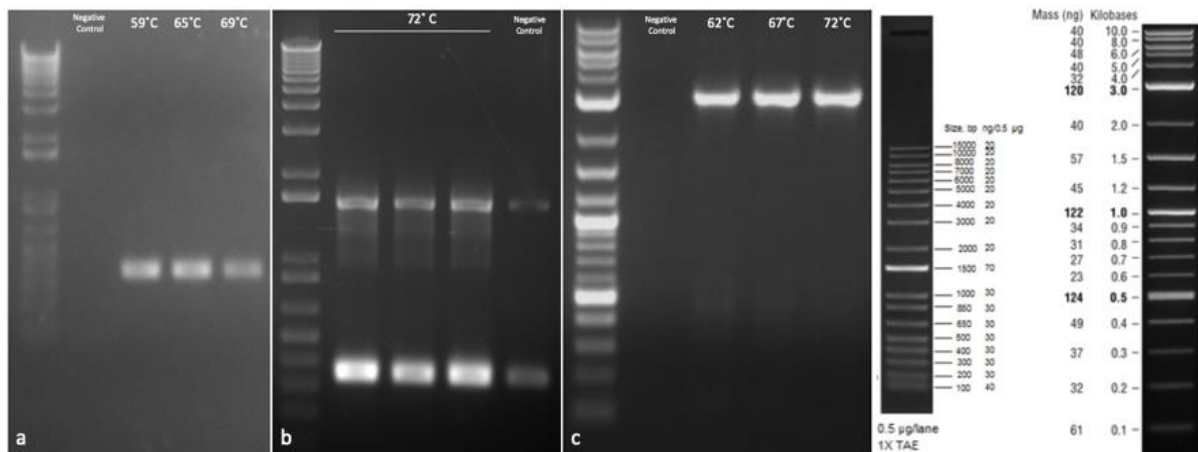
Απομονώσαμε τις αλληλουχίες των τεσσάρων πιθανών cis-ρυθμιστικών στοιχείων του *Dll*, E7, Eι3, Eι5, E6 από γενωμικό DNA άγριου τύπου *Parhyale* με PCR αντιδράσεις (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. PCR αντιδράσεις ενίσχυσης των υποψήφιων CREs E7, Eι3, E6, Eι5. (a) Gradient PCR αντιδράσεις της περιοχής E7 που ενίσχυσαν κυρίως το αναμενόμενο προϊόν 2021bp. b) Gradient PCR αντιδράσεις της περιοχής Eι3 που ενίσχυσαν κυρίως το αναμενόμενο προϊόν 2007bp. c) PCR αντίδραση της περιοχής Eι5 που ενίσχυσε και το αναμενόμενο προϊόν 3928bp. d) Gradient PCR αντιδράσεις της περιοχής E6 που το αναμενόμενο προϊόν 3592bp ενισχύθηκε μόνο στις υψηλές θερμοκρασίες Annealing. Ο DNA Ladder 1kb Plus της Invitrogen (Ladder στα αριστερά) χρησιμοποιήθηκε στα a,b και 1kb Plus της NEB στα c,d (Ladder στα δεξιά).

Nested PCR αντιδράσεις με μήτρα τα προηγούμενα PCR προϊόντα

Το μέγεθος των CRE περιοχών E7, Eι3, Eι5, που ενισχύθηκαν, περιορίστηκε με αντιδράσεις Nested PCR (Εικόνα 15), οι οποίες εισήγαγαν στα προϊόντα άκρα με θέσεις περιορισμού NcoI, με τη χρήση εκκινητών που είχαν ως προεξέχοντα άκρα τις θέσεις αυτές (αναφέρεται στα Υλικά και Μέθοδοι).

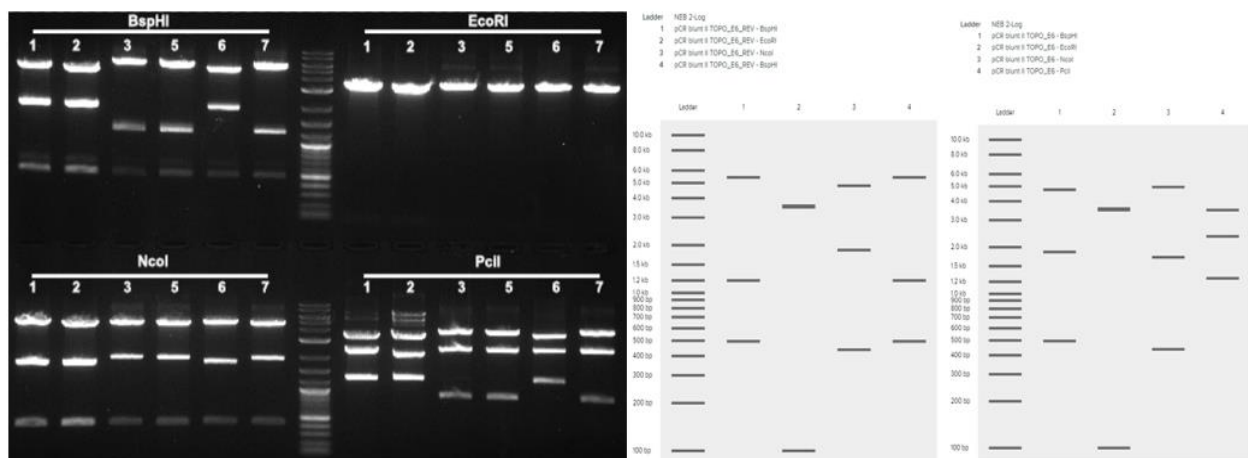


Εικόνα 15. Nested PCR αντιδράσεις των υποψήφιων CREs E7, E13, E15. a) Gradient PCR αντιδράσεις της περιοχής E7 που ενίσχυαν το αναμενόμενο προϊόν 382bp. b) PCR αντιδράσεις της περιοχής E13 που ενίσχυαν και το αναμενόμενο προϊόν 1595bp. c) Gradient PCR αντιδράσεις της περιοχής E15 που ενίσχυαν το αναμενόμενο προϊόν 3015bp. Ο DNA Ladder 1kb Plus της Invitrogen (Ladder στα αριστερά) χρησιμοποιήθηκε στα a,b και 1kb Plus της NEB στο c (Ladder στα δεξιά).

Οι αλληλουχίες DNA E7, E13, E15 που παρήχθησαν από τις Nested PCR αντιδράσεις καθαρίστηκαν με το Zymo DNA clean and concentrator-5 kit, κόπηκαν με NcoI και τα υπολείμματα, μήκους 3-4bp, της κοπής απομακρύνθηκαν με έναν ακόμη καθαρισμό μέσω του Zymo DNA clean and concentrator-5 kit.

Κλωνοποίηση του E6 PCR προϊόντος στον φορέα Zero TOPO Blunt II PCR kit

Πραγματοποιήθηκαν Nested PCR αντιδράσεις με μήτρα το E6 PCR προϊόν (Εικόνα 14,d), με διαφορετικά ζεύγη εκκινητών και διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδοποίησης, όμως καμία δεν απέδωσε το αναμενόμενου μεγέθους προϊόν. Έτσι, έγινε εξαγωγή της συγκεκριμένης PCR ζώνης (3592bp) από πηκτή αгарόζης 1%, ακολούθησε καθαρισμός του DNA με το Zymo DNA clean and concentrator-5 kit και η ενσωμάτωση του σε ένα Zero TOPO Blunt II PCR kit (Thermo Fisher) φορέα, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για τον μετασχηματισμό 10-beta competent cells (NEB). Αποστειρωμένοι σωλήνες με LB εμβολιάστηκαν με 9 βακτηριακές αποικίες, πραγματοποιήθηκαν mini-preps και έπειτα πέψεις σε 6 (1,2,3,5,6,7) από τους 9 κλώνους, με τα ένζυμα περιορισμού BspHI, EcoRI, NcoI και PciI (Εικόνα 16).

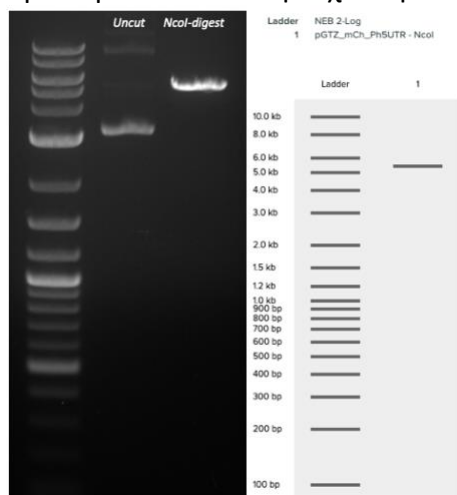


Εικόνα 16. Διαγνωστικές πέψεις των κλώνων PCR_Blunt_II_TOPO_E6. Πλασμιδιακό DNA από τους κλώνους 1,2,3,5,6,7 υποβλήθηκε σε πέψεις με BspHI, EcoRI, NcoI και PciI (Αριστερά). Υπάρχουν 2 διαφορετικά πρότυπα κοπής με τα αναμενόμενα μεγέθη που αντιπροσωπεύονται από τα 1,2,6, τα οποία έχουν κανονικό προσανατολισμό του ενθέματος, και τα 3,5,7, τα οποία έχουν ανάποδο προσανατολισμό του ενθέματος. Εικονικές πέψεις του PCR_Blunt_II_TOPO_E6 στο Benchling (Δεξιά).

Η αλληλούχιση των κλώνων 1 και 5 επιβεβαίωσε ότι η κλωνοποιημένη αλληλουχία E6 είναι πλήρως συμβατή με την E6 CRE περιοχή στο γενωμικό DNA του *Parhyale* και ότι ήταν κανονικά προσανατολισμένη στον κλώνο 1 και ανάστροφα στον κλώνο 5. Το πλασμιδιακό DNA από τον κλώνο 1 "PCR_Blunt_II_TOPO_E6" υποβλήθηκε σε επεξεργασία με PciI για να απομονωθεί ένα μικρότερο τμήμα της E6 CRE περιχής που περιλαμβάνει μόνο την ATAC-seq κορυφή. Το θραύσμα καθαρίστηκε με το Zymo DNA clean and concentrator-5 kit και χρησιμοποιήθηκε στα επόμενα βήματα.

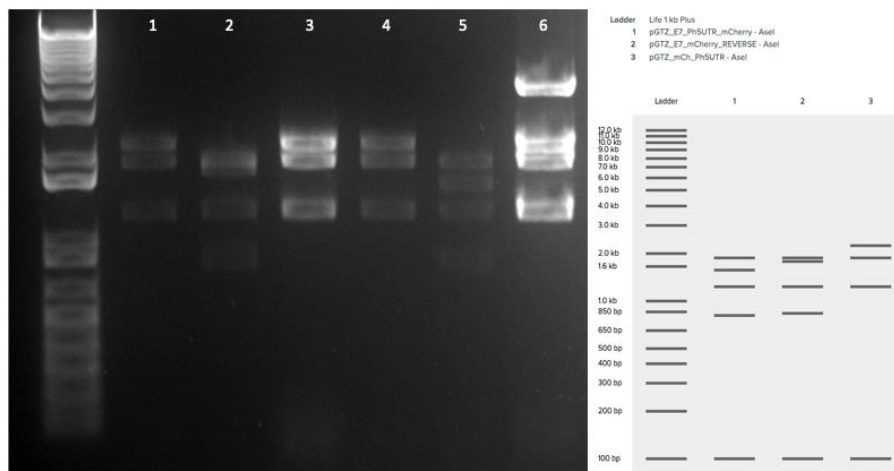
Κλωνοποίηση των E7, Eι3, E6, Eι5 αλληλουχιών στον φορέα pGTZ{Ph5UTR-DlIeprom-PhH2B-mCherry}

Για τα επόμενα βήματα, πλασμιδιακό DNA του φορέα pGTZ{Ph5UTR-DlIeprom-PhH2B-mCherry} υποβλήθηκε σε πέψη με NcoI και αφού επαληθεύτηκε ότι η πέψη ήταν πλήρης (Εικόνα 17), το γραμμικό πλασμίδιο αποφωσφορυλιώθηκε με το ένζυμο quick-CIP προκειμένου να αποφευχθεί η επανακυκλοποίηση του.

