

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗΣ

**Ανάλυση ενθέσεων του μεταθετού στοιχείου
Minos στο ανθρώπινο γονιδίωμα**

Διατριβή μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης

Ναταλία Παπαδοπούλου

Επιβλέπων καθηγητής:
Χ. Σαββάκης
Δεύτερος εξεταστής:
Ι. Ταλιανίδης

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2003

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μετά την περάτωση της αλληλούχισης του ανθρώπινου γονιδιώματος, μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις για την επιστήμη αποτελεί η ανάπτυξη τεχνικών, οι οποίες να επιτρέπουν την εύκολη και γρήγορη διερεύνηση της λειτουργίας των γονιδίων. Τα μεταθετά στοιχεία της υπερ-οικογένειας *mariner/Tc1*, στα οποία ανήκει το *Minos*, μπορούν να αποτελέσουν σημαντικά εργαλεία στην προσπάθεια αυτή, καθώς παρουσιάζουν υψηλή ενεργότητα σε μεγάλο εύρος οργανισμών, μεταξύ των οποίων και στον άνθρωπο.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν ενθέσεις του μεταθετού στοιχείου *Minos* στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Η μελέτη έγινε σε κύτταρα HepG2 (human hepatocellular carcinoma) σταθερά μετασχηματισμένα με κασέτα που φέρει το τρανσποζόνιο. Με ανάκτηση των ενθέσεων μέσω ανάστροφης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ελέγχθηκε η προτίμηση του στοιχείου ως προς τη θέση ένθεσης σε επίπεδο αλληλουχίας του γενωμικού DNA και της χρωμοσωμικής περιοχής.

Summary

After completion of the human genome project, the development of new techniques, which will facilitate the study of gene function, became one of the greatest challenges for science. Transposable elements of the *mariner/Tc1* superfamily, including *Minos*, might represent important tools in this effort, as they exhibit high activity in a wide variety of organisms.

In this report insertions of the transposable element *Minos* in the human genome have been studied. The study was carried out in HepG2 (human hepatocellular carcinoma) cells, stably transformed with a cassette carrying the transposon. After recovering the insertions through inverse PCR, preferences of the element regarding the position of the insertion were examined. The preferences refer to the genomic DNA sequence, as well as to the chromosomal region of the insertion.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Μεταθετά στοιχεία

Τα μεταθετά στοιχεία αποτελούν αυτόνομα τμήματα DNA που έχουν την ικανότητα να μετατίθενται μέσα στο γένωμα στο οποίο ενδημούν. Τέτοια στοιχεία, ενεργά και μη, έχουν βρεθεί στο γένωμα όλων των οργανισμών από τα βακτήρια μέχρι και τον άνθρωπο. Στα έντομα, και ειδικά στο γένος *Drosophila*, απαντώνται διάφοροι τύποι μεταθετών στοιχείων, ενώ στη *Drosophila melanogaster* υπολογίζεται ότι αποτελούν το 10-20% του γενώματος.

Τα μεταθετά στοιχεία που απαντώνται στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς χωρίζονται σε τέσσερις βασικές κατηγορίες ανάλογα με τη δομή και τον μηχανισμό μεταθεσής τους.

Οι δύο πρώτες κατηγορίες περιλαμβάνουν τα μεταθετά στοιχεία τύπου I. Πρόκειται για τα μεταθετά στοιχεία τύπου ρετροϊού και τα ρετρομεταθετά στοιχεία. Απαντώνται σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς, από το σακχαρομύκητα μέχρι τον άνθρωπο. Ο πολλαπλασιασμός και η μετάθεση πραγματοποιείται μέσω ενδιάμεσων μορφών RNA, ιδιότητα που παραπέμπει στους ρετροϊούς των θηλαστικών. Τα μεταθετά στοιχεία τύπου ρετροϊού ορίζονται από “μακρές τερματικές επαναλήψεις” (long terminal repeats-LTRs) μήκους 200-500 βάσεων, δομή που απουσιάζει από τα ρετρομεταθετά στοιχεία. Τα τύπου I μεταθετά στοιχεία περιέχουν κωδική περιοχή η οποία παρουσιάζει ομολογία με την αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase) των ρετροϊών.

Στην τρίτη κατηγορία ανήκουν τα αναδιπλούμενα μεταθετά στοιχεία (foldback transposons), τα οποία ορίζονται από αντεστραμμένα άκρα μεγάλου μήκους. Μέσα στην αλληλουχία των άκρων υπάρχουν επαναλήψεις μικρών αλληλουχιών, ενώ η περιοχή μεταξύ των άκρων ποικίλλει σε μέγεθος και είναι άγνωστο αν κωδικοποιεί πρωτεΐνη.

Τέλος, τα μεταθετά στοιχεία με κατοπτρικά αντεστραμμένα άκρα είναι στοιχεία μικρού σχετικά μεγέθους και ορίζονται από μικρού συνήθως μεγέθους κατοπτρικά αντεστραμμένα άκρα (inverted repeats). Η μεταξύ των άκρων περιοχή κωδικοποιεί την πρωτεΐνη που είναι απαραίτητη για τη μετάθεση του στοιχείου. Σ' αυτήν την κατηγορία υπάγονται μερικά από τα πιο καλά

μελετημένα μεταθετά στοιχεία της *Drosophila* αλλά και άλλων οργανισμών. Τα αναδιπλούμενα μεταθετά στοιχεία μαζί με τα μεταθετά στοιχεία με κατοπτρικά αντεστραμμένα άκρα, αποτελούν τα μεταθετά τύπου II.

1.1 Μεταθετά στοιχεία με κατοπτρικά αντεστραμμένα άκρα

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει μερικά από τα πιο γνωστά μεταθετά στοιχεία που έχουν βρεθεί στα έντομα και άλλα ασπόνδυλα καθώς και σε σπονδυλωτά. Σε αυτήν ανήκει το πρώτο μεταθετό στοιχείο που χαρακτηρίστηκε και χρησιμοποιήθηκε σαν εργαλείο σε πειράματα γενετικού μετασχηματισμού στα έντομα, το στοιχείο *P*, το οποίο ενδημεί στο γένωμα της *Drosophila melanogaster* (Spradling and Rubin, 1982). Το πλήρες στοιχείο έχει μήκος 2907 bp και ορίζεται από τέλεια αντεστραμμένα άκρα μήκους 31 bp.

Η εγγενής αδυναμία του *P* να μετατίθεται σε είδη άλλα από τη *Drosophila melanogaster* οδηγεί στην υπόθεση ότι για τη μετάθεση του στοιχείου *in vivo* η τρανσποζάση υποβοηθείται από άλλες πρωτεΐνες της Δροσόφιλας. Μια τουλάχιστον πρωτεΐνη υποψήφια γι' αυτή τη λειτουργία έχει αναφερθεί, η IRBP (inverted repeat binding protein) (Rio and Rubin, 1997).

1.2 Η υπερ-οικογένεια *mariner/Tc1*

Χρησιμοποιώντας ως κριτήριο την ομοιότητα σε επίπεδο αλληλουχίας της τρανσποζάσης οι Robertson και Lampe (1995) συνένωσαν τις οικογένειες *mariner* και *Tc1* σε μία υπερ-οικογένεια. Τα μεταθετά της οικογένειας (ενεργά ή μη) είναι πολύ διαδεδομένα στη φύση, από μονοκύτταρους οργανισμούς μέχρι και τον άνθρωπο. Χαρακτηρίζονται από την ιδιότητα να εντίθενται αποκλειστικά σε δινουκλεοτίδιο TA, το οποίο διπλασιάζεται μετά την ένθεση.

Το πιο καλά μελετημένο στοιχείο της οικογένειας *mariner* είναι το *Mos 1* της *D.mauritiana*, το μοναδικό της οικογένειας που έχει χρησιμοποιηθεί σε πειράματα γενετικού μετασχηματισμού (Garza *et al.*, 1991).

Η οικογένεια *Tc1* πήρε το όνομά της από το ομώνυμο μεταθετό που ταυτοποιήθηκε στο νηματώδη σκώληκα *Caenorabditis elegans* (Emmons *et al.*, 1983). Αντιπρόσωποι της οικογένειας *Tc1* στα έντομα είναι το *HB1* από τη *D.melanogaster* (Brierly *et al.*, 1985, Harris *et al.*, 1988), το *Uhu* από τη *D.heteroneura* (Brezinsky *et al.*, 1990), το *Bari-1* από τη *D.melanogaster*

(Caizzi *et al.*, 1993), το S από τη *D.melanogaster* (Merriman *et al.*, 1995), και το *Minos* από τη *D.hydei* (Franz and Savakis, 1991).

Μεταθετά της υπερ-οικογένειας έχουν βρεθεί και σε σπονδυλωτά και συγκεκριμένα στα ψάρια. Κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τον οργανισμό προέλευσης: τύπου zebrafish, τύπου σαλμονιδών και τύπου *Xenopus TXr* (Izsvak *et al.*, 1997). Σημαντική είναι η περίπτωση του μεταθετού *Sleeping beauty* το οποίο προέκυψε με *in vitro* ανασύσταση από δύο ανενεργά στοιχεία που βρέθηκαν στο σολωμό του Ατλαντικού (*Salmo salar*) καθώς κι ένα επίσης ανενεργό στοιχείο από το *Oncorhynchus mykiss* (Ivics *et al.*, 1997).

Στα μεταθετά στοιχεία τύπου II ανήκει και το *piggyBac* το οποίο βρέθηκε ως ένθεση στο γενετικό υλικό του baculovirus, ενός ιού που παρασιτεί σε κύτταρα λεπιδοπτέρων (Wang and Fraser, 1993). Δεν εντάσσεται σε καμιά από τις παραπάνω κατηγορίες γιατί δεν παρουσιάζει ομολογίες με μέλη αυτών. Χαρακτηριστικό του *piggyBac* είναι το ότι εντίθεται σε τετρανουκλεοτίδιο (TTAA), το οποίο και διπλασιάζεται μετά την ένθεση. Μετά από εκτομή από τη νέα θέση δεν αφήνει κανένα αποτύπωμα, αποτελώντας έτσι και μοναδική εξαίρεση για τα στοιχεία τύπου II (Fraser *et al.*, 1996).

1.3 Το μεταθετό στοιχείο *Minos*

Το μεταθετό στοιχείο *Minos* απομονώθηκε ως ένθεση στο γενετικό τόπο του ριβοσωμικού RNA του στελέχους bb¹ της *Drosophila hydei* (Franz and Savakis, 1991). Στη συνέχεια βρέθηκαν άλλες τρεις ενθέσεις του *Minos* στο ίδιο στέλεχος. Στις δύο απ'αυτές το στοιχείο ήταν ολόκληρο, ενώ στην τρίτη έλειπαν το αριστερό άκρο και με το μεγαλύτερο μέρος της κωδικής περιοχής της τρανσποζάσης. Το στοιχείο *Minos* που χρησιμοποιήθηκε αργότερα είναι ένα υβρίδιο των αντιτύπων *Minos-1* και *Minos-4*.

Το *Minos* έχει μήκος 1777 νουκλεοτίδια και ορίζεται από δύο κατοπτρικά αντεστραμμένα άκρα (inverted repeats) μήκους 255 νουκλεοτιδίων. Κάθε άκρο περιέχει διπλά επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 18 βάσεων (direct repeat). Ο πυρήνας της αλληλουχίας αυτής (TATTAAT) στο αριστερό άκρο του στοιχείου μοιάζει με την αλληλουχία TATA των ευκαρυωτικών υποκινητών, αντίστοιχη λειτουργία του, όμως, δεν έχει

επιβεβαιωθεί. Στο δεξί άκρο του *Minos* περιέχεται αλληλουχία AATAAA που ενδεχομένως αποτελεί σήμα πολυαδενυλίωσης, γεγονός που επίσης δεν έχει αποδειχθεί.

Μεταξύ των άκρων του *Minos* περιέχεται η κωδική περιοχή της τρανσποζάσης. Αποτελείται από δύο εξώνια, ανάμεσα στα οποία παρεμβάλλεται εσώνιο μήκους 60 νουκλεοτιδίων. Με την εκτομή του εσωνίου προκύπτει η εννιαία κωδική αλληλουχία της τρανσποζάσης μήκους 341 αμινοξέων, πολύ κοντά στο μέσο όρο του μεγέθους των τρανσποζασών της οικογένειας *Tc 1* (340 αμινοξέα).

Η τρανσποζάση *Minos* κατατάσσει το στοιχείο στην οικογένεια *Tc1*, παρουσιάζοντας 27 % ταυτότητα και 46.4 % ομοιότητα με την τρανσποζάση *Tc1A*. Η αμινοτελική περιοχή της τρανσποζάσης παρουσιάζει 18% ταυτότητα με την περιοχή *paired box* της πρωτεΐνης *paired* της *D. melanogaster*. Η συγκεκριμένη αλληλουχία συναντάται και σε άλλες πρωτεΐνες της Δροσόφιλας (Treisman *et al.*, 1991) και του ποντικού (Deutsch *et al.*, 1988) που έχουν την ιδιότητα να προσδένονται στο DNA. Εικάζεται ότι και η αμινοτελική περιοχή της τρανσποζάσης *Minos* περιέχει ικανότητα πρόσδεσης στο DNA, καθώς η αντίστοιχη περιοχή των επίσης ομοίων με την *paired* τρανσποζασών *Tc1A* και *Tc3* έχει ενεργότητα πρόσδεσης στο DNA (Colloms *et al.*, 1994).

2. Λειτουργική γενωμική

Η αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδιώματος, όπως και πολλών άλλων οργανισμών, είναι πλέον γνωστή. Η μεγάλη πρόκληση έγκειται στην κατανόηση της λειτουργίας του κάθε γονιδίου χωριστά, αλλά και της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης. Η νέα ερευνητική περιοχή που ονομάζεται Λειτουργική Γενωμική (functional genomics) έχει σαν στόχο της την ανάπτυξη νέων μεθοδολογιών για τον κορεσμό των γονιδιωμάτων με μεταλλάξεις και τη στόχευση γονιδίων.

Μέχρι τώρα χρησιμοποιήθηκαν γι' αυτό το σκοπό πλασμιδιακοί φορείς και φορείς ρετροϊών με αρκετή επιτυχία. Προέκυψαν όμως και κάποιοι περιορισμοί, που στην περίπτωση των πλασμιδιακών φορέων έχουν να κάνουν με χαμηλά ποσοστά ένθεσης, ενώ στην περίπτωση των φορέων ρετροϊών με δυσκολίες στους μετέπειτα χειρισμούς τους.

Μία εναλλακτική λύση για να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί παρουσιάζουν τα μεταθετά στοιχεία.

2.1 Τα μεταθετά στοιχεία ως εργαλεία μετασχηματισμού εντόμων

Τα μεταθετά στοιχεία έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί ως φορείς γενετικού μετασχηματισμού των εντόμων. Τυπικό παράδειγμα αποτελεί το μεταθετό στοιχείο *P* στο γενετικό μετασχηματισμό της *D. melanogaster* (Spradling and Rubin, 1982).

Σε αντίθεση με το *P* που παρουσιάζει αδυναμία κινητοποίησης εκτός της Δροσόφιλας, μεταθετά στοιχεία των οικογενειών *hAT* και *mariner/Tc1* καθώς και το *piggyBac* έχουν χρησιμοποιηθεί για το γενετικό μετασχηματισμό ειδών διαφορετικών από αυτά από τα οποία προήλθαν.

