ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Χαρακτηρισμός Πρωτεϊνικών Αλληλεπιδράσεων και Λειτουργικός Ρόλος Της Πρωτεΐνης SH3 του *Bombyx mori*

ΓΕΩΡΓΟΜΑΝΩΛΗΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2012

NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS

SCHOOL OF SCIENCES

FACULTY OF BIOLOGY

DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY AND BIOPHYSICS

PhD THESIS

CHARACTERIZATION OF PROTEIN INTERACTIONS AND FUNCTIONAL ROLE OF PROTEIN BmSH3 OF BOMBYX MORI

THEODORE GEORGOMANOLIS

ATHENS 2012

Η παρούσα Διατριβή χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα υποστήριξης υποψήφιων Διδακτόρων του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος και εν μέρη από το Υπουργείο Ανάπτυξης (Γενική Γραμματεία έρευνας και τεχνολογίας).

Η έγκριση Διδακτορικής Διατριβής από τη Σχολή Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών δε δηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα (Ν. 5343/1932 Άρθρο 202).

Συμβουλευτική επιτροπή

1. Καθηγητής Σταύρος Ι. Χαμόδρακας Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών (επιβλέπων)
2. Καθηγητής Κώστας Ιατρού Ινστιτούτο Βιολογίας, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος
3. Αν. Καθηγητής Σπύρος Ευθυμιόπουλος Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Εξεταστική επιτροπή

1. Καθηγητής Σ. Ι. Χαμόδρακας Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
2. Καθηγητής Κ. Ιατρού Ινστιτούτο Βιολογίας, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος
3. Ομότιμος Καθηγητής Λ.Χ. Μαργαρίτης Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
4. Καθηγητής Γ. Ροδάκης Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
5. Ομότιμη Καθηγήτρια Ε. Λεκανίδου Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
6. Αν. Καθηγητής Σ. Ευθυμιόπουλος Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
7. Επικ. Καθηγητής Δ. Στραβοπόδης Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είναι αφιερωμένη

στους γονείς μου

Δημήτρη και Σμαράγδω

που όλα αυτά τα χρόνια μου συμπαραστάθηκαν ποικιλοτρόπως, στα αδέρφια μου Σπύρο και Μαρία.

Επιπλέον είναι αφιερωμένη στους ανθρώπους που

μ' αγαπούν, πιστεύουν σε μένα και βρίσκονται δίπλα μου όταν τους χρειάζομαι.

Ελπίζω να αναδειχτώ άξιος της υπομονής τους

και της εμπιστοσύνης τους

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

Η διατριβή αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Εντόμων και Βιοτεχνολογίας του Ινστιτούτου Βιολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή και Διευθυντή Ερευνών Κώστα Ιατρού και μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής τον Καθηγητή Σταύρο Χαμόδρακα (πρόεδρο) και τον αναπληρωτή Καθηγητή Σπύρο Ευθυμιόπουλο.

Ευχαριστώ ιδιαιτέρως τον Διευθυντή του εργαστηρίου Μοριακής Γενετικής Εντόμων και Βιοτεχνολογίας του Ινστιτούτου Βιολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος Καθηγητή Κώστα Ιατρού, για την προτροπή και τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω τη διδακτορική μου διατριβή. Η ανάθεση ενός θέματος ενδιαφέροντος και πρωτοποριακού, η άοκνος καθοδήγησή του, η αγαστή συνεργασία, οι πολύτιμες συμβουλές που μου παρείχε μέχρι την ολοκλήρωση της εργασίας ήταν καθοριστικές για την έκβαση της παρούσας διατριβής.

Ευχαριστώ εξίσου θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής τον καθηγητή Σταύρο Χαμόδρακα, του εργαστηρίου Βιοφυσικής και Βιοπληροφορικής του τομέα Κυτταρικής Βιολογίας και Βιοφυσικής του Ε.Κ.Π.Α. και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Σπύρο Ευθυμιόπουλο, του τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου του Ε.Κ.Π.Α. για το ενδιαφέρον που επέδειξαν για την παρούσα διατριβή.

Αποτελεί μεγάλη τιμή το γεγονός ότι οι τρεις αυτοί διακεκριμένοι επιστήμονες και αξιόλογοι άνθρωποι δέχθηκαν να αφιερώσουν μέρος του πολύτιμου χρόνου τους στην παρακολούθηση και καθοδήγηση της διδακτορικής μου διατριβής.

Ευχαριστώ και τα μέλη της εσωτερικής επιτροπής του Ινστιτούτου Βιολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος, Καθηγητή Κώστα Ιατρού, Ερευνητή Α' Luc Swevers και την Ερευνήτρια Β' Αναστασία Προμπονά.

Η παρουσία των μελών της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, του Ομότιμου Καθηγητή Λουκά Μαργαρίτη, του Καθηγητή Γεωργίου Ροδάκη, της Ομότιμης Καθηγήτριας Ειρήνης Λεκανίδου και του Επίκουρου Καθηγητή Δημήτριου Στραβοπόδη με τιμά επίσης ιδιαίτερα. Για τον λόγο αυτό τους ευχαριστώ θερμά.

Ιδιαίτερα, θέλω να ευχαριστήσω τον συνεπιβλέποντα καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής, Ερευνητή Α΄ Δρ. Luc Swevers, για την αμέριστη υπομονή και εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου. Οι επιστημονικές αλλά και τεχνικές γνώσεις του

συνέβαλαν σημαντικά ώστε να αντιμετωπιστούν και να επιλυθούν πολλά πειραματικά προβλήματα.

Για την ξεχωριστή στήριξη και τη βοήθειά τους, ευχαριστώ τους συναδέλφους και τους συνεργάτες Δρ. Βασίλη Δουρή, Δρ. Rodica Efrose και Νάντια Σδράλια, για την οποία εύχομαι να έρθει η σειρά της το συντομότερο δυνατό, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Γενετικής Εντόμων και Βιοτεχνολογίας, με ιδιαίτερη αναφορά στην Ερευνήτρια Β΄ Δρ. Βασιλική Λαμπροπούλου και τη Δήμητρα Στεφάνου καθώς και όλα τα παρελθόντα μέλη του εργαστηρίου που συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά τους Δρ. Βασίλη Δουρή και Δρ. Θανάση Τάρτα για τη κριτική ανάγνωση αυτού του κειμένου. Οι υποδείξεις τους αποτέλεσαν το σημαντικότερο οδηγό συγγραφής του κειμένου.

Είμαι ευγνώμων στους γονείς μου και τα αδέρφια μου για την πλήρη υποστήριξη και συμπαράστασή τους σε αυτή την πολύχρονη και επίπονη προσπάθεια μου, οι οποίοι βρέθηκαν κοντά μου σε κάθε απόφαση μου και σε κάθε μου πρόβλημα όλα αυτά τα χρόνια.

ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

20E : 20-υδροξυ-εκδυσόνη

$AcNH_4$: οξικό αμμώνιο

APS: υπερθειικό αμμώνιο

ATP: τριφωσφορική αδενοσίνη

bp: ζεύγος βάσεων

cDNA: συμπληρωματικό DNA

CIAP: αλκαλική φωσφατάση από έντερο μόσχου (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)

DAPI: 4',6-διαμίδινο-2-φαινυλινδόλη

dCTP: δεοξυ-τριφωσφορική κυτοσίνη

ddNTP: δυδεοξυνουκλεοτίδια

DDT: p,p'-Δίχλωρο-διφαινυλο-τριχλωρο-αιθάνιο

DNA: δεοξυ-ριβονουκλεϊκό οξύ

dNTP: δεοξυνουκλεοτίδια

dT: δεοξυθυμίνη

EDTA: αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

ESP : ειδική πρωτεΐνη του αυγού

EtBr: βρωμιούχο αιθίδιο

EYFP: ενισχυμένη κίτρινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Enhanced Yellow Fluorescent Protein)

FITC: fluorescein

kbp: χιλιάδα ζευγών βάσεων (kilobasepair)

MixC: διάλυμα δεοξυνουκλεοτιδίων πλην της κυτοσίνης

MOPS: 4-Μορφολινεπροπανοσουλφονικό οξύ

mRNA: μήνυμα RNA (messenger RNA)

NGS: ουδέτερος ορός αίγας (Normal Goat Serum)

NP-40: nonidet P-40

PAGE: ηλεκτροφόρηση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης

PEG: πολυαιθυλενική γλυκόζη

PPD: υδροχλωρική p-φαινυλενοδιαμίνη

RIPA: Ρυθμιστικό διάλυμα Ραδιοανοσοκατακρίμνισης (RadioImmunoPrecipitation Assay)

RNA: ριβονουκλεϊκό οξύ

RORE: (Retinoic Acid-Related Orphan Receptor Response Element)

SDS: θείο-δωδεκυλικό νάτριο

SSC: φυσιολογικό ορός κιτρικού νατρίου

T4 PNK: T4 πολυνουκλεοτιδική κινάση

TEMED: N',N',N',N'-τετραμεθυλενοδιαμίνη

Tris: 2-αμινο-2-υδροξυμεθυλο-προπανο-1,3-διόλη

X-GAL: 5-βρώμο-4-χλώρο-3-ινδύλυλο-γαλακτοσίδιο

TAE: Tris base, οξικό οξύ (acetic acid) και EDTA

SoHo: δομική μονάδα με ομοιότητα στη sorbin (Sorbin Homology)

ORF: ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης

IPTG: ισοπρόπυλ-β-D-θειογαλακτοσίδιο

MCS: περιοχή πολυσυνδέσμου (multiple cloning sites)

RT: αντίστροφη μεταγραφή του RNA

UTR: αμετάφραστη περιοχή (UnTranslated Region)

λΦ: λάμδα φάγος

BLAST: (Basic Local Alignment Search Tool)

SH3: περιοχή με ομοιότητα στην περιοχή 3 της Src (Sarcoma)

NLS: Σήμα Πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal)

cAMP: κυκλικό AMP

PKA: κινάση εξαρτώμενη από το cAMP

PKG: κινάση εξαρτώμενη από το cGMP

PMSF : phenylmethanesulphonylfluoride

ERK2: κινάση ρυθμιζόμενη από εξωκυττάρια μηνύματα (Extracellular signal-regulated kinase 2)

NCBI: Εθνικό Κέντρο για τις Πληροφορίες Βιοτεχνολογίας (National Center for Biotechnology Information)

EXPAsY: Υπολογιστικό Ειδικό Σύστημα Ανάλυσης Πρωτεϊνών **(**Expert Protein Analysis System)

kDa: kilo Dalton (μονάδα μέτρησης μάζας πρωτεϊνών)

GFP: Πράσινη Φθορίζουσα Πρωτεΐνη (Green Fluorescent Protein)

EGFP: Ενισχυμένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη

FBS: βόειος εμβρυικός ορός (Fetal bovine serum)

RRX: Rhodamine Red-X

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ **I**

ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ **III**

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ V

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΙΝΑΚΩΝ XIV

ΠΕΡΙΛΗΨΗ **XV**

ABSTRACT **XVIII**

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 1

1.1. Ο ΜΕΤΑΞΟΣΚΩΛΗΚΑΣ *Bombyx mori* ΩΣ ΠΡΟΤΥΠΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ. 1

1.2. Η ΩΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΟΝ ΜΕΤΑΞΟΣΚΩΛΗΚΑ *Bombyx mori*. 3

1.2.1. ΠΡΟΒΙΤΕΛΛΟΓΕΝΕΣΗ 5

1.2.2. ΒΙΤΕΛΛΟΓΕΝΕΣΗ 7

1.2.2.1. Παραγωγή των λεκιθοπρωτεϊνών 7

1.2.2.2. Βιτελλινική μεμβράνη 8

1.2.3. Η ΛΗΞΗ ΤΗΣ ΒΙΤΕΛΛΟΓΕΝΕΣΗΣ 9

1.2.3.1. Απόπτωση και εκκένωση των τροφοκυττάρων 10

1.2.3.2. Ωσμωτική διόγκωση και κλείσιμο των αυλακώσεων 11

1.2.4. ΧΟΡΙΟΓΕΝΕΣΗ 11

1.2.5. ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΡΙΘΜΗΣΗΣ 15

1.2.6. Η ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ ΓΕΓΟΝΟΤΩΝ ΠΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ 20Ε 16

1.3. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΟΡΦΑΝΟΥ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ BmE75 23

1.4. ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΜΙΑΣ ΝΕΑΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΩΣ ΠΙΘΑΝΟΥ ΣΤΟΧΟΥ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ BmE75C 25

1.5. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ CAV 28

1.5.1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ CAV 28

1.5.1.1. Η πρωτεΐνη CAP 31

1.5.1.2. Η πρωτεΐνη ArgBP2 33

1.5.1.3. Η πρωτεΐνη vinexin 34

1.5.1.4. Άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας 35

1.5.2. ΣΥΝΤΗΡΗΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ CAV ΚΑΙ Ο ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΥΣ ΡΟΛΟΣ. 35

1.5.2.1. SH3 35

Εξειδίκευση της αλληλεπίδρασης των SH3 περιοχών και των προσδετών 38

Άλλες αλληλουχίες αλληλεπίδρασης των SH3 περιοχών 39

1.5.2.2. SOHO 40

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ 41

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ 43

3.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ 43

3.2. Ο ΜΕΤΑΞΟΣΚΩΛΗΚΑΣ *BOMBYX MORI* 43

3.2.1. ΕΚΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΞΟΣΚΩΛΗΚΑ 43

3.2.1.1. Τροφή 43

3.2.1.2. Συνθήκες εκτροφής 44

3.2.1.3. Διαδικασία εκτροφής 44

3.2.2. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΘΗΛΥΚΩΝ ΑΤΟΜΩΝ 44

3.2.3. ΑΝΑΤΟΜΙΑ 45

3.2.4. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ 46

3.3. ΚΟΙΝΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ. 47

3.4. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ, ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΚΑΙ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΦΟΡΕΙΣ 50

3.4.1. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ 50

3.4.2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΕΝΤΟΜΩΝ 50

3.4.3. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ 50

3.5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (RNA/DNA) ΑΠΟ ΙΣΤΟΥΣ 52

3.5.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA 52

3.5.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA 53

3.6. ΠΕΨΗ DNA ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ 53

3.7. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA 53

3.8. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 54

3.8.1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΗΛΕΚΤΡΟΕΚΛΟΥΣΗΣ 54

3.8.2. ΜΕΘΟΔΟΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ. 54

3.8.3. ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΣΕ ΣΤΗΛΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ 55

3.8.3.1. Στήλη μοριακής διήθησης στερεής φήσης SEPHADEX G-50 55

3.8.3.2. Στήλη φυγοκήντρησης SEPHADEX-G50 (SPIN-COLUMN CHROMATOGRAPHY) 56

3.9. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ – ΦΟΡΕΙΣ/ΕΚΦΡΑΣΗΣ 56

3.9.1. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΕ ΦΟΡΕΙΣ 56

3.9.2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΑΚΡΩΝ (LIGATION REACTIONS) – ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΥΦΛΩΝ ΑΚΡΩΝ 57

3.9.3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΑΠΟΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ - ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ DNA ΑΚΡΩΝ. 57

3.9.4. ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ 58

3.9.5. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ 58

3.9.6. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ (TRANSFORMATION) ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ – ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΛΩΝΩΝ 59

3.10. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA 60

3.10.1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΚΑΛΙΚΗΣ ΛΥΣΗΣ ΜΙΚΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ (MINI-PREP) 60

3.10.2. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΚΑΛΙΚΗΣ ΛΥΣΗΣ ΜΕΣΑΙΑΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ (MIDI-PREP) 60

3.10.3. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA ΜΕ CsCl ... *61*
3.11. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ ΤΟΥ DNA ... 62
3.12. ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΝΣΗ ΤΟΥ DNA ... 63
3.13. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΤΑ SOUTHERN. ... 64
3.13.1. ΜΕΤΑΦΟΡΑ DNA ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ ... *64*
3.14. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ mRNA ΜΕ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟ NORTHERN ... 65
3.14.1. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ RNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ/ ΦΟΡΜΑΛΔΕΫΔΗΣ ... *65*
3.14.2. ΜΕΤΑΦΟΡΑ RNA ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ ... *65*
3.15. ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ... 66
3.15.1. ΕΚΠΛΥΣΗ ΚΑΙ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ... *66*
3.15.2. ΑΠΟΫΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ... *67*
3.16. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ cDNA ΚΛΩΝΟΥ - ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ. ... 67
3.17. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR) ... 67
3.18. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ GST-ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ... 69
3.19. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ GST ... 69
3.19.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ, ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ... *69*
3.19.2. ΛΥΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ... *70*
3.19.3. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ – ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ... *70*
3.19.4. ΟΜΟΙΟΠΟΛΙΚΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ GSH-SEPHAROSE 4B. ... *71*
3.20. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ EYFP ... 72
3.21. ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (CELL TRANSFECTION) ... 76
3.21.1. ΛΥΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (ΕΝΤΟΜΩΝ) ... *77*
3.22. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ... 77
3.23. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ... 79
3.23.1. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ... *79*
3.24. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ ... 79
3.24.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ. ... *79*
3.24.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ. *79*
3.24.3. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ... *80*
3.25. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΟ (SDS) ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ (ΜΕΘΟΔΟΣ LAEMMLI, SDS-PAGE) ... 80
3.25.1. ΧΡΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ... *81*
3.26. ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ (CO-IMMUNOPRECIPITATION) ... 81
3.27. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ (WESTERN) ... 83
3.27.1. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ... *83*
3.27.2. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ... *83*
3.27.3. ΔΕΥΤΕΡΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ - ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ... *84*
3.28. ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΟΧΗΜΕΙΑ ... 84

3.28.1. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ Hi5 ΚΑΙ Bm5 84
3.28.1.1. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΛΥΠΤΡΙΔΩΝ ΠΟΛΥ-L-ΛΥΣΙΝΗΣ 85
3.28.1.2. ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΙΣ ΚΑΛΥΠΤΡΙΔΕΣ – ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ85
3.28.2. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΣΤΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΞΟΣΚΩΛΗΚΑ 86
3.29. ΕΥΡΕΣΗ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΗΣ BmSH3 88
3.30. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ-ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ LASER 88
3.31. ΑΝΑΛΥΣΗ IN SILICO 88
3.31.1. ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΠΙΘΑΝΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ SH3 ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ SH3HUNTER 89

4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α΄ 90

4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 91
4.2. ΕΙΔΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ 91
4.2.1. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΠΟΥ ΕΝΙΣΧΥΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΤΗΝ pfu 91
4.2.2. PCR 91
4.2.3. RT-PCR 92
4.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 94
4.3.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ cDNA ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΕΙ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΜΕ ΜΙΑ SoHo ΚΑΙ ΤΡΕΙΣ SH3 ΠΕΡΙΟΧΕΣ. 94
4.3.2. ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΗΣ ΥΠΑΡΞΗΣ IN VIVO ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΕΙ ΤΗΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΤΟΥ BmSH3 cDNA. 97
4.3.3. IN SILICO ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ 100
4.3.4. ΚΥΡΙΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ BmSH3. 101
4.3.4.1. Περιοχές SH3 101
4.3.4.2. Περιοχή SoHo 102
4.3.4.3. ‘Αλλες περιοχές ενδιαφέροντος 104
4.3.4.4. Ομολογία της BmSH3-A1 με τις πρωτεΐνες της οικογένειας CAV 106
4.3.5. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ BmSH3 107
4.3.5.1. Προσδιορισμός του αριθμού των *bmsh3* γονιδίων στο γονιδίωμα του μεταξοσκώληκα. 107
4.3.5.2. Προσδιορισμός των ορίων μεταξύ εξονίων και εσωνίων 109
4.3.6. ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΝΕΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ 111
4.3.7. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ 115
4.3.7.1. Μεταγραφική ρύθμιση 115
4.3.7.2. Ιστοειδική έκφραση του γονιδίου BmSh3 115
ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΥΠΟΥ NORTHERN 115
RT-PCR ΑΝΑΛΥΣΗ 116
4.3.7.3. Ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου *bmsh3* κατά την ανάπτυξη των ωοθυλακίων του μεταξοσκώληκα 118
Ανάλυση τύπου northern 119
Ανάλυση RT-PCR 121

4.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ 123

5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β΄: 126

5.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 127

5.2. ΕΙΔΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ 127

5.2.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ 127

5.2.1.1. Επιλογή αντιγονικών περιοχών της BmSH3-A1 127

5.2.1.2. Κατασκευή των φορέων έκφρασης της GST-BmSH3.1 και GST.BmSH3.2 131

GST-BmSH3.1 (αα 527–646) 131

GST- BmSH3.2 (659 – 1030 αα) 131

5.2.1.3. Παραγωγή και καθαρισμός αντισωμάτων 133

5.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 134

5.3.1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ 134

5.3.1.1. Εξειδίκευση του anti-BmSH3.1 αντισώματος 136

5.3.2. ΙΣΤΟΕΙΔΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΗΣ BmSH3 137

5.3.3. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΗΣ BmSH3 ΣΤΑ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ 141

5.3.4. Η BmSH3 ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ 144

5.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ 146

6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ' 150

6.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 151

6.1.1. Η ΠΡΑΣΙΝΗ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΑ ΠΡΩΤΕΪΝΗ 151

6.1.2. ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΌΣ 153

6.2. ΕΙΔΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ 154

6.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 156

6.3.1. ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΗΣ EYFP ΧΙΜΑΙΡΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ. 156

6.3.2. ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΗΣ BmSH3-A1 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΕΝΤΟΜΩΝ 158

6.3.3. ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΗΣ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ BmSH3 ΣΤΑ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ 159

6.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ 164

7. ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ' 168

7.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 169

7.2. ΕΙΔΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ 169

7.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 171

7.3.1. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΤΩΝ BmSH3-A1, BmE75A ΚΑΙ BmE75C 171

7.3.2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΤΩΝ BmSH3-A1, BmE75A ΚΑΙ BmE75C ΜΕ ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ 173

7.3.3. ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗΣ 178

7.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ 182

8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ 185

9. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ 202

10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 203

11. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ 220

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I:. 221

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II:. 222

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III: 224

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV: 225

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V: 228

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI: 235

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VII: 239

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VIII: 242

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IX: 246

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ X: 251

12. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ 258

13. ΕΡΓΑΣΙΕΣ 260

ΠΙΝΑΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΕΙΚΟΝΑ 1.1: Ο ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΞΟΣΚΩΛΗΚΑ B. MORI. Α. 3
ΕΙΚΟΝΑ 1.2: ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΩΟΘΗΚΗΣ/ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ ΤΟΥ ΜΕΤΑΞΟΣΚΩΛΗΚΑ *B. MORI* 4
ΕΙΚΟΝΑ 1.3: ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΣΤΑΔΙΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΕΝΟΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΥ ΜΕΤΑΞΟΣΚΩΛΗΚΑ B. MORI. 6
ΕΙΚΟΝΑ 1.4: ΔΙΑΚΡΙΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΒΙΤΕΛΛΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΤΗ ΧΟΡΙΟΓΕΝΕΣΗ, ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗΝ ΕΚΚΡΙΤΙΚΗ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ. 7
ΕΙΚΟΝΑ 1.5: ΑΠΩΛΕΙΑ ΤΩΝ ΔΕΣΜΙΔΩΝ ΑΚΤΙΝΗΣ ΣΤΑ ΤΡΟΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΕΠΙΚΕΙΜΕΝΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΑ ΠΡΟΣ ΤΟ ΩΟΚΥΤΤΑΡΟ, ΣΤΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ ΤΗΣ D. MELANOGASTER 10
ΕΙΚΟΝΑ 1.6: ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΣΑΡΩΣΗΣ 13
ΕΙΚΟΝΑ 1.7: ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΧΟΡΙΟΥ ΣΤΑ ΩΡΙΜΑ ΑΥΓΑ ΤΟΥ B. MORI 14
ΕΙΚΟΝΑ 1.8: ΩΟΘΗΚΑΡΙΟ ΤΟΥ ΜΕΤΑΞΟΣΚΩΛΗΚΑ *B. MORI* 15
ΕΙΚΟΝΑ 1.9: ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ (ΣΤΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ) ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΩΟΓΕΝΕΣΗΣ, ΟΠΩΣ ΑΥΤΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΟΝ ΜΕΤΑΞΟΣΚΩΛΗΚΑ B. MORI. 20
ΕΙΚΟΝΑ 1.10: ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΗΣ BME75C (A) ΚΑΙ BME75A (B) ΑΜΙΝΟΞΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ 25
ΕΙΚΟΝΑ 1.11: ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΗΣ BMSH3 26
ΕΙΚΟΝΑ 1.12: ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ CAV 29
ΕΙΚΟΝΑ 1.13: ΟΙ ΔΟΜΕΣ ΤΗΣ ΔΕΥΤΕΡΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ SH3 ΤΗΣ PONSIN 36
ΕΙΚΟΝΑ 1.14: ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ SH3 ΜΕ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΕΤΗ (MAYER 2001). 37
ΕΙΚΟΝΑ 3.1: ΣΧΕΔΙΟ ΠΟΥ ΑΝΑΠΑΡΙΣΤΑ ΤΟΝ ΜΕΤΑΞΟΣΚΩΛΗΚΑ BOMBYX MORI ΣΤΟ ΤΕΤΑΡΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΠΡΟΝΥΜΦΗΣ 45
ΕΙΚΟΝΑ 4.1: Ο ΦΟΡΕΑΣ PGAD424. 95
ΕΙΚΟΝΑ 4.2: ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΟΥ CDNA ΤΟΥ BMSH3 ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΧΕΤΙΚΗΣ ΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΕΚΙΝΗΤΩΝ 378R ΚΑΙ 308R. 95
ΕΙΚΟΝΑ 4.3: PCR ΓΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΠΙΠΛΕΟΝ 5' ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΑΠΟ ΒΙΤΕΛΛΟΓΕΝΙΚΗ ΚΑΙ ΧΟΡΙΟΓΕΝΙΚΗ CDNA ΒΙΒΛΙΟΘΗΚ 96
ΕΙΚΟΝΑ 4.4: ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗ ΚΑΙ ΑΜΙΝΟΞΙΚΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΤΗΣ ΕΠΕΚΤΑΣΗΣ ΠΟΥ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ PCR ΑΠΟ ΤΗ ΧΟΡΙΟΓΕΝΙΚΗ CDNA ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ. 96
ΕΙΚΟΝΑ 4.5: ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR ΜΕ ΤΟ ΖΕΥΓΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ 43F ΚΑΙ 430R. 97
ΕΙΚΟΝΑ 4.6: RT-PCR ΓΙΑ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΗΣ ΑΥΘΕΝΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΟΥ ΚΛΩΝΟΥ BMSH3 99
ΕΙΚΟΝΑ 4.7: ΑΜΙΝΟΞΙΚΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΤΗΣ BMSH3-A1. 100
ΕΙΚΟΝΑ 4.8: ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΗΣ ΑΜΙΝΟΞΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΗΣ BMSH3-A1. 101
ΕΙΚΟΝΑ 4.9: ΣΤΟΙΧΙΣΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ SH3 ΤΗΣ BMSH3-A1 ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ CLUSTALW2 ΚΑΙ BIOEDIT 102

Εικονα 4.10: Στοιχιση της περιοχης SoHo της BmSH3-A1 με ομοιες περιοχες που ειναι κατατεθειμενες στην βαση δεδομενων NCBI 103
Εικονα 4.11: Οι συντηρημενες μορφες και οι ομολογες περιοχες των σημαντικοτερων μελων της οικογενειας CAV. 107
Εικονα 4.12: Σχηματικη παρουσιαση του BmSH3-A1 cDNA και της περιοχης που χρησιμοποιηθηκε για την κατασκευη του ραδιοσημασμενου ιχνηθετη. 108
Εικονα 4.13: Αυτοραδιογραφια αναλυσης κατα Southern γονιδιωματικου DNA του B. mori για τον προσδιορισμο του αριθμου των αντιγραφων του γονιδιου bmsh3 στο γονιδιωμα του μεταξοσκωληκα. 108
Εικονα 4.14: Σχηματικη παρασταση της κατανομης των εξονιων του bmsh3 στο γονιδιωμα του μεταξοσκωληκα.. 110
Εικονα 4.15: Σχηματικη παρασταση της θεσης των εκκινητων 2377R και 2464R 111
Εικονα 4.16: Αναλυση του εναλλακτικου μεταγραφου BmSH3-B 113
Εικονα 4.17: Ηλεκτροφορηση των προϊοντων της RT-PCR για τον BmSH3-B 114
Εικονα 4.18: Μελετη της συσσωρευσης του μηνυματος του γονιδιου bmsh3 στους ιστους του μεταξοσκωληκα με αναλυση τυπου northern 116
Εικονα 4.19: Αναλυση της ιστοειδικης εκφρασης του bmsh3 με RT-PCR 117
Εικονα 4.20: Μελετη της ιστοειδικης κατανομης του κλωνου BmSH3-B με το ζευγος των εκκινητων 8bF και 3'UTR.R 118
Εικονα 4.21: Μελετη της συσσωρευσης με αναλυση τυπου northern του μηνυματος του γονιδιου *bmsh3* κατα την αναπτυξη των θυλακοκυτταρων. 120
Εικονα 4.22: Χρονοειδικη αναλυση των επιπεδων των μεταγραφων του γονιδιου *bmsh3* στα αναπτυσσομενα ωοθυλακια με RT-PCR 122
Εικονα 5.1: Σχηματικη παρασταση της αμινοξικης αλληλουχιας της BmSH3-A1. 129
Εικονα 5.2: Διαγραμμα υδροφοβικοτητας της αμινοξικης BmSH3-A1 αλληλουχιας κατα Kyte και Doolitle 129
Εικονα 5.3: Ηλεκτροφορηση SDS-PAGE 12% των ολικων εκχυλισματων του στελεχους BL-21 134
Εικονα 5.4: Ανοσοαποτυπωση τυπου Western για την εξεταση ολικων εκχυλισματων ιστων του μεταξοσκωληκα με τον ανοσοποιημενο ορο.. 136
Εικονα 5.5: Ανοσοαποτυπωση τυπου Western για την πιστοποιηση της εξειδικευσης και καθαροτητας του αντισωματος anti-BmSH3.1. 137
Εικονα 5.6: Ανοσοαποτυπωση τυπου Western μετα απο ηλεκτροφορηση σε 12% SDS-PAGE.. 139
Εικονα 5.7: Μελετη της εκφρασης της BmSH3 πρωτεϊνης στα διαμερισματα της ωοθηκης 142
Εικονα 5.8: Χρονοειδικη εκφραση της BmSH3-A1 πρωτεϊνης στα επιθηλιακα κυτταρα των ωοθυλακιων 145
Εικονα 6.1: Γραφικη παρασταση των χιμαιρικων πρωτεϊνων της EYFP 154
Εικονα 6.2: Προτυπο φθορισμου της χιμαιρικης BmSH3-A1 η τμηματων της με την EYFP μετα απο παροδικη διαμολυνση της Bm5 κυτταρικης σειρας 157

ΕΙΚΟΝΑ 6.3: ΠΡΟΤΥΠΟ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΒΜSH3-A1 ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΒΜ5 ΚΑΙ ΗΙ5. 159
ΕΙΚΟΝΑ 6.4: ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ 161
ΕΙΚΟΝΑ 6.5: ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ… 163
ΕΙΚΟΝΑ 7.1: ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ. 172
ΕΙΚΟΝΑ 7.2: ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ. 174
ΕΙΚΟΝΑ 7.3: ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ. 175
ΕΙΚΟΝΑ 7.4: ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ. 177
ΕΙΚΟΝΑ 7.5 : ΔΟΚΙΜΕΣ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΒΜSH3-A1, ΒΜE75C ΚΑΙ ΒΜE75A.. 180
ΕΙΚΟΝΑ 7.6: ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΠΙΘΑΝΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ SH3 ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΣΤΙΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΒΜE75A ΚΑΙ ΒΜE75C. 182

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1-1: ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΡΙΩΝ ΕΚΠΡΟΣΩΠΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ CAV, ... 31

ΠΙΝΑΚΑΣ 3-1: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΥΡΕΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΤΩΝ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ cDNA ΣΤΟΥΣ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ 63

ΠΙΝΑΚΑΣ 3-2: : ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΤΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ cDNA ΠΟΥ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΟΥΝ ΣΤΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑ BMSH3-A1/A2 ΚΑΙ BMSH3-A2 68

ΠΙΝΑΚΑΣ 5-1: ΟΜΟΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ (A) ΑΑ 526–646 ΚΑΙ (B) ΑΑ 659–1030 ΤΗΣ BMSH3-A1 ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ B. MORI ΚΑΤΑΤΕΘΗΜΕΝΩΝ ΣΤΗ ΒΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ NCBI.. 130

ΠΙΝΑΚΑΣ 5-2: ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΟΥ ΤΡΟΠΟΥ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΤΟΥ ΦΟΡΕΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ GST ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ. 132

ΠΙΝΑΚΑΣ 5-3: ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΙΣΤΟΕΙΔΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ BMSH3 146

ΠΙΝΑΚΑΣ 5-4 ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΤΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ BMSH3 ΣΤΑ ΔΙΑΜΕΡΙΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΩΟΘΗΚΗΣ. 146

ΠΙΝΑΚΑΣ 7-1 ΠΑΡΑΘΕΣΗ ΤΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ ΜΕ ΤΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ BMSH3-A1, BME75A ΚΑΙ BME75C. 170

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οικογένεια των πρωτεϊνών αγκυροβόλησης CAV (CAP, ArgBP2, Vinecin), που χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη τριών SH3 περιοχών στο καρβοξυ-τελικό τους άκρο και μιας περιοχής με ομοιότητα με το πεπτίδιο σορβίνης (sorbin homology, SoHo) προς το αμινο-τελικό άκρο, εμπλέκεται σε σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στη ρύθμιση των επαφών μεταξύ κυττάρων, στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και στην απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες. Στην παρούσα εργασία περιγράφεται η αναγνώριση και ο χαρακτηρισμός ενός νέου μέλους της οικογένειας CAV, που εκφράζεται στον μεταξοσκώληκα *Bombyx mori*, την BmSH3. Η BmSH3 απομονώθηκε αρχικά ως πιθανός στόχος αλληλεπίδρασης με τον ορφανό πυρηνικό υποδοχέα BmE75C, ένα μεταγραφικό παράγοντα που εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα των ωοθυλακίων και εμπλέκεται στην καταστολή της σύνθεσης της ειδικής πρωτεΐνης του αυγού (ESP, Egg Specific Protein) κατά τη μετάβαση από τη βιτελλογένεση στη χοριογένεση.

Ανιχνεύτηκαν τρία μετάγραφα του γονιδίου BmSH3, τα BmSH3-A1, BmSH3-A2 και BmSH3-B. Με την μελέτη του προτύπου μεταγραφής του γονιδίου *bmsh3* διαπιστώθηκε η έκφρασή του σε όλους τους ιστούς του *B. mori* που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα, το μετάγραφο BmSH3-A1 ανιχνεύτηκε σε όλους τους ιστούς, που αναλύθηκαν, το BmSH3-A2 βρέθηκε στην ωοθήκη και στο κεφάλι ενώ το BmSH3-B ανιχνεύτηκε αποκλειστικά στην ωοθήκη. Ειδικά για τα μετάγραφα BmSH3-A1 και BmSH3-B, διαπιστώθηκε η συστατική συσσώρευσή τους σε όλα τα στάδια της ωογένεσης που μελετήθηκαν.

Για την μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης της BmSH3 παράχθηκαν δύο αντισώματα, το anti-BmSH3.1 έναντι της περιοχής που συνδέει τη SoHo με την πρώτη SH3 περιοχή και το anti-BmSH3.2 έναντι των SH3 περιοχών. Με πειράματα τύπου Western κατέστη δυνατή η αναγνώριση πολλαπλών πιθανών ισομορφών της BmSH3 σε όλους τους ιστούς του μεταξοσκώληκα. Για την ειδική μελέτη της BmSH3-A1, χρησιμοποιήθηκε το anti-BmSH3.1 αντίσωμα. Πειράματα τύπου Western με τη χρήση του anti-BmSH3.1 επιβεβαίωσαν την ειδική έκφραση της BmSH3 σε εκχυλίσματα από τους ιστούς της ωοθήκης, όπου αναγνωρίστηκαν δύο ζώνες μοριακού βάρους 75 kDa και 85 kDa. Προτείνεται ότι οι ισομορφές αυτές προέρχονται από ειδική πρωτεόλυση

της αυθεντικής BmSH3-A1, που αναγνωρίστηκε ακέραιη στο περίβλημα των ωοθυλακίων (sheath) με μοριακό βάρος άνω των 120 kDa.

Η υποκυτταρική κατανομή της BmSH3 σε κυτταροσειρές εντόμων προσδιορίστηκε με τη μελέτη της χιμαιρικής πρωτεΐνης EYFP-BmSH3 καθώς και της αυθεντικής BmSH3-A1, με ανοσοφθορισμό. Και στις δύο περιπτώσεις η BmSH3 βρέθηκε να έχει κυτταροπλασματική κατανομή.

Μελετήθηκε επίσης η υποκυτταρική κατανομή της BmSH3-A1 σε κύτταρα εντόμων μετά από συνδιαμόλυνση με τον φορέα έκφρασης για τον παράγοντα BmE75A ή τον BmE75C. Ενδιαφέρον παρουσίασε ο εντοπισμός του BmE75C: εκτός από τον αναμενόμενο πυρηνικό εντοπισμό παρατηρήθηκε και ο έντονος κυτταροπλασματικός εντοπισμός του σε κοκκία, κατά την συνέκφρασή του με την BmSH3, σε δομές των κυττάρων που μοιάζουν με ψευδοπόδια, στα φιλοπόδια και λαμελλοπόδια. Η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκε και με δοκιμές ανοσοκατακρήμνισης, στην ίδια κυτταρική σειρά. Η παρατήρηση αυτή είναι σημαντική γιατί υποδεικνύει νέες λειτουργικές ιδιότητες για την BmE75C, όπως τη συμμετοχή της στην μετανάστευση των κυττάρων μέσω της αλληλεπίδρασης με την BmSH3. Επιπλέον, πιθανολογείται η εμπλοκή της στη διαφοροποίηση της λειτουργίας της BmE75C. Ο εντοπισμός του ορφανού πυρηνικού υποδοχέα BmE75C στο κυτταρόπλασμα παρουσιάζεται για πρώτη φορά και ο συνεντοπισμός του με την BmSH3 σε ειδικές δομές, όπως τα ψευδοπόδια, ανοίγει νέες προοπτικές για τους πιθανούς ρόλους του BmE75C στην οργάνωση του κυτταροσκελετού.

Μεγάλο ενδιαφέρον επίσης παρουσίασε και η υποκυτταρική κατανομή της BmSH3 στα θυλακοκύτταρα των ωοθυλακίων. Κατά τη βιττελλογένεση παρατηρήθηκε ο κυτταροπλασματικός εντοπισμός της στα θυλακοκύτταρα. Σημαντική αλλαγή του προτύπου φθορισμού παρατηρήθηκε κατά τη χοριογένεση. Ειδικότερα κατά την πρώιμη χοριογένεση, η BmSH3 ανιχνεύτηκε κυρίως στο κυτταρόπλασμα των θυλακοκυττάρων, στις μεσαίες τομές αυτών και, αμυδρά, στην κορυφαία και στη βασική πλευρά και στις συνεκτικές επαφές μεταξύ των κυττάρων. Κατά την όψιμη χοριογένεση, η κατανομή της BmSH3 στα επιθηλιακά διαφοροποιείται και εμφανίζει πολικότητα. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε η απουσία της BmSH3 από τις μεσαίες τομές των κυττάρων και η συσσώρευσή της περιμεμβρανικά, στις επαφές μεταξύ των κυττάρων και στη βασική και την κορυφαία πλευρά. Επιπλέον, στην κορυφαία πλευρά των θυλακοκυττάρων η BmSH3 εντοπίστηκε σε μεγάλα κοκκία, τα οποία αντικατοπτρίζουν την δομή του

σχηματιζόμενου χορίου, γεγονός που υπονοεί την εμπλοκή της BmSH3 στον μηχανισμό έκκρισης των πρωτεϊνών του χορίου.

Συμπερασματικά προτείνεται ότι εκτός από τη συμμετοχή της στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, όπως συμβαίνει με όλες τις μέχρι τώρα χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες της οικογένειας CAV, η BmSH3 πιθανά εμπλέκεται και στους μηχανισμούς ανάπτυξης των ωοθυλακίων. Ειδικότερα, είναι πιθανό ότι συμμετέχει σε διαδικασίες όπως (α) το κλείσιμο των αυλακώσεων μεταξύ των θυλακοκυττάρων, που σχηματίζονται κατά το στάδιο της βιτελλογένεσης κατά τη μετάβαση από τη βιτελλογένεση στη χοριογένεση με την συμμετοχή της στον σχηματισμό συνεκτικών επιφανειών μεταξύ των θυλακοκυττάρων και (β) στο μηχανισμό έκκρισης των πρωτεϊνών του χορίου.

ABSTRACT

Members of the adaptor protein family CAV (CAP, ArgBP2, Vinecin), which is characterized by the presence of three SH3 domains at the C-terminal and a SoHo domain at the N-terminal of its members are known to participate in various signaling pathways that lead to cytoskeletal reorganization or growth hormone responses. In this study, we present the identification of BmSH3, a new member of the CAV family found in the domesticated silkmoth *Bombyx mori*. BmSH3 was initially identified as a protein interacting with the orphan nuclear receptor BmE75C, a known transcription factor found to be expressed in the epithelium of the silkmoth ovarian follicles and known to repress the expression of the gene encoding the egg specific protein (ESP) during the transition from vitellogenesis to choriogenesis.

Three putative transcripts originating from a single *bmsh3* gene have been identified, BmSH3-A1, BmSH3-A2 and BmSH3-B. We studied the transcription pattern of BmSH3 and deduced the presence of BmSH3 mRNA in all studied tissues. In particular, for the three identified transcripts we found that BmSH3-A1 is expressed in all tissues studied, BmSH3-A2 is expressed in the ovary and the head, whereas transcripts of BmSH3-B were identified only in the ovary. The expression of BmSH3-A1 and BmSH3-B transcripts occurred in all stages of oogenesis.

To study BmSH3 at the protein level, we generated two antibodies, anti-BmSH3.1 that recognizes the linker area between the SoHo and the first SH3 domain and BmSH3.2 that recognizes the SH3 domains. Using immunobloting, multiple possible protein isoforms were detected in various silkworm tissues. For the specific identification of BmSH3, we used mainly the anti-BmSH3.1 antibody, based on its specificity for the follicles. The expression of BmSH3 was verified also by Western immunoblotting of follicular tissue, where two distinct isoforms were detected of approximately 75 and 85 kDa, which we propose to be specific proteolytic cleavage products of the original BmSH3-A1 isoform that was identified intact in the sheath.

The subcellular distribution BmSH3 was investigated by transient expression of EYFP-BmSH3-A1 chimeric proteins in silkmoth cultured cells and examination of the subcellular distribution of BmSH3 in developing follicles.

Following the establishment of the cytoplasmic distribution of BmSH3-A1 by immunofluorescence in transiently transfected cell lines, we examined the subcellular localization in cell lines co-transfected with BmSH3-A1 and expression vectors for

BmE75A or BmE75C. Although the localization of BmSH3-A1 remained cytoplasmic, a clear change was established in the distribution of BmE75C, which in addition to the nucleus, was also found in the cytoplasm and more specifically in filopodia and lamellopodia formations.

The colocalization of BmSH3-A1 with BmE75C was verified by immunoprecipitation assays. We confirmed the interaction of BmSH3-A1with BmE75C in insect cell limes co-transfected with respective expression constructs. After co-transfection of the same insect cell lines with vectors expressing BmSH3-A1 and BmE75A, we could observe the interaction of these two proteins as well.

This significant observation implies new functions for BmE75C and BmE75A. Specifically, for the BmE75C isoform we speculate based on its subcellular distribution, which is also involved in cell movement via the BmSH3-A1 interaction. Hence, BmSH3 could modify the known role of BmE75C and BmE75A as transcription factors to other functions.

A cytoplasmic distribution of BmSH3 as represented by BmSH3-A1, was also found to exist in developing follicles, both during vitellogenesis and choriogenesis. Of particular interest was the investigation of the spatial distribution of BmSH3-A1 during choriogenesis, which revealed a dynamic change in subcellular distribution that progressed from a diffuse cytoplasmic occurance in the middle sections of the cells of the follicular epithelium during early choriogenesis, to a polarized distribution at the apical and basal sites of the follicular epithelium during late choriogenesis. At the apical site of the follicular cells of late choriogenic follicles, BmSH3 was observed at specific foci that may reflect the emerging structure of the developing chorion. Because of this distribution, we propose that BmSH3 is also involved in the mechanism of chorion protein secretion during eggshell formation.

Apart from the cytoplasmic distribution of BmSH3 at the middle sections of the follicular cells during early choriogenesis, BmSH3 was also faintly observed at the apical site of newly formed cell-cell adhesions, which appear as thick polygonal shapes during late choriogenesis. Based on such observations, we also propose that BmSH3 plays a role in the loss of patency during the transition from vitellogenesis to choriogenesis.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ο ΜΕΤΑΞΟΣΚΩΛΗΚΑΣ *Bombyx mori* ΩΣ ΠΡΟΤΥΠΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ.

Τις τελευταίες δεκαετίες τα λεπιδόπτερα έντομα αποτέλεσαν πρότυπα συστήματα για βασική έρευνα στους τομείς της φυσιολογίας, της ενδοκρινολογίας και της βιοχημείας των εντόμων αλλά και κύρια αντικείμενα έρευνας για μελέτες αναπτυξιακής βιολογίας, εξέλιξης και γονιδιωματικής. Η σημασία των λεπιδοπτέρων ως πρότυπων συστημάτων μελέτης είναι ιδιαίτερα μεγάλη, καθώς η μελέτη τους παρέχει τη δυνατότητα διερεύνησης ενός μεγάλου φάσματος βιολογικών φαινομένων.

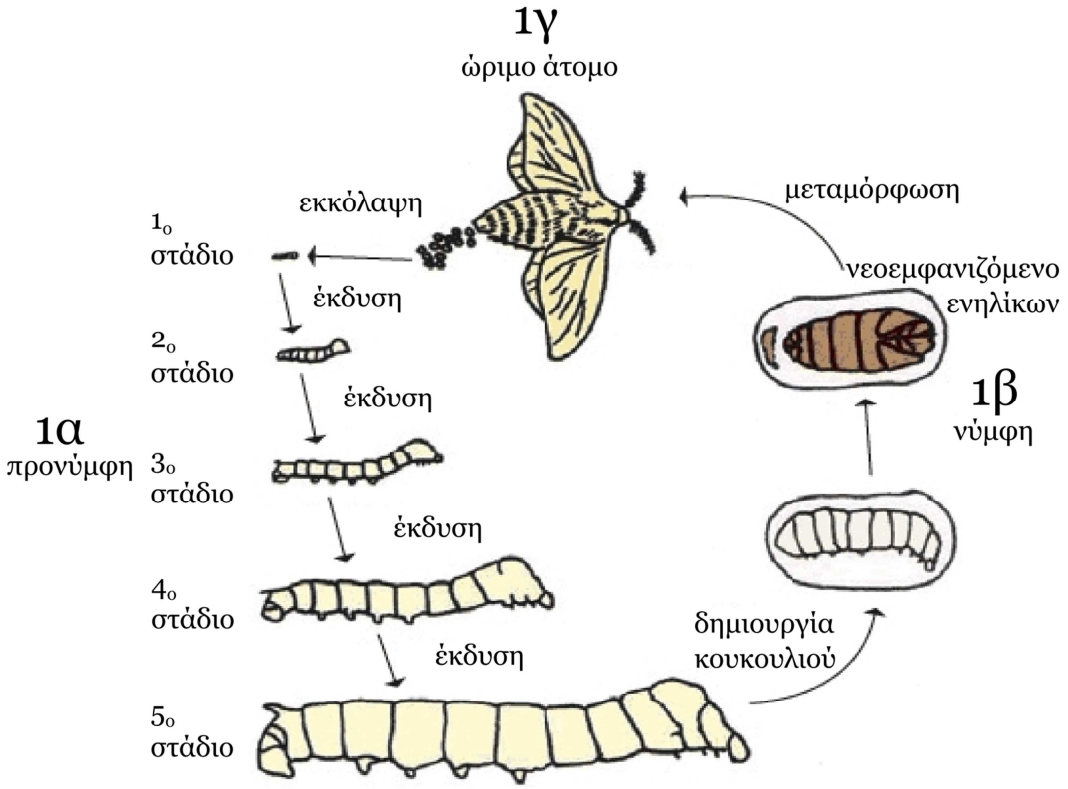
Ένα κλασικό παράδειγμα έρευνας των λεπιδοπτέρων είναι αυτό που σχετίζεται με τους σχηματισμούς σχεδίων (patterns) στα φτερά της πεταλούδας. Η ποικιλομορφία των φτερών τους (η συμμετρία των σχεδίων και η αισθητική τους τελειότητα) είναι ιδιαίτερα σημαντική τόσο για μελέτες συστηματικής και εξελικτικής βιολογίας, όσο και για την εξαγωγή ή την κατανόηση θεωριών για το σχηματισμό προτύπων (Nijhout, 2001, 2010). Η λεπτομερής ανάλυση των στίξεων που διακοσμούν τα φτερά των λεπιδοπτέρων απετέλεσε σημαντικό οδηγό προς την ανάπτυξη της βιο-οργανικής χημείας (Willis et al., 1995). Επιπλέον, πολλά από όσα είναι γνωστά για τις ορμόνες και για την ρύθμιση της ζωής των εντόμων έχουν την προέλευσή τους στη μελέτη των λεπιδοπτέρων. Τα λεπιδόπτερα διαθέτουν ένα σχετικά εξελιγμένο σύστημα αναγνώρισης και απόκρισης στις φερομόνες (Willis et al., 1995). Η ανακάλυψη αυτή έγινε δυνατή λόγω του σχετικά μεγάλου μεγέθους τους, και απετέλεσε έναυσμα μεταγενέστερων ερευνών, που οδήγησαν στον λεπτομερή χαρακτηρισμό της νευρικής απόκρισης στις φερομόνες. Ένα από τα σημαντικότερα συστήματα μελέτης της οικογένειας των λεπιδοπτέρων είναι ο μεταξοσκώληκας *Bombyx mori*.

Μία μοναδική ιδιότητα του μεταξοσκώληκα (και κάποιων μελών της οικογένειας Saturniidae, όπως του Cecropia Moth (*Hyalophora c ecropia*), είναι η παραγωγή του μεταξιού. Η οικονομική σημασία της παραγωγής μεταξιού ώθησε στην καθιέρωση του μεταξοσκώληκα ως πρότυπου συστήματος μελέτης (Sprague, 1995). Με μόνη εξαίρεση την Δροσόφιλα (*Drosophila melanogaster),* ο *B. mori* αποτελεί, ένα από τα πιο καλά χαρακτηρισμένα από γενετική άποψη έντομα. Η μεγάλη ποικιλία σε χαρακτηρισμένες μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη μορφολογία, την ανάπτυξη και τη συμπεριφορά του, παράλληλα με την οικονομική σημασία του εντόμου αυτού

οδήγησαν στην καθιέρωση του μεταξοσκώληκα ως πρότυπου συστήματος μελέτης και από τη σκοπιά της γενετικής (Nagaraju, 2002; Nagaraju and Goldsmith, 2002). Την έρευνα στο μεταξοσκώληκα ενίσχυσε η πρόσφατη αποκωδικοποίηση του γονιδιώματός του (Mita et al., 2004), The International Silkworm Genome Consortium, 2008), καθώς αποτέλεσε το πρώτο (και για την ώρα μοναδικό) λεπιδόπτερο, του οποίου η πλήρης γενωμική αλληλουχία έχει ταυτοποιηθεί.

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα χρήσης του μεταξοσκώληκα ως προτύπου συστήματος μελέτης, είναι η ωογένεση, δηλαδή η διαδικασία κατασκευής και ωρίμανσης των αυγών και, ειδικά, του πρωτεϊνικού κελύφους τους (χόριο). Η κατασκευή του χορίου έχει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, όπως την έκφραση των πρωτεϊνών που συγκροτούν το χόριο και εκφράζονται από εξειδικευμένα κύτταρα, τα επιθηλιακά κύτταρα του ωοθυλακίου (ιδιαίτερη αναφορά ακολουθεί στο κεφάλαιο 1.2 της εισαγωγής), στα οποία υλοποιείται ένα αυστηρά ρυθμιζόμενο αναπτυξιακό πρόγραμμα έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων (Kafatos FC et al., 1995; Kafatos et al., 1987). Επιπλέον, η ευκολία απομόνωσης και προσδιορισμού της αναπτυξιακής σταδιοποίησης των ωοθυλακίων, σε συνδυασμό με την οργάνωση των γονιδίων του χορίου σε ένα γενετικό τόπο στο ίδιο χρωμόσωμα, καθιστά τον μεταξοσκώληκα ιδανικό σύστημα μελέτης των ρυθμιστικών μηχανισμών που ελέγχουν τη διαφορική έκφραση γονιδίων (Bock et al., 1986). Η μελέτη των αναπτυξιακών διεργασιών στον μεταξοσκώληκα μπορεί επιπλέον να επωφεληθεί από την αντιστοιχία των γονιδίων του *B. mori* που εμπλέκονται στην ωογένεση με αντίστοιχα γονίδια της *D. melanogaster*, καθώς και από την ύπαρξη μιας σειράς τεχνικών και εργαλείων στον Bombyx, που επιτρέπουν την μελέτη της ωογένεσης τόσο σε γενετικό όσο και σε μοριακό επίπεδο.

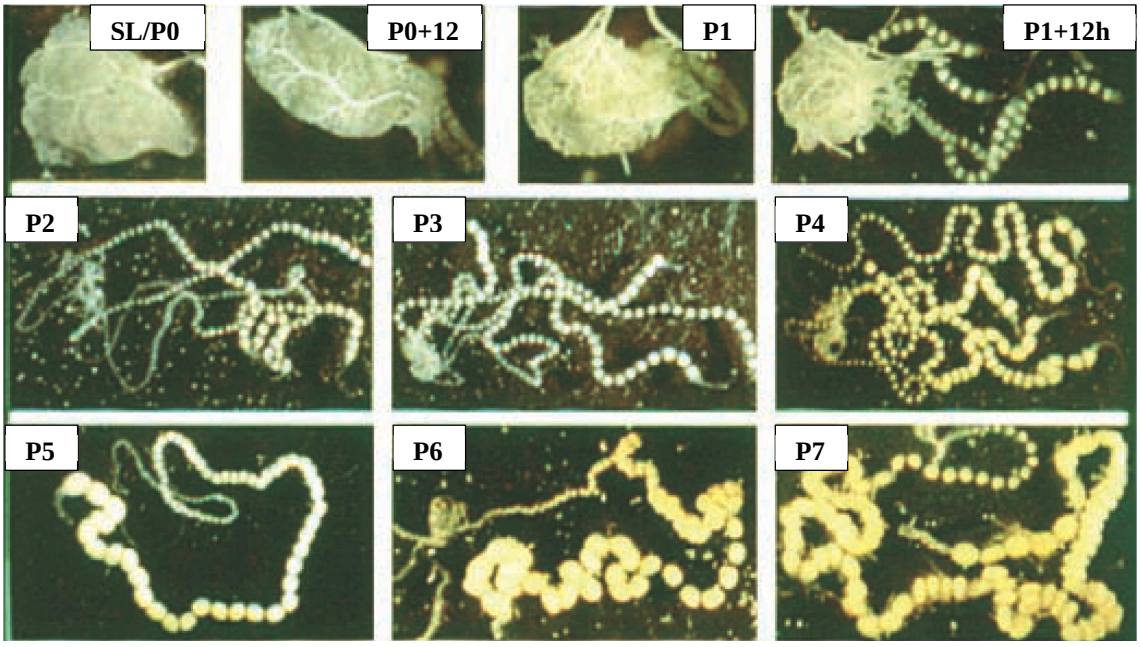
1.2. Η ΩΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΟΝ ΜΕΤΑΞΟΣΚΩΛΗΚΑ *Bombyx mori*.



Εικόνα 1.1: Ο κύκλος ζωής του μεταξοσκώληκα B. mori. **α**. Από το γονιμοποιημένο αυγό εκκολάπτεται η προνύμφη. Η προνύμφη διέρχεται από 5 στάδια τα οποία διαχωρίζονται από τις διαδοχικές εκδύσεις του εντόμου. Στο τελευταίο στάδιο μετά από την σίτιση η προνύμφη πλέκει γύρω από τον εαυτό της το κουκούλι μέσα στο οποίο και εγκλωβίζεται. Το δέρμα της προνύμφης γίνεται διαφανές και μετά την ολοκλήρωση του πλεξίματος του κουκουλιού πραγματοποιείται η έκδυση της που μεταβάλλει την προνύμφη σε νύμφη. **β**. Το δεύτερο στάδιο αποτελεί το στάδιο της νύμφης στο οποίο γίνεται η μεταμόρφωση του μεταξοσκώληκα. Κατά το τελευταίο στάδιο της νύμφης το έντομο ονομάζεται νεοεμφανιζόμενο ενήλικο (pharate adult). **γ**. Το τελευταίο στάδιο είναι το στάδιο του ώριμου εντόμου, (πεταλούδα), στο οποίο γίνεται και η γονιμοποίηση των αυγών.

Ο κύκλος ζωής του μεταξοσκώληκα διέρχεται από τρεις διακριτές φάσεις (εικόνα 1.1). Αμέσως μετά την εκκόλαψη του γονιμοποιημένου αυγού η πρώτη φάση είναι αυτή της προνύμφης (εικόνα 1.1 α). Η εκκόλαψη του γονιμοποιημένου αυγού μπορεί να διαρκέσει από έξι έως είκοσι μέρες. Η φάση της προνύμφης χωρίζεται σε πέντε επιμέρους στάδια (instar), τα οποία διαχωρίζονται από τις εκδύσεις της προνύμφης ανά στάδιο. Η περίοδος αυτή χαρακτηρίζεται από την συνεχή σίτιση της προνύμφης και τη συνεχή αύξηση της μάζας της. Η φάση της προνύμφης διαρκεί συνολικά εικοσιπέντε με τριανταπέντε μέρες. Μετά το πέμπτο στάδιο η προνύμφη πλέκει το κουκούλι, για περίπου τρεις μέρες και μετά το πέρας της κατασκευής του γίνεται η τελευταία έκδυση της προνύμφης που σηματοδοτεί την έναρξη του σταδίου

της νύμφης (εικόνα 1.1 β). Κατά το στάδιο της νύμφης γίνεται η μεταμόρφωση της νύμφης στη τελική φάση της ζωής του μεταξοσκώληκα, δηλαδή στο ώριμο έντομο (εικόνα 1.1 γ). Το ώριμο άτομο εξέρχεται από το κουκούλι μετά από περίπου είκοσι μέρες, και το κύριο μέλημα των εντόμων είναι η αναπαραγωγή τους μέσω της γονιμοποίησης των αυγών και της εναπόθεσής τους. Η ανάπτυξη των ωοθυλακίων, των μονάδων από τις οποίες δημιουργούνται τα ώριμα αυγά έτοιμα προς γονιμοποίηση, ξεκινάει με την μεταμόρφωση του μεταξοσκώληκα σε νύμφη μετά το πέρας του πέμπτου σταδίου της προνύμφης (εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2: Αναπτυξιακά στάδια της ωοθήκης/ωοθυλακίων του μεταξοσκώληκα *B. mori* (Swevers et al., 2005). Στο τέλος του 5ου προνυμφικού σταδίου και κατά το στάδιο του πλεξίματος του κουκουλιού (Spinning Larvae, SL) και μέχρι δώδεκα ώρες μετά την τελευταία έκδυση που μεταβάλλει την προνύμφη σε νύμφη (P0 και P0+12, P: Pupa), η ωοθήκη περιβάλλεται από το προστατευτικό κάλυμμα. Όταν τα επίπεδα των εκδυστεροειδών αυξηθούν το περίβλημα διαρρηγνύεται και τα ωοθηκάρια που περιέχουν τα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια ελευθερώνονται στην κοιλιακή περιοχή (P1, P1+12, Pn:Pupa ή Pharate adult, n: μέρες μετά την έκδυση). Δύο με τρεις μέρες μετά από την τελική έκδυση, ξεκινάει η βιτελλογένεση (P2 και P3), ενώ η χοριογένεση ξεκινάει πέντε μέρες μετά από την έκδυση (P5). Κατά το τέλος του σταδίου του νεοεμφανιζόμενου ενήλικου χοριογενικά ωοθυλάκια συσσωρεύονται στον ωαγωγό και ξεκινάει η ωοαπόθεση (P6 και P7).

Η οργανογένεση των ωοθηκών (ovaries) ολοκληρώνεται από τα πρώτα στάδια της προνύμφης και ήδη στο 3ο στάδιο της προνύμφης οι ωοθήκες είναι ορατές. Στον *B. mori* η ωρίμανση των ωοθυλακίων (follicles) γίνεται αποκλειστικά κατά το στάδιο της

νύμφης και του νεοεμφανιζόμενου ενήλικου και ολοκληρώνεται πριν από την έξοδο του ώριμου εντόμου από το κουκούλι (Tsuchida et al., 1987).

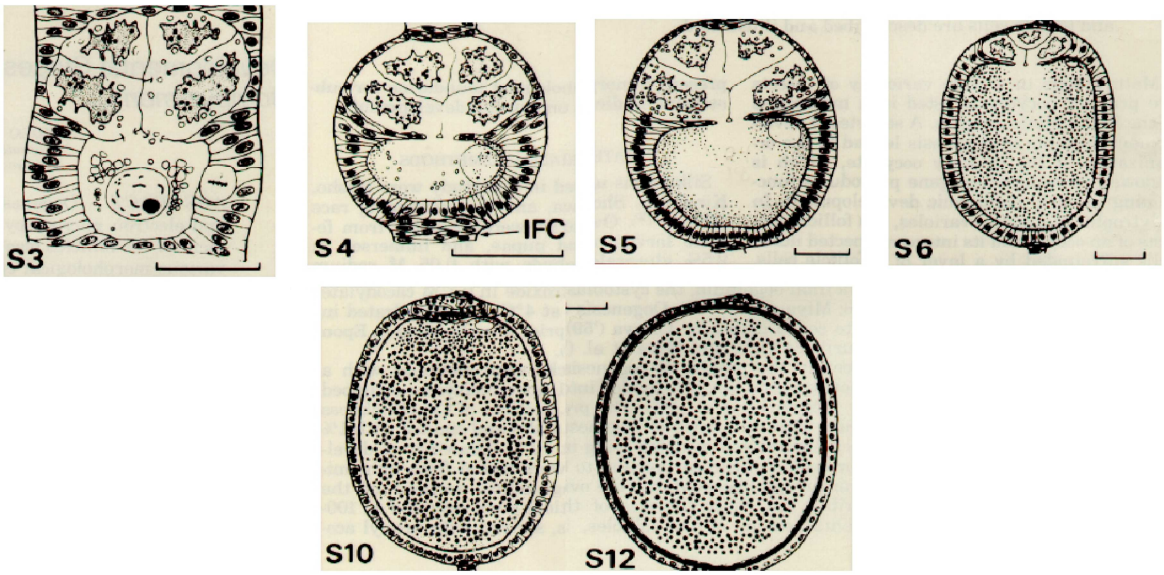
Κάθε θηλυκός μεταξοσκώληκας έχει δύο ωοθήκες. Όπως σε όλα τα ολομετάβολα και πολυτροφικά έντομα, από κάθε ωοθήκη αναπτύσσονται τέσσερις σωληνοειδείς ιστοί, τα ωοθηκάρια (ovarioles), μέσα στα οποία αναπτύσσονται τα ωοθυλάκια (follicles). Η ανάπτυξη των ωοθυλακίων περιλαμβάνει τρία διακριτά στάδια: το στάδιο της προβιτελλογένεσης, κατά το οποίο γίνεται ο σχηματισμός του ωοθυλακίου, το στάδιο της βιτελλογένεσης, κατά το οποίο το ωοκύτταρο τροφοδοτείται με διάφορα υλικά, κυρίως πρωτεΐνες και κατά βάση την ειδική πρωτεΐνη του αυγού (Egg-Specific Protein, ESP), και τέλος το στάδιο της χοριογένεσης, το οποίο χαρακτηρίζεται από την κατασκευή του χορίου (κέλυφος του αυγού), στάδιο από το οποίο προκύπτει τελικά το ώριμο αυγό, που είναι έτοιμο για γονιμοποίηση (εικόνα 1.2 P7).

Η έναρξη της ανάπτυξης των ωοθυλακίων σηματοδοτείται από τη παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης της ορμόνης 20-υδροξυ-εκδυσόνης (20E), μιας στεροειδούς ορμόνης, η οποία εκκρίνεται από τους προθωρακικούς αδένες κατά την μεταμόρφωση της προνύμφης σε νύμφη (Tsuchida et al., 1987). Η 20E στον *B. mori* αποτελεί την ορμόνη ελέγχου της ανάπτυξης των ωοθυλακίων και διεγείρει τόσο την προβιτελλογένεση όσο και την βιτελλογένεση. Η παρουσία της 20E αποτελεί ικανή και αναγκαία συνθήκη για την εκκίνηση τόσο του αναπτυξιακού σταδίου της προβιτελλογένεσης όσο και της βιτελλογένεσης στα ωοθυλάκια (Swevers and Iatrou, 1999). Ο μεταξοσκώληκας *B. mori* ανήκει στην κατηγορία των λεπιδοπτέρων, στα οποία δεν φαίνεται να εμπλέκεται στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων η ορμόνη νεότητας ή νεαροποίησης (JH, Juvenile Hormone) (Izumi et al., 1984).

1.2.1. ΠΡΟΒΙΤΕΛΛΟΓΕΝΕΣΗ

Κατά τη διάρκεια της προβιτελλογένεσης σχηματίζονται τα ωοθυλάκια στο πρόσθιο άκρο του ωοθηκαρίου. Αυτά αποτελούνται από επτά τροφικά κύτταρα (ή και τροφοκύτταρα, nurse cells) και ένα ωοκύτταρο (oocyte), τα οποία αποτελούν προϊόντα μιτωτικών διαιρέσεων και παραμένουν ενωμένα μέσω κυτταροπλασματικών αυλακώσεων και περιβάλλονται από ένα μονόστοιβο επιθήλιο περίπου 5000 επιθηλιακών κυττάρων (follicular epithelium cells) (εικόνα 1.3, στάδια S3 και S4,

(Telfer and Anderson, 1968). Το σύμπλεγμα των τροφοκυττάρων και του ωοκύτταρου προέρχεται από τα εμβρυακά κύτταρα (germ cells). Μετά από διαιρέσεις τα εμβρυακά κύτταρα δίνουν τους κυστοβλάστες (cystoblasts), όπου μετά από ατελή κυτοκίνηση (cytokinesis) δημιουργείται το σύμπλεγμα των κυστοκυττάρων (cystocyte complex), από τα οποία τα επτά θα γίνουν τα τροφοκύτταρα και το ένα ωοκύτταρο. Τα επιθηλιακά κύτταρα προέρχονται από διαιρούμενα μεσοδερμικά κύτταρα, τα οποία επικαλύπτουν το σύμπλεγμα τροφοκυττάρων-ωοκύτταρου.

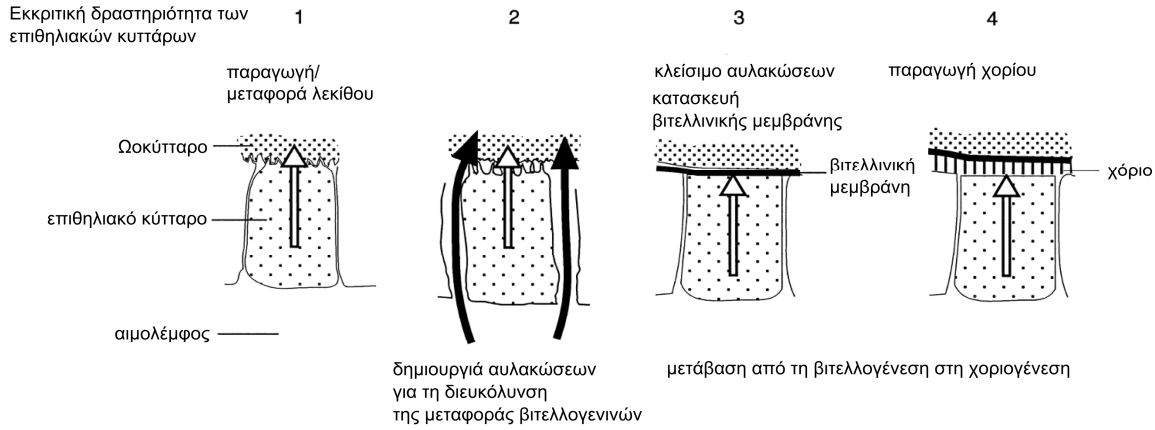


Εικόνα 1.3: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων ανάπτυξης *(τα στάδια συμβολίζονται ως S1, S2 κ.ο.κ.)* ***ενός ωοθυλακίου μεταξοσκώληκα B. mori****. Οι εικόνες S3-S4 αντιστοιχούν στην προβιτελλογένεση, οι S5-S6 στη βιτελλογένεση και οι S10-S12 στη χοριογένεση (Yamauchi, and Yoshitake, 1984). Συγκεκριμένα στο σχήμα S3 απεικονίζεται ο σχηματισμός του ωοθυλακίου από τα επιθηλιακά κύτταρα που περιβάλλουν το ωάριο και τα τροφικά κύτταρα (απεικονίζονται τέσσερα). Στο στάδιο S4 το ωάριο απεικονίζεται μεγαλύτερο λόγω της πρόσληψης συστατικών από τα τροφικά κύτταρα. Στο στάδιο S5 το ωοθυλάκιο έχει αποκτήσει ελλειψοειδές σχήμα και τα επιθηλιακά κύτταρα εγκολπώνουν το ωοκύτταρο και τα τροφοκύτταρα, ενώ έχει ξεκινήσει η πρόσληψη των λεκιθοπρωτεϊνών από το ωοκύτταρο. Στο στάδιο S6 το ωοκύτταρο έχει διογκωθεί λόγω της συσσώρευσης λεκιθοπρωτεϊνών και συστατικών από τα τροφικά κύτταρα. Σε σχέση με τον όγκο του ωοκυττάρου, τα τροφοκύτταρα συρρικνώνονται. Στο στάδιο S10 τα τροφικά κύτταρα έχουν συρρικνωθεί στη θέση όπου θα σχηματιστεί η μικροπύλη (αποτελεί μια μικρή οπή στο εμπρόσθιο τμήμα του αυγού, την περιοχή εισόδου του σπέρματος κατά τη γονιμοποίηση). Έχει ξεκινήσει η εναπόθεση των συστατικών του χορίου γύρω από τη βιτελλινική μεμβράνη του αυγού. Στο στάδιο S12 παρουσιάζεται το ώριμο χοριογενικό ωοθυλάκιο έτοιμο προς γονιμοποίηση.*

1.2.2. ΒΙΤΕΛΛΟΓΕΝΕΣΗ

Η έναρξη της βιτελλογένεσης συμπίπτει με την αύξηση των επιπέδων των εκδυστεροειδών στην αιμολέμφο στα μέγιστα δυνατά επίπεδα (Tsuchida et al., 1987). Η αύξηση των επιπέδων των εκδυστεροειδών κατά το στάδιο της νύμφης επιδρά άμεσα στη μορφολογία της ωοθήκης. Το περίβλημα της ωοθήκης διαρρηγνύεται και τα ωοθηκάρια που περιέχουν τα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια εξέρχονται προοδευτικά στην κοιλιακή χώρα (Yamauchi and Yoshitake, 1984) (εικόνα 1.2 P1, P1+12hr). Η έξοδος των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων από το περίβλημα της ωοθήκης επιτρέπει στα ωοθυλάκια να έρθουν σε άμεση επαφή με την αιμολέμφο και έτσι διευκολύνεται η πρόσληψη της λεκίθου από το ωοκύτταρο καθώς και η άμεση έκθεση σε διάφορους αναπτυξιακούς παράγοντες.

Κατά την διάρκεια της βιτελλογένεσης παρατηρείται σημαντική αύξηση του όγκου του ωοκυττάρου, σε αντίθεση με τον όγκο των τροφοκυττάρων (εικόνα 1.3, στάδιο S5, S6).



Εικόνα 1.4: Διακριτά στάδια της φυσιολογίας των επιθηλιακών κυττάρων κατά την βιτελλογένεση και τη χοριογένεση, με έμφαση στην εκκριτική τους δραστηριότητα *(προσαρμοσμένο από The Insects, R.F. Charpman, 4th edition 1998). Αποτυπώνονται 1) η παραγωγή και έκκριση των λεκιθοπρωτεϊνών από τα επιθηλιακά κύτταρα, 2) το άνοιγμα των αυλακώσεων που επιτρέπει την επικοινωνία τησαιμολέμφου με το ωοκύτταρο, 3) το κλείσιμο των αυλακώσεων και την έκκριση της βιτελλινικής μεμβράνης και 4) την έναρξη της παραγωγής του χορίου που σηματοδοτεί και το τελικό στάδιο της ανάπτυξης της ωογένεσης.*

1.2.2.1. Παραγωγή των λεκιθοπρωτεϊνών

Το κύριο χαρακτηριστικό της βιτελλογένεσης, από μοριακή σκοπιά, είναι η έκφραση από τα επιθηλιακά κύτταρα και έκκριση προς το ωοκύτταρο της ειδικής

πρωτεΐνης του αυγού (egg-specific protein, ESP) (Sato and Yamashita, 1991), η οποία αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά της λεκίθου. Η έναρξη της έκφρασης της ESP συμπίπτει με τα μέγιστα επίπεδα της 20Ε στην αιμολέμφο κατά την περίοδο της μετάβασης από την φάση της προνύμφης στη φάση της νύμφης.

Το πέρασμα των πρωτεϊνών της λεκίθου στο ωοκύτταρο ρυθμίζεται από τα επιθηλιακά κύτταρα. Κατά την διάρκεια της βιτελλογένεσης δημιουργούνται αυλακώσεις μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων (patency) για την μεταφορά των πρωτεϊνών της λεκίθου από την αιμολέμφο στο ωοκύτταρο (Telfer and Woodruff, 2002) (εικόνα 1.4). Η διαδικασία της δημιουργίας των διαύλων περιλαμβάνει την ενεργοποίηση καναλιών νατρίου/καλίου στα επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία οδηγούν σε μείωση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης των ιόντων και συρρίκνωσης των κυττάρων μέσω μείωσης της ωσμωτικής πίεσης (Sevala et al., 1995).

Το λιπαρό σώμα (fat body) αποτελεί τον κύριο ιστό παραγωγής λεκιθοπρωτεϊνών που ονομάζονται βιτελλογενίνες (vitellogenins) και αποτελούν το κύριο συστατικό της λεκίθου (Pan, 1971). Στον μεταξοσκώληκα, το 40% του ωοκυττάρου αποτελείται από την βιτελλίνη (vitellogenin), την κρυσταλλική μορφή των βιτελλογενινών, που αποθηκεύονται στο ωοκύτταρο. Στην αιμολέμφο του μεταξοσκώληκα, εμφανίζονται σε μεγάλο ποσοστό (~35%) και μικρότερες πρωτεΐνες, μεγέθους 30 kDa, που παράγονται και εκκρίνονται από το λιπαρό σώμα (Zhu et al., 1986). Η μεταφορά των λεκιθοπρωτεϊνών από την αιμολέμφο στο ωοκύτταρο γίνεται με ενδοκύττωση ελεγχόμενη από υποδοχείς των οποίων ο ρόλος είναι ο έλεγχος των υλικών που θα εισέλθουν στο ωοκύτταρο. Ο πιο κοινός τρόπος ενδοκύττωσης των πρωτεϊνών αυτών είναι μέσω κυστιδίων κλαθρίνης (clathrin) (Takei and Haucke, 2001).

Πέρα από την πρόσληψη της λεκίθου από την αιμολέμφο, τα τροφικά κύτταρα εφοδιάζουν το ωοκύτταρο με διάφορα κυτταρικά συστατικά (π.χ. ριβοσώματα) μέσω των κυτταροπλασματικών αυλακώσεων, συμβάλλοντας έτσι στη συνεχή αύξηση του όγκου του ωοκυττάρου, σε αντιδιαστολή με το δικό τους μέγεθος (σχήμα 1.3, στάδιο S6).

1.2.2.2. Βιτελλινική μεμβράνη

Κατά τα τελικά στάδια της βιτελλογένεσης αρχίζει η παραγωγή από τα επιθηλιακά κύτταρα των συστατικών της βιτελλινικής μεμβράνης, η οποία

σχηματίζεται ανάμεσα στα επιθηλιακά κύτταρα και στο ωοκύτταρο (εικόνα 1.4). Η βιτελλινική μεμβράνη έχει πολλαπλές λειτουργίες (Noguerón et al., 2000):

α. παρέχει έναν τρόπο για την χρονική διαφοροποίηση της έκκρισης και χρήσης των διαφόρων μορίων που εκκρίνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα. Η οργάνωση αυτή ίσως είναι απαραίτητη για τη σωστή κατασκευή του χορίου. Εναλλακτικά μπορεί να αποτρέπει την δημιουργία πρόωρων ή και ακατάλληλων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών του χορίου.

β. πιθανόν να αποτελεί μία δομή πρότυπο μήτρα, στην οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί η συγκρότηση των πρωτεϊνών του χορίου (Mauzy-Melitz and Waring, 2003).

γ. Αποτελεί μια πιθανή παροδική αποθήκη προϊόντων έκκρισης των επιθηλιακών κυττάρων που εμπλέκονται στον σχηματισμό προτύπου στο έμβρυο. Εξωκυτταρικές πρωτεΐνες που σηματοδοτούν τον σχηματισμό προτύπου στο έμβρυο έχει βρεθεί ότι αγκυροβολούν στη βιτελλινική μεμβράνη και συμμετέχουν ενεργά στον σχηματισμό της (LeMosy and Hashimoto, 2000; Cernilogar et al., 2001).

1.2.3. Η ΛΗΞΗ ΤΗΣ ΒΙΤΕΛΛΟΓΕΝΕΣΗΣ

Κατά τη λήξη της περιόδου της βιτελλογένεσης παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στη μορφολογία και φυσιολογία των ωοθυλακίων. Οι περισσότερες γνώσεις προέρχονται από την μελέτη της ανάπτυξης των ωοθυλακίων στα έντομα *D. melanogaster* και *Aedes aegypti* (κουνούπι). Οι κύριες διεργασίες που γίνονται κατά τη φάση αυτή είναι οι εξής:

α. Πριν από την έναρξη της χοριογένεσης, τα τροφικά κύτταρα αδειάζουν το περιεχόμενό τους στο ωοκύτταρο και ατροφούν (Mahajan-Miklos and Cooley, 1994):

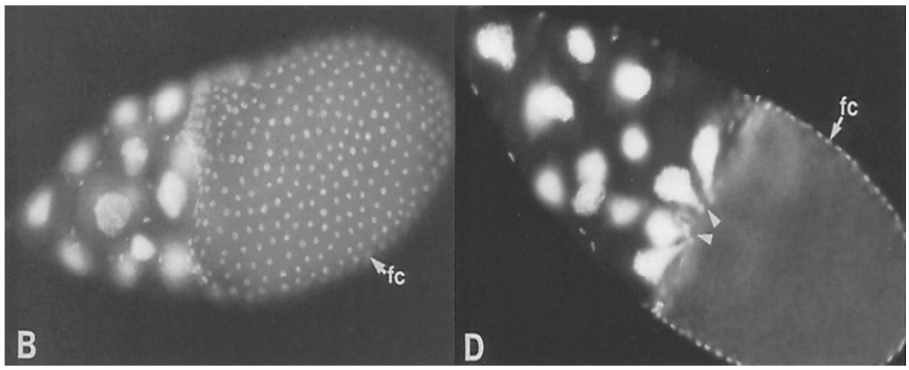
β. Παρατηρείται εισροή νερού στα επιθηλιακά κύτταρα και στο ωοκύτταρο, η οποία προκαλεί απότομη αύξηση του όγκου του ωοθυλακίου καθώς και φραγή των αυλακώσεων της βιτελλινικής μεμβράνης και των

επιθηλιακών κυττάρων μέσω των οποίων γινόταν η επικοινωνία του ωοθυλακίου με την αιμολέμφο (Wang and Telfer, 1996) (εικόνα 1.4).

γ. Παρατηρείται αλλαγή στο αναπτυξιακό πρόγραμμα των επιθηλιακών κυττάρων, όπου αντί για την έκφραση των γονιδίων των πρωτεϊνών της λεκίθου του αυγού, αρχίζει η παραγωγή των πρωτεϊνών του χορίου (έναρξη της χοριογένεσης) (Kafatos et al., 1977).

1.2.3.1. Απόπτωση και εκκένωση των τροφοκυττάρων

Η διαδικασία έχει μελετηθεί στην *D. melanogaster*, όπου το περιεχόμενο των τροφοκυττάρων ενίεται γρήγορα στο ωοκύτταρο αυξάνοντας στο διπλάσιο τον όγκο του τελευταίου (εικόνα 1.3 S6) (Mahajan-Miklos and Cooley, 1994). Η μεταφορά του κυτταροπλάσματος στο ωοκύτταρο εξαρτάται από τον κυτταροσκελετό, που παίζει καθοριστικό ρόλο σε δύο διαδικασίες. Αρχικά, ο κυτταροσκελετός του φλοιού (cortical cytoskeleton) μαζί με την μυοσίνη (myosin, κινητήρια πρωτεΐνη που σχετίζεται με τον κυτταροσκελετό) παράγει την απαραίτητη ώθηση για την εξαγωγή του κυτταροπλάσματος των τροφοκυττάρων (Wheatley et al., 1995). Κατά δεύτερο λόγο, οι δεσμίδες ακτίνης (actin bundles) "κρατάνε" τον πυρήνα των τροφικών κυττάρων στις μεμβράνες, αποτρέποντας έτσι την στένωση των αυλακώσεων που ενώνουν τα τροφοκύτταρα με το ωοκύτταρο, διευκολύνοντας την εκροή των υλικών (Cant et al., 1994), (εικόνα 1.5).



Εικόνα 1.5: ***Απώλεια των δεσμίδων ακτίνης στα τροφοκύτταρα και επικείμενη μεταφορά του πυρήνα προς το ωοκύτταρο, στα ωοθυλάκια της D. melanogaster*** *(Cant et al. 1994). Στην εικόνα Β παρουσιάζονται οι πυρήνες σε στέλεχος αγρίου τύπου από ωοθυλάκιο της D. melanogaster και στην εικόνα D οι πυρήνες από το μεταλλαγμένο στέλεχος, όπου οι πυρήνες φαίνεται να "σπρώχνονται" προς το ωοκύτταρο, (λευκά βέλη). Οι πυρήνες σημαίνονται με την ειδική χρωστική DAPI.*

Η έκκριση των υλικών από τα τροφοκύτταρα στο ωοκύτταρο έχει βρεθεί ότι συσχετίζεται με την έναρξη του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση) των τροφοκυττάρων (McCall and Steller, 1998). Τα υπολείμματα των τροφοκυττάρων αφομοιώνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα με φαγοκύτωση (Velentzas et al., 2007). Επιπλέον, έχει γίνει η συσχέτιση της έκκρισης των υλικών των τροφοκυττάρων με τις κινήσεις των επιθηλιακών κυττάρων κατά τη μετάβαση από τη βιτελλογένεση στη χοριογένεση, έτσι ώστε το ωοκύτταρο να καλυφθεί πλήρως από τα επιθηλιακά κύτταρα (εικόνα 1.3 στάδια S6-S10) και η εναπόθεση του χορίου από τα επιθηλιακά κύτταρα να γίνει σε όλη την επιφάνεια του ωοκυττάρου. Η διαδικασία αυτή πιστεύεται ότι συντονίζεται από το σηματοδοτικό μονοπάτι της JNK κινάσης (c-Jun NH_2-terminal kinase) (Dobens et al., 2001; Dequier et al., 2001). Στο σημείο όπου θα γίνει η ένωση των επιθηλιακών κυττάρων θα σχηματιστεί η μικροπύλη.

1.2.3.2. Ωσμωτική διόγκωση και κλείσιμο των αυλακώσεων

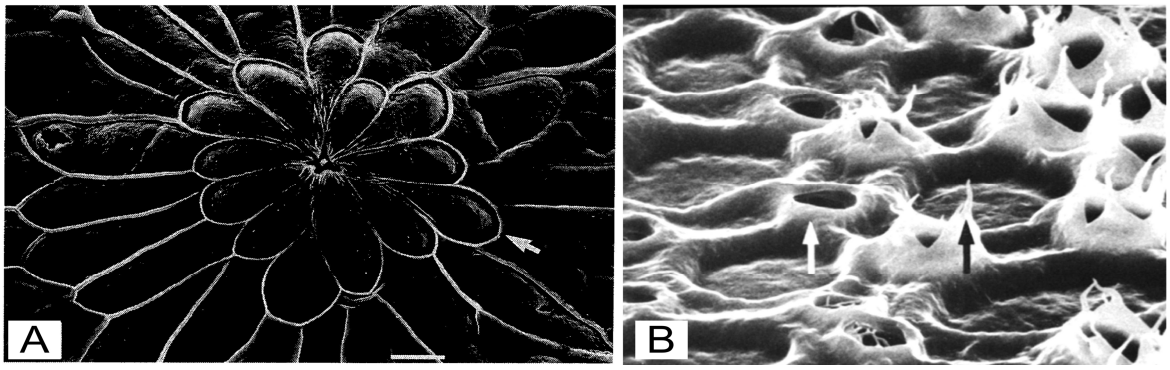
Ο μηχανισμός που προκαλεί το κλείσιμο των αυλακώσεων κατά την μετάβαση από την βιτελλογένεση στη χοριογένεση έχει μελετηθεί στο λεπιδόπτερο *Hyalophora. cecropia* (Telfer and Woodruff, 2002). Στο συγκεκριμένο έντομο, το κλείσιμο των αυλακώσεων είναι αποτέλεσμα της ωσμωτικής διόγκωσης των επιθηλιακών κυττάρων, που αυξάνουν τον όγκο τους κατά 50% λόγω της εισροής νερού. Η διαδικασία ξεκινάει από την αύξηση των επιπέδων του cAMP στα επιθηλιακά κύτταρα (Wang and Telfer, 1996), που οδηγεί στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνάσης Α και αλλάζει τις ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες των κυττάρων. Η αλλαγή γίνεται με την πρόσληψη ιόντων χλωρίου και καλίου και τη μείωση του pH του κυτταροπλάσματος, που τελικώς οδηγούν στην εισροή νερού στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων (Wang and Telfer, 1998). Επειδή τα επιθηλιακά κύτταρα και το ωοκύτταρο επικοινωνούν μέσω των αυλακώσεων επιτρέποντας την απρόσκοπτη ανταλλαγή ιόντων και άλλων μικρών μορίων, η ωσμωτική διόγκωση πραγματοποιείται εκτός από τα επιθηλιακά κύτταρα και στο ωοκύτταρο (εικόνα 1.4) (Telfer and Woodruff, 2002).

1.2.4. ΧΟΡΙΟΓΕΝΕΣΗ

Κατά τη διάρκεια της χοριογένεσης, δηλαδή της τελικής αναπτυξιακής φάσης του ωοθυλακίου γίνεται η έναρξη και η ολοκλήρωση της κατασκευής του κελύφους (χόριο) του αυγού. Η χοριογένεση πραγματοποιείται κατά την τελική διαφοροποίηση

των επιθηλιακών κυττάρων του ωοθυλακίου, τα οποία πλέον αφοσιώνονται στη σύνθεση και έκκριση των πρωτεϊνών του χορίου μεταξύ της βιτελλινικής μεμβράνης και των ίδιων (εικόνα 1.3, S10-S12). Οι πρωτεΐνες του χορίου τελικώς οργανώνονται εξωκυτταρικά σε μια μεγάλη μακροσκοπική κατασκευή (Orr-Weaver, 1991; Kafatos FC et al., 1995). Η κατασκευή της πολύπλοκης δομής του χορίου γίνεται για την προστασία του εμβρύου από το αφιλόξενο περιβάλλον, διατηρώντας παράλληλα και την αναγκαία επικοινωνία με αυτό. Έτσι, παρόλο που η δομή του κελύφους ελαχιστοποιεί τις απώλειες νερού, αποτρέποντας την αφυδάτωση του εμβρύου, μέσω ειδικών δομών του κελύφους, όπως οι αεροπύλες που εντοπίζονται στην πρόσθια πλευρά του κελύφους της *D. Melanogaster* αλλά και κατά μήκος του κελύφους κατά λωρίδες όπως στο *Antheraea polyphemus*, επιτρέπεται η διαμεταγωγή αερίων από το εξωτερικό περιβάλλον και η απρόσκοπτη αναπνοή του εμβρύου. Άλλες ειδικές δομές είναι η μικροπύλη (εικόνα 1.6 Α), στο εμπρόσθιο τμήμα, από την οποία γίνεται η είσοδος του σπέρματος για τη γονιμοποίηση και το operculum**,** από το οποίο θα γίνει η έξοδος της προνύμφης (Mazur et al., 1989; Spradling, 1993) (εικόνα 1.6 Β). Στα λεπιδόπτερα η πύλη αυτή, που διευκολύνει την εκκόλαψη της λάβρας, απουσιάζει (Hinton, 1981).

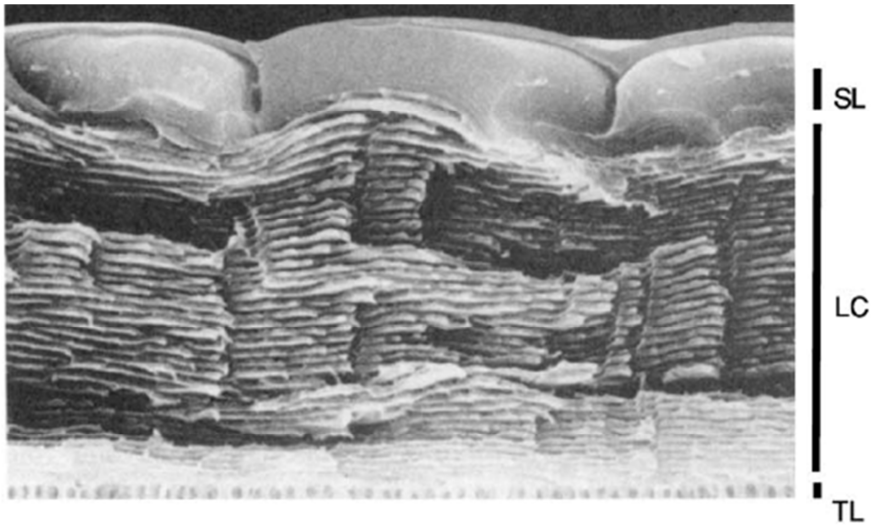
Η κατασκευή του χορίου έχει μελετηθεί κυρίως στην *D. melanogaster* αλλά σημαντική έρευνα έχει γίνει και στον μεταξοσκώληκα *B. mori*. Το χόριο που κατασκευάζεται στον *B. mori* αποτελεί μια πολύπλοκη δομή, την οποία απαρτίζουν περισσότερα από εκατό πολυπεπτίδια, ενώ η κατασκευή του γίνεται σε χρονικό διάστημα δύο ημερών, ακολουθώντας ένα αυστηρό πρόγραμμα ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων του χορίου (Kafatos FC et al., 1995; Kafatos et al., 1985). Μετά το τέλος της έκκρισης των πρωτεϊνών του χορίου, γίνεται η σταθεροποίηση και η ενδυνάμωση της μακρομοριακής δομής με την διασύνδεση των πρωτεϊνών του χορίου μέσω δι- και τρι-τυροσινικών διαμοριακών συνδέσεων, που δημιουργούνται από τη δράσης της υπεροξειδάσης του χορίου CPO (Margaritis, 1985; Han et al., 2000).



Εικόνα 1.6: Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) επιφάνειας ώριμου αυγού από B.mori (A) και Antheraea polyphemus (B) Επιφανειακή εικόνα του εμπρόσθιου πόλου του αυγού όπου διακρίνεται ο σχηματισμός «πετάλων ανθέων» που περιβάλλει την μικροπύλη (λευκό βέλος, Kawaguchi et al., 1996). (B) Επιφανειακή εικόνα του χορίου όπου διακρίνονται οι αεροπύλες (λευκό/μαύρο βέλος) αλλά και η «κορώνα» που περιβάλει συνήθως τις αεροπύλες (μαύρο βέλος, Mazur et al., 1989). Σημειώνεται ότι στον *B. mori* απουσιάζει η κορώνα.

Το κέλυφος του αυγού του μεταξοσκώληκα αποτελείται από τρεις βασικές δομές, την εσωτερική βιτελλινική μεμβράνη, το χόριο και την εξωτερική βασική μεμβράνη (Kafatos et al., 1977). Το χόριο συνίσταται κυρίως (άνω του 96%) από πρωτεΐνες και χωρίζεται σε δύο στοιβάδες, την στυλοειδή (trabecular layer, TL), στην εσωτερική πλευρά, η οποία αποτελείται από χώρους με αέρα που διαχωρίζονται από κάθετους στυλίσκους, και την πιο παχιά ελασματοειδή (lamellar chorion, LC), στην εξωτερική πλευρά (εικόνα 1.7), που συγκροτείται από αλλεπάλληλα στρώματα ινιδίων (ελάσματα), διατεταγμένα ελικοειδώς μεταξύ τους και παράλληλα προς την επιφάνεια του ωοκυττάρου (Kafatos et al., 1977). Στην υπεροικογένεια των Bombycoidea, όπως και στον *B.mori*, η ελασματοειδής στοιβάδα περιέχει πρόσθετα ελάσματα (lamellae), σε σύγκριση με το χόριο άλλων εντόμων, τα οποία αριθμούν άνω των εκατό στοιβάδων (εικόνα 1.7) και κατασκευάζονται από πρωτεΐνες του χορίου που κατηγοριοποιούνται σε δύο μεγάλες υπεροικογένειες, την α και την β. Τα γονίδια του χορίου που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες των κατηγοριών α και β υποδιαιρούνται σε επιπλέον τρεις οικογένειες. Συνολικά τα α-τύπου γονίδια περιλαμβάνουν τις οικογένεις ErA, A και HcA ενώ τα β τις οικογένειες ErB, B και HcB (Lecanidou et al., 1986; Eickbush and Izzo, 1995). Το χόριο του *B. mori* περιλαμβάνει μια εξωτερική ελασματοειδή στοιβάδα που αποτελείται από τις Hc πρωτεΐνες. Η στοιβάδα αυτή, που σχηματίζεται κατά την όψιμη χοριογένεση, είναι χαρακτηριστικό μόνο των ειδών που τα αυγά τους διέρχονται

από φάση διάπαυσης πριν την εκκόλαψη και αποσκοπεί στην προστασία του εμβρύου κατά την διάρκεια του χειμώνα (Kafatos et al., 1977).



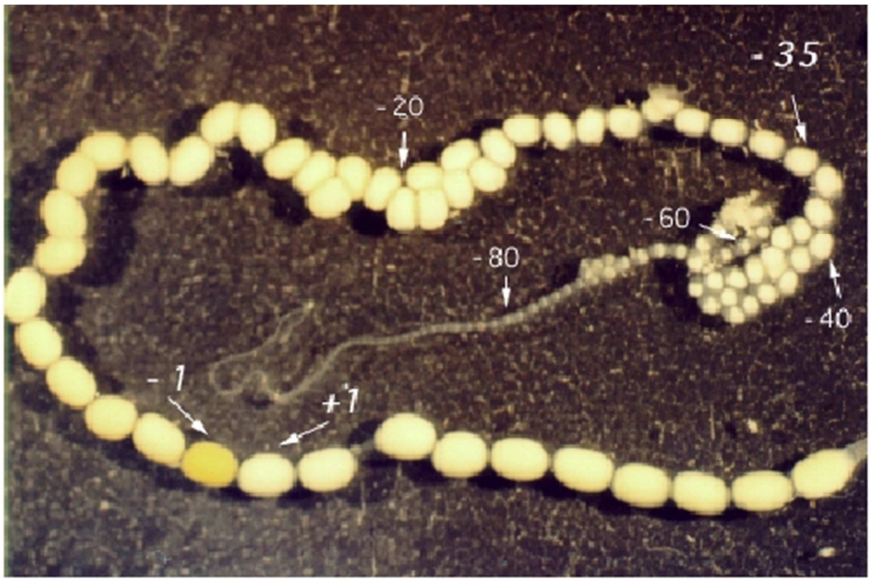
Εικόνα 1.7: Δομή του χορίου στα ώριμα αυγά του B. mori. *SEM εγκάρσιας τομής ολοκληρωμένου κελύφους. Στη διακεκομμένη ράβδο παρουσιάζονται οι διαφορετικές στοιβάδες του χορίου: η μικρή στυλοειδής στοιβάδα ((trabecular layer, TL), που εντοπίζεται στην πλευρά της βιτελλινικής μεμβράνης και του ωοκυττάρου (κορυφαία πλευρά). Ο κύριος όγκος του χωρίου αποτελείται από ελάσματα, που αποτελούν την ελασματοειδή περιοχή (lamellar chorion, LC). Στην εξωτερική πλευρά (βασική πλευρά), παρουσιάζονται τα επιφανειακά ελάσματα (μονόστοιβο επιθήλιο, Single Layer, SL). (Μεγέθυνση x2000, Kafatos et al. 1995)*

Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις έξι κύριες ομάδες πρωτεϊνών, που απαρτίζουν το χόριο (ErA/ErB, A/B και HcA/HcB), κατά κανόνα οργανώνονται σε ζεύγη με βάση την αναπτυξιακή εξειδίκευση. Έτσι, κατά την πρώιμη χοριογένεση εκφράζονται τα πρώιμα γονίδια των οικογενειών ErA/ErB και οι πρωτεΐνες που παράγονται είναι υπεύθυνες για τον σχηματισμό του αρχικού σκελετού του χορίου (Regier et al., 1982; Lecanidou et al., 1986, 1983). Τα γονίδια της οικογένειας A/B εκφράζονται ως επί το πλείστον στα μεσαία στάδια της χοριογένεσης και χωρίζονται σε 3 υποκατηγορίες ανάλογα με τα στάδια που μεταγράφονται (Eickbush and Izzo, 1995). Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν τα γονίδια της οικογένειας A/B, είναι υπεύθυνες για την επέκταση του αρχικού σκελετού και την αύξηση της πυκνότητας του σχηματιζόμενου χορίου. Κατά την όψιμη χοριογένεση εκφράζονται τα γονίδια HcA/B (Iatrou and Tsitilou, 1983; Iatrou et al., 1984). Οι πρωτεΐνες των όψιμων γονιδίων συμβάλλουν στη διασύνδεση όλων των πρωτεϊνών και στο σχηματισμό της υδρόφοβης εξωτερικής στοιβάδας.

Άλλες δομές του χορίου, δηλαδή το TL (εικόνα 1.7), στην εσωτερική πλευρά και οι ειδικές δομές στην εξωτερική επιφάνεια (Single Layer, SL, εικόνα 1.7) απαρτίζουν λιγότερο από το 5% της μάζας του χορίου και αποτελούνται από μοναδικές πρωτεΐνες διαφορετικές από αυτές του χορίου (Regier et al., 1982; Mazur et al., 1989).

Στα τελικά στάδια της χοριογένεσης, τα επιθηλιακά κύτταρα ατροφούν και αποπίπτουν και τα ώριμα αυγά απελευθερώνονται στον ωαγωγό περιμένοντας τη γονιμοποίηση (Bloch Qazi et al., 2003). Το ώριμο έντομο (πεταλούδα) του μεταξοσκώληκα B. mori φέρει περίπου 70 – 80 αυγά ανά ωοθηκάριο.

1.2.5. ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΡΙΘΜΗΣΗΣ



Εικόνα 1.8: Ωοθηκάριο του μεταξοσκώληκα *B. mori* (Swevers and Iatrou 2003). Ωοθηκάριο από ανατομία νύμφης 6 ημερών, όπου διακρίνονται ωοθυλάκια διαφορετικών σταδίων. Ο χαρακτηρισμός των αναπτυξιακών σταδίων γίνεται με βάση το πρώτο χοριογενικό ωοθυλάκιο το οποίο παίρνει την αρίθμηση +1. Ως στάδιο -1 χαρακτηρίζεται το τελευταίο βιτελλογενικό ωοθυλάκιο που είναι μικρότερο και με εντονότερο χρωματισμό από το πρώτο χοριογενικό. Με αρνητική αρίθμηση σημαίνονται τα νεώτερα βιτελλογενικά ωοθυλάκια.

Η διάκριση των ωοθυλακίων που βρίσκονται στη βιτελλογένεση από αυτά που έχουν εισέλθει στη χοριογένεση είναι εφικτή λόγω του μικρότερου όγκου των βιτελλογενικών ωοθυλακίων, αλλά και του εντονότερου κίτρινου χρώματος αυτών. Η φάση, στην οποία βρίσκεται κάθε ωοθυλάκιο στην αναπτυξιακή αλυσίδα, μπορεί να καθοριστεί από το πρώτο ωοθυλάκιο που μόλις έχει περάσει στο στάδιο της χοριογένεσης, το οποίο λαμβάνει κατά συνθήκη την αρίθμηση +1 ενώ το ωριμότερο βιτελογενετικό ωοθυλάκιο λαμβάνει την αρίθμηση –1. Αναλογικά, τα πιο πρώιμα από

το στάδιο –1 και τα πιο όψιμα από το +1 λαμβάνουν αντίστοιχα αύξουσα αρνητική και θετική αρίθμηση (εικόνα 1.8) (Kafatos et al., 1977). Η ανάπτυξη των ωοθυλακίων γίνεται σε σειρά, με τα ωριμότερα ωοθυλάκια να προηγούνται σε θέση ως προς το πρόσθιο άκρο του ωοθηκάριου. Κάθε ωοθυλάκιο, απέχει από τα γειτονικά του κατά περίπου 2 ώρες αναπτυξιακής απόστασης (Bock et al., 1986; Swevers and Iatrou, 1992). Η ύπαρξη τόσο του αριθμητικού συστήματος όσο και της σταθερής χρονικής αναπτυξιακής απόστασης των ωοθυλακίων αποτελεί το κυριότερο πλεονέκτημα στη μελέτη του αναπτυξιακού μοντέλου ανάπτυξης και διαφοροποίησης της ωοθήκης του μεταξοσκώληκα, καθώς επιτρέπει τον ακριβή χαρακτηρισμό των αναπτυξιακών σταδίων και καθιστά δυνατή την απομόνωση ωοθυλακίων συγκεκριμένου αναπτυξιακού σταδίου, ανεξάρτητα από την ηλικία του μεταξοσκώληκα (Swevers and Iatrou, 1998; Eystathioy et al., 2001). Ένα επιπλέον πλεονέκτημα είναι η ικανότητα αυτόνομης εκτέλεσης του προγράμματος διαφοροποίησης *ex vivo* με καλλιέργεια είτε ολόκληρων ωοθηκαρίων ή μεμονωμένων ωοθυλακίων (Swevers and Iatrou, 1999, 1992). Κάτω από αυτές τις συνθήκες ωοθυλάκια ωριμότερα του σταδίου -35 (Swevers and Iatrou, 1992, 2003; Swevers et al., 2005) έχουν την ικανότητα να ολοκληρώσουν τη βιτελλογένεση να εισέλθουν και να ολοκληρώσουν το πρόγραμμα της χοριογένεσης με κινητική παρόμοια με αυτή που παρατηρείται in vivo (Swevers and Iatrou, 1999).

1.2.6. Η ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ ΓΕΓΟΝΟΤΩΝ ΠΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ 20Ε

Δύο κυρίως ορμόνες πιστεύεται ότι ελέγχουν την ανάπτυξη όλων των εντόμων, συμπεριλαμβανομένου και του μεταξοσκώληκα *Bombyx mori*: η ορμόνη νεαροποίησης (juvenille hormone) και η 20-υδρόξη εκδυσόνη (20E). Η ορμόνη νεαροποίησης παρόλο που αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της ωογένεσης σε άλλα έντομα, στον *B. mori* δεν φαίνεται να συμμετέχει στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων (Izumi et al., 1984). Αντίθετα, η ύπαρξη αυξημένης συγκέντρωσης της 20E στην αιμολέμφο αρκεί για την εκκίνηση της ανάπτυξης των ωοθυλακίων. Είναι χαρακτηριστικό ότι σε κοιλιακή χώρα (abdomen) απομονωμένη από το κεφάλι μία ημέρα μετά την μεταμόρφωση της προνύμφης σε νύμφη, τα ωοθυλάκια δεν καταφέρνουν να εκτελέσουν το πρόγραμμα της χοριογένεσης, ενώ μετά από ένεση 20E στην απομονωμένη κοιλιακή χώρα παρατηρείται κανονική αύξηση των ωοθυλακίων (Tsuchida et al., 1987; Swevers and Iatrou, 1998). Η αύξηση της συγκέντρωσης της 20E στην αιμολέμφο στην αρχή του

σταδίου της νύμφης, συνδέεται τόσο με την με τη μεταμόρφωση του μεταξοσκώληκα όσο και με την ανάπτυξη των ωοθυλακίων (Calvez et al., 1976).

Η αυξημένη συγκέντρωση της 20Ε στην αιμολέμφο, κατά τη μετάβαση από το τέλος του τελευταίου προνυμφικού σταδίου σε αυτό της νύμφης, οδηγεί στην ενεργοποίηση του αναπτυξιακού μονοπατιού που θα επιτρέψει την ανάπτυξη ώριμων αυγών, μέσω ενός πολύπλοκου μηχανισμού ενεργοποίησης και καταστολής πολλών μεταγραφικών παραγόντων και άλλων γονιδιακών προϊόντων (εικόνα 1.9). Το αρχικό συμβάν που οδηγεί στη δράσης της 20Ε είναι η πρόσδεση και η συνεπαγόμενη ενεργοποίηση του ετεροδιμερούς των πυρηνικών υποδοχέων BmEcR και BmCF1 (Swevers et al., 1996; Tzertzinis et al., 1994). Το γονίδιο BmEcR κωδικοποιεί τον υποδοχέα της εκδυσόνης. Η BmCF1 (εμφανίζεται και ως BmUSP) είναι η ομόλογη πρωτεΐνη του προϊόντος της έκφρασης του γονιδίου *ultraspiracle* της *D. melanogaster*. Και οι δύο πρωτεΐνες εκφράζονται στα επιθηλιακά κύτταρα καθιστώντας τα ωοθυλάκια άμεσο στόχο της 20Ε. Η ενεργοποίηση του συμπλόκου είναι απαραίτητη για την εκκίνηση της πρώτης ρυθμιστικής ακολουθίας γεγονότων, κατά την οποία τα ωοθυλάκια δεσμεύονται (commitment) για την τελική τους διαφοροποίηση. Έτσι, μετά από λίγες ώρες παρατηρείται η έκφραση των λεγόμενων πρώιμων γονιδίων απόκρισης στην ορμόνη. Τα πλέον μελετημένα από τα πρώιμα γονίδια είναι αυτά που κωδικοποιούν τις ισομορφές των ορφανών πυρηνικών υποδοχέων BmE75A, BmE75C, BmHR3B και BmHR3C. Η έκφραση των BmE75A και BmE75C, εμφανίζεται περίπου μια ώρα μετά από την ενεργοποίηση του διμερούς BmCF1 και BmEcR, ενώ η έκφραση των BmHR3B και BmHR3C εμφανίζεται μετά από δύο έως τέσσερις ώρες (Swevers et al., 2002a; Eystathioy et al., 2001). Η ενεργοποίηση της μεταγραφής του BmHR3 ακολουθεί την παρατηρούμενη καταστολή της μεταγραφής ενός άλλου πυρηνικού υποδοχέα, του BmFTZ-F1 (Sun et al., 1994). Στον μεταξοσκώληκα, ένας ακόμα πυρηνικός υποδοχέας, ο BmHNF-4 μεταγράφεται 6 με 24 ώρες μετά από την έναρξη του μεταγραφικού καταρράκτη (cascade) (Swevers and Iatrou, 1998).

Τόσο ο BmE75 όσο και ο BmHR3 περιλαμβάνουν μία περιοχή που αναγνωρίζει μια χαρακτηριστική αλληλουχία DNA (AGGTCA), γνωστή ως RORE (Retinoic acid-related Orphan receptor Response Element) (Eystathioy et al., 2001). Ο BmHR3 προσδένεται ισχυρά στα RORE στοιχεία υποκινητών, όπου αυτά υπάρχουν και προκαλει την ενεργοποίηση των γονιδίων που υπόκεινται στη ρύθμιση του

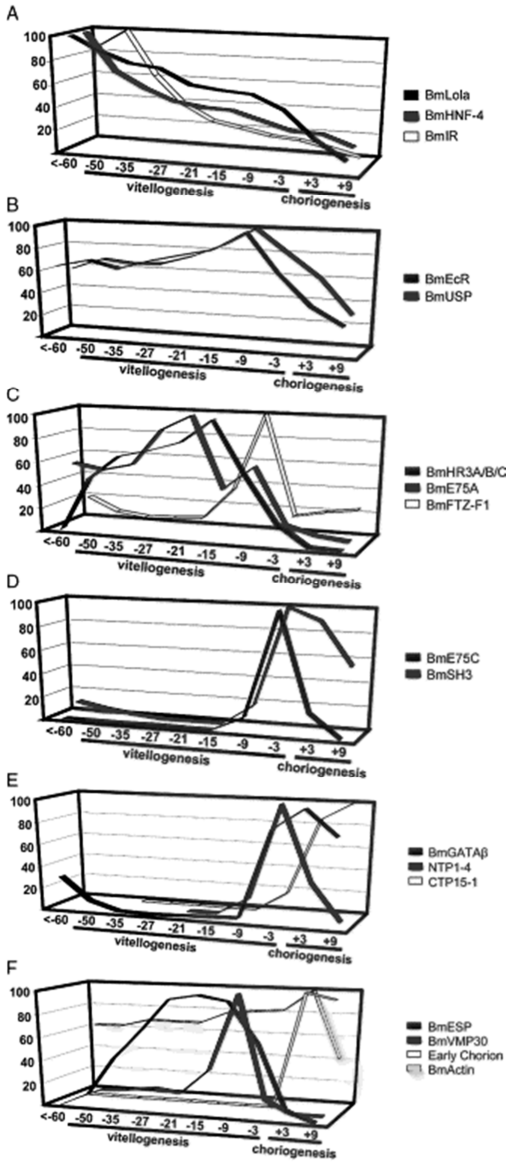
συγκεκριμένου τύπου υποκινητή. Από την άλλη μεριά, ο BmE75 προσδένεται ασθενώς στα RORE στοιχεία, εμποδίζοντας την έκφραση των ίδιων γονιδίων και έτσι δρα ανταγωνιστικά καταστέλλοντας τη λειτουργία του BmHR3 (Swevers et al., 2002b).