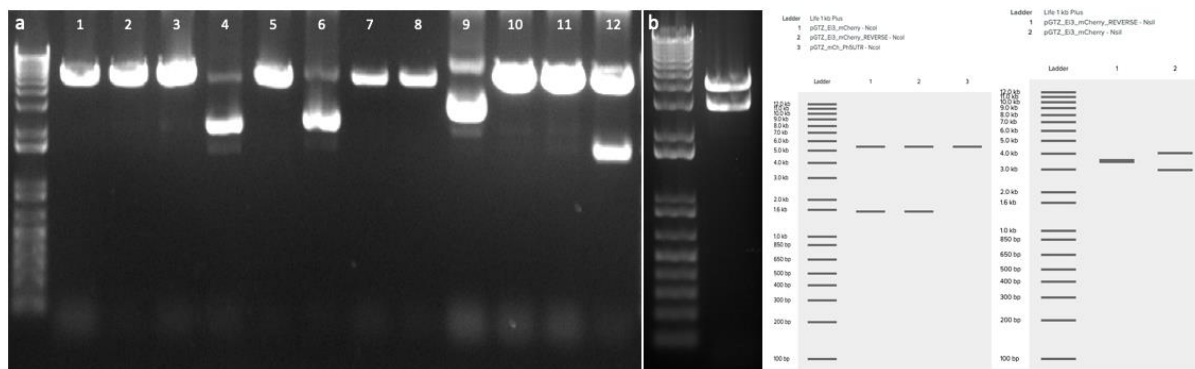


Εικόνα 17. Πέψη του πλασμιδίου αναφοράς pGTZ{Ph5UTR-DlIeprom-PhH2B-mCherry} με NcoI. Το πλασμίδιο με την κασέτα αναφοράς υπέστη πέψη με NcoI δίνοντας μία αναμενόμενη ζώνη μεγέθους 5395bp. Ο φορέας που δεν είχε υποστεί πέψη χρησιμοποιήθηκε για έλεγχο. Εικονική πέψη του πλασμιδίου αναφοράς pGTZ στο Benchling (Δεξιά).

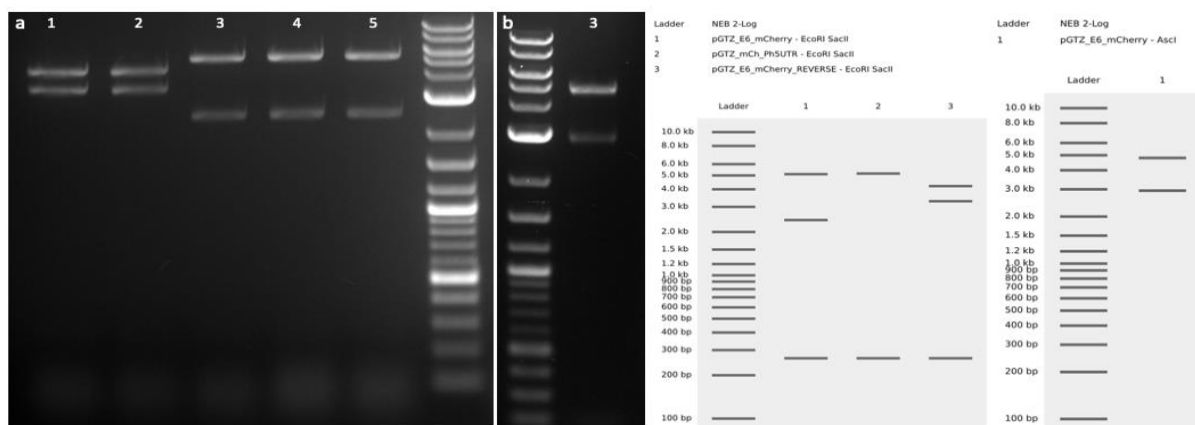
Τα κατεργασμένα με NcoI θραύσματα E7, Eι3, Eι5, καθώς και το θραύσμα E6 που είχε κοπεί με με PciI ενσωματώθηκαν στον φορέα pGTZ{Ph5UTR-DlIeprom-PhH2B-mCherry}, χρησιμοποιώντας την T4-DNA Ligase. Στη συνέχεια, DH5a chemo-competent βακτηριακά κύτταρα μετασηματίστηκαν με το μισό μίγμα της κάθε αντίδρασης και τοποθετήθηκαν σε πιάτα με θρεπτικό υλικό και αντιβιοτικό LB- ampicillin (100μg/ml). Υγρό μέσο (LB-ampicillin) εμβολιάστηκε με μεμονωμένες αποικίες και το πλασμιδιακό DNA των κλώνων απομονώθηκε με mini-preps. Ο έλεγχος για την ύπαρξη και τον προσανατολισμό του κάθε ενθέματος πραγματοποιήθηκε με διαγνωστικές πέψεις και στη συνέχεια οι θετικοί κλώνοι ελέγχθηκαν με ακόμη μία πέψη (Εικόνες 18,19,20,21).



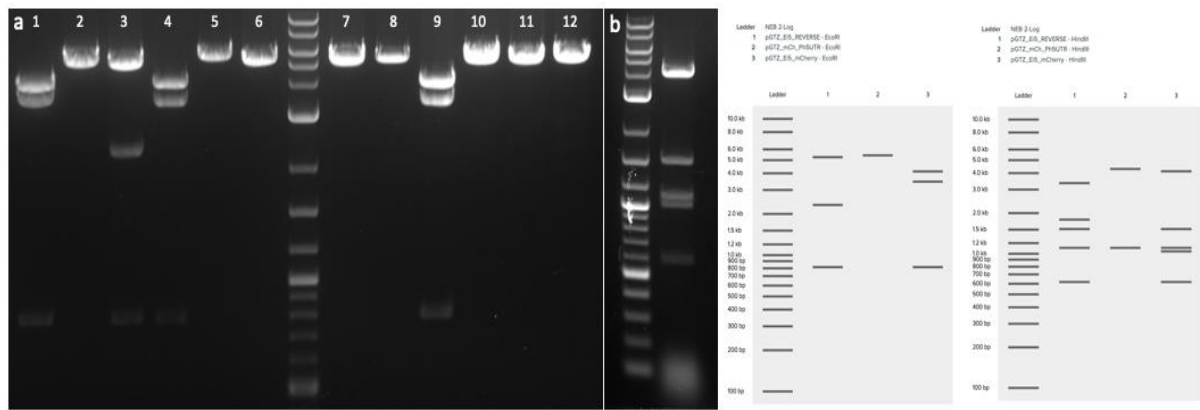
Εικόνα 18. Διαγνωστικές πέψεις των κλώνων pGTZ_E7_PhUTR_Dlleprom_mCherry. Πέψεις του πλασμιδιακού DNA 6 κλώνων με AseI. Μόνο ο κλώνος 5 έχει το αναμενόμενο πρότυπο κοπής με κανονικό προσανατολισμό του ενθέματος. Εικονική πέψη με AseI στο Benchling (δεξιά).



Εικόνα 19. Διαγνωστικές πέψεις των κλώνων pGTZ_Ei3_PhUTR_Dlleprom_mCherry. α) Πέψεις του πλασμιδιακού DNA 12 κλώνων με NcoI. Μόνο ο κλώνος 12 έχει το αναμενόμενο πρότυπο κοπής παρουσίας του ενθέματος. β) Πέψη επαλήθευσης του κλώνου 12 με NsiI που αποδεικνύει ότι είναι θετικός και έχει κανονικό προσανατολισμό του ενθέματος. Εικονικές πέψεις με NcoI και NsiI στο Benchling (δεξιά).



Εικόνα 20. Διαγνωστικές πέψεις των κλώνων pGTZ_E6_PhUTR_Dlleprom_mCherry. α) Διπλή πέψη EcoRI/SacII πλασμιδιακού DNA από 5 κλώνους. Όλοι οι κλώνοι φαίνεται να είναι θετικοί, οι 3, 4, 5 με κανονικό προσανατολισμό του ενθέματος και οι 1, 2 με ανάποδο προσανατολισμό του ενθέματος. β) Πέψη επαλήθευσης του κλώνου 3 με AscI. Εικονικές πέψεις με EcoRI/SacII και AscI στο Benchling (Δεξιά).

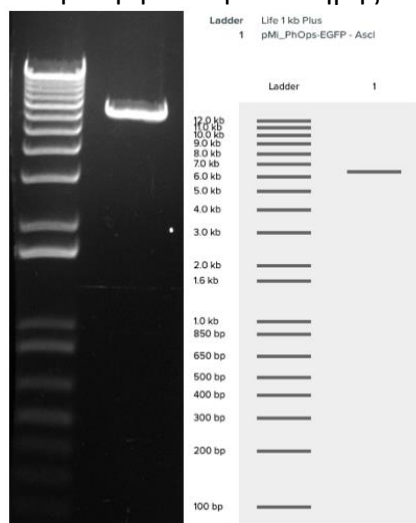


Εικόνα 21. Διαγνωστικές πέψεις των κλώνων rGTZ_Ei5_PhUTR_Dlleprom_mCherry. α) Πέψεις πλασμιδιακού DNA από 12 κλώνους με EcoRI. Οι κλώνοι 1, 4, 9 έχουν το αναμενόμενο πρότυπο κοπής με κανονικό προσανατολισμό του ενθέματος και ο κλώνος 3 με ανάποδο προσανατολισμό. β) Πέψη επαλήθευσης του κλώνου 4 με HindIII. Εικονικές πέψεις με EcoRI και HindIII στο Benchling (Δεξιά).

Οι 4 θετικοί κλώνοι του πλασμιδιακού DNA rGTZ-CRE αλληλουχήθηκαν για να επικυρωθεί ότι οι αλληλουχίες E7, Ei3, E6, Ei5 που έχουν κλωνοποιηθεί, ταυτίζονται με τις γονιδιωματικές αλληλουχίες των υποψήφιων CRE περιοχών. Μερικά βακτήρια από τους θετικούς κλώνους E7, Ei3, E6, Ei5 επιστρώθηκαν σε πιάτα LB-αμπικιλίνης, μία μοναδιαία αποικία από κάθε πιάτο καλλιεργήθηκε σε υγρό μέσο της ίδιας σύνθεσης και ακολούθησαν mini-preps με το QIAprep Spin Mini-prep Kit για την ανάκτηση καθαρού πλασμιδιακού DNA καθενός από τα 4 πλασμίδια. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν 4 αντιδράσεις πέψης με *AscI* για την απομόνωση των κατασκευών των υποψήφιων CREs (E7-Ph5UTR-Dlleprom-PhHB-mCherry, Ei3-Ph5UTR-Dlleprom-PhHB-mCherry, Ei5-Ph5UTR-Dlleprom-PhHB-mCherry, E6-Ph5UTR-Dlleprom-PhHB-mCherry) από το rGTZ κορμό και την επερχόμενη κλωνοποίηση τους στο φορέα διαγένεσης.

