

Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Βιολογίας

Μοριακή ανάλυση της διαφορικής έκφρασης γονιδίων σε λεπιδόπτερα έντομα

Μελέτη της «αρχιτεκτονικής» του
υποκινητή του γονιδιακού ζεύγους A/B.L9
στο μεταξοσκώληκα *Bombyx mori* μέσω
ηλεκτροδιάτρησης

Τσατσαρούνος Π. Σωτήρης

Διδακτορική διατριβή

Αθήνα 2014



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Σύντομος τίτλος (Κεφαλίδας):

Ανάλυση της «αρχιτεκτονικής» υποκινητών μέσω ηλεκτροδιάτρησης

Η παρούσα Διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε υπό την επίβλεψη τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής που απαρτίζουν οι:

P. Λεκανίδου, Ομότιμη Καθηγήτρια, ΕΚΠΑ (επιβλέπουσα)

Γ. Ροδάκης, Καθηγητής, ΕΚΠΑ

L.Swevers, Ερευνητής Α', ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Και η επταμελής εξεταστική επιτροπή συμπληρώθηκε από:

Σίδερης Διαμάντης, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμ. Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Βασιλακοπούλου Διδώ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμ. Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Στραβοπόδης Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Τμ. Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Ντέντος Σκαρλάτος, Επίκουρος Καθηγητής Τμ. Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

Ευχαριστίες

Φεβ' 2009 – Δεκ' 2014: Έξι χρόνια χρειάστηκαν για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής, που πραγματοποιήθηκε στον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη της Ομότιμης Καθηγήτριας Ρ. Λεκανίδου. Έξι χρόνια, με πολλές ευχάριστες και, ευτυχώς, λιγότερες δύσκολες στιγμές για τις οποίες, όμως, αισθάνομαι πολύ τυχερός που βίωσα, ουδεμίας εξαιρουμένης. Με τη συγγραφή της διδακτορικής διατριβής, μου δίνεται η ευκαιρία να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε ανθρώπους που, ο καθένας με τον δικό του τρόπο, συνέβαλαν στην διαμόρφωση της παρούσας εργασίας.

Στο χώρο του πανεπιστημίου υπήρξαν πολλοί άνθρωποι που αφιέρωσαν αρκετό χρόνο σ' εμένα (για εμένα). Η Ομότιμη Καθηγήτρια Ρένα Λεκανίδου ήταν η πρώτη που με εμπιστεύτηκε για να συνεργαστούμε, αρχικά σε επίπεδο διπλωματικής εργασίας (προπτυχιακά) και εν συνεχεία σε μεταπτυχιακό επίπεδο, για την εκπόνηση της παρούσας διατριβής. Η επιστημονική της καθοδήγηση με βοήθησε στην οργάνωση σκέψεων, ερωτημάτων και λύσεων. Την ευχαριστώ γιατί μου έδειξε πως να γράφω απλά, κατανοητά επιστημονικά κείμενα, για τις εποικοδομητικές συμβουλές της και, γενικά, για το ενδιαφέρον της. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τα υπόλοιπα δύο μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής. Τον Καθηγητή Γιώργο Ροδάκη, για τις πολλές συζητήσεις μας που με βοήθησαν να διευρύνω τις σκέψεις μου και για την καθοριστική συμβολή του στην πορεία της διατριβής, και τον Ερευνητή Α' Luc Swevers (Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. "Δημόκριτος»), διότι όποτε χρειαζόμουν τη βοήθειά του ήταν πάντα παρών.

Μεγάλη ευγνωμοσύνη χρωστώ σε πολλούς ανθρώπους που με βοήθησαν στην ολοκλήρωση της διατριβής. Αρχικά, ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή Ζωολογίας Σκαρλάτο Ντέντο για τις συμβουλές του, την τεχνογνωσία του και που με προμήθευε με νύμφες μεταξοσκώληκα.

Επίσης, ευχαριστώ τον μεταδιδάκτορα Θανάση Βελέντζα για την βοήθειά του στα πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού.

Ιδιαίτερα, ευχαριστώ τον Άκη Παπαντώνη, γιατί με έμαθε τα «μυστικά του πάγκου» κατά τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας και στα πρώτα στάδια της διδακτορικής διατριβής, και την Λάρα Κραββαρίτη, με την οποία συζητούσαμε όλα τα προβλήματα που προέκυπταν (επιστημονικά και μη).

Οφείλω, ξεχωριστά, να ευχαριστήσω τρεις φίλους: Τον παιδικό φίλο (και βιοστατιστικό στο επάγγελμα) Κώστα Πατέρα για την βοήθειά του στην στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Την υποψήφια διδάκτορα Ελένη Κυριακού, με την οποία συμπέσαμε στο εργαστήριο και μοιραστήκαμε προβληματισμούς και λύπες, χαρές και επιτυχίες, και τον διδάκτορα Βαγγέλη Καρούση, για τη συμπαράσταση, βοήθεια και τις στιγμές που περάσαμε μέσα και έξω από το εργαστήριο.

Πάνω απ' όλα ευχαριστώ τους πολύ στενούς φίλους και την οικογένειά μου για τη στήριξή τους.

Περιεχόμενα

1 Εισαγωγή (1–38)

1.1 Το χόριο ως πρότυπο σύστημα μελέτης αναπτυξιακά ρυθμιζόμενων γονιδίων.....	1
1.2 Η ωογένεση στο λεπιδόπτερο <i>Bombyx mori</i> – ανάπτυξη ωοθυλακίων.....	2
1.3 Χοριογένεση - δομή και λειτουργία.....	4
1.4 Η πολυγονιδιακή οικογένεια του χορίου - οργάνωση και έκφραση.....	6
1.5 Χρωμοσωμική οργάνωση και εξέλιξη των γονιδίων του χορίου.	9
1.6 Μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων του χορίου.....	14
1.6.1 «Διφασικοί» υποκινητές.....	14
1.6.1.1 Cis-ρυθμιστικά στοιχεία.....	16
1.6.2 Μεταγραφικοί παράγοντες στη χοριογένεση.....	22
1.6.2.1 Η μετάβαση από τη βιτελλογένεση.....	22
1.6.2.2 Ο μεταγραφικός παράγοντας GATA1.....	25
1.6.2.3 Ο μεταγραφικός παράγοντας C/EBP.....	26
1.6.2.3.1 Οι πρωτεΐνες C/EBPγ, CbZ.....	28
1.6.2.4 «Αρχιτεκτονικοί» παράγοντες.....	29
1.6.2.4.1 Ο μεταγραφικός παράγοντας CHD1.....	30
1.6.2.4.2 Ο μεταγραφικός παράγοντας HMGA.....	32
1.7 Τεχνικές παροδικής έκφρασης γονιδίων - ηλεκτροδιάτρηση (electroporation).....	35
1.8 Στόχοι της διδακτορικής διατριβής.....	36

2 Υλικά και μέθοδοι (39–72)

2.1 Πρωτογενές βιολογικό υλικό: κύκλος ζωής & εκτροφές <i>B. Mori</i>	40
2.2 Πρωτογενές βιολογικό υλικό: ανατομίες & σταδιοποίηση.....	41
2.3 Απομόνωση ολικών νουκλεϊκών οξέων από ωοθυλάκια.....	43
2.4 Απομόνωση ρυθμιστικών στοιχείων από χρωματίνη ωοθυλακίων, επιβοηθούμενη με φορμαλδεΐδη (FAIRE).....	44
2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (συμβατική PCR).....	47
2.6 Παρασκευή φορέα κλωνοποίησης & αντίδραση τεχνητής σύνδεσης.....	51
2.7 Παρασκευή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων.....	53
2.8 Μετασηματισμός δεκτικών κυτάρων.....	54
2.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini prep)...	55
2.10 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα (midi prep).....	57
2.11 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (maxi prep).....	58
2.12 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	58
2.13 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης.....	60
2.14 Ραδιοσήμανση & χρωματογραφικός καθαρισμός τμημάτων DNA.....	61
2.15 Ανάλυση της πρωτοδιάταξης του DNA.....	66

2.16 Ανάλυση κηλίδων RNA.....	66
2.17 Μελέτες παροδικής έκφρασης μέσω ηλεκτροδιάτρησης.....	69
2.18 Στατιστική ανάλυση.....	70
3 Αποτελέσματα (73–102)	
3.1 Βελτιστοποίηση των παραμέτρων ηλεκτροδιάτρησης.....	73
3.2 Γονιδιακές κατασκευές με το γονίδιο αναφοράς <i>lacZ</i> υπό τον έλεγχο πλήρους μήκους υποκινητών διαφόρων γονιδίων του χορίου.....	76
3.2.1 Κλωνοποίηση της κασέτας έκφρασης <i>lacZ</i> στον πλασμιδιακό φορέα pUC9.....	76
3.2.2 Κλωνοποίηση του υποκινητή του γονιδιακού ζεύγους ErA/B.1.....	77
3.2.3 Κλωνοποίηση του υποκινητή του γονιδιακού ζεύγους A/B.L9.....	78
3.2.4 Κλωνοποίηση του υποκινητή του γονιδιακού ζεύγους A/B.L1.....	78
3.2.5 Κλωνοποίηση του υποκινητή του πρώιμου γονιδίου 5H4...	79
3.3 Έλεγχος της μεθόδου της ηλεκτροδιάτρησης για το σύστημα της χοριογένεσης στο μεταξοσκώληκα.....	79
3.4 Τα ζεύγη γονιδίων που ρυθμίζονται από τον ίδιο υποκινητή εκφράζονται ταυτόχρονα ή όχι;.....	84
3.5 Γονιδιακές κατασκευές με το γονίδιο αναφοράς <i>lacZ</i> υπό τον έλεγχο μεταλλαγμένων μορφών του υποκινητή pL9.....	88
3.5.1 Γονιδιακές κατασκευές με τον μεταλλαγμένο υποκινητή	88

ρL9 στη θέση πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα GATA.....	
3.5.2 Γονιδιακές κατασκευές με τον μεταλλαγμένο υποκινητή ρL9 στη θέση πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα HMGA.....	89
3.5.3 Γονιδιακές κατασκευές με μεταλλαγμένες μορφές του υποκινητή ρL9 σε θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα C/EBP.....	90
3.6 Μελέτη του ρόλου των θέσεων πρόσδεσης GATA και HMG στον υποκινητή ρL9.....	93
3.7 Μελέτη του ρόλου των θέσεων πρόσδεσης C/EBP στον υποκινητή ρL9.....	94
3.7.1 Ο ρόλος των θέσεων πρόσδεσης C/EBP1 και C/EBP2.....	99
3.7.2 Ο ρόλος των θέσεων πρόσδεσης C/EBP3 και C/EBP4.....	100
4 Συμπεράσματα – Συζήτηση (103–112)	
4.1 Η μέθοδος της ηλεκτροδιάτρησης.....	103
4.2 Ρύθμιση της έκφρασης του ενδιάμεσου γονιδιακού ζεύγους A/B.L9.....	104
4.3 Προς ένα γενικευμένο πρότυπο ρύθμισης του συστήματος της χοριογένεσης, βασιζόμενο στην αρχιτεκτονική των υποκινητών	107

Περίληψη.....	113
Summary.....	117
Βιβλιογραφία.....	121
Παράρτημα Α.....	137
Παράρτημα Β.....	145
Παράρτημα Γ.....	149
Παράρτημα Δ.....	155
Παράρτημα Ε – Βιογραφικό σημείωμα.....	157
Παράρτημα Στ - Εργασίες.....	161

1. Εισαγωγή

1.1 Το χόριο ως πρότυπο σύστημα μελέτης αναπτυξιακά ρυθμιζόμενων γονιδίων.

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, η γονιδιακή ρύθμιση περιλαμβάνει ένα αυστηρό πρόγραμμα ενεργοποίησης και καταστολής γονιδίων, στους διάφορους ιστούς, για την παραγωγή των απαραίτητων δομικών και λειτουργικών πρωτεϊνών. Η έκφραση των γονιδίων, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και διαφοροποίησης, ελέγχεται τόσο στο επίπεδο της μεταγραφής όσο και στο επίπεδο της μετάφρασης. Όσον αφορά τη μεταγραφική ενεργοποίηση, που αποτελεί κύριο θέμα της παρούσας διατριβής, εξαρτάται σε πολύ σημαντικό βαθμό από τις αλληλουχίες των υποκινητών ή/και των ενισχυτών. Αντικείμενο της Μοριακής Βιολογίας αποτελεί η ανάλυση των πολύπλοκων αυτών μηχανισμών χρησιμοποιώντας κατάλληλα συστήματα-μοντέλα.

Ο μεταξοσκώληκας *Bombyx mori*, που ανήκει στην τάξη των λεπιδοπτέρων εντόμων (οικογένεια *Bombycidae*), έχει μελετηθεί εκτενώς τις τελευταίες δεκαετίες, καθώς αποτελεί παραδοσιακά έντομο οικονομικής σημασίας. Διαδικασίες όπως η χοριογένεση, η ανοσολογική απόκριση, η παραγωγή μεταξιού, βιτελλογενίνης και πρωτεϊνών του ωοκυττάρου του *B. mori* αποτελούν ιδανικά συστήματα μελέτης γονιδιακής ρύθμισης.

Στα πλαίσια της παρούσης διδακτορικής διατριβής μελετήθηκε το σύστημα της χοριογένεσης, που αποτελεί το τελευταίο στάδιο της ωογένεσης, σε επίπεδο ρύθμισης των γονιδίων του χορίου. Συγκεκριμένα, μελέτη των ρυθμιστικών στοιχείων των γονιδίων του χορίου, τόσο σε επίπεδο υποκινητών (*cis*-στοιχεία) όσο και σε επίπεδο πρωτεϊνών (*trans*-παραγόντων), δεν έχει μόνο θεωρητικό ενδιαφέρον, αλλά παρέχει και τη

δυνατότητα πρακτικών εφαρμογών για την αντιμετώπιση βλαβερών εντόμων, χωρίς την καταστροφή άλλων οργανισμών. Τόσο η κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν το σχηματισμό του χορίου όσο και η μελέτη των υποκινητών γονιδίων του χορίου είναι πιθανό να μας δώσουν τη δυνατότητα μεταφοράς στον πληθυσμό κατάλληλων γονιδίων που θα εκφράζονται αποκλειστικά στα θηλυκά άτομα, υπό τον έλεγχο των ιστοειδικών υποκινητών, με στόχο τη διαταραχή της ωογένεσης και τη δημιουργία στείρων θηλυκών ατόμων.

1.2 Η ωογένεση στο λεπιδόπτερο *Bombyx mori* – ανάπτυξη ωοθυλακίων

Στο μεταξοσκώληκα *B. mori* η διαδικασία της ωογένεσης πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια του σταδίου της νύμφης (pupa). Ο μεταξοσκώληκας, όπως και τα περισσότερα λεπιδόπτερα, διαθέτει δύο ωοθήκες. Το πρόγραμμα ανάπτυξης τους διαρκεί περίπου 10 ημέρες και ενεργοποιείται από την ορμόνη 20 υδροξυ-εκδυσόνη, η οποία εκκρίνεται από τους προθωρακικούς αδένες της νύμφης (Legay, 1976, Swevers and Iatrou, 1992, Yamauchi, 1984). Κάθε ωοθήκη αποτελείται από τέσσερα ωοθηκάρια (ovarioles), καθένα από τα οποία περιέχει μία σειρά από αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια (follicles) διατεταγμένα ανάλογα με το βαθμό ωρίμανσής τους. Στο πρόσθιο τμήμα του ωοθηκαρίου, το γερμάριο (germarium), εντοπίζονται τα πιο ανώριμα ωοθυλάκια, ενώ στην πλευρά του ωαγωγού, όπου καταλήγουν και τα οχτώ ωοθηκάρια, βρίσκονται τα πιο ώριμα. Έτσι, κάθε ωοθυλάκιο αντιπροσωπεύει ένα διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο που απέχει αναπτυξιακά από το αμέσως διπλανό του κατά περίπου δύο ώρες (Swevers and Iatrou, 1992, Bock CG, 1986) (Εικόνα 1.1). Το ωοθυλάκιο (follicle) αποτελεί τη βασική λειτουργική μονάδα της ωογένεσης και αποτελείται από ένα ωοκύτταρο, επτά τροφικά κύτταρα (nurse cells) και μια στιβάδα ~5000 επιθηλιακών κυττάρων που τα περιβάλλουν και ονομάζονται θυλακοκύτταρα (follicular

cells). Τα διαδοχικά ωθυλάκια είναι συνεχώς συνδεδεμένα μεταξύ τους με κύτταρα του προθυλακικού ιστού μέχρι την πλήρη ανάπτυξή τους σε ώριμα αυγά.



Εικόνα 1.1: Διαδοχικά αναπτυσσόμενα ωθυλάκια ενός ωθηκαρίου, από τα προβιτελλογενετικά έως τα τελευταία χοριογενετικά στάδια. Με βέλος σημειώνεται η θέση του πρώτου χοριογενετικού ωθυλακίου.

Η ανάπτυξη των ωθυλακίων απαρτίζεται από τρεις διακριτές φάσεις: τη βιτελλογένεση, τη τελική φάση διόγκωσης και τη χοριογένεση. Κατά τη βιτελλογένεση κάθε ωκύτταρο προσλαμβάνει διάφορα θρεπτικά συστατικά από τα τροφοκύτταρα και λεκιθοπρωτεΐνες από την αιμολέμφο (Telfer, 1975). Στη φάση αυτή τα θυλακοκύτταρα αρχίζουν τη σύνθεση της βιτελλινικής μεμβράνης, που σχηματίζεται ανάμεσα σε αυτά και στο ωκύτταρο, ενώ τα τροφοκύτταρα ατροφούν (Telfer, 1975, King and Aggarwal, 1965). Ακολουθεί η τελική φάση διόγκωσης στην οποία εξαιτίας της πρόσληψης νερού ο όγκος του ωκυττάρου αυξάνεται, το σχήμα του γίνεται ελαφρά πεπλατυσμένο και το κίτρινο χρώμα γίνεται πιο αμυδρό (Telfer and Anderson, 1968). Παράλληλα, ολοκληρώνεται ο σχηματισμός της βιτελλινικής μεμβράνης. Στη φάση αυτή διευκολύνεται ο εντοπισμός του πρώτου ωθυλακίου που μπαίνει στη χοριογένεση και συμβολίζεται ως +1 (Εικόνα 1.1). Τα διαδοχικά ωριμότερα (χοριογενετικά)

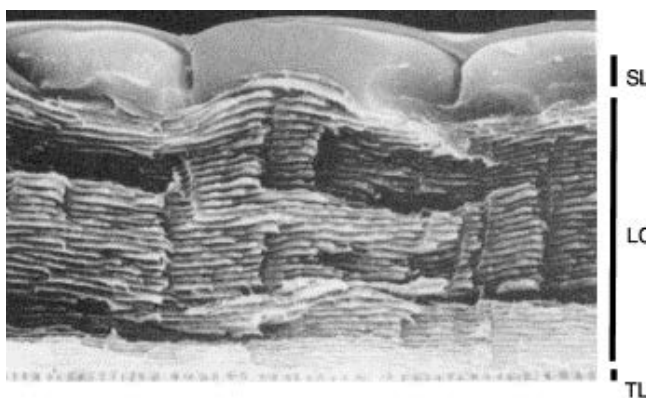
ωοθυλάκια συμβολίζονται με αυξανόμενους θετικούς αριθμούς (+2, +3,...+n), ενώ τα διαδοχικά νεότερα (βιτελλογενετικά) ωοθυλάκια με αρνητικούς αριθμούς (-1, -2,...-n, καθώς απομακρυνόμαστε από το +1). Κατά την τρίτη και τελευταία φάση της χοριογένεσης, τα θυλακοκύτταρα συνθέτουν πρωτεΐνες που εκκρίνονται στο χώρο ανάμεσα σε αυτά και στη βιτελλινική μεμβράνη, σχηματίζοντας μια συμπαγή δομή, το χόριο. Στο τέλος της χοριογένεσης, τα θυλακοκύτταρα ατροφούν και όλο το επιθήλιο μένει στο ωοθηκάριο καθώς το ώριμο, πλέον, αυγό προχωράει προς τον ωαγωγό.

Στο τέλος του σταδίου της νύμφης έχουν παραχθεί πλήθος ώριμα αυγά, έτοιμα να γονιμοποιηθούν μόλις το ώριμο θηλυκό άτομο βγει από το κουκούλι του.

1.3 Χοριογένεση - δομή και λειτουργία

Το ωοθυλάκιο του *B. mori* αποτελείται από τρεις βασικές δομές, των οποίων τα συστατικά εκκρίνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα: τη βιτελλινική μεμβράνη (<2 μm), το χόριο (20-25μm) και την εξωτερική βασική μεμβράνη (Kafatos et al., 1977, Kafatos FC, 1995, Regier et al., 1982). Το χόριο είναι μια σύνθετη εξωκυτταρική δομή πρωτεϊνικής φύσης που, μαζί με τη βιτελλινική μεμβράνη, αποτελεί το προστατευτικό κέλυφος του αυγού. Σκοπός του είναι να επιτελεί ορισμένες πολύ βασικές λειτουργίες όπως: (α) να παρέχει μηχανική προστασία στο έμβρυο μετά τη γονιμοποίηση και εναπόθεση των αυγών, (β) να το προστατεύει από την ξηρασία, εμποδίζοντας την εξάτμιση νερού και (γ) να επιτρέπει την ανταλλαγή αερίων κατά την αναπνοή, δηλαδή την είσοδο O₂ και την αποβολή CO₂. Επιπλέον, η πολύπλοκη αυτή δομή διαθέτει έναν κατάλληλο σχηματισμό, τη μικροπύλη, η οποία επιτρέπει τη διέλευση του σπέρματος για τη γονιμοποίηση του ωαρίου και τέλος, παρά την ανθεκτικότητά της, επιτρέπει την εκκόλαψη του εμβρύου.

Οι παραπάνω λειτουργίες εξασφαλίζονται από την ιδιαίτερη αρχιτεκτονική του χορίου που περιλαμβάνει: (α) εσωτερικά τη στυλοειδή στοιβάδα (trabecular layer), η οποία αποτελείται από χώρους με αέρα που διαχωρίζονται από κάθετους στηλίσκους, και (β) εξωτερικά, την αρκετά λεπτότερη ελασματοειδή στοιβάδα (lamellate layer), που συγκροτείται από αλλεπάλληλα στρώματα ινιδίων (ελάσματα), διατεταγμένα ελικοειδώς μεταξύ τους και παράλληλα με την επιφάνεια του ωκυττάρου (Kafatos et al., 1977, Mazur et al., 1989) (Εικόνα 1.2). Το στρώμα αυτό διαπερνάται από κάθετα κανάλια, τις αεροπύλες, ενώ στον ένα πόλο του χορίου βρίσκεται μια οπή που αποτελεί τη μικροπύλη.



Εικόνα 1.2: Φωτογραφία εγκάρσιας τομής ωθυλακίου *Bombyx* από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Διακρίνονται οι στοιβάδες της υπερμοριακής δομής του χορίου: trabecular (TL), lamellate (LC), στιβάδα θυλακοκυττάρων (SL) [από (Kafatos et al., 1977)].

Η βασική αυτή δομή, εντούτοις, μπορεί να παρουσιάζει σημαντικές διαφορές, ανάμεσα στα διάφορα είδη λεπιδοπτέρων, ανάλογα με τη φυσιολογία του κάθε εντόμου και τις απαιτήσεις του περιβάλλοντος στο οποίο αναπαράγεται. Έτσι, το χόριο του *Bombyx* περιέχει 15–20 πρόσθετα εξωτερικά ελάσματα που αποτελούνται από πρωτεΐνες πλούσιες σε κυστεΐνη (High cysteine, Hc). Το συμπαγές αυτό εξωτερικό στρώμα, που δημιουργείται στα όψιμα στάδια της χοριογένεσης, είναι

χαρακτηριστικό των ειδών που τα αυγά τους πέφτουν σε διάπαυση και αποσκοπεί στην προστασία και επιβίωση του εμβρύου κατά τη διάρκεια του χειμώνα (Kafatos et al., 1977). Σε είδη που δεν πέφτουν σε διάπαυση, όπως είναι οι *Antheraea polyphemus* και *Antheraea pernyi*, το στρώμα αυτό απουσιάζει.

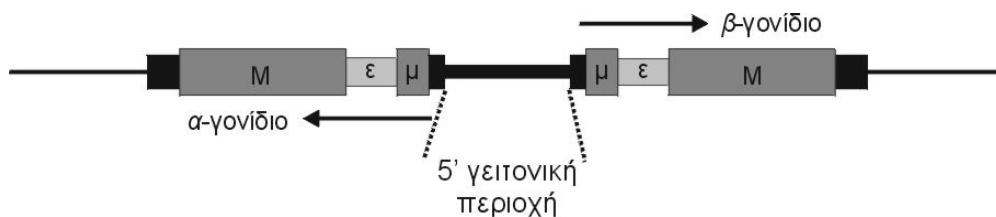
1.4 Η πολυγονιδιακή οικογένεια του χορίου - οργάνωση και έκφραση

Για κάθε ωοθυλάκιο η χοριογένεση διαρκεί περίπου δυο μέρες και κατά τη διάρκειά της τα θυλακοκύτταρα εμφανίζουν το μέγιστο της πρωτεϊνοσυνθετικής και εκκριτικής τους ικανότητας. Η συγκρότηση της δομής του χορίου γίνεται σταδιακά με βάση ένα συγκεκριμένο αναπτυξιακό πρόγραμμα. Ανάλογα με τη χρονική περίοδο σύνθεσης - αρχή, μέσο ή τέλος της χοριογένεσης- οι πρωτεΐνες του χορίου χαρακτηρίζονται συμβατικά ως πρώιμες (early), ενδιάμεσες (middle) ή όψιμες (late) αντίστοιχα. Οι πρώιμες πρωτεΐνες πιστεύεται ότι συμμετέχουν στο σχηματισμό του αρχικού δικτύου του χορίου (Kafatos et al., 1977), οι ενδιάμεσες στην επέκταση και συμπύκνωσή του (Bock CG, 1986, Mazur et al., 1989), ενώ οι όψιμες, που είναι πρωτεΐνες πλούσιες σε κυστεΐνη, συμβάλλουν στη διασύνδεση όλων των πρωτεϊνών μεταξύ τους και στο σχηματισμό της αδιάβροχης εξωτερική στοιβάδας (Kafatos et al., 1977).

Στο μεταξοσκώληκα *Bombyx mori* οι πρωτεΐνες του χορίου κωδικοποιούνται από περισσότερα από 100 γονίδια τα οποία συγκροτούν μία πολυγονιδιακή οικογένεια. Με βάση το βαθμό ομοιότητας της αμινοξικής αλληλουχίας των παραγόμενων πρωτεϊνών, τα γονίδια του χορίου διακρίνονται σε δύο τύπους α - και β -. Τα α -τύπου γονίδια περιλαμβάνουν τις οικογένειες ErA, A και HcA, ενώ τα β - τις οικογένειες ErB, B και HcB (Lecanidou et al., 1986, Hibner et al., 1988). Περαιτέρω διάκριση αυτών των τύπων γονιδίων σε υποοικογένειες γίνεται βάσει

αφενός της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας και αφετέρου της χρονικής περιόδου κατά την οποία εκφράζονται (Εικόνα 1.6).

Κατά κανόνα, τα α και β γονίδια της ίδιας αναπτυξιακής εξειδίκευσης οργανώνονται σε ζεύγη με αντιπαράλληλη κατεύθυνση μεταγραφής και κοινή 5' ρυθμιστική περιοχή, μήκους 250 bp κατά μέσο όρο (Jones and Kafatos, 1980, Iatrou and Tsilou, 1983, Spoerel et al., 1986, Eickbush and Burke, 1986, Eickbush, 1995) (Εικόνα 1.3). Ορισμένα, όμως, πρώιμα γονίδια αποτελούν εξαίρεση στη βασική οργάνωση των γονιδίων του χορίου, καθώς είναι αζευγάρωτα και η 5' ρυθμιστική τους περιοχή δεν οριοθετείται σαφώς (στο 5' άκρο της). Πρόκειται για ένα γονίδιο που αντιστοιχεί στο cDNA κλώνο m5H4, δύο γονίδια που αντιστοιχούν στον m2G12 (Hibner et al., 1991) και τρία στον m6F6 (Lecanidou and Rodakis, 1992, Kravariti et al., 1995).



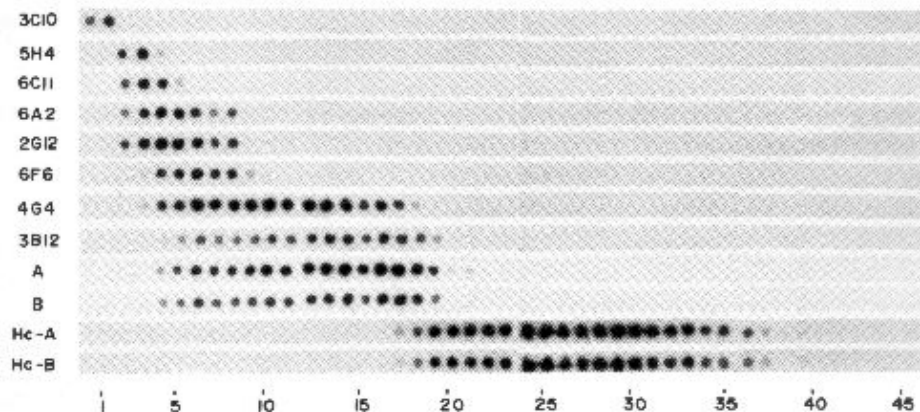
Εικόνα 1.3: Σχηματική αναπαράσταση ενός τυπικού ζεύγους γονιδίων του χορίου. Διακρίνονται οι 5' και 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές (**μαύρα πλαίσια**), το μικρό (**μ**) και μεγάλο (**M**) εξώνιο, το εσώνιο (**ε**) και η 5' ενδιάμεση περιοχή. Τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση μεταγραφής των γονιδίων (από Διδακτορική Διατριβή Ε. Κραββαρίτη).

Όλα τα γονίδια του χορίου αποτελούνται από δύο εξώνια, το μικρό και το μεγάλο, και ένα εσώνιο (Εικόνα 1.3). Το μικρό εξώνιο κωδικοποιεί το μεγαλύτερο μέρος του πεπτιδίου οδηγητή, το οποίο χρειάζεται για την έκκριση των πρωτεϊνών, ενώ το μεγάλο εξώνιο κωδικοποιεί κυρίως τη δομική πρωτεΐνη. Στην ώριμη πρωτεΐνη διακρίνονται τρία τμήματα: αμινικός βραχίονας, κεντρική περιοχή και

καρβοξυλικός βραχίονας. Η κεντρική περιοχή παρουσιάζει μεγάλη συντηρητικότητα μεταξύ των γονιδίων κάθε κλάδου και αποτελεί κριτήριο για την κατάταξή τους σε α - ή β - τύπου οικογένεια. Αντίθετα οι βραχίονες ποικίλλουν σημαντικά ανάμεσα στα μέλη τόσο ίδιων όσο και διαφορετικών οικογενειών. Σύμφωνα με ένα πιθανό μοντέλο, οι κεντρικές περιοχές των α και β πρωτεϊνών αλληλεπιδρούν για να σχηματίσουν τον πυρήνα των ινιδίων του χορίου, ενώ οι βραχίονες συμμετέχουν στη σύνδεση και οργάνωση των διαφορετικών ινιδίων (Kafatos et al., 1985).

Τα πρώιμα γονίδια των οικογενειών ErA/ErB εκφράζονται στα στάδια +1 έως +9 (Kafatos et al., 1977, Regier et al., 1982, Lecanidou et al., 1983, Hibner et al., 1988, Lecanidou et al., 1986, Hibner et al., 1991). Τα ενδιάμεσα γονίδια των οικογενειών A/B εκφράζονται κατά ομάδες, σε μια εκτεταμένη χρονική περίοδο. Ανάλογα με το αναπτυξιακό πρότυπο της έκφρασής τους διακρίνουμε επιμέρους υποοικογένειες: (α) τα γονίδια της υποοικογένειας A/B.E, που εκφράζονται στα στάδια +3 έως +16 (Eickbush, 1995), (β) τα γονίδια της υποοικογένειας A/B.L12-τύπου (πρώιμα-ενδιάμεσα, early-middle), που εκφράζονται στα στάδια +6 ως +24 και (γ) τα γονίδια της υποοικογένειας A/B.L11-τύπου (ενδιάμεσα-όψιμα, middle-late), που εκφράζονται στα στάδια +16 ως +28 (Sproerel et al., 1986, Sproerel et al., 1989, Eickbush, 1995). Τέλος, τα όψιμα γονίδια των οικογενειών HcA/HcB εκφράζονται στο τέλος της χοριογένεσης (στάδια +23 ως +40) (Iatrou and Tsitilou, 1983, Rodakis et al., 1984, Eickbush et al., 1985). Η συσχέτιση των γονιδίων του χορίου με τα αναπτυξιακά στάδια της χοριογένεσης φαίνεται από τη συσσώρευση των αντίστοιχων mRNAs στα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια (Sproerel et al., 1986, Eickbush et al., 1985) (Εικόνα 1.4). Ωστόσο, πρέπει να τονιστεί ότι η αρίθμηση των ωοθυλακίων, στα οποία παρατηρείται η έκφραση των γονιδίων του χορίου, είναι ενδεικτική, καθώς εξαρτάται από τον συνολικό αριθμό

χοριογενετικών ωοθυλακίων του ωοθηκαρίου και το ακριβές στάδιο της νύμφης κατά το οποίο πραγματοποιήθηκε ανατομία.



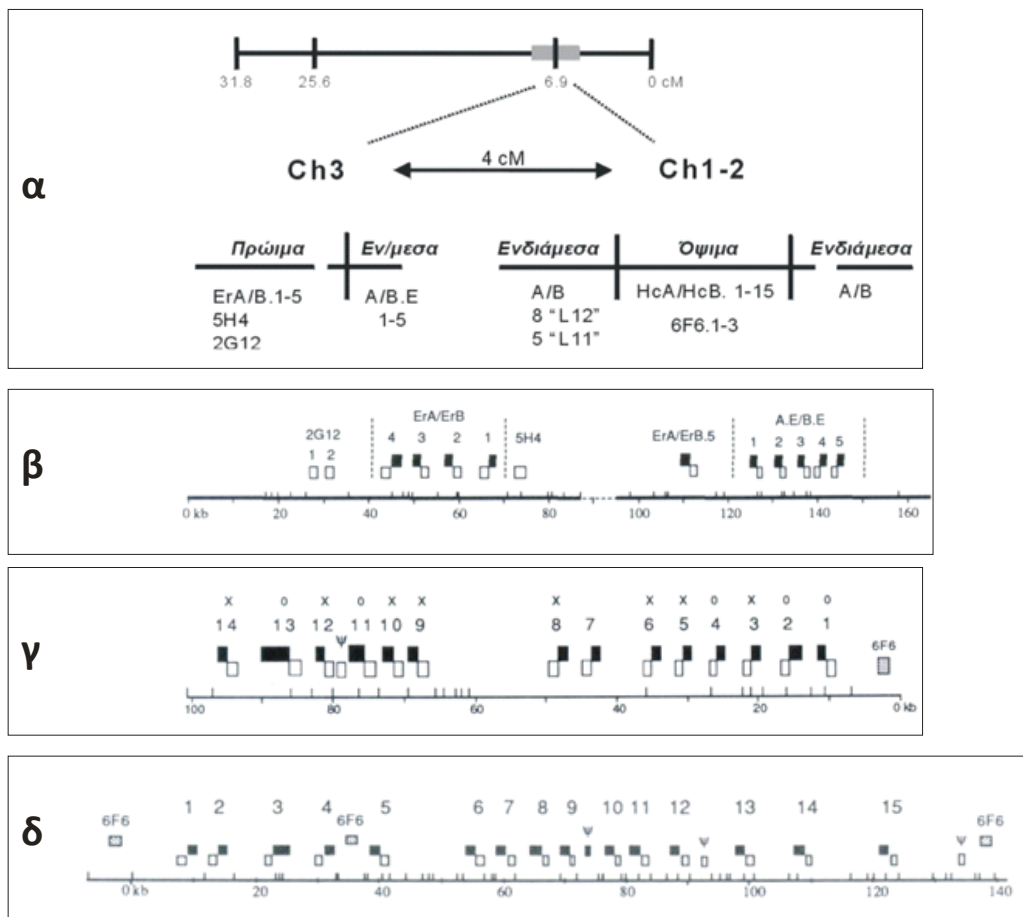
Εικόνα 1.4: Ανάλυση κηλίδων RNA από ωοθυλάκια διαδοχικών αναπτυξιακών σταδίων της χοριογένεσης (θέσεις +1 έως +48) ενός ωοθηκαρίου. Κάθε κηλίδα περιέχει ολικά νουκλεϊκά οξέα από ένα ωοθυλάκιο. Ως ανιχνευτές για κάθε υβριδοποίηση χρησιμοποιήθηκαν cDNA κλώνοι που αντιστοιχούν σε πλώιμα (5H4, 6C11, 6A2, 2G12, 6F6), ενδιάμεσα (4G4, 3B12, A-m2774, B-m1602) και όψιμα (HcA-m1911, HcB-m2574) γονίδια [από (Eickbush et al., 1985)].

1.5 Χρωμοσωμική οργάνωση και εξέλιξη των γονιδίων του χορίου

Τα γονίδια του χορίου εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 2 και αρχικά είχε θεωρηθεί ότι είναι οργανωμένα σε δύο γενετικούς τόπους, Ch1-2 και Ch3, οι οποίοι απείχαν μεταξύ τους περίπου τέσσερις χαρτογραφικές μονάδες (Goldsmith, 1989). Ωστόσο, με την ολοκλήρωση της αλληλούχισης του γονιδιώματος του *B.mori* αποκαλύφθηκε ότι όλα τα μέλη της οικογένειας των γονιδίων του χορίου βρίσκονται σε έναν ενιαίο γενετικό τόπο (Mita et al., 2004, Xia et al., 2004, The International Silkworm Genome Consortium, 2008). Εντούτοις, δεν θεωρείται ότι έχει αλλάξει η διάταξη των γονιδίων του χορίου, όπως περιγράφεται στη συνέχεια. Συγκεκριμένα, είχε βρεθεί ότι ο γενετικός τόπος Ch3 αποτελείται από δύο χρωμοσωμικά τμήματα 85 και 70 kb, που απέχουν μεταξύ τους μόλις 8 kb (Eickbush, 1995), και περιέχει τα περισσότερα

πρώιμα γονίδια (ErA/B.1–5, τα τρία αζευγάρωτα: 5H4, 2G12.1, 2G12.2) και πέντε ζεύγη των ενδιάμεσων γονιδίων A/B.E1–5 (Hibner et al., 1991, Eickbush, 1995) (εικόνα 1.5.α και 1.5.β). Όσον αφορά τον γενετικό τόπο Ch1-2, είχε βρεθεί ότι αποτελείται από δύο τμήματα μήκους 270 και 50 kb και περιέχει τα υπόλοιπα ενδιάμεσα γονίδια, τα όψιμα και τρία αντίγραφα του πρώιμου 6F6 γονιδίου (εικόνα 1.5.γ και 1.5.δ). Στο μεγάλο χρωμοσωμικό τμήμα και σε μία περιοχή μήκους 140 kb εντοπίζονται 15 ζεύγη όψιμων γονιδίων (εικόνα 1.5.δ). Τα τέσσερα ζεύγη γονιδίων (HcA/B.1–4), δεξιά της χρωμοσωμικής περιοχής, εμφανίζουν αντίθετο προσανατολισμό εν συγκρίσει με τα υπόλοιπα ζεύγη όψιμων γονιδίων. Τρία ψευδογονίδια εντοπίζονται διάσπαρτα ανάμεσά τους. Δύο από αυτά είναι β-τύπου και φαίνεται να είναι μεταγραφικά ενεργά, αλλά δεν παράγουν λειτουργική πρωτεΐνη, λόγω αλλαγών στο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (Fotaki and Iatrou, 1988, Fotaki and Iatrou, 1993). Το τρίτο ψευδογονίδιο αντιστοιχεί σε τμήμα ενός HcA γονιδίου (Burke and Eickbush, 1986). Η περιοχή των όψιμων γονιδίων διακόπτεται από τα τρία αντίγραφα του πρώιμου 6F6 γονιδίου (6F6.1, 6F6.2, 6F6.3), τα οποία είναι β-τύπου (Eickbush et al., 1985, Lecanidou and Rodakis, 1992, Kravariti et al., 1995). Τα 6F6.1 και 6F6.3 γειτνιάζουν με ένα α-τύπου γονίδιο, αλλά δεν αποτελούν τυπικό ζεύγος, δηλαδή δεν μοιράζονται την ίδια 5' γειτονική περιοχή. Είναι αξιοσημείωτο ότι και τα τρία 6F6 έχουν αντίθετη πολικότητα από τα γειτονικά ζεύγη γονιδίων, γεγονός που σημαίνει ότι τόσο η ύπαρξή τους στη συγκεκριμένη περιοχή όσο και ο προσανατολισμός τους οφείλονται σε φαινόμενα γενετικών ανακατατάξεων (Kravariti et al., 1995). Για την ακρίβεια, έχει προταθεί μια υπόθεση, που περιλαμβάνει δύο γεγονότα διπλασιασμού και μιας αναστροφής, για να εξηγήσει τον πολλαπλασιασμό και τη διασπορά του 6F6 γονιδίου στο γενετικό τόπο των όψιμων γονιδίων (Kravariti et al., 1995). Όσον αφορά στα ενδιάμεσα γονίδια, το μεγαλύτερο ποσοστό τους εντοπίζεται αριστερά των όψιμων, σε μία περιοχή μήκους 100 kb (εικόνα

1.5.γ), και στην περιοχή των 50 kb του Ch1-2. Το τμήμα των 100 kb περιέχει 5 ζεύγη ενδιάμεσων γονιδίων L11-τύπου (L1, L2, L4, L11, L13) και 8 ζεύγη πρώιμων-ενδιάμεσων L12-τύπου (L3, L5, L6, L8, L9, L10, L12, L14). Τα L12 και L11- τύπου γονίδια βρίσκονται διάσπαρτα μέσα στην περιοχή και ανάμεσά τους υπάρχει ένα ψευδογονίδιο α -τύπου (Eickbush, 1995, Spoerel et al., 1986).



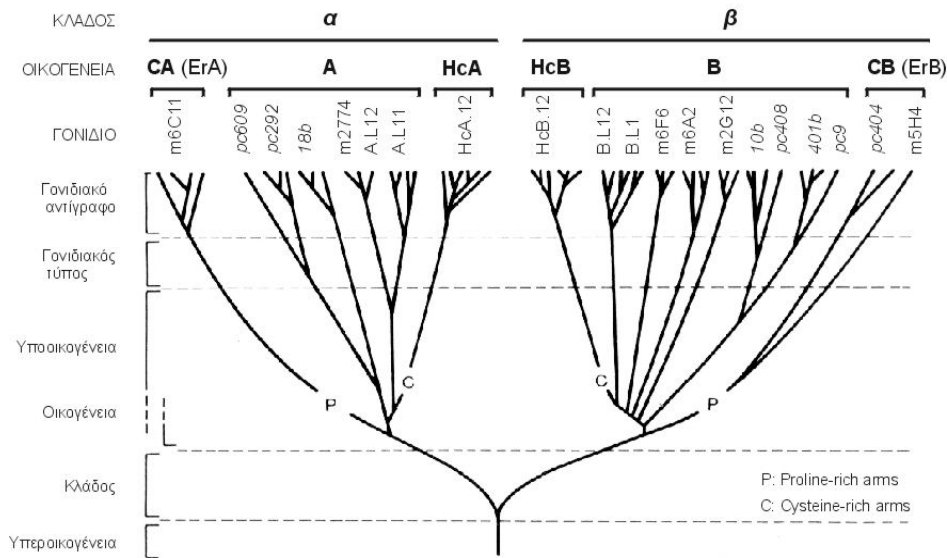
Εικόνα 1.5: Σχηματική αναπαράσταση του γενετικού τόπου των γονιδίων του χορίου (τα άσπρα κουτιά αντιστοιχούν στα β -τύπου γονίδια, ενώ τα μαύρα στα α -τύπου). **(α)** γενετικός χάρτης του χρωμοσώματος 2. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε γενετικές αποστάσεις σε centiMorgans (cM), για ορισμένους γενετικούς δείκτες. Η θέση των χρωμοσωμικών περιοχών Ch1-2 και Ch3 σημειώνεται με πλαίσιο. Με οριζόντιες γραμμές σημειώνονται τα χρωμοσωμικά τμήματα που έχουν κλωνοποιηθεί και τα γονίδια που εντοπίζονται στο καθένα. **(β)** Οργάνωση

των γονιδίων του γενετικού τόπου Ch3. Η διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στη μη κλωνοποιημένη περιοχή (8 kb). Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε kb και δείχνουν αποστάσεις, όπως έχουν προκύψει με πέψεις περιοριστικών ενδονουκλεασών. Οι κάθετες γραμμές παρουσιάζουν τις θέσεις αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *EcoRI*. Τα γονίδια συμβολίζονται με κουτιά. Το 5H4 και τα δύο 2G12 γονίδια είναι αζευγάρωτα. (**γ**) Οργάνωση των A/B ενδιάμεσων γονιδίων στην περιοχή των 100 kb, αριστερά από την περιοχή των όψιμων γονιδίων. Η ένδειξη 0 kb αντιστοιχεί στην ίδια θέση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *EcoRI* της εικόνας δ. Τα γονίδια του χορίου και τα ψευδογονίδια (ψ) συμβολίζονται με κουτιά (το γκρι κουτί συμβολίζει το 6F6.1 γονίδιο). Τα σύμβολα α και β αντιστοιχούν στα ενδιάμεσα γονίδια L11 και L12-τύπου. (**δ**) Οργάνωση των όψιμων ζευγών γονιδίων HcA/B στη χρωμοσωμική περιοχή των 140 kb. Ανάμεσα στα ζεύγη των όψιμων γονιδίων εντοπίζονται διάσπαρτα τρία ψευδογονίδια (ψ) και αζευγάρωτα 6F6 γονίδια (γκρι κουτιά)(Lecanidou and Rodakis, 1992, Kravariti et al., 1995) [εικόνα από (Eickbush, 1995)].

Τα μέλη της πολυγονιδιακής οικογένειας του χορίου φαίνεται να έχουν προέλθει από έναν κοινό πρόγονο, ο οποίος τοποθετείται ανάμεσα στις αλληλουχίες του α - και β - τύπου γονιδίων. Διπλασιασμός του προγονικού γονιδίου οδήγησε στο σχηματισμό των αρχικών α και β γονιδίων, τα οποία αφού απέκτησαν τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους διπλασιάστηκαν, επεκτάθηκαν και διαφοροποιήθηκαν παράλληλα, οδηγώντας στις σημερινές οικογένειες και υποοικογένειες (Lecanidou et al., 1986). Είναι πιθανόν τα πρώιμα γονίδια (ErA και ErB) να συνιστούν τις αρχαιότερες οικογένειες, ενώ τα όψιμα (HcA και HcB) τις πιο πρόσφατες, καθώς υπάρχουν μόνο στο *Bombyx* (Lecanidou et al., 1986). Κάποιες οικογένειες και υποοικογένειες των ενδιάμεσων γονιδίων εμφανίζονται τόσο στο *B. mori* όσο και στον *A. polyphemus* (Kafatos et al., 1987), άρα πρέπει να δημιουργήθηκαν πριν από το διαχωρισμό των *Saturniidae* από τα *Bombycidae*, δηλαδή πριν 50 εκατομμύρια χρόνια. Τα γονιδιακά

αντίγραφα μέσα σε κάθε υποοικογένεια πρέπει να εμφανίστηκαν πολύ αργότερα με συνεχείς διπλασιασμούς γονιδίων (Lecanidou et al., 1986).

Ένα χαρακτηριστικό των γονιδίων του χορίου είναι ότι οι γονιδιακοί διπλασιασμοί δεν συνοδεύονται από απόκλιση στην αλληλουχία των αντιγράφων, αλλά οδηγούν στη δημιουργία ομάδων γονιδίων με πολύ μεγάλη ομολογία μεταξύ τους μέσω γονιδιακής σύγκλισης (gene conversion). Συγκρίσεις ανάμεσα στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των γονιδίων του χορίου καθώς και πειράματα υβριδισμών με διαφορετικά κριτήρια έδειξαν ότι, με εξαίρεση την οικογένεια των ErB γονιδίων, τα ποσοστά ομοιότητας ανάμεσα στα μέλη κάθε μιας από τις υπόλοιπες οικογένειες (HcA, HcB, A, B και ErA) είναι πολύ υψηλά. Βέβαια, η έκταση και ο βαθμός ομοιότητας των γονιδίων είναι διαφορετικά για κάθε οικογένεια. Για παράδειγμα, τα HcA και HcB γονίδια εμφανίζουν εξαιρετικά υψηλά ποσοστά νουκλεοτιδικής ταυτότητας σε όλο το μήκος των α/β ζευγών γονιδίων, συμπεριλαμβάνοντας κωδικές και μη κωδικές περιοχές (Burke and Eickbush, 1986). Στην περίπτωση των A/B οικογενειών υπάρχει η τάση τα γεγονότα γονιδιακής σύγκλισης να συμβαίνουν κυρίως ανάμεσα σε μέλη της ίδιας υποοικογένειας και εκτείνονται και στις γειτονικές περιοχές των γονιδίων. Κάποια γεγονότα που συμβαίνουν ανάμεσα σε γονίδια διαφορετικών υποοικογενειών περιορίζονται στην περιοχή του μεγάλου εξωνίου (Sproerel et al., 1989). Τέλος, για τις οικογένειες ErA και ErB τέτοια γεγονότα περιορίζονται αποκλειστικά στα μεγάλα εξώνια των ErA γονιδίων, τα οποία έχουν και τα μεγαλύτερα ποσοστά ομοιότητας, ενώ τόσο τα ErB γονίδια όσο και οι μη κωδικές περιοχές των πρώιμων γονιδίων είναι πολύ διαφοροποιημένα (Hibner et al., 1991).



Εικόνα 1.6: Κλαδόγραμμα που αναπαριστά το μοντέλο εξέλιξης των γονιδίων του χορίου από τον κοινό πρόγονο των α και β γονιδίων μέχρι τη δημιουργία των τριών βασικών οικογενειών CA/B, A/B, HcA/B. [από (Lecanidou et al., 1986)].

1.6 Μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων του χορίου

1.6.1 «Διφασικοί» υποκινητές

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα γονίδια α - και β - τύπου της ίδιας αναπτυξιακής εξειδίκευσης οργανώνονται σε ζεύγη, με αντιπαράλληλη κατεύθυνση μεταγραφής και κοινή 5' ρυθμιστική περιοχή (Lecanidou et al., 1986, Hibner et al., 1988, Jones and Kafatos, 1980, Spoerel et al., 1989). Η ίδια οργάνωση ζευγών γονιδίων έχει βρεθεί και σε άλλους οργανισμούς όπως στο ποντίκι, στους μύκητες, *Arabidopsis thaliana*, *D. melanogaster*, *C. elegans* και στον άνθρωπο (Koyanagi et al., 2005, Wang et al., 2009, Neil et al., 2009, Lercher et al., 2003, Spellman and Rubin, 2002, Spoerel et al., 1989). Συγκεκριμένα στον άνθρωπο, έχει βρεθεί ότι κάποια γονίδια που ρυθμίζονται από «διφασικούς» υποκινητές εμπλέκονται σε διάφορες ασθένειες, όπως καρκίνο μαστού και ωθηκών (Yang et al., 2007), καρκίνο στον εγκέφαλο (Chen et al., 2009) και στην

ασθένεια Parkinson (West et al., 2003). Συνεπώς, η μελέτη του μηχανισμού με τον οποίο ένας «διφασικός» υποκινητής ρυθμίζει τη μεταγραφή είναι πολύ σημαντική.

Γενικά, το μήκος των «διφασικών» υποκινητών είναι μικρότερο από 1000 ζεύγη βάσεων και τουλάχιστον κάποιες από τις θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, που εμπεριέχονται, συμμετέχουν στη ρύθμιση των εμπλεκόμενων γονιδίων (Trinklein et al., 2004, Adachi and Lieber, 2002, Takai and Jones, 2004). Στο μεταξοσκώληκα, οι «διφασικοί» υποκινητές έχουν μήκος ~250 ζεύγη βάσεων, κατά μέσο όρο, και περιέχουν όλα τα απαραίτητα *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία για την ιστοειδική έκφραση των γονιδίων στο σωστό αναπτυξιακό στάδιο. Το συμπέρασμα αυτό διαπιστώθηκε με πειράματα *in vivo* μετασχηματισμού (μέσω P-στοιχείων) του A/BL.12 γονιδίου του *Bombyx mori* στη *Drosophila*, όπου το ενδιάμεσο χοριογενετικό γονίδιο εκφράστηκε σε υψηλά επίπεδα αποκλειστικά στα θυλακοκύτταρα των χοριογενετικών ωοθυλακίων (Mitsialis and Kafatos, 1985). Επιπλέον, εισαγωγή του ζεύγους γονιδίων HcA/B.12, μέσω του ανασυνδυασμένου ραβδοϊού BmNPV, σε λάρβες του μεταλλαγμένου στελέχους GrB, από το οποίο λείπουν όλα τα Hc γονίδια (Iatrou et al., 1980), οδήγησε στην παραγωγή σωστών HcA και HcB μεταγράφων στα θυλακοκύτταρα των θηλυκών ατόμων (Iatrou and Meidinger, 1990). Η λειτουργικότητα της 5' γειτονικής περιοχής αλλά και η ικανότητά της να κατευθύνει ειδικά την έκφραση των γονιδίων, και προς τις δύο κατευθύνσεις (αντιπαράλληλα), επιβεβαιώθηκε για τέσσερα διαφορετικά ζεύγη γονιδίων του χορίου, από τρία είδη μεταξοσκώληκα. Συγκεκριμένα, οι 5' γειτονικές περιοχές των A/B.L12 του *B. mori*, Po18/401 και Po292/10 του *A. polyphemus* και Pe18/401 του *A. pernyi*, απομονώθηκαν και κλωνοποιήθηκαν, προς την μία ή την άλλη κατεύθυνση, μπροστά από τα γονίδια αναφοράς CAT (Mitsialis et al., 1987, Mitsialis et al., 1989) ή *lacZ* (Fenerjian and Kafatos, 1994). Ταυτόχρονα, η δυνατότητα των υποκινητών των γονιδίων του

μεταξοσκώληκα να λειτουργούν στη *Drosophila* αποκάλυψε την ύπαρξη κοινών ρυθμιστικών μηχανισμών, ή αλλιώς ομόλογων μεταγραφικών παραγόντων, στα επιθηλιακά κύτταρα μεταξύ λεπιδοπτέρων και διπτέρων. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε από αντίστροφες πειραματικές προσεγγίσεις *in vitro* (Sourmeli et al., 2005b), όπου υποκινητές γονιδίων του χορίου από άλλα λεπιδόπτερα (*Antheraea sp.*) και δίπτερα (*Drosophila sp.*, *Ceratitis capitata*) σχημάτισαν αντίστοιχα σύμπλοκα DNA-πρωτεϊνών, παρουσία πυρηνικών εκχυλισμάτων μεταξοσκώληκα.

Όσον αφορά στο βαθμό που οι αλληλουχίες των υποκινητών ζευγών γονιδίων ίδιας αναπτυξιακής εξειδίκευσης παραμένουν συντηρημένες, οι υποκινητές των HcA/B ζευγών γονιδίων παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ταυτότητα (Iatrou et al., 1984, Burke and Eickbush, 1986), ενώ οι 5' γειτονικές περιοχές των ενδιάμεσων ζευγών γονιδίων παρουσιάζουν σημαντικά (αν και μικρότερα) ποσοστά ταυτότητας. Εξάιρεση αποτελούν οι υποκινητές των πρώιμων (ErA/B) γονιδίων, οι οποίοι εμφανίζουν περιορισμένη ομοιότητα, τόσο μεταξύ τους όσο και με τους υποκινητές των υπόλοιπων γονιδίων του χορίου (Hibner et al., 1991). Αντίθετα, οι υποκινητές των πρώιμων 6F6 αντιγράφων εμφανίζονται ιδιαίτερα όμοιοι (Kravariti et al., 1995). Σύγκριση, μάλιστα, των υποκινητών των 6F6 με τους υποκινητές των υπόλοιπων γονιδίων του χορίου έδειξε ότι μοιάζουν περισσότερο με τους υποκινητές των ενδιάμεσων και των όψιμων γονιδίων, από ότι με αυτούς των πρώιμων (ErA/B) γονιδίων (Kravariti et al., 1995, Lecanidou and Rodakis, 1992).