Τα πρώιμα γονίδια (*BmE75A, BmE75C, BmHR3B* και *BmHR3C*) συμβάλλουν στην ενεργοποίηση των λεγόμενων όψιμων γονιδίων. Τα πιο μελετημένα από αυτά είναι η ισομορφή Α του BmHR3 και η ESP (Eystathioy et al., 2001). Η έκφραση των όψιμων γονιδίων γίνεται δύο ημέρες μετά την επαγωγή με 20Ε. Η έκφραση της ESP υποδηλώνει την έναρξη της βιτελλογένεσης. Ο ορφανός πυρηνικός υποδοχέας BmHR3A, από την άλλη πλευρά, πιστεύεται ότι οδηγεί στη ρύθμιση των γονιδίων *BmGATAβ* και *esp* κατά την βιτελογένεση (Eystathioy et al., 2001) επειδή οι υποκινητές των γονιδίων αυτών περιέχουν επίσης στοιχεία RORE.

Η μετάβαση από τη βιτελλογένεση στη χοριογένεση ρυθμίζεται από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες της ωοθήκης και χαρακτηρίζεται από την ελάττωση στη συγκέντρωση της 20Ε. Σε αυτή την περίοδο (στάδια -6/+8 της ανάπτυξης των ωοθυλακίων) γίνεται καταστολή του γονιδίου *BmEcR* καθώς και του *BmCF1*, ενώ εκκινείται η έκφραση του γονιδίου *BmGATA*. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα γονίδια που εκφράζονται σε περιορισμένη μόνο χρονική περίοδο, όπως τα γονίδια *BmE75* και *BmFTZ-F1*. Ο παράγοντας BmFTZ-F1 εκφράζεται κατά τα τελευταία στάδια της βιτελλογένεσης (Swevers and Iatrou, 1999) και φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μετάβαση στη χοριογένεση, όπως και ο ομόλογος παράγοντας της *D. melanogaster* (Broadus et al., 1999). Η ολοκλήρωση της βιτελλογένεσης χαρακτηρίζεται από την επαγωγή της έκφρασης των πυρηνικών υποδοχέων BmE75C και BmE75D και του μεταγραφικού παράγοντα BmGATAβ καθώς και από τη μείωση της μεταγραφής των γονιδίων *BmHR3* και του *BmE75A* (Swevers and Iatrou, 2003), (εικόνα 1.9). Η BmHR3 φαίνεται ότι ρυθμίζει την έκφραση πολλών γονιδίων, που περιέχουν στοιχεία RORE στον υποκινητή τους, συμπεριλαμβανομένων και των *BmFTZ-F1* και *BmGATAβ* (Eystathioy et al., 2001).

Αργότερα και υπό τον έλεγχο των παραγόντων GATAβ, τα ωοθυλάκια περνάνε στην χοριογένεση με την επαγωγή της έκφρασης της ομάδας των γονιδίων που εκφράζουν τις πρωτεΐνες του χορίου (Kafatos FC et al., 1995), (εικόνα 1.9).

Η έναρξη της χοριογένεσης χαρακτηρίζεται, εκτός από την ενεργοποίηση της έκφρασης των γονιδίων του χορίου, και από την έκφραση ποικίλων μεταγραφικών παραγόντων όπως επίσης και από την αντίστοιχη καταστολή γονιδίων, τα οποία εκφράζονταν κατά την βιτελλογένεση. Οι μεταγραφικοί παράγοντες που εκφράζονται κατά τη διάρκεια της χοριογένεσης είναι το ετεροδιμερές σύμπλοκο του λειτουργικού υποδοχέα της εκδυσόνης BmEcR/BmCF1, η ισομορφή BmE75C (εκφράζεται κατά την πρώιμη χοριογένεση), ο BmGATAβ, ο BmFTZ-F1 (ανιχνεύεται σε χαμηλά επίπεδα). Αντιθέτως με την έναρξη της χοριογένεσης είναι χαρακτηριστική η καταστολή της μεταγραφής όλων των ισομορφών του ορφανού πυρηνικού υποδοχέα BmHR3 και του BmE75A. Οι παραπάνω μεταγραφικοί παράγοντες, πλην του BmGATAβ, που παίζει σημαντικό ρόλο στην χοριογένεση, δεν είναι γνωστό αν και με ποιον τρόπο συμμετέχουν στον έλεγχο της χρονοειδικής έκφρασης των γονιδίων του χορίου.



***Εικόνα 1.9: Διαγραμματική παρουσίαση των προτύπων έκφρασης (στο επίπεδο της μεταγραφής) των γονιδίων των μεταγραφικών παραγόντων κατά τη διάρκεια της ωογένεσης, όπως αυτά ταυτοποιήθηκαν στον μεταξοσκώληκα* B. mori** *(Swevers and Iatrou 2003). Τα επίπεδα έκφρασης κάθε γονιδίου είναι κανονικοποιημένα με βάση το υψηλότερο ποσό έκφρασης που ανιχνεύτηκε για κάθε ένα μετάγραφο.*

Όπως προαναφέρθηκε ήδη, η χοριογένεση απαρτίζεται από τρεις αδρές αναπτυξιακές περιόδους, που χαρακτηρίζονται από την έκφραση και έκκριση από τα κύτταρα του επιθηλίου των θυλακοκυττάρωντων ErA/B, A/B και HcA/B πρωτεϊνών του χορίου, την πρώιμη, τη μεσαία και την όψιμη χοριογένεση αντιστοίχως (βλ. και κεφάλαιο 1.2.4).

Όπως επίσης προαναφέρθηκε, μια από τις σημαντικότερες παρατηρήσεις που έχουν γίνει για την ανάπτυξη των ωοθυλακίων είναι ότι μετά από το σημείο –35 (±2) τα ωοθυλάκια μπορούν να ωριμάσουν *in vitro*, χωρίς η 20Ε να φαίνεται να επιδρά με οποιοδήποτε τρόπο στην αυτόνομη πορεία τους. Πιστεύεται ότι ενδεχομένως κάποιος άλλος παράγοντας, του οποίου η συγκέντρωση πιθανόν αυξάνεται στη συγκεκριμένη περίοδο, είναι υπεύθυνος για την αυτόνομη απόκριση των ωοθυλακίων. Οι προτάσεις στρέφονται προς μια σειρά ορμονών, τις ινσουλινοπροσωμοιάζουσες πρωτεΐνες bombyxins, που παρουσιάζουν αύξηση των επιπέδων τους στην αιμολέμφο κατά τη συγκεκριμένη περίοδο (Saegusa et al., 1992).

Οι bombyxins ανήκουν στην κατηγορία των πεπτιδίων συγγενικών προς την ινσουλίνη (ILP, Insulin-Like Peptides), τα οποία απομονώθηκαν από εγκεφαλικά εκχυλίσματα του *B. mori* (Nagasawa et al., 1984). Η λειτουργία τους στον *B. mori* σχετίζεται με τη ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης με τα επίπεδά τους να ρυθμίζονται από την αφθονία της τροφής (Masumura et al., 2000). Υψηλά επίπεδα bombyxins ανιχνεύτηκαν και στην αιμολέμφο των θηλυκών νεοεμφανιζόμενων ενηλίκων. Η παρατήρηση αυτή πιθανώς εμπλέκει τις bombyxins στη ρύθμιση της ανάπτυξης της ωοθήκης και γενικότερα στο αναπαραγωγικό σύστημα (Saegusa et al., 1992). Η ικανότητα δέσμευσης των bombyxins αναγνωρίστηκε σε μεμβρανικά εκχυλίσματα από επιθηλιακά κύτταρα, υποδεικνύοντας τους ιστούς της αναπτυσσόμενης ωοθήκης ως στόχο των bombyxins (Fullbright et al., 1997). Επιπλέον, η έκφραση του mRNA των bombyxins εντοπίστηκε στους ιστούς της ωοθήκης υποδηλώνοντας την πιθανή αυτοκρινή και παρακρινή δράση των bombyxins κατά την ανάπτυξη των ωοθυλακίων (Iwami et al., 1996; Swevers and Iatrou, 2003). Στον *B. mori* αναγνωρίστηκε ένα γονίδιο που κωδικοποιεί ένα πιθανό υποδοχέα των bombyxins και εμφανίζει δομή παρόμοια με αυτή των υποδοχέων που προσομοιάζουν με τον υποδοχέα της ινσουλίνης και ονομάστηκε BmIRL. Από τη μελέτη του προτύπου μεταγραφής του γονιδίου που κωδικοποιεί για την BmIRL (Swevers and Iatrou, 2003),

διαπιστώθηκε η μείωση των επιπέδων του κατά την ανάπτυξη των ωοθυλακίων. Η παρατήρηση αυτή μειώνει την πιθανότητα εμπλοκής του υποδοχέα BmIRL στην αυτόνομη ανάπτυξη των ωοθυλακίων, ή στην μετάβαση από τη βιτελλογένεση στη χοριογένεση διότι έρχεται σε αντίθεση με την προσδοκώμενη διατήρηση ή αύξηση των επιπέδων μεταγραφής του γονιδίου. Επομένως, ο ρόλος των bombyxins και του πιθανού υποδοχέα τους BmIRL παραμένει ασαφής.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν επίσης ότι είναι πιθανό οι προσταγλανδίνες να αποτελούν κομβικό σημείο για τη μετάβαση από τη βιτελλογένση στη χοριογένεση. Η αναστολή της βιοσύνθεσης των προσταγλανδινών οδήγησε σε αναστολή της μετάβασης από τη βιτελλογένεση στη χοριογένεση (Machado et al., 2007). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το σηματοδοτικό μονοπάτι, στο οποίο εμπλέκονται οι προσταγλανδίνες, επηρεάζει την ομοιόσταση των επιθηλιακών κυττάρων αλλά δεν υπάρχουν ενδείξεις για την εμπλοκή αυτού του σηματοδοτικού μονοπατιού στον έλεγχο των γονιδίων του χορίου. Ωστόσο, έχει προταθεί η πιθανή εμπλοκή του σηματοδοτικού μονοπατιού της προσταγλανδίνης μέσω του cAMP (3'-5'-cyclic adenosine monophosphate) στη ρύθμιση του γονιδίου για την πρωτεΐνη BmC/EBP (Lecanidou and Papantonis, 2010). Η πρωτεΐνη C/EBP είναι ομόλογη της πρωτεΐνης των σπονδυλωτών C/EBP (CCAAT/Enhancer-Binding Protein). Είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ανήκει στην γενική κατηγορία των bZIP πρωτεϊνών. Ο λειτουργικός τους ρόλος είναι η στρατολόγηση του ολοένζυμου CBP/PolII, οπότε και δρα θετικά στη μεταγραφή. Το πρώτο βήμα της ενεργοποίησης της μεταγραφής είναι η πρόσδεση της C/EBP στο μοτίβο CCAAT. Ακολουθεί η στρατολόγηση του συμπλέγματος της PolII και ξεκινάει η μεταγραφή των αντίστοιχων γονιδίων (Ramji and Foka, 2002).

Πρέπει επιπλέον να σημειωθεί, ότι ενώ τα επίπεδα της 20E στην αιμολέμφο μειώνονται δραστικά πέντε μέρες μετά την εκκίνηση του σταδίου της νύμφης, παρατηρείται μία αύξηση των επιπέδων των εκδυστεροειδών στα ωοθυλάκια (Calvez et al., 1976; Tsuchida et al., 1987). Η αύξηση των επιπέδων της 20E στα ωοθυλάκια δεν επιφέρει καμία αλλαγή στην ανάπτυξη τους, μιας και η 20E είναι στην πρόδρομη μορφή της, συζευγμένη με σάκχαρα και είναι είτε φωσφορυλιωμένη είτε θειωμένη (Mizuno et al., 1981). Η 20E, που παράγεται μέσα στα ωοθυλάκια 20E, δεν επιδρά στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων αλλά δρα στην σωστή διαφοροποίηση και ανάπτυξη του εμβρύου (Kadono-Okuda et al., 1994).

1.3. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΟΡΦΑΝΟΥ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ BmE75

Ο ορφανός πυρηνικός υποδοχέας BmE75C ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων Rev-ErbA. Ο πρώτος ορφανός πυρηνικός υποδοχέας της οικογένειας χαρακτηρίστηκε ως ένα πρωτο-ογκογονίδιο, που κωδικοποιεί τον θυροειδή πυρηνικό υποδοχέα και ονομάστηκε earl (erbA-related gene) (Laudet and Gronemeyer, 2001). Στη Δροσόφιλα, η ομόλογη πρωτεΐνη αποτελείται από τρεις χαρακτηρισμένες ισομορφές, τις E75A, E75B και E75C. Οι τρεις ισομορφές παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης και διαφορετική απόκριση στην εκδυσόνη κατά την μεταμόρφωση.

Οι ορφανοί πυρηνικοί υποδοχείς της οικογένειας μοιράζονται τα ίδια κοινά χαρακτηριστικά, δηλαδή μία περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD, DNA Binding Domain) αποτελούμενα από δύο C4-τύπου δάχτυλα ψευδαργύρου, που αναγνωρίζουν τα στοιχεία RORE, και μια περιοχή πρόσδεσης του προσδέτη (LBD, Ligand Binding Domain). Τα συντηρημένα αυτά στοιχεία εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα με τα αντίστοιχα στοιχεία της οικογένειας ROR/RZRα (Retinoic acid receptor related Orphan Receptor). Η E75B ισομορφή της Δροσόφιλας είναι μοναδική, γιατί δεν περιέχει την πρώτη περιοχή δαχτύλων ψευδαργύρου της DBD και για αυτόν τον λόγο δε προσδένεται από μόνη της στο DNA. Χρειάζεται και η ταυτόχρονη αλληλεπίδραση με την DHR3 (White et al., 1997). Όταν αυτή η αλληλεπίδραση πραγματοποιείται, η ισομορφή E75B προκαλεί την καταστολή των γονιδίων που ενεργοποιούνται από την DHR3.

Είναι γνωστό ότι, όπως και στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης του E75B με τον DHR3, και άλλοι γνωστοί εκπρόσωποι της οικογένειας E75 εντόμων όπως *Manduca sexta* (Hiruma and Riddiford, 2004), *B. mori* (Swevers et al., 2002b) και *D. melanogaster* (White et al., 1997; Thummel, 1997), αλληλεπιδρούν με τις αντίστοιχες ομόλογες πρωτεΐνες HR3 (MHR3, BmHR3 και DHR3 αντιστοίχως), ενώ ταυτόχρονα μπορούν να αλληλεπιδρούν και με στοιχεία RORE, αλληλεπίδραση που είναι καθοριστική για τη μεταμόρφωση του εντόμου. Σε κάθε περίπτωση, η οικογένεια των πρωτεϊνών E75 δρα ανασταλτικά στη μεταγραφή των γονιδίων που υπόκεινται στον έλεγχο στοιχείων RORE, όπως του μεταγραφικού παράγοντα FTZ-F1 (White et al., 1997), που αποτελεί κομβικό γονίδιο κατά τον έλεγχο των μοριακών γεγονότων που ρυθμίζουν τη μεταμόρφωση με την πρόσδεση στα στοιχεία RORE ή και με την αλληλεπίδραση με τις HR3. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η πρόσφατη συσχέτιση της

ρύθμισης της αλληλεπίδρασης της HR3 με την E75 στη Δροσόφιλα από τα αέρια NO ή CO (Reinking et al., 2005). Η ρύθμιση γίνεται με την πρόσδεση των αερίων σε ένα μόριο αιμίνης που βρίσκεται εντός της "τσέπης" του LBD της E75. Η ύπαρξη της αιμίνης στην LBD είναι σημαντική για τη σταθερότητα του ετεροδιμερούς E75/DHR3. Παρόλο που η σημασία αυτού του ευρήματος δεν είναι γνωστή, αποτελεί ένδειξη για τον πιθανό συνδυασμό του μεταβολισμού της αιμίνης και των διεργασιών που ελέγχονται από την εκδυσόνη, όπως η μεταμόρφωση και η ωογένεση.

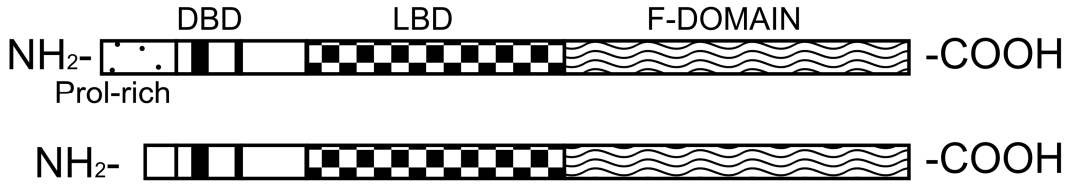
Ο μεταγραφικός παράγοντας HR3 αναγνωρίστηκε πρώτη φορά στη Δροσόφιλα και πήρε το όνομα DHR3 (Drosophila Hormone Receptor 3), (Koelle et al., 1992). Οι μεταγραφικοί παράγοντες HR3 των εντόμων (DHR3, BmHR3, MHR3 και άλλοι) ανήκουν επίσης στην κατηγορία των ορφανών πυρηνικών υποδοχέων ROR/RZRβ και έχουν την ίδια βασική δομή με τους ορφανούς πυρηνικούς υποδοχείς Rev-ErbA. Η κύρια λειτουργία τους είναι η ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων που υπόκεινται στον έλεγχο στοιχείων RORE, όπως είναι και αυτή του μεταγραφικού παράγοντα FTZ-F1 (White et al., 1997; Lam et al., 1997).

Στον μεταξοσκώληκα *B. mori* η οικογένεια των Rev-ErbA αποτελείται από δύο γνωστές ισομορφές, τις BmE75A και BmE75C (Swevers et al., 2002a; b). Η δομή τους, όπως και αυτή όλων των μελών της οικογένειας, χαρακτηρίζεται, από δύο υψηλά συντηρημένες περιοχές την DBD και LBD (εικόνα 1.10), που εμφανίζουν ιδιαίτερα υψηλή ταυτότητα στις ομόλογες πρωτεΐνες των εντόμων (Swevers et al., 2002a). Στον μεταξοσκώληκα, η BmE75C και η BmE75A έχουν συσχετιστεί με την ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων κατά την ωογένεση (Swevers et al., 2002b). Έτσι, ενώ ο BmHR3 δρα ως ενεργοποιητής γονιδίων που περιέχουν το στοιχείο RORE στον εκκινητή τους, ο BmE75C με την πρόσδεσή του στην ίδια ρυθμιστική περιοχή ή και με την άμεση αλληλεπίδρασή του με τον BmHR3, δρα ως καταστολέας της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα BmFTZ-F1. Επιπλέον, υπάρχει η υπόθεση της ρύθμισης της μεταγραφής του γονιδίου *esp* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ESP (Eystathioy et al., 2001) από τους ορφανούς πυρηνικούς υποδοχείς BmHR3 και BmE75, αυτή τη φορά μέσω της κατασταλτικής δράσης της BmHR3. Η υπόθεση αυτή βασίζεται σε δύο στοιχεία: α) στην αναγνώριση στοιχείων πρόσδεσης του BmHR3 στον υποκινητή του *esp* και στην ταυτόχρονη σύμπτωση του προτύπου έκφρασης των ισομορφών του BmHR3 με το πρότυπο έκφρασης της ESP. Ομοίως, από το πρότυπο έκφρασης των

γονιδίων *BmGATAβ*, *BmHR3A* και *BmE75A* προέκυψε η υπόθεση της πιθανής ρύθμισης της έκφρασης του *BmGATAβ* από το σύμπλοκο BmHR3A/BmE75A (Swevers et al., 2005).

Οι ισομορφές BmE75A και BmE75C φέρουν εκτός από τις χαρακτηριστικές δομές DBD και LBD και μια περιοχή στο καρβοξυ-τελικό άκρο που ονομάζεται F-Domain, η οποία ταυτοποιήθηκε ως η περιοχή αλληλεπίδρασης με την BmHR3 (Swevers et al., 2002b) χωρίς όμως να είναι γνωστή η ακριβής αλληλουχία που είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση των δύο μεταγραφικών παραγόντων.

Οι δύο ισομορφές διαφέρουν στο αμινο-τελικό άκρο (εικόνα 1.10). Η ισομορφή BmE75C στο αμινο-τελικό άκρο περιέχει μια περιοχή πλούσια στο αμινοξύ προλίνη, η οποία απουσιάζει πλήρως από την BmE75A. Οι περιοχές αυτές είναι γνωστό ότι αποτελούν στόχο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μέσω των SH3 περιοχών (Li, 2005).



Εικόνα 1.10: Σχηματική παρουσίαση της BmE75C (A) και BmE75A (B) αμινοξικής αλληλουχίας. Αναπαρίστανται και οι βασικές περιοχές της αλληλουχίας. Διακρίνονται το F-domain στο καρβοξυ-τελικό άκρο, τα DBD και LBD και η μοναδική αμινο-τελική ακολουθία της ισομορφής BmE75C που είναι πλούσια σε προλίνες.

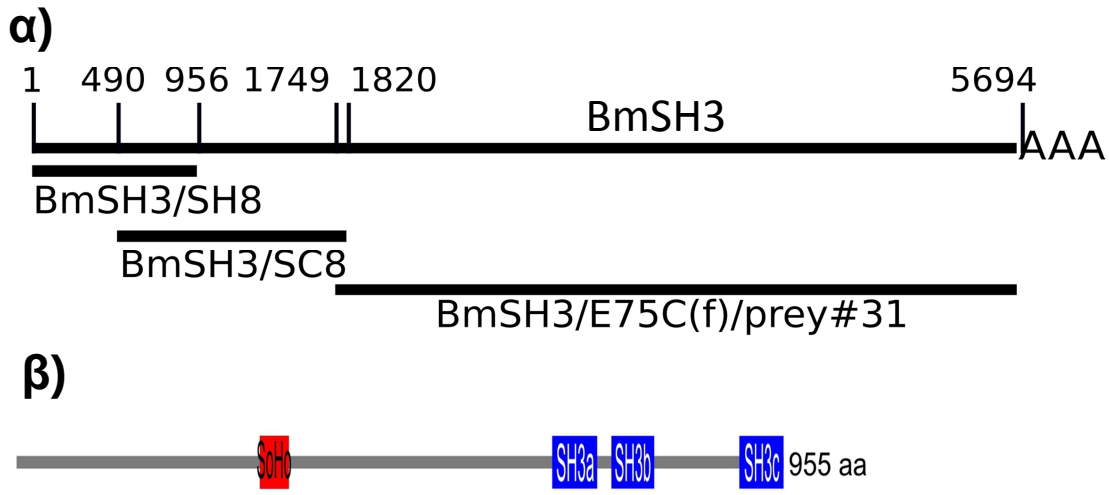
.

1.4. ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΜΙΑΣ ΝΕΑΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΩΣ ΠΙΘΑΝΟΥ ΣΤΟΧΟΥ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ BmE75C

Όπως προαναφέρθηκε, κατά τη μετάβαση από την βιτελογένεση στη χοριογένεση πραγματοποιείται μεταγραφή μιας σειράς γονιδίων όπως του μεταγράφου για την ισομορφή BmE75C (Swevers et al., 2002a). Για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκφρασης του μεταγράφου για την BmE75C ισομορφή, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα των δύο υβριδίων του σακχαρομύκητα (Y2H), χρησιμοποιώντας ως πρωτεΐνη-δόλωμα την πρωτεΐνη BmE75C (K. Ito και K. Iatrou, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Από τη σάρωση cDNA βιβλιοθήκης που είχε δημιουργηθεί από mRNA απομονωμένο από βιτελλογενικά ωοθυλάκια, ανακτήθηκαν δύο κλώνοι. Ο πρώτος από αυτούς βρέθηκε να κωδικοποιεί τον ορφανό πυρηνικό υποδοχέα BmHR3, που έχει ήδη μελετηθεί και είναι γνωστή η αλληλεπίδρασή του με τον BmE75C (Eystathioy et al., 2001; Swevers et al., 2002a). Ο

δεύτερος κωδικοποιεί το καρβοξυ-τελικό άκρο μιας άγνωστης ως τώρα πρωτεΐνης, η οποία περιέχει τρεις SH3 (Src-Homology 3 domain) περιοχές, από τις οποίες έλαβε και την ονομασία της, BmSH3.

Ο αρχικά απομονωθείς κλώνος της BmSH3 (εικόνα 1.11 α) είχε μήκος αλληλουχίας περίπου 3.95 kb (κωδική ονομασία E75C(f)/prey #31). Σε αυτόν εντοπίστηκε ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης μεγέθους 1.14 kb, το οποίο δεν περιλάμβανε κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης, με συνέπεια το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης να παραμένει ανοιχτό στο 5' άκρο του. Η υπόλοιπη αλληλουχία περιλάμβανε και την 3' αμετάφραστη περιοχή που περιείχε το σήμα πολυαδενυλίωσης και την poly(A) ακολουθία.



Εικόνα 1.11: Σχηματική παράσταση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της BmSH3, όπως αυτή προκύπτει μετά από την κλωνοποίηση των κλώνων που απομονώθηκαν από το Y2H σύστημα και από τις διαδοχικές σαρώσεις της βιτελλογενικής βιβλιοθήκης. **β)** Σχηματική αναπαράσταση της αμινοξικής αλληλουχίας, όπου διακρίνονται και οι συντηρημένες περιοχές SoHo και SH3 (βλέπε και κεφάλαια 1.5.2.1 και 1.5.2.2).

Για την ανάκτηση της υπόλοιπης 5' αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε νέα σάρωση της βιτελλογενετικής cDNA βιβλιοθήκης σε φάγο λgt11 (Swevers et al., 1995) με ιχνηθέτη 310 bp από το 5' άκρο του E75C(f)/prey #31. Ο μεγαλύτερος κλώνος που απομονώθηκε, ο SC8, ήταν περίπου 1.25 kb (K Ito και K Iatrou, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Ωστόσο, ούτε και αυτή η αλληλουχία φάνηκε να περιέχει την αναζητούμενη περιοχή έναρξης της μετάφρασης. Ακολούθησε νέα σάρωση της βιβλιοθήκης με αλληλουχία των πρώτων 300 bp από το 5' άκρο του κλώνου SC8.

Ανιχνεύτηκαν επιπλέον κλώνοι, από τους οποίους ένας έδωσε επιπλέον αλληλουχία. Ο κλώνος αυτός (SH8), είχε μήκος περίπου 0.49 kb, αλλά και πάλι δεν να περιείχε περιοχή έναρξης της μετάφρασης. Ακολούθησε ένωση των κλώνων E75C(f)prey #31, SC8 και SH8 με χρήση κατάλληλων περιοριστικών ενζύμων και υποκλωνοποίησή τους σε pBluescript (εικόνα 1.11 α).

In silico μετάφραση ολόκληρης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (εικόνα 1.11 β) αποκάλυψε μια θεωρητικά προβλεπόμενη πρωτεΐνη 955 αμινοξικών καταλοίπων (αα). Η πρωτεϊνική αλληλουχία συγκρίθηκε με χρήση προγραμμάτων BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) με γνωστές αλληλουχίες σε διάφορες βάσεις δεδομένων και ταυτοποιήθηκαν δύο συντηρημένες περιοχές, η περιοχή SoHo και περιοχή με τρία SH3 στοιχεία, στο αμινο-τελικό και το καρβοξυ-τελικό άκρο αντίστοιχα. Λόγω αυτών των χαρακτηριστικών μοτίβων, η BmSH3 κατατάσσεται ως μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών CAV [η ονομασία προέρχεται από τα αρχικά των πρωτεϊνών CAP (c-Cbl Associated Protein), ArgBP2 (Arg Binding Protein 2) και vinexin (vinculin binding protein) (πίνακας 1.1)]. Η συγκεκριμένη οικογένεια πρωτεϊνών έχει ως κύριο δομικό χαρακτηριστικό τρεις διακριτές SH3 περιοχές στο C-τελικό άκρο και μια περιοχή με ομολογία με το πολυπεπτίδιο σορβίνη (SoHo, Sorbin Homology) (Vagne-Descroix et al., 1991) στο N-τελικό άκρο (πίνακας 1.1).

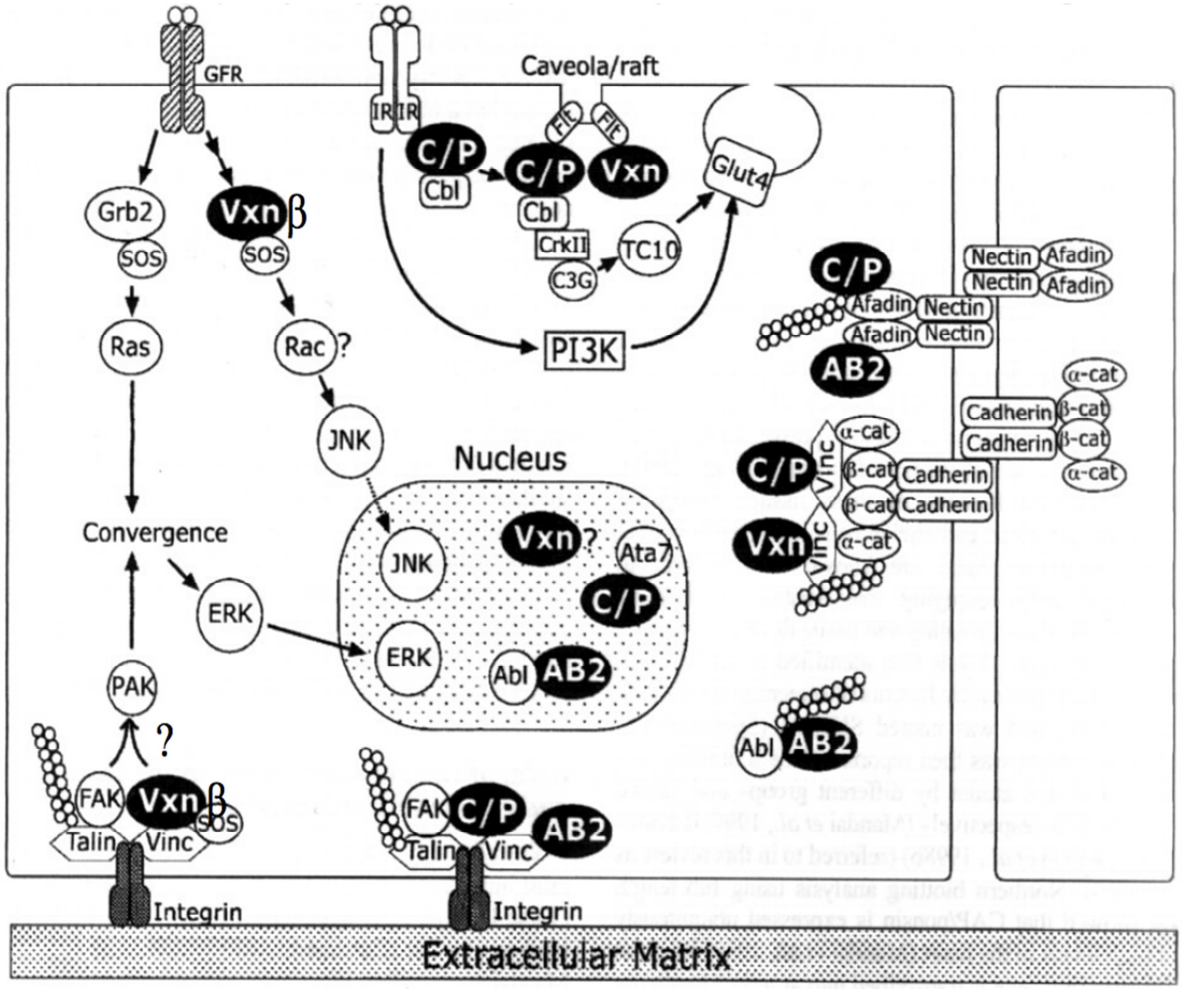
1.5. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ CAV

Τα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών CAV κατατάσσονται στην κατηγορία των συνδετικών πρωτεϊνών (adaptor proteins). Οι συνδετικές πρωτεΐνες ρυθμίζουν έναν μεγάλο αριθμό κυτταρικών δραστηριοτήτων, όπως η προσκόλληση, η μετανάστευση, ο πολλαπλασιασμός, ο κυτταρικός κύκλος και η επιβίωση του κυττάρου (Flynn, 2001). Οι πρωτεΐνες αυτές εμπεριέχουν ένα ή περισσότερα δομικά στοιχεία, τα οποία οδηγούν σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, χωρίς να εμφανίζουν κάποια ενζυματική δραστηριότητα. Χαρακτηριστική ιδιότητά τους αποτελεί η διασύνδεση συγκεκριμένων πρωτεϊνών, ή η διασύνδεση πρωτεϊνών με την κυτταρική μεμβράνη και η συμμετοχή τους σε σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν δεκάδες άλλων πρωτεϊνών (εικόνα 1.12). Η αλληλεπίδραση οδηγεί σε ειδική υποκυτταρική κατανομή των αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών για συμμετοχή σε ειδικές υποκυτταρικές λειτουργίες. Οι συνδετικές πρωτεΐνες συνεισφέρουν στην αύξηση της εξειδίκευσης και της αποδοτικότητας της απόκρισης μονοπατιών σηματοδότησης. Ειδικότερα, οι πρωτεΐνες της οικογένειας CAV, είναι γνωστό, ότι συμμετέχουν και στην μεταγωγή σημάτων και στην οργάνωση του κυτταροσκελετού (Kioka et al., 2002; Roignot and Soubeyran, 2009), (εικόνα 1.12).

1.5.1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ CAV

Οι τρεις κύριες πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια CAV χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να προσδένονται σε περιοχές πλούσιες σε προλίνη στο σύστημα δύο υβριδίων στη ζύμη. Πρώτη αναγνωρίστηκε η ArgBP2 (Arg Binding Protein) από την ικανότητά της να αλληλεπιδρά με την Arg (Abl related gene) πρωτεΐνη, που αποτελεί μέλος της οικογένειας των κινασών της τυροσίνης Abelson που δεν είναι υποδοχείς (Wang et al., 1997), μέσω των SH3 περιοχών. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Abelson συσχετίζονται με την εμφάνιση χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας και κάποιων μορφών οξείας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας στον άνθρωπο. Η περιοχή SoHo αναγνωρίστηκε αργότερα στην CAP (c-cbl associated protein) μετά από τη σύγκριση της αμινοξικής της αλληλουχίας με την πρωτεϊνική βάση δεδομένων GenBank (Ribon et al., 1998a; Mandai et al., 1999), καθώς και στην n-ArgBP2 (Kawabe et al., 1999) και στην vinexin (Wakabayashi et al., 2003; Tujague et al., 2004).

Οι τρεις αυτές πρωτεΐνες εκφράζονται από τρία διαφορετικά γονίδια που ονομάζονται SORBS1, SORBS2 και SORBS3 και τα οποία εκφράζουν αντίστοιχα για τις πρωτεΐνες CAP/ponsin, ArgBP2/n-ArgBP2 και vinexin (παράρτημα Ι). Όσον αφορά στο ανθρώπινο γονιδίωμα, τα γονίδια έχουν εντοπιστεί στα χρωμοσώματα 10, 4 και 8 (University of California Santa Cruz, Genome Bioinformatics).



Εικόνα 1.12: Σχηματική αναπαράσταση των λειτουργιών της οικογένειας CAV (Kioka et al. 2002). Με τα μαύρα ελλειψοειδή σχήματα αναπαριστάνονται οι πρωτεΐνες της οικογένειας CAV (Vxn: vinexin, C/P: CAP, AB2:ArgBP2). Με μικρούς κύκλους αναπαρίστανται τα πολυμερή της ακτίνης. Τα υπόλοιπα σχήματα αντιπροσωπεύουν γνωστές πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρούν ή συσχετίζονται (α-cat: α-catenin, β-cat: β-catenin, Flt: Flotillin, Ata7: Ataxin-7, IR: Insulin Receptor, GFR: Growth Factor Receptor). Οι πρωτεΐνες α-cat, β-cat, Cadherin, Afadin, Nectin εμπλέκονται στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού μέσω των επαφών κυττάρου κυττάρου. Οι πρωτεΐνες Talin, Vinc: vinculin, FAK εμπλέκονται στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού μέσω των επαφών κυττάρου-εξωκυττάριας μήτρας. Οι πρωτεΐνες Cbl, CrkII, C3G, TC10, Glut4, PI3K, IT, Glut4, Flt συμμετέχουν σε σηματοδότηση εξαρτώμενη από την ινσουλίνη. Οι υπόλοιπες αφορούν κυρίως σε μεταγραφική ρύθμιση εξαρτώμενη από στεροειδείς ορμόνες.

Τα κύρια χαρακτηριστικά των εκπροσώπων της οικογένειας των πρωτεϊνών CAV έχουν ως εξής:

α) Η CAP αναγνωρίστηκε αρχικά ως πιθανός προσδέτης περιοχών αναγνώρισης από τις SH3 περιοχές (Sparks et al., 1996). Αργότερα, πιστοποιήθηκε η αλληλεπίδρασή της με την c-Cbl και την afadin, από δυο διαφορετικές ερευνητικές ομάδες, που της έδωσαν και διαφορετικές ονομασίες, CAP και ponsin (Mandai et al., 1999; Ribon et al., 1998a). Το γονίδιο κωδικοποιεί, μέσω εναλλακτικής συρραφής, τουλάχιστον 13 διαφορετικά μετάγραφα (Lebre et al., 2001; Mandai et al., 1999; Zhang et al., 2003), τα οποία παρουσιάζουν ιστοειδική έκφραση (Lebre et al., 2001) με τις διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης να παρουσιάζουν επίσης διαφορετική υποκυτταρική κατανομή (Zhang et al., 2003).

β) Η ArgBP2, που απομονώθηκε ως πιθανή πρωτεΐνη αλληλεπίδρασης με την cAbl (Wang et al., 1997), εμφανίζει μια επιπλέον ισομορφή, την nArgBP2 (neural ArgBP2), που απομονώθηκε από την αλληλεπίδρασή της με την πρωτεΐνη SAPAP (SAP90/PSD-95-associated protein) και εκφράζεται αποκλειστικά στον εγκέφαλο, στις νευρικές μετασυναπτικές πυκνώσεις (neural postsynaptic densities) (Kawabe et al., 1999). Η ισομορφή nArgBP2 περιέχει μια μοναδική αμινοξική αλληλουχία 606 καταλοίπων που χαρακτηρίζεται ως περιοχή δακτύλων ψευδαργύρου (zing finger) και απουσιάζει από τις υπόλοιπες ισομορφές (Kioka et al., 2002).

γ). Η vinexin αρχικά χαρακτηρίστηκε από την πρόσδεσή της στην πλούσια σε προλίνη περιοχή της πρωτεΐνης vinculin (Kioka et al., 1999). Μετά την αναγνώριση της περιοχής SoHo, η πρωτεΐνη εντάχθηκε στην οικογένεια των πρωτεϊνών CAV. Μέχρι στιγμής έχουν μελετηθεί εκτενώς δύο ισομορφές, η vinexin α και η vinexin β (Akamatsu et al., 1999), ενώ είναι γνωστή και μια τρίτη ισομορφή η vinexin-γ (Matsuyama et al., 2005).

Συνοπτικά, τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται η οικογένεια των πρωτεϊνών CAV παρουσιάζονται διαγραμματικά στην εικόνα 1.12. Στον πίνακα 1.1

παρουσιάζονται στοιχεία της δομής των πρωτεϊνών, οι μελετημένες ισομορφές τους καθώς και οι γνωστές λειτουργίες του κάθε μέλους της οικογένειας. Λόγω της ομοιότητας που εμφανίζει η δομή της αμινοξικής αλληλουχίας της BmSH3 με την οικογένεια των πρωτεϊνών CAV και της ένταξής της στην οικογένεια αυτή, παρατίθενται στη συνέχεια μερικές επιπλέον πληροφορίες για την λειτουργία των τριών κυρίων εκπροσώπων της οικογένειας.

Πίνακας 1-1: Παρουσίαση των κύριων εκπροσώπων της οικογένειας CAV, της πρωτοταγούς δομής τους, τις αλληλεπιδρώσες πρωτεΐνες και λειτουργίες στις οποίες εμπλέκονται (Roignot and Soubeyran 2009).

Μέλος	Χαρακτηρισμένες Ισομορφές	Δομή (SoHo, SH3)	Επιβεβαιωμένη Λειτουργία
ArgBP2	A	666 αα	Σηματοδότηση εξαρτώμενη από τον κυτταροσκελετό, αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση, επέκταση νευριτών, οργάνωση των συνάψεων, σηματοδότηση εξαρτώμενη από τις c-Abl, c-Arg, Akt, Pyk2
	B	640 αα	
	n-ArgBP2	1100 αα	
	gamma	573 αα	
CAP/Ponsin	Isoform 1	684 αα	Σηματοδότηση εξαρτώμενη από ινσουλίνη, αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, μυϊκή διαφοροποίηση και δομή, μεταφορά γλυκόζης, σηματοδότηση εξαρτώμενη από την Erk
	Isoform 2	816 αα	
Vinexin	alpha	671 αα	Κυτταρική διάχυση - μετανάστευση, εμπλοκή στη δημιουργία φιλοποδίων και συνάψεων, σηματοδότηση εξαρτώμενη από την Erk, και υποδοχείς ρετινοϊκού οξέως και οιστρογόνου
	beta	329 αα	
	gamma	680 αα	

1.5.1.1. Η πρωτεΐνη CAP

Η CAP είναι ένα απαραίτητο ενδιάμεσο της σηματοδότησης που ρυθμίζεται από την ινσουλίνη σε κύτταρα 3T3-L1 που προέρχονται από τον εμβρυϊκό ιστό ποντικιού (Ribon et al., 1998a; Kimura et al., 2001). Μετά την διέγερση από ινσουλίνη, η CAP αλληλεπιδρά με τη c-Cbl μέσω της περιοχής SH3 και με μια τρίτη πρωτεΐνη την flotillin, μέσω της περιοχής SoHo. Η flotillin οδηγεί το σύμπλοκο σε περιοχες της

κυτταρικής μεμβράνης που είναι γνωστές ως “σχεδίες” λιπιδίων (lipid rafts). Η μεταφορά αυτή είναι απαραίτητη για την μετακίνηση των μεταφορέων γλυκόζης στη μεμβράνη, οπότε και πραγματοποιείται η απορρόφηση της γλυκόζης από τα κύτταρα μέσω του υποδοχέα της, του GLUT4 (Baumann et al., 2000; Saltiel and Kahn, 2001; Kimura et al., 2001), Οι σχεδίες λιπιδίων αποτελούν ιδιαίτερες δομές της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και σε αντίθεση με το μοντέλο του “ρευστού μωσαϊκού” (όπως αυτό ορίστηκε από τους (Singer and Nicolson, 1972), αποτελούν σταθερές περιοχές πλούσιες σε σφιγγολιπίδια και χοληστερόλη αλλά κυρίως σε caveolin-1 και σε flotillin (Marx, 2001). Πιστεύεται ότι σχετίζονται ιδιαίτερα με τον συνεντοπισμό και τις αλληλεπιδράσεις διαφόρων παραγόντων κατά τη σηματοδότηση, καθώς και την μετακίνηση των κυστιδίων (vesicular trafficking) (Simons and Ikonen, 1997; Marx, 2001). Μελέτη της CAP και συγκεκριμένα της εμπλοκής της με το μονοπάτι σηματοδότησης της ινσουλίνης έδωσε ενδείξεις για την λειτουργία της περιοχής SoHo. Έτσι, έχει προταθεί ότι οι πρωτεΐνες της οικογένειας CAV, κυρίως οι ισομορφές που περιέχουν την περιοχή SoHo, αποτελούν συνδετικό κρίκο της σηματοδότησης τουλάχιστον των πρωτεϊνών που εμπλέκονται με την οργάνωση του κυτταροσκελετού με τις σχεδίες λιπιδίων.

Άλλες λειτουργίες της CAP είναι πρόσδεσή της με την dynamin, μια GTPase (παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανοσίνης), με την οποία σχηματίζουν σύμπλοκα στις κυτταρικές σειρές που έγινε η μελέτη (Tosoni and Cestra, 2009). Αυτή η αλληλεπίδραση πιστεύεται ότι οδηγεί στη ρύθμιση της ενδοκύττωσης του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR, Epidermal growth factor receptor) με τρόπο εξαρτώμενο από τα κυστίδια κλαθρίνης (clathrin coated pits). Η ενδοκύτωση γίνεται με την αλληλεπίδραση της CAP τόσο με την dynamin όσο και με τον κυτταροσκελετό. Η αλληλεπίδραση της CAP με τον κυτταροσκελετό και η ρύθμιση της αναδιοργάνωσης αυτού σε καταστάσεις στρες έχει δειχθεί με την επαγωγή ινιδίων ακτίνης (Ribon et al., 1998a).

Το γονίδιο που εκφράζει την ορθόλογη πρωτεΐνη στους ανθρώπους ονομάζεται SORBS1 (Sorbin και SH3-domain-containing-1), (Lin et al., 2001) και χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 10q23.3-q24.1. Η περιοχή αυτή θεωρείται υποψήφια για την ανθεκτικότητα στην ινσουλίνη, που βρέθηκε στους Ινδιάνους Pima (Lin et al., 2001). Αλληλόμορφα του γονιδίου σε διάφορους πληθυσμούς έχουν θεωρηθεί

υπεύθυνα για την αδυναμία απόκρισης στην ινσουλίνη και την εμφάνιση διαβήτη (Yang et al., 2003; Hagiwara et al., 2008).

1.5.1.2. Η πρωτεΐνη ArgBP2

Η ArgBP2 είναι μία πρωτεΐνη που δεσμεύεται στην Arg και στην Abl, εκπροσώπους της οικογένειας Abelson των κινασών τυροσίνης (Wang et al., 1997). Η ογκοπρωτεΐνη Abl εντοπίζεται μερικώς στον πυρήνα, όπου και φωσφορυλιώνει την RNA πολυμεράση ΙΙ. Η ArgBP2 εκφράζεται σε πολλούς ιστούς, αλλά κυρίως στην καρδιά. Στο κυτταρόπλασμα είναι άμεση η σχέση της με την δομή του κυτταροσκελετού ακτίνης καθώς και με τη δημιουργία ινιδίων σε συνθήκες στρες. Η Arg εντοπίζεται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα και ρυθμίζει άμεσα την δομή του κυτταροσκελετού ακτίνης (Wang et al., 2001). Βρίσκεται τόσο στις εστιακές επαφές, όπου αλληλεπιδρά με σημαντικούς τελεστές των κυτταρικών επαφών όπως η Vinculin και η Afadin (Kawabe et al., 1999). Εντοπίζεται τόσο στα ινίδια ακτίνης, που επάγονται από στρες των επιθηλιακών κυττάρων αλλά και στους Z-δίσκους (Z-disks) των σαρκωμάτων στους μυϊκούς καρδιακούς ιστούς (Wang et al., 1997). Πρόσφατα η ArgBP2 χαρακτηρίστηκε ως αντι-καρκινικός παράγοντας (Roignot and Soubeyran, 2009; Roignot et al., 2010) λόγω της συσχέτισής της με την κυτταρική μετανάστευση. Δύο διαφορετικές λειτουργίες οδηγούν στην διαφοροποίηση της ενεργοποίησης της WAVE1. Όταν αλληλεπιδρά με την κινάση της τυροσίνης c-Abl οδηγεί στην ενεργοποίηση της φωσφορυλίωσης της WAVE1, ενώ αντίθετα στην καταστολή της όταν αλληλεπιδρά με την φωσφατάση της τυροσίνης PTP-PEST (Roignot and Soubeyran, 2009). Η πρωτεΐνη WAVE1 (μέλος της οικογένειας των συνδετικών πρωτεϊνών του συνδρόμου Wiskott–Aldrich - WASP) έχει συσχετιστεί με τη μετανάστευση των κυττάρων και τον πολυμερισμό της ακτίνης, διεργασία που χρησιμοποιούν τα καρκινικά κύτταρα για τη μετανάστευση (Roignot and Soubeyran, 2009; Taieb et al., 2008).

Συνολικά έχουν χαρακτηριστεί τέσσερις ισομορφές οι ArgBPA, ArgBP2B, n-ArgBP2 και ArgBPγ (πίνακας 1.1), που αποτελούν προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος/συρραφής και εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα. Η ισομορφή ArgBP2B εμφανίζει μικρή διαφοροποίηση στην υποκυτταρική κατανομή της και βρέθηκε ότι εντοπίζεται και στον πυρήνα (Wang et al., 1997), παρόλο που και η ArgBP2A περιέχει

επίσης σήμα πυρηνικού εντοπισμού NLS. Η κατανομή της ArgBP2B στον πυρήνα θεωρείται ότι αποτελεί ένδειξη της επικοινωνίας διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Μια πιθανότητα για τη λειτουργία της πυρηνικής ArgBP2 είναι η διασύνδεση μηνυμάτων που ξεκινούν από τον κυτταροσκελετό με πυρηνικά γεγονότα, όπως η διαφοροποίηση της μεταγραφής γονιδίων. Εναλλακτικά, η πυρηνική ArgBP2 πιθανόν να συμμετέχει σε μιτοτικά γεγονότα, στα οποία εμπλέκεται η ακτίνη (Wang et al., 1997).

1.5.1.3. Η πρωτεΐνη vinexin

Η vinexin αποτελεί μία ακόμα πρωτεΐνη με τρεις SH3 περιοχές και μία περιοχή που εμφανίζει ομολογία προς το πεπτίδιο σορβίνη (Akamatsu et al., 1999). Έχει πιστοποιηθεί η εμπλοκή της στην δημιουργία εξωκυττάριων συνδέσμων, με την εξωκυττάρια μήτρα (Kioka et al., 1999). Έτσι, στην περιοχή SH3, που εντοπίζεται στο C-τελικό άκρο, προσδένεται η Sos, ένας παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανιδίνης (GTPase) για την Ras, που μεσολαβεί στη μεταφορά μηνυμάτων από αυξητικούς παράγοντες στην κινάση Erk και, τελικά, στην ενεργοποίηση των ιντεγκρινών (Akamatsu et al., 1999). Επιπλέον, η vinexin οδηγεί στην ενεργοποίηση των JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinases/ Stress-Activated Protein Kinase) μέσω της αλληλεπίδρασής της με τον EGF (Epidermic Growth Factor), (Akamatsu et al., 1999). Στις δύο άλλες SH3 περιοχές της vinexin προσδένεται η πρωτεΐνη vinculin, προκαλώντας την αύξηση των κυτταρικών συνδέσεων (Kioka et al., 1999). Η vinexin έχει εμπλακεί τόσο στην κυτταρική εξάπλωση, όσο και στη μετανάστευση των κυττάρων που προάγεται από την αλληλεπίδρασή της με την vinexin.

Όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας CAV, ο κύριος υποκυτταρικός εντοπισμός της vinexin είναι κυτταροπλασματικός και έχει βρεθεί στις εστιακές επαφές του κυτταροσκελετού με την εξωκυττάρια μήτρα. Μία σημαντική παρατήρηση είναι ο εντοπισμός της ισομορφής vinexin-α στον πυρήνα. Η παρατήρηση αυτή είναι σημαντική λόγω της συσχέτισης της vinexin-α με την μεταγραφική ικανότητα διάφορων υποδοχέων στεροειδών ορμονών όπως των ER (Estrogen Receptor), AR (Androgen Receptor) και GR (Glucocorticoid Receptor). Η πρόσδεση της vinexin-α στους πυρηνικούς υποδοχείς γίνεται κατά την ελεύθερη κατάσταση των υποδοχέων στο κυτταρόπλασμα και το σύμπλοκο μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου ενεργοποιείται η

μεταγραφή γονιδίων στόχων χωρίς την ανάγκη πρόσδεσης των στεροειδών ορμονών στους αντίστοιχους υποδοχείς. Η παρατήρηση αυτή αποτελεί μια ακόμα ένδειξη για την επικοινωνία μεταξύ διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως αυτών των στεροειδών ορμονών και του κυτταροσκελετού (Tujague et al., 2004).

1.5.1.4. Άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας

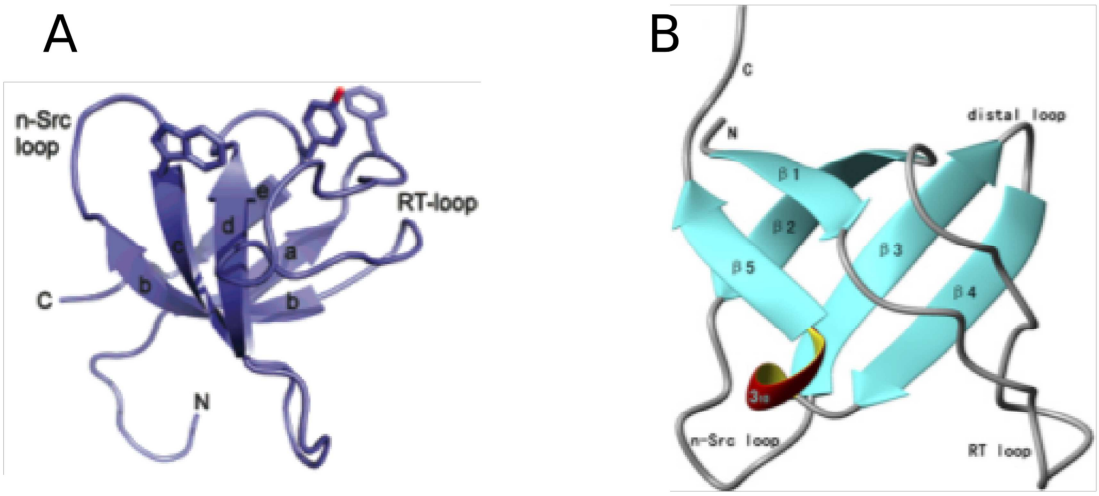
Η ανάλυση των γονιδιωμάτων διάφορων οργανισμών, όπως η *D. melanogaster*, η μέλισσα *Apis mellifera*, και τα κουνούπια *Anopheles gambiae* και *Aedes aegypti*, ταυτοποίησε άλλες πρωτεΐνες ομόλογες προς μέλη της οικογένειας CAV (παράρτημα Ι). Από αυτές, μόνο η DCAP (Drosophila C-cbl Associated Protein) που εκφράζεται στη *D. melanogaster*, έχει μελετηθεί και βρέθηκε η πιθανή εμπλοκή της στον μηχανισμό ελέγχου της μεταφοράς γλυκόζης μέσω της ινσουλίνης στο έμβρυο (Yamazaki and Nusse, 2002; Yamazaki and Yanagawa, 2003).

1.5.2. ΣΥΝΤΗΡΗΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ CAV ΚΑΙ Ο ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΥΣ ΡΟΛΟΣ.

Οι βασικές περιοχές που χαρακτηρίζουν τις πρωτεΐνες της οικογένειας CAV είναι οι SH3 επαναλήψεις που εντοπίζονται στο καρβοξυ-τελικό άκρο και η περιοχή με ομοιότητα στο πεπτίδιο σορβίνη (Sorbin Homology domain), η SoHo.

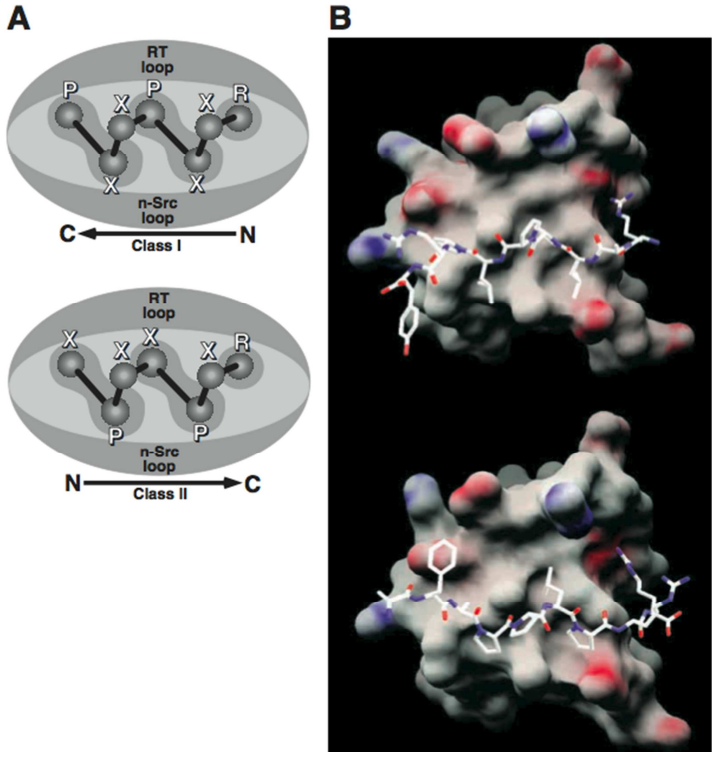
1.5.2.1. SH3

Η συντηρημένη περιοχή SH3 (Src homology domain 3) αποτελεί μια μικρή πρωτεϊνική περιοχή που απαρτίζεται συνήθως από 60 αμινοξέα. Αρχικά αναγνωρίστηκε ως μια περιοχή του αμινο-τελικού άκρου του μη-καταλυτικού τμήματος της κινάσης Src (Mayer et al., 1988). Η περιοχή βρέθηκε σε διαφορετικές πρωτεΐνες, όπως αυτές της οικογένειας των κινασών τυροσίνης, της v-Crk, της φωσφολιπάσης C-γ, της phosphatidyl inositol-3-kinase (PI-3 kinase) και της πρωτεΐνης ενεργοποίησης των GTPase (GAP) (Mayer et al., 1988; Stahl et al., 1988). Οι περιοχές SH3 εμφανίζονται κυρίως σε πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια, αλλά και σε μια πληθώρα άλλων πρωτεϊνών που δεν συμμετέχουν σε τέτοια μονοπάτια (Musacchio et al., 1992) αλλά έχουν συσχετιστεί με αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού και με πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού.



Εικόνα 1.13: Οι δομές της δεύτερης περιοχής SH3 της ponsin (A) (Margiolaki et al. 2007**)** και της πρώτης SH3 περιοχής της vinexin (B) (Zhang et al. 2007). Παρουσιάζονται τα βασικά στοιχεία της δευτεροταγούς δομής. Με πλατιά βέλη απεικονίζονται οι β-πτυχωτές επιφάνειες. Γίνεται και η επισήμανση και άλλων δομικών στοιχείων όπως των θηλειών τύπου n-Src και RT.

Η περιοχή SH3 συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις, με άλλες πρωτεϊνικές περιοχές πλούσιες στο αμινοξύ προλίνη. Η μικρή αυτή περιοχή δεν εμφανίζει ενζυμική δραστηριότητα και γρήγορα συσχετίστηκε με πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Βρέθηκε ότι οι περιοχές που αλληλεπιδρούν με την SH3 περιοχή, σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν, είναι πλούσιες στο αμινοξύ προλίνη και αναγνωρίστηκε η αλληλουχία PXXP (P: προλίνη, X: οποιαδήποτε αμινοξύ) ως κεντρική συντηρημένη αλληλουχία αναγνώρισης της SH3 (Ren et al., 1993). Πρόσφατα έγινε και ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής της δεύτερης περιοχής SH3 της ponsin/CAP (εικόνα 1.13 A, (Margiolaki et al., 2007) και της πρώτης περιοχής SH3 της vinexin (εικόνα 1.13 B),(Zhang et al., 2007a). Βρέθηκε ότι η τρισδιάστατη δομή και των δύο συντηρημένων περιοχών ακολουθούν την αναμενόμενη γενική δομή των περιοχών SH3 που περιέχουν πέντε β-πτυχωτές επιφάνειες και μια α-έλικα. Κάθε μια από τις β-πτυχωτές επιφάνειες είναι αντιπαράλληλη με την γειτονική β-πτυχωτή επιφάνεια και έτσι σχηματίζουν δομή β-βαρελιού (β-barrel). Επιπλέον, μελέτες έδειξαν ότι η επιφάνεια της περιοχής SH3 αποτελείται από μια σχετικά επίπεδη υδροφοβική επιφάνεια, που αποτελείται από τρεις ρηχές τσέπες ή αύλακες (grooves) που καθορίζονται από συντηρημένα υδροφοβικά κατάλοιπα (εικόνα 1.14 B), (Mayer, 2001).



Εικόνα 1.14: Αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης της περιοχής SH3 με τον προσδέτη (Mayer 2001). (A) Η πρόσδεση της τάξης I (πάνω) και τάξης II (κάτω) περιοχής πλούσιας σε προλίνη (δομή ραβδιού και σφαίρας) στην επιφάνεια της περιοχής SH3 (σκούρα γκρι περιοχή) παρουσιάζεται διαγραμματικά. Η ειδική "τσέπη" που συνήθως αλληλεπιδρά με το κατάλοιπο αργινίνη (R) στον προσδέτη βρίσκεται στα δεξιά του διαγράμματος και οι δύο υδρόφοβες προλίνες στα αριστερά. Η φορά του προσδέτη αναφέρεται κάτω από το διάγραμμα (εικόνα A). Κατ' εκτίμηση παρουσιάζονται και οι θέσεις των θηλειών RT και n-Scr της περιοχής SH3. (B) Εναλλακτική αναπαράσταση της περιοχής πρόσδεσης που είναι πλούσια σε προλίνες (δομή ράβδου), τάξης I (πάνω) και τάξης II (κάτω) στην SH3 περιοχή της Src κινάσης χρησιμοποιώντας χωροπληρωτικό μοντέλο.

Ο προσδέτης (περιοχή αλληλεπίδρασης) της SH3 περιοχής αποτελείται από περιοχές πλούσιες σε προλίνη κάτι που έχει ιδιαίτερη σημασία γιατί η φύση της προλίνης και κυρίως ο υδρόφοβος πενταγωνικός δακτύλιος (συμβολίζεται ως: **ΦΡ**) καταστρέφει τυχόν δευτεροταγείς δομές (α-έλικες, β-πτυχωτές επιφάνειες) και επιτρέπει μόνο συγκεκριμένες δομές (δομή πολυ-προλίνης τύπου II, polyproline type II) που συνήθως εμφανίζονται στην επιφάνεια των πρωτεϊνών (Li, 2005) καθιστώντας τες εύκολα προσβάσιμες από την SH3. Ο προσδέτης εμφανίζει μια αριστερόστροφη ελικοειδή διαμόρφωση που ονομάζεται έλικα πολυπρολίνης-2 (polyproline-2 helix, PPII). Η έλικα PPII αποτελείται από τρία κατάλοιπα ανά στροφή και εμφανίζει μια

σχετική τριγωνική δομή σε εγκάρσια τομή (εικόνα 1.14 Α), η βάση της οποίας προσαρμόζεται στην επιφάνεια της περιοχής SH3. Έτσι, δύο από τις τρεις τσέπες της περιοχής SH3 είναι κατειλημμένες από δύο υδρόφοβους δακτύλιους προλίνης (ΦΡ) οι οποίοι βρίσκονται στις στροφές της έλικας, ενώ η τρίτη τσέπη στις περισσότερες περιπτώσεις αλληλεπιδρά με ένα βασικό κατάλοιπο του προσδέτη μακριά από το πυρήνα PXXP. Η έλικα PPII παρουσιάζει παρόμοια δομή από όποια κατεύθυνση και αν εξεταστεί (καρβοξυ- και αμινο-τελικό άκρο) και μπορεί να προσδεθεί στην περιοχή SH3 και με τις δύο κατευθύνσεις. Κοιτάζοντας στην κατεύθυνση από το καρβοξυ-τελικό στο αμινο-τελικό, σχηματίζεται η **τάξη Ι** (class I, εικόνα 1.14 Α) που αποτελείται από την συναινετική (ή ομόφωνη, consensus) αλληλουχία +ΧΦΡΧΦΡ και η **τάξη ΙΙ** (class II, εικόνα 1.14 Α) από την συναινετική αλληλουχία ΦΡΧΦΡΧ+ (όπου Χ: οποιοσδήποτε αμινοξύ, +: βασικό αμινοξύ -κυρίως αργινίνη- εικόνα 1.14 Α) (Feng et al., 1994; Mayer and Eck, 1995). Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι υδροφοβικές προλίνες του ίδιου προσδέτη, ανάλογα με την κατεύθυνσή του, μπορούν να καταλάβουν διαφορετικές περιοχές στην επιφάνεια της περιοχής SH3 σε σχέση με τον άξονά του. Έτσι οι δύο βασικές προλίνες βρίσκονται στη δεξιά πλευρά στην περίπτωση της τάξης Ι και στην αριστερή πλευρά στην περίπτωση της τάξης ΙΙ (εικόνα 1.14 Α), (Mayer, 2001).

Εξειδίκευση της αλληλεπίδρασης των SH3 περιοχών και των προσδετών

Λόγω της ιδιαιτερότητας της αλληλεπίδρασης των πλούσιων σε προλίνη περιοχών με την περιοχή SH3, εμφανίζεται χαμηλή εξειδίκευση για την κατεύθυνση του προσδέτη και του στόχου. Η μικρή συγγένεια που εμφανίζει η περιοχή SH3 με πεπτίδια που περιέχουν το πρότυπο PXXP, το οποίο σε συνδυασμό με την μικρή εξειδίκευση για συγκεκριμένη κατεύθυνση του προσδέτη, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι περιοχές SH3 μπορούν να αλληλεπιδράσουν στον ίδιο χρόνο με ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών, ενεργοποιώντας παράλληλα παράπλευρα μονοπάτια (Ladbury and Arold, 2000). Όμως, τα πειραματικά δεδομένα συνηγορούν στην ύπαρξη εξειδίκευσης στην επιλογή της κατεύθυνσης που προέρχεται από την τρίτη τσέπη της περιοχής SH3, που δεν καταλαμβάνεται από προλίνη, και εξειδίκευσης και για άλλα κατάλοιπα εκτός της αργινίνης αυξάνοντας ταυτόχρονα και την συγγένεια της περιοχής SH3 για συγκεκριμένα πρότυπα PXXP (Wu et al., 1995; Mayer, 2001). Μια άλλη περιοχή που οδηγεί σε αυξημένη συγγένεια μεταξύ προσδέτη και SH3 περιοχών είναι η φύση των

αμινοξικών καταλοίπων εκτός του κεντρικού προτύπου PXXP (Feng et al., 1995; Lee et al., 1995; Zhao et al., 2000). Η εξειδίκευση που εμφανίζεται σε αυτές τις περιπτώσεις είναι σχετικά αυξημένη, αλλά εξακολουθεί να υπάρχει η χαμηλή συγγένεια μεταξύ του προσδέτη και των περιοχών SH3. Πιθανολογείται ότι έχει επιλεχθεί αυτός ο τρόπος αλληλεπίδρασης γιατί επιτρέπει την άμεση αποδέσμευση των πρωτεϊνικών συμπλόκων όταν αυτό είναι απαραίτητο, κυρίως σε σηματοδοτικά μονοπάτια με υψηλά επίπεδα ενεργοποίησης και καταστολής. Διεργασίες με άμεση απόκριση είναι ιδιαίτερα σημαντικές, όπως για παράδειγμα συμβαίνει με τις αλλαγές που προκαλούνται στον κυτταροσκελετό από σηματοδότηση εξαρτώμενη από τις ιντεγκρίνες, όπου είναι απαραίτητη η σχεδόν ακαριαία αποδόμηση των πρωτεϊνικών συμπλόκων (Vaynberg et al., 2005).

Έχει προταθεί (Zarrinpar et al., 2003), αλλά και επιβεβαιωθεί πειραματικά (Li, 2005), ότι η συγγένεια αυξάνεται λόγω:

(α) της ειδικής υποκυτταρικής κατανομής των πρωτεϊνών που μπορούν να αλληλεπιδράσουν,

(β) της συνεργιστικής δράσης στην αύξηση της συγγένειας που μπορεί να εμφανίζει η αλληλεπίδραση με πολλαπλές πρωτεΐνες

(γ) της πιθανής συνέργειας στην αύξηση της εξειδίκευσης που συντελείται με την ταυτόχρονη αλληλεπίδραση πρωτεϊνών που περιέχουν το πρότυπο PXXP σε πολλαπλά αντίγραφα με περισσότερες από μια SH3 περιοχές της ίδιας πρωτεΐνης.

δ) της εξειδίκευσης που παρέχει η αμινοξική αλληλουχία μακριά από τον πυρήνα PXXP, όπως η αλληλεπίδραση με περιοχές που δεν ανήκουν στο πρότυπο PXXP, η ύπαρξη βασικού αμινοξέος στην περιοχή πρόσδεσης, αλλά και με την συμμετοχή επιφανειών μακριά από την κεντρική περιοχή πρόσδεσης.

Άλλες αλληλουχίες αλληλεπίδρασης των SH3 περιοχών

Οι περιοχές SH3 μπορούν επίσης να αλληλεπιδράσουν με περιοχές που δεν ακολουθούν το πρότυπο PXXP. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι οι περιοχές SH3 μπορούν να αλληλεπιδράσουν με διαφοροποιήσεις του προτύπου PXXP, όπως το πρότυπο Pix

της πρωτεΐνης Pak, PPPVIAPRPETKS, (Manser et al., 1998), το πρότυπο Eps, PXXDY (Mongiovi et al., 1999) και το πρότυπο Hbp της πρωτεΐνης UBPY, Px(V/I)(D/N)RXXKP (Kato et al., 2000), αλλά και με συναινετικές αλληλουχίες, από τις οποίες απουσιάζει η προλίνη, όπως η συναινετική αλληλουχία RKXXYXXY, που βρέθηκε στην πρωτεΐνη SKAP55, μια πρωτεΐνη που σχετίζεται με τη Src κινάση. Ομοίως, στη ζύμη αναγνωρίστηκε η συναινετική αλληλουχία WxxxFxxLE. Η περιοχή SH3 αναγνωρίζει και προσδένεται σε αυτή την αλληλουχία (Li, 2005).

Η δυναμική των περιοχών SH3 αποτελεί ένα ενδιαφέρον πεδίο της μελέτης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, λόγω της δυναμικής που παρουσιάζει η ταυτόχρονη χαμηλή συγγένεια με τις περιοχές-στόχους και της εξειδίκευσης που εμφανίζει η αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών που περιλαμβάνουν τα αντίστοιχα δομικά στοιχεία (Li, 2005).

1.5.2.2. SOHO

Όπως προαναφέρθηκε, η περιοχή SoHo εμφανίζει ομολογία με το πεπτίδιο σορβίνη (Charpin et al., 1992). Το πεπτίδιο σορβίνη που αποτελείται από 153 αμινοξέα, απομονώθηκε από το έντερο του χοίρου. Είναι ένα βιο-ενεργό πεπτίδιο που ενεργοποιεί την πρόσληψη νερού και ηλεκτρολυτών από τη χοληδόχο κύστη (Charpin et al., 1992). Η προέλευση και ο γονιδιακός τόπος του γονιδίου της σορβίνης στον άνθρωπο ήταν άγνωστος μέχρι που βρέθηκε πως το ανθρώπινο πολυπεπτίδιο της σορβίνης κωδικοποιείται από εναλλακτικό μετάγραφο (alternative transcript) του γονιδίου SORBS2 (Hand and Eiden, 2005). Η λειτουργία της περιοχής SoHo δεν έχει διευκρινιστεί, πιστεύεται όμως ότι αποτελεί μια περιοχή στόχευσης πρωτεϊνών σε σχεδίες λιπιδίων (lipid rafts), (Kimura et al., 2001). Έτσι, βρέθηκε ότι η περιοχή SoHo αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη flotillin, μια πρωτεΐνη που συσχετίζεται με σχεδίες λιπιδίων. Όπως προαναφέρθηκε, μετά από την αύξηση των επιπέδων της ινσουλίνης στην εξωκυττάρια περιοχή, η CAP μεταναστεύει στις σχεδίες λιπιδίων και σημαντικό ρόλο σε αυτή την μετακίνηση παίζει η αλληλεπίδραση της περιοχής SoHo με την flotillin.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η μετάβαση από τη βιτελλογένεση στη χοριογένεση ρυθμίζεται από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες της ωοθήκης και χαρακτηρίζεται από τη μείωση της συγκέντρωσης της 20Ε στην αιμολέμφο. Σε αυτή την περίοδο γίνεται η καταστολή και ενεργοποίηση διάφορων γονιδίων. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα γονίδια που εκφράζονται σε περιορισμένη χρονική περίοδο (ιδιαίτερα στα στάδια κοντά στη μετάβαση από τη βιτελλογένεση στη χοριογένεση, στάδια -10/+10) όπως τα γονίδια *BmE75* και *BmFTZ-F1*. Η περίοδος αυτή είναι σημαντική για την ολοκλήρωση του αναπτυξιακού προγράμματος με την εκκίνηση της χοριογένεσης. Με βάση τις πρώτες ενδείξεις που υπήρχαν για το πρότυπο έκφρασης της BmSH3, θεωρήθηκε ότι η πρωτεΐνη αυτή εμφάνιζε χρονοειδική κατανομή στο μεταβατικό στάδιο μεταξύ της χοριογένεσης και της βιτελλογένεσης (Swevers and Iatrou, 1999). Με αυτό το σκεπτικό ένα από τα ερωτήματα που τέθηκε κατά τον αρχικό σχεδιασμό της διατριβής ήταν η διερεύνηση της έκφρασης της BmSH3 κατά τη μετάβαση από τη βιτελλογένεση στη χοριογένεση και η διερεύνηση του ρόλου της πρωτεΐνης στο συγκεκριμένο στάδιο.

Ενδιαφέρον παρουσίασε και η κατάταξη της BmSH3 στην οικογένεια των πρωτεϊνών CAV των οποίων ο ρόλος στις διάφορες κυτταρικές λειτουργίες αποτελεί αντικείμενο εντατικής μελέτης (Kioka et al., 2002; Roignot and Soubeyran, 2009) ειδικότερα σε σχέση με την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και τη σηματοδότηση που συσχετίζεται με τον κυτταροσκελετό, όπως έχει ήδη αναφερθεί στο κεφάλαιο 1.5. Κατά τη διάρκεια της ωογένεσης τα κύτταρα που απαρτίζουν τα ωοθυλάκια υπόκεινται σε σημαντικές αναδιοργανώσεις του κυτταροσκελετού, κυρίως λόγω πιέσεων που δέχονται από τις άμεσες αλλαγές στη φυσιολογία και την ομοιόσταση των κυττάρων. Με βάση τα παραπάνω, ένα επιπλέον ερώτημα που τέθηκε ήταν η διερεύνηση της πιθανής εμπλοκής της BmSH3 σε διάφορες σηματοδοτικές διεργασίες εξαρτώμενες ή μη από τον κυτταροσκελετό, που λαμβάνουν χώρα κατά την ωογένεση.

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει φυσικά και η μελέτη της αλληλεπίδρασης της BmSH3 με την BmE75C, όπως τουλάχιστον αυτή ανιχνεύτηκε από το σύστημα δύο υβριδίων στη ζύμη (K. Ito and K. Iatrou, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Η επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών οδηγεί σε συσχέτιση της σηματοδότησης του κυτταροσκελετού με τα μοριακά δρώμενα που ενεργοποιούνται από την εκδυσόνη και

ιδιαίτερα τη μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων που ελέγχονται από αυτή. Επομένως, ένα επιπλέον ερώτημα που τέθηκε ήταν αν η BmE75C και η BmSH3 αλληλεπιδρούν στα θυλακοκύτταρα *in vivo* και ποιες οι πιθανές συνέπειες για τη λειτουργία των θυλακοκυττάρων.

Για να απαντηθούν τα παραπάνω ερωτήματα η ερευνητική προσπάθεια εστιάστηκε στον χαρακτηρισμό της BmSH3 και ειδικότερα:

α. Στο δομικό και αναπτυξιακό χαρακτηρισμό της πρωτεΐνης

β. Στο χαρακτηρισμό πιθανών αλληλεπιδράσεών της BmSH3 με άλλες πρωτεΐνες. Στην παρούσα διατριβή η ανίχνευση των πιθανών αλληλεπιδράσεων περιορίστηκε στην πιστοποίηση της αλληλεπίδρασης της BmSH3 με τη BmE75C.

γ. Στη διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου της πρωτεΐνης BmSH3 κατά τη διάρκεια της ωογένεσης

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Α. ΥΛΙΚΑ

3.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Το βιολογικό υλικό προέρχεται από τον υπό μελέτη οργανισμό, τον μεταξοσκώληκα *B. mori* (στέλεχος Daizo). Χρησιμοποιήθηκαν οι μεταξογόνοι αδένες για την απομόνωση γενωμικού DNA, και άλλοι ιστοί (κυρίως ωοθυλάκια διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων) για την απομόνωση ολικού RNA. Η εκτροφή των εντόμων έλαβε χώρα στο εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Εντόμων και Βιοτεχνολογίας του Ινστιτούτου Βιολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε «Δημόκριτος» (βλ. κεφάλαιο 3.2.1).

Χρησιμοποιήθηκαν επίσης χαρακτηρισμένες βιβλιοθήκες cDNA που συντέθηκαν από ολικό RNA απομονωμένο από χοριογενικά ή βιτελογενικά ωοθυλάκια ενός υβριδικού στελέχους μεταξοσκώληκα που εκτρέφεται στο “Forest Pest Management Institute, Sault Sainte-Marie, στον Καναδα (Swevers et al., 2002b).

Για την παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων πραγματοποιήθηκαν ενέσεις σε κουνέλια (New Zealand White Rabbits), τα οποία εκτρέφονταν στο εκτροφείο πειραματόζωων του Ινστιτούτου Βιολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. “Δημόκριτος”.

3.2. Ο ΜΕΤΑΞΟΣΚΩΛΗΚΑΣ *Bombyx mori*

3.2.1. ΕΚΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΞΟΣΚΩΛΗΚΑ

3.2.1.1. Τροφή

Οι μεταξοσκώληκες τρέφονται αποκλειστικά με φύλλα μουριάς. Στο «φυσικό» περιβάλλον (παραδοσιακή σηροτροφία) η εκκόλαψη των αυγών συμπίπτει με την άνθηση της μουριάς, οπότε η τροφή είναι διαθέσιμη σε μεγάλες ποσότητες. Με την έναρξη του φθινοπώρου, τα γονιμοποιημένα αυγά εισέρχονται σε διάπαυση και επιβιώνουν μέχρι την επόμενη άνοιξη. Στο εργαστήριο, οι συνθήκες είναι ελεγχόμενες και ο κύκλος εκκόλαψης και γονιμοποίησης νέων εντόμων είναι συνεχής. Για την καλλιέργεια του εντόμου κατά τη διάρκεια όλου του χρόνου χρησιμοποιείται αποξηραμένη τεχνητή τροφή (Yakuroto Co., Japan) που βασίζεται στα φύλλα μουριάς. Η αποξηραμένη τροφή επαναιωρείται σε απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό στις

προτεινόμενες συγκεντρώσεις και το μείγμα που παράγεται κόβεται σε λεπτά κομμάτια για να είναι εύληπτο από τους μεταξοσκώληκες.

3.2.1.2. Συνθήκες εκτροφής

Η εκτροφή γίνεται σε επωαστήρες με δυνατότητα ρύθμισης της θερμοκρασίας, της υγρασίας και της φωτοπεριόδου στα επιθυμητά επίπεδα. Οι συνθήκες εκκόλαψης και ανάπτυξης των εντόμων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 25^{o}C, με 70% υγρασία, υπό δωδεκάωρη εναλλαγή ημέρας-νύχτας (Swevers et al., 1995).

3.2.1.3. Διαδικασία εκτροφής

Το στέλεχος Daizo που χρησιμοποιήθηκε δεν υφίσταται διάπαυση και τα γονιμοποιημένα αυγά μετά από περίπου δέκα με δώδεκα μέρες εκκολάπτονται, χωρίς να χρειαστούν την απαραίτητη, σε αντίθετη περίπτωση, ενεργοποίηση. Οι νεοεκκολαπτόμενες προνύμφες μεταφέρονται σε κατάλληλα πλαστικά δοχεία, όπου έχει τοποθετηθεί τροφή. Τα δοχεία με τις προνύμφες καθαρίζονται επιμελώς από τα περιττώματα και την ξερή τροφή, η οποία και αντικαθίσταται καθημερινά με φρέσκια. Κατά την μετάβαση από την προνύμφη στη νύμφη και την κατασκευή του κουκουλιού, τα άτομα είτε μεταφέρονται μέσα σε εφημερίδες περιτυλιγμένες σε χωνί, είτε σε καθαρό δοχείο. Τέσσερις μέρες μετά την ολοκλήρωση του κουκουλιού, οι προνύμφες μεταμορφώνονται σε νύμφες. Μετά τη μεταμόρφωση το άτομο μπορεί να μεταφερθεί από το κουκούλι, με προσεχτική κοπή του κουκουλιού, έτσι ώστε να διευκολύνεται η παρακολούθηση της ανάπτυξης και η χρήση του στα επιθυμητά αναπτυξιακά στάδια.

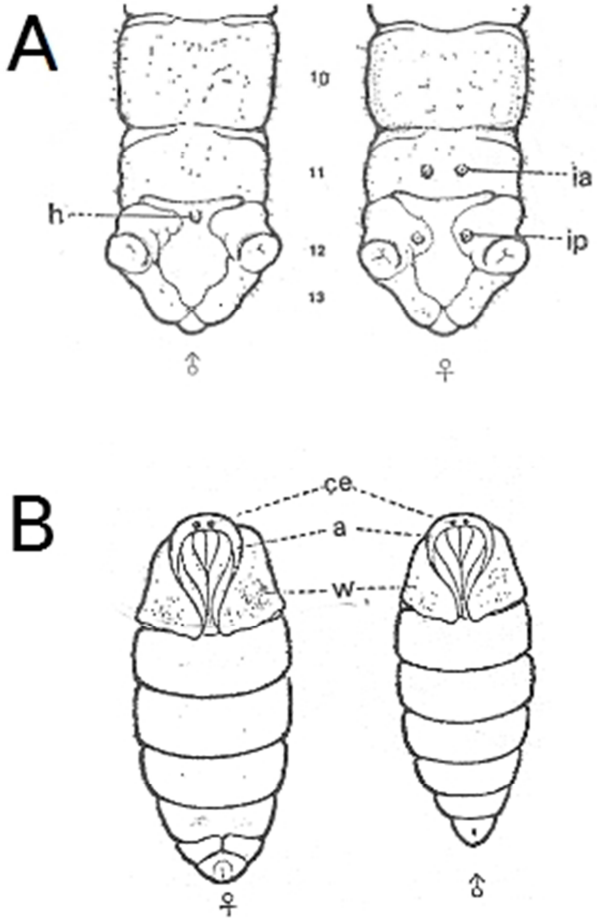
3.2.2. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΘΗΛΥΚΩΝ ΑΤΟΜΩΝ

Ο διαχωρισμός των αρσενικών από τα θηλυκά άτομα μπορεί να γίνει σε δύο στάδια της ανάπτυξης του μεταξοσκώληκα:

α) Μετά το πέρας του τέταρτου σταδίου της προνύμφης και της επακόλουθης έκδυσης, εμφανίζονται χαρακτηριστικά στίγματα στο οπίσθιο κοιλιακό τμήμα (ventral-posterior part of the abdomen) στα θηλυκά άτομα. Πρόκειται για τέσσερις μικρές κυκλικές γαλακτόχροες παχύνσεις στο κοιλιακό οπίσθιο τμήμα μεταξύ του 11^{ου} και 12^{ου} μεταμερούς οι οποίες λέγονται “Ishiwata imaginal bud”. Τα αρσενικά

άτομα δεν έχουν αυτές τις παχύνσεις και ξεχωρίζουν από το σημείο του Herold (Herold imaginal bud) εικόνα 3.1 Α**.**

β) Ασφαλέστερος τρόπος διαχωρισμού των αρσενικών και θηλυκών ατόμων μπορεί να γίνει κατά το στάδιο της νύμφης, με βάση τα εξωτερικά χαρακτηριστικά που εντοπίζονται στην οπίσθια κοιλιακή περιοχή, όπως διακρίνονται στην εικόνα 3.1 Β.



Εικόνα 3.1: Σχέδιο που αναπαριστά τον μεταξοσκώληκα Bombyx mori στο τέταρτο στάδιο της προνύμφης (Α) και κατά το στάδιο της νύμφης (Β). Α: κοιλιακή όψη των οπίσθιων τομών. h: σημείο του Herold, ia: εμπρόσθιο σημείο Ishiwata, ip: οπίσθιο σημείο Ishiwata. Β) κοιλιακή όψη της ασερνικής και της θυλικής νύμφης. a: κεραίες, ce: συγκαλυμένα μάτια, w: φτερά.

3.2.3. ΑΝΑΤΟΜΙΑ

Ανατομία πραγματοποιείται σε θηλυκά άτομα που συνήθως βρίσκονται στη έκτη με όγδοη μέρα του σταδίου της νύμφης και απομονώνονται διάφοροι ιστοί, κυρίως

ωοθυλάκια. Το χρονικό διάστημα επιλέγεται συνήθως αυτό λόγω της αντιπροσώπευσης όλων των σταδίων της ωογένεσης στα ωοθηκάρια, από την προβιτελλογένεση την βιτελλογένεση και τη χοριογενεση. Ο αριθμός των ωοθυλακίων που έχουν εισέλθει στο στάδιο της χοριογένεσης στη έκτη με όγδοη μέρα ποικίλει ανάλογα με το στέλεχος και τις συνθήκες διατροφής και καλλιέργειας. Στις παρούσες συνθήκες τα ωοθυλάκια που είχαν εισέλθει στην χοριογένεση μετά την έκτη μέρα δεν ξεπερνούσαν τα 25 ανά ωοθηκάρια με το τελικό αριθμό των ώριμων αυγών να κυμαίνεται στο δύο περίπου.

Η ανατομία γίνεται εντός διαλύματος Hunsley's Medium (κεφάλαιο 3.3, (Swevers and Iatrou, 1992), κάτω από στερεοσκόπιο με ψυχρό φωτισμό οπτικής ίνας. Λόγω της σύγχρονισμένης ανάπτυξης των ωοθυλακίων ανά ωοθηκάριο, είναι δυνατή η χρήση του ενός ωοθηκαρίου για τη σταδιοποίηση όλων των ωοθυλακίων του ίδιου εντόμου (βλ. και παρακάτω κεφάλαιο 3.2.4). Το ωοθηκάριο, στο οποίο έγινε η σταδιοποίηση απορρίπτεται, ενώ τα υπόλοιπα επτά ωοθηκάρια συλλέγονται για τις βοχημικές μοριακές και λειτουργικές μελέτες. Κατά την διάρκεια της ανατομίας οι ιστοί διατηρούνται σε τρυβλία που περιέχουν διάλυμα Hunsley's Medium, πάνω σε πάγο. Οι ιστοί είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται άμεσα. Όταν δεν είναι δυνατή η άμεση χρήση τους τα απομονωμένα ωοθυλάκια μεταφέρονται σε σωλήνες τύπου eppendorf, απομακρύνεται το διάλυμα ανατομίας και φυλάσσονται στους -80 ^{o}C. Οι διαδικασίες απομόνωσης και οι ακόλουθες μελέτες πρέπει να ολοκληρώνονται σε σύντομο χρονικό διάστημα για να αποφευχθεί οποιαδήποτε καταστροφή του βιολογικού υλικού.

3.2.4. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Η σταδιοποίηση βασίζεται σε 2 βασικές ιδιότητες των ωοθυλακίων. Κατά την μετάβαση από την βιτελλογένεση στη χοριογένεση παρατηρείται ελαφρά διόγκωση του ωοθυλακίου που αποκτά ανοιχτόχρωμο υποκίτρινο χρώμα λόγω της πρόσληψης νερού (φάση διόγκωσης). Το πρώτο ωοθυλάκιο με τα χαρακτηριστικό αυτό θεωρείται ως το πρώτο χοριογενικό και του δίνεται η αρίθμηση +1 (Kafatos et al., 1977). Μια πιο εύκολη σταδιοποίηση γίνεται με την εμβάπτιση του ωοθηκάριου σε 90% γλυκερόλη. Τα ωοθυλάκια που δεν έχουν εισέλθει στη χοριογένεση συρρικνώνονται άμεσα λόγω της αυδάτωσής τους από την γλυκερόλη, σε αντίθεση με τα χοριογενικά ωοθηλάκια που ανθίστανται στην επίδραση της γλυκερόλης, λόγω της έναρξης της κατασκευής του χορίου και το κλείσιμο των αυλακώσεων.

Κάθε ωοθυλάκιο λαμβάνει αρίθμηση ανάλογα με τη θέση που έχει στην αναπτυξιακή αλυσίδα στο ωοθηκάριο. Έτσι, όσα έπονται του πρώτου χοριογενικού (τα χοριογενικά) λαμβάνουν αύξουσα αρίθμηση, ενώ όσα προηγούνται (βιτελογενικά, προβιτελογενικά) λαμβάνουν φθίνουσα (αρνητική) αρίθμηση, ώστε να υπάρχει μια πλήρη αναπτυξιακή σειρά που συμβολίζεται ως ...-2,-1,+1,+2....

3.3. ΚΟΙΝΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.

Χρησιμοποιήθηκαν ορισμένα κοινά θρεπτικά μέσα και διαλύματα που παρουσιάζονται στη συνέχεια και θα αναφέρονται, χάριν ευκολίας, με τα αρχικά τους.

mQ (Milli-Q): Νερό το οποίο είναι απιονισμένο σε μεγάλο βαθμό μέσω του συστήματος καθαρισμού της εταιρείας Millipore Corporation

Θρεπτικό υλικό Luria-Bertoni (LB) για καλλιέργεια βακτηρίων: 1 gr Tryptone, 0,5 gr Yeast Extract, 1 gr NaCl ανά 100 ml θρεπτικού μέσου. Ρύθμιση του pH στο 7,0 με προσθήκη διαλύματος NaOH. Για στερεές καλλιέργειες σε τρυβλία χρησιμοποιείται LB-agar

LB agar (bottom agar): 1,5% άγαρ σε θρεπτικό LB. Το άγαρ προστίθεται στο μείγμα του LB και υγροποιείται κατά την αποστείρωση. Πριν την στερεοποίηση, το θρεπτικό υλικό διαμοιράζεται σε τρυβλία petri, τα οποία κατόπιν χρησιμοποιούνται για την επίστρωση βακτηρίων. Εφόσον είναι αναγκαίο προστίθεται αντιβιοτικό σε τελική συγκέντρωση 100 mg/ml.

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

Φαινόλη: σε pH 8,0 για τον καθαρισμό DNA, και σε pH 2,5, για τον καθαρισμό RNA. Η εξισορρόπηση της φαινόλης γίνεται με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl αντίστοιχου pH και συγκέντρωσης 1M.

Φαινόλη/SEVAG**:** 25 μέρη εξισορροπημένης φαινόλης, 24 μέρη χλωροφορμίου και 1 μέρος ισοαμυλικής αλκοόλης (v/v).

TEA (ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρισης νουκλεοτιδίων): 10mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0, 40 mM οξικό οξύ

DNA extraction Buffer: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 50 mM EDTA, 0,5 % SDS, 100 μg/ml πρωτεϊνάση Κ

40x Salts Stock: 158 mM NaCl, 1M KCl, 0,7 M $MgCl_2.6H_2O$, 158 mM $CaCl_2$ (4,64 gr NaCl, 39,2 gr KCl, 73,2 gr $MgCl_2.6H_2O$, 8.8 gr $CaCl_2$ σε τελικό όγκο 500 ml).

50x Buffer Stock: 312 mM KH_2PO_4, 143 mM $K_2HPO_4.3H_2O$ (21,25 gr KH_2PO_4, 16,32 gr $K_2HPO_4.3H_2O$ διάλυση σε H2O, σε τελικό όγκο 500 ml).

Hunsley's Medium: για 1 lt διαλύματος αναμειγνλυονται 25 ml 40x salts stock, 20 ml 50x buffer stock, 85,57 gr σακχαρόζη (τελική συγκέντρωση 0.25 M). Το pH ρυθμίζεται με KOH στην τιμή 6,6. Το διάλυμα αποστειρώνεται με φίλτρο διήθησης 0,25 μm.

100X Denhardt's buffer: 2% Ficoll (Type 400), 2% Polyvinylpyrrolidone, 2% BSA (Bovine Serum Albumin, Fraction V)

Phosphate buffer για υβριδισμό: Na_2HPO_4 0,5 M pH 7,0

Διάλυμα Υβριδισμού: 0,3 M NaCl, 50 mM phosphate buffer, 12,5x Denhard's buffer, 1% SDS, 5mM EDTA, 5mg/ml yeast RNA.

50x MOPS: 1 M MOPS pH 7, 0,25 M οξικό νάτριο και 0.5 M EDTA

Sample Buffer για ηλεκτροφόρηση RNA: 50% φορμαμίδιο, 7,4% φορμαλδεΰδη, 1x MOPS, 0,1 μg/μl βρωμιούχο αιθίδιο, 0,01% bromphenol blue και 0,01% coomasie blue

RNA Running Buffer, ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση RNA: 1x MOPS, 1M φορμαλδεΰδη σε νερό ελεύθερο από RNase.

20X SSC: 3 M NaCl, 0,3 M κιτρικό νάτριο.

Διαλύματα για απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση βακτηρίων:

Solution I (G.E.T.): 50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA,

Solution II: 1% SDS, 0,2 N NaOH,

Solution III: 3M KAc pH 4,8.

Sequencing Buffer: 50 mM Tris-HCl pH 9,0, 2 mM $MgCl_2$

1x PBS (Phosphate Buffered Saline): 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1,8 mM KH_2PO_4, pH 7,4.

20X PBS: 0,8% w/v NaCl, 0,02% w/v KCl, 0,144% w/v Na_2HPO_4, 0,024% w/v KH_2PO_4, pH 7,4

TBS (Tris-Buffer Saline): 20 mM Tris pH 7.6, 0.5 M NaCl

TBS-T (TBS-Tween): 0,1 % Tween-20 σε TBS

Αιώρημα Sephadex G-50: Προστίθενται 10 g Sephadex G-50 σε τελικό όγκο 160 ml mQ νερό. Ρυθμίζεται το pH στο 7,6 με ΤΕ και αποστειρώνεται σε 120 ºC/10 psi για 15 λεπτά.

Ραδιενεργά νουκλεοτίδια - ιχνηθέτες [α-^{32}P]dCTP (10 mCi/ml, Amersham)

Πήκτωμα διαχωρισμού (Separating Gel) 10% πολυακρυλαμίδη, για πρωτεϊνες: 10 % Acrylamide/Bis-acrylamide (30%/0.8% w/v), 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,1 % APS και 5 μl TEMED.

Πήκτωμα συμπύκνωσης (Stacking gel) 5%, για πρωτεϊνες: 5% Acrylamide (30%) Bis-acrylamide (0,8%), 0,75 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% APS, 5 μl TEMED.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer) για πρωτεϊνες: 50 mM Tris, 380 mM γλυκίνη, 0,1 % SDS.

Διάλυμα μεταφοράς (**transfer buffer**): 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 20% methanol, 0,1% SDS

Διάλυμα χρωματισμού πρωτεϊνών Ponceau-S: 0.1% Ponceau-S (w/v, Sigma-Pr. No. 7170) σε 5.0% acetic acid (w/v).

Cracking Buffer για λύση ιστών και κυττάρων: 0,125M Tris-HCl pH 6,8, 5% β-mercaptoethanol, 2% SDS, 4M urea; (Koelle et al., 1991)

RIPA buffer: 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS.

NP-40 buffer: 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, ρύθμιση pH το 8

Διάλυμα ηχοτριψίας, για τη λύση βακτηρίων: 0,1% Triton X-100, 40 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 0,2 mg/ml λυσοζύμης σε 1xPBS.

10% Blocking Buffer για ανάλυση τύπου Western: 10% (w/v) γάλα σε σκόνη, 80mM Na_2HPO4, 20mM NaH_2PO4, 100mM NaCl, 0,1% Tween.

3.4. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ, ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΚΑΙ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΦΟΡΕΙΣ

3.4.1. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη DH5a (INVITROGEN) και BL21 DE3 (Studier and Moffatt, 1986) του βακτηρίου *Escherichia coli*:. Το στέλεχος DH5a χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA και το στέλεχος BL21 DE3 για την παραγωγή και την απομόνωση πρωτεϊνών.

3.4.2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΕΝΤΟΜΩΝ

Για την μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών του μεταξοσκώληκα χρησιμοποιήθηκαν οι εντομικές κυτταρικές σειρές:

α. Bm5, προερχόμενη από κύτταρα του επιθηλίου της ωοθήκης του μεταξοσκώληκα *B. mori* (Grace, 1967) και

β. BTI-Tn-5B1–4 (ή High Five™, Hi5), που προέρχεται από έμβρυα του λεπιδοπτέρου *Trichoplusia ni* (Granados et al., 1974).

3.4.3. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ

Για τις περισσότερες ανάγκες κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο φορέας pBluescriptII SK (+) (Stratagene) και το pGEM-T easy (Promega), ειδικά για την ταχεία κλωνοποίηση προϊόντων της PCR. Εναλλακτικά χρησιμοποιήθηκε για το σκοπό αυτό ο T-φορέας που κατασκευάζεται από pBluescriptII SK μετά από πέψη με EcoRV και προσθήκη ακραίου T με επώαση του γραμμικού φορέα με Taq πολυμεράση παρουσιά dTTPs όπως περιγράφεται από (Marchuk et al., 1991)). Για την έκφραση γονιδίων στο βακτηριακό στέλεχος BL21 χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο έκφρασης της glutathione-S-transferase (GST), pGEX-5x (Pharmacia). Οι χιμαιρικές πρωτεΐνες που εκφράζονται από το pGEX-5X φέρουν την GST στο N' τελικό άκρο, για τον εύκολο καθαρισμό τους με χρωματογραφία συγγένειας (κεφάλαιο 3.19.3).

Για την έκφραση γονιδίων σε εντομικές κυτταρικές σειρές χρησιμοποιήθηκε ο φορέας έκφρασης pEA (Lu et al., 1996, 1997)**,** καθώς και το, pEIA, τροποποιημένο, ώστε να περιλαμβάνει μετά τον πολυσύνδεσμο αλληλουχίες που κωδικοποιούν για τους επίτοπους Myc και 6xHis στο καρβοξυ-τελικό άκρο (pEA.Myc.His και pEIA.Myc.His αντιστοίχως) (Douris et al., 2006).

Επιπλέον, οι βιβλιοθήκες cDNA (βιτελογενική και χοριογενική), που χρησιμοποιήθηκαν, είχαν κλωνοποιηθεί αρχικά swevers(Swevers et al., 2002a) στον φορέα έκφρασης του συστήματος δύο υβριδίων στη ζύμη pGAD424 (Clontech)

Β. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (RNA/DNA) ΑΠΟ ΙΣΤΟΥΣ

Για την απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων, χρησιμοποιήθηκαν 300 μg επιπλέον ιστού ανά αντίδραση εξαγωγής, εκτός από τις ωοθήκες όπου και χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 10 ωοθυλάκια από τα στάδια της κάθε επιλογής. Η ποσοτικοποίηση του καθαρού προϊόντος, καθώς και η εκτίμηση της καθαρότητας του DNA γίνεται φωτομετρικά, με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 260 nm και 280 nm και σύγκριση του λόγου των τιμών. Μία μονάδα Οπτικής Πυκνότητας (Optical Density, O.D.) στα 260 nm αντιστοιχεί περίπου σε συγκέντρωση 50 μg/ml διαλύματος δίκλωνου DNA, 40 μg/ml μονόκλωνου DNA ή RNA και 33 μg/ml ολιγονουκλεοτιδίων. Ο λόγος OD_{260}/OD_{280}, που προσεγγίζει την τιμή 2, αποτελεί ένδειξη καθαρού DNA. Τιμές λόγων σημαντικά μικρότερες του 1,7 υποδηλώνουν προσμίξεις φαινόλης ή πρωτεϊνών στο διάλυμα, ενώ τιμές μεγαλύτερες του 2 οφείλονται σε διάλυμα μεγάλης οπτικής πυκνότητας ή και υψηλής συγκέντρωσης αλάτων ή και φαινόλης (Sambrook and Russell, 2001).

3.5.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA

Η απομόνωση γενωμικού DNA έγινε από τους μεταξογόνους αδένες, λόγω της ύπαρξης πολλαπλών αντιγράφων του γονιδιώματος στον συγκεκριμένο ιστό. Ακολουθήθηκε η μέθοδος όπως περιγράφεται από τους (Drevet et al., 1994). Συνοπτικά, οι ιστοί του μεταξογόνου αδένα ομογενοποιούνται σε DNA extraction buffer με τη προσθήκη 10 μl RNase A (10 mg/ml) και επωάζονται για 3 hr στους 37 ^{o}C. Ακολουθεί εξαγωγή του DNA με προσθήκη ενός όγκου φαινόλης/SEVAG και εκχύλιση. Με φυγοκέντριση του μείγματος στις 13.000 rpm διαχωρίζεται η υδατική φάση (που περιέχει τα διαλυτά στο νερό νουκλεϊκά οξέα), η οποία και επανεκχυλίζεται μέχρις να εξαφανιστεί η πρωτεϊνική μεσόφαση. Το DNA κατόπιν κατακρημνίζεται με προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης. Το DNA αναδιαλύεται σε mQ νερό και ποσοτικοποιείται.

3.5.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA

Η απομόνωση ολικού RNA έγινε με την χρήση του Trizol™ (Invitrogen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά η διαδικασία έχει ως εξής:

Απομονώνονται περίπου 300 μg ιστού, ή 10 ωοθυλάκια για την σταδιοποίηση της ανάπτυξης των ωοθυλακίων. Για την εκπροσώπηση όλων των σταδίων ανάπτυξης των ωοθυλακίων ομογενοποιείται μια σειρά ωοθυλακίων όπως βρίσκονται στο ωοθηκάριο. Ακολουθεί επώαση του ιστού με την κατάλληλη ποσότητα Trizol ανάλογα με την ποσότητα του ιστού, επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προσθήκη 0,2 ml χλωροφορμίου ανά 1 ml Trizol™ για τον διαχωρισμό της υδατικής φάσης, έντονη ανάμιξη και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm, και απομόνωση της υδατικής φάσης με πιπέτα. Εάν κριθεί απαραίτητο, μπορεί να προστεθεί μια επιπλέον εκχύλιση με όξινη φαινόλη/χλωροφόρμιο. Το ολικό RNA στην υδατική φάση κατακρημνίζεται με ισοπροπανόλη και, μετά από φυγοκέντριση και απομάκρυνση του υπερκείμενου, ξεπλένεται με 70% αιθανόλη. Ακολουθεί αναδιάλυση του στεγνού ιζήματος σε αποστειρωμένο ελεύθερο νουκλεασών H_2O και φύλαξη στους -80^oC. Τα δείγματα RNA πριν την χρήση τους κατεργάζονται με RNase-free RQ1 DNase (Promega) σε αναλογία 0.1 U/μg (ένζυμου/ολικού RNA), για την απομάκρυνση υπολειμμάτων γενωμικού DNA, όπως αναγράφεται στις οδηγίες του κατασκευαστή.

3.6. ΠΕΨΗ DNA ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ

Για τις πέψεις των δειγμάτων DNA χρησιμοποιήθηκε μια σειρά περιοριστικών ενδονουκλεασών των εταιρειών New England Biolabs και Fermentas. Οι ενζυμικές αντιδράσεις έγιναν με βάση τις οδηγίες των εταιρειών.

3.7. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA

Ανάλογα με το αναμενόμενο μέγεθος των μορίων DNA προς ηλεκτροφόρηση, κατασκευάζονται πηκτώματα διαφορετικής συγκέντρωσης αγαρόζης. Η ανίχνευση των μορίων στο πήκτωμα γίνεται είτε με προσθήκη στο αρχικό πήκτωμα, είτε με εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα φθορίζουσας χρωστικής (βρωμιούχου αιθιδίου), σε τελική συγκέντρωση 0,5 mg/lt. Το βρωμιούχο αιθίδιο ενσωματώνεται στα δίκλωνα νουκλεϊκά οξέα και έτσι αυτά γίνονται ορατά λόγω του φθορισμού κατά την έκθεση σε υπεριώδες φως. Έτσι, με την σύγκριση με δίκλωνα μόρια DNA/μάρτυρες γνωστού μοριακού

μεγέθους και ποσότητας είναι δυνατή η κατά προσέγγιση εκτίμηση του μεγέθους του μορίου, αλλά και της ποσότητάς του. Οι μάρτυρες μοριακών μεγεθών που χρησιμοποιήθηκαν προκύπτουν από την πέψη γενωμικού DNA του φάγου λ είτε με το περιοριστικό ένζυμο HincII είτε με τον συνδυασμό των HincII/HindIII ενζύμων (τα μεγέθη των ζωνών παρουσιάζονται στο Παράρτημα Χ εικόνα 7). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν, όπου υπήρχε ανάγκη, και εμπορικοί μάρτυρες όπως ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών 1 kbp (GeneRuler™ *1 kb DNA Ladder, Fermentas)*.

3.8. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η απομόνωση του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης και ο καθαρισμός του πραγματοποιήθηκαν με ποικίλους τρόπους ανάλογα με την περίσταση. Ηλεκτροέκλουση, καθώς και εμπορικές στήλες χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση και καθαρισμό DNA μετά από ηλεκτροφόρηση, ενώ μοριακή διήθηση χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό του DNA από υπολείμματα ή παραπροϊόντα μετά από ενζυμικές πέψεις.

3.8.1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΗΛΕΚΤΡΟΕΚΛΟΥΣΗΣ

Αρχικά γίνεται προετοιμασία των μεμβρανών διαπίδυσης με εμβάπτιση αυτών σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το μέρος της αγαρόζης που περιέχει την επιθυμητή ζώνη DNA αφαιρείται με νυστέρι και τοποθετείται μέσα στη μεμβράνη διαπίδυσης. Προστίθονται 300 μl νερού ή ρυθμιστικού διαλύματος και η μεμβράνη κλείνει με κατάλληλα μανταλάκια. Το σύστημα τοποθετείται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης με διάλυμα 1xTAE, σε τάση έως 120 Volt, μέχρις ότου το DNA εξέλθει πλήρως από το πήκτωμα. Με αλλαγή φάσης για 60 δευτερόλεπτα το DNA αποκολλάται από την μεμβράνη και παραμένει στο διάλυμα μέσα στην μεμβράνη. Το διάλυμα με το DNA μεταφέρεται με πιπέτα σε καθαρό σωλήνα τύπου eppendorf όπου και καθαρίζεται με φαινόλη/χλωροφόρμιο όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.5.

3.8.2. ΜΕΘΟΔΟΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ.

Για τον καθαρισμό DNA κυρίως όταν αυτό προερχεται από PCR αντιδράσεις, όταν βρίσκεται σε μικρές ποσότητες ή για χάρη ταχύτητας, χρησιμοποιήθηκαν εμπορικές κολόνες καθαρισμού DNA (QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Gel

Extraction Kit, Qiagen). Βασίζονται στη συγγένεια του DNA με ανιονικούς παράγοντες σαν τη ανιονική ρητίνη Οι πιο συνηθισμένοι ανιονικοί παράγοντες που διατίθονται στο εμπόριο είναι η DEAE (Diethylaminoethyl cellulose) και η QAE (Quaternary Amino Ethyl).

3.8.3. ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΣΕ ΣΤΗΛΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Η μέθοδος της χρωματογραφίας σε στήλη μοριακής διήθησης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό μορίων DNA με βάση το μέγεθός τους. Βασίζεται στο γεγονός ότι μόνο τα μόρια έως ένα συγκεκριμένο όριο μεγέθους, το οποίο καθορίζεται από την κατασκευή του υλικού πλήρωσης της στήλης, εισέρχονται στους πόρους των σφαιριδίων του υλικού, ενώ τα μεγαλύτερα μόρια διανύουν την στήλη χωρίς να εισέρχονται στους πόρους, για αυτό και εκλούονται πρώτα. Όσο μικρότερα είναι τα μόρια, σε σχέση με το όριο μεγέθους, τόσο παγιδεύονται στους πόρους των σφαιριδίων και καθυστερούν να εκλουστούν.

Η τεχνική χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό των παραπροϊόντων ενζυματικών αντιδράσεων πέψης νουκλεϊκών οξέων και για τον διαχωρισμό ραδιοσημασμένων μορίων DNA-ανιχνευτών από τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια μετά από αντίδραση σήμανσης των άκρων. Χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι στήλης, η στήλη μοριακής διήθησης στερεής φάσης και μια παραλλαγή αυτής γνωστή ως στήλη φυγοκέντρησης Sephadex (spin-column chromatography).

3.8.3.1. Στήλη μοριακής διήθησης στερεής φήσης SEPHADEX G-50

Η στήλη κατασκευάζεται από πλαστικές σύριγγες των 5 ml στο άκρο των οποίων τοποθετείται μικρή ποσότητα αποστειρωμένου υαλοβάμβακα για την στερέωση του υλικού πληρώσεως. Στο άκρο της προσαρμόζεται στρόφιγγα ώστε να ελέγχεται η ροή της υδατικής φάσης. Ως χρωματογραφικό υλικό προστέθηκαν 5 ml Sephadex G-50, και η ροή προσαρμόζεται σε ρυθμό 1 σταγόνας ανά 15 δευτερόλεπτα. Η στήλη δε πρέπει να ξεραθεί και η ροή ρυθμίζεται ώστε να αποφευχθεί η ξήρανσή της. Το διάλυμα του DNAεισάγεται με προσοχή σε τελικό όγκο 300 – 400 μl χωρίς να διαταραχθεί η επιφάνεια της στήλης και κατόπιν η στήλη γεμίζεται με mQ νερό, χωρίς να διαταραχθεί η επιφάνεια. Συλλέχτηκαν κλάσματα ίδιου όγκου με του διαλύματος DNA και προσδιορίζεται με φωτομετρικές μεθόδους η συγκέντρωση του DNA.

3.8.3.2. Στήλη φυγοκήντρησης SEPHADEX-G50 (SPIN-COLUMN CHROMATOGRAPHY)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση καθαρισμού ανιχνευτών που ραδιοσημάνθηκαν στα άκρα με ραδιοσημασμένο dCTP με το Klenow και ήταν απαραίτητη η συλλογή τους σε μικρό όγκο (100 - 300 μl).

Η στήλη κατασκευάζεται από πλαστικές σύριγγες των 5 ml στο άκρο των οποίων τοποθετείται μικρή ποσότητα αποστειρωμένου υαλοβάμβακα για την στερέωση του υλικού πληρώσεως. Η σύριγγα γεμίζεται με Sephadex G-50 και τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωλήνα των 15 ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε χαμηλές στροφές (2000 – 3000 rpm) σε θερμοκρασία δωματίου. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρις ότου απομακρυνθεί όλη η ποσότητα του υγρού. Το δείγμα, τελικού όγκου 100 - 300 μl, φορτώνεται στην στήλη με προσοχή, ώστε να αποφευχθεί η διατάραξη της επιφάνειας του υλικού, και η σύριγγα τοποθετείται σε καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε χαμηλές στροφές για 10 λεπτά και η εκλουόμενη ποσότητα υγρού (excluded volume) μεταφέρεται με προσοχή σε σωλήνα τύπου eppendorf.

3.9. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ – ΦΟΡΕΙΣ/ΕΚΦΡΑΣΗΣ

3.9.1. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΕ ΦΟΡΕΙΣ

Πλασμιδιακοί φορείς χρησιμοποιήθηκαν για την ενσωμάτωση των επιλεγμένων DNA. Ο χειρισμός περιλαμβάνει την κατεργασία του πλασμιδίου με επιλεγμένη περιοριστική ενδονουκλεάση, ή συνδυασμό περισσότερων ανάλογα με το μόριο του δίκλωνου DNA προς εισαγωγή και την κατεργασία των άκρων του γραμμικού πλασμιδίου με το CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase), προκειμένου να μην ανασυνδυαστεί ο φορέας από μόνος του (self-ligation). Παράλληλα πραγματοποιείται η ενζυμική κατεργασία του επιθυμητού DNA ώστε να υπάρχει συμβατότητα των άκρων του γονιδίου με το γραμμικό πλασμίδιο. Ο καθαρισμός του γραμμικού πλασμιδίου γίνεται με έναν από τους τρόπους που περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.8. Η ποσοτικοποίηση του καθαρού προϊόντος, καθώς και ο έλεγχος της καθαρότητας του DNA γίνεται φωτομετρικά, όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 3.5.

3.9.2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΑΚΡΩΝ (LIGATION REACTIONS) – ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΥΦΛΩΝ ΑΚΡΩΝ

Η σύνδεση άκρων μορίων DNA πραγματοποιείται με καταλύτη το ενζύμο T4 DNA λιγάση (ligase). Παρουσία ATP το ένζυμο καταλύει το σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των άκρων 5'-P και 3'-OH. Η λιγάση μπορεί να συνδέει δίκλωνα μόρια συμπληρωματικών άκρων (sticky ends) και τυφλών άκρων (blunt -ends).

Για τη μετατροπή των συμπληρωματικών άκρων σε τυφλά, μετά από κατεργασία κομματιών DNA με περιοριστικά ένζυμα γίνεται κατεργασία αυτών με το μεγάλο τμήμα του κομματιού Klenow (DNA polymerase I Large (Klenow) Fragment) για 20 λεπτά στους 25 ^{o}C. Ακολουθεί απενεργοποίηση του ενζύμου με επώαση στους 75 ^{o}C για 20 λεπτά. Η δράση του κομματιού Klenow έχει ως αποτέλεσμα την συμπλήρωση των 5' – 3' προεξέχοντων άκρων με τη δράση της 5' – 3' DNA πολυμεράσης και την καταστροφή των 3' – 5' προεξέχοντων άκρων με τη δράση της 3' – 5' εξονουκλεάσης. Από το κομμάτι Klenow απουσιάζει η δράση της 5' – 3' εξονουκλεάσης.

Η επώαση σύνδεσης των άκρων έγινε με την DNA λιγάση (DNA ligase, Takara), η οποία μπορεί να συνδέσει και συμπληρωματικά και τυφλά άκρα διαρκεί 3 με 16 ώρες και πραγματοποιείται στους 15^{o}C, αν η σύνδεση γίνεται μεταξύ συμπληρωματικών άκρων, ή σε θερμοκρασία δωματίου αν η σύνδεση γίνεται μεταξύ τυφλών άκρων. Το μείγμα χρησιμοποιείται στη συνέχεια για τον μετασχηματισμό δεκτικών βακτηρίων (competent cells, κεφάλαιο 3.9.6), ενώ αν δεν χρησιμοποιηθεί άμεσα φυλάσσεται στους 4^{o}C.

3.9.3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΑΠΟΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ - ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ DNA ΑΚΡΩΝ.

Οι αντιδράσεις αποφωσφορυλίωσης χρησιμοποιήθηκαν ως επί το πλείστον για την αύξηση της απόδοσης των αντιδράσεων ανασύνδεσης (κλωνοποίησης) και την ελαχιστοποίηση των παραπροϊόντων.

Με την επώαση του γραμμικού πλασμιδίου με την CIAP (Fermentas), πραγματοποιείται υδρόλυση των φωσφορικών ομάδων στα 5' άκρα του DNA. Συνοπτικά, 30 μg γραμμικού φορέα με συμπληρωματικά άκρα επωάζονται παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος 1xCIAP (Fermentas) και 2 U ενζύμου CIAP, σε τελικό όγκο

50 μl, στους 37 ^{o}C για 30 λεπτά. Ακολουθεί εκχύλιση/καθαρισμός του DNA με φαινόλη/SEVAG και κατακρήμνισή του με αιθανόλη 70% παρουσία οξικού νατρίου σε τελική συγκέντρωση 0,25 M. Ακολουθεί ποσοτικοποίηση του DNA. Για DNA με τυφλά άκρα η διαδικασία είναι η ίδια εκτός από τους χρόνους επώασης. Αρχικά πραγματοποιείται επώαση για 30 λεπτά στους 37 ^{o}C και μετά την προσθήκη επιπλέον 1 U ενζύμου, επώαση στους 56 ^{o}C για 1 ώρα.

Η φωσφορυλίωση των 5' άκρων γίνεται εφόσον απαιτείται ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί η κλωνοποίηση τους σε αποφωσφορυλιωμένα πλασμίδια. Η εισαγωγή των φωσφορικών ομάδων γίνεται με την T4 PNK (T4 Polynucleotide Kinase, NEB) η οποία καταλύει την μεταφορά φωσφορικών ομάδων από το ATP στα 5' άκρα πολυνουκλεοτιδίων (μονόκλωνων και δίκλωνων). Η διαδικασία περιλαμβάνει επώαση 20μg ολιγονουκλεοτιδίου παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος 1xT4 PNK (NEB) και 1 mM ATP σε τελικό όγκο 100 μl, στους 37 ^{o}C για 1 ώρα. Τα φωσφορυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια απομονώνονται με εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη 70% παρουσία οξικού νατρίου σε τελική συγκέντρωση 0,25 M.

3.9.4. ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ

Η υβριδοποίηση γίνεται σε υδατικό διάλυμα με ισομοριακές συγκεντρώσεις των δύο συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων. Το διάλυμα βράζει για 5 min και κατόπιν απομακρύνεται από το ζεόν υδατόλουτρο και παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου μέχρις ότου επιτευχθεί εξισορρόπηση των θερμοκρασιών. Με αυτόν τον τρόπο μειώνεται αργά η κινητική ενέργεια των κλώνων και τελικώς η πιο σταθερή θερμοδυναμικά δομή του δίκλωνου μορίου παραμένει στο διάλυμα.

3.9.5. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ο μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων διευκολύνεται από κατάλληλη επεξεργασία των τοιχωμάτων τους με χημικές ουσίες (κυρίως δισθενή κατιόντα, όπως το Ca^{+2}) ώστε εξωγενές DNA να μπορεί να εισέλθει αποτελεσματικά στα βακτήρια. Για τη διαδικασία παρασκευής δεκτικών κυττάρων, 100 ml αποστειρωμένου LB επιμολύνονται με φρέσκια καλλιέργεια βακτηρίων και επωάζονται στους 37 ^{o}C στις 220 rpm μέχρι η οπτική πυκνότητα να φτάσει σε OD_{600}=0,4. Οι καλλιέργειες τοποθετούνται

σε παγόλουτρο μέχρι να κρυώσουν και κατόπιν γίνεται φυγοκέντρηση στις 2500 rpm για 10 λεπτά στους 4 ^{o}C. Τα βακτήρια επαναιωρούνται σε 50 ml διαλύματος 80 mM $MgCl_2$ και 20 mM $CaCl_2$). Τα βακτήρια παραμένουν στο παγόλουτρο 20 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2500 rpm για 10 λεπτά στους 4 ^{o}C και μετά την πλήρη απομάκρυνση του υπερκείμενου επαναιώρηση των βακτηρίων σε 4 ml παγωμένου διαλύματος 0,1 M $CaCl_2$, για κάθε 100 ml αρχικής καλλιέργειας. Τα δεκτικά βακτήρια χωρίζονται σε δείγματα όγκου 150 μl και είτε χρησιμοποιούνται άμεσα είτε εμβαπτίζονται σε υγρό άζωτο για την άμεση ψύξη τους και κατόπιν αποθηκεύονται στους -80 ^{o}C.

3.9.6. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ (TRANSFORMATION) ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ – ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΛΩΝΩΝ

Σε τρυβλία επιστρώνεται bottom agar, στο οποίο έχει προστεθεί το κατάλληλο αντιβιοτικό σε τελική συγκέντρωση 100 mg/ml, για την επιλογή του πλασμιδίου μετασχηματισμού. Το DNA, με το οποίο θα μετασχηματιστούν τα βακτήρια, μεταφέρεται σε 150 μl δεκτικών κυττάρων. Ακολουθεί παραμονή του μείγματος σε παγόλουτρο για 30 λεπτά και μετά μεταφορά του σε υδατόλουτρο στους 42^{o}C. Το μείγμα DNA-βακτηρίων παραμένει για 90 δευτερόλεπτα στο υδατόλουτρο και αμέσως μετά τοποθετείται σε παγόλουτρο. Προστίθενται 800 μl LB και τα βακτήρια επωάζονται για 45 λεπτά στους 37 ^{o}C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του μείγματος (2500 rpm, για 5') και μερική απομάκρυνση του υπερκείμενου. Τα βακτήρια επαναιωρούνται στην υγρή φάση που παρέμεινε και τοποθετούνται στα προετοιμασμένα τρυβλία. Κατόπιν τοποθετούνται για 16 – 18 ώρες σε επωαστήρα στους 37 ^{o}C.

Τα πλασμίδια φορείς που χρησιμοποιήθηκαν περιέχουν και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλλίνη, *amp^{r}*. Έτσι, μόνο όσα βακτήρια μετά τον μετασχηματισμό περιέχουν το πλασμίδιο, ανασυνδυασμένο ή μη, θα επιβιώσουν στο θρεπτικό μέσο παρουσία του αντιβιοτικού και θα δώσουν διακριτές αποικίες. Μια αρχική επιλογή των αποικιών που έχουν μετασχηματιστεί με το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο μπορεί να γίνει με έλεγχο της α-συμπληρωματικότητας. Τα πλασμίδια-φορείς/έκφρασης που χρησιμοποιήθηκαν έχουν ενσωματωμένη την αλληλουχία του πολυσύνδεσμου (polylinker, MCS), στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης,το γονίδιο *lacZ*. Εαν το πλασμίδιο δεν έχει ανασυνδιαστεί, το γονίδιο *lacZ* εκφράζεται κανονικά και

μεταβολίζει την X-GAL, εφόσον έχει προστεθεί στο θρεπτικό μέσο, και το μεταβολικό προϊόν χρωματίζει κυανές τις αποικίες. Στην αντίθετη περίπτωση το πλαίσιο ανάγνωσης και κατ' επέκταση η έκφραση του γονιδίου *lacZ* έχει διακοπεί, η ουσία X-GAL δεν μεταβολίζεται και οι αποικίες παραμένουν λευκές.

Το ανασυνδυασμένο DNA ελέγχεται τελικά με συμβατικές μεθόδους μοριακής βιολογίας, για να διαπιστωθεί η ορθότητα του DNA που κλωνοποιήθηκε, η φορά κλωνοποίησης (σε περιπτώσεις φορέα έκφρασης) καθώς και η τυχόν ύπαρξη μεταλλάξεων που μπορεί να προέκυψαν από την ενίσχυση του DNA με PCR πριν την κλωνοποίηση, με προσδιορισμό της πρωτοδιάταξης του DNA.

3.10. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

3.10.1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΚΑΛΙΚΗΣ ΛΥΣΗΣ ΜΙΚΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ (MINI-PREP)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για ταχεία απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μια βακτηριακή αποικία, με σκοπό να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση του πλασμιδίου με άλλες τεχνικές.

Από το τρυβλίο επιλέγεται μια αποικία που εμβολιαζεται σε 2 ml LB υπό την παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού και ακολουθεί επώαση για 16 – 18 ώρες στους 37 ^{o}C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των βακτηρίων στις 2500 rpm για 5 λεπτά και το ιζήμα επαναιωρείται σε 200 μl G.E.T. (Solution I, κεφάλαιο 3.3) και παραμονή για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα προστίθενται 100 μl Solution II (κεφάλαιο 3.3) και μετά από ελαφρά ανάδευση το μείγμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για επιπλέον 10 λεπτά. Τέλος προστίθεται 100 μl Solution III (κεφάλαιο 3.3) και ακολουθεί ήπια ανάδευση και παραμονή 30 λεπτά στο πάγο. Το μείγμα φυγοκεντρείται 15 λεπτά στις 13000 rpm και το υπερκείμενο, που περιέχει το DNA, μεταφέρεται σε νέους σωλήνες. Για την κατακρήμνηση του DNA προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης. Μετά από έντονη ανάδευση το μείγμα φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 15 λεπτά και το ίζημα αναδιαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα mQ νερού. Το DNA ποσοτικοποιείται όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 3.5.

3.10.2. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΚΑΛΙΚΗΣ ΛΥΣΗΣ ΜΕΣΑΙΑΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ (MIDI-PREP)

Όταν απαιτείται μεγαλύτερη ποσότητα ή και υψηλότερη καθαρότητα DNA (π.χ. για κλωνοποίηση, προσδιορισμό της πρωτοδιάταξης του κλώνου, κ.λ.π.), επιλέγεται η

απομόνωση και ο καθαρισμός του DNA με τη μέθοδο αλκαλικής λύσης μεσαίας κλίμακας.

Η διαδικασία είναι παρόμοια με αυτήν που περιγράφεται στο προηγούμενο καεφάλαιο για την προετοιμασία μικρής κλίμακας καλλιεργειας μόνο που ο αρχικός όγκος του θρεπτικού υλικού είναι 20 ml και το ίζημα των βακτηρίων επαναιωρείται σε 400 μl G.E.T., ενώ ανάλογος είναι ο όγκος των υπόλοιπων διαλυμάτων (x2). Επιπλέον, μετά την κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη, το DNA καθαρίζεται με φαινόλη/SEVAG, (βλ κεφάλαιο 3.5.1**)** και κατακρημνίζεται με 2,5 όγκους απόλυτης αλκοόλης και 1/10 όγκου οξικού αμμωνίου στους -20 ^{o}C. Το ίζημα κατόπιν αναδιαλύεται σε συνολικό όγκο 80 μl νερού και επιπλέον προστίθενται 20 μl 4 M NaCl και 100 μl 13% PEG 8000. Το διάλυμα παραμένει στον πάγο για τουλάχιστον 2 ώρες και κατόπιν φυγοκεντρείται 15 λεπτά στις 13000 rpm. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα ξεπλένεται με 75% αιθανόλης. Μετά το ξέπλυμα το στεγνό ίζημα αναδιαλύεται σε mQ νερό και ποσοτικοποιείται.

3.10.3. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA ΜΕ CsCl

Η μέθοδος στηρίζεται στη διαφορετική ικανότητα ενσωμάτωσης EtBr και συνεπαγώμενη διαφορά πυκνότητας ανάμεσα στο γραμμικό και το κυκλικό DNA (γενωμικό και πλασμιδιακό DNA αντίστοιχα). Το κλειστό κυκλικό DNA, λόγω των υπερελικώσεων του DNA, ενσωματώνει μικρότερη ποσότητα EtBr από το γραμμικό DNA, με αποτέλεσμα να εμφανίζει μεγαλύτερη άνωση και έτσι ισορροπεί σε περιοχές με μεγαλύτερη πυκνότητα σε διάλυμα διαβαθμισμένης πυκνότητας CsCl, κορεσμένο σε EtBr, από ότι το γραμμικό DNA (Sambrook and Russell, 2001). Το DNA που απομονώνεται με αυτόν τον τρόπο χρησιμοποιείται ως επί το πλείστον για την διαμόλυνση των κυτταρικών σειρών εντόμων. Με την διαδικασία αυτή το RNA κατακρυμνίζεται.

Συνοπτικά η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: Συλλέγεται βακτηριακή καλλιέργεια 500 ml που έχει επωαστεί για 12-16 ώρες στους 37^{o}C, υπό ανάδευση στις 200 rpm, και τα κύτταρα καθιζάνουν με φυγοκέντρηση στις 5000 rpm, για 5 λεπτά. Το ίζημα επαναιωρείται σε 4 ml G.E.T. και προστίθεται 1 ml λυσοζύμης από διάλυμα 10 mg/ml. Επωάζεται κατόπιν για 30 λεπτά στον πάγο και ακολουθεί η προσθήκη 10 ml Solution II (βλ κοινά θρεπτικά μέσα και διαλύματα). Μετά από παραμονή 10 λεπτών

στον πάγο προστίθενται επιπλέον 7,5 ml Solution III και το μείγμα παραμένει για ακόμα 60 λεπτά στον πάγο. Τα αδιάλυτα κυτταρικά συστατικά καθιζάνουν με φυγογέντρηση για 15 λεπτά στις 15000 rpm και το υπερκείμενο κατακρημνίζεται με την προσθήκη ίσης ποσότητας καθαρής ισοπροπανόλης. Μετά από φυγοκέντριση στις 15000 rpm για 15 λεπτά, το ίζημα αναδιαλύεται σε 3 ml mQ νερού με 3,5 gr CsCl και 240 μl EtBr από διάλυμα συγκέντρωσης 10 mg/ml. Το μείγμα φυγοκεντρείται στις 10000 rpm, σε επιτραπέζια φυγόκεντρο, για την απομάκρυνση αδιάλυτων αλάτων και φυγοκεντρείται εκ νέου στις 100.000 rpm, σε υπερφυγόκεντρο Beckman ultracentrifuge TL100, από 5 έως και 16 ώρες. Το κυκλικό υπερελικομένο DNA εμφανίζεται ως έντονος δακτύλιος στο μείγμα, το οποίο απομακρύνεται και τοποθετείται σε καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα. Το EtBr απομακρύνεται με πολλαπλές εκχυλίσεις με κορεσμένη ή και ακόρεστη βουτανόλη και κατακρημνίζεται με αιθανόλη ή ισοπροπανόλη. Απαιτούνται επιπλέον ξεπλύματα με 70% αιθανόλη για την απομάκρυνση αλάτων CsCl. Το ίζημα αναδιαλύεται σε υπερκάθαρο νερό και ποσοτικοποιείται φωτομετρικά όπως περιγράφεται στο 2.5.

3.11. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ ΤΟΥ DNA

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας DNA πραγματοποιήθηκε με το BigDye^{TM} Terminator v3.0 cycle Sequencing Ready Reaction Kit της ABI PRISM και κατάλληλους εκκινητές. Το πρωτοκόλλο αυτό βασίζεται στη μέθοδο Sanger (Sanger et al., 1977). Η αρχική τεχνική βασίζεται στην ενσωμάτωση με τυχαίο τρόπο διδεόξυ-νουκλεοτιδίων (ddNTPs) στον συμπληρωματικό κλώνο DNA που συντίθεται μέσω PCR με εκμαγείο (template) το μελετούμενο DNA. Λόγω της έλλειψης 3'-OH στα ddNTPs, κάθε φορά που ένα ddNTP ενσωματώνεται στην αλληλουχία, η αντίδραση του πολυμερισμού σταματάει δημιουργώντας διαφορετικού μεγέθους τμήματα DNA. Κατόπιν, γίνεται ηλεκτροφόρηση των συντιθέμενων τμημάτων που αντιστοιχούν σε κάθε τύπο ddNTP και γίνεται αντιστοιχία μήκους και καταληκτικού ddNTP. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε μια παραλλαγή της τεχνικής αυτής, η μέθοδος τερματισμού με χρωστική σε θερμικό κυκλοποιητή (thermal cycle DNA sequencing), όπου χρησιμοποιείται επίσης η αντίδραση της PCR. Κάθε ddNTP είναι σημασμένο με διαφορετική φθορίζουσα ουσία για την ανίχνευσή του (Sambrook and Russell, 2001). Τα προϊόντα διαχωρίζονται και ανιχνεύονται από τον αναλυτή ABI PRISM 310 Genetic Analyser. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση του προγράμματος που

παρέχεται από την εταιρεία, είτε με το πρόγραμμα BIOEDIT (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html).

Η προετοιμασία των δειγμάτων έχει ως εξής: Σε τελικό όγκο 20 μl προστίθενται 1,5 μl BigDye™, 2 pmol εκκινητή, 6,5 μl Sequencing Buffer, και το DNA προς έλεγχο (DNA μήτρα για την μέθοδο). Ως εκμαγείο στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε κυρίως πλασμιδιακό DNA σε ποσότητα 500 ng. Η ενίσχυση του σήματος έγινε σε συσκευές GeneAmp PCR System 2400 και GeneAmp PCR System 9700. Πριν την εισαγωγή τους στον αναλυτή, τα προϊόντα αποδιατάσσονται με προσθήκη φορμαλδεΰδης 1:1 και θέρμανση στους 65 ^{o}C για 5 λεπτά.

Ως ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές της PCR για τα κλωνοποιημένα τμήματα DNA χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές του πίνακα 3.1. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά αντιστοιχούν σε αλληλουχίες που βρίσκονται εκκατέρωθεν του πολυσύνδεσμου των πλασμιδίων pBSK(+), pGEX-5x, pGEM-T-easy, pEA, pEIA και τροποποιήσεων αυτών. Σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί ως προς το γονίδιο που είχε κλωνοποιηθεί εσωτερικοί εκκινητές .

Πίνακας 3-1: Αλληλουχίες πλασμιδιακών εκκινητών και πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση της πρωτοταγούς δομής των κλωνοποιημένων cDNA στους αντίστοιχους φορείς

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή	Πλασμίδιο
T3	5'-ATTAACCCTCACTAAAG-3'	pBSK(+), pGEM-T-easy
T7	5'-AATAGGACTCACTATAG-3'	pBSK(+), pGEM-T-easy
SP6	5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3'	pBSK(+), pGEM-T-easy
pGEX-5 primer	5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'	pGEX-5x
pGEX-3 primer	5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3'	pGEX-5x
actin A3-1	5'-GACGAAGAAGTTGCCGCGTTGG-3'	pEA, pEIA
actin-A3-2	5'--3'	pEA, pEIA

3.12. ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΝΣΗ ΤΟΥ DNA.

Η ραδιοσήμανση του DNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο επέκτασης με τυχαίους εκκινητές (random primer extension) με τη χρήση της μεγάλης υπομονάδας (Klenow Fragment) της DNA πολυμερασης I. του βακτηρίου *E.coli*, η οποία δεν εμφανίζει ενεργότητα εξονουκλεάσης 5'=>3'. Η κατασκευή των ιχνηθετών έγινε με το HexaLabel™ DNA Labeling Kit (Fermentas), όπου χρησιμοποιούνται τυχαίοι

εκκινητές (hexamers) για την κλωνοποίηση του DNA (Feinberg and Vogelstein, 1983). Το τμήμα Klenow που διατίθεται στο εμπορικό πακέτο έχει τροποποιηθεί έτσι ώστε να μην εμφανίζει την ενεργότητα 3'=>5' εξονουκλεάσης. Το προϊόν είναι ραδιοσημασμένα DNA με βάση το εκάστοτε εκμαγείο και συντίθεται αποκλειστικά μέσω συμπλήρωσης των 3' υπολειπόμενων άκρων του με ραδιενεργά δεοξυνουκλεοτίδια. Χρησιμοποιήθηκε μόνο ραδιενεργό [α-^{32}P]dCTP, ώστε να ελαχιστοποιηθεί όσο το δυνατόν περισσότερο η καταστροφή του ιχνηθέτη λόγω ραδιόλυσης.

Συνοπτικά 25 ng DNA υποστρώματος σε διάλυμα όγκου 10 μl αναμειγνύονται με 10 μl 5x εξανουκλεοτίδια, και προστίθεται mQ νερό μέχρι τελικού όγκου 40 μl. Το μείγμα βράζεται για 5 λεπτά προς αποδιάταξη του δίκλωνου DNA και αμέσως τοποθετείται σε παγόλουτρο. Προστίθενται 3 μl ρυθμιστικού διαλύματος MixC και 6 μl διαλύματος [α-^{32}P] dCTP και 1 μl Klenow Fragment exo$^-$ (5 u/μl) και ακολουθεί επώαση 45 λεπτά στους 37 ^{o}C. Το ραδιοσημασμένο DNA καθαρίζεται από τα μη ενσωματωμένα ραδιενεργά νουκλεοτίδια με κολώνα φυγοκέντρησης Sephadex G-50 (κεφάλαιο 3.8.3.2).

3.13. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΤΑ SOUTHERN.

Η ανάλυση κατά Southern διεξήχθη όπως περιγράφεται από τους (Drevet et al., 1994). 10 μg γενωμικού DNA, στα οποία πραγματοποιήθηκε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI* και *XhoI*, ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1% σε διάλυμα 1x TAE. Ως εκμαγείο για τη ραδιοσήμανση χρησιμοποιήθηκε τμήμα 600 βάσεων μετά από πέψη της αλληλουχίας του BmSH3 με τα περιοριστικά ένζυμα *XhoI*/*BglII*.

3.13.1. ΜΕΤΑΦΟΡΑ DNA ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ

Η μεταφορά του DNA σε μεμβράνη υβριδισμού έγινε με βάση το πρωτόκολλο μεταφοράς του DNA μέσω τριχοειδών φαινομένων (upward capillary transfer) σε μεμβράνη Hybond-N (Amersham). Για να διευκολυνθεί η διαδικασία, το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε διάλυμα 1,5 M NaCl και 0,5 M NaOH για 30 λεπτά για την αποδιάταξή του δίκλωνου DNA. Κατόπιν το πήκτωμα ξεπλένεται σε mQ νερό και εμβαπτίζεται σε διάλυμα 10x SSC για εξισορρόπηση, ενώ ταυτόχρονα εμβαπτίζεται και η μεμβράνη μεταφοράς σε ίδιο διάλυμα. Η μεταφορά πραγματοποιείται σε διάλυμα 10x SSC και

διαρκεί 18 ώρες. Ακολούθως, η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε διάλυμα 2x SSC για 15 λεπτά και η μονιμοποίηση του DNA στη μεμβράνη γίνεται με έκθεση για 2 λεπτά σε υπεριώδες φώς και επώαση για 2 ώρες στους 80 ^{o}C.

3.14. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ mRNA ΜΕ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟ NORTHERN

Ολικό RNA απομονώθηκε από επιλεγμένους ιστούς. Η σταδιοποίηση των ωοθυλακίων έγινε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.2.4. Επελέγησαν συγκεκριμένοι ιστοί του μεταξοσκώληκα όπως ο εγκέφαλος, ο μυϊκός ιστός, το λιπαρό σώμα, οι μεταξογόνοι αδένες, τα ωοθυλάκια και άλλα διακριτά μέρη, και πραγματοποιήθηκε απομόνωση και καθαρισμός ολικού RNA, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.5.2. και στο (Drevet et al., 1994).

3.14.1. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ RNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ/ ΦΟΡΜΑΛΔΕΫΔΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση του RNA γίνεται σε πήκτωμα αγαρόζης/φορμαλδεϋδης (Lehrach et al., 1977). Για το πήκτωμα προσθέτονται 1,8 gr αγαρόζη και 4 ml 50x MOPS σε 163,2 ml mQ νερό. Το μείγμα βράζει έως ότου λιώσει η αγαρόζη και κατόπιν προστίθενται 33,6 ml φορμαλδεΰδης 37%. Το προς ηλεκτροφόρηση RNA αναμειγνύεται με 2 όγκους sample buffer (κεφάλαιο 3.3) και πραγματοποιείται αποδιάταξη του RNA με επώαση στους 65 ^{o}C για 5 λεπτά και μεταφορά σε παγόλουτρο. Το RNA ηλεκτροφορείται σε ρυθμιστικό διάλυμα (RNA running buffer, κεφάλαιο 3.3) με την εφαρμογή τάσης 5 V/cm.

3.14.2. ΜΕΤΑΦΟΡΑ RNA ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ

Η μεταφορά του RNA σε μεμβράνη υβριδισμού έγινε σύμφωνα με το σχετικό πρωτόκολλο μεταφοράς μέσω τριχοειδών φαινομένων (upward capillary transfer) σε νάυλον μεμβράνη Hybond-N (Amersham). Για να διευκολυνθεί η διαδικασία το RNA υδρολύεται σε μικρότερα κομμάτια με εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα 0,5 M $AcNH_4$ για 15 λεπτά. Κατόπιν, το πήκτωμα ξεπλένεται σε 0,5 $AcNH_4$ για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων της φορμαλδεΰδης. Η μεταφορά γίνεται με διάλυμα 3 mM NaOH για 18 ώρες. Η μεμβράνη ξεπλένεται με 2x SSC για 15 λεπτά. Η μονιμοποίηση του RNA στη μεμβράνη πραγματοποιείται με έκθεση για 2 λεπτά σε υπεριώδες φώς και επώαση για 2 ώρες στους 80 ^{o}C.

3.15. ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

Η υβριδοποίηση πραγματοποιείται σε αεροστεγώς κλειστή πλαστική σακούλα ή σε θερμοανθεκτικό γυάλινο δοχείο (pyrex) εφόσον με τον ίδιο ραδιενεργό ιχνηθέτη σημαίνονται περισσότερες των 2 μεμβρανών. Για την κατάληψη (blocking) των μη ειδικών θέσεων της μεμβράνης πραγματοποιείται προϋβριδισμός για 4 ώρες με το διάλυμα υβριδισμού (κεφάλαιο 3.3). Ακολούθως προστίθεται ο ραδιενεργός ιχνηθέτης αφού πρώτα έχει καθαριστεί με κολόνα φυγοκέντρησης sephadex G-50 και αποδιαταχθεί με βράσιμο για 5 λεπτά. Το διάλυμα του ραδιενεργού ιχνηθέτη προστίθεται στη σακούλα ή το δοχείο, η σακούλα κλείνεται πάλι αεροστεγώς και ακολουθεί επώαση του μείγματος των ιχνηθετών και της μεμβράνης στους 65 ^{o}C υπό ανάδευση για 16 ώρες.

Για την ανίχνευση των μεταγράφων του *bmsh3* χρησιμοποιήθηκε ραδιοσημασμένος ιχνηθέτης που αντιστοιχούσε στην πλήρη cDNA αλληλουχία του BmSH3-A1 περίπου 3 kbp όπως ενισχύθηκε από τους εκκινητές 48F και 3'UTR.R, (πίνακας 3.2, κεφάλαιο 4.3.2, εικόνα 4.6 Δ).

3.15.1. ΕΚΠΛΥΣΗ ΚΑΙ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

Για την απομάκρυνση της περίσσειας του ιχνηθέτη που δεν έχει υβριδιστεί στην μεμβράνη, η μεμβράνη επωάζεται με διαλύματα διαδοχικά μικρότερης συγκέντρωσης SSC παρουσία 0,1% SDS, έως ότου πάψει να ανιχνεύεται μη-ειδικό σήμα στην μεμβράνη. Η ανίχνευση του σήματος γίνεται με ανιχνευτή Geiger-Müller (LUDLUM Measurements Inc.).

Αρχικά η μεμβράνη επωάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα αντίστοιχης ιονικής ισχύος με το διάλυμα υβριδοποίησης, δηλαδή με ρυθμιστικό 2xSSC και 01% SDS, σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά και στους 65 ^{o}C για 30 λεπτά. Ακολουθεί επώαση δις στους 65 ^{o}C για 30 λεπτά, και ακολούθως σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,5xSSC και 0,1% SDS. Το ρυθμιστικό διάλυμα απομακρύνεται μετά από κάθε επώαση και μετριέται η ένταση της ακτινοβολίας από τη μεμβράνη, έως ότου υπάρξει εντοπισμένο σήμα. Το πλύσιμο της μεμβράνης συνεχίζεται αν κριθεί απαραίτητο με επώασή της σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,2x SSC και 0,1% SDS στους 65 ^{o}C για 30 λεπτά επαναλαμβάνοντας όσο χρειαστεί. Αφού ολοκληρωθεί το πλύσιμο, η μεμβράνη τυλίγεται σε πλαστική μεμβράνη και τοποθετείται για έκθεση σε ειδικές κασέτες αυτοραδιογραφίας, με X-

RAY φιλμ (Kodak). Η έκθεση διαρκεί ανάλογα με την ένταση του σήματος (από 2 έως και πάνω από 24 ώρες).

3.15.2. ΑΠΟΫΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

Μετά την εμφάνιση της μεμβράνης και εφόσον χρειάζεται να γίνει εκ νέου υβριδοποίηση αυτής με διαφορετικό ιχνηθέτη, πραγματοποιείται αποϋβριδοποίηση με επώαση σε διάλυμα 1% SDS σε υδατόλουτρο 80 ^{o}C για 30 λεπτά. Κατόπιν το θερμό διάλυμα με την μεμβράνη απομακρύνεται από το υδατόλουτρο και παραμένει σε κατάσταση ηρεμίας μέχρι να εξισορροπηθεί η θερμοκρασία του με αυτή του περιβάλλοντος. Η διαδικασία υβριδοποίησης επαναλαμβάνεται όπως προηγουμένως.

3.16. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ cDNA ΚΛΩΝΟΥ - ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ.

Για την αντίστροφη μεταγραφή του RNA (RT), το ολικό RNA μεταγράφεται σε cDNA με χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση SuperScript II (First-Strand Synthesis System, Invitrogen) κατά τις προδιαγραφές του κατασκευαστή. Η RT πραγματοποιήθηκε με oligo(dT) εκκινητές ή εκκινητές ειδικούς για το υπό μελέτη γονίδιο. Η διαδικασία έχει ως εξής:

2 μg ολικού RNA αναμιγνύονται με 500 ng oligo(dT) ή 2 pmol αντίστροφου εκκινητή (reverse primer) ειδικού για το γονίδιο προς μελέτη, 1 μl 10mM dNTPs και mQ νερό σε τελικό όγκο 12 μl. Το μείγμα θερμαίνεται στους 65 ^{o}C για 5 min για την αποδιάταξη του RNA και μεταφέρεται άμεσα σε παγόλουτρο. Προστίθενται 4 μl 5x first-strand buffer, 2 μl 0,1 M DDT και 1 μl 40 u/μl RNaseOUT (γενικός αναστολέας των RNασών) και μεταφέρονται στους 42^{o}C για 2 min. Ακολούθως προστίθεται η αντίστροφη μεταγραφάση, 1 U SuperScript II, και το μείγμα επωάζεται στους 42^{o}C για 30 με 40 λεπτά. Τέλος ακολουθεί θερμο-απενεργοποίηση του ενζύμου με θέρμανση στους 72^{o}C για 15 λεπτά.

3.17. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Στη παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν οι Taq πολυμεράση (Bioron) για τον γενικό πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA, η pfu DNA πολυμεράση (Fermentas) η οποία εμφανίζει και ενεργότητα 3'=>5' εξονοκλεάσης για την διόρθωση λαθών στην νεοσύστατη αλληλουχία και η Expand Long Range Taq Polymerase (Roche), για τον πολλαπλασιασμό του πλήρους μήκους της αλληλουχίας του BmSH3. Η απλή Taq

πολυμεράση χρησιμοποιήθηκε για την γενική ενίσχυση κομματιών DNA, για τα οποία δεν είναι κρίσιμη η πιστότητα, όπως κατά την ανάλυση της έκφρασης γονιδίων με την PCR. Τα ρυθμιστικά διαλύματα και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αντίδραση προέρχονται από την εκάστοτε εταιρεία που διαθέτει και το αντίστοιχο ένζυμο. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με βάση την αλληλουχία DNA που επρόκειτο να ενισχυθεί, το ποσοστό A/T, και τη σχετική θερμοκρασία αναδιάταξης και δίνονται στον πίνακας 3.2. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στις συσκευές GeneAmp PCR System 2400 και GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Πίνακας 3-2: Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του cDNA που αντιστοιχούν στα μετάγραφα BmSH3-A1/A2 και BmSH3-A2

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Θέση στη cDNA αλληλουχία
Εμπρόσθιοι:		BmSH3-A1/2
43F	5′-CGATACCGATTTCGATGAGCG-3′	στο 5' άκρο του ORF
280F	CGTCAAGAATCACCAAGTAAAGAA	στο 5' άκρο του ORF
1875F	5'-CCCCTACGCGGATTCCGATCTC-3′	καθοδικά των SH3 περιοχών
2604F	5'-CTACAGGAACCCAGCCAGAG -3′	τέλος του δεύτερου SH3
Οπίσθιοι		BmSH3-A1/2
278R	GGACGTTCTTTACTTGGTGATTCTTGAC	στο 5' άκρο του ORF
378R	CTAGTAAGGAACTCCAGCTCC	στο 5' άκρο του ORF
430R	GCTTAAAGGCAGCCCGCTCCA	στο 5' άκρο του ORF
1222R	GTCGTACATATCTTTTTATACCAACG	στο 5′ του SoHo
Εμπρόσθιοι:		BmSH3-B
8Fb	5′-GTGCGTGAGAGTTGGACGCGGA-3′	5' UTR
Οπίσθιοι		BmSH3-A1/2, BmSH3-B
2377R	5'-ACGGGAACAGCCCAATTCTT-3'	καθοδικά των SH3 περιοχών
2464R	5'-CAAACTTCGCCCTGGCACGGCC-3′	αρχή του δεύτερου SH3
2900R	TGGTATGGCTTCGGCATTAGTGTCG	αρχή του τρίτου SH3
3'UTR.R	5′-CCGACGGAACAGCGACGTCTC-3′	στην αρχή της 3' αμετάφραστης περιοχής

Η ενίσχυση του cDNA των BmSH3-A1/2 πραγματοποιήθηκε με χρήση των εμπρόσθιων εκκινητών 43F, 1875F, 2604F και του οπίσθιου 3'UTR.R. Η ενίσχυση της ισομορφής BmSH3-B πραγματοποιήθηκε με χρήση του εμπρόσθιου εκκινητή 8Fb και των οπίσθιων 2377R και 3'UTR.R (εικόνα 4.16 και 4.15 αντιστοίχως και πίνακας 3.2). Οι συνθήκες ενίσχυσης ήταν 94^{o}C, για 45 sec (1^{o} βήμα), 56^{o}C ή 61^{o}C για 45 sec (2^{o} βήμα) και 72^{o}C για 1 λεπτό (3^{o} βήμα) για 35 κύκλους. Η ενίσχυση των BmE75C, της ακτίνης και των cDNA γονιδίων του χορίου πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται από τους (Machado et al., 2007).

3.18. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ GST-ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν χιμαιρικές πρωτεΐνες σύντηξης με την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (glutathione-S-transferase, GST) για την παραγωγή και καθαρισμό αντισωμάτων. Τα υβριδικά γονίδια για τις πρωτεΐνες σύντηξης με GST κατασκευάζονται σε φορέα υψηλής πρωτεϊνικής έκφρασης pGEX-5x (Pharmacia Biotech). Ο φορέας pGEX περιλαμβάνει ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης με το γονίδιο της GST υπό τον έλεγχο του υποκινητή tac, ο οποίος επάγεται με το ανάλογο της λακτόζης IPTG.

3.19. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ GST

Η έκφραση των πρωτεϊνών έγινε στο βακτηριακό στέλεχος *E. coli* BL-21. Σε κάθε βήμα της διαδικασίας συλλέγεται μικρή ποσότητα δείγματος πριν την κατεργασία για την αξιολόγηση της μεθόδου, εφόσον υπάρχει τέτοια ανάγκη.

3.19.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ, ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Ο μετασχηματισμός των BL-21 (DE3) με το πλασμίδιο pGEX-5x, στο οποίο έχει κλωνοποιηθεί τμήμα του cDNA του BmSH3, έγινε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.9.6. Η μητρική καλλιέργεια των μετασχηματισμένων βακτηρίων καλλιεργείται σε θρεπτικό υλικό LB με 75 μg/μl αμπικιλίνης στους 37 ^{o}C, υπό ανάδευση στις 320 rpm. 500 ml LB με 75 μg/μl αμπικιλίνης εμβολιάζονται με μικρή ποσότητα από τη μητρική καλλιέργεια και ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στις 320 rpm. Η πορεία της καλλιέργειας παρακολουθείται με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας δειγμάτων σε μήκος κύματος 600 nm. Όταν η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας πλησιάσει σε O.D.=0,6, προστίθεται ο επαγωγέας της πρωτεϊνοσύνθεσης IPTG, σε τελική συγκέντρωση 0,5 mM. Η επώαση συνεχίζεται για 4 ώρες και μετά η καλλιέργεια συλλέγεται και φυγοκεντρείται στις 3000 rpm για 20 λεπτά στους 4 ^{o}C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το βακτηριακό ίζημα ξεπλένεται με επαναιώρησή του σε 500ml 1xPBS σε παγόλουτρο και ακολουθεί νέα κατακρήμνιση των βακτηρίων με φυγοκέντρηση όπως παραπάνω. Το τελικό βακτηριακό ίζημα μπορεί να αποθηκευθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα στους -80 ^{o}C.

3.19.2. ΛΥΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η λύση των βακτηριακών κυττάρων πραγματοποιείται με εκπομπή υπέρηχων (ηχοτριψία, sonication). Βακτηριακό ίζημα που αντιστοιχεί σε 20 ml αρχικής βακτηριακής καλλιέργειας αναδιαλύεται σε 1 ml διαλύματος ηχοτριψίας. Η λύση των κυττάρων γίνεται με διακοπτόμενες εκπομπές υπέρηχου, σε παγόλουτρο, ώστε να αποφευχθεί η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και το άφρισμα του μείγματος. Τα βακτήρια έχουν υποστεί πλήρη λύση όταν το μείγμα γίνει σχετικά διαυγές. Το μείγμα φυγοκεντρείται στις 50000 g, για 40 λεπτά στους 4 ^{o}C. Το υπερκείμενο συλλέγεται και η χιμαιρική πρωτεΐνη απομονώνεται με χρωματογραφία συγγένειας.

3.19.3. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ – ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Ο καθαρισμός των GST συντηγμένων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε σε στήλη με σφαιρίδια σεφαρόζης-γλουταθειόνης (GSH-Sepharose 4B, Amersham Pharmacia). Η γλουταθειόνη αποτελεί το φυσικό υπόστρωμα της GST.

Τα σφαιρίδια του χρωματογραφικού υλικού αρχικά εξισορροπούνται με αιώρηση σε διάλυμα ηχοτριψία, απουσία Triton και λυσοζύμης, με ήπια ανακίνηση για 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 500 g και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Τα σφαιρίδια αναδιαλύονται σε τελικό εναιώρημα διπλάσιου όγκου (50% slurry). Τα σφαιρίδια προστίθενται στο υπερκείμενο από την φυγοκέντριση των λυμένων βακτηρίων με ήπια ανάδευση με περιστροφή επί 1 h στους 4 ^{o}C, σε αναλογία 1 ml slurry ανά 50 ml αρχικής βακτηριακής καλλιέργειας. Ακολουθεί έγχυση του συνολικού υλικού σε χρωματογραφική στήλη. Η υγρή φάση αφήνεται να περάσει μόνο με την υδροστατική πίεση με σταθερή ροή που ρυθμίζεται από προσαρτημένη στρόφιγγα. Ακολουθούν πλύσιμο της στήλης με διάλυμα ηχοτριψίας χωρίς λυσοζύμη, όγκου 20 με 25 φορές του όγκου του χρωματογραφικού υλικού και τέλος πλύσιμο με το ίδιο διάλυμα χωρίς Triton X-100 στην ίδια αναλογία. Σε αυτό το στάδιο, το χρωματογραφικό υλικό με τη δεσμευμένη χιμαιρική πρωτεΐνη μπορεί να αποθηκευτεί στους 4 ^{o}C σε τουλάχιστον ίσο όγκο 1xPBS παρουσία 0.02% w/v Na-azide.

Η αποδέσμευση της πρωτεΐνης μπορεί να γίνει ως εξής:

Η έκλουση της χιμαιρικής πρωτεΐνης από τα σφαιρίδια μπορεί να γίνει και με πέψη με κατάλληλο ένζυμο, όπως η πρωτεάση factor Xa και κατόπιν έκλουσή της.

Ολόκληρη η χιμαιρική πρωτεΐνη αποδεσμεύεται από τα σφαιρίδια με την επώαση του μείγματος για 5 λεπτά σε ζέον υδατόλουτρο παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης και κατόπιν με SDS-PAGE γίνεται ο διαχωρισμός της πρωτεΐνης με βάση το μοριακό βάρος της χιμαιρικής πρωτεΐνης (βλ και κεφάλαιο 3.25).

Τέλος ολόκληρη η χιμαιρική πρωτεΐνη αποδεσμεύεται με επώαση και έκλουση από την στήλη με διάλυμα συγκέντρωσης 0,1 Μ υδροχλωρική γλυκίνη pH 2,5.

Εφ' όσον η χιμαιρική πρωτεΐνη δεσμευτεί ομοιοπολικά στα σφαιρίδια μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό αντισώματος.

3.19.4. ΟΜΟΙΟΠΟΛΙΚΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ GSH-SEPHAROSE 4B.

Στη παρούσα διατριβή η ομοιοπολική πρόσδεση των πρωτεϊνών στο χρωματογραφικό υλικό έγινε για τον καθαρισμό των αντισωμάτων που παρήχθησαν (κεφάλαιο 3.22-3.23).

Η στήλη που περιέχει τα σφαιρίδια με την προσδεδεμένη πρωτεΐνη (κεφάλαιο 3.19.3) ξεπλένεται αρχικά με διάλυμα 10 όγκων διαλύματος 0,5 Μ HEPES pH 8,5 και κατόπιν με 10 όγκους διαλύματος 0,2 Μ βορικού οξέως - NaOH pH 8,6. Τα σφαιρίδια επαναδιαλύονται σε 2 ml 0.2 Μ βορικό οξύ-NaOH, pH 8,5. Για κάθε 1 ml χρωματογραφικού υλικού προστίθεται, φρέσκο παρασκευασμένο διάλυμα σύζευξης 15,5 mg DMP (Dimethyl pimelimidate dihydrochloride) σε 2ml 0,2 Μ triethanolamine pH 8,3 ή μεγαλύτερο). Το DMP ανήκει στην κατηγορία των δις-ιμιδοεστέρων τα οποία αντιδρούν ειδικά σε βασικό pH (7 – 10) με ελεύθερες αμινομάδες (πχ λυσίνη). Οι παραγόμενες αμιδίνες είναι σταθερές ενώσεις (Wong, 1991), σελ 57, σελ 75 και σελ 98) Το μείγμα επωάζεται 45 λεπτά υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση σύζευξης τερματίζεται με προσθήκη διαλύματος τερματισμού (0,2Μ ethanolamine pH 8,2 - παρέχει περίσσεια αμινομάδων στις οποίες δεσμεύεται το DMP) σε αναλογία 1:1 με το διάλυμα σύζευξης για 10 λεπτά υπό ανάδευση και μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου προστίθεται ίσος όγκος επιπλέον διαλύματος τερματισμού. Κατόπιν το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα σφαιρίδια ξεπλένονται με 0,1 Μ υδροχλωρική γλυκίνη pH 2,5 για την απομάκρυνση της περίσσειας ethanolamine και των μη ομοιοπολικά προσδεμένων πρωτεϊνών. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το χρωματογραφικό υλικό ξεπλένεται για 5 λεπτά επί 3 φορές με 10 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος 1xPBS pH 7,4 για εξισορρόπηση.. Τέλος, τα σφαιρίδια αναδιαλύονται σε

1xPBS με 0,02 % αζίδιο. Σε αυτό το στάδιο το χρωματογραφικό υλικό με την ομοιοπολικά δεσμευμένη πρωτεΐνη μπορούν να αποθηκευτούν με ασφάλεια στους 4 ^{o}C. Δείγμα 20μl φυλάσσεται για έλεγχο της πρόσδεσης με ηλεκτροφόρηση τύπου SDS-PAGE.

Η πιστοποίηση για την ομοιοπολική πρόσδεση της GST στα σφαιρίδια έγινε με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε 12% SDS-PAGE (αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, βλ. κεφάλαιο 3.25). Η σύγκριση του αποτελέσματος με αντίστοιχο δείγμα από τα σφαιρίδια πριν από την ομοιοπολική πρόσδεση της GST μπορεί να εκτιμήσει την απόδοση της αντίδρασης.

3.20. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ EYFP

Για την κατασκευή των φορέων έκφρασης των χιμαιρικών πρωτεϊνών σε εντομικές κυτταρικές σειρές χρησιμοποιήθηκε ο φορέας έκφρασης pEA, που περιλαμβάνει τον ενισχυτή hr3 του BmNPV, τον υποκινητή του γονιδίου της ακτίνης του μεταξοσκώληκα και την 3΄ αμετάφραστη περιοχή του ίδιου γονιδίου (φορέας pEA), (Douris et al., 2006). Καθοδικά του υποκινητή της ακτίνης κλωνοποιήθηκε το cDNA που κωδικοποιεί την EYFP και στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης cDNA που κωδικοποιεί το μέρος της BmSH3 που μας ενδιαφέρει με κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης. Οι φορείς έκφρασης χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της υποκυτταρικής κατανομής της χιμαιρικής πρωτεΐνης EYFP με την BmSH3 ή τμημάτων αυτής στις κυτταρικές σειρές εντόμων Bm5 και Hi5. Εκτός από τον φορέα έκφρασης της χιμαιρικής πρωτεΐνης EYFP με τη σχεδόν πλήρη ακολουθία της (απουσιάζουν 105 αα από το Ν΄ άκρο και αναφέρεται ως pEA.EYFP/BmSH3-A1, εικόνα 6.1) κατασκευάστηκαν και φορείς έκφρασης της χιμαιρικής EYFP με το αμινο-τελικό ή το καρβοξυ-τελικό άκρο της BmSH3 (αα 105-753 και 716-1030, αναφορά ως pEA.EYFP/BmSH3Δ.C και pEA.EYFP/BmSH3Δ.N αντίστοιχα, εικόνα 6.1). Τα τμήματα της BmSH3-A1 που περιλαμβάνουν τα βασικά δομικά στοιχεία της χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα υποκυταρικής κατανομής για να αξιολογηθεί η πιθανή λειτουργία κάθε περιοχής.

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης για την EYFP απομονώθηκε από τον φορέα έκφρασης της, τον pEYFP-1 (Clontech) (Παράρτημα Χ, εικόνα 1 Γ). Σχεδιάσαμε εκκινητές για την τροποποίηση του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης της EYFP για την εισαγωγή στο 5΄ άκρο του γονιδίου της αλληλουχίας αναγνώρισης του περιοριστικού

ενζύμου NotI, το στοιχείο Kozak και το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης ATG, ενώ στο 3΄ του γονιδίου αφαιρέθηκε το κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης και έγινε εισαγωγή της αλληλουχίας αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου StyI (Παράρτημα Χ, εικόνα 1 Α, Β). Η ενίσχυση της αλληλουχίας της EYFP έγινε με το ένζυμο pfu DNA πολυμεράση (Promega) που περιλαμβάνει και υψηλή ικανότητα επιδιόρθωσης (proofreading). Το πρωτόκολλο της αντίδρασης PCR περιελάμβανε αρχικά 5 κύκλους με αποδιάταξη στους 94^{o}C για 1’, ανασύνδεση στους 55 ^{o}C (αντιστοιχεί στο μέρος του εκκινητή ταυτόσημου με το EYFP) για 1’ και επιμήκυνση στους 72 ^{o}C για 1’, για την εισαγωγή των αλληλουχιών που αντιστοιχούν στα περιοριστικά ένζυμα NotI και StyI. Ακολούθως, 35 κύκλους με τα εξής βήματα: αποδιάταξη στους 95^{o}C για 1’, ανασύνδεση στους 65^{o}C για 1’ και επιμήκυνση στους 72^{o}C για 1’. Το κομμάτι που ενισχύθηκε καθαρίζεται από τα υποπροϊόντα της αντίδρασης σε στήλη μοριακής διήθησης στερεής φάσης Sephadex G-50.

Κατόπιν, κατασκευάστηκαν 3 πλασμίδια που κωδικοποιούν BmSH3 χιμαιρικές πρωτεΐνες με την EYFP στο Ν-τελικό άκρο τους. Ο φορέας έκφρασης pEA.EYFP/BmSH3-A1 κωδικοποιεί την πλήρη αλληλουχία του BmSH3-A1, εκτός των πρώτων 105 αμινοξέων από την αρχή της γνωστής αμινοξικής αλληλουχίας (105 – 1030 αα). Ο φορέας έκφρασης pEA.EYFP/BmSH3Δ.Νκωδικοποιεί την χιμαιρική πρωτεΐνη με τα 294 αμινοξέα του καρβοξυ-τελικού άκρου (716 – 1030 αα), που περιέχουν τις περιοχές SH3. Ο φορέας έκφρασης pEA.EYFP/BmSH3Δ.C κωδικοποιεί τη χιμαιρική πρωτεΐνη με τα 648 αμινοξέα (105 – 753 αα) του αμινο- τελικού άκρου που περιέχει την ακολουθία SoHo αλλά όχι τις περιοχές SH3 (εικόνα 6.1).

ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ pEA.EYFP/BmSH3-A1

Κατά τη διαδικασία ανασύνδεσης των κλώνων *E75C(f)prey #31, SC8 και SH8* (αποτελούν τα τμήματα του BmSH3-A1 που απομονώθηκαν κατά την σάρωση της βιτελλογενικής βιβλιοθήκης, βλέπε και εισαγωγή 1.4) για την κατασκευή μιας cDNA αλληλουχίας που κωδικοποιεί για την κλωνοποιημένη BmSH3 cDNA αλληλουχία κατασκευάστηκαν οι cDNA κλώνοι BmSH3NX2.0 και BmSH3XX2.0 της εικόνας 2 του παραρτήματος Χ. Για την κατασκευή ενός κλώνου που να κωδικοποιεί για την EYFP-BmSH3-A1 (εικόνα 6.1) κατασκευάστηκε ο φορέας έκφρασης σε εντομικά κύτταρα pEA.EYFP/BmSH3-A1, με ανασύνδεση του κομματιού που ενισχύθηκε με

PCR από τον φορέα pEYFP-1 (παράρτημα Χ) και κωδικοποιεί για την EYFP στο 5΄ άκρο του κλώνου *BmSH3NX2.0* στο μέσο και του κλώνου *BmSH3XX2.0* στο 3΄ άκρο.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

Ο κλώνος *BmSH3NX2.0* έχει κλωνοποιηθεί στον φορέα pBSK(+). Με πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα NotI και StyI, απελευθερώνεται τμήμα 90nt από το 5΄ άκρο του cDNA. Το γραμμικό πλασμίδιο καθαρίζεται μετά από ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη με ηλεκτροέκλουση (κεφάλαιο 3.8.1). Στη θέση του κομματιού των 90nt, του γραμμικού πλασμιδίου κλωνοποιήθηκε το γονίδιο της EYFP όπως είχε ενισχυθεί με PCR με τους εκκινητές EYFP.F και EYFP.R προς παρασκευή του EYFP/BmSH3NX2.8 (παράρτημα Χ, εικόνα 2 Β). Ο κλώνος *BmSH3XX2*.0 έχει κλωνοποιηθεί σε pBSK(+) και απελευθερώνεται από το περιοριστικό ένζυμο XhoI. Έγινε πέψη του EYFP/BmSH3NX2.8 με το περιοριστικό ένζυμο XhoI, αποφωσφορυλίωση των 5΄ άκρων και στο γραμμικό πλασμίδιο κλωνοποίηση του κομματιού *BmSH3XX2.0*, (παράρτημα Χ, εικόνα 2 Γ). Έτσι κατασκευάστηκε το πλασμίδιο EYFP/BmSH3NXXX4.8 (παράρτημα Χ, εικόνα 2 Δ). Ο κλώνος αυτός αποτελείται από το γονίδιο έκφρασης της EYFP και στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης την cDNA αλληλουχία της BmSH3-A1 εκτός των πρώτων γνωστών 255 nt. Όλο το EYFP/BmSH3NXXX4.8 απελευθερώθηκε από το πλασμίδιο Bluescript SK+ με πέψη με NotI. Το γονίδιο απομονώθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και ηλεκτροέκλουση αυτού. Τέλος, κλωνοποιήθηκε στον φορέα έκφρασης των λεπιδοπτέρων pEA (Lu et al., 1997) μετά από επώασή του με το περιοριστικό ένζυμο NotI, αποφωσφορυλίωση των 5΄ άκρων και κλωνοποίηση του EYFP/BmSH3NXXX4.8 προς κατασκευή του φορέα έκφρασης pEA.EYFP/BmSH3-A1 (παράρτημα Χ, εικόνα 2 Ε).

ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ pEA.EYFP/BmSH3Δ.C

Για την κατασκευή του φορέα έκφρασης του EYFPNN, που περιλαμβάνει το Ν΄ τελικό άκρο απουσία των SH3 περιοχών και υποκλωνοποίησή του στο πλασμίδιο έκφρασης pEA, έπρεπε να δημιουργηθεί ένα κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης και περιοχή αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου NotI στο 3΄ άκρο του EYFP/BmSH3NX2.8 (παράρτημα Χ, εικόνα 2 Β και 4.12 Β).

Μετά την κατεργασία του pBSK.EYFP/BmSH3NX2.8 με XhoI και KpnI, ο συνδέτης (παράρτημα Χ, εικόνα 3) κλωνοποιείται στο γραμμικό πλασμίδιο (παράρτημα

Χ, εικόνα 4 Γ) και κατασκευάζεται ο φορέας pBSK.EYFP/BmSH3NN2.8 (παράρτημα Χ, εικόνα 4 Δ). Ακολουθεί επώαση του φορέα pBSK.EYFP/BmSH3NN2.8 με το περιοριστικό ένζυμο NotI όπου και απελευθερώνεται η πλήρης cDNA αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη χιμαιρική πρωτεΐνη και μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό του κομματιού EYFP/BmSH3NN2.8 ακολουθεί υποκλωνοποίησή του στον φορέα έκφρασης pEA (παράρτημα Χ, εικόνα 4 Δ-Ε) για την κατασκευή του φορέα έκφρασης pEA.EYFP/BmSH3Δ.C.

ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ pEA.EYFP/BmSH3Δ.N΄end

Η κατασκευή του pEA.EYFP/BmSH3Δ.Nβασίστηκε στον φορέα pBSK.EYFP/BmSH3NN2.8 (παράρτημα Χ, εικόνα 2 Γ), όπου η αλληλουχία που κωδικοποιεί για το Ν΄ τελικό άκρο της BmSH3 αντικαταστάθηκε με την C΄ τελική περιοχή που κωδικοποιεί για τις SH3 περιοχές (παράρτημα Χ, εικόνα 5). Το κομμάτι που αντιστοιχεί στο 3΄ άκρο απελευθερώνεται μετά από πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα StyI/XhoI (παράρτημα Χ, εικόνα 5 Β). Στη θέση του BmSH3NN2.8 κλωνοποιείται το κομμάτι SH3XX1.1 που ενισχύθηκε με PCR από το cDNA της BmH3-A1, με την pfu DNA πολυμεράση (Promega), με τους εκκινητές XX.F και XX.R (παράρτημα Χ, εικόνα 5 Α).

Οι εκκινητές έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να εισάγουν στην αλληλουχία περιοχές αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων StyI στο 5' άκρο και XhoI στο 3' (παράρτημα Χ, εικόνα 5). Το πρόγραμμα της ενίσχυσης είχε ως εξής: αρχική αποδιάταξη στους 94 ^{o}C για 4 λεπτά. Έπειτα έγινε αποδιάταξη στους 94 ^{o}C για 30”, αναδιάταξη στους 49 ^{o}C για 40” και ενίσχυση στους 68 ^{o}C για 3 λεπτά για 5 κύκλους. Ακολούθησαν 25 ακόμα κύκλοι με τις ίδιες συνθήκες πλην της θερμοκρασίας αναδιάταξης που ήταν στους 58 ^{o}C. Τα προϊόντα κατακρημνίστηκαν με αιθανόλη/οξικό αμμώνιο και η αναδιάλυση έγινε σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, όπως συνίσταται από τις εταιρείες για πέψη με StyI/XhoI. Ακολούθησε καθαρισμός του DNA σε στήλη μοριακής διήθησης στερεής φάσης Sephadex G-50 για την απομόνωση του κομματού DNA από τα μικρότερα ολιγονουκλεοτίδια. Τέλος έγινε ανασύνδεση του γραμμικού πλασμιδίου με το κομμάτι SH3XX1.1, που ενισχύθηκε από την PCR και κωδικοποιεί τις SH3 περιοχές, για την κατασκευή του EYFP/BmSH3NN1.8 (Παράρτημα Χ, εικόνα 6 Β και Γ). Η τελική κατασκευή του pEA.EYFP/BmSH3Δ.N ολοκληρώνεται με την υποκλωνοποίηση του

κομματιού EYFP/BmSH3NN1.8 (Παράρτημα Χ, εικόνα 6 Γ και Δ) στον φορέα έκφρασης pEA των εντόμων, στη θέση NotI όπως και στο 4.3.3.

3.21. ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (Cell Transfection)

Κατά τη διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων γίνεται εισαγωγή εξωγενούς DNA (όπως ενός φορέα έκφρασης του επιθυμητού γονιδίου) στο κύτταρο. Η εισαγωγή του DNA στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε με χρήση του λιποσώματος (liposome, λιπιδικά κιστίδια) lipofectin (Invitrogen) όπως περιγράφεται από τους (Swevers et al., 2002b). Τα λιποσώματα όταν βρίσκονται σε υδατικό διάλυμα σχηματίζουν διπλοστοιβάδα λιπιδίων, όπως και στην κυτταρική μεμβράνη και ενσωματώνονται εύκολα σε αυτή Στο εσωτερικό των κυστιδίων εγκλωβίζονται υδατοδιαλυτά υλικά όπως DNA, τα οποία εισάγονται και στο κύτταρο με την ενσωμάτωση των λιποσωμάτων στη μεμβράνη.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε έχει ως εξής:

Αρχικά σε τρυβλίο έξι πηγαδίων προστίθενται 10^6 κύτταρα ανά πηγάδι σε πλήρες θρεπτικό μέσο, και παραμένουν σε ηρεμία για 1 ώρα ώστε να προσκολληθούν τα κύτταρα στον πλαστικό πυθμένα των πηγαδιών. Κατόπιν το πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας αντικαθίσταται από το βασικό διάλυμα καλλιέργειας κυτταρικών σειρών εντόμων, IPL-41^{TM} (GIBCO BRL). Η απομάκρυνση του υπερκειμένου και η προσθήκη του νέου διαλύματος γίνονται με ιδιαίτερη προσοχή με μηχανική πιπέτα κρατώντας το τρυβλίο σε ελαφρά κεκλιμένη θέση και αναρροφώντας από το χείλος του υγρού, ώστε να μην γίνει αποκόλληση των κυττάρων. Η πλύση με το IPL-41^{TM} επαναλαμβάνεται για τρεις φορές.

Ακολουθεί η προετοιμασία των λιποσωμάτων ως εξής:

15 μl lipofectin προστίθενται σε 250 μl IPL-41 με ήπια ανάδευση με την πιπέτα και το μείγμα παραμένει για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Παράλληλα, 3 μg DNA διαλύονται σε 250 μl IPL-41 και το μείγμα παραμένει σε παγόλουτρο για 30 λεπτά. Ακολουθεί ανάμειξη του μείγματος του DNA και του μείγματος της lipofectin σε παγόλουτρο όπου και παραμένουν για 20 λεπτά.

Τέλος η διαμόλυνση των κυττάρων έχει ως εξής:

Το μείγμα προστίθεται στα κύτταρα από τα οποία έχει αφαιρεθεί και η τελευταία πλύση με IPL-41^{TM}. Τα κύτταρα με το μείγμα διαμόλυνσης επωάζονται για

τουλάχιστον 4 ώρες στους 28 ^{o}C. Κατόπιν, απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται πλήρες θρεπτικό μέσο IPL-41 με 10% βόειο εμβρυικό ορό (Fetal bovine serum, FBS, Gibco BRL) και τα κύτταρα επωάζονται στους 28 ^{o}C για τουλάχιστον ακόμα 18 ώρες (Johnson et al., 1992).

Έχει δειχθεί ότι ο συνενεργοποιητής IE-1 μπορεί να ενισχύσει τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που είναι κλωνοποιημένα στον φορέα pEA κατά 50 φορές (Lu et al., 1996, 1997). Έτσι, συνήθως πραγματοποιείται συνδιαμόλυνση των φορέων έκφρασης με βάση το pEA (pEA.EYFPBmSH3NXXX, pEA.EYFPBmSH3NX, pEA.EYFPBmSH3NN, pEA.BmSH3-A), με το πλασμίδιο BmIE-1 (το οποίο περιέχει την κασέτα έκφρασης για το IE-1 του ιού BmNPV (Huybrechts et al., 1992), σε αναλογία 50:1 (pEA/BmIE1). Δεν απαιτείται συνδιαμόλυνση για τους φορείς έκφρασης με βαση το pEIA (pEIA.BmE75C-MycHis, pEIA.BmE75A-MycHis), διότι σε αυτούς περιέχεται από την κατασκευή τους η κασέτα έκφρασης του IE1.

3.21.1. ΛΥΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (ΕΝΤΟΜΩΝ)

Τα κύτταρα τοποθετούνται σε πλαστικό σωλήνα τύπου eppendorf. Η πλήρης απομάκρυνση των κυττάρων από το τρυβλίο πραγματοποιείται είτε με χρήση πλαστικής ξύστρας (όταν τα πηγάδια ήταν αρκετά μεγάλα), είτε με την ρίψη θρεπτικού μέσου με πίεση με μηχανική πιπέτα. Με φυγοκέντρηση στις 500 rpm για 5 λεπτά τα κύτταρα διαχωρίζονται από το υπερκείμενο θρεπτικό το οποίο και απορρίπτεται. Η λύση των κυττάρων γίνεται μέσα σε cracking buffer με έντονη ανάδευση, και ακολουθεί αποδιάταξη με βρασμό για 5-10 λεπτά. 200 μl διαλύματος cracking buffer χρησιμοποιούνται για την λύση 1x10^{6} κυττάρων. Το εκχύλισμα μπορεί να φυλαχθεί στους 4 ^{o}C με ασφάλεια για λίγες μέρες πριν τη χρήση του.

3.22. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Για την αναγνώριση της πρωτεΐνης BmSH3, πραγματοποιήθηκε η κατασκευή πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι επιλεγμένων τμημάτων της. Οι περιοχές αυτές της πρωτεΐνης απεικονίζονται σχηματικά στην εικόνα 5.1 και επιλέχτηκαν με βάση την υδροφοβικότητα που παρουσιάζει η αμινοξική αλληλουχία (εικόνα 5.2). Για τον σκοπό αυτό έγινε ανάλυση της υδροφοβικότητας κατά (Kyte and Doolittle, 1982), με τη χρήση του διαδικτυακού εργαλείου ProtParam, (Gasteiger et al., 2003). Οι αλληλουχίες cDNA που εκφράζουν τις περιοχές που επιλέχτηκαν κλωνοποιήθηκαν στον φορέα έκφρασης

pGEX-5x (κεφάλαιο 5.2.1**)** ώστε να εκφραστεί χιμαιρική πρωτεΐνη με την GST στο N' τελικό άκρο της πρωτεΐνης.

Η πορεία που ακολουθείται για την ανοσοποίηση και την παραλαβή του ορού πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το εργαστηριακό εγχειρίδιο Antibodies: A laboratory manual (Harlow and Lane, 1988). Περιληπτικά, ο καθαρισμός των χιμαιρικών πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη σφαιριδίων γλουταθειόνης (κεφάλαιο 3.19.13). Η απομόνωση της πρωτεΐνης έγινε από το πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 12%, μετά από ηλεκτροφόρηση των σφαιριδίων σεφαρόζης στα οποία έχει προσδεθεί η χιμαιρική πρωτεΐνη. Το πήκτωμα χρωματίζεται παροδικά όπως αναγράφεται στο κεφάλαιο 3.25.1. Η πρωτεΐνη απομονώθηκε με εκτομή της περιοχής του πηκτώματος που αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος της. Κατόπιν έγινε λυοφιλύωση του τμήματος του πηκτώματος, κονιορτοποίησή του και αναδιάλυση σε 1xPBS. Πριν από την ένεση στο κουνέλι πραγματοποιήθηκε ανάμιξη με διάλυμα ενίσχυσης της ανοσολογικής απόκρισης (Freund’s adjuvant, (FREUND, 1956).

Πριν από την πρώτη ένεση με το αντιγόνο στο κουνέλι είναι απαραίτητη η λήψη μη ανοσοποιημένου αίματος για τον κατοπινό έλεγχο του ανοσοποιημένου ορού. Το μείγμα του αντιγόνου χορηγείται σε δύο ζώα. Όλες οι ενέσεις γίνονται υποδερμικά εκατέρωθεν της σπονδυλικής στήλης, με προσοχή ώστε να μην τραυματιστεί το ζώο. Μετά την πάροδο 14 ημερών γίνεται λήψη μικρής ποσότητας αίματος (15 ml) και έπειτα χορηγείται και η δεύτερη ένεση με το αντιγόνο. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται ακόμα δύο φορές και σε κάθε κύκλο 14 ημέρες μετά από την ένεση λαμβάνονται 15 ml αίματος. Στην τελευταία δόση λαμβάνεται αρκετό αίμα (50 ml) για να μπορέσει να συντηρήσει τα επερχόμενα πειράματα.

Για να καθαριστεί ο ορός από τα ερυθρά αιμοσφαίρια και άλλα συστατικά, μετά την λήψη του αίματος γίνεται επώαση στους 37^{o}C για 30 με 60 λεπτά έως την πήξη του ινώδους. Μετά από ολονύχτια φύλαξη του στους 4^{o}C το δείγμα φυγοκεντρείται στις 3000rpm με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό του ορού από τα μη διαλυτά συστατικά του αίματος. Ο ορός μεταφέρεται σε κατάλληλα δοχεία φύλαξης και αποθηκεύεται στους –20^{o}C.

Η ίδια ακριβώς διαδικασία ακολουθήθηκε για την παραγωγή και των δύο αντισωμάτων

3.23. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Τα αντισώματα που παράγονται από την ανοσοποίηση των κουνελιών πρέπει να καθαρίζονται για να αποφευχθεί η πιθανή μη ειδική αναγνώριση πρωτεϊνών. Για τον καθαρισμό των αντισωμάτων έναντι της BmSH3 έπρεπε αρχικά να απομακρύνθουν τα αντισώματα που αναπτύχθηκαν έναντι της GST. Ο καθαρισμός γίνεται με χρωματογραφία συγγένειας, των αντισωμάτων έναντι της GST.

3.23.1. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

Ο καθαρισμός από τα αντισώματα που παρήγαγε το κουνέλι έναντι της πρωτεΐνης GST πραγματοποιήθηκε με τη χρησιμοποίηση στήλης συγγένειας στην οποία έχει προσδεθεί ομοιοπολικά η GST όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.19.4. Πραγματοποιήθηκε επώαση του ανοσοποιημένου ορού με σφαιρίδια στα οποία είχε συνδεθεί ομοιοπολικά η GST για 4 ώρες στους 4^{o}C με σκοπό την πρόσδεση του αντισώματος στην GST. Ο καθαρισμένος ορός (flow-through) συλλέχτηκε για μεταγενέστερα πειράματα, αφού δοκιμάστηκε για την εξειδίκευσή του με ανοσοαποτύπωσης τύπου Western (βλ. κεφάλαιο 5.3.1)

Η στήλη επωάστηκε στη συνέχεια με υδροχλωρική γλυκίνη pH 2,5 για την έκλουση του αντισώματος που προσδέθηκε στην GST. Το εκλουσμένο αντίσωμα έναντι της GST, (anti-GST) εξισορροπήθηκε με ίσο όγκο Tris-HCl pH 8.0 και χρησιμοποιήθηκε κυρίως σε πειράματα ελέγχου.

3.24. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ

3.24.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ.

Για την πλήρη λύση και αποδιάταξη των ωοθυλακίων έγινε επώαση με cracking buffer για 30 λεπτά. Κατόπιν οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν με κατάλληλο πλαστικό έμβολο. Με την μέθοδο αυτή γίνεται εκχύλιση όλων των υλικών του ωοθυλακίου, διαλυτών και μη.

3.24.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ.

Για την απομόνωση πρωτεϊνών αποκλειστικά από τα επιθηλιακά κύτταρα των ωοθυλακίων η απομόνωση πραγματοποιείται με επώαση των ωοθυλακίων με ήπια

αποδιατακτικά μέσα έτσι ώστε το εκχύλισμα να μην επιμολυνθεί από τις πρωτεΐνες της λεκίθου. Η απομόνωση πραγματοποιείται σε διάλυμα RIPA, παρουσία των αντιπρωτεασικών PMSF (100μg/ml), aprotinin (10μg/ml), leupeptin (10μg/ml), για 30 λεπτά σε παγόλουτρο με ήπια ανάδευση ανά διαστήματα με το χέρι. Στο στάδιο αυτό χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή για να μην σπάσουν τα ωοκύτταρα και το μείγμα μολυνθεί με λέκιθο ή άλλα συστατικά του ωοκύτταρου και των τροφοκυττάρων. Ακολουθεί φυγοκέντριση του μείγματος για 5 λεπτά στις 500 rpm και συλλογή του υπερκείμενου και μεταφορά του σε καθαρό σωλήνα. Το υπερκείμενο που περιέχει εκχυλίσματα από τα επιθηλιακά κύτταρα μεταφέρεται σε νέο σωλήνα, ενώ το ίζημα, που περιέχει τα ωοκύτταρα ξεπλένεται τρεις φορές με PBS για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων των επιθηλιακών κυττάρων. Το ίζημα επαναιωρείται σε ίσο όγκο (300 μl) διαλύματος πλήρους αποδιάταξης (cracking buffer), και με μηχανική πίεση (χρήση κατάλληλου πλαστικού εμβόλου) υποβοηθείται η πλήρης λύση των ωοκυττάρων.

3.24.3. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων έγινε με την μέθοδο Bradford (Bradford, 1976). Η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης έγινε με την μέτρηση της απορρόφησης (560 nm) διαλυμάτων αλβουμίνης γνωστών συγκεντρώσεων.

3.25. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΟ (SDS) ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ (ΜΕΘΟΔΟΣ LAEMMLI, SDS-PAGE)

Η μονοδιάστατη ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο (LAEMMLI, 1970) διαχωρίζει τις πρωτεΐνες με βάση την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες που καθορίζονται από την παρουσία του SDS. Το SDS είναι ισχυρό ανιονικό απορρυπαντικό το οποίο δεσμεύεται στις πρωτεΐνες καταστρέφοντας τους μη ομοιοπολικούς δεσμούς, αποδιατάσοντας τις δευτεροταγείς δομές, (πλην των δισουλφιδικών δεσμών) και προσθέτοντας αρνητικό φορτίο στην αμινοξική αλληλουχία. Λόγω της αναλογίας αρνητικού φορτίου με το μέγεθος της κάθε πρωτεΐνης, μέσω του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης πραγματοποιείται διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος, καθώς οι πρωτεΐνες κινούνται προς την άνοδο. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται στο “πήκτωμα διαχωρισμού” (κεφάλαιο

3.3), ενώ πάνω από αυτό τοποθετείται ένα λεπτό στρώμα αραιότερου πηκτώματος (3,6 %) που ονομάζεται "πήκτωμα συμπύκνωσης" (κεφάλαιο 3.3), στο οποίο γίνεται η εισαγωγή του δείγματος.

Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (PAG) κατασκευάζεται σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης της Biorad (mini PROTEAN Tetra cell), σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας. Πριν από την ηλεκτροφόρηση γίνεται η αποδιάταξη των πρωτεϊνών. 25 – 40 μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος επωάζονται για 5 λεπτά σε ζέον υδατόλουτρο παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης για την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών που δεν καταστρέφονται από το SDS. Το διάλυμα (loading buffer), που χρησιμοποιήθηκε διατίθεται από την Fermentas. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε διάλυμα γλυκίνης, Running buffer (κεφάλαιο 3.3) αρχικά στα 80 Volt μέχρι την εισαγωγή των πρωτεϊνών στο πήκτωμα διαχωρισμού, και κατόπιν στα 120 Volt, μέχρι η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης που περιέχεται στο loading buffer να φτάσει στο τέλος του πηκτώματος.

3.25.1. ΧΡΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης μπορεί να γίνει χρώση των πρωτεϊνών στο πήκτωμα με Coomasie blue. Η χρώση μπορεί να είναι μόνιμη ή παροδική. Η μόνιμη χρώση γίνεται σε διάλυμα 0,1% Coomasie blue P250, 10% οξικό οξύ και 50% μεθανόλη, με ήπια ανάδευση για 30 λεπτά έως 1 ώρα. Η περίσσεια της χρωστική που δεν έχει δεσμευτεί σε πρωτεΐνες αφαιρείται με διαδοχικές πλύσεις σε διάλυμα 10% μεθανόλης και 10% οξικού οξέος. Για την παροδική χρώση των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται διάλυμα 0,001 % Coomasie blue R250 σε νερό. Η παροδική χρώση χρησιμοποιείται για την απομόνωσης της πρωτεΐνης κατά την παραγωγή αντισωμάτων.

3.26. ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ (CO-IMMUNOPRECIPITATION)

Η μέθοδος της ταυτόχρονης ανοσοκατακρήμνισης χρησιμοποιείται για ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση της πιθανής αλληλεπίδρασης της BmSH3 με την BmE75c όπως είχε δειχθεί από τα πειράματα δύο υβριδίων στη ζύμη (K. Ito and K. Iatrou, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Για την εφαρμογή της μεθόδου απαιτούνται αντισώματα και για τις δύο πρωτεΐνες. Αντισώματα έναντι της BmSH3 (anti-BmSH3-1 και anti-BmSH3-2) κατασκευάστηκαν και επιβεβαιώθηκαν στο εργαστήριο (κεφάλαιο 3.23), ενώ για την

ανίχνευση του BmE75c, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση του ανοιχτού πλαιδίου ανάγνωσης του γονιδίου του BmE75c στο πλασμίδιο έκφρασης pEA.Myc.His (Douris et al., 2006), ,ανοδικά της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για τους επίτόπους Myc και 6xHis, επιτρέποντας την επισήμανση της πρωτεΐνης με τους επιτόπους αυτούς στο καρβοξυ-τελικό άκρο. Για την ανίχνευση της τελικής εκφραζόμενης πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό αντίσωμα 9B11 (Cellular Signaling), έναντι του επιτόπου Myc. Η διαδικασία έχει συνοπτικά ως εξής:

Μετά τη διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς εντόμων όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 3.21 ακολούθησε επώαση των παροδικά διαμολυσμένων κυττάρων σε πλήρες θρεπτικό για 3 ημέρες. Ακολουθεί συλλογή των κυττάρων απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και ξέπλυση με 1xPBS. Όλη η διαδικασία ολοκληρώθηκε μέσα σε δωμάτιο θερμοκρασίας 4^{o}C (cold room). Μετά από φυγοκέντριση για 5 λεπτά σε χαμηλές στροφές (500 rpm) το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθεί λύση των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα NP-40, παρουσία μείγματος αναστολέων πρωτεασών. Το μείγμα των κυττάρων φυγοκεντρείται για δεκαπέντε λεπτά στις 14000 x g στους 4^{o}C, και μετά την απομάκρυνση του ιζήματος ακολουθεί προεπώαση του υπερκείμενου με 50 μl μη -ανοσοποιημένου ορού κουνελιού για 2 ώρες υπό ελαφριά ανάδευση. Προστίθεται 100 μl σφαιριδίων slurry και επώαση για επιπλέον 2 ώρες. Το μείγμα κατόπιν φυγοκετρείται στις 14000 x g για δέκα λεπτά. Το υπερκείμεον είναι έτοιμο για την ανοσοκατακρήμνιση. Το μείγμα χωρίζεται στα δύο όπου το πρώτο θα επωαστεί με 5 μl από το αντίσωμα έναντι της BmSH3-A1, anti-BmSH3-1, κυττάρων επωάζονται με αντισώματα έναντι της BmSH3 ή και το δεύτερο με 1 μl από το αντίσωμα anti-Myc για 4 ώρες στους 4 ^{o}C υπό συνεχή ήπια ανάδευση. Ακολουθεί προσθήκη 70 μl απόσφαιρίδια σεφαρόζης στα οποία έχει δεσμευτεί η πρωτεΐνη A για την πρόσδεση του πολυκλωνικού αντισώματος και της πρωτεΐνης-G για την πρόσδεση του μονοκλωνικού αντισώματος.και επώαση για 4 ώρες με ήπια ανάδευση στους 4 ^{o}C. Η πρόσδεση της πρωτεΐνης A ή πρωτεΐνης-G , επιτρέπει την κατακρήμνιση του συμπλόκου του αντισώματος με την πρωτεΐνη με φυγοκέντρηση στις 10000 x g και το υπερκείμενο απορρίπτεται ενώ το ίζημα ξεπλένεται τρείς φορές με 10xV 1xPBS. Οι πρωτεΐνες αποδεσμεύονται από την πρωτεΐνη A και αποδιατάσσονται με βρασμό για πέντε λεπτά παρουσία loading buffer και ακολουθεί ανάλυση τύπου Western σε 10% SDS-PAGE.

Τέλος, η BmSH3-A1 ή η BmE75A/C αναγνωρίζονται από το anti.BmSH3 ή το anti-Myc (Andronopoulou et al., 2006) αντίσωμα αντιστοίχως.

3.27. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ (WESTERN)

3.27.1. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών προς μελέτη πραγματοποιήθηκε με ανοσοαποτύπωση τύπου Western. Η μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα προς τη μεμβράνη (Hybond ECL, Amersham) έγινε στη συσκευή mini PROTEAN^{TM} Tetra cell (Biorad). Πριν την μεταφορά η μεμβράνη και το πήκτωμα ξεπλένονται με διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer, κεφάλαιο 3.3). Η μεταφορά διαρκεί για τουλάχιστον 90 λεπτά υπό τάση 120 Volt ή για 12 ώρες υπό τάση 30 Volt. Η απόδοση της μεταφοράς μπορεί να ελεγχθεί με μόνιμη χρώση του πηκτώματος ή με προσωρινή βαφή της μεμβράνης με διάλυμα Ponceau-S (κεφάλαιο 3.3). Η έκπλυση της μεμβράνης με απιονισμένο νερό δεν θα αποχρωματίσει τις πρωτεΐνες πάνω στην μεμβράνη ενώ με διάλυμα 1xPBS η μεμβράνη αποχρωματίζεται πλήρως.

3.27.2. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Για την ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών που μεταφέρθηκαν στη μεμβράνη Hybond ECL χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντισώματα.

1. Τα πρώτα πολυκλωνικά αντισώματα anti-BmSH3-1 και anti-BmSH3-2, τα οποία παρήχθησαν και καθαρίστηκαν στο εργαστήριο (κεφάλαιο 5.3.1), χρησιμοποιήθηκαν σε τελική αραίωση 1:2000.
2. πρώτο μονοκλωνικό αντίσωμα Anti-Myc 9B11 (Cellular Signaling) που παράχθηκε σε ποντίκι και χρησιμοποιήθηκε σε αραίωση 1:5000
3. πρώτο μονοκλωνικό αντίσωμα εμπορίου έναντι της GFP (Anti-GFP, mAb 11E5, Invitrogen) σε αραίωση 1:700
4. δεύτερο μονοκλωνικό αντίσωμα εμπορίου έναντι των IgG ποντικιού που παράχθηκε από αίγα (Goat Anti-Mouse antibody, Jackson Immunoresearch) συνδεδεμένο με το ένζυμο Horse Radish Peroxidase (HRP) χρησιμοποιήθηκε σε τελική αραίωση 1:5000.
5. δεύτερο μονοκλωνικό αντίσωμα εμπορίου έναντι των IgG κουνελιού που

παράχθηκε από αίγα (Goat Anti-Rabbit antibody, Jackson Immunoresearch) και συνδεδεμένο με το ένζυμο HRP χρησιμοποιήθηκε σε τελική αραίωση 1:5000.

Μετά την μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη, πραγματοποιήθηκε επώαση της μεμβράνης σε 10 % (w/v) αποβουτυρωμένο γάλατος σε σκόνη σε 1xPBS-T (blocking buffer), απουσία αντισώματος για την δέσμευση των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης της μεμβράνης. Η επώαση διαρκεί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση. Κατόπιν, στο διάλυμα προστίθεται το πρώτο αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης που μελετάται, μέχρι την επιθυμητή αραίωση. Η επώαση διαρκεί για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή για 16 ώρες στους 4 ^{o}C υπό ήπια ανάδευση. Μετά το πέρας της επώασης η μεμβράνη ξεπλένεται τρεις (3) φορές με 1xPBS-T, για την απομάκρυνση των αδέσμευτων αντισωμάτων.

3.27.3. ΔΕΥΤΕΡΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ - ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

Η επώαση της μεμβράνης με το δεύτερο αντίσωμα πραγματοποιείται σε blocking buffer για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ήπια ανάδευση. Το δεύτερο αντίσωμα αναγνωρίζει την σταθερή περιοχή του πρώτου αντισώματος, που είναι κοινή για όλα τα IgG αντισώματα του ίδιου είδους (οργανισμού). Στο σταθερό άκρο αυτού βρίσκεται προσδεδεμένο το ένζυμο HRP. Για την εμφάνιση των θέσεων των αντισωμάτων στη μεμβράνη προστέθηκε αντιδραστήριο ECL (Electrochemiluminescence) (Amersham) ώστε να παραχθεί αντίδραση χημειοφωταύγειας (chemilluminescence) μέσω της HRP. Με τοποθέτηση της μεμβράνης και φιλμ αυτοραδιογραφίας σε ειδικές κασέτες για διάφορα χρονικά διαστήματα (συνήθως μεταξύ 1-20 λεπτών), επιτυγχάνεται η αποτύπωση της υπό μελέτη πρωτεΐνης (ζώνης).

3.28. ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΟΧΗΜΕΙΑ

3.28.1. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ HI5 ΚΑΙ BM5

Ο ανοσοφθορισμός στις κυτταρικές σειρές είχε ως σκοπό την εύρεση της υποκυτταρικής κατανομής της BmSH3 και τον πιθανό συνεντοπισμό της με την BmE75c. Οι κυτταρικές σειρές διαμολύνθηκαν, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.21, με τον φορέα έκφρασης pEA με κλωνοποιημένο το γονίδιο BmSH3, με τον φορέα έκφρασης pEA.Myc.His με κλωνοποιημένο το γονίδιο BmE75c ενώ ταυτόχρονα

διαμολύθηκαν με τον φορέα BmIE1 για την ενίσχυση της έκφρασης των κλωνοποιημένων γονιδίων.

Η διαμόλυνση των κυττάρων έγινε σε τρυβλία έξι θέσεων όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.21. Η παρατήρηση των διαμολυσμένων κυττάρων πραγματοποιήθηκε στα πηγάδια με χρήση μικροσκοπίου φθορισμού (AXIOPLAN ZEISS) ή σε καλυπτρίδα κατεργασμένη με πολυ-L-λυσίνη. Οι καλυπτρίδες βρίσκονται μέσα στα πηγάδια από την αρχή της διαμόλυνσης των κυττάρων για την καλύτερη προσκόλλησή τους.

3.28.1.1. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΛΥΠΤΡΙΔΩΝ ΠΟΛΥ-L-ΛΥΣΙΝΗΣ

Η μονιμοποίηση της πολυ-L-λυσίνης πραγματοποιείται με αρχική επώαση των καλυπτρίδων σε διάλυμα 1 N HCl για 1 ώρα στους 50 -60 ^{o}C. Το στάδιο αυτό βοηθάει στην μέγιστη πρόσδεση των αμινοξέων και των κυττάρων σε γυάλινη επιφάνεια. Μετά από εκτεταμένη πλύση με mQ νερό, επάνω στις καλυπτρίδες προστίθεται 0,5 - 1 ml διαλύματος 0,1 mg/ml πολύ-L-λυσίνης σε mQ νερό. Η παραμονή του διαλύματος διάρκεσε 1 ώρα στους 37^{o}C και ακολούθως οι καλυπτρίδες πλύθηκαν με mQ νερό και αποστειρώθηκαν με έκθεση σε ακτινοβολιά UV για 45 λεπτά.

3.28.1.2. ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΙΣ ΚΑΛΥΠΤΡΙΔΕΣ – ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Η μονιμοποίηση πραγματοποιείται με προσθήκη διαλύματος φορμαλδεΰδης 4% σε 1xPBS στις καλυπτρίδες με τα προσκολημένα κύτταρα και επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η φορμαλδεΰδη πλένεται τέσσερις φορές με 1xPBS απουσία Triton-X-100. Η έκπλυση γίνεται προσεχτικά ώστε να αποφευχθεί η καταστροφή και η απομάκρυνση κυττάρων, με αργή απορροή του ρυθμιστικού διαλύματος με μηχανική πιπέτα. Τα κύτταρα επωάζονται για 30 λεπτά με 0,1 % Triton-X-100 σε 1xPBS για 20 λεπτά. Το διάλυμα απομακρύνεται και γίνεται δέσμευση των μη ειδικών θέσεων με επώαση των κυττάρων με 4 % NGS σε 1xPBS για 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η επώαση με το πρώτο αντίσωμα (βλέπε και κεφάλαιο 3.27.2) γίνεται σε 1% NGS για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή για 16 ώρες στους 4 ^{o}C. Τα κύτταρα ξεπλένονται τέσσερεις φορές με 1xPBS για την απομάκρυνση του αντισώματος που δεν έχει δεσμευτεί και προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα σε 1% NGS για 1 ώρα σε θερμοκρασία

δωματίου. Μετά από τέσσερις πλύσεις με 1xPBS, γίνεται επώαση των ωοθυλακίων με 0.3mg/ml DAPI σε 1xPBS για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για την χρώση των πυρήνων. Για την απομάκρυνση της περίσσειας του DAPI τα κύτταρα ξεπλένονται για 4 φορές ακόμα με 1xPBS για 10 λεπτά την φορά. Τα κατεργασμένα κύτταρα τοποθετούνται σε γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα σε διάλυμα 1 % (w/v) PPD, 90 % γλυκερόλης, σε 1xPBS για να αποφευχθεί η εξασθένηση του χρωμοφόρου. Η επαφή της καλυπτρίδας με την αντικειμενοφόρο πλάκα σφραγίζεται με βερνίκι νυχιών. Ο φθορισμός παρατηρείται είτε στο μικροσκόπιο φθορισμού είτε με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (κεφάλαιο 3.30), όπου και λαμβάνονται ψηφιακές φωτογραφίες. Η διέγερση των χρωμοφόρων γίνεται στο εκάστοτε μήκος κύματος που προτείνει ο κατασκευαστής. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με τα προγράμματα ImageJ (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA**)** και GNU Image Manipulation Program (GIMP, http://www.gimp.org/)

3.28.2. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΣΤΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΞΟΣΚΩΛΗΚΑ

Ο ανοσοφθορισμός στα ωοθυλάκια είχε ως σκοπό την εύρεση της *in vivo* υποκυτταρικής κατανομής της BmSH3. Για την παρατήρηση της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε κατεργασία των ωοθυλακίων (Swevers and Iatrou, 1998), ως εξής:

Τα ωοθυλάκια απομονώνονται από νύμφη 5 – 6 ημερών και πραγματοποιείται μονιμοποίηση των πρωτεϊνών με 4% φορμαλδεΰδη σε TBS-T σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες με ελαφρά ανακίνηση. Μετά το πέρας της μονιμοποίησης απομακρύνεται το διάλυμα φορμαλδεΰδης και τα ωοθυλάκια ξεπλένονται 4 φορές με διάλυμα TBS-T για 10 λεπτά. Για την διάνοιξη πόρων στο κυτταρικό τοίχωμα τα ωοθυλάκια υφίστανται κατεργασία με 0,5 mg/ml κολλαγενάση (Sigma) σε TBS-T για 20 λεπτά και μετά επαναλαμβάνεται η πλύση τους με TBS-T όπως και προηγουμένως. Για την δέσμευση των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης του αντισώματος γίνεται επώαση των ωοθυλακίων σε 4% NGS σε TBS-T για 1½ ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η επώαση των ωοθυλακίων με το πρώτο αντίσωμα λαμβάνει χώρα σε μείγμα 1% NGS σε TBS-T για 16 ώρες στους 4 ^{o}C στο οποίο περιέχεται το πρώτο αντίσωμα, ειδικό έναντι της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Μετά την επώαση το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα ωοθυλάκια ξεπλένονται 4 φορές με ήπια ανάδευση με TBS-T. Για την οπτικοποίηση

της κατανομής των πρωτεϊνών τα ωοθυλάκια επωάζονται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με αντίσωμα έναντι της σταθερής περιοχής των IgG κουνελιού συζευγμένο με κατάλληλο χρωμοφόρο ή με αντίσωμα έναντι της σταθερής περιοχής των IgG ποντικιού συζευγμένο με το κατάλληλο χρωμοφόρο, σε TBS-T παρουσία 1% NGS.

Τα κατεργασμένα ωοθυλάκια τοποθετούνται σε γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα,ειδικά διαμορφωμένη για αυτό τον σκοπό, σε διάλυμα 10 mM PPD, 90 % γλυκερόλης σε διάλυμα φωσφορικών για να αποφευχθεί η εξασθένηση του χρωμοφόρου. Η επαφή της καλυπτρίδας με την αντικειμενοφόρο πλάκα σφραγίζεται με “βερνίκι νυχιών”. Ο φθορισμός παρατηρείται είτε στο μικροσκόπιο φθορισμού είτε με συνεστιακό.

Τα αντισωματα που χρησιμοποιηθηκαν στα πειραματα ανοσοφθορισμου ηταν τα:

1. Το πρώτο anti-BmSH3-1 πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της BmSH3, που παράχθηκε στο εργαστήριο από κουνέλια, σε τελική αραίωση 1:500.
2. Το πρώτο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του επιτόπου Myc (anti-Myc 9B11, Cellular Signaling), παραγόμενο σε ποντίκια και σε τελική αραίωση 1:500.
3. Το δεύτερο αντίσωμα anti-rabbit FITC (Jackson ImmunoResearch), έναντι της σταθερής περιοχής των IgG κουνελιών, στο οποίο έχει δεσμευθεί η χρωμοφόρα ουσία FITC σε τελική συγκέντρωση 1:1000 (διέγερση σε μήκος κύματος 492nm και εκπέμπει σε μήκος κύματος E=520nm).
4. Το δεύτερο αντίσωμα anti-rabbit RRX (Jackson ImmunoResearch), έναντι της σταθερής περιοχής των IgG κουνελιών, στο οποίο έχει δεσμευθεί η χρωμοφόρα ουσία ροδαμίνη σε τελική συγκέντρωση 1:1000 (διέγερση σε μήκος κύματος 570 nm και εκπομπή σε μήκος κύματος 590 nm).
5. Το δεύτερο αντίσωμα anti-mouse FITC (Jackson ImmunoResearch) έναντι της σταθερής περιοχής των IgG ποντικιών, στο οποίο έχει δεσμευθεί η χρωμοφόρα ουσία FITC σε τελική συγκέντρωση 1:1000 (διέγερση σε μήκος κύματος 492nm και εκπομπή σε μήκος κύματος 520nm).

Τα αντισώματα στα οποία έχει προσδεθεί το χρωμοφόρο πρέπει να φυλάσσονται σε σκοτεινό χώρο για να μην εξασθενήσει το χρωμοφόρο.

3.29. ΕΥΡΕΣΗ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΗΣ BmSH3

Εναλλακτικά για τον προσδιορισμό της υποκυτταρικής κατανομής της BmSH3 χρησιμοποιήθηκαν χιμαιρικές πρωτεΐνες τμημάτων της BmSH3 με την EYFP (Clontech). Η κατασκευή των πλασμιδίων έκφρασης των χιμαιρικών πρωτεϊνών περιγράφεται στο παράρτημα Χ. Η διαμόλυνση των κυττάρων έγινε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 3.21. Η διαμόλυνση των κυττάρων έγινε σε τρυβλία 6 θέσεων (6 well plates), και η παρατήρηση τους σε μικροσκόποιο φθορισμού.

3.30. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ-ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ LASER

Τα μικροσκόπια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρατήρηση των καλλιεργειών ήταν: 1. μικροσκόπιο φθορισμού AXIOPLAN ZEISS και 2. συνεστιακό μικροσκόπιο laser BIO-RAD MRC 1024 CONFOCAL SYSTEM

3.31. ΑΝΑΛΥΣΗ IN SILICO

Για τον προσδιορισμό της γονιδιακής δομής (διαδοχή εξονίων και εσωνίων) του γονιδίου BmCAP χρησιμοποιήθηκαν εργαλεία σύγκρισης αλληλουχιών που βασίζονται στο πρόγραμμα BLAST προκειμένου να συγκριθεί η αλληλουχία cDNA που κλωνοποιήθηκε με τις δύο κατατεθειμένες γενωμικές αλληλουχίες του μεταξοσκώληκα *B. mori*, (Mita et al., 2004; Xia et al., 2004). Για την ανάλυση των αλληλουχιών έναντι των κατατεθειμένων αλληλουχιών του *B. mori*, χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων SilkDB (Duan et al., 2009). Για τον καθορισμό της διαδοχής χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα BLAST (Altschul et al., 1997) και KaikoBLAST (http://kaikoblast.dna.affrc.go.jp/). Τα αποτελέσματα των συγκρίσεων τελικώς διορθώθηκαν με το χέρι. Το BLAST αποτελεί τον πιο συχνά χρησιμοποιημένο ευριστικό (heuristic) αλγορίθμους και βρίσκονται διαθέσιμοι στο διαδίκτυο και σε τοπικές εκδόσεις. Ο όρος ευριστικός (heuristic) χρησιμοποιείται για αλγόριθμους που βρίσκουν λύσεις μεταξύ όλων των πιθανών, αλλά δεν εγγυώνται ότι θα βρουν τη βέλτιστη. Τέτοιου είδους αλγόριθμοι, βρίσκουν μια λύση κοντινή στη βέλτιστη (close to the best one) γρήγορα και εύκολα.

Προς αναζήτηση ήδη χαρακτηρισμένων στοιχείων και συντηρημένων περιοχών χρησιμοποιήθηκαν τα πρωτεομικά εργαλεία από το ExPASy (http://au.expasy.org/tools/) όπως το InterPRO (The InterPro Consortium, 2001; (Gasteiger et al., 2003) και ο ELM διακομιστής (server, (Puntervoll et al., 2003) που αναζητεί πιθανές λειτουργικές περιοχές σε δεδομένες αμινοξικές αλληλουχίες και το πρόγραμμα GPS (http://gps.biocuckoo.org/, (Xue et al., 2011).Η στοίχιση αλληλουχιών για τη σύγκριση με γνωστές αλληλουχίες της οικογένειας έγινε με το πρόγραμμα ClustalX (Larkin et al., 2007) στις προκαθορισμένες ρυθμίσεις.

Χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων Swissprot (http://au.expasy.org) και Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) για την σλυγκριση της BmSH3 cDNA ή πρωτεϊνικής αλληουχίας με τις κατατεθημένες αλληλουχίες.

3.31.1. ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΠΙΘΑΝΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ SH3 ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ SH3HUNTER

Κατά την μελέτη της αμινοξικής αλληλουχίας της BmSH3 και των BmE75A/C ισομορφών, έγινε ανάλυση της αλληλουχίας με την χρήση του προγράμματος SH3HUNTER (http://cbm.bio.uniroma2.it/SH3-Hunter/, (Ferraro et al., 2007). Η μινοξική αλληλουχία αρχικά ελέγχεται από ένα πρόγραμμα αναγνώρισης περιοχές πλούσιες σε προλίνη. Η παρουσία αυτών των περιοχών έχουν καθοριστεί ως απαραίτητες για την πιθανή αλληλεπίδραση με SH3 περιοχές. Σε αυτές τις περιοχές γίνεται η προσπάθια για αναγνώριση τάξης Ι ή τάξης ΙΙ αλληλουχίες αναγνώρισης από SH3 περιοχές (κεφάλαιο 1.5.2.1). Οι περιοχές πλούσιες σε προλίνη που εμφανίζουν τις ομόφονες αλληλουχίες

4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α΄

ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΚΑΙ ΤΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑ ΤΟΥ BmSH3: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΔΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΗΚΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΕΙΔΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μετά από σάρωση με το σύστημα δύο υβριδίων στη ζύμη (Y2H) για την αναγνώρηση πιθανών πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την BmE75C είχε αναγνωρηστεί ο ημιτελείς κλώνος E75C(f)/prey #31. Για την εύρεση επιπλέων 5' αλληλουχίας χρησιμοποιήθηκε ως ιχνηθέτης η αλληλουχία του E75C(f)/prey #31 για τη σάρωση χοριογενικής βιβλιοθήκης (βλ. και κεφάλαιο 1.4) όπου και έγινε η αναγνώρηση δύο επιπλέον ημιτελών κλώνων, οι BmSH3SC8 και BmSH3SH8, που αντιστοιχούν σε επιπλέον 5' αλληλουχία της E75C(f)/prey #31. Με βάση τις επικαλύψεις που εμφάνιζαν οι αλληλουχίες έγινε ανασύνδεσή τους σε έναν κλώνο και συγκεκριμένα στον *BmSH3*, μεγέθους 5694 nt (παράρτημα ΙΙ), που περιέχει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) 2865 nt που κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη μεγέθους 955 αα (εικόνα 1.11, Ito και Iatrou, αδημοσίευτα αποτελέσματα, (Swevers et al., 2002b). Το ORF του BmSH3 στο 5' άκρο του παραμένει ανοιχτό γιατί δεν κατέστει δυνατή η ταυτοποίηση του κωδικωνίου έναρξης της μεταγραφής.

4.2. ΕΙΔΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.1. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΠΟΥ ΕΝΙΣΧΥΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΤΗΝ pfu

Χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pBSK (+) ο οποίος είχε επωαστεί με EcoRV (αφήνει τυφλά άκρα), και έγινε αποφωσφορυλίωση των άκρων (κεφάλαιο 3.9) για να αποφευχθεί η ανασύνδεσή του. Η αντίδραση ανασύνδεσης του γραμμικού φορέα με τα προϊόντα της αντίδρασης PCR με το ένζυμο pfu, έγινε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες

4.2.2. PCR

Το πρωτόκολλο της PCR με τους εκκινητές GAL4ADSequencing και 378R περιλαμβάνει 30 κύκλους που αποτελούνται από την αποδιάταξη στους 94^{o}C για 1', ανασύνδεση στους 54^{o}C για 1'και επιμήκυνση στους 72^{o}C για 1'.

Το πρωτόκολλο της PCR με τους εκκινητές Matchmaker 5'AD LD-insert-Screening Amplimer και 278R περιελάμβανε 30 κύκλους που αποτελούνται από την αποδιάταξη στους 94 ^{o}C για 1', ανασύνδεση στους 61 ^{o}C για 1' και επιμήκυνση στους 72 ^{o}C για 1'.

Το πρωτόκολλο της PCR με τους εκκινητές GAL4ADSequencing και 2377R περιλάμβανε στάδιο αποδιάταξης στους 94 ^{o}C, για 1 λεπτό, ανασύνδεση στους 53 ^{o}C για 1 λεπτό και ενίσχυση στους 72 ^{o}C για 1 min, για 35 κύκλους.

Από την αντίδραση PCR με τους εκκινητές GAL4ADSequencing και 2377R χρησιμοποιήθηκε ποσότητα 2μl και επαναλήφθηκε η διαδικασία με τους εσωτερικούς εκκινητές 5'AD LD-insert-Screening Amplimer και 2464R. Το πρωτόκολλο της PCR με τους εκκινητές 5'AD LD-insert-Screening Amplimer και 2464R περιλάμβανε στάδιο αποδιάταξης στους 94 ^{o}C για 1 λεπτό, ανασύνδεσης στους 62 ^{o}C για 1 min και τελικώς ενίσχυση στους 72 ^{o}C για 1 min, για 35 κύκλους.

Η πρώτη αντίδραση PCR έγινε με τους εξωτερικούς εκκινητές GAL4ADSequencing και 2377R. Το προϊόν της αντίδρασης επωάστηκε με το μεγάλο τμήμα του κομματιού Klenow (DNA polymerase I (lg) Klenow fragment, Fermentas, κεφάλαιο 3.9) για την παραγωγή τυφλών άκρων και τα προϊόντα κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pBSK(+).

4.2.3. RT-PCR

Η απομόνωση του ολικού RNA έγινε με το αντιδραστήριο Trizol και κατά το πρωτόκολλο της εταιρίας Invitrogen, ενώ η αντίστροφη μεταγραφή του RNA έγινε με το ένζυμο SuperscriptII κατά το πρωτόκολλο της ίδιας εταιρίας χρησιμοποιώντας oligo-dT ως εκκινητή.

Για την RT-PCR με τους εκκινητές 43F και 430R (πίνακας 3.2) το πρωτόκολλο της αντίδρασης PCR περιελάμβανε 30 κύκλους που αποτελούνται από την αποδιάταξη στους 94 ^{o}C για 1', ανασύνδεση στους 60 ^{o}C για 45" και επιμήκυνση στους 72 ^{o}C για 30".

Για την RT-PCR με τους εκκινητές 280F και 1222R, 1875F και 2900R (πίνακας 3.2) το πρωτόκολλο της αντίδρασης PCR περιελάμβανε 30 κύκλους με αποδιάταξη στους 94 ^{o}C για 1', ανασύνδεση στους 58 ^{o}C για 30'' και επιμήκυνση στους 72 ^{o}C για 30''.

Για την RT-PCR με τους εκκινητές 43F και 3'UTR.R, λόγω του αναμενόμενα μεγάλου μεγέθους του προϊόντος, για την ενισχυσή του επιλέχτηκε η Long Range

Polymerase (Roche) και ως ρυθμιστικό διάλυμα το “system 2” (Roche). Ακολουθήθηκαν οι προτεινόμενες συνθήκες αναδιάταξης και κύκλων, με εξέρεση την θερμοκρασία ανασύνδεσης (62 ^{o}C) και τον χρόνο της επιμήκυνσης (3,5 λεπτά).

Για την RT-PCR με τους εκκινητές 8Fb (πίνακας 3.2) με τον 3'UTR.R (πίνακας 3.2) και 8Fb με τον 2377R (πίνακας 3.2) το πρωτόκολλο της αντίδρασης PCR περιελάμβανε στάδιο αποδιάταξης στους 94 ^{o}C, για 1 λεπτό, ανασύνδεσης στους 56 ^{o}C για 90” και ενίσχυση στους 72 ^{o}C για 1 λεπτό, για 35 κύκλους.

Για την RT-PCR με τους εκκινητές 1875F και 3'UTR.R (πίνακας 3.2 το πρωτόκολλο της αντίδρασης PCR περιελάμβανε 30 κύκλους που αποτελούνται από την αποδιάταξη στους 94 ^{o}C για 45", ανασύνδεση στους 58 ^{o}C για 45" και επιμήκυνση στους 72 ^{o}C για 1 λεπτό.

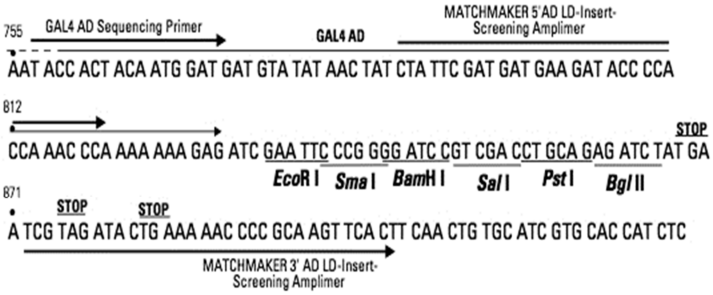
4.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.3.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ cDNA ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΕΙ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΜΕ ΜΙΑ SoHo ΚΑΙ ΤΡΕΙΣ SH3 ΠΕΡΙΟΧΕΣ.

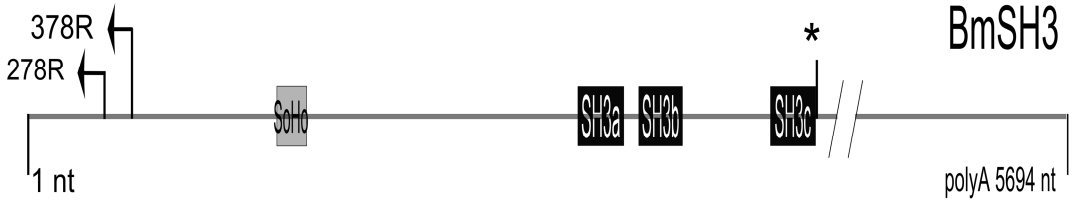
Για την εύρεση του κωδικονίου έναρξης και την επιπλέον 5' αλληλουχίας ακολουθήθηκε η μέθοδος της ένθετης PCR (nested PCR) στη χοριογενική και στη βιτελλογενική cDNA βιβλιοθήκη που ήταν κλωνοποιημένη στον φορέα του συστήματος δύο υβριδίων της ζύμης pGAD424, (Swevers et al., 2002b).

Για το πρώτο στάδιο της ενίσχυσης χρησιμοποιήθηκε ζευγάρι εκκινητών που περιλάμβανε τους εκκινητές GAL4ADSequencing (εικόνα 4.1) και 378R (ειδικός για το γονίδιο του BmSH3, πίνακας 3.2), που βρίσκεται 150 βάσεις μακριά από το γνωστό 5’ άκρο cDNA BmSH3 (εικόνα 4.2). Τα προϊόντα της κάθε αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης (εικόνα 4.3 Α), Και από τις δύο αντιδράσεις παρήχθησαν μη ειδικά προϊόντα ποικίλων μεγεθών αλλά από το δείγμα της χοριογενικής βιβλιοθήκης (εικόνα 4.3, διαδρομή CL) ήταν εμφανής η παρουσία μιας ζώνης μεγέθους περίπου 800 bp.

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε δεύτερη ένθετη PCR με τη χρησιμοποίηση, ως εκμαγείου, 2 μl από το μείγμα της πρώτης PCR και με (εσωτερικούς) εκκινητές τους Matchmaker 5’AD LD-insert-Screening Amplimer (εικόνα 4.1) και 278R (ειδικός για τον BmSH3 clone) που εντοπίζεται 50 βάσεις μακριά από το μέχρι τότε γνωστό 5’ άκρο (πίνακας 3.2 και εικόνα 4.2). Μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης στα προϊόντα της δεύτερης PCR, βρέθηκε ένα ειδικό προϊόν μεγέθους 400 bp στο δείγμα της χοριογενικής βιβλιοθήκης σε αντίθεση με το δείγμα της βιτελλογενικής βιβλιοθήκης, από το οποίο δεν ανιχνεύτηκε ειδικό προϊόν (εικόνα 4.3 Β).



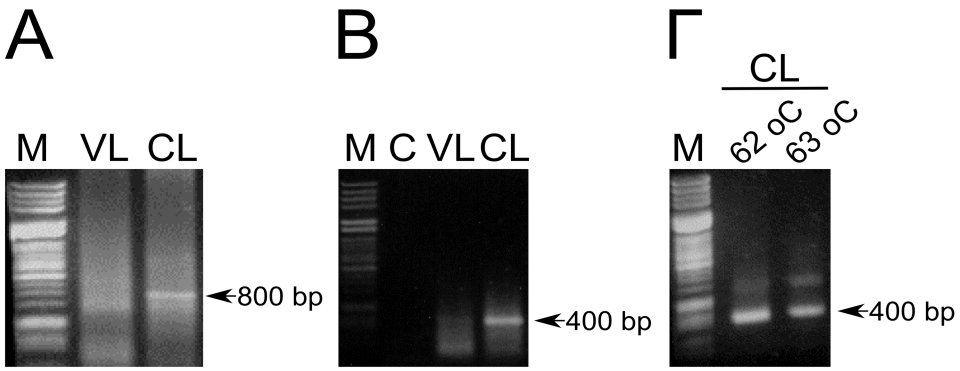
Εικόνα 4.1: Η περιοχή πολυσύνδεσμου του φορέα άκφρασης pGAD424 (Clontech). Παρουσιάεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία του πολυσυνδέσμου με τις θέσεις αναγνώρισης των μοναδικών περιοριστικών ενζύμων (με έντονη γραμματοσειρά) και την αλληλουχία των εκκινητών GAL4 AD Sequencing primer και MATCHMAKER 5'AD LD-Insert-Screening Amplimer.



Εικόνα 4.2: Σχηματική παράσταση του cDNA του BmSH3 και της σχετικής θέσης των εκινητών 378R και 308R. Παρουσιάζεται και η σχετική θέση των SH3 και SoHo περιοχών με μαύρα και γκρι πλαίσια αντίστοιχα. Με * συμβολίζεται η θέση του κωδικονίου λήξης της μεταγραφής.

Για τον εμπλουτισμό της αντίδρασης σε ειδικότερο και καθαρότερο προϊόν, η ένθετη PCR της χοριογενικής βιβλιοθήκης επαναλήφθηκε σε υψηλότερες θερμοκρασίες ανασύνδεσης (62 ^{o}C - 63 ^{o}C, εικόνα 4.3 Γ). Μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% έγινε η απομόνωση του ειδικού προϊόντος των 400 bp, το οποίο υποκλωνοποιήθηκε στον T-φορέα (κεφάλαιο 3.4.3). Η αλληλουχία αυτή υποκλωνοποίηθηκε στον φορέα pBSK(+) και πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης της με τη χρήση εκκινητή ειδικού για τον pBSK(+) (πίνακας 3.2) και του 378R (πίνακας 3.2). Η στοίχιση της νέας αλληλουχίας που προέκυψε από την PCR με την ήδη γνωστή αλληλουχία με το πρόγραμμα Bioedit (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) οδήγησε στην αναγνώριση επιπλέον

227 βάσεων (εικόνα 4.4). Συνολικά, η γνωστή BmSH3 cDNA αλληλουχία ανήλθε σε 5921 nt (παράρτημα ΙΙ) με ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 3090 nt που κωδικοποιεί πρωτεΐνη 1030 αα (παράρτημα ΙΙΙ). I*n silico* ανάλυση ταυτοποίησε 2 πιθανά κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης (εικόνα 4.4), χωρίς όμως να έχει επιβεβαιωθεί ένα από αυτά ως το κωδικόνιο έναρξης.



Εικόνα 4.3: PCR για απομόνωση επιπλέον 5' αλληλουχίας από βιτελλογενική (VL) και χοριογενική (CL) cDNA βιβλιοθήκη. Τα προϊόντα της κάθε αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε 1% πήκτωμα αγαρόζης. (Α) Προϊόντα της PCR της VL και CL με τους εκκινητές GAL4ADSequencing και 378R. (Β) Προϊόντα της PCR της Α με τους εσωτερικούς εκκινητές Matchmaker 5'AD LD-insert-Screening Amplimer και 278R. (Γ) Επανάληψη της PCR της Β σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες ανασύνδεσης: 63 ^{o}C και 64 ^{o}C. Εμφανίζεται ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών λΦDNA Hinc/HindIII (M).

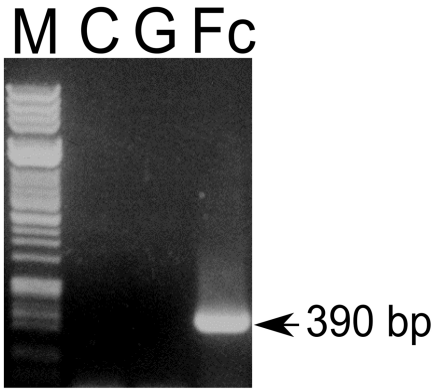
```
  1 CCAGAACATAATAGTAATGGAAAAACTGATGCCAACATTAAAACGATACCGATTTCGATG 60
     P  E  H  N  S  N  G  K  T  D  A  N  I  K  T  I  P  I  S  M
 61 AGCGATAACAATTTTCAAACTAAAGAAGAAATAACACAACGTTCAACTGTAACTGAACAT 120
     S  D  N  N  F  Q  T  K  E  E  I  T  Q  R  S  T  V  T  E  H
121 AAGATAAATGAAATCGAAGAAATTAAGACAATCAAGAAGATAGTTTTGAACGAATACGAT 180
     K  I  N  E  I  E  E  I  K  T  I  K  K  I  V  L  N  E  Y  D
181 AGAATGCGGGATACCAGAGAAGACGATTATTCTAAAATTATTCGCGATAGAAATAATCAT 240
     R  M  R  D  T  R  E  D  D  Y  S  K  I  I  R  D  R  N  N  H
```

Εικόνα 4.4: Νουκλεοτιδική και αμινοξική αλληλουχία της επέκτασης που ταυτοποιήθηκε με την μέθοδο της PCR από τη χοριογενική cDNA βιβλιοθήκη (εικόνα 4.3 Γ). Διακρίνεται με μπλέ επισήμανση η ήδη γνωστή αλληλουχία, με έντονους χαρακτήρες τα πιθανά κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης, και με υπογεγράμμιση η αλληλουχία που αντιστοιχεί στον εκκινητή 43F.

Για την πιστοποίηση της νέας επέκτασης *in vivo*, χρησιμοποιήθηκαν δύο εκκινητές 43F και 430R (εικόνα 4.4 και πίνακας 3.2), για την ενίσχυση αντίστροφα μεταγραμένου ολικού RNA (cDNA) που απομονώθηκε από επιθηλιακά κύτταρα των χοριογενικών ωοθυλακίων νύμφης έκτης ημέρας. Οι εκκινητές επιλέχτηκαν έτσι ώστε ο ανοδικός (43F) να εντοπίζεται στην νέα αλληλουχία (εικόνα 4.4) ενώ ο καθοδικός

(430F) να εντοπίζεται στην αλληλουχία που είχε ήδη κλωνοποιηθεί. Επιπλέον, οι εκκινητές επιλέχτηκαν έτσι ώστε να ανήκουν σε διαφορετικά εξόνια.

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης. Αναγνωρίστηκε ένα προϊόν μεγέθους 390 bp (εικόνα 4.5), το οποίο μετά από προσδιορισμό της πρωτοδιάταξης της αλληλουχίας βρέθηκε ότι ταυτίζεται με την αλληλουχία των 400bp που απομονώθηκε με την μέθοδο της ένθετης PCR στη χοριογενική βιβλιοθήκη.



Εικόνα 4.5: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR με το ζεύγος εκκινητών 43F και 430R από αντίστροφα μεταγραμμένο ολικό RNA που είχε απομονωθεί από θυλακοκύτταρα (Fc) αναπτυσσόμενης ωοθήκης από νύμφη έκτης ημέρας. Αναγνωρίστηκε ένα μοναδικό προϊόν μεγέθους 390 bp. Εμφανίζεται ο αρνητικός μάρτυρας απουσία DNA (C), τα προϊόντα της αντίδρασης κατά την ίδια αντίδραση με εκμαγείο γενωμικό DNA (G) και ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών λΦDNA HincII/HindIII (M).

4.3.2. ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΗΣ ΥΠΑΡΞΗΣ IN VIVO ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΕΙ ΤΗΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΤΟΥ BmSH3 cDNA.

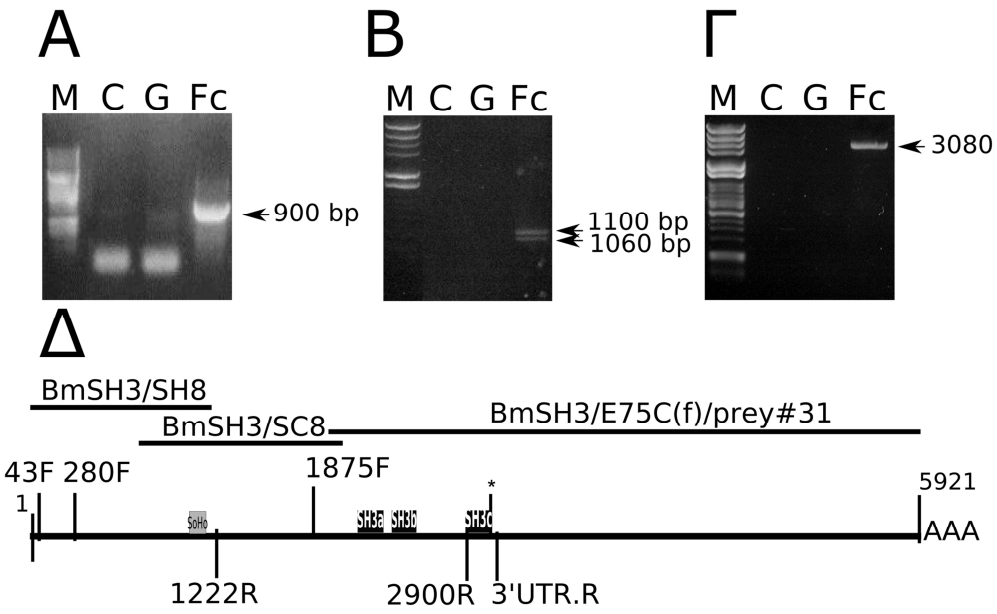
Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η BmSH3 cDNA αλληλουχία που έχει κλωνοποιηθεί στον φορέα pBSK(+) είναι αποτέλεσμα της ανασύνδεσης διαφορετικών τμημάτων που ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν και από το σύστημα δύο υβριδίων στη ζύμη και από διαδοχικές σαρώσεις της βιτελλογενικής cDNA βιβλιοθήκης (K. Ito και K. Iatrou, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Επιπλέον, όπως περιγράφτηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, ανιχνεύτηκε μια επιπλέον 5' αλληλουχία από τη χοριογενική βιβλιοθήκη η οποία προστέθηκε στην υπάρχουσα αλληλουχία.

Για την πιστοποίηση της *in vivo* μεταγραφής ενός RNA που περιέχει την αλληλουχία του διαθέσιμου cDNA με RT-PCR σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές, τα ζεύγη 280F και 1222R, 1875F και 2900R (εικόνα 4.6 Δ, πίνακας 3.2) εκατέρωθεν

των περιοχών ανασύνδεσης των κομματιών που απομονώθηκαν από προηγούμενες εργασίες.

Για την ενίσχυση ολόκληρης της περιοχής του κλωνοποιημένου cDNA με RT-PCR από ολικό RNA από τα θυλακοκύτταρα ωοθήκης νυμφών έκτης ημέρας χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος των εκκινητών 43F και 3'UTR.R (πίνακας 3.2).

Η ανάλυση των προϊόντων των αντιδράσεων RT-PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Τα προβλεπόμενα από του BmSH3 cDNA μεγέθη είναι 938 bps για το ζεύγος των 280F και 1222R και 1025 bps για το ζεύγος των 1875F και 2900R. Τα αποτελέσματα (εικόνα 4.6 A, B) δίνουν για κάθε περίπτωση ένα προϊόν στο αναμενόμενο μοριακό βάρος, με εξαίρεση την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων της RT-PCR για τους εκκινητές 1875F και 2900R (πίνακας 3.2), όπου η αντίδραση έδωσε ένα επιπλέον προϊόν, μήκους περίπου 1040 bp, μικρότερο του αναμενόμενου μοριακού μεγέθους των 1100 bp (εικόνα 4.6 B). Μετά από κλωνοποίηση και εύρεση της αλληλουχίας του προϊόντος των 1040 bp βρέθηκε ότι αυτό αντιστοιχεί στην BmSH3 αλληλουχία και το μικρότερο μέγεθος της ζώνης οφείλεται σε έλλειψη 60 bp από το κλωνοποιημένο BmSH3 cDNA (παράρτημα ΙΙ). Έτσι, αναγνωρίστηκε ένα νέο πιθανό μετάγραφο το οποίο ονομάστηκε BmSH3-A2, ενώ το μετάγραφο που αντιστοιχεί στην κλωνοποιημένη cDNA αλληλουχία ονομάστηκε BmSH3-A1. Με αυτές τις ονομασίες παρουσιάζονται τα μετάγραφα του γονιδίου *bmsh3* στη συνέχεια.



Εικόνα 4.6: RT-PCR για επιβεβαίωση της αυθεντικότητας της αλληλουχίας του κλώνου BmSH3. (Α) RT-PCR σε δείγματα από RNA θυλακοκυττάρων με το ζεύγος των υποκινητών 280F και 1222R. (Β) RT-PCR στα ίδια δείγματα με το ζεύγος των υποκινητών 1875F και 2900R. (Γ) RT-PCR στα ίδια δείγματα για ενίσχυση του πλήρους μήκους του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης με το ζεύγος των υποκινητών 43F και 3'UTR.R. Παρουσιάζονται ο μάρτυρας μοριακού μεγέθους λΦDNA HincII/HindIII (M), ο αρνητικός μάρτυρας απουσία DNA (C) και τα προϊόντα της αντίδρασης με εκμαγείο γενωμικό DNA (G). (Δ) Γραφική παρουσίαση του cDNA του BmSH3 και της θέσης των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις αναλύσεις RT-PCR. Παρουσιάζονται οι σχετικές θέσεις των κλώνων BmSH3/SH8, BmSH3/SC8, BmSH3/E75C(f)prey#31, όπως αυτοί απομονώθηκαν σε προηγούμενες εργασίες (K. Ito and K. Iatrou αδημοσίευτα αποτελέσματα). Το σημείο 1 αντιστοιχεί στο κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης και το * στο κωδικόνιο λήξης αυτής.

Σε κάθε περίπτωση ενισχύθηκε τμήμα που αντιστοιχεί στην αναμενόμενη cDNA αλληλουχία του BmSH3, όπως πιστοποιήθηκε μετά από αλληλούχιση των προϊόντων των αντιδράσεων.

Ακολούθησε η επιβεβαίωση της πρωτοταγούς δομής του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του BmSH3-A1 με το ζεύγος των εκκινητών 43F και 3'UTR.R (πίνακας 3.2). Μετά από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης αναγνωρίστηκε μόνο ένα ειδικό προϊόν μεγέθους 3100 bp στη διαδρομή που περιέχει το δείγμα από το RNA των θυλακοκυττάρων (εικόνα 4.6 Γ). Η αλληλουχία της BmSH3-A1 επιβεβαιώθηκε μετά από αλληλούχιση του προϊόντος της αντίδρασης RT-PCR. Με αυτόν τον τρόπο ταυτοποιήθηκε ένα μετάγραφο στα επιθηλιακά κύτταρα των ωοθυλακίων της αναπτυσσόμενης ωοθήκης, το οποίο αντιστοιχεί στην κλωνοποιημένη cDNA αλληλουχία του BmSH3-A1. Λόγω της μικρής διακριτικής ικανότητας στις

περιοχές υψηλών μοριακών μεγεθών στη συγκεκριμένη ανάλυση, δεν κατέστη δυνατή η αναγνώριση του μικρότερου εναλλακτικού μεταγράφου που εμφανίζει την έλλειψη και ανιχνεύτηκε με τους εκκινητές 1875F–2900R (πίνακας 3.2).

4.3.3. IN SILICO ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

Ακολούθησε *in silico* μετάφραση του συνόλου της διαθέσιμης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και προσδιορισμός πιθανών γνωστών προτύπων μοτίβων για την πρωτεΐνη BmSH3 (εικόνα 4.7) με τα διαδικτυακά προγράμματα της βιβλιοθήκης Expasy **(**www.expasy.org**).**

```
PEHNSNGKTDANIKTIPISMSDNNFQTKEEITQRSTVTEHKINEIEEIKTIKKIVLNEYD      60
RMRDTREDDYSKIIRDRNNHSDKSSRVRRNEDFRQESPSKERPILPRNGCHNPQNEENNK     120
RSWSSLSSTYDQYKSEHENLTSTSVEFPSGEVVTIKPPVKSPSTHTPANVPSPTTKQTVM     180
ITPTFKARSTSPAVWRPGAPTPPPAPSTPRSPGGPPPPPPPPVWTPGSAEPSPQPTRKTF     240
RPVHFEETPPSRRKFANTEQNGCTSGSESEGRLRTSQSAPATGLNTLSGSSSTSRLPRVQ     300
NPTVTLLQKAREGQLPRGPATLQSERDSARLPRDRPSPPSGDPVHALRREYASESEAERR     360
DYERIGVRKMSDTRQKVDGVGPITKDGMPITLRSEVKDPSRWYKKMYDTIHKNKYDDDYV     420
TIRYKSRREAAERVPSSKSQYAYFDPRSGYLSEPEGGLSRLSAFSDAYDSDVTTGPRRRT     480
ASVQEDRRISDVSSSYLSNNKYSTLASARASQEVYKNQPGRIENYVPGKSSVVDKEAKQW     540
WDEVMDIFDGQNISSTTSLPQPSPKEKKDITAAILSKSNMAKALKESGYESDSTLIFRRR     600
EETDAPLSPAERRAAYRDLQAGGEPPLRGFRSPAPPRQETDSAPEPPRRTQHGSYSDAES     660
PRRYVESDVNIHYRCPVRHDPLPLVPERELARQQAEHMKRLYREQKRNKYLQELQDMQNR     720
RHQDNFTPSQKTVVPLNRYDDADKVLAKALYTFNGQTSRELSFRKGDIIFVRRQIDANWY     780
EGEIHGRIGLFPYNYVEIQKGDTIQVIKKPSIIEGRARAKFDFIAQTNLELPLKKGEVVT     840
LTRRIDQNWWEGRNGLKTGIFPDSYVTILQEPSQSKPDPRPILNTDKPAASPAAHGLLNG     900
SDKRSMGSHSYTPQQNNPALSNAPPSTQPLPGYVAKPAQATLTPSERGYGPPTGSGVDLN     960
NTEPLYVDTNAEAIPYRAMYKYRPQNPDELELNEGDTVYVLEKCDDGWYVGSSQRTGRFG    1020
    TFPGNYVERI                                                  1030
```

Εικόνα 4.7: Αμινοξική αλληλουχία της BmSH3-A1. Με σκούρο γκρίζο επισημαίνονται οι SH3 περιοχές, ενώ με ανοιχτό γκρί η SoHo περιοχή. Με έντονους μαύρους χαρακτήρες επισημαίνονται οι δύο μεθειονίνες. Τα αμινοξέα που απουσιάζουν από την BmSH3-A2 παρουσιάζονται με πλάγια γραφή. Οι περιοχές πλούσιες σε προλίνη, πιθανές περιοχές πρόσδεσης των περιοχών SH3, είναι υπογραμμισμένες. Με έντονα θαλασσί γράμματα επισημαίνεται η τάξης Ι περιοχή πρόσδεσης των SH3 περιοχών και με έντονα κόκκινα γράμματα η τάξης ΙΙ.

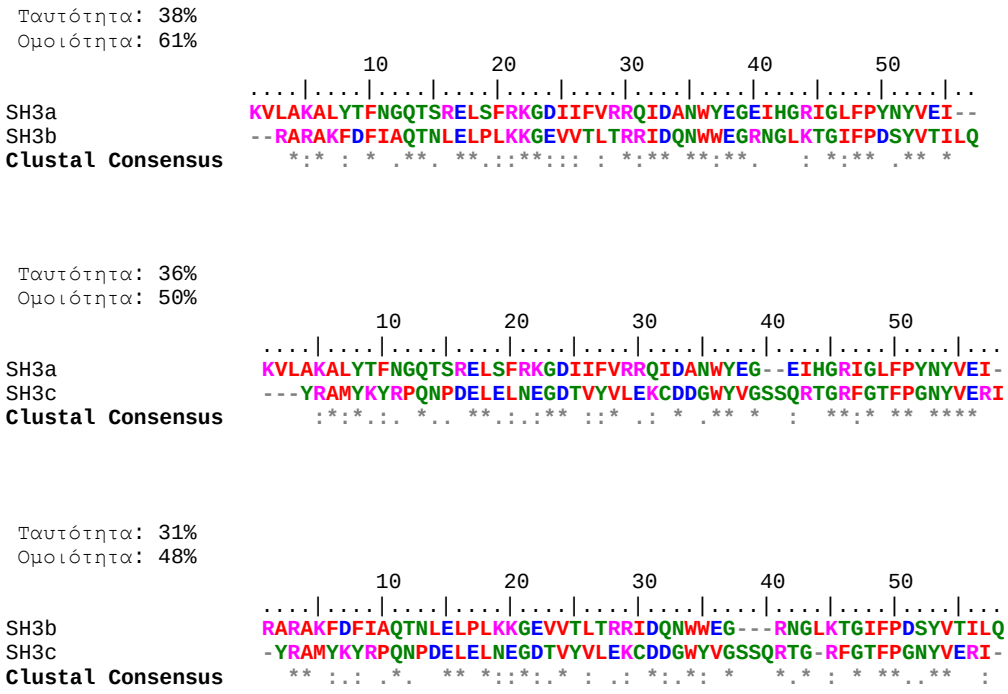
4.3.4. ΚΥΡΙΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ BmSH3.

Η *in silico* μετάφραση του BmSH3-A1 έδειξε ότι το πλήρες ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης του κλωνοποιημένου cDNA κωδικοποιεί πρωτεΐνη 1030 αμινοξέων με προβλεπόμενη μοριακή μάζα 116 kDa (εικόνα 4.7). Αν το πρώτο κωδικόνιο ATG αποτελεί πράγματι το σημείο έναρξης της μετάφρασης, τότε το BmSH3-A1 cDNA κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 1011 AA, με προβλεπόμενη μοριακή μάζα 114 kDa. Η ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας της BmSH3 αποκάλυψε συγκεκριμένα πρότυπα (εικόνες 4.7 και 4.8). Σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας της BmSH3 με τη βάση δεδομένων του NCBI έδειξε την ύπαρξη τριών SH3 περιοχών στο καρβοξυ-τελικό άκρο και μιας περιοχής SoHo προς το αμινο-τελικό άκρο.

Εικόνα 4.8: Σχηματική παρουσίαση της αμινοξικής αλληλουχίας της BmSH3-A1. Επισημαίνονται η σχετική θέση των συντηρημένων περιοχών. Τα αντίστροφα βέλη υποδηλώνουν την παρουσία περιοχής με τις δύο PXXP επαναλήψεις. Η υπόλοιπη αμινοξική αλληλουχία δεν εμφανίζει κάποια άλλη συντηρημένη πρωτοταγή ή δευτεροταγή δομή.

4.3.4.1. Περιοχές SH3

Στο καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης αναγνωρίστηκαν τρεις περιοχές SH3 (Src-Homology domain 3); (Zarrinpar et al., 2003), SH3A (αα 742–802), SH3B (αα 814–869) και SH3C (αα 976–1030) (εικόνες 4.7 και 4.8). Οι περιοχές SH3 εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, κυρίως πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε λειτουργίες του κυτταροσκελετού (βλ. κεφάλαιο 1.5, χαρακτηριστικά της οικογένειας CAV και η περιοχή SH3). Οι περιοχές SH3A και SH3B διαχωρίζονται από μια συνδετική περιοχή 17 αα, ενώ συνδετική αλληλουχία μεταξύ των SH3B και SH3C έχει μήκος στα 106 αα. Σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας των SH3 περιοχών της BmSH3-A1 (εικόνα 4.9) έδειξε μεγαλύτερη ομοιότητα μεταξύ των περιοχών SH3A και SH3B (39% ταυτότητα και 61% ομοιότητα), ενώ η περιοχή SH3C παρουσιάζει μεγαλύτερες αποκλίσεις (36% ταυτότητα και 50% ομοιότητα με την SH3A και 31% ταυτότητα και 48% ομοιότητα με την SH3B).



Εικόνα 4.9: Στοίχιση των περιοχών SH3 της BmSH3-A1 με το πρόγραμμα ClustalW2 και Bioedit. Παρουσιάζεται η στοίχιση των SH3A/SH3B, SH3A/SH3C και SH3B/SH3C. Ο μονογράμματος συμβολισμός των αμινοξέων παρουσιάζεται με διαφορετικό χρώμα ανά τύπο αμινοξέως (με βάση τον χρωματικό κανόνα του προγράμματος clustal, όπου με κόκκινο συμβολίζονται τα μικρά υδροφοβικά αμινοξέα μαζί με τα αυτά που περιλαμβάνουν αρωματικό δακτύλιο, αμινοξέα: AVFPMILW, με μπλε τα όξινα αμινοξέα, αμινοξέα: DE, με μωβ τα βασικά, αμινοξέα: RK και με πράσινο όσα περιέχουν πλευρική αλυσίδα με σουλφιδρική αμινική ή υδροξυλική αλυσίδα, αμινοξέα: STYHCNGQ) για την ευκολότερη ανάγνωση των όμοιων. Στην τελευταία γραμμή όπου εμφανίζεται το σύμβολο «*» η στήλη περιέχει το ίδιο αμινοξύ, «:» αμινοξέα με αρκετά συντηρημένες ιδιότητες, με «.» αμινοξέα με χαμηλά συντηρημένες ιδιότητες. (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/help/faq.html#24).

4.3.4.2. Περιοχή SoHo

Προς το αμινο-τελικό άκρο (αα 377-418) αναγνωρίστηκε περιοχή που εμφανίζει ομολογία με το πεπτίδιο sorbin (εικόνα 4.7 και 4.8) (Pansu et al., 1981; Vagne-Descroix et al., 1991) και ονομάζεται SoHo (Sorbin Homology Domain), (Kimura et al., 2001). Η στοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας με τις αντίστοιχες περιοχές άλλων οργανισμών εμφανίζει μεγάλη συντήρηση (εικόνα 4.10). Ο λειτουργικός ρόλος της περιοχής αυτής δεν είναι σαφής, εκτιμάται όμως ότι παίζει σημαντικό ρόλο στο μονοπάτι σηματοδότησης της ινσουλίνης και συγκεκριμένα στη διαμεταγωγή μηνυμάτων με τελικό αποτέλεσμα την σωστή απορρόφηση της γλυκόζης από τα κύτταρα ((Baumann et al., 2000; Chiang et al., 2001; Kimura et al., 2001) βλέπε και εισαγωγή 1.5).

```
                                        10        20        30        40
                                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|
BmSH3-A1 [Bombyx mori]          -DGVGPITKDGMPITLRSEVKD--PSRWYKKMYDTIHKNKY-DDD
PREDICTED [Tribolium.castaneum] -EGIGPTTKDGMPLILRSEVKDANQSKWYKKMYDTIHKQKP-HRD
PREDICTED.[Apis mellifera]      -EGIGPTSKEGIPLVLRSEVKENNQTKWYKKMYDSLHR-------
AGAP007717-PC [Anopheles.gambiae] -DGIGPITREGMPLTLRSEIDEGNRDKWYKQMYQTLHKTQD-DAD
DCAP [Drosophila melanogaster]  -DGIGPVTNDGMPIILRSEVKEPHQHEWYKRLYQTIHKQKN-GDD
vinexin [Rattus norvegicus]     -EGIGPVDESGMPIAPRSSVDS--PRDWYRRMFQQIHRKMP-D--
ArgBP2 [Mus musculus]           --GIGPVDESGIPTAIRTTVDR--PKDWYKTMFKQIHMVHKPDDD
ponsin [Homo.sapiens]           LSDVS-TDEVGIP--LRNT-ER--SKDWYKTMFKQIHKLNR-DDD
Clustal Consensus                 .:.   . *:*   *.  .      **: ::. :*
```

BmSH3-A1 [Bombyx mori]

PREDICTED: similar to DCAPL3 [Tribolium castaneum]

Identities = 69%, Positives = 79%

BmSH3-A1 [Bombyx mori]

REDICTED: similar to CAP CG18408-PC, isoform C [Apis mellifera]

Identities = 54%, Positives = 86%

BmSH3-A1 [Bombyx mori]

AGAP007717-PC [Anopheles gambiae str. PEST]

Identities = 58%, Positives = 81%

BmSH3-A1 [Bombyx mori]

DCAP [Drosophila melanogaster]

Identities = 65%, Positives = 78%

BmSH3-A1 [Bombyx mori]

vinexin [Rattus norvegicus]

Identities = 43%, Positives = 67%

BmSH3-A1 [Bombyx mori]

ArgBP2 [Mus musculus]

Identities = 40% Similarities = 62%

BmSH3-A1 [Bombyx mori]

CAP/ponsin [Homo sapiens]

Identities = 36% Similarities = 49%

Εικόνα 4.10: Στοίχιση της περιοχής SoHo της BmSH3-A1 με όμοιες περιοχές που είναι κατατεθειμένες στην βάση δεδομένων NCBI. Η στοίχιση έγινε με το πρόγραμμα ClustalW2 και η απεικόνηση των αποτελεσμάτων με το Bioedit. Παρουσιάζονται επίσης η ταυτότητα και η ομοιότητα στην περιοχή SoHo με τις παρόμοιες περιοχές, που βρέθηκαν στην βιβλιοθήκη NCBI. Ο μονογράμματος συμβολισμός των αμινοξέων λαμβάνει διαφορετικό χρώμα ανά αμινοξύ με βάση τα χαρακτηριστηκά τους, όπως και στην εικόνα 4.9.

4.3.4.3. ‘Αλλες περιοχές ενδιαφέροντος

Εκτός από τα συντηρημένα πρότυπα, που αναγνωρίστηκαν στην αλληλουχία της BmSH3-A1, ταυτοποήθηκαν και μερικές άλλες περιοχές που εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Κοντά στο αμινο-τελικό άκρο, μεταξύ των αμινοξέων 157 και 250 (εικόνα 4.7, 4.8) και συγκεκριμένα στις θέσεις 161 με 173, 197 με 209, 210 με 231 και 231 με 247, βρέθηκαν περιοχές πλούσιες σε προλίνη. Περιοχές που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη του βασικού προτύπου PXXP (P: Proline, X: οποιαδήποτε αμινοξύ) εμπλέκονται κυρίως σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και ειδικότερα σε αλληλεπιδράσεις με SH3 περιοχές. Με την χρήση ειδικών αλγορίθμων ανίχνευσης πιθανών αλληλουχιών πρόσδεσης SH3 περιοχών, όπως το πρόγραμμα SH3hunter, έγινε ένα επιπλέον στάδιο διαλογής των PXXP μοτίβων και αναγνώριση περιοχών πιθανής πρόσδεσης SH3 περιοχών (εικόνα 4.7). Οι θέσεις βρίσκονται διάσπαρτες σε όλο το μήκος της αμινοξικής αλληλουχίας. Συγκεκριμένα στις θέσεις 99, 332, 629 αναγνωρίστηκαν περιοχές αλληλεπίδρασεις της τάξης I και στις θέσεις 643, 682, 980 αναγνωρίστηκαν περιοχές αλληλπίδρασης της τάξης II (εικόνα 4.7, βλ. κεφάλαιο 1.5, περιοχές SH3).

Έγινε επίσης μια εκτίμηση της υποκυτταρικής κατανομής της BmSH3 με βάση την πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης με χρήση ειδικών διαδικτυακών εργαλείων. Τα συνολικά αποτελέσματα, που παρουσιάζονται στο παράρτημα IV, δεν έδωσαν σαφή εικόνα. Το εργαλείο NUCDISK (discrimination of nuclear localisation signals) της συλλογής προγραμμάτων PSORT (Nakai and Horton, 1999) προέβλεψε την παρουσία τριών σημάτων πυρηνικού εντοπισμού (NLS, Nuclear Localization Signal) στις θέσεις 174 αα (πρότυπο PPSRRKFA), 401 αα (πρότυπο PRRRTAS) και 489 αα (πρότυπο PSPKEKKDI) (παράρτημα IV) και χαρακτήρισε, με μεγάλη πιθανότητα, την πρωτεΐνη ως πυρηνική. Άλλα εργαλεία όμως, δεν προβλέπουν συγκεκριμένο υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης και μάλιστα μερικά, όπως το PredictNLS (παράρτημα IV), που απέτυχε να χαρακτηρίσει κάποιο NLS, έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα του PSORT. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα, για τον υποκυτταρικό εντοπισμό των ομόλογων πρωτεϊνών, συνηγορούν και με τις δύο προβλέψεις εφόσον διαφορετικές ισομορφές της ίδιας πρωτεΐνης βρίσκονται είτε στο κυτταρόπλασμα είτε στον πυρήνα

(Kawabe et al., 1999; Zhang et al., 2003). Από άλλες αναλύσεις της αμινοξικής αλληλουχίας της BmSH3 (προγράμματα targetP, PSORTII) δεν προβλέπεται έκκριση της πρωτεΐνης, παρουσία διαμεμβρανικών περιοχών ούτε υποκυτταρικός εντοπισμός σε κάποιο κυτταρικό οργανίδιο (παράρτημα IV).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης και η *in silico* πρόβλεψη τεσσάρων θέσεων φωσφορυλίωσης σερίνης (θέσεις 276, 371, 482, 490) και δύο θέσεων φωσφορυλίωσης θρεονίνης (θέσεις 480, 640) από κινάση εξαρτώμενη από το cAMP (PKA) καθώς και τριών θέσεων φωσφορυλίωσης σερίνης (θέσεις 371, 490, 511) και μίας θέσης φωσφορυλίωσης θρεονίνης (θέση 480) από κινάση εξαρτώμενη από το cGMP (PKG), (παράρτημα VII). Για την αλληλουχία της BmSH3 προβλέπονται επίσης δύο περιοχές φωσφορυλίωσης από την ERK2 (μοτίβο PX(S/T)P, όπου X, οποιαδήποτε αμινοξύ, στις θέσεις 211 και 608). Στην vinexin έχει διαπιστωθεί ότι αυτές οι θέσεις φωσφορυλιώνονται από την ERK2, αλλά αυτό συμβαίνει μόνο όταν υπάρχουν οι συντηρημένες περιοχές RRXXXXXXITL και FPFP, γνωστές ως D και DEF περιοχές αντιστοίχως. Στις ομόλογες πρωτεΐνες CAP/ponsin και ArgBP2 δε βρέθηκαν τα D και DEF πρότυπα αμινοξέων και επιπλέον δεν έχει παρατηρηθεί φωσφορυλίωση των αμινοξέων σερίνη/θρεονίνη του μοτίβου αναγνώρισης της ERK2 (PX(S/T)P). Στην αλληλουχία της BmSH3 δεν έχουν βρεθεί παρόμοιες περιοχές, οπότε η φωσφορυλίωση της σερίνης/θρεονίνης από την ERK2 σε αυτές τις θέσεις δεν θεωρείται πιθανή. Από το πρόγραμμα εύρεσης πιθανών περιοχών φωσφορυλίωσης GPS (Group-based Prediction System, (Xue et al., 2011) αναγνωρίστηκαν επίσης περιοχές αναγνώρισης της Abl κινάσης (θέσεις 911 και 949). Μάλιστα για την ArgBP2, εκτός από την αναγνώριση πιθανών περιοχών φωσφορυλίωσης καταλοίπων τυροσίνης από την Abl, επιβεβαιώθηκε και πειραματικά η φωσφορυλίωση των περιοχών αυτών στις CAP και vinexin (Wang et al., 1997; Mitsushima et al., 2004; Fernow et al., 2009). Στην BmSH3, αναγνωρίστηκαν *in silico* πολλαπλές πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης αμινοξικών καταλοίπων, τόσο από το πρόγραμμα GPS (Xue et al., 2011), όσο και από την βάση περιοχών φωσφορυλίωσης Phospho.ELM (Dinkel et al., 2011) (παράρτημα VIII). Στη παρούσα μελέτη δεν ήταν δυνατή η αξιολόγηση της πιθανής φωσφορυλίωσης των προβλεπόμενων περιοχών, όμως, η φωσφορυλίωση των ομόλογων πρωτεϊνών σε αντίστοιχες θέσης αυξάνει την πιθανότητα και η BmSH3 να υπόκειται σε αντίστοιχες φωσφορυλιώσεις.

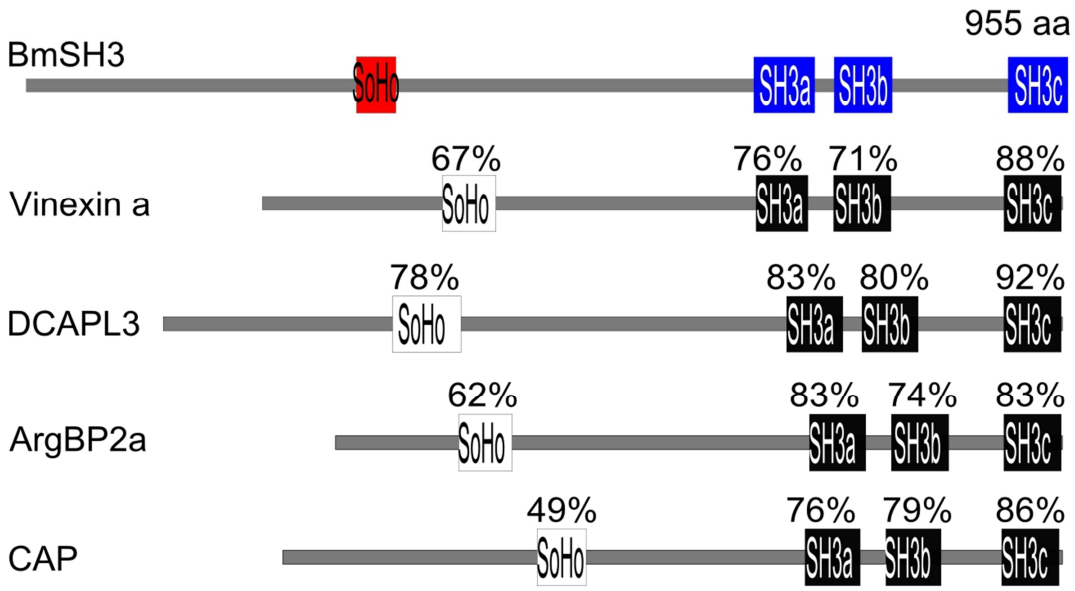
Τέλος, η *in silico* ανάλυση με τα εργαλεία πρόβλεψης που προσφέρει η βάση δεδομένων Expasy (Gasteiger et al., 2003) για πιθανές θέσεις αναγνώρισης πρωτεολυτικών ενζύμων ταυτοποίησε πιθανές θέσεις ενδοπρωτεασών. Το πρόγραμμα προέβλεψε ότι η θρομβίνη (thrombin) αναγνωρίζει αμινοξική αλληλουχία και επάγει θραύσεις στις θέσεις 107 και 477 ενώ για πρωτεάσες τύπου παράγοντα-Xa (factor-Xa like) οι αντίστοιχες θέσεις αναγνωρίστηκαν στα κατάλοιπα τις 816 και 853 της BmSH3-A1 (Παράρτημα VII).

4.3.4.4. Ομολογία της BmSH3-A1 με τις πρωτεΐνες της οικογένειας CAV.

Όπως προαναφέρθηκε (κεφάλαιο 1.4, 1.5.2, 4.3.4) η δευτεροταγής δομή της BmSH3-A1 με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας CAV είναι συντηρημένη, σε αντίθεση με τη συνολική πρωτοταγή της δομή, όπου εμφανίζει μικρή συντήρηση. Ομόλογες πρωτεΐνες ταυτοποιήθηκαν σε διάφορους ευκαρυωτικούς πολυκύτταρους οργανισμούς από τα πρώτιστα έως τα έντομα (Kioka et al., 2002).

Όπως έδειξε το εργαλείο σύγκρισης πρωτεϊνών blastp της βάσης δεδομένων NCBI (Gasteiger et al., 2003) η ομοιότητα της αλληλουχίας της πρωτεΐνης BmSH3-A1 με άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας CAV είναι μικρή (20-30%, παράρτημα V). Εξαίρεση παρουσιάζει η σύγκριση με την αλληλουχία της πρωτεΐνης DCAPL3 της *D. melanogaster* (Yamazaki and Nusse, 2002) και της προβλεπόμενης ομόλογης πρωτεΐνης από τα *Tribolium castaneum, Apis meliffera* και *Nasonia vitripennis*, όπου παρατηρήθηκε η ιδιαίτερα υψηλή ομοιότητα (57%, 56%, 59%, 60% αντιστοίχως) στο σύνολο της πρωτεΐνης (παράρτημα V). Από την άλλη, μεγάλη ομοιότητα αλλά και ταυτότητα εμφανίζεται για τις συντηρημένες περιοχές (εικόνα 4.11). Έτσι μεταξύ των πρωτεϊνών BmSH3-A1, vinexin a, DCAPL3, ArgBP2 και CAP, εμφανίζεται 50 με 69 % ταυτότητα και 76 με 83 % ομοιότητα για την περιοχή SH3A, 49 με 60% ταυτότητα και 71 με 80 % ομοιότητα για την περιοχή SH3B και 63 με 85% ταυτότητα και 83 με 92 % ομοιότητα για την περιοχή SH3C, αλλά και για τη περιοχή SoHo (36-64% AA ταυτότητα, εικόνες 4.9, 4.10 και 4.11).

Η εύρεση της ομοιότητας στο επίπεδο της δευτεροταγής δομής (μία περιοχή SoHo στο αμινο-τελικό άκρο και τρεις SH3 περιοχές στο καρβοξυ-τελικό άκρο) στο σύνολο των μελών της οικογένειας CAV είναι σημαντική γιατί με βάση τις κοινές ιδιότητες των υπόλοιπων μελών είναι δυνατή η υπόθεση της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης BmSH3.



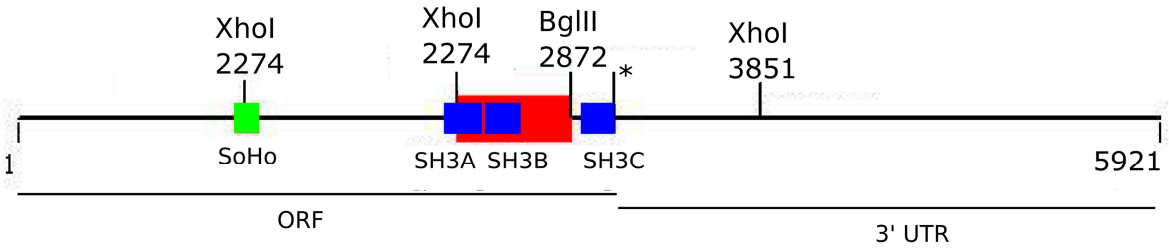
Εικόνα 4.11: Οι συντηρημένες μορφές και οι ομόλογες περιοχές των σημαντικότερων μελών της οικογένειας CAV. Παρουσιάζεται επίσης η σχετική επί τις εκατό ομοιότητα των συντηρημένων περιοχών. Η σύγκριση έχει γίνει με βάση τις συγκεκριμένες περιοχές της BmSH3 και τις ομόλογες περιοχές των άλλων πρωτεϊνών της οικογένειας CAV.

4.3.5. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ BmSH3

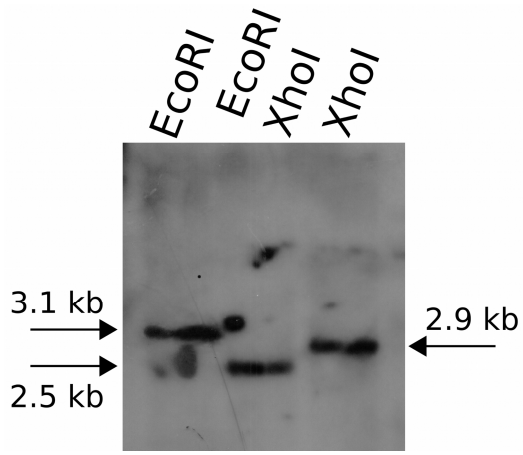
4.3.5.1. Προσδιορισμός του αριθμού των *bmsh3* γονιδίων στο γονιδίωμα του μεταξοσκώληκα.

Για τον προσδιορισμό του αριθμού των γονιδίων *bmsh3* στο γονιδίωμα του μεταξοσκώληκα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Southern σε γενωμικό DNA του *B. mori*. Το γενωμικό DNA επωάστηκε με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI, XhoI και EcoRI/XhoI και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των τριών δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης και μεταφορά σε νάιλον μεμβράνη. Ο ιχνηθέτης του υβριδισμού, κομμάτι 0.6 kb, που προήλθε από πέψη του cDNA του BmSH3-A1 με XhoI/BglII και περιλάμβανε

τις SH3A και SH3B περιοχές (2274–2875 nt, εικόνα 4.12) ραδιοσημάνθηκε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.12. Από την αυτοραδιογραφία της μεμβράνης μετά τον υβριδισμό ανιχνεύτηκαν ζώνες μοριακού μεγέθους 3,1 kb, 2,5 kb και 2,9 kb για το γενωμικό DNA που είχε επωαστεί με EcoRI, EcoRI/XhoI και XhoI αντίστοιχα (εικόνα 4.13). Για τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI και HindIII δεν προβλέπεται θέση αναγνώρισης στη γνωστή cDNA αλληλουχία του BmSH3-A1, ενώ το *Xho*I κόβει δύο φορές (εικόνα 4.12). Επιπλέον, κανένα από τα περιοριστικά ένζυμα δε κόβει τον ιχνηθέτη.



Εικόνα 4.12: Σχηματική παρουσίαση του BmSH3-A1 cDNA και της περιοχής που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του ραδιοσημασμένου ιχνηθέτη (κόκκινο πλαίσιο). Η περιοχή απομονώθηκε με πέψη του cDNA με XhoI/BglII και απομόνωση του κομματιού από την ηλεκτροφόρηση του σε αγαρόζη 1%. Διακρίνονται η περιοχή SoHo (πράσινο πλαίσιο) και οι SH3 περιοχές (μπλε πλαίσια). Με αστερίσκο επισημαίνεται η περιοχή λήξης της μετάφρασης. Επισημαίνονται επίσης το γνωστό ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) και η 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR).



Εικόνα 4.13: Αυτοραδιογραφία ανάλυσης κατά Southern γονιδιωματικού DNA του B. mori για τον προσδιορισμό του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου bmsh3 στο γονιδίωμα του μεταξοσκώληκα. Γενωμικό DNA υποβλήθηκε σε πέψη από τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI, συνδυασμό των EcoRI/XhoI και XhoI και υβριδισμό με περιοχή που απομονώθηκε με πέψη του cDNA του BmSH3-A1 με XhoI/BglII. Σε κάθε περίπτωση μία μόνο ζώνη (που αντιστοιχεί σε ένα προϊόν πέψης) υβριδίζει με τον ειδικό για την αλληλουχία BmSH3-A1 ραδιοσημασμένο ιχνηθέτη

Η αυτοραδιογραφία εμφάνισε μοναδική ζώνη (εικόνα 4.13), για κάθε πέψη του γενωμικού DNA του μεταξοσκώληκα, επιβεβαιώνοντας την παρουσία ενός και μόνο *bmsh3* γονιδίου στο γονιδίωμα του *B. mori*.

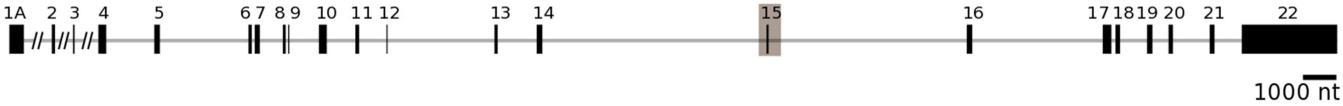
4.3.5.2. Προσδιορισμός των ορίων μεταξύ εξονίων και εσωνίων

Για τη διερεύνηση της δομής του *bmsh3*, έγινε σύγκριση της cDNA αλληλουχίας του BmSH3-A1 με την αλληλουχία του γονιδιώματος του μεταξοσκώληκα (NCBI: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, SilkDB: http://silkworm.genomics.org.cn/). Σημαντική πληροφορία για την αλληλοεπικάλυψη των γενωμικών κομματιών ανακτήθηκε από την σύγκριση του Κινέζικου (Xia et al., 2004) και του Ιαπωνικού (Mita et al., 2004) προγράμματος εύρεσης της πρωτοταγούς αλληλουχίας του γονιδιώματος του μεταξοσκώληκα (Duan et al., 2009, The International Silkworm Genome Consortium, 2008).

Μετά από στοίχιση της cDNA αλληλουχίας του BmSH3-A1 με τη γενωμική αλληλουχία του *B. mori*, εντοπίστηκε μοναδική νουκλεοτιδική αλληλουχία στο γονιδίωμα του μεταξοσκώληκα, που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 9. Η εύρεση μιας και μόνο γονιδιακής περιοχής συμφωνεί με τα αποτελέσματα της ανάλυσης κατά Southern (κεφάλαιο 4.3.5.1, εικόνα 4.13), που αναγνώρισαν ένα μοναδικό αντίγραφο του γονιδίου *bmsh3*.

Ο γονιδιακός τόπος του *bmsh3* εμφανίζεται μεγαλύτερος από 120 kb (εικόνα 4.14. Με τη σύγκριση της BmSH3-A1 cDNA αλληλουχίας με τη γονιδιακή αλληλουχία, ταυτοποιήθηκαν 22 εξόνια. Τα όρια των εξονίων προσδιορίστηκαν με βάση τον κανόνα των ακολουθιών των δότη και δέκτη στα όρια των εσωνίων (donor and acceptor sites). Έτσι προσδιορίστηκε η δομή του γονιδίου *bmsh3* (εικόνα 4.14). Όλα τα εσώνια/εξόνια ακολουθούν τον κανόνα του δότη και δέκτη, (GT/AG) εκτός του εσωνίου που εντοπίζεται στη περιοχή 1915-1916 nt όπου παρατηρήθηκε μια παραλλαγή του κανόνα, από το ζεύγος GC/AG (δε γίνεται παράθεση της γενωμικής αλληλουχίας λόγω του μεγέθους αυτής). Η διαφοροποίηση που παρατηρείται είναι γνωστή σε διαφορετικούς οργανισμούς και, αναφέρεται ως “σημείο ασθενούς παραλλαγής δότη GC” (weak variant GC donor sites, (Thanaraj and Clark, 2001) και έχει προταθεί ότι αποτελεί σημείο εναλλακτικής συρραφής. Όπως έδειξε η RT-PCR

ανάλυση, με τους εκκινητές 1875F και 2900R (πίνακας 3.2) εντοπίστηκε ένα εναλλακτικό μετάγραφο. Με σύγκριση της αλληλουχίας του BmSH3-A2 με την βάση δεδομένων στη βάση δεδομένων SilkDB ήταν δυνατή η αναγνώριση του εξονίου 15 ως το εξόνιο που απουσιάζει από το BmSH3-A2 (εικόνα 4.14). Η εύρεση αυτή είναι σε συμφωνία με την χρήση του σημείου ασθενούς παραλλαγής δότη GC και την πρόβλεψη για εναλλακτική συρραφή.



Εικόνα 4.14: Σχηματική παράσταση της κατανομής των εξονίων του bmsh3 στο γονιδίωμα του μεταξοσκώληκα. Με γκρίζο πλαίσιο επισημαίνεται το εξόνιο που απουσιάζει από το μικρότερο προϊόν, BmSH3-A2, που αναγνωρίστηκε κατά την ανάλυση RT-PCR (εικόνα 4.6) με τους εκκινητές 1875F-2900R (Πίνακας 3.3). Η αρίθμηση των εξονίων έχει γίνει με την παραδοχή ότι το πρώτο γνωστό εξόνιο είναι και το πρώτο εξόνιο του μετάγραφου.

Παρόλο ότι είναι πιθανό πως το πρώτο από τα δύο κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης που ταυτοποιήθηκαν στην αρχή της αλληλουχίας της BmSH3 είναι το σημείο έναρξης της μετάφρασης, δεν είναι σαφής η επιλογή αυτού ως κωδικόνιου έναρξης της μετάφρασης, διότι ενδέχεται να υπάρχει επιπλέον εσώνιο σημαντικού μήκους πριν από το σημείο έναρξης της κλωνοποιηθείσας ακολουθίας. Η νέα βάση δεδομένων SilkDB εκτός από τη δυνατότητα για στοίχιση αλληλουχιών έναντι της γενωμικής αλληλουχίας του μεταξοσκώληκα, ενσωματώνει και υπορουτίνες πρόβλεψης πιθανών γονιδίων και προβλέπει πιθανά εξόνια και εσώνια. Όταν έγινε η στοίχιση της BmSH3-A1 αλληλουχίας με τη γενωμική ακολουθία, βρέθηκε ότι η μηχανή πρόβλεψης μεταγράφων προβλέπει την ύπαρξη τριών ακόμα εξονίων, τα οποία προσθέτουν επιπλέον 909 νουκλεοτίδια στο υπάρχον ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (παράρτημα VI). Συνολικά 303 επιπλέον αμινοξέα είναι πιθανόν να αποτελούν μέρος του BmSH3-A1 με το συνολικό μήκος της πρωτεΐνης να φτάνει τελικά τα 1258 αμινοξέα.

Τέτοια πολυπλοκότητα στην οργάνωση του γονιδίου (μεγάλος αριθμός εξονίων, μεγάλης έκτασης γονιδιακός τόπος, εναλλακτική συρραφή) παρατηρείται και στα ομόλογα γονίδια του BmSH3, από τον άνθρωπο στη Δροσόφιλα (Lin et al., 2001; Yamazaki and Nusse, 2002).

4.3.6. ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΝΕΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ

Από τις προηγούμενες μελέτες έγινε σαφής η πολυπλοκότητα της μεταγραφής του *bmsh3*. Για την ανίχνευση νέων ισομορφών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ένθετης PCR σε δείγματα από τη βιτελλογενική και χοριογενική cDNA βιβλιοθήκη (Swevers et al., 2002b). Στην ένθετη PCR χρησιμοποιήθηκαν οι ειδικοί εκκινητές για τον φορέα pGAD424 αλλά διαφορετικοί ειδικοί εκκινητές για το κλωνοποιημένο cDNA, οι 2377R και 2464R (πίνακας 3.2), που εντοπίζονται στις SH3 περιοχές, SH3A και SH3B αντιστοίχως **(**εικόνα 4.15). Μετά τη δεύτερη ένθετη PCR ακολούθησε κλωνοποίηση των προϊόντων στον φορέα pBSK(+) και επιλογή των κλώνων μετά από την ανάπτυξη των αποικιών.

Εικόνα 4.15: Σχηματική παράσταση της θέσης των εκκινητών 2377R και 2464R, που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση νέων μετάγραφων του BmSH3, στην cDNA αλληλουχία του ***bmsh3-a1*.**

Από τις αποικίες που αναλύθηκαν, μόνο ένας κλώνος έδωσε νέα πληροφορία για το γονίδιο του BmSH3 καθώς βρέθηκε να περιέχει ένα νέο μετάγραφο του *bmsh3*, το BmSH3-B μεγέθους 1080 nt (εικόνα 4.16 Α).

Το μετάγραφο BmSH3-B διαφοροποιείται από τα υπόλοιπα (BmSH3-A1/2) στο 5' άκρο στη θέση 2137 του BmSH3-A1 (εικόνα 4.16 Β). Περιέχει αλληλουχία 96 νουκλεοτιδίων στο 5' άκρο (εικόνα 4.16 Α) που αντιστοιχεί σε ένα νέο εξόνιο, το 1Β (εικόνα 4.16 Β) το οποίο περιλαμβάνει την κωδικοποιούσα αλληλουχία (6 κωδικόνια) και την 5' αμετάφραστη περιοχή (5' UTR) μήκους 78 nt. Το συνολικό ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της BmSH3B αποτελείται από 972 νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν 324 αμινοξέα με προβλεπόμενο μοριακό βάρος 36,3 kDa. *In silico* μελέτη της αμινοξικής αλληλουχίας της BmSH3-B έδειξε ότι αυτή δε περιέχει την SoHo περιοχή (εικόνα 4.16 Α). Η μοναδική ειδική για την BmSH3-B αλληλουχία στο αμινο-τελικό άκρο δεν προσδίδει κάποιο αναγνωρίσιμο χαρακτηριστικό στην δομή της πρωτεΐνης.

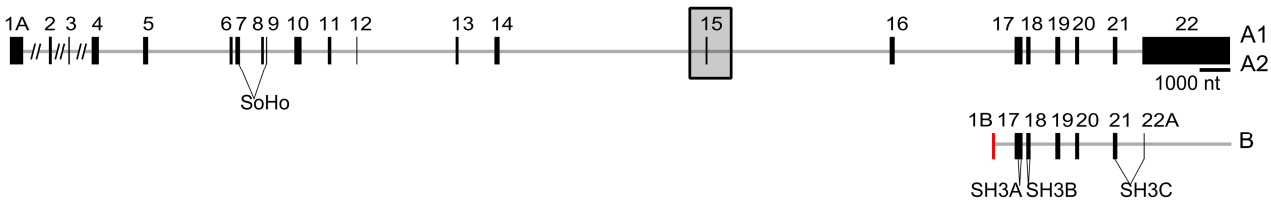
Μετά από σύγκριση της cDNA αλληλουχίας της BmSH3-B με την κατατεθειμένη γενωμική αλληλουχία του *B. mori* ταυτοποιήθηκαν επτά εξόνια, από τα οποία τα τελευταία έξι εξόνια, στο 3' άκρο, είναι κοινά με αυτά των μεταγράφων BmSH3-A1/A2 και κωδικοποιούν για τις SH3 περιοχές. Το πρώτο εξόνιο, στο οποίο βρέθηκε κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης ATG και μέρος της 5' αμετάφραστης αλληλουχίας, είναι ειδικό για τη συγκεκριμένη ισομορφή. Λόγω της διαφορετικής χρήσης κωδικονίου έναρξης της μετάφρασης αλλά και της διαφορετικής 5' αμετάφραστης περιοχής η επιλογή του μεταγράφου BmSH3-B πιθανώς να γίνεται με τη χρήση εναλλακτικού υποκινητή, προσδίδοντας στο εναλλακτικό μετάγραφο διαφορετική λειτουργικότητα. Η γνωστή 3'UTR, 100 βάσεις, τουλάχιστον μέχρι την περιοχή που προσδένεται ο εκκινητής 3'UTR.R είναι ίδια. Συνεπάγεται ότι η 3' αμετάφραστη περιοχή είναι η ίδια για τις δύο ισομορφές, BmSH3-A και BmSH3-B.

Παρόλο που από την ανάλυση τύπου northern (κεφάλαιο 4.3.7.2, και 4.3.7.3, εικόνα 4.18, 4.21) υπήρξαν ενδείξεις για την ύπαρξη επιπλέον πιθανών εναλλακτικών μετάγραφων, δεν ήταν δυνατή η αναγνώριση άλλων μετάγραφων. Ίσως η επιλογή των συγκεκριμένων εκκινητών να μην ήταν η κατάλληλη για την αναγνώριση νέων μετάγραφων ή η cDNA βιβλιοθήκη που χρησιμοποιήθηκε να μην ήταν ιδιαίτερα εμπλουτισμένη στα επιπλέον μετάγραφα που ανιχνεύσαμε. Η ανίχνευση και ταυτοποίηση όλων των εναλλακτικών μετάγραφων του *bmsh3* θα μπορούσε να συνεισφέρει περαιτέρω στην κατανόηση της λειτουργίας του γονιδίου, αλλά δεν επιδιώχθηκε στην παρούσα διατριβή λόγω της επικέντρωσης των μελετών στα λειτουργικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης BmSH3-A1.

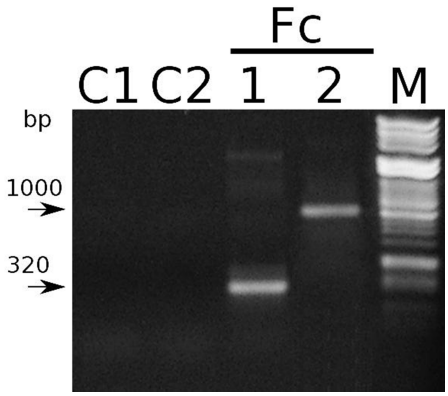
A)

```
agtaagcgtgcgtgagagttggacgcggaaaccgcgttattgttgctttcaagattaagc    60
aaaatttaaattattaaaatgctggacagattgttggagctgcaagatatgcaaaacagg   120
       *          M  L  D  R  L  L  E  L  Q  D  M  Q  N  R      17
cgtcaccaagacaacttcacgccttcacagaagaccgtagtccctctgaacagatacgac   180
 R  H  Q  D  N  F  T  P  S  Q  K  T  V  V  P  L  N  R  Y  D     37
gatgccgacaaagttcttgcaaaagccctatacactttcaacggtcagacttctcgagaa   240
 D  A  D  K  V  L  A  K  A  L  Y  T  F  N  G  Q  T  S  R  E    57
ctcagttttagaaaaggagatataatatttgtgcgaaggcagattgacgcgaattggtac   300
 L  S  F  R  K  G  D  I  I  F  V  R  R  Q  I  D  A  N  W  Y    77
gaaggtgaaattcatggaagaattgggctgttcccgtataattatgtagagatacagaag   360
 E  G  E  I  H  G  R  I  G  L  F  P  Y  N  Y  V  E  I  Q  K    97
ggtgatacaatccaagttattaagaagccgtcaatcatcgagggccgtgccagggcgaag   420
 G  D  T  I  Q  V  I  K  K  P  S  I  I  E  G  R  A  R  A  K   117
tttgatttcatagcacagaccaatctcgaactgccattgaagaaaggagaagttgtgact   480
 F  D  F  I  A  Q  T  N  L  E  L  P  L  K  K  G  E  V  V  T   137
ttgacaagacgtattgaccagaactggtgggaaggccgaaacggcttaaaaactggaata   540
 L  T  R  R  I  D  Q  N  W  W  E  G  R  N  G  L  K  T  G  I   157
ttcccggacagctatgttacaattctacaggaacccagccagagcaaacctgatccgagg   600
 F  P  D  S  Y  V  T  I  L  Q  E  P  S  Q  S  K  P  D  P  R   177
ccaatcttaaacaccgataagccagcggcgtcaccggccgctcacggtcttctcaacggt   660
 P  I  L  N  T  D  K  P  A  A  S  P  A  A  H  G  L  L  N  G   197
tccgataaaagaagtatgggttctcatagctacacgccacagcagaacaatccagcgctc   720
 S  D  K  R  S  M  G  S  H  S  Y  T  P  Q  Q  N  N  P  A  L   217
tctaatgcgccaccttccactcagccacttcccggttatgtggcgaaaccagcccaagcg   780
 S  N  A  P  P  S  T  Q  P  L  P  G  Y  V  A  K  P  A  Q  A   237
acacttacaccttccgaacgtggttacggacctccaacaggctcgggggtagatcttaat   840
 T  L  T  P  S  E  R  G  Y  G  P  P  T  G  S  G  V  D  L  N   257
aacaccgaacccctgtacgtcgacactaatgccgaagccatacatatcgtgcgatgtac    900
 N  T  E  P  L  Y  V  D  T  N  A  E  A  I  P  Y  R  A  M  Y   277
aaataccggcctcaaaatcctgacgagctcgaactgaacgagggtgatacggtgtacgta   960
 K  Y  R  P  Q  N  P  D  E  L  E  L  N  E  G  D  T  V  Y  V   297
ctggagaaatgcgacgacggctggtacgtcggctcaagccagagaaccggccgcttcggt  1020
 L  E  K  C  D  D  G  W  Y  V  G  S  S  Q  R  T  G  R  F  G   317
accttcccaggcaactacgtggagcgtatctgatagcgcgagacgtcgctgttccgtcgg  1080
 T  F  P  G  N  Y  V  E  R  I  *  *                           327
```

B)



Εικόνα 4.16: Ανάλυση του εναλλακτικού μετάγραφου BmSH3-B. Α) Παρουσίαση της νουκλεοτιδικής και αμινοξικής αλληλουχίας της BmSH3-B. Με έντονους χαρακτήρες επισημαίνονται οι περιοχές SH3. Στο γκρί πλαίσιο επισημαίνεται το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης. Η υπογραμμισμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία αντιστοιχεί στους υποκινητές 8bF και 3'UTR.R, αντιστοίχως που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση ολόκληρου του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης ή τμήμα αυτού (πίνακας 3.2). Η υπογραμμισμένη αμινοξική αλληλουχία αντιστοιχεί στη μοναδική αμινοξική αλληλουχία του BmSH3-B. Β) Σχηματική παράσταση της κατανομής εξονίων του BmSH3-B (κάτω διάγραμμα) σε σύγκριση με τη κατανομή των εξονίων του BmSH3-A1 (επάνω διάγραμμα). Το BmSH3-B μετάγραφο αποτελείται από τα εξόνια 17 έως 21 και μικρό τμήμα του εξονίου 22, ενώ το πρώτο εξόνιο 1Β είναι μοναδικό. Το εξόνιο 15 αποτελεί τμήμα του Α1 αλλά απουσιάζει από το Α2.



Εικόνα 4.17: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RT-PCR για τον BmSH3-B με τα ζεύγη των εκκινητών 8bF-2377R (1) 8bF και 3'UTR.R (2) σε αντίστροφα μεταγραμμένο RNA επιθηλιακών κυττάρων αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων. Παρουσιάζονται ο μάρτυρας μοριακού μεγέθους HincII/HindIII (M), ο αρνητικός μάρτυρας απουσία DNA (C1) για το πρώτο ζεύγος εκκινητών και (C2) για το δεύτερο ζεύγος. Αναγνωρίστηκε μία ζώνη στο αναμενόμενο μοριακό μέγεθος και στις δύο αντιδράσεις με το αντίστροφα μεταγραμμένο RNA από θυλακοκύτταρα (Fc).

Για την επιβεβαίωση της μεταγραφής ενός προϊόντος που αντιστοιχεί στην cDNA αλληλουχία του BmSH3-B έγινε RT-PCR σε ολικό RNA που απομονώθηκε από επιθηλιακά κύτταρα των θυλακοκυττάρων αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων με τα ζεύγη των εκκινητών 8Fb (εντοπίζεται στο 5' UTR του BmSH3-B), και του 2377R (χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της ισομορφής) και του 8Fb με τον 3'UTR.R (πίνακας 3.2, εικόνα 4.16 Α). Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης (εικόνα 4.17) έδειξε την παρουσία μιας ειδικής ζώνης στο αναμενόμενο μέγεθος για κάθε ζεύγος εκκινητών, 320 bp για το ζεύγος 8bF-2377R και 1000 bp για το ζεύγος 8bF–3'UTR.R.

Συμπερασματικά, πιστοποιήθηκε η παρουσία μεταγράφου, που αντιστοιχεί στην cDNA ακολουθία της BmSH3-B στα επιθηλιακά κύτταρα των ωοθυλακίων.

4.3.7. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

4.3.7.1. Μεταγραφική ρύθμιση

Ο προσδιορισμός της ιστοειδικής και χρονικής μεταγραφικής έκφρασης ενός γονιδίου αποτελεί ένα πρώτο βήμα για την κατανόηση της λειτουργικότητάς του. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκαν τα πρότυπα συσσώρευσης των μηνυμάτων του γονιδίου *bmsh3* με ανάλυση τύπου northern και με ενίσχυση με PCR αντίστροφα μεταγραμμένου RNA (RT-PCR) ωοθηλακίων, όπου επικεντρώθηκε η παρούσα εργασία, αλλά και άλλων ιστών της νύμφης του μεταξοσκώληκα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επιπλέον και η ανίχνευση τυχόν νέων εναλλακτικών μεταγράφων.

4.3.7.2. Ιστοειδική έκφραση του γονιδίου BmSh3

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΥΠΟΥ NORTHERN

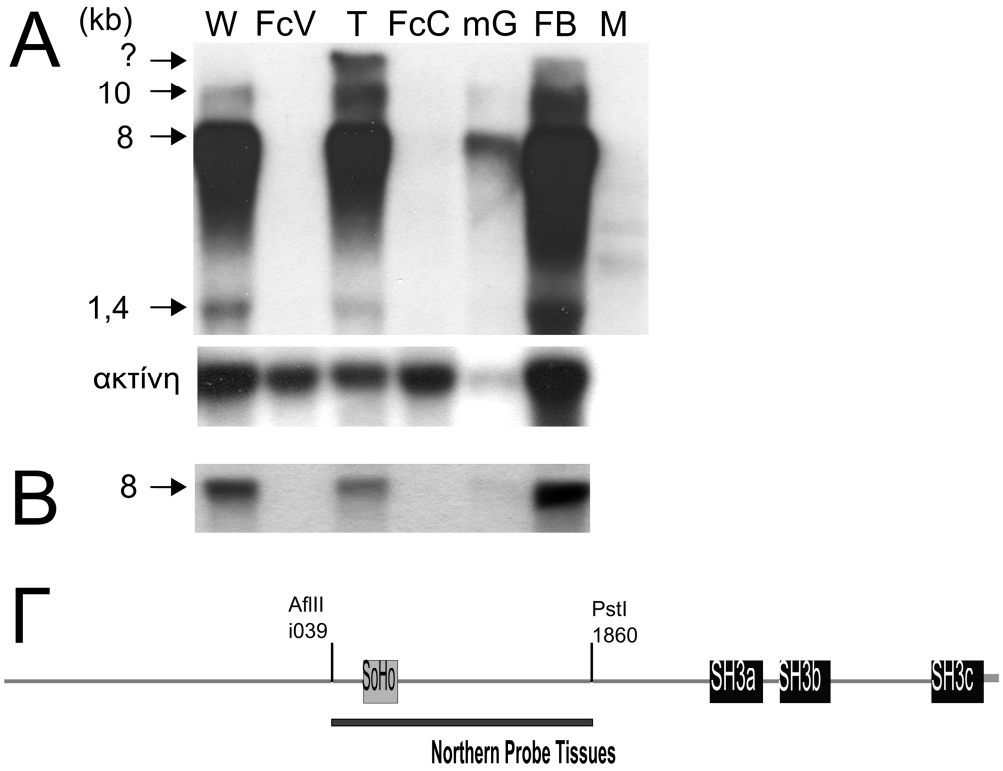
Η απομόνωση ολικού RNA έγινε από φτερά, όρχεις, μεσέντερο, λιπαρό σώμα και προβιτελλογενετικά/βιτελλογενετικά και χοριογενικά θυλακοκύτταρα του μεταξοσκώληκα. Η ανίχνευση των μετάγραφων έγινε με ραδιοσημασμένο ιχνηθέτη 0,8 kb, που απομονώθηκε μετά από πέψη του cDNA του BmSH3-A1 με τα περιοριστικά ένζυμα PstI και AflII (εικόνα 4.18 Γ). Το ολικό RNA, αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα φορμαλδεΰδης/αγαρόζης 1%, μεταφέρθηκε σε μεμβράνη Hybond-N και ακολούθησε υβριδισμός με τον ειδικό ιχνηθέτη, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.14.

Μετά από αυτοραδιογραφία, βρέθηκε σήμα υβριδισμού σε όλους τους ιστούς που εξετάστηκαν (εικόνα 4.18 Α) πλην των ωοθυλακίων, ανεξάρτητα από το αναπτυξιακό στάδιο των τελευταίων (χοριογενικά ή βιτελογενικά ωοθυλάκια). Ανιχνεύτηκαν συνολικά τέσσερα σήματα, δύο μεγέθους 8 και 1,4 kb, και δύο μεγέθους μεγαλύτερου των 10 kb (εικόνα 4.18 Α). Παρατηρήθηκε, σε κάποιο βαθμό ποικιλομορφία του μεγέθους των πιθανών ισομορφών. Για παράδειγμα, η ζώνη υψηλού μοριακού μεγέθους εμφανίζεται μόνο στα δείγματα από τους όρχεις. Ολιγόωρη έκθεση της ραδιενεργής μεμβράνης σε νέο φωτογραφικό φιλμ έδειξε ότι η έντονη ζώνη που εντοπίστηκε στα 8kb είναι ομοιογενής (εικόνα 4.18 Β).

Κατά την ιστοειδική ανάλυση τύπου northern δεν ήταν δυνατός ο προσδιορισμός ειδικής ζώνης στα δείγματα ολικού RNA που απομονώθηκαν από τα θυλακοκύτταρα.

Η αδυναμία αναγνώρισης ενός σήματος για τα δείγματα, που προέρχονται από τα θυλακοκύτταρα, πιθανόν να οφείλεται στη χαμηλή έκφραση του γονιδίου στον συγκεκριμένο ιστό. Η μεταγραφή του *bmsh3* στην αναπτυσσόμενη ωοθήκη επιβεβαιώθηκε με περαιτέρω μελέτες RT-PCR (εικόνα 4.19, 4.20).

Χαρακτηριστικό της μελέτης μεταγραφής αποτελεί η αναγνώριση πολλαπλών μεταγράφων για το *bmsh3* σε όλους τους ιστούς που μελετήθηκαν, όπως συμβαίνει και με τα άλλα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών CAV (Lin et al., 2001; Yamazaki and Nusse, 2002).

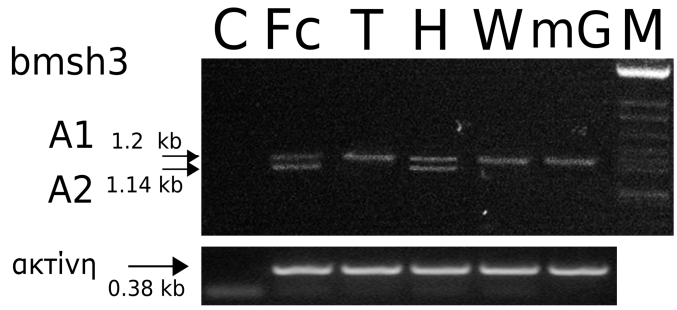


Εικόνα 4.18: Μελέτη της συσσώρευσης του μηνύματος του γονιδίου bmsh3 στους ιστούς του μεταξοσκώληκα με ανάλυση τύπου northern. Οι διαδρομές αντιστοιχούν σε ολικό RNA από φτερά (W), βιτελλογενικά θυλακοκύτταρα (FcV), όρχεις (T), χοριογενικά θυλακοκύτταρα (FcC), μεσέντερο (mG) και λιπαρό σώμα (FB). (Α) Εμφανίζονται πολλαπλά πιθανά εναλλακτικά μετάγραφα του bmsh3. Παρατίθεται και ο υβριδισμός ελέγχου με ειδικό ιχνηθέτη έναντι της ακτίνης. (Β) Μικρότερη έκθεση της ραδιενεργής μεμβράνης (4 ώρες) για καλύτερη ευκρίνεια της ζώνης μεγέθους 8 kb. (Γ) Γραφική παράσταση της θέσης του ραδιενεργού ιχνηθέτη, που απομονώθηκε με πέψη του κλώνου BmSH3-A1 με τα περιοριστικά ένζυμα AflII/PstI

RT-PCR ΑΝΑΛΥΣΗ

Η μελέτη της μεταγραφής του *bmsh3* έγινε και με RT-PCR. Με τη χρήση ειδικών

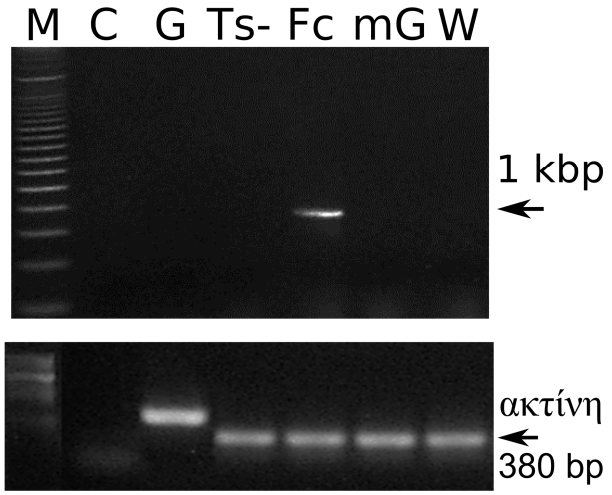
για τα εναλλακτικά μετάγραφα εκκινητών ήταν δυνατή η μελέτη των μεταγράφων BmSH3-A1/2 και BmSH3-B και να γίνει επιπλέον, η πιστοποίηση της μεταγραφής του *bmsh3* στα θυλακοκύτταρα που δεν ήταν εφικτή με την ανάλυση τύπου northern. Για τη μελέτη της ιστοειδικής κατανομής του BmSH3-A1 επιλέχτηκαν οι εκκινητές 1875F και 3'UTR.R (πίνακας 3.2) που ενισχύουν τις περιοχές SH3, αλλά και την περιοχή που αντιστοιχεί στο εξόνιο 15, το οποίο εμφανίζει εναλλακτική συρραφή. Δεν έγινε ανάλυση ολόκληρης της γνωστής cDNA ακολουθίας γιατί, όπως αναφέρθηκε στα κεφάλαια 4.3.1 και 4.3.2 (εικόνα 4.6 Γ) δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση του μεταγράφου BmSH3-A2 με τη χρήση των εκκινητών 43F και 3'UTR.R, που ενισχύουν όλη τη cDNA αλληλουχία.



Εικόνα 4.19: Ανάλυση της ιστοειδικής έκφρασης του bmsh3 με RT-PCR με το ζεύγος εκκινητών 1875F και 3'UTR.R**.** Ανιχνεύτηκαν δύο ζώνες, με μοριακά μεγέθη 1,2 kb και 1,14 kb που εμφανίζει ιστοειδική κατανομή. Η ζώνη των 1,2 kb αντιστοιχεί στο μετάγραφο BmSH3-A1 και είναι παρούσα σε όλους τους ιστούς που μελετήθηκαν: θυλακοκύτταρα (Fc), όρχεις (T), κεφάλι (H), Φτερά (W), μαλπιγγιανά σωληνάρια (mG). Η ζώνη των 1,14 kb προέρχεται από το μετάγραφο BmSH3-A2 και ανιχνεύεται στα δείγματα από θυλακοκύτταρα (Fc) και το κεφάλι του μεταξοσκώληκα (H). Παρουσιάζονται επίσης ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών HincII/HindIII (M) και ο αρνητικός μάρτυρας απουσία DNA (C, παράρτημα Χ εικόνα 7)

Ανιχνεύτηκε μία ζώνη μεγέθους 1,2 kb, που αντιστοιχεί στο αναμενόμενο μοριακό μέγεθος, σε όλους τους ιστούς που εξετάστηκαν και επιπλέον μια ζώνη μικρότερου μεγέθους 1,14 kbp στα δείγματα από ωοθυλάκια και κεφάλι του μεταξοσκώληκα (εικόνα 4.19).

Μετά τον προσδιορισμό της πρωτοταγούς δομής των δύο προϊόντων βρέθηκε ότι η ζώνη 1,2 kb αντιστοιχεί στο BmSH3-A1 μετάγραφο ενώ η μικρότερη, 1,14 kb, στο BmSH3-A2 μετάγραφο, που στερείται του εξονίου 15 (κεφάλαιο 4.3.5.2).



Εικόνα 4.20: **Μελέτη της ιστοειδικής κατανομής του κλώνου BmSH3-B με το ζεύγος των εκκινητών 8bF και 3'UTR.R** (**εικόνα** 4.6, πίνακας 3.2). Παρουσιάζονται ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών 1 kb (M, παράρτημα Χ εικόνα 7), ο αρνητικός μάρτυρας απουσία DNA (C), τα προϊόντα της αντίδρασης με εκμαγείο γενωμικό DNA (G), ολικό ιστό μεταξοσκώληκα χωρίς τις ωοθήκες (Ts-), επιθηλιακά κύτταρα ωοθήκης (Fc), μεσέντερο (mG) και φτερά (W). Δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση ζώνης στους ιστούς νύμφης έξη ημερών. Αναγνωρίστηκε μόνο μια ζώνη με μοριακό μέγεθος περίπου 1 kb στη διαδρομή που περιέχει το αντίστροφα μεταγραμμένο RNA θυλακοκυττάρων (Fc). Στην κάτω εικόνα παρουσιάζονται τα προϊόντα της ίδιας αντίστροφης μεταγραφής με εκκινητές ειδικούς για την β-ακτίνη (αναμενόμενη ζώνη μοριακού μεγέθους 380 bp) για την επιβεβαίωση της ορθής αντίστροφης μεταγραφής του RNA (αναμενόμενη ζώνη μοριακού μεγέθους 480 bp κατά την ενίσχυση γενωμικής αλληλουχίας).

Για τη μελέτη της ιστοειδικής κατανομής του BmSH3-B χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 8bF και 3'UTR.R (πίνακας 3.2), με τους οποίους γίνεται η ενίσχυση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης. Ανιχνεύτηκε μία ζώνη μεγέθους 1 kb, που αντιστοιχεί στο αναμενόμενο μοριακό μέγεθος, μόνο στη διαδρομή με αντίστροφα μεταγραμμένο RNA από τα θυλακοκύτταρα (εικόνα 4.20), ενώ δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση ζώνης στις διαδρομές που αντιστοιχούν στους υπόλοιπους ιστούς που εξετάστηκαν.

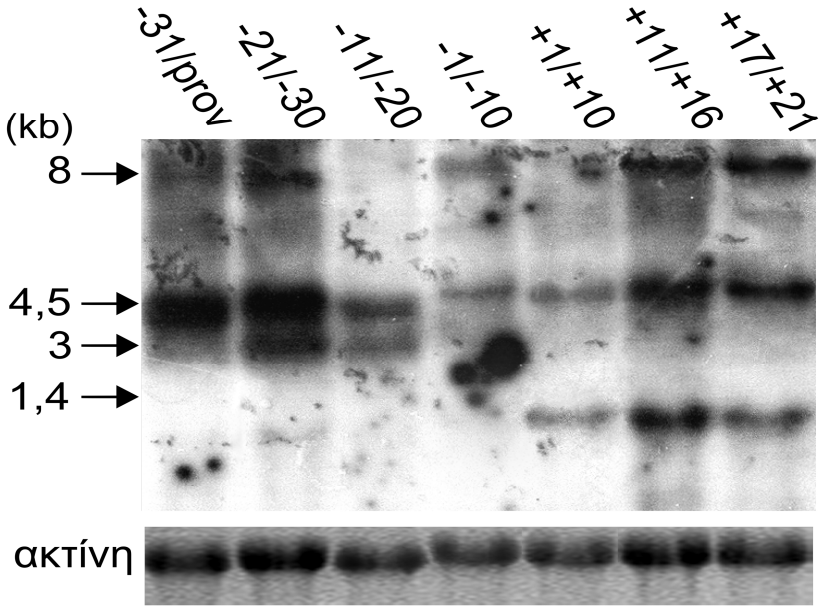
4.3.7.3. Ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου *bmsh3* κατά την ανάπτυξη των ωοθυλακίων του μεταξοσκώληκα

Η μελέτη της χρονοεξειδίκευσης της μεταγραφικής ρύθμισης του *bmsh3* κατά την

ανάπτυξη των ωοθυλακίων, έγινε με ανάλυση τύπου northern και RT-PCR σε ολικό RNA από επιθηλιακά κύτταρα ωοθυλακίων διακριτών σταδίων (κεφάλαιο 3.5.2). Η μελέτη έγινε σε ομαδοποιημένα στάδια της ωογένεσης, όπως περιγράφεται σε κάθε δοκιμή για την μελέτη συγκεκριμένων αναπτυξιακών σταδίων. Κατά την απομόνωση των ωοθυλακίων, τα προβιτελλογενετικά ωοθυλάκια και τα ωοθυλάκια των αρχικών σταδίων της βιτελλογένεσης ομαδοποιήθηκαν σε ένα δείγμα. Όπως και κατά την μελέτη της ρύθμισης της μεταγραφής στους ιστούς του μεταξοσκώληκα, έτσι και σε αυτή την περίπτωση μελετήθηκαν αρχικά τα επίπεδα συσσώρευσης του μηνύματος του γονιδίου *bmsh3* με ανάλυση τύπου northern, ενώ η μελέτη συγκεκριμένων μεταγράφων έγινε με ενίσχυση αντίστροφα μεταγραμμένου RNA του *bmsh3* με PCR (RT-PCR) και εκκινητές ειδικούς για το *bmsh3*.

Ανάλυση τύπου northern

Η ανάλυση τύπου northern έγινε σε ωοθυλάκια χωρισμένα ανά 10 αναπτυξιακά στάδια από το στάδιο -31 έως το +21. Τα στάδια της προβιτελλογένεσης ως το στάδιο 31 της βιτελλογένεσης συγκεντρώθηκαν σε ένα δείγμα. Μετά από έκθεση της ραδιενεργής μεμβράνης στο φωτογραφικό φιλμ, αναγνωρίστηκαν τέσσερα πιθανά εναλλακτικά μετάγραφα του *bmsh3* που αντιστοιχούν στα μεγέθη 1,4 kb, 3 kb, 4,5 kb και 8 kb (εικόνα 4.21).



***Εικόνα 4.21*: Μελέτη της συσσώρευσης με ανάλυση τύπου northern του μηνύματος του γονιδίου *bmsh3* κατά την ανάπτυξη των θυλακοκυττάρων.** Η μελέτη northern έγινε για τα στάδια-31 εώς +21. Ανιχνεύτηκαν τέσσερα μετάγραφα του *bmsh3* μεγέθους 8 kb, 4,5 kb, 3 kb και 1,4 kb.

Μια σημαντική παρατήρηση αποτελεί η χρονοειδική κατανομή των πιθανών εναλλακτικών μεταγράφων κατά την ανάπτυξη των ωοθυλακίων. Συστατική συσσώρευση των ζωνών που αντιστοιχούν στα μεγέθη 4,5 kbp και 8 kbp παρατηρείται σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης των ωοθυλακίων που μελετήθηκαν. Διαφορετική αναπτυξιακή ρύθμιση παρατηρήθηκε όμως για τα υπόλοιπα πιθανά εναλλακτικά μετάγραφα μεγέθους 3 kbp και 1,4 kbp. Η ζώνη των 3 kbp ανιχνεύτηκε στις διαδρομές που περιέχουν σε δείγματα από τα στάδιο της βιτελλογένεσης -30 έως -11, ενώ η ζώνη των 1,4 kbp ανιχνεύτηκε στις διαδρομές που περιέχουν σε δείγματα από όλα τα στάδιο της χοριογένεσης. Εκτός από τη χρονοειδική ρύθμιση της μεταγραφής, παρατηρήθηκε και ιστοειδική κατανομή του *bmsh3*. Οι ζώνες μοριακού μεγέθους 3 και 4,5 kbp που ανιχνεύτηκαν στα ωοθυλάκια απουσιάζουν από τους υπόλοιπους ιστούς που εξετάστηκαν (εικόνα 4.18Α), άρα αποτελούν εναλλακτικά μετάγραφα με ιστοειδική κατανομή.

Κατά τη μελέτη της ιστοειδικής έκφρασης του *bmsh3* στην ανάλυση τύπου northern, παρατηρήθηκε μια διαφορά στους ιστούς, εικόνα 4.18 Α και στα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια (εικόνα 4.21). Πιθανά, το *bmsh3* υποεκφράζεται στα ωοθυλάκια και για αυτόν τον λόγω η ανίχνευσή του δεν έγινε κατά την μικρής διάρκειας έκθεση του φιλμ στην πρώτη περίπτωση, ενώ κατά την δεύτερη όπου η

έκθεση ήταν κατά πολύ μεγαλήτερη ήταν δυνατή η ανίχνευση ειδικού σήματος.

Ανάλυση RT-PCR

Η ανίχνευση ειδικών ζωνών σε δοκιμές τύπου northern ήταν δυνατή μόνο μετά από μακροχρόνια έκθεση της σημασμένης μεμβράνης στο φωτογραφικό φιλμ (εικόνα 4.21) που σημαίνει ότι το γονίδιο *bmsh3* υποεκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων Η ανάλυση τύπου northern παρουσιάζει μια γενική εικόνα της μεταγραφής του *bmsh3* κατά την ανάπτυξη των ωοθυλακίων, αλλά λόγω της ελλιπούς γνώσης για το αναμενόμενου μοριακό μέγεθος των μεταγράφων του *bmsh3*, είναι αδύνατο να αναγνωριστεί το πρότυπο έκφρασης των ταυτοποιημένων εναλλακτικών μεταγράφων BmSH3-A1/2 και BmSH3-B. Για την ειδική μελέτη του προτύπου μεταγραφής των μεταγράφων αυτών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της RT-PCR σε ολικό RNA από επιθηλιακά κύτταρα σταδιοποιημένων ωοθυλακίων.

Για την μελέτη αυτή, έγινε διαχωρισμός στα εξής στάδια:

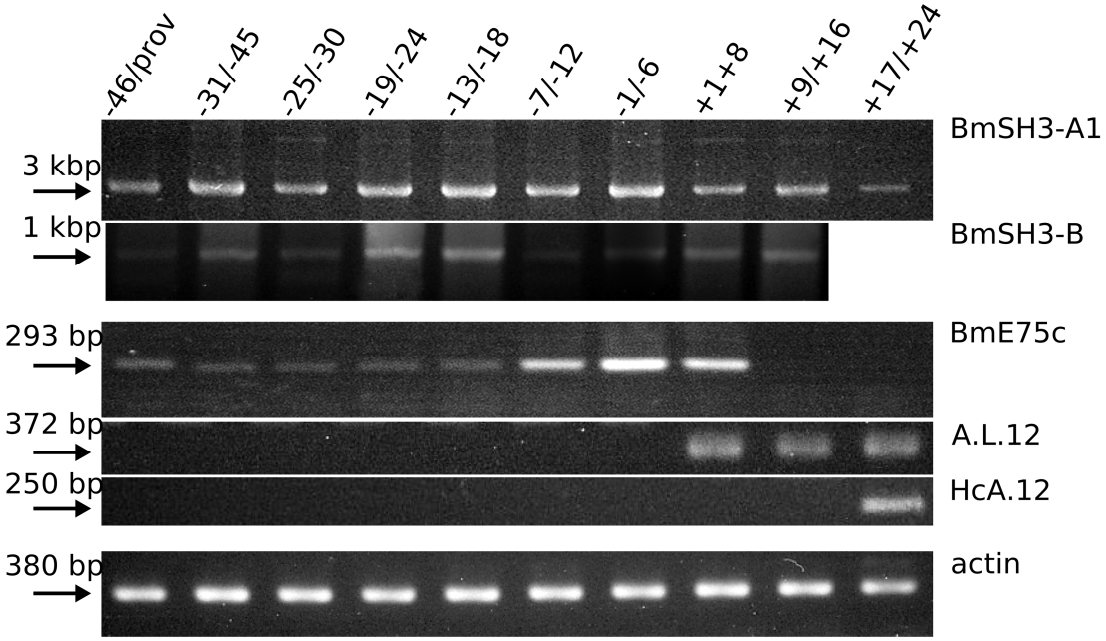
α) ομαδοποίηση των προβιτελλογενικών με στάδια της βιτελλογένεσης έως και -46

β) ομαδοποίηση από το -45 έως το -31 και

γ) ομαδοποίηση ανά 6 με 8 στάδια ως το +24 στάδιο.

Για την ειδική ενίσχυση του μεταγράφου BmSH3-A1 χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 43F και 3'UTR.R (πίνακας 3.2). Ενώ για την ειδική ενίσχυση του μεταγράφου BmSH3-B χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 8bF και 3'UTR.R (πίνακας 3.2). Από τα ίδια δείγματα cDNA έγινε η ενίσχυση του εναλλακτικού μεταγράφου BmE75C χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που περιγράφονται από (Swevers and Iatrou, 2003) και (Machado et al., 2007). Η παράλληλη μελέτη των επιπέδων του BmE75C έγινε αρχικά για την παρατήρηση του αναπτυξιακού προτύπου του μεταγράφου και της πιθανής συσχέτισης αυτού με το πρότυπο των BmSH3-A1 και BmSH3-B και, κατά δεύτερο λόγο, για την επαλήθευση των αναπτυξιακών σταδίων των ωοθυλακίων που απομονώθηκαν, καθόσον είναι γνωστό από προηγούμενες μελέτες (Swevers and Iatrou, 2003, Machado et al., 2007) ότι η μεταγραφή του BmE75C ρυθμίζεται θετικά κατά την μετάβαση από την βιτελλογένεση στη χοριογένεση. Για την πιστοποίηση των αναπτυξιακών σταδίων και για τον ακριβή

καθορισμό των σταδίων της χοριογένεσης ενισχύθηκαν και αλληλουχίες άλλων χαρακτηρισμένων γονιδίων όπως τα χοριογενικά γονίδια A.L12, (πρώιμο γονίδιο χορίου) και HcA.12 (όψιμο γονίδιο χορίου) (Drevet et al., 1995; Machado et al., 2007).



Εικόνα 4.22: **Χρονοειδική ανάλυση των επιπέδων των μεταγράφων του γονιδίου *bmsh3* στα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια με RT-PCR**. Μελέτη του αναπτυξιακού προτύπου των εναλλακτικών μεταγράφων BmSH3-A1 και BmSH3-B από τα στάδια της προβιτελλογένεσης έως την μεσαία/όψιμη χοριογένεση, στάδιο +24 την έκτη μέρα της νύμφης με τα ζεύγη εκκινητών 43F και 3'UTR.R ή 8Fb και 3'UTR.R, αντιστοίχως. Τα στάδια της βιτελλογένεσης ομαδοποιήθηκαν ανά έξι ωοθυλάκια από το στάδιο -1 έως το στάδιο -30, ενώ τα στάδια της χοριογένεσης ομαδοποιήθηκαν ανά οκτώ ωοθυλάκια. Ανιχνεύτηκε προϊόν που αντιστοιχεί στο προβλεπόμενο μοριακό μέγεθος των αντίστοιχων μεταγράφων σε όλα τα στάδια που εξετάστηκαν. Η πιστοποίηση των αναπτυξιακών σταδίων έγινε στα ίδια δείγματα με τη χρήση εκκινητών που ενισχύουν το cDNA για τα μετάγραφα, του ορφανού πυρηνικού υποδοχέα BmE75C, των πρωτεϊνών του χορίου A.L.12, HcA.12 και της ακτίνης (Drevet *et al.* 1995, Machado *et al.*, 2007, Swevers and Iatrou 2003)

Στην ανάλυση RT-PCR ανιχνεύτηκαν ζώνες με μοριακά μεγέθη αναμενόμενα για τα μετάγραφα BmSH3-A1 και BmSH3-B σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης των ωοθυλακίων που μελετήθηκαν (εικόνα 4.22). Τα προϊόντα από τις αντιδράσεις κλωνοποιήθηκαν και ταυτοποιήθηκε η πρωτοταγής δομή της ακολουθίας τους για επιβεβαίωση της ορθής ενίσχυσης της αλληλουχίας.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη της έκφρασης του BmE75c σε μεταγραφικό επίπεδο στα στάδια της προβιτελλογένεσης και μέχρι το στάδιο +8 της χοριογένεσης. Σε προηγούμενες μελέτες (Swevers et al., 2002b; Machado et al., 2007), είχε αναφερθεί ότι το εναλλακτικό μετάγραφο BmE75C εκφράζεται κατά τα αρχικά στάδια της

ωογένεσης και από το στάδιο -12 της βιτελλογένεσης ώς και το στάδιο +8 της χοριογένεσης. Στη παρούσα διδακτορική διατριβή βρέθηκε ότι το μετάγραφο BmE75C συσσωρεύεται επίσης σε χαμηλά επίπεδα στα αρχικά στάδια της προβιτελλογένεσης. Για τα στάδια -7 της βιτελλογένεσης έως +8 της χοριογένεσης επιβεβαιώθηκε η έντονη συσσώρευση του μετάγραφου BmE75C. Μετά το στάδιο +9 δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση του BmE75C (εικόνα 4.22), αποτέλεσμα που έρχεται σε συμφωνία με τα ήδη δημοσιευμένα αποτελέσματα.

4.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

Στο πρώτο μέρος της παρούσας διατριβής παρουσιάστηκε η απομόνωση και η κλωνοποίηση ενός νέου γονιδίου του μεταξοσκώληκα, του γονιδίου *bmsh3*. Έγινε προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης αυτού καθώς και της δομής του. Δεν ήταν όμως δυνατή η πιστοποίηση του κωδικονίου έναρξης και το ORF παραμένει ανοιχτό. Το *bmsh3* αναγνωρίστηκε ως μοναδικό γονίδιο στο γονιδίωμα του μεταξοσκώληκα, που περιέχει 22 εξόνια σε μια περιοχή μεγαλύτερη των 120 kb γονιδιακής αλληλουχίας. Βρέθηκε επίσης μία ασθενής GC αλληλουχία-δέκτη (acceptor) εναλλακτικής συρραφής (Thanaraj and Clark, 2001) στην περιοχή που περιέχει το εναλλακτικό εξόνιο 15. Το εναλλακτικό μετάγραφο που περιέχει το εξόνιο 15 ονομάστηκε BmSH3-A1, ενώ χωρίς το εξόνιο 15 ονομάστηκε BmSH3-A2.

Παρουσιάστηκε, επίσης, η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός τριών εναλλακτικών μεταγράφων του *bmsh3* γονιδίου, των BmSH3-A1, BmSH3-A2 και BmSH3-B. Από τα τρία εναλλακτικά μετάγραφα, μόνο για το BmSH3-B κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός του πλήρους ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης που αποτελείται από επτά εξόνια με πλήρες ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης, που περιέχει το κωδικόνιο έναρξης και λήξης της μετάφρασης, από τα οποία το πρώτο, 1Β εξόνιο (εικόνα 4.16), είναι μοναδικό για το μετάγραφο BmSH3-B, το οποίο εμφανίζει μια ειδική για αυτό 5' αμετάφραστη περιοχή και ειδική αλληλουχία έναρξης της μεταγραφής. Τα υπόλοιπα εξόνια είναι ταυτόσημα με τα έξι τελευταία εξόνια του BmSH3-A1 (εικόνα 4.16). Για το εναλλακτικό μετάγραφο BmSH3-A1 βρέθηκε επιπλέον 5' αλληλουχία, που αντιστοιχεί σε 22 εξόνια και πιστοποιήθηκε η μεταγραφή του *in vivo*. Το εναλλακτικό μετάγραφο BmSH3-A2 περιέχει κοινή αλληλουχία με το BmSH3-A1 από το νουκλεοτίδιο 1875 έως το 3120, με το εξόνιο 15 να απουσιάζει (εικόνα 4.16). Δεν ήταν

δυνατή η ανίχνευση επιπλέον 5’ αλληλουχίας για το BmSH3-A2 όπως και η αναγνώριση του κωδικονίου έναρξης της μεταγραφής.

Η *in silico* ανάλυση της πρωτοταγούς δομής της μεταφραζόμενης αμινοξικής αλληλουχίας της BmSH3-A1 έδειξε την παρουσία δύο τύπων συντηρημένων δομικών περιοχών. Τρεις περιοχές SH3 βρέθηκαν κοντά στο καρβοξυ-τελικό άκρο της (όπως και της BmSH3-B) ενώ μια περιοχή SoHo βρέθηκε να υπάρχει προς το αμινο-τελικό της άκρο. Λόγω της δομής των συντηρημένων περιοχών της η BmSH3-A1 κατατάσσεται στην οικογένεια των πρωτεϊνών CAV. Οι συντηρημένες αλληλουχίες της BmSH3-A1 στο σύνολο της πρωτεΐνης είναι χαμηλή, 20 με 30%, με εξαίρεση την ομόλογη πρωτεΐνη της Δροσόφιλας και πιο συγκεκριμένα την ισομορφή DCAPL3 (Yamazaki and Nusse, 2002). Οι πλέον συντηρημένες αλληλουχίες βρέθηκαν μεταξύ των περιοχών SH3 των ομόλογων πρωτεϊνών, με μέγιστη την πρώτη SH3 περιοχή, καθώς και μεταξύ των περιοχών SoHo. Η πιθανή υποκυτταρική κατανομή της BmSH3-A1 δεν ήταν δυνατόν να πρόβλεφθεί με μεθόδους βιοπληροφορικής αφού τα αποτελέσματα ήταν διφορούμενα (οι προβλέψεις έδειξαν τόσο κυτταροπλασματική όσο και πυρηνική κατανομή).

Η *in silico* ανάλυση της πρωτοταγούς δομής της BmSH3-B δεν έδωσε κάποια επιπλέον πληροφορία για την σημασία των πέντε μοναδικών κωδικονίων στο 5' άκρο, τα οποία δεν φαίνεται να προσδίδουν κάποια πρόσθετη ιδιότητα στην BmSH3-B πρωτεΐνη. Ποιό σημαντική είναι η έλλειψη της περιοχής SoHo αλλά και άλλων περιοχών, που βρέθηκαν μέσω *in silico* αναλύσεων, όπως της περιοχής που περιέχει τα σήματα πυρηνικού εντοπισμού, της περιοχής που είναι πλούσια σε προλίνη αλλά και σχεδόν όλων των πιθανών θέσεων αναγνώρισης SH3 περιοχών, εκτός της θέσης 980. Από την BmSH3-B απουσιάζουν, επίσης, και οι περισσότερες θέσεις φωσφορυλίωσης από διάφορες κινάσες, που παρουσιάστηκαν στο κεφάλαιο 4.3.3, αλλά και οι θέσεις ειδικής πρωτεόλυσης. Η ταυτοποίηση της μοναδικής 5’ αλληλουχίας της BmSH3-B οδηγεί στην υπόθεση ότι το συγκεκριμένο μετάγραφο τελεί υπό τον έλεγχο διαφορετικού υποκινητή από ότι τα μετάγραφα για τις πρωτεΐνες BmSH3-A1/A2. Αυτές οι διαφοροποιήσεις μεταξύ των ισομορφών οδηγούν στην υπόθεση ότι η BmSH3-B ίσως έχει και διαφορετική λειτουργία από ότι οι ισομορφές BmSH3-A1/A2.

Ανιχνεύτηκε, επίσης η μεταγραφή του γονιδίου *bmsh3* σε όλους τους ιστούς που

εξετάστηκαν και βρέθηκαν νέα πιθανά εναλλακτικά μετάγραφα που παρουσιάζουν τόσο ιστοειδική όσο και χρονοειδική κατανομή. Συγκεκριμένα, ανιχνεύτηκαν τέσσερα ειδικά μετάγραφα μεγέθους 1,4 kb, 8 kb, 10 kb και ενός μεγαλύτερου μεγέθους (εικόνα 4.18 Α) σε όλους τους ιστούς που μελετήθηκαν. Το πιθανό εναλλακτικό μετάγραφο άνω των 10 kb βρέθηκε να εμφανίζει ιστοειδική κατανομή εφόσον βρέθηκε μόνο στους ιστούς που προέρχονται από τους όρχεις. Τα εναλλακτικά μετάγραφα 1,4 kb και 8 kb ανιχνεύτηκαν και στα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια, στα οποία ανιχνεύτηκαν επίσης και δύο ειδικά εναλλακτικά μετάγραφα μεγέθους 3 kb και 4,5 kb που απουσιάζουν από τους άλλος ιστούς που εξετάστηκαν (εικόνα 4.21). Τέλος, μελετήθηκε η κατανομή της μεταγραφής του *bmsh3* στα επιθηλιακά κύτταρα των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων. Συγκεκριμένα το μετάγραφο 1,4 kb ανιχνεύτηκε στα στάδια της χοριογένεσης ενώ το μεγέθους 3 kb ανιχνεύτηκε στα στάδια της βιτελλογένεσης. Από τη μελέτη της μεταγραφής του γονιδίου με RT-PCR, βρέθηκε ότι το εναλλακτικό μετάγραφο BmSH3-A1 μεταγράφεται σε όλους τους ιστούς που εξετάσαμε, ενώ το BmSH3-B υπάρχει μόνο στα θυλακοκύτταρα. Τέλος, με την ανάλυση τύπου northern ανιχνεύτηκαν δύο εναλλακτικά μετάγραφα μεγέθους 8 kb και 4 kb, τα οποία συσσωρεύονται συστατικά σε όλη τη διάρκεια της ωογένεσης. Έτσι, το εναλλακτικό μετάγραφο BmSH3-A1 είναι αυτό με μέγεθος 8 kb ενώ το BmSH3-B αντιστοιχεί στο μετάγραφο μεγέθους 4 kb, όπως αυτά αναγνωρίστηκαν από την ανάλυση τύπου northern.

Τα μετάγραφα BmSH3-A1 και BmSH3-B εμφανίζουν ουσιαστικές διαφορές τόσο στην δομή τους, όπως η απουσία μεγάλης περιοχής του 5’ άκρου, που κωδικοποιεί για την SoHo, από το BmSH3-B, όσο και στη διαφορετική ιστοειδική κατανομή τους. Αποτελεί ερώτημα το κατά πόσο είναι δυνατόν οι διαφορές αυτές να αντικατοπτρίζουν και ουσιαστικές λειτουργικές διαφορές των μεταγράφων, προσδίδοντας έτσι έναν επιπλέον βαθμό πολυπλοκότητας στο *bmsh3* γονίδιο. Για τον σκοπό αυτό κρίθηκε αναγκαία η κατασκευή ειδικών αντισωμάτων έναντι της BmSH3 και έγινε προσπάθεια ανίχνευσης της λειτουργικότητας και της σημασίας του *bmsh3* κατά την ωογένεση όπως περιγράφεται στα κεφάλαια που ακολουθούν.

5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β΄:

Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ BmSH3: ΙΣΤΟΕΙΔΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΛΕΠΙΔΟΠΤΕΡΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ ΚΑΙ ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΞΟΣΚΩΛΗΚΑ.

5.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κατά την μελέτη της μεταγραφικής ρύθμισης του *bmsh3* κατέστη προφανής η πολυπλοκότητα της μεταγραφής του γονιδίου. Με την ανάλυση τύπου northern και RT-PCR (κεφάλαιο 4) έγινε η ταυτοποίηση τριών εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου, BmSH3-A1, BmSH3-A2 και BmSH3-B. Το μετάγραφο BmSH3-A1 ανιχνεύτηκε σε όλους τους ιστούς που μελετήσαμε (επιθηλιακά κύτταρα, όρχεις, κεφάλι, φτερά, μαλπιγγιανά σωληνάρια, εικόνα 4.20), το BmSH3-A2 στα επιθηλιακά κύτταρα και στο κεφάλι ενώ το BmSH3-B φαίνεται να μεταγράφεται αποκλειστικά στα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια (εικόνα 4.20). Επιπλέον, από την ανάλυση τύπου northern κατέστη δυνατή η ανίχνευση πολλαπλών εναλλακτικών μεταγράφων του *bmsh3*.

Σε αυτό το κεφάλαιο περιγράφεται η προσπάθεια για την μελέτη της πρωτεΐνης BmSH3. Και η ανίχνευση των πρωτεϊνικών ισομορφών που αντιστοιχούν στις ισομορφές BmSH3-A1, BmSH3-A2 και BmSH3-B. Η μελέτη επικεντρώθηκε στην ιστοειδική κατανομή της πρωτεΐνης σε διάφορους ιστούς του μεταξοσκώληκα, στην έκφραση της κατά την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και στον υποκυτταρικό εντοπισμό της σε κυτταρικές σειρές εντόμων και στα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια. Επίσης έγιναν δοκιμές για να πιστοποιηθεί η αλληλεπίδραση της BmSH3 με τον ορφανό πυρηνικό υποδοχέα BmE75C. Καθώς είχε αρχικά βρεθεί ως πιθανός στόχος του υποδοχέα στο σύστημα δύο υβριδίων.

5.2. ΕΙΔΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.2.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Προκιμένου να γίνει η μελέτη της πρωτεΐνης BmSH3 στους ιστούς του μεταξοσκώληκα χρειάστηκε να παρασκευαστούν ειδικά αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης BmSH3-A1.

5.2.1.1. Επιλογή αντιγονικών περιοχών της BmSH3-A1

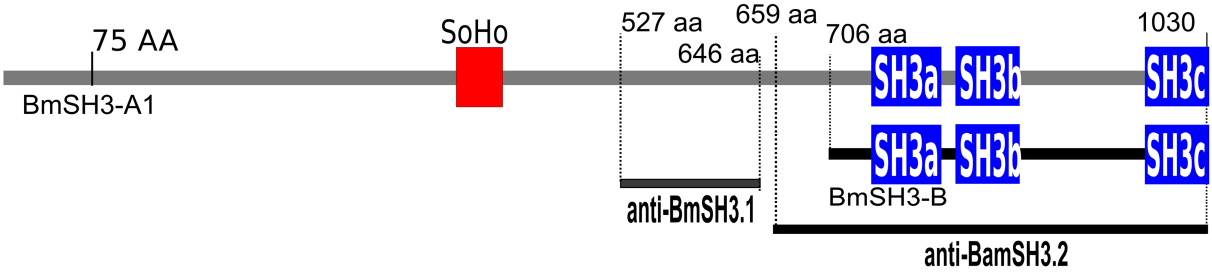
Δύο διαφορετικές περιοχές της πρωτεΐνης BmSH3 επιλέχθηκαν για τη παρασκευή των αντισωμάτων που αντιστοιχούν σε διαφορετικούς επίτοπους. Ο πρώτος επίτοπος αντιστοιχεί στη περιοχή μεταξύ του SoHo και των SH3 περιοχών (αα 526-646,

εικόνα 5.1). Το αντίσωμα αυτό, anti-BmSH3.1, σχεδιάστηκε ώστε να αναγνωρίζει την BmSH3-A1, όχι όμως την BmSH3-B. Επειδή η αμινο-τελική περιοχή της BmSH3-A2 δεν προσδιορίστηκε από τα προηγούμενα πειράματά μας (κεφάλαιο 4) δεν είναι γνωστό αν το αντίσωμα αναγνωρίζει και τη A2 ισομορφή. Ο δεύτερος επίτοπος, περιλαμβάνει τις SH3 περιοχές (αα 659–1030, εικόνα 5.1, παράρτημα ΙΙΙ), οι οποίες είναι παρούσες σε όλες τις ισομορφές που ανιχνεύσαμε. Το παραγόμενο αντίσωμα ονομάστηκε anti-BmSH3.2. Η επιλογή των επίτοπων έγινε με βάση την υδροφοβικότητα της αμινοξικής αλληλουχίας, και την συντήρησή της. Η υδροφοβικότητα εξετάστηκε με το διάγραμμα υδροφοβικότητας κατά (Kyte and Doolittle, 1982), όπως αυτό σχεδιάστηκε από το protscale (εικόνα 5.2 http://www.expasy.org/tools/protscale.html) και η συντήρηση των αλληλουχιών αναλύθηκε με BLAST στη βάση δεδομένων NCBI (πίνακας 5.1 και παράρτημα IX).

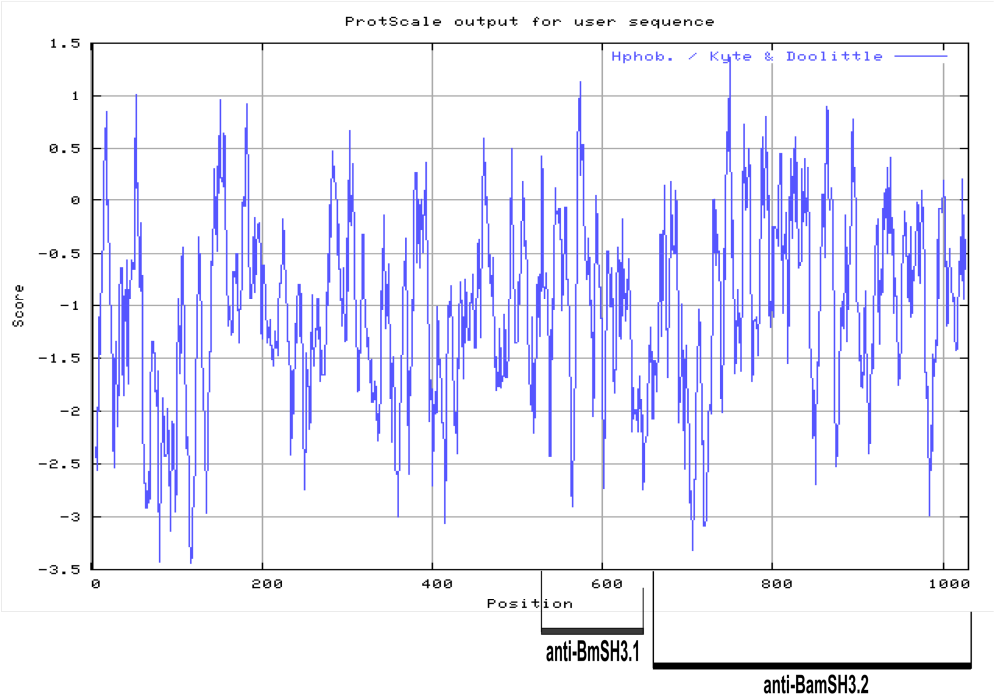
Η επιλογή της περιοχής 526 – 646 της BmSH3.1 έγινε με βάση την υψηλή υδροφιλικότητα της (εικόνα 5.2) και τη χαμηλή συντήρηση της πρωτοταγούς δομής, όπως αυτή προσδιορίστηκε μετά από σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας με τις γνωστές αλληλουχίες του B. mori (πίνακας 5.1 Α) και με τις πρωτεΐνες που είναι κατατεθειμένες στην πρωτεϊνική βιβλιοθήκη του NCBI (παράρτημα IX). Επομένως αναμένεται ότι το αντίσωμα anti-BmSH3.1 **έ**χει εξειδίκευση για την BmSH3-A1 εφ’όσον κατά την ανάλυση BLAST δεν βρέθηκε σημαντική ομοιότητά της με άλλες πρωτεΐνες του *B. mori* (όπως φαίνεται και από τον πίνακα 5.1 Α) ακόμα και μεταξύ άλλων λεπιδοπτέρων, όπως του *T. Ni* (παράρτημα IX).

Ο σχεδιασμός για τη παραγωγή αντισώματος έναντι των SH3 περιοχών (αα 659–1030) της BmSH3-A1 δίνει την δυνατότητα ανίχνευσης νέων πιθανών ισομορφών της BmSH3, λόγω της υψηλής συντήρησης της δομής του καρβοξυ-τελικού άκρου, που περιέχει τις SH3 περιοχές, σε όλες τις ισομορφές της οικογένειας CAV (Roignot and Soubeyran, 2009). Λόγω της ύπαρξης των συντηρημένων περιοχών SH3 βρέθηκαν και άλλες πρωτεΐνες του *B. mori* που εμφανίζουν όμως χαμηλή ταυτότητα με την καρβοξυ-τελική περιοχή της BmSH3-A1. Αυτές είναι οι DRK (downstream of receptor kinase, gb.ADZ99023.1), η longer ecdysteroid-phosphate phosphatase (BAJ61834.1), η nervous wreck M (BAK22649.1) η phospholipase C gamma (NP_001165394.1) και η K3 protein (NP_001119719.1), ενώ όπως φαίνεται και στο παράρτημα IX, για τις

συγκεκριμένες πρωτεΐνες η μικρή ομοιότητα εμφανίζεται αποκλειστικά στις SH3 περιοχές.



Εικόνα 5.1: Σχηματική παράσταση της αμινοξικής αλληλουχίας της BmSH3-A1. *Οι θέσεις αναγνώρισης των αντισωμάτων anti-BmSH3.1 και anti-BmSH3.2 είναι υπογραμμισμένες.*



Εικόνα 5.2: Διάγραμμα υδροφοβικότητας της αμινοξικής BmSH3-A1 αλληλουχίας κατά Kyte και Doolitle. *Στον άξονα των Y αναγράφεται η σχετική τιμή της υδροφοβικότητας και στον άξονα των X το μήκος της αμινοξικής αλληλουχίας. Οι αρνητικές τιμές αντιστοιχούν σε υδρόφιλες περιοχές. Οι θέσεις των περιοχών της αλληλουχίας που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία των αντισωμάτων είναι υπογραμμισμένες.*

Πίνακας 5-1: Ομοιότητα των περιοχών (Α) αα 526–646 και (Β) αα 659–1030 της BmSH3-A1 έναντι των πρωτεϊνών του B. mori κατατεθημένων στη βάση δεδομένων NCBI. *Παρατίθενται οι 20 πρωτεΐνες με το το μικρότερο E-value (μεγαλύτερη ομοιότητα).*

A)

Accession No	Description	E value
NP_001166801.1	c-Cbl-associated protein isoform A [Bombyx mori]	1e-78
NP_001106223.1	cytochrome P450 CYP4G25 [Bombyx mori]	0.008
NP_001136084.1	voltage-gated sodium channel alpha subunit [Bombyx	0.082
ACV87001.1	paralytic protein [Bombyx mori]	0.083
NP_001037376.1	eukaryotic translation initiation factor 4A [Bombyx	0.18
BAG68376.1	polyprotein [Bombyx mori]	0.33
NP_001188507.1	Rho-associated protein kinase [Bombyx mori]	0.39
NP_001037007.1	FMRFamide receptor [Bombyx mori]	0.41
NP_001040138.1	vacuolar ATPase subunit C [Bombyx mori]	0.50
NP_001182008.1	loquacious [Bombyx mori]	0.51
BAI66485.1	carboxyl/cholinesterase 5BL [Bombyx mori]	0.61
NP_001040466.1	alpha-esterase 48 isoform l [Bombyx mori]	0.66
NP_001165227.1	alpha-esterase 48 isoform s1 [Bombyx mori]	0.68
NP_001036978.1	conventional protein kinase C [Bombyx mori]	0.69
NP_001036948.1	juvenile hormone binding protein an-0921 [Bombyx mori]	0.89
NP_001037668.1	cytosolic juvenile hormone binding protein [Bombyx	0.93
BAB21513.1	TRAS5 [Bombyx mori]	1.4
NP_001036953.1	cytochrome P450 302A1 [Bombyx mori]	1.5
FAA00438.1	TPA: putative cuticle protein [Bombyx mori]	1.5

B)

Accession	Description	E value
NP_001166801.1	c-Cbl-associated protein isoform A [Bombyx mori]	0.0
NP_001159613.1	c-Cbl-associated protein isoform B [Bombyx mori]	0.0
ADZ99023.1	DRK [Bombyx mori]	4,00E-12
BAJ61834.1	longer ecdysteroid-phosphate phosphatase [Bombyx mori]	2,00E-07
BAK22649.1	nervous wreck M [Bombyx mori]	4,00E-06
NP_001165394.1	phospholipase C gamma [Bombyx mori	8,00E-05
NP_001119719.1	K3 protein [Bombyx mori	6,00E-04
NP_001091843.1	titin2 [Bombyx mori]	0.003
BAB85198.1	Titin-like protein [Bombyx mori]	0.003
NP_001188511.1	protein kinase ASK1 [Bombyx mori]	0.003
BAA19775.1	Gag protein [Bombyx mori]	0.21
NP_001119724.1	Actin, muscle-type A1; Flags: Precursor [Bombyx mori]	0.36
NP_001037189.1	translation initiation factor 2 gamma subunit [Bombyx mori]	0.96
NP_001037558.1	fibroblast growth factor receptor [Bombyx mori]	1.1
BAA13042.1	trehalase [Bombyx mori]	1.1
NP_001037458.1	trehalase precursor [Bombyx mori]	1.1
NP_001036996.1	p38 map kinase [Bombyx mori	1.2
NP_001119723.1	kinesin-like protein Ncd [Bombyx mori]	1.2
NP_001037410.1	ubiquitin-like protein SMT3 [Bombyx mori]	1.3

5.2.1.2. Κατασκευή των φορέων έκφρασης της GST-BmSH3.1 και GST.BmSH3.2

Ο φορέας έκφρασης που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των χιμαιρικών της GST με τις περιοχές της BmSH3 ήταν ο pGEX-5x (παράρτημα Χ εικόνα 8). Χαρακτηριστική ιδιότητα του φορέα είναι ότι περιέχει το γονίδιο της GST πρωτεΐνης στο 3’ άκρο του οποίου μπορεί να κλωνοποιηθεί η cDNA ακολουθία της επιλογής μας, ώστε να δημιουργηθεί υβριδική πρωτεΐνη με την GST στο Ν τελικό άκρο και την πρωτεΐνη (ή πεπτίδιο) στο C τελικό άκρο.

GST-BmSH3.1 (αα 527–646)

Για την παρασκευή του πλασμιδίου που εκφράζει την χιμαιρική GST-BmSH3.1 επιλέχτηκε ο φορέας pGEX-5x-2. Έγινε κατεργασία του φορέα pGEX-5x-2 με το περιοριστικό ένζυμο SmaI. Στη θέση αυτή κλωνοποιήθηκε το κομμάτι cDNA του BmSH3-A1 μετά από κατεργασία με τα περιοριστικά ένζυμα SmaI/SacII και επώαση με το μεγάλο τμήμα του κομματιού Klenow (DNA polymerase I (lg) Klenow fragment, Fermentas, κεφάλαιο 3.9) για την παραγωγή τυφλών άκρων (πίνακας 5.2, παράρτημα Χ εικόνα 8).

GST- BmSH3.2 (659 – 1030 αα)

Χρησιμοποιήθηκε το αρχικό μόριο cDNA που είχε ταυτοποιηθεί από το σύστημα δύο υβριδίων στη ζύμη (E75C(f)/prey #31, κεφάλαιο 1.4) το οποίο είχε κλωνοποιήθηκε στις θέσεις EcoRI/NotI του φορέα pBSK(+). Η περιοχή που κλωνοποιήθηκε αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια 1976–4274. Το ανοιχτό ORF της περιοχής περιέχει και το κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης στη θέση 3030. Ο κλώνος E75C(f)/prey #31, απελευθερώθηκε από τον φορέα pBSK(+) με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI/NotI. Η υποκλωνοποίηση έγινε στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα έκφρασης pGEX-5-1 (πίνακας 5.2, παράρτημα Χ εικόνα 8).

Πίνακας 5-2: Συνοπτική παρουσίαση του τρόπου κατασκευής του φορέα έκφρασης των GST χιμαιρικών πρωτεϊνών. Παρουσιάζονται οι φορείς από τους οποίους απομονώθηκαν τα ενθέματα, η περιοχή του cDNA της BmSH3-A1 που αντιστοιχεί στην περιοχή που κλωνοποιήθηκε, ο φορέας έκφρασης στον οποίο έγινε η υποκλωνοποίηση του κομματιού της BmSH3-A1, ο τρόπος κλωνοποίησης, η ονομασία της χιμαιρικής πρωτεΐνης, και η προβλεπόμενη μοριακή μάζα.

Βασικός κλώνος	Περιοχή προέλευσης	Φορέας έκφρασης GST	Τρόπος κλωνοποίησης	GST-κλώνος	Προβλεπόμενο Μ.Β., της χιμαιρικής πρωτεΐνης (kDa)
pBSK.BmSH3.A1	527–646αα	pGEX 5x-2	Ένζυμα SmaI–SacII (τυφλά άκρα) σε SmaI του pGEX	GST-BmSH3.1	39,2
pBSK. E75C(f)/prey #31	659–1030αα	pGEX 5x-1	Ένζυμα EcoRI–NotI, με πέψη του E75C(f)/prey#31 (συμπληρωματικά άκρα)	GST-BmSH3.2	68,5

5.2.1.3. Παραγωγή και καθαρισμός αντισωμάτων

Η παραγωγή των δύο αντισωμάτων σε albino κουνέλια Νέας Ζηλανδίας έγινε με τον τρόπο που περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.22.

Για τη χρήση των παραγόμενων αντισωμάτων ακολούθησε καθαρισμός των αντισωμάτων με χρωματογραφία συγγένειας, όπως παρουσιάζεται στο κεφάλαιο 3.23, σε δύο βήματα. Στήλη γλουταθειόνης στην οποία είχε προσδεθεί GST πρωτεΐνη επωάστηκε πρώτα με ανοσοποιημένο ορό για την δέσμευση των αντισωμάτων έναντι της GST. Το εκχύλισμα που δε δεσμεύτηκε στην στήλη ήταν σε μεγάλο βαθμό ελεύθερο των αντισωμάτων έναντι της GST. Τα αντισώματα anti-GST, εκλούστηκαν με όξινο διάλυμα υδροχλωρικής γλυκίνης pH 2,5 και κατόπιν έγινε εξισορρόπηση του διαλύματος με προσθήκη ίσου όγκου Tris-HCl pH 8.0.

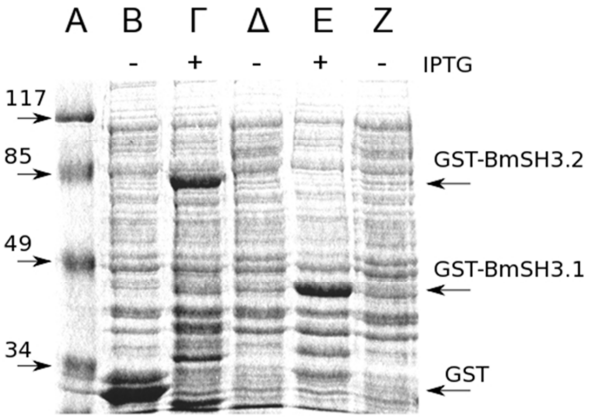
Για την απομόνωση των αντισωμάτων έναντι των επίτοπων της BmSH3-A1 έγινε επώαση του καθαρισμένου ανοσοποιημένου ορού σε στήλη στην οποία είχε δεσμευτεί ομοιοπολικά η χιμαιρική πρωτεΐνη της GST με το αντιγόνο. Μετά την έκπλυση της κολώνας, το καθαρό αντίσωμα εκλούστηκε με όξινο διάλυμα υδροχλωρικής γλυκίνης pH 2,5 και κατόπιν έγινε εξισορρόπηση του διαλύματος με ίσο όγκο Tris-HCl pH 8.0. Το διάλυμα περιέχει το καθαρό αντίσωμα έναντι του επίτοπου της BmSH3-A1.

Με αυτή τη μέθοδο καθαρισμού αντισωμάτων ήταν δυνατή επίσης και η απομόνωση αντισωμάτων έναντι της GST (anti-GST) από το πρώτο στάδιο καθαρισμού του αντισώματος (εικόνα 5.5 Γ). Αυτά χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ελέγχου.

5.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.3.1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

Για την πιστοποίηση της υποκλωνοποίησης των κομματιών της αλληλουχίας της BmSH3 στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με την GST του φορέα έκφρασης pGEX-5x, έγινε προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης του DNA κάθε ανασυνδιασμένου φορέα.



Εικόνα 5.3: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12% των ολικών εκχυλισμάτων του στελέχους BL-21 μετά από διαμόλυνση με τον κενό φορέα pGEX-5x (διαδρομή Β) που εκφράζει την GST, με αναμενόμενο μοριακό βάρος περί που 29 kDa, με τον φορέα pGEX-GST-BmSH3.2 που εκφράζει τη χιμαιρική GST-BmSH3.2 παρουσία (διαδρομή Γ) ή άνευ (διαδρομή Δ) IPTG, με αναμενόμενο μοριακό βάρος 68,5 kDa, ή με τον φορέα pGEX-GST-BmSH3.1 που εκφράζει τη χιμαιρική GST-BmSH3.1 παρουσία (διαδρομή Ε) ή άνευ (διαδρομή Ζ) IPTG, με αναμενόμενο μοριακό βάρος 39,2 kDa. Στη διαδρομή Α παρουσιάζεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους.

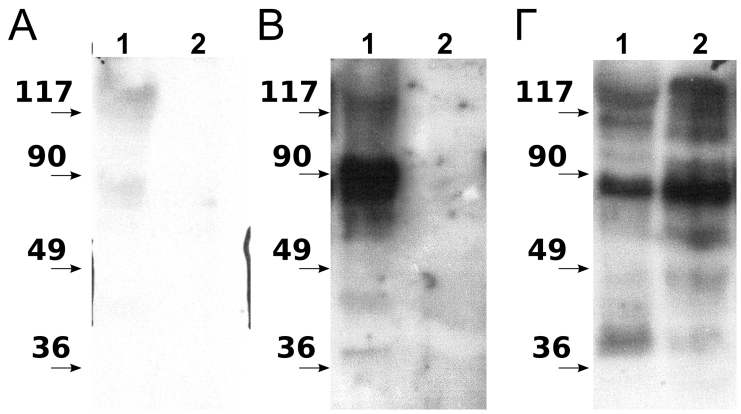
Ακολούθησε μετασχηματισμός του βακτηριακού στελέχους BL-21 με τους φορείς έκφρασης pGEX-GST-BmSH3.1 και pGEX-GST-BmSH3.2. Κατόπιν ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των ολικών εκχυλισμάτων των κυττάρων σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE, εικόνα 5.3). Από τα προβλεπόμενα μοριακά βάρη φάνηκε ότι οι κλώνοι που εκφράζουν για τους επίτοπους BmSH3.1 και BmSH3.2 έδωσαν το αναμενόμενο για τις χιμαιρικές πρωτεΐνες μοριακό βάρος (εικόνα 5.3).

Έγινε έλεγχος της παραγωγής αντισωμάτων έναντι των επιτόπων GST-BmSH3.1 και GST-BmSH3.2. Για την δοκιμή χρησιμοποιήθηκαν ολικά εκχυλίσματα από αναπτυσσόμενη ωοθήκη μεταξοσκώληκα έκτης ημέρας (εικόνα 5.4 διαδρομή 1) και ολικό εκχύλισμα από όλους τους ιστούς της νύμφης πλην της ωοθήκης (εικόνα 5.4 διαδρομή 2). Τόσο ο ανοσοποιημένος όσο και ο μη ανοσοποιημένος ορός είχαν προεπωαστεί με ολικά λύμματα από μετασχηματισμένα βακτήρια που εκφράζουν την GST. Με αυτό τον τρόπο έγινε μείωση της μη ειδικής προσρόφησης που μπορεί να

προκύψει από τα αντισώματα που είχαν αναπτυχθεί έναντι της GST. Ο ανοσοποιημένος ορός χρησιμοποιήθηκε στην ίδια αραίωση 1:1000, όπως και ο μη ανοσοποιημένος ορός.

Όπως φαίνεται από την εικόνα 5.4 Α ο μη ανοσοποιημένος ορός δεν αναγνώρισε κάποια ζώνη. Αντίθετα, ο ανοσοποιημένος ορός που αναπτύχθηκε έναντι της ειδικής περιοχής της BmSH3.1 αναγνώρισε στα δείγματα που προέρχονται από την αναπτυσσόμενη ωοθήκη μια ζώνη μοριακού βάρους περίπου 90 kDa (εικόνα 5.4 Β διαδρομή 1). Στους υπόλοιπους ιστούς του μεταξοσκώληκα (εικόνα 5.4 Β διαδρομή 2) δε αναγνωρίστηκε κάποια ζώνη.

Ο ανοσοποιημένος ορός που αναπτύχθηκε έναντι της ειδικής περιοχής BmSH3.2 εμφανίζει διαφορετικό πρότυπο (εικόνα 5.4 Γ). Αναγνωρίζει μία ζώνη περίπου 80 kDa και μία ακόμα μικρότερη ζώνη περίπου 40 kDa στα δείγματα που προέρχονται από την αναπτυσσόμενη ωοθήκη (εικόνα 5.4 Γ διαδρομή 1). Επιπλέον, αναγνωρίστηκε μια λιγότερο έντονη ζώνη υψηλότερου μεγέθους λίγο μικρότερη από τον μάρτυρα των 117 kDa. Στους υπόλοιπους ιστούς του μεταξοσκώληκα (εικόνα 5.4 Γ διαδρομή 2) αναγνωρίστηκε μια ζώνη μεγαλήτερη από 117 kDa και μια ζώνη με μοριακό βάρος περίπου 80 kDa, περίπου ίδια με αυτή που ανιχνεύτηκε και στα εκχυλίσματα από την ωοθήκη.



Εικόνα 5.4: Ανοσοαποτύπωση τύπου Western για την εξέταση ολικών εκχυλισμάτων ιστών του μεταξοσκώληκα με τον ανοσοποιημένο ορό. *Η διαδρομή 1 περιέχει ολικό εκχύλισμα της αναπτυσσόμενης ωοθήκης και η διαδρομή 2 ολικό εκχύλισμα από όλους τους ιστούς του μεταξοσκώληκα πλην της ωοθήκης. (Α) ανοσοεντοπισμός με μη ανοσοποιημένο ορό, (Β) ανοσοεντοπισμός με τον ανοσοποιημένο ορό έναντι της BmSH3.1, (Γ) ανοσοεντοπισμός με τον ανοσοποιημένο ορό έναντι της BmSH3.2. Τα βέλη ορίζουν τις θέσεις των μοριακών μεγεθών του μάρτυρα (σε kDa).*

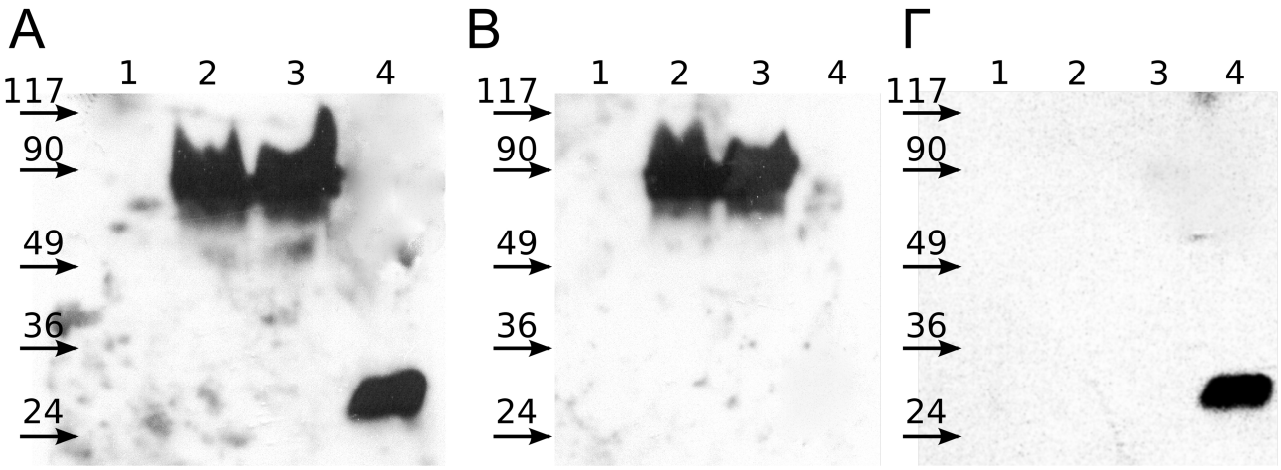
Συγκρίνοντας το πρότυπο που παρατηρήθηκε κατά την ανοσοαποτύπωση με τον μη ανοσοποιημένο ορό (εικόνα 5.4 Α) σε σχέση με τους ανοσοποιημένους ορούς (εικόνα 5.4 Β, Γ), είναι εμφανής η παραγωγή αντισωμάτων έναντι των επιτόπων που χορηγήθηκαν στα ζώα και ότι αυτοί αναγνωρίζουν ειδικές πρωτεΐνες στα εκχυλίσματα των ιστών του μεταξοσκώληκα.

5.3.1.1. Εξειδίκευση του anti-BmSH3.1 αντισώματος

Το αντίσωμα anti-BmSH3.1 χρησιμοποιήθηκε στις περισσότερες μελέτες και για το λόγο αυτό έγιναν περισσότεροι έλεγχοι για την πιστοποίηση της εξειδίκευσης αυτού. Μετά τον καθαρισμό του αντισώματος με χρωματογραφία συγγένειας, έγινε περαιτέρω έλεγχος της καθαρότητας του αντισώματος με ανοσοαποτύπωση τύπου Western σε ολικά εκχυλίσματα της κυτταρικής σειράς Bm5 (εικόνα 5.5, διαδρομή 1), εκχυλίσματα ωοθυλακίων σταδίων της όψιμης βιτελλογένεσης, -5/-1, και πρώιμης χοριογένεσης +1/+5 (εικόνα 5.5 διαδρομή 2 και 3 αντιστοίχως) και εκχυλίσματα από βακτηριακό στέλεχος BL-21 μετασχηματισμένο με το πλασμίδιο έκφρασης της GST (εικόνα 5.5 διαδρομή 4). Το πρότυπο της ανοσοαποτύπωσης με το καθαρισμένο αντίσωμα συγκρίθηκε με το πρότυπο της ανοσοαποτύπωσης των ίδιων δειγμάτων με τον ανοσοποιημένο ορό και με το αντίσωμα anti-GST, το οποίο παραγάγαμε στο εργαστήριο (βλέπε και 5.3.1.3). Το καθαρισμένο αντίσωμα anti-BmSH3.1 αναγνωρίζει

ειδικά μια έντονη ζώνη, όπως είχε παρατηρηθεί και στις δοκιμές του ανοσοποιημένου ορού, μόνο στις διαδρομές που περιέχουν εκχυλίσματα από ωοθυλάκια (εικόνα 5.5 Β διαδρομές 2 και 3), ενώ δεν αναγνωρίστηκαν πρωτεΐνες στα εκχυλίσματα της κυτταρικής σειράς Bm5 (εικόνα 5.5 Β διαδρομή 1) ή στα εκχυλίσματα των μετασχηματισμένων βακτηρίων (εικόνα 5.5 Β διαδρομή 4). Αντιθέτως, ο ανοσοποιημένος ορός που περιέχει και το αντίσωμα έναντι της GST και της BmSH3.1 περιοχής αναγνωρίζει τις ίδιες ζώνες στα δείγματα των ωοθυλακίων (εικόνα 5.5 Α διαδρομές 2 και 3) αλλά και μια ζώνη που αντιστοιχεί στην GST στα βακτηριακά εκχυλίσματα (εικόνα 5.5 Α διαδρομή 4).

Τέλος, το αντίσωμα έναντι της GST αναγνώρισε μόνο μια ζώνη στο αναμενόμενο μοριακό βάρος της GST στη διαδρομή που περιέχει BL-21 βακτηρίων μετασχηματισμένων με τον φορέα έκφρασης της GST (εικόνα 5.5 Γ διαδρομή 4), ενώ δεν αναγνώρισε κάποια ζώνη στις υπόλοιπες διαδρομές.



Εικόνα 5.5: Ανοσοαποτύπωση τύπου Western για την πιστοποίηση της εξειδίκευσης και καθαρότητας του αντισώματος anti-BmSH3.1. Α) Ανοσοαποτύπωση με τον ανοσοποιημένο ορό έναντι του BmSH3.1. Β) Ανοσοαποτύπωση με το καθαρό αντίσωμα anti-BmSH3.1, Γ) Ανοσοαποτύπωση με το καθαρό αντίσωμα έναντι της GST, anti-GST. Η διαδρομή 1 περιείχε ολικό εκχύλισμα κυτταρικής σειράς Bm5, η διαδρομή 2 ολικό εκχύλισμα ωοθυλακίων σταδίου -10/-1, η διαδρομή 3 ολικό εκχύλισμα ωοθυλακίων σταδίου +1/+10 και η διαδρομή 4 ολικό εκχύλισμα BL-21 βακτηρίων μετασχηματισμένων με τον φορέα έκφρασης της GST.

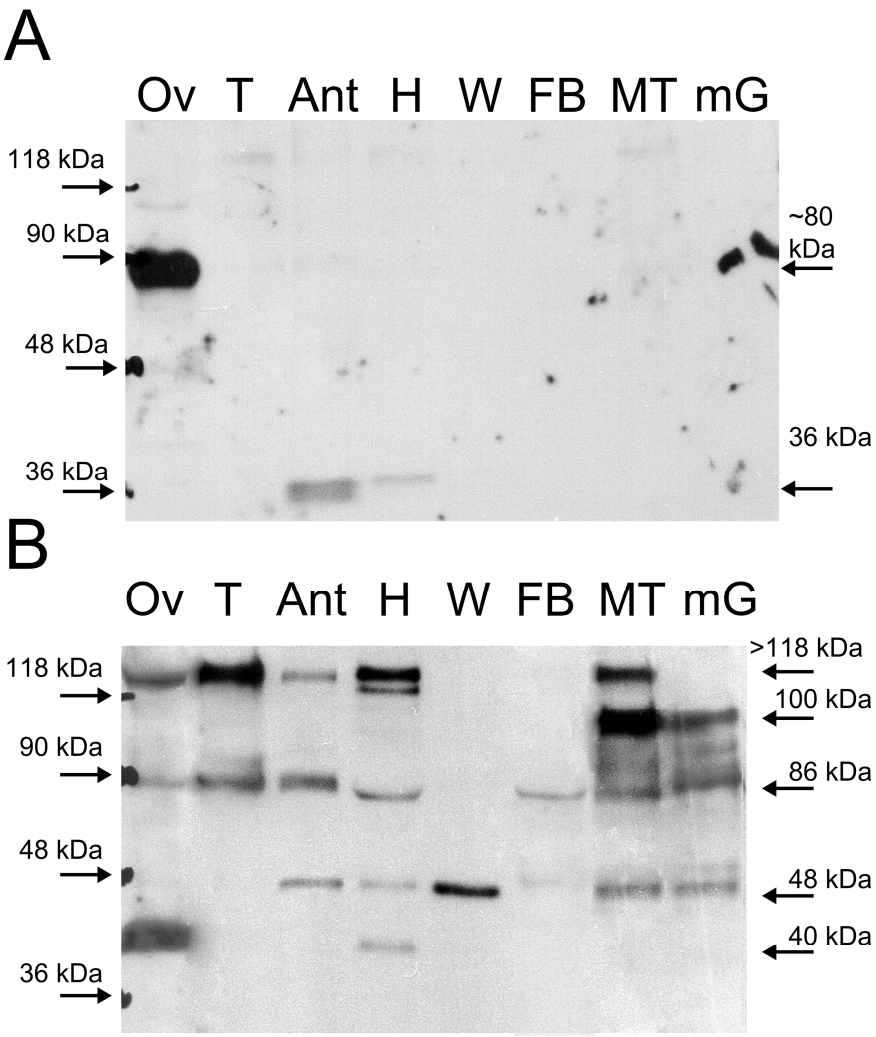
5.3.2. ΙΣΤΟΕΙΔΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΗΣ BmSH3

Για τον προσδιορισμό της ιστοειδικής κατανομής της BmSH3 έγινε η απομόνωση ολικής πρωτεΐνης από διαφορετικούς ιστούς νυμφών έξι ημερών του μεταξοσκώληκα

όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.24. Μετά την ποσοτικοποίηση του περιεχομένου των εκχυλισμάτων, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση ίσης ποσότητας δειγμάτων σε 12% SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση τύπου Western με τα αντισώματα anti-BmSH3.1 και anti-BmSH3.2.

Από το πρότυπο ανοσοαποτύπωσης με το αντίσωμα anti-BmSH3.1 ανιχνεύτηκε μια έντονη ζώνη περίπου 80 kDa στην διαδρομή που περιείχε το εκχύλισμα από τα ωοθυλάκια της αναπτυσσόμενης ωοθήκης (εικόνα 5.6 Α, διαδρομή Ov). Επίσης ανιχνεύτηκε μια αχνή διπλή ζώνη σε μοριακό βάρος περίπου 36 kDa στη διαδρομή που περιείχε το εκχύλισμα από κεραίες (εικόνα 5.6 Α, διαδρομή Ant) και μια μονή ζώνη στο ίδιο περίπου μοριακό βάρος στο εκχύλισμα από το κεφάλι του εντόμου (εικόνα 5.6 Α, διαδρομή Η). Στις διαδρομές που περιείχαν εκχυλίσματα από όρχεις, φτερά, λιπαρό σώμα, Μαλπιγγιανά σωληνάρια και μεσέντερο δεν ανιχνεύτηκαν ζώνες (εικόνα 5.6 Α διαδρομές Η, W, FB, MT, mG).

Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι σε επόμενες αναλύσεις με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα χαμηλότερης συγκέντρωσης πολυακρυλαμίδης (10%), βρέθηκε ότι η ζώνη με κινητικότητα στα 80 kDa είναι διπλή και αποτελείται από μια κύρια ζώνη 75 kDa και μια λιγότερη έντονη στα 85 kDa (εικόνα 5.7).



Εικόνα 5.6: Ανοσοαποτύπωση τύπου Western μετά από ηλεκτροφόρηση σε 12% SDS-PAGE. Η μελέτη της έκφρασης της BmSH3 στους ιστούς νύμφης του μεταξοσκώληκα *B. mori* έκτης ημέρας έγινε με το αντίσωμα anti-BmSH3.1 που αναγνωρίζει την περιοχή καθοδικά από τη SoHo που απουσιάζει από την BmSH3-B (A) και το anti-BmSH3.2 που αναγνωρίζει τις SH3 περιοχές (B). A) Το αντίσωμα anti-BmSH3.1 αναγνωρίζει ειδικά μια έντονη ζώνη με μέγεθος κοντά στα ~80 kDa στη διαδρομή που περιέχει το εκχύλισμα των ωοθυλακίων της αναπτυσσόμενης ωοθήκης. Επιπλέον ανιχνεύει δύο ακόμα μικρότερες ζώνες, περίπου 36 kDa, στις διαδρομές που περιέχουν τα εκχυλίσματα από το κεφάλι και τις κεραίες. B) Το πρότυπο της ανοσοαποτύπωσης με το αντίσωμα anti-BmSH3.2 είναι διαφορετικό, με πολλαπλές ζώνες σε όλους τους ιστούς που εξετάστηκαν. Οι κύριες ζώνες που διακρίνονται εμφανίζουν κατά προσέγγιση μοριακό βάρος της τάξης των: άνω των 118, 100, 85 50 και 40 kDa. Ov: Ωοθυλάκια, T: όρχεις, Ant: κεραίες, H: κεφάλι, W: φτερά, FB: λιπαρό σώμα, MT: Μαλπιγγιανά σωληνάρια, mG: μεσέντερο. Στα αριστερά παρουσιάζονται οι μάρτυρες μοριακού βάρους και στα δεξιά τα κατά προσέγγιση μοριακά βάρη των ζωνών που αναγνωρίζονται από το κάθε αντίσωμα.

Το πρότυπο ανοσοαποτύπωσης, των ίδιων δειγμάτων με το αντίσωμα anti-BmSH3.2, ήταν εντελώς διαφορετικό (εικόνα 5.6 Β). Το αντίσωμα αυτό αναγνωρίζει τις SH3 περιοχές (εικόνα 5.1) επομένως ήταν αναμενόμενη η ανίχνευση περισσότερων ζωνών συγκριτικά με την ανοσοαποτύπωση με το anti-BmSH3.1 αντίσωμα. Πράγματι, ανιχνεύτηκαν επιπλέον πρωτεϊνικές ζώνες τόσο στην αναπτυσσόμενη ωοθήκη όσο και στους υπόλοιπους ιστούς που μελετήθηκαν. Συνολικά ανιχνεύτηκαν πέντε κύριες ζώνες (εικόνα 5.6 Β). Έτσι:

Α. Δύο ζώνες υψηλού μοριακού βάρους (εικόνα 5.6 Β**,** διαδρομές Ov, T, Ant, H, FB, MT, mG). Η μεγαλύτερη από αυτές ανιχνεύτηκε στα εκχυλίσματα από τα επιθηλιακά κύτταρα, τους όρχεις, τις κεραίες, το κεφάλι και τα Μαλπιγγιανά σωληνάρια. Η μικρότερη ανιχνεύτηκε μόνο στο εκχύλισμα από το κεφάλι (εικόνα 5.6 Β, διαδρομή Η). Καμία από αυτές τις ζώνες δεν ανιχνεύτηκε από το anti-BmSH3.1.

Β. Μια ζώνη μοριακού βάρους περίπου 100 kDa (εικόνα 5.6 Β διαδρομές MT, mG) στο εκχύλισμα του μεσέντερου και των Μαλπιγγιανών σωληναρίων.

Γ. Μια ζώνη με μοριακό βάρος περίπου 85 kDa σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν (εικόνα 5.6 Β**,** διαδρομές Ov, T, Ant, H, MT) εκτός από αυτά που προέρχονται από φτερά και λιπαρό σώμα.

Δ. Μια ζώνη με μοριακό βάρος περίπου 48 kDa (εικόνα 5.6 Β**,** διαδρομές Ant, H, MT, mG) στα εκχυλίσματα από κεραίες, κεφάλι, μεσέντερο, Μαλπιγγιανά σωληνάρια και φτερά.

Ε. Μια ζώνη στα 40 kDa (εικόνα 5.6 Β, διαδρομές Ov, H) αναγνωρίστηκε αποκλειστικά στα εκχυλίσματα από την αναπτυσσόμενη ωοθήκη και από το κεφάλι του εντόμου. Η ζώνη αυτή πιθανά αντιστοιχεί στην BmSH3-B που έχει αναμενόμενο μοριακό βάρος 36,3 kDa, αλλά μπορεί να περιέχει μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που αυξάνουν το προβλεπόμενο μοριακό βάρος.

Σημειώνεται ότι το anti-BmSH3.1 αντίσωμα που παράχθηκε έναντι της περιοχής 526 – 646 αα της BmSH3-A1 φαίνεται ότι δεν ανίχνευσε την BmSH3-B, η οποία

αντιστοιχεί στην περιοχή των αμινοξέων 706 – 1030 της BmSH3-A1 με προβλεπόμενο μοριακό βάρος 36,3 kDa. Καθώς η BmSH3-B αποτελείται από τις SH3 περιοχές και είναι αναμενόμενη η ανίχνευσή της από το anti-BmSH3.2 (οι ζώνες των 40 kDa στην εικόνα 5.6 Β) και το πρότυπο που ανιχνεύτηκε μετά από Western των ίδιων δειγμάτων με τα αντισώματα anti-BmSH3.1 και anti-BmSH3.2 είναι διαφορετικό για τις πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους. Αν και το anti-BmSH3.1 ήταν ικανό να ανιχνεύσει την BmSH3-B θα εμφάνιζε κοινό πρότυπο για τα δείγματα από τα ωοθυλάκια στα μικρά μοριακά βάρη.

5.3.3. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΗΣ BmSH3 ΣΤΑ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ

Για τη διερεύνηση της κατανομής της BmSH3 στην αναπτυσσόμενη ωοθήκη, έγινε διαχωρισμός των σημαντικότερων διαμερισμάτων των ωοθυλακίων. Οι μελέτες έγιναν με την χρήση του anti-BmSH3.1 και του anti-BmSH3.2 αντισώματος.

Η απομόνωση των διακριτών διαμερισμάτων της ωοθήκης περιελάμβανε:

α. το περίβλημα των ωοθυλακίων (ωαγωγός, sheath)

β. τα επιθηλιακά κύτταρα των ωοθυλακίων

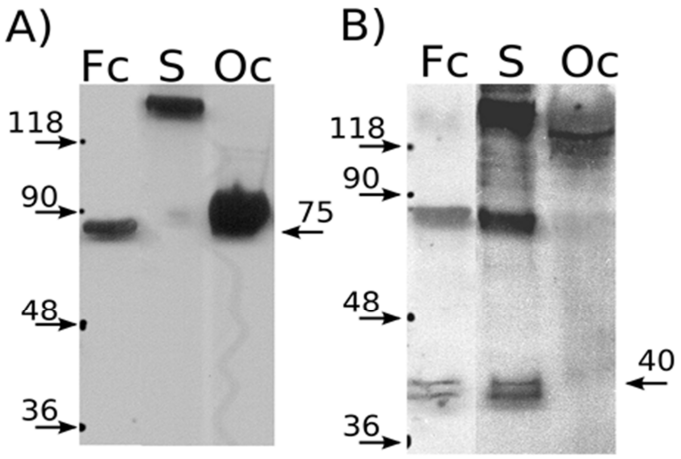
γ. τα ωοκύτταρα.

Η απομόνωση του ωαγωγού γίνεται κατά την ανατομία της ωοθήκης και την απομόνωση του αντίστοιχου ιστού. Έγινε διαχωρισμός των συστατικών όπως αναφέρεται (κεφάλαιο 3.24.2), η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων των διακριτών διαμερισμάτων των ωοθηκών σε 10% SDS-PAGE. Ο ανοσοεντοπισμός με το anti-BmSH3.1 αντίσωμα αποκάλυψε την παρουσία πρωτεϊνών διαφορετικού μοριακού βάρους στα διαφορετικά διαμερίσματα της ωοθήκης (εικόνα 5.7 Α). Ειδικότερα:

Α. Το anti-BmSH3.1 αντίσωμα αναγνώρισε μια ζώνη 75 kDa στο εκχύλισμα από τα επιθηλιακά κύτταρα (εικόνα 5.7 Α, διαδρομή Fc).

Β. Μια έντονη ζώνη περίπου 85 kDa στο εκχύλισμα από το ωοκύτταρο (εικόνα 5.7 Α, διαδρομή Oc).

Γ. Μία ζώνη με μοριακό βάρος κατά πολύ μεγαλύτερο των 118 kDa στα εκχύλισμα του περιβλήματος (εικόνα 5.7 Α, διαδρομή S) που δεν είχε ανιχνευτεί στο ολικό εκχύλισμα της αναπτυσσόμενης ωοθήκης (εικόνα 5.6 Β). Η αδυναμία αναγνώρισης της μεγάλου μοριακού βάρους ζώνης από το anti-BmSH3.1 κατά την προηγούμενη ανάλυση (εικόνα 5.6 Α διαδρομή Ov) πιθανόν να οφείλεται στη μικρή αντιπροσώπευση του περιβλήματος της ωοθήκης στη συνολική μάζα των ωοθυλακίων.



Εικόνα 5.7: Μελέτη της έκφρασης της BmSH3 πρωτεΐνης στα διαμερίσματα της ωοθήκης. Η ανίχνευση με ανοσοαποτύπωση τύπου Western σε 10 % SDS-PAGE για την έγινε με το αντίσωμα anti-BmSH3.1 (Α) και το anti-BmSH3.2 (Β). Α) Με το αντίσωμα anti-BmSH3.1 ανιχνεύτηκαν 3 ζώνες σε διαφορετικά διαμερίσματα της ωοθήκης: μια ζώνη 75 kDa στο εκχύλισμα από τα επιθηλιακά κύτταρα (Fc), μια ζώνη με υψηλό μοριακό βάρος στο εκχύλισμα από το περίβλημα των ωοθυλακίων (S) και μια έντονη ζώνη μεγέθους 85 kDa στο εκχύλισμα από το ωοκύτταρο. Β) Με το αντίσωμα anti-BmSH3.2 ανιχνεύτηκε στη διαδρομή Fc μία ζώνη με το ίδιο μέγεθος 75 kDa, όπως και με το αντίσωμα anti-BmSH3.1 και μια διπλή ζώνη περίπου 40 kDa. Η ίδια διπλή ζώνη των 40 kDa ανιχνεύτηκε στη διαδρομή S, μαζί με μια ζώνη μεγάλου μοριακού βάρους με μέγεθος παρόμοιο με αυτό που βρέθηκε και με το anti-BmSH3.1, καθώς και μια ζώνη περίπου στα 75 kDa η οποία δεν ανιχνεύτηκε από το BmSH3.1 αντίσωμα και για αυτόν τον λόγο δεν είναι πιθανό να είναι η ίδια πρωτεΐνη που βρέθηκε στη διαδρομή Fc. Στα δείγματα από το ωοκύτταρο (Oc) ανιχνεύτηκε ζώνη με μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 118 kDa που δεν ανιχνεύτηκε από το BmSH3.1.

Η ανοσοαποτύπωση των ίδιων δειγμάτων με το anti-BmSH3.2 αντίσωμα αποκάλυψε διαφορετικό πρότυπο ανοσοαποτύπωσης (εικόνα 5.7 Β):

Α. Ανιχνεύτηκε μια ζώνη 75 kDa στα δείγματα από επιθηλιακά κύτταρα (εικόνα 5.7 Β, διαδρομή Fc), όπως και κατά την ανοσοαποτύπωση με το anti-BmSH3.1 αντίσωμα (εικόνα 5.7 Α, διαδρομή Fc). Επιπλέον, όπως και κατά την μελέτη της ιστοειδικής κατανομής της BmSH3 (εικόνα 5.6 Β, διαδρομή Ov), αναγνωρίστηκε μια διπλή ζώνη περίπου 40 kDa.

Β. Στη διαδρομή που περιείχε το εκχύλισμα από το ωοκύτταρο ανιχνεύτηκε μια μεγάλου μοριακού βάρους ζώνη μεγαλύτερη των 118 kDa (εικόνα 5.7 Β, διαδρομή Oc), ενώ δεν ανιχνεύτηκε η 85 kDa ζώνη που ανιχνεύεται με το BmSH3.1 αντίσωμα, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτή η πρωτεΐνη ίσως δεν περιέχει τις SH3 περιοχές.

Γ. Το πρότυπο ανοσοαποτύπωσης για το εκχύλισμα από το περίβλημα (διαδρομή S) είναι διαφορετικό, από αυτό που παρατηρήθηκε με το anti-BmSH3.1 αντίσωμα. Ειδικότερα, ανιχνεύτηκε πρωτεΐνη μοριακού βάρους άνω των 118 kDa όπως και με το anti-BmSH3.1 αντίσωμα (εικόνα 5.7 διαδρομή S). Επομένως αυτή η περιοχή περιέχει τόσο για τη συνδετική περιοχή μεταξύ του SoHo και των SH3 περιοχών, όσο και τις SH3 περιοχές. Επιπλέον, όμως, ανιχνεύτηκαν μια ζώνη στα 75 kDa που δεν αναγνωρίστηκε από το αντίσωμα anti-BmSH3.1 καθώς και μια διπλή ζώνη μοριακού βάρους περίπου 40 kDa (εικόνα 5.7 Β, διαδρομή S), όπως και στη διαδρομή που περιέχει το εκχύλισμα από τα επιθηλιακά κύτταρα, και στα εκχυλίσματα από την ωοθήκη και το κεφάλι κατά την ιστοειδική ανάλυση της BmSH3 (εικόνα 5.6 διαδρομή Ov και H) αλλά όχι στο εκχύλισμα από το ωοκύτταρο με το anti-BmSH3.1 αντίσωμα. Επομένως, η διπλή ζώνη θα πρέπει να αναγνωρίζει πρωτεΐνη που περιέχει τις SH3 περιοχές.

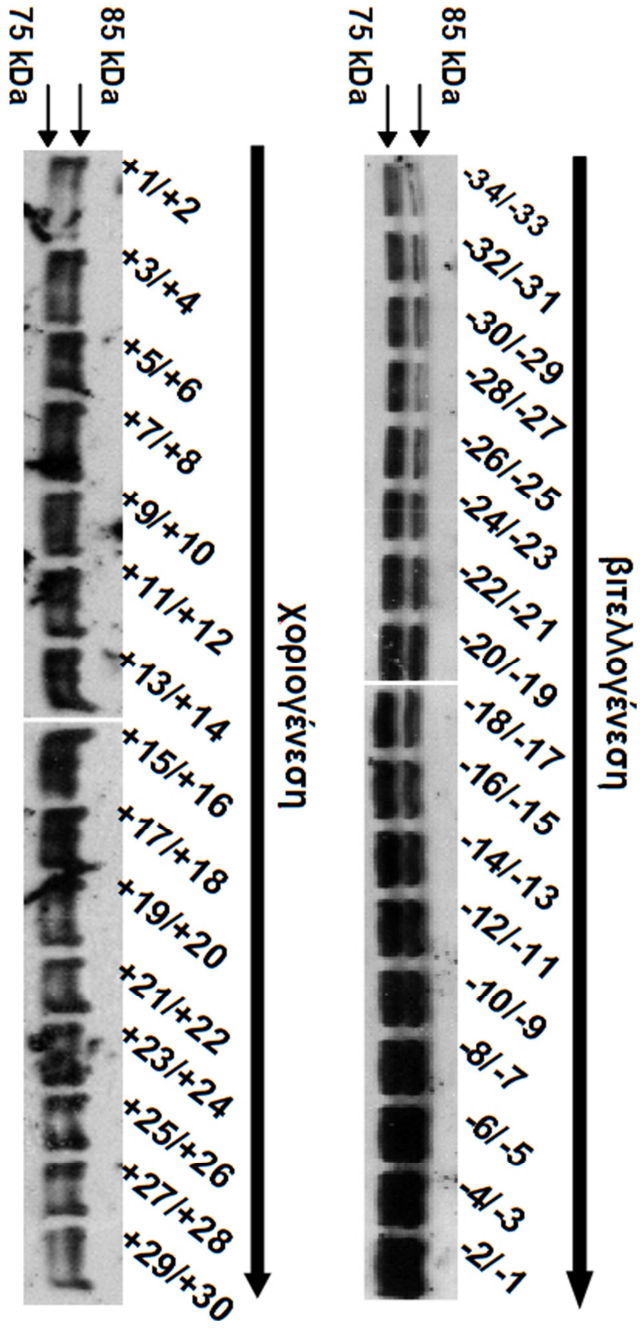
Για τις επόμενες μελέτες, λόγω του χαμηλότερου βαθμού πολυπλοκότητας του προτύπου ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά το anti-BmSH3.1 αντίσωμα, το οποίο και δημιουργήθηκε για την ειδική αναγνώριση της πρωτεΐνης

BmSH3-A1. Με τη χρήση αυτού του αντισώματος εξετάστηκε η ισομορφή που εκφράζεται στα ωοθυλάκια.

5.3.4. Η BmSH3 ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ

Για την περαιτέρω διερεύνηση της μελέτης της έκφρασης της BmSH3 κατά την ανάπτυξη των ωοθυλακίων έγινε απομόνωση των ωοθυλακίων από το περίβλημα και ομαδοποίηση τους ανά δύο στάδια αναπτυξιακού χρόνου από τα στάδια της προβιτελλογένεσης και της βιτελλογένεσης, -34/-33, -32/-31 κ.ο.κ., έως τα τελικά στάδια της χοριογένεσης, +29/+30 (Swevers and Iatrou, 2003). Συνολικά τέσσερα ωοθυλάκια ανά διαδρομή ομογενοποιήθηκαν με 100 μl αποδιατακτικού διαλύματος cracking buffer για την πλήρη αποδιάταξη των συστατικών των ωοθυλακίων (κεφάλαιο 3.24).

Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε 10% SDS-PAGE και η ανοσοαποτύπωση έγινε με το anti-BmSH3.1 αντίσωμα (εικόνα 5.8). Λόγω της πλήρους λύσης των ωοθυλακίων, το εκχύλισμα περιέχει όλα τα συστατικά του ωοθυλακίου πλην του περιβλήματος, το οποίο αφαιρέθηκε κατά την απομόνωση τους. Η ανοσοαποτύπωση έδειξε συστατική συσσώρευση της BmSH3 σε όλα τα στάδια που μελετήθηκαν (εικόνα 5.8). Το αντίσωμα αναγνώρισε τις ίδιες δύο ζώνες μοριακού βάρους 75 kDa και 85 kDa που αναγνωρίστηκαν με το ίδιο αντίσωμα κατά την μελέτη της κατανομής της BmSH3 στα διαμερίσματα της αναπτυσσόμενης ωοθήκης (εικόνα 5.7 Α, διαδρομές Fc και Oc**)**. Κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων της βιτελλογένεσης μέχρι το στάδιο -10 της βιτελλογένεσης, παρατηρείται σχετική αύξηση της συσσώρευσης των δύο ισομορφών, ενώ στα τελικά στάδια της βιτελλογένεσης, πέραν του -10, και της χοριογένεσης παρατηρείται η σταθεροποίηση των επιπέδων των δύο πρωτεϊνών. Το αναπτυξιακό πρότυπο των δύο ισομορφών είναι σύμφωνο με το αναπτυξιακό πρότυπο που παρατηρήθηκε κατά τη μελέτη της μεταγραφής της BmSH3-A1 με μελέτες τύπου RT-PCR (εικόνα 4.22).



Εικόνα 5.8: Χρονοειδική έκφραση της BmSH3-A1 πρωτεΐνης στα επιθηλιακά κύτταρα των ωοθυλακίων. Η μελέτη έγινε με ανοσοαποτύπωση τύπου Western με το ανίσωμα anti-BmSH3.1. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στα αναπτυξιακά στάδια των ωοθυλακίων (Swevers and Iatrou, 1992, 2003; Swevers et al., 2005). Το οριζόντιο βέλος ορίζει την φορά της ωρίμανσης των ωοθυλακίων προς τα τελικά στάδια της χοριογένεσης. Κάθε διαδρομή περιέχει ολικό εκχύλισμα από τέσσερα ωοθυλάκια.

5.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

Η καταγραφή των ισομορφών που αναγνωρίστηκαν κατά την ανάλυση της ιστοειδικής έκφρασης παρουσιάζεται στους πίνακες 5.3 και 5.4

Πίνακας 5-3: Συνοπτική παρουσίαση των πολυπεπτιδίων που ανιχνεύτηκαν κατά τη μελέτη της ιστοειδική έκφρασης της BmSH3. Τα πολυπεπτίδια που εμφανίζουν το ίδιο κινητικό πρότυπο παρουσιάζονται με το ίδιο χρώμα με άμεση αντιστοιχία με τον πίνακα 5.2. Ov: Ωοθυλάκια, T: όρχεις, Ant: κεραίες, H: κεφάλι, W: φτερά, FB: λιπαρό σώμα, MT: Μαλπιγγιανά σωληνάρια, mG: μεσέντερο

Αντίσωμα\Ιστοί	Ov	T	Ant	H	W	FB	MT	mG
anti-BmSH3.1 (αναγνωρίζει τη συνδετική περιοχή)	85 kDa 75 kDa		2x36 kDa	36 kDa				
anti-BmSH3.2 (αναγνωρίζει τις SH3 περιοχές)	>118 kDa 85 kDa 40 kDa	>118 kDa 85kDa	>118 kDa 85kDa 48 kDa	(2x)>118 kDa 85kDa 48 kDa 40 kDa	48 kDa	85kDa	>118 kDa 100 kDa 85kDa 48 kDa	100 kDa 85kDa 48 kDa

Πίνακας 5-4 Συνοπτική παρουσίαση των πολυπεπτιδίων που αναγνωρίστηκαν κατά την μελέτη της BmSH3 στα διαμερίσματα της ωοθήκης. Τα πολυπεπτίδια που εμφανίζουν το ίδιο κινητικό πρότυπο είναι σκιαγραφημένες με το ίδιο χρώμα. Fc: Επιθηλιακά κύτταρα, Oc: Ωοκύτταρο, S: περίβλημα.

Αντίσωμα	Fc	Oc	S
anti-BmSH3.1 αναγνωρίζει τη συνδετική περιοχή)	75 kDa	85 kDa	>>118 kDa
anti-BmSH3.2 (αναγνωρίζει τις SH3 περιοχές)	75 kDa (2x)40 kDa	>118 kDa	>>118 kDa 75 kDa (2x)40 kDa

Όπως προαναφέρθηκε, ανιχνεύτηκαν πολλαπλές πιθανές εναλλακτικές ισομορφές της BmSH3 με φανερή ιστοειδική κατανομή, όπως των 100 kDa που αναγνωρίστηκε στα εκχυλίσματα από Μαλπιγγιανά σωληνάρια και μεσέντερο (εικόνα 5.6 A, B). Η ποικιλομορφία των πιθανών πρωτεϊνικών ισομορφών που αναγνωρίστηκαν συμπληρώνει και επιβεβαιώνει την ποικιλομορφία των μεταγράφων που αναγνωρίστηκαν κατά την μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *bmsh3* στο επίπεδο της μεταγραφής (κεφάλαιο 4.3). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανίχνευση ισομορφών της

πρωτεΐνης που εκφράζονται αποκλειστικά στην ωοθήκη και ειδικότερα της κατανομής αυτών στο ωοκύτταρο (ισομορφή μοριακού βάρους 85 kDa) και στα επιθηλιακά κύτταρα (ισομορφή μοριακού βάρους 75 kDa).

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 5.1 βρέθηκαν τρεις πρωτεΐνες του μεταξοσκώληκα που εμφανίζουν αρκετά μεγάλο ποσοστό ομοιότητας στις SH3 περιοχές. Η DRK, που αποτελείται από 2 SH3 περιοχές που περικλείουν μια SH2 περιοχή, μεγέθους 212 αμινοξέων, εμφανίζει την μέγιστη ταυτότητα που αγγίζει το 48% (όπως φαίνεται και στο παράρτημα IX) μεταξύ της πρώτης SH3 περιοχής της BmSH3-A1 και της πρώτης SH3 της DRK.

Η ανίχνευση της ισομορφής των 85 kDa έγινε με το anti-BmSH3.1 και όχι με το anti-BmSH3.2 αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει μόνο την 75 kDa ισομορφή. Φαίνεται δηλαδή ότι από την ισομορφή των 85 kDa απουσιάζουν οι SH3 περιοχές. Το anti-BmSH3.1 αντίσωμα έδειξε μεγάλη εξειδίκευση στην αναγνώριση μιας πρωτεΐνης μοριακού βάρους άνω των 118 kDa που ανιχνεύτηκε ειδικά στο περίβλημα του ωοθυλακίου (εικόνα 5.7 Α, διαδρομή S). Πρέπει να σημειωθεί ότι η κινητικότητα της ζώνης αυτής είναι διαφορετική από την κινητικότητα της ζώνης μοριακού βάρους άνω των 118 kDa που αναγνωρίστηκε από το anti-BmSH3.2 τόσο κατά την ιστοειδική μελέτη (εικόνα 5.6 Β), όσο και κατά την μελέτη της BmSH3 στα διαμερίσματα των ωοθυλακίων και συγκεκριμένα στο εκχύλισμα από το ωοκύτταρο (εικόνα 5.7 Β, διαδρομή Oc). Έτσι, το μετάγραφο BmSH3-A1 κωδικοποιεί την μεγάλου μοριακού βάρους ζώνη που αναγνωρίστηκε στο εκχύλισμα από το περίβλημα των ωοθυλακίων. Σχετική με τα παραπάνω είναι η επεξεργασία του γονιδιώματος του μεταξοσκώληκα (SilkDB), (Duan et al., 2009) προς εύρεση πιθανών γονιδίων και συγκεκριμένα του γενετικού τόπου που κωδικοποιεί την BmSH3-A1 (κεφάλαιο 4.3.5.2, παράρτημα ΙΙ), η οποία προσδίδει επιπλέον 303 αμινοξέα, μοριακού βάρους 33 kDa, στην γνωστή αλληλουχία BmSH3-A1 και στα οποία πιθανώς να οφείλεται και η απόκλιση του προσδιορισθέντος μοριακού βάρους της BmSH3-A1 από το προβλεπόμενο με *in silico* ανάλυση της γνωστής cDNA αλληλουχίας.

Οι μικρότερες ισομορφές που ανιχνεύτηκαν στο εκχύλισμα από τα ωοθυλάκια πιθανόν να προέρχονται από εναλλακτική συρραφή, αν και πιθανότερη είναι η εκδοχή να αποτελούν προϊόντα μετα-μεταφραστικής τροποποίησης, συγκεκριμένα ειδικής

πρωτεόλυσης, της αυθεντικής BmSH3-A1 (όπως και η ισομορφή μοριακού βάρους 85 kDa που βρέθηκε στο ωοκύτταρο). Μετά από *in silico* μελέτη της αμινοξικής αλληλουχίας, με τα εργαλεία που είναι διαθέσιμα στη βάση δεδομένων Expasy (Gasteiger et al., 2003), βρέθηκαν δύο ενδοπρωτεάσες που κόβουν ειδικά την BmSH3 αλληλουχία, ακολουθίες θρομβίνης στις θέσεις 107 και 477 αα και ακολουθίες αναγνώρισης από ενδοπρωτεάση, όμοια με τη Factor-Xa, στις θέσεις 816 και 853 αα (παράρτημα VII). Η προβλεπόμενη ενζυμική δράση της θρομβίνης δίνει προϊόν μεγέθους 600 αμινοξέων που αναγνωρίζεται από το anti-BmSH3.1 και το anti-BmSH3.1 αντίσωμα και η ειδική πρωτεόλυση από την πρωτεάση Factor-Xα προϊόντα μεγέθους 800 αμινοξέων που αναγνωρίζονται μόνο από το anti-BmSH3.1. Τα προϊόντα της πρωτεόλυσης των παραπάνω ενδοπρωτεασών δίνουν μεγέθη πολυπεπτιδίων συγκρίσιμα με αυτά που ανιχνεύτηκαν πειραματικά (δηλαδή των 36,5, 85 και 100 kDa). Η μετα-μεταφραστική τροποποίηση της αυθεντικής BmSH3 μπορεί να εξηγήσει την ειδική ανίχνευση ισομορφών στα ωοθυλάκια μοριακού βάρος 75 kDa και 85 kDa.

Η μικρή πιθανή ισομορφή των ~40 kDa που αναγνωρίστηκε ειδικά από το αντίσωμα anti-BmSH3.2 μπορεί να προέρχεται είτε από την ειδική πρωτεόλυση της BmSH3 με τον Factor-Xα, αλλά πιο πιθανό είναι να αντιστοιχεί στην BmSH3-B λόγω της εξειδίκευσης της έκφρασής του στο εκχύλισμα από τα ωοθηλάκια και της αναγνώρισής του αποκλειστικά από το αντίσωμα anti-BmSH3.2 που αναγνωρίζει μόνο τις SH3 περιοχές. Η δεύτερη ζώνη μπορεί να οφείλεται σε μετα-μεταφραστική τροποποίηση της BmSH3-B, όπως φωσφορυλίωση, αφού έχουν αναγνωριστεί με δοκιμές in silico πολλαπλές πιθανές θέσεις αναγνώρισης κινασών (παράρτημα VIII).

Η διαφορετική ιστοειδική κατανομή της πρωτεΐνης και μάλιστα διαφορετικών πιθανών ισομορφών αποτελεί ένδειξη της διαφορετικής λειτουργίας της BmSH3 ανά κυτταρικό τύπο. Η αναγνώριση πιθανών πολλαπλών πρωτεϊνικών ισομορφών της BmSH3, αφού το ίδιο έχει παρατηρηθεί και για τις πρωτεΐνες της οικογένειας CAV. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση της ομόλογης πρωτεΐνης DCAP της Δροσόφιλας όπου και εκεί αναγνωρίστηκαν πολλαπλές πρωτεϊνικές ισομορφές (Yamazaki and Nusse, 2002).

Η BmSH3-A1 ανιχνεύτηκε σε όλα τα στάδια της ωογένεσης που μελετήσαμε σε συμφωνία με τα απότελέσματα της μελέτης της αναπτυξιακής ρύθμισης με RT-PCR (κεφάλαιο 4.3.7.3).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το αντίσωμα έναντι της BmSH3-A1 ισομορφής (anti-BmSH3.1) αναγνωρίζει ειδικά μία διπλή ζώνη στο ολικό εκχύλισμα των ωοθυλακίων, ενώ το anti-BmSH3.2 αναγνωρίζει ένα πιο περίπλοκο πρότυπο ζωνών. Για το λόγο αυτό οι επόμενες μελέτες στηρίχτηκαν κυρίως στο anti-BmSH3.1 αντίσωμα.

6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ’

ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ BmSH3 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΚΑΙ ΣΕ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ

6.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Για τη διερεύνηση της λειτουργίας της BmSH3 εξετάστηκε η μελέτη της υποκυτταρικής κατανομής της. Στο κεφάλαιο 4.3.4.3 περιγράφεται η προσπάθεια που έγινε για *in silico* πρόβλεψης της υποκυτταρικής κατανομής της BmSH3 με τη βοήθεια κατάλληλων προγραμμάτων (παράρτημα IV). Η ποικιλία των ισομορφών που ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν, η διαφορετική ιστοειδική κατανομή αυτών αλλά και οι ενδείξεις για πιθανές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως φωσφορυλίωση και ειδική πρωτεόλυση, αποτέλεσαν το έναυσμα για τη πειραματική μελέτη της υποκυτταρικής δομής της BmSH3.

Η μελέτη της πρωτεϊνικής κατανομής έγινε αρχικά με την χρήση της GFP φθορίζουσας τεχνολογίας, χιμαιρικών πρωτεϊνών της EYFP με ολόκληρη την BmSH3-A1 (EYFP/BmSH3-A1), με τα κυριότερα δομικά στοιχεία της BmSH3 (SoHo ή SH3 περιοχές, EYFP/BmSH3Δ.N, EYFP/BmSH3Δ.C, εικόνα 6.1). Η υποκυτταρική κατανομή της BmSH3 προσδιορίστηκε επίσης και με την ανίχνευση παροδικά εκφραζόμενης BmSH3-A1 με ανοσοφθορισμό στις κυτταρικές σειρές λεπιδοπτέρων εντόμων Bm5 και Hi5 με χρήση ειδικού anti-BmSH3.1 αντισώματος. Τέλος μελετήθηκε η υποκυτταρική κατανομή της ενδογενούς BmSH3 στα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια με ανοσοφθορισμό με το anti-BmSH3.1 αντίσωμα σε συνεστιακό μικροσκόπιο.

6.1.1. Η ΠΡΑΣΙΝΗ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΑ ΠΡΩΤΕΪΝΗ

Η GFP (πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη), το γονίδιο της οποίας έχει κλωνοποιηθεί από τη μέδουσα *Aequorea victoria*, χρησιμοποιείται ευρέως ως μάρτυρας για τη μελέτη της μεταγραφικής ρύθμισης γονιδίων ως επίτοπος για τον κυτταρικό εντοπισμό πρωτεϊνών *in vivo*. Η εκπομπή φθορισμού από ζώντα κύτταρα προϋποθέτει τη διέγερση τους από κυανό ή υπεριώδες (Ultra Violet, UV) φως.

Η GFP αποτελείται από 238 αμινοξικά κατάλοιπα και είναι μια ιδιαίτερα σταθερή πρωτεΐνη, ανθεκτική στη δράση των πρωτεασών. Η ικανότητα της GFP να απορροφά και να εκπέμπει φθορισμό οφείλεται στην παρουσία ενός χρωμοφόρου π-υδροξυβενζυλιδενημιδαζολινόνης (p-hydroxybenzylideneimidazolinone) στο μόριό της. Το χρωμοφόρο αυτό συγκροτείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα Ser65, Tyr66 και Gly67 και είναι προϊόν μετα-μεταφραστικής τροποποίησης, δηλαδή μιας αντίδρασης

κυκλοποίησης των τριών καταλοίπων και μιας αντίδρασης οξείδωσης του τυροσινικού καταλοίπου από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο. Το φάσμα διέγερσης του χρωμοφόρου της GFP παρουσιάζει μέγιστο στα 395 nm (με μέγιστο εκπομπής στα 509 nm), ενώ μια δεύτερη κορυφή εμφανίζεται στα 475 nm.

Μερικά μειονεκτήματα που παρουσιάζονται από τη χρήση της φυσικού-τύπου μορφής της GFP όπως, χαμηλή ένταση φθορισμού, υστέρηση στην ανάπτυξη φθορισμού, σύνθετος φωτοϊσομερισμός (όπου μετά από ακτινοβόληση της GFP με υπεριώδες φως αυτή διεγείρεται σε δύο μήκη κύματος, στα 395 και στα 475 nm, Brejc et. al., 1997), έχουν ξεπεραστεί με την απομόνωση μεταλλαγμένων μορφών της. Οι μεταλλαγές στην αμινοξική αλληλουχία της GFP έχουν σαν αποτέλεσμα τη μετατόπιση του μεγίστου απορρόφησης και εκπομπής του χρωμοφόρου. Μια ευρέως χρησιμοποιούμενη ισομορφή είναι αυτή που φέρει τη μεταλλαγή S65T. Η ένταση του φθορισμού που εκπέμπεται από τη GFP-S65T στα 510 nm μετά από διέγερση στα 490 nm είναι έξι φορές μεγαλύτερη από αυτού που εκπέμπεται από την φυσικού-τύπου μορφή. Επιπλέον, στη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη η αντίδραση οξείδωσης κατά το σχηματισμό του χρωμοφόρου είναι τέσσερις φορές ταχύτερη, ενώ δεν παρατηρείται φωτοϊσομερισμός και ο ρυθμός της φωτολεύκανσης είναι πολύ αργός (Cubitt et al., 1995).

Οι χιμαιρικές κατασκευές με την GFP πρέπει να εξασφαλίζουν τόσο το φθορισμό του χρωμοφόρου, όσο και τη λειτουργικότητα της προς μελέτη πρωτεΐνης. Σε γενικές γραμμές η GFP πρωτεΐνη μπορεί να κλωνοποιηθεί είτε στο αμινο-τελικό είτε στο καρβοξυ-τελικό άκρο της προς μελέτη πρωτεΐνης, με τη μεσολάβηση ή όχι συνδετικών αμινοξέων (Cubitt et al., 1995). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η τροποποιημένη GFP ονομαζόμενη ως EYFP (Enhanced Yellow Fluorescence Protein).

Η EYFP αποτελεί μια παραλλαγή της αγρίου τύπου GFP που έχει τροποποιηθεί ώστε να εκπέμπει πιο ισχυρά και να εκφράζεται εντονότερα από την αγρίου τύπου GFP σε ευκαριωτικά κύτταρα (μέγιστη διέγερση = 513 nm, μέγιστο εκπομπής = 527 nm. Η EYFP περιέχει τις εξής υποκαταστάσεις αμινοξέων: Ser-65 σε Gly, Val-68 σε Leu, Ser-72 σε Ala και Thr-203 σε Tyr (Ormö et al., 1996). Αυτές οι σημειακές μεταλλαγές μετατοπίζουν την εκπομπή από το ορατό πράσινο στο κίτρινοπράσινο αυξάνοντας εκτός από την φωτεινότητα του χρώματος και την διαλυτότητα της EYFP, αρχικά λόγω

της καλύτερης αναδίπλωσης της πρωτεΐνης αλλά λόγω και της αποτελεσματικότητας του σχηματισμού του χρωμο*φόρο*υ (αμινοξικά κατάλοιπα 65-67, (Ormö et al., 1996; Cormack et al., 1996). Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης της EYFP είναι, επίσης, τροποποιημένο, έτσι ώστε να αποτελείται από κωδικόνια που προτιμούνται στα θηλαστικά και έτσι η μετάφραση είναι πιο αποδοτική (Haas et al., 1996). Παρουσιάζονται, δηλαδή, αυξημένα επίπεδα έκφρασης της EYFP στα ευκαριωτικά κύτταρα, σε σύγκριση με την αγρίου τύπου GFP.

6.1.2. ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΌΣ

Η μελέτη της κατανομής μιας πρωτεΐνης με την τεχνολογία χιμαιρικών μορφών της με την GFP χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό του εντοπισμού της πρωτεΐνης και συγκεκριμένων περιοχών της. Παρά την ευκολία της όμως, η τεχνολογία GFP παρουσιάζει περιορισμούς όπως, η εισαγωγή μιας μεγάλης ετερόλογης αμινοξικής ακολουθίας στην αλληλουχία της υπό μελέτη πρωτεΐνης που μπορεί να οδηγήσει σε παρεμπόδιση της ορθής στερεοδιαμόρφωσης ή και της λειτουργίας της με αποτέλεσμα τη λανθασμένη κατανομή της πρωτεΐνης στο κύτταρο.

Το πρόβλημα αντιμετωπίζεται με τη χρήση της τεχνολογίας του ανοσοφθορισμού με ειδικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης - στόχου. Όταν δεν είναι διαθέσιμο αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης τότε η πρωτεΐνη εκφράζεται με ειδικό επίτοπο στο αμινο- ή το καρβοξυ-τελικό άκρο της και η ανίχνευσή της γίνεται με ειδικό αντίσωμα έναντι του επιτόπου. Ο επίτοπος είναι ένα μικρό ολιγοπεπτίδιο που συνήθως δεν μεταβάλλει τη στερεοδιάταξη της πρωτεΐνης. Το μειονέκτημα της χρήσης αντισωμάτων είναι η ανάγκη μονιμοποίησης των κυττάρων, στα οποία θα γίνει η ανίχνευση των πρωτεϊνών, και η διάνοιξη πόρων στην κυτταρική μεμβράνη για την είσοδο του αντισώματος.

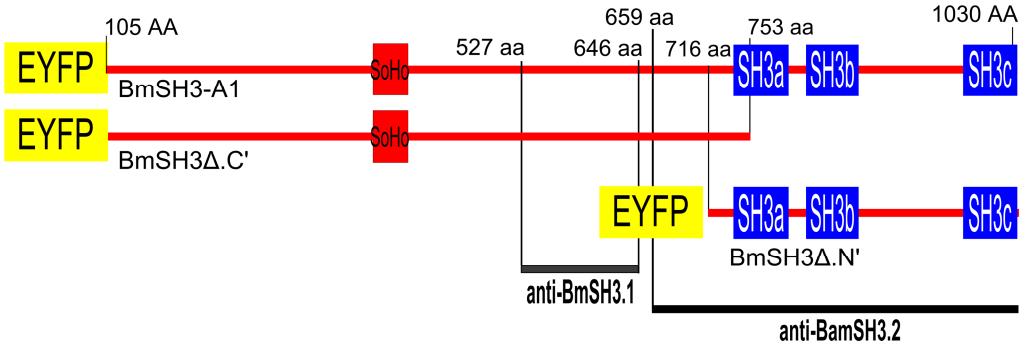
Για την ανίχνευση της κατανομής της BmSH3 στις κυτταρικές σειρές έγινε διαμόλυνση κυττάρων Hi5 και Bm5 με τον φορέα έκφρασης των BmSH3-A1, τον pEA.BmSH3-A1 (παράρτημα Χ).

Το ενδιαφέρον της παρούσας διδακτορικής διατριβής επικεντρώνεται στην αναπτυσσόμενη ωοθήκη και, συγκεκριμένα, στα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια όπου και ανιχνεύτηκε η συστατική συσσώρευση των δύο ισομορφών της BmSH3 σε όλα τα στάδια της χοριογένεσης που εξετάσαμε. Στις προηγούμενες μελέτες ανιχνεύτηκε η

ειδική έκφραση μιας διπλής ζώνης 75 kDa και 85 kDa στα ωοθυλάκια του μεταξοσκώληκα από το αντίσωμα έναντι τη περιοχής μεταξύ της SoHo και των SH3 περιοχών, anti-BmSH3.1 (εικόνα 5.6). Για τη μελέτη της ενδογενούς BmSH3 χρησιμοποιήθηκε το anti-BmSH3.1 αντίσωμα σε πειράματα *in situ* ανοσοφθορισμού. Από τη μελέτη του προτύπου φθορισμού της χιμαιρικής της EYFP με ολόκληρη την BmSH3-A1 και από το πρότυπο ανοσοφθοριμού της BmSH3-A1 βρέθηκε ότι η υποκυτταρική κατανομή της BmSH3 είναι κυτταροπλασματική, Επομένως, αναμένεται η ίδια κατανομή και στα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια.

6.2. ΕΙΔΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η χρήση της GFP ως μόριο αναφοράς έδωσε την δυνατότητα της άμεσης παρατήρησης σημασμένων πρωτεϊνών σε ζώντα κύτταρα, χωρίς κατεργασία των κυττάρων, μετά από διαμόλυνση των κυττάρων με κατάλληλο φορέα έκφρασης (Stearns, 1995; Tsien, 1998). Αυτό δίνει την δυνατότητα της παρατήρησης της κατανομής της πρωτεΐνης σε ζωντανά κύτταρα σε πραγματικό χρόνο (live imaging).



Εικόνα 6.1: Γραφική παράσταση των χιμαιρικών πρωτεϊνών της EYFP με ολόκληρη την BmSH3-A1, EYFP/BmSH3-A1, με το αμινο-τελικό άκρο της BmSH3, EYFP/BmSH3Δ.C και τέλος με το καρβοξυ-τελικό άκρο, EYFP/BmSH3Δ.N. Με τα κίτρινα κουτιά γίνεται η αναπαράσταση της σχετικής θέσης της EYP, με κόκκινα της SoHo, με μπλε των SH3. Σημαίνεται και η σχετική θέση των τμημάτων της BmSH3 και των αντισωμάτων με την BmSH3-A1, με μαύρες κάθετες γραμμές.

Η αναλυτική περιγραφή της κατασκευής των EYFP χιμαιρικών πρωτεϊνών με ολόκληρη τη BmSH3-A1 ή τμήματα αυτής περιγράφεται στο παράρτημα Χ**.** Οι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν κατασκευάστηκαν έτσι ώστε να περιλαμβάνουν τον ενισχυτή hr3, τον υποκινητή της ακτίνης, το cDNA του ενδιαφέροντός μας και την 3΄ αμετάφραστη περιοχή της ακτίνης που περιέχει και την poly-A ουρά (pEA φορέας,

(Douris et al., 2006) (παράρτημα Χ, εικόνα 6.1). Οι φορείς έκφρασης χρησιμοποιήθηκαν για την παροδική διαμόλυνση των κυτταρικών σειρών Bm5 και Hi5 παρουσία του φορέα έκφρασης που περιλαμβάνει το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα IE1 που ενισχύει επιπλέον την έκφραση του γονιδίου κατά 100 φορές (Douris et al., 2006). Με τη χρήση τμημάτων της πρωτεΐνης, που περιλαμβάνουν βασικά δομικά στοιχεία της, είναι δυνατόν να ληφθούν σημαντικές πληροφορίες για τον πιθανό ρόλο των συντηρημένων περιοχών στον υποκυτταρικό εντοπισμό της BmSH3.

Η διαμόλυνση των κυτταρικών σειρών έγινε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.21 σε τρυβλίο κυτταροκαλιέργειας έξι θέσεων (6-well plate). Κατά τη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκαν 0,5 μg από τον φορέα έκφρασης pEA.BmSH3-A1, 0,5 μg από τον φορέα έκφρασης pEA και 0,5 μg από τον pEIA, ώστε η τελική ποσότητα DNA να είναι 1,5 μg. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε 1 μg από τον κενό φορέα έκφρασης pEA και 0,5 μg από τον φορέα έκφρασης pEIA. Μετά την πάροδο τριών ημερών από τη διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς έγινε η μονιμοποίηση των κυττάρων, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.28.1.2 και παρατήρησή τους σε μικροσκόποιο φθορισμού.

Για την προετοιμασία των ωοθυλακίων πριν από την παρατήρηση στο συνεστιακό μικροσκόπιο, απομονώθηκε η αναπτυσσόμενη ωοθήκη από νύμφη έκτης μέρας και τα ωοθυλάκια κατεργάστηκαν όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 3.28.2. Μετά από την διάνοιξη πόρων στο κυτταρικό τοίχωμα των ιστών με κολλαγενάση (Sigma) και τη μονιμοποίηση με 4% φορμαλδεΰδη σε PBS για 2 ώρες, ακολούθησε ολονύχτια επώαση των κατεργασμένων ωοθυλακίων με το πρώτο αντίσωμα, anti.BmSH3.1, σε αραίωση 1:500 σε 4% NGS (Neutral Goat Serum, Ουδέτερος ορός αίγας) και με το δεύτερο αντίσωμα στο οποίο είχε προσδεθεί κόκκινη φθορίζουσα ουσία RRX (Rhodamine Red-X) (κεφάλαιο 3.28.2) σε αραίωση 1:1000 για 1 ώρα. Τα ωοθυλάκια τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα με κοίλωμα, για να αποφευχθεί η ρήξη του ωοθυλακίου, και προστέθηκε μικρή ποσότητα από διάλυμα 1% PPD (υδροχλωρική p-φαινυλενοδιαμίνη) (κεφάλαιο 3.28.1.2) σε γλυκερόλη. Το σύστημα σφραγίστηκε αεροστεγώς με βαφή για νύχια και ακολούθησε η παρατήρηση του προτύπου φθορισμού σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.

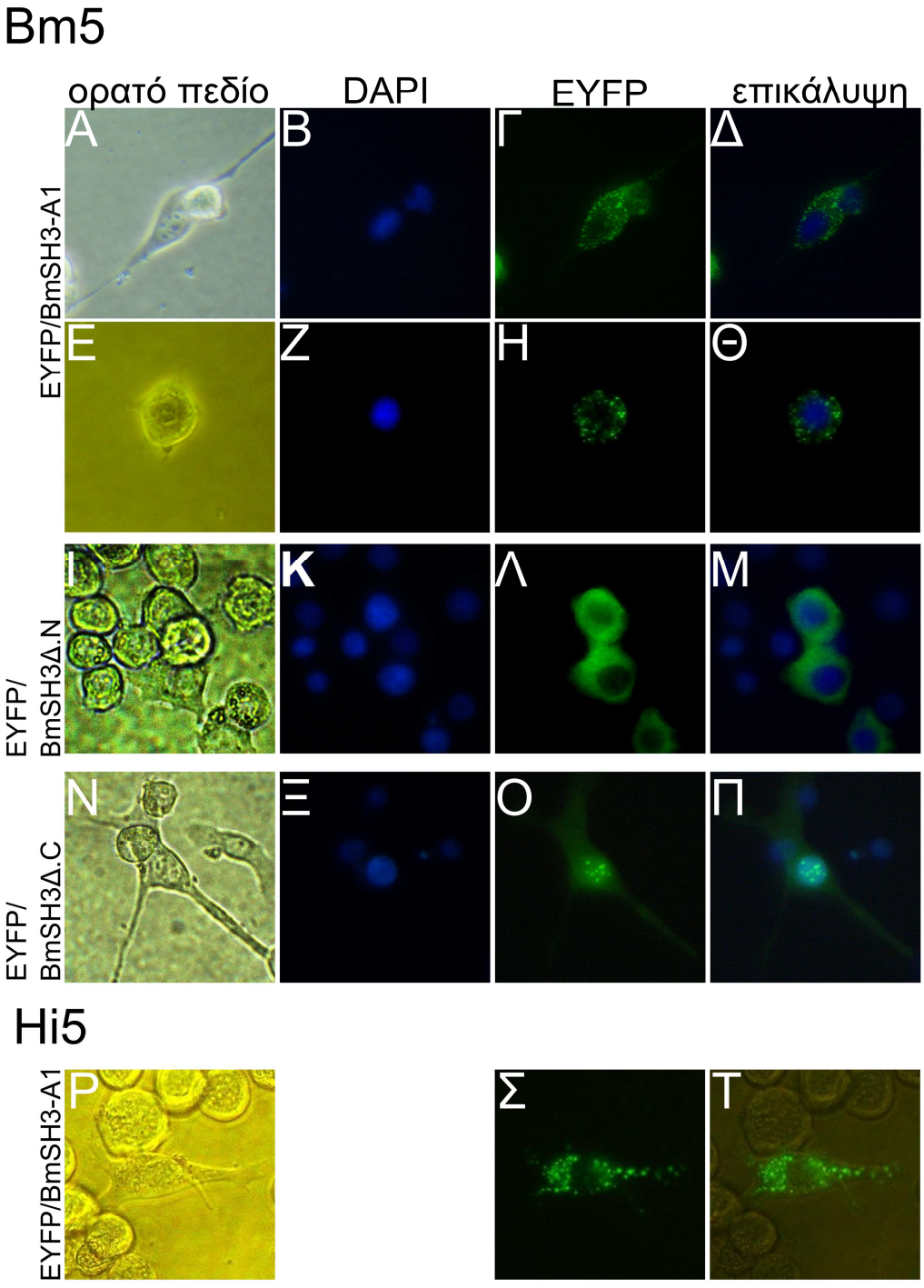
6.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.3.1. ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΗΣ EYFP ΧΙΜΑΙΡΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ.

Μετά την διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς Bm5 με τους φορείς έκφρασης των EYFP/BmSH3-A1, EYFP/BmSH3Δ.N και EYFP/BmSH3Δ.C, μελετήθηκε το πρότυπο φθορισμού των χιμαιρικών πρωτεϊνών σε κυτταρικές σειρές.

Από τη μελέτη του προτύπου φθορισμού της χιμαιρικής πρωτεΐνης EYFP/BmSH3-A1 σε κύτταρα Bm5 (εικόνα 6.2 Α-Θ**)** προέκυψε ότι ο υποκυτταρικός εντοπισμός της είναι σε κοκκία ή συσσωματώματα στο κυτταρόπλασμα. Επιπλέον παρατηρήθηκε και αμυδρός διάχυτος φθορισμός και στο κυτταρόπλασμα (εικόνα 6.2 Γ, Η).

Το πρότυπο φθορισμού της χιμαιρικής πρωτεΐνης EYFP/BmSH3Δ.N, από την οποία απουσιάζει το αμινο-τελικό άκρο (εικόνα 6.1), παρουσίασε μόνο διάχυτη κυτταροπλασματική κατανομή, (εικόνα 6.2 Ι-Μ). Επομένως, η κατανομή της BmSH3 στα κοκκία πιθανόν να οφείλεται σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά του αμινο-τελικού άκρου της BmSH3-A1.



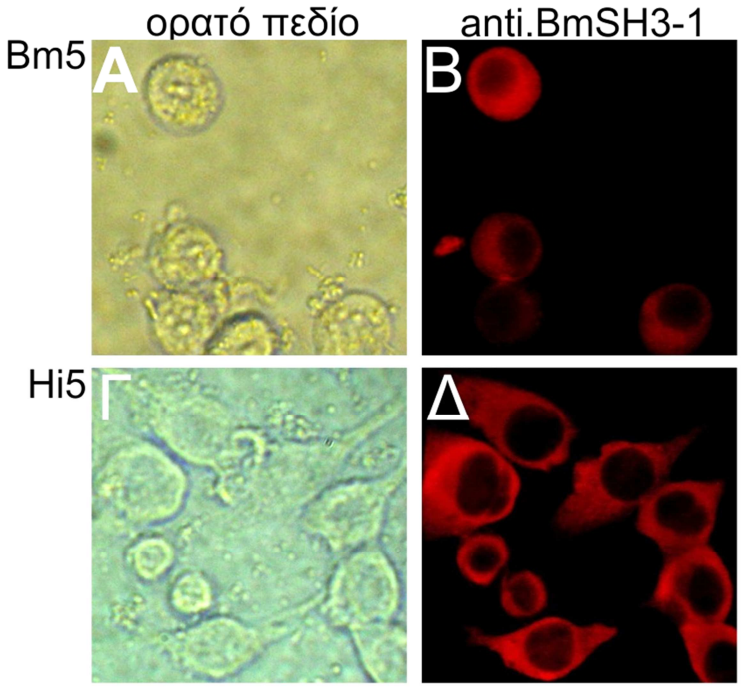
Εικόνα 6.2: Πρότυπο φθορισμού της χιμαιρικής BmSH3-A1 ή τμημάτων της με την EYFP μετά από παροδική διαμόλυνση της Bm5 κυτταρικής σειράς*. Μελετήθηκε το πρότυπο φθορισμού της χιμαιρικής της BmSH3-A1 (Α-Θ), του καρβοξυ-τελικού της άκρου (Ι-Μ) και του αμινο-τελικού της άκρου (Ν-Π). Επιπλέον μελετήθηκε το πρότυπο φθορισμού της EYFP/BmSH3-A1 στην κυτταρική σειρά Hi5 (Ρ-Τ). Στις εικόνες Α, Ε, Ι, Ν, Ρ, παρουσιάζονται φωτογραφίες των κυττάρων στο ορατό φώς, με ιώδες χρώμα παρουσιάζεται η χρώση του πυρηνικού DNA με DAPI (Β, Ζ, Κ, Ξ), και με πράσινο χρώμα ο φθορισμός των χιμαιρικών πρωτεϊνών (Γ, Η, Λ, Ο).*

Τέλος, η μελέτη του πρότυπου φθορισμού της χιμαιρικής πρωτεΐνης EYFP/BmSH3Δ.C, από την οποία απουσιάζουν οι SH3 περιοχές, έδειξε πως η χιμαιρική πρωτεΐνη εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα σε μεγάλα κοκκία, με κάποιο αμυδρό διάχυτο φθορισμό να είναι επίσης εμφανής στο κυτταρόπλασμα (εικόνα 6.2, Ν-Π).

Για τη κυτταρική σειρά Hi5, η υποκυτταρική κατανομή της BmSH3-A1 εξετάστηκε μόνο για τη χιμαιρική πρωτεΐνη EYFP/BmSH3-A1, μετά από παροδική συνδιαμόλυνση της κυτταρικής σειράς με τον φορέα pEIA (εικόνα 6.2 Ρ-Τ). Όπως παρατηρήθηκε κατά την διαμόλυνση των Bm5 κυττάρων το πρότυπο φθορισμού της EYFP/BmSH3-A1 είναι κυτταροπλασματικό και η EYFP/BmSH3-A1 εντοπίζεται και σε αυτή την περίπτωση σε κοκκία (εμφάνιση στικτού προτύπου, εικόνα 6.2 Σ).

6.3.2. ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΗΣ BmSH3-A1 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΕΝΤΟΜΩΝ

Αρχικά μελετήθηκε η υποκυτταρική κατανομή της BmSH3-A1 με το αντίσωμα anti-BmSH3 μετά από την παροδική διαμόλυνση των κυτταρικών σειρών εντόμων Bm5 και Hi5 με τον φορέα έκφρασης pEA.BmSH3-A1 (εικόνα 6.3). Παρατηρήθηκε, διάχυτος εντοπισμός της BmSH3 στο κυτταρόπλασμα και των δύο κυτταρικών σειρών (εικόνα 6.3 Β, Δ) αλλά το στικτό πρότυπο που παρατηρήθηκε για την χιμαιρική πρωτεΐνη EYFP/BmSH3-A1 και την EYFP/BmSH3Δ.C δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση της αυθεντικής BmSH3-A1.



Εικόνα 6.3: Πρότυπο φθορισμού της BmSH3-A1 στις κυτταρικές σειρές Bm5 (Α, Β) και Hi5 (Γ, Δ). Φωτογραφία από το μικροσκόπιο φθορισμού: ο ανοσοφθορισμός παρουσιάζεται με κόκκινο χρώμα (Β, Δ). Ορατό πεδίο: εικόνες Α,Γ. Παρατηρείται η κυτταροπλασματική κατανομή της BmSH3-A1.

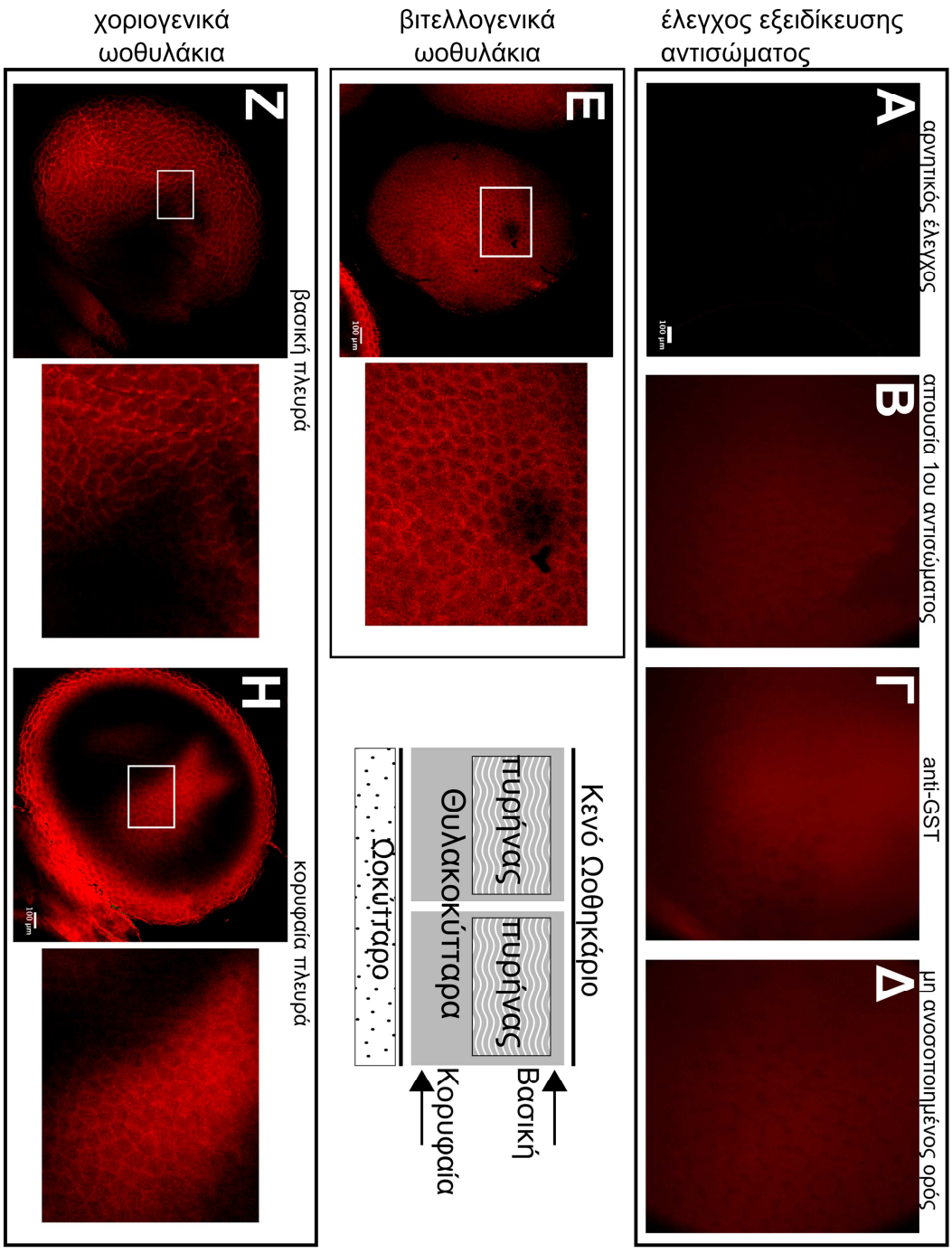
Εφόσον και η υποκυτταρική κατανομή της BmSH3-A1 στη Bm5 και στη Hi5 κυτταρική σειρά (εικόνα 6.3) ήταν ταυτόσημη, η μελέτη της υποκυτταρικής κατανομής της BmSH3-A1 συνεχίστηκε στην Hi5 κυτταρική σειρά λόγω της αυξημένης έκφρασης της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης στα συγκεκριμένα κύτταρα έναντι των Bm5 κυττάρων.

6.3.3. ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΗΣ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ BmSH3 ΣΤΑ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ

Η παρατήρηση του προτύπου φθορισμού της BmSH3 έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού σε αρχική οπτική μεγέθυνση x10. Το πρότυπο φθορισμού των ωοθυλακίων κατά την βιτελλογένεση ήταν κυτταροπλασματικό (εικόνα 6.4, Ε-Η). Δεν ήταν δυνατή η παρατήρηση του προτύπου φθορισμού σε βιτελλογενικά ωοθυλάκια με μεγαλύτερη μεγέθυνση επειδή λόγω ‘θορύβου’ (αυτοφθορισμού από συστατικά του

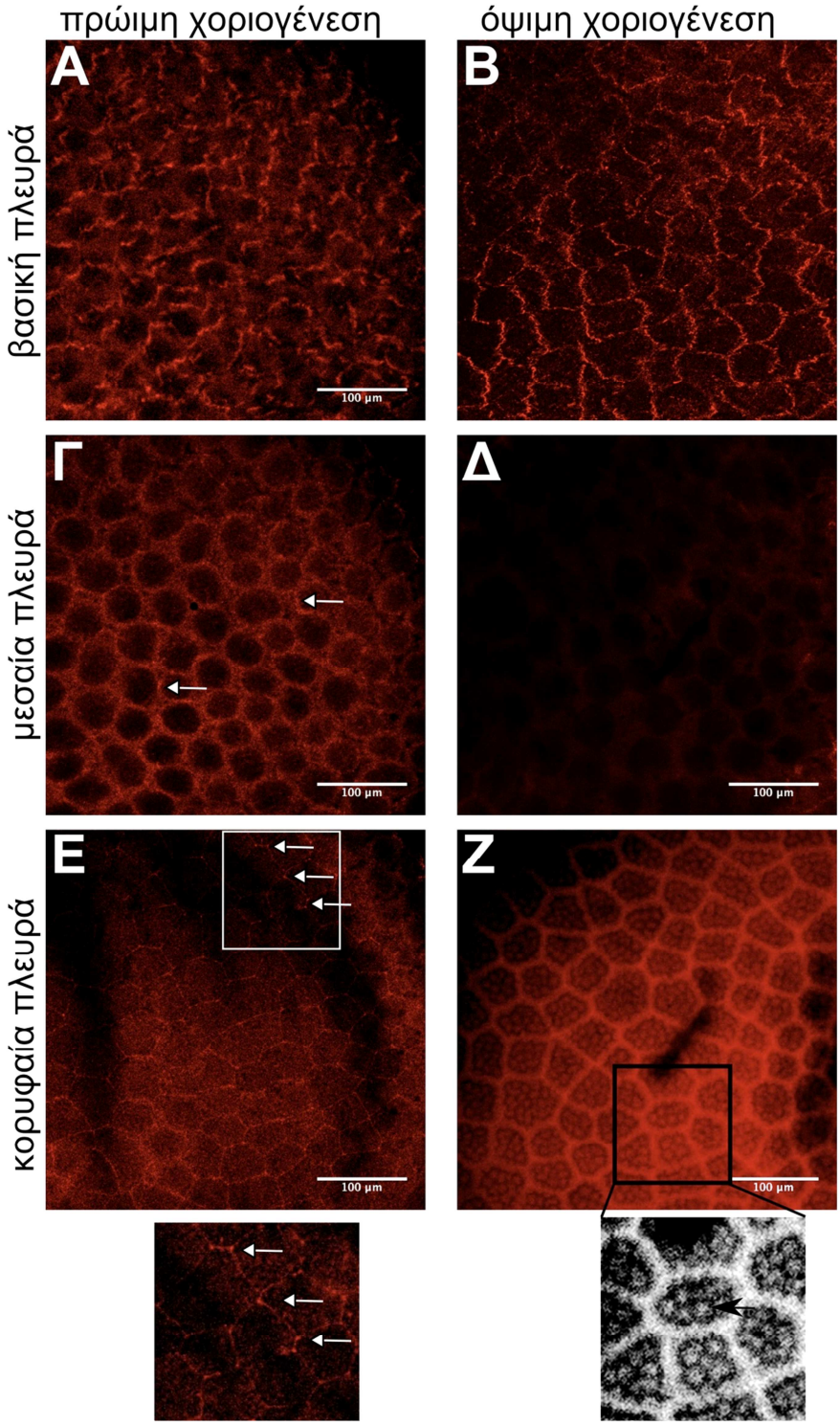
ωοκύτταρου) που προέρχεται από τον ωοκύτταρο και της απουσίας του κελύφους, που σχηματίζεται κατά την χοριογένεση, παρεμποδίζεται η ευκρινής παρατήρηση της ισομορφής που βρίσκεται στα επιθηλιακά κύτταρα. Ο αυτοφθορισμός ίσως να προέρχεται από την ισομορφή των 85 kDa που εντοπίστηκε στο ωοκύτταρο κατά τις μελέτες τύπου Western (εικόνα 5.7, 5.8). Δεν ήταν δυνατή η απόκτηση καθαρότερων φωτογραφιών για τα στάδια της βιτελλογένεσης από αυτές που παρουσιάζονται. Σε όλα τα στάδια όμως ήταν δυνατή η ανίχνευση της κυτταροπλασματικής κατανομής.

Κατά τη χοριογένεση η κατανομή της BmSH3, στην ίδια οπτική μεγέθυνση, παρουσιάζει εμφανή διαφοροποίηση (εικόνα 6.4 Z, H). Το γενικό πρότυπο φθορισμού της BmSH3 εξακολουθεί να είναι κυτταροπλασματικό. Όμως, στα ωοθυλάκια όψιμης χοριογένεσης η BmSH3 βρέθηκε να εντοπίζεται και στη βασική (εικόνα 6.4 Z) και στην κορυφαία πλευρά (εικόνα 6.4 H) των θυλακοκυττάρων, σε δομές που πιθανότατα να αποτελούν τις επαφές μεταξύ κυττάρων**.** Παρατηρήθηκε, λοιπόν, μια πολικότητα στην κατανομή της πρωτεΐνης κατά τη χοριογένεση σε αντιδιαστολή με την υποκυτταρική κατανομή κατά τη βιτελλογένεση.



Εικόνα 6.4: Συνεστιακή μικροσκοπία ανοσοφθορισμού σε οπτική μεγέθυνση x10. Δοκιμή αρνητικού μάρτυρα σε αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια (Α-Δ). Για την εξέταση της εξειδίκευση του αντισώματος έγινε ανάλυση του προτύπου φθορισμού (Α) σε ωοθυλάκια που επωάστηκαν μόνο με το δεύτερο αντίσωμα έναντι της σταθερής περιοχής του πρώτου πολυκλωνικού αντισώματος (Β) με επώαση με το δεύτερο αντίσωμα απουσία του πρώτου ειδικού αντισώματος, (Γ) με επώαση με αντίσωμα έναντι της GST και του δεύτερου αντισώματος και (Δ) με την επώαση με τον μη ανοσοποιημένο ορό και του δεύτερου αντισώματος. (Ε) Ανοσοφθορισμός στις μεσαίες τομές από θυλακοκύτταρα βιτελλογενετικού ωοθυλακίου. Διακρίνεται ο κυτταροπλασματικός φθορισμός. Και παρουσιάζεται απίσης η ψηφιακή μεγέθυνση του λευκού πλαισίου. (Ζ-Η) Ανοσοφθορισμός στην κορυφαία (Ζ) και στη βασική (Η) πλευρά των θυλακοκυττάρων χοριογενετικού ωοθυλακίου. Παρουσιάζεται και η ψηφιακή μεγέθυνση της περιοχής εντός του λευκού πλαισίου. Με το σχεδιάγραμμα αναπαρίστανται η δομή των θυλακοκυττάρων και οι εστιακές τομές από όπου έχουν ληφθεί οι εικόνες.

Η μελέτη της υποκυτταρικής κατανομής της ενδογενούς BmSH3 στα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια συνεχίστηκε με την παρατήρηση του προτύπου φθορισμού των ωοθυλακίων σε μεγαλύτερη μεγέθυνση (40x οπτική μεγέθυνση) για τα στάδια της χοριογένεσης, όπου ήταν δυνατή η παρατήρηση της κατανομής της BmSH3 χωρίς την παρεμβολή 'θορύβου' από τον αυτοφθορισμό του ωοκυττάρου. Στην εικόνα 6.5 παρουσιάζονται τομές των επιθηλιακών κυττάρων, από την βασική, τη μεσαία και την κορυφαία πλευρά των ωοθυλακίων κατά τα πρώιμα και τα όψιμα στάδια της χοριογένεσης. Όπως παρατηρήθηκε και στις εικόνες από την μικρότερη μεγέθυνση, ο υποκυτταρικός εντοπισμός της BmSH3 στα θυλακοκύτταρα κατά τη χοριογένεση είναι εξ ολοκλήρου κυτταροπλασματικός. Σημαντική διαφοροποίηση υπήρξε όμως στο δυναμικό πρότυπο που παρατηρήθηκε κατά την ανάπτυξη των ωοθυλακίων, καθώς ανιχνεύτηκε διαφορετικός υποκυτταρικός εντοπισμός της BmSH3 στα πρώιμα, σε σχέση με τα όψιμα στάδια της χοριογένεσης (εικόνα 6.5). Κατά την πρώιμη χοριογένεση, η BmSH3 βρέθηκε να συσσωρεύεται στη μεσαία τομή των επιθηλιακών κυττάρων (εικόνα 6.5 Β) δηλαδή να έχει κυτταροπλασματική κατανομή. Στην βασική πλευρά των πρώιμων χοριογενικών ωοθυλακίων η επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων παρατηρείται η συσσώρευση της BmSH3 στις επαφές μεταξύ των κυττάρων (εικόνα 6.5 Α). Στην κορυφαία πλευρά παρατηρήθηκε μικρή συγκέντρωση της BmSH3 στα όρια μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων (εικόνα 6.5 Ε), πιθανόν περιμεμβρανικά, ενώ επιπλέον, παρατηρήθηκε και εντονότερη συσσώρευση στις εστιακές επαφές στο κυτταρόπλασμα στην πλευρά όπου γίνεται η έκκριση του χορίου (εικόνα 6.4 Ε μεγέθυνση).



Εικόνα 6.5: Συνεστιακή μικροσκοπία ανοσοφθορισμού. Παρουσιάζεται το πρότυπο φθορισμού της BmSH3 σε θυλακοκύτταρα από χοριογενικά ωοθυλάκια. Παρουσιάζονται εστιακές τομές της βασικής πλευρά (Α, Β), της μεσαίας πλευράς (Γ, Δ) και της κορυφαίας πλευράς (Ε, Ζ) των θυλακοκυττάρων στα πρώιμα (Α, Γ, Ε) και όψιμα χοριογενικά ωοθυλάκια (Β, Δ, Ζ). Παρουσιάζεται επιπλέον η ψηφιακή μεγέθυνση περιοχών ενδιαφέροντος από τις εικόνες στην κορυφαία πλευρά που βρίσκονται εντός πλαισίου. Με λευκά βέλη υποδεικνύονται οι περιοχές όπου είναι έντονες οι επαφές κυττάρων, ενώ με μαύρο βέλος ένα από τα συσσωματώματα που εντοπίστηκαν στη κορυφαία πλευρά.

Στα όψιμα ωοθυλάκια παρατηρήθηκε ουσιώδης διαφορά στο πρότυπο φθορισμού. Σε αυτά δεν ανιχνεύτηκε φθορισμός στις μεσαίες τομές των επιθηλιακών κυττάρων, γεγονός που υποδηλώνει την απουσία της BmSH3 από τις συγκεκριμένες τομές (εικόνα 6.5 Δ). Επιπλέον, σε αντίθεση με το πρότυπο φθορισμού στα πρώιμα χοριογενικά ωοθυλάκια, το πρότυπο φθορισμού στη βασική πλευρά είναι κυματιστό και εντοπίζεται στις επαφές μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων (εικόνα 6.5 Β). Στην κορυφαία περιοχή, το πρότυπο φθορισμού παρουσιάζεται ως περιμεμβρανικό και εμφανίζει γεωμετρική διάταξη, σε πεντάγωνες ή και εξάγωνες γεωμετρικές δομές που περικλείουν μικρές κυκλικές δομές από συσσωματώματα της BmSH3 (εικόνα 6.5 Ζ). Το πρότυπο που παρατηρήθηκε στην κορυφαία πλευρά θυμίζει την επιφάνεια του κελύφους των αυγών του *Bombyx mori* όπως αυτή παρατηρείται σε φωτογραφίες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (KAWAGUCHI et al., 1996). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν την πιθανή εμπλοκή της BmSH3 στην διαδικασία διαμόρφωσης της δομής της επιφάνειας του κελύφους του μεταξοσκώληκα κατά τη διάρκεια της χοριογένεσης.

6.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

Τόσο σε κύτταρα Bm5 όσο και σε Hi5, η EYFP/BmSH3-A1 εμφανίζει την ίδια κυτταροπλασματική κατανομή. Το στικτό πρότυπο που παρατηρήθηκε εμφανίζεται και στην βιβλιογραφία για ομόλογες πρωτεΐνες, όπως για την περίπτωση των πρωτεϊνών της οικογένειας CAV. Έτσι, η εμφάνιση των κοκκίων ήταν συνήθης μετά από υπερέκφραση των συζευγμένων πρωτεϊνών της vinexin με πρωτεΐνες τύπου GFP ή μετά από σήμανση με τον επίτοπο FLAG (Kioka et al., 1999; Tujague et al., 2004), όπου παρατηρήθηκε η συσσωμάτωση της vinexin ανεξάρτητα από την ύπαρξης της vinculin, της πρωτεΐνης με την οποία αλληλεπιδρά, υπονοώντας ότι η συσσωμάτωση πιθανόν να οφείλεται στην υπερέκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης. Σε άλλες αναφορές και συγκεκριμένα κατά την μελέτη της ArgBP2 βρέθηκε ότι στα συσσωματώματα που εμφανίζονται κατά την υπερέκφραση της χιμαιρικής της GFP με την ArgBP2 γίνεται συνεντοπισμός και αλληλεπίδραση της ArgBP2 με τη phalloidin (Cestra et al., 2005), ενώ στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε και ο συνεντοπισμός της χιμαιρικής με την περιοχή SoHo της ενδογενούς α2-spectrin (πρωτεΐνη ικριώματος που συμβάλει στη διατήρηση της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης και του κυτταροσκελετού) σε

παρόμοια συσσωματώματα. Για την CAP το πρότυπο που παρατηρήθηκε προσομοιάζει περισσότερο το πρότυπο φθορισμού που παρατηρήθηκε κατά την διαμόλυνση του EYFP/BmSH3-A1 και εντοπίζεται στις επαφές κυττάρου εξωκυττάριας μήτρας (Zhang et al., 2006; Fernow et al., 2009).

Ο εντοπισμός της χιμαιρικής της EYFP σε αυτά τα κοκκία πιθανά να αποτελεί προϊόν της υπερέκφρασης της χιμαιρικής πρωτεΐνης αφού δεν παρατηρήθηκε ίδιο πρότυπο κατά την μελέτη της κατανομής της BmSH3 με το anti-BmSH3, ή να συμβαίνει λόγω του συνεντοπισμού της με κάποια άλλη πρωτεΐνη, την phalloidin ή την α2-spectrin. Σε κάθε περίπτωση η κατανομή της BmSH3-A1 είναι εμφανής στο κυτταρόπλασμα, ενώ δεν ανιχνεύεται στον πυρήνα (εικόνα 6.2 Δ, Θ).

Αντίθετα, παρατηρήθηκε ότι η πρωτεΐνη EYFP/BmSH3Δ.C, από την οποία απουσιάζουν οι SH3 περιοχές, εντοπίζεται και στον πυρήνα, εκτός από το κυτταρόπλασμα. Η ανίχνευση της EYFP/BmSH3Δ.C στον πυρήνα πιθανώς να οφείλεται στα σήματα πυρηνικού εντοπισμού που αναγνωρίστηκαν κατά την in silico μελέτη της αμινοξικής αλληλλουχίας (κεφάλαιο 4.3.4.3, παράρτημα IV), τα οποία απουσία της καρβοξυ-τελικής, περιοχής που περιλαμβάνει τις περιοχές SH3, οδηγούν την BmSH3 στον πυρήνα.

Παρόμοια κατανομή παρατηρήθηκε κατά την μελέτη της ArgBP2 συζευγμένης με την EGFP και του αμινο-τελικού της άκρου, που περιλαμβάνει τη περιοχή SoHo ή του καρβοξυ-τελικού άκρου που περιλαμβάνει τις περιοχές SH3 (Rönty et al., 2005). Η πλήρης ArgBP2 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και ειδικότερα στα ινίδια ακτίνης που σχηματίζονται σε κατάσταση στρες, ενώ η αμινο-τελική της περιοχή, που εμφανίζει το ίδιο πρότυπο, ανιχνεύτηκε και στον πυρήνα πιθανώς λόγω της ύπαρξης σημάτων πυρηνικού εντοπισμού που υπάρχουν στην αλληλουχία της, όπως παρατηρήθηκε και με την BmSH3. Στην παρούσα μελέτη δεν ήταν δυνατή η διερεύνηση της συγκατανομής της BmSH3-A1 με ομόλογες πρωτεΐνες του *B. mori*, για τις οποίες αναφέρθηκε η αλληλεπίδραση με μέλη της οικογένειας CAV.

Σημειώνεται ότι δεν ήταν δυνατή η αναγνώριση κάποιου άλλου συντηρημένου στοιχείου της αμινοξικής αλληλουχίας που θα μπορούσε να εξηγήσει την κατανομή των χιμαιρικών πρωτεϊνών σε κοκκία στο κυτταρόπλασμα (όπως παρατηρήθηκε για τις

χιμαιρικές EYFP/BmSH3-A1 και EYFP/BmSH3Δ.N) ή στον πυρήνα (όπως παρατηρήθηκε για την EYFP/BmSH3Δ.C).

Ενδιαφέρον παρουσίασε και η διαφορετική υποκυτταρική κατανομή της BmSH3-A1 που παρατηρήθηκε για το καρβοξυ-τελικό κομμάτι (εικόνα 6.2, Κ-Π). Όταν μελετήθηκε η υποκυτταρική κατανομή του καρβοξυ-τελικού κομματιού της EYFP/BmSH3Δ.N βρέθηκε ο διάχυτος κυτταροπλασματικός εντοπισμός. Συμπερασματικά, η τοπολογία της πρωτεΐνης στο κύτταρο τροποποιείται από το καρβοξυ- άκρο, που να αφορά τις SH3 περιοχές, που πιθανώς διατηρούν την κατανομή της πρωτεΐνης κυτταροπλασματική. Σε καμία περίπτωση δεν εντοπίστηκαν τα κοκκία ή συσσωματώματα που παρατηρήθηκαν στις υπόλοιπες δύο περιπτώσεις. Η κατανομή σε κοκκία μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη της SoHo περιοχής (Cestra et al., 2005). Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 4.3.4.3 η αμινοτελική περιοχή εμφανίζει δύο χαρακτηριστικές ακολουθίες, τα πιθανά πυρηνικά σήματα εντοπισμού και μια εκτεταμένη περιοχή πλούσια στο αμινοξύ προλίνη, που αποτελεί στόχο άλλων πρωτεϊνών αγκυροβόλησης που περιέχουν SH3 ή άλλες περιοχές με παρόμοιο στόχο. Ο εντοπισμός της EYFP/BmSH3Δ.C στον πυρήνα πιθανώς να οφείλεται στα πυρηνικά σήματα εντοπισμού που εντοπίστηκαν στο αμινο-τελικό άκρο της αλληλουχίας (κεφάλαιο 4.3.4.3). Παρόλο που τα στοιχεία αυτά υπάρχουν στην αλληλουχία της EYFP/BmSH3-A1, αυτή εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα πιθανώς λόγω της απόκρυψης αυτών των στοιχείων που τα καθιστά μη λειτουργικά. Μία εξήγηση για αυτή την ιδιότητα μπορεί να είναι η πιθανή ενδομοριακή αλληλεπίδραση των SH3 περιοχών του καρβοξυ- τελικού άκρου με την πλούσια σε προλίνη περιοχή στο αμινο-τελικό άκρο. Η μελέτη ολόκληρης της BmSH3-A1 μετά από υπερέκφρασή της στις κυτταρικές σειρές των εντομικών κυτταρικών σειρών Hi5 και Bm5 έδειξε ότι η BmSH3-A1 εμφανίζει διάχυτη κυτταροπλασματική κατανομή.

Για την ωογένεση ιδιαίτερη σημασία αποτελεί η διαφοροποίηση της κατανομής της BmSH3 κατά τη διάρκεια της χοριογένεσης. Η μικροσκοποία φθορισμού, κατά τη βιτελλογένεση η BmSH3 φαίνεται να απουσιάζει από τις επαφές των κυττάρων, όπως συμβαίνει και με τα θυλακοκύτταρα από πρώιμα χοριογενικά ωοθυλάκια. Μετά την μετάβαση από τη βιτελλογένεση στη χοριογένεση και κυρίως στη όψιμη χοριογένεση, η υποκυτταρική της κατανομή εμφανίζει πολικότητα και εντοπίζεται κυρίως στις επαφές

μεταξύ των κυττάρων στην βασική και στην κορυφαία πλευρά αλλά και σε συσσωματώματα στην κορυφαία πλευρά. Η δυναμική αυτή υποκυτταρική διαμερισματοποίηση της BmSH3 κατά την ωογένεση υποδηλώνει την πιθανή εμπλοκή της στον σχηματισμό του χορίου.

7. ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ’

Η ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ BmSH3 ΜΕ ΤΟΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ BmE75

7.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης της BmSH3-A1 με τους ορφανούς πυρηνικούς υποδοχείς BmE75A και BmE75C που βρέθηκε με το σύστημα δύο υβριδίων στη ζύμη, έγινε με στόχο να επιβεβαιωθεί αυτή η αλληλεπίδραση *in vitro*.

7.2. ΕΙΔΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Αρχικά έγινε διαμόλυνση Hi-5 κυττάρων με τους κατάλληλους φορείς έκφρασης και κατεργασίας των κυττάρων έγινε ακριβώς όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 3.28.1, με επιπλέον εισαγωγή 0,5 μg από τον φορέα έκφρασης pEA.myc.BmE75A ή pEA.myc.BmE75C κατά τη συνδιαμόλυνσή κυττάρων με τον pEA.BmSH3-A1 (πίνακας 7.1). Για την ανίχνευσή των αντίστοιχων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό αντίσωμα anti-Myc ή το αντίσωμα anti-BmSH3.1. Το δεύτερο αντίσωμα έναντι του πολυκλωνικού anti-BmSH3.1 αντισώματος φέρει το χρωμοφόρο RRX, το οποίο εκπέμπει στο φάσμα του κόκκινου (κεφάλαιο 3.28.2) και το δεύτερο αντίσωμα έναντι του μονοκλωνικού anti.Myc αντισώματος φέρει το χρωμοφόρο FITC που εκπέμπει στο πράσινο φάσμα (κεφάλαιο 3.28.2).

Για τη μελέτη της υποκυτταρικής κατανομής της BmSH3-A1 και των BmE7A, BmE75C στο συνεστιακό μικροσκόποιο, έγιναν δύο τροποποιήσεις στο χειρισμό των κυττάρων. Αρχικά, έγινε αντιστροφή των χρωμοφόρων των δεύτερων αντισωμάτων έναντι του πολυκλωνικού και του μονοκλωνικού αντισώματος, που φέρουν πλέον το FITC και το RRX χρωμοφόρο αντίστοιχα. Έτσι στο φάσμα εκπομπής του πράσινου παρατηρήθηκε η κατανομή της BmSH3-A1 και στο κόκκινο η κατανομή πρωτεϊνών σημασμένων με τον Myc επίτοπο. Επιπλέον, κατά την καλλιέργεια των κυττάρων, στα οποία είχε γίνει η παροδική διαμόλυνση με τους κατάλληλους φορείς έκφρασης, στα τρυβλία έξι θέσεων είχαν τοποθετηθεί αποστειρωμένες καλυπτρίδες πολύ-L-λυσίνης (3.28.1.1) ανά πηγάδι για την ισχυρότερη προσκόλληση των κυττάρων στις καλυπτρίδες και τον αποδοτικότερο χειρισμό των κυττάρων κατά τα ξεπλύματα και την τοποθέτηση στην αντικειμενοφόρο πλάκα, που αποσκοπεί στην αποφυγή της απώλειας αυτών και της μείωσης της ταλαιπωρίας των κυττάρων. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.28.1.2.

Πίνακας 7-1 Παράθεση της ποσότητας των φορέων έκφρασης που χρησιμοποιήθηκαν κατά παροδική διαμόλυνση των κυτταρικών σειρών εντόμων με τους φορείς έκφρασης των BmSH3-A1, BmE75A και BmE75C.

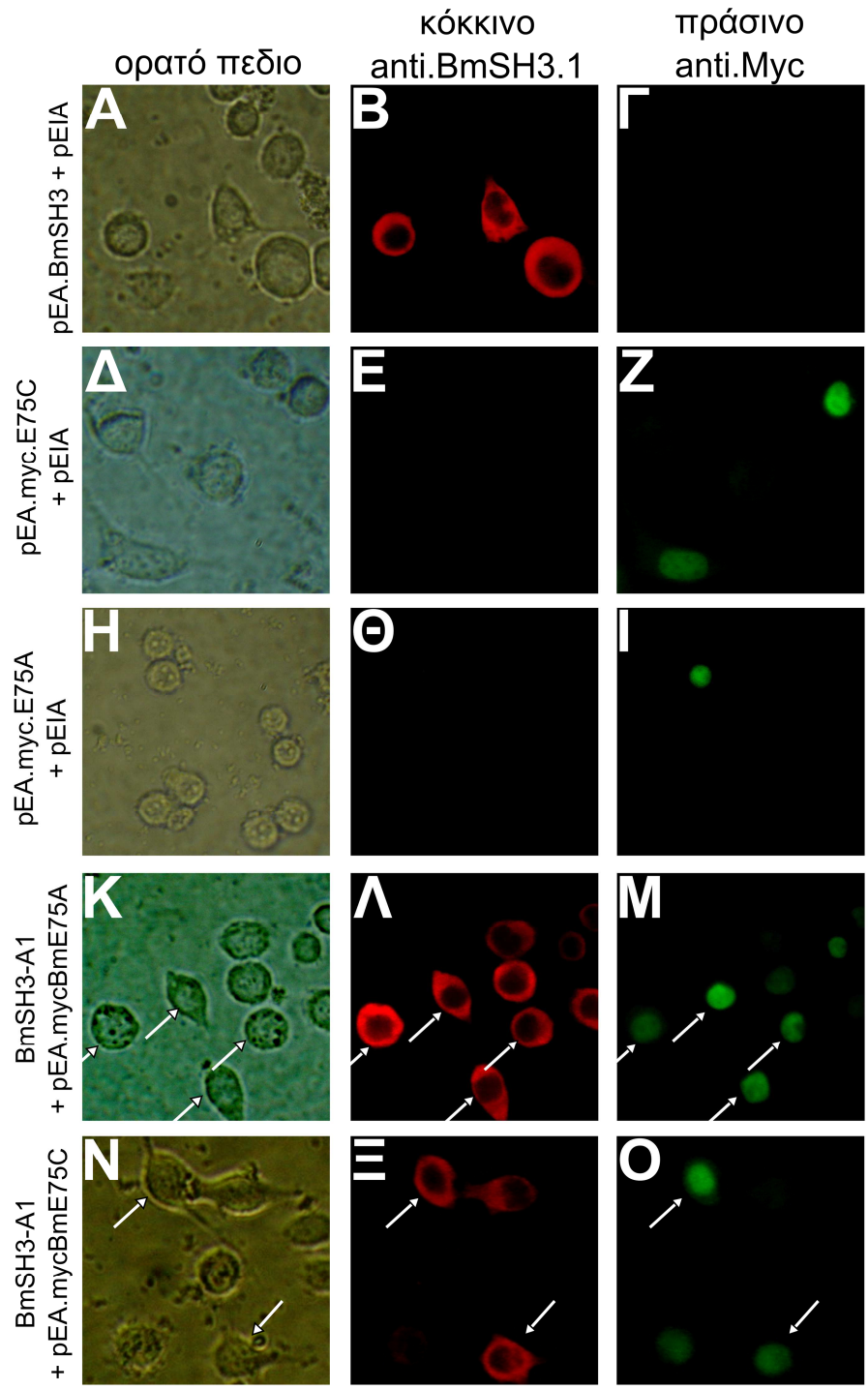
φορέας έκφρασης	pEA	pEIA	pEA.BmSH3-A1	pEA.myc.BmE75A	pEA.myc.BmE75C
Εκφραζόμενη πρωτεΐνη					
-	1 μg	0,5 μg	-	-	-
BmSH3-A1	0,5 μg	0,5 μg	0,5 μg	-	-
myc.BmE75A	0,5 μg	0,5 μg	-	0,5 μg	-
myc.BmE75C	0,5 μg	0,5 μg	-	-	0,5 μg
BmSH3-A1 + myc.BmE75A	-	0,5 μg	0,5 μg	0,5 μg	-
BmSH3-A1 + Bmyc.mE75C	-	0,5 μg	0,5 μg	-	0,5 μg

7.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.3.1. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΤΩΝ BmSH3-A1, BmE75A ΚΑΙ BmE75C

Αρχικά μελετήθηκε η κατανομή των πρωτεϊνών στην κυτταρική σειρά Hi5 σε μικροσκόπιο φθορισμού. Έγινε διαμόλυνση των κυττάρων με τους φορείς έκφρασης pEA.BmSH3-A1 (εικόνα 7.1 Α-Γ), pEA.myc.BmE75A (εικόνα 7.1 Η-Ι) και pEA.myc.BmE75C (εικόνα 7.1 Δ-Ζ) και συνδιαμόλυνση με τους φορείς pEA.BmSH3-A1 και pEA.myc.BmE75A (εικόνα 7.1 Κ-Μ), ή με τους φορείς pEA.BmSH3-A1 και pEA.myc.BmE75C (εικόνα 7.1 Ν-Ο).

Η μελέτη της υποκυτταρικής κατανομής των πρωτεϊνών ξεχωριστά ήταν η αναμενόμενη. Παρατηρήθηκε, η διάχυτη κατανομή της BmSH3-A1 στο κυτταρόπλασμα (εικόνα 7.1 Α-Γ), ενώ η υποκυτταρική κατανομή των BmE75C (εικόνα 7.1 Δ-Ζ) και BmE75A (εικόνα 7.1.Η-Ι) ήταν πυρηνική (εικόνα 7.1 Ζ, Ι). Καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στο πρότυπο φθορισμού κατά την συνδιαμόλυνση των κυττάρων με τους κατάλληλους φορείς έκφρασης (εικόνα 7.1 Κ-Μ). Η κατανομή των πρωτεϊνών, που παρατηρήθηκε μετά από την παροδική συνέκφραση των BmSH3-A1 και BmE75A (εικόνα 7.1 Ν-Ο), ήταν αντιστοίχως κυτταροπλασματική και πυρηνική και ομοίως κατά την παροδική συνέκφραση των BmSH3-A1 και BmE75C (εικόνα 7.1 Ν-Ο). Επομένως, το πρότυπο φθορισμού που παρατηρήθηκε δεν συνηγορεί με την πιθανή αλληλεπίδραση της BmSH3-A1 και της BmE75C που ανιχνεύτηκε στο σύστημα δύο υβριδίων της ζύμης, τουλάχιστον στο πειραματικό σύστημα των Hi5 κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη.



Εικόνα 7.1: Μικροσκοπία φθορισμού*. Παρουσιάζεται ο ανοσοφθορισμός παροδικά διαμολυσμένΩΝ κυττάρων Hi5 με τους φορείς έκφρασης pEA.BmSH3-A1 (Α-Γ), pEA.myc.BmE75A (Η-Ι) και pEA.myc.BmE75C (Δ-Ζ) pEA.BmSH3-A1 και pEA.myc.BmE75A (Κ-Μ), pEA.BmSH3-A1 και pEA.myc.BmE75C (Ν-Ο). Παρουσιάζονται οι εικόνες των κυττάρων στο κόκκινο φάσμα Β, Ε, Θ, Λ, Ξ, που αντιστοιχούν στον ανοσοφθορισμό από την ανίχνευση της BmSH3-A1 και στο πράσινο φάσμα Γ, Ζ, Ι, Μ, Ο, που αντιστοιχούν στον ανοσοφθορισμό από την ανίχνευση του Myc επίτοπου. Οι εικόνες Γ, Ε, Θ αποτελούν τον αρνητικό μάρτυρα για το πράσινο και το κόκκινο φάσμα. Τα βέλη σημαίνουν κύτταρα που συνεκφράζουν την BmSH3-A1 και την BmE75C ή BmE75A.*

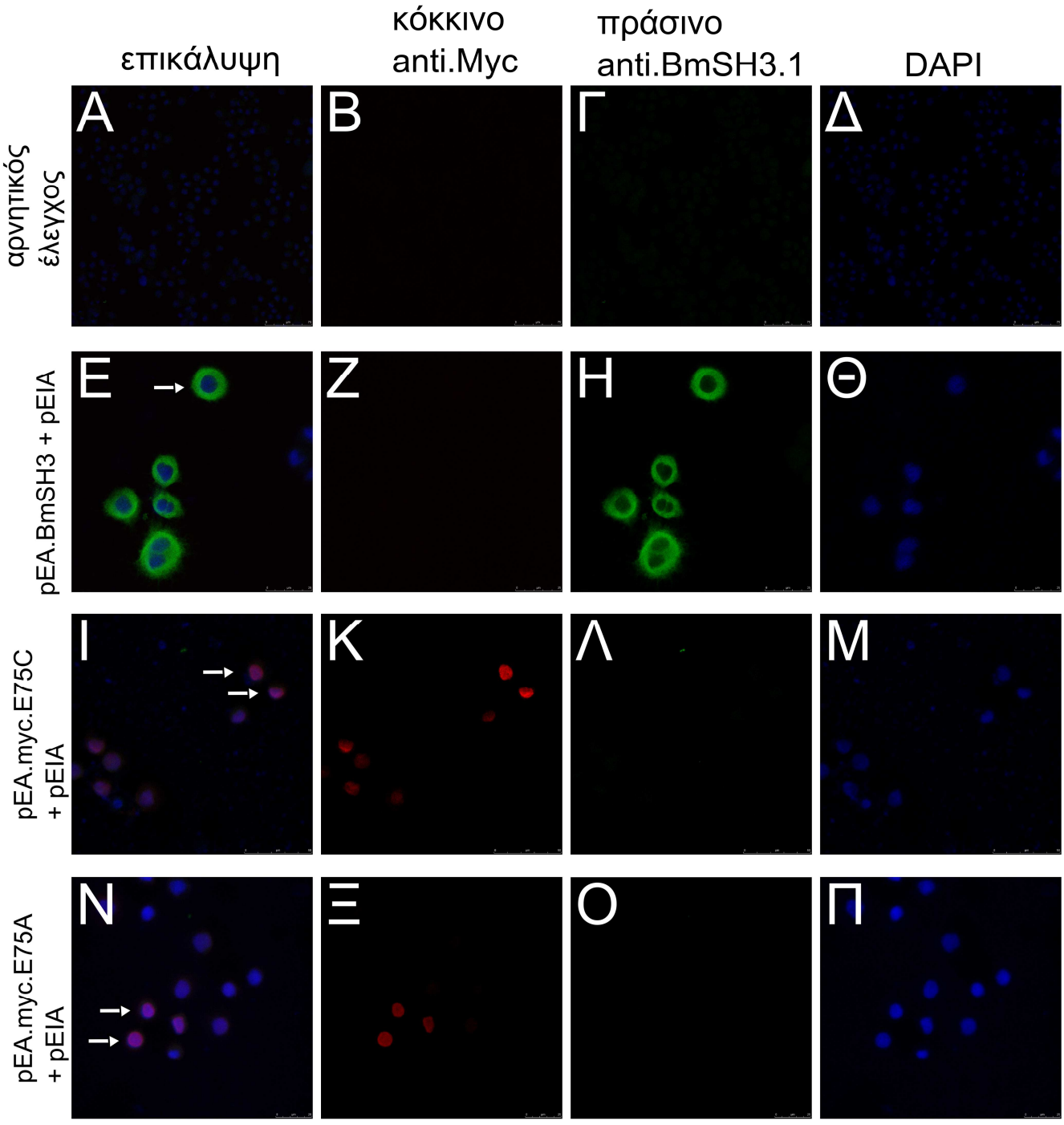
7.3.2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΤΩΝ BmSH3-A1, BmE75A ΚΑΙ BmE75C ΜΕ ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ

Για μια ευκρινέστερη και πιο λεπτομερή ανάλυση της υποκυτταρικής κατανομής των πρωτεϊνών, μελετήθηκε η υποκυτταρική κατανομή των BmE75A και BmE75C, αλλά και ο πιθανός συνεντοπισμός τους με την BmSH3-A1 σε κύτταρα Hi5 με συνεστιακή μικροσκοπία.

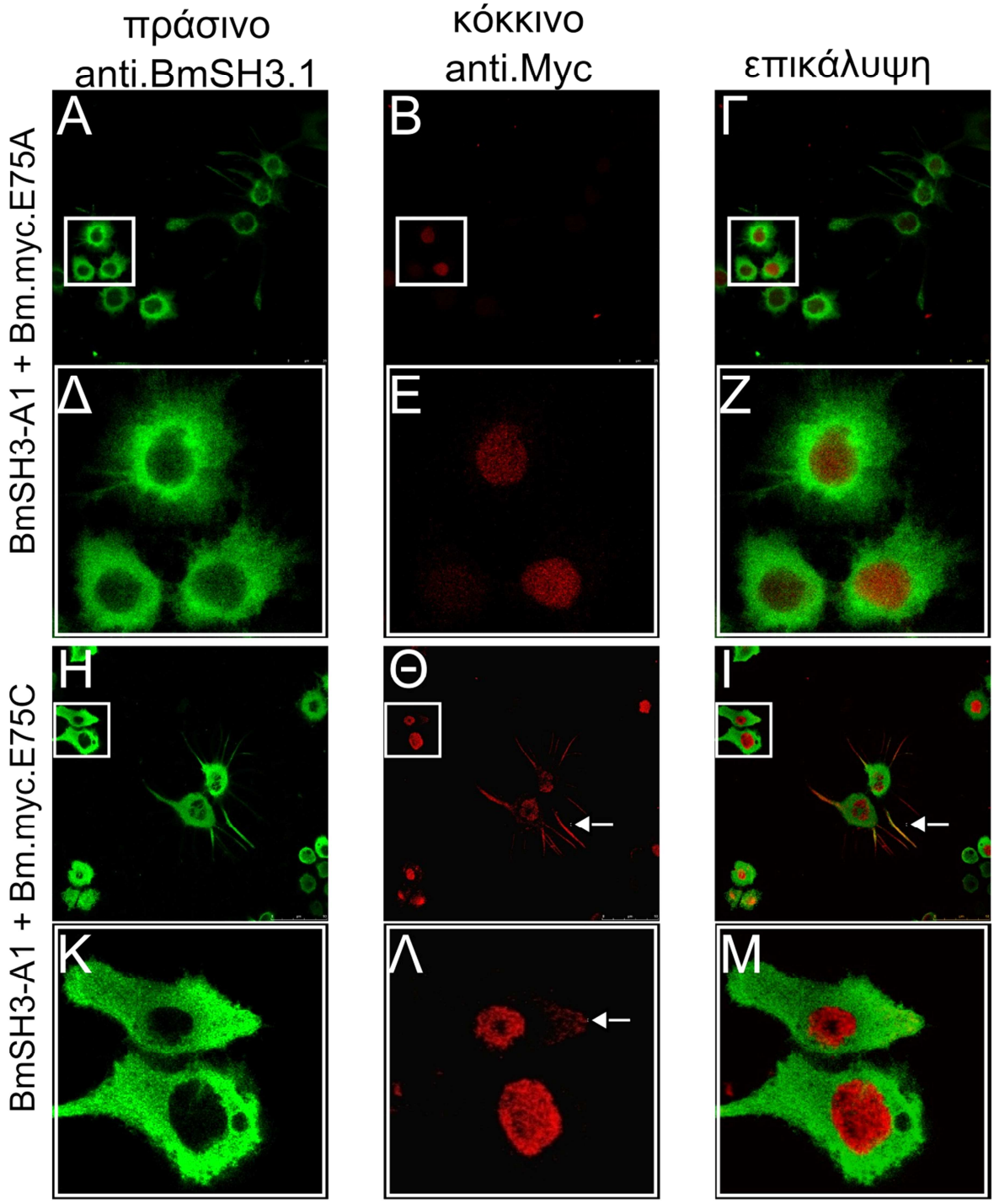
Αρχικά μελετήθηκε ο υποκυτταρικός εντοπισμός της κάθε μιας πρωτεΐνης χωριστά για την αναγνώριση πιθανών διαφοροποιήσεων κατά τη συνέκφρασή τους. Κατά την παρατήρηση των προτύπων φθορισμού στα διαμολυσμένα κύτταρα ανιχνεύτηκε ο διάχυτος κυτταροπλασματικός εντοπισμός της πρωτεΐνης BmSH3-A1 (εικόνα 7.2 Ε-Θ), ενώ το πρότυπο φθορισμού των BmE75A και BmE75C ήταν αυστηρά πυρηνικό (εικόνα 7.2 Ι-Μ και Ν-Π, αντιστοίχως), όπως ήταν αναμενόμενο.

Ενδιαφέρον όμως παρουσίασε η μελέτη του προτύπου φθορισμού μετά από την παροδική συνδιαμόλυνση Hi5 κυττάρων με τους φορείς έκφρασης pEA.BmSH3-A1 και pEA.myc.E75C ή pEA.BmSH3-A1 και pEA.myc.BmE75A. (εικόνα 7.3). Η ειδοποιός διαφορά αυτής της σειράς πειραμάτων είναι η διεξαγωγή του πειράματος σε τρυβλία παρουσία καλυπτρίδας πολυ-L-λυσίνης, όπου και μεγάλωσαν τα κύτταρα. Η πολύ-L-λυσίνη χρησιμοποιήθηκε για την ισχυρή προσκόληση των κυττάρων στη γυάλινη επιφάνεια. Παρόλο που η υποκυτταρική κατανομή της BmSH3-A1 ήταν κυτταροπλασματική και αυτή των BmE75A και BmE75C πυρηνική, παρατηρήθηκαν ορισμένες σημαντικές διαφοροποιήσεις από το αναμενόμενο πρότυπο.

Έτσι, μετά από παροδική συνέκφραση των BmSH3-A1 και BmE75A, παρατηρήθηκε έντονος εντοπισμός της BmSH3-A1 στην περιφέρεια του πυρήνα (εικόνα 7.3 Δ), γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τη διάχυτη κατανομή, ανιχνεύτηκε όταν η ίδια κυτταρική σειρά εκφράζει μόνο την BmSH3-A1 (εικόνα 7.2 Η).



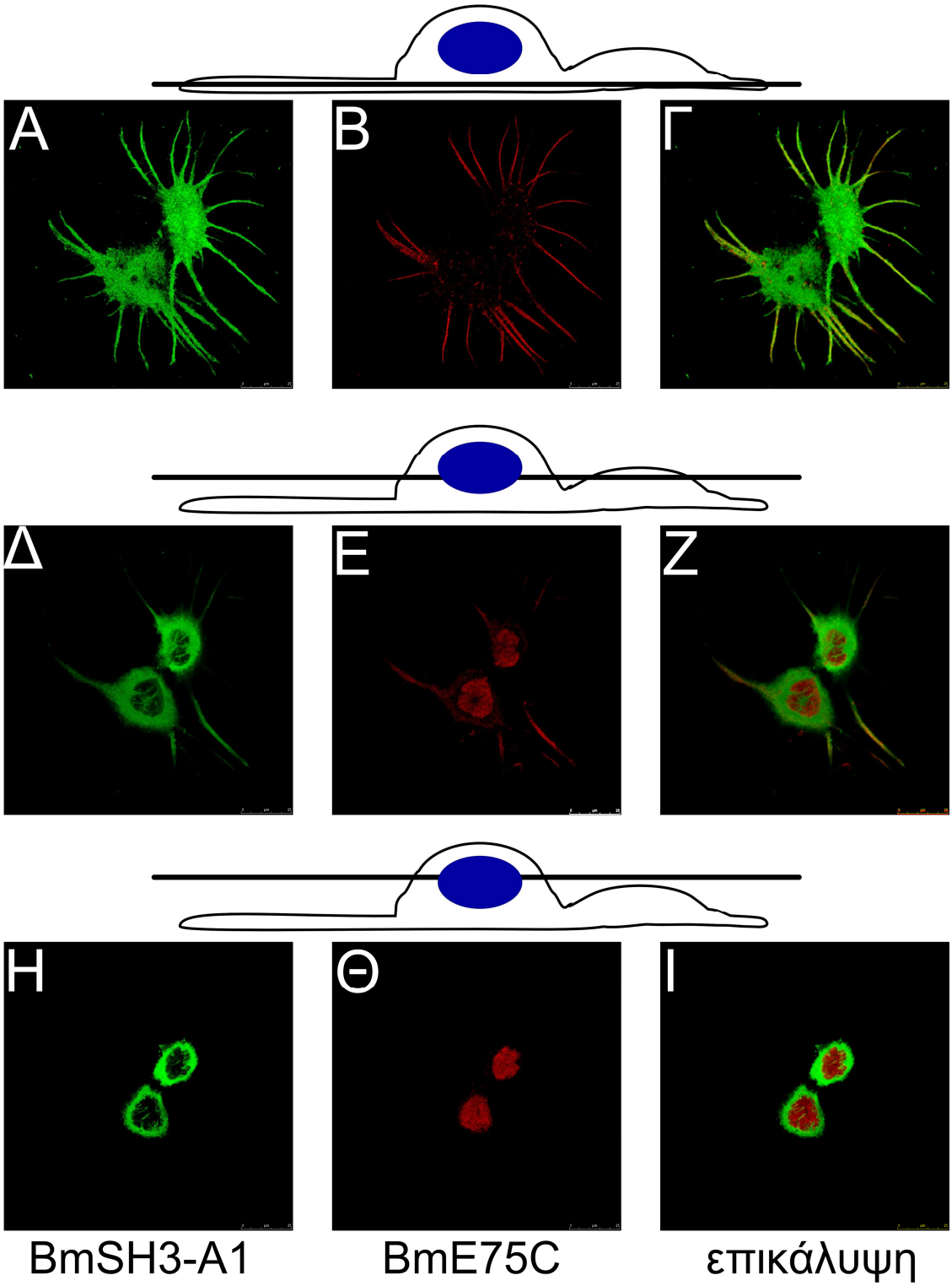
Εικόνα 7.2: Συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού*. Παρουσιάζεται ο ανοσοφθορισμός της παροδικά διαμολυσμένης κυτταρικής σειράς Hi5 με τους φορείς έκφρασης pEA.BmSH3-A1 (Ε-Θ), pEA.myc.E75C (Ι-Μ) και pEA.myc.E75A (Ν-Π). Παρουσιάζονται οι εικόνες των κυττάρων στο κόκκινο φάσμα, που αντιστοιχεί στον ανοσοφθορισμό από την ανίχνευση των BmE75A ή BmE75C (Β, Ζ, Κ, Ξ), στο πράσινο φάσμα, που αντιστοιχεί στην ανίχνευση της BmSH3 (Γ, Η, Λ, Ο) και στο ιώδες φάσμα, όπου γίνεται η σήμανση του πυρήνα με DAPI (Δ, Θ, Μ, Π). Η επικάλυψη των φωτογραφιών διαφορετικού φάσματος παρουσιάζεται στη πρώτη στήλη (Α, Ε, Ι, Ν). Ως αρνητικός μάρτυρας εξετάστηκε η κυτταρική σειρά Hi5 μετά από παροδική διαμόλυνση με κενούς φορείς έκφρασης όπου και πραγματοποιήθηκε ο ανοσοφθορισμός, όπως και στα υπόλοιπα δείγματα.*



Εικόνα 7.3: Συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού*. Παρουσιάζεται ο ανοσοφθορισμός παροδικά διαμολυσμένων κυττάρων Hi5 με τους φορείς έκφρασης pEA.BmSH3-A1 και pEA.myc.E75A (εικόνες Α-Ζ, όπου στις Δ-Ζ παρουσιάζεται η μεγέθυνση των λευκών πλαισίων των Α-Γ), ή με τους φορείς pEA.BmSH3-A1 και pEA.myc.E75C (εικόνες Η-Μ, όπου στις Κ-Μ παρουσιάζεται η μεγέθυνση των αντίστοιχων λευκών πλαισίωντων Η-Ι). Παρουσιάζονται οι εικόνες των κυττάρων στο πράσινο φάσμα Α, Δ, Η, Κ, που αντιστοιχεί σε ανοσοφθορισμό από την ανίχνευση της BmSH3-A1 και στο κόκκινο φάσμα Β, Ε, Θ, Λ, που αντιστοιχεί σε ανοσοφθορισμό από την ανίχνευση του Myc επίτοπου. Ο συνεντοπισμός εμφανίζεται στα πλαίσια Γ, Ζ, Ι και Μ. Το λευκό βέλος υποδεικνύει τα κύτταρα που παρατηρήθηκε ο συνεντοπισμός. Τα κύτταρα των εικόνων Η, Θ, Ι μελετήθηκαν επιπλέον και σε μεγαλύτερη μεγέθυνση (εικόνα 7.4).*

Επιπλέον, μετά από συνδιαμόλυνση της κυτταρικής σειράς με τους φορείς έκφρασης του BmE75C και της BmSH3-A1 ενδιαφέρον παρουσίασε το πρότυπο φθορισμού της BmE75C, που βρέθηκε όχι μόνο στον πυρήνα, όπως ήταν αναμενόμενο, αλλά και στο κυτταρόπλασμα και συγκεκριμένα στις απολήξεις των κυττάρων (εικόνα 7.3 Λ). Σε ακραίες καταστάσεις, όπου τα κύτταρα εμφανίζουν απολήξεις παρόμοιες με ψευδοπόδια, παρατηρήθηκε εντονότερη η κατανομή της BmE75C στο κυτταρόπλασμα και συγκεκριμένα στις απολήξεις αυτών (εικόνα 7.3 Η-Ι, λευκό βέλος και εικόνα 7.4).

Τα κύτταρα της εικόνας 7.3 Θ που σημαίνονται με λευκό βέλος μελετήθηκαν στην μέγιστη δυνατή μεγέθυνση που παρείχε το συνεστιακό μικροσκόπιο (60x, εικόνα 7.4) και ταυτόχρονα ελήφθησαν διαδοχικές σαρώσεις σε διαφορετικά εστιακά επίπεδα. Σε όλες τις τομές που μελετήθηκαν, η BmSH3-A1 εντοπίστηκε στο κυτταρόπλασμα (εικόνα 7.3 Α, Δ, Η). Στην τομή του κυττάρου όπου έχει γίνει η προσκόλλησή του στην καλυπτρίδα παρατηρείται ο συνεντοπισμός της BmSH3-A1 και της BmE75C στα άκρα των επεκτάσεων του κυττάρου (εικόνα 7.4 Β, Γ). Στο μέσο του κυττάρου, είναι ακόμη δυνατή η παρατήρηση του εντοπισμού της BmE75C στον πυρήνα, αλλά και για ακόμα μια φορά στις επεκτάσεις, όπου συνεντοπίζεται με την BmSH3-A1, αλλά απουσιάζει από το κυτταρόπλασμα. Τέλος, στην ακραία τομή, δεν παρατηρήθηκε ο συνεντοπισμός των πρωτεϊνών, και η BmSH3-A1 εντοπίστηκε στο κυτταρόπλασμα και η BmE75C αποκλειστικά στον πυρήνα. Η εύρεση της BmE75C στο κυτταρόπλασμα, και συγκεκριμένα στους σχηματισμούς που μοιάζουν με ψευδοπόδια είναι σημαντική γιατί αποτελεί την πρώτη παρατήρηση της υποκυτταρικής κατανομής του ορφανού πυρηνικού υποδοχέα BmE75C στο κυτταρόπλασμα, όταν ο αναμενόμενος υποκυτταρικός εντοπισμός του είναι πυρηνικός.



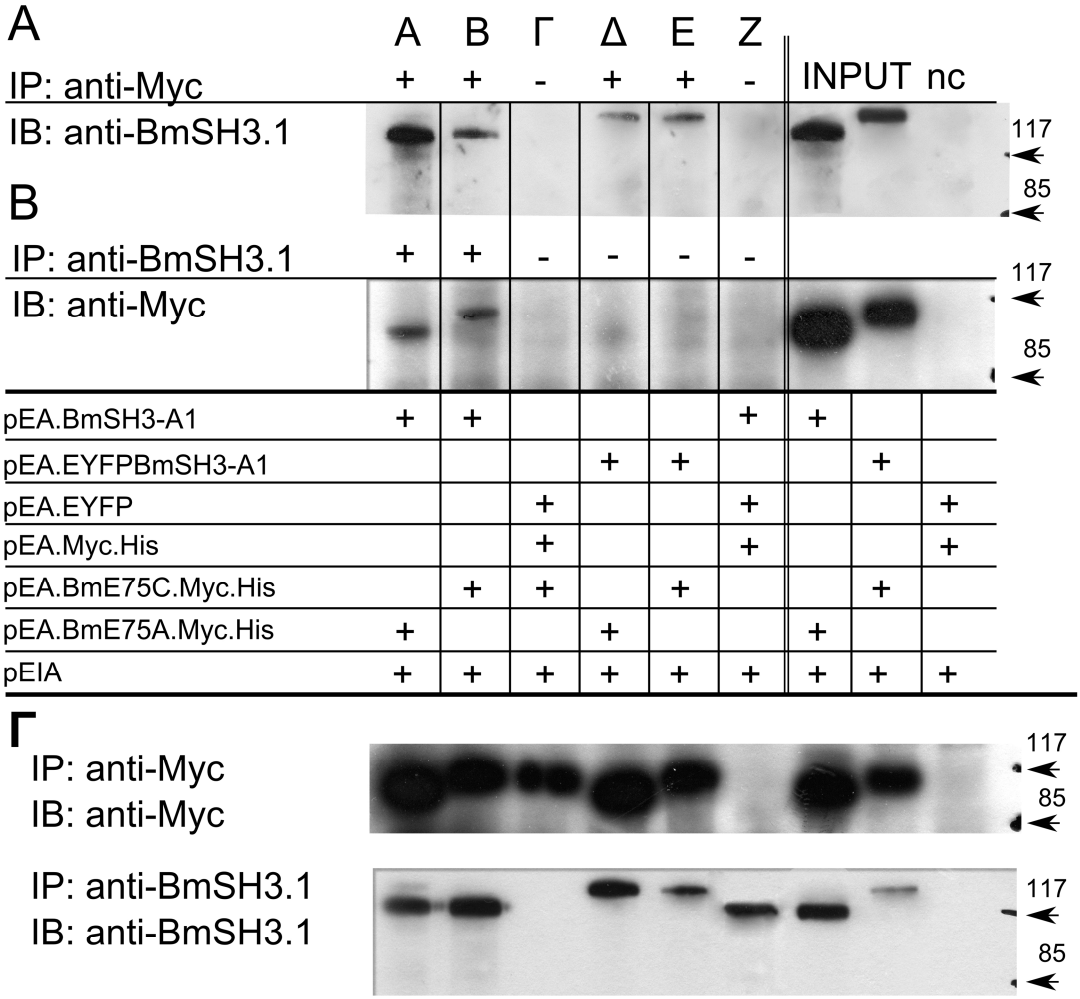
Εικόνα 7.4: Συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού*. Παρουσιάζονται εικόνες από διαφορετικό εστιακό επίπεδο της κυτταρικής σειράς Hi5 που συνεκφράζουν την BmSH3-A1 (πράσινο χρώμα, Α, Δ, Η) και την BmE75C (κόκκινο χρώμα, Β, Ε, Θ) και ο συνεντοπισμός στις Γ,Ζ και Ι. Οι σχηματικές απεικονίσεις αναπαριστούν ένα κύτταρο, και η μαύρη οριζόντια γραμμή την εστιακή τομή του κυττάρου από όπου έγινε η λήψη κάθε εικόνας. Οι εικόνες Α, Β, Γ αντιστοιχούν στην πλευρά του κυττάρου που εφάπτεται στην επιφάνεια του τρυβλίου, οι Δ, Ε, Ζ αντιστοιχούν στη μεσαία πλευρά, και οι Η, Θ, Ι στην πιο απομακρυσμένη από το τρυβλίο πλευρά. Οι εικόνες Γ, Ζ, Ι παρουσιάζουν την επικάλυψη των εικόνων από διαφορετικό φάσμα, στο ίδιο εστιακό επίπεδο*

7.3.3. ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗΣ

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1.4 της εισαγωγής, η ταυτοποίηση της BmSH3 έγινε μέσω της αλληλεπίδρασής της με την BmE75c σε δοκιμές αλληλεπίδρασης με το σύστημα των δύο υβριδίων της ζύμης. Χρησιμοποιώντας το ίδιο σύστημα επιβεβαιώθηκε η αλληλεπίδραση της BmE75C με την καρβοξυ-τελική περιοχή της BmSH3 που περιέχει τις SH3 περιοχές (K. Ito και K. Iatrou, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Η αλληλεπίδραση στο σύστημα των δύο υβριδίων αποτελεί ένδειξη της αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών *in vivo*. Κατά τη μελέτη του προτύπου φθορισμού της BmSH3-A1 και της BmE75C σε κύτταρα, τα οποία είχαν συνδιαμολυνθεί με τους αντίστοιχους φορείς έκφρασης (κεφάλαιο 7.3.2) παρατηρήθηκε ο συνεντοπισμός των δύο πρωτεϊνών σε δομές των κυττάρων που προσομοιάζουν με ψευδοπόδια. Η παρατήρηση αυτή είναι σημαντική γιατί ο BmE75C είναι πυρηνικός υποδοχέας και για τον λόγο αυτό αναμένεται να εντοπίζεται μόνο στον πυρήνα. Σε καμία περίπτωση όμως δεν ανιχνεύτηκε η BmSH3-A1 στον πυρήνα και, επομένως, δεν ήταν αναμενόμενο να συνεντοπίζεται εκεί με τον BmE75C.

Για την περαιτέρω διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της BmSH3-A1 με την BmE75C και την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων του ανοσοφθορισμού πραγματοποιήθηκαν μελέτες ταυτόχρονης ανοσοκατακρήμνισης των δύο πρωτεϊνών σε ολικά εκχυλίσματα παροδικά διαμολυσμένων κυττώρων Hi5, που ήταν τα ίδια με αυτά στα οποία παρατηρήθηκε ο συνεντοπισμός (κεφάλαιο 7.3.2). Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία διαμόλυνσης των κυττάρων, υπό τις ίσιες συνθήκες με αυτές όπου εντοπίστηκε ο ανοσοεντοπισμός παρουσία του φορέα έκφρασης pEIA, στις ίδιες ποσότητες σε τρυβλία που περιείχαν την καλυπτρίδα πολυ-L-λυσίνης. Ο κενός φορέας pEA και ο φορέας έκφρασης pEA.EYFP χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες της ανοσοκατακρήμνισης για την διερεύνηση της ύπαρξης ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων που μπορεί να προέρχονται από την αλληλεπίδραση με τους επίτοπους Myc και His ή από την EYFP (εικόνα 7.5 διαδρομή nc). Έγινε διερεύνηση τυχόν ψευδώς θετικής συγκατακρήμνισης των EYFP, BmE75C και Myc-His επιτόπων (εικόνα 7.5, διαδρομή Γ) και των BmSH3-A1, EYFP και Myc-His (εικόνα 7.5, διαδρομή Ζ). Σε όλες τις περιπτώσεις, οι αρνητικοί μάρτυρες έδωσαν τα αναμενόμενα αρνητικά αποτελέσματα.

Κατά την δοκιμή ανοσοκατακρήμνισης της BmSH3-A1 με την BmE75C ανιχνεύτηκε η αλληλεπίδρασή των δύο πρωτεϊνών (εικόνα 7.5 Α, διαδρομή Β), επιβεβαιώνοντας τόσο τα αποτελέσματα του συστήματος δύο υβριδίων στη ζύμη (K. Ito και K. Iatrou, αδημοσίευτα αποτελέσματα), όσο και τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού που ελήφθησαν από το συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (κεφάλαιο 7.3.2). Ειδικότερα, παρατηρήθηκε η ειδική παρουσία της BmSH3-A1 στο ανοσοΐζημα μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι του επίτοπου Myc, (anti-Myc) και ανοσοεντοπισμό με το anti-BmSH3.1. Η συνανοσοκατακρήμνιση επιβεβαιώθηκε και με με το anti-BmSH3.1 και ανοσοεντοπισμό με το anti-Myc (εικόνα 7.5 Β, διαδρομή Β). Η αλληλεπίδρασή των πρωτεϊνών πρέπει να είναι άμεση γιατί, όπως έχει δειχθεί από τα πειράματα αλλελεπίδρασης με το σύστημα δύο υβριδίων στη ζύμη, η BmE75C αλληλεπιδρά άμεσα με την BmSH3-A1 μέσω της περιοχής πλούσιας σε προλίνη και των SH3 περιοχών, αντιστοίχως. Ομοίως, θετική ήταν και η ανοσοκατακρήμνιση της χιμαιρικής EYFP/BmSH3-A1 από την BmE75C (εικόνα 7.5 Α, διαδρομή Ε). Η θετική ανοσοκατακρήμνιση, όμως, δεν ήταν δυνατόν να επιβεβαιωθεί με την αντίστροφη φορά (εικόνα 7.5 Β, διαδρομή Ε). Η αστοχία αυτή μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη της EYFP που μπορεί να οδηγεί σε παρεμπόδηση της αναγνώρισης του επίτοπου από το αντίσωμα. Όμως, η ανοσοκατακρήμνιση της EYFP/BmSH3-A1 από τον BmE75C αποτελεί θετικό αποτέλεσμα.



Εικόνα 7.5 : Δοκιμές ανοσοκατακρήμνισης για τις πρωτεΐνες BmSH3-A1, BmE75C και BmE75A*. Στην αριστερή πλευρά κάθε εικόνας γράφεται το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοκατακρήμνιση (immunoprecipitation, IP) και τον ανοσοεντοπισμό (immunoblotting, IB). (Α) ανοσοκατακρήμνιση με το anti-Myc αντίσωμα και ανοσοεντοπισμός με το anti-BmSH3.1 αντίσωμα, (Β) ανοσοκατακρήμνιση με το anti-BmSH3.1 αντίσωμα και ανοσοεντοπισμός με το anti-Myc αντίσωμα. Οι διαδρομές Γ και Ζ περιέχουν ανοσοκατακρημνίσεις ελέγχου, με την συνδιαμόλυνση της κυτταρικής σειράς με τους pEA.EYFP, pEA και του pEA.BmE75C (διαδρομή Γ) ή των pEA, pEA.EYFP και pEA.BmSH3-A1. Στις διαδρομές Α και Β παρουσιάζονται η δοκιμή της ανοσοκατακρήμνισης της BmSH3-A1 με τις BmE75C ή BmE75A αντιστοίχως. Στις διαδρομές Δ και Ε παρουσιάζονται η δοκιμή της ανοσοκατακρήμνισης της EYFP/BmSH3-A1 με τις BmE75C ή BmE75A αντιστοίχως. Τα αποτελέσματα της ανοσοκατακρήμνισης παρουσιάζονται πάνω από την εικόνα όπου με + παρουσιάζεται το θετικό αποτέλεσμα και με – το αρνητικό αποτέλεσμα. Παρουσιάζεται, επίσης, η θετική αναγνώριση των πρωτεϊνών (INPUT) σε δείγματα που δεν έγινε η δοκιμή ανοσοκατακρήμνισης. (Γ) Αναγνώριση των πρωτεϊνών, έναντι των οποίων έγινε η ανοσοκατακρήμνιση με ανοσοεντοπισμό με το ίδιο αντίσωμα. Παρατηρείται η αναγνώριση όλων των παροδικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών, σε κάθε περίπτωση. Στη διαδρομή nc φαίνεται η αρνητική δοκιμή ανοσοκατακρήμνισης μετά από παροδική διαμόλυνση των κυττάρων με τους φορείς pEA.EYFP και τον* pEA.Myc.His*. Στη δεξιά πλευρά κάθε εικόνας αναφέρεται και το μοριακό βάρος του μάρτυρα μοριακών μεγεθών σε kDa.*

Ενδιαφέρον παρουσιάσε επίσης η ανοσοκατακρήμνιση της BmSH3-A1 με την BmE75A στο ίδιο σύστημα. Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, η διαφορά της ισομορφής BmE75A από την BmE75C έγκειται στην απουσία από την BmE75A του αμινο-τελικού άκρου της BmE75C που είναι πλούσια σε προλίνη και αποτελεί πιθανό στόχο πρόσδεσης των SH3 περιοχών (εικόνα 7.6). Για αυτό το λόγο η ανοσοκατακρήμνιση της BmSH3-A1 από την BmE75A ήταν μη αναμενόμενη. Όμως, παρατηρήθηκε ανοσοκατακρήμνιση της BmSH3-A1 από την BmE75A και κατά τις δύο φορές (εικόνα 7.5, διαδρομή Β), αλλά και της EYFP/BmSH3-A1 (εικόνα 7.5, διαδρομή Δ) επιβεβαιώνοντας με αυτόν τον τρόπο την αλληλεπίδραση. Το εύρημα αυτό δεν επιβεβαιώθηκε κατά την μελέτη του προτύπου φθορισμού της κυτταρικής σειράς Hi5 μετά από ταυτόχρονη παροδική συνδιαμόλυνση με τους φορείς έκφρασης των BmSH3-A1 και BmE75A (εικόνα 7.3). Παρατηρήθηκε όμως η αλλαγή της υποκυτταρικής κατανομής της BmSH3-A1 κατά τη παροδική συνδιαμόλυνση των δύο φορέων. Έτσι, ενώ η υποκυτταρική κατανομή της BmSH3-A1 εντοπίστηκε διάχυτη στο κυτταρόπλασμα, κατά τη συνέκφραση της με την BmE75A η BmSH3-A1 εμφανίστηκε να είναι και πάλι διάχυτη στο κυτταρόπλασμα αλλά έντονα περιπυρηνική.

Πρόσφατα δημοσιεύτηκε ένα νέο εργαλείο εύρεσης πιθανών περιοχών πρόσδεσης των περιοχών SH3 το SH3hunter (Ferraro et al., 2007), το οποίο ελέγχει την αμινοξική αλληλουχία με βάση τις ομόφωνες (consensus) αλληλουχίες πρόσδεσης των SH3 τάξης Ι και τάξης ΙΙ (κεφάλαιο 1.5.2.1), (Mayer, 2001) και επιπλέον στοιχίζει την αλληλουχία με τις χαρακτηρισμένες αλληλουχίες πρόσδεσης SH3 περιοχών. Το πρόγραμμα χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της αμινοξικής αλληλουχίας των BmE75A και BmE75C ισομορφών με σκοπό την εύρεση νέων περιοχών πρόσδεσης των SH3 που δεν ήταν δυνατόν να προσδιοριστούν πειραματικώς, αλλά πιθανώς συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με την BmSH3. Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά εφόσον αναγνωρίστηκαν περιοχές πιθανής πρόσδεσης SH3 περιοχών στο κοινό καρβοξυ-τελικό άκρο των ισομορφών (εικόνα 7.6). Συγκεκριμένα αναγνωρίστηκαν οι ακολουθίες τάξης Ι HPHPASP και KKSPSPP.

E75C

MQCYPKLSPKREPPEGLYEIEMLPGARRLEL**PAPPGK**EFRAPVLLAGPSLAPTHSVIQCM**RPPPPPP****PPPPPR**LLKPPSF
EEPSSSIPDLEFDGTTVLCRVCGDKASGFH**YGVHSC**EGCKGFFRRSIQQKIQYRPCTKNQQCSILRINRNRCQYCRLKKC
IAVGMSRDAVRFGRVPKREKARILAAMQQSSSSRAHEQAAAAELDDAPRLLARVVRAHLDTCEFTRDRVASMRARARDCP
TYSQPTLACPLNPAPELQSEKEFSQRFAHVIRGVIDFAGLIPGFQLLTQDDKFTLLKSGLFDALFVRLICMFDAPLNSII
CLNGQLMKRDSIQSGANARFLVDSTFKFAERMNSMNLTDAEIGLFCAIVLITPDRPGLRNIELVERMHSRLKACLQTVIA
QNRPERPGFLRELMDTLPDLRTLSTLHTEKLVVFRTEHKELLRQQMWNEEEGVSWADSVVEESARSPIGSVSSSESGEVP
SDCGTPLLAATLAGRRRLDSRGSVDEEALGVAHLAHNGLTVTPVRPPPRYRKLDSPTDSGIESGNEKHERIIGPGSGCSS
PRSSLEEHTEDRRPTAPADDMPVLKRVLQAPPLYGGTSTLMDETYKPHKKFRAMRRDTGEAEARPVQPTPSPQPL**HPHPA**
SPAHPAHSPRPPRISLSSTHSVLAKSLMEGPRMTPEQLKRTDMIQQYMRRNEAGSSVEGCTLRTGGLLTCYRGASPAPPP
VLALQVDVTDAPLNLS**KKSPSPP**RSYMPQMLEA

E75A

MSPDSSYGRYDVPTSVDHSLMSSMHKEREPELHIEFDGTTVLCRVCGDKASGFHYGVHSCEGCKGFFRRSIQQKIQYRPC
TKNQQCSILRINRNRCQYCRLKKCIAVGMSRDAVRFGRVPKREKARILAAMQQSSSSRAHEQAAAAELDDAPRLLARVVR
AHLDTCEFTRDRVASMRARARDCPTYSQPTLACPLNPAPELQSEKEFSQRFAHVIRGVIDFAGLIPGFQLLTQDDKFTLL
KSGLFDALFVRLICMFDAPLNSIICLNGQLMKRDSIQSGANARFLVDSTFKFAERMNSMNLTDAEIGLFCAIVLITPDRP
GLRNIELVERMHSRLKACLQTVIAQNRPERPGFLRELMDTLPDLRTLSTLHTEKLVVFRTEHKELLRQQMWNEEEGVSWA
DSVVEESARSPIGSVSSSESGEVPSDCGTPLLAATLAGRRRLDSRGSVDEEALGVAHLAHNGLTVTPVRPPPRYRKLDSP
TDSGIESGNEKHERIIGPGSGCSSPRSSLEEHTEDRRPTAPADDMPVLKRVLQAPPLYGGTSTLMDETYKPHKKFRAMRR
DTGEAEARPVQPTPSPQPL**HPHPASP**AHPAHSPRPPRISLSSTHSVLAKSLMEGPRMTPEQLKRTDMIQQYMRRNEAGSS
VEGCTLRTGGLLTCYRGASPAPPPVLALQVDVTDAPLNLS**KKSPSPP**RSYMPQMLEA

***Εικόνα 7.6**: **Παρουσίαση των περιοχών πιθανής πρόσδεσης SH3 περιοχών στις αλληλουχίες BmE75A και BmE75C**, όπως προσδιορίστηκαν από το πρόγραμμα αναζήτησης περιοχών πρόσδεσης SH3 περιοχών SH3HUNTER (Ferraro et al., 2007). Με θαλασσί χρώμα παρουσιάζεται η αλληλουχία τάξης I και με κόκκινα γράμματα τάξης II. Υπογραμμισμένο είναι το μοναδικό αμινο-τελικό άκρο των ισομορφών. Σε γκρι πλαίσιο είναι σημασμένη η περιοχή πλούσια σε προλίνη που είχε προσδιοριστεί και προηγουμένως (K. Ito και K. Iatrou αδημοσίευτα αποτελέσματα).*

7.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

Κατά τη συνέκφρασή της BmSH3-A1 με τον ορφανό πυρηνικό υποδοχέα BmE75A, παρατηρήθηκε αλλαγή στη διάχυτη κυτταροπλασματική κατανομή της BmSH3-A1 σε έντονα περιπυρηνική (εικόνα 7.3). Τα κύτταρα εμφάνισαν και διαφορετική μορφολογία, όπου παρουσιάστηκαν επίπεδα με επεκτάσεις με μικρές προεξοχές στις οποίες εμφανίστηκε η BmSH3-A1. Δεν ήταν δυνατή η παρατήρηση του συνεντοπισμού των BmSH3-A1 και BmE75A παρόλο που ήταν σαφής η επίδραση της BmE75A στον εντοπισμό της BmSH3-A1. Κατά τη συνδιαμόλυνση της BmSH3-A1 με την BmE75C, δεν εντοπίστηκε κάποια ορατή διαφορά στην υποκυτταρική κατανομή της BmSH3-A1 (εικόνα 7.3). Εντονη διαφοροποίηση παρατηρήθηκε, όμως, στην υποκυτταρική κατανομή της BmE75C κατά την συνέκφρασή της με την BmSH3-A1 σε

κύτταρα εντόμων που είχαν προσκοληθεί σε καλυπτρίδες πολυ-L-λυσίνης. Ανιχνεύτηκε, εκτός από την πυρηνική κατανομή της BmE75C και την διάχυτη κυτταροπλασματική κατανομή της BmSH3-A1, η συσσώρευση της BmE75C σε κυτταρικές δομές που θυμίζουν ψευδοπόδια όπου και συνεντοπίζεται με την BmSH3-A1. Η παρατήρηση αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική γιατί είναι η πρώτη φορά που ανιχνεύτηκε η κυτταροπλασματική έκφραση της BmE75C, Παρόμοια υποκυτταρική κατανομή δε παρατηρήθηκε κατά την συνέκφραση της BmSH3-A1 με την BmE75A.

Δεν ήταν δυνατή η συσχέτιση των ψευδοπόδιων που παρατηρήθηκαν στην εικόνα 7.4 με φιλοπόδια ή λαμελοπόδια και γενικώς με την επέκταση ή την μετακίνηση των κυττάρων. Η ίδια εικόνα των κυττάρων παρατηρήθηκε και κατά την συνέκφραση της BmSH3-A1 με την BmE75A (εικόνα 7.3 Α), όπου παρατηρήθηκε η δημιουργία του κώνου ανάπτυξης (κύτταρα στη δεξιά πλευρά της εικόνας) όπου είναι γνωστό ότι εμφανίζονται λαμελοπόδια και φιλοπόδια (Mattila and Lappalainen, 2008). Παρόλο που δεν ήταν δυνατό να εντοπιστεί ο συνεντοπισμός της BmSH3-A1 με τον BmE75A, η μορφολογία των κυττάρων και η προηγούμενη παρατήρηση της συγκατανομής της BmSH3-A1 με την BmE75C αποτελούν ένδειξεις για τον συνεντοπισμό τους.

Επιπλέον, από την παρούσα εργασία δεν ήταν δυνατό να διευκρινιστεί αν η BmSH3-A1 συμβάλλει στη δημιουργία αυτών των προεκτάσεων του κυττάρου, αν αποτελεί ανεξάρτητη ιδιότητα των κυττάρων ή αν απαιτείται η συνέργεια αυτών με τον ορφανό πυρηνικό υποδοχέα BmE75.

Από τις μελέτες συγκατακρίμνησης (εικόνα 7.5) πιστοποιήθηκε η αλληλεπίδραση της BmSH3-A1 και με την BmE75C και με την BmE75A. Όπως αναφέρθηκε η αλληλεπίδραση της BmSH3-A1 με την BmE75C είναι πιθανή λόγω της μοναδικής αμινο- τελικής ακολουθίας της BmE75C που περιέχει περιοχές υψηλής συγκέντρωσης στο αμινοξύ προλίνη (εικόνα 1.10). Η εύρεση της αλληλεπίδρασης και με την ισομορφή BmE75A οδήγησε στην αναζήτηση άλλων περιοχών της πρωτεϊνικής αλληλουχίας που θα μπορούσαν να εξηγήσουν τα αποτελέσματα της ανοσοκατακρήμνισης. Ο έλεγχος της αμινοξικής αλληλουχίας των BmE75A και BmE75C παρουσίασε δύο επιπλέον περιοχές πρόσδεσης SH3 περιοχών στο καροξυ-τελικό άκρο που δικαιολογούν την αλληλεπίδραση της BmSH3-A1 και με την BmE75A, τις αλληλουχίες HPHPASP και

KKSPSPP (εικόνα 7.6). Έχουν αναφερθεί και άλλες περιοχές της οικογένειας CAV που μπορούν να συμμετέχουν σε πιθανές αλληλεπιδράσεις όπως η περιοχή SoHo (Kimura et al., 2001) αλλά δεν αποκλείονται και άλλες περιοχές αλληλεπίδρασης. Από τις δοκιμές δύο υβριδίων στη ζύμη (K. Ito και K. Iatrou αδημοσίευτα αποτελέσματα) είναι γνωστό ότι η SH3C είναι η κύρια υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση της BmSH3-A1 με την BmE75C. Όμως, όταν και οι τρεις SH3 περιοχές χρησιμοποιήθηκαν η ένταση της αλληλεπίδρασης ήταν εντονότερη και για αυτό τον λόγο προτείνουμε ότι τουλάχιστον δύο SH3 περιοχές παίρνουν μέρος στην αλληλεπίδραση. Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία υπάρχουν πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν και με τις τρεις SH3 περιοχές της CAV οικογένειας, όπως η synaptojanin-1 και οι dynamin-1 και -2, με δύο SH3 περιοχές, με δύο SH3, με τις SH3A και SH3B όπως η WAVE2 και με τις SH3B και SH3C, όπως η synaptojanin-2b2 (Cestra et al., 2005).

Όμως, η in vivo αλληλεπίδραση της BmSH3-A1 με την BmE75C και την BmE75A δεν ήταν δυνατό να επιβεβαιωθεί λόγω έλλειψης αντισώματος των BmE75A και BmE75C, επομένως οι παρατηρήσεις μας βασίζονται μόνο στην υπερέκφραση των πρωτεϊνών σε μια ετερόλογη κυτταρική σειρά.

8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Δύο είναι τα σημαντικότερα ευρήματα της παρούσας διατριβής.

Πρώτον, έγινε η επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης της BmSH3 με τους ορφανούς πυρηνικούς υποδοχείς BmE75C και BmE75A. Αυτή η αλληλεπίδραση γίνεται στο κυτταρόπλασμα, όπως προσδιορίστηκε με πειράματα ανοσοφθορισμού και είναι σημαντική γιατί αποτελεί ένδειξη συμμετοχής των ορφανών υποδοχέων BmE75A και BmE75C στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού ή σε σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχει ο κυτταροσκελετός. Βιβλιογραφικά δεν έχει αναφερθεί μέχρι στιγμής ο κυτταροπλασματικός εντοπισμός της BmE75 ούτε η συσχέτισή του με σηματοδοτικά μονοπάτια.

Δεύτερον, η BmSH3, εκτός από τη πιθανή συμμετοχή της στη γενικότερη οργάνωση του κυτταροσκελετού, όπως συμβαίνει με όλες τις πρωτεΐνες της οικογένειας CAV, φαίνεται να εμπλέκεται και στους μηχανισμούς αναδιοργάνωσής του κατά την ανάπτυξη των ωοθυλακίων. Ειδικότερα, φαίνεται ότι η BmSH3 συμμετέχει σε διαδικασίες όπως (α) το κλείσιμο των αυλακώσεων, που σχηματίζονται κατά το στάδιο της βιτελλογένεσης μεταξύ των θυλακοκυττάρων κατά τη μετάβαση από τη βιτελλογένεση στη χοριογένεση με την συμμετοχή της στον σχηματισμό συνεκτικών επιφανειών μεταξύ των θυλακοκυττάρων και (β) στον μηχανισμό της μεταφοράς των λεκιθοπρωτεϊνών στο ωοκύτταρο (γ) στο μηχανισμό έκκρισης των πρωτεϊνών του χορίου. Σε κάθε περίπτωση η BmSH3 αποτελεί συνδετικό μέλος των προαναφερόμενων διεργασιών με τον κυτταροσκελετό και ότι είναι ενεργός μέτοχος αυτών των διεργασιών.

ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή έγινε προσπάθεια για τον χαρακτηρισμό του γονιδίου BmSH3. Από προηγούμενες μελέτες ήταν γνωστή η πρωτοταγής δομή της πρωτεΐνης που χαρακτηρίζεται από μια περιοχή SoHo στο αμινο-τελικό άκρο και τρεις περιοχές SH3 στο καρβοξυ-τελικό άκρο, που θεωρήθηκαν ως πιθανές περιοχές αλληλεπίδρασής με τον ορφανό πυρηνικό υποδοχέα BmE75C. Γνωστή ήταν και επίσης

η ημιτελής cDNA αλληλουχία της, όπου δεν είχε ταυτοποιηθεί το 5' άκρο και το πλαίσιο ανάγνωσης παρέμενε ανοιχτό. Λόγω της χαρακτηριστικής τοπολογίας των περιοχών SoHo και SH3 η BmSH3 κατατάσσεται στην οικογένεια των πρωτεϊνών CAV (κεφάλαιο 1.5), (Kioka et al., 2002). Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Kioka et al., 2002; Roignot and Soubeyran, 2009) τα μέλη της οικογένειας CAV (CAP, ArgBP2 και vinexin στον άνθρωπο και το ποντίκι και τα ορθόλογά τους σε άλλους οργανισμούς, παράρτημα I) συμμετέχουν σε κυτταρικές διεργασίες όπως στις επαφές μεταξύ κυττάρων και κυττάρων με την εξωκυττάρια μήτρα (extracellular matrix), στην οργάνωση του κυτταροσκελετού, αλλά και σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια όπως αυτά των αυξητικών παραγόντων και στεροειδών ορμονών (Kioka et al., 2002; Roignot and Soubeyran, 2009).

Συνοπτικά, είναι γνωστό ότι η CAP είναι μια συνδετική πρωτεΐνη (adaptor protein), που εμπλέκεται στη σηματοδότηση για τη δημιουργία εστιακών επαφών με ινίδια ακτίνης που επάγονται από καταστάσεις στρες (stress fibers) (Ribon et al., 1998a; b; Zhang et al., 2003), και αποτελεί κύριο ρυθμιστικό συστατικό του υποδοχέα της γλυκόζης, GLUT4, κατά το σηματοδοτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από την ινσουλίνη (Baumann et al., 2000; Kimura et al., 2001). Η Arg-Binding-Protein 2 (ArgBP2) λειτουργεί ως ελεγκτής που εποπτεύει την ισορροπία μεταξύ της προσκόλλησης ή της κινητικότητας των κυττάρων. Όπως έχει παρατηρηθεί και για τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας, η ArgBP2 εμπλέκεται σε πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία τελικώς οδηγούν στην οργάνωση του κυτταροσκελετού (Cestra et al., 2005; Roignot and Soubeyran, 2009). Η πρωτεΐνη vinexin έχει βρεθεί να εμπλέκεται στην οργάνωση του κυτταροσκελετού με την δέσμευσή της στη Vinculin, μια πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού, που προσδένεται στην ακτίνη και εντοπίζεται στις επαφές του κυττάρου με την εξωκυττάριας μήτρας και στις επαφές μεταξύ κυττάρων (Kioka et al., 1999; Mandai et al., 1999).

Ομόλογες πρωτεΐνες αναγνωρίστηκαν και σε άλλους οργανισμούς (παράρτημα I) είτε με εργαλεία πρόβλεψης γονιδίων, είτε πειραματικά, όπως για τη Δροσόφιλα όπου χαρακτηρίστηκε το γονίδιο DCAP, που εκφράζει τις ισομορφές DCAP 1 έως 5 και την DCAPL, προϊόντα εναλλακτικής συρραφής, και έχουν συσχετιστεί με τον μεταβολισμό

της γλυκόζης στο έμβρυο της Δροσόφιλας (Yamazaki and Nusse, 2002; Yamazaki and Yanagawa, 2003).

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ BmSH3 ΣΤΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ΤΟΥ mRNA

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας CAV (CAP/ponsin, ArgBP2 και vinexin), αναγνωρίστηκαν αρχικά στα θηλαστικά, συγκεκριμένα στο ποντίκι και στον άνθρωπο ώς θηρευτές στο σύστημα δύο υβριδίων στη ζύμη. Εκφράζονται από τρία διαφορετικά γονίδια τα οποία όπως αναφέρθηκε έχουν ονομαστεί SORBS1, SORBS2, SORBS3 και ανιχνευτεί σε διαφορετικά χρωμοσώματα στον ίδιο οργανισμό (παράρτημα I). Ομοίως, βρέθηκε ότι τουλάχιστον σε έναν οργανισμό (*Danio Rerio*, παράρτημα I) κωδικοποιούνται ομόλογες πρωτεΐνες από δύο διαφορετικά γονίδια.

Μια από τις διαφορές μεταξύ θηλαστικών και των άλλων οργανισμών είναι ότι στα θηλαστικά οι ισομορφές της οικογένειας CAV κωδικοποιούνται από τρεις διαφορετικούς γονιδιακούς τόπους που εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα σε αντίθεση με μη θηλαστικούς οργανισμούς όπου εμφανίζεται ένα αντίγραφο του γονιδίου (παράρτημα I). Αντίθετα, στη παρούσα διδακτορική διατριβή βρέθηκε ότι όλες οι πρωτεϊνικές ισομορφές της BmSH3 κωδικοποιούνται από έναν γονιδιακό τόπο στο γονιδίωμα του μεταξοσκώληκα, που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 9 (κεφάλαιο 4.3.5.1, εικόνα 4.13). Σε κάθε περίπτωση, βρέθηκε ότι ένας γονιδιακός τόπος κωδικοποιεί διαφορετικές πρωτεϊνικές ισομορφές μέσω εναλλακτικής συρραφής (όπως διαπιστώθηκε στη Δροσόφιλα) (Yamazaki and Nusse, 2002) ή εναλλακτικής χρήσης υποκινητή, όπως βρήκαμε ότι συμβαίνει για την BmSH3.

Στη παρούσα διατριβή περιγράφονται δύο κύρια εναλλακτικά μετάγραφα. Το BmSH3-A1, του οποίου το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης παραμένει ανοιχτό (δε κατέστη δυνατή η ταυτοποίηση του 5’ άκρου), και το BmSH3-B, που αναγνωρίστηκε μετά από μελέτες RT-PCR. Η μεταγραφή της BmSH3-B γίνεται από διαφορετικό υποκινητή και όχι από εναλλακτική συρραφή λόγω του διαφορετικού κωδικονίου έναρξης που εντοπίζεται σε ένα εξόνιο διαφορετικό από αυτά που κωδικοποιούν το BmSH3-A1, ειδικότερα το εξώνιο 1B, που τοποθετείται μεταξύ των εξονίων 16 και 17 του BmSH3-A1 (εικόνα 4.16). Τα κλωνοποιημένα cDNA είναι μεγέθους 5921 και 1080 βάσεων

αντιστοίχως (παράρτημα ΙΙ) και κωδικοποιούν πρωτεΐνες με αναμενόμενο μοριακό βάρος 116 και 36,3 kDa αντιστοίχως (παράρτημα ΙΙΙ). Με τη χρήση RT-PCR ανιχνεύσαμε και μια τρίτη ισομορφή**,** την BmSH3-A2 που μοιράζεται το ίδιο 3' άκρο με την BmSH3-A1 και το ίδιο κωδικόνιο λήξης ενώ το 5' άκρο της είναι άγνωστο και το ανοιχτό πλαίσιο παραμένει ανοιχτό. Η διαφορά που εμφανίζει με τη cDNA αλληλουχία του BmSH3-A1 μετάγραφου έγκειται στην απουσία του δέκατου πέμπτου ($15^{ου}$) εξονίου (εικόνα 4.14) του BmSH3-A1 (παράρτημα ΙΙ).

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ BmSH3 ΣΤΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας CAV, βρέθηκαν στο καρβοξυ-τελικό άκρο της BmSH3-A1 τρεις SH3 περιοχές, των οποίων η λειτουργία έγκειται στην αλληλεπίδραση με άλλες διάφορων πρωτεΐνες (Mayer, 2001; Zarrinpar et al., 2003; Li, 2005) και προς το αμινο-τελικό άκρο μια περιοχή που αναγνωρίστηκε από την ομοιότητά της με το πεπτίδιο σορβίνη και ονομάζεται SoHo περιοχή (Sorbin Homology Domain) (Pansu et al., 1981; Kimura et al., 2001). Η SoHo περιοχή φαίνεται να μπορεί και αυτή να συμμετέχει σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και μέσω αυτών να γίνεται η ειδική στόχευση πρωτεϊνών στις σχεδίες λιπιδίων (lipid rafts).

Τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης κυτταρικών εκχυλισμάτων από ιστούς του μεταξοσκώληκα *B. mori* με το ειδικό αντίσωμα έναντι της BmSH3-A1 οδήγησαν στην ανίχνευση μιας ποικιλίας ισομορφών της πρωτεΐνης BmSH3-A1. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το αντίσωμα BmSH3.1 που αναγνωρίζει τη περιοχή μεταξύ της SoHo και των SH3 αναγνώρισε ειδικά μια διπλή ζώνη μοριακού βάρους 75 και 85 kDa αποκλειστικά στα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια (εικόνα 5.6, πίνακας 5.3). Η ίδια διπλή ζώνη αναγνωρίστηκε και κατά την μελέτη της έκφρασης της BmSH3 κατά την ανάπτυξη των ωοθυλακίων (εικόνα 5.8). Επιπλέον, το αντίσωμα αναγνώρισε ασθενέστερα μικρότερου μοριακού βάρους ζώνες με ειδική κατανομή στα δείγματα από την κεραία και το κεφάλι του μεταξοσκώληκα (εικόνα 5.6, πίνακας 5.3).

Ενδιαφέρουσα ήταν και η αναγνώριση διαφορετικών πιθανών ισομορφών για κάθε τμήμα της αναπτυσσόμενης ωοθήκης (εικόνα 5.7, πίνακας 5.4). Η ισομορφή μεγάλου μοριακού βάρους που αναγνωρίστηκε στο περίβλημα των ωοθυλακίων

(sheath) πιθανώς αντιστοιχεί στην αυθεντική BmSH3-A1 της οποίας το μοριακό βάρος ίσως είναι μεγαλύτερο από αυτό που βρέθηκε μέσω *in silico* μετάφρασης της αλληλουχίας. Αναφέρθηκε ότι η in silico αναζήτηση πιθανών εξονίων και εσωνίων στο γονιδίωμα του μεταξοσκώληκα ταυτοποίησε ως πιθανό κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης ένα ATG αρκετές βάσεις ανοδικά (909 nt) της γνωστής αλληλουχίας που προσθέτει επιπλέον 303 αμινοξέα (33 kDa στην πρωτεΐνη) (κεφάλαιο 4.3.5, παράρτημα VI). Έτσι, το αναμενόμενο μέγεθος του cDNA της BmSH3-A1 είναι 6224 nt με προβλεπόμενο μέγεθος της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης 1114 αμινοξέα και προβλεπόμενο μοριακό βάρος 124 kDa. Παρατηρήσαμε επίσης διαφορετική κατανομή των μικρότερων ισομορφών στα διαμερίσματα των ωοθυλακίων (εικόνα 5.7). Τα μοριακά βάρη των πιθανών ισομορφών που αναγνωρίστηκαν στα επιθηλιακά κύτταρα και στο σύμπλεγμα των τροφοκύτταρων και του ωοκύτταρου είναι σαφώς μικρότερα (40 έως 85 kDa). Οι πρωτεΐνες που αντιστοιχούν στις μικρού μοριακού βάρους ζώνες, ίσως να προέρχονται από εναλλακτική συρραφή ή από χρήση διαφορετικού υποκινητή (όπως πιθανώς συμβαίνει και με το BmSH3-B μετάγραφο), ενώ είναι επίσης δυνατό να αποτελούν προϊόν ειδικής πρωτεόλυσης της BmSH3-A1, όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 5.4.

Είναι γνωστό ότι η μετα-μεταφραστική τροποποίηση των πρωτεϊνών και συγκεκριμένα η ειδική πρωτεόλυση που εμπλέκονται στην ωογένεση είναι σημαντική για την σωστή κατασκευή της βιτελλινικής μεμβράνης και της δόμησης του χορίου (Waring et al., 1990; Kendirgi et al., 2002). Χαρακτηριστικά, έχει προταθεί η ειδική πρωτεολυτική επεξεργασία της BmVMP30 (μιας δομικής πρωτεΐνης της βιτελλινικής μεμβράνης) που οδηγεί στην απώλεια των υδροφοβικών περιοχών στο αμινο-τελικό άκρο αυτής. Προτείνουμε ότι με την ίδια διαδικασία μπορεί επίσης να γίνεται η παραγωγή των BmSH3 ισομορφών που παρατηρήθηκαν κατά την ιστοειδική ανάλυση της πρωτεΐνης BmSH3. Αυτή η υπόθεση οδηγεί στη πιθανή συσχέτιση της BmSH3 με την κατασκευή της βιτελλινικής μεμβράνης.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ

Το κύριο χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών της οικογένειας CAV είναι οι SH3 και η SoHo περιοχές, οι οποίες συμμετέχουν σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Από την μελέτη της αμινοξικής αλληλουχίας της BmSH3 και της αναγνώρισης των περιοχών πρόσδεσης SH3 περιοχών στην αλληλουχία της BmSH3 (κεφάλαιο 7.3.3, εικόνα 7.6), μπορεί κανείς να υποθέσει ότι με την BmSH3 μπορούν να αληλεπιδρούν άλλες πρωτεΐνες που περιέχουν SH3 περιοχές. Είναι δηλαδή δυνατόν να συμβαίνει διμερισμός ή και πολυμερισμός της πρωτεΐνης, με την συμμετοχή των ίδιων ή διαφορετικών ισομορφών της, μέσω των SH3 περιοχών και των περιοχών τάξης I και II. Επιπλέον, η BmSH3 μπορεί, πιθανώς, μέσω των ίδιων περιοχών να αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες που περιέχουν SH3 περιοχές και με αυτόν τον τρόπο να αυξάνεται ο αριθμός των πιθανών αλληλεπιδράσεων και συνάμα η πολυπλοκότητα της λειτουργίας της πρωτεΐνης.

Όπως προαναφέρθηκε, στην παρούσα εργασία δεν κατέστη δυνατή η αναγνώριση νέων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της BmSH3. Η επιβεβαίωση όμως της αλληλεπίδρασης της BmSH3 με την BmE75C θεωρήθηκε πρωτεύουσας σημασίας κυρίως λόγω της πιθανής λειτουργικής της σημασίας.

ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ BmSH3 ΜΕ ΤΗΝ BmE75C

Η BmSH3 ανιχνεύτηκε αρχικά με το σύστημα δύο υβριδίων στη ζύμη μέσω της αλληλεπίδρασής της καρβοξυ-τελικής της περιοχής με τον ορφανό πυρηνικό υποδοχέα BmE75C. Ο BmE75C είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που λειτουργεί ως καταστολέας της δράσης της BmHR3, ενός ενεργοποιητή (trans-activator) της μεταγραφής των γονιδίων που περιέχουν RORE στοιχεία στον υποκινητή τους (Swevers et al., 2002b). Η καταστολή γίνεται τόσο με την πρόσδεση της BmE75C, αλλά και της BmE75A ισομορφής, στα RORE στοιχεία αλλά και με την άμεση αλληλεπίδραση με την BmHR3.

Από μελέτες που είχαν γίνει προηγούμενα στο σύστημα δύο υβριδίων στη ζύμη (K. Ito και K. Iatrou αδημοσίευτα αποτελέσματα), είχε βρεθεί ότι στην αλληλεπίδραση

της BmSH3 με την BmE75C εμπλέκονται οι SH3 περιοχές της BmSH3. Ειδικότερα η αλληλεπίδραση είναι πιο ισχυρή μεταξύ της τρίτης SH3 περιοχής στο καρβοξυ-τελικό άκρο (SH3C), και του αμινο-τελικού άκρου της BmE75C που είναι πλούσια σε προλίνη. Ασθενέστερη αλληλεπίδραση είχε παρατηρηθεί όταν στην ίδια μελέτη είχαν χρησιμοποιηθεί η αυθεντική BmE75C και η BmSH3 μήκους 955 αα (εικόνα 1.10 και 1.11).

Εξετάστηκε ο συνεντοπισμός των πρωτεϊνών με δοκιμές ανοσοφθορισμού και η αλληλεπίδραση μέσω ανοσοκατακρήμνισης. Κατά την υπερέκφραση της BmE75C σημασμένης με τον επίτοπο Myc και της BmSH3-A1 σε κύτταρα Hi5**,** το πρότυπο φθορισμού ήταν κυτταροπλασματικό για την BmSH3-A1 και πυρηνικό για την BmE75 (εικόνα 7.1). Το πρότυπο φθορισμού της BmSH3 στα επιθηλιακά κύτταρα των ωοθυλακίων βρέθηκε να είναι κυτταροπλασματικό, επιβεβαιώνοντας την υποκυτταρική κατανομή της παροδικά υπερεκφρασμένης BmSH3-A1. Ειδικότερα, δεν ήταν ορατός ο εντοπισμός της BmSH3-A1 στον πυρήνα όπου συνήθως εντοπίζονται οι πυρηνικοί υποδοχείς, όπως ο BmE75 και BmHR3. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, η λειτουργία της BmE75C είναι αναμενόμενο να μην επηρεάζεται από την BmSH3-A1. Πράγματι, λειτουργικές δοκιμές της πιθανής επίδρασης της BmSH3 στην λειτουργία της BmE75C έδωσαν αρνητικά αποτελέσματα (L. Swevers και K.Iatrou αδημοσίευτα αποτελέσματα). Δηλαδή, σε σύστημα μελέτης της έκφρασης ενός γονιδίου αναφοράς (Luciferase) υπό τον έλεγχο υποκινητή που περιέχει τα στοιχεία RORE και ενεργοποιείται από την BmHR3, δεν αναφέρθηκε καμία αλλαγή στα πιστοποιημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς, που επιφέρει η BmE75C, όταν έγινε συνέκφραση της BmSH3-A1 με τις BmE75C και BmHR3 (Swevers et al., 2002b, L. Swevers και K.Iatrou αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Με έκπληξη παρατηρήσαμε την αλλαγή του προτύπου της υποκυτταρικής κατανομής της BmE75C όταν τα κύτταρα κατά την παροδική συνδιαμόλυνση παρουσία πολυ-L-λυσίνης (εικόνα 7.3, κεφάλαιο 7.3.2). Εκτός από την πυρηνική κατανομή της BmE75C παρατηρήσαμε τον εντοπισμό της στις προεκτάσεις των κυττάρων, σε μορφές ψευδοποδίων. Οι προεκτάσεις αυτές θυμίζουν λαμελλοπόδια ή φιλοπόδια, τα οποία συγκροτούνται κυρίως από ινίδια ακτίνης. Η δημιουργία αυτών των απολήξεων

εξαρτάται από τον κυτταροσκελετό και κύριος σκοπός αυτών των απολήξεων είναι η μετανάστευση των κυττάρων (Mattila and Lappalainen, 2008). Η προσκόλληση των κυττάρων σε επιφάνειες με πολυ-L-λυσίνη οδηγούν στον σχηματισμό λαμελλοποδίων και φιλοποδίων (Deng et al., 2009). Δηλαδή, παρατηρήσαμε τον συνεντοπισμό της BmSH3-A1 και την BmE75C στο κυτταρόπλασμα, και συγκεκριμένα στις προεκτάσεις των κυττάρων όμοιες με λαμελοπόδια ή φιλοπόδια, όπου παρατηρείται έντονος σχηματισμός ινιδίων ακτίνης που επάγεται από την προσκόλληση των κυττάρων σε τρυβλία πολυ-L-λυσίνης. Αυτή η διαπίστωση οδηγεί στην συσχέτιση ενός ορφανού πυρηνικού υποδοχέα, του BmE75C, με τον σχηματισμό ινιδίων ακτίνης, και ψευδοποδίων και κατ' επέκταση με την μετανάστευση των κυττάρων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί (Swevers et al., 2002b), η BmE75C πιθανώς να εμπλέκεται σε διαφορετικές λειτουργίες εκτός από τη ρύθμιση της λειτουργίας της BmHR3. Η μετανάστευση των κυττάρων ή η οργάνωση του κυτταροσκελετού ίσως είναι μια από αυτές.

Το εύρημα του συνεντοπισμού της BmSH3-A1 με την BmE75C επιβεβαιώθηκε και με δοκιμές ανοσοκατακρήμνισης. Έτσι, σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης σε κύτταρα Hi5 (όπου έγινε υπερέκφραση της BmE75C σημασμένης με τον επίτοπο Myc και της BmSH3) πιστοποιήθηκε η αλληλεπίδραση της BmSH3 με την BmE75C (εικόνα 7.5, κεφάλαιο 7.3.3). Μία ακόμα σημαντική παρατήρηση ήταν η συγκατακρήμνιση της BmSH3-A1 και με την BmE75A, από την οποία απουσιάζει το αμινο-τελικό άκρο του BmE75C που είναι πλούσιο στο αμινοξύ προλίνη και αποτελεί περιοχή πρόσδεσης SH3 περιοχών.

Κατά την μελέτη της υποκυτταρικής κατανομής του E75 στην *Manduca sexta*, το πρότυπο φθορισμού βρέθηκε να είναι πυρηνικό (Riddiford et al., 2003), όπως παρατηρήθηκε και στην παρούσα διατριβή (εικόνα 7.1). Αναλογικά, πιθανώς κατά την ανάπτυξη των ωοθυλακίων στον μεταξοσκώληκα, η BmE75C να εντοπίζεται στον πυρήνα. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν σε ερωτήματα για την ιστοειδική και χρονοειδική αλληλεπίδραση της BmE75C και της BmSH3-A1 και τη λειτουργική σημασία της αλληλεπίδρασης.

Η αλληλεπίδραση της BmSH3 τόσο με την BmE75A και την BmE75C, που βρέθηκε με τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης προυποθέτει την ύπαρξη και άλλων

περιοχών που ευνοούν την αλληλεπίδραση των δύο ισομορφών, όπως έχει προταθεί και για άλλα μέλη της οικογένειας CAV (Kimura et al., 2001). Ως πιθανότερη περιοχή αλληλεπίδρασης της BmSH3 με τις BmE75 ισομορφές φαίνεται να είναι το καρβοξυ-τελικό άκρο των ισομορφών όπου βρέθηκαν δύο αλληλουχίες πρόσδεσης SH3 περιοχών τάξης I (κεφάλαιο 7.3.3 εικόνα 7.6). Η περιοχή αυτή, που δεν είχε αναγνωριστεί ως σημαντική για πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις σε προηγούμενες μελέτες, εξηγεί την παρατηρούμενη αλληλεπίδραση με την BmE75A. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι η BmE75C ισομορφή περιέχει δύο στοιχεία πρόσδεσης SH3 περιοχών αντιδιαμετρικά το ένα από το άλλο. Η μία περιοχή εμφανίζεται στο αμινο-τελικό άκρο και είναι τάξης II ενώ η προαναφερόμενη τάξης I βρίσκεται στο καρβοξυ-τελικό άκρο. Η ύπαρξη των δύο αυτών στοιχείων πιθανώς να οδηγεί στην συνεργειακή πρόσδεση της BmSH3 σε περισσότερες θέσεις, ή ακόμα και στην ταυτόχρονη πρόσδεση διαφορετικών πρωτεϊνών που περιλαμβάνουν SH3 περιοχές με αποτέλεσμα την διαφοροποίηση της γνωστής λειτουργίας της BmE75C.

Εκτός από τις SH3 περιοχές και άλλες γνωστές περιοχές της CAV οικογένειας πρωτεϊνών θα μπορούσαν να συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις με τις BmE75 ισομορφές. Έτσι, η CAP αλληλεπιδρά με την flotilin, μέσω της περιοχής SoHo (Kimura et al., 2001) και με την filamin-C με το αμινο-τελικό άκρο, με τρόπο ανεξάρτητο των SH3 περιοχών (Zhang et al., 2007b). Ομοίως, η vinexin α αλληλεπιδρά με τις ERβ (Estrogen Receptor beta), τον ERα (Estrogen Receptor alpha), τον AR (Androgen Receptor), και τον GR (glucocorticoid receptor) είτε με το αμινο-τελικό άκρο είτε με το μεσαίο μέρος της αλληλουχίας της, ανεξάρτητα από την ύπαρξη του προσδέτη, ή από τις SH3 περιοχές (Tujague et al., 2004).

Η αλληλεπίδραση της vinexin α με τον ERα οδηγεί στην ρύθμιση της φωσφορυλίωσης και της ενεργότητας του υποδοχέα με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μεταγραφής (εξαρτώμενης από τον ERα) *in vitro* (Tujague et al., 2004). Με αυτόν τον τρόπο μια πρωτεΐνη χωρίς ενζυμική δραστηριότητα ρυθμίζει έμμεσα την μεταγραφική ενεργότητα ενός πυρηνικού υποδοχέα. Η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών γίνεται στον πυρήνα σε αντίθεση με την περίπτωση του E75 όπου ο ορφανός πυρηνικός υποδοχέας βρέθηκε στο κυτταρόπλασμα. Δεν είναι γνωστό αν η vinexin α ρυθμίζει τη

μεταγραφική ικανότητα του ERα με άμεση αλληλεπίδρασή τους, ή μέσω της συμμετοχής της σε ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών που έρχονται σε επαφή με τον ERα μέσω της vinexin α.

Άλλες περιπτώσες ρύθμισης κυτταρικών λειτουργιών από την οικογένεια CAV, αφορούν την ArgBP2, που βρέθηκε να αλληλεπιδρά με την α2-spectrin μέσω της περιοχής SoHo (Cestra et al., 2005). Φαίνεται ότι ArgBP2 οδηγεί σε ρύθμιση του κυτταροσκελετού συμμετέχοντας στην δημιουργιάς συσσωμάτων F-ακτίνης.

Από τις βιβλιογραφικές αναφορές γίνεται εμφανές ότι όπου οι αλληλεπιδράσεις συμβαίνουν μεταξύ των SH3 περιοχών, παρατηρείται η άμεση αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού. Όταν στις αλληλεπιδράσεις δεν υπάρχει συμμετοχή των SH3 περιοχών οι πρωτεΐνες της CAV οικογένειας προωθούν σηματοδοτικά μονοπάτια ανεξάρτητα της συμμετοχής του κυτταροσκελετού. Όταν η αλληλεπίδραση συμβαίνει τόσο με τις SH3 περιοχές όσο και με άλλες περιοχές της αλληλουχίας της CAV οικογένειας παρατηρείται επικοινωνία μεταξύ διαφορετικών μονοπατιών.

Παρόλο που δεν παρατηρήθηκε η διαφοροποίηση της λειτουργίας της BmE75C από την BmSH3-A1 στις δοκιμές λειτουργικότητας (L. Swevers και K. Iatrou αδημοσίευτα αποτελέσματα), δεν γίνεται να απορριφθεί η πιθανότητα της τροποποίησης της λειτουργίας της BmE75C από την BmSH3-A1 στα ωοθυλάκια ή και σε άλλους ιστούς και από άλλες ισομορφές της BmSH3 όπως της BmSH3-B. Μια ακόμα σημαντική παρατήρηση είναι ότι από τη BmSH3-B ισομορφή απουσιάζει το μεγάλο αμινο-τελικό άκρο, στο οποίο περιλαμβάνονται ακολουθίες πυρηνικού εντοπισμού, και το αναμενόμενο μόριο είναι αρκετά μικρό (36.3 kDa) για να μπορέσει να εισέλθει στον πυρήνα μέσω των πυρηνικών πόρων χωρίς την ύπαρξη σημάτων πυρηνικού εντοπισμού στην αλληλουχία του (Nigg, 1997), καθιστώντας την ικανή για αλληλεπίδραση με την BmE75C ή την BmE75A και ακόλουθη επίδραση στην λειτουργία της κατά την ωογένεση. Στη παρούσα μελέτη δεν εξετάστηκε η πιθανή αλληλεπίδραση της BmSH3-B με την BmE75C ή την BmE75A, ενώ δεν υπάρχουν δεδομένα για την ειδική υποκυτταρική κατανομή της BmSH3-B. Ας σημειωθεί και εδώ ότι η μελέτη της αλληλεπίδρασης με το σύστημα δύο υβριδίων στη ζύμη (k. Ito και K. Iatrou, αδημοσίευτα αποτελέσματα) έδειξε ισχυρή αλληλεπίδραση των BmE75C και του

καρβοξυ-τελικού άκρου του BmSH3-A1, που περιέχει μόνο τις SH3 περιοχές, των οποίων το μέγεθος και η δομή είναι συγκρίσιμα με την δομή της BmSH3-B.

Όπως παρουσιάστηκε η υποκυτταρική κατανομή της BmSH3-A1 σε παροδικά διαμολυσμένα κύτταρα είναι κυτταροπλασματική (εικόνα 6.2 και 6.3). Ομοίως, το προτύπο φθορισμού της BmSH3 στα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια βρέθηκε να είναι επίσης κυτταροπλασματικό (εικόνα 6.4 και 6.5). Δεν ήταν όμως δυνατόν να μελετηθεί η κατανομή της BmSH3 στα βιτελλογενετικά στάδια της ωογένεσης και ακόμα περισσότερο τα νεαρά στάδια της βιτελλογένεσης και της προβιτελογένεσης (κεφάλαιο 6.3.3), όπου και επιβεβαιώθηκε η έκφραση της BmSH3 με ανάλυση τύπου Western (κεφάλαιο 5.3.3 εικόνα 5.7). Κατά τα πρώτα στάδια της ωογένεσης είναι δυνατόν η BmSH3 να εντοπίζεται και στον πυρήνα. Είναι γνωστό ότι κατά την έναρξη της ωογένεσης ενεργοποιείται η μεταγραφή της BmE75A και της BmE75C (κεφάλαιο 1.2.6). Ενώ τα επίπεδα της BmE75C παραμένουν χαμηλά, τα επίπεδα της BmE75A αυξάνονται μέχρι περίπου το στάδιο -21 όπου και ξεκινάει η μείωση των επιπέδων του μετάγραφου BmE75A, μέχρι την τελική μείωση κατά την μετάβαση από τη βιτελλογένεση στη χοριογένεση μέχρι το στάδιο +5 (εικόνα 1.9) (Swevers and Iatrou, 2003). Το ενδιαφέρον που παρατηρείται στα αρχικά στάδια της ωογένεσης είναι η μείωση των επιπέδων έκφρασης της BmE75C σε αντίθεση με την αύξηση των επιπέδων της BmE75A (εικόνα 1.9). Κατά την περίοδο αυτή είναι πιθανόν η BmSH3 να αλληλεπιδρά με την BmE75A και να εντοπίζεται στον πυρήνα.

Κατά την μελέτη του προτύπου φθορισμού της BmSH3 και των χιμαιρικών τμημάτων της με την EYFP βρέθηκε ότι το αμινο-τελικό άκρο εντοπίζεται και στον πυρήνα με το καρβοξυ-τελικό άκρο να εμφανίζει αυστηρά κυτταροπλασματικό εντοπισμό (εικόνα 6.2). Κατά την *in silico* μελέτη της πρωτοταγούς δομής της BmSH3-A βρέθηκαν πιθανά σήματα πυρηνικού εντοπισμού στο αμινο-τελικό άκρο αλλά και περιοχές πλούσιες σε προλίνη, που ίσως να προσδένονται στις SH3 περιοχές (κεφάλαιο 4.3.4). Όπως αναφέρεται στην βιβλιογραφία (Zhang et al., 2003) κατά την αλληλεπίδραση των SH3 περιοχών του καρβοξυ-τελικού άκρου της ισομορφή της CAP, CAP4, με τις πλούσιες σε προλίνη περιοχές του αμινο-τελικού άκρου του ίδιου μορίου, πιθανόν να οδηγεί σε αλλαγή της δομής της CAP4, εκθέτοντας τις δομές σπείρας-

σπείρας (coiled-coil) επιτρέποντας έτσι τον διμερισμό της CAP4 (οι δομές σπείρας-σπείρας είναι δομές υπερελίκωσης που μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους, (Lupas, 1996). Παρομοίως, το αμινο-τελικό και το καρβοξυ-τελικό άκρο της BmSH3 πιθανώς να αλληλεπιδρούν, τα σήματα πυρηνικού εντοπισμού να απενεργοποιούνται με αποτέλεσμα η BmSH3 να εντοπίζεται μόνο στο κυτταρόπλασμα. Η διατάραξη της ενδομοριακής αλληλεπίδρασης του καρβοξυ-τελικού και του αμινο-τελικού άκρου, μέσω αλληλεπίδρασης μιας τρίτης πρωτεΐνης με τις SH3 περιοχές, ίσως να οδηγεί στον πυρηνικό εντοπισμό της BmSH3 και αλληλεπίδραση με την BmE75C.

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ BmSH3

Η BmSH3 είναι μια συνδετική πρωτεΐνη της οποίας ο λειτουργικός ρόλος φαίνεται να ποικίλει και να καθορίζεται από την χωροταξία του στο κύτταρο από την ιστοειδική και χρονοειδική έκφραση του. Είναι γνωστό ότι η υποκυτταρική κατανομή των συνδετικών πρωτεϊνών είναι σημαντική για την υποκυτταρική διαμερισματοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών, μέσω στρατολόγησης πρωτεϊνών σε συγκεκριμένα διαμερίσματα του κυττάρου (Soubeyran et al., 2003). Όπως αναφέρθηκε, επιβεβαιώσαμε την αλληλεπίδραση της BmSH3 με την BmE75C αλλά και με την BmE75A εκτός του πυρήνα. Η αλληλεπίδραση αυτή πιθανώς να οδηγεί στην εμπλοκή των ορφανών πυρηνικών υποδοχέων σε νέα σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία αφορούν στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, στον σχηματισμό ινιδίων ακτίνης επαγόμενων από στρες αλλά και στη μετακίνηση των κυττάρων μέσω της ανάπτυξης φιλοποδίων και λαμελοποδίων. Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια ανίχνευσης της λειτουργίας της BmSH3 κατά την ωογένεση και συγκεκριμένα στα στάδια της μετάβασης από τη βιτελλογένεση στη χοριογένεση και κατά τη χοριογένεση, όπου παρατηρήσαμε σημαντική αλλαγή στον υποκυτταρικό εντοπισμό της BmSH3.

Έγινε απόπειρα για την καταστολή της έκφρασης με τη χρήση της τεχνολογίας της παρεμβολής RNA (RNAi), όμως τα αποτελέσματα ήταν αποθαρρυντικά μιας και δεν ήταν δυνατή η απρόσκοπη εφαρμογή της τεχνικής για συστηματική μελέτη της καταστολής της έκφρασης της BmSH3. Η εφαρμογή της τεχνολογίας RNAi παρουσιάζει ακόμα προβλήματα στο χώρο των λεπιδοπτέρων εντόμων και εξαίρεση δεν

αποτέλεσε η εφαρμογή της στο εργαστήριο. Η εφαρμογή της τεχνολογίας του συμπληρωματικού DNA ήταν επίσης αδύνατη γιατί ήταν απαραίτητη η γνώση του σημείου έναρξης της μετάφρασης (Kendirgi et al., 2002). Για αυτούς τους λόγους, στην παρούσα εργασία δεν ήταν δυνατή η μελέτη της λειτουργίας της BmSH3 μέσω της μεθόδου της απώλειας λειτουργίας (loss of function).

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ BmSH3 ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΩΟΓΕΝΕΣΗ

Κατά τη μελέτη της υποκυτταρικής κατανομής της BmSH3 στα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια, βρέθηκε σημαντική διαφοροποίηση στην κατανομή της πρωτεΐνης κατά την όψιμη βιτελλογένεση, την πρώιμη χοριογένεση και την όψιμη χοριογένεση (εικόνα 6.5).

Κατά τα στάδια της όψιμης βιτελλογένεσης, το πρότυπο ανοσοφθορισμού της BmSH3 είναι διάχυτο και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, και είναι παρόμοιο με το πρότυπο ανοσοφθορισμού που παρατηρήθηκε κατά την παροδική διαμόλυνση των Hi5 κυττάρων με ολόκληρη την BmSH3 ή το τμήμα της που περιείχε μόνο τις SH3 περιοχές. Τα πειράματα μελέτης της αναπτυξιακής κατανομής της BmSH3 μέσω RT-PCR και ανοσοαποτύπωσης τύπου Western (κεφάλαιο 4.3.7.2 και 5.3.3) έδειξαν ότι η BmSH3-A εκφράζεται από τα στάδια -34 της βιτελλογένεσης έως το στάδιο +30 της χοριογένεσης (πρώιμη βιτελλογένεση και όψιμη χοριογένεση, αντιστοίχως, Swevers and Iatrou, 1992). Παρατηρήθηκε η σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης της BmSH3 ακόμα και πριν τα στάδια της ορατής αύξησης του όγκου των ωοθυλακίων που συμβαίνει λίγο πριν την χοριογένεση (Kafatos et al., 1977). Μετά τη μετάβαση από τη βιτελλογένεση στη χοριογένεση, η συγκέντρωση της BmSH3-A παραμένει σταθερή.

Κατά το τέλος της βιτελλογένεσης και την αρχή της χοριογένεσης συμβαίνουν αλλαγές στα ωοθυλάκια, όπως αλλαγή του όγκου των ωοθυλακίων λόγω εισροής νερού στο ωοκύτταρο. Καθώς το ωοθυλάκιο αυξάνει τον όγκο του στα τελικά στάδια της βιτελλογένεσης, τα επιθηλιακά κύτταρα υπόκεινται σε κατάσταση στρες και παρατηρείται άμεση αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού για την διατήρηση της ομοιόστασης του κυττάρου. Έμμεση επίπτωση της αύξησης του όγκου είναι η φραγή των αυλακώσεων (loss off patency) μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων, μέσω των οποίων γινόταν η εισροή υλικών στο ωοκύτταρο, όπως των βιτελλογενενινών, από την

αιμολέμφο στην επιφάνεια του ωοκυττάρου (Zimowska et al., 1995; Wang and Telfer, 1996; Telfer and Woodruff, 2002) Η διαδικασία εκκινείται από την αύξηση των επιπέδων του cAMP στα επιθηλιακά κύτταρα με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης εξαρτώμενης από το cAMP (cAMP-dependent protein kinase, PKA). Η διαδικασία πιστεύεται ότι ενεργοποιείται από τα ίδια τα ωοθυλάκια (Wang and Telfer, 1996, 1998).

Η οικογένεια των πρωτεϊνών CAV έχει συσχετιστεί τόσο με την διαμεταγωγή σημάτων όσο και με την οργάνωση του κυτταροσκελετού (Wang et al., 1997; Ribon et al., 1998a; Kioka et al., 1999; Mandai et al., 1999; Baumann et al., 2000; Soubeyran et al., 2003; Zhang et al., 2003; Haglund et al., 2004; Cestra et al., 2005). Όπως αναφέρθηκε ήδη, κατά τα στάδια της πρώιμης χοριογένεσης η BmSH3 εντοπίζεται διάχυτη στο κυτταρόπλασμα, αλλά εμφανίζεται και στις επαφές των κυττάρων. Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας και των βιβλιογραφικών δεδομένων προτείνουμε ότι η BmSH3 πιθανώς να εμπλέκεται στην ρύθμιση της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού κατά την διάρκεια της αύξησης του όγκου του ωοθυλακίου, που συμβαίνει κατά την μετάβαση από τη βιτελλογένεση στη χοριογένεση. Η πρόταση αυτή ενισχύεται εκτός από την παρατήρηση της κατανομής της BmSH3 στις επαφές των κυττάρων (εικόνα 6.4 και 6.5) και από την *in silico* αναγνώρηση πολλαπλών αλληλουχιών αναγνώρισης των κινασών PKA και PKG (κεφάλαιο 4.3.4, παράρτημα VIII). Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι ίδιες θέσεις αναγνώρισης των κινασών εμφανίζονται και στην ομόλογη CAP που αλληλεπιδρά με την PKA σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από την καρδιά (Matson et al., 2005). Η vinexin συχετίζεται με την vinculin, έναν σημαντικό παράγοντα της δημιουργίας ινιδίων ακτίνης σε κατάσταση στρες (stress actin fibers) (Zamir and Geiger, 2001). Προτείνουμε την εμπλοκή της BmSH3 στον σχηματισμό ινιδίων ακτίνης σε κατάσταση στρες που επάγεται από το ωσμωτικό στρες, μέσω του μηχανισμού της PKA αφού την ίδια περίοδο παρατηρείται η αύξηση των επιπέδων του cAMP στα θυλακοκύτταρα, κατά τα τελικά στάδια της βιτελλογένεσης, που επάγει την διαδικασία της ωσμωτικής διόγκωσης (osmotic swelling, Wang and Telfer, 1996, 1998).

Όπως αναφέρθηκε (κεφάλαιο 1.5.1.1), η CAP εμπλέκεται στην ενδοκύτωση του υποδοχέα της γλυκόζης, GLUT4 μέσω της σχεδίας λιπιδίων όπου η ενδοκύτωση γίνεται μόνο μέσω κυστιδίων κλαθρίνης. Στην περίπτωση της ωογένεσης του μεταξοσκώληκα, η μεταφορά των λεκιθοπρωτεϊνών στο ωοκύτταρο γίνεται με ελεγχόμενη ενδοκύτωση από κατάλληλους υποδοχείς, των οποίων ο ρόλος είναι ο έλεγχος των υλικών που θα εισέλθουν στο ωοκύτταρο. Ο πιο κοινός τρόπος ενδοκύτωσης των πρωτεϊνών αυτών είναι μέσω κυστιδίων κλαθρίνης (Takei and Haucke, 2001). Υπάρχει μια ομοιότητα στις δύο διεργασίες δηλαδή του τρόπου με τον οποίο γίνεται η ενδοκύτωση είτε του GLUT4 είτε των υλικών που εισέρχονται στο ωοκύτταρο η οποία έγκειται στον σχηματισμό κυστιδίων κλαθρίνης για την ενδοκύτωση. Όπως η CAP παίζει σημαντικό ρόλο στην ενδοκύττωση του GLUT4 μέσω κυστιδίων κλαθρίνης, σε αναλογία προτείνουμε ότι η BmSH3 παίζει σημαντικό ρόλο στην ενδοκύτωση των υλικών που παράγονται από τα επιθηλιακά κύτταρα στο ωοκύτταρο.

Η BmSH3 βρέθηκε διάχυτη στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων κατά τη βιτελλογένεση, καθώς και τα πρώιμα στάδια της χοριογένεσης. Κατά την όψιμη χοριογένεση παρατηρήθηκε ένα εντελώς διαφορετικό πρότυπο φθορισμού της BmSH3 στον κάθετο άξονα των επιθηλιακών κυττάρων (κεφάλαιο 6.3.3). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της BmSH3 στην κορυφαία περιοχή και στη βασική πλευρά των επιθηλιακών κυττάρων παράλληλα με την μείωση των επιπέδων στην μεσαία τομή κατά την πρόοδο της χοριογένεσης (εικόνα 6.5). Η BmSH3 φαίνεται να αποκτά πολωμένο εντοπισμό στα χοριογενικά στάδια σε αντίθεση με τη διάχυτη κατανομή που παρατηρήθηκε σε πιο πρώιμα στάδια.

Στη βασική περιοχή των επιθηλιακών κυττάρων, η BmSH3 εντοπίζεται καθαρά στην επαφές κυττάρου-κυττάρου, σχηματίζοντας μια κυματιστή μορφή (εικόνα 6.5,) η οποία παρατηρήθηκε και στην εξωτερική πλευρά των επιθηλιακών κυττάρων των ωοθυλακίων των ετερόπτερων (Heteroptera) κατά την ανάλυση της κατανομής της fructose-1,6-bisphatase (Dziewulska-Szwajkowska and Ogorzałek, 2005). Η ομόλογη της BmSH3, DCAP (Yamazaki and Nusse, 2002) πιστεύεται ότι εμπλέκεται στο σύμπλεγμα της μεταφοράς/μεταβολισμού της γλυκόζης στο έμβρυο της Δροσόφιλας. Η BmSH3, επαγωγικά, ίσως να εμπλέκεται και σε παρόμοιους μηχανισμούς.

Στην κορυφαία πλευρά του ωοθυλακίου, η συγκέντρωση της BmSH3 αυξάνεται στην επιφάνεια και στις επαφές των επιθηλιακών κυττάρων (εικόνα 6.5). Όπως προαναφέρθηκε, στην πρώιμη χοριογένεση η BmSH3 εμφανίζεται ως λεπτή γραμμή στις επαφές των κυττάρων, ενώ κατά τα στάδια της όψιμης χοριογένεσης η κατανομή της BmSH3 θυμίζει την επιφάνεια του κελύφους του αυγού, πολυγωνικές δομές που αντιπροσωπεύουν τις συμβολές των επιθηλιακών κυττάρων. Επιπροσθέτως, η BmSH3 εντοπίστηκε και σε κυκλικούς σχηματισμούς στην κορυφαία πλευρά στο κέντρο των κυττάρων, που προσομοιάζουν την επιφάνεια του ώριμου κελύφους του αυγού όπως αυτή εμφανίζεται σε πειράματα σκιαγράφησης ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (Kawaguchi et al., 1996). Το μοτίβο της επιφάνειας του κελύφους του αυγού θεωρείται ως το αποτυπώματα των επιθηλιακών κυττάρων (Margaritis et al., 1980; Margaritis, 1985; Trougakos and Margaritis, 1998) και για αυτόν τον λόγο θεωρείται ότι η επιφάνεια του κελύφους αντανακλά την κορυφαία πλευρά των επιθηλιακών κυττάρων κατά την έκκριση των πρωτεϊνών του χορίου. Για αυτούς τους λόγους, προτείνουμε ότι το πρότυπο φθορισμού της BmSH3 που παρατηρήθηκε στα όψιμα χοριογενικά ωοθυλάκια, υποδηλώνει την εμπλοκή της BmSH3 και στον μηχανισμό έκκρισης των πρωτεϊνών του χορίου κατά τη διαμόρφωση της επιφάνειας του κελύφους κατά την χοριογένεση εκτός από την εμπλοκή της στην μεταφορά λεκιθοπρωτεϊνών.

9. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Ως πρώτη και σημαντικότερη μελλοντική μελέτη θεωρείται η αναγνώριση όλων των πιθανών εναλλακτικών μετάγραφων της BmSH3 αλλά και των αντίστοιχων πρωτεϊνικών ισομορφών. Σημαντική είναι και η ιστοειδική κατανομή κάθε μίας από αυτές στους ιστούς του μεταξοσκώληκα. Κατά συνέπεια, η ταυτοποίηση των άγνωστων πρωτεϊνικών ισομορφών κρίνεται εξίσου σημαντική για την αναγνώριση της λειτουργίας της BmSH3 ειδικότερα στην ωογένεση. Εφόσον έχει γίνει η πλήρη ταυτοποίηση των μετάγραφων του γονιδίου *bmsh3* θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η τεχνολογία συμπληρωματικού DNA για την παρεμπόδιση της μεταγραφής του γονιδίου ή της RNAi, αν έχει προηγουμένως αξιοποιηθεί η συγκεκριμένη τεχνολογία στα λεπιδόπτερα έντομα.

Λόγω της δομής της η BmSH3 αποτελεί μια πρωτεΐνη αγκυροβόλησης. Για την κατανόηση της λειτουργικής σημασίας της σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες πρέπει να γίνει αναγνώριση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στις οποίες λαμβάνει μέρος, αρχικά με πρωτεΐνες ομόλογες με αυτές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για να εξεταστεί η πιθανή εμπλοκή της με παρόμοιες κυτταρικές λειτουργίες. Μια από αυτές τις αλληλεπιδράσεις που πρέπει να διερευνηθεί εξονυχιστικά είναι η αλληλεπίδραση με τους BmE75A και BmE75C. Ποια είναι η σημασία αυτής της αλληλεπίδρασης, πως επιδρά στη γνωστή λειτουργία αυτών των μεταγραφικών παραγόντων και σε ποιόν ιστό είναι σημαντική αυτή η αλληλεπίδραση, είναι μερικά από τα ερωτήματα που πρέπει να απαντηθούν.

10.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Akamatsu, M., S. Aota, A. Suwa, K. Ueda, T. Amachi, K.M. Yamada, S.K. Akiyama, and N. Kioka. 1999. Vinexin forms a signaling complex with Sos and modulates epidermal growth factor-induced c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activities. *J. Biol. Chem*. 274:35933–35937.

Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 25:3389–3402.

Andronopoulou, E., V. Labropoulou, V. Douris, D.F. Woods, H. Biessmann, and K. Iatrou. 2006. Specific interactions among odorant-binding proteins of the African malaria vector Anopheles gambiae. *Insect Mol. Biol*. 15:797–811.

Baumann, C.A., V. Ribon, M. Kanzaki, D.C. Thurmond, S. Mora, S. Shigematsu, P.E. Bickel, J.E. Pessin, and A.R. Saltiel. 2000. CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature*. 407:202–207.

Bloch Qazi, M.C., Y. Heifetz, and M.F. Wolfner. 2003. The developments between gametogenesis and fertilization: ovulation and female sperm storage in drosophila melanogaster. *Developmental Biology*. 256:195–211.

Bock, S.C., K. Campo, and M.R. Goldsmith. 1986. Specific protein synthesis in cellular differentiation : VI. Temporal expression of chorion gene families in Bombyx mori strain C108. *Developmental Biology*. 117:215–225.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72:248–254.

Broadus, J., J.R. McCabe, B. Endrizzi, C.S. Thummel, and C.T. Woodard. 1999. The Drosophila [beta]FTZ-F1 Orphan Nuclear Receptor Provides Competence for Stage-Specific Responses to the Steroid Hormone Ecdysone. *Molecular Cell*. 3:143–149.

Calvez, B., M. Hirn, and M. De Reggi. 1976. Ecdysone changes in the haemolymph to two silkworms (Bombyx mori and Philosamia cynthia) during larval and pupal development. *FEBS Lett*. 72:57–61.

Cant, K., B.A. Knowles, M.S. Mooseker, and L. Cooley. 1994. Drosophila singed, a fascin homolog, is required for actin bundle formation during oogenesis and bristle extension. *J. Cell Biol*. 125:369–380.

Cernilogar, F., F. Fabbri, D. Andrenacci, C. Taddei, and G. Gargiulo. 2001. Drosophila vitelline membrane cross-linking requires the fs(1)Nasrat , fs(1)polehole and chorion genes activities. *Development Genes and Evolution*. 211:573–580.

Cestra, G., D. Toomre, S. Chang, and P. De Camilli. 2005. The Abl/Arg substrate ArgBP2/nArgBP2 coordinates the function of multiple regulatory mechanisms converging on the actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:1731–1736.

Charpin, G., A.R. Chikh-Issa, H. Guignard, G. Jourdan, C. Dumas, D. Pansu, and M. Descroix-Vagne. 1992. Effect of sorbin on duodenal absorption of water and electrolytes in the rat. *Gastroenterology*. 103:1568–1573.

Chiang, S.H., C.A. Baumann, M. Kanzaki, D.C. Thurmond, R.T. Watson, C.L. Neudauer, I.G. Macara, J.E. Pessin, and A.R. Saltiel. 2001. Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature*. 410:944–948.

Cormack, B.P., R.H. Valdivia, and S. Falkow. 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*. 173:33–38.

Cubitt, A.B., R. Heim, S.R. Adams, A.E. Boyd, L.A. Gross, and R.Y. Tsien. 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci*. 20:448–455.

Deng, Z., T. Zink, H. Chen, D. Walters, F. Liu, and G. Liu. 2009. Impact of Actin Rearrangement and Degranulation on the Membrane Structure of Primary Mast Cells: A Combined Atomic Force and Laser Scanning Confocal Microscopy Investigation. *Biophys J*. 96:1629–1639.

Dequier, E., S. Souid, M. Pál, P. Maróy, J.-A. Lepesant, and C. Yanicostas. 2001. Top-DER- and Dpp-dependent requirements for the Drosophila fos/kayak gene in follicular epithelium morphogenesis. *Mechanisms of Development*. 106:47–60.

Dinkel, H., C. Chica, A. Via, C.M. Gould, L.J. Jensen, T.J. Gibson, and F. Diella. 2011. Phospho.ELM: a database of phosphorylation sites--update 2011. *Nucleic Acids Res.* 39:D261–267.

Dobens, L.L., E. Martín-Blanco, A. Martínez-Arias, F.C. Kafatos, and L.A. Raftery. 2001. Drosophila puckered regulates Fos/Jun levels during follicle cell morphogenesis. *Development*. 128:1845–1856.

Douris, V., L. Swevers, V. Labropoulou, E. Andronopoulou, Z. Georgoussi, and K. Iatrou. 2006. Stably transformed insect cell lines: tools for expression of secreted and membrane-anchored proteins and high-throughput screening platforms for drug and insecticide discovery. *Adv. Virus Res*. 68:113–156.

Drevet, J.R., Y.A. Skeiky, and K. Iatrou. 1994. GATA-type zinc finger motif-containing sequences and chorion gene transcription factors of the silkworm Bombyx mori. *J. Biol. Chem*. 269:10660–10667.

Drevet, J.R., L. Swevers, and K. Iatrou. 1995. Development Regulation of a Silkworm Gene Encoding Multiple GATA-type Transcription Factors by Alternative Splicing. *Journal of Molecular Biology*. 246:43–53.

Duan, J., R. Li, D. Cheng, W. Fan, X. Zha, T. Cheng, Y. Wu, J. Wang, K. Mita, Z. Xiang, and Q. Xia. 2009. SilkDB v2.0: a platform for silkworm (Bombyx mori) genome biology. *Nucl. Acids Res.* gkp801.

Dziewulska-Szwajkowska, D., and A. Ogorzałek. 2005. F-actin, beta-tubulin, aldolase, and fructose-1,6-bisphosphatase in heteropteran ovarioles--I. Immunocytochemical investigations of whole-mounted ovarioles. *Cell Tissue Res*. 321:311–321.

Eickbush, T.H., and J.A. Izzo. 1995. Chorion genes: molecular models in evolution. *In* Molecular Model System in the Lepidoptera. M.R. Goldsmith and A.S. Wilkins, editors. Cambridge University Press. 217–248.

Eystathioy, T., L. Swevers, and K. Iatrou. 2001. The orphan nuclear receptor BmHR3A of Bombyx mori: hormonal control, ovarian expression and functional properties. *Mech. Dev*. 103:107–115.

Feinberg, A.P., and B. Vogelstein. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem*. 132:6–13.

Feng, S., J. Chen, H. Yu, J. Simon, and S. Schreiber. 1994. Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science*. 266:1241 –1247.

Feng, S., C. Kasahara, R.J. Rickles, and S.L. Schreiber. 1995. Specific interactions outside the proline-rich core of two classes of Src homology 3 ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:12408–12415.

Fernow, I., A. Tomasovic, A. Siehoff-Icking, and R. Tikkanen. 2009. Cbl-associated protein is tyrosine phosphorylated by c-Abl and c-Src kinases. *BMC Cell Biol*. 10:80.

Ferraro, E., D. Peluso, A. Via, G. Ausiello, and M. Helmer-Citterich. 2007. SH3-Hunter: discovery of SH3 domain interaction sites in proteins. *Nucleic Acids Res*. 35:W451–W454.

Flynn, D.C. 2001. Adaptor proteins. *Oncogene*. 20:6270–6272.

FREUND, J. 1956. The mode of action of immunologic adjuvants. *Bibl Tuberc*. 130–148.

Fullbright, G., E.R. Lacy, and E.E. Büllesbach. 1997. The Prothoracicotropic Hormone Bombyxin has Specific Receptors on Insect Ovarian Cells. *European Journal of Biochemistry*. 245:774–780.

Gasteiger, E., A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R.D. Appel, and A. Bairoch. 2003. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*. 31:3784–3788.

Grace, T.D. 1967. Establishment of a line of cells from the silkworm Bombyx mori. *Nature*. 216:613.

Granados, R.R., W.J. McCarthy, and M. Naughton. 1974. Replication of a cytoplasmic polyhedrosis virus in an established cell line of Trichoplusia in cells. *Virology*. 59:584–586.

Haas, J., E.-C. Park, and B. Seed. 1996. Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Current Biology*. 6:315–324.

Hagiwara, N., T. Kitazono, M. Kamouchi, J. Kuroda, T. Ago, J. Hata, T. Ninomiya, H. Ooboshi, Y. Kumai, S. Yoshimura, K. Tamaki, K. Fujii, T. Nagao, Y. Okada, K. Toyoda, H. NAKANE, H. Sugimori, Y. Yamashita, Y. Wakugawa, M. Kubo, Y. Tanizaki, Y. Kiyohara, S. Ibayashi, and M. Iida. 2008. Polymorphism in the sorbin and SH3-domain-containing-1 (SORBS1) gene and the risk of brain infarction in the Japanese population: the Fukuoka Stroke Registry and the Hisayama study. *Eur. J. Neurol*. 15:481–486.

Haglund, K., I. Ivankovic-Dikic, N. Shimokawa, G.D. Kruh, and I. Dikic. 2004. Recruitment of Pyk2 and Cbl to lipid rafts mediates signals important for actin reorganization in growing neurites. *J. Cell. Sci*. 117:2557–2568.

Han, Q., G. Li, and J. Li. 2000. Purification and Characterization of Chorion Peroxidase from Aedes aegypti Eggs. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 378:107–115.

Hand, D., and L.E. Eiden. 2005. Human sorbin is generated via splicing of an alternative transcript from the ArgBP2 gene locus. *Peptides*. 26:1278–1282.

Harlow, E., and D. Lane. 1988. Antibodies: A Laboratory Manual. 1st ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hinton, H.E. 1981. Biology of insect eggs. Pergamon Press. 508 pp.

Hiruma, K., and L.M. Riddiford. 2004. Differential control of MHR3 promoter activity by isoforms of the ecdysone receptor and inhibitory effects of E75A and MHR3. *Dev. Biol*. 272:510–521.

Huybrechts, R., L. Guarino, M. Van Brussel, and V. Vulsteke. 1992. Nucleotide sequence of a transactivating Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus immediate early gene. *Biochim. Biophys. Acta*. 1129:328–330.

Iatrou, K., and S.G. Tsitilou. 1983. Coordinately expressed chorion genes of Bombyx mori: is developmental specificity determined by secondary structure recognition? *EMBO J*. 2:1431–1440.

Iatrou, K., S.G. Tsitilou, and F.C. Kafatos. 1984. DNA sequence transfer between two high-cysteine chorion gene families in the silkmoth Bombyx mori. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:4452–4456.

Iwami, M., I. Furuya, and H. Kataoka. 1996. Bombyxin-related peptides: cDNA structure and expression in the brain of the hornworm Agrius convoluvuli. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 26:25–32.

Izumi, S., K. Kiguchi, and S. Tomino. 1984. Hormonal Regulation of Biosynthesis of Major Plasma Proteins in Bombyx mori(Biochemistry). *Zoological Science*. 1:223–228.

Johnson, R., R.G. Meidinger, and K. Iatrou. 1992. A cellular promoter-based expression cassette for generating recombinant baculoviruses directing rapid expression of passenger genes in infected insects. *Virology*. 190:815–823.

Kadono-Okuda, K., W. Amornsak, and O. Yamashita. 1994. Controlled ecdysteroid accumulation in eggs of the silkworm,Bombyx mori, by an imidazole compound (KK-42), and embryogenesis in these eggs. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 25:121–135.

Kafatos, F.C., S.A. Mitsialis, N. Spoerel, B. Mariani, J.R. Lingappa, and C. Delidakis. 1985. Studies on the developmentally regulated expression and amplification of insect chorion genes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol*. 50:537–547.

Kafatos, F.C., J.C. Regier, G.D. Mazur, M.R. Nadel, H.M. Blau, W.H. Petri, A.R. Wyman, R.E. Gelinas, P.B. Moore, M. Paul, A. Efstratiadis, J.N. Vournakis, M.R. Goldsmith, J.R. Hunsley, B. Baker, J. Nardi, and M. Koehler. 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., N. Spoerel, S.A. Mitsialis, H.T. Nguyen, C. Romano, J.R. Lingappa, B.D. Mariani, G.C. Rodakis, R. Lecanidou, and S.G. Tsitilou. 1987. Developmental control and evolution in the chorion gene families of insects. *Adv. Genet*. 24:223–242.

Kafatos FC, Tzertzinis G, Spoerel NA, and Nguyen HT. 1995. Chorion genes: an overview of their structure, function and transcriptional regulation. In Molecular Model System i the Lepidoptera. MR Goldsmith & AS Wilkins (eds.). *Cambridge University Press*. 181–216.

Kato, M., K. Miyazawa, and N. Kitamura. 2000. A Deubiquitinating Enzyme UBPY Interacts with the Src Homology 3 Domain of Hrs-binding Protein via a Novel Binding Motif PX(V/I)(D/N)RXXKP. *Journal of Biological Chemistry*. 275:37481 –37487.

Kawabe, H., Y. Hata, M. Takeuchi, N. Ide, A. Mizoguchi, and Y. Takai. 1999. nArgBP2, a novel neural member of ponsin/ArgBP2/vinexin family that interacts with synapse-associated protein 90/postsynaptic density-95-associated protein (SAPAP). *J. Biol. Chem*. 274:30914–30918.

KAWAGUCHI, Y., Y. Banno, K. KOGA, T. KAWARABATA, and H. DOIRA. 1996. Comparison of Chorion Structure of Eggs from Bombyx mori, Bombyx mandarina (Lepidoptera: Bombycidae) and Their First Filial Generation. *Applied Entomology and Zoology*. 31:405–415.

Kendirgi, F., L. Swevers, and K. Iatrou. 2002. An ovarian follicular epithelium protein of the silkworm (Bombyx mori) that associates with the vitelline membrane and contributes to the structural integrity of the follicle. *FEBS Letters*. 524:59–68.

Kimura, A., C.A. Baumann, S.H. Chiang, and A.R. Saltiel. 2001. The sorbin homology domain: a motif for the targeting of proteins to lipid rafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:9098–9103.

Kioka, N., S. Sakata, T. Kawauchi, T. Amachi, S.K. Akiyama, K. Okazaki, C. Yaen, K.M. Yamada, and S. Aota. 1999. Vinexin: a novel vinculin-binding protein with multiple SH3 domains enhances actin cytoskeletal organization. *J. Cell Biol*. 144:59–69.

Kioka, N., K. Ueda, and T. Amachi. 2002. Vinexin, CAP/ponsin, ArgBP2: a novel adaptor protein family regulating cytoskeletal organization and signal transduction. *Cell Struct. Funct*. 27:1–7.

Koelle, M.R., W.A. Segraves, and D.S. Hogness. 1992. DHR3: a Drosophila steroid receptor homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:6167–6171.

Koelle, M.R., W.S. Talbot, W.A. Segraves, M.T. Bender, P. Cherbas, and D.S. Hogness. 1991. The Drosophila EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell*. 67:59–77.

Kyte, J., and R.F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol*. 157:105–132.

Ladbury, J.E., and S. Arold. 2000. Searching for specificity in SH domains. *Chemistry & Biology*. 7:R3–R8.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227:680–685.

Lam, G.T., C. Jiang, and C.S. Thummel. 1997. Coordination of larval and prepupal gene expression by the DHR3 orphan receptor during Drosophila metamorphosis. *Development*. 124:1757–1769.

Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, and D.G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23:2947–2948.

Laudet, V., and H. Gronemeyer. 2001. The Nuclear Receptor FactsBook. 1st ed. Academic Press.

Lebre, A.S., L. Jamot, J. TAKAHASHI, N. Spassky, C. Leprince, N. Ravisé, C. Zander, H. Fujigasaki, P. Kussel-Andermann, C. Duyckaerts, J.H. Camonis, and A. Brice. 2001. Ataxin-7 interacts with a Cbl-associated protein that it recruits into neuronal intranuclear inclusions. *Hum. Mol. Genet*. 10:1201–1213.

Lecanidou, R., T.H. Eickbush, G.C. Rodakis, and F.C. Kafatos. 1983. Novel B family sequence from an early chorion cDNA library of Bombyx mori. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 80:1955–1959.

Lecanidou, R., and A. Papantonis. 2010. Silkmoth chorion gene regulation revisited: promoter architecture as a key player. *Insect Molecular Biology*. 19:141–151.

Lecanidou, R., G.C. Rodakis, T.H. Eickbush, and F.C. Kafatos. 1986. Evolution of the silk moth chorion gene superfamily: gene families CA and CB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 83:6514–6518.

Lee, C.H., B. Leung, M.A. Lemmon, J. Zheng, D. Cowburn, J. Kuriyan, and K. Saksela. 1995. A single amino acid in the SH3 domain of Hck determines its high affinity and specificity in binding to HIV-1 Nef protein. *EMBO J*. 14:5006–5015.

Lehrach, H., D. Diamond, J.M. Wozney, and H. Boedtker. 1977. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry*. 16:4743–4751.

LeMosy, E.K., and C. Hashimoto. 2000. The nudel protease of Drosophila is required for eggshell biogenesis in addition to embryonic patterning. *Dev. Biol.* 217:352–361.

Li, S.S.-C. 2005. Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem. J.* 390:641.

Lin, W.H., C.J. Huang, M.W. Liu, H.M. Chang, Y.J. Chen, T.Y. Tai, and L.M. Chuang. 2001. Cloning, mapping, and characterization of the human sorbin and SH3 domain containing 1 (SORBS1) gene: a protein associated with c-Abl during insulin signaling in the hepatoma cell line Hep3B. *Genomics*. 74:12–20.

Lu, M., P.J. Farrell, R. Johnson, and K. Iatrou. 1997. A Baculovirus (Bombyx mori Nuclear Polyhedrosis Virus) Repeat Element Functions as a Powerful Constitutive

Enhancer in Transfected Insect Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 272:30724 – 30728.

Lu, M., R.R. Johnson, and K. Iatrou. 1996. Trans-activation of a cell housekeeping gene promoter by the IE1 gene product of baculoviruses. *Virology*. 218:103–113.

Lupas, A. 1996. Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem. Sci.* 21:375–382.

Machado, E., L. Swevers, N. Sdralia, M.N. Medeiros, F.G. Mello, and K. Iatrou. 2007. Prostaglandin signaling and ovarian follicle development in the silkmoth, Bombyx mori. *Insect Biochem. Mol. Biol*. 37:876–885.

Mahajan-Miklos, S., and L. Cooley. 1994. The villin-like protein encoded by the Drosophila quail gene is required for actin bundle assembly during oogenesis. *Cell*. 78:291–301.

Mandai, K., H. Nakanishi, A. Satoh, K. Takahashi, K. Satoh, H. Nishioka, A. Mizoguchi, and Y. Takai. 1999. Ponsin/SH3P12: an l-afadin- and vinculin-binding protein localized at cell-cell and cell-matrix adherens junctions. *J. Cell Biol*. 144:1001–1017.

Manser, E., T.-H. Loo, C.-G. Koh, Z.-S. Zhao, X.-Q. Chen, L. Tan, I. Tan, T. Leung, and L. Lim. 1998. PAK Kinases Are Directly Coupled to the PIX Family of Nucleotide Exchange Factors. *Molecular Cell*. 1:183–192.

Marchuk, D., M. Drumm, A. Saulino, and F.S. Collins. 1991. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res*. 19:1154.

Margaritis, L.H. 1985. The egg-shell of drosophila melanogaster III. Covalent crosslinking of the chorion proteins involves endogenous hydrogen peroxide. *Tissue Cell*. 17:553–559.

Margaritis, L.H., F.C. Kafatos, and W.H. Petri. 1980. The eggshell of Drosophila melanogaster. I. Fine structure of the layers and regions of the wild-type eggshell. *J. Cell. Sci*. 43:1–35.

Margiolaki, I., J.P. Wright, M. Wilmanns, A.N. Fitch, and N. Pinotsis. 2007. Second SH3 domain of ponsin solved from powder diffraction. *J. Am. Chem. Soc*. 129:11865–11871.

Marx, J. 2001. Caveolae: a once-elusive structure gets some respect. *Science*. 294:1862–1865.

Masumura, M., S. Satake, H. Saegusa, and A. Mizoguchi. 2000. Glucose Stimulates the Release of Bombyxin, an Insulin-Related Peptide of the Silkworm Bombyx mori. *General and Comparative Endocrinology*. 118:393–399.

Matson, S.A., G.C. Pare, and M.S. Kapiloff. 2005. A novel isoform of Cbl-associated protein that binds protein kinase A. *Biochim. Biophys. Acta*. 1727:145–149.

Matsuyama, M., H. Mizusaki, A.[1] Shimono, T.[1] Mukai, K.[2] Okumura, K.[3] Abe, K.[4] Shimada, and K. Morohashi. 2005. A novel isoform of Vinexin, Vinexin γ, regulates Sox9 gene expression through activation of MAPK cascade in mouse fetal gonad. *Genes to Cells*. 10:421–434.

Mattila, P.K., and P. Lappalainen. 2008. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9:446–454.

Mauzy-Melitz, D., and G.L. Waring. 2003. fc177, a minor dec-1 proprotein, is necessary to prevent ectopic aggregation of the endochorion during eggshell assembly in Drosophila. *Dev. Biol.* 255:193–205.

Mayer, B.J. 2001. SH3 domains: complexity in moderation. *J. Cell. Sci*. 114:1253–1263.

Mayer, B.J., and M.J. Eck. 1995. SH3 Domains: Minding your p's and q's. *Current Biology*. 5:364–367.

Mayer, B.J., M. Hamaguchi, and H. Hanafusa. 1988. A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C. *Nature*. 332:272–275.

Mazur, G.D., J.C. Regier, and F.C. Kafatos. 1989. Morphogenesis of silkmoth chorion: Sequential modification of an early helicoïdal framework through expansion and densification. *Tissue and Cell*. 21:227–242.

McCall, K., and H. Steller. 1998. Requirement for DCP-1 Caspase During Drosophila Oogenesis. *Science*. 279:230 –234.

Mita, K., M. Kasahara, S. Sasaki, Y. Nagayasu, T. Yamada, H. Kanamori, N. Namiki, M. Kitagawa, H. Yamashita, Y. Yasukochi, K. Kadono-Okuda, K. Yamamoto, M. Ajimura, G. Ravikumar, M. Shimomura, Y. Nagamura, T. Shin-i, H. Abe, T. Shimada, S. Morishita, and T. Sasaki. 2004. The genome sequence of silkworm, Bombyx mori. *DNA Res*. 11:27–35.

Mitsushima, M., A. Suwa, T. Amachi, K. Ueda, and N. Kioka. 2004. Extracellular signal-regulated kinase activated by epidermal growth factor and cell adhesion interacts with and phosphorylates vinexin. *J. Biol. Chem*. 279:34570–34577.

Mizuno, T., K. Watanabe, and E. Ohnishi. 1981. Developmental Changes of Ecdysteroids in the Eggs of the Silkworm, Bombyx mori. *Dev Growth Differ*. 23:543–552.

Mongiovi, A.M., P.R. Romano, S. Panni, M. Mendoza, W.T. Wong, A. Musacchio, G. Cesareni, and P. Paolo Di Fiore. 1999. A novel peptide-SH3 interaction. *EMBO J*. 18:5300–5309.

Musacchio, A., T. Gibson, V.P. Lehto, and M. Saraste. 1992. SH3--an abundant protein domain in search of a function. *FEBS Lett*. 307:55–61.

Nagaraju, J. 2002. Application of genetic principles for improving silk production. *Current Science*. 83:409–414.

Nagaraju, J., and M.R. Goldsmith. 2002. Silkworm genomics – progress and prospects. *Current Science*. 83:415–425.

Nagasawa, H., H. Kataoka, A. Isogai, S. Tamura, A. Suzuki, H. Ishizaki, A. Mizoguchi, Y. Fujiwara, and A. Suzuki. 1984. Amino-Terminal Amino Acid Sequence of the Silkworm Prothoracicotropic Hormone: Homology with Insulin. *Science*. 226:1344 – 1345.

Nakai, K., and P. Horton. 1999. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem. Sci.* 24:34–36.

Nigg, E.A. 1997. Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature*. 386:779–787.

Nijhout, H.F. 2001. Elements of butterfly wing patterns. *J. Exp. Zool*. 291:213–225.

Nijhout, H.F. 2010. Molecular and Physiological Basis of Colour Pattern Formation. *In* Advances in Insect Physiology: Insect Integument and Colour. Academic Press. 219–265.

Noguerón, M.I., D. Mauzy-Melitz, and G.L. Waring. 2000. Drosophila dec-1 eggshell proteins are differentially distributed via a multistep extracellular processing and localization pathway. *Dev. Biol*. 225:459–470.

Ormö, M., A.B. Cubitt, K. Kallio, L.A. Gross, R.Y. Tsien, and S.J. Remington. 1996. Crystal Structure of the Aequorea victoria Green Fluorescent Protein. *Science*. 273:1392 –1395.

Orr-Weaver, T.L. 1991. Drosophila chorion genes: cracking the eggshell's secrets. *Bioessays*. 13:97–105.

Pan, M.L. 1971. The synthesis of vitellogenin in the Cecropia silkworm. *Journal of Insect Physiology*. 17:677–689.

Pansu, D., M. Vagne, A. Bosshard, and V. Mutt. 1981. Sorbin, a peptide contained in porcine upper small intestine which induces the absorption of water and sodium in the rat duodenum. *Scand. J. Gastroenterol*. 16:193–199.

Puntervoll, P., R. Linding, C. Gemünd, S. Chabanis-Davidson, M. Mattingsdal, S. Cameron, D.M.A. Martin, G. Ausiello, B. Brannetti, A. Costantini, F. Ferrè, V. Maselli, A. Via, G. Cesareni, F. Diella, G. Superti-Furga, L. Wyrwicz, C. Ramu, C. McGuigan, R. Gudavalli, I. Letunic, P. Bork, L. Rychlewski, B. Küster, M. Helmer-Citterich, W.N. Hunter, R. Aasland, and T.J. Gibson. 2003. ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins. *Nucleic Acids Res.* 31:3625–3630.

Ramji, D.P., and P. Foka. 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J*. 365:561–575.

Regier, J.C., G.D. Mazur, F.C. Kafatos, and M. Paul. 1982. Morphogenesis of silkmoth chorion: Initial framework formation and its relation to synthesis of specific proteins. *Developmental Biology*. 92:159–174.

Reinking, J., M.M.S. Lam, K. Pardee, H.M. Sampson, S. Liu, P. Yang, S. Williams, W. White, G. Lajoie, A. Edwards, and H.M. Krause. 2005. The Drosophila nuclear receptor e75 contains heme and is gas responsive. *Cell*. 122:195–207.

Ren, R., B. Mayer, P. Cicchetti, and D. Baltimore. 1993. Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science*. 259:1157 –1161.

Ribon, V., R. Herrera, B.K. Kay, and A.R. Saltiel. 1998a. A role for CAP, a novel, multifunctional Src homology 3 domain-containing protein in formation of actin stress fibers and focal adhesions. *J. Biol. Chem*. 273:4073–4080.

Ribon, V., J.A. Printen, N.G. Hoffman, B.K. Kay, and A.R. Saltiel. 1998b. A novel, multifuntional c-Cbl binding protein in insulin receptor signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biol*. 18:872–879.

Riddiford, L.M., K. Hiruma, X. Zhou, and C.A. Nelson. 2003. Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from Manduca sexta and Drosophila melanogaster. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 33:1327–1338.

Roignot, J., and P. Soubeyran. 2009. ArgBP2 and the SoHo family of adapter proteins in oncogenic diseases. *Cell Adh Migr*. 3:167–170.

Roignot, J., D. Taïeb, M. Suliman, N.J. Dusetti, J.L. Iovanna, and P. Soubeyran. 2010. CIP4 is a new ArgBP2 interacting protein that modulates the ArgBP2 mediated control of WAVE1 phosphorylation and cancer cell migration. *Cancer Lett*. 288:116–123.

Rönty, M., A. Taivainen, M. Moza, G.D. Kruh, E. Ehler, and O. Carpén. 2005. Involvement of palladin and alpha-actinin in targeting of the Abl/Arg kinase adaptor ArgBP2 to the actin cytoskeleton. *Exp. Cell Res*. 310:88–98.

Saegusa, H., A. Mizoguchi, H. Kitahora, H. Nagasawa, A. Suzuki, and H. Ishizaki. 1992. Changes in the titer of bombyxin-immunoreactive material in hemolymph during the postembryonic development of the silkmoth Bombyx mori. *Development Growth and Differentiation*. 34:595–605.

Saltiel, A.R., and C.R. Kahn. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 414:799–806.

Sambrook, J., and D.W. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. CSHL Press. 778 pp.

Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74:5463–5467.

Sato, Y., and O. Yamashita. 1991. Structure and expression of a gene coding for egg-specific protein in the silkworm, Bombyx mori. *Insect Biochemistry*. 21:495–505.

Sevala, V.L., K.G. Davey, and G.D. Prestwich. 1995. Photoaffinity labeling and characterization of a juvenile hormone binding protein in the membranes of follicle cells of Locusta migratoria. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 25:267–273.

Simons, K., and E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 387:569–572.

Singer, S.J., and G.L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 175:720–731.

Soubeyran, P., A. Barac, I. Szymkiewicz, and I. Dikic. 2003. Cbl-ArgBP2 complex mediates ubiquitination and degradation of c-Abl. *Biochem. J*. 370:29–34.

Sparks, A.B., N.G. Hoffman, S.J. McConnell, D.M. Fowlkes, and B.K. Kay. 1996. Cloning of ligand targets: systematic isolation of SH3 domain-containing proteins. *Nat. Biotechnol*. 14:741–744.

Spradling, A.C. 1993. Developmental genetics of oogenesis. *In* The Development of Drosophila melanogaster. M. Bate and A. Martinez-Arias, editors. Plainview, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1–70.

Sprague, K. 1995. Control of transcription by Bombyx mori RNA polymerase III. *In* Molecular Model Systems in the Lepidoptera. M.R. Goldsmith and A.S. Wilkins, editors. Cambridge University Press. 273–91.

Stahl, M.L., C.R. Ferenz, K.L. Kelleher, R.W. Kriz, and J.L. Knopf. 1988. Sequence similarity of phospholipase C with the non-catalytic region of src. *Nature*. 332:269–272.

Stearns, T. 1995. Green Flourescent Protein: The green revolution. *Current Biology*. 5:262–264.

Studier, F.W., and B.A. Moffatt. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol*. 189:113–130.

Sun, G.C., S. Hirose, and H. Ueda. 1994. Intermittent expression of BmFTZ-F1, a member of the nuclear hormone receptor superfamily during development of the silkworm Bombyx mori. *Dev. Biol*. 162:426–437.

Swevers, L., L. Cherbas, P. Cherbas, and K. Iatrou. 1996. Bombyx EcR (BmEcR) and Bombyx USP (BmCF1) combine to form a functional ecdysone receptor. *Insect Biochem. Mol. Biol*. 26:217–221.

Swevers, L., J.R. Drevet, M.D. Lunke, and K. Iatrou. 1995. The silkmoth homolog of the Drosophila ecdysone receptor (B1 isoform): cloning and analysis of expression during follicular cell differentiation. *Insect Biochem. Mol. Biol*. 25:857–866.

Swevers, L., T. Eystathioy, and K. Iatrou. 2002a. The orphan nuclear receptors BmE75A and BmE75C of the silkmoth Bombyx mori: hornmonal control and ovarian expression. *Insect Biochem. Mol. Biol*. 32:1643–1652.

Swevers, L., and K. Iatrou. 1992. Early establishment and autonomous implementation of a developmental program controlling silkmoth chorion gene expression. *Dev. Biol*. 150:12–22.

Swevers, L., and K. Iatrou. 1998. The orphan receptor BmHNF-4 of the silkmoth Bombyx mori: ovarian and zygotic expression of two mRNA isoforms encoding polypeptides with different activating domains. *Mech. Dev*. 72:3–13.

Swevers, L., and K. Iatrou. 1999. The ecdysone agonist tebufenozide (RH-5992) blocks the progression into the ecdysteroid-induced regulatory cascade and arrests silkmoth oogenesis at mid-vitellogenesis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 29:955–963.

Swevers, L., and K. Iatrou. 2003. The ecdysone regulatory cascade and ovarian development in lepidopteran insects: insights from the silkmoth paradigm. *Insect Biochem. Mol. Biol*. 33:1285–1297.

Swevers, L., K. Ito, and K. Iatrou. 2002b. The BmE75 nuclear receptors function as dominant repressors of the nuclear receptor BmHR3A. *J. Biol. Chem*. 277:41637–41644.

Swevers, L., A.S. Raikhel, T.W. Sappington, P. Shirk, and K. Iatrou. 2005. 1.3 - Vitellogenesis and Post-Vitellogenic Maturation of the Insect Ovarian Follicle. *In* Comprehensive Molecular Insect Science. Elsevier, Amsterdam. 87–155.

Taieb, D., J. Roignot, F. André, S. Garcia, B. Masson, A. Pierres, J.-L. Iovanna, and P. Soubeyran. 2008. ArgBP2-dependent signaling regulates pancreatic cell migration, adhesion, and tumorigenicity. *Cancer Res*. 68:4588–4596.

Takei, K., and V. Haucke. 2001. Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger. *Trends in Cell Biology*. 11:385–391.

Telfer, W., and R. Woodruff. 2002. Ion physiology of vitellogenic follicles. *J. Insect Physiol*. 48:915–923.

Telfer, W.H., and L.M. Anderson. 1968. Functional transformations accompanying the initiation of a terminal growth phase in the cecropia moth oocyte. *Dev. Biol*. 17:512–535.

Thanaraj, T.A., and F. Clark. 2001. Human GC-AG alternative intron isoforms with weak donor sites show enhanced consensus at acceptor exon positions. *Nucleic Acids Res*. 29:2581–2593.

Thummel, C.S. 1997. Dueling orphans-interacting nuclear receptors coordinateDrosophila metamorphosis. *Bioessays*. 19:669–672.

Tosoni, D., and G. Cestra. 2009. CAP (Cbl associated protein) regulates receptor-mediated endocytosis. *FEBS Lett*. 583:293–300.

Trougakos, I.P., and L.H. Margaritis. 1998. The Formation of the Functional Chorion Structure of Drosophila virilis Involves Intercalation of the “Middle” and “Late” Major Chorion Proteins into a Scaffold Formed by the “Early” Chorion Proteins: A General Model for Chorion Assembly in Drosophilidae. *Journal of Structural Biology*. 123:97–110.

Tsien, R.Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67:509–544.

Tsuchida, K., Masao Nagata, and Akinori Suzuki. 1987. Hormonal control of ovarian development in the silkworm, <I>Bombyx mori</I>. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 5:167–177.

Tujague, M., J.S. Thomsen, K. Mizuki, C.M. Sadek, and J.-Å. Gustafsson. 2004. The focal adhesion protein vinexin alpha regulates the phosphorylation and activity of estrogen receptor alpha. *J. Biol. Chem*. 279:9255–9263.

Tzertzinis, G., A. Malecki, and F.C. Kafatos. 1994. BmCF1, a Bombyx mori RXR-type receptor related to the Drosophila ultraspiracle. *J. Mol. Biol*. 238:479–486.

Vagne-Descroix, M., D. Pansu, H. Jornvall, M. Carlquist, H. Guignard, G. Jourdan, A. Desvigne, M. Collinet, C. Caillet, and V. Mutt. 1991. Isolation and characterisation of porcine sorbin. *Eur. J. Biochem*. 201:53–59.

Vaynberg, J., T. Fukuda, K. Chen, O. Vinogradova, A. Velyvis, Y. Tu, L. Ng, C. Wu, and J. Qin. 2005. Structure of an Ultraweak Protein-Protein Complex and Its Crucial Role in Regulation of Cell Morphology and Motility. *Molecular Cell*. 17:513–523.

Velentzas, A.D., I.P. Nezis, D.J. Stravopodis, I.S. Papassideri, and L.H. Margaritis. 2007. Apoptosis and autophagy function cooperatively for the efficacious execution of programmed nurse cell death during Drosophila virilis oogenesis. *Autophagy*. 3:130–132.

Wakabayashi, M., T. Ito, M. Mitsushima, S. Aizawa, K. Ueda, T. Amachi, and N. Kioka. 2003. Interaction of lp-dlg/KIAA0583, a membrane-associated guanylate kinase family protein, with vinexin and beta-catenin at sites of cell-cell contact. *J. Biol. Chem*. 278:21709–21714.

Wang, B., E.A. Golemis, and G.D. Kruh. 1997. ArgBP2, a multiple Src homology 3 domain-containing, Arg/Abl-interacting protein, is phosphorylated in v-Abl-transformed cells and localized in stress fibers and cardiocyte Z-disks. *J. Biol. Chem*. 272:17542–17550.

Wang, Y., A.L. Miller, M.S. Mooseker, and A.J. Koleske. 2001. The Abl-related gene (Arg) nonreceptor tyrosine kinase uses two F-actin-binding domains to bundle F-actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:14865–14870.

Wang, Y., and W.H. Telfer. 1996. Cyclic nucleotide-induced termination of vitellogenin uptake by Hyalophora cecropia follicles. *Insect Biochem. Mol. Biol*. 26:85–94.

Wang, Y., and W.H. Telfer. 1998. Cyclic-AMP-induced water uptake in a moth ovary: inhibition by bafilomycin and anthracene-9-carboxylic acid. *J. Exp. Biol*. 201:1627–1635.

Waring, G.L., R.J. Hawley, and T. Schoenfeld. 1990. Multiple proteins are produced from the dec-1 eggshell gene in Drosophila by alternative RNA splicing and proteolytic cleavage events. *Dev. Biol*. 142:1–12.

Wheatley, S., S. Kulkarni, and R. Karess. 1995. Drosophila nonmuscle myosin II is required for rapid cytoplasmic transport during oogenesis and for axial nuclear migration in early embryos. *Development*. 121:1937–1946.

White, K.P., P. Hurban, T. Watanabe, and D.S. Hogness. 1997. Coordination of Drosophila Metamorphosis by Two Ecdysone-Induced Nuclear Receptors. *Science*. 276:114–117.

Willis, J., A.S. Wilkins, and M.R. Goldsmith. 1995. A brief history of Lepidoptera as model systems. *In* Molecular model systems in the Lepidoptera. Cambridge University Press. 1–20.

Wong, S.S. 1991. Chemistry of protein conjugation and cross-linking. CRC Press. 360 pp.

Wu, X., B. Knudsen, S.M. Feller, J. Zheng, A. Sali, D. Cowburn, H. Hanafusa, and J. Kuriyan. 1995. Structural basis for the specific interaction of lysine-containing proline-rich peptides with the N-terminal SH3 domain of c-Crk. *Structure*. 3:215–226.

Xia, Q., Z. Zhou, C. Lu, D. Cheng, F. Dai, B. Li, P. Zhao, X. Zha, T. Cheng, C. Chai, G. Pan, J. Xu, C. Liu, Y. Lin, J. Qian, Y. Hou, Z. Wu, G. Li, M. Pan, C. Li, Y. Shen, X. Lan, L. Yuan, T. Li, H. Xu, G. Yang, Y. Wan, Y. Zhu, M. Yu, W. Shen, D. Wu, Z. Xiang, J. Yu, J. Wang, R. Li, J. Shi, H. Li, G. Li, J. Su, X. Wang, G. Li, Z. Zhang, Q. Wu, J. Li, Q. Zhang, N. Wei, J. Xu, H. Sun, L. Dong, D. Liu, S. Zhao, X. Zhao, Q. Meng, F. Lan, X. Huang, Y. Li, L. Fang, C. Li, D. Li, Y. Sun, Z. Zhang, Z. Yang, Y. Huang, Y. Xi, Q. Qi, D. He, H. Huang, X. Zhang, Z. Wang, W. Li, Y. Cao, Y. Yu, H. Yu, J. Li, J. Ye, H. Chen, Y. Zhou, B. Liu, J. Wang, J. Ye, H. Ji, S. Li, P. Ni, J. Zhang, Y. Zhang, H. Zheng, B. Mao, W. Wang, C. Ye, S. Li, J. Wang, G.K.-S. Wong, and H. Yang. 2004. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (Bombyx mori). *Science*. 306:1937–1940.

Xue, Y., Z. Liu, J. Cao, Q. Ma, X. Gao, Q. Wang, C. Jin, Y. Zhou, L. Wen, and J. Ren. 2011. GPS 2.1: enhanced prediction of kinase-specific phosphorylation sites with an algorithm of motif length selection. *Protein Eng. Des. Sel.* 24:255–260.

Xue, Y., J. Ren, X. Gao, C. Jin, L. Wen, and X. Yao. 2008. GPS 2.0, a Tool to Predict Kinase-specific Phosphorylation Sites in Hierarchy. *Molecular & Cellular Proteomics*. 7:1598 –1608.

Yamauchi, H., and N. Yoshitake. 1984. Developmental stages of ovarian follicles of the silkworm, <I>Bombyx mori</I> L. *Journal of Morphology*. 179:21–31.

Yamazaki, H., and R. Nusse. 2002. Identification of DCAP, a drosophila homolog of a glucose transport regulatory complex. *Mech. Dev*. 119:115–119.

Yamazaki, H., and S. ichi Yanagawa. 2003. Axin and the Axin/Arrow-binding protein DCAP mediate glucose-glycogen metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 304:229–235.

Yang, W.-S., W.-J. Lee, K.-C. Huang, K.-C. Lee, C.-L. Chao, C.-L. Chen, T.-Y. Tai, and L.-M. Chuang. 2003. mRNA levels of the insulin-signaling molecule SORBS1 in the adipose depots of nondiabetic women. *Obes. Res*. 11:586–590.

Zamir, E., and B. Geiger. 2001. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *Journal of Cell Science*. 114:3583 –3590.

Zarrinpar, A., R.P. Bhattacharyya, and W.A. Lim. 2003. The structure and function of proline recognition domains. *Sci. STKE*. 2003:RE8.

Zhang, J., X. Li, B. Yao, W. Shen, H. Sun, C. Xu, J. Wu, and Y. Shi. 2007a. Solution structure of the first SH3 domain of human vinexin and its interaction with vinculin peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 357:931–937.

Zhang, M., A. Kimura, and A.R. Saltiel. 2003. Cloning and characterization of Cbl-associated protein splicing isoforms. *Mol. Med*. 9:18–25.

Zhang, M., J. Liu, A. Cheng, S.M. DeYoung, X. Chen, L.H. Dold, and A.R. Saltiel. 2006. CAP interacts with cytoskeletal proteins and regulates adhesion-mediated ERK activation and motility. *EMBO J*. 25:5284–5293.

Zhang, M., J. Liu, A. Cheng, S.M. Deyoung, and A.R. Saltiel. 2007b. Identification of CAP as a costameric protein that interacts with filamin C. *Mol. Biol. Cell*. 18:4731–4740.

Zhao, Z., E. Manser, and L. Lim. 2000. Interaction between PAK and Nck: a Template for Nck Targets and Role of PAK Autophosphorylation. *Mol Cell Biol*. 20:3906–3917.

Zhu, J., L.S. Indrasith, and O. Yamashita. 1986. Characterization of vitellin, egg-specific protein and 30 kDa protein from Bombyx eggs, and their fates during oogenesis and embryogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 882:427–436.

Zimowska, G., P.D. Shirk, D.L. Silhacek, and E. Shaaya. 1995. Vitellin and formation of yolk spheres in vitellogenic follicles of the moth, Plodia interpunctella. *Archives of insect biochemistry and physiology*. 29:71–85.

11.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I: Παράθεση των οργανισμών και το χρωμόσωμα όπου έχει ταυτοποιηθεί γονίδιο που κωδικοποιεί για CAV πρωτεΐνες.

SORBS1

Bos taurus	Chromosome 26
Callithrix jacchus	Chromosome 12 (Πιθηκοειδές)
Equus caballus	Chromosome 1 (άλογο)
Gallus gallus	Chromosome 6
Homo sapiens	Chromosome 10
Macaca mulatta	Chromosome 9 (Πιθηκοειδές)
Mus musculus	Chromosome 19
Pan troglodytes	Chromosome 10 (Χιμπατζής)
Pongo abelii	Chromosome 10 (Ουρακοτάγκος)
Rattus norvegicus	Chromosome 1
Sus scrofa	Chromosome 14

SORBS2

Ailuropoda melanoleuca	Chromosome Unk (Γιγάντιο Πάντα)
Bos taurus	Chromosome 27
Callithrix jacchus	Chromosome 3
Canis lupus familiaris	Chromosome 16
Danio rerio	Chromosome Unk (Zebrafish)
Equus caballus	Chromosome 27
Gallus gallus	Chromosome 4
Homo sapiens	Chromosome 4
Macaca mulatta	Chromosome 5
Mus musculus	Chromosome 8
Pan troglodytes	Chromosome 4
Pongo abelii	Chromosome 4
Rattus norvegicus	Chromosome 9
Sus scrofa	Chromosome 15

SORBS3

Ailuropoda melanoleuca	Chromosome Unk
Bos taurus	Chromosome 8
Callithrix jacchus	Chromosome 13
Canis Lupus familiaris	Chromosome 25
Danio rerio	Chromosome 8
Equus caballus	Chromosome 2
Homo sapiens	Chromosome 8
Macaca mulatta	Chromosome 8
Mus musculus	Chromosome 14
Pan troglodytes	Chromosome 8
Pongo abelii	Chromosome 8
Rattus norvegicus	Chromosome 15
Sus scrofa	Chromosome 14

Μη κατηγοριοποιημένα, :

Anopheles gambiae	chromosome 2L	
Biston betularia	chromosome 9	(λεπιδόπτερο, πεταλούδα νύχτας)
Tetraodon nigroviridis	chromosome 17	(ψάρι του γλυκού νερού)
Drosophila melanogaster	chromosome 2R	

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ: (Α) Παρουσίαση της γνωστής cDNA αλληλουχίας του BmSH3-A1 που κλωνοποιήθηκε και της in silico μετάφρασης αυτής. Με μικρά γράμματα παρουσιάζεται η νέα αλληλουχία που ταυτοποιήθηκε, με κεφαλαία γράμματα η ήδη γνωστή αλληλουχία. Υπογραμμισμένη παρουσιάζεται η αλληλουχία που απουσιάζει από το εναλλακτικό μετάγραφο BmSH3-A2. Με έντονα και πλάγια γράμματα σημαίνεται το Bm1 μεταθετό στοιχείο. (Β) Παρατίθεται η γνωστή cDNA αλληλουχία της BmSH3-B και της in silico μετάφρασης αυτής. Με μικρά γράμματα παρουσιάζεται η μοναδική αλληλουχία του εναλλακτικού μετάγραφου BmSH3-B και με κεφαλαία γράμματα η κοινή αλληλουχία με την BmSH3-A1. Το κωδικόνιο έναρξης της μεταγραφής και η πρώτη μεθιονίνη σημαίνονται με έντονους χαρακτήρες.

(Α)

```
ccagaacataatagtaatggaaaaactgatgccaacattaaaacgataccgatttcgatgagcgataacaattttcaaactaaagaagaaataacacaac 100
 p  e  h  n  s  n  g  k  t  d  a  n  i  k  t  i  p  i  s  m  s  d  n  n  f  q  t  k  e  e  i  t  q    34
gttcaactgtaactgaacataagataaatgaaatcgaagaaattaagacaatcaagaagatagttttgaacgaatacgatagaatgcgggataccagaga 200
r  s  t  v  t  e  h  k  i  n  e  i  e  e  i  k  t  i  k  k  i  v  l  n  e  y  d  r  m  r  d  t  r  e   69
agacgattattctaaaattattcgcgaTAGAAATAATCATTCTGATAAATCTTCAAGAGTAAGACGCAATGAAGATTTTCGTCAAGAATCACCAAGTAAA 300
  d  d  y  s  k  i  i  r  d  R  N  N  H  S  D  K  S  S  R  V  R  R  N  E  D  F  R  Q  E  S  P  S  K   103
GAACGTCCTATATTACCAAGGAATGGATGTCATAATCCACAAAATGAAGAGAATAATAAAAGGAGCTGGAGTTCCTTATCTAGTACGTACGATCAGTACA 400
 E  R  P  I  L  P  R  N  G  C  H  N  P  Q  N  E  E  N  N  K  R  S  W  S  S  L  S  S  T  Y  D  Q  Y   137
AATCCGAGCATGAAAACCTCACGAGCACTTCAGTCGAATTTCCGTCGGGCGAGGTGGTGACCATCAAACCACCCGTGAAATCCCCGAGCACACACACGCC 500
K  S  E  H  E  N  L  T  S  T  S  V  E  F  P  S  G  E  V  V  T  I  K  P  P  V  K  S  P  S  T  H  T  P  172
TGCAAACGTCCCCAGCCCCACAACGAAACAGACCGTCATGATAACGCCGACGTTCAAGGCACGCTCGACCTCTCCAGCCGTGTGGAGGCCGGGAGCGCCA 600
  A  N  V  P  S  P  T  T  K  Q  T  V  M  I  T  P  T  F  K  A  R  S  T  S  P  A  V  W  R  P  G  A  P   206
ACGCCCCCGCCGGCTCCGAGCACCCCGCGCAGTCCCGGCGGACCGCCGCCTCCGCCGCCCCCGCCGGTTTGGACGCCGGGTAGCGCGGAACCATCTCCGC 700
 T  P  P  P  A  P  S  T  P  R  S  P  G  G  P  P  P  P  P  P  P  P  V  W  T  P  G  S  A  E  P  S  P   240
AACCCACACGGAAGACATTCAGACCAGTACATTTTGAGGAAACACCACCGAGTCGCCGGAAATTCGCAAACACGGAACAAAACGGTTGCACCAGTGGCTC 800
Q  P  T  R  K  T  F  R  P  V  H  F  E  E  T  P  P  S  R  R  K  F  A  N  T  E  Q  N  G  C  T  S  G  S  275
CGAGAGCGAGGGTCGACTGCGTACCTCGCAGAGCGCCCCCGCCACCGGGCTGAACACGCTAAGCGGCTCATCATCTACTAGCCGTCTACCACGAGTGCAG 900
  E  S  E  G  R  L  R  T  S  Q  S  A  P  A  T  G  L  N  T  L  S  G  S  S  S  T  S  R  L  P  R  V  Q   309
AACCCCACTGTCACGCTCTTGCAAAAAGCGCGAGAAGGACAGTTGCCACGTGGTCCTGCCACACTTCAATCAGAAAGAGACAGTGCCCGATTACCTCGTG 1000
 N  P  T  V  T  L  L  Q  K  A  R  E  G  Q  L  P  R  G  P  A  T  L  Q  S  E  R  D  S  A  R  L  P  R   343
ATAGACCTTCGCCACCTAGCGGTGACCCAGTCCATGCCTTAAGAAGAGAGTACGCGAGCGAGAGCGAAGCAGAAAGAAGAGATTACGAACGTATCGGCGT 1100
D  R  P  S  P  P  S  G  D  P  V  H  A  L  R  R  E  Y  A  S  E  S  E  A  E  R  R  D  Y  E  R  I  G  V  378
TCGTAAAATGTCTGATACTCGACAGAAAGTGGACGGTGTTGGACCTATAACAAAAGACGGCATGCCGATTACACTTAGATCTGAAGTCAAAGATCCATCG 1200
  R  K  M  S  D  T  R  Q  K  V  D  G  V  G  P  I  T  K  D  G  M  P  I  T  L  R  S  E  V  K  D  P  S   412
CGTTGGTATAAAAAGATGTACGACACGATTCATAAAAACAAATACGATGACGATTACGTGACAATACGATACAAAAGTCGACGAGAGGCCGCAGAAAGGG 1300
 R  W  Y  K  K  M  Y  D  T  I  H  K  N  K  Y  D  D  D  Y  V  T  I  R  Y  K  S  R  R  E  A  A  E  R   446
TGCCAAGCAGTAAATCTCAATACGCATATTTCGACCCACGTTCTGGCTACCTGAGCGAACCTGAAGGAGGATTGAGCAGGCTCAGTGCGTTTAGTGATGC 1400
V  P  S  S  K  S  Q  Y  A  Y  F  D  P  R  S  G  Y  L  S  E  P  E  G  G  L  S  R  L  S  A  F  S  D  A  481
CTATGACAGTGACGTCACGACGGGCCCGAGGAGACGAACGGCATCCGTGCAGGAAGATCGCCGGATCAGTGACGTCAGTTCTTCTTATCTATCCAATAAT 1500
  Y  D  S  D  V  T  T  G  P  R  R  R  T  A  S  V  Q  E  D  R  R  I  S  D  V  S  S  S  S  Y  L  S  N  N   515
AAATACAGCACATTAGCATCGGCGAGGGCGAGCCAGGAAGTTTACAAGAACCAGCCGGGAAGAATTGAGAACTATGTGCCCGGGAAATCTTCAGTCGTTG 1600
 K  Y  S  T  L  A  S  A  R  A  S  Q  E  V  Y  K  N  Q  P  G  R  I  E  N  Y  V  P  G  K  S  S  V  V   549
ATAAAGAAGCAAAGCAGTGGTGGGACGAGGTTATGGACATTTTTGACGGGCAAAATATATCCAGCACTACCTCGTTGCCCCAACCTTCGCCAAAAGAAAA 1700
D  K  E  A  K  Q  W  W  D  E  V  M  D  I  F  D  G  Q  N  I  S  S  T  T  S  L  P  Q  P  S  P  K  E  K  584
GAAGGATATTACTGCCGCAATTCTGTCAAAATCCAACATGGCAAAAGCTCTAAAGGAGTCGGGCTATGAATCTGATTCTACTCTTATATTCCGCCGTCGC 1800
  K  D  I  T  A  A  I  L  S  K  S  N  M  A  K  A  L  K  E  S  G  Y  E  S  D  S  T  L  I  F  R  R  R   618
GAGGAAACGGACGCTCCACTCTCTCCAGCGGAAAGGAGGGCCGCGTATCGTGACCTGCAGGCCGGCGGGGAGCCACCCCTACGCGGATTCCGATCTCCTG 1900
 E  E  T  D  A  P  L  S  P  A  E  R  R  A  A  Y  R  D  L  Q  A  G  G  E  P  P  L  R  G  F  R  S  P   652
CGCCGCCACGTCAAGAAACAGACTCAGCGCCCGAGCCACCGCGGAGAACACAACATGGGAGCTATTCAGATGCAGAGTCTCCCCGGCGTTATGTGGAAAG 2000
A  P  P  R  Q  E  T  D  S  A  P  E  P  P  R  R  T  Q  H  G  S  Y  S  D  A  E  S  P  R  R  Y  V  E  S  687
CGATGTGAACATCCACTACCGGTGTCCAGTGCGACACGACCCCTTACCTCTCGTACCCGAGAGAGAACTTGCGAGGCAGCAGGCAGAACACATGAAGAGG 2100
  D  V  N  I  H  Y  R  C  P  V  R  H  D  P  L  P  L  V  P  E  R  E  L  A  R  Q  Q  A  E  H  M  K  R   721
CTGTATCGAGAGCAGAAACGGAATAAATATCTGCAGGAGCTGCAAGATATGCAAAACAGGCGTCACCAAGACAACTTCACGCCTTCACAGAAGACCGTAG 2200
 L  Y  R  E  Q  K  R  N  K  Y  L  Q  E  L  Q  D  M  Q  N  R  R  H  Q  D  N  F  T  P  S  Q  K  T  V   755
TCCCTCTGAACAGATACGACGATGCCGACAAAGTTCTTGCAAAAGCCCTATACACTTTCAACGGTCAGACTTCTCGAGAACTCAGTTTTAGAAAAGGAGA 2300
V  P  L  N  R  Y  D  D  A  D  K  V  L  A  K  A  L  Y  T  F  N  G  Q  T  S  R  E  L  S  F  R  K  G  D  790
TATAATATTTGTGCGAAGGCAGATTGACGCGAATTGGTACGAAGGTGAAATTCATGGAAGAATTGGGCTGTTCCCGTATAATTATGTAGAGATACAGAAG 2400
  I  I  F  V  R  R  Q  I  D  A  N  W  Y  E  G  E  I  H  G  R  I  G  L  F  P  Y  N  Y  V  E  I  Q  K   824
GGTGATACAATCCAAGTTATTAAGAAGCCGTCAATCATCGAGGGCCGTGCCAGGGCGAAGTTTGATTTCATAGCACAGACCAATCTCGAACTGCCATTGA 2500
 G  D  T  I  Q  V  I  K  K  P  S  I  I  E  G  R  A  R  A  K  F  D  F  I  A  Q  T  N  L  E  L  P  L   858
AGAAAGGAGAAGTTGTGACTTTGACAAGACGTATTGACCAGAACTGGTGGGAAGGCCGAAACGGCTTAAAAACTGGAATATTCCCGGACAGCTATGTTAC 2600
K  K  G  E  V  V  T  L  T  R  R  I  D  Q  N  W  W  E  G  R  N  G  L  K  T  G  I  F  P  D  S  Y  V  T  893
AATTCTACAGGAACCCAGCCAGAGCAAACCTGATCCGAGGCCAATCTTAAACACCGATAAGCCAGCGGCGTCACCGGCCGCTCACGGTCTTCTCAACGGT 2700
  I  L  Q  E  P  S  Q  S  K  P  D  P  R  P  I  L  N  T  D  K  P  A  A  S  P  A  A  H  G  L  L  N  G   927
TCCGATAAAAGAAGTATGGGTTCTCATAGCTACACGCCACAGCAGAACAATCCAGCGCTCTCTAATGCGCCACCTTCCACTCAGCCACTTCCCGGTTATG 2800
 S  D  K  R  S  M  G  S  H  S  Y  T  P  Q  Q  N  N  P  A  L  S  N  A  P  P  S  T  Q  P  L  P  G  Y   961
TGGCGAAACCAGCCCAAGCGACACTTACACCTTCCGAACGTGGTTACGGACCTCCAACAGGCTCGGGGGTAGATCTTAATAACACCGAACCCCTGTACGT 2900
```

```
V  A  K  P  A  Q  A  T  L  T  P  S  E  R  G  Y  G  P  P  T  G  S  G  V  D  L  N  N  T  E  P  L  Y  V  996
CGACACTAATGCCGAAGCCATACCATATCGTGCGATGTACAAATACCGGCCTCAAAATCCTGACGAGCTCGAACTGAACGAGGGTGATACGGTGTACGTA 3000
  D  T  N  A  E  A  I  P  Y  R  A  M  Y  K  Y  R  P  Q  N  P  D  E  L  E  L  N  E  G  D  T  V  Y  V 1030
CTGGAGAAATGCGACGACGGCTGGTACGTCGGCTCAAGCCAGAGAACCGGCCGCTTCGGTACCTTCCCAGGCAACTACGTGGAGCGTATCTGATAGCGCG 3100
 L  E  K  C  D  D  G  W  Y  V  G  S  S  Q  R  T  G  R  F  G  T  F  P  G  N  Y  V  E  R  I  *  *     1060
AGACGTCGCTGTTCCGTCGGCTGCGGCGCGCTGCACTGTGCGGCCGGCGGCGTCGCTGAACTGACGCACTAACACGTGCCACGGTACAACACGACACAAC 3200
CTCCATACCATTATACAGGGTGTAACTACACCGTTCCCGAAATCGAAACGAGAATATATTTTTTATTGCTTAAGTGTGTGTGTGGTGT***TAAGTGGTTACT*** 3300
***GGAGCCCATAGACATCTACAACGTAAATGCCGCCACCCTCGTTTAGATAAGAGTTCTAGGGTCTCAGTATAGTTACCACGGCTACCCCATCCTACAAACC*** 3400
***GAAACGCATTACTGCTTCACGGCAGAAATAGGCAGGGTGGTGGTACGGGTAGCGTGCGGACTTACAAGAGGTCTTACAAAATAATATATATAATAACCTT*** 3500
ACTAACTTCACTTAAACTAAACGATGTTGCAATAATATTATATTTCGCAAAGGCGAAGGCGGCTACCCCGTGTTCATCGTGATCGTAGATTTCGCGCATA 3600
AATCTTTTTTGTTATTGTTACATTGCGTGCGATGCTTAAAAGCCTTAGAACAAATACATTTTTAATGTTGCCGTGTTATCTATTCTTCAAATTTACTTCG 3700
TTTACAGTAACGGTTCCAATACACCCTGTATAGTGTTAGTACTAGTGCAGCCCGGAGCCTATTAATATTTTATGAAACGATATTTACAATGTAAATGACC 3800
TTAAAAATCAAAATTGTACGGTCAGCTGCAAAATTGGATGGATACCTACCTCGAGTTCCACAATCTATATACCATAAACATTTATAGACGCTTACAATAA 3900
AATAAATACACTGAAATATAATAATACGCTATTAATGACAAATAGCGTTAATTACGTTACAGTTTTACCGTACTATATCCATACATTTTTGCTGCCTCTA 4000
AAAACATAACCACGAAACCAAAACTATACAAAATGTACTGCCAAATACCAAAACTCACGAAATAACTTCGGAGCTTGAGCTTTGTAATAAAATTGTTGGC 4100
TGTTGTATTCGAGGCGTAGAAAAAATACGGCTTCAATTCATATTCGACAGATAATAAAATTCAATTAACTAATAGGAAAATGATCTTGACATTAGAAGCA 4200
TCATATTGAGGTGACTACTTTTAACGAAAATCGCATTAAACGGATTCTAGTGTCTTACAAAAATAATTGTTCCCTTGGCTTTTCGCCCTCGGAACTATAG 4300
TCCCATTATAAATATTACAATTCTTAGATCAATTACTTGACAATATTATCCTACAACATTACAGTCAATTACAATTTGAACAGTTCAGTGTTTAAGTCGT 4400
AAAAGTGTTTATCCAACCTCTTGCGTCTAATGTGGAGCTTAATCATATCCTAAATATGTTATCCGTATCCGTTTACGTAGTACCTAGTAGATTGCCTCGA 4500
CATTACCATGAAAGATACCAAAATATTGCCATGACTTTAAGTAATTTTTGTACAAAATATAGCATGAAAATTTCTAGAAGAAGTAAGTTCTTAAACTTGA 4600
TTTGTATAGATCCGTTTTATAAGGACAAAAAAAATATGGCAACATCGTGGCATCTAATTTTTTTAGAGGGCTTACTGTAATAGTACATATTTTGTTCTTT 4700
ATAAACAAAATAGTTTCAAAATGTAAAGATGAAAACGTCAGTGTAAGCAATCCAAAGTTGTGCTGAGTTCCAAAGAATATGTCTAAAATGTTGTAAAATT 4800
GTATAAAATTTTTATTAAAAAAATACTTATTTACTTATAATTTAGCGTAGTTATTTATTTAAAACATACAATTGACCATAATGAGCTCTTCATTTAAAAG 4900
TGAAATTTTAAAAGAATGTAGCTCTGCACATGAATCATTAATGAGAATGACTAACAAAAAAATTATTATATCGGCAAAAGTCAAACTTTGAGTGATAACT 5000
TGTAGTTTGGCGATAACAAAGTTTAGACATTTTGTGGGCGTTGATGAAAGGCTTCACATAACATTAATTTAGTGTAATAACTCATTGACAAGTATGAAGT 5100
ATTAGTTACCGTGTTAATGGTGTAGTTACTTTACTCAGGCCGTCTTTAACCAATTTAAGGCACTGGACATTTCGGGATAATAGGCCCCTATGACCGTTGT 5200
TTAACGAATGCTGATTAAACTACCACGGTCTACACCAGATGACTTTCCGGTGTACTCTCTCATTTTATAAAATGATCTAATGGAGGGCCTCCAAATATAT 5300
CAGGGCTCTAGGTACCGGCTTGGAGTGACTAATGGGAAAAAGGGGCCTGATAATACTCAAGTTACACATTGACTAGTACATTAGGGCGAGTTTTTGGCAA 5400
CGTTTGACAATACATTATGATTAACTAGGTGATACATTATTTAATTGAAATTTAAAACATATTGTAAGGAATGAATTAATCAACCGATTATATGGTATGT 5500
AATTTTTGTAATAATTATCAAAAAAATTATAAACTTCATCATTCATAAATTCTAGTCAATGAATTTTGTGCTACTTTTGTTGTTTTCGTTGTCGATTCCT 5600
TTGCTGAAATTCTTGAAATGTTTTATCCCTAAAGATTAGTTATAAGAACCGTTTATATGTAGTTTTAAGTAGATCGAATCCTGATATCGCATACAGCACT 5700
CGCCCTACGTGAAATGCTTGTTATTTTTCATAATGCATTACTAGTGTATTTTATTTTTAACCTATTATTGTATTGTTGTATTTACTTTTGTTAAATTATT 5800
TTTTAAAGCACAAAAATTTTATTTGTTGTTGACACCTTGAAGTACGATGTAACATTAACTGCTACTGTTCAAAATCACACCTAATAAAATAATCTTTCTA 5900
TTTAAAAAAAAAAAAAAAAAA 5921
```

(B)

```
agtaagcgtgcgtgagagttggacgcggaaaccgcgttattgttgctttcaagattaagc    60
aaaatttaaattattaaa**atg**ctggacagattgttgGAGCTGCAAGATATGCAAAACAGG   120
                  **m**  l  d  r  l  l  E  L  Q  D  M  Q  N  R       17
CGTCACCAAGACAACTTCACGCCTTCACAGAAGACCGTAGTCCCTCTGAACAGATACGAC   180
 R  H  Q  D  N  F  T  P  S  Q  K  T  V  V  P  L  N  R  Y  D       37
GATGCC**GACAAAGTTCTTGCAAAAGCCCTATACACTTTCAACGGTCAGACTTCTCGAGAA**   **240**
 D  A  **D  K  V  L  A  K  A  L  Y  T  F  N  G  Q  T  S  R  E**       57
**CTCAGTTTTAGAAAAGGAGATATAATATTTGTGCGAAGGCAGATTGACGCGAATTGGTAC**   **300**
 **L  S  F  R  K  G  D  I  I  F  V  R  R  Q  I  D  A  N  W  Y**       77
**GAAGGTGAAATTCATGGAAGAATTGGGCTGTTCCCGTATAATTATGTAGAGATA**CAGAAG   360
 **E  G  E  I  H  G  R  I  G  L  F  P  Y  N  Y  V  E  I**  Q  K       97
GGTGATACAATCCAAGTTATTAAGAAGCCGTCAATCATCGAGGGC**CGTGCCAGGGCGAAG**   **420**
 G  D  T  I  Q  V  I  K  K  P  S  I  I  E  G  **R  A  R  A  K**      117
**TTTGATTTCATAGCACAGACCAATCTCGAACTGCCATTGAAGAAAGGAGAAGTTGTGACT**   **480**
 **F  D  F  I  A  Q  T  N  L  E  L  P  L  K  K  G  E  V  V  T**      **137**
**TTGACAAGACGTATTGACCAGAACTGGTGGGAAGGCCGAAACGGCTTAAAAACTGGAATA**   **540**
 **L  T  R  R  I  D  Q  N  W  W  E  G  R  N  G  L  K  T  G  I**      157
**TTCCCGGACAGCTATGTTACAATTCTACAG**GAACCCAGCCAGAGCAAACCTGATCCGAGG   600
 **F  P  D  S  Y  V  T  I  L  Q**  E  P  S  Q  S  K  P  D  P  R      177
CCAATCTTAAACACCGATAAGCCAGCGGCGTCACCGGCCGCTCACGGTCTTCTCAACGGT   660
 P  I  L  N  T  D  K  P  A  A  S  P  A  A  H  G  L  L  N  G      197
TCCGATAAAAGAAGTATGGGTTCTCATAGCTACACGCCACAGCAGAACAATCCAGCGCTC   720
 S  D  K  R  S  M  G  S  H  S  Y  T  P  Q  Q  N  N  P  A  L      217
TCTAATGCGCCACCTTCCACTCAGCCACTTCCCGGTTATGTGGCGAAACCAGCCCAAGCG   780
 S  N  A  P  P  S  T  Q  P  L  P  G  Y  V  A  K  P  A  Q  A      237
ACACTTACACCTTCCGAACGTGGTTACGGACCTCCAACAGGCTCGGGGGTAGATCTTAAT   840
 T  L  T  P  S  E  R  G  Y  G  P  P  T  G  S  G  V  D  L  N      257
AACACCGAACCCCTGTACGTCGACACTAATGCCGAAGCCATACCA**TATCGTGCGATGTAC**   **900**
 N  T  E  P  L  Y  V  D  T  N  A  E  A  I  P  **Y  R  A  M  Y**      277
**AAATACCGGCCTCAAAATCCTGACGAGCTCGAACTGAACGAGGGTGATACGGTGTACGTA**   **960**
 **K  Y  R  P  Q  N  P  D  E  L  E  L  N  E  G  D  T  V  Y  V**      **297**
**CTGGAGAAATGCGACGACGGCTGGTACGTCGGCTCAAGCCAGAGAACCGGCCGCTTCGGT**  **1020**
 **L  E  K  C  D  D  G  W  Y  V  G  S  S  Q  R  T  G  R  F  G**      **317**
**ACCTTCCCAGGCAACTACGTGGAGCGTATC**TGATAGCGCGAGACGTCGCTGTTCCGTCGG  1080
 **T  F  P  G  N  Y  V  E  R  I**  *  *                           327
```

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III: Αμινοξική αλληλουχία της BmSH3-A1 και της BmSH3-B. Με έντονα γράμματα παρουσιάζεται η πρώτη μεθιονίνη. Με ανοιχτή γκρι σκίαση σημαίνεται η SoHo περιοχή και με εντονότερο γκρι οι SH3 περιοχές. Με απλή υπογράμμιση σημαίνεται η περιοχή αναγνώρισης του anti-BmSH3.2 και με διπλή η περιοχή αναγνώρισης του anti-BmSH3.1 αντισώματος. Με μικρά γράμματα σημαίνεται η μοναδική αμινοξική αλληλουχία της BmSH3-B ισομορφής.

BmSH3-A1

PEHNSNGKTDANIKTIPISMSDNNFQTKEEITQRSTVTEHKINEIEEIKTIKKIVLNEYDRMRDTREDDYSKIIRDRNNHSDKSSR
VRRNEDFRQESPSKERPILPRNGCHNPQNEENNKRSWSSLSSTYDQYKSEHENLTSTSVEFPSGEVVTIKPPVKSPSTHTPANVPS
PTTKQTVMITPTFKARSTSPAVWRPGAPTPPPAPSTPRSPGGPPPPPPPPVWTPGSAEPSPQPTRKTFRPVHFEETPPSRRKFANT
EQNGCTSGSESEGRLRTSQSAPATGLNTLSGSSSTSRLPRVQNPTVTLLQKAREGQLPRGPATLQSERDSARLPRDRPSPPSGDPV
HALRREYASESEAERRDYERIGVRKMSDTRQKVDGVGPITKDGMPITLRSEVKDPSRWYKKMYDTIHKNKYDDDYVTIRYKSRREA
AERVPSSKSQYAYFDPRSGYLSEPEGGLSRLSAFSDAYDSDVTTGPRRRTASVQEDRRISDVSSSYLSNNKYSTLASARASQEVYK
NQPGRIENYVPGKSSVVDKEAKQWWDEVMDIFDGQNISSTTSLPQPSPKEKKDITAAILSKSNMAKALKESGYESDSTLIFRRREE
TDAPLSPAERRAAYRDLQAGGEPPLRGFRSPAPPRQETDSAPEPPRRTQHGSYSDAESPRRYVESDVNIHYRCPVRHDPLPLVPER
ELARQQAEHMKRLYREQKRNKYLQELQDMQNRRHQDNFTPSQKTVVPLNRYDDADKVLAKALYTFNGQTSRELSFRKGDIIFVRRQ
IDANWYEGEIHGRIGLFPYNYVEIQKGDTIQVIKKPSIIEGRARAKFDFIAQTNLELPLKKGEVVTLTRRIDQNWWEGRNGLKTGI
FPDSYVTILQEPSQSKPDPRPILNTDKPAASPAAHGLLNGSDKRSMGSHSYTPQQNNPALSNAPPSTQPLPGYVAKPAQATLTPSE
RGYGPPTGSGVDLNNTEPLYVDTNAEAIPYRAMYKYRPQNPDELELNEGDTVYVLEKCDDGWYVGSSQRTGRFGTFPGNYVERI

BmSH3-B

mldrllELQDMQNRRHQDNFTPSQKTVVPLNRYDDADKVLAKALYTFNGQTSRELSFRKGDIIFVRRQIDANWYEGEIHGR
IGLFPYNYVEIQKGDTIQVIKKPSIIEGRARAKFDFIAQTNLELPLKKGEVVTLTRRIDQNWWEGRNGLKTGIFPDSYVTILQEPS
QSKPDPRPILNTDKPAASPAAHGLLNGSDKRSMGSHSYTPQQNNPALSNAPPSTQPLPGYVAKPAQATLTPSERGYGPPTGSGVDL
NNTEPLYVDTNAEAIPYRAMYKYRPQNPDELELNEGDTVYVLEKCDDGWYVGSSQRTGRFGTFPGNYVERI

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV: Αποτελέσματα αξιολόγηση της υποκυτταρικής κατανομής της BmSH3-A1 με βάση την πρωτοταγή δομή της, με διάφορα προγράμματα που είναι ανοιχτά προς χρήση στο διαδίκτυο. Με έντονους χαρακτήρες σημαίνεται το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε και με έντονους και υπογραμμισμένους τα αποτελέσματα της αναζήτησης. Όπου είναι απαραίτητο παρατίθενται και επεξηγήσεις για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα παρατίθενται χωρίς αλλαγές από την μορφή των αποτελεσμάτων του κάθε προγράμματος.

WoLF PSORT (Horton et al., 2007) (http://wolfpsort.org/)
k used for kNN is: 32
queryProtein details nucl: 25.0, cyto_nucl: 16.5, cyto: 6.0

PRED-CLASS (http://athina.biol.uoa.gr/PRED-CLASS/input.html)

Classified in the **MIXED** protein class.

subnuclear (Lei and Dai, 2005) (http://array.bioengr.uic.edu/subnuclear.htm): Predict subnuclear localizations
predicted by AA module: **Nuclear Lamina**

SVMtm Predictor (Yuan et al., 2004): SVM for Transmembrane Segments Prediction

Prediction result for sequence ID: bmsh3Number of **transmembrane domains: 0**

PrediSi (Hiller et al., 2004): Prediction of signal peptides and their cleavage positions (http://www.predisi.de/home.html)
not predicted for secretion

TargetP 1.1 Server - prediction results

Technical University of Denmark
targetp v1.1 prediction results
Number of query sequences: 1
Cleavage site predictions included.
Using NON-PLANT networks.

Name	Len	mTP	SP	other	Loc	RC	TPlen
Sequence	1030	**0.100**	**0.044**	**0.927**	**_**	**1**	**-**
cutoff		0.000	0.000	0.000			

mTP, a mitochondrial targeting peptide;
SP, a signal peptide;
_, Any other location;
RC Reliability class, from 1 to 5, where 1 indicates the strongest prediction
Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence.
Olof Emanuelsson, Henrik Nielsen, Søren Brunak and Gunnar von Heijne.
J. Mol. Biol., 300: 1005-1016, 2000.
Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites.
Henrik Nielsen, Jacob Engelbrecht, Søren Brunak and Gunnar von Heijne.
Protein Engineering, 10:1-6, 1997

ESLpred: (Bhasin and Raghava, 2004): SVM for Eukaryotics using Dipeptide composition & PSI-BLAST (http://www.imtech.res.in/raghava/eslpred/)
Predicted Subcellular Localization (based on Composition, Physio-chemical properties, Dipeptide composition):

Nuclear Protein

Reliability Index= 1
Expected Accuracy=~ 53%
Predicted Subcellular Localization (based on EuPSI-BLAST):

Cytoplasmic Protein

NCF2_HUMAN 3e-98
Length = 526
Score = 47.8 bits (112), Expect = 3e-06
Identities = 19/50 (38%), Positives = 33/50 (66%)

Query: 748 KALYTFNGQTSRELSFRKGDIIFVRRQIDANWYEGEIHGRIGLFPYNYVE 797
+AL+++ +L F++GDII V +++ W EGE G++G+FP +VE
Sbjct: 463 EALFSYEATQPEDLEFQEGDIILVLSKVNEEWLEGECKGKVGIFPKVFVE 512

PSORT (Nakai et al., 1990s): First computer program for subcellular location prediction (http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html)
nucleus --- Certainty= 0.600(Affirmative) < succ>
microbody (peroxisome) --- Certainty= 0.300(Affirmative) < succ>
mitochondrial matrix space --- Certainty= 0.100(Affirmative) < succ>
lysosome (lumen) --- Certainty= 0.100(Affirmative) < succ>

PSORT II (http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html)

Results of Subprograms
*** Warning: 1st aa is not methyonine
PSG: a new signal peptide prediction method
N-region: length 10; pos.chg 1; neg.chg 2
H-region: length 3; peak value 0.00
PSG score: -4.40
GvH: von Heijne's method for signal seq. recognition
GvH score (threshold: -2.1): -16.17
possible cleavage site: between 21 and 22
>>> Seems to have no N-terminal signal peptide

MITDISC: discrimination of mitochondrial targeting seq
R content: 0 Hyd Moment(75): 6.27
Hyd Moment(95): 0.61 G content: 1
D/E content: 2 S/T content: 2

Score: -7.54

Gavel: prediction of cleavage sites for mitochondrial preseq
cleavage site motif not found

NUCDISC: discrimination of nuclear localization signals
pat4: PRRR (4) at 476
pat7: PPSRRKF (4) at 249
pat7: PSRRKFA (5) at 250
pat7: PRRRTAS (5) at 476
pat7: PSPKEKK (3) at 562
pat7: PKEKKDI (5) at 564
bipartite: none
content of basic residues: 14.9%

NLS Score: 1.67

KDEL: ER retention motif in the C-terminus: none
ER Membrane Retention Signals: none
SKL: peroxisomal targeting signal in the C-terminus: **none**
SKL2: 2nd peroxisomal targeting signal: **none**
VAC: possible vacuolar targeting motif: **none**

RNA-binding motif: none

Actinin-type actin-binding motif:
type 1: none
type 2: none
NMYR: N-myristoylation pattern : **none**

Prenylation motif: none
memYQRL: transport motif from cell surface to Golgi: **none**

Tyrosines in the tail: none

Dileucine motif in the tail: none

PROSITE DNA binding motifs: none

PROSITE ribosomal protein motifs: none

PROSITE prokaryotic DNA binding motifs: none

NNCN: Reinhardt's method for Cytplasmic/Nuclear discrimination

Prediction: nuclear

Reliability: 94.1

COIL: Lupas's algorithm to detect coiled-coil regions
total: 0 residues

Results of the k-NN Prediction
k = 9/23

78.3 %: nuclear
8.7 %: cytoskeletal
4.3 %: cytoplasmic
4.3 %: Golgi
4.3 %: plasma membrane

prediction for QUERY is nuc (k=23)
Nakai, K. and Horton, P., PSORT: a program for detecting the sorting signals of proteins and predicting their subcellular localization, Trends Biochem. Sci, 24(1) 34-35 (1999).
Nakai, K. and Kanehisa, M., A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells, Genomics 14, 897-911 (1992).

PredictNLS (Cokol et al., 2000)(http://cubic.bioc.columbia.edu/cgi/var/nair/resonline.pl)

This protein does not contain a nuclear localization signal
Cokol M, Nair R, Rost B., Finding nuclear localization signals, EMBO Rep. 2000 Nov;1(5):411-5.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V: Αποτελέσματα της σύγκρισης της αμινοξικής αλληλουχίας της BmSH3-A1 με την βάση δεδομένων του NCBI. Τα αποτελέσματα παρατίθενται χωρίς επεξεργασία. Ενδεικτικά παρατίθενται και λεπτομερέστερα αποτελέσματα της σύγκρισης.

Accession	Description	E value
NP_001166801.1	c-Cbl-associated protein isoform A [Bombyx mori] >gb|ACV52545.1| CAP isoform A [Bombyx mori]	0.0
XP_001605377.1	PREDICTED: similar to DCAPL3 [Nasonia vitripennis]	0.0
NP_001159613.1	c-Cbl-associated protein isoform B [Bombyx mori] >gb|ACV52546.1| CAP isoform B [Bombyx mori]	0.0
XP_393153.3	PREDICTED: similar to CAP CG18408-PC, isoform C [Apis mellifera]	0.0
XP_001687850.1	AGAP007717-PB [Anopheles gambiae str. PEST] >gb|EDO64499.1| AGAP007717-PB [Anopheles gambiae str. PEST]	4e-168
XP_970771.2	PREDICTED: similar to DCAPL3 [Tribolium castaneum]	4e-167
XP_001687851.1	AGAP007717-PC [Anopheles gambiae str. PEST] >gb|EDO64500.1| AGAP007717-PC [Anopheles gambiae str. PEST]	5e-158
BAB62019.1	DCAPL3 [Drosophila melanogaster]	7e-154
NP_724910.1	CAP, isoform C [Drosophila melanogaster] >gb|AAM68778.1| CAP, isoform C [Drosophila melanogaster] >gb|AAO24972.1| RE10170p [Drosophila melanogaster]	9e-154
NP_724911.1	CAP, isoform F [Drosophila melanogaster] >gb|AAF58815.2| CAP, isoform F [Drosophila melanogaster]	1e-152
XP_002016495.1	GL10458 [Drosophila persimilis] >gb|EDW32385.1| GL10458 [Drosophila persimilis]	9e-152
NP_001137636.1	CAP, isoform K [Drosophila melanogaster] >ref|NP_001137640.1| CAP, isoform O [Drosophila melanogaster] >gb|AAO39438.1| SD03761p [Drosophila melanogaster] >gb|ACL83090.1| CAP, isoform K [Drosophila melanogaster] >gb|ACL83094.1| CAP, isoform O [Drosophila melanogaster]	2e-150
XP_002425805.1	dcapl, putative [Pediculus humanus corporis] >gb|EEB13067.1| dcapl, putative [Pediculus humanus corporis]	6e-139
NP_001137638.2	CAP, isoform Q [Drosophila melanogaster] >gb|ACL83092.2| CAP, isoform Q [Drosophila melanogaster]	2e-134
NP_610571.2	CAP, isoform A [Drosophila melanogaster] >gb|AAF58816.2| CAP, isoform A [Drosophila melanogaster]	3e-134
BAB62017.1	DCAPL1 [Drosophila melanogaster]	3e-134
ABX00735.1	IP16877p [Drosophila melanogaster]	2e-132
NP_610570.1	CAP, isoform I [Drosophila melanogaster] >gb|AAF58813.2| CAP, isoform I [Drosophila melanogaster] >gb|ACL87822.1| CAP-PE [synthetic construct]	6e-132
AAN71445.1	RE58362p [Drosophila melanogaster]	7e-132
NP_995795.1	CAP, isoform J [Drosophila melanogaster] >gb|AAS64879.1| CAP, isoform J [Drosophila melanogaster]	2e-131
NP_610572.1	CAP, isoform H [Drosophila melanogaster] >ref|NP_724912.1| CAP, isoform G [Drosophila melanogaster] >gb|AAL29113.1| LP11629p [Drosophila melanogaster] >gb|AAM68779.1| CAP, isoform G [Drosophila melanogaster] >gb|AAF58814.2| CAP, isoform H [Drosophila melanogaster] >gb|ACL90757.1| CAP-PE [synthetic construct]	3e-129
NP_001137637.1	CAP, isoform L [Drosophila melanogaster] >gb|ACL83091.1| CAP, isoform L [Drosophila melanogaster]	2e-124
ADB91437.1	SD16465p [Drosophila melanogaster]	4e-122
EFN89954.1	Sorbin and SH3 domain-containing protein 1 [Harpegnathos saltator]	1e-112
EFN64083.1	Sorbin and SH3 domain-containing protein 1 [Camponotus floridanus]	6e-110
XP_564508.3	AGAP007717-PA [Anopheles gambiae str. PEST] >gb|EAL41715.3| AGAP007717-PA [Anopheles gambiae str. PEST]	9e-102
NP_001163110.1	CAP, isoform R [Drosophila melanogaster] >dbj|BAB62018.1| DCAPL2 [Drosophila melanogaster] >gb|ACZ94385.1| CAP, isoform R [Drosophila melanogaster]	2e-98
XP_002068883.1	GK17791 [Drosophila willistoni] >gb|EDW79869.1| GK17791 [Drosophila willistoni]	3e-97
ABN12044.1	hypothetical protein [Maconellicoccus hirsutus]	8e-97
XP_001959269.1	GF12790 [Drosophila ananassae] >gb|EDV36091.1| GF12790 [Drosophila ananassae]	3e-96
NP_724913.2	CAP, isoform B [Drosophila melanogaster] >gb|AAM68780.2| CAP, isoform B [Drosophila melanogaster]	3e-96

Accession	Description	E value
XP_002089925.1	GE19353 [Drosophila yakuba] >gb|EDW89637.1| GE19353 [Drosophila yakuba]	7e-96
XP_002138468.1	GA24375 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura] >gb|EDY69026.1| GA24375 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	8e-96
XP_001969069.1	GG24159 [Drosophila erecta] >gb|EDV58128.1| GG24159 [Drosophila erecta]	2e-95
XP_002080888.1	GD10731 [Drosophila simulans] >gb|EDX06473.1| GD10731 [Drosophila simulans]	4e-95
XP_001987184.1	GH21781 [Drosophila grimshawi] >gb|EDW02051.1| GH21781 [Drosophila grimshawi]	8e-95
AAN71620.1	RH64582p [Drosophila melanogaster]	2e-94
XP_002050527.1	GJ22205 [Drosophila virilis] >gb|EDW61720.1| GJ22205 [Drosophila virilis]	2e-94
XP_002004951.1	GI19327 [Drosophila mojavensis] >gb|EDW08886.1| GI19327 [Drosophila mojavensis]	7e-94
XP_001663026.1	dcapl [Aedes aegypti] >gb|EAT34911.1| dcapl [Aedes aegypti]	2e-93
NP_724914.1	CAP, isoform D [Drosophila melanogaster] >gb|AAM68781.1| CAP, isoform D [Drosophila melanogaster]	4e-93
BAB62020.1	DCAPL4 [Drosophila melanogaster]	5e-93
XP_002033224.1	GM21208 [Drosophila sechellia] >gb|EDW47237.1| GM21208 [Drosophila sechellia]	7e-93
XP_001868598.1	dcapl [Culex quinquefasciatus] >gb|EDS27201.1| dcapl [Culex quinquefasciatus]	8e-93
XP_001848894.1	dcapl [Culex quinquefasciatus] >gb|EDS29237.1| dcapl [Culex quinquefasciatus]	1e-91
NP_724915.1	CAP, isoform E [Drosophila melanogaster] >ref|NP_001137639.1| CAP, isoform N [Drosophila melanogaster] >dbj|BAB62021.1| DCAPS [Drosophila melanogaster] >gb|AAM68782.1| CAP, isoform E [Drosophila melanogaster] >gb|ACL83093.1| CAP, isoform N [Drosophila melanogaster]	9e-84
EEZ97544.1	hypothetical protein TcasGA2_TC011394 [Tribolium castaneum]	1e-80
XP_002405563.1	hypothetical protein IscW_ISCW008643 [Ixodes scapularis] >gb|EEC12044.1| hypothetical protein IscW_ISCW008643 [Ixodes scapularis]	5e-65
EFN64084.1	hypothetical protein EAG_02344 [Camponotus floridanus]	2e-63
ADO32999.1	c-Cbl-associated protein [Biston betularia]	4e-63
XP_002596050.1	hypothetical protein BRAFLDRAFT_202929 [Branchiostoma floridae] >gb|EEN52062.1| hypothetical protein BRAFLDRAFT_202929 [Branchiostoma floridae]	5e-62
XP_001153937.1	PREDICTED: sorbin and SH3 domain containing 1 isoform 1 [Pan troglodytes]	3e-58
NP_001030128.1	sorbin and SH3 domain-containing protein 1 isoform 5 [Homo sapiens] >gb|AAK37565.1| sorbin and SH3 domain containing 1 [Homo sapiens]	4e-58
CAI14383.1	sorbin and SH3 domain containing 1 [Homo sapiens]	4e-58
CAE45892.1	hypothetical protein [Homo sapiens]	2e-56
XP_002731995.1	PREDICTED: Arg/Abl-interacting protein ArgBP2-like [Saccoglossus kowalevskii]	5e-56
NP_001030136.1	sorbin and SH3 domain-containing protein 1 isoform 5 [Mus musculus]	6e-56
AAM77354.1	c-Cbl associated protein CAP [Mus musculus]	7e-56
NP_001125065.1	sorbin and SH3 domain-containing protein 1 [Pongo abelii] >emb|CAH90184.1| hypothetical protein [Pongo abelii]	5e-54
CAG04709.1	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	8e-51
NP_001005762.1	vinexin [Rattus norvegicus] >gb|AAH83666.1| Sorbin and SH3 domain containing 3 [Rattus norvegicus] >gb|EDM02209.1| sorbin and SH3 domain containing 3, isoform CRA_b [Rattus norvegicus]	1e-49
EDM02208.1	sorbin and SH3 domain containing 3, isoform CRA_a [Rattus norvegicus]	2e-49
Q62417.2	RecName: Full=Sorbin and SH3 domain-containing protein 1; AltName: Full=Ponsin; AltName: Full=SH3 domain protein 5; AltName: Full=SH3P12; AltName: Full=c-Cbl-associated protein; Short=CAP	2e-49
BAC65769.2	mKIAA1296 protein [Mus musculus]	2e-49
EDL41835.1	sorbin and SH3 domain containing 1, isoform CRA_c [Mus musculus]	2e-49
XP_002914819.1	PREDICTED: vinexin-like [Ailuropoda melanoleuca]	3e-49
XP_001492014.2	PREDICTED: similar to sorbin and SH3 domain containing 3 [Equus caballus]	3e-49
XP_002004952.1	GI19326 [Drosophila mojavensis] >gb|EDW08887.1| GI19326 [Drosophila mojavensis]	4e-49
EAW63676.1	sorbin and SH3 domain containing 3, isoform CRA_d [Homo sapiens]	4e-49
XP_002818929.1	PREDICTED: vinexin-like [Pongo abelii]	6e-49
O60504.1	RecName: Full=Vinexin; AltName: Full=SH3-containing adapter molecule 1; Short=SCAM-1; AltName: Full=Sorbin and SH3 domain-containing protein 3	7e-49

Accession	Description	E value
	>gb|AAC09244.1| SH3-containing adaptor molecule-1 [Homo sapiens] >gb|AAH91514.1| Sorbin and SH3 domain containing 3 [Homo sapiens] >gb|EAW63675.1| sorbin and SH3 domain containing 3, isoform CRA_c [Homo sapiens] >gb|AAH67260.2| Sorbin and SH3 domain containing 3 [Homo sapiens] >dbj|BAI45882.1| sorbin and SH3 domain containing 3 [synthetic construct]	
NP_005766.3	vinexin isoform 1 [Homo sapiens]	1e-48
XP_002805327.1	PREDICTED: vinexin isoform 2 [Macaca mulatta]	1e-48
XP_001156497.1	PREDICTED: vinexin beta (SH3-containing adaptor molecule-1) isoform 1 [Pan troglodytes]	2e-48
XP_540021.2	PREDICTED: similar to Arg/Abl-interacting protein 2 isoform 2 isoform 2 [Canis familiaris]	2e-48
XP_001106790.2	PREDICTED: vinexin isoform 1 [Macaca mulatta]	2e-48
XP_528084.2	PREDICTED: vinexin beta (SH3-containing adaptor molecule-1) isoform 2 [Pan troglodytes]	3e-48
AAD32304.1	vinexin beta [Homo sapiens]	4e-48
NP_001018003.1	vinexin isoform 2 [Homo sapiens] >gb|AAH10146.1| Sorbin and SH3 domain containing 3 [Homo sapiens]	5e-48
XP_002756894.1	PREDICTED: vinexin [Callithrix jacchus]	5e-48
XP_534577.2	PREDICTED: similar to SH3 domain protein 4 [Canis familiaris]	5e-48
BAG62776.1	unnamed protein product [Homo sapiens]	6e-48
EAW63674.1	sorbin and SH3 domain containing 3, isoform CRA_b [Homo sapiens]	8e-48
BAE91197.1	unnamed protein product [Macaca fascicularis]	8e-48
XP_002745214.1	PREDICTED: sorbin and SH3 domain-containing protein 2 isoform 1 [Callithrix jacchus]	9e-48
CAL38050.1	hypothetical protein [synthetic construct]	9e-48
XP_001164522.1	PREDICTED: sorbin and SH3 domain containing 2 isoform 13 [Pan troglodytes] >ref|XP_001164718.1| PREDICTED: sorbin and SH3 domain containing 2 isoform 18 [Pan troglodytes] >ref|XP_001164759.1| PREDICTED: sorbin and SH3 domain containing 2 isoform 19 [Pan troglodytes] >ref|XP_001164797.1| PREDICTED: sorbin and SH3 domain containing 2 isoform 20 [Pan troglodytes] >ref|XP_001164834.1| PREDICTED: sorbin and SH3 domain containing 2 isoform 21 [Pan troglodytes] >ref|XP_001164942.1| PREDICTED: sorbin and SH3 domain containing 2 isoform 24 [Pan troglodytes] >ref|XP_001165395.1| PREDICTED: sorbin and SH3 domain containing 2 isoform 37 [Pan troglodytes]	9e-48
XP_001087467.1	PREDICTED: sorbin and SH3 domain-containing protein 2 isoform 6 [Macaca mulatta]	9e-48
AAI48111.1	SORBS3 protein [Bos taurus]	1e-47
XP_001164409.1	PREDICTED: sorbin and SH3 domain containing 2 isoform 11 [Pan troglodytes] >ref|XP_001164486.1| PREDICTED: sorbin and SH3 domain containing 2 isoform 12 [Pan troglodytes] >ref|XP_001164562.1| PREDICTED: sorbin and SH3 domain containing 2 isoform 14 [Pan troglodytes] >ref|XP_001164641.1| PREDICTED: sorbin and SH3 domain containing 2 isoform 16 [Pan troglodytes]	1e-47
XP_517563.2	PREDICTED: sorbin and SH3 domain containing 2 isoform 38 [Pan troglodytes] >ref|XP_001165183.1| PREDICTED: sorbin and SH3 domain containing 2 isoform 31 [Pan troglodytes]	1e-47
XP_001087237.1	PREDICTED: sorbin and SH3 domain-containing protein 2 isoform 4 [Macaca mulatta]	1e-47
XP_001087587.2	PREDICTED: sorbin and SH3 domain-containing protein 2 isoform 7 [Macaca mulatta]	1e-47
NP_001039450.1	vinexin [Bos taurus] >gb|AAI14103.1| Sorbin and SH3 domain containing 3 [Bos taurus] >gb|DAA26729.1| sorbin and SH3 domain containing 3 [Bos taurus]	1e-47
NP_001139145.1	sorbin and SH3 domain-containing protein 2 isoform 6 [Homo sapiens]	2e-47
CAL38582.1	hypothetical protein [synthetic construct]	2e-47
XP_001164868.1	PREDICTED: sorbin and SH3 domain containing 2 isoform 22 [Pan troglodytes]	2e-47
CAL38068.1	hypothetical protein [synthetic construct]	2e-47
NP_001139146.1	sorbin and SH3 domain-containing protein 2 isoform 7 [Homo sapiens] >dbj|BAH12362.1| unnamed protein product [Homo sapiens]	2e-47
XP_002745215.1	PREDICTED: sorbin and SH3 domain-containing protein 2 isoform 2 [Callithrix jacchus]	2e-47

ref|NP_001166801.1| c-Cbl-associated protein isoform A [Bombyx mori]
gb|ACV52545.1| CAP isoform A [Bombyx mori]
Length=1011

GENE ID: 100307004 CAP c-Cbl-associated protein [Bombyx mori]
Score = 2071 bits (5366), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 1011/1011 (100%), Positives = 1011/1011 (100%), Gaps = 0/1011 (0%)

ref|XP_001605377.1| PREDICTED: similar to DCAPL3 [Nasonia vitripennis]
Length=2978
GENE ID: 100121771 LOC100121771 | similar to DCAPL3 [Nasonia vitripennis]
Score = 664 bits (1712), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 416/902 (47%), Positives = 539/902 (60%), Gaps = 140/902 (15%)

ref|NP_001159613.1| c-Cbl-associated protein isoform B [Bombyx mori]
gb|ACV52546.1| CAP isoform B [Bombyx mori]
Length=323
GENE ID: 100307004 CAP | c-Cbl-associated protein [Bombyx mori]
Score = 662 bits (1707), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 316/318 (99%), Positives = 317/318 (99%), Gaps = 0/318 (0%)

ref|XP_393153.3| PREDICTED: similar to CAP CG18408-PC, isoform C [Apis mellifera]
Length=1201
GENE ID: 409655 LOC409655 | similar to CAP CG18408-PC, isoform C
[Apis mellifera]
Score = 649 bits (1673), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 405/895 (46%), Positives = 526/895 (59%), Gaps = 158/895 (17%)

ref|XP_001687850.1| AGAP007717-PB [Anopheles gambiae str. PEST]
gb|EDO64499.1| AGAP007717-PB [Anopheles gambiae str. PEST]
Length=850

GENE ID: 1269515 AgaP_AGAP007717 | AGAP007717-PB [Anopheles gambiae str. PEST](10 or
fewer PubMed links)
Score = 597 bits (1538), Expect = 4e-168, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 385/942 (41%), Positives = 512/942 (55%), Gaps = 188/942 (19%)

ref|XP_970771.2| PREDICTED: similar to DCAPL3 [Tribolium castaneum]
Length=1473
GENE ID: 659365 LOC659365 | similar to DCAPL3 [Tribolium castaneum]
Score = 593 bits (1530), Expect = 4e-167, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 397/886 (45%), Positives = 492/886 (56%), Gaps = 205/886 (23%)

ref|XP_001687851.1| AGAP007717-PC [Anopheles gambiae str. PEST]
gb|EDO64500.1| AGAP007717-PC [Anopheles gambiae str. PEST]
Length=839
GENE ID: 1269515 AgaP_AGAP007717 | AGAP007717-PB [Anopheles gambiae str. PEST]
Score = 563 bits (1451), Expect = 5e-158, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 374/942 (40%), Positives = 500/942 (54%), Gaps = 199/942 (21%)
dbj|BAB62019.1| DCAPL3 [Drosophila melanogaster]
Length=824
Score = 549 bits (1415), Expect = 7e-154, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 389/904 (44%), Positives = 514/904 (57%), Gaps = 136/904 (15%)

ref|NP_724910.1| CAP, isoform C [Drosophila melanogaster]
gb|AAM68778.1| CAP, isoform C [Drosophila melanogaster]
gb|AAO24972.1| RE10170p [Drosophila melanogaster]
Length=824
GENE ID: 36084 CAP | CG18408 gene product from transcript CG18408-RI
[Drosophila melanogaster]
Score = 549 bits (1414), Expect = 9e-154, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 389/904 (44%), Positives = 514/904 (57%), Gaps = 136/904 (15%)

ref|NP_724911.1| CAP, isoform F [Drosophila melanogaster]
gb|AAF58815.2| CAP, isoform F [Drosophila melanogaster]
Length=811
GENE ID: 36084 CAP | CG18408 gene product from transcript CG18408-RI [Drosophila
melanogaster]

Score = 545 bits (1404), Expect = 1e-152, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 387/898 (44%), Positives = 511/898 (57%), Gaps = 136/898 (15%)
ref|NP_001137636.1| CAP, isoform K [Drosophila melanogaster]
ref|NP_001137640.1| CAP, isoform O [Drosophila melanogaster]
gb|AAO39438.1| SD03761p [Drosophila melanogaster]
gb|ACL83090.1| CAP, isoform K [Drosophila melanogaster]
gb|ACL83094.1| CAP, isoform O [Drosophila melanogaster]
Length=630
GENE ID: 36084 CAP | CG18408 gene product from transcript CG18408-RI
[Drosophila melanogaster]
Score = 538 bits (1385), Expect = 2e-150, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 328/694 (48%), Positives = 421/694 (61%), Gaps = 108/694 (15%)

ref|XP_002425805.1| dcapl, putative [Pediculus humanus corporis]
gb|EEB13067.1| dcapl, putative [Pediculus humanus corporis]
Length=784
GENE ID: 8237765 Phum_PHUM221180 | dcapl, putative [Pediculus humanus corporis]
Score = 499 bits (1286), Expect = 6e-139, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 333/842 (40%), Positives = 458/842 (55%), Gaps = 138/842 (16%)

ref|NP_001137638.2| CAP, isoform Q [Drosophila melanogaster]
gb|ACL83092.2| CAP, isoform Q [Drosophila melanogaster]
Length=2412
GENE ID: 36084 CAP | CG18408 gene product from transcript CG18408-RI
[Drosophila melanogaster]
Score = 485 bits (1248), Expect = 2e-134, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 285/606 (48%), Positives = 364/606 (61%), Gaps = 115/606 (18%)

ref|NP_610571.2| CAP, isoform A [Drosophila melanogaster]
gb|AAF58816.2| CAP, isoform A [Drosophila melanogaster]
Length=2376
GENE ID: 36084 CAP | CG18408 gene product from transcript CG18408-RI
[Drosophila melanogaster] (Over 10 PubMed links)
Score = 484 bits (1246), Expect = 3e-134, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 288/611 (48%), Positives = 370/611 (61%), Gaps = 92/611 (15%)

ref|NP_610570.1| CAP, isoform I [Drosophila melanogaster]
gb|AAF58813.2| CAP, isoform I [Drosophila melanogaster]
gb|ACL87822.1| CAP-PE [synthetic construct]
Length=639
GENE ID: 36084 CAP | CG18408 gene product from transcript CG18408-RI
[Drosophila melanogaster]
Score = 476 bits (1226), Expect = 6e-132, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 286/611 (47%), Positives = 369/611 (61%), Gaps = 92/611 (15%)

gb|AAN71445.1| RE58362p [Drosophila melanogaster]
Length=647
Score = 476 bits (1225), Expect = 7e-132, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 286/611 (47%), Positives = 369/611 (61%), Gaps = 92/611 (15%)

ref|NP_995795.1| CAP, isoform J [Drosophila melanogaster]
gb|AAS64879.1| CAP, isoform J [Drosophila melanogaster]
Length=565
GENE ID: 36084 CAP | CG18408 gene product from transcript CG18408-RI
[Drosophila melanogaster]
Score = 475 bits (1222), Expect = 2e-131, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 286/611 (47%), Positives = 369/611 (61%), Gaps = 92/611 (15%)

ref|NP_610572.1| CAP, isoform H [Drosophila melanogaster]
ref|NP_724912.1| CAP, isoform G [Drosophila melanogaster]
gb|AAL29113.1| LP11629p [Drosophila melanogaster]
gb|AAM68779.1| CAP, isoform G [Drosophila melanogaster]
gb|AAF58814.2| CAP, isoform H [Drosophila melanogaster]

gb|ACL90757.1| CAP-PE [synthetic construct]
Length=500
GENE ID: 36084 CAP | CG18408 gene product from transcript CG18408-RI
[Drosophila melanogaster]
Score = 468 bits (1203), Expect = 3e-129, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 264/543 (49%), Positives = 340/543 (63%), Gaps = 71/543 (13%)

ref|NP_001137637.1| CAP, isoform L [Drosophila melanogaster]
gb|ACL83091.1| CAP, isoform L [Drosophila melanogaster]
Length=2365
GENE ID: 36084 CAP | CG18408 gene product from transcript CG18408-RI
[Drosophila melanogaster]
Score = 451 bits (1161), Expect = 2e-124, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 280/611 (46%), Positives = 359/611 (59%), Gaps = 103/611 (16%)

ref|XP_001663026.1| dcapl [Aedes aegypti]
gb|EAT34911.1| dcapl [Aedes aegypti]
Length=339
GENE ID: 5576943 AaeL_AAEL012888 | dcapl [Aedes aegypti]
Score = 348 bits (894), Expect = 2e-93, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 183/382 (48%), Positives = 243/382 (64%), Gaps = 62/382 (16%)

ref|XP_001153937.1| PREDICTED: sorbin and SH3 domain containing 1 isoform 1 [Pan
troglodytes]
Length=905
GENE ID: 450628 SORBS1 | sorbin and SH3 domain containing 1 [Pan troglodytes]
Score = 231 bits (590), Expect = 3e-58, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 175/558 (32%), Positives = 260/558 (47%), Gaps = 113/558 (20%)

ref|NP_001030128.1| sorbin and SH3 domain-containing protein 1 isoform 5 [Homo
sapiens]
gb|AAK37565.1| sorbin and SH3 domain containing 1 [Homo sapiens]
Length=905
GENE ID: 10580 SORBS1 | sorbin and SH3 domain containing 1 [Homo sapiens]
Score = 231 bits (590), Expect = 4e-58, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 173/558 (32%), Positives = 258/558 (47%), Gaps = 113/558 (20%)

emb|CAI14383.1| sorbin and SH3 domain containing 1 [Homo sapiens]
Length=905
GENE ID: 10580 SORBS1 | sorbin and SH3 domain containing 1 [Homo sapiens]
Score = 231 bits (590), Expect = 4e-58, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 173/558 (32%), Positives = 258/558 (47%), Gaps = 113/558 (20%)
Score = 38.9 bits (89), Expect = 3.8, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 21/67 (32%), Positives = 32/67 (48%), Gaps = 3/67 (4%)

ref|NP_001030136.1| sorbin and SH3 domain-containing protein 1 isoform 5 [Mus
musculus]
Length=740
GENE ID: 20411 Sorbs1 | sorbin and SH3 domain containing 1 [Mus musculus]
Score = 224 bits (571), Expect = 6e-56, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 236/836 (29%), Positives = 340/836 (41%), Gaps = 211/836 (25%)

gb|AAM77354.1|AF521593_1 c-Cbl associated protein CAP [Mus musculus]
Length=740
GENE ID: 20411 Sorbs1 | sorbin and SH3 domain containing 1 [Mus musculus]
Score = 224 bits (570), Expect = 7e-56, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 238/841 (29%), Positives = 339/841 (41%), Gaps = 221/841 (26%)

ref|NP_001125065.1| sorbin and SH3 domain-containing protein 1 [Pongo abelii]
emb|CAH90184.1| hypothetical protein [Pongo abelii]
Length=749
GENE ID: 100171946 SORBS1 | sorbin and SH3 domain containing 1 [Pongo abelii]

Score = 218 bits (554), Expect = 5e-54, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 208/763 (28%), Positives = 308/763 (41%), Gaps = 201/763 (26%)

ref|NP_001005762.1| vinexin [Rattus norvegicus]
gb|AAH83666.1| Sorbin and SH3 domain containing 3 [Rattus norvegicus]
gb|EDM02209.1| sorbin and SH3 domain containing 3, isoform CRA_b [Rattus norvegicus]
Length=733
GENE ID: 282843 Sorbs3 | sorbin and SH3 domain containing 3 [Rattus norvegicus]
Score = 203 bits (516), Expect = 1e-49, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 125/309 (41%), Positives = 173/309 (56%), Gaps = 36/309 (11%)

sp|Q62417.2|SRBS1_MOUSE RecName: Full=Sorbin and SH3 domain-containing protein 1;
AltName:
Full=Ponsin; AltName: Full=SH3 domain protein 5; AltName:
Full=SH3P12; AltName: Full=c-Cbl-associated protein; Short=CAP
Length=1290
GENE ID: 20411 Sorbs1 | sorbin and SH3 domain containing 1 [Mus musculus]
Score = 202 bits (514), Expect = 2e-49, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 128/406 (32%), Positives = 192/406 (48%), Gaps = 99/406 (24%)

gb|EAW63676.1| sorbin and SH3 domain containing 3, isoform CRA_d [Homo sapiens]
Length=725
GENE ID: 10174 SORBS3 | sorbin and SH3 domain containing 3 [Homo sapiens]
Score = 201 bits (512), Expect = 4e-49, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 118/304 (39%), Positives = 172/304 (57%), Gaps = 25/304 (8%)

sp|O60504.1|VINEX_HUMAN RecName: Full=Vinexin; AltName: Full=SH3-containing adapter
molecule
1; Short=SCAM-1; AltName: Full=Sorbin and SH3 domain-containing
protein 3
gb|AAC09244.1| SH3-containing adaptor molecule-1 [Homo sapiens]
gb|AAH91514.1| Sorbin and SH3 domain containing 3 [Homo sapiens]
gb|EAW63675.1| sorbin and SH3 domain containing 3, isoform CRA_c [Homo sapiens]
gb|AAH67260.2| Sorbin and SH3 domain containing 3 [Homo sapiens]
dbj|BAI45882.1| sorbin and SH3 domain containing 3 [synthetic construct]
Length=671

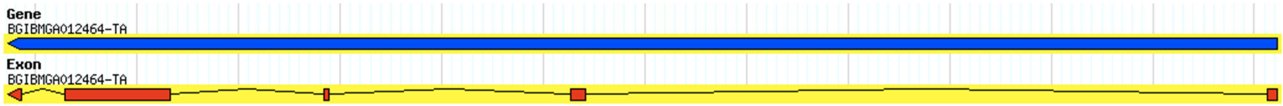
GENE ID: 10174 SORBS3 | sorbin and SH3 domain containing 3 [Homo sapiens]
Score = 201 bits (510), Expect = 7e-49, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 118/304 (39%), Positives = 172/304 (57%), Gaps = 25/304 (8%)

ref|NP_005766.3| vinexin isoform 1 [Homo sapiens]
Length=671
GENE ID: 10174 SORBS3 | sorbin and SH3 domain containing 3 [Homo sapiens]
Score = 200 bits (508), Expect = 1e-48, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 118/304 (39%), Positives = 172/304 (57%), Gaps = 25/304 (8%)

ref|XP_002805327.1| PREDICTED: vinexin isoform 2 [Macaca mulatta]
Length=725
GENE ID: 716198 SORBS3 sorbin and SH3 domain containing 3 [Macaca mulatta]
Score = 199 bits (507), Expect = 1e-48, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 125/304 (42%), Positives = 176/304 (58%), Gaps = 25/304 (8%)

ref|XP_001156497.1| PREDICTED: vinexin beta (SH3-containing adaptor molecule-1)
isoform 1 [Pan troglodytes]
Length=725
GENE ID: 472712 SORBS3 | sorbin and SH3 domain containing 3 [Pan troglodytes]
Score = 199 bits (506), Expect = 2e-48, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 117/306 (39%), Positives = 174/306 (57%), Gaps = 29/306 (9%)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI: Σχηματική αναπαράσταση του προβλεπόμενου γονιδίου με μπλε παχιά γραμμή όπου το βέλος δείχνει τη φορά μεταγραφής του γονιδίου, με κόκκινα παχιά πλαίσια τα προβλεπόμενα εξόνια. Έπειτα παρατίθεται η ιστοσελίδα πρόβλεψης της κατανομής εξονίων/εσωνίων, όπως βρέθηκε από την βάση δεδομένων SilkDB (http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase/gbrowse_details/scaffold_2?name=BGIBMGA012464). Ο πίνακας που παρατίθεται δίνει στοιχεία για το προβλεπόμενο γονίδιο, οι θέσεις των προβλεπόμενων εξονίων Η νουκλεοτιδική αλληλουχία που παρατίθεται αντιστοιχεί στη γενωμική αλληλουχία Με κίτρινο πλαίσιο σημαίνονται τα εξόνια, η αλληλουχία των οποίων αντιστοιχεί στην 5' αλληλουχία του BmSH3-A1. Με γκρι πλαίσιο σημαίνονται τα προβλεπόμενα εξόνια, ενώ με έντονους χαρακτήρες σημαίνεται το ATG.



BGIBMGA012464 Details

Name: BGIBMGA012464
Type: mRNA
Description:
CHINA_GENE_MODEL
Bm_scaf56:1416879..1429465 (- strand)
Length: 12587
0.95513
IPR001478|PDZ/DHR/GLGF
data_type:gene
local_id:BGIBMGA012464

Parts:

Type: CDS
Description:
Source: CHINA_GENE_MODEL
Position: Bm_scaf56:1416879..1417012 (-strand)
Length: 134
parent_id: BGIBMGA012464

Type: CDS
Description:
Source: CHINA_GENE_MODEL
Position: Bm_scaf56:1417443..1418480 (-strand)
Length: 1038
parent_id: BGIBMGA012464

Type: CDS
Description:
Source: CHINA_GENE_MODEL
Position: Bm_scaf56:1419987..1420042 (-strand)
Length: 56
parent_id: BGIBMGA012464

Type: CDS
Description:
Source: CHINA_GENE_MODEL
Position: Bm_scaf56:1422415..1422566 (-strand)
Length: 152
parent_id: BGIBMGA012464

Type: CDS
Description:
Source: CHINA_GENE_MODEL
Position: Bm_scaf56:1429370..1429465 (-strand)
Length: 96
parent_id: BGIBMGA012464

>BGIBMGA012464 class=Sequence position=Bm_scaf56:1416879..1429465 (- strand)
ATGACTGCGA AGGAAGTGGA ACTGACAGGT GGCGTACCCT GGGGATTTCG TATGCACGGC GGAAATGACC AGAACCAGCC

GCTTAGAATA TCACGGGTTA GTAAATTAAA GTTAATTTAA TATTATATTT TCTTAGGCGT TCGCGAGTGG TAGACAGAAT
TAAAAAAAAT ATTTTATTTA TTTTTTTATT TATTGGTTAG ATGGATGGAC GAGCTCACAG CCCACCTAAT GTTAAGTGGT
TACTGGAGCC CATAGACATC TACAACGTAA ATGCGCCACC CATCTTGAGA TATAAGTTCT AAGGGCTCAG TATAGTTACA
ATTACGGTTT AATCTTGGCT TTTTTACGGT CATTATATTA TTTTTAATGT TTCGGATACT TTGTAGTTTT CGTAATATGT
ATATGATATG GATAGCAAAT ATGGATATGA AAGCTAATAT AATATAAAAT ATTATTTTGT GAACGAATGT GGTTACCGTC
AACAAATATA ATTATTAATA ATTAATATAG TCTGCAATCA TGTATACATT CTACGATATA CAGAATTCGA TTTCAAATTA
TATTCTAATT AAAATAACAA AATTCAGCAT CAGAATGTGA CTTGTTAATT ATAAAAGAGT TTCTAGTAGT TGAGAACCCT
ATTAGCTCAG AAAGAAAAGT AATTTCCTTG AATTCCTTAG GGGTGTAGTG TCAGATTACG CAATTAAATG CCGCTATAAA
TGAAAGAACG AAACAATTCG TTTCGCTCTT TGTTGGTGGA CAATTGTACA ATTTGTCAAG AGTACTGTAC CGATTATTGT
GGCGGTGAGG TGTGAAATGT TCCATAGAGA TTTACTGAAA CAGATTCATT AAAATTTCTA TGATTTTTGA AAGATTTCAT
AGTTACATCC ACTTAAGCTT TTACAATTGA ATGTAGGTTA TGTCGGTAAT TGTCATTATA GAATTACAAT TTTTCGTAAT
GCTTCTGACT GAGATATGAA TAAGATTACC ATAAATTGTG TTTACTGAAC AAACAACAAT CAATCATTAA AAAAATGAGA
CTCCTTTTCG TTAATAAAAC CAGTGACGTT TTCCTCATCT TTATACACAT AACTACCGCA GGTAATCAAT CAGGATTTTT
AAGACAAGAT TAATTTCACT GTTATCATTT CTGTAGTTTA TTACTGAATT ATAGAATTAA AAGTTTTGAA AATGGTATCA
TAAAATATAT AATAGAAAGT GATTAGATTT TAAAGAGCAA GAAAAAATAT TCTCGAATTT TTTTTATAGG TGTCTTTGTT
AGAGATTTTT ACGGCACCAT CCTCAAATAG CGAAAGCTGT CGGCGACAGT GAGGTAAAGC CCTTGTTTAA TGTAACAAGA
TACTGCGATC GCTTCCCTCA GGTTAAGGAT TATTATTTGA TACTTCAATA AGGATTGAAG AGAGCAAATT AAGCGGCCCT
ATCTTGTTTC TTTTAACCTG TCAACAAACT TTACTAGCTG CCGAGATCAA AGCTAAAAAC TACCGTTTTT TTTACCTATT
ATTACCAACT TCACCAATTA TGGTACACAA TGTGACTCCG TAATTCTACT TACAATATTT GGCTAATGTA TGAATGCACC
AACAACTACA ATATGATAAT GTTACGCGCT GTGGTTCGGG ATAAATAAAA TTCCACCGAA GTATAAATTA AAACTATATT
TATCACCTAG AACCGTGATC CGCTTACTGC CTAGCTTCGA GTAGTTTCGA TTACTGACTG ACCGCGTATT TTTTTTTTTT
ATTATGATTG GAAATTTACT GGTGGCCCGA AGGCCTTTCC AGTTTCACCA GGACAGGTGG GCGAGCAAAG GCTCAGCCAA
GAGGGGTGGG ATTGCTAACA ACTGCCCGAG CGCCTCCGAA GGAGACCTAA CAACTCAAGA GCAATTGTTT CGCGAATGAA
TCTACTACCG GATCGGAATC GCGACCCGCT GAGGAGATCC AGCGAGAAAC TCAGCGGGCT GATGCATGGG TTAGGTTGCA
CGTCGACCTC TTTGTCGAGT TCGACGAGTA CGGTTACCGG GGTCCCTAAG CCTGCCCCTA GTAATAGAGC TGAAGGCGTC
TAATGCAAAG GTTATTGGAT CTGATGGATC CGTAAGGACG TGTCTAGGGC GTCGACGGTG ACTGGCTCCT GCATGATCAG
GATTCGNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN
NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNAGGA CGTAGGTCTT TGATCAAGTC TTTAACTTCT ATCGGGGTGA CGGGTGGTAA
CGCATCCGAT GGTGGCAAGG AGGCTCTGCG TTCTACCTCA CTGTCTACTA ATTCTACATG AACAGGGTCC ACGGATTGAG
TGCTGGGCGT GCACTGGGTT TGCAATGTAT CGACCAGCAG CTCTGCTTTT TCGTCATCAT CGAACGCCGC GAGTCGGCCT
GAGGGGCCTA CGAGGGGGGG CATAGTTACT ACCGTATCCG ATTTGAGAGT ACGAGCTAAG CGGTAGTAAG ACCTTTGGGA
GGGCGCGAGT CCTTCTAAGA AATCAGACCA TCTGGCATCT CGGACTTCGG CGATGCGAGA CTTTACGTCG CGTTGTAGGG
CACGCATTCG AATACGATGA CTGACCGCGT GCCATCTCTG CAACGTTTTT ATAGTCAAGA CGAAATCCCC AGAATCGTCG
AGAATATTCC ACTAAAGTCG AGTATTGTGT GTTTCCACTA TCTGACAATA GATGGCGTTG TACTTCTCGA GCGTTCTAGA
TGCTACTAGA ACCTTCGAAT TCGTTCGACT ATTCGCCGAT AGATGGGGTT ACTTTGACCG TCGTAACAAT AATAATATCA
ATATGGTAAT ATAATAATGA TAGGAGACAT CATCTAATGT TATTTGAGTG TGAATACAAT GTTACTTGTG ATTTTATCGA
GCACAGTTTC CTGACACCTT CAATAAGGTT GATACCAGTG TCTTATTTTA AGTTCCCACG GTCAGACACT TAAGCCATAA
AAAGTTCTTC ACTTGATATG TTTTAACACT TATTTATTAT GTTACATGGG TCGAAATCAC AGGTACACAA AAACGACCTG
CAAGCTATGT GACGTCGAAA TCACGTAGAG GGTTGAAAGT CAGGGCCACA TGCGTCATTA CGCTGATATT GTGAGGGTTG
ATGGTGCTTT GTCGTTCGCT CGGGCGTAAA TTATCCCGCA CGTTCAACAA TTACAAGCGC TCTTTAGAAA ATCGTCATGT
AATTGCAGAA ATATAGGTGT GCGTTGTACG TATTGTAAAA TTCCGAACCA GTATTATTAT TATTAATGAT CTATGTACGC
GGAATTTATC ATCAGAACAT TTTGTCGTAT TAAAATGTGT TAACTGTGTT CATAAAAGCT TATGAGAAAC GCCCATGGTA
AAATTTTAAG TGGCATATCT ATAAGGCTTT TTAGTGTATA AAATGAAAAA TTAGCCAATT CTCTTAAACA TTGCCCAAAA
GGCAGGCGAG CTTTTAGTTT ACATAACTGT AAGTAATTGG TTACCGTTAC CTTATGAACA TGAGTATTGT CAGGGCTCAG
CCAAGACGTT CCGAAAAGAA CCAGGTAAAT AATAGGATCA CCTTTGAAAC GCATTCTAAG TGGACACCGT TCTTTTGGTA
GTGGGTATAA ACTCTGCTCC TCGGGCTGAT GGACTGATGC TAAAAAACGG GGTATTTTCA AACAATTCCG TCTCAAATAA
TAAATCAATA AGTTGATAAT AAACTTAATA TTTTGGTCTG CTTAATTTTT TGTACAGATG ATCGAAGAAA ATGAATATTA
TATAAAAATA AGAAACGAAT GTTGTTTATA AGTCGTATTT TTTTGATTAA GCTTATTGTC TTGGATACAT GCAACGTCTC
TAACTAAAAT GGATAAATTG GGAATATAAC TCCAGTACAT AGATATAGAA TTTGATCGTT GAGGCGACGC ACGTCGTTGT
CACGCGGCCT ACGTGTTCGG AATGTAAACC TAGTCGTTGT CATATCCAGA TTATGTAGAG CCACTCTTCT CCGACAATTC
ACACAGTTAT CTACTCTTGA ATTCGTCAGT AAATAAAAGA TAGTTCTTAT TAAATTGGTA CTGTTTCAAA CCTTCTCACA
GTGAAACATA CCCCTTGAGT TTTAAATGTT TATTAGTCGT CGTGGTATCG ATTAATCTGT CATTTTGTGA TACTTTGAGA
TAACAAACTA AATTAAACTA ACTAAACTTA ACTTTGTTAA GATTGTACGG TATGCTTTGG AGTTTGATGG CATTTAATAA
CATATAAATT ATTCACGGTT TTATGTTAAA TGATTTAAAA TCCTATAGAG TTGTTCTGAA GAACTTTTAA TTGCATAAAG
ATGTCTAGTG AATGCGGCAC CACTTTATTG AATTGCGCTA ATAAGATTCT CACAACTTGT GCTTTTAATT ACAACATCTC
AAACGATGAG ACACTTGCAT TATTTAATAA TTTCACTTAA TTTTGTTATA TTTCAGATTG AATATTCATT GATTAAACAT
TAATAGTATT TTTCTGCTTG GCGAAAACAA AGTATCTGAC ACAAACTGAG ACAATTATAT GTAAGACATA AACAAAACTT
ATTTTTCCCT AATGTAATGG TGATATTCGA TATATTAACT GAAATTATTG TTCCTTAAAT TATACGTCAA TCAGAAATAA
AGCTAGTTTT GAAAGAAAAC AGGAAAAAAA ATAGCTCGTA GCGCGAAAAT TTTAAATGCC ACAAAACGAA CCTGACTTAA
AAAATGTGAC GTAAAAACAT TTGTTTCCAA TATAATTTAT AAATTAGGAA TAGTAGAGTA AATAGAATTT GGCAAATATT
GTAACATAGT TCGACGAAAT ATAAATATTG TTACGCGCTG GGATTCGGAA TAAATAAATC TTCCACCGAA GTACAAATTA
AAACTCTACG AGTATATATC ACTTAGAGCA CCTAAGGAAC ACTTTAAAAT TCTCAATTCA CTTCTTTCGC TTCGCTTCAG
GTGGTCCGTT CGCTGTTTCG CTTCGAGTAG ATCCGATTAC TAACTGCTTT CGTGTCATCT CTGCAACGCT TTTATAGTCG
ATACGATAAC TCTACAATTA TCGAGAACAT TCCTGACAGG TCGAGTAGTT TCGATATGTA TTTCCGCTAT TTAATAATAG
ATGGCGATGT ACTTCTCGAA CGTTCTCGAT TTTACTAGTT GTTTTTATAT TTGTTTCTGA TATTCGACGA TAGATGGCGC
TACTCTTACC GGCGTAGCTA GCTGACCTGA AGCTATTGCA ATTCAAAAAA ATACCTTAAC TATGATAGAG AAGATGTTTA
GCGCTTATCT AAAAACTGAG ATCCTCTTAT CGAGAAGATG ATACAGAATA TCAGGCCCGA AGATACCTTT AGTTCTTTTT
GTATGTTAAG AAAGGTAAAA TTGACGTCAA TATACAATAT TCAAATGTTG ATGAATAGCA ATGATGAATA ATAAATATCT
TGGTCGTGCA TGACTACATC CAATAATATA AAATCTAAGC TATAAAAATT TGCAATACTG AAAAGTATTC GAAATATCCG
AAATAATAAA ATCAAAATAT TAAGCACAAT ATTAAATATT AAAATAGCCA TTGCTTGCGT TCTCTACATT CGAGAAAGCT
TTCACAAATT GTGGATATTT ATTTATGTAA TGCACTTAGC TCAGATCTAC ATGAAATTAA AAGTAGGTAC ATAATATTTA
CAATATAAGT TATCATCTCT AAATTAGGTA ATTAGAATTT ATTCTAATAT TAATCTTGAG CGATTTGCAT ACAATATACA

AGTTCATCGT CCTAATAGCG ACATGGACGT TCCGAAGAGC ACGCGCGCAC GACTTGAATC GAACGATACC CTGACTTACC
TTCGACAAGA TTAATATTCG AGGCGTGTGG TGGACCCCGA CAATGTGTGC GTCCCTCACG GCGCATGCAT TTTCGAATAA
TACCCATATA ATGTTTCGAT GAAATTGGCT ATTGTAACGC GCCTATCTCT TTAGTATAAC TTACGACTTT CTTGAGGCTA
CCGGCTGATG CTTCATAGGA ATCGTAGCGA GCACGTTAAC TGAAAAACAA ATTGTATCGT ACGGTGATTT TTTGTGTTTA
GTGCCTTTTA CGTTATTGAC TTTTTATAAA TAATAATAAT ATTAACGATG CAATCTGTGC TCTTGGTATT TTGAGTGCGA
TATAACATTA AAATAATTAC AATGACCTTT CCCAACGCCT AGTGGTGTGC GTGTACATTG AGGGTATGTG GTATCGAGGG
TGGTTCATTA CAGAGTGAAC ATGTTGAAAT TTTGCTCACC AGCGACTCGG CGACGGGAAA CAAATGTGGT CTGTGCTTAG
GCAGCTTTAT TTTCGAAAAT AACAAAAAAT ATATCTAAAC TGATGTAACA TTTTACTTTA TTTCTTTACT TAGAATTATC
GTTGTTATAT GCATCGTGTT GCTTGAGGAA CTTCCGTAAT AAATATTATT ACTTATTTAG GACAAATAGA AATAAAACAC
AAAAAAGAGG TTAGATAAAC TAACTACATA CAATGTGTTT GTAGTATCTG TGTAATGCAG AATACCGATA TCAGAATGCC
GGCAAAAATT AATATAAAAA CTAAGTAATC ATCATAATCA TCGTCATCAT CATCATCAAC AGCCCACAGT CGTCCACTGC
TGGACATAGG CCTCTCCCAG TTCATAACAC TGAGCAAGGT CATAATAAGT AATCATACAA AAAGTTAATT AAGAAATATA
GATTTTTAAA TTAGGATATG AGAAGTTTTA TGGTAATATT TGTTGTGTAG TTATACATAT ATTATTTAAC TGTAAGCATC
AATTTAATTT GTTTTACAGG TAAATCCAGG ACGGAAGGCA TCTTTGAGCG GTATCCGCGA AGGCGATGTC ATTTCGTCCA
TAAACGGGCG GTCTACCAGG AGCATGAGTA ATGCTGAAGC TCACGCCATG CTGCGAACAG CTGGTCCAGT CCTAAGACTT
GGCCTAAACG AGTAAGTATT GCTTCTTGAA TATTTACAGC TTAGAAAATA TGCTGATCTC TTATCATAGA TTGGGGGGAA
TAGGGACTAG GGGTACAAAA GGTAAAATAA AAAAAAAGGA AAAATCTGGG ATGTTCACAA TGCTTTTTTG AGATTTAAAT
TTGTTGAATT GAAAAGGACT TTTATTTAGT GTTTAAGAAT ATTAAACGAT TTAATTTAGT CATCAGAATT TTGTAATTGA
TTAATGATAT TGAAAAGTTA ATTACCTAAA GGTAAGACCG ACCTAACAAC TAAACAGTTT CAGCCCTATC GAAAAACTCT
GTTGTCCCCA TACGTGATTC CCCGATTCAC CCCAAAAGCC AAGGTGGATC AGGTTCAGCT AGTTTTTTAT GTTTTTGTGT
ATATTCGGTA GGCAGCGGCT TGGCTCTGTC CCTGGCATTG CTGAAGTCCA TGGACGATGG TAACCCCTCA CCATCAATCA
GGTCGTCGTA TGCTCGTCTG CCTACAAGGG CAAAAAACAT TTTTTTTCAA TGAACACTGT ATACTAATGC ATCGTATATG
AAAATTTAAA CCTCCGGAAC CATTTTAATC TCAATTTTAT TGGTATTACC CTAAGAAAAA ACGCTGAAAA TTTGTGTTGG
TATCGGAAAG CGTCTCGATT CCCCCCAATC TACTGTACGG AAAATTGAAT TGTGCTTATG TTCATATTAT AAGTTTATTC
ATATTTTTTT AAATAATATG AATAACTAAT TATATTTTTT TTTAATTGTA ATCATATGTA TACAATGCCT ATTATTCACT
TGACTATGTG GCTATCGTCA GTAACAAAAA TCAGTACGTC GAACGACTAT CTCAACAATA CTTTTTGGTG TGGAGACAAA
TAAAAGTATT TCGGATGTGG TGGTCTCATC AACGAAGGCC GCAGGACTTT TTCTTTCTCC TCCAACTCCA AAGACGAGTT
TATAAGACAC TAATCAGTGT GATTAAGAAT CCCAACATCA TATTTTTCTT TGACATCGAA CATCGACATT TTAGAGATTC
CGATCATCCA AAAGACTAGC TATCCACTTG GAGAATACCA CGAGAATAAG TCTGTAATAG GTATGATCAG TCTCTCTTTC
AAAGAGTAGG GTTAATTATA GTTAATTATA GGAATGAACT CCCTTATGAT GGAATTTATT CCAAATCAAA ATTTCTAATA
GAGAGATAAT ACAAATACAA GTATTCATAT CAAATTAGTG TTGAACGACT TATACTAAAC TTGCACTAAA AAAATGCTGA
GCTTTTTCTG TTTAATATCC GTTAAAAATA ATAATAAAAA AATTAAAATA GTTTTCCTAT GATTGGAAGC TACTCACGAG
CTTAGTTGTA AGATCGACTT TCACCTTAGT GCAGGTTTTA AAAATGACTT CAGAAAAGGT ATGTTGAGAA ATAAAAATGA
CATTTGGTTC TAAATCGACT GTTGAAATAT CTGAAATTGA TTTCACATTT ACAAAGACTT CTGCCGTATT GGATGGATGT
CAGCGGAAAT CGGACAGTCA CTAATCCGAT CTCTCCTCGC CGTTTCACAC AACATTCAAA TGGATTTACA GATTAGTCGG
GACGTAAATC GATGCACATT ATTTATTCTG TCGAGCCCAA TTAACTTATT ACTTACAAGC TTTACCCTCT ATTCAATATG
GGAAAATCTC CTTATAATAA TATTAAATGT ACATTATTGT TGATTGAATA AATCGTGATT ATCTTATTTT ATTTCGATCG
GAATTAAGGG AAGCAATGGC CTATCAAGTT GACATACAGG TATCAATAGT ATAAACGATA CAGACATGCT ATGGACAAGT
TTCTATCTGT ACAACCATCC TTCATAATTT TATCTTCAAG TTCCAATCAC ATTCTTCTTA TTCGAATCTA ATTGTGACTG
TGACTCCAAT GCGATTGACG TTCACGGTGT ATTGCCTAAA AATATGGTAA TCACTTTCCC TCAGTAAATC TACAATCTTT
CATCCATCCT GTCTCTCTCA ACTGTCAGTA AATAAATATA TTGCTGGTGG TAGGACCTCT TGTGAGTCCG CGCTGGTAGG
TACCACCACC CTGCTTATTT CTGCCGTGAA GCAGTAATGC GTTTCGGTTT GAGTGGTGGG GCAGCCGTTG TAACTATACT
TGAGACCTTC GAACTTATGT CTCAAGGTAG GTGGCGCATT TACGTTGTAG ATATCTATGG GCTCCAGTAA CCACTTAACA
CCAGGTGGGC TGTGAGCTCG TCCACCCATC TAAGCAATAA AACAATATTT ATAATATATA TACCTATATG TATAAATAAT
AAAATTTATT TTACAAGTTC TTCAGCTACA TACAACCTTA ATGAGTTTAC TTTTTGTCTA CAGAGACAGA GAGATATCGC
CGCGACGGAG ATCTATCGGC AAAGGAACGG ATTTAAAACG TAAGATACGA AACACATGCT TATTAATCGA TATCATTAGT
GAAGTTTATT AGAAATTAAA ATCTAACGAT TAACAATGAA TCGAAAATAT TTTTTAAGAT AATTTGTATC ACGCCTAATT
TGAATATTAT TACTTTTGAA ACCACATTAG CTTACGTCGC AGTGAATCTT CACCGTCGCT CCGGAAATAA ACCATAGCAC
TTTTAAACAC AAGTGTAGAT ATTTTTTATC GATATATCGC GGTCACCATG CATGCTATCA TTGACCAGCC TGTATACAGC
AGCTATCGAA TGCTCCGCGA CCTTGATTGC TAGCAATTCA CTTGTGTAGT ACCTAGAAGA TCGCATATTA ACCTCAATAG
AAGCTCCTTA AGACCCGATC TGCCTCTGTA ATAAACAACA CATTTGGTGT TAATTGGTTA CCGGATCACA TCATAGATAC
ACACGTGTGT GCCACTACCC GCTTGGGAAA AGAAGATCGA TGGTCACATA GAGAACATTT TGACTTATAC GATTGGCTAG
TGTTACCGTA GATGACTAGA CGTGTTTGCT AATAGGTATA TAGACACCAT CCCTTATTTA AAACATGAGG TTCACGTTTC
CATAATATTG CTTTAACGAT TGTCCTATCC TTCGAGCCGT AATGCATGAA TAGTTAGACT TATTTGAAGG CTCAGGCTAA
ATGCATCAAA GCTTGGATTT TTTATGGGTT TAGGTGCATT TCCACGGATT ATTAAACAAA CTCTATTGGC GAGCTCCTAT
ATTTCGCCGG GTGCATAATT TTTTTCCTAA CTGATTCAAA AACTCAATTT CGATTAAACC AGATGAAGTT AAATTCGTGG
CGTTATCGTT ATATTTAGTA TTCATTAAAA GACTTATAAA GCTCATTCAA ACTTAAAGTG TTATAATAAT AATTACAAGT
CTAAGATGAG GCGTCTGAAC TCTATCGTGG AAACCCAAAA TATATTTTTT ATTTATTCAT CTGAACCTTA AAGGTTTAAT
AAAGGCGTTT TATGTTCGAA TATAAACATT AACTTGTCCC CTTTGACAGA GCAATCTGCG AGACAACGCG TAAACCTCTA
TACAAATCAG AAACGTTAAA ATATATATTT ATACGTTTCG CTGTGTGAAA TGTTGCCTTT TGTATGGCGG CAACTTTATT
TATTTTATCA AACGACTGCA CGTGCTGGGC TTTGGTTCAA ATAAGCACAA ACAGACTGCG ACTTTATTGT CGTTGCTTGT
TTACTTGGAA CGATCTAAGA AAAACGTTAA ACGTACTAAA AACTGTAATT CTACCAAAAC AATTCCGCGC TGAATGTGTC
AGATAGATTA CAATGTTTTC ATCATCATCA TCATTATCCT GTCGGCGCAA CATGTTTTCT CCTTCCATAC TATTCTATCA
TATACCATTT CTTCGCTCAT TCCCCTCTTA GCCATATCGT CTTTCACACA ATCTATCCAA TTACAATGTT TTATTTTCTC
AAATAAAGTT AAAAAATTGT TTTAGGACCA TCGCAGTTGA TTGCTGAAGT ACAATGTGGA AGAGCGACGC CTCAAGCACC
AGTTTATGCA ACGATAAGAT CATCTGAATC ACCGATTAAG CGTCCGTCTC CATCAGGCAT TCGTTCTTCA TTAAGTTCCT
TGCCTGGCGA ATTTCATTCG ACACCCCTTG CGAAATCGCC AACAAATTCC GATAATACTA TTGGATTTCA CCCGACAAAT
CCATTTTATA CTACTCTCCC TTCAAATTAT TTGAGTACTT CCAGATTACC TGTGCCGAAC GGTAAAGCTA ATACTTTAAA
TTTAGATAGA GATAAACCTA AACAGTCGTC GCCATTCTAT GATTGTGGTG GAGATATAAA ATCTACCACG AATCATGAGC
GACTACTACA ATCTAGTTCC AGCAGTCTTC CATATTATAA TCACAATAAT GTGAAAAAGT TCAACGGTTA CGAAAGTCCA
ACATCAAAAT TTGCAAACAA AACGGACTTT GGTCATTTTG CTAATAGCTA TAAAGAATTT AATGAGCAAA CAGACCAAAG
TCTACCGGAT GAGTCTAAAA ATCCATTTGC AACAAAAAGA AACAGCGATC CCTTTGAAAA GTATTTACGT CCAGAACATA

ATAGTAATGG AAAAACTGAT GCCAACATTA AAACGATACC GATTTCGATG AGCGATAACA ATTTTCAAAC TAAAGAAGAA
ATAACACAAC GTTCAACTGT AACTGAACAT AAGATAAATG AAATCGAAGA AATTAAGACA ATCAAGAAGA TAGTTTTGAA
CGAATACGAT AGAATGCGGG ATACCAGAGA AGACGATTAT TCTAAAATTA TTCGCGATAG AAATAATCAT TCTGATAAAT
CTTCAAGAGT AAGACGCAAT GAAGATTTTC GTCAAGAATC ACCAAGTAAA GAACGTCCTA TATTACCAAG GAATGGATGT
CATAATCCAC AAAATGAAGA GAATAATAAA AGGAGCTGGA GTTCCTTATC TAGTACGTAC GATCAGTACA AATCCGAGCA
TGAAAACCTC ACGAGCACTT CAGGTAAGCC GTTAACGTTA TTATGTTTAC TGTAATAGTC AAATTCAAGG AAAACTGGCC
CGGTACTGTA AACGAATCAT CTCTATTGTT ATTATGTTAT CAGTACAGTA ATATATTTTT TTGTAACTGC TCCAAATTAG
TAGATTATCT CATGTTCCAT TGTTTGTTAA ATGGTTGCTA GAGAAAGAGA CATCACAAAA ATTAATAATC CATCCACCAT
TTTTATTGGG AGTCCTTTCA ATTAGAACGA TTTAAGAGGA CAGTTGAGGG ACTTAACTTG TTTTTATTGG AAAATAATAT
TATTCCTTGA TACATTGGTT TCAATTATAA TTGACAGTTA ATCTTGATTC ATGCGCAAGT TACGGGCTTT GTTCCTGAAC
AATTCAGGTG CGATTACACG ATATGTACAT AACAATGCAT TCAACCCTCC AAGGCAATGT GGAACAGCAA AAGGGGTGGA
TCGTTATACT GGCTTATAGT ACCGATACGA CACGAATTTA TACCGATTAC TTTCGTCCTC ACGTTTCCCA TGTGCAAGCT
TTACAAAATG CTCTACGTGC TACCTGA

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VII: Θέσεις αναγνώρισης ενδοπρωτεασών στην πρωτεϊνική αλληλουχία της BmSH3-A1 όπως αυτές αναγνωρίστηκαν από το εργαλείο PeptideCutter της βάσης δεδομένων EXPAsY (Gasteiger et al., 2003). Με έντονο γκριζο σημαίνονται τα ένζυμα ενδιαφέροντος Factor Xa και Thrombin.

Ένζυμο	Αριθμός σημείων αναγνώρισης	Θέση στην Αμινοξική αλληλουχία
Arg-C proteinase	93	34 61 63 66 75 77 86 88 89 94 102 107 121 188 196 210 237 241 252 253 272 274 295 298 311 317 326 330 333 335 348 349 359 360 364 368 374 393 401 423 427 428 433 447 460 477 478 479 487 488 509 521 598 599 600 612 613 617 628 631 637 648 649 662 663 674 678 688 692 700 703 707 720 721 738 759 764 772 773 787 816 818 843 844 853 880 904 947 977 983 1015 1018 1029
Asp-N endopeptidase	60	9 21 59 63 67 68 75 81 91 130 326 333 341 360 371 377 385 397 407 415 416 417 444 465 468 470 485 490 533 541 545 548 568 591 603 617 640 656 667 679 715 723 739 740 742 766 775 801 821 845 862 877 885 901 957 967 987 995 1004 1005
Asp-N endopeptidase + N-terminal Glu	134	1 9 21 28 29 38 43 45 46 57 59 63 66 67 68 75 81 90 91 95 100 115 116 130 135 137 145 150 229 245 246 258 267 269 311 324 326 333 341 349 353 355 357 360 362 371 377 385 394 397 407 415 416 417 428 431 444 452 454 465 468 470 484 485 490 512 522 533 535 541 542 545 548 565 568 585 589 591 600 601 603 610 617 623 638 640 644 656 658 665 667 679 686 688 695 703 712 715 723 739 740 742 759 766 775 780 782 796 801 813 821 829 836 845 850 862 870 877 885 901 945 957 962 967 971 987 988 990 993 995 1001 1004 1005 1027
BNPS-Skatole	10	123 195 224 402 540 541 779 849 850 1008
CNBr	12	20 62 180 370 388 406 545 580 698 717 906 979
Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P)	70	25 59 70 93 123 130 133 185 195 224 240 245 255 351 362 402 403 407 415 419 424 441 443 444 450 464 468 496 502 515 525 540 541 548 589 597 616 630 655 664 673 702 710 726 739 751 753 763 770 779 780 793 795 821 823 849 850 865 911 933 949 966 976 980 982 999 1008 1009 1019 1026
Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	141	3 20 25 40 56 59 62 70 80 93 111 123 126 130 133 137 140 165 180 185 195 224 240 244 245 255 273 284 287 306 307 322 345 347 351 362 370 392 402 403 407 411 415 419 424 441 443 444 450 451 458 461 464 468 496 497 502 505 515 525 540 541 545 548 575 580 584 589 595 597 607 616 619 627 630 652 655 664 672 673 684 690 698 701 702 710 711 714 717 722 726 736 739 746 750 751 753 761 763 770 779 780 785 790 793 795 821 823 829 833 841 849 850 856 865 869 883 895 897 898 906 909 911 920 933 942 949 959 965 966 976 980 982 990 992 999 1001 1008 1009 1019 1026
Clostripain	93	34 61 63 66 75 77 86 88 89 94 102 107 121 188 196 210 237 241 252 253 272 274 295 298 311 317 326 330 333 335 348 349 359 360 364 368 374 393 401 423 427 428 433 447 460 477 478 479 487 488 509 521 598 599 600 612 613 617 628 631 637 648 649 662 663 674 678 688 692 700 703 707 720 721 738 759 764 772 773 787 816 818 843 844 853 880 904 947 977 983 1015 1018 1029
Factor Xa	**2**	**816 853**
Formic acid	60	10 22 60 64 68 69 76 82 92 131 327 334 342 361 372 378 386 398 408 416 417 418 445 466 469 471 486 491 534 542 546 549 569 592 604 618 641 657 668 680 716 724 740 741 743 767 776 802 822 846 863 878 886 902 958 968 988 996 1005 1006

Glutamyl endopeptidase	74	2 29 30 39 44 46 47 58 67 91 96 101 116 117 136 138 146 151 230 246 247 259 268 270 312 325 350 354 356 358 363 395 429 432 453 455 485 513 523 536 543 566 586 590 601 602 611 624 639 645 659 666 687 689 696 704 713 760 781 783 797 814 830 837 851 871 946 963 972 989 991 994 1002 1028
Hydroxylamine	6	6 108 261 754 854 899
Iodosobenzoic	10	123 195 224 402 540 541 779 849 850 1008
LysC	60	8 14 28 41 49 52 53 72 83 100 120 134 156 160 176 186 238 254 309 369 376 385 397 404 405 412 414 425 438 501 516 529 535 538 565 567 568 577 582 585 699 706 709 731 744 748 765 800 808 809 820 834 835 857 876 887 903 936 981 1003
LysN	60	7 13 27 40 48 51 52 71 82 99 119 133 155 159 175 185 237 253 308 368 375 384 396 403 404 411 413 424 437 500 515 528 534 537 564 566 567 576 581 584 698 705 708 730 743 747 764 799 807 808 819 833 834 856 875 886 902 935 980 1002
NTCB (2-nitro-5-	4	109 262 674 1003
Pepsin (pH1.3)	167	24 25 56 58 59 69 70 92 93 105 125 126 129 130 132 133 140 147 185 194 244 245 273 283 284 286 287 296 305 306 306 307 315 321 322 331 346 391 392 402 402 415 418 419 424 441 442 443 443 450 450 451 457 458 461 463 464 467 468 495 496 496 497 501 502 504 505 514 515 524 539 541 547 548 559 574 575 583 588 589 594 595 596 597 606 616 618 629 655 672 673 683 689 710 710 713 714 725 735 739 745 749 751 752 753 760 762 763 769 770 778 779 779 780 791 792 794 795 821 823 828 829 831 832 840 841 848 849 849 850 856 861 864 865 868 869 883 896 898 910 920 933 941 948 958 959 964 966 975 980 981 989 990 991 992 998 999 1000 1001 1007 1008 1008 1009 1019 1022 1025 1026
Pepsin (pH>2)	100	24 25 56 92 93 105 125 126 140 147 185 244 245 273 283 284 286 287 296 305 306 306 307 315 321 322 331 346 391 392 443 450 451 457 458 461 463 464 496 497 504 505 547 548 559 574 575 583 594 595 596 597 606 618 629 683 689 710 713 714 725 735 745 749 752 753 760 762 763 769 770 791 821 823 828 829 831 832 840 841 856 861 868 869 883 896 898 920 941 958 959 964 989 990 991 992 1000 1001 1019 1022
Proline-	10	103 197 242 336 810 877 881 888 937 984
Proteinase K	353	9 11 13 15 16 18 25 27 31 32 36 37 38 42 45 48 50 51 54 55 56 59 65 70 73 74 87 93 104 105 123 126 129 130 133 140 141 143 145 147 152 153 154 155 159 164 166 168 170 174 175 178 179 181 182 184 185 187 190 193 194 195 199 201 205 208 223 224 225 229 236 239 240 243 245 248 255 256 258 264 273 275 279 281 282 284 286 287 293 296 299 303 304 305 306 307 310 315 320 321 322 329 331 344 346 347 351 352 357 362 365 367 373 377 380 383 384 390 391 392 396 402 403 407 409 410 415 419 420 421 422 424 430 431 434 441 442 443 444 450 451 458 461 463 464 467 468 472 473 474 480 481 483 489 492 496 497 502 504 505 506 508 510 514 515 522 525 526 532 533 537 540 541 544 547 548 553 556 557 559 570 571 572 573 574 575 581 583 584 589 594 595 596 597 603 605 607 610 614 615 616 619 621 627 630 634 640 643 650 655 658 664 665 669 671 673 677 682 684 685 690 691 695 701 702 710 711 714 726 727 732 733 734 736 739 742 745 746 747 749 750 751 752 753 757 761 763 768 769 770 771 775 777 779 780 784 788 790 791 793 795 796 798 803 804 806 807 812 813 817 819 821 823 824 825 827 829 831 833 838 839 840 841 842 845 849 850 856 858 860 861 865 866 867 868 869 882 883 885 889 890 893 894 897 898 911 912 919 920 923 927 930 933 934 935 938 940 941 942 943 949 953 957 959 962 965 966 967 969 971 973 974 976 978 980 982 990 992 997 998 999 1000 1001 1008 1009 1010 1016 1019 1021 1022 1026 1027 1030

Staphylococcal peptidase I	69	2 29 39 44 46 58 67 91 96 101 116 136 138 146 151 230 246 259 268 270 312 325 350 354 356 358 363 395 429 432 453 455 485 513 523 536 543 566 586 590 601 611 624 639 645 659 666 687 689 696 704 713 760 781 783 797 814 830 837 851 871 946 963 972 989 991 994 1002 1028
Thermolysin	179	12 17 19 24 36 41 50 53 54 55 61 72 73 86 103 125 139 144 152 154 158 167 178 179 180 184 186 192 193 222 228 239 242 244 254 255 272 280 283 286 298 303 305 306 309 319 321 328 343 345 346 351 364 366 369 376 379 382 389 391 405 409 419 421 430 441 443 450 457 460 462 463 480 482 488 496 504 505 507 509 521 531 532 544 547 552 571 572 573 574 579 580 582 583 594 595 596 606 609 613 614 620 626 629 664 670 676 683 690 694 697 700 710 725 732 735 744 745 746 748 749 752 762 768 769 770 774 787 789 795 803 805 806 811 812 816 818 820 823 824 828 832 838 840 844 855 859 865 867 868 881 882 888 889 892 893 896 897 905 918 919 933 934 937 939 941 956 964 966 970 977 978 997 999 1000 1009 1018 1026 1029
Thrombin	**2**	**107 477**
Trypsin	139	8 14 28 34 41 49 52 53 61 63 66 72 75 77 83 86 88 89 94 100 107 120 121 134 160 176 186 188 210 237 238 252 253 254 272 274 295 298 309 311 317 326 330 333 348 349 359 360 364 368 369 374 376 385 393 397 401 404 405 412 414 423 425 427 428 433 438 447 460 477 479 487 488 501 509 516 521 529 535 538 565 567 568 577 582 585 598 600 612 613 617 628 631 637 648 649 662 663 674 678 688 692 699 700 703 706 707 709 720 731 738 744 748 759 764 765 772 773 787 800 808 816 818 820 834 835 843 844 853 857 903 904 947 977 981 1003 1015 1018 1029

Τα παρακάτω ένζυμα δε κόβουν στην συγκεκριμένη αλληλουχία: Caspase1, Caspase10, Caspase2, Caspase3, Caspase4, Caspase5, Caspase6, Caspase7, Caspase8, Caspase9, Enterokinase, GranzymeB, Tobacco etch virus protease

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VIII: Α) Περιοχές ενδιαφέροντος στην πρωτοταγή αλληλουχία της BmSH3-A1 όπως αναγνωρίστηκαν από την μηχανή αναζήτησης EML. Β) Πρόβλεψη πιθανών θέσεων φωσφορυλίωσης από τις κινάσες ERK, Abl, PKA και PKG όπως αυτές αναγνωρίστηκαν από το πρόγραμμα εύρεσης θέσεων φωσφορυλίωσης GPS (http://gps.biocuckoo.org, (Xue et al., 2008).

A)

ονομασία από το ELM	Θέση	Περιγραφή	Υποκυτταρική κατανομή
LIG_CYCLIN_1	699-702	Περιοχή αναγνώρισης από την κυκλίνη, που επάγει την αύξηση της φωσφορυλίωσης από το σύμπλοκο κυκλίνης/cdk. Για είναι ενεργά αυτά τα μοτίβα πρέπει να υπάρχουν αλληλουχίες αναγνώρησης και φωσφορυλίωσης από την cdk (MOD_CDK).	κυτταρόπλασμα, πυρήνας
LIG_PDZ_3	28-31, 45-48 137-140, 150-153 341-344, 362-365 431-434, 541-544 679-682, 801-804 962-965	Τάξης III PDZ περιοχές πρόσδεσης.	μεμβράνη, κυτταροπλασματική μεμβράνη, κυτταρόπλασμα
LIG_PP1	239-246	Protein phosphatase 1 catalytic subunit (PP1c) interacting motif binds targeting proteins that dock to the substrate for dephosphorylation. The motif defined is [RK]{0,1}[VI][^P][FW]	κυτταρόπλασμα, πυρήνας
LIG_SH3_1	100-106, 333-339	Περιοχή τάξης I αναγνώρησης από τις SH3 περιοχές	Κυτταροπλασματική μεμβράνη, κυτταρόπλασμα. Εστιακές επαφές
LIG_SH3_2	644-649, 683-688	Περιοχή τάξης II αναγνώρησης από τις SH3 περιοχές	Κυτταροπλασματική μεμβράνη, κυτταρόπλασμα. Εστιακές επαφές
LIG_SH3_3	100-106, 142-148 156-162, 167-173 191-197, 194-200 197-203, 200-206	Μη κανονικό μοτίβο τάξης I αναγνώρησης από τις SH3 περιοχές	Κυτταροπλασματική μεμβράνη, κυτταρόπλασμα. Εστιακές επαφές
LIG_SH3_4	156-163	Μη κανονικό μοτίβο τάξης II αναγνώρησης από τις SH3 περιοχές.	Κυτταροπλασματική μεμβράνη, κυτταρόπλασμα. Εστιακές επαφές
LIG_WW_3	634-638, 645-649	περιοχή πρόσδεσης της ομάδας III των περιοχών WW.	κυτταρόπλασμα
LIG_WW_4	94-99, 158-163 163-168, 169-174 179-184, 188-193 198-203, 205-210 208-213, 222-227 229-234, 245-250 334-339, 560-565 605-610, 629-634 657-662, 724-729 888-893, 909-914 940-945	περιοχή πρόσδεσης της ομάδας IV των περιοχών WW; Αλληλεπιδράσεις εξαρτώμενες από φωσφορυλίωσης.	κυτταρόπλασμα, πυρήνας

MOD_CDK_1	94-100, 657-663	Μοτίβο αναγνώρισης και φωσφορυλίωσης του ολοενζύμου πρωτεϊνικής κινάσης εξαρτώμενο από την κυκλίνη (cdk), που ελέγχει τον κυτταρικό κύκλο, φωσφορυλιώνει σερίνη ή θρεονίνη	nucleus, πυρήνας κυτταρόπλασμα
MOD_CK1_1	35-41, 81-87 122-128, 124-130 125-131, 161-167 163-169, 172-178 288-294, 290-296 291-297, 337-343 436-442, 459-465 462-468, 470-476 490-496, 495-501 554-560, 555-561 591-597, 729-735 905-911	Μοτίβο αναγνώρισης και φωσφορυλίωσης από την casein κινάση (CK1), φωσφορυλιώνει σερίνη ή θρεονίνη	κυτταρόπλασμα, πυρήνας
MOD_CK2_1	24-30, 33-39 132-138, 140-146 262-268, 264-270 350-356, 352-358 423-429, 449-455 479-485, 560-566 584-590, 605-611 639-645, 653-659 808-814, 940-946 966-972	Μοτίβο αναγνώρισης και φωσφορυλίωσης από την casein κινάση (CK2), φωσφορυλιώνει σερίνη ή θρεονίνη	
MOD_GSK3_1	2-9, 12-19 29-36, 78-85 121-128, 122-129 171-178, 175-182 204-211, 225-232 229-236, 262-269 275-282, 279-286 283-290, 285-292 287-294, 321-328 445-452, 467-474 487-494, 491-498 500-507, 504-511 551-558, 584-591 647-654, 653-660 898-905, 905-912 938-945	Μοτίβο αναγνώρισης και φωσφορυλίωσης από την casein κινάση (GSK3), φωσφορυλιώνει σερίνη ή θρεονίνη	
MOD_PKA_1	477-483, 487-493 808-814	Κύρια περιοχή αναγνώρησης από την PKA1 κινάση.	
MOD_PKA_2	33-39, 62-68 187-193, 236-242 273-279, 325-331 459-465, 477-483 487-493, 508-514 647-653	Δευτερεύουσα περιοχή αναγνώρησης από την PKA1 κινάση.	
MOD_PKB_1	477-485, 598-606	Περιοχή φωσφορυλίωσης από την PKB	κυτταρόπλασμα, πυρήνας

MOD_PLK	568-574, 591-597	Περιοχή φωσφορυλίωσης από την Polo-like-kinase	κυτταρόπλασμα, πυρήνας
MOD_ProDKin_1	94-100, 158-164 163-169, 169-175 179-185, 188-194 198-204, 205-211 208-214, 222-228 229-235, 245-251 334-340, 560-566 605-611, 629-635 657-663, 724-730 888-894, 909-915 940-946,	Θέση φωσφορυλίωσης από κινάσες κατευθυνόμενες από το αμινοξύ προλίνη (Proline-Directed Kinase) παράδειγμα η MAPK, στα ανώτερα αυκαρυωτικά	κυτταρόπλασμα, πυρήνας
TRG_ENDOCYTIC_2	59-62, 70-73 362-365, 441-444 502-505, 616-619	Συνιάλο πρόσδεσης της μ υπομονάδας της AP (προτεΐνης πρόσδεσης, Adaptor Protein)	Κυτταροπλασματική μεμβράνη, ενδοκύττωση μέσω κυστιδίων κλαθρίνης, κυτταρόπλασμα

B)

Θέση στην αμινοξική αλληλουχία	αμινοξύ	Κινάσες	Θέσεις αναγνώρισης
36	T	AGC/PKA	EEITQRSTVTEHKIN
276	S	AGC/PKA	SEGRLRTSQSAPATG
371	S	AGC/PKA	RIGVRKMSDTRQKVD
480	T	AGC/PKA	TTGPRRRTASVQEDR
482	S	AGC/PKA	GPRRRTASVQEDRRI
490	S	AGC/PKA	VQEDRRISDVSSSYL
640	T	AGC/PKA	PAPPRQETDSAPEPP
371	S	AGC/PKG	RIGVRKMSDTRQKVD
480	T	AGC/PKG	TTGPRRRTASVQEDR
490	S	AGC/PKG	VQEDRRISDVSSSYL
511	S	AGC/PKG	TLASARASQEVYKNQ
371	S	AGC/PKG/PKG1	RIGVRKMSDTRQKVD
426	S	AGC/PKG/PKG1	YVTIRYKSRREAAER
436	S	AGC/PKG/PKG1	EAAERVPSSKSQYAY
482	S	AGC/PKG/PKG1	GPRRRTASVQEDRRI
490	S	AGC/PKG/PKG1	VQEDRRISDVSSSYL
490	S	AGC/PKG/PKG2	VQEDRRISDVSSSYL
97	S	CMGC/MAPK/ERK	NEDFRQESPSKERPI
161	S	CMGC/MAPK/ERK	TIKPPVKSPSTHTPA
166	T	CMGC/MAPK/ERK	VKSPSTHTPANVPSP
191	S	CMGC/MAPK/ERK	TFKARSTSPAVWRPG
208	T	CMGC/MAPK/ERK	TPPPAPSTPRSPGGP
211	S	CMGC/MAPK/ERK	PAPSTPRSPGGPPPP
232	S	CMGC/MAPK/ERK	TPGSAEPSPQPTRKT
563	S	CMGC/MAPK/ERK	TTSLPQPSPKEKKDI
608	S	CMGC/MAPK/ERK	EETDAPLSPAERRAA
660	S	CMGC/MAPK/ERK	GSYSDAESPRRYVES
891	S	CMGC/MAPK/ERK	NTDKPAASPAAHGLL

943	T	CMGC/MAPK/ERK	KPAQATLTPSERGYG
161	S	CMGC/MAPK/ERK/MAPK1	TIKPPVKSPSTHTPA
172	S	CMGC/MAPK/ERK/MAPK1	HTPANVPSPTTKQTV
191	S	CMGC/MAPK/ERK/MAPK1	TFKARSTSPAVWRPG
201	T	CMGC/MAPK/ERK/MAPK1	VWRPGAPTPPPAPST
208	T	CMGC/MAPK/ERK/MAPK1	TPPPAPSTPRSPGGP
211	S	CMGC/MAPK/ERK/MAPK1	PAPSTPRSPGGPPPP
232	S	CMGC/MAPK/ERK/MAPK1	TPGSAEPSPQPTRKT
337	S	CMGC/MAPK/ERK/MAPK1	RLPRDRPSPPSGDPV
563	S	CMGC/MAPK/ERK/MAPK1	TTSLPQPSPKEKKDI
608	S	CMGC/MAPK/ERK/MAPK1	EETDAPLSPAERRAA
660	S	CMGC/MAPK/ERK/MAPK1	GSYSDAESPRRYVES
891	S	CMGC/MAPK/ERK/MAPK1	NTDKPAASPAAHGLL
943	T	CMGC/MAPK/ERK/MAPK1	KPAQATLTPSERGYG
161	S	CMGC/MAPK/ERK/MAPK3	TIKPPVKSPSTHTPA
166	T	CMGC/MAPK/ERK/MAPK3	VKSPSTHTPANVPSP
182	T	CMGC/MAPK/ERK/MAPK3	TKQTVMITPTFKARS
191	S	CMGC/MAPK/ERK/MAPK3	TFKARSTSPAVWRPG
208	T	CMGC/MAPK/ERK/MAPK3	TPPPAPSTPRSPGGP
211	S	CMGC/MAPK/ERK/MAPK3	PAPSTPRSPGGPPPP
248	T	CMGC/MAPK/ERK/MAPK3	RPVHFEETPPSRRKF
608	S	CMGC/MAPK/ERK/MAPK3	EETDAPLSPAERRAA
891	S	CMGC/MAPK/ERK/MAPK3	NTDKPAASPAAHGLL
912	T	CMGC/MAPK/ERK/MAPK3	SMGSHSYTPQQNNPA
943	T	CMGC/MAPK/ERK/MAPK3	KPAQATLTPSERGYG
161	S	CMGC/MAPK/ERK/MAPK7	TIKPPVKSPSTHTPA
172	S	CMGC/MAPK/ERK/MAPK7	HTPANVPSPTTKQTV
182	T	CMGC/MAPK/ERK/MAPK7	TKQTVMITPTFKARS
208	T	CMGC/MAPK/ERK/MAPK7	TPPPAPSTPRSPGGP
211	S	CMGC/MAPK/ERK/MAPK7	PAPSTPRSPGGPPPP
225	T	CMGC/MAPK/ERK/MAPK7	PPPPPVWTPGSAEPS
563	S	CMGC/MAPK/ERK/MAPK7	TTSLPQPSPKEKKDI
608	S	CMGC/MAPK/ERK/MAPK7	EETDAPLSPAERRAA
891	S	CMGC/MAPK/ERK/MAPK7	NTDKPAASPAAHGLL
921	S	CMGC/MAPK/ERK/MAPK7	QQNNPALSNAPPSTQ
926	S	CMGC/MAPK/ERK/MAPK7	ALSNAPPSTQPLPGY
927	T	CMGC/MAPK/ERK/MAPK7	LSNAPPSTQPLPGYV
943	T	CMGC/MAPK/ERK/MAPK7	KPAQATLTPSERGYG
911	Y	TK/Abl	RSMGSHSYTPQQNNP
949	Y	TK/Abl	LTPSERGYGPPTGSG
911	Y	TK/Abl/Abl	RSMGSHSYTPQQNNP
949	Y	TK/Abl/Abl	LTPSERGYGPPTGSG

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IX: Ομοιότητα των περιοχών (Α) 526 – 646 αα και (Β) της 659 – 1030 αα της BmSH3-A1 μετά από BLAST αυτής στη βάση δεδομένων NCBI με βάση το E-value έναντι των κατατεθημένων πρωτεϊνών.

A) Sequences producing significant alignments

Accession	Description	E value
NP_001166801.1	>gb|ACV52545.1| CAP isoform A [Bombyx mori]	9,00E-74
XP_001687850.1	>gb|EDO64499.1| AGAP007717-PB [Anopheles gambiae str. PEST]	9,00E-29
XP_970771.2	PREDICTED: similar to DCAPL3 [Tribolium castaneum]	6,00E-27
EEZ97544.1	hypothetical protein TcasGA2_TC011394 [Tribolium castaneum]	6,00E-27
EFN89954.1	Sorbin and SH3 domain-containing protein 1 [Harpegnathos saltator]	8,00E-27
XP_393153.4	PREDICTED: hypothetical protein LOC409655 [Apis mellifera]	8,00E-27
XP_001605377.1	PREDICTED: similar to DCAPL3 [Nasonia vitripennis]	2,00E-26
XP_002138468.1	>gb|EDY69026.1| GA24375 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	3,00E-26
XP_002004952.1	>gb|EDW08887.1| GI19326 [Drosophila mojavensis]	3,00E-26
XP_001959269.1	>gb|EDV36091.1| GF12790 [Drosophila ananassae]	4,00E-26
XP_003245429.1	PREDICTED: hypothetical protein LOC100167639 [Acyrthosiphon pisum]	4,00E-26
XP_002016495.1	>gb|EDW32385.1| GL10458 [Drosophila persimilis]	4,00E-26
NP_610571.2	>gb|AAF58816.2| CAP, isoform A [Drosophila melanogaster]	5,00E-26
BAB62017.1	DCAPL1 [Drosophila melanogaster]	5,00E-26
NP_001137638.2	>gb|ACL83092.2| CAP, isoform Q [Drosophila melanogaster]	5,00E-26
XP_002050527.1	>gb|EDW61720.1| GJ22205 [Drosophila virilis]	7,00E-26
XP_001987184.1	>gb|EDW02051.1| GH21781 [Drosophila grimshawi]	8,00E-26
XP_001969069.1	>gb|EDV58128.1| GG24159 [Drosophila erecta]	9,00E-26
XP_002080887.1	>gb|EDX06472.1| GD10730 [Drosophila simulans]	1,00E-25
AAN71445.1	RE58362p [Drosophila melanogaster]	2,00E-25
NP_995795.1	>gb|AAS64879.1| CAP, isoform J [Drosophila melanogaster]	2,00E-25
ABX00735.1	IP16877p [Drosophila melanogaster]	2,00E-25
XP_002068883.1	>gb|EDW79869.1| GK17791 [Drosophila willistoni]	2,00E-25
XP_002089925.1	>gb|EDW89637.1| GE19353 [Drosophila yakuba]	2,00E-25
XP_002033222.1	>gb|EDW47235.1| GM21206 [Drosophila sechellia]	3,00E-25
BAB62019.1	DCAPL3 [Drosophila melanogaster]	4,00E-25
XP_564508.3	>gb|EAL41715.3| AGAP007717-PA [Anopheles gambiae str. PEST]	2,00E-17
XP_001687851.1	>gb|EDO64500.1| AGAP007717-PC [Anopheles gambiae str. PEST]	4,00E-17
EFN64084.1	hypothetical protein EAG_02344 [Camponotus floridanus]	3,00E-16
NP_001137637.1	>gb|ACL83091.1| CAP, isoform L [Drosophila melanogaster]	9,00E-16
ADB91437.1	SD16465p [Drosophila melanogaster]	1,00E-15
NP_724913.2	>gb|AAM68780.2| CAP, isoform B [Drosophila melanogaster]	2,00E-15
NP_001163110.1	>gb|ACZ94385.1| CAP, isoform R [Drosophila melanogaster]	2,00E-15
XP_001663025.1	>gb|EAT34910.1| conserved hypothetical protein [Aedes aegypti]	2,00E-13
XP_002425805.1	>gb|EEB13067.1| dcapl, putative [Pediculus humanus corporis]	2,00E-13
XP_001848890.1	>gb|EDS29233.1| DCAPL2 [Culex quinquefasciatus]	7,00E-11
EFR26285.1	hypothetical protein AND_07767 [Anopheles darlingi]	2,00E-10
EFX79626.1	hypothetical protein DAPPUDRAFT_197424 [Daphnia pulex]	1,00E-09
EFZ14922.1	hypothetical protein SINV_11574 [Solenopsis invicta]	1,00E-05
XP_002610282.1	>gb|EEN66292.1| hypothetical protein BRAFLDRAFT_126843 [Branchiostoma floridae]	4.8

B) Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	E value
NP_001166801.1	>gb|ACV52545.1| CAP isoform A [Bombyx mori]	0.0
NP_001159613.1	>gb|ACV52546.1| CAP isoform B [Bombyx mori]	0.0
XP_393153.4	PREDICTED: hypothetical protein LOC409655 [Apis mellifera]	2,00E-129
EGI69544.1	Sorbin and SH3 domain-containing protein 1 [Acromyrmex echinatior]	3,00E-128
EFN64083.1	Sorbin and SH3 domain-containing protein 1 [Camponotus floridanus]	5,00E-127
EFN89954.1	Sorbin and SH3 domain-containing protein 1 [Harpegnathos saltator]	7,00E-125
XP_001605377.1	PREDICTED: similar to DCAPL3 [Nasonia vitripennis]	1,00E-119
ABN12044.1	hypothetical protein [Maconellicoccus hirsutus]	1,00E-119
AAN71620.1	RH64582p [Drosophila melanogaster]	3,00E-116
XP_003245429.1	PREDICTED: hypothetical protein LOC100167639 [Acyrthosiphon pisum]	1,00E-115
XP_001687851.1	>gb|EDO64500.1| AGAP007717-PC [Anopheles gambiae str. PEST]	3,00E-115
XP_001663026.1	dcapl [Aedes aegypti] >gb|EAT34911.1| dcapl [Aedes aegypti]	4,00E-115
XP_001687850.1	>gb|EDO64499.1| AGAP007717-PB [Anopheles gambiae str. PEST]	5,00E-115
XP_002080888.1	GD10731 [Drosophila simulans] >gb|EDX06473.1| GD10731 [Drosophila simulans]	

		5,00E-114
ADB91437.1	SD16465p [Drosophila melanogaster]	2,00E-113
XP_001868598.1	>gb|EDS27201.1| dcapl [Culex quinquefasciatus]	3,00E-113
NP_995795.1	>gb|AAS64879.1| CAP, isoform J [Drosophila melanogaster]	5,00E-113
NP_610570.1	>gb|ACL87822.1| CAP-PE [synthetic construct]	1,00E-112
AAN71445.1	RE58362p [Drosophila melanogaster]	2,00E-112
XP_564508.3	>gb|EAL41715.3| AGAP007717-PA [Anopheles gambiae str. PEST]	3,00E-112
XP_002004951.1	>gb|EDW08886.1| GI19327 [Drosophila mojavensis]	4,00E-112
XP_002033224.1	>gb|EDW47237.1| GM21208 [Drosophila sechellia]	1,00E-111
BAB62020.1	DCAPL4 [Drosophila melanogaster]	1,00E-111
XP_002016495.1	>gb|EDW32385.1| GL10458 [Drosophila persimilis]	3,00E-109
BAB62019.1	DCAPL3 [Drosophila melanogaster]	3,00E-109
XP_001848894.1	>gb|EDS29237.1| dcapl [Culex quinquefasciatus]	3,00E-108
EFX79626.1	hypothetical protein DAPPUDRAFT_197424 [Daphnia pulex]	4,00E-108
BAB62017.1	DCAPL1 [Drosophila melanogaster]	1,00E-107
XP_002068883.1	>gb|EDW79869.1| GK17791 [Drosophila willistoni]	2,00E-107
NP_001137638.2	>gb|ACL83092.2| CAP, isoform Q [Drosophila melanogaster]	4,00E-107
XP_001959269.1	>gb|EDV36091.1| GF12790 [Drosophila ananassae]	8,00E-107
NP_724913.2	>gb|AAM68780.2| CAP, isoform B [Drosophila melanogaster]	2,00E-106
XP_002050527.1	>gb|EDW61720.1| GJ22205 [Drosophila virilis]	3,00E-106
XP_002138468.1	>gb|EDY69026.1| GA24375 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]	4,00E-106
XP_002089925.1	>gb|EDW89637.1| GE19353 [Drosophila yakuba]	5,00E-106
XP_001969069.1	>gb|EDV58128.1| GG24159 [Drosophila erecta]	1,00E-105
XP_001987184.1	>gb|EDW02051.1| GH21781 [Drosophila grimshawi]	7,00E-105
XP_002425805.1	>gb|EEB13067.1| dcapl, putative [Pediculus humanus corporis]	1,00E-92
XP_970771.2	PREDICTED: similar to DCAPL3 [Tribolium castaneum]	2,00E-91
EEZ97544.1	hypothetical protein TcasGA2_TC011394 [Tribolium castaneum]	2,00E-88
XP_002405563.1	>gb|EEC12044.1| hypothetical protein IscW_ISCW008643 [Ixodes scapularis]	4,00E-77
XP_002596050.1	>gb|EEN52062.1| hypothetical protein BRAFLDRAFT_202929 [Branchiostoma floridae]	1,00E-75
XP_002731995.1	PREDICTED: Arg/Abl-interacting protein ArgBP2-like [Saccoglossus kowalevskii]	9,00E-62
CAE45892.1	hypothetical protein [Homo sapiens]	2,00E-59
CAG04709.1	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	3,00E-58
EAW63674.1	sorbin and SH3 domain containing 3, isoform CRA_b [Homo sapiens]	6,00E-58
AAD32304.1	vinexin beta [Homo sapiens]	8,00E-58
NP_001018003.1	>gb|AAH10146.1| Sorbin and SH3 domain containing 3 [Homo sapiens]	1,00E-57
BAE91197.1	unnamed protein product [Macaca fascicularis]	3,00E-57
NP_001030128.1	>gb|AAK37565.1| sorbin and SH3 domain containing 1 [Homo sapiens]	4,00E-57
CAI14383.1	sorbin and SH3 domain containing 1 [Homo sapiens]	4,00E-57
BAG62776.1	unnamed protein product [Homo sapiens]	5,00E-57
EFZ15383.1	hypothetical protein SINV_14409 [Solenopsis invicta]	1,00E-56
XP_003402224.1	PREDICTED: sorbin and SH3 domain-containing protein 1-like [Bombus terrestris]	1,00E-56
XP_003363501.1	PREDICTED: sorbin and SH3 domain-containing protein 1 [Equus caballus]	1,00E-56
XP_002914819.1	PREDICTED: vinexin-like [Ailuropoda melanoleuca]	3,00E-55
XP_001492014.3	PREDICTED: vinexin [Equus caballus]	4,00E-55
EDM02208.1	sorbin and SH3 domain containing 3, isoform CRA_a [Rattus norvegicus]	5,00E-55
AAC09244.1	>gb|AAH91514.1| Sorbin and SH3 domain containing 3 [Homo sapiens]	6,00E-55
NP_001005762.1	>gb|AAH83666.1| Sorbin and SH3 domain containing 3 [Rattus norvegicu	7,00E-55
EAW63676.1	sorbin and SH3 domain containing 3, isoform CRA_d [Homo sapiens]	1,00E-54
NP_005766.3	>sp|O60504.2|VINEX_HUMAN RecName: Full=Vinexin; AltName: Full=SH3-containing adapter molecule 1	1,00E-54
XP_002818929.1	PREDICTED: vinexin-like [Pongo abelii]	1,00E-54
XP_001156497.2	PREDICTED: vinexin isoform 1 [Pan troglodytes]	1,00E-54
XP_001106790.2	PREDICTED: vinexin isoform 1 [Macaca mulatta]	6,00E-54
XP_003359519.1	PREDICTED: sorbin and SH3 domain-containing protein 2 isoform 2 [Sus scrofa]	7,00E-54
XP_002805327.1	PREDICTED: vinexin isoform 2 [Macaca mulatta]	8,00E-54
NP_001030136.1	sorbin and SH3 domain-containing protein 1 isoform 5 [Mus musculus]	9,00E-54
NP_001039450.1	>gb|DAA26729.1| sorbin and SH3 domain containing 3 [Bos taurus]	1,00E-53
XP_002756894.1	PREDICTED: vinexin [Callithrix jacchus]	1,00E-53
AAI48111.1	SORBS3 protein [Bos taurus]	1,00E-53
XP_003339141.1	PREDICTED: sorbin and SH3 domain-containing protein 2 [Pan troglodytes]	3,00E-53
NP_001139147.1	sorbin and SH3 domain-containing protein 2 isoform 8 [Homo sapiens]	3,00E-53
BAC65769.2	mKIAA1296 protein [Mus musculus]	5,00E-53

```
EDL41835.1          sorbin and SH3 domain containing 1, isoform CRA_c [Mus musculus]    5,00E-53
AAM77354.1          c-Cbl associated protein CAP [Mus musculus]                         6,00E-53
XP_540021.2         PREDICTED: similar to Arg/Abl-interacting protein 2 isoform 2 isoform 2 [Canis
                    familiaris]                                                         7,00E-53
XP_534577.2         PREDICTED: similar to SH3 domain protein 4 [Canis familiaris]       1,00E-52
XP_856798.1         PREDICTED: similar to Arg/Abl-interacting protein 2 isoform 1 isoform 4 [Canis
                    familiaris]                                                         1,00E-52
BAH14233.1          unnamed protein product [Homo sapiens]                              1,00E-52
XP_856757.1         PREDICTED: similar to Arg/Abl-interacting protein 2 isoform 1 isoform 3 [Canis
                    familiaris]                                                         1,00E-52
AAH04314.1          SORBS3 protein [Homo sapiens]                                       1,00E-52
XP_003364286.1      PREDICTED: sorbin and SH3 domain-containing protein 2 isoform 6 [Equus caballus]
                                                                                        2,00E-52
XP_001165328.2      PREDICTED: sorbin and SH3 domain-containing protein 2 isoform 35 [Pan
                    troglodytes]                                                        2,00E-52
NP_001139142.1      sorbin and SH3 domain-containing protein 2 isoform 3 [Homo sapiens] 2,00E-52
BAH11501.1          unnamed protein product [Homo sapiens]                              3,00E-52
```

gb|ADZ99023.1| DRK [Bombyx mori]

```
Score = 57.0 bits (136),  Expect = 5e-12, Method: Compositional matrix adjust.
 Identities = 26/54 (48%), Positives = 38/54 (70%), Gaps = 0/54 (0%)

Query  153  EEMLVQALYDFTPQEAGELEFRRGDVITVTDRSDQHWWQGEIAHRRGLFPASYV  206
            +++L +ALY F  Q + EL FR+GD+I V  + D +W++GEI  R GLFP +YV
Sbjct  724  DKVLAKALYTFNGQTSRELSFRKGDIIFVRRQIDANWYEGEIHGRIGLFPYNYV  777

 Score = 56.6 bits (135),  Expect = 6e-12, Method: Compositional matrix adjust.
 Identities = 56/217 (26%), Positives = 87/217 (40%), Gaps = 19/217 (9%)

Query  3     ALAKHDFTATADDELSFRKNQVLKILNMEDDMNWYRAELDGKEGLIPSNYIQMKNHSWYY  62
              A AK DF A  + EL  +K +V+  L    D NW+      K G+ P +Y+ +
Sbjct  798   ARAKFDFIAQTNLELPLKKGEVV-TLTRRIDQNWWEGRNGLKTGIFPDSYVTILQEPSQS  856

Query  63    GRITRA--DAEKLLANKPEGGFLIRISESSPGDFSLSVKCPDGVQHFKVLRDA--SSKFF  118
                 R   + +K  A+    G L    + S G  S + +     Q+   L +A  S++
Sbjct  857   KPDPRPILNTDKPAASPAAHGLLNGSDKRSMGSHSYTPQ-----QNNPALSNAPPSTQPL  911

Query  119   LWVVKFNSLNELVDYHRTASVSRLQDVKLRDVVP-------EEMLVQALYDFTPQEAGEL  171
               V   +   L    R         V L +  P       E +  +A+Y + PQ   EL
Sbjct  912   PGYVAKPAQATLTPSERGYGPPTGSGVDLNNTEPLYVDTNAEAIPYRAMYKYRPQNPDEL  971

Query  172   EFRRGDVITVTDRSDQHWWQG--EIAHRRGLFPASYV  206
              E   GD + V ++ D  W+ G  +   R G FP +YV
Sbjct  972   ELNEGDTVYVLEKCDDGWYVGSSQRTGRFGTFPGNYV  1008

 Score = 55.5 bits (132),  Expect = 1e-11, Method: Compositional matrix adjust.
 Identities = 26/66 (39%), Positives = 41/66 (62%), Gaps = 2/66 (3%)

Query  142  LQDVKLRDVVPEEMLVQALYDFTPQEAGELEFRRGDVITVTDRSDQHWWQGEIAHRRGLF  201
            +Q +K   ++  E   +A +DF  Q   EL  ++G+V+T+T R DQ+WW+G    + G+F
Sbjct  785  IQVIKKPSII--EGRARAKFDFIAQTNLELPLKKGEVVTLTRRIDQNWWEGRNGLKTGIF  842

Query  202  PASYVT  207
            P SYVT
Sbjct  843  PDSYVT  848

 Score = 43.5 bits (101),  Expect = 1e-07, Method: Compositional matrix adjust.
 Identities = 20/54 (37%), Positives = 31/54 (57%), Gaps = 1/54 (2%)

Query  3    ALAKHDFTATADDELSFRKNQVLKILNMEDDMNWYRAELDGKEGLIPSNYIQMK  56
            A A + F      ELSFRK  ++  +  + D NWY  E+ G+ GL P NY++++
Sbjct  728  AKALYTFNGQTSRELSFRKGDII-FVRRQIDANWYEGEIHGRIGLFPYNYVEIQ  780

longer ecdysteroid-phosphate phosphatase [Bombyx mori]

Score = 45.4 bits (106),  Expect = 3e-07, Method: Compositional matrix adjust.
 Identities = 25/58 (43%), Positives = 29/58 (50%), Gaps = 4/58 (7%)

Query  240   YKVTQGYSPQASDELELVLGDYIYIEEKEFDISPDGWVHGTSWLTGLNGYLPAVYTRR  297
```

```
            Y+    Y PQ  DELEL  GD +Y+ EK      DGW  G+S  TG  G  P  Y  R
Sbjct  957  YRAMYKYRPQNPDELELNEGDTVYVLEK----CDDGWYVGSSQRTGRFGTFPGNYVER  1010

nervous wreck M [Bombyx mori]

Score = 43.5 bits (101),  Expect = 8e-06, Method: Compositional matrix adjust.
 Identities = 52/222 (23%), Positives = 86/222 (39%), Gaps = 38/222 (17%)

Query  542  KCTALYSYTAQNPDELSIIENEQLEVVGEGDGDGWLKARNYRGEEGYVPHNYLDVDHDQA  601
            +  A + + AQ   EL + + E + +    D + W + RN   + G  P +Y+ +  + +
Sbjct  797  RARAKFDFIAQTNLELPLKKGEVVTLTRRIDQN-WWEGRNGL-KTGIFPDSYVTILQEPS  854

Query  602  SSAP-----------------GLVS---QISFSSVDYTVEGEDADVVQSPDQISVISAP  640
             S P                   GL++   + S  S  YT +  +  +  +P     +
Sbjct  855  QSKPDPRPILNTDKPAASPAAHGLLNGSDKRSMGSHSYTPQQNNPALSNAPPSTQPLPGY  914

Query  641  VGKPDEPTKAAEAAQGEAAAVAQG-------PPKVDLPTLGYCF-ALYDYEAEACDELNL  692
            V KP + T    + +G       G       P  VD       + A+Y Y  +  DEL L
Sbjct  915  VAKPAQAT-LTPSERGYGPPTGSGVDLNNTEPLYVDTNAEAIPYRAMYKYRPQNPDELEL  973

Query  693  EEGQIIRVVSRNAHDVDDGWWRGET--NGIVGNFPSLIVEEC  732
             EG  + V+ +     DDGW+ G +   G  G FP   VE
Sbjct  974  NEGDTVYVLEK----CDDGWYVGSSQRTGRFGTFPGNYVERI  1011

Score = 41.2 bits (95),  Expect = 4e-05, Method: Compositional matrix adjust.
 Identities = 21/67 (31%), Positives = 35/67 (52%), Gaps = 6/67 (9%)

Query  678  ALYDYEAEACDELNLEEGQIIRVVSRNAHDVDDGWWRGETNGIVGNFPSLIVEECDENGE  737
            ALY +  +   EL+  +G II V       +D  W+ GE +G +G FP   VE   + G+
Sbjct  730  ALYTFNGQTSRELSFRKGDIIFV----RRQIDANWYEGEIHGRIGLFPYNYVE--IQKGD  783

Query  738  PLSVVEE  744
             + V+++
Sbjct  784  TIQVIKK  790

Score = 37.4 bits (85),  Expect = 7e-04, Method: Compositional matrix adjust.
 Identities = 30/146 (21%), Positives = 56/146 (38%), Gaps = 36/146 (25%)

Query  647  PTKAAEAAQGEAAAVAQGPPKVDLPTLGYCFALYDYEAEACDELNLEEGQIIRVVSRNAH  706
            P    E  +G+   V + P  ++    G   A +D+ A+   EL L++G++++ +  +  R
Sbjct  773  PYNYVEIQKGDTIQVIKKPSIIE----GRARAKFDFIAQTNLELPLKKGEVVTLTRR---  825

Query  707  DVDDGWWRGETNGIVGNFP----SLIVEECDENGEPLSVVEED----------------  745
             +D  WW G      G FP    +++ E      +P  ++  D
Sbjct  826  -IDQNWWEGRNGLKTGIFPDSYVTILQEPSQSKPDPRPILNTDKPAASPAAHGLLNGSDK  884

Query  746  -------WTPSGCAPPVFASPPTSPP  764
                  +TP    P +  +PP++ P
Sbjct  885  RSMGSHSYTPQQNNPALSNAPPSTQP  910

phospholipase C gamma [Bombyx mori]
Score = 37.0 bits (84),  Expect = 4e-04, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 23/54 (43%), Positives = 28/54 (52%), Gaps = 1/54 (2%)

Query  778  KVTVKALYDYRARQGDELSFCKHAIITNVDKPDEGWWRGDYGGKRHHWFPANYV  831
            KV  KALY +  +   ELSF K  II    + D  W+ G+  G R   FP NYV
Sbjct  725  KVLAKALYTFNGQTSRELSFRKGDIIFVRRQIDANWYEGEIHG-RIGLFPYNYV  777

Score = 36.2 bits (82),  Expect = 6e-04, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 22/69 (32%), Positives = 34/69 (49%), Gaps = 3/69 (4%)

Query  767   PGYMDPTSFTSKVTVKALYDYRARQGDELSFCKHAIITNVDKPDEGWWRGDYG-GKRHHW  825
             P Y+D  +    +  +A+Y YR +  DEL   +   +  ++K D+GW+ G      R
Sbjct  945   PLYVD--TNAEAIPYRAMYKYRPQNPDELELNEGDTVYVLEKCDDGWYVGSSQRTGRFGT  1002

Query  826   FPANYVLEI  834
             FP NYV  I
Sbjct  1003  FPGNYVERI  1011

Score = 35.8 bits (81),  Expect = 8e-04, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 24/84 (29%), Positives = 38/84 (45%), Gaps = 3/84 (4%)
```

```
Query  781  VKALYDYRARQGDELSFCKHAIITNVDKPDEGWWRGDYGGKRHHWFPANYVLEIEVP--H  838
             +A +D+ A+   EL   K  ++T   + D+ WW G  G K    FP +YV  ++ P
Sbjct  798  ARAKFDFIAQTNLELPLKKGEVVTLTRRIDQNWWEGRNGLK-TGIFPDSYVTILQEPSQS  856

Query  839  TPDVTSGLENESAALGSLQKGVLD  862
             PD    L  +  A      G+L+
Sbjct  857  KPDPRPILNTDKPAASPAAHGLLN  880
```

K3 protein [Bombyx mori]

Score = 38.9 bits (89), Expect = 2e-05, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 49/230 (21%), Positives = 82/230 (36%), Gaps = 62/230 (27%)

```
Query  162   EGEACPFSKDPS---GRYVVLYTFTARDENDVDVERGEFVTVLNREDPDWYWIVRSDGQE  218
              +G+     K PS   GR    + F A+   ++ +++GE VT+  R D +W W  R+  +
Sbjct  781   KGDTIQVIKKPSIIEGRARAKFDFIAQTNLELPLKKGEVVTLTRRIDQNW-WEGRNGLKT  839

Query  219   GFIPSGFV--------------------YPAVVQA-----------------TTQENTQ  240
              G  P  +V                      PA   A                   T Q+N
Sbjct  840   GIFPDSYVTILQEPSQSKPDPRPILNTDKPAASPAAHGLLNGSDKRSMGSHSYTPQQNNP  899

Query  241   TLHPTPPTNT---------NNSIIS---------TNNNSSINNTTQQDNDGRYHGTELVM  282
               L   PP+             + ++         T +   +NNT     D
Sbjct  900   ALSNAPPSTQPLPGYVAKPAQATLTPSERGYGPPTGSGVDLNNTEPLYVDTNAEAIPYRA  959

Query  283   LYDYKAQAPDDLTVKRGEWVYADLTQQTVEGWLWAHAPKSRRSGFIPTAY  332
              +Y Y+ Q PD+L +  G+ VY  + ++  +GW    + ++ R G  P  Y
Sbjct  960   MYKYRPQNPDELELNEGDTVY--VLEKCDDGWYVGSSQRTGRFGTFPGNY  1007
```

Score = 26.9 bits (58), Expect = 0.083, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 13/49 (27%), Positives = 23/49 (47%), Gaps = 1/49 (2%)

```
Query  178  VLYTFTARDENDVDVERGEFVTVLNREDPDWYWIVRSDGQEGFIPSGFV  226
             LYTF  +   ++   +G+ + V  + D +WY      G+ G  P  +V
Sbjct  730  ALYTFNGQTSRELSFRKGDIIFVRRQIDANWYE-GEIHGRIGLFPYNYV  777
```

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Χ: Φορείς έκφρασης και κατασκευή των χιμαιρικών πρωτεϊνών της EYFP με ολόκληρη ή τμήματα της BmSH3-A1.

Α)

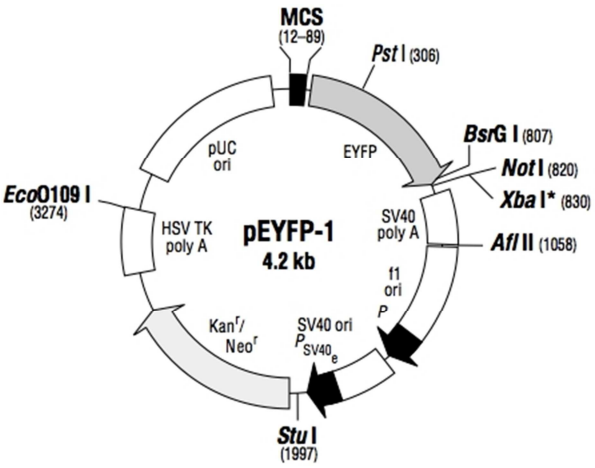
EYFP.F: 5΄TATAGCGGCCGCCAACATGGTGAGCAAGGGCGA΄3

EYFP.R: 5΄CGGCCCCTTGGCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG΄3

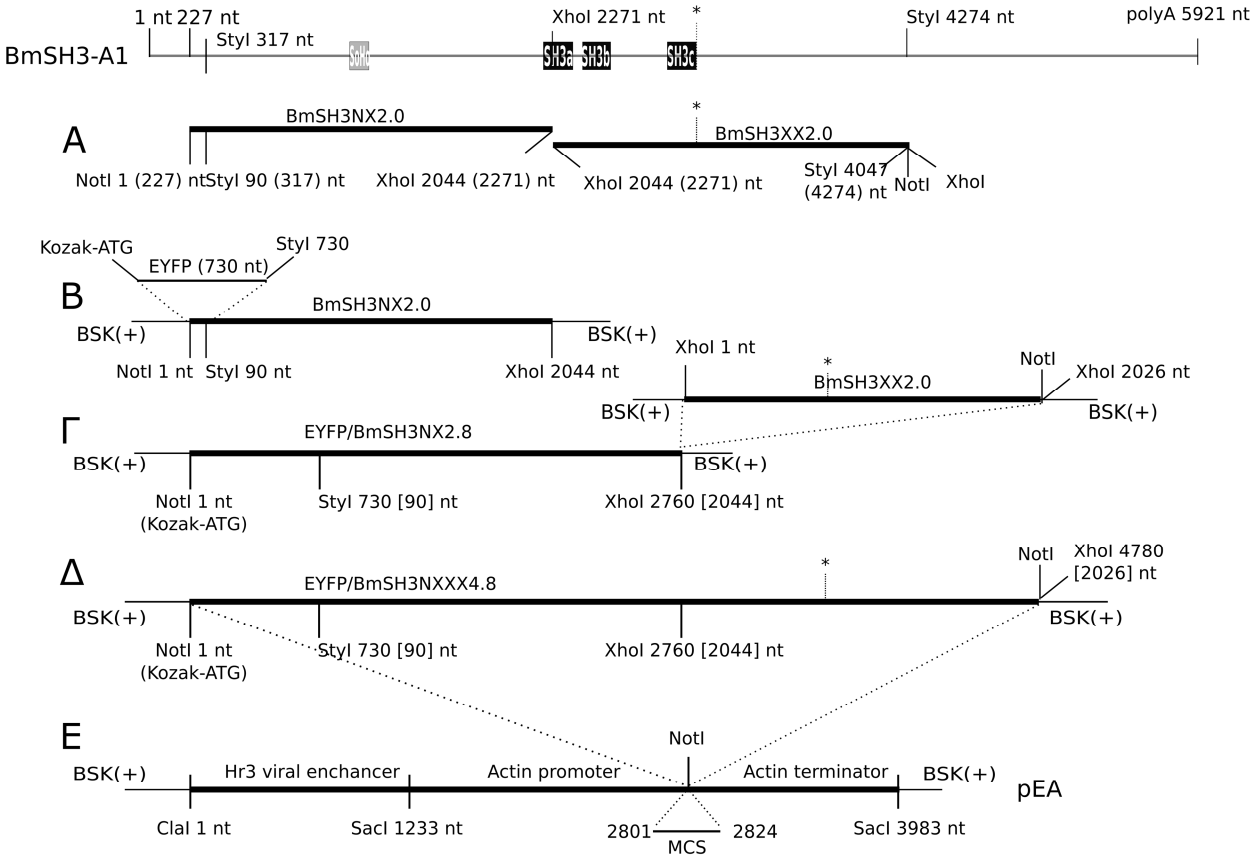
Β)

*TATAGCGGCCGCCAAC***ATGGTGAGCAAGGGCGA**GGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGA
CGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCA
CCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATG
AAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAA
GACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACA
TCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAC
TTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGT
GCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGG
AGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCT**CGGCATGGACGAGCTGTACAAG***CCAAGGGGCCG*

Γ)



Εικόνα 1: Η αλληλουχία που κωδικοποιεί την EYFP μετά από ενίσχυσή της από τον φορέα έκφρασης pEYFP-1 (Clontech). Α) Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης της EYFP Β) Η πλήρης αλληλουχία του EYFP που ενισχύθηκε με τους εκκινητές EYFP.F και EYFP.R. Διακρίνονται οι αλληλουχίες αναγνώρισης για τα περιοριστικά ένζυμα NotI (κίτρινο πλαίσιο) και StyI (γκρίζο πλαίσιο) και η ακολουθία Kozak (θαλασσί πλαίσιο). Με έντονο χαρακτήρα σημειώνεται η περιοχή του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης της EYFP αλληλουχίας που αναγνωρίζουν οι εκκινητές και με πλάγιους χαρακτήρες η αλληλουχία που προστέθηκε στο γονίδιο. Γ) Σχηματική παρουσίαση του φορέα έκφρασης της EYFP, pEYFP-1 (Clontech). Εμφανίζονται τα κύρια χαρακτηριστικά του φορέα έκφρασης όπως η περιοχή MCS, την κασέτα έκφρασης της EYFP και του γονιδίου ανθεκτικότητας στην νεομικίνη.



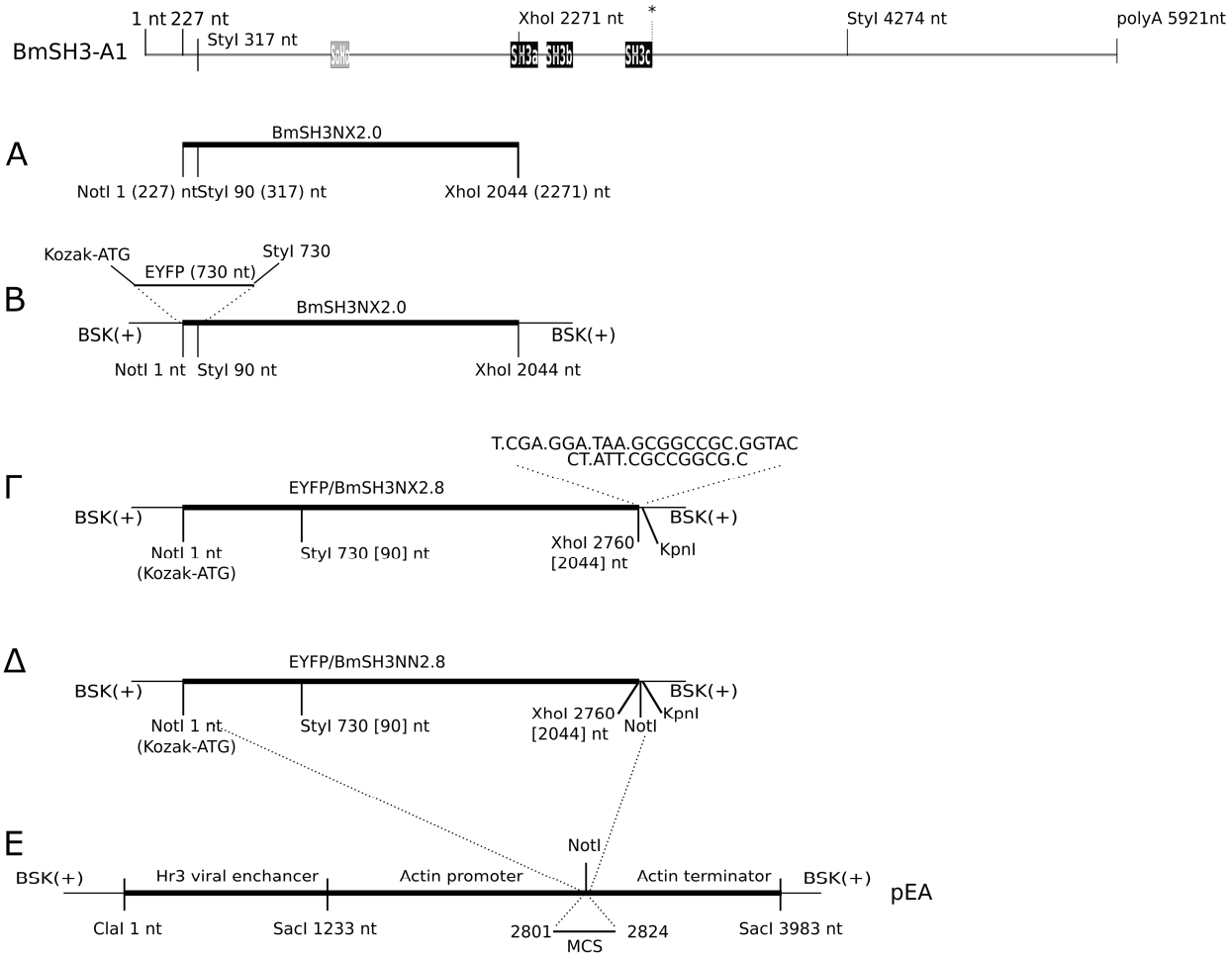
Εικόνα 2: Σχηματική παρουσίαση της κατασκευής του φορέα έκφρασης pEA.EYFP/BmSH3-A1**.** Οι μαύρες έντονες οριζόντιες γραμμές ορίζουν το μέγεθος της αντίστοιχης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Με λεπτές κάθετες μαύρες γραμμές επισημαίνεται η θέση των περιοριστικών ενζύμων, ενώ με διακεκομμένες γραμμές η θέση της κλωνοποίησης κομματιών DNA. Με γκρι πλαίσιο παρουσιάζεται η περιοχή που κωδικοποιεί την SoHo και με μαύρα πλαίσια τις SH3. Με κάθετη διακεκομμένη γραμμή και αστερίσκο παρουσιάζεται η θέση του κωδικονίου λήξης της BmSH3-A1. Α) Σχηματική παρουσίαση της σχετικής θέσης των δύο κομματιών BmSH3NX2.0 και BmSH3XX2.0 στη BmSH3-A1 αλληλουχία. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις δείχνουν την θέση σε σχέση με την αλληλουχία του γνωστού cDNA του BmSH3-A1. Β) Σχηματική παρουσίαση του EYFP όπως ενισχύθηκε από τη PCR με τις περιοχές αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων NotI και StyI (παράρτημα Χ, εικόνα 1). Το BmSH3NX2.0 αναπαριστά τον κλώνο του BmSH3 που θα εισαχθεί το EYFP. Γ) Γραφική παράσταση του EYFP/BmSH3NX2.8. Οι αριθμοί στις αγκύλες δείχνουν την θέση σε σχέση με την αλληλουχία του γνωστού cDNA του BmSH3-A1 Δ) Γραφική παράσταση του EYFP/BmSH3NXXX4.8 που κατασκευάστηκε μετά από την υποκλωνοποίηση του BmSH3XX2.0 στη θέση XhoI του EYFP/BmSH3NX2.8. Ε) Γραφική παράσταση του φορέα έκφρασης των λεπιδοπτέρων pEA (Douris et al., 2006) όπου εμφανίζεται η θέση αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου NotI, όπου έγινε η υποκλωνοποίηση του EYFP/BmSH3NXXX4.8 για την κατασκευή του φορέα έκφρασης pEA.EYFP/BmSH3-A1. hr3 (homologous region 3): ενισχυτής από τον βακιλοϊό (BmNPV:Bombyx mori Nuclear Polyhedrosis Virus) του B. mori, Actin: πλήρης υποκινητής της ακτίνης του μεταξοσκώληκα B. mori. Actin poly-A: 1.3 kb από την 3΄ αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου της ακτίνης του B. mori που περιλαμβάνει το σήμα πολυαδενυλίωσης.

```
Linker.F 5´-CT.CGA.GGA.TAA.GCGGCCGCGGTACC-´3

Linker.R3´ -.......CCT.ATT.CGCCGGCGC.....-5

              [XhoI]   stop [NotI]   [KpnI]
```

Εικόνα 3: Παρουσίαση του συνδέτη που κατασκευάστηκε για την εισαγωγή των αλληλουχιών αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων XhoI, NotI και KpnI καθώς και του κωδικονίου λήξης της μετάφρασης TAA. Η αλληλουχία του συνδέτη είναι υπογραμμισμένη, οι αλληλουχίες αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων είναι με έντονους χαρακτήρες.



Εικόνα 4: Σχηματική παρουσίαση της κατασκευής του φορέα έκφρασης pEA.EYFP/BmSH3Δ.C. Οι μαύρες έντονες οριζόντιες γραμμές ορίζουν το μέγεθος της αντίστοιχης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Με λεπτές κάθετες μαύρες γραμμές επισημαίνεται η θέση των περιοριστικών ενζύμων, ενώ με διακεκομμένες γραμμές η θέση της κλωνοποίησης κομματιών DNA. Με γκρι πλαίσιο παρουσιάζεται η περιοχή που κωδικοποιεί την SoHo και με μαύρα πλαίσια τις SH3. Με κάθετη διακεκομμένη γραμμή και αστερίσκο παρουσιάζεται η θέση του κωδικονίου λήξης της BmSH3-A1. Α) Σχηματική παρουσίαση και σχετική θέση του κλώνου BmSH3NX2.0 στη BmSH3-A1 αλληλουχία. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις δείχνουν τη θέση σε σχέση με την αλληλουχία του γνωστού cDNA του BmSH3 Β) Σχηματική παρουσίαση του κομματιού

EYFP όπως ενισχύθηκε από από την PCR με τις περιοχές αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων NotI και StyI (βλ και παράρτημα X, εικόνα 1,). Γ) Σχηματική παρουσίαση του EYFP/BmSH3NX2.8. Οι αριθμοί στις αγκύλες δείχνουν την θέση σε σχέση με την αλληλουχία του γνωστού cDNA του BmSH3. Παρουσιάζεται και ο συνδέτης (βλέπε και εικόνα 2) προς εισαγωγή των περιοριστικών ενζύμων XhoI , KpnI και NotI και του κωδικονίου λήξης Δ) Σχηματική παρουσίαση του pBSKEYFP/BmSH3NN2.8. Ε) Σχηματική παρουσίαση του φορέα έκφρασης των λεπιδοπτέρων pEA (Douris et al., 2006) όπου εμφανίζεται η θέση κλωνοποίησης του EYFP/BmSH3NN2.8 για την κατασκευή του φορέα έκφρασης pEA.EYFP/BmSH3Δ.C.

A)

XX.F:

(5´CCAAGGATGCAAAACAGGCGTCACCAAG´3)

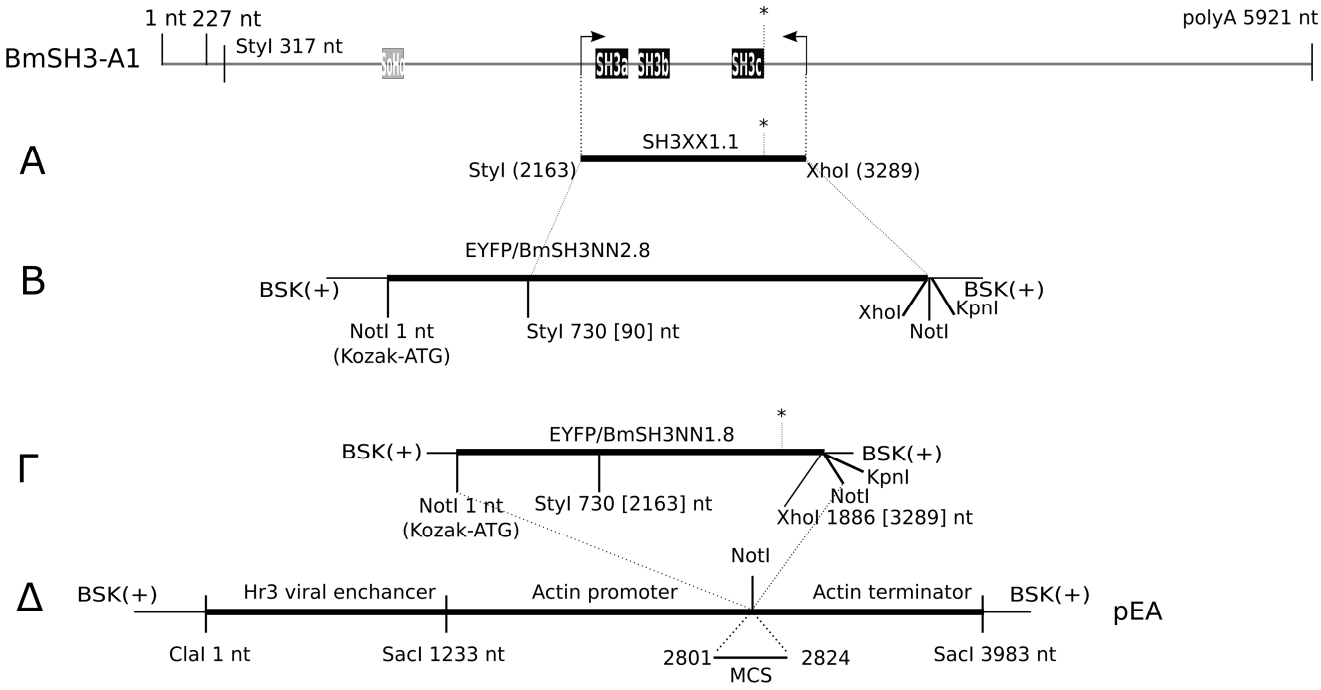
XX.R:

(5´GAGCTCCTCCAGTAACCACTTAACACCA´3)

B)

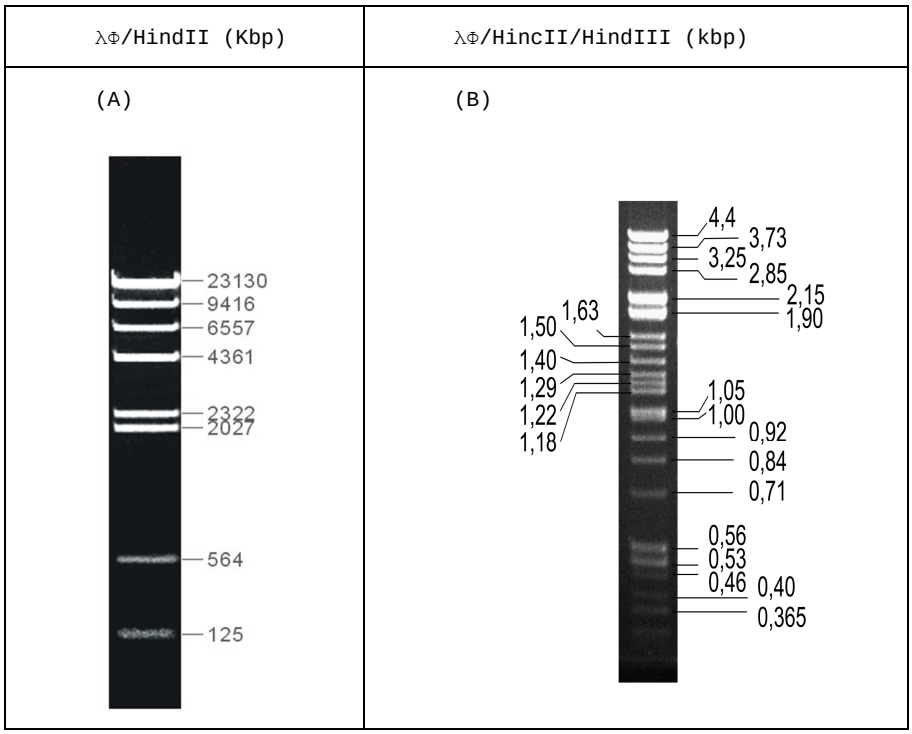
CCAAGGATGCAAAACAGGCGTCACCAAGACAACTTCACGCCTTCACAGAAGACCGTAGTCCCTCTGAACAGATACGACGAT
GCCGACAAAGTTCTTGCAAAAGCCCTATACACTTTCAACGGTCAGACTTCTCGAGAACTCAGTTTTAGAAAAGGAGATATAATATT
TGTGCGAAGGCAGATTGACGCGAATTGGTACGAAGGTGAAATTCATGGAAGAATTGGGCTGTTCCCGTATAATTATGTAGAGATAC
AGAAGGGTGATACAATCCAAGTTATTAAGAAGCCGTCAATCATCGAGGGCCGTGCCAGGGCGAAGTTTGATTTCATAGCACAGACC
AATCTCGAACTGCCATTGAAGAAAGGAGAAGTTGTGACTTTGACAAGACGTATTGACCAGAACTGGTGGGAAGGCCGAAACGGCTT
AAAAACTGGAATATTCCCGGACAGCTATGTTACAATTCTACAGGAACCCAGCCAGAGCAAACCTGATCCGAGGCCAATCTTAAACA
CCGATAAGCCAGCGGCGTCACCGGCCGCTCACGGTCTTCTCAACGGTTCCGATAAAAGAAGTATGGGTTCTCATAGCTACACGCCA
CAGCAGAACAATCCAGCGCTCTCTAATGCGCCACCTTCCACTCAGCCACTTCCCGGTTATGTGGCGAAACCAGCCCAAGCGACACT
TACACCTTCCGAACGTGGTTACGGACCTCCAACAGGCTCGGGGGTAGATCTTAATAACACCGAACCCCTGTACGTCGACACTAATG
CCGAAGCCATACCATATCGTGCGATGTACAAATACCGGCCTCAAAATCCTGACGAGCTCGAACTGAACGAGGGTGATACGGTGTAC
GTACTGGAGAAATGCGACGACGGCTGGTACGTCGGCTCAAGCCAGAGAACCGGCCGCTTCGGTACCTTCCCAGGCAACTACGTGGA
GCGTATCTGATAGCGCGAGACGTCGCTGTTCCGTCGGCTGCGGCGCGCTGCACTGTGCGGCCGGCGGCGTCGCTGAACTGACGCAC
TAACACGTGCCACGGTACAACACGACACAACCTCCATACCATTATACAGGGTGTAACTACACCGTTCCCGAAATCGAAACGAGAAT
ATATTTTTTATTGCTTAAGTGTGTGTG**TGGTGTTAAGTGGTTACTGGAGGA.GCT.C**

Εικόνα 5: Α) Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του 3´ άκρου της ακολουθίας του BmSH3-A1, XX.F και XX.R. Με γκρι πλαίσιο σημαίνεται η περιοχή αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων StyI, για το XX.F, και XhoI, για το XX.R. Β) Η αλληλουχία του SH3XX1.1 που αντιστοιχεί στο 3´ άκρο της BmSH3 cDNA αλληλουχίας, όπως ενισχύθηκε μετά από PCR με τους εκκινητές XX.F και XX.R. Στο γκρι πλαίσιο παρουσιάζονται οι αλληλουχίες αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων StyI στο 5´ άκρο και XhoI στο 3´, με γαλάζια γραμματοσειρά η ακολουθία που κωδικοποιεί τις περιοχές SH3, με κόκκινο το κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης και με έντονη γραμματοσειρά η ακολουθία της SH3 που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των εκκινητών.

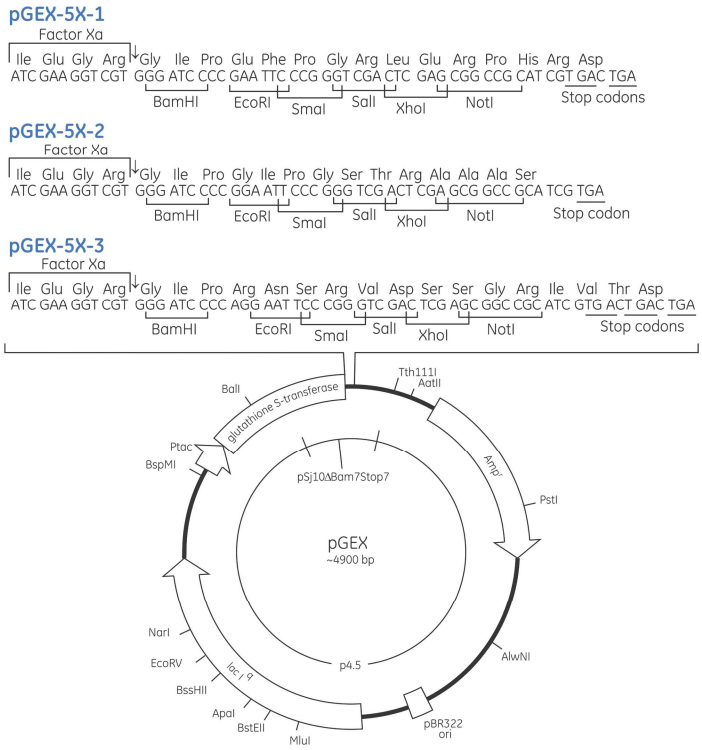


Εικόνα 6: Σχηματική παρουσίαση της κατασκευής του φορέα έκφρασης pEA.EYFP/BmSH3Δ.N. Οι μαύρες έντονες οριζόντιες γραμμές ορίζουν το μέγεθος της αντίστοιχης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Με λεπτές κάθετες μαύρες γραμμές επισημαίνεται η θέση των περιοριστικών ενζύμων, ενώ με διακεκομμένες γραμμές η θέση της κλωνοποίησης κομματιών DNA. Με γκρι πλαίσιο παρουσιάζεται η περιοχή που κωδικοποιεί την SoHo και με μαύρα πλαίσια τις SH3. Με κάθετη διακεκομμένη γραμμή και αστερίσκο παρουσιάζεται η θέση του κωδικονίου λήξης της BmSH3-A1, και με τα αντίστροφα βέλη παρουσιάζεται η περιοχή που ενισχύθηκε από την PCR με τους εκκινητές XX.F, XX.R. Α) Σχηματική παρουσίαση και σχετική θέση του κομματιού SH3XX1.1 στη BmSH3-A1 αλληλουχία. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις δείχνουν την θέση σε σχέση με την αλληλουχία του γνωστού cDNA του BmSH3-A1, όπου παρουσιάζονται και οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων StyI, XhoI Β) Σχηματική παρουσίαση του EYFP/BmSH3Δ.NN2.8. Παρουσιάζονται και οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων StyI και XhoI όπου έγινε η υποκλωνοποίηση του SH3XX1.1. Γ) Σχηματική παρουσίαση του EYFP/BmSH3NN1.8.Δ). Σχηματική παρουσίαση του φορέα έκφρασης των λεπιδοπτέρων pEA (Douris et al., 2006) όπου εμφανίζεται η θέση κλωνοποίησης του EYFP/BmSH3NN1.8 για την κατασκευή του φορέα έκφρασης pEA.EYFP/BmSH3Δ.N΄end.

Εικόνα 7: Γνωστά μοριακά μεγέθη της πέψης του λ φάγου με τα περιοριστικά ένζυμα HindIII και HincII/HindIII. Α).Ηλεκτροφόριση σε 0,7 % πήκτωμα αγαρόζης του μάρτυρα μοριακών μεγεθών λ/HindII. Β).



Ηλεκτροφόρηση σε 1 % πήκτωμα αγαρόζης του μάρτυρα οριακών μεγεθών λ/HincII/HindII



Εικόνα 8:Ο φορέας έκφρασης pGEX. Παρουσιάζονται το γονίδιο έκφρασης της GST (glutathion-S-transferase), που βρίσκεται υπό τον έλεγχο του tac υποκινητή (Ptac), το γονίδιο της ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (Amp), και του καταστολέα lac (lacI). Περιέχει το oriC (origin of replication) του πλασμιδίου pBR322. Παρατίθεται η περιοχή που κωδικοποιεί τα αμινοξέα αναγνώρισης του Factor-Xa, του MCS (η θέση σημαίνεται με μαύρο βέλος), και τα κωδικόνια λήξης στα διαφορετικά πλαίσια ανάγνωσης που αντιστοιχούν σε κάθε ένα από τους διαφορετικούς φορείς έκφρασης.

12.ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΕΠΩΝΥΜΟ : **Γεωργομανώλης**

ΟΝΟΜΑ : **Θεόδωρος**

ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΡΟΣ : **Δημήτριος**

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ : 25 Μαρτίου 1977

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ :tgeorgo@bio.demokritos.gr, tgeorgo@bioacademy.gr

Δ/ΝΣΗ ΣΗΜΕΡΙΝΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ :Ίδρυμα Ιατροβιολογικών ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, στον τομέα βασικής έρευνας ΙΙ, Σωρανού Εφεσίου 4, 115 27 Αθήνα

ΣΗΜΕΡΙΝΗ ΘΕΣΗ :Υποψήφιος Διδάκτωρ (Υ.Δ.) στον τομέα Κυτταρικής Βιολογίας και Βιοφυσικής του Ε.Κ.Π.Α..

Συνεργαζόμενος ερευνητής στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, στον τομέα βασικής έρευνας ΙΙ

Εκπαίδευση- Ερευνητική Εμπειρία

2011 έως σήμερα: Ως συνεργαζόμενος ερευνητής στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, στον τομέα βασικής έρευνας ΙΙ, στο εργαστήριο του Διευθυντή Ερευνών Δρ. Δ. Θάνου, όπου το ερευνητικό μου έργο αφορά στον μηχανισμό της μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου της ιντερφερόνης β, μετά από ιική μόλυνση, σε ανθρώπινα κύτταρα.

2002 έως σήμερα: Υποψήφιος Διδάκτωρ του τομέα Κυτταρικής Βιολογίας και Βιοφυσικής του Ε.Κ.Π.Α..με θέμα διδακτορικής διατριβής: «Χαρακτηρισμός Πρωτεϊνικών Αλληλεπιδράσεων και Λειτουργικός Ρόλος Της Πρωτεΐνης SH3 του Bombyx mori», η οποία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Εντόμων και Βιοτεχνολογίας του Ινστιτούτου Βιολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος υπό την επίβλεψη του καθηγητή Κ. Ιατρού.

2001-2002: Ως εκπαιδευόμενος στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας Εντόμων του Ινστιτούτο Βιολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε Δημόκριτος, υπό την επίβλεψη του Δρ. Κ. Ιατρού και του Δρ. L. Swevers.

Απρίλιος 2001: Ένταξη στο πρόγραμμα Υ.Μ.Υ.Δ. του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» για εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο Ινστιτούτο Βιολογίας (υποτροφία από το πρόγραμμα Υ.Μ.Υ.Δ.)

1995-2001: Προπτυχιακός φοιτητής στο Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών επιστημών του Πανεπιστημίου Πατρών. Η διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στον τομέα βιοτεχνολογίας με επιβλέπουσα την Αν. Καθηγ. Νικολέτα Παπαγεωργακοπούλου με τίτλο: «Απομόνωση και μελέτη Θειικής Κερατάνης λοβών και παρεγκεφαλίδας εγκεφάλου αμνού». Έλαβα το πτυχίο μου με βαθμό 7,27 (Λίαν Καλώς) τον Απρίλιο του 2001.

1995: Αποφοίτησα από το Λύκειο με βαθμό 14 και 9/10

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Georgomanolis, T., Iatrou, K., and Swevers, L. (2005). Expression analysis of BmSH3, an adaptor protein characterized by multiple SH3 domains and a single SoHo domain, during silkmoth oogenesis. Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology. Proceedings 57th Meeting. Volume 52, 213-216 (Athens, 2005).

T. Georgomanolis, K. Iatrou, and L. Swevers (2006). BmSH3, an adaptor protein with multiple SH3 and a single SoHo domain: expression analysis during follicle development in the ovary of the silkmoth, *Bombyx mori*, Insect Molecular Genetics and Biotechnology, Institute of Biology, National Center of Scientific Research Demokritos, Greece

Georgomanolis Th, Iatrou K, Swevers L. (2006). Expression analysis of BmSH3, a putative modulator of the function of the ecdysone-regulated orphan nuclear receptor BmE75C, during silkmoth oogenesis, Insect Molecular Genetics and Biotechnology Group, Insitute of Biology, National Center for Scientific Research "Demokritos", Aghia Paraskevi Attikis, Athens, Greece.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

Θεόδωρος Γεωργομανώλης, Ελένη Δελήγιάννη, Αιμιλία Δήμα, Κυριακή Καραγιάννη, Χριστόφορος Νικολάου και Δημήτρης Βύνιος, Καταλυτικά αντισώματα, Άρθρα επισκόπησης, Φαρμακευτική 13,I, 21-31,2000

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

Georgomanolis T., Iatrou K., Swevers L, 2009. BmCAP,a silkmoth gene encoding multiple protein isoforms characterized by SoHo and SH3 domains: Expression analysis during ovarian follicular development. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 39, 892-902.

13.ΕΡΓΑΣΙΕΣ

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