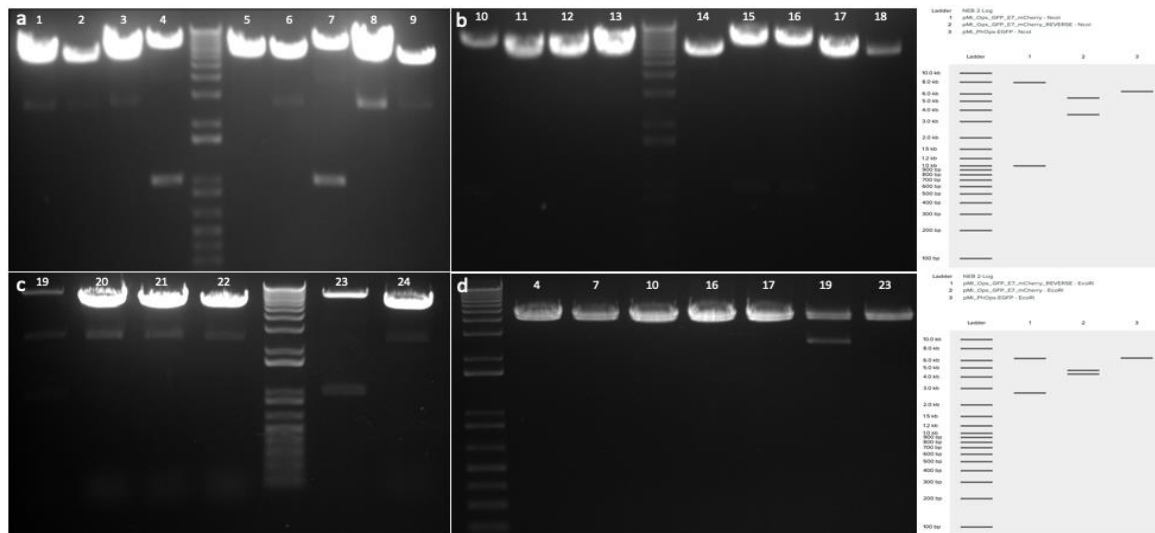
Κλωνοποίηση των E7,Ei3,E6,Ei5 κατασκευών στον φορέα pMi{PhOps-EGFP}

Ομοίως με την προετοιμασία του rGTZ φορέα, πλασμιδιακό DNA του pMi{PhOps-EGFP} υπέστη κατεργασία με *AscI* και το αποφωσφορυλίωση με quick-CIP αφού επιβεβαιώθηκε ότι η πέψη *AscI* ήταν πλήρης και ότι το πλασμίδιο ήταν πλέον γραμμικό (Εικόνα 22).

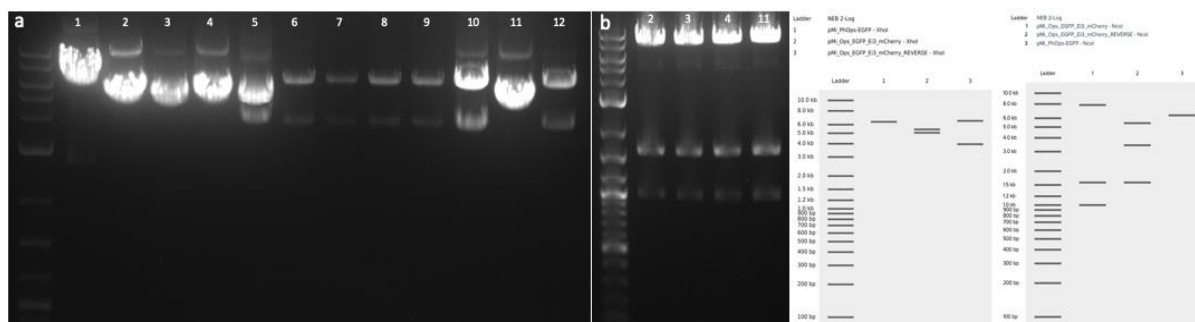


Εικόνα 22. Πέψη του διαγονιδιακού φορέα pMi{PhOps-EGFP} με *AscI*. Ο διαγονιδιακός φορέας υπέστη πέψη με *AscI* και το γραμμικό DNA που προέκυψε είχε μήκος 6365bp όπως αναμενόταν (Αριστερά). Εικονική πέψη του φορέα pMi με *AscI* στο Benchling (Δεξιά).

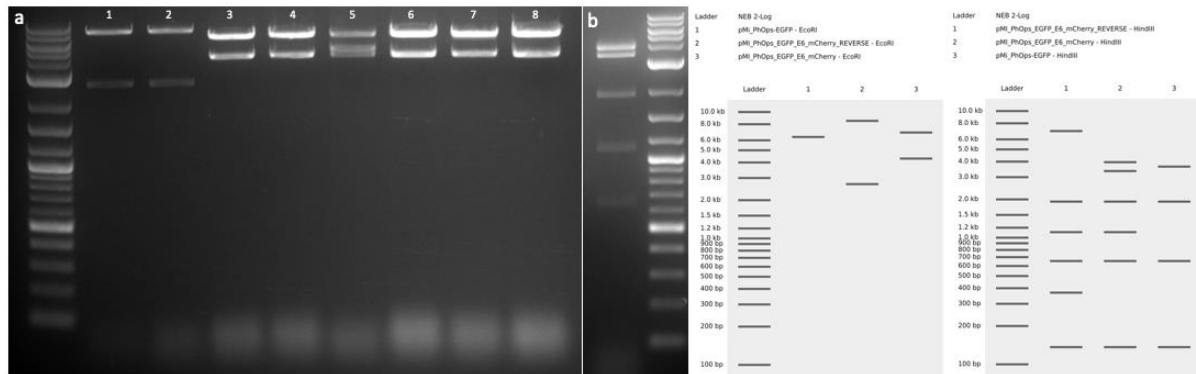
Οι κατασκευές αναφοράς E7, Ei3, E6, Ei5 που έφεραν άκρα *Ascl* εισήχθησαν στον αποφωσφορυλιωμένο με *Ascl*-άκρα, *pMi{PhOps-EGFP}* φορέα, με αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν από την T4-DNA Ligase. Το ήμισυ του μείγματος κάθε αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε για μετασχηματισμό των DH5a *chemo-competent* βακτηρίων, τα οποία επιστρώθηκαν σε πιάτα LB-αμπικιλίνης. Μοναδιαίες αποικίες από κάθε πιάτο διηθήθηκαν σε υγρό μέσο της ίδιας σύνθεσης, πραγματοποιήθηκαν αλκαλικά *miniprep*s και το πλασμιδικό DNA που απομονώθηκε ελέγχθηκε για την ύπαρξη και τον προσανατολισμό του ενθέματος με διαγνωστικές πέψεις (Εικόνες 23, 24, 25, 26).



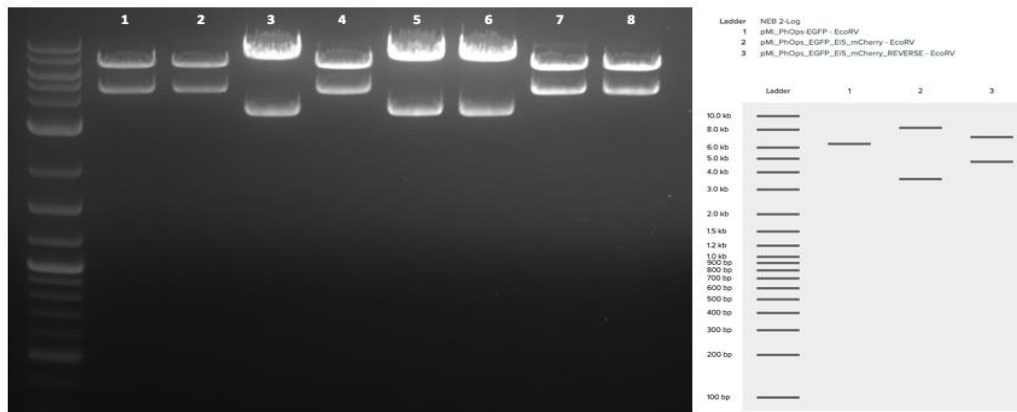
Εικόνα 23. Διαγνωστικές πέψεις κλώνων *pMi_PhOps_EGFP_E7_PhUTR_Dlleprom_mCherry*. a),b),c) Διαγνωστικές πέψεις με *NcoI* πλασμιδικού DNA 24 βακτηριακών κλώνων. Οι κλώνοι 4, 7, 10, 15, 16, 19, 23 παρουσιάζουν το πρότυπο που προκύπτει από τον κανονικό προσανατολισμό του ενθέματος. Η 1kb ζώνη στους κλώνους 10, 15, 16 είναι πολύ αχνή και δυσδιάκριτη χωρίς την αύξηση της φωτεινότητας της εικόνας. d) Πέψεις επαλήθευσης των θετικών κλώνων με *EcoRI* που αποδεικνύουν τη θετικότητα και τον κανονικό προσανατολισμό όλων των κλώνων εκτός του 19. Ο κλώνος 4 χρησιμοποιήθηκε για τα επόμενα βήματα. Εικονικές πέψεις του *pMi_PhOps_EGFP_E7_PhUTR_Dlleprom_mCherry* με *NcoI* και *EcoRI* στο Benchling (Δεξιά).



Εικόνα 24. Διαγνωστικές πέψεις κλώνων *pMi_PhOps_EGFP_Ei3_PhUTR_Dlleprom_mCherry*. a) Διαγνωστικές πέψεις με *XhoI* πλασμιδικού DNA 12 βακτηριακών κλώνων. Οι κλώνοι 2, 3, 4, 11 έχουν πιθανότατα το αναμενόμενο πρότυπο που αντιπροσωπεύει τον κανονικό προσανατολισμό του ενθέματος και οι κλώνοι 10, 12 τον ανάποδο προσανατολισμό. b) Οι πέψεις επαλήθευσης των κλώνων 2, 3, 4, 11 με *NcoI* δείχνουν τη θετικότητά τους και τον κανονικό προσανατολισμό του ενθέματος. Ο κλώνος 2 επιλέχθηκε για τα επόμενα βήματα. Εικονικές πέψεις του *pMi_PhOps_EGFP_Ei3_PhUTR_Dlleprom_mCherry* με *XhoI* και *NcoI* στο Benchling (Δεξιά).



Εικόνα 25. Διαγνωστικές πέψεις κλώνων *pMi_PhOps_EGFP_E6_PhUTR_Dlleprom_mCherry*. α) Διαγνωστικές πέψεις με EcoRI 8 βακτηριακών κλώνων. Οι κλώνοι 3, 4, 6, 7, 8 έχουν το αναμενόμενο πρότυπο με τον κανονικό προσανατολισμό του ενθέματος και οι κλώνοι 1, 2 με τον ανάποδο προσανατολισμό. β) Ο κλώνος 3 επαληθεύτηκε περαιτέρω με κοπή HindIII και χρησιμοποιήθηκε για τα επόμενα βήματα. Εικονικές πέψεις του *pMi_PhOps_EGFP_Ei6_PhUTR_Dlleprom_mCherry* με EcoRI και HindIII στο Benchling (Δεξιά).



Εικόνα 26. Διαγνωστικές πέψεις κλώνων *pMi_PhOps_EGFP_Ei5_PhUTR_Dlleprom_mCherry*. Διαγνωστικές πέψεις με EcoRV 8 βακτηριακών κλώνων. Οι κλώνοι 3, 5, 6 έχουν το αναμενόμενο πρότυπο με τον κανονικό προσανατολισμό του ενθέματος και οι υπόλοιποι κλώνοι με τον ανάποδο προσανατολισμό. Ο κλώνος 3 χρησιμοποιήθηκε για τα επόμενα βήματα. Εικονικές πέψεις του *pMi_PhOps_EGFP_Ei5_PhUTR_Dlleprom_mCherry* με EcoRV στο Benchling (Δεξιά).

Βακτήρια από κάθε επιλεγμένο θετικό κλώνο επιστρώθηκαν σε πιάτα LB-αμπικιλίνης, μία μοναδιαία καλλιέργεια από κάθε πιάτο επώαστηκε σε υγρό μέσο ίδιας σύνθεσης και το πλασμιδικό DNA κάθε καλλιέργειας καθαρίστηκε για τη χρήση σε μικροενέσεις με το ZymoPURE Plasmid Midiprep Kit. Τα midipreps απέδωσαν τουλάχιστον 1000ng/μl από κάθε πλασμίδιο *pMi{PhOps-EGFP-E7-mCherry}*, *pMi{PhOps-EGFP-Ei3-mCherry}*, *pMi{PhOps-EGFP-E6-mCherry}* και *pMi{PhOps-EGFP-Ei5-mCherry}*.