Το *mariner* από τη *D. mauritiana* έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στις *D. melanogaster* και *D. virilis* (Lidholm *et al.*, 1993; Lohe and Hartl, 1996), το *hobo* από τη *D. melanogaster* για το μετασχηματισμό της *D. Virilis* (Losovskaya *et al.*, 1996), το *Hermes* από τη *Musca domestica* και το *mariner* για το γενετικό μετασχηματισμό του κουνουπιού *Aedes aegypti* (Jasinskiene *et al.*, 1998; Coates *et al.*, 1998). Επιπλέον το μεταθετό στοιχείο *piggyBac* που είναι το μοναδικό που δεν προέρχεται από Δίπτερο αλλά από Λεπιδόπτερο αποδείχθηκε αποτελεσματικός φορέας μετασχηματισμού του Διπτέρου *Ceratitis capitata* (Handler *et al.*, 1998).

Τέλος, το μεταθετό στοιχείο *Minos* που προέρχεται από τη *D. hydei* χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς σε πειράματα γενετικού μετασχηματισμού της *D. melanogaster* και *C. capitata* (Loukeris *et al.*, 1995a; 1995b), στο μετασχηματισμό κυττάρων *Anopheles gambiae*, και εντόμων του είδους *Anopheles stephensi* (Catteruccia *et al.*, 2000a; 2000b), στο μετασχηματισμό κυττάρων *Aedes Aegypti* και του λεπιδότερου *spodoptera frugiperda* (Klinakis *et al.*, 2000), καθώς επίσης και του μεταξοσκωλήκα *Bombyx mori* (Shimizu *et al.*, 2000).

2.2 Τα μεταθετά στοιχεία ως εργαλεία μετασχηματισμού άλλων ειδών

Πολλά μεταθετά στοιχεία όπως το στοιχείο P της *D. melanogaster*, χρειάζονται εξειδικευμένες πρωτεΐνες του ξενιστή για τη μετάθεσή τους. Σε αντίθεση με αυτά, η ενεργότητα των μεταθετών της υπερ-οικογένειας mariner/Tc1 δεν εξαρτάται από την παρουσία ειδο-ειδικών πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα αυτά να μετατίθενται σε είδη φυλογενετικά πολύ απομακρυσμένα από τον ξενιστή.

Συγκεκριμένα το mariner από τη *D. melanogaster* είναι ικανό να καταλύσει μετάθεση στο πρωτόζωο *Leishmania* (Gueiros- Filho and Beverly, 1997). Το Sleeping beauty παρουσιάζει ενεργότητα σε κύτταρα HeLa (Ivics *et al.*, 1997), καθώς και σε βλαστικά κύτταρα εμβρύου ποντικού (ES cells), (Luo *et al.*, 1998) και το Tc1 στην κυτταρική σειρά 911 (ανθρώπινα κύτταρα) (Schouten *et al.*, 1998). Ανασυνδιασμένες Tc1 και mariner τρανσποζάσες, εκφρασμένες στην *E. coli*, είναι ικανές να καταλύσουν μετάθεση *in vitro* (Lampe *et al.*, 1996, Vos *et al.*, 1996). Τέλος, το *Minos* παρουσιάζει υψηλή ενεργότητα σε κύτταρα HeLa (Klinakis *et al.*, 2000b), όπως επίσης και σε ποντίκια (Zagoraiou *et al.*, 2001)

2.3 Μεταλλαξιγένεση οργανισμών και παγίδευση γονιδίων μέσω μεταθετών στοιχείων

Όπως φαίνεται από τις ήδη υπάρχουσες μελέτες, κάποια μεταθετά στοιχεία, μεταξύ των οποίων και το *Minos*, λόγω της ενεργότητάς τους σε μεγάλο εύρος οργανισμών και του υψηλού ποσοστού ενσωμάτωσής τους σε κύτταρα, μεταξύ άλλων των θηλαστικών και του ανθρώπου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν με σκοπό την κατανόηση της λειτουργίας και σημασίας των γονιδίων στα διάφορα μονοπάτια μέσω:

A) μεταλλαξιγένεσης οργανισμών μέσω ενθέσεων (transposon tagged mutagenesis)

B) Παγίδευσης γονιδίων ή ενισχυτών (gene trapping, enhancer trapping) λόγω ένθεσης (insertional mutagenesis) και πιθανή δημιουργία νέων φαινοτύπων Έχει δειχθεί ότι με τη χρήση μεταθεμάτων τα οποία φέρουν κασέτες gene trap επιτυγχάνεται αυξημένη η συχνότητα παγίδευσης γονιδίων, σε σχέση με τεχνικές στις οποίες χρησιμοποιείται μη ομόλογος ανασυνδιασμός (Klinakis *et al.*, 2000a).

2.4 Μεταλλαξιγένεση οργανισμών μέσω του μεταθετού στοιχείου *Minos*

Για τον κορεσμό με μεταλλάξεις μέσω ενθέσεων ολόκληρου του γονιδιώματος είναι σημαντικό η επιλεκτικότητα του μεταθετού στοιχείου ως προς τη θέση ένθεσης να είναι όσο το δυνατό μικρότερη.

Το στοιχείο *P*, το οποίο έχει ήδη χρησιμεύσει στην λειτουργική ανάλυση χιλιάδων γονιδίων της *D. Melanogaster*, δείχνει ισχυρή προτίμηση σε ορισμένα γονίδια (hotspots), χαμηλότερη για κάποια άλλα (warmspots) και ιδιαίτερα χαμηλή για τη μεγάλη πλειοψηφία των υπολοίπων (coldspots). Σύμφωνα με πρόσφατη εκτίμηση για να καλυφθεί το 87% των 14.000 γονιδίων της Δροσόφιλας με ενθέσεις του στοιχείου *P*, θα πρέπει να δημιουργηθούν πάνω από 154.000 μετασχηματισμένες σειρές Δροσόφιλας (Spradling *et al.*, 1999)

Πρόσφατα δείχθηκε ότι το μεταθετό στοιχείο *Minos* έχει την ικανότητα να εντίθεται σε γονίδια της *D. Melanogaster*, τα οποία δεν έχουν μεταλλαχθεί από το στοιχείο *P*. Επιπλέον, μετά από ανάλυση 96 ενθέσεων το *Minos* δε φαίνεται να έχει προτίμηση για συγκεκριμένες αλληλουχίες-στόχους. Παράλληλα εξετάστηκαν και οι φυσικές ιδιότητες του DNA στις θέσεις των ενθέσεων, οι οποίες εξαρτώνται από τη δευτεροταγή δομή του. Δείχθηκε ότι οι θέσεις αυτές έχουν διαφορετική δομή από εκείνες, στις οποίες εντίθενται άλλα μέλη της υπερ-οικογένειας *Tc1/mariner*, όπως το *P*, το *Sleeping beauty*, και το *Tc1* (Metaxakis, unpublished data).

ΣΚΟΠΟΣ

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι το μεταθετό στοιχείο *Minos* μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στην μεταλλαξιγένεση του γονιδιώματος της *D. Melanogaster*.

Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στη διερεύνηση της δυνατότητας χρήσης του *Minos* σαν εργαλείο στην μεταλλαξιγένεση του ανθρώπινου γονιδιώματος.

Γι' αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκαν σταθερά μετασχηματισμένοι κυτταρικοί κλώνοι HepG2 (human hepatocellular carcinoma) που φέρουν ενθέσεις του *Minos*, για απομόνωση DNA και προσδιορισμό των θέσεων ένθεσης.

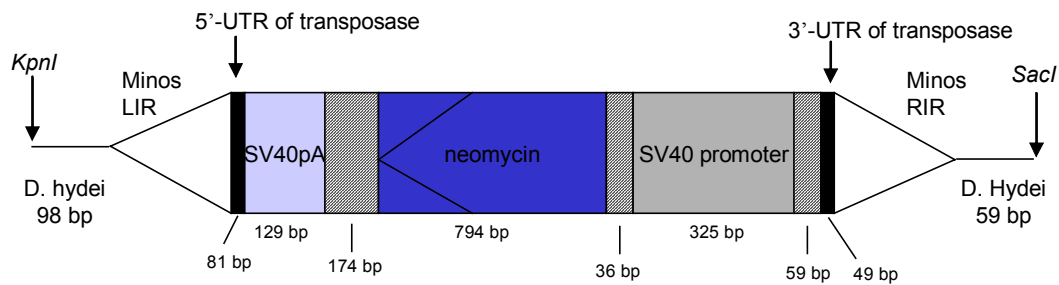
Μετά από προσδιορισμό των θέσεων ένθεσης σε μεγάλο αριθμό κλώνων και στατιστική ανάλυση αυτών μπορούν να βρεθούν τυχόν προτιμήσεις του *Minos* στο ανθρώπινο γονιδίωμα σε επίπεδο αλληλουχίας DNA, ως προς το χρωμόσωμα και τη χρωμοσωμική περιοχή (ευχρωματίνη/ετεροχρωματίνη, επαναλαμβανόμενες περιοχές, εσώνιο/εξώνιο), αλλά και ως προς τη δευτεροταγή δομή του DNA στις θέσεις ένθεσης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η εισαγωγή ξένων γονιδίων σε κυτταρικές σειρές με τη βοήθεια του *Minos* δεν είναι πάντα εφικτή, λόγω της δυσκολίας που παρουσιάζεται στην κυτταρική διαμόλυνση με DNA κάποιων σειρών με συμβατικές μεθόδους (π.χ. μέθοδος CaCl_2). Η έρευνα των τελευταίων ετών έδειξε ότι οι βακουλοϊοί (ιοί που μολύνουν λεπιδόπτερα), αν και πολλαπλασιάζονται μόνο σε λεπιδόπτερα ή σε κύτταρα αυτών, έχουν την ικανότητα να μολύνουν μεγάλο εύρος κυτάρων, διαιρούμενων και μη.

Βάσει αυτών των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε αρχικά ο βακουλοϊός AcNPV (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) σε πειράματα διαμόλυνσης διαφόρων κυτταρικών σειρών (HepG2, NIH3T3, MCF7, T47D, Ref1) με επιτυχία (Λασκαρώ Ζαγοραίου, Διδακτορική Διατριβή). Στη συνέχεια αναπτύχθηκαν χιμαιρικοί φορείς *Minos*-AcNPV που φέρουν τρανσποζόνια *Minos* και τρανσποζάση (βλ. Παράρτημα 1). Με αυτούς τους φορείς συν-διαμολύνθηκαν κύτταρα HepG2 (human hepatocellular carcinoma), έτσι ώστε η τρανσποζάση που παράγεται από το pBacPAK9CMV//ILMi να καταλύει την εκτομή του μη αυτόνομου μεταθετού στοιχείου MiLRneo από το pBacPAK9MILRneo, και την ενσωμάτωσή του σε χρωμοσωμικές θέσεις. Η διαμόλυνση με αναλογία των φορέων 1:1 και χρήση υψηλού τίτλου ιού (10^9 pfu ανά τρυβλίο 35 mm, 1000 MOI) οδήγησε σε 19000 σταθερά μετασχηματισμένους κλώνους από 7×10^5 - 10^6 κύτταρα που διαμολύνθηκαν. Τα κύτταρα που φέρουν τις ενθέσεις επιλέχθηκαν ως ανθεκτικοί κλώνοι στη νεομυκίνη (G418) (Λασκαρώ Ζαγοραίου, Διδακτορική Διατριβή).

Η κασέτα MiLRneo που φέρουν τα μετασχηματισμένα κύτταρα απεικονίζεται στο *σχήμα 1*. Τα απεικονισμένα άκρα της *D. hydei* δεν μεταφέρονται στα κύτταρα κατά την εκτομή του μεταθετού στοιχείου.



Σχήμα 1: Η κασέτα MiLRneo που φέρουν τα κύτταρα αποτελείται από το γονίδιο της νεομυκίνης υπό τον έλεγχο του υποκινητή SV40 και το σήμα πολυαδενυλίωσης SV40 pA. Οι διαγραμμισμένες μικρές περιοχές στο σχήμα αντιστοιχούν σε κομμάτια του πλασμιδίου απ' το οποίο προήλθε η κασέτα MiLRneo. Το τρανσποζόνιο (Minos left και right inverted repeat, LIR/RIR) περιβάλλεται από γενωμικές αλληλουχίες της *Drosophila hydei* (D.h. 98 bp και 59 bp για το αριστερό και το δεξί άκρο, αντίστοιχα). Το αριστερό άκρο του στοιχείου φέρει μαζί του 81 bp (gct...atg) της αλληλουχίας που παρεμβάλλεται μεταξύ αυτού και του κωδικόνιου έναρξης της τρανσποζάσης. Το δεξί άκρο φέρει 59 bp (gac...aca) όπου περιέχονται τα 6 τελευταία κωδικόνια και την 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή της τρανσποζάσης. Τα μεγέθη κάθε στοιχείου σε bp αναγράφονται κάτω από την κασέτα.

Το γενωμικό DNA που απομονώθηκε από τους κυτταρικούς κλώνους φέρει συνήθως μία ή δύο, αλλά σε κάποιες περιπτώσεις μέχρι και οκτώ ενθέσεις του στοιχείου MiLRneo, όπως φαίνεται στον *πίνακα Α*.

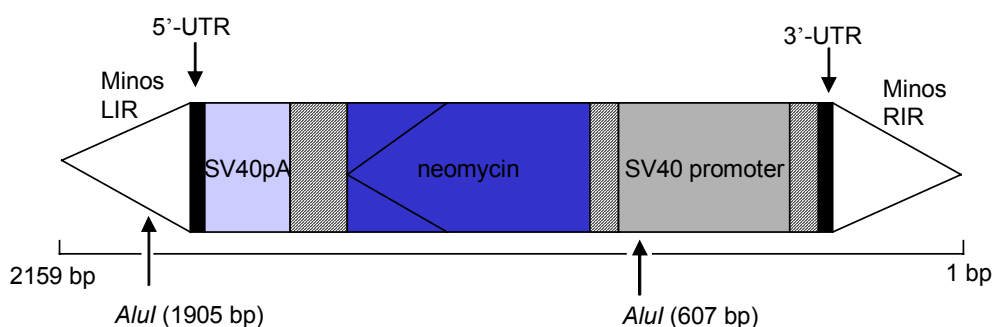
Πίνακας Α

Ονομασία κλώνου	Αριθμός ενθέσεων του Minos*	Μέγεθος ζωνών από εσωτερική αντίδραση πολυμεράσης (nested PCR) σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5 % [bp]
12.1	1	200
12.2	1	240
12.3	6-8	220
12.4	1	350; 400
12.5	1	260; 420; 600
12.6	1-2	-
12.7	1	380; 440
12.8	1	200
12.9	2	360; 450
12.10	3	200
12.12	1	180; 360
12.13	4	380
12.14	1	340; 460
12.17	1	200; 400
1	1	300
3	1-2	-
7	1	240
8	2	200
small	2	280
10	2-3	450
11	1-2	200; 420

*Η ανάλυση κατά Southern για τον προσδιορισμό του αριθμού των ενθέσεων έγινε μετά από πέψη του DNA με ένζυμο περιορισμού BglII (Λασκαρώ Ζαγοραίου, Διδακτορική διατριβή).