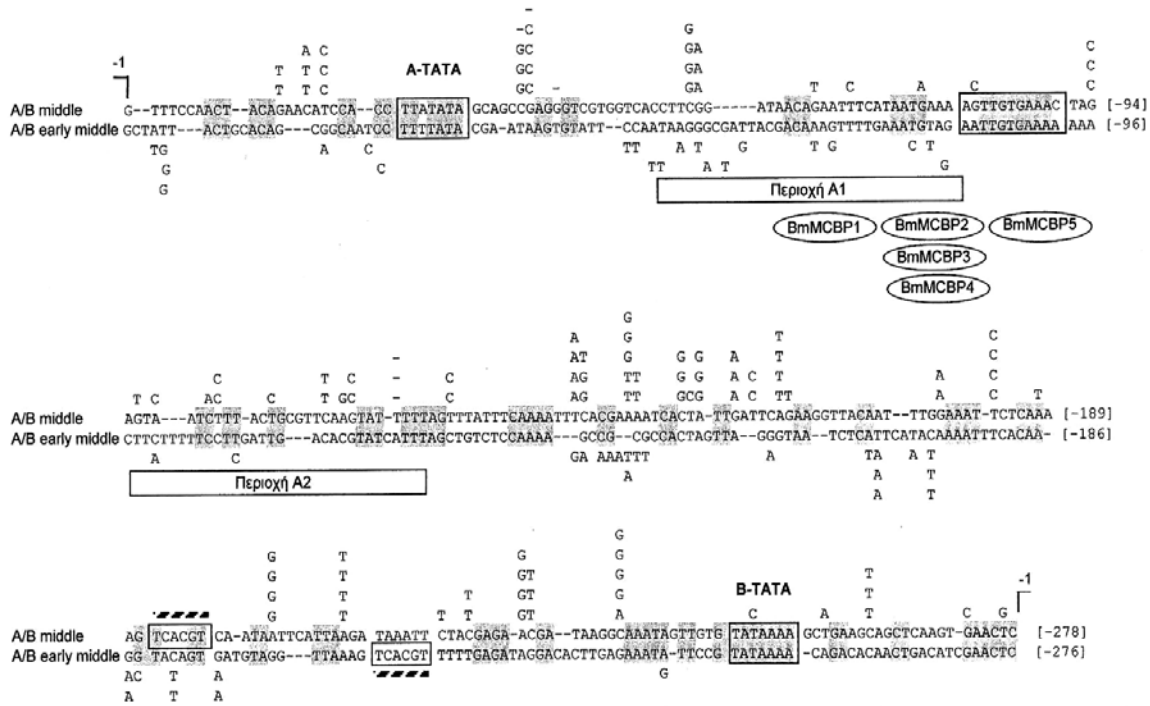
1.6.1.1 Cis-ρυθμιστικά στοιχεία

Οι περισσότεροι υποκινητές γονιδίων του χορίου, τόσο στα δίπτερα *-Drosophila, C. capitata-* (Wong et al., 1985, Levine and Spradling, 1985, Martinez-Cruzado et al., 1988, Fenerjian and Kafatos, 1994,

Swimmer et al., 1990, Konsolaki et al., 1990, Vlachou et al., 1997) όσο και στα λεπιδόπτερα (*Bombyx mori*), διαθέτουν το εξαμερές TCACGT. Συγκεκριμένα στο *Bombyx mori*, υπάρχει σε όλους τους υποκινητές των γονιδίων του χορίου εκτός από τα πρώιμα γονίδια. Η θέση και ο προσανατολισμός του εξαμερούς, καθώς και ο αριθμός των αντιγράφων του σε κάθε ζεύγος γονιδίων του μεταξοσκώληκα, ποικίλει (Mitsialis et al., 1989). Στη *Drosophila*, βρέθηκε να προσδένεται στην ευρύτερη περιοχή του εξαμερούς ο παράγοντας DmCF1 (Shea et al., 1990), που ανήκει στην οικογένεια των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων (Christianson et al., 1992), και να ετεροδιμερίζεται με τον υποδοχέα της εκδυσόνης DmEcR (Yao et al., 1993). Στο *Bombyx*, βάσει ομολογιών με τον DmCF1, απομονώθηκε ο παράγοντας BmCF1 (Tzertzinis et al., 1994), ο οποίος διμερίζεται με το BmEcR παρουσία της στεροειδούς ορμόνης 20 υδροξυ-εκδυσόνης (Swevers et al., 1996).

Πειράματα γενετικού μετασχηματισμού στη *Drosophila* έδειξαν ότι το στοιχείο αυτό είναι απαραίτητο για την έκφραση των γονιδίων του χορίου. Έλλειψη ή σημειακές αντικαταστάσεις του εξαμερούς στους υποκινητές των γονιδιακού ζεύγους A/B.L12 του *B. mori* οδήγησαν σε απώλεια της λειτουργικότητας του υποκινητή και προς τις δύο κατευθύνσεις (Mitsialis et al., 1987, Fenerjian and Kafatos, 1994). Αν και η αλληλουχία που περιέχει το εξαμερές έχει κριθεί απαραίτητη για τη μεταγραφή του ενδιάμεσου ζεύγους γονιδίων A/B.L12, δεν επαρκεί για τη σωστή μεταγραφική του ρύθμιση. Για την ακρίβεια, δύο περιοχές (A1 και A2), κοντά στο α -τύπου γονίδιο, περιέχουν αλληλουχίες που οδηγούν σε ενεργοποίηση και καταστολή του γονιδίου, στα όψιμα και στα πρώιμα στάδια αντίστοιχα, διαφοροποιώντας επίσης και το ποσοστό της μεταγραφής (Sproerel et al., 1993) (εικόνα 1.7). Γενικά, έχει προταθεί ότι η διαφορετική χρονική ρύθμιση των γονιδίων του χορίου μπορεί να οφείλεται σε: (α) γειτονικά, ή ακόμα και επικαλυπτόμενα, *cis*-στοιχεία με θετικές και αρνητικές ενεργότητες και (β) αλλαγές στη συγκέντρωση

ενεργοποιητών ή καταστολέων σε συνδυασμό με διαφορετική συγγένεια πρόσδεσης στις ρυθμιστικές αλληλουχίες κατά τη διάρκεια της χοριογένεσης (Kafatos FC, 1995, Spoerel et al., 1993).



Εικόνα 1.7: Στοιχισή αλληλουχιών των πλήρους μήκους υποκινητών από τα γονιδιακά ζεύγη τύπου L11 (A/B middle) και L12 (A/B early-middle). Παρουσιάζονται οι ρυθμιστικές περιοχές A1, A2 και οι θέσεις δέσμησης των υποθετικών ρυθμιστών MCBP1–5. Οι ταυτόσημες αλληλουχίες είναι σκιασμένες [από (Kafatos FC, 1995)].

Επιπλέον, με *in vitro*, κυρίως, πειράματα προσδιορίστηκαν και άλλες αλληλουχίες πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, με ίσως πιο σημαντικές του παράγοντα C/EBP. Αλληλουχίες πρόσδεσης C/EBP παραγόντων [TKNNGYAAK (Ryden and Beemon, 1989), όπου K=G/T, Y=C/T, N=A/T/C/G] απαντούν στο σύνολο των υποκινητών των γονιδίων του χορίου. Λαμβάνοντας υπόψη ότι, στην περίπτωση των υποκινητών των γονιδίων 6F6.1, 6F6.2 και HcA/B.13 το τελευταίο νουκλεοτίδιο έχει αντικατασταθεί από ένα κατάλοιπο κυτοσίνης, καταλήγουμε σε μια γενική συναινετική αλληλουχία η οποία απαντά σε δύο τύπους: (α) στην

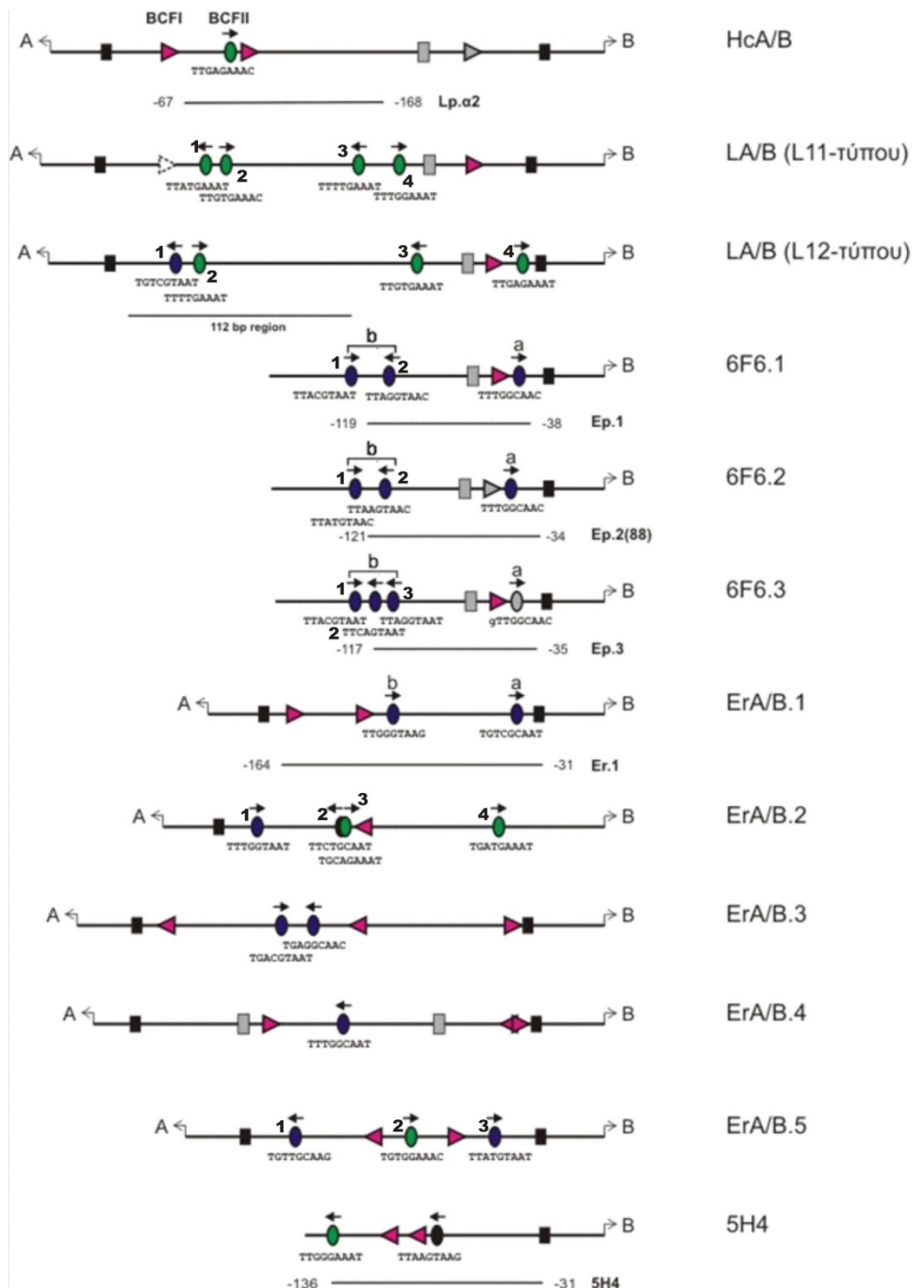
πρώιμη (TKNNGT/CAAT/G/C) και (β) στην όψιμη (TKNNGAAAT/G/C). Οι δύο εναλλακτικές αλληλουχίες έχουν ταυτοποιηθεί ως C/EBP αλληλουχίες αναγνώρισης (Umayahara et al., 1997, Osada et al., 1996) και εντοπίζονται περισσότερες από μία φορές σε κάθε υποκινητή. Πειράματα παροδικής έκφρασης (biolistic), χρησιμοποιώντας τους υποκινητές των γονιδίων 6F6.1 και 6F6.2, κατέληξαν στο ότι μία από τις αλληλουχίες αναγνώρισης C/EBP στη περιοχή b είναι σημαντική για την ποσοτική μεταγραφή του γονιδίου, ενώ αυτή στη θέση a υπεύθυνη μάλλον για την χρονοειδικότητα της έκφρασης (Kravariti et al., 2001). Η εμφάνιση C/EBP αλληλουχιών διαφορετικής συγγένειας και λειτουργικής σημασίας είναι αρκετά συχνό φαινόμενο (Lee et al., 1997, Reinhart et al., 1999, Palamarchuk et al., 2001) και, πιθανότατα, συμβάλλει στη ρύθμιση των αντίστοιχων γονιδίων, κυρίως μέσω διαφορικών αλληλεπιδράσεων με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (Palamarchuk et al., 2001, Hai and Curran, 1991). Σε τμήμα υποκινητή του όψιμου γονιδίου χορίου s15 της *Drosophila melanogaster* αποκαλύφθηκε η ύπαρξη C/EBP ρυθμιστικών στοιχείων (θετικών και αρνητικών), όπου η αλληλουχία του όψιμου ενεργοποιητή (TTATGAAAT) μοιάζει με όψιμη C/EBP αλληλουχία, ενώ το (ποσοτικά) σημαντικό *cis*-στοιχείο TCGCGTAAC του υποκινητή θυμίζει πρώιμη C/EBP αλληλουχία αναγνώρισης (Mariani et al., 1988, Mariani et al., 1996).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η κατανομή των C/EBP αλληλουχιών αναγνώρισης στους υποκινητές των γονιδίων του χορίου που παρουσιάζουν διαφορετική αναπτυξιακή εξειδίκευση (Εικόνα 1.8) (Sourmeli et al., 2003). Οι πρώιμου-τύπου αλληλουχίες κυριαρχούν στους υποκινητές των πρώιμων γονιδίων, ενώ οι όψιμου-τύπου στους υποκινητές των ενδιάμεσων και όψιμων ζευγών γονιδίων. Είναι αξιοσημείωτη η κατανομή που παρουσιάζεται στις ομάδες εκείνες των γονιδίων που εκφράζονται κατά τα πρώιμα-ενδιάμεσα, ενδιάμεσα και ενδιάμεσα-όψιμα χοριογενετικά στάδια. Συγκεκριμένα, τα αζευγάρωτα

γονίδια 6F6 περιέχουν αποκλειστικά πρώιμες C/EBP αλληλουχίες στους υποκινητές τους. Τα γονίδια που εκφράζονται αμέσως μετά (με μερική αλληλοεπικάλυψη στα πρότυπα έκφρασης με τα 6F6), τα τύπου L12, περιέχουν τόσο πρώιμες όσο και όψιμες αλληλουχίες, με τις τελευταίες να είναι πολυπληθέστερες. Στα τύπου L11 γονίδια, που ολοκληρώνουν την ενδιάμεση χοριογένεση, απαντούν μόνο όψιμες C/EBP αλληλουχίες αναγνώρισης. Από την άλλη μεριά, οι αλληλουχίες αναγνώρισης GATA παρουσιάζονται σταθερά τοποθετημένες κοντύτερα στο β-τύπου γονίδιο (στα γονίδια 6F6, τύπου L11 και L12, HcA/B). Όμως, στα πιο όψιμα εξ αυτών (τύπου L11 και HcA/B) παρατηρείται και μια δεύτερη αλληλουχία, η οποία γειτνιάζει με όψιμη C/EBP αλληλουχία. Ας σημειωθεί, επίσης, ότι οι υποκινητές των πρώιμων ErA/B γονιδίων διαθέτουν C/EBP και GATA αλληλουχίες σε ποικίλες θέσεις και προσανατολισμούς, χωρίς να είναι δυνατός ο εντοπισμός συγκεκριμένης αρχιτεκτονικής. Τέλος, στους υποκινητές αντιπροσώπων των πρώιμων-ενδιάμεσων (A/B.L9) και ενδιάμεσων-όψιμων (A/B.L1) γονιδίων έχουν εντοπιστεί, και έχουν επιβεβαιωθεί πειραματικά, αλληλουχίες πρόσδεσης για αρχιτεκτονικούς παράγοντες, όπως ο HMG και CHD1 (Parantonis et al., 2008b and 2008c)(Εικόνα 1.9).

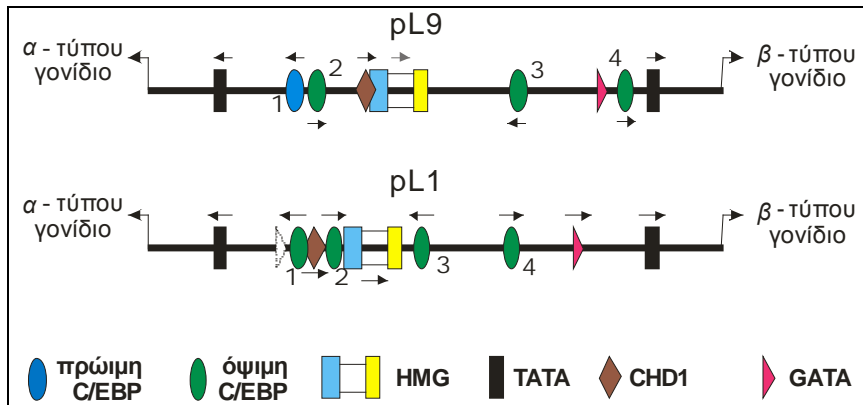
Παρατηρείται, λοιπόν, μία σταδιακή διαφοροποίηση στην αρχιτεκτονική των υποκινητών των γονιδίων, η οποία ενδέχεται να σχετίζεται με τη σταδιακή μετατόπιση της έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων προς πιο όψιμα στάδια (Εικόνα 1.8). Επίσης, έχει προταθεί ότι, στους «διφασικούς» υποκινητές των λεπιδοπτέρων, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η αναλογία του πλήθους των αλληλουχιών C/EBP προς τον τύπο (πρώιμο ή όψιμο) αυτών (Sourmeli et al., 2003). Συνολικά, είναι ενδιαφέρον ότι τα συχνά φαινόμενα γονιδιακής σύγκλισης, που χαρακτηρίζουν το γενετικό τόπο όπου εδράζονται τα γονίδια του χορίου (Eickbush and Burke, 1986, Yue et al., 1988, Lecanidou and Rodakis, 1992, Kravariti et al., 1995), έχουν καθορίσει τη χρονική εξειδίκευση της

έκφρασης των γονιδίων, μέσω της συγκεκριμένης αρχιτεκτονικής των υποκινητών τους.



Εικόνα 1.8: Σχηματική αναπαράσταση των υποθετικών *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων στους υποκινητές των, διαφορετικής αναπτυξιακής εξειδίκευσης, γονιδίων του χορίου. Τα οβάλ σχήματα συμβολίζουν τις θέσεις πρόσδεσης C/EBP (μπλε οι πρώιμου-τύπου, πράσινο οι όψιμου-τύπου) που αριθμούνται για

λόγους διάκρισης. Τα τρίγωνα συμβολίζουν τις θέσεις GATA, τα μαύρα κουτιά τις θέσεις TATA ενώ με γκρι κουτί συμβολίζεται το εξαμερές TCACGT· τα βέλη δείχνουν τον προσανατολισμό κάθε αλληλουχίας [από (Sourmeli et al., 2003)].



Εικόνα 1.9: Σχηματική αναπαράσταση της σχετικής διεύθεσης *cis*-στοιχείων στους υποκινητές των ζευγών γονιδίων του χορίου A/B.L9 και A/B.L1.

1.6.2 Μεταγραφικοί παράγοντες στη χοριογένεση

1.6.2.1 Η μετάβαση από τη βιτελλογένεση

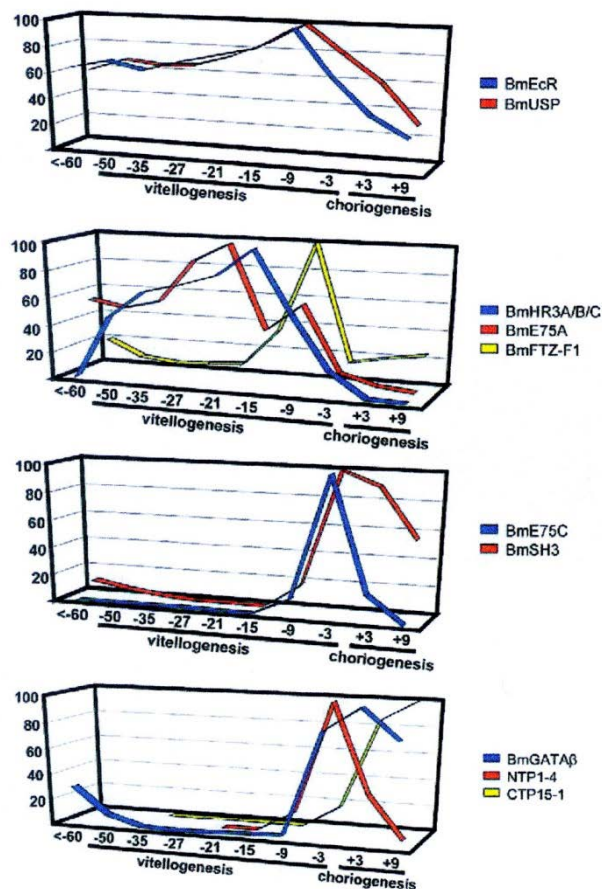
Η ανάπτυξη των ωθηκών στο μεταξοσκώληκα *Bombyx mori* ελέγχεται από την ορμόνη 20-ύδροξυ-εκδυσόνη (20E) και ενεργοποιεί ένα πολύπλοκο μονοπάτι που περιλαμβάνει τη ρύθμιση πολλών μεταγραφικών παραγόντων και γονιδίων (Εικόνα 1.10).

Το αναπτυξιακό πρόγραμμα ξεκινά με τη μεταμόρφωση της προνύμφης σε νύμφη, ενώ το έναυσμα για τη μετάβαση αυτή είναι η έκκριση της 20E από τους προθωρακικούς αδένες του ενήλικου ατόμου (Yamauchi, 1984). Η αύξηση της συγκέντρωσης της 20E είναι υπεύθυνη για τη μετάβαση από την προβιτελλογένεση στη βιτελλογένεση και παραμένει σε υψηλά επίπεδα μέχρι τα όψιμα στάδια αυτής (Legay, 1976). Η 20E δεσμεύεται στον υποδοχέα της εκδυσόνης (BmEcR), ο οποίος παρουσία της ετεροδιμερίζεται με τον πυρηνικό υποδοχέα BmUSP (Swevers et al., 1996). Τα γονίδια των πυρηνικών υποδοχέων εκφράζονται

στα επιθηλιακά κύτταρα των ωοθυλακίων, κατά τη διάρκεια της βιτελλογένεσης. Παρόλα αυτά, ο ρόλος των υποδοχέων αυτών (και άλλων όπως BmHR3 και BmHNF-4), στη χοριογένεση του μεταξοσκώληκα, δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως.

Η μετάβαση από τη βιτελλογένεση στη χοριογένεση ρυθμίζεται από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες της ωοθήκης και -φυσιολογικά- χαρακτηρίζεται από ελάττωση στη συγκέντρωση της 20E. Ένα από τα πιο χαρακτηριστικά γεγονότα του αναπτυξιακού προγράμματος της ωογένεσης είναι η δυνατότητα των ωοθυλακίων να αναπτύσσονται αυτόνομα, προκειμένου να περάσουν από τη βιτελλογένεση στη χοριογένεση. *Ex vivo* πειράματα έδειξαν ότι ωοθυλάκια βιτελλογενετικών σταδίων μπορούν ακόμα να ολοκληρώσουν, αυτόνομα, το ενδογενές αναπτυξιακό τους πρόγραμμα (Swevers and Iatrou, 1992). Πρωτεϊνικοί παράγοντες, με ενδεχόμενο σημαντικό ρόλο για τη μετάβαση αυτή, είναι ο πυρηνικός υποδοχέας BmFTZ-F1 (Sun et al., 1994) και οι διάφορες ισομορφές των BmHR3 και BmE75. Ο παράγοντας BmFTZ-F1 εκφράζεται κατά τα τελευταία στάδια της βιτελλογένεσης (Swevers and Iatrou, 1998) και φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μετάβαση στη χοριογένεση, όπως άλλωστε και ο ομόλογος παράγοντας της *Drosophila* (Broadus et al., 1999). Η ολοκλήρωση της βιτελλογένεσης χαρακτηρίζεται από την επαγωγή της έκφρασης των πυρηνικών υποδοχέων BmE75C και BmE75D, της πρωτεΐνης BmSH3 και του μεταγραφικού παράγοντα BmGATAβ, καθώς και από τη μείωση του ποσοστού μεταγραφής των BmHR3 και της BmE75A (Swevers and Iatrou, 2003, Swevers et al., 2002a). Η BmHR3 ρυθμίζει την έκφραση πολλών γονιδίων-στόχων, όπως του BmFTZ-F1 και BmGATAβ. Η ενεργότητά της, όμως, καταστέλλεται από την παρουσία του BmE75, γεγονός που υποδηλώνει ότι το ισοζύγιο στις συγκεντρώσεις BmE75-BmHR3 καθορίζει τα επίπεδα της έκφρασης των γονιδίων-στόχων (Swevers et al., 2002b).

Η έναρξη της χοριογένεσης χαρακτηρίζεται, εκτός από την ενεργοποίηση των γονιδίων του χορίου, από την έκφραση ποικίλων μεταγραφικών παραγόντων, όπως επίσης και από την καταστολή πρωτεϊνικών γονιδίων, τα οποία εκφράζονται κυρίως κατά τη βιτελλογένεση. Οι παράγοντες που έχει βρεθεί να εκφράζονται και κατά τη διάρκεια της χοριογένεσης είναι τα δύο μονομερή του λειτουργικού υποδοχέα της εκδυσόνης (BmEcR/BmCF1), η ισομορφή BmE75C, ο BmGATAβ, ο BmFTZ-F1 (σε χαμηλά επίπεδα), ενώ χαρακτηριστική είναι η καταστολή της μεταγραφής των BmHR3 ισομορφών και του BmE75A με την έναρξη της χοριογένεσης. Δεν υπάρχουν στοιχεία που να διευκρινίζουν το ρόλο των παραπάνω μεταγραφικών παραγόντων στην χρονοειδική έκφραση των γονιδίων του χορίου, εκτός της περίπτωσης του BmGATAβ.



Εικόνα 1.10: Διαγράμματα που παρουσιάζουν το πρότυπο έκφρασης (στο

επίπεδο της μεταγραφής) διαφόρων πρωτεϊνών με ρυθμιστικό ρόλο, κατά τη μετάβαση των ωοθυλακίων του μεταξοσκώληκα από τη αναπτυξιακή περίοδο της βιτελλογένεσης σε αυτή της χοριογένεσης [από (Swevers and Iatrou, 2003)].

Τέλος, πρόσφατα μελετήθηκε η συμμετοχή της αυτοκρινούς-παρακρινούς σηματοδότησης, μέσω προσταγλανδινών, στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων. Χρήση ειδικών αναστολέων των μονοπατιών βιοσύνθεσης της προσταγλανδίνης αποτρέπει τη μετάβαση από τη βιτελλογένεση στη χοριογένεση. Η ενεργοποίηση (δευτερογενής) του σηματοδοτικού μονοπατιού του cAMP, μέσω της φυσιολογικής δράσης της προσταγλανδίνης, επηρεάζει άμεσα την ωρίμανση της ωοθήκης. Αυτό, όμως, θεωρείται ότι σχετίζεται περισσότερο με τη διατήρηση της ομοιόστασης των ωοθυλακίων, παρά με χρονοειδική δράση σε γονίδια-στόχους (Machado et al., 2007).

1.6.2.2 Ο μεταγραφικός παράγοντας GATA1

In vitro πειράματα με τον υποκινητή του όψιμου ζεύγους γονιδίων HcA/B.12 οδήγησαν στον εντοπισμό δύο συναινετικών αλληλουχιών, κοντά στο α -τύπου γονίδιο, με τις οποίες αλληλεπιδρούν οι μεταγραφικοί παράγοντες BCFI και BCFII (Skeiky and Iatrou, 1991). Η αλληλουχία πρόσδεσης του BCFI υποδηλώνει ότι πρόκειται για έναν μεταγραφικό παράγοντα της οικογένειας GATA (παράγοντες δακτύλων ψευδαργύρου), οι οποίοι είναι γνωστό ότι λειτουργούν ως ενεργοποιητές (Martin et al., 2001), καταστολείς (John et al., 1996) ή και τα δύο, ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους (McNaghy et al., 1998). Στο μεταξοσκώληκα, το γονίδιο BmGATAβ δίνει, με εναλλακτική ωρίμανση, τρεις ισομορφές: BmGATAβ1, BmGATAβ2 και BmGATAβ3 (Drevet et al., 1995). Σύμφωνα με το μοντέλο που έχει προταθεί, ο παράγοντας GATAβ συντίθεται πριν την έναρξη της χοριογένεσης (Eystathiou et al., 2001, Swevers, 1999) αλλά παραμένει στο

κυτταρόπλασμα, σε φωσφορυλιωμένη και ανενεργή μορφή (Skeiky et al., 1994). Το ποσοστό μεταγραφής του γονιδίου διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα, καθόλη τη διάρκεια της χοριογένεσης (Drevet et al., 1995), αν και οι διαφορετικές ισομορφές του BmGATAβ ενδέχεται να εμφανίζουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης κατά τη διάρκεια της χοριογένεσης (Swevers and Iatrou, 2003). Στα τελευταία στάδια της χοριογένεσης, μια ειδική φωσφατάση τον αποφωσφορυλιώνει, προκειμένου να εισαχθεί στον πυρήνα και να οδηγήσει σε έκφραση των όψιμων γονιδίων του χορίου (Skeiky et al., 1994). Ωστόσο, τελευταία, εκτός από ενεργοποιητές των όψιμων γονιδίων, του αποδίδεται και ο ρόλος του καταστολέα των πρώιμων και ενδιάμεσων γονιδίων, ως αποτέλεσμα δύο παρατηρήσεων: (α) έχουν παρατηρηθεί (και έχουν επιβεβαιωθεί με *in vitro* πειράματα μείωσης κινητικότητας συμπλόκου-MKΣ) θέσεις πρόσδεσης GATA σε όλους τους υποκινητές γονιδίων των πρώιμων και ενδιάμεσων σταδίων (Sourmeli et al., 2003) και (β) με πειράματα ανοσοσυγκρατήσεως της χρωματίνης έχει παρατηρηθεί πρόσδεση του παράγοντα στους υποκινητές των ενδιάμεσων γονιδίων, σε στάδια που είναι μεταγραφικά ανενεργοί (Parantonis et al., 2008c).

1.6.2.3 Ο μεταγραφικός παράγοντας C/EBP

Ο παράγοντας BCFII προσδένεται σε μια αλληλουχία 10–12 ζευγών βάσεων στους υποκινητές των Hc γονιδίων. Η αλληλουχία αυτή, όπως έχει αναφερθεί πιο πάνω, απαντά (ελαφρά παραλλαγμένη) σε όλους ανεξαιρέτως τους υποκινητές των γονιδίων του χορίου (βλ. Εικόνα 1.8). Προκύπτει, λοιπόν, η συναινετική αλληλουχία αναγνώρισης: TKNNGY/AAAK/C (όπου K=T/G, Y=T/C), η οποία αποτελεί ένα διμερές στοιχείο που αναγνωρίζουν, ειδικά, οι παράγοντες της υπεροικογένειας των πρωτεϊνών με φερμουάρ λευκίνης [bZIP, (Hurst, 1995)]. Η υπεροικογένεια bZIP απαρτίζεται από πέντε οικογένειες: C/EBP,

CREB/ATF, AP-1, NF-E2 και PAR. Τα μέλη τους χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας χαρακτηριστικής λειτουργικής δομής (BRLZ) στην οποία περιέχονται η βασική περιοχή και το φερμουάρ λευκίνης. Η μεν πρώτη είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση στο DNA, η δεύτερη διαμεσολαβεί το διμερισμό, απαραίτητος για ισχυρή πρόσδεση σε αλληλουχίες-στόχους (Johnson, 1993, Williams et al., 1991).

Η αλληλουχία αναγνώρισης bZIP, που απαντά στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων του χορίου, είναι αλληλουχία αναγνώρισης C/EBP. Τα μέλη της οικογένειας C/EBP (CCAAT Enhancer Binding Protein) φέρουν το μοτίβο BRLZ πιο κοντά στο καρβοξυλικό άκρο τους, ενώ έχουν δυνατότητα ομοδιμερισμού και ετεροδιμερισμού (Fassler et al., 2002, Vinson et al., 2002). Τα σχηματιζόμενα διμερή έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν σε ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών μονοπατιών, όπως η διαφοροποίηση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός ή η φλεγμονή και η απόπτωση (Lekstrom-Himes and Xanthopoulos, 1998, Ramji and Foka, 2002). Ενώ στα θηλαστικά έχουν απομονωθεί έξι μέλη της οικογένειας (C/EBP α - ζ), στα έντομα γνωρίζουμε μόνο την πρωτεΐνη της *Drosophila* και του *Bombyx*. Η DmC/EBP (Slbo) εκφράζεται στο επιθήλιο της ωοθήκης και συμμετέχει στη μετανάστευση μιας ομάδας κυττάρων [slow border cells, (Montell et al., 1992)], ενώ, κατά την εμβρυική ανάπτυξη, ο ρόλος της θεωρείται ρυθμιστικός (Rorth and Montell, 1992). Σε αρκετές, μάλιστα, διεργασίες Διπτέρων ή Λεπιδοπτέρων έχει προταθεί ότι εμπλέκονται παράγοντες C/EBP, όπως για παράδειγμα στη ρύθμιση της έκφρασης της λυσοσωμικής ασπαρτικής πρωτεάσης (LAP), της πρόδρομης πρωτεΐνης της λεκίθου (YPP), της βιτελλογενίνης (Vg), ή της φερριτίνης (An and Wensink, 1995, Dittmer and Raikhel, 1997, Kokoza et al., 2001, Raikhel et al., 2002, Pham et al., 2005).

Η C/EBP του μεταξοσκώληκα απομονώθηκε από θυλακοκύτταρα (βιτελλογενετικά και πλώιμα) και το πρότυπο μεταγραφής της εμφανίζει

μέγιστο κατά τα πρώιμα, πρώιμα-ενδιάμεσα χοριογενετικά στάδια και φθίνει σταδιακά μέχρι την ολοκλήρωση της χοριογένεσης. Προσδένεται ισχυρά στις αλληλουχίες αναγνώρισης C/EBP *in vitro* (εμφανίζει υψηλότερη συγγένεια για αλληλουχίες όψιμου-τύπου) και προτείνεται ότι μετέχει ως κύριος ρυθμιστής στα μοριακά γεγονότα που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση (Sourmeli et al., 2005b). Συγκεκριμένα, μέσω πειραμάτων ανοσοσυγκρατήσεως της χρωματίνης φάνηκε ότι, πρόσδεση της πρωτεΐνης C/EBP στους υποκινητές των ενδιάμεσων γονιδίων του χορίου είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίησή τους στο σωστό αναπτυξιακό στάδιο. Απομάκρυνση του παράγοντα (πιθανά λόγω ανταγωνισμού με τον παράγοντα GATA) καταστέλλει την έκφραση και, τέλος, επαναπρόσδεση του παράγοντα C/EBP διατηρεί την καταστολή, κατά τα όψιμα στάδια της χοριογένεσης (Parantonis et al., 2008a).

1.6.2.3.1 Οι πρωτεΐνες C/EBPγ, CbZ

Παράλληλα με την απομόνωση του μεταγραφικού παράγοντα C/EBP, απομονώθηκαν, από το επιθήλιο των ωοθυλακίων του *Bombyx*, δύο άλλοι bZIP παράγοντες, οι BmCbZ και BmC/EBPγ (Sourmeli et al., 2005a). Ο τελευταίος εμφανίζει υψηλή ομολογία με την πρωτεΐνη C/EBPγ των θηλαστικών, η οποία έχει χαρακτηριστικά μικρό μοριακό βάρος (περίπου 15 kDa) και δεν φέρει λειτουργικές περιοχές *trans*-ενεργοποίησης (Friedman et al., 1989). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό διμερών που, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, δρουν κατασταλτικά (Zafarana et al., 2000, Parkin et al., 2002). Βρέθηκε ότι η C/EBPγ αναγνωρίζει τις συναινετικές αλληλουχίες C/EBP στους υποκινητές των γονιδίων του χορίου, όμως η χαμηλή συγγένειά της για αυτές δεν της επιτρέπει να ανταγωνιστεί τη C/EBP κατά την πρόσδεσή της. Επίσης, αναγνωρίζει και ένα νέο ρυθμιστικό στοιχείο (Gamma Binding Element, GBE) στον υποκινητή του γονιδίου 6F6.3.

Ετεροδιμερισμός μεταξύ C/EBP-C/EBPγ δεν μπόρεσε να επιτευχθεί *in vitro* (Sourmeli et al., 2005a).

Ο παράγοντας CbZ (Chorion bZIP protein) αποτελεί μια πρωτεΐνη με το χαρακτηριστικό BRLZ μοτίβο, το οποίο, όμως, συνοδεύεται από μια λειτουργική περιοχή τύπου AT-hook (Sourmeli et al., 2005a). Η βασική περιοχή του BRLZ της CbZ φέρει μια N-N-E-A-S αμινοξική ακολουθία, η οποία δεν απαντά σε άλλες bZIP πρωτεΐνες. Ο ασυνήθης συνδυασμός της χαρακτηριστικής BRLZ περιοχής με το 'AT-hook' δημιουργεί ένα μόριο το οποίο δεν μπορεί να βρει όμοιό του, παρά μόνο μεταξύ αλληλουχιών που προέρχονται από άλλα έντομα. Πρόκειται, δηλαδή, για ένα έντομο-ειδικό παράγοντα που —μάλλον— πρέπει να καταταχθεί σε μια νέα οικογένεια. *In vitro*, ο CbZ παρουσιάζει δυνατότητα πρόσδεσης στο DNA μόνο εφόσον ετεροδιμεριστεί με τον C/EBPγ, με το ετεροδιμερές να αναγνωρίζει τις αλληλουχίες C/EBP. Το αποτύπωμα, όμως, της πρόσδεσης (με τη χρήση Dnase I) αποκάλυψε μικρή προέκταση προς γειτονικές αλληλουχίες υψηλής περιεκτικότητας σε A/T (Sourmeli et al., 2005a). Το επικρατέστερο σενάριο τοποθετεί τη C/EBPγ, ή το διμερές CbZ-C/EBPγ, στην αναπτυξιακή φάση της βιτελλογένεσης, όπου και προτάθηκε ότι διατηρεί μεταγραφικά ανενεργά τα γονίδια του χορίου, απουσία της πρωτεΐνης C/EBP.

1.6.2.4 «Αρχιτεκτονικοί» παράγοντες

Δύο από τους παράγοντες που εντοπίστηκαν σε cDNA βιβλιοθήκη έκφρασης, χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτές ολιγονουκλεοτίδια από τον υποκινητή του ενδιάμεσου ζεύγους γονιδίων A/B.L12 (Kafatos FC, 1995), οι BmMCP4-5, μελετήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν ως οι μεταγραφικοί παράγοντες CHD1 και HMGA αντίστοιχα (Παπαντώνης, 2008, Parantonis et al., 2008b, Parantonis et al., 2008c).

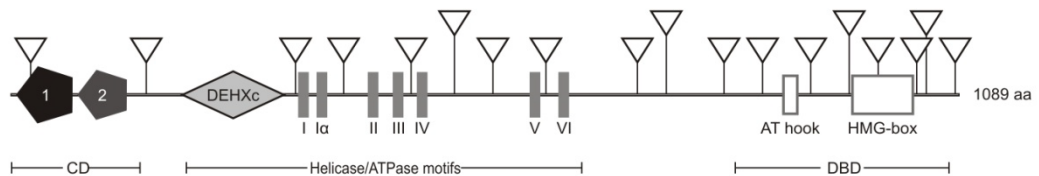
1.6.2.4.1 Ο μεταγραφικός παράγοντας CHD1

Οι παράγοντες της υποοικογένειας των Chromo-Helicase/ATPase-DNA binding protein 1 (CHD1) συμμετέχουν στην αναδόμηση/μετατόπιση της χρωματίνης, έχοντας τόσο θετική όσο και αρνητική επίδραση στη μεταγραφή (Tran et al., 2000). Οι διαφοροποιήσεις στην κατανομή της CHD1 σε θέσεις του πυρήνα, κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, συνέδεσαν τη δραστηριότητα της με την αρχιτεκτονική της χρωματίνης (Stokes and Perry, 1995) και της έδωσε το χαρακτηρισμό 'αρχιτεκτονικός' παράγοντας.

Τα μέλη της οικογένειας CHD φέρουν λειτουργικές περιοχές με αντίρροπους χαρακτήρες. Στο αμινικό άκρο εντοπίζεται ένα λειτουργικό μοτίβο (συχνά διπλό) 'chromo', το οποίο είχε, αρχικά, σχετιστεί με τη συμπύκνωση της χρωματίνης, αλλά πλέον αναγνωρίζεται ως διαμεσολαβητής για την αλληλεπίδραση με διάφορα χρωματινικά συστατικά (Eissenberg, 2001, Marfella and Imbalzano, 2007). Φέρουν, επίσης, μια διάταξη συνεχόμενων μοτίβων ελικασών που χρησιμοποιούν ATP προκειμένου να ξετυλίξουν τη διπλή έλικα του DNA (Delmas et al., 1993, Woodage et al., 1997). Το χαρακτηριστικό, όμως, που διαφοροποιεί την CHD1 (και 2) από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας CHD (και από τις SWI/SNF) είναι η ικανότητα πρόσδεσης στο DNA και παραμονής της σε αλληλουχίες αναγνώρισης (Tran et al., 2000). Θεωρείται ότι η CHD1 είναι μια "sequence-selective" και όχι "sequence-specific" πρωτεΐνη, με προτίμηση σε τμήματα DNA που περιέχουν σχετικά μεγάλες (>12 bp) αλληλουχίες αδενίνης και θυμίνης (Stokes and Perry, 1995). Τελικά, οι πρωτεΐνες CHD1 έχουν τη δυνατότητα, ως μέλη χαλαρών πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων [ακόμη και ως μονομερή (Lusser et al., 2005)], να μεταβάλουν τη δομή των νουκλεοσωμάτων χρησιμοποιώντας ενέργεια που εκλύεται από την υδρόλυση του ATP. Το γεγονός αυτό τις διαφοροποιεί από άλλους παράγοντες αναδόμησης, π.χ. του συμπλόκου

SWI/SNF, που μπορούν να δράσουν μόνο ως συγκροτημένες πολυπρωτεϊνικές μηχανές αναδόμησης της χρωματίνης.

Κατά μήκος της αλληλουχίας της πρωτεΐνης CHD1 του *Bombyx* εντοπίζονται τρεις διακριτές λειτουργικές περιοχές (Εικόνα 1.11). Κοντά στο αμινικό άκρο παρατηρούνται δύο διαδοχικά μοτίβα 'chromo' (CD1-2) που ακολουθούνται από μια ευρύτερη περιοχή, στην οποία εδράζονται μια αμινοξική ακολουθία γνωστή ως DEXHc-box (Gross and Shuman, 1995) και επτά διαδοχικά μοτίβα με χαρακτηριστικά ελικάσης (Woodage et al., 1997). Κοντά στο καρβοξυλικό άκρο εντοπίζεται η (δυσνητική) λειτουργική περιοχή υπεύθυνη για την πρόσδεση στο DNA (DBD), η οποία απαρτίζεται από ένα τυπικό μοτίβο 'AT-hook' (R-K-R-G-R-P) και μια αλληλουχία HMG-box, χαρακτηριστική των πρωτεϊνών HMGB (van Beest et al., 2000).



Εικόνα 1.11: Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης CHD1 του *Bombyx*. Παρουσιάζονται τα μοτίβα Chromo 1-2 (πεντάγωνα), η αλληλουχία DEXHc (ρόμβος), τα διαδοχικά μοτίβα ελικάσης/ΑΤΡάσης (I–VI) και οι δύο λειτουργικές περιοχές του DBD (AT-hook/HMG-box, κουτιά). Κατά μήκος του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης, οι σχετικές θέσεις εσωνίων συμβολίζονται με τρίγωνα [από (Parantonis et al., 2008b)].

Γενικά, το γονίδιο της BmCHD1 παρουσιάζει συνεχή έκφραση με μια υψηλή κορυφή κατά την ενδιάμεση χοριογένεση. Πειράματα συστήματος δύο υβριδίων αποκάλυψαν την αλληλεπίδραση της CHD1 με τον παράγοντα HMGA (Parantonis et al., 2008b). Επιπλέον, χρησιμοποιώντας ένα ανασυνδυασμένο πολυπεπτίδιο, που περιέχει μόνο

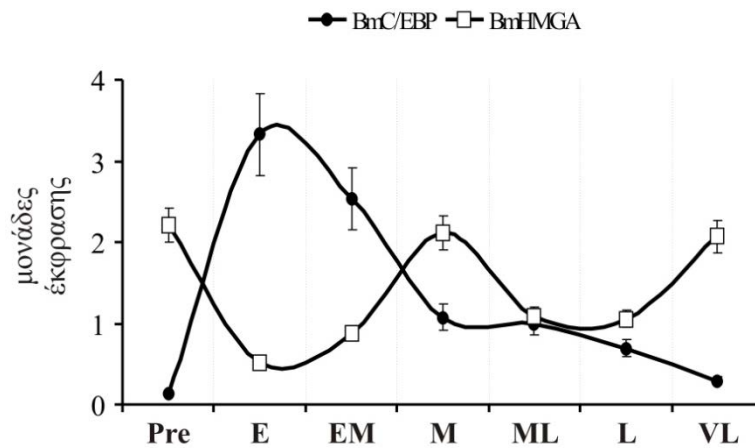
το μοτίβο 'AT-hook', σε πειράματα ΜΚΣ αποδείχτηκε ότι αυτό είναι υπεύθυνο για τη πρόσδεση στο DNA. Συγκεκριμένα, με πειράματα αποτυπώματος Dnase I, στους υποκινητές των A/B.L9 και A/B.L1 γονιδίων, προσδιορίστηκε μια συναινετική αλληλουχία πρόσδεσης (5'-ATWKWGAAAWK-3'; W=A/T, K=T/C) (Parantonis et al., 2008b). Τέλος, δεδομένα από πειράματα 'primer extension' έδειξαν ότι (τουλάχιστον στον υποκινητή pL9) η βιτελλογενετική διαμόρφωση της χρωματίνης αναδομείται σημαντικά, καθώς παρατηρήθηκε μετακίνηση του νουκλεοσώματος που καλύπτει το α-μισό του υποκινητή κατά ~20 ζεύγη βάσεων, πριν τη μετάβαση στη χοριογένεση (Parantonis et al., 2008b). Έχει προταθεί ότι η μετακίνηση αυτή «ανοίγει το χώρο» για την πρόσδεση άλλων μεταγραφικών παραγόντων (Parantonis et al., 2008b).

1.6.2.4.2 Ο μεταγραφικός παράγοντας HMGA

Οι High Mobility Group (HMG) πρωτεΐνες είναι ανάμεσα στις πιο κοινές πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη χρωματίνη και μετέχουν στον καθορισμό της μορφής της, *in vivo* (γι' αυτό και χαρακτηρίζονται ως «αρχιτεκτονικές» μη-ιστονικές πρωτεΐνες). Κατηγοριοποιούνται σε τρεις οικογένειες: HMGA (HMGI/Y, -C), HMGB (HMG-1, -2) και HMGN [HMG14/17, αναθεωρημένη ονοματολογία σύμφωνα με (Bustin, 2001)]. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας HMGA χαρακτηρίζονται από μικρό μοριακό μέγεθος (10–13 kDa) και αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω της ανάπτυξης δεσμών στη μικρή αύλακα. Η πρόσδεση διαμεσολαμβάνεται από τα χαρακτηριστικά μοτίβα 'AT-hook' (G/P-R-G-R-P, core consensus) και μια αλληλουχία, μήκους 8–10 ζευγών βάσεων, πλούσια σε αδενίνη και θυμίνη (Huth et al., 1997). Στις πρωτεΐνες HMGA περιλαμβάνονται οι HMGA1a, HMGA1b και HMGA2. Τα HMGA1a και 1b πολυπεπτίδια κωδικοποιούνται από το ίδιο γονίδιο και παράγονται μέσω εναλλακτικής συρραφής· η HMGA2 πρωτεΐνη κωδικοποιείται από διαφορετικό γονίδιο

(Reeves and Beckerbauer, 2001). Λειτουργικά, έχει βρεθεί ότι προκαλούν αλλαγές στην τριτοταγή δομή της χρωματίνης, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η δημιουργία αλληλεπιδράσεων DNA-πρωτεϊνών ή/και πρωτεϊνών-πρωτεϊνών, εξαιτίας της συμπύκνωσης του ζωτικού χώρου σε θέσεις υποκινητών/ενισχυτών (Semsey et al., 2005).

Η πρωτεΐνη HMGA του μεταξοσκώληκα φέρει κλασσικά χαρακτηριστικά των HMGA των θηλαστικών (αλληλουχία μοτίβων 'AT-hook', όξινη ουρά, μικρό μοριακό μέγεθος), διαφοροποιείται, όμως, εξαιτίας της ύπαρξης ενός (μερικά εκφυλισμένου) επιπρόσθετου μοτίβου 'AT-hook', το οποίο απαντά μόνο σε HMGA φυτικών οργανισμών (Grasser, 2003). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι δεν υπάρχουν ισομορφές της πρωτεΐνης μέσω εναλλακτικής συρραφής (τουλάχιστον στο επιθήλιο των ωοθυλακίων), παρά την ύπαρξη τριών εσωνίων, γεγονός που τη διαφοροποιεί από τα θηλαστικά. Η HMGA του μεταξοσκώληκα έχει τη δυνατότητα να προσδέεται στο DNA, μέσω της μικρής αύλακας, σε αλληλουχίες πλούσιες σε A/T και C. Πειράματα αποτυπώματος Dnase I, στους υποκινητές των A/B.L9 και A/B.L1 γονιδίων, προτείνουν ότι η πρόσδεση λαμβάνει χώρα μέσω δύο διαδοχικών μοτίβων 'AT-hook', σε δύο γειτονικές θέσεις (I/II) που έχουν τον ίδιο προσανατολισμό στο χώρο. Βρέθηκε, επίσης, ότι *in vitro* φωσφορυλίωση της HMGA, στα κατάλοιπα σερίνης των θέσεων 44 και 48 (μεταξύ δεύτερου και τρίτου 'AT-hook'), μπορεί να αποτρέψει την πρόσδεσή της στο DNA και να αποκατασταθεί μετά από επίδραση με αλκαλική φωσφατάση (Parantonis et al., 2008c). Τέλος, το μεταγραφικό πρότυπο του BmHMGA έδειξε τρεις διακριτές κορυφές υψηλής έκφρασης κατά τη βιτελλογένεση, την ενδιάμεση και την όψιμη-πολύ όψιμη χοριογένεση (Εικόνα 1.12).



Εικόνα 1.12: Ανάλυση των (μεταγραφικών) επιπέδων έκφρασης των BmC/EBP, BmHMGA μέσω ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου. Η σύγκρισή τους, ανά αναπτυξιακό στάδιο, έγινε εφικτή μέσω υπολογισμών $\Delta(\Delta Ct)$ και οι τυπικές αποκλίσεις, κάθε μέτρησης, παρουσιάζονται με κάθετες γραμμές [από (Parantonis et al., 2008c)].

Όσον αφορά το ρόλο του μεταγραφικού παράγοντα HMGA, η πρόσδεση του στο DNA των υποκινητών των γονιδιακών ζευγών A/B.L9 και A/B.L1 είχε ως άμεσο αποτέλεσμα την επαγωγή κάμψης σε αυτούς κατά $\sim 90^\circ$. Τα σημεία κάμψης, επί των δύο υποκινητών, εδράζονται μεταξύ των αλληλουχιών αναγνώρισης I και II του HMGA, στο α -μισό των υποκινητών. Έχει προταθεί, λοιπόν, ότι λειτουργικά η κάμψη των υποκινητών εξυπηρετεί: (α) την προβολή αλληλουχιών προς τα έξω, ώστε να καθίστανται ευκολότερα προσβάσιμες και (β) τη μείωση των αποστάσεων μεταξύ των δύο μισών του υποκινητή, ώστε να διευκολύνεται η αλληλεπίδραση απομακρυσμένων πρωτεϊνικών παραγόντων. Συγκεκριμένα, πειράματα συστήματος δύο υβριδίων και ανοσοσυγκρατήρισης της χρωματίνης έδειξαν ότι η πρωτεΐνη HMGA αναπτύσσει πολλαπλές αλληλεπιδράσεις κατά την παρουσία της στους υποκινητές των ενδιαμέσων γονιδίων (εντοπίζεται εκεί *in vivo* καθ' όλη τη διάρκεια της χοριογένεσης), τόσο με τον παράγοντα CHD1 (αναδόμηση

χρωματίνης) (Parantonis et al., 2008b) όσο και με τους παράγοντες C/EBP και GATA, κατά τα πρώιμα και όψιμα στάδια της χοριογένεσης αντίστοιχα (Parantonis et al., 2008c).

1.7 Τεχνικές παροδικής έκφρασης γονιδίων - ηλεκτροδιάτρηση (electroporation)

Πολλές είναι οι μέθοδοι που έχουν εφαρμοστεί κατά καιρούς για την εισαγωγή και παροδική έκφραση γονιδιακών κατασκευών σε κυτταροκαλλιέργειες ή/και ολόκληρους ιστούς εντόμων. Για την παροδική έκφραση κλωνοποιημένων γονιδίων του μεταξοσκώληκα έχουν αναφερθεί ο ετερόλογος μετασχηματισμός μέσω μεταθετών στοιχείων στην *Drosophila* (Mitsialis and Kafatos, 1985), η διαμόλυνση με κατάλληλους βακιλοϊούς (Iatrou and Meidinger, 1990), η μικροένεση εμβρύων του *Bombyx* με ανασυνδυασμένα πλασμίδια (Nikolaev et al., 1993), η εφαρμογή βομβαρδισμού με σφαιρίδια για τον μετασχηματισμό εμβρύων και γονάδων (Thomas et al., 2001), αδένων (Horard et al., 1994), επιθηλιακών κυττάρων ωοθυλακίων (Kravariti et al., 2001) ή ιστών από νύμφες και προνύμφες μεταξοσκώληκα (Thomas et al., 2001), και η ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) σε εμβρυϊκούς ιστούς και προνυμφικούς ιστούς (ωοθήκες, επιθηλιακά κύτταρα εμβρυϊκού δίσκου του φτερού) του *B. mori* (Thomas, 2003). Από όλες τις παραπάνω μεθόδους, η πιο γρήγορη και εύκολη μέθοδος, υψηλής απόδοσης, για μελέτες ανάλυσης της έκφρασης γονιδίων στο μεταξοσκώληκα θεωρείται η μέθοδος της ηλεκτροδιάτρησης.

Η συγκεκριμένη μέθοδος, γνωστή και ως ηλεκτροδιήθηση, στηρίζεται στην εφαρμογή ηλεκτρικών ώσεων σε κύτταρα ή βιολογικούς ιστούς με επακόλουθο την δημιουργία ηλεκτροδιαπερατών μεμβρανών για την είσοδο μορίων DNA/RNA, ιόντων ή φαρμάκων στο εσωτερικό των κυττάρων. Ο μοριακός και κυτταρικός μηχανισμός της επαγωγής της

διαπερατότητας δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί. Θεωρείται ότι υπό την επίδραση ηλεκτρικών παλμών προκαλείται αλλαγή στον προσανατολισμό των πολικών κεφαλών των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης· η αναδιοργάνωση των φωσφολιπιδίων αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την επαγωγή της ηλεκτροδιαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών και τη δημιουργία παροδικών πόρων (Lopez et al., 1988, Golgio et al., 1998). Οι πόροι έχουν μέγεθος 40–120 nm και παραμένουν ανοιχτοί για αρκετά δευτερόλεπτα παρέχοντας τη δυνατότητα εισόδου μορίων στο εσωτερικό των κυττάρων (DeBruin et al., 1999). Επίσης, υπάρχουν πειραματικές ενδείξεις που εμπλέκουν συστατικά του κυτταροσκελετού, πρωτεϊνικά κανάλια ή πρωτεΐνες μεταφοράς της μεμβράνης στο μηχανισμό εισόδου (Vernhes et al., 1999). Η απόδοση της μεθόδου εξαρτάται από ποικίλες παραμέτρους: (α) βασικά χαρακτηριστικά κυττάρων όπως το μέγεθος, το σχήμα, η διαφορά δυναμικού και η σύσταση της μεμβράνης, (β) τεχνικές συνθήκες, όπως η σύσταση του διαλύματος εντός του οποίου εφαρμόζεται το ηλεκτρικό πεδίο, η τάση του πεδίου, η διάρκεια, ο αριθμός και τύπος παλμών, (γ) το υλικό και η γεωμετρία των ηλεκτροδίων.

