

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ - ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Το μεταθετό στοιχείο *Minos*: Ανάπτυξη συστημάτων για λειτουργική  
γενωμική ανάλυση στον άνθρωπο και στον ποντικό.**

**ΛΑΣΚΑΡΩ ΖΑΓΟΡΑΙΟΥ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2003**

*Στη Μαρούσα τη μικρή, στη Μαρούσα τη μεγάλη,  
στη Μαρία τη μικρή, στη Μαρία τη μεγάλη, στο Νίκο,  
στο Σωτήρη, στη Ντίνα, στην Έφη, στο Δημήτρη,  
στον Αποστόλη*

Νοέμβρης 1997- Δεκέμβρης 2003

Πώς πέρασαν τόσο γρήγορα έξι χρόνια στο Ηράκλειο, έξι χρόνια στο IMBB, πεντέμισι χρόνια στο εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Εντόμων.....

Πολλές οι αναμνήσεις και πολλοί οι άνθρωποι με τους οποίους μοιράστηκα στιγμές είτε επιστημονικές είτε φιλικές.

Τώρα που έφτασε ο καιρός να φύγω για άλλα μέρη θα ήθελα να ευχαριστήσω πολλούς από αυτούς. Αρχικά θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον επιβλέποντα της διδακτορικής διατριβής μου Μπάμπη Σαββάκη για όλα αυτά που περάσαμε μαζί, για τη στήριξή του, τη βοήθειά του εντός και εκτός εργαστηρίου, τις συζητήσεις μας και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια. Ένα εξίσου μεγάλο ευχαριστώ θέλω να στείλω στην “αναπληρωματική επιβλέπουσά” μου Κλειώ Μαμαλάκη γιατί εφόσον ήμουνα σε εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Εντόμων και δούλευα με ποντίκια, χωρίς τη βοήθειά της δεν νομίζω να κατάφερνα και πολλά πράγματα. Νομίζω ότι την αντιγράφω όσον αφορά σε κάποιες επιστημονικές συμπεριφορές αλλά μου αρέσει...Ευχαριστώ θερμά τον Δημήτρη Κιούση που ακόμα και στις διακοπές του πάντα έβρισκε χρόνο για να συζητήσει μαζί μου για πειράματα και άλλες ανησυχίες. Θέλω επίσης να πω στη Μαρία Μοναστηριώτη ότι αισθάνομαι πολύ τυχερή που ξεκίνησα την πορεία μου στο IMBB από το εργαστήριό της διότι με έκανε να αποκτήσω αρκετή αυτοπεποίθηση που με βοήθησε μετέπειτα.

Ας πάμε τώρα στο εργαστήριο και στους συναδέλφους και φίλους που θα μου λείψουν πολύ τώρα που θα φύγω. Θέλω να τους πω ότι το νέο μου εργασιακό περιβάλλον ουδεμία σχέση έχει με τη ζεστασιά που δημιουργήσαμε τόσα χρόνια στο εργαστήριο Σαββάκη. Θα μου λείψουν οι συζητήσεις μας, οι πλάκες μας, οι έξοδοί μας και το όλο κλίμα. Ένα τεράστιο ευχαριστώ θέλω να στείλω στον Αποστόλη, δάσκαλο και σύντροφό μου όλα αυτά τα χρόνια (δεν θα μου λείψει γιατί το εργαστήριο στο οποίο θα δουλεύω σε λίγο καιρό απέχει δύο οικοδομικά τετράγωνα από το δικό του), πολλά ευχαριστώ στη Μαίρη και το Stefan που με δίδαξαν πολλά και επίσης στο Θάνο στη Μαρία, στον Αλέξανδρο και στους μικρούς: Ιωάννα, Γιάννη, Ναταλία, Νίκο. Εγώ πέρασα πολύ όμορφα μαζί τους, ελπίζω και αυτοί.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω τους: Δ. Αλεξανδράκη, Γ. Γιαννόπουλο, Χ. Δελιδάκη, Δ. Καραγωγέως και Ι. Παπαμαθαιάκη που μαζί με το Χ. Σαββάκη και την Κ. Μαμαλάκη αποτέλεσαν την επταμελή επιτροπή αξιολόγησης της διδακτορικής διατριβής μου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
SUMMARY.....	8
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1. Μεταθετά στοιχεία.....	11
1.1 Μεταθετά στοιχεία με κατοπτρικά αντεστραμμένα άκρα (τύπου II).....	11
1.1.1 Η οικογένεια μεταθετών στοιχείων <i>hAT</i> .....	12
1.1.2 Η υπεροικογένεια <i>mariner-Tc1</i> .....	12
1.1.3 Τα μεταθετά στοιχεία <i>piggyBac</i> και <i>tagalong</i> .....	13
1.1.4 Το μεταθετό στοιχείο <i>Minos</i> .....	14
1.2 Ο μηχανισμός μετάθεσης.....	15
1.3 Μεταθετά στοιχεία και εύρος ξενιστών.....	17
2. Λειτουργική γενωμική.....	21
2.1 Παγίδευση γονιδίων.....	22
2.2 Μέθοδοι για τη δημιουργία μεταλλάξεων στον ποντικό.....	23
2.2.1 Χημική μεταλλαξιγένεση.....	23
2.2.2 Μεταλλαξιγένεση με ηλεκτροπόρωση γυμνού DNA.....	26
2.2.3 Μεταλλαξιγένεση με τροποποιημένους ρετροϊούς.....	27
3. Μεταθετά στοιχεία και Λειτουργική γενωμική.....	29
3.1 Μεταθετά στοιχεία και μεταλλαξιγένεση στα έντομα.....	29
3.2 Μεταθετά στοιχεία και μεταλλαξιγένεση στα φυτά.....	31
3.3 Μεταθετά στοιχεία και μεταλλαξιγένεση στον ποντικό.....	33
3.4 Μεταθετό στοιχείο <i>Minos</i> και μεταλλαξιγένεση.....	34
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	36
1. Μελέτη της ενεργότητας του μεταθετού στοιχείου <i>Minos</i> στον ποντικό ( <i>Mus musculus</i> ).....	37
1.1 Έλεγχος της ικανότητας μετάθεσης τρανσποζονίων <i>Minos</i> σε σωματικά κύτταρα ποντικού.....	37
1.2 Έλεγχος της ικανότητας μετάθεσης τρανσποζονίων <i>Minos</i> σε κύτταρα γαμετικής σειράς ποντικού.....	45
1.3 Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών που φέρουν επαγόμενο σύστημα παραγωγής τρανσποζάσης.....	51
2. Ανάπτυξη χιμαιρικών φορέων <i>Minos</i> -AcNPV ( <i>Autographa californica</i> nuclear polyhedrosis virus) με σκοπό την ενσωμάτωση τρανσποζονίων <i>Minos</i> στο γονιδίωμα διαφόρων ειδών κυττάρων με υψηλή συχνότητα.....	56
2.1 Μελέτη της ικανότητας εισόδου του ιού AcNPV σε κυτταρικές σειρές και πρωτογενή κύτταρα.....	56
2.2 Ενσωμάτωση τρανσποζονίων <i>Minos</i> στο γονιδίωμα κυτταρικών σειρών μετά από επώαση με χιμαιρικούς φορείς <i>Minos</i> -AcNPV.....	59
2.3 Δημιουργία σταθερά μετασχηματισμένων κυτταρικών σειρών που παράγουν επαγώγιμη τρανσποζάση και καταλύουν την ενσωμάτωση τρανσποζονίων στο γονιδίωμά τους μετά από επώαση με τον ιό BacMiLRneo....	66

2.4 Έλεγχος της ικανότητας χιμαιρικών φορέων <i>Minos</i> -AcNPV να μετασχηματίσουν δίπτερα μετά από μόλυνση.....	75
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	77
1. Ενεργότητα των μεταθετών στοιχείων στον ποντικό.....	78
1.1 Ενεργότητα του <i>Minos</i> σε σωματικά κύτταρα ποντικού.....	78
1.2 Ενεργότητα του <i>Minos</i> σε κύτταρα της γαμετικής σειράς ποντικού.....	80
1.3 Επαγώγιμα συστήματα παραγωγής τρανσποζάσης.....	81
1.4 Συνδυασμός του <i>Minos</i> με τα συστήματα Tet-On και Tet-Off.....	83
2. Ανάπτυξη της τεχνολογίας δημιουργίας χιμαιρικών φορέων <i>Minos</i> -AcNPV.....	84
2.1 Διαφορές στην ικανότητα εισόδου του ιού AcNPV σε κυτταρικές σειρές	84
2.2 Ικανότητα εισόδου του ιού AcNPV σε κύτταρα <i>in vivo</i> .....	85
2.3 Δημιουργία χιμαιρικών φορέων <i>Minos</i> -AcNPV για την αποτελεσματικότερη μεταφορά και ενσωμάτωση τρανσποζονίων στο γονιδίωμα κυτταρικών σειρών.....	86
2.4 Δημιουργία σταθερά μετασχηματισμένων κυτταρικών σειρών που παράγουν επαγώγιμη τρανσποζάση και καταλύουν την ενσωμάτωση τρανσποζονίων στο γένωμά τους μετά από επώαση με τον ιό BacMiLRneo.....	87
2.5 Προοπτικές χρήσης των χιμαιρικών φορέων <i>Minos</i> -AcNPV στο μετασχηματισμό εντόμων.....	88
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	90
Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών.....	91
Απομόνωση γενωμικού DNA από βιοψίες ουράς ποντικού.....	91
Ανάλυση κατά Southern.....	91
Απομόνωση ολικού RNA από ιστούς ποντικού.....	92
Ανάλυση κατά Northern.....	93
Ανίχνευση γεγονότων εκτομής και χαρακτηρισμός των αποτυπωμάτων.....	94
Πειράματα υβριδοποίησης με φθορίζουσες χρωστικές <i>in situ</i> (FISH) σε μεταφασικούς πυρήνες ποντικού.....	95
Προετοιμασία μεταφασικών πυρήνων από θύμο και σπλήνα ποντικού.....	95
Σήμανση του ανιχνευτή με χρωμοφόρα.....	95
Υβριδοποίηση με φθορίζουσες χρωστικές <i>in situ</i> (FISH).....	96
Προσδιορισμός της θέσης ένθεσης τρανσποζονίων στον ποντικών.....	98
Επαγωγή έκφρασης των γονιδίων στον ποντικό τα οποία είναι υπό τον έλεγχο του χειριστή <i>tetO</i> .....	99
Σύνθεση cDNA/Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (RT-PCR).....	100
Ανίχνευση της ενεργότητας της λουσιφεράσης.....	101
Κατασκευή και παραγωγή σε υψηλούς τίτλους ανασυνδυασμένων ιών AcNPV (baculovirus).....	101
Προσδιορισμός του τίτλου των ανασυνδυασμένων ιών AcNPV.....	102
Δημιουργία πρωτογενών καλλιιεργειών νευρικών κυττάρων από γάγγλια οπισθίων ριζών (DRG's) και νωτιαίο μυελό εμβρύου ποντικού (E14).....	103
Μόλυνση πρωτογενών κυττάρων με ιό <i>AcNPV</i> και ανίχνευση των νευρώνων.....	103
Μόλυνση κυττάρων HepG2 , Ref1, NIH3T3, MCF7, T47D, ES και S2 από ιό <i>AcNPV</i> .....	104
Δημιουργία σταθερά μετασχηματισμένων κυττάρων HepG2.....	105
Επιλογή ευκαρυωτικών κυττάρων ανθεκτικών στα φάρμακα G418, hygromycin B, πουρομυκίνη.....	105
Διαμόλυνση κυττάρων με τη μέθοδο του CaCl <sub>2</sub> .....	106

Διαμόλυνση κυττάρων με τη χρήση λιπιδίων.....	106
Ανοσοεντοπισμός κυττάρων που εκφράζουν τρανσποζάση.....	107
Πλασμιδιακές κατασκευές.....	108
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	109
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	127
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ.....	144

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μεταθετό στοιχείο *Minos* της *Drosophila hydei* υπάγεται στην υπεροικογένεια μεταθετών στοιχείων *mariner-Tc1*, μέλη της οποίας απαντώνται σε διάφορους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Πολλά από τα μέλη της υπεροικογένειας έχουν την ικανότητα να μετατίθενται σε ξενιστές εξελικτικά απομακρυσμένους από αυτόν στον οποίο αναγνωρίστηκαν. Η μοναδική προϋπόθεση της μετάθεσης φαίνεται να είναι η ύπαρξη ενεργής τρανσποζάσης και άρτιων κατοπτρικά αντεστραμμένων άκρων.

Στην παρούσα διατριβή αποδεικνύεται η ικανότητα του μεταθετού στοιχείου *Minos* να μετατίθεται από χρωμοσωμικές θέσεις σε νέες χρωμοσωμικές θέσεις, σε σωματικά κύτταρα και σε κύτταρα της γαμετικής σειράς ποντικού (*Mus musculus*). Η ικανότητά του αυτή το καθιστά πολύτιμο εργαλείο σε πειράματα λειτουργικής γενωμικής ανάλυσης στον ποντικό και προς αυτή την κατεύθυνση, στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, δημιουργήθηκαν διαγονιδιακές σειρές ποντικών, οι οποίες φέρουν επαγόμενο σύστημα παραγωγής τρανσποζάσης.

Το μεταθετό στοιχείο *Minos* έχει αποδειχθεί χρήσιμο εργαλείο σε πειράματα κορεσμού του γενώματος με ενθέσεις στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά HeLa. Ο κορεσμός με ενθέσεις του γενώματος κυτταρικών σειρών που δε διαμολύνονται με υψηλή συχνότητα απαιτεί μεγάλο αριθμό πειραμάτων διαμόλυνσης. Για αυτό το λόγο το *Minos* συνδυάστηκε με ιό που εισέρχεται σε κύτταρα θηλαστικών αλλά δεν πολλαπλασιάζεται σε αυτά (AcNPV, baculovirus) και δημιουργήθηκαν χιμαιρικοί φορείς *Minos*-AcNPV. Οι χιμαιρικοί φορείς αυξάνουν κατά πολύ τον αριθμό των κλώνων που φέρουν ενθέσεις του μεταθετού στοιχείου σε κυτταρικές σειρές από θηλαστικά, ανοίγοντας το δρόμο για την πραγματοποίηση πειραμάτων λειτουργικής γενωμικής σε διάφορους τύπους κυττάρων.

## SUMMARY

The *Drosophila hydei* transposable element *Minos* belongs to the *mariner-Tc1* superfamily of transposons, members of which are found in diverse eukaryotic organisms. Many members of the superfamily can transpose in organisms evolutionarily distant to the host they were originally isolated from. The only requirements for transposition appear to be the presence of active transposase and intact inverted repeats.

In this thesis, the ability of the *Minos* element to transpose in somatic cells and in the germ line of the mouse (*Mus musculus*) from one chromosomal position to a new one is demonstrated. This establishes a valuable tool towards functional genomic analysis in the mouse. Furthermore, mouse lines carrying an inducible transposase production system were created.

It has previously been demonstrated that the transposable element *Minos* is a valuable tool for saturating insertional mutagenesis of the genome of HeLa cells. For insertional saturation of cell lines that do not take up DNA efficiently, a large number of transfections would be required. To circumvent this problem, the *Minos* system was combined with a virus which enters mammalian cells but does not replicate in them (AcNPV, baculovirus). Chimeric *Minos*-AcNPV vectors were established. Use of these vectors increased the number of clones carrying transposon insertions in various mammalian cell lines, opening the way for functional genomic experiments in many cell types.



## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

SB: Sleeping Beauty

LCR: Locus Control Region

ILMi: intronless *Minos* transposase

GFP: Green Fluorescent Protein

CMV: Cytomegalovirus

FISH: Fluorescent *in situ* hybridization

zp: zona pellucida

dox: doxycycline

AcNPV: *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus

DRG's: γάγγλια οπισθίων ριζών, Dorsal Root Gagnlion

TK: thymidine kinase

tetO: Tetracycline operator

FBS: Fetal Bovine Serum

MOI: Multiplicity of Infection

pfu: plaque forming units

tTA: tetracycline transactivator (TetR-VP16 fusion)

rtTA: reverse tetracycline transactivator (rTetR-VP16 fusion)

ENU: N-ethyl-N-nitrosourea

HSV: Herpes simplex virus

# ***ΕΙΣΑΓΩΓΗ***

## 1. Μεταθετά στοιχεία

Τα μεταθετά στοιχεία είναι αυτόνομα τμήματα DNA τα οποία έχουν την ικανότητα να μετατίθενται μέσα στο γένωμα στο οποίο ενδημούν. Μεταθετά στοιχεία, ενεργά και μη, απαντώνται στο γένωμα όλων των οργανισμών από τα βακτήρια μέχρι τον άνθρωπο.

Τα μεταθετά στοιχεία των ευκαρυωτικών οργανισμών κατατάσσονται σε τέσσερις κατηγορίες ανάλογα με τη δομή τους και το μηχανισμό μετάθεσης. Τα μεταθετά στοιχεία **τύπου ρετροϊού** και τα **ρετρομεταθετά στοιχεία** απαντώνται σε πολλούς οργανισμούς και η μετάθεσή τους πραγματοποιείται μέσω ενδιάμεσων μορφών RNA. Λόγω του συγκεκριμένου μηχανισμού μετάθεσης, η μετάθεση συνοδεύεται και από διπλασιασμό του στοιχείου (copy and paste). Τα μεταθετά στοιχεία τύπου ρετροϊού ορίζονται από μακρές τερματικές επαναλήψεις (long terminal repeats-LTRs) μήκους 200-500 βάσεων. Τα μεταθετά στοιχεία των δύο παραπάνω κατηγοριών φέρουν κωδική περιοχή που παρουσιάζει ομολογία με την αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase) των ρετροϊών και αποτελούν το υποσύνολο στοιχείων τύπου I. Τα **αναδιπλούμενα μεταθετά στοιχεία** (foldback transposons) ορίζονται από αντεστραμμένα άκρα μεγάλου μήκους μέσα στα οποία υπάρχουν επαναλήψεις μικρών αλληλουχιών. Η περιοχή μεταξύ των άκρων ποικίλλει σε μέγεθος και είναι άγνωστο αν κωδικοποιεί πρωτεΐνη. Τα **μεταθετά στοιχεία με κατοπτρικά αντεστραμμένα άκρα** ορίζονται από μικρού συνήθως μεγέθους κατοπτρικά αντεστραμμένα άκρα. Η περιοχή μεταξύ των άκρων κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη που καταλύει τη μετάθεση (τρανσποζάση). Οι δύο παραπάνω κατηγορίες αποτελούν τα μεταθετά στοιχεία τύπου II. Η μετάθεση πραγματοποιείται με εκτομή του στοιχείου από την αρχική του θέση και τη μεταφορά του σε νέα, οπότε ο αριθμός των στοιχείων στο γένωμα παραμένει σταθερός (cut and paste).

### 1.1 Μεταθετά στοιχεία με κατοπτρικά αντεστραμμένα άκρα (τύπου II)

Μεταθετά της κατηγορίας αυτής απαντώνται σε ασπόνδυλα και σπονδυλωτά. Το πρώτο μεταθετό στοιχείο τύπου II που χαρακτηρίστηκε στα έντομα είναι το στοιχείο *P* από τη *Drosophila melanogaster* (Spradling and Rubin, 1982). Το στοιχείο *P* έχει μήκος 2907 bp και ορίζεται από κατοπτρικά αντεστραμμένα άκρα μήκους 31 bp. Η μεταξύ των άκρων περιοχή κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη μετάθεσης και αποτελείται από τέσσερα

εξώνια και τα παρεμβαλλόμενα αυτών ιντρόνια. Η απομάκρυνση των τριών ιντρονίων πραγματοποιείται μόνο στα κύτταρα της γαμετικής σειράς και οδηγεί στην παραγωγή ενεργής τρανσποζάσης. Στα σωματικά κύτταρα, με εναλλακτική συρραφή, απομακρύνονται τα δύο από τα τρία ιντρόνια και παράγεται μη ενεργή ως προς τη μετάθεση τρανσποζάση (Laski *et al.*, 1986). Το στοιχείο *P* είναι το πρώτο στοιχείο με το οποίο πραγματοποιήθηκε γενετικός μετασχηματισμός της *Drosophila melanogaster* (Rubin and Spradling, 1982), παρουσιάζει όμως ενεργότητα μόνο σε είδη που έχουν μικρή φυλογενετική απόσταση από τη *D. melanogaster*. Άρα χρειάζεται και άλλες πρωτεΐνες εκτός της τρανσποζάσης για τη μετάθεσή του. Μία πρωτεΐνη υποψήφια για το ρόλο αυτό είναι η IRBP (inverted repeat binding protein; Beall *et al.*, 1994; Beall and Rio, 1996). Το στοιχείο εντίθεται πάντα σε οκτανουκλεοτίδιο, μη αυστηρά καθορισμένης αλληλουχίας, το οποίο και διπλασιάζεται μετά την ένθεση.

#### **1.1.1 Η οικογένεια μεταθετών στοιχείων *hAT***

Η οικογένεια ονομάστηκε έτσι από τα στοιχεία *hobo* της *D. melanogaster* (McGinnis *et al.*, 1983), *Ac/Ds* του *Zea mays* (McClintock, 1956) και *Tam3* του *Antirrhinum majus* (Hehl *et al.*, 1991). Σε αυτή την οικογένεια ανήκουν επίσης το *Hermes* της *Musca domestica* (Warren *et al.*, 1994), το *Hector* της *Musca vetustissima* (Warren *et al.*, 1995), το *Tag1* του *Arabidopsis thaliana* (Tsay *et al.*, 1993), το *Bg/rbg* του *Zea mays* (Hartings *et al.*, 1991) κ.ά. Τα στοιχεία της οικογένειας που έχουν εξεταστεί ως προς την αλληλουχία στην οποία εντίθενται, βρέθηκε ότι εισέρχονται σε οκτανουκλεοτίδιο, μη αυστηρά καθορισμένης αλληλουχίας, το οποίο και διπλασιάζουν. Μέλη της οικογένειας, σε αντίθεση με το στοιχείο *P*, έχουν την ικανότητα να μετατίθενται και σε άλλους οργανισμούς εκτός του φυσικού τους ξενιστή.

#### **1.1.2 Η υπεροικογένεια *mariner-Tc1***

Η υπεροικογένεια *mariner-Tc1* περιλαμβάνει τις οικογένειες *mariner* και *Tc1* και ο διαχωρισμός γίνεται με κριτήριο την ομοιότητα της αλληλουχίας των τρανσποζασών. Όσον αφορά τα μεταθετά στοιχεία της οικογένειας *mariner* μέλη της συναντώνται σε μεγάλο εύρος οργανισμών από μονοκύτταρους μέχρι και τον άνθρωπο. Ο πιο μελετημένος εκπρόσωπος της οικογένειας στα έντομα είναι το *Mos-1* της *Drosophila*

*mauritiana* (Jacobson *et al.*, 1986; Medhora *et al.*, 1991). Έχει μήκος 1286 bp και ορίζεται από κατοπτρικά αντεστραμμένα άκρα μήκους 30 bp.

Η οικογένεια *Tc1* ονομάστηκε έτσι από το ομώνυμο μεταθετό στοιχείο που βρέθηκε στον νηματώδη σκώληκα *Caenorabditis elegans* (Emmons *et al.*, 1983). Το στοιχείο έχει μήκος 1610 bp και ορίζεται από κατοπτρικά αντεστραμμένα άκρα μήκους 54 bp. Άλλα μέλη της οικογένειας είναι το *Tc3* του *C. elegans* (Collins *et al.*, 1989), το *HB1* της *D. melanogaster* (Brierley *et al.*, 1985; Harris *et al.*, 1988), το *Uhu* της *Drosophila heteroneura* (Brezinsky *et al.*, 1990), το *Bari-1* της *D. melanogaster* (Caizzi *et al.*, 1993), το *S* της *D. melanogaster* (Merriman *et al.*, 1995) και το *Minos* της *Drosophila hydei* (Franz and Savakis, 1991).

Μεταθετά στοιχεία της οικογένειας αυτής έχουν βρεθεί και σε ψάρια. Αυτά είναι ανενεργά λόγω της συσσώρευσης μεταλλάξεων. Τα μεταθετά στοιχεία των ψαριών χωρίζονται σε τρεις τύπους ανάλογα με τον οργανισμό προέλευσης: τύπου zebrafish, τύπου σαλμονιδών και τύπου Xenopus *TXr* (Izsvak *et al.*, 1997). Αξίζει να αναφερθεί ότι το μεταθετό στοιχείο *Sleeping Beauty (SB)* στο οποίο θα αναφερθούμε σε παρακάτω κεφάλαιο προέκυψε με *in vitro* ανασύσταση από δύο ανενεργά στοιχεία του *Salmo salar* και ένα επίσης ανενεργό του *Oncorhynchus mykiss* (Ivics *et al.*, 1997).

Τα μεταθετά στοιχεία της υπεροικογένειας *mariner-Tc1* εντίθενται πάντα σε δινουκλεοτίδιο TA το οποίο και διπλασιάζουν κατά την ένθεση. Μέλη της υπεροικογένειας είναι ενεργά και σε άλλους οργανισμούς εκτός του φυσικού τους ξενιστή.

### 1.1.3 Τα μεταθετά στοιχεία *piggyBac* και *tagalong*

Τα μεταθετά στοιχεία *piggyBac* (IFP2; Cary *et al.*, 1989) και *tagalong* (TFP3; Wang *et al.*, 1989) της *Trichoplusia ni* είναι στοιχεία τύπου II αλλά δεν εντάσσονται σε καμία από τις οικογένειες που περιγράφηκαν. Βρέθηκαν ως ένθεση στο γενετικό υλικό του baculovirus, ιού που μολύνει λεπιδόπτερα. Το *piggyBac* έχει μήκος 2476 bp και ορίζεται από κατοπτρικά αντεστραμμένα άκρα μήκους 13 bp. Το *tagalong* ορίζεται από ατελή κατοπτρικά αντεστραμμένα άκρα μήκους 15-bp. Και τα δύο μεταθετά στοιχεία εντίθενται σε τετρανουκλεοτίδιο TTAA το οποίο και διπλασιάζουν με την ένθεση (Cary *et al.*, 1989; Wang and Fraser, 1993). Κατά την εκτομή τους δεν αφήνουν αποτύπωμα, γεγονός που αποτελεί εξαίρεση για τα μεταθετά στοιχεία τύπου II (Fraser *et al.*, 1996, Elick *et al.*, 1996). Ακόμα και το διπλασιασμένο με την ένθεση τετρανουκλεοτίδιο TTAA,

μετά την εκτομή μένει ως μοναδιαίο αντίτυπο στο χρωμόσωμα. Το *piggyBac* είναι ενεργό και σε άλλους οργανισμούς εκτός του φυσικού του ξενιστή.

#### 1.1.4 Το μεταθετό στοιχείο *Minos*

Το μεταθετό στοιχείο *Minos* βρέθηκε ως ένθεση στο γενετικό τόπο του ριβοσωμικού RNA του στελέχους bb<sup>1</sup> της *Drosophila hydei* (Franz and Savakis, 1991). Στη συνέχεια απομονώθηκαν άλλες τρεις μορφές του στοιχείου με μικρές διαφοροποιήσεις στην αλληλουχία. Το στοιχείο *Minos* που χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια είναι ένα υβρίδιο των αντιτύπων *Minos-1* και *Minos-4*, έχει μήκος 1777 bp και ορίζεται από κατοπτρικά αντεστραμμένα άκρα μήκους 255 bp. Κάθε ένα από τα άκρα φέρει δύο ευθείες επαναλήψεις (direct repeats) 18 bp. Ο πυρήνας (TATTAAT) της αλληλουχίας αυτής στο αριστερό άκρο του στοιχείου (το γειτονικό με το 5' άκρο της κωδικής περιοχής της τρανσποζάσης) μοιάζει με την αλληλουχία TATA των ευκαρυωτικών υποκινητών και αποτελεί ελάχιστο υποκινητή για την μεταγραφή του γονιδίου της τρανσποζάσης. Άρα υπάρχουν δύο θέσεις έναρξης της μεταγραφής πάνω στο άκρο του *Minos* (Καπετανάκη Μ., 2001, Διδακτορική διατριβή). Στο δεξί άκρο, υπάρχει η αλληλουχία AATAAA που ενδεχομένως αποτελεί σήμα πολυαδενυλίωσης, υπόθεση που δεν έχει επιβεβαιωθεί. Η μεταξύ των άκρων περιοχή κωδικοποιεί για την τρανσποζάση, και διακόπτεται από ένα ιντρόνιο μήκους 60 bp. Το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης βρίσκεται στη θέση 398 και το κωδικόνιο λήξης στη θέση 1480. Η τρανσποζάση αποτελείται από 341 αμινοξέα και παρουσιάζει 27% ταυτότητα και 46.4% ομοιότητα με την τρανσποζάση *Tc1A*, γεγονός που κατατάσσει το στοιχείο *Minos* στην οικογένεια *Tc1*. Επίσης η τρανσποζάση περιέχει τα αμινοξέα W196 και Y219 καθώς επίσης και το πρότυπο D155E156, D245(N)<sub>34</sub>E280. Το γλουταμικό οξύ στη θέση 280 διαφοροποιεί την οικογένεια *Tc1* από την οικογένεια *mariner* που στην αντίστοιχη θέση των τρανσποζασών τους περιέχουν ασπαρτικό οξύ. Η αμινοτελική περιοχή της τρανσποζάσης έχει 18% ταυτότητα με την περιοχή *paired box* της πρωτεΐνης *paired* της *D. melanogaster* (Franz *et al.*, 1994). Η αλληλουχία αυτή συναντάται σε πρωτεΐνες που έχουν ικανότητα να προσδένονται στο DNA. Για την τρανσποζάση του *Minos* η ιδιότητα πρόσδεσης στο DNA έχει επιβεβαιωθεί, αλλά δεν είναι ακόμα γνωστό αν η πρόσδεση πραγματοποιείται με την αμινοτελική περιοχή (Παυλόπουλος Α., Oehler S., αδημοσίευτα αποτελέσματα). Οι αντίστοιχες περιοχές των τρανσποζασών *Tc1A* και *Tc3*, έχουν επίσης ομοιότητα με την πρωτεΐνη *paired* της *D. melanogaster* και παρουσιάζουν ενεργότητα

πρόσδεσης στο DNA (Colloms *et al.*, 1994; Vos and Plasterk, 1994; van Pouderoyen *et al.*, 1997).

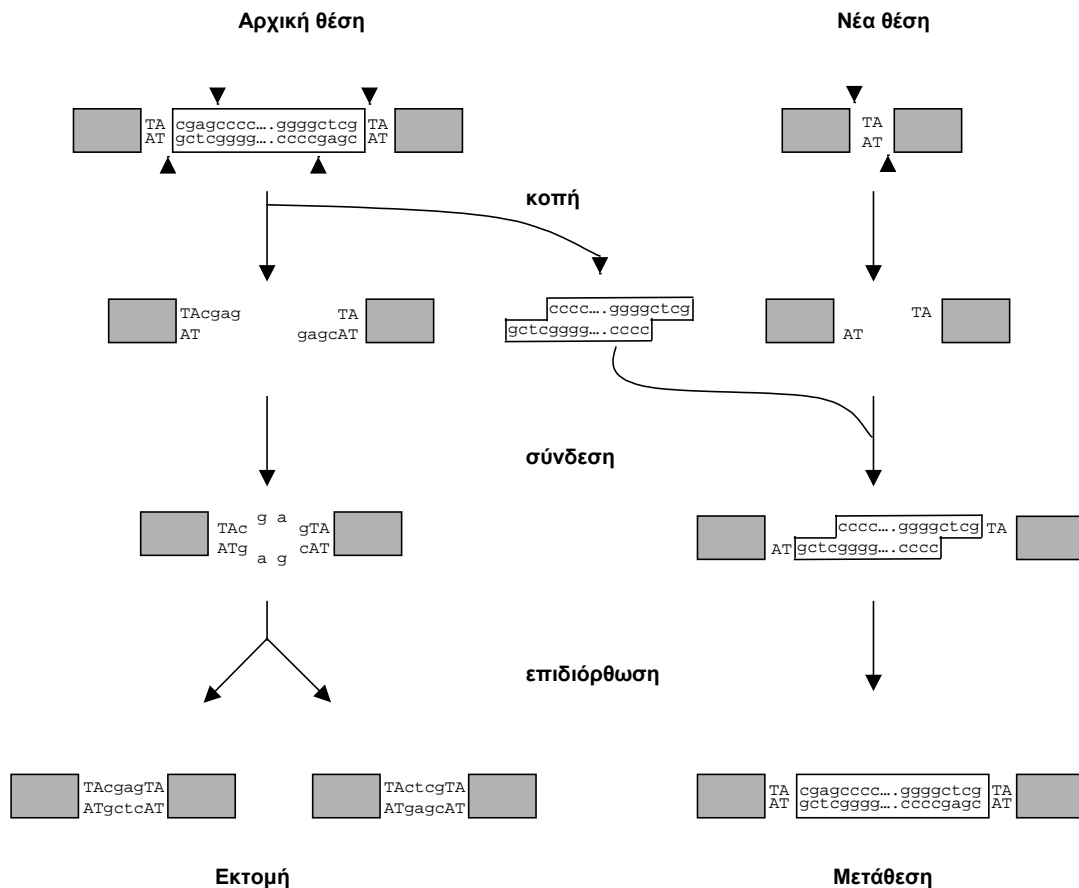
Από τα μεταθετά της οικογένειας *mariner-Tc1*, μόνο το *Minos*, το *S*, το *Tdr1* και το *Tc3* έχουν μεγάλοι μήκους άκρα, τα υπόλοιπα στοιχεία ορίζονται από μικρού μήκους άκρα. Οι ευθείες επαναλήψεις απαντώνται και στα τέσσερα μεταθετά στοιχεία με μεγάλα άκρα και στα *Tc3* και *Minos* έχει βρεθεί ότι αποτελούν περιοχές πρόσδεσης της τρανσποζάσης (Colloms *et al.*, 1994; Παυλόπουλος Α., αδημοσίευτα αποτελέσματα).

## 1.2 Ο μηχανισμός μετάθεσης

Όσον αφορά στα μεταθετά στοιχεία τύπου II, η μετάθεση του κάθε αντιτύπου πραγματοποιείται με την εκτομή του από την αρχική θέση και τη μεταφορά του σε νέα (cut and paste). Τα μεταθετά της υπεροικογένειας *mariner-Tc1* εντίθενται πάντα σε δινουκλεοτίδιο TA το οποίο και διπλασιάζουν κατά την ένθεση. Μετά την εκτομή τους αφήνουν πίσω το διπλασιασμένο TA και μικρό μέρος της αλληλουχίας τους (αποτύπωμα, footprint). Το πιο καλά μελετημένο στοιχείο της οικογένειας *Tc1*, όσον αφορά στο μηχανισμό μετάθεσης, είναι το *Tc3* του *C.elegans* (van Luenen *et al.*, 1994). Αρχικά η τρανσποζάση προσδένεται – ίσως μαζί με άλλες πρωτεΐνες - στα άκρα του στοιχείου και δημιουργεί κοψίματα και στις δύο αλυσίδες της διπλής έλικας, όχι όμως σε θέσεις ακριβώς απέναντι, δημιουργώντας άκρα υπολειπόμενα κατά δύο νουκλεοτίδια και στα δύο άκρα του στοιχείου και οδηγεί στην εκτομή. Στην “άδεια θέση” μένει το διπλασιασμένο δινουκλεοτίδιο TA και δύο νουκλεοτίδια από το ένα ή το άλλο άκρο του στοιχείου (αποτύπωμα, footprint). Το “ελεύθερο” στοιχείο περιέχει την πλήρη αλληλουχία του στα 3’ άκρα αλλά στερείται των δύο τελευταίων νουκλεοτιδίων στα 5’ άκρα. Για να μη “χαθεί το στοιχείο” θα πρέπει να επανεντεθεί χρησιμοποιώντας τα 3’ άκρα. Αυτά φέρουν μία ομάδα 3’ υδροξυλίου. Αυτή η ομάδα μπορεί να πραγματοποιήσει πυρηνόφιλη επίθεση (nucleophilic attack) κατά την ένθεση. Η ένθεση οδηγεί σε διπλασιασμό του δινουκλεοτιδίου TA. Για να προκύψει ο διπλασιασμός, οι δύο ομάδες 3’ υδροξυλίου πρέπει να “επιτεθούν” στους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς που βρίσκονται στην 5’ πλευρά του νουκλεοτιδίου T και στις 2 αλυσίδες. Μετά την ένθεση το κενό των τεσσάρων βάσεων (2+2, TA+άκρο) επιδιορθώνεται, μάλλον μέσω μηχανισμών επιδιόρθωσης DNA του κυττάρου και δημιουργείται ένα πλήρες στοιχείο ανάμεσα στο διπλασιασμένο TA.

Όσον αφορά στο *Minos*, με βάση πειραματικά δεδομένα που προέρχονται από την ανάλυση των αποτυπωμάτων μετά από την εκτομή του από χρωμοσωμικές θέσεις

στη *D. melanogaster* (Arca *et al.*, 1997), προτείνεται ανάλογο μοντέλο μετάθεσης. Η διαφορά του *Minos* σε σχέση με το *Tc3* είναι το ότι το υπολειπόμενο μέρος των άκρων μετά την εκτομή έχει μήκος τεσσάρων νουκλεοτιδίων. Επειδή οι τετρανουκλεοτιδικές προεξοχές που δημιουργούνται δεν είναι συμπληρωματικές καθ' όλο το μήκος τους, μετά από την επιδιόρθωση ή την αντιγραφή του DNA προκύπτουν δύο διαφορετικά αποτυπώματα μήκους έξι νουκλεοτιδίων που αποτελούνται από το διπλασιασμένο TA και τα τέσσερα τελευταία νουκλεοτίδια του ενός ή του άλλου άκρου (Εικόνα 1).



**Εικόνα 1. Μεταθετό στοιχείο *Minos*: Μοντέλο μετάθεσης.** Κατά την εκτομή (αριστερά) δημιουργούνται υπολειπόμενα άκρα τεσσάρων νουκλεοτιδίων. Μετά τη σύνδεσή τους, επειδή δεν είναι συμπληρωματικά καθ' όλο το μήκος τους, ακολουθεί επιδιόρθωση και προκύπτουν τα δύο είδη αποτυπωμάτων που απεικονίζονται. Το στοιχείο μετά την εκτομή μπορεί να εντεθεί σε νέα θέση. Κατά την ένθεση (δεξιά), η τρανσποζάση δημιουργεί δύο κοψίματα εκατέρωθεν του TA της ένθεσης που δημιουργούν υπολειπόμενα άκρα, έτσι ώστε κατά την επιδιόρθωση ένα διπλασιασμένο TA να περιβάλλει το στοιχείο.



Ένας άλλος μηχανισμός επιδιόρθωσης της “κενής θέσης” μετά την εκτομή περιλαμβάνει τη δράση εξωνουκλεάσης στα υπολειπόμενα άκρα και ακολουθείται από επιδιόρθωση χάσματος (gap repair) με τη χρήση του ομολόγου χρωμοσώματος ως μήτρα. Σε αυτή την περίπτωση αναλόγως αν το μεταθετό υπήρχε στον οργανισμό σε ετεροζυγωτία ή ομοζυγωτία, στην “κενή θέση” δεν υπάρχει αποτύπωμα ή ξαναδημιουργείται το μεταθετό στοιχείο αντίστοιχα.

Η υδρόλυση στο 3' άκρο του στοιχείου δημιουργεί την ομάδα 3' υδροξυλίου που πραγματοποιεί την πυρηνόφιλη επίθεση. Η ενός βήματος αντίδραση της ένθεσης έχει προταθεί στη βάση της ύπαρξης του συντηρημένου πρότυπου DDE (Doak *et al.*, 1994). Το πρότυπο αυτό είναι συντηρημένο σε όλες τις τρανσποζάσες της υπεροικογένειας, στις ιντεγκράσες των ρετροϊών και στις τρανσποζάσες των βακτηριακών μεταθετών στοιχείων (Fayet *et al.*, 1990; Khan *et al.*, 1991). Πιθανώς είναι μέρος του ενεργού κέντρου των παραπάνω ενζύμων και παίζει σημαντικό ρόλο στην ενός βήματος αντίδραση μεταφοράς φωσφόρου (one-step phosphoryl transfer reaction; Drelich *et al.*, 1992). Το προτεινόμενο μοντέλο εξηγεί και την προέλευση των αποτυπωμάτων στο σημείο εκτομής.

### 1.3 Μεταθετά στοιχεία και εύρος ξενιστών

Τα μεταθετά στοιχεία της οικογένειας *hAT*, της υπεροικογένειας *mariner-Tc1* καθώς και το *piggyBac* παρουσιάζουν ικανότητα μετάθεσης σε οργανισμούς διαφορετικούς από τους φυσικούς ξενιστές τους. Σε αυτό το κεφάλαιο θα γίνει αναφορά για το εύρος ξενιστών της υπεροικογένειας *mariner-Tc1* και του *piggyBac*. Μερικά από τα στοιχεία της οικογένειας *hAT*, που είναι ενεργά σε ξενιστές εκτός του οργανισμού στον οποίο ανακαλύφθηκαν, θα αναφερθούν σε παρακάτω κεφάλαιο.

Οι μελέτες της ενεργότητας των μεταθετών σε διάφορους οργανισμούς πραγματοποιείται με πειράματα γενετικού μετασχηματισμού (Loukeris *et al.*, 1995a; Loukeris *et al.*, 1995b), με δοκιμασίες εκτομής (Rio *et al.*, 1986; Klinakis *et al.*, 2000a), με δοκιμασίες μετάθεσης (O' Brochta *et al.*, 1994; O' Brochta *et al.*, 1996; Klinakis *et al.*, 2000a), με πειράματα μετάθεσης από πλασμίδιο στο γονιδίωμα κυτταρικών σειρών (Klinakis *et al.*, 2000b; Ivics *et al.*, 1997) και με πειράματα μετάθεσης από χρωμοσωμική θέση – στην οποία το στοιχείο δεν έχει ενσωματωθεί μέσω μετάθεσης - σε νέα χρωμοσωμική θέση (Fisher *et al.*, 2001, Horie *et al.*, 2001). Στους Πίνακες 1 και 2

καταγράφονται οι ξενιστές των μεταθετών στοιχείων της υπερικογένειας *mariner-Tc1* και του *riggyBac* αντίστοιχα.

<b>Πίνακας 1. Μεταθετά στοιχεία της υπεροικογένειας <i>mariner-Tc1</i> και εύρος ξενιστή</b>						
<i>Tc1</i> Στοιχείο	<i>C. elegans</i> Πρωτόζωο/ξενιστής	Άνθρωπος* Νέος ξενιστής	Διαμόλυνση Μέθοδος	Πλασμιδίο Εκτομή από	Χρωμόσωμα Ένθεση σε	Schouten <i>et al.</i> , 1998
		<i>Ustilago maydis</i> (basidiomycete)	Μετασχηματισμός	Πλασμιδίο	Χρωμόσωμα	Ladendorf <i>et al.</i> , 2003
<i>Tc3</i>	<i>C. elegans</i> Νηματώδης	Zebrafish	Μικροένεση	Πλασμιδίο	Χρωμόσωμα	Raz <i>et al.</i> , 1998
<i>SB</i>	Ψάρια	Άνθρωπος*	Διαμόλυνση	Πλασμιδίο	Χρωμόσωμα	Ivics <i>et al.</i> , 1997
		Ψάρια*	Διαμόλυνση	Πλασμιδίο	Χρωμόσωμα	Ivics <i>et al.</i> , 1997
		Zebrafish	Μικροένεση	Πλασμιδίο	Χρωμόσωμα	Davidson <i>et al.</i> , 2003
		ES cells*	Διαμόλυνση	Χρωμόσωμα	Χρωμόσωμα	Luo <i>et al.</i> , 1998
		Σπονδυλωτά*	Διαμόλυνση	Πλασμιδίο	Χρωμόσωμα	Izsvak <i>et al.</i> , 2000
		Ποντικός	Διασταύρωση	Χρωμόσωμα	Χρωμόσωμα	Fischer <i>et al.</i> , 2001
<i>Himar1</i>	<i>H. irritans</i> Έντομο	<i>E. coli</i>	Μετασχηματισμός	Πλασμιδίο	Χρωμόσωμα	Rubin <i>et al.</i> , 1999
		<i>M. smegmatis</i> (mycobacteria)	Μετασχηματισμός	Πλασμιδίο	Χρωμόσωμα	Rubin <i>et al.</i> , 1999
		<i>M. acetivorans</i> (αρχαιοβακτήριο)	Μετασχηματισμός	Πλασμιδίο	Χρωμόσωμα	Zhang <i>et al.</i> , 2000
		Άνθρωπος*	Επιμόλυνση και Διαμόλυνση	Πλασμιδίο	Πλασμιδίο	Zhang <i>et al.</i> , 1998
<i>Mos1</i>	<i>D. mauritiana</i> Έντομο	<i>D. melanogaster</i> (έντομο)	Διασταύρωση	Χρωμόσωμα	Χρωμόσωμα	Garza <i>et al.</i> , 1991
		<i>D. virilis</i> (έντομο)	Μικροένεση	Πλασμιδίο	Χρωμόσωμα	Lohe and Hartl, 1996
		<i>Ae. aegypti</i> (έντομο)	Μικροένεση	Πλασμιδίο	Χρωμόσωμα	Coates <i>et al.</i> , 1998
		<i>L. cuprina</i> (έντομο)	Μικροένεση	Πλασμιδίο	Πλασμιδίο	Coates <i>et al.</i> , 1997
		<i>B. tryoni</i> (έντομο)	Μικροένεση	Πλασμιδίο	Πλασμιδίο	Coates <i>et al.</i> , 1997
		<i>B. mori</i> *	Διαμόλυνση	Πλασμιδίο	Χρωμόσωμα	Wang <i>et al.</i> , 2000
		<i>L. major</i> Πρωτόζωο	Μετασχηματισμός	Πλασμιδίο	Χρωμόσωμα	Gueiros-Filho <i>et al.</i> , 1997
		Κοτόπουλο	Μικροένεση	Πλασμιδίο	Χρωμόσωμα	Sherman <i>et al.</i> , 1998
		Zebrafish	Μικροένεση	Πλασμιδίο	Χρωμόσωμα	Fadool <i>et al.</i> , 1998
		<i>C. elegans</i>	Μικροένεση	Πλασμιδίο	Χρωμόσωμα	Bessereau <i>et al.</i> , 2001
<i>Minos</i>	<i>D. hydei</i> Έντομο	<i>D. melanogaster</i> (έντομο)	Μικροένεση	Πλασμιδίο	Χρωμόσωμα	Loukeris <i>et al.</i> , 1995a
		<i>C. capitata</i> (έντομο)	Μικροένεση	Πλασμιδίο	Χρωμόσωμα	Loukeris <i>et al.</i> , 1995b
		<i>A. gambiae</i> * (έντομο)	Διαμόλυνση	Πλασμιδίο	Χρωμόσωμα	Catteruccia <i>et al.</i> , 2000a
		<i>A. stephensi</i> (έντομο)	Μικροένεση	Πλασμιδίο	Χρωμόσωμα	Catteruccia <i>et al.</i> , 2000b
		<i>Ae. aegypti</i> * (έντομο)	Διαμόλυνση	Πλασμιδίο	Πλασμιδίο	Klinakis <i>et al.</i> , 2000a
		<i>S. frugiperda</i> * (έντομο)	Διαμόλυνση	Πλασμιδίο	Πλασμιδίο	Klinakis <i>et al.</i> , 2000a
		<i>B. mori</i> (έντομο)	Μικροένεση	Πλασμιδίο	Πλασμιδίο	Shimizu <i>et al.</i> , 2000
		<i>Gryllus bimaculatus</i> (έντ)	Μικροένεση	Πλασμιδίο	Πλασμιδίο	Zhang <i>et al.</i> , 2002
		Άνθρωπος*	Διαμόλυνση	Πλασμιδίο	Χρωμόσωμα	Klinakis <i>et al.</i> , 2000b
		<i>Ciona intestinalis</i> (ασκίδιο)	Μικροένεση	Πλασμιδίο	Χρωμόσωμα	Sasakura <i>et al.</i> , 2003

**Πίνακας 2. Μεταθετό στοιχείο piggyBac της *Trichoplusia ni* (λεπιδόπτερο) και εύρος ξενιστών**

Νέος ξενιστής	Μέθοδος	Εκτομή από	Ένθεση σε	Αναφορά
<i>Girardia tigrina</i>	Μικροένεση και ηλεκτροπρόρωση	Πλασμίδιο	Χρωμόσωμα	Gonzalez-Estevéz <i>et al.</i> , 2003
<i>Tribolium castaneum</i>	Μικροένεση	Πλασμίδιο	Χρωμόσωμα	Lorenzen <i>et al.</i> , 2003
<i>Athalia rosae</i>	Μικροένεση	Πλασμίδιο	Χρωμόσωμα	Sumitani <i>et al.</i> , 2003
<i>D. melanogaster</i>	Μικροένεση	Πλασμίδιο	Χρωμόσωμα	Handler and Harrell, 1999
<i>Mamestra brassicae</i> *	Διαμόλυνση	Πλασμίδιο	Χρωμόσωμα	Mandrioli and Wimmer, 2003
<i>Anopheles albimanus</i>	Μικροένεση	Πλασμίδιο	Χρωμόσωμα	Perera <i>et al.</i> , 2002
<i>Aedes aegypti</i>	Μικροένεση	Πλασμίδιο	Χρωμόσωμα	Kokoza <i>et al.</i> , 2001
<i>Bombyx mori</i>	Μικροένεση	Πλασμίδιο	Χρωμόσωμα	Tamura <i>et al.</i> , 2000
<i>Anopheles gambiae</i>	Μικροένεση	Πλασμίδιο	Χρωμόσωμα	Grossman <i>et al.</i> , 2001
<i>Lucilia cuprina</i>	Μικροένεση	Πλασμίδιο	Χρωμόσωμα	Heinrich <i>et al.</i> , 2002
<i>Anopheles stephensi</i>	Μικροένεση	Πλασμίδιο	Χρωμόσωμα	Nolan <i>et al.</i> , 2002
<i>Musca domestica</i>	Μικροένεση	Πλασμίδιο	Χρωμόσωμα	Hediger <i>et al.</i> , 2001
<i>Aedes albopictus</i> , <i>Ae. triseriatus</i>	Μικροένεση	Πλασμίδιο	Πλασμίδιο	Lobo <i>et al.</i> , 2001
<i>Anastrepha suspensa</i>	Μικροένεση	Πλασμίδιο	Χρωμόσωμα	Handler and Harrell, 2001
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Μικροένεση	Πλασμίδιο	Χρωμόσωμα	Handler and McCombs, 2000
<i>Pectinophora gossypiella</i>	Μικροένεση	Πλασμίδιο	Χρωμόσωμα	Peloquin <i>et al.</i> , 2000
<i>Ceratitis capitata</i>	Μικροένεση	Πλασμίδιο	Χρωμόσωμα	Handler <i>et al.</i> , 1998

\* Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε κυτταρικές σειρές.

## 2. Λειτουργική γενωμική

Η πρωτοταγής δομή του γονιδιώματος του ποντικού και του ανθρώπου καθώς και κάποιων οργανισμών μοντέλων είναι στις μέρες μας γνωστή και ακολουθεί ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του γονιδιώματος πολλών ακόμα. Η πληροφορία που υπάρχει σχετικά με τη λειτουργία των γονιδίων είναι πολύ μικρή συγκρινόμενη με τον όγκο της πληροφορίας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γονιδίων, καθώς τα γονίδια για τα οποία γνωρίζουμε τη λειτουργία τους και τις αλληλεπιδράσεις τους με προϊόντα άλλων γονιδίων αποτελούν ένα μικρό μέρος του συνολικού αριθμού. Πολλές τεχνικές έχουν αναπτυχθεί για τη μετάβαση από την πρωτοταγή δομή στη λειτουργία των γονιδίων, μια καινούρια ερευνητική περιοχή η οποία ονομάζεται Λειτουργική Γενωμική (functional genomics, Hicks *et al.*, 1997; Woychik *et al.*, 1998). Η βιοπληροφορική παίζει σπουδαίο ρόλο στην ομαδοποίηση γονιδίων και πρωτεϊνών με βάση ομοιότητες σε νουκλεοτιδικό και αμινοξικό επίπεδο, αντίστοιχα, και στην αναγνώριση νέων γονιδίων. Οι διατάξεις (arrays, Schena *et al.*, 1996), η διαφορική παρουσίαση (differential display, Liang and Pardee, 1995), η σειριακή ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης (serial analysis of gene expression-SAGE, Velculescu *et al.*, 1995), η φασματοσκοπία μάζας, η ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτώματα δύο διαστάσεων και το σύστημα εύρεσης αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών “των δύο υβριδίων” (two-hybrid screen, Fields and Sternglanz, 1994; Fromont-Racine *et al.*, 1997) αποτελούν πειραματικές προσεγγίσεις που δίνουν σημαντικές πληροφορίες για τη δράση αγνώστων έως τώρα γονιδίων. Παρόλα αυτά η ολοκληρωμένη ανάλυση για τη λειτουργία του κάθε γονιδίου θα προκύψει από μελέτη των γονιδίων στο φυσικό τους περιβάλλον, στο επίπεδο του οργανισμού. Όσον αφορά στην εύρεση της λειτουργίας των ανθρώπινων γονιδίων χρησιμοποιούνται κυτταρικές σειρές και ο ποντικός ως οργανισμός μοντέλο. Ο ποντικός προσφέρει το μεγάλο πλεονέκτημα της χρήσης των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (Embryonic Stem cells). Σε αυτά μπορούν να δημιουργηθούν μεταλλάξεις, με διάφορους τρόπους που θα συζητηθούν παρακάτω, και στη συνέχεια τα κύτταρα αυτά έχουν την ικανότητα δημιουργίας σειρών ποντικών όπου μελετάται η μετάλλαξη *in vivo*.

