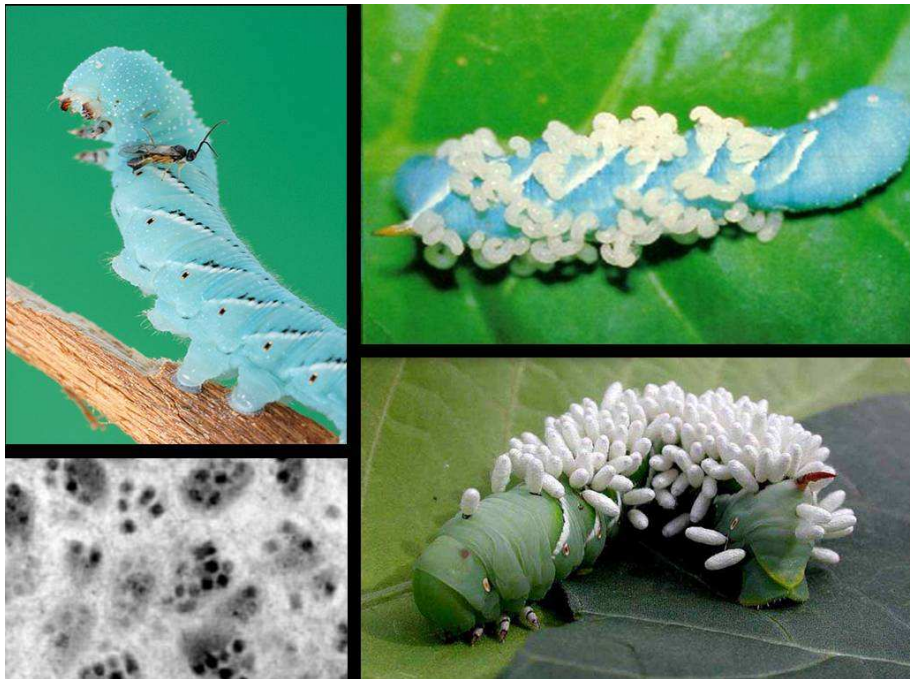


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ-ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών του ενδοσυμβιωτικού
ιού του παρασιτοειδούς Υμενοπτέρου *Cotesia*
congregata με πρωτεΐνες της ανοσολογικής απόκρισης
των Λεπιδοπτέρων



Διδακτορική διατριβή
της ΧΡΙΣΤΙΑΝΑΣ-ΣΤΑΥΡΟΥΛΑΣ ΜΑΓΚΡΙΩΤΗ
Βιολόγου

ΑΘΗΝΑ 2011

Φωτογραφίες εξώφυλλου από:

- Alex Wild,
- Galveston County Master Gardener Association και
- Chen, Y.-P. and Gundersen-Rindal, D.E. 2003. Morphological and genomic characterization of the polydnavirus associated with the parasitoid wasp *G. indiensis*. *Journal of General Virology* 84: 2051-2060

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

- Ε. Λεκανίδου** Ομότιμη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Δ. Σίδερης Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Κ. Ιατρού Ερευνητής Α', Ινστιτούτο Βιολογίας, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

- Ε. Λεκανίδου** Ομότιμη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Δ. Σίδερης Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Κ. Ιατρού Ερευνητής Α', Ινστιτούτο Βιολογίας, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος
Ε. Φραγκούλης Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Γ. Ροδάκης Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Δ. Βασιλακοπούλου Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Β. Λαμπροπούλου Ερευνήτρια Β', Ινστιτούτο Βιολογίας, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Βιολογικό Τμήμα της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

Ν. 5343/1932, άρθρο 202, παρ. 2

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Εντόμων και Βιοτεχνολογίας, στο Ινστιτούτο Βιολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος υπό την επίβλεψη του Δρ. Κώστα Ιατρού και της Δρ. Βασιλικής Λαμπροπούλου. Η διατριβή χρηματοδοτήθηκε από Πρόγραμμα ΠΕΝΕΔ 2003, χορηγούμενο από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βαθέων τον Δρ. Ιατρού για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπαιδευτώ επιστημονικά στο εργαστήριό του και να εργαστώ στο αρμονικό περιβάλλον που έχει διαμορφώσει εκεί. Οι οξυδερκείς του παρατηρήσεις και οι συμβουλές του σε όλη την πορεία διεξαγωγής της διατριβής μου ήταν εξαιρετικά χρήσιμες και πολύ συχνά μου πρόσφεραν μια διαφορετική οπτική γωνία, η οποία με βοηθούσε να αντιμετωπίσω τις προκλήσεις κατά τη διάρκεια της διατριβής. Επιπλέον, θα ήθελα να αναγνωρίσω και να τον ευχαριστήσω για την υπομονή και στοργή του απέναντί μου αυτά τα έξι χρόνια γνωριμίας μας.

Η Δρ Βασιλική Λαμπροπούλου υπήρξε η άμεση επιβλέπουσά μου σε καθημερινή βάση, η οποία με συμβούλευε σε κάθε είδους θέματα από τα πιο απλά (συγκεντρώσεις διαλυμάτων) έως τα πιο σύνθετα επιστημονικά θέματα της διατριβής, αλλά ενίοτε δε και προσωπικά. Αναμφίβολα, αποτέλεσε το ανθρώπινο μικροπεριβάλλον που μου επέτρεψε να φέρω εις πέρας την εκπόνηση της διατριβής και γι' αυτό την ευχαριστώ.

Ο Δρ. Luc Swevers, επιβλέπων μου στα πλαίσια της εσωτερικής τριμελούς επιτροπής στο Δημόκριτο, επίσης στάθηκε κοντά μου όλα αυτά τα χρόνια. Η πολύχρονη εμπειρία του σε θέματα Μοριακής Βιολογίας αποτέλεσε μεγάλη βοήθεια για μένα, ενώ η κριτική του ματιά ως προς τα αποτελέσματα των πειραμάτων μου και η ενθάρρυνσή του συχνά μου έδωσαν ώθηση σε πολλαπλά επίπεδα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου με τα οποία συνύπαρξα αυτά τα χρόνια, είτε για περισσότερο χρόνο είτε για λιγότερο. Να ξεκινήσω ευχαριστώντας την Ντανιέλα Τσίκου, η οποία υπήρξε η πρώτη μου «δασκάλα» πειραματικά, την Παναγιώτα Τσίτουρα, την Άννα Κολιοπούλου, τον Κωνσταντίνο Ιωαννίδη, τη Γεωργία Κυθραιώτη, την Τζίνα Κοτζιά, το Θοδωρή Γεωργομανώλη και τη Νάντια Σδράλια για την αγαστή συνεργασία μας, τις επιστημονικές συμβουλές αλλά και για όλη την υποστήριξη και φιλία. Ευχαριστώ τον Βασίλη Δουρή για όλες τις συζητήσεις, επιστημονικές και υπαρξιακές, που με συνόδευσαν αυτά τα χρόνια και τον Κωστή Κούση για το τρομερό χιούμορ του που ομόρφυνε το γραφείο μας. Φυσικά, ευχαριστώ τη Δήμητρα Στεφάνου και τον Δημήτρη Κοπανέλη πρωτίστως για τη –σχεδόν γονεϊκή– αγάπη τους απέναντί μου και, δευτερευόντως, για την πρακτική βοήθειά τους στο εργαστήριο. Αλλά και τον Ruben de Wilde τόσο για τη βοήθειά του σε θέματα στατιστικής, όσο και για την αισιοδοξία του. Όμως, η λίστα των εργαστηριακών μελών-φίλων μπορεί να κλείσει μόνο ευχαριστώντας την Rodica Efrose, χωρίς την οποία είναι αμφίβολο κατά πόσο θα είχα καταφέρει να φέρω εις πέρας το έργο αυτό. Την ευχαριστώ για την υποστήριξή της και το κουράγιο που μου έδωσε.

Δεν πρέπει να αμελήσω να ευχαριστήσω όλο το Ινστιτούτο Βιολογίας, καθώς τόσο διοικητικά, όσο και επιστημονικά συνεισέφερε στη διατριβή αυτή. Φυσικά, εκτός από το μόνιμο ερευνητικό ή διοικητικό προσωπικό που πάντα ήταν πρόθυμο για οποιαδήποτε βοήθεια, ευχαριστώ και τους υπόλοιπους φοιτητές με τους οποίους ακολουθήσαμε παράλληλες πορείες και άλλοτε γελούσαμε και άλλοτε απογοητευόμασταν μαζί.

Ιδιαίτερη μνεία χρωστώ στον Δρ. Θεοδόση Θεοδοσίου από το Ινστιτούτο Φυσικοχημείας του Δημοκρίτου για τις ατέλειωτες ώρες και τον ενθουσιασμό που μου διέθεσε κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση των δειγμάτων μου, ως υπεύθυνος του συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης.

Επίσης, ευχαριστώ βαθύτατα τους επιβλέποντες καθηγητές μου από το Πανεπιστήμιο Αθηνών, Δρ. Ρένα Λεκανίδου και Δρ. Διαμάντη Σίδηρη, οι οποίοι με βοήθησαν ακόμα και υπό συνθήκες χρονικής πίεσης, με καθοδήγησαν σε τεχνικά και επιστημονικά θέματα και με ενθάρρυναν. Ταυτόχρονα, πολλά μέλη του Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, όπως ο Νίκος Αρβανίτης, η Λάρα Κραββαρίτη και η Βιβή Σκούρου με βοήθησαν πολλές φορές αυτά τα χρόνια και τους ευχαριστώ.

Η διδακτορική διατριβή μου δε θα είχε πραγματοποιηθεί αν δε μας είχε προμηθεύσει ο Δρ. Jean-Michel Drezon του Πανεπιστημίου François Rabelais στην Τούρ της Γαλλίας με τα γονίδια *Ank* του ιού CcBV, τα οποία αποτέλεσαν το αντικείμενο μελέτης μου. Όμως, και ο Δρ. Minoru Yamakawa από το Εθνικό Ινστιτούτο Αγροβιολογικών Επιστημών στην Tsukuba της Ιαπωνίας μας προμήθευσε με πολύτιμα πλασμίδια ελέγχου και γονίδια μεταγραφικών παραγόντων του *Bombyx mori* που χρησιμοποίησα εκτενώς στη μελέτη μου. Τους ευχαριστώ και τους δύο πολύ.

Δε θα ήθελα να παραλείψω να ευχαριστήσω τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής καθηγητές Εμμανουήλ Φραγκούλη, Γιώργο Ροδάκη και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Διδώ Βασιλακοπούλου για την ενασχόλησή τους και εξέταση της διατριβής μου.

Ενώ, τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους φίλους μου εκτός Δημοκρίτου, καθώς χωρίς τη συμπαράσταση και ενθάρρυνσή τους θα ήταν πολύ πιο δύσκολο να εκπονήσω τη διατριβή μου. Το μεγαλύτερο ευχαριστώ, όμως, στέλνω στα μέλη της οικογένειάς μου, τη μητέρα μου, τον πατέρα μου, τη γιαγιά μου και την αδερφή μου για την οικονομική και ... διατροφική υποστήριξή τους, αλλά κυρίως για την αγάπη τους, το κουράγιο τους και τη ζεστασιά τους.

Η διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος 03ED-122, ΠΕΝΕΔ 2003.

Το έργο συγχρηματοδοτείται κατά:

- 75% της Δημόσιας Δαπάνης από την Ευρωπαϊκή Ένωση – Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο
- 25% της Δημόσιας Δαπάνης από το Ελληνικό Δημόσιο – Υπουργείο Ανάπτυξης – Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας
- και από τον Ιδιωτικό Τομέα
στο πλαίσιο του Μέτρου 8.3 του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα – Γ΄ Κοινοτικό Πλαίσιο Στήριξης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
1.1 ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΝΤΟΜΩΝ	13
Φαγοκύτωση	14
Εγκύστωση.....	15
Μελανοποίηση.....	17
Αντιμικροβιακά πεπτίδια.....	19
Σηματοδότηση στην εγγενή ανοσία των εντόμων.....	21
1.2. ΟΔΟΙ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ ΠΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥΝ ΤΟ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ NF-κΒ ΣΤΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ	28
1.3. ΤΟ ΠΑΡΑΣΙΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	32
Γενικά.....	32
Polydna ιοί.....	32
Οικογένειες των polydna ιών	34
Επίδραση των PDVs στον ξενιστή	36
Το σύστημα παρασιτισμού <i>Cotesia congregata</i> – <i>Manduca sexta</i>	38
Ο ιός <i>Cotesia congregata bracovirus</i> (CcBV).....	39
1.3 ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ANK.....	42
Γενικά.....	42
Η οικογένεια των πρωτεϊνών Ank στους polydna ιούς.....	44
Η οικογένεια Ank του CcBV.....	47
1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	51
2.1 ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ANK	51
2.2 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΕΙΣ.....	51
2.2.1 Γενική διαδικασία κλωνοποίησης.....	51
2.2.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αραρόζης.....	58
2.2.3 Υποκλωνοποιήσεις των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης των γονιδίων ank σε φορείς έκφρασης.....	59
2.2.4 Υποκλωνοποίηση των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης των μεταγραφικών παραγόντων του <i>B. mori</i> σε φορείς έκφρασης εντόμων	62
Υποκλωνοποίηση του ενεργού τμήματος του γονιδίου <i>relish1</i> του μεταξοσκώληκα στο φορέα <i>pEA.his-glu</i>	63
Υποκλωνοποίηση των γονιδίων <i>relish1</i> , <i>relish1-d2</i> και <i>relb</i> του μεταξοσκώληκα στο φορέα <i>pEA.flag</i>	64
2.3 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΕΙΣ.....	71
2.3.1 Καλλιέργειες κυττάρων εντόμων.....	71
2.3.2 Καλλιέργειες κυττάρων θηλαστικών.....	71
2.3.3 Διαμολύνσεις	72
2.4 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ	73
2.4.1 Πειράματα φωταύγειας σε κύτταρα εντόμων.....	73
2.4.1.1 Έλεγχος πλασμιδίων αναφοράς και επιλογή κυτταρικής σειράς.....	73
2.4.1.2 Έλεγχος της επαγωγής των πλασμιδίων αναφοράς από τους μεταγραφικούς παράγοντες του <i>B. mori</i> , <i>RelB</i> , <i>Relish1</i> και <i>R1d2</i> στη σειρά κυττάρων <i>Hi5</i>	74
2.4.1.3 Επίδραση των πρωτεϊνών Ank στο μεταγραφικό παράγοντα <i>RelB</i>	76
2.4.1.4 Επίδραση των πρωτεϊνών Ank στο μεταγραφικό παράγοντα <i>Relish1-d2</i>	77
2.4.2 Λειτουργικά πειράματα σε κύτταρα <i>HEK293</i>	78
2.5 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΙΑ ΤΑ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ANK...80	
2.6 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	81
2.6.1 Αποδιατακτική SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση κατά Western	81
2.6.2 Πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης	83
2.6.3 Πειράματα ανίχνευσης πρωτεϊνικών συμπλόκων με χρωματογραφία συγγένειας (<i>pull-down assays</i>).....	86
2.6.4 Επίδραση του αναστολέα του πρωτεοσώματος <i>MG132</i> στα επίπεδα των πρωτεϊνών Ank.....	87

2.7 ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ	88
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΕΝΤΟΜΩΝ..91	
3.1 ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ	91
3.2 ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΟΙΧΤΩΝ ΠΛΑΙΣΙΩΝ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ REL/NF-κB ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΟΥ ΜΕΤΑΞΟΣΚΩΛΗΚΑ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΛΕΠΙΔΟΠΤΕΡΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ.....	94
3.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ RELB ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΑΤΤ.LUC ΚΑΙ ΔΚΒ.ΑΤΤ.LUC	96
3.3.1 <i>Κυτταρική σειρά S2 της Drosophila (Δίπτερα)</i>	96
3.3.2 <i>Κυτταρική σειρά Hi5 (Λεπιδόπτερα)</i>	98
3.3.3 <i>Επίδραση του ενισχυτή hr3 στην επαγωγή γονιδίων in trans σε κύτταρα Hi5</i>	100
3.3.4 <i>Λειτουργία του μεταγραφικού παράγοντα RelB όταν αυτός εκφράζεται από τον φορέα pBmA σε τρεις κυτταρικές σειρές λεπιδόπτέρων εντόμων</i>	101
3.4 ΕΠΙΛΟΓΗ ΝΕΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ	103
3.5 ΕΠΑΓΩΓΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ RELB ΚΑΙ RELISH1 ΤΟΥ B. MORI	104
3.6 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ANK ΣΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ RELB ΚΑΙ RELISH1	108
3.6.1 <i>Η επίδραση των πρωτεϊνών Ank στη μεταγραφική ικανότητα του RelB</i>	108
3.6.2 <i>Η επίδραση των πρωτεϊνών Ank στη μεταγραφική ικανότητα του R1d2</i>	112
3.6.3 <i>Οι πρωτεΐνες Ank επηρεάζουν τη μεταγραφική λειτουργία του R1d2 με δοσοεξαρτώμενο τρόπο</i>	116
3.7 ΣΥΝΟΨΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ	119
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ANK.....	121
4.1 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ANK4 ΚΑΙ ANK8 ΤΟΥ CcBV ΜΕ ΤΟΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ RELISH1 ΤΟΥ B. MORI	121
4.1.1 <i>Πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης</i>	121
4.1.2 <i>Πειράματα ανίχνευσης πρωτεϊνικών συμπλόκων με χρωματογραφία συγγένειας (pull-down assays)</i>	123
4.2 ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ	124
4.2.1 <i>Υποκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών Ank</i>	124
4.2.2 <i>Εντοπισμός των μεταγραφικών παραγόντων Relish1, R1d2 και RelB του B. mori</i>	127
4.2.3 <i>Συνεντοπισμός των πρωτεϊνών Ank σε συνδυασμό με τους μεταγραφικούς παράγοντες του B. mori</i>	128
4.3 ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ANK ΤΟΥ CcBV	132
4.4 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ANK2 ΜΕ ΤΗ ΜΙΤΩΤΙΚΗ ΑΤΡΑΚΤΟ	135
4.5 ΣΥΝΟΨΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ	137
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ	139
ΣΥΝΟΨΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ	142
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	144
ΠΡΟΣΦΟΡΑ ΣΤΟ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΠΕΔΙΟ	144
ΣΥΝΟΨΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	145
ΕΡΜΗΝΕΙΑ	154
<i>Σημασία των παραγόντων Rel/NF-κB στις ανοσολογικές αποκρίσεις ενάντια του παρασιτισμού.</i>	154
<i>Πολλαπλοί ρόλοι για τις Ank του CcBV</i>	157
ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ	159
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	160
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	162
SUMMARY.....	165
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	168

Συντομογραφίες

α. κ. : αμινοξικά κατάλοιπα

AMP: antimicrobial peptide, αντιμικροβιακό πεπτίδιο

ank: γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που περιέχουν επαναλήψεις αγκυρίνης, όταν συνοδεύεται από αριθμό (π.χ. *ank1*) δηλώνει ένα συγκεκριμένο γονίδιο

Ank: ankyrin-repeat protein, πρωτεΐνη επαναλήψεων αγκυρίνης

ANOVA: analysis of variance, ανάλυση διακύμανσης

ΑΠΑ: ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης

ARD: Ankyrin-repeat domain, δομική μονάδα επαναλήψεων αγκυρίνης

ASFV: African swine fever virus, αφρικανικός ιός των χοίρων

BCR: B-cell receptor, υποδοχέας B λεμφοκυττάρων

βGRP: β-glucan recognition protein, β-1, 3-πρωτεΐνη αναγνώρισης γλυκάνης

BmNPV: *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus ή πυρηνικός πολυεδρικός ιός του *B. mori*

BSA: bovine serum albumine, αλβουμίνη του ορού μόσχου

BS/BK: Bluescript, βακτηριακός φορέας

BV: bracovirus, μπρακοϊός

CcBV: *Cotesia congregata* bracovirus, μπρακοϊός της *C. congregata*

CDK: cyclin-dependent kinase, κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης

CiBV: *Chelonus inanitus* bracovirus, μπρακοϊός του *C. inanitus*

cpm: counts per minute, στροφές ανά λεπτό

CrPV: Cricket Paralysis virus

CrV1: *Cotesia rubecula* viral protein 1

CsIV: *Campolepis sonorensis* ichnovirus, ichnovirus του *C. sonorensis*

CKII: Casein Kinase II, κινάση καζεΐνης II

CRP: Cysteine Rich Protein, πρωτεΐνη πλούσια σε κυστεΐνη

DAP: diaminopimelic acid, διαμινοπιμελικό οξύ

Dif : Dorsal-related immunity factor

DMSO: dimethylsulfoxide, διμεθυλοσουλφοξείδιο

DREDD: Death related ced-3/NEDD2-like protein

Dscam: Down syndrome cell adhesion molecule

EcRE: ecdysone response element, στοιχείο απόκρισης σε εκδυσόνη

EGF: epidermal growth factor, παράγοντας ανάπτυξης της επιδερμίδας

EMSA: electrophoretic mobility shift assay, δοκιμασία μεταβολής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας

EP1: early protein 1, πρόιμη πρωτεΐνη 1 του CcBV

EST: Expressed Sequence Tag

EtBr: ethidium bromide , βρωμιούχο αιθίδιο

FBS: Fetal Bovine Serum, ορός εμβρύου μόσχου

GATA παράγοντας: μεταγραφικός παράγοντας που προσδέεται στην αλληλουχία DNA "GATA"

GFP: Green Fluorescent Protein, πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη

Glc: Glycosylated central core protein, πρωτεΐνη με γλυκοζυλιωμένο πυρήνα

GNBP1: Gram-Negative Binding Protein 1, έχει μετονομαστεί σε glucan binding protein 1 διατηρώντας το ίδιο ακρωνύμιο

HdIV: *Hyposoter didymator* ichnovirus

HEK293: Human Embryonic Kidney cells 293 ή ανθρώπινα εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα

Hi5: High Five κύτταρα από αυγά του λεπιδόπτερου *Trichoplusia ni* (BTI-TN-5B1-4)

HP: hemolymph proteinase, πρωτεάση της αιμολέμφου

hr3: homologous region 3 of BmNPV, αλληλουχία του BmNPV που λειτουργεί ως ενισχυτής

HRP: Horseradish Peroxidase

iel: immediate early gene 1, άμεσο πρόιμο γονίδιο του BmNPV

IκB: Inhibitor of NFκB, αναστολέας του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NFκB

IKK: Inhibitor of NFκB Kinase, κινάση του IκB

IL1-R: IL-1 receptor, υποδοχέας της ιντερλευκίνης 1

Imd: πρωτεΐνη Immune deficiency (μεταλλαγή του αντίστοιχου γονιδίου προκαλεί ανεπάρκεια στην ανοσολογική απόκριση της *Drosophila*)

IML: immunolectins, λεκτίνες που αναγνωρίζουν λιποπολυσακχαρίτες

IPTG: Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

IQR: interquartile range, διατετατημοριακό εύρος

IRAK: interleukin 1 receptor associated kinase, κινάση που σχετίζεται με τον υποδοχέα ιντερλευκίνης 1

JAK: Janus kinase, κινάση Janus

JNK: c-Jun N-terminal kinase

L-DOPA: L-3,4-dihydroxyphenylalanine, L-3,4-διδροξυφαιτυλαλανίνη

LPS: lipopolysaccharides, λιποπολυσακχαρίτες
MdBV: *Microplitis demolitor* bracovirus, μπρακοϊός του *M. demolitor*
NFκB: Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
Ni-NTA: Nickel Nitrilo-Triacetic Acid
NLS: Nuclear Localization Signal, σήμα πυρηνικού εντοπισμού
ORF: open reading frame, ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης
PAC: Puromycin Acetyltransferase, ακετυλοτρανσφεράση της πουρομυκίνης
PAP3: pro-PO activating proteinase, πρωτεάση που ενεργοποιεί την προφαινολοξειδάση
PBS: Phosphate Buffer Saline, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
PDV: polydna virus, πολυ-dna ιός
PEST: proline, glutamic acid, serine, threonine –rich regions, περιοχές πλούσιες στα αμινοξέα προλίνη, γλουταμικό οξύ, σερίνη και θρεονίνη
PGRP: Peptidoglycan Recognition Protein, πρωτεΐνη αναγνώρισης πεπτιδογλυκάνης
PO: phenoloxidase, φαινολοξειδάση
PPO: prophenoloxidase, προφαινολοξειδάση
PRR: pattern recognition receptor, υποδοχέας αναγνώρισης παθογόνων προτύπων
PSP-1: plasmatocyte-spreading peptide
PTP: protein tyrosine phosphatase, φωσφατάση τυροσίνης
R1d2: Relish1-d2
RHD: Rel Homology Domain, περιοχή ομολογίας των Rel πρωτεϊνών
RIP1: TNF receptor interacting protein, πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα του TNF-α
RNI: reactive nitrogen intermediates, ενεργές ρίζες αζώτου
ROI: reactive oxygen intermediates, ενεργές ρίζες οξυγόνου
rpm: rounds per minute, στροφές ανά λεπτό
SDS: Sodium Dodecyl Sulphate, θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο
SE: standard error, τυπικό σφάλμα
Sf21: κυτταρική σειρά από το λεπιδόπτερο *Spodoptera frugiperda*
SPC: single photon count, μέθοδος μέτρησης του μετρητή β-σωματιδίων ειδική για φωταύγεια
SPE: Spätzle-activating enzyme, ένζυμο που ενεργοποιεί το Spätzle
SPZ: Spätzle

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription, μεταγωγέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής

TAB1: TAK1 binding protein, πρωτεΐνη που προσδένει την TAK1

TAK1: TGF- β -Activated Kinase, κινάση ενεργοποιούμενη από τον παράγοντα TGF- β

TCR: T-cell receptor, υποδοχέας T λεμφοκυττάρων

TEP-1: thioester-containing protein, πρωτεΐνη που περιέχει θειοεστέρα

TIR: Toll/IL-1 Receptor domain, δομική μονάδα του υποδοχέα Toll/IL-1

TnBV: *Toxoneuron nigriceps* bracovirus, μπρακοϊός της σφήκας *T. nigriceps*

TNF- α : Tumor Necrosis Factor α , παράγοντας νέκρωσης όγκων α

TNFR: tumor necrosis factor receptor, υποδοχέας του TNF- α

TRADD: TNFR-associated death domain protein, πρωτεΐνη με περιοχή θανάτου που σχετίζεται με τον υποδοχέα του TNF- α

TRAF: TNFR-Associated Factor, παράγοντας που σχετίζεται με τον υποδοχέα του TNF

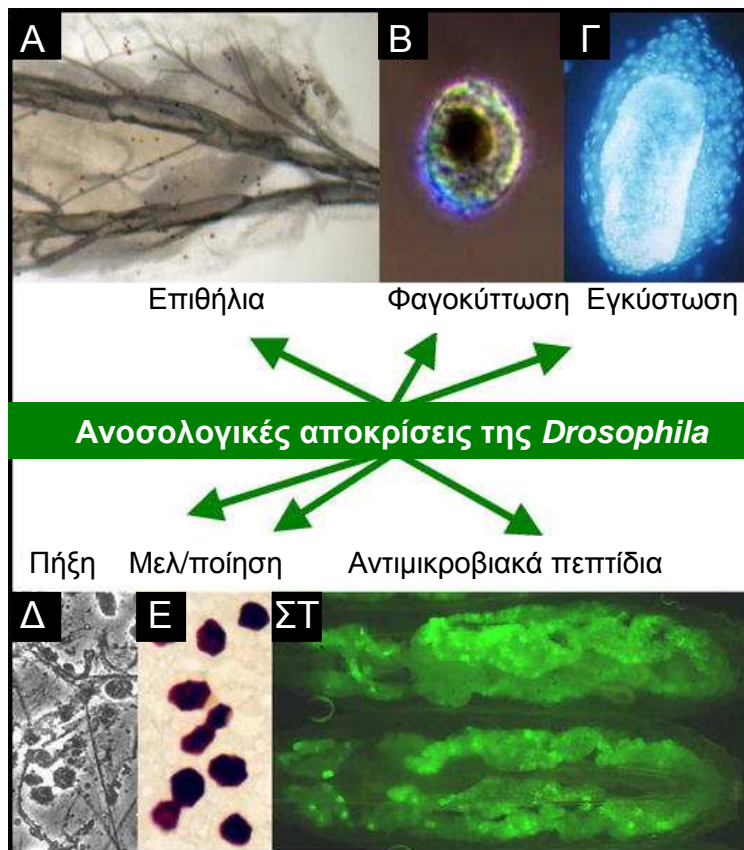
VHv: viral segment V *Heliothis virescens*, πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από γονίδιο στον κύκλο V του ιού που μολύνει τον *H. virescens*

20E: 20-υδροξυεκεδυσόνη

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή

1.1 Ανοσοποιητικό σύστημα εντόμων

Το ανοσοποιητικό σύστημα των σπονδυλόζων διακρίνεται σε έμφυτη (innate) και επίκτητη (acquired) ανοσία. Τα έντομα διαθέτουν έμφυτη ανοσία η οποία μελετάται εκτενώς, αν και τα τελευταία χρόνια υπάρχουν στοιχεία υπερ της πιθανής ύπαρξης μνήμης και ειδικότητας στο ανοσοποιητικό σύστημα των εντόμων (Watson et al. 2005), στοιχεία που παραδοσιακά χαρακτηρίζουν την επίκτητη ανοσία, με αποτέλεσμα να προτείνεται ότι πιθανώς τα έντομα έχουν και επίκτητη ανοσία. Η έμφυτη ανοσία των εντόμων διακρίνεται σε κυτταρική και χυμική ανοσία με την κυτταρική να διεξάγεται από τα αιμοκύτταρα που κυκλοφορούν στην αιμολέμφο και τη χυμική να πραγματοποιείται από διαλυτούς εξωκυττάριους παράγοντες, όπως αντιμικροβιακά πεπτιδία και παράγοντες που συμμετέχουν στην πήξη ή στη μελανοποίηση (Uvell and Engström 2007). Η μόλυνση από παθογόνους οργανισμούς προκαλεί ένα συνδυασμό κυτταρικών και χυμικών αποκρίσεων. Οι προκαρυωτικοί οργανισμοί επάγουν τις διαδικασίες της φαγοκύττωσης, της πήξης της αιμολέμφου και της σύνθεσης κυτταροκινών, αντιμικροβιακών πεπτιδίων και ενεργών ριζών οξυγόνου και αζώτου, ενώ οι μεγαλύτεροι, πολυκύτταροι παθογόνοι οργανισμοί, όπως τα έμβρυα (αυγά) των παρασιτοειδών Υμενοπτέρων και άλλα παράσιτα, επάγουν εγκύστωση και μελανοποίηση (**εικόνα 1**) (Uvell and Engström 2007; Nappi et al. 2009).



Εικόνα 1. Ανοσολογικές αποκρίσεις της *Drosophila*. **Α.** Οπίσθια περιοχή προνύμφης όπου φαίνεται το επιδερμίδιο (cuticle) και η τραχεία. Αυτές οι δύο δομές αποτελούν φυσικά εμπόδια ενάντια στις μολύνσεις. **Β.** Φαγοκύττωση ενός νεκρού, μελανοποιημένου κυττάρου από ένα πλασματοκύτταρο. **Γ.** Εγκύστωση αυγού ενδοπαρασιτοειδούς. Το ενδοπαρασιτοειδές είναι σφήκα που προσβάλλει προνύμφες. Τα κύτταρα που συγκεντρώνονται γύρω από το αυγό είναι λαμελλοκύτταρα. Τόσο τα κύτταρα όσο και το αυγό έχουν χρωστεί με πυρηνική χρώση. **Δ.** Πήξη κατά την επούλωση πληγών. **Ε.** Μελανοποιημένα κύτταρα-«κρύσταλλοι» (crystal cells). Η μελανοποίηση αποτελεί απόκριση σε παθογόνους οργανισμούς ή παράσιτα, ενώ παρατηρείται και κατά την επούλωση μετά από τραυματισμό. **ΣΤ.** Έκφραση αντιμικροβιακών πεπτιδίων στο λιπαρό σώμα της προνύμφης μετά από μόλυνση με μικρόβια. Τα κύτταρα του λιπαρού σώματος φθορίζουν από την έκφραση του διαγονιδίου που κωδικοποιεί την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη υπό τον έλεγχο του υποκινητή ενός γονιδίου αντιμικροβιακού πεπτιδίου. Ο συγκεκριμένος υποκινητής, του γονιδίου της δροσομυκίνης, επάγεται μετά από μόλυνση με μύκητες. Όταν τα αντιμικροβιακά πεπτιδία παράγονται στο λιπαρό σώμα, εκκρίνονται στην αιμόλεμφο και επομένως η απόκριση αυτή είναι συστημική. Ωστόσο, η παραγωγή αντιμικροβιακών παραγόντων μπορεί να γίνεται και τοπικά σε εξειδικευμένους ιστούς. Εικόνα από (Govind and Nehm 2004).

Φαγοκύττωση

Στον πρότυπο οργανισμό των εντόμων *Drosophila melanogaster* η φαγοκύττωση πραγματοποιείται από μία κατηγορία αιμοκυττάρων παρόμοια με τα μακροφάγα των θηλαστικών, τα πλασματοκύτταρα. Η αναγνώριση των μικροοργανισμών γίνεται από υποδοχείς των πλασματοκυττάρων. Στη συνέχεια ακολουθεί επαγωγή εσωτερικών οδών σηματοδότησης, που οδηγούν σε

αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και εσωτερίκευση των μικροοργανισμών (Williams 2007). Οι υποδοχείς που είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στην αναγνώριση των παθογόνων μικροοργανισμών και συντελούν στη φαγοκύττωση είναι η πρωτεΐνη αναγνώρισης πεπτιδογλυκάνης (peptidoglycan recognition protein LC ή PGRP-LC) που αναγνωρίζει αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Ramet et al. 2002), η πρωτεΐνη Eater που έχει επαναλήψεις EGF-like, εκφράζεται σε πλασματοκύτταρα και σχετίζεται με την αναγνώριση, πρόσδεση και φαγοκύττωση κατά Gram αρνητικών και θετικών βακτηρίων (Kocks et al. 2005) και το μόριο της υπεροικογένειας ανοσοσφαιρινών Dscam (Down syndrome cell adhesion molecule) (Watson et al. 2005). Ο υποδοχέας Dscam είναι σημαντικός για τη φαγοκύττωση και μπορεί να εκφράζεται στα αιμοκύτταρα και το λιπαρό σώμα της *Drosophila* σε χιλιάδες ισομορφές (18,000) μέσω εναλλακτικής συρραφής, με τις διαφορετικές ισομορφές να διαφέρουν στην εξωκυτταρική τους περιοχή και πιθανώς στα μόρια-προσδέτες τους (Watson et al. 2005). Επιπλέον, στη διαδικασία της φαγοκύττωσης συμμετέχουν μόρια που σχετίζονται με τη μετακίνηση κυστιδίων, αιμοποιητικοί μεταγραφικοί παράγοντες και ρυθμιστικές πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού (Ramet et al. 2002).

Εγκύστωση

Μετά από μόλυνση με ευκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως οι παρασιτοειδείς σφήκες, επάγεται μια διαδικασία που ονομάζεται εγκύστωση. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την πρόσδεση αιμοκυττάρων στην επιφάνεια του ξένου σώματος με σχηματισμό πολλών κυτταρικών στρώσεων γύρω από αυτό (Schmidt et al. 2001). Οι διαφορετικοί τύποι αιμοκυττάρων που συμμετέχουν στην εγκύστωση ποικίλλουν στις διαφορετικές τάξεις εντόμων. Στα Δίπτερα, όπως είναι γνωστό από τη *Drosophila*, η εγκύστωση πραγματοποιείται κυρίως από τα λαμελλοκύτταρα (lamellocytes), κύτταρα που παράγονται μόνο στα προνυμφικά στάδια και μόνο μετά από συγκεκριμένο ερέθισμα, όπως μόλυνση με παρασιτοειδή Υμενόπτερα (Lanot et al. 2001). Τα λαμελλοκύτταρα απομονώνουν το ξένο σώμα από τον υπόλοιπο οργανισμό φτιάχνοντας πολλές στρώσεις κυττάρων γύρω από αυτό. Ωστόσο, στην εγκύστωση συμμετέχουν και άλλοι τύποι κυττάρων όπως τα πλασματοκύτταρα (plasmatocytes), που αναγνωρίζουν και είναι τα πρώτα που προσκολλώνται στο ξένο σώμα, και μια τρίτη ομάδα κυττάρων τα κύτταρα-«κρύσταλλοι» (crystal cells) τα οποία διεκπεραιώνουν τη μελανοποίηση, φαινόμενο που συχνά συνοδεύει την εγκύστωση (Williams 2007). Στα Λεπιδόπτερα, από μελέτες στην *Pseudoplusia includens* είναι

γνωστό ότι στην εγκύστωση συμμετέχουν τα κοκκιώδη κύτταρα (granular cells) και τα πλασματοκύτταρα, με τον πρώτο πληθυσμό κυττάρων να σχηματίζει την πρώτη και τελευταία κυτταρική στρώση και το δεύτερο πληθυσμό κυττάρων να σχηματίζει τις ενδιάμεσες (Pech and Strand 1996). Η διαδικασία της εγκύστωσης περιλαμβάνει την αναγνώριση του εισβολέα ως ξένο σώμα από τα κοκκιώδη κύτταρα, τη μετάβαση των πλασματοκυττάρων από μια κατάσταση χαμηλής πρόσφυσης (non-adhesive) σε μια κατάσταση υψηλής πρόσφυσης (adhesive), τον τερματισμό της συσσώρευσης των αιμοκυττάρων και τη θανάτωση του ξένου σώματος (Schmidt et al. 2001).

Η αναγνώριση ξένων εντόμων-εισβολέων ή αλλοιωμένων ιστών του εαυτού από τα αιμοκύτταρα βασίζεται πιθανώς στη διάκριση μορίων της βασικής μεμβράνης του εαυτού (μεμβράνη που περιβάλλει το αιμόκοιλο) τα οποία εμποδίζουν την προσκόλληση των αιμοκυττάρων, σε αντιδιαστολή με μόρια των ξένων ή αλλοιωμένων ιστών που ευνοούν την προσκόλλησή τους (Carton and Nappi 1997; Schmidt et al. 2001). Τέτοια μόρια ενδεχομένως περιλαμβάνουν πρωτεΐνες και λιπίδια με γλυκοζιδικές τροποποιήσεις, οι οποίες θα μπορούσαν να αποτελούν τη βάση για τη διάκριση εαυτού-μη εαυτού. Από την άλλη πλευρά, η μετάβαση των αιμοκυττάρων από κατάσταση χαμηλής πρόσφυσης σε κατάσταση υψηλής πρόσφυσης επάγεται από παράγοντες που εκκρίνονται από ιστούς όπως η επιδερμίδα, το λιπαρό σώμα και τα αιμοκύτταρα. Το πεπτίδιο PSP-1 (plasmacyte-spreading peptide), παραδείγματος χάριν, που έχει απομονωθεί από προνύμφες του Λεπιδοπτέρου *P. includens* και παράγεται στο λιπαρό σώμα, το νευρικό ιστό και τα αιμοκύτταρα, προκαλεί την προσκόλληση των πλασματοκυττάρων στην επιφάνεια δοχείων κυτταροκαλλιέργειας (Clark et al. 1997; Clark et al. 1998).

Ωστόσο, πολλοί εντομοπαθογόνοι οργανισμοί έχουν αναπτύξει μηχανισμούς που τους επιτρέπουν είτε να μην αναγνωρίζονται ως ξένοι είτε να αποτρέπουν τις αποκρίσεις των αιμοκυττάρων όπως την εγκύστωση ή τη φαγοκύττωση (Schmidt et al. 2001; Eleftherianos et al. 2010). Στα ενδοπαρασιτοειδή τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η *Cotesia rubecula*, που αποφεύγει την εγκύστωση των αυγών και προνυμφών της τόσο μέσω της αποφυγής της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή *Pieris rapae* όσο και μέσω της ανοσολογικής καταστολής του. Σε πρώτο στάδιο, η αποφυγή της ανοσολογικής επιτυγχάνεται μέσω της πρωτεΐνης Ctp32 που περιβάλλει τα αυγά, μια πρωτεΐνη που παράγεται στις ωοθήκες του ενήλικου θηλυκού παρασιτοειδούς και έχει δειχθεί ότι μπορεί να προστατεύει αβιωτικά αντικείμενα από εγκύστωση (Asgari et al. 1998). Σε δεύτερο στάδιο, τα αιμοκύτταρα του ξενιστή

καταστέλλονται παροδικά από την πρωτεΐνη CrV1, μια ιική πρωτεΐνη που παράγεται από ιστούς του ξενιστή μολυσμένου από τον ενδοσυμβιωτικό ιό της *C. rubecula*. Η έκφρασή της, 8 με 12 ώρες μετά την ωοαπόθεση, οδηγεί σε διαταραχές του κυτταροσκελετού ακτίνης και συνεπακόλουθη καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης από τα αιμοκύτταρα (Asgari et al. 1997).

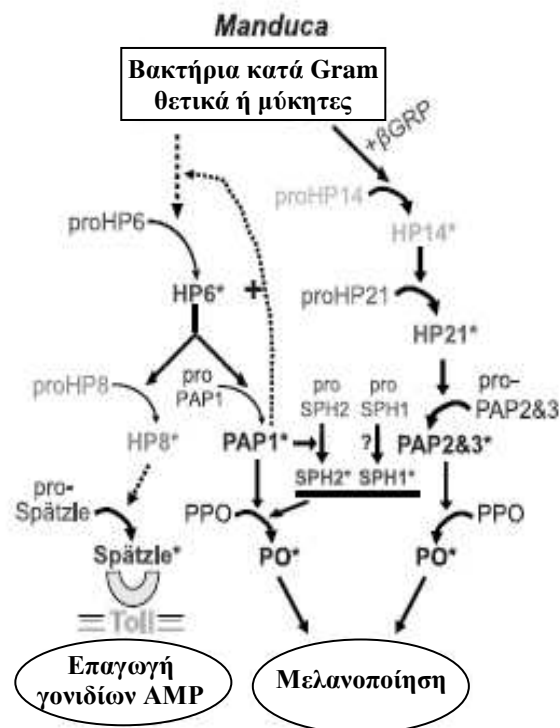
Μελανοποίηση

Η μελανοποίηση είναι μια διαδικασία που υπάγεται στη χυμική ανοσία, συνοδεύει την εγκύστωση και συνίσταται στο σχηματισμό κινόνων και, στη συνέχεια, μελανίνης από το ένζυμο φαινολοξειδάση χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την τυροσίνη, την L-DOPA ή την ντοπαμίνη (Jiang et al. 2010). Οι κινόνες είναι ουσίες που συμμετέχουν στη σκλήρυνση του επιδερμιδίου (cuticle), την επούλωση πληγών, την αντιμετώπιση ξένων οργανισμών και τη σύνθεση μελανίνης (Kanost et al. 2004). Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι μελανίνης: η ευμελανίνη (καφέ-μαύρη) και η φαιομελανίνη (κιτρινοκόκκινη), που έχουν τόσο κυτταροτοξικές όσο και κυτταροπροστατευτικές ιδιότητες αφού μπορούν να οδηγήσουν στην απαλοιφή τοξικών ουσιών και ενεργών ριζών, να εκκινήσουν αντιδράσεις οξειδοαναγωγής και να προκαλέσουν διασυνδέσεις (cross-linking) μεταξύ πρωτεϊνών. Η παραγωγή της μελανίνης ξεκινά από την οξείδωση της τυροσίνης, της L-DOPA ή της ντοπαμίνης από τη φαινολοξειδάση προς κινόνες και συνεχίζει με μια σειρά αντιδράσεων οξειδοαναγωγής που εξαρτώνται από την παρουσία ιόντων υδρογόνου, μετάλλων και αναγωγικών παραγόντων (Nappi et al. 2009).

Αν και δεν είναι γνωστός ο ακριβής τρόπος που προκαλείται η θανάτωση του ξένου σώματος κατά την εγκύστωση-μελανοποίηση και πώς γίνεται η στόχευση των ξένων ιστών χωρίς να εξαπλώνεται σε όλον τον οργανισμό η σύνθεση των προϊόντων της μελανοποίησης, φαίνεται ότι οι ενεργές ρίζες οξυγόνου και αζώτου (ROI και RNI) συμμετέχουν σε αυτές τις διαδικασίες καθώς έχουν βρεθεί υψηλές συγκεντρώσεις αυτών σε ξενιστές με ενεργή ανοσολογική απόκριση (Nappi et al. 2009). Οι ενεργές ρίζες προκαλούν βλάβες στο DNA, οξείδωση σουλφυδρυλικών ομάδων, έκκριση κυτταροκινών και μη ειδική ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων τύπου nuclear factor κB (NF-κB) με αποτέλεσμα να είναι τοξικές. Η πιο ενεργή ρίζα είναι αυτή του υδροξυλίου OH, αφού μπορεί να αντιδρά με πολλά οργανικά μόρια, η οποία παράγεται με ταυτόχρονη αναγωγή των μετάλλων του σιδήρου ή του χαλκού. Καθώς η φαινολοξειδάση περιέχει χαλκό, η παρουσία αυτού

του ενζύμου στον τόπο της μόλυνσης πιθανώς αποτελεί έναν μηχανισμό για την εντοπισμένη παραγωγή των ενεργών ριζών κοντά στους παθογόνους οργανισμούς (Nappi et al. 2009).

Η φαινολοξειδάση αρχικά συντίθεται ως ζυμογόνο, την προφαινολοξειδάση (prophenoloxidase ή pro-PO), η οποία ενεργοποιείται μέσω ενός καταρράκτη πρωτεασών. Εξαιτίας του μεγάλου της μεγέθους και της μεγάλης ποσότητας αιμολέμφου που περιέχει, η *Manduca sexta* έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε μελέτες της μελανοποίησης, με αποτέλεσμα σε αυτόν τον οργανισμό να έχουν χαρακτηριστεί πάνω από είκοσι μόρια του καταρράκτη των πρωτεασών (Kanost et al. 2004; An et al. 2009). Συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί τρεις πρωτεάσες που ενεργοποιούν την προφαινολοξειδάση της *M. sexta*, οι PAP1, PAP2 και PAP3 (pro-PO activating proteinases) (Kanost et al. 2004). Οι πρωτεάσες PAP συντίθενται, επίσης, ως ζυμογόνα και ενεργοποιούνται από μία άλλη ομάδα πρωτεασών, τις πρωτεάσες της αιμολέμφου (hemolymph proteinases ή HP). Για την ενεργοποίηση των πρόδρομων μορφών των μορίων PAP, proPAP, έχουν βρεθεί δύο οδοί ενεργοποίησης (**εικόνα 2**). Στην πρώτη οδό, η πρωτεάση HP14 ενεργοποιεί πρωτεολυτικά την proHP21 και η HP21 ενεργοποιεί την πρόδρομη μορφή της PAP3, proPAP3, με αποτέλεσμα η ενεργή PAP3 να πρωτεολύει την προφαινολοξειδάση (Gorman et al. 2007). Στη δεύτερη οδό, η HP6 ενεργοποιεί πρωτεολυτικά την proPAP1, η οποία στη συνέχεια προκαλεί την πρωτεολυτική επαγωγή της προφαινολοξειδάσης (An et al. 2009). Από την άλλη πλευρά, η πρωτεάση HP6 ενεργοποιεί επίσης τη ζυμογόνο μορφή της HP8, μια πρωτεάση που επάγει την πρωτεόλυση του ζυμογόνου proSpätzle στην κυτταροκίνη Spätzle (**εικόνα 2**). Η κυτταροκίνη Spätzle είναι ένα σημαντικό μόριο που έχει βρεθεί ότι ευθύνεται για την ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού Toll μέσω διμερισμού του υποδοχέα της τόσο στη *Drosophila* όσο και στη *Manduca*. Έτσι, η HP6, εκτός από τη μελανοποίηση, ενεργοποιεί και το δεύτερο σκέλος της χυμικής ανοσίας, την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων (An et al. 2009; An et al. 2010).



Εικόνα 2. Μοντέλο για τους καταρράκτες πρωτεασών σερίνης που οδηγούν στην ενεργοποίηση της κυτταροκίνης Spätzle και του ενζύμου φαινολοξειδάση στη *Manduca*. Από την κυτταροκίνη Spätzle συνεχίζει η οδός μεταγωγής σήματος Toll που οδηγεί στην επαγωγή γονιδίων αντιμικροβιακών πεπτιδίων, ενώ από τη φαινολοξειδάση επάγεται η διαδικασία παραγωγής κινονών και μελανίνης, δηλαδή η μελανοποίηση. Τα βέλη συμβολίζουν ενεργοποίηση. Τα στικτά βέλη συμβολίζουν βήματα που δεν έχουν αποδειχτεί πειραματικά ή που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. βGRP: β-1, 3-πρωτεΐνη αναγνώρισης γλυκάνης, PPO: προφαινολοξειδάση. Εικόνα από (An et al. 2009).

Αντιμικροβιακά πεπτίδια

Η σύνθεση αντιμικροβιακών πεπτιδίων (antimicrobial peptides ή AMPs) γίνεται κατά κύριο λόγο στο λιπαρό σώμα με σκοπό τη θανάτωση βακτηρίων και μυκήτων (Uvell and Engström 2007). Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια συναντώνται σε μεγάλο εύρος οργανισμών, όπως τα φυτά, τα έντομα και ο άνθρωπος. Η σημασία τους καταδεικνύεται από μελέτες με διαγονιδιακά άτομα *D. Melanogaster*, κατά τις οποίες η τεχνητή έκφραση ενός αντιμικροβιακού πεπτιδίου σε άτομα με ελλείψεις ανοσολογικές σηματοδοτικές οδούς, οδήγησε σε αυξημένη επιβίωσή τους (Tzou et al. 2002). Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια είναι πεπτίδια με 100-200 α.κ., με ετερογενή ακολουθία και δομή. Τα περισσότερα έχουν θετικό φορτίο λόγω της παρουσίας βασικών αμινοξέων ή και αμιδίωσης, ενώ ταυτόχρονα έχουν αμφιπαθικό χαρακτήρα, χαρακτηριστικά που ευνοούν τη διείσδυση στα ανιονικά κυτταρικά τοιχώματα ή στις φωσφολιπιδικές μεμβράνες των μικροοργανισμών και τη βακτηριολυτική τους

επίδραση (Bulet et al. 2004). Παραδείγματος χάρη, το πεπτίδιο αττασίνη προσδένεται στους λιποπολυσακχαρίτες των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, ενσωματώνεται στην εξωτερική μεμβράνη τους και επάγει ειδική μείωση της έκφρασης πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης στο μεταγραφικό επίπεδο, προκαλώντας αλλαγή στη σύσταση της βακτηριακής μεμβράνης και, ενδεχομένως, διάσπαση της συνοχής της (Carlsson et al. 1998). Άλλα γνωστά αντιμικροβιακά πεπτίδια στη *D. melanogaster* είναι η κεκροπίνη, η ντεφενσίνη, η διπτερισίνη, η δροσομυκίνη κ. α. (Uvell and Engström 2007). Ειδικά στα Λεπιδόπτερα συναντώνται η λεμποσίνη, η γκλοβερίνη και η μορισίνη (Kanost et al. 2004).

Από μελέτες που έχουν γίνει στη *Drosophila* είναι γνωστά αρκετά στοιχεία για τη ρύθμιση της έκφρασης των αντιμικροβιακών πεπτιδίων. Η ρύθμιση προέρχεται από το συνδυασμό πολλών διαφορετικών στοιχείων που εξαρτώνται από εξωγενή ερεθίσματα και μη. Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια εκφράζονται α) συστατικά με ιστοειδικό τρόπο, δηλαδή σε συγκεκριμένα επιθήλια που έρχονται σε επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον, όπως τα όργανα αναπαραγωγής, β) ιστοειδικά μετά από επαγωγή, δηλαδή μετά από τοπική μόλυνση ή την ερωτική συνεύρεση και γ) συστηματικά μετά από επαγωγή, δηλαδή σε περίπτωση μόλυνσης του αιμόκοιλου (Uvell and Engström 2007). Στην τελευταία περίπτωση, το λιπαρό σώμα και τα αιμοκύτταρα παράγουν μια πλειάδα αντιμικροβιακών παραγόντων που εκκρινόμενοι στην αιμόλεμφο καταπολεμούν τη μόλυνση. Ωστόσο, αυτή η συστηματική απόκριση είναι αυστηρά ελεγχόμενη καθώς καταστέλλεται εντός 12–24 ωρών (Uvell and Engström 2007).

Η μεταγραφή των γονιδίων αντιμικροβιακών πεπτιδίων ελέγχεται από την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών οδών Toll και Imd (Immune deficiency) μετά από συστηματική μόλυνση (εικόνα 3) ή μόνο της οδού Imd μετά από τοπική μόλυνση (Charroux and Royet 2010). Στα πλαίσια αυτών των οδών ενεργοποιούνται οι Rel/NF-κB παράγοντες που προσδένονται σε κατάλληλες ακολουθίες, τα μοτίβα κB, οι οποίες βρίσκονται στους υποκινητές των συγκεκριμένων γονιδίων. Στις τοπικές μολύνσεις, εκτός από τους Rel/NF-κB παράγοντες, συμμετέχουν και οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA οι οποίοι εμφανίζουν ιστοειδική έκφραση (Senger et al. 2006), μπορούν να προσδένονται σε στοιχεία των υποκινητών των γονιδίων αντιμικροβιακών πεπτιδίων και πιθανώς εξασφαλίζουν την ιστοειδική ρύθμιση σε επιδερμίδα, τραχεία και έντερο (Uvell and Engström 2007).

Αντίθετα, η συστατική έκφραση αντιμικροβιακών πεπτιδίων σε συγκεκριμένους ιστούς απουσία μόλυνσης δεν εξαρτάται από την ενεργοποίηση Rel/NF-κB παραγόντων, αλλά φαίνεται πως βασίζεται σε μηχανισμούς παρόμοιους με αυτούς που καθορίζουν το αναπτυξιακό πρόγραμμα του οργανισμού (Uvell and Engström 2007). Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι ο μεταγραφικός παράγοντας Caudal, μέλος των πρωτεϊνών homeobox (Hox), μπορεί να προσδένεται σε ακολουθίες του υποκινητή ορισμένων γονιδίων αντιμικροβιακών πεπτιδίων και είναι απαραίτητος για τη συστατική έκφραση της δροσομυκίνης στους σιελογόνους αδένες και της κεκροπίνης A1 στον εκσπερματιστικό πόρο (Ryu et al. 2004). Στον εντερικό σωλήνα, αντίθετα, ο Caudal λειτουργεί ως μεταγραφικός καταστολέας δρώντας ανταγωνιστικά στην επαγόμενη από NF-κB ενεργοποίηση των γονιδίων των AMP από τα βακτήρια της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου. Από πειράματα σιώπησης του γονιδίου *caudal* συμπεραίνεται πως, απουσία μόλυνσης, η φυσιολογική βακτηριακή χλωρίδα ενεργοποιεί την οδό Imd, εντούτοις ο παράγοντας Caudal αναστέλλει την παραγωγή αντιμικροβιακών παραγόντων με αποτέλεσμα να ευνοεί τη διατήρηση της φυσιολογικής σύστασης της εντερικής χλωρίδας, η οποία θα διαταρασσόταν από την παραγωγή AMP, και να αποτρέπει την παθολογία του εντέρου (Ryu et al. 2008). Από την άλλη πλευρά, η μεταγραφή άλλων γονιδίων-στόχων της οδού Imd δεν αναστέλλεται από τον Caudal. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν αρνητικούς ρυθμιστές της οδού Imd, με αποτέλεσμα να δημιουργείται μια αρνητική ανάδραση που αναστέλλει την ενεργοποίηση της οδού από τα βακτήρια της φυσιολογικής χλωρίδας. Παρουσία μόλυνσης εντούτοις, το αυξημένο βακτηριακό φορτίο υπερνικά την αναστολή οδηγώντας στην ολοκληρωτική επαγωγή της οδού και την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων στο έντερο (Charroux and Royet 2010). Από τα παραπάνω καταδεικνύεται η πολυπλοκότητα της ρύθμισης των γονιδίων AMP.

Σηματοδότηση στην εγγενή ανοσία των εντόμων

Οι οδοί μεταγωγής σήματος Toll και Imd που αναφέρθηκαν παραπάνω, αποτελούν τις δύο κύριες ανοσολογικές οδούς μεταγωγής σήματος που επάγονται μετά από μικροβιακή μόλυνση στη *Drosophila* (Lemaitre et al. 1995; Lemaitre et al. 1996). Αυτές βρίσκονται σε αναλογία με τις οδούς των θηλαστικών Toll/IL1-R και TNFR, αντίστοιχα, που περιγράφονται στην παράγραφο 1.2. Η βάση και των δύο οδών είναι οι υποδοχείς αναγνώρισης μοριακών προτύπων από παθογόνους οργανισμούς (pattern recognition receptors ή PRRs), οι οποίοι αναγνωρίζουν στοιχεία

του εξωτερικού περιβλήματος των μικροοργανισμών. Οι δύο οδοί ρυθμίζουν, ανάμεσα σε άλλα, την έκφραση αντιμικροβιακών πεπτιδίων (AMPs), των υποδοχέων αναγνώρισης μοριακών προτύπων από παθογόνους οργανισμούς PRRs και πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη διαδικασία της μελανοποίησης (De Gregorio et al. 2002), ενώ εμπλέκονται και στην αντι-ιική απόκριση (Zamboni et al. 2005; Costa et al. 2009).

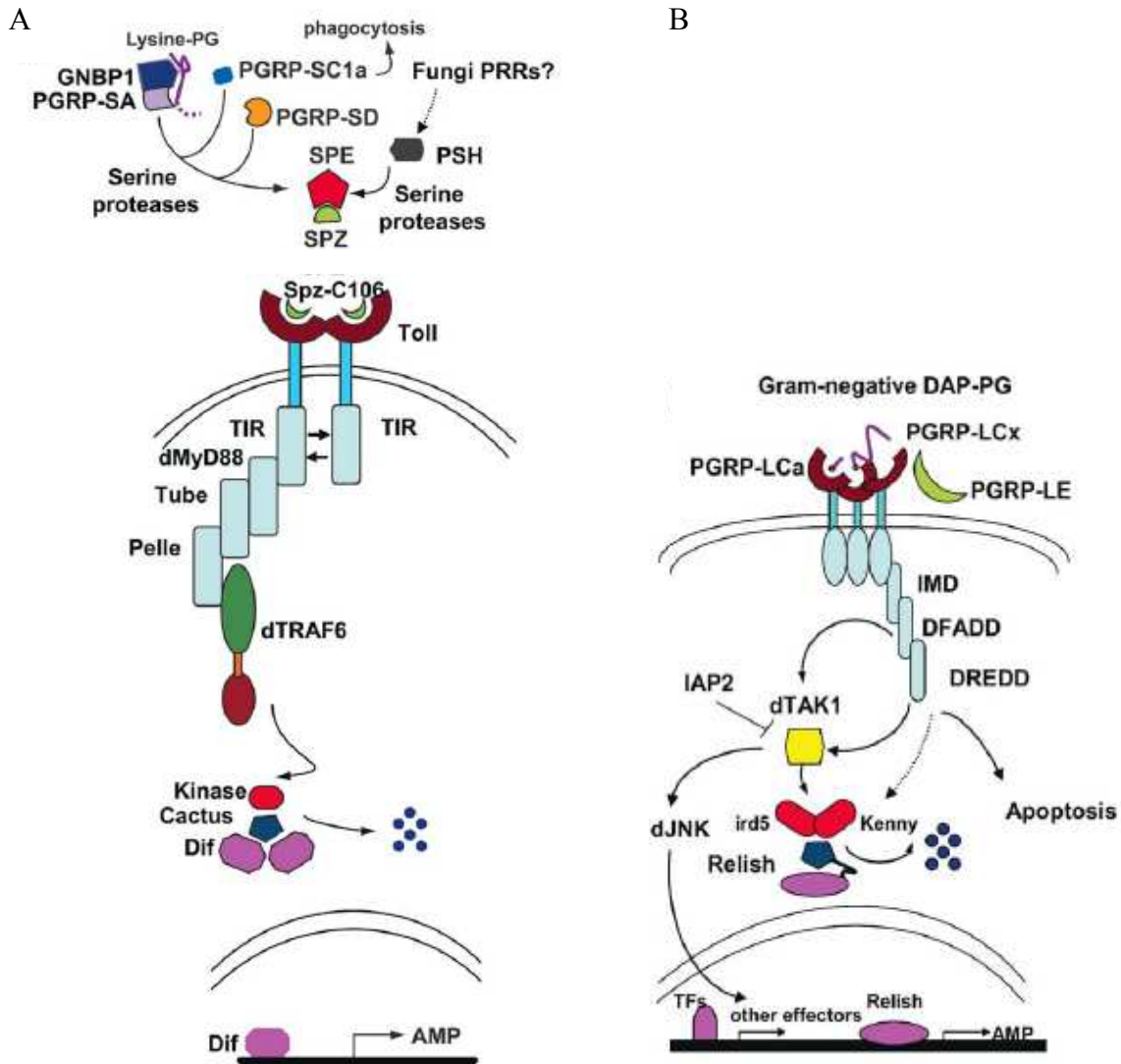
Η οδός Toll (**εικόνα 3A**) ενεργοποιείται κατά κανόνα μετά από μικροβιακή μόλυνση με μύκητες ή κατά Gram θετικά βακτήρια, που χαρακτηρίζονται από πεπτιδογλυκάνη τύπου λυσίνης (Lys-type). Στην αναγνώριση των μικροβιακών προτύπων συμμετέχουν οι υποδοχείς αναγνώρισης πεπτιδογλυκάνης (peptidoglycan recognition proteins) PGRP-SA, PGRP-SD, PGRP-SC1a και ο υποδοχέας αναγνώρισης γλυκάνης (Gram-negative binding protein 1 ή glucan binding protein 1) GNBP1 οι οποίοι επάγουν την ενεργοποίηση ενός καταρράκτη πρωτεασών σερίνης με τελικό αποδέκτη την κυτταροκίνη Spätzle [βλ. ανασκόπηση (Wang and Ligoxygakis 2006)]. Το μόριο αυτό επάγει με τη σειρά του το διμερισμό του υποδοχέα Toll ή Toll-1, το πρώτο μέλος της οικογένειας των υποδοχέων Toll που έχουν βρεθεί στη *Drosophila* (Tauszig et al. 2000), που οδηγεί στη συμμετοχή μιας σειράς μορίων-τελεστών στη μετάδοση του σήματος (dMyd88, Tube, Pelle) καταλήγοντας στη φωσφορυλίωση και αποικοδόμηση του Cactus, μορίου-αναστολέα που σε κατάσταση ηρεμίας των κυττάρων συγκρατεί τον μεταγραφικό παράγοντα Dif στο κυτταρόπλασμα (Wang and Ligoxygakis 2006). Ο παράγοντας Dif ή Dorsal-related immunity factor είναι ο κύριος μεταγραφικός παράγοντας της οδού μεταγωγής σήματος Toll όσον αφορά την ανοσοαπόκριση (Ip et al. 1993; Meng et al. 1999). Στην ίδια οδό δρα ένας ακόμη Rel/NF-κB μεταγραφικός παράγοντας (Steward 1987), ο Dorsal, ο οποίος, αν και συνδέεται με την ανοσοαπόκριση (Pal et al. 2008), σχετίζεται περισσότερο με την αναπτυξιακή λειτουργία της οδού αφού εμπλέκεται στη διαμόρφωση της ραχιαίο-κοιλιακής πολικότητας του εμβρύου της *Drosophila* (Drier and Steward 1997).

Από την άλλη πλευρά, η οδός Imd (**εικόνα 3B**) επάγεται μετά από μόλυνση με κατά Gram αρνητικά βακτήρια ή βάκιλλους, που χαρακτηρίζονται από πεπτιδογλυκάνη τύπου διαμινοπιμελικού οξέος (DAP-type), το οποίο είναι ένα αμινοξικό παράγωγο της λυσίνης. Η αναγνώρισή τους γίνεται από τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς PGRP-LC και PGRP-LE. Ακολουθεί η ενδοκυτταρική μεταγωγή σήματος μέσω των τελεστών IMD και DFADD και η ενεργοποίηση της κινάσης TAK1 (TGF-β activated kinase) (Wang and Ligoxygakis 2006). Καθοδικά

της κινάσης TAK1 δρα το σύμπλοκο Ird5-Kenny (ανάλογο του συμπλόκου IKK των θηλαστικών), το οποίο φωσφορυλιώνει (Erturk-Hasdemir et al. 2009) τον μεταγραφικό παράγοντα Relish. Ο παράγοντας Relish είναι ο κύριος μεταγραφικός παράγοντας της οδού Imd και αποτελείται από μια δομική μονάδα Rel (Rel homology domain ή RHD) και μια δομική μονάδα επαναλήψεων αγκυρίνης (ankyrin-repeat domain ή ARD) (Dushay et al. 1996; Hedengren et al. 1999). Προκειμένου να γίνει ενεργός, ο Relish υφίσταται φωσφορυλίωση (από το σύμπλοκο Ird5-Kenny) και πρωτεόλυση από την κασπάση DREDD (Death related ced-3/NEDD2-like protein) (Stoven et al. 2003; Erturk-Hasdemir et al. 2009). Η ενεργοποίηση τόσο της οδού μεταγωγής σήματος Toll όσο και της οδού Imd καταλήγει στη μετακίνηση των Rel/NF-κB παραγόντων, DIF και Relish αντίστοιχα, από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και τη μεταγραφή γονιδίων της ανοσολογικής απόκρισης, όπως τα γονίδια των αντιβακτηριακών πεπτιδίων δροσομυκίνη (Toll) και διπερισίνη (Imd) (Cherry and Silverman 2006).

Άλλες σηματοδοτικές οδοί που ενεργοποιούνται κατά την ανοσολογική απόκριση είναι οι οδοί JAK (Janus kinase)/STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) και JNK (c-Jun N-terminal kinase). Το μονοπάτι JAK/STAT επάγει στο λιπαρό σώμα τη σύνθεση της πρωτεΐνης TEP-1 (thioester-containing protein) μετά από μόλυνση, μια πρωτεΐνη όμοια με τις πρωτεΐνες του συμπληρώματος των θηλαστικών που πιθανώς σχετίζεται με τη φαγοκύτωση, καθώς και τη σύνθεση της πρωτεΐνης TOT-A μετά από μια σειρά παραγόντων στρες ή και μόλυνση (Agaïsse and Perrimon 2004). Επιπλέον, το μονοπάτι JAK/STAT σχετίζεται με τη διαφοροποίηση των αιμοκυττάρων σε λαμειλοκύτταρα (Agaïsse and Perrimon 2004), έναν κυτταρικό υποπληθυσμό υπεύθυνο για την εγκύστωση, και με την αντι-ιική απόκριση (Dostert et al. 2005). Η οδός JNK επάγεται κατά την ανοσολογική απόκριση μαζί με τις σηματοδοτικές οδούς NF-κB παραγόντων αλλά σε κάποιες περιπτώσεις οδηγεί στην καταστολή των παραπάνω οδών (Kim et al. 2005). Αντίστοιχα, ο μεταγραφικός παράγοντας Relish καταστέλλει την οδό JNK (Park et al. 2004). Τέλος, τόσο η οδός JAK/STAT όσο και η οδός JNK επάγουν την ανανέωση των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου μετά από βακτηριακή μόλυνση και συμμετέχουν στη διατήρηση της ομοιόστασης του εντέρου (Charroux and Royet 2010).

Τα μόρια που ενέχονται στις παραπάνω οδούς είναι συντηρημένα και έχει βρεθεί ότι ενεργοποιούνται και στα Λεπιδόπτερα.



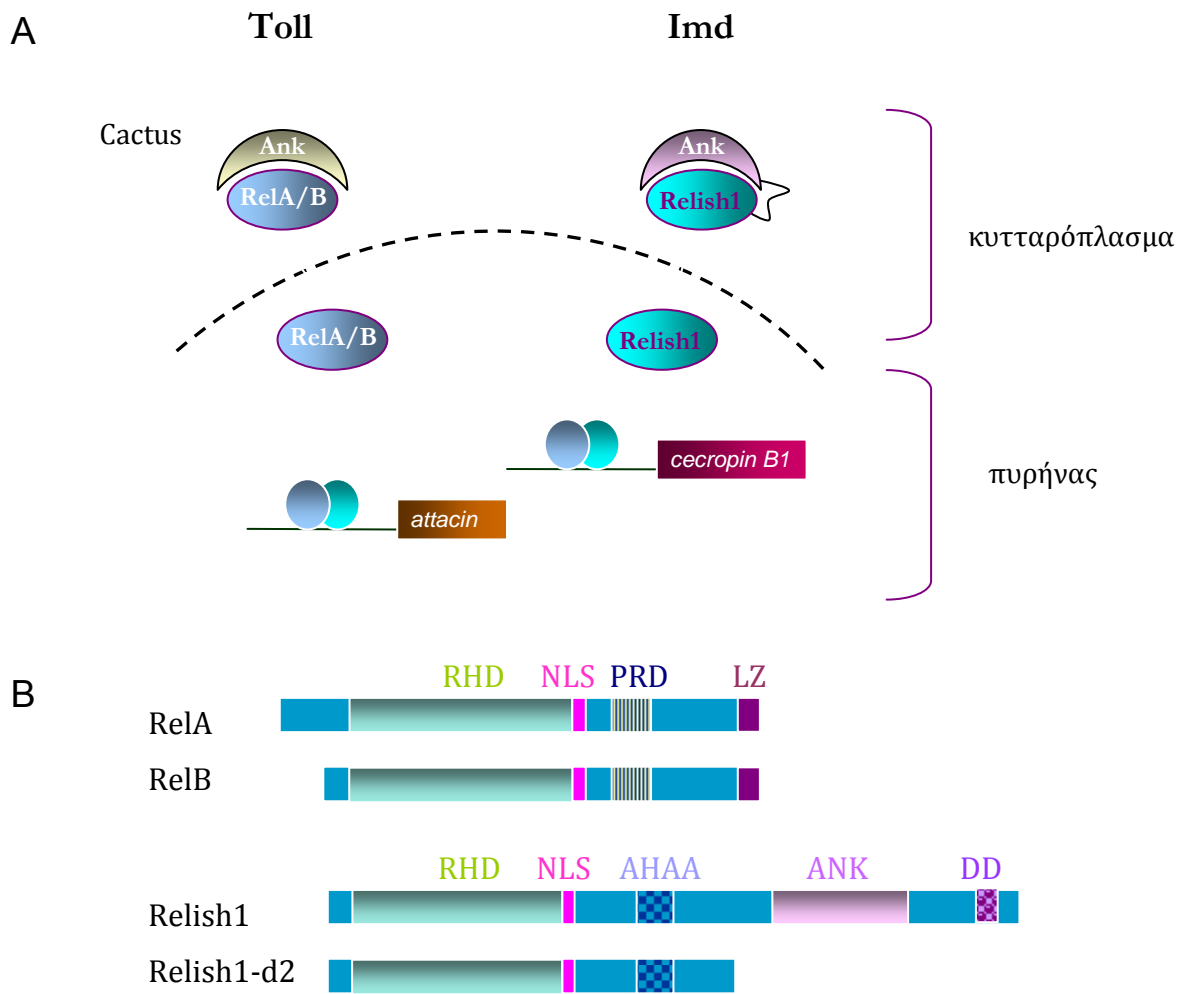
Εικόνα 3. Οι οδοί μεταγωγής σήματος Toll και Imd της *Drosophila*.

A. Ενεργοποίηση της οδού Toll. Μύκητες ή κατά Gram θετικά βακτήρια που χαρακτηρίζονται από πεπτιδογλυκάνη τύπου λυσίνης αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς PGRP-SA, PGRP-SD, PGRP-SC1a και GNBP1, οι οποίοι ενεργοποιούν έναν καταρράκτη πρωτεασών σερίνης με τελικό αποδέκτη την κυτταροκίνη Spätzle. Το ενεργό μόριο Spätzle επάγει τη μεταγωγή σήματος μέσω των τελεστών dMyd88, Tube και Pelle. Ακολούθως, ο αναστολέας του Dif, Cactus, φωσφορυλιώνεται και αποικοδομείται με αποτέλεσμα να μετακινείται ο μεταγραφικός παράγοντας Dif από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. **B.** Ενεργοποίηση της οδού Imd. Μικροοργανισμοί που χαρακτηρίζονται από πεπτιδογλυκάνη τύπου διαμινοπιμελικού οξέος (DAP-PG), όπως κατά Gram αρνητικά βακτήρια και βάκιλλοι, αναγνωρίζονται από τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς PGRP-LC και PGRP-LE. Ενδοκυτταρικά ενεργοποιούνται οι τελεστές IMD, DFADD, η κινάση TAK1 και το σύμπλοκο Ird5-Kenny, το οποίο φωσφορυλιώνει το μεταγραφικό παράγοντα Relish. Ο Relish μετά από μερική πρωτεόλυση από την κασπάση DREDD εισέρχεται στον πυρήνα. Η μετάβαση των μεταγραφικών παραγόντων Dif και Relish των δύο οδών (**A**, **B**) στον πυρήνα επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν αντιμικροβιακά πεπτίδια. Εικόνα από (Wang and Ligoxygakis 2006).

Στο Λεπιδόπτερο *M. sexta* η αλληλούχιση μικρών αλληλουχιών cDNA, των ονομαζόμενων expressed sequence tags (ESTs), που προέρχονται από ένα συνδυασμό ιστών (λιπαρό σώμα, αιμοκύτταρα, περίβλημα και τραχεία) έδειξε την παρουσία μιας σειράς ακολουθιών που κωδικοποιούν πιθανές πρωτεΐνες εμπλεκόμενες σε μονοπάτια ανοσίας, όπως: υποδοχείς αναγνώρισης παθογόνων μοτίβων (PRRs ή pattern recognition receptors), πρωτεΐνες-μεσολαβητές εξωκυττάρων μηνυμάτων (π.χ. υποδοχείς Toll και το μόριο Spätzle), ενδοκυτταρικά συστατικά των οδών μεταγωγής σήματος και παράγοντες μεταγραφής, όπως οι Dif και Relish (Zou et al. 2008). Ειδικότερα, έχει γίνει η απομόνωση και κλωνοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρόδρομη μορφή της κυτταροκίνης Spätzle, proSpätzle 1 (An et al. 2010) και ο χαρακτηρισμός των πρωτεασών σερίνης HP6 και HP8 που οδηγούν στην ενεργοποίηση του proSpätzle 1 (An et al. 2009; An et al. 2011). Επίσης, έχει πιστοποιηθεί η ύπαρξη διάφορων υποδοχέων αναγνώρισης παθογόνων μοτίβων (PRRs), όπως η αιμολίνη, που είναι ειδική για τα Λεπιδόπτερα, πρωτεΐνες αναγνώρισης πεπτιδογλυκάνης (PGRPs ή peptidoglycan recognition proteins), πρωτεΐνες αναγνώρισης β-1,3-γλυκάνης (bGRPs ή b-glucan recognition proteins) και λεκτίνες που αναγνωρίζουν λιποπολυσακχαρίτες (IMLs ή immunolectins) (Kanost et al. 2004). Από την άλλη πλευρά, τα γονίδια μεταγραφικών παραγόντων Rel/NF-κB (*dorsal*, *rela*, *relb*) κλωνοποιήθηκαν πρόσφατα χωρίς να έχει γίνει ακόμα ο λειτουργικός χαρακτηρισμός των προϊόντων τους.

Στο Λεπιδόπτερο *Bombyx mori*, η αναζήτηση γονιδίων που σχετίζονται με ανοσοαπόκριση έδειξε ότι πολλά μόρια που συμμετέχουν στις ανοσολογικές οδούς μεταγωγής σήματος της *Drosophila* βρίσκονται στο γονιδιώμα του (Tanaka et al. 2008). Πειραματικά δεδομένα υποδηλώνουν την ύπαρξη της οδού Toll (Wang et al. 2007; Cheng et al. 2008) και την ύπαρξη διαλυτών εξωκυττάρων λεκτινών που δεσμεύουν τόσο βακτηριακούς λιποπολυσακχαρίτες όσο και αιμοκύτταρα (Koizumi et al. 1997; Koizumi et al. 1999). Σε αντίθεση με την *M. sexta*, στο μεταξοσκώληκα έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί γονίδια μεταγραφικών παραγόντων τύπου Rel/NF-κB των οδών Toll και Imd (**εικόνα 4**). Συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί τα γονίδια των BmRelA, BmRelB, BmRelish1 και BmRelish2 τα οποία παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία με τα αντίστοιχα της *Drosophila*. Οι μεταγραφικοί παράγοντες BmRelA και BmRelB ενεργοποιούνται μετά από μόλυνση του μεταξοσκώληκα με κατά Gram θετικά βακτήρια, παρουσιάζουν ομολογία με το προϊόν του γονιδίου *dorsal* της *D. melanogaster* και προέρχονται από εναλλακτική συρραφή του μεταγράφου του

γονιδίου *Bmrel* (Tanaka et al. 2005). Το μετάγραφο *Bmrelb* είναι μικρότερο κατά 241 ζεύγη βάσεων σε σχέση με το μετάγραφο *Bmrela*, μέσα στα οποία συγκαταλέγεται και το κωδικόνιο έναρξης που χρησιμοποιείται για τη μεταγραφή του *Bmrela* (Tanaka et al. 2005). Επομένως, εικάζεται ότι το mRNA *Bmrelb* χρησιμοποιεί ένα διαφορετικό κωδικόνιο έναρξης, ενώ η παραγόμενη πρωτεΐνη είναι μικρότερη κατά 52 αμινοξικά κατάλοιπα. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα mRNA *Bmrela* και *Bmrelb* επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων αντιμικροβιακών πεπτιδίων, αλλά η καθεμιά στοχεύει σε διαφορετικά γονίδια, επομένως χαρακτηρίζονται από ειδικευση (Tanaka et al. 2005). Αντίθετα, οι μεταγραφικοί παράγοντες *BmRelish1* και *BmRelish2* ενεργοποιούνται μετά από μόλυνση με κατά Gram αρνητικά βακτήρια και η Rel υπομονάδα τους (Rel Homology Domain ή RHD) παρουσιάζει ομολογία με την αντίστοιχη του παράγοντα *Relish* της *D. melanogaster* (Tanaka et al. 2007). Αποτελούν ισομορφές προερχόμενες από το γονίδιο *Bmrelish*, με τα μετάγραφα *Bmrelish1* και *Bmrelish2* να είναι ταυτόσημα στις πρώτες 1490 βάσεις που κωδικοποιούν το RHD. Ωστόσο, το μετάγραφο *Bmrelish1* φέρει επιπλέον ακολουθίες που κωδικοποιούν μια περιοχή με επαναλήψεις αγκυρίνης (ankyrin-repeat domain), μία πιθανή περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής με υδρόφοβα και όξινα κατάλοιπα και μία ακολουθία θανάτου 'Death Domain' στο 3' άκρο (Tanaka et al. 2007). Ο παράγοντας *BmRelish1*, μετά από απομάκρυνση της περιοχής αγκυρίνης με πρωτεόλυση, επάγει την έκφραση αντιμικροβιακών πεπτιδίων. Για τον παράγοντα *BmRelish2* υπάρχουν ενδείξεις ότι πιθανά καταστέλλει τη δράση του *BmRelish1* (Tanaka et al. 2007).



Εικόνα 4. Μεταγραφικοί παράγοντες τύπου Rel/NF- κ B του μεταξοσκώληκα, *B. mori*. A. Στην οδό μεταγωγής σήματος Toll δραστηριοποιούνται οι μεταγραφικοί παράγοντες RelA και RelB, οι οποίοι απουσία ερεθίσματος αναστέλλονται από το μόριο Cactus, το οποίο φέρει επαναλήψεις αγκυρίνης (Ank). Στην οδό Imd δραστηριοποιείται ο παράγοντας Relish1, ο οποίος απουσία ερεθίσματος αναστέλλεται από μια δομική περιοχή επαναλήψεων αγκυρίνης. Μετά από μόλυνση από Gram θετικά και Gram αρνητικά βακτήρια οι RelA/B και Relish1, αντίστοιχα, ενεργοποιούνται και μεταβαίνουν στον πυρήνα όπου μεταγράφουν γονίδια αντιμικροβιακών πεπτιδίων (*attacin*, *cecropin B1*). **B.** Σχηματική παρουσίαση των δομικών περιοχών στις πρωτεΐνες RelA, RelB, Relish1 και Relish1-d2 (RHD: Rel homology domain ή περιοχή ομολογίας Rel πρωτεϊνών, NLS: nuclear localization signal ή σήμα πυρηνικού εντοπισμού, PRD: proline rich domain ή περιοχή πλούσια σε προλίνη, LZ: leucine zipper motif ή μοτίβο «φερμουάρ» λευκίνης, AHAA: Acidic and hydrophobic amino acids ή όξινα και υδρόφοβα αμινοξέα, ANK: ankyrin-repeat domain ή περιοχή επαναλήψεων αγκυρίνης, DD: death domain ή περιοχή θανάτου) (Tanaka et al. 2005; Tanaka et al. 2007).

1.2. Οδοί μεταγωγής σήματος που ενεργοποιούν το μεταγραφικό παράγοντα NF-κB στα θηλαστικά

Στο ανοσοποιητικό σύστημα των θηλαστικών ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB ρυθμίζει τη σύνθεση κυτταροκινών, αναπτυξιακών παραγόντων, ενζύμων και άλλων παραγόντων μετά από ένα πλήθος ερεθισμάτων που οδηγεί στην ενεργοποίηση της οικογένειας υποδοχέων Toll/IL-1R, της οικογένειας υποδοχέων TNFR (tumor necrosis factor receptor), BCRs (B-cell receptors), TCRs (T-cell receptors) και άλλων (Hayden and Ghosh 2004).