Μετά από προσδιορισμό της συγκέντρωσής του γενωμικού DNA χρησιμοποιούνται 500 ng-1μg κάθε δείγματος σε αντίδραση πέψης με το ένζυμο περιορισμού *AclI*, των οποίων οι θέσεις αναγνώρισης στο MiLRneo

περιγράφονται στο *σχήμα 2*. Το ένζυμο αναγνωρίζει φυσικά εκτός από τις θέσεις μέσα στην κασέτα και θέσεις στο γενωμικό DNA. Επειδή είναι *fougcutter*, τα θραύσματα γενωμικού DNA που αναμένεται να προκύψουν κατά την πέψη έχουν κατά μέσο όρο μέγεθος 400 bp.

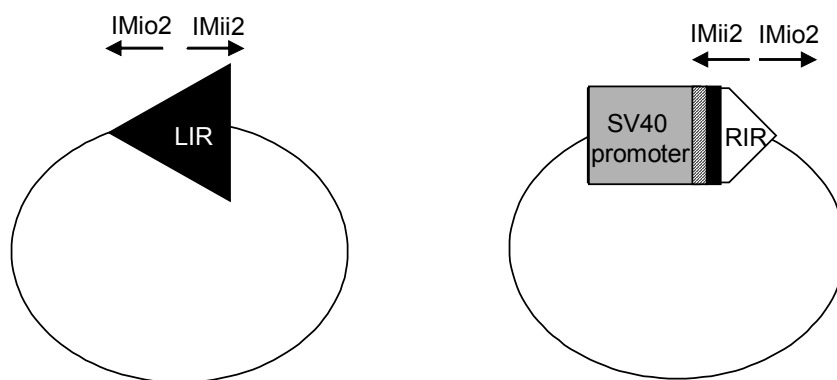


Σχήμα 2: Η κασέτα όπως εισάγεται στα κύτταρα από την τρανσποζάση έχει μέγεθος 2159 bp. Εάν θέσουμε ως σημείο έναρξης της κασέτας το δεξί άκρο του Minos, το ένζυμο περιορισμού *AluI* αναγνωρίζει 3 θέσεις μέσα στον SV40 υποκινητή (607, 661, 671 bp), δύο στο γονίδιο της νεομυκίνης (959, 1417 bp), μία στο σήμα πολυαδενυλίωσης SV40 pA (1708 bp) και μία στο αριστερό άκρο του *Minos* (1905 bp). Για τον προσδιορισμό των ενθέσεων ενδιαφέρουν μόνο οι εξωτερικές θέσεις αναγνώρισης, όπως απεικονίζονται στο σχήμα.

Η ποσότητα του DNA που εισάγεται στην αντίδραση της πέψης και ακολούθως της αντίδρασης συρραφής καθορίζεται από τα μόρια DNA που πρέπει να χρησιμοποιηθούν στην πρώτη αντίδραση PCR. Δεδομένου του γεγονότος ότι το ανθρώπινο γένωμα αποτελείται από 3×10^9 bp και το μοριακό βάρος ενός bp είναι περίπου 660 g/mol, υπολογίστηκε ότι ένα μόριο διπλοειδούς γενώματος ζυγίζει περίπου 6.6 µg. Το ελάχιστο όριο συγκέντρωσης υποστρώματος στην αντίδραση, που ορίζεται από το κατώτατο όριο ανίχνευσης της πολυμεράσης είναι 150 μόρια DNA, συνεπώς, σύμφωνα με τους παραπάνω υπολογισμούς, 1 ng διπλοειδούς ανθρώπινου γενώματος. Μέσω πειραματικών δοκιμών αποδείχθηκε ότι η καλύτερη συγκέντρωση του υποστρώματος σε 25 µl της πρώτης αντίδρασης είναι 2.5 ng (400 μόρια) DNA.

Απαραίτητος ήταν ο καθαρισμός των θραυσμάτων μέσω κατακρήμνισης με 3M NaOAc, pH 5.2, για την απαλλαγή του DNA από το ένζυμο και από υπολείμματα αλάτων της πέψης, καθώς σε αντίθετη περίπτωση δεν ανακτήθηκαν ενθέσεις στην ανάστροφη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Θεωρείται ότι αυτό οφειλόταν σε μη επιτυχημένη αντίδραση συγκόλλησης, καθώς το ένζυμο λιγάση δρα υπό συγκεκριμένες συνθήκες και αποκλίσεις π.χ. στη συγκέντρωση άλατος στην αντίδραση επιδρούν αρνητικά στην ενεργότητά του.

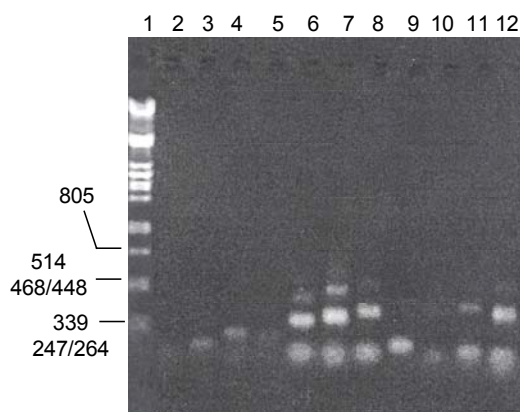
Τα θραύσματα γενωμικού DNA με τυφλά άκρα *AluI* (80- 100 ng) χρησιμοποιήθηκαν σε αντίδραση συγκόλλησης τελικού όγκου 40 μl. Οι συνθήκες επιλέχθηκαν τέτοιες (μικρή συγκέντρωση DNA στην αντίδραση), ώστε να ευνοείται η κυκλοποίηση του ίδιου θραύσματος (self-ligation) και όχι η ένωση των θραυσμάτων μεταξύ τους. Τα βασικά κυκλοποιημένα προϊόντα που αναμένεται να προκύψουν από την αντίδραση συγκόλλησης και πολλαπλασιάζονται στη συνέχεια στην ανάστροφη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης απεικονίζονται στο *σχήμα 3*.



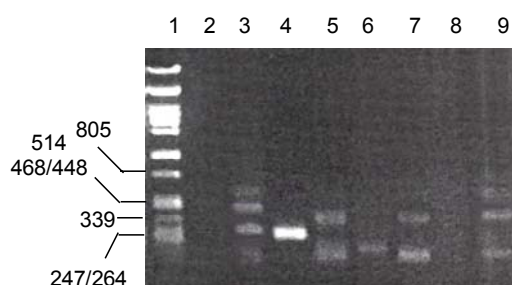
Σχήμα 3: Τα κυκλοποιημένα προϊόντα προέρχονται από την πέψη του γενωμικού DNA των μετασηματισμένων κλώνων με *AluI* και ακόλουθη αντίδραση συγκόλλησης (self-ligation). Απεικονίζονται μόνο εκείνα που μπορούν να πολλαπλασιαστούν με τους εκκινητές IMio 2 και IMii 2 στην ανάστροφη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Το προϊόν συγκόλλησης στα αριστερά περιέχει το αριστερό άκρο του *Minos* και την παρακείμενη γενωμική περιοχή. Το άλλο προϊόν της συγκόλλησης περιέχει το δεξί άκρο του *Minos*, 59 bp (gac...aca) που αποτελούνται από τα 6 τελευταία κωδικόνια και τη 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή της τρανσποζάσης, 49 bp του πλασμιδίου rMiLRneo (Klinakis *et al.*, 2000b) και 244 bp από τον SV40 υποκινητή. Με τόξα απεικονίζονται οι περιοχές που προσδένονται οι ειδικοί εκκινητές στα άκρα του *Minos* και η κατεύθυνση επιμήκυνσής τους από την πολυμεράση.

Στην διπλή ανάστροφη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (inverse nested PCR), όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι», πολλαπλασιάστηκαν με τους ειδικούς για τα άκρα του *Minos* εκκινητές IMio2 και IMii2 το αριστερό ή το δεξί άκρο του *Minos* με τις παρακείμενες γενωμικές αλληλουχίες. Τα αναμενόμενα PCR προϊόντα έχουν μέγεθος άνω των 96 bp, εάν περιέχουν το αριστερό άκρο του *Minos* και άνω των 370 bp για το προϊόν που περιέχει το δεξί άκρο του *Minos*, όπως προκύπτει από τις θέσεις αναγνώρισης του *AluI* και το σχήμα 3. Το ακριβές μέγεθος των προϊόντων εξαρτάται από την κοντινότερη θέση αναγνώρισης του *AluI* στην παρακείμενη γενωμική περιοχή έξω από τα άκρα του *Minos*.

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε 1.5 % πήκτωμα αγαρόζης έδωσε τις ζώνες που φαίνονται στις εικόνες 1, 2, 3 και 4. Το σχετικό τους μέγεθος αναγράφεται στον Πίνακα Α.



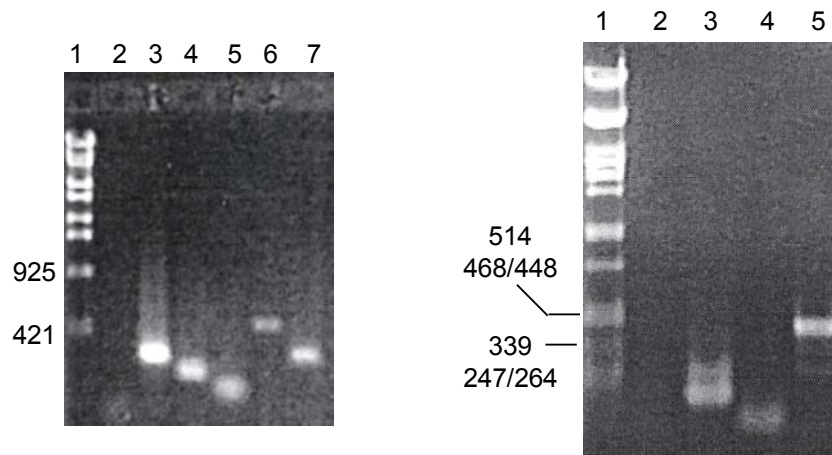
Εικόνα 1



Εικόνα 2

ΕΙΚΟΝΑ 1: Στις σειρές 2-12 έχουν τρέξει 5 μl από nested PCR- ή reamplification- product. **lane 1:** 1 μg λ Pst, **lane 2:** negative control, **lane 3:** κλώνος 12.1, **lane 4:** κλώνος 12.2, **lane 5:** blanc, **lane 6:** κλώνος 12.4, **lane 7:** κλώνος 12.7, **lane 8:** κλώνος 12.9, **lane 9:** κλώνος 12.10, **lane 10:** blanc, **lane 11:** κλώνος 12.13, **lane 12:** κλ. 12.14.

ΕΙΚΟΝΑ 2: : Στις σειρές 2-9 έχουν τρέξει 5 μl από gel slice reamplification- product. **lane 1:** 1 μg λ PSt, **lane 2:** negative control, **lane 3:** κλώνος 12.5, **lane 4:** κλώνος 12.8, **lane 5:** κλώνος 12.17, **lane 6:** κλώνος 12.3, **lane 7:** κλώνος 12.12, **lane 8:** blanc, **lane 9:** κλώνος 12.14.



Εικόνα 3

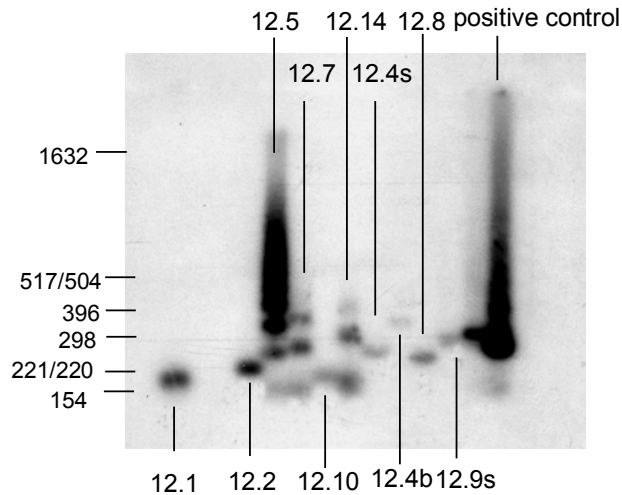
Εικόνα 4

ΕΙΚΟΝΑ 3: Στις σειρές 2-7 έχουν τρέξει 5 μl από gel slice reamplification- product. **lane 1:** 400 ng λ Sty, **lane 2:** negative control, **lane 3:** κλώνος 1, **lane 4:** κλώνος 7, **lane 5:** κλώνος 8, **lane 6:** κλώνος 10, **lane 7:** κλώνος small.

ΕΙΚΟΝΑ 4: : Στις σειρές 2-9 έχουν τρέξει 5 μl από gel slice reamplification- product. **lane 1:** 1 μg λ PSt, **lane 2:** negative control, **lane 3:** positive control, **lane 4:** κλώνος 11 (μικρή ζώνη), **lane 5:** κλώνος 11 (μεγάλη ζώνη).

Μετά την απομόνωση των προϊόντων, έγινε ο προσδιορισμός των θέσεων ένθεσης με αλληλούχιση κατά Sanger, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι».

Λόγω της γενικότερης δυσκολίας προσδιορισμού της αλληλουχίας θέσεων ένθεσης (βλ. Συζήτηση) τα προϊόντα PCR των κλώνων 12.1, 12.2, 12.5, 12.7, 12.10, 12.14, 12.4, 12.8 και 12.9 χρησιμοποιήθηκαν σε ανάλυση κατά Southern (Υλικά και Μέθοδοι), για να διαπιστωθεί αν πράγματι ο ειδικός εκκινητής IMio2 υβριδοποιείται στα προϊόντα ή αν πρόκειται για artifacts της αντίδρασης. Χρησιμοποιώντας ραδιενεργά σημασμένο εκκινητή IMio2 η ανάλυση κατά Southern έδωσε ακριβώς τις ίδιες ζώνες σε φιλμ αυτοραδιογραφίας, όπως και μετά από ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης (εικόνα 5).



Εικόνα 5: Υβριδοποίηση κατά Southern του εκκινητή IMio2 στα προϊόντα PCR των κλώνων 12.1, 12.2, 12.5, 12.7, 12.10, 12.14, 12.4, 12.8 και 12.9. Τα γράμματα s,b συμβολίζουν ότι χρησιμοποιήθηκε το μικρό/ μεγάλο προϊόν PCR αντίστοιχα. Αριστερά δίνονται οι ζώνες του δείκτη pBR322/ *Hinfl* που χρησιμοποιήθηκε στην ηλεκτροφόρηση.

Με τη χρήση σημασμένου εκκινητή IMio2 προσδιορίστηκε η αλληλουχία τριών ενθέσεων από τους κλώνους 12.2, 12.8 και 12.10 (SequiTherm *Excel*[™] II DNA Sequencing Kit-LC, της εταιρείας Epicentre). Άλλες επτά προσδιορίστηκαν μέσω κυκλικής αντίδρασης με σημασμένα νουκλεοτίδια και ένα από τους δύο ειδικούς εκκινητές IMio2/ IMii2 (ABI PRISM Bid Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing kit, της εταιρείας Applied Biosystems). Οι γενωμικές αλληλουχίες που γειτνιάζουν με ένα απ' τα δύο άκρα του *Minos* σε καθένα απ' τα γεγονότα μετάθεσης χρησιμοποιήθηκαν σε πρόγραμμα συγκριτικής ανάλυσης (blast) με την αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδιώματος.