1.8 Στόχοι της διδακτορικής διατριβής

Σκοπό της παρούσης διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η μελέτη του μηχανισμού που ρυθμίζει τη χρονοειδική έκφραση των γονιδίων του χορίου. Συγκεκριμένα, τα τελευταία χρόνια έχει γίνει μια προσπάθεια προσέγγισης του προτύπου αναπτυξιακής ρύθμισης της χοριογένεσης μέσω των σχέσεων των μεταγραφικών παραγόντων που αναγνωρίζουν και προσδένονται στα ρυθμιστικά στοιχεία των υποκινητών. Ωστόσο, εφόσον, όπως φαίνεται στην εικόνα 1.7, σε όλους τους υποκινητές προσδένονται οι ίδιοι μεταγραφικοί παράγοντες, παραμένει το ερώτημα, που αποτελεί και το κύριο ερώτημα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, ΠΩΣ η «αρχιτεκτονική» των υποκινητών, δηλαδή

συγκεκριμένες θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, ο προσανατολισμός τους, ο αριθμός τους ακόμα και οι σχετικές αποστάσεις μεταξύ τους, συνδράμουν στην αναπτυξιακή εξειδίκευση της έκφρασης των γονιδίων του χορίου. Για το διεξοδικό έλεγχο του γενικού προτύπου, όπως έχει διαμορφωθεί έως σήμερα, και για να απαντηθεί το παραπάνω ερώτημα, εστίασαμε το ενδιαφέρον μας στην ανάλυση της «αρχιτεκτονικής» του υποκινητή του γονιδιακού ζεύγους A/B.L9, που ανήκει στην ομάδα των ενδιάμεσων L12 τύπου γονιδίων. Ως βασική μέθοδο προσέγγισης, επιλέξαμε την τεχνική της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation) μέσω της οποίας καθίσταται εφικτή η επιτυχής εισαγωγή και έκφραση γονιδιακών κατασκευών στα επιθηλιακά κύτταρα των ωοθυλακίων του μεταξοσκώληκα *Bombyx mori*. Οι κατασκευές αυτές είναι τμήματα ανασυνδυασμένου DNA που περιέχουν το γονίδιο αναφοράς *lacZ* υπό τον έλεγχο άρτιων ή/και τροποποιημένων υποκινητών αντιπροσωπευτικών γονιδίων του χορίου. Η όλη προσέγγιση προσομοιάζει την *in vivo* κατάσταση.

Συνοπτικά, στόχοι της διδακτορικής διατριβής αποτέλεσαν:

- Η ανάπτυξη της ηλεκτροδιάτρησης ως εργαλείου για τη διεξαγωγή μοριακών μελετών στο μεταξοσκώληκα, που θα αντικαταστήσει τις υφιστάμενες *in vivo* λειτουργικές δοκιμασίες με μια προσέγγιση χαμηλότερου κόστους, υψηλής και ταχείας απόδοσης.
- Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός εξειδικευμένων ρυθμιστικών (*cis*) στοιχείων σε επίπεδο «αρχιτεκτονικής» υποκινητών, και κυρίως του υποκινητή του γονιδιακού ζεύγους A/B.L9 (κατηγορία τύπου L12 γονιδίων), που έχει τύχει εκτεταμένης ερευνητικής προσοχής στο παρελθόν.
- Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός εξειδικευμένων ρυθμιστικών στοιχείων σε επίπεδο μεταγραφικών (*trans*) παραγόντων, για την

επιβεβαίωση ή όχι των προτύπων δράσης των αντίστοιχων παραγόντων που προκύπτουν από την *in vitro* προσέγγιση.

- Τέλος, η κατανόηση του γενικότερου προτύπου ρύθμισης του συστήματος της χοριογένεσης, μέσω της μελέτης του συνόλου των δεδομένων που έχουν προκύψει τα τελευταία χρόνια για το σύνολο των γονιδίων του χορίου, ανεξαρτήτως αναπτυξιακής εξειδίκευσης.

2. Υλικά και μέθοδοι

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν μια σειρά από θρεπτικά υλικά και διαλύματα, τα οποία στη συνέχεια θα αναγράφονται με τα αρχικά ή την αγγλική ονομασία τους:

LB: 1 g Tryptone, 0,5 g Yeast extract, 1 g NaCl ανά 100 ml θρεπτικού μέσου, ρύθμιση pH στο 7,0 με NaOH,

bottom agar: LB που περιέχει 1,5% άγαρ,

PBS: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ - pH 7,4 ανά 1 lt διαλύματος,

RINGER: 100 ml διάλυμα I (7,5 g NaCl, 0,2 g CaCl₂, 0,1 g KCl), 100 mL διάλυμα II (0,2 g NaHCO₃) και 800 mL H₂O. Τα διαλύματα αποστειρώνονται χωριστά και ενώνονται στο τέλος. Το τελικό pH πρέπει να είναι 6,5-7,5,

SEVAG: 24 μέρη χλωροφόρμιο: 1 μέρος ισοαμυλική αλκοόλη,

20x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M κιτρικό νάτριο,

10x TBE: 1 M Tris, 0,83 M βορικό οξύ (H₃BO₃), 10 mM EDTA,

TE: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA),

Φαινόλη/SEVAG: 1 μέρος φαινόλη pH 8,0: 1 μέρος SEVAG,

10X Nick Translation Buffer (NTB): 0,5 M Tris-HCl pH 7,2, 0,1 M MgSO₄, 1mM DTT, 500 μg/ml BSA,

Διάλυμα ηλεκτροδιάτρησης: 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,5 mM Na₂HPO₄, 2,1 mM HEPES,

Διάλυμα χρώσης X-gal: 15 mM Potassium Ferrocyanide (K₄Fe(CN)₆), 15

mM Potassium Ferricianide ($K_3Fe(CN)_6$), 2 mM $MgCl_2$, 1 mg/ml X-gal.

2.1 Πρωτογενές βιολογικό υλικό: κύκλος ζωής & εκτροφές *B. mori*

Το λεπιδόπτερο *Bombyx mori* κατατάσσεται στα ολομετάβολα έντομα και η ανάπτυξή του λαμβάνει χώρα σε τέσσερα διαδοχικά στάδια: έμβρυο (embryo) - προνύμφη (larva) - νύμφη (pupa) - τέλειο έντομο (imago). Η διάρκεια του βιολογικού κύκλου του είναι περίπου 52 μέρες, οι οποίες κατανέμονται στα διάφορα στάδια ως εξής: έμβρυο 10-12 μέρες, προνύμφη 25 μέρες, νύμφη 15 μέρες και τέλειο έντομο 2-3 μέρες. Το μόνο στάδιο κατά το οποίο τρέφεται ο μεταξοσκώληκας είναι αυτό της προνύμφης. Ως προνύμφη, το ζώο υφίσταται 4 εκδύσεις κατά την διάρκεια των οποίων παραμένει ακίνητο και δεν τρέφεται προσωρινά· με τον τρόπο αυτό διέρχεται τα 5 προνυμφικά στάδια. Στο τέλος του 5^{ου} σταδίου, η προνύμφη αρχίζει το «πλέξιμο» του κουκουλιού μέσα στο οποίο μεταμορφώνεται σε νύμφη. Στο τέλος αυτού του σταδίου, το ώριμο άτομο βγαίνει από το κουκούλι και είναι έτοιμο να ζευγαρώσει. Μετά τη γονιμοποίηση, το θηλυκό άτομο γεννά αυγά τα οποία είτε εκκολάπτονται αμέσως είτε περνούν σε φάση διάπαυσης.

Εκτροφές μεταξοσκώληκα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας Ασπονδύλων του τομέα Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, στο εργαστήριο Σηροτροφίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και στο Ινστιτούτο Βιολογίας του ΕΚΕΦΕ “Δημόκριτος”. Τα υβρίδια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα J106 x Daizo και Qiufeng x Baiyu. Η εκτροφή πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 25°C και η τεχνητή εναλλαγή νύχτας-ημέρας είχε ρυθμιστεί κάθε 12 ώρες. Οι προνύμφες τρέφονταν με φύλλα μουριάς ή τεχνητή τροφή, όταν τα τελευταία δεν ήταν διαθέσιμα. Πριν χρησιμοποιηθούν πλένονται με άφθονο νερό και αφήνονται να στεγνώσουν. Τα πλυμένα

φύλλα διατηρούνται στους 4°C για 2-3 μέρες. Οι προνύμφες αναπτύχθηκαν σε κουτιά (τα οποία πρέπει να καθαρίζονται καθημερινά από περιττώματα και ξερά φύλλα) και κατά τη διάρκεια των εκδύσεων δεν πρέπει να μετακινηθούν καθόλου. Στο τέλος της 5^{ης} ηλικίας, οι προνύμφες μεταφέρονται σε τεχνητές κυψέλες για να «πλέξουν». Τρεις με τέσσερις ημέρες μετά την έναρξη πλεξίματος του κουκουλιού, οι προνύμφες μεταμορφώνονται σε νύμφες. Στη φάση αυτή το κουκούλι μπορεί να απομακρυνθεί ώστε να είναι δυνατή η παρακολούθηση της ωρίμανσης κάθε νύμφης.

2.2 Πρωτογενές βιολογικό υλικό: ανατομίες & σταδιοποίηση

Οι ανατομίες πραγματοποιήθηκαν σε θηλυκά άτομα, κατά κανόνα στην 7^η-8^η ημέρα του σταδίου της νύμφης, με σκοπό την απομόνωση ωοθυλακίων. Στο στάδιο αυτό αντιπροσωπεύονται όλα τα στάδια της ωογένεσης στα ωοθηκάρια: απαντούν προχοριογενετικά, χοριογενετικά ωοθυλάκια καθώς και 1-4 ώριμα ωοκύτταρα. Ο αριθμός των ωοθυλακίων, που βρίσκονται στο στάδιο της χοριογένεσης, μπορεί να ποικίλλει, από 40 έως 70 ωοθυλάκια, ανάλογα με το στέλεχος και τις συνθήκες διατροφής και καλλιέργειας. Ο διαχωρισμός αρσενικών και θηλυκών ατόμων μπορεί να γίνει από το στάδιο του 5^{ου} προνυμφικού σταδίου, αμέσως μετά την 4^η έκδυση. Τα θηλυκά άτομα έχουν 4 μικρές κυκλικές γαλακτόχρες παχύνσεις στο κοιλιακό οπίσθιο τμήμα (ventral-posterior abdomen) και, συγκεκριμένα, στο 11^ο-12^ο τμήμα που καλείται "Ishiwata imaginal bud". Πιο εύκολος και σίγουρος διαχωρισμός αρσενικών και θηλυκών ατόμων γίνεται στο στάδιο της νύμφης με βάση εξωτερικά μορφολογικά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, τα θηλυκά άτομα εμφανίζουν μια εγκοπή στην κοιλιακή πλευρά του τελευταίου μεταμερούς η οποία είναι απύσα στα αρσενικά άτομα. Οι ανατομίες

λαμβάνουν χώρα σε διάλυμα RINGER, με τη βοήθεια στερεοσκοπίου και ψυχρού φωτισμού (μέσω οπτικών ινών). Από κάθε άτομο απομονώνονται 8 ωθηκάρια. Αρχικά, πραγματοποιείται προσεκτική απομάκρυνση του λιπώδους ιστού, που με τη μορφή ινιδίων περιβάλλει τα ωθηκάρια. Στη συνέχεια, η απομόνωση και σταδιοποίηση των ωθυλακίων πραγματοποιείται αποκλειστικά σε ωθηκάρια που έχουν διατηρηθεί ακέραια.

Η σταδιοποίηση των ωθυλακίων βασίζεται στο γεγονός ότι αμέσως μετά τη βιτελλογένεση, και πριν τη χοριογένεση, το ωθυλάκιο γίνεται ελάχιστα πιο ανοιχτόχρωμο, λόγω της πρόσληψης νερού (φάση διόγκωσης), ενώ η επιφάνειά του κάτω από τα επιθηλιακά κύτταρα, υπό κατάλληλη γωνία φωτισμού, εμφανίζει μια ανεπαίσθητη γυαλάδα. Το ωθυλάκιο που εμφανίζει αυτά τα χαρακτηριστικά ορίζεται ως σημείο 0 της ανάπτυξης. Όσα ωθυλάκια προηγούνται συμβολίζονται με αρνητικούς αριθμούς (-1, -2, κλπ.) και αντιστοιχούν σε στάδια της βιτελλογένεσης, ενώ όσα έπονται συμβολίζονται με +1, +2, κλπ. και αντιστοιχούν σε στάδια της χοριογένεσης. Η σταδιοποίηση των χοριογενετικών ωθυλακίων βασίστηκε στα δεδομένα από τους (Nadel and Kafatos, 1980). Ένας δεύτερος, πιο πρακτικός τρόπος σταδιοποίησης των ωθυλακίων είναι η μεταφορά ενός εκ των 8 ωθηκαρίων σε διάλυμα 90% γλυκερόλης· λόγω οσμωτικών φαινομένων και εξαιτίας της χοριονικής μεμβράνης, η οποία είναι αδιαπέραστη από το νερό, τα βιτελλογενετικά ωθυλάκια συρικνώνονται, σε αντίθεση με τα χοριονικά που παραμένουν άθικτα. Όλα τα ωθυλάκια μέχρι το πρώτο χοριογενετικό ομαδοποιούνται ως προχοριογενετικά και αποτελούν το στάδιο **Vit** (vitellogenic). Από το πρώτο χοριογενετικό και μέχρι το πρώτο ώριμο αυγό τα ωθυλάκια ομαδοποιούνται ανά 10% του συνολικού αριθμού των χοριογενετικών ωθυλακίων στα ακόλουθα διαδοχικά αναπτυξιακά στάδια:

1. **E**, πρώιμα (early): περιέχει το πρώτο 10%.
2. **EM**, πρώιμα - ενδιάμεσα (early - middle): το δεύτερο 10%.
3. **M**, ενδιάμεσα (middle): το τρίτο 10%.
4. **ML**, ενδιάμεσα - όψιμα (middle - late): το τέταρτο 10%.
5. **L**, όψιμα (late): το πέμπτο 10%.
6. **VL**, πολύ όψιμα (very late): το επόμενο 20%.

Το τελευταίο 30% περιέχει πολύ ώριμα ωοθυλάκια, τα επιθηλιακά κύτταρα των οποίων έχουν αρχίσει να ατροφούν και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Έτσι, το ποσοστό αυτό, καθώς και όλα τα ώριμα αυγά, απορρίπτονται. Τα σταδιοποιημένα ωοθυλάκια μεταφέρονται, ανά στάδιο, σε ξεχωριστούς σωλήνες τύπου erpendorf, που περιέχουν διάλυμα RINGER, και τοποθετούνται σε πάγο. Μετά την απομόνωσή τους μπορούν να αποθηκευθούν στους -70°C , αφού πρώτα αφαιρεθεί το διάλυμα RINGER.

2.3 Απομόνωση ολικών νουκλεϊκών οξέων από ωοθυλάκια

Η μέθοδος βασίζεται στην κατεργασία του ιστού με διάλυμα SDS και πρωτεΐνάσης K, ώστε να αποδιαταχθούν οι κυτταρικές μεμβράνες και τα πρωτεϊνικά συστατικά.

1. Τοποθετούμε τον ιστό σε 400 μL διαλύματος 1 (200 mM NaCl, 20 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 2% SDS, 2,5 mg/ml πρωτεΐνάση K). (Συνήθως, 1-10 ωοθυλάκια, εξαιτίας της μικρής ποσότητας ιστού, τοποθετούνται σε 200 μL διαλύματος 1.)
2. Επώαση στους 50°C για 1-2 ώρες ανακινώντας περιοδικά.
3. Εκχύλιση με φαινόλη/sevag όσο χρειαστεί (2-6 φορές).

4. Προσθήκη 1/10 του όγκου 3 M οξικό νάτριο pH 5,2.
5. Προσθήκη 2 όγκων απόλυτης αιθανόλης.
6. Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C.
7. Ξέπλυμα του ιζήματος (DNA-RNA) με 80% αιθανόλη.
8. Ξήρανση και αναδιάλυση στον επιθυμητό όγκο διαλύματος 50% φορμαμιδίου-6% φορμαλδεΰδης.

Το παραπάνω πρωτόκολλο απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση κηλίδων σε επίπεδο RNA (dot-blot). Για το λόγο αυτόν, τα διαλύματα κατασκευάστηκαν με DEPC-ddH₂O. Σε περίπτωση, πάντως, που προτιμάται η απαλλαγή από το RNA (απομόνωση χρωμοσωμικού DNA), το πρωτόκολλο συνεχίζεται ως εξής:

9. Αναδιάλυση του ιζήματος σε ddsH₂O, προσθήκη RNase A (DNase free) σε τελική συγκέντρωση 0,1 mg/mL και παραμονή στους 37°C για 30 λεπτά.
10. Εκχύλιση με φαινόλη/sevag.
11. Προσθήκη 1/10 του όγκου 3 M οξικό νάτριο pH 5,2.
12. Κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων προσθέτοντας 2 όγκους απόλυτης αιθανόλης.
13. Ξέπλυμα του ιζήματος με 80% αιθανόλη.
14. Αναδιάλυση του ιζήματος στον επιθυμητό όγκο διαλύματος TE.

Το χρωμοσωμικό DNA, που απομονώνεται με το πιο πάνω πρωτόκολλο, χρησιμοποιήθηκε σε PCR κατόπιν αραίωσης (1:2-1:10).

2.4 Απομόνωση ρυθμιστικών στοιχείων από χρωματίνη ωοθυλακίων,

επιβοηθούμενη με φορμαλδεΐδη (FAIRE)

Η μέθοδος αυτή αποτελεί έναν απλό και γρήγορο τρόπο για τον προσδιορισμό περιοχών στο DNA που δεν είναι κατειλημμένες από νουκλεοσώματα. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, πραγματοποιήθηκε ένας συνδυασμός πρωτοκόλλων για την απομόνωση πυρήνων από σταδιοποιημένα ωοθυλάκια (βήματα 1-8), με μέριμνα για την ελάχιστη δυνατή μηχανική καταπόνηση. Ακολούθησε μονιμοποίηση των πυρήνων (και συνεπώς της χρωματίνης) με φορμαλδεΐδη, που λόγω του μικρού της μεγέθους μπορεί και διαπερνά την πυρηνική μεμβράνη (βήματα 9-14), λύση των πυρήνων και θραύση της χρωματίνης με τη χρήση υπερήχων (βήματα 15-17) και τέλος απομόνωση των ρυθμιστικών στοιχείων χρησιμοποιώντας την παραδοσιακή τεχνική εκχυλίσεων με φαινολη-sevag (βήματα 18-27).

1. Σπάσιμο των ωοθυλακίων στον πάγο με τη χρησιμοποίηση ακροφύσιου μηχανικής πιπέτας (tip) ενώ είναι κατεψυγμένα.
2. Προσθήκη 1 ml NP-40 lysis buffer (1x RSB, 0,5% NP-40, 0,15 mM σπερμίνη, 0,5 mM σπερμιδίνη). Ήπια ανάδευση κατά διαστήματα για 30 λεπτά.
3. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο erppendorf. Επανάληψη βήματος 2 στο erppendorf με τα αυγά.
4. Μεταφορά του υπερκείμενου.
5. Φυγοκέντρηση στα 2000g για 15 min στους 4°C (swing rotor).
6. Απόρριψη υπερκείμενου και αναδιάλυση του ιζήματος σε 100μL αραιής σουκρόζης 0,25 M.
7. Εναπόθεση του διαλύματος με την αραιή σουκρόζη σε erppendorf που περιέχει 1,7 ml 2,0 M σουκρόζη. Φυγοκέντρηση στα 2000g για 15 λεπτά στους 4°C.

8. Απόρριψη υπερκείμενου και ξέπλυμα ιζήματος 2 φορές με διάλυμα PBS.
9. Φυγοκέντρηση στα 2000g για 10 min στους 4°C.
10. Απόρριψη υπερκείμενου, αναδιάλυση σε 750 μL διαλύματος 1% φορμαλδεύδης σε PBS για να γίνει μονιμοποίηση (crosslinking).
11. Απαλή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 10-15 λεπτά.
12. Προσθήκη γλυκίνης σε τελική συγκέντρωση 0,125 M και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά (τερματισμός της μονιμοποίησης).
13. Φυγοκέντρηση στα 3000g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
14. Ξεπλύματα με PBS, 3 φορές, με ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις, όπως στο βήμα 13.
15. Αναδιάλυση του ιζήματος σε 600 μL Lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 1-1.5% NP-40, 1 mM DTT) σε θερμοκρασία δωματίου και επώαση για 10 λεπτά, προκειμένου να αποδιαταχθούν οι δομές του πυρήνα.
16. Ακολουθεί θραύση χρωματίνης με τη χρήση υπερήχων (amplitude 20%, cycle 0.5, 50x20 pulses, UP200 S sonicator) ώστε να έχουμε τμήματα μήκους 100-300 ζευγών βάσεων.
17. Φυγοκέντρηση 15000g για 5 λεπτά στους 4°C.
18. Εκχύλιση υπερκείμενου με φαινόλη-sevag στους 4°C. Μεταφέρουμε την υδατική φάση σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf και στην οργανική φάση προσθέτουμε 500 μL TE.
19. Ανάμιξη των υδατικών φάσεων και εκχύλιση με φαινόλη-sevag στους 4°C.

20. Προσθήκη 1/10 του όγκου οξικό αμμώνιο (3 M NaAc, pH 5,2) και 2 ½ όγκους 100% αιθανόλης.
21. Παραμονή στους -20°C ο/η.
22. Φυγοκέντρηση σε 12000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C.
23. Ξέπλυμα του ιζήματος με 80% αιθανόλη, ξήρανση και αναδιάλυση σε 20μL ddsH₂O.
24. Προσθήκη RNaseA για 2 ώρες στους 37°C.
25. Μεταφορά στους 65°C για ≥5 ώρες προκειμένου να γίνει αντιστροφή της μονιμοποίησης DNA-DNA.
26. Εκχύλιση υπερκείμενου με φαινόλη-sevag.
27. Επανάληψη βημάτων 20-23 (κατακρήμνιση DNA).

Τα απομονωμένα τμήματα DNA μπορούν να μεταφερθούν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και να χρησιμοποιηθούν σε υβριδοποιήσεις, με κατάλληλους ραδιοσημασμένους ανιχνευτές, και αυτοραδιογραφία, προκειμένου να προσδιοριστούν οι ελεύθερες από νουκλεοσώματα περιοχές DNA.

2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (συμβατική PCR)

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιείται για τον *in vitro* ενζυμικό πολλαπλασιασμό συγκεκριμένης αλληλουχίας δίκλωνου DNA. Η διαδικασία στηρίζεται σε συνεχείς κύκλους πολυμερισμού του DNA, με τη βοήθεια μιας DNA πολυμεράσης και δύο ειδικών μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητών), που καθορίζουν τα όρια του τμήματος DNA που θα πολλαπλασιαστεί. Οι εκκινητές είναι αντιπαράλληλης κατεύθυνσης και συμπληρωματικοί με τις δύο αλυσίδες του DNA. Η αντίδραση πολυμερισμού απαιτεί την

παρουσία τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων και ιόντων Mg^{++} .

Τα βασικά βήματα της PCR είναι: (α) αρχική αποδιάταξη του υποστρώματος DNA (template), (β) 25-40 κύκλοι πολυμερισμού, οι οποίοι περιλαμβάνουν αποδιάταξη υποστρώματος, πρόσδεση εκκινητών (annealing) και επιμήκυνση από το 3' OH του εκκινητή στην κάθε αλυσίδα και (γ) επιμήκυνση, προκειμένου να πολυμεριστούν πιθανά ατελή τμήματα DNA. Γενικά, η απόδοση της αντίδρασης εξαρτάται από πολλές παραμέτρους, όπως καθαρότητα του υποστρώματος DNA, σχετική ποσότητα των ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών και DNA, συγκέντρωση $MgCl_2$ και σωστή επιλογή χρόνου και θερμοκρασίας στα βήματα κάθε κύκλου.

Στην παρούσα διατριβή, ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το γενετικό υλικό του μεταξοσκώληκα και πλασμιδιακό DNA. Η ποσότητα του DNA, που χρησιμοποιείται στη αντίδραση, εξαρτάται κυρίως από την πολυπλοκότητα του DNA (δηλαδή το βαθμό αντιπροσώπευσης του επιθυμητού τμήματος DNA). συνήθως, απαιτείται ποσότητα από 0,01-1 μg . Η Taq DNA πολυμεράση, που χρησιμοποιήθηκε, ανήκει στην εταιρεία Promega. Σε αντιδράσεις όπου απαιτούνταν ο πολλαπλασιασμός μεγάλου τμήματος DNA (>3 kb, long PCR) και υψηλή πιστότητα (proof-reading) χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes).

Σε κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε μείγμα τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), σε τελική συγκέντρωση 200 μM το καθένα, και $MgCl_2$, σε τελική συγκέντρωση από 1,5-3 mM. Η συγκέντρωση του $MgCl_2$ είναι παράμετρος υπεύθυνη για την ειδικότητα της αντίδρασης. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 2.1) βρίσκονται σε τελική συγκέντρωση 0,2-0,6 $\mu moles/\mu L$ αντίδρασης. Το μήκος τους κυμαίνεται συνήθως από 18-30 νουκλεοτίδια. Το σημείο τήξης (T_m) του κάθε εκκινητή προσδιορίζεται από την εταιρεία

κατασκευής τους (Invitrogen, MWG Biotech). Είναι σημαντικό σε κάθε αντίδραση να χρησιμοποιούνται εκκινητές με παραπλήσιο σημείο τήξης και αλληλουχία που να μην επιτρέπει τη δημιουργία δευτεροταγών δομών και την εκτενή συμπληρωματικότητα μεταξύ τους (cross-dimer, ελέγχεται μέσω του λογισμικού Primer Premier 5.0).

Πίνακας 2.1

Όνομα	Αλληλουχία (5'-3')	Χρήση/Υπόστρωμα εκκινητή
5H4F	CCAAATTGGTAATACT	Πολ/σμός υποκινητή 5H4 (από το -136 έως το +31 του γονιδίου 5H4)
5H45U	ACACGCGTCGACAGGTCTATCCTCCAA	
Erp1F	GCGGGGAAGCTTAAACTTCTGAGGGC	Πολ/σμός υποκινητή Er1 (από το +27 του γονιδίου ErB.1 έως το +30 του ErA.1)
Erp1R	GCGGGGAAGCTTGTGATCAATTGAGGAAC	
L9fFR1	GGAATTCGACGGAGAATGCTATTACTG	Πολ/σμός υποκινητή L9 (από το +10 του A.L9 έως το +10 του B.L9)
L9fRR1	GGAATTCACCTCAGAATGAGTTCGATGTC	
L1fFR1	GGAATTCGATCTAGAATGTTTCCAAC TA	Πολ/σμός υποκινητή L1 (από το +10 του A.L1 έως το +10 του B.L1)
L1fRR1	GGAATTCACCTCAGAATGAGTTCACCTTG	
mutGATApL9F	GTCACGTTTTTGACTGTGGACACTTGAG	Πολ/σμός υποκινητή L9 με μεταλλαγμένη την αλληλουχία GATA
mutGATApL9R	CTCAAGTGTCACAGTCAAAAACGTGAC	
mutHMGIpL9F	GTAGAATTGTGAAAAACAGGCTTTTTCCTTG	Πολ/σμός υποκινητή L9 με μεταλλαγμένη την αλληλουχία HMGI
mutHMGIpL9R	CAAGGAAAAAGCCTGGTTTTTTCACAATTCTAC	
mutHMGIpL9F	GACACGTATCCCGAGCTGTCTCC	Πολ/σμός υποκινητή L9 με

mutHMGIIP9R	GGAGACAGCTCGGGGATACGTGTC	μεταλλαγμένη την αλληλουχία HMGI
mutCEBP1pL9F	GGGCGATTACGATGAAGTTTGAATG	Πολ/σμός υποκινητή L9 με μεταλλαγμένη την αλληλουχία C/EBP1
mutCEBP1pL9R	CATTTCAAACTTCATCGTAATCGCCC	
mutCEBP2pL9F	GCGATTACGACAAAGCATTGAAATGTAG	Πολ/σμός υποκινητή L9 με μεταλλαγμένη την αλληλουχία C/EBP2
mutCEBP2pL9R	CTACATTTCAATGCTTTGTCGTAATCGC	
mutCEBP1+2pL9F	GCGATTACGATGAAGCATTGAAATGTAG	Πολ/σμός υποκινητή L9 με μεταλλαγμένες τις αλληλουχίες C/EBP1+2
mutCEBP1+2pL9R	CTACATTTCAATGCTTCATCGTAATCGC	
mutCEBP3pL9F	CATTCATACAAAACCTCACAAAGGTACAG	Πολ/σμός υποκινητή L9 με μεταλλαγμένη την αλληλουχία C/EBP3
mutCEBP3pL9R	CTGTACCTGTGAGGTTTTGTATGAATG	
3mutCEBP4pL9F	GGACACTTGAGTGGTATTCCGTATAAAAC	Πολ/σμός υποκινητή L9 με μεταλλαγμένη την αλληλουχία C/EBP4
3mutCEBP4pL9R	GTTTTATACGGAATACCACTCAAGTGTCC	
modpL9+M13F	GTTTTCCAGTCACGACCTAAACGAAAACTACTATTACTACAC	Πολ/σμός υποκινητή L9 έπειτα από χημική τροποποίηση με δισουλφοξείδιο (από το +13 του γονιδίου A.L9 έως το +9 του B.L9)
modpL9R	CTTCAAATAAATTCGATATCAATTATATC	

Παρουσιάζονται το όνομα, η αλληλουχία (με κόκκινο συμβολίζονται τα μεταλλαγμένα νουκλεοτίδια) και η χρήση όλων των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις PCR, συμβατικές ή για μεταλλαξογένεση. Σε όλες τις περιπτώσεις της παρούσας διδακτορικής διατριβής ως +1 ορίζεται το σημείο έναρξης της μεταγραφής (cap site).

Ανάλογα με τις ειδικές απαιτήσεις κάθε αντίδρασης, οι συνθήκες (θερμοκρασία και χρόνος του κάθε βήματος) μπορεί να ποικίλουν. Κατά κανόνα, μία αντίδραση περιλαμβάνει μία αρχική αποδιάταξη στους 94⁰C ή στους 95⁰C για 1 έως 3 λεπτά. Οι κύκλοι πολυμερισμού που ακολουθούν περιλαμβάνουν αποδιάταξη, στην ίδια θερμοκρασία, για 50 δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό, πρόσδεση των εκκινητών σε θερμοκρασία που καθορίζεται από το σημείο τήξης τους (συνήθως 2-4⁰C χαμηλότερα από το σημείο τήξης) από 15 δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό και επιμήκυνση στους 72⁰C ή 74⁰C (ανάλογα με την Taq πολυμεράση) για 20 δευτερόλεπτα έως 3 λεπτά. Ο χρόνος της επιμήκυνσης καθορίζεται από το μήκος του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Ο αριθμός των κύκλων επίσης ποικίλει και εξαρτάται από το βαθμό αντιπροσώπευσης του επιθυμητού DNA. Μετά από τους κύκλους πολυμερισμού ακολουθεί ένα τελευταίο στάδιο επιμήκυνσης στη θερμοκρασία λειτουργίας του κάθε ενζύμου (72-74⁰C) για 2-10 λεπτά. Στην περίπτωση αντίδρασης PCR για *in vitro* μεταλλαξογένεση, η μόνη παράμετρος που αλλάζει είναι η θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών που καθορίζεται από το σημείο τήξης τους (συνήθως 10⁰C χαμηλότερα από το σημείο τήξης). Τα παραπάνω συστατικά αναμιγνύονται σε σωλήνα τύπου erpendorf των 0,5 mL ή 0,25 mL. Οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν είναι των εταιρειών Techne Progene και LabNet.

2.6 Παρασκευή φορέα κλωνοποίησης & αντίδραση τεχνητής σύνδεσης

Η διαδικασία περιλαμβάνει πέψη του πλασμιδίου με τα επιθυμητά περιοριστικά ένζυμα και επίδραση του ενζύμου της αλκαλικής φωσφατάσης, προκειμένου να αποφευχθεί η επανακυκλοποίηση του γραμμικού πλασμιδίου. Για τις ανάγκες της παρούσας διδακτορικής διατριβής, ως φορείς κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα

πλασμίδια: pBluescript II KS+/- (STRATAGENE), pUC9 και pTurbo-RFP-PRL (Evrogen).

1. Πέψη της επιθυμητής ποσότητας πλασμιδιακού DNA με το κατάλληλο, για τη δεδομένη υποκλωνοποίηση, περιοριστικό ένζυμο.
2. Ηλεκτροφορητικός έλεγχος μικρής ποσότητας DNA για να διαπιστωθεί ότι η πέψη είναι πλήρης.
3. Απενεργοποίηση του ενζύμου με θέρμανση στους 65°C για 10 λεπτά.
4. Προσθήκη 1/10 του όγκου ρυθμιστικού διαλύματος 1 M Tris-HCl pH 8,8 και 20 units του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση (CIP). Επώαση στους 37°C για 45 λεπτά.
5. Μεταφορά στους 65°C για 10 λεπτά για απενεργοποίηση της CIP.
6. Προσθήκη 1/10 του όγκου 0,5 M EDTA pH 8,0 και εκχύλιση με φαινόλη/SEVAG μέχρι πλήρους απομακρύνσεως των πρωτεϊνών.
7. Ηλεκτροφόρηση σε παρασκευαστικό πήκτωμα αγαρόζης 1,5% για τον διαχωρισμό των διαμορφώσεων του πλασμιδίου.
8. Απομόνωση της ζώνης του γραμμικού πλασμιδιακού DNA.
9. Ακολουθεί κατακρήμνιση του απομονωμένου DNA και αναδιάλυση στον επιθυμητό όγκο TE ή ddH₂O και ποσοτικός προσδιορισμός του DNA φωτομετρικά.

Ακολουθεί τεχνητή σύνδεση των άκρων μορίων DNA με τη βοήθεια του ενζύμου T4 DNA λιγάση, το οποίο, παρουσία ATP, καταλύει το σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ 5'-P και 3'-OH. Η σύνδεση μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο μεταξύ τμημάτων DNA με μονόκλινα συμπληρωματικά (cohesive) άκρα όσο και μεταξύ δίκλωνων, «ίσων» άκρων (blunt-end). Οι ποσότητες DNA του φορέα και του

ενθέματος (insert) σε κάθε αντίδραση είναι, κατά κανόνα, ισομοριακές, εκτός αν για την συγκεκριμένη κλωνοποίηση απαιτούνται διαφορετικές αναλογίες (αύξηση της διαθεσιμότητας του ενθέματος). Το 10X ρυθμιστικό διάλυμα (ligation buffer) περιέχει 0,5 M Tris-HCl pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 1 mg/ml BSA, 100 mM DTT και 5 mM ATP. Η T4 DNA λιγάση (TAKARA) χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 15 u/μL ενώ η T4 DNA λιγάση (FERMENTAS) χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 0,05-1 u/μL. Το ένζυμο αυτό διατίθεται με συμβατό 10X ρυθμιστικό διάλυμα. Η αντίδραση επωάζεται για 4-16 ώρες στους 16°C (TAKARA) ή για 15 λεπτά στους 22°C (FERMENTAS).

2.7 Παρασκευή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων

Τα βακτηριακά στελέχη *Escherichia coli*, που χρησιμοποιήθηκαν για μετασχηματισμό, είναι τα: DH5α και DH10B. Η διαδικασία παρασκευής δεκτικών κυττάρων στηρίζεται σε δύο βασικές προϋποθέσεις: (α) η καλλιέργεια πρέπει εισέλθει στην εκθετική της φάση και (β) τα κύτταρα πρέπει να υποστούν επεξεργασία με διαλύματα κατάλληλων αλάτων, συνήθως δισθενών κατιόντων.

1. Ανάπτυξη καλλιέργειας έναρξης (~5 ml).
2. Εμβολιασμός 75 ml θρεπτικού υλικού με 0,5 ml από την καλλιέργεια έναρξης. Επώαση, υπό ανάδευση, στους 37°C, έως ότου η οπτική πυκνότητα φτάσει OD₆₀₀= 0,35 - 0,4.
3. Τοποθέτηση της καλλιέργειας στον πάγο για 10-15 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 2500 rpm για 12 λεπτά στους 4°C.
4. Αναδιάλυση του κυτταρικού ιζήματος σε 25 ml διαλύματος 1 (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂·4H₂O, 30 mM οξικό κάλιο pH 7,5, 10 mM CaCl₂·2H₂O, 15% γλυκερόλη, τελικό pH διαλύματος 5,8 με

προσθήκη διαλύματος 0,2 M οξικού οξέος) και επώαση των κυττάρων στον πάγο για 15 - 20 λεπτά.

5. Φυγοκέντρηση όπως στο βήμα 3.
6. Αναδιάλυση του κυτταρικού ιζήματος σε 6 ml διαλύματος 2 [10 mM MOPS pH 6,8, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂·2H₂O, 15% w/v γλυκερόλη, τελικό pH διαλύματος 6,8 με προσθήκη διαλύματος NaOH] και επώαση των κυττάρων στον πάγο για 15 λεπτά.
7. Μοίρασμα 100 και 200 µL δεκτικών κυττάρων σε σωλήνες τύπου erpendorf. Απότομη ψύξη των κυττάρων σε υγρό άζωτο ή ξηρό πάγο και διατήρησή τους στους -80°C. Τα δύο διαλύματα αποστειρώνονται με διήθηση σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης, με πόρους διαμέτρου 0,45 µm ή 0,22 µm (Millipore).

Πριν μετασχηματιστούν, τα δεκτικά κύτταρα πρέπει να μείνουν για περίπου 30 λεπτά στον πάγο ώστε να ξεπαγώσουν.

2.8 Μετασχηματισμός δεκτικών κυτάρων

1. Προσθήκη 1-200 ng ανασυνδυασμένου DNA (σε μέγιστο όγκου 10 µL) σε 200 µL δεκτικών κυττάρων και επώαση για 30 λεπτά στον πάγο.
2. Θερμικό σοκ των κυττάρων με επώαση για 2 λεπτά στους 42°C.
3. Προσθήκη 1 mL θρεπτικού μέσου LB και επώαση για 1 ώρα στους 37°C.
4. Φυγοκέντρηση στις 6000 rpm για 3 λεπτά και αναδιάλυση του βακτηριακού ιζήματος σε 200 µL θρεπτικού μέσου LB.
5. Επίστρωση των βακτηρίων σε τρυβλία (διαμέτρου 90 mm) που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό και έχουν επιστρωθεί με 50 µL

X-gal.

6. Επώαση των τρυβλίων στους 37°C για 16 ώρες.

Η ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων κλώνων πραγματοποιείται μέσα από ποικίλα φίλτρα επιλογής. Αρχικά, τα βακτηριακά κύτταρα, μετά τον μετασχηματισμό, επιστρώνονται σε θρεπτικό μέσο, παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού για το οποίο το πλασμίδιο παρέχει ανθεκτικότητα, με επακόλουθο να αναπτύσσονται τα κύτταρα που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο. Το δεύτερο φίλτρο επιλογής αφορά την παρουσία X-gal στο θρεπτικό μέσο και την επιλογή των άσπρων αποικιών. Η επιλογή αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι η παρεμβολή του εξωγενούς DNA γίνεται εντός του πολυσυνδέσμου, που είναι ενσωματωμένος στο γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης, με επακόλουθο την αδρανοποίησή του γονιδίου και την αδυναμία υδρόλυσης του X-gal. Στην περίπτωση που τα κύτταρα έχουν προσλάβει το μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης εκφράζεται φυσιολογικά και το προϊόν της διασπά το X-gal παράγοντας μια μπλε χρωστική. Ο έλεγχος των ανασυνδυασμένων κλώνων πραγματοποιείται επίσης μέσω απομόνωσης πλασμιδιακού DNA και πέψης με τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες και μέσω προσδιορισμού της πρωτοδιάταξης του εξωγενούς DNA. Η διατήρηση του ανασυνδυασμένου κλώνου γίνεται με καλή ανακίνηση (vortex) της καλλιέργειας και διαλύματος 100% γλυκερόλης σε αναλογία 1:1, σε κατάλληλους σωλήνες (liquid stabs). Τα κύτταρα διατηρούνται ικανά για ανακαλλιέργεια στους -70°C για μερικά χρόνια.

2.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini prep)

Το πρωτόκολλο βασίζεται στη μέθοδο της αλκαλικής λύσης.

- 1.** Ανάπτυξη 2 mL υγρής βακτηριακής καλλιέργειας, με το επιθυμητό πλασμίδιο, σε θρεπτικό υλικό LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό στους 37°C για 12-16 ώρες.

2. Μεταφορά 1,5 ml της καλλιέργειας σε σωλήνα μικροφυγοκέντρου τύπου errendorf και φυγοκέντρωση στις 8000 rpm για 2 λεπτά.
3. Αναδιάλυση του βακτηριακού ιζήματος σε 100 μ L διαλύματος I (50 mM γλυκόζη, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8,0) με μηχανική ανακίνηση (vortex). Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
4. Προσθήκη 200 μ L φρέσκου διαλύματος II (0,2 N NaOH, 1% SDS), ήπια ανάδευση και διατήρηση στον πάγο για 5 λεπτά.
5. Προσθήκη 150 μ L διαλύματος III (3 M οξικό κάλιο pH 4,8), μηχανική ανακίνηση με το σωλήνα ανάποδα για 1 δευτερόλεπτο και παραμονή στον πάγο για 5 λεπτά.
6. Φυγοκέντρωση στις 12000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα.
7. Εκχύλιση με φαινόλη/SEVAG. Μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο σωλήνα.
8. Προσθήκη 2 όγκων παγωμένης αιθανόλης και διατήρηση στον πάγο για 10 λεπτά. Φυγοκέντρωση στις 12000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C και ξέπλυμα του ιζήματος με 80% αιθανόλη.
9. Ξήρανση, υπό κενό, και αναδιάλυση του ιζήματος στην επιθυμητή ποσότητα TE (συνήθως 20 μ L).

Το πλασμιδιακό DNA, που απομονώνεται με αυτή τη μέθοδο, είναι κατάλληλο για πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, με σκοπό τη χαρτογράφηση ή την απομόνωση του κλωνοποιημένου DNA.

2.10 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα (midi prep)

Το πρωτόκολλο βασίζεται στη μέθοδο της αλκαλικής λύσης.

1. Ανάπτυξη 20 mL βακτηριακής καλλιέργειας, με το επιθυμητό πλασμίδιο, σε θρεπτικό υλικό LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό, στους 37°C για 12-16 ώρες.
2. Μεταφορά της καλλιέργειας σε σωλήνα τύπου Falcon των 50 mL και φυγοκέντρηση στις 6000 rpm για 5 λεπτά.
3. Αναδιάλυση του ιζήματος σε 400 µL διαλύματος I με μηχανική ανακίνηση και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Μεταφορά σε 4 σωλήνες τύπου erpendorf (100 µL ανά σωλήνα).
4. Προσθήκη 200 µL φρέσκου διαλύματος II σε κάθε σωλήνα τύπου erpendorf. Ήπια ανάδευση και παραμονή στον πάγο για 10 λεπτά.
5. Προσθήκη 150 µL διαλύματος III. Μηχανική ανάδευση, με τους σωλήνες ανάποδα, για 1 δευτερόλεπτο και διατήρηση στον πάγο για 10 λεπτά.
6. Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Μεταφορά των υπερκείμενων σε νέους σωλήνες.
7. Εκχύλιση με φαινόλη/SEVAG και μεταφορά των υδατικών φάσεων σε νέους σωλήνες.
8. Σε κάθε σωλήνα υπερκείμενου προστίθενται 3 µL RNAase A (10 mg/ml) και επώαση στους 37°C για 30 λεπτά.
9. Εκχύλιση με φαινόλη/SEVAG.
10. Μεταφορά των υδατικών φάσεων σε νέους σωλήνες και προσθήκη 2 όγκων απόλυτης αιθανόλης. Παραμονή στον πάγο για 10 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C.

11. Ξέπλυμα των ιζημάτων με 80% αιθανόλη και ξήρανση υπό κενό.
12. Ενοποίηση των ιζημάτων με αναδιάλυσή τους σε συνολικό όγκο 80 μL H₂O. Προσθήκη 20 μL 4 M NaCl και 100 μL 13% PEG 8.000. Παραμονή για τουλάχιστον δύο ώρες στον πάγο.
13. Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C.
14. Ξέπλυμα του ιζήματος 2-3 φορές με 80% αιθανόλη για την απομάκρυνση του PEG και του άλατος.
15. Ξήρανση, υπό κενό, και αναδιάλυση σε 40 μL TE.

Το DNA, που απομονώνεται με αυτή τη μέθοδο, είναι κατάλληλο για προσδιορισμό της πρωτοδιάταξης του κλώνου.

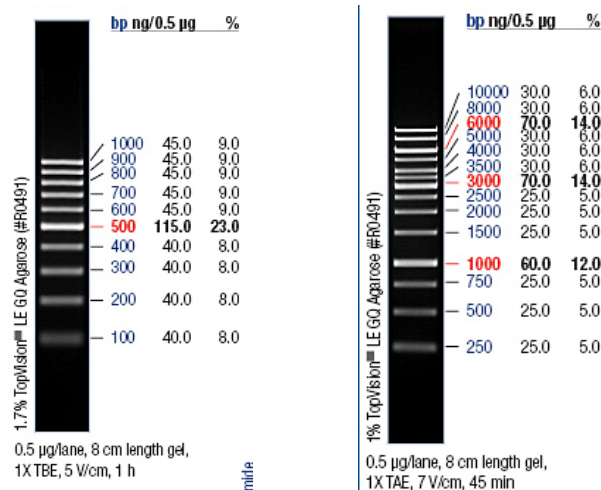
2.11 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (maxi prep)

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε ξεκινώντας από μεγάλους όγκους καλλιέργειας (~1000 mL), μέσω των στηλών χρωματογραφικού καθαρισμού Nucleobond Extra-Maxi (Macherey-Nagel), για απομόνωση μεγάλης ποσότητας DNA (~1000 μg).

2.12 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα αγαρόζης αποτελεί βασική μέθοδο για τον διαχωρισμό, τον προσδιορισμό μεγέθους τμημάτων DNA και τον μετέπειτα καθαρισμό τους. Επίσης, αποτελεί μία απλή διαδικασία για τον έλεγχο της ποιότητας του DNA και για τον προσδιορισμό της ποσότητάς του. Ανάλογα με τα μεγέθη του DNA και τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιούνται πηκτώματα αγαρόζης 0,7-2%. Τα πηκτώματα παρασκευάζονται με διάλυση της αγαρόζης σε ρυθμιστικό

διάλυμα 0,5X TBE, που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, και βρασμό. Το διάλυμα τοποθετείται σε ειδικές ηλεκτροφορητικές συσκευές αφού τοποθετηθούν τα κατάλληλα χτένια με σκοπό τη δημιουργία ειδικών θέσεων (πηγάδια, slots). Τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση αναμιγνύονται με 1/10 του όγκου διάλυμα χρωστικής (0,025% μπλε της βρωμοφαινόλης και/ή 0,025% κυανού της ξυλόλης, 50% γλυκερόλη σε TE) και τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις του πηκτώματος. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,5X TBE, σε ειδικές συσκευές, υπό την επίδραση κατάλληλου ηλεκτρικού πεδίου (50–150 V). Η θέση του DNA στο πήκτωμα μπορεί να προσδιοριστεί άμεσα με την προσθήκη στο πήκτωμα βρωμιούχου αιθιδίου, μιας φθορίζουσας χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων και η οποία παρουσία υπεριώδους φωτός φθορίζει χαρακτηριστικά (πορτοκαλί χρώμα). Ο προσδιορισμός του μεγέθους των εξεταζόμενων τμημάτων DNA επιτυγχάνεται με την παρουσία, στο πήκτωμα, κατάλληλου προτύπου DNA (marker). Οι markers που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι οι: 1 Kb και 100 bp ladder (Fermentas). Τα μεγέθη των ζωνών σε ζεύγη βάσεων παρουσιάζονται στην εικόνα 2.1. Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης, τα πηκτώματα φωτογραφίζονται με τη χρήση ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής (Sony DSC-W55) και φίλτρου, για τη διερχόμενη υπεριώδη ακτινοβολία (364 nm), από ειδική UV-φωτοτράπεζα.



Εικόνα 2.1 Οι markers, 1 Kb (δεξιά) και 100 bp (αριστερά) που χρησιμοποιήθηκαν σε ηλεκτροφορήσεις.

2.13 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης

Η εισαγωγή υδροξυ-αιθυλομάδων στην πολυσακχαρική αλυσίδα της αγαρόζης έχει οδηγήσει σε νέους τύπους, που διαλυτοποιούνται στους 65°C, ενώ δημιουργούν στερεό πήκτωμα στους 30°C. Οι ιδιότητες αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί με σκοπό την εύκολη απομόνωση ζώνης DNA από πηκτώματα. Το μικρό ποσοστό αγαρόζης, που κατακρημνίζεται με το DNA, δεν αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για την πραγματοποίηση αντιδράσεων σύνδεσης άκρων και προσδιορισμού της πρωτοδιάταξης του. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η ακόλουθη:

- 1.** Τομή του πηκτώματος της 'low-melting' αγαρόζης, που περιλαμβάνει την προς απομόνωση ζώνη, με, όσο το δυνατό, περιορισμό της αγαρόζης που παραλαμβάνεται.
- 2.** Τοποθέτηση του τμήματος του πηκτώματος σε 5 όγκους διαλύματος που περιέχει 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA. Επώαση για 5 λεπτά στους 65°C, επαναφορά σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να πέσει η θερμοκρασία του διαλύματος (<40°C).
- 3.** Εκχύλιση με φαινόλη, φαινόλη/sevag και τελευταία με sevag.
- 4.** Προσθήκη 1/5 του όγκου οξικό αμμώνιο (3 M NaAc, pH 5.2 και 2 ½ όγκους 100% αιθανόλης.
- 5.** Παραμονή στους -80°C για 30 λεπτά και στους -20°C για 20 λεπτά.
- 6.** Φυγοκέντρηση σε 12000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C.
- 7.** Ξέπλυμα του ιζήματος με 80% αιθανόλη, ξήρανση και αναδιάλυση στον επιθυμητό όγκο TE ή ddsH₂O.

2.14 Ραδιοσήμανση & χρωματογραφικός καθαρισμός τμημάτων DNA

Για τις ανάγκες της διατριβής χρησιμοποιήθηκαν τριφωσφωρικά δεοξυριβονουκλεοτίδια ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$) για τη σήμανση ανιχνευτών. Τα ραδιενεργά νουκλεοτίδια είχαν ειδική ενεργότητα 800 Ci/mmol ή 3000 Ci/mmol, ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος. Όλα τα ραδιενεργά αντιδραστήρια προήλθαν από τις εταιρίες ICN και IZOTOP. Για τη σήμανση μορίων DNA χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι του “nick translation”, του πολυμερισμού των άκρων των τμημάτων DNA μέσω της μεγάλης υπομονάδας της DNA πολυμεράσης I (Klenow fragment) και της ακραίας σήμανσης με T4 πολυνουκλεοτιδική κινάση.

Η μέθοδος “**nick-translation**” στηρίζεται στο τυχαίο σπάσιμο φωσφοδιεστερικών δεσμών του DNA με τη βοήθεια του ενζύμου DNase I (DNase I) και στις δύο ενεργότητες του ενζύμου DNA πολυμεράση I. Η ενεργότητα της 5'→3' εξωνουκλεάσης αφαιρεί νουκλεοτίδια από τα ελεύθερα 5' άκρα, τα οποία έχουν προκύψει εξαιτίας της δράσης της DNάσης I. Η ενεργότητα της 5'→3' πολυμεράσης προσθέτει νουκλεοτίδια στα ελεύθερα 3'OH. Ένα ή και δύο νουκλεοτίδια στο μίγμα των νουκλεοτιδίων είναι ραδιενεργά, ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος. Η DNase I (Boehringer Mannheim) παρέχεται σε διάλυμα 1 mg/ml. Πριν την έναρξη της αντίδρασης αραιώνεται 1/5000. Αναμιγνύονται τα συστατικά της αντίδρασης, ddsH_2O , DNA, dNTPs, 10X Nick Translation Buffer (NTB, 0,5 M Tris-HCl pH 7.2, 0,1 M MgSO_4 , 1 mM DTT, 500 $\mu\text{g/ml}$ BSA). Προστίθεται η ποσότητα της DNase I (1 μL). Κατόπιν, γίνεται η προσθήκη του ραδιενεργού νουκλεοτιδίου $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ και τελευταία της DNA πολυμεράσης I (5 units, Boehringer Mannheim). Η αντίδραση πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο των 11–13°C για 30 έως 60 λεπτά. Μετά το τέλος της επώασης, η αντίδραση αναμιγνύεται με 1/10 του

όγκου 0,5 M EDTA ή ίσου όγκου χρωστικής (0,025% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,025% μπλε της δεξτράνης, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8) με σκοπό την αναστολή της δράσης των ενζύμων. Ακολουθεί απομάκρυνση των μη ενσωματωμένων νουκλεοτιδίων μέσω στήλης χρωματογραφίας P-60 ή Sephadex G-25/50.

Η μέθοδος “**end fill-in**” στηρίζεται στις ιδιότητες της μεγάλης υπομονάδας της DNA πολυμεράσης I (klenow fragment). Αυτή διαθέτει την ενεργότητα 5'→3' πολυμεράσης και 3'→5' εξωνουκλεάσης, ενώ στερείται της 5'→3' εξωνουκλεάσης. Η ραδιοσήμανση πραγματοποιείται με συμπλήρωση των μονόκλωνων ουρών και απαιτεί ελεύθερα 3'OH στα υπολειπόμενα άκρα του τμήματος DNA. Τα ραδιενεργά νουκλεοτίδια επιλέγονται με τέτοιο τρόπο ώστε να υπάρχουν τα συμπληρωματικά τους στα 5' προεξέχοντα άκρα (στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε [α -³²P]dATP). Η αντίδραση της Klenow έχει χρησιμοποιηθεί και απουσία ραδιενεργών νουκλεοτιδίων με σκοπό τη συμπλήρωση των μονόκλωνων άκρων σε τμήματα DNA που προορίζονται για κλωνοποίηση στη περιοριστική θέση της *Sma*I σε πλασμιδιακούς φορείς. Η αντίδραση έχει συνολικό όγκο 20 μ L. Αφού αναμιχθούν όλα τα συστατικά της αντίδρασης, με τελευταίο το ένζυμο Klenow (Fermentas), γίνεται επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, για 30–60 λεπτά. Στο τέλος της επώασης, προστίθενται 5 μ L διαλύματος χρωστικής (0,025% μπλε της βρωμοφαινόλης, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8), που δεν περιέχει μπλε της δεξτράνης, και 80 μ L διαλύματος TE. Η αντίδραση προστίθεται σε κολώνα P-60 ή Sephadex G-25/50 για να πραγματοποιηθεί η απομάκρυνση των μη ενσωματωμένων νουκλεοτιδίων.

Η μέθοδος της “**ακρικής σήμανσης (end labeling)**” με T4 πολυνουκλεοτιδική κινάση στηρίζεται στην αντικατάσταση του ακραίου 5' φωσφόρου ενός μορίου DNA με [γ -³²P] από ραδιενεργό νουκλεοτίδιο [γ -³²P]dATP. Αφού αναμιχθούν όλα τα συστατικά της αντίδρασης, με

τελευταίο το ένζυμο T4 πολυνουκλεοτιδική κινάση (Fermentas), γίνεται επώαση στους 37°C για 30 λεπτά. Ακολουθεί τερματισμός της αντίδρασης με προσθήκη 1 μl EDTA (0,5 M) και επώαση στους 75°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθεται 1/10 του όγκου χρωστικής (0,025% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,025% μπλε της δεξτράνης, 50% γλυκερόλη). Τέλος, γίνεται απομάκρυνση των μη ενσωματωμένων νουκλεοτιδίων μέσω στήλης χρωματογραφίας P-60 ή Sephadex G-25/50.

Ο καθαρισμός με τη **μέθοδο της χρωματογραφίας** σε στήλη χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μορίων DNA υψηλού μοριακού βάρους από μικρότερα μόρια και βασίζεται στο γεγονός ότι τα μικρομοριακά συστατικά καθυστερούν στο υλικό της στήλης, ενώ τα μεγαλύτερα μόρια του DNA εκλούνται πιο γρήγορα. Η μέθοδος εφαρμόστηκε για το διαχωρισμό ραδιοσημασμένων μορίων DNA-ανιχνευτή από τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια, μετά από αντίδραση σήμανσης, καθώς και για τον καθαρισμό ολιγονουκλεοτιδίων. Ανάλογα με την περίπτωση, χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι στήλης: BioGel P-60 fine (Bio-Rad) και Sephadex G-25/50.