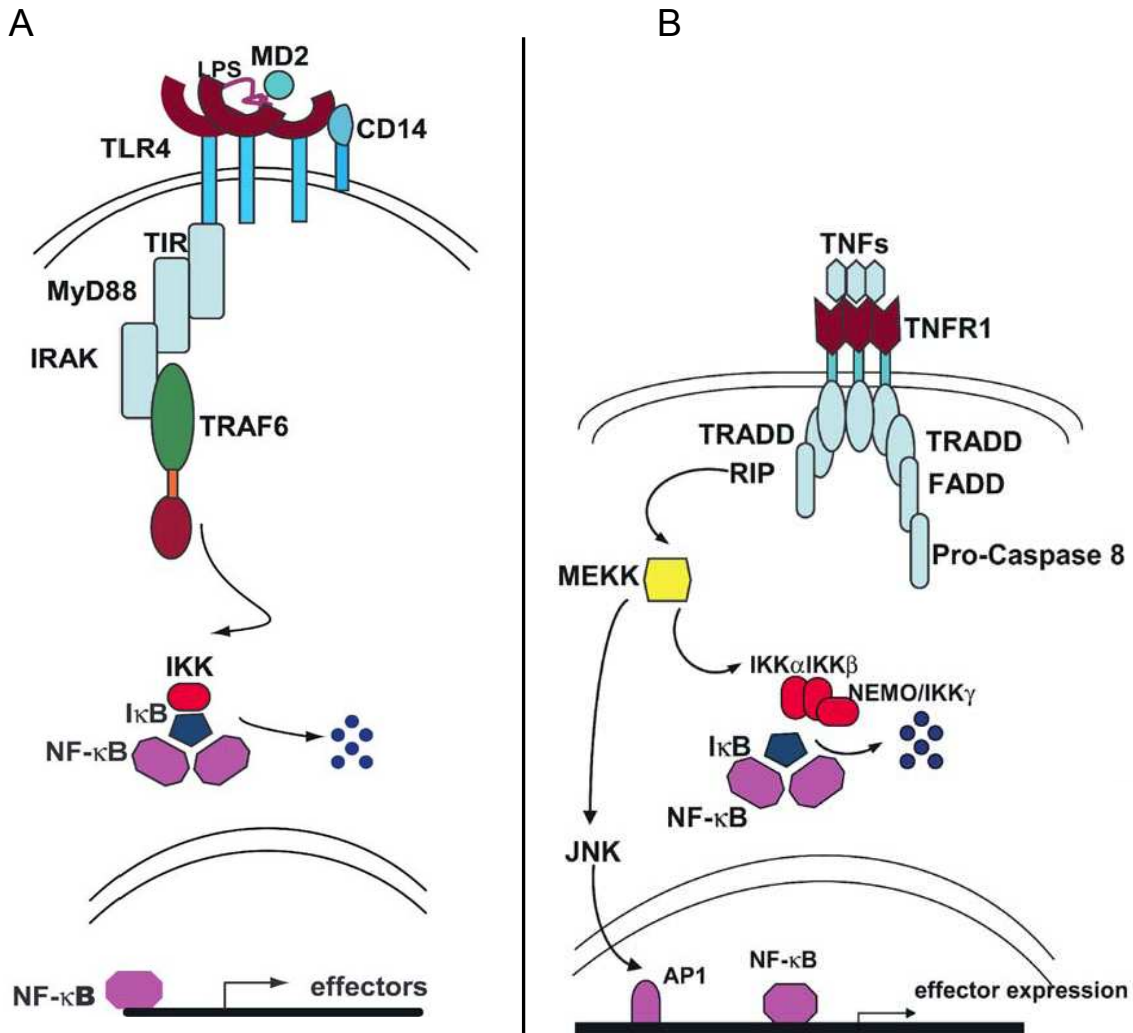
Η οικογένεια NF-κB παραγόντων των θηλαστικών αποτελείται από πέντε μέλη, τα p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF-κB1) και p52/p100 (NF-κB2). Όλα τα μέλη της οικογένειας NF-κB φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο μια συντηρημένη αλληλουχία RHD (Rel homology domain), η οποία προσδένεται στο DNA, είναι υπεύθυνη για το διμερισμό τους και την αλληλεπίδραση με τους αναστολείς τους. Οι πρωτεΐνες p65, RelB και c-Rel διαθέτουν επιπλέον μια περιοχή ενεργοποίησης (transactivation domain) στο καρβοξυτελικό τους άκρο, ενώ οι πρωτεΐνες p105 και p100 στο καρβοξυτελικό τους άκρο διαθέτουν μια περιοχή επαναλήψεων αγκυρίνης με ανασταλτική δράση, η οποία απομακρύνεται πρωτεολυτικά προκειμένου οι δύο παράγοντες να μετατραπούν στις ενεργές τους μορφές p50 και p52 (Leeman and Gilmore 2008). Οι παράγοντες NF-κB σχηματίζουν όμο- ή έτερο-διμερή που συγκρατούνται στο κυτταρόπλασμα από τους αναστολείς IκB (inhibitor of κB), οικογένεια πρωτεϊνών με 6 έως 8 επαναλήψεις αγκυρίνης και ρυθμιστικές περιοχές στα δύο άκρα τους. Μέλη της οικογένειας είναι οι IκBa, IκBβ, IκBγ, IκBe, IκBζ και Bcl3 με τους δύο τελευταίους παράγοντες να δρουν και ενεργοποιητικά εκτός από ανασταλτικά ως προς τα μόρια NF-κB. Ο περισσότερο μελετημένος παράγοντας IκB είναι ο IκBa, ο οποίος συμμετέχει στο κλασικό μονοπάτι ενεργοποίησης παραγόντων NF-κB. Στο σύμπλοκο που σχηματίζει με το διμερές p65/p50, ο IκBa καλύπτει το σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) του p65, αλλά όχι του p50, ενώ ο IκBa διαθέτει σήμα εξόδου από τον πυρήνα (NES), με αποτέλεσμα το συγκεκριμένο σύμπλοκο να βρίσκεται σε μια συνεχή είσοδο και έξοδο από τον πυρήνα (Ghosh and Karin 2002). Μετά από κατάλληλο ερέθισμα ενεργοποιείται η κινάση IKK (IκB kinase), σύμπλοκο αποτελούμενο από τις καταλυτικές υπομονάδες IKKα, IKKβ και τη ρυθμιστική υπομονάδα IKKγ ή NEMO, και φωσφορυλιώνει τον αναστολέα IκBa

(Hayden and Ghosh 2004). Τη φωσφορυλίωση ακολουθεί ουβικιτινυλίωση, πρωτεοσωμική αποικοδόμηση του αναστολέα και απελευθέρωση του συμπλόκου p65/p50 το οποίο μεταβαίνει στον πυρήνα, όπου προσδένεται σε συγκεκριμένες ακολουθίες στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων. Παρόμοια πορεία ακολουθείται κατά την ενεργοποίηση των υπόλοιπων μελών της οικογένειας NF-κB. Εξαίρεση αποτελούν οι πρόδρομοι μεταγραφικοί παράγοντες p100 και p105, οι οποίοι θεωρούνται μέλη και της οικογένειας των αναστολέων IκB. Ο παράγοντας p105 υφίσταται συστατική και όχι επαγόμενη επεξεργασία και ενεργοποίηση. Αντίθετα, ο p100 ενεργοποιείται από το εναλλακτικό μονοπάτι ενεργοποίησης παραγόντων NF-κB, κατά το οποίο φωσφορυλιώνεται η ανασταλτική υπομονάδα του p100, υφίσταται μερική πρωτεοσωμική αποικοδόμηση και ωριμάζει στη μορφή p52.

Οι Toll/IL-1R και TNFR οδοί μεταγωγής σήματος είναι οι πιο καλά μελετημένες σηματοδοτικές οδοί που οδηγούν σε ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Επιπλέον, υπάρχουν και οι οδοί που ξεκινούν από τους υποδοχείς των B και T λεμφοκυττάρων, BCRs και TCRs, αντίστοιχα, οι οποίες επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό και την ωρίμανση λεμφοκυτταρικών κλώνων ειδικών έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων, όπως συμβαίνει στην επίκτητη ανοσία (Hayden and Ghosh 2004).

Η οδός μεταγωγής σήματος που ξεκινά από τους υποδοχείς Toll/IL-1R αντιστοιχεί στην οδό Toll της *Drosophila*. Οι υποδοχείς Toll/IL-1R περιλαμβάνουν τους υποδοχείς της ιντερλευκίνης 1 και τους υποδοχείς Toll, που αναγνωρίζουν μοριακά αντιγόνα, όπως λιποπολυσακχαρίτες, δίκλωνο RNA και μη μεθυλιωμένες νησίδες CpG, από βακτήρια, ιούς, μύκητες ή παράσιτα και ελέγχουν την αναγνώριση εαυτού-μη εαυτού συμμετέχοντας στην εγγενή και την επίκτητη ανοσία (Hayden et al. 2006). Το κοινό χαρακτηριστικό των υποδοχέων Toll/IL-1R είναι η κυτταροπλασματική δομική περιοχή TIR, από την οποία ξεκινά και η κοινή μεταγωγή σήματός τους μέσω της αλληλεπίδρασής τους με μόρια τελεστές που επίσης διαθέτουν περιοχή TIR, όπως ο παράγοντας Myd88 (Hayden and Ghosh 2004). Ο Myd88 φέρνει σε επαφή τον παράγοντα IRAK1 με την κινάση IRAK4 με αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση του IRAK1 (IRAK: interleukin 1 receptor associated kinase) (Leeman and Gilmore 2008). Η φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη IRAK1 αλληλεπιδρά με τον TRAF6 (TNFR-associated factor), ο οποίος ενεργοποιεί το σύμπλοκο TAK1/TAB1 (TAK1: TGF-β activated kinase 1, TAB1: TAK1 binding protein). Η κινάση TAK1 φωσφορυλιώνει τη β υπομονάδα της κινάσης IKK (Inhibitor of κB

kinase), με αποτέλεσμα η ενεργοποιημένη κινάση IKK να φωσφορυλιώνει τον παράγοντα IκB, οδηγώντας τον σε ουβικιτινυλίωση και αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα, ενεργοποίηση του NF-κB και μετάβασή του στον πυρήνα (εικόνα 5A) (Leeman and Gilmore 2008).



Εικόνα 5. Οι δύο κύριες οδοί μεταγωγής σήματος των θηλαστικών που οδηγούν σε ενεργοποίηση NFκB παραγόντων. **A.** Ενδεικτικά αναπαρίσταται η οδός μεταγωγής σήματος που ξεκινά από τον υποδοχέα TLR4 ως παράδειγμα της μεταγωγής σήματος μέσω υποδοχέων Toll/IL1-R. Μετά την αναγνώριση βακτηριακών λιποπολυσακχαριτών από τον TLR4 επάγεται η αλληλεπίδραση των δομικών περιοχών TIR ανάμεσα στους TLR4 και MyD88. Η πρωτεΐνη MyD88 αλληλεπιδρά με τους παράγοντες IRAK και αυτοί με τον παράγοντα TRAF6 (TNFR-associated factor 6), με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του συμπλόκου IKK. Η κινάση IKK φωσφορυλιώνει τον αναστολέα IκB οδηγώντας τον προς αποικοδόμηση. Ο NF-κB μεταβαίνει στον πυρήνα των κυττάρων όπου μεταγράφει τα γονίδια-στόχους. **B.** Ο υποδοχέας TNFR1 της οικογένειας υποδοχέων TNFR, μετά από πρόσδεση του TNF-α και τον τριμερισμό του, αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη TRADD (TNFR-associated death domain). Η TRADD μαζί με άλλους παράγοντες, όπως η πρωτεΐνη RIP (receptor interacting protein) σχηματίζει ένα σύμπλοκο μεταγωγής σήματος. Η πρωτεΐνη RIP ενεργοποιεί το σύμπλοκο IKK που απαρτίζεται από τις υπομονάδες IKKα, IKKβ και IKKγ/NEMO, οδηγώντας σε φωσφορυλίωση τον παράγοντα IκB. Όπως και στο A, η φωσφορυλίωση του IκB οδηγεί στη μετατόπιση του NF-κB στον πυρήνα. (Wang and Ligoxygakis 2006)

Η οδός μεταγωγής σήματος που ξεκινά από τους υποδοχείς TNFR αντιστοιχεί στην οδό Imd της *Drosophila*. Οι υποδοχείς TNFR ανταποκρίνονται σε ένα πλήθος προσδετών (ligands) με πιο γνωστή την κυτταροκίνη TNF- α , η οποία εμπλέκεται στη ρύθμιση της απόπτωσης. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 5B**, μετά από την πρόσδεση του TNF- α στον υποδοχέα TNFR1 (τον πιο καλά μελετημένο υποδοχέα της οικογένειας) επάγεται η σύνδεση τριών μορίων του υποδοχέα (trimerization) και η αλληλεπίδραση του τριμερούς με την πρωτεΐνη TRADD (TNFR-associated death domain protein), η οποία φέρει μία περιοχή θανάτου (Leeman and Gilmore 2008). Η πρωτεΐνη TRADD επιστρατεύει πρωτεΐνες της οικογένειας TRAF (TNFR-associated factors), με ένα μέλος αυτών να ουβικτινυλιώνει την πρωτεΐνη RIP1 (TNF receptor interacting protein). Η κινάση IKK προστίθεται στο σύμπλοκο του υποδοχέα TNFR μέσω αλληλεπίδρασης με το μόριο TRAF2 (Devin et al. 2001), ενώ η αλληλεπίδρασή της με την ουβικτινυλιωμένη RIP1 οδηγεί στην ενεργοποίησή της (Zhang et al. 2000). Η ενεργή πια κινάση IKK επάγει την απελευθέρωση του NF- κ B από τον αναστολέα I κ B και τη μετάβασή του από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα.

1.3. Το παρασιτικό σύστημα

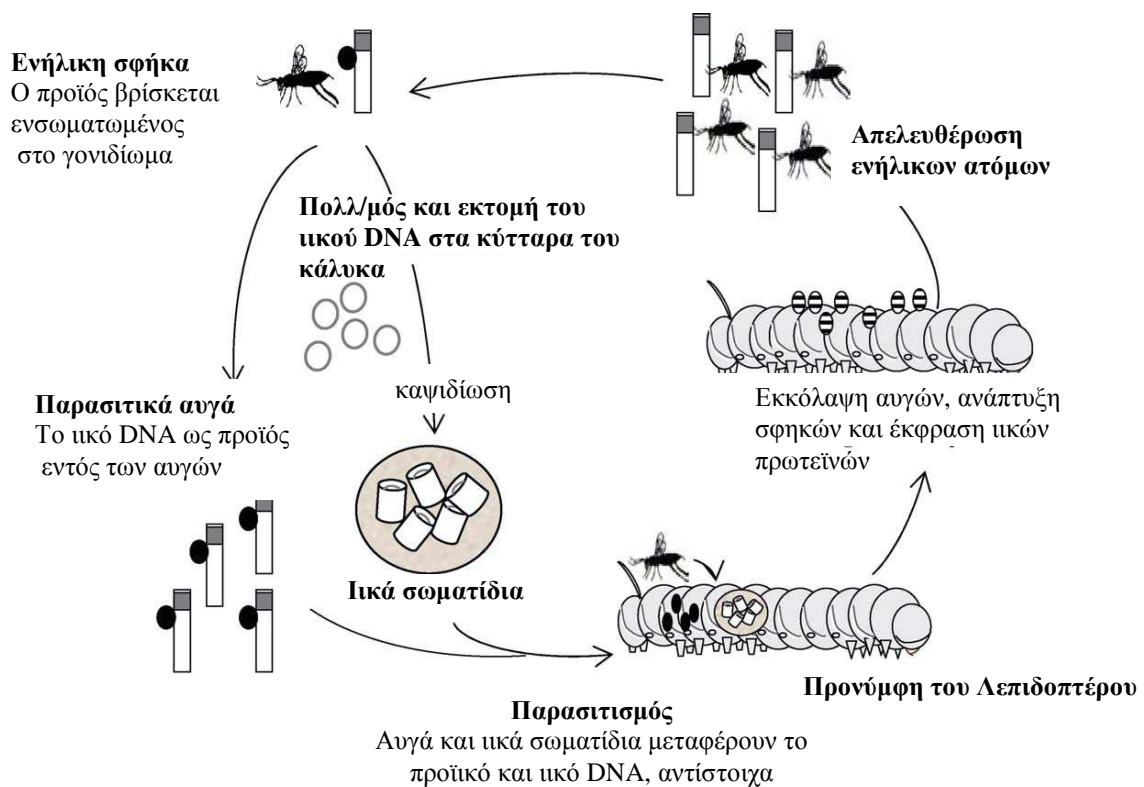
Γενικά

Στη φύση υπάρχει μια ομάδα υμενοπτέρων εντόμων που ζουν παρασιτικά εις βάρος των λεπιδοπτέρων εντόμων. Αυτά διακρίνονται σε εκτοπαρασιτοειδή και ενδοπαρασιτοειδή, ανάλογα με το αν παραμένουν εκτός ή εντός του σώματος του ξενιστή τους (Schmidt et al. 2001). Τα εκτοπαρασιτοειδή παραλύουν τον ξενιστή με τη χρήση δηλητηρίου, εναποθέτουν τα γονιμοποιημένα αυγά τους εκτός του σώματος των Λεπιδοπτέρων και εν συνεχεία οι εκκολαπτόμενες προνύμφες των Υμενοπτέρων καταναλώνουν τον ξενιστή (Whitfield 1990). Στην παραπάνω διαδικασία, τα γονιμοποιημένα αυγά δεν εκτίθενται στο ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή καθώς βρίσκονται εκτός του σώματος του Λεπιδοπτέρου. Στην κατηγορία των ενδοπαρασιτοειδών, τα Υμενόπτερα εναποθέτουν τα γονιμοποιημένα αυγά τους μέσω έγχυσης μέσα στο σώμα προνυμφών των Λεπιδοπτέρων. Στην προκειμένη περίπτωση τα αυγά έρχονται σε άμεση αλληλεπίδραση με το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή και κινδυνεύουν από την ανοσολογική του απόκριση (Whitfield 1990). Στο αιμόκοιλο της προνύμφης, τα έμβρυα των Υμενοπτέρων εκκολάπτονται και αναπτύσσονται οδηγώντας μακροπρόθεσμα στο θάνατο της προνύμφης των Λεπιδοπτέρων. Η επιβίωση των αυγών των ενδοπαρασιτοειδών εντός του ξενιστή, η οποία είναι κρίσιμη για τη συνέχιση του κύκλου ζωής τους, επιτυγχάνεται με μία σειρά παραγόντων-μορίων που εγχύονται στην προνύμφη μαζί με τα αυγά. Αυτοί οι παράγοντες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, σε παράγοντες που μιμούνται μόρια των Λεπιδοπτέρων και καλύπτουν τα αυγά τους ώστε να μην αναγνωριστούν ως ξένα σώματα και απορριφθούν από τον ξενιστή, και σε παράγοντες που δρουν ως καταστολείς του ανοσοποιητικού συστήματος των Λεπιδοπτέρων (Federici and Bigot 2003). Τέτοιοι παράγοντες είναι πρωτεΐνες από τις ωοθήκες και δηλητήρια από το ενήλικο Υμενόπτερο, καθώς και ιοί.

Polydna ιοί

Οι ιοί αυτοί ονομάζονται poly-disperse dna ιοί, polydna ιοί ή polydnaviruses (PDVs). Το όνομά τους οφείλεται στο γεγονός ότι το γονιδιώμά τους είναι πολυτμηματικό, αποτελούμενο από πολλούς κύκλους δίκλωνου DNA (Whitfield 1990). Οι συγκεκριμένοι ιοί κατανέμουν τον κύκλο ζωής τους ανάμεσα και στις δύο

τάξεις εντόμων, τα Λεπιδόπτερα και τα Υμενόπτερα. Επειδή οι διάφορες φάσεις της ζωής τους (μόλυνση, διπλασιασμός, μετάδοση) κατανέμονται ανάμεσα στα Λεπιδόπτερα και στα Υμενόπτερα, ποτέ δε συμβαίνει μια αναπαραγωγική μόλυνση. Το γονιδίωμα των polydna ιών βρίσκεται ενσωματωμένο στο γενετικό υλικό των Υμενοπτέρων με τους οποίους ενδοσυμβιώνουν (Fleming and Summers 1986; Fleming and Summers 1991; Xu and Stoltz 1991; Belle et al. 2002) και υπάρχουν ενδείξεις ότι όλα τα κυκλικά τμήματα DNA εντοπίζονται σε ένα μόνο σημείο του γονιδιώματος των Υμενοπτέρων (Belle et al. 2002). Έτσι, το γονιδίωμα των polydna ιών μεταφέρεται κάθετα από γενιά σε γενιά Υμενοπτέρων (Stoltz 1990; Savary et al. 1997). Κατά την περίοδο της ωοαπόθεσης των Υμενοπτέρων στην προνύμφη των Λεπιδοπτέρων, το ικό DNA διπλασιάζεται και τα κυκλικά του κομμάτια (ικά χρωμοσώματα) πακετάρονται ως ικά σωματίδια. Ο πολλαπλασιασμός των ικών σωματιδίων λαμβάνει χώρα μόνο σ' αυτό το στάδιο και ειδικά στα κύτταρα του κάλυκα των ωαγωγών των ενδοπαρασιτοειδών Υμενοπτέρων (σφήκες) (Krell and Stoltz 1980). Τα σωματίδια των polydna ιών ενίονται μαζί με τα αυγά των σφηκών στις προνύμφες λεπιδοπτέρων εντόμων συμμετέχοντας στη διαδικασία του παρασιτισμού τους από τα Υμενόπτερα (εικόνα 6). Σε συνεργασία με τις υπόλοιπες ουσίες που ενίονται κατά την ωοαπόθεση (Luckhart and Webb 1996), πιθανολογείται ότι οι polydna ιοί προστατεύουν τα αυγά των Υμενοπτέρων από αντιδράσεις άμυνας του ξενιστή. Η έγχυση των polydna ιών συνεπάγεται μια σειρά από επιπτώσεις στη φυσιολογία της προνύμφης των Λεπιδοπτέρων, που δεν οφείλονται σε ενεργή μόλυνση από τον ιό ή παραγωγή νέων ικών σωματιδίων, αλλά στην έκφραση των ικών πρωτεϊνών. Οι ικές πρωτεΐνες επιδρούν στη φυσιολογία του λεπιδόπτερου ξενιστή επιφέροντας αλλαγές στο μεταβολισμό του, καθυστερώντας την ανάπτυξή του και καταστέλλοντας το ανοσοποιητικό του σύστημα (Whitfield 1990). Στο τελικό στάδιο, αφού τα προστατευμένα αυγά έχουν εκκολαφθεί, οι ώριμες προνύμφες του ενδοπαρασιτοειδούς εξέρχονται από το σώμα του ξενιστή. Εκεί σχηματίζουν κουκούλια (στάδιο νύμφης) και μεταμορφώνονται σε ενήλικα άτομα. Επομένως, σε ένα τέτοιο σύστημα υπάρχει αμοιβαία εξάρτηση ανάμεσα στα συγκεκριμένα Υμενόπτερα και τους αντίστοιχους polydna ιούς: ο ιός χρειάζεται το Υμενόπτερο για τη διατήρησή του (διπλασιασμός και μετάδοση), ενώ το Υμενόπτερο χρειάζεται τον ιό για τον αποτελεσματικό παρασιτισμό του Λεπιδόπτερου (Dupuy et al. 2006).

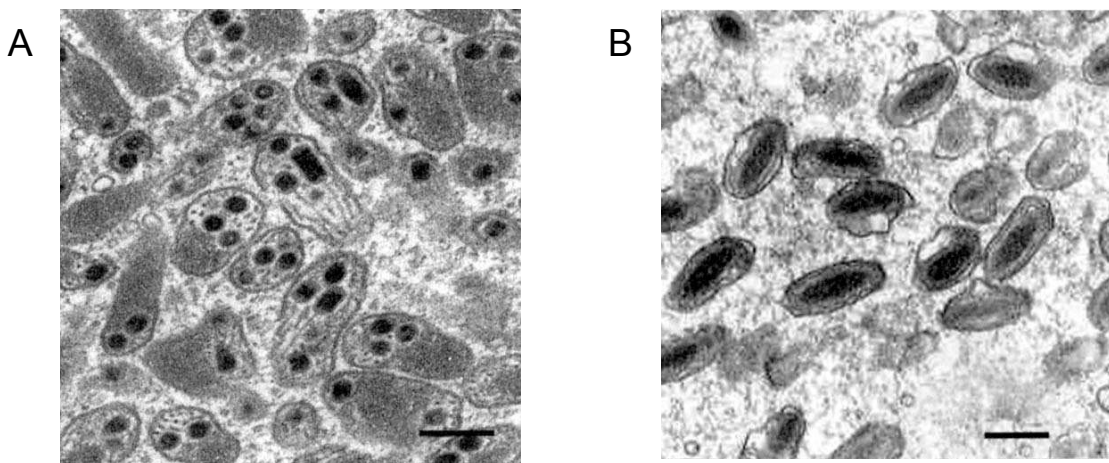


Εικόνα 6. Κύκλος ζωής της ενδοπαρασιτοειδούς σφήκας και του polydnavirus. Το ιικό DNA είναι ενσωματωμένο στο γονιδίωμα της σφήκας και μεταδίδεται χρωμοσωμικά ως προϊός. Στα κύτταρα των ωοθηκών τα κυκλικά τμήματα DNA πακετάρονται σε ιικά σωματίδια. Κατά την ωοαπόθεση η σφήκα ενίει τα ιικά σωματίδια στο λεπιδόπτερο ξενιστή. Τα ιικά σωματίδια εισέρχονται στα κύτταρα του ξενιστή, όπου τα ιικά γονίδια εκφράζονται, αλλά το γενετικό υλικό του ιού δεν πολλαπλασιάζεται. Οι ιικές πρωτεΐνες επιτρέπουν την ανάπτυξη των ενδοπαρασιτοειδών προνυμφών οι οποίες εξέρχονται από τον ξενιστή, περνούν στο στάδιο της νύμφης και τελικά μεταμορφώνονται σε ενήλικα άτομα. Εικόνα από (Duruoy et al. 2006).

Οικογένειες των polydnavirus

Polydnavirus ιοί συμβιώνουν με πολλά είδη Υμενοπτερών. Τα Υμενόπτερα-φορείς των polydnavirus ιών ανήκουν στις οικογένειες Braconidae και Ichneumonidae και, κατ'αντιστοιχία, οι polydnavirus ιοί κατατάσσονται στις οικογένειες των bracoviruses και ichnoviruses (Whitfield and Asgari 2003). Οι ιοί των δύο οικογενειών έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά. Τα σωματίδια των bracoviruses (**εικόνα 7A**) έχουν ένα ή περισσότερα νουκλεοκαψίδια που είναι κυλινδρικά με σταθερή διάμετρο αλλά μεταβλητό μήκος, με ένα τμήμα DNA ανά νουκλεοκαψίδιο και ελευθερώνονται από τα κύτταρα του κάλυκα με κυτταρική λύση (Whitfield and Asgari 2003). Τα σωματίδια των ichnoviruses (**εικόνα 7B**) περιλαμβάνουν ένα νουκλεοκαψίδιο ελλειμοειδές, σταθερού μεγέθους που περιβάλλεται από δύο μεμβράνες και περιέχει

πολλά τμήματα DNA, ενώ απελευθερώνονται από τα κύτταρα του ενδοπαρασιτοειδούς μέσω εκβλάστησης (Whitfield and Asgari 2003). Ωστόσο, οι δύο οικογένειες εμφανίζουν ομοιότητες ως προς την οργάνωση του γονιδιώματός τους, όπως τον κερματισμό του σε τμήματα, τη χαμηλή πυκνότητα κωδικοποιουσών περιοχών, σε αντίθεση με τους συνήθεις ιούς, και την ύπαρξη εσώνίων στις ακολουθίες των γονιδίων (Dupuy et al. 2006), αλλά και ομοιότητες ως προς το μηχανισμό δράσης τους. Τελευταία έχει προταθεί η ύπαρξη και μιας τρίτης κατηγορίας polydna ιών οι οποίοι συμβιώνουν με τις σφήκες της υποοικογένειας Banchinae των Ichneumonidae, ωστόσο πιθανώς αποτελούν διακριτό κλάδο από τους ichnoviruses (Lapointe et al. 2007). Οι τρεις τύποι ιών παρουσιάζουν παρόμοιο τρόπο παραγωγής και λειτουργίας και παρόμοια οργάνωση γονιδιώματος, αλλά επειδή παρουσιάζουν και αρκετές μορφολογικές και γονιδιακές διαφορές, η εξελικτική τους προέλευση θεωρείται ανεξάρτητη (Whitfield and Asgari 2003; Dupuy et al. 2006; Lapointe et al. 2007).



Εικόνα 7. Ιικά σωματίδια polydna ιών. Α. Σωματίδια από bracovirus PDV. Κάθε σωματίδιο περιέχει πολλά νουκλεοκαψίδια. **Β.** Σωματίδια από ichnovirus PDV. Κάθε σωματίδιο περιέχει ένα νουκλεοκαψίδιο. Οι εικόνες προέρχονται από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης, οι μπάρες αντιστοιχούν σε 200 nm. Φωτογραφίες από D.B. Stoltz. (Federici and Bigot 2003)

Επί δεκαετίες η επιστημονική κοινότητα έθετε την ική υπόσταση των PDVs υπό αμφισβήτηση. Μια μερίδα ερευνητών υποστήριζε ότι οι polydna ιοί είναι οχήματα μεταφοράς γονιδίων-όπλων, τα οποία έχουν δημιουργηθεί από τα Υμενόπτερα έναντι των ξενιστών τους, ενώ άλλοι ερευνητές υποστήριζαν την ική υπόσταση των PDVs (Whitfield 1990; Whitfield and Asgari 2003). Η άποψη περί

ευκαρυωτικής προέλευσης στηρίζεται (α) στην ομοιότητα πολλών πρωτεϊνών των PDVs με πρωτεΐνες των ευκαρυωτικών κυττάρων, π. χ. υπάρχουν κοινοί επίτοποι μεταξύ ικών πρωτεϊνών και πρωτεϊνών από το δηλητήριο των Υμενοπτέρων (Webb and Summers 1990), (β) στη χαμηλή πυκνότητα των ικών γονιδιωμάτων σε γονίδια, (γ) στην ύπαρξη εσώνιων σε πολλά γονίδια των PDVs (Whitfield and Asgari 2003) και (δ) στην απουσία πολλαπλασιασμού του ιού εντός του ξενιστή. Ωστόσο, πρόσφατα οι Bezier et al. εντόπισαν στο γονιδίωμα δύο παρασιτοειδών σφηκών, των *Chelonus inanitus* και *Cotesia congregata*, 22 γονίδια, που προέρχονται εξελικτικά από τους εντομοϊούς του γένους Nudivirus (Wang et al. 2007) και, ταυτόχρονα, τα προϊόντα αρκετών από αυτά τα γονίδια στα σωματίδια των αντίστοιχων polydna ιών, CiBV και CcBV (Bezier et al. 2009). Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από αυτά τα γονίδια έρχονται να καλύψουν «λειτουργικά κενά» των polydna ιών, καθώς αυτοί στερούνται γονιδίων που να κωδικοποιούν δομικές πρωτεΐνες των ικών σωματιδίων και πολυμεράσες. Έτσι, επιβεβαιώθηκε η σχέση αμφίδρομης εξάρτησης ανάμεσα σε Υμενόπτερα και polydna ιούς σε γονιδιακό επίπεδο. Η ύπαρξη γονιδίων ικής προέλευσης στο γονιδίωμα των ενδοπαρασιτοειδών, και των προϊόντων τους στα σωματίδια των PDVs επιβεβαιώνει την ική προέλευση των τελευταίων (Bezier et al. 2009; Stoltz and Whitfield 2009). Φαίνεται πως ο πρόγονος των polydna ιών διέθετε τα συγκεκριμένα γονίδια αλλά, μετά τη συμβίωση με τα Υμενόπτερα, αυτά χάθηκαν από τα ικά χρωμοσώματα λόγω της ενσωμάτωσής τους στο γονιδίωμα του ενδοπαρασιτοειδούς.

Επίδραση των PDVs στον ξενιστή

Έχει γίνει εκτεταμένη μελέτη της επίδρασης των polydna ιών, τόσο της οικογένειας των ichnoviruses όσο και της οικογένειας των bracoviruses στους τελικούς ξενιστές των παρασιτικών συστημάτων, τα Λεπιδόπτερα.

Ως παράδειγμα αναφέρεται ο παρασιτισμός του Λεπιδοπτέρου *Heliothis virescens* από το Υμενόπτερο *Camponotus sonorensis* της οικογένειας Ichneumonidae, που φέρει τον polydna ιό CsIV και επιφέρει μια σειρά από αλλαγές στον ξενιστή. Τέτοιες αλλαγές είναι η καταστολή της ικανότητας των πλασματοκυττάρων να εγκυστώνουν ξένα σώματα (Davies and Vinson 1988), η αναστολή της ανάπτυξης της παρασιτισμένης προνύμφης εξαιτίας ορμονικών διαταραχών (Shelby and Webb 1997) και η αλλαγή του μεταβολισμού της εξαιτίας της μείωσης στην έκφραση αποθηκευτικών πρωτεϊνών της αιμοσφαιρίνης όπως η Riboflavin binding hexamer (Shelby and Webb 1997) και η αρυλφορίνη (Shelby and Webb 1994). Φαίνεται,

μάλιστα, πως δε γίνεται γενική καταστολή της έκφρασης όλων των πρωτεϊνών της αιμολέμφου, αλλά επιλογή συγκεκριμένων. Για παράδειγμα, μετά από εισαγωγή του ιού CsIV στον ξενιστή *H. virescens*, επέρχεται μείωση στην παραγωγή της εστεράσης της νεανικής ορμόνης, αλλά όχι της πρωτεΐνης που προσδένει τη νεανική ορμόνη (Shelby and Webb 1997). Παράλληλα, έχουν μελετηθεί και συγκεκριμένες πρωτεΐνες του CsIV, όπως η εκκρινόμενη πρωτεΐνη VHv1.4 (viral segment V of *Heliothis virescens*), η οποία βρέθηκε ότι προσδένεται στα αιμοκύτταρα του ξενιστή που διεξάγουν την εγκύστωση, προσδίδοντας στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη έναν πιθανό ρόλο αναστολέα της εγκύστωσης (Cui et al. 1997).

Στο παρασιτικό σύστημα του λεπιδόπτερου ξενιστή *Pseudoplusia includens* και της σφήκας *Microplitis demolitor* της οικογένειας Braconidae, η παρουσία των σωματιδίων του ενδοσυμβιωτικού ιού MdBV αναστέλλει την εγκύστωση των αυγών του παρασιτοειδούς από τον ξενιστή. Η αναστολή οφείλεται στη μόλυνση από τα ιικά σωματίδια των δύο ομάδων των αιμοκυττάρων που συμμετέχουν στην εγκύστωση, τα κοκκιώδη κύτταρα και τα πλασματοκύτταρα (Strand 1994). Τα σωματίδια MdBV οδηγούν σε απόπτωση τα κοκκιώδη κύτταρα του ξενιστή (Strand and Pech 1995), ενώ μειώνουν την ικανότητα των πλασματοκυττάρων για πρόσφυση (Strand et al. 1999), με αποτέλεσμα να μειώνεται η ικανότητα του ξενιστή για εγκύστωση των αυγών του παρασιτοειδούς. Επίσης, ο ιός MdBV καταστέλλει τη φαγοκυτταρική ικανότητα του ξενιστή, καθώς πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι η ιική πρωτεΐνη GLC1.8 (glycosylated central core protein) αναστέλλει την κυτταρική πρόσφυση και τη φαγοκύτωση από κύτταρα εντόμων *in vitro* (Beck and Strand 2005; Strand et al. 2006).

Η πλειοψηφία των αλλαγών που επάγονται στη φυσιολογία του ξενιστή θεωρείται ότι σχετίζεται με την έκφραση των ικών πρωτεϊνών που λαμβάνει χώρα μέσα στο σώμα του ξενιστή (Beckage and Kanost 1993; Harwood et al. 1994; Cui et al. 1997; Asgari and Schmidt 2002; Schmidt et al. 2005). Στην περίπτωση του παρασιτισμού του Λεπιδόπτερου *Pieris rapae* από το Υμενόπτερο *C. rubecula*, μία ιική πρωτεΐνη, η CrV1, είναι αρκετή για να προκαλέσει αποδιάταξη του κυτταροσκελετού ακτίνης στα αιμοκύτταρα του ξενιστή, μείωση μορίων της επιφάνειας σημαντικών για την ανοσολογική απόκριση και τελικά την καταστολή των αιμοκυττάρων (Asgari et al. 1997; Asgari and Schmidt 2002). Έτσι, πολλές ερευνητικές ομάδες επικεντρώνουν τη μελέτη τους στη δράση συγκεκριμένων ικών πρωτεϊνών πάνω σε κύτταρα των εκάστοτε ξενιστών.

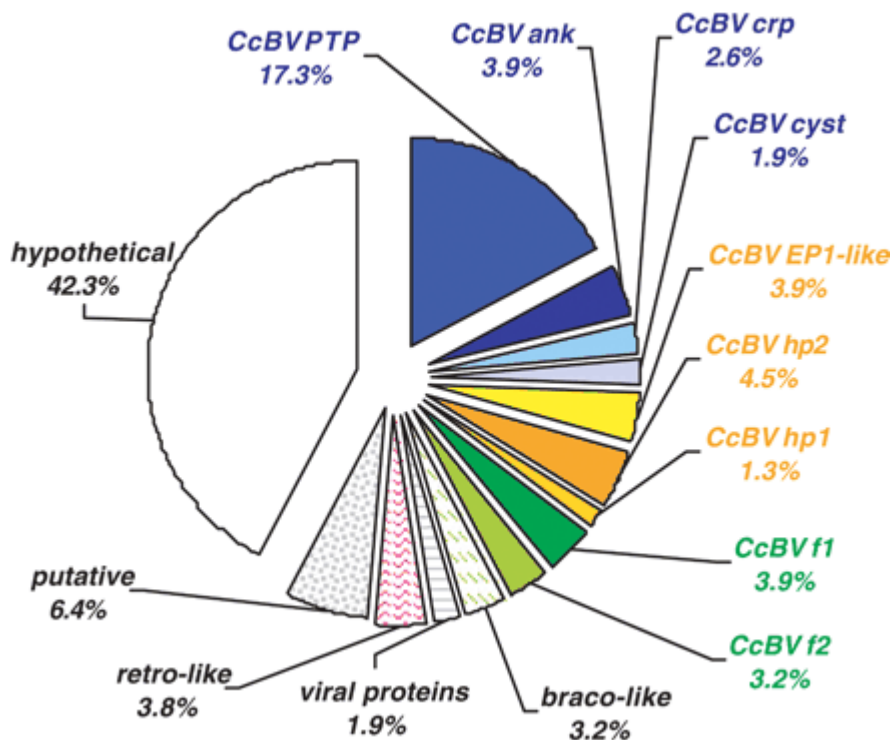
Το σύστημα παρασιτισμού *Cotesia congregata* – *Manduca sexta*

Το παρασιτικό σύστημα *Cotesia congregata* – *Manduca sexta* περιλαμβάνει το παρασιτοειδές Υμενόπτερο *C. congregata* (= *Apanteles congregatus*) της οικογένειας Braconidae, τον polydna ιό CcBV (*C. congregata* Bracovirus) που συμβιώνει ως προϊός με το παρασιτοειδές και τον τελικό ξενιστή, το Λεπιδόπτερο *M. sexta* (= tobacco hornworm). Το σύστημα αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς η *M. sexta* στο στάδιο της προνύμφης, δηλαδή το στάδιο που προσβάλλεται από την *C. congregata*, τρέφεται με φυτά όπως ο καπνός και η ντομάτα και είναι επιβλαβές για αυτές τις αγροτικές καλλιέργειες.

Το θηλυκό άτομο της *Cotesia* εναποθέτει από 50 έως μερικές εκατοντάδες αυγά στο σώμα του ξενιστή και οι προνύμφες που εξέρχονται από τα αυγά τρέφονται από την αιμολέμφο και το λιπαρό σώμα του ξενιστή (Nakamatsu et al. 2002). Εντός μισής ώρας από την ένεση των γονιμοποιημένων αυγών της *C. congregata* και των σωματιδίων του CcBV, αρχίζει η παραγωγή νέων πρωτεϊνών, ενώ μειώνεται η έκφραση πρωτεϊνών της αιμολέμφου του ξενιστή, όπως η σερπίνη και η αρυλφορίνη (Beckage and Kanost 1993). Παράλληλα, η ανάπτυξη του λεπιδοπτερού ξενιστή καθυστερεί εξαιτίας της μη φυσιολογικής συνεχιζόμενης αύξησης της νεανικής ορμόνης κατά τις 4 πρώτες ημέρες του παρασιτισμού, που οφείλεται σε μειωμένη αποικοδόμησή της (Beckage and Riddiford 1982). Ο ξενιστής δεν φτάνει ποτέ σε μεταμόρφωση, ενώ πριν την έξοδο των παρασιτοειδών, σταματά και να τρέφεται. Το αποτέλεσμα του παρασιτισμού είναι η εκκόλαψη των εμβρύων της σφήκας, η έξοδος τους ως προνύμφες δεύτερου σταδίου από τον ξενιστή (Thompson et al. 2005) και ο θάνατος του τελευταίου. Έχει δειχθεί, επίσης, ότι η πρωτεΐνη του ιού CcBV EP1 (early expressed protein1) και πιθανώς οι πρωτεΐνες EP2 και EP3 (Harwood et al. 1994; Harwood et al. 1998), η ομόλογη της CrV1 του polydna ιού CrBV, CcV1 (Le et al. 2003), και οι συστατίνες (cystatins) (Espagne et al. 2005) εκφράζονται σε διάφορα στάδια του παρασιτισμού της προνύμφης της *M. sexta*. Επίσης, έχει δειχθεί η μεταγραφή 22 γονιδίων φωσφατασών τυροσίνης (PTPs ή Protein Tyrosine Phosphatases) (Provost et al. 2004) και έξι γονιδίων που αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες επαναλήψεων αγκυρίνης Ank (Falabella et al. 2007).

Ο ιός *Cotesia congregata bracovirus* (CcBV)

Το γονιδίωμα του CcBV αποτελείται από 567.670 bp και έχει αποκωδικοποιηθεί πλήρως (Espagne et al. 2004). Συνίσταται από 30 κυκλικά κομμάτια DNA, τα οποία, σύμφωνα με μια ερευνητική ομάδα, περιλαμβάνουν 156 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης με το 69% αυτών να περιέχει εσώνια (Espagne et al. 2004). Ωστόσο, σύμφωνα με άλλη ερευνητική ομάδα που χρησιμοποίησε διαφορετικά υπολογιστικά προγράμματα, τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης είναι 148, ενώ το ποσοστό γονιδίων που περιλαμβάνουν εσώνια κυμαίνεται γύρω στο 6,8% (Webb et al. 2006). Όπως ισχύει και για άλλους polydna ιούς, το γονιδίωμα του CcBV έχει υψηλό ποσοστό αδενίνης-θυμίνης (66%), μικρή πυκνότητα γονιδίων κι έναν αρχικά μικρό αριθμό γονιδίων που όμως μέσω διπλασιασμού και απόκλισης έχει δημιουργήσει πολυγονιδιακές οικογένειες (Espagne et al. 2004). Έτσι, 69 γονίδια συγκροτούν 9 οικογένειες (**εικόνα 8**), την οικογένεια των φωσφατασών τυροσίνης, την οικογένεια πρωτεϊνών με επαναλήψεις αγκυρίνης (Ank proteins), την οικογένεια πρωτεϊνών πλούσιων σε κυστεΐνες (cysteine rich proteins ή CRPs), την οικογένεια των συστατινών (cystatins) και άλλες πέντε, των οποίων τα μέλη δεν έχουν κάποιο γνωστό λειτουργικό στοιχείο και κατηγοριοποιούνται σαν υποθετική οικογένεια 1, υποθετική οικογένεια 2 (CcBV hypothetical1, CcBV hypothetical2), CcBV EP1-like, CcBV family1 και CcBV family2 (Espagne et al. 2004). Τα γονίδια που δεν ανήκουν σε καμία από τις 9 οικογένειες είτε κωδικοποιούν προϊόντα που δεν ομοιάζουν με καμία κατατεθειμένη ακολουθία πρωτεΐνης στις βάσεις δεδομένων, ή είναι ομόλογα με ικές δομικές πρωτεΐνες ή με πρωτεΐνες άλλων μπρακοϊών. Επιπλέον, ορισμένα γονίδια ομοιάζουν με στοιχεία ρετροϊών.



Εικόνα 8. Κατάταξη των 156 αναγνωρισμένων γονιδίων του γονιδιώματος του CcBV. Το 42,3% των γονιδίων κωδικοποιεί πρωτεΐνες χωρίς καμία ομοιότητα με γνωστές πρωτεΐνες (άσπρο) ενώ το 42,5% των γονιδίων οργανώνεται σε εννέα πολυγονιδιακές οικογένειες (παρουσιάζονται με διάφορα χρώματα). Με μπλε παρουσιάζονται γονίδια που εκφράζουν προϊόντα με γνωστά και καλά διατηρημένα δομικά στοιχεία (PTP: φωσφατάσες τυροσίνης, ank: πρωτεΐνες επαναλήψεων αγκυρίνης, crp: πρωτεΐνες πλούσιες σε κυστεΐνες, cyst: συστατίνες). Με πορτοκαλί φαίνονται οικογένειες γονιδίων ειδικές για τον CcBV (hp1 και hp2: υποθετικές οικογένειες 1 και 2), ενώ με πράσινο φαίνονται οικογένειες γονιδίων κοινές με ενδοσυμβιωτικούς ιούς από άλλα είδη του γένους *Cotesia*. Από το σύνολο των γονιδίων, το 3,2% είναι μεμονωμένα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ομόλογες με πρωτεΐνες μπρακοϊών (διακεκομμένο πράσινο), το 1,9% (διακεκομμένο γκρι) αντιστοιχεί σε τρία γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με ικές δομικές υπομονάδες και το 3,8% αντιστοιχεί σε γονίδια που ομοιάζουν με ρετροϊικά στοιχεία (διακεκομμένο ροζ). Με γκρι κόκκους απεικονίζεται το 6,4% του συνόλου των γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες όμοιες με υποθετικές πρωτεΐνες. Εικόνα από (Espagne et al. 2004).

Η μεγαλύτερη οικογένεια στο γονιδίωμα του ιού είναι αυτή των γονιδίων που κωδικοποιούν προϊόντα με ολόκληρη ή μερική δομική περιοχή φωσφατάσης τυροσίνης (PTP) με 27 μέλη (**εικόνα 8**). 22 εξ'αυτών εκφράζονται σε ιστούς του παρασιτισμένου ξενιστή (Provost et al. 2004). Οι φωσφατάσες τυροσίνης εν γένει έχουν ιδιαίτερη σημασία στη ρύθμιση της κυτταρικής σηματοδότησης, αφού απομακρύνουν φωσφορικές ομάδες από τυροσίνες πολλών πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια (Andersen 2001). Δεκαπέντε μέλη της οικογένειας των φωσφατασών του CcBV προβλέπεται ότι έχουν ενεργό καταλυτικό κέντρο φωσφατάσης και ότι δρουν ως πραγματικές φωσφατάσες τυροσίνης, ενώ για τις υπόλοιπες ο τρόπος δράσης τους είναι άγνωστος και

πιθανολογείται ότι δρουν ως «παγίδες» φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών (Provost et al. 2004). Ομόλογες οικογένειες φωσφατασών τυροσίνης έχουν βρεθεί και μελετηθεί και σε άλλους polydna ιούς, όπως τον *M. demolitor* bracovirus, MdBV, όπου τα μέλη PTP-H2 και PTP-H3, που εκφράζονται σε παρασιτισμένα άτομα του ξενιστή *Pseudoplusia includens*, είναι λειτουργικές φωσφατάσες και προκαλούν μείωση στη φαγοκυτταρική ικανότητα κυττάρων S2 της *Drosophila in vitro* (Pruijssers and Strand 2007). Επίσης, στο παρασιτικό σύστημα του Λεπιδοπτέρου *Heliothis virescens* και του Υμενοπτέρου *Toxoneuron nigriceps*, έχει παρατηρηθεί ότι η μόλυνση με τον ενδοσυμβιωτικό ιό του *T. nigriceps* προκαλεί μείωση της σύνθεσης εκδυστεροειδών από τους προθωρακικούς αδένες με συνεπαγόμενη αναστολή της ανάπτυξης του ξενιστή. Καθώς η πτώση στη λειτουργικότητα των προθωρακικών αδένων σε παρασιτισμένα άτομα συνοδεύεται από υποφωσφορυλίωση σημαντικών πρωτεϊνών της οδού μεταγωγής σήματος της προθωρακικοτρόπου ορμόνης (Bradleigh Vinson et al. 1998) και δεδομένου ότι τουλάχιστον ένα μέλος της οικογένειας των φωσφατασών PTP εκφράζεται στους συγκεκριμένους αδένες παρασιτισμένων ξενιστών (Falabella et al. 2006), είναι πιθανό οι ιικές πρωτεΐνες PTP να προκαλούν την απενεργοποίηση των προθωρακικών αδένων (Falabella et al. 2006).

Η δεύτερη μεγαλύτερη γονιδιακή οικογένεια του ιού CcBV κωδικοποιεί εννιά πρωτεΐνες με επαναλήψεις αγκυρίνης (Ank). Οι πρωτεΐνες αυτές παρουσιάζουν ομολογία με μία ευρύτερη οικογένεια αναστολέων των Rel/NF-κB μεταγραφικών παραγόντων, τις πρωτεΐνες IκB (Inhibitor of NF-κB) του ανθρώπου και το ομόλογο μόριο Cactus της *Drosophila*. Η τρίτη σε μέγεθος οικογένεια γονιδίων (με τέσσερα μέλη) είναι αυτή που κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες πλούσιες σε κυστεΐνη (Cysteine-rich proteins ή CRPs). Για μια τέτοια πρωτεΐνη πλούσια σε κυστεΐνες από τον ενδοσυμβιωτικό ιό της *Cotesia plutellae* CpBV, τη CRP1 (Cysteine-rich Protein 1), υπάρχουν δεδομένα ότι αναστέλλει την ικανότητα πρόσφυσης των αιμοκυττάρων και την ανάπτυξη του ξενιστή *Plutella xylostella* (Barandoc and Kim 2009). Οι πρωτεΐνες CRPs των bracoviruses CcBV και CpBV παρουσιάζουν ομοιότητα με άλλες οικογένειες πρωτεϊνών κυστεΐνης όπως με τις πρωτεΐνες VHV των ichnoviruses (Fath-Goodin et al. 2006) όπως επίσης και με μία κυτταρική πρωτεΐνη της σφήκας *Microplitis croceipes* της οικογένειας Braconidae, την TSP14. Η πρωτεΐνη TSP14 επάγει μείωση της σύνθεσης πρωτεϊνών του ξενιστή (Dahlman et al. 2003).

Η τέταρτη οικογένεια γονιδίων του ιού CcBV, με τρία μέλη, κωδικοποιεί τις συστατίνες (cystatins), πρωτεΐνες με προβλεπόμενη λειτουργία αναστολέων

πρωτεασών κυστεΐνης. Οι συστατίνες αποτελούν μια πρωτεϊνική υπεροικογένεια που απαντάται σε πολλούς οργανισμούς, ανάμεσα στους οποίους και στα νηματώδη παράσιτα όπου έχουν ανοσοκατασταλτική δράση. Έχει επιβεβαιωθεί η έκφραση των τριών συστατινών του ιού σε ιστούς παρασιτισμένης *M. sexta* και για ένα τουλάχιστον μέλος της οικογένειας, την cystatin1, έχει δειχθεί *in vitro* η ανασταλτική του δράση έναντι πρωτεασών κυστεΐνης τύπου C1, όπως η παπαΐνη και οι καθεψίνες B και L (Espagne et al. 2005). Στο συγκεκριμένο Λεπιδόπτερο, τη *M. sexta*, έχουν ανακαλυφθεί τέσσερις πρωτεάσες κυστεΐνης: οι MsCathB, MsCathL, MsCath1 και MsCath2, με τις δύο τελευταίες να καταστέλλονται σε μεταγραφικό επίπεδο σε ανοσοποιημένα άτομα, ενώ οι δύο πρώτες να παραμένουν ανεπηρέαστες (Serbielle et al. 2009). Η συνολική ενεργότητα πρωτεασών κυστεΐνης της *M. sexta* σημειώνει αύξηση μία ημέρα μετά τον παρασιτισμό από την *C. congregata* τόσο στα αιμοκύτταρα, όσο και στο πλάσμα, ενώ δύο ημέρες μετά τον παρασιτισμό η ενεργότητά τους στο πλάσμα μειώνεται στα επίπεδα των μη παρασιτισμένων ατόμων (Serbielle et al. 2009). Η μείωση της ενεργότητας των πρωτεασών κυστεΐνης στο πλάσμα του ξενιστή μεταξύ της πρώτης και της δεύτερης ημέρας του παρασιτισμού είναι πιθανό ότι είναι αποτέλεσμα κατασταλτικής ρύθμισης από τις συστατίνες του ιού, δεδομένου ότι η ενεργή cystatin1 συνεντοπίζεται με την πρωτεάση MsCath1, για την οποία έχει δειχθεί η έκκρισή της μετά από τον παρασιτισμό στην αιμολέμφο (Serbielle et al. 2009).

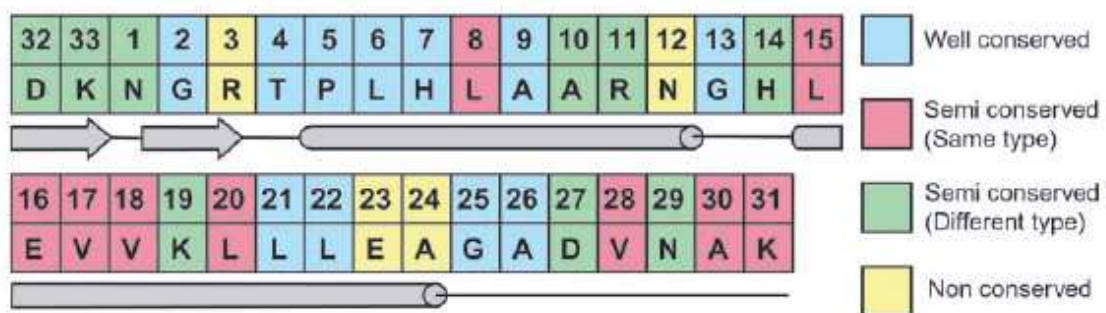
Οι υπόλοιπες πέντε οικογένειες του ιού κωδικοποιούν προϊόντα χωρίς κάποια γνωστά δομικά χαρακτηριστικά και είναι ειδικές για τον ιό CcBV ή εν γένει για τους ενδοσυμβιωτικούς ιούς σφηκών του γένους *Cotesia* (Espagne et al. 2004).

1.3 Οι πρωτεΐνες Ank

Γενικά

Η δεύτερη μεγαλύτερη πολυγονιδιακή οικογένεια του CcBV είναι η οικογένεια *ank* που κωδικοποιεί πρωτεΐνες με επαναλήψεις αγκυρίνης (Ankyrin-repeat proteins ή Ank) που αποτελούν και το αντικείμενο της παρούσας μελέτης. Οι επαναλήψεις αγκυρίνης είναι περιοχές 33 αμινοξικών καταλοίπων που πήραν το όνομά τους από την πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού αγκυρίνη, η οποία διαθέτει 24 τέτοιες περιοχές (Li et al. 2006). Οι συγκεκριμένες επαναλήψεις έχουν εντοπιστεί σε μία πληθώρα πρωτεϊνών διαφορετικών λειτουργιών στις οποίες προάγουν τις

αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών (protein-protein interactions). Λόγω αυτών των αλληλεπιδράσεων, συμμετέχουν σε διάφορες διεργασίες όπως η ρύθμιση της μεταγραφής, η οργάνωση του κυτταροσκελετού και η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (Li et al. 2006). Οι επαναλήψεις αγκυρίνης δε χαρακτηρίζονται από μια συγκεκριμένη, αυστηρά συντηρημένη ακολουθία (αν και υπακούουν σε μία συναινετική αλληλουχία που φαίνεται στην **εικόνα 9** (Mosavi et al. 2002)), αλλά από την πολύ καλά συντηρημένη δομή τους, η οποία συνίσταται στη δομή β φουρκέτα-α έλικα-στροφή-α έλικα (Sedgwick and Smerdon 1999). Τα ζεύγη των ελίκων από τις διαφορετικές επαναλήψεις στοιβάζονται το ένα δίπλα στο άλλο και ενώνονται με β φουρκέτες (**εικόνα 10**). Οι β φουρκέτες σχηματίζουν μεταξύ τους φύλλα β-πτυχωτής επιφάνειας, τα οποία προβάλλουν σε ορθή γωνία σε σχέση με τις έλικες (Sedgwick and Smerdon 1999) με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα σχήμα L.



Εικόνα 9. Η συναινετική αλληλουχία των επαναλήψεων αγκυρίνης. Με γαλάζιο είναι χρωματισμένα αμινοξικά κατάλοιπα αυστηρής συντήρησης, με ροζ και πράσινο κατάλοιπα μέσης συντήρησης (στις ροζ θέσεις τα πιο συχνά απαντόμενα αμινοξέα ανήκουν στον ίδιο τύπο όσον αφορά το φορτίο και την υδροφοβικότητα, στις πράσινες θέσεις τα πιο συχνά απαντόμενα αμινοξέα ανήκουν σε διαφορετικό τύπο), ενώ με κίτρινο είναι χρωματισμένα τα μη συντηρημένα κατάλοιπα (Mosavi et al. 2002).



Εικόνα 10. Δευτεροταγής δομή επαναλήψεων αγκυρίνης. Μία πλήρης επανάληψη απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα και αποτελείται από μία β φουρκέτα (βέλη) και δύο α-έλικες (κύλινδροι) που διαχωρίζονται από μία λούπα. Το β-πτυχωτό φύλλο που δημιουργείται προβάλλει μακριά από τις έλικες και σχηματίζει μία καμπύλη. Εικόνα από (Sedgwick and Smerdon 1999).

Η οικογένεια των πρωτεϊνών Ank στους polydna ιούς

Η οικογένεια πρωτεϊνών Ank έχει βρεθεί σε μία σειρά από polydna ιούς· συγκεκριμένα είναι η μόνη κοινή οικογένεια που έχει έως τώρα εντοπιστεί σε όλους τους PDVs για τους οποίους υπάρχει αξιόλογος όγκος γενετικής πληροφορίας (Gill et al. 2006). Πρωτεΐνες με επαναλήψεις αγκυρίνης έχουν εντοπιστεί σε διάφορους polydna ιούς της ομάδας των bracoviruses (Thoetkiattikul et al. 2005; Gundersen-Rindal and Pedroni 2006; Falabella et al. 2007; Chen et al. 2008; Bae and Kim 2009), των ichnoviruses (Kroemer and Webb 2005; Tian et al. 2007) αλλά και ενός banchine polydna ιού (Lapointe et al. 2007) καθιστώντας την οικογένεια μία από τις ελάχιστες που διατρέχουν και τις τρεις υποκατηγορίες των PDVs, γεγονός που καταδεικνύει τη σημασία της στην επιβίωση των παρασιτοειδών σφηκών. Σύμφωνα με ορισμένους ερευνητές, οι πρωτεΐνες Ank των bracoviruses και ichnoviruses δεν ομαδοποιούνται μαζί στις φυλογενετικές αναλύσεις (Webb et al. 2006; Bae and Kim 2009), γεγονός που υποδηλώνει την ανεξάρτητη απόκτηση των γονιδίων *ank* από τους ευκαρυωτικούς συμβιώτες τους, ενώ σύμφωνα με άλλους σχηματίζουν μια μονοφυλετική ομάδα και προέρχονται από κοινό πρόγονο (Falabella et al. 2007).

Οι πρωτεΐνες Ank των PDVs είναι ομόλογες των IκB και Cactus, μόρια-αναστολείς του NF-κB στα θηλαστικά και τη *Drosophila*, αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες IκB των θηλαστικών δεσμεύουν διμερή του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB συγκρατώντας τα στο κυτταρόπλασμα (Zabel and Bauerle 1990; Lehming et al. 1995; Jacobs and Harrison 1998), αν και πιθανολογείται ότι τα σύμπλοκα IκB-NF-κB συνεχώς εισέρχονται κι εξέρχονται από τον πυρήνα χάρη σε σήματα πυρηνικής εισόδου κι εξόδου των πρωτεϊνών του συμπλόκου (Ghosh and Karin 2002). Μετά από την ενεργοποίηση του συγκεκριμένου μονοπατιού, οι IκB φωσφορυλιώνονται σε δύο σερίνες του αμινοτελικού τους άκρου, ακολουθεί ουβικιτινυλίωση και αποικοδόμησή τους, με ταυτόχρονη απελευθέρωση των διμερών NF-κB και είσοδό τους στον πυρήνα. Παράλληλα, οι πρωτεΐνες IκB έχουν μια περιοχή PEST (περιοχή πλούσια στα αμινοξέα προλίνη, γλουταμικό οξύ, σερίνη και θρεονίνη), που είναι στόχος φωσφορυλιώσεων και ρυθμίζει τα γενικά επίπεδα αυτών των πρωτεϊνών (Beg and Baldwin 1993). Οι πρωτεΐνες Ank των polydna ιών έχουν βάσει πρόγνωσης από μία έως τέσσερις επαναλήψεις αγκυρίνης. Παρουσιάζουν ομολογία στις τέσσερις τελευταίες από τις έξι επαναλήψεις αγκυρίνης των IκB, αλλά δεν έχουν το μοτίβο με τις δύο σερίνες που φωσφορυλιώνονται στο αμινοτελικό άκρο, ούτε την περιοχή PEST των IκB. Επομένως, οι έως τώρα γνωστές Ank των polydna ιών στερούνται

των ρυθμιστικών στοιχείων που ευθύνονται για την πρωτεόλυση και την κυτταρική ρύθμιση των πρωτεϊνών IκB. Έτσι, πιθανολογείται ότι οι Ank των PDVs μπορούν να καταστέλλουν τη δράση μορίων ομόλογων του NF-κB με μη αναστρέψιμο τρόπο (Kroemer and Webb 2005).

Στον ιό του Υμενοπτέρου *T. nigriceps* (TnBV) της οικογένειας των Braconidae έχουν βρεθεί τρία γονίδια *ank*, με το ένα να συνιστά ψευδογονίδιο (Falabella et al. 2007). Τα γονίδια *ank1*, 3 του TnBV μεταγράφονται 3 ώρες μετά τον παρασιτισμό και μετάγραφά τους ανιχνεύονται έως και 48 ώρες αργότερα. Με λειτουργικά πειράματα δείχτηκε ότι πρωτεΐνη Ank1 του TnBV μπορεί να καταστέλλει το NF-κB μονοπάτι σε ανθρώπινα κύτταρα *in vitro* (Falabella et al. 2007). Η ίδια πρωτεΐνη, ωστόσο, όταν εκφράζεται σε διαγονιδιακές μύγες επιφέρει ανωμαλίες στη μεταφορά των μεταγράφων και στην κατανομή των πρωτεϊνών-κινητήρων πάνω στους μικροσωληνίσκους σε έμβρυα της *Drosophila*, πιθανώς λόγω της πρόσδεσής της στα άκρα των μικροσωληνίσκων και τη συνεπαγόμενη αποδιοργάνωση του δικτύου τους (Duchi et al. 2010). Επομένως, η συγκεκριμένη πρωτεΐνη Ank του ιού TnBV φαίνεται ότι μπορεί να λειτουργεί σε περισσότερα από ένα μονοπάτια και να επιφέρει πολλά διαφορετικά αποτελέσματα.

Ο polydna ιός του *M. demolitor*, επίσης της οικογένειας Braconidae, περιέχει επτά γονίδια *ank*, τα οποία μεταγράφονται στον ξενιστή. Πειράματα επιβράδυνσης της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (EMSA ή electrophoretic mobility shift assay) έδειξαν ότι δύο από τις πρωτεΐνες Ank καταστέλλουν *in vitro* την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα Dif της *Drosophila* στον υποκινητή του γονιδίου που εκφράζει το αντιμικροβιακό πεπτίδιο δροσομυκίνη, και την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα Relish στον υποκινητή του γονιδίου που εκφράζει το αντιμικροβιακό πεπτίδιο κεκροπίνη A1, στοχεύοντας έτσι και τις δύο οδούς μεταγωγής σήματος NF-κB της *Drosophila*, Toll και Imd (Thoetkiattikul et al. 2005). Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες Ank και τους μεταγραφικούς παράγοντες είναι άμεση, όπως έδειξαν πειράματα συνασοκα-τακρήμνισης.

Ένα γονίδιο *ank* έχει εντοπιστεί και στον bracovirus ιό του παρασιτοειδούς *Glyptaranteles indiensis*, GiBV (Gundersen-Rindal and Pedroni 2006). Η έκφρασή του στον ξενιστή ξεκινά στις δύο ώρες μετά τον παρασιτισμό και συνεχίζεται έως και 13 ημέρες μετά. Ιστοειδική εξέταση οδήγησε στον εντοπισμό μεταγράφων του στο λιπαρό σώμα, τα αιμοκύτταρα, το νευρικό ιστό και το μεσέντερο επτά ημέρες μετά τον παρασιτισμό (Gundersen-Rindal and Pedroni 2006). Επίσης, ο bracovirus της *C.*

plutellae (ή *Cotesia vestalis*) περιέχει οκτώ γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες επαναλήψεων αγκυρίνης CrBV-IkB ή Ank (Bae and Kim 2009). Η μεταγραφή των επτά γονιδίων ξεκινά από την έναρξη του παρασιτισμού, 30 λεπτά μετά την ωοαπόθεση (Chen et al. 2008), και συνεχίζεται για τις επόμενες επτά ημέρες (Bae and Kim 2009). Η έκφρασή τους γίνεται στο λιπαρό σώμα, την επιδερμίδα, τα αιμοκύτταρα και το έντερο. Μελέτες συνδέουν τις πρωτεΐνες CrBV-IkB με την καταστολή αντι-ιικών αποκρίσεων, καθώς η επαγόμενη από βακτροϊούς μελανοποίηση στον ξενιστή *Plutella xylostella* αναστέλλεται όταν έχει προηγηθεί ένεση του ξενιστή με τα κυκλικά τμήματα DNA του polydnavirus που περιέχουν τα συγκεκριμένα γονίδια ή όταν ο ίδιος ο βακτροϊός εκφράζει ένα μέλος της πρωτεϊνικής οικογένειας CrBV-IkB (Bae and Kim 2009). Η έκφραση μιας από τις πρωτεΐνες CrBV-IkB, επίσης, καθιστά το Λεπιδόπτερο πιο ευπαθές στη μόλυνση από βακτροϊούς.

Στους ichnoviruses η πιο καλά μελετημένη οικογένεια γονιδίων που κωδικοποιεί πρωτεΐνες με επαναλήψεις αγκυρίνης είναι αυτή του *C. sonorensis* PDV (CsIV) με επτά μέλη. Τα mRNA από 6 από αυτές ανιχνεύονται στον ξενιστή *Heliothis virescens* από 4-8 ώρες έως και 5 μέρες μετά τον παρασιτισμό (Kroemer and Webb 2005). Η μέγιστη έκφραση των γονιδίων *ank* (ή *vankyrins*) στο Λεπιδόπτερο φαίνεται στις 2-3 μέρες μετά τον παρασιτισμό. Η έκφρασή τους είναι ιστοειδική, με κάποια γονίδια να μεταγράφονται στο λιπαρό σώμα, την επιδερμίδα και το νευρικό ιστό, και με άλλα να μεταγράφονται στα αιμοκύτταρα (Kroemer and Webb 2005). Οι πρωτεΐνες Ank του CsIV φαίνεται πως έχουν διαφορετικό ενδοκυτταρικό εντοπισμό και διαφορετική απόκριση σε παθογόνα ερεθίσματα, όπως λιποπολυσακχαρίτες (LPS, lipopolysaccharides) και ιούς, υποδηλώνοντας ότι κάθε μέλος της οικογένειας μπορεί να έχει έναν ιδιαίτερο ρόλο. Συγκεκριμένα, τα μέλη της οικογένειας P-vank-1 και I²-vank-3 καθυστερούν την κυτταρική λύση μετά από μόλυνση με βακτροϊούς και ευνοούν την κυτταρική επιβίωση σε σχέση με άλλα μέλη της οικογένειας (Kroemer and Webb 2006). Αυτή η λειτουργία τους πιθανώς οφείλεται σε αντιαποπτωτική δράση, η οποία έχει δειχθεί για την P-vank-1, καθώς αυτή αναστέλλει την ενεργότητα κασπασών και τον κατακερματισμό του DNA μετά από αποπτωτικό ερέθισμα (Fath-Goodin et al. 2009).

Σε έναν άλλον ichnovirus ιό, τον CcIV του Υμενοπτέρου *Campoletis chloridae* που παρασιτεί εις βάρος του Λεπιδοπτέρου *Helicoverpa armigera*, έχουν εντοπιστεί δύο γονίδια *ank* τα οποία εκφράζονται στον παρασιτισμένο ξενιστή με

μέγιστη έκφραση στα 30 λεπτά μετά την έναρξη του παρασιτισμού και στη συνέχεια χαμηλότερη αλλά σταθερή έκφραση για όλη τη διάρκεια του παρασιτισμού. Μετάγραφα των δύο γονιδίων εντοπίζονται στα αιμοκύτταρα, το λιπαρό σώμα, τον πεπτικό σωλήνα και την επιδερμίδα του ξενιστή (Tian et al. 2007). Στον *Hyposoter didymator* Ichnovirus ή HdIV, ιός που ενδοσυμβιώνει με το Υμενόπτερο *H. didymator* και συμμετέχει στον παρασιτισμό πολλών ειδών Λεπιδοπτέρων, κυρίως του γένους *Spodoptera*, έχουν βρεθεί εννέα γονίδια *ank* ή *vankyrin*. Σε παρασιτισμένες προνύμφες *Spodoptera frugiperda* η έκφραση και των εννέα γονιδίων ξεκινά στα 30 λεπτά μετά την έναρξη του παρασιτισμού και λαμβάνει χώρα στα αιμοκύτταρα, το λιπαρό σώμα, το μεσέντερο και τη νευρική χορδή (Clavijo et al. 2011). Ωστόσο, σύγκριση της έκφρασης ανάμεσα σε προνύμφες του είδους *S. frugiperda* και του είδους *Spodoptera littoralis* έδειξε ότι τα γονίδια *vankyrin* του HdIV στο πρώτο είδος εκφράζονται υψηλότερα στα αιμοκύτταρα, ενώ στο δεύτερο είδος εκφράζονται υψηλότερα στο λιπαρό σώμα, καταδεικνύοντας τη σημασία του ξενιστή στην εξέλιξη του παρασιτισμού (Clavijo et al. 2011). Τέλος, γονίδια *ank* έχουν προβλεφθεί και στους ichnoviruses ιούς των Υμενοπτέρων *Hyposoter fugitivus* και *Tranosema rostrale* (Dupuy et al. 2006), αλλά και στον banchine polydna ιό που ενδοσυμβιώνει με το Υμενόπτερο *Glypta fumiferanae* (Lapointe et al. 2007).

Η οικογένεια Ank του CcBV

Η οικογένεια γονιδίων *ank* του ιού CcBV αριθμεί εννέα μέλη. Τα *ank1-ank6* χαρακτηρίστηκαν μετά την αποκωδικοποίηση του γονιδιώματος του CcBV (Espagne et al. 2004) και βρέθηκαν να μεταγράφονται με ιστοειδικό τρόπο κυρίως στο λιπαρό σώμα ή τα αιμοκύτταρα του ξενιστή *M. sexta*, αλλά και στη νευρική χορδή, τα μαλπιγγιανά σωληνάκια και το μεσέντερο από τρεις ώρες μετά τον παρασιτισμό και για τουλάχιστον δύο ημέρες (Falabella et al. 2007). Το χρονοειδικό και ιστοειδικό πρότυπο μεταγραφής καθενός από τα έξι γονίδια παρουσιάζεται στον **πίνακα 1**. Τα γονίδια *ank7* και *ank8* ανακαλύφθηκαν σε πρόσθετα κυκλικά τμήματα DNA του CcBV που βρέθηκαν μετά την αλληλούχιση του γονιδιώματος (J. M. Drezen, προσωπική επικοινωνία), και το γονίδιο *ank9* αναγνωρίστηκε ως μέλος της οικογένειας αρκετά μετά τη δημοσίευση του γονιδιώματος (J. M. Drezen, προσωπική επικοινωνία), με την πρωτεΐνη Ank9 να έχει αρχικά χαρακτηριστεί ως υποθετική πρωτεΐνη CcBV_26.5 (accession number YP_184873). Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκαν τα μέλη Ank1, Ank2, Ank4, Ank7, Ank8 και Ank9 της συγκεκριμένης

οικογένειας πρωτεϊνών του CcBV, τα οποία δεν ήταν διαθέσιμα για μελέτη προηγουμένως.

Ιστός Χρόνος	Αιμοκύτταρα	Νευρική χορδή	Λιπαρό σώμα	Μαλπιγγιανά σωληνάκια	Μεσέντερο
3 ώρες	Απουσία δεδομένων	ank2, ank5, ank6	ank1, ank2, ank4, ank5, ank6	ank1, ank3, ank4, ank5, ank6	ank4, ank5
24 ώρες	ank1, ank3, ank4, ank5, ank6	ank2, ank4, ank5, ank6	ank1, ank2, ank4, ank5, ank6	ank1, ank2, ank3, ank4, ank5, ank6	ank1, ank2, ank3, ank4, ank5, ank6
48 ώρες	ank1, ank3, ank4, ank5, ank6	ank4, ank5, ank6	ank1, ank2, ank4, ank5, ank6	ank1, ank3, ank4, ank5, ank6	ank3, ank4, ank5, ank6

Πίνακας 1. Ανίχνευση των μεταγράφων των έξι από τα εννέα γονίδια *ank* του CcBV σε διάφορους ιστούς (Falabella et al. 2007).

1.4 Σκοπός της διδακτορικής διατριβής

Βάσει της ομολογίας που εμφανίζουν οι πρωτεΐνες επαναλήψεων αγκυρίνης Ank του ιού CcBV με τους αναστολείς Rel/NF-κB παραγόντων στοιχειοθετείται η υπόθεση ότι οι Ank του CcBV αναστέλλουν μεταγραφικούς παράγοντες τύπου Rel/NF-κB του ξενιστή *M. sexta*. Βασικός στόχος της παρούσας διατριβής είναι η εξακρίβωση των φαινομένων που προκαλούν οι πρωτεΐνες Ank σε κυτταρικές καλλιέργειες και, ειδικότερα, της επίδρασής τους στη λειτουργία Rel/NF-κB παραγόντων σε σύστημα προερχόμενο από λεπιδόπτερα έντομα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται λειτουργική διάταξη που εξετάζει την πιθανή αναστολή των μεταγραφικών παραγόντων RelB και Relish1 του *B. mori*, οι οποίοι εκφράζονται εξωγενώς σε κυτταρικές καλλιέργειες. Οι δύο αυτοί παράγοντες συμμετέχουν στις οδούς μεταγωγής σήματος Toll και Imd, αντίστοιχα, και επιλέχθηκαν αφενός γιατί ανήκουν σε λεπιδόπτερο οργανισμό, όπως είναι και ο φυσικός ξενιστής *M. sexta* της *C. congregata*, και αφετέρου γιατί τα γονίδια τους ήταν ήδη κλωνοποιημένα, σε αντίθεση με τα γονίδια μεταγραφικών παραγόντων του φυσικού ξενιστή, που έως πρόσφατα δεν είχαν κλωνοποιηθεί. Στα πλαίσια σύγκρισης με το σύστημα των εντόμων, χρησιμοποιείται και σύστημα θηλαστικών κυττάρων, στο οποίο εξετάζεται η επίδραση των Ank του CcBV στη δράση του ενδογενούς NF-κB.

Καθώς η οικογένεια πρωτεϊνών Ank του CcBV απαρτίζεται από πολλά μέλη, προκύπτει ερώτημα που αφορά στην αναγκαιότητα ύπαρξης ενός τόσο μεγάλου αριθμού γονιδίων της ίδιας οικογένειας για τον παρασιτισμό της *M. sexta* από την *C. congregata*. Για το λόγο αυτό πραγματοποιείται σύγκριση ανάμεσα σε έξι μέλη της οικογένειας προκειμένου να κατανοηθεί αν αυτά έχουν επικαλυπτόμενους ή διαφορετικούς ρόλους. Εκτός από τον λειτουργικό χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών επαναλήψεων αγκυρίνης, στην παρούσα διατριβή μελετάται επίσης και η έκφραση και υποκυτταρική κατανομή των πρωτεϊνών Ank σε κυτταρική σειρά λεπιδόπτερου εντόμου.

Μακροπρόθεσμα, η μελέτη πρωτεϊνών των polydnavirion που ενδοσυμβιώνουν με ενδοπαρασιτοειδή Υμενόπτερα δίνει τη δυνατότητα κατανόησης της βιολογίας του παρασιτισμού, σε σχέση με την επαγόμενη ανοσολογική απόκριση του ξενιστή και την καταστολή που επιφέρει το εκάστοτε ενδοπαρασιτοειδές στον ξενιστή. Επίσης, δίνει τη δυνατότητα εύρεσης και χρήσης νέων παραγόντων ως βιολογικών εντομοκτόνων. Τέτοια εντομοκτόνα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την

ολοκληρωμένη προστασία των αγροτικών καλλιεργειών από επιβλαβή Λεπιδόπτερα, όπως η *M. sexta*. Η ενδεχόμενη χρήση πρωτεϊνών των ενδοπαρασιτοειδών ως παραγόντων ενίσχυσης βιολογικών εντομοκτόνων προσφέρει το πλεονέκτημα της απαλοιφής της χημικής επιβάρυνσης του περιβάλλοντος, και πιθανώς της εξειδίκευσης ενάντια σε συγκεκριμένες οικογένειες εντόμων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Μεθοδολογία

2.1 Υπολογιστική διερεύνηση των ιδιοτήτων των πρωτεϊνών Ank

Για την πρόβλεψη των επαναλήψεων αγκυρίνης στις πρωτεΐνες Ank του CcBV χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό εργαλείο InterProScan (Zdobnov and Arweiler 2001). Οι ακολουθίες των πρωτεϊνών Ank στοιχήθηκαν με τις ακολουθίες των ομόλογων πρωτεϊνών IκBa του *Homo sapiens* (accession number P25963, περιοχή α. κ. 120 έως το 5' τελικό άκρο) και Cactus της *D. melanogaster* (accession number AAA85908, περιοχή α. κ. 275 έως το 5' τελικό άκρο) με τον αλγόριθμο ClustalX (Chenna et al. 2003). Η αναζήτηση αλληλουχιών PEST έγινε με τον αλγόριθμο EPESTFIND (Rice et al. 2000), ενώ ο έλεγχος πιθανών θέσεων φωσφορυλίωσης έγινε με δύο αλγόριθμους: α) τον αλγόριθμο NetPhos 2.0 (Blom et al. 1999) που προβλέπει γενικές θέσεις φωσφορυλίωσης και β) τον αλγόριθμο PROSITE (Sigrist et al. 2010) που προβλέπει φωσφορυλίωσεις από συγκεκριμένες κινάσες. Η αναζήτηση σήματος πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal ή NLS) στην πρωτοταγή δομή των πρωτεϊνών Ank έγινε με την εφαρμογή NLStradamus (Nguyen Ba et al. 2009).

2.2 Κλωνοποιήσεις

2.2.1 Γενική διαδικασία κλωνοποίησης

Η κλωνοποίηση είναι η διαδικασία εισαγωγής ενός τμήματος DNA, ένθεμα (insert), σε ένα μεγαλύτερο τμήμα DNA, τον φορέα (vector). Το ένθεμα προκύπτει μετά από πέψη ενός ήδη υπάρχοντος πλασμιδίου και απομόνωσή του ή μετά από ενίσχυσή του με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας κατάλληλο DNA-μήτρα. Η εισαγωγή του ενθέματος στο φορέα επιτυγχάνεται μετά από πέψη των δύο με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα ώστε να έχουν συμβατά άκρα. Στην παρούσα διατριβή κλωνοποιήθηκαν τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης μιας σειράς ικών γονιδίων, αλλά και γονιδίων του μεταξοσκώληκα, σε πλασμιδιακούς φορείς. Αναλυτικότερα, τα στάδια της γενικής διαδικασίας κλωνοποίησης που ακολουθήθηκε παρουσιάζονται παρακάτω.

Διαλύματα / Θρεπτικά υλικά

Διάλυμα φαινόλης-χλωροφόρμιου: φαινόλη – χλωροφόρμιο - ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 25:24:1, v/v/v

LB, Lysogeny broth ή Luria broth (για υγρές καλλιέργειες βακτηρίων): 10 gr τρυπτόνη, 10 gr NaCl, 5 gr yeast extract σε 1 L νερού. Το pH ρυθμίζεται με την προσθήκη 87,5 μl από διάλυμα 10N NaOH.

LB άγαρ (για στέρες καλλιέργειες βακτηρίων): LB στο οποίο προστίθενται 15 gr άγαρ για 1L θρεπτικού υλικού. Αφού αποστειρωθεί προστίθεται αμπικιλίνη 100 μg/ml (ampicillin-sodium salt, A0839, Applichem) και επιστρώνεται σε τρυβλία petri.

TB, terrific broth (για υγρές καλλιέργειες βακτηρίων): 6 gr τρυπτόνης, 12 gr yeast extract, 2 ml γλυκερόλης και προσθήκη νερού έως τελικό όγκο 450 ml. Μετά από αποστείρωση προστίθενται 50 ml φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος PB.

Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα PB (phosphate buffer): 62,7 gr K_2HPO_4 , 11,6 gr KH_2PO_4 και 500 ml νερού.

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA:

Διάλυμα I: 8% σουκρόζη, 25 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA pH 8

Διάλυμα II: 0.2 M NaOH, 1% SDS

Διάλυμα III: 3 M CH_3COOK , 11.5 % (v/v) CH_3COOH

Πειραματική διαδικασία

1. Ενίσχυση του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική κατά την οποία από ένα μόριο DNA-μήτρα πολλαπλασιάζεται επιθυμητό τμήμα DNA, το οποίο οριοθετείται από δύο εκκινητές. Οι εκκινητές είναι μικρές αλληλουχίες μονόκλωνου DNA 20-30 βάσεων οι οποίες είναι συμπληρωματικές ως προς συγκεκριμένες αλληλουχίες του μορίου DNA-μήτρα (εκμαγείο). Μετά από αποδιάταξη του εκμαγείου, και σε κατάλληλη θερμοκρασία, οι εκκινητές υβριδοποιούνται με το DNA-μήτρα. Η χρήση κατάλληλης πολυμεράσης επιτρέπει την ενίσχυση της αλληλουχίας ανάμεσα στα σημεία υβριδοποίησης των εκκινητών με το εκμαγείο και το σχηματισμό δίκλωνου DNA. Η PCR περιλαμβάνει την επανάληψη πολλών κύκλων με εναλλαγές στη θερμοκρασία ώστε να επιτρέπεται η υβριδοποίηση των εκκινητών με το εκμαγείο, η σύνθεση του νέου κλώνου από την πολυμεράση και η αποδιάταξη του σχηματισθέντος δίκλωνου DNA έως ότου σχηματιστεί επαρκής ποσότητα του επιθυμητού προϊόντος.

Αναλυτικότερα, το μίγμα της αντίδρασης περιλαμβάνει :

Συστατικά	Τελική συγκέντρωση
ζεύγος κατάλληλων εκκινητών	0,4 μM (ο καθένας)
DNA-μήτρα (από το οποίο ενισχύεται το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης)	10 ng
Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs)	200 μM (το καθένα)
Πολυμεράση Pfu (Fermentas, EP0502)	1,2 units
10x Ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για την πολυμεράση [200 mM Tris-HCl (pH 8,8), 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 100 mM KCl, 1% Triton X-100, 1 mg/ml BSA]	σε αραιώση 1x
MgSO ₄	2 mM
Απεσταγμένο νερό ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 50 μl	

Πίνακας 2. Συστατικά της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Το πρόγραμμα της αντίδρασης περιλαμβάνει τα στάδια που φαίνονται στον **πίνακα 3**:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
αποδιάταξη	94°C	3'	1
αποδιάταξη	94°C	30''-60''	25-30
υβριδοποίηση (annealing)	Ειδική ανά περίσταση	30''-60''	
επιμήκυνση	72°C	1'-3' ανάλογα με το μέγεθος του ORF	
επιμήκυνση	72°C	7'	1
διατήρηση	4°C	∞	1

Πίνακας 3. Γενικό πρότυπο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Ανά περίπτωση έγινε ένα ή δύο σετ κύκλων «αποδιάταξης-υβριδοποίησης-επιμήκυνσης».

Ακολουθεί έλεγχος του προϊόντος της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, καθαρισμός του προϊόντος με διάλυμα φαινόλης-χλωροφόρμιου και κατακρήμνισή του μετά από προσθήκη CH₃COONa, pH 5,2 στο 1/10 του συνολικού όγκου, σύμφωνα με (Moore 1987).

2. Πέψη και απομόνωση του DNA του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης με τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες (που προέρχονται είτε από την εταιρεία Takara είτε από τη New England Biolabs) στις συνθήκες και το ρυθμιστικό διάλυμα που συστήνονται για το κάθε ένζυμο. Η διάρκεια της πέψης είναι 3-4 ώρες. Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης (αναλύεται στην παράγραφο 2.2.2) και ακολουθεί απομόνωση και καθαρισμός της αντίστοιχης ζώνης DNA από το πήκτωμα με ηλεκτροέκλυση όπως έχει περιγραφεί (Moore 1987). Περιληπτικά, η ηλεκτροέκλυση περιλαμβάνει εισαγωγή του τμήματος του πηκτώματος με την επιθυμητή ζώνη σε μεμβράνη διαπίδησης που περιέχει νερό και η οποία σφραγίζεται στα δύο της άκρα. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση στα 100 V για 30 λεπτά προκειμένου να εξέλθει το DNA από την αγαρόζη, καθαρισμός του DNA με διάλυμα φαινόλης-χλωροφόρμιου και κατακρήμνισή του με προσθήκη CH₃COONa, pH 5,2 στο 1/10 του συνολικού όγκου.

3. Πέψη του πλασμιδιακού φορέα με τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, απενεργοποίηση των ενζύμων με θέρμανση στους 65 °C για 10 λεπτά και

απομάκρυνση της φωσφορικής ομάδας από τα 5' άκρα του πλασμιδιακού φορέα με τη χρήση της αλκαλικής φωσφατάσης (Calf Intestine Alkaline Phosphatase ή CIAP, EF0341 της Fermentas) στους 37 °C για 30 λεπτά σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας. Η απομάκρυνση των ακραίων φωσφορικών ομάδων γίνεται προκειμένου να αποφευχθεί η επανακυκλοποίηση του φορέα. Ο καθαρισμός του πλασμιδίου από τα ένζυμα (περιοριστικές ενδονουκλεάσες και CIAP) γίνεται με διάλυμα φαινόλης-χλωροφόρμιου και κατακρήμνιση του DNA με CH₃COONa pH 5,2 στο 1/10 του συνολικού όγκου.

4. Αντίδραση σύνδεσης (ligation) του πλασμιδιακού φορέα με το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης χρησιμοποιώντας τη DNA λιγάση T4 (EL0011, Fermentas) με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα της εταιρείας (10x : 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP, pH 7.8 στους 25 °C). Η αντίδραση σύνδεσης διεξάγεται στους 16 °C για περίπου 16 ώρες (overnight) και περιέχει:

- 5 units λιγάσης T4
- 2 μl ρυθμιστικού διαλύματος για τη λιγάση 10x
- 1 mM ATP (επιπλέον του ρυθμιστικού διαλύματος)
- πλασμιδιακό φορέα και DNA του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης σε αναλογία 1:3

Γίνεται προσθήκη νερού ώστε ο τελικός όγκος να είναι 20 μl.

5. Μετασηματισμός βακτηρίων *Escherichia coli* με τη μέθοδο του θερμικού σοκ. Δεκτικά κύτταρα του βακτηριακού στελέχους DH5α επωάζονται με 1-200 ng προϊόντος της αντίδρασης σύνδεσης στους 4 °C για 30 λεπτά. Ακολουθεί θερμικό σοκ στους 42 °C για 1 ½ λεπτό, επώαση 1 λεπτού σε θερμοκρασία δωματίου, προσθήκη 1 ml LB και επώαση για 1 ώρα στους 37 °C. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία LB-άγαρ που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό, στην προκειμένη περίπτωση αμικιλίνη 100 μg/ml αφού όλοι οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν περιέχουν γονίδιο ανθεκτικότητας σε αμικιλίνη. Τα τρυβλία διατηρούνται στους 37 °C για 16 ώρες (overnight) ώστε να επιτραπεί η ανάπτυξη των βακτηρίων.

6. Επιλογή αποικιών και απομόνωση του πλασμιδιακού DNA. Οι αποικίες που έχουν αναπτυχθεί στα τρυβλία απομονώνονται και αναπτύσσονται περαιτέρω σε 3 ml υγρού LB, παρουσία αμικιλίνης 100 μg/ml, με επώαση στους 37 °C για 16 ώρες και υπό

ανάδευση. Μετά από συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση ακολουθεί αλκαλική λύση των βακτηρίων και καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (miniprep) όπως περιγράφεται παρακάτω:

- Φυγοκέντρηση των βακτηρίων στις 4000 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 5 λεπτά και απόρριψη του υπερκειμένου.
- Επαναδιάλυση των βακτηρίων σε 400 μl διαλύματος I στο οποίο έχει προστεθεί RNase A (A3832, Applichem) σε τελική συγκέντρωση 25 μg/ml. Επώαση 10 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη 200 μl φρέσκου διαλύματος II, ήπια ανάδευση και επώαση 10 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη 200 μl διαλύματος III, ήπια ανάδευση και επώαση σε πάγο για 30 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 15 λεπτά ή στις 8500 rpm για 30 λεπτά.
- Συλλογή υπερκειμένου και κατακρήμνιση του DNA με ίσο όγκο ισοπροπανόλης (800 μl). Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 20 λεπτά.
- Απομάκρυνση των αλάτων από το ίζημα (DNA) με διάλυμα αιθανόλης 70% σε νερό. Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 λεπτά.
- Πλήρης αφαίρεση της αιθανόλης (αρχικά με πιπέττα, μετά μέσω εξάτμισης) και αναδιάλυση του DNA σε 20 μl νερού.

Το πλασμιδιακό DNA που έχει απομονωθεί από κάθε αποικία ελέγχεται με πέψη κατάλληλων περιοριστικών ενζύμων και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης προκειμένου να πιστοποιηθεί η εισαγωγή του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης στον φορέα. Όταν η κλωνοποίηση γίνεται ανάμεσα σε δύο θέσεις του ίδιου περιοριστικού ενζύμου, τότε ακολουθεί και δεύτερη πέψη με άλλη περιοριστική ενδονουκλεάση για να ελεγχθεί η κατεύθυνση εισαγωγής του γονιδίου εντός του φορέα.

7. Πολλαπλασιασμός του κλώνου και απομόνωση πλασμιδιακού DNA. Μέρος της υγρής καλλιέργειας που αντιστοιχεί στην αποικία με τον επιθυμητό κλώνο επιστρώνεται σε τρυβλίο LB-άγαρ-αμπικιλίνης και επωάζεται στους 37 °C για 16 ώρες. Μία αποικία από το νέο τρυβλίο εμβολιάζεται σε 250 ml θρεπτικού υλικού TB που περιέχει διάλυμα φωσφορικών PB και αμπικιλίνη 100 μg/ml. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται με επώαση στους 37 °C για 16 ώρες (overnight) με ανάδευση στις 220 rpm και ακολουθεί αλκαλική λύση των βακτηρίων και απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (large scale preparation ή maxiprep) με τη χρήση κλίσης

χλωριούχου καισίου (CsCl). Συγκεκριμένα, η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Διαχωρισμός των βακτηρίων από το θρεπτικό υλικό με φυγοκέντρηση στις 5000 rpm για 10 λεπτά.
- Αναδιάλυση των βακτηρίων σε 5 ml διαλύματος I που περιέχει λυσοζύμη 10 mg/ml (A3711, Applichem) και επώαση σε πάγο για 30 λεπτά.
- Προσθήκη 10 ml διαλύματος II, ήπια ανάδευση και επώαση σε πάγο για 10 λεπτά.
- Προσθήκη 7,5 ml διαλύματος III, ήπια ανάδευση και επώαση σε πάγο για μία ώρα.
- Φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 20 λεπτά (ή στις 10000 rpm για 15 λεπτά), άντληση του υπερκειμένου και προσθήκη ισοπροπανόλης σε αυτό ώστε να κατακρημνιστεί το DNA. Επώαση στους -20 °C για 16 ώρες.
- Φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 25 λεπτά (ή στις 10000 rpm για 15 λεπτά).
- Αναδιάλυση του ιζήματος σε 3,5 gr CsCl και 3ml απεσταγμένου νερού. Προσθήκη 250 μl διαλύματος EtBr 10 mg/ml και φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 10 λεπτά (ή στις 10000 rpm για 5 λεπτά) για την απομάκρυνση πρωτεϊνών και σακχάρων.
- Μεταφορά 4 ml του υπερκειμένου εντός κάψουλας, η οποία σφραγίζεται και φυγοκεντρείται σε υπερφυγόκεντρο στις 100k rpm για 5 ώρες.
- Παρατήρηση των ζωνών του DNA που έχουν διαμορφωθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Από τις δύο έντονες ζώνες γίνεται λήψη της ζώνης που αντιστοιχεί στο πλασμιδιακό DNA (κάτω ζώνη) με σύριγγα, αραίωση σε 1 ml νερού και απομάκρυνση του EtBr κάνοντας πλύσεις με ενυδατωμένη βουτανόλη 4-6 φορές.
- Κατακρήμνιση του DNA με προσθήκη αιθανόλης, επώαση στους -20 °C για 16 ώρες και φυγοκέντρηση σε 8000 rpm για 20 λεπτά.
- Απομάκρυνση των αλάτων με διάλυμα αιθανόλης 70%, φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 20 λεπτά, πλήρης αφαίρεση της αιθανόλης και αναδιάλυση του πλασμιδιακού DNA σε νερό.
- Έλεγχος του πλασμιδιακού DNA με πέψη και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

8. Αλληλούχιση του πλασμιδιακού DNA (sequencing). Προκειμένου να πιστοποιηθεί η ορθότητα της κλωνοποιημένης αλληλουχίας για όλα τα πλασμίδια που περιγράφονται παρακάτω έγινε αλληλούχιση του DNA. Η αλληλούχιση έγινε με αυτοματοποιημένη μεθοδολογία από ιδιωτική εταιρεία. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Sanger που βασίζεται σε PCR με κατάλληλο εκκινητή για το εκάστοτε πλασμίδιο και σημασμένα διδεοξυνουκλεοτίδια που σταματούν τον πολυμερισμό του DNA.

2.2.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Στα πλαίσια των κλωνοποιήσεων χρησιμοποιείται εκτενώς η τεχνική της ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης για τον έλεγχο των τμημάτων DNA είτε αυτά προκύπτουν από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είτε από απομόνωση πλασμιδίου και πέψη. Αυτή η τεχνική διαχωρίζει τα μόρια DNA με βάση το μέγεθός τους. Ο διαχωρισμός είναι εφικτός χάρη στην εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης στα άκρα του πηκτώματος και τη μετακίνηση του αρνητικά φορτισμένου DNA προς την άνοδο, δηλαδή το θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο. Τα μικρότερα τμήματα DNA μεταναστεύουν ταχύτερα, και επομένως διανύουν μεγαλύτερη απόσταση, από τα μεγαλύτερα. Η σύσταση του πηκτώματος που χρησιμοποιείται διαφέρει ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων του DNA που αναλύονται. Η παρακολούθηση της μετακίνησης των τμημάτων DNA γίνεται υπό υπεριώδη ακτινοβολία στην οποία το DNA είναι ορατό μετά από δέσμευση βρωμιούχου αιθιδίου, μιας ουσίας που εμπεριέχεται στο πήκτωμα της αγαρόζης. Για την εξαγωγή συμπερασμάτων, τα τμήματα DNA συγκρίνονται με κατάλληλο δείκτη ζωνών DNA με γνωστό πρότυπο ανάλυσης.

Διαλύματα

10x TAE: 48,4 gr Tris, 11,42 ml CH_3COOH και 20 ml από διάλυμα 0,5 M EDTA.
Προσθήκη νερού για τελικό όγκο 1 L.

Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) 1 mg/ml

10x loading buffer (Takara): 0,9% SDS, 50% γλυκερόλη, 0,05% μπλε της βρωμοφαινόλης

Πειραματική διαδικασία

Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης διαλύεται σε 150 ml διαλύματος 1x TAE έτσι ώστε το πήκτωμα να περιέχει 1 έως 2,5 % (w/v) αγαρόζη, ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA του δείγματος που επιθυμούμε να αναλύσουμε. Η διάλυση της αγαρόζης επιτυγχάνεται με βρασμό σε φούρνο μικροκυμάτων. Ακολούθως, στο διάλυμα αγαρόζης προστίθενται 75 μl από διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) 1 mg/ml, έτσι ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 0,5 μg/ml. Το μίγμα αφήνεται να πολυμεριστεί εντός κατάλληλου εκμαγείου, σφραγισμένου στα άκρα του.

Το πήκτωμα τοποθετείται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει διάλυμα 1x TAE. Τα δείγματα DNA αναμιγνύονται με 10x loading buffer σε τελική αραιώση 1x και εισάγονται στο πήκτωμα. Παράλληλα φορτώνεται και κατάλληλος δείκτης ζωνών DNA, συγκεκριμένα DNA λ βακτηριοφάγου που έχει υποστεί πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες HincII/HindIII και παρασκευάζεται στο εργαστήριο. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση στα 100 V για την αναγκαία χρονική διάρκεια. Η παρατήρηση του πηκτώματος γίνεται σε υπεριώδη ακτινοβολία.

2.2.3 Υποκλωνοποιήσεις των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης των γονιδίων *ank* σε φορείς έκφρασης.

*Υποκλωνοποίηση του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης *ank1* στους φορείς *pEIA.his-glu*, *pEIA.flag* για έκφραση σε κύτταρα εντόμων*

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) του *ank1* κλωνοποιήθηκε στους φορείς υπερέκφρασης *pEIA.his-glu* και *pEIA.flag* (Douris et al. 2006). Οι φορείς αυτοί φέρουν τον ενισχυτή *hr3* και το γονίδιο *ie1*, το προϊόν του οποίου δρα ως συνενεργοποιητής της μεταγραφής και μαζί με τον ενισχυτή *hr3* αυξάνει την έκφραση *in cis* γονιδίων που βρίσκονται υπό τον υποκινητή της ακτίνης του μεταξοσκώληκα κατά τουλάχιστον 5000 φορές (Lu et al. 1997). Το *ank1* ενισχύθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με εκκινητές που φαίνονται στον **πίνακα 4** και οι οποίοι προσθέτουν στα άκρα του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης θέσεις αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης BamHI. Το πρόγραμμα της PCR έγινε με βάση το πρότυπο του **πίνακα 3** και περιελάμβανε 5 κύκλους «αποδιάταξης-υβριδοποίησης-επιμήκυνσης» με υβριδοποίηση (annealing) στους 48 °C και 30 κύκλους με

υβριδοποίηση στους 52 °C. Η εισαγωγή στους φορείς έγινε στη θέση αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου BamHI (**εικόνα 11**).

Υποκλωνοποίηση των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης ank1, ank2, ank4, ank7, ank8 και ank9 στο φορέα έκφρασης pEA.myc-his για έκφραση σε κύτταρα εντόμων

Τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των έξι ικών γονιδίων *ank* κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pEA.myc-his, ο οποίος περιέχει τον ενισχυτή hr3, καθώς και ακολουθίες κωδικοποίησης του επιτόπου myc και έξι καταλοίπων ιστιδίνης, 6xHis (Douris et al. 2006). Η κλωνοποίηση στον pEA.myc-his δίνει τη δυνατότητα υψηλής έκφρασης του προϊόντος του εκάστοτε γονιδίου σε κυτταροκαλλιέργειες Λεπιδοπτέρων. Επίσης, δίνει τη δυνατότητα καθαρισμού της πρωτεΐνης με χρωματογραφία υψηλής συγγένειας σε στήλη νικελίου (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC) χάρη στην ύπαρξη του επιτόπου 6xHis. Παράλληλα, η ύπαρξη του επιτόπου myc επιτρέπει την ανίχνευση της πρωτεΐνης με εμπορικά αντισώματα κατά τη διεξαγωγή πειραμάτων ανοσοφθορισμού για τη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού της εκφραζόμενης πρωτεΐνης ή σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Η κλωνοποίηση του *ank1* στο φορέα pEA.myc-his πραγματοποιήθηκε μετά από απομόνωση του γονιδίου από το πλασμίδιο pEIA.ank1.his-glu και σύνδεση με τον κομμένο με την ενδονουκλεάση BamHI φορέα. Αντίθετα, τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των γονιδίων *ank2, ank4, ank7, ank8* και *ank9* κλωνοποιήθηκαν στον ίδιο φορέα μετά από PCR. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pcr-4-TOPO ή pDRIVE στα οποία βρίσκονταν ήδη κλωνοποιημένα τα συγκεκριμένα γονίδια από το εργαστήριο του J. M. Drezen του Πανεπιστημίου της Tours στη Γαλλία. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν προσθέτουν θέσεις αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης BamHI στα άκρα του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης κάθε γονιδίου (**πίνακας 4**). Οι καρβοξυτελικοί εκκινητές είναι σχεδιασμένοι με τρόπο που να αφαιρείται το κωδικόνιο λήξης από κάθε ORF, έτσι ώστε να γίνει σήμανσή του στο καρβοξυτελικό άκρο. Οι συνθήκες της PCR ακολούθησαν το πρότυπο του **πίνακα 3** και περιελάμβαναν 5 κύκλους «αποδιάταξης-υβριδοποίησης-επιμήκυνσης» με υβριδοποίηση στους 55 °C για το *ank2*, στους 52 °C για τα *ank4, ank8* και στους 50 °C για τα *ank7, ank9*. Ακολούθησαν 25 κύκλοι «αποδιάταξης-υβριδοποίησης-επιμήκυνσης» με υβριδοποίηση στους 60 °C για το *ank2* και 30 κύκλοι με υβριδοποίηση στους 54 °C για τα γονίδια *ank4, ank7, ank8* και *ank9*. Τα προϊόντα της

PCR υπέστησαν πέψη με το περιοριστικό ένζυμο BamHI και σύνδεση με τον pEA.myc-his στη θέση αναγνώρισης του συγκεκριμένου ενζύμου (**εικόνα 11**).

Υποκλωνοποίηση των γονιδίων ank1, ank2, ank4, ank7, ank8 και ank9 στο φορέα έκφρασης pBmA για έκφραση σε κύτταρα εντόμων

Τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των έξι γονιδίων *ank* υποκλωνοποιήθηκαν στο φορέα pBmA ο οποίος φέρει τον υποκινητή της ακτίνης του μεταξοσκώληκα. Η υποκλωνοποίηση έγινε με μεταφορά του ORF από το φορέα pEA.myc-his στον pBmA κατά τέτοιον τρόπο, ώστε να μεταφερθεί και ο επίτοπος myc-his. Όπως φαίνεται και στην **εικόνα 11**, η εισαγωγή των *ank1, ank2, ank7* και *ank8* στο φορέα pBmA έγινε στο ζεύγος θέσεων κοπής των περιοριστικών ενζύμων HindIII (5'), XhoI (3'), ενώ η εισαγωγή των *ank4* και *ank9* έγινε στο ζεύγος θέσεων κοπής των περιοριστικών ενζύμων AccI (5'), XhoI (3').

Υποκλωνοποίηση των γονιδίων ank1, ank2, ank4, ank7, ank8 και ank9 στο φορέα έκφρασης pcDNA3 για έκφραση σε κύτταρα θηλαστικών

Τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των γονιδίων *ank1* και *ank2* τροποποιήθηκαν κατάλληλα έτσι ώστε μέσω PCR αντίδρασης να προστεθούν στα άκρα τους θέσεις περιορισμού BamHI. Με αυτόν τον τρόπο κατέστη δυνατή η κλωνοποίησή τους στην αντίστοιχη θέση περιορισμού του φορέα pcDNA3 (**εικόνα 12**), που είναι κατάλληλος για έκφραση σε κύτταρα θηλαστικών. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον **πίνακα 4**. Το πρόγραμμα της PCR ακολούθησε το πρότυπο του **πίνακα 3** και περιελάμβανε 5 κύκλους «αποδιάταξης-υβριδοποίησης-επιμήκυνσης» με υβριδοποίηση στους 48 °C και 30 κύκλους με υβριδοποίηση στους 52 °C για το γονίδιο *ank1*, ενώ για το *ank2* περιελάμβανε 5 κύκλους με υβριδοποίηση στους 53 °C και 25 κύκλους με υβριδοποίηση στους 60 °C.

Η κλωνοποίηση των γονιδίων *ank4, ank7, ank8* και *ank9* στο φορέα έκφρασης pcDNA3 έγινε με EcoRI εκτομή των αντίστοιχων ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης από τους φορείς pDRIVE ή pcr-4-TOPO στους οποίους προϋπήρχαν, ηλεκτροέκλυση των τμημάτων DNA και εισαγωγή τους στη θέση περιορισμού EcoRI του φορέα pcDNA3 (**εικόνα 12**).

2.2.4 Υποκλωνοποίηση των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης των μεταγραφικών παραγόντων του *B. mori* σε φορείς έκφρασης εντόμων

*Υποκλωνοποίηση των *rela* και *relb* στους φορείς έκφρασης *pEA* και *pBmA**

Δύο διαφορετικά cDNA του γονιδίου *rel* του *B. mori*, τα *rela* και *relb* μας παραχωρήθηκαν από τον Δρ. Yamakawa M., Εθνικό Ινστιτούτο Αγροβιολογικών Επιστημών της Ιαπωνίας. Τα cDNA, αρχικά κλωνοποιημένα στο πλασμίδιο pPac-PL υπό τον υποκινητή της ακτίνης 5C της *D. melanogaster* (Tanaka et al. 2005), μεταφέρθηκαν στους φορείς έκφρασης pEA και pBmA, που διαθέτουν υποκινητή κατάλληλο για έκφραση σε κύτταρα λεπιδοπτέρων (υποκινητής ακτίνης του μεταξοσκώληκα). Αρχικά έγινε απομόνωση των γονιδίων από τον φορέα pPac-PL με την εξής διαδικασία: i) πέψη με το ένζυμο KpnI που δημιουργεί 3' ελεύθερα άκρα, ii) απομάκρυνση των ελεύθερων 3' άκρων με τη χρήση της ενεργότητας 3'→5' εξωνουκλεάσης της DNA πολυμεράσης T4 στους 12 °C για 20 λεπτά, iii) πέψη με το ένζυμο NotI και iv) διαχωρισμός των δύο ORFs από το φορέα pPac-PL με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και ηλεκτροέκλυση. Ακολούθησε καθαρισμός του DNA των δύο ORFs και κλωνοποίηση στο φορέα pEA στο ζεύγος θέσεων αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων SmaI και NotI (**εικόνα 13**). Τα πλασμίδια pEA.rela και pEA.relb που προέκυψαν υπέστησαν κοπή με το περιοριστικό ένζυμο HindIII και τα ORFs των *rela* και *relb* κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pBmA (**εικόνα 13**).

*Υποκλωνοποίηση του ενεργού τμήματος του γονιδίου *relish1* του μεταξοσκώληκα στο φορέα *pBmA**

Το τμήμα του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου *relish1* που στερείται των επαναλήψεων αγκυρίνης, *relish1-d2*, (Tanaka et al. 2007) κλωνοποιήθηκε στο φορέα pBmA. Η υποκλωνοποίηση από τον αρχικό φορέα pPac-PL στον pBmA έγινε σε δύο βήματα. Αρχικά, η νουκλεοτιδική αλληλουχία του *relish1-d2* (~1700 ζεύγη βάσεων) πολλαπλασιάστηκε με PCR βάσει του **πίνακα 3** και 5 κύκλους «αποδιάταξης-υβριδοποίησης-επιμήκυνσης» με υβριδοποίηση εκκινητών – DNA μήτρας στους 50 °C και ακολούθως 30 κύκλους με υβριδοποίηση στους 55 °C. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν φέρουν στο άκρο τους θέσεις αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο BamHI και φαίνονται στον **πίνακα 4**. Επιπλέον, ο

αντίστροφος εκκινητής προσθέτει ένα κωδικόνιο τερματισμού της μεταγραφής στο γονιδιακό τμήμα. Στο προϊόν της αντίδρασης PCR προστέθηκε ένα νουκλεοτίδιο αδενίνης με τη χρήση της πολυμεράσης Taq. Το τελικό προϊόν κλωνοποιήθηκε στο φορέα pGEM-T-easy (Promega), ο οποίος διαθέτει από μία ελεύθερη θυμίνη σε κάθε 3' άκρο του. Καθώς η θέση κλωνοποίησης του γονιδίου βρίσκεται εντός του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης (*β-gal*) του φορέα pGEM-T-easy, η ένθεση προκαλεί διακοπή του γονιδίου *β-gal*, επομένως οι αποικίες με το επιθυμητό ένθεμα δεν παράγουν β-γαλακτοσιδάση. Η β-γαλακτοσιδάση σε τρυβλία LB άγαρ- IPTG-X-gal μπορεί να αποικοδομεί το X-gal δίνοντας ένα προϊόν μπλέ χρώματος. Αντίθετα, αποικίες που φέρουν το πλασμίδιο pGEM-T-easy μετά από επιτυχή κλωνοποίηση και διακεκομένο *β-gal* έχουν άσπρο χρώμα με αποτέλεσμα να αναγνωρίζονται. Η επιλογή των αποικιών έγινε σε τρυβλία LB άγαρ παρουσία αμπικιλλίνης 100 μg/ml, IPTG 0.5 mM (A1008, Applichem) και X-gal 80 μg/ml (A1007, Applichem). Στο δεύτερο στάδιο απομονώθηκε το πλασμίδιο pGEM-T-R1d2 και το *relish1-d2* μεταφέρθηκε στο φορέα pBmA μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο BamHI (εικόνα 14).

Υποκλωνοποίηση του ενεργού τμήματος του γονιδίου relish1 του μεταξοσκόληκα στο φορέα pEA.his-glu

Το τμήμα DNA που αντιστοιχεί στο ενεργό κομμάτι του μεταγραφικού παράγοντα Relish1 ενισχύθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Η αντίδραση έγινε με τη χρήση εκκινητών που φέρουν στο άκρο τους θέση αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση BamHI (πίνακας 4). Το πρόγραμμα PCR που χρησιμοποιήθηκε ακολουθεί το γενικό σχήμα που αναφέρθηκε στον πίνακα 3. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν 5 κύκλοι «αποδιάταξης-υβριδοποίησης-επιμήκυνσης» με υβριδοποίηση στους 50 °C και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν 25 κύκλοι με υβριδοποίηση στους 55 °C. Το προϊόν της PCR υπέστη πέψη με το περιοριστικό ένζυμο BamHI και κλωνοποιήθηκε στο φορέα pEA.his-glu, ο οποίος είχε υποστεί πέψη με το ένζυμο BglII που παράγει κολλώδη άκρα συμβατά με τα άκρα που παράγει το ένζυμο BamHI (εικόνα 14). Ο συγκεκριμένος φορέας είναι σχεδιασμένος έτσι ώστε να προσθέτει τους επιτόπους 6xHis και glu στο καρβοξυτελικό άκρο της εκφραζόμενης πρωτεΐνης προσφέροντας τη δυνατότητα αναγνώρισης της πρωτεΐνης με εμπορικά διαθέσιμα αντισώματα.

Υποκλωνοποίηση των γονιδίων relish1, relish1-d2 και relb του μεταξοσκώληκα στο φορέα pEA.flag

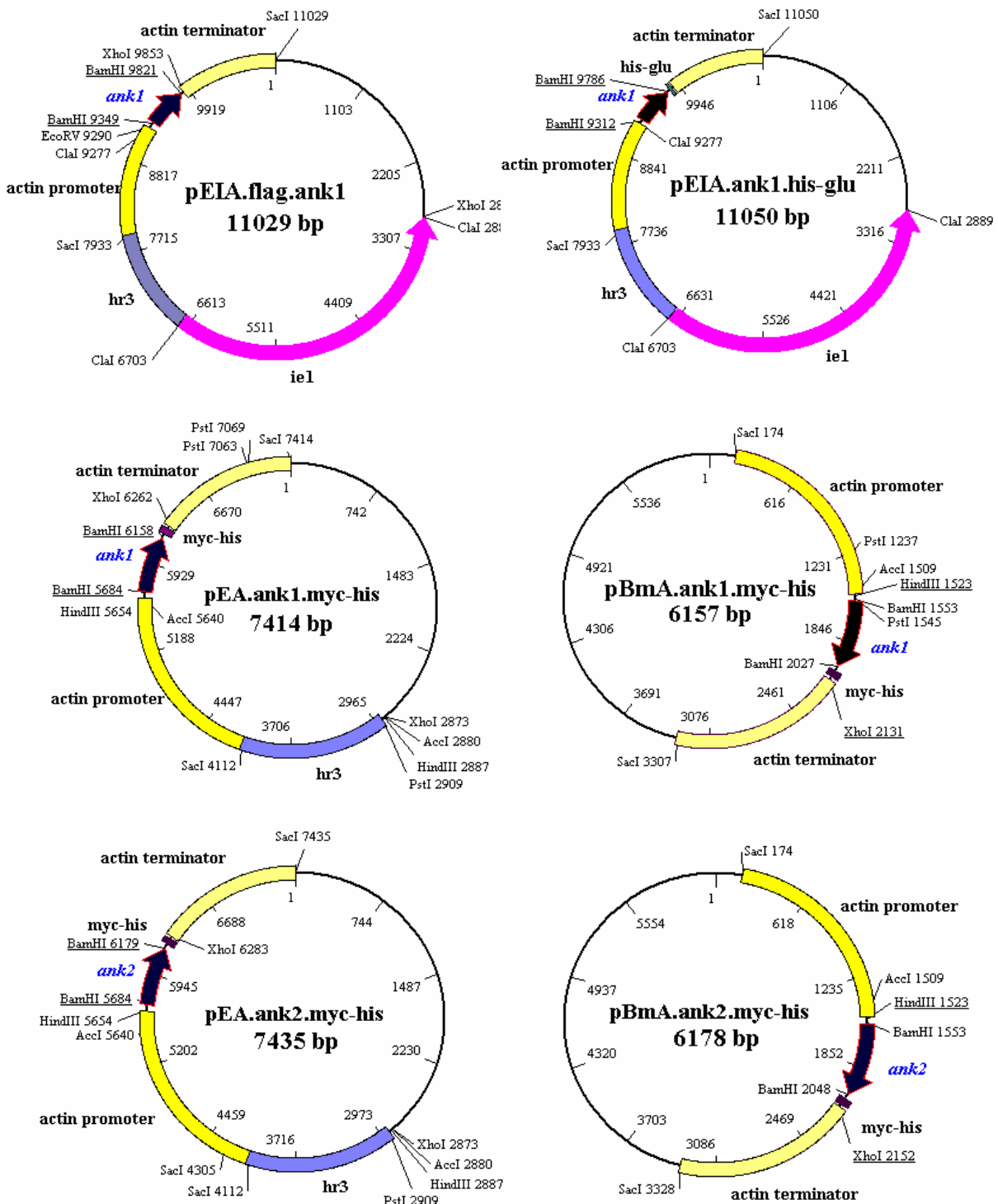
Για την κλωνοποίηση του *relish1* στο φορέα pEA.flag το γονίδιο ενισχύθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές που προσθέτουν στα άκρα του γονιδίου θέσεις αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση BamHI (**πίνακας 4**). Η υβριδοποίηση των εκκινητών με το DNA-μήτρα έγινε στους 58 °C. Ακολούθησε σύνδεση του προϊόντος με τον φορέα pGEM-T-easy. Η επιλογή των αποικιών που περιείχαν προϊόντα της αντίδρασης σύνδεσης έγινε σε τρυβλία LB άγαρ- IPTG-X-gal βάσει του χρώματος των αποικιών. Το πλασμίδιο pGEM-T-relish1 που προέκυψε πολλαπλασιάστηκε και χρησιμοποιήθηκε ως μεταβατικό για την τελική κλωνοποίηση του γονιδίου στο φορέα pEA.flag. Καθώς το γονίδιο *relish1* και ο φορέας pGEM-T-easy έχουν παρόμοιο μήκος, στην πέψη με την ενδονουκλεάση BamHI προστέθηκε και το περιοριστικό ένζυμο PciI ώστε να κοπεί ο φορέας σε δύο μέρη και να διαχωριστεί από τη ζώνη του γονιδίου κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1.2%. Αφού απομονώθηκε το DNA του γονιδίου *relish1*, ακολούθησε σύνδεσή του με τον φορέα pEA.flag στη θέση περιορισμού BamHI (**εικόνα 14**).

Η υποκλωνοποίηση του γονιδίου *relish1-d2* στον pEA.flag έγινε με παρόμοιο τρόπο. Το *relish1-d2* ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας ένα ζεύγος εκκινητών που προσθέτει θέσεις αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο BamHI στα δύο άκρα του ORF (**πίνακας 4**) και κωδικόνιο λήξης της μεταγραφής στο 3' άκρο του. Το πρόγραμμα της PCR ακολούθησε το βασικό πρότυπο του **πίνακα 3** και περιελάμβανε 5 κύκλους «αποδιάταξης-υβριδοποίησης-επιμήκυνσης» με υβριδοποίηση στους 52 °C και 30 κύκλους με υβριδοποίηση στους 58 °C. Ακολούθησε ενσωμάτωση στο φορέα pGEM-T-easy και απελευθέρωση του γονιδίου με BamHI πέψη, ώστε να συνδεθεί με τον τελικό φορέα pEA.flag, ο οποίος είχε κοπεί με το ίδιο ένζυμο (**εικόνα 14**).

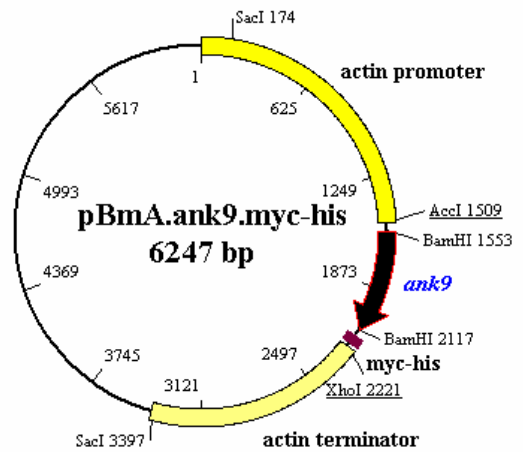
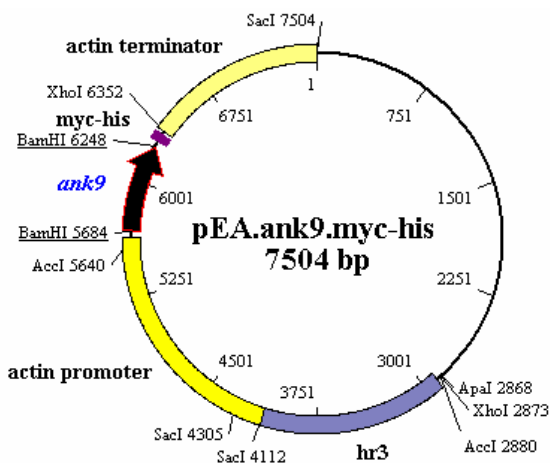
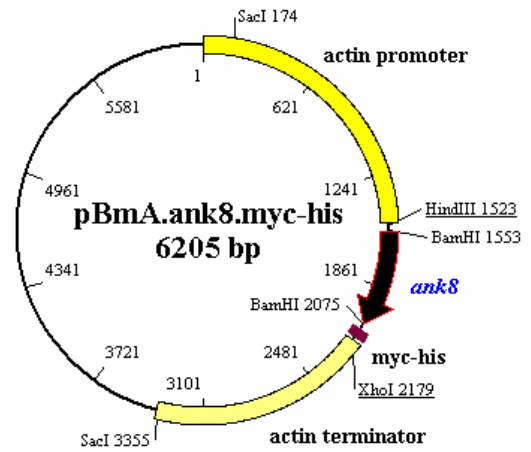
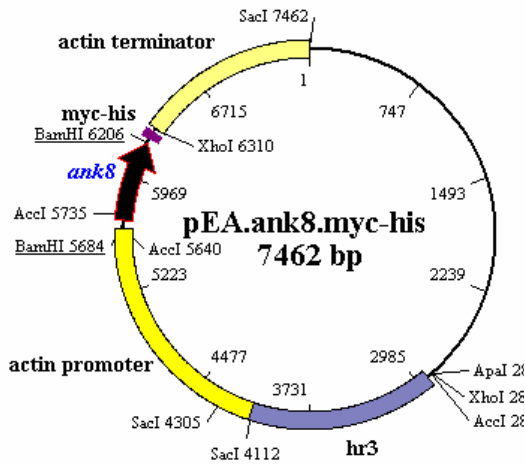
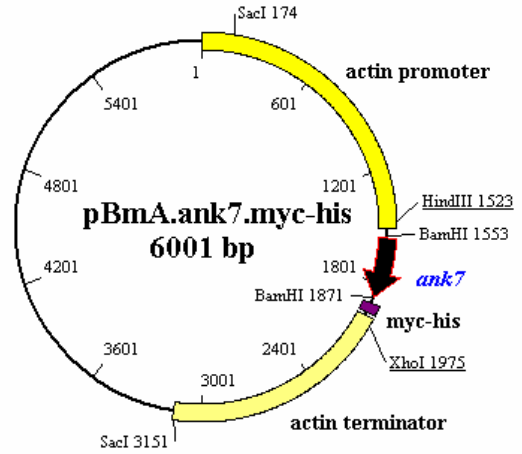
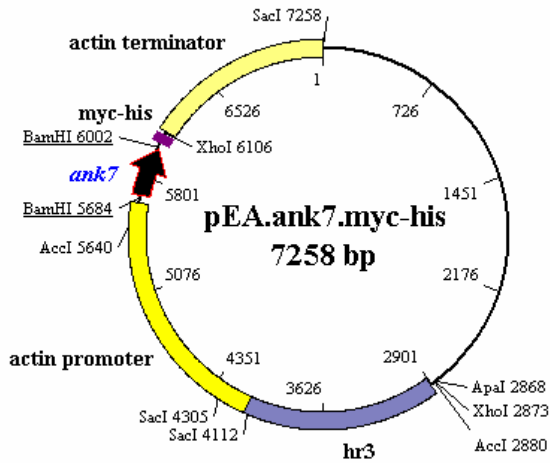
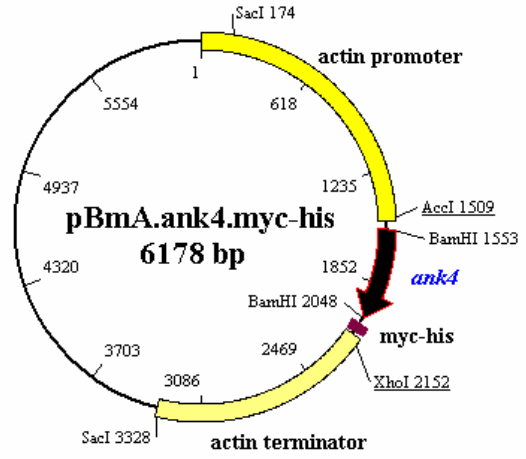
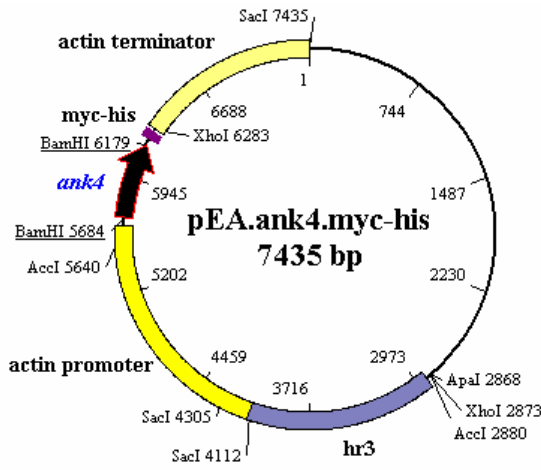
Αντίθετα, το γονίδιο *relb* ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές που προσθέτουν στα άκρα του γονιδίου θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων XbaI και NotI (**πίνακας 4**). Η υβριδοποίηση των εκκινητών με το DNA-μήτρα έγινε στους 67 °C για 25 κύκλους «αποδιάταξης-υβριδοποίησης-επιμήκυνσης». Μετά από ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της αντίδρασης απομονώθηκε η κατάλληλη ζώνη με ηλεκτροέκλυση, έγινε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες XbaI, NotI και σύνδεση με το φορέα pEA.flag, ο οποίος είχε κοπεί με τα ίδια ένζυμα (**εικόνα 13**).

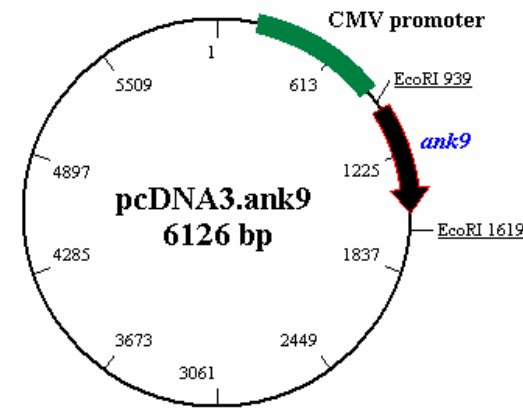
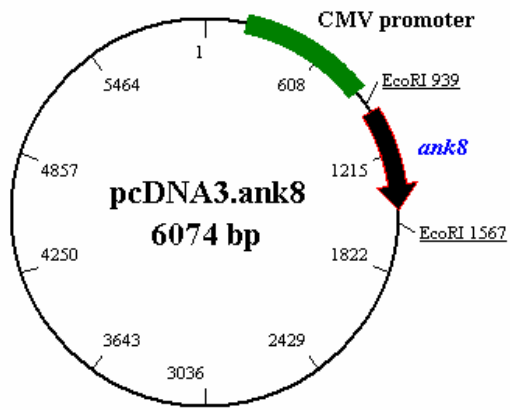
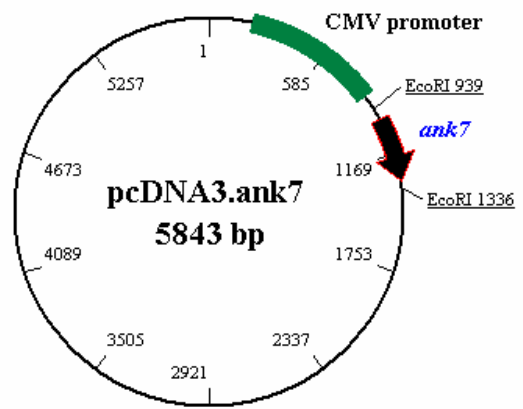
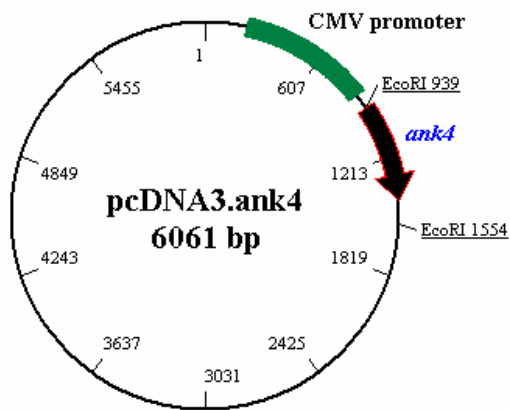
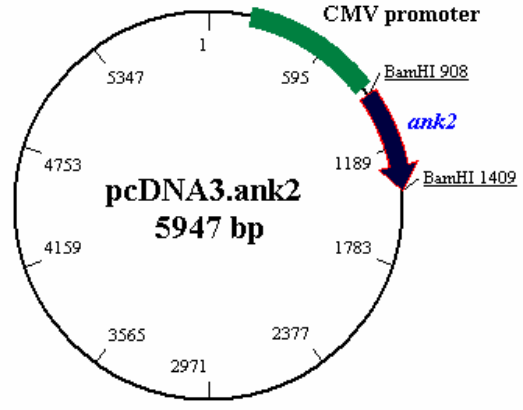
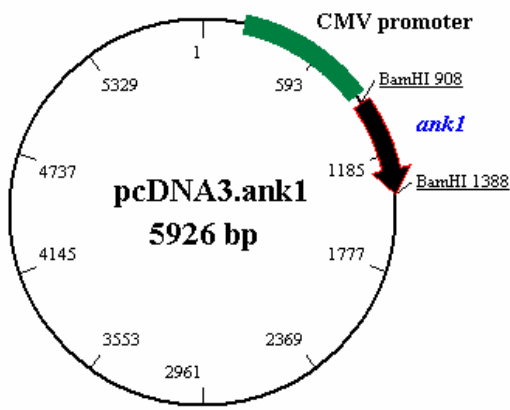
Γονίδια	Εκκινητές	Πλασμιδιακός φορέας
<i>ank1</i>	F: 5-GATAGGATCCTGAGATATGTGGCCATCGGA-3	pEA.myc-his και pEIA.his-glu
	R: 5'- TCTAGGATCCATTTTTCCGTTGTGCTGC-3'	
	F: 5-ATTGGATCCGCCACCATGTGGCCATCGGAAAAC-3	pcDNA3
	R: 5'-CTAGGATCCCCGTTAATTTTTCCGTTGTG-3'	
	F: 5-ACCGGATCCGTGGCCATCGGAAAAC TTATC-3	pEIA.flag
	R: 5'-CTAGGATCCCCGTTAATTTTTCCGTTGTG-3'	
<i>ank2</i>	F: 5-GATAGGATCCTGCACGATGGGTTGGTCCGG-3	pEA.myc-his
	R: 5'-TCTAGGATCCGATTTTATCATCAACTTCCAC-3'	
	F: 5-GATAGGATCCTGCACGATGGGTTGGTCCGG-3	pcDNA3
	R: 5'-CGCGGATCCTGCTCAGATTTTATCATCAACTTCCAC-3'	
<i>ank4</i>	F: 5 -TATGGATCCACCATGGAAGTGCCAAATTTT-3	pEA.myc-his
	R: 5'-TATGGATCCCACCTAGATCGGTGTTTTTCG-3'	
<i>ank7</i>	F: 5-TATGGATCCACCATGAAACTCCTGACACTC-3	pEA.myc-his
	R: 5'-TATGGATCCAAACCTTTGAAACTTGAC-3'	
<i>ank8</i>	F: 5-TATGGATCCACCATGGGAGAGAATGGAGC-3	pEA.myc-his
	R: 5'-TATGGATCCCCTCGGAGTCAATTCAAGAC-3	
<i>ank9</i>	F: 5-TATGGATCCACCATGGAGAGGACTAAATCG-3	pEA.myc-his
	R: 5'-TATGGATCCCTCTAAACCAAAACTCAAC-3'	
Bm <i>relish1-d2</i>	F: 5-TACGGATCCACCATGTCTACAACCTGCCAGT-3	pBmA
	R: 5'-CGCGGATCCTCACAGTTCTCTTAGTAGCTG-3'	
	R: 5'-GGAGGATCCAGTTCTCTTAGTAGCTG-3'	pEA.his-glu
	F: 5- TATGGATCCGTCTACAACCTGCCAGTGATC- 3	pEA.flag
	R: 5'-CGCGGATCCTCACAGTTCTCTTAGTAGCTG-3'	
Bm <i>relish1</i>	F: 5- TATGGATCCGTCTACAACCTGCCAGTGATC- 3	pEA.flag
	R: 5'-AAAGGATCCCTTATAAGCTGGGTTGCTGCA-3'	
Bm <i>relb</i>	F: 5 GCTTGTCTAGAGGCGAGTCAATCCGCGCCCC 3	pEA.flag
	R: 5' GCATTGCGGCCGCTCACAGCAGGAGGTCGCTTG 3'	

Πίνακας 4. Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση και την υποκλωνοποίηση των γονιδίων *ank1*, *ank2*, *ank4*, *ank7*, *ank8*, *ank9* του ιού CcBV και των γονιδίων *Rld2*, *relish1* και *relb* που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες του *B. mori* (Bm). F=forward ή πρόσθιος εκκινητής, R=reverse ή αντίστροφος εκκινητής.

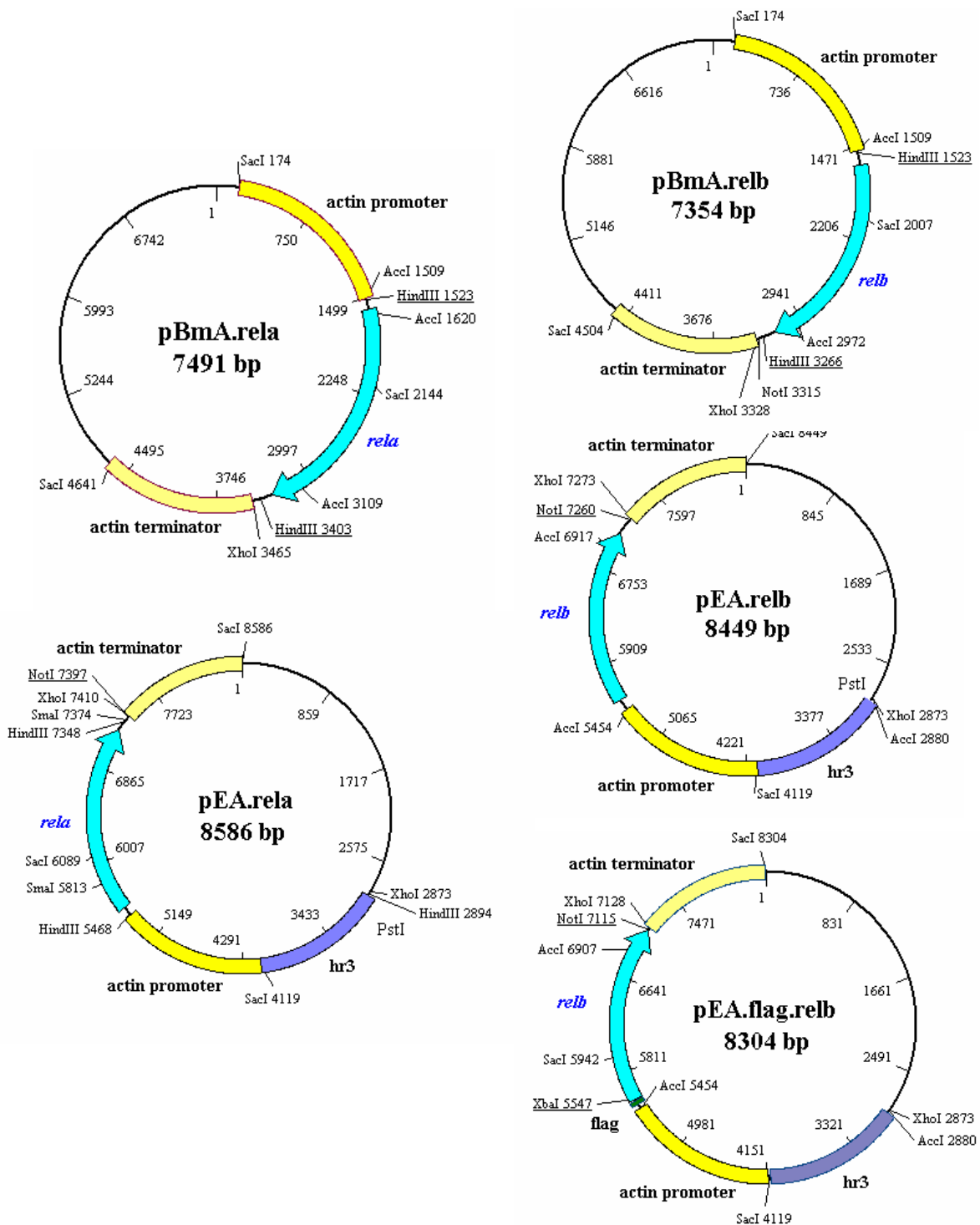


Εικόνα 11. Χάρτες των πλασμιδίων μετά την κλωνοποίηση των ORFs των γονιδίων *ank1*, *ank2*, *ank4*, *ank7*, *ank8* και *ank9* του ιού CcBV σε φορείς του εργαστηρίου που είναι κατάλληλοι για έκφραση σε κύτταρα Λεπιδόπτερον εντόμων, όπως οι pEA.myc-his, pBmA, pEIA.flag και pEIA.his-glu. Παρουσιάζονται οι σημαντικότερες θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων. Με πλάγια γράμματα απεικονίζεται το όνομα του εκάστοτε ενθέματος και με υπογράμμιση σημειώνονται οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων στις οποίες έγινε η εισαγωγή του προς μελέτη γονιδίου (η εικόνα συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα).

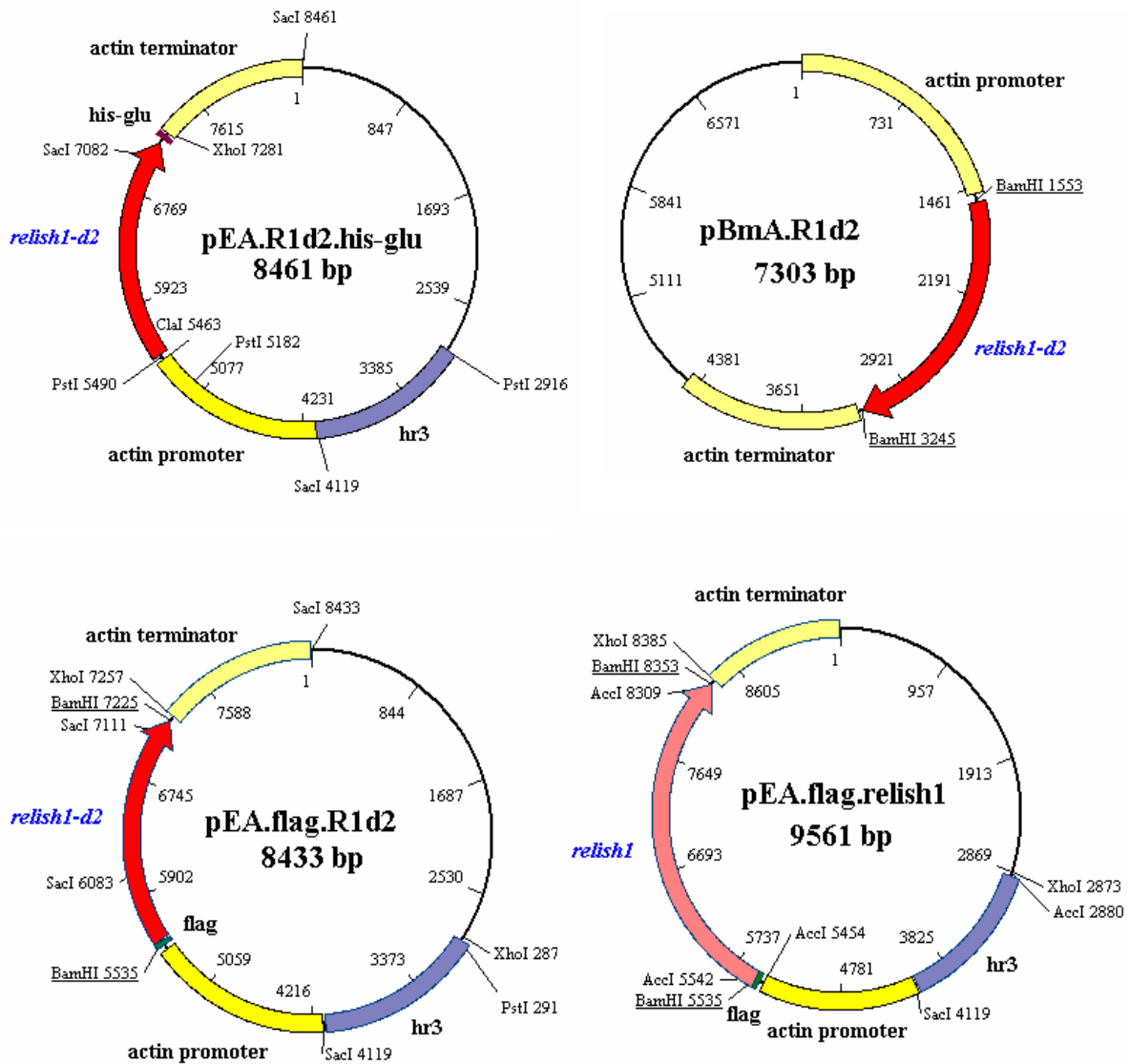




Εικόνα 12. Χάρτες των πλασμιδίων που προέκυψαν μετά την κλωνοποίηση των ORFs των γονιδίων *ank1*, *ank2*, *ank4*, *ank7*, *ank8* και *ank9* του ιού CcBV στο φορέα pcDNA3 για έκφραση σε κύτταρα θηλαστικών. Το όνομα του εκάστοτε γονιδίου που υποκλωνοποιήθηκε φαίνεται με πλάγια γράμματα, ενώ οι θέσεις εισαγωγής του στο φορέα επισημαίνονται με υπογράμμιση.



Εικόνα 13. Πλασμιδιακοί χάρτες των γονιδίων *rela* και *relb* του *B. mori* στους φορείς **pBmA**, **pEA** και **pEA.flag** που είναι κατάλληλοι για έκφραση σε κύτταρα Λεπιδοπτέρων εντόμων. Τα ενθέματα απεικονίζονται με πλάγια γράμματα, ενώ οι θέσεις κλωνοποίησης επισημαίνονται με υπογράμμιση. Στα πλασμίδια pEA.rela και pEA.relb η σύνδεση φορέα-ενθέματος στο 5' άκρο του γονιδίου πραγματοποιήθηκε με σύνδεση ισοτελών άκρων των περιοριστικών θέσεων KpnI και SmaI, αφού είχε προηγηθεί απομάκρυνση του 3' κολλώδους άκρου της θέσης KpnI, με αποτέλεσμα να δημιουργείται υβριδική αλληλουχία που δεν αναγνωρίζεται από κάποια περιοριστική ενδονουκλεάση.



Εικόνα 14. Χάρτες των πλασμιδίων μετά την εισαγωγή των ORFs των γονιδίων *relish1-d2* και *relish1* του *B. mori* στους φορείς pEA.his-glu, pBmA και pEA.flag, κατάλληλους για έκφραση σε κύτταρα Λεπιδόπτερον εντόμων. Παρουσιάζονται τα γονίδια με πλάγια γράμματα και οι σημαντικότερες θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων, με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για την εισαγωγή των γονιδίων να φέρουν υπογράμμιση. Για το πλασμίδιο pEA.R1d2.his-glu έγινε συνδυασμός των ελεύθερων άκρων των θέσεων BamHI του γονιδίου και BglIII του φορέα με αποτέλεσμα να προκύπτουν υβριδικές αλληλουχίες που δεν αναγνωρίζονται από καμιά περιοριστική ενδονουκλεάση και για το λόγο αυτό δεν παρουσιάζονται οι θέσεις της αντίδρασης σύνδεσης στο χάρτη.

2.3 Καλλιέργειες κυττάρων και διαμολύνσεις

2.3.1 Καλλιέργειες κυττάρων εντόμων

Κύτταρα BTI-TN-5B1-4 (High Five™ της Invitrogen) από αυγά *Trichoplusia ni* (Granados et al. 1994), Bm5 από ωοθήκες του *B. mori* (Grace 1967) και Sf21 από ωοθήκες νυμφών του *S. frugiperda* (Vaughn et al. 1977) διατηρούνται σε θάλαμο 28 °C και ανακαλλιεργούνται εβδομαδιαίως σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό IPL. 1L θρεπτικού υλικού περιέχει 39,86 g σκόνης IPL-41 (56923C, SAFC Biosciences), 0,35 g NaHCO₃ (sodium bicarbonate), 2,6 g/L tryptose phosphate broth, 0.24 μM ZnSO₄ 7H₂O, 16 μM AlK(SO₄)₂ 12 H₂O και 10% ορού εμβρύου μόσχου (Fetal Bovine Serum, Sigma-Aldrich). Το pH ρυθμίζεται με KOH στο 6,3 και η οσμωτική πίεση ρυθμίζεται με NaCl ή νερό στα 360-380 mOsm. Μετά την προετοιμασία το υλικό διηθείται με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0.22 μm.

Κύτταρα S2 από έμβρυα *Drosophila melanogaster* (Schneider 1972) διατηρούνται σε θρεπτικό υλικό HyQ (Hyclone) και ανακαλλιεργούνται εβδομαδιαίως.

2.3.2 Καλλιέργειες κυττάρων θηλαστικών

Κύτταρα HEK293 αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει Dulbecco's Mod Eagle Medium 10x (DMEM με 4.5 g/L D-glucose και 8 mg/L phenol red, F0455 της Biochrom) σε αραιώση 1x, 10% ορό εμβρύου μόσχου (FBS, Sigma-Aldrich) για την παροχή αυξητικών παραγόντων, 2 mM L-glutamine (25030, GIBCO) αμινοξύ που λειτουργεί ως πηγή αζώτου και ενέργειας, 0,375 % (w/v) διττανθρακικό νάτριο (sodium bicarbonate, 25080, GIBCO) μια αμφοτερική ένωση για τη διατήρηση του pH και ένα μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης - στρεπτομυκίνης (15140, GIBCO) σε συγκέντρωση 100 units/ml πενικιλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη, ενώσεις που αναστέλλουν την ανάπτυξη κατά Gram θετικών και κατά Gram αρνητικών βακτηρίων, αντίστοιχα. Οι καλλιέργειες διατηρούνται σε θάλαμο 37 °C και σταθερής συγκέντρωσης διοξειδίου του άνθρακα 5%, ενώ ανακαλλιεργούνται κάθε τρεις ημέρες.

2.3.3 Διαμόλυνσεις

Για τη διαμόλυνση τα κύτταρα καταμετρώνται σε αιμοκυτταρόμετρο με ειδική χρώση (Trypan Blue stain 0.4%, 0287, Gibco). Για τη μέτρηση χρησιμοποιούνται 120 μl αραιωμένου διαλύματος Trypan Blue 0.1% και 30 μl καλλιέργειας. Για τη διαμόλυνση κυττάρων εντόμων η επιστροφή γίνεται σε συγκέντρωση 500.000 κύτταρα / $3,8 \text{ cm}^2$ για τα Hi5, Bm5 και Sf21 ή 1×10^6 κύτταρα / $3,8 \text{ cm}^2$ για τα S2, σε βοθρία πλακών καλλιέργειας των δώδεκα ή των έξι βοθρίων και σε τελικό όγκο 1 ml ή 2 ml θρεπτικού υλικού, αντίστοιχα ($3,8 \text{ cm}^2$ είναι η επιφάνεια ενός βοθρίου σε πλάκα δώδεκα βοθρίων). Ακολουθήθηκαν δύο πρωτόκολλα διαμόλυνσης, το πρώτο με τον κατιονικό παράγοντα διαμόλυνσης Lipofectin (18292-037, Invitrogen) και το δεύτερο με το αντιδραστήριο Escort IV (L3287, Sigma-Aldrich). Στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιούνται 7,5 μl Lipofectin ανά $3,8 \text{ cm}^2$ σε αναλογία 1 μg DNA : 6 μl Lipofectin για όλα τα κύτταρα εντόμων (με εξαίρεση τα Bm5 που η αναλογία ήταν 1 μg DNA : 3 μl Lipofectin), ενώ στη δεύτερη χρησιμοποιούνται 4 μg Escort IV ανά $3,8 \text{ cm}^2$ σε αναλογία 1 μg DNA : 8 μg Escort IV. Και στις δύο περιπτώσεις, η επώαση του DNA με το αντιδραστήριο διαμόλυνσης γίνεται με διάλυση στο θρεπτικό υλικό IPL-41 (11405, Gibco) χωρίς ορό για 15-30 λεπτά και ακολούθως το μείγμα DNA- αντιδραστηρίου διαμόλυνσης προστίθεται στα κύτταρα για 5-6 ώρες. Στη συνέχεια το υλικό της διαμόλυνσης απομακρύνεται και αντικαθίσταται με φρέσκο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας το οποίο περιέχει το αντιβιοτικό γενταμυκίνη σε συγκέντρωση 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (15710049, Gibco).

Για τη διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών, τα κύτταρα επιστρώνονται σε μικροπλάκες των δώδεκα βοθρίων, σε συγκέντρωση 160.000 κύτταρα/ $3,8 \text{ cm}^2$ και σε τελικό όγκο 1 ml θρεπτικού υλικού έτσι ώστε να καλύπτεται το 80% της επιφάνειας κάθε βοθρίου. Η διαμόλυνση γίνεται με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου Lipofectin (18292-037, Invitrogen) το οποίο διαλύεται σε θρεπτικό υλικό OPTIMEM (51985, GIBCO) χωρίς ορό και επωάζεται με το DNA για 15-30 λεπτά. Το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας με το μίγμα της διαμόλυνσης διατηρείται στα κύτταρα για 5 ώρες και ακολούθως αντικαθίσταται με φρέσκο πλήρες θρεπτικό υλικό.

2.4 Λειτουργικά πειράματα φωταύγειας

2.4.1 Πειράματα φωταύγειας σε κύτταρα εντόμων

2.4.1.1 Έλεγχος πλασμιδίων αναφοράς και επιλογή κυτταρικής σειράς

◀ Ελέγχθηκε η ενεργοποίηση του πλασμιδίου αναφοράς pGL3.att.luc (ή Att.luc) το οποίο φέρει το γονίδιο της λουσιφεράσης του οργανισμού *Photinus pyralis* (λουσιφεράση Firefly) υπό τον υποκινητή του γονιδίου της αττασίνης πάνω στον οποίον ο παράγοντας RelB του μεταξοσκώληκα μπορεί να προσδένεται (Tanaka et al. 2005). Παράλληλα, εξετάστηκε και το πλασμίδιο αναφοράς ΔκB.Att.luc, το οποίο φέρει μια έλλειψη στην περιοχή πρόσδεσης Rel/NFκB παραγόντων του υποκινητή της αττασίνης. Οι διαμολύνσεις για τον έλεγχο των δύο πλασμιδίων αναφοράς και την επαγωγή τους από την πρωτεΐνη RelB πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα S2 και Hi5, επιστρωμένα σε πλάκες των 24 βοθρίων, με το πρωτόκολλο της Lipofectin και 1 μg ολικό DNA ανά βοθρίο. Περιελάμβαναν 500 ng από το πλασμίδιο αναφοράς Att.luc ή τη μεταλλαγμένη του εκδοχή ΔκB.Att.luc, 250 ng από το πλασμίδιο έκφρασης του RelB (pPac.relb για τα S2, pEA.relb για τα Hi5), 30 ng από το πλασμίδιο κανονικοποίησης pBmA.renilla (δηλαδή πλασμίδιο που επιτρέπει τη διόρθωση των αποτελεσμάτων ως προς διαφορές στον αριθμό των κυττάρων και στην απόδοση της διαμόλυνσης ανάμεσα στα δείγματα) που κωδικοποιεί τη λουσιφεράση Renilla υπό τον έλεγχο του υποκινητή ακτίνης του *B. mori* και πλασμίδιο pBluescript για τη συμπλήρωση σταθερής ποσότητας DNA στα διαφορετικά δείγματα. Μία ημέρα μετά τη διαμόλυνση έγινε προσθήκη λιποπολυσακχαριτών από *E. coli* (LPS, serotype O111:B4, L2630, Sigma-Aldrich) σε ορισμένους κυτταρικούς πληθυσμούς, σε συγκέντρωση 10 μg/ml. Δύο ημέρες μετά τη διαμόλυνση ακολούθησε λύση των κυττάρων και μέτρηση των δύο ειδών φωταύγειας με το Dual Luciferase® Reporter Assay (E1910, Promega) σε σπινθηρογράφο β ακτινοβολίας. Το Dual Luciferase® Reporter Assay περιέχει δύο αντιδραστήρια. Το πρώτο είναι η λουσιφερίνη σκαθαριού, που αποτελεί υπόστρωμα της λουσιφεράσης Firefly από την οποία οξειδώνεται με ταυτόχρονη παραγωγή φωτός και το δεύτερο είναι η λουσιφερίνη κοιλεντερωτών, το υπόστρωμα της λουσιφεράσης Renilla. Με τη χρήση των δύο αντιδραστηρίων πραγματοποιήθηκαν οι διπλές αντιδράσεις φωταύγειας στα κυτταρικά λύματα.

Επίσης, πραγματοποιήθηκε έλεγχος του φορέα pEA στον οποίο βρίσκεται το γονίδιο *relb*. Ο έλεγχος έγινε σε κύτταρα Hi5 επιστρωμένα σε πλάκα 24 βοθρίων μετά

από διαμόλυνση με 250 ng Att.luc, 250 ή 750 ng του φορέα pEA είτε αυτός είναι άδειος είτε εκφράζει τις πρωτεΐνες GFP ή RelB και φορέα pBluescript για τη συμπλήρωση της ολικής ποσότητας DNA. Δύο ημέρες μετά τη διαμόλυνση τα κύτταρα λύθηκαν με ψύξη – απόψυξη και έγινε μέτρηση της φωταύγειας με το αντιδραστήριο Steady-Glo Luciferase assay system (E2510) της Promega. Ως παράγοντας κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε η ολική πρωτεΐνη των δειγμάτων, η οποία μετρήθηκε στο ND-1000 Spectrophotometer της NanoDrop Technologies, Inc, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

◀ Για την επιλογή κυτταρικής σειράς πραγματοποιήθηκαν πειράματα ελέγχου του πλασμιδίου pBmA.relb στις κυτταρικές σειρές Sf21, Hi5 και Bm5. Οι διαμολύνσεις έγιναν μετά από επιστροφή των κυττάρων σε πλάκες των δώδεκα βοθρίων και ακολούθησαν το πρωτόκολλο του αντιδραστηρίου της Lipofectin. Για τις σειρές Sf21 και Hi5 χρησιμοποιήθηκαν 1700 ng ολικού DNA ανά βοθρίο, εκ των οποίων 408 ng Att.luc, 17 ng pRL, μια βελτιωμένη έκδοση πλασμιδίου έκφρασης της λουσιφεράσης Renilla, και 1275 ng pBmA.relb ή άδειου φορέα. Για τη σειρά Bm5 χρησιμοποιήθηκαν οι διπλάσιες ποσότητες πλασμιδίων. Σε ορισμένους κυτταρικούς πληθυσμούς μία ημέρα μετά τη διαμόλυνση έγινε προσθήκη λιποπολυσακχαριτών *E. coli* σε συγκέντρωση 10 µg/ml. Η λύση των κυττάρων έλαβε χώρα δύο ημέρες μετά τη διαμόλυνση και η μέτρηση των δύο ειδών φωταύγειας, Firefly και Renilla, έγινε με το Dual Luciferase® Reporter Assay (E1910, Promega) στη συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών Infinite M200 της Tecan.

2.4.1.2 Έλεγχος της επαγωγής των πλασμιδίων αναφοράς από τους μεταγραφικούς παράγοντες του *B. mori*, RelB, Relish1 και R1d2 στη σειρά κυττάρων Hi5

Γενική πειραματική διαδικασία:

- Κύτταρα επιστρωμένα σε πλάκες των δώδεκα βοθρίων διαμολύνονται με τα κατάλληλα πλασμίδια αναφοράς Att.luc ή CecB1.luc, τον κατάλληλο φορέα για την επαγωγή της φωταύγειας, δηλαδή πλασμίδιο έκφρασης καθενός από τους τρεις μεταγραφικούς παράγοντες, και με το φορέα κανονικοποίησης. Ως φορέας κανονικοποίησης χρησιμοποιείται ο pBmA/EcRE.gfp, ο οποίος φέρει το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (συγκεκριμένα της ευρέως χρησιμοποιούμενης μεταλλαγμένης μορφής EGFP ή enhanced GFP) υπό τον έλεγχο του υποκινητή της ακτίνης του μεταξοσκώληκα και μιας περιοχής με επτά στοιχεία πρόσδεσης της 20-

υδροξυεκδυσόνης (20HE) (Swevers et al. 2004), με αποτέλεσμα να επάγεται η έκφραση της GFP μετά την προσθήκη 20HE ή αναλόγου της.

- Μία ημέρα μετά τη διαμόλυνση τα κύτταρα κάθε δείγματος χωρίζονται σε δύο ίσους υποπληθυσμούς και επιστρώνονται σε πλάκες των 24 βοθρίων. Στον έναν υποπληθυσμό προστίθεται ανάλογο της 20HE, όπως το tebufenozide (RH5992) ή το methoxyfenozide (RH2485) (Dhadialla et al. 1998) σε συγκέντρωση 200 nM για την επαγωγή του φθορισμού.
- Δύο ημέρες μετά τη διαμόλυνση ακολουθεί μέτρηση του φθορισμού στους υποπληθυσμούς όπου προστέθηκε το ανάλογο της 20HE. Η μέτρηση γίνεται στη συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών Infinite M200 της Tecan με διέγερση της GFP στα 488 nm και ανίχνευση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας στα 521 nm.
- Τα κύτταρα του δεύτερου υποπληθυσμού εκπλένονται με PBS (phosphate buffered saline), φυγοκεντρούνται στις 4000 rpm για 5 λεπτά και λύονται σε τελικό όγκο 50 μl θρεπτικού υλικού IPL με τη μέθοδο της ψύξης-απόψυξης. Χρησιμοποιώντας 20 μl λύματος και 20 μl αντιδραστηρίου Steady-Glo Luciferase assay system (E2510) της Promega μετράται η φωταύγεια από τη λουσιφεράση Firefly στη συσκευή Infinite M200 της Tecan.
- Μετά τη συλλογή των μετρήσεων φθορισμού και φωταύγειας, αφαιρείται το υπόβαθρο του φθορισμού και στη συνέχεια υπολογίζεται ο λόγος της φωταύγειας ως προς τον φθορισμό. Ο λόγος αυτός ισοδυναμεί με την κανονικοποιημένη φωταύγεια κάθε δείγματος. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων παρουσία και απουσία του μεταγραφικού παράγοντα προσδιορίζει την επαγωγή της κανονικοποιημένης φωταύγειας από το συγκεκριμένο παράγοντα.

Η παραπάνω γενική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ενεργότητας καθενός από τους τρεις μεταγραφικούς παράγοντες που εξετάζονται. Ωστόσο, ανάλογα με το μεταγραφικό παράγοντα υπήρξαν κάποιες διαφορές όσον αφορά στα πλασμίδια κάθε διαμόλυνσης. Παρακάτω περιγράφονται οι ειδικές λεπτομέρειες για τα πειράματα με τους τρεις παράγοντες.

◀ Η ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα RelB ελέγχθηκε με τη χρήση του πλασμιδίου αναφοράς pGL3.att.luc (ή Att.luc). Συγκεκριμένα, 5×10^5 κύτταρα διαμολύνθηκαν χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Escort IV με 100 ng πλασμιδίου Att.luc, 150 ng pBmA.relb ως πλασμίδιο επαγωγής της φωταύγειας, 50 ng του φορέα

pBmbA/EcRE.gfp ως πλασμίδιο κανονικοποίησης και 200 ng συμπληρωματικού πλασμιδίου pEA.pac.

◀ Η ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα Relish1 ελέγχθηκε σε συνδυασμό με το πλασμίδιο αναφοράς pGL3.cec.luc (CecB1.luc) που φέρει το γονίδιο της λουσιφεράσης Firefly (*Photinus pyralis*) υπό τον υποκινητή του γονιδίου της κεκροπίνης B1 του μεταξοσκώληκα. Η διαμόλυνση πραγματοποιήθηκε με το πρωτόκολλο του Escort IV ως εξής: 5×10^5 κύτταρα Hi5 διαμολύνθηκαν με 100 ng πλασμιδίου αναφοράς CecB1.luc, 50 ng πλασμιδίου κανονικοποίησης pBmbA/EcRE.gfp και 350 ng πλασμιδίου pEA.flag.relish1 ή pEA.pac. Μία ημέρα μετά τη διαμόλυνση, παράλληλα με την επαγωγή του φθορισμού που περιγράφεται στη γενική διαδικασία, έγινε κατεργασία των κυττάρων με λιποπολυσακχαρίτες από *E. coli*, δηλαδή από αρνητικά κατά Gram βακτήρια (*E. coli* LPS, serotype O111:B4, L2630, Sigma-Aldrich). Οι λιποπολυσακχαρίτες αναδιαλύθηκαν σε νερό και προστέθηκαν στα κύτταρα σε τελική συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/ml}$ για 24 ώρες. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε κανονικά η γενική διαδικασία. Για την εκτίμηση της ενεργότητας του Relish1 υπολογίστηκε η επαγωγή του γονιδίου αναφοράς διαιρώντας την κανονικοποιημένη φωταύγεια δειγμάτων με LPS ως προς την αντίστοιχη δειγμάτων χωρίς LPS.

◀ Για τον έλεγχο της ενεργότητας του Relish1-d2, η ενεργός μεταλλαγμένη μορφή του Relish1, 5×10^5 κύτταρα διαμολύνθηκαν χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Escort IV με 100 ng CecB1.luc, 50 ng pBmbA/EcRE.gfp, 200 ng pEA.pac και 150 ng pBmA.Relish1-d2 ή άδειου φορέα pBmA. Στα πειράματα με τη συστατικά ενεργή μορφή του μεταγραφικού παράγοντα δεν έγινε επώαση των κυττάρων με λιποπολυσακχαρίτες.

2.4.1.3 Επίδραση των πρωτεϊνών Ank στο μεταγραφικό παράγοντα RelB

Οι διαμολύνσεις για τα λειτουργικά πειράματα με το μεταγραφικό παράγοντα RelB και παρουσία των πρωτεϊνών Ank ακολούθησαν το πρότυπο της γενικής πειραματικής διαδικασίας που περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.1.2, ενώ πιο ειδικά στοιχεία παρουσιάζονται παρακάτω: Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με το αντιδραστήριο Escort IV και με 100 ng pGL3.att.luc, 150 ng pBmA.relb, 50 ng pBmbA/EcRE.gfp και 200 ng από κάθε pEA πλασμίδιο που εκφράζει την εκάστοτε πρωτεΐνη Ank.myc-his ή την πρωτεΐνη-μάρτυρα, PAC. Η πρωτεΐνη PAC (puromycin acetyltransferase) δε σχετίζεται με ανοσολογικές αποκρίσεις και χρησιμοποιείται ως μάρτυρας αρνητικού

ελέγχου ως προς τις πρωτεΐνες Ank. Στις δοκιμασίες με έκφραση των πρωτεϊνών Ank, ως δείγμα ελέγχου νοούνται τα κύτταρα που εκφράζουν τον επαγωγέα και την πρωτεΐνη PAC, η οποία αντικαθιστά την έκφραση των πρωτεϊνών Ank. Μετά τις μετρήσεις φωταύγειας και φθορισμού υπολογίστηκε η κανονικοποιημένη φωταύγεια κάθε δείγματος, η οποία εκφράστηκε ως ποσοστό της αντίστοιχης φωταύγειας του δείγματος ελέγχου που ορίζεται ως 100. Οι ποσοστιαίες τιμές κανονικοποιημένης φωταύγειας τριών επαναλήψεων κάθε δείγματος συμψηφίστηκαν για τον υπολογισμό του μέσου όρου, αλλά και του τυπικού σφάλματος.

Για τις δοκιμασίες ελέγχου τυχόν δοσοεξαρτώμενης επίδρασης της Ank2 στον παράγοντα RelB τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με 50 ng pGL3.att.luc, 50 ng pBmA.relb, 25 ng pBmbA/EcRE.gfp και αυξανόμενες ποσότητες του πλασμιδίου pEA.ank2.myc-his ,125, 250 ή 375 ng. Με το πλασμίδιο pEA.pac έγινε η εξίσωση της ολικής ποσότητας DNA ανάμεσα στους διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς.

2.4.1.4 Επίδραση των πρωτεϊνών Ank στο μεταγραφικό παράγοντα Relish1-d2

◀ Για τα λειτουργικά πειράματα της έκφρασης των πρωτεϊνών Ank του CcBV, κύτταρα Hi5 επιστρώθηκαν σε πλάκες των έξι βοθρίων και διαμολύνθηκαν βάσει του πρωτοκόλλου της Lipofectin ακολούθως : 500 ng (20% του ολικού DNA) του πλασμιδίου αναφοράς pGL3.cec.luc, 250 ng (10% του ολικού DNA) του φορέα κανονικοποίησης pBmbA/EcRE.gfp, 1000 ng (40% του ολικού DNA) του πλασμιδίου επαγωγής pBmA.Relish1-d2 και 750 ng (30% του ολικού DNA) από κάθε pEA.ank.myc-his πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση των πρωτεϊνών CcBV Ank ή πλασμιδίου pEA.pac στο δείγμα ελέγχου. Ο χωρισμός των δειγμάτων σε δύο ίσα μέρη, η επαγωγή του φθορισμού, η μέτρηση τόσο του φθορισμού όσο και της φωταύγειας και η κανονικοποίηση έγιναν με τον τρόπο που αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.4.1.2. Τέλος, η κανονικοποιημένη φωταύγεια κάθε δείγματος εκφράστηκε ως ποσοστό της αντίστοιχης φωταύγειας του δείγματος ελέγχου, η οποία ορίζεται ως 100.

◀ Για τα πειράματα μέτρησης της φωταύγειας με ισόποση έκφραση των πρωτεϊνών Ank 1-9, κύτταρα Hi5 επιστρώθηκαν σε μικρόπλακες των δώδεκα βοθρίων και διαμολύνθηκαν βάσει του πρωτοκόλλου του Escort IV ως εξής : 100 ng pGL3.cec.luc (20% του ολικού DNA), 150 ng pBmA.Relish1-d2 (30% του ολικού DNA), 50 ng pBmbA/EcRE.gfp (10% του ολικού DNA) και 200 ng μίγματος

pEA.ank.myc-his – pEA.pac (40% του ολικού DNA). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 12 ng, 80 ng, 36 ng, 80 ng, 20 ng και 200 ng των πλασμιδίων που εκφράζουν τις Ank1, Ank2, Ank4, Ank7, Ank8 και Ank9, αντίστοιχα, και η ολική ποσότητα του DNA συμπληρώθηκε με το πλασμίδιο pEA.pac. Η επαγωγή του φθορισμού, η μέτρηση της φωταύγειας και η έκφραση της κανονικοποιημένης φωταύγειας ως ποσοστό της αντίστοιχης του δείγματος ελέγχου έγινε όπως περιγράφηκε παραπάνω.

◀ Οι δοκιμασίες παρουσία αυξανόμενης έκφρασης των πρωτεϊνών Ank έγιναν με παρόμοιο τρόπο, αλλά οι ποσότητες του DNA διέφεραν. Ο ενεργός μεταγραφικός παράγοντας Relish1-d2 εκφράστηκε από τον φορέα pEA.his-glu, ο οποίος επιτρέπει υψηλότερη έκφραση από τον φορέα pBmA. Οι διαμολύνσεις για τα πειράματα ελέγχου της επαγωγής του γονιδίου αναφοράς από το πλασμίδιο pEA.Relish1-d2.his-glu και η σύγκρισή του με το πλασμίδιο pBmA.Relish1-d2 έγιναν βάσει του πρωτοκόλλου της Lipofectin σε πλάκες των έξι βοθρίων χρησιμοποιώντας 500 ng pGL3.cec.luc, 250 ng pBmbA/EcRE.gfp, 1000 ng pBmA ή pEA.pac και 750 ng pEA.Relish1-d2.his-glu ή pBmA.Relish1-d2, αντίστοιχα. Οι δοκιμασίες με αυξανόμενες ποσότητες pEA.Relish1-d2.his-glu πραγματοποιήθηκαν με τις ίδιες ποσότητες πλασμιδίων αναφοράς και κανονικοποίησης και μειούμενες ποσότητες pEA.pac, έτσι ώστε το τελικό ποσό DNA να παραμένει σταθερό. Για τα πειράματα αυξανόμενης έκφρασης της Ank4 τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε μικροπλάκες δώδεκα βοθρίων και διαμολύνθηκαν βάσει του πρωτοκόλλου της Lipofectin με 250 ng pGL3.cec.luc, 250 ng pEA.Relish1-d2.his-glu, 125 ng pBmbA/EcRE.gfp και 125, 312,5 ή 625 ng pEA.ank4.myc-his. Ενώ για τα αντίστοιχα πειράματα με Ank8 ή Ank9, η διαμόλυνση έγινε με 50 ng pGL3.cec.luc, 50 ng pEA.Relish1-d2.his-glu, 25 ng pBmbA/EcRE.gfp και αυξανόμενες ποσότητες των πλασμιδίων pEA.ank8.myc-his ή pEA.ank9.myc-his (125, 250 ή 375 ng) χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο του Escort IV.

2.4.2 Λειτουργικά πειράματα σε κύτταρα HEK293

Στις λειτουργικές δοκιμασίες φωταύγειας σε κύτταρα θηλαστικών, ως πλασμίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το pCMV3xNFκB.luc (ευγενική χορηγία του Δρ Ν. Γραμματικάκη), το οποίο κωδικοποιεί τη λουσιφεράση Firefly υπό τον άμεσο υποκινητή του κυτομεγαλοϊού (CMV) σε συνδυασμό με το βασικό υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου της E-σελεκτίνης. Ο τελευταίος φέρει τρεις ακολουθίες

πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB με αποτέλεσμα η μεταγραφή του γονιδίου της λουσιφεράσης Firefly να είναι ανάλογη της ποσότητας του ενεργού NF-κB. Ως παράγοντας κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pCMV.Renilla της Promega σε αναλογία 1:1000 ως προς το πλασμίδιο αναφοράς. Το πλασμίδιο pCMV.Renilla φέρει το γονίδιο της λουσιφεράσης του οργανισμού *Renilla reniformis* και, στη συγκεκριμένη έκδοση (pRL), η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου είναι ανασυνδυασμένη με σκοπό την αποφυγή εσωτερικών ακολουθιών πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων. Ο υποκινητής του πλασμιδίου είναι ο άμεσος υποκινητής του ανθρώπινου κυτομεγαλοϊού (CMV) και επιτρέπει συστατική έκφραση του γονιδίου.

Στις δοκιμασίες για την εύρεση της κατάλληλης ποσότητας DNA, $1,6 \times 10^5$ κύτταρα / $3,8 \text{ cm}^2$ διαμολύνθηκαν με αυξανόμενες ποσότητες DNA: 0,5, 1, 2, 5 $\mu\text{g/ml}$ σε 250 μl όγκου. Σε όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς το μισό DNA ήταν το πλασμίδιο αναφοράς pCMV3xNFκB.luc και το άλλο μισό ήταν άδειος φορέας pcDNA3. Δύο μέρες μετά τη διαμόλυνση έγινε επαγωγή του μονοπατιού NF-κB με την προσθήκη της κυτταροκίνης TNF- α (210-TA, R&D Systems) σε τελική συγκέντρωση 20 ng/ml . Στη συνέχεια τα δείγματα συλλέχθηκαν και λύθηκαν με το διάλυμα Passive Lysis Buffer από το Dual-Luciferase® Reporter Assay System της εταιρείας Promega (E1910) και μετρήθηκε η φωταύγεια Firefly στη συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών Infinite M200 της εταιρείας Tecan.

Σε όλες τις επόμενες δοκιμασίες στα κύτταρα HEK293, χρησιμοποιήθηκε ολική ποσότητα DNA 2 $\mu\text{g/ml}$, δηλαδή 0,5 μg ανά $3,8 \text{ cm}^2$ (βοθρίο πλακών 12 βοθρίων) ανά διαμόλυνση $1,6 \times 10^5$ κυττάρων. Στις δοκιμασίες ελέγχου της επαγωγής του πλασμιδίου αναφοράς pCMV3xNFκB.luc, χρησιμοποιήθηκαν 250 ng του συγκεκριμένου πλασμιδίου, 0,25 ng του pCMV.Renilla και 250 ng άδειου φορέα pcDNA3. Δύο μέρες μετά τη διαμόλυνση έγινε επαγωγή του μονοπατιού NF-κB με 20 ng/ml TNF- α για 6 ώρες. Στη συνέχεια, τα δείγματα συλλέχθηκαν και λύθηκαν με το διάλυμα Passive Lysis Buffer από το Dual-Luciferase® Reporter Assay System της εταιρείας Promega (E1910). Η μέτρηση της φωταύγειας έγινε σε δύο βήματα χρησιμοποιώντας τα δύο αντιδραστήρια για την απελευθέρωση της φωταύγειας από το Dual-Luciferase® Reporter Assay System της εταιρείας Promega. Αρχικά μετρήθηκε η φωταύγεια από τη λουσιφεράση Firefly με το πρώτο αντιδραστήριο, ενώ στη συνέχεια αποσβέθηκε η φωταύγεια Firefly και μετρήθηκε η φωταύγεια της λουσιφεράσης Renilla με το δεύτερο αντιδραστήριο. Για τις μετρήσεις

χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Infinite M200 της Tecan. Μετά τη συλλογή των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε ο λόγος της φωταύγειας Firefly προς τη φωταύγεια Renilla (Firefly/Renilla), ο οποίος εκπροσωπεί την κανονικοποιημένη φωταύγεια κάθε δείγματος. Από όλα τα πειράματα μίας σειράς, καθώς και τις τρεις επαναλήψεις κάθε δείγματος εντός κάθε πειράματος, υπολογίστηκε ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα ανάμεσα στις τιμές κανονικοποιημένης φωταύγειας για κάθε δείγμα. Συγκρίνοντας την κανονικοποιημένη φωταύγεια παρουσία και απουσία της κυτοκίνης TNF- α , υπολογίστηκε η επαγωγή της ενδογενούς κλασσικής οδού μεταγωγής σήματος του NF κ B.

Στις διαμολύνσεις για τις δοκιμασίες ελέγχου της επίδρασης των πρωτεϊνών Ank, ο άδειος φορέας pcDNA3 αντικαταστάθηκε είτε από pcDNA3 που εκφράζει κάθε μία από τις πρωτεΐνες Ank (pcDNA3.ank) είτε τη συστατικά ενεργή, μεταλλαγμένη μορφή του I κ B α , I κ B α (ser32 \rightarrow ala32, ser36 \rightarrow ala36), η οποία χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας αναστολής του ενδογενούς μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B. Η φωταύγεια από τα δύο είδη λουσιφεράσης, Firefly και Renilla, μετρήθηκε με τη μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω και υπολογίστηκε η κανονικοποιημένη φωταύγεια κάθε δείγματος. Η μέση τιμή κανονικοποιημένης φωταύγειας για κάθε δείγμα εκφράστηκε ως ποσοστό της αντίστοιχης φωταύγειας του δείγματος ελέγχου (που δεν εκφράζει πρωτεΐνη Ank ή I κ B α).

2.5 Στατιστική ανάλυση για τα λειτουργικά πειράματα της έκφρασης των πρωτεϊνών Ank

Όλες οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με το πακέτο ανάλυσης GraphPad Prism v. 4.00, GraphPad Software San Diego California USA και με βάση την ακόλουθη διαδικασία.

- Η κανονικοποιημένη, ως προς το φθορισμό, φωταύγεια κάθε δείγματος των λειτουργικών πειραμάτων υπολογίζεται και στη συνέχεια εκφράζεται ως ποσοστό του αντίστοιχου μεγέθους από το δείγμα ελέγχου. Οι ποσοστιαίες τιμές κανονικοποιημένης φωταύγειας εισάγονται στο πακέτο ανάλυσης GraphPad Prism.
- Από τρία ή περισσότερα ανεξάρτητα πειράματα κάθε σειράς (και τις επαναλήψεις εντός κάθε πειράματος) υπολογίζονται οι μέσες τιμές, οι τυπικές αποκλίσεις και τα τυπικά σφάλματα (SE ή standard errors) των ποσοστών της κανονικοποιημένης φωταύγειας για τα δείγματα της ίδιας ομάδας.

- Η ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA) εξετάζει κατά πόσο οι μέσες τιμές κανονικοποιημένης φωταύγειας εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Η δοκιμασία πολλαπλών συγκρίσεων κατά Tukey's (Tukey's multiple comparisons' test) συγκεκριμενοποιεί αυτές τις διαφορές ανάμεσα στους διάφορους πληθυσμούς δειγμάτων.
- Στις περιπτώσεις που οι τυπικές αποκλίσεις ανάμεσα στις μέσες τιμές των διαφόρων πληθυσμών είναι σημαντικά διαφορετικές μεταξύ τους, οπότε η χρήση της ανάλυσης διακύμανσης δεν είναι επιτρεπτή, χρησιμοποιείται η μη παραμετρική δοκιμασία Kruskal-Wallis μαζί με την post-hoc δοκιμασία Dunn's. Σε αυτές τις περιπτώσεις υπολογίζονται οι διάμεσες τιμές \pm IQR (interquartile range ή ενδοτεταρτημοριακό εύρος) των ποσοστών της κανονικοποιημένης φωταύγειας αντί οι μέσες τιμές.
- Τα στατιστικά μεγέθη που αποδίδονται από τους δύο τύπους ανάλυσης, F από την ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα και KW statistic από τη δοκιμασία Kruskal-Wallis, συγκρίνονται με τις τιμές για τους αντίστοιχους βαθμούς ελευθερίας στους πίνακες του παραρτήματος προκειμένου να αξιολογηθούν και να επιβεβαιωθεί ή απορριφθεί η μηδενική υπόθεση, η οποία ορίζει ότι δεν υφίστανται στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στο δείγμα ελέγχου και τα δείγματα έκφρασης των ικόν πρωτεϊνών. Τέλος, οι τιμές p value, που επίσης δίνονται από τις στατιστικές δοκιμασίες δηλώνουν το επίπεδο σημαντικότητας του στατιστικού αποτελέσματος.

2.6 Πρωτεϊνική ανάλυση

2.6.1 Αποδιατακτική SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση κατά Western

Για την ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων και το διαχωρισμό των πρωτεϊνών μεταξύ τους χρησιμοποιείται εκτενώς η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης εντός κατάλληλης συσκευής ηλεκτροφόρησης. Η προετοιμασία των δειγμάτων γίνεται με κατάλληλο διάλυμα που περιλαμβάνει αφ' ενός τη χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης, ώστε να είναι ορατό το δείγμα, και αφ' ετέρου το απορρυπαντικό SDS (sodium dodecyl sulfate ή θειικό δωδεκυλικό νάτριο) το οποίο αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, διασπώντας τους μη ομοιοπολικούς δεσμούς τους, και

τους προσδίδει αρνητικά φορτία. Η προσθήκη αρνητικών φορτίων στο πρωτεϊνικό δείγμα σε συνδυασμό με την ηλεκτρική τάση που εφαρμόζεται στα δύο άκρα του πήκτωματος επιτρέπει την κίνηση των πρωτεϊνών από την κάθοδο προς την άνοδο. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται βάσει του μοριακού τους βάρους, ενώ οι τυχόν διαφορές στο σχήμα των πρωτεϊνών έχουν εξαλειφθεί κατά την αποδιάταξη. Η συγκέντρωση ακρυλαμίδης στο πήκτωμα μπορεί να ποικίλλει και καθορίζεται από το μέγεθος των υπό ανάλυση πρωτεϊνών.

Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Το πήκτωμα τοποθετείται πάνω στη μεμβράνη, ανάμεσα σε δύο χαρτιά και σε ειδική κασσέττα. Εντός κατάλληλου διαλύματος μεταφοράς και με την εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης στις δύο πλευρές της κασσέττας επιτυγχάνεται η μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη. Οι εξεταζόμενες πρωτεΐνες ανιχνεύονται με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων, συνδυασμός πρώτου αντισώματος και δεύτερου το οποίο είναι συζευγμένο με την υπεροξειδάση της ραπανίδας (horseradish peroxidase, HRP), και υπόστρωμα της HRP που οδηγεί στην παραγωγή χημειοφωταύγειας και ανίχνευση της πρωτεΐνης πάνω στη μεμβράνη.

Υλικά

Πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 15%

Πήκτωμα διαχωρισμού: 2,4 ml νερού, 5 ml 30% acrylamide/bis acrylamide, 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 100 μl 10% (w/v) sodium dodecyl sulfate ή SDS, 50 μl 10% (w/v) ammonium persulfate ή APS, 8 μl Temed

Πήκτωμα φόρτωσης: 3,6 ml νερού, 0,65 ml 30% acrylamide/bis acrylamide, 0,625 ml 1M Tris-HCl pH 6,8, 50 μl 10% (w/v) SDS, 25 μl 10% (w/v) APS, 8 μl Temed

6x SDS sample buffer: 7 ml 4x Tris HCl, pH 6,8, 3 ml γλυκερόλης, 1 g SDS, 0,93 g dithiothreitol ή DTT, 1,2 mg μπλε της βρωμοφαινόλης, νερό ώστε να συμπληρωθεί τελικός όγκος 10 ml

10x διάλυμα ηλεκτροφόρησης ή SDS Laemmli Running Buffer: 250 mM Tris, 1,92 M γλυκίνης, 1 % SDS, pH 8,3

Διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer): 25 mM Tris, 192 mM γλυκίνη, 20% μεθανόλη

Διάλυμα απομάκρυνσης των αντισωμάτων (stripping buffer): 100 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 2% SDS και 62,5 mM Tris-HCl pH 6.7

PBS-T ή phosphate buffered saline-Tween, pH 7,4: 80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 0,1% Tween-20

Πειραματική διαδικασία για την ανίχνευση των πρωτεϊνών Ank.myc-his

Κυτταρικά λύμματα από τα δείγματα των λειτουργικών πειραμάτων φωταύγειας θερμαίνονται στους 95 °C για 10 λεπτά παρουσία 1x SDS sample buffer. Τα δείγματα φορτώνονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 15% και ηλεκτροφορούνται εντός κατάλληλου διαλύματος (Laemmli Running Buffer) στα 120-140 Volts. Ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης Hybond ECL της Amersham εντός διαλύματος μεταφοράς (Transfer buffer). Οι πρωτεΐνες Ank σημασμένες με τον επίτοπο myc ανιχνεύονται με το πρωτεύον αντίσωμα anti-myc (9B11, Cell Signaling) σε αραίωση 1:1000 και το δευτερεύον αντίσωμα goat anti-mouse IgG-HRP (sc-2005, Santa-Cruz Biotechnology) σε αραίωση 1:5000 εντός διαλύματος PBS-T με γάλα 3% (w/v). Η ανίχνευση της τουμπουλίνης, που πραγματοποιείται μετά από απομάκρυνση των αντισωμάτων της πρώτης ανίχνευσης με κατάλληλο διάλυμα (stripping buffer), γίνεται με το συνδυασμό των αντισωμάτων anti-tubulin (Serotec) σε αραίωση 1:1000 και goat anti-rat IgG-HRP (Chemicon) σε αραίωση 1:4000. Για την αντίδραση χημειοφωταύγειας, που παράγουν τα συζευγμένα με HRP αντισώματα, χρησιμοποιείται το υπόστρωμα SuperSignal west pico της Thermo Scientific, ενώ η λήψη των εικόνων πραγματοποιείται με το σύστημα απεικόνισης LAS-4000 της Fujifilm. Στις περιπτώσεις που απαιτείται ποσοτικοποίηση των ανιχνευόμενων ζωνών, χρησιμοποιείται το πρόγραμμα ImageJ (Rasband ; Abramoff 2004). Προηγείται αντιστροφή των χρωμάτων σύμφωνα με τις οδηγίες του προγράμματος και ακολουθεί πυκνομέτρηση των ζωνών.

2.6.2 Πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης

Η συνανοσοκατακρήμνιση είναι μια μέθοδος για την ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος που αναγνωρίζει τη μία εκ

των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν. Συνήθως αναζητείται η αλληλεπίδραση μεταξύ δύο συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Οι δύο πρωτεΐνες μπορεί να εκφράζονται στα ίδια κύτταρα ή η μία να έχει καθαριστεί και στη συνέχεια να αναμιχθεί με λύμμα στο οποίο θα αλληλεπιδράσει με τη δεύτερη πρωτεΐνη. Τα λύμματα παράγονται σε μη αποδιατακτικές συνθήκες ώστε να πραγματοποιούνται και να διατηρούνται οι αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών, ενώ η παρουσία όλων των κυτταρικών συστατικών εξασφαλίζει τη δημιουργία και διατήρηση των αλληλεπιδράσεων. Με ειδικό αντισώμα έναντι της μίας πρωτεΐνης (πρωτεΐνη-δόλωμα ή bait) επιτυγχάνεται η κατακρήμνιση αυτής, διαδικασία κατά την οποία συμπαρασύρονται και οι αλληλεπιδρώσες με αυτήν πρωτεΐνες. Το σύμπλοκο των πρωτεϊνών και του αντισώματος ακινητοποιείται σε σφαιρίδια αгарόζης συζευγμένα με τις πρωτεΐνες A ή G, οι οποίες παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια για τη σταθερή περιοχή των αντισωμάτων. Ακολουθεί απομάκρυνση (έκλουση) του συμπλόκου από τα σφαιρίδια με τη χρήση αποδιατακτικού παράγοντα και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων έκλουσης. Μετά από μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western γίνεται η ανίχνευση της πρωτεΐνης-δόλωμα και της πρωτεΐνης-θήραμα (prey) με κατάλληλα αντισώματα.

Υλικά

Διάλυμα κυτταρικής λύσης: 50 mM Tris-Cl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP-40 και μίγμα αναστολέων πρωτεασών (P8340, Sigma-Aldrich)

Σφαιρίδια αгарόζης-πρωτεΐνης A/G: μίξη σφαιριδίων αгарόζης-πρωτεΐνης A (Roche) και αгарόζης-πρωτεΐνης G (Santa Cruz Biotechnology) σε αναλογία 1:1.

Πειραματική διαδικασία

Κύτταρα Hi5 επιστρωμένα σε φιάλη καλλιέργειας των 25 cm² διαμολύνθηκαν βάσει του πρωτοκόλλου του Escort IV χρησιμοποιώντας 2,5 μg ολικού DNA, εκ των οποίων 1250 ng pEA.Relish1-d2.his-glu, 750 ng pEA.ank4/8.myc-his και 500 ng pEIA.yfp προκειμένου να εξεταστεί τυχόν αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Ank4/8.myc-his και Relish1-d2.his-glu. Ο φορέας pEIA.yfp χρησιμοποιήθηκε για υψηλότερη έκφραση των πρωτεϊνών χάρη στην παρουσία του συνενεργοποιητή της μεταγραφής IE1 του βακτηριόϊου BmNPV. Επίσης, έγιναν επιπλέον διαμολύνσεις για την έκφραση κάθε εξεταζόμενης πρωτεΐνης ξεχωριστά, οι οποίες αποτέλεσαν

μάρτυρες αρνητικού ελέγχου. Δύο ημέρες μετά τις διαμολύνσεις τα κύτταρα κάθε φιάλης καλλιέργειας λύθηκαν σε 50 μl διαλύματος κυτταρικής λύσης. Μετά τη λύση, ο όγκος κάθε λύματος προσαρμόστηκε στα 200 μl ώστε να αραιωθεί ο αποδιατακτικός παράγοντας NP-40 και να είναι εφικτή η πραγματοποίηση της αντίδρασης Bradford για την ποσοτικοποίηση της ολικής πρωτεΐνης των δειγμάτων. Η αντίδραση Bradford έγινε με το αντιδραστήριο Bradford reagent (B-6916, Sigma-Aldrich) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για το πείραμα της συνανοσοκατακρήμνισης ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- 400-500 μg ολικής πρωτεΐνης κάθε δείγματος επώαστηκαν με 20 μl μίγματος 1:1 διαλύτη προς σφαιρίδια αγαρόζης-πρωτεΐνης A/G για 30 λεπτά στους 4 °C προκειμένου το δείγμα να καθαριστεί από πρωτεΐνες που συνδέονται στα σφαιρίδια αγαρόζης με μη ειδικό τρόπο.
- Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 1000 g, 5 λεπτά.
- Το υπερκείμενο από τη φυγοκέντρωση κάθε δείγματος επώαστηκε με 2 μg αντισώματος έναντι της μίας εκ των δύο πρωτεϊνών για 16 ώρες στους 4 °C. Χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα anti-myc ή anti-glu ανάλογα με τον επίτοπο που φέρουν οι εξεταζόμενες πρωτεΐνες.
- Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 20 μl μίγματος 1:1 διαλύτη προς σφαιρίδια αγαρόζης-πρωτεΐνης A/G για 2 ώρες.
- Με φυγοκέντρωση στα 1000 g για 5 λεπτά απομονώθηκαν τα σφαιρίδια αγαρόζης και τα τυχόν σύμπλοκα που έχουν δημιουργηθεί σε αυτά.
- Ακολούθησαν 6 πλύσεις των σφαιριδίων με το διάλυμα λύσης παρουσία 0.25% αντί 1% NP-40 και απουσία μίγματος αναστολέων των πρωτεασών. Ανάμεσα στις πλύσεις έγιναν φυγοκεντρήσεις στα 1000 g για 5 λεπτά.
- Η έκλυση των πρωτεϊνών από τα σφαιρίδια έγινε με 30 μl αντιδραστηρίου 1x SDS sample buffer και θέρμανση στους 95 °C. Τα σφαιρίδια αγαρόζης απομακρύνθηκαν με φυγοκέντρωση στα 16000 g.
- Οι πρωτεΐνες του υπερκειμένου αναλύθηκαν σε SDS-PAGE πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western και ανίχνευση του Relish1-d2.his-glu με αντίσωμα anti-glu (18838, QED Biosciences) σε αραιώση 1:1000 σε PBS-T - γάλα και το αντίσωμα anti-rabbit IgG-HRP (Jackson) σε αραιώση 1:5000 σε PBS-T - γάλα, ενώ η ανίχνευση των πρωτεϊνών Ank.myc-his έγινε με τον συνδυασμό των αντισωμάτων anti-myc (9B11, Cell Signaling) και goat anti-mouse

IgG-HRP (sc-2005, Santa-Cruz Biotechnology) σε αραιώση 1:1000 και 1:5000, αντίστοιχα, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.6.1.

2.6.3 Πειράματα ανίχνευσης πρωτεϊνικών συμπλόκων με χρωματογραφία συγγένειας (pull-down assays)

Η ανίχνευση πρωτεϊνικών συμπλόκων με χρωματογραφία συγγένειας είναι μια μέθοδος για την ανίχνευση ή εξακρίβωση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, που στηρίζεται στη σήμανση της πρωτεΐνης-δόλωμα με έναν επίτοπο ιστιδίνης (επανάληψη έξι καταλοίπων ιστιδίνης) και τη χρήση σφαιριδίων αγαρόζης-Ni-NTA (σφαιρίδια με προσθήκη Nickel Nitriolo-triacetic Acid). Ο συγκεκριμένος επίτοπος επιτρέπει την πρόσδεση της πρωτεΐνης σε σφαιρίδια αγαρόζης-Ni-NTA χάρη στη συγγένεια της ιστιδίνης με τα ιόντα νικελίου. Μαζί με την πρωτεΐνη-δόλωμα ακινητοποιούνται και οι αλληλεπιδρώσες με αυτήν πρωτεΐνες. Με περίσσεια ιμιδαζολίου εκλύεται το σύμπλοκο των πρωτεϊνών από τα σφαιρίδια αγαρόζης. Οι πρωτεΐνες αναλύονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανιχνεύονται με κατάλληλα αντισώματα.

Υλικά

Διάλυμα λύσης: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM ιμιδαζόλιο, 1% NP-40 και μίγμα αναστολέων των πρωτεασών (P8340, Sigma-Aldrich)

Διάλυμα έκπλυσης: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl και 40 mM ιμιδαζόλιο

Διάλυμα έκλουσης: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl και 500 mM ιμιδαζόλιο

Πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12 %

Πήκτωμα διαχωρισμού: 3,4 ml νερού, 4 ml 30% acrylamide/bis acrylamide, 2,5 ml 1.5 M Tris-HCl pH 8,8, 100 μl 10% (w/v) sodium dodecyl sulfate ή SDS, 50 μl 10% (w/v) ammonium persulfate ή APS, 8 μl Temed

Πήκτωμα φόρτωσης: 3,6 ml νερού, 0,65 ml 30% acrylamide/bis acrylamide, 0,625 ml 1M Tris-HCl pH 6,8, 50 μl 10% (w/v) SDS, 25 μl 10% (w/v) APS, 8 μl Temed

Πειραματική διαδικασία

- Κύτταρα Hi5 επιστρωμένα σε μικροπλάκα των έξι βοθρίων διαμολύνθηκαν με το πρωτόκολλο του Escort IV χρησιμοποιώντας 400 ng pEA.flag.Relish1, 400 ng pEA.Ank4.myc-his ή pEA.Ank8.myc-his και 200 ng pEIA.
- Δύο ημέρες μετά τη διαμόλυνση τα κύτταρα λύθηκαν σε 400 μl διαλύματος λύσης για 15 λεπτά σε πάγο και φυγοκεντρήθηκαν στα 1000 g για 10 λεπτά στους 4 °C.
- Το υπερκείμενο των λυμάτων από κάθε βοθρίο επώαστηκε για 2 ώρες υπό ανάδευση με 40 μl μίγματος 1:1 διαλύτη προς σφαιρίδια αγαρόζης Ni-NTA (Qiagen) προκειμένου να επιτραπεί η πρόσδεση των επισημασμένων με επίτοπο 6xHis πρωτεϊνών στα σφαιρίδια. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 1000 g για 5 λεπτά. Τόσο η επώαση όσο και η φυγοκέντρωση πραγματοποιήθηκαν στους 4 °C.
- Τα σφαιρίδια αγαρόζης εκπλύθηκαν 6 φορές με το διάλυμα έκπλυσης. Ανάμεσα στις πλύσεις μεσολάβησαν φυγοκεντρήσεις των 5 λεπτών στα 1000 g και στους 4 °C.
- Η έκλουση των προσδεμένων πρωτεϊνών έγινε με 50 μl διαλύματος έκλουσης και φυγοκέντρωση στα 1000 g για 5 λεπτά και στους 4 °C.
- Ακολούθησε διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12% και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.
- Για την ανίχνευση του flag.Relish1 συνδυάστηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα anti-flag (F7425, Sigma-Aldrich) σε αραιώση 1:1000 εντός διαλύματος PBS-T-γάλα με το αντίσωμα anti-rabbit IgG-HRP (Jackson) σε αραιώση 1:5000, ενώ η ανίχνευση των πρωτεϊνών Ank.myc-his έγινε με το συνδυασμό των αντισωμάτων anti-myc (9B11, Cell Signaling) σε αραιώση 1:1000 και goat anti-mouse IgG-HRP (sc-2005, Santa-Cruz Biotechnology) σε αραιώση 1:5000, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.6.1.

2.6.4 Επίδραση του αναστολέα του πρωτεοσώματος MG132 στα επίπεδα των πρωτεϊνών Ank

Κύτταρα Hi5 επιστρωμένα σε μικροπλάκα των δώδεκα βοθρίων διαμολύνθηκαν με το αντιδραστήριο Escort IV και με 500 ng από κάθε πλασμίδιο pEA.ank.myc-his (*ank1*, *ank2*, *ank7* ή *ank9*). Μία ημέρα μετά τη διαμόλυνση τα κύτταρα κάθε δείγματος χωρίστηκαν σε δύο ίσα μέρη και στο καθένα το μέσο καλλιέργειας αντικαταστάθηκε με φρέσκο IPL-FBS, το οποίο είτε περιείχε 5 μM

MG132 (PI-102, BIOMOL, Enzo Life Sciences) διαλυτοποιημένο σε DMSO είτε σκέτο διαλύτη DMSO. 24 ώρες μετά την προσθήκη, τα κύτταρα κάθε μέρους εκπλύθηκαν με PBS και λύθηκαν σε 25 μl διαλύματος 50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl και NP-40 1%. Ακολούθησε αποδιάταξη των πρωτεϊνών με θέρμανση στους 95 °C για 10 λεπτά εντός 1x SDS sample buffer, ανάλυσή τους σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 15%, ανοσοαποτύπωση κατά Western και ανίχνευση των Ank.myc-his και της τουμπουλίνης όπως αναφέρθηκε για την ανίχνευση σε λύματα από τα λειτουργικά πειράματα στην παράγραφο 2.6.1. Μετά από απομάκρυνση των αντισωμάτων από τη μεμβράνη, ανιχνεύτηκε η πρωτεΐνη ουβικιτίνη χρησιμοποιώντας ως πρώτο αντίσωμα το μονοκλωνικό anti-ubiquitin (P4D1, Cell Signaling) σε αραιώση 1:1000 σε συνδυασμό με το goat anti-mouse IgG-HRP (sc-2005, Santa-Cruz Biotechnology) ως δεύτερο αντίσωμα, σε αραιώση 1:5000.

2.7 Ανοσοφθορισμός

Η τεχνική του ανοσοφθορισμού χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πρωτεϊνών εντός κυττάρων μέσω της αναγνώρισης μιας πρωτεΐνης-αντιγόνου από ένα ειδικό για αυτήν αντίσωμα. Το αντίσωμα αναγνωρίζεται από δεύτερο αντίσωμα συζευγμένο με ένα φθορίζον μόριο με αποτέλεσμα το σύμπλοκο αντιγόνο-1^ο αντίσωμα-2^ο αντίσωμα να γίνεται ορατό με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού.

Πειραματική διαδικασία

- Κύτταρα εντόμων επιστρώθηκαν σε μικροπλάκες καλλιέργειας των 24 βοθρίων και διαμολύνθηκαν χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Escort IV και 250 ng ολικού DNA. Από αυτά, 125 ng αντιστοιχούν σε πλασμίδιο έκφρασης πρωτεΐνης Ank (pEA.ank.myc-his) και 125 ng αντιστοιχούν σε πλασμίδιο έκφρασης ενός από τους εξεταζόμενους μεταγραφικούς παράγοντες (pEA.flag.relb ή pEA.flag.R1d2) ή σε άδειο φορέα.
- Δύο ημέρες μετά τη διαμόλυνση τα κύτταρα επώστηκαν επί 45 λεπτά πάνω σε γυάλινες πλάκες μικροσκοπίου (Thermo Scientific) επικαλυμμένες με πολυλυσίνη (poly-L-lysine hydrochloride, P2658 της Sigma-Aldrich) ώστε να προσκολληθούν. Σε συγκεκριμένα πειράματα, πριν την εναπόθεση των κυττάρων προηγήθηκε επώαση με ειδική χρωστική για τα λυσοσώματα LysoTracker Red Lysosomal Probe (PA-3015, Lonza) σε συγκέντρωση 400 nM για 1 ώρα στους 28 °C ή με τον αναστολέα του

πρωτεοσώματος MG132 (BIOMOL, Enzo Life Sciences) σε συγκέντρωση 5 μM για 16 ώρες.

- Πραγματοποιήθηκαν δύο πλύσεις με διάλυμα φωσφορικών αλάτων PBS pH 7,6, (80 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl).
- Σε ορισμένες περιπτώσεις έγινε χρώση των κυτταρικών μεμβρανών με Wheat Germ Agglutinin, Texas Red-X (W21405, Molecular Probes) 5 $\mu\text{g/ml}$, στους 28 °C για 10 λεπτά και δύο πλύσεις με PBS.
- Ακολούθησε στερέωση των κυττάρων με διάλυμα παραφορμαλδεϋδης 2% σε PBS για 15 λεπτά και 3 πλύσεις με PBS. Τρεις πλύσεις λαμβάνουν χώρα ανάμεσα σε όλα τα επόμενα στάδια της διαδικασίας έως την ετοιμασία των δειγμάτων προς παρατήρηση.
- Μετά τη στερέωση, τα κύτταρα επώαστηκαν για 20 λεπτά με διάλυμα απορρυπαντικού 0,1% Triton-X 100 σε PBS (ή 0,2% όπου αναφέρεται) το οποίο καθιστά τις κυτταρικές μεμβράνες περατές.
- Ακολούθησε επώαση μιας ώρας με διάλυμα αλβουμίνης (BSA) 3% σε PBS, η οποία περιορίζει τη μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος στο επόμενο στάδιο.
- Τα κύτταρα επώαστηκαν για 16 ώρες στους 4 °C παρουσία μονοκλωνικού αντισώματος anti-myc (9B11, Cell Signaling) ή/και πολυκλωνικού anti-flag (F7425, Sigma-Aldrich) σε αραιώση 1:200 σε PBS και BSA 1 %.
- Η επώαση με το διάλυμα δεύτερου αντισώματος anti-mouse FITC (F0257, Sigma-Aldrich) σε αραιώση 1:200 ή/και goat anti-rabbit Alexa Fluor 568 (Molecular Probes) αραιωμένο 1:2500 σε PBS-BSA 1% διήρκησε μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- Για την πυρηνική χρώση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 4',6 diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, DAPI, (D9542, Sigma-Aldrich) σε συγκέντρωση 1 $\mu\text{g/ml}$ για 5 λεπτά, ή διάλυμα propidium iodide (P4170, Sigma-Aldrich) 1 μM μαζί με RNase 10 $\mu\text{g/ml}$ για 30 λεπτά ή TO-PRO-3 iodide (Molecular Probes, Invitrogen) σε αραιώση 1:2000 για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Σε ορισμένες περιπτώσεις έγινε χρώση του κυτταροσκελετού ακτίνης με rhodamine-φαλλοϊδίνη 1:50.
- Ακολούθησε τοποθέτηση διαλύματος polyvinyl alcohol 4-88 (81381, Sigma-Aldrich) και σφράγισμα των δειγμάτων με καλυπτρίδες (P231.2, ROTH).
- Η παρατήρηση των δειγμάτων έγινε α) με μικροσκοπία φθορισμού σε ανάστροφο μικροσκόπιο Axiovert της Zeiss, χρησιμοποιώντας το σετ φίλτρων

488009 με διέγερση στα 450-490 nm και ανίχνευση εκπεμπόμενης ακτινοβολίας στα 520-1150 nm και το σετ φίλτρων 488015 με διέγερση στα 546 nm και ανίχνευση εκπεμπόμενης ακτινοβολίας στα 590-1150 nm και β) με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με Laser σε μικροσκόπιο BIORAD MRC 1024 Confocal System το οποίο συνδυάζεται με το λογισμικό Laser Sharp Version 3.2 BioRad software και δίνει τη δυνατότητα λήψης σειριακών τομών. Η παρατήρηση του πράσινου χρώματος (φθορίζουσα ουσία FITC) στο συνεστιακό μικροσκόπιο έγινε με διέγερση στα 488 nm και ανίχνευση εκπεμπόμενης ακτινοβολίας στα 522 nm. Η παρατήρηση του κόκκινου χρώματος (για τις φθορίζουσες ουσίες Alexa Fluor 568, Texas Red-X και rhodamine) έγινε με διέγερση στα 568 nm και ανίχνευση στα 605 nm, ενώ για το βαθύ κόκκινο (Topro-3) η διέγερση έγινε στα 647 nm και η ανίχνευση στα 680 nm. Η ανάλυση των εικόνων μικροσκοπίας και συνεστιακής μικροσκοπίας έγινε με το λογισμικό ImageJ (Rasband ; Abramoff 2004).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Λειτουργικά πειράματα φωταύγειας σε κύτταρα εντόμων

3.1 Προκαταρκτική ανάλυση των υπό μελέτη πρωτεϊνών με μεθοδολογίες βιοπληροφορικής

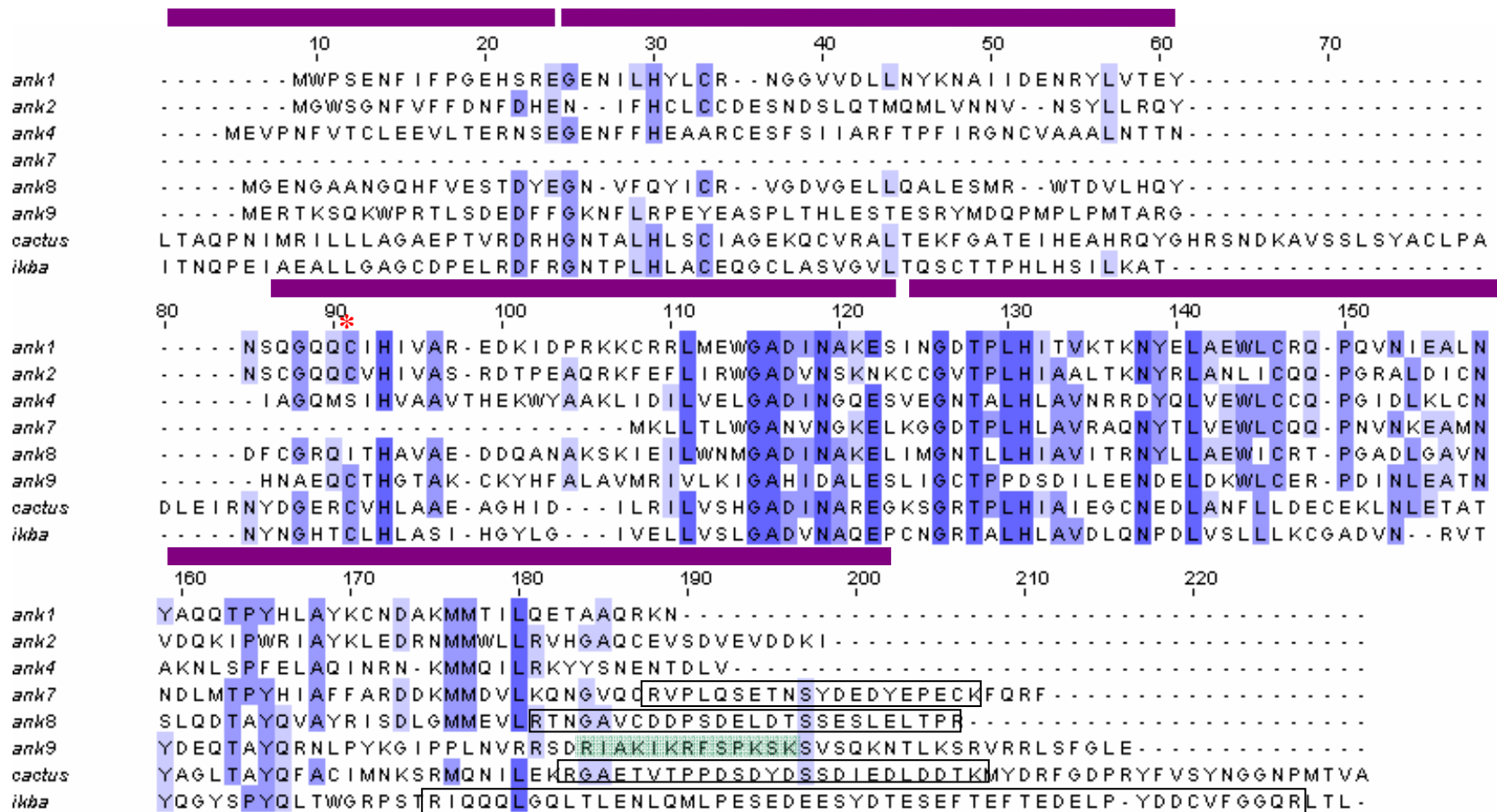
Όπως προαναφέρθηκε, οι πρωτεΐνες Ank των PDVs είναι ομόλογες των IκB και Cactus, μόρια-αναστολείς του NF-κB στα θηλαστικά και τη *Drosophila*, αντίστοιχα. Στην **εικόνα 15** παρουσιάζεται πολλαπλή στοίχιση μεταξύ των ακολουθιών των έξι πρωτεϊνών επαναλήψεων αγκυρίνης του CcBV που μελετήσαμε, του IκBα των θηλαστικών και του Cactus της *Drosophila*. Οι πρωτεΐνες Ank του CcBV παρουσιάζουν ομοιότητα κατά μέσο όρο 50% και ταυτότητα 30% με τους δύο γνωστούς αναστολείς στην περιοχή επαναλήψεων αγκυρίνης, αν και είναι μικρότερες κατά τουλάχιστον δύο επαναλήψεις (**πίνακας 5**). Αντίθετα, οι ικές πρωτεΐνες στερούνται ρυθμιστικών περιοχών που διαθέτουν οι IκBα και Cactus, όπως τις θέσεις που υφίστανται φωσφορυλίωση μετά από ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν και, ίσως, την αλληλουχία PEST, η οποία σχετίζεται με τη σταθερότητα, την αποικοδόμηση και το χρόνο ημιζωής των πρωτεϊνών που τη φέρουν (Rogers et al. 1986). Σημειώνεται ότι, σύμφωνα με τον αλγόριθμο EPESTFIND (Rice et al. 2000), ακολουθία PEST αναγνωρίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο των πρωτεϊνών Ank7 και Ank8, και μια οριακά πιθανή ακολουθία PEST αναγνωρίζεται στην Ank9 του CcBV (**εικόνα 15**). Η φωσφορυλίωση της περιοχής PEST των IκBα (Lin et al. 1996; McElhinny et al. 1996) και Cactus (Liu et al. 1997; Packman et al. 1997) σε αμινοξικά κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης από την κινάση καζεΐνης II (CKII) ρυθμίζει τη σταθερότητα των δύο παραγόντων. Έτσι, ελέγχθηκαν οι πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης για τις πρωτεΐνες Ank του CcBV. Ο έλεγχος έγινε με δύο διαφορετικούς αλγορίθμους. Με τον αλγόριθμο NetPhos 2.0 (Blom et al. 1999) ανιχνεύτηκαν αρκετά αμινοξικά κατάλοιπα ως πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης (**πίνακας 6**), με την Ank9 να παρουσιάζει τα περισσότερα, ενώ για τις Ank7 και Ank8 εντοπίστηκαν πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης και εντός της πιθανής περιοχής PEST. Με τον αλγόριθμο PROSITE (Sigrist et al. 2010), ο οποίος προβλέπει φωσφορυλίωσεις από συγκεκριμένες κινάσες (**πίνακας 6**), εντοπίστηκε μία πιθανή θέση φωσφορυλίωσης από την CKII εντός της εκάστοτε PEST περιοχής των Ank7, Ank8 και Ank9, γεγονός που αποτελεί ένδειξη

πιθανής ρύθμισης των Ank 7, 8 και 9 από την CKII, όπως ισχύει για τους IκBa και Cactus.

Άλλα χαρακτηριστικά της πρωτοταγούς δομής των πρωτεϊνών Ank του CcBV περιλαμβάνουν το σήμα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal ή NLS) που φαίνεται να υπάρχει στην πρωτεΐνη Ank9 (α.κ. 153-165 στην **εικόνα 15**) (Nguyen Ba et al. 2009) και οι πιθανές θέσεις ουβικιτινυλίωσης που προβλέπονται με βάση τον αλγόριθμο BDM-PUB (Xue et al. 2006) για τις πέντε πρωτεΐνες (εκτός της Ank8), με τις περισσότερες να εντοπίζονται στην Ank9 (**πίνακας 6**). Επιπλέον, οι Ank1, Ank2 και Ank9 διαθέτουν ένα κατάλοιπο κυστεΐνης το οποίο φαίνεται να είναι συντηρημένο ανάμεσα σε αυτές και τον IκBa των θηλαστικών (**εικόνα 15**, αστερίσκος). Στον IκBa η συγκεκριμένη κυστεΐνη (C186) υπόκειται σε προσθήκη γλουταθειόνης, μία αντιστρεπτή διαδικασία που καθιστά την πρωτεΐνη πιο ανθεκτική σε φωσφορυλίωση, ουβικιτινυλίωση και αποικοδόμηση (Kil et al. 2008).

Ank	IκBa (%)		Cactus (%)	
	ταυτότητα	ομοιότητα	ταυτότητα	ομοιότητα
1	24	44	38	57
2	32	51	36	54
4	30	48	29	47
7	33	49	29	51
8	27	47	34	44
9	23	42	33	53

Πίνακας 5. Ομολογία ανάμεσα στις έξι πρωτεΐνες Ank του ιού CcBV και την περιοχή των τεσσάρων τελευταίων επαναλήψεων αγκυρίνης των αναστολέων IκBa του ανθρώπου (α. κ. 143-291) και Cactus της *D. melanogaster* (α. κ. 298-473) βάσει του αλγορίθμου Blastp της National Library of Medicine.



Εικόνα 15. Στοιχισμός μεταξύ των έξι ικών πρωτεϊνών Ank του CcBV, του Cactus της *D. melanogaster* (τμήμα α.κ. 275-500) και του ανθρώπινου IkBa (τμήμα α.κ. 120-317). Η στοιχισμός έγινε με τον αλγόριθμο ClustalX (Chenna et al. 2003). Οι διαφορετικές αποχρώσεις του μπλε αντιστοιχούν σε διαφορετικά επίπεδα αμινοξικής συντήρησης. Οι ράβδοι πάνω από τη στοιχισμός δείχνουν τις επαναλήψεις αγκυρίνης (από τη δεύτερη έως την έκτη) του παράγοντα IkBa, οι οποίες συμπίπτουν με τις επαναλήψεις αγκυρίνης των πρωτεϊνών Ank του CcBV, όπως αυτές προβλέπονται με το εργαλείο InterProScan (Zdobnov and Arweiler 2001). Οι αλληλουχίες στα κενά ορθογώνια πλαίσια σηματοδοτούν τις ακολουθίες PEST, όπως αυτές έχουν προβλεφθεί από τον αλγόριθμο EPESTFIND (Rice et al. 2000). Η αλληλουχία επισημασμένη με ανοιχτό πράσινο αντιστοιχεί στο προβλεπόμενο NLS της Ank9 σύμφωνα με το εργαλείο NLStradamus (Nguyen Ba et al. 2009). Ο αστερίσκος δηλώνει την κυστεΐνη 186 του IkBa που υπόκειται σε προσθήκη γλουταθειόνης και είναι συντηρημένη σε ορισμένες από τις εξεταζόμενες πρωτεΐνες Ank.

	Ser*	Thr*	Tyr*	PKC**	Κινάση καζεΐνης II**	cAMP ή cGMP εξαρτόμενη κινάση**	Ub
Ank1	3	1	2	1	-	-	4
Ank2	1	1	0	-	1	-	1
Ank4	4	2	0	1	3	-	1
Ank7	2	1	2	-	2	-	5
Ank8	4	4	2	2	4	-	-
Ank9	10	6	5	7	5	2	10

Πίνακας 6. Αριθμός θέσεων φωσφορυλίωσης έξι πρωτεϊνών Ank του CcBV στα αμινοξικά κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης, τυροσίνης όπως προβλέπεται από τον αλγόριθμο NetPhos (*) (Blom et al. 1999) και αριθμός φωσφορυλίώσεων από τις κινάσες PKC, CKII και cAMP ή cGMP εξαρτόμενη κινάση όπως προβλέπεται από την Prosite (). Στην τελευταία στήλη φαίνεται ο αριθμός πιθανών θέσεων ουβικιτινυλίωσης (Xue et al. 2006). PKC: protein kinase C, CKII: casein kinase II, Ub: ουβικιτινυλίωση.**

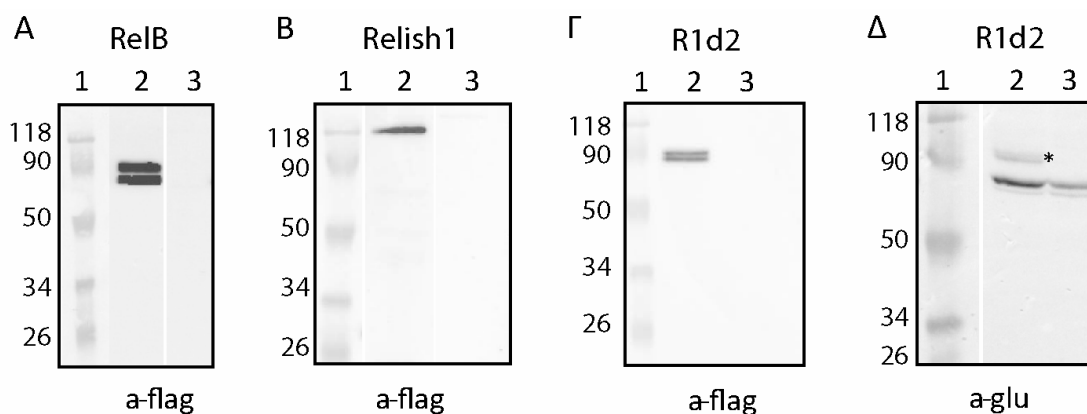
3.2 Έκφραση των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης Rel/NF-κB παραγόντων του μεταξοσκώληκα σε κύτταρα λεπιδοπτέρων εντόμων

Για τη μελέτη της επίδρασης των πρωτεϊνών Ank σε μεταγραφικούς παράγοντες τύπου Rel/NF-κB των Λεπιδοπτέρων, εξετάστηκαν οι Rel/NF-κB παράγοντες RelB και Relish1 του μεταξοσκώληκα. Οι συγκεκριμένοι παράγοντες ενεργοποιούνται μέσω των Toll και Imd οδών μεταγωγής σήματος του ανοσοποιητικού συστήματος των εντόμων, αντίστοιχα. Οι δύο παράγοντες διαθέτουν από μια δομική μονάδα Rel Homology Domain (RHD) η οποία αναγνωρίζει και προσδένεται σε αλληλουχίες κB στους υποκινητές των γονιδίων που μεταγράφουν. Η RHD του RelB είναι ομόλογη με την αντίστοιχη περιοχή του Dorsal της *Drosophila* ενώ η RHD του Relish1 είναι ομόλογη με την αντίστοιχη περιοχή του DmRelish (Tanaka et al. 2005; Tanaka et al. 2007). Ο Relish1, ωστόσο, εκτός από τη δομική μονάδα RHD, περιλαμβάνει και μια δομική μονάδα επαναλήψεων αγκυρίνης η οποία δρα ανασταλτικά στην περιοχή RHD καθιστώντας τον παράγοντα ανενεργό (Tanaka et al. 2007). Αντίθετα, η ελλειμματική μορφή του Relish1-d2 ή R1d2, η οποία στερείται των επαναλήψεων αγκυρίνης, είναι συνεχώς ενεργή (εικόνα 4).

Τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των γονιδίων *relb*, *relish1* και *R1d2* ήταν κλωνοποιημένα σε φορέα ειδικό για έκφραση σε κύτταρα διπτέρων εντόμων. Για την έκφρασή τους σε κύτταρα Λεπιδοπτέρων, υποκλωνοποιήθηκαν (α) στον φορέα pBmA, στον οποίο το εκάστοτε ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή της A3 κυτταροπλασματικής ακτίνης του *B. mori* (Johnson et al. 1992), (β) στον

φορέα pEA, ο οποίος επιπλέον του υποκινητή ακτίνης διαθέτει τον ενισχυτή hr3 του βακτηρίου BmNPV (Lu et al. 1997) που ενισχύει τη γονιδιακή έκφραση και (γ) στους φορείς pEA.his-glu και pEA.flag, που διαθέτουν όλα τα στοιχεία του pEA και παράλληλα εκφράζουν τους επιτόπους his-glu ή flag, αντίστοιχα, προσφέροντας τη δυνατότητα σήμανσης της εκφραζόμενης πρωτεΐνης. Τα γονίδια των παραγόντων RelB και R1d2 υποκλωνοποιήθηκαν στους φορείς pBmA και pEA για να χρησιμοποιηθούν σε λειτουργικά πειράματα, ενώ, για τον ίδιο σκοπό, το πλήρες ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ΑΠΑ) για το γονίδιο *relish1* κλωνοποιήθηκε στον φορέα pEA.flag. Στους φορείς pEA.flag ή pEA.his-glu υποκλωνοποιήθηκαν επίσης και τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των *relb* και *R1d2* ώστε να μπορούν τα προϊόντα τους να ανιχνεύονται με εμπορικά διαθέσιμα αντισώματα έναντι των επιτόπων flag ή glu.

Η έκφραση του RelB, του πλήρους Relish1 και του ενεργού τμήματος του Relish1 (R1d2) του μεταξοσκώληκα από τους παραπάνω φορείς πιστοποιήθηκε σε κυτταρικά εκχυλίσματα μετά από παροδική διαμόλυνση κυττάρων Hi5 και ανοσοαποτύπωση κατά Western (εικόνα 16).



Εικόνα 16. Έκφραση των παραγόντων RelB, Relish1 και του ενεργού τμήματος του Relish1 σε εκχυλίσματα κυττάρων Hi5 μετά από διαμόλυνση των κυττάρων με τους φορείς pEA.flag ή pEA.his-glu στους οποίους έχουν κλωνοποιηθεί τα ΑΠΑ των γονιδίων *relb*, *relish1* και *relish1-d2* (ή *R1d2*) του *B. mori* (διαδρομή 2). Σύγκριση με εκχυλίσματα κυττάρων διαμολυσμένα με άδειο φορέα (διαδρομή 3) και τους δείκτες μοριακών βαρών (σε kDa, διαδρομή 1). Οι τρεις μεταγραφικοί παράγοντες είναι σημασμένοι με τον επίτοπο flag στο αμινοτελικό τους άκρο (Α-Γ), ενώ ο ενεργός μεταγραφικός παράγοντας R1d2 έχει σημειωθεί και με τον επίτοπο his-glu στο καρβοξυτελικό του άκρο (Δ). Ο αστερίσκος στο Δ δείχνει την ειδική ζώνη που αντιστοιχεί στον R1d2, ενώ η διπλή ζώνη που ανιχνεύεται στις διαδρομές 2 και 3 είναι μη ειδική ζώνη που ανιχνεύει το αντίσωμα anti-glu. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών έγινε με ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας αντισώματα anti-flag ή anti-glu σε συνδυασμό με αντισώματα συζευγμένα με HRP. Τα θεωρητικά μοριακά βάρη των μεταγραφικών παραγόντων με βάση το εργαλείο Compute pI/MW (Gasteiger et al. 2003) είναι flag.RelB: 59 kDa, flag.Relish1: 106 kDa, flag.R1d2: 64 kDa και R1d2.his-glu: 65 kDa.

Αφού πιστοποιήθηκε η έκφραση των Rel/NF-κB μεταγραφικών παραγόντων, ελέγχθηκε η λειτουργικότητά τους με παροδικές διαμολύνσεις στην κυτταρική σειρά Hi5 και τη χρήση κατάλληλων πλασμιδίων αναφοράς.

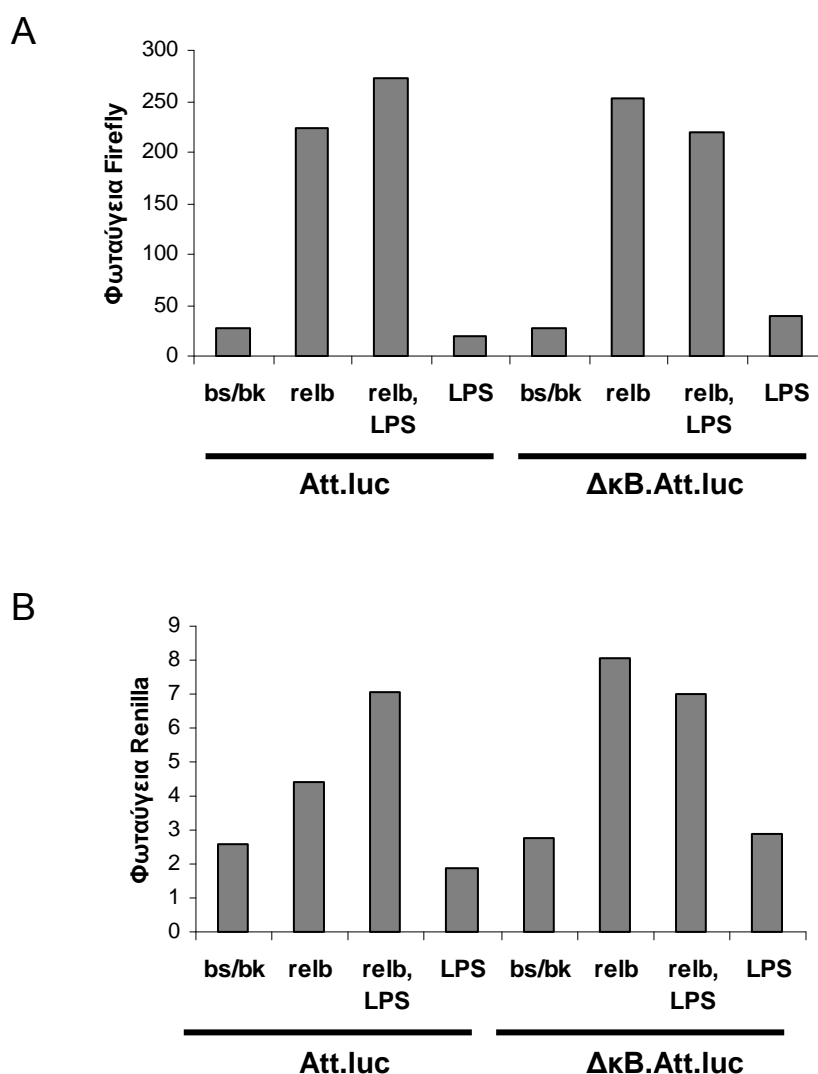
3.3 Έλεγχος λειτουργικότητας του μεταγραφικού παράγοντα RelB και των πλασμιδίων αναφοράς Att.luc και ΔκB.Att.luc

3.3.1 Κυτταρική σειρά S2 της *Drosophila* (Δίπτερα)

Αρχικά, ελέγχθηκε η λειτουργικότητα του μεταγραφικού παράγοντα RelB του μεταξοσκώληκα όταν αυτός εκφράζεται από τον φορέα pPac-PL, που χρησιμοποιεί τον υποκινητή της ακτίνης 5C της *Drosophila* και είναι κατάλληλος για έκφραση σε κύτταρα διπτέρων εντόμων. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε κύτταρα S2 της Δροσόφιλα. Ως πλασμίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το Att.luc το οποίο περιέχει το γονίδιο της Firefly λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου για το αντιμικροβιακό πεπτίδιο του μεταξοσκώληκα αττασίνη, που περιέχει στοιχεία πρόσδεσης Rel/NF-κB παραγόντων, στα οποία προσδένεται ο RelB (Tanaka et al. 2005). Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκε σύγκριση ανάμεσα στο πλασμίδιο αναφοράς Att.luc και στη μεταλλαγμένη μορφή του, ΔκB.Att.luc, η οποία φέρει έλλειψη σε μία αλληλουχία κB του υποκινητή του γονιδίου της αττασίνης (Tanaka et al. 2005). Ως παράγοντας εσωτερικού ελέγχου, για την κανονικοποίηση των διαφορών στην απόδοση της διαμόλυνσης ή στον αριθμό των κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pBmA.renilla το οποίο φέρει γονίδιο που κωδικοποιεί τη Renilla λουσιφεράση υπό τον υποκινητή ακτίνης του μεταξοσκώληκα. Επιπλέον, εξετάστηκε η επίδραση λιποπολυσακχαριτών από *E. coli* στα πλασμίδια αναφοράς.

Όπως φαίνεται στην **εικόνα 17**, διαπιστώθηκε ότι ο μεταγραφικός παράγοντας RelB είναι ενεργός εφόσον έχει την ικανότητα να επάγει το πλασμίδιο αναφοράς Att.luc. Παρουσία του RelB επάγεται και το μεταλλαγμένο πλασμίδιο αναφοράς ΔκB.Att.luc, γεγονός που υποδηλώνει ότι το τελευταίο διατηρεί τη λειτουργικότητά του παρά την έλλειψη που φέρει. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι το πλασμίδιο εσωτερικού ελέγχου, pBmA.renilla, παρά την αναμενόμενη συστατική του έκφραση (βρίσκεται υπό τον έλεγχο συστατικού υποκινητή, ετερόλογου ως προς το κυτταρικό σύστημα - υποκινητής ακτίνης του μεταξοσκώληκα), επηρεάζεται από τον μεταγραφικό παράγοντα RelB, όπως φαίνεται στο διάγραμμα της φωταύγειας Renilla (**εικόνα 17**). Τέλος, οι λιποπολυσακχαρίτες, σε

τελική συγκέντρωση 10 µg/ml, είχαν μια αμελητέα επίδραση στο πλασμίδιο αναφοράς αγρίου τύπου και στο πλασμίδιο εσωτερικού ελέγχου παρουσία του παράγοντα RelB.

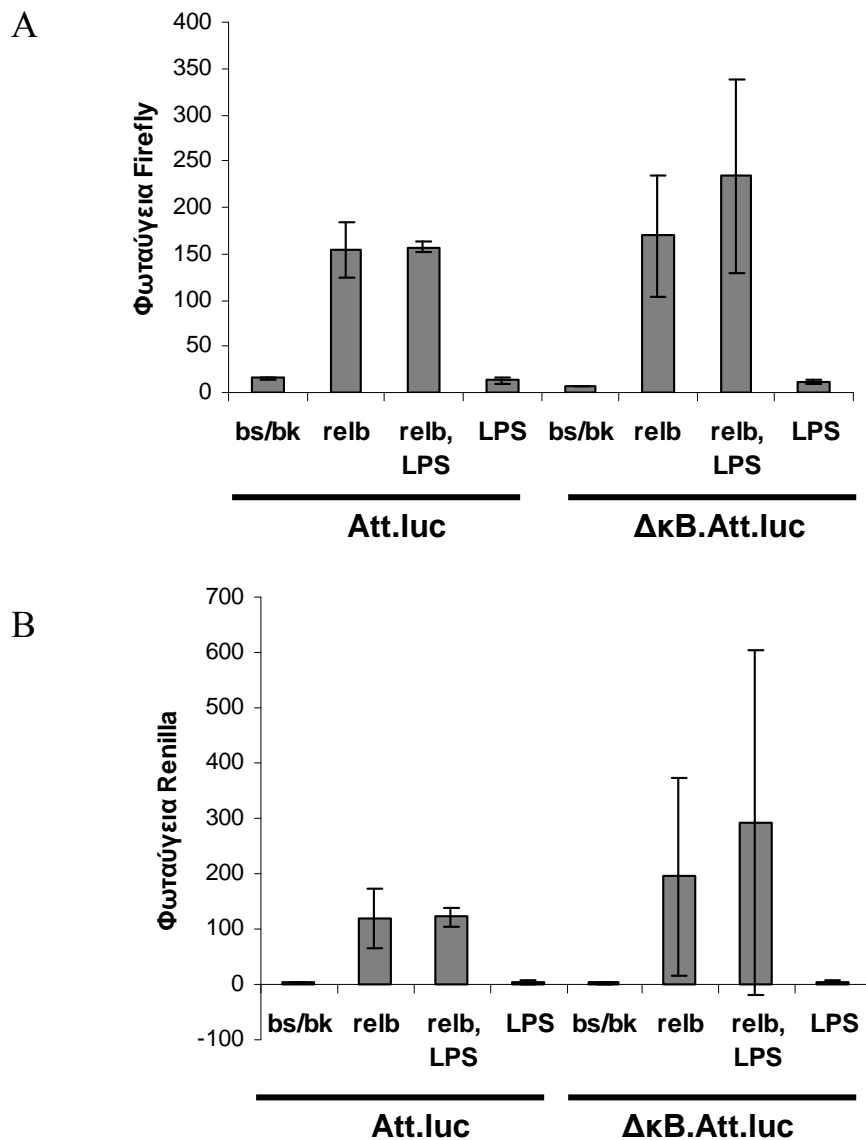


Εικόνα 17. Έλεγχος της επαγωγής των πλασμιδίων αναφοράς Att.luc και ΔκB.Att.luc από το μεταγραφικό παράγοντα RelB σε κύτταρα S2. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς Att.luc ή τη μεταλλαγμένη μορφή του, ΔκB.Att.luc, (50% του ολικού DNA), με το πλασμίδιο επαγωγής pPac.relb (25% του ολικού DNA) και με το πλασμίδιο κανονικοποίησης pBmA.renilla (3% του ολικού DNA). Το πλασμίδιο pBluescript (bs/bk) χρησιμοποιήθηκε για να συμπληρωθεί η σταθερή συνολική ποσότητα DNA ανά διαμόλυνση. Μία ημέρα μετά τη διαμόλυνση, σε ορισμένους πληθυσμούς κυττάρων έγινε προσθήκη λιποπολυσακχαριτών (LPS) σε τελική συγκέντρωση 10 µg/ml. Παρουσιάζονται ξεχωριστά οι μετρήσεις φωταύγειας από τα δύο είδη λουσιφεράσης, Firefly (A) και Renilla (B).

3.3.2 Κυτταρική σειρά Hi5 (Λεπιδόπτερα)

Αφού διαπιστώθηκε ότι ο RelB και το Att.luc λειτουργούν στα κύτταρα Διπτέρων (Tanaka et al. 2005), εξετάστηκε η λειτουργία των παραπάνω μορίων σε σύστημα λεπιδοπτέρων εντόμων, δηλαδή σε κάποιο σύστημα που προσεγγίζει περισσότερο τον φυσικό ξενιστή του ιού CcBV, το Λεπιδόπτερο *M. sexta*. Για την έκφραση του RelB χρησιμοποιήθηκε ο φορέας έκφρασης pEA, ο οποίος φέρει τον υποκινητή του γονιδίου της ακτίνης του μεταξοσκώληκα και είναι κατάλληλος για έκφραση σε κύτταρα Λεπιδοπτέρων, καθώς και τον ενισχυτή hr3 του βακτηριού BmNPV που ενισχύει την έκφραση του υποκινητή της ακτίνης (Lu et al. 1997). Ο έλεγχος της επαγωγής του πλασμιδίου αναφοράς Att.luc καθώς και του αντίστοιχου μεταλλαγμένου πλασμιδίου αναφοράς ΔκB.Att.luc από το πλασμίδιο pEA.relb έγινε σε κύτταρα Hi5.

Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων στην κυτταροσειρά Hi5 (**εικόνα 18**) επιβεβαιώθηκε η επαγωγή του πλασμιδίου αναφοράς Att.luc από τον RelB σε κύτταρα Λεπιδοπτέρων, ωστόσο παρατηρήθηκε επαγωγή και, επομένως, λειτουργικότητα και του μεταλλαγμένου πλασμιδίου ελέγχου ΔκB.Att.luc (όπως είχε δειχθεί και στην κυτταροσειρά S2). Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι οι λιποπολυσακχαρίτες σε συγκέντρωση 10 μg/ml δεν είχαν κάποια σημαντική επίδραση στο πλασμίδιο αναφοράς στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά, ενώ για μια ακόμη φορά παρατηρήθηκε η επαγωγή του πλασμιδίου κανονικοποίησης pBmA.renilla από τον φορέα έκφρασης του RelB. Λόγω της διαπίστωσης αυτής, στα επόμενα πειράματα αντικαταστάθηκε το γονίδιο της λουσιφεράσης Renilla με μια διαφορετική, ανασυνδυασμένη μορφή του ίδιου γονιδίου, η οποία έχει σχεδιαστεί από την εταιρεία Promega ώστε να έχει μειωμένες θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων εντός του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης και πιθανώς να έχει μεγαλύτερη αξιοπιστία σε σχέση με το φυσικό γονίδιο. Το πλασμίδιο που περιέχει αυτή τη μορφή του ΑΠΑ του γονιδίου *renilla luciferase* (phRL) περιλαμβάνει τον υποκινητή του ανθρώπινου κυτομεγαλοϊού (CMV).



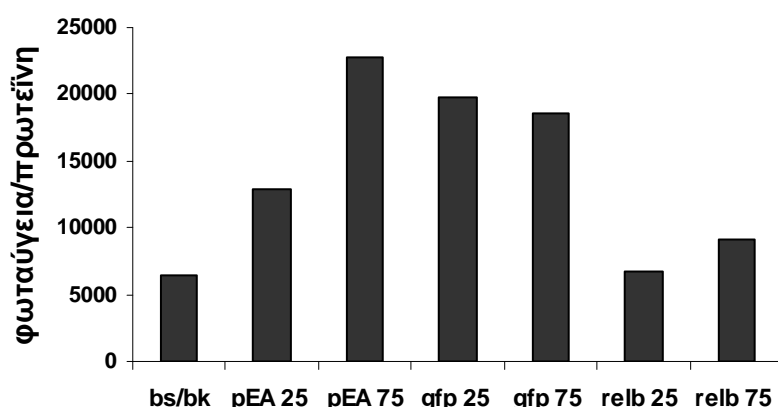
Εικόνα 18. Έλεγχος της επαγωγής των πλασμιδίων αναφοράς *Att.luc* και *ΔκB.Att.luc* από τον **RelB** στην κυτταρική σειρά **Hi5**. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς *Att.luc* ή τη μεταλλαγμένη μορφή *ΔκB.Att.luc* (50% του ολικού DNA), με το πλασμίδιο επαγωγής *pEA.relb* (25% του ολικού DNA) και με το πλασμίδιο κανονικοποίησης *pBmA.renilla* (3% του ολικού DNA). Το πλασμίδιο *pBluescript* χρησιμοποιήθηκε για να συμπληρωθεί η ίδια συνολική ποσότητα DNA ανά διαμόλυνση. Μία ημέρα μετά τη διαμόλυνση, ορισμένοι πληθυσμοί κυττάρων επώαστηκαν με λιποπολυσακχαρίτες (LPS) σε τελική συγκέντρωση 10 $\mu\text{g/ml}$. Οι μετρήσεις φωταύγειας από τους δύο τύπους λουσιφεράσης, *Firefly* (**A**) και *Renilla* (**B**), παρουσιάζονται σε ξεχωριστά γραφήματα. Οι τυπικές αποκλίσεις προέρχονται από διπλά δείγματα.

Τέλος, φαίνεται ότι ο μεταγραφικός παράγοντας **RelB** αυξάνει τη μεταγραφή του γονιδίου *renilla luciferase* κατά 24 φορές στα κύτταρα **Hi5** (**εικόνα 18B**), παρά το γεγονός ότι εκφράζεται από τον φορέα *pEA*, σε αντίθεση με μόνο 2,5 φορές στα κύτταρα **S2** (**εικόνα 17B**), όπου χρησιμοποιήθηκε ο φορέας *pRac-PL*. Η παρατήρηση αυτή έθεσε

ερωτήματα ως προς την επίδραση του ενισχυτή *hr3*, που βρίσκεται στον φορέα pEA, στη μεταγραφή γονιδίων *in trans* και μας οδήγησε στον έλεγχο του συγκεκριμένου φορέα.

3.3.3 Επίδραση του ενισχυτή *hr3* στην επαγωγή γονιδίων *in trans* σε κύτταρα *Hi5*

Προκειμένου να ελεγχθεί η ύπαρξη τυχόν επίδρασης του φορέα έκφρασης pEA, και συγκεκριμένα του ενισχυτή *hr3* που αυτός φέρει, εξετάστηκε η επαγωγή που προκαλεί ο άδειος φορέας έκφρασης pEA στο πλασμίδιο αναφοράς *Att.luc* σε σχέση με την επαγωγή που προκαλεί όταν αυτός εκφράζει τις πρωτεΐνες GFP ή RelB. Η σύγκριση παρουσιάζεται στην **εικόνα 19** και δείχνει ότι ο κενός φορέας pEA είναι ικανός να επάγει την παραγωγή φωταύγειας από το πλασμίδιο αναφοράς *in trans*. Επομένως ο συγκεκριμένος φορέας δεν ενδείκνυται για τα πειράματα ελέγχου της ειδικής επαγωγής του συστήματος από μεταγραφικούς παράγοντες Rel/NF-κB.



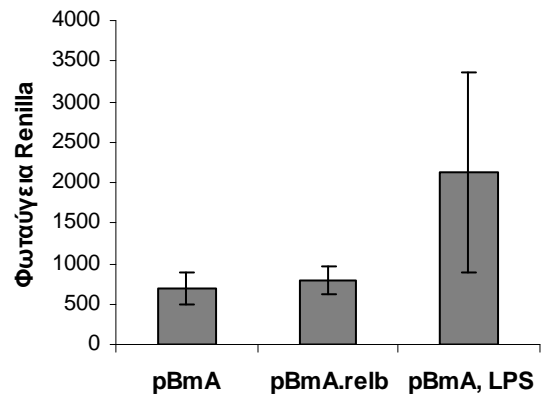
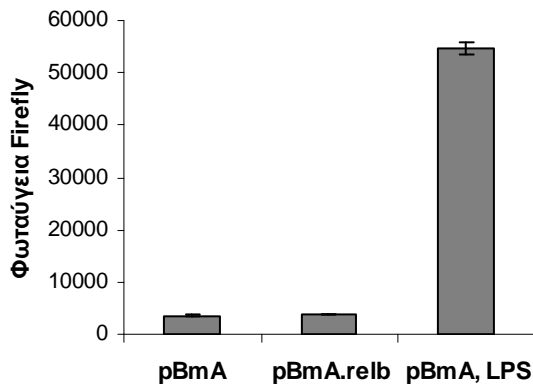
Εικόνα 19. Επίδραση του φορέα έκφρασης pEA στην παραγωγή φωταύγειας. Κύτταρα *Hi5* διαμολύνθηκαν με τον φορέα έκφρασης pEA είτε αυτός είναι άδειος είτε εκφράζει μία από τις δύο πρωτεΐνες RelB ή GFP. Κάθε ένα από τα τρία πλασμίδια καλύπτει το 25% ή το 75% του ολικού DNA της διαμόλυνσης, ανάλογα με το δείγμα. Επιπλέον, όλοι οι κυτταρικοί πληθυσμοί συνδιαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς *Att.luc* (25% του ολικού DNA). Το πλασμίδιο pBluescript (bs/bk) χρησίμευσε για τη συμπλήρωση του σταθερού συνολικού ποσού DNA των διαμολύνσεων. Το γράφημα παρουσιάζει την παραγόμενη φωταύγεια Firefly κανονικοποιημένη ως προς την ολική πρωτεΐνη κάθε δείγματος.

3.3.4 Λειτουργία του μεταγραφικού παράγοντα RelB όταν αυτός εκφράζεται από τον φορέα pBmA σε τρεις κυτταρικές σειρές λεπιδοπτέρων εντόμων

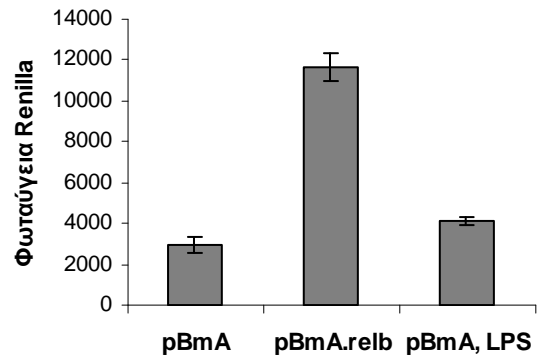
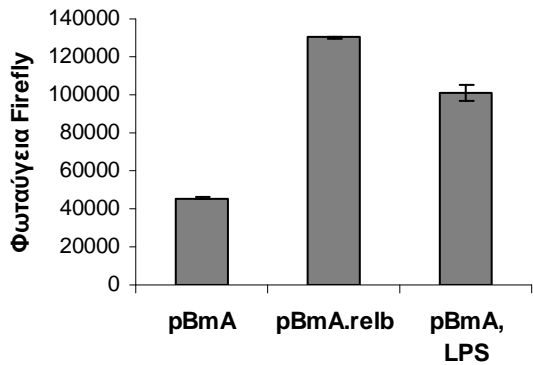
Καθώς πιστοποιήθηκε ότι ο ενισχυτής hr3 του βακτηριού BmNPV που βρίσκεται στον φορέα pEA επηρεάζει τη μεταγραφή του πλασμιδίου αναφοράς *in trans*, το γονίδιο *relb* υποκλωνοποιήθηκε στον φορέα pBmA, ο οποίος στερείται του ενισχυτή. Η λειτουργικότητα του νέου πλασμιδίου ελέγχθηκε σε τρεις κυτταρικές σειρές Λεπιδοπτέρων, Sf21 (από *Spodoptera frugiperda*), Hi5 (από *Trichoplusia ni*) και Bm5 (από *B. mori*) (εικόνα 20). Ως πλασμίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το Att.luc. Ως πλασμίδιο κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση της λουσιφεράσης Renilla το πλασμίδιο pHRL, που, όπως προαναφέρθηκε, είναι τεχνητά σχεδιασμένο και διαθέτει βελτιωμένα χαρακτηριστικά σε σχέση με το πλασμίδιο pBmA.renilla. Επιπλέον, ελέγχθηκε η επίδραση αυξημένης συγκέντρωσης λιποπολυσακχαριτών από *E. coli* (LPS 100 µg/ml) στους δύο τύπους λουσιφεράσης, Firefly και Renilla, στις τρεις κυτταρικές σειρές.

Βάσει των αποτελεσμάτων που συνοψίζονται στην εικόνα 20 παρατηρήθηκε ότι ο παράγοντας RelB εκφραζόμενος από τον φορέα pBmA επάγει το πλασμίδιο αναφοράς Att.luc μόνο σε μία από τις τρεις κυτταρικές σειρές, στην κυτταρική σειρά Hi5. Ωστόσο, στα ίδια κύτταρα ο RelB επηρεάζει και το πλασμίδιο κανονικοποίησης pHRL, δηλαδή επάγει την παραγωγή φωταύγειας και από τη λουσιφεράση Renilla. Επίσης, διαπιστώθηκε η ενεργοποίηση της μεταγραφής του πλασμιδίου αναφοράς Att.luc από τους λιποπολυσακχαρίτες σε συγκέντρωση 100 µg/ml τόσο στα κύτταρα Sf21 όσο και στα Hi5, με τους λιποπολυσακχαρίτες να επηρεάζουν παράλληλα και τη μεταγραφή του γονιδίου της λουσιφεράσης Renilla σε αυτές τις κυτταρικές σειρές. Αντίθετα, στα κύτταρα Bm5 δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση του μεταγραφικού παράγοντα RelB ή των λιποπολυσακχαριτών στα πλασμίδια αναφοράς και κανονικοποίησης. Συμπερασματικά, η κυτταρική σειρά Hi5 κρίθηκε και επιλέχθηκε ως η μόνη κατάλληλη σειρά για τη διεξαγωγή των λειτουργικών πειραμάτων με τον παράγοντα RelB αφού το πλασμίδιο αναφοράς Att.luc επάγεται μόνο σε αυτά τα κύτταρα. Όσον αφορά τη φωταύγεια που παράγεται από τη λουσιφεράση Renilla (πλασμίδιο pHRL), αυτή κρίθηκε γενικά ακατάλληλη ως παράγοντας κανονικοποίησης για τα λειτουργικά πειράματα.

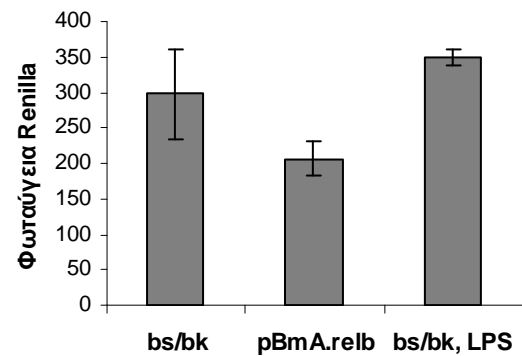
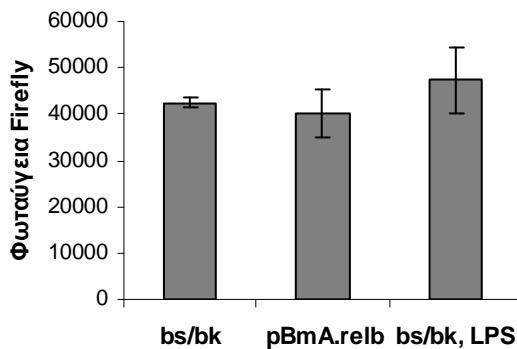
Sf21



Hi5



Bm5



Εικόνα 20. Έλεγχος επαγωγής του πλασμιδίου αναφοράς *Att.luc* από τον παράγοντα *RelB*, όταν αυτός εκφράζεται από τον φορέα έκφρασης *pBmA*, σε τρεις κυτταρικές σειρές λεπιδοπτέρων εντόμων. Κυτταρικές σειρές Sf21, Hi5 και Bm5 διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς *Att.luc* (24% του ολικού DNA), το πλασμίδιο έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα *RelB*, *pBmA.relb*, ή άδειο φορέα (*pBmA* ή *pBluescript*, *bs/bk*) (75% του ολικού DNA) και το πλασμίδιο κανονικοποίησης *phRL* (1% του ολικού DNA). Σε ορισμένους πληθυσμούς κυττάρων έγινε προσθήκη λιποπολυσακχαριτών, LPS, από *E. coli* σε τελική συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/ml}$. Τα γραφήματα στην αριστερή στήλη παρουσιάζουν τη φωταύγεια που παράγεται από τη λουσιφεράση Firefly (*Att.luc*), ενώ στη δεξιά στήλη παρουσιάζουν τη φωταύγεια που παράγεται από τη λουσιφεράση Renilla (*phRL*).

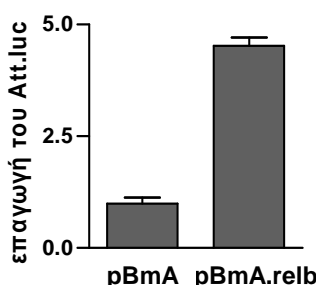
3.4 Επιλογή νέου παράγοντα εσωτερικού ελέγχου

Τα αποτελέσματα της προηγούμενης παραγράφου έδειξαν ότι η επίδραση του RelB, όταν αυτός εκφράζεται από τον φορέα έκφρασης pBmA, στο πλασμίδιο κανονικοποίησης pHRL στη σειρά Hi5 και η επίδραση των λιποπολυσακχαριτών στο ίδιο πλασμίδιο σε δύο κυτταρικές σειρές, Sf21 και Hi5, καθιστούν το pHRL ακατάλληλο ως πλασμίδιο κανονικοποίησης. Επομένως, αναζητήθηκε ένας διαφορετικός παράγοντας εσωτερικού ελέγχου της απόδοσης της διαμόλυνσης ανάμεσα στα δείγματα. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε, ως προς την καταλληλότητά του, ένα εναλλακτικό σύστημα που στηρίζεται στην επαγόμενη έκφραση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (Green Fluorescence Protein ή GFP). Βάση του συστήματος αποτέλεσε ο φορέας pBmbA/EcRE.gfp που περιέχει το γονίδιο *gfp* υπό τον έλεγχο του βασικού υποκινητή της ακτίνης του μεταξοσκώληκα σε συνδυασμό με επτά στοιχεία απόκρισης σε 20-υδροξυεκδυσόνη, ή 20HE, (ecdysone response element ή ERE). Απουσία 20HE, τα επίπεδα της έκφρασης της GFP παραμένουν χαμηλά και δεν παράγεται μετρήσιμη ποσότητα φθορισμού. Αντίθετα, παρουσία 20HE ή ενός μιμητικού αγωνιστή, όπως το tebufenozide (RH5992) ή το methoxyfenozide (RH2485) (Dhadialla et al. 1998), ενεργοποιείται ο υποκινητής με αποτέλεσμα την ενίσχυση της μεταγραφής του καθοδικού γονιδίου *gfp* κατά 1000-1800 φορές (Swevers et al. 2004). Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης GFP σε ένα τέτοιο σύστημα είναι πολύ υψηλά και μετρήσιμα με φθορισμόμετρο και δεν επηρεάζονται από τον RelB ή τους λιποπολυσακχαρίτες. Επομένως η συγκεκριμένη γονιδιακή κατασκευή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της απόδοσης της διαμόλυνσης και την κανονικοποίηση των μετρήσεων της φωταύγειας.

Πειράματα στη σειρά Sf21 έδειξαν ότι τα ανάλογα της εκδυσόνης επηρεάζουν τη φωταύγεια, για το λόγο αυτό η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε μετά από κάθε διαμόλυνση περιλαμβάνει χωρισμό κάθε πληθυσμού κυττάρων σε δύο ίσα μέρη. Στο πρώτο γίνεται προσθήκη του αναλόγου 20HE για την επαγωγή και μέτρηση του φθορισμού, ενώ στο δεύτερο λαμβάνει χώρα η μέτρηση της φωταύγειας μετά από λύση των κυττάρων.

3.5 Επαγωγή γονιδίων που κωδικοποιούν αντιμικροβιακά πεπτίδια από τους παράγοντες RelB και Relish1 του *B. mori*

Χρησιμοποιώντας τον φθορισμό για την κανονικοποίηση των διαφορών ανάμεσα στα δείγματα, ελέγχθηκε η επαγωγή του πλασμιδίου αναφοράς Att.luc από τον παράγοντα RelB εκφραζόμενο από τον φορέα pBmA στην κυτταρική σειρά Hi5. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα κατάλληλα πλασμίδια για τον έλεγχο της μεταγραφής, Att.luc, την επαγωγή της μεταγραφής, pBmA.relb, και την κανονικοποίηση, pBmbA/EcRE.gfp, και μία ημέρα αργότερα ακολούθησε χωρισμός κάθε κυτταρικού πληθυσμού σε δύο μέρη. Στο πρώτο μέρος προστέθηκε ανάλογο της 20-υδροξυεκεδυσόνης και 24 ώρες μετά μετρήθηκε ο παραγόμενος φθορισμός μέσω επαγωγής της GFP, ενώ στο δεύτερο μέρος μετρήθηκε η εκπεμπόμενη φωταύγεια από τη λουσιφεράση Firefly. Η κανονικοποίηση της φωταύγειας έγινε διαιρώντας τις μετρήσεις φωταύγειας με τις αντίστοιχες τιμές φθορισμού. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε ο λόγος της κανονικοποιημένης φωταύγειας παρουσία του μεταγραφικού παράγοντα ως προς την κανονικοποιημένη φωταύγεια απουσία αυτού, προκειμένου να υπολογιστεί η επαγωγή (induction fold) του πλασμιδίου αναφοράς (εικόνα 21). Συμπερασματικά, το πλασμίδιο αναφοράς Att.luc επάγεται πέντε φορές από τον μεταγραφικό παράγοντα RelB στο συγκεκριμένο σύστημα.



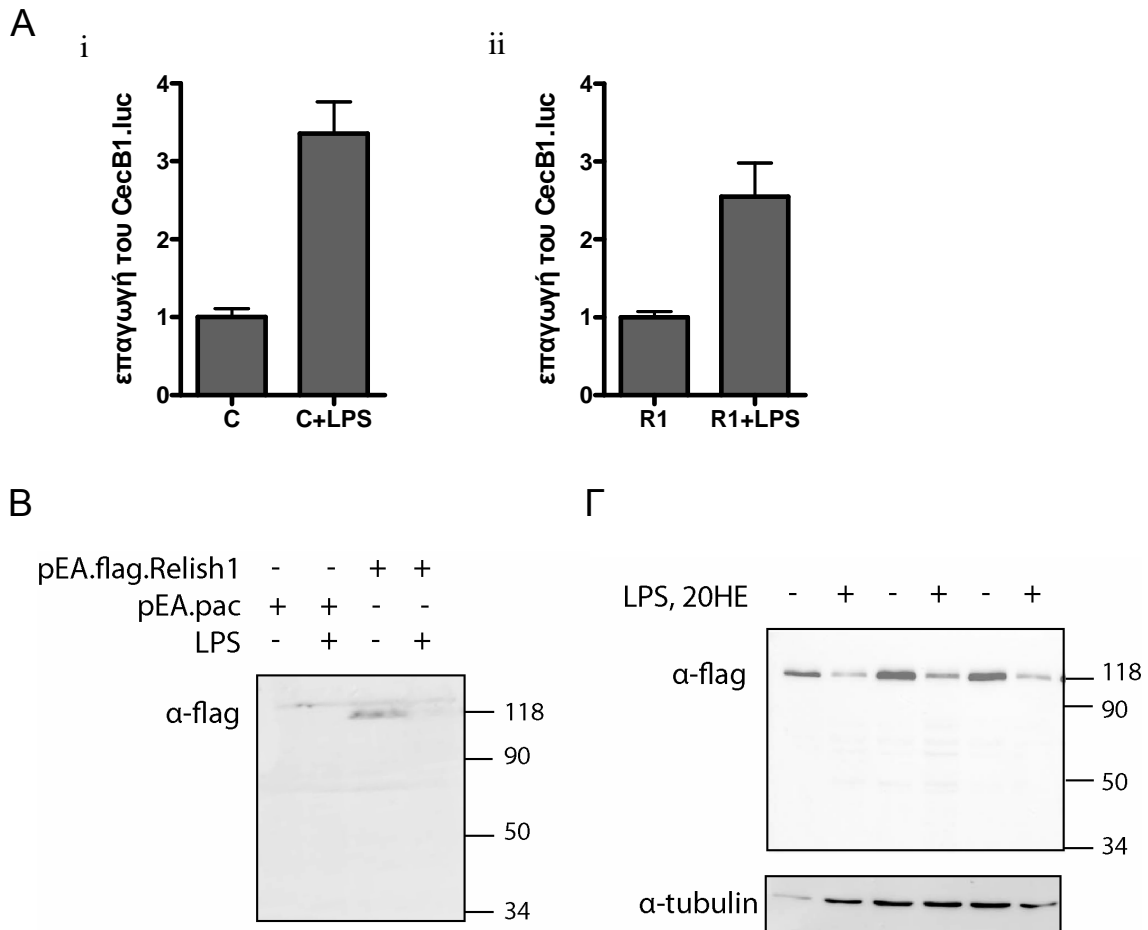
Εικόνα 21. Επαγωγή του πλασμιδίου Att.luc από το μεταγραφικό παράγοντα RelB σε κύτταρα Hi5. Παροδική διαμόλυνση κυττάρων Hi5 με το πλασμίδιο pBmA.relb που κωδικοποιεί τον RelB, το πλασμίδιο αναφοράς Att.luc και το πλασμίδιο κανονικοποίησης pBmbA/EcRE.gfp. Ο RelB προκαλεί την παραγωγή φωταύγειας από την πρωτεΐνη αναφοράς, λουσιφεράση Firefly, το γονίδιο της οποίας βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή της αττασίνης (Att.luc).

Επιπλέον, ελέγχθηκε η λειτουργικότητα ενός δεύτερου μεταγραφικού παράγοντα της ευρύτερης οικογένειας Rel/NF-κB παραγόντων, του Relish1 του μεταξοσκώληκα, ο οποίος δρα στην Imd οδό μεταγωγής σήματος και είναι ομόλογος του Relish της *Drosophila* (Tanaka et al. 2007). Ο Relish1 περιέχει μια λειτουργική δομική μονάδα RHD (Rel Homology Domain) και μια δομική μονάδα επαναλήψεων αγκυρίνης η οποία δρα ανασταλτικά στην περιοχή RHD καθιστώντας τον Relish1 ανενεργό (Tanaka et al. 2007).

Ελέγχθηκε η δραστικότητα τόσο του πλήρους παράγοντα Relish1, όσο και της ελλειμματικής μορφής του, Relish1-d2 ή R1d2, η οποία στερείται των επαναλήψεων αγκυρίνης με αποτέλεσμα να είναι συνεχώς ενεργή. Καθώς έχειδειχθεί ότι η περιοχή RHD του Relish1 μπορεί να προσδένεται σε κB αλληλουχίες στους υποκινητές των γονιδίων που κωδικοποιούν τα αντιμικροβιακά πεπτίδια κεκροπίνη B1 και αττασίνη του μεταξοσκώληκα (Tanaka et al. 2007), ως πλασμίδιο ελέγχου της λειτουργίας των δύο μορφών του Relish1 χρησιμοποιήθηκε το CecB1.luc, που φέρει το γονίδιο της Firefly λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *cecropin B1*.

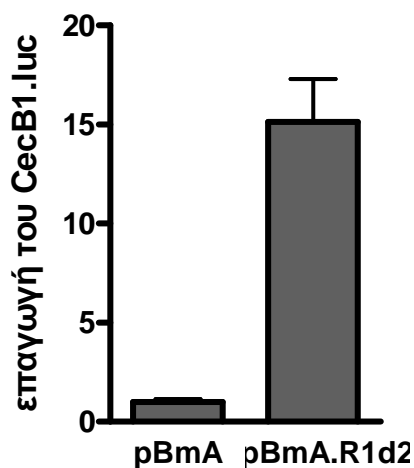
Προκειμένου να εκφραστεί ο πλήρους μήκους μεταγραφικός παράγοντας Relish1 σε κύτταρα Hi5, το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου εκφράστηκε από τον φορέα pEA.flag. Για να εξαλειφθεί η μη ειδική επαγωγή που προκαλεί ο ενισχυτής hr3, ο οποίος περιέχεται στον φορέα pEA.flag, κύτταρα-αρνητικοί μάρτυρες διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pEA.pac ως πλασμίδιο σύγκρισης. Οι κυτταρικοί πληθυσμοί που διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pEA.flag.relish1 ή pEA.pac επώαστηκαν με λιποπολυσακχαρίτες (LPS) από *E. coli* οι οποίοι αναμένεται να ενεργοποιήσουν τον Relish1, αφού έχειδειχθεί ότι ενεργοποιούν τον ορθόλογο μεταγραφικό παράγοντα DmRelish της *Drosophila* σε κύτταρα Διπτέρων mbn-2 (Stoven et al. 2000) και επάγουν τη σηματοδοτική οδό Imd στην κυτταρική σειρά της *Drosophila* S2* (Kaneko et al. 2004). Η κανονικοποιημένη φωταύγεια παρουσία LPS διαιρέθηκε ως προς την κανονικοποιημένη φωταύγεια απουσία LPS ώστε να εκτιμηθεί η επαγωγή του πλασμιδίου αναφοράς παρουσία του ερεθίσματος. Όπως δείχνει η **εικόνα 22A**, οι λιποπολυσακχαρίτες προκάλεσαν αύξηση στην παραγόμενη φωταύγεια, τόσο στα κύτταρα που εκφράζουν τον Relish1 όσο και στα κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη PAC, με στατιστικά σημαντικό τρόπο βάσει της δοκιμασίας Student's t-test με διόρθωση κατά Welch (P value=0.0095 και P value=0.0114, αντίστοιχα). Επομένως, τα κύτταρα Hi5 ήταν δεκτικά στο ερέθισμα. Ωστόσο, η επαγωγή στα δείγματα έκφρασης του Relish1 και στα δείγματα έκφρασης της πρωτεΐνης PAC δεν παρουσιάζει διαφορά, δηλαδή η παρουσία του Relish1 δεν προκαλεί ειδική αύξηση στη μεταγραφή του γονιδίου που κωδικοποιεί τη Firefly λουσιφεράση. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το μόριο Relish1 στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά δεν ενεργοποιείται παρουσία των λιποπολυσακχαριτών. Ανάλυση των δειγμάτων με ανοσοαποτύπωση κατά Western (**εικόνα 22B, Γ**) έδειξε ότι ο σημασμένος με επίτοπο flag Relish1 εκφράζεται επιτυχώς και ότι η ποσότητα της πλήρους μήκους πρωτεΐνης μειώνεται τόσο παρουσία LPS όσο και παρουσία συνδυασμού LPS με 20HE [η επώαση με 20HE καθιστά τα κύτταρα πιο δεκτικά σε LPS (Flatt et al. 2008)], χωρίς ωστόσο να ανιχνεύεται η

ενεργός μορφή του παράγοντα στα 68 kDa. Επομένως, σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα η σειρά Hi5 ανταποκρίνεται στους λιποπολυσακχαρίτες (πιθανά μέσω ενεργοποίησης κάποιων ενδογενών υποδοχέων του LPS), δεν είναι όμως κατάλληλη για την ενεργοποίηση του Relish1, πιθανώς λόγω της έλλειψης κάποιων απαραίτητων ενδιάμεσων παραγόντων της οδού μεταγωγής σήματος Imd.



Εικόνα 22. Έλεγχος της λειτουργικότητας του Relish1 παρουσία ερεθίσματος (LPS). **A.** Κύτταρα Hi5 (5×10^5) διαμολύνθηκαν με 100 ng πλασμίδιου αναφοράς CecB1.luc, 50 ng πλασμίδιου κανονικοποίησης pBmbA/EcRE.gfp και 350 ng pEA.pac (**i**) ή pEA.flag.relish1 (**ii**). Τα γραφήματα παρουσιάζουν την κανονικοποιημένη φωταύγεια κάθε δείγματος διαιρεμένη με την κανονικοποιημένη φωταύγεια του αντίστοιχου δείγματος απουσία λιποπολυσακχαριτών (LPS). Οι γραμμές τυπικής απόκλισης προέρχονται από σειρά δύο πειραμάτων με επαναλήψεις. **B, Γ.** Ανάλυση κατά Western των κυτταρικών λυμάτων που εκφράζουν τον πλήρους μήκους παράγοντα Relish1 και έχουν υποστεί κατεργασία με LPS (**B**) ή 20HE και LPS (**Γ**). Η έκφραση του Relish1 σημασμένου με τον επίτοπο flag ανιχνεύτηκε με μονοκλωνικό αντίσωμα anti-flag και αντίσωμα anti-mouse-HRP. Επιπλέον, στο Γ ανιχνεύεται η τουμπουλίνη για τον έλεγχο της ποσότητας των δειγμάτων.

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η ικανότητα της ελλειμματικής μορφής του Relish1 (Tanaka et al. 2007), R1d2, όταν αυτή εκφράζεται από το φορέα pBmA, να επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς *firefly luciferase* από τον φορέα CecB1.luc. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pBmA.R1d2 ή με τον άδειο φορέα pBmA (αρνητικός μάρτυρας), το πλασμίδιο αναφοράς CecB1.luc και το πλασμίδιο κανονικοποίησης pBmbA/EcRE.gfp. Καθώς η ελλειμματική μορφή του Relish1 είναι ενεργή, δεν απαιτείται προσθήκη μικροβιακού ερεθίσματος. Η επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου αναφοράς υπολογίστηκε από το λόγο της κανονικοποιημένης φωταύγειας παρουσία του μεταγραφικού παράγοντα R1d2 ως προς την αντίστοιχη απουσία του R1d2. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας R1d2 προκαλεί την επαγωγή της φωταύγειας από το πλασμίδιο αναφοράς CecB1.luc 15 φορές (εικόνα 23).



Εικόνα 23. Έλεγχος της λειτουργικότητας της ελλειμματικής μορφής του Relish1, R1d2. Κύτταρα Hi5 (5×10^5) διαμολύνθηκαν με 100 ng πλασμιδίου αναφοράς pGL3.cecB1.luc, 50 ng του πλασμιδίου εσωτερικού ελέγχου pBmbA/EcRE.gfp, 200 ng pEA.pac και 150 ng του φορέα pBmA.R1d2 ή pBmA. Το γονίδιο αναφοράς, *firefly luciferase*, του πλασμιδίου CecB1.luc ελέγχεται από τον υποκινητή της κεκροπίνης B1 και μεταγράφεται από τον συστατικά ενεργό μεταγραφικό παράγοντα του μεταξοσκώληκα, R1d2. Το γράφημα παρουσιάζει την κανονικοποιημένη φωταύγεια διαιρεμένη με την αντίστοιχη του δείγματος αρνητικού ελέγχου (απουσία μεταγραφικού παράγοντα). Οι γραμμές τυπικής απόκλισης προέρχονται από τρία πειράματα με τρεις επαναλήψεις το καθένα.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, συμπεραίνουμε ότι η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα RelB και της συστατικά ενεργούς μορφής R1d2 του Relish1 του *B. mori* προκαλούν αύξηση της φωταύγειας από τα πλασμίδια αναφοράς κατά 5 και 15 φορές, αντίστοιχα. Επομένως, αυτοί οι παράγοντες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μεταγραφικοί ρυθμιστές σε κύτταρα Hi5 προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση των ικόν πρωτεϊνών Ank.

3.6 Η επίδραση των πρωτεϊνών Ank στη μεταγραφική ικανότητα των μεταγραφικών παραγόντων RelB και Relish1

3.6.1 Η επίδραση των πρωτεϊνών Ank στη μεταγραφική ικανότητα του RelB

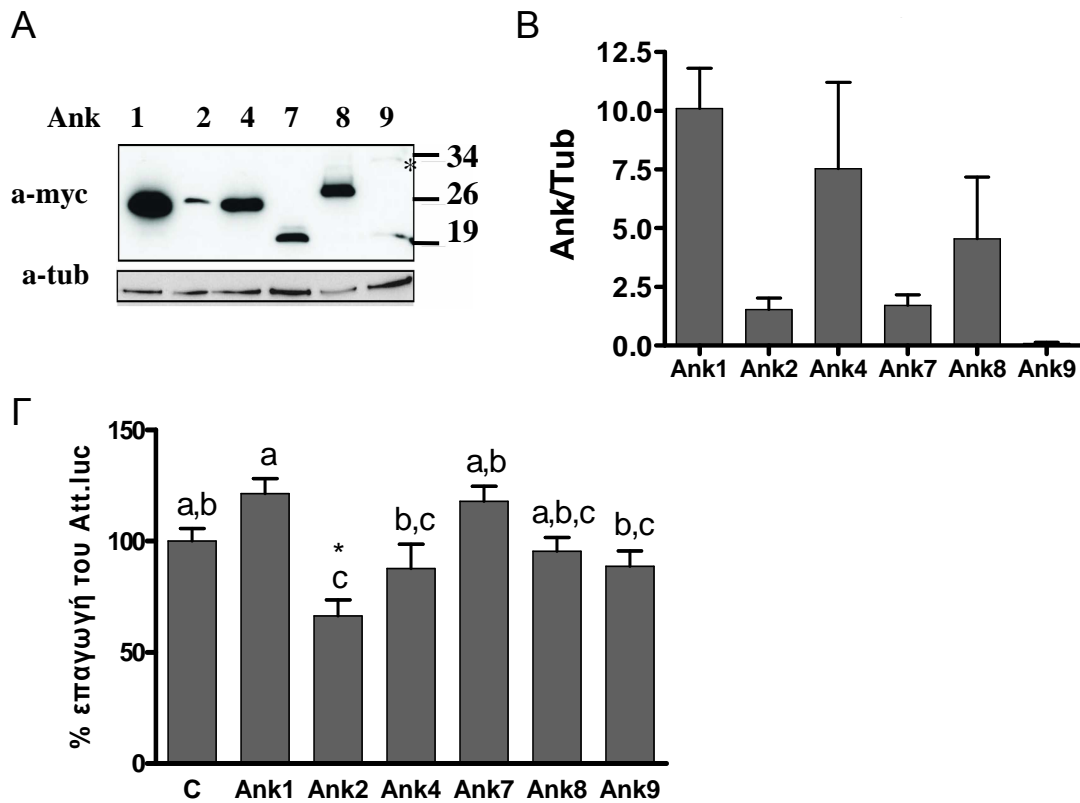
Προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση των πρωτεϊνών Ank στη μεταγραφική ικανότητα των παραγόντων RelB και R1d2, τα γονίδια των ικών πρωτεϊνών Ank -1, 2, 4, 7, 8, 9 υποκλωνοποιήθηκαν στον φορέα pEA.myc-his και ελέγχθηκε η έκφρασή τους με ανοσοαποτύπωση κατά Western (τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών Ank μαζί με τους επιτόπους παρουσιάζονται στον **πίνακα 7**). Όπως φαίνεται στις **εικόνες 24Α, Β**, τα επίπεδα έκφρασης των ικών πρωτεϊνών βρέθηκαν να διαφέρουν αρκετά μεταξύ τους, με την Ank9 να έχει ιδιαίτερα χαμηλή έκφραση, τις Ank -2, 7 λίγο υψηλότερη και τις Ank -1, 4 και 8 να εκφράζονται σε ικανοποιητικά υψηλά επίπεδα.

Στα πλαίσια των λειτουργικών πειραμάτων με το μεταγραφικό παράγοντα RelB, έγιναν παροδικές διαμολύνσεις με το πλασμίδιο αναφοράς για τον έλεγχο της μεταγραφής Att.luc, το πλασμίδιο έκφρασης του RelB pBmA.relb, το πλασμίδιο κανονικοποίησης pBmbA/EcRE.gfp και καθένα από τα πλασμίδια έκφρασης των ικών πρωτεϊνών pEA.ank.myc-his. Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα όπου το πλασμίδιο pEA.ank.myc-his είχε αντικατασταθεί από το πλασμίδιο pEA.pac, το οποίο κωδικοποιεί την ακετυλοτρανσφεράση της πουρομυκίνης (PAC), πρωτεΐνη που δεν επηρεάζει το γονίδιο αναφοράς. Η πειραματική διαδικασία ακολούθησε το πρότυπο των πειραμάτων ελέγχου της επαγωγής. Κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, η κανονικοποιημένη φωταύγεια από τα δείγματα έκφρασης των πρωτεϊνών Ank συγκρίνεται με την αντίστοιχη του δείγματος ελέγχου, όπου εκφράζεται η πρωτεΐνη PAC. Η στατιστική ανάλυση με ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA) έδειξε ότι ανάμεσα στους κυτταρικούς πληθυσμούς που εκφράζουν διαφορετικές πρωτεΐνες, Ank-1, 2, 4, 7, 8, 9 ή PAC, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (όπως δηλώνει η παράμετρος $F_{6,82} = 6,515$ η οποία συγκρίνεται με την κατάλληλη τιμή του **πίνακα Π1**) με επίπεδο σημαντικότητας $P < 0,0001$. Για τη συγκεκριμενοποίηση των στατιστικά σημαντικών διαφορών έγινε δεύτερη στατιστική δοκιμασία, η δοκιμασία πολλαπλών συγκρίσεων κατά Tukey's, η οποία έδειξε ότι στατιστικά σημαντική μείωση στη μεταγραφική ενεργότητα του RelB παρατηρείται μόνο στα κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη Ank2. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 24Γ**, η Ank2 προκάλεσε μια αναστολή 34%, ενώ τα υπόλοιπα μέλη

της οικογένειας Ank του CcBV που εξετάστηκαν δεν επέφεραν σημαντικές αλλαγές στη μετρούμενη φωταύγεια υπό αυτές τις συνθήκες, παρά το γεγονός ότι τέσσερα μέλη παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης από την Ank2 (εικόνες 24A, B). Ωστόσο, η πολύ χαμηλή έκφραση της Ank9 σε συνδυασμό με τη μείωση που επιφέρει στη φωταύγεια δεν αποκλείει το ενδεχόμενο και η Ank9 να προκαλεί στατιστικά σημαντική αναστολή της μεταγραφής, αν εκφραστεί σε μεγαλύτερη ποσότητα.

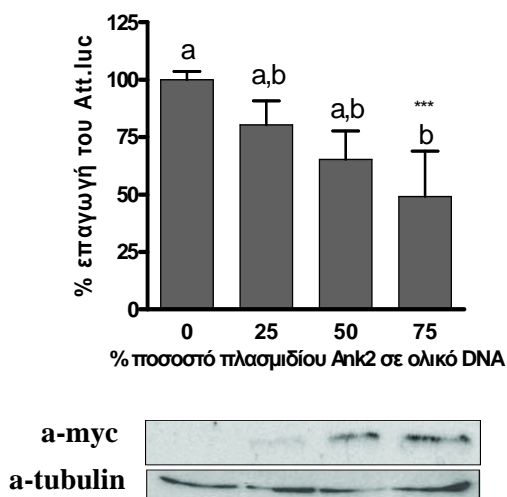
Πρωτεΐνη	Μοριακό βάρος
Ank1	21.3
Ank2	21.9
Ank4	21.6
Ank7	15.3
Ank8	22.3
Ank9	24.7

Πίνακας 7. Τα προβλεπόμενα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών Ank.myc-his με βάση το υπολογιστικό εργαλείο Compute pI/MW (Gasteiger et al. 2003).



Εικόνα 24. Η επίδραση της έκφρασης των έξι πρωτεϊνών Ank του ιού CcBV στη μεταγραφική ενεργότητα του RelB. **A.** Ενδεικτικός έλεγχος της έκφρασης των πρωτεϊνών Ank.myc-his σε κυτταρικά λύματα των πειραμάτων φωταύγειας μετά από ανοσοαποτύπωση κατά Western. Η ανίχνευση έγινε με το αντίσωμα anti-myc (άνω πλαίσιο), ενώ η τουμπουλίνη χρησίμευσε στον έλεγχο της φόρτωσης (κάτω πλαίσιο). Η θέση της Ank9 έχει επισημανθεί με αστερίσκο. **B.** Πυκνομέτρηση των ζωνών που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες Ank.myc-his, όπως αυτές ανιχνεύονται στα κυτταρικά λύματα των λειτουργικών πειραμάτων, σε σχέση με αυτές της ενδογενούς τουμπουλίνης των ίδιων δειγμάτων. Το γράφημα απεικονίζει το μέσο όρο από την ανάλυση δύο μεμβρανών από δύο διαφορετικά πειράματα. **Γ.** Παραγωγή φωταύγειας από το πλασμίδιο αναφοράς Att.luc παρουσία των έξι πρωτεϊνών Ank.myc-his. Πέραν των πλασμιδίων έκφρασης των ικών πρωτεϊνών και του πλασμιδίου Att.luc, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν επιπρόσθετα με το πλασμίδιο pBmA.relB που κωδικοποιεί τον RelB, και το πλασμίδιο κανονικοποίησης pBmbA/EcRE.gfp. Η φωταύγεια έχει κανονικοποιηθεί ως προς τις τιμές φθορισμού και εκφραστεί ως ποσοστό της αντίστοιχης φωταύγειας του δείγματος ελέγχου, C (C=κύτταρα που παράγουν την πρωτεΐνη μάρτυρα PAC). Το γράφημα παρουσιάζει τις μέσες τιμές της κανονικοποιημένης φωταύγειας (\pm SE, τυπικό σφάλμα) από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Όπως υποδεικνύουν τα γράμματα πάνω από τις στήλες, μόνο η Ank2 έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στο μεταγραφικό παράγοντα RelB. Ο αστερίσκος δηλώνει το επίπεδο σημαντικότητας (* = $P < 0,05$).

Στη συνέχεια, εξετάστηκε κατά πόσο η επιφερόμενη από την πρωτεΐνη Ank2 μείωση της μεταγραφής του γονιδίου αναφοράς είναι ειδική. Για το λόγο αυτό, κύτταρα διαμολύνθηκαν με αυξανόμενες ποσότητες του πλασμιδίου που εκφράζει τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 25**, τα αποτελέσματα αυτής της δοκιμασίας έδειξαν ότι η αυξανόμενη έκφραση της Ank2 επέφερε αυξανόμενη αναστολή της μεταγραφικής λειτουργίας του RelB, επομένως η δράση της πρωτεΐνης Ank2 στη μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς είναι ειδική. Η δοκιμασία Kruskal-Wallis με επίπεδο σημαντικότητας 0,0020 (P value = 0,0020) επεσήμανε στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις διάμεσες τιμές κανονικοποιημένης φωταύγειας των εξεταζόμενων κυτταρικών πληθυσμών (η τιμή KW statistic = 14,78 συγκρίνεται με την κατάλληλη τιμή του **πίνακα Π2**). Με την post-hoc δοκιμασία Dunn όμως, φαίνεται ότι στατιστικά σημαντική είναι η μείωση μόνο παρουσία της υψηλότερης ποσότητας (75%) του πλασμιδίου έκφρασης της Ank2.

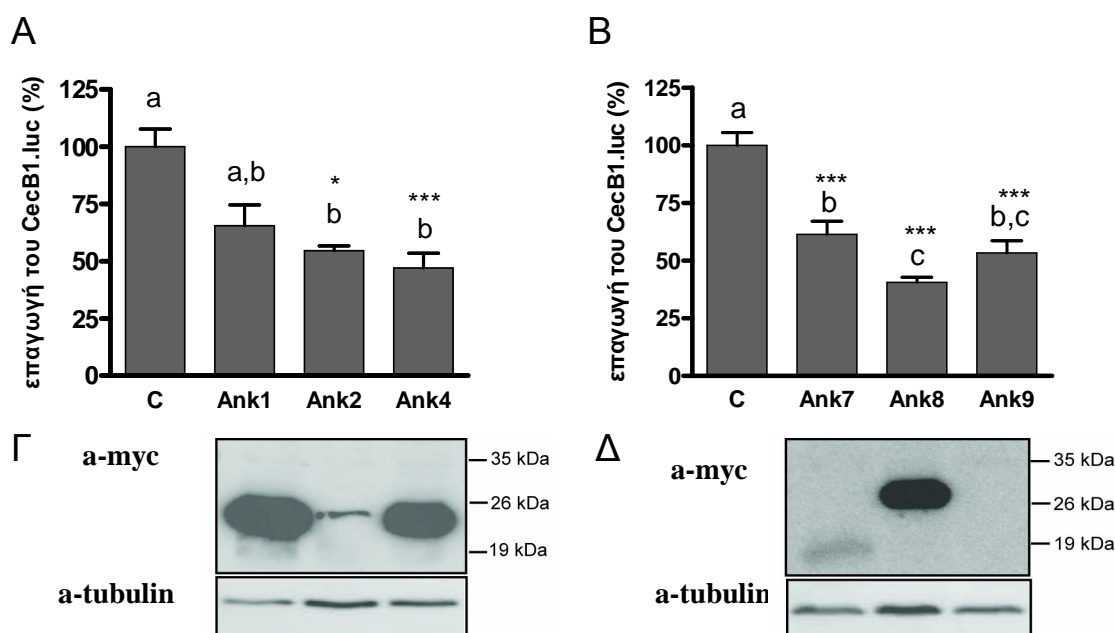


Εικόνα 25. Δοσοεξαρτώμενη αναστολή της μεταγραφικής ικανότητας του RelB από την πρωτεΐνη Ank2. Το γράφημα δείχνει τις διάμεσες τιμές κανονικοποιημένης φωταύγειας από τρία ανεξάρτητα πειράματα με διπλά δείγματα. Στο κάτω μέρος του γραφήματος παρουσιάζεται η αυξανόμενη παραγωγή της πρωτεΐνης Ank2.myc-his με ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-myc (άνω πλαίσιο). Η τουμπουλίνη χρησιμεύει στον έλεγχο της ποσότητας των πρωτεϊνικών δειγμάτων (κάτω πλαίσιο). Οι αστερίσκοι δηλώνουν το επίπεδο σημαντικότητας (*** = P < 0,001).

3.6.2 Η επίδραση των πρωτεϊνών Ank στη μεταγραφική ικανότητα του R1d2

Η επίδραση της έκφρασης των διαφορετικών πρωτεϊνών Ank του CcBV στη μεταγραφική λειτουργία του R1d2, την ενεργή μορφή του μεταγραφικού παράγοντα Relish1 που συμμετέχει στην οδό μεταγωγής σήματος των εντόμων Imd, εξετάστηκε με παροδικές διαμολύνσεις κυττάρων Hi5 με το πλασμίδιο αναφοράς CecB1.luc, το πλασμίδιο έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα R1d2, pBmA.R1d2, το πλασμίδιο pBmbA/EcRE.gfp καθώς και τα πλασμίδια έκφρασης pEA.ank.myc-his των πρωτεϊνών Ank (CcBV Ank -1, 2, 4, 7, 8 και 9). Οι διαμολύνσεις διαχωρίστηκαν σε δύο ομάδες (Ank -1, 2, 4 και Ank -7, 8, 9) και τα συνολικά αποτελέσματα των λειτουργικών δοκιμών, που συνοψίζονται στα διαγράμματα Α και Β της **εικόνας 26**, δείχνουν ότι όλα τα μέλη της οικογένειας επέφεραν μείωση της φωταύγειας.

Στην πρώτη ομάδα πρωτεϊνών, Ank -1, 2, 4, με βάση τη δοκιμασία Kruskal-Wallis (KW statistic= 21.09) βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,0001 (P value= 0,0001) μεταξύ των διάμεσων τιμών κανονικοποιημένης φωταύγειας των τεσσάρων κυτταρικών πληθυσμών που εκφράζουν τις τρεις πρωτεΐνες Ank ή την πρωτεΐνη ελέγχου. Η post-hoc δοκιμασία Dunn's test, που ακολουθεί τη δοκιμασία Kruskal-Wallis και συγκεκριμενοποιεί τις στατιστικά σημαντικές διαφορές, έδειξε ότι, σε σύγκριση με την πρωτεΐνη ελέγχου PAC, οι πρωτεΐνες Ank2 και Ank4 έχουν μια στατιστικά σημαντική επίδραση στο μεταγραφικό παράγοντα R1d2, 45% και 53% αντίστοιχα, ενώ η επίδραση της Ank1, 35%, δε βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική (**εικόνα 26A**). Στη δεύτερη ομάδα πρωτεϊνών, Ank -7, 8, 9, η ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA) έδειξε την ύπαρξη στατιστικά σημαντικών διαφορών ($F_{3,31} = 28,91$; $P < 0,0001$) ανάμεσα στις μέσες τιμές κανονικοποιημένης φωταύγειας των διαφορετικών πληθυσμών, όπως αυτές παρουσιάζονται στο διάγραμμα της **εικόνας 26B**. Η post hoc δοκιμασία πολλαπλών συγκρίσεων κατά Tukey's έδειξε ότι και οι τρεις πρωτεΐνες είχαν σημαντική επίδραση στον μεταγραφικό παράγοντα R1d2. Η προκαλούμενη μείωση της φωταύγειας από τις Ank -7, 8, 9 ήταν 39%, 60% και 47%, αντίστοιχα. Συμπερασματικά, για το σύνολο των εξετασθέντων μελών της οικογένειας των CcBV Ank πρωτεϊνών παρατηρείται μείωση της εκπεμπόμενης φωταύγειας από 35% έως 60% σε σχέση με την πρωτεΐνη-μάρτυρα PAC.



Εικόνα 26. Η επίδραση της έκφρασης των έξι πρωτεϊνών Ank του CcBV στη λειτουργικότητα του παράγοντα R1d2. Ο R1d2 εκφράστηκε από τον φορέα pBmA. Ως πλασμίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το CecB1.luc και ως παράγοντας κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη GFP. Η επίδραση της έκφρασης των ικόν πρωτεϊνών υπολογίζεται από την παρατηρούμενη μείωση στην κανονικοποιημένη φωταύγεια. Η τελευταία εκφράζεται ως ποσοστό της αντίστοιχης φωταύγειας του δείγματος ελέγχου, C (όπου C = δείγμα έκφρασης της ουδέτερης πρωτεΐνης, PAC). **A.** Η επίδραση των πρωτεϊνών Ank 1, 2 και 4 σημασμένων με τον επίτοπο myc-his. Το γράφημα παρουσιάζει τις διάμεσες τιμές (median ± IQR) της ποσοστιαίας κανονικοποιημένης φωταύγειας από τρία ανεξάρτητα πειράματα, το καθένα με τριπλά δείγματα. **B.** Η επίδραση των πρωτεϊνών Ank.myc-his 7, 8 και 9. Το γράφημα παρουσιάζει τις μέσες τιμές (±SE, τυπικό σφάλμα) της ποσοστιαίας κανονικοποιημένης φωταύγειας από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Στα **A, B** τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν κυτταρικούς πληθυσμούς με στατιστικά σημαντικές διαφορές και οι αστερίσκοι το επίπεδο σημαντικότητας της εκάστοτε διαφοράς από το δείγμα ελέγχου (* = $P < 0,05$, *** = $P < 0,001$). **Γ, Δ.** Ανίχνευση με ανοσοαποτύπωση κατά Western των πρωτεϊνών Ank.myc-his στα κυτταρικά λύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις μετρήσεις φωταύγειας. Η ανίχνευση έγινε με αντίσωμα anti-myc (άνω πλαίσιο), ενώ η τουμπουλίνη χρησίμευσε για τον έλεγχο της ποσότητας των αναλυθέντων δειγμάτων (κάτω πλαίσιο).

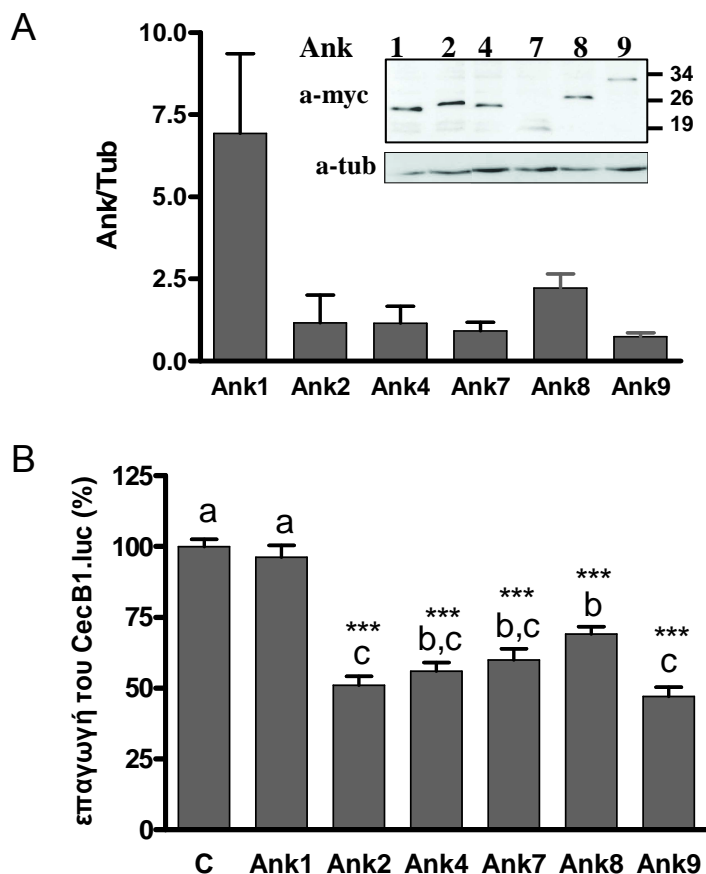
Παράλληλα με τις λειτουργικές δοκιμές, έγινε ανάλυση της έκφρασης των πρωτεϊνών στα κυτταρικά εκχυλίσματα με ανοσοαποτύπωση κατά Western προκειμένου να προσδιοριστούν τα επίπεδα έκφρασης για τα διάφορα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών Ank. Όπως φαίνεται στις εικόνες 26Γ, Δ τα επίπεδα έκφρασης των διαφορετικών πρωτεϊνών Ank παρουσίασαν μεγάλες διαφορές. Όπως είχε δειχθεί και στα λειτουργικά πειράματα με τον μεταγραφικό παράγοντα RelB, οι πρωτεΐνες Ank1, Ank4 και Ank8 εκφράζονται σε πολύ υψηλά επίπεδα, ενώ οι Ank2, Ank7 και Ank9 εκφράζονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα, με την Ank9 να είναι ελάχιστα ανιχνεύσιμη.

Συμπερασματικά, η Ank1, η οποία έχει τη μεγαλύτερη έκφραση, έχει καθόλου ή μικρή επιρροή στη μεταγραφική ικανότητα του R1d2 ενώ οι πρωτεΐνες Ank2, Ank7 και Ank9, παρά τα χαμηλά επίπεδα έκφρασής τους, προκαλούν στατιστικά σημαντική μείωση στη μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς. Τέλος, οι πρωτεΐνες Ank4 και Ank8, που έχουν υψηλά επίπεδα έκφρασης, προκαλούν υψηλή αναστολή στην ενεργοποίηση του γονιδίου της λουσιφεράσης.

Προκειμένου να γίνει πιο άμεση σύγκριση ανάμεσα στην επίδραση των έξι πρωτεϊνών Ank στη μεταγραφή του γονιδίου της λουσιφεράσης, έγιναν προσπάθειες να εξισωθούν τα επίπεδα έκφρασης των διαφορετικών Ank μεταξύ τους. Για το σκοπό αυτό, οι ποσότητες DNA των πλασμιδίων που εκφράζουν τις υψηλότερα παραγόμενες πρωτεΐνες προσαρμόστηκαν στα πειράματα διαμόλυνσης, ώστε να εξομοιωθεί η έκφρασή τους με αυτήν της πρωτεΐνης Ank9, το μέλος της οικογένειας με την ελάχιστη ποσότητα παραγόμενου προϊόντος. Στην **εικόνα 27A** (ένθεμα) παρουσιάζονται ενδεικτικά τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών Ank υπό αυτές τις συνθήκες. Όπως φαίνεται στο γράφημα της πυκνομέτρησης που παρουσιάζει αποτελέσματα τριών πειραμάτων, επιτεύχθηκε η εξομοίωση της πρωτεϊνικής έκφρασης για τα περισσότερα μέλη της οικογένειας Ank. Εντούτοις, η Ank1, παρ'ότι μειωμένη, εξακολουθεί να εκφράζεται εντονότερα από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες Ank.

Χρησιμοποιώντας τις τροποποιημένες ποσότητες των φορέων που περιέχουν τα γονίδια *ank* και διατηρώντας σταθερές τις ποσότητες για τα πλασμίδια κανονικοποίησης (pBmbA/EcRE.gfp), αναφοράς (CecB1.luc) και έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα R1d2 (pBmA.R1d2), επαναλήφθηκαν οι λειτουργικές δοκιμασίες με νέες διαμολύνσεις κυττάρων. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA), η οποία πιστοποίησε την ύπαρξη στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων έκφρασης των πρωτεϊνών Ank και του δείγματος ελέγχου ($F_{6,53} = 40,95$; $P < 0,0001$). Η μείωση των επιπέδων έκφρασης των Ank8 και Ank4, δηλαδή των πρωτεϊνών που είχαν δείξει την εντονότερη αναστολή στη μεταγωγή του σήματος (**εικόνα 26**), οδήγησε και στη μείωση της επιφερόμενης αναστολής της φωταύγειας από 60% σε 31% για την Ank8 και από 53% σε 44% για την Ank4 (**εικόνα 27B**). Ομοίως, η μείωση των επιπέδων της Ank1 οδήγησε στην πλήρη εξάλειψη της μερικής αναστολής που είχε δείξει προηγουμένως (**εικόνες 26A και 27B**). Οι πρωτεΐνες που εμφανίζουν συστηματικά χαμηλή έκφραση, Ank2, Ank7 και Ank9, διατήρησαν παρόμοια επίπεδα αναστολής σε σχέση με τις προηγούμενες λειτουργικές δοκιμές, με τις Ank2 και Ank9 να εμφανίζουν τη μέγιστη αναστολή, 49% και 53%, αντίστοιχα. Συνεπώς,

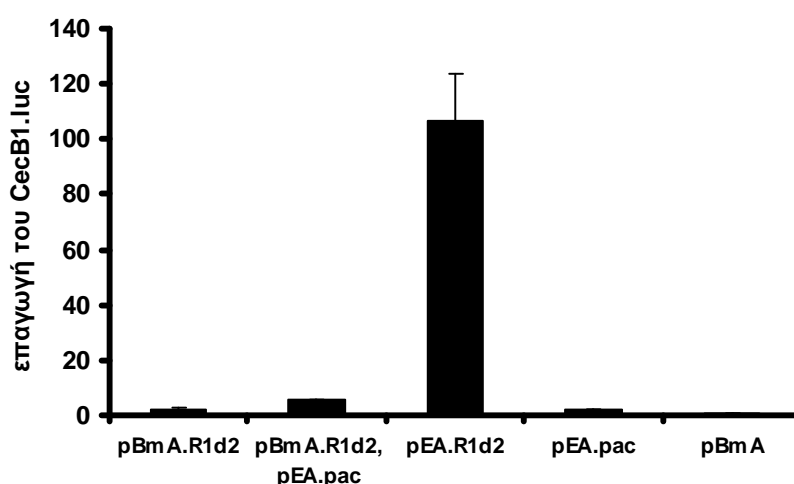
στα λειτουργικά πειράματα σε συνθήκες παρόμοιων επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών Ank του CcBV, όλες οι Ank, με εξαίρεση την Ank1, επέφεραν αναστολή στη λειτουργία του R1d2, με τη μεγαλύτερη ανασταλτική δράση να επιδεικνύουν οι Ank9 και Ank2 (εικόνα 27B).



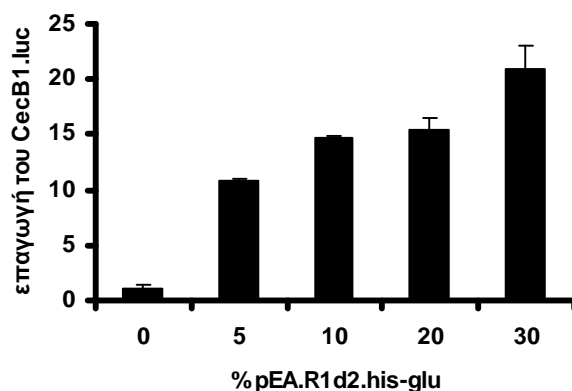
Εικόνα 27. Η επίδραση έξι πρωτεϊνών Ank του CcBV στη λειτουργικότητα του μεταγραφικού παράγοντα R1d2 υπό συνθήκες παρόμοιας έκφρασης. Α. Ανάλυση πυκνομέτρησης των ζωνών που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες Ank πάνω στις μεμβράνες ανοσοαποτύπωσης κατά Western από τα λύματα τριών διαφορετικών πειραμάτων. Η πυκνομέτρηση παρουσιάζεται ως λόγος της εκάστοτε πρωτεΐνης Ank ως προς την τουμπουλίνη του ίδιου δείγματος. Μετά την κανονικοποίηση ως προς την τουμπουλίνη φαίνεται ότι τα επίπεδα της Ank1 παραμένουν υψηλότερα από ό,τι για τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας. Το ένθεμα παρουσιάζει ενδεικτικά τη μεμβράνη ανοσοαποτύπωσης ενός πειράματος. Τα επίπεδα έκφρασης των Ank σε γενικές γραμμές εξομοιώθηκαν, αν και για τις Ank -7, 9 είναι ελαφρώς χαμηλότερα. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών έγινε με το αντίσωμα anti-myc (άνω πλαίσιο), ενώ η τουμπουλίνη χρησίμευσε σαν μάρτυρας για τον έλεγχο της φόρτωσης (κάτω πλαίσιο). Δεξιά εμφανίζονται οι δείκτες μοριακού βάρους. **Β.** Μείωση στη λειτουργία του R1d2, την ενεργή μορφή του Relish1, παρουσία παρόμοιων επιπέδων έκφρασης για τις ικές πρωτεΐνες Ank. Οι ποσότητες των φορέων έκφρασης για τις διαφορετικές πρωτεΐνες Ank αναφέρονται στο κεφάλαιο 'μεθοδολογία'. Η φωταύγεια κάθε δείγματος κανονικοποιήθηκε ως προς τα επίπεδα φθορισμού και στη συνέχεια εκφράστηκε ως ποσοστό της κανονικοποιημένης φωταύγειας του δείγματος ελέγχου (C). Το γράφημα παρουσιάζει τις μέσες τιμές (\pm SE, τυπικό σφάλμα) της ποσοστιαίας κανονικοποιημένης φωταύγειας από τρία ανεξάρτητα πειράματα, με τριπλά δείγματα το καθένα. Τα διαφορετικά γράμματα πάνω από τις στήλες σηματοδοτούν κυτταρικούς πληθυσμούς με στατιστικά σημαντικές διαφορές. Οι αστερίσκοι δηλώνουν το επίπεδο σημαντικότητας της διαφοράς κάθε πληθυσμού από το δείγμα ελέγχου (***) = $P < 0,001$).

3.6.3 Οι πρωτεΐνες Ank επηρεάζουν τη μεταγραφική λειτουργία του R1d2 με δοσοεξαρτώμενο τρόπο

Προκειμένου να εξεταστεί κατά πόσο η παρατηρούμενη μείωση στη φωταύγεια παρουσία των πρωτεϊνών Ank είναι ειδική, έγιναν πειράματα με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των πλασμιδίων έκφρασής τους. Στα πειράματα αυτά, το πλασμίδιο pBmA.R1d2 αντικαταστάθηκε από το πλασμίδιο pEA.R1d2.his-glu το οποίο παρέχει τη δυνατότητα αυξημένης έκφρασης λόγω του ενισχυτή hr3 επιτρέποντας την αύξηση του ποσοστού των πλασμιδίων που εκφράζουν τις Ank ανά διαμόλυνση, ενώ η ολική ποσότητα του DNA παραμένει η ίδια. Όπως φαίνεται και στην **εικόνα 28**, η μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς αυξάνεται κατά 19 φορές όταν ο R1d2 εκφράζεται από τον φορέα pEA.his-glu σε σχέση με τον φορέα pBmA. Παροδικές διαμολύνσεις χρησιμοποιώντας αυξανόμενες ποσότητες του πλασμιδίου pEA.R1d2.his-glu και σταθερή ποσότητα του πλασμιδίου αναφοράς CecB1.luc επιβεβαίωσαν την εξειδίκευση του μεταγραφικού παράγοντα ως προς το πλασμίδιο αναφοράς (**εικόνα 29**).



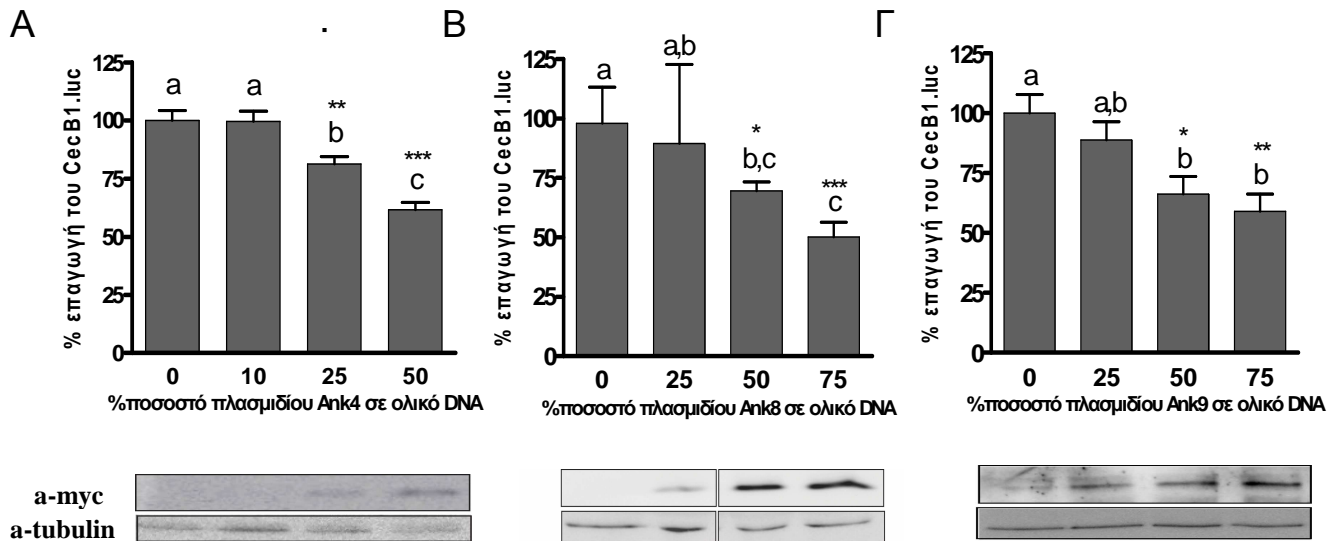
Εικόνα 28. Μεταγραφή του γονιδίου CecB1.luc μετά από διαμόλυνση με τους φορείς pBmA.R1d2 ή pEA.R1d2.his-glu. Στη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκε σταθερή ποσότητα ολικού DNA ανά βοθρίο, όπου 20% ήταν το pGL3.cec.luc, 10% το pBmbA/EcRE.gfp, 30% το pBmA.R1d2 ή το pEA.R1d2.his-glu (στην εικόνα αναφέρεται pEA.R1d2 για συντομία) και η υπόλοιπη ποσότητα συμπληρώθηκε με pBmA ή με pEA.pac. Η επαγωγή υπολογίστηκε διαιρώντας την κανονικοποιημένη φωταύγεια κάθε δείγματος με την αντίστοιχη κυττάρων διαμολυσμένων με άδειο φορέα pBmA (τελευταία στήλη). Οι γραμμές τυπικής απόκλισης υπολογίστηκαν από διπλά δείγματα.



Εικόνα 29. Επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου CecB1.luc από αυξανόμενες ποσότητες του R1d2. Η έκφραση του R1d2 ρυθμίζεται από τον υποκινητή ακτίνης του μεταξοσκώληκα και τον ενισχυτή hr3 του βακτηριού BmNPV. Χρησιμοποιήθηκε σταθερή ποσότητα DNA ανά βοθρίο μικροπλακών, όπου το 20% του ολικού DNA ήταν pGL3.cec.luc, το 10% pBmbA/EcRE.gfp, το 40% pBmA και αυξανόμενες ποσότητες του pEA.R1d2.his-glu. Το μίγμα DNA ανά βοθρίο συμπληρώθηκε με pEA.pac, έτσι ώστε η ολική ποσότητα του ενισχυτή hr3 να παραμένει σταθερή ανάμεσα στα διαφορετικά δείγματα. Οι γραμμές τυπικής απόκλισης υπολογίστηκαν από διπλά δείγματα.

Για τα πειράματα αυξημένης έκφρασης των ικών πρωτεϊνών, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pEA.R1d2.his-glu, τα πλασμίδια αναφοράς και κανονικοποίησης, CecB1.luc και pBmbA/EcRE.gfp, και με αυξανόμενες ποσότητες των πλασμιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες Ank4, Ank8 ή Ank9. Η αυξανόμενη έκφραση των πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκε με ανάλυση κυτταρικών λυμμάτων κατά Western (**εικόνα 30**). Αυτή η σειρά πειραμάτων έδειξε ότι υπάρχει δοσοεξαρτώμενη αναστολή της μεταγραφικής λειτουργίας του R1d2 από τις τρεις πρωτεΐνες του CcBV (**εικόνα 30**). Για τις Ank4 και Ank9, η στατιστική ανάλυση με one-way ANOVA έδειξε σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις μέσες τιμές κανονικοποιημένης φωταύγειας των κυτταρικών πληθυσμών με διαφορετικές ποσότητες πρωτεϊνών Ank ($F_{3,26} = 22,19$; $P < 0,0001$ για τις δοκιμασίες δοσοεξάρτησης με την Ank4 και $F_{3,23} = 6,271$; $P = 0,0029$ για τις δοκιμασίες με την Ank9). Όσον αφορά στα δείγματα αυξανόμενης έκφρασης της πρωτεΐνης Ank8, τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη δοκιμασία Kruskal-Wallis (KW statistic = 31,74) καθώς παρουσίασαν μεγάλες τυπικές αποκλίσεις. Αυτή η ανάλυση επεσήμανε σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις εξεταζόμενες διάμεσες τιμές κανονικοποιημένης φωταύγειας με P value $< 0,0001$. Και για τις τρεις σειρές πειραμάτων, ακολούθησαν δοκιμασίες post hoc που εντόπισαν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δείγματα ελέγχου και τα

δείγματα με τα δύο υψηλότερα ποσοστά κάθε πρωτεΐνης (εικόνα 30: 25%, 50% για την Ank4, 50%, 75% για τις Ank8 και Ank9).



Εικόνα 30. Ειδική αναστολή της λειτουργίας του R1d2 από τις πρωτεΐνες Ank4, Ank8 και Ank9. Κύτταρα Hi5 συνδιαμολύνθηκαν με αυξανόμενες ποσότητες πλασμιδίων που εκφράζουν τις Ank -4, 8 ή 9 μαζί με το πλασμίδιο αναφοράς pGL3.cecB1.luc, το πλασμίδιο κανονικοποίησης pBmbA/EcRE.gfp και το πλασμίδιο pEA.R1d2.his-glu. Η κανονικοποιημένη φωταύγεια κάθε δείγματος εκφράζεται ως ποσοστό της αντίστοιχης φωταύγειας του δείγματος ελέγχου (μηδενικό ποσοστό πλασμιδίου έκφρασης Ank). Στα **A** και **Γ** παρουσιάζονται οι μέσες τιμές (\pm SE) της ποσοστιαίας κανονικοποιημένης φωταύγειας από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Στο **B** απεικονίζονται οι διάμεσες τιμές (\pm IQR) από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα. Και στα τρία γραφήματα, πληθυσμοί που διαφέρουν σημαντικά ως προς το ποσοστό κανονικοποιημένης φωταύγειας φέρουν διαφορετικά γράμματα. Οι αστερίσκοι δηλώνουν το επίπεδο σημαντικότητας της διαφοράς κάθε πληθυσμού από το δείγμα ελέγχου (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$). Στο κάτω μέρος κάθε γραφήματος παρουσιάζεται η ανίχνευση της αυξανόμενης έκφρασης των πρωτεϊνών Ank, σημασμένων με τον επίτοπο myc-his, μετά από ανοσοαποτύπωση κατά Western.

3.7 Σύνοψη-Συμπεράσματα κεφαλαίου

Για τη διερεύνηση της επίδρασης των πρωτεϊνών Ank του ιού CcBV σε μεταγραφικούς παράγοντες Rel/NF-κB, μελετήθηκαν οι μεταγραφικοί παράγοντες RelB και Relish1 του μεταξοσκώληκα *B. mori*, που λειτουργούν στις σηματοδοτικές οδούς Toll και Imd, αντίστοιχα. Η έκφραση του RelB, του πλήρους Relish1 και της ενεργής μεταλλαγμένης μορφής του Relish1 (R1d2) πιστοποιήθηκε σε κυτταρικά εκχυλίσματα μετά από παροδική διαμόλυνση κυττάρων Hi5. Στα πλαίσια ελέγχου της λειτουργικότητας των παραγόντων αυτών πραγματοποιήθηκαν πειράματα ελέγχου για τη βελτιστοποίηση του πειραματικού συστήματος, στα οποία χρησιμοποιήθηκε ο παράγοντας RelB σε συνδυασμό με το πλασμίδιο αναφοράς Att.luc. Από τα πειράματα αυτά προκύπτει ότι ο RelB επάγει το πλασμίδιο αναφοράς Att.luc μόνο σε μία από τρεις κυτταρικές σειρές Λεπιδοπτέρων που εξετάστηκαν, στην κυτταρική σειρά Hi5. Κατά συνέπεια, αυτή επιλέχθηκε ως κατάλληλη σειρά για τη διεξαγωγή των επόμενων πειραμάτων. Επιπλέον, ως παράγοντας κανονικοποίησης επιλέχθηκε ο φθορισμός, σε αντίθεση με τη φωταύγεια που παράγεται από τη λουσιφεράση Renilla διότι τεκμηριώθηκε ότι η τελευταία επηρεάζεται από τον RelB. Στην τελικά διαμορφωμένη πειραματική διάταξη πιστοποιήθηκε ότι το πλασμίδιο αναφοράς Att.luc επάγεται πέντε φορές από τον μεταγραφικό παράγοντα RelB.

Όσον αφορά στο μεταγραφικό παράγοντα Relish1 που δρα στην οδό Imd, χρησιμοποιήθηκαν κατά Gram⁻ βακτηριακοί λιποπολυσακχαρίτες προκειμένου να ενεργοποιήσουν τον συγκεκριμένο παράγοντα. Παρατηρήθηκε πως τα κύτταρα Hi5 ήταν δεκτικά στους λιποπολυσακχαρίτες, αφού αυτοί προκάλεσαν αύξηση στην εκλυόμενη φωταύγεια, ωστόσο το μόριο Relish1 δεν ενεργοποιήθηκε, καθώς δεν προκάλεσε περαιτέρω αύξηση της φωταύγειας ούτε ανιχνεύτηκε η ενεργός μορφή του. Η μη ενεργοποίηση του Relish1 πιθανώς οφείλεται στην έλλειψη κάποιων απαραίτητων ενδιάμεσων παραγόντων της οδού μεταγωγής σήματος Imd στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά. Αντίθετα, η μεταλλαγμένη, ενεργή μορφή του Relish1, R1d2, προκάλεσε υψηλή επαγωγή της φωταύγειας από το πλασμίδιο αναφοράς CecB1.luc. Έτσι, χρησιμοποιήθηκε ο συστατικά ενεργός R1d2 ως μεταγραφικός ρυθμιστής προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση των ικών πρωτεϊνών Ank στην οδό Imd.

Στα πλαίσια των λειτουργικών πειραμάτων, παρατηρήθηκε μεγάλη ετερογένεια στα επίπεδα έκφρασης των έξι ικών πρωτεϊνών επαναλήψεων αγκυρίνης, με την Ank9 να έχει

ιδιαίτερα χαμηλή έκφραση, τις Ank -2, 7 λίγο υψηλότερη και τις Ank -1, 4 και 8 αρκετά υψηλή. Στα πειράματα διαμόλυνσης με το πλασμίδιο αναφοράς Att.luc και το πλασμίδιο έκφρασης του RelB, στατιστικά σημαντική μείωση στη μεταγραφική ενεργότητα του RelB παρατηρήθηκε μόνο στα κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη Ank2. Η μείωση αυτή είναι ειδική, καθώς αυξανόμενη έκφραση της Ank2 επιφέρει αυξανόμενη αναστολή της μεταγραφικής λειτουργίας του RelB. Δεδομένης της απουσίας ερεθίσματος από κατά Gram⁺ βακτήρια, πιθανολογείται ότι η προσθήκη μικροβιακού ερεθίσματος ενδεχομένως να είχε ενεργοποιήσει περαιτέρω τον μεταγραφικό παράγοντα RelB και επιπλέον μέλη της οικογένειας να είχαν παρουσιάσει ανασταλτική δράση σε αυτόν.

Όσον αφορά στις διαμολύνσεις με το πλασμίδιο έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα R1d2 και το πλασμίδιο αναφοράς CecB1.luc, διαπιστώθηκε ότι οι πρωτεΐνες Ank2, Ank4, Ank7, Ank8 και Ank9 έχουν στατιστικά σημαντική επίδραση στη μεταγραφική ενεργότητα του R1d2. Μετά από σχετική εξομοίωση των επιπέδων έκφρασης των διαφορετικών Ank, πραγματοποιήθηκαν εκ νέου οι λειτουργικές δοκιμασίες. Για τα μέλη της οικογένειας με εξορισμού υψηλή έκφραση, όπως οι Ank4 και Ank8, η μείωση των επιπέδων έκφρασής τους οδήγησε σε μείωση της επίδρασής τους στα επίπεδα της φωταύγειας. Αντίθετα, τα μέλη με συστηματικά χαμηλή έκφραση, Ank2, Ank7 και Ank9, διατήρησαν παρόμοια επίπεδα αναστολής. Συνολικά, οι πρωτεΐνες Ank -2, -4, -7, -8 και -9 επέφεραν μείωση στην ενεργότητα του R1d2. Παροδικές διαμολύνσεις με αυξημένες ποσότητες πλασμιδίων έκφρασης των πρωτεϊνών Ank4, Ank8 και Ank9 πιστοποίησαν τη δόσοεξαρτώμενη και ειδική αναστολή της μεταγραφικής λειτουργίας του R1d2 από τις τρεις πρωτεΐνες.

Δεδομένων των παραπάνω αποτελεσμάτων, συμπεραίνεται ότι οι πρωτεΐνες επαναλήψεων αγκυρίνης του CcBV επιδρούν στις δύο κύριες σηματοδοτικές οδούς της εγγενούς ανοσίας των Λεπιδοπτέρων *in vitro*. Δεδομένου ότι μόνο μία Ank αναστέλλει τον μεταγραφικό παράγοντα RelB, ενώ, με εξαίρεση την Ank1, όλες οι Ank αναστέλλουν τον R1d2, συμπεραίνεται ότι οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες παρεμβάλλονται κυρίως στην οδό μεταγωγής σήματος Imd.

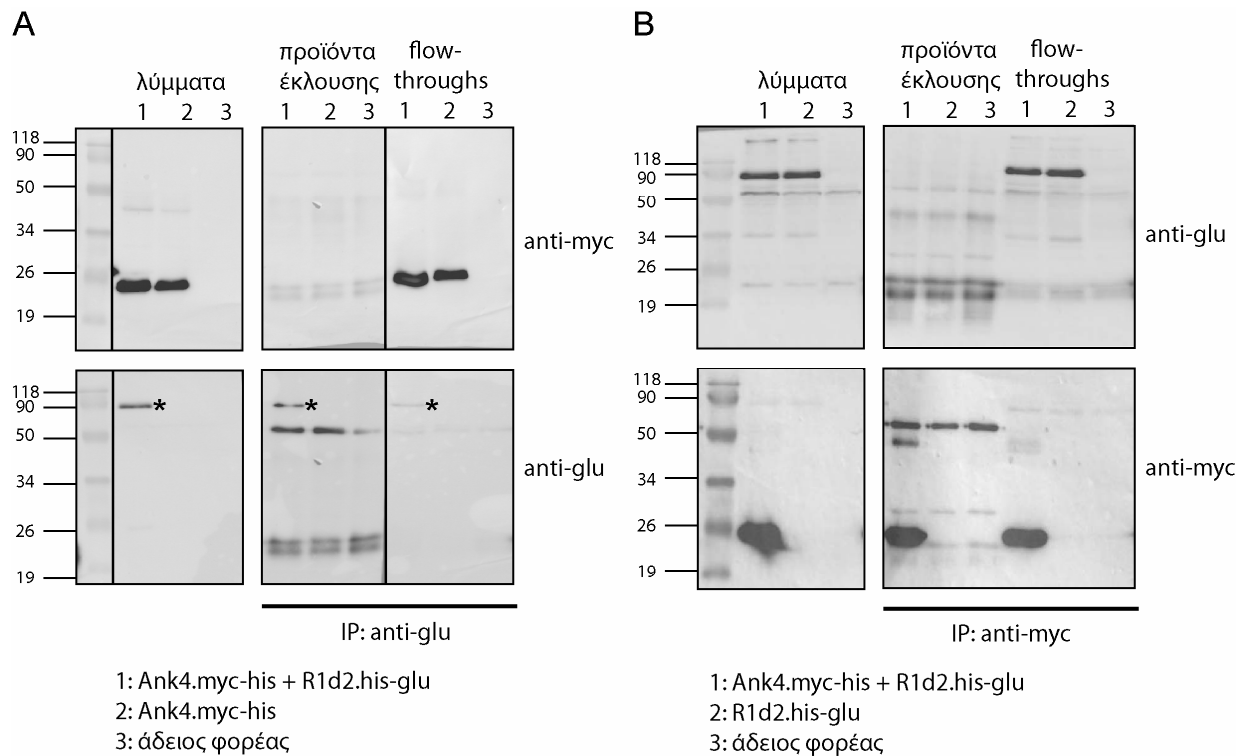
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Βιοχημική και ανοσοκυτταροχημική ανάλυση των πρωτεϊνών Ank

4.1 Αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Ank4 και Ank8 του CcBV με τον παράγοντα Relish1 του *B. mori*

Έχοντας υπόψιν την επίδραση των πρωτεϊνών επαναλήψεων αγκυρίνης του CcBV στη μεταγραφική λειτουργία του παράγοντα R1d2 του *B. mori*, εξετάστηκε η πιθανότητα αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις ικές πρωτεΐνες και τον συγκεκριμένο μεταγραφικό παράγοντα. Από τις έξι ικές πρωτεΐνες, επιλέχθηκαν δύο, οι Ank4 και Ank8, καθώς αυτά τα δύο μέλη της οικογένειας αφενός παρεμπόδισαν τη λειτουργικότητα του παράγοντα R1d2 και αφετέρου εκφράζονται σε ικανοποιητικά επίπεδα ώστε να ανιχνεύονται εύκολα (βλ. εικόνες 24Α και 26Γ, Δ).

4.1.1 Πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης σε κυτταρικά εκχυλίσματα κυττάρων Hi5 που είχαν διαμολυνθεί με φορείς που εκφράζουν τις πρωτεΐνες Ank4 ή Ank8, σημασμένες με τους επιτόπους myc και 6xHis, και τον μεταγραφικό παράγοντα R1d2, σημασμένο με τον επίτοπο glu. Η ανοσοκατακρήμνιση δοκιμάστηκε και προς τις δύο κατευθύνσεις, δηλαδή τόσο με αντίσωμα έναντι του επιτόπου glu, για την ανίχνευση του μεταγραφικού παράγοντα R1d2, όσο και με αντίσωμα έναντι του επιτόπου myc, για την ανίχνευση των πρωτεϊνών Ank4 ή Ank8. Τα ανοσοσύμπλοκα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση όπως φαίνεται στην **εικόνα 31** (παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μόνο για το συνδυασμό Ank4.myc-his με R1d2.his-glu, αλλά παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και για το συνδυασμό Ank8.myc-his με R1d2.his-glu). Η ανοσοκατακρήμνιση της εκάστοτε πρωτεΐνης-δολώματος έγινε επιτυχώς αλλά για καμία από αυτές δεν ανιχνεύτηκε η πρωτεΐνη-θήραμα.



Εικόνα 31. Πειράματα συνανοσοκατακρήμισης της πρωτεΐνης R1d2.his-glu και της πρωτεΐνης Ank4.myc-his. Α. Κύτταρα Hi5 διαμολύνθηκαν με φορείς που εκφράζουν την ιική πρωτεΐνη και τον μεταγραφικό παράγοντα (1), μόνο την ιική πρωτεΐνη (2) ή καμία εκ των δύο πρωτεϊνών (3). Τα λύμματα των κυττάρων επώαστηκαν με αντίσωμα anti-glu και μίγμα σφαιριδίων αгарόζης συνδεδεμένων με πρωτεΐνη A και πρωτεΐνη G. Ακολούθησε φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο της οποίας αποτελεί τα flowthroughs. Μετά από πλύσεις των σφαιριδίων έγινε έκλυση των πρωτεϊνών με SDS sample buffer και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα δείγματα (2) και (3) χρησίμευσαν ως αρνητικοί μάρτυρες. *: Ειδική ζώνη του R1d2. **Β.** Κύτταρα Hi5 διαμολύνθηκαν με φορείς που εκφράζουν την ιική πρωτεΐνη Ank4 και τον μεταγραφικό παράγοντα (1), μόνο τον μεταγραφικό παράγοντα (2) ή καμία από τις δύο πρωτεΐνες (3). Τα λύμματα των κυττάρων επώαστηκαν με αντίσωμα anti-myc και μίγμα σφαιριδίων αгарόζης πρωτεΐνης A - πρωτεΐνης G. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στο Α.

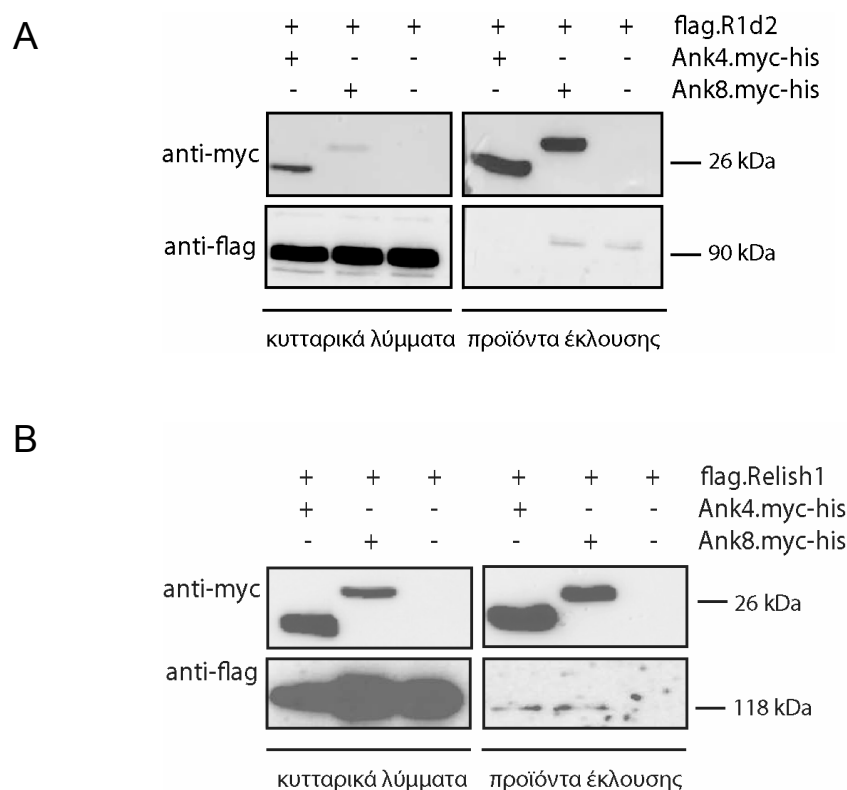
4.1.2 Πειράματα ανίχνευσης πρωτεϊνικών συμπλόκων με χρωματογραφία συγγένειας (pull-down assays)

Η πιθανή αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών Ank4 και Ank8 του CcBV με τον R1d2 εξετάστηκε επίσης και με την τεχνική της συγκατακρήμνισης με σφαιρίδια αγαρόζης-Ni-NTA, δηλαδή σφαιρίδια με προσθήκη Nickel Nitrilo-triacetic Acid (Ni-NTA). Καθώς οι δύο ικές πρωτεΐνες φέρουν σήμανση myc και 6xHis είναι δυνατή η πρόσδεσή τους σε σφαιρίδια αγαρόζης επικαλυμμένα με νικέλιο, χάρη στη συγγένεια που παρουσιάζουν οι ιστιδίνες για το νικέλιο. Εξετάστηκε αν και ο παράγοντας R1d2, σημασμένος με τον επίτοπο flag, προσδένεται στα σφαιρίδια αγαρόζης μέσω των ικών πρωτεϊνών. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 32A**, μία ποσότητα του flag.R1d2 προσδένεται και εκλύεται από τα σφαιρίδια αγαρόζης με μη ειδικό τρόπο, αφού ανιχνεύεται στο προϊόν έκλυσης και του αρνητικού μάρτυρα (απουσία πρωτεϊνών Ank). Όπως και στα πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης, έτσι και στα πειράματα συγκατακρήμνισης δεν επιβεβαιώνεται *in vitro* αλληλεπίδραση μεταξύ των Ank4 ή Ank8 με τον ενεργό μεταγραφικό παράγοντα R1d2. Το γεγονός αυτό πιθανά οφείλεται στην παρουσία του R1d2 στον πυρήνα, όπως επιβεβαιώνεται και από πειράματα ανοσοφθορισμού που παρουσιάζονται παρακάτω, ενώ οι Ank4 και Ank8 εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στο κυτταρόπλασμα και δευτερευόντως στον πυρήνα, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η ανίχνευση τυχόν αλληλεπίδρασής τους.

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η πιθανή αλληλεπίδραση των δύο ικών πρωτεϊνών Ank4.myc-his και Ank8.myc-his με τον πλήρους μήκους μεταγραφικό παράγοντα Relish1 του μεταξοσκώληκα, καθώς η μικροσκοπική παρατήρηση έδειξε ότι ο Relish1 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (**εικόνα 35A**). Ο Relish1, που φέρει τον επίτοπο flag στο αμινοτελικό του άκρο, συνεκφράστηκε με κάθε μία από τις δύο ικές πρωτεΐνες στον ίδιο πληθυσμό κυττάρων. Τα αποτελέσματα στην **εικόνα 32B** παρουσιάζουν την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών Ank4.myc-his και Ank8.myc-his με τον παράγοντα flag.Relish1, ο οποίος ανιχνεύεται στα προϊόντα έκλυσης από τα σφαιρίδια μόνο παρουσία των Ank4 ή Ank8, ενώ δεν ανιχνεύεται στο δείγμα αρνητικού μάρτυρα απουσία αυτών. Η χαμηλή ένταση του σήματος για τον Relish1, ωστόσο, υποδηλώνει ότι η αλληλεπίδραση αυτή ενδεχομένως είναι ασθενής ή παροδική.

Η αλληλεπίδραση των Ank4 και Ank8 με τον παράγοντα Relish1, σε συνδυασμό με την αναστολή που οι πρωτεΐνες Ank επιφέρουν στη μεταγραφική ενεργότητα του R1d2,

καθιστά πιθανή την αλληλεπίδραση των δύο ικών πρωτεϊνών με τον ενεργό μεταγραφικό παράγοντα R1d2, παρά το γεγονός ότι αυτή δεν ανιχνεύτηκε πειραματικά.



Εικόνα 32. Πειράματα ανίχνευσης συμπλόκων των πρωτεϊνών Ank4, Ank8 με τις δύο μορφές του μεταγραφικού παράγοντα Relish1. Κάθε μία από τις δύο πρωτεΐνες του CcBV, Ank4 και Ank8, σημασμένες με τον επίτοπο myc-his συνεκφράστηκε σε κύτταρα Hi5 μαζί με την ελλειμματική (**A**) ή την πλήρη μορφή (**B**) του παράγοντα Relish1. Και οι δύο μορφές του Relish1 φέρουν τον επίτοπο flag. Τα κυτταρικά λύματα επώαστηκαν με σφαιρίδια αγαρόζης-Ni-NTA και οι πρωτεΐνες εκλούστηκαν με περίσσεια ιμιδαζολίου. Οι παράγοντες flag.R1d2 και flag.Relish1 ανιχνεύτηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-flag, ενώ οι πρωτεΐνες Ank.myc-his ανιχνεύθηκαν με το αντίσωμα anti-myc. Ο flag.R1d2 συγκατακρημνίζεται μη ειδικά (**A**), ενώ ο flag.Relish1 συγκατακρημνίζεται με ειδικό τρόπο (**B**).

4.2 Ανοσοφθορισμός

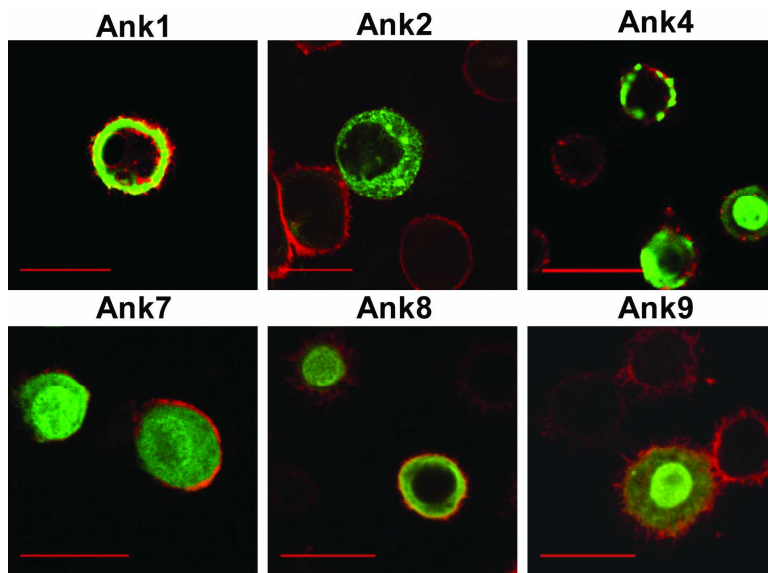
4.2.1 Υποκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών Ank

Η ανίχνευση του υποκυτταρικού εντοπισμού μιας πρωτεΐνης προσφέρει στοιχεία για την ερμηνεία της λειτουργίας της. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού σε κυτταροκαλλιέργειες που εκφράζουν εξωγενώς τις πρωτεΐνες Ank, με σκοπό να διερευνηθεί τόσο ο υποκυτταρικός εντοπισμός των συγκεκριμένων πρωτεϊνών, όσο και η πιθανότητα αλληλεπίδρασής τους με τους μεταγραφικούς παράγοντες των λειτουργικών πειραμάτων. Παρατήρηση τόσο με μικροσκοπία φθορισμού, όσο και με

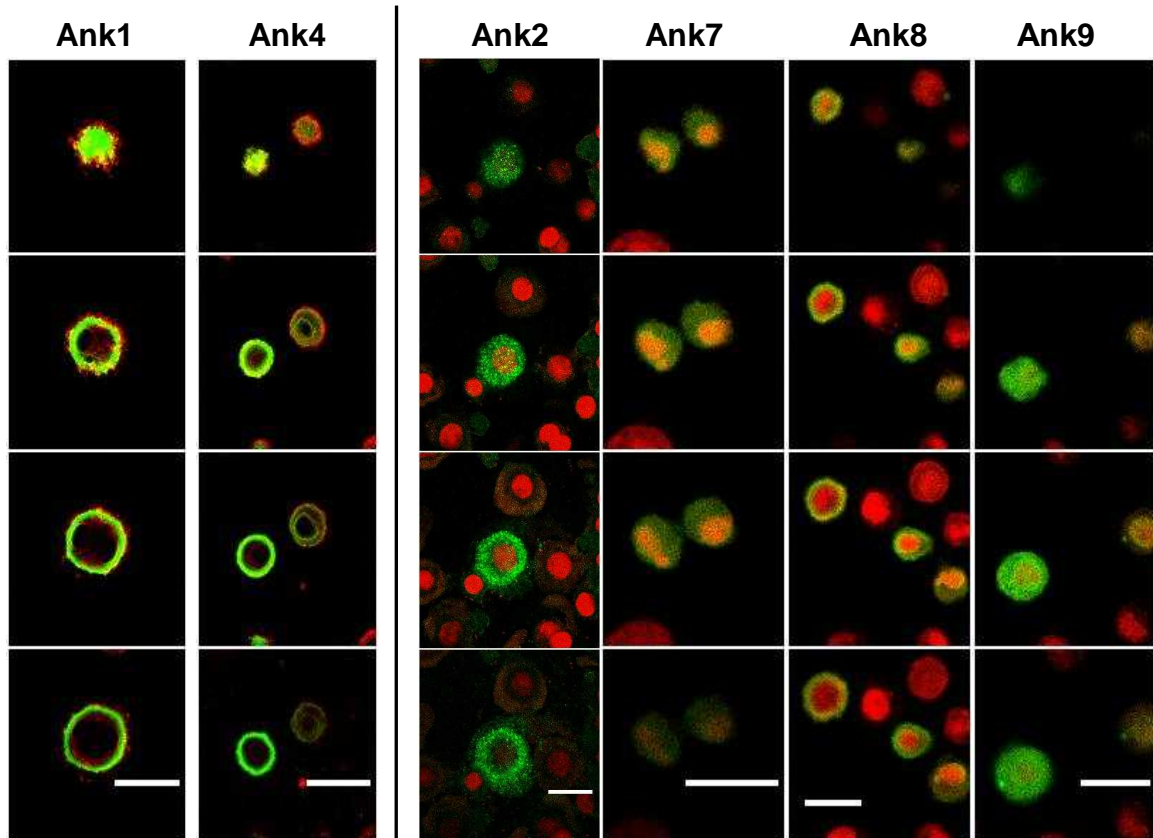
συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης έδειξε ότι οι πρωτεΐνες CcBV Ank παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο υποκυτταρικής κατανομής και κατανέμονται στο κυτταρόπλασμα ή τον πυρήνα, ενώ ορισμένες ικές πρωτεΐνες ανιχνεύθηκαν και στην πυρηνική μεμβράνη (εικόνες 33, 34). Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες Ank1 και Ank2 βρέθηκαν να εντοπίζονται σχεδόν αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα (96% και 99%, αντίστοιχα), οι πρωτεΐνες Ank4 και Ank8 ανιχνεύθηκαν κυρίως στο κυτταρόπλασμα (72% και 49%, αντίστοιχα) αλλά και στον πυρήνα (14% και 27%, αντίστοιχα) ή την πυρηνική μεμβράνη (14% και 24%, αντίστοιχα), ενώ η Ank7 βρέθηκε να εντοπίζεται σε όλο το κύτταρο με μεγαλύτερη ένταση στον πυρήνα (πίνακας 8). Η Ank9, η μόνη από τις εξεταζόμενες πρωτεΐνες με προβλεπόμενο σήμα πυρηνικού εντοπισμού, ήταν το μέλος της οικογένειας με τη μεγαλύτερη συχνότητα πυρηνικής εμφάνισης (54%). Παράλληλα, σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρήθηκε η εμφάνιση συσσώρευσης των ικών πρωτεϊνών σε φθορίζοντα κοκκία, φαινόμενο που χαρακτήρισε κυρίως την πρωτεΐνη Ank2, όπως φαίνεται και στην εικόνα 33.

	Κυτταρόπλασμα (%)	Πυρήνας (%)	Πυρηνική μεμβράνη και κυττ/σμα (%)
Ank1 (n=399)	96	2	2
Ank2 (n=101)	99	1	-
Ank4 (n=572)	72	14	14
Ank7 (n=39)	80*	15	5
Ank8 (n=143)	49	27	24
Ank9 (n=52)	36	54	10

Πίνακας 8. Ποσοτικοποίηση της υποκυτταρικής κατανομής των πρωτεϊνών Ank του CcBV σε κύτταρα Hi5. Η ποσοτικοποίηση έγινε με τη μέτρηση του συνολικού αριθμού κυττάρων "n" που εκφράζουν την εκάστοτε πρωτεΐνη και με επιλογή τυχαίων πεδίων από φωτογραφίες μικροσκοπίας φθορισμού. Τα ποσοστά αναφέρονται στην υποκυτταρική κατανομή της κάθε πρωτεΐνης Ank. Για τις Ank7 και Ank9 μετρήθηκε μικρότερος αριθμός κυττάρων εξαιτίας των χαμηλών επιπέδων έκφρασής τους. *, βάσει συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης, η Ank7 εντοπίζεται ταυτόχρονα τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα.



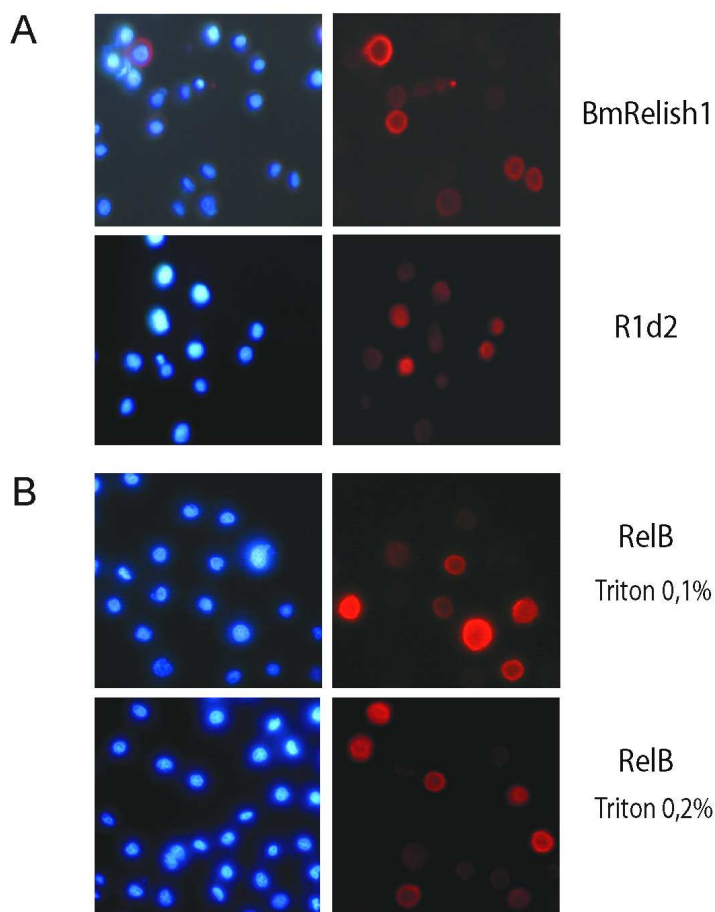
Εικόνα 33. Υποκυτταρική κατανομή των πρωτεϊνών Ank του CcBV. Οι σημασμένες με τον επίτοπο myc πρωτεΐνες εκφράστηκαν στην κυτταρική σειρά Hi5. Η ανίχνευση του επίτοπου myc έγινε με τα αντισώματα anti-myc και anti-mouse-FITC (πράσινη χρώση). Για τη χρώση της περιφέρειας των κυττάρων που εκφράζουν τις Ank -2, 7, 8 και 9 χρησιμοποιήθηκε η φαλλοιδίνη-ροδαμίνη (κόκκινη χρώση), ενώ στα κύτταρα που εκφράζουν τις Ank1 και Ank4 χρησιμοποιήθηκε η χρωστική WGA-Texas Red (κόκκινη χρώση), η οποία βάφει την κυτταρική μεμβράνη και εν μέρει την πυρηνική μεμβράνη. Η παρατήρηση έγινε με συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης και οι κλίμακες αντιστοιχούν σε 200 μm .



Εικόνα 34. Διαδοχικές τομές συνεστιακής μικροσκοπίας από κύτταρα Hi5 που εκφράζουν τις πρωτεΐνες Ank. Οι πρωτεΐνες φέρουν τον επίτοπο myc και έχουν ανιχνευθεί με το αντίσωμα myc όπως στην εικόνα 33. Στις δύο πρώτες στήλες ανιχνεύεται με κόκκινο η κυτταρική μεμβράνη μετά από χρώση με WGA-Texas Red, ενώ στη δεξιά πλευρά ανιχνεύονται με κόκκινο οι πυρήνες των κυττάρων μετά από χρώση με propidium iodide. Οι κλίμακες αντιστοιχούν σε 200 μm .

4.2.2 Εντοπισμός των μεταγραφικών παραγόντων Relish1, R1d2 και RelB του *B. mori*

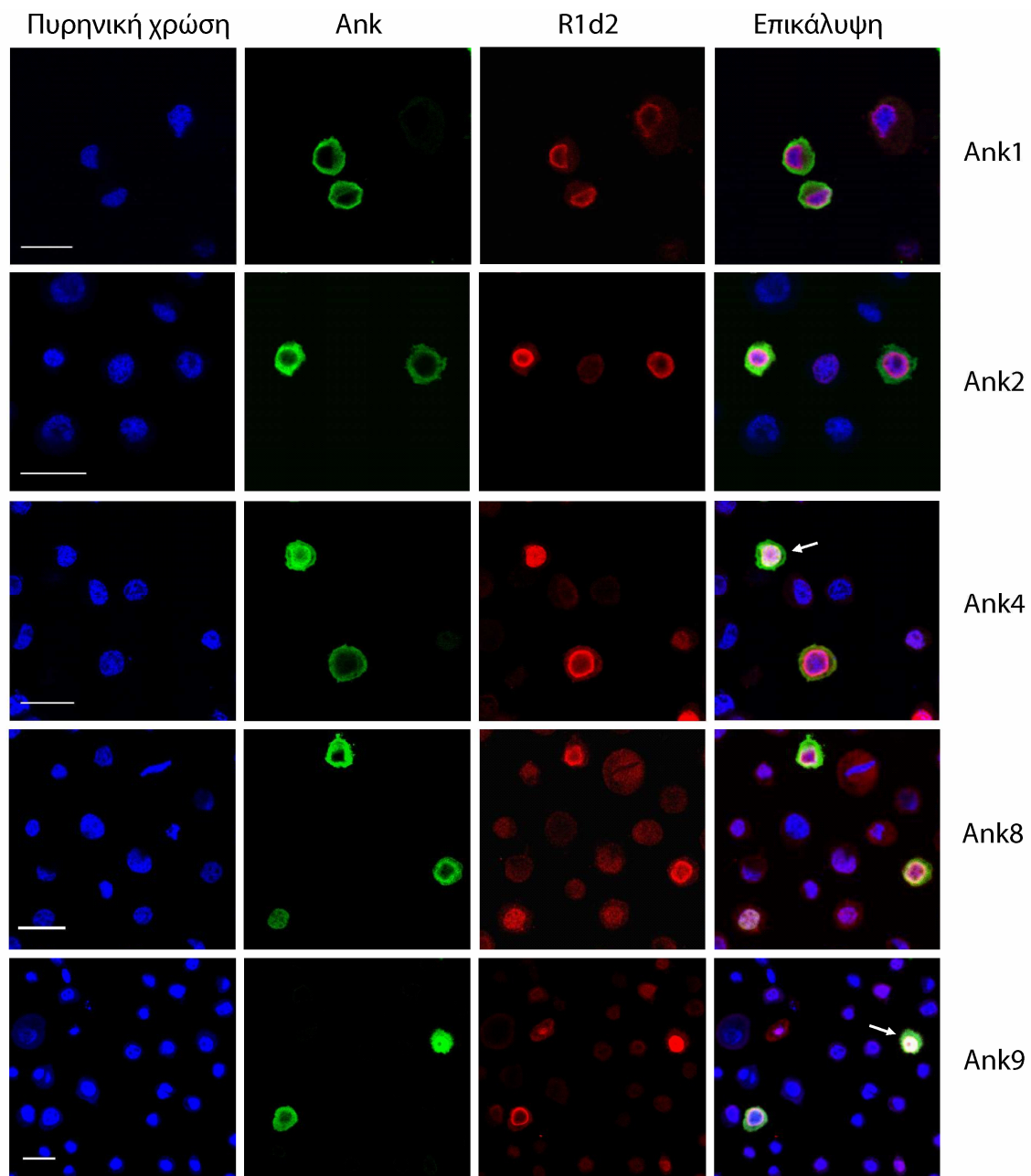
Παράλληλα με τις ικές πρωτεΐνες, εξετάστηκε η υποκυτταρική κατανομή των μεταγραφικών παραγόντων που χρησιμοποιήθηκαν στα λειτουργικά πειράματα, δηλαδή του Relish1 στις δύο του μορφές (πλήρους μήκους Relish1 και ενεργό τμήμα R1d2) και του RelB. Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες Relish1, R1d2 και RelB, σημασμένες με τον επίτοπο flag, εκφράστηκαν σε κύτταρα Hi5 και ανιχνεύθηκαν με τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος anti-flag. Όπως ήταν αναμενόμενο από την κατανομή του ορθόλογου Relish της *D. melanogaster* (Stoven et al. 2000; Wiklund et al. 2009), ο πλήρους μήκους παράγοντας BmRelish1 εμφανίζεται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα (**εικόνα 35A**), γεγονός που συνάδει με την απουσία μεταγραφικής ενεργότητας. Αντίθετα, η ενεργός μεταλλαγμένη μορφή του, R1d2, εμφανίζεται στον πυρήνα (**εικόνα 35A**), σε συμφωνία με την ύπαρξη της μεταγραφικής ενεργότητας που δείχτηκε σε αυτήν τη διατριβή και σε προηγούμενες μελέτες (Tanaka et al. 2007; Tanaka et al. 2009), αλλά και σε συμφωνία με την κατανομή του ενεργού τμήματος του DmRelish, όπως έχει δειχθεί σε κυτταρικές σειρές της *Drosophila* (Stoven et al. 2000; Wiklund et al. 2009). Εντούτοις, σε περιπτώσεις που τα κύτταρα βρίσκονταν σε μίτωση, ο R1d2 βρέθηκε μετατοπισμένος στο κυτταρόπλασμα λόγω της αποδιάταξης της πυρηνικής μεμβράνης. Για τον δεύτερο μεταγραφικό παράγοντα, τον RelB, παρατηρήθηκε κυρίως κυτταροπλασματική κατανομή, ενώ με συγκέντρωση Triton-X 100 0,2%, η πρωτεΐνη ανιχνεύθηκε επίσης σε μικρό ποσοστό και στον πυρήνα των κυττάρων, όπου και επιτελεί τη μεταγραφική του λειτουργία (**εικόνα 35B**). Το γεγονός ότι ο RelB βρίσκεται στον πυρήνα λίγων μόνο κυττάρων (~12%) πιθανώς σχετίζεται με την απουσία εξωτερικού ερεθίσματος, που θα οδηγούσε σε πλήρη ενεργοποίηση, και εξηγεί τη μικρότερη, ως προς τον παράγοντα R1d2, επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου αναφοράς στα λειτουργικά πειράματα.



Εικόνα 35. Υποκυτταρικός εντοπισμός των μεταγραφικών παραγόντων Relish1, R1d2 και RelB σε κύτταρα Hi5. Εικόνες μικροσκοπίας επιφθορισμού. Διακρίνονται οι πυρήνες των κυττάρων μετά από χρώση με DAPI (μπλε χρώμα, πρώτη στήλη) ή οι σημασμένοι με τον επίτοπο flag μεταγραφικοί παράγοντες μετά από ανίχνευση με τα αντισώματα anti-flag και anti-rabbit Alexa 568 (κόκκινο χρώμα, δεύτερη στήλη). Για τη διάτρηση των κυττάρων που εκφράζουν τους flag.Relish1 ή flag.R1d2 χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 0,1 % TritonX-100 σε PBS (A), ενώ στα κύτταρα που εκφράζουν τον flag.RelB η διάτρηση έγινε με 0,1 ή 0,2 % TritonX-100 (B).

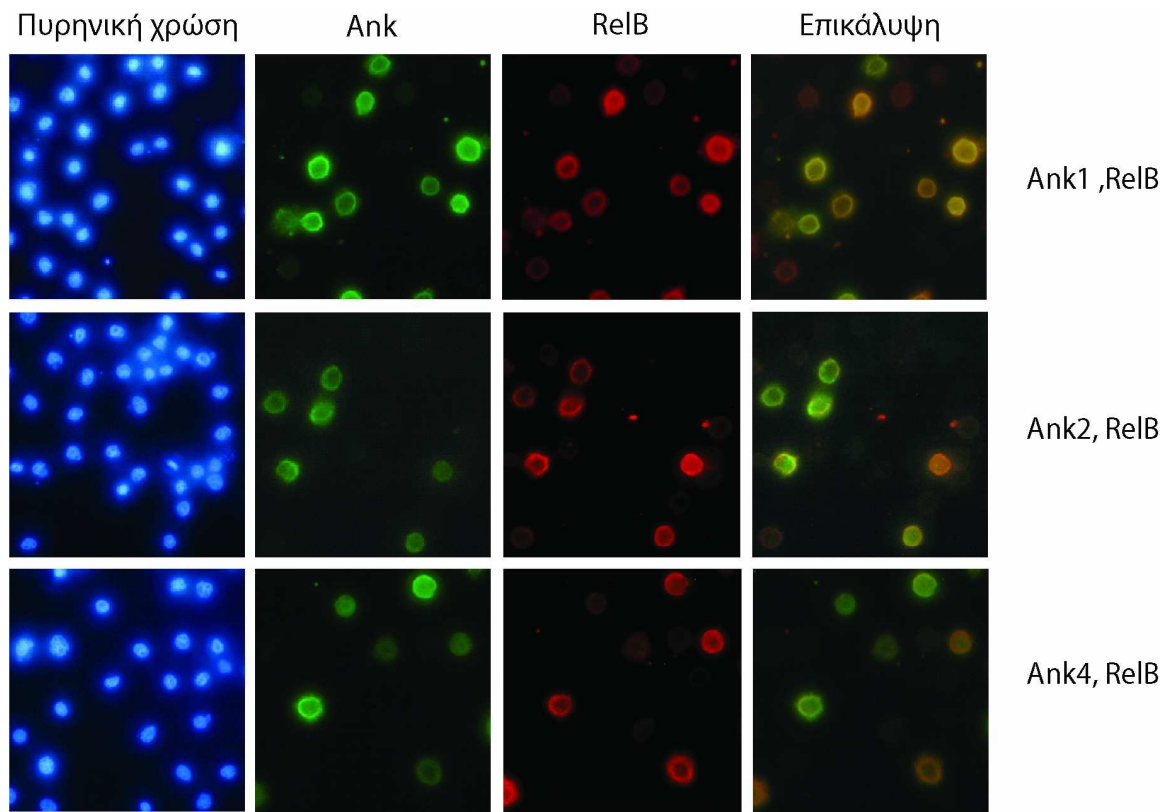
4.2.3 Συνεντοπισμός των πρωτεϊνών Ank σε συνδυασμό με τους μεταγραφικούς παράγοντες του *B. mori*

Σε πειράματα συνδιαμόλυνσης όπου συνεκφράστηκε ο παράγοντας R1d2 με καθεμία από τις πέντε ικές πρωτεΐνες Ank1, Ank2, Ank4, Ank8 και Ank9 παρατηρήθηκε με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού ότι, από τις εξεταζόμενες πρωτεΐνες, οι Ank4, Ank8 και Ank9 εμφανίζουν μερικό συνεντοπισμό με τον R1d2 στον πυρήνα, ενώ οι Ank1 και Ank2 δε συνεντοπίζονται με τον μεταγραφικό παράγοντα (εικόνα 36). Ο συνεντοπισμός των πρωτεϊνών Ank -4, 8 και 9 με τον R1d2 στον πυρήνα δείχνει ότι η προκαλούμενη από αυτές αναστολή της λειτουργικότητάς του θα μπορούσε να εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων. Αντίθετα, για την πρωτεΐνη Ank2 η αναστολή της λειτουργίας του μεταγραφικού παράγοντα R1d2 χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

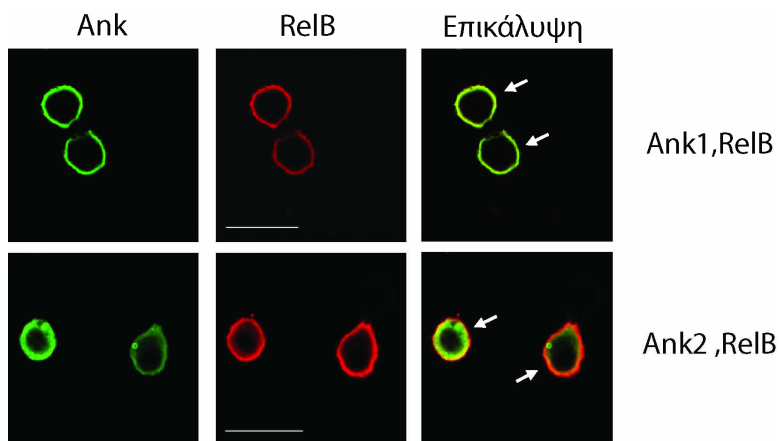


Εικόνα 36. Συνέκφραση των πρωτεϊνών Ank του CcBV με τον μεταγραφικό παράγοντα R1d2 του μεταξοσκώληκα σε κύτταρα Hi5. Ο παράγοντας R1d2 σημασμένος με τον επίτοπο flag συνεκφράστηκε με τις Ank1, Ank2, Ank4, Ank8 και Ank9 σημασμένες με τον επίτοπο myc. Η αντίχνευση των πυρήνων έγινε με χρώση TO-PRO-3 iodide και μπλε ψευδοχρωματισμό (πρώτη στήλη). Οι Ank-myc ανιχνεύθηκαν με anti-myc και anti-mouse-FITC (πράσινη χρώση, δεύτερη στήλη), ενώ ο flag.R1d2 ανιχνεύθηκε με πολυκλωνικό anti-flag και anti-rabbit-Alexa 568 (κόκκινη χρώση, τρίτη στήλη). Στην τελευταία στήλη παρουσιάζεται η επικάλυψη των τριών χρώσεων. Τα βέλη δείχνουν κύτταρα με χαρακτηριστικό συνεντοπισμό Ank και R1d2. Η παρατήρηση έγινε με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης και οι κλίμακες αντιστοιχούν σε 200 μm.

Η συνέκφραση κάθε μιας από τις τρεις πρωτεΐνες Ank, Ank -1, 2 και 4, με τον μεταγραφικό παράγοντα RelB εμφάνισε συνεντοπισμό των ικών πρωτεϊνών με τον μεταγραφικό παράγοντα στο κυτταρόπλασμα (**εικόνα 37**). Για τις Ank1 και Ank2 ο συνεντοπισμός με τον συγκεκριμένο μεταγραφικό παράγοντα επιβεβαιώθηκε και με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης (**εικόνα 38**). Το γεγονός αυτό μπορεί να υποδηλώνει ότι η Ank2, η μόνη από τις πρωτεΐνες Ank που βρέθηκε να αναστέλλει τη λειτουργία του RelB, αλληλεπιδρά με τον RelB στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων.



Εικόνα 37. Υποκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών Ank με τον μεταγραφικό παράγοντα RelB. Ο συνεντοπισμός του μεταγραφικού παράγοντα flag.RelB με τις Ank1, Ank2 ή Ank4 εμφανίζεται στο κυτταρόπλασμα. Οι εικόνες προέρχονται από μικροσκοπία επιφθορισμού. Η αντίχρωση των πυρήνων έγινε με τη χρωστική DAPI (μπλε χρώση, πρώτη στήλη), η αντίχρωση των Ank.myc έγινε με τα αντισώματα anti-myc και anti-mouse-FITC (πράσινη χρώση, δεύτερη στήλη), ενώ ο flag.RelB ανιχνεύτηκε με πολυκλωνικό anti-flag και anti-rabbit-Alexa 568 (κόκκινη χρώση, τρίτη στήλη). Η επικάλυψη δύο χρωμάτων φαίνεται στην τελευταία στήλη.



Εικόνα 38. Συνεντοπισμός των πρωτεϊνών Ank1 και Ank2 με τον μεταγραφικό παράγοντα RelB στο κυτταρόπλασμα Hi5 κυττάρων. Η αντίχρωση του RelB σημασμένου με τον επίτοπο flag και των Ank σημασμένων με τον επίτοπο myc έγινε όπως στην εικόνα 37, αλλά η παρατήρηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με συνεστιακή μικροσκοπία. Η επικάλυψη των χρωμάτων από την αντίχρωση των πρωτεϊνών Ank και του παράγοντα RelB παρουσιάζεται στην τελευταία στήλη. Οι κλίμακες αντιστοιχούν σε 200 μm.

4.3 Πρωτεόλυση των πρωτεϊνών Ank του *CcBV*

Η συστηματικά χαμηλή έκφραση ορισμένων μελών της οικογένειας, όπως οι Ank2, Ank7 και Ank9 (εικόνες 24A, 26Γ και 26Δ), καθώς και η παρουσία φθορίζοντων κοκκίων, στα οποία συσσωρεύονται ορισμένες από τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες Ank, ιδιαιτέρως η πρωτεΐνη Ank2 (εικόνες 33, 38), μας οδήγησαν στην υπόθεση ότι κάποια από τα μέλη της οικογένειας των Ank ενδεχομένως υφίστανται πρωτεοσωμική αποικοδόμηση και ότι τα φθορίζοντα κοκκία αποτελούν σημεία αποικοδόμησής τους. Για να διερευνήσουμε αυτήν την υπόθεση, κύτταρα Hi5 διαμολύνθηκαν με πλασμίδια έκφρασης pEA.ank.myc-his και εξετάστηκαν, με ανάλυση κατά Western και ανοσοφθορισμό, ως προς την ποσότητα των αντίστοιχων εκφραζόμενων πρωτεϊνών παρουσία και απουσία του πρωτεοσωμικού αναστολέα MG132 [ή ZLLLal (Tsubuki et al. 1993)]. Στα πειράματα ανοσοφθορισμού, χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη Ank2 επειδή αυτή εμφανίζει πιο έντονο το πρότυπο συσσώρευσης σε ενδοκυτταρικά κοκκία. Παρατηρήθηκε ότι το πρότυπο αυτό ενισχύθηκε παρουσία του αναστολέα του πρωτεοσώματος MG132 (εικόνα 39A), γεγονός που υποδηλώνει πως, υπό φυσιολογικές συνθήκες, η πρωτεΐνη αποικοδομείται από το πρωτεόσωμα, ενώ παρουσία του MG132 η αποικοδόμησή της καταστέλλεται με αποτέλεσμα η συσσώρευση της Ank2 στα κυτταροπλασματικά κοκκία να αυξάνεται. Είναι, επομένως, πιθανό ότι τα παρατηρούμενα κοκκία αποτελούν πράγματι σημεία πρωτεοσωμικής αποικοδόμησης, αν και δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο να αποτελούν ενδιάμεσους σταθμούς στην πορεία της πρωτεΐνης πριν την πρωτεόλυση. Η πιθανότητα ταύτισης των παρατηρούμενων κοκκίων με λυσοσώματα, που επίσης συμμετέχουν στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών, αποκλείστηκε αφού, με τη χρήση ειδικής χρώσης για λυσοσώματα, πιστοποιήθηκε ότι δεν υπάρχει σύμπτωση ανάμεσα σε αυτά και τα κοκκία συσσώρευσης της Ank2 (εικόνα 39B).

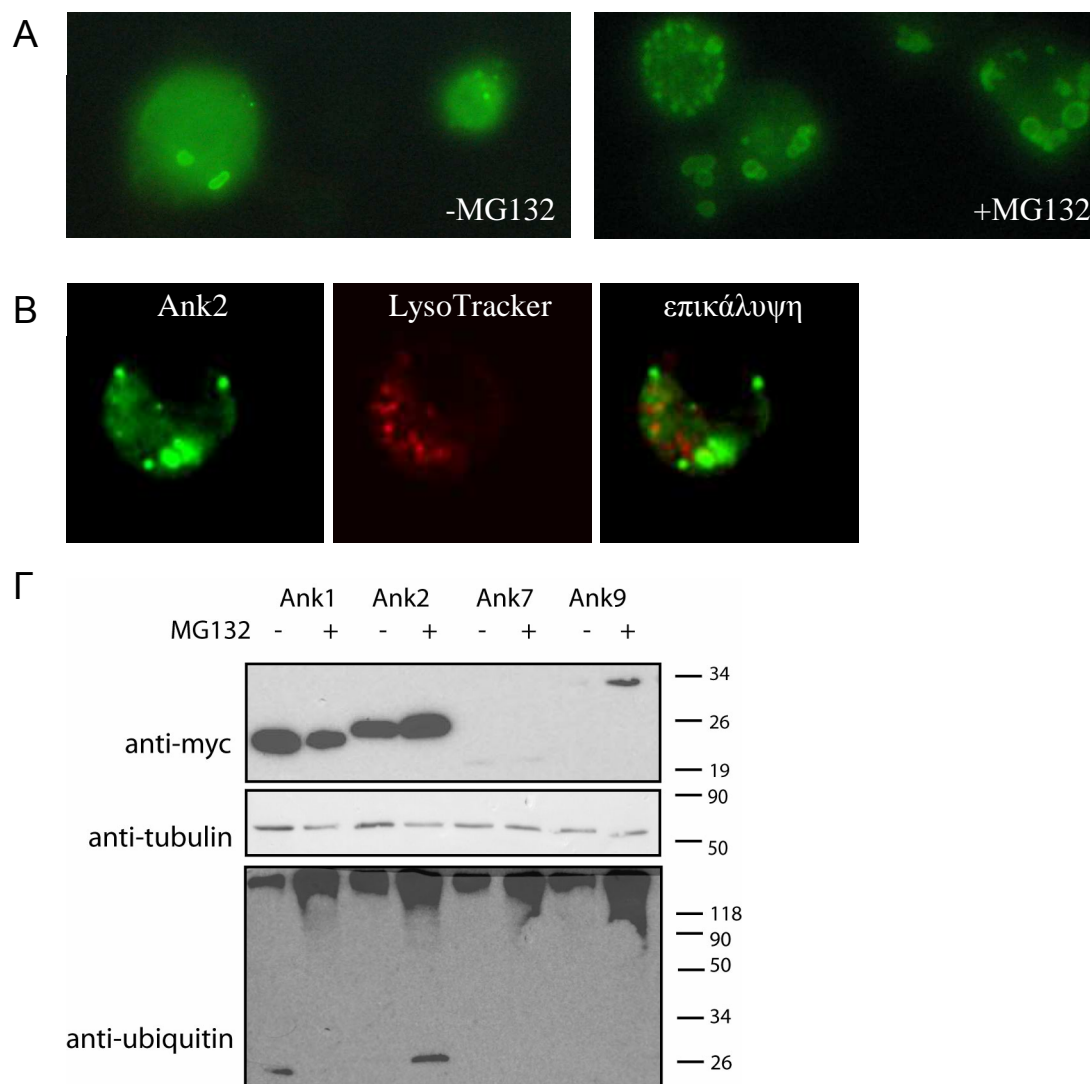
Από την άλλη πλευρά, η ανάλυση κατά Western έδειξε ότι η ποσότητα των πρωτεϊνών Ank2 και Ank9 αυξάνεται σημαντικά παρουσία του πρωτεοσωμικού αναστολέα (εικόνα 39Γ), γεγονός που υποδηλώνει ότι υπό συνθήκες παροδικής διαμόλυνσης, απουσία του MG132, τα δύο αυτά μόρια πράγματι αποικοδομούνται στο πρωτεόσωμα. Αντίθετα, η έκφραση των Ank1 και Ank7 φαίνεται ότι δεν επηρεάζεται από τον πρωτεοσωμικό αναστολέα (εικόνα 39Γ).

Για την πρωτεοσωμική αποικοδόμηση μιας πρωτεΐνης υπάρχουν δύο οδοί. Η πρώτη περιλαμβάνει την αποικοδόμηση πρωτεϊνών με περιοχές μη συγκεκριμένης διαμόρφωσης (unfolded) από το πρωτεόσωμα 20s (καταλυτική υπομονάδα του πρωτεοσώματος 26s)

χωρίς ουβικτινυλίωση του υποστρώματος (Asher et al. 2006). Η δεύτερη, και πιο μελετημένη, περιλαμβάνει την αποικοδόμηση από ολόκληρο το πρωτεόσωμα 26s μετά από επαγόμενη σήμανση της πρωτεΐνης-υποστρώματος με αλυσίδα πολυουβικτινίνης (Glickman and Ciechanover 2002). Ο αναστολέας MG132 αναστέλλει την 20s υπομονάδα (Tsubuki et al. 1993), επομένως επηρεάζει και τις δύο οδούς πρωτεοσωμικής αποικοδόμησης. Δεδομένου ότι μια πληθώρα πρωτεϊνών υφίσταται προσθήκη πολυουβικτινίνης πριν οδηγηθεί σε αποικοδόμηση, η μεμβράνη που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των πρωτεϊνών Ank παρουσία ή απουσία του MG132 επώαστηκε και με αντίσωμα έναντι της ουβικτινίνης, ώστε να ανιχνευθεί μια τυχόν τέτοια τροποποίηση των ικών πρωτεϊνών. Ανιχνεύθηκε, πράγματι, ουβικτινίνη στο ύψος που αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες Ank1 και Ank2 (εικόνα 39Γ), γεγονός που αποτελεί ένδειξη υπέρ της ουβικτινυλίωσης των δύο μορίων. Ωστόσο, η Ank1 παρουσιάζει ουβικτινυλίωση απουσία του αναστολέα MG132, ενώ η Ank2 παρουσία αυτού. Η διαφορετική ουβικτινυλίωση των δύο πρωτεϊνών ενδεχομένως δηλώνει τη διαφορετική ρύθμισή τους. Εξάλλου υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι μεταμεταφραστικής τροποποίησης που περιλαμβάνουν το μόριο της ουβικτινίνης, όπως η πολλαπλή μονοουβικτινυλίωση, η πολυουβικτινυλίωση με ομοτυπικές αλυσίδες ουβικτινίνης, όπου ο πολυμερισμός της γίνεται μέσω της λυσίνης⁴⁸ (λυσίνη στη θέση 48 της αμινοξικής ακολουθίας της ουβικτινίνης) οδηγώντας σε πρωτεόλυση, η πολυουβικτινυλίωση με ομοτυπικές αλυσίδες ουβικτινίνης όπου ο πολυμερισμός γίνεται μέσω άλλης λυσίνης, π. χ. της λυσίνης⁶³ (σχετίζεται με τη μεταγωγή σήματος, την εσωτερίκευση υποδοχέων, την επιδιόρθωση βλαβών του DNA (Keating and Bowie 2009)), της λυσίνης³³ κλπ ή η πολυουβικτινυλίωση όπου χρησιμοποιείται συνδυασμός καταλοίπων λυσίνης για τη σύνδεση των μορίων της ουβικτινίνης μεταξύ τους (Ikeda and Dikic 2008). Επομένως, οι πρωτεΐνες Ank1 και Ank2 πιθανόν να φέρουν διαφορετικό τύπο ουβικτινυλίωσης. Στο ύψος της Ank9 δε γίνεται ανίχνευση ουβικτινίνης, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην αποικοδόμηση της πρωτεΐνης μέσω οδού που είναι ανεξάρτητη από την ουβικτινίνη ή στο γεγονός ότι τα επίπεδα παραγωγής της συγκεκριμένης πρωτεΐνης είναι πολύ χαμηλά και οδηγούν σε τεχνική αδυναμία ανίχνευσης της ουβικτινίνης. Πάντως, όπως δείχτηκε στο κεφάλαιο 3, η συγκεκριμένη πρωτεΐνη φέρει τον υψηλότερο αριθμό προβλεπόμενων θέσεων ουβικτινυλίωσης. Η αποικοδόμηση της Ank9, επομένως, απαιτεί περαιτέρω ουσιαστική διερεύνηση.

Συμπερασματικά, για την Ank2 ο συνδυασμός των πειραμάτων ανοσοφθορισμού και ελέγχου της πρωτεϊνικής έκφρασης με ανοσοαποτύπωση κατά Western δείχνει ότι σε συνθήκες υπερέκφρασης, σε κύτταρα Hi5 η πρωτεΐνη αυτή υφίσταται αποικοδόμηση από

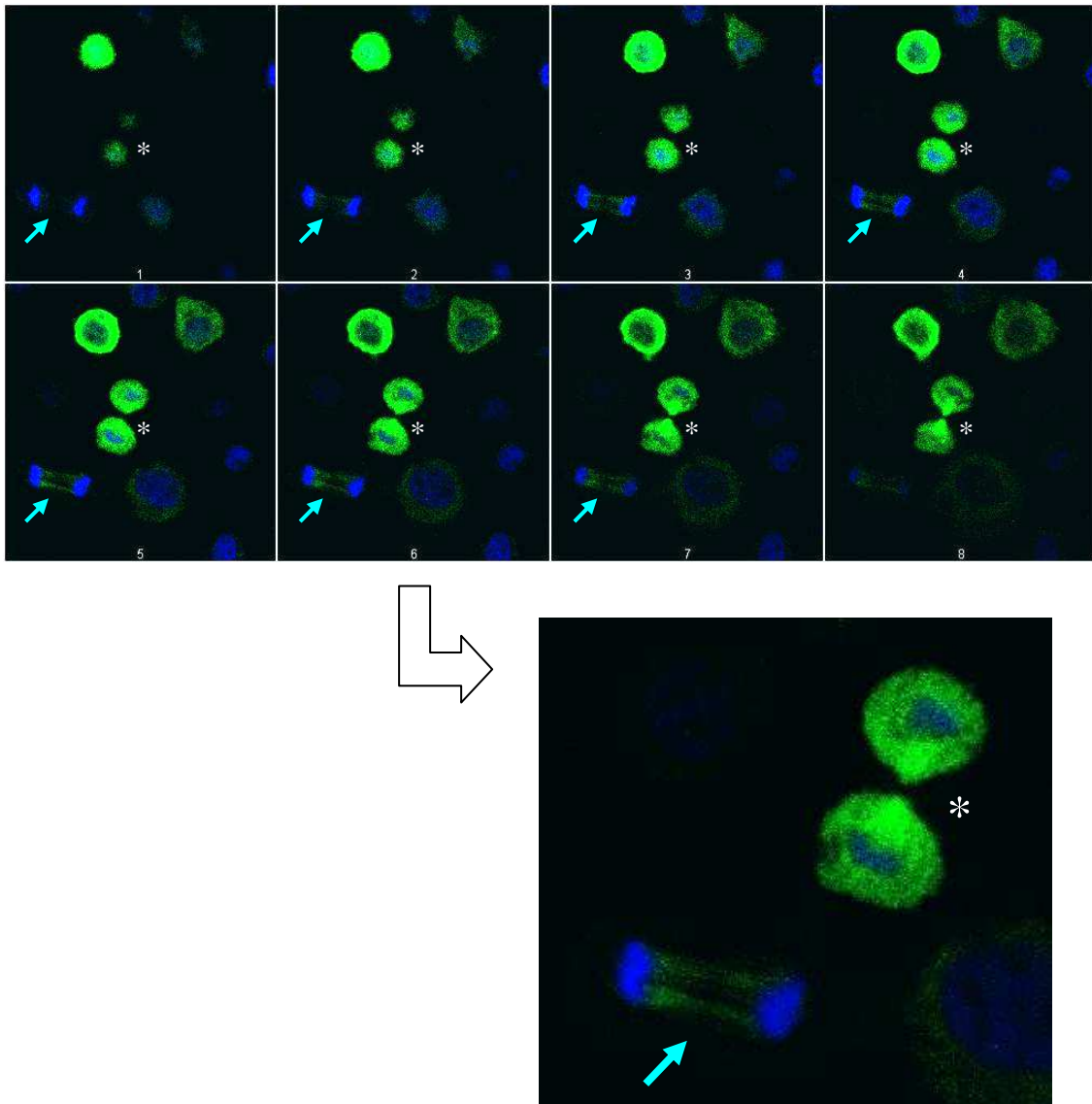
το πρωτεόσωμα. Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για την πρωτεΐνη Ank9 με βάση την παρατηρούμενη αλλαγή των επιπέδων της μετά την προσθήκη του πρωτεοσωμικού αναστολέα. Για τις Ank1 και Ank7 δεν παρατηρήθηκαν ενδείξεις πρωτεοσωμικής αποικοδόμησης.



Εικόνα 39. Επίδραση του πρωτεοσωμικού αναστολέα, MG132, στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών Ank. **A, B.** Ανοσοφθορισμός Hi5 κυττάρων που εκφράζουν την πρωτεΐνη Ank2 (πράσινο). **A.** Δύο υποπληθυσμοί κυττάρων που επώαστηκαν παρουσία και απουσία του αναστολέα του πρωτεοσώματος MG132. Οι ενδοκυτταρικές συσσωρεύσεις της Ank2 παρουσιάζονται αυξημένες παρουσία του MG132. Παρατήρηση με μικροσκόπιο επιφθορισμού. **B.** Κύτταρα μετά από επώαση με την κόκκινη, ειδική για λυσοσώματα χρωστική, LysoTracker, σε συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης. **Γ.** Έκφραση των πρωτεϊνών Ank1, Ank2, Ank7 και Ank9 σημασμένων με τον επίτοπο myc-his. Λύματα από διαμολυσμένες κυτταρικές καλλιέργειες, απουσία και παρουσία του MG132 για 24 ώρες, ελέγχθηκαν ως προς την ποσότητα των ικών πρωτεϊνών. Η ανίχνευσή τους έγινε με ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας το anti-myc αντίσωμα, ενώ για τον έλεγχο της φόρτωσης των δειγμάτων ανιχνεύθηκε η τουμποουλίνη με το αντίσωμα anti-tubulin. Στην ίδια μεμβράνη έγινε και ανίχνευση ουβικιτίνης χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-ubiquitin. Δεξιά της μεμβράνης παρουσιάζονται οι δείκτες μοριακού βάρους.

4.4 Συσχέτιση της πρωτεΐνης Ank2 με τη μιτωτική άτρακτο

Όπως προαναφέρθηκε, κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ανοσοφθορισμού, η πρωτεΐνη Ank2 συχνά παρουσίασε ιδιαίτερους φαινότυπους κυρίως με τον σχηματισμό συσσωματωμάτων στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων που την εκφράζουν. Επιπλέον, σε δύο περιπτώσεις διαιρούμενων κυττάρων προέκυψε η ενδιαφέρουσα παρατήρηση εντοπισμού της Ank2 σε δομές που θυμίζουν τη μιτωτική άτρακτο (από τις δύο διαιρέσεις η μία έχει σχεδόν ολοκληρωθεί και βρίσκεται στη φάση της κυτοκίνησης, ενώ η δεύτερη βρίσκεται σε εξέλιξη, **εικόνα 40**). Σε αυτές τις περιπτώσεις, η εν λόγω πρωτεΐνη φαίνεται να ακολουθεί το πρότυπο των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου. Αυτό το εύρημα συνάδει με αποτελέσματα από μια άλλη μελέτη, που συσχετίζει την ομόλογη πρωτεΐνη επαναλήψεων αγκυρίνης του *T. nigriceps bracovirus*, TnBV Ank1, με τους μικροσωληνίσκους και την οργάνωση του κυτταροσκελετού (Duchi et al. 2010). Περαιτέρω διερεύνηση της σχέσης της πρωτεΐνης Ank2 και των μικροσωληνίσκων με ταυτόχρονη χρώση της Ank2 και πρωτεϊνών που δομούν τους μικροσωληνίσκους (τουμπουλίνη) ή σχετίζονται με αυτούς και τη μιτωτική άτρακτο (όπως οι πρωτεΐνες-κινητήρες δυνεΐνη, κινεσίνη) απαιτείται για την επιβεβαίωση του φαινομένου και την κατανόηση της λειτουργίας του συγκεκριμένου ιικού μορίου.



Εικόνα 40. Παρουσία της Ank2 στη μιτωτική άτρακτο. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Ank2 σε κύτταρα Hi5 ανιχνεύτηκε σε σχηματισμούς που ομοιάζουν με τη μιτωτική άτρακτο διαιρούμενων κυττάρων. Με πράσινο ανιχνεύεται η Ank2, ενώ με μπλε ανιχνεύονται οι πυρήνες των κυττάρων μετά από χρώση με TO-PRO-3 iodide και μπλε ψευδοχρωματισμό. Οι επάνω δύο σειρές εικόνων παρουσιάζουν σειριακές τομές συνεστιακής μικροσκοπίας. Η κάτω εικόνα παρουσιάζει ένα από τα πάνω στιγμιότυπα σε μεγέθυνση. Το βέλος επισημαίνει ένα κύτταρο σε διαίρεση και ο αστερίσκος (*) δείχνει δύο κύτταρα που μόλις διαιρέθηκαν και η μιτωτική άτρακτος αποικοδομείται.

4.5 Σύνοψη-Συμπεράσματα κεφαλαίου

Η αναστολή στη μεταγραφική λειτουργία του παράγοντα R1d2 του *B. mori* από τις πρωτεΐνες Ank του CcBV, όπως φάνηκε από τα λειτουργικά πειράματα του κεφαλαίου 3, έθεσε το ερώτημα του υποκυτταρικού εντοπισμού και της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις ικές πρωτεΐνες και τους μεταγραφικούς παράγοντες. Εξετάστηκε η πιθανότητα αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις πρωτεΐνες Ank4 και Ank8 και τον R1d2, ωστόσο τόσο πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης όσο και πειράματα ανίχνευσης πρωτεϊνικών συμπλόκων με χρωματογραφία συγγένειας δεν έδωσαν κάποια ένδειξη *in vitro* αλληλεπίδρασης μεταξύ τους. Αντίθετα, οι δύο πρωτεΐνες Ank4 και Ank8 βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν ασθενώς με τον πλήρους μήκους παράγοντα Relish1, γεγονός που καθιστά πιθανή την αλληλεπίδραση των δύο ικών πρωτεϊνών *in vivo* και με τον ενεργό μεταγραφικό παράγοντα R1d2. Η μη εύρεση της συγκεκριμένης αλληλεπίδρασης πιθανά οφείλεται στην αποκλειστική παρουσία του R1d2 στον πυρήνα, σε αντίθεση με την ως επί το πλείστον κυτταροπλασματική (και δευτερευόντως πυρηνική) παρουσία των Ank4 και Ank8, που καθιστά την ανίχνευση των τυχόν αλληλεπιδράσεών τους δύσκολη.

Παρόλα αυτά, η επίδραση των Ank του CcBV στη λειτουργικότητα του R1d2 δείχτηκε με τα πειράματα φωταύγειας, τα οποία διακρίνονται από μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με τα συγκεκριμένα πειράματα αλληλεπίδρασης. Αυτή η ανασταλτική δράση των πρωτεϊνών Ank φαίνεται ότι, τουλάχιστον για τις Ank4, Ank8 και Ank9, επιτυγχάνεται από τα ποσοστά της κάθε πρωτεΐνης που βρίσκονται στον πυρήνα, εφόσον και οι τρεις πρωτεΐνες εμφανίζουν μερικό συνεντοπισμό με τον R1d2 στο συγκεκριμένο κυτταρικό διαμέρισμα. Αντίθετα, η πρωτεΐνη Ank2 η οποία παρουσιάζει αποκλειστικά κυτταροπλασματικό εντοπισμό, φαίνεται ότι αναστέλλει τον R1d2 με έμμεσο τρόπο από το κυτταρόπλασμα. Όσον αφορά την αναστολή του RelB από την Ank2, αυτή θα πρέπει να γίνεται με άμεσο τρόπο καθώς, όπως διαπιστώθηκε με μικροσκοπία φθορισμού, τα δύο μόρια συνεντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα.

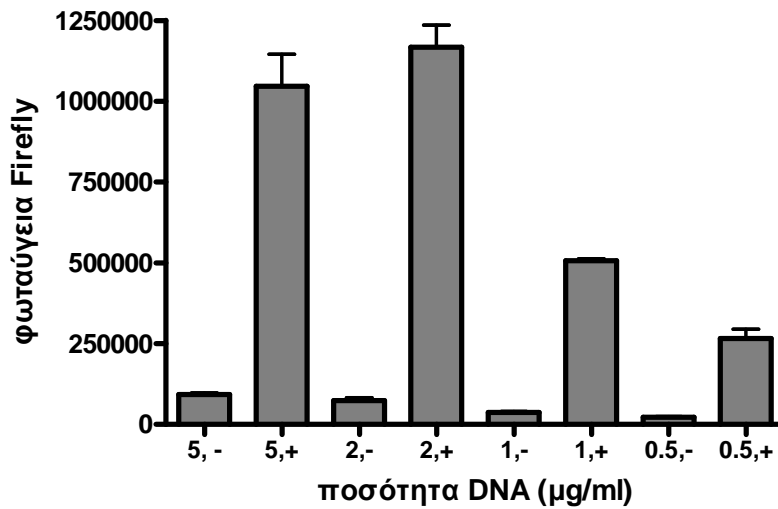
Η μελέτη της υποκυτταρικής κατανομής των πρωτεϊνών Ank παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς, με εξαίρεση τις Ank1 και Ank2, φαίνεται πως τα συγκεκριμένα μόρια μπορούν να μετακινούνται ανάμεσα στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα. Εξάλλου οι ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές στην υποκυτταρική κατανομή τους μπορεί να εξηγούν και τις λειτουργικές διαφορές τους. Άλλο ένα χαρακτηριστικό που φαίνεται να διαφοροποιεί τις Ank του CcBV μεταξύ τους είναι η ουβικιτινυλίωση. Τόσο η Ank1 όσο και η Ank2 ουβικιτινυλιώνονται, σε συμφωνία και με την πρόβλεψη θέσεων

ουβικιτινυλίωσης. Η ανιχνευθείσα ουβικιτινυλίωση μπορεί να σχετίζεται είτε με μεταγωγή σήματος για κάποια άγνωστη μέχρι στιγμής διαδικασία είτε με πρωτεοσωμική αποικοδόμηση. Για την Ank2, μόριο που σταθεροποιείται από την παρουσία του πρωτεοσωμικού αναστολέα MG132, φαίνεται ότι η προσθήκη ουβικιτίνης σχετίζεται με την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης. Αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα φαίνεται να υφίσταται και η Ank9, πρωτεΐνη για την οποία το εργαλείο πρόγνωσης προβλέπει τον μεγαλύτερο αριθμό θέσεων ουβικιτινυλίωσης σε σχέση με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας, παρότι δεν ανιχνεύτηκε ουβικιτινυλίωση στο συγκεκριμένο μόριο, πιθανά εξαιτίας της ιδιαίτερα χαμηλής έκφρασής του. Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει και ο εντοπισμός της πρωτεΐνης Ank2 σε σχηματισμό που ομοιάζει με τη μιτωτική άτρακτο, ιδιότητα που δεν έχει παρατηρηθεί για άλλα μέλη της οικογένειας και επομένως δύναται να αποτελεί διαφοροποιητικό στοιχείο ανάμεσά τους. Η παρατήρηση αυτή, ωστόσο, χρήζει περαιτέρω διερεύνησης καθώς τα αποτελέσματά μας είναι προκαταρκτικά και θα πρέπει να θεωρηθούν ως βάση μελλοντικών μελετών.

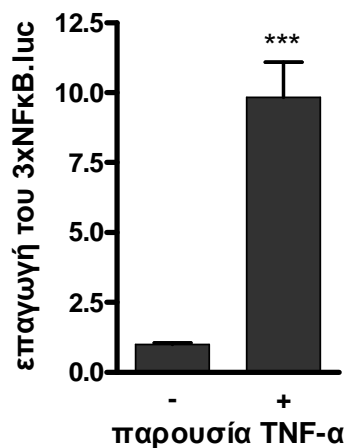
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Λειτουργικά πειράματα σε κύτταρα θηλαστικών

Προκειμένου να διερευνηθεί το εύρος των οργανισμών στους οποίους οι ικές πρωτεΐνες Ank αναστέλλουν Rel/NF-κB παράγοντες, διεξάχθηκαν λειτουργικά πειράματα στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά HEK293. Στη συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων, ελέγχθηκε η πιθανή ανασταλτική δράση των ικών μορίων στην ενδογενή NF-κB οδό μεταγωγής σήματος των κυττάρων. Ως πλασμίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το pCMV3xNF-κB.luc, το οποίο περιέχει το γονίδιο της Firefly λουσιφεράσης υπό τον βασικό υποκινητή του γονιδίου της σελεκτίνης ο οποίος διαθέτει τρεις θέσεις πρόσδεσης για τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB. Ως παράγοντας κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε η φωταύγεια από τη λουσιφεράση του οργανισμού *Renilla reniformis*, πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το πλασμίδιο pCMV-Renilla, το οποίο περιέχει το ανασυνδυσασμένο γονίδιο της λουσιφεράσης Renilla υπό τον υποκινητή του ανθρώπινου κυτομεγαλοϊού (Promega). Η μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς *Firefly luciferase* επάγεται μετά από επώαση με την κυτταροκίνη TNF-α (tumor necrosis factor α ή παράγοντας νέκρωσης όγκων α), καθώς αυτή ενεργοποιεί το μονοπάτι του ενδογενούς NF-κB.

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα προκειμένου να προσδιοριστεί η ποσότητα DNA που ήταν κατάλληλη για τις διαμολύνσεις των κυττάρων της συγκεκριμένης σειράς, ώστε να εξασφαλιστεί η μέγιστη ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 41**, η μέγιστη αύξηση της φωταύγειας από τη Firefly λουσιφεράση παρουσία 20 ng/ml TNF-α επιτεύχθηκε όταν η ολική ποσότητα του DNA ήταν 2 μg/ml. Χρησιμοποιώντας αυτήν την ποσότητα ολικού DNA και διαμολύνοντας τα κύτταρα με τα πλασμίδια αναφοράς και κανονικοποίησης, υπολογίστηκε ότι η κυτταροκίνη TNF-α προκαλεί επαγωγή του πλασμιδίου αναφοράς 10 φορές (**εικόνα 42**). Η επαγωγή αυτή κρίθηκε σημαντική βάσει της στατιστικής δοκιμασίας Student's t-test με διόρθωση κατά Welch (P value = 0,0001).



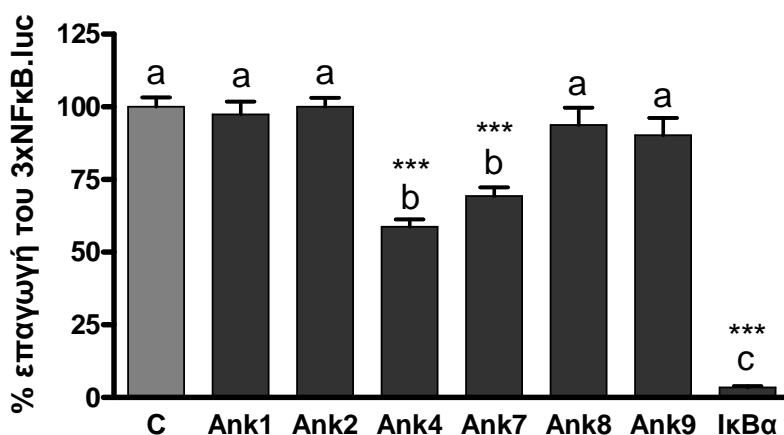
Εικόνα 41. Επιλογή κατάλληλης ποσότητας DNA για τη διαμόλυνση κυττάρων HEK293. Η επιλογή έγινε με βάση τη μέγιστη επαγωγή της φωταύγειας που παράγεται από τη Firefly λουσιφεράση. Κύτταρα (1.6×10^5) διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς pCMV3xNF-κB.luc και άδειο φορέα pcDNA3 σε διαφορετικά ποσά ολικού DNA παρουσία (+) ή απουσία (-) TNF-α. Οι τυπικές αποκλίσεις έχουν προκύψει από τρεις επαναλήψεις των ίδιων δειγμάτων.



Εικόνα 42. Επαγωγή του πλασμιδίου αναφοράς από την κυτταροκίνη TNF-α. Κύτταρα διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς pCMV3xNF-κB.luc, το πλασμίδιο κανονικοποίησης pCMV.renilla και άδειο φορέα pcDNA3. Το γράφημα παρουσιάζει την κανονικοποιημένη φωταύγεια παρουσία TNF-α (20 ng/ml) ως προς απουσία TNF-α. Οι αστερίσκοι δηλώνουν το επίπεδο σημαντικότητας της διαφοράς ανάμεσα στον εξεταζόμενο πληθυσμό και το δείγμα ελέγχου (***) = $P < 0,001$).

Για τον έλεγχο της επίδρασης των πρωτεϊνών Ank στην ενεργότητα του παράγοντα NF-κB σε παροδικές διαμολύνσεις των κυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pcDNA3.ank που εκφράζουν τις ικές πρωτεΐνες. Ως θετικός μάρτυρας αναστολής

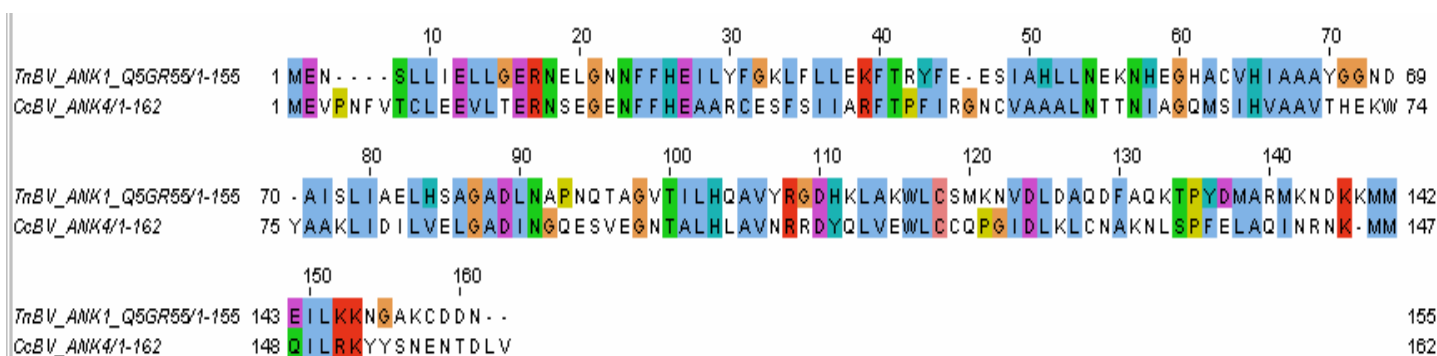
χρησιμοποιήθηκε η μεταλλαγμένη μορφή του αναστολέα του NF-κB, IκBa (ser32→ala32, ser36→ala36), η οποία είναι συστατικά ενεργή. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων συνοψίζονται στο διάγραμμα της **εικόνας 43**, το οποίο αναπαριστά την ποσοστιαία κανονικοποιημένη φωταύγεια κάθε δείγματος ως προς τη φωταύγεια του δείγματος ελέγχου. Ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA) έδειξε ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους κυτταρικούς πληθυσμούς που εκφράζουν τις πρωτεΐνες Ank ή την πρωτεΐνη IκBa και τον πληθυσμό ελέγχου ($F = 82.16$, $P \text{ value} < 0.0001$). Η post-hoc δοκιμασία πολλαπλών συγκρίσεων κατά Tukey προσδιόρισε ότι, επιπλέον του θετικού μάρτυρα (IκBa), στατιστικά σημαντικές διαφορές εμφανίζονται ανάμεσα στα δείγματα έκφρασης των Ank4 ή Ank7 και το δείγμα ελέγχου. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη Ank4 επέφερε μια μείωση στα επίπεδα της φωταύγειας κατά 40% και η Ank7 κατά 30%. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες δε φαίνεται να επηρέασαν τη μεταγραφή του γονιδίου της Firefly λουσιφεράσης από το μεταγραφικό παράγοντα NF-κB στο συγκεκριμένο σύστημα.



Εικόνα 43. Επίδραση των πρωτεϊνών Ank στη μεταγραφική λειτουργία του ενδογενούς NF-κB. Ως πλασμίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το pCMV-3xNF-κB.luc και ως πλασμίδιο κανονικοποίησης το pCMV.renilla. Η επαγωγή της ενδογενούς οδού NF-κB έγινε με τον παράγοντα TNF-α. Οι μετρήσεις της φωταύγειας της Firefly λουσιφεράσης κανονικοποιήθηκαν ως προς τις μετρήσεις της φωταύγειας της Renilla λουσιφεράσης και εκφράστηκαν ως ποσοστά της κανονικοποιημένης φωταύγειας του δείγματος ελέγχου (C). Οι γραμμές τυπικής απόκλισης προέρχονται από τρεις σειρές πειραμάτων με τρεις εσωτερικές επαναλήψεις. Η πρωτεΐνη IκBa χρησιμεύει ως θετικός μάρτυρας αναστολής. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν το επίπεδο σημαντικότητας της διαφοράς κάθε πληθυσμού και τα κύτταρα ελέγχου (***) = $P < 0,001$.

Σύνοψη-Συμπεράσματα κεφαλαίου

Τα λειτουργικά πειράματα φωταύγειας στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά HEK293 έδειξαν ότι δύο μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών Ank του CcBV παρουσιάζουν ανασταλτική δράση έναντι του ενδογενούς παράγοντα NF-κB στην οδό μεταγωγής σήματος που ελέγχεται από τον υποδοχέα TNFR. Η προκαλούμενη μείωση στα επίπεδα της φωταύγειας, 40% για την Ank4 και 30% για την Ank7 για τις ποσότητες των Ank πρωτεϊνών που εκφράστηκαν στα κύτταρα των συγκεκριμένων πειραμάτων, θεωρείται σημαντική δεδομένου ότι το σύστημα που χρησιμοποιείται είναι ετερόλογο ως προς τα ιικά μόρια. Το γεγονός ότι τη μεγαλύτερη αναστολή στη λειτουργία του παράγοντα NF-κB προκάλεσε η πρωτεΐνη Ank4 συνάδει με την εξελικτική συγγένεια της συγκεκριμένης πρωτεΐνης με την πρωτεΐνη TnBV1 του polydνα ιού της σφήκας *T. nigriceps*, για την οποία έχει δειχθεί από άλλους ερευνητές ότι αναστέλλει τη μεταγραφική ικανότητα του NF-κB των θηλαστικών έως και 70% (Falabella et al. 2007). Όπως φαίνεται και στην εικόνα της σύγκρισης των σχετικών αμινοξικών αλληλουχιών, οι δύο πρωτεΐνες έχουν αρκετά συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα (**εικόνα 44**), γεγονός που αιτιολογεί και την παρόμοια δράση τους στην αναστολή της σηματοδότησης μέσω του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB.



Εικόνα 44. Στοιχισμός της αμινοξικής ακολουθίας της πρωτεΐνης Ank4 του ιού CcBV με αυτήν της Ank1 του ιού TnBV. Τα διαφορετικά χρώματα αντιπροσωπεύουν αμινοξικά κατάλοιπα διαφορετικού τύπου (μωβ= όξινα κατάλοιπα, κόκκινο= βασικά κατάλοιπα, γαλάζιο= υδρόφοβα κατάλοιπα, τηρκουάζ= αρωματικά κατάλοιπα, πράσινο= πολικά, μη φορτισμένα κατάλοιπα, πορτοκαλί= γλυκίνη, ροζ= κυστεΐνη και κίτρινο= προλίνη).

Από τα αποτελέσματά μας προκύπτει ότι ορισμένα μέλη της οικογένειας Ank μπορούν να καταστέλλουν την ενδογενή οδό μεταγωγής σήματος NF-κB θηλαστικών κυττάρων, ενώ άλλα μέλη όχι. Επειδή δεν υπάρχουν διαθέσιμα αντισώματα έναντι των φυσικών Ank πρωτεϊνών, δε γνωρίζουμε αν οι διαφορές στη δραστηριότητα των έξι Ank

που εξετάστηκαν οφείλονται σε διαφορετικά επίπεδα έκφρασης στην κυτταρική σειρά HEK293. Σημειώνεται, επίσης, ότι με τη χρήση του προγράμματος Pfam για την πρόβλεψη λειτουργικών περιοχών (Coggill et al. 2008; Finn et al. 2008) δε βρέθηκαν διακριτές λειτουργικές περιοχές που να χαρακτηρίζουν κάποιες Ank του CcBV έναντι των υπολοίπων και, επομένως, να είναι δυνητικά υπεύθυνες για τις λειτουργικές διαφορές των Ank. Πολλαπλή στοίχιση των πρωτεϊνών Ank (**εικόνα 15**) δείχνει ότι όλες εμφανίζουν περιοχές αγκυρίνης, αν και η πρωτεΐνη Ank7, μια από τις πρωτεΐνες που παρουσιάζει δραστηριότητα στα κύτταρα HEK293, παρουσιάζει έλλειψη ενός μεγάλου τμήματος, που περιλαμβάνει και την πρώτη επανάληψη αγκυρίνης. Επομένως, οι λειτουργικές διαφορές ανάμεσα στα διάφορα μέλη της οικογένειας μπορεί να οφείλονται σε διαφορές στην αμινοξική ακολουθία, σε μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις όπως αυτές που αναφέρθηκαν στο δεύτερο κεφάλαιο, σε διαφορές στην υποκυτταρική κατανομή τους ή σε συνδυασμό κάποιων από αυτούς τους παράγοντες.

Κεφάλαιο 6: Συζήτηση

Προσφορά στο επιστημονικό πεδίο

Στην παρούσα διατριβή ελέγχθηκαν συστηματικά έξι μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών με επαναλήψεις αγκυρίνης του ενδοσυμβιωτικού ιού CcBV της *C. congregata* τόσο ως προς την υποκυτταρική τους κατανομή όσο και ως προς την επίδρασή τους στην ενεργότητα Rel/NF-κB μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι συμμετέχουν ενεργά στην εγγενή ανοσία των εντόμων. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με την υπόθεση της δράσης των πρωτεϊνών Ank ως αναστολέων Rel/NF-κB παραγόντων, η οποία βασίζεται στην ομολογία τους με μόρια τύπου IκB, αφού πέντε μέλη της CcBV Ank οικογένειας βρέθηκε ότι αναστέλλουν τον ενεργό παράγοντα Relish1 και ένα μέλος αναστέλλει τον παράγοντα RelB του μεταξοσκώληκα. Κατ'επέκταση οι πρωτεΐνες της οικογένειας Ank του CcBV έχουν την ικανότητα να καταστέλλουν τις κύριες ανοσολογικές οδούς μεταγωγής σήματος Toll και Imd, με έμφαση στην οδό Imd, στα Λεπιδόπτερα έντομα. Η σύγκριση ανάμεσα σε τόσα μέλη μιας οικογένειας πρωτεϊνών Ank από polydna ιούς, τόσο σε επίπεδο λειτουργικότητας όσο και σε επίπεδο υποκυτταρικής κατανομής, επιχειρείται για πρώτη φορά και δίνει τη δυνατότητα κατανόησης της ποικιλομορφίας που υπάρχει στις συγκεκριμένες οικογένειες των polydna ιών. Επίσης, φαίνεται ότι τα μέλη της οικογένειας Ank του ενδοσυμβιωτικού ιού ενός Υμενόπτερου που παρασιτεί ένα συγκεκριμένο Λεπιδόπτερο μπορούν να παρεμποδίζουν τη λειτουργία ρυθμιστών της ανοσίας και από άλλα Λεπιδόπτερα πλην του φυσικού ξενιστή. Επομένως, πρωτεΐνες των ιών PDV, όπως οι Ank, θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στην καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος επιβλαβών εντόμων και να χρησιμοποιηθούν για την ενίσχυση στρατηγικών καταπολέμησης εντόμων οι οποίες βασίζονται στη χρήση εντομοπαθογόνων ιών, βακτηρίων ή μυκήτων. Η συγκριτική μελέτη ανάμεσα στις ικές πρωτεΐνες, σαν αυτή που παρουσιάζεται στην παρούσα διατριβή, μπορεί να βοηθήσει στην επιλογή των κατάλληλων πρωτεϊνών που θα προκαλούν τον καλύτερο δυνατό έλεγχο των επιβλαβών πληθυσμών και τις μικρότερες δυνατές επιδράσεις σε άλλους οργανισμούς, είτε έντομα είτε θηλαστικά.

Σύνοψη-Συμπεράσματα

Έξι γονίδια *ank* του CcBV υποκλωνοποιήθηκαν σε φορείς κατάλληλους για έκφραση σε κύτταρα λεπιδοπτέρων εντόμων και εκφράστηκαν στην κυτταρική σειρά Hi5. Ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας Ank του CcBV που εξετάστηκαν, παρατηρήθηκε μια συστηματική διαφοροποίηση ως προς τα επίπεδα έκφρασής τους. Οι πρωτεΐνες Ank1, Ank4 και Ank8 εκφράζονται σε πολύ υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τις πρωτεΐνες Ank2, Ank7 και Ank9. Ομοίως, άνισα πρωτεϊνικά επίπεδα έχουν καταγραφεί και για τις ομόλογες πρωτεΐνες Vankyrin ενός άλλου polydnavirus, του *C. sonorensis* ichnovirus ή CsIV. Σε κύτταρα Sf9 της *S. frugiperda* και S2 της *Drosophila* διαμολυσμένα με πλασμίδια που διέφεραν μόνο ως προς το ΑΠΑ των γονιδίων εμφανίστηκαν διαφορές στην πρωτεϊνική έκφραση των Vankyrin. Όλες οι πρωτεΐνες Vankyrin ανιχνεύθηκαν με ανοσοκυτταροχημεία, όμως παρουσιάστηκαν διαφορές ως προς τον αριθμό των κυττάρων που εκφράζουν τα συγκεκριμένα μέλη της οικογένειας. Οι πρωτεΐνες P-vank-2, P-vank-4 και I²-vank-2 εκφράζονται σε πολύ λιγότερα κύτταρα από τις P-vank-1, P-vank-3, I²-vank-1 και I²-vank-3 και μόνο η δεύτερη κατηγορία πρωτεϊνών ανιχνεύεται με ανοσοαποτύπωση κατά Western σε λύματα διαμολυσμένων κυττάρων (Kroemer and Webb 2006). Με PCR πραγματικού χρόνου διαπιστώθηκε ότι η είσοδος των διαφορετικών πλασμιδίων στα κύτταρα και η μεταγραφή των ξεχωριστών γονιδίων ήταν σε παρόμοια επίπεδα, άρα τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των Vankyrins οφείλονται σε διαφορές στην απόδοση της μετάφρασης ή της αποικοδόμησης των πρωτεϊνών (Kroemer and Webb 2006). Παρομοίως, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι πιθανώς οι πρωτεΐνες Ank του CcBV υπόκεινται σε διαφορετική αποικοδόμηση. Ένα μέλος της οικογένειας του CcBV, η Ank9 με τη χαμηλότερη έκφραση, προβλέπεται ότι έχει τον υψηλότερο αριθμό θέσεων φωσφορυλίωσης. Με βάση κατάλληλα εργαλεία πρόβλεψης, ορισμένες από τις υποψήφιες θέσεις φωσφορυλίωσης αποτελούν υπόστρωμα της κινάσης καζεΐνης (casein kinase II ή CKII), μια κινάση που συνδέεται άμεσα με τη ρύθμιση της σταθερότητας και της αποικοδόμησης των αναστολέων IκBa και Cactus του ανθρώπου και της *Drosophila*, αντίστοιχα, τις οποίες η κινάση CKII φωσφορυλιώνει συστατικά στην αλληλουχία PEST (Lin et al. 1996; McElhinny et al. 1996; Liu et al. 1997; Packman et al. 1997). Πειράματα με τον πρωτεοσωμικό αναστολέα MG132 σε κύτταρα που εκφράζουν τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες Ank έδειξαν ότι πράγματι η Ank9, αλλά και η Ank2, υπόκεινται σε πρωτεοσωμική αποικοδόμηση, ερμηνεύοντας εν μέρει τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης των δύο συγκεκριμένων μορίων. Η ανίχνευση ζώνης στη θέση που μεταναστεύει

η Ank2 με αντίσωμα έναντι της ουβικιτίνης και η μικροσκοπική παρατήρηση της συσσώρευσης της Ank2 σε ενδοκυτταρικά κοκκία, τα οποία αυξάνονται παρουσία του αναστολέα MG132, αποτελούν ενδείξεις ότι αυτοί οι σχηματισμοί είναι σημεία αποικοδόμησης της πρωτεΐνης στο πρωτεόσωμα και ενισχύουν την υπόθεση της πρωτεοσωμικής αποικοδόμησης της πρωτεΐνης.

Για τον έλεγχο της επίδρασης των έξι πρωτεϊνών Ank στις οδούς μεταγωγής σήματος Toll και Imd χρησιμοποιήθηκαν τα γονίδια των ετερόλογων μεταγραφικών παραγόντων Relish1 και RelB του Λεπιδόπτερου *B. mori*, καθώς τα γονίδια τέτοιων παραγόντων από το φυσικό ξενιστή της *C. congregata*, *M. sexta*, δεν ήταν διαθέσιμα. Επίσης, τα λειτουργικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν στην ετερόλογη κυτταρική σειρά του Λεπιδόπτερου *T. ni*, Hi5. Η οδός μεταγωγής σήματος Toll του ανοσοποιητικού συστήματος των εντόμων ενεργοποιήθηκε με έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα RelB χρησιμοποιώντας ως σύστημα αναφοράς τη μετρούμενη φωταύγεια που ελέγχεται από τον υποκινητή του γονιδίου της αττασίνης. Οι λειτουργικές δοκιμασίες έδειξαν ότι, παρουσία άνισων πρωτεϊνικών ποσοτήτων των διαφορετικών μελών της οικογένειας Ank, η μεσολαβούμενη από τον RelB μεταγραφή του γονιδίου της αττασίνης αναστέλλεται μόνο από την πρωτεΐνη Ank2. Εντούτοις, βάσει της ομολογίας των πρωτεϊνών Ank με τους παράγοντες IkBα και Cactus, περισσότερα μέλη της οικογένειας αναμένονταν να επιδρούν σε αυτήν τη σηματοδοτική οδό. Δεδομένου ότι η Ank2 σημείωσε τη δεύτερη χαμηλότερη έκφραση στα συγκεκριμένα λειτουργικά πειράματα, φαίνεται ότι η ανασταλτική δράση των πρωτεϊνών Ank δεν είναι ανάλογη με τα επίπεδα έκφρασής τους.

Στην άλλη οδό μεταγωγής σήματος του ανοσοποιητικού συστήματος των εντόμων, την Imd, εξετάστηκε η επίδραση έξι μελών της οικογένειας CcBV Ank στα επίπεδα φωταύγειας που παράγονται από τη λουσιφεράση, η έκφραση της οποίας βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου που κωδικοποιεί το αντιμικροβιακό πεπτίδιο κεκροπίνη B1. Καθώς ο συγκεκριμένος υποκινητής φέρει στοιχεία ρύθμισης από NF-κB παράγοντες, το γονίδιο αναφοράς ενεργοποιείται από τέτοιους παράγοντες. Ο πλήρους μήκους μεταγραφικός παράγοντας Relish1, ωστόσο, δεν μπόρεσε να χρησιμοποιηθεί καθώς δεν επάγει το γονίδιο αναφοράς, πιθανώς γιατί στην κυτταρική σειρά Hi5 δεν είναι εφικτή η ενζυμική πρωτεόλυσή του, διαδικασία απαραίτητη για την ενεργοποίησή του (Tanaka et al. 2007). Η απουσία πρωτεολυτικής ενεργοποίησης του Relish1 διαπιστώθηκε από τη μη ανίχνευση της ενεργούς μορφής του Relish1 με ανοσοαποτύπωση κατά Western μετά από επίδραση με λιποπολυσακχαρίτες. Αντίθετα, η μεταλλαγμένη μορφή του Relish1, R1d2, που είναι συστατικά ενεργή χάρη στην απαλοιφή της ανασταλτικής περιοχής

επαναλήψεων αγκυρίνης (ARD), επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς κατά 15 φορές. Η επαγωγή της οδού Imd ήταν σε υψηλότερα επίπεδα από την οδό Toll, πιθανώς λόγω της υψηλότερης συγγένειας που επιδεικνύει ο R1d2, σε σχέση με τον RelB, ως προς τις θέσεις πρόσδεσης Rel/NF-κB παραγόντων στους υποκινητές των γονιδίων της κεκροπίνης B1 και αττασίνης (Tanaka et al. 2009). Τα αποτελέσματα των δοκιμασιών φωταύγειας έδειξαν ότι όλα τα μέλη της οικογένειας Ank που εξετάστηκαν παρουσίασαν ανασταλτική επίδραση στον R1d2, με εξαίρεση την πρωτεΐνη Ank1 που δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική αναστολή. Προκειμένου να γίνει σύγκριση ανάμεσα στις διαφορετικές πρωτεΐνες Ank, διεξήχθησαν δοκιμασίες μετά από εξομοίωση των επιπέδων έκφρασής τους διαμολύνοντας τα κύτταρα με άνισες ποσότητες πλασμιδίων και μετά από έλεγχο με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Κάτω από αυτές τις συνθήκες όλα τα μέλη που εξετάστηκαν, με εξαίρεση την Ank1, προκάλεσαν αναστολή στη μεταγραφική λειτουργία του R1d2. Η αναστολή ήταν διαφορετική και για τρία μέλη που εξετάστηκαν δοσοεξαρτώμενη, και άρα ειδική. Οι πρωτεΐνες που φυσιολογικά έχουν υψηλή έκφραση, όπως οι Ank8 και Ank1, όταν εκφράστηκαν σε επίπεδα συγκρίσιμα με τις υπόλοιπες Ank προκάλεσαν μικρή ή μηδενική αναστολή, αντίστοιχα, γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανά απαιτείται ικανή ποσότητα αυτών προκειμένου να είναι δραστικές. Αντίθετα, τα χαμηλότερα επίπεδα φωταύγειας και η μέγιστη αναστολή στην ενεργότητα του R1d2 σημειώθηκαν παρουσία των πρωτεϊνών Ank9 και Ank2 αν και παρουσιάζουν εν γένει χαμηλή έκφραση. Η πρωτεΐνη Ank9, ο πιο ισχυρός αναστολέας της δράσης του R1d2, είναι η πιο απομακρυσμένη πρωτεΐνη από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας τόσο ως προς την ακολουθία όσο και ως προς συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, όπως το προβλεπόμενο σήμα πυρηνικού εντοπισμού και ο μεγάλος αριθμός πιθανών θέσεων φωσφορυλίωσης. Τα χαρακτηριστικά αυτά διαφοροποιούν την Ank9 από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες Ank του CcBV και πιθανώς συσχετίζονται με τη μεγαλύτερη ανασταλτική δράση που εμφανίζει η Ank9 έναντι του R1d2. Ο δεύτερος ισχυρότερος αναστολέας ήταν η πρωτεΐνη Ank2. Η ανασταλτική δράση της Ank2 τόσο ως προς τον R1d2 όσο και ως προς τον RelB δείχνει ότι η πρωτεΐνη αυτή είναι το μόνο μέλος της οικογένειας Ank του CcBV με αποδεδειγμένη επίδραση και στις δύο οδούς μεταγωγής σήματος, Imd και Toll. Η συμμετοχή της Ank2 στην καταστολή των ανοσολογικών οδών *in vitro* βρίσκεται σε συμφωνία με την εμφάνιση των μεταγράφων της *in vivo* σε παρασιτισμένες προνύμφες της *M. sexta* σε έναν από τους δύο κύριους ιστούς της ανοσολογικής απόκρισης, το λιπαρό σώμα (Falabella et al. 2007).

Για να επιβεβαιωθεί η συμμετοχή των πρωτεϊνών Ank σε κοινό σύμπλοκο με τον ενεργό μεταγραφικό παράγοντα R1d2 διεξήχθησαν πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης

και pull-down ανάμεσα στις Ank4, Ank8 και τον ενεργό παράγοντα. Η επιλογή των ικών πρωτεϊνών έγινε γιατί αφενός είχαν στατιστικά σημαντική ανασταλτική δράση στον R1d2 και αφετέρου υψηλά επίπεδα έκφρασης. Ωστόσο, δε διαπιστώθηκε κάποια αλληλεπίδραση, πιθανώς εξαιτίας του αποκλειστικά πυρηνικού εντοπισμού του R1d2 σε αντίθεση με την ως επί το πλείστον κυτταροπλασματική, και δευτερευόντως πυρηνική, παρουσία των πρωτεϊνών Ank4 και Ank8. Από την άλλη πλευρά, με πειράματα pull-down σε κυτταρικά λύματα συνέκφρασης των Ank4 ή Ank8 με τον πλήρους μήκους μεταγραφικό παράγοντα Relish1, διαπιστώθηκε αλληλεπίδραση ανάμεσα στις δύο ικές πρωτεΐνες και τον Relish1. Η ανίχνευση της αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών Ank με τον Relish1 πιθανά είναι ευκολότερη από την ανίχνευση μιας υποθετικής αλληλεπίδρασης με τον R1d2, αφού ο πλήρους μήκους παράγοντας εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, όπως και το μεγαλύτερο ποσοστό των μορίων Ank4 και Ank8. Επιπλέον, ενδεχομένως το πλήρους μήκους μόριο να δημιουργεί πιο σταθερές αλληλεπιδράσεις με τις Ank4 και Ank8 σε σχέση με το μεταλλαγμένο R1d2 και γι' αυτό να ανιχνεύεται ευκολότερα η αλληλεπίδρασή του. Σε κάθε περίπτωση, η αλληλεπίδραση του Relish1 με τις Ank4 και Ank8 χρήζει περαιτέρω διερεύνησης προκειμένου να αποσαφηνιστεί αν είναι άμεση ή έμμεση, ωστόσο υποδηλώνει ότι η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Ank του CcBV με τον R1d2 ή την ενεργοποιημένη φυσική μορφή του Relish1 του μεταξοσκώληκα είναι πιθανή *in vivo*. Κατ'επέκταση είναι πιθανό τα ικά μόρια να αλληλεπιδρούν και με τον ομόλογο μεταγραφικό παράγοντα του φυσικού ξενιστή.

Πειράματα ανοσοφθορισμού σε κύτταρα Hi5 που εκφράζουν παροδικά τις πρωτεΐνες Ank έδειξαν ετερογένεια στον υποκυτταρικό εντοπισμό ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας. Για ορισμένα μέλη παρατηρήθηκε ότι η ίδια πρωτεΐνη μπορεί να απαντά σε περισσότερα του ενός υποκυτταρικά διαμερίσματα, όπως συμβαίνει για τις Ank -4, 8 και 9 οι οποίες εντοπίζονται πρωτίστως στο κυτταρόπλασμα και δευτερευόντως στην πυρηνική μεμβράνη ή τον πυρήνα. Η μετάβαση των πρωτεϊνών Ank εντός κι εκτός του πυρήνα θα μπορούσε να καθορίζεται από αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες, δεδομένου ότι οι επαναλήψεις αγκυρίνης θεωρούνται κατεξοχήν περιοχές υπεύθυνες για πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Η ποικιλομορφία που συναντάται στην υποκυτταρική κατανομή των πρωτεϊνών Ank του CcBV έχει παρατηρηθεί επίσης και στην ομόλογη πολυπρωτεϊνική οικογένεια των Vankyrins του ιού CsIV (Kroemer and Webb 2006). Οι πρωτεΐνες P-vank-1 και I²-vank-3 (που φυσιολογικά εκφράζονται στο λιπαρό σώμα του ξενιστή *H. virescens*) εμφανίζουν πυρηνικό και κυτταροπλασματικό εντοπισμό σε κύτταρα Sf9, ενώ εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα σε κύτταρα Hi5. Οι πρωτεΐνες P-vank-2, P-vank-

4 και I²-vank-1 (που φυσιολογικά εκφράζονται στα αιμοκύτταρα του ξενιστή) ανιχνεύονται αποκλειστικά στον πυρήνα των κυττάρων Sf9 και Hi5, ενώ η P-vank-3 (με αιμοκυτταρική έκφραση) και η I² vank-2 (με έκφραση στο λιπαρό σώμα) ανιχνεύονται σε κυτταροπλασματικά κοκκία (Kroemer and Webb 2006). Η παρουσία πρωτεϊνών Vankyrin του CsIV σε κοκκία συνάδει και με την εμφάνιση της Ank2 του CcBV σε κυτταροπλασματικά κοκκία. Επιπλέον, η υπερέκφραση των Vankyrins έδειξε ότι ο υποκυτταρικός εντοπισμός τους μπορεί να αλλάζει μετά από επίδραση ανοσολογικού ερεθίσματος, όπως λιποπολυσακχαρίτες, λαμιναρίνη ή μόλυνση με βακτροϊούς στις κυτταρικές σειρές (Kroemer and Webb 2006). Επομένως, τόσο από τις Ank του CcBV όσο και από τις Vankyrins του CsIV διαμορφώνεται η θεωρία ότι οι πρωτεΐνες επαναλήψεων αγκυρίνης των polydna ιών μπορούν να μεταφέρονται ανάμεσα στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα, ενώ η παρατήρηση της ίδιας πρωτεΐνης Ank σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα ανάμεσα σε διαφορετικά κύτταρα (και όχι μια διάχυτη παρουσία) υποδεικνύει ότι ο εντοπισμός τους υπόκειται σε συγκεκριμένη ρύθμιση.

Ο υποκυτταρικός εντοπισμός των μεταγραφικών παραγόντων Relish1 και R1d2 του *B. mori* που χρησιμοποιήθηκαν στα λειτουργικά πειράματα ήταν ο αναμενόμενος. Ο Relish1 βρέθηκε να έχει κυτταροπλασματικό εντοπισμό σε συμφωνία με την απουσία μεταγραφικής ενεργότητας, ενώ η ενεργή μεταλλαγμένη μορφή R1d2 εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα. Στα πειράματα συνέκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα R1d2 και των CcBV Ank παρατηρήθηκε πυρηνικός συνεντοπισμός του R1d2 με τις πρωτεΐνες Ank4, Ank8 και Ank9. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες στα λειτουργικά πειράματα φωταύγειας είχαν δείξει ανασταλτική δράση της μεταγραφικής του ενεργότητας. Επομένως, η ανασταλτική τους δράση θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα άμεσης αλληλεπίδρασης με τον R1d2 στον πυρήνα. Μια τέτοια αλληλεπίδραση θα παρεμπόδιζε την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα στα στοιχεία κB στο DNA. Αντίθετα, η πρωτεΐνη Ank2 φαίνεται να ακολουθεί έναν διαφορετικό μηχανισμό αναστολής του R1d2 δεδομένης της κυτταροπλασματικής της εμφάνισης.

Οι πρωτεΐνες Ank των PDVs συχνά παρομοιάζονται με την πρωτεΐνη A238L ενός άλλου ιού, του αφρικανικού ιού των χοίρων (African swine fever virus ή ASFV). Αυτή η πρωτεΐνη αποτελείται από 238 α. κ. και περιέχει επαναλήψεις αγκυρίνης παρόμοιες με αυτές των παραγόντων IκB. Καθώς διαθέτει τέσσερις επαναλήψεις αγκυρίνης, σε σχέση με τις έξι των πρωτεϊνών IκB, ενώ στερείται ρυθμιστικές περιοχές των παραγόντων IκB, όπως συμβαίνει και για τις Ank των PDVs, θεωρείται ότι έχει τη δυνατότητα να λειτουργεί ως ένας φυσικός, συστατικός αναστολέας της λειτουργίας του NF-κB. Πράγματι, η πρωτεΐνη

A238L αναστέλλει με ειδικό τρόπο τη μεταγραφή γονιδίου αναφοράς με στοιχεία κB στον υποκινητή του. Συγκεκριμένα, σε κύτταρα Vero παρουσία της A238L, τόσο τα βασικά επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου αναφοράς ανεστάληκαν, όσο και τα επαγόμενα από TNF- α επίπεδα μεταγραφής (Revilla et al. 1998). Ενώ σε κύτταρα Jurkat, η ίδια πρωτεΐνη εμπόδισε την ενεργοποίηση της μεταγραφής από δύο ξεχωριστά σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούν τον παράγοντα NF- κ B, δείχνοντας ότι πιθανώς η ιική πρωτεΐνη δρα απευθείας στον μεταγραφικό παράγοντα. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη A238L βρέθηκε να απομακρύνει το σύμπλοκο p65/p50, και όχι το ανενεργό σύμπλοκο p50/p50, από το DNA, ενώ συνανοσοκατακρημνίζεται με τον παράγοντα p65 και αναστέλλει την πρόσδεση του συμπλόκου p65/p50 στο DNA (Revilla et al. 1998). Αυτό συνδέει άμεσα τη λειτουργία της πρωτεΐνης A238L με αυτήν του I κ B α , αφού και αυτός αλληλεπιδρά με ενεργά σύμπλοκα NF- κ B, όπως το p65/p50, αλλά όχι με ανενεργά σύμπλοκα όπως το p50/p50.

Από την άλλη πλευρά, η πρωτεΐνη A238L εκτός από την αναστολή του NF- κ B, προκαλεί και αναστολή της φωσφατάσης καλσινευρίνη. Η A238L έχει δύο μορφές, την 28 και την 32 kDa, οι οποίες ανιχνεύονται στην αρχή της μόλυνσης κυρίως στο κυτταρόπλασμα, ενώ αυξημένες ποσότητες της A238L ανιχνεύονται στον πυρήνα στις 16 ώρες μετά τη μόλυνση (Silk et al. 2007). Μετά τις 16 ώρες υπερισχύει η μορφή των 32 kDa, ιδιαίτερα στον πυρήνα. Η είσοδος της A238L στον πυρήνα γίνεται τόσο με διάχυση όσο και με ενεργή μεταφορά. Φαίνεται πως η μορφή των 32 kDa, που είναι η μορφή που συνανοσοκατακρημνίζεται με τον p65, μετακινείται εντός κι εκτός του πυρήνα, ενώ η μορφή των 28 kDa, που δεν ανανοσοκατακρημνίζεται με τον p65, βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα όπου αναστέλλει την καλσινευρίνη. Πάντως, βάσει πειραμάτων, η A238L δε φαίνεται να επηρεάζει την είσοδο και την έξοδο του p65 στον πυρήνα (Silk et al. 2007). Επομένως, ίσως επηρεάζει μόνο την πρόσδεσή του στο DNA και όχι την πυρηνική του μετατόπιση, γεγονός που συνάδει με την παρουσία μόνο τεσσάρων επαναλήψεων αγκυρίνης, οι οποίες δε θα μπορούσαν ταυτόχρονα να καλύπτουν το σήμα πυρηνικού εντοπισμού του p65 και να εμποδίζουν την πρόσδεσή του στο DNA (Silk et al. 2007). Φαίνεται, λοιπόν, ότι η δράση της A238L έναντι του NF- κ B εντοπίζεται στον πυρήνα. Αυτό μοιάζει και με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, βάσει των οποίων ο R1d2 συνεντοπίζεται με αρκετά από τα μόρια Ank στον πυρήνα. Η σταθερά πυρηνική του παρουσία, ακόμα και σε συνέκφραση με τις Ank, δείχνει ότι η αναστολή της μεταγραφικής λειτουργίας του R1d2 λαμβάνει χώρα στον πυρήνα και δε συμβαίνει μέσω παρεμπόδισης της εισόδου του σε αυτόν.

Ο ανασυνδυασμένος μεταγραφικός παράγοντας RelB που δρα στην οδό Toll, ανιχνεύτηκε κυρίως στο κυτταρόπλασμα, γεγονός που εξηγείται από την απουσία εξωτερικού ανοσολογικού ερεθίσματος (λιποπολυσακχαρίτες ή πεπτιδογλυκάνη), ενώ στον πυρήνα ανιχνεύτηκε μόνο σε μια μειοψηφία κυττάρων. Η μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της αττασίνης παρουσία του RelB στα λειτουργικά πειράματα, οφείλεται είτε σε αυτήν τη μειοψηφία κυττάρων με πυρηνικό RelB είτε σε μία παλινδρόμηση του μεταγραφικού παράγοντα ανάμεσα στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα, όπως συμβαίνει και με το σύμπλοκο του NF-κB/IκBα στα θηλαστικά (Birbach et al. 2002; Ghosh and Karin 2002). Συγκεκριμένα, σε αδρανή CD4⁺ T λεμφοκύτταρα του ανθρώπου θεωρείται ότι η παλινδρόμηση αυτή είναι υπεύθυνη για τα βασικά επίπεδα μεταγραφής γονιδίων του ιού HIV-1 (Coiras et al. 2007). Η συνέκφραση του RelB με τις πρωτεΐνες Ank έδειξε συνεντοπισμό του μεταγραφικού παράγοντα στο κυτταρόπλασμα και με τα τρία μέλη της οικογένειας που εξετάστηκαν (Ank1, Ank2 και Ank4), παρά το γεγονός ότι στα πειράματα φωταύγειας μόνο η Ank2 είχε δείξει στατιστικά σημαντική ανασταλτική δράση στη μεταγραφική του λειτουργία. Μία πιθανή εκδοχή του τρόπου επίδρασης της Ank2 στον RelB είναι μέσω παρεμπόδισης της μετάβασής του από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, όμοια με τον τρόπο που δρουν και τα ομόλογα μόρια IκBα και Cactus στους παράγοντες Rel/NF-κB.

Η αλληλεπίδραση δύο πρωτεϊνών Ank του CcBV με τον Relish1 του *B. mori* καθώς και η αναστολή που επιφέρουν οι πρωτεΐνες Ank στη μεταγραφή γονιδίων αντιμικροβιακών πεπτιδίων που γίνεται από Rel/NF-κB παράγοντες Λεπιδοπτέρων βρίσκονται σε συμφωνία με αποτελέσματα των Thoetkiattikul et al. για τις πρωτεΐνες επαναλήψεων αγκυρίνης ενός άλλου polydna ιού, του *M. demolitor* bracovirus ή MdBV. Ο MdBV κωδικοποιεί επτά πρωτεΐνες επαναλήψεων αγκυρίνης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους, δύο από αυτές τις πρωτεΐνες, οι H4 και N5, καταστέλλουν τη μεταγραφή του γονιδίου της δροσομυκίνης (*drosomycin*) σε κύτταρα της *D. melanogaster* που έχουν την οδό Toll συστατικά ενεργοποιημένη και τη μεταγραφή του γονιδίου της αττασίνης (*attacin*) μετά από ενεργοποίηση της οδού μεταγωγής σήματος Imd με λιποπολυσακχαρίτες (Thoetkiattikul et al. 2005). Οι ίδιες πρωτεΐνες, επίσης, καταστέλλουν την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων Dif και Relish του ίδιου οργανισμού σε στοιχεία κB που απαντώνται στους υποκινητές των γονιδίων της δροσομυκίνης και της κεκροπίνης A1, αντίστοιχα (Thoetkiattikul et al. 2005). Επομένως, φαίνεται ότι οι πρωτεΐνες Ank των PDVs γενικότερα έχουν τη δυνατότητα να καταστέλλουν τη μεταγραφή γονιδίων της ανοσίας μέσω της αναστολής παραγόντων τύπου Rel/NF-κB των

εντόμων και πιθανά αυτή η αναστολή χαρακτηρίζεται από εξειδίκευση έναντι συγκεκριμένων μορίων-στόχων.

Επιπλέον, οι πρωτεΐνες H4 και N5 του MdBV βρέθηκε με πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης ότι αλληλεπιδρούν με τους μεταγραφικούς παράγοντες Dif και Relish της *D. melanogaster*, ενώ η μία από αυτές αλληλεπιδρά και με τον παράγοντα Dorsal (Thoetkiattikul et al. 2005). Επομένως, τα αποτελέσματα των Thoetkiattikul et al και τα δικά μας συνηγορούν στο ότι οι πρωτεΐνες επαναλήψεων αγκυρίνης Ank των PDVs προσδένουν το πλήρες μόριο Relish, είτε της *D. melanogaster* είτε του *B. mori*, υποδηλώνοντας ότι μπορούν να δρουν και αναρροϊκά της ενεργοποίησης του συγκεκριμένου παράγοντα. Από την άλλη πλευρά, η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών του MdBV με τους παράγοντες Dif και Dorsal και η αναστολή της μεταγραφικής λειτουργίας των ενεργών R1d2 και RelB από τις πρωτεΐνες του CcBV, δείχνουν ότι οι Ank των PDVs αναστέλλουν και τους ενεργούς μεταγραφικούς παράγοντες Rel/NF-κB. Επομένως, η δράση τους και η παρεμπόδιση των οδών μεταγωγής σήματος Toll και Imd μπορεί να γίνεται σε πολλά επίπεδα.

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση των πρωτεϊνών της οικογένειας Ank του CcBV στη μεταγωγή σήματος μέσω NF-κB σε κύτταρα θηλαστικών. Οι Falabella et al. έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη TnBV Ank1 του polydna ιού της σφήκας *T. nigriceps* προκαλεί αναστολή στον ενδογενή παράγοντα NF-κB κυττάρων HeLa που έχουν ενεργοποιηθεί με TNF-α (Falabella et al. 2007). Στο δικό μας σύστημα, κύτταρα HEK293 διαμολύνθηκαν με γονίδιο αναφοράς ελεγχόμενο από υποκινητή με στοιχεία πρόσδεσης NF-κB παραγόντων και έγινε επαγωγή της ενδογενούς οδού που ενεργοποιείται από τον υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκων TNF-α, TNFR, η οποία αντιστοιχεί στην οδό Imd των εντόμων. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των (Falabella et al. 2007), διαπιστώθηκε ότι δύο μέλη της οικογένειας Ank του CcBV έχουν ανασταλτική δράση έναντι της TNFR ενδογενούς οδού μετά από επαγωγή με τον TNF-α. Τα μέλη αυτά, οι πρωτεΐνες Ank4 και Ank7, έδειξαν ανασταλτική δράση και στην οδό Imd σε κύτταρα Λεπιδοπτέρων Hi5. Αυτό δηλώνει το μεγάλο εύρος Rel/NF-κB παραγόντων που οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να αναστείλλουν είτε άμεσα είτε έμμεσα σε κάποιο κοινό καταρροϊκό στάδιο των δύο οδών και επομένως δεν αποτελούν προτιμητέα μέλη της οικογένειας για μια πιθανή χρήση τους σε στρατηγική καταπολέμησης εντόμων.

Πέραν των polydna ιών, πολλοί άλλοι ιοί έχουν τη δυνατότητα να επηρεάζουν τις οδούς μεταγωγής σήματος που καταλήγουν σε παράγοντες NF-κB θηλαστικών κυττάρων. Ένα πλήθος ιών χρησιμοποιεί τον NF-κB προς όφελός του κατά τη διαδικασία της

μόλυνσης είτε για τη μεταγραφή ικόν γονιδίων είτε ως αντιαιμοπεταλιακό παράγοντα που προστατεύει τα μολυσμένα κύτταρα (Santoro et al. 2003). Αντίθετα, για άλλους ιούς που εγκαθίστανται ως προϊοί ή που έχουν μολυσματικό κύκλο μεγάλης χρονικής διάρκειας, η ενεργοποίηση του NF-κΒ μπορεί να είναι μοιραία. Έτσι, οι ερπητοϊοί, από τη μία πλευρά χρησιμοποιούν τον ενδογενή NF-κΒ υπέρ τους και από την άλλη προβαίνουν στην καταστολή του ώστε να αποφύγουν την ανοσολογική απόκριση. Παραδείγματος χάριν, η πρωτεΐνη ICP27 του ανθρώπινου herpes simplex virus-1 σταθεροποιεί τον IκΒα, καταστέλλοντας τον NF-κΒ κατά την έναρξη της μόλυνσης, ενώ άλλες πρωτεΐνες του ιού σε επόμενο στάδιο της μόλυνσης επάγουν τον ίδιο μεταγραφικό παράγοντα (Santoro et al. 2003; Kim et al. 2008). Η πρωτεΐνη ORF73 του ερπητοϊού 4 των τροκτικών αναστέλλει παροδικά τον παράγοντα NF-κΒ στοχεύοντας τον πυρηνικό RelA προς πρωτεοσωμική αποικοδόμηση συμμετέχοντας σε ένα σύμπλοκο με λιγάση ουβικιτίνης (Rodrigues et al. 2009). Ο ανθρώπινος ερπητοϊός 6 αναστέλλει τον NF-κΒ μειώνοντας τη φωσφορυλίωση ανοδικών μορίων στο σηματοδοτικό του μονοπάτι, όπως την TAK1, την IKKα/β και τον IκΒα οδηγώντας σε μειωμένη σύνθεση κυτταροκινών (Murakami et al. 2010). Από την άλλη πλευρά, οι Poxviruses αναστέλλουν τη σηματοδότηση του NF-κΒ μέσω πολλών στρατηγικών (Mohamed and McFadden 2009). Εκφράζουν εκκρινόμενους υποδοχείς ή πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με προσδέτες (ligands) αιχμαλωτίζοντας κυτταροκίνες που θα ενεργοποιούσαν τον NF-κΒ (Mohamed and McFadden 2009), καθώς και ενδοκυτταρικούς παράγοντες που αναστέλλουν το σύμπλοκο της κινάσης IKK με αποτέλεσμα να εμποδίζουν τη μεταγωγή σήματος προς τον NF-κΒ, όπως παραδείγματος χάριν ισχύει για την πρωτεΐνη B14 του ιού της vaccinia (Chen et al. 2008). Από την άλλη πλευρά, άλλες πρωτεΐνες των poxviruses εμποδίζουν την αποικοδόμηση του IκΒβ, όπως κάνει ο παράγοντας MC159 του Molluscum contagiosum virus, την αποικοδόμηση του IκΒα, μέσω της πρωτεΐνης επαναλήψεων αγκυρίνης K1L του ιού της vaccinia (Shisler and Jin 2004), ή προσδένονται απευθείας στον NF-κΒ/p65 και τον οδηγούν προς αποικοδόμηση, παραδείγματος χάριν η πρωτεΐνη CP77 του cowpox viral ankyrin-repeat (Mohamed and McFadden 2009). Ενώ την άμεση αναστολή του συμπλόκου p65/p50 προκαλεί και η πρωτεΐνη A238L του ιού ASFV, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

Επομένως, η αναστολή του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ είναι μια στρατηγική που πολλοί ιοί έχουν υιοθετήσει προκειμένου να εξασφαλίσουν την επιβίωση αυτών ή των φορέων τους και η εμπλοκή των πρωτεϊνών επαναλήψεων αγκυρίνης των PDVs σε αυτό αποτελεί άλλο ένα παράδειγμα αυτής της διαδικασίας.

Ερμηνεία

Σημασία των παραγόντων Rel/NF-κB στις ανοσολογικές αποκρίσεις ενάντια του παρασιτισμού

Οι παράγοντες Rel/NF-κB εμπλέκονται στην επαγωγή μιας σειράς ανοσολογικών αποκρίσεων. Εκτός από γονίδια που σχετίζονται με την αναγνώριση βακτηρίων ή με αντιμικροβιακά πεπτίδια, οι παράγοντες Rel/NF-κB μέσω των οδών Imd και Toll ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται και με άλλες πτυχές του ανοσοποιητικού. Όπως έδειξε μελέτη με μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων μετά από μόλυνση διαγονιδιακών ενήλικων ατόμων *Drosophila* με βακτήρια ή μύκητες και σύγκριση ανάμεσα σε άτομα αγρίου τύπου και άτομα με απενεργοποιημένη μία ή δύο από τις σηματοδοτικές οδούς Imd και Toll, βρέθηκε ότι τα δύο μονοπάτια συνεργάζονται για τη ρύθμιση της οφωνοποίησης, της πήξης της αιμολέμφου και της επούλωσης πληγών, καθώς και για τη ρύθμιση της μελανοποίησης και της παραγωγής ελευθέρων ριζών που αφορούν πιο άμεσα την αντιμετώπιση των παρασιτοειδών (De Gregorio et al. 2002). Συγκεκριμένα, το μονοπάτι Imd επηρεάζει γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα (αναγωγήση, μονοοξυγενάση, υδρολάση) που συμμετέχουν στη μελανοποίηση, πρωτεάσες σερίνης και μια σερίνη που θα μπορούσαν να συμμετέχουν στη μελανοποίηση, ενώ το μονοπάτι Toll επηρεάζει γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεάσες σερίνης και ένζυμα ενεργοποίησης της προφαινολοξειδάσης καθώς και μια περοξειδάση που πιθανά ρυθμίζει την παραγωγή ελευθέρων ριζών (De Gregorio et al. 2002). Η παραπάνω μελέτη καταδεικνύει τη σημασία των Rel/NF-κB παραγόντων στη μελανοποίηση, ανοσολογική απόκριση που επάγεται κατά τον παρασιτισμό. Από την άλλη πλευρά, μια άλλη μελέτη στη *D. melanogaster* δείχνει ότι ο παράγοντας Relish δεν εμπλέκεται στη διαδικασία της εγκύστωσης καθώς διαγονιδιακές προνύμφες *D. melanogaster* μεταλλαγμένες ως προς το γονίδιο *relish* δεν παρουσίασαν πρόβλημα κατά την εγκύστωση παρασιτοειδών *Leptopilina boulardi* (Hedengren et al. 1999).

Αν και οι παράγοντες NF-κB σχετίζονται με την ανοσοαπόκριση κατά τον παρασιτισμό και επάγουν ένα σύνολο γονιδίων, φαίνεται ότι τα επαγόμενα γονίδια δεν ταυτίζονται με αυτά που ενεργοποιούνται μετά από μόλυνση με μικροοργανισμούς. Έτσι, οι Wertheim et al. βρήκαν ότι ο παρασιτισμός, ναι μεν προκαλεί επαγωγή σε ένα μικρό αριθμό γονιδίων των οδών Toll και Imd και δύο πρωτεΐνες αναγνώρισης πεπτιδογλυκάνης, αλλά επάγει μόνο τρία από τα 14 αντιμικροβιακά πεπτίδια που είναι γνωστά στη *Drosophila*. Η αύξηση της έκφρασής τους αποδίδεται από τους συγγραφείς στην έκθεση σε

μικροοργανισμούς που συνοδεύει τη διάτρηση του σώματος του ξενιστή κατά τον παρασιτισμό και όχι στην άμεση συσχέτιση ανάμεσα στην παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων και την αντιμετώπιση του παρασιτισμού (Wertheim et al. 2005). Επιπλέον, οι Coustau et al. μελετώντας την απόκριση δύο διαφορετικών στελεχών *D. melanogaster* έναντι του παρασιτοειδούς *Leptopilina boulandi*, ενός ανθεκτικού που αναγνωρίζει και εγκυστώνει τα αυγά του παρασιτοειδούς και ενός ευπαθούς που δεν παρουσιάζει εγκύστωση, διαπίστωσαν ότι το μεν ανθεκτικό στέλεχος δεν παρήγαγε αντιμικροβιακά πεπτιδία μετά τον παρασιτισμό, ενώ το ευπαθές στέλεχος παρήγαγε (Coustau et al. 1996). Η μη παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων από το ανθεκτικό στέλεχος υποδηλώνει ότι αυτά δε σχετίζονται με την αναγνώριση, εγκύστωση και θανάτωση των αυγών του παρασιτοειδούς, διαχωρίζοντας την αντιβακτηριακή απόκριση από την αντιπαρασιτική. Αντίθετα, η παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων από το ευπαθές στέλεχος δείχνει ότι το παρασιτοειδές μπορεί να επάγει σύνθεση αντιμικροβιακών πεπτιδίων πιθανώς στα πλαίσια μιας μη ειδικής ανοσολογικής απόκρισης (Coustau et al. 1996).

Μελέτη που συνέκρινε την έκφραση γονιδίων της *Drosophila* ανάμεσα σε άτομα αγρίου τύπου και άτομα μολυσμένα από το παρασιτοειδές *Asobara tabida*, έναντι του οποίου ανταπεξέρχονται θετικά, μας οδηγεί σε συμπεράσματα ως προς την επιτυχή απόκριση της *Drosophila* στον παρασιτισμό (Wertheim et al. 2005). Στα παρασιτισμένα άτομα σημειώνεται αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα Relish που συμμετέχει στην οδό Imd δηλώνοντας τη σημασία που έχει η οδός Imd κατά τον παρασιτισμό. Επίσης, σημειώνεται αυξημένη μεταγραφή μιας σειράς άλλων γονιδίων που αφορούν σε ανοσολογικές αποκρίσεις. Γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεάσες σερίνης που πιθανώς σχετίζονται με τον καταρράκτη πρωτεασών της μελανοποίησης και επάγονται κατά τον παρασιτισμό εμφανίζουν θετική συσχέτιση με την παρουσία μοτιβών πρόσδεσης NF-κB παραγόντων στους υποκινητές τους (Wertheim et al. 2005). Δύο γονίδια που κωδικοποιούν μία λεκτίνη και μια ιντεγκρίνη, πρωτεΐνες σχετικές με την κυτταρική πρόσφυση που πιθανώς εμπλέκονται στην εγκύστωση (Irving et al. 2005), επίσης φέρουν στοιχεία πρόσδεσης NF-κB παραγόντων στους υποκινητές τους, ενώ τέτοια στοιχεία παρατηρούνται και σε μια σειρά άλλων γονιδίων που επάγει ο παρασιτισμός, όπως γονίδια πρωτεϊνών αναγνώρισης, πρωτεϊνών σχετικών με τη μελανοποίηση κ. α. Αν και πρέπει να γίνει ο λειτουργικός χαρακτηρισμός αυτών των ακολουθιών-στοιχείων πρόσδεσης παραγόντων NF-κB, φαίνεται ότι οι παράγοντες NF-κB έχουν σημαντικό ρόλο στην απόκριση έναντι στον παρασιτισμό. Με αυτό συνάδει και η άμεση σχέση ανάμεσα στον πολλαπλασιασμό και την πυκνότητα των αιμοκυττάρων, τη διαφοροποίηση των

λαμελλοκυττάρων (ο βασικός πληθυσμός αιμοκυττάρων που συμμετέχει στην εγκύστωση στη *Drosophila*), και το σχηματισμό κάψουλας (capsule) με τη σηματοδοτική οδό Toll, αφού έχει δειχθεί ότι μεταλλαγή στα γονίδια *cactus* και *toll* ή συστατική έκφραση του *dorsal* επάγει τη διαφοροποίηση των λαμελλοκυττάρων, την αύξηση του πληθυσμού των αιμοκυττάρων και την εγκύστωση (Qiu et al. 1998), διαδικασίες που σχετίζονται με την αντιμετώπιση του παρασιτισμού. Επομένως, η αναστολή των παραγόντων Rel/NF-κB και η συνεπαγόμενη παρεμπόδιση των οδών Toll και Imd από πρωτεΐνες των polydna ιών είναι σημαντική για την επιβίωση των παρασιτοειδών.

Καθώς ο παρασιτισμός των εντόμων από Υμενόπτερα συχνά συνοδεύεται από τη συμμετοχή polydna ιών, αναμένεται οι ξενιστές να παρουσιάζουν και αντι-ικές αποκρίσεις κατά τον παρασιτισμό. Μελέτες έχουν δείξει τη σύνδεση αυτών των αποκρίσεων με τις οδούς που ενεργοποιούν Rel/NF-κB παράγοντες. Ο ρόλος της οδού Toll στις αντι-ικές αποκρίσεις καταδεικνύεται από το γεγονός ότι διαγονιδιακά άτομα με κατεσταλμένη τη συγκεκριμένη οδό και μολυσμένα με τον ιό *Drosophila X virus* σημείωσαν πρόωρο θάνατο και αυξημένο ιικό φορτίο σε σχέση με μολυσμένα άτομα αγρίου τύπου (Zamboni et al. 2005). Αντίστοιχα, ο ρόλος της οδού Imd φαίνεται από το γεγονός ότι διαγονιδιακά άτομα που φέρουν μεταλλάξεις στην οδό Imd σημείωσαν αυξημένη ευαισθησία και αυξημένο ιικό φορτίο μετά από μόλυνση με τον ιό Cricket Paralysis virus (CrPV) (Costa et al. 2009). Επομένως, η αναστολή Rel/NF-κB παραγόντων από τους polydna ιούς έχει σημασία για την αντιμετώπιση των πιθανών αντι-ικών ανοσολογικών αποκρίσεων που ενεργοποιούνται κατά τον παρασιτισμό με PDVs.

Γίνεται εμφανές ότι η ανασταλτική δράση των πρωτεϊνών Ank του CcBV έναντι Rel/NF-κB παραγόντων είναι ιδιαίτερα σημαντική για την καταστολή τόσο των αντιπαρασιτικών όσο και των αντι-ικών ανοσολογικών αποκρίσεων που παρουσιάζει ο ξενιστής κατά τον παρασιτισμό. Η αναστολή των συγκεκριμένων παραγόντων των οδών μεταγωγής σηματος Toll και Imd συνεπάγεται τη μείωση της μεταγραφής πολλών γονιδίων-στόχων των δύο οδών. Καταστολή της μεταγραφής γονιδίων που εμπλέκονται στις ανοσολογικές αποκρίσεις έχει δειχθεί και από άλλες πρωτεΐνες των παρασιτοειδών, όπως πρωτεΐνες του δηλητηρίου της ενδοπαρασιτοειδούς σφήκας *Pteromalus rufarum* που παρασιτεί νύμφες του Λεπιδόπτερου ξενιστή *Pieris rapae*. Η συγκεκριμένη σφήκα κατά την έγχυση των αυγών της στον ξενιστή ενίει δηλητήριο αλλά όχι σωματίδια polydna ιών. Συγκρίνοντας RNA από αιμοκύτταρα και λιπαρό σώμα ανοσοποιημένων ατόμων *P. rapae*, παρουσία και απουσία δηλητηρίου του παρασιτοειδούς, διαπιστώθηκε μείωση στη μεταγραφή μιας σειράς γονιδίων παρουσία του δηλητηρίου (Fang et al. 2010). Ανάμεσα σε

αυτά βρίσκονταν γονίδια που παρουσιάζουν υψηλή ομοιότητα με γονίδια αντιμικροβιακών πεπτιδίων, όπως η κεκροπίνη, η λυσοζύμη, η αττασίνη κ.α., γονίδια πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον καταρράκτη ενεργοποίησης της προφαινολοξειδάσης στη διαδικασία της μελανοποίησης και γονίδια που κωδικοποιούν υποδοχείς αναγνώρισης μοριακών προτύπων παθογόνων οργανισμών, όπως οι λεκτίνες ή η καλρετικουλίνη, πρωτεΐνη που στα αιμοκύτταρα σχετίζεται με την αναγνώριση εαυτού-μη εαυτού και την εγκύστωση (Fang et al. 2010). Επομένως, η καταστολή γονιδίων που συμμετέχουν στις ανοσολογικές αποκρίσεις από το δηλητήριο του ενδοπαρασιτοειδούς αποτελεί προστατευτικό μηχανισμό για τα αυγά του τελευταίου και φαίνεται ότι η καταστολή της γονιδιακής έκφρασης του ξενιστή είναι μια διαδεδομένη τακτική των ενδοπαρασιτοειδών Υμενοπτέρων.

Πολλαπλοί ρόλοι για τις Ank του CcBV

Εκτός από την παρεμβολή τους στη σηματοδότηση των οδών του NF-κΒ, οι πρωτεΐνες επαναλήψεων αγκυρίνης των polydna ιών έχει αποδειχτεί ότι εμπλέκονται και σε άλλες δραστηριότητες. Έχουν συνδεθεί με αναστολή της μελανοποίησης, καθώς η μελανοποίηση που επάγεται μετά από μόλυνση με βακτροϊούς στον ξενιστή *P. xylostella* αναστέλλεται όταν έχει προηγηθεί ένεση του ξενιστή με τα ιικά χρωμοσώματα του polydna ιού που περιέχουν γονίδια της πρωτεϊνικής οικογένειας CpBV-IκΒ ή όταν οι ίδιοι οι βακτροϊοί εκφράζουν CpBV-IκΒ πρωτεΐνες (Bae and Kim 2009). Επιπλέον, πρωτεΐνες Vankyrins του CsIV καθυστερούν την κυτταρική λύση μετά από μόλυνση με βακτροϊούς και ευνοούν την κυτταρική επιβίωση, ενώ αναστέλλουν την απόπτωση σε κύτταρα μολυσμένα με βακτροϊούς (Kroemer and Webb 2006; Fath-Goodin et al. 2009). Ενώ, πρωτεΐνες επαναλήψεων αγκυρίνης των PDVs έχουν συνδεθεί και με την αποδιοργάνωση του δικτύου των μικροσωληνίσκων, αφού όταν η πρωτεΐνη Ank1 του TnBV εκφράζεται σε διαγονιδιακές μύγες παρεμβάλλεται στη μεταφορά των μεταγράφων και στην κατανομή των πρωτεϊνών-κινητήρων πάνω στους μικροσωληνίσκους σε έμβρυα της *Drosophila* και επιφέρει αποδιοργάνωση του δικτύου των μικροσωληνίσκων (Duchi et al. 2010). Σε αυτό το πλαίσιο, η ανίχνευση της πρωτεΐνης Ank2 του CcBV σε σχηματισμό που ομοιάζει στη μιτωτική άτρακτο, αν και πρέπει να επιβεβαιωθεί με πρόσθετα πειράματα, συνάδει με την άποψη των Duchi et al. ότι η οικογένεια Ank των PDVs παρεμβάλλεται στην οργάνωση του κυτταροσκελετού (Duchi et al. 2010). Επιπλέον, κάποια μέλη της οικογένειας Ank του *C. congregata* PDV (CcBV) παρουσιάζουν πολύ υψηλή ομολογία (έως και 91%) με μέλη της αντίστοιχης οικογένειας του *C. plutellae* PDV (CpBV), πρωτεΐνες που μειώνουν τη μελανοποίηση και ενισχύουν την παθογένεια των βακτροϊών (Bae and Kim 2009). Αυτή η

ομολογία τοποθετεί τις CcBV Anks και πιο άμεσα σε πλευρές της ανοσίας όπως η μελανοποίηση. Επομένως, οι πρωτεΐνες Ank του ιού CcBV πιθανώς να σχετίζονται με ένα πλήθος λειτουργιών. Αν αυτή η υπόθεση ισχύει, δεν είναι γνωστό αν όλα τα μέλη της οικογένειας μοιράζονται τους ίδιους ρόλους ή αν διαφορετικά μέλη επιτελούν εξειδικευμένες λειτουργίες όπως υποδηλώνει το διαφορετικό ιστοειδικό πρότυπο έκφρασής τους και η διαφορετική υποκυτταρική τους κατανομή.

Η πιθανή λειτουργική διαφοροποίηση των μελών που ανήκουν σε πολυπρωτεϊνικές οικογένειες του ιού CcBV συνάγεται και από την απόκλιση που διαπιστώνεται στις κωδικοποιούσες ακολουθίες των αντίστοιχων γονιδίων με τη χρήση υπολογιστικών μεθόδων και εργαλείων εξελικτικής βιολογίας. Αυτή η απόκλιση υποδεικνύει τη μεγάλη ταχύτητα εξέλιξης των polydnavirion (Bezier et al. 2008). Ωστόσο, η απόκλιση στο νουκλεοτιδικό επίπεδο επιδέχεται και μίας πολύ διαφορετικής ερμηνείας, με βάση την οποία τα μέλη μιας πρωτεϊνικής οικογένειας του CcBV δεν έχουν αναγκαστικά διαφοροποιημένες λειτουργίες. Προέρχονται από διπλασιασμό ενός αρχικού γονιδίου και όλα μαζί μεταλλάσσονται υπό την εξελικτική πίεση (π.χ. κατά τη μετάβαση από έναν ξενιστή σε έναν άλλον) έως ότου επιλεγεί το καλύτερο. Μέχρι τότε όλα τα μέλη της οικογένειας δρουν προς την ίδια κατεύθυνση επιτελώντας την ίδια ή παρόμοια λειτουργία (Bezier et al. 2008). Κανένα από μόνο του δεν έχει αρκετή συγγένεια για το/τα μόρια-στόχους, ενώ πολλά μαζί έχουν μεγαλύτερη δραστηριότητα κι επομένως ο μεγάλος αριθμός μελών εξυπηρετεί την καλύτερη απόδοση της οικογένειας. Σε αυτό το πλαίσιο μπορεί να ερμηνευτεί και η διαπιστούμενη επίδραση πέντε μελών της οικογένειας Ank του CcBV πάνω στον ίδιο μόριο-στόχο, τον μεταγραφικό παράγοντα R1d2. Πολλά μέλη της οικογένειας μπορούν να αναστέλλουν τον ίδιο Rel/NF-κB παράγοντα με διαφορετική απόδοση μεταξύ τους.

Από την άλλη πλευρά, η διαφορά στα λειτουργικά αποτελέσματά μας ανάμεσα στις δύο οδούς μεταγωγής σήματος και η αναστολή του RelB μόνο από την Ank2 υποδηλώνουν τη διαφορετική εξειδίκευση των διαφορετικών Ank ως προς τα μόρια-στόχους τους, δηλαδή ως προς συγκεκριμένα Rel ετεροδιμερή/ομοδιμερή, που βρίσκονται πιθανώς σε διακριτούς ιστούς. Εξάλλου είναι γνωστό βάσει πειραμάτων συνανοσοκατακρήμνισης και EMSA ότι τουλάχιστον στη *Drosophila* οι μεταγραφικοί παράγοντες Rel/NF-κB σχηματίζουν διμερή, όπως τα ετεροδιμερή Dorsal/Relish ή Dif/Relish και τα ομοδιμερή Relish/Relish ή Dif/Dif τα οποία εμφανίζουν προτίμηση για διαφορετικά γονίδια (Han and Ip 1999). Για τα μέλη μιας άλλης οικογένειας πρωτεϊνών με επαναλήψεις αγκυρίνης, τους αναστολείς INK (inhibitor of cyclin-dependent kinase) της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης 4 (cyclin-

dependent kinase 4 ή CDK4) έχει, επίσης, διαπιστωθεί ότι παρουσιάζουν διαφορετική συγγένεια για τα μόρια-στόχους τους, CDK4 και CDK 6 (Li et al. 2006). Επομένως, και οι εξεταζόμενες πρωτεΐνες Ank μπορεί να εμφανίζουν διαφορετική προτίμηση για διαφορετικούς παράγοντες Rel/NF-κB (είτε στη μορφή διμερών είτε όχι) και πολλά μέλη της οικογένειας να παρουσιάζουν διαφορετική συγγένεια για κάθε παράγοντα Rel/NF-κB.

Μελλοντικές κατευθύνσεις

Αναμφισβήτητα, η μελέτη των πρωτεϊνών της οικογένειας Ank του ενδοσυμβιωτικού ιού της *C. congregata* CcBV μπορεί να συνεχιστεί προς πολλές κατευθύνσεις. Αφενός μπορούν να μελετηθούν οι μηχανισμοί ρύθμισης των διαφορετικών επιπέδων έκφρασής τους, όπως η ουβικιτινυλίωση, καθώς και ο τρόπος ρύθμισης της υποκυτταρικής κατανομής τους. Αφετέρου μπορεί να μελετηθεί σε μεγαλύτερο βάθος η προτίμηση συγκεκριμένων Ank σε συγκεκριμένα ετεροδιμερή ή ομοδιμερή Rel/NF-κB παραγόντων. Η δημιουργία μεταλλαγμένων μορφών των πρωτεϊνών Ank και η σύγκριση της επίδρασης αυτών, σε σχέση με τις πρωτεΐνες αγρίου τύπου, πάνω στους παράγοντες Rel/NF-κB θα οδηγήσει στη διευκρίνιση των περιοχών αλληλεπίδρασης με τα μόρια-στόχους των πρωτεϊνών Ank. Ενδιαφέρον, επίσης, παρουσιάζει η μελέτη της επίδρασης των πρωτεϊνών Ank στη διαμόρφωση του κυτταροσκελετού και την πορεία του κυτταρικού κύκλου, διαδικασίες για τις οποίες προέκυψαν έμμεσα στοιχεία μέσω των πειραμάτων ανοσοφθορισμού. Συγκεκριμένα προς αυτήν την κατεύθυνση το μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η πρωτεΐνη Ank2. Επομένως, προκύπτει ένα ερώτημα που αξίζει να διερευνηθεί για το αν η αναστολή των Rel/NF-κB παραγόντων είναι άμεσο αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των Ank του CcBV με τους μεταγραφικούς παράγοντες ή και έμμεσα της αποδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού. Η πλήρης διευκρίνιση των λειτουργιών των μελών της οικογένειας Ank του CcBV καθώς και η αξιολόγηση της αναγκαιότητας ή της περισσειας τόσων μελών στη διαδικασία του παρασιτισμού χρήζει, επίσης, περαιτέρω μελέτης. Όλες αυτές οι κατευθύνσεις θα οδηγήσουν σε καλύτερη γνώση τόσο των βασικών μηχανισμών ανοσίας των λεπιδοπτέρων εντόμων όσο και της πορείας του παρασιτισμού του φυσικού ξενιστή *M. sexta* από το ενδοπαρασιτοειδές *C. congregata*. Τέλος, σε επίπεδο εφαρμογής θα μπορούσε να γίνει συνδυασμός της έκφρασης πρωτεϊνών Ank με μόλυνση από εντομοπαθογόνους μικροοργανισμούς και ακόλουθη μέτρηση της βιωσιμότητας λεπιδοπτέρων πληθυσμών, ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσο αυτές οι πρωτεΐνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο επιβλαβών εντόμων.

Chi Square Distribution Table							
d.f.	$\chi^2_{.25}$	$\chi^2_{.10}$	$\chi^2_{.05}$	$\chi^2_{.025}$	$\chi^2_{.010}$	$\chi^2_{.005}$	$\chi^2_{.001}$
1	1.32	2.71	3.84	5.02	6.63	7.88	10.8
2	2.77	4.61	5.99	7.38	9.21	10.6	13.8
3	4.11	6.25	7.81	9.35	11.3	12.8	16.3
4	5.39	7.78	9.49	11.1	13.3	14.9	18.5
5	6.63	9.24	11.1	12.8	15.1	16.7	20.5
6	7.84	10.6	12.6	14.4	16.8	18.5	22.5
7	9.04	12.0	14.1	16.0	18.5	20.3	24.3
8	10.2	13.4	15.5	17.5	20.1	22.0	26.1
9	11.4	14.7	16.9	19.0	21.7	23.6	27.9
10	12.5	16.0	18.3	20.5	23.2	25.2	29.6
11	13.7	17.3	19.7	21.9	24.7	26.8	31.3
12	14.8	18.5	21.0	23.3	26.2	28.3	32.9
13	16.0	19.8	22.4	24.7	27.7	29.8	34.5
14	17.1	21.1	23.7	26.1	29.1	31.3	36.1
15	18.2	22.3	25.0	27.5	30.6	32.8	37.7
16	19.4	23.5	26.3	28.8	32.0	34.3	39.3
17	20.5	24.8	27.6	30.2	33.4	35.7	40.8
18	21.6	26.0	28.9	31.5	34.8	37.2	42.3
19	22.7	27.2	30.1	32.9	36.2	38.6	43.8
20	23.8	28.4	31.4	34.2	37.6	40.0	45.3
21	24.9	29.6	32.7	35.5	38.9	41.4	46.8
22	26.0	30.8	33.9	36.8	40.3	42.8	48.3
23	27.1	32.0	35.2	38.1	41.6	44.2	49.7
24	28.2	33.2	36.4	39.4	42.8	45.6	51.2
25	29.3	34.4	37.7	40.6	44.3	46.9	52.6
26	30.4	35.6	38.9	41.9	45.6	48.3	54.1
27	31.5	36.7	40.1	43.2	47.0	49.6	55.5
28	32.6	37.9	41.3	44.5	48.3	51.0	56.9
29	33.7	39.1	42.6	45.7	49.6	52.3	58.3
30	34.8	40.3	43.8	47.0	50.9	53.7	59.7
40	45.6	51.8	55.8	59.3	63.7	66.8	73.4
50	56.3	63.2	67.5	71.4	76.2	79.5	86.7
60	67.0	74.4	79.1	83.3	88.4	92.0	99.6
70	77.6	85.5	90.5	95.0	100	104	112
80	88.1	96.6	102	107	112	116	125
90	98.6	108	113	118	124	128	137
100	109	118	124	130	136	140	149

Table from Ronald J. Wonnacott and Thomas H. Wonnacott, *Statistics: Discovering its Power*, New York: John Wiley and Sons, 1982, p.352.

Πίνακας Π2. Κρίσιμες τιμές για την αξιολόγηση του μεγέθους KW statistic της μη παραμετρικής δοκιμασίας Kruskal-Wallis. Όταν εξετάζονται 4 ομάδες (πληθυσμοί κυττάρων), όπως στις περιπτώσεις αυτής της εργασίας που χρησιμοποιείται η δοκιμασία KW, και κάθε ομάδα (πληθυσμός κυττάρων) περιλαμβάνει μέγεθος δείγματος μεγαλύτερο του 5, τότε το KW statistic μπορεί να αξιολογηθεί με βάση τον πίνακα τιμών της γνωστής στατιστικής δοκιμασίας χ^2 (chi square) (Wonnacott and Wonnacott 1982). Ως βαθμοί ελευθερίας λαμβάνονται ο αριθμός του συνόλου των ομάδων πλην ένα ($df=k-1$, όπου k ο αριθμός των ομάδων). Στα πειράματα που χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Kruskal-Wallis ο αριθμός των ομάδων είναι 4, άρα $df=4-1=3$. Η τιμή του KW statistic συγκρίνεται με τις κρίσιμες τιμές του πίνακα (για $df=3$, οι οποίες περιλαμβάνονται στο κόκκινο πλαίσιο) για να βρεθεί το επίπεδο σημαντικότητας του αποτελέσματος. Η μηδενική υπόθεση απορρίπτεται και η πειραματική υπόθεση επιβεβαιώνεται αν η τιμή του KW statistic υπερβαίνει την κρίσιμη τιμή του χ^2 στον πίνακα στο γενικό αποδεκτό επίπεδο σημαντικότητας 0.05 ($\chi^2_{.05}$).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι polydna ιοί είναι μια ομάδα ιών που ενδοσυμβιώνει με ενδοπαρασιτοειδή υμενόπτερα έντομα (σφήκες) και συμμετέχει στον παρασιτισμό λεπιδοπτέρων εντόμων από τα Υμενόπτερα. Τα σωματίδια των ιών ενίονται μαζί με τα γονιμοποιημένα αυγά των σφηκών στα λεπιδόπτερα έντομα-ξενιστές. Τα γονίδια των polydna ιών εκφράζονται στα κύτταρα του λεπιδόπτερου ξενιστή και οι παραγόμενες πρωτεΐνες επιδρούν στη φυσιολογία του ξενιστή καθυστερώντας την ανάπτυξή του και καταστέλλοντας το ανοσοποιητικό του σύστημα. Με αυτόν τον τρόπο τα αυγά και τα έμβρυα της σφήκας προστατεύονται από αντιδράσεις άμυνας του ξενιστή και μπορούν να αναπτυχθούν.

Στόχος της διατριβής ήταν η μελέτη μελών της οικογένειας πρωτεϊνών που περιέχουν επαναλήψεις αγκυρίνης (πρωτεΐνες Ank) του polydna ιού CcBV (*Cotesia congregata* bracovirus), ο οποίος ενδοσυμβιώνει με τη σφήκα *Cotesia congregata* και συμμετέχει στον παρασιτισμό των προνυμφών του Λεπιδόπτερου *Manduca sexta*. Οι πρωτεΐνες Ank του ιού CcBV είναι ομόλογες με μόρια IκB, δηλαδή δυνητικοί αναστολείς μεταγραφικών παραγόντων τύπου Rel/NF-κB. Έξι γονίδια *ank* του CcBV υποκλωνοποιήθηκαν σε φορείς κατάλληλους για έκφραση σε κύτταρα λεπιδοπτέρων εντόμων ώστε να γίνει συγκριτική μελέτη των ιδιοτήτων των κωδικοποιούμενων πρωτεϊνών. Με παροδικές διαμολύνσεις και ανοσοαποτυπώσεις κατά Western βρέθηκε ότι τα διάφορα μέλη της οικογένειας παρουσιάζουν άνισα επίπεδα έκφρασης, ενώ πειράματα ανοσοφθορισμού ανέδειξαν ετερογένεια στον υποκυτταρικό εντοπισμό τους, με κάποιες πρωτεΐνες να απαντώνται σε περισσότερα του ενός υποκυτταρικά διαμερίσματα σε διαφορετικά κύτταρα, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο εντοπισμός και η έκφρασή τους υπόκεινται σε ρύθμιση.

Με χρήση κατάλληλων λειτουργικών πειραμάτων, εξετάστηκε επίσης η επίδραση των πρωτεϊνών Ank στην ενεργότητα Rel/NF-κB παραγόντων του καλλιεργούμενου μεταξοσκώληκα *Bombyx mori* σε κυτταρικές σειρές λεπιδοπτέρων εντόμων. Οι παράγοντες Rel/NF-κB ρυθμίζουν, μέσω των οδών μεταγωγής σήματος Imd και Toll, την έκφραση γονιδίων που ελέγχουν πολλαπλές πτυχές του ανοσοποιητικού συστήματος των εντόμων, όπως την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων, καθώς και αποκρίσεις που αφορούν πιο άμεσα την αντιμετώπιση του παρασιτισμού, όπως η μελανοποίηση, η εγκύστωση, η παραγωγή ελευθέρων ριζών και οι αντι-ικές αποκρίσεις. Επομένως,

πιθανολογείται ότι η αναστολή των παραγόντων Rel/NF-κB και η συνεπαγόμενη παρεμπόδιση των σηματοδοτικών οδών Toll και Imd του ανοσοποιητικού συστήματος των λεπιδόπτερων ξενιστών από πρωτεΐνες των polydna ιών, και ειδικότερα από τις πρωτεΐνες Ank, είναι σημαντική για την επιβίωση των παρασιτοειδών. Για να διαπιστωθεί αν η συγκεκριμένη υπόθεση ευσταθεί και με δεδομένη τη μη διαθεσιμότητα των γονιδίων Rel/NF-κB παραγόντων του φυσικού ξενιστή της *C. congregata*, *M. sexta*, χρησιμοποιήθηκε ένα ετερόλογο λειτουργικό σύστημα που περιέλαβε τα γονίδια των ετερόλογων μεταγραφικών παραγόντων Relish1 και RelB του *B. mori*, που συμμετέχουν στις οδούς μεταγωγής σήματος Imd και Toll, αντίστοιχα, σε συνδυασμό με την κυτταρική σειρά Hi5 του Λεπιδοπτέρου *Trichoplusia ni*. Σε λειτουργικές δοκιμασίες φωταύγειας διερευνήθηκε η επίδραση των έξι ικών πρωτεϊνών Ank στη μεταγραφή ενός γονιδίου αναφοράς *firefly luciferase*, που είχε τεθεί υπό τον έλεγχο υποκινητών με στοιχεία πρόσδεσης Rel/NF-κB για τους δύο μεταγραφικούς παράγοντες του μεταξοσκώληκα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι πέντε από τις έξι πρωτεΐνες του CcBV που ελέγχθηκαν προκάλεσαν αναστολή στην ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα R1d2, μια συστατικά ενεργή μορφή του Relish1, στο μονοπάτι Imd, με την αναστολή να είναι διαφορετική για τα έξι μέλη και δοσοεξαρτώμενη για τρία μέλη της οικογένειας που εξετάστηκαν σε σχετικά πειράματα δοσοεξάρτησης. Αντίθετα, η ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα RelB, που ενεργοποιείται από το μονοπάτι Toll, βρέθηκε να αναστέλλεται μόνο από ένα από τα έξι μέλη της οικογένειας Ank που εξετάστηκαν. Η διαφοροποίηση ανάμεσα στις δύο οδούς μεταγωγής σήματος υποδηλώνει την εξειδίκευση των διαφορετικών ικών πρωτεϊνών Ank ως προς τα μόρια-στόχους τους και υποδεικνύει ότι τα περισσότερα μέλη στοχεύουν την οδό μεταγωγής σήματος Imd, γεγονός πιθανά ενδεικτικό του ρόλου που η συγκεκριμένη οδός διαδραματίζει στην αντι-ικκή προστασία των εντόμων.

Σε κύτταρα Hi5 που υπερεκφράζουν παροδικά τις ικές πρωτεΐνες και τους μεταγραφικούς παράγοντες παρατηρήθηκε πυρηνικός συνεντοπισμός του μεταγραφικού παράγοντα R1d2 με αρκετές από τις πρωτεΐνες Ank που αναστέλλουν τη λειτουργία του, ενώ ο παράγοντας RelB παρουσίασε συνεντοπισμό με την πρωτεΐνη-αναστολέα του στο κυτταρόπλασμα. Επιπλέον, πειράματα συγκατακρήμνισης έδειξαν αλληλεπίδραση ανάμεσα σε δύο πρωτεΐνες Ank και τον πλήρους μήκους παράγοντα Relish1, γεγονός που, σε συνδυασμό με την αναστολή του R1d2 από τις ικές πρωτεΐνες, υποδηλώνει ότι οι πρωτεΐνες Ank πιθανώς δρουν ως αναστολείς του Relish1 και *in vivo*.

Στα πλαίσια της προσπάθειας για διαλεύκανση πιθανής δράσης των πρωτεϊνών Ank του CcBV σε Rel/NF-κB παράγοντες θηλαστικών, τα έξι *ank* γονίδια υποκλωνοποιήθηκαν σε φορέα κατάλληλο για έκφραση σε κύτταρα θηλαστικών και εξετάστηκε η δράση των αντίστοιχων πρωτεϊνών στη λειτουργικότητα του ενδογενούς μεταγραφικού παράγοντα NF-κB κυττάρων HEK293. Χρησιμοποιώντας την κυτταροκίνη TNF-α ως επαγωγέα του NF-κB, διαπιστώθηκε η ανασταλτική δράση δύο πρωτεϊνών στην ανοσολογική οδό μεταγωγής σήματος των θηλαστικών που ενεργοποιείται μέσω του υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκων TNFR και είναι αντίστοιχη με την Imd οδό των εντόμων.

Συμπεραματικά, με τις μελέτες που περιγράφονται σε αυτή τη διατριβή, επιχειρήθηκε για πρώτη φορά η σύγκριση ανάμεσα σε πολλά μέλη μιας οικογένειας πρωτεϊνών Ank των ενδοσυμβιωτικών polydna ιών σε επίπεδο έκφρασης και υποκυτταρικής κατανομής αλλά και σε λειτουργικό επίπεδο δίνοντας έτσι τη δυνατότητα κατανόησης της λειτουργικής ποικιλομορφίας που υπάρχει σε πρωτεϊνικές οικογένειες των polydna ιών. Τα αποτελέσματα είναι συμβατά με την υπόθεση ότι οι πρωτεΐνες επαναλήψεων αγκυρίνης των polydna ιών δρουν ως αναστολείς παραγόντων Rel/NF-κB, τόσο στα λεπιδόπτερα έντομα όσο και στα θηλαστικά. Μάλιστα, στα έντομα, οι πρωτεΐνες Ank έχουν τη δυνατότητα να καταστέλλουν και τις δύο κύριες ανοσολογικές οδούς μεταγωγής σήματος, Toll και Imd. Επίσης, φαίνεται ότι τα μέλη της οικογένειας Ank του ενδοσυμβιωτικού ιού ενός Υμενοπτέρου που παρασιτεί ένα συγκεκριμένο Λεπιδόπτερο μπορούν να παρεμποδίζουν τη λειτουργία ρυθμιστών της ανοσίας και άλλων Λεπιδοπτέρων πέραν του φυσικού του ξενιστή. Επομένως, πρωτεΐνες των polydna ιών, όπως οι Ank, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος των εντόμων στα πλαίσια ενίσχυσης ήδη υπάρχοντων στρατηγικών καταπολέμησης επιβλαβών εντόμων, οι οποίες βασίζονται στη χρήση εντομοπαθογόνων μικροοργανισμών.

SUMMARY

Polydnaviruses (PDVs) are endosymbiotic viruses of parasitoid Hymenoptera. Their particles are injected together with the endoparasitoid's eggs in the final lepidopteran host, where the viral genes are transcribed. The expressed proteins mediate a series of changes in the host's physiology, such as developmental delay and immune suppression, thus protecting the hymenopteran embryos from host reactions.

This dissertation's objective was to study members of the Ankyrin-repeat protein family (Ank proteins) of the CcBV polydnavirus (*Cotesia congregata* bracovirus), which lives as a provirus in the hymenopteran species *Cotesia congregata*, a wasp known to parasitize larvae of the lepidopteran *Manduca sexta*. CcBV Ank proteins are homologous to I κ B molecules and, therefore, could function as inhibitors of Rel/NF- κ B transcription factors. Six out of nine CcBV *ank* genes were subcloned to lepidopteran-specific plasmids and expressed in order to make a comparison among their encoded products. Doing transient transfections and subsequent Western immunoblotting, the different Ank proteins were found to be unequally expressed, whereas according to immunofluorescence experiments, their subcellular distribution varies among the different family members and often varies among different cells expressing the same protein. Thus, both the expression levels and the subcellular distribution of CcBV Ank proteins seem to be under regulation.

Employing functional assays we tested the effect of Ank proteins on Rel/NF- κ B transcription factors of the domesticated silkworm *Bombyx mori* in a lepidopteran cell line. Through the Imd and Toll signalling pathways, Rel/NF- κ B factors regulate the transcription of genes implicated in many aspects of the insect immune system, such as antimicrobial (antimicrobial peptide synthesis), antiparasitic (melanization, encapsulation and reactive intermediates production) and antiviral responses. Therefore, it is hypothesized that inhibiting Rel/NF- κ B factors and the corresponding Imd and Toll signalling pathways of the lepidopteran host's immune system is crucial for the endoparasitoid's survival. To examine whether CcBV Ank proteins are indeed capable of such an inhibition, we used a heterologous system that included the *Trichoplusia ni* Hi5 cell line and transiently expressing genes that encode the silkworm Rel/NF- κ B transcription factors Relish1 and RelB, given that the corresponding genes from *C. congregata*'s natural host, *M. sexta*, were unavailable. In luciferase assays we examined whether the six viral Ank proteins can suppress the transcription of a *firefly luciferase* reporter gene placed

under the control of a promoter that bears Rel/NF- κ B binding elements. Five out of the six examined CcBV proteins inhibited transcription factor R1d2, a constitutively active Relish1 mutant that participates in the Imd signalling pathway. The inhibition of R1d2 transcriptional activity varied between the different Ank proteins and was dose-dependent for three of them. On the contrary, the transcriptional activity of RelB, a factor activated by the Toll pathway, was inhibited only by one of the six Ank family members. The observed differences between the two signalling pathways suggest that different Ank proteins show specificity against their targets and imply that most CcBV Anks target the Imd pathway, indicating the importance of this pathway in anti-viral responses.

Immunofluorescence experiments in Hi5 cells transiently over-expressing the viral proteins and the silkworm transcription factors revealed a nuclear co-localization between transcription factor R1d2 and some of the Ank proteins that are able to suppress its activity, while RelB co-localized with its Ank inhibitor in the cytoplasm. Moreover, two Ank proteins were found to interact with full-length Relish1 in pull-down experiments which, together with the R1d2 inhibition observed in the functional assays, implies that Ank proteins could act as Relish1 inhibitors *in vivo*.

Furthermore, the possible suppression of mammalian Rel/NF- κ B factors by CcBV Ank proteins was also tested. Six *ank* genes were subcloned in a plasmid suitable for expression in mammalian cells and the effect of the corresponding proteins on endogenous transcription factor NF- κ B of HEK293 cells was examined. Tumor necrosis factor α (TNF- α) was used as an inducer of the endogenous mammalian signalling pathway that is initiated by the TNF-receptor and corresponds to the insect Imd pathway. According to our results, two Ank family members were found to inhibit the TNFR pathway in HEK293 cells.

Conclusively, this dissertation describes the first attempt to compare so many members of a PDV Ank family both at an expression/localization level and at a functional level, thus giving the opportunity to comprehend the existing variation in PDV protein families. The results are in agreement with the hypothesis that polydnavirus Ankyrin-repeat proteins act as Rel/NF- κ B inhibitors; both in lepidopteran insect cells and in mammalian cells. In fact, Ank proteins are capable of suppressing both major immune signalling pathways, Toll and Imd, in insect cells. Finally, it is evident that Ank proteins of a PDV endosymbiotic of a certain hymenopteran species can block immune regulators of the natural lepidopteran host, as well as of other Lepidoptera. Therefore, PDV proteins, like Anks, could be employed for the immune suppression of a range of insects in order to

enhance the effectiveness of pest control applications involving entomopathogenic viruses, bacteria or fungi.

Βιβλιογραφία

- Abramoff, M. D., Magelhaes, P.J., Ram, S.J. (2004). "Image Processing with ImageJ." Biophotonics International **11**(7): 36-42.
- Agaisse, H. and N. Perrimon (2004). "The roles of JAK/STAT signaling in Drosophila immune responses." Immunol Rev **198**: 72-82.
- An, C., J. Ishibashi, E. J. Ragan, H. Jiang and M. R. Kanost (2009). "Functions of Manduca sexta hemolymph proteinases HP6 and HP8 in two innate immune pathways." J Biol Chem **284**(29): 19716-26.
- An, C., H. Jiang and M. R. Kanost (2010). "Proteolytic activation and function of the cytokine Spatzle in the innate immune response of a lepidopteran insect, Manduca sexta." FEBS J **277**(1): 148-62.
- An, C., E. J. Ragan and M. R. Kanost (2011). "Serpin-1 splicing isoform J inhibits the proSpatzle-activating proteinase HP8 to regulate expression of antimicrobial hemolymph proteins in Manduca sexta." Dev Comp Immunol **35**(1): 135-41.
- Andersen (2001). "Structural and Evolutionary Relationships among Protein Tyrosine Phosphatase Domains." Molecular and Cellular Biology **21**(21): 7117–7136.
- Asgari, S. and O. Schmidt (2002). "A coiled-coil region of an insect immune suppressor protein is involved in binding and uptake by hemocytes." Insect Biochem Mol Biol **32**(5): 497-504.
- Asgari, S., O. Schmidt and U. Theopold (1997). "A polydnavirus-encoded protein of an endoparasitoid wasp is an immune suppressor." J Gen Virol **78** (Pt 11): 3061-70.
- Asgari, S., U. Theopold, C. Wellby and O. Schmidt (1998). "A protein with protective properties against the cellular defense reactions in insects." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 3690-5.
- Asher, G., N. Reuven and Y. Shaul (2006). "20S proteasomes and protein degradation "by default"." Bioessays **28**(8): 844-9.
- Bae, S. and Y. Kim (2009). "IκB genes encoded in Cotesia plutellae bracovirus suppress an antiviral response and enhance baculovirus pathogenicity against the diamondback moth, Plutella xylostella." J Invertebr Pathol **102**(1): 79-87.
- Barandoc, K. and Y. Kim (2009). "A technique of segment expression and RNA interference (SERI) reveals a specific physiological function of a cysteine-rich protein gene encoded in cotesia plutellae bracovirus." J Microbiol Biotechnol **19**(6): 610-5.
- Beck, M. and M. R. Strand (2005). "Glc 1.8 from *Microplitis demolitor* Bracovirus Induces a Loss of Adhesion and Phagocytosis in Insect High Five and S2 Cells." J Virol **79**(3): 1861-1870.
- Beckage, N. E. and M. R. Kanost (1993). "Effects of parasitism by the braconid wasp *Cotesia congregata* on host hemolymph proteins of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*." Insect Biochem Mol Biol **23**(5): 643-53.
- Beckage, N. E. and L. M. Riddiford (1982). "Effects of parasitism by *Apanteles congregatus* on the endocrine physiology of the tobacco hornworm *Manduca sexta*." Gen Comp Endocrinol **47**(3): 308-22.
- Beg, A. and A. J. Baldwin (1993). "The IκB proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-κB transcription factors." Genes Dev **7**: 2064-2070.
- Belle, E., N. E. Beckage, J. Rousselet, M. Poirie, F. Lemeunier and J. M. Drezen (2002). "Visualization of polydnavirus sequences in a parasitoid wasp chromosome." J Virol **76**(11): 5793-6.

- Bezier, A., M. Annaheim, J. Herbinere, C. Wetterwald, G. Gyapay, S. Bernard-Samain, P. Wincker, I. Roditi, M. Heller, M. Belghazi, R. Pfister-Wilhem, G. Periquet, C. Dupuy, E. Huguet, A. N. Volkoff, B. Lanzrein and J. M. Drezen (2009). "Polydnnaviruses of braconid wasps derive from an ancestral nudivirus." Science **323**(5916): 926-30.
- Bezier, A., J. Herbinere, C. Serbielle, J. Lesobre, P. Wincker, E. Huguet and J. M. Drezen (2008). "Bracovirus gene products are highly divergent from insect proteins." Arch Insect Biochem Physiol **67**(4): 172-87.
- Birbach, A., P. Gold, B. R. Binder, E. Hofer, R. de Martin and J. A. Schmid (2002). "Signaling molecules of the NF-kappa B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus." J Biol Chem **277**(13): 10842-51.
- Blom, N., S. Gammeltoft and S. Brunak (1999). "Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites." J Mol Biol **294**(5): 1351-62.
- Bradleigh Vinson, S., C. Malva, V. Paola, R. Sordetti, P. Falabella and F. Pennacchio (1998). "Prothoracic gland inactivation in *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera:Noctuidae) larvae parasitized by *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Hymenoptera: Braconidae)." J Insect Physiol **44**(9): 845-857.
- Bulet, P., R. Stöcklin and L. Menin (2004). "Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates." Immunol Rev **198**: 169-84.
- Carlsson, A., T. Nystrom, H. de Cock and H. Bennich (1998). "Attacin--an insect immune protein--binds LPS and triggers the specific inhibition of bacterial outer-membrane protein synthesis." Microbiology **144**(8): 2179-2188.
- Carton, Y. and A. J. Nappi (1997). "Drosophila cellular immunity against parasitoids." Parasitol Today **13**(6): 218-27.
- Charroux, B. and J. Royet (2010). "Drosophila immune response: From systemic antimicrobial peptide production in fat body cells to local defense in the intestinal tract." Fly (Austin) **4**(1): 40-7.
- Chen, R. A., G. Ryzhakov, S. Cooray, F. Randow and G. L. Smith (2008). "Inhibition of IkappaB kinase by vaccinia virus virulence factor B14." PLoS Pathog **4**(2): e22.
- Chen, Y. F., M. Shi, P. C. Liu, F. Huang and X. X. Chen (2008). "Characterization of an IkappaB-like gene in *Cotesia vestalis* polydnnavirus." Arch Insect Biochem Physiol **68**(2): 71-8.
- Cheng, T. C., Y. L. Zhang, C. Liu, P. Z. Xu, Z. H. Gao, Q. Y. Xia and Z. H. Xiang (2008). "Identification and analysis of Toll-related genes in the domesticated silkworm, *Bombyx mori*." Dev Comp Immunol **32**(5): 464-75.
- Chenna, R., H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T. J. Gibson, D. G. Higgins and J. D. Thompson (2003). "Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs." Nucleic Acids Res **31**(13): 3497-500.
- Cherry, S. and N. Silverman (2006). "Host-pathogen interactions in drosophila: new tricks from an old friend." Nat Immunol **7**(9): 911-7.
- Clark, K. D., L. L. Pech and M. R. Strand (1997). "Isolation and identification of a plasmatocyte-spreading peptide from the hemolymph of the lepidopteran insect *Pseudoplusia includens*." J Biol Chem **272**(37): 23440-7.
- Clark, K. D., A. Witherell and M. R. Strand (1998). "Plasmatocyte spreading peptide is encoded by an mRNA differentially expressed in tissues of the moth *Pseudoplusia includens*." Biochem Biophys Res Commun **250**(2): 479-85.
- Clavijo, G., T. Doremus, M. Ravallec, M. A. Mannucci, V. Jouan, A. N. Volkoff and I. Darboux (2011). "Multigenic Families in Ichnovirus: A Tissue and Host Specificity Study through Expression Analysis of Vankyrins from *Hyposoter didymator* Ichnovirus." PLoS One **6**(11): e27522.

- Coggill, P., R. D. Finn and A. Bateman (2008). "Identifying protein domains with the Pfam database." *Curr Protoc Bioinformatics* **Chapter 2**: Unit 2 5.
- Coiras, M., M. R. Lopez-Huertas, J. Rullas, M. Mittelbrunn and J. Alcamí (2007). "Basal shuttle of NF-kappaB/I kappaB alpha in resting T lymphocytes regulates HIV-1 LTR dependent expression." *Retrovirology* **4**: 56.
- Costa, A., E. Jan, P. Sarnow and D. Schneider (2009). "The Imd pathway is involved in antiviral immune responses in *Drosophila*." *PLoS One* **4**(10): e7436.
- Coustau, C., Y. Carkion, A. Nappi, F. Shotkoski and R. ffrench-Constant (1996). "Differential induction of antibacterial transcripts in *Drosophila* susceptible and resistant to parasitism by *Leptopilina boulardi*." *Insect Mol Biol* **5**(3): 167-72.
- Cui, L., A. Soldevila and B. A. Webb (1997). "Expression and hemocyte-targeting of a *Campoplex sonorensis* polydnavirus cysteine-rich gene in *Heliothis virescens* larvae." *Arch Insect Biochem Physiol* **36**(4): 251-71.
- Dahlman, D. L., R. L. Rana, E. J. Schepers, T. Schepers, F. A. DiLuna and B. A. Webb (2003). "A teratocyte gene from a parasitic wasp that is associated with inhibition of insect growth and development inhibits host protein synthesis." *Insect Mol Biol* **12**(5): 527-34.
- Davies, D. H. and S. B. Vinson (1988). "Interference with function of plasmatocytes of *Heliothis virescens* in vivo by calyx fluid of the parasitoid *Campoplex sonorensis*." *Cell Tissue Res* **251**(2): 467-75.
- De Gregorio, E., P. T. Spellman, P. Tzou, G. M. Rubin and B. Lemaitre (2002). "The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*." *Embo J* **21**(11): 2568-79.
- Devin, A., Y. Lin, S. Yamaoka, Z. Li, M. Karin and Z. Liu (2001). "The alpha and beta subunits of IkappaB kinase (IKK) mediate TRAF2-dependent IKK recruitment to tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 in response to TNF." *Mol Cell Biol* **21**(12): 3986-94.
- Dhadialla, T. S., G. R. Carlson and D. P. Le (1998). "New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity." *Annu Rev Entomol* **43**: 545-69.
- Dostert, C., E. Jouanguy, P. Irving, L. Troxler, D. Galiana-Arnoux, C. Hetru, J. A. Hoffmann and J. L. Imler (2005). "The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*." *Nat Immunol* **6**(9): 946-53.
- 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**: 113-56.
- Drier, E. A. and R. Steward (1997). "The dorsoventral signal transduction pathway and the Rel-like transcription factors in *Drosophila*." *Semin Cancer Biol* **8**(2): 83-92.
- Duchi, S., V. Cavaliere, L. Fagnocchi, M. R. Grimaldi, P. Falabella, F. Graziani, S. Gigliotti, F. Pennacchio and G. Gargiulo (2010). "The impact on microtubule network of a bracovirus IkappaB-like protein." *Cell Mol Life Sci* **67**(10): 1699-712.
- Dupuy, C., E. Huguet and J. M. Drezen (2006). "Unfolding the evolutionary story of polydnaviruses." *Virus Res* **117**(1): 81-89.
- Dushay, M. S., B. Asling and D. Hultmark (1996). "Origins of immunity: Relish, a compound Rel-like gene in the antibacterial defense of *Drosophila*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(19): 10343-7.
- Eleftherianos, I., R. H. ffrench-Constant, D. J. Clarke, A. J. Dowling and S. E. Reynolds (2010). "Dissecting the immune response to the entomopathogen *Photorhabdus*." *Trends Microbiol* **18**(12): 552-60.

- Erturk-Hasdemir, D., M. Broemer, F. Leulier, W. S. Lane, N. Paquette, D. Hwang, C. H. Kim, S. Stoven, P. Meier and N. Silverman (2009). "Two roles for the *Drosophila* IKK complex in the activation of Relish and the induction of antimicrobial peptide genes." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(24): 9779-84.
- Espagne, E., V. Douris, G. Lalmanach, B. Provost, L. Cattolico, J. Lesobre, S. Kurata, K. Iatrou, J. M. Drezen and E. Huguet (2005). "A virus essential for insect host-parasite interactions encodes cystatins." J Virol **79**(15): 9765-76.
- Espagne, E., C. Dupuy, E. Huguet, L. Cattolico, B. Provost, N. Martins, M. Poirie, G. Periquet and J. M. Drezen (2004). "Genome sequence of a polydnavirus: insights into symbiotic virus evolution." Science **306**(5694): 286-9.
- Falabella, P., P. Caccialupi, P. Varricchio, C. Malva and F. Pennacchio (2006). "Protein tyrosine phosphatases of *Toxoneuron nigriceps* bracovirus as potential disrupters of host prothoracic gland function." Arch Insect Biochem Physiol **61**(3): 157-69.
- Falabella, P., P. Varricchio, B. Provost, E. Espagne, R. Ferrarese, A. Grimaldi, M. de Eguileor, G. Fimiani, M. V. Ursini, C. Malva, J. M. Drezen and F. Pennacchio (2007). "Characterization of the IkappaB-like gene family in polydnaviruses associated with wasps belonging to different Braconid subfamilies." J Gen Virol **88**(Pt 1): 92-104.
- Fang, Q., L. Wang, J. Zhu, Y. Li, Q. Song, D. W. Stanley, Z. R. Akhtar and G. Ye (2010). "Expression of immune-response genes in lepidopteran host is suppressed by venom from an endoparasitoid, *Pteromalus puparum*." BMC Genomics **11**: 484.
- Fath-Goodin, A., T. A. Gill, S. B. Martin and B. A. Webb (2006). "Effect of *Campoletis sonorensis* ichnovirus cys-motif proteins on *Heliothis virescens* larval development." J Insect Physiol **52**(6): 576-85.
- Fath-Goodin, A., J. A. Kroemer and B. A. Webb (2009). "The *Campoletis sonorensis* ichnovirus vankyrin protein P-vank-1 inhibits apoptosis in insect Sf9 cells." Insect Mol Biol **18**(4): 497-506.
- Federici, B. A. and Y. Bigot (2003). "Origin and evolution of polydnaviruses by symbiogenesis of insect DNA viruses in endoparasitic wasps." J Insect Physiol **49**(5): 419-32.
- Finn, R. D., J. Tate, J. Mistry, P. C. Coghill, S. J. Sammut, H. R. Hotz, G. Ceric, K. Forslund, S. R. Eddy, E. L. Sonnhammer and A. Bateman (2008). "The Pfam protein families database." Nucleic Acids Res **36**(Database issue): D281-8.
- Flatt, T., A. Heyland, F. Rus, E. Porpiglia, C. Sherlock, R. Yamamoto, A. Garbuzov, S. R. Palli, M. Tatar and N. Silverman (2008). "Hormonal regulation of the humoral innate immune response in *Drosophila melanogaster*." J Exp Biol **211**(Pt 16): 2712-24.
- Fleming, J. A. and M. D. Summers (1986). "*Campoletis sonorensis* Endoparasitic Wasps Contain Forms of *C. sonorensis* Virus DNA Suggestive of Integrated and Extrachromosomal Polydnavirus DNAs." J Virol **57**(2): 552-562.
- Fleming, J. G. and M. D. Summers (1991). "Polydnavirus DNA is integrated in the DNA of its parasitoid wasp host." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(21): 9770-4.
- 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**(13): 3784-8.
- Ghosh, S. and M. Karin (2002). "Missing pieces in the NF-kappaB puzzle." Cell **109**: S81-96.
- Gill, T. A., A. Fath-Goodin, Maiti, II and B. A. Webb (2006). "Potential uses of Cys-motif and other polydnavirus genes in biotechnology." Adv Virus Res **68**: 393-426.

- Glickman, M. H. and A. Ciechanover (2002). "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction." Physiol Rev **82**(2): 373-428.
- Gorman, M. J., Y. Wang, H. Jiang and M. R. Kanost (2007). "Manduca sexta hemolymph proteinase 21 activates prophenoloxidase activating proteinase 3 in an insect innate immune response proteinase cascade." J Biol Chem.
- Govind, S. and R. H. Nehm (2004). "Innate immunity in fruit flies: a textbook example of genomic recycling." PLoS Biol **2**(8): E276.
- Grace, T. D. C. (1967). "Establishment of a Line of Cells from the Silkworm *Bombyx mori*" Nature **216**(613).
- Granados, R., L. Guoxun, A. Derksen and K. McKenna (1994). "A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus" J. Invertebr. Pathol. **64**(3): 260-266.
- Gundersen-Rindal, D. E. and M. J. Pedroni (2006). "Characterization and transcriptional analysis of protein tyrosine phosphatase genes and an ankyrin repeat gene of the parasitoid *Glyptapanteles indiensis* polydnavirus in the parasitized host." J Gen Virol **87**(Pt 2): 311-22.
- Han, Z. S. and Y. T. Ip (1999). "Interaction and specificity of Rel-related proteins in regulating *Drosophila* immunity gene expression." J Biol Chem **274**(30): 21355-61.
- Harwood, S. H., A. J. Grosovsky, E. A. Cowles, J. W. Davis and N. E. Beckage (1994). "An abundantly expressed hemolymph glycoprotein isolated from newly parasitized *Manduca sexta* larvae is a polydnavirus gene product." Virology **205**(2): 381-92.
- Harwood, S. H., J. S. McElfresh, A. Nguyen, C. A. Conlan and N. E. Beckage (1998). "Production of early expressed parasitism-specific proteins in alternate sphingid hosts of the braconid wasp *Cotesia congregata*." J Invertebr Pathol **71**(3): 271-9.
- Hayden, M. S. and S. Ghosh (2004). "Signaling to NF-kappaB." Genes Dev **18**(18): 2195-224.
- Hayden, M. S., A. P. West and S. Ghosh (2006). "NF-kappaB and the immune response." Oncogene **25**(51): 6758-80.
- Hedengren, M., B. Asling, M. S. Dushay, I. Ando, S. Ekengren, M. Wihlborg and D. Hultmark (1999). "Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in *Drosophila*." Mol Cell **4**(5): 827-37.
- Ikeda, F. and I. Dikic (2008). "Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series." EMBO Rep **9**(6): 536-42.
- Ip, Y. T., M. Reach, Y. Engstrom, L. Kadalayil, H. Cai, S. Gonzalez-Crespo, K. Tatei and M. Levine (1993). "Dif, a dorsal-related gene that mediates an immune response in *Drosophila*." Cell **75**(4): 753-763.
- Irving, P., J. M. Ubeda, D. Doucet, L. Troxler, M. Lagueux, D. Zachary, J. A. Hoffmann, C. Hetru and M. Meister (2005). "New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis." Cell Microbiol **7**(3): 335-50.
- Jacobs, M. and S. Harrison (1998). "Structure of an Ikb α /NF-kB Complex." Cell **95**: 749-758.
- Jiang, H., A. Vilcinskas and M. R. Kanost (2010). "Immunity in lepidopteran insects." Adv Exp Med Biol **708**: 181-204.
- 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**(2): 815-23.
- Kaneko, T., W. E. Goldman, P. Mellroth, H. Steiner, K. Fukase, S. Kusumoto, W. Harley, A. Fox, D. Golenbock and N. Silverman (2004). "Monomeric and polymeric gram-

- negative peptidoglycan but not purified LPS stimulate the *Drosophila* IMD pathway." Immunity **20**(5): 637-49.
- Kanost, M. R., H. Jiang and X. Q. Yu (2004). "Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*." Immunol Rev **198**: 97-105.
- Keating, S. E. and A. G. Bowie (2009). "Role of non-degradative ubiquitination in interleukin-1 and toll-like receptor signaling." J Biol Chem **284**(13): 8211-5.
- Kil, I. S., S. Y. Kim and J. W. Park (2008). "Glutathionylation regulates IkappaB." Biochem Biophys Res Commun **373**(1): 169-73.
- Kim, J. C., S. Y. Lee, S. Y. Kim, J. K. Kim, H. J. Kim, H. M. Lee, M. S. Choi, J. S. Min, M. J. Kim, H. S. Choi and J. K. Ahn (2008). "HSV-1 ICP27 suppresses NF-kappaB activity by stabilizing IkappaBalpha." FEBS Lett **582**(16): 2371-6.
- Kim, T., J. Yoon, H. Cho, W. B. Lee, J. Kim, Y. H. Song, S. N. Kim, J. H. Yoon, J. Kim-Ha and Y. J. Kim (2005). "Downregulation of lipopolysaccharide response in *Drosophila* by negative crosstalk between the AP1 and NF-kappaB signaling modules." Nat Immunol **6**(2): 211-8.
- Kocks, C., J. H. Cho, N. Nehme, J. Ulvila, A. M. Pearson, M. Meister, C. Strom, S. L. Conto, C. Hetru, L. M. Stuart, T. Stehle, J. A. Hoffmann, J. M. Reichhart, D. Ferrandon, M. Ramet and R. A. Ezekowitz (2005). "Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*." Cell **123**(2): 335-46.
- Koizumi, N., Y. Imai, A. Morozumi, M. Imamura, T. Kadotani, K. Yaoi, H. Iwahana and R. Sato (1999). "Lipopolysaccharide-binding protein of *Bombyx mori* participates in a hemocyte-mediated defense reaction against gram-negative bacteria." J Insect Physiol **45**(9): 853-859.
- Koizumi, N., A. Morozumi, M. Imamura, E. Tanaka, H. Iwahana and R. Sato (1997). "Lipopolysaccharide-binding proteins and their involvement in the bacterial clearance from the hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*." Eur J Biochem **248**(1): 217-24.
- Krell, P. J. and D. B. Stoltz (1980). "Virus-like particles in the ovary of an ichneumonid wasp: Purification and preliminary characterization." Virology **101**(2): 408-18.
- Kroemer, J. and B. Webb (2006). "Divergences in Protein Activity and Cellular Localization Within the *Campoletis sonorensis* Ichnovirus Vankyrin Family." J Virol.
- Kroemer, J. A. and B. A. Webb (2005). "Ikappabeta-related vankyrin genes in the *Campoletis sonorensis* ichnovirus: temporal and tissue-specific patterns of expression in parasitized *Heliothis virescens* lepidopteran hosts." J Virol **79**(12): 7617-28.
- Kroemer, J. A. and B. A. Webb (2006). "Divergences in protein activity and cellular localization within the *Campoletis sonorensis* Ichnovirus Vankyrin family." J Virol **80**(24): 12219-28.
- Lanot, R., D. Zachary, F. Holder and M. Meister (2001). "Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*." Dev Biol **230**(2): 243-57.
- Lapointe, R., K. Tanaka, W. E. Barney, J. B. Whitfield, J. C. Banks, C. Beliveau, D. Stoltz, B. A. Webb and M. Cusson (2007). "Genomic and morphological features of a banchine polydnavirus: comparison with bracoviruses and ichnoviruses." J Virol **81**(12): 6491-501.
- Le, N. T., S. Asgari, K. Amaya, F. F. Tan and N. E. Beckage (2003). "Persistence and expression of *Cotesia congregata* polydnavirus in host larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*." J Insect Physiol **49**(5): 533-43.
- Leeman, J. R. and T. D. Gilmore (2008). "Alternative splicing in the NF-kappaB signaling pathway." Gene **423**(2): 97-107.

- Lehming, N., S. McGuire, J. M. Brickman and M. Ptashne (1995). "Interactions of a Rel protein with its inhibitor." Proc Natl Acad Sci U S A **92**: 10242-10246.
- Lemaitre, B., E. Kromer-Metzger, L. Michaut, E. Nicolas, M. Meister, P. Georgel, J. M. Reichhart and J. A. Hoffmann (1995). "A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the Drosophila host defense." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9465-9.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart and J. A. Hoffmann (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults." Cell **86**(6): 973-83.
- Li, J., A. Mahajan and M. D. Tsai (2006). "Ankyrin repeat: a unique motif mediating protein-protein interactions." Biochemistry **45**(51): 15168-78.
- Lin, R., P. Beauparlant, C. Makris, S. Meloche and J. Hiscott (1996). "Phosphorylation of IkappaBalpha in the C-terminal PEST domain by casein kinase II affects intrinsic protein stability." Mol Cell Biol **16**(4): 1401-9.
- Liu, Z. P., R. L. Galindo and S. A. Wasserman (1997). "A role for CKII phosphorylation of the cactus PEST domain in dorsoventral patterning of the Drosophila embryo." Genes Dev **11**(24): 3413-22.
- 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. ." J. Biol. Chem. **272**(49): 30724-30728.
- Luckhart, S. and B. A. Webb (1996). "Interaction of a wasp ovarian protein and polydnavirus in host immune suppression." Dev Comp Immunol **20**(1): 1-21.
- McElhinny, J. A., S. A. Trushin, G. D. Bren, N. Chester and C. V. Paya (1996). "Casein kinase II phosphorylates I kappa B alpha at S-283, S-289, S-293, and T-291 and is required for its degradation." Mol Cell Biol **16**(3): 899-906.
- Meng, X., B. S. Khanuja and Y. T. Ip (1999). "Toll receptor-mediated Drosophila immune response requires Dif, an NF-kappaB factor." Genes Dev **13**(7): 792-7.
- Mohamed, M. R. and G. McFadden (2009). "NFkB inhibitors: strategies from poxviruses." Cell Cycle **8**(19): 3125-32.
- Moore, D. (1987). Preparation and analysis of DNA. Current protocols in molecular biology. F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston et al, John Wiley & Sons, Inc. **1**.
- Mosavi, L. K., D. L. Minor, Jr. and Z. Y. Peng (2002). "Consensus-derived structural determinants of the ankyrin repeat motif." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 16029-34.
- Murakami, Y., K. Tanimoto, H. Fujiwara, J. An, K. Suemori, T. Ochi, H. Hasegawa and M. Yasukawa (2010). "Human herpesvirus 6 infection impairs Toll-like receptor signaling." Virology **7**: 91.
- Nakamatsu, Y., S. Fujii and T. Tanaka (2002). "Larvae of an endoparasitoid, Cotesia kariyai (Hymenoptera: Braconidae), feed on the host fat body directly in the second stadium with the help of teratocytes." J Insect Physiol **48**(11): 1041-1052.
- Nappi, A., M. Poirie and Y. Carton (2009). "The role of melanization and cytotoxic by-products in the cellular immune responses of Drosophila against parasitic wasps." Adv Parasitol **70**: 99-121.
- Nguyen Ba, A. N., A. Pogoutse, N. Provart and A. M. Moses (2009). "NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction." BMC Bioinformatics **10**: 202.
- Packman, L. C., K. Kubota, J. Parker and N. J. Gay (1997). "Casein kinase II phosphorylates Ser468 in the PEST domain of the Drosophila IkappaB homologue cactus." FEBS Lett **400**(1): 45-50.

- Pal, S., J. Wu and L. P. Wu (2008). "Microarray analyses reveal distinct roles for Rel proteins in the *Drosophila* immune response." *Dev Comp Immunol* **32**(1): 50-60.
- Park, J. M., H. Brady, M. G. Ruocco, H. Sun, D. Williams, S. J. Lee, T. Kato, Jr., N. Richards, K. Chan, F. Mercurio, M. Karin and S. A. Wasserman (2004). "Targeting of TAK1 by the NF-kappa B protein Relish regulates the JNK-mediated immune response in *Drosophila*." *Genes Dev* **18**(5): 584-94.
- Pech, L. L. and M. R. Strand (1996). "Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes." *J Cell Sci* **109** (Pt 8): 2053-60.
- Provost, B., P. Varricchio, E. Arana, E. Espagne, P. Falabella, E. Huguet, R. La Scaleia, L. Cattolico, M. Poirié, C. Malva, J. A. Olszewski, F. Pennacchio and J. M. Drezen (2004). "Bracoviruses Contain a Large Multigene Family Coding for Protein Tyrosine Phosphatases." *J Virol* **78**(23): 13090-103.
- Pruijssers, A. J. and M. R. Strand (2007). "PTP-H2 and PTP-H3 from *Microplitis demolitor* Bracovirus localize to focal adhesions and are antiphagocytic in insect immune cells." *J Virol* **81**(3): 1209-19.
- Qiu, P., P. C. Pan and S. Govind (1998). "A role for the *Drosophila* Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis." *Development* **125**(10): 1909-20.
- Ramet, M., P. Manfrulli, A. Pearson, B. Mathey-Prevot and R. A. Ezekowitz (2002). "Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*." *Nature* **416**(6881): 644-8.
- Rasband, W. S. "ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA,." <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
- Revilla, Y., M. Callejo, J. M. Rodriguez, E. Culebras, M. L. Nogal, M. L. Salas, E. Vinuela and M. Fresno (1998). "Inhibition of nuclear factor kappaB activation by a virus-encoded IkappaB-like protein." *J Biol Chem* **273**(9): 5405-11.
- Rice, P., I. Longden and A. Bleasby (2000). "EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite." *Trends Genet* **16**(6): 276-7.
- Rodrigues, L., J. Filipe, M. P. Seldon, L. Fonseca, J. Anrather, M. P. Soares and J. P. Simas (2009). "Termination of NF-kappaB activity through a gammaherpesvirus protein that assembles an EC5S ubiquitin-ligase." *EMBO J* **28**(9): 1283-95.
- Rogers, S., R. Wells and M. Rechsteiner (1986). "Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis." *Science* **234**(4774): 364-8.
- Ryu, J. H., S. H. Kim, H. Y. Lee, J. Y. Bai, Y. D. Nam, J. W. Bae, D. G. Lee, S. C. Shin, E. M. Ha and W. J. Lee (2008). "Innate immune homeostasis by the homeobox gene caudal and commensal-gut mutualism in *Drosophila*." *Science* **319**(5864): 777-82.
- Ryu, J. H., K. B. Nam, C. T. Oh, H. J. Nam, S. H. Kim, J. H. Yoon, J. K. Seong, M. A. Yoo, I. H. Jang, P. T. Brey and W. J. Lee (2004). "The homeobox gene Caudal regulates constitutive local expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* epithelia." *Mol Cell Biol* **24**(1): 172-85.
- Santoro, M. G., A. Rossi and C. Amici (2003). "NF-kappaB and virus infection: who controls whom." *Embo J* **22**(11): 2552-60.
- Savary, S., N. Beckage, F. Tan, G. Periquet and J. M. Drezen (1997). "Excision of the polydnavirus chromosomal integrated EP1 sequence of the parasitoid wasp *Cotesia congregata* (Braconidae, Microgastinae) at potential recombinase binding sites." *J Gen Virol* **78** (Pt 12): 3125-34.
- Schmidt, O., R. V. Glatz, S. Asgari and H. L. Roberts (2005). "Are insect immune suppressors driving cellular uptake reactions?" *Arch Insect Biochem Physiol* **60**(4): 153-8.
- Schmidt, O., U. Theopold and M. R. Strand (2001). "Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids." *Bioessays* **23**(4): 344-51.

- Schneider, I. (1972). "Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*." J. Embryol. Exp. Morphol. **27**(2): 353-365.
- Sedgwick, S. G. and S. J. Smerdon (1999). "The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework." Trends Biochem Sci **24**(8): 311-6.
- Senger, K., K. Harris and M. Levine (2006). "GATA factors participate in tissue-specific immune responses in *Drosophila* larvae." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(43): 15957-62.
- Serbielle, C., S. Moreau, F. Veillard, E. Voldoire, A. Bezier, M. A. Mannucci, A. N. Volkoff, J. M. Drezen, G. Lalmanach and E. Huguet (2009). "Identification of parasite-responsive cysteine proteases in *Manduca sexta*." Biol Chem **390**(5-6): 493-502.
- Shelby, K. S. and B. A. Webb (1994). "Polydnavirus infection inhibits synthesis of an insect plasma protein, arylphorin." J Gen Virol **75** (Pt 9): 2285-92.
- Shelby, K. S. and B. A. Webb (1997). "Polydnavirus infection inhibits translation of specific growth-associated host proteins." Insect Biochem Mol Biol **27**(3): 263-70.
- Shisler, J. L. and X. L. Jin (2004). "The vaccinia virus K1L gene product inhibits host NF-kappaB activation by preventing IkappaBalpha degradation." J Virol **78**(7): 3553-60.
- Sigrist, C. J., L. Cerutti, E. de Castro, P. S. Langendijk-Genevaux, V. Bulliard, A. Bairoch and N. Hulo (2010). "PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation." Nucleic Acids Res **38**(Database issue): D161-6.
- Silk, R. N., G. C. Bowick, C. C. Abrams and L. K. Dixon (2007). "African swine fever virus A238L inhibitor of NF-kappaB and of calcineurin phosphatase is imported actively into the nucleus and exported by a CRM1-mediated pathway." J Gen Virol **88**(Pt 2): 411-9.
- Steward, R. (1987). "Dorsal, an embryonic polarity gene in *Drosophila*, is homologous to the vertebrate proto-oncogene, c-rel." Science **238**(4827): 692-4.
- Stoltz, D. B. (1990). "Evidence for chromosomal transmission of polydnavirus DNA." J Gen Virol **71** (Pt 5): 1051-6.
- Stoltz, D. B. and J. B. Whitfield (2009). "Virology. Making nice with viruses." Science **323**(5916): 884-5.
- Stoven, S., I. Ando, L. Kadalayil, Y. Engstrom and D. Hultmark (2000). "Activation of the *Drosophila* NF-kappaB factor Relish by rapid endoproteolytic cleavage." EMBO Rep **1**(4): 347-52.
- Stoven, S., N. Silverman, A. Junell, M. Hedengren-Olcott, D. Erturk, Y. Engstrom, T. Maniatis and D. Hultmark (2003). "Caspase-mediated processing of the *Drosophila* NF-kappaB factor Relish." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 5991-6.
- Strand, M. R. (1994). "Microplitis demolitor polydnavirus infects and expresses in specific morphotypes of *Pseudaletia includens* haemocytes." J Gen Virol **75** (Pt 11): 3007-20.
- Strand, M. R., M. H. Beck, M. D. Lavine and K. D. Clark (2006). "Microplitis demolitor bracovirus inhibits phagocytosis by hemocytes from *Pseudaletia includens*." Arch Insect Biochem Physiol **61**(3): 134-45.
- Strand, M. R., K. C. Clark and E. M. Gardiner (1999). "Plasmatocyte spreading peptide does not induce *Microplitis demolitor* polydnavirus-infected plasmatocytes to spread on foreign surfaces." Arch Insect Biochem Physiol **40**(1): 41-52.
- Strand, M. R. and L. L. Pech (1995). "Microplitis demolitor polydnavirus induces apoptosis of a specific haemocyte morphotype in *Pseudaletia includens*." J Gen Virol **76** (Pt 2): 283-91.

- Swevers, L., L. Kravariti, S. Ciolfi, M. Xenou-Kokoletsi, N. Ragoussis, G. Smagghe, Y. Nakagawa, B. Mazomenos and K. Iatrou (2004). "A cell-based high-throughput screening system for detecting ecdysteroid agonists and antagonists in plant extracts and libraries of synthetic compounds." Faseb J **18**(1): 134-6.
- Tanaka, H., J. Ishibashi, K. Fujita, Y. Nakajima, A. Sagisaka, K. Tomimoto, N. Suzuki, M. Yoshiyama, Y. Kaneko, T. Iwasaki, T. Sunagawa, K. Yamaji, A. Asaoka, K. Mita and M. Yamakawa (2008). "A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori*." Insect Biochem Mol Biol **38**(12): 1087-110.
- Tanaka, H., H. Matsuki, S. Furukawa, A. Sagisaka, E. Kotani, H. Mori and M. Yamakawa (2007). "Identification and functional analysis of Relish homologs in the silkworm, *Bombyx mori*." Biochim. Biophys. Acta **1769**: 559-68.
- Tanaka, H., A. Sagisaka, Y. Nakajima, K. Fujita, S. Imanishi and M. Yamakawa (2009). "Correlation of differential expression of silkworm antimicrobial peptide genes with different amounts of rel family proteins and their gene transcriptional activity." Biosci Biotechnol Biochem **73**(3): 599-606.
- Tanaka, H., M. Yamamoto, Y. Moriyama, M. Yamao, S. Furukawa, A. Sagisaka, H. Nakazawa, H. Mori and M. Yamakawa (2005). "A novel Rel protein and shortened isoform that differentially regulate antibacterial peptide genes in the silkworm *Bombyx mori*." Biochim Biophys Acta **1730**(1): 10-21.
- Tauszig, S., E. Jouanguy, J. A. Hoffmann and J. L. Imler (2000). "Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(19): 10520-5.
- Thoetkiattikul, H., M. H. Beck and M. R. Strand (2005). "Inhibitor kappaB-like proteins from a polydnavirus inhibit NF-kappaB activation and suppress the insect immune response." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(32): 11426-31.
- Thompson, S. N., R. A. Redak and L. W. Wang (2005). "Host nutrition determines blood nutrient composition and mediates parasite developmental success: *Manduca sexta* L. parasitized by *Cotesia congregata* (Say)." J Exp Biol **208**: 625-635.
- Tian, S. P., J. H. Zhang and C. Z. Wang (2007). "Cloning and characterization of two *Campoletis chloridae* ichnovirus vankyrin genes expressed in parasitized host *Helicoverpa armigera*." J Insect Physiol **53**(7): 699-707.
- Tsubuki, S., H. Kawasaki, Y. Saito, N. Miyashita, M. Inomata and S. Kawashima (1993). "Purification and characterization of a Z-Leu-Leu-Leu-MCA degrading protease expected to regulate neurite formation: a novel catalytic activity in proteasome." Biochem Biophys Res Commun **196**(3): 1195-201.
- Tzou, P., J. M. Reichhart and B. Lemaitre (2002). "Constitutive expression of a single antimicrobial peptide can restore wild-type resistance to infection in immunodeficient *Drosophila* mutants." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(4): 2152-7.
- Uvell, H. and Y. Engström (2007). "A multilayered defense against infection: combinatorial control of insect immune genes." Trends Genet. **23**(7): 342-9.
- Vaughn, J. L., R. H. Goodwin, G. J. Tompkins and P. McCawley (1977). "The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae)." In Vitro **13**(4): 213-7.
- Wang, L. and P. Ligoxygakis (2006). "Pathogen recognition and signalling in the *Drosophila* innate immune response." Immunobiology **211**(4): 251-61.
- Wang, Y., T. Cheng, S. Rayaprolu, Z. Zou, Q. Xia, Z. Xiang and H. Jiang (2007). "Proteolytic activation of pro-spatzle is required for the induced transcription of antimicrobial peptide genes in lepidopteran insects." Dev Comp Immunol **31**(10): 1002-12.

- Wang, Y., M. M. van Oers, A. M. Crawford, J. M. Vlak and J. A. Jehle (2007). "Genomic analysis of *Oryctes rhinoceros* virus reveals genetic relatedness to *Heliothis zea* virus 1." *Arch Virol* **152**(3): 519-31.
- Watson, F. L., R. Puttmann-Holgado, F. Thomas, D. L. Lamar, M. Hughes, M. Kondo, V. I. Rebel and D. Schmucker (2005). "Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects." *Science* **309**(5742): 1874-8.
- Webb, B. A., M. R. Strand, S. E. Dickey, M. H. Beck, R. S. Hilgarth, W. E. Barney, K. Kadash, J. A. Kroemer, K. G. Lindstrom, W. Rattanadechakul, K. S. Shelby, H. Thoetkiattikul, M. W. Turnbull and R. A. Witherell (2006). "Polydnavirus genomes reflect their dual roles as mutualists and pathogens." *Virology* **347**(1): 160-74.
- Webb, B. A. and M. D. Summers (1990). "Venom and viral expression products of the endoparasitic wasp *Campoletis sonorensis* share epitopes and related sequences." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(13): 4961-5.
- Wertheim, B., A. R. Kraaijeveld, E. Schuster, E. Blanc, M. Hopkins, S. D. Pletcher, M. R. Strand, L. Partridge and H. C. Godfray (2005). "Genome-wide gene expression in response to parasitoid attack in *Drosophila*." *Genome Biol* **6**(11): R94.
- Whitfield, J. B. (1990). "Parasitoids, polydnaviruses and endosymbiosis." *Parasitol Today* **6**(12): 381-4.
- Whitfield, J. B. and S. Asgari (2003). "Virus or not? Phylogenetics of polydnaviruses and their wasp carriers." *J Insect Physiol.* **49**(5): 397-405.
- Wiklund, M. L., S. Steinert, A. Junell, D. Hultmark and S. Stoven (2009). "The N-terminal half of the *Drosophila* Rel/NF-kappaB factor Relish, REL-68, constitutively activates transcription of specific Relish target genes." *Dev Comp Immunol.*
- Williams, M. J. (2007). "*Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity." *J Immunol* **178**(8): 4711-6.
- Wonnacott, R. J. and T. H. Wonnacott (1982). *Statistics: Discovering its power*. New York, John Wiley and Sons: 382.
- Xu, D. M. and D. Stoltz (1991). "Evidence for a chromosomal location of polydnavirus DNA in the ichneumonid parasitoid *Hyposoter fugitivus*." *J Virol* **65**(12): 6693-704.
- Xue, Y., A. Li, L. Wang, H. Feng and X. Yao (2006). "PPSP: prediction of PK-specific phosphorylation site with Bayesian decision theory." *BMC Bioinformatics* **7**: 163.
- Zabel, U. and P. A. Bauerle (1990). "Purified human I κ B can rapidly dissociate the complex of the NF- κ B transcription factor with its cognate DNA." *Cell* **61**: 255-265.
- Zambon, R. A., M. Nandakumar, V. N. Vakharia and L. P. Wu (2005). "The Toll pathway is important for an antiviral response in *Drosophila*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(20): 7257-62.
- Zdobnov, E. M. and R. Apweiler (2001). "InterProScan - an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro." *Bioinformatics* **17**(9): 847-8.
- Zhang, S. Q., A. Kovalenko, G. Cantarella and D. Wallach (2000). "Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKK γ) upon receptor stimulation." *Immunity* **12**(3): 301-11.
- Zou, Z., F. Najar, Y. Wang, B. Roe and H. Jiang (2008). "Pyrosequence analysis of expressed sequence tags for *Manduca sexta* hemolymph proteins involved in immune responses." *Insect Biochem Mol Biol* **38**(6): 677-82.



Differential inhibition of BmRelish1-dependent transcription in lepidopteran cells by bracovirus ankyrin-repeat proteins

Christiana Magkrioti, Kostas Iatrou, Vassiliki Labropoulou*

Insect Molecular Genetics and Biotechnology Group, Institute of Biology, National Centre for Scientific Research "Demokritos", Neapoleos & Patr. Grigoriou, 153 10 Aghia Paraskevi Attikis, Athens, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 August 2011
Received in revised form
23 September 2011
Accepted 30 September 2011

Keywords:

Ank
BmRelish1
Braconid wasps
Cotesia congregata
Host–parasite interactions
Insect immunity
Polydnavirus
Manduca sexta
Tobacco hornworm

ABSTRACT

In the tripartite parasitization system of the lepidopteran host *Manduca sexta*, the endoparasitoid wasp *Cotesia congregata* and its endosymbiotic virus, *C. congregata* Bracovirus (CcBV), the expression of viral proteins is necessary for successful parasitization. Here we have examined the *in vitro* effects of six members of the ankyrin-repeat protein family (Ank) of CcBV, which are thought to interfere with the host's induced innate immune responses, on the transcriptional activity of a heterologous lepidopteran Rel/NFκB transcription factor, Relish1 of *Bombyx mori*. Using as transcriptional activator BmRelish1-d2 (R1d2), a constitutively active mutant of the major regulator of the Imd pathway, BmRelish1, in conjunction with a reporter gene controlled by a *B. mori* antimicrobial peptide gene promoter, we have found that 5 of the 6 examined Anks suppress R1d2-dependent transcriptional activity to various degrees. Immunofluorescence studies have also revealed that while some of the Ank proteins have a rather strict cytoplasmic localization, others are detected both in the cytoplasm and the nucleus of the expressing cells and that colocalization with R1d2 occurs exclusively in the nucleus. Thus, our results suggest that functional and spatial differences among the various CcBV Ank family members may be responsible for the observed differential inhibition of R1d2 activity.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Parasitization of lepidopteran insects by parasitoid Hymenoptera (wasps) results in disruption of the host immune system. In some cases, viral particles, termed polydnaviruses (PDVs reviewed in Drezen et al., 2003; Dupuy et al., 2006; Bezier et al., 2009) that are injected together with the endoparasitoid eggs into the host larvae play important roles in the parasitization process. In the lepidopteran host, PDVs, which encompass the groups Ichnoviruses and Bracoviruses (Whitfield, 1990), exert effects leading to the prevention of the wasp eggs' encapsulation (Edson et al., 1981). In fact, many PDV proteins have been shown to interfere with the development of the host (Shelby and Webb, 1997; Barandoc and Kim, 2009) and its cellular and humoral immune reactions (Beck and Strand, 2005; Puijssers and Strand, 2007; Labropoulou et al., 2008; Lu et al., 2010).

In *Drosophila*, where immune responses have been studied extensively, two major immune signalling pathways are induced after microbial infection, Imd and Toll (Lemaitre et al., 1995, 1996), which, among others, control the expression of antimicrobial peptides (AMPs), pattern recognition proteins (PRPs), melanization

(De Gregorio et al., 2002) and are implicated in antiviral responses (Zamboni et al., 2005; Costa et al., 2009). In terms of the transcription factors acting in the two pathways, three major ones are known in the fruitfly; (i) Dorsal, which is involved in dorsoventral patterning and at the same time is a Rel/NFκB transcription factor (Steward, 1987) linked to immunity (Lemaitre et al., 1996); (ii) the Dorsal-related immunity factor, Dif, which together with Dorsal is involved in the Toll pathway (Ip et al., 1993; Meng et al., 1999); and (iii) Relish, a compound protein consisting of a Rel homology domain (RHD) and an ankyrin-repeat domain (ARD) that acts as a downstream factor in the Imd pathway (Dushay et al., 1996; Hedengren et al., 1999).

Genomic and biochemical data indicate that the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, produces homologues for most known components of the *Drosophila* Toll and Imd signal transduction pathways (Wang et al., 2007; Cheng et al., 2008; Tanaka et al., 2008; An et al., 2010). Thus far, four Rel/NFκB transcription factors have been described in *B. mori*; BmRelA, BmRelB, BmRelish1 and BmRelish2. Of these, BmRelA and BmRelB derive from a single gene by alternative splicing (Tanaka et al., 2005). The RHD of BmRelA/B shares homology with the RHD of the *Drosophila* Dorsal and the two factors bind to NFκB binding sites on the promoters of antibacterial peptide genes (Tanaka et al., 2005). BmRelish1 and 2, on the other hand,

* Corresponding author. Tel.: +30 210 6503621; fax: +30 210 6511767.
E-mail address: beslabro@bio.demokritos.gr (V. Labropoulou).

contain an RHD homologous to the one of *Drosophila* Relish. BmRelish1 also encompasses an acidic and hydrophobic amino acid-rich region (AHAA) and an ankyrin-repeat domain (ARD), which BmRelish2 lacks. While the full-length BmRelish1 is inactive, a deletion mutant lacking the ARD (BmRelish1-d2, thereafter designated R1d2) is active and able to induce the transcription of many antimicrobial peptide genes, including *cecropin B1*, constitutively (Tanaka et al., 2007). BmRelish2 has not been found to be transcriptionally active; in fact, it is considered to act as transcriptional suppressor of the active form of BmRelish1 (Tanaka et al., 2007).

The bracovirus of the parasitoid wasp *Cotesia congregata* (CcBV) that parasitizes the moth *Manduca sexta* encodes an ankyrin-repeat protein family (Espagne et al., 2004) consisting of nine genes, *ank1–ank9*. The characterization of *ank1–ank6* has shown that the relevant gene products are homologous to I κ B and Cactus, inhibitors of NF κ B factors in mammals and *Drosophila*, respectively, containing ankyrin repeats but lacking the regulatory sites that are present in I κ B and Cactus (Espagne et al., 2004; Falabella et al., 2007). The expression of these genes has been shown to occur in many host tissues including haemocytes, fat body, midgut, the nerve cord and malpighian tubules (Falabella et al., 2007). Besides the first six genes, the *ank* family encompasses also genes *ank7–9*, which were discovered or recognized as such more recently and have been less studied (J. M. Drezen, personal communication).

Polydnavirus (PDV)-encoded ankyrin-repeat proteins have been shown to have a range of activities. Thus, TnBVAnk1 of *Toxoneuron nigriceps* bracovirus was shown to inhibit the TNF α signalling mediated by NF κ B in HeLa cells (Falabella et al., 2007), but the same protein was also found to disrupt the microtubule network in *Drosophila* oocytes probably due to its anchoring to microtubule ends (Duchi et al., 2010). On the other hand, two ankyrin-repeat proteins of *Microplitis demolitor* bracovirus have also been implicated in Rel/NF κ B inhibition as they were found to suppress the transcription of two antimicrobial peptide genes, *drosomycin* in cells expressing a constitutively active Toll receptor and *attacin* in cells stimulated with LPS (Thoetkiattikul et al., 2005). These proteins co-immunoprecipitated with Dif and full-length Relish of *Drosophila* and prevented them from binding to the NF κ B binding sites of the *drosomycin* and *cecropin A1* promoters, respectively (Thoetkiattikul et al., 2005). Finally, PDV ankyrin-repeat proteins have been linked to the suppression of host responses against other viruses as well. Thus, P-vank1 and I²-vank3 of the *Campoletis sonorensis* ichnovirus enhance longevity and delay the lysis of *Spodoptera frugiperda* Sf9 and *Drosophila* S2 cells infected with baculoviruses (Kroemer and Webb, 2006), while the ankyrin-repeat proteins of *Cotesia plutellae* (or *Cotesia vestalis*) bracovirus, CpBV-I κ Bs, decrease induced melanization in baculovirus-infected *Plutella xylostella* larvae (Bae and Kim, 2009).

Given their homology to mammalian I κ B α and *Drosophila* Cactus proteins, we have tested whether CcBV Ank proteins could function as inhibitors of insect NF κ B homologues. As the question has arisen whether all members of one PDV Ank family share a common role, we focused our studies on multiple CcBV Ank proteins. Our results show a differential repression of R1d2, the constitutively active mutant of BmRelish1 that is implicated in the Imd pathway. They also reveal an unanticipated shuttling of Ank proteins between cytoplasm and nucleus, which enables their colocalization with R1d2 in the nucleus.

2. Materials and methods

2.1. Expression constructs

cDNAs from CcBV *ank1*, 2, 4, 7, 8 and 9 genes were provided by Dr J. M. Drezen, University Francois Rabelais, Tours, France. Their open

reading frames (ORFs) were amplified using appropriate pairs of primers (primers 1–12 in Supp. Table 1) and subcloned in the BamHI restriction site of expression vector pEA.myc-his (Lu et al., 1997; Douris et al., 2006). All forward primers had a Kozak sequence for optimal initiation of translation (Kozak, 1987) and all reverse primers were depleted of the stop codon to allow fusion of the myc-his tag to the gene.

The cDNAs of *Bmrelish1* and *Bmrelish1-d2*, a gift from Dr M. Yamakawa, were initially in the pPac-PL vector that contained the *Drosophila melanogaster* actin 5C promoter (Tanaka et al., 2007). The partial cDNA encoding the constitutively active deletion mutant of transcription factor BmRelish1 (Tanaka et al., 2007), BmRelish1-d2 or R1d2, was amplified using primers that added a BamHI restriction site at both its ends (primers 13, 14 in Supp. Table 1). The forward primer (primer 13 in Supp. Table 1) contained a Kozak sequence for optimal initiation of translation and the reverse primer (primer 14 in Supp. Table 1) was modified so that a stop codon was inserted at the 3' end of the amplified sequence. *Bmrelish1-d2* was first cloned in pGEM-T-easy (Promega), released from it and ligated to the final vector, pBmA, under the control of the *B. mori* A3 cytoplasmic actin promoter (Johnson et al., 1992). Combining the same forward primer (primer 13 in Supp. Table 1) with a different reverse primer (primer 15 in Supp. Table 1) that does not add a stop codon to *Bmrelish1-d2*, this gene fragment was cloned in pEA.his-glu which confers carboxy-terminal tagging. The same gene fragment was also cloned in the BamHI cloning site of expression vector pEA.flag which adds an aminoterminal flag tag to the encoded protein (Douris et al., 2006). For this cloning, primers 16 and 17 in Supp. Table 1 were employed, with the forward primer designed in such a way that the start codon of the gene is abolished and pGEM-T-easy was used as an intermediate vector. The same procedure was followed for the cloning of *Bmrelish1* in pEA.flag (with primers 18, 19 in Supp. Table 1).

The reporter construct pGL3.cecB1.luc that drives the transcription of the firefly luciferase gene under the control of the silkworm *Cecropin B1* gene promoter was provided by Dr M. Yamakawa (Tanaka et al., 2005). Reporter plasmid pBmbA.EcRE.gfp encoding the enhanced green fluorescence protein (eGFP) downstream of a *B. mori* actin promoter combined with seven binding sites of 20-hydroxy-ecdysone (Swevers et al., 2004) served as an internal standard in the functional assays.

2.2. Cell cultures and transient transfections

BTI-Tn-5B1-4 cells (High Five™; Invitrogen), mentioned in the text as Hi5, derived from *Trichoplusia ni* embryos (Granados et al., 1994), were maintained in IPL-41 insect cell culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma–Aldrich) and subcultured weekly as previously reported (Douris et al., 2006). For transfection, 500,000 cells were seeded per well of 12-well microtiter plates at a final volume of 1 ml medium. Transfections were done with Escort IV (Sigma–Aldrich) at a ratio of 1 μ g DNA: 8 μ g Escort IV.

2.3. Immunoblottings

Cells expressing transcription factors BmRelish1 or R1d2 were lysed in buffer containing 50 mM Tris–Cl, 150 mM NaCl, 1% NP-40 and protease inhibitors cocktail (P8340, Sigma–Aldrich), whereas cells expressing the viral myc-tagged Ank proteins in the functional experiments were lysed with the freeze-thaw method in IPL medium in order to allow the subsequent luminescence measurements. All lysates were boiled in SDS/PAGE buffer and loaded on 10% or 15% polyacrylamide gels, respectively. Proteins were

transferred to Hybond ECL membrane (Amersham) using an appropriate buffer, 25 mM Tris, 192 mM glycine and 20% methanol. Flag.BmRelish1 and flag.R1d2 were detected with the polyclonal anti-flag (F7425, Sigma–Aldrich) as a primary antibody diluted 1:1000 and the anti-rabbit HRP (Jackson ImmunoResearch) as a secondary antibody diluted 1:5000. Myc-tagged Ank proteins were visualized with an anti-myc (9B11, Cell Signalling) primary antibody at a 1:1000 dilution combined with a goat anti-mouse IgG-HRP (sc-2005, Santa-Cruz Biotechnology) secondary antibody at a 1:5000 dilution. According to Compute pI/Mw (Gasteiger et al., 2003), the predicted molecular weights of the tested proteins are flag.R1d2: 64 kDa, flag.BmRelish1: 106 kDa, Ank1: 21.3 kDa, Ank2: 21.9 kDa, Ank4: 21.6 kDa, Ank7: 15.3 kDa, Ank8: 22.3 kDa and Ank9: 24.7 kDa. Tubulin served as a loading control and its detection was done with anti-tubulin (Serotec) primary antibody at a 1:1000 dilution and goat anti-rat HRP (Chemicon) secondary antibody at a 1:4000 dilution. The chemiluminescence reaction was performed with the SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) as described by the manufacturer and images were captured with the Fujifilm LAS-4000 image system. Densitometric analysis of Ank protein expression was done with ImageJ software (Abramoff et al., 2004) after colour inversion in the immunoblot images.

2.4. Luciferase reporter assays

Two kinds of induction control assays were done. In the first, 5×10^5 Hi5 cells were co-transfected with 100 ng of pGL3.cecB1.luc, 50 ng of pBmbA.EcRE.gfp, 200 ng of pEA.pac and 150 ng of pBmA.R1d2 or pBmA. In the second, the same number of cells was co-transfected with 100 ng of pGL3.cecB1.luc, 50 ng of pBmbA.EcRE.gfp and 350 ng of pEA.flag.Bmrelish1 or pEA.pac. The pEA.pac construct expresses puromycin acetyltransferase (PAC) and is not related to any types of immune responses Ank-related or otherwise. In the second kind of assays, cells were treated one day post-transfection with LPS (produced with phenol extraction from *Escherichia coli* serotype O111:B4, product L2630, Sigma–Aldrich) at 100 μ g/ml for 24 h. Moreover, for all assays, cells were split one day post-transfection in two equal parts. The first part was treated with 200 nM tebufenozide (20HE analogue (Dhadialla et al., 1998)) to induce GFP production and fluorescence measurements were taken 24 h later in a Tecan fluorometer. The second part was used for preparation of cell lysates and subsequent luminescence measurements using the Steady-Glo system (Promega) as described by the manufacturer. Luminescence values were normalized against fluorescence values in the duplicate aliquots. In order to calculate the induction of the reporter gene, normalized luminescence from samples expressing an inducer was divided with normalized luminescence from control samples (i.e. samples without inducer).

To test the effect of Ank proteins on R1d2 transcription, cells were co-transfected with 100 ng of pGL3.cecB1.luc, 150 ng of pBmA.R1d2, 50 ng of pBmbA.EcRE.gfp and 200 ng of pEA.ank.myc-his/pEA.pac DNA mixtures. The quantities of the different Ank-expressing constructs varied among different Ank proteins so that almost equal levels of Ank protein accumulation were achieved. Specifically, 12 ng, 80 ng, 36 ng, 80 ng, 20 ng and 200 ng of constructs expressing Ank1, Ank2, Ank4, Ank7, Ank8 and Ank9, respectively, were employed. Wherever needed, pEA.pac plasmid was added in order to reach equal total DNA quantities. In the control cells, all the DNA of the pEA.ank.myc-his/pEA.pac mixture was covered with pEA.pac, thus not expressing any Ank protein, and, contrary to the induction assays described above, they included the inducer expressing plasmid. Two days post-transfection, cells were split, fluorescence and luminescence

measurements were taken and normalization of luminescence against fluorescence was performed for each sample, as mentioned above. Average normalized luminescence of the control sample was set as 100 and normalized luminescence values for all other samples were expressed as percentages of the control (100%) value. The Ank dose-dependence assays were performed in a similar manner, but R1d2 was expressed from a different vector, pEA.R1d2.his–glu, which carries the baculovirus enhancer HR3 in order to enhance expression leading to higher luminescence levels. Moreover, the transfection mixtures contained different quantities of expression vectors: 50 ng of pGL3.cecB1.luc, 50 ng of pEA.R1d2.his–glu, 25 ng of pBmbA.EcRE.gfp and increasing amounts of pEA.myc-his plasmids (125, 250 or 375 ng). pEA.pac was added to reach equal total DNA amounts.

2.5. Statistical analysis

In the reporter induction assays, the differences between mean values of normalized luminescence in the presence or absence of inducer (either LPS or R1d2) were tested with an unpaired *t*-test with Welch's correction using GraphPad Prism v. 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA).

In the luminescence assays, which tested the effect of Ank proteins on R1d2, means of percentages of normalized luminescence were drawn from three independent experiments with triplicate samples and were depicted on a graph. The differences between the mean values from the Ank-expressing samples and the control were tested with one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons' test using GraphPad Prism. On the occasion of statistically significant variances among different samples, the non-parametric test Kruskal–Wallis was used along with the post-hoc Dunn's test. In these cases, the graphs depict the medians \pm IQR (interquartile range) instead of the means of the normalized data.

2.6. Immunofluorescence assays

Hi5 cells seeded at 24-well culture plates were transfected with pEA.ank.myc-his, pEA.flag.R1d2 or both at a total quantity of 250 ng DNA per 250,000 cells. Two days post-transfection, cells were allowed to spread on poly-L-lysine coated slides (Thermo Scientific) for 40 min, washed in Phosphate buffered saline (PBS) and fixed in 2% paraformaldehyde–PBS solution for 15 min. Whenever required, prior to fixation, cell membranes were stained with 5 μ g/ml wheat germ agglutinin (WGA) Texas Red-X conjugate (W21405, Molecular Probes), at 28 °C, for 10 min. After fixation, cells were permeabilized with 0.1% Triton X 100–PBS for 20 min, blocked with 3% BSA in PBS for 1 h and treated with monoclonal anti-myc antibody (9B11, Cell Signalling), polyclonal anti-flag antibody (F7425, Sigma–Aldrich) or both at a 1:200 dilution for 16 h at 4 °C. Incubation with goat anti-mouse IgG-FITC antibody (F0257, Sigma–Aldrich) 1:200 or anti-rabbit Alexa 568 antibody (Molecular Probes, Invitrogen) 1:2500 was for 1 h at room temperature. Nuclei were stained with TO-PRO-3 iodide (Molecular Probes, Invitrogen) in a 1:2000 dilution for 15 min, room temperature or Dapi (4',6 diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, D9542, Sigma–Aldrich) 1 μ g/ml for 5 min, room temperature. On some occasions, the actin cytoskeleton was stained with rhodamine-phalloidin 1:50. Samples were mounted with polyvinyl alcohol 4–88 (Sigma–Aldrich) and observed under an Axiovert 25 inverse epifluorescence microscope (Carl Zeiss) or a BIORAD MRC 1024 laser scanning confocal microscope equipped with a Laser Sharp Version 3.2 BioRad software. All images were processed with ImageJ software (Abramoff et al., 2004). Quantification of the Ank protein distribution in the distinct subcellular compartments was done by counting all the cells expressing Ank proteins, as observed in images taken

from random fields. Subsequently, the cells were attributed to the categories “cytoplasm”, “nucleus” or “nuclear membrane and cytoplasm”.

2.7. Pull-down assays

Hi5 cells seeded in 6-well culture plates (1×10^6 per well) were transfected with 400 ng of the BmRelish1-expressing construct pEA.flag.Bmrelish1, 400 ng of either pEA.ank4.myc-his or pEA.ank8.myc-his and 200 ng of a plasmid encoding the BmNPV transactivator IE1. Two days post-transfection, cells of each well were lysed in 400 μ l of 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, 1% NP-40 and protease inhibitors cocktail (P8340, Sigma–Aldrich). Cell lysates from each well were incubated with 40 μ l of 50% slurry of Ni-NTA Agarose (Qiagen) for 2 h to allow the binding of the Ank proteins, which is enabled by the affinity of their 6xHis epitope to the nickel agarose beads. Subsequently, the agarose beads were washed 6 times with 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl and 40 mM imidazole, whereas bound proteins were eluted with 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl and 500 mM imidazole. Eluted proteins were denatured, separated in a 12% polyacrylamide gel and detected as described above.

3. Results

3.1. CcBV Ank proteins exhibit variability in their expression levels and subcellular localization in vitro

Six *ank* gene family members of CcBV were expressed as myc-his tagged proteins in transfected lepidopteran (Hi5) cells under the control of the cytoplasmic actin promoter of *B. mori*. When equal amounts of the Ank-expression vectors were used for the transfection, the levels of accumulation of the recombinant Ank proteins in the transfected cells showed significant variability. Thus, proteins Ank1, Ank4 and Ank8 were found to accumulate at high levels, while Ank2, Ank7 and Ank9 were expressed poorly (Fig. 1A). Treatment of the cells expressing the latter three proteins or Ank1 with a proteasome inhibitor resulted in an increase in the accumulation of Ank2 and Ank9 but not Ank7 or Ank1 (Supp. Fig. 1) suggesting that two of the three proteins with low levels of accumulation in the expressing cells may be subjected to proteasomal degradation. Thus, in this heterologous expression system, CcBV Anks are accumulating in variable levels due, at least in part, to differences in degradation rates.

We then examined the subcellular localization of recombinant Ank proteins in the expressing Hi5 cells in order to obtain some insights in their mode of action. Representative images of immunofluorescence results obtained are presented in Fig. 1B while the quantitative aspects of the localization studies are presented in Table 1. In general, most of the viral proteins did not follow strict localization patterns apart from Ank1 and Ank2, which were localized almost exclusively in the cytoplasm of the expressing cells (96% of the cells for Ank1 and 99% of the cells for Ank2; Table 1). Although Ank4 and Ank8 were found mostly in the cytoplasm (72% and 49%, respectively), occasionally (14–27%) they were found also in the nucleus or the nuclear membrane of the cells. For Ank7, although under epifluorescence microscopy the protein appeared to be localized primarily in the cytoplasm (Table 1), confocal microscopy revealed that the expressing cells actually displayed whole-cell staining patterns (Fig. 1B). The detection of Ank7 in the whole cell implies that this protein may shuttle between cytoplasm and nucleus either actively or, given its small size, by diffusion. Finally, cells expressing recombinant Ank9 showed that this protein is distributed at similar levels between nucleus and cytoplasm (54% and 37%, respectively). The prediction

of a nuclear localization signal (NLS) in Ank9 [aa 153–165] by NLStradamus (Nguyen Ba et al., 2009) is consistent with this protein's higher nuclear occurrence (54%) compared to the rest of the family members (1–27%).

3.2. The inhibitory effect of Ank proteins on R1d2

Given the homology between CcBV Ank proteins and Rel/NF κ B inhibitors such as the mammalian I κ B α and the *Drosophila* Cactus (Espagne et al., 2004; Falabella et al., 2007), we examined whether the Ank proteins could inhibit lepidopteran Rel/NF κ B factors. Towards this goal, we initially tested the functionality of BmRelish1, the Rel/NF κ B counterpart of the silkworm Imd immune pathway and homologue of the *Drosophila* Relish (Tanaka et al., 2007), in Hi5 cells. In parallel, the constitutively active mutant of BmRelish1, R1d2, which comprises of the RHD and AHAA regions of BmRelish1 but is deprived of the inhibitory ARD region (Tanaka et al., 2007), was also examined. As illustrated in Fig. 2A, upon transfection of Hi5 cells with the relevant cDNA expression constructs, both proteins were expressed. The examination of their subcellular localization showed that the intact BmRelish1 was localized in the cytoplasm (Fig. 2B, i–iii) whereas the active mutant R1d2, presumably a mimic of the natural processed form of BmRelish1, accumulated exclusively in the nucleus (Fig. 2B, iv–vi), similar to the previously reported localization of the *Drosophila* orthologues DmRelish and its active component. Unprocessed DmRelish has a cytoplasmic localization, whereas after LPS addition the processed RHD-containing protein translocates to the nucleus and the remaining fragment stays in the cytoplasm (Stoven et al., 2000; Wiklund et al., 2009).

Given the fact that the RHD of BmRelish1 was previously shown to bind to an NF κ B binding site on the promoters of antimicrobial peptide genes *cecropin B1* and *attacin* (Tanaka et al., 2007), the functionality of the two transcription factors in Hi5 cells was subsequently examined using as reporter a construct containing the *firefly luciferase* gene under the control of the *cecropin B1* gene promoter. BmRelish1 did not induce substantially the reporter construct *cecB1.luc* (data not shown) and, as shown in Fig. 2C, was unable to do so even after challenging the cells with LPS from *E. coli*, which contains peptidoglycan residuals (Kaneko et al., 2004; Ha Lee et al., 2007; Tanaka et al., 2009) and is known to induce the Imd pathway in *Drosophila* S2* cells (Kaneko et al., 2004) and activate the orthologue DmRelish in *mbn-2* cells (Stoven et al., 2000). Moreover, analysis of BmRelish1 by immunoblotting revealed the absence of a processed, allegedly active form of the transcription factor in the presence of LPS (data not shown). Thus, our results suggest that Hi5 cells respond to an LPS challenge by inducing unknown, endogenous factors that activate the reporter construct, but the same cell line is not suitable for activation of the exogenously expressed transcription factor BmRelish1. In contrast, R1d2 was capable of evoking a 15-fold induction in luminescence (Fig. 2C) and thus proved to be a suitable transcriptional activator of the *CecB1.luc* reporter transcription.

To deduce whether the six members of the CcBV Ank family under investigation can exert an inhibitory effect on R1d2, we expressed each of the viral proteins together with the transcription factor and the *CecB1.luc* reporter in Hi5 cells. To facilitate the interpretation of the functional assays, we modulated the amounts of Ank-expression vectors used for transfection in order to obtain similar levels of Ank proteins in the cells. Indeed, this strategy resulted in the accumulation of very similar levels of Ank proteins in the expressing cells (inset in Fig. 3A). As is shown in Fig. 3B, the functional tests demonstrated that the six CcBV Ank proteins, when expressed at comparable levels, inhibited the R1d2-mediated transcription in a differential manner. With the sole exception of

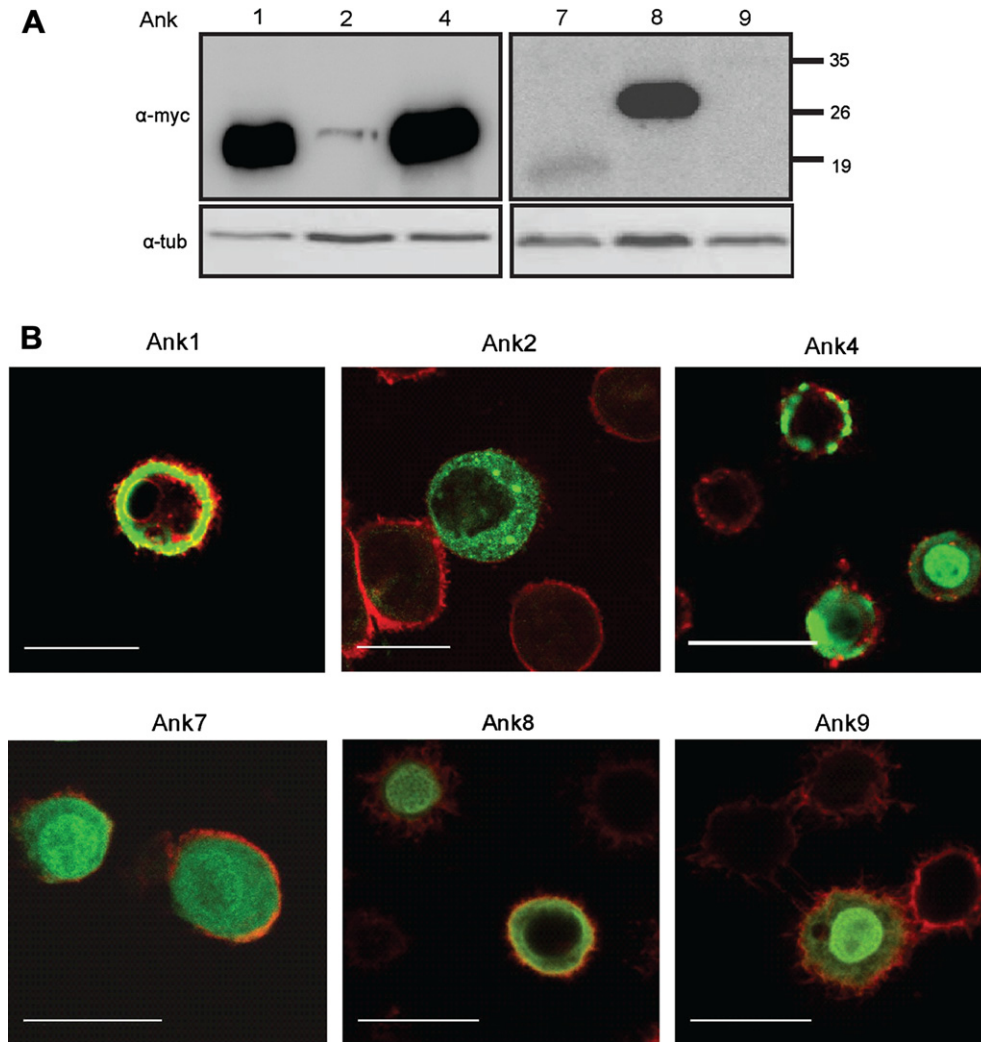


Fig. 1. Transient expression of CcBV Ank proteins in Hi5 cells. Recombinant myc-tagged Ank proteins were expressed from the pEA.myc-his vector. (A) Western blotting in cell lysates after transfection with equal amounts of the Ank-expressing plasmids. Anks were detected with an anti-myc antibody (upper panel). Tubulin served as a loading control and was detected with an anti-tubulin antibody (lower panel). The molecular weight markers are indicated at right. (B) Subcellular localization of Ank proteins analysed with confocal microscopy. CcBV Ank-myc proteins were detected with a mouse anti-myc antibody and an anti-mouse-FITC antibody (green fluorescence). The cell periphery was stained with rhodamine-phalloidin (red fluorescence) for the cases of Ank 2, 7, 8 and 9, or with WGA-Texas Red-X, which detects the cellular and, occasionally, the nuclear membrane, for the cases of Ank1 and Ank4. Scale bars; 200 μm . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Ank1, all examined Ank proteins conferred a statistically significant inhibition of the R1d2 transcriptional activity ranging from 31% to 53%, relative to control reactions from cells expressing puromycin acetyltransferase (PAC), a protein that does not affect the activity of

Table 1

Subcellular distribution of CcBV Ank proteins in Hi5 cells. The data are based on images from epifluorescence microscopy, with “n” indicating the total number of Ank-expressing cells that were counted. Percentages show protein distribution. *, based on confocal microscopy, the cytoplasmic occurrence of Ank7 actually represents whole-cell distribution. A lower number of cells were counted for Ank7 and Ank9 due to the low expression levels of these proteins in the cells.

	Cytoplasm (%)	Nucleus (%)	Nuclear membrane and cytoplasm (%)
Ank1 (n = 399)	96	1.75	2.25
Ank2 (n = 101)	99	1	–
Ank4 (n = 572)	72.3	14.2	13.5
Ank7 (n = 39)	79.5*	15.4	5.1
Ank8 (n = 143)	49	26.6	24.5
Ank9 (n = 52)	36.5	53.8	9.6

the luminescence reporter construct. Based on its significant inhibitory effects on the luminescence assays (Fig. 3B) in conjunction with its low expression levels (Fig. 3A), Ank9 was shown to be the most potent inhibitor of all examined Ank proteins. Slightly lower, but still significant, were the inhibitory effects of Ank2, Ank4, Ank7 and Ank8, when these were expressed at almost equivalent levels (Fig. 3). In sharp contrast, Ank1 did not interfere with the R1d2-mediated induction of reporter activity despite the fact that it was expressed at levels significantly higher than any of the other members of the family (Fig. 3A) suggesting that this protein differs from the rest of the examined Ank proteins.

To examine whether the observed inhibitory effects of Anks on the activity of R1d2 are dose-dependent, cells were transfected with increasing amounts of constructs expressing two of the tested proteins, Ank8 and Ank9. Indeed, increasing inhibitory effects on the transcription of *CecB1.luc* by R1d2 were observed with increasing expression of the proteins (Fig. 4 upper panels), which were verified by Western blotting (Fig. 4 lower panels) indicating specificity of the inhibition. In contrast, cells transfected with increasing amounts of a plasmid expressing the

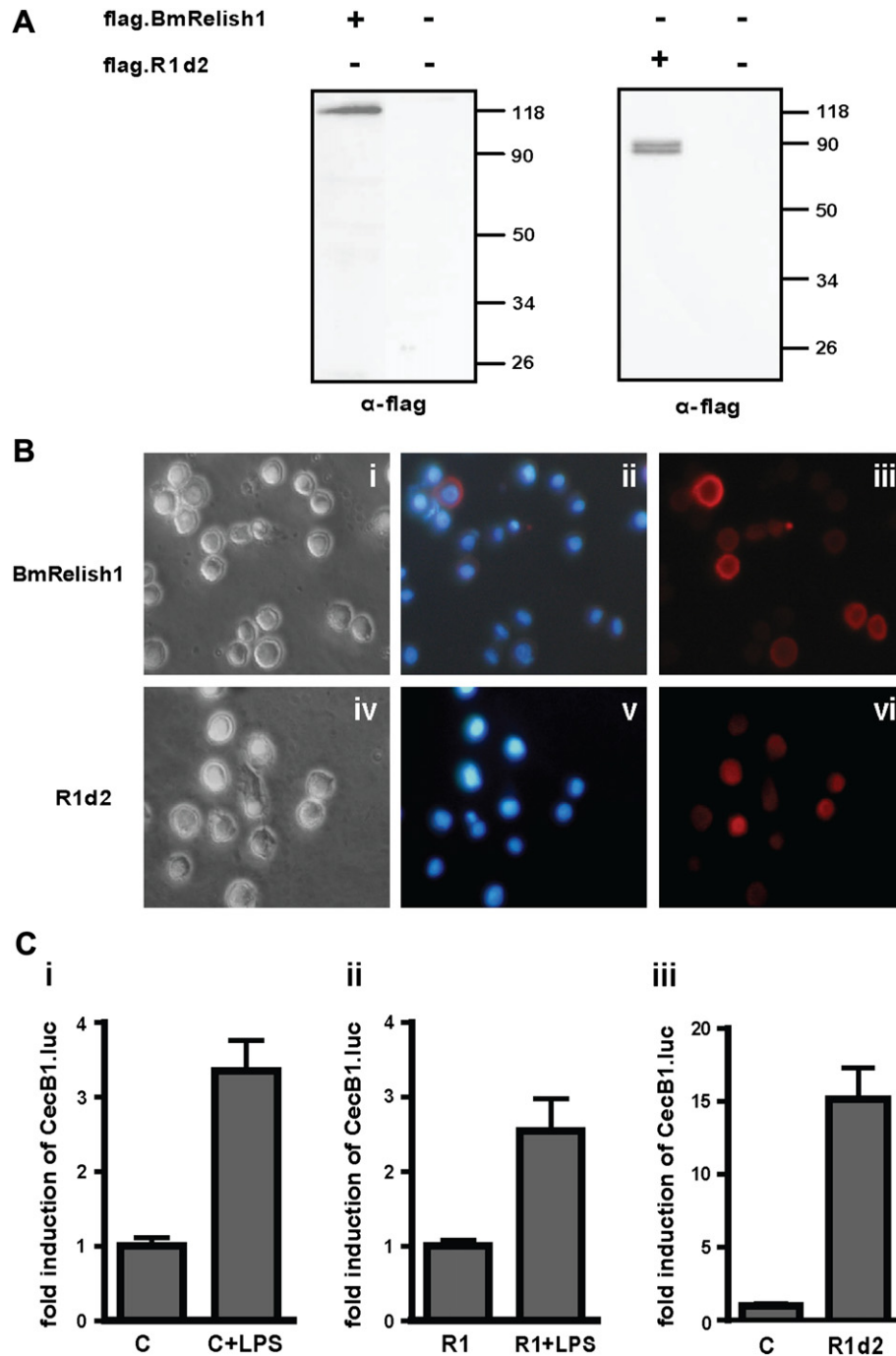


Fig. 2. Expression of BmRelish1 and R1d2 in Hi5 cells. (A) Detection of flag-tagged BmRelish1 and R1d2 in lysates of Hi5 cells transfected with the pEA.flag.Bmrelish1 or pEA-flag.R1d2 constructs, respectively. Proteins were analysed by Western blotting using an anti-flag antibody. (B) Immunofluorescence of the flag-tagged transcription factors. Phase contrast microscopy (i, iv), fluorescence microscopy for detection of nuclei with DAPI (ii, v) and for detection of the transcription factors with polyclonal anti-flag and anti-rabbit Alexa 568 antibodies (iii, vi). (C) Luminescence assays for the transcriptional induction of a *firefly luciferase* gene that is placed under the control of the *cecropin B1* gene promoter. Normalization of luminescence values was done against fluorescence of the cells. Each graph represents ratios of luminescence in induced versus uninduced cells. LPS (100 μ g/ml) induces the reporter gene 3-fold in a statistically significant way (P value = 0.0114) according to an unpaired t -test (i), but the expression of BmRelish1 (R1) does not evoke a further increase in the induction (ii). On the contrary, the constitutively active mutant R1d2 elicits a statistically significant (P value = 0.0003) induction of the reporter gene (iii). Bars represent standard errors from two (i, ii) and three (iii) independent experiments with replicates. C = control cells not expressing any transcription factor.

control protein PAC did not show reduction in the R1d2 activity (data not shown). Therefore, we conclude that five out of the six Ank proteins tested in this study inhibit the active mutant of transcription factor BmRelish1, with the inhibition from Ank8 and Ank9 being dose-dependent.

3.3. Subcellular colocalization of CcBV Ank proteins and R1d2

Subsequently, we tested whether CcBV Ank proteins and the mutant factor R1d2 exhibit overlapping localization in the expressing cells. As already presented in Fig. 2B, R1d2 was found

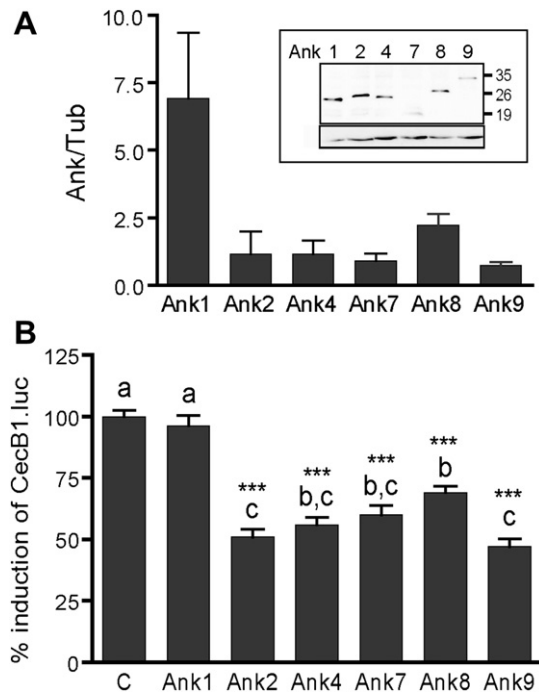


Fig. 3. Inhibitory activity of six CcBV Ank proteins on R1d2. Hi5 cells were transfected with reporter plasmid pGL3.cecB1.luc (100 ng), inducer plasmid pBmA.R1d2 (150 ng), normalization plasmid pBmbA.EcRE.gfp (50 ng) and mixtures of pEA.ank.myc-his and pEA.pac (200 ng), with Ank 1, 2, 4, 7, 8 or 9 expressing constructs at different amounts (12, 80, 36, 80, 20 or 200 ng, respectively) aimed at achieving equivalent levels of recombinant protein expression in the cells. (A) Average quantification of Ank protein expression in cell lysates used in the functional assays. Quantification was done with densitometry of protein bands from three independent immunoblots and Ank protein expression was normalized against tubulin accumulation. One of the immunoblots is shown in the inset, with Ank proteins being detected with an anti-myc antibody (upper panel), tubulin being detected with an anti-tubulin antibody (lower panel) and the molecular weight markers indicated at right. (B) Functional assays presenting the effect of Ank proteins on R1d2. Luminescence produced from the reporter construct in the Ank lysates was normalized against fluorescence and, subsequently, expressed as a percentage of the average normalized luminescence in the control lysates, C (C = cells expressing the control protein PAC instead of Anks). The graph depicts mean values (\pm SE) of % normalized luminescence from three independent experiments, each one with triplicate samples. One-way ANOVA verified the existence of statistically significant differences among different groups ($F_{6,53} = 40.95$; $P < 0.0001$) with different letters signifying these differences.

to be almost exclusively nuclear. Confocal microscopy analysis showed that, upon coexpression with Ank proteins, R1d2 retains its nuclear localization (Fig. 5). These studies also revealed the colocalization of R1d2 with Ank4 (third row in Fig. 5), Ank9 (fourth row in Fig. 5) and Ank8 (data not shown) in the cell nuclei. The nuclear colocalization of R1d2 with the various Ank proteins was particularly evident in the case of Ank9, the most active suppressor of R1d2 function as evidenced by the luciferase reporter assays. In contrast, Ank1 and Ank2 did not colocalize with R1d2, despite the fact that Ank2 was found to inhibit the *cecropin B1* gene promoter-driven activity of the luciferase reporter gene in the functional assays. The cytoplasmic localization of Ank2 (Figs. 1B and 5) raises questions related to the mechanism of suppression of the reporter gene by this specific protein and implies that Ank2 may exert its effect on regulators other than R1d2.

3.4. Interaction of BmRelish1 with Ank4 and Ank8

In view of the inhibitory effects of the majority of the CcBV Ank proteins on R1d2-mediated transcription and the colocalization of

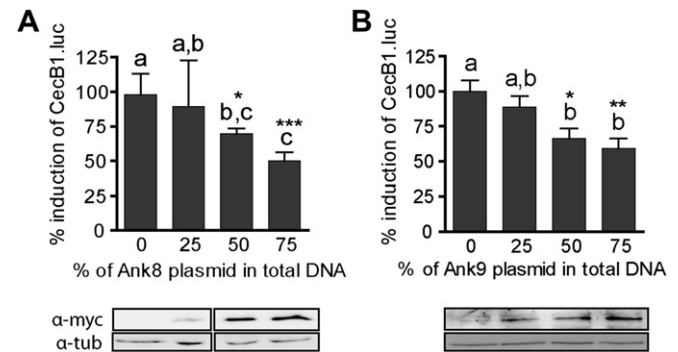


Fig. 4. Luminescence production mediated by R1d2 transcription is specifically inhibited by viral proteins Ank8 (A) and Ank9 (B). Hi5 cells were transfected with increasing amounts of Ank8 or Ank9-expressing constructs (125, 250 or 375 ng) together with plasmids pGL3.cecB1.luc (50 ng), pBmbA.EcRE.gfp (25 ng) and pEA.R1d2.his-glu (50 ng). Note that the pEA vector, used for the expression of R1d2 directs more abundant transgene expression relative to the pBmA vector, used in Fig. 3. Luminescence produced from the *cecropin B1*-driven firefly luciferase gene was normalized against fluorescence. Normalized luminescence in the Ank lysates was expressed as a percentage of the respective normalized luminescence in the control lysates, which do not contain Ank protein. (A) Luminescence in the presence of increasing Ank8 amounts. The graph depicts the medians of % normalized luminescence (\pm IQR) from four independent experiments. According to the Kruskal–Wallis test (KW statistic = 31.74) there are significant differences between the different medians, with P value < 0.0001 . (B) Luminescence in the presence of increasing Ank9 amounts. The graph depicts mean values of % normalized luminescence (\pm SE) from three independent experiments. One-way ANOVA demonstrated that there are statistically significant differences between the means ($F_{3,23} = 6.271$; $P = 0.0029$). In both (A) and (B), doses with significant differences are specified with distinct letters. Western blots below the graphs show increasing protein expression of Ank8.myc-his (A) or Ank9.myc-his (B) as detected in the respective cell extracts with an anti-myc antibody. Tubulin, which served as a loading control, was detected with an anti-tubulin antibody.

Ank4, Ank8 and Ank9 with R1d2, we sought to confirm the postulated interaction between the viral proteins and R1d2 with pull-down assays. Although we focused our effort on proteins Ank4 and Ank8, which accumulate in the expressing cells at higher levels relative to the rest of the studied proteins, we have been unable to capture the interaction between them and R1d2 (data not shown). In contrast, pull-down assays employing the same Ank proteins and the intact transcription factor, BmRelish1, revealed reproducible interactions (Fig. 6). The low abundance of BmRelish1 in the eluates containing the Ank proteins suggests that the interaction is weak, possibly because of its transient nature.

4. Discussion

In this study, we systematically examined six ankyrin-repeat proteins of the polydnavirus CcBV for effects on the functionality of Rel/NF κ B type innate immunity regulators. As the genes of such regulators from the natural *C. congregata* host were not available to us, we examined the Ank effects on the heterologous transcription factor BmRelish1 of another lepidopteran species, the domesticated silkworm *B. mori*, and utilized the widely used lepidopteran cell line Hi5 for our assays. We found that five of the ankyrin-repeat proteins could exert an inhibitory effect on the activity of a constitutively active BmRelish1 mutant, R1d2, while one was unable to do so.

A consistent observation made in relation to the expression of the recombinant CcBV Anks was the variability in the accumulation levels among the tested proteins in Hi5 cells (Fig. 1A). Thus, while Ank1, Ank4 and Ank8 were found to be highly expressed, Ank2, Ank7 and Ank9 were detected at much lower amounts. Ank9, the protein with the lowest expression levels, was found to have the

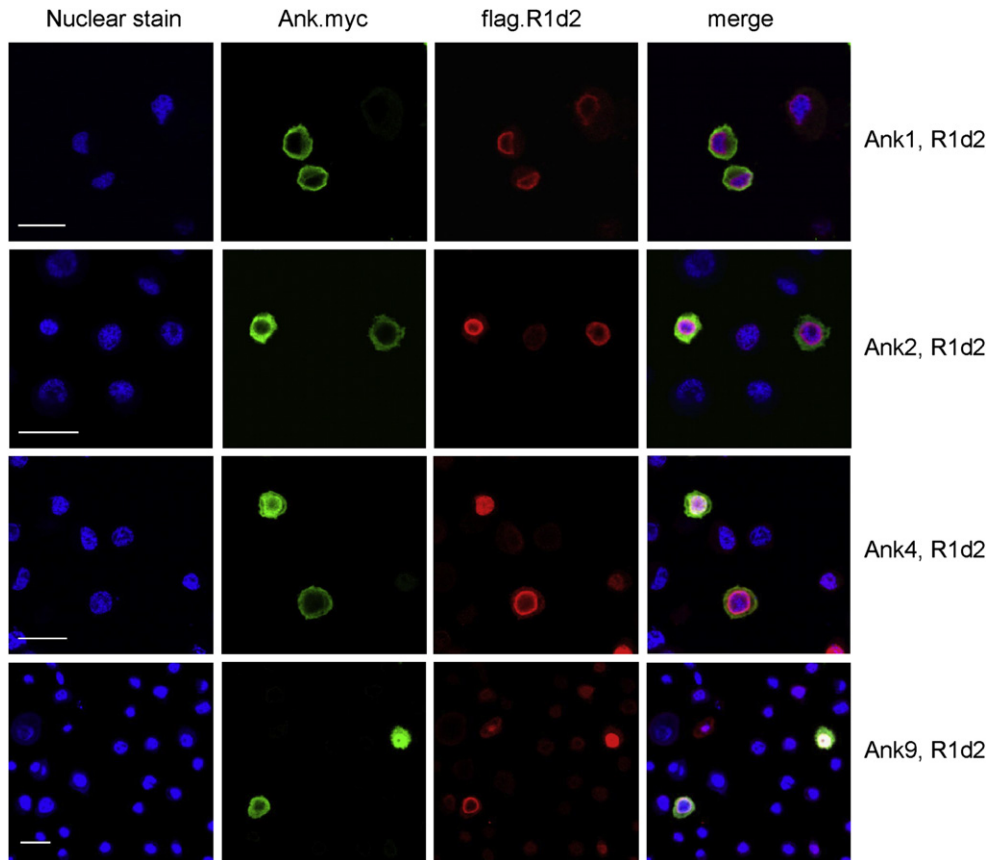


Fig. 5. Subcellular localization of myc-tagged CcBV Ank proteins coexpressed with flag-tagged R1d2. All recombinant proteins were expressed in Hi5 cells using the pEA expression vector. Confocal microscopy reveals that, upon coexpression with Ank1, Ank2, Ank4 or Ank9, R1d2 retains its nuclear detection and colocalizes with Ank4 and Ank9, whereas no colocalization is detectable with Ank1 and Ank2. Nuclei were stained with TO-PRO-3 iodide followed by blue pseudocolouring (first column), Ank.myc detection was carried out with anti-myc and anti-mouse-FITC antibodies (second column) and flag-tagged R1d2 was detected with rabbit polyclonal anti-flag and anti-rabbit Alexa 568 antibodies (third column). Overlap of the three stains is shown in the last image of every row. Scale bars; 200 μ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

highest number of predicted phosphorylation sites (Supp. Table 2), some of them specific for casein kinase II (CKII), a kinase linked to protein turnover and regulation of intrinsic stability of human I κ B α and *Drosophila* Cactus (Lin et al., 1996; Liu et al., 1997), which are both phosphorylated constitutively by CKII (Lin et al., 1996; McElhinny et al., 1996; Packman et al., 1997). While the involvement of CKII in the control of Ank9 turnover remains to be shown,

treatment of the cells expressing recombinant Ank proteins with a proteasome inhibitor revealed that Ank9, but also Ank2, are subject to proteasomal degradation. This finding may explain, at least in part, the low accumulation levels of these two proteins in the expressing Hi5 cells. Irrespective of the mechanisms behind the differential control of protein stability and turnover, our findings are consistent with previously reported results concerning the unequal expression levels of the members of another PDV Ank protein family, Vankyrin proteins of *C. sonorensis* ichnovirus, which were attributed to differences in translational efficiencies or rates of degradation, but not transcription (Kroemer and Webb, 2006).

The subcellular localization of the six CcBV Ank proteins in transiently transfected Hi5 cells was also analysed and revealed variability in the localization patterns of the different family members. Such spatial variation has been also reported for the Vankyrin proteins of *C. sonorensis* ichnovirus (Kroemer and Webb, 2006). Combined, the results of that study and those reported here suggest that distinct members of PDV Ank proteins shuttle between the two major cellular compartments, cytoplasm and nucleus.

The six Ank proteins of CcBV were investigated for their possible role on the suppression of the activity of the Imd immune pathway transcription factor BmRelish1 in Hi5 cells. In this cell system, BmRelish1-mediated activation of a reporter luciferase gene placed under the promoter of a silkworm antimicrobial peptide gene, *cecropin B1*, whose activity is controlled by immune regulators of

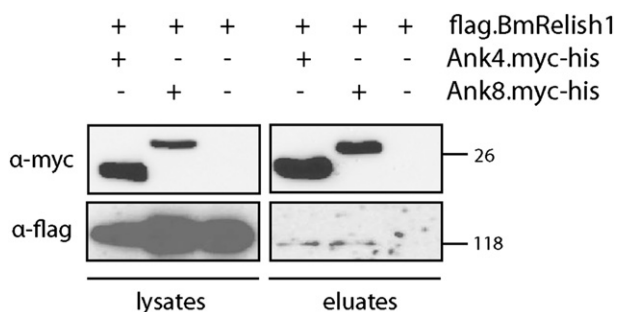


Fig. 6. Interaction between CcBV proteins Ank4 or Ank8 and the intact transcription factor BmRelish1. Each Ank protein, tagged with a myc-his epitope, was coexpressed in Hi5 cells together with flag-tagged BmRelish1. Cell lysates were incubated with Ni-NTA beads and proteins were eluted with an excess of imidazole. Detection by Western blotting was with an anti-flag antibody for flag.BmRelish1 and an anti-myc antibody for the Ank.myc-his proteins. Flag.BmRelish1 is eluted from the beads in the samples coexpressing the viral proteins but not in the negative control.

the Rel/NF κ B type (Tanaka et al., 2007), was not possible. This is likely due to the observed lack of proteolytic processing of BmRelish1 (data not shown), which is presumably required for the activation of the transcription factor (Tanaka et al., 2007). On the other hand, the constitutively active mutant of BmRelish1, R1d2, which lacked the ARD, could induce 15-fold the transcription of the reporter gene that was driven by the *cecropin B1* gene promoter.

Upon expression at similar levels in the cells, all tested Ank proteins except Ank1 exerted differential and, for at least two of them, dose-dependent inhibitory effects on the reporter gene's transcription. The most potent inhibitor was Ank9, a protein distant from the other CcBV Ank family members both in terms of sequence and other distinct features such as a predicted NLS site (aa 153–165) and a large number of putative phosphorylation sites (Supp. Table 2). The second most potent protein was Ank2, whose involvement in the suppression of immune responses is consonant with its expression in the fat body of parasitized *M. sexta* larvae (Falabella et al., 2007), one of the primary sites of immune responses. Given that Ank9 and Ank2 are present in low quantities in the expressing cells, it is evident that the inhibitory activities of the various CcBV Ank proteins are not proportional to their expression levels in the cells, at least in this *in vitro* system. The fact that Ank8 and Ank1, which are both expressed at high levels, exerted the lowest degree of or no inhibition on R1d2 transcriptional activity leads to the same conclusion.

As was anticipated from the results of the transcriptional inhibition studies, partial colocalization between Ank4, Ank8 or Ank9 and R1d2 was observed in the nucleus of Hi5 cells implying that the observed inhibition of R1d2 by the three Ank proteins derives from their interaction in the nuclear fraction. We were unable to confirm the specific interactions in subsequent co-immunoprecipitation and pull-down assays, probably due to the fact that, in contrast to the exclusive localization of R1d2 in the nucleus, the majority of the Ank proteins reside primarily in the cytoplasm of the expressing cells (Table 1). However, the pull-down experiments demonstrating an interaction between Ank4 or Ank8 and intact BmRelish1, suggest that the interaction of Ank4, Ank8 or Ank9 with R1d2 is likely, although the possibility that this is indirect cannot be excluded. The case of Ank2 seems to be an exception as this protein inhibits the R1d2-dependent activation of the *cecropin B1* gene promoter-driven luciferase reporter despite the fact that it is localized in the cytoplasm of essentially all cells that express it. Obviously, Ank2 may inhibit *cecropin B1* promoter-driven luciferase expression by a distinct and, as yet, undefined mechanism that merits further investigation.

The interaction of two CcBV Ank proteins with the intact BmRelish1 and the observed inhibition of the R1d2-dependent transcription of antimicrobial gene *cecropin B1* by the Ank proteins are in agreement with the results of previous studies on the ankyrin-repeat protein family of another PDV, the *M. demolitor* bracovirus, MdBV. In MdBV, two members of the ankyrin-repeat protein family were shown to suppress transcription of antimicrobial genes in the Toll and Imd pathways of *Drosophila* and to interact with the fruitfly's intact Relish and Dif factors (Thoetkiattikul et al., 2005). Moreover, our results are compatible with the notion that these viruses manipulate the Rel/NF κ B signalling pathways during infection. Many viruses are known to hijack these pathways and use NF κ B as a transcription factor at their disposal or as an anti-apoptotic factor protecting the infected cells (Santoro et al., 2003), while others, like poxviruses, inhibit NF κ B signalling (Mohamed and McFadden, 2009) and, herpesviruses, balance their activities between exploitation (Santoro et al., 2003) and inhibition (Kim et al., 2008) of endogenous NF κ B so that they evade immune surveillance mechanisms. Thus, NF κ B inhibition is a common strategy that many viruses have adopted in order to ensure their

survival or the survival of their vectors and polydnavirus Ank proteins seem to be a part of this strategy.

In conclusion, this study analysed multiple members of the CcBV ankyrin-repeat protein family and documented that different Ank proteins show differences in their expression levels in Hi5 cells, the subcellular compartments they occupy and the extent of Rel/NF κ B-like factor inhibition they elicit, the latter being exemplified by the constitutively active deletion mutant of BmRelish1, R1d2. Both the suppression of R1d2 by the viral proteins and the demonstrated interaction between two Ank proteins and intact BmRelish1 imply that Anks act as Relish inhibitors *in vivo*, too. Importantly, this study establishes that Ank family members of the endosymbiotic bracovirus of a hymenopteran wasp that parasitizes a specific lepidopteran host are capable of interfering with the function of innate immune regulators of other lepidopteran species in a heterologous cellular environment. This finding suggests that PDVs have the potential for horizontal transfer. It may also have implications related to the use of PDV genes encoding proteins such as Ank family members as tools for insect, lepidopteran or otherwise, pest control applications involving entomopathogenic viruses, bacteria or fungi whose effectiveness could be enhanced by the suppression of the innate immune defences of the target insect.

Acknowledgements

This paper is part of a research project, 03ED-122, to K.I. implemented within the framework of the "Reinforcement Programme of Human Research Manpower" (PENED) and co-financed by National and European Commission Funds (25% from the Greek Ministry of Development-General Secretariat of Research and Technology and 75% from E.U.-European Social Fund). We thank Jean-Michel Drezen, University François Rabelais, Tours, France for the CcBV Ank cDNAs, Minoru Yamakawa, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan for the initial constructs of the *Bombyx mori* transcription factors used in this study, Theodosios Theodosiou, NCSR Demokritos, Athens, Greece for assistance with confocal microscopy, Luc Swevers, NCSR Demokritos, Athens, Greece for useful discussions and Michael Strand, University of Georgia, Athens, USA for advice regarding the statistical analysis.

Appendix. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found online at doi:10.1016/j.ibmb.2011.09.008.

References

- Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J., Ram, S.J., 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics Int.* 11 (7), 36–42.
- An, C., Jiang, H., Kanost, M.R., 2010. Proteolytic activation and function of the cytokine Spatzle in the innate immune response of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *FEBS J.* 277 (1), 148–162.
- Bae, S., Kim, Y., 2009. I κ B genes encoded in *Cotesia plutellae* bracovirus suppress an antiviral response and enhance baculovirus pathogenicity against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Invertebr. Pathol.* 102 (1), 79–87.
- Barandoc, K.P., Kim, Y., 2009. Identification of three host translation inhibitory factors encoded in *Cotesia glomerata* bracovirus. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics*.
- Beck, M., Strand, M.R., 2005. Glc1.8 from *Microplitis demolitor* bracovirus induces a loss of adhesion and phagocytosis in insect high five and S2 cells. *J. Virol.* 79 (3), 1861–1870.
- Bezier, A., Annaheim, M., Herbinier, J., Wetterwald, C., Gyapay, G., Bernard-Samain, S., Wincker, P., Roditi, I., Heller, M., Belghazi, M., Pfister-Wilhelm, R., Periquet, G., Dupuy, C., Huguet, E., Volkoff, A.N., Lanzrein, B., Drezen, J.M., 2009. Polydnaviruses of braconid wasps derive from an ancestral nudivirus. *Science* 323 (5916), 926–930.
- Cheng, T.C., Zhang, Y.L., Liu, C., Xu, P.Z., Gao, Z.H., Xia, Q.Y., Xiang, Z.H., 2008. Identification and analysis of Toll-related genes in the domesticated silkworm, *Bombyx mori*. *Dev. Comp. Immunol.* 32 (5), 464–475.

- Costa, A., Jan, E., Sarnow, P., Schneider, D., 2009. The Imd pathway is involved in antiviral immune responses in *Drosophila*. *PLoS ONE* 4 (10), e7436.
- De Gregorio, E., Spellman, P.T., Tzou, P., Rubin, G.M., Lemaitre, B., 2002. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *EMBO J.* 21 (11), 2568–2579.
- Dhadialla, T.S., Carlson, G.R., Le, D.P., 1998. New insecticides with ecdysteroid and juvenile hormone activity. *Annu. Rev. Entomol.* 43, 545–569.
- Douris, V., Swevers, L., Labropoulou, V., Andronopoulou, E., Georgoussi, Z., Iatrou, K., 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.
- Drezen, J.M., Provost, B., Espagne, E., Cattolico, L., Dupuy, C., Poirie, M., Periquet, G., Huguet, E., 2003. Polydnavirus genome: integrated vs. free virus. *J. Insect Physiol.* 49 (5), 407–417.
- Duchi, S., Cavaliere, V., Fagnocchi, L., Grimaldi, M.R., Falabella, P., Graziani, F., Gigliotti, S., Pennacchio, F., Gargiulo, G., 2010. The impact on microtubule network of a bracovirus I κ B-like protein. *Cell Mol. Life Sci.* 67 (10), 1699–1712.
- Dupuy, C., Huguet, E., Drezen, J.M., 2006. Unfolding the evolutionary story of polydnaviruses. *Virus Res.* 117 (1), 81–89.
- Dushay, M.S., Asling, B., Hultmark, D., 1996. Origins of immunity: Relish, a compound Rel-like gene in the antibacterial defense of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93 (19), 10343–10347.
- Edson, K.M., Vinson, S.B., Stoltz, D.B., Summers, M.D., 1981. Virus in a parasitoid wasp: suppression of the cellular immune response in the parasitoid's host. *Science* 211 (4482), 582–583.
- Espagne, E., Dupuy, C., Huguet, E., Cattolico, L., Provost, B., Martins, N., Poirie, M., Periquet, G., Drezen, J.M., 2004. Genome sequence of a polydnavirus: insights into symbiotic virus evolution. *Science* 306 (5694), 286–289.
- Falabella, P., Varricchio, P., Provost, B., Espagne, E., Ferrarese, R., Grimaldi, A., de Eguileor, M., Fimiani, G., Ursini, M.V., Malva, C., Drezen, J.M., Pennacchio, F., 2007. Characterization of the I κ B-like gene family in polydnaviruses associated with wasps belonging to different Braconid subfamilies. *J. Gen. Virol.* 88 (1), 92–104.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D., Bairoch, A., 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31 (13), 3784–3788.
- Granados, R., Guoxun, L., Derksen, A., McKenna, K., 1994. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* 64 (3), 260–266.
- Ha Lee, J., Hee Lee, I., Noda, H., Mita, K., Taniyai, K., 2007. Verification of elicitor efficacy of lipopolysaccharides and peptidoglycans on antibacterial peptide gene expression in *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37 (12), 1338–1347.
- Hedengren, M., Asling, B., Dushay, M.S., Ando, I., Ekengren, S., Wihlborg, M., Hultmark, D., 1999. Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in *Drosophila*. *Mol. Cell* 4 (5), 827–837.
- Ip, Y.T., Reach, M., Engstrom, Y., Kadalayil, L., Cai, H., Gonzalez-Crespo, S., Tatei, K., Levine, M., 1993. Dif, a dorsal-related gene that mediates an immune response in *Drosophila*. *Cell* 75 (4), 753–763.
- Johnson, R., Meidinger, R.G., Iatrou, K., 1992. A cellular promoter-based expression cassette for generating recombinant baculoviruses directing rapid expression of passenger genes in infected insects. *Virology* 190 (2), 815–823.
- Kaneko, T., Goldman, W.E., Mellroth, P., Steiner, H., Fukase, K., Kusumoto, S., Harley, W., Fox, A., Golenbock, D., Silverman, N., 2004. Monomeric and polymeric gram-negative peptidoglycan but not purified LPS stimulate the *Drosophila* IMD pathway. *Immunity* 20 (5), 637–649.
- Kim, J.C., Lee, S.Y., Kim, S.Y., Kim, J.K., Kim, H.J., Lee, H.M., Choi, M.S., Min, J.S., Kim, M.J., Choi, H.S., Ahn, J.K., 2008. HSV-1 ICP27 suppresses NF- κ B activity by stabilizing I κ B α . *FEBS Lett.* 582 (16), 2371–2376.
- Kozak, M., 1987. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* 196 (4), 947–950.
- Kroemer, J.A., Webb, B.A., 2006. Divergences in protein activity and cellular localization within the *Campoplex sonorensis* ichnovirus Vankyrin family. *J. Virol.* 80 (24), 12219–12228.
- Labropoulou, V., Douris, V., Stefanou, D., Magkrioti, C., Swevers, L., Iatrou, K., 2008. Endoparasitoid wasp bracovirus-mediated inhibition of hemolymph function and lepidopteran host immunosuppression. *Cell Microbiol.* 10 (10), 2118–2128.
- Lemaitre, B., Kromer-Metzger, E., Michaut, L., Nicolas, E., Meister, M., Georgel, P., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., 1995. A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92 (21), 9465–9469.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86 (6), 973–983.
- Lin, R., Beuparlant, P., Makris, C., Meloche, S., Hiscott, J., 1996. Phosphorylation of I κ B α in the C-terminal PEST domain by casein kinase II affects intrinsic protein stability. *Mol. Cell Biol.* 16 (4), 1401–1409.
- Liu, Z.P., Galindo, R.L., Wasserman, S.A., 1997. A role for CKII phosphorylation of the cactus PEST domain in dorsoventral patterning of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 11 (24), 3413–3422.
- Lu, M., Farrell, P.J., Johnson, R., Iatrou, K., 1997. A baculovirus (*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus) repeat element functions as a powerful constitutive enhancer in transfected insect cells. *J. Biol. Chem.* 272 (49), 30724–30728.
- Lu, Z., Beck, M.H., Strand, M.R., 2010. Egf1.5 is a second phenoloxidase cascade inhibitor encoded by *Microplitis demolitor* bracovirus. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40 (7), 497–505.
- McElhinny, J.A., Trushin, S.A., Bren, G.D., Chester, N., Paya, C.V., 1996. Casein kinase II phosphorylates I κ B α at S-283, S-289, S-293, and T-291 and is required for its degradation. *Mol. Cell Biol.* 16 (3), 899–906.
- Meng, X., Khanuja, B.S., Ip, Y.T., 1999. Toll receptor-mediated *Drosophila* immune response requires Dif, an NF- κ B factor. *Genes Dev.* 13 (7), 792–797.
- Mohamed, M.R., McFadden, G., 2009. NF κ B inhibitors: strategies from poxviruses. *Cell Cycle* 8 (19), 3125–3132.
- Nguyen Ba, A.N., Pogoutse, A., Provart, N., Moses, A.M., 2009. NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics* 10, 202.
- Packman, L.C., Kubota, K., Parker, J., Gay, N.J., 1997. Casein kinase II phosphorylates Ser468 in the PEST domain of the *Drosophila* I κ B α homologue cactus. *FEBS Lett.* 400 (1), 45–50.
- Pruijssers, A.J., Strand, M.R., 2007. PTP-H2 and PTP-H3 from *Microplitis demolitor* bracovirus localize to focal adhesions and are antiphagocytic in insect immune cells. *J. Virol.* 81 (3), 1209–1219.
- Santoro, M.G., Rossi, A., Amici, C., 2003. NF- κ B and virus infection: who controls whom. *EMBO J.* 22 (11), 2552–2560.
- Shelby, K.S., Webb, B.A., 1997. Polydnavirus infection inhibits translation of specific growth-associated host proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27 (3), 263–270.
- Steward, R., 1987. Dorsal, an embryonic polarity gene in *Drosophila*, is homologous to the vertebrate proto-oncogene, c-rel. *Science* 238 (4827), 692–694.
- Stoven, S., Ando, I., Kadalayil, L., Engstrom, Y., Hultmark, D., 2000. Activation of the *Drosophila* NF- κ B factor Relish by rapid endoproteolytic cleavage. *EMBO Rep.* 1 (4), 347–352.
- Swevers, L., Kravarioti, L., Ciolfi, S., Xenou-Kokoletsis, M., Ragoussis, N., Smagghe, G., Nakagawa, Y., Mazomenos, B., Iatrou, K., 2004. A cell-based high-throughput screening system for detecting ecdysteroid agonists and antagonists in plant extracts and libraries of synthetic compounds. *FASEB J.* 18 (1), 134–136.
- Tanaka, H., Ishibashi, J., Fujita, K., Nakajima, Y., Sagisaka, A., Tomimoto, K., Suzuki, N., Yoshiyama, M., Kaneko, Y., Iwasaki, T., Sunagawa, T., Yamaji, K., Asaoka, A., Mita, K., Yamakawa, M., 2008. A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38 (12), 1087–1110.
- Tanaka, H., Matsuki, H., Furukawa, S., Sagisaka, A., Kotani, E., Mori, H., Yamakawa, M., 2007. Identification and functional analysis of Relish homologs in the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta* 1769, 559–568.
- Tanaka, H., Sagisaka, A., Fujita, K., Kaneko, Y., Imanishi, S., Yamakawa, M., 2009. Lipopolysaccharide elicits expression of immune-related genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.* 18 (1), 71–75.
- Tanaka, H., Yamamoto, M., Moriyama, Y., Yamao, M., Furukawa, S., Sagisaka, A., Nakazawa, H., Mori, H., Yamakawa, M., 2005. A novel Rel protein and shortened isoform that differentially regulate antibacterial peptide genes in the silkworm *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta* 1730 (1), 10–21.
- Thoetkiattikul, H., Beck, M.H., Strand, M.R., 2005. Inhibitor κ B-like proteins from a polydnavirus inhibit NF- κ B activation and suppress the insect immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102 (32), 11426–11431.
- Wang, Y., Cheng, T., Rayaprolu, S., Zou, Z., Xia, Q., Xiang, Z., Jiang, H., 2007. Proteolytic activation of pro-spatzle is required for the induced transcription of antimicrobial peptide genes in lepidopteran insects. *Dev. Comp. Immunol.* 31 (10), 1002–1012.
- Whitfield, J.B., 1990. Parasitoids, polydnaviruses and endosymbiosis. *Parasitol. Today* 6 (12), 381–384.
- Wiklund, M.L., Steinert, S., Junell, A., Hultmark, D., Stoven, S., 2009. The N-terminal half of the *Drosophila* Rel/NF- κ B factor Relish, REL-68, constitutively activates transcription of specific Relish target genes. *Dev. Comp. Immunol.*
- Zamboni, R.A., Nandakumar, M., Vakharia, V.N., Wu, L.P., 2005. The Toll pathway is important for an antiviral response in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102 (20), 7257–7262.