Στον *πίνακα Β* δίνονται για κάθε κυτταρικό κλώνο στοιχεία που προέκυψαν χρησιμοποιώντας το nucleotide-nucleotide blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), δηλαδή ο αριθμός καταχώρησης στην τράπεζα πληροφοριών (genbank entry site), η νουκλεοτιδική θέση, η οποία γειτνιάζει το δινουκλεοτίδιο **TA** της ένθεσης (nucleotide position), το χρωμόσωμα μέσα στο οποίο ενσωματώθηκε το *Minos* και το είδος της χρωμοσωμικής περιοχής (π.χ. επαναλαμβανόμενη της οικογένειας Alu). Το

γονίδιο (γνωστό ή προβλεπόμενο λόγω ομοιότητας της αλληλουχίας με άλλο γνωστό γονίδιο), μέσα στο οποίο βρίσκεται η ένθεση ή το κοντινότερο στην ένθεση γονίδιο προσδιορίστηκε με τη βοήθεια του human genome blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/page.cgi?F=HsBlast.html&&ORG=Hs>).

Πίνακας Β

Clone	Chromosome	Gen Bank Entry site: nucleotide position/ Chromosomal nucleotide position	Region	Gene / function (known or predicted by homology)
12.2	19	AC010320: 163374/ 25.091.332	Alu-repetitive region	MGC32104: Gene with protein product of unknown function 6.3 kb far from insertion
12.8	2	AC073838: 15509/ 69485246	intragenic exon CDS	USP37: ubiquitin specific protease 37 (predicted)
12.10	6	AL117378: 34583/ 36287441	intragenic intron	ENNP1: ectonucleotide phosphatase/ phosphodiesterase 1
1	12	AC026310: 82181/ 17854829	intragenic intron between Alu-repetitive regions (AluSx-AluJb)	BCAT1: branched chain aminotransferase 1, cytosolic
7	16	AC002045: 106566/ 6112496	Large tandem repeat	LOC 339033: similar to nuclear pore complex interacting protein 9kb far from insertion
small	2	AC013444: 58400/ 12259149	intragenic intron MaLR-repetitive region	KYNU: kynureninase (L-Kynurenine hydrolase)

10	10	AL450384: 100875/ 878501	intragenic exon CDS	FLJ23473: Gene with protein product of unknown function
11	6	AL391833: 3952/ 5430489	intragenic intron	PARK2: Parkinson disease (autosomal recessive,juvenile) parkin isoform 1, 2 or 3.
8	19	AK092940: 2044/ 11646078	intragenic exon CDS	SIRT2: Sirtuin (silent mating type information regulative 2 homolog)
12.3	8	AC138372: 36091/ 14506	L2-repetitive region	KIAA0146: Gene with protein product of unknown function 19,9 kb far from insertion

Οι θέσεις των ενθέσεων που βρίσκονται μέσα σε γονίδια αναπαρίστανται γραφικά στο Παράρτημα 2.

Τα αποτελέσματα της συγκριτικής αλληλούχισης αναλυτικά για κάθε ένθεση είναι στο Παράρτημα 3.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το πρώτο βήμα στην προσπάθεια ανάλυσης των ενθέσεων του *Minos* στο ανθρώπινο γονιδίωμα ήταν η ανάκτηση τους με διπλή ανάστροφη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (nested inverse PCR).

Από τους 21 μετασχηματισμένους με τρανσποζόνιο κλώνους για τους οποίους ολοκληρώθηκε το σετ των αντιδράσεων (γενωμικό DNA από 20 επιπλέον κλώνους έχει απομονωθεί και κυκλοποιηθεί μετά από πέψη με *AluI*, αλλά δεν ήταν χρονικά δυνατό να ανακτηθούν οι ενθέσεις), μόνο για δύο (3 και 12.6) στάθηκε αδύνατη η ανάκτηση των ενθέσεων του *Minos* με PCR.

Για την ανάκτηση των ενθέσεων έπρεπε πρώτα να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες των αντιδράσεων:

- α) συγκέντρωση DNA στην πρώτη αντίδραση (βλ. Αποτελέσματα)
- β) συγκέντρωση εκκινητών (25 pmol) και δεοξυνουκλεοτιδίων (0.2 mM) στη nested αντίδραση και στις αντιδράσεις επαναπολλαπλασιασμού (reamplification). Σε προσπάθειες με 10 pmol εκκινητών και 0.1 mM dNTPs σε 25μl τελικού όγκου αντίδρασης, η ανακτώμενη ποσότητα των τελικών προϊόντων δεν επαρκεί για αλληλούχιση.
- γ) αριθμός επαναλήψεων στο θερμοκυκλικό πρόγραμμα, που σε γενικές γραμμές διαφέρει ανάλογα με το προϊόν. 3-4 περισσότεροι κύκλοι από το ιδανικό πολλαπλασιάζουν μη ειδικά προϊόντα (έλλειψη διακριτών ζωνών κατά την ηλεκτροφόρηση), ενώ λιγότεροι κύκλοι δεν πολλαπλασιάζουν το προϊόν σε ικανοποιητικό βαθμό ή και καθόλου.

Μετά την ανάκτηση του εκάστοτε προϊόντος, η nested αντίδραση επαναλήφθηκε μόνο με τον ένα από τους δύο εσωτερικούς εκκινητές, δηλαδή μόνο με τον IMio2 και παράλληλα μόνο με τον IMii2 για να διαπιστωθεί αν το προϊόν είναι αληθινό ή artifact, όπως διαπιστώθηκε για τον κλώνο 12.1 σε αντίδραση με τον IMii2.

Το δεύτερο βήμα ήταν ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των προϊόντων του PCR.

Γενικότερα τα προϊόντα από PCR < 1000 bp (στην περίπτωση μας 100-500 bp) θεωρούνται δύσκολα υποστρώματα αλληλούχισης, καθώς οι αποδιαταγμένες αλυσίδες του DNA επανασυνδέονται γρήγορα, όταν η θερμοκρασία της αντίδρασης δεν είναι αρκετά υψηλή, εμποδίζοντας έτσι τον

εκκινητή να υβριδοποιηθεί και την πολυμεράση να «διαβάσει» (http://www5.amershambiosciences.comaptrix/upp01077.nst/Content/autodna-app_guide_general_sequencing-handbook/).

Μια άλλη δυσκολία που παρουσιάζεται συχνά, είναι ο καθαρισμός των προϊόντων από μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια και περίσσεια εκκινητών. Τα μεν πρώτα επιδρούν αρνητικά στην αντίδραση, διαταράσσοντας την ευαίσθητη αναλογία dNTPs/ ddNTPs, με αποτέλεσμα να ενσωματώνονται λιγότερα διδεοξυνουκλεοτίδια. Οι μη σημασμένοι εκκινητές ανταγωνίζονται το σημασμένο εκκινητή της αντίδρασης αλληλούχισης ως προς τις θέσεις πρόσδεσης στο υπόστρωμα. Και οι δύο αυτές περιπτώσεις έχουν σαν αποτέλεσμα, το σήμα που προκύπτει να είναι αχνό (http://www5.amershambiosciences.comaptrix/upp01077.nst/Content/autodna-app_guide_general_sequencing-handbook/).

Οι προσπάθειες αλληλούχισης των PCR προϊόντων από τους κλώνους 12.4, 12.7, 12.8, 12.9 και 12.14 μετά την απομόνωσή τους από πήκτωμα αγαρόζης με πρωτόκολλο Merlin, όπως περιγράφεται στο κεφ. «Υλικά και Μέθοδοι», ήταν αποτυχημένες. Δεν υπήρχε καθόλου ή πολύ αχνό σήμα και η πολυμεράση δεν μπορούσε να διαβάσει πέρα από μερικές βάσεις από τον εκκινητή IMio2.

Η αποτυχία αλληλούχισης μετά από απομόνωση με διαλύματα Merlin πρέπει να οφείλεται σε αδυναμία της μεθόδου να καθαρίσει τα προϊόντα από περίσσεια dNTPs και εκκινητών και όχι σε κακή διεκπεραίωση του πρωτοκόλλου, καθώς, όπως περιγράφεται εκτενέστερα παρακάτω, η απομόνωση πλασμιδιακού DNA που περιείχε προϊόν PCR κλωνοποιημένο σε T-φορέα (pGEM-T easy, της εταιρείας Promega) με το ίδιο πρωτόκολλο έδωσε καλά αποτελέσματα στην αλληλούχιση. Επίσης, μετά από απομόνωση με ειδικό kit (Marligen, Clontech ή Qiagen), ο προσδιορισμός της θέσης ένθεσης για τον κλώνο 12.8 ήταν επιτυχής. Τελικά, οι γειτνιάζουσες γενωμικές αλληλουχίες δέκα ενθέσεων προσδιορίστηκαν μετά από απομόνωση των PCR προϊόντων με ειδικό kit. Το ίδιο επετεύχθηκε για τρεις ακόμη ενθέσεις, των οποίων όμως η γενωμική αλληλουχία ήταν πολύ μικρή, ώστε να δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα στο πρόγραμμα συγκριτικής ανάλυσης και για δύο, απ' τις οποίες προέκυψαν πολυμερή των άκρων του Minos κατά την αντίδραση συγκόλλησης.

Άλλοι πιθανοί λόγοι που δημιούργησαν προβλήματα στον προσδιορισμό των γενωμικών αλληλουχιών, αλλά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για να ξεπεραστούν τα εμπόδια που παρουσιάστηκαν, συζητούνται στο εξής.

Πολύ σημαντικό για την επιτυχία της αντίδρασης αλληλούχισης είναι το υπόστρωμα να αποτελείται από ένα και μοναδικό προϊόν. Η ανάκτηση μίας και μοναδικής ζώνης στο PCR ήταν εξ' ορισμού αδύνατη, καθώς βάσει της διαδικασίας που ακολουθείται, ακόμη και εάν υπάρχει μία ένθεση στα κύτταρα, αναμένονται δύο προϊόντα, ένα με το αριστερό και ένα με το δεξί άκρο του *Minos*. Ο κλασσικός τρόπος για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα είναι να ηλεκτροφορηθεί η αντίδραση σε πήκτωμα αγαρόζης υψηλής πυκνότητας (1.5 %- 2 %), ώστε να διαχωριστούν καλά τα προϊόντα και να απομονωθούν οι ζώνες. Πολλές φορές τα απομονωμένα προϊόντα χρησιμοποιήθηκαν σε αντίδραση επαναπολλαπλασιασμού (reamplification) για να ανακτηθούν μεγαλύτερες ποσότητες. Σε αυτές τις περιπτώσεις, συνήθως, δίπλα στο μεγαλύτερο πολλαπλασιαζόταν και το μικρότερο σε μέγεθος προϊόν, καθώς ίχνη του υπάρχουν στη θέση της υψηλότερης ζώνης στο πήκτωμα αγαρόζης. Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει ότι ακόμη και αν στη διαγνωστική ηλεκτροφόρηση πριν το sequencing δε φαίνεται άλλο εκτός από το επιθυμητό προϊόν, περιέχονται και ίχνη των υπολοίπων προϊόντων, καθώς και μη ειδικών παραπροϊόντων της αντίδρασης. Τα ανεπιθύμητα προϊόντα πολλαπλασιάζονται κατά την αντίδραση αυτόματης αλληλούχισης (cycle sequencing), ανταγωνίζονται με το κυρίως υπόστρωμα για την πρόσδεση του σημασμένου εκκινητή IMio2, μειώνουν την ενεργότητα και εμποδίζουν τη δράση της πολυμεράσης. Το ορατό αποτέλεσμα είναι να προκύπτει σήμα αχνό, να παρουσιάζονται λάθη στο «διάβασμα» της αλληλουχίας και/ ή να εμφανίζονται τερματικές αλληλουχίες (STOPs). Αυτά τα προβλήματα προέκυψαν πολύ έντονα στην προσπάθεια προσδιορισμού των παρακείμενων του *Minos* γενωμικών αλληλουχιών.

Σε πέντε δείγματα που απομονώθηκαν με kit και στάλθηκαν για αυτόματη αλληλούχιση, παρουσιάστηκαν STOPs και συμπιέσεις (compressions) στην αλληλουχία τους. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην ίδια την αλληλουχία των γενωμικών θέσεων, στις οποίες εντέθηκε το *Minos*.

Προβλήματα αυτού του είδους αναφέρονται συχνά στη βιβλιογραφία για περιοχές πλούσιες σε AT ή GC, καθώς έχουν την τάση να σχηματίζουν ισχυρές δευτεροταγείς δομές που εμποδίζουν την υβριδοποίηση των εκκινητών και τη δράση της πολυμεράσης. Επίσης υποστρώματα που περιέχουν περιοχές ομοπολυμερών ή επαναλαμβανόμενες περιοχές δημιουργούν παρόμοια προβλήματα στην αλληλούχηση. Για παράδειγμα μεγάλες επαναλήψεις T νουκλεοτιδίων εμποδίζουν τη δράση της πολυμεράσης

(http://www5.amershambiosciences.comaptrix/upp01077.nst/Content/autodna-app_guide_general_sequencing-handbook/).

Τα προβλήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω έχουν πιθανώς τη ρίζα τους στην ίδια την ιδιότητα του *Minos* να εντίθεται σε **TA** δινουκλεοτίδιο. Τα πρώτα αποτελέσματα για τις προτιμήσεις του *Minos* στο γένωμα της *D. melanogaster* δείχνουν μία ελαφρά προτίμηση του μεταθετού για την παλίνδρομη αλληλουχία ATATATAT γύρω από την περιοχή ένθεσης (Metaxakis, unpublished data). Επίσης, όπως παρατηρείται από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, έξι από τις δέκα ενθέσεις που προσδιορίστηκαν βρίσκονται σε επαναλαμβανόμενες περιοχές, εκ των οποίων τρεις σε επαναλαμβανόμενες Alu-περιοχές. Πρόκειται για διμερείς αλληλουχίες, μήκους 300 περίπου bp που συναντώνται μόνο στα ανώτερα θηλαστικά και είναι η μεγαλύτερη σε αφθονία οικογένεια SINEs (short interspersed repetitive elements) στο ανθρώπινο γένωμα (περίπου 1.000.000 αντίτυπα στο διπλοειδές ανθρώπινο γένωμα). Περιέχουν ένα διμερή εκκινητή RNA πολυμεράσης, ένα κεντρικό σήμα πολυαδενυλίωσης pA, το 3'-άκρο του pA και πολλά CpG islands, στα οποία παρεμβάλλονται μικρές επαναλαμβανόμενες περιοχές. Τα στοιχεία Alu βρίσκονται διάσπαρτα κυρίως σε περιοχές πλούσιες σε AT μέσα σε μεγαλύτερες GC-πυκνές χρωμοσωμικές περιοχές μέσω ενός μηχανισμού γνωστού ως «αναμετάθεση» (retroposition) (Rowald and Herrera, 2000).

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι είναι αναμενόμενο, ειδικά στο ανθρώπινο γένωμα, το μεταθετό στοιχείο *Minos* να εντίθεται σε «δύσκολες» για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας γενωμικές περιοχές.