3.3 Ανάλυση του χωροχρονικού προτύπου έκφρασης των υποψήφιων CREs σε ενεμένα G0 έμβρυα *Parhyale hawaiensis*

Στη συνέχεια παρατίθενται εικόνες φωτεινού πεδίου (brightfield – BF) και φθορισμού, ενεμένων G0 *Parhyale* εμβρύων, στις οποίες παρουσιάζεται το χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης H2B-mCherry που επάγεται από κάθε υποψήφιο ενισχυτή και αντικατοπτρίζει την ενεργότητά του. Τα έμβρυα που απεικονίζονται είναι μωσαϊκά και απέδωσαν μοναδικά πρότυπα έκφρασης φθορισμού λόγω των στοχαστικών ενθέσεων που πραγματοποιούνται από την *Minos*-τρανσποζάση στα ενεμένα έμβρυα. Οι όροι Unilateral και Bilateral στους παρακάτω πίνακες αναφέρονται στην έκφραση Orsin-EGFP στον ένα ή και τους δύο οφθαλμούς του κάθε G0, αντίστοιχα, και είναι ενδεικτικά για χαμηλά επίπεδα

μωσαϊκισμού των G0 εμβρύων (Pavlopoulos & Averof, 2005). Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται τα πειράματα των ενέσεων και τα αποτελέσματα τους (Πίνακας 1).

	E7	Ei3	E6	Ei5
Ενεμένα G0 έμβρυα	980	1.125	1.370	450
Έμβρυα με mCherry σήμα	0	5	0	1
Έμβρυα που ελέγχθηκαν για Opsin-EGFP σήμα	60	130	47	50
Έμβρυα με Opsin-EGFP σήμα	6	11	11	10

Πίνακας 1. Ενέσεις G0 *Parhyale* εμβρύων.

pMi{PhOps-EGFP; E7-mCherry}

Τα ενεμένα G0 έμβρυα με pMi{PhOps-EGFP; E7-mCherry} δεν απέδωσαν ποτέ πυρηνικό σήμα mCherry κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Από τα 980 έμβρυα που ενέθηκαν, 60 επιζήσαντα ελέγχθηκαν για Opsin-EGFP (διαγονιδιακός δείκτης) και 6 βρέθηκαν θετικά. Από αυτά τα 6 G0 μόνο 3 έφτασαν στη σεξουαλική ωριμότητα και διασταυρώθηκαν με ζώα WT για την ανάλυση της έκφρασης των G1 απογόνων τους. Από τα 31 G1 έμβρυα που ελέγχθηκαν για φθορισμό, σε ζωντανή (live) παρατήρηση στο στερεοσκόπιο, κανένα δεν εμφάνισε σήμα mCherry, αλλά υπήρχαν 11 θετικά Opsin-EGFP που προέρχονταν από 2 διαφορετικούς G0 γονείς (Πίνακας 2). Αυτά τα θετικά G1 έμβρυα ανατράφηκαν μέχρι την ενηλικίωση και οι G2 απόγονοι τους ελέγχθηκαν για mCherry και EGFP φθορισμό. Από τα 104 έμβρυα που ελέγχθηκαν, όλα ήταν αρνητικά σε mCherry και υπήρχαν 50 θετικά σε Opsin-EGFP που προέρχονταν από 4 διαφορετικούς γονείς G1, 2 εκ των οποίων είχαν μεταξύ τους διασταυρωθεί (Πίνακας 3).

G0 Founders	G1s	Opsin-EGFP
7.1 (Bilateral)	14	0
7.2 (Unilateral)	9	3
7.3 (Bilateral)	8	8

Πίνακας 2. Θετικοί για EGFP-Opsin G1 απόγονοι

G1s	G2s	Opsin-EGFP
7.2.1 (xWT)	29	6
7.2.2 (xWT)	41	10
7.3.1 (x7.3.2)	19	19
7.3.2 (xWT)	15	15

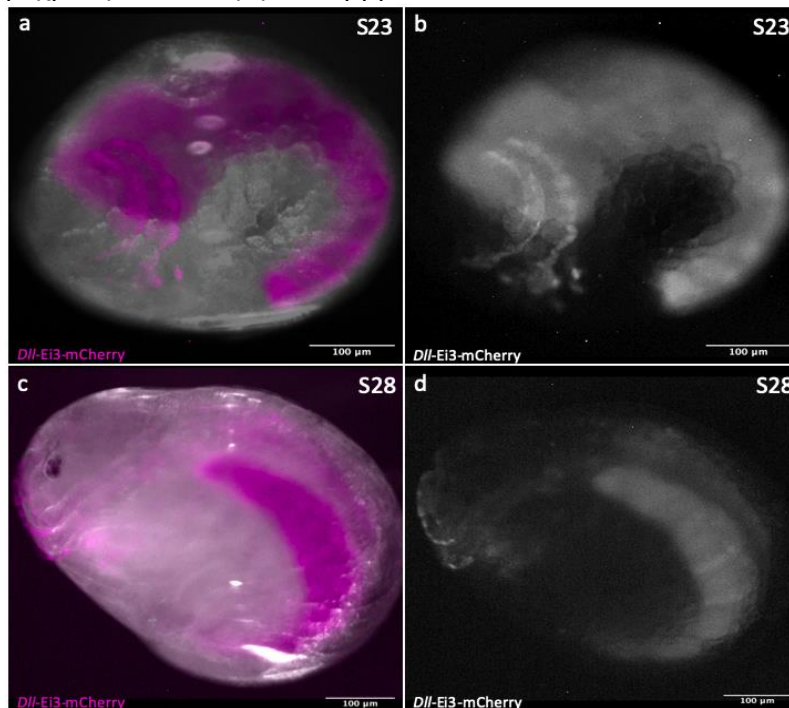
Πίνακας 3. Θετικοί για EGFP-Opsin G2 απόγονοι

Λαμβάνοντας υπόψη ότι χαμηλά επίπεδα έκφρασης του H2B-mCherry μπορεί να μην ανιχνεύονται σε ζωντανά έμβρυα στο στερεοσκόπιο φθορισμού που χρησιμοποιήθηκε σε αυτά τα πειράματα, G2 έμβρυα διαφόρων σταδίων από μία σταθερή διαγονιδιακή σειρά

Ε7 ζώων υποβλήθηκαν σε ανοσοφθορισμό καταλήγοντας σε περισσότερο ενθαρρυντικά αποτελέσματα (βλ. 3.4).

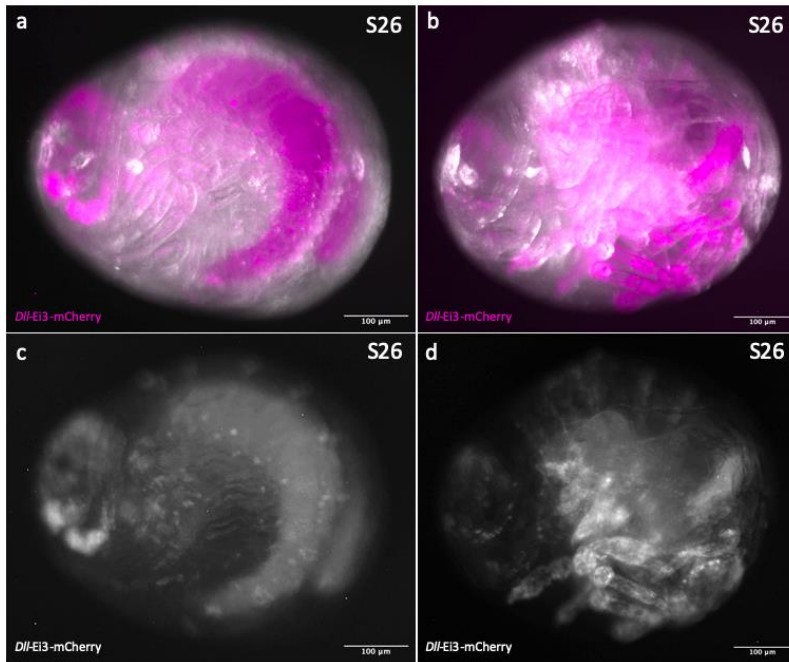
pMi{PhOps-EGFP; Ei3-mCherry}

Τα έμβρυα G0 που ενέθηκαν με pMi{PhOps-EGFP; Ei3-mCherry} παρουσίασαν διακύμανση στη χωροχρονική έκφραση της πυρηνικής mCherry, η οποία εντοπίστηκε στα άκρα κατά τα στάδια S23-S28. Ένα έμβρυο σταδίου S23 (την 6η ημέρα της εμβρυογένεσης) εμφάνισε σήμα mCherry σχεδόν ομοιόμορφα κατανομημένο μεταξύ του εγγύ-άπω άξονα των αριστερών κεραιών An1 και An2 (Εικόνα 27, a). Το πρότυπο και η ένταση του φθορισμού διατηρήθηκαν για τις επόμενες 3 ημέρες, καθώς το ίδιο έμβρυο εξετάστηκε εκ νέου 76 ώρες αργότερα (Εικόνα 27, c). Εντός των επόμενων ωρών, το σήμα εξασθένησε και χάθηκε μέχρι την εκκόλαψη του εμβρύου.



Εικόνα 27. Μικτές εικόνες φωτεινού πεδίου και φθορισμού που παρουσιάζουν την έκφραση του pMi{PhOps-EGFP; Ei3-mCherry}. a), c) Το κανάλι φθορισμού DSR είναι magenta και το κανάλι φωτεινού πεδίου είναι γκρι. b), d) Μικτή εικόνα φθορισμού και φωτεινού πεδίου σε κλίμακα του γκρι (το κανάλι DSR είναι λευκό). Ο φθορισμός ανιχνεύεται στα κύτταρα των αριστερών μόνο κεραιών An1 και An2 τόσο στο στάδιο S23 και στο στάδιο S28. Το έμβρυο είναι προσανατολισμένο ώστε να φαίνεται ο φθορισμός (Η εμπρόσθια μερία βρίσκεται στα αριστερά). Παρατηρείται επίσης αυτοφθορισμός που προκύπτει πάντα από τα κύτταρα του μέσου εντέρου. Scale bar (100μm).

4 έμβρυα σταδίου S26 (7η-8η ημέρα εμβρυογένεσης) εμφάνισαν έντονο ή και πιο ασθενές σήμα της mCherry πρωτεΐνης στα πόδια και στις κεραιές. Τα 2 από αυτά εμφάνισαν πιο διακριτό μοτίβο και το πιο έντονο σήμα της mCherry (Εικόνα 28). Αξίζει να σημειωθεί ότι και τα 5 θετικά σε mCherry έμβρυα αυτών των πειραμάτων εμφάνισαν σήμα Orpsin-EGFP, γεγονός που υποδηλώνει ότι η έκφραση της mCherry πιθανότατα οφείλεται σε διαγονιδιακές ενθέσεις (Pavlopoulos & Averof, 2005).



Εικόνα 28. Μικτές εικόνες φωτεινού πεδίου και φθορισμού που παρουσιάζουν την έκφραση του $pMi\{PhOps-EGFP; Ei3-mCherry\}$. a) Το κανάλι φθορισμού DSR είναι magenta και το κανάλι φωτεινού πεδίου είναι γκρι. Η mCherry εκφράζεται αραιά από κύτταρα κάποιων θωρακικών άκρων και αρκετά έντονα στα κύτταρα των κεραίων, περιορίζεται όμως μόνο στην αριστερή πλευρά του σώματος του εμβρύου. Παρατηρείται επίσης αυτοφθορισμός στο μέσο έντερο. b) Το κανάλι φθορισμού DSR είναι magenta. Παρατηρείται έντονο σήμα της mCherry στον εγγύς-άπω άξονα όλων των άκρων, εκτός των κεραίων όπου η mCherry εκφράζεται σε αραιά κατανεμημένα κύτταρα. Στο έμβρυο αυτό το σήμα εντοπίζεται και στις δύο πλευρές του σώματος (Στην εικόνα φαίνεται η αριστερή πλευρά). c) Εικόνα φθορισμού σε κλίμακα του γκρι του εμβρύου στην εικόνα(α) (το κανάλι DSR είναι λευκό). d) Εικόνα φθορισμού σε κλίμακα του γκρι του εμβρύου στην εικόνα(β) (το κανάλι DSR είναι λευκό). Η εμπρόσθια μεριά των εμβρύων βρίσκεται στα αριστερά. Scale bar (100μm).