Η δημιουργία μεταλλάξεων στον ποντικό μπορεί να γίνει με ακτίνες X, με χημικές ουσίες (Kasarskis *et al.*, 1998), με μεταλλαξιγένεση μέσω ενθέσεων (insertional mutagenesis, Soriano *et al.*, 1987), με στόχευση γονιδίων με ομόλογο ανασυνδυασμό (gene targeting, Bradley, 1993; Ramirez-Solis *et al.*, 1993) και με παγίδευση γονιδίων (gene trapping, Friedrich and Soriano, 1991; Evans *et al.*, 1997).

## 2.1 Παγίδευση γονιδίων

Η παγίδευση γονιδίων περιλαμβάνει την παγίδευση ενισχυτών, υποκινητών, γονιδίων/εξωνίων και σημάτων πολυαδενυλίωσης. Στην παγίδευση ενισχυτών οι κατασκευές οι οποίες χρησιμοποιούνται φέρουν ένα γονίδιο αναφοράς υπό τον έλεγχο ελάχιστου υποκινητή και ένα δείκτη επιλογής υπό τον έλεγχο συστατικού υποκινητή για την επιλογή όλων των γεγονότων ενσωμάτωσης της κατασκευής στο γένωμα. Αν κατά την ενσωμάτωση το γονίδιο αναφοράς τεθεί υπό τον έλεγχο γειτονικού ενισχυτή, η ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς οδηγεί στο χαρακτηρισμό του ενισχυτή. Μικρό μέρος των ενθέσεων είναι μεταλλαξιγόνες. Η παγίδευση ενισχυτών έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη *Drosophila melanogaster* με γονίδιο αναφοράς το *lacZ* υπό τον έλεγχο ελάχιστου υποκινητή, κλωνοποιημένο στο μεταθετό στοιχείο *P* μαζί με ένα δείκτη επιλογής (χρώμα ματιού) (O' Kane and Gehring, 1987; Bellen *et al.*, 1989; Sentry *et al.*, 1994). Στον ποντικό λίγες αναφορές υπάρχουν για παγίδευση ενισχυτών (Kothary *et al.*, 1988, Allen *et al.*, 1988). Ο προσδιορισμός του παγιδευμένου γονιδίου με αυτή τη μέθοδο είναι περίπλοκη διαδικασία και γι' αυτό η μέθοδος δεν προτιμάται για μεγάλης κλίμακας μεταλλαξιγένεση.

Στην παγίδευση υποκινητών, οι φορείς φέρουν γονίδιο αναφοράς που στερείται υποκινητή και έχει κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης. Δίπλα στο γονίδιο αναφοράς μπορεί να φέρουν έναν αυτόνομο δείκτη επιλογής για την επιλογή όλων των γεγονότων ενσωμάτωσης του φορέα στο γένωμα. Η ενσωμάτωση του φορέα μέσα σε εξώνιο ή πολύ κοντά σε κάποιο υποκινητή μεταγραφικά ενεργού γονιδίου ενεργοποιεί το γονίδιο αναφοράς. Μεγάλο μέρος των ενθέσεων είναι μεταλλαξιγόνες γιατί εμποδίζεται η παραγωγή ακέραιης ενδογενούς πρωτεΐνης.

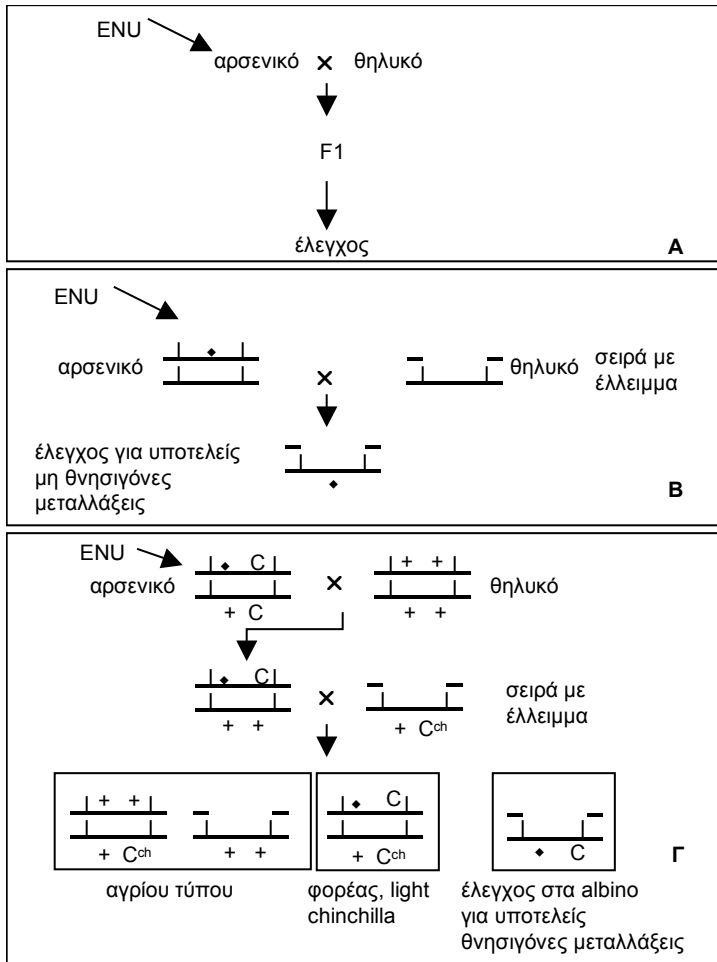
Στην παγίδευση γονιδίων/εξωνίων οι φορείς φέρουν ένα δέκτη συρραφής πριν το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης του γονιδίου αναφοράς (η παρουσία του ATG είναι προαιρετική). Η ενσωμάτωση του φορέα σε ιντρόνιο κατά τη φορά έκφρασης μεταγραφικά ενεργού ενδογενούς γονιδίου οδηγεί σε υβριδικό μετάγραφο. Αν η ένθεση έχει γίνει κατά τέτοιο τρόπο ώστε το αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου αναφοράς να συμπίπτει με του ενδογενούς γονιδίου, τότε παράγεται υβριδική πρωτεΐνη από μέρος της ενδογενούς πρωτεΐνης και της πρωτεΐνης αναφοράς. Μεγάλο μέρος των ενθέσεων είναι μεταλλαξιγόνες γιατί εμποδίζεται η παραγωγή ακέραιης ενδογενούς πρωτεΐνης. Τα πιο γνωστά γονίδια αναφοράς για την παγίδευση εξωνίων είναι το *lacZ* και το *geo* (προϊόν σύντηξης των γονιδίων *lacZ* και του γονιδίου της ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη).

Στην παγίδευση σημάτων πολυαδενυλίωσης οι φορείς φέρουν το γονίδιο αναφοράς υπό τον έλεγχο συστατικού υποκινητή αλλά χωρίς σήμα πολυαδενυλίωσης. Λόγω της έλλειψης αυτού το μετάγραφο είναι ασταθές με αποτέλεσμα να μην παράγεται η πρωτεΐνη αναφοράς εκτός και αν μετά την ένθεση του φορέα γίνει σύντηξη με σήμα πολυαδενυλίωσης ενδογενούς γονιδίου (Niwa *et al.*, 1993; Yoshida *et al.*, 1995). Γι αυτό το λόγο το γονίδιο αναφοράς φέρει έναν δότη συρραφής που επιτρέπει τη συρραφή του με εξώνια ενδογενών γονιδίων. Στη μέθοδο αυτή, η έκφραση του γονιδίου αναφοράς δεν εξαρτάται από τη μεταγραφική ενεργότητα του ενδογενούς γονιδίου και η ένθεση του φορέα δεν οδηγεί σε μετάλλαξη εκτός και αν προστεθεί κασέτα παγίδευσης αλληλουχιών από το 5' άκρο (παγίδευση υποκινητών ή γονιδίων/εξωνίων).

## **2.2 Μέθοδοι για τη δημιουργία μεταλλάξεων στον ποντικό**

### **2.2.1 Χημική μεταλλαξιγένεση**

Η ικανότητα του ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) να προκαλεί σημειακές μεταλλάξεις στον ποντικό έχει συμβάλει στην αναγνώριση γονιδίων που ελέγχουν την ανάπτυξη, βιοχημικές αντιδράσεις, τους κirkάδιους ρυθμούς κ.ά. Η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση επικρατών μη θνησιγόνων μεταλλάξεων (Peters *et al.*, 1986; Favor *et al.*, 1991; King *et al.*, 1997), με τον έλεγχο των απογόνων αρσενικών που έχουν ενεθεί με ENU για την εύρεση επικρατών φαινοτύπων (Εικόνα 2A). Επίσης η μεταλλαξιγένεση με ENU έχει χρησιμοποιηθεί και για την αναγνώριση υποτελών μεταλλάξεων. Όσον αφορά στις μη θνησιγόνες μεταλλάξεις, αυτές μπορούν να αναγνωριστούν σε συγκεκριμένες χρωμοσωμικές περιοχές μετά από διασταύρωση αρσενικών που έχουν ενεθεί με ENU με θηλυκές οι οποίες φέρουν γνωστά χρωμοσωμικά ελλείμματα (Εικόνα 2B). Τα στελέχη με ελλείμματα είναι καλά χαρακτηρισμένα και η εύρεση του μεταλλαγμένου γενετικού τόπου διευκολύνεται. Με αυτόν τον τρόπο όμως δεν διαχωρίζονται οι επικρατείς μεταλλάξεις μέσα ή έξω από την αντίστοιχη περιοχή του ελλείμματος από τις υποτελείς που ανιχνεύονται λόγω έλλειψης του αγρίου τύπου αλληλομόρφου τους.



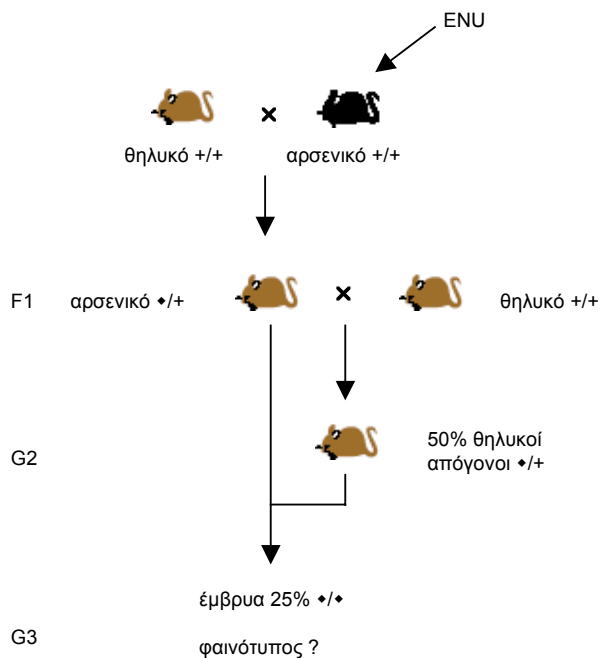
**Εικόνα 2.** Μεταλαξιγένεση με ENU στον ποντικό. **(Α)** Ανίχνευση επικρατών μη θνησιγόνων μεταλλάξεων. Τα ενεμένα με ENU αρσενικά διασταυρώνονται με θηλυκές μη ενεμένες και στους απογόνους αυτών γίνεται έλεγχος για την ανίχνευση επικρατών μη θνησιγόνων μεταλλάξεων. **(Β)** Ανίχνευση υποτελών μη θνησιγόνων μεταλλάξεων σε συγκεκριμένες περιοχές του γενώματος για τις οποίες υπάρχουν σειρές που φέρουν ελλείμματα. Τα ενεμένα με ENU αρσενικά διασταυρώνονται με θηλυκές ημίζυγες για τα ελλείμματα και στους απογόνους αυτών γίνεται έλεγχος για μεταλλάξεις. Οι επικρατείς μεταλλάξεις δεν διαχωρίζονται

στην περίπτωση αυτή. **(Γ)** Ανίχνευση υποτελών θνησιγόνων μεταλλάξεων σε συγκεκριμένες περιοχές του γενώματος για τις οποίες υπάρχουν σειρές που φέρουν ελλείμματα. Το χρωμόσωμα που θα ελεγχθεί για μεταλλάξεις και το ομόλογο του ελλείμματος χρωμόσωμα είναι γενετικά μαρκαρισμένα: το πρώτο φέρει τη μετάλλαξη albino (C, άσπρο χρώμα τριχώματος) και το δεύτερο φέρει το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο chinchilla ( $C^{ch}$ , chinchilla χρώμα τριχώματος) στον γενετικό τόπο albino. Σύμφωνα με το σχήμα διασταυρώσεων που απεικονίζεται, τρεις κατηγορίες ποντικών, όσον αφορά στο χρώμα του τριχώματος, θα προκύψουν (άσπρο, ανοιχτό chinchilla και αγρίου τύπου). Τα ποντίκια με άσπρο χρώμα φέρουν πιθανές μεταλλάξεις στην περιοχή του ελλείμματος. Έλλειψη άσπρων ποντικών μετά από τη διασταύρωση σημαίνει την ύπαρξη υποτελούς θνησιγόνου μετάλλαξης. Με αυτόν τον τρόπο ανιχνεύονται και υποτελείς μη θνησιγόνες μεταλλάξεις ενώ οι επικρατείς μεταλλάξεις ξεχωρίζουν από την πρώτη διασταύρωση. Ο ρόμβος απεικονίζει μετάλλαξη που προκάλεσε το ENU.

Όσον αφορά στην αναγνώριση υποτελών θνησιγόνων μεταλλάξεων, αυτή πραγματοποιείται με δύο τρόπους. Ο απλούστερος είναι η εύρεση υποτελών θνησιγόνων μεταλλάξεων σε συγκεκριμένες θέσεις μετά από διασταύρωση των



ενεμένων ποντικών με θηλυκές οι οποίες φέρουν γνωστά χρωμοσωμικά ελλείμματα στις θέσεις αυτές και γονίδια δείκτες (π.χ. χρώμα τριχώματος). Ο τρόπος αυτός χρειάζεται δύο γενεές ποντικών από τα ενεμένα αρσενικά ποντικών. Για παράδειγμα, 24 τέτοιες μεταλλάξεις αναγνωρίστηκαν όταν βρέθηκαν *in trans* με κάποια ελλείμματα γύρω από τον γενετικό τόπο του γονιδίου albino (Rinchik *et al.*, 1990a; Rinchik and Carpenter, 1999, Εικόνα 2Γ). Με αυτόν τον τρόπο ανιχνεύονται και υποτελείς μη θνησιγόνες μεταλλάξεις ενώ οι επικρατείς μεταλλάξεις ξεχωρίζουν από την πρώτη διασταύρωση. Ο δεύτερος τρόπος απαιτεί μια επιπλέον γενεά ποντικών αλλά έχει το πλεονέκτημα ότι δεν περιορίζει την εύρεση μεταλλάξεων σε συγκεκριμένες περιοχές του γενώματος (Εικόνα 3). Σε πειράματα μεταλλαξιγένεσης με ENU για την εύρεση μεταλλάξεων που επηρεάζουν τον πρόσθιο εγκέφαλο απομονώθηκαν 4 μεταλλάξεις από 150 μεταλλαγμένες “σειρές” (αρσενικοί απόγονοι ενεμένων αρσενικών) (Hentges *et al.*, 1999). Όταν το ερώτημα είναι πιο γενικό, όπως εύρεση μεταλλάξεων που επηρεάζουν το έμβρυο κατά το μέσο της εγκυμοσύνης, απομονώνονται περισσότερες μεταλλάξεις από τις αρχικές μεταλλαγμένες “σειρές” (μία μετάλλαξη ανά 5 με 10 “σειρές” που ελέγχονται, Kasarskis *et al.*, 1998).



**Εικόνα 3. Ανίχνευση υποτελών θνησιγόνων μεταλλάξεων στον ποντικό μετά από μεταλλαξιγένεση με ENU.** Αρσενικοί ποντικοί (F1), ετερόζυγοι για πολλές διαφορετικές μεταλλάξεις, απόγονοι των αρσενικών που ενέθηκαν με ENU, διασταυρώνονται με θηλυκές και στην επόμενη γενεά (G2) κάθε θηλυκή έχει 50% πιθανότητα να έχει κληρονομήσει οποιαδήποτε μετάλλαξη φέρει ο F1 αρσενικός. Αν φέρει συγκεκριμένη μετάλλαξη τότε μετά τη διασταύρωσή της με τον πατέρα της (F1) το 25% των απογόνων της θα είναι ομόζυγοι για τη μετάλλαξη αυτή. Η

ύπαρξη χαρτογραφημένων πολυμορφισμών μεταξύ των στελεχών βάσει της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR-based polymorphisms), διευκολύνει την κλωνοποίηση του μεταλλαγμένου γενετικού τόπου. Για το λόγο αυτό σε τέτοιου είδους πειράματα οι διασταυρώσεις πραγματοποιούνται μεταξύ διαφορετικών στελεχών (μαύρο και καφέ στην εικόνα). Ο ρόμβος απεικονίζει μετάλλαξη που προκάλεσε το ENU.

Στην ταυτοποίηση του μεταλλαγμένου γενετικού τόπου βοηθά η ύπαρξη καλά χαρακτηρισμένων στελεχών ποντικών και η αλληλουχία του γονιδιώματος. Περίπου 24 ετερόζυγοι ποντικοί, φορείς της μετάλλαξης, χρειάζονται για τη χαρτογράφηση της σε περιοχή 20 centimorgan (1% του γενώματος) με τη χρήση 8000 χαρτογραφημένων πολυμορφισμών βασισμένων στην Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR-based polymorphisms). Με 2000 αντιδράσεις PCR, η μετάλλαξη χαρτογραφείται σε μια μικρή χρωμοσωμική περιοχή (Anderson, 2000). Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι η μεταλλαξιγένεση με ENU οδηγεί στην παραγωγή "σειρών" που φέρουν περίπου 100 μεταλλάξεις η κάθε μία, η ταυτοποίηση της μετάλλαξης που προκαλεί το φαινότυπο φαίνεται αρκετά δύσκολη διαδικασία. Σε πέντε, όμως, από τις έξι μεταλλάξεις που απομονώθηκαν σε πειράματα μεταλλαξιγένεσης τέτοιου τύπου, οι φαινότυποι χαρτογραφήθηκαν σε ένα μόνο γενετικό τόπο (Hentges *et al.*, 1999; Kasarskis *et al.*, 1998).

Μετά από ειδικά τεστ (specific locus test, Hitotsumachi *et al.*, 1985) υπολογίστηκε ότι σε 1000 αρσενικούς απογόνους ενεμένων με ENU αρσενικών ποντικών υπάρχουν κατά μέσο όρο 1,3 μεταλλάξεις ανά γονίδιο που οδηγούν σε ορατό φαινότυπο. Σε κατανομή Poisson οι μεταλλάξεις που υπάρχουν στους 1000 απογόνους αντιπροσωπεύουν το 70% του κορεσμένου από μεταλλάξεις σε κάθε γενετικό τόπο γενώματος.

Η μεταλλαξιγένεση με ENU και ακτίνες X, είναι αποτελεσματική και χρησιμοποιείται αρκετά αλλά οι εφαρμογές της είναι περιορισμένες. Στις περιπτώσεις όπου είναι επιθυμητός ο κορεσμός του γενώματος με μεταλλάξεις τέτοιου τύπου, απαιτείται μεγάλος αριθμός ζώων και διασταυρώσεων και πολύς κόπος για τη χαρτογράφηση των μεταλλαγμένων γονιδίων.

Μία άλλη μέθοδος χημικής μεταλλαξιγένεσης που συχνά οδηγεί σε ελλείμματα ή μετατοπίσεις είναι η μεταλλαξιγένεση με chlorambucil (Rinchik *et al.*, 1990b). Η ιδιότητα αυτή καθιστά το συγκεκριμένο μεταλλαξιγόνο χρήσιμο εργαλείο για τη δημιουργία σειρών ποντικών με χρωμοσωμικά ελλείμματα.

## **2.2.2 Μεταλλαξιγένεση με ηλεκτροπόρωση γυμνού DNA**

Οι μέθοδοι μεταλλαξιγένεσης με τη χρήση φορέων DNA διακρίνονται σε δύο τύπους: τη στόχευση γονιδίων (gene targeting) και την παγίδευση γονιδίων (gene trapping). Η στόχευση γονιδίων (Bradley, 1993; Ramirez-Solis *et al.*, 1993) βασίζεται στον ομόλογο ανασυνδυασμό και χρησιμοποιείται για τη μετάλλαξη συγκεκριμένων

γονιδίων. DNA που φέρει αλληλουχίες του γονιδίου εκατέρωθεν δείκτη επιλογής, εισάγεται στα κύτταρα ES με ηλεκτροπόρωση, επιλέγονται οι αποικίες στις οποίες έγινε στόχευση και στη συνέχεια από αυτές μπορεί να δημιουργηθεί ποντικός που να φέρει την μετάλλαξη, στον οποίο η μελέτη θα γίνει *in vivo*. Η μέθοδος είναι πολύ αποτελεσματική αλλά έχει μειονεκτήματα. Περιορίζεται στη μετάλλαξη των γονιδίων που είναι ήδη γνωστά, για κάθε γονίδιο απαιτείται και η κατασκευή διαφορετικού φορέα στόχευσης που φέρει μέρος της αλληλουχίας του και τέλος η μετάλλαξη όλων των γονιδίων με αυτόν τον τρόπο είναι πολύ χρονοβόρα.

Η παγίδευση γονιδίων γίνεται με ηλεκτροπόρωση σε κύτταρα ES (Friedrich and Soriano, 1991; Skarnes *et al.*, 1992; Kothary *et al.*, 1988; Allen *et al.*, 1988; Niwa *et al.*, 1993) με φορείς παγίδευσης γονιδίων που περιγράφηκαν στο κεφάλαιο 2.1. Πιο εξελιγμένα γονίδια αναφοράς από αυτά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παγίδευση γονιδίων με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά π.χ. γονιδίων που κωδικοποιούν μεμβρανικές ή εκκρινόμενες πρωτεΐνες (Skarnes *et al.*, 1995). Στόχο αποτελούν όλα τα γονίδια και δεν απαιτείται πληροφορία για την αλληλουχία τους. Με την μέθοδο αυτή το μεταλλαγμένο γονίδιο “σημαίνεται” καθώς εισάγεται σε αυτό DNA γνωστής αλληλουχίας. Αυτό βοηθά σημαντικά στην κλωνοποίησή του. Η μέθοδος αυτή ενδείκνυται για μεγάλης κλίμακας μεταλλαξιγένεση και όσον αφορά στα κύτταρα ES, από αυτά μπορεί να δημιουργηθεί ποντικός που να φέρει την μετάλλαξη, στον οποίο η μελέτη θα γίνει *in vivo*. Τα προβλήματα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι η ηλεκτροπόρωση συχνά οδηγεί σε ένθεση πολλών αντιγράφων (concatamers) του φορέα στην ίδια θέση (Friedrich and Soriano 1991) και η ένθεση μπορεί να προκαλέσει ελλείψεις και αναδιατάξεις του χρωμοσωμικού DNA στην περιοχή όπου πραγματοποιείται. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αλλοίωση της δομής του DNA η οποία μπορεί να επηρεάσει εκτός από το παγιδευμένο γονίδιο και γειτονικά (Niwa *et al.*, 1993). Το ποσοστό του γενωμικού DNA που μπορεί να αποτελέσει στόχο για ενθέσεις δεν είναι γνωστό.

### **2.2.3 Μεταλλαξιγένεση με τροποποιημένους ρετροϊούς**

Αρχικά οι τροποποιημένοι ρετροϊοί (Moloney murine leukemia virus) χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα μεταλλαξιγένεσης μέσω ενθέσεων (insertional mutagenesis) με μόλυνση εμβρύων πριν ή μετά την εμφύτευσή τους. Μέρος των ρετροϊών ενσωματώνεται στο γένωμα των βλαστομεριδίων που μολύνουν (προϊοί) και πολλές από τις ενθέσεις (70-100%) είναι κληρονομήσιμες (Jaenisch *et al.*, 1983; Soriano

and Jaenisch, 1986; Soriano *et al.*, 1987). Ποσοστό 4% των ενθέσεων των προϊών, σε ομόζυγη κατάσταση, αποτελούν υποτελείς θνησιγόνες μεταλλάξεις (Soriano *et al.*, 1987).

Στη συνέχεια στους ρετροϊούς προστέθηκαν κασέτες παγίδευσης υποκινητών (von Melchner *et al.*, 1990; von Melchner *et al.*, 1992), στο LTR τους. Η τροποποίηση δεν επηρεάζει τη λειτουργία του ιού. Οι ιοί μολύνουν και ενσωματώνονται στο γένωμα των κυττάρων ES, στα οποία η λειτουργία του γονιδίου αναφοράς για την παγίδευση υποκινητών δεν φαίνεται να επηρεάζεται από ρυθμιστικά στοιχεία του ιού αλλά μόνο από ενεργούς ενδογενείς υποκινητές (Τα LTRs δεν είναι μεταγραφικά ενεργά στα κύτταρα ES). Οι κλώνοι που φέρουν παγιδευμένους υποκινητές μπορούν να δημιουργήσουν ποντικούς για τη μελέτη της μετάλλαξης *in vivo*. Περίπου το 50% των ενθέσεων των προϊών αποτελούν υποτελείς θνησιγόνες μεταλλάξεις σε ομόζυγη κατάσταση (von Melchner *et al.*, 1992).

Μεταγενέστερα στους τροποποιημένους ιούς προστέθηκαν κασέτες παγίδευσης γονιδίων με δέκτη συρραφής (Friedrich and Soriano, 1991), οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία. Τέλος δημιουργήθηκαν τροποποιημένα γονίδια αναφοράς (GFNR) για την παγίδευση επαγόμενων γονιδίων σε κυτταρικές σειρές (MLP-29, Medico *et al.*, 2001).

Η χρήση ιικών φορέων για μεταλλαξιγένεση βοηθά σημαντικά στην κλωνοποίηση του μεταλλαγμένου γονιδίου γιατί αυτό “σημαίνεται” καθώς εισάγεται σε αυτό DNA γνωστής αλληλουχίας. Οι ενθέσεις των ρετροϊών δεν οδηγούν σε ελλείψεις και αναδιατάξεις του γενωμικού DNA. Με την πιλοδότηση του ιού πριν την μόλυνση χρησιμοποιείται ο κατάλληλος τίτλος που οδηγεί σε μοναδιαίες ενθέσεις στην πλειοψηφία των κυττάρων. Η συγκεκριμένη μέθοδος όμως, παρουσιάζει περιορισμούς όσον αφορά στον κορεσμό του γενώματος με ενθέσεις, διότι οι ιοί έχουν επιλεκτικότητα στην ένθεσή τους και προτιμούν να εισέρχονται κοντά σε θέσεις που είναι ευαίσθητες στην ενδονουκλεάση DNaseI (Vijaya *et al.*, 1986) ή σε μεταγραφικά ενεργές περιοχές (Scherdin *et al.*, 1990). Επίσης στην περίπτωση των ρετροϊών είναι απαραίτητη η ύπαρξη και δεύτερης κυτταρικής σειράς για την παραγωγή των ιοσωμάτων. Τέλος τα LTR σε κάποιες περιπτώσεις λειτουργούν ως ενισχυτές και αλλοιώνουν τα επίπεδα έκφρασης παρακείμενων γονιδίων (Jonkers and Berns, 1996; Allen and Berns, 1996; Berns *et al.*, 1999).

### 3. Μεταθετά στοιχεία και λειτουργική γενωμική

Η χρήση των μεταθετών στοιχείων στη μεταλλαξιγένεση έχει συμβάλλει πολύ στη μετάβαση από την αλληλουχία στη λειτουργία των γονιδίων. Ένα μεταθετό στοιχείο για να θεωρηθεί ικανό εργαλείο για μεγάλης κλίμακας μεταλλαξιγένεση (genome wide mutagenesis) σε διάφορα είδη θα πρέπει να πληροί τις παρακάτω προϋποθέσεις: να είναι ενεργό σε διαφορετικούς οργανισμούς, να μετατίθεται με υψηλή συχνότητα στο γένωμα ώστε να είναι εφικτός ο κορεσμός του γενώματος με ενθέσεις και να μην παρουσιάζει επιλεκτικότητα στη θέση ένθεσης. Στα επόμενα κεφάλαια θα παρουσιαστούν πειράματα λειτουργικής γενωμικής με μεταθετά στοιχεία σε διάφορους οργανισμούς καθώς και τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των διαφορετικών συστημάτων.

#### 3.1 Μεταθετά στοιχεία και μεταλλαξιγένεση στα έντομα

Φορείς παγίδευσης ενισχυτών, βασισμένοι στο μεταθετό στοιχείο *P* έχουν χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στη *D. melanogaster* (O' Kane and Gehring, 1987; Bellen *et al.*, 1989; Sentry *et al.*, 1994, Wilson *et al.*, 1989) για το χαρακτηρισμό μεταγραφικά ενεργών περιοχών. Οι φορείς αυτοί όπως προαναφέρθηκε φέρουν ένα γονίδιο αναφοράς (*lacZ*) υπό τον έλεγχο ελάχιστου υποκινητή και ένα δείκτη επιλογής υπό τον έλεγχο συστατικού υποκινητή, για την ανίχνευση όλων των γεγονότων μετάθεσης. Τα παραπάνω κλωνοποιούνται ανάμεσα από τα άκρα του στοιχείου *P* και το στοιχείο ενσωματώνεται στο γένωμα, απ' όπου κινητοποιείται παρουσία τρανσποζάσης από την αρχική του θέση, μέσω μετάθεσης, για να δημιουργήσει ανεξάρτητες ενθέσεις. Το γονίδιο αναφοράς (*lacZ*) εκφράζεται μόνο εάν το τρανσποζόνιο έχει εντεθεί εντός της "εμβέλειας" ενός ενισχυτή. Με τη χρήση τέτοιου είδους φορέων, έχουν προκύψει πολλές σειρές που δείχνουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης του *lacZ* (ιστοειδικά και χρονικά) και έχουν αναγνωρισθεί τα ενδογενή γονίδια που βρίσκονται υπό τον έλεγχο του παγιδευμένου υποκινητή. Βασικό μειονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι το ότι πολλοί ενισχυτές δρουν από μεγάλη απόσταση, οπότε σε τέτοιες περιπτώσεις είναι ιδιαίτερα δύσκολος ο χαρακτηρισμός του γονιδίου που επηρεάζεται από τον παγιδευμένο ενισχυτή. Επίσης τα γεγονότα παγίδευσης δεν είναι πάντα μεταλλαξιγόνα.

Για τους παραπάνω λόγους κατασκευάστηκαν πιο εξελιγμένοι φορείς όπως είναι οι φορείς "διπλής παγίδευσης" (Lukacsovich *et al.*, 2001) που φέρουν ανάμεσα στα άκρα

του τρανσποζονίου έναν ισχυρό δέκτη συρραφής και ένα γονίδιο αναφοράς (παγίδευση εξωνίου) καθώς επίσης και ένα δείκτη επιλογής υπό τον έλεγχο συστατικού υποκινητή που στερείται σήματος πολυαδενυλίωσης (παγίδευση σήματος πολυαδενυλίωσης) και φέρει ισχυρό δότη συρραφής. Κατ' αυτόν τον τρόπο, ένθεση του φορέα σε ιντρόνιο ενεργού ή όχι γονιδίου οδηγεί σε έκφραση του δείκτη επιλογής, αφού πραγματοποιηθεί συρραφή του με το επόμενο ιντρόνιο. Στην περίπτωση που το γονίδιο είναι ενεργό, γίνει συρραφή του γονιδίου αναφοράς με το 5' εξώνιο και το αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου αναφοράς συμπίπτει με το πλαίσιο του ενδογενούς γονιδίου, το γονίδιο αναφοράς θα εκφραστεί. Η μέθοδος αυτή οδηγεί σε μεγάλο ποσοστό μεταλλάξεων απώλειας λειτουργίας (loss of function) και σε εύκολη κλωνοποίηση του παγιδευμένου γονιδίου. Μία παραλλαγή του παραπάνω σχήματος είναι η χρήση του γονιδίου της GFP, με έναν ισχυρό δέκτη συρραφής στο 5' άκρο και ισχυρό δότη συρραφής στο 3' άκρο, κλωνοποιημένης στο τρανσποζόνιο (protein trapping; Morin *et al.*, 2001). Οι μύγες που φθορίζουν φέρουν ένθεση του τρανσποζονίου μέσα σε ιντρόνιο μεταγραφικά ενεργού γονιδίου, το αναγνωστικό πλαίσιο της GFP συμπίπτει με αυτό του ενδογενούς γονιδίου και το γονίδιο της GFP αποτελεί ένα επιπλέον εξώνιο. Εάν η GFP δεν καταστρέφει κάποια από τις λειτουργικές περιοχές της παγιδευμένης πρωτεΐνης βοηθά και στον υποκυτταρικό εντοπισμό του παγιδευμένου γονιδίου.

Το στοιχείο *P* δεν παρουσιάζει ενεργότητα εκτός του είδους *Drosophila melanogaster* και των συγγενών του, γεγονός που περιορίζει τη χρήση του. Εντίθεται πάντα σε οκτανουκλεοτίδιο, μη αυστηρά καθορισμένης αλληλουχίας, το οποίο διπλασιάζεται μετά την ένθεση. Υπάρχουν περιοχές στο γένωμα όπου το στοιχείο αυτό προτιμά να εντίθεται (hot spots) και άλλες όπου ποτέ δεν έχει βρεθεί ένθεσή του (cold spots). Επιπλέον παρουσιάζει επιλεκτικότητα ένθεσης στις 5' περιοχές γονιδίων (Spradling *et al.*, 1995). Όσον αφορά στην επιλεκτικότητα ένθεσης εντός των μονάδων μεταγραφής (transcription units), προτιμά τις 5' μη μεταφραζόμενες περιοχές. Η χρήση των μεταθετών στοιχείων για παγίδευση εξωνίων ευνοείται όταν τα μεταθετά παρουσιάζουν τάση ένθεσης σε ιντρόνια. Η ιδιότητα όμως του *P* να προτιμά τις 5' περιοχές γονιδίων το καθιστά πολύτιμο εργαλείο για πειράματα κέρδους λειτουργίας (gain of function).

Στη *D. melanogaster* η επιτυχής μεταλλαξιγένεση με το *P* (Cooley *et al.*, 1988, Spradling *et al.*, 1995) σε συνδυασμό με την ανάπτυξη του συστήματος Gal4 (Brand and Perrimon, 1993) οδήγησε στο σχεδιασμό πειραμάτων λειτουργικής γενωμικής με βάση τη δημιουργία μεταλλάξεων κέρδους λειτουργίας (Rorth, 1996; Rorth *et al.*, 1998). Στα

συγκεκριμένα πειράματα το τρανσποζόνιο φέρει θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού ενεργοποιητή Gal4 και έναν ελάχιστο υποκινητή κοντά στο ένα άκρο καθώς κι έναν αυτόνομο δείκτη επιλογής κοντά στο άλλο άκρο για την ανίχνευση όλων των γεγονότων μετάθεσης. Τα ρυθμιστικά αυτά στοιχεία παρουσία του Gal4 ενεργοποιούν τη μεταγραφή παρακείμενων γονιδίων. Αρχική ένθεση του τρανσποζονίου κινητοποιείται και δημιουργούνται σειρές μυγών με διαφορετικές ενθέσεις. Αυτές διασταυρώνονται με κατάλληλες σειρές που εκφράζουν τον ενεργοποιητή Gal4 σε ιστούς στους οποίους θα γίνει η μελέτη εύρεσης μεταλλάξεων. Στις διπλά μετασχηματισμένες μύγες και στους προς μελέτη ιστούς ερευνάται η ύπαρξη φαινοτύπου που δημιουργούν οι ενθέσεις. Ο συγκεκριμένος τρόπος μεταλλαξιγένεσης οδηγεί συνήθως σε μεταλλάξεις υπερέκφρασης ή εκτοπικής έκφρασης γονιδίων. Με πολύ μικρή συχνότητα ανιχνεύονται και μεταλλάξεις που οφείλονται στην παραγωγή αντι-κωδικού μεταγράφου (antisense).

Πειράματα μεταλλαξιγένεσης μέσω ενθέσεων στη *D. melanogaster* έχουν πραγματοποιηθεί και με το μεταθετό στοιχείο *piggyBac* (Hacker *et al.*, 2003). Με τη χρήση του συγκεκριμένου μεταθετού στοιχείου δημιουργήθηκαν 1741 ενθέσεις. Οι 798 χαρτογραφούνται στο τρίτο χρωμόσωμα. Το 9% των 798 ενθέσεων είναι υποτελείς θνησιγόνες μεταλλάξεις, συχνότητα παρόμοια με του στοιχείου *P* (Peter *et al.*, 2002). Το *piggyBac* έχει σημεία προτίμησης (hot spots) αλλά εντίθεται σε αυτά με μικρότερη συχνότητα από ότι το στοιχείο *P* στα δικά του. Από τις ενθέσεις που έχουν πραγματοποιηθεί σε γονίδια (50% των συνολικών ενθέσεων), το 57% χαρτογραφούνται σε γονίδια στα οποία δεν έχουν βρεθεί ποτέ ενθέσεις του στοιχείου *P*. Το *piggyBac* έχει προτίμηση ένθεσης μέσα ή κοντά σε γονίδια και όσον αφορά στην επιλεκτικότητα ένθεσης εντός των μονάδων μεταγραφής (transcription units), προτιμά τα ιντρόνια κοντά στο 5' άκρο των γονιδίων. Άρα χρήση και των δύο μεταθετών στοιχείων στη *D. melanogaster* βοηθά στην προσπάθεια κορεσμού του γενώματος με ενθέσεις. Τέλος με συνδυασμό των μεταθετών στοιχείων *Minos*, *Hermes*, *Mos1* και *piggyBac* έχουν κατασκευαστεί φορείς για μεταλλαξιγένεση μέσω ενθέσεων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε έντομα εκτός της *D. melanogaster* (Horn *et al.*, 2003).

### 3.2 Μεταθετά στοιχεία και μεταλλαξιγένεση στα φυτά

Στα φυτά τα μεταθετά στοιχεία χρησιμοποιούνται για μεταλλαξιγένεση μέσω ενθέσεων και για παγίδευση γονιδίων με φορείς που φέρουν κασέτες παγίδευσης ενισχυτών και εξωνίων. Τα μεταθετά στοιχεία που χρησιμοποιούνται προέρχονται από

το καλαμπόκι (*Zea mays*). Σε αυτό, πειράματα μεταλλαξιγένεσης πραγματοποιούνται με τα μεταθετά στοιχεία *Ac/Ds* (*Activator/Dissociator*) και *MuDR/Mu* (*Mutator*) (Chomet, 1996; Dellaporta and Moreno, 1996). Η πρώτη αναφορά μεταλλαξιγένεσης φυτού, εκτός του καλαμποκιού, με μεταθετά στοιχεία προερχόμενα από αυτό είναι η μεταλλαξιγένεση στο *Arabidopsis thaliana* με τη χρήση του μεταθετού στοιχείου Enhancer-Inhibitor (Aarts *et al.*, 1993). Το φυτό *Arabidopsis thaliana* προσφέρεται για πειράματα μεταλλαξιγένεσης μέσω ενθέσεων διότι το γονιδίωμά του είναι γνωστό και “πυκνό”: κατά μέσο όρο σε κάθε 4,5 Kb συναντάται ένα γονίδιο μέσου μήκους 2,5 Kb. Τα μεταθετά στοιχεία μαζί με το T-DNA (Krysan *et al.*, 1999) αποτελούν τα εργαλεία που χρησιμοποιούνται για μεταλλαξιγένεση στο *Arabidopsis thaliana*. Εκτός του Enhancer-Inhibitor, δύο επιπλέον συστήματα από μεταθετά στοιχεία προερχόμενα από το καλαμπόκι έχουν χρησιμοποιηθεί: το *Ac/Ds* (*Activator/Dissociator*, Sundaresan *et al.*, 1995; Springer *et al.*, 1995) και το *En/Spm* (*Enhancer/Suppressor-mutator*, Tissier *et al.*, 1999). Η χρήση τους στηρίζεται στην χορήγηση τρανσποζάσης και την κινητοποίηση στοιχείων που ήδη βρίσκονται στο γονιδίωμα (μέσω ενθέσεων T-DNA). Η κινητοποίηση των στοιχείων αυτών μπορεί να οδηγήσει σε μεταλλαξιγένεση λόγω της ένθεσης (insertional mutagenesis) ή σε παγίδευση ενισχυτή (enhancer trapping) ή παγίδευση εξωνίου (exon trapping) εάν κλωνοποιηθούν στο μεταθετό στοιχείο τα κατάλληλα γονίδια αναφοράς (Sundaresan *et al.*, 1995; Springer *et al.*, 1995). Το γονίδιο της γλυκουρονιδάσης χρησιμοποιείται στα φυτά ως γονίδιο αναφοράς σε σχήματα παγίδευσης γονιδίων. Το μεταθετό στοιχείο μπορεί, παρουσία της τρανσποζάσης, να επανακινητοποιηθεί από το γονίδιο στο οποίο έχει εντεθεί με αποτέλεσμα την αναστροφή του φαινοτύπου. Με αυτόν τον τρόπο πιστοποιείται το ότι ο μεταλλαγμένος φαινότυπος οφείλεται στη συγκεκριμένη ένθεση. Όταν ένα στοιχείο κινητοποιηθεί, συνήθως εισέρχεται σε θέσεις συνδεδεμένες με την αρχική (Parinov and Sundaresan, 2000). Αυτή η ιδιότητα των μεταθετών στοιχείων χρησιμεύει στην περίπτωση μελέτης της λειτουργίας συγκεκριμένων γονιδίων. Αρχίζοντας με μια αρχική ένθεση κοντά στα γονίδια αυτά αυξάνεται η πιθανότητα να “παγιδευτούν” μετά από την κινητοποίηση του μεταθετού στοιχείου. Η επιλεκτικότητα ένθεσης όμως σε γειτονικές θέσεις αποτελεί πρόβλημα σε πειράματα κορεσμού του γενώματος με μεταλλάξεις. Ένα άλλο πρόβλημα που προκύπτει από τη χρήση των μεταθετών στοιχείων στα φυτά είναι η επιλογή γεγονότων μετάθεσης που στερούνται πηγής τρανσποζάσης ώστε η νέα ένθεση να είναι σταθερή. Για τη λύση του προβλήματος αυτού έχουν σχεδιαστεί σχήματα στα οποία τόσο το γονίδιο της τρανσποζάσης όσο και οι ενθέσεις σε γειτονικές περιοχές επιλέγονται αρνητικά με



αποτέλεσμα τη δημιουργία σειρών όπου οι νέες ενθέσεις είναι σταθερές και έχουν πραγματοποιηθεί σε θέσεις απομακρυσμένες από την αρχική. Με τη χρήση του T-DNA και των μεταθετών στοιχείων έχουν δημιουργηθεί μέχρι σήμερα πάνω από 10.000 διαφορετικές ενθέσεις στο *Arabidopsis thaliana* (Pan *et al.*, 2003).

### 3.3 Μεταθετά στοιχεία και μεταλλαξιγένεση στον ποντικό

Στον ποντικό, υπάρχει μία αναφορά για πειράματα μεταλλαξιγένεσης με τη χρήση μεταθετών στοιχείων. Το μόνο μεταθετό στοιχείο για το οποίο έχει δειχθεί ότι παρουσιάζει ενεργότητα στον ποντικό είναι το *SB* (Yant *et al.*, 2000; Fischer *et al.*, 2001; Horie *et al.*, 2001; Dupuy *et al.*, 2001; Dupuy *et al.*, 2002), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην παραπάνω αναφορά (Carlson *et al.*, 2003). Στο συγκεκριμένο πειραματικό σχήμα μεταξύ των άκρων του τρανσποζονίου κλωνοποιήθηκε δέκτης συρραφής, κωδικόνια λήξης της μετάφρασης και στα τρία αναγνωστικά πλαίσια και σήμα πολυαδενυλίωσης καθώς και το γονίδιο της GFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή *Rosa26* (Kisseberth *et al.*, 1999), χωρίς σήμα πολυαδενυλίωσης αλλά με ισχυρό δότη συρραφής. Το τρανσποζόνιο κινητοποιήθηκε στα κύτταρα της γαμετικής σειράς και κάποιες από τις ενθέσεις πραγματοποιήθηκαν μέσα σε γνωστά ή “προβλεπόμενα” γονίδια. Πέντε από τις σειρές ποντικών που έφεραν ένθεση σε γονίδιο και μία που έφερε ένθεση κοντά σε γονίδιο αναλύθηκαν για το αν φέρουν υποτελείς θνησιγόνες μεταλλάξεις. Δύο τέτοιες μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν σε δύο από τις σειρές που έφεραν ένθεση σε γονίδιο ή “προβλεπόμενο” γονίδιο.

Το μεταθετό στοιχείο *SB*, όπως και το *Minos* εντίθεται πάντα σε δινουκλεοτίδιο TA, το οποίο διπλασιάζεται μετά την ένθεση. Το *SB* παρουσιάζει προτίμηση ένθεσης σε περιοχές πλούσιες σε AT και συγκεκριμένα προτιμά την ένθεση στο **TA** της αλληλουχίας ANNTANNT (Carlson *et al.*, 2003). Σε κύτταρα HeLa πραγματοποιήθηκε επίσης μελέτη της προτίμησης ένθεσης του συγκεκριμένου μεταθετού στοιχείου και βρέθηκε ότι το στοιχείο προτιμά την αλληλουχία ATATATAT (Vigdal *et al.*, 2002). Στον ποντικό οι Carlson *et al.*, (2003) έδειξαν ότι από τις 44 ενθέσεις που αναλύθηκαν, οι 19 έγιναν επί του αρχικού χρωμοσώματος ή του ομολόγου του και οι 13 από αυτές χαρτογραφούνται σε περιοχή 5-15 Mb γύρω από τα αρχικά τρανσποζόνια (concatamer). Άρα το *SB* όπως και το στοιχείο *P* παρουσιάζουν τάση για τοπικές μεταθέσεις. Δώδεκα από τις ενθέσεις χαρτογραφούνται μέσα σε γονίδιο ή “προβλεπόμενο” γονίδιο και όλες βρίσκονται μέσα

σε ιντρόνια. Η ιδιότητα αυτή ευνοεί τη χρήση του στοιχείου αυτού σε πειράματα παγίδευσης εξωνίων.

Η συχνότητα κινητοποίησης του SB στο παραπάνω πείραμα είναι δύο κινητοποιήσεις ανά γαμέτη. Η συχνότητα αυτή σε συνδυασμό με το ποσοστό των ενθέσεων που έχουν πραγματοποιηθεί σε γονίδια δεν είναι ικανή για την πραγματοποίηση πειραμάτων μεγάλης κλίμακας μεταλλαξιγένεσης. Για σύγκριση, με τη χρήση του ENU σε πειράματα μεταλλαξιγένεσης επιτυγχάνεται η μετάλλαξη 30 γονιδίων ανά αρσενικό γαμέτη στα ενεμένα με ENU αρσενικά άτομα (Justice *et al.*, 2000).

### 3.4 Μεταθετό στοιχείο *Minos* και μεταλλαξιγένεση

Το μεταθετό στοιχείο *Minos* έχει χρησιμοποιηθεί στη *D. melanogaster* σε πειράματα παγίδευσης ενισχυτών (Μεταξάκης Α., αδημοσίευτα αποτελέσματα) και δημιουργίας μεταλλάξεων κέρδους λειτουργίας (Κιουπάκης Α. αδημοσίευτα αποτελέσματα). Όσον αφορά στα θηλαστικά, πειράματα μεταλλαξιγένεσης με το *Minos* έχουν πραγματοποιηθεί σε κύτταρα HeLa (Klinakis *et al.*, 2000b). Στα κύτταρα αυτά το *Minos* παρουσιάζει υψηλή συχνότητα ένθεσης από πλασμίδια σε χρωμοσωμικές θέσεις. Συγκεκριμένα διαμόλυνση σε τρυβλίο 100mm (περίπου  $2 \times 10^6$  κύτταρα) με πλασμίδιο που φέρει το τρανσποζόνιο με το γονίδιο της ανθεκτικότητας στο G418 (pMiLRneo, δότης) και πλασμίδιο που παράγει τρανσποζάση (pEF1/ILMi, βοηθός) οδηγεί στην παραγωγή 33000-103000 ανθεκτικών κλώνων στο G418, ενώ απουσία της τρανσποζάσης οι ανθεκτικοί κλώνοι που προκύπτουν από την τυχαία ενσωμάτωση του γονιδίου της ανθεκτικότητας είναι 3350-6240 (Klinakis *et al.*, 2000b). Στην ίδια αναφορά περιγράφεται πείραμα παγίδευσης εξωνίων με το *Minos*, βασισμένο στη χρήση τρανσποζονίου που φέρει μεταξύ των άκρων του μεταθετού, το χωρίς ATG υβριδικό γονίδιο *geo* (*lacZ-neo*) μαζί με τον πρώτο δέκτη συρραφής και μέρος του δεύτερου εξωνίου του γονιδίου *Engrailed 2* του ποντικού. Ένθεση του στοιχείου σε ιντρόνια ενεργών γονιδίων και εφόσον η συρραφή με το εξώνιο του ενδογενούς γονιδίου δεν αλλοιώσει το αναγνωστικό πλαίσιο του *geo*, αναμένεται να οδηγήσει σε ανθεκτικότητα στο G418 και συχνά σε ανιχνεύσιμη με X-gal ενεργότητα β-γαλακτοσιδάσης. Με αυτό το πειραματικό σχήμα “παγιδεύτηκε” το γονίδιο *monocarboxylate transporter* (*MCT4*, Yoon *et al.*, 1999).

Το παραπάνω τρανσποζόνιο έχει χρησιμοποιηθεί και για την επίδειξη της δυνατότητας του *Minos* να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλης κλίμακας μεταλλαξιγένεση και

παγίδευση γονιδίων/εξωνίων στα κύτταρα HeLa (Klinakis *et al.*, 2000b). Στο πείραμα αυτό δημιουργήθηκε μια “αντιπροσωπευτική”, ως προς τον κορεσμό του γενώματος, βιβλιοθήκη ενθέσεων και τέθηκε το ερώτημα εάν το *Minos* έχει εντεθεί σε δώδεκα μεταγραφικά ενεργά γονίδια (Ryo *et al.*, 1998) των κυττάρων HeLa. Σε έξι από αυτά ανιχνεύθηκαν ενθέσεις του *Minos*, γεγονός που επιβεβαιώνει την ικανότητα του να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλης κλίμακας μεταλλαξιγένεση.

Όσον αφορά στην προτίμηση ένθεσης του *Minos* σε συγκεκριμένες αλληλουχίες, μελέτες έχουν γίνει μόνο στη *D. melanogaster* και έχει βρεθεί ότι οι ενθέσεις που έχουν πραγματοποιηθεί μέσα σε μεταγραφικές μονάδες είναι κυρίως ενθέσεις σε ιντρόνια, γεγονός που καθιστά το *Minos* χρήσιμο εργαλείο σε πειράματα παγίδευσης γονιδίων/εξωνίων.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της ενεργότητας του μεταθετού στοιχείου *Minos* στον ποντικό, σε σωματικά κύτταρα και στη γαμετική σειρά, καθώς και η ανάπτυξη εργαλείων και συστημάτων για την πραγματοποίηση λειτουργικής γενωμικής ανάλυσης στον ποντικό και σε ανθρώπινα κύτταρα.

# **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

## 1. Μελέτη της ενεργότητας του μεταθετού στοιχείου *Minos* στον ποντικό (*Mus musculus*)

### 1.1 Έλεγχος της ικανότητας μετάθεσης τρανσποζονίων *Minos* σε σωματικά κύτταρα ποντικού

Για τον έλεγχο της ενεργότητας του μεταθετού στοιχείου *Minos* σε σωματικά κύτταρα ποντικού χρησιμοποιήθηκαν δύο σειρές διαγονιδιακών ποντικών. Η μία εκφράζει τρανσποζάση ιστοειδικά και η άλλη φέρει τρανσποζόνια του *Minos* ενσωματωμένα στο γονιδίωμα του ποντικού.

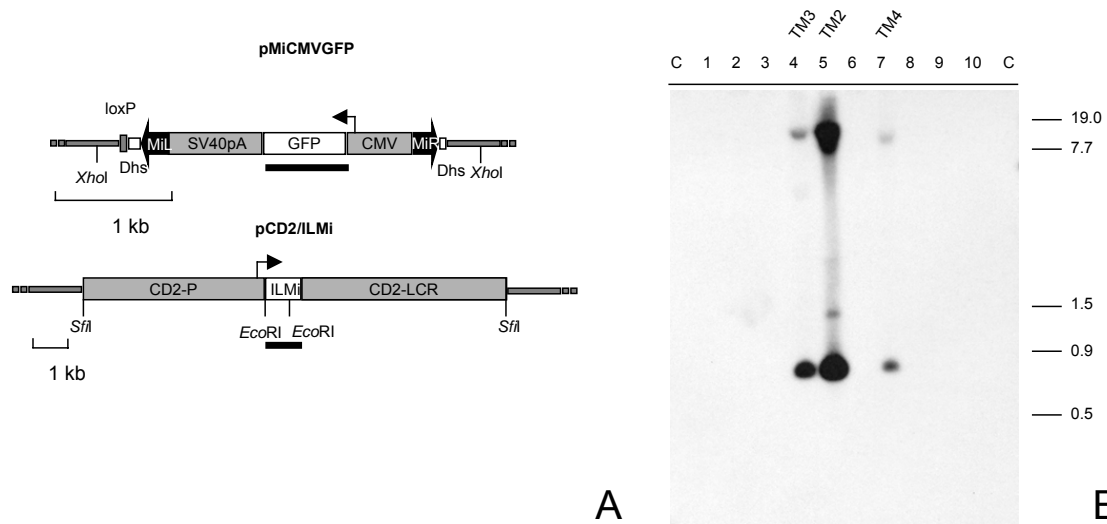
Για την πραγματοποίηση του πειράματος επιλέχθηκαν τα T-λεμφοκύτταρα, και για το λόγο αυτό το cDNA της τρανσποζάσης του *Minos* κλωνοποιήθηκε σε κατάλληλο φορέα (τροποποιημένος VA, Zhumabekov *et al.*, 1995) ώστε να είναι υπό τον έλεγχο του υποκινητή και LCR (Locus Control Region) του ανθρώπινου γενετικού τόπου CD2. Έκφραση του ανθρώπινου CD2 σε διαγονιδιακούς ποντικούς παρατηρείται μόνο σε κύτταρα του θύμου, σε T-λεμφοκύτταρα της περιφέρειας και σε μεγακαρυοκύτταρα. Η έκφραση είναι ανάλογη των αντιγράφων του CD2 και ανεξάρτητη από τη θέση ένθεσης των διαγονιδίων (Lang *et al.*, 1988).