Οι δυσκολίες αυτές στην αλληλούχηση δοκιμάστηκε να ξεπεραστούν με δύο τρόπους:

Ο πρώτος ήταν η προσπάθεια κλωνοποίησης των προϊόντων PCR στον pGEM-T easy πλασμιδιακό φορέα της εταιρείας PROMEGA (Υλικά και Μέθοδοι). Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι πολλά:

A) Τα πλασμίδια αποτελούν γενικότερα πολύ πιο εύκολα υποστρώματα στην αντίδραση αλληλούχισης από τα προϊόντα PCR, επειδή οι αποδιαταγμένες αλυσίδες του DNA είναι μεγαλύτερες, οπότε δεν επανασυνδέονται εύκολα κατά την αντίδραση και επιπλέον, επειδή η υβριδοποίηση του εκκινητή σε μη ειδικές θέσεις (mis-annealing) γίνεται (λόγω μεγέθους του πλασμιδίου) σε περισσότερα σημεία απ' ότι στα προϊόντα PCR, τα μη ειδικά προϊόντα δεν πολλαπλασιάζονται σημαντικά στο cycle sequencing, οπότε δεν επηρεάζουν ιδιαίτερα το σήμα.

B) Ανάκτηση μεγάλης ποσότητας DNA προς αλληλούχιση. Η παραγωγή του πλασμιδίου στα βακτήρια διευκολύνει, όταν η ποσότητα του ανακτημένου PCR προϊόντος είναι μικρή.

Γ) Χρήση εμπορικών σημασμένων εκκινητών στην αλληλούχιση. Συγκεκριμένα, ο pGEM-T easy περιέχει ακριβώς έξω από τη θέση κλωνοποίησης αλληλουχίες, στις οποίες υβριδοποιούνται οι εκκινητές T7 και SP6.

Δ) Η κλωνοποίηση DNA στον T-φορέα διακόπτει την έκφραση της β-γαλακτοζιδάσης, LacZ. Απλώνοντας τα βακτήρια σε πιάτα που περιέχουν X-Gal σα δείκτη, η επιλογή των μετασχηματισμένων με το κλωνοποιημένο DNA βακτηριακών κλώνων γίνεται ευκολότερη, καθώς επιλέγονται άσπρες αποικίες (η παραγωγή LacZ έχει διακοπεί λόγω ενσωμάτωσης του επιθυμητού DNA) από το μπλε background (το γονίδιο της β-γαλακτοζιδάσης εκφράζεται, άρα δεν έχει εισέλθει DNA στο φορέα). Μία εξαίρεση υπάρχει σε αυτό τον κανόνα: Το κομμάτι DNA, ειδικά εάν είναι μικρό, να κλωνοποιηθεί in frame με το γονίδιο της β-γαλακτοζιδάσης, οπότε να μην εμποδίζει εντελώς τη μεταγραφή αλλά και τη λειτουργία της πρωτεΐνης (υπομπλέ ή μπλε αποικίες).

Οι προσπάθειες κλωνοποίησης έγιναν για 1-2 προϊόντα PCR προερχόμενα από τους κλώνους 12.2, 12.4, 12.5, 12.7, 12.9, 12.10, 12.12, 12.13, 12.14 και 12.17. Μετά το μετασχηματισμό επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* προέκυψαν πολύ λίγες λευκές αποικίες (3%) και περισσότερες υπομπλέ, ενώ στο μεγαλύτερο ποσοστό τους οι αποικίες ήταν μπλε. Από μόνη της αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει ότι ο T-φορέας που χρησιμοποιήθηκε είχε χάσει τα

3'-προεξέχοντα T-άκρα του, με αποτέλεσμα να αυτο-κυκλοποιείται (self-ligation) κατά την αντίδραση συγκόλλησης. Παρ' όλα αυτά, επιλέχθηκαν συνολικά 148 αποικίες (όλες οι άσπρες και οι υπόλοιπες μπλε και υπομπλέ) και έγιναν δύο πέψεις, μία με *EcoRI* και μία με *NotI*. Και τα δύο ένζυμα αναγνωρίζουν θέσεις δεξιά και αριστερά ακριβώς έξω από τη θέση κλωνοποίησης.

Το DNA που προήλθε από τις λευκές και τις υπομπλέ αποικίες δεν κόπηκε, γεγονός που αποδίδεται σε απουσία (deletion) της περιοχής κλωνοποίησης του T-φορέα, και συνεπώς και μέρους του γονιδίου *LacZ*, οπότε αδυνατεί να εκφραστεί πλήρως λειτουργική β-γαλακτοζιδάση. Η περίπτωση να οφείλεται η αποτυχία των πέψεων σε έλλειψη καθαρότητας του DNA αποκλείστηκε, μιας και πέψη του ίδιου DNA με το ένζυμο περιορισμού *XmnI*, το οποίο αναγνωρίζει θέση μέσα στο γονίδιο ανθεκτικότητας *Amp^r* ήταν επιτυχής. Τέλος, μπλέ αποικίες προερχόμενες από τους κλώνους 12.2, 12.7, 12.5 και 12.13 κόπηκαν κατά την πέψη, δίνοντας ζώνες γύρω στα 500 bp. Η αλληλούχιση των 12.7 και 12.13 απέδειξε ότι πρόκειται για T-φορέα, ο οποίος έχει χάσει τα προεξέχοντα 3'-T άκρα του.

Επειδή η διαδικασία κλωνοποίησης αποδείχθηκε ούτως ή άλλως αρκετά χρονοβόρα για να χρησιμοποιηθεί για πολλές διαφορετικές ενθέσεις του *Minos*, δοκιμάστηκε manual αλληλούχιση στο εργαστήριο με το πρωτόκολλο cycle sequencing, procedure B, της εταιρείας Amersham biosciences, όπως αυτό περιγράφεται στο κεφάλαιο «Υλικά και Μεθόδοι».

Το πλεονέκτημα σε σχέση με το αυτόματο sequencing είναι ότι υπάρχει το περιθώριο πειραματισμού με τις συνθήκες της αντίδρασης, ώστε να προκύψει πιο δυνατό και καθαρό σήμα. Επίσης, προβλήματα αλληλούχισης δύσκολων περιοχών (πχ. πλούσιες σε GC) μπορούν να ξεπεραστούν χρησιμοποιώντας στην αντίδραση de-aza GTP, το οποίο όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία περιορίζει τη δημιουργία δευτεροταγών δομών.

Τα αποτελέσματα του manual sequencing για PCR προϊόντα από τους κλώνους 12.7, 12.9 και 12.10 ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά. Το σήμα που προέκυψε στη δεύτερη κιόλας δοκιμή ήταν δυνατό και καθαρό για τις πρώτες βάσεις μετά το άκρο του εκκινήτη IMio2, αν και δυστυχώς χάθηκε πριν να μπορέσει να προσδιοριστεί αλληλουχία αρκετά μεγάλη για να χρησιμοποιηθεί στο πρόγραμμα συγκριτικής ανάλυσης (blast). Ο πιο πιθανός λόγος γι' αυτό

ήταν ότι χρησιμοποιήθηκε Taq πολυμεράση χαμηλής ενεργότητας (Minotech) σε σχέση με αυτή που αναφέρεται στο πρωτόκολλο (Amersham biosciences). Επιπλέον, η συγκέντρωση των dNTPs απαιτεί προσαρμογή στα πλαίσια της αντίδρασης, καθώς κάθε πολυμεράση διαφέρει στη συγγένεια (affinity) για το εκάστοτε νουκλεοτίδιο. Στα χρονικά πλαίσια αυτής της εργασίας δεν ήταν δυνατή η περαιτέρω προμήθεια των απαραίτητων για τη διαδικασία υλικών (ddNTPs, [^{32}P]-ATP, Taq DNA polymerase).

Τα καλύτερα αποτελέσματα αλληλούχισης προέκυψαν τελικά με τη χρήση του ABI PRISM Bid Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing kit, της εταιρείας Applied Biosystems. Από τις 24 αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν, οι 22 έδωσαν ήδη στην πρώτη δοκιμή αρκετά καλό σήμα. Ο αριθμός ενθέσεων που προσδιορίστηκε μέσα στα χρονικά πλαίσια της εργασίας αυτής δεν είναι αρκετά μεγάλος, για να επιτρέψει στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Μπορούν όμως να γίνουν κάποιες παρατηρήσεις (βλ. Αποτελέσματα, Πίνακας Β):

Επτά από τις δέκα ανακτημένες ενθέσεις βρίσκονται μέσα σε γονίδια. Οι υπόλοιπες τρεις είναι μέσα σε επαναλαμβανόμενες περιοχές των οικογενειών L2, Alu και μία μακρά επαναλαμβανόμενη και απέχουν 6, 9 και 20 kb αντίστοιχα από το κοντινότερο γονίδιο. Από τις ενθέσεις που ενσωματώθηκαν μέσα σε γονίδια, τρεις βρίσκονται σε εξώνια και τέσσερις σε εσώνια. Χαρακτηριστικά τρεις από αυτές (δύο σε εσώνια και μία σε εξώνιο) βρίσκονται σε επαναλαμβανόμενες περιοχές των οικογενειών Alu και MaLR (mammalian retrotransposon family). Έτσι συνολικά των 60% των ανακτημένων ενθέσεων έχει ενσωματωθεί σε επαναλαμβανόμενες περιοχές, οι οποίες είναι κυρίως πλούσιες σε AT (Alu, L2), δείχνοντας μία ελαφρά προτίμηση του μεταθετού σε επίπεδο αλληλουχίας DNA, όπως συζητήθηκε και παραπάνω.

Τα αποτελέσματα δεν επαρκούν βέβαια για να αναδειχθεί κάποια προτίμηση του *Minos* σε επίπεδο χρωμοσωμικής περιοχής. Παρ' όλα αυτά, αξίζει να σημειωθεί ότι το 70 % των ανακτημένων ενθέσεων βρίσκονται μέσα σε γονίδια και μάλιστα τρία από αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνες άγνωστης λειτουργίας στον άνθρωπο (FLJ23473, PARK2 και SIRT2). Επίσης, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι έχουν «παγιδευτεί» τρία εξώνια και τέσσερα εσώνια. Τα αποτελέσματα της έρευνας ενθέσεων του *Minos* στο

γονιδίωμα της *D. Melanogaster* έδειξαν σαφή προτίμηση του στοιχείου για ενσωμάτωση σε εσώνια (Metaxakis, unpublished data). Επίσης, είναι γνωστό, ότι το μεταθετό *Sleeping beauty* δείχνει προτίμηση σε εσώνια σε ανθρώπινα κύτταρα, ενώ και το στοιχείο *pigggyBac* παρουσιάζει την ίδια προτίμηση στη Δροσόφιλα (Hacker et al., 2003). Ίσως η σχετική αφθονία σε A/T πλούσιες περιοχές των εσωνίων να δίνουν μία εξήγηση γι' αυτό το φαινόμενο. Από τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής δεν προκύπτει κάποια προτίμηση του *Minos* για ενσωμάτωση σε εσώνια στο ανθρώπινο γονιδίωμα.

Τα στοιχεία που προέκυψαν, αποτελούν ενθαρρυντικές ενδείξεις για τη δυνατότητα μελλοντικής χρήσης του μεταθετού *Minos* ως εργαλείου στη μεταλλαξιγένεση του ανθρώπινου γονιδιώματος και στη διερεύνηση της λειτουργίας των γονιδίων. Η περαιτέρω ανάλυση ενθέσεων του στοιχείου στο ανθρώπινο γένωμα θα επιτρέψει το σχηματισμό μιας πιο ολοκληρωμένης εικόνας.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΜΕΘΟΔΟΙ

Καλλιέργεια κυττάρων HepG2

21 με βακουλοϊό σταθερά μετασχηματισμένοι κυτταρικοί κλώνοι, στους οποίους έχει ενσωματωθεί η κασσέτα MILRneo ξεπαγώθηκαν από το υγρό άζωτο και καλλιεργήθηκαν σε μέσο καλλιέργειας DMEM (GIBCO/BRL) με 10% FBS (fetal bovine serum) και 10 mg/ml κενταμυκίνη. Επώαστηκαν στους 37 °C για 4-10 d μέχρι να καταλάβουν επιφάνεια φλασκών 25 -75 cm².

Πριν την απομόνωση DNA από τα κύτταρα, το 1/5 του συνολικού όγκου τους επαναδιαλύθηκε σε 0.5-1 ml freezing medium (40% FBS, 7.5 % DMSO, 52.5 % DMEM) και καταψύχθηκε με σκοπό την διατήρηση του stock των μετασχηματισμένων κλώνων.

Άλλοι 20 κλώνοι επιλέχθηκαν ως μοναδιαίες αποικίες απευθείας από το τρυβλίο διαμόλυνσής τους με ιούς που φέρουν το τρανσποζόνιο και την τρανσποζάση και πολλαπλασιάστηκαν όπως περιγράφεται παραπάνω σε διάστημα 7-14 ημερών, με σκοπό τη δημιουργία stock και την απομόνωση DNA.

Απομόνωση γενωμικού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα HepG2

Τα κύτταρα επαναδιαλύονται μετά τη συλλογή τους σε 100 μl PBS (1X phosphate-buffered saline: NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄, pH 7.4). Αμέσως τοποθετούνται για 16 ώρες στους 55⁰C σε 600 μl μείγματος teil mix (50mM Tris pH 8.0, 100mM EDTA, 100mM NaCl, 1% SDS), το οποίο περιέχει 20 μl proteinase K (10mg/ml).

Ακολουθούν δύο εκχυλίσεις με ίσο όγκο μείγματος φαινόλης/χλωροφορμίου, σε αναλογία 1/1 και κατακρήμνιση του γενωμικού DNA με 0,8 όγκους ισοπροπανόλης. Μετά από ξέπλυμα με 70% αιθανόλη το DNA συλλέγεται με πιπέττα pasteur. Η επαναδιάλυση έγινε σε 70 μl H₂O και ακολούθησε επώαση με 1 μl Rnase ανά δείγμα στους 37 °C για 1 h για να καταστραφεί το RNA.

Αντίδραση συγκόλλησης PCR προϊόντων (self –ligation)

80- 100 ng DNA εισάγονται σε αντίδραση τελικού όγκου 40 μl. Προστίθεται 10X διαλύματος συγκόλλησης (ligation buffer) ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1X και 4u/ μl λιγάση (Boehringer). Το μείγμα επωάζεται στους 16 °C για 16 ώρες περίπου.

Ανάστροφη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (inverse PCR)

Δύο διαδοχικές αντιδράσεις πολλαπλασιασμού πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικούς για τα άκρα του *Minos*.

Στην πρώτη αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 2 μl (2 - 2.5 ng DNA) από την αντίδραση συγκόλλησης που περιγράφηκε παραπάνω, με 25 pmol των εκκινητών **IMio1** (5' **AAGAGAATAAAATTCTCTTTGAGACG** 3') και **IMii1** (5' **CAAAAATATGAGTAATTTATTCAAACGG** 3'), 0.2 mM dNTPs, 1x polymerase buffer και 0.5 μl Minotech πολυμεράση σε τελικό όγκο αντίδρασης 25 μl. Το θερμοκυκλικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής: 30'' στους 94 °C, 30'' στους 58 °C, 1 min στους 72 °C, 35 επαναλήψεις.

Εκ νέου πολλαπλασιασμός σε 1 μl από την πρώτη αντίδραση πραγματοποιήθηκε με τους εσωτερικούς εκκινητές **IMii2** (5' **GCTTAAGAGATAAGAAAAAAGTGACC** 3') και **IMio2** (5' **GATAATATAGTGTGTTAAACATTGCGC** 3'). Οι συγκεντρώσεις των αντιδρώντων ήταν οι ίδιες, ενώ το θερμοκυκλικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής: 30'' στους 94 °C, 30'' στους 58 °C, 1 min στους 72 °C, 25 επαναλήψεις.