Στήλη χρωματογραφίας BioGel P-60

Η παρασκευή του υλικού της κολώνας γίνεται ως εξής: 2 gr πολυακρυλαμίδης P-60 fine προστίθενται σε 100 ml διαλύματος P-60 που περιέχει 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 mM EDTA pH 8.0 και 0,1% SDS. Γίνεται ανανέωση του διαλύματος και ακολουθεί αποστείρωση για 15 λεπτά. Στην περίπτωση που το προς διαχωρισμό τμήμα DNA πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα αλληλεπιδράσεων DNA-πρωτεΐνης, δε χρησιμοποιείται SDS και το διάλυμα περιέχει 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8.0 και 100 mM NaCl. Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Σε μια πιπέτα pasteur γίνεται μια τομή (με τη βοήθεια διαμαντιού) στο σημείο που αρχίζει να λεπταίνει και το λεπτό τμήμα

απομακρύνεται.

2. Με τη βοήθεια μιας άλλης πιπέτας pasteur τοποθετείται ελάχιστη ποσότητα αποστειρωμένου υαλοβάμβακα στην άκρη της κομμένης πιπέτας.
3. Γίνεται διάβρεξη της κολώνας με διάλυμα P-60, με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδας αέρα στη βάση της κολώνας. Αρχίζει η σταδιακή προσθήκη υλικού, ενώ υπάρχει ακόμα διάλυμα μέσα στην κολώνα (για να μη σχηματιστεί φυσαλίδα πρέπει το υλικό P-60, το διάλυμα και η κολώνα να βρίσκονται στην ίδια θερμοκρασία). Η προσθήκη υλικού συνεχίζεται μέχρι η επιφάνειά του να έρθει κοντά στη χαραγή της πιπέτας pasteur.
4. Μόλις η περίσσεια του διαλύματος, στο πάνω μέρος της κολώνας απορροφηθεί, φορτώνεται το δείγμα, με προσοχή, ώστε να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες.
5. Αμέσως μόλις απορροφηθεί το δείγμα, ξεπλένονται τα τοιχώματα της κολώνας με ελάχιστο διάλυμα P-60. Μόλις απορροφηθεί, προστίθεται και νέο διάλυμα P-60 μέχρι να συμπληρωθεί η κολώνα.
6. Η πορεία της χρωματογραφίας παρακολουθείται με τη βοήθεια των χρωστικών που υπάρχουν στο δείγμα και επίσης με το μετρητή ραδιενέργειας Geiger. Η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης κινείται περίπου μαζί με τα ελεύθερα δεοξυνουκλεοτίδια, ενώ η χρωστική μπλε της δεξτράνης μαζί με το ραδιενεργό ανιχνευτή. Στην περίπτωση που ο ανιχνευτής θα χρησιμοποιηθεί σε πειράματα αλληλεπίδρασης DNA-πρωτεϊνών, δεν προστίθεται στο δείγμα μπλε της δεξτράνης και η πορεία της χρωματογραφίας ελέγχεται μόνο με το μετρητή ραδιενέργειας. Το κλάσμα που περιέχει τον ανιχνευτή συλλέγεται, σε τελικό όγκο 200–400 μL , και φυλάσσεται στους -20°C .

Στήλη χρωματογραφίας Sephadex G-25/G-50

Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση καθαρισμού ανιχνευτών ή ανταγωνιστών που συμπληρώθηκαν στα άκρα με ένζυμο Klenow και ήταν απαραίτητη η συλλογή τους σε μικρό όγκο (100 μ L). Οι ανιχνευτές και οι ανταγωνιστές χρησιμοποιήθηκαν, ως επί το πλείστον, σε πειράματα μειωμένης κινητικότητας συμπλόκου (ΜΚΣ) DNA-πρωτεΐνης. Η παρασκευή του υλικού Sephadex (πολυσακχαρίτης) παρασκευάζεται όπως το P-60, με τη διαφορά ότι το διάλυμα εξισορρόπησης είναι TE pH 8,0.

1. Στο άκρο μιας σύριγγας του 1 ml τοποθετείται μικρή ποσότητα υαλοβάμβακα.
2. Η σύριγγα συμπληρώνεται με υλικό Sephadex G-50 (ή G-10).
3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε κεφαλή swinging bucket, στις 2000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου (το υλικό της κολώνας συμπιέζεται). Προσθήκη υλικού και επανάληψη της διαδικασίας της φυγοκέντρησης μέχρι ο όγκος του υλικού στην κολώνα να είναι περίπου 0,9 ml. Για την φυγοκέντρηση η σύριγγα τοποθετείται μέσα σε σωλήνα των 15 ml και αυτός μέσα σε σωλήνα των 50 ml τύπου Falcon.
4. Προσθήκη 100 μ L διαλύματος TE και φυγοκέντρηση, όπως στο βήμα 3. Επανάληψη.
5. Το δείγμα φορτώνεται στην κολώνα σε τελικό όγκο 100 μ L (ο όγκος συμπληρώνεται με TE). Η κολώνα μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα 15 ml που περιέχει ένα σωλήνα τύπου erpendorf χωρίς καπάκι.
6. Φυγοκέντρηση, όπως στο βήμα 3, και συλλογή του DNA που εκλούεται στο erpendorf σε όγκο 100 μ L.

Στο τέλος της χρωματογραφίας, και στις δύο περιπτώσεις,

απαιτείται μέτρηση τόσο του ακριβούς όγκου όσο και της ραδιενέργειας στο κλάσμα του ανιχνευτή (cps/μL).

2.15 Ανάλυση της πρωτοδιάταξης του DNA

Οι αλληλουχίες των δειγμάτων διαβάστηκαν μέσω αυτόματου αναλυτή και παραδόθηκαν, από την εταιρία (VBC-BIOTECH), ως αρχεία χρωματογραφημάτων (.ab1) ή αδρής αλληλουχίας (.txt).

2.16 Ανάλυση κηλίδων RNA

Η ανάλυση κηλίδων RNA έγινε με την χρήση της συσκευής MINIFOLD της εταιρείας S&S, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αναλυτικά η διαδικασία, για κάθε περίπτωση, έχει ως εξής:

1. Αναδιάλυση του RNA στον κατάλληλο όγκο διαλύματος που περιέχει 50% φορμαμίδιο και 6% φορμαλδεΐδη.
2. Αποδιάταξη των δειγμάτων RNA με επώαση στους 60°C για 15 λεπτά. Μεταφορά αμέσως σε πάγο.
3. Κόψιμο της μεμβράνης (gene screen plus, NEN) στις κατάλληλες διαστάσεις και διάβρεξή της, μαζί με το φίλτρο (filter pad), σε απιονισμένο νερό για 15 λεπτά.
4. Εξίσωση των όγκων των δειγμάτων RNA, που πρόκειται να μεταφερθούν, με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό στον επιθυμητό όγκο (συνήθως 100 μL).
5. Συναρμολόγηση της συσκευής MINIFOLD με τη μεμβράνη και το φίλτρο. Τοποθέτηση των δειγμάτων αποδιαταγμένου RNA στις ειδικές οπές (wells) και παραμονή για 30 λεπτά ώστε να

απορροφηθούν σιγά-σιγά.

6. Σύνδεση της συσκευής με αντλία κενού και εφαρμογή χαμηλής πίεσης για 30 δευτερόλεπτα. Ακολουθεί αποσυναρμολόγηση της συσκευής και απομάκρυνση της μεμβράνης, η οποία αφήνεται να στεγνώσει σε διηθητικό χαρτί σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Θέρμανση της μεμβράνης στους 80°C για 2 ώρες ή, εναλλακτικά, έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) για 40 δευτερόλεπτα.

Οι υβριδοποιήσεις μεμβρανών (νάιλον και νιτροκυτταρίνης) έγιναν μέσα σε σακούλες υβριδοποίησης ή σε ειδικούς σωλήνες υβριδοποίησης (Hybritube 15 της Gibco-BRL εταιρείας). Ανάλογα με το βαθμό συγγένειας του ανιχνευτή με το DNA ή το RNA της στατικής φάσης χρησιμοποιείται το κατάλληλο κριτήριο υβριδοποίησης. Ο καθορισμός του κριτηρίου γίνεται με τον κατάλληλο συνδυασμό θερμοκρασίας και ιονικής ισχύος στο διάλυμα υβριδοποίησης (υψηλή θερμοκρασία ή/και χαμηλή ιονική ισχύς συνεπάγεται υψηλό κριτήριο και αντίστροφα). Η ιονική ισχύς καθορίζεται από τη συγκέντρωση NaCl στο διάλυμα προϋβριδοποίησης και υβριδοποίησης (0,3–1,5 M NaCl), το οποίο περιέχει ακόμα 1% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 7,5 και 100 µg/mL αποδιαταγμένο DNA από θύμο αδένα μοσχαριού ή από σπέρμα σολωμού. Κατά την **προϋβριδοποίηση**, η μεμβράνη τοποθετείται στο κατάλληλο δοχείο ή σωλήνα με διάλυμα προϋβριδοποίησης. Ακολουθεί παραμονή στην επιθυμητή θερμοκρασία (ανάλογα με το κριτήριο) για τουλάχιστον 2 ώρες σε υδατόλουτρο υπό συνεχή ανακίνηση. Για την **υβριδοποίηση**, γίνεται αποδιάταξη του ραδιενεργού ανιχνευτή, με προσθήκη 1/10 του όγκου 1 M NaOH, και ακόλουθη εξουδετέρωση, με ίση ποσότητα 1 M HCl. Ο ραδιενεργός ανιχνευτής προστίθεται στο διάλυμα και ακολουθεί παραμονή στην ίδια θερμοκρασία, όπως και στην προϋβριδοποίηση, σε υδατόλουτρο υπό συνεχή ανακίνηση για 16-18 ώρες. Μετά το τέλος της υβριδοποίησης, ακολουθεί ξέπλυμα της

μεμβράνης σε διάλυμα SSC αντίστοιχης ιονικής ισχύος με το διάλυμα υβριδοποίησης (π.χ. 2x SSC ισοδυναμεί με 0,3 M NaCl), δύο φορές για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί πλύσιμο της μεμβράνης για 30 λεπτά στη θερμοκρασία υβριδοποίησης, σε περίσσεια διαλύματος 1% SDS και SSC αντίστοιχης ιονικής ισχύος με αυτήν του διαλύματος υβριδοποίησης. Το πλύσιμο μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές, ανάλογα με την ένταση της υβριδοποίησης και σε συνάρτηση με το κριτήριο, ακόμη και σε υψηλότερη θερμοκρασία και χαμηλότερη ιονική ισχύ (όχι πάντως μικρότερη από 2x SSC). Η διαδικασία του πλυσίματος παρακολουθείται με τον μετρητή Geiger-Muller και εμπειρικά καθορίζεται η διάρκειά της. Αφού ολοκληρωθεί το πλύσιμο, ακολουθεί νέο ξέπλυμα της μεμβράνης, 2 φορές σε 2x SSC για την απομάκρυνση του SDS. Ακολουθεί τοποθέτηση της μεμβράνης σε καθαρό τζάμι, κάλυψη με διαφανή μεμβράνη (saran wrap) και αυτοραδιογραφία μέσα στους ειδικούς φακέλους (folders), παρουσία οθόνης που ενισχύει την ένταση του σήματος (screen), σε θερμοκρασία -80°C . Στην περίπτωση που επιθυμείται αποϋβριδοποίηση, η μεμβράνη δεν πρέπει να στεγνώσει. Μετά την εμφάνιση της αυτοραδιογραφίας, ακολουθεί **αποϋβριδοποίηση** της μεμβράνης. Η αποϋβριδοποίηση μπορεί να γίνει με ποικίλους τρόπους που καθορίζονται από την εταιρεία κατασκευής τους: Πλύσιμο σε περίσσεια 0,4 N NaOH για 30 λεπτά στους 42°C και νέο πλύσιμο σε διάλυμα αποϋβριδοποίησης (0,2 M Tris-HCl pH 7,5, 1x SSC, 0,1% SDS) στις ίδιες συνθήκες. Τοποθέτηση της μεμβράνης σε βραστό διάλυμα αποϋβριδοποίησης (0,1x SSC, 0,01% SDS) και ανακίνηση για 5 λεπτά. Επανάληψη της διαδικασίας 4-5 φορές. Η αποϋβριδοποίηση ελέγχεται με τον μετρητή Geiger ή με αυτοραδιογραφία και αν χρειαστεί επαναλαμβάνεται. Μετά το τέλος της αποϋβριδοποίησης η μεμβράνη ξεπλένεται με 2x SSC και μπορεί να χρησιμοποιηθεί αμέσως σε νέα υβριδοποίηση με άλλο ανιχνευτή.

2.17 Μελέτες παροδικής έκφρασης μέσω ηλεκτροδιάτρησης

Ο σκοπός της χρήσης της ηλεκτροδιάτρησης ήταν η παροδική έκφραση του γονιδίου αναφοράς *lacZ* (β-γαλακτοσιδάση) ή *rfp* (κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη) ή *gfp* (πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη) υπό τον έλεγχο τμημάτων υποκινητών των γονιδίων του χορίου, με σκοπό την μελέτη-επιβεβαίωση της χρονοειδικής τους έκφρασης.

Για τον σκοπό αυτό, κατασκευάστηκαν ανασυνδυασμένα πλασμίδια με τους πλήρους μήκους υποκινητές γονιδίων του χορίου διαφορετικής αναπτυξιακής εξειδίκευσης και με μεταλλαγμένες παραλλαγές του υποκινητή του ενδιάμεσου γονιδιακού ζεύγους A/B.L9. Παρ'όλα αυτά, η μέθοδος της ηλεκτροδιάτρησης πραγματοποιήθηκε και με πλασμίδια ελέγχου το pBRJZ, όπου το γονίδιο αναφοράς βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της ακτίνης A3 (Kravariti et al., 2001). Πραγματοποιήθηκαν ανατομίες σε θηλυκά άτομα που βρίσκονταν στην 7^η-8^η ημέρα του σταδίου της νύμφης. Σε κάθε ένα ωθηκάριο πραγματοποιείται σταδιοποίηση των ωθυλακίων και μεταφορά τους σε ξεχωριστούς σωλήνες τύπου erpendorf, με διάλυμα RINGER, οι οποίοι φυλάσσονται στον πάγο μέχρι να ολοκληρωθεί η διαδικασία των σταδιοποιήσεων. Σε εστία στείρων συνθηκών (laminar flow) αφαιρείται το RINGER και τοποθετείται διάλυμα καλλιέργειας-Grace's medium. Το σύνολο των ωθυλακίων του κάθε σωλήνα μεταφέρεται με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur σε κυψελίδες (διάκενο 4 mm). Αφαιρείται προσεκτικά η περίσσεια του διαλύματος· προστίθενται τελικά 200 μL διαλύματος ηλεκτροδιάτρησης (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,5 mM Na₂HPO₄, 2,1 mM HEPES) που περιέχει το εκάστοτε ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (40–60 μg). Στη συνέχεια, οι κυψελίδες τοποθετούνται στην ειδική θέση εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου της συσκευής ECM 830 (BTX). Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ακόλουθες: 250 Volts/cm, διάρκεια παλμών 25 msec, 2 παλμοί. Μετά την

επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, και υπό στείρες συνθήκες, τα ωοθυλάκια μεταφέρονται σε δοχεία καλλιέργειας (24-well culture plates). Αφού αφαιρεθεί το διάλυμα ηλεκτροδιάτρησης προστίθεται διάλυμα καλλιέργειας (Grace's medium), παρουσία του αντιβιοτικού γενταμυκίνη (τελική συγκέντρωση 0.5% v/v), για 24 ώρες στους 25°C. Στο χρονικό αυτό διάστημα πραγματοποιείται η έκφραση του γονιδίου αναφοράς.

Στις περιπτώσεις που το γονίδιο αναφοράς ήταν το *lacZ*, μετά την επώαση ακολουθεί ξέπλυμα των ωοθυλακίων με PBS και μονιμοποίηση με διάλυμα 0,5% φορμαλδεΐδης σε PBS (συνολικού όγκου 800 µL) για 5 λεπτά. Κατόπιν, τα ωοθυλάκια ξεπλένονται αρκετές φορές με PBS (τουλάχιστον 3). Ακολουθεί προσθήκη 800 µL διαλύματος χρώσης X-gal (15mM Potassium Ferrocyanide, 15mM Potassium Ferricyanide, 2mM MgCl₂, 1 mg/mL X-gal). Το X-gal παρασκευάζεται σε διάλυμα διμεθυλικού φορμαμιδίου (DMF) και προστίθεται στο διάλυμα χρώσης λίγο πριν τη χρήση. Τα ωοθυλάκια επώάζονται στους 37°C για 12 ώρες και ακολουθεί παρατήρηση σε στερεοσκόπιο για την ανίχνευση χαρακτηριστικών μπλε κηλίδων στο επιθήλιο.

Στις περιπτώσεις που τα γονίδια αναφοράς ήταν τα *rfp* και *gfp*, μετά την επώαση ακολουθεί ξέπλυμα των ωοθυλακίων με PBS, απομόνωση του μονόστιβου επιθηλίου, που περιβάλλει κάθε ωοθυλάκιο, και τοποθέτηση του σε αντικειμενοφόρο πλάκα, σε διάλυμα Ringer, προκειμένου να γίνει παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.

2.18 Στατιστική ανάλυση

Προκειμένου να καθοριστούν τα τελικά πρότυπα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς *lacZ* υπό τον έλεγχο των διαφορετικών υποκινητών, αρχικά έγινε εφαρμογή της μεθόδου της ηλεκτροδιάτρησης σε σταδιοποιημένα ωοθυλάκια σε τουλάχιστον 5 επαναλήψεις (διαφορετικά

ωοθηκάρια). Στη συνέχεια, υπολογίσαμε τη συχνότητα των ωοθυλακίων που παρουσίασαν έκφραση του *lacZ*, για κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται σε μορφή πίνακα, όπου αναφέρεται και ο αριθμός των επαναλήψεων που πραγματοποιήθηκαν για κάθε γονιδιακή κατασκευή και προσανατολισμό αυτής (Παράρτημα Α), και σε μορφή ιστογραμμάτων (Παράρτημα Γ). Κρίθηκε όμως απαραίτητο να γίνει στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων προκειμένου να επιβεβαιωθεί ποια αναπτυξιακά στάδια είναι πιο πιθανά να εμφανίσουν έκφραση για κάθε γονιδιακή κατασκευή και για κάθε προσανατολισμό που εξετάστηκε (Παράρτημα Δ). Για τον σκοπό αυτόν, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικοί στατιστικοί έλεγχοι (χ^2 - chi-square tests). Πιο αναλυτικά, για κάθε γονιδιακή κατασκευή εφαρμόσαμε πρώτα έναν γενικό έλεγχο (general statistical test) για να αποδείξουμε ότι παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων. Εφόσον απορρίπταμε τη μηδενική υπόθεση, καθορίσαμε ένα κατώφλι για να αποδείξουμε ότι ένα ή περισσότερα αναπτυξιακά στάδια ήταν πιο πιθανά να παρουσιάσουν έκφραση ($p < 0.05$). Συνεπώς, για κάθε γονιδιακή κατασκευή συγκρίναμε το πιο πιθανό αναπτυξιακό στάδιο (δηλ. με τη μεγαλύτερη κορυφή στο αντίστοιχο ιστόγραμμα) με όλα τα υπόλοιπα αναπτυξιακά στάδια ομαδοποιημένα σε μια κατηγορία (υπόθεση δεύτερου γενικού ελέγχου-Α). Αν η μηδενική υπόθεση απορριπτόταν, τότε το συγκρίναμε με το δεύτερο πιο πιθανό αναπτυξιακό στάδιο (υπόθεση εξειδικευμένου ελέγχου-Α). εφόσον και οι δύο έλεγχοι απέρριπταν τη μηδενική υπόθεση τότε μπορούμε να θεωρήσουμε τα αντίστοιχα στάδια ως στατιστικά σημαντικά. Στις περιπτώσεις, όμως, που δεν υπήρχε στατιστική διαφορά, προχωρήσαμε στη σύγκριση των δύο πιο πιθανών σταδίων, ομαδοποιημένα σε μια κατηγορία, με όλα τα υπόλοιπα αναπτυξιακά στάδια, ομαδοποιημένα σε μια δεύτερη κατηγορία (υπόθεση δεύτερου γενικού ελέγχου-Β), και εν συνεχεία με το τρίτο πιο πιθανό αναπτυξιακό

στάδιο (υπόθεση εξειδικευμένου ελέγχου-B). εφόσον αυτοί οι έλεγχοι απέρριπταν τη μηδενική υπόθεση, τότε δεχόμαστε τα αντίστοιχα στάδια (ή κατηγορία σταδίων) ως τα πιο στατιστικά σημαντικά.

Υπόθεση γενικού ελέγχου:

- $H_0: p_1 = p_2 = \dots = p_7,$
- $H_1: \text{τουλάχιστον ένα } p_i \text{ διαφορετικό από τα υπόλοιπα,}$

όπου p_i είναι η πιθανότητα τα ωθυλάκια να εκφράσουν το γονίδιο *lacZ* στην αντίστοιχη ομάδα-κατηγορία και $i=1,\dots,7$ αναφέρεται στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια.

Υπόθεση δεύτερου γενικού ελέγχου:

- $H_0: p_{\text{μεγ}} = p_{\text{υπολ}},$
- $H_1: p_{\text{μεγ}} \text{ όχι ίσο με το } p_{\text{υπολ}},$

όπου $p_{\text{μεγ}}$ η πιθανότητα του πιο υψηλού ή των δύο πιο υψηλών αναπτυξιακών σταδίων, ανάλογα με το αντίστοιχο βήμα της διαδικασίας, και $p_{\text{υπολ}}$ η πιθανότητα των υπολοίπων σταδίων.

Υπόθεση εξειδικευμένου ελέγχου:

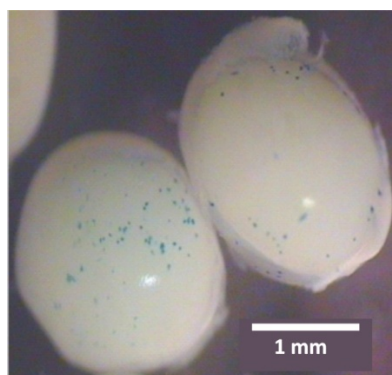
- $H_0: p_{\text{μεγ}} = p_{\text{επομ}},$
- $H_1: p_{\text{μεγ}} \text{ όχι ίσο με } p_{\text{επομ}},$

όπου $p_{\text{μεγ}}$ η πιθανότητα του υψηλότερου ή των δύο πιο υψηλών αναπτυξιακών σταδίων, ανάλογα με το αντίστοιχο βήμα της διαδικασίας, και $p_{\text{επομ}}$ η πιθανότητα του δεύτερου ή τρίτου πιο ψηλού αναπτυξιακού σταδίου, ανάλογα με το αντίστοιχο βήμα της διαδικασίας.

3. Αποτελέσματα

3.1 Βελτιστοποίηση των παραμέτρων ηλεκτροδιάτρησης

Η εισαγωγή και έκφραση ξένου DNA σε ιστούς με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (Volt/cm), τη συνολική διάρκεια των ηλεκτρικών παλμών (msec x αριθμός παλμών) και το μέσο στο οποίο εφαρμόζεται το ηλεκτρικό ρεύμα. Μια πρώτη προσέγγιση ελέγχου της μεθόδου έγινε με τα πλασμίδια pBmA/*lacZ* και pBRJZ. Το πρώτο περιέχει το γονίδιο αναφοράς *lacZ*, υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της ακτίνης του *B. mori*, ενώ το δεύτερο προέρχεται από το ανασυνδυασμένο γονιδίωμα του δενσοϊού (τύπου II) του λεπιδόπτερου *Junonia coenia* (Giraud et al., 1992). Και τα δύο πλασμίδια παρουσιάζουν γενικευμένη και ισχυρή έκφραση σε όλους τους ιστούς του *B. mori* (Thomas JL, 1997) και με την εφαρμογή της ηλεκτροδιάτρησης παρατηρήθηκε έκφραση στα επιθηλιακά κύτταρα (Εικόνα 3.1). Κρίθηκε απαραίτητη, όμως, η πραγματοποίηση επιπλέον δοκιμασιών για βελτιστοποίηση των συνθηκών.



Εικόνα 3.1. Φωτογραφία ωθυλακίων από οπτικό στερεοσκόπιο όπου παρατηρείται η έκφραση του γονιδίου αναφοράς *lacZ* στα επιθηλιακά κύτταρα που τα περιβάλλουν. Κάθε μπλε κηλίδα αντιστοιχεί σε ένα επιθηλιακό κύτταρο. (Μεγέθυνση: 4,5X).

Δοκιμάστηκαν συνθήκες έντασης ηλεκτρικού πεδίου 150–1250 Volt/cm, διάρκειας παλμού 10 msec–100 msec και αριθμός παλμών 2–10 (Πίνακας 3.1). Επαναληψιμότητα, όσον αφορά στην παροδική έκφραση του γονιδίου αναφοράς από τα επιθηλιακά κύτταρα των ωοθυλακίων, παρουσιάστηκε για τις παραμέτρους 250 Volt/cm, 15–30 msec, 2–10 παλμοί. Οι συνθήκες ηλεκτροδιάτρησης, στις οποίες καταλήξαμε, για την επιτυχή εισαγωγή και έκφραση του γονιδίου αναφοράς στα επιθηλιακά κύτταρα των ωοθυλακίων είναι 250 Volt/cm - 25 msec - (2–3) παλμοί. Επιπλέον, οι πιο πάνω συνθήκες εφαρμόστηκαν και σε διαφορετικά θρεπτικά διαλύματα (Πίνακας 3.2), που προτείνονται από την βιβλιογραφία, προκειμένου να επιλεγεί εκείνο που αυξάνει την απόδοση της ηλεκτροδιάτρησης. Από τα τέσσερα διαλύματα που δοκιμάστηκαν, τα διαλύματα Ringer και Grace's απορρίφθηκαν, καθώς είχαν μειωμένη απόδοση. Αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι τα ιόντα Ca^{2+} που υπάρχουν στα δύο διαλύματα διαπερνούν τη μεμβράνη των κυττάρων μέσω των οπών που δημιουργούνται από την εφαρμογή ηλεκτρικών παλμών και ενεργοποιούν τη διαδικασία της απόπτωσης. Το διάλυμα PBS και το διάλυμα ηλεκτροδιάτρησης για κυτταροκαλλιέργειες προσομοιάζουν προς το μεσοκυττάριο υγρό (ιόντα Na^+ και K^+). Ωστόσο, το PBS δεν έχει τη ρυθμιστική ικανότητα που διαθέτει το διάλυμα ηλεκτροδιάτρησης, καθώς περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic Acid). Συνεπώς, πιο αποδοτικό θεωρήθηκε το διάλυμα ηλεκτροδιάτρησης.

Πίνακας 3.1. Συνθήκες που δοκιμάστηκαν σε πειράματα**ηλεκτροδιάτρησης**

ένταση ηλεκτρικού πεδίου (Volts/cm)	διάρκεια παλμού	αριθμός παλμών	ένταση ηλεκτρικού πεδίου (Volts/cm)	διάρκεια παλμού	αριθμός παλμών	
150	150μsec	5	225	5msec	10	
	200μsec	5		20msec	3	
	500μsec	5	250	10μsec	2	
	150μsec	8		100μsec	2	
	7msec	7		250μsec	2	
	10msec	3		450μsec	2	
	10msec	5		650μsec	2	
	15msec	5		900μsec	2	
175	10msec	2		5msec	2	
	80msec	3		10msec	5	
188	700μsec	7		10msec	10	
	4msec	4		15msec	2	
	4msec	5	15msec	5		
	4msec	6	15msec	10		
	7msec	6	20msec	5		
	10msec	7	25msec	2		
	15msec	3	25msec	4		
	15msec	4	30msec	2		
	25msec	4	50msec	2		
	200	150μsec	5	300	70msec	2
150μsec		8	100msec		2	
400μsec		8	325		5msec	5
500μsec		2			10msec	5
4msec		4		15msec	5	
4msec		6	350	20msec	5	
5msec		5		5msec	5	
5msec		8	375	10msec	5	
5msec		10		15msec	5	
6msec		6	425	15msec	5	
7msec		7		500μsec	3	
10msec		3		500μsec	5	
10msec		5		500μsec	7	
213	50msec	5	500	1msec	3	
	3msec	6		3msec	3	
	5msec	5		1250	5msec	5
	5msec	6	10msec		5	
	6msec	5				
	10msec	5				
	10msec	10				
	15msec	5				
15msec	10					

Με πράσινο συμβολίζονται οι συνθήκες που έδωσαν θετικό αποτέλεσμα, χωρίς επαναληψιμότητα. Με μπλε συμβολίζονται οι συνθήκες που έδωσαν θετικό αποτέλεσμα με επαναληψιμότητα.

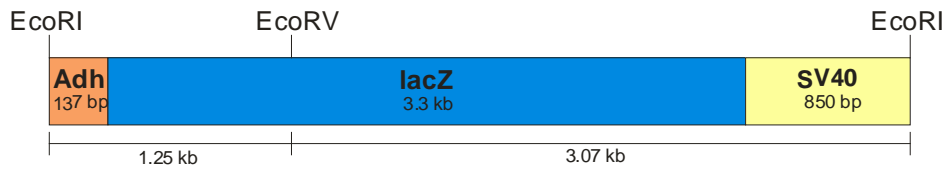
Πίνακας 3.2. Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ως μέσο εφαρμογής ηλεκτρικών ώσεων σε πειράματα ηλεκτροδιάτρησης

PBS (pH: 7,4)	Ringer (pH: 6,5 – 7,5)	Grace's Medium (pH: 7)	Electroporation Buffer για κυτ. σειρές (pH: 7,1)
NaCl (137 mM)	NaCl (128,3 mM)	MgCl₂ (11,23 mM)	NaCl (137 mM)
KCl (2,68 mM)	KCl (1,34 mM)	KCl (54,67 mM)	KCl (5 mM)
Na₂HPO₄ (10,14 mM)	CaCl₂ (1,8 mM)	CaCl₂ (6,76 mM)	Na₂HPO₄ (0,5 mM)
KH₂PO₄ (1,76 mM)	NaHCO₃ (2,38 mM)	NaHCO₃ (4,17 mM)	Hepes (2,1 mM)
		Na₂HPO₄ (7,34 mM)	
		MgSO₄ (11,3 mM)	

3.2 Γονιδιακές κατασκευές με το γονίδιο αναφοράς *lacZ* υπό τον έλεγχο πλήρους μήκους υποκινητών διαφόρων γονιδίων του χορίου

3.2.1 Κλωνοποίηση της κασέτας έκφρασης *lacZ* στον πλασμιδιακό φορέα pUC9

Αρχικά έγινε απομόνωση της κασέτας έκφρασης *lacZ* έπειτα από πέψη του κλώνου #80-*lacZ*(4.32 kb)(*EcoRI*)/ *rbIs* (Σουρμελή, 2004) με τα ένζυμα *HindIII-PstI* και ενσωμάτωση της στον πλασμιδιακό φορέα pUC9. Ο κλώνος που προέκυψε ονομάστηκε #15-*lacZ*(*HindIII-PstI*)/ pUC9. Η κασέτα έκφρασης *lacZ* είναι το ανασυνδυασμένο τμήμα pC4-AUG-βgal με άκρα *EcoRI* (Thummel et al., 1988), το οποίο περιέχει: (α) την 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή, τον κωδικό έναρξης της μετάφρασης και μια μικρή αλληλουχία που κωδικοποιεί τα 30 πρώτα αμινοξέα του γονιδίου της αλκαλικής αφυδρογονάσης (*Adh*) της *D. melanogaster*, (β) το γονίδιο αναφοράς *lacZ* και (γ) 850 ζεύγη βάσεων από το γονιδίωμα του ιού SV40, το οποίο περιέχει ένα ισχυρό σήμα πολυαδενυλίωσης (Εικόνα 3.2).

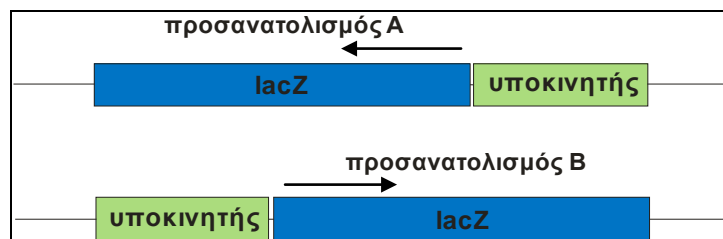


Εικόνα 3.2. Ανασυνδυασμένο τμήμα pC4-AUG-βgal με άκρα *EcoRI*.

3.2.2 Κλωνοποίηση του υποκινητή του γονιδιακού ζεύγους ErA/B.1

Για την απομόνωση του υποκινητή των πρώιμων γονιδίων ErA/B.1 χρησιμοποιήθηκε ο κλώνος E54 Er.1(790 bp)(*KpnI-BglII*)/ pBS (ο οποίος περιέχει την αλληλουχία από τη θέση +339 του ErB.1 γονιδίου έως τη +261 του ErA.1) ως μήτρα σε PCR με τους εκκινητές Erp1F και Erp1R, οι οποίοι διαθέτουν την αλληλουχία του ενζύμου *HindIII* στο 5' άκρο τους. Το προϊόν της αντίδρασης εκτείνεται από το νουκλεοτίδιο +27 του ErB.1 γονιδίου έως το +30 του ErA.1. Ακολούθησε πέψη με *HindIII* και κλωνοποίηση στον φορέα #80-*lacZ*(4.32 kb)(*EcoRI*)/ pbls. Επιλέχθηκαν δύο κλώνοι, ανάλογα με τον προσανατολισμό της κλωνοποίησης, ώστε η κασέτα *lacZ* να εντοπίζεται προς το α-τύπου ή το β-τύπου γονίδιο σε σχέση με τον υποκινητή (Εικόνα 3.3),

- #1-ErA/B.1(251 bp)(*HindIII*)/ *lacZ*(*EcoRI*)/ pbls(α promoter-*lacZ*) και
- #4-ErA/B.1(251 bp)(*HindIII*)/ *lacZ*(*EcoRI*)/ pbls(β promoter-*lacZ*).



Εικόνα 3.3. Σχηματική απεικόνιση του προσανατολισμού της κασέτας *lacZ* σε σχέση με τον εκάστοτε υποκινητή. Τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση της μεταγραφής.

3.2.3 Κλωνοποίηση του υποκινητή του γονιδιακού ζεύγους A/B.L9

Για την απομόνωση του υποκινητή του πρώιμου-ενδιάμεσου γονιδιακού ζεύγους A/B.L9 (από το νουκλεοτίδιο +10 του A.L9 έως το +10 του B.L9) πραγματοποιήθηκε PCR με τους εκκινητές pL9.fullIF και pL9.fullIR, οι οποίοι διαθέτουν την αλληλουχία του ενζύμου *EcoRI* στο 5' άκρο τους και μήτρα τον κλώνο #B-fullpL9(*HindIII*)/ pbls (Παπαντώνης, 2008). Στην αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε Taq πολυμεράση, που δημιουργεί δίκλινα άκρα (blunt ends), και το προϊόν κλωνοποιήθηκε στον φορέα #15-*lacZ*(*HindIII*-*PstI*)/ pUC9, αφού, πρώτα, υπέστη πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *SmaI*. Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν δύο κλώνοι ανάλογα με τον προσανατολισμό της κλωνοποίησης έτσι ώστε η κασέτα *lacZ* να εντοπίζεται προς το α-τύπου ή το β-τύπου γονίδιο σε σχέση με τον υποκινητή (Εικόνα 3.3),

- #1-fullpL9(*EcoRI*)/ *lacZ*(*EcoRI*)/ pUC9(α promoter-*lacZ*) και
- #3-fullpL9(*EcoRI*)/ *lacZ*(*EcoRI*)/ pUC9 (β promoter-*lacZ*).

3.2.4 Κλωνοποίηση του υποκινητή του γονιδιακού ζεύγους A/B.L1

Για την απομόνωση του υποκινητή του ενδιάμεσου-όψιμου γονιδιακού ζεύγους A/B.L1 (από το νουκλεοτίδιο +10 του A.L1 έως το +10 του B.L1) πραγματοποιήθηκε PCR με τους εκκινητές pL1.fullIF και pL1.fullIR, οι οποίοι διαθέτουν την αλληλουχία του ενζύμου *EcoRI* στο 5' άκρο τους και μήτρα τον κλώνο #1-fullpL1(*HindIII*)/pbls (Παπαντώνης, 2008). Στη συνέχεια, ακολούθησε η ίδια διαδικασία, όπως στην περίπτωση του υποκινητή pL9, οπότε προέκυψαν οι κλώνοι:

- #6-fullpL1(*EcoRI*)/ *lacZ*(*EcoRI*)/ pUC9(α promoter-*lacZ*) και
- #12-fullpL1(*EcoRI*)/ *lacZ*(*EcoRI*)/ pUC9 (β promoter-*lacZ*).

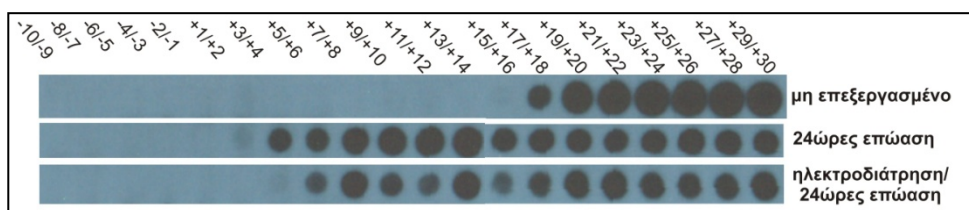
3.2.5 Κλωνοποίηση του υποκινητή του πρώιμου γονιδίου 5H4

Τέλος, ο χρωμοσωμικός κλώνος E58(1,2 kb)(*SacI*-*EcoRI*)/ pUC13 χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα σε PCR με τους εκκινητές 5H4F (διαθέτει την αλληλουχία της *EcoRI* στο 5' άκρο του) και 5H45U, για να πολλαπλασιαστεί η αλληλουχία -136 έως +31 του 5H4 γονιδίου. Κατόπιν κλωνοποίησης του προϊόντος (#2-5H4(167 bp)(*EcoRI*-*Sall*)/ pBS(*EcoRV*)) και εισαγωγής της κασέτας *lacZ* προέκυψε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο έκφρασης #18-5H4(167 bp)(*EcoRI*-*Sall*)/ *lacZ*(*EcoRI*)/ pBS(*EcoRV*).

3.3 Έλεγχος της μεθόδου της ηλεκτροδιάτρησης για το σύστημα της χοριογένεσης στο μεταξοσκώληκα

Όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, τα ωοθυλάκια του μεταξοσκώληκα παραμένουν μεταβολικά ενεργά μετά την εκτομή τους από το ζώο για περίπου 72 ώρες (Swevers and Iatrou, 1992). Επειδή μετά την εφαρμογή ηλεκτρικών ώσεων στα ωοθυλάκια πραγματοποιείται *in vitro* επώαση τους για 24 ώρες, χρονικό διάστημα κατά το οποίο εκφράζεται το γονίδιο αναφοράς που έχουμε εισάγει κατά την ηλεκτροδιάτρηση, θελήσαμε να εξετάσουμε αν η διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης επηρεάζει το αναπτυξιακό πρόγραμμα της χοριογένεσης των ωοθυλακίων. Για τον σκοπό αυτόν απομονώσαμε τρία ωοθηκάρια από μία ωοθήκη ενός ατόμου νύμφης μεταξοσκώληκα και σε κάθε ωοθηκάριο πραγματοποιήθηκε σταδιοποίηση των ωοθυλακίων σε ζεύγη. Τα σταδιοποιημένα ωοθυλάκια του πρώτου ωοθηκαρίου καταψύχθηκαν αμέσως μετά την ανατομία (μη επεξεργασμένο

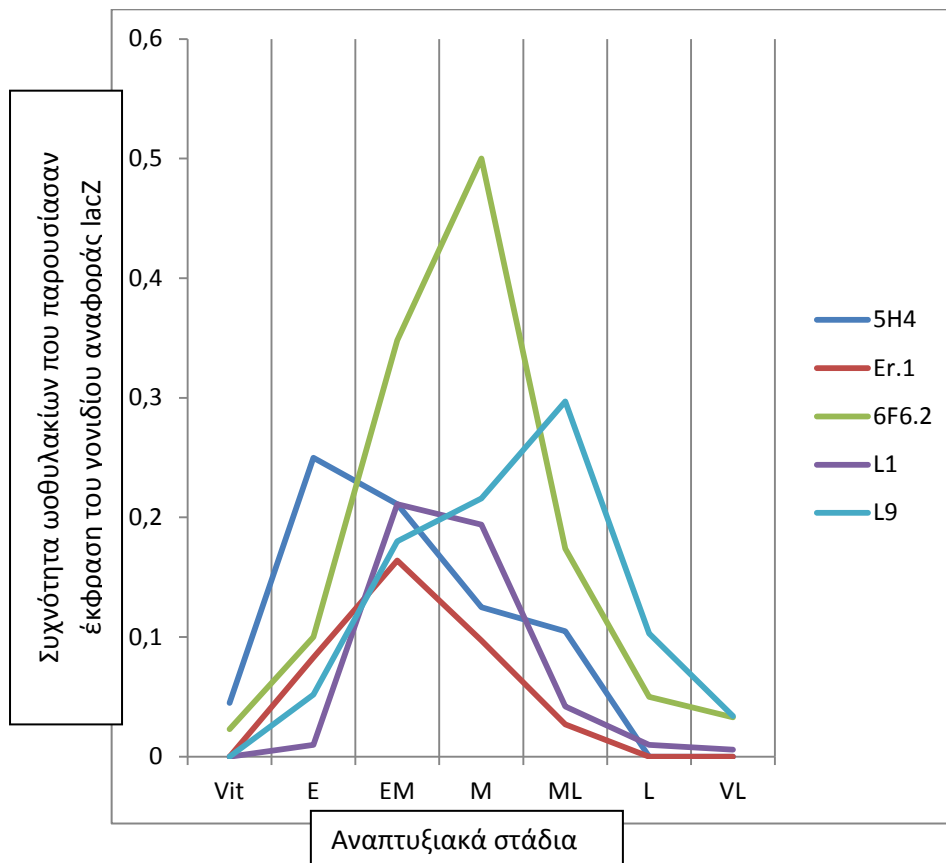
ωθηκάριο), του δεύτερου ωθηκαρίου επώαστηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό Grace's και στη συνέχεια καταψύχθηκαν (*in vitro* επώαση) και του τρίτου ωθηκαρίου υπέστησαν ηλεκτροδιάτρηση, έπειτα επώαστηκαν για 24 ώρες και στη συνέχεια καταψύχθηκαν (ηλεκτροδιάτρηση-*in vitro* επώαση). Έπειτα, από τα σταδιοποιημένα ωθυλάκια κάθε ωθηκαρίου απομονώθηκαν ολικά νουκλεϊκά οξέα και εφαρμόστηκε η τεχνική ανάλυσης κηλίδων RNA. Ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό θραύσμα *BglII-EcoRI* του cDNA κλώνου #38 (Φούντας, 1995) που περιέχει τμήμα του γονιδίου HcA.13 (δεξιός βραχίονας και 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή), το οποίο εκφράζεται στα όψιμα στάδια. Οι συνθήκες υβριδοποίησης ήταν οι εξής: 72°C, 0,4 M NaCl. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 3.4, η μεταγραφή των γονιδίων Hc12 ξεκινάει από τα ωθυλάκια +17+18 στο μη επεξεργασμένο ωθηκάριο. Στο ωθηκάριο, που επώαστηκε *in vitro* για 24 ώρες, παρατηρήθηκε μεταγραφική ενεργοποίηση στα ωθυλάκια +3+4 επιβεβαιώνοντας ότι τα ωθυλάκια παραμένουν μεταβολικά ενεργά σε *in vitro* συνθήκες, αφού τα ωθυλάκια κατάφεραν να αναπτυχθούν. Τέλος, στο ωθηκάριο που εφαρμόστηκαν ηλεκτρικές ώσεις και έπειτα επώαστηκε σε θρεπτικό υλικό για 24 ώρες παρατηρήθηκε μεταγραφική ενεργοποίηση στα ωθυλάκια +5+6 διαπιστώνοντας ότι η εφαρμογή ηλεκτρικών παλμών επηρεάζει αμελητέα την ακεραιότητα των ωθυλακίων. Η μικρή διαφοροποίηση που παρατηρείται μεταξύ του ωθηκαρίου που απλά επώαστηκε και του ωθηκαρίου που υπέστη ηλεκτροδιάτρηση και έπειτα επώαση μπορεί να αποδοθεί είτε σε πολύ μικρή επίδραση της ηλεκτροδιάτρησης στην ανάπτυξη των ωθυλακίων, είτε σε μικρή απόκλιση κατά τον προσδιορισμό του +1 χοριονικού ωθυλακίου στα δύο προαναφερθέντα ωθηκάρια.



Εικόνα 3.4. Ανάλυση κηλίδων RNA σε ζεύγη σταδιοποιημένων ωοθυλακίων από 3 ωοθηκάρια της ίδιας ωοθήκης μίας νύμφης μεταξοσκώληκα που επεξεργάστηκαν με διαφορετικό τρόπο. Ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε ραδιοσημασμένη αλληλουχία, ειδική για το γονίδιο HcA.13, που εκφράζεται κατά τα όψιμα στάδια της χοριογένεσης, όπως περιγράφεται αναλυτικότερα στο κείμενο.

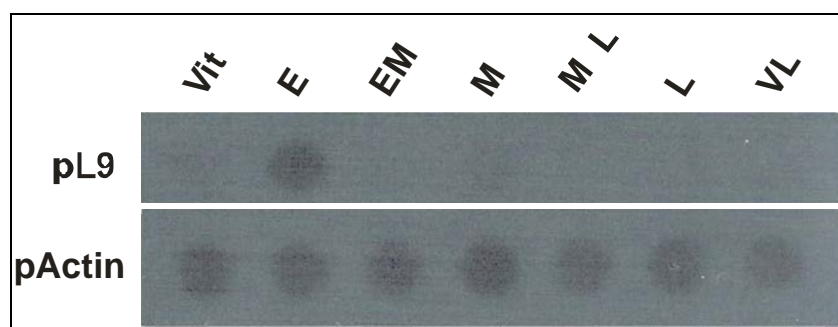
Επόμενο βήμα ήταν ο καθορισμός του προτύπου έκφρασης του γονιδίου αναφοράς μέσω ηλεκτροδιάτρησης που ελέγχεται από τους πλήρους μήκους υποκινητές γονιδίων του χορίου, διαφορετικής αναπτυξιακής εξειδίκευσης. Το βήμα αυτό, εκτός του ότι αποτέλεσε επιβεβαίωση ότι η μέθοδος της ηλεκτροδιάτρησης λειτουργεί σωστά στο σύστημα που μελετάμε, ήταν απαραίτητο, διότι τα πρότυπα αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως σημείο αναφοράς για τα πρότυπα έκφρασης που προέκυψαν από τις κατασκευές με τα τμήματα του υποκινητή pL9. Ακολούθησαν, λοιπόν, πειράματα ηλεκτροδιάτρησης σε απομονωμένα ωοθηκάρια χρησιμοποιώντας τις γονιδιακές κατασκευές με τους υποκινητές p5H4, pEr1, p6F6.2 (Kravariti et al., 2001), pL9 και pL1. Για τους υποκινητές pEr1, pL9 και pL1 χρησιμοποιήθηκαν, αρχικά, μόνο οι κλώνοι που έχουν το γονίδιο αναφοράς προς την πλευρά του υποκινητή που βρίσκεται το β-τύπου γονίδιο. Οι δοκιμές αυτές έγιναν σε πολλές επαναλήψεις για κάθε υποκινητή. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στο Παράρτημα Α στο οποίο για κάθε υποκινητή και αναπτυξιακό στάδιο δηλώνονται: (α) το σύνολο των ωοθυλακίων από όλες τις δοκιμές ηλεκτροδιάτρησης, (β) ο αριθμός των ωοθυλακίων που παρατηρήθηκε έκφραση του γονιδίου αναφοράς και (γ) η συχνότητα των ωοθυλακίων που εμφάνισαν μπλε κηλίδες στην επιφάνειά τους. Επίσης

παρουσιάζονται και σε μορφή ιστογράμματος (Εικόνα 3.5 και Παράρτημα Γ). Συγκεκριμένα, για τον υποκινητή του πρώιμου γονιδίου 5H4 μεγάλη συχνότητα έκφρασης παρατηρήθηκε κυρίως στο πρώιμο στάδιο (E) και για τον υποκινητή rEr.1 στο πρώιμο-ενδιάμεσο στάδιο (EM). Όσον αφορά τον υποκινητή του πρώιμου-ενδιάμεσου γονιδίου 6F6.2, υψηλή συχνότητα έκφρασης εμφανίστηκε στα στάδια EM-M. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με τα αντίστοιχα πρότυπα μεταγραφής που έχουν προκύψει, και γνωρίζουμε βιβλιογραφικά, από πειράματα ανάλυσης κηλίδων RNA (Eickbush et al., 1985).



Εικόνα 3.5. Διαγραμματική απεικόνιση σε μορφή ιστογράμματος των προτύπων έκφρασης υποκινητών γονιδίων του χορίου διαφορετικής αναπτυξιακής εξειδίκευσης. Για τους υποκινητές rEr.1, rL1 και rL9 τα πρότυπα έκφρασης αντιστοιχούν στον β- προσανατολισμό.

Για τον υποκινητή ρL1 το πρότυπο έκφρασης του *lacZ* μέσω ηλεκτροδιάτρησης ήταν κυρίως στα πρώιμα-ενδιάμεσα στάδια (EM-M) και για τον υποκινητή ρL9 κυρίως στα ενδιάμεσα-όψιμα στάδια (M-ML). Αυτά τα πρότυπα έκφρασης συμπίπτουν μερικώς με τα πρότυπα μεταγραφής των αντίστοιχων υποκινητών βάσει πειραμάτων ανάλυσης κηλίδων RNA (Spoerel et al., 1986). Για να επιβεβαιώσουμε με διαφορετικό τρόπο τα αποτελέσματα των Spoerel et al., 1986, ότι δηλαδή η μεταγραφική ενεργοποίηση τουλάχιστον του γονιδιακού ζεύγους A/B.L9 γίνεται κατά τα πρώιμα στάδια της χοριογένεσης, πραγματοποιήσαμε πειράματα βάσει της τεχνικής FAIRE (**F**ormaldehyde-**A**ssisted **I**solation of **R**egulatory **E**lements). Η μέθοδος αυτή αποτελεί έναν απλό και γρήγορο τρόπο για τον προσδιορισμό ρυθμιστικών περιοχών στο DNA που δεν είναι κατειλημμένες από νουκλεοσώματα και συνεπώς είναι μεταγραφικά ενεργές. Από σταδιοποιημένα, λοιπόν, ωοθυλάκια απομονώσαμε τις ρυθμιστικές περιοχές που δεν καταλαμβάνονται από νουκλεοσώματα, τις ακινητοποιήσαμε σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (ανάλυση κηλίδων νουκλεϊκών οξέων) και ακολούθησε υβριδοποίηση χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή την πλήρους μήκους αλληλουχία του υποκινητή ρL9. Το κριτήριο υβριδοποίησης ήταν 65°C και 0,45 M NaCl. Στην εικόνα 3.6 παρατηρούμε ότι μόνο στα πρώιμα χοριονικά στάδια (E) παρατηρείται σήμα, που σημαίνει ότι στο συγκεκριμένο στάδιο τα νουκλεοσώματα που κάλυπταν τον υποκινητή ρL9 μετακινούνται αποκαλύπτοντας την αλληλουχία του και επιτρέποντας τη μεταγραφική ενεργοποίηση των αντίστοιχων γονιδίων.



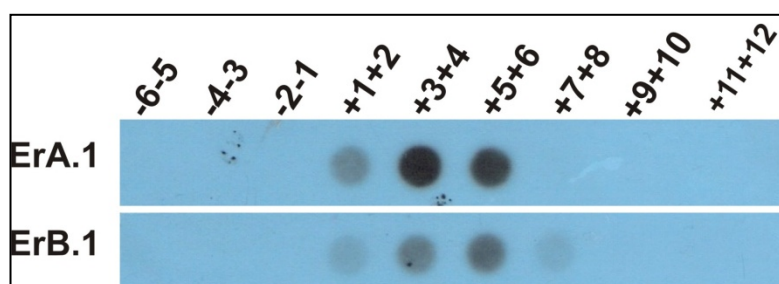
Εικόνα 3.6. Ανάλυση κηλίδων ολικών ρυθμιστικών αλληλουχιών που απομονώθηκαν με τη μέθοδο FAIRE από σταδιοποιημένα ωοθυλάκια ενός ωοθηκαρίου 40 χοριογενετικών ωοθυλακίων και ισομοιράστηκαν σε δύο μεμβράνες για λόγους σύγκρισης των αποτελεσμάτων. Ως ραδιοσημασμένοι ανιχνευτές χρησιμοποιήθηκαν ο υποκινητής του γονιδιακού ζεύγους A/B.L9 (pL9) και ο υποκινητής του γονιδίου της ακτίνης (pActin), ως θετικός μάρτυρας.

Ως μια πρώτη γενική διαπίστωση από πειράματα ανάλυσης κηλίδων RNA (Spoerel et al., 1986) και ηλεκτροδιάτρησης, θα μπορούσαμε να πούμε ότι είναι η εξής: Οι όποιες παρατηρούμενες μικροδιαφορές μεταξύ των προτύπων μεταγραφής των υποκινητών pL9 και pL1, ίσως οφείλονται στο γεγονός ότι οι γονιδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν με την τεχνική της ηλεκτροδιάτρησης είναι άγνωστο τι είδους χρωματινική δομή αποκτούν, αφ' ότου εισέλθουν στα επιθηλιακά κύτταρα, και πώς αυτή επηρεάζει τη λειτουργικότητα του εκάστοτε υποκινητή. Ωστόσο, θεωρούμε ότι η μέθοδος της ηλεκτροδιάτρησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για τη μελέτη του ρόλου των *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων ενός υποκινητή, εφόσον χρησιμοποιηθεί, ως πρότυπο σύγκρισης, το πρότυπο που προκύπτει από την γονιδιακή κατασκευή που περιέχει τον φυσιολογικό υποκινητή.

3.4 Τα ζεύγη γονιδίων που ρυθμίζονται από τον ίδιο υποκινητή εκφράζονται ταυτόχρονα ή όχι;

Παρατηρώντας τα πρότυπα έκφρασης από τις κατασκευές που περιέχουν τους φυσιολογικούς διφασικούς υποκινητές των γονιδίων Er.1, pL9, pL1 και για τους δύο προσανατολισμούς (Παράρτημα Γ), αναρωτηθήκαμε αν τα γονίδια που ρυθμίζονται από τον ίδιο υποκινητή εκφράζονται ταυτόχρονα. Στην περίπτωση του υποκινητή Er.1 παρατηρήσαμε ότι τα πρότυπα έκφρασης κάθε προσανατολισμού

διαφέρουν κατά ένα στάδιο. Συγκεκριμένα, στον α -προσανατολισμό παρατηρείται έκφραση στα ενδιάμεσα στάδια (M) και στον β -προσανατολισμό στα πρώιμα-ενδιάμεσα στάδια (EM). Θέλοντας να δούμε το *in vivo* πρότυπο μεταγραφής των α -, β - τύπου γονιδίων του ζεύγους Er.1 κάναμε πειράματα ανάλυσης κηλίδων RNA. Για την επιλογή κατάλληλων ανιχνευτών στοιχίσαμε της αλληλουχίες γονιδίων, κάθε τύπου χωριστά, για όλα τα μέλη της οικογένειας Er, όπως φαίνεται στο Παράρτημα Β. Η στοιχίση αφορούσε την περιοχή από την 5' αμετάφραστη περιοχή έως την 3' αμετάφραστη περιοχή του κάθε τύπου γονιδίου, χωρίς να συμπεριληφθεί η αλληλουχία του εσωνίου, και έγινε με το πρόγραμμα Clustalx. Βάσει της στοιχίσης επιλέχθηκε μία περιοχή για κάθε τύπου γονίδιο Er.1 που δεν έχει μεγάλη ομοιότητα με τα γονίδια των υπολοίπων μελών. Οι αλληλουχίες αυτές (σημειώνονται στο Παράρτημα Β), αφού κλωνοποιήθηκαν με κατάλληλους εκκινητές, χρησιμοποιήθηκαν ως ειδικοί ανιχνευτές για τα mRNA που προκύπτουν από τα α - και β - τύπου Er.1 γονίδια αντίστοιχα. Το κριτήριο υβριδοποίησης που εφαρμόστηκε, και έδωσε το αποτέλεσμα που παρουσιάζεται στην εικόνα 3.6, ήταν 75°C και 0,4 M NaCl.