Μετά από ένεση της παραπάνω κατασκευής (CD2/ILMi) σε γονιμοποιημένα ωάρια προέκυψαν τρεις διαγονιδιακοί ποντικοί. Ο ένας ήταν χιμαιρικός (TM4) καθώς δεν μεταβίβασε το γονίδιο στους απογόνους του. Οι άλλοι δύο είχαν ενσωματωμένα στο γονιδίωμά τους πολλά αντίγραφα της κατασκευής CD2/ILMi και χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των σειρών διαγονιδιακών ποντικών TM2 και TM3 (Εικόνα 4A και B).

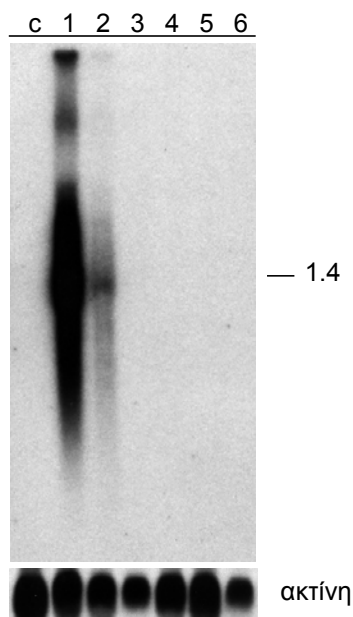
Η παραγωγή της τρανσποζάσης στα T-λεμφοκύτταρα ελέγχθηκε με ανάλυση κατά Northern σε ολικό RNA απομονωμένο από θύμο, σπλήνα και νεφρό των δύο σειρών. Όσον αφορά τη σειρά TM2, RNA της τρανσποζάσης του *Minos* ανιχνεύτηκε σε θύμο και σπλήνα, δύο όργανα με μεγάλο αριθμό T-λεμφοκυττάρων και όχι σε νεφρό. Στη σειρά TM3 δεν ανιχνεύτηκε RNA της τρανσποζάσης (Εικόνα 5).

Η δεύτερη σειρά διαγονιδιακών ποντικών που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ενεργότητας του *Minos* σε T-λεμφοκύτταρα δημιουργήθηκε στο εργαστήριο του Dr. Frank Grosveld από την Dr. Dubravka Drabek. Η σειρά αυτή (MCG) έχει ενσωματωμένα, πολύ κοντά στο τελομέρος του χρωμοσώματος 14, πολλά αντίγραφα ενός τρανσποζονίου *Minos* (MiCMVGFP) το οποίο φέρει το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) υπό τον έλεγχο του υποκινητή του ιού CytoMegalovirus

(Εικόνα 4A). Στο συγκεκριμένο τρανσποζόνιο έχει αφαιρεθεί σχεδόν όλη η αλληλουχία μεταξύ των άκρων του και έχει αντικατασταθεί με κομμάτι DNA το οποίο κωδικοποιεί για την GFP (CMVP-GFP-SV40pA). Δίχως το γονίδιο της τρανσποζάσης του *Minos*, το τρανσποζόνιο είναι μη αυτόνομο και μπορεί να κινητοποιηθεί μόνο παρουσία πηγής τρανσποζάσης. Ποντικοί της παραπάνω σειράς δεν φθορίζουν όταν ακτινοβολούνται με μπλε φως στα 395 nm (Inouye and Tsuji, 1994, Chalfie, *et al.*, 1994) παρόλο που φέρουν το γονίδιο της GFP, πιθανώς επειδή το διαγονίδιο έχει ενσωματωθεί κοντά σε τελομερική αλληλουχία.



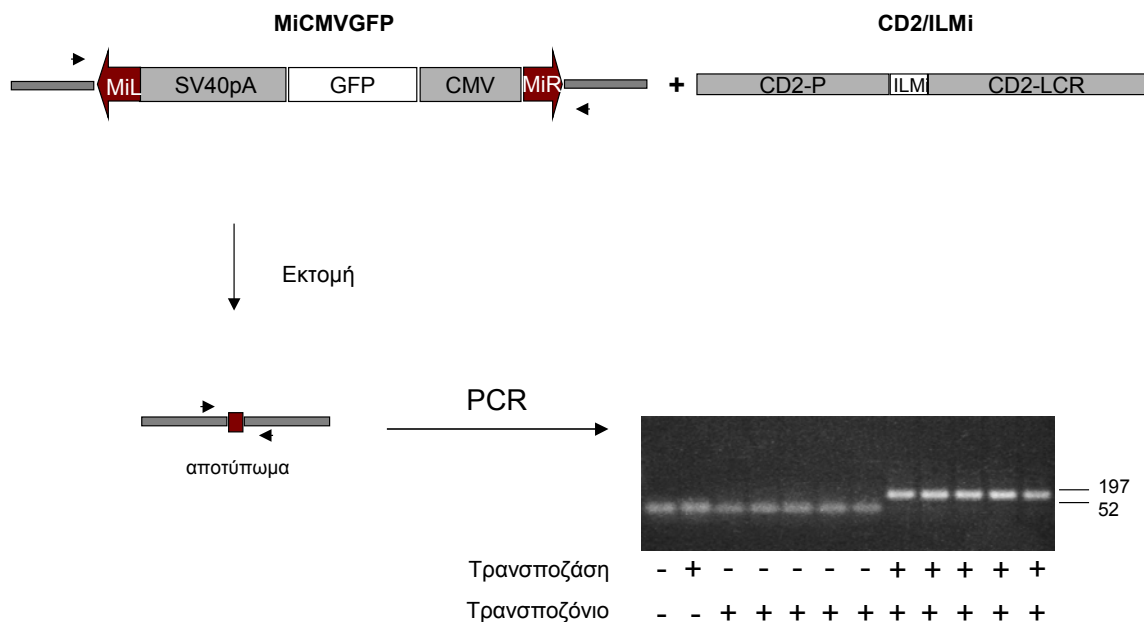
**Εικόνα 4. Φορείς βασισμένοι στο στοιχείο *Minos*.** (A) Οι βασισμένοι στο *Minos* φορείς που κατασκευάστηκαν για τη δημιουργία σειρών διαγονιδιακών ποντικών. Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό των ποντικών συμβολίζονται με μαύρη γραμμή. (B) Ανάλυση κατά Southern στους απογόνους ποντικών που έχουν ενεθεί με την κατασκευή CD2/ILMi. Της ηλεκτροφόρησης έχει προηγηθεί πέψη του γενωμικού DNA με το ένζυμο περιορισμού *EcoRI*. Οι διαδρομές 1 έως 10 αντιστοιχούν σε δέκα απογόνους ενεμένων ποντικών. Τρεις από αυτούς έχουν ενσωματώσει το διαγονίδιο. Οι διαδρομές "C" περιέχουν DNA από μη διαγονιδιακούς ποντικούς.



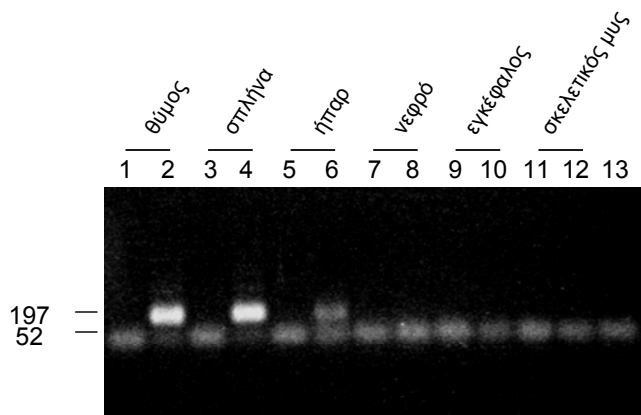
**Εικόνα 5. Ιστοειδική έκφραση της τρανσποζάσης του *Minos* σε διαγονιδιακούς ποντικούς.**

Ανάλυση κατά Northern σε ολικό RNA απομονωμένο από θύμο, σπλήνα και νεφρό με τη χρήση του γονιδίου της τρανσποζάσης ως ανιχνευτή. Οι διαδρομές 1, 2 και 3 περιέχουν RNA από θύμο, σπλήνα και νεφρό αντίστοιχα, ετερόζυγων διαγονιδιακών ποντικών της σειράς TM2. Οι διαδρομές 4, 5 και 6 περιέχουν RNA από θύμο, σπλήνα και νεφρό αντίστοιχα, ετερόζυγων διαγονιδιακών ποντικών της σειράς TM3. Η διαδρομή "c" περιέχει RNA από θύμο μη διαγονιδιακού ποντικού. Στην κάτω εικόνα παρουσιάζεται η υβριδοποίηση με ανιχνευτή το cDNA της ακτίνης. (Πάνω εικόνα: έκθεση 40 ωρών, κάτω εικόνα: έκθεση τριών ωρών).

Ο αρχικός στόχος ήταν η ανίχνευση της εκτομής τρανσποζονίων σε ποντικούς διπλά ετερόζυγους για τα παραπάνω διαγονίδια (MCG/+ ; TM2/+). Ο έλεγχος αυτός γίνεται με μία ευαίσθητη μέθοδο, βασισμένη στην Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης, με υπόστρωμα DNA από διάφορους ιστούς και εκκινητές που υβριδοποιούν στις παρακείμενες, μη μεταθέσιμες περιοχές του τρανσποζονίου. Με το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών το ενδεικτικό προϊόν της εκτομής έχει μέγεθος 167 bp και ανιχνεύθηκε σε θύμο και σπλήνα ποντικών με γονότυπο MCG/+ ; TM2/+ ενώ δεν ανιχνεύτηκε σε ποντικούς με γονότυπο MCG/+ ; +/+, οι οποίοι δεν εκφράζουν τρανσποζάση (Εικόνα 6). Επιπλέον, εκτομή παρατηρείται και σε ήπαρ MCG/+ ; TM2/+ ποντικών, αλλά σε χαμηλότερα επίπεδα (Εικόνα 7). Μετά από 15 επιπλέον κύκλους Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης χαμηλά επίπεδα εκτομής ανιχνεύονται και σε πνεύμονα, νεφρό, σκελετικό μυ και εγκέφαλο. Το προϊόν εκτομής στις περιπτώσεις αυτές είναι πιθανό να οφείλεται στην παγίδευση μικρού αριθμού T-λεμφοκυττάρων σε αυτούς τους ιστούς ή σε έκφραση της τρανσποζάσης λόγω του φαινομένου επίδρασης θέσεως (position effect). Για την επιβεβαίωση της ταυτότητας του προϊόντος εκτομής πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Southern με ανιχνευτή που υβριδοποιεί εσωτερικά των εκκινητών.



**Εικόνα 6. Ανίχνευση των γεγονότων εκτομής του *Minos*.** Ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) των προϊόντων της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα DNA απομονωμένο από θύμο μη διαγονιδιακού ποντικού (διαδρομή 1), διαγονιδιακού ποντικού γονότυπου TM2/+ (διαδρομή 2), πέντε διαγονιδιακών ποντικών γονότυπου MCG/+ (διαδρομές 3-7) και πέντε διαγονιδιακών ποντικών γονότυπου MCG/+ ; TM2/+ (διαδρομές 8-12). Με μικρά βέλη παριστάνονται οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για τον πολλαπλασιασμό της διαγνωστικής ζώνης της εκτομής. Στην ίδια εικόνα παρουσιάζεται και σχηματική απεικόνιση της εκτομής.



**Εικόνα 7. Ιστοειδικότητα της εκτομής του *Minos*.** Ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) των προϊόντων της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης με εκκινητές που υβριδοποιούν στις μη μεταθέσιμες αλληλουχίες εξωτερικά του τρανσποζονίου και

χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα DNA απομονωμένο από ιστούς ποντικού γονότυπου MCG/+ ; +/- (1, 3, 5, 7, 9, 11) και ποντικού γονότυπου MCG/+ ; TM2/+ (2, 4, 6, 8, 10, 12). Η διαδρομή 13 αντιστοιχεί σε αντίδραση χωρίς υπόστρωμα.



Η εκτομή των τρανσποζονίων του *Minos* από το γονιδίωμα της *Drosophila melanogaster* ακολουθείται από επιδιόρθωση της “κενής θέσης” και στην πλειοψηφία των περιπτώσεων την προσθήκη τεσσάρων νουκλεοτιδικών ζευγαριών. Αυτά τα τέσσερα και επιπλέον άλλα δύο ζεύγη που το *Minos* έχει ήδη διπλασιάσει κατά την ένθεσή του αποτελούν το αποτύπωμά του (AcgagT ή ActcgT, Arca *et al.*, 1997). Για τον προσδιορισμό της φύσης των γεγονότων εκτομής, το προϊόν της εκτομής από θύμο και σπλήνα κλωνοποιήθηκε και προσδιορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία του. Σε αντίθεση με τα έντομα, στα σωματικά κύτταρα ποντικού η διαγνωστική ζώνη ποικίλει σε μέγεθος και τα αποτυπώματα σε αλληλουχία (Εικόνα 8). Μόνο δύο από τα δεκαεννέα αποτυπώματα ήταν ίδια με τα “τυπικά” αποτυπώματα που ανιχνεύονται στα κύτταρα των εντόμων. Τα υπόλοιπα ήταν ατελή αποτυπώματα ή περιείχαν επιπλέον νουκλεοτίδια σε συνδυασμό με “τυπικά” ή ατελή αποτυπώματα.

ttc	ctcgTAgaa
ttcT	cgTAgaa
ttcTA	ctcgTAgaa
ttcTAc	cgTAgaa
ttcTAc	ctcgTAgaa
tccTAcg	TAgaa
ttcTAcg	TAgaa
ttcTAcgag	TAgaa
ttcTAcgag	gTAgaa
ttcTAcgagg	gTAgaa
ttcTAcgagg	cgTAgaa
tccTAcgagaa	TAgaa
tccTAcgagaa	TAgaa
ttcTAcgagag	gTAgaa
ttcTAcgaggg	gTAgaa
ttcTAcgaggg	gTAgaa
ttcTAcgagttctcg	TAgaa
ttcTAcgagact	gTAgaa
ttcTAcgagttgggg	TAgaa

**Εικόνα 8. Αποτυπώματα του *Minos* μετά από την εκτομή του από χρωμοσωμικές θέσεις.** Αποτυπώματα που προέκυψαν από Αλυσιδωπή Αντίδραση Πολυμεράσης με υπόστρωμα DNA απομονωμένο από θύμο και σπλήνα διπλά διαγονιδιακών ποντικών (MCG/+ ; TM2/+) και εκκινητές που υβριδοποιούν στη μη μεταθέσιμη αλληλουχία εξωτερικά του τρανσποζονίου. Οι ζώνες που παρήχθησαν, κλωνοποιήθηκαν και προσδιορίστηκαν οι αλληλουχίες 19 κλώνων. Τα νουκλεοτίδια με κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν στις τελικές αλληλουχίες των αντεστραμμένων άκρων του *Minos*. Τα νουκλεοτίδια με μπλε χρώμα είναι αγνώστου προελεύσεως.

Την ανίχνευση της εκτομής ακολούθησε ο έλεγχος της ικανότητας επανένθεσης των τρανσποζονίων. Ο έλεγχος της μετάθεσης (transposition) δεν είναι απλός διότι κάθε γεγονός μετάθεσης είναι μοναδικό και ο ιστός στον οποίο συμβαίνει αποτελείται από κύτταρα που φέρουν διαφορετικά γεγονότα μετάθεσης και άρα χαρακτηρίζεται από

μωσαϊκισμό. Στην περίπτωση που ένα γεγονός μετάθεσης έχει συμβεί νωρίς κατά την ανάπτυξη και έχει δημιουργήσει ένα μεγάλο κλώνο κυττάρων που το φέρουν, θα ήταν πιθανό να ανιχνευθεί με ανάλυση κατά Southern. Τέτοιου είδους ανάλυση απέτυχε να διαγνώσει γεγονότα μετάθεσης, οπότε στην περίπτωση που τέτοιοι κλώνοι υπάρχουν, αποτελούνται από μικρό αριθμό κυττάρων.

Ως μέθοδος για την ανίχνευση γεγονότων μετάθεσης σε επίπεδο μοναδιαίων κυττάρων επιλέχθηκε η υβριδοποίηση με φθορίζουσες χρωστικές *in situ* (fluorescent *in situ* hybridization, Mulder *et al.*, 1995) σε μεταφασικούς πυρήνες ποντικού. Κατά την ανάλυση αυτή ως ανιχνευτής για τη διάγνωση πιθανών γεγονότων μετάθεσης χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της GFP. Σε κάθε πυρήνα που έχει πραγματοποιηθεί ένα γεγονός μετάθεσης, ο ανιχνευτής υβριδοποιεί σε δύο ζεύγη σημείων πάνω στα χρωμοσώματα: στην αρχική θέση, όπου υπάρχουν τα αντίγραφα των τρانشποζονίων και σε μια νέα. Σε πυρήνες οι οποίοι δεν φέρουν γεγονότα μετάθεσης ο ανιχνευτής υβριδοποιεί σε ένα ζεύγος σημείων. Προκαταρκτική ανάλυση σε μεταφασικούς και μεσοφασικούς πυρήνες έδειξε ότι η αρχική θέση των τρانشποζονίων (concatamer) βρίσκεται στο τελομέρος του χρωμοσώματος 14 πολύ κοντά σε ένα τελομερικό μάρτυρα (Shi *et al.*, 1997). Στο πείραμα αυτό εξετάστηκαν 1688 μεταφασικοί πυρήνες από σπλήνα και 1426 από θύμο έξι ποντικών γονότυπου MCG/+, TM2/+ (σύνολο 3114, Πίνακας 3). Σε δεκαεννέα από τους πυρήνες υπάρχουν γεγονότα μετάθεσης (ένδεκα από σπλήνα και οκτώ από θύμο). Επομένως, η συχνότητα μετάθεσης τρانشποζονίων του *Minos* σε T-λεμφοκύτταρα είναι 0,61%. Τα τρانشποζόνια έχουν μετατεθεί σε νέα θέση πάνω στο χρωμόσωμα 14 ή σε άλλα χρωμοσώματα. Ανάλυση των θετικών μεταφάσεων με ανιχνευτή τον τελομερικό μάρτυρα του χρωμοσώματος 14 πιστοποιεί ότι η μετάθεση δεν συνοδεύεται με μετακίνηση τελομερικού χρωμοσωμικού υλικού (Εικόνα 9). Επίσης στο επίπεδο του κάθε ποντικού, μορφολογική εξέταση των χρωμοσωμάτων που έφεραν γεγονότα μετάθεσης πιστοποιεί ότι όλα τα γεγονότα εκτός πιθανώς ενός είναι ανεξάρτητα (Πίνακας 3). Για το πείραμα ελέγχου εξετάστηκαν 2440 μεταφασικοί πυρήνες από πέντε ποντικούς γονότυπου MCG/+ ; +/- και δεν ανιχνεύτηκε μετάθεση σε κανένα.

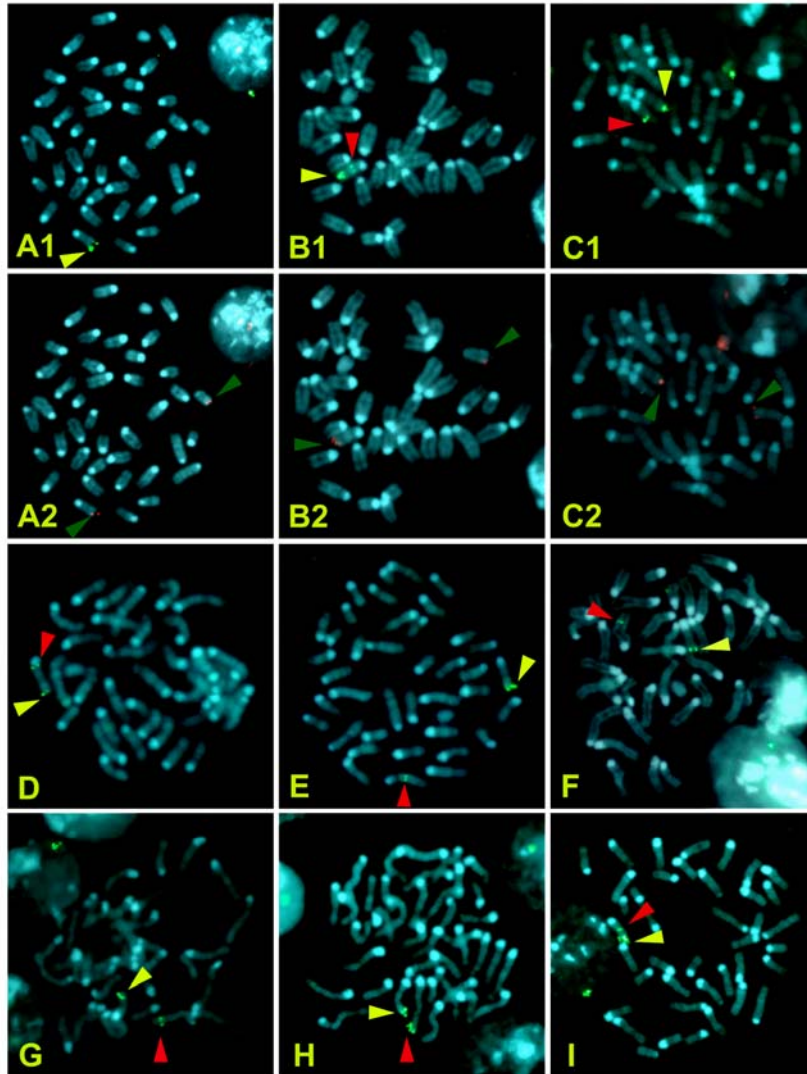
Η σειρά διαγονιδιακών ποντικών η οποία φέρει τα τρانشποζόνια δεν φθορίζει μετά από ακτινοβόλησή της στα 395 nm. Είναι πιθανό όμως στην περίπτωση που το τρانشποζόνιο μετατεθεί σε ανοικτή χρωματίνη ή κοντά σε έναν ισχυρό ενισχυτή να ξεκινήσει ή να ενισχυθεί η μεταγραφή του γονιδίου της GFP και τα T-λεμφοκύτταρα που

το φέρουν να φθορίζουν. Σε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (FACS) T-λεμφοκυττάρων από διπλά διαγονιδιακούς ποντικούς δεν διακρίνονται πληθυσμοί πράσινων κυττάρων.

**Πίνακας 3. Γεγονότα μετάθεσης σε σπλήνα και θύμο ποντικών γονοτύπου MCG/+ ; TM2/+**

Γ.Μ.	Ποντικός	Ιστός	Αριθμός πυρήνων	Μέγεθος Χρωμοσώματος	% Απόσταση από το τελομέρος*
GM? 1	6210	σπλήνα	100	μεσαίο	0
		θύμος	160	μεσαίο	70%
2 3 4 5 6 7	6904	σπλήνα	470	μεγάλο	20%
				μεσαίο	50%
				μεγάλο	0%
				μεγάλο	50%
				μεσαίο	0
				14	30%
		θύμος	250		
8 9 10 11	6906	σπλήνα	303	μεσαίο	50%
				μεσαίο	50%
		θύμος	300	μεγάλο	50%
				μεσαίο	100%
12 13	8311	θύμος	306	14	50%
				μεγάλο	100%
14 15 16 17	8210	θύμος	410	14	90%
				μεγάλο	60%
		σπλήνα	365	μεγάλο	35%
				μεσαίο	25%
18 19	8201	σπλήνα	450	14	60%
				μεγάλο	100%

\*100% = κεντρομέρος \*\*Αριθμός πυρήνων στο πείραμα ελέγχου: 2440 από θύμο και σπλήνα 5 ποντικών



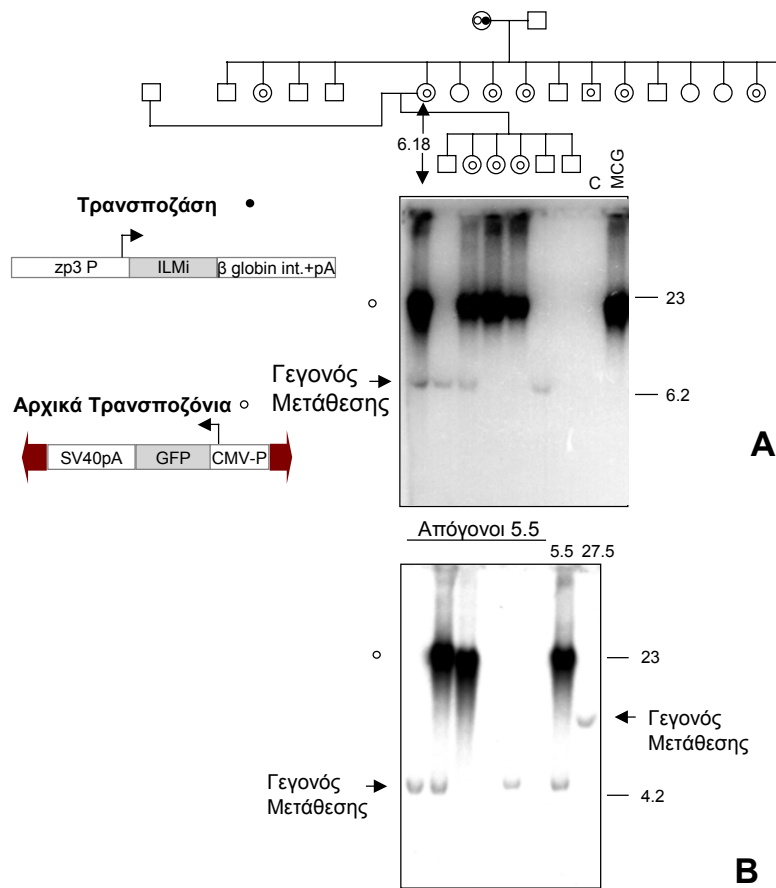
**Εικόνα 9.** Ανίχνευση γεγονότων μετάθεσης του *Minos* σε μεταφασικούς πυρήνες με τη μέθοδο FISH. Τα χρωμοσώματα είναι βαμμένα με DAPI. Οι φωτογραφίες A1 και A2 προέρχονται από τον ίδιο μεταφασικό πυρήνα διαγονιδιακού ποντικού γονότυπου MCG/+ ; +/+, υβριδοποιημένο με ανιχνευτή το γονίδιο της GFP και τελομερικό μάρτυρα του χρωμοσώματος 14, αντίστοιχα. Οι φωτογραφίες B-I απεικονίζουν πυρήνες από θύμο και σπλήνα διαγονιδιακών ποντικών γονότυπου MCG/+ ; TM2/+. Οι πυρήνες B1, C1 και D-I είναι υβριδοποιημένοι με ανιχνευτή το γονίδιο της GFP. Οι πυρήνες B2 και C2 είναι οι ίδιοι με τους B1 και C1, αντίστοιχα, και είναι υβριδοποιημένοι με τελομερικό μάρτυρα του χρωμοσώματος 14. Τα κίτρινα βέλη υποδεικνύουν την αρχική θέση των τρανσποζονίων στο χρωμόσωμα 14. Τα κόκκινα βέλη υποδεικνύουν τα γεγονότα μετάθεσης.

## 1.2 Έλεγχος της ικανότητας μετάθεσης τρανσποζονίων *Minos* σε κύτταρα γαμετικής σειράς ποντικού

Ένα σχήμα μετάθεσης ανάλογο με αυτά που έχουν περιγραφεί για το μεταθετό στοιχείο *SB* (Fischer *et al.*, 2001; Horie *et al.*, 2001; Dupuy *et al.*, 2001) χρησιμοποιήθηκε για το *Minos*. Για τον έλεγχο της ενεργότητας του *Minos* σε κύτταρα της γαμετικής σειράς ποντικού χρησιμοποιήθηκαν δύο σειρές διαγονιδιακών ποντικών. Η πρώτη φέρει τρανσποζόνια του *Minos* (MCG) και είναι η ίδια με τη σειρά η οποία χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα στα σωματικά κύτταρα. Η δεύτερη σειρά (ZP3/ILMi ή ZP3) έχει ενσωματωμένα στο γονιδίωμά της πολλά αντίγραφα της κατασκευής, η οποία φέρει το cDNA της τρανσποζάσης υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *ZP3* (zona pellucida 3, Millar *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1996). Ο υποκινητής αυτός είναι ενεργός μόνο σε ωκύτταρα και επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης *zr3* από το στάδιο της διπλοταινίας, κατά την πρώτη διαίρεση της μείωσης (Kinloch *et al.*, 1993). Η σειρά αυτή δημιουργήθηκε στο εργαστήριο του Dr. Frank Grosveld από την Dr. Dubravka Drabek. Σε ωκύτταρα τα οποία εκφράζουν τρανσποζάση και φέρουν τρανσποζόνια είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί μετάθεση.

Ετερόζυγα ποντίκια της σειράς διαγονιδιακών ποντικών MCG διασταυρώθηκαν με ετερόζυγα ποντίκια της σειράς ZP3/ILMi (ή ZP3). Οι θηλυκοί απόγονοι αυτών, που έφεραν και τα δύο διαγονίδια, στα ωκύτταρα των οποίων πιθανόν να συμβούν γεγονότα μετάθεσης, διασταυρώθηκαν με μη διαγονιδιακούς αρσενικούς ποντικούς. Συγκεκριμένα το πείραμα πραγματοποιήθηκε με 6 διπλά διαγονιδιακές θηλυκές, απογόνους αρσενικών γονότυπου MCG/+ ; +/+ και θηλυκών γονότυπου +/+ ; ZP3/+ (double transgenics from ZP3 females, DTFs) και με 4 διπλά διαγονιδιακές θηλυκές, απογόνους θηλυκών γονότυπου MCG/+ ; +/+ και αρσενικών γονότυπου +/+ ; ZP3/+ (double transgenics from ZP3 males, DTMs). Στους απογόνους αυτών με ανάλυση κατά Southern και χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης μπορούν να ανιχνευθούν τα γεγονότα μετάθεσης. Πέψη του DNA με το ένζυμο περιορισμού *Bgl*I, το οποίο δεν έχει θέση αναγνώρισης μέσα στα τρανσποζόνια, δίνει σε ανάλυση κατά Southern μία ζώνη μεγέθους πάνω από 20 κιλοβάσεις, η οποία αντιστοιχεί στην αρχική ένθεση πολλαπλών αντιγράφων (concatamer) του τρανσποζονίου *MiCMV*GFP. Μετάθεση ενός τρανσποζονίου αλλάζει το παραπάνω πρότυπο καθώς το τρανσποζόνιο που έχει μετατεθεί εμφανίζεται στο φιλμ αυτοραδιογραφίας ως ανεξάρτητη ζώνη (εκτός της περίπτωσης που η μετάθεση

πραγματοποιείται εσωτερικά του θραύσματος με άκρα *Bgl*II, το οποίο περιλαμβάνει την αρχική ένθεση). Η μείωση του μεγέθους της αρχικής ζώνης κατά 2.65 κιλοβάσεις δεν διακρίνεται μετά από ηλεκτροφόρηση στον τύπο πηκτώματος που χρησιμοποιήθηκε. Τα γεγονότα μετάθεσης συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της πρώτης και της δεύτερης διαίρεσης της μείωσης. Αν συμβούν στην πρώτη διαίρεση και σε διαφορετικό χρωμόσωμα από το αρχικό, το χρωμόσωμα το οποίο φέρει το γεγονός μετάθεσης είναι δυνατόν να διαχωριστεί από το χρωμόσωμα το οποίο φέρει τα αρχικά τρανσποζόνια (concatamer). Σε αυτή την περίπτωση στην ανάλυση κατά Southern θα παρουσιαστεί μία μόνο ζώνη που αντιστοιχεί στο γεγονός μετάθεσης (Εικόνα 10, ποντικός 27.5). Από τους 153 απογόνους των διπλά διαγονιδιακών θηλυκών που εξετάστηκαν, οι 70 έφεραν τρανσποζόνια στο γονιδίωμά τους. Σε τέσσερις από αυτούς ανιχνεύτηκαν γεγονότα μετάθεσης (Εικόνα 10). Δύο από αυτούς έφεραν ένα γεγονός μετάθεσης και τα αρχικά τρανσποζόνια ενώ οι άλλοι δύο έφεραν μόνο τρανσποζόνια που έχουν μετατεθεί. Τρία από τα γεγονότα μετάθεσης βρέθηκαν σε απογόνους DTFs και το τέταρτο σε απόγονο DTM. Οι απόγονοι που περιείχαν γεγονότα μετάθεσης και τα αρχικά τρανσποζόνια, διασταυρώθηκαν με μη διαγονιδιακούς ποντικούς και στους απογόνους τους το γεγονός μετάθεσης διαχωρίστηκε από το αρχικό διαγονίδιο, το οποίο σημαίνει ότι η μετάθεση δεν έχει γίνει επί του ίδιου χρωμοσώματος.



**Εικόνα 10. Ανίχνευση γεγονότων μετάθεσης του *Minos* σε κύτταρα της γαμετικής σειράς. (A)** Γενεαλογικό δένδρο όπου φαίνονται οι γονείς (MCG/+ ; ZP3ILMi/+ θηλυκή και +/+ ; +/+ αρσενικός) 18 ποντικών που εξετάστηκαν για την ύπαρξη γεγονότων μετάθεσης, οι ποντικοί που εξετάστηκαν, μεταξύ των οποίων κι ένας που φέρει γεγονός μετάθεσης (6.18), καθώς και οι απόγονοι αυτού. Ανάλυση κατά Southern του ποντικού που φέρει γεγονός μετάθεσης, των απογόνων του, μη διαγονιδιακού (C) και MCG/+ ; +/+ ποντικού. Της ηλεκτροφόρησης έχει προηγηθεί πέψη του γενωμικού DNA με το ένζυμο περιορισμού *Bgl*I. Στην ίδια εικόνα παρατίθενται και οι χάρτες του τρανσποζονίου και της τρανσποζάσης που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή των σειρών διαγονιδιακών ποντικών MCG και ZP3/ILMi. Τα μεγέθη δεν είναι ανάλογα των πραγματικών μεγεθών των στοιχείων των κατασκευών. **(B)** Ανάλυση κατά Southern των ποντικών 27.5 και 5.5 που φέρουν γεγονότα μετάθεσης καθώς και των απογόνων του ποντικού 5.5.

Η συχνότητα μετάθεσης ορίζεται ως το επί τοις εκατό ποσοστό γεγονότων μετάθεσης (Γ.Μ) προς τον αριθμό των ποντικών που έφεραν τρανσποζόνια (Α.Π.Τ). Στην περίπτωση του *Minos* η συχνότητα αυτή είναι 5.7%.

Το παραπάνω πείραμα πραγματοποιήθηκε παράλληλα και σε εργαστήριο συνεργατών (Dr. Frank Grosveld), όπου εξετάστηκαν 154 απόγονοι διπλά διαγονιδιακών θηλυκών, 76 από αυτούς έφεραν τρανσποζόνια στο γονιδίωμά τους και σε έξι από αυτούς ανιχνεύτηκαν συνολικά 8 γεγονότα μετάθεσης. Η συχνότητα μετάθεσης που προκύπτει από την άθροιση των αποτελεσμάτων είναι 8.2% και τα επιμέρους αποτελέσματα περιγράφονται στον Πίνακα 4.

**Πίνακας 4. Συχνότητα μετάθεσης του *Minos* σε κύτταρα γαμετικής σειράς**

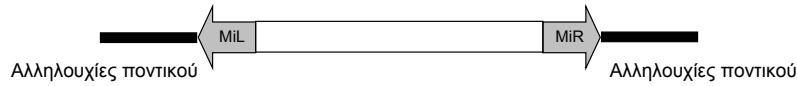
	Αριθμός απογόνων διπλά διαγονιδιακών ποντικών οι οποίοι ελέγχθηκαν	Γεγονότα μετάθεσης (Γ.Μ)	Αριθμός ποντικών οι οποίοι έφεραν τρανσποζόνια (Α.Π.Τ)	Συχνότητα μετάθεσης (Γ.Μ)/(Α.Π.Τ)%
Αριθμός ποντικών οι οποίοι ελέγχθηκαν στο Ηράκλειο	153	4	70	5.7%
Αριθμός ποντικών οι οποίοι ελέγχθηκαν στο Rotterdam	154	8	76	10.5%
<b>Σύνολο</b>	<b>307</b>	<b>12</b>	<b>146</b>	<b>12/146% = 8.2%</b>

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία στην νέα θέση των τρανσποζονίων προσδιορίστηκε με ανάστροφη Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (inverse PCR), κλωνοποίηση των προϊόντων και προσδιορισμό της αλληλουχίας για τα τρία από τα τέσσερα γεγονότα μετάθεσης που ανιχνεύτηκαν στο IMBB. Και τα τρία αποτελούν ακριβή ένθεση του τρανσποζονίου, όπως φαίνεται από τον διπλασιασμό του TA στο οποίο εντίθεται πάντα το μεταθετό στοιχείο *Minos* (Εικόνα 11). Οι γενωμικές αλληλουχίες που γειτνιάζουν με το άκρο του *Minos* σε καθένα από τα γεγονότα μετάθεσης χρησιμοποιήθηκαν σε πρόγραμμα συγκριτικής ανάλυσης (BLAST) με την αλληλουχία του γονιδιώματος του ποντικού. Ένα από τα τρανσποζόνια έχει εντεθεί στο τρίτο ιντρόνιο του γονιδίου *creb* (cytoplasmic polyadenylation element binding protein, Tay and Richter, 2001) το οποίο χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 7 (scaffold number GA\_5J8B7W8 9HK, Celera



database, εικόνες 11 και 12). Το δεύτερο γεγονός μετάθεσης χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 10 (scaffold number GA\_5J8B7W3239, Celera database) και για το τρίτο δεν υπάρχουν πληροφορίες για την χαρτογράφησή του στη βάση δεδομένων Celera, είναι όμως φανερό ότι δεν βρίσκεται στο αρχικό χρωμόσωμα καθώς στην ανάλυση κατά Southern ανιχνεύτηκε ως μοναδική ζώνη. Από τον προσδιορισμό της νέας θέσης των τρανσποζονίων ή με ανάλυση κατά Southern ή FISH πιστοποιήθηκε ότι τα τρία από τα δώδεκα γεγονότα μετάθεσης που ανιχνεύτηκαν στα δύο εργαστήρια χαρτογραφούνται επί του αρχικού χρωμοσώματος. Για δύο από τα γεγονότα μετάθεσης γνωρίζουμε ότι η μετάθεση δεν έγινε επί του αρχικού χρωμοσώματος καθώς στην ανάλυση κατά Southern ανιχνεύτηκαν ως μοναδικές ζώνες.

Όπως προαναφέρθηκε η σειρά διαγονιδιακών ποντικών η οποία φέρει τα τρανσποζόνια δεν φθορίζει μετά από ακτινοβόλησή της στα 395 nm. Είναι πιθανό όμως στην περίπτωση που το τρανσποζόνιο βρεθεί σε ευχρωματική περιοχή ή κοντά σε έναν ισχυρό ενισχυτή να αρχίσει ή να ενισχυθεί η μεταγραφή του γονιδίου της GFP και οι ποντικοί να φθορίζουν. Απόγονοι τριών από τους τέσσερις ποντικούς που εξετάστηκαν (ο τέταρτος πέθανε πριν δώσει απογόνους) οι οποίοι έφεραν γεγονότα μετάθεσης ελέγχθηκαν για φθορισμό αλλά κανένας δεν φθόριζε. Επίσης ο ποντικός που έφερε το γεγονός μετάθεσης στο γονίδιο *creb* ομοζυγώθηκε για να ελεγχθεί αν το τρανσποζόνιο αναστέλλει την έκφραση του γονιδίου. Το συγκεκριμένο γονίδιο συμμετέχει στη διαφοροποίηση των γαμετικών κυττάρων ρυθμίζοντας το σχηματισμό του συναπτονηματικού συμπλέγματος. Ο φαινότυπος της έλλειψης του *creb* γονιδίου (knockout) έχει περιγραφεί (Tay and Richter, 2001) και είναι ολική στειρότητα στα ομόζυγα ελλειμματικά θηλυκά και μερική στειρότητα στα ομόζυγα ελλειμματικά αρσενικά (λιγότερο από 20% των ομόζυγων αρσενικών δίνουν απογόνους). Τα ομόζυγα ποντίκια που φέρουν το τρανσποζόνιο δεν είναι στείρα. Το αποτέλεσμα ήταν αναμενόμενο διότι το τρανσποζόνιο έχει εντεθεί σε ιντρόνιο και κατά τέτοια φορά ώστε το σήμα πολυαδενυλίωσης (SV40 polyA) το οποίο φέρει να είναι αντίθετης φοράς από τη φορά της μεταγραφής του γονιδίου *creb*.



Χρωμόσωμα 10, GA\_5J8B7W3239  
(ποντικός 6.18)

ATAGCTATAGTGGTAATAcgag.....ctcgTAGAGGTATGATTCCTAT

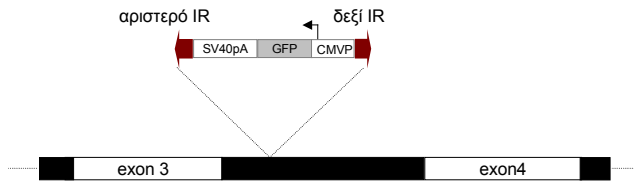
Χρωμόσωμα 7, GA\_5J8B7W89HK      Cytoplasmic polyadenylation  
(ποντικός 5.5)                                    element binding protein

ATTTTTCTTACCTACATAcgag.....ctcgTACATGTGCATATATGGC

Χρωμόσωμα ? (ποντικός 27.5)

AAAATCAAATAATCAAATAcgag.....ctcgTAATGTTTTTAAGCATTAAATTTTGTA

**Εικόνα 11. Μοριακός χαρακτηρισμός των ενθέσεων του *Minos* στα χρωμοσώματα του ποντικού.** Στο πάνω μέρος της εικόνας απεικονίζεται το τρανσποζόνιο σε νέα θέση στο γένωμα του ποντικού. Οι αλληλουχίες που γειτνιάζουν με τα άκρα του στοιχείου στη νέα του θέση εμφανίζονται με κεφαλαία γράμματα. Το διπλασιασμένο, μετά την ένθεση, TA εμφανίζεται με έντονη γραφή και κεφαλαία γράμματα και οι ακριανές βάσεις του άκρου του *Minos* με μικρά. Δίπλα στον αριθμό του χρωμοσώματος στο οποίο πραγματοποιήθηκε η ένθεση (όταν αυτό είναι γνωστό) αναφέρονται οι χρωμοσωμικές θέσεις των ενθέσεων όπως ορίζονται από την βάση δεδομένων Celera.



**Εικόνα 12. Ένθεση του τρανσποζονίου *MiCMVGFP* στο τρίτο ιντρόνιο του γονιδίου *creb*.** Απεικόνιση της ένθεσης του *Minos* στο τρίτο ιντρόνιο του γονιδίου *creb*. Το γονίδιο αυτό αποτελείται από 12

εξώνια και τα μεταξύ τους ιντρόνια. Το *Minos* έχει εντεθεί κατά τέτοιο τρόπο ώστε το σήμα πολυαδενυλίωσης που φέρει είναι αντίθετης φοράς με αυτήν του γονιδίου.

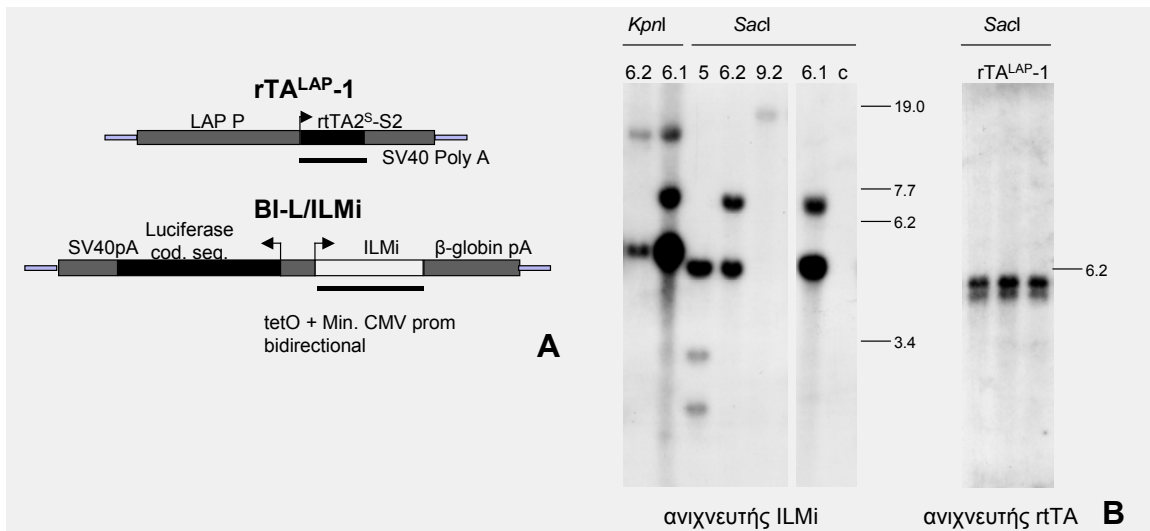
### 1.3 Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών που φέρουν επαγόμενο σύστημα παραγωγής τρανσποζάσης.

Με την επίδειξη της ενεργότητας του *Minos* στα κύτταρα της γαμετικής σειράς του ποντικού ανοίγει ο δρόμος για την χρήση του ως εργαλείο για μεταλλαξιγένεση μέσω ενθέσεων. Δυστυχώς όμως η χρήση μεταθετών στοιχείων για πειράματα μεταλλαξιγένεσης μεγάλης έκτασης και κορεσμό του γονιδιώματος με ενθέσεις με τη δημιουργία “βιβλιοθηκών από ποντικούς”, είναι χρονοβόρα και καθόλου οικονομική. Εναλλακτική διαδικασία είναι η επαγωγή μετάθεσης σε σωματικά κύτταρα και η δημιουργία ποντικών που θα φέρουν “σωματικές βιβλιοθήκες” από ενθέσεις. Σε αυτήν την περίπτωση είναι απαραίτητη η επαγόμενη παραγωγή τρανσποζάσης διότι μετά από την μετάθεση θα πρέπει η νέα ένθεση να είναι σταθερή και άρα να εξασφαλίζεται απουσία τρανσποζάσης. Γενικότερα τέτοιου είδους πηγή τρανσποζάσης είναι χρήσιμη και στην κατάλυση μετάθεσης στη γαμετική σειρά διότι με τη χρήση ενός κατάλληλου επαγόμενου υποκινητή μπορούν να ρυθμιστούν τα επίπεδα τρανσποζάσης έτσι ώστε η συχνότητα μετάθεσης να είναι ελεγχόμενη.

Το σύστημα το οποίο επιλέχθηκε για την παραγωγή επαγόμενης τρανσποζάσης είναι το επαγόμενο, από ορισμένα ανάλογα τετρακυκλίνης, σύστημα Tet-On (Gossen *et al.* 1995). Η τρανσποζάση του *Minos* κλωνοποιήθηκε υπό τον έλεγχο του στοιχείου απόκρισης/χειριστή της τετρακυκλίνης (TRE/tetO) στο πλασμίδιο pBI-L (Clontech). Το συγκεκριμένο πλασμίδιο φέρει τον χειριστή tetO και εκατέρωθεν δύο ελάχιστους υποκινητές του ιού CytoMegalovirus, αντίθετης φοράς. Υπό τον έλεγχο του ενός κλωνοποιήθηκε η τρανσποζάση και υπό τον έλεγχο του άλλου βρίσκεται το γονίδιο της λουσιφεράσης. Παρουσία του αντίστροφου ενεργοποιητή της τετρακυκλίνης (rtTA) και doxycycline επάγεται η μεταγραφή γονιδίων υπό τον έλεγχο του tetO χειριστή. Απουσία doxycycline ο ενεργοποιητής δεν μπορεί από μόνος του να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή. Η λουσιφεράση αναμένεται να παράγεται μαζί με την τρανσποζάση σε κατάσταση επαγωγής και χρησιμοποιήθηκε στην παραπάνω κατασκευή για να βοηθήσει μελλοντικά στην ανίχνευση της επαγωγής *in vivo* (Hasan *et al.*, 2001). Η παραπάνω κατασκευή (BI-L/ILMi, εικόνα 13A) ενέθηκε σε γονιμοποιημένα ωάρια, τα οποία μεταφέρθηκαν σε ψευδοέγκυες θηλυκές και δημιουργήθηκαν 13 σειρές διαγονιδιακών ποντικών. (lucTM: 1, 2, 3, 4, 5, 6.0, 6.1, 6.2, 8, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4). Η σειρά lucTM9.2 έφερε ενσωματωμένο στο γένωμά της ένα αντίγραφο της κατασκευής ενώ όλες οι υπόλοιπες έφεραν περισσότερα (Εικόνα 13B).

Έως τώρα σε όλα τα συστήματα μετάθεσης τα οποία έχουν περιγραφεί χρησιμοποιούνται δύο σειρές διαγονιδιακών ποντικών, μία που φέρει τα τρανσποζόνια και μία που φέρει πηγή συστατικά εκφραζόμενης τρανσποζάσης. Στον συγκεκριμένο πειραματικό σχεδιασμό είναι απαραίτητη η παρουσία μιας τρίτης σειράς που να παράγει τον ενεργοποιητή, ο οποίος παρουσία του αναλόγου της τετρακυκλίνης doxycycline (dox) ξεκινά τη μεταγραφή των γονιδίων της λουσιφεράσης και της τρανσποζάσης. Ως όργανο πραγματοποίησης του πειράματος επιλέχθηκε το ήπαρ και χρησιμοποιήθηκε σειρά διαγονιδιακών ποντικών (rTA<sup>LAP</sup>-1, Schonig *et al.*, 2002) η οποία έχει ενσωματωμένα στο γονιδίωμά της πολλά αντίγραφα κατασκευής (Εικόνα 13A) που φέρει το γονίδιο του τροποποιημένου αντίστροφου ενεργοποιητή της τετρακυκλίνης (reverse tetracycline transactivator rTA2<sup>S</sup>-S2, Urlinger *et al.*, 2000) υπό τον έλεγχο του υποκινητή P<sub>LAP</sub> του αρουραίου (Liver enriched Activator Protein, Talbot *et al.*, 1994). Η έκφραση γονιδίων σε διαγονιδιακούς ποντικούς υπό τον έλεγχο του P<sub>LAP</sub> είναι ανάλογη των αντιγράφων που ενσωματώνονται και ανεξάρτητη από τη θέση ένθεσης των διαγονιδίων. Ο P<sub>LAP</sub> έχει χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών που εκφράζουν tTA και παρουσιάζει ενεργότητα στο ήπαρ (Kistner *et al.*, 1996). Αξίζει να σημειωθεί ότι στη συγκεκριμένη σειρά διαγονιδιακών ποντικών που χρησιμοποιήθηκε (rTA<sup>LAP</sup>-1), εκτός του ήπατος ανιχνεύεται rTA και σε κάποιους τύπους κυττάρων του νεφρού και σποραδικά σε ένα μικρό μέρος βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων (Schonig *et al.*, 2002).

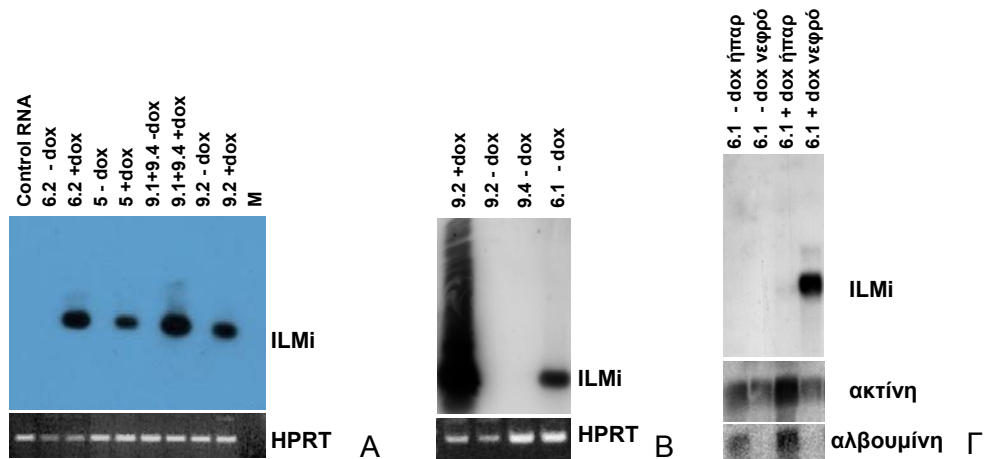
Ποντικοί από τις διαγονιδιακές σειρές lucTM διασταυρώθηκαν με ποντικούς της σειράς rTA<sup>LAP</sup>-1 και οι διπλά διαγονιδιακοί απόγονοι ενέθηκαν ή όχι με doxycycline και προστέθηκε ή όχι doxycycline στο νερό που έπιναν για να ελεγχθεί αν κάποια από τις σειρές παράγει τρανσποζάση στο ήπαρ και στο νεφρό μετά από επαγωγή. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με ανάλυση κατά Northern, σύνθεση cDNA και Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (RT-PCR) και με ανίχνευση της ενεργότητας της λουσιφεράσης. Οι σειρές lucTM 5, lucTM6.2 και lucTM 9.2 παράγουν τρανσποζάση μετά από επαγωγή ενώ απουσία doxycycline δεν ανιχνεύεται σε αυτές μετάγραφο τρανσποζάσης σε ανάλυση κατά Northern ή σε RT-PCR (Εικόνα 14A).