Στις περιπτώσεις που το προϊόν δεν ανακτήθηκε με αυτό τον τρόπο το θερμοκυκλικό πρόγραμμα χρησιμοποιήθηκε για 10 ακόμα επαναλήψεις.

Στις περιπτώσεις που η ποσότητα του ανακτημένου προϊόντος ήταν μικρή ή τα προϊόντα που προέκυπταν κατά την αντίδραση ήταν περισσότερα από ένα και έπρεπε να διαχωριστούν και να επαναπολλαπλασιαστούν η εσωτερική αντίδραση (nested PCR) επαναλήφθηκε (reamplification) με 1 μl απομονωμένου από πήκτωμα αγαρόζης προϊόντος ή απευθείας από μικρό κομμάτι πηκτώματος που περιείχε το προϊόν. Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε στην τελευταία περίπτωση ήταν: αποδιάταξη για 7 min στους 94 °C, 30'' στους 94 °C, 30'' στους 58 °C, 1 min στους 72 °C, 10 επαναλήψεις.

Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Η απομόνωση έγινε με δύο τρόπους:

α) απομόνωση με διάτομα (merlin prep).

Στο κομμάτι αγαρόζης προστίθενται 100 μl NaI, ο χαοτροπικός παράγοντας που αποδιατάσσει την αγαρόζη και 300 μl Merlin IV, διάλυμα που περιέχει τα διάτομα (Diatomaceous earth, Sigma) που δεσμεύουν το DNA. Ακολουθεί ανακίνηση (vortex) και επώαση στους 37 °C για 10 min, ή όσο χρειάζεται για να διαλυθεί η αγαρόζη.

Μετά από φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 4 min, απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται στα διάτομα 1 ml Merlin V για ξέπλυμα. Μετά από επαναδιάλυση των διατόμων, φυγοκέντρηση για 4 min, και πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης από τα διάτομα, το DNA εκλούεται με νερό προθερμασμένο στους 70 °C.

β) απομόνωση με kit (Qiaquick Gel extraction kit, της εταιρείας QIAGEN, Nucleotrap CR, της Clontech ή NucleoSpin Extract, της Clontech).

Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων E.coli (competent cells)

Αποστειρωμένο θρεπτικό διάλυμα SOB (2% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.4mM NaCl, 0.1mM KCl) εμπλουτισμένο με MgCl₂ και MgSO₄ συγκέντρωσης 1M το κάθε ένα, μολύνεται με 1-2 αποικίες από φρέσκο πιάτο στο οποίο καλλιεργήθηκε το βακτηριακό στέλεχος που θέλουμε να μετατρέψουμε σε επιδεκτικό. Η επώαση γίνεται στους 25 °C υπό έντονη ανάδευση έως ότου η απορρόφηση των κυττάρων (OD) να φτάσει 0.35- 0.4. Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων για 10 λεπτά στους 4°C και στις 4000 στροφές. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 40 ml διαλύματος μετασχηματισμού (10mM Pipes, 15mM CaCl₂, 250mM KCl, 55mM MgCl₂, pH 6,7). Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά στον πάγο και επανάληψη της φυγοκέντρησης. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 10 ml διαλύματος μετασχηματισμού εμπλουτισμένου με DMSO (τελικής συγκέντρωσης 7%). Τα κύτταρα μοιράζονται σε μικρές ποσότητες και διατηρούνται στους -80 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Αντίδραση συγκόλλησης πλασμιδιακού φορέα με τμήμα DNA (ligation)

Η αντίδραση συγκόλλησης πραγματοποιείται αναμιγνύοντας κατάλληλες ποσότητες DNA από το φορέα και το τμήμα DNA ώστε η αναλογία μορίων φορέα/ DNA να είναι περίπου 1/5. Στην αντίδραση προστίθεται 10X διαλύματος συγκόλλησης (ligation buffer) ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1X και 4u/ μl λιγάση (Boehringer). Το μείγμα επωάζεται στους 16 °C για 16 ώρες περίπου.

Μετασηματισμός βακτηριακών στελεχών από πλασμιδιακές κατασκευές

Σε 200 μl επιδεκτικών κυττάρων προστίθεται ένα μέρος από την αντίδραση συρραφής και το μίγμα αφήνεται στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολουθεί θερμικό σοκ για 45 δευτερόλεπτα στους 42 °C και τοποθέτηση του μείγματος στον πάγο για 2 λεπτά. Στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη 800 μl θρεπτικού μέσου SOC και επώαση μιας ώρας στους 37 °C. Τέλος το δείγμα επιστρώνεται υπό στείρες συνθήκες σε πιάτο με θρεπτικό μέσο LB (Sambrook et al.), το οποίο έχει κατάλληλη ποσότητα του αντιβιοτικού με το οποίο γίνεται η επιλογή. Τα πιάτα τοποθετούνται στους 37 °C για 16 ώρες προκειμένου να αναπτυχθούν οι αποικίες των βακτηρίων.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

1.5 ml βακτηριακής ο/η καλλιέργειας φυγοκεντρείται στις 5000 rpm για 10 min. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 200 μl Merlin I (50 mM Tris-Cl; pH 7.5, 10 mM EDTA, 100 μg/ml RNAase A). Ύστερα προστίθενται 200 μl Merlin II (0.2 M NaOH, 1% SDS) και Merlin III (61.35 gr CH₃COOK διαλύονται σε 35.7 ml CH₃COOH και προστίθεται ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 500 ml). Ακολουθεί προσεκτική ανακίνηση του μείγματος και φυγοκέντρησή του στις 14000 rpm για 10 min.

Το υπερκείμενο επαναδιαλύεται σε 500 μl Merlin IV και φυγοκεντρείται στις 14000 rpm για 10 min. Ακολουθεί ξέπλυμα του ιζήματος με Merlin V (200 mM NaCl, 20 mM Tris-Cl; pH 7.5, 5 mM EDTA, 50% EtOH) και φυγοκέντρωση στις 14000 rpm για 5 min. Η έκλυση του DNA από τα διάτομα πραγματοποιείται με προθερμασμένο στους 70 °C ddH₂O.

Ραδιοσήμανση συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων

Η T4 πολυνουκλεοτιδική κινάση (T4 polynucleotide kinase, PNK) καταλύει τη μεταφορά της γ-φωσφορικής ομάδας του ATP στο 5'-άκρο μονόκλωνου και δίκλωνου DNA και σε μόρια RNA που περιέχουν μία 5'-υδροξυλική ομάδα. Λόγω αυτής της ιδιότητάς της χρησιμοποιήθηκε για την 5'-ραδιοσήμανση του ειδικού για το Μίνος εκκινητή IMio2 με ³²P. Στην αντίδραση ραδιοσήμανσης χρησιμοποιήθηκαν 100 ng εκκινητή, 200 μCi [γ³²P]-ATP, 10x PNK buffer (330 mM Tris-acetate, pH 7.8, 660 mM KOAc, 100 mM MgOAc, 5 mM DTT) και 4 units T4 PNK σε τελικό όγκο 25 μl. Η αντίδραση αφήνεται για 1 h στους 37 °C. Η T4 PNK απενεργοποιείται στη συνέχεια στους 70 °C για 5 min. Ο ραδιοσημασμένος εκκινητής φυλάσσεται στους - 20 °C και μπορεί να χρησιμοποιηθεί μέχρι και δύο εβδομάδες αργότερα.

Ανάλυση DNA κατά Southern (Southern blot)

Το DNA ηλεκτροφορεύεται σε πήκτωμα αγαρόζης (0.9%). Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα επωάζεται για 15 λεπτά σε διάλυμα 0.125M HCl και για 45 λεπτά σε διάλυμα αλκαλικού χαρακτήρα (0.5N NaOH, 1.5M NaCl). Μετά την αποδιάταξη ακολουθεί επώαση του πηκτώματος σε ουδέτερο διάλυμα (0.5M Tris-HCl pH 7.4, 1.5 N NaCl) για 45 λεπτά.

Στη συνέχεια το πήκτωμα τοποθετείται πάνω σε γέφυρα από διηθητικό χαρτί Watman 3MM, του οποίου τα άκρα είναι βυθισμένα σε διάλυμα 20X SSC (3M NaCl, 0.3M NaOAc). Επάνω στο πήκτωμα τοποθετείται μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (S&S) και δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM ίδιου μεγέθους με τη μεμβράνη και εμβαπτισμένα σε 2X SSC. Πάνω από αυτά τοποθετούνται φύλλα απορροφητικού χαρτιού. Μετά από 10-16 ώρες ολοκληρώνεται η μεταφορά του DNA, η μεμβράνη ξεπλένεται σε διάλυμα 6X SSC και ψήνεται στους 80 °C για 2 ώρες για την ακινητοποίηση του DNA.

Μετά την ακινητοποίηση του DNA, η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε διάλυμα 2X SSC και στη συνέχεια υβριδοποιείται για 2 h στους 65°C με 10 ml διαλύματος υβριδοποίησης (3X SSC, 0.1% SDS, 10% Dextran sulfate (Pharmacia), 0.2% Ficoll, 0.2% PVP, 0.2% BSA) και 500μg αποδιαταγμένου με βρασμό DNA από σπέρμα σολομού.

Στη συνέχεια προστίθεται ο ραδιοσημασμένος ανιχνευτής (εδώ, ο εκκινητής IMio2), ο οποίος προηγουμένως αποδιατάσσεται με βρασμό για 5 λεπτά. Η διάρκεια της υβριδοποίησης είναι 8-16 ώρες. Αφού ολοκληρωθεί η υβριδοποίηση, απομακρύνεται το διάλυμα υβριδοποίησης και η μεμβράνη ξεπλένεται από τον μη ειδικά υβριδοποιημένο ανιχνευτή. Οι πλύσεις γίνονται και πάλι στους 65°C με την χρήση τριών διαλυμάτων. Αρχικά γίνονται δύο πλύσεις με διάλυμα 3X SSC-0.1% SDS, διάρκειας 15 λεπτών, ακολουθούν δύο πλύσεις με διάλυμα 0.3X SSC-0.1% SDS διάρκειας 15 λεπτών και αν χρειαστεί γίνονται κι άλλες πλύσεις με διάλυμα 0.1X SSC-0.1% SDS. Η μεμβράνη εκτίθεται σε φιλμ αυτοραδιογραφίας στους -80 °C.

Προσδιορισμός αλληλουχίας DNA

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των PCR προϊόντων δοκιμάστηκε με τέσσερις τρόπους:

A, B) Αυτόματα κατά Sanger, με το SequiTherm *Excel*[™] II DNA Sequencing Kit-LC, της εταιρείας Epicentre.

Η αλληλούχιση των PCR προϊόντων έγινε με σημασμένο τον ειδικό εκκινητή για τα άκρα του Minos, IMio2, με φθορίζουσα ουσία. Η συγκέντρωση του DNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν 100 - 200 ng.

Η αλληλούχιση των συγκολλημένων με T-φορέα PCR προϊόντων έγινε με τους σημασμένους ειδικούς για τον φορέα εκκινητές T7 και SP6. Η συγκέντρωση του DNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1 µg.

Γ) Αυτόματα κατά Sanger, με το ABI PRISM Bid Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing kit, της εταιρείας Applied Biosystems. Η αλληλούχιση των PCR προϊόντων έγινε με τον ειδικό εκκινητή για τα άκρα του Minos, IMio2 ή τον IMii2 και σημασμένα ddNTPs.

Δ) Manual, αλληλούχιση μέσω θερμικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (thermal cycle sequencing) χρησιμοποιώντας την Taq DNA πολυμεράση. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα ειδικών διδεοξυνουκλεοτιδίων να σταματούν την καταλυμένη από την DNA πολυμεράση επιμήκυνση των εκκινητών. Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο cycle sequencing kit, procedure B, της εταιρείας Amersham biosciences, όπως περιγράφεται παρακάτω:

Προετοιμάζονται τέσσερις ξεχωριστές αντιδράσεις, εκ των οποίων η καθεμία περιλαμβάνει το υπόστρωμα (DNA), τον εκκινητή (primer), τα τέσσερα δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs), και διαφορετικό διδεοξυνουκλεοτίδιο (ddATP, ddCTP, ddGTP ή ddTTP). Έτσι προκύπτει ένα σετ προϊόντων, εκ των οποίων κάθε ένα σταματάει με το ειδικό διδεόξυνουκλεοτίδιο που εισάχθηκε στην αντίδραση. Συνεπώς τα προϊόντα σε κάθε αντίδραση αντικατοπτρίζουν την ύπαρξη του αντίστοιχου δεοξυνουκλεοτιδίου στην αλληλουχία του υποστρώματος. Μέσω ραδιοσήμανσης πριν ή κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και ηλεκτροφόρησης των τεσσάρων αντιδράσεων σε παρακείμενα πηγάδια προκύπτει η αλληλουχία του DNA, καθώς προοδευτικά μεγαλύτερα προϊόντα εμφανίζονται στα τέσσερα lanes.

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα διαλύματα:

[α -³²P] dATP: 10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol.

5X Sequencing Buffer: 350 mM Tris-HCl (pH 9.0), 7.5 mM MgCl₂, 52% DMSO.

Taq DNA Polymerase

Taq Dilution Buffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 1% Tween-20, 1% NP-40, 50% glycerol, 0.1 mg/ml gelatin.

dNTP Mix: 80 μ M each dATP, dCTP, dTTP.

A-Termination Mix: 780 μ M ddATP in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5).

C-Termination Mix: 300 μ M ddCTP in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5).

G-Termination Mix: 24 μ M ddGTP in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5).

T-Termination Mix: 850 μ M ddTTP in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5).

Stop Solution: 97.5% deionized formamide, 10 mM EDTA, 0.3% xylene cyanol, 0.3% bromophenol blue.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Ετοιμάστηκαν τέσσερα eppendorf tubes 0.5 ml, A, C, G, T με 2 μ l του αντίστοιχου termination mix. Για κάθε DNA προς αλληλούχιση ετοιμάστηκε master mix συνολικού όγκου 25 μ l που περιείχε 50-500 fmol του υποστρώματος, 10 pmol του ειδικού εκκινητή (IMio2), 5 μ l 5x sequencing buffer, 1 μ l dNTP mix, 1 μ l Taq DNA πολυμεράση (1 u/ μ l) και 1 μ l [α -³²P] dATP. Σε κάθε ένα από τα τέσσερα tubes πιπεταρίστηκαν 5 μ l master mix, θερμάνθηκαν για 2 min στους 94 °C και χρησιμοποιήθηκαν στο ακόλουθο θερμοκυκλικό πρόγραμμα: 95 °C για 30''

(αποδιάταξη), 55 °C για 36'' (υβριδοποίηση εκκινητών), 72 °C για 84 '' (επιμήκυνση), 25 επαναλήψεις.

Μετά το τέλος του προγράμματος, 3 μl stop solution προστίθενται σε κάθε αντίδραση. Τα δείγματα θερμαίνονται στους 85 °C για 2 min και 3 μl από κάθε δείγμα ηλεκτροφορούνται σε sequencing gel 6% (running buffer: 1x TBE, 40 W constant power). Το sequencing gel μεταφέρεται πάνω σε χαρτί Whatman, στεγνώνεται σε gel dryer και εκτίθεται σε φιλμ αυτοραδιογραφίας στους -80 °C.