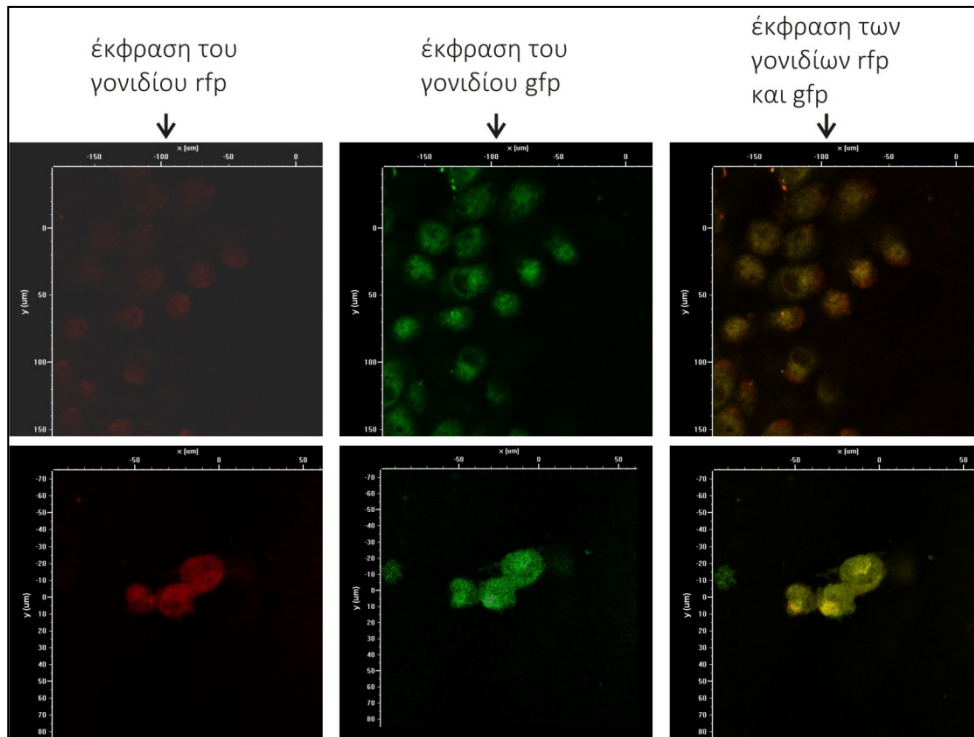
Εικόνα 3.6. Ανάλυση κηλίδων RNA σε ζεύγη σταδιοποιημένων ωοθυλακίων από ένα ωοθηκάριο με 40 χοριογενετικά ωοθυλάκια που ισομοιράστηκε στις δύο μεμβράνες για λόγους σύγκρισης των αποτελεσμάτων. Ως ανιχνευτές χρησιμοποιήθηκαν οι υπογραμμισμένες αλληλουχίες του Παραρτήματος Β, όπως περιγράφεται αναλυτικότερα στο κείμενο.

Σύμφωνα, λοιπόν, με το αποτέλεσμα που παρουσιάζεται στην εικόνα 3.6, φαίνεται ότι τα δύο γονίδια εκφράζονται περίπου στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο (E-EM). Το γεγονός όμως ότι παρατηρείται διαφορετική ένταση σήματος και σε διαφορετικά ωθυλάκια για το ErB.1 συγκριτικά με το ErA.1 γονίδιο, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το συγκεκριμένο αποτέλεσμα θα μπορούσε να αποδοθεί σε υβριδοποίηση του ανιχνευτή με mRNA προϊόντα και από άλλα μέλη της οικογένειας των Er γονιδίων (cross-hybridization), με τα οποία εμφανίζει μερική συμπληρωματικότητα. Σημειώνουμε ότι τα γονίδια μέλη της πολυγονιδιακής οικογένειας του χορίου, εμφανίζουν σημαντικό βαθμό ομοιότητας και επομένως είναι πρακτικά αδύνατο να εντοπιστεί σχετικά εκτεταμένη περιοχή τους που να είναι μοναδική από άποψη πρωτοδιάταξης για συγκεκριμένο γονίδιο. Ως εκ τούτου, για τον περιορισμό "διασταυρούμενης" υβριδοποίησης (cross hybridization) εφαρμόσαμε επανάληψη της ίδιας διαδικασίας, σε ακόμη υψηλότερο κριτήριο (78°C, 0,4 M NaCl), έτσι ώστε να αυξηθεί η ειδικότητα υβριδοποίησης του ανιχνευτή με τους mRNA-στόχους του. Όμως και αυτή η προσέγγιση δεν απέδωσε σαφές αποτέλεσμα. Συνεπώς, με τη χρήση υβριδοποίησης δεν μπορεί να απαντηθεί το ερώτημα αν τα γονίδια ErA.1 και ErB.1 εκφράζονται ταυτόχρονα ή όχι.

Εναλλακτικά, μια άλλη προσέγγιση που θα μπορούσε να εφαρμοστεί είναι ο έλεγχος της έκφρασης δύο γονιδίων αναφοράς (rfr και gfr) που ρυθμίζονται από τον υποκινητή του γονιδιακού ζεύγους ErA/B.1. Όμως, η προσέγγιση αυτή δεν είναι δυνατό να εφαρμοστεί στο συγκεκριμένο σύστημα της χοριογένεσης καθώς θα χρειαζόταν πολύ μεγάλος χρόνος παρατήρησης (υπό μικροσκόπιο φθορισμού) για τον έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων rfr και gfr, σε καθένα σταδιοποιημένο ωθυλάκιο.

Ωστόσο, η προσέγγιση με τα δύο γονίδια αναφοράς εφαρμόστηκε για να απαντηθεί ένα άλλο παρεμφερές ερώτημα με τον υποκινητή *pL9*, που το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου αναφοράς *lacZ*, βάσει των πειραμάτων ηλεκτροδιάτρησης, ήταν το ίδιο ανεξαρτήτως προσανατολισμού. Συγκεκριμένα, λαμβάνοντας υπόψη το μέγεθος του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής στο χώρο και το γεγονός ότι η απόσταση μεταξύ των θέσεων έναρξης της μεταγραφής των α -, β - τύπου γονιδίων του χορίου του ίδιου ζεύγους δεν είναι μεγαλύτερη από 300 ζεύγη βάσεων, συμπεραίνουμε ότι λογικά δε μπορούν να συγκροτηθούν δύο σύμπλοκα έναρξης της μεταγραφής (ένα για κάθε γονίδιο) ώστε τα δύο γονίδια να μεταγράφονται ταυτόχρονα. Καθώς, όμως, κάθε ωοθυλάκιο περιβάλλεται από ~5000 επιθηλιακά κύτταρα, θα ήταν πιθανό σε καθένα επιθηλιακό κύτταρο να δημιουργείται ένα σύμπλοκο μεταγραφής το οποίο επιλέγει και μεταγράφει τυχαία, αλλά κατά αποκλειστικότητα, ένα από τα δύο γονίδια. Για να ελέγξουμε αν τα δύο γονίδια του ζεύγους A/B.L9 εκφράζονται από το ίδιο επιθηλιακό κύτταρο, ή όχι, κλωνοποιήσαμε τον υποκινητή τους ανάμεσα σε δύο γονίδια αναφοράς (*rfp* και *gfp*). Αρχικά κλωνοποιήσαμε τον ολόκληρου μήκους υποκινητή *pL9* στη θέση *SmaI* του πλασμιδιακού φορέα pTurbo-RFP-PRL (της εταιρείας Enrogen). Ο κλώνος που προέκυψε ονομάστηκε #12 *pL9(SmaI)/pTurboRFP*. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές GFP-*PstI*-F και GFP-*HindIII*-R απομονώσαμε με PCR το γονίδιο αναφοράς *gfp* και το κλωνοποιήσαμε στον παραπάνω κλώνο. Ο κλώνος που προέκυψε ήταν ο #14 *pL9(SmaI)/pTurboRFP/GFP(PstI-HindIII)* που περιείχε δύο γονίδια αναφοράς εκατέρωθεν του υποκινητή *pL9*. Η κατασκευή αυτή χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ηλεκτροδιάτρησης ωοθυλακίων και, όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 3.7, τόσο το γονίδιο *rfp* όσο και το γονίδιο *gfp* εκφράστηκαν στα ίδια επιθηλιακά κύτταρα. Συνεπώς, απορρίπτεται η περίπτωση κάθε επιθηλιακό κύτταρο να εκφράζει τυχαία και κατά αποκλειστικότητα το ένα από τα δύο γονίδια

που ελέγχει ο «διφασικός» υποκινητής pL9. Εφόσον, λοιπόν, τα δυο γονίδια εκφράζονται στο ίδιο κύτταρο, παραμένει το ερώτημα αν μπορούν να μεταγραφούν ταυτόχρονα από το ίδιο μόριο DNA ή, εναλλακτικά, σε κάθε κύκλο μεταγραφής το σύμπλοκο έναρξης επιλέγει και μεταγράφει στοχαστικά διαφορετικό γονίδιο.



Εικόνα 3.7. Παρατηρούμε την ταυτόχρονη έκφραση των γονιδίων αναφοράς gfr και gfp σε καθένα από τα επιθηλιακά κύτταρα που περιβάλλουν κάθε ωοθυλάκιο. Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου φθορισμού.

3.5 Γονιδιακές κατασκευές με το γονίδιο αναφοράς lacZ υπό τον έλεγχο μεταλλαγμένων μορφών του υποκινητή pL9

3.5.1 Γονιδιακές κατασκευές με τον μεταλλαγμένο υποκινητή pL9 στη θέση πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα GATA

Η *in vitro* μεταλλαξογένεση του υποκινητή pL9 πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τους κλώνους #1-fullpL9(*EcoRI*)/*lacZ*(*EcoRI*)/ pUC9(α promoter-*lacZ*) και #3-fullpL9(*EcoRI*)/ *lacZ*(*EcoRI*)/ pUC9 (β promoter-*lacZ*), που περιέχουν τον πλήρους μήκους υποκινητή, σε αντιδράσεις PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές mutGATApL9F και mutGATApL9R, οι οποίοι περιέχουν τη μεταλλαγή που θέλουμε να εισάγουμε. Συγκεκριμένα, ο παράγοντας GATA αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-A/GGATAA/G-3' η οποία μεταλλάχθηκε στην αλληλουχία 5'-A/GctgtA/G-3' (με μικρά γράμματα συμβολίζονται τα μεταλλαγμένα νουκλεοτίδια). Έτσι προέκυψαν οι εξής κλώνοι:

- #6-mutGATApL9/*lacZ*/pUC9 (α promoter-*lacZ*) και
- #23-mutGATApL9/*lacZ*/pUC9 (β promoter-*lacZ*).

3.5.2 Γονιδιακές κατασκευές με τον μεταλλαγμένο υποκινητή pL9 στη θέση πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα HMGA

Ο μεταγραφικός παράγοντας HMGA αναγνωρίζει και προσδέεται σε δύο αλληλουχίες πάνω στον υποκινητή L9 (HMG-I και HMG-II) που απέχουν μεταξύ τους περίπου 20 ζεύγη βάσεων. Η θέση πρόσδεσης HMG-I ακολουθεί τη συναινετική αλληλουχία 5'-ARARWAAYYTYT-3' (W=A/T, R=A/G, Y=C/T) και η θέση πρόσδεσης HMG-II ακολουθεί την αλληλουχία 5'-WAKYATTTW-3' (K=G/T). Ο κοινός προσανατολισμός των δύο *cis*-στοιχείων είναι προαπαιτούμενο για την πρόσδεση ενός μορίου HMGA στο DNA μέσω δύο διαδοχικών μοτίβων 'AT-hook' (Bustin, 2001). Ωστόσο, για να αποφύγουμε πιθανή πρόσδεση του παράγοντα, θεωρήσαμε ότι έπρεπε να μεταλλαχθούν και οι δύο αλληλουχίες ως εξής: mutHMG-I: 5'-AAAAAccaggCT-3' και mutHMG-II: 5'-TATCcccgA-3'. Έτσι, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές mutHMGIpL9F και mutHMGIpL9R και ως υπόστρωμα τους κλώνους #1-fullpL9(*EcoRI*)/ *lacZ*(*EcoRI*)/ pUC9(α

promoter-*lacZ*) και #3-fullpL9(*EcoRI*)/ *lacZ*(*EcoRI*)/ pUC9 (β promoter-*lacZ*) σε αντιδράσεις PCR προέκυψαν οι εξής κλώνοι:

- #5-mutHMGIpL9/*lacZ*/ pUC9 (α promoter-*lacZ*) και
- #10-mutHMGIpL9/*lacZ*/ pUC9 (β promoter-*lacZ*).

Εν συνεχεία, οι παραπάνω κλώνοι χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις PCR με τους εκκινητές mutHMGIpL9F και mutHMGIpL9R για να προκύψουν οι εξής κλώνοι:

- #5-mutHMGI+IipL9/*lacZ*/ pUC9 (α promoter-*lacZ*) και
- #16-mutHMGI+IipL9/*lacZ*/ pUC9 (β promoter-*lacZ*).

3.5.3 Γονιδιακές κατασκευές με μεταλλαγμένες μορφές του υποκινητή pL9 σε θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα C/EBP

Όπως ήδη έχει αναφερθεί στην εισαγωγή, οι αλληλουχίες πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα C/EBP διακρίνονται σε “πρώιμου” και “όψιμου” τύπου με συναινετική αλληλουχία 5'-TKNNGYAAB-3' (N=A/T/C/G, B=T/G/C) και 5'-TKNNGAAAB-3' αντίστοιχα. Από πειράματα ΜΚΣ με μεταλλαγμένους, σε διάφορες θέσεις, ανταγωνιστές των παραπάνω αλληλουχιών (Sourmeli et al., 2003, Σουρμελή, 2004) διαπιστώθηκε ότι τα κρίσιμα νουκλεοτίδια για την αναγνώριση και πρόσδεση του παράγοντα C/EBP είναι τα δύο πρώτα και τα 6^ο, 7^ο, 8^ο του εννιανουκλεοτιδίου, αφού οι ανταγωνιστές 5'-caNNGYAAB-3' και 5'-TKNNGtggB-3' δεν μπορούσαν να προσδέσουν την πρωτεΐνη C/EBP. Αρχικά, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τους κλώνους #1-fullpL9(*EcoRI*)/ *lacZ*(*EcoRI*)/ pUC9(α promoter-*lacZ*) και #3-fullpL9(*EcoRI*)/ *lacZ*(*EcoRI*)/ pUC9 (β promoter-*lacZ*) σε αντιδράσεις PCR και με κατάλληλους εκκινητές (βλέπε υλικά και μέθοδοι), που περιέχουν τη μεταλλαγή που θέλουμε, προχωρήσαμε στη δημιουργία κατασκευών

με μεταλλαγμένο τον ρL9 σε καθεμία από τις τέσσερις θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα C/EBP χωριστά. Έτσι προέκυψαν οι εξής κλώνοι:

- #4-mutC/EBP1ρL9/lacZ/ρUC9(α promoter-lacZ),
- #17-mutC/EBP1ρL9/lacZ/ρUC9(β promoter-lacZ),
- #27- mutC/EBP2ρL9/lacZ/ρUC9(α promoter-lacZ),
- #44-mutC/EBP2ρL9/lacZ/ρUC9(β promoter-lacZ),
- #55-mutC/EBP3ρL9/lacZ/ρUC9(α promoter-lacZ),
- #63-mutC/EBP3ρL9/lacZ/ρUC9(β promoter-lacZ) και
- #32- mutC/EBP4ρL9/lacZ/ρUC9(α promoter-lacZ),
- #43-mutC/EBP4ρL9/lacZ/ρUC9(β promoter-lacZ).

Με την ίδια διαδικασία οι παραπάνω κατασκευές χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα για τη δημιουργία των κλώνων:

- #8-mutC/EBP1+2ρL9/lacZ/ρUC9(α promoter-lacZ),
- #11-mutC/EBP1+2ρL9/lacZ/ρUC9(β promoter-lacZ),
- #3-mutC/EBP1+3ρL9/lacZ/ρUC9(α promoter-lacZ),
- #9-mutC/EBP1+3ρL9/lacZ/ρUC9(β promoter-lacZ),
- #8-mutC/EBP1+4ρL9/lacZ/ρUC9(α promoter-lacZ),
- #16-mutC/EBP1+4ρL9/lacZ/ρUC9(β promoter-lacZ),
- #7-mutC/EBP2+3ρL9/lacZ/ρUC9(α promoter-lacZ),
- #9-mutC/EBP2+3ρL9/lacZ/ρUC9(β promoter-lacZ),
- #1-mutC/EBP2+4ρL9/lacZ/ρUC9(α promoter-lacZ),
- #12-mutC/EBP2+4ρL9/lacZ/ρUC9(β promoter-lacZ) και
- #6-mutC/EBP3+4ρL9/lacZ/ρUC9(α promoter-lacZ),
- #13-mutC/EBP3+4ρL9/lacZ/ρUC9(β promoter-lacZ)

που αντιπροσωπεύουν όλους τους συνδυασμούς μεταλλαγών σε δύο θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα C/EBP, στον ρL9 και στους δύο προσανατολισμούς.

Έπειτα -ακολουθώντας και πάλι την ίδια πορεία- αφού χρησιμοποιήσαμε τις κατασκευές με τις διπλές μεταλλαγές C/EBP θέσεων στον υποκινητή L9, προχωρήσαμε στη δημιουργία κλώνων που περιέχουν τρεις μεταλλαγμένες θέσεις αναγνώρισης C/EBP σε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς:

- #2-mutC/EBP1+2+3pL9/lacZ/pUC9(α promoter-lacZ),
- #9-mutC/EBP1+2+3pL9/lacZ/pUC9(β promoter-lacZ),
- #7-mutC/EBP1+2+4pL9/lacZ/pUC9(α promoter-lacZ),
- #11-mutC/EBP1+2+4pL9/lacZ/pUC9(β promoter-lacZ),
- #5-mutC/EBP1+3+4pL9/lacZ/pUC9(α promoter-lacZ),
- #10-mutC/EBP1+3+4pL9/lacZ/pUC9(β promoter-lacZ) και
- #17-mutC/EBP2+3+4pL9/lacZ/pUC9(α promoter-lacZ),
- #23-mutC/EBP2+3+4pL9/lacZ/pUC9(β promoter-lacZ).

Τέλος, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τους κλώνους #2-mutC/EBP1+2+3pL9/lacZ/pUC9(α promoter-lacZ) και #9-mutC/EBP1+2+3pL9/lacZ/pUC9(β promoter-lacZ) και τους εκκινητές 3mutCEBP4pL9F και 3mutCEBP4pL9R κατασκευάσαμε τους εξής κλώνους:

- #4-mutC/EBPallpL9/lacZ/pUC9(α promoter-lacZ) και
- #19-mutC/EBPallpL9/lacZ/pUC9(β promoter-lacZ)

στους οποίους όλες οι θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα C/EBP είναι μεταλλαγμένες.

Όλοι οι παραπάνω κλώνοι ελέγχθηκαν με αλληλούχιση τόσο για επιβεβαίωση της ύπαρξης των μεταλλαγών όσο και του προσανατολισμού κλωνοποίησης του υποκινητή.

Επιπλέον, όλες οι παραπάνω γονιδιακές κατασκευές χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ηλεκτροδιάτρησης και υπολογίστηκε η συχνότητα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς για κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε μορφή πίνακα στο

Παράρτημα Α και σε μορφή ιστογραμμάτων στο Παράρτημα Γ. Στη συνέχεια, για να επιβεβαιωθεί ποια αναπτυξιακά στάδια είναι πιο πιθανά να εμφανίσουν έκφραση για κάθε γονιδιακή κατασκευή και για κάθε προσανατολισμό που εξετάστηκε, πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία στα πιο πάνω αποτελέσματα (χ^2 - chi-square tests). Τα τελικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα του Παραρτήματος Δ και στην Εικόνα 3.8.

3.6 Μελέτη του ρόλου των θέσεων πρόσδεσης GATA και HMG στον υποκινητή pL9

Για να βεβαιωθούμε ότι η τεχνική της ηλεκτροδιάτρησης είναι επαρκής για τη μελέτη του ρόλου διαφόρων *cis*- ρυθμιστικών στοιχείων ενός υποκινητή χρησιμοποιήσαμε σε πειράματα ηλεκτροδιάτρησης τις γονιδιακές κατασκευές (και με τους δύο προσανατολισμούς) που περιέχουν τους μεταλλαγμένους υποκινητές στις θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων GATA (*mutGATApL9*) και HMGA (*mutHMGI+IIP9*). Μεταλλαγή της θέσης πρόσδεσης GATA έδωσε μέγιστη συχνότητα έκφρασης στο πρώιμο-ενδιάμεσο στάδιο (EM) ανεξαρτήτως προσανατολισμού κλωνοποίησης του υποκινητή. Με σύγκριση του προτύπου αυτού με το αντίστοιχο του φυσιολογικού υποκινητή pL9 παρατηρείται μετατόπιση της έκφρασης από τα στάδια M-ML προς το στάδιο EM (Εικόνα 3.8).

Πιθανή εξήγηση αυτής της μετατόπισης στην έκφραση είναι η παραδοχή ότι ο μεταγραφικός παράγοντας GATA δρα ως καταστολέας της έκφρασης κατά τα πρώιμα στάδια της χοριογένεσης στον υποκινητή pL9 και γι' αυτό το λόγο μεταλλαγή της θέσης αναγνώρισης δεν επιτρέπει την πρόσδεσή του για να μπορέσει να δράσει. Συνεπώς η έκφραση ξεκινάει νωρίτερα. Μεταλλαγή των θέσεων πρόσδεσης του παράγοντα HMGA καθιστά τον υποκινητή ανίκανο να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή σε

οποιοδήποτε αναπτυξιακό στάδιο. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς ο μεταγραφικός παράγοντας HMGA έχει δειχθεί ότι είναι υπεύθυνος για την προσέλκυση του μεταγραφικού παράγοντα C/EBP (Parantonis et al., 2008b), ο οποίος είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση της μεταγραφής, επιβεβαιώνοντας, με αυτόν τον τρόπο, τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει στην έναρξη της μεταγραφής των αντίστοιχων γονιδίων του χορίου.

Θεωρούμε, λοιπόν, ότι η μέθοδος της ηλεκτροδιάτρησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για τη μελέτη του ρόλου των *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων ενός υποκινητή, εφόσον γίνεται σύγκριση μόνο των προτύπων έκφρασης που προκύπτουν από τις διαφορετικές παραλλαγές του ιδίου υποκινητή μεταξύ τους.

3.7 Μελέτη του ρόλου των θέσεων πρόσδεσης C/EBP στον υποκινητή ρL9

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, ο μεταγραφικός παράγοντας C/EBP είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση της μεταγραφής των A/B.L9 γονιδίων (Parantonis et al., 2008c), γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από τα πειράματα ηλεκτροδιάτρησης. Συγκεκριμένα, για τις γονιδιακές κατασκευές του μεταλλαγμένου υποκινητή ρL9 σε όλες τις πιθανές θέσεις πρόσδεσης C/EBP (mutC/EBPall) δεν παρατηρήθηκε έκφραση ανεξαρτήτως προσανατολισμού (Εικόνα 3.8).

Για να μπορέσουμε να ερμηνεύσουμε πιο εύκολα τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα ηλεκτροδιάτρησης με τις γονιδιακές κατασκευές που περιέχουν τις διάφορες μεταλλαγμένες, σε C/EBP θέσεις, μορφές του υποκινητή ρL9, στο εξής οι γονιδιακές κατασκευές θα περιγράφονται με τις “λειτουργικές” (δηλ. όχι μεταλλαγμένες) C/EBP θέσεις πρόσδεσης που περιέχονται στην εκάστοτε

μορφή του υποκινητή pL9, όπως αντιστοιχούνται και στην Εικόνα 3.8. Επιπλέον, εφόσον ο φυσιολογικός υποκινητής pL9 μπορεί και ρυθμίζει τη μεταγραφή και προς τις δύο κατευθύνσεις, εστίασαμε περισσότερο την προσοχή μας στις γονιδιακές κατασκευές που παρουσίασαν έκφραση και για τους δύο (α - και β -) προσανατολισμούς.

λειτουργικές θέσεις C/EBP	α-τύπου γονίδιο							υποκινητής	β-τύπου γονίδιο							μεταλλαγμένες θέσεις C/EBP
	Vit	E	EM	M	ML	L	VL		Vit	E	EM	M	ML	L	VL	
all																pL9
all (mutHMG)	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	none (mutHMG)
none	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	all
3	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	mut1+2+4
all (mutGATA)																none (mutGATA)
2																mut1+3+4
1+3																mut2+4
2+4																mut1+3
3+4																mut1+2
2+3+4																mut1
1+2+3																mut4
1+2+4																mut3
1																mut2+3+4
4									X	X	X	X	X	X	X	mut1+2+3
2+3									X	X	X	X	X	X	X	mut1+4
1+2									X	X	X	X	X	X	X	mut3+4
1+3+4	X	X	X	X	X	X	X									mut2
1+4	X	X	X	X	X	X	X									mut2+3

Εικόνα 3.8. Αποτελέσματα ηλεκτροδιάτρησης για κάθε γονιδιακή κατασκευή και για κάθε προσανατολισμό που εξετάστηκε έπειτα από στατιστική επεξεργασία (χ^2 - chi-square tests).

Στον Πίνακα 3.3 συνοψίζονται οι γονιδιακές κατασκευές που παρουσίασαν έκφραση στα αναπτυξιακά στάδια M-ML (στάδια που παρατηρήθηκε έκφραση από τον φυσιολογικό υποκινητή) για οποιονδήποτε προσανατολισμό. Παρατηρούμε ότι στην Ομάδα I η μοναδική κατασκευή που παρουσίασε έκφραση και στους δύο προσανατολισμούς ήταν αυτή με τον υποκινητή που περιείχε λειτουργική τη θέση πρόσδεσης C/EBP1. Ωστόσο, αν και οι κατασκευές με τους υποκινητές C/EBP1+2, C/EBP1+4 και C/EBP1+3+4 περιέχουν τη θέση C/EBP1, δεν παρουσίασαν έκφραση και στους δύο προσανατολισμούς. Συνεπώς, φαίνεται ότι χρειάζονται περισσότερες θέσεις C/EBP για στατιστικά σημαντική και χρονικά σωστή αντιπαράλληλη γονιδιακή έκφραση. Στην Ομάδα II μόνο οι κατασκευές με τους υποκινητές C/EBP1+3 και C/EBP2+4 παρουσίασαν έκφραση και στους δύο προσανατολισμούς. Συγκρίνοντας την αρχιτεκτονική των δύο αυτών μεταλλαγμένων υποκινητών (Εικόνα 3.8), παρατηρούμε ότι οι θέσεις C/EBP που περιέχουν έχουν τον ίδιο προσανατολισμό μεταξύ τους και βρίσκονται εκατέρωθεν της θέσης πρόσδεσης του παράγοντα HMG. Τέλος, οι γονιδιακές κατασκευές με τους υποκινητές C/EBP1+2+3, C/EBP1+2+4 και C/EBP2+3+4 της Ομάδας III παρουσίασαν έκφραση και προς τις δύο κατευθύνσεις. Εφόσον, λοιπόν, αυτές οι κατασκευές περιέχουν τους συνδυασμούς των C/EBP θέσεων 1+3 και 2+4 θεωρούμε πιθανό ότι τουλάχιστον αυτοί οι συνδυασμοί είναι απαραίτητοι για την σωστή έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων του χορίου από τον υποκινητή pL9.

Πίνακας 3.3. Γονιδιακές κατασκευές που παρουσίασαν έκφραση του γονιδίου αναφοράς στο σωστό αναπτυξιακό στάδιο (M-ML) συγκρινόμενες με τον φυσιολογικό υποκινητή pL9, για οποιονδήποτε προσανατολισμό.

Αναπτυξιακά στάδια M-ML			Ομάδα
Λειτουργικές θέσεις C/EBP	α-τύπου προσανατολισμός	β-τύπου προσανατολισμός	
1	✓	✓	I
2	✓	X	
4	✓	X	
1+2	✓	X	II
1+3	✓	✓	
1+4	X	✓	
2+3	✓	X	
2+4	✓	✓	
3+4	X	✓	
1+2+3	✓	✓	III
1+2+4	✓	✓	
1+3+4	X	✓	
2+3+4	✓	✓	

Οι γονιδιακές κατασκευές έχουν χωριστεί σε τρεις ομάδες ανάλογα με τον αριθμό λειτουργικών θέσεων C/EBP που περιέχει ο τροποποιημένος υποκινητής. Το ✓ συμβολίζει στατιστικά σημαντική έκφραση του γονιδίου αναφοράς. Το X συμβολίζει μη στατιστικά σημαντική έκφραση μετά από στατιστικούς ελέγχους (χ^2 - Chi-square tests).

3.7.1 Ο ρόλος των θέσεων πρόσδεσης C/EBP1 και C/EBP2

Όπως γνωρίζουμε από προηγούμενα αποτελέσματα στο εργαστήριό μας, κατά την έναρξη ή λίγο πριν τη μεταγραφή των A/B.L9 γονιδίων, ένα νουκλεόσωμα που βρίσκεται στο α -μισό του υποκινητή μετακινείται προς την κατεύθυνση του α -τύπου γονιδίου αποκαλύπτοντας τις θέσεις πρόσδεσης C/EBP1 και C/EBP2 (Parantonis et al., 2008a). Συνεπώς, η μία ή και οι δύο θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα C/EBP είναι υπεύθυνες για την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Επειδή, όμως, η απόσταση μεταξύ των κέντρων των συγκεκριμένων δύο θέσεων πρόσδεσης είναι 11 νουκλεοτίδια και από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη C/EBP αλληλεπιδρά με περίπου 16 νουκλεοτίδια καθώς προσδέεται στο DNA (Vinson et al., 1989), υποθέσαμε ότι οι θέσεις πρόσδεσης C/EBP1 και C/EBP2 δε μπορούν να καταληφθούν ταυτόχρονα από το μεταγραφικό παράγοντα.

Η πιο πάνω υπόθεση επιβεβαιώνεται από τα πειράματα ηλεκτροδιάτρησης που πραγματοποιήσαμε και συγκεκριμένα από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων των γονιδιακών κατασκευών με τους υποκινητές C/EBP1, C/EBP2 και C/EBP1+2 για τον α -προσανατολισμό: Εφόσον η γονιδιακή κατασκευή C/EBP1 έδωσε έκφραση στα αναπτυξιακά στάδια ML-L και η κατασκευή C/EBP2 στα στάδια EM-M, συνεπάγεται ότι η κατασκευή με λειτουργικές τις θέσεις C/EBP1+2 αναμένεται να δίνει έκφραση στα στάδια M-ML, δηλαδή ενδιάμεσα των σταδίων EM και L, πράγμα που αποτελεί γεγονός με βάση τα αποτελέσματά μας (Εικόνα 3.8). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήσαμε ότι σε κάθε ένα ωθηκάριο που χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ηλεκτροδιάτρησης με την κατασκευή C/EBP1+2, η έκφραση του γονιδίου αναφοράς εμφανιζόταν είτε στα στάδια EM-M είτε στα στάδια ML-L, προφανώς ως αποτέλεσμα της πρόσδεσης του παράγοντα C/EBP στη θέση C/EBP2 ή στη θέση C/EBP1 αντίστοιχα (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Επιπλέον, σύμφωνα με την

εικόνα 3.8 οι υποκινητές που περιέχουν είτε μόνο τη θέση C/EBP1 είτε τη θέση C/EBP2 μπορούν να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή και προς τις δύο κατευθύνσεις. Ωστόσο, μόνο ο υποκινητής που περιέχει τη θέση C/EBP2 παρουσίασε έκφραση στο πρώιμο-ενδιάμεσο στάδιο (EM) που αντιστοιχεί στο αναπτυξιακό στάδιο μεταγραφικής ενεργοποίησης του φυσιολογικού υποκινητή pL9 σύμφωνα με τα πειράματα ανάλυσης κηλίδων RNA (Sporel et al., 1986). Με άλλα λόγια, η γονιδιακή κατασκευή με τον μεταλλαγμένο υποκινητή που περιέχει μόνο τη θέση πρόσδεσης C/EBP2 ίσως προσομοιάζει την *in vivo* χρωματινική δομή του φυσιολογικού υποκινητή pL9.

3.7.2 Ο ρόλος των θέσεων πρόσδεσης C/EBP3 και C/EBP4

Συγκρίνοντας τα πρότυπα έκφρασης των υποκινητών C/EBP1+3+4 και C/EBP2+3+4 παρατηρούμε ότι μόνο ο υποκινητής C/EBP2+3+4 δίνει έκφραση και με τους δύο προσανατολισμούς (Πίνακας 3.3). Ο υποκινητής αυτός, όμως, παρήγαγε ένα πιο αργοπορημένο πρότυπο έκφρασης συγκριτικά με το αντίστοιχο *in vivo* ή με το πρότυπο που παρήγαγε ο υποκινητής με μοναδική λειτουργική θέση τη C/EBP2 (Εικόνα 3.8). Αυτή η διαφοροποίηση στο πρότυπο έκφρασης θα μπορούσε να αποδοθεί στις αλληλουχίες αναγνώρισης C/EBP3 ή C/EBP4 ή και στις δύο. Όμως, λαμβάνοντας υπόψη ότι (α) ο υποκινητής με λειτουργική τη θέση C/EBP3 δεν ήταν ικανός να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή και προς τις δύο κατευθύνσεις, και (β) η μεταλλαγή της θέσης αυτής (δηλαδή ο υποκινητής C/EBP1+2+4) δεν μεταβάλλει το πρότυπο έκφρασης, συγκρίνοντάς το με αυτό του φυσιολογικού υποκινητή, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η θέση C/EBP3 είναι κατά κάποιον τρόπο «ουδέτερη». Αντιθέτως, παρόλο που ο υποκινητής με λειτουργική τη θέση C/EBP4 παρουσίασε έκφραση μόνο ως προς τον α-προσανατολισμό, στα αναπτυξιακά στάδια ML-L, ο υποκινητής C/EBP2+4 παρήγαγε το ίδιο

πρότυπο έκφρασης και στους δύο προσανατολισμούς, δηλαδή ακριβώς όπως ο υποκινητής C/EBP2+3+4. Συνεπώς, φαίνεται ότι η θέση C/EBP4 είναι σημαντική για τη χρονοειδική έκφραση των A/B.L9 γονιδίων του χορίου.

Αυτά τα ευρήματα βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα που υποδείκνυαν ότι η θέση ενός νουκλεοσώματος στο β-μισό του υποκινητή pL9 διατηρείται κατά τη διάρκεια της χοριογένεσης (Parantonis et al., 2008a). Αυτό το νουκλεόσωμα πιθανότατα είναι τοποθετημένο σε τέτοια θέση, ώστε η θέση πρόσδεσης C/EBP3 να βρίσκεται κοντά στο μέσον του νουκλεοσωμικού DNA και έτσι να μην είναι προσβάσιμη από τον μεταγραφικό παράγοντα [όμως δείτε (Zaret and Carroll, 2011, Struhl and Segal, 2013, Koerber et al., 2009)]. Από την άλλη πλευρά, η θέση C/EBP4, παρόλο που βρίσκεται μέσα στα 146 ζεύγη βάσεων του νουκλεοσωμικού DNA, φαίνεται να είναι πιο εύκολα προσβάσιμη από την πρωτεΐνη C/EBP, καθώς βρίσκεται προς την πλευρά του δεξιού ορίου του νουκλεοσωμικού DNA. Η αργοπορημένη έκφραση που παρατηρείται *ex vivo* (πειράματα ηλεκτροδιάτρησης) για τον φυσιολογικό υποκινητή pL9 μπορεί να οφείλεται στην άγνωστη χρωματινική δομή, που μπορεί να αποκτά μια γονιδιακή κατασκευή μετά την είσοδο της στα επιθηλιακά κύτταρα των ωοθυλακίων μέσω ηλεκτροδιάτρησης, σε αντίθεση με το πρότυπο μεταγραφής *in vivo* (πειράματα ανάλυσης κηλίδων RNA) που πιθανόν οφείλεται στην παρουσία ενός νουκλεοσώματος στο β-μισό του υποκινητή.

4. Συμπεράσματα - Συζήτηση

Στο μεταξοσκώληκα, η πλειοψηφία των γονιδίων του χορίου της ίδιας αναπτυξιακής εξειδίκευσης είναι οργανωμένα σε ζευγάρια με αντιπαράλληλη κατεύθυνση μεταγραφής και κοινό «διφασικό» υποκινητή. Έχει βρεθεί ότι αυτοί οι υποκινητές περιέχουν *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία των ίδιων μεταγραφικών παραγόντων αλλά με διαφοροποιήσεις στην αρχιτεκτονική, δηλαδή στον αριθμό, στη θέση και στον προσανατολισμό τους (Sourmeli et al., 2003). Προκειμένου να διερευνήσουμε τον ρόλο καθεμίας θέσης πρόσδεσης στην χρονοειδική γονιδιακή έκφραση, κατασκευάσαμε μια σειρά από μεταλλαγμένες παραλλαγές του γονιδιακού ζεύγους A/B.L9 οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα παροδικής έκφρασης μέσω ηλεκτροδιάτρησης σε *ex vivo* αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια.

4.1 Η μέθοδος της ηλεκτροδιάτρησης

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή δείξαμε ότι η τεχνική της ηλεκτροδιάτρησης μπορεί να εφαρμοστεί ως ένα εργαλείο για τη διεξαγωγή *in vivo* μοριακών μελετών με σκοπό τον λειτουργικό χαρακτηρισμό εξειδικευμένων ρυθμιστικών στοιχείων τόσο σε επίπεδο αλληλουχίας και αρχιτεκτονικής (*cis*) υποκινητών, όσο και σε επίπεδο μεταγραφικών (*trans*) παραγόντων. Στόχος μας ήταν να βελτιστοποιήσουμε και να προτείνουμε μια προσέγγιση χαμηλότερου κόστους, υψηλής και ταχείας απόδοσης για να αντικατασταθούν οι υφιστάμενες *in vivo* λειτουργικές δοκιμασίες (biolistic, transformation) που μέχρι τώρα είχαν εφαρμοστεί σε διάφορους ιστούς του μεταξοσκώληκα.

4.2 Ρύθμιση της έκφρασης του ενδιάμεσου γονιδιακού ζεύγους A/B.L9

Γενικά, πολύ σημαντικοί παράγοντες για την σωστή γονιδιακή έκφραση αποτελούν η «αρχιτεκτονική» των υποκινητών και η δομή της χρωματίνης σε αυτούς. Για να μπορέσει ένας συγκεκριμένος μεταγραφικός παράγοντας να ρυθμίσει τα γονίδια στόχους του πρέπει όχι μόνο να μπορεί να προσδεθεί στο DNA αλλά και να αλληλεπιδράσει κατάλληλα με άλλες πρωτεΐνες, όπως συμπαράγοντες και μέλη του βασικού συμπλόκου μεταγραφής. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις, μαζί με επαγόμενες αλλαγές στη στερεοδομή του DNA (όπως κάμψη του DNA), καθιστούν την τοπολογία και τον προσανατολισμό των αλληλουχιών πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων πολύ σημαντικές για την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

Στο σύστημα της χοριογένεσης, τα πειράματα ηλεκτροδιάτρησης επιβεβαίωσαν ότι η πρόσδεση του αρχιτεκτονικού μεταγραφικού παράγοντα HMGA στο μέσο του «διφασικού» υποκινητή των γονιδίων A/B.L9 είναι εξαιρετικά σημαντική όχι μόνο για την κάμψη του υποκινητή (Parantonis et al., 2008c), ώστε να είναι δυνατή η μεταγραφή σε αντιπαράλληλες κατευθύνσεις, αλλά και για την προσέλκυση του κύριου ρυθμιστικού παράγοντα C/EBP. Επιπλέον, τα ίδια πειράματα αποκάλυψαν ότι τουλάχιστον δύο θέσεις πρόσδεσης C/EBP, εκατέρωθεν της αλληλουχίας πρόσδεσης HMGA και με τον ίδιο προσανατολισμό (συνδυασμοί θέσεων πρόσδεσης C/EBP: 1+3 ή 2+4) είναι απαραίτητες για την έναρξη της μεταγραφής των αντίστοιχων γονιδίων. Η τοπολογία και ο προσανατολισμός των θέσεων πρόσδεσης C/EBP φαίνεται να μην είναι τυχαία, καθώς, μόνο έτσι, οι παράγοντες C/EBP μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους ή/και με το σύμπλοκο της RNA πολυμεράσης II, προκειμένου να το τοποθετήσουν είτε στην α - είτε στην β - θέση TATA (Εικόνα 4Γ). Όσον αφορά την οργάνωση της χρωματίνης στην περιοχή του υποκινητή, η τοπολογία, η δομή και οι τροποποιήσεις των νουκλεοσωμάτων διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στις

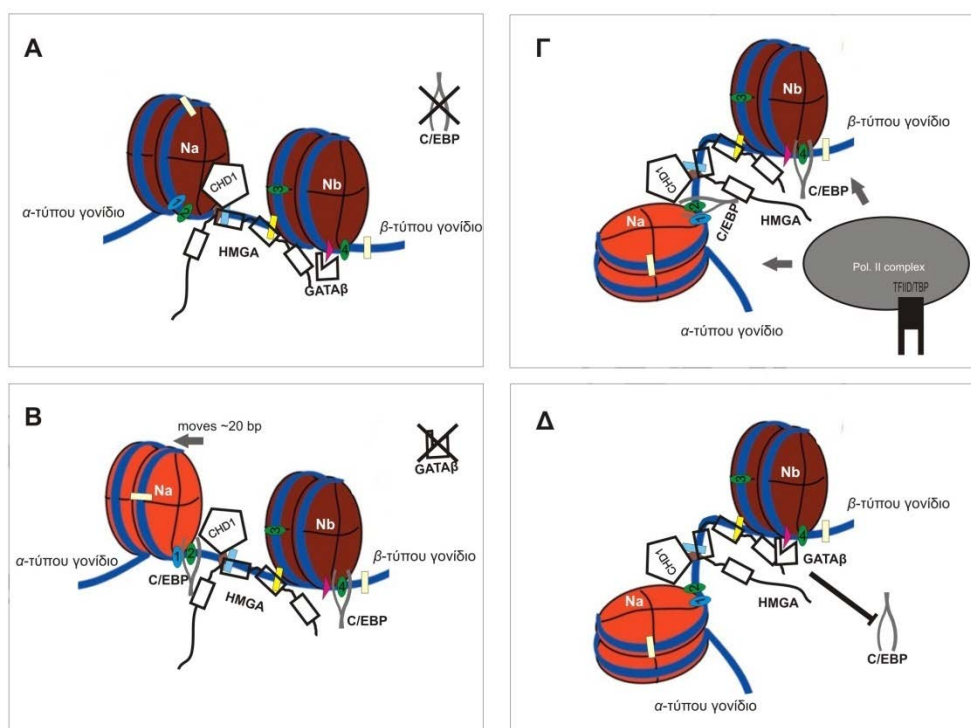
διαδικασίες της γονιδιακής ρύθμισης. Στον υποκινητή *pL9*, έχει βρεθεί ότι δύο νουκλεοσώματα συμμετέχουν στο μηχανισμό που ρυθμίζει αναπτυξιακά την γονιδιακή έκφραση. Το ένα νουκλεόσωμα μετακινείται για να αποκαλυφθεί η αλληλουχία πρόσδεσης C/EBP2, ενώ το δεύτερο νουκλεόσωμα, παρ' ότι διατηρεί τη θέση του, επικαλύπτει μερικώς τις θέσεις πρόσδεσης GATA και C/EBP4 των οποίων ο ρόλος είναι βοηθητικός για τη χρονοειδική έκφραση των A/B.L9 γονιδίων του χορίου.

Πιο αναλυτικά, βάσει προηγούμενων *in vitro* αναλύσεων (Sourmeli et al., 2003, Sourmeli et al., 2005a, Sourmeli et al., 2005b, Papantonis et al., 2008c, Papantonis et al., 2008b, Papantonis et al., 2008a, Papantonis and Lecanidou, 2009, Lecanidou and Papantonis, 2010b, Lecanidou and Papantonis, 2010a) και των παρόντων *ex vivo* δεδομένων προέκυψε ένα αναθεωρημένο πρότυπο το οποίο περιγράφει τα βήματα που απαιτούνται για τη σωστή αναπτυξιακή ρύθμιση των A/B.L9 γονιδίων. Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 4, κατά τη διάρκεια της βιτελλογένεσης στον υποκινητή *pL9* δύο νουκλεοσώματα παρεμποδίζουν την μεταγραφική ενεργοποίηση των α - και β - τύπου γονιδίων *in vivo*. Το ένα νουκλεόσωμα (Na) βρίσκεται στο α - μισό του υποκινητή και το δεύτερο (Nb) στο β - μισό (Papantonis et al., 2008b) (Εικόνα 4A). Κατά την έναρξη της χοριογένεσης το νουκλεόσωμα Na μετακινείται κατά 20 ζεύγη βάσεων προς το α - τύπου γονίδιο, ενώ το Nb διατηρεί τη θέση του (Papantonis et al., 2008b). Η μετακίνηση του νουκλεοσώματος Na οφείλεται στη δράση του μεταγραφικού παράγοντα αναδόμησης της χρωματίνης CHD1 ο οποίος προσελκύεται στον υποκινητή από τον παράγοντα HMGA (Εικόνα 4B). Παράλληλα, ο παράγοντας HMGA όχι μόνο προκαλεί κάμψη ($\sim 90^\circ$) στον υποκινητή *pL9* αλλά προσελκύει και τον μεταγραφικό παράγοντα C/EBP, ο οποίος είναι απαραίτητος για την μεταγραφική ενεργοποίηση σε αντιπαράλληλες κατευθύνσεις (Εικόνα 4Γ). Τα δεδομένα ότι α) η μετακίνηση του νουκλεοσώματος Na αποκαλύπτει τις θέσεις C/EBP1 και C/EBP2, β) αυτές οι δύο θέσεις δε μπορούν να καταληφθούν ταυτόχρονα

από τον παράγοντα C/EBP (Vinson et al., 1989) και γ) τα αποτελέσματα της παρούσης διατριβής, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η θέση πρόσδεσης C/EBP2 είναι υπεύθυνη για την έναρξη της μεταγραφής και των δύο γονιδίων στο πρώιμο-ενδιάμεσο στάδιο (EM). Η προτίμηση για πρόσδεση στη θέση C/EBP2 αντί της θέσης C/EBP1 από τον παράγοντα C/EBP μπορεί να οφείλεται είτε στην μεγαλύτερη συγγένεια που έχει για την “όψιμου” τύπου αλληλουχία C/EBP2, εν συγκρίσει με την “πρώιμου” τύπου θέση C/EBP1 (Sourmeli et al., 2003), είτε στο γεγονός ότι κατά τη μετακίνηση του νουκλεοσώματος Na η πρώτη αλληλουχία που αποκαλύπτεται είναι η C/EBP2.

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 3.7, η θέση πρόσδεσης C/EBP4 φαίνεται να είναι απαραίτητη για την έκφραση στα ενδιάμεσα στάδια (M) ενώ η θέση C/EBP3 να είναι “ουδέτερη”. Το συμπέρασμα αυτό συμφωνεί με την *in vivo* κατάσταση, όπου το νουκλεόσωμα Nb καλύπτει (146 ζεύγη βάσεων νουκλεοσωμικού DNA) την περιοχή του υποκινητή pL9 που εκτείνεται από τη θέση HMG-I μέχρι τη θέση του β-TATA, παρεμποδίζοντας, έτσι, την πρόσδεση του παράγοντα C/EBP στη θέση C/EBP3, η οποία βρίσκεται στο μέσο του νουκλεοσωμικού DNA [όμως δείτε (Zaret and Carroll, 2011, Struhl and Segal, 2013, Koerber et al., 2009)]. Αντίθετα, οι θέσεις GATA και C/EBP4, που βρίσκονται στο δεξί όριο του νουκλεοσωμικού DNA, μπορεί να είναι προσβάσιμες (Koerber et al., 2009), από τις αντίστοιχες πρωτεΐνες, με μεγαλύτερη συχνότητα από ότι η θέση C/EBP3. Τα *in vitro* και *in vivo* αποτελέσματά μας υποδηλώνουν ότι κατά τη διάρκεια της βιτελλογένεσης και της πρώιμης χοριογένεσης ο μεταγραφικός παράγοντας GATA δρα ως καταστολέας (σε συνδυασμό με τα υπάρχοντα, στην περιοχή, νουκλεοσώματα), καθώς πρόσδεση του στον υποκινητή παρεμποδίζει την έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων (Εικόνα 4A). Ωστόσο, κατά τα πρώιμα-ενδιάμεσα χοριογενετικά στάδια, η συγκέντρωση του παράγοντα C/EBP αυξάνεται (Parantonis et al., 2008c, Παπαντώνης, 2008), σε αντίθεση με την συγκέντρωση του παράγοντα

GATA που μειώνεται. Συνεπώς, η θέση C/EBP4 προτιμάται έναντι της θέσης GATA και σε συνεργασία με τον παράγοντα C/EBP που βρίσκεται στη θέση C/EBP2, παρατηρείται ενεργοποίηση της μεταγραφής σε αντιπαράλληλες κατευθύνσεις (Εικόνα 4A-B). Εν συνεχεία, κατά τη διάρκεια των όψιμων σταδίων χοριογένεσης, έχει παρατηρηθεί αύξηση της συγκέντρωσης του παράγοντα GATA (Drevet et al., 1995, Eystathiou et al., 2001, Swevers, 1999) και θεωρείται πιθανό η πρόσδεσή του στην αντίστοιχη θέση να απενεργοποιεί τον υποκινητή A/B.L9 (Εικόνα 4Δ).



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση των γεγονότων που ρυθμίζουν την ακριβή έκφραση των γονιδίων του χορίου A/B.L9. Για περισσότερες λεπτομέρειες δείτε το κείμενο.

4.3 Προς ένα γενικευμένο πρότυπο ρύθμισης του συστήματος της χοριογένεσης, βασιζόμενο στην αρχιτεκτονική των υποκινητών

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα ηλεκτροδιάτρησης των ολόκληρου μήκους υποκινητών p5H4, pEr.1 και p6F6.2 διαπιστώνουμε ότι

συμφωνούν απόλυτα με τα αντίστοιχα πρότυπα μεταγραφής που έχουν προκύψει και γνωρίζουμε βιβλιογραφικά από πειράματα ανάλυσης κηλίδων RNA (Eickbush et al., 1985). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε το ίδιο για τους υποκινητές pL9 και pL1. Πιο αναλυτικά, για τον πρώιμο-ενδιάμεσο (σύμφωνα με πειράματα ανάλυσης κηλίδων RNA) υποκινητή pL9 μεγαλύτερη συχνότητα έκφρασης παρατηρήθηκε στα ενδιάμεσα-όψιμα στάδια (M-ML) της χοριογένεσης, ενώ για τον ενδιάμεσο-όψιμο (σύμφωνα με πειράματα ανάλυσης κηλίδων RNA) υποκινητή pL1 υψηλή συχνότητα έκφρασης εμφανίστηκε κυρίως στα πρώιμα-ενδιάμεσα στάδια (EM-M). Αυτή η ασυμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων ηλεκτροδιάτρησης και ανάλυσης κηλίδων RNA (Sproerel et al., 1986) για τους υποκινητές pL9 και pL1 ίσως εξηγείται από το γεγονός ότι οι κατασκευές που χρησιμοποιούνται στα πειράματα ηλεκτροδιάτρησης αποκτούν άγνωστη δομή χρωματίνης, όταν εισέρχονται στα επιθηλιακά κύτταρα των ωοθυλακίων, και συνεπώς δεν προσομοιάζουν την *in vivo* κατάσταση. Για ποιον λόγο, όμως, τα αποτελέσματα ηλεκτροδιάτρησης για τους υποκινητές των γονιδίων 5H4, Er.1 και 6F6.2 συμφωνούν με τα αποτελέσματα από πειράματα ανάλυσης κηλίδων RNA ενώ για τους υποκινητές των γονιδίων L9 και L1 όχι; Στηριζόμενοι στο πρότυπο ρύθμισης του γονιδιακού ζεύγους A/B.L9, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι ο μηχανισμός ρύθμισης των γονιδίων διαφέρει μεταξύ των πρώιμων (5H4, Er.1, 6F6.2) και ενδιάμεσων (L9, L1) και συγκεκριμένα για τα πρώιμα γονίδια είναι πιο απλός. Για την ακρίβεια, οι υποκινητές των πρώιμων γονιδίων 5H4, Er.1 και 6F6.2 είναι μικρότεροι σε μήκος συγκριτικά με τους υποκινητές των ενδιάμεσων γονιδίων L9 και L1. Θα μπορούσαμε, λοιπόν, να υποθέσουμε ότι δεν καλύπτονται από νουκλεοσώματα, έτσι ώστε να είναι ενεργοί κατά τα πρώτα στάδια της χοριογένεσης. Συνεπώς, είναι πιθανό η ρύθμιση των πρώιμων γονιδίων να μην εξαρτάται από την ύπαρξη νουκλεοσωμάτων στην περιοχή των υποκινητών τους αλλά μόνο από την πρόσδεση συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων (C/EBP,

GATA), ανάλογα με τη διαθεσιμότητά τους, εν αντιθέσει με το μηχανισμό ρύθμισης των ενδιάμεσων γονιδίων που περιγράφηκε παραπάνω. Για τον έλεγχο, όμως, αυτής της υπόθεσης θα πρέπει να γίνουν πειράματα όπως FAIRE-seq, ChIP-exo, primer extension of mononucleosomal DNA (Giresi et al., 2007, Rhee and Pugh, 2012, Parantonis et al., 2008b) στους υποκινητές των πρώιμων γονιδίων του χορίου.