**Εικόνα 13. Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών για επαγόμενη παραγωγή τρανσποζάσης. (Α)** Απεικόνιση των κατασκευών στις οποίες βασίστηκε η δημιουργία των σειρών διαγονιδιακών ποντικών  $rTA^{LAP-1}$  (Schonig *et al.*, 2002) και lucTM. Τα μεγέθη δεν είναι ανάλογα των πραγματικών μεγεθών των στοιχείων των κατασκευών. Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό των ποντικών συμβολίζονται με μαύρη γραμμή. **(Β)** Ανάλυση κατά Southern γενωμικού DNA από ποντικούς των σειρών lucTM 5, 6.1, 6.2, 9.2 και  $rTALAP-1$ . Της ηλεκτροφόρησης έχει προηγηθεί πέψη του γενωμικού DNA με τα ένζυμα περιορισμού που αναγράφονται στο πάνω μέρος της εικόνας. Η διαδρομή “c” περιέχει γενωμικό DNA μη διαγονιδιακού ποντικού. Οι θέσεις των αλληλουχιών αναγνώρισης των ενζύμων περιορισμού *SacI* και *KpnI* στην κατασκευή αναγράφονται στο χάρτη της κατασκευής (Παράρτημα).

Όσον αφορά στη σειρά lucTM6.1, πέντε ποντικοί εξετάστηκαν. Από αυτούς, οι δύο αρσενικοί παράγουν τρανσποζάση μετά από επαγωγή, κυρίως στο ήπαρ και λιγότερο στο νεφρό, δύο από τους θηλυκούς παράγουν χαμηλά ποσά στο ήπαρ και υψηλά ποσά στους νεφρούς και ο τρίτος θηλυκός δεν εκφράζει τρανσποζάση. Επαλήθευση του αποτελέσματος έγινε με υβριδοποίηση της ίδιας μεμβράνης με ηπατοειδικό ανιχνευτή (αλβουμίνη, εικόνα 14Γ). Η συγκεκριμένη σειρά ελέγχθηκε δύο φορές με RT-PCR και επίσης με υβριδοποίηση των προϊόντων με ανιχνευτή το γονίδιο της τρανσποζάσης απουσία και παρουσία doxycycline. Κατά τον πρώτο έλεγχο εντοπίστηκαν ίχνη μεταγράφου τρανσποζάσης στο δείγμα “απουσίας επαγωγής” μετά

από την υβριδοποίηση (Εικόνα 14B). Οι υπόλοιπες σειρές δεν εκφράζουν τρανσποζάση μετά από επαγωγή (Πίνακας 5).



**Εικόνα 14.** Έλεγχος σειρών διπλά διαγονιδιακών ποντικών *lucTM/+ ; rtTA<sup>LAP-1/+</sup>* για την παραγωγή μεταγράφου τρανσποζάσης μετά από επαγωγή με *doxycycline*. **A** και **B**. Υβριδοποίηση, με ανιχνευτή το γονίδιο της τρανσποζάσης, των προϊόντων που προέκυψαν μετά από RT-PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητών για την τρανσποζάση. Στις κάτω εικόνες παρουσιάζονται τα προϊόντα που προέκυψαν μετά από RT-PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητών για το γονίδιο *hprt*. **(A)** Σειρές στις οποίες ανιχνεύεται μετάγραφο τρανσποζάσης στο ήπαρ μόνο σε συνθήκες επαγωγής. Με M συμβολίζεται το πείραμα ελέγχου χωρίς την προσθήκη RNA στην αντίδραση. **(B)** Σειρά 6.1: Στη σειρά αυτή σε μία από τις δύο αντιδράσεις RT-PCR που πραγματοποιήθηκαν ανιχνεύτηκε στο ήπαρ μικρή ποσότητα μεταγράφου σε κατάσταση μη επαγωγής. Στην εικόνα φαίνεται η ποσότητα του μεταγράφου σε σύγκριση με το μετάγραφο της σειράς 9.2 (χαμηλά ποσά μεταγράφου) σε κατάσταση επαγωγής. **(Γ)** Σειρά 6.1: Ανάλυση κατά Northern θηλυκού ποντικού με ανιχνευτές το γονίδιο της τρανσποζάσης, της ακτίνης και της αλβουμίνης.

Συμπερασματικά, τέσσερις από τις 13 σειρές που δημιουργήθηκαν εκφράζουν τρανσποζάση μετά από επαγωγή και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον, συνδυαζόμενες κατάλληλα με σειρές που παράγουν *rtTA* ιστοειδικά και σειρές οι οποίες φέρουν τρανσποζόνια, για την κατάλυση μετάθεσης σε διάφορους ιστούς.

**Πίνακας 5. Σειρές διαγονιδιακών ποντικών που παράγουν τρανσποζάση του *Minos* μετά από επαγωγή με doxycycline.**

Σειρά διαγονιδιακών ποντικών lucTM	Ανίχνευση μεταγράφου ILMi (Northern analysis, ή/και RT PCR) μετά από επαγωγή με doxycycline	Ανίχνευση λουσιφεράσης (luc assay) μετά από επαγωγή με doxycycline	Ανίχνευση μεταγράφου ILMi (Northern analysis) απουσία doxycycline	Ανίχνευση μεταγράφου ILMi (RT PCR) απουσία doxycycline
1	-	-	-	
2	-	-	-	
3	-	-	-	
4	-	-	-	
5	+	+	-	-
6.0	-	-	-	
6.1	++	+	-	+
6.2	+	+	-	-
8	-	-	-	
9.1	-	-	-	
9.2	+	+	-	-
9.3	-	-	-	
9.4	-	-	-	
9.1+ 9.4	++	+	-	-

## **2. Ανάπτυξη χιμαιρικών φορέων *Minos-AcNPV* (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) με σκοπό την ενσωμάτωση τρανσποζονίων *Minos* στο γονιδίωμα διαφόρων ειδών κυττάρων με υψηλή συχνότητα**

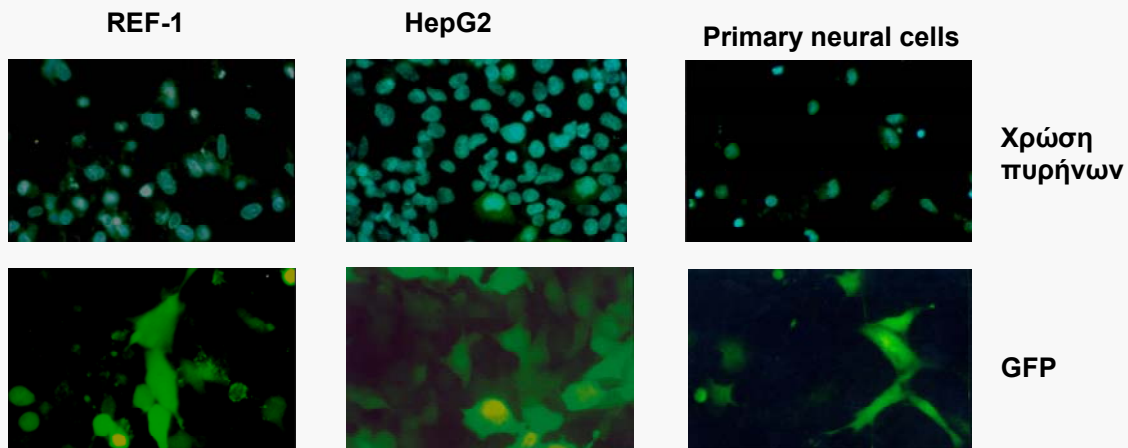
Ο ιός AcNPV ανήκει στους βακουλοϊούς (baculovirus) οι οποίοι είναι ιοί που μολύνουν λεπιδοπτερα και χρησιμοποιείται ευρέως για την έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών (Luckow, 1991; Vlak and Keus, 1990; O'Reilly *et al.*, 1992). Τα τελευταία χρόνια έχει δειχθεί ότι οι συγκεκριμένοι ιοί αν και πολλαπλασιάζονται μόνο σε λεπιδοπτερα ή κύτταρα αυτών σε καλλιέργεια (Bishop *et al.*, 1988), μπορούν να εισέλθουν σε μεγάλο εύρος κυττάρων, διαιρούμενων και μη (Hofmann *et al.*, 1995; van Loo *et al.*, 2001; Condreay *et al.*, 1999; Boyce and Bucher; 1996, Pieroni *et al* 2001; Sarkis *et al*, 2000). Πολλές φορές η αδυναμία της χρήσης του *Minos* ως μέσο για την ενσωμάτωση ξένων γονιδίων σε κάποιες κυτταρικές σειρές έγκειται στη δυσκολία κυτταρικής διαμόλυνσης με DNA. Σκοπός των πειραμάτων που περιγράφονται σε αυτήν την ενότητα είναι να ξεπεραστεί αυτό το εμπόδιο με τη δημιουργία χιμαιρικών φορέων που θα εισάγουν το μεταθετό στοιχείο στα κύτταρα.

### **2.1 Μελέτη της ικανότητας εισόδου του ιού AcNPV σε κυτταρικές σειρές και πρωτογενή κύτταρα**

Σε προκαταρκτικά πειράματα ελέγχθηκε το εύρος εισόδου του ιού AcNPV σε κυτταρικές σειρές. Τροποποιημένος ιός AcNPV που φέρει το γονίδιο της GFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή του ιού CytoMegaVirus (van Loo *et al.*, 2001) χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα μόλυνσης κυτταρικών σειρών και καλλιεργειών πρωτογενών κυττάρων. Η ικανότητα εισόδου του ιού ελέγχθηκε στις κυτταρικές σειρές HepG2 (human hepatocellular carcinoma), NIH3T3 (mouse fibroblasts), MCF7 (human breast adenocarcinoma), T47D (human breast carcinoma) REF-1 (Rat embryonic fibroblasts), σε εμβρυικά βλαστικά κύτταρα ποντικού (ES cells) και σε καλλιέργειες πρωτογενών κυττάρων απομονωμένων από γάγγλια οπισθίων ριζών (DRG's) και νωτιαίο μυελό. Όσον αφορά τις κυτταρικές σειρές, μόλυνση 16 ωρών παρουσία FBS με τίτλο ιού 500 MOI (Multiplicity Of Infection) οδήγησε σε ποσοστό φθοριζόντων κυττάρων HepG2 50%. Τα κύτταρα MCF7, T47D και τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα ποντικού φθόριζαν σε πολύ μικρότερα ποσοστά. Τα κύτταρα NIH3T3 και REF-1 φθόριζαν σε ποσοστό 30% και 10-20% αντίστοιχα (Εικόνα 15, Πίνακας 6). Στα κύτταρα REF-1 μειώνεται η βιωσιμότητα



τους μετά την επώαση 16 ωρών με τον ιό, οπότε δοκιμάστηκε επώαση τους με ιό για μία ώρα απουσία και παρουσία FBS (Fetal Bovine Serum). Οι δύο παραπάνω συνθήκες δεν φαίνεται να επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων και ειδικά η πρώτη (απουσία FBS) δεν μειώνει το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν GFP (Πίνακας 6). Στις καλλιέργειες πρωτογενών κυττάρων το ποσοστό έφτασε έως και 80% (Εικόνα 15). Με ανοσοεντοπισμό των νευρώνων με τη χρήση αντισώματος έναντι των νευροϊνιδίων (mouse IgG anti-neurofilaments) πιστοποιήθηκε ότι οι νευρώνες δεν φθόριζαν (Εικόνα 16).



**Εικόνα 15. Ικανότητα εισόδου του ιού AcNPV σε κύτταρα θηλαστικών.** Ανίχνευση GFP σε κύτταρα Ref 1, HepG2 και πρωτογενή κύτταρα απομονωμένα από DRGs μετά από επώαση 16 ωρών με ιό AcNPV (200 MOI) που φέρει το γονίδιο της GFP (CMV/GFP). Χρώση των πυρήνων με αντιδραστήριο Hoechst.

Για τον έλεγχο εισόδου του ιού AcNPV σε κύτταρα S2 (Schneider's *Drosophila* Line 2), χρησιμοποιήθηκε ο χιμαιρικός φορέας *Minos-AcNPV* BacMiBo14/GtTA2, ο οποίος προέκυψε από τον ενδιάμεσο πλασμιδιακό φορέα pBacPAK8MiBO14/GtTA2ΔPPΔNotI (Παράρτημα). Ο συγκεκριμένος φορέας αποτελείται από τροποποιημένο ιό AcNPV και ένα τρανσποζόνιο *Minos* που φέρει διπλασιασμένο τον χειριστή της τετρακυκλίνης (*tetO*) και δύο ελάχιστους υποκινητές από το γονίδιο *hsp70*, αντίθετης φοράς. Υπό τον έλεγχο του ενός έχει κλωνοποιηθεί ο ενεργοποιητής της τετρακυκλίνης tTA (Gossen et al., 1992) και υπό τον έλεγχο του άλλου, το γονίδιο

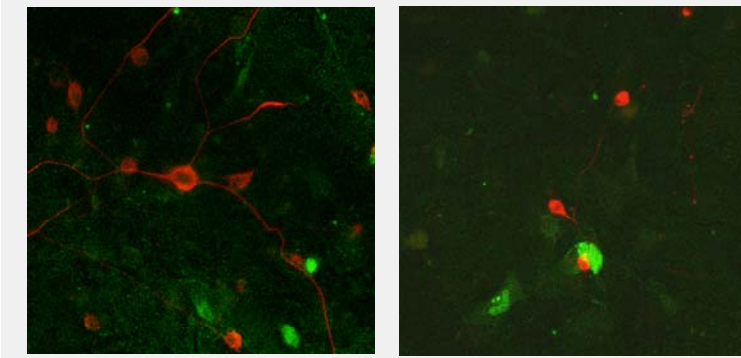
της GFP. Με αυτόν τον τρόπο, απουσία τετρακυκλίνης, χαμηλά επίπεδα μεταγραφής από τους ελάχιστους υποκινητές οδηγούν σε παραγωγή GFP και tTA. Με τη σειρά του το tTA δεσμεύεται στον τεχνητό χειριστή tetO και επάγει μεταγραφή του εαυτού του και της GFP. Μετά από επώαση των κυττάρων S2 με τον παραπάνω ιό, πάνω από 90% των κυττάρων φθόριζαν ακόμα και με χαμηλότερα MOIs (100) από αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για τα κύτταρα θηλαστικών. Υψηλή ικανότητα εισόδου σε κύτταρα S2 έχει περιγραφεί (Lee *et al.* 2000).

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι ο ιός αυτός έχει μεγάλο εύρος εισόδου σε κυτταρικές σειρές αλλά το ποσοστό των κυττάρων στα οποία εισέρχεται ή η ικανότητα έκφρασης του ξένου γονιδίου που αυτός μεταφέρει υπό τον έλεγχο συγκεκριμένου υποκινητή εξαρτώνται από τον κυτταρικό τύπο.

**Πίνακας 6. Ικανότητα εισόδου ιού AcNPV που φέρει το γονίδιο της GFP σε κύτταρα θηλαστικών**

Τύπος κυττάρων	% Ποσοστό φθοριζόντων κυττάρων μετά από μόλυνση με 500 MOI ιού για 1 ώρα χωρίς FBS στο διάλυμα μόλυνσης	% Ποσοστό φθοριζόντων κυττάρων μετά από μόλυνση με 500 MOI ιού για 1 ώρα παρουσία FBS στο διάλυμα μόλυνσης	% Ποσοστό φθοριζόντων κυττάρων μετά από μόλυνση με 500 MOI ιού για 16 ώρες παρουσία FBS στο διάλυμα μόλυνσης
HepG2	30	30	50
NIH3T3	5	<0.5	30
REF-1	10-20	2	10-20*
T47D	<2	<2	<2
MCF7	5	<5	<10

\* Μειωμένη βιωσιμότητα



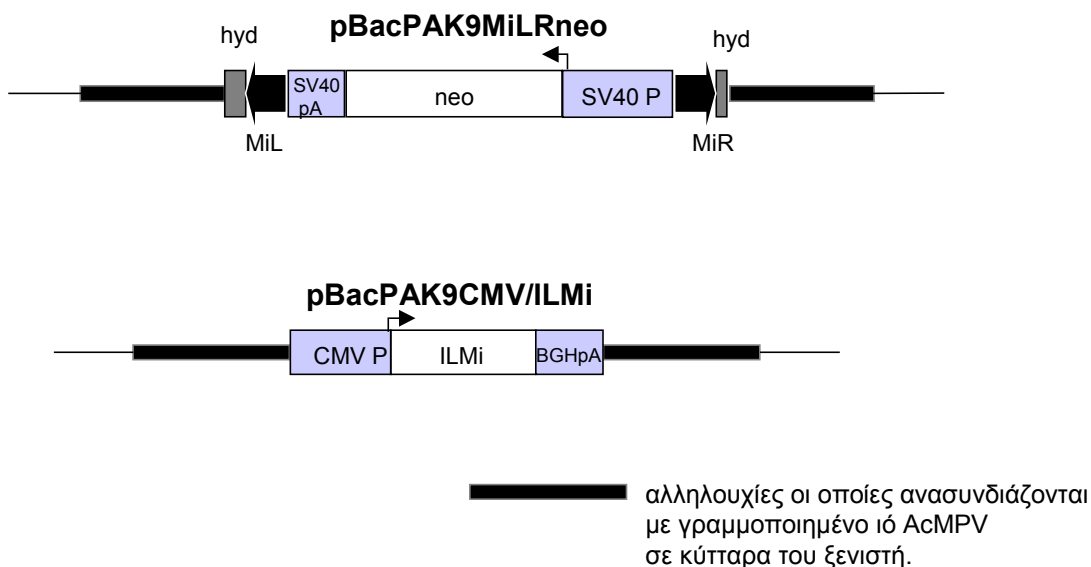
**Εικόνα 16. Απουσία φθορισμού σε νευρώνες μετά από επώαση με ιό AcNPV που φέρει GFP.** Ανοσοεντοπισμός νευρώνων απομονωμένων από DRGs. Το πρωτογενές αντίσωμα είναι έναντι των νευροϊνιδίων (neurofilaments) και το

δευτερογενές είναι το Cy3 anti mouse (εκπέμπει στο κόκκινο). Τα κύτταρα που εκφράζουν GFP ανιχνεύονται ως φθορίζοντα στο πράσινο. Κάθε εικόνα προέρχεται από αλληλοεπικάλυψη δύο φωτογραφιών του ίδιου πεδίου με διαφορετικά φίλτρα.

## **2.2 Ενσωμάτωση τρανσποζονίων *Minos* στο γονιδίωμα κυτταρικών σειρών μετά από επώαση με χιμαιρικούς φορείς *Minos-AcNPV***

Για τη δημιουργία σταθερά μετασχηματισμένων κλώνων κυττάρων με τη δράση της τρανσποζάσης του *Minos* τα προς μελέτη κύτταρα επωάστηκαν με χιμαιρικούς φορείς *Minos-AcNPV* που φέρουν τρανσποζόνια *Minos* και τρανσποζάση.

Η κυτταρική σειρά HepG2 επιλέχθηκε για την πραγματοποίηση των πειραμάτων σταθερού μετασχηματισμού μετά από διπλή μόλυνση με χιμαιρικούς φορείς *Minos-AcNPV*. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά δεν παρουσιάζει υψηλή ικανότητα διαμόλυνσης με συμβατικές μεθόδους (μέθοδος του  $\text{CaCl}_2$ ) και σε αυτήν ο ιός AcNPV εισέρχεται με μεγάλη συχνότητα. Στα πειράματα που ακολουθούν χρησιμοποιήθηκε το τρανσποζόνιο MiLRneo (Klinakis *et al.*, 2000b) κλωνοποιημένο σε τροποποιημένο ιό AcNPV (Clontech). Ο ενδιάμεσος φορέας για την δημιουργία του χιμαιρικού ιού BacMiLRneo παρουσιάζεται στην εικόνα 17. Το τρανσποζόνιο φέρει μεταξύ των άκρων του *Minos* το γονίδιο της ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη υπό τον έλεγχο του υποκινητή/ενισχυτή του ιού SV40. Η έκφραση του γονιδίου προσδίδει ανθεκτικότητα σε κύτταρα τα οποία καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει το αντιβιοτικό G418. Ως πηγή τρανσποζάσης χρησιμοποιήθηκε το cDNA της τρανσποζάσης υπό τον έλεγχο του υποκινητή του ιού CytoMegalovirus, κλωνοποιημένο σε τροποποιημένο ιό AcNPV (Clontech). Ο ενδιάμεσος φορέας για τη δημιουργία του χιμαιρικού ιού BacCMV/ILMi παρουσιάζεται επίσης στην εικόνα 17.



**Εικόνα 17. Δημιουργία χιμαιρικών φορέων *Minos-AcNPV*.** Πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία χιμαιρικών φορέων *Minos-AcNPV* μετά από ανασυνδυασμό με γραμμοποιημένο ιό σε κύτταρα SF21. Τα μεγέθη δεν είναι ανάλογα των πραγματικών μεγεθών των στοιχείων των κατασκευών

Οι δύο χιμαιρικοί φορείς BacMiLRneo, και BacCMV/ILMi χρησιμοποιήθηκαν για τη μόλυνση κυττάρων HepG2 σε διάφορους συνδυασμούς τίτλων έτσι ώστε να βρεθεί ο τίτλος ιών και η μεταξύ τους αναλογία που οδηγεί σε μεγαλύτερο αριθμό μετασχηματισμένων κλώνων. Μετά τη μόλυνση των κυττάρων με τους δύο χιμαιρικούς φορείς, η τρανσποζάση που παράγεται καταλύει την εκτομή του μη αυτόνομου μεταθετού στοιχείου MiLRneo και την ενσωμάτωση του σε χρωμοσωμικές θέσεις. Τα κύτταρα που φέρουν τέτοιου είδους ενθέσεις επιλέχθηκαν ως κλώνοι ανθεκτικοί στο G418.

Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από το παραπάνω πείραμα. Μόλυνση  $10^6$  κυττάρων HepG2 μόνο με τον ιό που φέρει το τρανσποζόνιο ( $3.3 \times 10^7$  rfu ή 33 MOI στη συγκεκριμένη περίπτωση) είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή μικρού αριθμού σταθερά μετασχηματισμένων κλώνων (6-40). Αύξηση του τίτλου του ιού έως και  $1 \times 10^9$  rfu (1000 MOI) οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των μετασχηματισμένων κλώνων (102-800). Οι κλώνοι που προέκυψαν απουσία τρανσποζάσης οφείλονται πιθανώς σε τυχαία ενσωμάτωση μέρους του γονιδιώματος του ιού που φέρει το γονίδιο της ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη στο γονιδίωμα των κυττάρων HepG2 (Condreay *et al.*,

**Πίνακας Χ. Δημιουργία κλώνων ανθεκτικών στο G418 με χιμαιρικούς φορείς *Minos*-AcNPV**

BacCMV/ILMi (pfu)	BacMilPneo (pfu)	HepG2 Π1 (A.A.)	HepG2 Π2 (A.A.)	REF-1 Π1 (A.A.)	REF-1 Π2 (A.A.)	REF-1* (A.A.)	NIH3T3 Π1 (A.A.)	NIH3T3 Π2 (A.A.)
0	3,3x10 <sup>7</sup>	6	40					
0	1,65x10 <sup>8</sup>	52	120					
0	1x10 <sup>9</sup>	102	800	226	480	3200	550	475
3,3x10 <sup>7</sup>	3,3x10 <sup>7</sup>	837	380					
3,3x10 <sup>7</sup>	1,65x10 <sup>8</sup>	2312	2400					
3,3x10 <sup>7</sup>	1x10 <sup>9</sup>	2034	14400					
1,65x10 <sup>8</sup>	3,3x10 <sup>7</sup>	2520	2014					
1,65x10 <sup>8</sup>	1,65x10 <sup>8</sup>	5260	7680					
1,65x10 <sup>8</sup>	1x10 <sup>9</sup>	9000	16000					
1x10 <sup>9</sup>	3,3x10 <sup>7</sup>	2380	4000					
1x10 <sup>9</sup>	1,65x10 <sup>8</sup>	3464	8200					
1x10 <sup>9</sup>	1x10 <sup>9</sup>	16120	22000	3050	2140	10900	10630	10000-15000

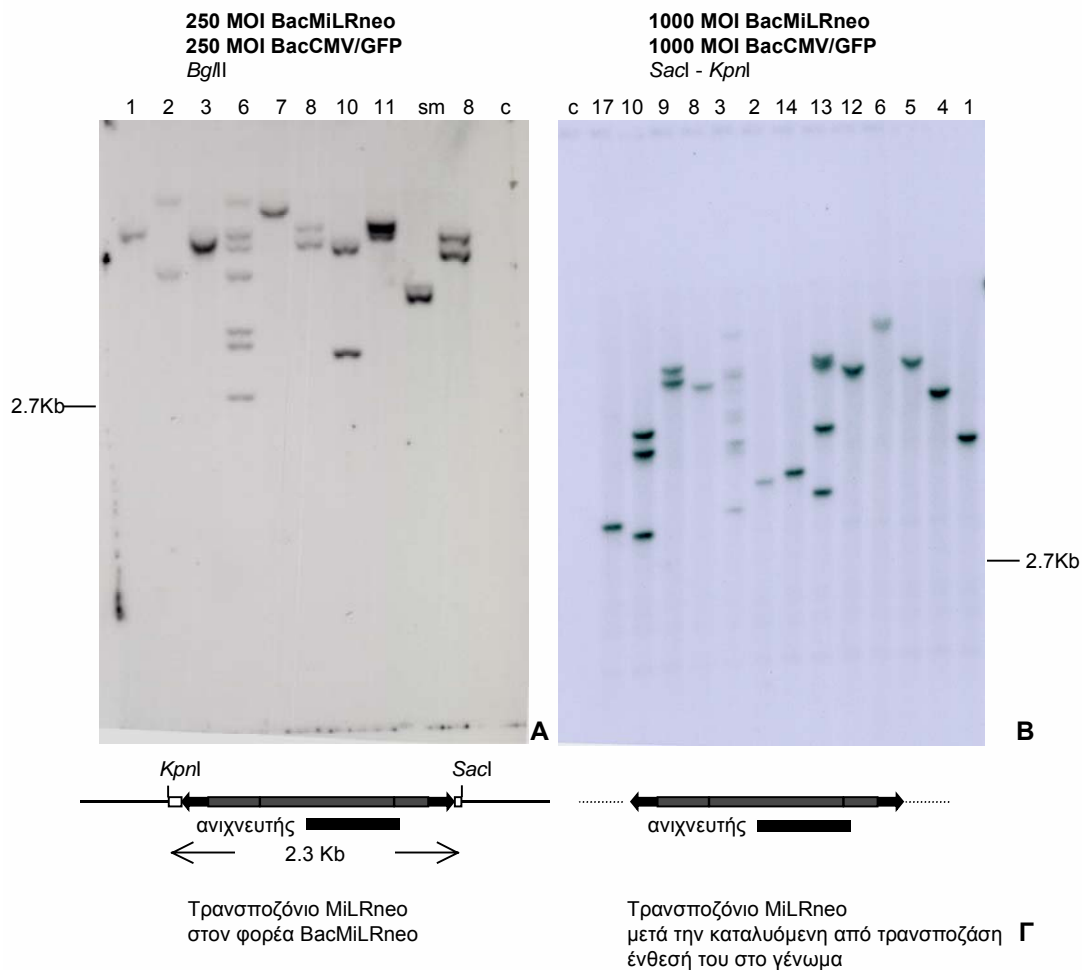
\* Επώαση μίας ώρας με τον ιό (συνήθης διάρκεια 16 ώρες)

A.A.: Αριθμός ανθεκτικών αποικιών στο G418. Π: Πείραμα

1999). Μετά την μόλυνση με τους ιούς BacMilRneo (3.3x10<sup>7</sup> pfu ή 33 MOI), και BacCMV/ILMi (3.3x10<sup>7</sup> pfu ή 33 MOI) ο αριθμός των μετασχηματισμένων κλώνων αυξήθηκε τουλάχιστον κατά μία τάξη μεγέθους. Η αναλογία ιών BacMilRneo και BacCMV/ILMi 1:1 και ο υψηλότερος τίτλος που χρησιμοποιήθηκε (10<sup>9</sup> pfu ανά τρυβλίο 35 mm, 1000 MOI) ήταν οι συνθήκες που οδήγησαν στον μεγαλύτερο αριθμό σταθερά μετασχηματισμένων κλώνων (16120-22000). Περαιτέρω αύξηση του τίτλου που χρησιμοποιήθηκε στις μολύνσεις δεν είναι εφικτή διότι τα κύτταρα που επωάζονται με τόσο υψηλούς τίτλους δεν είναι υγιή και πεθαίνουν κατά την πειραματική διαδικασία. Ακόμα και με τη χρήση 1000 MOI από τους δύο ιούς, η βιωσιμότητα των κυττάρων είναι μειωμένη. Ο συνδυασμός των δύο χιμαιρικών φορέων και οι τίτλοι που χρησιμοποιήθηκαν οδήγησαν στη δημιουργία υψηλού αριθμού σταθερά μετασχηματισμένων κλώνων στα κύτταρα HepG2.

Για τη διερεύνηση της δημιουργίας σταθερά μετασχηματισμένων κλώνων από τη δράση της τρανσποζάσης πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ανάλυση. Είκοσι δύο από τους κλώνους που προέκυψαν από το παραπάνω πείραμα απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν χωριστά. DNA από αυτούς απομονώθηκε και αναλύθηκε κατά Southern. Πέψη με τα ένζυμα περιορισμού *KpnI* και *SacI*, για τα οποία υπάρχουν αλληλουχίες αναγνώρισης στην κατασκευή του τρανσποζονίου, στις μη μεταθέσιμες περιοχές, εξωτερικά των δύο άκρων (μία αλληλουχία αναγνώρισης για κάθε ένα), έδειξε ότι στις περισσότερες περιπτώσεις (64%) ένα τρανσποζόνιο έχει ενσωματωθεί στο γονιδίωμα των κυττάρων (Εικόνα 18). Υπήρχαν και περιπτώσεις όπου ανιχνεύθηκε μεγάλος αριθμός ενθέσεων (7 και 8), αλλά κατά μέσο όρο ο αριθμός των ενθέσεων ανά κλώνο ήταν δύο. Είναι αξιοσημείωτο ότι δεν παρατηρείται αύξηση του αριθμού των ενθέσεων παράλληλα με την αύξηση του MOI.

Με τη χρήση των συγκεκριμένων ενζύμων περιορισμού και υβριδοποίηση με ανιχνευτή μέρος του γονιδίου της ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη ελέγχθηκε επίσης η πιθανότητα οι ενθέσεις να μην έχουν πραγματοποιηθεί με τη δράση της τρανσποζάσης. Σε αυτήν την περίπτωση το αναμενόμενο μέγεθος για το τμήμα του DNA που αποτελεί την ένθεση θα όφειλε να έχει μέγεθος 2.3 κιλοβάσεων. Καμία από τις ενθέσεις των 22 κλώνων που εξετάστηκαν δεν μεταναστεύει στο πήκτωμα αγαρόζης σε θέση που αντιστοιχεί στις 2.3 κιλοβάσεις. Άρα η κατάλυση της ένθεσης των τρανσποζονίων στο γονιδίωμα πραγματοποιήθηκε από την τρανσποζάση (Εικόνα 18). Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε και μετά τον προσδιορισμό των χρωμοσωμικών αλληλουχιών στις οποίες εντέθηκε το *Minos* (Παπαδοπούλου Ν., 2003, Διατριβή Μ.Τ.Ε, εικόνα 19).



**Εικόνα 18. Ανίχνευση γεγονότων μετάθεσης του *Minos* από τους χιμαιρικούς φορείς *AcNPV-Minos* στο γένωμα των κυττάρων *HepG2*. Ανάλυση κατά Southern ανεξάρτητων κλώνων *HepG2*. Το γενωμικό DNA πριν την ηλεκτροφόρηση έχει υποστεί πέψη με τα ένζυμα περιορισμού που αναγράφονται πάνω από τις αυτοραδιογραφίες. Οι διαδρομές “c” περιέχουν DNA από κύτταρα τα οποία δεν διαμολύνθηκαν. **(A)** Οι κλώνοι προέκυψαν από συν-μόλυνση με 250 MOI του ιού *BacMiLRneo* και 250 MOI *BacCMV/ILMi*. **(B)** Οι κλώνοι προέκυψαν από συν-μόλυνση με 1000 MOI του ιού *BacMiLRneo* και 1000 MOI *BacCMV/ILMi*. **(Γ)** Σχηματική απεικόνιση του τρανσποζονίου πριν το γεγονός μετάθεσης και μετά. Η ύπαρξη ζωνών στην αυτοραδιογραφία μεγέθους 2.3 Kb (*KpnI-SacI* πέψη) θα υποδήλωναν τυχαία ένθεση κομματιού DNA που φέρει την ανθεκτικότητα. Ο ανιχνευτής είναι μέρος του γονιδίου της ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη και παριστάνεται με μαύρη γραμμή.**

### **1000 MOI BacMiLRneo, 1000 MOI BacCMV/ILMi**

**ΚΛΩΝΟΣ 2:** CTCGTAActcaggaggctgtggcaggagaatcgcttgaacctgggaggcagagattgcagtgag

**ΚΛΩΝΟΣ 8:** CTCGTAgtgtgatttacaatcacatgaatatctaagaatgaagccaggcaggtggctcacacc

**ΚΛΩΝΟΣ 10:** CTCGTAaaactagacaagtggcca

**ΚΛΩΝΟΣ 3:** CTCGTAActagcagctctgggcaaaagatac

### **250 MOI BacMiLRneo, 250 MOI BacCMV/ILMi**

**ΚΛΩΝΟΣ 1:** CTCGTAgtctcagctgccatttgaatattgaaaatctccacttttagtcaagagataaacaacca

**ΚΛΩΝΟΣ 7:** CTCGTAcgtgttccaaaaattacatacatttatacaaatattaatgttatgatttgaat

**ΚΛΩΝΟΣ sm:** CTCGTAgttagtaggagaggcataccatgagccataatttctgttttaggtgaatagtggtgata

**ΚΛΩΝΟΣ 10:** CTCGTAactggttgcttaatgaggctcttaattgatcagttacccttttgaccaaacatc

**ΚΛΩΝΟΣ 11:** CTCGTAccttccccacaggcaatatatagacaaatacaacctatgttaccatccctaccca

**ΚΛΩΝΟΣ 8:** CTCGTAagatggtcatgggtccctggaacacagttaag

**Εικόνα 19. Μοριακός χαρακτηρισμός των ενθέσεων του *Minos* στα χρωμοσώματα των κυττάρων HepG2.** Ανάλυση των ενθέσεων του *Minos* από 10 κλώνους που προέκυψαν με συνμόλυνση ιών υψηλού τίτλου (1000 MOI BacMiLRneo, 1000 MOI BacCMV/ILMi) ή χαμηλού τίτλου (250 MOI BacMiLRneo, 250 MOI BacCMV/ILMi). Οι αλληλουχίες που γεινιάζουν με τα άκρα του στοιχείου στη νέα του θέση εμφανίζονται με μικρά γράμματα. Τα τελευταία 4 νουκλεοτίδια του *Minos* και το διπλασιασμένο, μετά την ένθεση, TA εμφανίζονται με κεφαλαία γράμματα.

Στο εργαστήριο έχουν δοκιμαστεί πολλοί διαφορετικοί τρόποι διαμόλυνσης κυττάρων HepG2 (CaCl<sub>2</sub>, διάφορα είδη λιποφεκτινών) και αυτός που οδήγησε στα υψηλότερα επίπεδα διαμόλυνσης ήταν το αντιδραστήριο διαμόλυνσης Gene Porter (Gene Therapy Systems). Το αντιδραστήριο χρησιμοποιήθηκε σε πείραμα ελέγχου για τη διερεύνηση της αποτελεσματικότερης ή όχι δημιουργίας σταθερά μετασηματισμένων κλώνων από το μεταθετό στοιχείο *Minos* με τη χρήση τροποποιημένου ιού AcNPV. Διαμόλυνση του ίδιου αριθμού κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε και στα πειράματα συνμόλυνσης, με πλασμίδια που φέρουν το τρανσποζόνιο MiLRneo και πηγή τρανσποζάσης CMV/ILMi (Κλινάκης Α., 2002, Διδακτορική διατριβή) ή EF1/ILMi (Elongation Factor 1, Klinakis *et al.*, 2000b) είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή πολύ μικρότερου αριθμού σταθερά μετασηματισμένων κλώνων. Ο μεγαλύτερος αριθμός μετασηματισμένων κλώνων (3780) προέκυψε με το πλασμίδιο βοηθό EF1/ILMi (Πίνακας 8). Η αναλογία πλασμιδίων τρανσποζονίου και τρανσποζάσης που



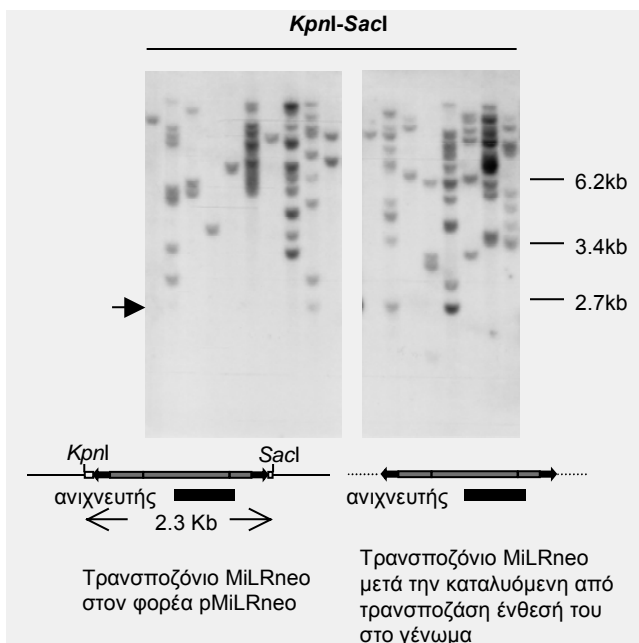
χρησιμοποιήθηκε στα συγκεκριμένα πειράματα (5:3) έχει προκύψει από ανάλογα πειράματα μετασχηματισμού σε κύτταρα HeLa με τη χρήση της τρανσποζάσης EF1/ILMi και είναι η βέλτιστη για τις συγκεκριμένες συνθήκες (Ζαγοραίου Λ., 1999, Διατριβή Μ.Τ.Ε.). Ανάλυση κατά Southern έδειξε ότι οι κλώνοι που προέκυψαν από συνδιαμόλυνση με πλασμίδια έφεραν κατά μέσο όρο 6-7 ενθέσεις του τρανσποζονίου (Εικόνα 20).

**Πίνακας 8. Δημιουργία ανθεκτικών κλώνων μετά από συν-διαμόλυνση με πλασμίδια**

	HepG2	NIH3T3	Ref1
2.5μg pMiLRneo	380	2400	780
2.5μg pMiLRneo +1.5μg pEF1/ILMi	3780	12000	1680
Αριθμός αποικιών παρουσία ILMi/Αριθμό αποικιών απουσία ILMi	9,9	5,0	2,2

Για τον έλεγχο του εύρους της χρήσης του συστήματος των χιμαιρικών φορέων το παραπάνω πείραμα δημιουργίας σταθερά μετασχηματισμένων κλώνων πραγματοποιήθηκε σε δύο επιπλέον κυτταρικές σειρές. Μόλυνση με τους χιμαιρικούς φορείς BacMiLRneo και BacCMV/ILMi πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα REF-1 και NIH3T3 στις συνθήκες που είχαν αποδειχθεί οι πλέον ευνοϊκές για τη δημιουργία μεγάλου αριθμού μετασχηματισμένων κλώνων από τη δράση της τρανσποζάσης ( $10^9$  rfu από τον κάθε ιό σε 35mm τρυβλίο). Ο αριθμός των μετασχηματισμένων κλώνων ήταν συγκρίσιμος με αυτόν που προέκυψε από τα πειράματα στα κύτταρα HepG2 και παρουσιάζεται στον Πίνακα 7. Όσον αφορά τα κύτταρα REF-1 η επώαση 16 ωρών αυξάνει την θνησιμότητά τους οπότε υψηλός αριθμός αποικιών επιτεύχθηκε μετά από επώαση μιας ώρας. Στα κύτταρα REF-1 και NIH3T3 πραγματοποιήθηκε επίσης πείραμα ελέγχου με τη διαμόλυνση με πλασμίδια (MiLRneo και πηγή τρανσποζάσης CMV/ILMi ή EF1/ILMi, Πίνακας 8). Για τα κύτταρα REF-1 το σύστημα της “συν-μόλυνσης” είναι καλύτερο από το σύστημα της “συν-διαμόλυνσης” όσον αφορά στην παραγωγή μεγάλου αριθμού σταθερά μετασχηματισμένων κλώνων και στο ποσοστό αυτών που έχουν προκύψει από τη δράση της τρανσποζάσης. Τα κύτταρα NIH3T3 δίνουν μεγάλο αριθμό σταθερά μετασχηματισμένων κλώνων και με το σύστημα της “συν-διαμόλυνσης” με τη χρήση της EF1/ILMi τρανσποζάσης, αλλά μετά από “συν-μόλυνση” ο αριθμός των κλώνων που προκύπτει από τυχαία ενσωμάτωση DNA είναι σαφώς μικρότερος. Από τα

παραπάνω συμπεραίνεται ότι η χρήση του συστήματος των “συν-μολύνσεων” δεν περιορίζεται στα κύτταρα HepG2.



**Εικόνα 20. Ανίχνευση γεγονότων μετάθεσης του *Minos* στο γένωμα των κυττάρων HepG2 μετά από συνδιαμόλυνση με πλασμίδια.** Ανάλυση κατά Southern ανεξάρτητων κλώνων HepG2 (18 από τους 21 που εξετάστηκαν). Το γενωμικό DNA πριν την ηλεκτροφόρηση έχει υποστεί πέψη με τα ένζυμα περιορισμού που αναγράφονται πάνω από τις αυτοραδιογραφίες. Οι κλώνοι προέκυψαν από συν-διαμόλυνση κυττάρων HepG2 με τα πλασμίδια pMiLRneo και pEF1/ILMi και επιλογή σε G418. Στο κάτω μέρος της εικόνας

υπάρχει σχηματική απεικόνιση του τρανσποζονίου πριν το γεγονός μετάθεσης και μετά. Η ύπαρξη ζωνών στην αυτοραδιογραφία μεγέθους 2.3 Kb (*KpnI-SacI* πέψη) υποδηλώνει τυχαία ένθεση κομματιού DNA που φέρει την ανθεκτικότητα. Ο ανιχνευτής είναι μέρος του γονιδίου της ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη και παριστάνεται με μαύρη γραμμή.

### 2.3 Δημιουργία σταθερά μετασχηματισμένων κυτταρικών σειρών που παράγουν επαγωγίμη τρανσποζάση και καταλύουν την ενσωμάτωση τρανσποζονίων στο γονιδίωμά τους μετά από επώαση με τον ιό BacMiLRneo

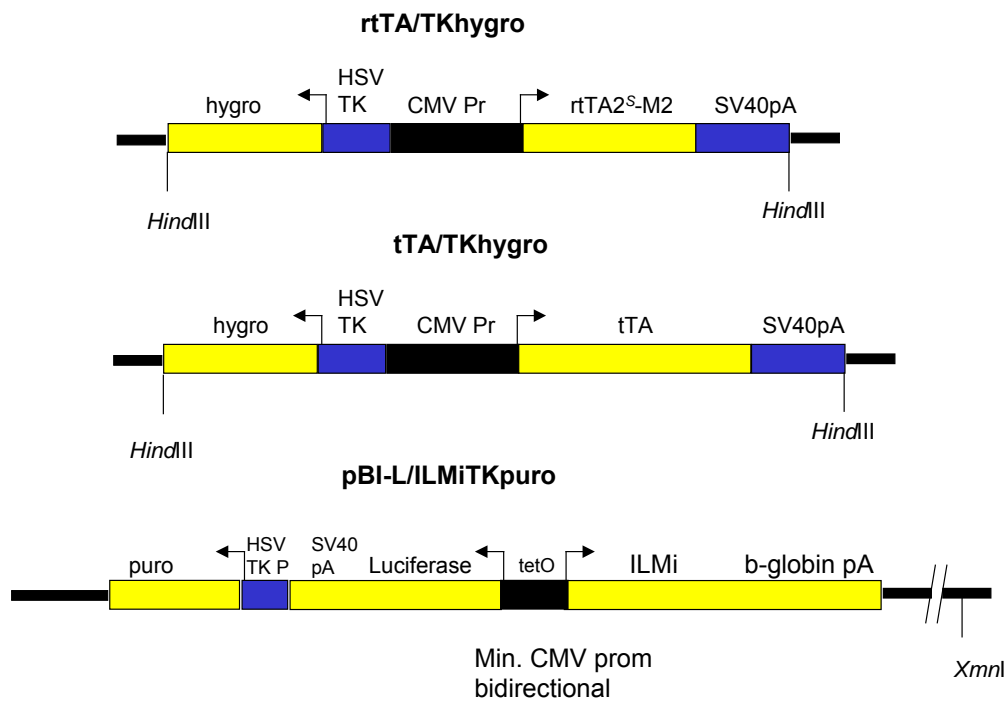
Η χρήση των χιμαιρικών φορέων *Minos*-AcNPV για τη δημιουργία μεγάλου αριθμού σταθερά μετασχηματισμένων από το *Minos* κλώνων σε κυτταρικές σειρές οι οποίες δεν διαμολύνονται σε υψηλά επίπεδα ανοίγει το δρόμο για πειράματα μεγάλης κλίμακας μεταλλαξιγένεσης σε διάφορων ειδών κυτταρικές σειρές. Μία παράλληλη οδός προσέγγισης της δημιουργίας μεγάλου αριθμού μετασχηματισμένων κλώνων από τρανσποζόνια σε διάφορες κυτταρικές σειρές είναι η χρήση επαγωγίμου συστήματος παραγωγής τρανσποζάσης σταθερά ενσωματωμένου στο γένωμα των κυττάρων και η μόλυνση με φορέα που φέρει τρανσποζόνια κατά την επαγωγή. Με αυτόν τον τρόπο όλα

τα κύτταρα στα οποία θα εισέλθει ο χιμαιρικός φορέας *Minos-AcNPV* έχουν θεωρητικά τη δυνατότητα να καταλύσουν την ενσωμάτωσή του στο γονιδίωμά τους.

Για το πείραμα αυτό επιλέχθηκαν τα κύτταρα HepG2 και τα συστήματα επαγωγής βασισμένα στην τετρακυκλίνη και τα ανάλογα αυτής (Tet-Off και Tet-On, Gossen and Bujard 1992; Gossen *et al.*, 1995). Το σύστημα Tet-Off βασίζεται στον ενεργοποιητή της τετρακυκλίνης (tTA), ο οποίος ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων που βρίσκονται υπό τον έλεγχο του χειριστή της τετρακυκλίνης tetO. Παρουσία doxycycline ο ενεργοποιητής δεν μπορεί να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή. Το σύστημα Tet-On βασίζεται στον αντίστροφο ενεργοποιητή της τετρακυκλίνης (rtTA). Παρουσία rtTA και παρουσία doxycycline επάγεται η μεταγραφή γονιδίων υπό τον έλεγχο του χειριστή tetO. Απουσία doxycycline ο ενεργοποιητής δεν μπορεί από μόνος του να δεσμευτεί στο χειριστή tetO και να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή. Για τη δημιουργία σταθερά μετασχηματισμένων κλώνων κυττάρων που παράγουν τρανσποζάση μετά από επαγωγή απαιτείται η ενσωμάτωση δύο γονιδίων στο γένωμά τους. Αυτό πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια διαμόλυνσης και επιλογής. Σε πρώτο στάδιο στα κύτταρα ενσωματώθηκε ο ενεργοποιητής της τετρακυκλίνης (tTA ή rtTA) και επιλέχθηκαν κλώνοι οι οποίοι σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης με πλασμίδιο αναφοράς (pBI-L, Clontech) και σε συνθήκες επαγωγής εμφάνισαν υψηλά επίπεδα επαγωγής. Σε δεύτερο στάδιο στα κύτταρα που φέρουν τον ενεργοποιητή ενσωματώθηκε η τρανσποζάση υπό τον έλεγχο του τεχνητού χειριστή της τετρακυκλίνης tetO.

Αρχικά τα κύτταρα HepG2 διαμολύνθηκαν με γραμμοποιημένο κομμάτι DNA που έφερε τον ενεργοποιητή tTA και το γονίδιο της ανθεκτικότητας στο φάρμακο hygromycin υπό τον έλεγχο του υποκινητή TK του ιού HSV (tTA/TKhygro). Ανάλογο πείραμα πραγματοποιήθηκε με κομμάτι DNA το οποίο έφερε τον ενεργοποιητή rtTA<sup>S</sup>-M2 (Udo Baron and Maz Hasan, αδημοσίευτα αποτελέσματα) και το γονίδιο HSVTK hygromycin (rtTA/TKhygro, εικόνα 21). Μετά από τις διαμολύνσεις και την επιλογή με hygromycin, προέκυψαν 27 ανθεκτικοί κλώνοι από τη διαμόλυνση με το tTA/TKhygro και 30 από τη διαμόλυνση με το rtTA/TKhygro. Οι κλώνοι αυτοί απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν χωριστά. Ο έλεγχος για την παραγωγή των ενεργοποιητών πραγματοποιήθηκε με διαμόλυνση αυτών, παρουσία και απουσία doxycycline, με DNA το οποίο φέρει το γονίδιο της λουσιφεράσης, υπό τον έλεγχο του χειριστή tetO και μέτρηση των επιπέδων της λουσιφεράσης. Όσον αφορά τους κλώνους που είχαν ενσωματώσει το διαγονίδιο tTA/TKhygro, σε 12 από τους 27 η έκφραση της λουσιφεράσης σε κατάσταση επαγωγής ήταν πάνω από είκοσι φορές υψηλότερη από ότι παρουσία doxycycline (Πίνακας 9).

Από τους 30 κλώνους που είχαν ενσωματώσει το rtTA/TKhygro διαγονίδιο, οι δύο παράγαγαν λουσιφεράση σε κατάσταση επαγωγής σε ποσοστό περίπου είκοσι φορές υψηλότερο από ότι απουσία doxycycline (Πίνακας 10).



**Εικόνα 21. Κατασκευές για τη δημιουργία κλώνων που παράγουν επαγόμενη τρανσποζάση.** Σχηματική απεικόνιση των κατασκευών που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία κλώνων κυττάρων HepG2 που παράγουν τρανσποζάση σε συνθήκες επαγωγής. Τα ένζυμα περιορισμού που αναγράφονται χρησιμοποιήθηκαν για τη γραμμοποίηση του DNA πριν τη διαμόλυνση. Τα μεγέθη δεν είναι ανάλογα των πραγματικών μεγεθών των στοιχείων των κατασκευών

**Πίνακας 9. Έλεγχος κλώνων HepG2 για την παραγωγή tTA**

κλώνος	μονάδες λουσιφεράσης απουσία dox	μονάδες λουσιφεράσης παρουσία dox	dox-/dox+
12	48,7	40,9	1,2
73	853,6	65,7	13,0
64	545,9	39,9	13,7
63	22	11,6	1,9
86	194	22,7	8,6
87	343,7	7,54	45,6
89	141	19,4	7,3
10	3771	198	19,0
17	6918	615,2	11,2
18	1198	134	9,0
38	2494	122,7	20,3
41	4738	157,3	30,1
50	2528	148	17,1
56	343	277	1,2
<b>7</b>	<b>6614</b>	<b>99,7</b>	<b>66,3</b>
<b>108</b>	<b>2936,8</b>	<b>77,2</b>	<b>38,0</b>
<b>107</b>	<b>2122</b>	<b>32,5</b>	<b>65,3</b>
<b>111</b>	<b>1986</b>	<b>35,6</b>	<b>55,8</b>
<b>3</b>	<b>1614</b>	<b>108,2</b>	<b>14,9</b>
<b>4</b>	<b>2505</b>	<b>25,6</b>	<b>97,9</b>
<b>13</b>	<b>1279</b>	<b>29,8</b>	<b>42,9</b>
<b>11</b>	<b>2321</b>	<b>14,4</b>	<b>161</b>
<b>90</b>	<b>2655</b>	<b>40</b>	<b>66,4</b>
<b>92</b>	<b>2071</b>	<b>27,1</b>	<b>76,4</b>
112	0,7	0,1	7
109	17,6	7,8	2,3
110	24,3	12,4	2,0

\* Με έντονη γραφή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μετά από κανονικοποίηση με β-gal assay

**Πίνακας 10. Έλεγχος κλώνων HepG2 για την παραγωγή rtTA**

κλώνος	μονάδες λουσιφεράσης απουσία dox	μονάδες λουσιφεράσης παρουσία dox	dox+/dox-
2	389,5	419,1	1,1
25	105,8	51,14	0,5
28	404,6	408,5	1,0
93	107	130,4	1,2
115	28,8	44	1,5
17	76,7	79,7	1,0
26	293	314	1,1
39	18,5	26,7	1,4
114	26,4	43,8	1,7
129	21,9	38,7	1,8
46	26,5	7,8	0,3
126	57,2	79,2	1,4
62	18,9	27,5	1,5
97	21,4	39,5	1,8
113	135	13	0,1
131	118	148	1,3
90	119,5	285	2,4
120	213	163,8	0,8
112	171,9	280	1,6
13	218,8	4562,3	20,9
116	114	115,2	1,0
77	91	267	2,9
10	876	948,6	1,1
16	675	787	1,2
20	3507	13315	3,8
19	1197	1301	1,1
29	463	8657	18,7
92	1051	1551	1,5
128	618,9	500,5	0,8
67	308	243	0,8

Στη συνέχεια τέσσερις από τους κλώνους επιλέχθηκαν για να ενσωματωθεί σε αυτούς το γονίδιο της τρανσποζάσης (κλώνοι 90 και 92 οι οποίοι παράγουν tTA και 13 και 29 οι οποίοι παράγουν rtTA). Η επιλογή για την περίπτωση των κλώνων tTA έγινε με βάση τα επίπεδα επαγωγής και την έλλειψη μεταγραφικής ή μεταφραστικής “εξάντλησης” (squelching - Gill and Ptashne 1988 – και μειωμένη παραγωγή πρωτεϊνών λόγω της κατάληψης της μεταφραστικής μηχανής από ενός τύπου μετάγραφο, αντίστοιχα). Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε σε πολλούς κλώνους κατά τον έλεγχο της επαγωγής με συνδιαμόλυνση με ένα επιπλέον πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο *lacZ* υπό τον έλεγχο συστατικού υποκινητή για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

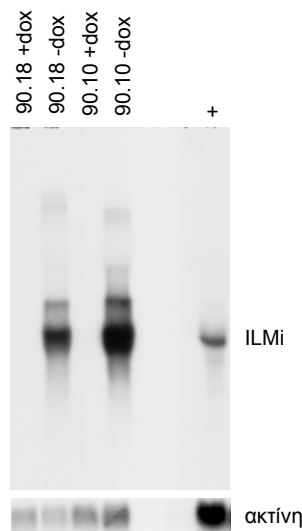
Κύτταρα από τους παραπάνω 4 κλώνους διαμολύνθηκαν με γραμμοποιημένο κομμάτι DNA (BI-L/ILMiTKρυγο, εικόνα 21) που έφερε τον χειριστή tetO, δύο ελάχιστους υποκινητές του ιού Cytomegalovirus αντίθετης κατεύθυνσης με παρακείμενα αυτών τα γονίδια της λουσιφεράσης και της τρανσποζάσης και γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην πουρομυκίνη υπό τον έλεγχο συστατικού υποκινητή (HSV TK). Προέκυψαν και εξετάστηκαν 8 ανθεκτικοί κλώνοι από τον κλώνο 90, 17 από τον κλώνο 92, 19 από τον κλώνο 13 και ένας από τον κλώνο 29. Όσον αφορά τους κλώνους 92 και 29, κανένας από τους διπλά μετασχηματισμένους, ανθεκτικούς στην πουρομυκίνη κλώνους, δεν εξέφραζε λουσιφεράση σε κατάσταση επαγωγής. Από τον κλώνο 90, ο οποίος παράγει tTA, τρεις διπλά μετασχηματισμένοι κλώνοι (90.6, 90.10 και 90.18) παρήγαγαν λουσιφεράση σε κατάσταση επαγωγής. Από τους 19 κλώνους που προήλθαν από τον 13, ο οποίος παράγει rtTA, μόνο ο ένας παρήγαγε λουσιφεράση μετά από επαγωγή (Πίνακας 11).