ΥΛΙΚΑ

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Boehringer, New England Biolabs και Minotech. Τα υπόλοιπα χημικά και αντιδραστήρια έχουν παρασκευαστεί από τις εταιρείες Amersham, Sigma, Merck, Promega, Stratagene, Qiagen, Clontech, S&S. Ως βακτηριακό στέλεχος μετασχηματισμού χρησιμοποιήθηκε το *E.coli* DH5α.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Brezinsky, L., Wang, V. L. G., Humphreys, T. & Hunt, J. (1990). The transposable element *Uhu* from Hawaiian *Drosophila*-member of the widely dispersed class of *Tc1*-like transposons. *Nucleic Acids Research* **18**, 2053-2059.

Brierly, H. L. & Potter, S. S. (1985). Distinct characteristics of loop sequences of two *Drosophila* foldback transposable elements. *Nucleic Acids Research* **13**, 485-500.

Caizzi, R., Caggese, C. & Pimpineli, S. (1993). *Bari-1*, a New Transposon-Like Family in *Drosophila melanogaster* with a Unique Heterochromatic Organisation. *Genetics* **133**, 335-345.

Catterucia F, Nolan T, Blass C, Muller HM, Crisanti A, Kafatos FC, Loukeris TG (2000a). Toward *Anopheles* transformation: Minos element activity in anopheline cells and embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 2157-2162.

Catterucia F, Nolan T, Loukeris TG, Blass C, Savakis C, Kafatos FC, Crisanti A (2000b) Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nature* **405**: 959-962.

Coates, C. J., Jasinskiene, N., Miyashiro, L., James, A. A. (1998). *Mariner* transposition and transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95(7)**, 3748-3751.

Colloms, S. D., Van Luenen, H. G. M. & Plasterk, R. H. A. (1994). DNA binding activities of the *Caenorhabditis elegans* Tc3 transposase. *Nucl. Acids. Res.* **22**, 5548-5554.

Deutsch U, Dressler GR, Gruss P (1988) *Pax 1*, a member of a paired box homologous murine gene family, is expressed in segmented structures during development. *Cell* **53**: 617-625.

Emmons, S. W., Ysner, L., Ruan, K. S. & Katzenberg, D. (1983). Evidence for a Transposon in *Caenorhabditis elegans*. *Cell* **32**, 55-65.

Franz, G. & Savakis, C. (1991). *Minos* a new transposable element from *Drosophila hydei* is a member of the Tc1 like family of transposons. *Nucleic Acids Res.* **19**, 6646.

Franser MJ, Ciszczon T, Elick T, Bauser C (1996). Precise excision of TTAA-specific lepidopteran transposons *piggyBac* (IFP2) and *tagalong* (TFP3) from the baculovirus genome in cell lines from the two species of Lepidoptera. *Insect Mol Biol* **5**: 141-151.

Garza, D., Medhora, M., Koga, A. & Hartle, D. L. (1991). Introduction of the Transposable Element *mariner* into the Germline of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **128**, 303-310.

Gueiros-Filho, J. F. & Beverley, M. S. (1997). Trans-kingdom transposition of the *Drosophila* element *mariner* within the Protozoan *Leishmania*. *Science* **276**. 1716-1719.

Handler, A. M., McCombs, S. D., Fraser, M. J. & Saul, S. H. (1998). The lepidopteran transposon vector, *piggyBac*, mediates germ-line transformation in the Mediterranean fruit fly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**.7520-5

Harris, L. J., Baillie, D. L. & Rose, A. M. (1988). Sequence identity between an inverted repeat family of transposable elements in *Drosophila* and *Caenorhabditis*. **16**, 5991-5997.

Ivics, Z., Hackett, P. B., Plasterk, R. H. & Izsvak, Z. (1997). Molecular reconstruction of *Sleeping beauty*, a Tc1- like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell* **91**, 501-510.

Izsvak, Z., Ivics, Z. & Hackett, P. B.(1997). Repetitive elements and their applications in zebrafish. *Biochem.Cell. Biol.***75**, 507-523.

Jasinskiene, N., Coates, C. J., Benedict, M. Q, Cornel, A. J., Rafferty, C. S. & James, A. A., Collins, F. H . (1998). Stable transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, with the Hermes element from the housefly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**, 3743-3747.

Klinakis AG, Loykeris TG, Pavlopoylos A, Savakis C (2000a). Mobility assays confirm the broad host range activity of the *Minos* transposable element and validate new transformation tools. *Insect Mol Biol* **9**: 269-275.

Klinakis AG, Zagoraiou L, Vassilatis DK, Savakis C (2000b). Genome wide insertional mutagenesis in human cells by the *Drosophila* mobile element *Minos*. *EMBO Rep* **1**: 416-421.

Λασκαρώ Ζαγοραίου, Διδακτορική Διατριβή.

Lampe, D. J., Churchill, M. E. & Robertson, H. M. (1996). A purified *mariner* transposase is sufficient to mediate transposition *in vitro*. *The EMBO Journal.* **19**, 5470-5479.

Lidholm, D. A., Lohe, A. R., Hartl, D. L. (1993). The Transposable Element *mariner* Mediates Germline Transformation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **134**. 859-868.

Lohe, A. R., Hartl, D. L. (1996). Germline transformation of *Drosophila virilis* with the transposable element *mariner*. *Genetics* **143**. 365-374.

Loukeris, T. G., Arca, B., Livadaras, I., Dialektaki, G. & Savakis, C. (1995a). Introduction of the transposable element *Minos* into the germline of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 9485-9489.

Loukeris, T.G., Livadaras, I., Arca, B., Zabalou, S. & Savakis, C (1995b). Gene transfer into the Medfly, *Ceratitis capitata*, with a *Drosophila hydei* transposable element. *Science* **270**, 2002-2005.

Lozovskaya, E. R., Nurminsky, D. I., Hartl, D. L. & Sullivan, D. T . (1996). Germline Transformation of *Drosophila virilis* Mediated by the Transposable Element hobo. *Genetics* **142**.173-177.

Luo, G., Ivics, Z., Izsvak, Z. & Bradley, A. (1998). Chromosomal transposition of a *Tc1/ mariner*- like element in mouse embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**. 10769-10773.

Merriman, P. J., Grimes, C. D., Ambroziak, J., Hackett, D. A., Skinner, P. & Simmons, M. J. (1995). S elements: A family of *Tc1*- like Transposons in the Genome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **141**, 1425-1438.

Metaxakis A, unpublished data.

Rio, D. C., Laski, F. & Rubin, G. M. (1996). Identification and immunochemical analysis of biochemically active *Drosophila P* element transposase. *Cell* **44**, 21-32.

Rio, D. C. & Rubin, G. M. (1997). Identification and purification of a *Drosophila* protein that binds to the terminal 31-base pair inverted repeats of the P transposable element. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **85**, 8929-8933.

Robertson, H. M. & Lampe, D. J. (1995). Distribution of transposable elements in arthropods. *Ann.Rev.Ebtomol.* **40**, 333-357.

Rowold, D.J. & Herrera R.J. (2000). Alu elements and the human genome. *Genetica* **108** (1): 57-72.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory press.

Schouten, G. J., Van Luenen, H. G., Verra, N. C., Valerio , D., Plasterk, R.H. (1998). Transposon Tc1 of the nematode *Caenorabditis elegans* jumps in human cells. *Nucleic. Acids. Res.* **12**, 3013-3017.

Shimizu K, Kamba M, Sonobe T, Kanda T, Klinakis AG (2000). Extrachromosomal transposition of the transposable element *Minos* occurs in embryos of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Mol Biol* **9**: 277-281.

Spradling, A. C. & Rubin, G. M. (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* **218** , 341-347.

Spradling AC, Stern DM, Kiss I, Roote J, Lavery T (1995). Gene disruption using *P* transposable elements: an integral component of the *Drosophila* genome project. *Proc Natll Acad Sci USA* **92**: 10824-10830.

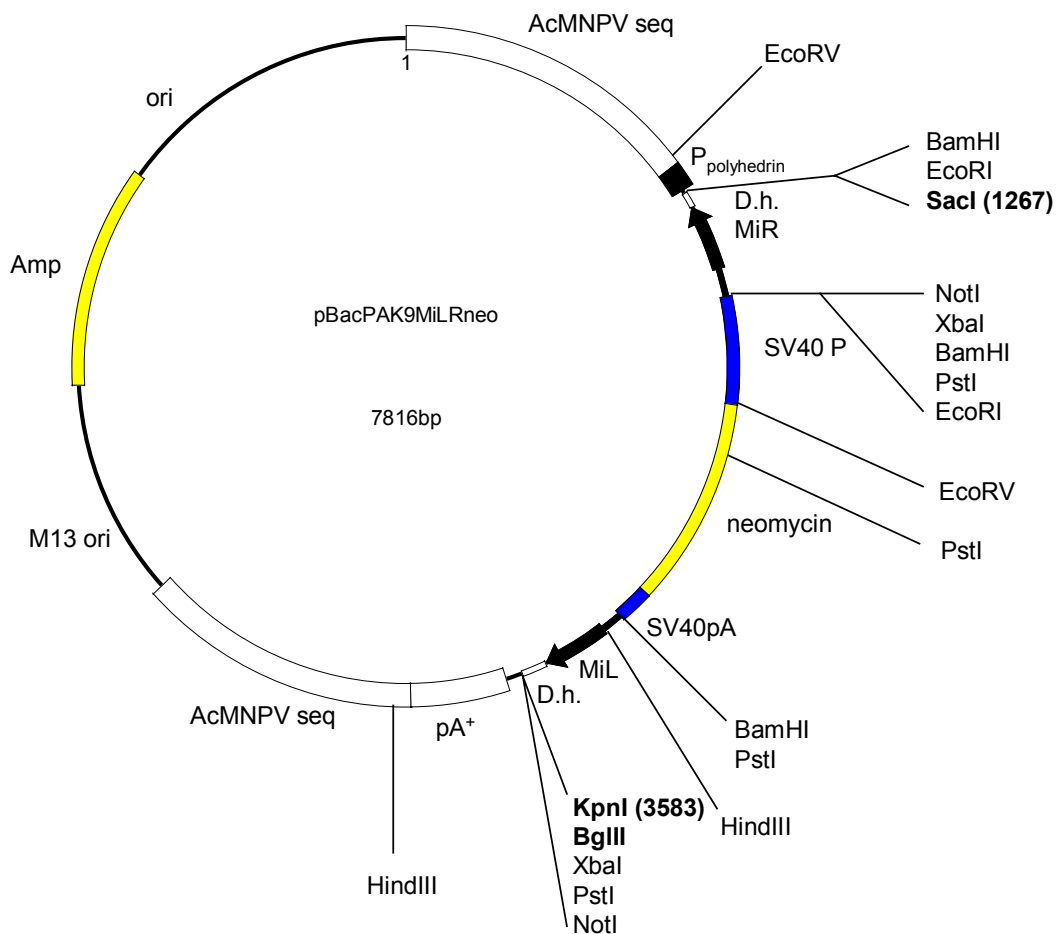
Treisman J, Harris E, Desplan C (1991). The paired box encodes a second DNA-binding domain in the *paired* homeodomain protein. *Genes Dev* **5**: 594-604.

Vos, J.C., Baere, I.,& Plasterk, R.H. (1996) Transposase is the only nematode protein required for *in vitro* transposition of Tc1. *Genes and Development* **10**, 755-761.

Wang HG & Fraser MJ (1993) TTAA serves as the target site for *TFP3* lepidopteran transposon insertions in both nuclear polyhedrosis virus and *Trichoplusia ni* genomes. *Insect Mol Biol* **1**: 109-116.

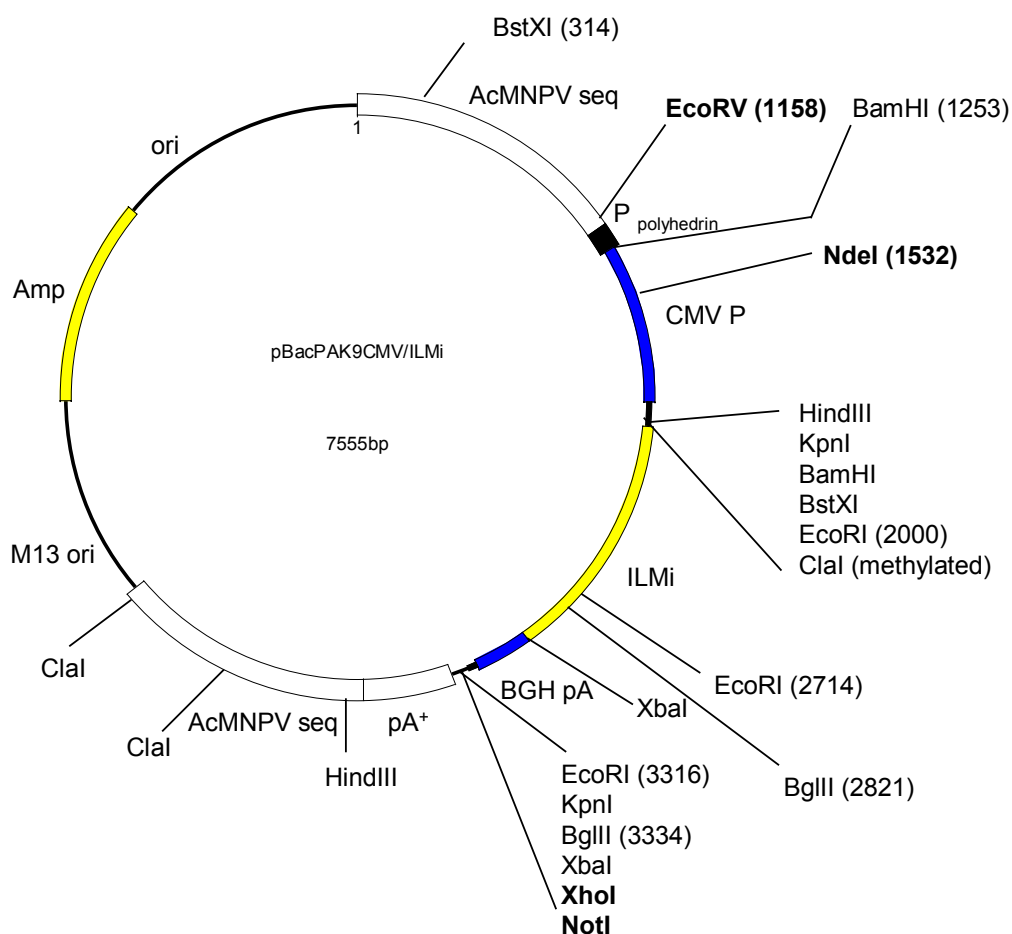
Zagoraiou L, Drabek D, Alexaki S, Guy JA, Klinakis AG, Langeveld A, Skavdis G, Mamalaki C, Grosveld F, Savakis C (2001). *In vivo* transposition of *Minos*, a *Drosophila* mobile element, in mammalian tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 11474-11478.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1



Το πλασμίδιο **pBacPAK9MiLRneo** προέκυψε με την υποκλωνοποίηση του μη αυτόνομου τρανσποζονίου MiLRneo (Klinakis *et al.*, 2000b) στον φορέα pBacPAK9 (Clontech). Ο συγκεκριμένος φορέας φέρει εκατέρωθεν της περιοχής κλωνοποίησης γονιδίων (MCS), αλληλουχίες οι οποίες ανασυνδιάζονται με γραμμοποιημένο ιό AcMPV σε κύτταρα του ξενιστή. Το τρανσποζόνιο περιβάλλεται από γενωμικές αλληλουχίες της *Drosophila hydei* (D.h. 98 bp και 59 bp για το αριστερό και το δεξί άκρο, αντίστοιχα). Το αριστερό άκρο του στοιχείου φέρει μαζί του 81 bp (gct...atg) της αλληλουχίας που παρεμβάλλεται μεταξύ αυτού και του κωδικόνιου έναρξης της τρανσποζάσης. Το δεξί άκρο φέρει 59 bp (gac....aca) όπου περιέχονται τα 6 τελευταία κωδικόνια και την 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή της τρανσποζάσης. Το τρανσποζόνιο υποκλωνοποιήθηκε ως θραύσμα με άκρα *SacI-KpnI* από το πλασμίδιο pMiLRneo στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pBacPAK9 (Clontech).