Ωστόσο, το γεγονός ότι όλοι οι υποκινητές των γονιδίων του χορίου διαθέτουν ρυθμιστικές αλληλουχίες πρόσδεσης για τους ίδιους μεταγραφικούς παράγοντες μας προκαταβάλλει να υποθέσουμε ότι, παρά τις διαφορές στη μεταξύ τους χρωματινική οργάνωση και αρχιτεκτονική, κάποια κοινά σημεία υφίστανται τουλάχιστον ως προς την αρχιτεκτονική τους. Αναλυτικότερα, στην παρούσα διδακτορική διατριβή δείξαμε ότι στον υποκινητή του γονιδιακού ζεύγους A/B.L9 απαιτούνται δύο θέσεις πρόσδεσης C/EBP για την μεταγραφική ενεργοποίηση, οι οποίες πρέπει να έχουν τον ίδιο προσανατολισμό (συνδυασμός θέσεων 2+4). Επιπλέον, βάσει της εικόνας 1.7 στην εισαγωγή, παρατηρούμε ότι οι περισσότεροι υποκινητές περιέχουν πάνω από δύο θέσεις C/EBP με κάποιες να έχουν κοινό προσανατολισμό. Συνεπώς, θα μπορούσαμε να προσδιορίσουμε θεωρητικά (και να στοχεύσουμε πειραματικά) τις πιθανές θέσεις πρόσδεσης C/EBP που είναι σημαντικές σε καθέναν υποκινητή για την σωστή γονιδιακή ρύθμιση. Πιο συγκεκριμένα, στους υποκινητές των γονιδίων τύπου L11, που εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα στην αρχιτεκτονική τους με τον υποκινητή rL9, οι θέσεις C/EBP2+4 είναι πιο πιθανό να είναι σημαντικές έναντι των θέσεων C/EBP1+3. Ας σημειωθεί σε αυτό το σημείο ότι, παρόλο που οι θέσεις C/EBP2+4 φαίνεται να είναι σημαντικές στους υποκινητές και των δύο τύπων ενδιάμεσων γονιδίων (L11 και L12 τύπου), το ελάχιστο διαφορετικό πρότυπο μεταγραφής που παρουσιάζουν (Spoerel et al., 1986) πιθανότατα να οφείλεται στη διαφορετική τοπολογία των θέσεων C/EBP2+4 σε συνδυασμό με την χρωματινική δομή του εκάστοτε υποκινητή, καθώς δε γνωρίζουμε τη θέση

των νουκλεοσωμάτων στον υποκινητή ρL1. Στους υποκινητές των 6F6 γονιδίων, η α-θέση C/EBP μαζί με την θέση C/EBP1 της b-περιοχής ίσως να είναι πιο σημαντικές. Η υπόθεση αυτή δεν απορρίπτεται από τα *in vivo* πειράματα με χρήση ανασυνδυασμένων πλασμιδίων έκφρασης που περιελάμβαναν το γονίδιο *lacZ* υπό τον έλεγχο τμημάτων υποκινητών των γονιδίων 6F6.1 και 6F6.2 (Σουρμελή, 2004). Το τμήμα του υποκινητή του γονιδίου 6F6.2 που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα αυτά περιελάμβανε και τις δύο (a και b) περιοχές (δηλαδή όλες τις θέσεις πρόσδεσης C/EBP) ενώ το τμήμα του γονιδίου 6F6.1 δεν περιείχε την περιοχή b, με επακόλουθο να μην είναι δυνατή η έκφραση του γονιδίου αναφοράς. Στην περίπτωση του υποκινητή του γονιδιακού ζεύγους ErA/B.2, οι συνδυασμοί των θέσεων C/EBP1+4 ή 2+4 ίσως να είναι οι πιο σημαντικοί ενώ στους υποκινητές των γονιδίων ErA/B.1 και 5H4 τα πράγματα είναι πιο απλά καθώς τυχαίνει να υπάρχουν μόνο δύο θέσεις C/EBP με κοινό προσανατολισμό. Εξαίρεση στον παραπάνω υποθετικό «κανόνα» αποτελούν οι υποκινητές των γονιδιακών ζευγών HcA/B και ErA/B.4, οι οποίοι περιέχουν μόνο μία θέση πρόσδεσης C/EBP, και ο υποκινητής του γονιδιακού ζεύγους ErA/B.3, που περιέχει δύο θέσεις πρόσδεσης C/EBP αλλά με αντίθετο προσανατολισμό. Άλλη μια αξιοσημείωτη παρατήρηση, που αφορά την αρχιτεκτονική όλων των υποκινητών γονιδίων του χορίου, είναι η παρουσία τουλάχιστον μίας θέσης πρόσδεσης C/EBP, που θεωρείται σημαντική για τη λειτουργία του εκάστοτε υποκινητή, πολύ κοντά σε θέση πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα GATA. Ίσως αυτή η γειτνίαση να σχετίζεται με τις σχέσεις (ανταγωνιστικές ή/και συνεργατικές), που αναπτύσσονται μεταξύ των εν λόγω μεταγραφικών παραγόντων, και συνεπώς με τον τρόπο δράσης τους. Σε αυτό το σημείο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι με τα πειράματα ηλεκτροδιάτρησης επιβεβαιώθηκε ότι ο μεταγραφικός παράγοντας GATA λειτουργεί ως καταστολέας της μεταγραφής των ενδιάμεσων γονιδίων όταν προσδένεται στους υποκινητές τους κατά τα πρώιμα-ενδιάμεσα στάδια της

χοριογένεσης. Ωστόσο, δεν αναιρείται η ενεργοποιητική δράση του GATA όταν προσδέεται στους υποκινητές των όψιμων γονιδίων κατά τα όψιμα στάδια της χοριογένεσης (Skeiky et al., 1994).

Συνοψίζοντας, παρά τις παρατηρούμενες διαφορές στην αρχιτεκτονική (αριθμό και τοπολογία μεταγραφικών παραγόντων, μήκος) των υποκινητών γονιδίων του χορίου, κάποιες ομοιότητες, όπως η παρουσία δύο θέσεων πρόσδεσης C/EBP με κοινό προσανατολισμό και μιας θέσης πρόσδεσης GATA κοντά σε μία από τις δύο προαναφερθείσες θέσεις C/EBP, ίσως να μην είναι τυχαίες και να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο τουλάχιστον για την ενεργοποίηση των υποκινητών και την έναρξη της μεταγραφής. Ωστόσο, φαίνεται ότι η χρονοειδικότητα της ενεργοποίησης εξαρτάται όχι μόνο από την τοπολογία των *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων αλλά κυρίως από τη χρωματινική δομή και συγκεκριμένα την ύπαρξη, ή όχι, νουκλεοσωμάτων στην περιοχή του εκάστοτε υποκινητή. Τέλος, στο συνολικό πρότυπο ρύθμισης του συστήματος της χοριογένεσης θα πρέπει να συμπεριληφθούν οι αλλαγές στη συγκέντρωση των διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων κατά τη διάρκεια της χοριογένεσης, αλλά και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, που ενδεχόμενα να καθορίζουν ποιες θέσεις πρόσδεσης θα καταληφθούν από τους αντίστοιχους μεταγραφικούς παράγοντες ανάλογα με το βαθμό συγγενείας που παρουσιάζουν. Εν κατακλείδι, το σύστημα της χοριογένεσης χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση, τόσο σε επίπεδο αρχιτεκτονικής υποκινητών γονιδίων διαφορετικής αναπτυξιακής εξειδίκευσης από αυτής των ενδιάμεσων σταδίων, όσο και σε βιοχημικό επίπεδο των εμπλεκόμενων μεταγραφικών παραγόντων, για τον εις βάθος προσδιορισμό του προτύπου ρύθμισης των αντίστοιχων γονιδίων.

Περίληψη

Η γονιδιακή έκφραση, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και διαφοροποίησης, ελέγχεται τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μεταφραστικό επίπεδο. Όσον αφορά τη μεταγραφική ενεργοποίηση, που αποτελεί κύριο θέμα της παρούσας διατριβής, εξαρτάται σε πολύ σημαντικό βαθμό από τις αλληλουχίες των υποκινητών (ή/και των ενισχυτών). Η μελέτη των πολύπλοκων μοριακών μηχανισμών, που εμπλέκονται στη διαφορική γονιδιακή έκφραση, προϋποθέτει τη χρήση κατάλληλων συστημάτων-μοντέλων και ως ένα τέτοιο έχει αναδειχθεί το σύστημα της χοριογένεσης (σχηματισμός κελύφους του αυγού) στο μεταξοσκώληκα *Bombyx mori*. Συγκεκριμένα, κάθε ένα από τα οκτώ ωοθηκάρια του μεταξοσκώληκα περιλαμβάνει μια σειρά διαδοχικά αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων και έτσι κάθε ωοθυλάκιο αντιπροσωπεύει ένα αναπτυξιακό στάδιο. Παρόλο που η αναπτυξιακή διαφοροποίηση των ωοθυλακίων είναι συνεχής, είναι δυνατή μια συμβατική διαίρεση της όλης πορείας σε τρία στάδια (πρώιμα, ενδιάμεσα και όψιμα) με βάση το γενικό πρότυπο έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων του χορίου. Στην πλειοψηφία τους, τα γονίδια του χορίου είναι οργανωμένα σε ζεύγη (α και β τύπου) ίδιας αναπτυξιακής εξειδίκευσης, με αντιπαράλληλη κατεύθυνση μεταγραφής και κοινή 5' ρυθμιστική περιοχή (~250 ζεύγη βάσεων).

Σκοπό της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η μελέτη της «αρχιτεκτονικής» των υποκινητών, δηλαδή πώς συνδράμουν στην αναπτυξιακή εξειδίκευση της έκφρασης των γονιδίων του χορίου οι συγκεκριμένες θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων (C/EBP, GATA, HMGA, CHD1), ο προσανατολισμός τους, ο αριθμός τους ακόμα και οι μεταξύ τους σχετικές αποστάσεις. Ως βασική μέθοδο προσέγγισης,

επιλέξαμε την τεχνική της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation) μέσω της οποίας καθίσταται εφικτή η επιτυχής εισαγωγή και έκφραση γονιδιακών κατασκευών στα επιθηλιακά κύτταρα των ωοθυλακίων του μεταξοσκώληκα *Bombyx mori*. Οι κατασκευές αυτές είναι τμήματα ανασυνδυασμένου DNA που περιέχουν το γονίδιο αναφοράς *lacZ*, υπό τον έλεγχο άρτιων ή/και τροποποιημένων υποκινητών αντιπροσωπευτικών γονιδίων του χορίου. Η όλη προσέγγιση προσομοιάζει την *in vivo* κατάσταση.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των παραμέτρων ηλεκτροδιάτρησης, καταλήγοντας στις παρακάτω συνθήκες: ένταση του ηλεκτρικού πεδίου 250 Volt/cm, συνολική διάρκεια των ηλεκτρικών παλμών 25 msec - (2–3) παλμοί και το διάλυμα ηλεκτροδιάτρησης για κυτταροκαλλιέργειες ως το μέσο στο οποίο εφαρμόζεται το ηλεκτρικό ρεύμα. Επιβεβαίωση ότι οι παραπάνω συνθήκες ηλεκτροδιάτρησης δεν επηρεάζουν το αναπτυξιακό πρόγραμμα της χοριογένεσης των ωοθυλακίων καθώς αναπτύσσονται σε *in vitro* καλλιέργειες, προήλθε από πειράματα ανάλυσης κηλίδων RNA με χρήση μη κατεργασμένων ωοθυλακίων, ωοθυλακίων που επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό και ωοθυλακίων που επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό μετά από εφαρμογή ηλεκτρικών παλμών. Το ίδιο συμπέρασμα προέκυψε έπειτα από σύγκριση των προτύπων έκφρασης, μέσω ηλεκτροδιάτρησης, των γονιδιακών κατασκευών με τους άρτιους (πλήρους μήκους) υποκινητές p5H4, pEr1, p6F6.2, pL9, pL1 και των προτύπων μεταγραφής των αντίστοιχων γονιδίων, μέσω πειραμάτων ανάλυσης κηλίδων RNA, που είναι γνωστά από τη βιβλιογραφία.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε ο ρόλος της «αρχιτεκτονικής» του «διφασικού» υποκινητή του γονιδιακού ζεύγους A/B.L9 στη ρύθμιση της μεταγραφής, προς οποιαδήποτε κατεύθυνση. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ηλεκτροδιάτρησης γονιδιακές

κατασκευές του υποκινητή pL9, μεταλλαγμένου σε διάφορες θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων. Μεταλλαγή της θέσης πρόσδεσης GATA έδειξε ότι ο παράγοντας δρα ως καταστολέας της έκφρασης, κατά τα πρώιμα στάδια της χοριογένεσης, στον υποκινητή pL9. Επιπλέον, μεταλλαγή των θέσεων πρόσδεσης του παράγοντα HMGA κατέστησε τον υποκινητή ανίκανο να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή σε οποιοδήποτε αναπτυξιακό στάδιο. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς ο μεταγραφικός παράγοντας HMGA έχει δειχθεί ότι είναι υπεύθυνος τόσο για την κάμψη του υποκινητή όσο και για την προσέλκυση του «ενεργοποιητικού» παράγοντα C/EBP, επιβεβαιώνοντας, με αυτόν τον τρόπο, τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει στην έναρξη της μεταγραφής των αντίστοιχων γονιδίων του χορίου. Τα δύο αυτά αποτελέσματα αποτέλεσαν, επίσης, απόδειξη ότι η μέθοδος της ηλεκτροδιάτρησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για τη μελέτη του ρόλου των *cis*- ρυθμιστικών στοιχείων ενός υποκινητή, εφόσον γίνεται σύγκριση μόνο των προτύπων έκφρασης που προκύπτουν από τις διαφορετικές παραλλαγές του ιδίου υποκινητή μεταξύ τους. Τέλος, μεταλλαγή σε μεμονωμένες θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα C/EBP (αλλά και σε συνδυασμούς αυτών) έδειξε ότι από τις τέσσερις θέσεις C/EBP, που εντοπίζονται στον συγκεκριμένο υποκινητή, δύο είναι οι πιο σημαντικές (με αξιοσημείωτο το γεγονός ότι έχουν τον ίδιο προσανατολισμό): (α) Η θέση C/EBP2, η οποία «προτιμάται» έναντι της θέσης C/EBP1 (η κοντινή τους απόσταση δεν επιτρέπει την ταυτόχρονη πρόσδεση της πρωτεΐνης και στις δύο θέσεις), και (β) Η θέση C/EBP4, καθώς η μεταλλαγή της επηρεάζει την ενεργοποίηση της μεταγραφής σε αντίθεση με τη θέση C/EBP3, της οποίας ο ρόλος αποδείχτηκε ότι είναι «ουδέτερος».

Από την παρούσα διατριβή προέκυψε ένα αναθεωρημένο πρότυπο για τη σωστή αναπτυξιακή ρύθμιση των A/B.L9 γονιδίων. Το πρότυπο αυτό περιλαμβάνει ένα αυστηρό πρόγραμμα πρόσδεσης -των

προαναφερθέντων- μεταγραφικών παραγόντων σε συγκεκριμένα *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία, των οποίων η προσβασιμότητα εξαρτάται από δύο νουκλεοσώματα, παρόντα στον υποκινητή.

Summary

Gene expression, during development and differentiation, is controlled at the transcriptional and translational level. As far as transcriptional activation (the main subject of this thesis) is concerned, promoter (and/or enhancer) sequences “play” a very important role. A useful system for studying the molecular mechanisms, implicated in differential gene expression, is choriogenesis (eggshell formation) in *Bombyx mori* silkworm. In particular, each developing ovariole includes a string of follicles, where each follicle represents a specific developmental phase. Although the follicle developmental differentiation is continuous, it is possible to divide choriogenesis into three stages (early, middle and late) according to the chorion gene expression patterns. In their vast majority, chorion genes of the same developmental specificity are organized in divergently-transcribed α/β gene pairs, sharing a common 5' flanking promoter region (~250 bp).

The primary aim of this thesis was to investigate how promoter “architecture” (number, orientation and position of transcriptional factor - C/EBP, GATA, HMGA, CHD1- binding sites) facilitates developmentally accurate chorion gene regulation. Towards this purpose, several mutated (and non-mutated) promoter regions of different developmental specificity chorion genes, were cloned upstream of a reporter gene (*lacZ*) to introduce these plasmid constructs into silkworm follicle epithelial cells via electroporation as an efficient and quick method for transient expression (on *ex vivo* developing follicles).

At first, electroporation parameters were optimized (250 Volts/cm current, 25 msec and 2-3 pulses duration using an electroporation buffer for cell cultures). RNA dot blot experiments on normal follicles, follicles

incubated in Grace's medium and follicles incubated in Grace's medium after being electroporated confirmed that the above electroporation parameters could not affect the choriogenic developmental program of follicles during incubation in Grace's medium. The same conclusion was drawn by comparing the expression patterns produced from constructs containing the p5H4, pEr1, p6F6.2, pL9, pL1 promoters in electroporation assays and the known transcription pattern produced by RNA dot blot experiments, respectively.

Next, the impact of systematic *cis*-element- mutations on the A/B.L9 chorion gene promoter were tested in electroporation assays. Mutation of the GATA recognition site showed that the GATA factor behaves as an early repressor of middle chorion genes, since preventing its binding on the promoter resulted in earlier expression of the genes. Furthermore, mutation of the HMGA recognition site completely inactivated pL9, as expected. This validates the importance of the HMGA factor in the regulation of early-middle chorion gene expression, as HMGA not only causes bending of the A/B.L9 promoter but also recruits the C/EBP transcriptional factor to initiate transcription in either direction. The above expression patterns, produced from mutGATApL9-*lacZ* and mutHMGPpL9-*lacZ* constructs, confirmed that the electroporation method can be used to deduce the role of specific binding sites in gene expression. Finally, mutation of each and every C/EBP binding site (in all possible combinations) on promoter pL9 revealed that two (out of four) C/EBP recognition sites, having the same orientation, are the most important for correct gene expression; the C/EBP2 site, which is preferred over the C/EBP1 one by the C/EBP protein, and the C/EBP4 because its mutation affects transcription. In contrast, the C/EBP3 site seemed to be "neutral".

In this thesis, a revised model is proposed for the developmentally accurate regulation of the A/B.L9 chorion genes. This model comprises a

strict binding “program” of the previously mentioned transcription factors on cis-regulatory elements, whose access is dependent on two nucleosomes located on the promoter.

Βιβλιογραφία

- ADACHI, N. & LIEBER, M. R. 2002. Bidirectional gene organization: a common architectural feature of the human genome. *Cell*, 109, 807-9.
- AN, W. & WENSINK, P. C. 1995. Three protein binding sites form an enhancer that regulates sex- and fat body-specific transcription of *Drosophila* yolk protein genes. *EMBO J*, 14, 1221-30.
- BOCK CG, C. K., GOLDSMITH MR 1986. Specific protein synthesis in cellular differentiation. IV: Temporal expression of chorion gene families in *Bombyx mori* strain C108. *Dev Biol*, 117, 215-225.
- BROADUS, J., MCCABE, J. R., ENDRIZZI, B., THUMMEL, C. S. & WOODARD, C. T. 1999. The *Drosophila* beta FTZ-F1 orphan nuclear receptor provides competence for stage-specific responses to the steroid hormone ecdysone. *Mol Cell*, 3, 143-9.
- BURKE, W. D. & EICKBUSH, T. H. 1986. The silkworm late chorion locus. I. Variation within two paired multigene families. *J Mol Biol*, 190, 343-56.
- BUSTIN, M. 2001. Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends Biochem Sci*, 26, 152-3.
- CHEN, Y. J., K, H. K., SHIBATA, S., LIM, D., D, D. S., TANG, M., LIU, A., R, D. P. & J, Y. C. W. 2009. Image-guided Radiotherapy Of Esophageal Cancer By Helical Tomotherapy: Acute Toxicity And Preliminary Clinical Outcome. *J Thorac Dis*, 1, 11-6.
- CHRISTIANSON, A. M., KING, D. L., HATZIVASSILIOU, E., CASAS, J. E., HALLENBECK, P. L., NIKODEM, V. M., MITSIALIS, S. A. & KAFATOS, F. C. 1992. DNA binding and heteromerization of the *Drosophila* transcription factor chorion factor 1/ultraspiracle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 11503-7.
- DELMAS, V., STOKES, D. G. & PERRY, R. P. 1993. A mammalian DNA-binding protein that contains a chromodomain and an SNF2/SWI2-like helicase domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 2414-8.
- DeBRUIN, K.A., KRASSOWSKA, W. 1999. Modeling electroporation in a single cell. I. Effects Of field strength and rest potential. *Biophys J*, 77, 1213-24.

- DITTMER, N. T. & RAIKHEL, A. S. 1997. Analysis of the mosquito lysosomal aspartic protease gene: an insect housekeeping gene with fat body-enhanced expression. *Insect Biochem Mol Biol*, 27, 323-35.
- DREVET, J. R., SWEVERS, L. & IATROU, K. 1995. Developmental regulation of a silkworm gene encoding multiple GATA-type transcription factors by alternative splicing. *J Mol Biol*, 246, 43-53.
- EICKBUSH, T. H. 1995. Chorion genes: molecular models of evolution. *Molecular Model Systems in the Lepidoptera*, 217-248.
- EICKBUSH, T. H. & BURKE, W. D. 1986. The silkworm late chorion locus. II. Gradients of gene conversion in two paired multigene families. *J Mol Biol*, 190, 357-66.
- EICKBUSH, T. H., RODAKIS, G. C., LECANIDOU, R. & KAFATOS, F. C. 1985. A complex set of early chorion DNA sequences from *Bombyx mori*. *Dev Biol*, 112, 368-76.
- EISSENBERG, J. C. 2001. Molecular biology of the chromo domain: an ancient chromatin module comes of age. *Gene*, 275, 19-29.
- EYSTATHIOY, T., SWEVERS, L. & IATROU, K. 2001. The orphan nuclear receptor BmHR3A of *Bombyx mori*: hormonal control, ovarian expression and functional properties. *Mech Dev*, 103, 107-15.
- FASSLER, J., LANDSMAN, D., ACHARYA, A., MOLL, J. R., BONOVIK, M. & VINSON, C. 2002. B-ZIP proteins encoded by the *Drosophila* genome: evaluation of potential dimerization partners. *Genome Res*, 12, 1190-200.
- FENERJIAN, M. G. & KAFATOS, F. C. 1994. Developmental specificity of a bidirectional moth chorion promoter in transgenic *Drosophila*. *Dev Biol*, 161, 37-47.
- FOTAKI, M. E. & IATROU, K. 1988. Identification of a transcriptionally active pseudogene in the chorion locus of the silkworm *Bombyx mori*. Regional sequence conservation and biological function. *J Mol Biol*, 203, 849-60.
- FOTAKI, M. E. & IATROU, K. 1993. Silk moth chorion pseudogenes: hallmarks of genomic evolution by sequence duplication and gene conversion. *J Mol Evol*, 37, 211-20.

- FRIEDMAN, A. D., LANDSCHULZ, W. H. & MCKNIGHT, S. L. 1989. CCAAT/enhancer binding protein activates the promoter of the serum albumin gene in cultured hepatoma cells. *Genes Dev*, 3, 1314-22.
- GIRAUD, C., DEVAUCHELLE, G. & BERGOIN, M. 1992. The densovirus of *Junonia coenia* (Jc DNV) as an insect cell expression vector. *Virology*, 186, 207-18.
- GIRESI, P. G., KIM, J., MCDANIELL, R. M., IYER, V. R. & LIEB, J. D. 2007. FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) isolates active regulatory elements from human chromatin. *Genome Res*, 17, 877-85.
- GOLDSMITH, M. 1989. Organization and developmental timing of the *Bombyx mori* chorion gene clusters in strain C108. *Developmental Genetics*, 10, 16-23.
- GOLZIO, M., MORA, M.P., RAYNAUD, C., DELTEIL, C., TEISSIE, J., ROLS, M.P., 1998. Control by osmotic pressure of voltage-induced permeabilization and gene transfer in mammalian cells. *Biophys J*, 74, 3015-22.
- GRASSER, K. D. 2003. Chromatin-associated HMGA and HMGB proteins: versatile co-regulators of DNA-dependent processes. *Plant Mol Biol*, 53, 281-95.
- GROSS, C. H. & SHUMAN, S. 1995. Mutational analysis of vaccinia virus nucleoside triphosphate phosphohydrolase II, a DEXH box RNA helicase. *J Virol*, 69, 4727-36.
- HAI, T. & CURRAN, T. 1991. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 3720-4.
- HIBNER, B. L., BURKE, W. D. & EICKBUSH, T. H. 1991. Sequence identity in an early chorion multigene family is the result of localized gene conversion. *Genetics*, 128, 595-606.
- HIBNER, B. L., BURKE, W. D., LECANIDOU, R., RODAKIS, G. C. & EICKBUSH, T. H. 1988. Organization and expression of three genes from the silkworm early chorion locus. *Dev Biol*, 125, 423-31.
- HORARD, B., MANGE, A., PELISSIER, B. & COUBLE, P. 1994. Bombyx gene promoter analysis in transplanted silk gland transformed by particle delivery system. *Insect Mol Biol*, 3, 261-5.
- HURST, H. C. 1995. Transcription factors 1: bZIP proteins. *Protein Profile*, 2, 101-68.

- HUTH, J. R., BEWLEY, C. A., NISSEN, M. S., EVANS, J. N., REEVES, R., GRONENBORN, A. M. & CLORE, G. M. 1997. The solution structure of an HMG-I(Y)-DNA complex defines a new architectural minor groove binding motif. *Nat Struct Biol*, 4, 657-65.
- IATROU, K. & MEIDINGER, R. G. 1990. Tissue-specific expression of silkworm chorion genes in vivo using *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus as a transducing vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 3650-4.
- IATROU, K. & TSITILLOU, S. G. 1983. Coordinately expressed chorion genes of *Bombyx mori*: is developmental specificity determined by secondary structure recognition? *EMBO J*, 2, 1431-40.
- IATROU, K., TSITILLOU, S. G., GOLDSMITH, M. R. & KAFATOS, F. C. 1980. Molecular analysis of the GrB mutation in *Bombyx mori* through the use of chorion cDNA library. *Cell*, 20, 659-69.
- IATROU, K., TSITILLOU, S. G. & KAFATOS, F. C. 1984. DNA sequence transfer between two high-cysteine chorion gene families in the silkworm *Bombyx mori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 4452-6.
- JOHNSON, P. F. 1993. Identification of C/EBP basic region residues involved in DNA sequence recognition and half-site spacing preference. *Mol Cell Biol*, 13, 6919-30.
- JONES, C. W. & KAFATOS, F. C. 1980. Structure, organization and evolution of developmentally regulated chorion genes in a silkworm. *Cell*, 22, 855-67.
- KAFATOS, F. C., MITSIALIS, S. A., SPOEREL, N., MARIANI, B., LINGAPPA, J. R. & DELIDAKIS, C. 1985. Studies on the developmentally regulated expression and amplification of insect chorion genes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 50, 537-47.
- KAFATOS, F. C., REGIER, J. C., MAZUR, G. D., NADEL, M. R., BLAU, H. M., PETRI, W. H., WYMAN, A. R., GELINAS, R. E., MOORE, P. B., PAUL, M., EFSTRATIADIS, A., VOURNAKIS, J. N., GOLDSMITH, M. R., HUNSLEY, J. R., BAKER, B., NARDI, J. & KOEHLER, M. 1977. The eggshell of insects: differentiation-specific proteins and the control of their synthesis and accumulation during development. *Results Probl Cell Differ*, 8, 45-145.
- KAFATOS, F. C., SPOEREL, N., MITSIALIS, S. A., NGUYEN, H. T., ROMANO, C., LINGAPPA, J. R., MARIANI, B. D., RODAKIS, G. C., LECANIDOU, R. &

- TSITILLOU, S. G. 1987. Developmental control and evolution in the chorion gene families of insects. *Adv Genet*, 24, 223-42.
- KAFATOS FC, T. G., SPOEREL NA AND NGUYEN HT, 1995. Chorion genes: an overview of their structure, function and transcriptional regulation. In: Molecular Model System in the Lepidoptera. . *Cambridge University Press*, 181-216.
- KING, R. C. & AGGARWAL, S. K. 1965. Oogenesis in *Hyalophora Cecropia*. *Growth*, 29, 17-83.
- KOERBER, R. T., RHEE, H. S., JIANG, C. & PUGH, B. F. 2009. Interaction of transcriptional regulators with specific nucleosomes across the *Saccharomyces* genome. *Mol Cell*, 35, 889-902.
- KOKOZA, V. A., MARTIN, D., MIENALTOWSKI, M. J., AHMED, A., MORTON, C. M. & RAIKHEL, A. S. 2001. Transcriptional regulation of the mosquito vitellogenin gene via a blood meal-triggered cascade. *Gene*, 274, 47-65.
- KONSOLAKI, M., KOMITOPOULOU, K., TOLIAS, P. P., KING, D. L., SWIMMER, C. & KAFATOS, F. C. 1990. The chorion genes of the medfly, *Ceratitis capitata*, I: Structural and regulatory conservation of the s36 gene relative to two *Drosophila* species. *Nucleic Acids Res*, 18, 1731-7.
- KOYANAGI, K. O., HAGIWARA, M., ITOH, T., GOJOBORI, T. & IMANISHI, T. 2005. Comparative genomics of bidirectional gene pairs and its implications for the evolution of a transcriptional regulation system. *Gene*, 353, 169-76.
- KRAVARITI, L., LECANIDOU, R. & RODAKIS, G. C. 1995. Sequence analysis of a small early chorion gene subfamily interspersed within the late gene locus in *Bombyx mori*. *J Mol Evol*, 41, 24-33.
- KRAVARITI, L., THOMAS, J., SOURMELI, S., RODAKIS, G. C., MAUCHAMP, B., CHAVANCY, G. & LECANIDOU, R. 2001. The biolistic method as a tool for testing the differential activity of putative silkworm chorion gene promoters. *Insect Biochem Mol Biol*, 31, 473-9.
- LECANIDOU, R., EICKBUSH, T. H., RODAKIS, G. C. & KAFATOS, F. C. 1983. Novel B family sequence from an early chorion cDNA library of *Bombyx mori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 1955-9.
- LECANIDOU, R. & PAPANTONIS, A. 2010a. Modeling bidirectional transcription using silkworm chorion gene promoters. *Organogenesis*, 6, 54-8.

- LECANIDOU, R. & PAPANTONIS, A. 2010b. Silkmoth chorion gene regulation revisited: promoter architecture as a key player. *Insect Mol Biol*, 19, 141-51.
- LECANIDOU, R. & RODAKIS, G. C. 1992. Three copies of the early gene 6F6 are interspersed in and around the late chorion gene cluster of *Bombyx mori*. *J Mol Evol*, 34, 304-14.
- LECANIDOU, R., RODAKIS, G. C., EICKBUSH, T. H. & KAFATOS, F. C. 1986. Evolution of the silk moth chorion gene superfamily: gene families CA and CB. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 6514-8.
- LEE, Y. H., WILLIAMS, S. C., BAER, M., STERNECK, E., GONZALEZ, F. J. & JOHNSON, P. F. 1997. The ability of C/EBP beta but not C/EBP alpha to synergize with an Sp1 protein is specified by the leucine zipper and activation domain. *Mol Cell Biol*, 17, 2038-47.
- LEGAY, J. M. 1976. Morphogenesis of the silkworm egg. *J Embryol Exp Morphol*, 36, 13-8.
- LEKSTROM-HIMES, J. & XANTHOPOULOS, K. G. 1998. Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem*, 273, 28545-8.
- LERCHER, M. J., BLUMENTHAL, T. & HURST, L. D. 2003. Coexpression of neighboring genes in *Caenorhabditis elegans* is mostly due to operons and duplicate genes. *Genome Res*, 13, 238-43.
- LEVINE, J. & SPRADLING, A. 1985. DNA sequence of a 3.8 kilobase pair region controlling *Drosophila* chorion gene amplification. *Chromosoma*, 92, 136-42.
- LOPEZ, A., ROLS, M.P., TEISSIE, J., 1988. ³¹P NMR analysis of membrane phospholipid organization in viable, reversibly electropermeabilized Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry*, 27, 1222-8.
- LUSSER, A., URWIN, D. L. & KADONAGA, J. T. 2005. Distinct activities of CHD1 and ACF in ATP-dependent chromatin assembly. *Nat Struct Mol Biol*, 12, 160-6.
- MACHADO, E., SWEVERS, L., SDRALIA, N., MEDEIROS, M. N., MELLO, F. G. & IATROU, K. 2007. Prostaglandin signaling and ovarian follicle development in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 37, 876-85.

- MARFELLA, C. G. & IMBALZANO, A. N. 2007. The Chd family of chromatin remodelers. *Mutat Res*, 618, 30-40.
- MARIANI, B. D., LINGAPPA, J. R. & KAFATOS, F. C. 1988. Temporal regulation in development: negative and positive cis regulators dictate the precise timing of expression of a *Drosophila* chorion gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 3029-33.
- MARIANI, B. D., SHEA, M. J., CONBOY, M. J., CONBOY, I., KING, D. L. & KAFATOS, F. C. 1996. Analysis of regulatory elements of the developmentally controlled chorion s15 promoter in transgenic *Drosophila*. *Dev Biol*, 174, 115-24.
- MARTIN, D., PIULACHS, M. D. & RAIKHEL, A. S. 2001. A novel GATA factor transcriptionally represses yolk protein precursor genes in the mosquito *Aedes aegypti* via interaction with the CtBP corepressor. *Mol Cell Biol*, 21, 164-74.
- MARTINEZ-CRUZADO, J. C., SWIMMER, C., FENERJIAN, M. G. & KAFATOS, F. C. 1988. Evolution of the autosomal chorion locus in *Drosophila*. I. General organization of the locus and sequence comparisons of genes s15 and s19 in evolutionary distant species. *Genetics*, 119, 663-77.
- MAZUR, G. D., REGIER, J. C. & KAFATOS, F. C. 1989. Morphogenesis of silkworm chorion: sequential modification of an early helicoidal framework through expansion and densification. *Tissue Cell*, 21, 227-42.
- MCNAGNY, K. M., SIEWEKE, M. H., DODERLEIN, G., GRAF, T. & NERLOV, C. 1998. Regulation of eosinophil-specific gene expression by a C/EBP-Ets complex and GATA-1. *EMBO J*, 17, 3669-80.
- MITA, K., KASAHARA, M., SASAKI, S., NAGAYASU, Y., YAMADA, T., et al. 2004. The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Res*, 11, 27-35.
- MITSIALIS, S. A. & KAFATOS, F. C. 1985. Regulatory elements controlling chorion gene expression are conserved between flies and moths. *Nature*, 317, 453-6.
- MITSIALIS, S. A., SPOEREL, N., LEVITEN, M. & KAFATOS, F. C. 1987. A short 5'-flanking DNA region is sufficient for developmentally correct expression of moth chorion genes in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 7987-91.

- MITSIALIS, S. A., VELETZA, S. & KAFATOS, F. C. 1989. Transgenic regulation of moth chorion gene promoters in *Drosophila*: tissue, temporal, and quantitative control of four bidirectional promoters. *J Mol Evol*, 29, 486-95.
- MONTELL, D. J., RORTH, P. & SPRADLING, A. C. 1992. slow border cells, a locus required for a developmentally regulated cell migration during oogenesis, encodes *Drosophila* C/EBP. *Cell*, 71, 51-62.
- NADEL, M. R. & KAFATOS, F. C. 1980. Specific protein synthesis in cellular differentiation. IV. The chorion proteins of *Bombyx mori* and their program of synthesis. *Dev Biol*, 75, 26-40.
- NEIL, H., MALABAT, C., D'AUBENTON-CARAFI, Y., XU, Z., STEINMETZ, L. M. & JACQUIER, A. 2009. Widespread bidirectional promoters are the major source of cryptic transcripts in yeast. *Nature*, 457, 1038-42.
- NIKOLAEV, A. I., TCHKONIA, T. T., KAFIANI-ERISTAVI, C. A. & TARANTUL, V. Z. 1993. Preferential extrachromosomal localization of exogenous DNA in transgenic silkworm *Bombyx mori* L. *Mol Gen Genet*, 236, 326-30.
- OSADA, S., YAMAMOTO, H., NISHIHARA, T. & IMAGAWA, M. 1996. DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family. *J Biol Chem*, 271, 3891-6.
- PALAMARCHUK, A. Y., KAVSAN, V. M., SUSSENBACH, J. S. & HOLTHUIZEN, P. E. 2001. The chum salmon insulin-like growth factor II promoter requires Sp1 for its activation by C/EBPbeta. *Mol Cell Endocrinol*, 172, 57-67.
- PAPANTONIS, A. & LECANIDOU, R. 2009. A modified chromatin-immunoprecipitation protocol for silkworm ovarian follicular cells reveals C/EBP and GATA binding modes on an early chorion gene promoter. *Mol Biol Rep*, 36, 733-6.
- PAPANTONIS, A., SOURMELI, S. & LECANIDOU, R. 2008a. Chorion gene activation and repression is dependent on BmC/EBP expression and binding to cognate cis-elements. *Biochem Biophys Res Commun*, 369, 905-9.
- PAPANTONIS, A., TSATSAROUNOS, S., VANDEN BROECK, J. & LECANIDOU, R. 2008b. CHD1 assumes a central role during follicle development. *J Mol Biol*, 383, 957-69.

- PAPANTONIS, A., VANDEN BROECK, J. & LECANIDOU, R. 2008c. Architectural factor HMGA induces promoter bending and recruits C/EBP and GATA during silkworm chorion gene regulation. *Biochem J*, 416, 85-97.
- PARKIN, S. E., BAER, M., COPELAND, T. D., SCHWARTZ, R. C. & JOHNSON, P. F. 2002. Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) activator proteins by heterodimerization with C/EBPγ (Ig/EBP). *J Biol Chem*, 277, 23563-72.
- PHAM, D. Q., DOUGLASS, P. L., CHAVEZ, C. A. & SHAFFER, J. J. 2005. Regulation of the ferritin heavy-chain homologue gene in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol*, 14, 223-36.
- RAIKHEL, A. S., KOKOZA, V. A., ZHU, J., MARTIN, D., WANG, S. F., LI, C., SUN, G., AHMED, A., DITTMER, N. & ATTARDO, G. 2002. Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. *Insect Biochem Mol Biol*, 32, 1275-86.
- RAMJI, D. P. & FOKA, P. 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J*, 365, 561-75.
- REGIER, J. C., MAZUR, G. D., KAFATOS, F. C. & PAUL, M. 1982. Morphogenesis of silkworm chorion: initial framework formation and its relation to synthesis of specific proteins. *Dev Biol*, 92, 159-74.
- REINHART, A. J., WILLIAMS, S. C., CLARK, B. J. & STOCCO, D. M. 1999. SF-1 (steroidogenic factor-1) and C/EBP β (CCAAT/enhancer binding protein-β) cooperate to regulate the murine StAR (steroidogenic acute regulatory) promoter. *Mol Endocrinol*, 13, 729-41.
- RHEE, H. S. & PUGH, B. F. 2012. CHIP-exo method for identifying genomic location of DNA-binding proteins with near-single-nucleotide accuracy. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 21, Unit 21 24.
- RODAKIS, G. C., LECANIDOU, R. & EICKBUSH, T. H. 1984. Diversity in a chorion multigene family created by tandem duplications and a putative gene-conversion event. *J Mol Evol*, 20, 265-73.
- RORTH, P. & MONTELL, D. J. 1992. Drosophila C/EBP: a tissue-specific DNA-binding protein required for embryonic development. *Genes Dev*, 6, 2299-311.

- RYDEN, T. A. & BEEMON, K. 1989. Avian retroviral long terminal repeats bind CCAAT/enhancer-binding protein. *Mol Cell Biol*, 9, 1155-64.
- SEMSEY, S., VIRNIK, K. & ADHYA, S. 2005. A gamut of loops: meandering DNA. *Trends Biochem Sci*, 30, 334-41.
- SHEA, M. J., KING, D. L., CONBOY, M. J., MARIANI, B. D. & KAFATOS, F. C. 1990. Proteins that bind to Drosophila chorion cis-regulatory elements: a new C2H2 zinc finger protein and a C2C2 steroid receptor-like component. *Genes Dev*, 4, 1128-40.
- SKEIKY, Y. A., DREVET, J. R., SWEVERS, L. & IATROU, K. 1994. Protein phosphorylation and control of chorion gene activation through temporal mobilization of a promoter DNA binding factor from the cytoplasm into the nucleus. *J Biol Chem*, 269, 12196-203.
- SKEIKY, Y. A. & IATROU, K. 1991. Synergistic interactions of silkmoth chorion promoter-binding factors. *Mol Cell Biol*, 11, 1954-64.
- SOURMELI, S., KRAVARITI, L. & LECANIDOU, R. 2003. In vitro analysis of Bombyx mori early chorion gene regulation: stage specific expression involves interactions with C/EBP-like and GATA factors. *Insect Biochem Mol Biol*, 33, 525-40.
- SOURMELI, S., PAPANTONIS, A. & LECANIDOU, R. 2005a. BmCbZ, an insect-specific factor featuring a composite DNA-binding domain, interacts with BmC/EBPgamma. *Biochem Biophys Res Commun*, 338, 1957-65.
- SOURMELI, S., PAPANTONIS, A. & LECANIDOU, R. 2005b. A novel role for the Bombyx Slbo homologue, BmC/EBP, in insect choriogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 337, 713-9.
- SPELLMAN, P. T. & RUBIN, G. M. 2002. Evidence for large domains of similarly expressed genes in the Drosophila genome. *J Biol*, 1, 5.
- SPOEREL, N., NGUYEN, H. T. & KAFATOS, F. C. 1986. Gene regulation and evolution in the chorion locus of Bombyx mori. Structural and developmental characterization of four eggshell genes and their flanking DNA regions. *J Mol Biol*, 190, 23-35.
- SPOEREL, N. A., NGUYEN, H. T., EICKBUSH, T. H. & KAFATOS, F. C. 1989. Gene evolution and regulation in the chorion complex of Bombyx mori.

- Hybridization and sequence analysis of multiple developmentally middle A/B chorion gene pairs. *J Mol Biol*, 209, 1-19.
- SPOEREL, N. A., NGUYEN, H. T., TOWNE, S. & KAFATOS, F. C. 1993. Negative and positive regulators modulate the activity of a silkworm chorion gene during choriogenesis. *J Mol Biol*, 230, 151-60.
- STOKES, D. G. & PERRY, R. P. 1995. DNA-binding and chromatin localization properties of CHD1. *Mol Cell Biol*, 15, 2745-53.
- STRUHL, K. & SEGAL, E. 2013. Determinants of nucleosome positioning. *Nat Struct Mol Biol*, 20, 267-73.
- SUN, G. C., HIROSE, S. & UEDA, H. 1994. Intermittent expression of BmFTZ-F1, a member of the nuclear hormone receptor superfamily during development of the silkworm *Bombyx mori*. *Dev Biol*, 162, 426-37.
- SWEVERS, I. 1999. The ecdysone agonist tebufenozide (RH-5992) blocks the progression into the ecdysteroid-induced regulatory cascade and arrests silkworm oogenesis at mid-vitellogenesis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29, 955-963.
- SWEVERS, L., CHERBAS, L., CHERBAS, P. & IATROU, K. 1996. *Bombyx* EcR (BmEcR) and *Bombyx* USP (BmCF1) combine to form a functional ecdysone receptor. *Insect Biochem Mol Biol*, 26, 217-21.
- SWEVERS, L., EYSTATHIOY, T. & IATROU, K. 2002a. The orphan nuclear receptors BmE75A and BmE75C of the silkworm *Bombyx mori*: hormonal control and ovarian expression. *Insect Biochem Mol Biol*, 32, 1643-52.
- SWEVERS, L. & IATROU, K. 1992. Early establishment and autonomous implementation of a developmental program controlling silkworm chorion gene expression. *Dev Biol*, 150, 12-22.
- SWEVERS, L. & IATROU, K. 1998. The orphan receptor BmHNF-4 of the silkworm *Bombyx mori*: ovarian and zygotic expression of two mRNA isoforms encoding polypeptides with different activating domains. *Mech Dev*, 72, 3-13.
- SWEVERS, L. & IATROU, K. 2003. The ecdysone regulatory cascade and ovarian development in lepidopteran insects: insights from the silkworm paradigm. *Insect Biochem Mol Biol*, 33, 1285-97.

- SWEVER, L., ITO, K. & IATROU, K. 2002b. The BmE75 nuclear receptors function as dominant repressors of the nuclear receptor BmHR3A. *J Biol Chem*, 277, 41637-44.
- SWIMMER, C., FENERJIAN, M. G., MARTINEZ-CRUZADO, J. C. & KAFATOS, F. C. 1990. Evolution of the autosomal chorion cluster in *Drosophila*. III. Comparison of the s18 gene in evolutionarily distant species and heterospecific control of chorion gene amplification. *J Mol Biol*, 215, 225-35.
- TAKAI, D. & JONES, P. A. 2004. Origins of bidirectional promoters: computational analyses of intergenic distance in the human genome. *Mol Biol Evol*, 21, 463-7.
- TELFER, W. 1975. Development and Physiology of the Oöcyte-Nurse Cell Syncytium. *Advances in Insect Physiology* 11, 223–319.
- TELFER, W. H. & ANDERSON, L. M. 1968. Functional transformations accompanying the initiation of a terminal growth phase in the cecropia moth oocyte. *Dev Biol*, 17, 512-35.
- THE INTERNATIONAL SILKWORM GENOME CONSORTIUM. 2008. The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol*, 38, 1036-45.
- THOMAS, J. L. 2003. Electroporation, an alternative to biolistics for transfection of *Bombyx mori* embryos and larval tissues. *J Insect Sci*, 3, 17.
- THOMAS, J. L., BARDOU, J., L'HOSTE, S., MAUCHAMP, B. & CHAVANCY, G. 2001. A helium burst biolistic device adapted to penetrate fragile insect tissues. *J Insect Sci*, 1, 9.
- THOMAS JL, B. J., MAUCHAMP B, CHAVANCY G, 1997. LacZ gene expression in gonads of *Bombyx mori* larvae and in embryonic tissues following gene gun bombardment. . *Fourth International Workshop on the Molecular Biology and Genetics of Lepidoptera, Kolympari, Crete, Greece*.
- THUMMEL, C. S., BOULET, A. M. & LIPSHITZ, H. D. 1988. Vectors for *Drosophila* P-element-mediated transformation and tissue culture transfection. *Gene*, 74, 445-56.

- TRAN, H. G., STEGER, D. J., IYER, V. R. & JOHNSON, A. D. 2000. The chromo domain protein chd1p from budding yeast is an ATP-dependent chromatin-modifying factor. *EMBO J*, 19, 2323-31.
- TRINKLEIN, N. D., ALDRED, S. F., HARTMAN, S. J., SCHROEDER, D. I., OTILLAR, R. P. & MYERS, R. M. 2004. An abundance of bidirectional promoters in the human genome. *Genome Res*, 14, 62-6.
- TZERTZINIS, G., MALECKI, A. & KAFATOS, F. C. 1994. BmCF1, a Bombyx mori RXR-type receptor related to the Drosophila ultraspiracle. *J Mol Biol*, 238, 479-86.
- UMAYAHARA, Y., JI, C., CENTRELLA, M., ROTWEIN, P. & MCCARTHY, T. L. 1997. CCAAT/enhancer-binding protein delta activates insulin-like growth factor-I gene transcription in osteoblasts. Identification of a novel cyclic AMP signaling pathway in bone. *J Biol Chem*, 272, 31793-800.
- VAN BEEST, M., DOOIJES, D., VAN DE WETERING, M., KJAERULFF, S., BONVIN, A., NIELSEN, O. & CLEVERS, H. 2000. Sequence-specific high mobility group box factors recognize 10-12-base pair minor groove motifs. *J Biol Chem*, 275, 27266-73.
- VERNHES, M.C., CABANES, P.A., TEISSIE, J., 1999. Chinese hamster ovary cells sensitivity to localized electrical stresses. *Bioelectrochem Bioenerg*, 48, 17-25.
- VINSON, C., MYAKISHEV, M., ACHARYA, A., MIR, A. A., MOLL, J. R. & BONOVICH, M. 2002. Classification of human B-ZIP proteins based on dimerization properties. *Mol Cell Biol*, 22, 6321-35.
- VINSON, C. R., SIGLER, P. B. & MCKNIGHT, S. L. 1989. Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science*, 246, 911-6.
- VLACHOU, D., KONSOLAKI, M., TOLIAS, P. P., KAFATOS, F. C. & KOMITOPOULOU, K. 1997. The autosomal chorion locus of the medfly *Ceratitis capitata*. I. Conserved synteny, amplification and tissue specificity but sequence divergence and altered temporal regulation. *Genetics*, 147, 1829-42.
- WANG, Q., WAN, L., LI, D., ZHU, L., QIAN, M. & DENG, M. 2009. Searching for bidirectional promoters in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Bioinformatics*, 10 Suppl 1, S29.

- WEST, A. B., LOCKHART, P. J., O'FARELL, C. & FARRER, M. J. 2003. Identification of a novel gene linked to parkin via a bi-directional promoter. *J Mol Biol*, 326, 11-9.
- WILLIAMS, S. C., CANTWELL, C. A. & JOHNSON, P. F. 1991. A family of C/EBP-related proteins capable of forming covalently linked leucine zipper dimers in vitro. *Genes Dev*, 5, 1553-67.
- WONG, Y. C., PUSTELL, J., SPOEREL, N. & KAFATOS, F. C. 1985. Coding and potential regulatory sequences of a cluster of chorion genes in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, 92, 124-35.
- WOODAGE, T., BASRAI, M. A., BAXEVANIS, A. D., HIETER, P. & COLLINS, F. S. 1997. Characterization of the CHD family of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 11472-7.
- XIA, Q., ZHOU, Z., LU, C., CHENG, D., DAI, F., et al. 2004. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 306, 1937-40.
- YAMAUCHI, H. A. Y., N. 1984. Developmental stages of ovarian follicles of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Morphol.*, 21-31.
- YANG, M. Q., KOEHL, L. M. & ELNITSKI, L. L. 2007. Comprehensive annotation of bidirectional promoters identifies co-regulation among breast and ovarian cancer genes. *PLoS Comput Biol*, 3, e72.
- YAO, T. P., FORMAN, B. M., JIANG, Z., CHERBAS, L., CHEN, J. D., MCKEOWN, M., CHERBAS, P. & EVANS, R. M. 1993. Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature*, 366, 476-9.
- YUE, X. N., SAKAGUCHI, B. & EICKBUSH, T. H. 1988. Gene conversions can generate sequence variants in the late chorion multigene families of *Bombyx mori*. *Genetics*, 120, 221-31.
- ZAFARANA, G., ROTTIER, R., GROSVELD, F. & PHILIPSEN, S. 2000. Erythroid overexpression of C/EBPgamma in transgenic mice affects gamma-globin expression and fetal liver erythropoiesis. *EMBO J*, 19, 5856-63.
- ZARET, K. S. & CARROLL, J. S. 2011. Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes Dev*, 25, 2227-41.

Μονογραφίες

- ΠΑΠΑΝΤΩΝΗΣ, Α. 2008. Νουκλεοσωμική Οργάνωση και ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων του χορίου μέσω ειδικών αρχιτεκτονικών παραγόντων, στο μεταξοσκώληκα *Bombyx mori*. . Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.
- ΣΟΥΡΜΕΛΗ, Σ. 2004. Μοριακή ανάλυση της διαφορικής έκφρασης γονιδίων σε λεπιδόπτερα έντομα. Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.
- ΦΟΥΝΤΑΣ, Λ. 1995. Χαρακτηρισμός και δομική ανάλυση cDNA κλώνων που περιέχουν αντίγραφα της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας "HOPE" στο γονιδίωμα του μεταξοσκώληκα *Bombyx mori*. Διπλωματική εργασία, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α. (Εργαστήριο Γ. Κ. Ροδάκη και Ρ. Λεκανίδου).

Παράρτημα Α

Αποτελέσματα πειραμάτων ηλεκτροδιάτρησης σε μορφή πίνακα για κάθε γονιδιακή κατασκευή και προσανατολισμό που εξετάστηκε. (Η ονομασία των γονιδιακών κατασκευών με μεταλλαγμένο τον υποκινητή pL9 σε θέσεις C/EBP αναφέρονται τόσο με τις λειτουργικές θέσεις C/EBP που περιέχουν όσο και με τις μεταλλαγμένες θέσεις C/EBP.)

υποκινητής	Προσανατολισμός (αριθμός επαναλήψεων)	Αναπτυξιακά στάδια	Αριθμός ωθυλακίων με έκφραση	σύνολο ωθυλακίων	συχρότητα έκφρασης	τυπική απόκλιση
5H4	-	Vit	2	44	0,045	0,00049305
		E	4	16	0,250	0,005859375
		EM	4	19	0,211	0,004373815
		M	2	16	0,125	0,003417969
		ML	2	19	0,105	0,002478495
		L	0	16	0,000	0
Er.1	α (18)	Vit	0	187	0	0
		E	3	103	0,0291	0,0001
		EM	8	102	0,0784	0,0004
		M	15	103	0,1456	0,0006
		ML	9	102	0,0882	0,0004
		L	2	103	0,0194	9E-05
	β (13)	Vit	0	142	0,000	0
		E	6	72	0,083	0,000530478
		EM	12	73	0,164	0,000940833
		M	7	72	0,097	0,000609514
		ML	2	73	0,027	0,000182511
		L	0	72	0,000	0
		VL	0	135	0,000	0
6F6.2	-	Vit	1	44	0,023	0,000252395
		E	2	20	0,100	0,00225
		EM	8	23	0,348	0,004931372
		M	10	20	0,500	0,00625

pL1	α (15)	ML	4	23	0,174	0,003123202
		L	1	20	0,050	0,0011875
		VL	1	30	0,033	0,000537037
		Vit	0	80	0	0
		E	3	84	0,0357	0,0002
		EM	12	81	0,1481	0,0008
		M	14	84	0,1667	0,0008
		ML	2	81	0,0247	0,0001
		L	0	84	0	0
	VL	0	162	0	0	
	β (18)	Vit	0	113	0,000	0
		E	1	98	0,010	5,15304E-05
		EM	20	95	0,211	0,000874763
		M	19	98	0,194	0,000797393
		ML	4	95	0,042	0,000212276
L		1	98	0,010	5,15304E-05	
VL		1	177	0,006	1,58695E-05	
pL9	α (16)	Vit	1	134	0,0075	3E-05
		E	1	86	0,0116	7E-05
		EM	5	87	0,0575	0,0003
		M	15	86	0,1744	0,0008
		ML	21	87	0,2414	0,0011
		L	8	86	0,093	0,0005
		VL	3	138	0,0217	8E-05
	β (22)	Vit	0	213	0,000	0
		E	6	116	0,052	0,000211417
		EM	20	111	0,180	0,000665384
		M	25	116	0,216	0,000728748
		ML	33	111	0,297	0,000941043
		L	12	116	0,103	0,00039977
		VL	6	177	0,034	9,25119E-05
		Vit	0	48	0,000	0
pL9mutHMG(I+II)	α (7)	E	0	31	0,000	0
		EM	0	32	0,000	0
		M	0	31	0,000	0
		ML	0	32	0,000	0
		L	0	31	0,000	0
		VL	0	58	0,000	0
		Vit	0	57	0	0
	β (8)	E	0	33	0	0
		EM	0	35	0	0

pL9mutGATA		M	0	33	0	0
		ML	0	35	0	0
		L	0	33	0	0
		VL	0	66	0	0
	α (11)	Vit	2	124	0,0161	6E-05
		E	1	56	0,0179	0,0002
		EM	12	55	0,2182	0,0016
		M	6	56	0,1071	0,0009
		ML	4	55	0,0727	0,0006
		L	2	56	0,0357	0,0003
		VL	0	110	0	0
	β (14)	Vit	3	137	0,022	8E-05
		E	3	73	0,041	0,0003
		EM	13	71	0,183	0,0011
M		6	73	0,082	0,0005	
ML		3	71	0,042	0,0003	
L		2	73	0,027	0,0002	
VL		1	144	0,007	2E-05	
pL9-C/EBP2+3+4 ή mutC/EBP1	α (12)	Vit	6	113	0,0531	0,0002
		E	3	60	0,05	0,0004
		EM	2	62	0,0323	0,0003
		M	3	60	0,05	0,0004
		ML	10	62	0,1613	0,0011
		L	0	60	0	0
		VL	1	109	0,0092	4E-05
	β (13)	Vit	3	126	0,024	9E-05
		E	2	65	0,031	0,0002
		EM	2	69	0,029	0,0002
		M	14	65	0,215	0,0013
		ML	12	69	0,174	0,001
		L	3	65	0,046	0,0003
		VL	3	117	0,026	0,0001
pL9-C/EBP1+3+4 ή mutC/EBP2	α (9)	Vit	3	72	0,0417	0,0003
		E	0	38	0	0
		EM	0	40	0	0
		M	1	38	0,0263	0,0003
		ML	4	40	0,1	0,0011
		L	1	38	0,0263	0,0003
		VL	6	67	0,0896	0,0006

pL9-C/EBP1+2+4 ή mutC/EBP3	β (10)	Vit	2	80	0,025	0,0002
		E	0	42	0,000	0
		EM	1	45	0,022	0,0002
		M	1	42	0,024	0,0003
		ML	5	45	0,111	0,0011
		L	1	42	0,024	0,0003
		VL	2	80	0,025	0,0002
	α (8)	Vit	2	77	0,026	0,0002
		E	0	39	0	0
		EM	2	39	0,0513	0,0006
		M	3	39	0,0769	0,0009
		ML	6	39	0,1538	0,0017
		L	0	39	0	0
		VL	0	74	0	0
β (5)	Vit	0	53	0,000	0	
	E	0	23	0,000	0	
	EM	1	23	0,043	0,0009	
	M	0	23	0,000	0	
	ML	4	23	0,174	0,0031	
	L	0	23	0,000	0	
	VL	0	45	0,000	0	
α (7)	Vit	4	76	0,0526	0,0003	
	E	0	33	0	0	
	EM	0	33	0	0	
	M	5	33	0,1515	0,0019	
	ML	2	33	0,0606	0,0009	
	L	0	33	0	0	
	VL	1	52	0,0192	0,0002	
β (9)	Vit	2	86	0,023	0,0001	
	E	1	42	0,024	0,0003	
	EM	3	43	0,070	0,0008	
	M	4	42	0,095	0,001	
	ML	9	43	0,209	0,0019	
	L	1	42	0,024	0,0003	
	VL	3	78	0,038	0,0002	
pL9-C/EBP3+4 ή mutC/EBP1+2	α (8)	Vit	1	65	0,0154	0,0001
		E	1	35	0,0286	0,0004
		EM	0	36	0	0
		M	3	35	0,0857	0,0011
		ML	3	36	0,0833	0,0011

		β (6)	L	6	35	0,1714	0,002
			VL	1	65	0,0154	0,0001
			Vit	0	52	0,000	0
			E	2	32	0,063	0,0009
			EM	2	35	0,057	0,0008
			M	5	32	0,156	0,0021
			ML	4	35	0,114	0,0014
			L	0	32	0,000	0
			VL	0	60	0,000	0
			pL9-C/EBP2+4 ή mutC/EBP1+3	α (6)	Vit	0	88
E	1	50			0,02	0,0002	
EM	4	53			0,0755	0,0007	
M	3	50			0,06	0,0006	
ML	9	53			0,1698	0,0013	
L	0	50			0	0	
VL	0	94			0	0	
Vit	0	59			0,000	0	
E	1	40			0,025	0,0003	
EM	1	42			0,024	0,0003	
pL9-C/EBP2+3 ή mutC/EBP1+4	α (11)	M	5	40	0,125	0,0014	
		ML	5	42	0,119	0,0012	
		L	1	40	0,025	0,0003	
		VL	0	66	0,000	0	
		Vit	1	106	0,0094	4E-05	
		E	2	49	0,0408	0,0004	
		EM	1	51	0,0196	0,0002	
		M	7	49	0,1429	0,0012	
		ML	4	51	0,0784	0,0007	
		L	0	49	0	0	
β (8)	VL	3	95	0,0316	0,0002		
	Vit	6	78	0,077	0,0005		
	E	0	39	0,000	0		
	EM	1	39	0,026	0,0003		
	M	1	39	0,026	0,0003		
	ML	1	39	0,026	0,0003		
	L	2	39	0,051	0,0006		
	VL	0	73	0,000	0		

pL9-C/EBP1+4 ή mutC/EBP2+3	α (7)	Vit	5	67	0,0746	0,0005
		E	0	35	0	0
		EM	0	36	0	0
		M	0	35	0	0
		ML	2	36	0,0556	0,0007
		L	1	35	0,0286	0,0004
		VL	2	72	0,0278	0,0002
	β (6)	Vit	5	60	0,083	0,0006
		E	1	30	0,033	0,0005
		EM	0	32	0,000	0
		M	0	30	0,000	0
		ML	3	32	0,094	0,0013
		L	4	30	0,133	0,0019
		VL	1	60	0,017	0,0001
pL9-C/EBP1+3 ή mutC/EBP2+4	α (8)	Vit	1	77	0,013	8E-05
		E	1	44	0,0227	0,0003
		EM	3	46	0,0652	0,0007
		M	7	44	0,1591	0,0015
		ML	5	46	0,1087	0,0011
		L	0	44	0	0
		VL	1	78	0,0128	8E-05
	β (6)	Vit	0	48	0,000	0
		E	0	31	0,000	0
		EM	4	32	0,125	0,0017
		M	2	31	0,065	0,001
		ML	6	32	0,188	0,0024
		L	1	31	0,032	0,0005
		VL	0	58	0,000	0
pL9-C/EBP1+2 ή mutC/EBP3+4	α (5)	Vit	0	35	0	0
		E	0	24	0	0
		EM	0	26	0	0
		M	3	24	0,125	0,0023
		ML	4	26	0,1538	0,0025
		L	0	24	0	0
		VL	2	39	0,0513	0,0006
	β (6)	Vit	3	29	0,103	0,0016
		E	1	25	0,040	0,0008
		EM	1	25	0,040	0,0008
		M	1	25	0,040	0,0008
		ML	1	25	0,040	0,0008

pL9-C/EBP4 ή mutC/EBP1+2+3	α (6)	L	1	25	0,040	0,0008		
		VL	1	47	0,021	0,0002		
		Vit	0	64	0	0		
		E	0	28	0	0		
		EM	1	30	0,0333	0,0005		
		M	0	28	0	0		
		ML	4	30	0,1333	0,0019		
		L	4	28	0,1429	0,0022		
		VL	1	44	0,0227	0,0003		
	β (6)	Vit	0	49	0,000	0		
		E	2	28	0,071	0,0012		
		EM	2	28	0,071	0,0012		
		M	2	28	0,071	0,0012		
		ML	2	28	0,071	0,0012		
		L	0	28	0,000	0		
		VL	1	48	0,021	0,0002		
		pL9-C/EBP3 ή mutC/EBP1+2+4	α (6)	Vit	0	76	0	0
				E	4	33	0,1212	0,0016
EM	1			33	0,0303	0,0004		
M	2			33	0,0606	0,0009		
ML	2			33	0,0606	0,0009		
L	1			33	0,0303	0,0004		
VL	0			59	0	0		
β (5)	Vit		0	29	0,000	0		
	E		0	14	0,000	0		
	EM		0	14	0,000	0		
	M		0	14	0,000	0		
	ML		0	14	0,000	0		
pL9-C/EBP2 ή mutC/EBP1+3+4	α (7)	L	0	14	0,000	0		
		VL	0	26	0,000	0		
		Vit	0	57	0	0		
		E	2	33	0,0606	0,0009		
		EM	8	35	0,2286	0,0025		
		M	6	33	0,1818	0,0023		
		ML	2	35	0,0571	0,0008		
	β (6)	L	1	33	0,0303	0,0004		
		VL	0	66	0	0		
		Vit	1	60	0,017	0,0001		
		E	5	29	0,172	0,0025		
		EM	12	30	0,400	0,004		

pL9-C/EBP1 ή mutC/EBP2+3+4	α (5)	M	2	29	0,069	0,0011
		ML	1	30	0,033	0,0005
		L	0	29	0,000	0
		VL	0	55	0,000	0
	β (5)	Vit	1	45	0,0222	0,0002
		E	0	21	0	0
		EM	0	22	0	0
		M	0	21	0	0
		ML	5	22	0,2273	0,004
		L	3	21	0,1429	0,0029
		VL	1	42	0,0238	0,0003
	α (5)	Vit	1	40	0,025	0,0003
		E	1	23	0,043	0,0009
EM		0	24	0,000	0	
M		0	23	0,000	0	
ML		3	24	0,125	0,0023	
L		0	23	0,000	0	
VL		1	46	0,022	0,0002	
pL9mutC/EBPaII	α (5)	Vit	0	32	0	0
		E	0	14	0	0
		EM	0	15	0	0
		M	0	14	0	0
		ML	0	15	0	0
		L	0	14	0	0
		VL	0	28	0	0
	β (5)	Vit	0	30	0,000	0
		E	0	13	0,000	0
		EM	0	14	0,000	0
		M	0	13	0,000	0
		ML	0	14	0,000	0
		L	0	13	0,000	0
		VL	0	26	0,000	0

Παράρτημα Β

Στοιχίση όλων των μελών των α- και β- τύπου γονιδίων της οικογένειας Er με το πρόγραμμα CLUSTAL X. Με πράσινο χρώμα σημειώνονται τα κωδικόνια έναρξης, με κόκκινο χρώμα τα κωδικόνια λήξης και με κίτρινο χρώμα η αλληλουχία των ανιχνευτών.