**Πίνακας 11. Κλώνοι κυττάρων HepG2 που παράγουν τρανσποζάση σε κατάσταση επαγωγής**

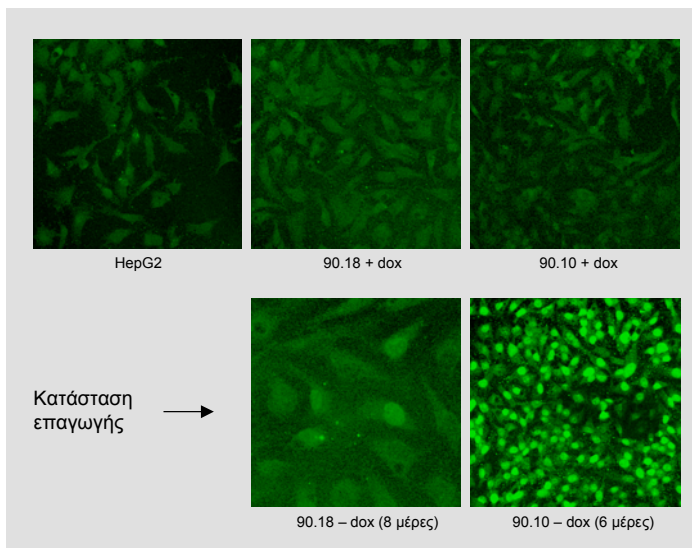
κλώνος	μονάδες λουσιφεράσης (-dox)	μονάδες λουσιφεράσης (+dox)	επαγωγή/μη επαγωγή
90.10 (tTA)	388,6	30,7	12,7
90.18 (tTA)	43,7	0,13	336
90.6 (tTA)	198,8	16	12,4
13.7(rtTA)	21,6	193	8,9

Δύο από τους θετικούς, όσον αφορά την παραγωγή λουσιφεράσης, κλώνους (90.10, 90.12) ελέγχθηκαν για την επαγόμενη έκφραση τρανσποζάσης με ανάλυση κατά Northern. Όπως φαίνεται στην εικόνα 22 και στους δύο κλώνους παράγεται μετάγραφο τρανσποζάσης σε κατάσταση επαγωγής ενώ μετάγραφο δεν ανιχνεύεται στα δείγματα

στα οποία δεν έχει γίνει επαγωγή. Επιπλέον με πειράματα ανοσοεντοπισμού με αντίσωμα έναντι της τρoσποζάσης ανιχνεύτηκε πρωτεΐνη στους πυρήνες των κυττάρων και των δύο κλώνων σε κατάσταση επαγωγής. Όσον αφορά στον κλώνο 90.10, η τρoσποζάση ανιχνεύεται σε όλα τα κύτταρα και συγκεκριμένα στον πυρήνα. Αντιθέτως τα κύτταρα του κλώνου 90.18 παρουσιάζουν ποικιλομορφία στην έκφραση (Εικόνα 23).



**Εικόνα 22. Παραγωγή μεταγράφου τρoσποζάσης σε κατάσταση επαγωγής.** Ανάλυση κατά Northern ολικού RNA απομονωμένου από δύο κλώνους κυττάρων HepG2 (90.10, 90.18) σταθερά μετασχηματισμένους με κατασκευές που φέρουν το γονίδιο του tTA υπό τον έλεγχο του υποκινητή του ιού CMV και το cDNA της τρoσποζάσης υπό τον έλεγχο του χειριστή tetO. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε κατάσταση επαγωγής (απουσία dox στο μέσο καλλιέργειας για 7 μέρες) και σε κατάσταση μη επαγωγής (παρουσία 4-6 μg/ml dox στο μέσο καλλιέργειας). Η διαδρομή + περιέχει RNA απομονωμένο από ποντικό που εκφράζει τρoσποζάση από την ίδια κατασκευή. Στην κάτω εικόνα παρουσιάζεται η υβριδοποίηση με ανιχνευτή το cDNA της ακτίνης.



**Εικόνα 23. Επαγόμενη έκφραση τρoσποζάσης σε κλώνους κυττάρων HepG2.** Ανοσοεντοπισμός, με αντίσωμα έναντι της τρoσποζάσης, σε κύτταρα HepG2 και σε κύτταρα των κλώνων 90.10 και 90.18 (μετασχηματισμένα με κατασκευές που φέρουν το γονίδιο του tTA υπό τον έλεγχο του υποκινητή του ιού CMV και το cDNA της τρoσποζάσης υπό τον έλεγχο του

χειριστή tetO) σε συνθήκες επαγωγής (απουσία dox) ή όχι. Στον κλώνο 90.18 η έκφραση της τρoσποζάσης παρουσιάζει ποικιλομορφία πιθανώς λόγω επίδρασης θέσεως (position effect). Για το λόγο αυτό η φωτογραφία έχει μεγαλύτερη μεγέθυνση όπου φαίνονται κύτταρα που εκφράζουν τρoσποζάση και κύτταρα που δεν εκφράζουν. Στις εικόνες της επαγωγής χαρακτηριστικός είναι ο πυρηνικός εντοπισμός της τρoσποζάσης.



Στη συνέχεια στους κλώνους 90.10 και 90.18 πραγματοποιήθηκε πείραμα σταθερού μετασχηματισμού μέσω της δράσης του *Minos* με μόλυνση από χιμαιρικό φορέα *Minos-AcNPV*. Η επαγωγή της τρανσποζάσης επιτεύχθηκε με απομάκρυνση του *dox* από το μέσο καλλιέργειας 2, 4, 6, 8 και 10 ημέρες κατά το πρώτο πείραμα και 1, 3, 5, 7, 9 και 11 κατά το δεύτερο, πριν τη μόλυνση με το χιμαιρικό φορέα *BacMiLRneo*. Τα κύτταρα που ενσωμάτωσαν το τρανσποζόνιο στο γένωμά τους εντοπίστηκαν ως ανθεκτικοί κλώνοι στο αντιβιοτικό G418. Ο αριθμός των μετασχηματισμένων κλώνων που προέκυψαν μετά από μόλυνση με 1000 MOI *BacMiLRneo* ( $10^9$  rfu ανά 35mm τρυβλίο που περιέχει  $7 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  κύτταρα) στις διάφορες συνθήκες επαγωγής παρουσιάζεται στον Πίνακα 12. Σε όλες τις περιπτώσεις ο μεγαλύτερος αριθμός ανθεκτικών κλώνων προέκυψε μετά από 7-8 μέρες επαγωγής. Όσον αφορά στη σειρά 90.10, οκτώ από τους ανθεκτικούς κλώνους στο G418 έφεραν μία ή δύο ενθέσεις του τρανσποζονίου στο γένωμά τους. Ο αριθμός των σταθερά μετασχηματισμένων κλώνων δεν ξεπέρασε αυτόν που προέκυψε μετά από τα πειράματα μόλυνσης με τους φορείς *BacMiLRneo* και *BacCMV/ILMi*.

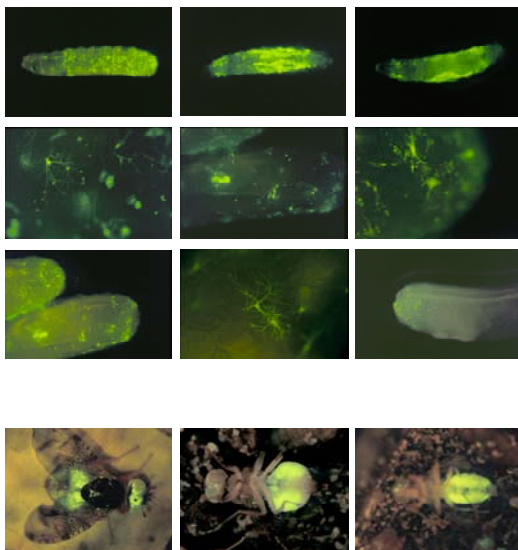
**Πίνακας 12. Μετάθεση σε κλώνους κυττάρων HepG2 από επαγόμενη τρανσποζάση**

κλώνος - συνθήκες επαγωγής - τίτλος ιού	αριθμός ανθεκτικών κλώνων στο G418
<b>1ο πείραμα</b>	
90.18 παρουσία dox	0
90.18 παρουσία dox +1000 MOI of BacMiLRneo	121
90.18 2 μέρες χωρίς dox +1000 MOI of BacMiLRneo	750
90.18 4 μέρες χωρίς dox +1000 MOI of BacMiLRneo	1200
90.18 6 μέρες χωρίς dox +1000 MOI of BacMiLRneo	μόλυνση από βακτήρια
90.18 8 μέρες χωρίς dox +1000 MOI of BacMiLRneo	1810
90.18 10 μέρες χωρίς dox +1000 MOI of BacMiLRneo	1580
<b>90.10 παρουσία dox</b>	
90.10 παρουσία dox +1000 MOI of BacMiLRneo	μόλυνση από βακτήρια
90.10 2 μέρες χωρίς dox +1000 MOI of BacMiLRneo	2970
90.10 4 μέρες χωρίς dox +1000 MOI of BacMiLRneo	4820
90.10 6 μέρες χωρίς dox +1000 MOI of BacMiLRneo	11040
90.10 8 μέρες χωρίς dox +1000 MOI of BacMiLRneo	11560
90.10 10 μέρες χωρίς dox +1000 MOI of BacMiLRneo	2160
HepG2 + 1000 MOI of BacMiLRneo	400
<b>2ο πείραμα</b>	
90.18 παρουσία dox	0
90.18 παρουσία dox +1000 MOI of BacMiLRneo	120
90.18 1 μέρα χωρίς dox +1000 MOI of BacMiLRneo	70
90.18 3 μέρες χωρίς dox +1000 MOI of BacMiLRneo	200
90.18 5 μέρες χωρίς dox +1000 MOI of BacMiLRneo	1400
90.18 7 μέρες χωρίς dox +1000 MOI of BacMiLRneo	1840
90.18 9 μέρες χωρίς dox +1000 MOI of BacMiLRneo	1720
90.18 11 μέρες χωρίς dox +1000 MOI of BacMiLRneo	1380
<b>90.10 παρουσία dox</b>	
90.10 παρουσία dox +1000 MOI of BacMiLRneo	1300
90.10 1 μέρα χωρίς dox +1000 MOI of BacMiLRneo	1460
90.10 3 μέρες χωρίς dox +1000 MOI of BacMiLRneo	5440
90.10 5 μέρες χωρίς dox +1000 MOI of BacMiLRneo	9280
90.10 7 μέρες χωρίς dox +1000 MOI of BacMiLRneo	11600
90.10 9 μέρες χωρίς dox +1000 MOI of BacMiLRneo	7560
90.10 11 μέρες χωρίς dox +1000 MOI of BacMiLRneo	5120
HepG2 + 1000 MOI of BacMiLRneo	800

## 2.4 Έλεγχος της ικανότητας χιμαιρικών φορέων *Minos-AcNPV* να μετασχηματίσουν δίπτερα μετά από μόλυνση

Μέχρι σήμερα ο μετασχηματισμός εντόμων γίνεται μετά από ένεση πλασμιδίων που φέρουν τρανσποζόνια και πηγή τρανσποζάσης, στο συγκυτιακό έμβρυο (Rubin and Spradling, 1982). Κάποια είδη εντόμων όμως (π.χ *Glossina morsitans*: Τσε-Τσε) δε γεννούν αυγά, αλλά προνύμφες. Έτσι κρίνεται απαραίτητο να βρεθεί ένας τρόπος μετασχηματισμού εντόμων που δεν γεννούν αυγά. Ο ιός AcNPV εκτός από κύτταρα θηλαστικών, έχει την ικανότητα να εισέρχεται και σε κύτταρα εντόμων σε καλλιέργεια (Lee *et al.*, 2000).

Προκειμένου να διερευνηθεί αν οι συγκεκριμένοι ιοί μπορούν να εισέλθουν σε κύτταρα εντόμων *in vivo*, προβλαστοδερμικά και κυτταροποιημένα έμβρυα καθώς και προνύμφες των εντόμων *C. capitata* και *D. melanogaster* ενέθηκαν με το χιμαιρικό φορέα *Minos-AcNPV* BacMiBo14GtTA2 ( $10^{10}$  pfu/ml). Ο φορέας αυτός φέρει ένα τρανσποζόνιο με μια αυτοενεργοποιούμενη πηγή GFP η οποία έχει περιγραφεί σε προηγούμενο κεφάλαιο (2.1). Οι ενέσεις των τριών διαφορετικών τύπων είχαν παρόμοια αποτελέσματα. Μέρος των ενεμένων ατόμων ήταν μωσαϊκά κυτάρων που φθόριζαν. Αναγνωρίστηκαν φθορίζοντα κύτταρα στις τραχείες, στο λιπαρό σώμα (fat body) και σε μυϊκά κύτταρα (Εικόνα 24). Το γεγονός ότι οι ενέσεις σε κυτταροποιημένα έμβρυα και στην αιμόλεμφο της προνύμφης οδηγούν σε φθορίζοντα κύτταρα διαφόρων ιστών αποδεικνύει ότι ο ιός έχει την ικανότητα να εισέρχεται σε κύτταρα *C. capitata* και *D. melanogaster in vivo*.



**Εικόνα 24. Φθορισμός σε άτομα *C.capitata* μετά από ένεση ιού που φέρει GFP. Προνύμφες (A) και ενήλικα άτομα (B) του εντόμου *C.capitata* που έχουν φθορίζοντα κύτταρα μετά από ένεση με χιμαιρικό φορέα *Minos-AcNPV* ο οποίος φέρει αυτοενεργοποιούμενη πηγή τρανσποζάσης.**

Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια μετασχηματισμού των παραπάνω εντόμων μέσω χιμαιρικών φορέων που παράγουν τρανσποζάση του *Minos* και φέρουν τρανσποζόνια. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε εκτός του BacMiBo14GtTA2 ένας ακόμη φορέας, ο Bachs/ILMi (ο πλασμιδιακός φορέας, ρBacPAK8hs/ILMiΔPP, που κατασκευάστηκε για τη δημιουργία του ιού μετά από ανασυνδυασμό απεικονίζεται στο παράρτημα), ο οποίος φέρει πηγή τρανσποζάσης υπό τον έλεγχο υποκινητή του γονιδίου *hsp70* της *D. melanogaster* (87C1). Οι κατασκευές αυτές ελέγχθηκαν για ικανότητα εκτομής των τρανσποζονίων του *Minos* σε κύτταρα S2 από *D. melanogaster* και το αποτέλεσμα ήταν θετικό. Ενέθηκαν σε προνύμφες δευτέρου σταδίου των εντόμων *C. capitata* (οι οποίες υπέστησαν heat shock) και *D. melanogaster* (ο υποκινητής σε αυτές είναι ενεργός και χωρίς heat shock) σε τίτλους  $10^{10}$  rfu/ml. Σε ένα μέρος των ενεμένων ατόμων φθόριζαν διάφοροι τύποι κυττάρων (Πίνακας 13). Τα άτομα τα οποία παρουσίασαν υψηλό επίπεδο μωσαϊκισμού διασταυρώθηκαν χωριστά από αυτά που δεν φθόριζαν με μη ενεμένα άτομα και οι απόγονοι ελέγχθηκαν για ενσωμάτωση του τρανσποζονίου MiBo14GtTA2 σε χρωμοσωμικές θέσεις. Δυστυχώς δεν ανιχνεύτηκαν φθορίζοντα άτομα μεταξύ των απογόνων.

**Πίνακας 13. Προσπάθεια μετασχηματισμού εντόμων με χιμαιρικούς φορείς *Minos*-AcNPV**

Αριθμός προνυμφών <i>C. capitata</i> δευτέρου σταδίου που ενέθηκαν	Αριθμός ενήλικων ατόμων που επιβίωσαν	Αριθμός ενήλικων ατόμων που φθορίζουν
153	65	17
165	64	21

Αριθμός προνυμφών <i>D. melanogaster</i> δευτέρου σταδίου που ενέθηκαν	Αριθμός προνυμφών που φθορίζουν
65	23
34	6

Απομόνωση όρχεων από αρσενικά άτομα υψηλού μωσαϊκισμού του εντόμου *C. Capitata*, μετά το πέρας 10-15 ημερών από την ένεση, και παρατήρηση αυτών σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού αποκάλυψε την ύπαρξη ελαχίστων φθορίζοντων σπερματοζωαρίων (ποσοστό μικρότερο του 1%). Αντιθέτως σε παρασκευάσματα ωοθηκών από ενεμένα άτομα δεν ανιχνεύτηκαν φθορίζοντα ωάρια. Αυτό ίσως να οφείλεται σε δυσκολία ή αδυναμία του ιού να εισέλθει σε κύτταρα της γαμετικής σειράς.

# **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

## 1. Ενεργότητα των μεταθετών στοιχείων στον ποντικό

Μέχρι σήμερα έχει αναφερθεί ικανότητα μετάθεσης τεσσάρων μεταθετών στοιχείων, της υπερ-οικογένειας *mariner Tc1*, σε κύτταρα θηλαστικών. Το *SB* από τα ψάρια είναι ενεργό σε ανθρώπινα κύτταρα (Ivics *et al.*, 1997), σε κυτταρικές σειρές από διάφορα θηλαστικά (Izsvak *et al.*, 2000) και σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ποντικού (ES cells) (Luo *et al.*, 1998). Το *Tc1* από τον νηματώδη (Schouten *et al.*, 1998), το *Himar* από το έντομο *H. irritans* και το *Minos* από τη *D. hydei* (Klinakis *et al.*, 2000b) είναι ενεργά σε ανθρώπινα κύτταρα. Όσον αφορά τη μετάθεση σε επίπεδο οργανισμού και συγκεκριμένα στον ποντικό, το *SB* αποδείχθηκε ενεργό σε σωματικά κύτταρα και κύτταρα γαμετικής σειράς (Yant *et al.*, 2000; Fischer *et al.*, 2001; Horie *et al.*, 2001; Dupuy *et al.*, 2001) καθώς και σε γονιμοποιημένα ωάρια (Dupuy *et al.*, 2002). Το *Minos* είναι το πρώτο μεταθετό στοιχείο το οποίο προέρχεται από έντομο και παρουσιάζει ενεργότητα σε σωματικά κύτταρα και κύτταρα γαμετικής σειράς ποντικού.

### 1.1 Ενεργότητα του *Minos* σε σωματικά κύτταρα ποντικού

Στην παρούσα διατριβή αποδεικνύεται ότι η τρανσποζάση του *Minos*, υπό τον έλεγχο ιστοειδικού υποκινητή, μπορεί να καταλύσει τη μετάθεση τρανσποζονίων σε T-λεμφοκύτταρα. Όσον αφορά την εκτομή, εκτός του θύμου και της σπλήνας όπου το ποσοστό των T-λεμφοκυττάρων είναι υψηλό, υπήρχαν και άλλοι ιστοί στους οποίους παρήχθη το ενδεικτικό προϊόν της εκτομής (ήπαρ, νεφρός, πνεύμονας, σκελετικός μυς, εγκέφαλος) μετά από επιπλέον κύκλους Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης. Στη βιβλιογραφία χαμηλά επίπεδα έκφρασης του ανθρώπινου CD2 έχουν αναφερθεί σε ήπαρ και πνεύμονα διαγονιδιακών ποντικών (Lang *et al.*, 1988). Η παραγωγή του προϊόντος εκτομής στους παραπάνω ιστούς μπορεί επίσης να αποδοθεί στην παρουσία μικρού αριθμού T-λεμφοκυττάρων λόγω της παγίδευσης αίματος σε αυτούς (Lang *et al.*, 1988) ή στην παραγωγή τρανσποζάσης από άλλα κύτταρα λόγω του φαινομένου επίδρασης θέσεως (position effect).

Τα αποτυπώματα που αφήνει το μεταθετό στοιχείο *Minos* στην “άδεια θέση” μετά από την εκτομή του διέφεραν από τα “τυπικά” αποτυπώματα που συναντώνται στα χρωμοσώματα της *Drosophila melanogaster* (Arca *et al.*, 1997). Αυτό πιθανώς οφείλεται στην απουσία παραγόντων στον ποντικό οι οποίοι υπάρχουν στη *Drosophila melanogaster* και συμμετέχουν στην εκτομή του μεταθετού στοιχείου ή στην

επιδιόρθωση μετά την εκτομή. Διαφορετικά αποτυπώματα από τα “τυπικά” έχουν ανιχνευθεί επίσης σε γεγονότα εκτομής του *SB* στον ποντικό (Fischer *et al.*, 2001) και στην εκτομή του *Minos* από χρωμοσωμικές θέσεις στη *D. melanogaster* (Arca *et al.*, 1997).

Η συχνότητα μετάθεσης του *Minos* σε T-λεμφοκύτταρα ήταν χαμηλή (0.61%) συγκρινόμενη με τη μετάθεση του *Minos* στην κυτταρική σειρά HeLa (Klinakis *et al.*, 2000b). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε δυσκολία ανίχνευσης των γεγονότων μετάθεσης λόγω της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε, στις συγκεκριμένες κατασκευές που φέρουν τα τρανσποζόνια και την τρανσποζάση, στον τύπο των κυττάρων που επιλέχθηκαν για την πραγματοποίηση του πειράματος ή σε συνδυασμό των παραπάνω. Η ανίχνευση των γεγονότων μετάθεσης με FISH είναι δυνατό να οδηγήσει σε υποεκτίμηση της συχνότητας εάν μεγάλο μέρος των τρανσποζονίων που εκτέμνονται, εντίθενται σε διπλανές θέσεις. “Τοπικές ενθέσεις”, σε περιοχή λίγων κιλοβάσεων μακριά από την αρχική θέση των τρανσποζονίων, έχουν περιγραφεί με αρκετά μεγάλη συχνότητα για το στοιχείο *P* κατά τη μετάθεση του στη *Drosophila melanogaster* (Zhang and Spradling, 1993) και για το *SB* (Carlson *et al.*, 2003). Η χαμηλή συχνότητα μετάθεσης ενδέχεται να οφείλεται σε υψηλά ή χαμηλά επίπεδα έκφρασης της τρανσποζάσης (υψηλά επίπεδα καταλύουν επανεκτομή και απώλεια των ήδη μετατεθειμένων τρανσποζονίων), σε δυσκολία της τρανσποζάσης να καταλύσει μετάθεση λόγω της μειωμένης προσβασιμότητας των τρανσποζονίων στην αρχική τους θέση κοντά στο τελομέρος, στην έλλειψη κάποιων παραγόντων στον ποντικό που συμμετέχουν στη μετάθεση στο κυτταρικό περιβάλλον του φυσικού ξενιστή ή σε συνδυασμό των παραπάνω. Τα επίπεδα της τρανσποζάσης θα μπορούσαν να βελτιστοποιηθούν με τροποποίηση κωδικονίων έτσι ώστε να γίνεται επιτυχέστερη παραγωγή της στον ποντικό (codon usage) ή με τη χρήση ενός επαγωγίμου υποκινητή. Επίσης με την τοποθέτηση των αρχικών τρανσποζονίων σε ευχρωματική περιοχή θα μπορούσε να αυξηθεί η προσβασιμότητά τους. Αυτό είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί είτε με την κλωνοποίηση ενός μεταγραφικά ενεργού γονιδίου μεταξύ των άκρων του *Minos* ή με την αρχική τοποθέτηση του τρανσποζονίου σε έναν μεταγραφικά ενεργό γενετικό τόπο με ομόλογο ανασυνδυασμό (knock in). Εάν με τους τρόπους που περιγράφηκαν αυξηθεί η συχνότητα μετάθεσης, τα τρανσποζόνια του *Minos* θα γίνουν πολύ χρήσιμο εργαλείο για την τροποποίηση γονιδίων και για την πραγματοποίηση πειραμάτων λειτουργικής γενωμικής (functional genomics) σε σωματικά κύτταρα ποντικού.

## 1.2 Ενεργότητα του *Minos* σε κύτταρα της γαμετικής σειράς ποντικού

Στα πειράματα που περιγράφηκαν αποδείχθηκε η ικανότητα μετάθεσης τρανσποζονίων *Minos* σε κύτταρα της γαμετικής σειράς ποντικού και συγκεκριμένα σε ωοκύτταρα. Σε θηλυκές που εκφράζουν τρανσποζάση στα ωοκύτταρά τους και φέρουν τρανσποζόνια του *Minos* ενσωματωμένα στο γονιδίωμά τους πραγματοποιείται μετάθεση και στους απογόνους τους ανιχνεύονται γεγονότα μετάθεσης. Η συχνότητα μετάθεσης είναι πάνω από μία τάξη μεγέθους πιο υψηλή από τη συχνότητα των σωματικών γεγονότων μετάθεσης (8.2% έναντι 0.61%).

Και σε αυτή την πειραματική διάταξη υπάρχει το ενδεχόμενο της υποεκτίμησης εξαιτίας της μεθόδου ανίχνευσης των γεγονότων μετάθεσης. “Τοπικές ενθέσεις”, κοντά στην αρχική θέση των τρανσποζονίων και μεταξύ των θέσεων αναγνώρισης των ενζύμων περιορισμού που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση κατά Southern, δεν ανιχνεύονται ως νέες ζώνες. Επίσης όταν η νέα ζώνη είναι παρόμοιου μεγέθους με τη ζώνη η οποία αντιστοιχεί στα αρχικά τρανσποζόνια δεν μπορεί να ανιχνευθεί ως νέα. Αντίστοιχο πείραμα έχει πραγματοποιηθεί με το *SB* (Fischer *et al.*, 2001). Η μία σειρά διαγονιδιακών ποντικών έχει ενσωματωμένη στο γένωμά της το γονίδιο της τρανσποζάσης του στοιχείου, υπό τον έλεγχο σπερματοειδικού υποκινητή (*Proximal protamine1*, *Prrm1*) και η άλλη σειρά φέρει ένα τρανσποζόνιο. Διπλά διαγονιδιακοί αρσενικοί ποντικοί δίνουν απογόνους, οι οποίοι φέρουν γεγονότα μετάθεσης με συχνότητα 20.4%. Σε ένα άλλο πειραματικό σχήμα με το *SB* άλλα με σειρά ποντικών που φέρει πολλά αντίγραφα τρανσποζονίου (*transposon concatamer*) (Dupuy *et al.*, 2001) η συχνότητα μετάθεσης ήταν δύο γεγονότα μετάθεσης ανά γαμέτη. Άμεση σύγκριση της συχνότητας μεταξύ των δύο μεταθετών στοιχείων δεν μπορεί να γίνει, διότι η αρχική θέση του τρανσποζονίου, τα αντίγραφα του αρχικού τρανσποζονίου, και η πηγή της τρανσποζάσης διαφέρουν και αποτελούν παράγοντες που επηρεάζουν τη μετάθεση.

Όσον αφορά το *Minos*, εννέα από τα δώδεκα γεγονότα μετάθεσης τα οποία χαρτογραφήθηκαν έχουν πραγματοποιηθεί σε διαφορετικό χρωμόσωμα από το αρχικό. Στην περίπτωση του *SB* οι Fischer *et al.* (2001) και οι Carlson *et al.* (2003) έδειξαν ότι μόνο τα δύο από τα δώδεκα γεγονότα μετάθεσης και τα εικοσιπέντε από τα σαράντα τέσσερα, αντίστοιχα, χαρτογραφούνται σε διαφορετικό χρωμόσωμα από το αρχικό ή το ομόλογό του. Άρα το *Minos* πλεονεκτεί έναντι του *SB* διότι παρουσιάζει μικρότερη τάση/προτίμηση για ένθεση στο ίδιο χρωμόσωμα.



Η συχνότητα μετάθεσης του *Minos* σε κύτταρα της γαμετικής σειράς είναι συγκρίσιμη με τη συχνότητα με την οποία έμβρυα που επιμολύνονται με ρετροϊούς ενσωματώνουν προϊούς στα κύτταρα της γαμετικής σειράς (2% αν η μόλυνση γίνεται σε έμβρυα μετά την εμφύτευση και 40% αν η μόλυνση γίνεται πριν την εμφύτευση, Soriano *et al.*, 1987, Soriano and Jaenish, 1986, Fischer *et al.*; 2001 ). Ποσοστό περίπου 4% των ενθέσεων των ρετροϊών είναι υποτελείς θνησιγόνες μεταλλάξεις (Jaenisch *et al.*, 1983, Soriano *et al.*, 1987). Αν θεωρήσουμε ότι το *Minos* έχει παρόμοια ικανότητα δημιουργίας μεταλλάξεων τότε συχνότητα μετάθεσης 8.2% έχει ως αποτέλεσμα ποσοστό 0.33% υποτελών θνησιγόνων μεταλλάξεων. Θεωρώντας ότι το *Minos* μπορεί να εισέλθει σε οποιονδήποτε γενετικό τόπο, πράγμα που δεν ισχύει στην περίπτωση των ρετροϊών και πολλών μεταθετών στοιχείων, εάν το γονιδίωμα του ποντικού έχει 35000 γενετικούς τόπους, η συχνότητα μετάλλαξης είναι λίγο μεγαλύτερη από  $10^{-7}$  ανά γενετικό τόπο, ανά γαμέτη που προέρχεται από διπλά διαγονιδιακή ετερόζυγη μητέρα. Η μεταλλαξιγένεση με *N-ethyl-N-nitrosurea* επάγει μεταλλάξεις σε συχνότητα  $10^{-3}$  ανά γενετικό τόπο, ανά γαμέτη (Schimenti and Bucan, 1998). Είναι φανερό, λοιπόν, ότι αυτές οι συχνότητες είναι απαγορευτικές για τη χρήση του *Minos* ή του *SB* σε πειράματα κορεσμού του γονιδιώματος του ποντικού με ενθέσεις για τον εντοπισμό υποτελών μεταλλάξεων. Παρόλα αυτά το *Minos* μπορεί χρησιμοποιηθεί για συγκεκριμένους σκοπούς όπως για παγίδευση ενισχυτών, γονιδίων, σημάτων πολυαδενυλίωσης ή ως μεταλλαξιγόνο σε ημίζυγα στελέχη τα οποία φέρουν χρωμοσωμικά ελλείμματα (Ramirez-Solis *et al.*, 1995, You *et al.*, 1997, Su *et al.*, 2000, Zheng *et al.*, 2000).

### 1.3 Επαγώγιμα συστήματα παραγωγής τρανσποζάσης

Στην παρούσα διατριβή δημιουργήθηκαν τέσσερις σειρές διαγονιδιακών ποντικών που παράγουν τρανσποζάση μετά από χορήγηση του αναλόγου της τετρακυκλίνης, doxycycline. Ο αρχικός αριθμός σειρών που δημιουργήθηκαν κι ελέγχθηκαν ήταν δεκατρείς. Εκτός των τεσσάρων οι υπόλοιπες δεν εκφράζουν τρανσποζάση παρουσία ή απουσία doxycycline. Το ποσοστό αυτό είναι σε συμφωνία με τη συχνότητα παραγωγής επαγώγιμων σειρών από άλλα εργαστήρια (Schonig Kai, προσωπική επικοινωνία).

Στα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένος αντίστροφος ενεργοποιητής της τετρακυκλίνης (reverse tetracycline transactivator rtTA2<sup>S</sup>-S2, Urlinger *et al.*, 2000). Ο εν λόγω ενεργοποιητής διαφέρει από τον αρχικό ως προς τα χαμηλά

επίπεδα επαγωγής που δίνει απουσία doxycycline και ως προς την ευαισθησία του. Αυτό είναι σαφές ότι συμβαίνει και από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής διότι τουλάχιστον οι τρεις από τις τέσσερις σειρές που δημιουργήθηκαν δεν παράγουν τρανσποζάση απουσία doxycycline.

Οι σειρές διαγονιδιακών ποντικών που εκφράζουν τρανσποζάση μετά από επαγωγή θα χρησιμοποιηθούν στο μέλλον για την πραγματοποίηση επαγόμενης μετάθεσης. Για το σκοπό αυτό εκτός των σειρών lucTM και rTA<sup>LAP</sup>-1 χρειάζεται και μία σειρά που να φέρει τρανσποζόνια. Αυτή είναι η S37.5, η οποία φέρει ένα τρανσποζόνιο του *Minos* στο χρωμόσωμα 7, σε ιντρόνιο του γονιδίου *creb*. Το τρανσποζόνιο έχει μετατεθεί στη συγκεκριμένη θέση μετά από κινητοποίησή του στα κύτταρα της γαμετικής σειράς. Σε τριπλά διαγονιδιακούς ποντικούς, παρουσία και απουσία doxycycline θα ελεγχθεί η ιστοειδική μετάθεση με μια ευαίσθητη μέθοδο βασισμένη στην Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Transposon display, David A. O'Brochta προσωπική επικοινωνία).

Η δημιουργία συστημάτων επαγόμενης μετάθεσης ανοίγει το δρόμο για πειράματα λειτουργικής γενωμικής ανάλυσης σε σωματικά κύτταρα. Για παράδειγμα, ένα τέτοιο σύστημα θα ήταν χρήσιμο στην εύρεση ογκογονιδίων. Με τη χρήση μιας σειράς ποντικών που θα φέρει ένα τρανσποζόνιο με έναν ισχυρό ενισχυτή ή ενισχυτή και υποκινητή, μετά από κινητοποίηση αυτού σε σωματικά κύτταρα, είναι δυνατό κάποιο ογκογονίδιο να βρεθεί υπό τον έλεγχό του. Αν το πείραμα πραγματοποιηθεί σε επιτρεπτικό γενετικό υπόβαθρο για τη δημιουργία όγκων, ένα τέτοιο πειραματικό σχήμα μπορεί να οδηγήσει στην ανίχνευση άγνωστων έως τώρα ογκογονιδίων.

Η χρησιμότητα της επαγόμενης μετάθεσης έγκειται καταρχάς στην αναστρεψιμότητα του φαινοτύπου γιατί ένας νέος παλμός τρανσποζάσης θα μπορεί να επανακινητοποιήσει το τρανσποζόνιο και κατά δεύτερον στη ρύθμιση της μετάθεσης στο αναπτυξιακό στάδιο της επιλογής μας. Η αναστρεψιμότητα του φαινοτύπου είναι και το ουσιαστικό πλεονέκτημα της χρήσης επαγόμενων συστημάτων έναντι της χρήσης του συστήματος CRE/loxP. Το σύστημα αυτό είναι ένα εργαλείο για τροποποιήσεις γονιδιωμάτων διαγονιδιακών ποντικών *in vivo* (Rajewsky *et al.*, 1996; Lewandoski, 2001), επιτρέπει την αναστροφή ή την απομάκρυνση αλληλουχιών καθώς και την ένωση απομακρυσμένων περιοχών (Ramirez-Solis *et al.*, 1995; Zheng *et al.*, 2000), αλλά δεν επιτρέπει επαναφορά στην αρχική χρωμοσωμική κατάσταση.

#### 1.4 Συνδυασμός του *Minos* με τα συστήματα Tet-On και Tet-Off

Στην εισαγωγή περιγράφηκαν τα πειράματα της Pernille Rorth (Rorth, 1996, Rorth *et al.*, 1998). Εν συντομία στα screens που πραγματοποίησε χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Gal4/UAS. Το τρανσποζόνιο (*P* element) έφερε θέσεις πρόσδεσης του Gal4 και δημιουργήθηκαν “βιβλιοθήκες” *Drosophila melanogaster* με διαφορετικές ενθέσεις. Οι μύγες διασταυρώνονταν με Gal4 σειρές και στις διπλά μετασχηματισμένες ανιχνεύονταν φαινότυποι σε συγκεκριμένους ιστούς. Το μεταθετό στοιχείο *P* παρουσιάζει προτίμηση ένθεσης σε 5' μη μεταφράσιμες περιοχές των γονιδίων (Spradling *et al.*, 1995), οπότε με την παραπάνω τεχνική ευνοούνταν οι περιπτώσεις υπερέκφρασης και εκτοπικής έκφρασης γονιδίων. Για την προσαρμογή του συστήματος επαγόμενης μετάθεσης σε ποντικούς και έντομα θα πρέπει να ελεγχθούν οι προτιμήσεις ένθεσης του *Minos*. Έως τώρα τέτοιου είδους μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί στη *Drosophila melanogaster* (Μεταξάκης Α., αδημοσίευτα αποτελέσματα) και έδειξαν ότι το *Minos* παρουσιάζει τάση ένθεσης σε ιντρόνια γονιδίων. Πειραματικά σχήματα σαν αυτά της Pernille Rorth στην περίπτωση του *Minos* θεωρητικά θα οδηγούν σε έκφραση ελλειμματικών πρωτεϊνών και πιθανά στην ανίχνευση επικρατών αρνητικών μεταλλάξεων (dominant negative mutants). Παρόμοιο πειραματικό σχήμα περιλαμβάνει τη δημιουργία ενθέσεων σε μύγες με το *Minos* να φέρει μεταξύ των άκρων του τον χειριστή tetO. Οι μύγες αυτές θα διασταυρώνονται με σειρές που θα εκφράζουν ιστοειδικά ή συστατικά tTA ή rtTA και στις διπλά μετασχηματισμένες, θα γίνεται έλεγχος φαινοτύπου σε κατάσταση επαγωγής. Το πλεονέκτημα αυτής της πειραματικής διάταξης έγκειται στο γεγονός ότι στα πλαίσια του ίδιου ατόμου μπορεί να γίνει έλεγχος στην κατάσταση ύπαρξης και απουσίας επαγωγής. Το μειονέκτημα είναι ότι προς το παρόν δεν υπάρχει ποικιλία σειρών που να εκφράζουν tTA ή rtTA σε διάφορους ιστούς.

Η μεταφορά της τεχνολογίας που αναπτύχθηκε βάσει των μεταθετών στοιχείων από τα έντομα στον ποντικό ανοίγει νέους δρόμους για πειράματα παγίδευσης ενισχυτών και γονιδίων και για πειράματα λειτουργικής γενωμικής.

## 2. Ανάπτυξη της τεχνολογίας δημιουργίας χιμαιρικών φορέων *Minos-AcNPV*

### 2.1 Διαφορές στην ικανότητα εισόδου του ιού AcNPV σε κυτταρικές σειρές

Ο ιός AcNPV έχει δείχθει ότι έχει την ικανότητα να εισέρχεται σε ποικιλία κυττάρων εκτός του φυσικού του ξενιστή. Σε κύτταρα σπονδυλωτών δεν πολλαπλασιάζεται γιατί οι υποκινητές των γονιδίων του είναι ανενεργοί (silent, Brusca *et al.*, 1986; Carbonell *et al.*, 1985).

Στην παρούσα διατριβή ελέγχθηκε η ικανότητα του να εισέρχεται σε κύτταρα θηλαστικών και κύτταρα από *D. melanogaster*. Κάποια από αυτά ήταν ήδη γνωστό ότι μολύνονται από τον AcNPV (HepG2: Hofmann *et al.*, 1995; van Loo *et al.*, 2001; S2: Lee *et al.*, 2000). Από τα υπόλοιπα κύτταρα τα οποία δοκιμάστηκαν και η ικανότητα εισόδου του ιού ανιχνεύτηκε ως ποσοστό φθορίζοντων κυττάρων μετά από μόλυνση με ιό που φέρει την GFP, τα πρωτογενή κύτταρα, τα NIH3T3 και τα REF-1, φθορίζουν σε ικανοποιητικές συχνότητες. Τα κύτταρα MCF7, T47D και τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ποντικού φθορίζουν πολύ λιγότερο (Πίνακας 4). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι ο ιός δεν εισέρχεται με την ίδια αποτελεσματικότητα σε αυτά ή ενδέχεται να εισέρχεται αλλά τα κύτταρα που τον φέρουν να μην ανιχνεύονται λόγω έλλειψης έκφρασης της GFP. Στα πρωτογενή κύτταρα (απομονωμένα από νωτιαίο μυελό και γάγγλια οπισθίων ριζών - DRGs - σταδίου E14) ο ιός AcNPV εισέρχεται με μεγάλη αποτελεσματικότητα σε όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς εκτός των νευρώνων, παρατήρηση που είναι σε συμφωνία με τα πειράματα *in vivo* που έχουν πραγματοποιηθεί σε νευρικό ιστό ποντικού, όπου οι νευρώνες είναι θετικοί για την GFP σε πολύ μικρές συχνότητες σε σύγκριση με άλλους τύπους κυττάρων (Sarkis *et al.*, 2000). Αυτό ενδέχεται να οφείλεται στον υποκινητή CytoMegalovirus και όχι στην μειωμένη ικανότητα των νευρώνων να δέχονται τον ιό, διότι με τη χρήση ιού που φέρει το γονίδιο *lacZ* υπό τον έλεγχο του υποκινητή του ιού Rous Sarcoma Virus οι νευρώνες είναι θετικοί για την παρουσία της β-γαλακτοσιδάσης σε μεγαλύτερες συχνότητες από ότι τα κύτταρα της γλοίας (Sarkis C., αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Οι διαφορές στην ικανότητα εισόδου του συγκεκριμένου ιού στους διάφορους κυτταρικούς τύπους μπορεί να σχετίζεται με τον μηχανισμό εισόδου. Έως σήμερα η ύπαρξη κάποιου ειδικού υποδοχέα δεν έχει διαπιστωθεί. Αντιθέτως υπάρχουν αποτελέσματα που οδηγούν στην θεωρία της εισόδου του ιού μέσω της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης gp64 του ιού με φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης και κυρίως με

φωσφατίδιο-ινοσιτόλη και φωσφατιδικό οξύ (Tani *et al.*, 2001). Επειδή τα παραπάνω φωσφολιπίδια είναι όξινα λιπίδια, είναι πιθανή η ύπαρξη ιοντικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ιού και των λιπιδίων. Πειράματα σε κύτταρα θηλαστικών έδειξαν ότι η ικανότητα του ιού AcNPV να εισέρχεται σε αυτά δεν μειώθηκε μετά από επώασή του με όξινες γλυκοζαμινογλυκάνες πριν από τη μόλυνση, αποκλείοντας έτσι την συνεισφορά ιοντικής αλληλεπίδρασης στην είσοδο του ιού (Tani *et al.*, 2001). Αντιθέτως μία άλλη ομάδα ερευνητών (Duisit *et al.*, 1999), έχει πραγματοποιήσει πειράματα που ενισχύουν το μοντέλο εισόδου μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων.

Μια άλλη πιθανή εξήγηση για τη διαφορά στο ποσοστό φθοριζόντων κυττάρων μετά από επώασή τους με τον ιό AcNPV είναι η διαφορετική ενεργότητα του υποκινητή της GFP. Ίσως ο υποκινητής του ιού CytoMegalovirus να είναι λιγότερο ενεργός στα κύτταρα MCF7, T47D, ES οπότε η παρουσία του ιού μέσα στα κύτταρα δεν ανιχνεύεται.

Για την ενίσχυση της εισόδου του ιού σε κύτταρα στα οποία δεν ανιχνεύεται ιός AcNPV σε υψηλές συχνότητες, έχει φτιαχτεί τροποποιημένος ιός ο οποίος φέρει στο φάκελό του τη γλυκοπρωτεΐνη G του ιού vesicular stomatitis (VSV G, Barsoum *et al.*, 1997). Η πρωτεΐνη παράγεται από υποκινητή του AcNPV, ο οποίος δεν είναι ενεργός στα θηλαστικά (υποκινητής της πολυεδρίνης). Η παρουσία της γλυκοπρωτεΐνης αυτής καθιστά τον ιό ικανό να εισέρχεται σε κύτταρα στα οποία ο ιός AcNPV δεν ανιχνευόταν ή ανιχνευόταν σε χαμηλή συχνότητα απουσία της και αυξάνει τον αριθμό των κυττάρων που φέρουν ιό σε κυτταρικές σειρές στις οποίες εισέρχεται και ο μη τροποποιημένος ιός.

## **2.2 Ικανότητα εισόδου του ιού AcNPV σε κύτταρα *in vivo***

Εκτός από τις μελέτες εισόδου του ιού AcNPV σε πρωτογενή κύτταρα ή κυτταρικές σειρές έχουν πραγματοποιηθεί και προσπάθειες εισόδου του ιού σε κύτταρα *in vivo*. Συγκεκριμένα ο ιός μπορεί να εισέλθει σε νευρικά κύτταρα μετά από ένεση στον εγκέφαλο τρωκτικών (Sarkis *et al.*, 2000) και σε μυϊκά κύτταρα ποντικού μετά από ένεση στον τετρακέφαλο (Pieroni *et al.*, 2001). *Ex vivo* ο ιός μπορεί να εισέλθει σε ανθρώπινα κύτταρα του ήπατος (Sandig *et al.*, 1996). *In vivo* η παρουσία του ιού στον οργανισμό ενεργοποιεί το κλασσικό μονοπάτι του συστήματος του συμπληρώματος και ο ιός απενεργοποιείται από τα συστατικά του ορού. Ο ιός προστατεύεται μόνο με ουσίες που εμποδίζουν τη δράση του συμπληρώματος (Hofmann and Strauss, 1998). Πρόσφατα, με την ενσωμάτωση της ρυθμιστικής πρωτεΐνης του συμπληρώματος human decay-accelerating factor (DAF) στο φάκελο του ιού, επιτεύχθηκε είσοδος του ιού σε κύτταρα

ήπατος νεογέννητων αρουραίων (Huser *et al.*, 2001). Η δράση του συμπληρώματος είναι από τις κύριες αιτίες που εμποδίζουν τη χρήση του ιού AcNPV στη γονιδιακή θεραπεία.

### **2.3 Δημιουργία χιμαιρικών φορέων *Minos-AcNPV* για την αποτελεσματικότερη μεταφορά και ενσωμάτωση τρανσποζονίων στο γονιδίωμα κυτταρικών σειρών**

Στην παρούσα διατριβή αναλύθηκε η αύξηση της παραγωγής κλώνων σταθερά μετασηματισμένων από τη δράση της τρανσποζάσης με τη χρήση χιμαιρικών φορέων *Minos-AcNPV*. Τα κύτταρα που επιλέχθηκαν για τα πειράματα αυτά (HepG2) δεν διαμολύνονται σε υψηλά επίπεδα με συμβατικές μεθόδους. Ο ιός AcNPV έχει την ικανότητα να εισέρχεται σε αυτά με μεγάλη αποτελεσματικότητα (van Loo *et al.*, 2001). Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε ως φορέας του *Minos* για την αποτελεσματικότερη είσοδό του στα κύτταρα. Με τον κατάλληλο τίτλο ιών που φέρουν τρανσποζόνιο και τρανσποζάση (BacMiLRneo, και BacCMV/ILMi) επιτεύχθηκε η παραγωγή μεγάλου αριθμού σταθερά μετασηματισμένων κλώνων (16000-22000 κλώνοι από τη συνμόλυνση  $7 \times 10^5$ - $10^6$  κυττάρων). Ο αριθμός αυτός είναι δύο φορές μεγαλύτερος από τον αριθμό των κλώνων που προκύπτουν όταν κύτταρα HeLa, τα οποία διαμολύνονται αποτελεσματικά με συμβατικές μεθόδους, διαμολύνονται με τρανσποζόνια και τρανσποζάση του μεταθετού στοιχείου *SB* (Izsvak *et al.*, 2000). Ο αριθμός αυτός παρόλα αυτά είναι μικρότερος από τον αριθμό των κλώνων που προκύπτουν όταν τα κύτταρα HeLa διαμολύνονται με τρανσποζόνια και τρανσποζάση του *Minos* (33000-103000, Klinakis *et al.*, 2000b). Όσον αφορά στη σύγκριση μεταξύ του αριθμού των κλώνων που προέκυψαν με την πιο αποτελεσματική μέθοδο διαμόλυνσης και τη συνμόλυνση με τους χιμαιρικούς φορείς *Minos AcNPV* σε κύτταρα HepG2, η συνμόλυνση οδήγησε σε πολύ μεγαλύτερο αριθμό μετασηματισμένων κλώνων. Επίσης οι κλώνοι μετά από συνμόλυνση (1000 και 250 MOI) έφεραν κατά μέσο όρο 2 ενθέσεις ενώ μετά τη διαμόλυνση έφεραν 6-7. Ο μικρός αριθμός ενθέσεων ανά κλώνο βοηθά στην αναγνώριση της ένθεσης που προκαλεί το φαινόμενο. Η έλλειψη κλώνων με μεγάλο αριθμό ενθέσεων (άνω των 8) μετά από συνμόλυνση με τίτλους 1000 και 250 MOI μπορεί να εξηγηθεί με την παρατήρηση ότι στον πυρήνα κυττάρων (Pk1) στα οποία εισέρχεται ο ιός AcNPV ανιχνεύονται 5-10 γενώματά του (van Loo *et al.*, 2001). Μπορεί επίσης να αποδοθεί σε διαφορετική ενεργότητα των υποκινητών CMV και EF1 στα κύτταρα HepG2 (μόνο ο CMV χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα με ιούς)

Η πραγματοποίηση με επιτυχία του πειράματος συν-μόλυνσης με χιμαιρικούς φορείς σε δύο ακόμα κυτταρικές σειρές (REF-1, NIH3T3) αποδεικνύει τη δυνατότητα χρήσης του συστήματος της συν-μόλυνσης σε διαφορετικού τύπου κύτταρα.

Πρόσφατα αναφέρθηκε η δημιουργία χιμαιρικών φορέων *SB*-αδενοϊού (Yant *et al.*, 2002). Το DNA του αδενοϊού είναι γραμμικό και η τρανσποζάση του *SB* δεν μπορεί να δράσει αποτελεσματικά σε μη υπερελικωμένες μορφές DNA. Αν αυτή η ιδιότητα χαρακτηρίζει όλες τις τρανσποζάσες της υπεροικογένειας τότε στην περίπτωση των χιμαιρικών φορέων *Minos*-AcNPV η κατάλυση της μετάθεσης γίνεται αποτελεσματικά γιατί το DNA του ιού AcNPV είναι υπερελικωμένο.

#### **2.4 Δημιουργία σταθερά μετασχηματισμένων κυτταρικών σειρών που παράγουν επαγωγίμη τρανσποζάση και καταλύουν την ενσωμάτωση τρανσποζονίων στο γένωμά τους μετά από επώαση με τον ιό BacMiLRneo**

Η δημιουργία κλώνων κυτάρων HepG2 που εκφράζουν γονίδια μετά από επαγωγή με τη χρήση του συστήματος της τετρακυκλίνης έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Tet-Off Erhardt *et al.*, 2002; Tet-On Lim *et al.*, 2002). Στην παρούσα διατριβή δημιουργήθηκαν και ελέγχθηκαν δύο σταθερά μετασχηματισμένοι κλώνοι κυτάρων HepG2 οι οποίοι παράγουν τρανσποζάση μετά από την απομάκρυνση του αντιβιοτικού doxycycline από το μέσο καλλιέργειας. Η επώαση αυτών σε κατάσταση επαγωγής με τον χιμαιρικό φορέα BacMiLRneo οδήγησε σε υψηλό αριθμό σταθερά μετασχηματισμένων από το τρανσποζόνιο κλώνων. Αρχικά αύξηση της επαγωγής (απουσία doxycycline για περισσότερες μέρες) είχε σαν αποτέλεσμα αύξηση του αριθμού των μετασχηματισμένων από το τρανσποζόνιο κλώνων, στη συνέχεια όμως, ακόμα περισσότερη επαγωγή οδήγησε σε μείωση των κλώνων. Αυτό ενδέχεται να συνέβη επειδή υψηλά επίπεδα τρανσποζάσης καταλύουν την επανεκτομή και την απώλεια των ήδη μετατεθειμένων τρανσποζονίων (Πίνακας 12).

Ο αριθμός των μετασχηματισμένων κλώνων με το σύστημα των σειρών που εκφράζουν επαγομένη τρανσποζάση δεν ξεπέρασε τον αριθμό των κλώνων που προκύπτουν μετά από συν-μόλυνση με τους φορείς BacMiLRneo, και BacCMV/ILMi. Το σύστημα των σειρών που παράγουν τρανσποζάση μετά από επαγωγή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περιπτώσεις που τα πειράματα απαιτούν έναν εύκολο τρόπο για την εκτομή του ενσωματωμένου στο γονιδίωμα τρανσποζονίου.