** Με έντονη γραφή παριστάνονται τα ένζυμα περιορισμού με μοναδική θέση αναγνώρισης. Η ύπαρξη και άλλων ενζύμων περιορισμού με μοναδική θέση αναγνώρισης στην παραπάνω κατασκευή δεν αποκλείεται.



Το πλασμίδιο **pBacPAK9CMV/ILMi** προέκυψε από την κλωνοποίηση της κασσέτας CMV-ILMi-BGHpA, στον φορέα pBacPAK9 (Clontech). Ο συγκεκριμένος φορέας φέρει εκατέρωθεν της περιοχής κλωνοποίησης γονιδίων (MCS), αλληλουχίες οι οποίες ανασυνδιάζονται με γραμμοποιημένο ιό AcMPV σε κύτταρα του ξενιστή. Η κωδική περιοχή της τρανσποζάσης υπό τον έλεγχο του υποκινητή του ιού CMV και του σήματος πολυαδενυλίωσης του γονιδίου bovine growth hormone (BGH pA) υποκλωνοποιήθηκε ως θραύσμα *NruI-PvuII* από το πλασμίδιο pCMV/ILMi στη θέση *SmaI* του φορέα pBacPAK9 (Clontech).

* Το πλασμίδιο pCMV/ILMi έχει προκύψει από την υποκλωνοποίηση της κωδικής περιοχής της τρανσποζάσης ως θραύσμα *Clal* blunted-*XbaI* στις θέσεις *EcoRV-XbaI* του φορέα pCDNA3 (Invitrogen).

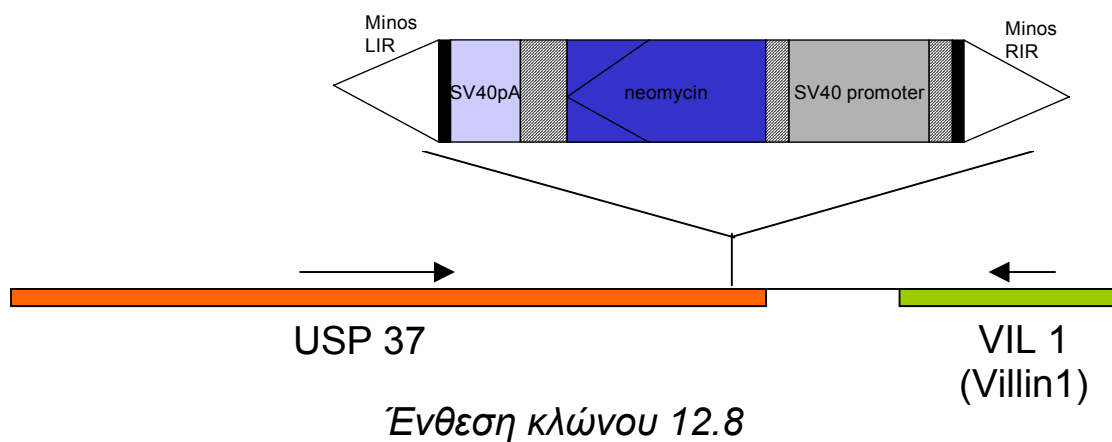
** Με έντονη γραφή παριστάνονται τα ένζυμα περιορισμού με μοναδική θέση αναγνώρισης. Η ύπαρξη και άλλων ενζύμων περιορισμού με μοναδική θέση αναγνώρισης στην παραπάνω κατασκευή δεν αποκλείεται.

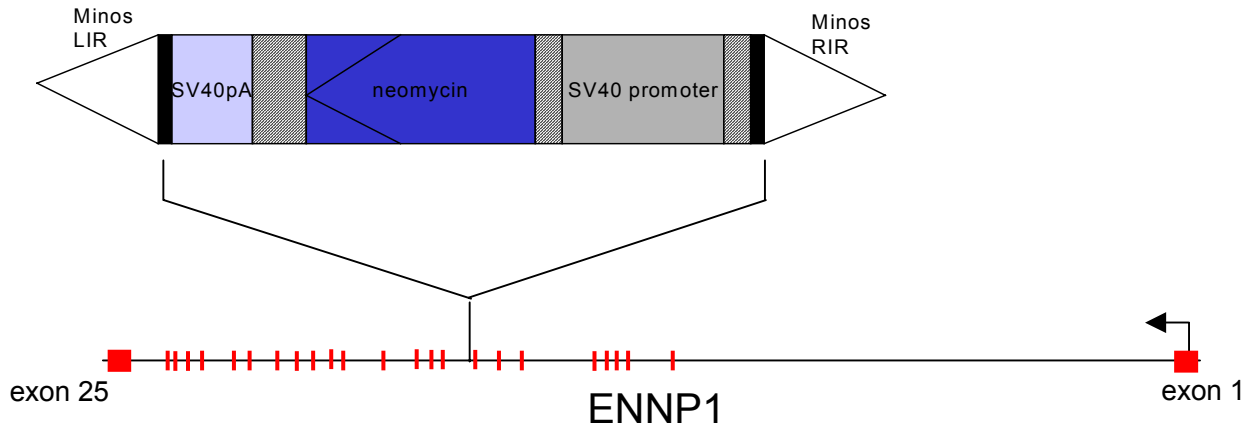
Σημείωση: περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τις παραπάνω πλασμιδιακές κατασκευές περιέχονται στη διδακτορική διατριβή της Ζαγοραίου, Λασκαρώς.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

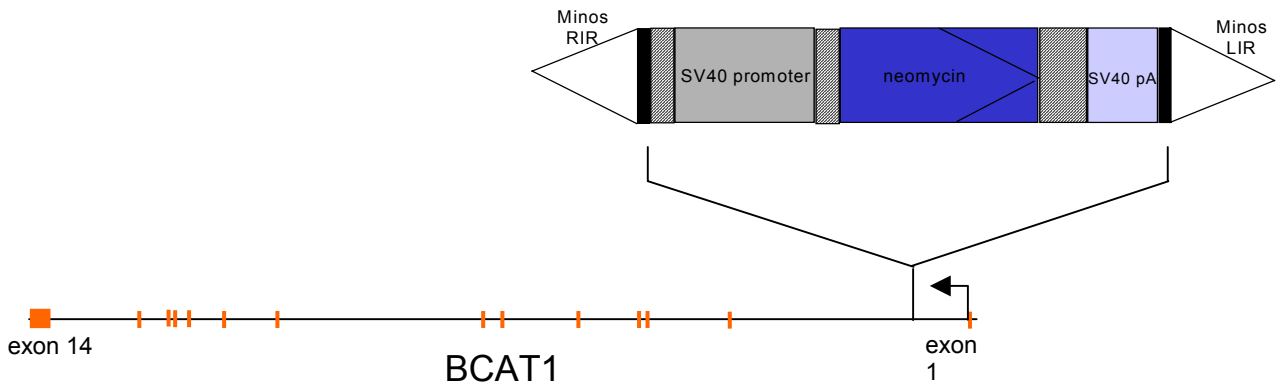
Γενωμική θέση ενθέσεων

Στα παρακάτω σχήματα δίνεται η θέση των ανακτημένων ενθέσεων που έχουν ενσωματωθεί μέσα σε γονίδια, σε σχέση με τη θέση των εξωνίων αλλά και την αρχή μεταγραφής (transcription start) του εκάστοτε γονιδίου. Για τις ενθέσεις των κλώνων 12.8 και 10 δίνεται η σχετική τους θέση μέσα στη γενωμική περιοχή που βρίσκονται, γιατί προσωρινά δεν υπάρχει πρόσβαση στα αντίστοιχα στοιχεία για τα γονίδια USP 37 και FLJ23473 στην τράπεζα δεδομένων.

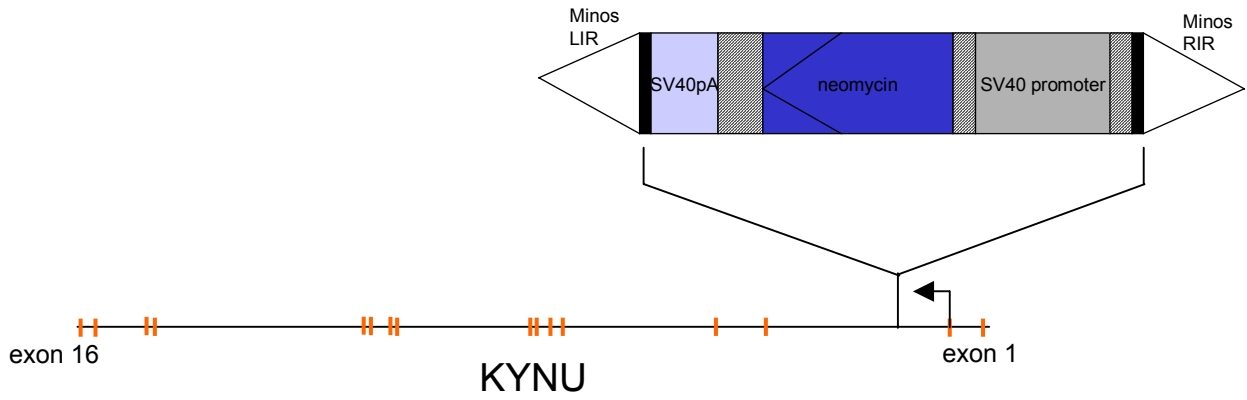




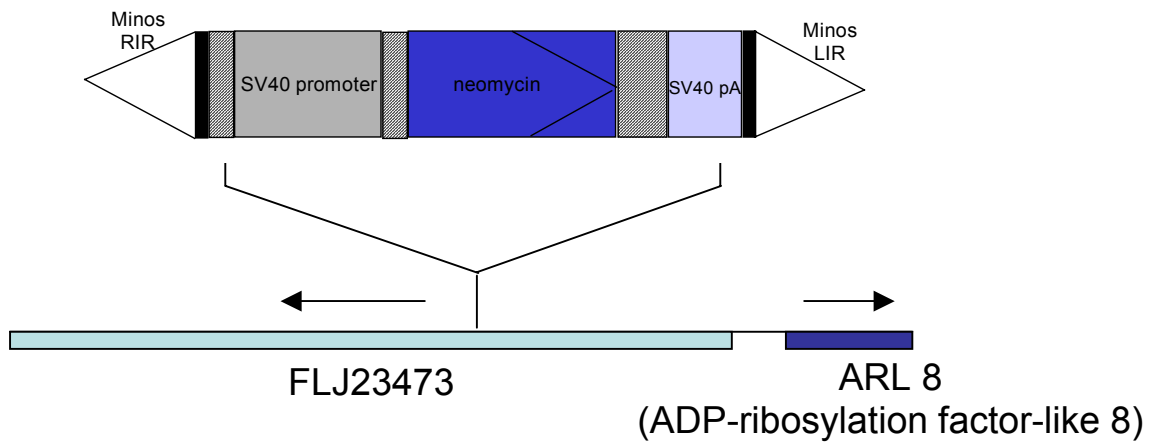
Ένθεση κλώνου 12.10



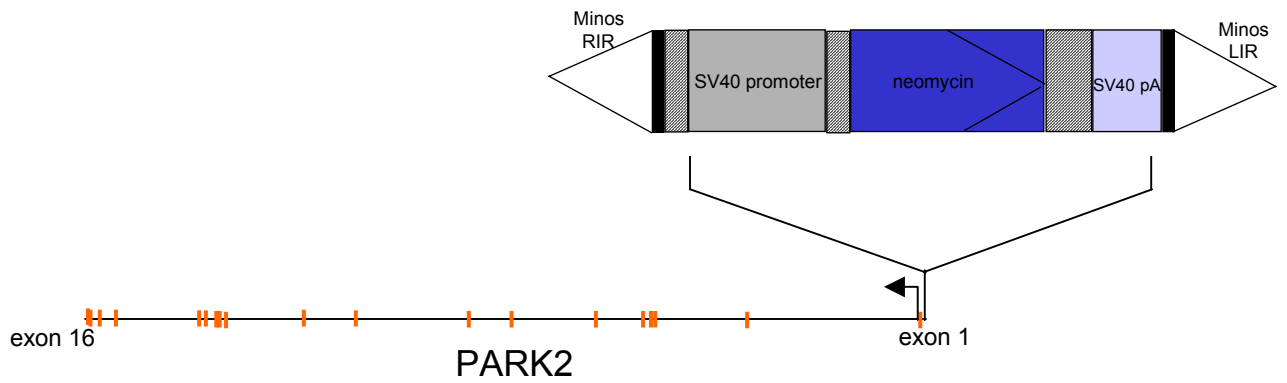
Ένθεση κλώνου 1



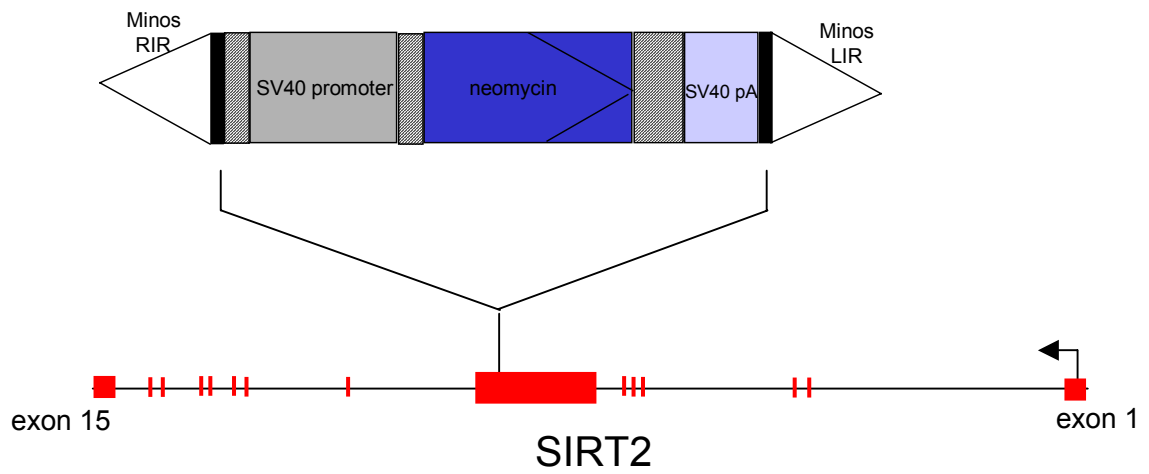
Ένθεση κλώνου small



Ένθεση κλώνου 10



Ένθεση κλώνου 11



Ένθεση κλώνου 8