A.1 -----ATTCAAAGGCCCTCAGAA---GTTTAAACGTCATG--TCTACATTTCGCTG
 A.3 GTTCGAAAAATATTTTATTTTCAATCC--GCCGTTCAAAATG--TCTTACTTTCGTTG
 A.2 ATTGTAACATAAAGTT---GACCTTTGAAA--ACAACCAAATATG--TCTAAACTTGTTG
 A.4 -----GTTTCGCACTTTGCTGTTATTAGAA---ACAATATGCTCTCC-TCTTCTTCTGCT
 A.5 ----GTTTCAGCATGTCAGTACTATCAGCACAGAGAAGCCAAAACATGCTCCACTTACACTT
 * * * * *

A.1 TCTTACTCCTTTGCGTTCAGGCTTGCTTGATCCAAATGTGTACAGTCAGTGCCTGGGTC
 A.3 TGTTTCGCGATCTGTATCCAGGCTTGCCCTGTTCCATAATGTGTACAGTCAGTGCCTGGGTC
 A.2 TCTTCTTATTTCTGCATTCAGTTTGTTTTATACAAAATGTGTACAGTCAGTGCCTGGGTC
 A.4 TCTTCTTATTTCTGCTTTCAAACCTTGTCTAATCCAAAATGTGTACAGCCAGTGCCTGGGTC
 A.5 TCGTTCATTTTGTCTACAAAATTTGTCTCATCCAAAATGTGTACAGTCAGTGCCTGGGTC
 * * * * *

A.1 GTGTGGGTCCCGGTGGACCTCCTTTAGGTCCATATGGCGGACCTCTCGGTGGGCCTGGGT
 A.3 GTGTGGGTCCCGGTGGACCTCCTTTAGGTCCATATGGCGGACCTCTCGGTGGGCCTGGGT
 A.2 GTGTGGGTCCCGGTGGACCTCCTTTAGGACCATATGGGGGACCTCTCGGTGGGCCTGGAT
 A.4 GTGTGGGTCCCGGTGGACCTCCTTTAGGTCCATATGGCGGACCCCTCGGTGGACCTGGGT
 A.5 GTGTGGGTCCCGGTGGGCCTCCTGTAGGTCCATATGGCGGACCTCTCGGTGGGCCTGGGT
 * * * * *

A.1 ACGGTCCTGTCCGGTACGGTGGCTGTGGAGGGTACGGCGGCTCCGGCATCCGTAACGTGG
 A.3 ACGGTCCTGTCCGGTACGGCGGCTGTGGAGGGTACGGCGGCTCCGGCATCCGTAACGTGG
 A.2 ATGGTCCGTCCGGTACGGCGGCTGTGGAGGGTACGGCGGCTCCGGCATCCGTAACGTGG
 A.4 ACGGCCCTGTCCGGTACGGCGGCTGTGGAGGGTACGGCGGCTCCGGCATCCGTAACGTGG
 A.5 ACGGTCCTGTCCGGTACGGCGGTTGTGGAGGGTACGGCGGCTCCGGCATCCGTAACGTGG
 * * * * *

A.1 CCGTGGCTGGCGAATCCCCGTGGCCGGCTCCACCGGTGTAATGGGACAGGTGCCCGTCA
 A.3 CCGTGGCTGGCGAATCCCCGTGGTCCGCTCCAGCGCTGTAATGGGACAGGTGCCCGTCA
 A.2 CCGTGGCTGGCGAATCCCCGTGGCAGGCTCCACCGGTGTAACGGGACAGGTGCCCGTCA
 A.4 CCGTGGCTGGCGAGCTCCCCGTGGCCGGCTCCGCGCTGTATTGGGACAGGTGCCCGTCA
 A.5 CCGTGGCTGGCGAGCTCCCCGTGGCCGGCTCCAGCGCTGTAATGGGACAGGTGCCCGTCA
 * * * * *

A.1 TCGGCGCGGTCGAGTTCGCGGGTCTGCCTGCGCTGTCCGTTCTGTCTCCATCTCTGGCG
 A.3 TCGGCGCGGTCGAGTTCGCGGGTCTGCCTGCGCTGTCCGTTCTGTCTCCATCTCTGGCG
 A.2 TCGGCGCGGTCGAGTTCGCGGGTCTGCCTGCGCTGTCCGTTCTGTCTCCATCTCTGGCG
 A.4 TCGGCGCGGTTGAGTTCGCGGGTCTGCCTGCGCTGTCCGTTCTGTCTCCATCTCTGGCG
 A.5 TCGGCGCGGTCGAGTTCGCGGGTCTGCCTGCGCTGTCCGTTCTGTCTCCATCTCTGGCG
 * * * * *

A.1 CATGCGGACCCACCTGCGGATGCGGCGGTTCTCCATACTATTAGCAATCTATATT-----
 A.3 CATGCGGACCCACCTGCGGATGCGGCGGTTCTCCATACTATTAGTAACATAGATTACTAA
 A.2 CATGCGGACCCACCTGCGGATGCGGCGGTTCTCCATTTCTATTAGCAATCTATATT-----
 A.4 CATGTGGACCCACCTGCGGATGCGGCGGTTCTCCATACTATTAGTAACATCTATATT-----
 A.5 CGTGCAGGACCCACCTGCGGATGCGGCGGTTCTCCATACTATTAGTAATCTACAATGTTG-
 * * * * *

A. 1 ---GTAATAA-TTAAGTGTATTTTAATCAAATAAGTAAAATGTTT--GATATATTCAA
 A. 3 CTTGTAAATAA-TTAAGGTTATCTTAATCATAAAAGTAAAATTTTAAGGACATATCCAA
 A. 2 ---GTAATAA-TTAAGTGTATTTTAATCACATAAGTAAAATGTTG--GATGTACATAA
 A. 4 ---GTAATAA-TTAAGTGTATTTTAATCACATAAGTAAAATGTTGGGTGTACATATAT
 A. 5 ---TTAAATAAATTAATTGTTAAGTTTAT-ATGGGTGTTTAAT-TCGAATTGAAAT----

***** ** * * * * * * * * * * *

A. 1 TTCTTTTATCTATAAAACTTT
 A. 3 T-----
 A. 2 TATATCAATTCTT-----
 A. 4 TCAATTCTTTATT-----
 A. 5 -----

B. 1 -----ATT---CGCA-AGTT----GTTCTC-----AA-----TTGAT----CA
 B. 2 ATTGTAACAGCGTC---CAC-AGTTTGTAGCTTTCC-----AA----ACTATT----TA
 B. 3 -----TTT---CTTT-GACC---GGTAT-----AAA----GTCATT----TT
 B. 4 -----ATT---CAAG-AACT---GGTGTTTGAGGAGA----GCGAGC----TA
 B. 5 -----GTTGGGCACACAATT-AAAATATCTTTAGGTAATAATACCAGTGTGATA

* * * * *

B. 1 -AATA-----AAATGCGCTTCAGGGGTATTGTGG-TCCT---TGCTTCAGCACTTTT
 B. 2 GAATACATACGAAAAATGCGCATTTAAAGCTATCCTAG-TTTT---CGCTTCAGCACTTTT
 B. 3 CGCG-----GCATAATG---CCTAG-AATTTTGTGATTGCGTGCCTTTT--ATTTTC
 B. 4 ACAA-----GCAAAATG---TCTAGCAACGTATTG-TTCTGTGTGTTTCTGCACCTTT
 B. 5 GAAAG-AGAAAAATAATG---CCAAAACCTGTTCTAT-TTGTTTTGCATCTGCCCTTAT

*** * * * * * * * *

B. 1 -TGTTCA-GTCTGCCTTGAGCCAGTGTGTGCGCCGAGCTGGTCCCCTGCTTGAGGGGTAC
 B. 2 -TCTAGA-GTCTGCCTTGGCCAGTGTCTTGGCCGAGCCGCTCCTGGTCTTGAGGCATAC
 B. 3 GTGTTTAAAGTCTGCTGTAAGCCAATGTGCTGGCCGATTTGGTTC---GTT----GCGGGC
 B. 4 -TATCA-GTGTGCTGTAAGCCAATGCGTTGGTCCGATTTGGTTC---TCT----GCGTGG
 B. 5 -TTCCCA-GGGTGTCTTAGCCAATTTACTGGACGCATCTTTTCT--CCT-----CGTCC

* * * * * * * * * * *

B. 1 CGTGGCGGTTGGGATGGCTTTGGTTACGACGGTCTGGGATACGACGGTGCCGGA-T--AC
 B. 2 CGTGGCGGTTGGGACGGCTTGGCTACGATGGTCTGGGCTATGATGGTATCGGT-T--AC
 B. 3 TG-GCCCACTCG-ACGGGTGGGGTTACGATAGTCTGGGCTATGATGGCTTCGGTATTGGC
 B. 4 TG-GTCCCTTCG-ATGGCTGGGGCTACGATGGTCTGGGCTATGATGGCTTCGGTATTGGC
 B. 5 TG-GT---TTCG-ACAGCCTGGCTTACGAAGCCCTCGGTTA-----CGGA-----

* * * * * * * * * * *

B. 1 GGATGGAATGGTTCGCTCGC---TGTGGTGGTCTCGGAGATGATATCGCAGCGGCCAGC
 B. 2 GGATGGAACGGTTCGCTCGC---TGTGGAGGCTTCGGTATGATATCGCAGCTGCCAGC
 B. 3 GGCTGGAACGGCCGC---GGC---TGTGGAGGCTTAGGCGATGAGATAGCCGCTGCT-GC
 B. 4 GGCTGGAACGGCCGC---GGC---TGTGGTGGTCTAGGCGATGACATAGCCGCTGCT-GC
 B. 5 GGTTGGAACGGTTCGA---GGCATTGTGGGGCGTCCGCGACGATATCACCGCAGCAGGC

** ***** ** * * * * * * * * * * *

B. 1 G-CTCTTGGAGCCTCTCACGGAGGTACCCTTGCTGTGGTGACTTCTTCTGCCGCTCCAC
 B. 2 G-CCCTCGGAGCCTCTCATGGAGGTACTCTTGCTGTGCTATCTTCGTCTGCAGCTCCTAC
 B. 3 G---CTGGAGCCTCTCACGGCGGCACGCTCGTGTGCTCAACCTCAGCCGCTCCTAC
 B. 4 GGCGCTGGGAGCCTCTCACGGGGCACGCTCGCGGTGCTCAACCTCAGCCGCTCCTAC
 B. 5 G-CTCTTGGCGCATCCAGGGTGGTGGACTTGCCGTTGTACCTCCTCGGCTGCACCTAC

* * * * * * * * * * *

B. 1 TGGCTTGGGCATAGCTTCTGAAAATTCATACGAAGGCGGCGTTGGTATATGTGGTAACT
 B. 2 CGGCCTGGGCGTGACTTCTGAGAATCTTACGAGGGTCCGTGGGTGCTGCGGTAATCT
 B. 3 CGGTCTGGGCATAGCGTCTGAGAATATTTACGAGGGTTCAGTCCGGTGTCTGCGGTAACCT
 B. 4 CGGTCTGGGCATAGCGTCTGAGAATGTTTACGAAGGTTCAGTCCGGTGTCTGCGGTAACCT
 B. 5 TGGTCTCGGCGAGACCTTAGAGAGCTCATAACGAGGTACGGTTTCGATTTGCGGCAACGC

** * * * * * * * * * *

B.1 ACCATTCCTGAGTACTGCGTCTATAGCCGGCGAACTCAGAACCGGTGGTACCGGTGGTA-
 B.2 GCCGTTCTGAGTACAGCAGCTGTCGCCGGTGAATCCCCACTGCTGGTGTGGTGGTA-
 B.3 GCCCTTCCTGGGTACTGCTGATGTCGCGGGCGAGTCCCAACAGCTGGGCTTGGCGGTA-
 B.4 GCCCTTCCTTGGTACTGCTGATGTTGCCGGCGAGTCCCAACAGCTGGGCTTGGCGGCA-
 B.5 GCCGTTCTCGGAACGCTGATGTTGCTGGCGAGCTTCCACAATCGGAGGTGGTG-TAG
 *

B.1 TCGACTATGGGTGTGGTAACGGAGCTGTTGGGATAACAGTGGAAAGCG-TAAT---A-T-
 B.2 TTAACTCCAGCTGTGGTACGGTGCCTTGGTATAACAGCTGAAGGTGGTATT---GGTT
 B.3 TCTACTATGGCTGTGGGGATGGTGTCTGTTGCCATCACCGCGGAGAATGGTATTTCCGGTC
 B.4 TCGATTATACTTGCGGCGATGGCGCAGTTGGCATTACTGTCGAGAATGCCATTAATGGCA
 B.5 TCAGCTACGAATGCGGCGACGGAGCTGTTGGTATAACCACGGAGGTGGTGTG---GGTG
 *

B.1 ---CT-----CCTGCCATTA--ACTA-TGCTCCTG-CTG---GT-GCTC
 B.2 ACGCT-----CCAGCTGTTGCCATTGCTGCCCTGTCTATAACGCAGCCC
 B.3 TTTCTGGTTTCGGATACGCGCCGGCCCGCTGTAGCTACTCCCG-CCTTG--GCCGGTC
 B.4 TCTCTAATGTTGGGTACGGACTAGCTCCTGGCATAGTTGGACCTG-CTGTA--GCTGCTC
 B.5 TCGC-----GCCAACCGCT---ACAATCGGATCTG-CTA----AC-ATTC
 *

B.1 CT-----TTA---GGCA----GG-----AGCT-TCAATCGCGG-----
 B.2 CTACCCCTGTCTATGGAGCT----GGTATCGCACC----AGCTGCCTACAGCGGTGTGA
 B.3 CCACCATTGGCTACGGAACC----GGAATCTCTCCCTGGGCT-ACAATGGCGCTG---
 B.4 CTGCCCTCGGCTACGGACCT----GGAATCTCTCTCTAGGCT-ACAACACCGCTG---
 B.5 CT-CCTGCGGTTG--GAGCTCCTGTGGGATACCG-----AGGCT-TTAACCGCGG-G---
 *

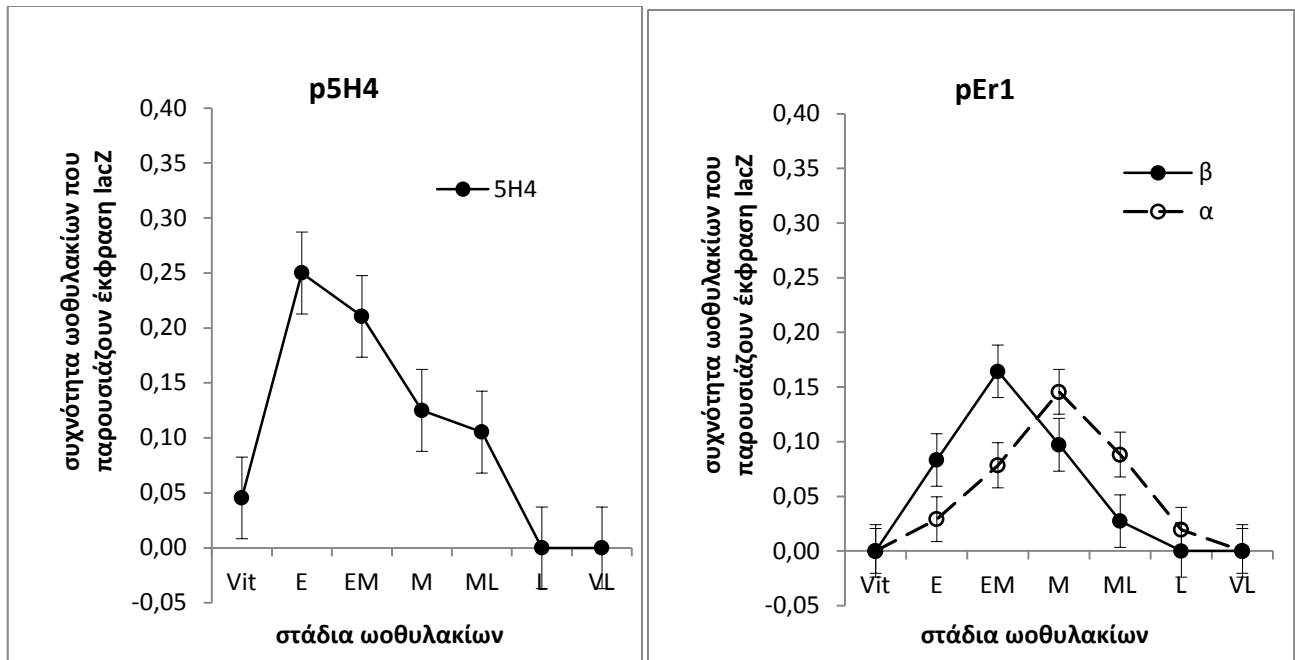
B.1 -CTGCGGATGCGGTGCTG-----C---CAACC-C--ATATPAA-----AAT---
 B.2 ACCGCGGATGCGGTGTGG---AGC---TAACTACGGATATPAA-----TTAATGA-
 B.3 GTCGGGGCTGTGGTTGTGGCCAGCACCTATGGC---TACTAGACTACCACCTAATTA-
 B.4 GTCGCGGCTGCGGGTGTGG---GGC---TAATTAC---TATPAA-----TGCAAT---
 B.5 --TGTGGATGCGGATGCGG-----C-TCTAACTACGCCTATPAA-----TGATATT
 *

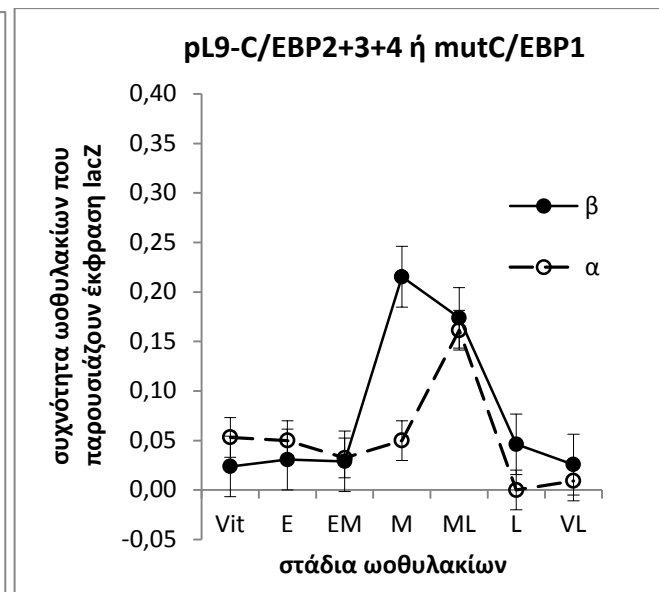
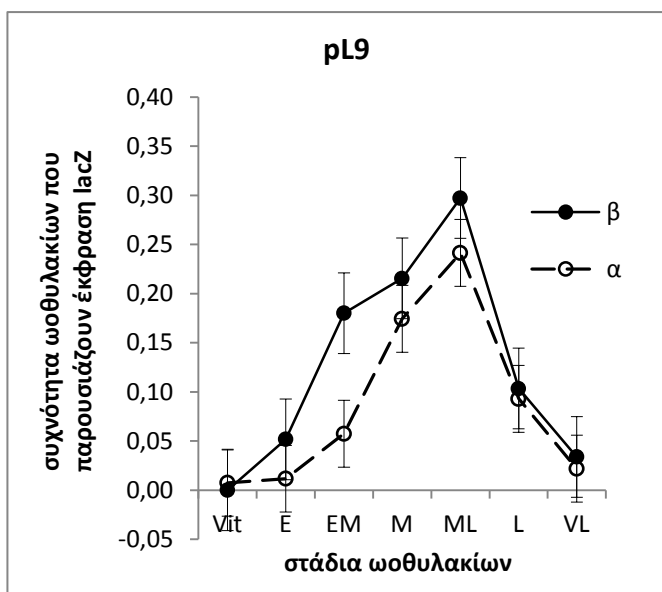
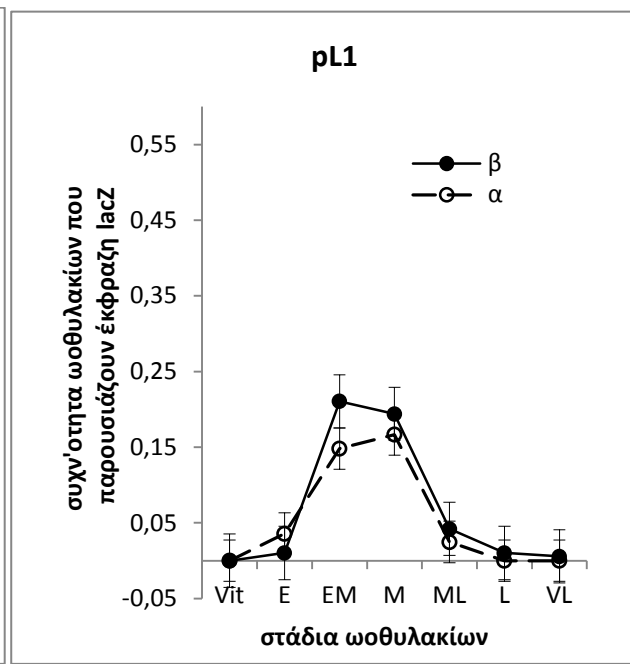
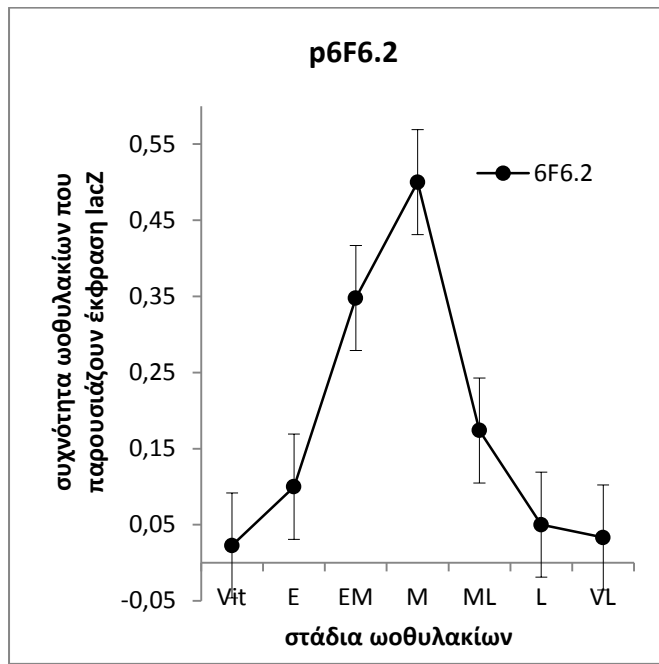
B.1 -TTAATGA--TG--T-T--ATT--TT----AATGTGTTAATAAAAATA---CTTA-TCAG
 B.3 ATGAATGAA-TGAATGT--ATT--TTTTATAATTCTCCAATACAAATA---AATAGTTTG
 B.5 ATAATTTAA-TAAATTT--ACT--TCT---AA---GCTATTTCTTGTA---TTTA-TT-G
 B.2 ---AATTTT-TAA-TTT--ACT--TT----AA-----TAA-----AGA---CTTC-TTTA
 B.4 ATAAATTAATGATTTTAAATTAATCA--TGAGGAAATAAACGAAATGAGTTTAA-TATA
 *

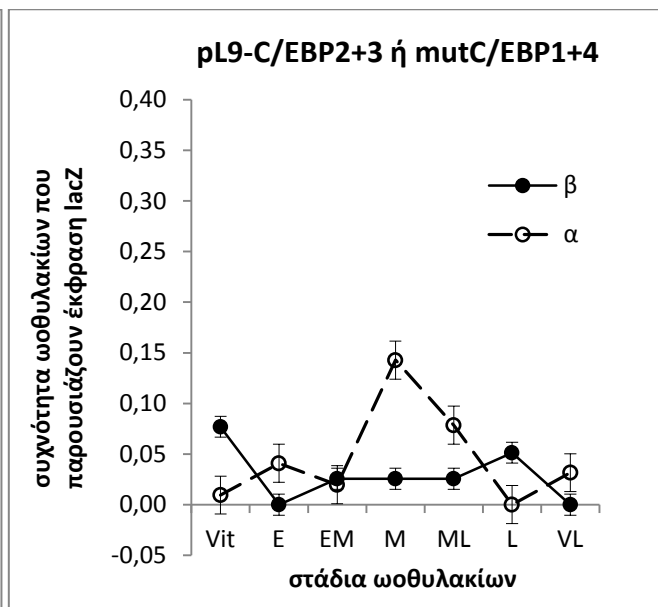
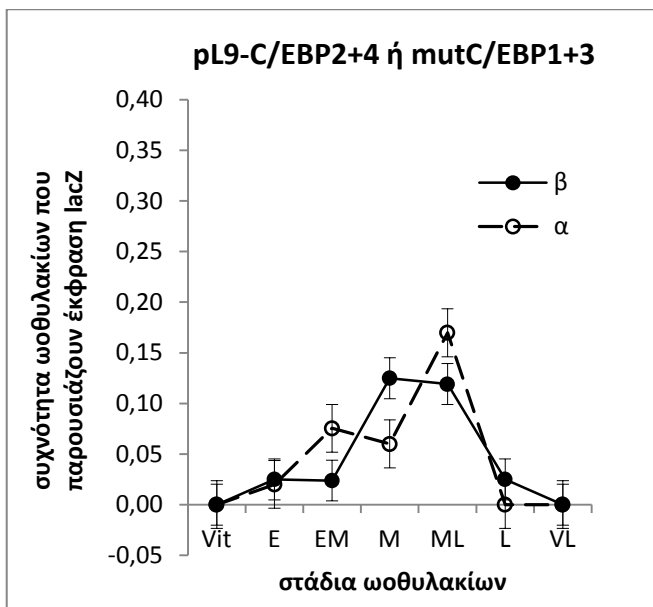
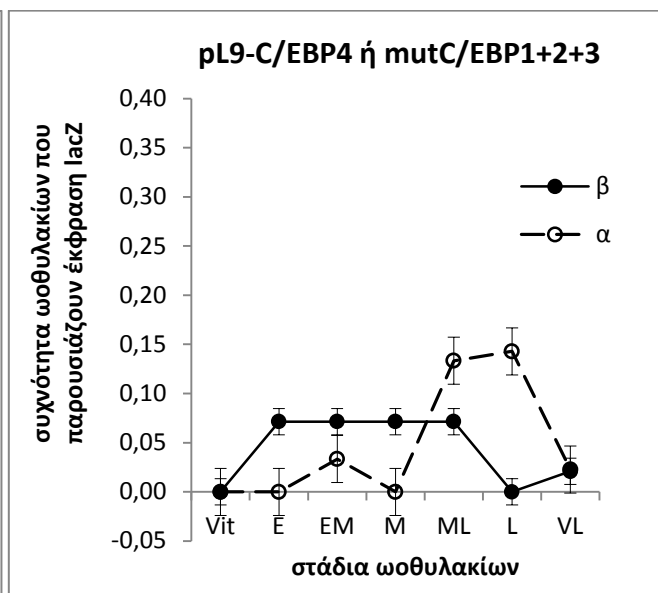
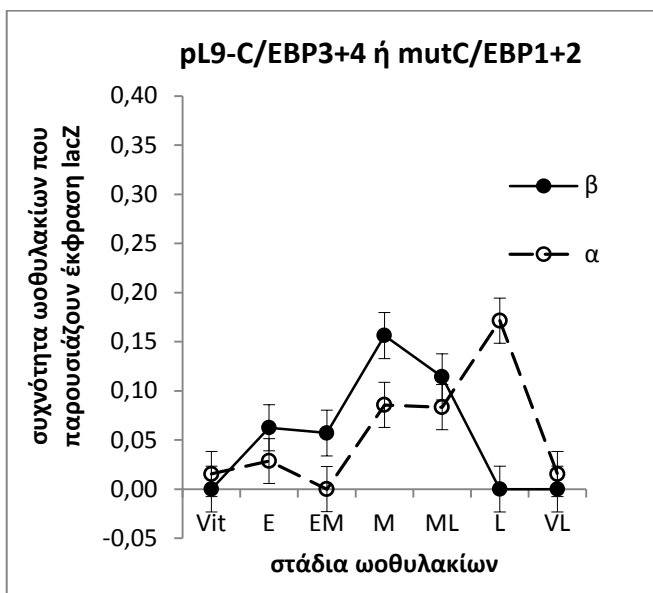
B.1 TT---AATT--CT----CTTCTTACTAATTTGTC--TTG---AAACATCCATCAGTGGT
 B.3 CA---AATT--TTATGTTTTTTTTATTGGGTAGACAATTG---AAAGA--AATCAAC---
 B.5 CTCC-AATC--CCA-----TTGTTATTTAATTTACTATCGTGTAATAA---AGTAAACA--
 B.2 AA---AATT--TT-----TTTTTTTTTGTCTCACAATTTT--AACAACTACTGAG----
 B.4 TATAAAATGGTT----TCTTTTTCTTGCTGTTT--CTGC---AAA-----ACGAA----
 *

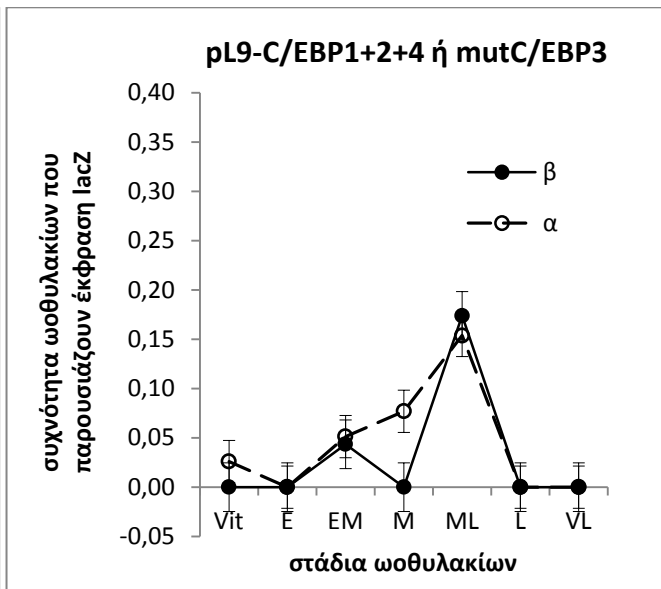
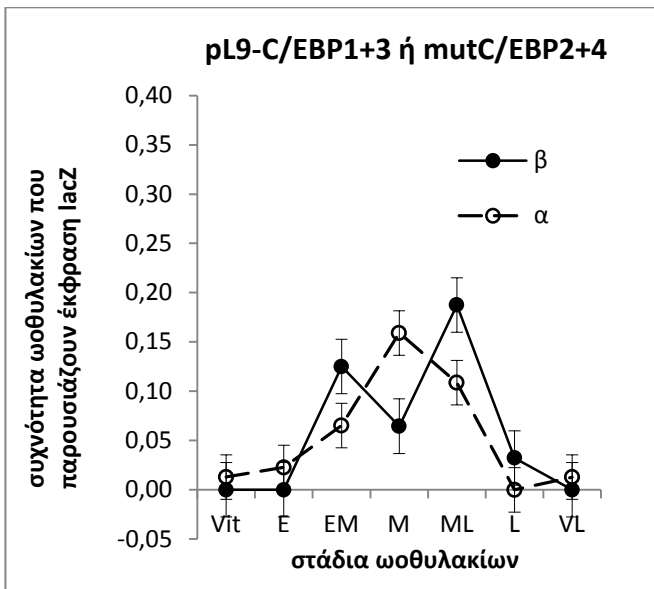
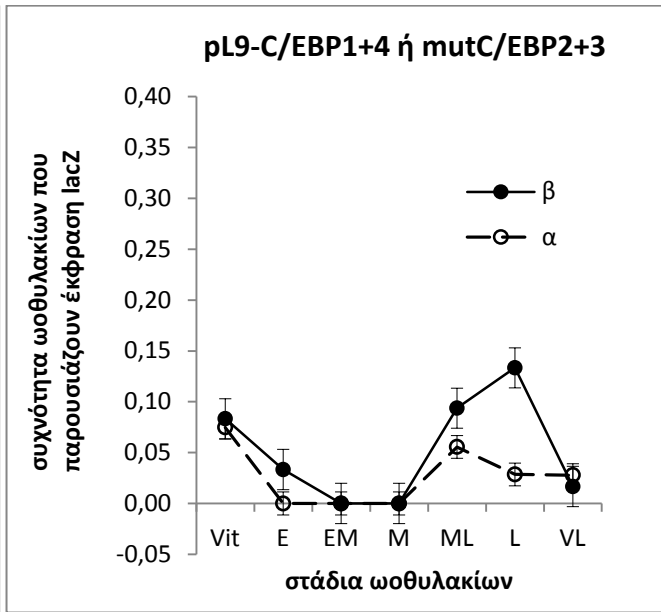
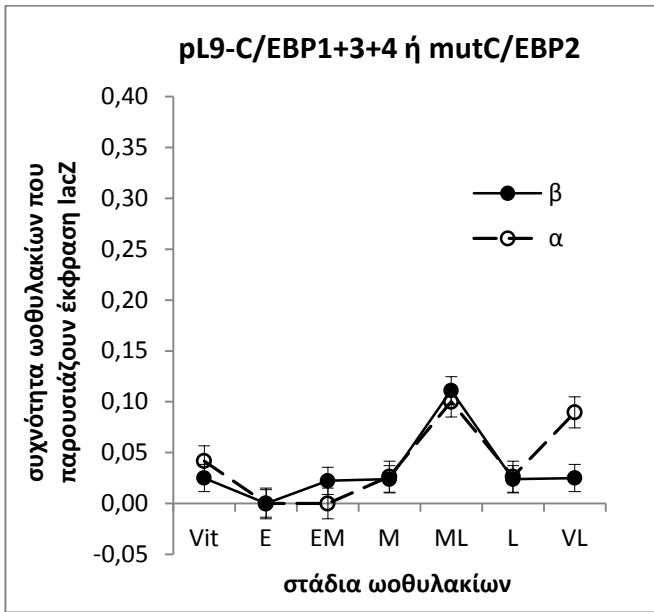
Παράρτημα Γ

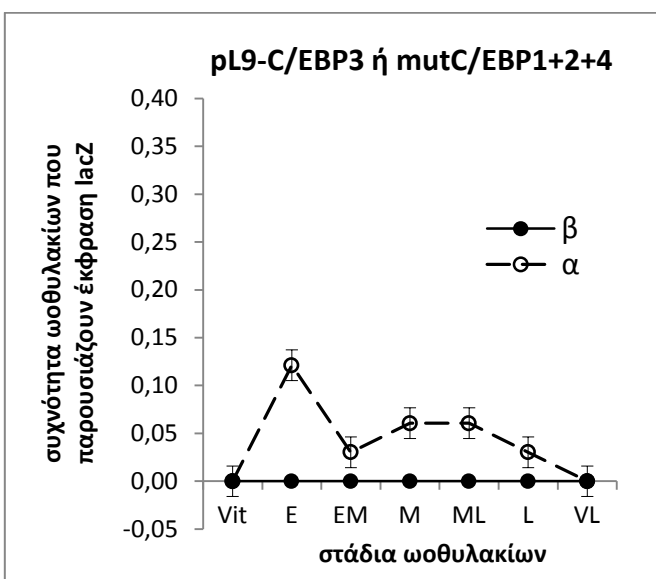
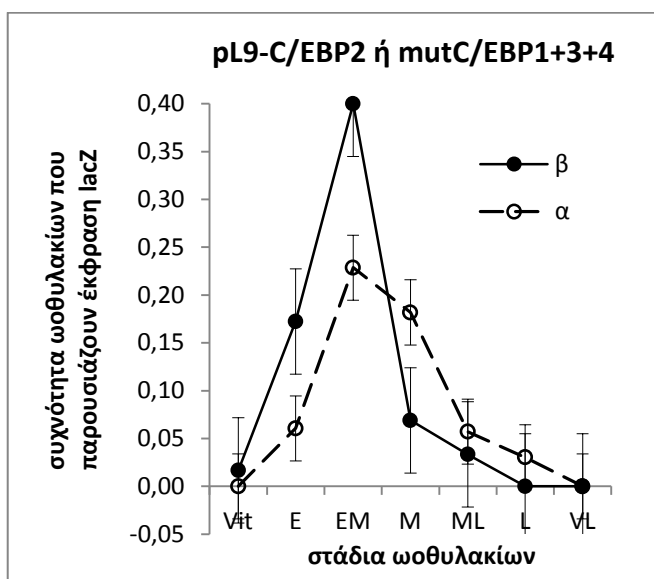
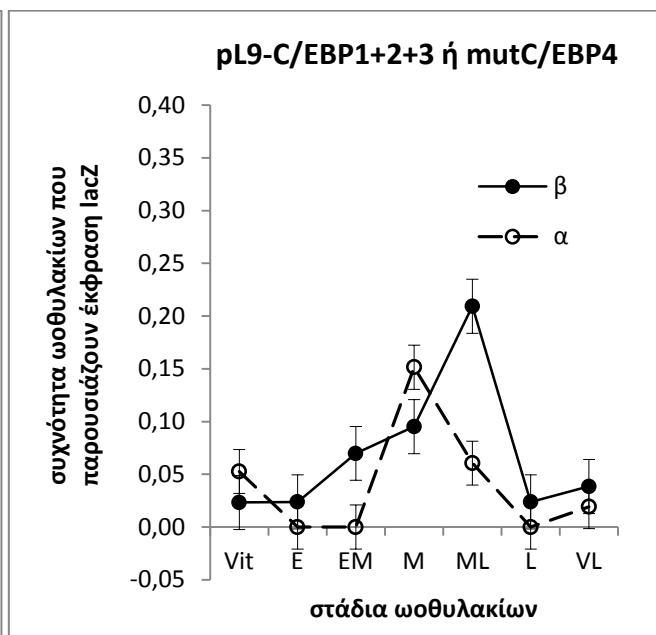
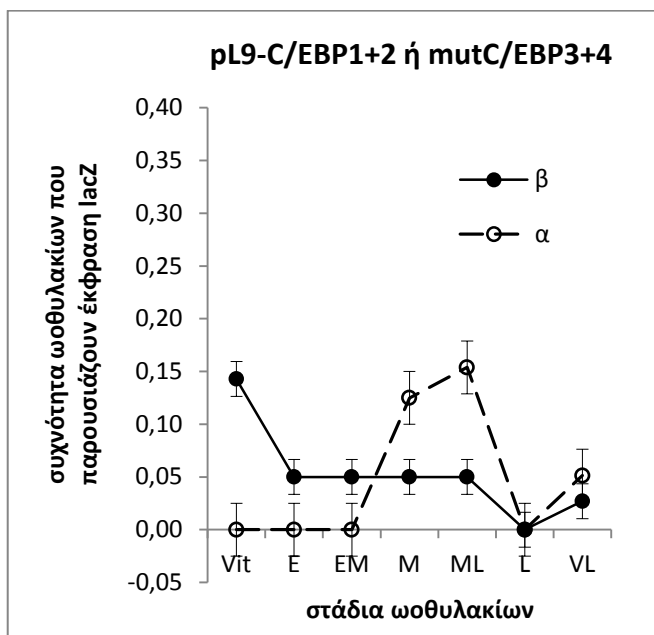
Αποτελέσματα πειραμάτων ηλεκτροδιάτρησης σε μορφή ιστογραμμάτων για κάθε γονιδιακή κατασκευή και προσανατολισμό που εξετάστηκε. (Η ονομασία των γονιδιακών κατασκευών με μεταλλαγμένο τον υποκινητή pL9 σε θέσεις C/EBP αναφέρονται τόσο με τις λειτουργικές θέσεις C/EBP που περιέχουν όσο και με τις μεταλλαγμένες θέσεις C/EBP.)

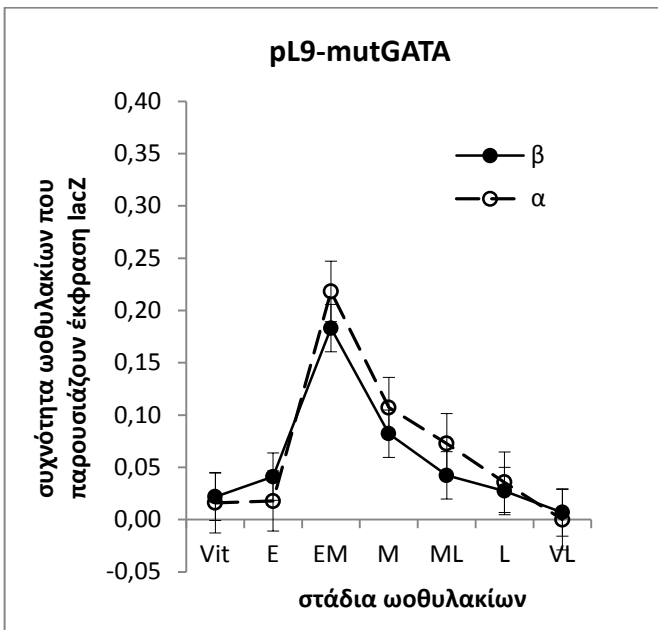
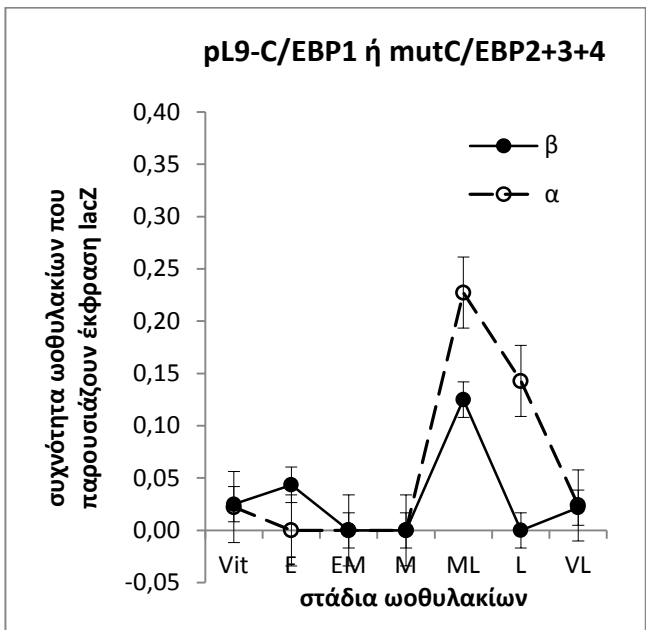












Παράρτημα Δ

Αποτελέσματα στατιστικών ελέγχων (χ^2 - Chi-square tests). ✓ συμβολίζει στατιστικά σημαντική έκφραση του γονιδίου αναφοράς, ✗ μη στατιστικά σημαντική έκφραση μετά από στατιστικούς ελέγχους (χ^2 - Chi-square tests). Οι κατασκευές με * δεν επεξεργάστηκαν στατιστικά διότι δεν έδωσαν κανένα αποτέλεσμα.

υποκινητής	πρόσδεσμοί	Feuils ελέγχος	P-value	Libe ωσπερ σωσείσ	(found)	Δε ύπερος Feuils ελέγχος (A)	P-value	εφέδινε ύπερος	ελέγχος (A)	P-value	Libe ωσπερ σωσείσ (ε ύπερ)	Δε ύπερος Feuils ελέγχος (B)	P-value	εφέδινε ύπερος	ελέγχος (B)	P-value	Libe ωσπερ σωσείσ
p19	α	✓	<0,001	ML	ML	✓	<0,001	✗	<0,001	0,278	M+ML	✓	<0,001	✓	<0,001	0,02	M+ML
p19-mutC/EBP1	α	✓	<0,001	ML	ML	✓	<0,001	✗	<0,001	0,158	M+ML	✓	<0,001	✗	0,123	M+ML	
p19-mutC/EBP1+2	β	✓	<0,001	M	M	✓	<0,001	✗	<0,001	0,018	M+ML	✓	<0,001	✓	0,006	M+ML	
p19-mutC/EBP1+3	α	✓	0,005	L	L	✓	<0,001	✗	<0,001	0,544	M+L	✓	0,001	✓	0,486	L	
p19-mutC/EBP1+4	β	✓	0,003	ML	ML	✓	0,002	✗	<0,001	0,615	M+ML	✓	<0,001	✗	0,287	M+ML	
p19-mutC/EBP1+2+3	α	✓	<0,001	ML	ML	✓	<0,001	✗	<0,001	0,139	EM+ML	✓	<0,001	✗	0,229	ML	
p19-mutC/EBP2	β	✗	0,002	M	M	✓	0,003	✗	<0,001	0,934	M+ML	✓	<0,001	✗	0,079	M+ML	
p19-mutC/EBP2+3	α	✗	0,002	M	M	✓	<0,001	✗	<0,001	0,303	M+ML	✓	<0,001	✗	0,16	M	
p19-mutC/EBP2+4	β	✗	0,149														
p19-mutC/EBP3	α	✗	0,034	L	L	✓	0,003	✗	0,074	0,916	ML+L	✓	<0,001	✗	0,125	ML+L	
p19-mutC/EBP3+4	β	✗	0,116	ML	ML	✗	0,074	✗	<0,001	0,857	ML-VL	✓	0,003	✗	0,19	ML	
p19-mutGATA	α	✓	0,086	ML	ML	✓	<0,001	✗	<0,001	0,108							
p19-mutC/EBP4	β	✗	0,222														
p19-mutC/EBP4+2+4	α	✗	0,07	L	L	✓	0,03	✗	0,623	0,523	ML-L	✓	0,012	✗	0,583	ML-L	
p19-mutC/EBP4+3+4	β	✓	0,001	M	M	✓	0,001	✗	<0,001	0,482	M+ML	✓	<0,001	✗	0,23	M+ML	
p19-mutC/EBP4+2+3+4	α	✓	<0,001	ML	ML	✓	<0,001	✗	<0,001	0,491	EM+ML	✓	<0,001	✗	0,207	EM+ML	
p19-mutHMGCI+II*	α	✓	0,001	ML	ML	✓	<0,001	✗	<0,001	0,288	M+ML	✓	<0,001	✗	0,263	M+ML	
	β	✓	<0,001	ML	ML	✓	<0,001	✗	<0,001	0,155	EM+ML	✓	<0,001	✗	0,1	ML	
	α	✗	0,015	ML	ML	✓	0,004	✗	0,769	0,168	M+ML	✓	<0,001	✗	0,168	M+ML	
	β	✗	0,517	V/T	V/T	✓	0,038	✗	0,317	0,525					0,525		
	α	✓	0,015	M	M	✓	0,001	✗	0,23	0,235	M+ML	✓	0,002	✗	0,235	M	
	β	✓	0,001	ML	ML	✓	<0,001	✗	0,144	0,179	M+ML	✓	<0,001	✗	0,179	ML	
	α	✓	<0,001	EM	EM	✓	<0,001	✗	0,113	0,11	EM+M	✓	<0,001	✗	0,11	EM	
	β	✗	<0,001	EM	EM	✓	<0,001	✗	0,074	0,041	EM+M	✓	<0,001	✗	0,041	EM	
	α	✗	0,051	E	E	✗	0,082	✗	0,413	0,273	E+M	✓	0,004	✗	0,273		
	β	✓	<0,001	EM	EM	✓	<0,001	✗	0,634	0,051	EM+M	✓	<0,001	✗	0,051	EM+M	
	α	✓	<0,001	EM	EM	✓	<0,001	✗	0,054	0,003	E+EM	✓	<0,001	✗	0,003	E+EM	
	β	✓	0,001	ML	ML	✓	<0,001	✗	0,447	0,015	ML+L	✓	<0,001	✗	0,015	ML+L	
	α	✗	0,123	ML	ML	✓	0,003	✗	0,317	0,003	E+ML	✓	<0,001	✗	0,003	ML	

Παράρτημα Ε - Βιογραφικό Σημείωμα

Σωτήρης Π. Τσατσαρούνος
Βιολόγος - Υποψήφιος Διδάκτωρ

Γενικά στοιχεία

Ημερομηνία Γέννησης: 25 Οκτωβρίου 1984

Υπηκοότητα: Ελληνική

Ηλεκτρονική διεύθυνση: tsatsar@biol.uoa.gr

Εκπαίδευση

02/2009-σήμερα: Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής με θέμα «Μοριακή ανάλυση της διαφορικής έκφρασης γονιδίων σε λεπιδόπτερα έντομα». Τομέας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας, ΕΚΠΑ. Επιβλέπουσα καθηγήτρια : Ρ. Λεκανίδου.

03/2008: Πτυχίο Τμήματος Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, ΕΚΠΑ, με βαθμό «Λίαν Καλώς».

2002 : Αποφοίτηση από το 5ο Ενιαίο Λύκειο Κορυδαλλού (πρώην Πολυκλαδικό) με βαθμό 18^{1/10}.

Εκπαιδευτική δραστηριότητα

- **02/2009-σήμερα:** Συμμετοχή στις εργαστηριακές ασκήσεις προπτυχιακών φοιτητών για τα μαθήματα Βιοχημεία II και Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία, Τομέας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας, ΕΚΠΑ.
- **2008-σήμερα:** Διδασκαλία του μαθήματος Βιολογίας σε φροντιστήρια Δευτεροβάθμιας Εκπαίδευσης για το σύστημα των Πανελλαδικών εξετάσεων.

Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά

- Tsatsarounos, S.P., Rodakis, G.C., and Lecanidou, R. Analysis of developmentally regulated chorion gene promoter architecture via electroporation of silk moth follicles. *Insect Mol. Biol* (2014). doi: 10.1111/imb.12136.
- Argyris Papantonis, Sotiris Tsatsarounos, Jozef Vanden Broeck and Rena Lecanidou. CHD1 assumes a central role during silkworm follicular development. *J. Mol. Biol.* (2008) **383**, 957-969.

Ανακοινώσεις σε συνέδρια

- Tsatsarounos P. Sotiris, Rodakis C. George and Lecanidou Rena. 14th FEBS Young Scientists' Forum (YSF) and FEBS EMBO 2014 Conference, Paris, France (2014).
- Tsatsarounos P. Sotiris, Lecanidou Rena. 64th Congress of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, Athens, Greece (2013).
- Tsatsarounos S.P., Lecanidou R. FP7 Marie Curie Initial Training Network, InteGer Conference: Integrated Gene Regulation: from DNA Sequence to Nuclear Structure, Athens, Greece (2012).
- S. Tsatsarounos and R. Lecanidou. 36th FEBS Congress: Biochemistry for Tomorrow's Medicine, Torino, Italy (June 2011). Abstract published in *FEBS Journal* 278: 443.
- A. Papantonis, S. Tsatsarounos and R. LECANIDOU. 8th International Workshop on the Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera, Orthodox Academy of Crete, Kolympari, Greece (2009).
- Papantonis A, Tsatsarounos S, Lecanidou R. 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference: Biochemistry of Cell Regulation, Athens, Greece (2008). *Abstract published in FEBS Journal* 275: 129.