Σε πειράματα μεταλλαξιγένεσης μέσω ενθέσεων θα ήταν σημαντικό να βρεθεί ένας απλός τρόπος που να οδηγεί σε αναστροφή του φαινοτύπου που δημιουργείται με την ένθεση, δηλαδή στην απομάκρυνση του τρανσποζονίου. Στο πειραματικό σχήμα της συν-διαμόλυνσης που περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο, εκτομή του τρανσποζονίου MiLRneo μπορεί να πραγματοποιηθεί μετά από παλμό τρανσποζάσης, μετά από επώαση με το φορέα BacCMV//ILMi. Στο σύστημα των σειρών που παράγουν επαγωγίμη τρανσποζάση η απομάκρυνση του αντιβιοτικού doxycycline οδηγεί σε παραγωγή τρανσποζάσης και εκτομή των τρανσποζονίων.

## **2.5 Προοπτικές χρήσης των χιμαιρικών φορέων *Minos-AcNPV* στο μετασχηματισμό εντόμων**

Στην παρούσα διατριβή αποδεικνύεται ότι ο ιός AcNPV μπορεί να εισέλθει σε κύτταρα *D. melanogaster* και *C. capitata in vivo*. Οι προσπάθειες μετασχηματισμού των εντόμων αυτών με τη χρήση χιμαιρικών φορέων *Minos-AcNPV* δεν ήταν επιτυχημένες. Αυτό πιθανώς να οφείλεται σε δυσκολία του ιού να εισέλθει σε κύτταρα της γαμετικής σειράς. Στα προκαταρκτικά πειράματα που έγιναν με ένεση του φορέα BacMiBo14GtTA2 σε προνύμφες και έμβρυα των παραπάνω εντόμων δε βρέθηκαν άτομα που να φθορίζουν έντονα στις γονάδες. Αν η είσοδος του ιού σε κύτταρα της γαμετικής σειράς είναι δύσκολη, τότε σε ένεση με δύο ιούς οι πιθανότητες να εισέλθουν και οι δύο στο ίδιο κύτταρο είναι πολύ μικρές. Άρα χαμηλή είναι και η πιθανότητα πραγματοποίησης μετάθεσης. Θεωρητικά μπορεί να γίνει βελτίωση αυτών των φορέων ώστε να αυξηθεί η είσοδός τους στα κύτταρα της γαμετικής σειράς και να αυξηθούν οι πιθανότητες πραγματοποίησης μετασχηματισμού με την προσθήκη στο φάκελο των ιών πρωτεϊνών που παρουσιάζουν τροπισμό στις γονάδες. Επιπλέον, η μεταφορά του τρανσποζονίου και του γονιδίου της τρανσποζάσης από τον ίδιο ιό θα παρακάμψει το εμπόδιο της προϋπόθεσης εισόδου δύο ιών στο ίδιο κύτταρο για την επίτευξη μετασχηματισμού.

Σε άτομα έντονου μωσαϊκισμού του εντόμου *C. Capitata* και 10-15 μέρες μετά την ένεση και των δύο ιών, ανιχνεύτηκε μικρός αριθμός φθοριζόντων σπερματοζωαρίων. Ο φθορισμός των κυττάρων αυτών για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την ένεση πιθανότατα δεν οφείλεται στην παρουσία ακέραιου χιμαιρικού φορέα. Τα κύτταρα αυτά μπορεί να φθορίζουν γιατί έχουν ενσωματώσει το γονίδιο της GFP στο γονιδίωμα τους τυχαία ή μέσω της δράσης της τρανσποζάσης. Και στις δύο περιπτώσεις είναι αναμενόμενο το γονίδιο να κληρονομηθεί στους απογόνους των ατόμων αυτών. Η



απουσία φθοριζόντων (διαγονιδιακών) ατόμων ανάμεσα στους απογόνους τους ίσως εξηγείται από το μικρό ποσοστό φθοριζόντων σπερματοζωαρίων που ανιχνεύτηκε στα άτομα αυτά.

## ***ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ***

## **Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών**

Οι σειρές διαγονιδιακών ποντικών TM φέρουν στο γένωμά τους το cDNA της τρανσποζάσης του *Minos* υπό τον έλεγχο του ανθρώπινου γενετικού τόπου CD2. Δημιουργήθηκαν μετά από μικροένεση γονιμοποιημένων ωοκυττάρων (CBA x C57 Bl/10), με κομμάτι DNA που προκύπτει μετά από πέψη του πλασμιδίου CD2/ILMi με το ένζυμο περιορισμού *SfiI*.

Οι σειρές διαγονιδιακών ποντικών lucTM φέρουν στο γένωμά τους το cDNA της τρανσποζάσης του *Minos* και της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο του χειριστή tetO και του ελάχιστου υποκινητή του ιού Cytomegalovirus (CMV). Δημιουργήθηκαν μετά από μικροένεση ίδιου τύπου γονιμοποιημένων ωοκυττάρων, με κομμάτι DNA που προκύπτει μετά από πέψη του πλασμιδίου BI-L/ILMi με το ένζυμο περιορισμού *BsrBI*.

Τα ενεμένα ωοκύτταρα μεταφέρθηκαν σε ψευδοέγκυες θηλυκές. Οι ποντικοί που γεννήθηκαν από αυτές ελέγχθηκαν για την ενσωμάτωση διαγονιδίων στο γένωμά τους. Ο παραπάνω έλεγχος πραγματοποιήθηκε με ανάλυση κατά Southern με DNA απομονωμένο από βιοψίες ουράς ποντικών. Ως ανιχνευτής για τις συγκεκριμένες σειρές χρησιμοποιήθηκε το cDNA της τρανσποζάσης του *Minos*.

## **Απομόνωση γενωμικού DNA από βιοψίες ουράς ποντικού**

Τμήμα της ουράς των προς μελέτη ποντικών (περίπου 0.5 εκατοστό) αφαιρείται και επωάζεται σε 0.75 ml διαλύματος που περιέχει 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl, 1% SDS και 330 µg/ml Proteinase K, για 16 ώρες σε θερμοκρασία 55° C. Ακολουθεί κατεργασία με RNase A σε τελική συγκέντρωση 130 µg/ml για μία ώρα στους 37° C και δύο εκχυλίσεις με ίσο όγκο μίγματος φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης, σε αναλογία 25/24/1. Στη συνέχεια το DNA κατακρημνίζεται με 0.6-0.8 όγκους ισοπροπανόλης, ξεπλένεται με 0.5 ml 70% αιθανόλης και επαναδιαλύεται σε διπλά απιονισμένο νερό.

## **Ανάλυση κατά Southern**

Ποσότητα DNA 10-15 µg, που απομονώνεται από βιοψίες ουράς ποντικών, υφίσταται πέψη 3 ωρών με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού και ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 0.8-1% για 16 περίπου ώρες. Στη συνέχεια το

πήκτωμα επωάζεται για 15 λεπτά σε διάλυμα 0.125 M HCl , για 45 λεπτά σε αλκαλικό διάλυμα αποδιάταξης (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) και τέλος για 45 λεπτά σε ουδέτερο διάλυμα (0.5 M Tris-HCl pH 7.4, 1.5 M NaCl). Το πήκτωμα τοποθετείται σε γέφυρα από διηθητικό χαρτί Whatman 3MM του οποίου τα άκρα βυθίζονται σε διάλυμα 20X SSC (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate). Πάνω από το πήκτωμα τοποθετείται μεμβράνη νιτροκυταρίνης (Schleicher & Schuell), 3 φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM εμβαπτισμένα σε 2X SSC, πολλά φύλλα απορροφητικού χαρτιού και ένα αντικείμενο βάρους περίπου μισού κιλού. Μετά 10-16 ώρες η μεμβράνη ξεπλένεται σε 6X SSC για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα αγαρόζης και επωάζεται για 2 ώρες στους 80°C για την ακινητοποίηση του DNA στην μεμβράνη. Στη συνέχεια, ενυδατώνεται σε διάλυμα 2X SSC και προϋβριδοποιείται στους 65 °C σε διάλυμα υβριδοποίησης (3X SSC, 0.1% SDS, 10% Dextran Sulfate, 0.2% BSA, 0.2% PVP, 0.2% Ficoll) και 50 µg/ml αποδιαταγμένου DNA από σπέρμα σολομού. Μετά από 2 ώρες προϋβριδοποίησης γίνεται η προσθήκη του ραδιοσημασμένου ανιχνευτή. Η υβριδοποίηση έχει διάρκεια 10-20 ώρες και μετά το πέρας αυτής η μεμβράνη ξεπλένεται δύο φορές με διάλυμα 3X SSC και 0.1% SDS για 15 λεπτά την κάθε φορά και ακόμα δύο φορές με διάλυμα 0.3X SSC και 0.1% SDS για 15 λεπτά την κάθε φορά. Τα τέσσερα ξεπλύματα γίνονται σε θερμοκρασία 65°C. Ακολουθεί έκθεση της μεμβράνης στους -80 °C με φιλμ αυτοραδιογραφίας.

Ο ανιχνευτής ραδιοσημαίνεται με τη μέθοδο της μετάφρασης εγκοπής (nick translation). Η αντίδραση γίνεται σε τελικό όγκο 20 µl με 25-100 ng DNA στα οποία προστίθενται 2 µl α-[P<sup>32</sup>] dATP, 2 µl α-[P<sup>32</sup>] dCTP, 2 µl dGTP και 2 µl dTTP συγκέντρωσης 1mM, 2 µl διαλύματος DNA πολυμεράσης (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 7.5 mM DTT), 30 units DNA πολυμεράσης (*E.coli* pol I) και 1 µl DNase I (0.5 µg/ml). Η αντίδραση επωάζεται για 45 λεπτά στους 16 °C και στη συνέχεια προστίθενται σε αυτή 80 µl διαλύματος TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0). Τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια απομακρύνονται με τη μέθοδο της μοριακής διήθησης σε κλώνα χρωματογραφίας Sephadex G-50.

### **Απομόνωση ολικού RNA από ιστούς ποντικού**

Μετά από την θυσία του ποντικού οι προς μελέτη ιστοί τοποθετούνται μέσα σε πλαστικούς σωλήνες (Falcon) σε 4 ml διαλύματος D (4,23 M guanidine thiocyanate, 0.53% sarcosyl, 26 mM sodium citrate, 0.1 M mercaptoethanol), στον πάγο. Οι ιστοί

ομογενοποιούνται στον πάγο και σε κάθε δείγμα προστίθενται 400 μl 2 M CH<sub>3</sub>COONa pH 4.0 και ακολουθεί στιγμιαία ισχυρή ανακίνηση. Στη συνέχεια σε κάθε δείγμα προστίθεται ίσος όγκος όξινης φαινόλης και ακολουθεί στιγμιαία ισχυρή ανακίνηση, προστίθεται 1/5 του όγκου του δείγματος μείγματος χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης και τα δείγματα ανακινούνται σε συσκευή Vortex για 2 λεπτά. Τα δείγματα επωάζονται στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρώνονται σε επιτραπέζια φυγόκεντρο σε 2000g για 20 λεπτά, σε θερμοκρασία 4 °C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης η υδατική φάση μεταφέρεται σε καθαρό πλαστικό σωλήνα και προστίθεται ίσος όγκος μείγματος φαινόλης/χλωροφορμίου σε αναλογία 1/1. Τα δείγματα ανακινούνται σε συσκευή Vortex για 2 λεπτά και φυγοκεντρώνονται σε 2000g για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία 4 °C. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα και το RNA κατακρημνίζεται με ίσο όγκο ισοπροπανόλης, ξεπλένεται με 1 ml 70% αιθανόλης και επαναδιαλύεται σε διπλά αποιονισμένο νερό. Τα δείγματα επωάζονται για 10 λεπτά στους 65 °C για την καλύτερη επαναδιάλυσή τους.

### **Ανάλυση κατά Northern**

Σε όγκο 10 μl RNA, συνολικής ποσότητας 10-15 μg προστίθενται 2 μl διαλύματος 20X MOPS (400 mM MOPS, 100 mM sodium acetate, 10 mM EDTA), 20 μl φορμαμίδιου, 7 μl φορμαλδεΐδης και 4 μl χρωστικής (Blue Juice). Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1.2% το οποίο περιέχει και 16% φορμαλδεΐδη. Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1X MOPS) περιέχει 20 mM MOPS, 5 mM sodium acetate και 0.5 mM EDTA. Στη συνέχεια το πήκτωμα επωάζεται για 20 λεπτά σε διάλυμα αποδιάταξης (50 mM NaOH, 100 mM NaCl), για 20 λεπτά σε ουδέτερο διάλυμα (100 mM Tris-HCl pH 7.6) και για 20 ακόμα λεπτά σε διάλυμα 2X SSC. Το πήκτωμα τοποθετείται σε γέφυρα από διηθητικό χαρτί Whatman 3MM του οποίου τα άκρα βυθίζονται σε διάλυμα 20X SSC (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate). Πάνω από το πήκτωμα τοποθετείτε νάιλον μεμβράνη (GeneScreen Plus, NEN Life Science Products), 3 φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM εμβαπτισμένα σε 2X SSC, πολλά φύλλα απορροφητικού χαρτιού και ένα αντικείμενο βάρους περίπου μισού κιλού. Μετά 10-16 ώρες η μεμβράνη ξεπλένεται σε 6X SSC για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα αγαρόζης και επωάζεται για 2 ώρες στους 80°C για την ακινητοποίηση του RNA στην μεμβράνη. Στη συνέχεια, ενυδατώνεται σε διάλυμα 2X SSC και προϋβριδοποιείται στους 42 °C σε διάλυμα υβριδοποίησης (50% φορμαμίδιο, 20 mM sodium phosphate buffer pH

6.8, 5X SSC, 0.4% SDS, 10% dextran sulfate, 0.02% BSA, 0.02%PVP, 0.02% Ficoll, 250 µg/ml αποδιαταγμένου DNA από σπέρμα σολομού και 100 µg/ml tRNA). Μετά από 2 ώρες προϋβριδοποίησης γίνεται η προσθήκη του ραδιοσημασμένου ανιχνευτή. Η υβριδοποίηση έχει διάρκεια 10-20 ώρες και μετά το πέρας αυτής η μεμβράνη ξεπλένεται δύο φορές με διάλυμα 3X SSC και 0.1% SDS για 15 λεπτά την κάθε φορά και ακόμα δύο φορές με διάλυμα 0.3X SSC και 0.1% SDS για 15 λεπτά την κάθε φορά. Τα τέσσερα ξεπλύματα γίνονται σε θερμοκρασία 42-52°C. Ακολουθεί έκθεση της μεμβράνης στους -80 °C με φιλμ αυτοραδιογραφίας. Ο ανιχνευτής ραδιοσημαίνεται με τη μέθοδο της μετάφρασης εγκοπής (nick translation), η οποία περιγράφεται στο κεφάλαιο: Ανάλυση κατά Southern.

### **Ανίχνευση γεγονότων εκτομής και χαρακτηρισμός των αποτυπωμάτων**

Ο έλεγχος της εκτομής των τρανσποζονίων του *Minos* από το γονιδίωμα του ποντικού στηρίζεται στην Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR), με τη χρήση εκκινητών που υβριδοποιούν στις μη μεταθέσιμες αλληλουχίες που περιβάλλουν τα άκρα του *Minos* στο διαγονίδιο MiCMVGFP.

Γενωμικό DNA απομονώνεται από θύμο, σπλήνα, συκώτι, νεφρό, εγκέφαλο, σκελετικό μυ και πνεύμονα με τη χρήση του συστήματος DNeasy Tissue Kit (Qiagen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι συνθήκες της Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης είναι οι εξής: 10 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% gelatin, 0.2 mM dNTPs, 1.2 units πολυμεράσης Taq 2000™ (Stratagene), 200 ng γενωμικού DNA και 10 ρmol από τον κάθε εκκινητή σε τελικό όγκο αντίδρασης 25 µl. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται σε δοκιμασίες εκτομής του *Minos* είναι ο 11DML (5' - **AAGTGTAAAGTGCTTGAAATGC** - 3'), ο οποίος υβριδοποιεί σε αλληλουχία που γειτνιάζει με το αριστερό άκρο του *Minos* στο διαγονίδιο MiCMVGFP και ο GOUM67 (5' - **GCATCAAATTGAGTTTTGCTC** - 3'), ο οποίος υβριδοποιεί σε αλληλουχία που γειτνιάζει με το δεξί άκρο. Το θερμοκυκλικό πρόγραμμα που ακολουθείται, μετά την αρχική αποδιάταξη του DNA στους 94 °C για 3 λεπτά, είναι το εξής: 30 δευτερόλεπτα στους 94 °C, 30 δευτερόλεπτα στους 59 °C, 30 δευτερόλεπτα στους 72°C για 43 ή 60 επαναλήψεις.

Τα προϊόντα της Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2.5%, κλωνοποιούνται σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς (PCR II TA

cloning vector, Invitrogen και pGEM T-easy, Promega) και ακολουθεί προσδιορισμός της αλληλουχίας τους.

### **Πειράματα υβριδοποίησης με φθορίζουσες χρωστικές *in situ* (FISH) σε μεταφασικούς πυρήνες ποντικού**

Προετοιμασία μεταφασικών πυρήνων από θύμο και σπλήνα ποντικού

Θύμος και σπλήνα των προς μελέτη ποντικών βυθίζονται σε 4 ml μέσου καλλιέργειας RPMI 1640 (GIBCO/BRL) εμπλουτισμένο με 9% FCS (GIBCO/BRL), 13.5% Hybridoma medium (GIBCO/BRL), 3.4 µg/ml Lithium Chloride (Merck), 7.2 µg/ml Con A (Sigma), 22.7 units/ml Heparin (Leo, Helsingborg, Sweden), 50 µM 2-mercaptoethanol, 25.4 µg/ml lipopolysaccharide (Sigma), 10ng/ml IL-6 (PEPROTECH EC LTD) και Gentamycin-Sulfate 100 µg/ml (Sigma). Με σύριγγα ινσουλίνης (1 ml), οι ιστοί ενίονται 4-5 φορές με μέσο καλλιέργειας. Με αυτόν τον τρόπο κύτταρα από τους ιστούς εισέρχονται στο μέσο καλλιέργειας. Τα κομμάτια του ιστού αφαιρούνται και στη συνέχεια τα μοναδιαία πλέον κύτταρα καλλιεργούνται για 48 ώρες στους 37 °C σε περιβάλλον που περιέχει CO<sub>2</sub> σε περιεκτικότητα 5%. Μία ώρα πριν από το τέλος της επώασης προστίθεται 1µl Caryomax Colcemid Solution ανά ml καλλιέργειας (GIBCO/BRL) και 45 λεπτά αργότερα προστίθενται 16 µl Caryomax Colcemid Solution ανά ml καλλιέργειας. Οι καλλιέργειες φυγοκεντρώνονται για 10 λεπτά σε 228g. Το υπερκείμενο αφαιρείται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 5 ml διαλύματος 0.075M KCl, σε θερμοκρασία δωματίου, και προστίθεται 1 ml διαλύματος μονιμοποίησης (μεθανόλη/οξικό οξύ σε αναλογία 3/1). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις παραπάνω συνθήκες, το υπερκείμενο αφαιρείται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 5 ml διαλύματος μονιμοποίησης. Το τελευταίο βήμα επαναλαμβάνεται για 2 ακόμη φορές και στο τέλος της διαδικασίας τα κύτταρα, τα οποία βρίσκονται στο υγρό μονιμοποίησης, απλώνονται σε αντικειμενοφόρους (στην περίπτωση που τα κύτταρα μετά το τέλος της διαδικασίας είναι λίγα η τελευταία επαναδιάλυση γίνεται σε μικρότερο όγκο υγρού μονιμοποίησης).

Σήμανση του ανιχνευτή με χρωμοφόρα

Ο ανιχνευτής σημαίνεται με βιοτίνη ή digoxigenin (Boehringer Mannheim) με τη μέθοδο της μετάφρασης εγκοπής (nick translation). Η αντίδραση γίνεται σε τελικό όγκο 50 µl, σε 1µg DNA στο οποίο προστίθενται 5 µl από 0.2 - 0.5 mM dATP, dGTP, dCTP και 0.04 - 0.1 mM dTTP, διαλυμένα σε Nick Translation Buffer 10X (Boehringer

Mannheim), 1 μl χρωμοφόρου σήμανσης (βιοτίνη ή digoxigenin, 1mM), 5 μl μίγματος ενζύμων DNA πολυμεράσης I (0.4U/μl)/DNase I (40 pg/ μl) (GIBCO/BRL) και 1 μl ενζύμου DNase I συγκέντρωσης 2μg/ml. Η αντίδραση επωάζεται για 2 ώρες στους 16 °C και μετά το πέρας αυτών στην αντίδραση προστίθενται 50 μg DNA από σπέρμα σολομού, 50 μg tRNA απομονωμένου από E. coli ή S. cerevisiae , 0.1 του όγκου της αντίδρασης διάλυμα sodium acetate 2M pH 5.6 και 5 όγκοι αιθανόλης. Τα δείγματα τοποθετούνται στους -70 °C για 2 ώρες και ακολουθεί φυγοκέντρηση για την κατακρήμνιση του DNA, ξέπλυμα με 70% αιθανόλη και επαναδιάλυση του σημασμένου πλέον DNA σε διάλυμα υβριδοποίησης. Το διάλυμα υβριδοποίησης αποτελείται από 50% φορμαμίδιο (Fluka) και 10% dextran sulfate (PHARMACIA) σε 2X SSCP (20X SSCP: 0.3 M sodium citrate, 3 M sodium chloride, 0.4 M disodium-hydrogen-phosphate)

Ως ανιχνευτής για την παρουσία του τρανσποζονίου χρησιμοποιείται κομμάτι DNA, μεγέθους 737 βάσεων, το οποίο φέρει το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP). Το κομμάτι προέρχεται από *SacI/NotI* πέψη του πλασμιδίου pMiCMVGFP, σημαίνεται με βιοτίνη και ο ανοσοεντοπισμός του γίνεται με FITC. Ως ανιχνευτής για την τελομερική αλληλουχία του χρωμοσώματος 14 χρησιμοποιείται ειδικός τελομερικός μάρτυρας (Shi *et al.*, 1997), ο οποίος σημαίνεται με Digoxigenin και ο ανοσοεντοπισμός του γίνεται με Texas Red.

#### Υβριδοποίηση με φθορίζουσες χρωστικές *in situ* (FISH)

Στην πάνω επιφάνεια των αντικειμενοφόρων που φέρουν τους μεταφασικούς πυρήνες, προστίθενται 200μl RNase A συγκέντρωσης 100-200μg /ml , διαλυμένη σε 2X SSC. Πάνω από τη "σταγόνα" της RNase A τοποθετείται καλυπτρίδα και οι αντικειμενοφόροι επωάζονται σε θάλαμο, υψηλής υγρασίας, θερμοκρασίας 37°C για μία ώρα. Στη συνέχεια οι καλυπτρίδες αφαιρούνται και οι αντικειμενοφόροι ξεπλένονται 2 φορές με διάλυμα 2X SSC και μία φορά σε διάλυμα 0.01N HCl. Οι αντικειμενοφόροι τοποθετούνται για μία ώρα σε ειδικό δοχείο (coplin jar) στους 37°C, στο οποίο επωάζονται με διάλυμα, προζεσταμένο στους 37°C, το οποίο περιέχει 10-20mg pepsine/100 ml 0.01 N HCl. Ακολουθούν 3 ξεπλύματα με PBS και στη συνέχεια οι αντικειμενοφόροι τοποθετούνται για δέκα λεπτά σε ειδικό δοχείο που περιέχει διάλυμα 1% φορμαλδεΐδης σε PBS εμπλουτισμένου με 50 mM MgCl<sub>2</sub>. Ακολουθούν 3 ξεπλύματα με PBS και στη συνέχεια οι αντικειμενοφόροι αφυδατώνονται με διαδοχικές εμβάπτισεις σε διαλύματα αιθανόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης. Η κάθε εμβάπτιση διαρκεί 3 λεπτά



και τα διαλύματα αιθανόλης που χρησιμοποιούνται είναι συγκέντρωσης: 50%, 75%, 95%, απόλυτη αιθανόλη.

Ο σημασμένος ανιχνευτής διαλύεται σε διάλυμα υβριδοποίησης έως τελικής συγκέντρωσης 2.5-20 ng/μl. Σε αυτόν προστίθεται 0.5-1 μg/μl γενωμικού DNA ποντικού, ακολουθεί αποδιάταξη του στους 70°C για 4 λεπτά και επώαση του στον πάγο για 4 τουλάχιστον λεπτά πριν την χρήση του.

Το DNA των πυρήνων στις αντικειμενοφόρους αποδιατάσσεται στους 70 °C για 2 λεπτά σε διάλυμα 70% φορμαμιδίου σε 2X SSC, που προέρχεται από 20X SSC pH 6.5. Στη συνέχεια οι αντικειμενοφόροι επωάζονται για 3 λεπτά σε παγωμένη αιθανόλη 70%, για 3 λεπτά σε αιθανόλη 95% και για 3 ακόμη λεπτά σε απόλυτη αιθανόλη για να αφυδατωθούν, αφήνονται να στεγνώσουν, προστίθεται σε αυτές ο ανιχνευτής (20-40μl/καλυπτρίδα) και καλύπτονται με καλυπτρίδες. Η υβριδοποίηση γίνεται ολονυχτίς σε δοχείο που εσωτερικά φέρει εγκοπές οι οποίες περιέχουν 50% φορμαμίδιο και σε θάλαμο υψηλής υγρασίας, στους 37 °C.

Την επόμενη μέρα οι αντικειμενοφόροι ξεπλένονται τρεις φορές με διάλυμα 55% φορμαμιδίου σε 2X SSC και σε θερμοκρασία 39 °C για 5 λεπτά την κάθε φορά (σε shaker). Στη συνέχεια ξεπλένονται τρεις φορές με διάλυμα 2X SSC και σε θερμοκρασία 39 °C για 5 λεπτά την κάθε φορά (σε shaker), μία φορά με διάλυμα 2X SSC σε θερμοκρασία δωματίου και μία φορά με διάλυμα 4X SSC/0.05% tween σε θερμοκρασία δωματίου (5 λεπτά). Σε κάθε αντικειμενοφόρο προστίθενται 120μl διαλύματος 5% αφυδατωμένου άπαχου γάλακτος σε 4X SSC και σκεπάζονται με καλυπτρίδα. Οι αντικειμενοφόροι επωάζονται σε θάλαμο, υψηλής υγρασίας, θερμοκρασίας 37°C για μισή ώρα.

Για ανιχνευτές οι οποίοι έχουν σημειωθεί με βιοτίνη η διαδικασία συνεχίζεται ως εξής: Στις αντικειμενοφόρους προστίθενται 100 μl αντισώματος Avidine FITC 1:1000 διαλυμένου σε 5% αφυδατωμένου άπαχου γάλακτος σε 4X SSC και επωάζονται στους 37°C για μισή ώρα. Ακολουθούν 3 ξεπλύματα με διάλυμα 4X SSC/0.05% tween για 5 λεπτά την κάθε φορά και στις αντικειμενοφόρους προστίθενται 100 μl αντισώματος Goat-anti-Avidine 1:100 διαλυμένου σε 5% αφυδατωμένου άπαχου γάλακτος σε 4X SSC. Ακολουθεί επώαση μισής ώρας στους 37°C, 3 ξεπλύματα όπως τα παραπάνω, προσθήκη 100 μl αντισώματος Avidine FITC 1:1000 διαλυμένου σε 5% αφυδατωμένου άπαχου γάλακτος σε 4X SSC, επώαση μισής ώρας στους 37°C, δύο ξεπλύματα όπως τα παραπάνω, 2 ξεπλύματα των 5 λεπτών σε PBS, αφυδάτωση με διαδοχικές εμβαπτίσεις σε διαλύματα αιθανόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης και τέλος στις αντικειμενοφόρους

προστίθεται υγρό μονιμοποίησης με ελάχιστη DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Για ανιχνευτές οι οποίοι έχουν σημειωθεί με digoxigenin η διαδικασία συνεχίζεται ως εξής: στις αντικειμενοφόρους προστίθενται 100 μl αντισώματος Sheep anti-digoxigenin-Rhodamine 1:100 διαλυμένου σε Boehringer Block Milk σε 0.1 M Tris-HCl/0.15 M NaCl. Ακολουθεί επώαση μισής ώρας στους 37°C, 3 ξεπλύματα με διάλυμα 0.1 M Tris-HCl/0.15 M NaCl/0.05% tween pH 7.5, προσθήκη 100 μl αντισώματος Donkey-anti-sheep-Texas Red 1:100 διαλυμένου σε Boehringer Block Milk σε 0.1 M Tris-HCl/0.15 M NaCl επώαση μισής ώρας στους 37°C, δύο ξεπλύματα όπως τα παραπάνω, 2 ξεπλύματα των 5 λεπτών σε PBS, αφυδάτωση με διαδοχικές εμβάπτισεις σε διαλύματα αιθανόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης και τέλος στις αντικειμενοφόρους προστίθεται υγρό μονιμοποίησης με ελάχιστη DAPI.

### Προσδιορισμός της θέσης ένθεσης τρανσποζονίων στον ποντικών

Γενωμικό DNA απομονώνεται από βιοψία ουράς ποντικού και υφίσταται πέψη με το ένζυμο περιορισμού *Bgl*II, η αλληλουχία αναγνώρισης του οποίου δεν υπάρχει στο τρανσποζόνιο MiCMVGFPP. Ηλεκτροφορεύεται σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8%, μεταφέρεται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και υβριδοποιείται με ανιχνευτή το γονίδιο της GFP. Δεκαπλάσια ποσότητα του ίδιου DNA υφίσταται πέψη με το ίδιο ένζυμο, ηλεκτροφορεύεται και η περιοχή του πηκτώματος, στην οποία από την υβριδοποίηση γνωρίζουμε ότι βρίσκεται το τρανσποζόνιο, αφαιρείται. Το DNA εκλούεται από το κομμάτι αγαρόζης και 100ng αυτού χρησιμοποιούνται σε αντίδραση συγκόλλησης DNA (ligation) σε τέτοιες συνθήκες (2-4 μg DNA/ml) ώστε να ευνοείται η κυκλοποίηση (self ligation) του κάθε κομματιού και όχι ο πολυμερισμός. Η αντίδραση επωάζεται 10-20 ώρες στους 16°C. Στη συνέχεια 2 μl από την αντίδραση χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα σε Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης. Οι συνθήκες που ακολουθούνται είναι οι εξής: 10 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% gelatin, 0.2 mM dNTPs, 1.2 units πολυμεράσης Taq 2000™ (Stratagene), και 10 pmol εκκινητή σε τελικό όγκο αντίδρασης 25 μl. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται είναι ο IMio1 (5' - **AAGAGAATAAAATTCTCTTTGAGACG**- 3'), ο οποίος υβριδοποιεί στα άκρα του *Minos*, για την πρώτη αντίδραση και ο IMio2 (5' - **GATAATATAGTGTGTTAAACATTGCGC**- 3'), ο οποίος επίσης υβριδοποιεί στα άκρα του *Minos*, για την εσωτερική (nested) Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης. Σε αυτή, ως υπόστρωμα χρησιμοποιείται 1 μl από την πρώτη αντίδραση. Το θερμοκυκλικό πρόγραμμα που ακολουθείται, μετά την αρχική

αποδιάταξη του DNA στους 94 °C για 3 λεπτά, είναι το εξής: 30 δευτερόλεπτα στους 94 °C, 30 δευτερόλεπτα στους 62 °C, 3 λεπτά στους 72°C για 35 επαναλήψεις. Τα προϊόντα κλωνοποιούνται σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα (PCRII TA cloning vector, Invitrogen) και ακολουθεί προσδιορισμός της αλληλουχίας τους.

Τα γεγονότα μετάθεσης που έφεραν τα ποντίκια 6.18 και 5.5 κλωνοποιήθηκαν κατ' αυτόν τον τρόπο. Για το δεύτερο χρειάστηκε ένας τρίτος γύρος Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης στις ίδιες συνθήκες και με τον ίδιο εκκινητή με την εσωτερική (nested).

Για το ποντίκι 27.5 ακολουθήθηκε διαφορετική διαδικασία διότι το κομμάτι DNA με άκρα BglII ήταν αρκετά μεγάλο (>6.2Kb) οπότε το προϊόν το οποίο θα παραγόταν, στην περίπτωση που έχει γίνει κινητοποίηση ενός και όχι δύο τρανσποζονίων, θα ήταν μεγαλύτερο από 4Kb και άρα δύσκολο να πολλαπλασιαστεί στις δεδομένες συνθήκες. Η εναλλακτική διαδικασία είναι η εξής: Γενωμικό DNA απομονώνεται από βιοψία ουράς ποντικού και υφίσταται πέψη με το ένζυμο περιορισμού AluI. Το ένζυμο αυτό αναγνωρίζει και πέπτει αλληλουχία εσωτερικά των άκρων του *Minos*. Στη συνέχεια 100ng αυτού χρησιμοποιούνται σε αντίδραση συγκόλλησης DNA (ligation) σε τέτοιες συνθήκες (2-4μg DNA/ml) ώστε να ευνοείται η κυκλοποίηση (self ligation) του κάθε κομματιού. Η αντίδραση επωάζεται 10-20 ώρες στους 16°C και 2 μl από την αντίδραση χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα σε Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης. Οι συνθήκες που ακολουθούνται είναι οι ίδιες με τις παραπάνω αλλά οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται είναι ο IMio1 (5' - **AAGAGAATAAAATTCTCTTTGAGACG**- 3') και ο IMii1 (5' - **CAAAAATATGAGTAATTTATTCAAACGG**- 3') για την πρώτη αντίδραση και οι IMio2 (5' - **GATAATATAGTGTGTTAAACATTGCGC**- 3') και ο IMii2 (5' - **GCTTAAGAGATAAGAAAAAAGTGACC**- 3') για την εσωτερική (nested) αντίδραση πολυμεράσης. Οι εκκινητές είναι ειδικοί για τα άκρα του *Minos*. Σε αυτή την περίπτωση το κομμάτι που περιλαμβάνει την αλληλουχία η οποία γειτνιάζει με το αριστερό άκρο του *Minos* και το κομμάτι περιλαμβάνει την αλληλουχία η οποία γειτνιάζει με το δεξί άκρο θα πολλαπλασιαστούν ανεξάρτητα.

### **Επαγωγή έκφρασης των γονιδίων στον ποντικό τα οποία είναι υπό τον έλεγχο του χειριστή tetO**

Οι προς μελέτη ποντικοί ταΐζονται για μία εβδομάδα με νερό το οποίο περιέχει 5% σουκρόζη και 2 mg/ml doxycycline (Sigma). Το νερό αλλάζεται μία φορά κατά τη

διάρκεια της εβδομάδας. Την έκτη μέρα ενίονται ενδοπεριτοναϊκά με 0.5 ml διαλύματος 0.9% NaCl το οποίο περιέχει 4 mg/ml doxycycline. Μετά από 12 ώρες γίνεται μία δεύτερη ένεση ίδιας συγκέντρωσης και μετά από 8 ώρες οι ποντικοί θυσιάζονται για να αναλυθεί η έκφραση τρανσποζάσης και λουσιφεράσης στους ιστούς τους.

### **Σύνθεση cDNA/Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (RT-PCR)**

Το RNA απομονώνεται με τη μέθοδο της όξινης φαινόλης, όπως περιγράφεται παραπάνω. Μικρή ποσότητα DNA που πιθανά υπάρχει στα δείγματα αφαιρείται με DNase I . Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε 15-20 µg ολικού RNA, στα οποία προστίθενται 2.5 µl ρυθμιστικού διαλύματος DNase I (Ambion), 1 µl DNase I (Ambion) και ο τελικός όγκος της κάθε αντίδρασης είναι 25 µl. Τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για μισή ώρα και στη συνέχεια προστίθενται σε αυτά 5 µl DNase inactivation Reagent, υλικού το οποίο δεσμεύει την DNase I και καθιζάνει απομακρύνοντας την από το δείγμα (Ambion). Μετά από ισχυρή ανακίνηση τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε επιτραπέζια φυγόκεντρο σε 10000 g για ένα λεπτό. Το υπερκείμενο κάθε αντίδρασης μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάκι και ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση έτσι ώστε να μην υπάρχουν υπολείμματα Inactivation Reagent και DNase I στο δείγμα στο οποίο θα πραγματοποιηθεί η σύνθεση του cDNA. Η αντίδραση σύνθεσης του cDNA γίνεται σε τελικό όγκο 40 µl με 3µg ολικού RNA στα οποία προστίθενται 2 µl εκκινητή, ο οποίος έχει προέλθει από την ένωση 16 τριφωσφορικών θυμιδινών (oligo-dT primer 100 µM), 8 µl διαλύματος αντίστροφης μεταγραφάσης (MMLV 5X buffer), 2 µl ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης (RT Promega, 200 units/µl), 1 µl Rnasin (Promega, 40 units/µl), 2 µl dNTPs (10mM) και επωάζεται στους 37°C για 2 ώρες. Μετά το πέρας αυτών, στην αντίδραση προστίθεται 0.5-2units RNase H (Promega) και επωάζεται στους 37°C για 1 ώρα. Στη συνέχεια 1 µl από την παραπάνω αντίδραση χρησιμοποιείται σε Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης. Οι συνθήκες που ακολουθούνται είναι οι εξής: 10 mM Tris-HCl pH 8.5, 50 mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 2 units Taq πολυμεράσης (Minotech), και 20 pmol από τον κάθε εκκινητή σε τελικό όγκο αντίδρασης 50 µl. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της τρανσποζάσης του *Minos* είναι ο minos1 (5' - **CAGCTTCGAAATGAGCCAC**- 3'), ο οποίος υβριδοποιεί σε αλληλουχία μέσα στο γονίδιο της τρανσποζάσης και ο βglobin/2exR (5' -**CCCAGGAGCCTGAAGTTC**- 3'), ο οποίος υβριδοποιεί σε αλληλουχία που γειτνιάζει με το τέλος του γονιδίου της

τρανσποζάσης και την αρχή του επόμενου εξώνιου του 3' β-globin pBI-L (Clontech). Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του μεταγράφου *hprt* είναι ο HPRTF (5' -**GCTGGTGAAAAGGACCTCT**- 3') και ο HPRTR (5' - **CACAGGACTAGAACACCTGC**- 3'). Το θερμοκυκλικό πρόγραμμα που ακολουθείται, μετά την αρχική αποδιάταξη του DNA στους 94 °C για 3 λεπτά, είναι το εξής: 30 δευτερόλεπτα στους 94 °C, 30 δευτερόλεπτα στους 55 °C, 45 δευτερόλεπτα στους 72°C για 28 ή 30 επαναλήψεις. Τα προϊόντα της Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5%. Όσον αφορά την ανίχνευση του μεταγράφου της τρανσποζάσης, μετά την ηλεκτροφόρηση τα προϊόντα μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και υβριδοποιούνται με ανιχνευτή το cDNA της τρανσποζάσης, διότι στις συγκεκριμένες συνθήκες παράγονται και μη ειδικά προϊόντα.

### **Ανίχνευση της ενεργότητας της λουσιφεράσης**

Οι προς μελέτη ιστοί ομογενοποιούνται σε διάλυμα Tris-HCl 250 mM pH 7.5. Τα προς μελέτη κύτταρα επαναδιαλύονται στο παραπάνω διάλυμα. Ακολουθεί επώαση για 2 λεπτά σε μπάνιο αιθανόλης/ξηρού πάγου και επώαση στους 37 °C έως ότου να λιώσουν και στιγμιαία ισχυρή ανάδευση. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται 2 φορές και στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρούνται στα 20000g για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάκι, 5 μl αυτού προστίθενται σε 30 μl υποστρώματος λουσιφεράσης (Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer, Promega) και η ενεργότητα λουσιφεράσης ανιχνεύεται σε TD-20/20 Luminometer (TURNER DESIGNS).

### **Κατασκευή και παραγωγή σε υψηλούς τίτλους ανασυνδυασμένων ιών AcMNPV (baculovirus)**

Για την κατασκευή των ανασυνδυασμένων ιών AcMNPV BacMiLRneo, BacCMV/ILMi, BacMiBo14/GtTA2 και Bachs/ILMi από τους ενδιάμεσους πλασμιδιακούς φορείς pBacPAK9MiLRneo, pBacPAK9CMV/ILMi, pBacPAK8MiBo14/GtTA2ΔPPΔNotI και pBacPAK8hs/ILMiΔPP αντίστοιχα (Παράρτημα), χρησιμοποιήθηκε το BacPAK™ Baculovirus Expression System (Clontech) και τα μέσα καλλιέργειας BacPAK Complete Medium και BacPAK Grace's Basic Medium (Clontech). Η κατασκευή των ανασυνδυασμένων ιών βασίζεται στην συνδιαμόλυνση των κυττάρων SF21 με έναν

γραμμοποιημένο ιό, ο οποίος στερείται μέρος ενός απαραίτητου γονιδίου, και ενός πλασμιδιακού φορέα ο οποίος φέρει εκατέρωθεν της περιοχής κλωνοποίησης ξένων γονιδίων, αλληλουχίες οι οποίες μπορούν να ανασυνδυαστούν με τον γραμμοποιημένο ιό και το απαραίτητο γονίδιο. Μετά τη συνδιαμόλυνση μόνο οι ιοί οι οποίοι έχουν παραχθεί με ανασυνδυασμό του γραμμοποιημένου και του πλασμιδιακού φορέα είναι ικανοί να πολλαπλασιάζονται στα κύτταρα SF21.

Οι ανασυνδυασμένοι ιοί διατηρούνται και πολλαπλασιάζονται με μόλυνση κυττάρων SF21 σε αναλογία ιού/κυττάρων 0.01-0.1 (M.O.I. Multiplicity of Infection) σε μέσο καλλιέργειας Grace's (GIBCO/BRL) με 10% FBS και 10  $\mu\text{g/ml}$  gentamycin. Τρεις ή τέσσερις μέρες μετά τη μόλυνση το μέσο καλλιέργειας τοποθετείται σε πλαστικό σωλήνα (Falcon), φυγοκεντρείται για 10 λεπτά σε 1000 g στους 4°C, ώστε τα κύτταρα και τα κυτταρικά υπολείμματα να κατακρημνιστούν και το υπερκείμενο, το οποίο φέρει και τους ιούς, φυλάσσεται στους 4°C (μέχρι έξι μήνες) ή στους -80°C για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα. Ο τίτλος του ιού είναι μεταξύ  $10^7$  και  $10^8$  πλάκες/ml. Για την περαιτέρω συγκέντρωσή του υπερφυγοκεντρείται σε 80000g για μισή ώρα, στους 4°C και ο κατακρημνισμένος ιός επαναδιαλύεται σε PBS.

### **Προσδιορισμός του τίτλου των ανασυνδυασμένων ιών AcNPV**

Ο τίτλος των ανασυνδυασμένων ιών υπολογίζεται με τη μέθοδο των πλακών ως εξής: σε 35mm τρυβλία μεταφέρονται  $1.5 \times 10^6$  κυττάρων SF21 ανά τρυβλίο και επωάζονται στους 27 °C για 1-4 ώρες. Σε ένα μέρος από το δείγμα του ιού γίνονται διαδοχικές αραιώσεις έως  $10^{-8}$ . Το μέσο καλλιέργειας αφαιρείται από τα τρυβλία και 300μl από την κάθε αραιώση προστίθενται σε δύο τρυβλία (300 μl/τρυβλίο). Επωάζονται στους 27 °C για μία ώρα και στη συνέχεια το υπερκείμενο αφαιρείται προσεκτικά και προστίθενται 2 ml προζεσταμένου στους 37 °C διαλύματος που περιέχει 50% μέσο καλλιέργειας και 1% αραρόζη. Όταν στερεοποιηθεί προστίθενται 2 ml μέσου καλλιέργειας. Τα τρυβλία με τα κύτταρα επωάζονται στους 27 °C για 4 μέρες και στη συνέχεια αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται σε αυτά 1 ml χρωστικής neutral red 0.03% διαλυμένης σε PBS, επωάζονται στους 27 °C για 2 ώρες και στη συνέχεια το διάλυμα της χρωστικής αφαιρείται, τα τρυβλία αναποδογυρίζονται και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5-16 ώρες έως ότου οι πλάκες να είναι ευδιάκριτες.

Ο τίτλος του ιού σε πλάκες/ml υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο: Μέσος όρος αριθμού πλακών σε μια συνθήκη αραιώσης  $\times 3.3 \times \text{αραιώση}^{-1}$ .

## **Δημιουργία πρωτογενών καλλιέργειών νευρικών κυττάρων από γάγγλια οπισθίων ριζών (DRG's) και νωτιαίο μυελό εμβρύου ποντικού (E14)**

Τα τρυβλία καλλιέργειας επωάζονται με 10μg/ml poly D-lysine διαλυμένης σε νερό ολονυχτίς στους 4°C ή για μία ώρα στους 37°C. Στη συνέχεια ξεπλένονται με απιονισμένο νερό και προστίθεται σε αυτά 10 μg/ml laminin διαλυμένης σε νερό. Επωάζονται για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, ακολουθεί ξέπλυμα με απιονισμένο νερό ή PBS και προσθήκη του μέσου καλλιέργειας. Η καλλιέργεια γίνεται σε μέσο καλλιέργειας DMEM/F-12 (NUT MIX F-12 HAM, GIBCO/BRL) εμπλουτισμένο με 10% FBS (Fetal Bovine Serum, GIBCO/BRL), 1% N<sub>2</sub> προσθετικό (GIBCO/BRL), 10 μl/ml Cytosine β-D arabino-furanoside (SIGMA) και αντιβιοτικά (100 units/ml Penicillin g sodium, 100 μg/ml Streptomycin sulfate, GIBCO/BRL). Για την καλλιέργεια των DRG's προστίθεται και 100 ng/ml NGF.

DRG's και κομμάτια από νωτιαίο μυελό απομονώνονται από τον ποντικό, σε στείρες συνθήκες, και τοποθετούνται σε πλαστικούς σωλήνες (Falcon). Επωάζονται με 3 ml διαλύματος τρυψίνης 0.05% σε PBS (trypsin 1:250 from porcine pancreas, Sigma T-4799), για 15 λεπτά στους 37°C. Στο τέλος της επώασης προστίθενται 3 ml μέσου καλλιέργειας και ακολουθεί φυγοκέντρηση 10 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου σε 228 g, αφαίρεση του υπερκείμενου, επαναδιάλυση σε 3 ml μέσου καλλιέργειας και πέρασμα από πολύ λεπτή πιπέτα (Pasteur με καμένο και στενό στόμιο), έως ότου τα κύτταρα να μην σχηματίζουν συσσωματώματα. Τα κύτταρα μεταφέρονται στα επιστρωμένα τρυβλία και καλλιεργούνται στους 37°C σε θάλαμο που περιέχει CO<sub>2</sub> σε περιεκτικότητα 5%.

## **Μόλυνση πρωτογενών κυττάρων με ιό *AcNPV* και ανίχνευση των νευρώνων**

Οι μολύνσεις με τον ιό *AcNPV* πραγματοποιούνται μία μέρα μετά την απομόνωση των κυττάρων και ο ιός επωάζεται με τα κύτταρα 10-16 ώρες. Ακολουθεί ξέπλυμα με PBS και μετά από 24-48 ώρες τα κύτταρα φωτογραφίζονται σε ανάστροφο μικροσκόπιο OLYMPUS ή μονιμοποιούνται για να γίνει ανίχνευση των νευρώνων. Η μονομοποίηση γίνεται με διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 4% σε PBS για μισή ώρα στους 4°C. Ακολουθεί επώαση σε διάλυμα 1% FBS και 0.01% Triton X σε PBS για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, προσθήκη του αντισώματος mouse IgG anti-neurofilaments (3A10, Furley *et al.*, 1990) σε αραιώση 1/10 στο ίδιο διάλυμα με το παραπάνω, επώαση για 16 ώρες στους 4°C και στη συνέχεια πραγματοποιούνται 4 ξεπλύματα σε PBS και

επώαση με το δεύτερο αντίσωμα Cy3 anti mouse (Jacson) σε αραιώση 1/800 σε 1% FBS σε PBS για 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 4 ξεπλύματα και στερέωση με *parafilm*. Τα δείγματα φωτογραφίζονται σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP. Η GFP παρουσιάζει μέγιστο εκπομπής στα 509 nm (Inouye and Tsuji, 1994, Chalfie, *et al.*, 1994)

### **Μόλυνση κυττάρων HepG2 , Ref1, NIH3T3, MCF7, T47D, ES και S2 από ιό AcNPV**

Τα κύτταρα μεταφέρονται σε τρυβλία 35 mm 24 ώρες πριν τη μόλυνση ( $7 \times 10^5$ - $10^6$  HepG2,  $3 \times 10^5$  Ref1,  $6 \times 10^5$  NIH3T3,  $3 \times 10^5$  MCF7,  $3 \times 10^5$  T47D ανά τρυβλίο). Λίγο πριν τη μόλυνση το μέσο καλλιέργειας (DMEM που περιέχει 10% FBS, GIBCO/BRL) αφαιρείται και προστίθενται 2-3 ml φρέσκου. Στα τρυβλία με τα κύτταρα προστίθενται οι ιοί, σε διάφορους συνδυασμούς τίτλων και ακολουθεί επώαση για 16 ώρες στους 37 °C σε περιβάλλον που περιέχει CO<sub>2</sub> σε περιεκτικότητα 5%. Μετά το πέρας της επώασης το κύτταρα ξεπλένονται 2 φορές με PBS και προστίθεται σε αυτά φρέσκο μέσο καλλιέργειας.

Για μολύνσεις που έγιναν με ιό που φέρει την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη υπό τον έλεγχο του υποκινητή του ιού CytoMegaVirus (CMV/GFP), 24-48 ώρες μετά την απομάκρυνση του γίνεται παρατήρηση των κυττάρων σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού (OLYMPUS). Η εκτίμηση του ποσοστού των φθοριζόντων κυττάρων πραγματοποιείται με παρατήρηση του ίδιου πεδίου παρουσία και απουσία φθορισμού.

Στην περίπτωση των μολύνσεων με χιμαιρικούς φορείς *Minos*-AcNPV που φέρουν τρανσποζόνια και τρανσποζάση (BacMiLRneo, BacCMV/ILMI), 48 ώρες μετά τη μόλυνση (36 ώρες μετά το ξεπλύμα για την απομάκρυνση των ιών) τα κύτταρα υφίστανται κατεργασία με τρυψίνη, 1/2 ή 1/5 ή 1/10 ή 1/20 αυτών μεταφέρονται σε τρυβλία 100 mm όπου 24 ώρες μετά προστίθεται το φάρμακο επιλογής G418 (GIBCO/BRL). Το μέσο καλλιέργειας με το G418 ανανεώνεται κάθε 3 μέρες και μετά από 20 μέρες σχηματίζονται αποικίες από κύτταρα ανθεκτικά στο G418. Μερικές μεταφέρονται σε νέο τρυβλίο για να πολλαπλασιαστούν και να χρησιμοποιηθούν για μοριακή ανάλυση των ενθέσεων. Οι υπόλοιπες μονιμοποιούνται σε 30% αιθανόλη σε PBS για 15 λεπτά και βάφονται με χρωστική Methylene Blue σε PBS για 20 λεπτά. Ακολουθεί ξεπλύμα με νερό, στέγνωμα και μέτρηση των σταθερά μετασηματισμένων κλώνων.



Όσον αφορά τα κύτταρα S2,  $2 \times 10^6$  κύτταρα μεταφέρονται σε τρυβλία 35 mm σε μέσο καλλιέργειας M3 που περιέχει 10%FBS. Οι μολύνσεις με τους ιούς BacMiBo14/GtTA2 και Bachs/ILMi πραγματοποιούνται όπως και για τα υπόλοιπα κύτταρα.

Οι κυτταρικές σειρές προέρχονται από τις εταιρείες ATCC και European Collection of Cell Cultures εκτός από τα κύτταρα REF-1 (Topol *et al.*, 1995)

### **Δημιουργία σταθερά μετασχηματισμένων κυττάρων HepG2**

Για τη δημιουργία των κλώνων κυττάρων HepG2 που εκφράζουν tTA τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τη μέθοδο του χλωριούχου ασβεστίου με κομμάτι DNA που προκύπτει μετά από πέψη του πλασμιδίου rT<sub>A</sub>/TKhygro με το ένζυμο περιορισμού *Hind*III. Για τη δημιουργία των κλώνων κυττάρων HepG2 που εκφράζουν rT<sub>A</sub> τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με κομμάτι DNA που προκύπτει μετά από πέψη του πλασμιδίου rT<sub>A</sub>/TKhygro με το ένζυμο περιορισμού *Hind*III. Και στις δύο περιπτώσεις οι πέψεις πραγματοποιούνται για την απομάκρυνση των πλασμιδιακών αλληλουχιών. Για τη δημιουργία κυττάρων που φέρουν τα γονίδια της τρανσποζάσης και της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο του χειριστή tetO, οι κλώνοι 90, 92, 13 και 29 διαμολύνθηκαν με κομμάτι DNA που προκύπτει μετά από πέψη του πλασμιδίου rBI-L/ILMiTKrugo με το ένζυμο περιορισμού *Xmn*I.

Η επαγωγή των κλώνων που φέρουν rT<sub>A</sub> και τρανσποζάση γίνεται με την προσθήκη στο μέσο καλλιέργειας 2-4 μg/ml dox (ανανέωση κάθε δύο μέρες). Για τη διατήρηση των κλώνων που φέρουν tTA και τρανσποζάση σε κατάσταση “μη επαγωγής” προστίθεται στο μέσο καλλιέργειας dox σε τελική συγκέντρωση 4-6 μg/ml κάθε δύο μέρες. Η επαγωγή πραγματοποιείται με αφαίρεση του dox από το μέσο καλλιέργειας. Μετά από 16 ώρες από τη μόλυνση προστίθεται ξανά dox στο μέσο καλλιέργειας. Οι μολύνσεις με ιούς πραγματοποιούνται όπως περιγράφονται σε προηγούμενο κεφάλαιο.

