

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ  
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗΣ

**Μελέτη της ενεργότητας του μεταθετού στοιχείου  
*Minos* σε κύτταρα θηλαστικών.**

Διατριβή μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης

Λασκαρώ Δ. Ζαγοραίου

Επιβλέπων καθηγητής:  
Χ. Σαββάκης

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 1999

**Στον Αποστόλη**

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Εντόμων του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας.

Φέρνοντας σε πέρας την εργασία αυτή, έχω την επιθυμία να ευχαριστήσω όλα τα άτομα που συνέβαλαν στην ολοκλήρωσή της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Χαράλαμπο Σαββάκη για την ανάθεση της εργασίας αυτής και για την εποικοδομητική συνεργασία. Επίσης ευχαριστώ τον Ερευνητή κ. Ιωάννη Ταλιανίδη για την πολύτιμη βοήθειά του κατά τη διάρκεια της εργασίας αυτής και το κ. Γεώργιο Βρέντζο για την προθυμία και συνέπεια με την οποία συνεργάστηκε μαζί μου.

Ιδιαίτερα δε, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στο συνάδελφό μου Απόστολο Κλινάκη για την ουσιαστική βοήθειά του στο ερευνητικό μέρος της εργασίας αυτής αλλά κυρίως για τη συμπαράστασή του όλο αυτόν το χρόνο.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα παιδιά της ομάδας των εντόμων για τη βοήθειά τους, την κατανόηση που έδειξαν όλο αυτό το διάστημα και πάνω απ'όλα για το όμορφο κλίμα το οποίο δημιουργούν.

Λασκαρώ Ζαγοραίου

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η ενεργότητα του μεταθετού στοιχείου *Minos* σε κύτταρα HeLa. Πραγματοποιήθηκαν διαμολύνσεις με δύο πλασμίδια δότες που έφεραν διαφορετικού μεγέθους μεταθέματα (2kb και 8.2kb), απουσία και παρουσία πηγής τρανσποζάσης, για να ελεγχθεί η επίδραση του μεγέθους του μεταθέματος στη συχνότητα των ενθέσεων (transposase mediated insertions). Βρέθηκε ότι με τη χρήση του μεγάλου μεταθέματος μειώνεται δραστικά η συχνότητα αυτή. Επίσης ελέγχθηκε η αναλογία συγκέντρωσης πλασμιδίου δότη και βοηθού που οδηγεί σε μέγιστο αριθμό σταθερά μετασχηματισμένων μέσω τρανσποζάσης κλώνων. Τέλος δημιουργήθηκαν σταθερά μετασχηματισμένοι κλώνοι κυττάρων HeLa, με κατάλληλο μετάθεμα, έτσι ώστε στο μέλλον να ελεγχθεί η κινητοποίηση ενός *Minos* μεταθέματος μέσα στο γένωμα των κυττάρων αυτών.

## SUMMARY

Here we report a study of the activity of *Minos* transposable element in the HeLa cells. Transfection experiments with two donor plasmids carrying different in size transposons (2 kb and 8.2 kb) were performed in order to determine the effect of the transposon size to the efficiency of the transposase-mediated integrations into the genome. The efficiency was found to drastically decrease when the 8.2 kb transposon was used. The ratio of transposase vs transposon that leads to the highest number of transposase-mediated integrations was also determined. Stably transformed clones were created such as remobilization of the transposon to be assayable, in order to assess the property of *Minos* to transpose to a new position in the genome.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### Μεταθετά στοιχεία

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

Με κριτήριο τη δομή και το μηχανισμό μετάθεσης τα μεταθετά στοιχεία που απαντώνται στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς κατατάσσονται σε 4 κύριες κατηγορίες.

Τα μεταθετά στοιχεία τύπου ρετροϊού και τα ρετρομεταθετά στοιχεία αποτελούν το υποσύνολο των μεταθετών στοιχείων τύπου I. 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. Μεταθετά στοιχεία και των δύο κατηγοριών περιέχουν κωδική περιοχή η οποία παρουσιάζει ομολογία με την αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase) των ρετροϊών.

Τα αναδιπλούμενα μεταθετά στοιχεία (foldback transposons) 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.

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 τάξης II.

### **Μεταθετά με αντεστραμμένα άκρα**

Η υπερ-οικογένεια περιλαμβάνει μερικά από τα πιο γνωστά μεταθετά στοιχεία που έχουν βρεθεί στα έντομα και άλλα ασπόνδυλα καθώς και σε σπονδυλωτά.

Το μεταθετό στοιχείο *P*, το οποίο βρέθηκε να ενδημεί στο γένωμα της *Drosophila melanogaster* είναι το πρώτο μεταθετό στοιχείο που χαρακτηρίστηκε και χρησιμοποιήθηκε σαν εργαλείο σε πειράματα γενετικού μετασχηματισμού στα έντομα και συγκεκριμένα στη *Drosophila melanogaster* (Spradling and Rubin 1982). Το πλήρες στοιχείο έχει μήκος 2907 bp και ορίζεται από τέλεια αντεσταμμένα άκρα 31 bp. Η περιοχή μεταξύ των άκρων περιέχει τέσσερα αναγνωστικά πλαίσια, που διαχωρίζονται από ιντρόνια, και κωδικοποιούν την πρωτεΐνη μετάθεσης, την τρανσποζάση. Με εναλλακτικό μάτισμα (splicing) που πραγματοποιείται σε σωματικά κύτταρα αφαιρούνται τα δύο από τα τρία ιντρόνια και προκύπτει μια πρωτεΐνη μεγέθους 66 kD, η οποία δεν μπορεί να καταλύσει μετάθεση (Laski et al., 1986; Siebel et al., 1990). Η απομάκρυνση των τριών ιντρονίων, που πραγματοποιείται στα κύτταρα της γαμετικής σειράς, οδηγεί στην παραγωγή της τρανσποζάσης *P* μεγέθους 87 kD (Laski et al., 1986; Rio et al., 1986). Δύο λειτουργίες έχουν αποδοθεί στην τρανσποζάση *P*: α) η πρόσδεσή της στη μήκους 10 bp περιοχή που βρίσκεται στο 5' άκρο του στοιχείου και επικαλύπτεται με τον υποκινητή του γονιδίου της τρανσποζάσης η οποία οδηγεί στην καταστολή της έκφρασης του (Kaufman and Rio, 1991) και β) η πρόσδεση αυτή σε συνδυασμό με επιπλέον πρόσδεση στην περιοχή του άκρου καταλύει τουλάχιστον το πρώτο βήμα της διαδικασίας μετάθεσης, την εκτομή (Beall and Rio 1996). 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 και είναι η πρωτεΐνη IRBP (inverted repeat binding protein) (Rio and Rubin 1987).

### **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 στοιχεία της υπερ-οικογένειας (ενεργά ή μη) είναι πολύ διαδεδομένα στη φύση, από μονοκύτταρους οργανισμούς μέχρι και τον άνθρωπο. Χαρακτηριστικό των μεταθετών αυτών είναι ότι εντίθενται πάντοτε σε δινοκλεοτίδιο TA το οποίο διπλασιάζεται μετά την ένθεση.

Το πιο μελετημένο στοιχείο της οικογένειας *mariner* είναι το *Mos 1* της *D.melanogaster* (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), το *Minos* από τη *D.hydei* (Franz and Savakis, 1991).

Μεταθετά της υπερ-οικογένειας έχουν βρεθεί και σε σπονδυλωτά και συγκεκριμένα στα ψάρια. Πρόκειται για τα *IpTc1* και *Tes-1* που βρέθηκαν στα *Ictalurus punctatus* και *Eptatretus strouti* αντίστοιχα. Κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τον οργανισμό από τον οποίον προέρχονται. Αυτές είναι: τύπου zebrafish, τύπου σαλμονίδων και τύπου Xenopus TXr (Izsvak et al., 1997). Σημαντική είναι η περίπτωση του μεταθετού *Sleeping beauty* το οποίο προήλθε από in vitro ανασύσταση από δύο ανενεργά στοιχεία του *Salmo salar* καθώς κι ένα επίσης ανενεργό στοιχείο από το *Oncorhynchus mykiss* (Ivics et al., 1997).

Τέλος στα μεταθετά στοιχεία τύπου II ανήκει και το *piggyBac* το οποίο βρέθηκε ως ένθεση στο γενετικό υλικό ιού που παρασιτεί σε κύτταρα λεπιδοπτερών (baculovirus). 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.

### **Το μεταθετό στοιχείο *Minos***

Το μεταθετό στοιχείο *Minos* απομονώθηκε ως ένθεση στο γενετικό τόπο του ριβοσωμικού RNA του στελέχους bb<sup>1</sup> της *Drosophila hydei* (Franz and Savakis, 1991). Στη συνέχεια βρέθηκαν άλλες τρεις ενθέσεις του *Minos* στο στέλεχος αυτό. Το στοιχείο *Minos* που χρησιμοποιήθηκε είναι ένα υβρίδιο των αντιτύπων *Minos*- 1 και *Minos*- 4. Το στοιχείο αυτό έχει μήκος 1777 νουκλεοτιδίων και ορίζεται από δύο αντεστραμμένα άκρα (inverted repeats) μήκους 255 νουκλεοτιδίων. Σε κάθε άκρο υπάρχει εις διπλούν 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. Μεταξύ των άκρων του *Minos* περιέχεται η κωδική περιοχή της τρανσποζάσης. Αποτελείται από δύο εξόνια και το παρεμβαλλόμενο σε αυτά ιντρόνιο μήκους 60 νουκλεοτιδίων. Η τρανσποζάση του *Minos* αποτελείται από 341 αμινοξέα, αριθμός πολύ κοντά στο μέσο όρο του μεγέθους των τρανσποζασών της οικογένειας *Tc* 1 (340 αμινοξέα). Η αμινοτελική περιοχή της τρανσποζάσης παρουσιάζει 18% ταυτότητα με την περιοχή *paired box* της πρωτεΐνης *paired* της *D. melanogaster*. Η αλληλουχία αυτή απαντάται σε πρωτεΐνες που έχουν την ιδιότητα πρόσδεσης στο DNA. Για την τρανσποζάση του *Minos* τέτοια ιδιότητα της περιοχής αυτής δεν έχει επιβεβαιωθεί. Αντιθέτως αντίστοιχες περιοχές των τρανσποζασών *Tc1A* και *Tc3* έχει δειχθεί ότι προσδένονται στο DNA (Colloms et al., 1994, Vos et al., 1994).



## Τα μεταθετά στοιχεία ως εργαλεία για το μετασχηματισμό εντόμων

Τα μεταθετά στοιχεία έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί ως φορείς γενετικού μετασχηματισμού των εντόμων. Σε ένα τυπικό πείραμα μετασχηματισμού χρειάζονται τα εξής:

- Ένα στέλεχος στο οποίο να μην ενδημεί το μεταθετό στοιχείο που θα χρησιμοποιηθεί ή συγγενή αυτού και να είναι μεταλλαγμένο για τα γονίδια-μάρτυρες που θα χρησιμοποιηθούν.
- Ένα πλασμίδιο το οποίο να φέρει το γονίδιο της τρανσποζάσης του στοιχείου με το οποίο θα γίνει ο μετασχηματισμός, υπό τον έλεγχο κατάλληλου υποκινητή (πλασμίδιο βοηθός).
- Ένα πλασμίδιο που να φέρει τα άκρα του μεταθετού ενώ το γονίδιο της τρανσποζάσης να έχει αντικατασταθεί από γονίδιο-μάρτυρα (πλασμίδιο δότης). Το τροποποιημένο μεταθετό ονομάζεται μετάθεμα.
- Κατάλληλα γονίδια μάρτυρες. Τα γονίδια αυτά ενσωματώνονται στο μετάθεμα προκειμένου να παρακολουθήσουμε φαινοτυπικά την ενσωμάτωσή του στο γονιδίωμα.

Η παραπάνω προσέγγιση χρησιμοποιήθηκε αρχικά για το μεταθετό στοιχείο *P* και το γενετικό μετασχηματισμό της *D. melanogaster* (Spradling and Rubin, 1982). Το στοιχείο *P* παρουσίασε αδυναμία κινητοποίησης εκτός της Δροσόφιλας, ενώ 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* επίσης (Losovskaya et al., 1996), ενώ πιο πρόσφατα το *Hermes* από τη *Musca domestica* και το *mariner* χρησιμοποιήθηκαν 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 έχει βρεθεί να είναι 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).

### **Χρήσεις των μεταθετών στοιχείων εκτός των εντόμων**

Σε αντίθεση με το μεταθετό στοιχείο *P*, μεταθετά της υπερ-οικογένειας *mariner*/ *Tc1* παρουσίασαν ενεργότητα και σε άλλα έντομα εκτός του ξενιστή τους. Είναι φανερό, λοιπόν, ότι για την ενεργότητα των στοιχείων αυτών, δεν είναι απαραίτητοι ειδικοί παράγοντες του ξενιστή. Πολλά από τα στοιχεία αυτά ελέγχθηκαν σε ετερόλογα συστήματα. 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), το *Tc1* στην κυτταρική σειρά 911 (ανθρώπινα κύτταρα) (Schouten et al., 1998) και το *Minos* σε κύτταρα HeLa (Κλινάκης, Διδακτορική διατριβή). Τέλος ανασυνδιασμένες *Tc1* και *mariner* τρανσποζάσες, εκφρασμένες στην *E. coli*, είναι ικανές να καταλύσουν μετάθεση *in vitro* (Lampe et al., 1996, Vos et al., 1996).

Η ενεργότητα καποιών μεταθετών στοιχείων σε κύτταρα θηλαστικών παρέχει τις εξής προοπτικές:

- Χρησιμοποίησή τους ως φορείς για γονιδιακή θεραπεία (gene therapy). Οι φορείς που χρησιμοποιούνται τώρα είτε δεν είναι αποτελεσματικοί σε μη διαιρούμενα κύτταρα (π.χ. ρετροϊοί) είτε δεν ενσωματώνουν DNA στο γένωμα των κυττάρων στόχων (π.χ. αδενοϊοί).
- Χρησιμοποίησή τους σε πειράματα “παγίδευσης” γονιδίων ή ενισχυτών (gene trapping, enhancer trapping). Έχει δειχθεί (Κλινάκης, Α., Διδακτορική διατριβή) ότι με τη χρήση μεταθεμάτων τα οποία φέρουν κασσέτες gene trap επιτυγχάνεται αυξημένη η συχνότητα παγίδευσης γονιδίων, σε σχέση με τεχνικές στις οποίες χρησιμοποιείται μη ομόλογος ανασυνδιασμός.
- Χρησιμοποίησή τους για μεταλλαξιγένεση μέσω ενθέσεων (transposon tagged mutagenesis).

## ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ναδειχθεί ότι η τρσνσποζάση του μεταθετού στοιχείου Minos μπορεί να αναγνωρίσει ένα μετάθεμα Minos (transposon) ενσωματωμένο στο γονιδίωμα των κυττάρων HeLa και να το μεταθέσει σε νέα θέση (Μέρος I).

Επίσης ο δεύτερος σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να βρεθεί η αναλογία μορίων πλασμιδίου δότη και βοηθού που σε διαμόλυνση HeLa κυττάρων δίνει μέγιστο αριθμό μετασχηματισμένων μέσω τρσνσποζάσης κλώνων (Μέρος II).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### ΜΕΡΟΣ Ι

Για να δειχθεί η μετάθεση ενός μεταθέματος Minos μέσα στο γονιδίωμα των κυττάρων HeLa κατασκευάστηκε ένα πλασμίδιο (pMiβgeoSV40 puco) που φέρει ένα μετάθεμα με δύο γονίδια μάρτυρες (Παράρτημα, χάρτης 1). Το πλασμίδιο αυτό, μεταξύ των άκρων (inverted repeats) φέρει έναν αυτόνομο μάρτυρα, το γονίδιο της ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη, υπό τον έλεγχο του υποκινητή SV40 και μία κασσέτα gene trap (geo, Skarnes et al., 1992). Το geo είναι ένα προϊόν σύντηξης του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης (lacZ) και του γονιδίου της ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη (neo). Στερείται κωδικονίου έναρξης της μετάφρασης αλλά φέρει μπροστά από το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης, στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο, μέρος του δευτέρου εξονίου και το πρώτο ιντρόνιο (μαζί με το αντίστοιχο splice acceptor site) από το γονίδιο engrailed 2 του ποντικού. Ένθεση του MiβgeoSV40 puco σε ιντρόνιο γονιδίου με φορά ομόρροπη προς αυτήν της μεταγραφής μπορεί να οδηγήσει σε έκφραση του geo, αν γίνει μάτισμα (splicing) μέσω του splice donor site του ενδογενούς γονιδίου και του splice acceptor site του geo, στο σωστό αναγνωστικό πλαίσιο. Αντίθετα το γονίδιο της ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη ελέγχεται από τον υποκινητή SV40 κι έτσι η έκφρασή του είναι αυτόνομη. Ως πηγή τρανσποζάσης στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο EF1/ ILMi (Κλινάκης Α. Διδακτορική διατριβή), το οποίο φέρει το άνευ ιντρονίου γονίδιο της τρανσποζάσης υπό τον έλεγχο του υποκινητή EF1 (πλασμίδιο βοηθός) (Παράρτημα, χάρτης 2).

Το πειραματικό σχήμα για να δειχθεί η κινητοποίηση ενός μεταθέματος στο γονιδίωμα των HeLa κυττάρων ήταν το εξής: Αρχικά ήταν αναγκαία η δημιουργία κυτταρικών κλώνων που να φέρουν μία ακριβή ένθεση του μεταθέματος (transposase mediated). Το γονίδιο της ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη χρησιμοποιήθηκε για την επιλογή των κλώνων αυτών. Στη συνέχεια όσοι από αυτούς θα έφεραν μοναδιαία ένθεση θα διαμολύνονταν με το πλασμίδιο EF1/ ILMi . Επιλογή με το ανάλογο της νεομυκίνης G418 θα οδηγούσε σε κλώνους στους οποίους το μετάθεμα βρίσκεται σε νέα θέση κι έχει “παγιδεύσει” κάποιο γονίδιο. Προϋπόθεση γι αυτό είναι οι αρχικοί ,

ανθεκτικοί στην πουρομυκίνη κλώνοι, να μην είναι ανθεκτικοί σε G418, όπως αναμένεται δεδομένου ότι το *geo* δεν διαθέτει ούτε υποκινητή ούτε κατάλληλο κωδικό έναρξης.

Πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση κυττάρων HeLa με το πλασμίδιο δότη *pMibgeoSV40puro* (16  $\mu$ g/ 60mm τρυβλίο) και το πλασμίδιο βοηθό *EF1/ ILMi* (2 $\mu$ g/ 60mm τρυβλίο) καθώς και μια διαμόλυνση ελέγχου, μόνο με το πλασμίδιο δότη (16  $\mu$ g/ 60mm τρυβλίο). Οι ανθεκτικές στην πουρομυκίνη αποικίες που προέκυψαν από την πρώτη διαμόλυνση ήταν 94 ενώ από τη διαμόλυνση ελέγχου 12. Παρουσία τρανσποζάσης ο αριθμός των μετασχηματισμένων αποικιών αυξάνεται 7.8 φορές. Ο αριθμός των ενθέσεων ανά κλώνο προσδιορίστηκε με ανάλυση κατά Southern χρησιμοποιώντας τη διαγνωστική πέψη με *EcoRV*, η οποία κόβει μία φορά το μετάθεμα και συγκεκριμένα στην αλληλουχία *lacZ*. Όπως φαίνεται στην εικόνα 1, χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή την περιοχή *lacZ* ανιχνεύονται 2 ζώνες ανά ένθεση.

Από τους 11 κλώνους που αναλύθηκαν κατ'αυτόν τον τρόπο οι 6 φαίνεται να περιέχουν δύο ενθέσεις, οι 4 μία ένθεση και ένας από αυτούς εμφάνισε smear.

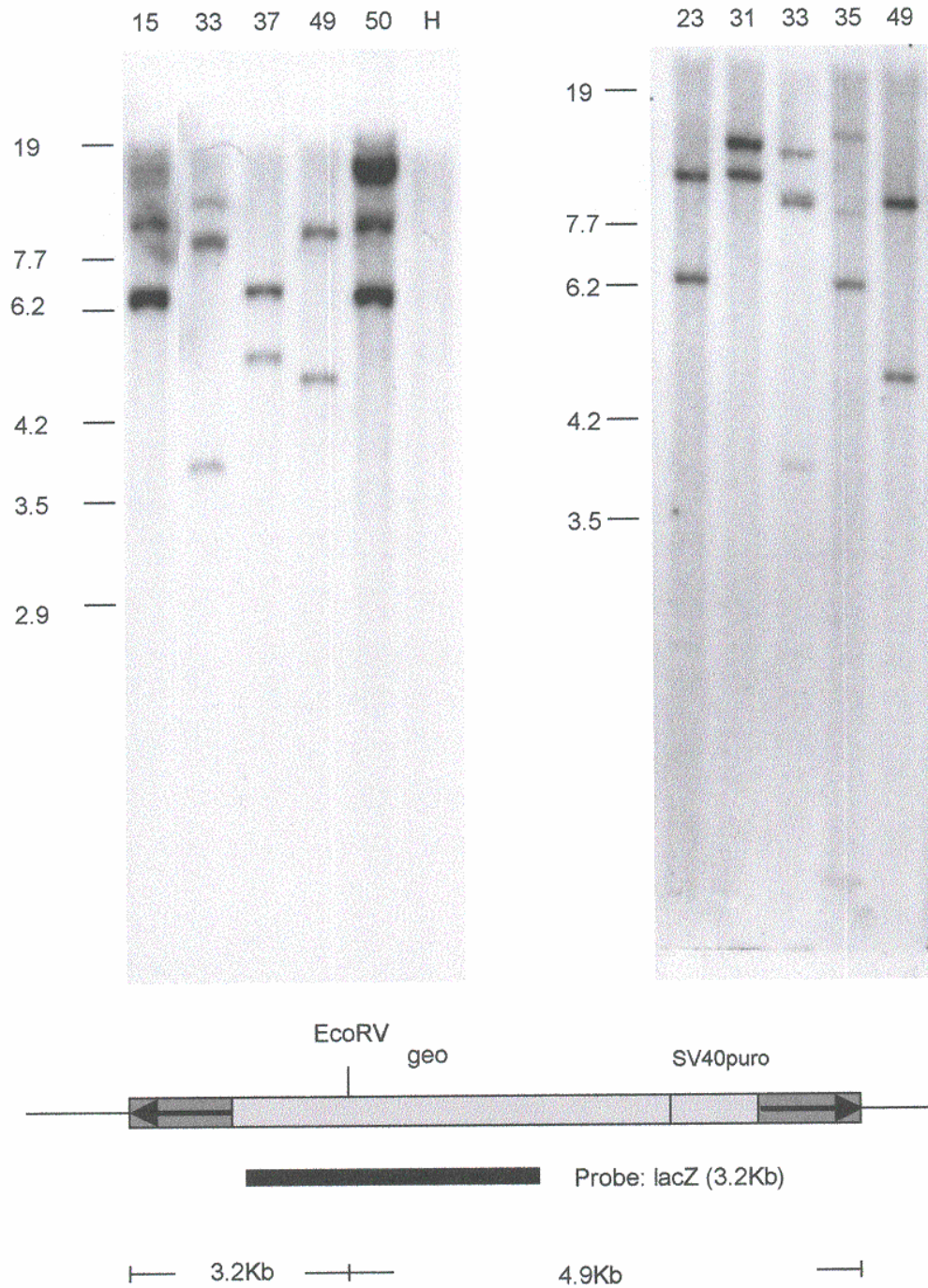
Οι δέκα κλώνοι από τους παραπάνω (15, 23, 31, 32, 33, 38, 35, 37, 49, 50) ελέγχθηκαν για ανθεκτικότητα σε G418 και βρέθηκε ότι όλοι είναι ανθεκτικοί. Ακόμα και με την αύξηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου έως 900 $\mu$ g/ ml παρέμεναν ανθεκτικοί. Κανένας, όμως, από αυτούς δεν έδινε χρώση με X-gal.

Το αποτέλεσμα αυτό δεν ήταν αναμενόμενο, για τους εξής λόγους: Στατιστικά η πιθανότητα όλες οι ενθέσεις να οδηγούν και σε “παγίδευση” γονιδίων είναι μηδέν διότι για να οδηγήσει μία ένθεση σε “παγίδευση” γονιδίου θα πρέπει να πληρεί κάποιες προϋποθέσεις (να έχει συμβεί σε ιντρόνιο, να έχει το σωστό προσανατολισμό κ.α.). Επίσης σύμφωνα με προηγούμενες παρατηρήσεις το 50% περίπου των περιπτώσεων “παγίδευσης” γονιδίων (neo positive) δίνει χρώση με Xgal (Skarnes WC, et al. 1992, Κλινάκης Α. Διδακτορική διατριβή), ανάλογα με την ισχύ του υποκινητή του “παγιδευμένου” γονιδίου. Άρα η ανθεκτικότητα στο G418 οφείλεται σε άλλους λόγους και όχι σε “παγίδευση” γονιδίων.

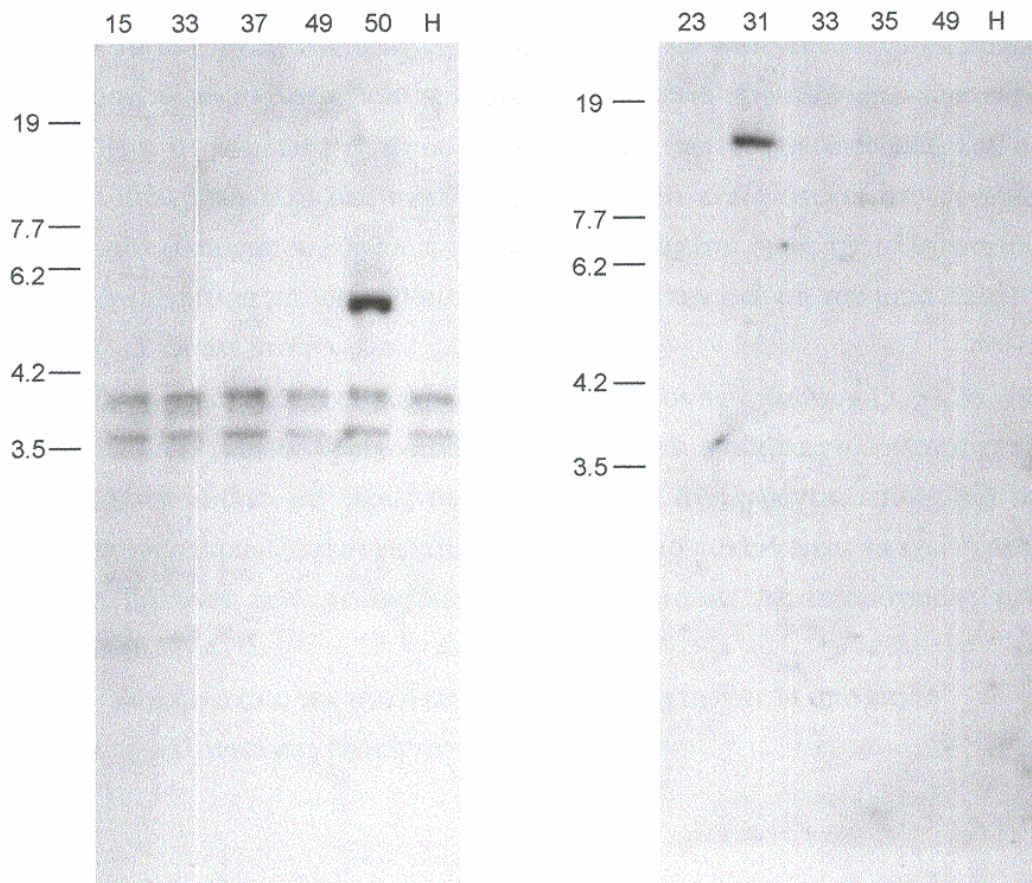
Επιπλέον ανάλυση κατά Southern με ανιχνευτή πλασμιδιακές αλληλουχίες σε 8 από τους παραπάνω κλώνους έδειξε πλασμιδιακές αλληλουχίες στους κλώνους 31, 35 και 50 (Εικόνα 2). Στους κλώνους 31 και 35 οι ζώνες οι οποίες υβριδοποιούνται με ανιχνευτή πλασμιδιακές αλληλουχίες υβριδοποιούνται και με lacZ. Άρα η ένθεση στον κλώνο 31 και μία από τις δύο ενθέσεις στον κλώνο 35 είναι τυχαίες και δεν έχουν προέλθει από τη δράση της τρανσποζάσης (Το μετάθεμα στερείται πλασμιδιακών αλληλουχιών). Στον κλώνο 50 οι ζώνες οι οποίες υβριδοποιούνται με ανιχνευτή πλασμιδιακές αλληλουχίες δεν αντιστοιχούν σε καμία από τις ζώνες που υβριδοποιούνται με lacZ. Έτσι στον κλώνο αυτό οι ενθέσεις είναι transposase mediated και οι πλασμιδιακές αλληλουχίες οφείλονται σε τυχαία ενσωμάτωση στο γένωμα μέρους του πλασμιδίου βοηθού ή του δότη που στερείται όμως της αλληλουχίας lacZ. Εναλλακτικά μπορεί ο άδειος φορέας, μετά την εκτομή του μεταθέματος να ενσωματώθηκε στο γένωμα.

Στην εικόνα 2 και συγκεκριμένα στην ανάλυση των κλώνων 15, 33, 37, 49, 50, φαίνεται η υβριδοποίηση κάποιων ζωνών με πλασμιδιακές αλληλουχίες, οι οποίες είναι κοινές για όλους τους κλώνους και ανιχνεύονται επίσης και σε DNA από κύτταρα μη μετασχηματισμένα (H). Το πιο πιθανό είναι να έχει συμβεί κάποια μόλυνση από πλασμίδιο στα αρχικά στάδια της απομόνωσης του γενωμικού DNA.

Συνολικά από την ανάλυση αυτή συμπαιρένεται ότι 14 από τις 16 ενθέσεις οφείλονται στη δράση της τρανσποζάσης.



**Εικόνα 1:** Υβριδοποίηση κατά Southern για την εύρεση του αριθμού των ενθέσεων που φέρει κάθε κλώνος μετασχηματισμένων κυττάρων. Ανιχνευτής: *lacZ*. Πέψη του γενωμικού DNA με *EcoRV*. Με το συγκεκριμένο ανιχνευτή και τη συγκεκριμένη διαγνωστική πέψη κάθε ένθεση εμφανίζεται ως δύο ζώνες.



**Εικόνα 2:** Υβριδοποίηση κατά Southern για την ανίχνευση πλασμιδιακών αλληλουχιών στους μετασηματισμένους κλώνους κυττάρων HeLa. Ανιχνευτής: πλασμιδιακές αλληλουχίες του pBluescript. Διαγνωστική πέψη με EcoRV.



## ΜΕΡΟΣ II

Το δεύτερο μέρος αυτής της εργασίας είχε ως σκοπό να βρεθεί η αναλογία μορίων μεταθέματος και πλασμιδίου βοηθού που σε διαμόλυνση κυττάρων HeLa δίνει μέγιστο αριθμό μετασχηματισμένων μέσω τρανσποζάσης κλώνων.

Για την δημιουργία μετασχηματισμένων HeLa κλώνων στο εργαστήριο είχαν χρησιμοποιηθεί τα πλασμίδια pMLRneo (Παράρτημα, χάρτης 3) και pMiβgeo (Παράρτημα, χάρτης 4) (Κλινάκης Α. Διδακτορική διατριβή). Συγκεκριμένα το τελευταίο χρησιμοποιήθηκε για πειράματα “παγίδευσης” γονιδίων.

Ο αριθμός των μετασχηματισμένων αποικιών που προκύπτουν από διαμόλυνση κυττάρων με πλασμίδιο δότη (pMLRneo) και πλασμίδιο βοηθό (EF1/ ILMi) είναι μέχρι και 16 φορές υψηλότερος από τον αριθμό των αποικιών που προκύπτουν από διαμόλυνση μόνο με το πλασμίδιο δότη. Οι

συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνταν σε αυτά τα πειράματα ήταν 8μg ρMLRneo και 2μg EF1/ ILMi (Κλινάκης Α. Διδακτορική διατριβή).

Στα πειράματα “παγίδευσης” γονιδίων και με τη χρησιμοποίηση 8μg ρMiβgeo και 2μg EF1/ ILMi , ο αριθμός των μετασχηματισμένων κλώνων ήταν μέχρι και 10 φορές υψηλότερος με την παρουσία πηγής τρανσποζάσης (πλασμιδίου βοηθού) κατά τη διαμόλυνση (Κλινάκης Α. Διδακτορική διατριβή).

Για να εξακριβωθεί ποιά είναι η αναλογία συγκέντρωσης των δύο πλασμιδίων που οδηγεί σε καλύτερα αποτελέσματα πραγματοποιήθηκε το παρακάτω πείραμα.

Αρχικά κατασκευάστηκε το πλασμίδιο ρMLRpuro (Παράρτημα, χάρτης 5), το οποίο φέρει το γονίδιο της ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη ως μάρτυρα μεταξύ των άκρων του *Minos* (μετάθεμα μεγέθους 2kb). Για τον υπολογισμό του ποσοστού των κυττάρων που έλαβαν DNA κατά τη διαμόλυνση, χρησιμοποιήθηκε η GFP που παρέχεται από το πλασμίδιο ρQBI25Δneo (Παράρτημα, χάρτης 6).

Πραγματοποιήθηκε μία σειρά διαμολύνσεων με διαφορετική αναλογία μορίων ρMLRpuro και EF1/ ILMi καθώς και αντίστοιχες διαμολύνσεις ελέγχου (χωρίς EF1/ ILMi). Στις τελευταίες προστέθηκε άδειος φορέας EF1 (Παράρτημα, χάρτης 7).

Οι διαμολύνσεις που έγιναν, ο αριθμός των ανθεκτικών στην πουρομυκίνη αποικιών καθώς και το ποσοστό των κυττάρων που έλαβαν DNA κατά τη διαμόλυνση φαίνονται στον πίνακα I. Επίσης στη στήλη **A** φαίνεται το ποσοστό των GFP+ κυττάρων τα οποία έδωσαν σταθερό μετασχηματισμό και στη στήλη **B** ο λόγος του αριθμού των μετασχηματισμένων κλώνων παρουσία και απουσία πηγής τρανσποζάσης.

## ΠΙΝΑΚΑΣ I

**Επίδραση των συνθηκών διαμόλυνσης (σχέση δότη/ βοηθού) στη συχνότητα των χρωμοσωμικών ενθέσεων.**

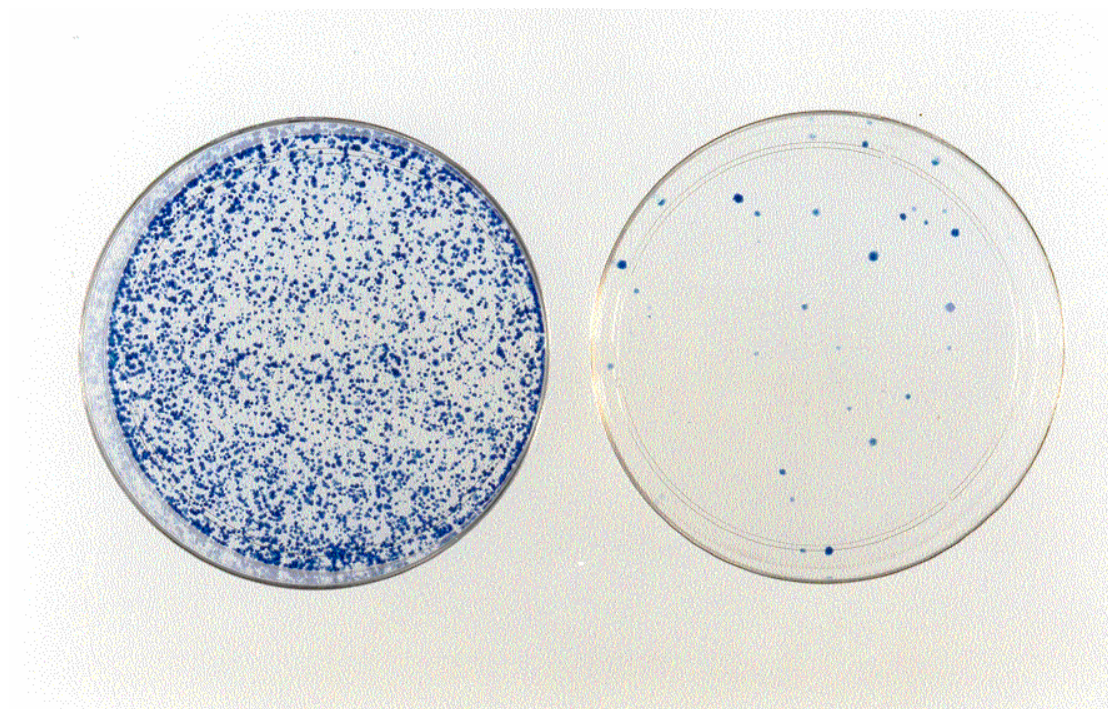
ρMLRpuro	EF1/ILMi	EF1empty	Αρ. αποικ.	GFP %	A*	B**
7 μg	1 μg		3800	9.75	3.25%	14.62

7 µg		1 µg	360	13.5	0.22%	
6 µg	2 µg		7600	9.8	6.46%	19.21
6 µg		2 µg	335	8.3	0.34%	
5 µg	3 µg		16800	19.9	7.04%	41.41
5 µg		3 µg	210	10.3	0.17%	
4 µg	4 µg		6800	12.8	4.43%	29.01
4 µg		4 µg	445	24.3	0.15%	
3 µg	5 µg		6600	19.8	2.78%	18.38
3 µg		5 µg	165	9.1	0.15%	
2 µg	6 µg		2215	10.6	1.74%	12.77
2 µg		6 µg	90	5.5	0.14%	
1 µg	7 µg		1575	7.9	1.66%	23.54
1 µg		7 µg	105	12.4	0.07%	

\*Ποσοστό των GFP+ κυττάρων τα οποία έδωσαν σταθερό μετασχηματισμό.

\*\*Αύξηση οφειλόμενη στην τρανσποζάση  $B = A$  (με τρανσποζάση)/  $A$  (χωρίς τρανσποζάση).

Από τα αποτελέσματα που φαίνονται στον πίνακα παρατηρείται ότι διαμόλυνση με 5µg πλασμιδίου δότη και 3µg πλασμιδίου βοηθού δίνει το μεγαλύτερο αριθμό μετασχηματισμένων αποικιών και τη μεγαλύτερη διαφορά με την αντίστοιχη διαμόλυνση ελέγχου (Εικ. 3).



**Εικόνα 3:** Μετασχηματισμένοι κλώνοι (το1/ 5 των συνολικών) που προέκυψαν από τη διαμόλυνση με τη χρήση 5μg πλασμιδίου δότη και 3μg βοηθού (αριστερά) καθώς και από την αντίστοιχη διαμόλυνση ελέγχου (δεξιά).

Για να διερευνηθεί η επίδραση του μεγέθους του μεταθέματος στη συχνότητα των ενθέσεων, πραγματοποιήθηκε και άλλη μία σειρά διαμολύνσεων, με το πλασμίδιο δότη pMιβgeoSV40puro (Παράρτημα, χάρτης 1), το οποίο φέρει μετάθεμα μεγέθους 8.2kb. Στις διαμολύνσεις χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος αριθμός μορίων μεγάλου και μικρού μεταθέματος. Και στις δύο περιπτώσεις για την επιλογή χρησιμοποιήθηκε η πουρομυκίνη. Στο πείραμα αυτό, το geo δεν εξυπηρετεί κανένα άλλο σκοπό εκτός του να αυξήσει το μέγεθος του μεταθέματος.

Τα αποτελέσματα αυτής της σειράς διαμολύνσεων φαίνονται στον πίνακα II.

## ΠΙΝΑΚΑΣ II

**Επίδραση των συνθηκών διαμόλυνσης (σχέση δότη/ βοηθού) στη συχνότητα των χρωμοσωμικών ενθέσεων.**

geo-puro	EF1/ILMi	EF1empty	Αρ. αποικ.	GFP %	A*	B**
16.8 µg	1 µg		140	12	0.0972%	4.49
16.8 µg		1 µg	40	15.4	0.0216%	
14.4 µg	2 µg		110	13.9	0.0659%	1.77
14.4 µg		2 µg	90	20.1	0.0373%	
12 µg	3 µg		120	23.7	0.0422%	1.36
12 µg		3 µg	40	10.75	0.0310%	
9.6 µg	4 µg		68	19.8	0.0286%	1.94
9.6 µg		4 µg	32	18.1	0.0147%	
7.2 µg	5 µg		45	14.2	0.0264%	0.99
7.2 µg		5 µg	30	9.4	0.0266%	
4.8 µg	6 µg		28	6.3	0.0370%	1.91
4.8 µg		6 µg	36	15.5	0.0194%	
2.4 µg	7 µg		16	8.6	0.0155%	1.02
2.4 µg		7 µg	16	8.75	0.0152%	

\*Ποσοστό των GFP+ κυττάρων τα οποία έδωσαν σταθερό μετασχηματισμό.

\*\*Αύξηση οφειλόμενη στην τρανσποζάση  $B = A$  (με τρανσποζάση)/  $A$  (χωρίς τρανσποζάση).

Τα παραπάνω αποτελέσματα, σε σύγκριση με τα αποτελέσματα του πίνακα I οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το μέγεθος του μεταθέματος επηρεάζει επίσης τη συχνότητα των μεταθέσεων.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ένας από τους στόχους της παρούσας εργασίας ήταν να δειχθεί ότι η τρανσποζάση *Minos* μπορεί να αναγνωρίσει ένα μετάθεμα *Minos* στο γένωμα των κυττάρων HeLa και να το μεταθέσει σε νέα θέση.

Μέχρι τώρα, τα πειράματα που δείχνουν ενεργότητα μεταθετών στοιχείων σε κύτταρα θηλαστικών σε καλλιέργεια βασίζονται στην ταυτόχρονη διαμόλυνση με πλασμιδίο δότη και βοηθό και την επιλογή κλώνων που ενσωμάτωσαν το μετάθεμα. (Κλινάκης, Α., Διδακτορική διατριβή, Ivics et al., 1997, Schouten et al., 1998). Κατά τη διαμόλυνση, εισέρχεται στα κύτταρα μεγάλος αριθμός πλασμιδίων. Σε αυτή την εργασία κρίθηκε σημαντικό το να δειχθεί ότι η τρανσποζάση μπορεί να εντοπίσει ένα μετάθεμα στο γένωμα των κυττάρων και να το μεταθέσει σε νέα θέση. Όσον αφορά τα θηλαστικά, αυτό ως τώρα έχει δειχθεί σε βλαστικά κύτταρα εμβρύου ποντικού (ES cells) με το μεταθετό *Sleeping beauty* (Luo et al., 1998) και συμβαίνει με μικρή συχνότητα. Συγκεκριμένα η τρανσποζάση πραγματοποιεί την εκτομή του μεταθέματος με μικρή συχνότητα ( $10^{-6}$  πιθανότητες εκτομής ανά κύτταρο που διαμολύνθηκε) αλλά το 76% των μεταθεμάτων επανεντίθενται σε νέα θέση στο γένωμα (Luo et al., 1998).

Η χρησιμότητα του παραπάνω πειράματος έγκειται στη δημιουργία ενός εργαλείου για μεταλλαξιγέννεση μέσω ενθέσεων (transposon tagged mutagenesis). Ήδη στα έντομα η μεθοδολογία αυτή έχει αποδειχθεί πολύ χρήσιμη. Η συχνότητα εκτομής που παρατηρήθηκε με το μεταθετό *Sleeping beauty* είναι απαγορευτική για τη χρήση του ως εργαλείο για μεταλλαξιγέννεση στα ES κύτταρα. Αυτό ίσως να οφείλεται σε χαμηλό ποσοστό κυττάρων που κατά τη διαμόλυνση λαμβάνουν DNA και όχι στην ενεργότητα του μεταθετού αυτού στο συγκεκριμένο κυτταρικό περιβάλλον.

Στο πείραμα που αναλύθηκε στο Μέρος I των αποτελεσμάτων όλοι οι ανθεκτικοί στην πουρομυκίνη κλώνοι που εξετάστηκαν ήταν ανθεκτικοί στο ανάλογο της νεομυκίνης, G418, αλλά δεν παρουσίασαν ενεργότητα β-γαλακτοσιδάσης (lacZ -). Όπως έχει αναφερθεί ήδη, σε προηγούμενα πειράματα “παγίδευσης” γονιδίων με τη χρήση του geo, το 50% των ανθεκτικών στο G418 κλώνων παρουσιάζει ενεργότητα β-γαλακτοσιδάσης. Έπισης είναι αδύνατο όλες οι ενθέσεις να πληρούν τις προϋποθέσεις που αναφέρθηκαν για να συμβεί “παγίδευση” γονιδίου. Έτσι η ανθεκτικότητα στο G418 που εμφανίζουν οι κλώνοι δεν ωφείλεται σε “παγίδευση” γονιδίων. Πιθανή εξήγηση της ανθεκτικότητας είναι η εξής: Δίπλα από το geo υπάρχει ο υποκινητής- ενισχυτής SV40 ο οποίος ελέγχει τη μεταγραφή του γονιδίου της ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη. Επίσης το άκρο *Minos* περιέχει 2 ευθείες επαναλήψεις μιας αλληλουχίας της οποίας ο πυρήνας (TATTAAT) μοιάζει με την αλληλουχία TATA των ευκαρυωτικών υποκινητών και ενδέχεται να έχει δράση minimal υποκινητή. Πιθανώς, ο SV40 υποκινητής- ενισχυτής ενισχύει το minimal υποκινητή του άκρου *Minos* με αποτέλεσμα τη μεταγραφή του geo. Το μετάγραφο αυτό έχει κάποια κωδικά ATG στην αλληλουχία του lacZ (το κωδικό έναρξης της μετάφρασης του lacZ απουσιάζει στο geo), στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με το γονίδιο της ανθεκτικότητας στο G418 κι έτσι μπορεί να παραχθεί υβριδική πρωτεΐνη με ένα τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης και ολόκληρη την πρωτεΐνη που προσδίδει την ανθεκτικότητα στο G418. Έτσι τα κύτταρα στα οποία συμβαίνουν τα παραπάνω αποκτούν ανθεκτικότητα στο G418 αλλά δεν παρουσιάζουν ενζυμική ενεργότητα β-γαλακτοσιδάσης γιατί στην υβριδική πρωτεΐνη το ένζυμο στερείται μέρος της αλληλουχίας του.

Παρόλα αυτά ο αρχικός σκοπός (η κινητοποίηση του μεταθέματος) μπορεί να δειχθεί με τη χρήση του lacZ ως μάρτυρα. Συγκεκριμένα, μπορεί σε μελλοντικά πειράματα να πραγματοποιηθεί διαμόλυνση κυττάρων με το πλασμίδιο βοηθό και τα κύτταρα στα οποία το αρχικό μετάθεμα μετακινηθεί σε νέα θέση και “παγιδεύσει” κάποιο γονίδιο, να ανιχνευτούν με ανίχνευση της δραστηριότητας β-γαλακτοσιδάσης.

Τα πειράματα που αναφέρθηκαν στο Μέρος II των αποτελεσμάτων είχαν ως στόχο την εύρεση της καλύτερης αναλογίας πλασμιδίου βοηθού και

δότη που δίνει μεγαλύτερο αριθμό μετασχηματισμένων μέσω τρανσποζάσης κλώνων.

Σε ένα τυπικό πείραμα δημιουργίας σταθερά μετασχηματισμένων κλώνων χρησιμοποιούνται γραμμικά μόρια DNA, τα οποία έχουν αυξημένες πιθανότητες να εισαχθούν σε πολλαπλά αντίτυπα στην ίδια θέση (concatameres). Επιπλέον η ύπαρξη πλασμιδιακών αλληλουχιών στις ενθέσεις αυτού του είδους συχνά οδηγεί σε αποσιώπηση των παρακείμενων γονιδίων. Η χρήση μεταθετών στοιχείων για τη δημιουργία σταθερά μετασχηματισμένων κλώνων έχει τα εξής πλεονεκτήματα:

- Άυξηση του αριθμού των σταθερά μετασχηματισμένων κλώνων
- Μοναδιαίες ενθέσεις και όχι πολλαπλά αντίτυπα.
- Απουσία πλασμιδιακών αλληλουχιών στην πλειοψηφία των ενθέσεων. Όλες οι ενθέσεις που πραγματοποιούνται μέσω τρανσποζάσης στερούνται πλασμιδιακών αλληλουχιών.

Από τον πίνακα I του Μέρους II των αποτελεσμάτων γίνεται σαφές ότι με τη χρήση 5μg πλασμιδίου δότη και 3μg πλασμιδίου βοηθού επιτυγχάνεται μεγαλύτερος αριθμός σταθερά μετασχηματισμένων κλώνων και μεγαλύτερη διαφορά στον αριθμό αυτό από τη διαμόλυνση ελέγχου (5μg πλασμιδίου δότη). Επίσης φαίνεται ότι η ποσότητα του πλασμιδίου βοηθού είναι περιοριστικός παράγοντας στον αριθμό των μετασχηματισμένων κλώνων, γιατί στις διαμολύνσεις όπου χρησιμοποιείται 7μg δότη- 1μg βοηθού, 6μg δότη- 2μg βοηθού, 5μg δότη- 3μg βοηθού, παρατηρείται σημαντική αύξηση των μετασχηματισμένων κλώνων με την αύξηση του πλασμιδίου βοηθού, παρά την μειούμενη ποσότητα του πλασμιδίου δότη. Επιπλέον στις διαμολύνσεις όπου χρησιμοποιείται 4μg δότη- 4μg βοηθού, 3μg δότη- 5μg βοηθού, 2μg δότη- 6μg βοηθού, 1μg δότη- 7μg βοηθού, παρατηρείται μείωση στον αριθμό των μετασχηματισμένων κλώνων παρά τη μεγάλη ποσότητα πλασμιδίου βοηθού. Είναι πιθανό λοιπόν ότι όταν στο σύστημα επέλθει κορεσμός σε πλασμίδιο βοηθό, χαμηλή ποσότητα πλασμιδίου δότη περιορίζει τον αριθμό των μετασχηματισμένων κλώνων. Μια εναλλακτική εξήγηση του αποτελέσματος αυτού είναι ότι αύξηση της συγκέντρωσης της τρανσποζάσης πέραν ενός σημείου έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή. Παρόμοια



αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί με την τρανσποζάση του *mariner* (Lampe et al., 1998).

Είναι σημαντικό να διερευνηθεί κατά πόσο το μέγεθος του μεταθέματος επηρεάζει τη συχνότητα των ενθέσεων μέσω τρανσποζάσης. Για το λόγο αυτό σε αντίστοιχο πείραμα με το παραπάνω ελέγχθηκε ένα μετάθεμα μεγάλου μεγέθους, το ρΜιβgeoSV40μιο. Με βάση τον πίνακα II του Μέρους II των αποτελεσμάτων παρατηρείται μεγάλη μείωση στον αριθμό των μετασχηματισμένων κλώνων που προκύπτουν με τη χρήση του ρΜιβgeoSV40μιο. Επίσης διαμόλυνση με 16.8μg πλασμιδίου δότη και 1μg πλασμιδίου βοηθού δίνει τη μεγαλύτερη διαφορά στον αριθμό των μετασχηματισμένων κλώνων από την αντίστοιχη διαμόλυνση ελέγχου. Στο πείραμα αυτό ενδέχεται να έχουμε οριακή δράση της τρανσποζάσης, γιατί ο μέσος όρος του λόγου A(με τρανσποζάση)/ A(χωρίς τρανσποζάση) είναι 1.92 (πίνακας II) ενώ στο πείραμα του πίνακα I ο λόγος αυτός είναι 22.7.

Στα πειράματα του Μέρους I των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση με 16μg ρΜιβgeoSV40μιο και 2μg πλασμιδίου βοηθού. Η διαφορά στον αριθμό των κλώνων μεταξύ αυτής της διαμόλυνσης και της διαμόλυνσης ελέγχου ήταν 7.8 φορές. Σε αυτό το πείραμα δεν υπήρξαν τόσο μεγάλες διαφορές μεταξύ διαμολύνσεων και διαμολύνσεων ελέγχου. Έτσι τα αποτελέσματα του τελευταίου πειράματος μπορούν να βελτιωθούν με καλύτερη διαμόλυνση, καλύτερης ποιότητας DNA και έλεγχο διαφορετικών αναλογιών πλασμιδίων δότη και βοηθού.

## **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα**

Για την παρασκευή σε μικρή κλίμακα πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης, ακολουθούμενης από τρεις εκχυλίσεις με μίγμα φαινόλης/ χλωροφορμίου/ ισοαμυλικής αλκοόλης (Φ/ Χ/ ΙΑΑ), σε αναλογία 25/24/1 και από μία με μίγμα Χ/ ΙΑΑ σε αναλογία 24/1, καθώς και από κατακρήμνιση με 2,5 όγκους απόλυτης αιθανόλης παρουσία 1/10 του όγκου διαλύματος 3M οξικού νατρίου pH=5,3 (Sambrook et al.).

#### **Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα**

Για τα πειράματα διαμόλυνσης κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε DNA το οποίο απομονώθηκε με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης με συνδυασμό διαδοχικών υπερφυγοκεντρήσεων κλίσης χλωριούχου καισίου παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου, όπως περιγράφεται από τους Sambrook et al.

Για τα υπόλοιπα πειράματα η απομόνωση έγινε με τη χρήση κολώνας QIAGEN tip 500 ή 100 σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας (QIAGEN GmbH).

#### **Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης**

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροέκλουσης σε μεμβράνες διαπίδωσης ή το ειδικό kit της εταιρείας QIAGEN (QIAquick Gel Extraction kit).

### **Απομόνωση γενωμικού DNA από HeLa κύτταρα**

Τα κύτταρα τοποθετούνται σε ειδικό μείγμα (50mM Tris pH8.0, 100mM EDTA, 100mM NaCl, 1% SDS) το οποίο περιέχει 33μl Proteinase K(10mg/ml) ανά ml για 16 ώρες στους 55<sup>0</sup>C. Ακολουθεί κατεργασία με 13 μl RNAase (10mg/ml) ανά ml και δύο εκχυλίσεις με ίσο όγκο μείγματος Φ/ Χ/ IAA, σε αναλογία 25/24/1.Ακολουθεί κατακρήμνιση με 0,6 όγκους ισοπροπανόλης, ξέπλυμα με 70% αιθανόλη και συλλογή του DNA με πιπέττα pasteur.

### **Ραδιοσήμανση μορίων DNA**

Για τη ραδιοσήμανση μορίων DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος μετάφρασης εγκοπής (nick translation). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην επιδιόρθωση και τον πολυμερισμό των τυχαίων εγκοπών που δημιουργούνται στο δίκλωνο κομμάτι DNA που πρόκειται να σημανθεί. Η ραδιοσήμανση γίνεται σε 100 ng DNA στο οποίο προστίθενται 2μl dTTP και 2μl dGTP συγκέντρωσης 1mM (μη ραδιοσημασμένα), 2μl α- [P] dATP και 2μl α- [P] dCTP συγκέντρωσης 1mM , 2μl ρυθμιστικού διαλύματος μετάφρασης εγκοπής (100mM Tris-HCl pH7.5 , 50mM MgCl<sub>2</sub> , 7.5mM διθειοθρεϊτόλη), 1.5μl DNA πολυμεράσης (E.coli pol I) και 1μl Dnase I η οποία έχει αραιωθεί 17000 φορές σε νερό από αρχική συγκέντρωση 10mg/ml. Η αντίδραση γίνεται στα 20 μl και στους 16 ° C για μία ώρα. Ακολουθεί μοριακή διήθηση του διαλύματος σε κλώνα χρωματογραφίας G –50 ώστε να κατακρατηθούν τα μη ενσωματωμένα ραδιενεργά νουκλεοτίδια.

### **Ανάλυση γενωμικού DNA κατα Southern (Southern blot)**

Το απομονωμένο DNA από τα κύτταρα υφίσταται πέψη διάρκειας 6 περιόδων ωρών με το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο. Στη συνέχεια 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 pH7.4 , 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 κίτρικό νάτριο). Επάνω στο πήκτωμα τοποθετείται μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (S&S) και δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM τα οποία μαζί με την μεμβράνη είναι εμβαπτισμένα σε 2X SSC. Πάνω από αυτά τοποθετούνται χαρτοπετσέτες κι ένα βάρος 0.5 κιλού περίπου. 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.

### **Υβριδοποίηση νουκλεϊκών οξέων με ραδιοσημασμένο ανιχνευτή**

Η μεμβράνη μετά το ψήσιμο εμβαπτίζεται σε διάλυμα 2X SSC και στη συνέχεια υβριδοποιείται στους 65°C με 10 ml διαλύματος υβριδοποίησης και 500μg αποδιαταγμένου με βρασμό DNA από σπέρμα σολομού. Το διάλυμα υβριδοποίησης αποτελείται από τα εξής:

3X SSC

0.1% SDS

10% Dextran sulfate (Pharmacia)

0.2% Ficoll

0.2% PVP

0.2% BSA

Μετά από 2 ώρες προστίθεται ο ραδιοσημασμένος ανιχνευτής 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  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **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  $\text{MgCl}_2$  και  $\text{MgSO}_4$  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  $25^{\circ}\text{C}$  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  $4^{\circ}\text{C}$  και στις 4000 στροφές. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 40 ml διαλύματος μετασχηματισμού (10mM Pipes , 15mM  $\text{CaCl}_2$  , 250mM KCl , 55mM  $\text{MnCl}_2$  , 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  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

### **Αντίδραση συρραφής πλασμιδιακού φορέα με τμήμα DNA (ligation)**

Η αντίδραση συρραφής 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 συρραφής (ligation buffer) ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1X και 4u/ ml λιγάση (Boehringer). Το μείγμα επωάζεται στους  $16^{\circ}\text{C}$  για 16 ώρες περίπου.

## **Μετασχηματισμός 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.

## **Προσδιορισμός της πρωτοταγούς αλληλουχίας νουκλεοτιδίων**

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων γίνεται σε περίπου 5μg DNA τα οποία πρέπει να είναι αποδιαταγμένα προκειμένου να υβριδοποιηθεί ο εκκινητής με τη συμπληρωματική του περιοχή στο πλασμίδιο. Η αποδιάταξη γίνεται με NaOH 0.2M για 5 λεπτά στους 85°C. Στο διάλυμα προσθέτονται 75 μl αιθανόλης 100% και 3 μl διαλύματος οξικού αμμωνίου συγκέντρωσης 2M pH4.0. Ακολουθεί κατακρήμνιση και πλύση με 75% αιθανόλη. Αφού αποξηρανθεί το ίζημα του πλασμιδίου προστίθενται σε αυτό 1μl εκκινητή (10ng/ μl) , 2 μl 5X ρυθμιστικού διαλύματος (200 mMTris-HCl pH7.5, 100 mM MgCl<sub>2</sub> , 250 mMNaCl) και 7 μl διαλύματος TE. Γίνεται επώαση για 15 λεπτά στους 37 °C και στη συνέχεια για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Εν τω μεταξύ σε πιάτο με ειδικά πηγάδια μοιράζονται ανά πηγάδι 2.5 μl από διαφορετικά ddNTP τα οποία προκαλούν σταμάτημα της αντιγράψης. Τα ddNTPs βρίσκονται σε διάλυμα που περιέχει 80 μM dNTP , 8 μM ddNTP και 50 mM NaCl. Στη συνέχεια το DNA αναμειγνύεται με το ακόλουθο διάλυμα:

- 2 μl labeling mix αραιωμένο σε νερό 8 φορές (7.5 μM dGTP, 7.5 μM dCTP , 7.5 μM dTTP)
- 6.5 u ένζυμο sequenase αραιωμένο σε TE 8 φορές

- 1 μl DTT 0.1 M
- 0.5 μl <sup>35</sup>S-ATP

Από το διάλυμα που προκύπτει μοιράζονται 4 μl σε κάθε πηγάδι. Γίνεται επώαση στους 37 °C για 10 λεπτά και τέλος σε κάθε πηγάδι προστίθενται 4 μl διαλύματος διακοπής της αντίδρασης (95% φορμαμίδιο, 20 mM EDTA, 0.05% Bromophenol blue, 0.05% Xylene Cyanol). Οι αντιδράσεις ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 5% αφού πρώτα αποδιαταχθούν με θέρμανση στους 100°C για 5 λεπτά. Το πήκτωμα στη συνέχεια στεγνώνεται και εκτίθεται σε φιλμ αυτοραδιογραφίας.

### **Διαμόλυνση κυττάρων HeLa**

Περίπου 300.000 κύτταρα τοποθετούνται σε τρυβλία των 60 mm (Falcon) 20 ώρες πριν από την διαμόλυνση και 2 ώρες πριν τη διαμόλυνση τοποθετείται σε αυτά φρέσκο θρεπτικό μέσο. Η διαμόλυνση γίνεται με τη μέθοδο του χλωριούχου ασβεστίου ( CaCl<sub>2</sub> ): υδατικό διάλυμα όγκου 225 μl που περιέχει έως 20 μg DNA αναμιγνύεται με 25 μl διαλύματος CaCl<sub>2</sub> μοριακότητας 2M. Στο διάλυμα προστίθενται 250 μl διαλύματος 2M HBS και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Αυτό το διάστημα είναι αρκετό για τη δημιουργία ενός μικροκρυσταλικού αιωρήματος , το οποίο αναμιγνύεται ήπια με το θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα αφήνονται 12-18 ώρες σε θερμοκρασία 37 °C και περιβάλλον με 5% CO<sub>2</sub>. Στη συνέχεια πλένονται με PBS ή HBSS και 30 ώρες μετά κατεργάζονται με τρυψίνη και τοποθετούνται σε νέο τρυβλίο. Η επιλογή με πουρομυκίνη (2.5 μg/ml) αρχίζει 72 ώρες μετά την κατεργασία με τρυψίνη, ενώ η επιλογή με G418 (600μg/ml) , 24 ώρες μετά.

2X HEPES-buffered saline (HBS)

- 280 mM NaCl
- 10 mM KCL
- 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O
- 12 mM dextrose

- 50 mM HEPES

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7.05 με 0.5 N NaOH. Το διάλυμα φιλτράρεται με φίλτρο 0.22-micron και διατηρείται στους -20 °C.

1X phosphate- buffered saline (PBS)

- 137 mM NaCl
- 2.7 mM KCl
- 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 1.76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Το pH ρυθμίζεται στο 7.4 με HCl και το διάλυμα αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο.

### **Μονιμοποίηση και βάψιμο αποικιών από κύτταρα HeLa**

Η μονιμοποίηση έγινε σε διάλυμα 10% φορμαλδεΐδης σε PBS για 15 λεπτά και το βάψιμο σε διάλυμα 0.05% methylene blue σε PBS για 30 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησε εξαντλητικό πλύσιμο με dd H<sub>2</sub>O και τα τρυβλία αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

### **Μονιμοποίηση κυττάρων HeLa και χρώση με X-gal**

Η μονιμοποίηση και η χρώση γίνονται στα τρυβλία όπου καλλιεργούνται τα κύτταρα. Αφού αφαιρεθεί το θρεπτικό μέσο από αυτά, πραγματοποιούνται δύο πλυσίματα με 1X PBS και ακολουθεί επώαση σε 1% διαλύματος γλουταραλδεΐδης (TED PELLA) σε νερό για 10 λεπτά ώστε να μονιμοποιηθούν. Ακολουθούν άλλα τρία πλυσίματα σε 1X PBS και επώαση για 10 λεπτά έως και 24 ώρες, ανάλογα με το πότε εμφανίζεται η χρώση, σε διάλυμα χρώσης (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH7.2, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM K<sub>4</sub>[Fe<sup>+2</sup>(CN)<sub>6</sub>], 3mM K<sub>4</sub>[Fe<sup>+3</sup>(CN)<sub>6</sub>], 0.3% Triton-X, 0.2% X-gal). Το διάλυμα χρώσης διατηρείται σε σκοτεινό δοχείο, σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ το X-



gal διατηρείται στους 4°C, σε σκοτεινό δοχείο και προστίθεται την τελευταία στιγμή.

## ΥΛΙΚΑ

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Boehringer , New England Biolabs και Minotech. Το G418 (Geneticin) που χρησιμοποιήθηκε για την επιλογή των neo positive HeLa κυττάρων ήταν της εταιρείας GIBCO BRL ενώ η πουρομυκίνη (Puromycin) της Clontech. Τα υπόλοιπα χημικά και αντιδραστήρια έχουν παρασκευαστεί από τις εταιρείες Amersham, Sigma, Merck, Promega, Stratagene, Qiagen, Clontech, S&S. Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν E.coli (DH5α και XL1 blue).

## ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ

Το πλασμίδιο δότης **pMiβgeoSV40puro** (Παράρτημα, χάρτης 1) κατασκευάστηκε ως εξής:

- Απομόνωση του γονιδίου της ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη (SV40puro) από το πλασμίδιο pPUR της εταιρείας Clontech (πέψεις με PvuII, BamHI, 1.4 Kb fragment).
- Κλωνοποίηση αυτού σε φορέα pBluescript KS+ μετά από πέψεις με SmaI και BamHI.
- Απομόνωση του γονιδίου της ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη από τον φορέα pBluescript KS+ με πέψεις EcoRV και NotI.
- Κλωνοποίηση αυτού στο πλασμίδιο pMiβgeo (Παράρτημα, χάρτης 4) μετά από πέψη με SpeI, δημιουργία τυφλών άκρων με Klenow και πέψη με NotI.

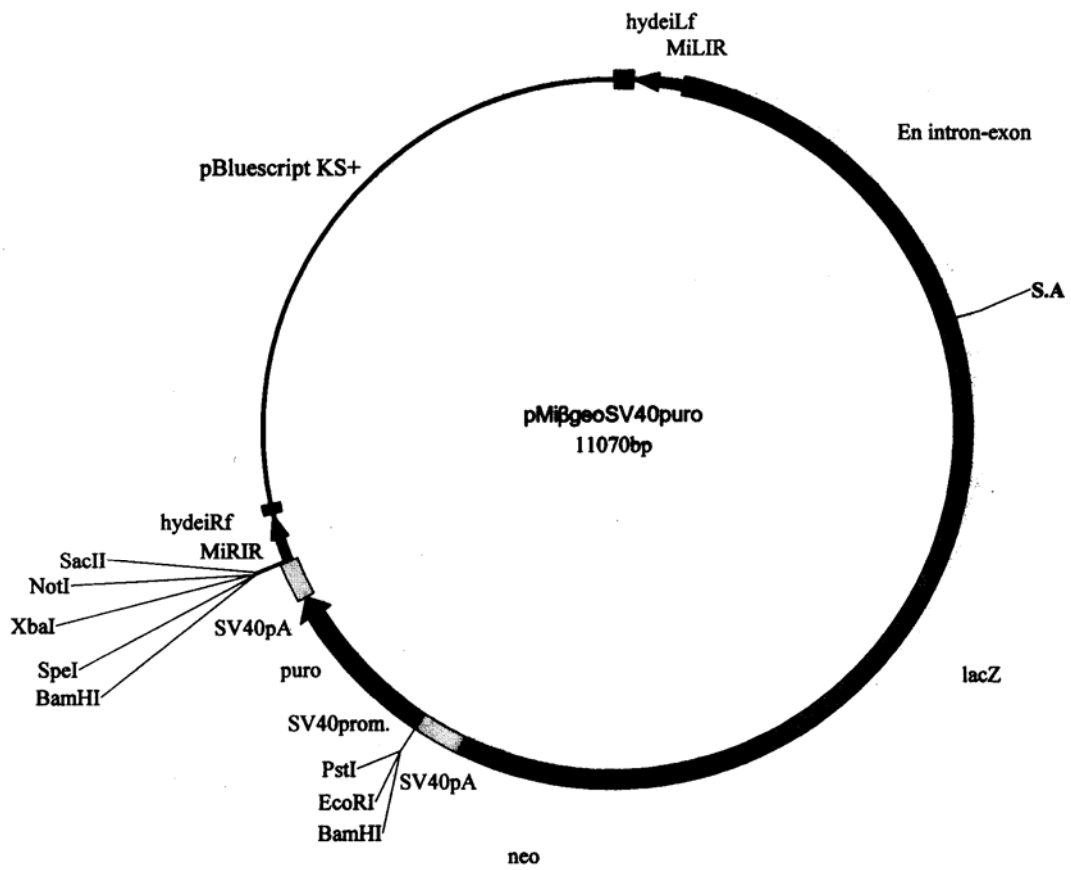
Το πλασμίδιο δότης **pMLRpuro** (Παράρτημα, χάρτης 5) προέκυψε από το πλασμίδιο pMιβgeoSV40puro με EcoRI πέψη για την αφαίρεση του geo και αντίδραση συρραφής.

Η GFP που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του αριθμού των HeLa κυττάρων που διαμολύνθηκαν προέρχεται από το πλασμίδιο pQBI25 της Quantum τροποποιημένο ως εξής: Με NaeI πέψη και αντίδραση συρραφής έχει αφαιρεθεί το γονίδιο της ανθεκτικότητας στο G418 ( **pQBI25Δneo**, Παράρτημα, χάρτης 6).

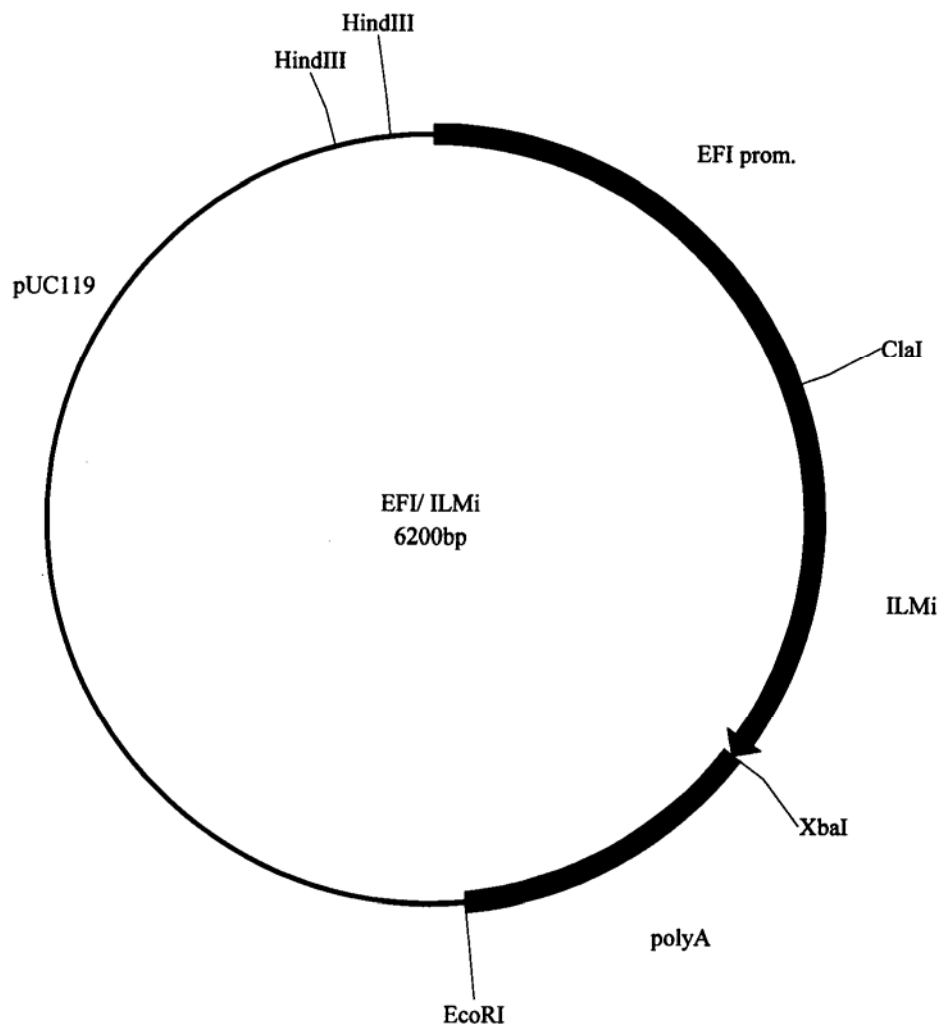


**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

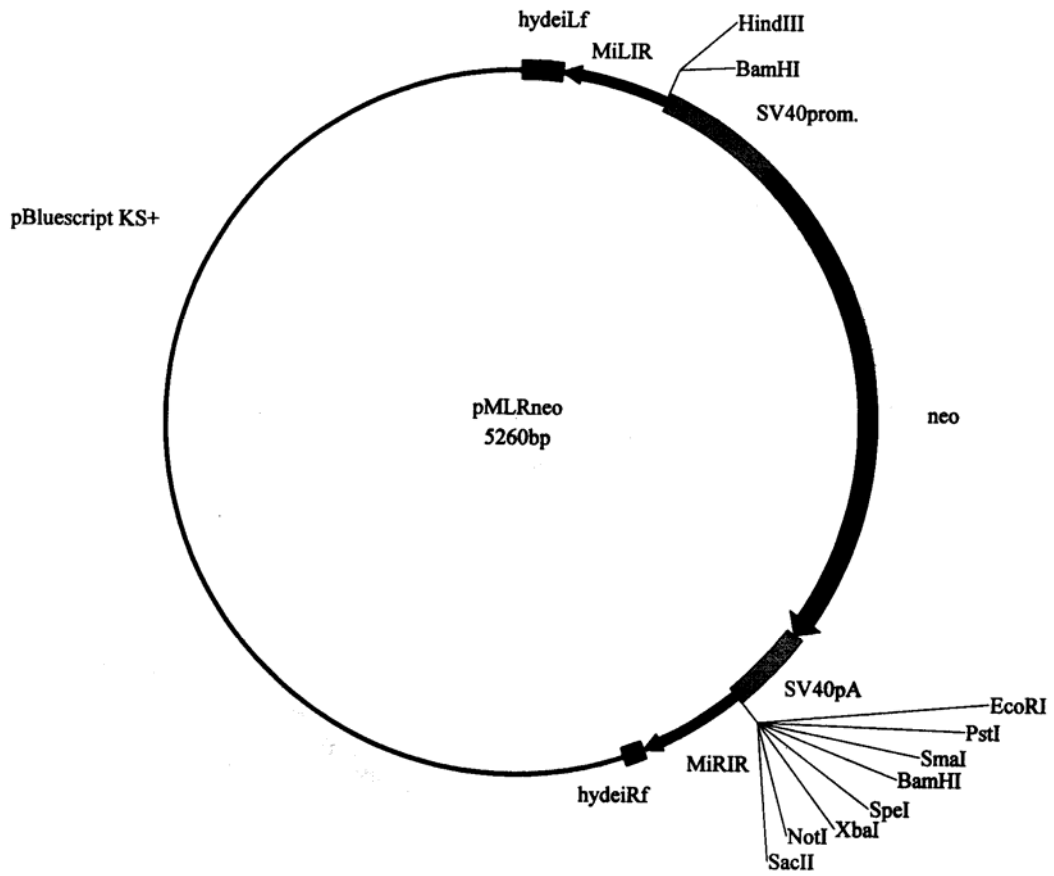
**ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ**



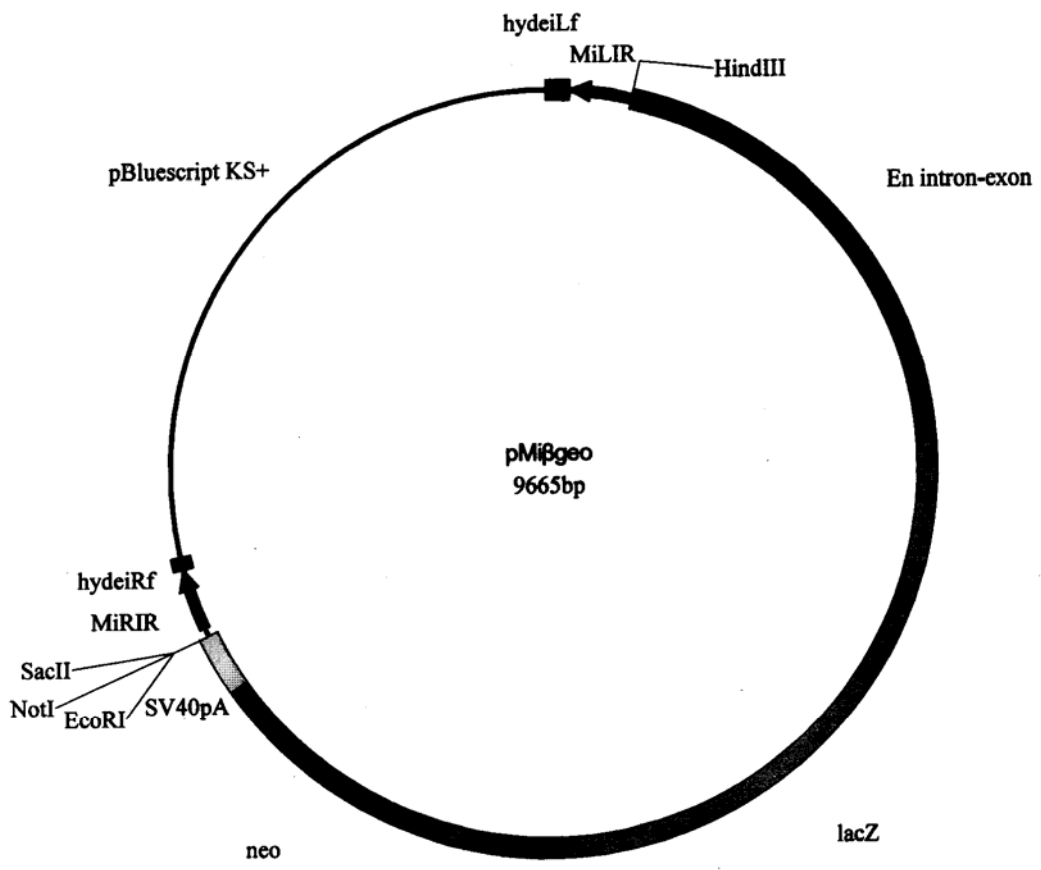
**Χάρτης 1**



**Χάρτης 2**

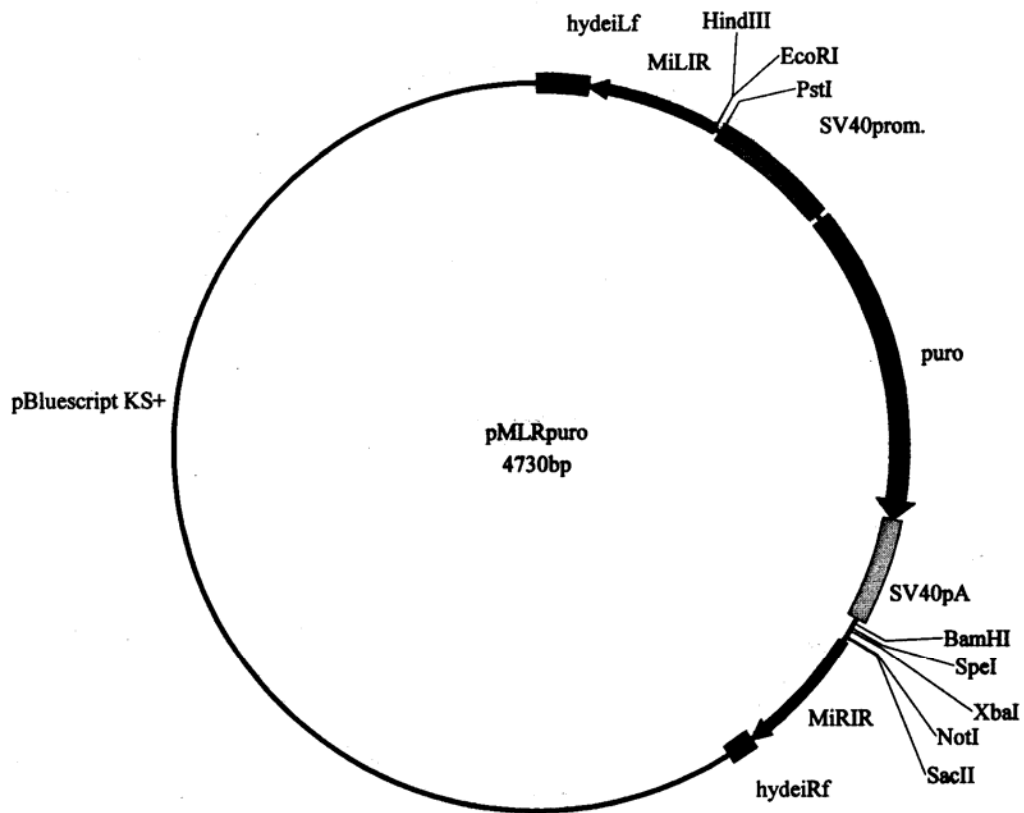


**Χάρτης 3**

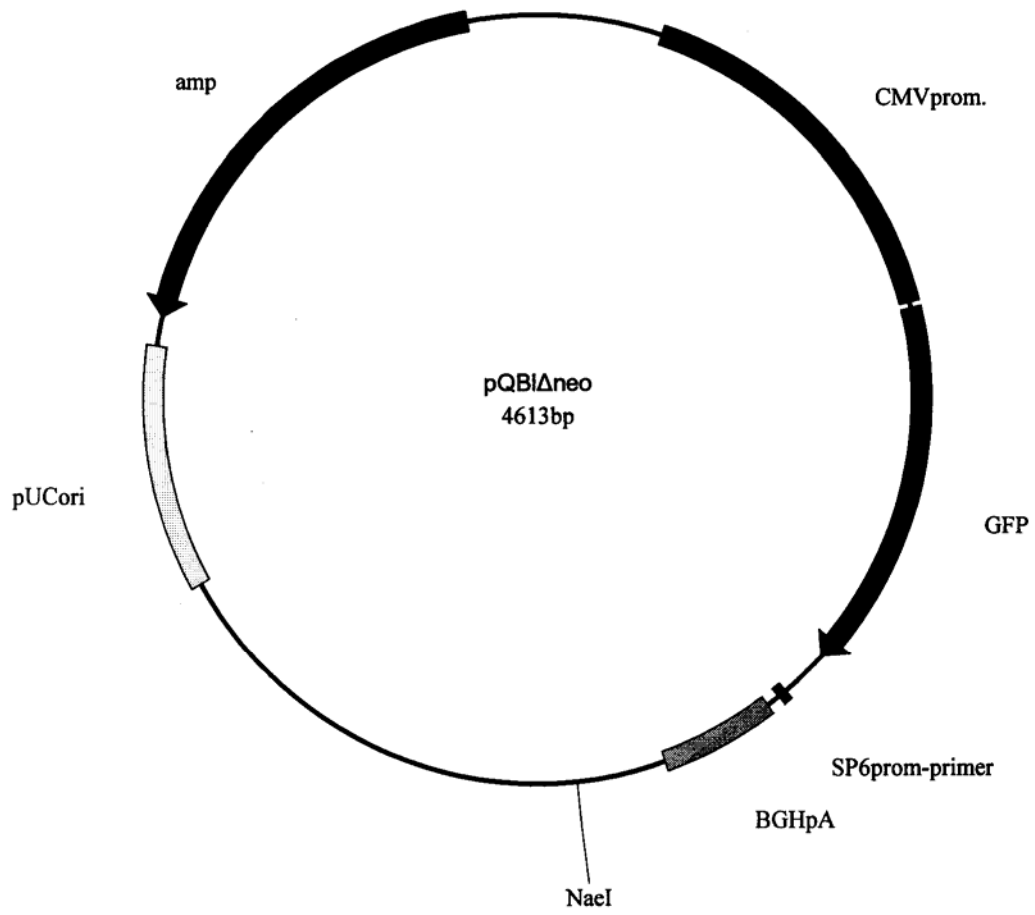


**Χάρτης 4**

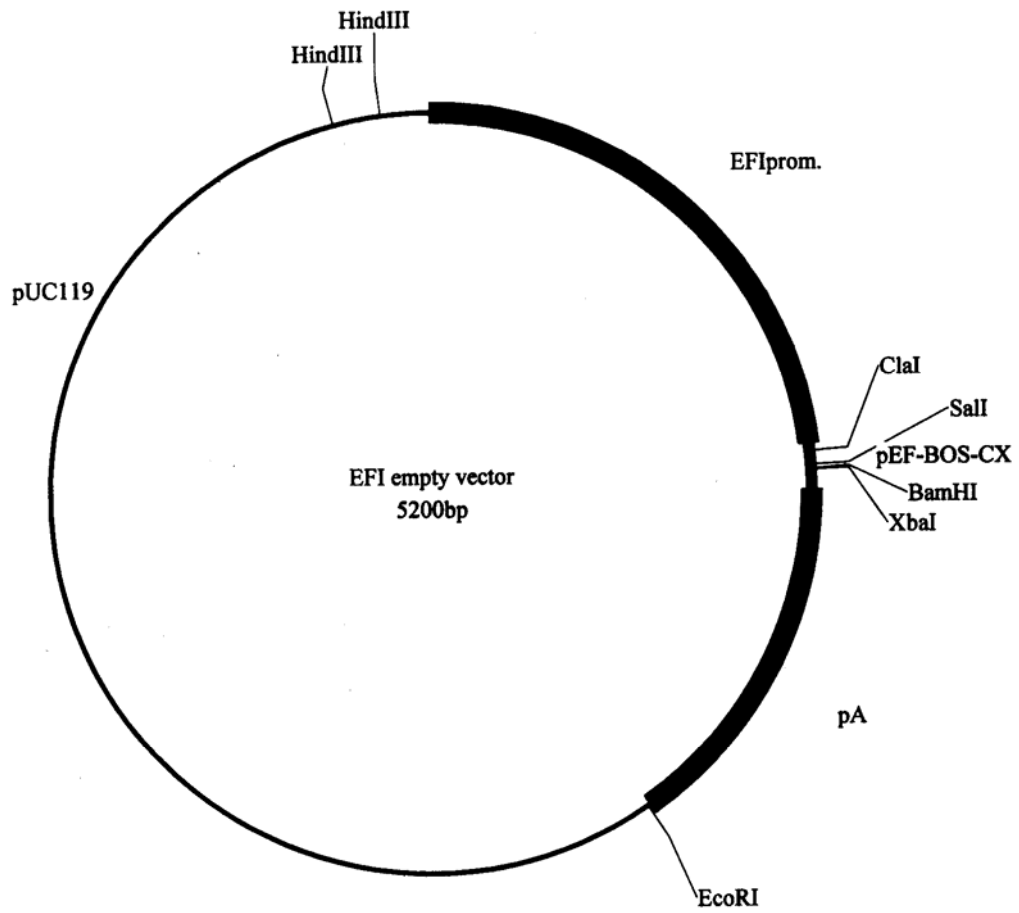




**Χάρτης 5**



**Χάρτης 6**



**Χάρτης 7**

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

**Beall, E. L. & Rio, D. C.** (1996). *Drosophila* IRBP/ Ku p 70 corresponds to the mutagen-sensitive mus309 gene and is involved in P- element excision in vivo. *Genes and development* **10**, 921-933.

**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.

**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.

**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.

**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.

**Kaufman, P. K. & Rio, D. C.** (1991). *Drosophila* P-element transposase in a transcriptional repressor in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **80**, 1655-1659.

**Κλινάκης, Α.** 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.

**Lampe, D. J., Grant, T. E., Robertson, H. M.** (1998). Factors Affecting Transposition of the *Himar 1 mariner* transposon in Vitro. *Genetics*. **149**, 179-187.

**Laski, F. A., Rio, D. C. & Rubin, G. M.** (1986) . Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *Cell* **44** , 7-19.

**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 germ line 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.

**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.

**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.

**Siebel, C. W. & Rio, D. C.** (1990). Regulated splicing of the *Drosophila* P transposable element third intron in vitro : somatic repression. *Science* **248**, 1200-1208.

**Skarnes, W. C., Auerbach, B. A. & Joyner, A. L.** (1992). A gene trap approach in mouse embryonic stem cells: the lacZ reported is activated by

splicing, reflects endogenous gene expression, and is mutagenic in mice. *Genes. Dev.* **6**,903-918.

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

**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.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



## ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