Συμμετοχή σε επιτροπές διοργάνωσης συνεδρίων

2013: Μέλος της οργανωτικής επιτροπής διοργάνωσης του 1ου Πανελληνίου Forum Νέων Επιστημόνων, στα πλαίσια του 63ου Συνεδρίου της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας.

Υποτροφίες

- **2014:** YSF-FEBS Travel Grant.
- **03/2011-σήμερα:** Πρόγραμμα χρηματοδότησης διδακτορικής διατριβής «ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ II» τριετούς διάρκειας, συγχρηματοδοτούμενο από εθνικούς πόρους μέσω του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) και το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ).
- **2011:** FEBS Travel Grant.
- **02/2009-02/2011:** Κληροδότημα Αντωνίου Παπαδάκη για μεταπτυχιακές σπουδές στην Ελλάδα έπειτα από γραπτές εξετάσεις στα μαθήματα Μοριακής Βιολογίας, Ειδικά Κεφάλαια Βιοχημείας και Ειδικά Κεφάλαια Κυτταρικής Βιολογίας.

Πρόσθετα στοιχεία

- Γνώση Αγγλικής γλώσσας: Πολύ καλή (Certificate of Proficiency in English).
- Γνώση Ισπανικής γλώσσας: Στοιχειώδης (επιπέδου Inicial).
- Καλή γνώση χρήσης Η/Υ και διαδικτύου.

Παράρτημα Στ – Εργασίες

ΠΡΩΤΟΤΥΠΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕ ΤΟ
ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΚΡΙΤΩΝ (PEER-REVIEW)

Analysis of developmentally regulated chorion gene promoter architecture via electroporation of silk moth follicles

S. P. Tsatsaronos, G. C. Rodakis and R. Lecanidou

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

Abstract

In the silk moth *Bombyx mori*, chorion genes of the same developmental specificity are organized in divergently transcribed α/β gene pairs, sharing a common 5' flanking promoter region. This bidirectional promoter contains a complete set of *cis*-elements responsible for developmentally accurate gene expression. In the present paper, based on the observation that *Bombyx* chorion gene promoters contain *cis*-elements for the same transcription factors without concrete evidence on which of them are essential, we address the question as to how promoter architecture (number, orientation and position of common factor binding sites) facilitates developmentally accurate chorion gene regulation. To this end, we constructed several mutated promoter regions of an early-middle gene pair and cloned them upstream of a reporter gene to introduce these plasmid constructs into silk moth follicle epithelial cells via electroporation as an efficient and quick method for transient expression. This is the first time that an *ex vivo* method had been applied to test the impact of systematic *cis*-element mutations on a chorion gene promoter. Our results confirmed the importance of the HMGA factor and the role of the GATA factor as an early repressor, and led to a more detailed understanding of which C/EBP sites participate in the regulation of early-middle chorion gene expression.

Keywords: *Bombyx mori*, choriogenesis, gene regulation, bidirectional promoter, C/EBP binding sites, electroporation.

Introduction

Choriogenesis in the domesticated silk moth, *Bombyx mori*, is a useful model system for studying tissue and temporal regulation of gene expression. A key advantage is the presence of progressively more mature follicles in each single ovariole, each follicle being separated by ~2 h of development from its neighbouring one (Swevers & Iatrou, 1992). The eggshell (chorion) proteins of the silk moth are exclusively produced in the epithelial cells that surround the developing oocyte. According to their temporal expression pattern, chorion genes are characterized as early, middle or late (Nadel & Kafatos, 1980; Lecanidou *et al.*, 1986; Kafatos *et al.*, 1987; Hibner *et al.*, 1988). Chorion genes of the same developmental specificity are organized in divergently transcribed α/β gene pairs, sharing a common 5' flanking promoter region (Jones & Kafatos, 1980; Lecanidou *et al.*, 1986; Hibner *et al.*, 1988; Spoerel *et al.*, 1989). Investigation of the mechanism by which bidirectional promoters regulate transcription is of great interest because such gene-pair organization is abundant in many species, such as mouse, yeast, *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*, but also in the human genome (Spellman & Rubin, 2002; Lercher *et al.*, 2003; Trinklein *et al.*, 2004; Koyanagi *et al.*, 2005; Neil *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). In general, the length of bidirectional promoters is <1 kb and at least some of the transcription factor-binding motifs therein are involved in regulating both divergent genes (Adachi & Lieber, 2002; Takai & Jones, 2004; Trinklein *et al.*, 2004). In silk moth chorion gene pairs, the intergenic region is ~250-bp long (Fig. 1A) and contains a complete set of *cis*-elements responsible for developmentally accurate gene expression (Mitsialis & Kafatos, 1985). It is noticeable that all chorion gene promoters contain binding sites for the same transcription factors and in various numbers without concrete evidence

Correspondence: R. Lecanidou, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, National and Kapodistrian, University of Athens, 15701 Athens, Greece. Tel.: +30 2107274362; fax: +30 2107274158, e-mail: rlecanid@biol.uoa.gr



Figure 1. (A) Organization of α/β chorion gene pairs in *Bombyx mori* sharing a bidirectional promoter. (B) Graphic presentation of the A/B.L9 promoter (pL9) representing the number and position of *cis*-elements. Arrows denote the orientation of each binding site.

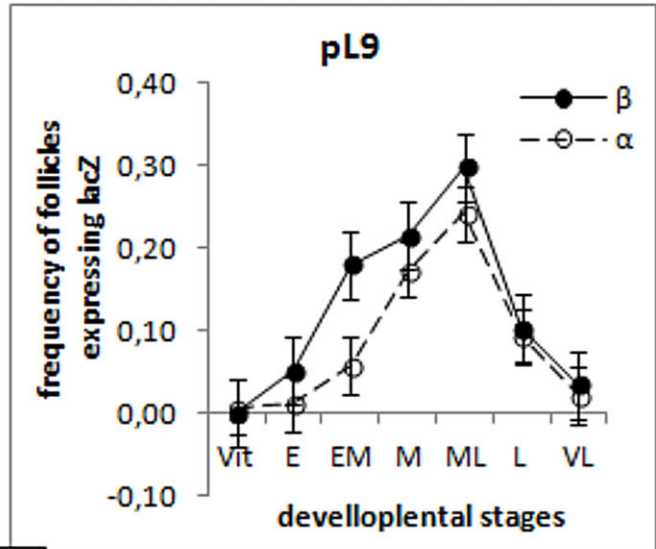
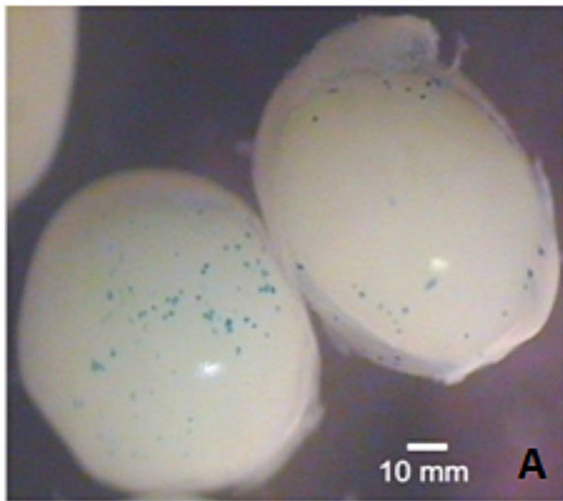
regarding which of them are essential for gene regulation. In more detail, all early promoters contain two to four putative C/EBP sites, except for the ErA/B.4 promoter, which has only one C/EBP site like all late Hc promoters. Middle gene pair promoters (L12-type which are expressed at EM-M developmental stages and L11-type expressed at M-ML stages) contain four putative C/EBP sites (Sourmeli *et al.*, 2003). C/EBP binding sites are of 'early' or 'late' type, with the latter having stronger affinity for the C/EBP protein (Sourmeli *et al.*, 2005b). It may be significant that early promoters contain only early-type C/EBP sites and late promoters only late-type C/EBP sites. Early-middle (L12-type) promoters contain both early- and late-type BmC/EBP sites, whereas middle-late (L11-type) ones only late-type sites. With regard to the number of GATA sites, ErA/B.2 and middle promoters contain only one GATA site; late promoters contain two GATA sites, while the remaining ErA/B promoters contain two or three GATA sites (Sourmeli *et al.*, 2003).

The current model, which describes the developmental regulation of middle genes, implicates both *cis*-elements, harboured in their bidirectional promoter and their corresponding transcription factors (TFs), BmC/EBP, BmHMGA, BmCHD1 and BmGATA β (Lecanidou & Papantonis, 2010b). The BmC/EBP transcription factor is considered both as an activator and a repressor during silk moth choriogenesis (Papantonis *et al.*, 2008a). BmGATA β -binding is possibly related to early repression of early and middle chorion gene expression (Sourmeli *et al.*, 2003; Papantonis *et al.*, 2008c) and late activation of late Hc.A/B chorion gene pairs (Skeiky & Iatrou, 1991; Drevet *et al.*, 1995). BmHMGA-factor-binding to middle chorion gene promoters recruits other TFs (CHD1, BmC/EBP and BmGATA β) and causes bending of the promoter so that the α and β genes of each pair have presumably equal chance of being transcribed (Papantonis *et al.*, 2008c; Lecanidou & Papantonis, 2010a). This model should not be far from the actual sequence of events governing regulation of gene expression; however, many questions remain unanswered. In the present paper, based on the observation that *Bombyx* chorion gene promoters contain *cis*-elements for the same transcription factors, we address the question of how promoter archi-

ture (number, orientation and position of common-factor binding sites) facilitates developmentally accurate chorion gene regulation. To answer this question, we focused on the regulatory region of the early-middle A/B.L9 (L12-type) chorion gene pair (Fig. 1B). We concentrated on this promoter (pL9) because of the considerable accumulation of data from recent studies (Spoerel *et al.*, 1993; Lecanidou & Papantonis, 2010a). To this end, we constructed several mutated A/B.L9 promoter regions and cloned them upstream of a reporter gene in order to introduce these plasmid constructs into silk moth follicle epithelial cells. The methods that have been used for transient expression of cloned moth genes are heterologous transformation in *Drosophila* using P-element vectors (Mitsialis & Kafatos, 1985), transduction using nuclear polyhedrosis virus vectors (Iatrou & Meidinger, 1990), microinjection of plasmid-carried genes in *Bombyx* embryos (Nikolaev *et al.*, 1993), the application of biolistic for the transformation of embryos and gonads (Thomas *et al.*, 2001), silk glands (Horard *et al.*, 1994), silkworm follicle epithelial cells (Kravariti *et al.*, 2001) or larval and pupal tissues (Thomas *et al.*, 2001), and electroporation in *B. mori* embryonic tissues and in larval tissues such as ovaries or epithelial cells of larval imaginal wing discs (Thomas, 2003). In the present paper, we used and optimized the electroporation technique as an efficient and quick method for transient expression of plasmid constructs in *Bombyx mori* follicular epithelial cells instead of the biolistic method (Kravariti *et al.*, 2001). This is the first time that an *ex vivo* method has been applied to study in a systematic way the impact of *cis*-elements mutations in silk moth chorion gene regulation.

Results and discussion

To determine the *lacZ* expression pattern under the control of each promoter construct, we staged follicles to seven developmental stages (see Experimental procedures) from a minimum of five ovarioles, used them separately in an electroporation assay, and calculated the frequency of follicles expressing the reporter gene (Fig. 2A) in each developmental stage. The results are



B

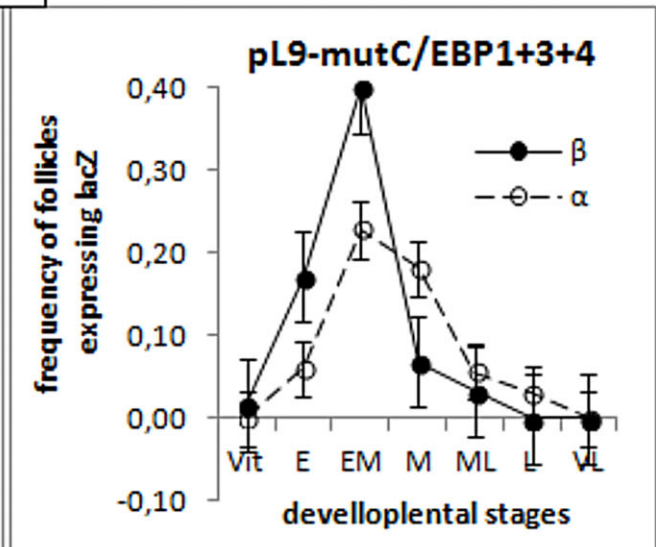
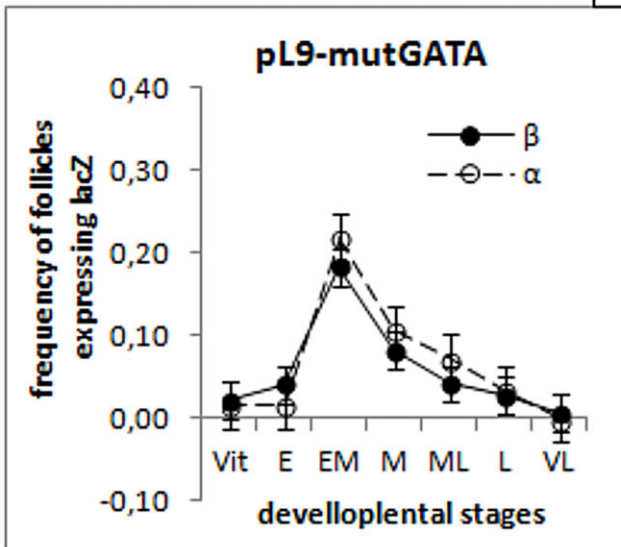


Figure 2. (A) Electroporated follicles. Each blue spot corresponds to one epithelial cell that has expressed the *lacZ* reporter gene. (B) Expression patterns in histogram form for pL9, mutGATA and mutC/EBP1+3+4 promoter constructs and for both orientations (α and β). Bars represent the standard error (SE).

shown in histogram form (see Supporting Information and Fig. 2B, where a few representative histograms obtained from the control pL9 and the constructs mutGATA and mutC/EBP1+3+4 are shown). To indicate which of the obtained developmental stage levels were the most probable for each construct and orientation tested, we applied a series of statistical tests (chi-squared tests). The results of the statistical analysis are shown in Fig. 3. Specifically, for each construct, we first applied a general statistical test (GT) to prove that there was significant difference ($P < 0.05$) between the developmental stage levels. If the null hypothesis was rejected, we proceeded to create a

threshold so as to prove that one or more developmental stage levels were the most probable ($P < 0.05$); therefore, for each construct we compared the most probable developmental stage level (based on the histograms) with all the remaining levels grouped into one category [subsequent general test 1 (SGT1)]. If this null hypothesis was rejected, we next compared it with the second-highest level [subsequent specific test 1 (SST1)]. If both tests results led us to reject the null hypothesis, we accepted the developmental stage level as statistically important. If no statistical difference was noticed, we compared the two most probable developmental stage levels (based on the

construct	Gene	General Test (GT)	P-value	Highest DS (solo)	SGT1	P-value	SST1	P-value	Two Highest DS (couple)	SGT2	P-value	SST2	P-value	Statistically Highest DS
pL9	α	✓	<0.001	ML	✓	<0.001	✗	0,278	M+ML	✓	<0,001	✓	0,02	M+ML
	β	✓	<0.001	ML	✓	<0.001	✗	0,158	M+ML	✓	<0,001	✗	0,123	M+ML
pL9-mutC/EBP1	α	✓	<0.001	ML	✓	<0.001	✓	0,018	—	—	—	—	—	ML
	β	✓	<0.001	M	✓	<0.001	✗	0,544	M+ML	✓	<0,001	✓	0,006	M+ML
pL9-mutC/EBP1+2	α	✓	0,005	L	✓	<0.001	✗	0,284	M+L	✓	0,001	✗	0,486	L
	β	✓	0,003	ML	✓	0,002	✗	0,615	M+ML	✓	<0,001	✗	0,287	M+ML
pL9-mutC/EBP1+3	α	✓	<0.001	ML	✓	<0.001	✗	0,139	EM+ML	✓	<0,001	✗	0,229	ML
	β	✓	0,002	M	✓	0,003	✗	0,934	M+ML	✓	<0,001	✗	0,079	M+ML
pL9-mutC/EBP1+4	α	✓	0,002	M	✓	<0.001	✗	0,303	M+ML	✓	<0,001	✗	0,16	M
	β	✗	0,149	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
pL9-mutC/EBP1+2+3	α	✓	0,003	L	✓	0,003	✗	0,916	ML+L	✓	<0,001	✗	0,125	ML+L
	β	✗	0,334	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
pL9-mutC/EBP2	α	✗	0,116	ML	✗	0,074	✗	0,857	ML-VL	✓	0,003	✗	0,19	—
	β	✗	0,086	ML	✓	<0.001	✗	0,108	—	—	—	—	—	ML
pL9-mutC/EBP2+3	α	✗	0,222	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	β	✗	0,07	L	✓	0,03	✗	0,623	ML-L	✓	0,012	✗	0,583	ML-L
pL9-mutC/EBP2+4	α	✓	0,001	M	✓	0,001	✗	0,482	M+ML	✓	<0,001	✗	0,23	M+ML
	β	✓	<0.001	ML	✓	<0.001	✗	0,491	EM+ML	✓	<0,001	✗	0,207	EM+ML
pL9-mutC/EBP3	α	✓	0,001	ML	✓	<0.001	✗	0,288	M+ML	✓	<0,001	✗	0,263	M+ML
	β	✓	<0.001	ML	✓	<0.001	✗	0,155	EM+ML	✓	<0,001	✗	0,1	ML
pL9-mutC/EBP3+4	α	✓	0,015	ML	✓	0,004	✗	0,769	M+ML	✓	<0,001	✗	0,168	M+ML
	β	✗	0,517	Vit	✓	0,038	✗	0,317	—	✗	0,111	✗	0,525	—
pL9-mutC/EBP4	α	✓	0,015	M	✓	0,001	✗	0,23	M+ML	✓	0,002	✗	0,235	M
	β	✓	0,001	ML	✓	<0.001	✗	0,144	M+ML	✓	<0,001	✗	0,179	ML
pL9-mutGATA	α	✓	<0.001	EM	✓	<0.001	✗	0,113	EM+M	✓	<0,001	✗	0,11	EM
	β	✓	<0.001	EM	✓	<0.001	✗	0,074	EM+M	✓	<0,001	✓	0,041	EM
pL9-mutC/EBP1+2+4	α	✗	0,051	E	✗	0,082	✗	0,413	E+M	✓	0,004	✗	0,273	—
	β*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
pL9-mutC/EBP1+3+4	α	✓	<0.001	EM	✓	<0.001	✗	0,634	EM+M	✓	<0,001	✗	0,051	EM+M
	β	✓	<0.001	EM	✓	<0.001	✗	0,054	E+EM	✓	<0,001	✓	0,003	E+EM
pL9-mutC/EBP2+3+4	α	✓	0,001	ML	✓	<0.001	✗	0,447	ML+L	✓	<0,001	✓	0,015	ML+L
	β	✗	0,123	ML	✓	0,003	✗	0,317	E+ML	✓	<0,001	✓	0,003	ML
pL9-mutC/EBPAII*	α	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	β	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
pL9-mutHMGII*	α	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	β	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Figure 3. Tabular presentation of the results during the application of a series of statistical tests (chi-squared tests). For more details see the Results and discussion section. Constructs marked with (*) were not statistically tested because they never produced expression of the reporter gene.

histograms) with all other remaining levels grouped into one category [subsequent general test 2 (SGT2)] and next we compared them with the third-highest level [subsequent specific test 2 (SST2)]; if both test results led us to reject the null hypothesis, we accepted those groups as statistically important. Figure 4 summarizes the results after application of the statistical tests (GT, SGT1, SST1, SGT2 and SST2).

The role of HMGA and GATA recognition sites

Previous studies from our laboratory have shown that the BmHMGA factor is a key player in middle chorion gene regulation (Papantonis *et al.*, 2008c; Lecanidou & Papantonis, 2010a). As mentioned above, the HMG protein does not only interact with other TFs (C/EBP,

GATA, CHD1) but also causes bending of the promoter region, which presumably facilitates promoter activation. In the present study, it was found that mutation of the HMGA recognition site completely inactivated pL9, as expected. This validates the importance of the HMGA factor in the regulation of early-middle chorion gene expression. Furthermore, mutation of the GATA recognition site caused for both orientations a shift of expression toward earlier stages (EM) compared with the control. This result confirms the hypothesis that the GATA factor behaves as an early repressor of middle chorion genes (Sourmeli *et al.*, 2003; Papantonis *et al.*, 2008c), as preventing its binding on the promoter resulted in earlier expression of the genes. The above expression patterns, produced from mutGATApL9-lacZ and mutHMGpL9-lacZ constructs (Fig. 4), confirm that the electroporation

contained C/EBP sites	α -type gene							promoter	β -type gene							mutated C/EBP sites
	Vit	E	EM	M	ML	L	VL		Vit	E	EM	M	ML	L	VL	
all																pL9
all (mutHMG)	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	none (mutHMG)
none	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	all
3	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	mut1+2+4
all (mutGATA)																none (mutGATA)
2																mut1+3+4
1+3																mut2+4
2+4																mut1+3
3+4																mut1+2
2+3+4																mut1
1+2+3																mut4
1+2+4																mut3
1																mut2+3+4
4									X	X	X	X	X	X	X	mut1+2+3
2+3									X	X	X	X	X	X	X	mut1+4
1+2									X	X	X	X	X	X	X	mut3+4
1+3+4	X	X	X	X	X	X	X									mut2
1+4	X	X	X	X	X	X	X									mut2+3

Figure 4. Tabular presentation of the expression pattern for each construct and each orientation after application of a series of statistical tests (chi-squared tests). Blank and X-marked boxes denote expression that was not statistically significant. Dark blue boxes indicate the stages with the highest expression level and light blue boxes those with the second highest expression level. The 'promoter' column is a graphic presentation of each A/B.L9 promoter construct.

method can be used to deduce the role of specific binding sites in gene expression.

It should be mentioned that the wild-type A/B.L9 promoter construct, which was used as the control, produced M-ML expression patterns for both orientations (α and β). These were similar to the transcription pattern produced by RNA dot blot experiments (Spoerel *et al.*, 1986); the slight shift observed could be attributed to the fact that constructs used to electroporate epithelial cells do not exactly simulate the *in vivo* state, because it is not clear to what extent these are chromatinized.

The role of C/EBP recognition sites

The contribution of C/EBP binding sites to temporal specificity may be deduced from the results shown in Table 1, where pL9 constructs bearing mutations on C/EBP recognition sites, which were able to express the reporter gene at the correct developmental stage (M-ML), were compared with the control (pL9) in either direction. These constructs are presented as three groups depending on the total number of C/EBP sites they contain. As non-mutated pL9 was able to regulate transcription in a divergent manner, we focused on constructs which could regulate both α - and β -type genes. In Group I (constructs that contain only one C/EBP site) the only construct able to express both genes was pL9 containing the C/EBP1 site; however, although constructs containing C/EBP1+2, C/EBP1+4 and C/EBP1+3+4 include the C/EBP1 site,

they were unable to initiate gene expression in both directions. It appeared, therefore, that more than one C/EBP binding site is required for statistically significant and temporally correct divergent gene expression. In Group II (constructs that contain two C/EBP sites) the only two constructs able to regulate expression in both directions were the ones containing C/EBP1+3 and C/EBP2+4 sites. Interestingly, these two constructs contain C/EBP sites of

Table 1. pL9 constructs expressing the reporter gene at the correct developmental stage (M-ML) compared with the control (pL9), in either direction

Group	Non-mutated C/EBP sites	α -type gene	β -type gene
I	1	+	+
	2	+	-
	4	+	-
II	1+2	+	-
	1+3	+	+
	1+4	-	+
	2+3	+	-
	2+4	+	+
III	3+4	-	+
	1+2+3	+	+
	1+2+4	+	+
	1+3+4	-	+
	2+3+4	+	+

'+' stands for positive expression, '-' for non-statistically significant expression after application of a series of statistical tests (chi-squared tests). Constructs are presented as three groups depending on the total number of C/EBP sites they contained.

the same orientation on the A/B.L9 promoter (Fig. 1B). In Group III (constructs that contain three C/EBP sites), constructs containing C/EBP1+2+3, C/EBP1+2+4 and C/EBP2+3+4 expressed both genes. As these three constructs include the C/EBP site combinations 1+3 and 2+4, it is likely that the minimum C/EBP sites required for correct chorion gene expression are C/EBP1+3 or C/EBP2+4.

The role of C/EBP1 and C/EBP2 recognition sites

Previous data from our laboratory have shown that, at the onset of A/B.L9 gene-pair transcription, a nucleosome positioned on the α -half of the promoter moved towards the α -type gene exposing the C/EBP1 and C/EBP2 binding sites (Papantonis *et al.*, 2008b); therefore, it was only reasonable to assume that one (or both) of these sites were responsible for transcriptional activation. However, as the distance between the centres of C/EBP1 and C/EBP2 sites is only 11 nucleotides, and as the C/EBP protein interacts with ~16 nucleotides upon binding to its cognate sequence (Vinson *et al.*, 1989), it was inferred that the C/EBP1 and C/EBP2 binding sites cannot be simultaneously occupied by the respective transcription factor. This is also confirmed from the electroporation-produced expression patterns using constructs expressing the α -reporter gene; pL9 containing C/EBP1 was expressed at the ML-L stages and pL9 containing C/EBP2 at the EM-M stages, while pL9 containing C/EBP1+2 was expressed at the M-ML stages, i.e. in between the two stages (EM to L). In fact, we noticed that, in each ovariole used for electroporation with the C/EBP1+2 construct, expression was observed either at the EM-M stages or at the ML-L stages, obviously as a result of the C/EBP factor binding to the C/EBP2 or the C/EBP1 site, (data not shown). In addition, promoters containing C/EBP1 or C/EBP2 were able to initiate transcription in both directions, but the only construct able to express both genes at the EM stage was the one containing the C/EBP2 site (Fig. 4). This expression pattern is consistent with the transcription pattern produced by RNA dot blot experiments (Spoerel *et al.*, 1986), which show that the A/B.L9 promoter is active during the EM-M stages. In other words, the construct bearing only C/EBP2 resembles the *in vivo* transcriptional behaviour of the A/B.L9 promoter.

The role of C/EBP3 and C/EBP4 recognition sites

As has already been mentioned, non-mutated pL9 was able to work in both directions; thus we focused on constructs which could express the reporter gene in both directions. Comparison of constructs containing C/EBP combinations 1+3+4 and 2+3+4 showed that only the

C/EBP2+3+4 construct could express both genes (Table 1). The pL9 construct containing C/EBP2+3+4 produced a delayed expression pattern compared to the *in vivo* one or to the pattern produced by the pL9 construct containing only C/EBP2. This shift should be accredited to C/EBP3 or C/EBP4 or both sites. A construct containing only C/EBP3 was unable to activate transcription in both directions; moreover, mutation of the C/EBP3 site (i.e. C/EBP1+2+4 construct) left the expression pattern of either orientation unchanged compared with the control. However, although pL9 containing C/EBP4 could activate transcription only towards the α -orientation at the ML-L stages, pL9 containing C/EBP2+4 produced the same expression patterns, in both directions, as in the case of pL9 containing C/EBP2+3+4 sites. It thus appeared that C/EBP3 was 'neutral', whereas C/EBP4 was important for fine tuning of A/B.L9 gene expression. These findings are consistent with previous data, which show that a nucleosome present in the β -half of the A/B.L9 promoter preserved its position during choriogenesis (Papantonis *et al.*, 2008b). This nucleosome is possibly positioned in such a way that the C/EBP3 site lies at the nucleosome core DNA, thus being inaccessible to the corresponding factor [but see Zaret & Carroll (2011) and Struhl & Segal (2013)]. The C/EBP4 site may be more accessible, however, because of its position at the right nucleosome border. The shift to later developmental stages observed *ex vivo* (electroporation) compared with the *in vivo* expression pattern (RNA dot blots) may be attributed to the presence of the nucleosome in the latter case, in contrast to the unknown chromatin structure in the electroporation experiments.

How the A/B.L9 bidirectional promoter regulates the corresponding chorion gene pair

As presented above, it appears that the mechanism that regulates A/B.L9 gene expression implicates both promoter architecture and its chromatin structure. During vitellogenesis two nucleosomes are harboured on the A/B.L9 promoter *in vivo*, hindering the transcriptional activation of both α -type and β -type genes. One nucleosome (Na) lies on the α -half of the promoter and the other (Nb) on the β -half (Papantonis *et al.*, 2008b) (Fig. 5A). In the beginning of choriogenesis Na moves (~20 bp) towards the α -type gene, while Nb retains its position (Papantonis *et al.*, 2008b). The Na shift occurs after binding of the HMGA factor which subsequently recruits the CHD1 factor, a chromatin remodeller (Fig. 5B). Later on, HMGA not only causes bending of the A/B.L9 promoter but also recruits the C/EBP transcriptional factor to initiate transcription in either direction (Fig. 5C). Knowing that pL9 becomes active at the EM choriogenic stages we concluded that Na movement exposes the C/EBP1 and

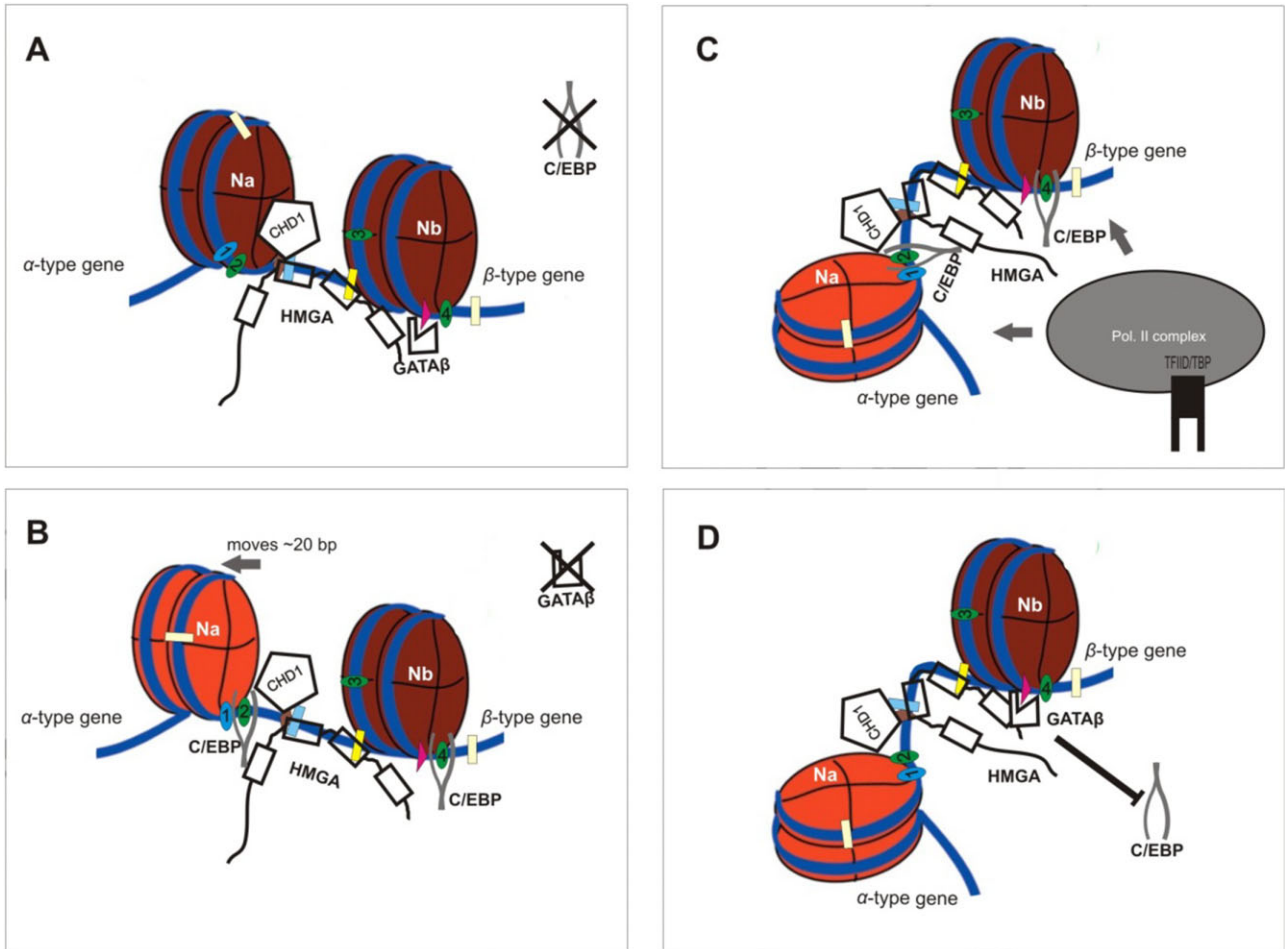


Figure 5. Schematic presentation of the sequential events which regulate the A/B.L9 chorion gene pair. (A) At vitellogenesis two nucleosomes repress gene transcription in combination with GATA-factor binding. During early choriogenesis HMGA-factor binding recruits CHD1 chromatin remodeler. (B) At early-middle choriogenesis Na moves (~20 bp) towards the α -type gene and exposes the C/EBP2 binding site. The C/EBP factor also binds at the C/EBP4 site even though Nb retains its position. (C) The HMGA factor causes $\sim 95^\circ$ bending (Papantonis *et al.*, 2008c) of pL9 and C/EBP factors can be properly positioned in order to interact with the RNA pol II complex and initiate transcription in either direction. (D) At late choriogenesis, because of the GATA factor concentration increase, GATA-factor rebinding antagonizes C/EBP-factor binding and permanently represses the A/B.L9 promoter.

C/EBP2 binding sites. As already mentioned, these two sites cannot be simultaneously occupied because of their close distance (~ 11 nt), and the C/EBP2 site is involved in the transcription of both genes at the EM stage. Preference of the C/EBP2 site over C/EBP1 by the C/EBP protein may be related to the stronger affinity of the late-type C/EBP2 site, compared with the early-type C/EBP1 site (Sourmeli *et al.*, 2005b), as well as to the fact that, during movement of the Na towards the α -type gene, C/EBP2 is the first site to be exposed.

In addition, our electroporation experiments revealed that the C/EBP2 site alone cannot regulate the fine tuning of chorion gene expression. As mentioned above, the C/EBP4 site appeared necessary for expression at the M stage, since the C/EBP3 binding site appeared to be 'neutral'. This conclusion is in accordance with the *in vivo*

state, where Nb (146 bp nucleosomal DNA) occupies the pL9 region, which extends from the HMG-I site to the β -TATA site, fully blocking the C/EBP3 binding site [but see Zaret & Carroll (2011)]. The GATA and C/EBP4 sites, at the right border of the nucleosomal DNA, however, might be less accessible (Koerber *et al.*, 2009). Our data indicate that during vitellogenic and early choriogenic stages the GATA factor acts as a repressor, as its binding on the A/B.L9 promoter inhibits expression of the corresponding genes (Fig. 5A); however, during early-middle choriogenesis, when the C/EBP factor concentration increases, the C/EBP4 binding site is preferred to the GATA site (as a result of low GATA factor concentration) and, in collaboration with C/EBP-factor binding on the C/EBP2 site, gene expression occurs at the correct developmental stages (Fig. 5A,B). Later on, during late

choriogenesis, GATA factor concentration increases again (Drevet *et al.*, 1995; Eystathioy *et al.*, 2001) and binding at the corresponding site deactivates the A/B.L9 promoter (Fig. 5D).

Concluding remarks

The vast majority of silk moth chorion genes are organized in divergently transcribed pairs of the same developmental specificity, which share a common bidirectional promoter. These promoters contain the same transcription factor *cis*-elements but in different numbers, positions and orientations (Sourmeli *et al.*, 2003). To investigate the contribution of each binding site to temporal gene specificity, we constructed a series of mutated promoters of an early-middle chorion gene pair (A/B.L9) and used them in an electroporation-based transient expression method for *ex vivo* developing follicles.

In the present system, electroporation experiments confirmed that binding of an architectural factor (HMGA) at the middle of the bidirectional A/B.L9 promoter is crucial not only for bending the promoter (Papantonis *et al.*, 2008c), so that transcription may be initiated in divergent directions, but also for recruiting the main regulation factor (C/EBP). In addition, they further showed that at least two C/EBP sites, on both sides of the HMGA-binding site, and with the same orientation (C/EBP site combinations 1 + 3 or 2 + 4) were important for correct divergent expression. As already discussed, however, the C/EBP2+4 combination must be more important for regulation of the A/B.L9 pair because the present results indicate that the C/EBP2 site is preferred to the C/EBP1 site, C/EBP3 is neutral and the C/EBP4 site is necessary for accurate gene expression. The location and orientation of the C/EBP sites appear to be crucial so that the C/EBP factors can be properly positioned and are able to interact with the RNA pol II complex, placing it on either (α or β) TATA site (Fig. 5C). Also, nucleosome positioning, structure and composition, play an important role in gene regulation; two nucleosomes positioned on pL9 are responsible for the developmentally accurate gene expression (Papantonis *et al.*, 2008b), one nucleosome is remodelled to expose the C/EBP2 binding site while the other one, being static, partially hinders the GATA and C/EBP4 binding sites whose role is ancillary for the fine tuning of the A/B.L9 chorion gene expression.

In our laboratory we have acquired detailed knowledge on almost all silk moth gene-pair promoter architecture (Sourmeli *et al.*, 2003) as well as exhaustive data from *in vitro* and *in vivo* experiments (Sourmeli *et al.*, 2003, 2005a, 2005b; Papantonis *et al.*, 2008c, 2008b, 2008a; Papantonis & Lecanidou, 2009; Lecanidou & Papantonis, 2010b, 2010a). Our present analysis of the role of specific *cis*-elements on the A/B.L9 promoter via electroporation

opens the way for deciphering silk moth chorion gene pair regulation as a whole. This is quite feasible through the use of representative promoters belonging to gene pairs of different developmental specificities, systematically performing *cis*-element mutations and electroporation experiments on them, in conjunction with the use of other methods for the determination of nucleosome positioning, such as FAIRE-seq, ChIP-exo and primer extension of mononucleosomal DNA (Giresi *et al.*, 2007; Papantonis *et al.*, 2008b; Rhee & Pugh, 2012).

Experimental procedures

Cloning the full length A/B.L9 promoter region upstream of the lacZ reporter gene

The *lacZ* cassette was cloned into the *Hind*III and *Pst*I restriction sites of the *pUC* 9 vector, with the 5' end next to the *Pst*I site. Using the primers A/B.L9fullF(R1): 5'-GGAATTCGACGGAG AATGCTACTACTG-3' and A/B.L9fullR(R1): 5'-GGAATTCACCTCAGAATGAGTTCGATGTC-3' we amplified by PCR the full-length A/B.L9 promoter region (between the transcription start sites of the α - and β -type chorion genes) and cloned it into the *Sma*I restriction site of the *lacZ* cassette/*pUC* 9 vector by blunt end ligation. We chose two clones with the A/B.L9 promoter in opposite orientation, so that the *lacZ* gene stands in for either the α - or the β -type chorion gene.

Construction of mutated A/B.L9 promoters

To construct differentially mutated A/B.L9 promoters, we had to create appropriate mutagenic primers. GATA transcriptional factor recognizes sequence 5'-A/GGATAA/G-3', which we mutated into sequence 5'-A/GCTGTA/G-3' (mutated nucleotides are underlined). Transcriptional factor HMGA recognizes and binds to two consecutive sequences (HMG-I and HMG-II), whose interval distance is ~20 bp. The HMG-I sequence is 5'-ARARWAAYTYT-3' (W = A/T, R = A/G, Y = C/T) while the HMG-II sequence is 5'-WAKYATTTW-3' (K = G/T). These two sequences must have the same orientation for HMGA-factor binding (Bustin, 2001). To ensure that HMGA would not bind on pL9 we mutated both sequences as follows: mutHMG-I: 5'-AAAAACCAGGCT-3' and mutHMG-II: 5'-TATCCCCGA-3'. Finally, there are two types of C/EBP binding sites, early-type and late-type, with consensus sequences 5'-TKNNGYAAB-3' (N = A/T/G/C) and 5'-TKNNGAAAB-3' (B = T/G/C) respectively. EMSA experiments with mutated competitors showed that the most important nucleotides for C/EBP factor binding are the first two and the 6th, 7th and 8th (Sourmeli *et al.*, 2003); therefore, the above sequences were changed to 5'-CANNGYAAB-3' or 5'-TKNNGTGGG-3' in order to block C/EBP factor binding (Sourmeli *et al.*, 2003). The mutagenic primers used are presented below:

mutGATApL9F: 5'-GTCACGTTTTTGGACTGTGGACACTTGAG-3'
mutGATApL9R: 5'-CTCAAGTGTCCACAGTCAAAAACGTGAC-3'
mutHMGIpL9F: 5'-GTAGAATTGTAAAAACCAGGCTTTTTCTTG-3'
mutHMGIpL9R: 5'-CAAGGAAAAAGCCTGGTTTTTCCACAATTCAC-3'

mutHMGIIpL9F: 5'-GACACGTATCCCCGAGCTGTCTCC-3'
 mutHMGIIpL9R: 5'-GGAGACAGCTCGGGGATACGTGTC-3'
 mutCEBP1pL9F: 5'-GGGCGATTACGATGAAGTTTTGAAATG-3'
 mutCEBP1pL9R: 5'-CATTTCAAAACCTCATCGTAATCGCCC-3'
 mutCEBP2pL9F: 5'-GCGATTACGACAAAGCATTGAAATGTAG-3'
 mutCEBP2pL9R: 5'-CTACATTTCAATGCTTTGTCGTAATCGC-3'
 mutCEBP3pL9F: 5'-CATTATACAAAACCTCACAAAGGTACAG-3'
 mutCEBP3pL9R: 5'-CTGTACCTTGTGAGGTTTTGTATGAATG-3'
 mutCEBP4pL9F: 5'-GGACACTTGAGTGGTATTCCGTATAAAA-3'
 mutCEBP4pL9R: 5'-GTTTTATACGGAATACCACTCAAGTGTCC-3'
 mutCEBP1+2pL9F: 5'-GCGATTACGATGAAGCATTGAAATGTAG-3'
 mutCEBP1+2pL9R: 5'-CTACATTTCAATGCTTCATCGTAATCGC-3'

The fullpL9-*lacZ* constructs (α and β) were used as template for site-directed mutagenesis in order to create the mutGATApL9-*lacZ*, mutHMG(I)pL9-*lacZ*, mutC/EBP1pL9-*lacZ*, mutC/EBP2pL9-*lacZ*, mutC/EBP3pL9-*lacZ* and mutC/EBP4pL9-*lacZ* constructs. These single-site mutated constructs (α and β) were used as template for site-directed mutagenesis in order to create the mutHMG(I+II)pL9-*lacZ*, mutC/EBP1+2pL9-*lacZ*, mutC/EBP1+3pL9-*lacZ*, mutC/EBP1+4pL9-*lacZ*, mutC/EBP2+3pL9-*lacZ*, mutC/EBP2+4pL9-*lacZ*, mutC/EBP3+4pL9-*lacZ* constructs. Then, the above double-site mutated constructs (α and β) were used as template for site-directed mutagenesis in order to create the mutC/EBP1+2+3pL9-*lacZ*, mutC/EBP1+2+4pL9-*lacZ*, mutC/EBP1+3+4pL9-*lacZ* and mutC/EBP2+3+4pL9-*lacZ* constructs. Finally, the mutC/EBP1+2+3pL9-*lacZ* constructs (α and β) were used as template for site-directed mutagenesis in order to create the mutC/EBPallpL9-*lacZ* construct. In each case, after the PCR reaction, parental methylated and hemimethylated strands were digested with *DpnI* restriction enzyme. Competent cells were transformed by the mutated plasmids for nick repair and propagation. All mutated clones were verified by DNA sequencing. All the above constructs were used in an electroporation-based transient expression method for *ex vivo* developing follicles.

It must be pointed out that when referring to constructs containing C/EBP sites, these refer only to non-mutated ones (while those not mentioned are considered to be mutated).

Electroporation assay

We used the following solutions and reagents: Ringer, phosphate-buffered saline (PBS), Grace's insect medium (Gibco, Paisley, UK), gentamycin (Gibco), fetal bovine serum (Gibco), electroporation buffer (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.5 mM Na₂HPO₄, 2.1 mM Hepes, pH 7.1), 37% formaldehyde solution, X-gal (20 mg/mL) and X-gal staining solution (15 mM potassium ferrocyanide [K₄Fe(CN)₆], 15 mM potassium ferricyanide [K₃Fe(CN)₆], 2 mM MgCl₂, 1 mg/ml X-gal).

Seven-day-old female pupae of *B. mori* A106xDaizo strain were dissected and the follicles of the isolated intact developing ovarioles (eight in each pupa) were staged (Nadel & Kafatos, 1980) in Ringer solution. Vitellogenic follicles were pooled

together (Vit), and choriogenic follicles were divided into six developmental stages: early (E), early-middle (EM), middle (M), middle-late (ML), late (L) and very late (VL). Each stage from E to L contained 10% of choriogenic follicles, while the VL stage contained 20%. The last 30% of choriogenic follicles and all mature eggs were discarded.

Follicles from each developmental stage were washed with Grace's medium and then were put separately in 4-mm gap cuvettes with a 200- μ l electroporation buffer volume containing 0.3 μ g/ μ l DNA-plasmid construct. The optimized electroporation parameters were 250 Volts/cm, 25 ms, 2–3 pulses. Next, follicles were placed in tissue culture plates for incubation at 25°C, for 24 h, in Grace's medium with 10% fetal bovine serum and 0.5% gentamycin. After incubation was completed, follicles were washed once with PBS solution, were fixed with 0.5% formaldehyde in PBS and then washed again three times with PBS solution before incubating overnight in the presence of 1 mg/mL X-gal staining solution, at 37°C. At the end of the staining procedure, follicles were washed twice with Ringer solution and observed under an optical stereoscope for blue spots at their surface (Fig. 2A).

Data analysis

To indicate which of the obtained developmental stage levels were the most probable for each construct and orientation tested, we applied a series of statistical tests (chi-squared tests). For more details see results and discussion and Fig. 3.

General tests hypotheses:

- Ho: $p_1 = p_2 = \dots = p_7$,
 - H₁: At least one p_i different from the others,
- where p_i is the probability of follicles expressing the *lacZ* gene at the corresponding group and $i = 1, \dots, 7$ denoting the different developmental stage.

Subsequent general tests hypotheses (SGT1 and SGT2):

- Ho: $p_{\text{Top}} = p_{\text{Rest}}$,
 - H₁: p_{Top} not equal to p_{Rest} ,
- where p_{Top} = probability of the highest or the two higher developmental stage levels depending on the current step of the procedure, p_{Rest} = probability of the remaining levels.

Subsequent specific tests hypotheses (SST1 and SST2):

- Ho: $p_{\text{Top}} = p_{\text{Next}}$,
 - H₁: p_{Top} not equal to p_{Next} ,
- where p_{Top} = probability of the highest or the two-higher developmental stage levels, depending on the current step of the procedure, p_{Next} = probability of the second or third higher developmental stage level, depending on the current step of the procedure.

Acknowledgements

The authors would like to thank S.G. Dedos for providing *B. mori*, A.D. Velentzas for excellent technical support with the optical stereoscope, and K.N. Pateras for help with the statistical analysis. This research was co-financed by the European Union (European Social Fund – ESF) and Greek national funds through the Operational Program 'Education and Lifelong Learning' of the National Strategic Reference Framework (NSRF) – Research Funding

Program: Heracleitus II. Investing in knowledge society through the European Social Fund.

References

- Adachi, N. and Lieber, M.R. (2002) Bidirectional gene organization: a common architectural feature of the human genome. *Cell* **109**: 807–809.
- Bustin, M. (2001) Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends Biochem Sci* **26**: 152–153.
- Drevet, J.R., Swevers, L. and Iatrou, K. (1995) Developmental regulation of a silkworm gene encoding multiple GATA-type transcription factors by alternative splicing. *J Mol Biol* **246**: 43–53.
- Eystathioy, T., Swevers, L. and Iatrou, K. (2001) The orphan nuclear receptor BmHR3A of *Bombyx mori*: hormonal control, ovarian expression and functional properties. *Mech Dev* **103**: 107–115.
- Giresi, P.G., Kim, J., McDaniel, R.M., Lyer, V.R. and Lieb, J.D. (2007) FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) isolates active regulatory elements from human chromatin. *Genome Res* **17**: 877–885.
- Hibner, B.L., Burke, W.D., Lecanidou, R., Rodakis, G.C. and Eickbush, T.H. (1988) Organization and expression of three genes from the silkworm early chorion locus. *Dev Biol* **125**: 423–431.
- Horard, B., Mange, A., Pelissier, B. and Couble, P. (1994) *Bombyx* gene promoter analysis in transplanted silk gland transformed by particle delivery system. *Insect Mol Biol* **3**: 261–265.
- Iatrou, K. and Meidinger, R.G. (1990) Tissue-specific expression of silkworm chorion genes in vivo using *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus as a transducing vector. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 3650–3654.
- Jones, C.W. and Kafatos, F.C. (1980) Structure, organization and evolution of developmentally regulated chorion genes in a silkworm. *Cell* **22**: 855–867.
- Kafatos, F.C., Spoerel, N., Mitsialis, S.A., Nguyen, H.T., Romano, C., Lingappa, J.R. *et al.* (1987) Developmental control and evolution in the chorion gene families of insects. *Adv Genet* **24**: 223–242.
- Koerber, R.T., Rhee, H.S., Jiang, C. and Pugh, B.F. (2009) Interaction of transcriptional regulators with specific nucleosomes across the *Saccharomyces* genome. *Mol Cell* **35**: 889–902.
- Koyanagi, K.O., Hagiwara, M., Itoh, T., Gojobori, T. and Imanishi, T. (2005) Comparative genomics of bidirectional gene pairs and its implications for the evolution of a transcriptional regulation system. *Gene* **353**: 169–176.
- Kravariti, L., Thomas, J., Sourmeli, S., Rodakis, G.C., Mauchamp, B., Chavancy, G. *et al.* (2001) The biolistic method as a tool for testing the differential activity of putative silkworm chorion gene promoters. *Insect Biochem Mol Biol* **31**: 473–479.
- Lecanidou, R. and Papantonis, A. (2010a) Modeling bidirectional transcription using silkworm chorion gene promoters. *Organogenesis* **6**: 54–58.
- Lecanidou, R. and Papantonis, A. (2010b) Silkworm chorion gene regulation revisited: promoter architecture as a key player. *Insect Mol Biol* **19**: 141–151.
- Lecanidou, R., Rodakis, G.C., Eickbush, T.H. and Kafatos, F.C. (1986) Evolution of the silk moth chorion gene superfamily: gene families CA and CB. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 6514–6518.
- Lercher, M.J., Blumenthal, T. and Hurst, L.D. (2003) Coexpression of neighboring genes in *Caenorhabditis elegans* is mostly due to operons and duplicate genes. *Genome Res* **13**: 238–243.
- Mitsialis, S.A. and Kafatos, F.C. (1985) Regulatory elements controlling chorion gene expression are conserved between flies and moths. *Nature* **317**: 453–456.
- Nadel, M.R. and Kafatos, F.C. (1980) Specific protein synthesis in cellular differentiation. IV. The chorion proteins of *Bombyx mori* and their program of synthesis. *Dev Biol* **75**: 26–40.
- Neil, H., Malabat, C., D'aubenton-Carafa, Y., Xu, Z., Steinmetz, L.M. and Jacquier, A. (2009) Widespread bidirectional promoters are the major source of cryptic transcripts in yeast. *Nature* **457**: 1038–1042.
- Nikolaev, A.I., Tchkonina, T.T., Kafiani-Eristavi, C.A. and Tarantul, V.Z. (1993) Preferential extrachromosomal localization of exogenous DNA in transgenic silkworm *Bombyx mori* L. *Mol Gen Genet* **236**: 326–330.
- Papantonis, A. and Lecanidou, R. (2009) A modified chromatin-immunoprecipitation protocol for silkworm ovarian follicular cells reveals C/EBP and GATA binding modes on an early chorion gene promoter. *Mol Biol Rep* **36**: 733–736.
- Papantonis, A., Sourmeli, S. and Lecanidou, R. (2008a) Chorion gene activation and repression is dependent on BmC/EBP expression and binding to cognate cis-elements. *Biochem Biophys Res Commun* **369**: 905–909.
- Papantonis, A., Tsatsarounos, S., Vanden Broeck, J. and Lecanidou, R. (2008b) CHD1 assumes a central role during follicle development. *J Mol Biol* **383**: 957–969.
- Papantonis, A., Vanden Broeck, J. and Lecanidou, R. (2008c) Architectural factor HMG A induces promoter bending and recruits C/EBP and GATA during silkworm chorion gene regulation. *Biochem J* **416**: 85–97.
- Rhee, H.S. and Pugh, B.F. (2012) ChIP-exo method for identifying genomic location of DNA-binding proteins with near-single-nucleotide accuracy. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 21: Unit 21.24.
- Skeiky, Y.A. and Iatrou, K. (1991) Synergistic interactions of silkworm chorion promoter-binding factors. *Mol Cell Biol* **11**: 1954–1964.
- Sourmeli, S., Kravariti, L. and Lecanidou, R. (2003) In vitro analysis of *Bombyx mori* early chorion gene regulation: stage specific expression involves interactions with C/EBP-like and GATA factors. *Insect Biochem Mol Biol* **33**: 525–540.
- Sourmeli, S., Papantonis, A. and Lecanidou, R. (2005a) BmCbZ, an insect-specific factor featuring a composite DNA-binding domain, interacts with BmC/EBP γ . *Biochem Biophys Res Commun* **338**: 1957–1965.
- Sourmeli, S., Papantonis, A. and Lecanidou, R. (2005b) A novel role for the *Bombyx* Slbo homologue, BmC/EBP, in insect choriogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **337**: 713–719.
- Spellman, P.T. and Rubin, G.M. (2002) Evidence for large domains of similarly expressed genes in the *Drosophila* genome. *J Biol* **1**: 5.1–5.8.

- Spoerel, N., Nguyen, H.T. and Kafatos, F.C. (1986) Gene regulation and evolution in the chorion locus of *Bombyx mori*. Structural and developmental characterization of four eggshell genes and their flanking DNA regions. *J Mol Biol* **190**: 23–35.
- Spoerel, N.A., Nguyen, H.T., Eickbush, T.H. and Kafatos, F.C. (1989) Gene evolution and regulation in the chorion complex of *Bombyx mori*. Hybridization and sequence analysis of multiple developmentally middle A/B chorion gene pairs. *J Mol Biol* **209**: 1–19.
- Spoerel, N.A., Nguyen, H.T., Towne, S. and Kafatos, F.C. (1993) Negative and positive regulators modulate the activity of a silkworm chorion gene during choriogenesis. *J Mol Biol* **230**: 151–160.
- Struhl, K. and Segal, E. (2013) Determinants of nucleosome positioning. *Nat Struct Mol Biol* **20**: 267–273.
- Swevers, L. and Iatrou, K. (1992) Early establishment and autonomous implementation of a developmental program controlling silkworm chorion gene expression. *Dev Biol* **150**: 12–22.
- Takai, D. and Jones, P.A. (2004) Origins of bidirectional promoters: computational analyses of intergenic distance in the human genome. *Mol Biol E* **21**: 463–467.
- Thomas, J.L. (2003) Electroporation, an alternative to biolistics for transfection of *Bombyx mori* embryos and larval tissues. *J Insect Sci* **3**: 17.1–17.12.
- Thomas, J.L., Bardou, J., L'hoste, S., Mauchamp, B. and Chavancy, G. (2001) A helium burst biolistic device adapted to penetrate fragile insect tissues. *J Insect Sci* **1**: 9.1–9.10.
- Trinklein, N.D., Aldred, S.F., Hartman, S.J., Schroeder, D.I., O'tillar, R.P. and Myers, R.M. (2004) An abundance of bidirectional promoters in the human genome. *Genome Res* **14**: 62–66.
- Vinson, C.R., Sigler, P.B. and McKnight, S.L. (1989) Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science* **246**: 911–916.
- Wang, Q., Wan, L., Li, D., Zhu, L., Qian, M. and Deng, M. (2009) Searching for bidirectional promoters in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Bioinformatics* **10** (Suppl 1): S29.
- Zaret, K.S. and Carroll, J.S. (2011) Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes Dev* **25**: 2227–2241.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Figure S1. Expression patterns in histogram form for differentially mutated A/B.L9 promoters and for both orientations (α and β). Bars represent the standard error (SE).