### **Επιλογή ευκαρυωτικών κυττάρων ανθεκτικών στα φάρμακα G418, hygromycin B, πουρομυκίνη**

Για την επιλογή των κυττάρων που φέρουν το γονίδιο της ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη τα κύτταρα HepG2 καλλιεργούνται σε μέσο καλλιέργειας το οποίο περιέχει 0.9-1 mg/ml G418 (GIBCO/BRL), τα κύτταρα REF-1 σε μέσο καλλιέργειας το οποίο

περιέχει 350 µg/ml G418 και τα κύτταρα NIH3T3 σε μέσο καλλιέργειας το οποίο περιέχει 500 µg/ml G418 (Όσον αφορά τα κύτταρα NIH3T3 συγκέντρωση 220 µg/ml G418 έχει τα ίδια αποτελέσματα αλλά απαιτεί μεγαλύτερη διάρκεια επιλογής). Για την επιλογή των κυττάρων HepG2 που φέρουν το γονίδιο της ανθεκτικότητας στην hygromycin (hygromycin B, Clontech, Invitrogen Life Technologies), χρησιμοποιείται συγκέντρωση hygromycin 400 µg/ml. Η επιλογή σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις αρχίζει τρεις ή τέσσερις ημέρες μετά τη διαμόλυνση ή τη μόλυνση και το μέσο καλλιέργειας ανανεώνεται κάθε τρεις ημέρες.

Τέλος όσον αφορά τα κύτταρα HepG2 και την επιλογή τους σε πουρομυκίνη, αυτή αρχίζει έξι ημέρες μετά τη διαμόλυνση με την προσθήκη 0.3 µg/ml πουρομυκίνης στο μέσο καλλιέργειας (puromycin, Clontech). Το μέσο καλλιέργειας ανανεώνεται κάθε δύο ημέρες. Τη δέκατη ημέρα μετά τη διαμόλυνση η συγκέντρωση της πουρομυκίνης αυξάνεται σε 0.5 µg/ml.

#### **Διαμόλυνση κυττάρων με τη μέθοδο του $\text{CaCl}_2$**

Τα κύτταρα μεταφέρονται σε τρυβλία 35mm 24 ώρες πριν τη διαμόλυνση ( $7 \times 10^5$  -  $10^6$  HepG2,  $3 \times 10^5$  Ref1,  $6 \times 10^5$  NIH3T3). Υδατικό διάλυμα όγκου 109.5 µl, το οποίο περιέχει το DNA αναμιγνύεται με 15.5 µl διαλύματος  $\text{CaCl}_2$  μοριακότητας 2 M. Στο διάλυμα προστίθενται 125 µl διαλύματος 2X HBS (Hepes-buffered saline: 280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 12 mM dextrose, 50 mM HEPES) και ακολουθεί επώαση 20 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια το αιώρημα που δημιουργείται προστίθεται στα κύτταρα. Η μέγιστη συνολική ποσότητα DNA που χρησιμοποιείται σε κάθε διαμόλυνση είναι 8µg. Μετά από 18 ώρες τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS και προστίθεται σε αυτά μέσο καλλιέργειας.

#### **Διαμόλυνση κυττάρων με τη χρήση λιπιδίων**

Η διαμόλυνση των κυττάρων με το αντιδραστήριο Gene Porter πραγματοποιείται με βάση των οδηγιών της εταιρείας (Gene Therapy Systems).

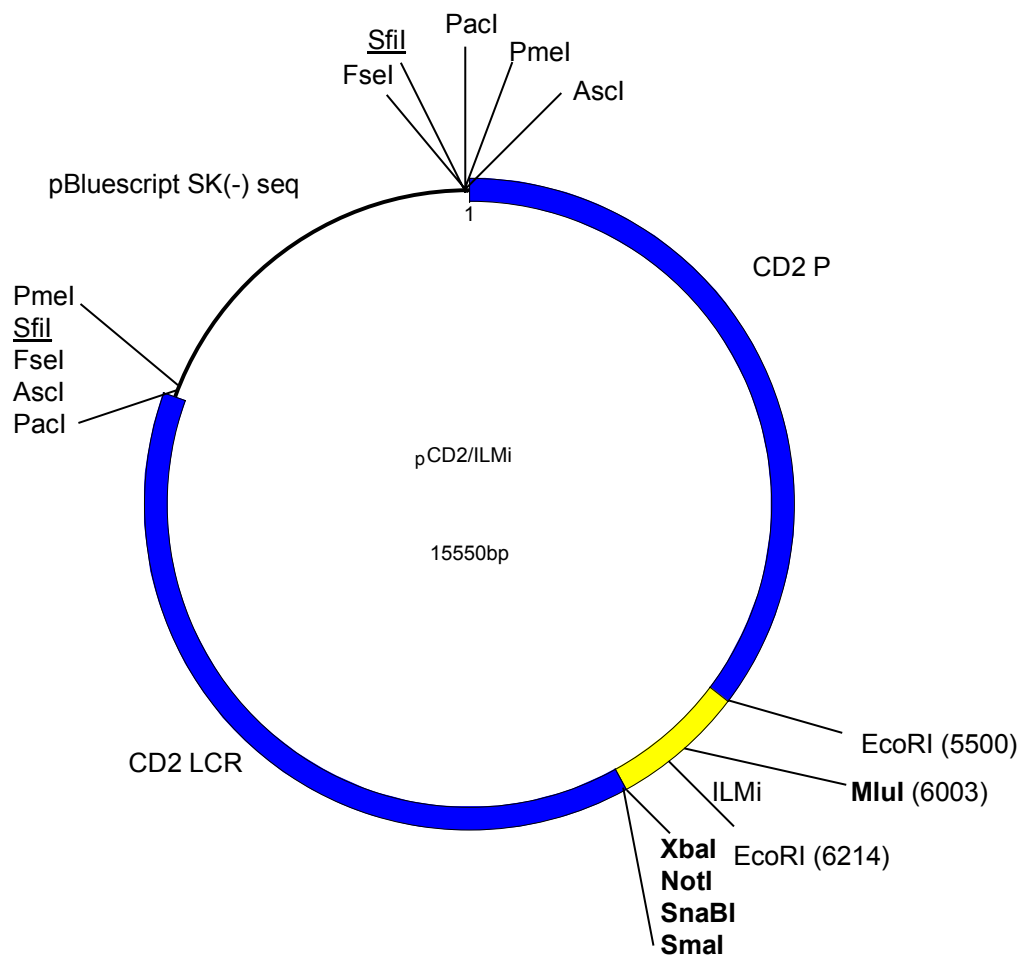
## Ανοσοεντοπισμός κυττάρων που εκφράζουν τρανσποζάση

Ειδικές στρογγυλές καλυπτρίδες (cover slips) τοποθετούνται σε καθαρή αιθανόλη για πέντε λεπτά. Στη συνέχεια τοποθετούνται σε πλάκες που φέρουν 12 ή 24 τρυβλία, οι οποίες αφήνονται ανοιχτές σε αποστειρωμένη απαγωγό (με UV) για 15 λεπτά. Τα κύτταρα υφίστανται κατεργασία με τρυψίνη και τοποθετούνται στα τρυβλία στα οποία προηγουμένως έχουν τοποθετηθεί τα cover slips. Την επόμενη μέρα τα cover slips αφαιρούνται, εμβαπτίζονται σε δοχείο με PBS, στραγγίζονται και τοποθετούνται σε τρυβλία που περιέχουν προπαγωμένη μεθανόλη (-20 °C) κατά τέτοιο τρόπο ώστε τα κύτταρα να βρίσκονται στην πάνω πλευρά. Η μονιμοποίηση με μεθανόλη διαρκεί 10 λεπτά στους -20 °C ή σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί ξέπλυμα με PBS όπως περιγράφηκε παραπάνω και τοποθέτηση των cover slips σε τρυβλία τα οποία περιέχουν διάλυμα 1% Bovine Serum Albumin σε PBS, για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η BSA χρησιμοποιείται για να εμποδίσει την μη ειδική σύνδεση του αντισώματος και στο σημείο αυτό η περαιτέρω διαδικασία του ανοσοεντοπισμού μπορεί να αναβληθεί έως και τρεις ημέρες (4 °C). Στη συνέχεια το υγρό αφαιρείται και τα cover slips τοποθετούνται στο κέντρο του ίδιου τρυβλίου. Στο κέντρο κάθε cover slip προστίθεται αργά 10-30 μl, ανάλογα με τη χρήση πλακών με 24 ή 12 τρυβλία, αντισώματος έναντι της τρανσποζάσης, αραιωμένο 1/50 σε διάλυμα 1% BSA σε PBS (Το αντίσωμα είναι δώρο από τον Stefan Oehler και έχει καθαριστεί με υβριδοποίηση με τρανσποζάση που έχει παραχθεί σε βακτήρια και έχει μεταφερθεί σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης). Οι πλάκες επωάζονται για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σκεπασμένες με υγρό χαρτί για να διατηρείται η υγρασία τους. Ακολουθούν τρία ξεπλύματα με διάλυμα 1% BSA σε PBS, διάρκειας 15 λεπτών το καθένα πάνω σε αναδευτή. Μετά την αφαίρεση του διαλύματος αυτού προστίθενται στο κέντρο των cover slips 10-30 μl αντισώματος Goat anti Rabbit FITC (Jackson), αραιωμένου 1/100 σε διάλυμα 1% BSA σε PBS. Το αντίσωμα αυτό είναι φωτοευαίσθητο οπότε οι πλάκες σκεπάζονται με υγρό χαρτί και τυλίγονται με αλουμινόχαρτο. Οι πλάκες επωάζονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν τρία ξεπλύματα όπως περιγράφηκαν παραπάνω και στη συνέχεια τα cover slips ξεπλένονται σε απεσταγμένο νερό, στραγγίζονται και τοποθετούνται με την πλευρά που φέρει τα κύτταρα προς τα κάτω σε αντικειμενοφόρους στις οποίες προηγουμένως έχουν τοποθετηθεί σταγόνες mowiol ή 87% γλυκερόλης. Τα κύτταρα φωτογραφίζονται σε συνεστιακό μικροσκόπιο BIORAD.

## Πλασμιδιακές κατασκευές

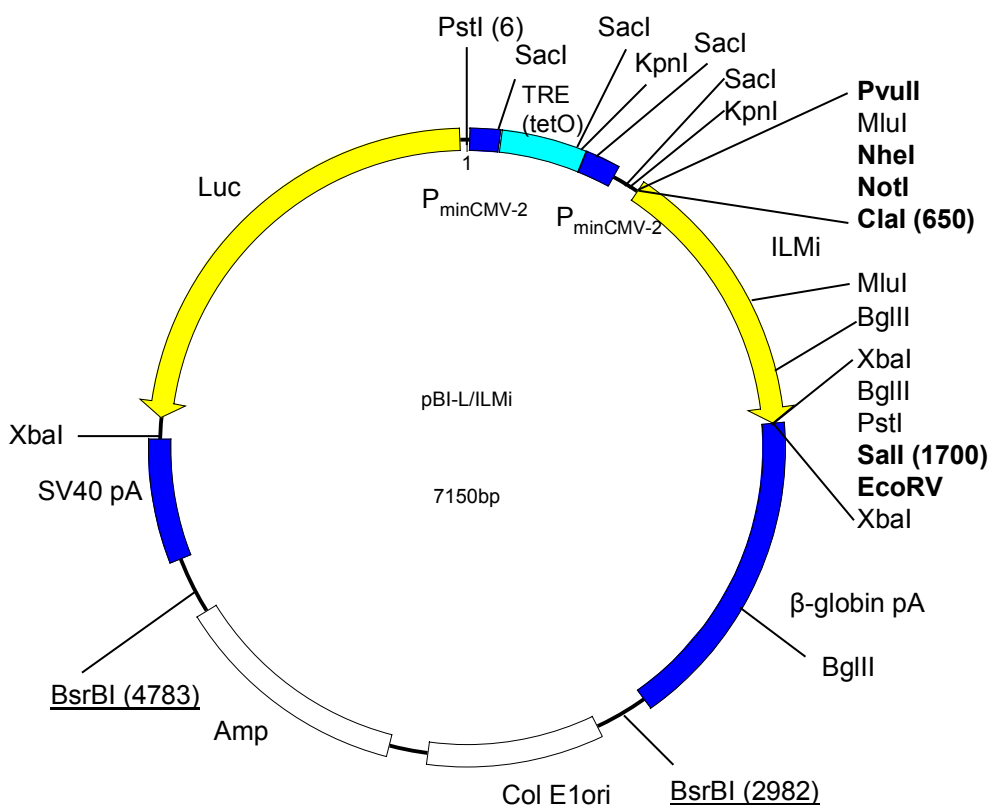
Τα ένζυμα περιορισμού και τροποποίησης του DNA που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τις εταιρείες Minotech, New England Biolabs, Promega, Ambion και Boehringer. Οι πλασμιδιακές κατασκευές πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα *Escherichia coli* K12 του στελέχους DH5α και η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA στηρίχθηκε στην αλκαλική λύση των κυττάρων (Sambrook *et al.*, 1989). Το DNA που χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα διαμόλυνσης απομονώθηκε με τη μέθοδο του κλινούς χλωριούχου καισίου ή με κολώνες ιοντοανταλλαγής (Qiagen). Τα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τις εταιρείες Sigma, Fluka και Merck.

# ***ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ***



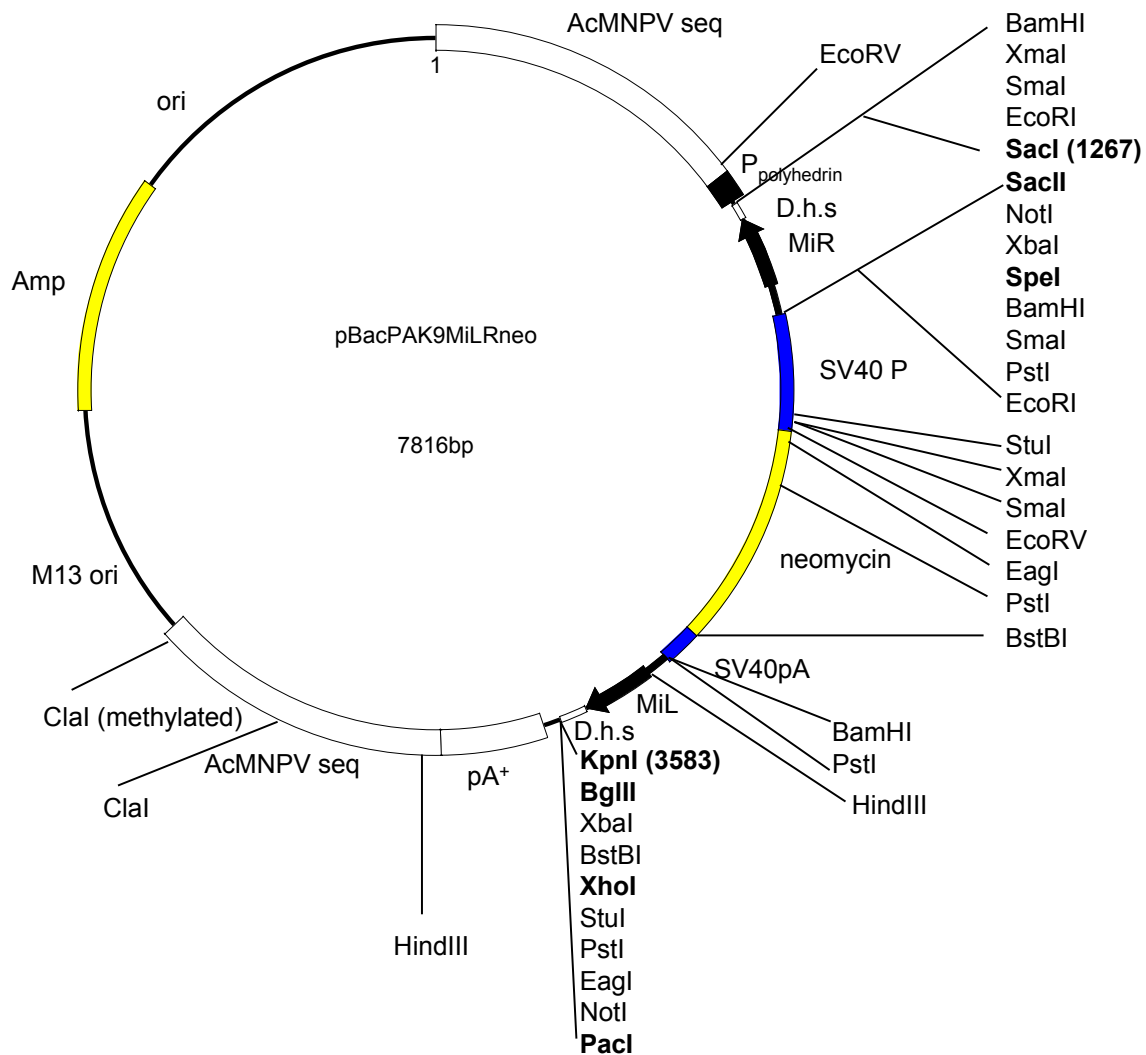
Το πλασμίδιο βοηθός **pCD2/ILMi** έχει βασιστεί στο φορέα έκφρασης SVA (-) (Σκάβδης Γ., αδημοσίευτα αποτελέσματα), ο οποίος προέρχεται από τον φορέα έκφρασης VA (Zhuwabekon *et al.*, 1995). Το πλασμίδιο **pCD2/ILMi** περιέχει την κωδική περιοχή της τρυσποζάσης του *Minos* (ILMi), από την οποία έχει απομακρυνθεί το παρεμβαλλόμενο ιντρόνιο (Παυλόπουλος Α., 1998, Διατριβή Μ.Τ.Ε.), κλωνοποιημένη στον ανθρώπινο γενετικό τόπο CD2 (υποκινητής και Locus Control Region). Το πλασμίδιο προέκυψε από την υποκλωνοποίηση της κωδικής περιοχής του *Minos* ως θραύσμα *ClaI* blunted-*XbaI* από το πλασμίδιο ILT42 (Παυλόπουλος Α., 1998, Διατριβή Μ.Τ.Ε.) στις θέσεις *KpnI* blunted-*XbaI* του φορέα SVA (-).

\* 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. Οι θέσεις περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του θραύσματος DNA που ενέθηκε σε γονιμοποιημένα ωάρια είναι υπογραμμισμένες.



Το πλασμίδιο **pBI-L/ILMi** έχει βασιστεί στο φορέα έκφρασης pBI-L (Clontech). Ο συγκεκριμένος φορέας φέρει το χειριστή της τετρακυκλίνης (tetO, TRE tetracycline response element) και εκατέρωθεν δύο ελάχιστους υποκινητές του ιού CMV (CMV minimal promoter) αντίθετης φοράς. Από τον ένα ρυθμίζεται η έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης και υπό τον έλεγχο του άλλου κλωνοποιήθηκε η κωδική περιοχή της τρυσποζάσης (ILMi) ως θραύσμα *ClaI-SalI* από το πλασμίδιο pHSS6hsILMi20 (Klinakis *et al.*, 2000a), στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pBI-L.

\* 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. Οι θέσεις περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του θραύσματος DNA που ενέθηκε σε γονιμοποιημένα ωάρια είναι υπογραμμισμένες.



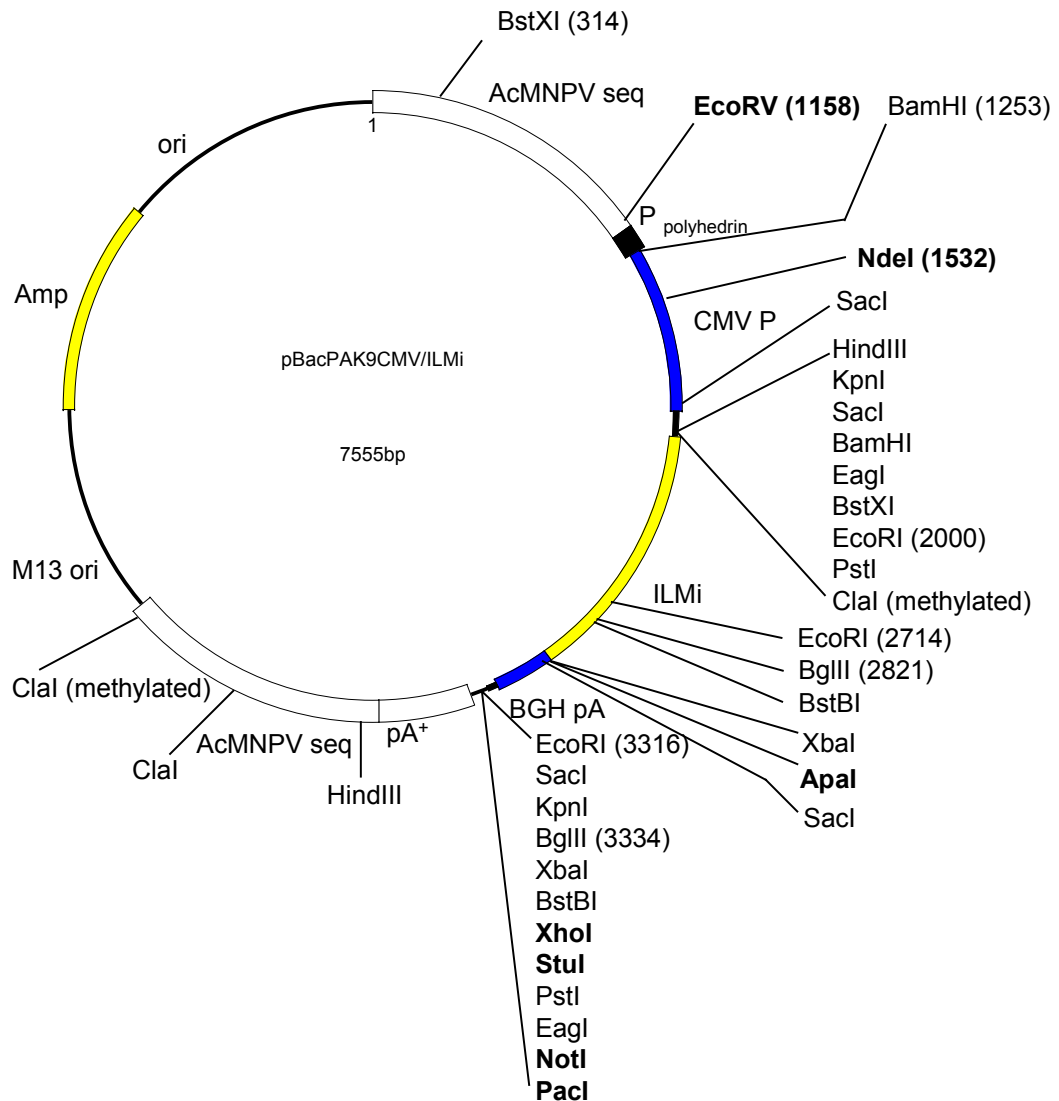
Το πλασμιδίο **pBacPAK9MiLRneo** προέκυψε με την υποκλωνοποίηση θραύσματος DNA το οποίο φέρει το μη αυτόνομο τρυσποζόνιο MiLRneo (Klinakis *et al.*, 2000b) στον φορέα pBacPAK9 (Clontech). Ο συγκεκριμένος φορέας φέρει εκατέρωθεν της περιοχής κλωνοποίησης γονιδίων (MCS) αλληλουχίες, οι οποίες ανασυνδυάζονται με γραμμοποιημένο ιό AcMPV σε κύτταρα του ξενιστή. Το τρυσποζόνιο περιβάλλεται από γενωμικές αλληλουχίες της *Drosophila hydei* (D.h.s. 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 τρυσποζάσης. Το δεξί άκρο φέρει 59 bp (gac....aca) όπου περιέχονται τα 6 τελευταία κωδικόνια και την 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή της τρυσποζάσης.



Το τρανσποζόνιο υποκλωνοποιήθηκε ως θραύσμα με άκρα *SacI-KpnI* από το πλασμίδιο *pMiLRneo* στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα *pBacPAK9* (Clontech).

\*Το πλασμίδιο *pMiLRneo* προέκυψε από το πλασμίδιο δότη *pMiLRtetR* (Λουκέρης Α., 1996, Διδακτορική Διατριβή) με αντικατάσταση του τμήματος που περιέχει το γονίδιο της ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη, με την κασέτα *SV40neo* από το πλασμίδιο *pRcCMV* (Invitrogen). Υποκλωνοποιήθηκε ως θραύσμα με άκρα *EcoRI-BamHI* στις αντίστοιχες θέσεις του πλασμιδίου *pMiLRtetR*.

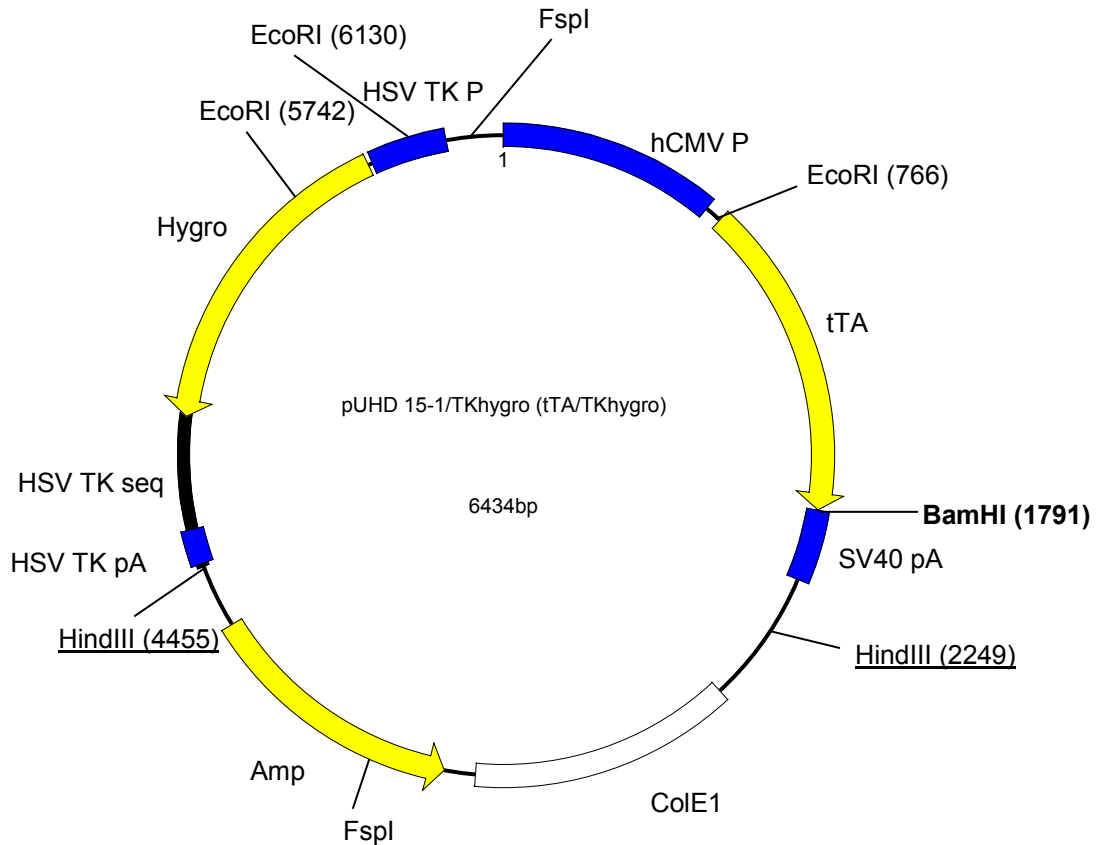
\*\* Με έντονη γραφή παριστάνονται τα ένζυμα περιορισμού με μοναδική θέση αναγνώρισης. Η ύπαρξη και άλλων ενζύμων περιορισμού με μοναδική θέση αναγνώρισης στην παραπάνω κατασκευή δεν αποκλείεται.



Το πλασμίδιο **pBacPAK9CMV/ILMi** προέκυψε από την κλωνοποίηση της κασέτας CMV-ILMi-BGHpA στον φορέα pBacPAK9 (Clontech). Ο συγκεκριμένος φορέας φέρει εκατέρωθεν της περιοχής κλωνοποίησης γονιδίων (MCS) αλληλουχίες, οι οποίες ανασυνδυάζονται 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 (Κλινάκης Α., 2002, Διδακτορική Διατριβή) στη θέση *SmaI* του φορέα pBacPAK9 (Clontech).

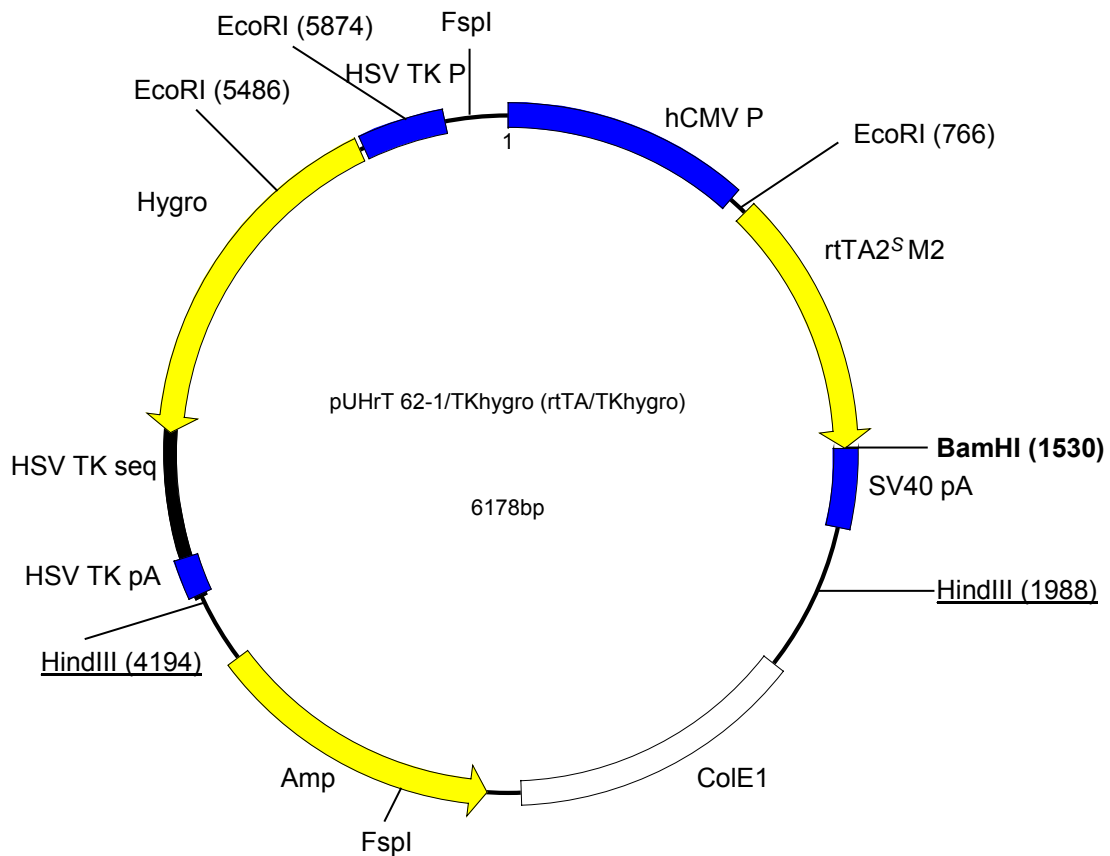
\* Το πλασμίδιο pCMV/ILMi έχει προκύψει από την υποκλωνοποίηση της κωδικής περιοχής της τρανσποζάσης ως θραύσμα *ClaI* blunted-*XbaI* στις θέσεις *EcoRV-XbaI* του φορέα pCDNA3 (Invitrogen).

\*\* 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.



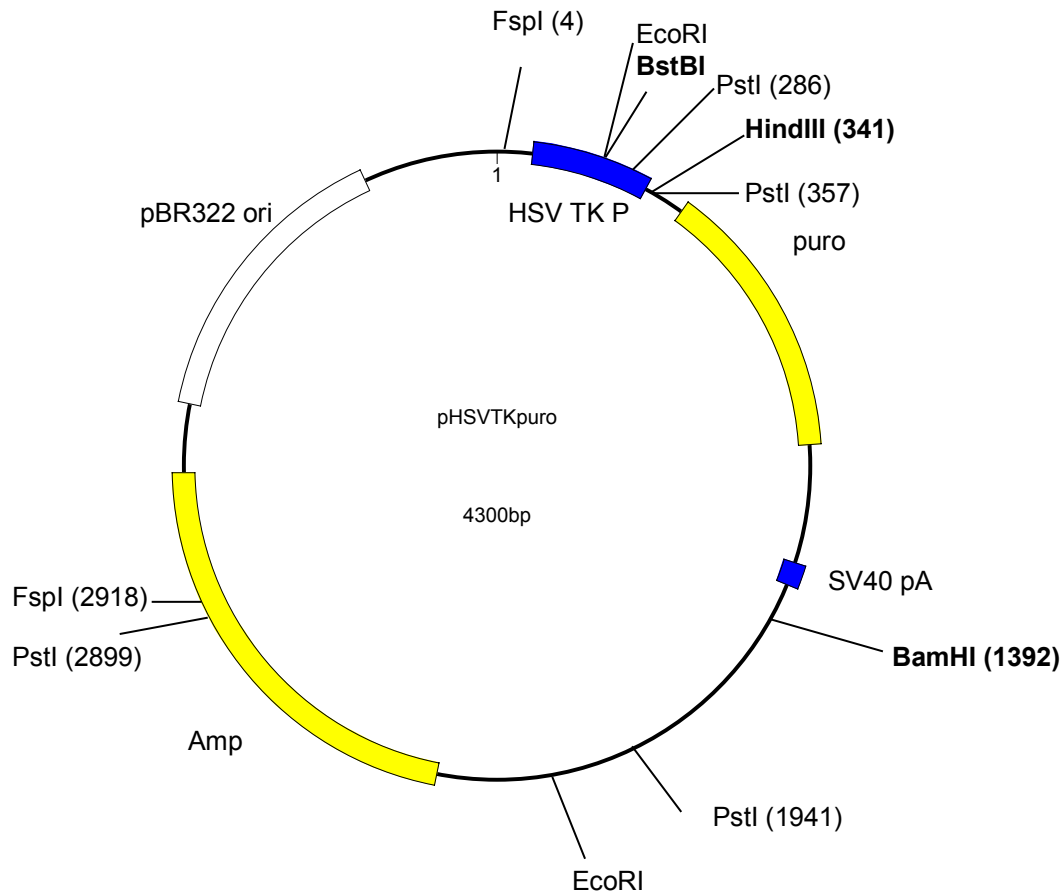
Το πλασμίδιο **pUHD 15-1/TKhygro (tTA/TKhygro)** είναι ένα παράγωγο του φορέα pBR322 και προέκυψε από την υποκλωνοποίηση ενός κομματιού DNA με άκρα *NruI-HindIII* blunted, το οποίο φέρει την κασέτα HSV TK hygro, από το πλασμίδιο pTK-Hyg (Clontech) στην *XhoI* blunted θέση του πλασμιδίου pUHD 15-1 (Gossen and Bujard, 1992). Το πλασμίδιο pUHD 15-1 φέρει τον ενεργοποιητή της τετρακυκλίνης (tTA) υπό τον έλεγχο του υποκινητή/ενισχυτή hCMV και περιέχει το σήμα πολυαδενυλίωσης του ιού SV40. Η κασέτα HSV TK hygro αποτελείται από το γονίδιο της ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη υπό τον έλεγχο ρυθμιστικών στοιχείων του γονιδίου thymidine kinase του ιού HSV. Ο συγκεκριμένος υποκινητής στερείται ενεργότητας ενισχυτή.

\* 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. Οι θέσεις περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του θραύσματος DNA που χρησιμοποιήθηκε στη διαμόλυνση κυττάρων HepG2 είναι υπογραμμισμένες.



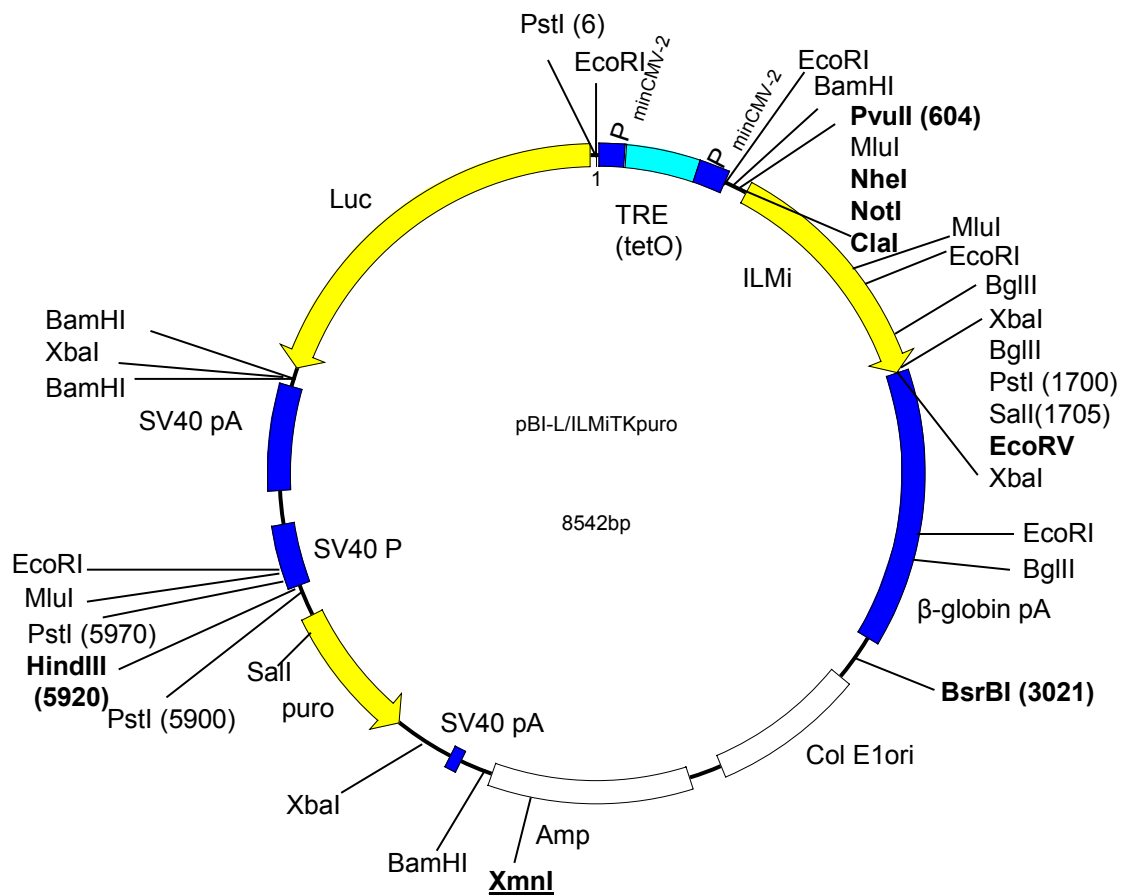
Το πλασμιδίο **pUhrT 62-1/TKhygro (rtTA/TKhygro)** είναι ένα παράγωγο του φορέα pBR322 και προέκυψε από την υποκλωνοποίηση ενός κομματιού DNA με άκρα *NruI-HindIII* blunted, το οποίο φέρει την κασέτα HSV TK hygro, από το πλασμιδίο pTK-Hyg (Clontech), στην *XhoI* blunted θέση του πλασμιδίου pUhrT 62-1 (Baron and Hasan, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Το πλασμιδίο pUhrT 62-1 φέρει τον ενεργοποιητή της τετρακυκλίνης rtTA2<sup>S</sup> M2 υπό τον έλεγχο του υποκινητή/ενισχυτή hCMV και περιέχει το σήμα πολυαδενυλίωσης του ιού SV40. Η κασέτα HSV TK hygro αποτελείται από το γονίδιο της ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη υπό τον έλεγχο ρυθμιστικών στοιχείων του γονιδίου thymidine kinase του ιού HSV. Ο συγκεκριμένος υποκινητής στερείται ενεργότητας ενισχυτή.

\* 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. Οι θέσεις περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του θραύσματος DNA που χρησιμοποιήθηκε στη διαμόλυνση κυττάρων HepG2 είναι υπογραμμισμένες.



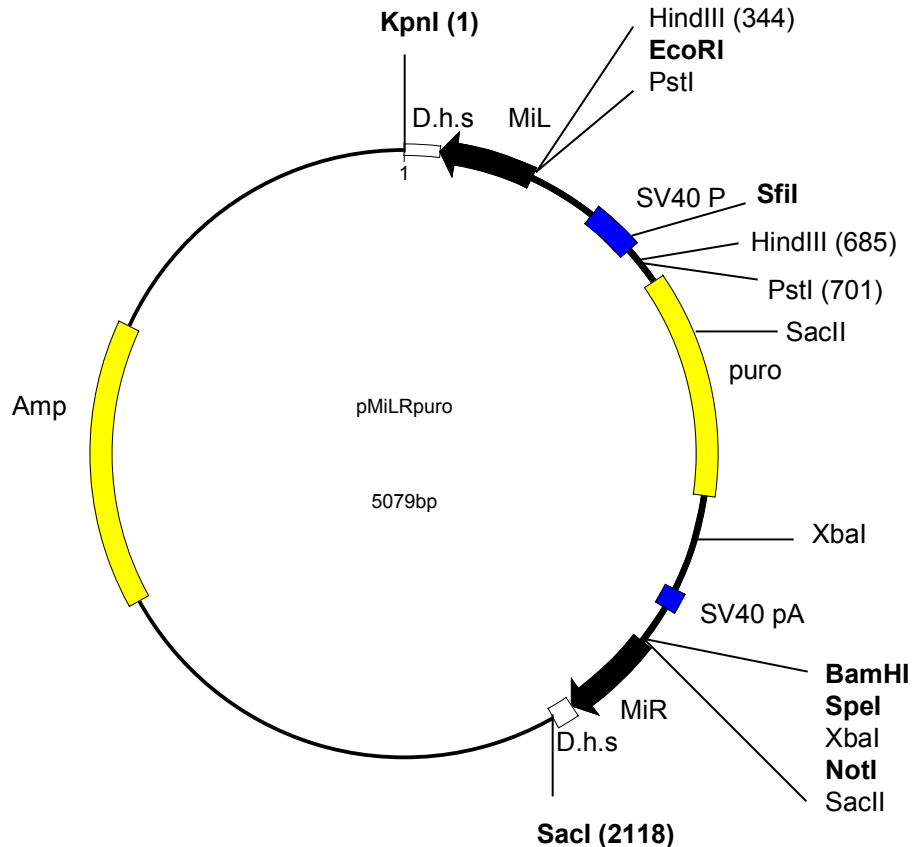
Το πλασμίδιο **pHSVTKpuro** προήλθε από το πλασμίδιο pPUR (Clontech) μετά από την αντικατάσταση του υποκινητή του ιού SV40 με τον υποκινητή του γονιδίου thymidine kinase του ιού HSV ο οποίος δεν φέρει στοιχεία ενισχυτή. Ο υποκινητής απομονώθηκε με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης από το πλασμίδιο pTK-Hyg (Clontech) με τη χρήση των εκκινητών HSVTKEcoRV (5'-ATGATATCTGCGCATTACAGTTCTC-3') και HSVTKHindIII (5'-GGGAAGCTTATCAAGCTGATCTTGCGG-3') και κλωνοποιήθηκε ως θραύσμα DNA με άκρα *EcoRV-HindIII* στις θέσεις *PvuII-HindIII* του πλασμιδίου pPUR (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 πλασμιδίο **pBI-L/ILMiTKpuro** έχει βασιστεί στο φορέα έκφρασης pBI-L (Clontech). Ο συγκεκριμένος φορέας φέρει το χειριστή της τετρακυκλίνης (tetO, TRE tetracycline response element) και εκατέρωθεν αυτού δύο υποκινητές του ιού CMV (CMV minimal promoter) αντίθετης φοράς. Από τον ένα ρυθμίζεται η έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης και από τον άλλο η έκφραση της κωδικής περιοχής της τρανσποζάσης (ILMi). Το πλασμιδίο pBI-L/ILMiTKpuro προέκυψε από την κλωνοποίηση της κασέτας HSVTKP-puro-SV40pA ως θραύσμα DNA με άκρα *FspI*-*Bam*HI blunted από το πλασμιδίο pHSVTKpuro (Παράρτημα) σε μία από τις θέσεις *Bsr*BI (στην 4783) του πλασμιδίου pBI-L/ILMi (Παράρτημα). Ο υποκινητής TK του ιού HSV δε φέρει στοιχεία ενισχυτή.

\* 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. Η θέση περιορισμού που χρησιμοποιήθηκε για την γραμμοποίηση του πλασμιδίου πριν από τη διαμόλυνση κυττάρων HepG2 είναι υπογραμμισμένη.

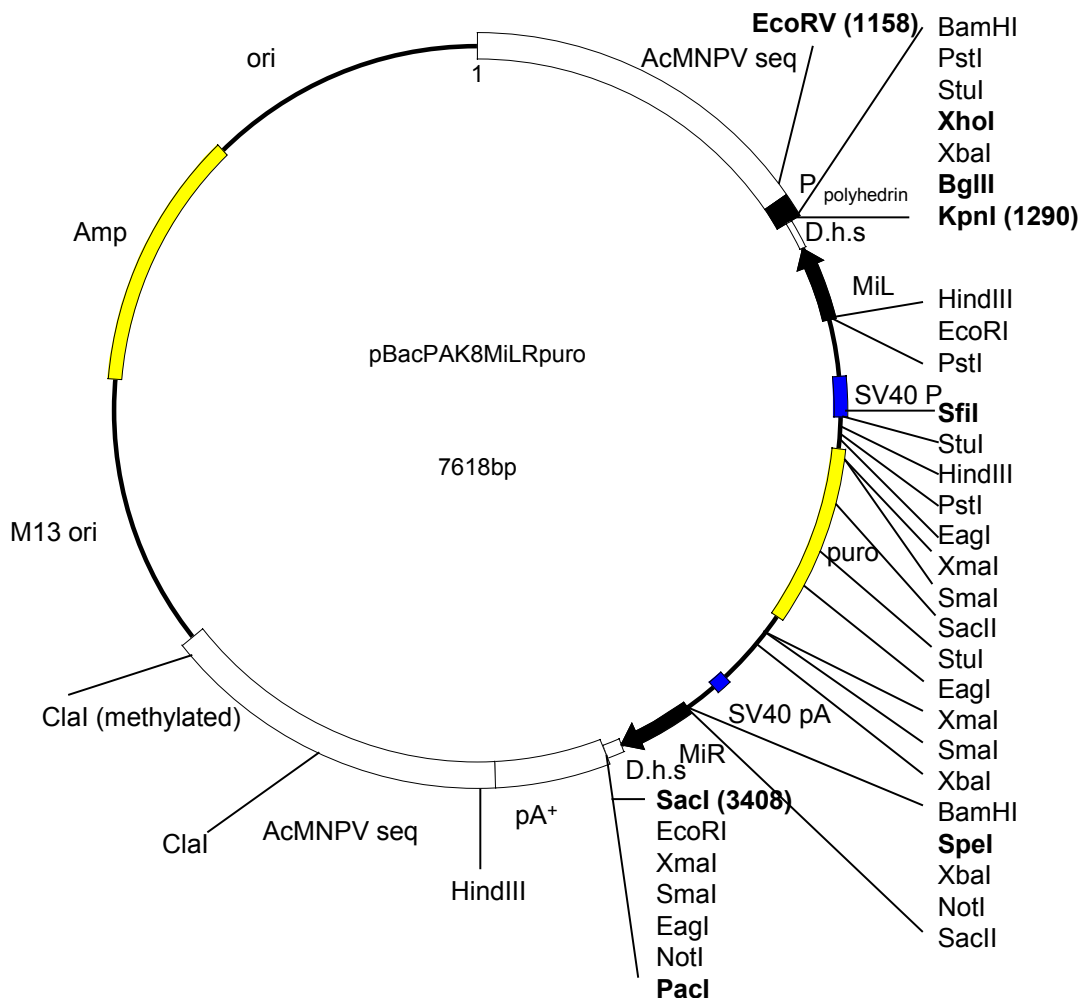


Το πλασμίδιο **pMiLRpuro** προέκυψε ως εξής:

- Απομόνωση του γονιδίου της ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη (SV40P-puro-pA) 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 (SV40P-puro-pA) από τον φορέα pBluescript KS+ με πέψεις *EcoRV* και *NotI*.
- Κλωνοποίηση αυτού στο πλασμίδιο pMiβgeo (Klinakis *et al.*, 2000b) μετά από πέψη με *SpeI*, δημιουργία τυφλών άκρων με Kleow και πέψη με *NotI* (Προέκυψε το πλασμίδιο pMiLRgeoSV40puro ή pMiβgeoSV40puro, Ζαγοραίου Λ., 1999, Διατριβή Μ.Τ.Ε.)
- Πέψη του πλασμιδίου pMiβgeoSV40puro με *EcoRI* για την αφαίρεση του *geo* και αντίδραση συρραφής.

\* 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.

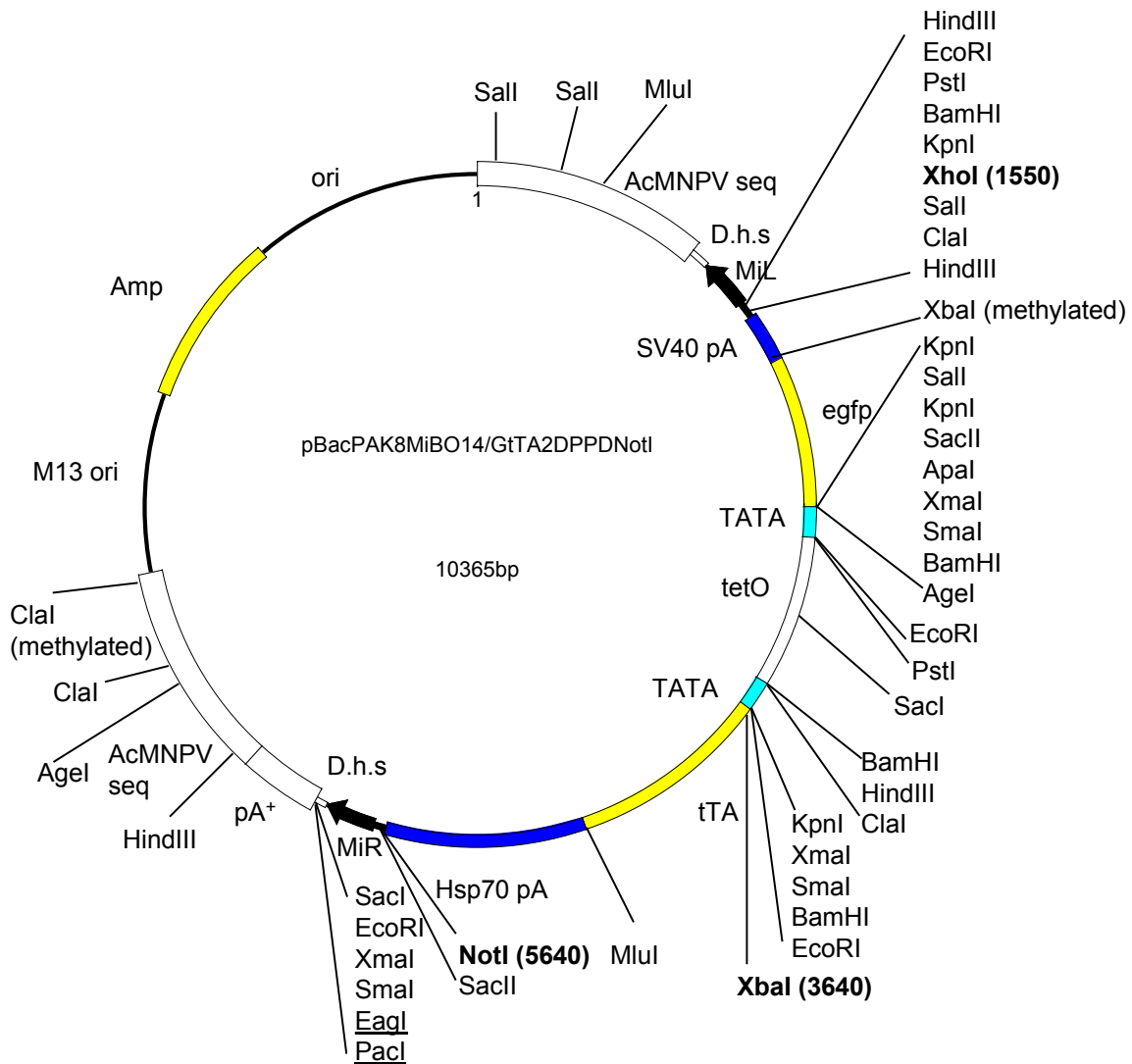




Το πλασμίδιο **pBacPAK8MiLRpuro** προέκυψε με την υποκλωνοποίηση θραύσματος DNA το οποίο φέρει το μη αυτόνομο τρανσποζόνιο MiLRpuro (Ζαγοραίου Λ., 1999, Διατριβή Μ.Τ.Ε, Παράρτημα) στον φορέα pBacPAK8 (Clontech). Ο συγκεκριμένος φορέας φέρει εκατέρωθεν της περιοχής κλωνοποίησης γονιδίων (MCS) αλληλουχίες, οι οποίες ανασυνδυάζονται με γραμμοποιημένο ιό AcMPV σε κύτταρα του ξενιστή. Το τρανσποζόνιο περιβάλλεται από γενωμικές αλληλουχίες της *Drosophila hydei* (D.h.s. 98 bp και 59 bp για το αριστερό και το δεξί άκρο, αντίστοιχα). Όλη η αλληλουχία εσωτερικά του αριστερού άκρου του *Minos* που αντιστοιχεί στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου της τρανσποζάσης και η οποία είναι παρούσα στο pBacPAK9MiLRneo έχει απομακρυνθεί σε προηγούμενο στάδιο κλωνοποίησης (Ζαγοραίου Λ., 1999, Διατριβή Μ.Τ.Ε). Το δεξί άκρο φέρει 59 bp (gac...aca) όπου περιέχονται τα 6 τελευταία

κωδικόνια και η 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή της τρoσποζάσης. Το τρoσποζόνιο υποκλωνοποιήθηκε ως θραύσμα με άκρα *KpnI-SacI* από το πλασμίδιο pMiLRpuro στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pBacPAK8(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.