Από τα 1.125 έμβρυα που ενέθηκαν, 130 ελέγχθηκαν για το διαγονιδιακό δείκτη Orsin-EGFP και 11 ήταν θετικά. Από αυτά τα G0, 5 εμφάνισαν σήμα mCherry (το μοτίβο του φθορισμού τους περιγράφηκε παραπάνω) και μόνο 2 έφτασαν στη σεξουαλική ωριμότητα, 1 από τα οποία διασταυρώθηκε αρκετές φορές με WT ζώα και δεν έδωσε ποτέ Orsin-EGFP φθορισμό. Οι διασταυρώσεις ενός άλλου G0 (αρνητικού για mCherry φθορισμό) με WT ζώα επίσης δεν έδωσαν διαγονιδιακούς απογόνους, ενώ τα υπόλοιπα G0 ζώα δεν έχουν έως τώρα φτάσει τη σεξουαλική ωριμότητα. Ως αποτέλεσμα, δεν υπήρχαν διαθέσιμα διαγονιδιακά ζώα για έλεγχο της mCherry έκφρασης με ανοσοφθορισμό στα πλαίσια αυτής της εργασίας.

$pMi\{PhOps-EGFP; E6-mCherry\}$

Στα έμβρυα G0 που ενέθηκαν με $pMi\{Ops-EGFP; E6-mCherry\}$ δεν ανιχνεύθηκε ποτέ πυρηνικός mCherry φθορισμός κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Από τα 1.370 έμβρυα που ενέθηκαν, 47 ελέγχθηκαν για Orsin-EGFP και 11 ήταν θετικά. Από τα 9 G0 που επιβίωσαν, 5 διασταυρώθηκαν με WT ζώα και 14 από τους 32 απογόνους G1 που παρήχθησαν ήταν θετικοί σε Orsin-EGFP, αλλά αρνητικοί σε mCherry φθορισμό. Αυτά τα 14 διαγονιδιακά G1 προέρχονταν από 2 διαφορετικά G0 (Πίνακας 4).

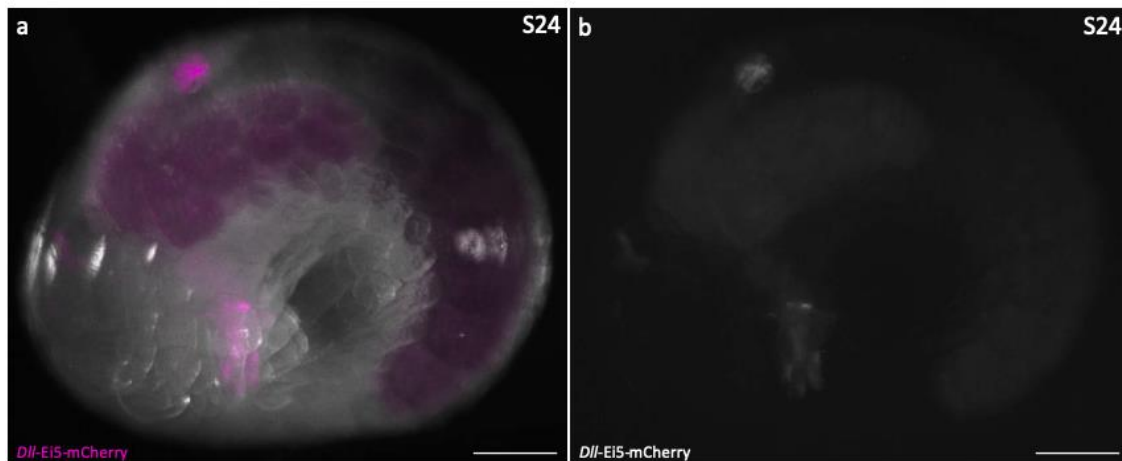
G0 Founders	G1s	Opsin_EGFP
E6.1 (Unilateral)	6	0
E6.3 (Bilateral)	13	11
E6.4 (Bilateral)	5	0
E6.7 (Unilateral)	3	3
E6.8 (Unilateral)	5	0

Πίνακας 4. Θετικοί για EGFP-Op sin G1 απόγονοι

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η έλλειψη φθορισμού μπορεί να οφείλεται σε περιορισμούς του εφαρμοζόμενου οπτικού συστήματος και έτσι για περαιτέρω έλεγχο της ενεργότητας του E6 υποψήφιου ενισχυτή, ένας αριθμός WT εμβρύων ενέθηκαν με $\rho\text{Mi}\{\text{Ops-EGFP; E6-mCherry}\}$ και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε χρώση με αντισώματα (βλ. 3.4).

$\rho\text{Mi}\{\text{PhOps-EGFP; Ei5-mCherry}\}$

Οι ενέσεις εμβρύων με $\rho\text{Mi}\{\text{Ops-EGFP; Ei5-mCherry}\}$ έδωσαν μόνο 1 έμβρυο που παρουσίασε πυρηνικό mCherry φθορισμό στο στάδιο S24 σε λίγα πρόσθια θωρακικά άκρα (Εικόνα 29).



Εικόνα 29. Πρότυπο έκφρασης του *Dll* CRE Ei5 σε ζωντανό ενεμένο έμβρυο G0. Έμβρυο G0 ενεμένο με $\rho\text{Mi}\{\text{PhOps-EGFP; Ei5-H2B-mCherry}\}$ που επιδεικνύει πυρηνικό φθορισμό της mCherry σε κύτταρα των πρόσθιων θωρακικών άκρων της αριστερής πλευράς (πιθανότατα στα gnathorods T3 και T4) στο όψιμο στάδιο S24. Ο πυρηνικός φθορισμός της H2B-mCherry και ο αυτοφθορισμός του εντέρου δείχνονται είτε επικαλυπτόμενοι με φωτογραφία φωτεινού πεδίου του εμβρύου (a, magenta) είτε μόνοι τους (b, γκρι). Όλες οι εικόνες δείχνουν την αριστερή πλευρά του εμβρύου με το κεφάλι αριστερά και τη ράχη πάνω. Scale bars 100μm.

Από τα 450 έμβρυα που ενέθηκαν, 50 επιζήσαντα ελέγχθηκαν για Op sin-EGFP και 10 από αυτά ήταν θετικά, συμπεριλαμβανομένου του εμβρύου που εμφάνισε mCherry σήμα (Εικόνα 29). Κανείς από τους 5 G0 επιζώντες δεν πρόλαβε να ωριμάσει αναπαραγωγικά στα πλαίσια αυτής της εργασίας, συνεπώς η ενεργότητα του Ei5 δεν ελέγχθηκε σε διαγονιδιακά άτομα.

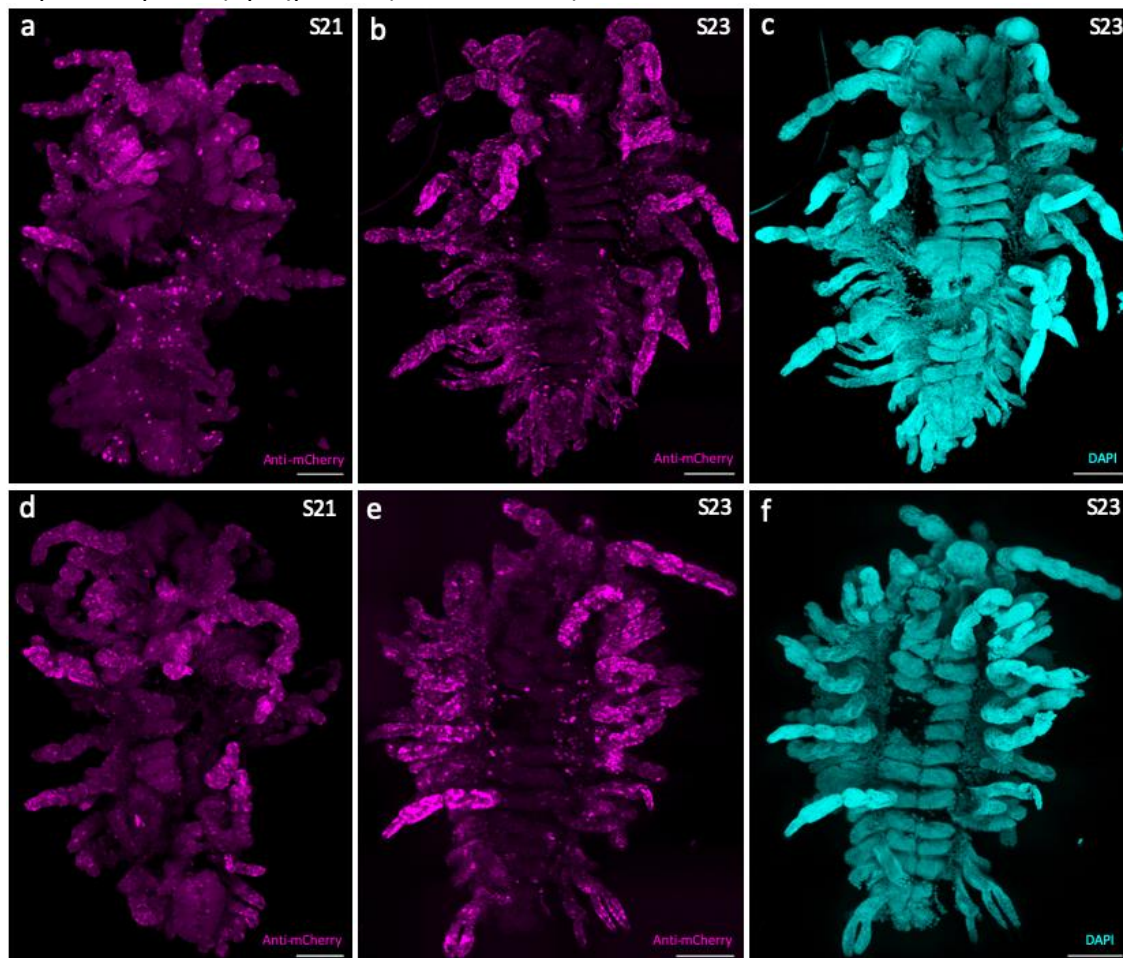
3.4 Χρώση αντισωμάτων και ανάλυση προτύπου έκφρασης των υποψήφιων ενισχυτών σε G0 και G2 έμβρυα *P.hawaiensis*

Οι εικόνες συνεστιακού μικροσκοπίου (Leica SP8 Confocal Microscope) που παρουσιάζονται παρακάτω έχουν υποστεί επεξεργασία με το πρόγραμμα Fiji και αναπαριστούν με τη βοήθεια ανοσοφθορισμού το πρότυπο έκφρασης της H2B-mCherry υπό τη καθοδήγηση των υποψήφιων ενισχυτές E6 και E7 σε μονιμοποιημένα έμβρυα. Τα

ίδια έμβρυα επώαστηκαν και με DAPI που βάφει τους πυρήνες των κυττάρων για τη μορφολογική ανάλυση των εμβρύων, διευκολύνοντας την αντιστοιχία μεταξύ της ενεργότητας των *Dll* ενισχυτών και της μορφολογίας.

pMi{PhOps-EGFP; E7-mCherry}

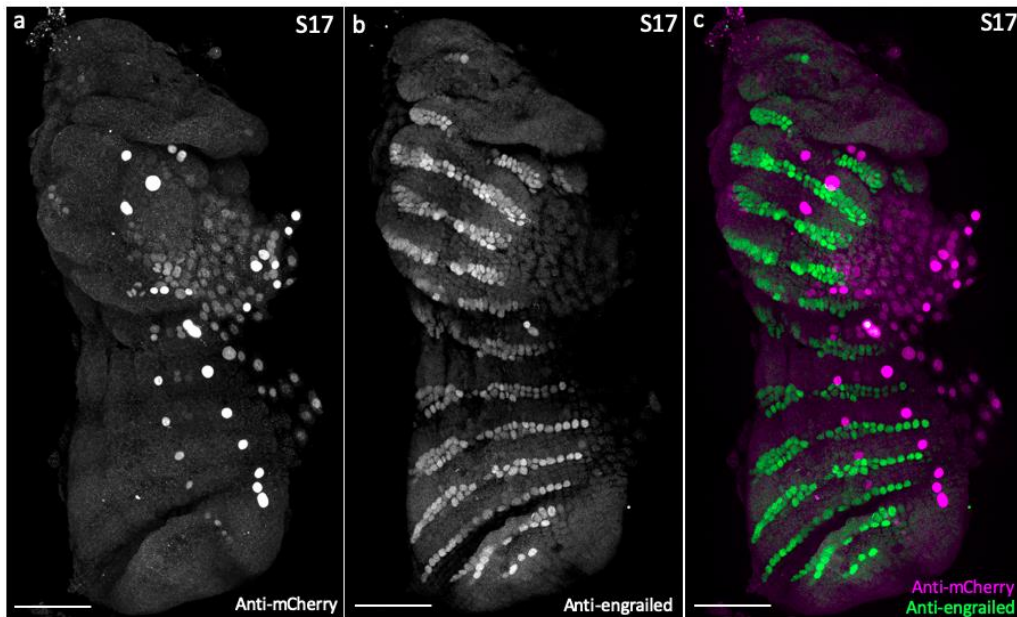
Τα έμβρυα που απεικονίζονται παρακάτω αποτελούν απογόνους 2 διαγονιδιακών G1 ζώων (7.3.1x7.3.2) και υπέστησαν ανοσοφθορισμό στα στάδια S21 και S23. Παρ'όλο που όλα τα έμβρυα του πειράματος παρουσίασαν πυρηνικό σήμα mCherry, παρουσιάζονται τα πιο ενδεικτικά της ενεργότητας του E7. Λόγω του συστήματος ενθέσεων με τη *Minos* τρανσποζάση, τα έμβρυα που παρουσιάζονται διαφέρουν ως προς τις ενθέσεις και έτσι, παρ'όλο που καταδεικνύουν την πιθανή ενεργότητα του E7, δεν απέδωσαν ένα επαναλαμβανόμενο μοτίβο mCherry σήματος. Τα κύτταρα που εξέφραζαν mCherry σε έμβρυα σταδίου S21 ήταν καταναμεμημένα στα πόδια και τις κεραίες, εμφανίζοντας ισχυρότερο ή ασθενέστερο σήμα στα διαφορετικά άκρα (Εικόνα 30,a,d), ενώ στα έμβρυα σταδίου S23, το σήμα mCherry ανιχνεύτηκε στα κύτταρα του εγγύ-άπω άξονα των περισσότερων εξαρτημάτων (Εικόνα 30,b,e).



Εικόνα 30. Πρότυπο έκφρασης του *Dll* CRE E7 σε μονιμοποιημένα διαγονιδιακά έμβρυα G2 με ανοσοφθορισμό. Ο πυρηνικός φθορισμός της H2B-mCherry (magenta) ελέγχθηκε με ανοσοφθορισμό και συνεστιακή μικροσκοπία σε διαγονιδιακά έμβρυα G2 με ενθέσεις του pMi{PhOps-EGFP; E7-H2B-mCherry} που μονιμοποιήθηκαν είτε (a, d) στο ενδιάμεσο στάδιο ανάπτυξης S21 είτε (b, e) στο όψιμο στάδιο S24. (c, f) Χρώση πυρήνων με DAPI (cyan) των εμβρύων στις εικόνες (b) και (e), αντίστοιχα. Σε όλα τα έμβρυα, το σήμα mCherry ανιχνεύεται σε κύτταρα καταναμεμημένα στις κεραίες και στα πόδια, χωρίς να παρατηρείται κάποιο επαναλήψιμο μοτίβο, λόγω του διαφορετικού αριθμού ενθέσεων των εμβρύων. Όλες οι εικόνες αναπαριστούν maximum intensity projections της κοιλιακής πλευράς των εμβρύων με το εμπρόσθιο μέρος προς τα πάνω. Scale bars 100μm.

ρMi{PhOps-EGFP; E6-mCherry}

Στην περίπτωση του E6 CRE, δεν ανιχνεύθηκε φθορισμός της H2B-mCherry σε ενεμένα G0 έμβρυα και δεν προλάβαινα να φτιάξω και να ελέγξω σταθερές διαγονιδιακές σειρές ζώων στο διαθέσιμο χρόνο. Για το λόγο αυτό, ένας μικρός αριθμός εμβρύων G0 που ενέθηκαν με ρMi{PhOps-EGFP- E6-H2B-mCherry} υποβλήθηκε σε χρώση με αντισώματα. Όπως αναμενόταν, το πρότυπο έκφρασης της H2B-mCherry που αποκαλύφθηκε ήταν μωσαϊκό στα 2 από τα 4 έμβρυα που αναλύθηκαν και δεν μπορούν να εξαχθούν τελικά συμπεράσματα. Παρόλα αυτά, μία παρατήρηση έχει ενδιαφέρον. Έντονη έκφραση της H2B-mCherry ανιχνεύτηκε σε 2 έμβρυα, σε μεσοδερμικά κύτταρα με μεταμερική οργάνωση που πιθανά αντιστοιχούν σε μεσοτελοβλάστες (πρόδρομα κύτταρα των μυών) (Εικόνα 32).



Εικόνα 32. Εικόνες συνεστιακού μικροσκοπίου που παρουσιάζουν το μοτίβο έκφρασης Engrailed και Dll-mCherry σε έμβρυα G0. α) Εικόνα anti-mCherry σε κλίμακα του γκρι (το anti-mCherry είναι σε λευκό χρώμα). **β)** Εικόνα anti-engrailed σε κλίμακα του γκρι (το anti-engrailed είναι σε λευκό χρώμα). **γ)** Μικτές εικόνες anti-mCherry και anti-engrailed: Η χρώση με anti-engrailed αντίσωμα (Mab 4D9) είναι πράσινη. Η χρώση με anti-mCherry αντίσωμα (R-anti-mCherry) είναι magenta. Τα κύτταρα με τη χρώση anti-Engrailed σχηματίζουν 12 λωρίδες κατά τον εμπροσθοπίσθιο άξονα του σώματος, όπως αναμένεται σε *Parhyale* έμβρυα σταδίου S17 (Browne et al. 2005). Το Dll-mCherry εκφράζεται σε κύτταρα μεσενδοδέρματος που βρίσκονται στη ραχιαία πλευρά του εμβρύου. Όλα τα έμβρυα είναι προσανατολισμένα με το εμπρόσθιο μέρος προς τα πάνω. Scale bar (100μm).

4. Συζήτηση

Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας ήταν ο λειτουργικός χαρακτηρισμός περιοχών που λειτουργούν ως ενισχυτές του *Distal-less early (Dlle)* γονιδίου στον *Parhyale hawaiiensis*. Οι υποψήφιας περιοχές επιλέχθηκαν με βάση γονιδιωματικά δεδομένα και μελετήθηκαν in vivo μέσω της δημιουργίας κατασκευών αναφοράς και διαγονιδιακής τεχνολογίας. Δεδομένα από αναλύσεις ATAC-seq, RNA-seq και φυλογενωμικών συγκρίσεων συνδυάστηκαν ώστε να ταυτοποιηθούν υποψήφιοι ενισχυτές, περιοχές ανοιχτής χρωματίνης κάποιες από τις οποίες εμφάνιζαν υψηλή ομολογία σε νουκλεοτιδικό επίπεδο με τις αντίστοιχες περιοχές άλλων συγγενικών καρκινοειδών. Τα δεδομένα ATAC-seq προέρχονταν από έμβρυα σταδίων S13, S17 και S19, κατά τα οποία η έκφραση του *Dll* στον *Parhyale* ενεργοποιείται κοιλιακά στα πρόδρομα κύτταρα των άκρων (Browne et al., 2005). Ελέγχθηκαν λειτουργικά δύο περιοχές ανοδικά της 5'-UTR περιοχής του *Dll* και δύο ιντρονικές περιοχές του γονιδίου. Ο έλεγχος της ρυθμιστικής ενεργότητας του εκάστοτε υποψήφιου ενισχυτή έγινε αρχικά σε ζωντανά ενεμένα έμβρυα G0 και διαγονιδιακά έμβρυα G1 ή G2 μέσω μικροσκοπίας φθορισμού, ενώ για περαιτέρω έλεγχο και μεγαλύτερη ακρίβεια του προτύπου έκφρασης εφαρμόστηκε ανοσοφθορισμός και συνεστιακή μικροσκοπία. Οι δύο από τους τέσσερις υποψήφιους ενισχυτές E7 και E13 έδωσαν ισχυρές ενδείξεις για τη συμμετοχή τους στη ρύθμιση του *Dll* σε όψιμα στάδια της εμβρυογένεσης, ενώ οι άλλοι δύο ενισχυτές E6 και E15 χρειάζονται περαιτέρω ανάλυση.

Αξίζει σε αυτό το σημείο να αναφερθεί ότι η δράση *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων απομονωμένων από το γονιδιωματικό τους περιβάλλον πρέπει να ερμηνεύεται με προσοχή. Όπως προαναφέρθηκε, οι ενισχυτές αποτελούν λογικούς επαγωγείς των ποικίλων σημάτων που δέχονται τα γονίδια από διαφορετικούς ρυθμιστές και το χωροχρονικό τους πρότυπο καθορίζεται από θετικά και αρνητικά σήματα (Istrail & Davidson, 2005). Το παράδειγμα της ρύθμισης του *Dll* στη *Drosophila melanogaster* φανερώνει ότι ενδέχεται ένας ενισχυτής να συνεργάζεται με κάποιον άλλο για τη ρύθμιση του γονιδίου (Chen et al., 2016; Estella et al., 2008; Estella & Mann, 2010). Η σημασία της αλληλεπίδρασης μεταξύ των ρυθμιστικών στοιχείων έχει επίσης δειχθεί στην περίπτωση του *Antennapedia* στη *Drosophila*, όπου αποδεικνύεται ότι η ευρύτερη γειτονιά ενός γονιδίου μπορεί να έχει καθοριστικό ρόλο στην δραστηριότητα των ενισχυτών (Calhoun et al., 2002). Έχοντας αυτά κατά νου, ενδέχεται η δράση μίας απομονωμένης περιοχής να μην επαρκεί για να αναπαράξει το πρότυπο του γονιδίου. Επιπλέον, βάσει της γνώσης της ρύθμισης του *Dll* και άλλων αναπτυξιακών γονιδίων στη *Drosophila melanogaster*, η έκφραση πλειοτροπικών γονιδίων συνήθως ρυθμίζεται από διαφορετικούς ενισχυτές σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια και κυτταρικούς τύπους (Chen et al., 2016; Estella et al., 2008; Estella & Mann, 2010). Για αυτό το λόγο, ο έλεγχος της ενεργότητας των *Dll* ενισχυτών πραγματοποιήθηκε συστηματικά από την 4^η έως και τη 10^η μέρα της εμβρυογένεσης που δρα το *Dll*.

Ένα άλλο ενδεχόμενο είναι ο μεμονωμένος ενισχυτής να είναι ικανός να επάγει την έκφραση του γονιδίου αναφοράς αλλά σε χαμηλά επίπεδα έκφρασης και άρα ο φθορισμός να μην είναι ανιχνεύσιμος χωρίς ενίσχυση του σήματος. Συνάγεται επομένως το συμπέρασμα ότι η έλλειψη φθορισμού στα ζωντανά έμβρυα δεν θα πρέπει να εκλαμβάνεται εξ αρχής ως ανενεργότητα του εκάστοτε υπο μελέτη *cis*-ρυθμιστικού στοιχείου και επιπλέον πειράματα ελέγχου της ενεργότητας θα πρέπει να γίνονται για

παράδειγμα με ανοσοφθορισμό. Μία τέτοια χαρακτηριστική περίπτωση στα πειράματά μου ήταν ο ενισχυτής E7. Η ενεργότητά του ελέγχθηκε αρχικά στα G0 έμβρυα ενεμένα με το πλασμίδιο pMi{PhOps-EGFP; E7-mCherry}, αλλά και σε διαγονιδιακούς G1 και G2 απόγονους, στους οποίους δεν εντοπίστηκε ποτέ φθορισμός, πιθανότατα λόγω χαμηλού σήματος. Για την περαιτέρω διερεύνηση της δράσης του E7, έμβρυα G2 από μία σταθερή διαγονιδιακή σειρά ζώων με ενθέσεις E7-mCherry, υποβλήθηκαν σε ανοσοφθορισμό, αποκαλύπτοντας ένα χωροχρονικό πρότυπο που μοιάζει με αυτό του *Dll* στα όψιμα στάδια. Συγκεκριμένα, σε έμβρυα S21 εντοπίστηκε mCherry σήμα σε σχετικά αραιά καταμεμημένα κύτταρα των κεραίων και των περισσότερων ποδιών, ενώ σε έμβρυα S23 τα κύτταρα εμφάνισαν πιο έντονο mCherry σήμα, πλήθυναν και εντοπιζόνταν πλέον σε όλα τα άκρα των εμβρύων. Το πρότυπο αυτό αποτελεί μία ισχυρή ένδειξη για τη δράση του E7 ως ενισχυτή που συντηρεί την έκφραση του *Dll* στις άπω δομές των άκρων σε αργότερα στάδια της ανάπτυξης. Υπενθυμίζεται ότι ο ενισχυτής E7 βρίσκεται ακριβώς άνωθεν του ενδογενούς *Dll* υποκινητή. Κρίνεται σκόπιμο να μελετηθεί στο μέλλον η ενεργότητα του σκέτου *Dll* υποκινητή χωρίς τον E7 ώστε να επιβεβαιωθεί η χωροχρονική ειδικότητα της δράσης του E7. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η περιοχή E7 εμφανίζεται ανοιχτή σε ATAC-seq αναλύσεις πιο πρώιμων εμβρύων S13 και S17. Αν αποκλειστεί η πρώιμη δράση του E7 που δεν ανιχνεύθηκε στην παρούσα εργασία, το εύρημα αυτό δείχνει ότι ένας ενισχυτής μπορεί να είναι προσβάσιμος πολύ νωρίτερα πριν αυτός χρησιμοποιηθεί κατά την ανάπτυξη.

Σε σχέση με τον E7, ο υποψήφιος ιντρονικός ενισχυτής Ei3 επέδειξε ισχυρότερη ενεργότητα. Υπό την καθοδήγησή του, το πρότυπο έκφρασης της H2B-mCherry αναλύθηκε σε ζωντανά G0 έμβρυα χωρίς να χρειαστεί η ενίσχυση του σήματος με ανοσοφθορισμό. Η πρώτη χρονικά ένδειξη της ενεργότητας του Ei3 ήταν στο στάδιο S23 και το σήμα εντοπίστηκε στις κεραίες και τα μασητικά εξαρτήματα του εμβρύου, ενώ διατηρήθηκε με αμείωτη ένταση έως το στάδιο S28 στα ίδια κύτταρα. Η ενεργότητά του στα όψιμα στάδια της ανάπτυξης των άκρων, μεταξύ των S23-S28, επιβεβαιώθηκε από 4 ακόμη έμβρυα G0. Μάλιστα, σε δύο έμβρυα το σήμα ήταν πολύ έντονο και ανιχνευόταν όχι μόνο στο κεφάλι αλλά και στο υπόλοιπα άκρα του θώρακα και της κοιλιάς. Τονίζεται, ότι η ανάλυση ρυθμιστικών περιοχών σε μωσαϊκά έμβρυα είναι μόνο ενδεικτική της ενεργότητάς τους. Οριστικά συμπεράσματα θα εξαχθούν στο μέλλον από την ανάλυση διαγονιδιακών ατόμων από δύο ή περισσότερες σειρές για να ελεγχθεί και η πιθανότητα επίδρασης της χρωματίνης της θέσης ένθεσης (position-effects) των διαγονιδίων. Επιπλέον, η χρήση ανοσοφθορισμού σε διαγονιδιακά ζώα θα δείξει σε ποιο ακριβώς στάδιο ξεκινάει η ρύθμιση της έκφρασης του *Dll* από τον Ei3. Σε κάθε περίπτωση, οι πρώτες αυτές πειραματικές ενδείξεις είναι ενθαρρυντικές για την ύπαρξη δύο τουλάχιστον διακριτών, όψιμων ενισχυτών του *Dll* στον *Parhyale*, των E7 και Ei3. Το φαινόμενο αυτό της ύπαρξης δύο ή περισσότερων σκιωδών ενισχυτών (shadow enhancers) που ελέγχουν το ίδιο γονίδιο-στόχο σε αλληλεπικαλυπτόμενα χωροχρονικά πρότυπα έκφρασης είναι πολύ διαδεδομένο σε αναπτυξιακά γονίδια σε ένα ευρύ φάσμα οργανισμών (Kvon et al., 2021). Αν επαληθευτεί αυτή η υπόθεση, θα έχει ενδιαφέρον στο μέλλον να μελετηθεί η συνεισφορά των E7, Ei3 ή και άλλων όψιμων ενισχυτών (ίσως του Ei5) στην στιβαρότητα (robustness) της έκφρασης του *Dll* στον *Parhyale*.

Η ανάλυση των ενισχυτών E6 και Ei5 παραμένει ανοιχτή και θα συνεχιστεί στα διαγονιδιακά ζώα που θα προκύψουν στο μέλλον. Στην περίπτωση του E6, το μοναδικό

πρότυπο έκφρασης αναλύθηκε σε μικρό αριθμό ενεμένων, μωσαϊκών G0 εμβρύων με ανοσοφθορισμό και εντοπίστηκε σε μεσεδοδερμικά κύτταρα με μεταμερική οργάνωση. Δεδομένου ότι δεν έχει περιγραφεί έκφραση του *Dll* στο μεσόδερμα, το πρότυπο αυτό είτε δεν οφείλεται στον E6 αλλά σε κάποια παγίδευση ενδογενούς ενισχυτή (enhancer trapping) είτε ο E6 δεν ρυθμίζει το *Dll* αλλά κάποιο γειτονικό γονίδιο που συμμετέχει στον καθορισμό του μεσοδέρματος. Θα είχε ενδιαφέρον θα διερευνηθεί, αν στην ευρύτερη περιοχή του *Dll* locus, υπάρχει κάποιο γονίδιο που συμμετέχει στον καθορισμό του μεσοδέρματος και του οποίου η έκφραση ρυθμίζεται από τον E6 ενισχυτή. Στην περίπτωση του Eι5, η μοναδική ένδειξη ενεργότητάς του ήταν σε ένα μοναδικό G0 έμβρυο, σε μερικά πρόσθια θωρακικά άκρα σταδίου S24. Το πρότυπο αυτό ή κάποιο άλλο δεν παρατηρήθηκε σε κανένα από τα εκατοντάδες ενεμένα έμβρυα. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι υποψήφιοι ενισχυτές Eι3 και Eι5 βρίσκονται στο μεγάλο, βαθιά συντηρημένο ιντρόνιο του *Dll* γονιδίου που διακόπτει την κωδική περιοχή που κωδικοποιεί την homeodomain. Το ιντρόνιο αυτό είναι συντηρημένο εκτός των καρκινοειδών, σε έντομα, νηματώδεις και τον άνθρωπο (Chen et al., 2016). Επιπλέον, οι *Parhyale* αλληλουχίες Eι3 και Eι5 επιδεικνύουν υψηλή ομολογία με τις αντίστοιχες ιντρονικές αλληλουχίες άλλων αμφιπόδων. Η συντήρηση αυτή στη θέση και την νουκλεοτιδική αλληλουχία του ιντρονίου, σε συνδυασμό με τα λειτουργικά δεδομένα που αποκτήθηκαν σε αυτή την εργασία, ειδικά για τον Eι3, συνηγορούν υπέρ του σημαντικού *cis*-ρυθμιστικού ρόλου του ιντρονίου αυτού.

4.1 Μελλοντικές προσεγγίσεις

Η λειτουργική ανάλυση *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων στην ευρύτερη περιοχή του γονιδίου *Distal-less*, τα οποία μπορούν να αναπαράγουν εν μέρει ή ολοκληρωτικά το ιστοειδικό και χρονικό πρότυπο έκφρασής του, συνιστά ένα πρώτο σημαντικό βήμα στην εξερεύνηση της ρύθμισης του γονιδίου κατά την ανάπτυξη των άκρων του *Parhyale hawaiensis*. Για την πιο ολοκληρωμένη κατανόηση της ρύθμισης του *Dll*, είναι σημαντικό να ταυτοποιηθούν στο μέλλον τα σηματοδοτικά μονοπάτια και οι μεταγραφικοί παραγόντες που προσδένονται και καθορίζουν τη δράση των ενισχυτών του. Η βιοπληροφορική προσέγγιση αφορά την αναζήτηση γνωστών ή/και συντηρημένων μοτίβων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων στις αλληλουχίες των ενισχυτών. Η λειτουργική προσέγγιση αφορά τόσο την *in vitro* βιοχημική ανάλυση της δέσμευσης των υποψηφίων παραγόντων με τους ενισχυτές μέσω της τεχνικής EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), όσο και τον *in vivo* έλεγχο της ενεργότητας μεταλλαγμένων ενισχυτών για αυτές τις θέσεις πρόσδεσης. Με αυτές τις συμπληρωματικές προσεγγίσεις θα καταστεί εφικτή η σύγκριση της λογικής της ρύθμισης του *Dll* μεταξύ ειδών με έμμεση και άμεση ανάπτυξη των άκρων.

5. Βιβλιογραφία

- Abzhanov, A., & Kaufman, T. C. (2000). Homologs of *Drosophila* appendage genes in the patterning of arthropod limbs. *Developmental Biology*, 227(2).
<https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9904>
- Angelini, D. R., & Kaufman, T. C. (2005). Functional analyses in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera) support a role for Wnt signaling in body segmentation but not appendage development. *Developmental Biology*, 283(2).
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.04.034>
- Brower, D. L. (1986). Patterning in “*Drosophila*” Imaginal Discs. *BioScience*, 36(8).
<https://doi.org/10.2307/1310157>
- Browne, W. E., Price, A. L., Gerberding, M., & Patel, N. H. (2005). Stages of embryonic development in the amphipod crustacean, *Parhyale hawaiiensis*. *Genesis (United States)*, 42(3). <https://doi.org/10.1002/gene.20145>
- Bruce, H. S., & Patel, N. H. (2020). Knockout of crustacean leg patterning genes suggests that insect wings and body walls evolved from ancient leg segments. *Nature Ecology and Evolution*, 4(12). <https://doi.org/10.1038/s41559-020-01349-0>
- Calhoun, V. C., Stathopoulos, A., & Levine, M. (2002). Promoter-proximal tethering elements regulate enhancer-promoter specificity in the *Drosophila* Antennapedia complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(14). <https://doi.org/10.1073/pnas.142291299>
- Chen, B., Piel, W. H., & Monteiro, A. (2016). Distal-less homeobox genes of insects and spiders: Genomic organization, function, regulation and evolution. In *Insect Science* (Vol. 23, Issue 3). <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12327>
- Cohen, S. M., & Jürgens, G. (1989). Proximal-distal pattern formation in *Drosophila*: Cell autonomous requirement for Distal-less gene activity in limb development. *EMBO Journal*, 8(7). <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03613.x>
- Cohen, S. M., & Jürgens, G. (1990). Mediation of *Drosophila* head development by gap-like segmentation genes. *Nature*, 346(6283). <https://doi.org/10.1038/346482a0>
- Estella, C., & Mann, R. S. (2008). Logic of Wg and Dpp induction of distal and medial fates in the *Drosophila* leg. *Development*, 135(4). <https://doi.org/10.1242/dev.014670>
- Estella, C., & Mann, R. S. (2010). Non-redundant selector and growth-promoting functions of two sister genes, buttonhead and Sp1, in *Drosophila* leg development. *PLoS Genetics*, 6(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001001>
- Estella, C., McKay, D. J., & Mann, R. S. (2008). Molecular Integration of Wingless, Decapentaplegic, and Autoregulatory Inputs into Distalless during *Drosophila* Leg Development. *Developmental Cell*, 14(1). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.11.002>
- Estella, C., Voutev, R., & Mann, R. S. (2012). A Dynamic Network of Morphogens and Transcription Factors Patterns the Fly Leg. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 98). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386499-4.00007-0>
- Franz, G., Loukeris, T. G., Dialektaki, G., Thompson, C. R. L., & Savakis, C. (1994). Mobile Minos elements from *Drosophila hydei* encode a two-exon transposase with similarity to the paired DNA-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(11). <https://doi.org/10.1073/pnas.91.11.4746>
- Galindo, M. I., Fernández-Garza, D., Phillips, R., & Couso, J. P. (2011). Control of Distal-less expression in the *Drosophila* appendages by functional 3' enhancers. *Developmental Biology*, 353(2). <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.02.005>

- Goto, S., & Hayashi, S. (1997). Specification of the embryonic limb primordium by graded activity of Decapentaplegic. *Development*, *124*(1).
<https://doi.org/10.1242/dev.124.1.125>
- Istrail, S., & Davidson, E. H. (2005). Logic functions of the genomic cis-regulatory code. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(14). <https://doi.org/10.1073/pnas.0409624102>
- Kao, D., Lai, A. G., Stamatakis, E., Rosic, S., Konstantinides, N., Jarvis, E., Di Donfrancesco, A., Pouchkina-Stancheva, N., Sémon, M., Grillo, M., Bruce, H., Kumar, S., Siwanowicz, I., Le, A., Lemire, A., Eisen, M. B., Extavour, C., Browne, W. E., Wolff, C., ... Aboobaker, A. (2016). The genome of the crustacean *Parhyale hawaiiensis*, a model for animal development, regeneration, immunity and lignocellulose digestion. *ELife*, *5*.
<https://doi.org/10.7554/elife.20062>
- Kontarakis, Z., & Pavlopoulos, A. (2014). Transgenesis in non-model organisms: The case of parhyale. *Methods in Molecular Biology*, *1196*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1242-1_10
- Kontarakis, Z., Pavlopoulos, A., Kiupakis, A., Konstantinides, N., Douris, V., & Averof, M. (2011). A versatile strategy for gene trapping and trap conversion in emerging model organisms. *Development*, *138*(12). <https://doi.org/10.1242/dev.066324>
- Kvon, E. Z., Waymack, R., Gad, M., & Wunderlich, Z. (2021). Enhancer redundancy in development and disease. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 22, Issue 5).
<https://doi.org/10.1038/s41576-020-00311-x>
- Lecuit, T., & Cohen, S. M. (1997). Proximal-distal axis formation in the drosophila leg. *Nature*, *388*(6638). <https://doi.org/10.1038/40563>
- Lemons, D., Fritzenwanker, J. H., Gerhart, J., Lowe, C. J., & McGinnis, W. (2010). Co-option of an anteroposterior head axis patterning system for proximodistal patterning of appendages in early bilaterian evolution. *Developmental Biology*, *344*(1).
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.04.022>
- Liubicich, D. M., Serano, J. M., Pavlopoulos, A., Kontarakis, Z., Protas, M. E., Kwan, E., Chatterjee, S., Tran, K. D., Averof, M., & Patel, N. H. (2009). Knockdown of *Parhyale* Ultrabithorax recapitulates evolutionary changes in crustacean appendage morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(33). <https://doi.org/10.1073/pnas.0903105106>
- Loukeris, T. G., Livadaras, L., Arcà, B., Zabalou, S., & Savakis, C. (1995). Gene transfer into the medfly, *Ceratitis capitata*, with a *Drosophila hydei* transposable element. *Science*, *270*(5244). <https://doi.org/10.1126/science.270.5244.2002>
- Lowe, C. J., Wu, M., Salic, A., Evans, L., Lander, E., Stange-Thomann, N., Gruber, C. E., Gerhart, J., & Kirschner, M. (2003). Anteroposterior patterning in hemichordates and the origins of the chordate nervous system. *Cell*, *113*(7).
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00469-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00469-0)
- Morata, G. (2001). How *Drosophila* appendages develop. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 2, Issue 2). <https://doi.org/10.1038/35052047>
- Münster, S., Jain, A., Mietke, A., Pavlopoulos, A., Grill, S. W., & Tomancak, P. (2019). Attachment of the blastoderm to the vitelline envelope affects gastrulation of insects. *Nature*, *568*(7752). <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1044-3>
- Ober, K. A., & Jockusch, E. L. (2006). The roles of wingless and decapentaplegic in axis and appendage development in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Developmental Biology*, *294*(2). <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.02.053>

- O'Hara, E., Cohen, B., Cohen, S. M., & McGinnis, W. (1993). Distal-less is a downstream gene of Deformed required for ventral maxillary identity. *Development*, *117*(3).
<https://doi.org/10.1242/dev.117.3.847>
- Panganiban, G. (2000). Distal-less function during Drosophila appendage and sense organ development. In *Developmental Dynamics* (Vol. 218, Issue 4).
[https://doi.org/10.1002/1097-0177\(200008\)218:4<554::aid-dvdy1023>3.0.co;2-%23](https://doi.org/10.1002/1097-0177(200008)218:4<554::aid-dvdy1023>3.0.co;2-%23)
- Panganiban, G., Irvine, S. M., Lowe, C., Roehl, H., Corley, L. S., Sherbon, B., Grenier, J. K., Fallon, J. F., Kimble, J., Walker, M., Wray, G. A., Swalla, B. J., Martindale, M. Q., & Carroll, S. B. (1997). The origin and evolution of animal appendages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(10).
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.10.5162>
- Panganiban, G., & Rubenstein, J. L. R. (2002). Developmental functions of the Distal-less/Dlx homeobox genes. In *Development* (Vol. 129, Issue 19).
<https://doi.org/10.1242/dev.129.19.4371>
- Panganiban, G., Sebring, A., Nagy, L., & Carroll, S. (1995). The development of crustacean limbs and the evolution of arthropods. *Science*, *270*(5240).
<https://doi.org/10.1126/science.270.5240.1363>
- Paris, M., Wolff, C., Patel, N. H., & Averof, M. (2022). The crustacean model Parhyale hawaiiensis. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 147).
<https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2022.02.001>
- Patel, N. H. (1994). Chapter 24 Imaging Neuronal Subsets and Other Cell Types in Whole-Mount Drosophila Embryos and Larvae Using Antibody Probes. *Methods in Cell Biology*, *44*(C). [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)60927-9](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)60927-9)
- Pavlopoulos, A., & Averof, M. (2005). Establishing genetic transformation for comparative developmental studies in the crustacean Parhyale hawaiiensis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(22).
<https://doi.org/10.1073/pnas.0501101102>
- Pavlopoulos, A., Kontarakis, Z., Liubicich, D. M., Serano, J. M., Akam, M., Patel, N. H., & Averof, M. (2009). Probing the evolution of appendage specialization by Hox gene misexpression in an emerging model crustacean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(33).
<https://doi.org/10.1073/pnas.0902804106>
- Pavlopoulos, A., Oehler, S., Kapetanaki, M. G., & Savakis, C. (2007). The DNA transposon Minos as a tool for transgenesis and functional genomic analysis in vertebrates and invertebrates. In *Genome Biology* (Vol. 8, Issue SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-s1-s2>
- Pavlopoulos, A., & Wolff, C. (2021). Crustacean limb morphogenesis during normal development and regeneration. In *Developmental Biology and Larval Ecology: The Natural History of the Crustacea, Volume 7*.
<https://doi.org/10.1093/oso/9780190648954.003.0002>
- Pechmann, M., Khadjeh, S., Sprenger, F., & Prpic, N. M. (2010). Patterning mechanisms and morphological diversity of spider appendages and their importance for spider evolution. In *Arthropod Structure and Development* (Vol. 39, Issue 6).
<https://doi.org/10.1016/j.asd.2010.07.007>
- Pechmann, M., Khadjeh, S., Turetzek, N., McGregor, A. P., Damen, W. G. M., & Prpic, N. M. (2011). Novel function of Distal-less as a gap gene during spider segmentation. *PLoS Genetics*, *7*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002342>

- Prpic, N. M., Wigand, B., Damen, W. G., & Klingler, M. (2001). Expression of dachshund in wild-type and Distal-less mutant *Tribolium* corroborates serial homologies in insect appendages. *Development Genes and Evolution*, 211(10).
<https://doi.org/10.1007/s004270100178>
- Pueyo, J. I., & Couso, J. P. (2005). Parallels between the proximal-distal development of vertebrate and arthropod appendages: Homology without an ancestor? In *Current Opinion in Genetics and Development* (Vol. 15, Issue 4).
<https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.06.007>
- Rallis, J., Kapai, G., & Pavlopoulos, A. (2021). Parhyale hawaiiensis, Crustacea. In *Handbook of Marine Model Organisms in Experimental Biology: Established and Emerging*.
<https://doi.org/10.1201/9781003217503-16>
- Rallis, J., & Pavlopoulos, A. (2022). Cellular basis of limb morphogenesis. In *Current Opinion in Insect Science* (Vol. 50). <https://doi.org/10.1016/j.cois.2022.100887>
- Rehm, E. J., Hannibal, R. L., Chaw, R. C., Vargas-Vila, M. A., & Patel, N. H. (2009). The crustacean Parhyale hawaiiensis: A new model for arthropod development. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4(1). <https://doi.org/10.1101/pdb.emo114>
- Ryan, J. F., Mazza, M. E., Pang, K., Matus, D. Q., Baxevanis, A. D., Martindale, M. Q., & Finnerty, J. R. (2007). Pre-bilaterian origins of the hox cluster and the hox code: Evidence from the sea anemone, *Nematostella vectensis*. *PLoS ONE*, 2(1).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000153>
- Serano, J. M., Martin, A., Liubicich, D. M., Jarvis, E., Bruce, H. S., La, K., Browne, W. E., Grimwood, J., & Patel, N. H. (2016). Comprehensive analysis of Hox gene expression in the amphipod crustacean Parhyale hawaiiensis. *Developmental Biology*, 409(1).
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.10.029>
- Si Dong, P. D., Chu, J., & Panganiban, G. (2000). Coexpression of the homeobox genes Distal-less and homothorax determines *Drosophila* antennal identity. *Development*, 127(2).
<https://doi.org/10.1242/dev.127.2.209>
- Stamatakis, E., & Pavlopoulos, A. (2016). Non-insect crustacean models in developmental genetics including an encomium to Parhyale hawaiiensis. In *Current Opinion in Genetics and Development* (Vol. 39). <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.07.004>
- Sun, D. A., & Patel, N. H. (2019). The amphipod crustacean Parhyale hawaiiensis: An emerging comparative model of arthropod development, evolution, and regeneration. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* (Vol. 8, Issue 5).
<https://doi.org/10.1002/wdev.355>
- Tabin, C. J., & Carroll, S. B. (1999). Out on a limb: Parallels in vertebrate and invertebrate limb patterning and the origin of appendages. *American Zoologist*, 39(3).
<https://doi.org/10.1093/icb/39.3.650>
- Tarazona, O. A., Lopez, D. H., Slota, L. A., & Cohn, M. J. (2019). Evolution of limb development in cephalopod mollusks. *eLife*, 8.
<https://doi.org/10.7554/eLife.43828.001>
- Vachon, G., Cohen, B., Pfeifle, C., McGuffin, M. E., Botas, J., & Cohen, S. M. (1992). Homeotic genes of the bithorax complex repress limb development in the abdomen of the *Drosophila* embryo through the target gene Distal-less. *Cell*, 71(3).
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90513-C](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90513-C)
- Williams, T. A., & Nagy, L. M. (2001). Developmental Modularity and the Evolutionary Diversification of Arthropod Limbs. In *Journal of Experimental Zoology* (Vol. 291, Issue 3). <https://doi.org/10.1002/jez.1101>

- Williams, T. A., Nulsen, C., & Nagy, L. M. (2002). A complex role for Distal-less in crustacean appendage development. *Developmental Biology*, 241(2).
<https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0497>
- Wolff, C., Tinevez, J. Y., Pietzsch, T., Stamatakis, E., Harich, B., Guignard, L., Preibisch, S., Shorte, S., Keller, P. J., Tomancak, P., & Pavlopoulos, A. (2018). Multi-view light-sheet imaging and tracking with the MaMuT software reveals the cell lineage of a direct developing arthropod limb. *ELife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.34410>