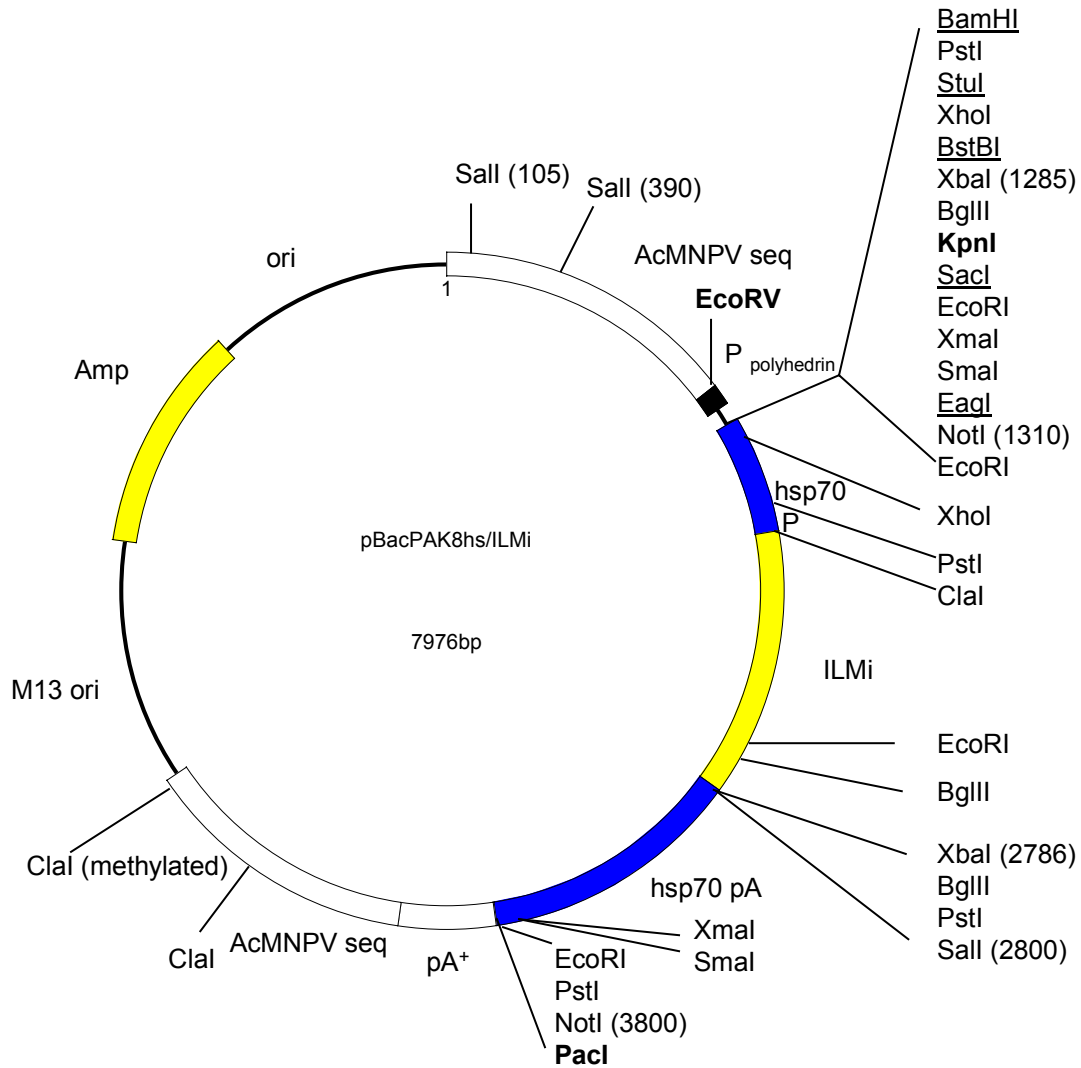
Το πλασμίδιο **pBacPAK8MiBO14/GtTA2ΔPPΔNotI** βασίζεται στο φορέα έκφρασης pBacPAK8 (Clontech). Ο συγκεκριμένος φορέας φέρει εκατέρωθεν της περιοχής κλωνοποίησης γονιδίων (MCS) αλληλουχίες, οι οποίες ανασυνδυάζονται με γραμμοποιημένο ιό AcMPV σε κύτταρα του ξενιστή. Το πλασμίδιο **pBacPAK8MiBO14/GtTA2ΔPPΔNotI** προέκυψε από το πλασμίδιο **pBacPAK8MiLRpuro** (Παράρτημα) μετά από διαδικασία τεσσάρων σταδίων. Αρχικά από το pBacPAK8MiLRpuro αφαιρέθηκε ο υποκινητής του γονιδίου της πολυεδρίνης· ο υποκινητής αφαιρέθηκε ως *EcoRV-KpnI* blunted κομμάτι και ο κυκλοποιημένος μετά από αντίδραση σύνδεσης φορέας ονομάστηκε **pBacPAK8MiLRpuroΔPP**. Στη συνέχεια στο φορέα pBacPAK8MiLRpuroΔPP αντικαταστάθηκε η κασέτα SV40puro με θραύσμα DNA με άκρα *PstI-XbaI* το οποίο φέρει ένα διπλασιασμένο χειριστή της τετρακυκλίνης (*tetO*), εκατέρωθεν του δύο ελάχιστους υποκινητές (*hsp70*) αντίθετης φοράς, το γονίδιο της *egfp* (pEGFP-N1, Clontech) υπό

τον έλεγχο του ενός και σήμα πολυαδενυλίωσης του ιού SV40 και μικρό μέρος του tTA υπό τον έλεγχο του άλλου. Η κασέτα προέρχεται από το πλασμίδιο pMiBO14/GtTA2 (Μετονομάστηκε σε pMiBO14/EtTA2, Κλινάκης Α. αδημοσίευτα αποτελέσματα). Το πλασμίδιο που προέκυψε ονομάζεται pBacPAK8MiBO14GΔPP. Σε αυτό αφαιρέθηκε η μία από τις δύο θέσεις αναγνώρισης για το ένζυμο περιορισμού *NotI* και συγκεκριμένα αυτή που προέρχεται από τον MCS του pBacPAK8, μετά από μερική πέψη με *NotI*, γέμισμα ώστε να δημιουργηθούν τυφλά (blunt) άκρα και αντίδραση σύνδεσης. Το πλασμίδιο αυτό ονομάστηκε pBacPAK8MiBO14GΔPPΔ*NotI*. Τελευταίο στάδιο ήταν η εισαγωγή στο παραπάνω πλασμίδιο του ενεργοποιητή της τετρακυκλίνης χωρίς το κομμάτι που είχε κλωνοποιηθεί κατά την προηγούμενη υποκλωνοποίηση (tTA) και του σήματος πολυαδενυλίωσης *hsp70* από το πλασμίδιο pMiBO14/GtTA2 (Μετονομάστηκε σε pMiBO14/EtTA2 Κλινάκης Α. αδημοσίευτα αποτελέσματα) ως θραύσμα DNA με άκρα *XbaI-NotI* στις αντίστοιχες μοναδικές θέσεις του πλασμιδίου pBacPAK8MiBO14GΔPPΔ*NotI*. Το πλασμίδιο που προέκυψε ονομάζεται pBacPAK8MiBO14/GtTA2ΔPPΔ*NotI*. Φέρει ένα μη αυτόνομο τραπεζόζονιο το οποίο έχει τα γονίδια της GFP και του tTA υπό τον έλεγχο του χειριστή *tetO*.

\* 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.

\*\* Στην παραπάνω κατασκευή υπάρχει άλλη μια θέση αναγνώρισης για το ένζυμο περιορισμού *PstI* (Πιθανώς στο *hsp70pA*).

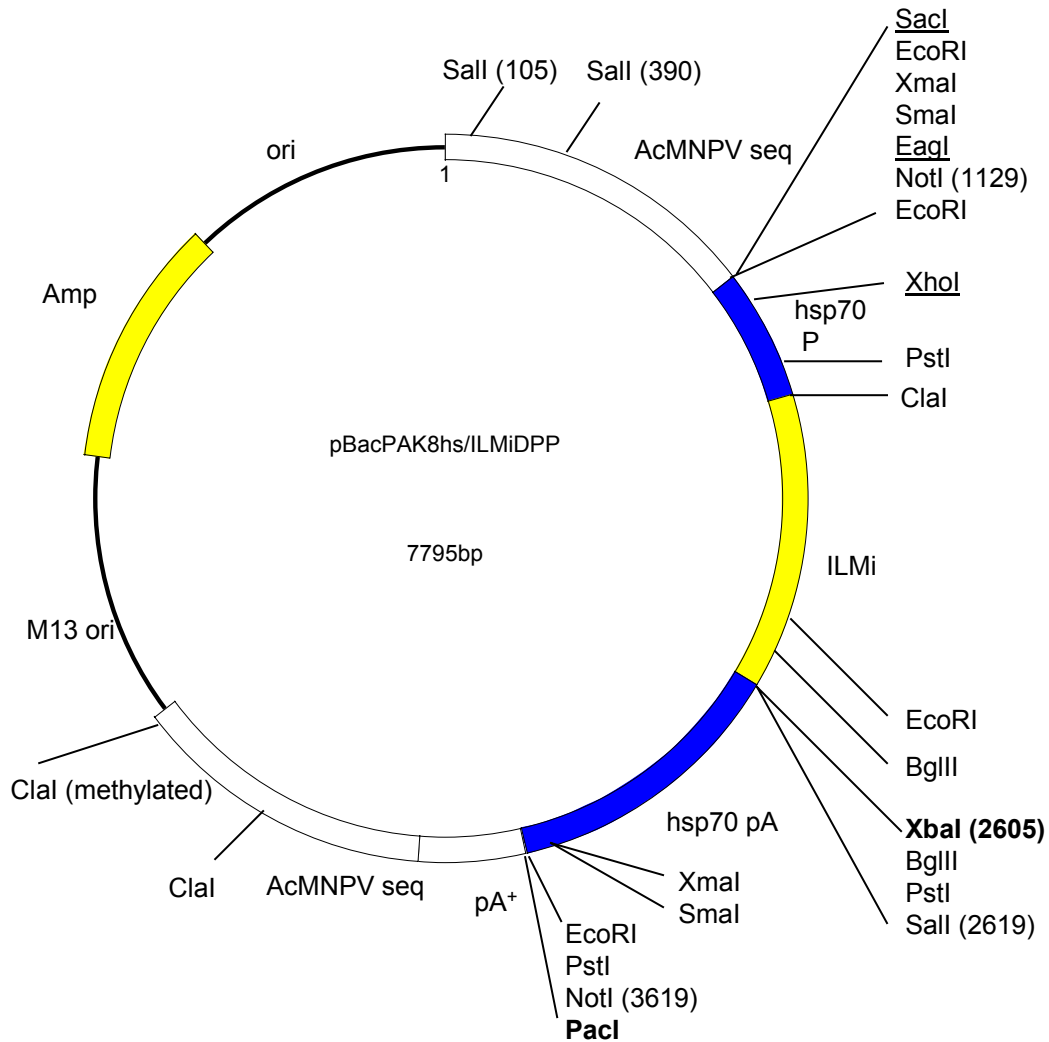
\*\*\* Υπογραμμισμένα παριστάνονται τα ένζυμα περιορισμού για τα οποία δεν είναι γνωστό αν έχουν μοναδική θέση αναγνώρισης στην κατασκευή.



Το πλασμιδίο **pBacPAK8hs/ILMi** προέκυψε από την κλωνοποίηση της κασέτας hsp70P-ILMi-hsp70pA στον φορέα pBacPAK8 (Clontech). Ο συγκεκριμένος φορέας φέρει εκατέρωθεν της περιοχής κλωνοποίησης γονιδίων (MCS) αλληλουχίες, οι οποίες ανασυνδυάζονται με γραμμοποιημένο ιό AcMPV σε κύτταρα του ξενιστή. Η κωδική περιοχή της τρανσποζάσης υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *hsp 70* της *Drosophila melanogaster* και του σήματος πολυαδενυλίωσης του ίδιου γονιδίου υποκλωνοποιήθηκε ως θραύσμα με άκρα *NotI* από το πλασμιδίο pHSS6hslILMi20 (Klinakis et al., 2000a) στη θέση *NotI* του φορέα pBacPAK8 (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.

\*\* Υπογραμμισμένα παριστάνονται τα ένζυμα περιορισμού για τα οποία δεν είναι γνωστό αν έχουν μοναδική θέση αναγνώρισης στην κατασκευή.



Το πλασμίδιο **pBacPAK8hs/ILMiDPP** προέκυψε από το πλασμίδιο pBacPAK8hs/ILMi (Παράρτημα X) με την αφαίρεση θραύσματος DNA που φέρει τον υποκινητή του γονιδίου της πολυεδρίνης. Ο υποκινητής αφαιρέθηκε ως *EcoRV-KpnI* blunted κομμάτι. Ο συγκεκριμένος φορέας φέρει εκατέρωθεν της περιοχής κλωνοποίησης γονιδίων (MCS), αλληλουχίες οι οποίες ανασυνδυάζονται με γραμμοποιημένο ιό AcMPV σε κύτταρα του ξενιστή. Η κωδική περιοχή της τρανσποζάσης είναι υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *hsp 70* της *Drosophila melanogaster* και του σήματος πολυαδενυλίωσης του ίδιου γονιδίου.

\* 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.

\*\* Υπογραμμισμένα παριστάνονται τα ένζυμα περιορισμού για τα οποία δεν είναι γνωστό αν έχουν μοναδική θέση αναγνώρισης στην κατασκευή.

## ***BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ***

Aarts, M. G., Dirkse, W. G., Stiekema, W. J., and Pereira, A. (1993). Transposon tagging of a male sterility gene in *Arabidopsis*. *Nature* 363, 715-717.

Allen, J. D., and Berns, A. (1996). Complementation tagging of cooperating oncogenes in knockout mice. *Semin Cancer Biol* 7, 299-306.

Allen, N. D., Cran, D. G., Barton, S. C., Hettle, S., Reik, W., and Surani, M. A. (1988). Transgenes as probes for active chromosomal domains in mouse development. *Nature* 333, 852-855.

Anderson, K. V. (2000). Finding the genes that direct mammalian development : ENU mutagenesis in the mouse. *Trends Genet* 16, 99-102.

Arca, B., Zabalou, S., Loukeris, T. G., and Savakis, C. (1997). Mobilization of a Minos transposon in *Drosophila melanogaster* chromosomes and chromatid repair by heteroduplex formation. *Genetics* 145, 267-279.

Barsoum, J., Brown, R., McKee, M., and Boyce, F. M. (1997). Efficient transduction of mammalian cells by a recombinant baculovirus having the vesicular stomatitis virus G glycoprotein. *Hum Gene Ther* 8, 2011-2018.

Beall, E. L., Admon, A., and Rio, D. C. (1994). A *Drosophila* protein homologous to the human p70 Ku autoimmune antigen interacts with the P transposable element inverted repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12681-12685.

Beall, E. L., and Rio, D. C. (1996). *Drosophila* IRBP/Ku p70 corresponds to the mutagen-sensitive mus309 gene and is involved in P-element excision in vivo. *Genes Dev* 10, 921-933.

Bellen, H. J., O'Kane, C. J., Wilson, C., Grossniklaus, U., Pearson, R. K., and Gehring, W. J. (1989). P-element-mediated enhancer detection: a versatile method to study development in *Drosophila*. *Genes Dev* 3, 1288-1300.

Berns, A., Mikkers, H., Krimpenfort, P., Allen, J., Scheijen, B., and Jonkers, J. (1999). Identification and characterization of collaborating oncogenes in compound mutant mice. *Cancer Res* 59, 1773s-1777s.

Bessereau, J. L., Wright, A., Williams, D. C., Schuske, K., Davis, M. W., and Jorgensen, E. M. (2001). Mobilization of a *Drosophila* transposon in the *Caenorhabditis elegans* germ line. *Nature* 413, 70-74.

Bishop D.H.L., Entwistle P.F., Cameron I.R., Allen C.J. and Possee R.D. Field trial of genetically engineered baculovirus insecticides. In *The Release of Genetically Engineered Organisms*. Edited by Sussman M., Collins C.H., Skinner F.A. and Stewart-Tull D.E. London: Academic Press, 1988:143-179

Boyce, F. M., and Bucher, N. L. (1996). Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2348-2352.

Bradley, A. (1993). Site-directed mutagenesis in the mouse. *Recent Prog Horm Res* 48, 237-251.



Brand, A. H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.

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

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

Brusca, J., Summers, M., Couch, J., and Courtney, L. (1986). *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus efficiently enters but does not replicate in poikilothermic vertebrate cells. *Intervirology* 26, 207-222.

Caizzi, R., Caggese, C., and Pimpinelli, S. (1993). Bari-1, a new transposon-like family in *Drosophila melanogaster* with a unique heterochromatic organization. *Genetics* 133, 335-345.

Carbonell, L. F., Klowden, M. J., and Miller, L. K. (1985). Baculovirus-mediated expression of bacterial genes in dipteran and mammalian cells. *J Virol* 56, 153-160.

Carlson, C. M., Dupuy, A. J., Fritz, S., Roberg-Perez, K. J., Fletcher, C. F., and Largaespada, D. A. (2003). Transposon mutagenesis of the mouse germline. *Genetics* 165, 243-256.

Cary, L. C., Goebel, M., Corsaro, B. G., Wang, H. G., Rosen, E., and Fraser, M. J. (1989). Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology* 172, 156-169.

Catteruccia, F., Nolan, T., Blass, C., Muller, H. M., Crisanti, A., Kafatos, F. C., and Loukeris, T. G. (2000a). Toward *Anopheles* transformation: Mimos element activity in anopheline cells and embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2157-2162.

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

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., and Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.

Chomet P.S. Transposon Tagging with Mutator. In *The Maize Handbook*. Edited by Freeling M. and Walbot V. New York: Springer, 1996:243-248.

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

Coates, C. J., Turney, C. L., Frommer, M., O'Brochta, D. A., and Atkinson, P. W. (1997). Interplasmid transposition of the mariner transposable element in non-drosophilid insects. *Mol Gen Genet* 253, 728-733.

Collins, J., Forbes, E., and Anderson, P. (1989). The Tc3 family of transposable genetic elements in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 121, 47-55.

Colloms, S. D., van Luenen, H. G., and Plasterk, R. H. (1994). DNA binding activities of the *Caenorhabditis elegans* Tc3 transposase. *Nucleic Acids Res* 22, 5548-5554.

Condreay, J. P., Witherspoon, S. M., Clay, W. C., and Kost, T. A. (1999). Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 127-132.

Cooley, L., Kelley, R., and Spradling, A. (1988). Insertional mutagenesis of the *Drosophila* genome with single P elements. *Science* 239, 1121-1128.

Davidson, A. E., Balciunas, D., Mohn, D., Shaffer, J., Hermanson, S., Sivasubbu, S., Cliff, M. P., Hackett, P. B., and Ekker, S. C. (2003). Efficient gene delivery and gene expression in zebrafish using the Sleeping Beauty transposon. *Dev Biol* 263, 191-202.

Dellaporta S.L. and Moreno M.A. Gene tagging with *Ac/Ds* elements in maize. In *The Maize Handbook*. Edited by Freeling M. and Walbot V. New York: Springer, 1996:219-239.

Doak, T. G., Doerder, F. P., Jahn, C. L., and Herrick, G. (1994). A proposed superfamily of transposase genes: transposon-like elements in ciliated protozoa and a common "D35E" motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 942-946.

Drelich, M., Wilhelm, R., and Mous, J. (1992). Identification of amino acid residues critical for endonuclease and integration activities of HIV-1 IN protein in vitro. *Virology* 188, 459-468.

Duisit, G., Saleun, S., Douthe, S., Barsoum, J., Chadeuf, G., and Moullier, P. (1999). Baculovirus vector requires electrostatic interactions including heparan sulfate for efficient gene transfer in mammalian cells. *J Gene Med* 1, 93-102.

Dupuy, A. J., Clark, K., Carlson, C. M., Fritz, S., Davidson, A. E., Markley, K. M., Finley, K., Fletcher, C. F., Ekker, S. C., Hackett, P. B., *et al.* (2002). Mammalian germ-line transgenesis by transposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4495-4499.

Dupuy, A. J., Fritz, S., and Largaespada, D. A. (2001). Transposition and gene disruption in the male germline of the mouse. *Genesis* 30, 82-88.

Elick, T. A., Bauser, C. A., and Fraser, M. J. (1996). Excision of the piggyBac transposable element in vitro is a precise event that is enhanced by the expression of its encoded transposase. *Genetica* 98, 33-41.

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

Erhardt, A., Hassan, M., Heintges, T., and Haussinger, D. (2002). Hepatitis C virus core protein induces cell proliferation and activates ERK, JNK, and p38 MAP kinases together with the MAP kinase phosphatase MKP-1 in a HepG2 Tet-Off cell line. *Virology* 292, 272-284.

- Evans, M. J., Carlton, M. B., and Russ, A. P. (1997). Gene trapping and functional genomics. *Trends Genet* 13, 370-374.
- Fadool, J. M., Hartl, D. L., and Dowling, J. E. (1998). Transposition of the mariner element from *Drosophila mauritiana* in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5182-5186.
- Favor, J., Neuhauser-Klaus, A., and Ehling, U. H. (1991). The induction of forward and reverse specific-locus mutations and dominant cataract mutations in spermatogonia of treated strain DBA/2 mice by ethylnitrosourea. *Mutat Res* 249, 293-300.
- Fayet, O., Ramond, P., Polard, P., Prere, M. F., and Chandler, M. (1990). Functional similarities between retroviruses and the IS3 family of bacterial insertion sequences? *Mol Microbiol* 4, 1771-1777.
- Fields, S., and Sternglanz, R. (1994). The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet* 10, 286-292.
- Fischer, S. E., Wienholds, E., and Plasterk, R. H. (2001). Regulated transposition of a fish transposon in the mouse germ line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6759-6764.
- Franz, G., Loukeris, T. G., Dialektaki, G., Thompson, C. R., and Savakis, C. (1994). Mobile Minos elements from *Drosophila hydei* encode a two-exon transposase with similarity to the paired DNA-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4746-4750.
- Franz, G., and 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.
- Fraser, M. J., Ciszczon, T., Elick, T., and Bauser, C. (1996). Precise excision of TTAA-specific lepidopteran transposons piggyBac (IFP2) and tagalong (TFP3) from the baculovirus genome in cell lines from two species of Lepidoptera. *Insect Mol Biol* 5, 141-151.
- Friedrich, G., and Soriano, P. (1991). Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev* 5, 1513-1523.
- Fromont-Racine, M., Rain, J. C., and Legrain, P. (1997). Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat Genet* 16, 277-282.
- Furley, A. J., Morton, S. B., Manalo, D., Karagogeos, D., Dodd, J., and Jessell, T. M. (1990). The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth-promoting activity. *Cell* 61, 157-170.
- Garza, D., Medhora, M., Koga, A., and Hartl, D. L. (1991). Introduction of the transposable element mariner into the germline of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 128, 303-310.
- Gill, G., and Ptashne, M. (1988). Negative effect of the transcriptional activator GAL4. *Nature* 334, 721-724.

- Gonzalez-Estevéz, C., Momose, T., Gehring, W. J., and Salo, E. (2003). Transgenic planarian lines obtained by electroporation using transposon-derived vectors and an eye-specific GFP marker. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 5547-5551.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Müller, G., Hillen, W., and Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* *268*, 1766-1769.
- Grossman, G. L., Rafferty, C. S., Clayton, J. R., Stevens, T. K., Mukabayire, O., and Benedict, M. Q. (2001). Germline transformation of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, with the piggyBac transposable element. *Insect Mol Biol* *10*, 597-604.
- Gueiros-Filho, F. J., and Beverley, S. M. (1997). Trans-kingdom transposition of the *Drosophila* element mariner within the protozoan *Leishmania*. *Science* *276*, 1716-1719.
- Hacker, U., Nystedt, S., Barmchi, M. P., Horn, C., and Wimmer, E. A. (2003). piggyBac-based insertional mutagenesis in the presence of stably integrated P elements in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 7720-7725.
- Handler, A. M., and Harrell, R. A., 2nd (1999). Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the piggyBac transposon vector. *Insect Mol Biol* *8*, 449-457.
- Handler, A. M., and Harrell, R. A., 2nd (2001). Transformation of the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*, with a piggyBac vector marked with polyubiquitin-regulated GFP. *Insect Biochem Mol Biol* *31*, 199-205.
- Handler, A. M., and McCombs, S. D. (2000). The piggyBac transposon mediates germline transformation in the Oriental fruit fly and closely related elements exist in its genome. *Insect Mol Biol* *9*, 605-612.
- Handler, A. M., McCombs, S. D., Fraser, M. J., and 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*, 7520-7525.
- Harris, L. J., Baillie, D. L., and Rose, A. M. (1988). Sequence identity between an inverted repeat family of transposable elements in *Drosophila* and *Caenorhabditis*. *Nucleic Acids Res* *16*, 5991-5998.
- Hartings, H., Spilmont, C., Lazzaroni, N., Rossi, V., Salamini, F., Thompson, R. D., and Motto, M. (1991). Molecular analysis of the Bg-rbg transposable element system of *Zea mays* L. *Mol Gen Genet* *227*, 91-96.
- Hasan, M. T., Schonig, K., Berger, S., Graewe, W., and Bujard, H. (2001). Long-term, noninvasive imaging of regulated gene expression in living mice. *Genesis* *29*, 116-122.
- Hediger, M., Niessen, M., Wimmer, E. A., Dubendorfer, A., and Bopp, D. (2001). Genetic transformation of the housefly *Musca domestica* with the lepidopteran derived transposon piggyBac. *Insect Mol Biol* *10*, 113-119.

- Hehl, R., Nacken, W. K., Krause, A., Saedler, H., and Sommer, H. (1991). Structural analysis of Tam3, a transposable element from *Antirrhinum majus*, reveals homologies to the Ac element from maize. *Plant Mol Biol* 16, 369-371.
- Heinrich, J. C., Li, X., Henry, R. A., Haack, N., Stringfellow, L., Heath, A. C., and Scott, M. J. (2002). Germ-line transformation of the Australian sheep blowfly *Lucilia cuprina*. *Insect Mol Biol* 11, 1-10.
- Hentges, K., Thompson, K., and Peterson, A. (1999). The flat-top gene is required for the expansion and regionalization of the telencephalic primordium. *Development* 126, 1601-1609.
- Hicks, G. G., Shi, E. G., Li, X. M., Li, C. H., Pawlak, M., and Ruley, H. E. (1997). Functional genomics in mice by tagged sequence mutagenesis. *Nat Genet* 16, 338-344.
- Hitotsumachi, S., Carpenter, D. A., and Russell, W. L. (1985). Dose-repetition increases the mutagenic effectiveness of N-ethyl-N-nitrosourea in mouse spermatogonia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 6619-6621.
- Hofmann, C., Sandig, V., Jennings, G., Rudolph, M., Schlag, P., and Strauss, M. (1995). Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10099-10103.
- Hofmann, C., and Strauss, M. (1998). Baculovirus-mediated gene transfer in the presence of human serum or blood facilitated by inhibition of the complement system. *Gene Ther* 5, 531-536.
- Horie, K., Kuroiwa, A., Ikawa, M., Okabe, M., Kondoh, G., Matsuda, Y., and Takeda, J. (2001). Efficient chromosomal transposition of a Tc1/mariner-like transposon Sleeping Beauty in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9191-9196.
- Horn, C., Offen, N., Nystedt, S., Hacker, U., and Wimmer, E. A. (2003). piggyBac-based insertional mutagenesis and enhancer detection as a tool for functional insect genomics. *Genetics* 163, 647-661.
- Huser, A., Rudolph, M., and Hofmann, C. (2001). Incorporation of decay-accelerating factor into the baculovirus envelope generates complement-resistant gene transfer vectors. *Nat Biotechnol* 19, 451-455.
- Inouye, S., and Tsuji, F. I. (1994). Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett* 341, 277-280.
- Ivics, Z., Hackett, P. B., Plasterk, R. H., and 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., and Hackett, P. B. (1997). Repetitive elements and their genetic applications in zebrafish. *Biochem Cell Biol* 75, 507-523.

- Izsvak, Z., Ivics, Z., and Plasterk, R. H. (2000). Sleeping Beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates. *J Mol Biol* 302, 93-102.
- Jacobson, J. W., Medhora, M. M., and Hartl, D. L. (1986). Molecular structure of a somatically unstable transposable element in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 8684-8688.
- Jaenisch, R., Harbers, K., Schnieke, A., Lohler, J., Chumakov, I., Jahner, D., Grotkopp, D., and Hoffmann, E. (1983). Germline integration of moloney murine leukemia virus at the *Mov13* locus leads to recessive lethal mutation and early embryonic death. *Cell* 32, 209-216.
- Jonkers, J., and Berns, A. (1996). Retroviral insertional mutagenesis as a strategy to identify cancer genes. *Biochim Biophys Acta* 1287, 29-57.
- Justice, M. J., Carpenter, D. A., Favor, J., Neuhauser-Klaus, A., Hrabe de Angelis, M., Soewarto, D., Moser, A., Cordes, S., Miller, D., Chapman, V., *et al.* (2000). Effects of ENU dosage on mouse strains. *Mamm Genome* 11, 484-488.
- Kapetanaki M. (2001). PhD Thesis. University of Crete, Greece
- Kasarskis, A., Manova, K., and Anderson, K. V. (1998). A phenotype-based screen for embryonic lethal mutations in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7485-7490.
- Khan, E., Mack, J. P., Katz, R. A., Kulkosky, J., and Skalka, A. M. (1991). Retroviral integrase domains: DNA binding and the recognition of LTR sequences. *Nucleic Acids Res* 19, 851-860.
- Kinloch R.A., Lira S.A., Mortillo S., Schickler M., Roller R.J. and Wassarman P.M. Regulation of expression of *mZP3*, the sperm receptor gene, during mouse development. In *Molecular Basis of Morphogenesis*. Edited by Bernfield M. New York: Wiley-Liss Inc., 1993:19-33.
- King, D. P., Zhao, Y., Sangoram, A. M., Wilsbacher, L. D., Tanaka, M., Antoch, M. P., Steeves, T. D., Vitaterna, M. H., Kornhauser, J. M., Lowrey, P. L., *et al.* (1997). Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* 89, 641-653.
- Kisseberth, W. C., Brettingen, N. T., Lohse, J. K., and Sandgren, E. P. (1999). Ubiquitous expression of marker transgenes in mice and rats. *Dev Biol* 214, 128-138.
- Kistner, A., Gossen, M., Zimmermann, F., Jerecic, J., Ullmer, C., Lubbert, H., and Bujard, H. (1996). Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10933-10938.
- Klinakis, A. G., Loukeris, T. G., Pavlopoulos, A., and 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, A. G., Zagoraiou, L., Vassilatis, D. K., and Savakis, C. (2000b). Genome-wide insertional mutagenesis in human cells by the *Drosophila* mobile element Minos. *EMBO Rep* 1, 416-421.

Klinakis A. (2002). PhD Thesis. University of Crete, Greece

Kokoza, V., Ahmed, A., Wimmer, E. A., and Raikhel, A. S. (2001). Efficient transformation of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* using the piggyBac transposable element vector pBac[3xP3-EGFP afm]. *Insect Biochem Mol Biol* 31, 1137-1143.

Kothary, R., Clapoff, S., Brown, A., Campbell, R., Peterson, A., and Rossant, J. (1988). A transgene containing lacZ inserted into the dystonia locus is expressed in neural tube. *Nature* 335, 435-437.

Krysan, P. J., Young, J. C., and Sussman, M. R. (1999). T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11, 2283-2290.

Ladendorf, O., Brachmann, A., and Kamper, J. (2003). Heterologous transposition in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* 269, 395-405.

Lang, G., Wotton, D., Owen, M. J., Sewell, W. A., Brown, M. H., Mason, D. Y., Crumpton, M. J., and Kioussis, D. (1988). The structure of the human CD2 gene and its expression in transgenic mice. *Embo J* 7, 1675-1682.

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

Lee, D. F., Chen, C. C., Hsu, T. A., and Juang, J. L. (2000). A baculovirus superinfection system: efficient vehicle for gene transfer into *Drosophila* S2 cells. *J Virol* 74, 11873-11880.

Lewandoski, M. (2001). Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet* 2, 743-755.

Liang, P., and Pardee, A. B. (1995). Recent advances in differential display. *Curr Opin Immunol* 7, 274-280.

Lim, S. P., Soo, H. M., Tan, Y. H., Brenner, S., Horstmann, H., MacKenzie, J. M., Ng, M. L., Lim, S. G., and Hong, W. (2002). Inducible system in human hepatoma cell lines for hepatitis C virus production. *Virology* 303, 79-99.

Liu, C., Litscher, E. S., Mortillo, S., Sakai, Y., Kinloch, R. A., Stewart, C. L., and Wassarman, P. M. (1996). Targeted disruption of the mZP3 gene results in production of eggs lacking a zona pellucida and infertility in female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5431-5436.

Lobo, N., Li, X., Hua-Van, A., and Fraser, M. J., Jr. (2001). Mobility of the piggyBac transposon in embryos of the vectors of Dengue fever (*Aedes albopictus*) and La Crosse encephalitis (*Ae. triseriatus*). *Mol Genet Genomics* 265, 66-71.

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

- Lorenzen, M. D., Berghammer, A. J., Brown, S. J., Denell, R. E., Klingler, M., and Beeman, R. W. (2003). piggyBac-mediated germline transformation in the beetle *Tribolium castaneum*. *Insect Mol Biol* 12, 433-440.
- Loukeris, T. G., Arca, B., Livadaras, I., Dialektaki, G., and Savakis, C. (1995a). Introduction of the transposable element Minos into the germ line of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9485-9489.
- Loukeris, T. G., Livadaras, I., Arca, B., Zabalou, S., and Savakis, C. (1995b). Gene transfer into the medfly, *Ceratitis capitata*, with a *Drosophila hydei* transposable element. *Science* 270, 2002-2005.
- Loukeris T.G. (1996). PhD Thesis. University of Crete, Greece
- Luckow V., A. Cloning and expression of heterologous genes in insect cells with baculovirus vectors. In *Recombinant DNA Technology and Applications*. Edited by Procop A., Bajpai R.K. and Ho C.S. New York: McGraw-Hill Inc., 1991:97-152.
- Lukacsovich, T., Asztalos, Z., Awano, W., Baba, K., Kondo, S., Niwa, S., and Yamamoto, D. (2001). Dual-tagging gene trap of novel genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 157, 727-742.
- Luo, G., Ivics, Z., Izsvak, Z., and Bradley, A. (1998). Chromosomal transposition of a Tc1/mariner-like element in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10769-10773.
- Mandrioli, M., and Wimmer, E. A. (2003). Stable transformation of a *Mamestra brassicae* (lepidoptera) cell line with the lepidopteran-derived transposon piggyBac. *Insect Biochem Mol Biol* 33, 1-5.
- McClintock, B. (1956). Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 21, 197-216.
- McGinnis, W., Shermoen, A. W., and Beckendorf, S. K. (1983). A transposable element inserted just 5' to a *Drosophila* glue protein gene alters gene expression and chromatin structure. *Cell* 34, 75-84.
- Medhora, M., Maruyama, K., and Hartl, D. L. (1991). Molecular and functional analysis of the mariner mutator element Mos1 in *Drosophila*. *Genetics* 128, 311-318.
- Merriman, P. J., Grimes, C. D., Ambroziak, J., Hackett, D. A., Skinner, P., and Simmons, M. J. (1995). S elements: a family of Tc1-like transposons in the genome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 141, 1425-1438.
- Millar, S. E., Lader, E., Liang, L. F., and Dean, J. (1991). Oocyte-specific factors bind a conserved upstream sequence required for mouse zona pellucida promoter activity. *Mol Cell Biol* 11, 6197-6204.
- Morin, X., Daneman, R., Zavortink, M., and Chia, W. (2001). A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 15050-15055.



Mulder, M. P., Wilke, M., Langeveld, A., Wilming, L. G., Hagemeyer, A., van Drunen, E., Zwarthoff, E. C., Riegman, P. H., Deelen, W. H., van den Ouweland, A. M., and et al. (1995). Positional mapping of loci in the DiGeorge critical region at chromosome 22q11 using a new marker (D22S183). *Hum Genet* 96, 133-141.

Niwa, H., Araki, K., Kimura, S., Taniguchi, S., Wakasugi, S., and Yamamura, K. (1993). An efficient gene-trap method using poly A trap vectors and characterization of gene-trap events. *J Biochem (Tokyo)* 113, 343-349.

Nolan, T., Bower, T. M., Brown, A. E., Crisanti, A., and Catteruccia, F. (2002). piggyBac-mediated germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi* using the red fluorescent protein dsRED as a selectable marker. *J Biol Chem* 277, 8759-8762.

O'Brochta, D. A., Warren, W. D., Saville, K. J., and Atkinson, P. W. (1994). Interplasmid transposition of *Drosophila hobo* elements in non-drosophilid insects. *Mol Gen Genet* 244, 9-14.

O'Brochta, D. A., Warren, W. D., Saville, K. J., and Atkinson, P. W. (1996). Hermes, a functional non-Drosophilid insect gene vector from *Musca domestica*. *Genetics* 142, 907-914.

O'Kane, C. J., and Gehring, W. J. (1987). Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 9123-9127.

O'Reilly D.R., Miller L.K. and Luckow V.A. *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual* W.H. New York: Freeman and Co., 1992.

Pan, X., Liu, H., Clarke, J., Jones, J., Bevan, M., and Stein, L. (2003). ATIDB: *Arabidopsis thaliana* insertion database. *Nucleic Acids Res* 31, 1245-1251.

Papadopoulou N. (2003). Master's Thesis. University of Crete, Greece

Parinov, S., and Sundaresan, V. (2000). Functional genomics in *Arabidopsis*: large-scale insertional mutagenesis complements the genome sequencing project. *Curr Opin Biotechnol* 11, 157-161.

Pavlopoulos A. (1998). Master's Thesis. University of Crete, Greece

Peloquin, J. J., Thibault, S. T., Staten, R., and Miller, T. A. (2000). Germ-line transformation of pink bollworm (*Lepidoptera: gelechiidae*) mediated by the piggyBac transposable element. *Insect Mol Biol* 9, 323-333.

Perera, O. P., Harrell, I. R., and Handler, A. M. (2002). Germ-line transformation of the South American malaria vector, *Anopheles albimanus*, with a piggyBac/EGFP transposon vector is routine and highly efficient. *Insect Mol Biol* 11, 291-297.

Peter, A., Schottler, P., Werner, M., Beinert, N., Dowe, G., Burkert, P., Mourkioti, F., Dentzer, L., He, Y., Deak, P., et al. (2002). Mapping and identification of essential gene functions on the X chromosome of *Drosophila*. *EMBO Rep* 3, 34-38.

- Peters, J., Ball, S. T., and Andrews, S. J. (1986). The detection of gene mutations by electrophoresis, and their analysis. *Prog Clin Biol Res* 209B, 367-374.
- Pieroni, L., Maione, D., and La Monica, N. (2001). In vivo gene transfer in mouse skeletal muscle mediated by baculovirus vectors. *Hum Gene Ther* 12, 871-881.
- Rajewsky, K., Gu, H., Kuhn, R., Betz, U. A., Muller, W., Roes, J., and Schwenk, F. (1996). Conditional gene targeting. *J Clin Invest* 98, 600-603.
- Ramirez-Solis, R., Davis, A. C., and Bradley, A. (1993). Gene targeting in embryonic stem cells. *Methods Enzymol* 225, 855-878.
- Ramirez-Solis, R., Liu, P., and Bradley, A. (1995). Chromosome engineering in mice. *Nature* 378, 720-724.
- Raz, E., van Luenen, H. G., Schaerringer, B., Plasterk, R. H., and Driever, W. (1998). Transposition of the nematode *Caenorhabditis elegans* Tc3 element in the zebrafish *Danio rerio*. *Curr Biol* 8, 82-88.
- Rinchik, E. M., Bangham, J. W., Hunsicker, P. R., Cacheiro, N. L., Kwon, B. S., Jackson, I. J., and Russell, L. B. (1990a). Genetic and molecular analysis of chlorambucil-induced germ-line mutations in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1416-1420.
- Rinchik, E. M., and Carpenter, D. A. (1999). N-ethyl-N-nitrosourea mutagenesis of a 6- to 11-cM subregion of the Fah-Hbb interval of mouse chromosome 7: Completed testing of 4557 gametes and deletion mapping and complementation analysis of 31 mutations. *Genetics* 152, 373-383.
- Rinchik, E. M., Carpenter, D. A., and Selby, P. B. (1990b). A strategy for fine-structure functional analysis of a 6- to 11-centimorgan region of mouse chromosome 7 by high-efficiency mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 896-900.
- Rio, D. C., Laski, F. A., and Rubin, G. M. (1986). Identification and immunochemical analysis of biologically active *Drosophila* P element transposase. *Cell* 44, 21-32.
- Rorth, P. (1996). A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12418-12422.
- Rorth, P., Szabo, K., Bailey, A., Laverty, T., Rehm, J., Rubin, G. M., Weigmann, K., Milan, M., Benes, V., Ansoerge, W., and Cohen, S. M. (1998). Systematic gain-of-function genetics in *Drosophila*. *Development* 125, 1049-1057.
- Rubin, E. J., Akerley, B. J., Novik, V. N., Lampe, D. J., Husson, R. N., and Mekalanos, J. J. (1999). In vivo transposition of mariner-based elements in enteric bacteria and mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1645-1650.
- Rubin, G. M., and Spradling, A. C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 218, 348-353.

Ryo, A., Kondoh, N., Wakatsuki, T., Hada, A., Yamamoto, N., and Yamamoto, M. (1998). A method for analyzing the qualitative and quantitative aspects of gene expression: a transcriptional profile revealed for HeLa cells. *Nucleic Acids Res* 26, 2586-2592.

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

Sandig, V., Hofmann, C., Steinert, S., Jennings, G., Schlag, P., and Strauss, M. (1996). Gene transfer into hepatocytes and human liver tissue by baculovirus vectors. *Hum Gene Ther* 7, 1937-1945.

Sarkis, C., Serguera, C., Petres, S., Buchet, D., Ridet, J. L., Edelman, L., and Mallet, J. (2000). Efficient transduction of neural cells in vitro and in vivo by a baculovirus-derived vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14638-14643.

Sasakura, Y., Awazu, S., Chiba, S., and Satoh, N. (2003). Germ-line transgenesis of the Tc1/mariner superfamily transposon Minos in *Ciona intestinalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7726-7730.

Schena, M., Shalon, D., Heller, R., Chai, A., Brown, P. O., and Davis, R. W. (1996). Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10614-10619.

Scherdin, U., Rhodes, K., and Breindl, M. (1990). Transcriptionally active genome regions are preferred targets for retrovirus integration. *J Virol* 64, 907-912.

Schimenti, J., and Bucan, M. (1998). Functional genomics in the mouse: phenotype-based mutagenesis screens. *Genome Res* 8, 698-710.

Schonig, K., Schwenk, F., Rajewsky, K., and Bujard, H. (2002). Stringent doxycycline dependent control of CRE recombinase in vivo. *Nucleic Acids Res* 30, e134.

Schouten, G. J., van Luenen, H. G., Verra, N. C., Valerio, D., and Plasterk, R. H. (1998). Transposon Tc1 of the nematode *Caenorhabditis elegans* jumps in human cells. *Nucleic Acids Res* 26, 3013-3017.

Sentry, J. W., Goodwin, S. F., Milligan, C. D., Duncanson, A., Yang, M., and Kaiser, K. (1994). Reverse genetics of *Drosophila* brain structure and function. *Prog Neurobiol* 42, 299-308.

Sherman, A., Dawson, A., Mather, C., Gilhooley, H., Li, Y., Mitchell, R., Finnegan, D., and Sang, H. (1998). Transposition of the *Drosophila* element mariner into the chicken germ line. *Nat Biotechnol* 16, 1050-1053.

Shi, Y. P., Mohapatra, G., Miller, J., Hanahan, D., Lander, E., Gold, P., Pinkel, D., and Gray, J. (1997). FISH probes for mouse chromosome identification. *Genomics* 45, 42-47.

Shimizu, K., Kamba, M., Sonobe, H., Kanda, T., Klinakis, A. G., Savakis, C., and Tamura, T. (2000). Extrachromosomal transposition of the transposable element Minos occurs in embryos of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Mol Biol* 9, 277-281.

- Skarnes, W. C., Auerbach, B. A., and 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.
- Soriano, P., Gridley, T., and Jaenisch, R. (1987). Retroviruses and insertional mutagenesis in mice: proviral integration at the Mov 34 locus leads to early embryonic death. *Genes Dev* 1, 366-375.
- Soriano, P., and Jaenisch, R. (1986). Retroviruses as probes for mammalian development: allocation of cells to the somatic and germ cell lineages. *Cell* 46, 19-29.
- Spradling, A. C., and Rubin, G. M. (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* 218, 341-347.
- Spradling, A. C., Stern, D. M., Kiss, I., Roote, J., Lavery, T., and Rubin, G. M. (1995). Gene disruptions using P transposable elements: an integral component of the *Drosophila* genome project. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10824-10830.
- Springer, P. S., McCombie, W. R., Sundaresan, V., and Martienssen, R. A. (1995). Gene trap tagging of PROLIFERA, an essential MCM2-3-5-like gene in *Arabidopsis*. *Science* 268, 877-880.
- Su, H., Wang, X., and Bradley, A. (2000). Nested chromosomal deletions induced with retroviral vectors in mice. *Nat Genet* 24, 92-95.
- Sumitani, M., Yamamoto, D. S., Oishi, K., Lee, J. M., and Hatakeyama, M. (2003). Germline transformation of the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera: Symphyta), mediated by a piggyBac-derived vector. *Insect Biochem Mol Biol* 33, 449-458.
- Sundaresan, V., Springer, P., Volpe, T., Haward, S., Jones, J. D., Dean, C., Ma, H., and Martienssen, R. (1995). Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes Dev* 9, 1797-1810.
- Talbot, D., Descombes, P., and Schibler, U. (1994). The 5' flanking region of the rat LAP (C/EBP beta) gene can direct high-level, position-independent, copy number-dependent expression in multiple tissues in transgenic mice. *Nucleic Acids Res* 22, 756-766.
- Tamura, T., Thibert, C., Royer, C., Kanda, T., Abraham, E., Kamba, M., Komoto, N., Thomas, J. L., Mauchamp, B., Chavancy, G., *et al.* (2000). Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nat Biotechnol* 18, 81-84.
- Tani, H., Nishijima, M., Ushijima, H., Miyamura, T., and Matsuura, Y. (2001). Characterization of cell-surface determinants important for baculovirus infection. *Virology* 279, 343-353.
- Tay, J., and Richter, J. D. (2001). Germ cell differentiation and synaptonemal complex formation are disrupted in CPEB knockout mice. *Dev Cell* 1, 201-213.

- Tissier, A. F., Marillonnet, S., Klimyuk, V., Patel, K., Torres, M. A., Murphy, G., and Jones, J. D. (1999). Multiple independent defective suppressor-mutator transposon insertions in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics. *Plant Cell* 11, 1841-1852.
- Topol, L. Z., Marx, M., Calothy, G., and Blair, D. G. (1995). Transformation-resistant mos revertant is unable to activate MAP kinase kinase in response to v-mos or v-raf. *Cell Growth Differ* 6, 27-38.
- Tsay, Y. F., Frank, M. J., Page, T., Dean, C., and Crawford, N. M. (1993). Identification of a mobile endogenous transposon in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 260, 342-344.
- Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M. T., Bujard, H., and Hillen, W. (2000). Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7963-7968.
- van Loo, N. D., Fortunati, E., Ehlert, E., Rabelink, M., Grosveld, F., and Scholte, B. J. (2001). Baculovirus infection of nondividing mammalian cells: mechanisms of entry and nuclear transport of capsids. *J Virol* 75, 961-970.
- van Luenen, H. G., Colloms, S. D., and Plasterk, R. H. (1994). The mechanism of transposition of Tc3 in *C. elegans*. *Cell* 79, 293-301.
- van Pouderooyen, G., Ketting, R. F., Perrakis, A., Plasterk, R. H., and Sixma, T. K. (1997). Crystal structure of the specific DNA-binding domain of Tc3 transposase of *C. elegans* in complex with transposon DNA. *Embo J* 16, 6044-6054.
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science* 270, 484-487.
- Vigdal, T. J., Kaufman, C. D., Izsvak, Z., Voytas, D. F., and Ivics, Z. (2002). Common physical properties of DNA affecting target site selection of sleeping beauty and other Tc1/mariner transposable elements. *J Mol Biol* 323, 441-452.
- Vijaya, S., Steffen, D. L., and Robinson, H. L. (1986). Acceptor sites for retroviral integrations map near DNase I-hypersensitive sites in chromatin. *J Virol* 60, 683-692.
- Vlak, J. M., and Keus, R. J. (1990). Baculovirus expression vector system for production of viral vaccines. *Adv Biotechnol Processes* 14, 91-128.
- von Melchner, H., DeGregori, J. V., Rayburn, H., Reddy, S., Friedel, C., and Ruley, H. E. (1992). Selective disruption of genes expressed in totipotent embryonal stem cells. *Genes Dev* 6, 919-927.
- von Melchner, H., Reddy, S., and Ruley, H. E. (1990). Isolation of cellular promoters by using a retrovirus promoter trap. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3733-3737.
- Vos, J. C., and Plasterk, R. H. (1994). Tc1 transposase of *Caenorhabditis elegans* is an endonuclease with a bipartite DNA binding domain. *Embo J* 13, 6125-6132.

Wang, H. G., and Fraser, M. J. (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.

Wang, H. H., Fraser, M. J., and Cary, L. C. (1989). Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of TFP3 lepidopteran transposon insertions at the FP locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Gene* 81, 97-108.

Wang, W., Swevers, L., and Iatrou, K. (2000). Mariner (Mos1) transposase and genomic integration of foreign gene sequences in *Bombyx mori* cells. *Insect Mol Biol* 9, 145-155.

Warren, W. D., Atkinson, P. W., and O'Brochta, D. A. (1994). The Hermes transposable element from the house fly, *Musca domestica*, is a short inverted repeat-type element of the hobo, Ac, and Tam3 (hAT) element family. *Genet Res* 64, 87-97.

Warren, W. D., Atkinson, P. W., and O'Brochta, D. A. (1995). The Australian bushfly *Musca vetustissima* contains a sequence related to transposons of the hobo, Ac and Tam3 family. *Gene* 154, 133-134.

Wilson, C., Pearson, R. K., Bellen, H. J., O'Kane, C. J., Grossniklaus, U., and Gehring, W. J. (1989). P-element-mediated enhancer detection: an efficient method for isolating and characterizing developmentally regulated genes in *Drosophila*. *Genes Dev* 3, 1301-1313.

Woychik, R. P., Klebig, M. L., Justice, M. J., Magnuson, T. R., Avner, E. D., and Avrer, E. D. (1998). Functional genomics in the post-genome era. *Mutat Res* 400, 3-14.

Yant, S. R., Ehrhardt, A., Mikkelsen, J. G., Meuse, L., Pham, T., and Kay, M. A. (2002). Transposition from a gutless adeno-transposon vector stabilizes transgene expression in vivo. *Nat Biotechnol* 20, 999-1005.

Yant, S. R., Meuse, L., Chiu, W., Ivics, Z., Izsvak, Z., and Kay, M. A. (2000). Somatic integration and long-term transgene expression in normal and haemophilic mice using a DNA transposon system. *Nat Genet* 25, 35-41.

Yoon, H., Donoso, L. A., and Philp, N. J. (1999). Cloning of the human monocarboxylate transporter MCT3 gene: localization to chromosome 22q12.3-q13.2. *Genomics* 60, 366-370.

Yoshida, M., Yagi, T., Furuta, Y., Takayanagi, K., Kominami, R., Takeda, N., Tokunaga, T., Chiba, J., Ikawa, Y., and Aizawa, S. (1995). A new strategy of gene trapping in ES cells using 3'RACE. *Transgenic Res* 4, 277-287.

You, Y., Browning, V. L., and Schimenti, J. C. (1997). Generation of radiation-induced deletion complexes in the mouse genome using embryonic stem cells. *Methods* 13, 409-421.

Zagoraiou L. (1999). Master's Thesis. University of Crete, Greece

Zeng, Q., Tan, Y. H., and Hong, W. (1998). A single plasmid vector (pSTAR) mediating efficient tetracycline-induced gene expression. *Anal Biochem* 259, 187-194.

Zhang, H., Shinmyo, Y., Hirose, A., Mito, T., Inoue, Y., Ohuchi, H., Loukeris, T. G., Eggleston, P., and Noji, S. (2002). Extrachromosomal transposition of the transposable element Minos in embryos of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Dev Growth Differ* 44, 409-417.

Zhang, J. K., Pritchett, M. A., Lampe, D. J., Robertson, H. M., and Metcalf, W. W. (2000). In vivo transposon mutagenesis of the methanogenic archaeon *Methanosarcina acetivorans* C2A using a modified version of the insect mariner-family transposable element Himar1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9665-9670.

Zhang, L., Sankar, U., Lampe, D. J., Robertson, H. M., and Graham, F. L. (1998). The Himar1 mariner transposase cloned in a recombinant adenovirus vector is functional in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 26, 3687-3693.

Zhang, P., and Spradling, A. C. (1993). Efficient and dispersed local P element transposition from *Drosophila* females. *Genetics* 133, 361-373.

Zheng, B., Sage, M., Sheppard, E. A., Jurecic, V., and Bradley, A. (2000). Engineering mouse chromosomes with Cre-loxP: range, efficiency, and somatic applications. *Mol Cell Biol* 20, 648-655.

Zhumabekov, T., Corbella, P., Tolaini, M., and Kioussis, D. (1995). Improved version of a human CD2 minigene based vector for T cell-specific expression in transgenic mice. *J Immunol Methods* 185, 133-140.

# **ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ**