

Politechnika Wroclawska
Wydziałowy Zakład Biochemii

PRACA DOKTORSKA

**Poznanie sekwencji genu białka wiążącego
hormon juwenilny z *Galleria mellonella***

mgr inż. Agnieszka Sok

**Pracę wykonano pod kierunkiem:
Prof. dr. hab. Mariana Kochmana**

Wrocław 2007

***Panu Profesorowi Marianowi Kochmanowi**, mojemu promotorowi, dziękuję za wyrozumiałość i ciągłą mobilizację do pracy. Również za liczne dyskusje i krytyczne uwagi podczas planowania eksperymentów, a zwłaszcza w trakcie omawiania i interpretacji uzyskanych wyników oraz pisania publikacji.*

Dziękuję także dr. inż. Janowi Rodriguez, który wprowadził mnie w arkana sztuki laboratoryjnej oraz dr inż. Iwonce Grad za pomoc w eksperymentach EMSA.

Panu Profesorowi Włodzimierzowi Grajkowi z Akademi Rolniczej w Poznaniu dziękuję za udostępnienie laboratorium i zgodę na prowadzenie testów z genem reporterowym oraz dr. Marcinowi Schmidt za wszelką pomoc intelektualną i manualną w trakcie tych eksperymentów.

Markowi Orłowskiemu dziękuję za cenne uwagi i konstruktywną krytykę dotyczącą niniejszej pracy.

Dziękuję wszystkim pracownikom Wydziałowego Zakładu Biochemii za wspaniałą atmosferę w pracy oraz pomoc i czas poświęcony na wspólne dyskusje.

Dziękuję Moim Przyjaciółom za wyrozumiałość i cierpliwość w oczekiwaniu na znaki życia ode mnie.

Szczególne podziękowania chciałabym złożyć Moim Rodzicom i Mirkowi za wsparcie w trudnych chwilach i momentach zwątpienia.

Spis treści

1	Spis skrótów	6
2	Streszczenie	10
3	Wstęp	14
3.1	Zacząło się od...	14
3.2	Architektura genów owadzych	14
3.2.1	Introny	17
3.2.1.1	Fazy intronów	18
3.2.1.2	Pochodzenie intronów	19
3.2.1.3	Geny intronowe	22
3.2.1.4	Wycinanie intronów spliceosomalnych	23
3.2.2	Budowa i charakterystyka promotora genu	25
3.2.2.1	Elementy regulatorowe promotorów rdzeniowych	25
3.2.2.2	Dystalne elementy regulatorowe	27
3.3	Wybrane hormony owadzie	30
3.3.1	Charakterystyka i rola hormonu juvenilnego	30
3.3.2	Charakterystyka i rola 20-hydroksyekdyzonu	34
3.3.3	Wzajemne oddziaływanie i wpływ na rozwój owadów hormonu juvenilnego i 20-hydroksyekdyzonu	37
3.4	Białka wiążące hormon juvenilny w hemolimfie owadów	39
3.5	Charakterystyka hJHBP z <i>G. mellonella</i>	42
4	Cel pracy	45
5	Spis własnych publikacji	46
6	Materialy i metody	47
6.1	Materialy	47
6.1.1	Odczynniki	47
6.1.2	Roztwory i podłoża hodowlane	48
6.1.2.1	Podstawowe bufory	48
6.1.2.2	Podłoża hodowlane	49
6.1.2.3	Roztwory stosowane do EMSA	49
6.1.3	Szczepy bakteryjne	50
6.1.4	Wektory plazmidowe	50
6.1.5	Charakterystyka linii komórkowej High Five	51
6.1.6	Oligonukleotydy	52
6.1.6.1	Startery do amplifikacji sekwencji promotora <i>jhbp</i>	52

6.1.6.2	Startery do identyfikacji i amplifikacji sekwencji intronów <i>jhbp</i>	53
6.1.6.3	Oligonukleotydy wykorzystywane w eksperymentach EMSA	56
6.1.6.4	Startery do amplifikacji fragmentów promotora do testów z genem reporterowym	56
6.1.6.5	Startery do reakcji sekwencjonowania	57
6.2	Metody	57
6.2.1	Hodowla owadów	57
6.2.2	Oznaczanie stężenia DNA i RNA	57
6.2.3	Izolacja genomowego DNA	58
6.2.4	Izolacja całkowitego RNA	59
6.2.5	Reakcja łańcuchowa polimerazy	61
6.2.6	Klonowanie produktów po PCR	61
6.2.7	Kontrola poprawności klonowania	62
6.2.7.1	Selekcja klonów metodą α -komplementacji	62
6.2.7.2	Selekcja klonów poprzez mini-preparację	62
6.2.8	Izolacja i oczyszczanie DNA z żelu agarozowego	63
6.2.9	Izolacja plazmidowego DNA z komórek bakteryjnych	63
6.2.9.1	Izolacja plazmidowego DNA z mini-hodowli	63
6.2.9.2	Izolacja plazmidowego DNA do sekwencjonowania	64
6.2.9.3	Izolacja plazmidowego DNA z hodowli	64
6.2.10	Sekwencjonowanie DNA	65
6.2.10.1	Sekwencjonowanie DNA z wykorzystaniem znakowanych starterów	65
6.2.10.2	Sekwencjonowanie DNA z wykorzystaniem znakowanych dideoksynukleotydów	65
6.2.11	Amplifikacja sekwencji promotora metodą <i>Genome Walking</i>	66
6.2.12	Identyfikacja miejsca startu transkrypcji	67
6.2.13	Testy z genem reporterowym	68
6.2.13.1	Hodowla komórek linii HighFive	68
6.2.13.2	Transfekcja komórek i odczyt aktywności lucyferazy	68
6.3	Programy komputerowe i bazy danych	69
7	Wyniki	70
7.1	Poznanie sekwencji i struktury genu <i>jhbp</i> z <i>G. mellonella</i>	71
7.1.1	Próby znalezienia sekwencji promotora <i>jhbp</i> oraz poznania ilości kopii genu w genomie	71
7.1.2	Spacer po genie, czyli poznanie sekwencji promotorowej	74
7.1.3	Sekwencje i położenia intronów	78
7.1.4	Miejsce startu transkrypcji	81
7.2	Analiza sekwencji genu <i>jhbp</i>. W poszukiwaniu miejsc regulatorowych	83
7.2.1	Poszukiwanie sekwencji regulatorowych w genie <i>jhbp</i> poprzez bazy danych zawierające znane elementy regulatorowe	83
7.2.2	Analiza sekwencji promotora rdzeniowego	85
7.2.3	Na tropach historii genu	86
7.2.3.1	Pozostałości ewolucyjne w genie <i>jhbp</i>	86
7.2.3.2	Fazy intronów	89
7.3	Wyniki EMSA uzyskane na potencjalnych sekwencjach wiążących białko Usp	89

7.4 Badanie aktywności transkrypcyjnej fragmentów promotora	91
7.4.1 Przygotowanie konstruktów	92
7.4.2 Kontrola aktywności promotora <i>jhbp</i> w testach z genem reporterowym	93
8 Dyskusja	95
8.1 Identyfikacja obszarów niekodujących i sekwencjonowanie genu <i>jhbp</i>	95
8.1.1 Wybór strategii sekwencjonowania	96
8.1.2 Wybór techniki sekwencjonowania	98
8.2 Porównanie genów <i>jhbp</i> z <i>G. mellonella</i> oraz <i>M. sexta</i>	99
8.2.1 Ogólna architektura genów i ich sekwencje	99
8.2.2 Potencjalne elementy regulatorowe	101
8.2.3 Budowa i pochodzenie intronów	103
8.3 Czy JHBP należy do rodziny lipokalin?	105
8.4 Porównanie elementów promotora rdzeniowego <i>jhbp</i> z innymi promotorami genów owadzich	107
8.5 Potencjalne elementy regulatorowe w intronach <i>jhbp</i> u <i>G. mellonella</i>	109
8.6 Funkcjonalność elementów regulatorowych CF1/Usp wiążących białko Usp – funkcjonalny receptor JH	110
8.7 Podsumowanie oraz dalsze perspektywy badań	111
9 Literatura	113
10 Spis rysunków	127
11 Spis tabel	129

1 Spis skrótów

W tekście pracy, na rysunkach i w tabelach stosowano ogólnie przyjęte symbole literowe nukleotydów. Symbole, oznaczające dwa lub więcej nukleotydów, które ułatwiają zapis sekwencji objaśniono poniżej (źródło, http://bioinformatica.uab.es/dpdb/help_blast.asp).

Symbol grupy nukleotydów	Znaczenie
M	A lub C (ang., <i>aMino</i>)
R	A lub G (ang., <i>puRine</i>)
W	A lub T (ang., <i>Weak</i>)
S	C lub G (ang., <i>Strong</i>)
Y	C lub T (ang., <i>pYrimidine</i>)
K	G lub T (ang., <i>Keto</i>)
V	A lub C lub G, ale nie T
H	A lub C lub T, ale nie G
D	A lub G lub T, ale nie C
B	C lub G lub T, ale nie A
N	A lub C lub G lub T (ang., <i>aNy</i>)

Ponadto w pracy pojawiły się następujące skróty:

Skrót	Znaczenie
20E	20-hydroksyekdyzon, α -ekdyzon; hormon steroidowy stawonogów; ligand dla funkcjonalnego receptora steroidowego;
BR-C	ang., <i>broad complex</i> ; nazwa elementu regulatorowego i wiążącego się do niego białka, które pojawia się w rozwoju owada w odpowiedzi na ekdyzon, należy do genów wczesnych;

Skrót	Znaczenie
BRE	ang., <i>TFIIB response element</i> ; element promotora rdzeniowego rozpoznawany przez czynnik transkrypcyjny TFIIB położony zwykle po 5' stronie kasety TATA (-37) - (-32);
CF1/Usp	ang., <i>chorion factor</i> ; element regulatorowy wiążący białko Usp;
Cy5	indodikarbocyanino 5-1-O-(2-cyanoetyl)-(N,N-diizopropyl) fosforamid;
DBD	ang., <i>DNA-binding domain</i> ; domena wiążąca DNA;
DCE	ang., <i>downstream core element</i> ; element promotora rdzeniowego złożony z trzech subelementów położonych zwykle w obszarze: 1) od +7 do +12; 2) od +19 do +24; 3) od +31 do +33;
DEPC	dietylopirowęglan;
DMSO	dimetylosulfotlenek;
DPE	ang., <i>downstream promoter element</i> ; element regulatorowy promotora rdzeniowego zwykle położony w pozycji (+28) - (+32) od miejsca startu transkrypcji;
E74 i E75	sieroce receptory jądrowe bezkręgowców; znalezione m.in. u <i>Drosophila melanogaster</i> , odgrywają ważną rolę w metamorfozie owada; ich nazwa pochodzi od lokalizacji cytologicznej;
EcR	ang., <i>ecdysteroid receptor</i> ; receptor jądrowy stawonogów; produkt genu <i>ecr</i> ; wspólnie z Usp tworzy funkcjonalny receptor ekdysteroidowy wiążący 20-hydroksyekdyzon; u <i>D. melanogaster</i> znane są trzy izoformy: EcR-B1, EcR-B2 oraz EcR-A;
EcRDBD	domena wiążąca DNA białka EcR;
EcRE	ang., <i>ecdysone response element</i> ; sekwencja regulatorowa warunkująca odpowiedź na 20-hydroksyekdyzon;
EMSA	ang., <i>electrophoretic mobility shift assay</i> ; technika analizy oddziaływania białek z DNA wykorzystująca zmianę ruchliwości elektroforetycznej sondy DNA po związaniu białka;
EVI2	ang., <i>ecotropic viral integration site</i> ;
FABP	ang., <i>fatty acid binding protein</i> ; białko wiążące kwasy tłuszczowe;
HSE	ang., <i>heat shock element</i> ; element regulatorowy na DNA, do którego wiążą się białka HSF w odpowiedzi na szok cieplny i inne czynniki stresowe;
HSF	ang., <i>heat shock factor</i> ; czynnik wiążący się z DNA i indukujący ekspresję genów w odpowiedzi na szok cieplny i inne czynniki stresowe;

Skrót	Znaczenie
<i>hsp27 EcRE</i>	ang., <i>heat shock protein 27 gene ecdysone response element</i> ; sekwencja EcRE znajdująca się w rejonie promotora genu <i>hsp27</i> z <i>D. melanogaster</i> ;
Inr	ang., <i>initiator</i> ; element regulatorowy promotora rdzeniowego obejmujący zwykle miejsce startu transkrypcji (-2) - (+4);
IPTG	izopropyl-β-D-tiogalaktopiranozyd;
JH	ang., <i>juvenile hormone</i> ; hormon juvenilny;
JHBP	ang., <i>juvenile hormone binding protein</i> ; białko wiążące i transportujące hormon juvenilny z miejsca jego syntezy do tkanek docelowych;
JHE	ang., <i>juvenile hormone esterase</i> ; esteraza hormonu juvenilnego;
JHEH	ang., <i>juvenile hormone epoxy hydrolase</i> ; epoksyhydrolaza hormonu juvenilnego;
LBD	ang., <i>ligand binding domain</i> ; domena wiążąca ligand;
MCS	ang., <i>multi cloning site</i> ; obszar wektora zawierający wiele miejsc restrykcyjnych, gdzie można wprowadzić insert;
MET	ang., <i>methopren tolerant protein</i> ;
mQ	skrót stosowany w odniesieniu do wody oczyszczanej w aparacie <i>Milli-Q Plus</i> (Millipore)
MTE	ang., <i>motif ten element</i> ; element promotora rdzeniowego umiejscowiony pomiędzy Inr a DPE, zwykle w obszarze od +18 do +29;
<i>NF1</i>	ang., <i>neurofibromatosis type 1 gene</i> ; gen nerwiakowłóknikowości typu 1;
nt	ang., <i>nucleotide</i> ; nukleotydy, nukleotydów;
OMGP	ang., <i>oligodendrocyte-myelin glycoprotein</i> ;
pre-mRNA	cząsteczka prekursorowego mRNA stanowiąca całość transkryptu wraz z intronami;
PTTH	ang., <i>prothoracicotropic hormone</i> ; hormon protorakotropowy;
Pu	deoksyrybonukleotyd purynowy;
Py	deoksyrybonukleotyd pirymidynowy;
pz	par zasad (w DNA);
RACE	ang., <i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i> ; technika umożliwiającą poznanie sekwencji niekodujących na 3' i 5' końcu cDNA;

Skrót	Znaczenie
RBP	ang., <i>retinol binding protein</i> ; białko wiążące retinol;
RNaza	rybonukleaza A;
RXR	ang., <i>retinoid X receptor</i> ; receptor kwasu 9- <i>cis</i> retinowego; pod nazwą tą występują trzy znane białka: RXR α , RXR β oraz RXR γ , kodowane przez odrębne geny;
SDS-PAGE	elektroforeza w żelu poliakrylamodowym w warunkach denaturujących; w obecności siarczanu dodecylu sodu;
snRNP	ang., <i>small nuclear ribonucleoprotein</i> ; małe jądrowe białka rybonukleotydowe tworzące wielozasteczkowe kompleksy, zdolne do wycinania intronów spliceosomalnych z pierwotnych transkryptów;
TAF	ang., <i>TBP associated factor</i> ; grupa czynników oddziałująca z białkiem wiążącym się do kasety TATA;
Tris	tris(hydroksymetyl)aminometan;
Usp	ang., <i>Ultraspiracle</i> ; inna nazwa to CF1 (ang., <i>chorion factor 1</i>); receptor jądrowy bezkręgowców będący produktem genu <i>Usp</i> ; ortolog względem RXR; wspólnie z EcR tworzy funkcjonalny receptor ekdyteroidowy;
UspDBD	domena wiążąca DNA białka Usp;
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indoilo- β -D-galaktopiranozyd; substrat dla enzymu β -galaktozydazy, wykorzystywany w selekcji klonów metodą α -komplementacji;
TF	ang., <i>transcription factor</i> ; czynnik transkrypcyjny; ogólne określenie dla białek biorących udział w procesie transkrypcji;
UTR	ang., <i>untranslated region</i> ; sekwencja na końcu 5' i 3' genu poddawana transkrypcji, ale nie kodująca białka (nietranslatowana).

2 Streszczenie

Hormon juwenilny (JH) oraz 20-hydroksyekdyzon (20E) wspólnie regulują rozwój i wzrost owadów. W przeciwieństwie do 20E, molekularny mechanizm działania JH a także wzajemny wpływ hormonów na siebie wciąż pozostają niejasne. Pierwszym ogniwem w przekazywaniu sygnału od JH jest białko wiążące hormon juwenilny (JHBP), które poza swoją tytułową rolą także chroni cząsteczkę hormonu przed działaniem niespecyficzyh esteraz i umożliwia jej transport do tkanek docelowych. Zamierzone w niniejszej pracy poznanie struktury i sekwencji genu *jhbp* stanowi pierwszy krok w kierunku poznania molekularnych podstaw regulacji jego ekspresji.

W trakcie realizacji niniejszej pracy opublikowana została sekwencja genu *jhbp* pochodząca z *Manduca sexta*. Dlatego też celem rozprawy doktorskiej stało się nie tylko przedstawienie budowy genu *jhbp* z innego organizmu - *Galleria mellonella*, ale poddanie go teoretycznej analizie porównawczej i nowym badaniom eksperymentalnym.

Szczegółowo w niniejszej pracy:

- Przedstawiono krok po kroku strategię sekwencjonowania obszarów niekodujących genu *jhbp* z *G. mellonella*. Aby tego dokonać, utworzono cztery biblioteki genomowego DNA, będące matrycami do PCR, gdzie szukano sekwencji niekodujących. Posługując się metodą *Genome Walking* uzyskano odpowiednie konstrukty, które następnie poddano sekwencjonowaniu. W sumie poznano 11 695 par zasad (pz).
- Powtarzając procedurę amplifikacji i sekwencjonowania, poznano obszar promotora na odcinku 1945 pz.
- Podano położenie i sekwencje czterech intronów (A, B, C, D) o następujących długościach: intron A - 4455 pz, intron B - 2319 pz, intron C - 1095 pz, intron D - 857 pz.
- Porównując sekwencję genomową z kodującą, określono dokładnie miejsca położenia intronów i ustalono ich fazy jak następuje: intron A - faza 1, intron B - faza 2, intron C i D - faza 1.

- Stwierdzono, że introny mają charakterystyczne sekwencje otaczające: GU na końcu 5' i AG na końcu 3'. Sugeruje to, że do ich wycinania z sekwencji pre-mRNA zaangażowana jest klasa U2 spliceosomów.
- Szczegółowa analiza budowy *jhbp*, w odniesieniu do genów nadrodziny kalicyn (białek wiążących niskocząsteczkowe ligandy), do której należą rodziny lipokalin, awidyn i białek wiążących kwasy tłuszczowe, wskazała, że gen *jhbp* jest najbardziej ewolucyjnie spokrewniony z rodziną lipokalin.
- Eksperymentalnie wykazano, że gen kodujący *jhbp* występuje w genomie *G. mellonella* tylko jeden raz.
- Wskazano miejsce startu transkrypcji. Przypada ono na resztę adenylową, położoną 11 nukleotydów dalej w kierunku 5' w stosunku do poznanej w naszym laboratorium sekwencji cDNA *jhbp* z *G. mellonella*.
- Analiza obszaru około 100 pz w obrębie miejsca startu transkrypcji, wskazała obecność następujących potencjalnych elementów regulatorowych promotora rdzeniowego: kasety TATA w położeniu od -29 do -24 nukleotydu, sekwencji TCAGTA reprezentuje element inicjatorowy (Inr) położony w pozycji 14 - 19 oraz sekwencji AGGTG w położeniu od 38 do 42 nukleotydu, wykazującej podobieństwo do DPE (ang., *downstream promoter element*).
- W oparciu o analizy statystyczne i dane literaturowe przedstawiono hipotezę, że podstawowy kompleks transkrypcyjny, przyłączający się do promotora rdzeniowego *jhbp*, zakotwicza się za pomocą kasety TATA, która wraz z dodatkowymi czynnikami regulatorowymi steruje odpowiednim ułożeniem białek i rozpoczęciem procesu transkrypcji. Wysłunięto przypuszczenie, iż wskazane elementy Inr i DPE są niefunkcjonalne w *jhbp*, ponieważ ich położenia odbiegają od danych statystycznych natomiast ich sekwencje w niewielkim stopniu różnią się od sekwencji zgodnych.
- Korzystając z bazy danych TRANSFAC[®] i algorytmu minimalizacji fałszywych pozytywów, znaleziono w genie *jhbp* z *G. mellonella* ponad pięćdziesiąt potencjalnych miejsc oddziaływania dla czynników regulatorowych, takich jak Hunchback (Hb), Heat Shock Factor (HSF), Ultrabithorax (Ubx), Elf-1, Chorion factor 1/Usp (CF1/Usp), Broad-Complex Z1 - Z4 (BR-C), Abdominal-B (Abd-B), Croc.
- W intronach A, B i C wskazano istnienie ośmiu potencjalnych elementów regulatorowych wiążących białko BR-C, które jest niezbędne do prawidłowego rozwoju owada, a szczególnie podczas usuwania tkanek ze stadiów larwalnych. Sekwencje te mogą stanowić miejsca krzyżowania się szlaków przekazywania sygnału od JH i 20E.

- Analiza składu nukleotydowego genu *jhbp* pokazała, że w sekwencji kodującej, która jest pod większą presją ewolucyjną, występuje więcej par GC (36%) oraz więcej puryn (54%) niż w obszarach niekodujących, gdzie jest odpowiednio 31% par GC i 50% puryn. Są jednak rejony w sekwencjach niekodujących, w których zawartość par GC przekracza 60%. Głównie tam odnaleziono fragmenty innych genów, które prawdopodobnie pojawiły się stosunkowo niedawno podczas ewolucji.
- W tych obszarach niekodujących genu *jhbp* występuje 18 fragmentów, o długościach od 25 do 127 pz, podobnych do sześciu innych genów z *G. mellonella* oraz jednego z *D. melanogaster*. Podobieństwo sekwencji jest w zakresie od 82 do 96%. Osiem fragmentów pochodzących z genu P25, arylforyny, profenolooksydazy oraz fibroiny (Fib-H), jest skupionych w klastrze, położonym w promotorze w rejonie (-1942) - (-1817). Cztery sekwencje z genu heksameryny są z kolei w klastrze umiejscowionym w intronie A, w obszarze 687 - 889. Pozostałe fragmenty są rozproszone w intronach.
- Poprzez porównanie *jhbp* z *G. mellonella* i *M. sexta* stwierdzono, że ogólna budowa tych genów jest podobna, ale są miejsca, w których występują istotne różnice. Obydwa geny mają po pięć eksonów i cztery introny jednak, transkrypt *jhbp* u *G. mellonella* jest około 1,6 razy dłuższy, ponieważ introny A, C i D są dłuższe. Miejsca wtrącenia intronów w sekwencję kodującą w obu genach są podobne, ale nie identyczne, zachowane są fazy intronów. Na obszarze 1945 pz obu promotorów dystalnych występują tylko dwie takie same potencjalne sekwencje regulatorowe (HSE i BR-C Z3). W promotorach rdzeniowych wskazano istnienie kasety TATA, Inr i DPE jednak ich sekwencje i położenia są odmienne u obu gatunków.
- W oparciu o eksperymenty EMSA wykazano, że spośród trzech potencjalnych miejsc regulatorowych CF1/Usp najsilniej oddziałuje z domeną wiążącą DNA białka Usp (UspDBD) element I CF1/Usp położony najdalej w kierunku 5' promotora (początek na -1053 nukleotydzie). Zawiera on sekwencję GGGGTCA.
- Stwierdzono, że występujący w promotorze *jhbp* naturalny element I CF1/Usp ma nieco wyższe powinowactwo do domeny wiążącej DNA białka Usp (UspDBD) niż element odpowiedzi na ekdyzon z genu *hsp27* (*hsp27* EcRE), o którym wiadomo, że oddziałuje z receptorem ekdysteroidowym.
- Wskazane w promotorze elementy CF1/Usp poddano badaniom *in vivo*, w teście z genem reporterowym. W tym celu umieszczono w wektorze pGL3-Basic cztery fragmenty promotora *jhbp*, które obejmowały promotor rdzeniowy i kolejne elementy CF1/Usp. Konstrukty, który stanowił kontrolę i służył do standaryzacji reakcji transfekcji złożono z wektora pRL oraz sekwencji promotorowej poliedryny pochodzącej z

wektora pFastBac1. Testy *in vivo* pokazały, że poziom ekspresji uzyskany dla konstruktów z promotorem *jhbp* jest od 5 do 8 razy wyższy niż pustego wektora pGL3-Basic. Najwyższą ekspresję uzyskano dla konstruktów zawierających tylko promotor rdzeniowy.

3 Wstęp

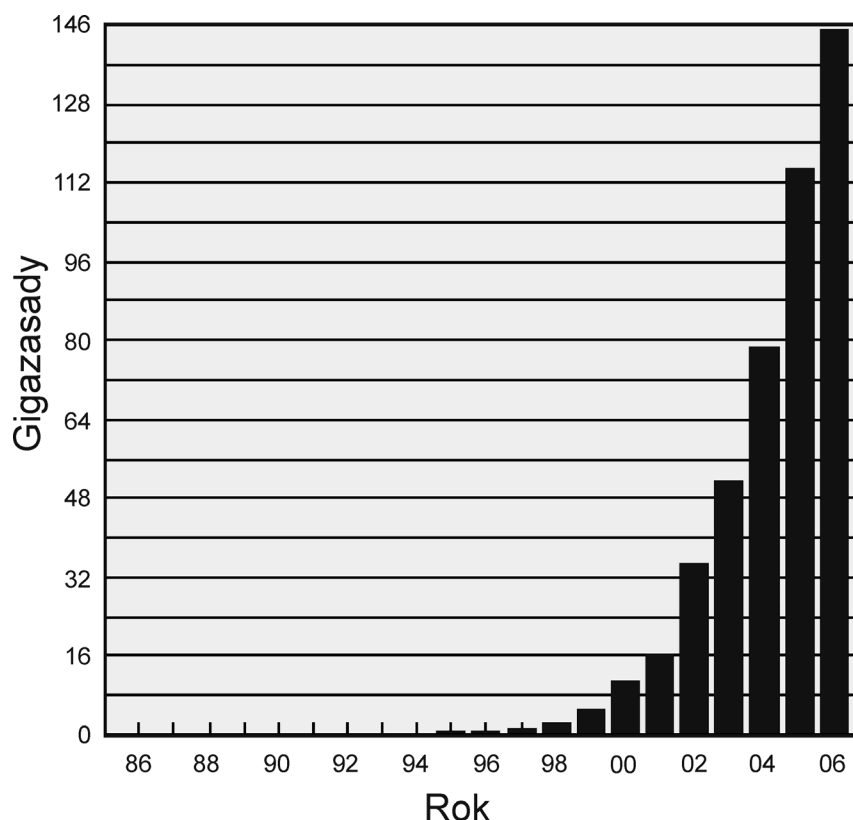
3.1 Zacząło się od...

Życie każdej istoty to tylko chwila w dziejach ziemi. Ale dzięki niezliczonej ilości takich „chwilowych” istnień przez około 3,5 miliarda lat ewolucji, ziemia została zamieszкана przez niesamowicie różnorodne organizmy. Od prymitywnej bakterii, przez organizmy wielokomórkowe, aż do człowieka każda istota ma swój czas i swoje miejsce na naszej planecie. Jednak tylko człowiek wciąż stawia sobie pytania, dlaczego?, po co?, kiedy?, jak? Pragnie on poznać to, co go otacza, poznać siebie, swoją przeszłość oraz inne istoty. Dzięki tej nieodpartej chęci poznawania świata rozpoczęła się moja przygoda z biochemią i biologią molekularną.

W ciągu ostatnich kilkunastu lat znacznie wzrosła liczba opisywanych nowych białek i sekwencji DNA. Jednak znajomość tych pojedynczych elementów, z których składa się każdy żywy organizm, nie daje nam pełnej odpowiedzi na temat jego funkcjonowania. Poznanie zależności i połączeń między cząsteczkami budującymi istotę żywą, ich wpływu na informację zapisaną w genach, pozwoli na uzyskanie pełniejszego obrazu wzajemnych oddziaływań i szlaków przekazywania sygnałów w gęstej sieci regulatorowej organizmu. Dlatego niniejsza praca poza przedstawieniem sekwencji, ważnego dla rozwoju i wzrostu owadów genu, spróbuje pokazać możliwe zależności pomiędzy badanym genem, produktem jego ekspresji - białkiem wiążącym hormon juwenilny (JHBP, ang., *juvenile hormone binding protein*) oraz hormonami 20-hydroksysekdyzonem (20E) i hormonem juwenilnym (JH, ang., *juvenile hormone*), jak też innymi białkami zaangażowanymi w procesy regulacji metabolizmu owadów. Ponadto próba cofnięcia się w czasie i analiza historii genu *jhbp* dostarczy kolejnych, nieznanych dotąd informacji na jego temat.

3.2 Architektura genów owadzich

Od momentu odkrycia i udoskonalenia technik automatycznego sekwencjonowania ilość poznawanych rocznie nukleotydów ma tendencję wzrostu eksponencjalnego (Rys. 1). Do 15 lipca 2006 roku poznane zostały sekwencje obejmujące 144 667 612 393 nukleotydów (nt). Większość z nich to sekwencje pochodzące ze ssaków. Owady, mimo, że stanowią



Rys. 1 Ilość zdeponowanych w bazie danych EMBL nukleotydów w latach 1986 - 2006 (wg EMBL Statistics; <http://www3.ebi.ac.uk/Services/DBStats/>).

najlichnieszą systematyczną grupę organizmów to ich sekwencje nie są tak licznie reprezentowane w bazach danych.

Obecnie duże konsorcja prowadzą 44 projekty, których celem jest sekwencjonowanie genomów różnych owadów. Szesnaście z nich jest na etapie składania i porządkowania poznanej już sekwencji a 27 jest w trakcie sekwencjonowania. Jedyne poznane, w pełni kompletny genom owadzi to sekwencja pochodząca z *D. melanogaster*. Jego odkrycie w 2000 roku (Adams i wsp., 2000) spowodowało znaczny postęp w poznawaniu budowy i charakterystyce genów nie tylko owadzi, ale w szerszym spojrzeniu - wszystkich eukariotycznych. Sekwencja ukończona w 2000 roku została zdeponowana w bazie danych *FlyBase* (*A Database of the Drosophila Genome*) i otrzymała numer wydania 1.0 (źródło, <http://flybase.bio.indiana.edu/>). Od tego czasu pojawiały się liczne poprawki i uzupełnienia sekwencji w postaci kolejnych wydań. Obecnie aktualna wersja nosi numer 4.3 i została zaprezentowana 30 marca 2006 roku. Na podstawie danych z sekwencjonowania powstał model obejmujący cały genom *D. melanogaster*, który zawiera informacje na temat ilości oraz rodzaju kwasów nukleinowych w nim zawartych (Tabela 1). Model ten podlega ciągłym modyfikacjom, ponieważ prace nad projektem nadal trwają a sekwencja jest wciąż udokładniana. Z prac tych wynika, że przeciętny gen *D. melanogaster* ma długość około 5000

Tabela 1 Charakterystyka genomu *Drosophila melanogaster* (wg FlyBase; <http://flybase.bio.indiana.edu/>).

	Ilość (nt)	Przeciętna długość (nt)	Najdłuższy (nt)	Najkrótszy (nt)
Geny	14816	5002	279927	16
Geny kodujące białka	14066	5247	279927	138
Transkrypty kodujące białka	19819	2256	69571	132
Eksony	65380	480	27725	3
Introny	48501	1192	185510	30
Obszary nietranslatowane (koniec 5')	17736	184	3391	1
Obszary nietranslatowane (koniec 3')	12162	366	5684	1
Unikalne białka	17134	568	23015	25
rRNA	104	172	1995	29
tRNA	314	75	186	61
snRNA^a	46	111	255	36
snoRNA^b	63	88	316	16
miRNA^c	66	22	29	20
Inne niekodujące RNA	110	1903	31065	19
Pseudogeny	52	1119	13064	53

a - (ang., *small nuclear RNA*), małe jądrowe RNA;

b - (ang., *small nucleolar RNA*), małe jąderkowe RNA;

c - mikroRNA, jednoniciowe cząsteczki RNA o długości 21-23 nt.

par zasad i składa się średnio z 4,4 eksonów i 3,7 intronów, których przeciętne długości wynoszą odpowiednio 480 i 1192 pary zasad. W porównaniu z *D. melanogaster* ilość poznanych pełnych sekwencji genów dla *G. mellonella* jest znikoma. W bazie danych znajduje się tylko 5 takich genów, w tym 4 kodujące białka, między innymi sekwencja genu *jhbp* opisana w niniejszej pracy. Ich struktura nie odbiega znacząco od przeciętnego genu z *D. melanogaster*, bo długość waha się w granicach od 5000 do 10 000 par zasad oraz mają po 5 eksonów i 4 introny.

3.2.1 Introny

Wraz ze wzrostem poziomu złożoności organizmu, coraz dłuższe geny odznaczają się większą ilością DNA niekodującego białek. Oszacowano, że dla niższych organizmów eukariotycznych, takich jak *Dictyostelium* i *Plasmodium* średnio jeden intron przypada na 1000 par zasad (Palmer i Logsdon, 1991). Ilość ta wzrasta do 3-4 w przypadku roślin i grzybów a maksimum, około 6 osiąga u zwierząt. Badania sekwencji intronowych wskazują, że nie są one tylko śmieciami i zbędnym balastem, którego organizmy w trakcie ewolucji nie chciały się pozbyć, ale pełnią niejednokrotnie istotne funkcje regulujące ekspresję genów.

W genach owadzych pochodzenia jądrowego jak dotąd znaleziono introny tak zwane spliceosomalne, które wycinane są z pierwotnych transkryptów za pomocą wielocząsteczkowych kompleksów rybonukleoproteinowych złożonych z małych jądrowych rybonukleoprotein (snRNP, ang., *small nuclear rybonucleotideprotein*). Wszystkie introny spliceosomalne zawierają charakterystyczne sekwencje na końcach 5' i 3' oraz miejsce rozgałęzienia, umożliwiające ich precyzyjne wycinanie z prekursorowych cząsteczek mRNA (pre-mRNA). Od rodzaju tych sekwencji zależy, przez jaki spliceosom intron będzie wycinany. Introny spliceosomalne tworzą dwie grupy, U2- i U12-zależnych (Sharp i Burge, 1997). Analizując pierwotnie sekwencje ludzkich genów stwierdzono, że około 99,9% intronów jest wycinanych przez U2-zależny splicosom, pozostałe 0,1% należy do klasy U12-zależnej, która ze względu na rzadkość występowania jest słabiej poznana (Jackson, 1991). Późniejsze analizy i komputerowe poszukiwania intronów typu U12 wykazały, że w ekspresjonowanych sekwencjach genomu człowieka występuje ich około 404 (Levine i Durbin, 2001). Ogólnie stwierdzono, że u kręgowców intronów klasy U12 w porównaniu z U2 jest od 0,15 do 0,34%, a u innych eukariontów jest jeszcze mniej (Burge i wsp., 1998a; Levine i Durbin, 2001).

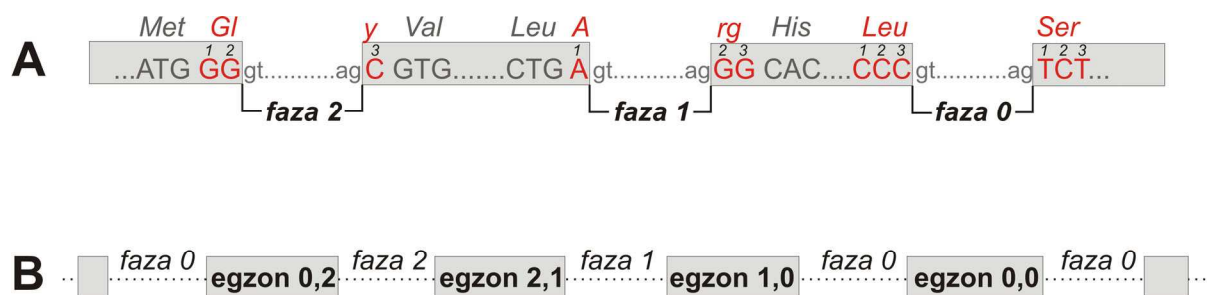
Ta niewielka grupa intronów była pierwotnie identyfikowana dzięki nietypowym sekwencjom sygnałowym w miejscu tworzenia rozgałęzienia oraz odmiennym dinukleotydom AU na końcu 5' i AC na końcu 3' (Jackson, 1991; Hall i Padgett, 1994). Klasyczne introny U2-zależne posiadają sekwencję 5'GU-AG3' na odpowiednich końcach. Późniejsze badania pokazały, że terminalne sekwencje 5'AU-AC3' nie są ściśle wymagane, aby introny były U12-zależne, ponieważ znaleziono w bazach danych wiele intronów U12 z końcowymi dinukleotydami 5'GU-AG3' i nie tylko (Sharp i Burge, 1997; Burge i wsp., 1998a; Wu i Krainer, 1999). Ponadto, zidentyfikowano niewielką liczbę U2-zależnych intronów posiadających dinukleotydowe zakończenia 5'AU-AC3', charakterystyczne dla intronów U12, co potwierdziło, że do prawidłowej klasyfikacji intronów spliceosomalnych, poza analizą końcowych nukleotydów, niezbędne jest zbadanie całych miejsc splicingowych (Dietrich i

wsp., 1997). Uznano, że charakterystyczne dla intronów klasy U12 jest silnie zachowane donorowe miejsce splicingowe (5'ss) oraz sekwencja odpowiedzialna za powstanie rozgałęzienia (Burge i wsp., 1998b). Natomiast introny klasy U2 wykazują umiarkowanie zachowany sygnał z donorowego (5'ss) i akceptorowego (3'ss) miejsca splicingowego oraz wysoce zdegenerowane rozgałęzienie. Poza tym w sekwencji intronów U2-zależnych u kręgowców, między miejscem rozgałęzienia a 3'ss znajduje się 10-15-nukleotydowy ciąg reszt pirymidynowych (poli(Py), ang., *polipirimidynie tract*). Sekwencji tej nie znaleziono wśród intronów klasy U2 pochodzących z roślin i drożdży (Reed, 2000; Lorkovič i wsp., 2000). U pozostałych *Eucaryota* ciągu poli(Py) również może nie być lub może pojawiać się w skróconej formie kilku reszt pirymidynowych. W intronach klasy U12, zarówno pochodzenia roślinnego i zwierzęcego, nie znaleziono ciągu poli(Py). W sekwencji intronów klasy U2 miejsce rozgałęzienia i 3'ss są od siebie oddalone zwykle o około 20-40 nt, natomiast w intronach U12-zależnych odległość ta jest mniejsza i wynosi około 10-16 nt.

Aby pełniej scharakteryzować klasę intronów U12-zależnych spróbowano zbadać przebieg ich ewolucji. Porównując położenia znanych intronów U12 pomiędzy homologicznymi genami pochodzącymi w różnych gatunków roślin i zwierząt stwierdzono, że na wczesnych etapach ewolucji introny te występowały częściej niż obecnie (Burge i wsp., 1998a; Spafford i wsp., 1998). Wysłano hipotezę stopniowego przekształcania się w toku ewolucji intronów klasy U12 w introny klasy U2 poprzez najpierw zmianę końców dinukleotydowych z AU-AC na GU-AG, a następnie przekształcenie charakterystycznych sekwencji sygnałowych dla U12 na typowe dla intronów U2-zależnych (Burge i wsp., 1998a). Sugeruje się, że na introny typu U12 była wywierana większa presja ewolucyjna i są bardziej wrażliwe na mutacje, ponieważ mają więcej nukleotydów silnie zachowanych w miejscach splicingowych, niż introny klasy U2 (Lynch, 2002). Oprócz tego stwierdzono, że introny U12-zależne są wolniej i mniej dokładnie wycinane z pre-mRNA niż U2-zależne (Patel i wsp., 2002; Levine i Durbin, 2001). Wymienione właściwości najprawdopodobniej zadecydowały o tendencji do zmniejszania liczby intronów klasy U12 w toku ewolucji (Lynch, 2002).

3.2.1.1 Fazy intronów

Sekwencje intronowe przerywają ciągłość sekwencji kodujących. Pozycję intronu pomiędzy, bądź wewnątrz kodonu określa się mianem fazy intronu (Sharp, 1981). Ze względu na sposób tej ingerencji intronom przypisano trzy różne fazy: 0, 1 lub 2 (Rys. 2A). Częstość występowania poszczególnych faz intronów jest znacząco różna (Fedorov i wsp., 1992; Long i wsp., 1995; Tomita i wsp., 1996}. Introny fazy 0 są najliczniejszą grupą (~50%), mniej



Rys. 2 Fazy intronów oraz wybrane rodzaje eksonów. Na panelu A przedstawiono schematycznie sposób określania fazy intronu przerywającego sekwencję kodującą. Jeżeli ingerencja zachodzi pomiędzy kodonami wtedy intron jest w fazie 0, gdy występuje po pierwszym lub drugim nukleotydzie kodonu wtedy intron jest odpowiednio w fazie 1 lub 2. Panel B przedstawia schemat genu zawierającego introny w różnych fazach oraz przykłady czterech spośród dziewięciu możliwych układów faz eksonów, które zależą od otaczających je intronów. Szare prostokąty symbolizują eksony, natomiast obszary pomiędzy nimi narysowane przerywaną linią to introny.

liczna jest grupa intronów fazy 1 (~30%), najmniej jest intronów w fazie 2 (~20%). Podobną klasyfikację przeprowadzono także dla eksonów, w zależności od fazy oskrzydlających je intronów (Rys. 2B). Eksony, których całkowita liczba nukleotydów jest podzielna przez 3, nazywa się eksonami symetrycznymi i wyróżnia wśród nich trzy grupy: 0,0; 1,1 i 2,2. Ilość symetrycznych eksonów w rzeczywistych genach zdecydowanie przewyższa liczbę tych eksonów w symulacji, w której introny przypadkowo przerywałyby sekwencję kodującą (Long i wsp., 1995; Tomita i wsp., 1996). Symetryczność eksonów stanowi warunek konieczny procesu duplikacji i zjawiska tasowania eksonów między genami, ponieważ nie powoduje zmiany ramki odczytu, w przeciwieństwie do pozostałych sześciu grup eksonów (0,1; 0,2; 1,0; 1,2; 2,0 i 2,1), (Fedorov i wsp., 1992; Long i Deutsch, 1999; Strachan i Read, 1999; Long i Rosenberg, 2000).

3.2.1.2 Pochodzenie intronów

Moment odkrycia intronów stał się równocześnie początkiem dyskusji na temat ich powstania, ewolucji, roli w rozwoju genów oraz korzyści płynących z ich posiadania. Potrzeba wyjaśnienia tajemnicy narodzin sekwencji intronowych przyczyniła się do powstania dwóch sprzecznych teorii. Za wczesnym pojawieniem się intronów w toku ewolucji przemawia teoria „intronów wcześniej” (ang., *introns-early*) natomiast za późniejszym, teoria “intronów-później” (ang., *introns-late*). Jednak żadna z koncepcji nie rozwiązała dotychczas zagadki pojawienia się intronów w genach. Zwolennicy wczesnego pojawienia się intronów w genach zakładają, że powstały one równocześnie z eksonami,

wtedy, gdy materiałem genetycznym był RNA (Darnell, 1978; Doolittle, 1978; Darnell i Doolittle, 1986; Gilbert, 1987). Zauważono, że prawdopodobnie introny zostały usunięte z genów *Procaryota* w trakcie ewolucji. Pozwoliło to organizmom prokariotycznym zdobyć przewagę selekcyjną przez uproszczenie genomu oraz minimalizację czasu replikacji, dzięki czemu mogły szybciej się rozmnażać. W genach *Eucaryota*, introny pierwotnie odziedziczone po przodku wszystkich organizmów, nazywanym progenotą, były zatrzymywane. Teoria wczesnego powstania intronów jest często nazywana „eksonową teorią genów” (ang., *exon theory of genes*), ponieważ poszczególne eksony są w niej traktowane jak sekwencje kodujące oddzielne domeny strukturalne (α -helisy, β -harmonijki), odpowiedzialne za określone funkcje (Gilbert i Glynias, 1993; de Souza i wsp., 1996; Gilbert i wsp., 1997). Rearanżacja istniejących domen, tzw. tasowanie eksonów może prowadzić do powstania genów kodujących białka o odmiennych właściwościach. Introny w tym procesie pełnią rolę miejsc włączania lub usuwania kolejnych domen, bo wprowadzenie do nich eksonów, pochodzących nawet z różnych źródeł, nie zmienia ramki odczytu w genie. Teoria o wczesnym pochodzeniu intronów znalazła swoje uzasadnienie w genach powstałych na wczesnych etapach ewolucji (m.in., genach globin, izomerazy triozofosforanowej, kinazy pirogronianowej czy dehydrogenazy 3-fosfogliceroaldehydu) (Stone i Schwarz, 1990; Go, 1981). W tych przypadkach wykazano korelację między eksonem a domeną strukturalną. Jednak późniejsze analizy przeczyły temu pogładowi, nawet w przypadku genów wcześniej uznawanych za powstałe w procesie tasowania eksonów (Stoltzfus i wsp., 1994; Kwiatowski i wsp., 1995). Wyniki tych badań wykorzystali zwolennicy teorii „introny-później” do umocnienia swoich przypuszczeń (Crick, 1979; Orgel i Crick, 1980; Cavalier-Smith, 1985; Cech, 1985; Sharp, 1985). Koncepcja późniejszego powstania intronów zakłada, że pojawiły się one w ewolucji organizmów po oddzieleniu eukariontów od pozostałych linii rozwojowych. Stwierdzono, że najprawdopodobniej progenota posiadał geny ciągłe, w których sekwencje nastąpiła insercja intronów. Istotnym założeniem jest fakt, że introny musiały wykazywać cechy elementów zdolnych do przemieszczania się i samo wycinania na poziomie RNA. Głównym argumentem popierającym tą teorię stanowią wyniki filogenetycznych analiz rozdziału intronów w toku ewolucji (Logsdon, 1998).

W ostatnim okresie również zwolennicy wczesnego pojawienia się intronów, badając geny prymitywnych *Eucaryota*, znaleźli dowody na słuszność swojej teorii (Archibald i wsp., 2002; Nixon i wsp., 2002; Simpson i wsp., 2002). Przy założeniu, że jako domenę przyjęto strukturę trzeciorzędową białka o średnicy 21–33 angstromów, zaobserwowano korelację między budową genu a jego białkowym produktem. Stwierdzono, że u progenoty w ~35% genów występowały introny w fazie 0, które oddzielały domeny. Potwierdzałoby to

powstanie starych ewolucyjnie białek na drodze tasowania eksonów. Obserwowany nadmiar eksonów fazy 0,0 w analizowanych genach również stanowi argument za takim przebiegiem procesu, ponieważ tasowanie eksonów zachodzi tylko w przypadku eksonów symetrycznych. Dlatego też zaczęto traktować introny fazy 0 jako relikty po sekwencjach wtrąconych w geny progenoty (de Souza i wsp., 1998). Stwierdzenie to jednak nie znalazło poparcia pośród najnowszych wyników badań nad fazami intronów, które podzielono ze względu na czas pojawienia się w toku ewolucji na „stare” i „nowe” (Sverdlov i wsp., 2003). Jako „stare” zdefiniowano sekwencje intronowe obecne w genach organizmów pochodzących przynajmniej z dwóch różnych królestw eukariotycznych (rośliny, grzyby, zwierzęta) lub dwóch odległych linii rozwojowych zwierząt (niciansie, stawonogi, kręgowce). Natomiast „nowe” introny uznano za specyficzne tylko dla pojedynczych linii rozwojowych organizmów. Stwierdzono, że fazę 0 można przypisać większej liczbie intronów „nowych” niż „starych”. Pociągnęło to za sobą poszukiwania przyczyn przewagi intronów fazy 0 w genach. Okazało się, że introny fazy 0 zajmują bardziej zachowawcze regiony niż introny fazy 1 i 2. Zatem w trakcie ewolucji regiony genu bogate w introny fazy 1 i 2 częściej podlegały mutacjom opartym na delecji sekwencji intronowych (Rogers, 1990; Lynch, 2002). Poza tym zaobserwowano, że „nowe” introny zawierają więcej kluczowych informacji w procesie ich wycinania, w sekwencjach terminalnych oskrzydlaających je eksonów. Natomiast introny „stare” przechowują więcej informacji, niezbędnych w procesie wycinania, we własnych końcowych sekwencjach. Wobec tego zasugerowano, że w przypadku „starych” intronów, następowała wędrówka sygnałów istotnych w procesie ich wycinania z terminalnych sekwencji eksonowych do intronowych (Sverdlov i wsp., 2003).

Zarówno zwolennikom teorii „wczesnego”, jak i „późnego” pojawienia się intronów w genach nie udało się przedstawić jednego niepodważalnego scenariuszu przebiegu zdarzeń ewolucyjnych. Dlatego stworzono kompromisowy, mieszany model ewolucji intronów (ang., *mixed model*) (Tyshenko i Walker, 1997; Roy, 2003). Zgodnie z jego założeniami, wśród intronów można wyróżnić liczną grupę sekwencji, które pojawiły się w genach względnie niedawno oraz niewielką grupę, występujących już u progenoty i przyjmujących przeważnie fazę 0. Uznano, że w toku ewolucji do genów były zarówno wprowadzane, jak i z nich usuwane introny, co umożliwiała zdolność intronów do zmiany położenia. Ta kompromisowa koncepcja znalazła odzwierciedlenie w wynikach analizy intronów z 684 ortologicznych genów, pochodzących z ośmiu sekwencjonowanych genomów eukariotycznych: roślin (*Arabidopsis thaliana*), zwierząt (*Caenorhabditis elegans*, *D. melanogaster*, *Anopheles gambiae*, *Homo sapiens*), grzybów (*Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*) i pierwotniaków (*Plasmodium falciparum*) (Rogozin i wsp., 2005). Na ich podstawie powstał

scenariusz ewolucji intronów, uwzględniający główne założenie parsymonii, czyli przebieg zmian ewolucyjnych najkrótszą z możliwych dróg. Zaobserwowano, że zarodek malarii (*P. falciparum*) ma około 30% intronów wspólnych z główną grupą *Eucaryota*, obejmującą grzyby, rośliny i zwierzęta. Świadczyłoby to o przetrwaniu tych intronów bez zmian przez ponad 1,5 miliarda lat, które minęły od oddzielenia *Plasmodium* od linii rozwojowej prowadzącej do roślin. Niewiarygodna wydała się zależność, że człowiek ma więcej wspólnych intronów z rzodkiewnikiem pospolitym (*A. thaliana*) niż wywilzną karłowką (*D. melanogaster*), czy nicieniem (*C. elegans*). Szczególnie wydało się to intrygujące ze względu na fakt, że wspólny przodek zwierząt posiadał bardzo dużo intronów. Wytłumaczono to w ten sposób, że w genach kręgowców i roślin pozostała większość intronów przodka, podczas gdy z genów grzybów, nicieni, stawonogów i *Plasmodium* były usuwane. Najprawdopodobniej u kręgowców i roślin znacznie częściej zachodziło zjawisko insercji intronów niż u pozostałych *Eucaryota*.

3.2.1.3 Geny intronowe

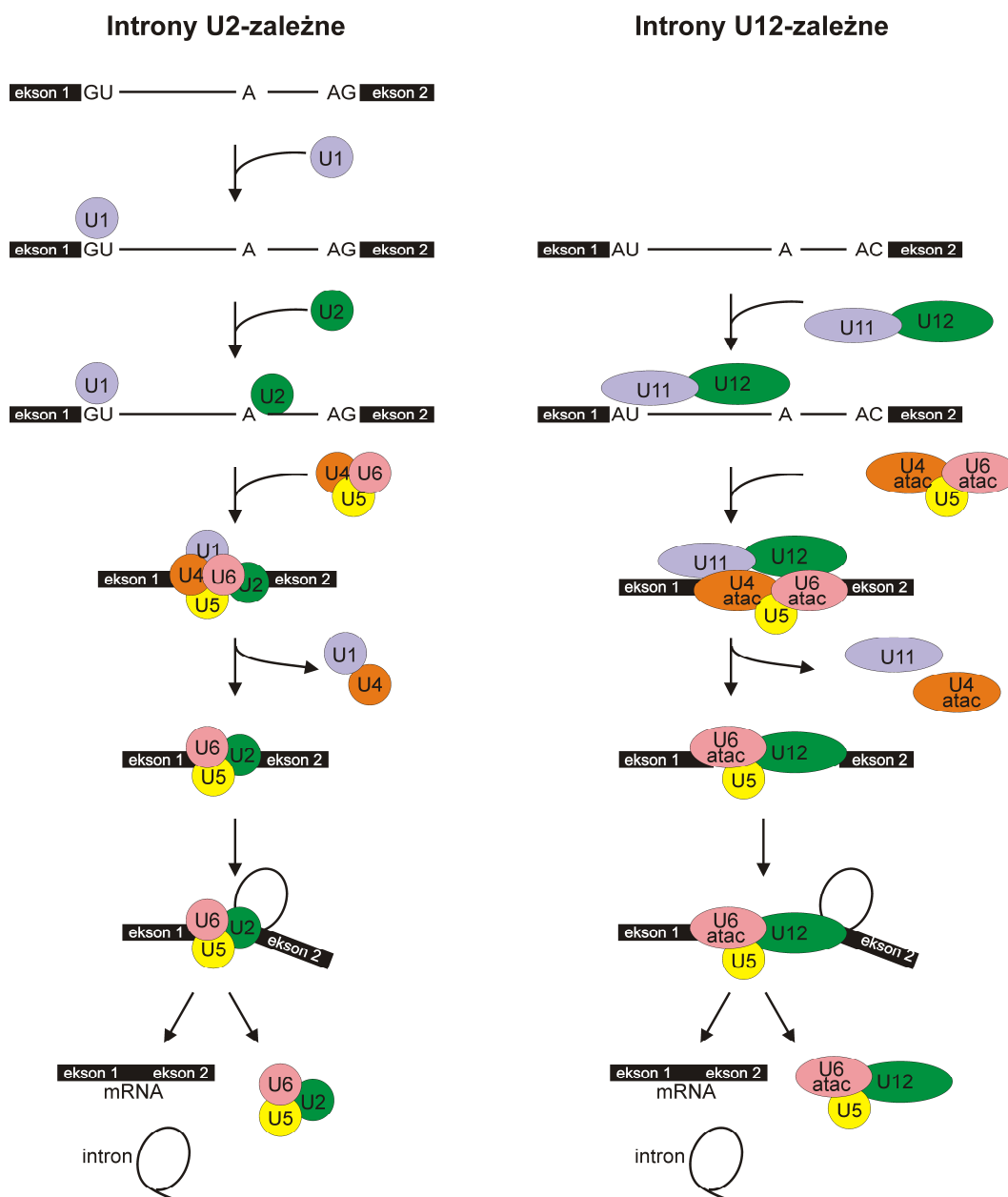
Geny intronowe to układy, w których jeden lub więcej genów znajduje się wewnątrz intronu innego genu, nazywanego genem gospodarza (Schmidt, 1999). Z reguły położone są one na obu niciach i transkrypcja genu gospodarza zachodzi w przeciwnym kierunku niż transkrypcja genu intronowego. Jednak w niektórych przypadkach ich sekwencje kodujące pokrywają się, co prowadzi zazwyczaj do wykształcenia wspólnego mechanizmu regulacji ekspresji. Przykładem struktury tego typu jest gen nerwiakowłóknikowości typu 1 (*NFI*, ang., *neurofibromatosis type 1 gene*). Liczy on około 350 kbp i składa się z 59 eksonów. Jego intron 27b, o długości około 50 kbp, zawiera trzy przeciwnie zorientowane geny, z których każdy zawiera intron: *EVI2A*, *EVI2B* (ang., *ecotropic viral integration site*) i *OMGP* (ang., *oligodendrocyte-myelin glycoprotein*). Ponadto w intronie 39 występuje pseudogen kinazy adenylowej 3 (*ΨAK3*), o długości 1,7 kbp i tej samej orientacji co gen *NFI* (Xu i wsp., 1990; Viskochil i wsp., 1990; Viskochil i wsp., 1991; Xu i wsp., 1992; Li i wsp., 1995). Pochodzenie takich zagnieżdżonych genów tłumaczy się trzema hipotezami: (1) insercja genu do intronu genu gospodarza; (2) insercja intronu posiadającego gen, do genu gospodarza; (3) pochłanianie innych genów przez jeden rozrastający się gen. Ze względu na rozległy zasięg genów intronu 27b, w sekwencji *NFI* najprawdopodobniej zaszła trzecia z wymienionych wyżej sytuacji. Pierwszy scenariusz natomiast miał przypuszczalnie miejsce w przypadku pozbawionego sekwencji intronowych pseudogenu kinazy adenylowej, przez wprowadzenie do chromosomu odcinka DNA stanowiącego kopię transkryptu, na drodze retrotranspozycji. Mutacje w obszarze genu *NFI* uważa się za przyczynę występowania jednostki chorobowej

nazywanej nerwiakowłóknikowatością (Wallace i wsp., 1990), która objawia się obniżoną zdolnością uczenia się, nadciśnieniem nerkopochodnym i podatnością na nowotwory. Niektóre z tych objawów mogą być pośrednim dowodem na powiązanie ekspresji genu *NFI* z aktywnością jego genów intronowych. W takiej sytuacji brak aktywności genu gospodarza prowadziłby do nadekspresji genów wtrąconych. Coraz częściej trudności w nauce przypisuje się zmianom w regulacji ekspresji genu *OMGP*, który bierze udział w różnicowaniu komórek podczas rozwoju mózgu. Poza tym pojawiło się podejrzenie, że zawiera on sekwencję wzmacniającą aktywność *NFI* (Viskochil i wsp., 1991). Natomiast zmiany w ekspresji *EVI2A* i *EVI2B* mogą okazać się odpowiedzialne za występowanie przewlekłej białaczki szpikowej typu dziecięcego.

3.2.1.4 Wycinanie intronów spliceosomalnych

Proces wycinania intronów z pre-RNA cechuje precyzja i dokładność (Reed, 2000). Prawidłowy przebieg splicingu wymaga właściwego rozpoznania miejsc cięcia oraz sekwencji sygnałowych 5', 3' i rozgałęzienia. Obok sieci oddziaływań typu RNA-białko, białko-białko i RNA-RNA u roślin istnieją sekwencje bogate w powtórzenia TA otaczające miejsca splicingowe, które stanowią dodatkowy mechanizm czuwający nad poprawnością przebiegu procesu wycinania (Luehrsen i Walbot, 1994; Simpson i Filipowicz, 1996; Brown i Simpson, 1998). U zwierząt podobną rolę pełnią eksonowe sekwencje wzmacniające (ESE, ang., *exonic splicing enhancer*), które zwiększają specyficzność procesu splicingu (Blencowe, 2000).

Mechanizm splicingu intronów spliceosomalnych opiera się na dwóch reakcjach transestryfikacji (Moore i Sharp., 1993). Prowadzone są one przez kompleks złożony z snRNP bogatych w reszty urydyłowe. Za wycinanie intronów U2-zależnych odpowiadają kompleksy snRNP U1, U2, U4, U5 i U6, natomiast na spliceosom U12 składają się kompleksy U11, U12, U4atac i U6atac i U5 (Burge i wsp., 1998b). Obserwowane w spliceosomie typu U2 oddziaływania kompleksów snRNP U1 i U2 z sekwencjami splicingowymi zachodzą sekwencyjnie (Frilander i Steitz, 1999). Najpierw U1 paruje zasadami z miejscem 5'ss, po czym U2 z 3'ss (Rys. 3). Odmienne zachowują się odpowiedniki tych kompleksów ze spliceosomu typu U12. Zaobserwowano, że cząsteczki snRNP U11 i U12 wiążą się równocześnie do miejsca splicingowego 5'ss i miejsca rozgałęzienia w sekwencji intronu (Rys. 3). Z tego wynika, że rozpoznawanie intronów klasy U12 wymaga jednoczesnego oddziaływania kompleksu U11 z 5'ss i U12 z rozgałęzieniem. Kolejno do miejsca splicingowego 5' w pre-spliceosomie przyłączają się kompleksy U4, U6 i U5 oraz w przypadku intronów U12-zależnych U4atac, U6atac i U5 (Rys. 3).



Rys. 3 Schemat wycinania intronów U2- i U12-zależnych (wg Will i Luhrmann, 2005). Miejsce rozgałęzienia przedstawiono symbolicznie literą A. Poszczególne snRNP z intronów U2-zależnych mają takie same kolory jak ich odpowiedniki w intronach U12-zależnych.

Najprawdopodobniej kluczowym elementem centrum katalitycznego spliceosomu jest cząsteczka snRNP U6, której sekwencja była szczególnie konserwowana w toku ewolucji w porównaniu z innymi snRNP (Nilsen, 1998). Dodatkowym argumentem potwierdzającym powyższą hipotezę jest fakt, że niewielkie zmiany w sekwencji U2 lub utworzenie dodatkowego wiązania fosfodwuestrowego, całkowicie blokują katalityczne etapy splicingu.

3.2.2 Budowa i charakterystyka promotora genu

Analiza ekspresji genów zajmuje coraz istotniejszą rolę w wyjaśnianiu molekularnych podstaw biologii owadów. Wiedza związana z regulacją transkrypcji stała się nieodzownym elementem w zrozumieniu wielu zagadnień z dziedziny entomologii m.in., oporności na choroby i środki owadobójcze oraz zachowania, ewolucji i rozwoju owadów. Regulacja ekspresji genów odbywa się poprzez fragmenty sekwencji DNA (*cis*-elementy), które kierują odpowiednim ułożeniem białek odpowiedzialnych bezpośrednio za transkrypcję. Elementy regulatorowe mogą być umiejscowione bądź w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca startu transkrypcji (elementy rdzeniowe), bądź w odległych obszarach genu, również poza sekwencją uznawaną za promotor (elementy dalsze). Uważa się, że zmiany w sekwencji elementów regulatorowych odgrywają rolę w stymulacji morfologicznego różnicowania i ewolucji mechanizmów rozwojowych (Tautz, 2000).

3.2.2.1 Elementy regulatorowe promotorów rdzeniowych

Analiza promotorów rdzeniowych daje nam możliwość wglądu w mechanizmy, od których bezpośrednio zależy transkrypcja. Ponadto wszystkie wydarzenia poprzedzające inicjację transkrypcji muszą i tak sprowadzić się do oddziaływania z podstawowym kompleksem transkrypcyjnym łączącym się z promotorem rdzeniowym (Butler i Kadonaga, 2002). Dlatego ten obszar jest ostatecznym celem dla wszystkich elementów regulatorowych zaangażowanych w regulację transkrypcji prowadzonej przez polimerazę RNA II.

Promotor rdzeniowy najczęściej definiuje się jako ciągłą sekwencję DNA, która jest wystarczająca, aby poprowadzić prawidłowo inicjację transkrypcji przez kompleks związany z polimerazą RNA II (Kutach and Kadonaga, 2000; Butler and Kadonaga, 2002). Obejmuje on miejsce startu transkrypcji oraz sekwencje położone około 40 pb powyżej i poniżej. W obszarze tym u *Eucaryota* dotychczas zidentyfikowano sześć charakterystycznych miejsc regulatorowych: kasetę TATA (Goldberg, 1979), element rozpoznawany przez TFIIB (BRE, ang., *TFIIB response element*) (Lagrange i wsp., 1998), inicjator (Inr, ang., *initiator*) (Corden i wsp., 1980; Smale i Baltimore, 1989), DPE (ang., *downstream promoter element*) (Burke i Kadonaga, 1996 i 1997), MTE (ang., *motif ten element*) (Ohler i wsp., 2002; Lim i wsp., 2004) oraz DCE (ang., *downstream core element*) (Lewis i wsp., 2000; Lee i wsp., 2005). Poza BRE i DCE, wszystkie cztery elementy zostały eksperymentalnie znalezione w promotorach genów *D. melanogastera* (Smale and Kadonaga, 2003; Lim i wsp., 2004). Statystyczna analiza sekwencji genów *D. melanogaster* potwierdziła również obecność elementów BRE i DCE u owadów (Gershenzon i wsp., 2006), jednak ich biologiczna funkcja

Smale, 1992; Burke and Kadonaga, 1997; Emami i wsp., 1997; Lagrange i wsp., 1998; Tsai i Sigler, 2000; Zhou i Chiang, 2001; Lee i wsp., 2005).

Analiza statystyczna niedużej grupy promotorów *D. melanogaster*, zawierającej 205 sekwencji wskazała, że kasetta TATA występuje w 42,4%, Inr w 67,3% i DPE w 40% (Kutach i Kadonaga, 2000). Ponadto około 31% promotorów nie zawierało ani kasety TATA, ani DPE. Dzięki późniejszej analizie grupy 1941 promotorów wskazano istnienie nowego elementu – MTE (Ohler i wsp., 2002), który może rekompensować brak obydwu elementów, ponieważ funkcjonuje niezależnie (Lim i wsp., 2004). Pokazano także, że dla prawidłowego funkcjonowania promotorów zawierających Inr oraz MTE istotna jest odległość pomiędzy tymi elementami wynosząca 14 nukleotydów (Lim i wsp., 2004). Podobna sytuacja występuje w promotorach funkcjonujących dzięki DPE i Inr, gdzie również bardzo ważna dla aktywności transkrypcyjnej, jest odległość DPE od miejsca startu transkrypcji i jego oddalenie od Inr, które w tym przypadku wynosi 24 nukleotydy (Kutach i Kadonaga, 2000). Przytoczone przykłady sugerują, że odpowiednie położenie par elementów regulatorowych warunkuje prawidłowe umiejscowienie względem miejsca startu transkrypcji wszystkich elementów maszynarii transkrypcyjnej i rozpoczęcie procesu transkrypcji.

3.2.2.2 Elementy regulatorowe promotora dalszego

Elementy regulatorowe znajdujące się poza obszarem rdzeniowym promotora, w przeciwieństwie do stałej lokalizacji tych pierwszych, mogą być położone w odległości od kilkudziesięciu do kilkuset tysięcy nukleotydów od miejsca startu transkrypcji, zarówno w rejonie 5' jak i 3' genu, w intronach, a nawet na komplementarnej nici DNA (Maniatis i wsp., 1987). Dzieli się je na dwie grupy, elementy wzmacniające i elementy wyciszające. Czynniki wzmacniające poprzez stymulację elementów rdzenia promotora zwiększają podstawowy poziom transkrypcji, natomiast elementy wyciszające najczęściej ograniczają transkrypcję specyficznych genów do poszczególnych grup komórek lub określają czas ich ekspresji. Dotychczas poznanych zostało kilkadziesiąt elementów regulatorowych występujących w obszarach dalszych promotorów owadzych. Większość z tych elementów zawarta jest w bazie danych TRANSFAC[®], obecna wersja 7.0 (źródło, www.gene-regulation.com). Na podstawie badań mutacyjnych dla 29 spośród nich poznane zostały sekwencje konsensusowe (Tabela 2). Dla pozostałych znane są tylko pojedyncze sekwencje występujące w konkretnych promotorach, gdzie dany element został zidentyfikowany. Ponadto istnieje wiele czynników regulatorowych, dla których wciąż nie poznano sekwencji, z którymi one oddziałują. Wśród wymienionych w Tabeli 2 elementów regulatorowych, w kontekście niniejszej pracy, na szczególną uwagę zasługują trzy: Chorion Factor 1/Usp (CF1/Usp), Broad Complex (BR-C)

Tabela 2 Elementy regulatorowe odkryte w promotorach dalszych owadów.

Element regulatorowy	Sekwencja konsensusowa	Białka wiążące (czynniki regulatorowe)	Odnosińniki do sekwencji elementów regulatorowych
CF1 / Usp	GGGGTcacg lub ggGGTCAys	Chorion factor 1	Christianson i wsp., 1992
CF2-II	rTATATrta lub gTATATata	CF2-II	Gogos i wsp., 1992
Sn	ascacCTGTTnca lub raCAGGTgya	Snail	Kasai i wsp., 1992; Mauhin i wsp., 1993
BR-C Z1	wnrtaatarACAARwnw	Broad-Complex Z1	von Kalm i wsp., 1994
BR-C Z2	btntnCTATTntt	Broad-Complex Z2	
BR-C Z3	antaAACTAra	Broad-Complex Z3	
BR-C Z4	wwwRTAAAsawaa	Broad-Complex Z4	
HSE	AGAAN lub agaanntTCTAGaa lub tTCTAGaanagaa lub aGAANagaannttct lub aGAANagaanngaa	Heat Shock Factor	Fernandes i wsp., 1994
Su (H)	anyGTGGGaamc	Suppressor of Hairless	Schweisguth i Posakony, 1992
E74A	aaycCGGAAgtnk	E74A	Thummel i wsp., 1990
Abd-B	snTTTTATggc	Abdominal-B	Celniker i wsp., 1989
Hb	smanAAAAAa	Hunchback	Stanojevic i wsp., 1989
Dfd	attamy	Deformed	Ekker i wsp., 1992
Zeste	wnttGAGTG	Zeste	Benson i Pirrotta, 1988
Croc	wanaaTAAATat	Croc	Haecker i wsp., 1995
Kr	amyGGGTTaw	Krueppel	Stanojevic i wsp., 1989
Elf-1	kwnyGGTTTtgwa	CP2; Elf-1	Dynlacht i wsp., 1989
Hairy	ggCACGCgmc	Hairy	van Doren i wsp., 1994
DI	hgrGAAAncv lub gggttTTTCC	Dorsal	Thisse i wsp., 1991; Pan i Courey, 1992
Ftz	anwgcaATTAAg	Fushi Tarasu	Florence i wsp., 1991
Bcd	sgGATTAA	Bicoid	TRANSFAC®
STAT	tttccsGGAAA	STAT	Yan i wsp., 1996
Adf-1	ccGCYGCygyngccgv	Adf-1	TRANSFAC®
Ttk 69K	ggTCCTGc	Tramtrack 69K	Read i Manley, 1992; Read i wsp., 1990
GCM	acCCGCAt	Glial Cells Missing	Akiyama i wsp., 1996
dTCF	CCTTTgatcaa	TCF-A	van der Wetering i wsp., 1997
Dri	rattaat	Dri	Gregory i wsp., 1996
Ovo	wgtaacng	Ovo-B	Lee i Garfinkel, 2000
mtTFA	kncttatc	mtTFA	Takata i wsp., 2001

Z1-4 oraz E74A, ponieważ wiążą specyficzne czynniki transkrypcyjne, które pojawiają się w organizmie owada w odpowiedzi na 20E i prowadzą odpowiednią regulację transkrypcji innych genów podczas rozwoju i metamorfozy. Funkcja i rola CF1/Usp została szerzej opisana w rozdziale 3.3.2, natomiast białko BR-C omówiono w rozdziale 3.2.3. E74A, o którym wspomniano w rozdziale 3.3.3, jest jedną z dwóch izoform białka kodowanego przez jeden gen *Eip74EF* (ang., *ecdysone induced protein 74EF*) i powstaje w wyniku działania alternatywnych czynników transkrypcyjnych i aktywacji innego promotora niż izoforma E74B. Forma A u *D. melanogaster* pełni także odmienną funkcję mimo, iż oddziałuje przez takie same elementy regulatorowe co forma B (Fletcher i wsp., 1997). Białko E74A funkcjonuje głównie jako aktywator dla kilku genów późnych. Dla swojej pełnej aktywacji, kiedy ilość krążącego 20E zaczyna wzrastać, potrzebuje obecności izoformy B, która pojawia się na początku metamorfozy w odpowiedzi na niski poziom 20E (Fletcher i Thummel, 1995; Fletcher i wsp., 1997). Mutanty *D. melanogaster* nie posiadające funkcjonalnego E74A często przeżywały okres przepoczwarzania natomiast ginęły w późniejszym stadium w przeciwieństwie do mutantów E74B, które nie potrafiły wytworzyć normalnej poczwarki (Fletcher i Thummel, 1995). Świadczy to o tym, że izoforma B swoją funkcję regulatorową prezentuje na wcześniejszym etapie metamorfozy, natomiast izoforma A jest niezbędna do aktywacji genów pojawiających się w późniejszym okresie. Pokazano, że E74A aktywuje m.in. późny gen *L71-6*, który w swoim obszarze promotorowym posiada 4 miejsca silnie wiążące E74A (Urness i Thummel, 1995).

3.3 Wybrane hormony owadzie

Prawidłowe funkcjonowanie oraz rozwój złożonego organizmu wymaga współdziałania wszystkich jego części. Oznacza to, że poszczególne elementy muszą się ze sobą komunikować, aby utrzymać stan homeostazy. Na przestrzeni ewolucji życia na ziemi organizmy wykształciły skomplikowany system przekazywania i odbioru sygnałów pomiędzy komórkami. Funkcję przekaźników w tym układzie pełnią między innymi hormony.

Hormon (gr., *hormaein* - posłaniec; gr., *hormao* - pobudzam, stymuluje), jak sama nazwa wskazuje pełni rolę przekaźnika informacji pomiędzy komórkami, tkankami lub narządami. Może on mieć wpływ na komórki będące w bliskim sąsiedztwie miejsca wydzielania, jak również może być transportowany przez krew lub limfę (kręgowce) albo przez hemolimfę (np. owady) do oddalonych znacznie tkanek docelowych. Hormony są wydzielane zwykle przez wyspecjalizowane komórki, natomiast ich „odbiorcami” może być jeden typ komórek lub wiele ich rodzajów. Dlatego niejednokrotnie sygnały hormonalne jest trudno interpretować ze względu na ich zawiły sposób działania. Jeden rodzaj komórek może mieć kilka receptorów rozpoznających ten sam hormon jednak każdy z receptorów będzie aktywował inny szlak przekazywania sygnału. Z drugiej strony istnieją sytuacje, w których to różne hormony oddziałujące ze swoimi receptorami mogą uruchamiać identyczne szlaki biochemiczne.

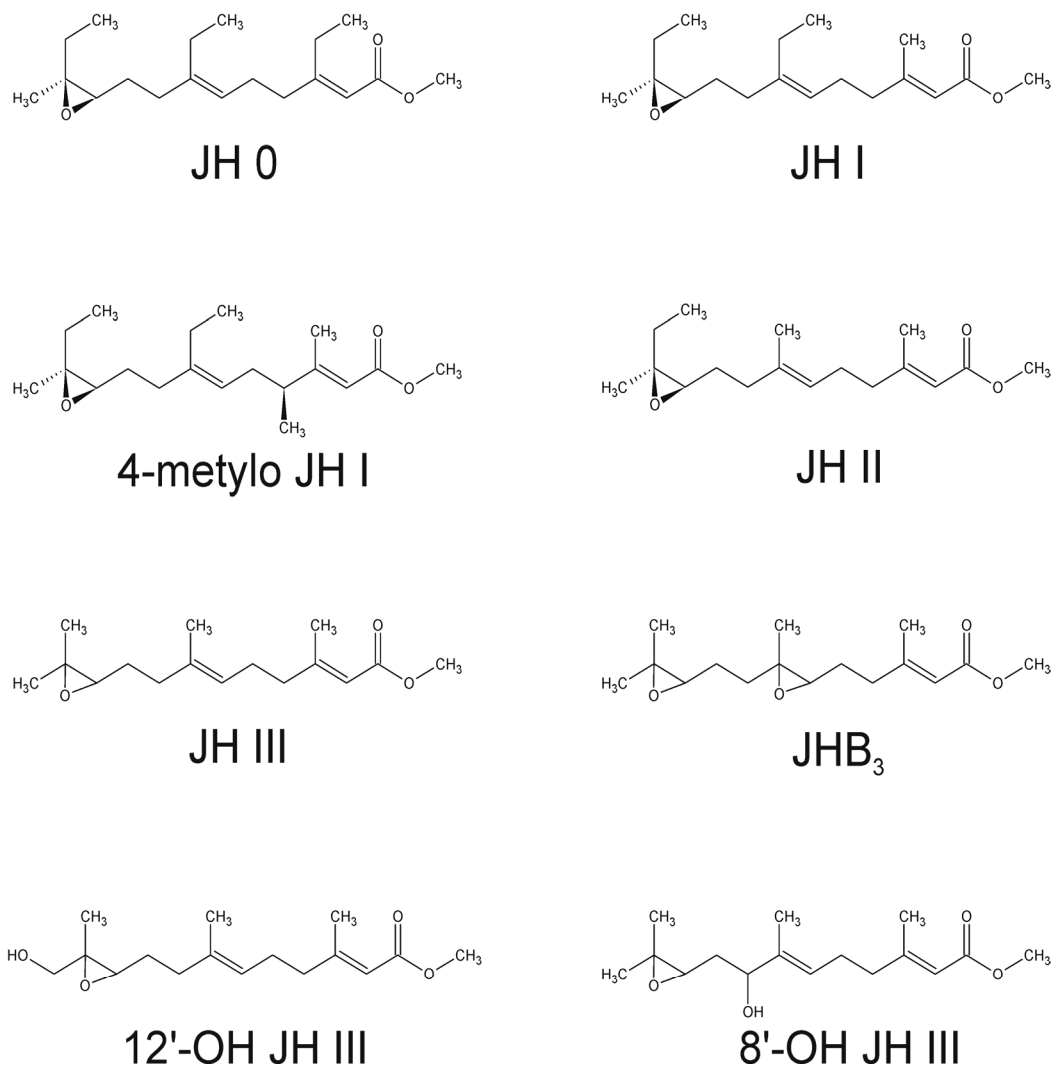
Owadzi system przekazywania sygnałów i komunikacji międzykomórkowej nie jest tak złożony jak u organizmów będących wyżej w ewolucji, ale prawdopodobnie dzięki niemu owadom udało się przetrwać na ziemi ponad 400 milionów lat i skutecznie zasiedlić ją stając się największą grupą istot żyjących. Poznanie tego systemu umożliwiło w wielu przypadkach odkrycie złożonych szlaków przekazywania sygnału u kręgowców. Ponadto jest on także łatwym w manipulacji układem modelowym do badań. Pierwsze wzmianki o czynnikach mózgowych, które wydzielane są najprawdopodobniej do hemolimfy i regulują prawidłowy rozwój owadów pochodzą aż z 1922 roku z pracy Stefana Kopcia (Kopeć, 1922). Badania te rozpoczęły trwające do dziś zmagania naukowców nad poznaniem endokrynologii owadów.

Dwa najważniejsze niskocząsteczkowe hormony u owadów to JH oraz 20E, których charakterystyka i rola w organizmie owadów zostanie omówiona w następnych podrozdziałach.

3.3.1 Charakterystyka i rola hormonu juwenilnego

Pierwszy odkrył istnienie hormonu juwenilnego w 1934 roku Wigglesworth, który pokazał, że usunięcie wewnątrzwydzielniczych gruczołów u *Rhodnius* powoduje przedwczesne przekształcenie do postaci dorosłej (Wigglesworth, 1934). Gruczoły, o których

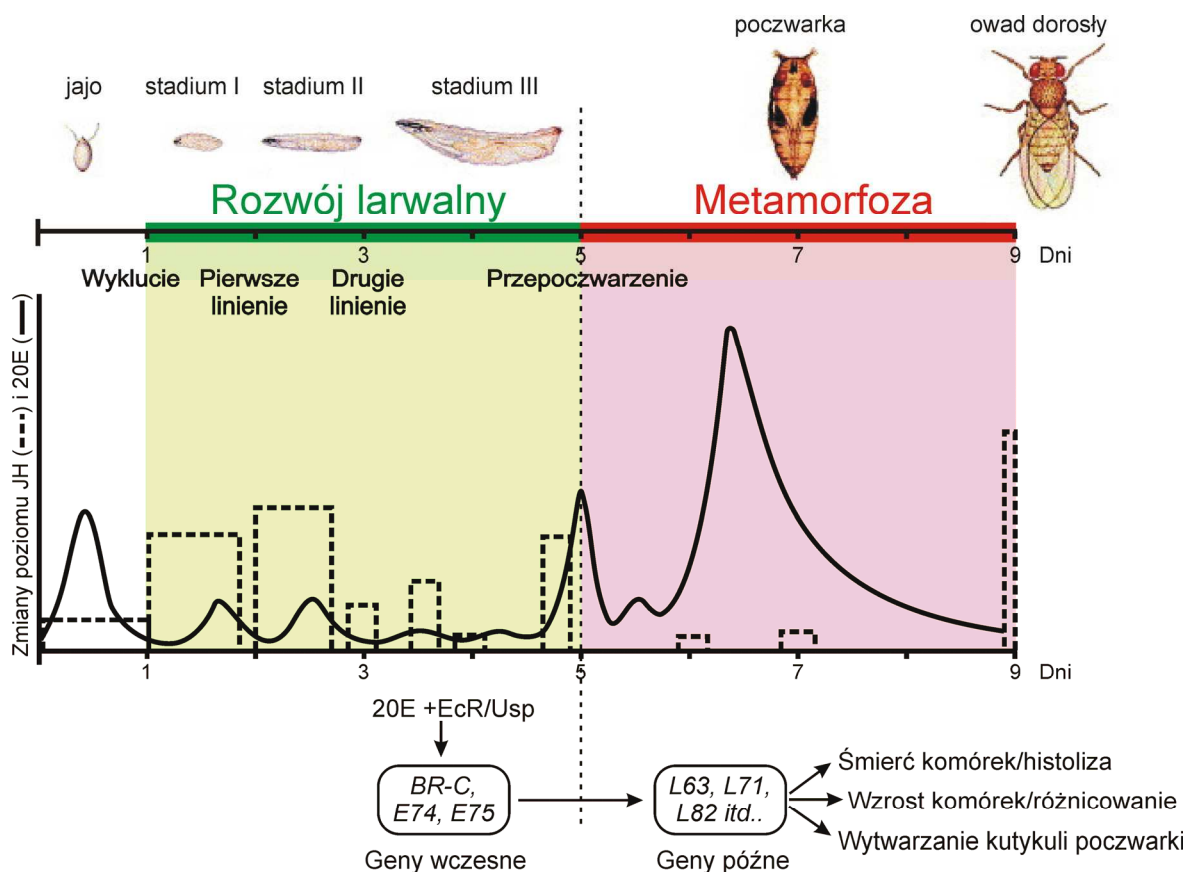
mowa to ciała przyległe (łac., *corpora allata*) będące miejscem syntezy hormonu (Cymborowski, 1984), aczkolwiek stwierdzono, że w szczególnych przypadkach synteza może zachodzić w zawiązkach skrzydeł (Wiśniewski i wsp., 1987). Chemiczna struktura cząsteczki została ustalona przez Roller w 1967 roku (Roller, 1967). Pod pojęciem hormonu juvenilny kryje się grupa związków o budowie seskwiterpenoidowej. Dotychczas opisano osiem homologów JH występujących u owadów (JH 0, I, II, III, JH3 bis epoksyd, 4-metylo-JH, 8'-OH-JH III, 12'-OH-JH III), z których najczęściej występuje forma JH III (Rys. 5). Prawdopodobnie najbardziej uderzającą cechą JH jest jego wszechstronność i uniwersalność. Ma on wpływ na wiele cech fenotypowych, jak i na procesy fizjologiczne oraz procesy związane ze wzrostem i rozwojem owada m.in.: rozwój postaci larwalnych, przyrost dysków



Rys. 5 Struktury hormonów juvenilnych (wg Baker, 1990). Na rysunku przedstawiono osiem homologów JH, które dotychczas opisano u owadów. Najczęściej występującą formą jest JH III.

imaginalnych, metamorfoza, rozwój jajników, dojrzewanie płciowe, produkcja feromonów, zachowanie w czasie godowym, regulacja diapauzy (anabiozy), migracje, zachowanie owadów żyjących w koloniach lub rojach, architektura neuronów, pamięć, uczenie się, funkcje odpornościowe, długość życia i wiele innych, które są słabo albo nie zostały jeszcze poznane (Flatt i wsp., 2005). Aby hormon mógł regulować tak wiele różnych procesów jego synteza, transport oraz czas rozkładu są ściśle regulowane. Na pierwszym etapie produkcji JH, kontrolę sprawują antagonistycznie działające neuropeptydy allatostatyny i allatotropiny (Gilbert i wsp., 2000). Za wiązanie, ochronę przed niespecyficznymi esterazami i transport JH z ciał przyległych do miejsc docelowych w tkankach w dużej mierze odpowiada JHBP (Trowell, 1992). Ponad 99,8% cząsteczek hormonu jest w hemolimfie związanych z tym białkiem (Hidayat i Goodman, 1994). Specyficzną hydrolizę i degradację hormonu przeprowadzają esteraza hormonu juwenilnego (JHE) oraz niespecyficzna epoksyhydrolaza hormonu juwenilnego (JHEH). JHE przeprowadza JH w formę JH-kwas natomiast JHEH przekształca JH do postaci JH-diol.

Spośród wymienionych wyżej funkcji hormonu, szczególnie istotny jest wpływ na rozwój, reprodukcję i metamorfozę u owadów. U *D. melanogaster* JH jest obecny od końca okresu embriogenezy aż do ostatniego stadium larwalnego (Rys. 6). W tym czasie jego poziom decyduje o charakterze linienia (Zhou i Riddiford, 2002). Wysokie stężenie JH powoduje pojawianie się kolejnych stadiów larwalnych (linienie typu larwa-larwa) i zabezpiecza przed przedwczesnym działaniem 20E powodującym różnicowanie w formę poczwarki oraz z poczwarki w formę dorosłą (Riddiford, 1996) (Rys. 6). Przez to, że JH hamuje różnicowanie bez wpływu na wzrost określa się go mianem hormonu „*status quo*”. Pod koniec ostatniego stadium larwalnego zahamowana zostaje syntezy hormonu przez ciała przyległe oraz wzmożona jego hydroliza w hemolimfie i w tkankach (Nijhout, 1994; Riddiford, 1993). W tych warunkach pojawia się PTTH, który stymuluje wydzielanie niewielkich ilości 20E umożliwiających rozpoczęcie ekspresji genów niezbędnych do metamorfozy. Zaobserwowano, że u niektórych *Lepidoptera* i *Coloptera* podanie JH pod koniec okresu larwalnego powoduje linienie i pojawienie się dodatkowego stadium larwalnego (Riddiford i wsp., 2003). Natomiast u *D. melanogaster* egzogenny hormon nie wpływa na transformację larwa-poczwarka (Riddiford i wsp., 2003), ale przedłuża czas rozwoju, zakłóca metamorfozę systemu nerwowego oraz mięśniowego, zaburza także procesy różnicowania odwłoka a nawet hamuje wykluwanie z jaja (Riddiford i Ashburner, 1991; Restifo i Wilson, 1998).



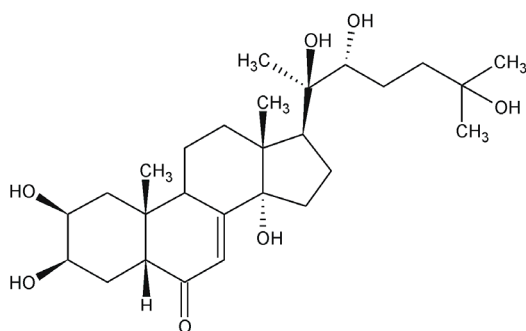
Rys. 6 Poziom JH i 20E podczas rozwoju *Drosophila* (wg Dubrovsky, 2005). Równowaga pomiędzy 20E (linia ciągła) i JH (linia przerywana) determinuje normalny przebieg rozwoju owada pokazany na górze rysunku. Wszystkie kolejne stadia rozwojowe są inicjowane przez 20E. JH wpływa na to jakiego rodzaju przejście zajdzie w danym momencie. I tak, linienie larwalne oraz wzrost zachodzi w obecności wysokiego stężenia JH. Pod koniec okresu larwalnego spadek JH i wzrost 20E sygnalizuje przepoczwarczenie. Ten impuls jest rozprzestrzeniany i inicjuje proces metamorfozy. 20E wiążąc się do funkcjonalnego receptora ekdyteroidowego (EcR/Usp) bezpośrednio aktywuje małą grupę genów wczesnych: *BR-C*, *E74*, *E75* (część dolna rysunku). Produkty białkowe genów wczesnych aktywują znacznie większą grupę genów późnych, która kontroluje rozmaite procesy metamorfozy.

Pomimo dziesiątków lat badań prawdopodobnie wciąż nie znamy wszystkich funkcji fizjologicznych hormonu, a na pewno niewiele wiadomo na temat molekularnych podstaw przekazywania przez JH sygnału. Dotychczas nie udało się jednoznacznie potwierdzić istnienia receptora dla hormonu. Najnowsze badania wysuwają przypuszczenia odnoszące się do dwóch białek: Usp i MET (ang., *methoprene tolerant protein*). Model, w którym Usp miałoby pełnić rolę receptora dla JH opiera się na zdolności wiązania przez receptor hormonu i jego pochodnych, ale z niskim powinowactwem ($K_D \sim 4 \mu\text{M}$) (Jones i Sharp, 1997; Jones i Jones, 2000; Xu i wsp., 2002) podczas gdy stężenie JH w tkankach jest rzędu 20 nM. W eksperymentach *in vivo* pokazano, że JH aktywuje ekspresję genu reporterowego poprzez promotor rdzeniowy oraz element odpowiedzi na hormon pochodzący z genu *jhe* (Xu i wsp.,

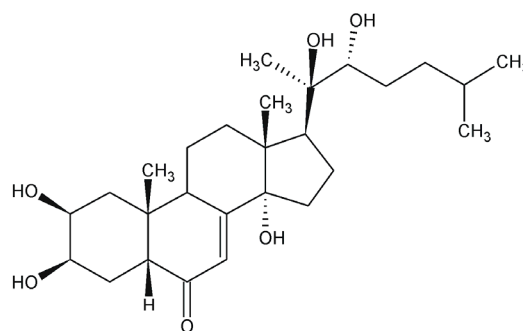
2002). W testach EMSA wykazano, że do tego elementu wiąże się białko Usp z *D. melanogaster*. Dodatkowe doświadczenia kotransfekcji, z Usp typu „dzikiego” nie dały żadnych efektów, natomiast kotransfekcja ze zmutowanym białkiem wywołała hamowanie aktywacji genu reporterowego. Autorzy powyższej pracy twierdzą, że efekt ten jest wywoływany poprzez oddziaływanie kompleksu Usp-JH. Badania krystalograficzne białek Usp z *Diptera* i *Lepidoptera* pokazały, że helisa 12 (H12) odpowiedzialna za zależną od liganda funkcję aktywacyjną receptora jądrowego jest zablokowana i stabilizowana przez pętlę pomiędzy helisą 1 i 3 (Billas i wsp., 2001; Clayton i wsp., 2001). Późniejsze analizy strukturalne i modelowanie na podstawie homologii z receptorem kwasu 9-*cis* retinowego (RXR) dały podstawy, aby sądzić, iż możliwa jest konformacja, w której Usp jest receptorem dla jakiegoś liganda (Sasorith i wsp., 2002). Domena wiążąca ligand (LBD) Usp posiada dużą hydrofobową kieszeń częściowo wypełnioną lipidami, a jej pozostały fragment jest być może miejscem wiązania cząsteczki sygnałowej. Wychodząc z tego założenia podjęto próbę dopasowania do modelu białka cząsteczek hormonów juvenilnych i ich pochodnych oraz kwasu 9-*cis* retinowego. Najlepsze dopasowanie uzyskano dla kwasu 9-*cis* retinowego, metoprenowego i JH-kwasu, ale procent obsadzenia kieszeni wiążącej ligand przez te cząsteczki leży w dolnym zakresie wartości dla klasycznych receptorów jądrowych. Obserwacja ta stawia pod znakiem zapytania słusność twierdzenia, że Usp jest receptorem dla JH. Wyniki *in vitro* wspomniane wyżej dotyczące powinowactwa Usp do JH pozostają w sprzeczności z doświadczeniami *in vivo*, w których wielokrotnie pokazywano, że hormon wywołuje efekty fizjologiczne już w stężeniach nanomolarnych.

3.3.2 Charakterystyka i rola 20-hydroksyekdyzonu

Kolejnym pionierem badającym endokrynologię owadów był Fraenkel, który w 1935 roku odkrył istnienie ekdyzonu. Ekdyzon należy do grupy związków steroidowych określanych mianem ekdysteroidów, posiadających często aktywność biologiczną (Koolman, 1990; Gilbert i wsp., 2002). W przypadku owadów, pajaków i skorupiaków najczęściej aktywnym hormonem jest 20E (Rys. 7). Struktura 20E została określona przez Hoffmeister (1966). Pod kontrolą ekdysteroidów znajduje się wiele biochemicznych i fizjologicznych procesów związanych z linieniem, wzrostem, morfogenezą oraz metamorfozą. W przypadku owadów, hormony te kontrolują takie zachowanie larwy jak przerwanie odżywiania przed przepoczwarceniem czy przedzielenie kokonu. Regulują m.in. proliferację komórek nabłonka, trawienie starej kutykuli i tworzenie oraz twardnienie nowej (Cymborowski, 1984, Koolman, 1990). Wzrost stężenia 20E w hemolimfie pod koniec ostatniego stadium larwalnego u *D. melanogaster* rozpoczyna złożony proces formowania poczwarki (Rys. 6). Tkanki



20-hidroksyekdyzon



Ponasteron A

Rys. 7 Struktury dwóch form ekdyzonu. Na rysunku przedstawiono wzory strukturalne dwóch aktywnych biologicznie form ekdyzonu.

larwalne już we wczesnych stadiach metamorfozy poddawane są histolizie, po czym z dysków imaginalnych różnicują się tkanki postaci dorosłej owada (Cymborowski, 1984, Thummel, 1995).

Już w 1960 roku zaobserwowano, że ekdyzon działa na ekspresję genów, wywołując pojawianie się tzw. „pufów” (ang., *puffs*), w rejonach aktywnych transkrypcyjnie chromosomów politenicznych, w komórkach ślinianek *Chironomus tetans* (Clever i Karlson, 1960). Późniejsze badania pokazały, że wzrost stężenia hormonu powoduje bezpośrednio ekspresję niewielkiego zestawu genów (geny wczesne), których produkty białkowe mają zdolność aktywacji następnych genów, określonych mianem genów późnych (Ashburner i wsp, 1974; Ashburner i Richards, 1976). Doniesienia te przyczyniły się do ostatecznego odkrycia receptora ekdyteroidowego (EcR), kiedy to zaobserwowano wiązanie się znakowanego ponasteronu A (Rys. 7) do frakcji cytozolowej oraz jądrowej komórek *D. melanogaster* (Maroy i wsp, 1978; Yund i wsp, 1978).

Białko EcR znaleziono u wielu gatunków owadów. Stanowi on, jak dotąd, jedyny receptor jądrowy stawonogów, dla którego jednoznacznie potwierdzono istnienie liganda i jednocześnie jedyny znany receptor jądrowy bezkręgowców, którego ligandem jest steryd (Thummel, 1995). EcR wykazuje także zdolność do formowania heterodimerycznego kompleksu z białkiem Usp (Yao i wsp, 1993) będącym ortologiem RXR u bezkręgowców (Oro i wsp, 1990). Stwierdzono, że heterodimeryzacja z Usp ma kluczowe znaczenia dla przekazywania sygnału hormonalnego (Yao i wsp, 1993; Hall i Thummel, 1998) i wykazano ponadto zdolność EcR do heterodimeryzacji z RXR kręgowców (Thomas i wsp, 1993). Mimo, iż najnowsze badania wskazują na istnienie znaczącego oddziaływania pomiędzy EcR i ligandem – 20E, to powinowactwo hormonu do heterokompleksu EcR-Usp

jest ponad 10-krotnie wyższe niż do monomeru EcR, co potwierdza wskazywaną wcześniej istotną rolę heterodimeryzacji tych białek w odpowiedzi na ekdyzon (Grebe i wsp, 2003). U *D. melanogaster*, 20E związany do receptora powoduje aktywację niewielkiej grupy genów: *BR-C*, *E74* i *E75*. Każdy z nich koduje zestaw izoform białek (*BR-C* od Z1 do Z4, *E74A*, *E74B*, *E75A*, *E75B*), które wiążą DNA i są regulatorami transkrypcji (Riddiford i wsp., 2001; Thummel, 2001). Pokazano również wpływ Usp na wiązanie się EcR do naturalnego elementu regulatorowego zależnego od 20E, występującego w obszarze promotorowym genu *hsp 27* (*hsp27* EcRE, ang., *hsp27 ecdysone response element*) (Riddihough i Pelham, 1987). Stwierdzono, że izolowane domeny wiążące DNA (DBD, ang., *DNA binding domain*) białek Usp i EcR tworzą na tym elemencie heterodimer w sposób asymetryczny, tzn. „półmiejsce” 5' jest obsadzone przez Usp, natomiast EcR oddziałuje z półmiejscem 3' (Niedziela-Majka i wsp., 2000).

Białko Usp funkcjonuje również pod nazwą *chorion factor 1* (CF1), która to pojawiła się po stwierdzeniu, że może ono mieć wpływ na formowanie się błony otaczającej zapłodnione komórki jajowe (Oro i wsp, 1992; Ghbeish i McKeown, 2002). Po raz pierwszy gen *usp* sklonowano u *D. melanogaster*. Wykorzystano w tym celu zdolność wiązania się fragmentu receptora do potencjalnego miejsca odpowiedzi na hormon (HRE, ang., *hormone response element*) w obszarze promotora genu *chorion s15* (Shea i wsp., 1990) i duże podobieństwo sekwencji aminokwasowej domeny wiążącej DNA do innych receptorów należących do nadrodziny receptorów jądrowych (Oro i wsp, 1990; Henrich i wsp, 1990). Jak już wspomniano powyżej, Usp jest homologiem białka RXR. To pozwoliło przypuszczać, że podobnie jak RXR jest zdolne do heterodimeryzacji z różnymi receptorami jądrowymi innymi niż EcR, co może być przyczyną różnorodności efektów fizjologicznych wywoływanych przez ekdyzon (Thummel, 1995). Przykładem tego typu oddziaływania jest heterodimeryzacja Usp z receptorem sierocym DHR38 (ang., *Drosophila hormone receptor 38*), będącym homologiem receptora NGFI-B (ang., *nerve growth factor-induced protein B*) występującego u kręgowców (Sutherland i wsp, 1995). Przypuszcza się, że prowadzi ono do oddysocjowania z funkcjonalnego receptora ekdysteroidowego, czyli heterodimeru Usp-EcR, białka EcR i utworzenia heterodimeru Usp-DHR38. Do podobnych oddziaływań polegających na hamowaniu sygnału hormonalnego dochodzi pomiędzy homologami Usp i DHR38 u kręgowców, czyli odpowiednio RXR i NGFI-B (Forman i wsp, 1995; Perlmann i Jansson, 1995). Zaobserwowano, że Usp jest zdolny do heterodimeryzacji na odpowiednich elementach regulatorowych także z receptorem TR, VDR, PPAR i RAR, które są naturalnymi partnerami dla RXR (Yao i wsp, 1992; Khoury Christianson i wsp, 1992). Niektóre z tych interakcji dają efekt w postaci transaktywacji (Hatzivassiliou i wsp, 1997). Biorąc pod uwagę

przytoczone przykłady oddziaływania Usp, wydaje się prawdopodobne, że tak jak RXR, bierze on udział w koordynacji sygnałów hormonalnych, poprzez interakcje z wieloma receptorami jądrowymi.

Dotychczas, pomimo intensywnej badań, nie wskazano jednoznacznie liganda dla białka Usp, co go odróżnia od homologu-RXR, dla którego ligand (kwas 9-*cis* retinowy) jest dobrze znany. Zarówno w rozważaniach teoretycznych, o których wspomniano w rozdziale „Charakterystyka i rola hormonu juvenilnego”, jak i w doniesieniach opartych na testach transkrypcyjnych *in vivo* oraz badaniach bezpośredniego oddziaływania *in vitro* wykazano, że Usp wiąże JH, ale z niskim powinowactwem (Jones i Sharp, 1997; Jones i Jones, 2000; Xu i wsp., 2002).

3.3.3 Wzajemne oddziaływanie i wpływ na rozwój owadów hormonu juvenilnego i 20-hydroksyekdyzonu

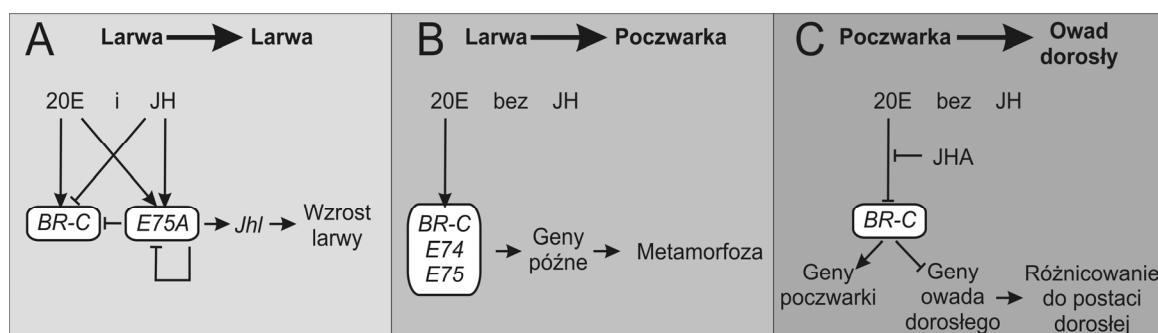
Dotychczas poznano wiele przykładów pokazujących wzajemne, uzupełniające się działanie JH i 20E, chociaż wciąż daleko do wyjaśnienia molekularnych podstaw tego zjawiska. Istnieje kilka przesłanek, które wskazują prawdopodobne miejsca krzyżowania się szlaków przekazywania sygnałów pochodzących od 20E i JH. Mowa tutaj o dwóch genach: *BR-C* oraz *E75A*, które dotychczas były znane jako geny „wczesne” indukowane przez ekdyzon.

Białko BR-C odgrywa istotną rolę w inicjacji oraz w postępowaniu metamorfozy (Mugat i wsp., 2000; Dubrovsky i wsp., 2001; Renault i wsp., 2001; Gonzy i wsp., 2002). Mutanty *D. melanogaster*, całkowicie pozbawione białka BR-C, umierają po przedłużonym trzecim okresie larwalnym, natomiast nie posiadające niektórych izoform BR-C, umierają na etapie poczwarki. Wykazują przy tym nieprawidłowości w morfogenezie dysków imaginalnych, oraz usuwaniu komórek larwalnych różnych narządów (Jiang i wsp., 2000; Brennan i wsp., 2001; Cakouros i wsp., 2002; Gonzy i wsp., 2002; Lee i wsp., 2002; Martin i Baehrecke, 2004). Podobny efekt zaobserwowano u *Bombyx mori* (*Lepidoptera*), gdzie brak białka BR-C powoduje nieprawidłowy przebieg przekształcenia larwy w poczwarkę (Uhlirva i wsp., 2003). Powyższe obserwacje nasuwają wnioski, że BR-C jest niezbędne podczas aktywacji metamorfozy zależnej od 20E ale niekonieczne przy przekształceniach w kolejne stadia larwalne. Ponadto funkcja białka jest zachowana w ewolucji u *Diptera* i *Lepidoptera*. Ciekawe doświadczenia wskazujące wpływ 20E i JH na syntezę BR-C prowadzono również na *M. sexta*. W tym celu wystawiano na działanie ekdyzonu epidermę owadów znajdujących się w ostatnim stadium larwalnym. Obserwowano zmiany świadczące o przygotowaniu do przekształcenia w poczwarkę oraz wysoki poziom ekspresji *BR-C*. Zahamowanie skutków

działania 20E uzyskiwano przez jednoczesną obecność JH w organizmie owadów (Zhou i Riddiford, 2001). Odwrotny efekt występuje podczas indukowanej przez 20E przemiany z poczwarki w formę dorosłą, która zachodzi pod nieobecność BR-C. Wystawienie na działanie JH owadów będących w początkowej fazie przejścia poczwarka-owad dorosły prowadzi do ponownej ekspresji genu *BR-C* i dodatkowego przepoczwarczenia (Rys. 8C). Doświadczenia te wskazują na rolę JH w regulacji ekspresji, zależnego od 20E genu *BR-C* (Zhou i Riddiford, 2002; Riddiford i wsp., 2003).

Drugim genem zależnym od 20E, na którego ekspresję wpływa JH jest *E75A*. W eksperymentach na linii komórkowej S2 pochodzącej z *D. melanogaster* wykazano, że JH, nawet w bardzo małych stężeniach (10 nM) może samodzielnie aktywować ekspresję receptora jądrowego - *E75A* (Dubrovsky i wsp., 2004). Ponadto w obecności JH, nadmierna ilość *E75A* hamuje ekspresję genów „wczesnych” indukowanych poprzez 20E (Rys. 8A). We wcześniejszych pracach prowadzonych na gruczołach przednich *G. mellonella*, czy też na epidermie *M. sexta* pokazano, że hormon wzmacnia indukowaną przez 20E syntezę *E75A* mimo, że samodzielnie nie jest w stanie zainicjować ekspresji tego genu (Riddiford i wsp., 2003).

Zmutowane owady – *D. melanogaster*, pozbawione białka *E75A* w większości przypadków ginęły podczas drugiego stadium larwalnego lub w około 20% przechodziły



Rys. 8 Model oddziaływań regulatorowych między JH i 20E podczas różnych stadiów rozwoju owada (wg. Dubrovsky, 2005). (A) Podczas linienia larwa-larwa równoczesna obecność 20E i JH prowadzi do szybkiego nagromadzenia *E75A*, który ułatwia aktywację drugorzędowych genów indukowanych przez JH (*Jhl*), hamuje swoją własną ekspresję i przyczynia się do hamowania wczesnych genów indukowanych przez 20E (m.in. *BR-C*). Działania te wspierają JH w utrzymaniu *status quo* i linieniu typu larwa-larwa. (B) Pod koniec stadium larwalnego, przy nieobecności JH 20E aktywuje grupę wczesnych genów (*BR-C*, *E74* i *E75*) w ten sposób inicjując metamorfozę. Po aktywacji przez 20E genu *BR-C*, JH nie jest już w stanie zapobiec przepoczwarczeniu. (C) Końcowe różnicowanie do postaci dorosłej pojawia się w obecności wysokiego poziomu 20E, braku JH i aktywności *BR-C*. Lokalne podanie analogu JH (JHA) tuż przed początkiem linienia poczwarka-owad dorosły może powodować ponowną ekspresję *BR-C* i powtórzenie procesu rozwoju poczwarki.

przedwczesną metamorfozę oraz nie wykazywały charakterystycznego wzrostu poziomu 20E przed trzecim linieniem (Bialecki i wsp., 2002). Taki efekt fizjologiczny sugeruje, że nastąpiło przerwanie szlaku komunikacji hormonalnej pochodzącej od JH w wyniku braku ekspresji *E75A*. Konsekwencją tego jest najprawdopodobniej zmniejszenie poziomu hormonu prorakotropowego (PTTH, ang., *prothoracicotropic hormone*), o którym wiadomo, że jest kluczowym hormonem stymulującym wydzielanie ekdysteroidów (Gilbert i wsp., 2002).

Na podstawie licznych badań, z których część przedstawiono wyżej wysunięto hipotezę wzajemnego oddziaływania JH i 20E (Dubrovsky, 2005) (Rys. 8A-C). Autor pracy sugeruje, że podczas przechodzenia w kolejne stadia larwalne duży wzrost poziomu 20E w obecności wysokiego stężenia JH silnie aktywuje ekspresję *E75A*, który pojawia się przed transkryptami innych wczesnych genów (*EcR-B*, *E74A* i *E75B*) (Rys. 8A). Pozostająca na wysokim poziomie ilość JH wraz z białkiem *E75A* skutecznie hamują przedwczesną ekspresję genów odpowiedzialnych za różnicowanie, tym samym utrzymując „*status quo*” owada. Działanie specyficznej JHE powoduje spadek poziomu JH pod koniec ostatniego stadium larwalnego wpływając na zmniejszenie aktywności i wrażliwości na 20E promotora genu *E75A*. Równocześnie pojawiający się niewielki wzrost stężenia 20E umożliwia aktywację genów *EcR-B*, *E74A*, *BR-C* (Sullivan i Thummel, 2003). Pojawienie się białka *BR-C* przesądza już dalszy bieg wydarzeń, w wyniku którego larwa przekształca się w poczwarkę (Rys. 8B).

3.4 Białka wiążące hormon juvenilny w hemolimfie owadów

Dotychczas w hemolimfie około 50 gatunków owadów zaobserwowano białka wiążące JH. Pośród nich jest grupa takich, które mają niskie powinowactwo ($K_D \geq 1,0 \mu\text{M}$) do JH oraz specyficzne, o wysokim powinowactwie ($K_D \leq 1,0 \mu\text{M}$). Pierwszą grupę, dosyć słabo poznaną, stanowią głównie białka o dużej masie cząsteczkowej (~ 600 kDa) transportujące diacyloglicerole, fosfolipidy, cholesterol, węglowodany i karotenoidy oraz lipoproteiny i analogiczne do albumin białka wiążące kwasy tłuszczowe (Goodman, 1990). Do grupy drugiej należą białka owadzie specyficznie wiążące i mające możliwość transportowania JH. Wśród nich znajdują się między innymi wysokocząsteczkowe lipoforyny i heksameryny oraz monomeryczne białka o niskiej masie cząsteczkowej.

Lipoforyny są wielopodjednostkowymi białkami transportującymi lipidy, feromony oraz również - JH, co stwierdzono u wielu gatunków owadów pochodzących z różnych, nawet oddalonych ewolucyjnie rzędów (*Dictyoptera*, *Isoptera*, *Coleoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera*) (Trowell, 1992). W skład cząsteczki wchodzi dwie podjednostki zwane apolipoforyną I i apolipoforyną II o masach odpowiednio, około 220 kD i 70 kDa, oraz lipidy. Większość z poznanych dotychczas lipoforyn najlepiej wiąże JH III. Szczegółowo scharakteryzowana

lipoforyna z *Diptera punctata* składa się z podjednostek o masie 230 kDa i 80 kDa a sumaryczna masa cząsteczki wynosi 680 kDa (King i Tobe, 1988). Badania ze znakowanym (10R) - JH III wskazały, że miejsce wiązania hormonu występuje tylko na apolipoforynie I a stała dysocjacji wynosi 3 nM (King i Tobe, 1988). Podobne właściwości mają lipoforyny pochodzące z *D. melanogaster* (Shemshedini i Wilson, 1988), *Periplaneta americana* (de Kort i Koopmanschap, 1989), *Leucophaea maderae* (Engelmann i Mala, 2000), czy *Blattella germanica* (Sevala i wsp., 1997). Przez większość okresu rozwoju owada ilość lipoforyn zmienia się wraz z ogólnymi wahaniami poziomu stężenia wszystkich białek hemolimfy i utrzymuje się na wysokim poziomie (10 - 40% białek hemolimfy) (King i Tobe, 1988). Daje to duży nadmiar miejsc wiążących JH, co umożliwia ochronę przed degradacją enzymatyczną.

Następną grupę wysokocząsteczkowych białek, mających zdolność specyficznego wiązania i transportu JH stanowią - heksameryny. Jak nazwa wskazuje, złożone są z sześciu podjednostek o masie 70 - 80 kDa. Ich występowanie nie ogranicza się tylko do owadów, ale znajdują się u wielu przedstawicieli stawonogów (Burmester, 2002). Do tej pory jednak udowodniono, że tylko heksameryny występujące u szarańczaków, m.in. *Locusta migratoria* (Koopmanschap i de Kort, 1988; Braun i Wyatt, 1996) oraz *Melanoplus sanguinipes* (Ismail i wsp., 1995), pełnią funkcję transportową dla JH. Najlepiej poznane białko z *L. migratoria* ma podjednostki o masie 74,4 kDa, określonej na podstawie sekwencji cDNA (Braun i Wyatt, 1996) i zawiera około 15% lipidów (Koopmanschap i de Kort, 1988). Stała dysocjacji dla wiązania enancjomeru (10R) - JH III wynosi 1-4 nM, a jedna cząsteczka białka posiada sześć miejsc wiązania dla hormonu (Koopmanschap i de Kort, 1988). Jak wykazały analizy funkcjonalne, w wiązanie JH najprawdopodobniej zaangażowany jest koniec N białka (Braun i Wyatt, 1996).

Najlepiej poznaną i wciąż intensywnie badaną grupą JHBP są monomeryczne białka występujące w hemolimfie owadów, głównie u *Lepidoptera* ale także u *Diptera*. Te pochodzące z *Lepidoptera* charakteryzują się niską masą cząsteczkową (25 - 32 kDa) i pI w granicach 4,5 - 7 (Wing i wsp., 1984; Trowell, 1992), z wyjątkiem hemolimfowego JHBP (hJHBP) z *G. mellonella*, którego pI wynosi 8,2 (Tabela 3) (Ożyhar i Kochman, 1987). Wszystkie zbadane hJHBP posiadają, jak się wydaje, tylko jedno miejsce wiązania hormonu, ale dotychczas nie udało się jednoznacznie ustalić reszt aminokwasowych zaangażowanych w oddziaływanie z JH. Obecnie trwają w naszym laboratorium intensywne prace nad opracowaniem struktury trzeciorzędowej hJHBP i wskazaniem miejsca wiązania JH z wykorzystaniem krystalografii rentgenowskiej. Przedstawiona już została metoda krystalizacji

oraz grupa przestrzenna i podstawowe parametry komórki elementarnej kryształu hJHBP z *G. mellonella* (Kołodziejczyk i wsp., 2003).

Cząsteczki hJHBP zawierają od czterech do sześciu reszt cysteilowych, z których u *M. sexta* (6 reszt) (Park i Goodman, 1993) i *G. mellonella* (4 reszty) (Kołodziejczyk i wsp., 2001) dwie pary tworzą dwa mostki disiarczkowe. Na podstawie badań nad hJHBP z *M. sexta* uważano, że białko to nie jest glikozylowane (Goodman i wsp., 1978). Z kolei opierając się na analizie sekwencji aminokwasowej, wskazano potencjalne miejsca glikozylacji dla hJHBP z *B. mori* (Vermunt i wsp., 2001), *M. sexta* (Touhara i wsp., 1993) i *Heliotis virescens* (Wojtasek i Prestwich, 1995) jednak nie potwierdzono eksperymentalnie istnienia i składu tych łańcuchów cukrowych. Dopiero badania prowadzone nad glikozylacją hJHBP z *G. mellonella* (Duk i wsp., 1996; Dębski i wsp., 2004) pokazały, że białko to jest glikozylowane na reszcie Asn94. Wyniki te sugerowałyby, że mimo braku zachowania miejsc przyłączenia reszt cukrowych pośród *Lepidoptera* to hJHBP jest glikozylowane u wszystkich przedstawicieli tej grupy owadów. Krótco po wynikach tych badań ukazała się informacja, która skorygowała wcześniejsze rezultaty dotyczące hJHBP z *M. sexta*. Pokazano, że także to białko posiada reszty cukrowe, które są przyłączone w pozycji Asn 66 i stanowią około 8% masy cząsteczki (Godmann, <http://plantpath.wisc.edu/~goodman/wgresrch.html>). JHBP jest syntezowane głównie w ciele tłuszczowym owadów, skąd przechodzi do hemolimfy, gdzie spełnia rolę cząsteczki transportującej oraz chroniącej JH przed hydrolizą przez niespecyficzne esterazy (Trowell, 1992; Kochman i Wiczorek, 1994; Gilbert i wsp., 2000). Tak jak wspomniano wyżej, ponad 99,8% cząsteczek hormonu jest w hemolimfie związane z hJHBP (Hidayat i Goodman, 1994) i oddziaływanie to jest specyficzne ze względu na niskie stałe dysocjacji (Tabela 3).

Sekwencje cDNA hJHBP zostały opublikowane dla białek z czterech gatunków owadów: *M. sexta* (Lerro i Prestwich, 1990), *H. virescens* (Wojtasek i Prestwich, 1995), *B. mori* (Vermunt i wsp., 2001) i *G. mellonella* (Rodriguez Parkitna i wsp., 2002). Porównanie struktur pierwszorzędowych tych białek wykazało identyczne położenie 57 reszt aminokwasowych (Rodriguez Parkitna i wsp., 2002). Jak dotychczas pełna sekwencja genu *jhbp* została poznana tylko dla *M. sexta* (Numer dostępu GenBank AF226857) (Orth i wsp., 2003). Obejmuje ona 19 266 pz, na które składa się pięć eksonów i cztery introny, sekwencje nietranslatowane 3' i 5' oraz promotor. Obszar podlegający transkrypcji zajmuje 6,7 kpz, natomiast otwarta ramka odczytu ma 732 pz, które kodują 244 aminokwasy. Dojrzałe białko po odcięciu peptydu sygnałowego obejmuje 226 aminokwasów (Lerro i Prestwich, 1990). W obszarze

Tabela 3 Właściwości hJHBP z *Lepidoptera*.

Gatunek	Stała dysocjacji (nM) ^a	Masa cząsteczkowa (kDa) ^b	Oдношник
<i>Manduca sexta</i>	0,67 - 200 (10R, 11S)-JH 0,74 - 12,5 I (10R, 11S)- 1,86 JH II (JH III)	32 (SDS PAGE) 25,1 (obliczono na podstawie sekwencji cDNA)	(Kramer i wsp., 1976; Wing i wsp., 1984; Peterson, 1985)
<i>Platyrepia virginalis</i>	-	34 (SDS PAGE)	(Prestwich i Atkinson, 1990)
<i>Diatraea grandiosella</i>	100 - 300 (JH I) 80 - 270 (JH II)	29 - 31 (filtracja żelowa)	(Dillwith i wsp., 1985) (Lenz i wsp., 1986)
<i>Galleria mellonella</i>	260 (JH I) 72 (JH II)	32 (SDS PAGE, filtracja żelowa) 25 (ESI - MS)	(Ożyhar i Kochman, 1987) (Duk i wsp., 1996)
<i>Plodia interpunctella</i>	-	25 (filtracja żelowa)	(Ferkovich i wsp., 1975; Ferkovich i wsp., 1977)
<i>Heliotis virescens</i>	610 (JH I)	32 (SDS PAGE) 24,976 (obliczono na podstawie sekwencji cDNA)	(Wing i wsp., 1984) (Wojtasek i Prestwich, 1995)
<i>Trichoplusia ni</i>	650 (JH I)	-	(Wing i wsp., 1984)

^a w nawiasach podano formę JH jaką użyto w badaniach

^b w nawiasach podano metodę jaką posługiwano się w badaniach

promotorowym wskazano niektóre charakterystyczne dla owadów sekwencje regulujące transkrypcję (Orth i wsp., 2003).

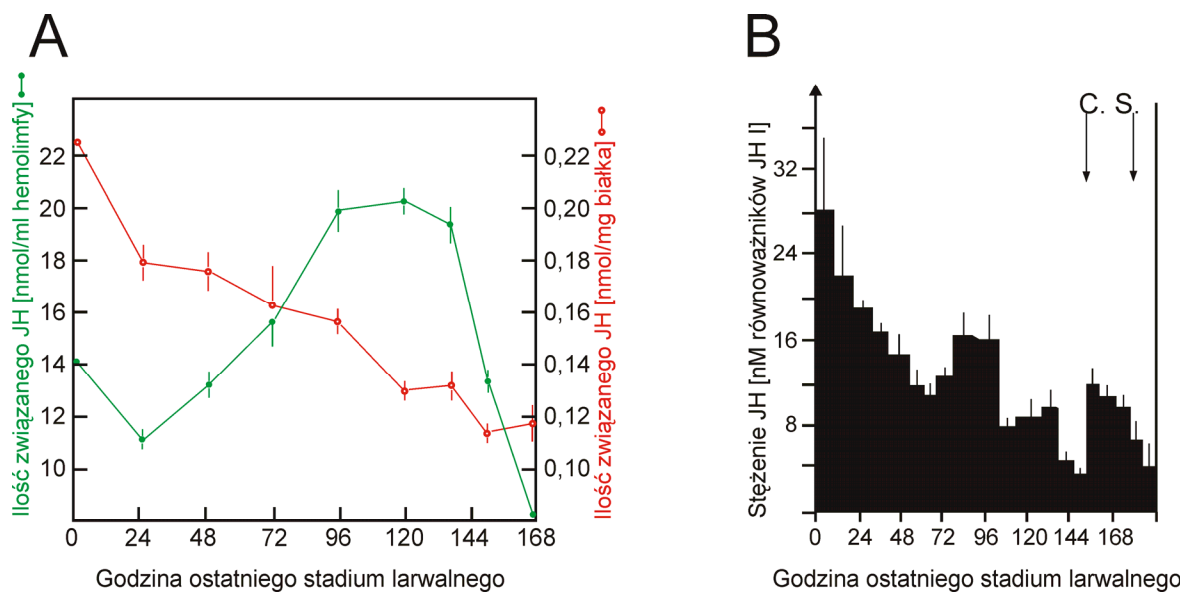
3.5 Charakterystyka hJHBP z *G. mellonella*

Obok hJHBP z *M. sexta*, które zostało jako pierwsze sklonowane i do tej pory jest najlepiej scharakteryzowane, równie dużo danych zostało zgromadzonych o białku z *G. mellonella*.

Dojrzała forma hJHBP jest glikoproteiną składającą się z 225 aminokwasów i powstaje z 245 aminokwasowego prekursora po odcięciu peptydu sygnałowego (Rodriguez Parkitna i wsp., 2002). Natomiast sekwencja cDNA, poznana dotychczas w naszym laboratorium, obejmuje 1063 pz, z czego 735 koduje cząsteczkę białka (Rodriguez Parkitna i wsp., 2002). Dokładna masa cząsteczki wynosi 25 880 kDa (Duk i wsp., 1996). Reszty cukrowe są przyłączone tylko w pozycji Asn94 (Dębski i wsp., 2004). Jak zostało już wcześniej nadmienione, hJHBP z *G. mellonella* wyróżnia się spośród pozostałych pochodzących z *Lepidoptera* wyjątkowo wysokim pI wynoszącym 8,2 (Tabela 3). Z tego powodu nie dziwi

tylko 25% identyczność sekwencji w porównaniu z pozostałymi trzema hJHBP (Rodriguez Parkitna i wsp., 2002). Pomimo tego, niektóre reszty aminokwasowe są dobrze zachowane. Dotyczy to szczególnie reszt cysteilowych oraz aromatycznych (proliłowych, tyrozyłowych i fenyloalanyłowych) (Rodriguez Parkitna, 2001). Również modelowanie struktur drugorzędowych wskazuje, że mimo różnic w sekwencji aminokwasowej, wszystkie poznane dotychczas hJHBP są do siebie podobne i być może przynależą do podrodziny kalicyn - lipokalin (Rodriguez Parkitna i wsp., 2002). Dobrze zachowane w ewolucji reszty cysteilowe tworzą dwa mostki disiarczkowe pomiędzy resztami Cys10 i Cys17 oraz Cys151 i Cys195 (Kołodziejczyk i wsp., 2001). Związanie do hJHBP z *G. mellonella* hormonu powoduje kilka istotnych zmian w jego właściwościach, wpływa m.in. na a) ruchliwości elektroforetyczną, b) widma różnicowe w UV, c) współczynnik sedymentacji, d) oporność na proteolizę (Wieczorek i Kochman, 1991; Krzyżanowska i wsp., 1998). Sugeruje się, że te zmiany konformacyjne mają znaczący wpływ na przekazywanie sygnału hormonalnego pochodzącego od JH (Kochaman i Wieczorek, 1991).

Stężenia hJHBP, podobnie jak JH podczas rozwoju owada nie jest stałe, co może sugerować, że ilość białka ma wpływ na regulację hormonalną pochodzącą od JH oraz *vice versa*, poziom hormonu reguluje ekspresję białka. Na początku ostatniego stadium larwalnego u *G. mellonella* stężenie hJHBP lekko spada, po czym od drugiego dnia wzrasta aż do maksimum przypadającego na czwarty i piąty dzień (Ożyhar i wsp., 1983) (Rys. 9A). W tym samym okresie larwalnym poziom JH osiąga maksimum zaraz na początku pierwszego dnia stadium, po czym szybko spada (Plantevin i wsp., 1984) (Rys. 9B). Niewielki wzrost obserwuje się w dniu trzecim oraz siódmym. Ten ostatni zapowiada przejście w stadium poczwarki. Ponieważ nie ma bezpośredniej korelacji między stężeniem hJHBP a JH, nie jest jasnym, czy hormon bezpośrednio reguluje syntezę hJHBP. Funkcji tej prawdopodobnie także nie można bezpośrednio przypisać ekdyteroidom, gdyż zmiany ich stężenia w hemolimfie (Plantevin i wsp., 1984) są rozbieżne z ekspresją *jhbp*.



Rys. 9 Zmiany stężeń hJHBP (wg Ożyhar i wsp., 1983) i JH (wg Plantevin i wsp., 1984) podczas ostatniego stadium larwalnego. Panel A przedstawia zmiany stężenia hJHBP w funkcji całkowitego stężenia białka (zielony) i objętości hemolimfy (czerwony), poprzedzające przepoczwarczenie. Panel B przedstawia zmiany stężenia JH (czarne kolumny) wyrażone jako nanomolarne stężenia równoważników JH I. Skrót c.s. oznacza przędzenie kokonu.

Jak już wspomniano w poprzednim rozdziale, trwają intensywne prace nad rozwiązaniem struktury trzeciorzędowej hJHBP. Jedyne dla białka z *G. mellonella* opublikowano dane dotyczące krystalizacji oraz opisano grupę przestrzenną i podano parametry komórki elementarnej (Kołodziejczyk i wsp., 2003). Dane dotyczące struktury trzeciorzędowej białka w przyszłości pozwolą zrozumieć podstawy oddziaływania JH z hJHBP. Natomiast wyniki, będące przedmiotem niniejszej rozprawy, opisujące architekturę genu *jhbp* mogą przyczynić się do poznania pochodzenia i ewolucji tego genu, a analiza potencjalnych miejsc regulatorowych do zrozumienia podstaw regulacji jego ekspresji.

4 Cel pracy

Nadrzędnym celem niniejszej pracy było poznanie sekwencji całego genu *jhbp* z *G. mellonella*, ponieważ dotychczas poznano tylko sekwencję białkową oraz sekwencję cDNA. W momencie rozpoczęcia eksperymentów nieznana była żadna sekwencja genu *jhbp* u owadów. Realizacja tego zamierzenia umożliwiła postawienie sobie dalszych zadań badawczych, do których należały:

- Określenie struktury genu *jhbp*, rozmieszczenia w sekwencji obszarów kodujących i niekodujących białka oraz wskazanie miejsca startu transkrypcji.
- Analiza sekwencji genu *jhbp* pod kątem poszukiwania potencjalnych elementów regulatorowych mogących mieć wpływ na ekspresję.
- Wskazanie i zbadanie potencjalnych elementów regulatorowych obecnych w promotorze genu *jhbp* zdolnych do oddziaływania z białkiem Usp.
- Próba klasyfikacji JHBP na podstawie budowy jego genu.

5 Spis własnych publikacji

Publikacje:

1. **Agnieszka J. Sok**, Kamila Czajewska, Andrzej Ożyhar i Marian Kochman (2005). The Structure of the juvenile hormone binding protein gene from *Galleria mellonella*. Biol Chem; Vol. 386, 1-10.
2. **Agnieszka J. Sok**, Grażyna Andruszewska, Anna Niewiadomska-Cimicka, Iwona Grad, Dorota Pajdzik, Grzegorz Rymarczyk, Marek Orłowski, Marcin T. Schmidt, Włodzimierz Grajek, Andrzej Ożyhar i Marian Kochman (2007). Regulatory elements in the juvenile hormone binding protein gene from *Galleria mellonella* – topography of binding sites for Usp and EcRDBD – praca w przygotowaniu.

Doniesienia konferencyjne:

1. Barbara Wysoczańska, Daria Drabczak-Skrzypek, Emilia Jaskuła, **Agnieszka J. Sok**, Anna Młynarczewska, Mariola Sędzimirska, Dorota Dłubek, Andrzej Lange (2007). The presence of TRECs in patients post HSCT is associated with the lower incidence of cGvHD and relapse. 21st Immunogenetics and Histocompatibility Conference, Barcelona, 5-8 maj 2007.
2. Anna Cimicka-Niewiadomska, **Agnieszka J. Sok** i Marian Kochman (2006). Analysis of the *G. mellonella* juvenile hormone binding protein core promoter. 31st FEBS Congress, Istanbuł, Turcja, The FEBS Journal (2006), Vol. 273, Supplement 1.
3. **Agnieszka J. Sok**, Kamila Czajewska, Andrzej Ożyhar i Marian Kochman (2003). Sequencing of juvenile hormone binding protein (*jhbp*) gene from *Galleria mellonella*. XXXIX Zjazd PTBioch, Gdańsk, Acta Bioch Pol (2003), Vol. 50 (Suppl. 1).

6 Materiały i metody

6.1 Materiały

6.1.1 Odczynniki

W poniższej tabeli wymieniono najczęściej wykorzystywane w pracy laboratoryjnej odczynniki.

Odczynnik	Producent
[α - ³² P]DTP	NEN TM Life Science Products, Boston, MA,USA
agar	Invitrogen, Paisley, Wielka Brytania
agaroza	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Niemcy
akrylamid	Roth, Karlsruhe, Niemcy
[γ - ³² P]ATP	NEN TM Life Science Products, Boston, MA,USA
bromek etydyny	Sigma, St Louis, MO, USA
DEPC	Roth, Karlsruhe, Niemcy
DMSO	Sigma, St Louis, MO, USA
dNTP (mieszanina)	MBI Fermentas, Wilno, Litwa
DTT	Sigma, St Louis, MO, USA
EDTA (Plusone)	Amersham Bioscience, Wielka Brytania
EDTA	Sigma, St Louis, MO, USA
ekstrakt drożdży	Gibco; ALAB, Warszawa
endonukleazy restrykcyjne	MBI Fermentas, Wilno, Litwa
fenol	POCH
fosfataza alkaliczna SAP	MBI Fermentas, Wilno, Litwa
glicerol	Sigma, St Louis, MO, USA
hydrolizat kazeiny	Gibco; ALAB, Warszawa
IPTG	Roth, Karlsruhe, Niemcy
karbenicylina	Roth, Karlsruhe, Niemcy
kwask borny (Plusone)	Amersham Bioscience, Wielka Brytania
kwask borny	Roth, Karlsruhe, Niemcy
ligaza DNA faga T4	MBI Fermentas, Wilno, Litwa

Odczynnik	Producent
Miniprep Express Matrix™	QBiogene CA, USA
2-merkaptoetanol	Sigma, St Louis, MO, USA
NaCl	POCH
(NH ₄) ₂ SO ₄	Roth, Karlsruhe, Niemcy
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	Roth, Karlsruhe, Niemcy
N'N'-bismetylenoakrylamid	Sigma, St Louis, MO, USA
polimeraza <i>Taq</i>	MBI Fermentas, Wilno, Litwa
polimeraza <i>Vent</i>	MBI Fermentas, Wilno, Litwa
poli(dI-dC)	Amersham Bioscience, Wielka Brytania
RNaza A	Sigma, St Louis, MO, USA
SDS	Roth, Karlsruhe, Niemcy
TEMED	Amersham Bioscience, Wielka Brytania
TRIS (Plusone)	Amersham Bioscience, Wielka Brytania
TRIS	Roth, Karlsruhe, Niemcy

Do przygotowywania roztworów oraz podczas pracy laboratoryjnej wykorzystywano wodę oczyszczaną w aparacie *Milli-Q Plus* (woda mQ) (Millipore, Niemcy).

6.1.2 Roztwory i podłoża hodowlane

W niniejszym rozdziale wymieniono składy i sposoby przygotowywania roztworów i podłoży hodowlanych używanych w wielu doświadczeniach i technikach. Przepisy zaczerpnięto z Sambrook i Russel (2001). W przypadku, gdy procedura wymagała użycia innych roztworów ich skład został podany w opisie konkretnej procedury.

6.1.2.1 Podstawowe bufony

Bufor TE

10 mM Tris-HCl (pH 7,4)

1 mM EDTA

Bufor TBE (10×stężony)

1 M Tris

833 mM kwas borny

10 mM EDTA

Roztwór sporządzano z odczynników Plusone (Amersham Bioscience).

6.1.2.2 Podłoża hodowlane

Podłoże płynne LB (Luria-Bertani) na 1 litr

ekstrakt drożdżowy	5,0 g
hydrolizat kazeiny	10,0 g
NaCl	10,0 g

Jeśli było to konieczne, pH doprowadzano do wartości 7,5 za pomocą 1 M NaOH.

Stałe podłoże LB

Do 1 litra płynnej pożywki LB dodawano 15 g agaru, po czym sterylizowano ją w autoklawie i wylewano na szalki Petri'ego w ilości około 20 ml.

Podłoże minimalne M-9 na 1 litr

Na ₂ HPO ₄	6,0 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1,0 g
agar	15,0 g

Po autoklawowaniu roztwór schładzano do temperatury 50 °C, po czym dodawano sterylizowany przez filtrację roztwór zawierający:

1M MgSO ₄	2,0 ml
1M CaCl ₂	0,1 ml
20 % (w/v) glukozy	10 ml
1 M tiamina-HCl	1,0 ml

6.1.2.3 Roztwory stosowane do EMSA

Żel poliakrylamidowy do EMSA

5,8% (w/v) akrylamid
0,2% (w/v) bisakrylamid
22,3 mM Tris-boran (pH 8,3)
0,5% EDTA
0,05% (w/v) (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈
0,1% (v/v) TEMED

Bufor do EMSA

10 mM Tris-HCl

150 mM NaCl

5 μ M ZnCl₂

10% v/v glicerol

0,5% mg/ml owoalbumina

0,5 mM DTT (dodawany przed użyciem buforu)

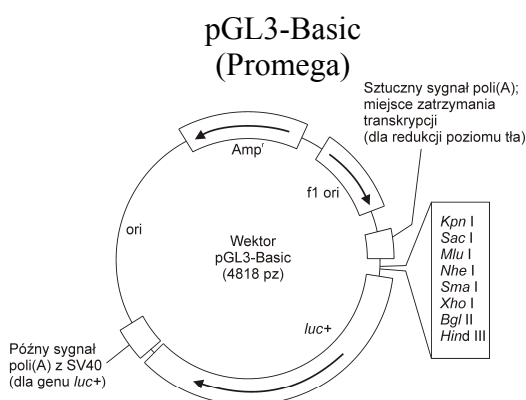
6.1.3 Szczepy bakteryjne

W doświadczeniach wykorzystywano jeden szczep bakterii *Escherichia coli* - NOVA BLUE z firmy Novagen. Używano go do replikacji DNA plazmidowego. Charakterystyka ich genotypu jest następująca:

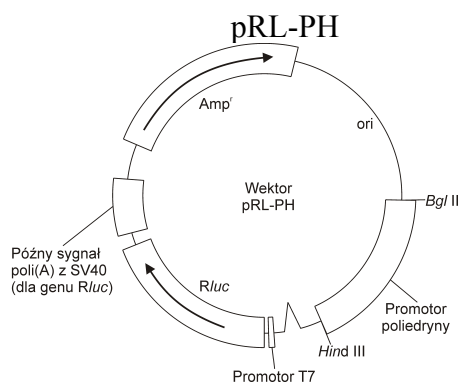
endA1 hsdR17 ($\text{rK12}^- \text{mK12}^+$) *supE44 thi-1 recA1 gyrA96*
relA1 lac[F' *proA*+B+ *lacI*^q Δ M15 ::Tn10(*tet*^R)]

Komórki tego szczepu nadekspresjonują lac represor. Dlatego aktywną β -galaktozydazę można ekspresjonować jedynie po uprzedniej inaktywacji represora lac za pomocą IPTG (Barkeley i Boureois, 1978). Komórki te wykorzystywano przy selekcji klonów metodą α -komplementacji.

6.1.4 Wektory plazmidowe



Wektor używany do testów z genem reporterowym. Zawiera zmodyfikowaną sekwencję kodującą lucyferazę *firefly*. Do wektora klonowano fragmenty promotora *jhbP*, a następnie transfekowano nim komórki owadzie linii High Five (opis linii w rozdziale 6.1.5).



Wektor przygotowano w naszym laboratorium. Jest on zmodyfikowaną formą wektora pRL-TK (Promega), z którego wycięto za pomocą *Bgl*II i *Hind*III sekwencję promotora HSV-TK i wstawiono w tym miejscu fragment promotora poliedryny pochodzący z wektora pFastBac 1. Wektor używano do testów z genem reporterowym jako kontrola wydajności transfekcji. Zawiera sekwencję kodującą lucyferazę *Renilla*

PTZ57R/T (Fermentas)	Wektor używany do klonowania produktów powstałych po PCR. Jest zlinearyzowaną formą plazmidu pTZ57R. Linearyzacji dokonano za pomocą enzymu Eco321 i dodano na obu końcach 3' dodatkowe reszty dideoksytyminy przy wykorzystaniu terminalnej transferazy.
pET-16-b-1 (Novagen)	Wektor używany do sprawdzania wydajności transformacji komórek kompetentnych, opisany przez Koelle i wsp., 1991, zbudowany w oparciu o wektor pET.
pFastBac1™ (Invitrogen)	Wektor standardowo wykorzystywany w systemie Bac-to-Bac® (Invitrogen). Przez nas użyty do pozyskania fragmentu promotora poliedryny, który zamplifikowano w PCR przy użyciu starterów PE_F1 i PE_R2, a następnie wklonowano do wektora PRL-TK w miejsca <i>Bgl</i> II i <i>Hind</i> III.

6.1.5 Charakterystyka linii komórkowej High Five (Invitrogen)

Nazwa linii:	High Five (BTI-Tn-5B1-4)
Organizm:	<i>Trichoplusia ni</i> (owady, Lepidoptera)
Tkanka:	embrionalna (komórki jaj)
Przyczepność:	słaba

Linie tę wykorzystywano do testów transkrypcyjnych z genem reporterowym. Komórki transfekowano odpowiednim konstruktem w wektorze pGL3-Basic i wektorem pRL-PH, który stanowił kontrolę wydajności transfekcji.

6.1.6 Oligonukleotydy

W podrozdziałach przedstawiono wykorzystane podczas pracy oligonukleotydy. Oligonukleotydy przede wszystkim wykorzystywano jako startery w technice PCR do amplifikacji sekwencji promotora i intronów *jhbp* z *G.mellonella* oraz ich sekwencjonowania. Poza tym służyły do konstrukcji sond znakowanych izotopowo do testów EMSA. Kolorem szarym oznaczono fragmenty sekwencji starterów, które nie są komplementarne do matrycy, a pismem pochyłym fragmenty rozpoznawane przez odpowiednie endonukleazy. Położenie oligonukleotydu określa, do jakiego fragmentu genu lub wektora dany odcinek DNA jest komplementarny.

6.1.6.1 Startery do amplifikacji sekwencji promotora *jhbp*

Nazwa	Sekwencja	Opis
WRA 292	CCG AGA GGG CAC ATT GAT ATA TCA C	Zaprojektowany na podstawie sekwencji cDNA JHBP z <i>G. mellonella</i> . Wsteczny, położenie 106-82, $T_m = 63^\circ\text{C}$.
WRA 300	TGT GAT TGA CGG CAA TAT ACT GAG A	Zaprojektowany na podstawie sekwencji cDNA JHBP z <i>G. mellonella</i> . Wsteczny, położenie 36-12, $T_m = 55,4^\circ\text{C}$.
AS 1	GTA AGA CTG ATT GAC TCA CTG ATC AAA G	Zaprojektowany na podstawie sekwencji promotora genu <i>jhbp</i> z <i>G. mellonella</i> amplifikowanej za pomocą starterów WRA 300 i AP 2. Wsteczny, położenie -236(-263), $T_m = 62,2^\circ\text{C}$.
AS 2	GCC TCT TCT AGA TGT ACA TGT AAA TCG	Zaprojektowany na podstawie sekwencji promotora genu <i>jhbp</i> z <i>G. mellonella</i> amplifikowanej za pomocą starterów WRA 300 i AP 2. Wsteczny, położenie -303(-329), $T_m = 63,4^\circ\text{C}$.
AS 3	CAG TAA TCA AAT ACA TGT TGC GCC ACA	Zaprojektowany na podstawie sekwencji promotora genu <i>jhbp</i> z <i>G. mellonella</i> amplifikowanej za pomocą starterów WRA 300 i AP 2. Przedni, położenie -908(-882), $T_m = 61,9^\circ\text{C}$.
AS 4	GGA AGA ATT GCA AGC CTA AGC TTG ACA	Zaprojektowany na podstawie sekwencji promotora genu <i>jhbp</i> z <i>G. mellonella</i> amplifikowanej za pomocą starterów WRA 300 i AP 2. Wsteczny, położenie -1256(-1282), $T_m = 63,4^\circ\text{C}$.

AS 12	GTT TCT GAT GGA ATG TAA TAG TTA GCC	Zaprojektowany na podstawie sekwencji promotora genu <i>jhbp</i> z <i>G. mellonella</i> amplifikowanej za pomocą starterów AS 2 i AP 2. Wsteczny, położenie -1298-(-1324), $T_m = 53,3^\circ\text{C}$.
AS 13	ACA GGG GGT CAA AAG TAC CTA CTG AGT	Zaprojektowany na podstawie sekwencji promotora genu <i>jhbp</i> z <i>G. mellonella</i> amplifikowanej za pomocą starterów AS 2 i AP 2. Przedni, położenie -1058-(-1032), $T_m = 57,8^\circ\text{C}$.
AS 14	CCT TGT ACA TAA AAA CGT CTA CTA GTA C	Zaprojektowany na podstawie sekwencji promotora genu <i>jhbp</i> z <i>G. mellonella</i> amplifikowanej za pomocą starterów AS 2 i AP 2. Wsteczny, położenie -577-(-604), $T_m = 49,3^\circ\text{C}$.
AS 15	CGA TAC AGA TTA CTC TCG TGT AGG TAC	Zaprojektowany na podstawie sekwencji promotora genu <i>jhbp</i> z <i>G. mellonella</i> amplifikowanej za pomocą starterów AS 2 i AP 2. Wsteczny, położenie -720-(-747), $T_m = 52^\circ\text{C}$.
AP 1	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	„Adaptor primer” - starter z zestawu Universal Genome Walker. Komplementarny do sekwencji adaptorowej dodawanej na końcach genomowego DNA. Stosowany do amplifikacji DNA genomowego wraz ze starterem specyficznym, zaprojektowanym do sekwencji genu. $T_m = 59^\circ\text{C}$.
AP 2	ACT ATA GGG CAC GCG TGG T	„Nested adaptor primer” - starter zagnieżdżający z zestawu Universal Genome Walker. Komplementarny do sekwencji adaptorowej dodawanej na końcach genomowego DNA. Stosowany, do amplifikacji matrycy DNA powstałej po reakcji PCR ze starterami AP1 i specyficznym do sekwencji genu. $T_m = 71^\circ\text{C}$.

6.1.6.2 Startery do identyfikacji i amplifikacji sekwencji intronów *jhbp*

Nazwa	Sekwencja	Opis
JR 16	AGT CTC AGT ATA TTG CCG TCA ATC AC	Zaprojektowany na podstawie sekwencji cDNA JHBP z <i>G. mellonella</i> . Przedni, położenie 12-35, $T_m = 54,8^\circ\text{C}$. Zaprojektowany przez dr. inż. J. Rodrigueza.
WRA 296	CAC AAG GCT CTG TCG ATA AGT TGA G	Zaprojektowany na podstawie sekwencji cDNA JHBP z <i>G. mellonella</i> (amplifikacja intronu A). Wsteczny, położenie 4597-4573, $T_m = 63^\circ\text{C}$.
KC 1	TGT ACT AAT CAG TTT TCA CTT TTA GGA G	Zaprojektowany na podstawie sekwencji intronu A z <i>G. mellonella</i> amplifikowanego za pomocą starterów JR 16 i WRA 296. Przedni, położenie 342-369, $T_m = 51,5^\circ\text{C}$. Zaprojektowany przez mgr inż. Kamilę Czajewską.
KC 2	CCG AGG TTT TTC CAA GAG ACT ATT ACA	Zaprojektowany na podstawie sekwencji intronu A z <i>G. mellonella</i> amplifikowanego za pomocą starterów JR 16 i WRA 296. Wsteczny, położenie 4286-4260, $T_m = 57,3^\circ\text{C}$. Zaprojektowany przez mgr inż. Kamilę Czajewską.

Nazwa	Sekwencja	Opis
AS 18	ATA CTT ATC ATC ATC ATT ATA TCA GCC	Zaprojektowany na podstawie sekwencji intronu A z <i>G. mellonella</i> amplifikowanego za pomocą starterów KC 1 i KC 2. Wsteczny, położenie 3754-3728, $T_m = 49,6^\circ\text{C}$.
AS 17	AGT ATA AAT CCA ACT CGG CTG GGC AG	Zaprojektowany na podstawie sekwencji intronu A z <i>G. mellonella</i> amplifikowanego za pomocą starterów KC 1 i KC 2. Przedni, położenie 1134-1159, $T_m = 63,4^\circ\text{C}$.
AS 19	ATG CGG GGT TGC CCC TAG AAA ATG AG	Zaprojektowany na podstawie sekwencji intronu A z <i>G. mellonella</i> amplifikowanego za pomocą starterów KC 1 i KC 2. Wsteczny, położenie 3268-3242, $T_m = 66,3^\circ\text{C}$.
KC 12	GGC TAT GGA GAG AAC TAT GCT TG	Zaprojektowany na podstawie sekwencji intronu A z <i>G. mellonella</i> amplifikowanego za pomocą starterów AS 17 i AS 19. Przedni, położenie 1316-1338, $T_m = 51,9^\circ\text{C}$. Zaprojektowany przez mgr inż. Kamilę Czajewską.
KC 13	TAA TTA CTT TGT ACG CTG ACT GAC CTC	Zaprojektowany na podstawie sekwencji intronu A z <i>G. mellonella</i> amplifikowanego za pomocą starterów AS 17 i AS 19. Wsteczny, położenie 2764-2738, $T_m = 54,5^\circ\text{C}$. Zaprojektowany przez mgr inż. Kamilę Czajewską.
WRA 293	CTC AAC TTA TCG ACA GAG CCT TGT G	Zaprojektowany na podstawie sekwencji cDNA JHBP z <i>G. mellonella</i> (amplifikacja intronu B). Przedni, położenie 4573-4597, $T_m = 63^\circ\text{C}$.
AS 5	GTA GGT TTT TGA TGA CTT AGG CAA TTC	Zaprojektowany na podstawie sekwencji cDNA JHBP z <i>G. mellonella</i> (amplifikacja intronu B). Wsteczny, położenie 7221-7195, $T_m = 55,1^\circ\text{C}$.
KC 3	CGG TAC AAT AAT TTA AAG GTA ACC GGA	Zaprojektowany na podstawie sekwencji intronu B z <i>G. mellonella</i> amplifikowanego za pomocą starterów WRA 293 i AS 5. Przedni, położenie 4747-4773, $T_m = 57,1^\circ\text{C}$. Zaprojektowany przez mgr inż. Kamilę Czajewską.
KC 4	GTG ACC CCA AAC AAT CAA AAA CTA GGC	Zaprojektowany na podstawie sekwencji intronu B z <i>G. mellonella</i> amplifikowanego za pomocą starterów WRA 293 i AS 5. Wsteczny, położenie 7033-7007, $T_m = 60,9^\circ\text{C}$. Zaprojektowany przez mgr inż. Kamilę Czajewską.
AS 20	GTC TAA CGA TAT CTA CAT TAT CTG TC	Zaprojektowany na podstawie sekwencji intronu B z <i>G. mellonella</i> amplifikowanego za pomocą starterów KC 3 i KC 4. Przedni, położenie 5102-5128, $T_m = 45,7^\circ\text{C}$.
AS 22	AAA GTG TAC AAT AAC AGA ATT CTT TCC	Zaprojektowany na podstawie sekwencji intronu B z <i>G. mellonella</i> amplifikowanego za pomocą starterów KC 3 i KC 4. Wsteczny, położenie 6804-6778, $T_m = 51,1^\circ\text{C}$.
AS 21	GCC ACC TCC TAT TAG GTG GAT TTA TC	Zaprojektowany na podstawie sekwencji intronu B z <i>G. mellonella</i> amplifikowanego za pomocą starterów KC 3 i KC 4. Przedni, położenie 5586-5611, $T_m = 56,6^\circ\text{C}$.
AS 23	CTA AAC AGC GGA CTG ACT TTT TAA TGC	Zaprojektowany na podstawie sekwencji intronu B z <i>G. mellonella</i> . Przedni, położenie 6413-6439, $T_m = 57,9^\circ\text{C}$.

Nazwa	Sekwencja	Opis
KC 9	CTA TTT TCA GTA TTA TTT TTG GCT G	Zaprojektowany na podstawie sekwencji cDNA JHBP z <i>G. mellonella</i> . Przedni, położenie 7033-7057, $T_m = 49,2^\circ\text{C}$. Zaprojektowany przez mgr inż. Kamilę Czajewską.
AS 16	TCA TCA AAA ACC TAC ACA GGA GAA GTC	Zaprojektowany na podstawie sekwencji cDNA JHBP z <i>G. mellonella</i> (amplifikacja intronu C). Przedni, położenie 7207-7233, $T_m = 56,1^\circ\text{C}$.
AS 8	CTT CAC GCT ATA ACT ATA AGC AGC TCC	Zaprojektowany na podstawie sekwencji cDNA JHBP z <i>G. mellonella</i> (amplifikacja intronu C). Wsteczny, położenie 8379-8353, $T_m = 55,7^\circ\text{C}$.
KC 5	GCC TCA TTG TTT TAT ACC AAT ACG	Zaprojektowany na podstawie sekwencji intronu C z <i>G. mellonella</i> amplifikowanego za pomocą starterów AS 16 i AS 8. Przedni, położenie 7619-7642, $T_m = 51,9^\circ\text{C}$. Zaprojektowany przez mgr inż. Kamilę Czajewską.
KC 6	ATC ACG ATG GGC TAA CTG ACC TG	Zaprojektowany na podstawie sekwencji intronu C z <i>G. mellonella</i> amplifikowanego za pomocą starterów AS 16 i AS 8. Wsteczny, położenie 8094-8072, $T_m = 52,6^\circ\text{C}$. Zaprojektowany przez mgr inż. Kamilę Czajewską.
KC 10	ATA GAG TAA GTT ATA TCT GTC AAG	Zaprojektowany na podstawie sekwencji intronu C z <i>G. mellonella</i> . Przedni, położenie 7281-7304, $T_m = 39,3^\circ\text{C}$. Zaprojektowany przez mgr inż. Kamilę Czajewską.
KC 11	AAA TAT TGC ATA TCT GTA ATT ACA GG	Położenie 8317-8342, $T_m = 48,6^\circ\text{C}$. Zaprojektowany przez mgr inż. Kamilę Czajewską.
JR 18	GTT ATA GCG TGA AGA CTG ATG ATG ATA AAG	Zaprojektowany na podstawie sekwencji cDNA JHBP z <i>G. mellonella</i> . Przedni, położenie 8366-8392, $T_m = 52,3^\circ\text{C}$. Zaprojektowany przez dr inż. J. Rodrigueza.
AS 10	CCT CCG TTA GTT GTT TAC CAT ATC CCG	Zaprojektowany na podstawie sekwencji cDNA JHBP z <i>G. mellonella</i> (amplifikacja intronu D). Wsteczny, położenie 9402-9376, $T_m = 60,8^\circ\text{C}$.
JR 21	CCG AAG CTT TTA AAC ATT TTT GAA GTA TGC ACT C	Zaprojektowany na podstawie sekwencji cDNA JHBP z <i>G. mellonella</i> . Wsteczny, położenie 9515-9490, $T_m = 64,4^\circ\text{C}$. Zaprojektowany przez dr inż. J. Rodrigueza.
KC 7	CAT ATG TGA ACC ACG TGA ACG T	Zaprojektowany na podstawie sekwencji intronu D z <i>G. mellonella</i> amplifikowanego za pomocą starterów JR 18 i AS 10. Przedni, położenie 8750-8771, $T_m = 52,4^\circ\text{C}$. Zaprojektowany przez mgr inż. Kamilę Czajewską.
KC 8	GTC AGT CAG TCA GTT TGT TTG TC	Zaprojektowany na podstawie sekwencji intronu D z <i>G. mellonella</i> amplifikowanego za pomocą starterów JR 18 i AS 10. Wsteczny, położenie 9093-9071, $T_m = 48^\circ\text{C}$. Zaprojektowany przez mgr inż. Kamilę Czajewską.
JR 13	CCG GAA TTC TAG AAT GCA TAA GCA AAG	Zaprojektowany na podstawie sekwencji cDNA JHBP z <i>G. mellonella</i> . Przedni, położenie 4610-4627, $T_m = 48^\circ\text{C}$. Zaprojektowany przez dr inż. J. Rodrigueza.

Nazwa	Sekwencja	Opis
JR 19	CCA AAT ATT TCG CAA GAA ACC GTT TCT G	Zaprojektowany na podstawie sekwencji cDNA JHBP z <i>G. mellonella</i> . Wsteczny, położenie 8417-8444, $T_m = 56^\circ\text{C}$. Zaprojektowany przez dr inż. J. Rodrigueza
JR 20	CCG GAA TTC AGT AAA CTC AAC TTA TCG ACA GA	Zaprojektowany na podstawie sekwencji cDNA JHBP z <i>G. mellonella</i> . Przedni, położenie 4567-4589, $T_m = 62^\circ\text{C}$. Zaprojektowany przez dr inż. J. Rodrigueza

6.1.6.3 Oligonukleotydy wykorzystywane w eksperymentach EMSA

W eksperymentach EMSA wykorzystywano dwuniciowe, znakowane ^{32}P sondy DNA ale dla przejrzystości w niniejszym rozdziale zostaną podane tylko sekwencje jednej nici, odpowiadającej w danym genie nici kodującej.

Nazwa	Sekwencja	Opis
WRA 111	AGC GAC AAG GGT TCA ATG CAC TTG TCC AAT GA	Oligonukleotyd zaprojektowany na podstawie sekwencji promotora <i>hsp27</i> z <i>D. melanogaster</i> , zawiera element oddziałujący z receptorem ekdyteroidowym. Wykorzystany do utworzenia dwuniciowej, znakowanej sondy do testów EMSA. Przedni, $T_m = 63^\circ\text{C}$.
IG 1 (sonda I)	AGT TAC AGG GGG TCA AAA GTA CCT ACT GAG TA	Oligonukleotyd zaprojektowany na podstawie sekwencji promotora <i>jhbp</i> z <i>G. mellonella</i> . Wykorzystany do utworzenia dwuniciowej, znakowanej sondy do testów EMSA. Przedni, położenie -1062-(-1031), $T_m = 60,2^\circ\text{C}$.
IG 3 (sonda II)	GAA TTG GTA GGG TCA CTA CCA TAA CTC CTG AT	Oligonukleotyd zaprojektowany na podstawie sekwencji promotora <i>jhbp</i> z <i>G. mellonella</i> . Wykorzystany do utworzenia dwuniciowej, znakowanej sondy do testów EMSA. Przedni, położenie -969-(-938), $T_m = 61,8^\circ\text{C}$.
IG 5 (sonda III)	GGC TGA AAA TGG TCA CTG ATA ATT CTT TTG CA	Oligonukleotyd zaprojektowany na podstawie sekwencji promotora <i>jhbp</i> z <i>G. mellonella</i> . Wykorzystany do utworzenia dwuniciowej, znakowanej sondy do testów EMSA. Przedni, położenie -484-(-453), $T_m = 65,4^\circ\text{C}$.

6.1.6.4 Startery do amplifikacja fragmentów promotora do testów z genem reporterowym

Nazwa	Sekwencja	Opis
FT 1066F	CGC GGT ACC AAG TTA CAG GGG GTC AAA AG	Zaprojektowany na podstawie sekwencji genu <i>jhbp</i> z <i>G. mellonella</i> do amplifikacji fragmentu promotora z miejscem restrykcyjnym <i>KpnI</i> . Przedni, położenie -1062-(-1043), $T_m = 68^\circ\text{C}$.

Nazwa	Sekwencja	Opis
FT 442F	CGC GGT ACC ATC AAC AAA CTG TTC AAC TAT C	Zaprojektowany na podstawie sekwencji genu <i>ihbp</i> z <i>G. mellonella</i> do amplifikacji fragmentu promotora z miejscem restrykcyjnym <i>KpnI</i> . Przedni, położenie -440-(-439), $T_m = 65^\circ\text{C}$.
FT 39F	CGC GGT ACC ATG TTC ATA TAT AAA TTT GAG AG	Zaprojektowany na podstawie sekwencji genu <i>ihbp</i> z <i>G. mellonella</i> do amplifikacji fragmentu promotora z miejscem restrykcyjnym <i>KpnI</i> . Przedni, położenie -39-(-16), $T_m = 62^\circ\text{C}$. Zaprojektowany przez mgr inż. Annę Niewiadomską-Cimicką.
FT 51R	GCG CAA GCT TGT GGT ATC CAC CTG TGT G	Zaprojektowany na podstawie sekwencji genu <i>ihbp</i> z <i>G. mellonella</i> do amplifikacji fragmentu promotora z miejscem restrykcyjnym <i>HindIII</i> . Wsteczny, położenie 33-52, $T_m = 68^\circ\text{C}$. Zaprojektowany przez mgr inż. Annę Niewiadomską-Cimicką.
PE_F1	CGC AGA TCT ATC ATG GAG ATA ATT AAA ATG ATA AC	Zaprojektowany na podstawie sekwencji wektora pFastBac 1 do amplifikacji fragmentu promotora poliedryny z miejscem restrykcyjnym <i>BglII</i> . Przedni, $T_m = 61^\circ\text{C}$.
PE_R2	GCG CAA GCT TCG CGC CCG ATG GTG GGA C	Zaprojektowany na podstawie sekwencji wektora pFastBac 1 do amplifikacji fragmentu promotora poliedryny z miejscem restrykcyjnym <i>HindIII</i> . Wsteczny, $T_m = 79^\circ\text{C}$.

6.1.6.5 Startery do reakcji sekwencjonowania

Nazwa	Sekwencja	Opis
Uniwersalny	CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT	Starter, znakowany Cy5 na końcu 5', używany do sekwencjonowania wektorów z rodziny pUC (pTZ57R). Przedni, $T_m = 62,8^\circ\text{C}$.
Wsteczny	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Starter, znakowany Cy5 na końcu 5', używany do sekwencjonowania wektorów z rodziny pUC (pTZ57R). Wsteczny, $T_m = 36,2^\circ\text{C}$.

6.2 Metody

6.2.1 Hodowla owadów

Hodowla *G. mellonella* była prowadzona według przepisu Sehnal'a (Sehnal i Meyer, 1968).

6.2.2 Oznaczanie stężenia DNA i RNA

Stężenie DNA oraz RNA oznaczano przez pomiar absorbancji przy 260 nm (Warburg i Christian, 1942) (cytowane za (Sambrook i wsp., 1989)). Rozcieńczenia dobierano w ten sposób, aby odczytana wartość absorbancji mieściła się w zakresie od 0,1 do 1. Stężenia obliczano następująco:

dla DNA: wartość absorbancji x rozcieńczenie x 0,05 (mg/ml),

dla RNA: wartość absorbancji x rozcieńczenie x 0,04 (mg/ml).

Jeżeli dodatkowo szacowano stopień zanieczyszczenia kwasu nukleinowego białkami wykonywano pomiar absorbancji przy 280 nm. Próbkę uważano za odpowiedniej jakości, jeżeli stosunek A_{260}/A_{280} wynosił:

dla DNA: $1,6 < A_{260}/A_{280} < 1,9$,

dla RNA $1,65 < A_{260}/A_{280} < 2,0$.

6.2.3 Izolacja genomowego DNA

Procedura, pierwotnie opisana przez Blin i Stanford (1976) opiera się na izolacji DNA w obecności rybonukleazy A, proteinazy K i fenolu, dzięki którym denaturuje się i usuwa białka oraz RNA. Do izolacji wybrano larwy z różnych stadiów i zważono (2,5 g). Następnie umieszczono w mózdzierzu i zalano ciekłym azotem. Sproszkowano owady przez ucieranie. Dalszą procedurę izolacji DNA genomowego o dużej masie cząsteczkowej i wysokiej czystości prowadzono w oparciu o metodę opisaną przez Sambrook i Russell (2001). W pierwszym etapie przeprowadza się lizę komórek przy pomocy SDS oraz równocześnie trawienie RNA przez rybonukleazę A używając buforu do lizy.

Bufor do lizy

10 mM Tris-HCl pH 8,0

100 mM EDTA pH 8,0

20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ rybonukleaza A (dodano tuż przed użyciem buforu)

0,5% (w/v) SDS

Proszek otrzymany z owadów homogenizowano w 25 ml buforu do lizy i umieszczono na 1 godzinę w 37°C, w celu hydrolizy RNA. Następnie dodano 125 μl proteinazy K o stężeniu 20 mg/ml i inkubowano przez 3 godziny w temp. 50°C. Po zakończeniu proteolizy zawiesinę schłodzono do temperatury pokojowej i dodano równą objętość równoważonego z buforem fenolu.

Fenol równoważony

Około 100 ml stałego fenolu rozpuszczono w 100 ml 0,5 M Tris-HCl pH 8,0. Wytrząsano i odstawiono aż do momentu rozdzielenia się faz. Następnie zlewano fazę wodną i dodawano świeżą porcję buforu Tris-HCl. Czynność tę powtarzano dopóki pH zlewanego buforu nie wynosiło około 7.

Hydrolizat wraz z fenolem delikatnie mieszano przez 10 minut a następnie wirowano przez 15 minut przy 5000xg w celu rozdzielania faz. Usuwano fenol i do pozostałej fazy wodnej dodawano świeżą porcję fenolu. Ekstrakcję powtarzano jeszcze 3 razy. Do zebranej fazy wodnej (12,5 ml) dodano 0,2 objętości octanu amonu 10 M oraz 2 objętości etanolu 96 %. Wytrącające się DNA delikatnie, aby nie porozrywać nici, nawijano na pipetę Pasteura i przeniesiono do czystej probówki. Z pozostałego roztworu odzyskano DNA poprzez wirowanie przez 15 minut przy 5000xg w 4°C. Uzyskane DNA przemywano dwukrotnie w 20 ml 70 % etanolu i wirowano jak poprzednio. Osad DNA zawieszano w 4 ml TE inkubując przez 24 godziny w temp. 4°C. Po tym czasie widać było w roztworze „kłaczkę” (nierozpuszczone DNA), więc wstawiono próbki do wytrząsarki w temp. pokojowej (500 obr/min). Następnie odwirowano resztki niezawieszonego DNA przez 10 minut przy 7000xg w temp. pokojowej. Zebrano supernatant i oszacowano czystość wyizolowanego DNA na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych (współczynnik A_{260}/A_{280} , patrz rozdział 6.2.2) (Sambrook i wsp., 1989). Długość uzyskanego DNA genomowego szacowano na podstawie elektroforezy w żelu agarozowym.

6.2.4 Izolacja całkowitego RNA

Całkowite RNA było pozyskiwane z ciała tłuszczowego larw będących w 3 dniu 7 stadium larwalnego. Do izolacji RNA z tkanki wykorzystano zmodyfikowaną procedurę opisaną pierwotnie przez Chomczyński i Sacchi (Chomczyński i Sacchi, 1987; Chomczyński, 1994). Metoda ta polega na trwałym unieczynnieniu rybonukleaz za pomocą roztworu zawierającego tiocyjanian guanidyny, N-laurylo sarkozyne, β -merkaptoetanol, a następnie usunięciu białek oraz DNA poprzez ekstrakcję fenolem.

Przy izolacji i pracy z RNA zwracano szczególną uwagę, aby unikać kontaktu preparatów RNA z rybonukleazami. W tym celu szkło i narzędzia metalowe wygrzewano w temperaturze 300°C przez 4 godziny. Pipety, narzędzia plastikowe oraz komorę do elektroforezy dokładnie myto wodą z detergentem, suszono etanolem i moczo no przez noc w 3% (v/v) roztworze H_2O_2 . Następnie przepłukiwano wodą traktowaną DEPC (opis przygotowania poniżej). Końcówki do pipet automatycznych oraz probówki plastikowe brano wprost ze świeżo otwartych opakowań, nie dotykając ich bezpośrednio rękoma. Podczas pracy z RNA unikano przeniesienia rybonukleaz z dłoni poprzez noszenie lateksowych rękawiczek. Stół laboratoryjny myto stężonym etanolem, a następnie 3% (v/v) roztworem H_2O_2 .

Skład używanych roztworów

Woda traktowana DEPC

Do dejonizowanej wody dodawano DEPC aby końcowe stężenie wynosiło 0,1% (v/v). Następnie roztwór wytrząsano przez około 12 godzin i wygrzewano w temperaturze 100°C przez minimum 3 godziny.

Roztwór denaturujący

12,5 g tiocyjanian guanidyny

0,13 g N-sarkozyl sodu

0,80 ml 0,75M cytrynian sodu pH 7.0

Powyższe składniki dodano do 15,95 ml wody mQ i rozpuszczono przy użyciu mieszadła magnetycznego w temperaturze około 60°C. Roztwór przechowywano w temperaturze pokojowej chroniąc go przed światłem. Przed każdym użyciem roztworu denaturującego dodawano do niego β -merkaptotanol w ilości 0,18 ml na każde 25 ml roztworu.

Podczas preparacji wyizolowaną tkankę (~100 mg) od razu umieszczano na lodzie w 1 ml roztworu przygotowanego z roztworu denaturującego, fenolu oraz octanu sodu o pH 4.0 w proporcjach 10:10:1. Całość homogenizowano przez około 30 sekund. 1 ml homogenatu przeniesiono do czystej próbki, dodano 200 μ l chloroformu i dobrze wymieszano. Roztwór następnie wirowano przy 17 000xg przez 30 minut w temperaturze 4°C aby dobrze rozdzielić powstałe dwie fazy. Fazę wodną (górną) delikatnie zebrano, tak aby nie naruszyć interfazy, i przeniesiono po 250 μ l do nowych probówek. Do każdej z probówek dodano 250 μ l chloroformu, dobrze wymieszano i ponownie wirowano w takich samych warunkach jak wcześniej. Po zebraniu około 150 μ l fazy wodnej dodano po 450 μ l bezwodnego etanolu do każdej próbki. Roztwory pozostawiono na 20 godzin w temperaturze -20°C w celu precypitacji RNA. Następnie wirowano je przy 18 000xg przez 30 minut w temperaturze 4°C. Supernatant odrzucono i do osadu dodano po 1 ml 70% etanolu, który przygotowano w wodzie traktowanej DEPC. Próbkę wirowano przy 18 000xg przez 30 minut w temperaturze 25°C. Potem zebrano dokładnie supernatant i suszono przez około 10 minut. Osad zawieszono przez pipetowanie w 80 μ l wody traktowanej DEPC. Próbkę podzielono na 4 porcje po 20 μ l każda i szybko zamrożono do -80°C. Stężenie szacowano spektrofotometrycznie przez pomiar absorbancji przy 260 nm (patrz rozdział 6.2.2).

6.2.5 Reakcja łańcuchowa polimerazy (wg Saiki i wsp., 1985)

Metodą PCR posługiwano się do amplifikacji DNA genomowego, DNA plazmidowego oraz do syntezy drugiej nici cDNA w metodzie 5'-RACE. PCR prowadzono w aparacie TGradient z pokrywą grzejącą (Biometra) w probówkach o pojemności 0,2 ml. Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła zawsze 50 μ l.

W reakcjach, gdzie matrycą było DNA genomowe stosowano głównie mieszaninę polimeraz Advantage Genomic Polymerase Mix (Clontech) w ilości pięciu jednostek na reakcję. Składa się ona głównie z termostabilnej polimerazy *Tth* i dodatku polimerazy o aktywności korekcyjnej 3'→5' oraz przeciwciał TthStart™, dzięki którym omija się etap tzw. "gorącego startu" (ang., *hot start*). Mieszanina reakcyjna zawierała poza tym 40 mM Tris-HCl, 15 mM KOAc, 0,02% Triton X-100, 1,1 mM Mg(OAc)₂ oraz 0,2 mM każdego z dNTP. Końcowe stężenie starterów wynosiło 0,2 μ M.

Przy amplifikacji DNA plazmidowego i w pozostałych przypadkach, o ile nie napisano inaczej, stosowano polimerazę DyNAzyme EXT (Finnzymes) w ilości jednej jednostki na reakcję. Polimeraza EXT składa się głównie z termostabilnej polimerazy *Tbr* i niewielkiego dodatku polimerazy *Pfu*, która posiada aktywność korekcyjną 3'→5'. Mieszanina reakcyjna zawierała poza tym 50 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 15 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Triton X-100 oraz 0,2 mM każdego z dNTP. Końcowe stężenie starterów wynosiło 0,2 μ M.

Szczegółowy opis programów i ewentualnych odstępstw od standardowej procedury zawarto w poszczególnych rozdziałach wyników (7.1.2, 7.1.3).

6.2.6 Klonowanie produktów po PCR

Powstałe po PCR produkty klonowano do wektora lub bezpośrednio poddawano sekwencjonowaniu, przy użyciu techniki sekwencjonowania wykorzystującej znakowane dideoksynukleotydy (6.2.10.1). Umieszczenie fragmentu DNA w wektorze miało za zadanie przygotować konstrukt do sekwencjonowania, bądź do eksperymentów z genem reporterowym. Przy klonowaniu konstruktów do sekwencjonowania używano zestawu odczynników InsT/Aclone (MBI Fermentas), który wykorzystuje aktywność terminalnej transferazy niektórych polimeraz DNA. Aktywność ta powoduje dodawanie dodatkowych reszt adenyłowych na końcach 3' powstałego podczas PCR produktu. Wektor pTZ57R używany do klonowania, który wchodzi w skład zestawu, jest przecięty i ma dodane na końcach 5' reszty tymidylowe, co zwiększa prawdopodobieństwo połączenia z produktem PCR. Procedurę ligacji przeprowadzano zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta do zestawu. W przypadku tworzenia konstruktów do testów z genem reporterowym klonowanie

polegało na wygenerowaniu przez endonukleazy restrykcyjne tzw. „lepkich końców” zarówno we fragmencie insertu jak i w wektorze, a następnie ich ligację.

6.2.7 Kontrola poprawności klonowania

W celu zweryfikowania, czy podczas klonowania do wektora został wprowadzony insert albo czy jest on prawidłowej długości i w odpowiedniej orientacji stosowano dwie metody. Metoda α -komplementacji umożliwia tylko identyfikację insertu w wektorze, natomiast prowadzenie mini-hodowli a następnie izolacja i analiza restrykcyjna (mini-preparacja) umożliwia zarówno sprawdzenie istnienia insertu jak i kontrolę jego długości i poprawności klonowania.

6.2.7.1 Selekcja klonów metodą α -komplementacji

Metoda α -komplementacji (Ullmann i wsp., 1967) polega na powstaniu aktywnej formy β -galaktozydazy z *E. coli* z dwóch fragmentów nieaktywnych. Szczep bakterii Nova Blue (6.1.3), używany do namnażania plazmidów, zawiera zmodyfikowany gen β -galaktozydazy, który nie ma fragmentu sekwencji od strony 5' końca, przez co koduje niepełne (nieaktywne) białko (fragment akceptorowy, fragment ω). Natomiast wektor wykorzystywany do testów α -komplementacji (m.in. pTZ57R (6.1.4)) zawiera w obszarze MCS fragment genu, który koduje początek białka (fragment donorowy, fragment α). W wyniku połączenia fragmentu akceptorowego z donorem powstaje aktywny enzym β -galaktozydazy.

Aby przeprowadzić test na płytce do hodowli z podłożem stałym rozprowadzano 100 μ l 2% (w/v) X-Gal w dimetyloformamidzie i 9 μ l 0,5 M IPTG. Kolonie bakterii wyhodowane na tak przygotowanych płytkach miały barwę białą, jeżeli wprowadzony plazmid zawierał insert lub barwę niebieską, jeżeli w wektorze nie było insertu, a tym samym sekwencja kodująca fragment donorowy β -galaktozydazy nie została przerwana.

6.2.7.2 Selekcja klonów poprzez mini-preparację

W celu wyselekcjonowaniu spośród kolonii transformowanych bakterii tych, które zawierają właściwy insert wybierano z płytki przypadkowo 5-10 kolonii bakterii i zakładano z nich mini-hodowle płynne (5 ml podłoża płynnego). Po całonocnej hodowli plazmidowe DNA izolowano wykorzystując technikę alkalicznej lizy komórek bakteryjnych i za pomocą odczynnika Miniprep Express Matrix™ (QBiogene), który wiąże plazmidowe DNA (6.2.9.1). Tak otrzymane DNA plazmidowe poddawano cięciu za pomocą odpowiednich endonukleaz

restrykcyjnych. Próbkę po reakcji poddawano elektroforezie w żelu agarozowym z bromkiem etydyny i na podstawie widocznych prążków określano, które klonów zawierają fragment DNA o właściwej długości.

6.2.8 Izolacja i oczyszczanie DNA z żelu agarozowego

Fragmety DNA genomowego lub plazmidowego amplifikowane poprzez PCR rozdzielano elektroforetycznie w żelu agarozowym. Następnie odpowiednie prążki wycinano i izolowano DNA z żelu przy pomocy zestawu odczynników Gel-Out (A&A Biotechnology). Metoda oczyszczania opiera się na zdolności wiązania DNA do złoż krzemionkowych w wysokich stężeniach soli chaotropowych.

6.2.9 Izolacja plazmidowego DNA z komórek bakteryjnych

Izolacje plazmidowego DNA prowadzono w różnej skali i różnymi metodami w zależności od potrzeb i dostępności odczynników. W większości przypadków izolację prowadzono za pomocą gotowych zestawów odczynników. Wszystkie wykorzystywane podczas pracy metody izolacji opisano szczegółowo w poniższych podrozdziałach.

6.2.9.1 Izolacja plazmidowego DNA z mini-hodowli

Podczas eksperymentów selekcji klonów zawierających odpowiednie inserty stosowano metodę izolacji plazmidowego DNA z wykorzystaniem lizy alkalicznej i odczynnika - Miniprep Express Matrix™ (QBiogene). Procedura została oparta na instrukcji załączonej do powyższego odczynnika.

Stosowane roztwory

<i>Roztwór 1</i>	<i>Roztwór 2</i>	<i>Roztwór 3</i>
50 mM glukoza	(przygotowywany na świeżo)	3 M octan sodu pH 5,2
25 mM Tris-HCl pH 8,0	0,2 M NaOH	(pH doprowadzono do 5,2 za
10 mM EDTA	1% SDS	pomocą kwasu octowego)

Z płynnej hodowli bakterii o objętości około 5 ml pobierano 1,5 ml i odwirowywano przez 4 minuty przy 7000 obr/min. Osad zawieszano przez pipetowanie w 100 µl roztworu 1 schłodzonego do temp. 4°C. Następnie dodawano 200 µl roztworu 2 i mieszano delikatnie przez obracanie probówek. Inkubowano w temp. 4°C przez 3 minuty i dodawano 150 µl roztworu 3. Po ponownym delikatnym wymieszaniu roztwór wirowano przez 5 minut przy

14 000 obr/min. Delikatnie zbierano supernatant i przenoszono go do czystej probówki a następnie dodawano 400 µl Miniprep Express Matrix™ (QBiogene). Roztwór dokładnie mieszano, aby DNA plazmidowe związało się z matrycą. Próbkę zwirowywano 5–10 sekund i odrzucano supernatant. Pozostały osad zawieszano w 500 µl 80% etanolu i ponownie zwirowywano a supernatant odrzucano. Po usunięciu resztek etanolu próbki suszono około 10 minut. Wyszuszony osad zawieszano w 20 µl wody mQ, zwirowywano i supernatant przenoszono do czystej probówki. Osad ponownie zawieszano w 20 µl świeżej porcji wody mQ i tak jak poprzednio zwirowywano a supernatant łączono z uzyskanym wcześniej. Z preparacji uzyskuje się 1–5 µg plazmidowego DNA.

6.2.9.2 Izolacja plazmidowego DNA do sekwencjonowania

W przypadkach, gdy plazmidowe DNA wykorzystywano tylko w celu poznania sekwencji, izolację prowadzono za pomocą zestawu NucleoSpin® (Macherey-Nagel). Zestaw ten umożliwia uzyskanie do 40 µg DNA o czystości odpowiadającej wymogom sekwencjonowania. Procedurę izolacji prowadzono zgodnie z załączoną do zestawu instrukcją. Podczas izolacji wykorzystuje się zmodyfikowaną lizę alkaliczną/SDS w obecności rybonukleazy A w celu przygotowania warunków, w których plazmidowe DNA wiąże się do silikonowej membrany umieszczonej w kolumnkach.

6.2.9.3 Izolacja plazmidowego DNA z hodowli

W przypadkach, gdy eksperymenty wymagały pozyskania większej ilości plazmidowego DNA (np. do transfekcji), izolację prowadzono w większej skali za pomocą zestawów NucleoBond PC 100® oraz NucleoBond PC 500® (Macherey-Nagel). Z preparacji uzyskiwano odpowiednio około 200 µg oraz 500 µg plazmidowego DNA. Izolację prowadzono zgodnie z załączoną do zestawu instrukcją. Podczas procedury wykorzystuje się zmodyfikowaną lizę alkaliczną/SDS w obecności rybonukleazy A w celu przygotowania komórek bakteryjnych do oczyszczenia plazmidowego DNA. Zarówno chromosomalne, jak i plazmidowe DNA zostaje zdenaturowane w warunkach lizy. Do powstałego lizatu dodaje się octanu potasu, który powoduje precypitację chromosomalnego DNA białek i innych składników komórki oraz neutralizację roztworu, nie powodując przy tym wytrącenia plazmidowego DNA. Po oddzieleniu precypitatu pozostały roztwór nakłada się na kolumnę, która wypełniona jest żywicą (anionit). Umożliwia to związanie ujemnie naładowanych reszt fosforanowych szkieletu DNA do dodatnio naładowanych grup funkcyjnych na kuleczkach krzemionkowych, które wchodzi w skład żywicy. Z kolumny DNA jest wmywane buforem

o podwyższonym pH i obniżonej zawartości soli a następnie wytrącane izopropanolem. Osad DNA przepłukuje się etanolem, suszy a następnie zawiesza w buforze TE.

6.2.10 Sekwencjonowanie DNA

W celu poznania sekwencji DNA posługiwano się dwoma procedurami, które opierają się na metodzie dideoksy (Sanger i wsp., 1977). W jednej z nich wykorzystuje się znakowane fluorescencyjnie barwnikiem Cy5 startery a w drugiej znakowane, również Cy5 dideoksynukleotydy. Cykliczne sekwencjonowanie, z wykorzystaniem znakowanych starterów, stosowano do fragmentów genomowego DNA wklonowanych wcześniej do wektora (pTZ57R). Sekwencjonowanie z wykorzystaniem znakowanych dideoksynukleotydów stosowano bezpośrednio do produktów po PCR, wyłącznie w celu poznania sekwencji DNA genomowego. Szczegóły postępowania oraz używane zestawy odczynników są opisane w poniższych dwóch podrozdziałach. W obydwu przypadkach elektroforezę przeprowadzano w aparacie AlfExpress™ a wyniki analizowano przy pomocy programu AlfWin Software 2.0 (Amersham Bioscience).

6.2.10.1 Sekwencjonowanie DNA z wykorzystaniem znakowanych starterów

Przy sekwencjonowaniu DNA tą metodą korzystano z zestawu odczynników CycleReader™ Auto DNA Sequencing Kit (MBI Fermentas). Startery Universal i Reversed, znakowane Cy5 (6.1.6.5) używano w ilości 2 pmol na reakcję. Matrycą do sekwencjonowania było DNA plazmidowe w ilości od 400 do 800 ng przygotowane przy użyciu zestawów Nucleospin® (Macherey-Nagel) (6.2.9.2) lub NucleoBond PC100/PC500® (Macherey-Nage) (6.2.9.3).

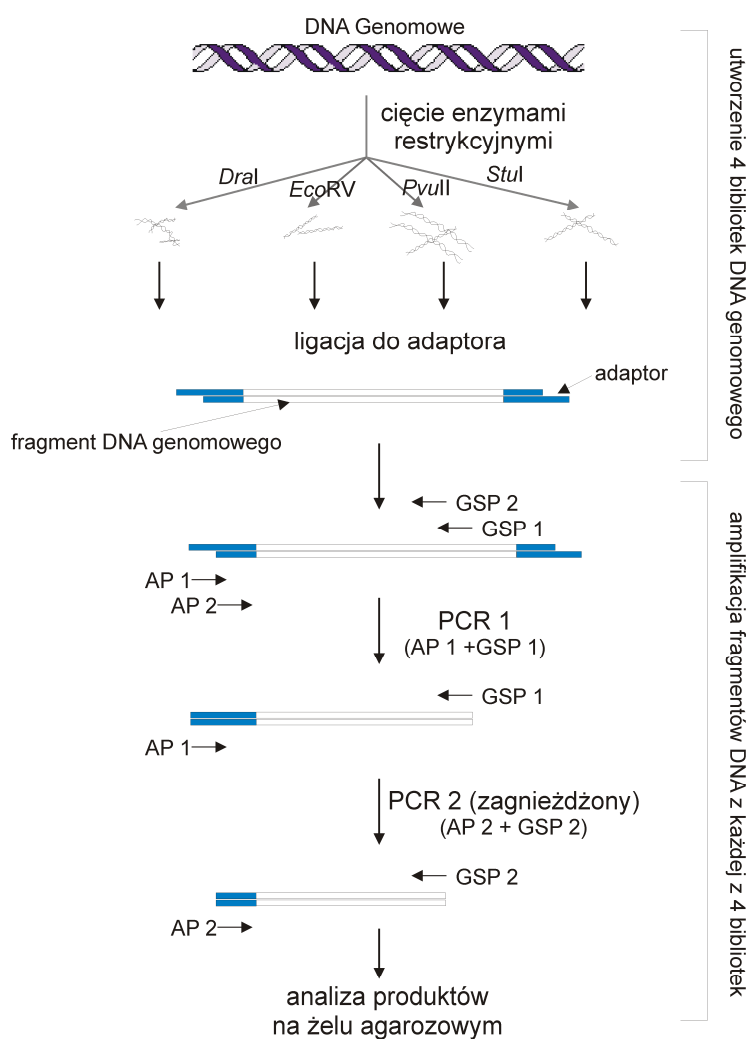
6.2.10.2 Sekwencjonowanie DNA z wykorzystaniem znakowanych dideoksynukleotydów

Przy sekwencjonowaniu DNA metodą ze znakowanymi dideoksynukleotydami korzystano z zestawu odczynników Thermo Sequenase™ Cy5 Dye Terminator Sequencing Kit (Amersham Bioscience). Jako starterów używano oligonukleotydów, za pomocą których wcześniej amplifikowano dany fragment genomowego DNA metodą PCR. Do pojedynczej reakcji brano 4 pmol startera. Matrycę do sekwencjonowania stanowił, amplifikowany w PCR, fragment DNA genomowego, który rozdzielano w żelu agarozowym, wycinano a następnie oczyszczano. Ilość używanego DNA szacowano na podstawie wyniku elektroforezy.

W tym celu widoczne na zdjęciu żelu elektroforetycznego prążki analizowano za pomocą programu AIDA. Umożliwia on obliczenie ilości DNA poprzez porównanie intensywności zabarwienia badanego prążka z prążkami markera, dla których masy DNA są znane. Wielkość ta wahała się w granicach od 100 do 400 ng DNA na reakcję. Wyniki sekwencjonowania analizowano stosując dodatkową nakładkę na program AlfWin Software 2.0 (Amersham Bioscience), która umożliwia prawidłowy odczyt wyników elektroforezy.

6.2.11 Amplifikacja sekwencji promotora metodą *Genome Walking*

Metoda *Genome Walking* oparta jest o reakcję PCR a polega na poznawaniu sekwencji niekodujących krok po kroku, przesuując się w kierunku 5' genu. W eksperymentach wykorzystywano zestaw Universal Genome Walker Kit (Clontech). Najpierw skonstruowano



Rys. 10 Schemat procedury amplifikacji fragmentów promotora. Najpierw utworzono cztery biblioteki DNA genomowego, a następnie wykorzystywano je jako matryce do PCR. Na schemacie oznaczono startery specyficzne do sekwencji genu jako GSP 1 oraz GSP 2, natomiast startery skierowane do adaptora to AP1 oraz AP 2.

cztery biblioteki genomowego DNA poprzez trawienie odpowiednim enzymem restrykcyjnym z zestawu (*Dra*I, *Eco*RV, *Pvu*II i *Stu*I) (Rys. 10). Enzymy te pozostawiają tzw. „tępe” końce, do których w kolejnym etapie doświadczenia liguje się fragmenty DNA adaptorowego (dostarczone z zestawem). W ten sposób przygotowane pule genomowego DNA stanowiły matryce do pierwszego PCR. Do amplifikacji wykorzystano specyficzny do sekwencji genu starter wsteczny (GSP1), który był skierowany do znanego fragmentu cDNA oraz starter przedni, który był komplementarny do dołączonej sekwencji adaptorowej (AP1, dostarczony z zestawem). Mieszaninę po pierwszym PCR rozcieńczono 1:50 i użyto jako matrycy w drugim PCR (zagnieżdżonym) ze starterami GSP2 i AP2. Uzyskane produkty amplifikacji analizowano na żelu agarozowym. Wybrane prążki wycięto i izolowano z nich DNA a następnie ligowano do wektora pTZ57R. Plazmidowe DNA namnożono w bakteriach a następnie oczyszczono i poddano sekwencjonowaniu. Po poznaniu nowego fragmentu sekwencji w kierunku 5' genu projektowano kolejną parę wstecznych starterów specyficznych i procedurę amplifikacji rozpoczynano od początku.

6.2.12 Identyfikacja miejsca startu transkrypcji

W celu określenia pierwszego nukleotydu, który poddawany jest transkrypcji w sekwencji genomowej, posłużono się metodą 5'RACE (ang., *Rapid Amplification of cDNA Ends*). Reakcje przeprowadzono wykorzystując jako matrycę całkowite RNA wyizolowane z ciała tłuszczowego larw oraz zestaw odczynników 5'RACE Kit (Roche) i 2 specyficzne startery komplementarne do sekwencji cDNA *jhbp*. Na pierwszym etapie doświadczenia przeprowadzono syntezę nici cDNA na matrycy RNA. W tym celu wzięto około 1,6 µg całkowitego RNA, starter komplementarny do pierwszego eksonu - WRA 294 (6.1.6.2) oraz odwrotną transkryptazę AMV i dodatkowe odczynniki zawarte w zestawie. Następnie do pierwszej nici cDNA dołączono dodatkowe dideoksynukleotydy adenylowe za pomocą terminalnej transferazy. Drugą nić cDNA syntezowano przez PCR używając jako matrycy pierwszej nici cDNA, drugiego specyficznego startera – WRA 296 (4.1.6.2) oraz startera oligo-dT, który jest komplementarny do dodanego “ogona poliA”. Warunki reakcji były następujące: 7 cykli 25 s w 94°C, 30 s w 51°C, 40 s w 67°C, następnie 31 cykli 25 s w 94°C, 60 s w 69°C i końcowa elongacja przez 5 minut w 69°C. Produkt po PCR został wklonowany do wektora pTZ57R/T (MBI Fermentas) i poddany sekwencjonowaniu.

6.2.13 Testy z genem reporterowym

Wszystkie czynności związane z hodowlą, transfekcją i odczytem wyników testów *in vivo* przeprowadzono we współpracy z dr Marcinem Schmidtem z Akademi Rolniczej w Poznaniu.

6.2.13.1 Hodowla komórek linii HighFive

Hodowlę prowadzono w plastikowych butelkach lub na 12-dołkowych płytkach (Corning) w inkubatorze w temperaturze 27°C. Skład pożywki do hodowli był następujący:

TMN-FH Insect Medium (Sigma)

2mM glutamina (Sigma)

10% surowica cielęca (Invitrogen)

50 µg/ml gentamycyna (Sigma)

0,035% (w/v) Na₂CO₂

W zależności od potrzeb eksperymentu, hodowano i pasażowano komórki aż do uzyskania odpowiedniej ich liczebności. Hodowle te prowadzono w 50 ml butelkach. Aby przygotować komórki do transfekcji, zawiesinę hodowlaną rozkładano na płytki 12-dołkowe, dając po $2 \cdot 10^5$ komórek na dołek. Transfekcję przeprowadzano po 24 godzinach inkubacji płytek w temp. 27°C. Przy transfekcji używano pożywki bez surowicy i antybiotyku.

6.2.13.2 Transfekcja komórek i odczyt aktywności lucyferazy

Transfekcji typu przejściowego dokonywano przy użyciu odczynnika TfxTM-20 (Promega), zalecanego przez producenta do komórek owadzych. Odczynnik ten tworzy struktury liposomowe, dzięki którym DNA plazmidowe jest przenoszone do komórki. Do reakcji transfekcji dodawano mieszaniny plazmidów, badanego oraz kontrolnego - pRL-PH, w stosunku molowym 10:1 i odczynnika TfxTM-20 w ilości 3µl na 1µg DNA. Na każdy dołek przypadało 2 µg DNA plazmidowego. Transfekcję prowadzono przez godzinę inkubując komórki w temp. 27°C na pożywce bez surowicy i antybiotyku. Po transfekcji dodawano pożywki zawierającej surowicę oraz antybiotyk i prowadzono hodowlę przez 48 godzin w temp. 27°C. Po tym czasie komórki zbierano z płytek, poddawano lizie i badano aktywność lucyferazy przy użyciu zestawu Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Luminescencję odczytywano na aparacie LUMAC Biocounter M1500. Przy obliczeniach, aktywność lucyferazy *firefly* (konstrukty w wektorze pGL3) normalizowano w odniesieniu do aktywności lucyferazy *Renilla* (wektor pRL-PH) w każdej studzience.

6.3 Programy komputerowe i bazy danych

Pierwsza analiza sekwencji genu *jhbp* pod kątem poszukiwania sekwencji regulatorowych przeprowadzona została za pomocą programów PatSearch i MatInspector (www.gene-regulation.com). Późniejsze analizy zostały wykonane przy wykorzystaniu narzędzi Patch™ i Match™, które są ulepszonymi odpowiednikami wymienionych powyżej programów. Obecnie wykorzystują one jako źródło danych o elementach regulatorowych bazę TRANSFAC 6.0. Przy wyszukiwaniu potencjalnych elementów regulatorowych w sekwencji promotora oraz w innych obszarach niekodujących posługiwano się głównie algorytmem minimalizacji fałszywych pozytywów. Korzystano również z możliwości indywidualnego ustawienia poziomu podobieństwa matrycy i rdzenia do zadanej sekwencji. W tych wypadkach ustawiano prawdopodobieństwo na poziomie od 0,7 do 0,95. Wyszukiwania ograniczone były tylko do matryc owadzi.

Poszukiwanie sekwencji podobnych do poznanego genu przeprowadzono pośród sekwencji zdeponowanych w bazie danych GenBank. W tym celu posługiwano się usługą BLAST umożliwiającą porównywanie ze sobą sekwencji nukleotydowych (blastn) stosując następujące parametry: database - nr (ang., *non-redundant*); expect - 10; word size - 7 (Altschul i wsp., 1990; Altschul i Lipman, 1990; Altschul i wsp., 1997).

Analizę częstości występowania par GC i AT oraz pirymidyn i puryn w sekwencji wykonano za pomocą programu Excel (Microsoft).

7 Wyniki

Białko wiążące hormon juvenilny, jak to przedstawiono we wstępie, stanowi istotny element regulacji rozwoju owadów ze względu na swoją ochronną (Touhara i Prestwich, 1993) i transportową rolę (Cymborowski, 1984) spełnianą względem jednego z dwóch, niskocząsteczkowych owadzych hormonów. W momencie, gdy rozpoczynano przedstawiony w niniejszej rozprawie projekt badawczy, nie znano żadnej pełnej sekwencji genu białka wiążącego JH. Niedostępna była również sekwencja promotorowa, która ma znaczący wpływ na czasowo i tkankowo specyficzną regulację transkrypcji genu. Poza tym obszar promotora, szczególnie rdzeniowego jest miejscem, do którego przyłącza się cały skomplikowany aparat transkrypcyjny, gdzie następuje inicjacja transkrypcji, która stanowi pierwszy etap procesu prowadzącego do syntezy białka. Mimo wiedzy na temat wahaniami stężenia JHBP w hemolimfie u owadów, nadal nie wiadomo było, w jaki sposób regulowana jest synteza JHBP oraz jakie czynniki regulatorowe mogą mieć wpływ na zmiany stężenia tego białka w hemolimfie. Pierwszym krokiem do rozwiązania tej zagadki jest poznanie sekwencji promotorowej genu *jhbp*, czego podjęto się podczas realizacji niniejszego projektu badawczego. Poza tym podjęto próbę analizy sekwencji promotorowej w celu zidentyfikowania potencjalnych miejsc mogących mieć wpływ na regulację transkrypcji. Jeden ze wskazanych potencjalnych elementów regulatorowych - CF1/Usp poddano szczegółowym badaniom, ze względu na to, że z doniesień literaturowych wiadomo było o możliwości wiązania do tej sekwencji białka Usp (Christianson i wsp, 1992). O białku Usp natomiast wiadomo, że może wiązać JH a także wraz z EcR tworzy funkcjonalny receptor ekdyteroidowy, który przekazuje sygnał pochodzący od drugiego hormonu owadziego, 20E (Kozlova i Thummel, 2000; Yao i wsp., 1993). Przygotowano także konstrukty zawierające fragmenty promotora, które posłużyły do badań aktywności transkrypcyjnej promotora w teście z genem reporterowym w systemie *in vivo*, co umożliwi dalsze poznanie promotora i jego miejsc regulatorowych. Ponadto, przy współpracy z mgr inż. Kamilą Czajewską, podjęto próbę poznania sekwencję całego genu oraz jego struktury, czyli rozmieszczenia elementów kodujących (eksony) i niekodujących białko (introny, promotor, elementy nietranslatowane

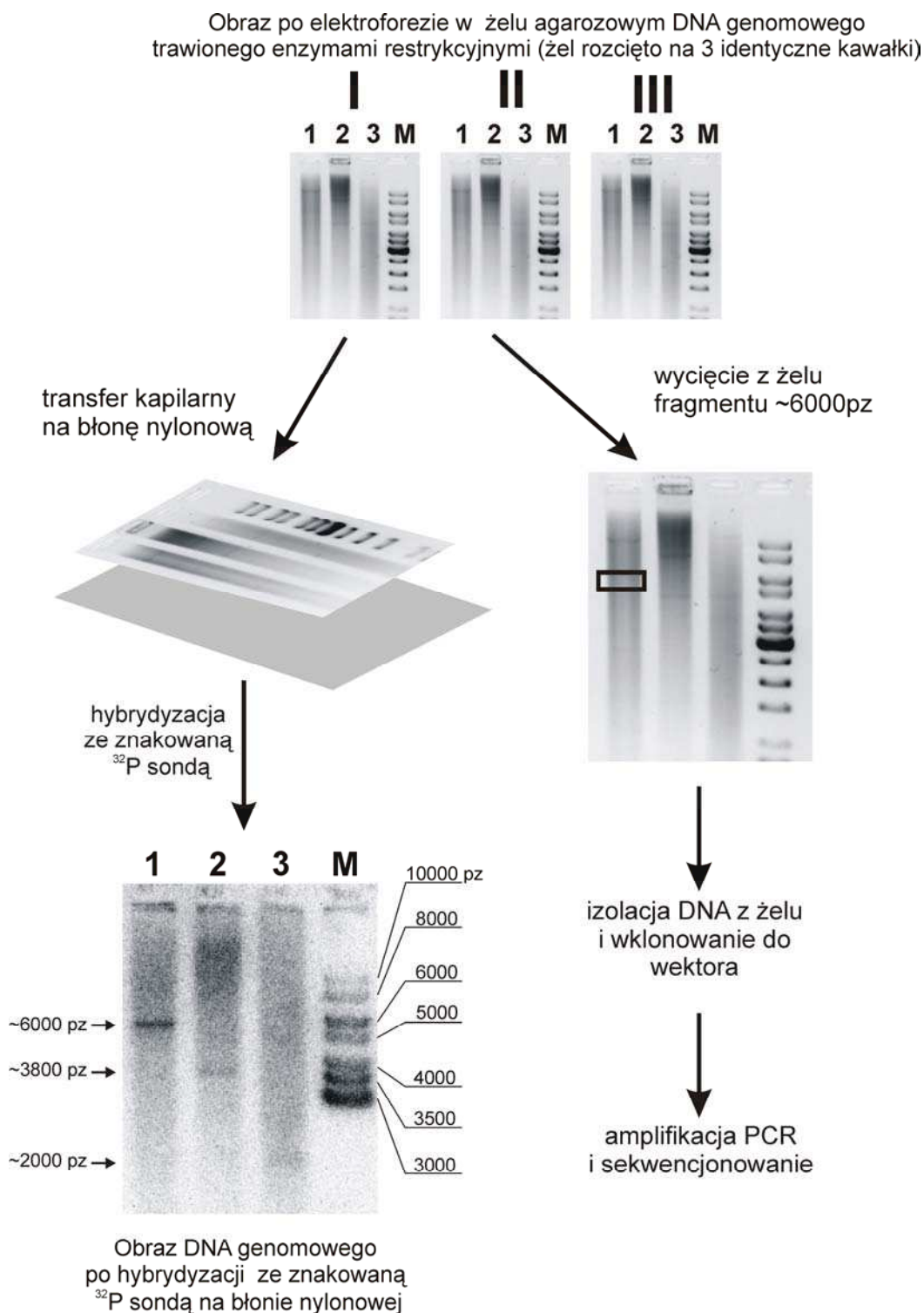
(UTR, ang., *untranslated region*)). Dalsza analiza sekwencji całego genu pozwoliła rzucić światło na prawdopodobne pochodzenie i ewolucję genu białka wiążącego JH.

7.1 Poznanie sekwencji i struktury genu *jhbp* z *G. mellonella*

Po sekwencjonowaniu cDNA *jhbp* (Rodriguez Parkitna i wsp., 2002) kolejnym, naturalnym krokiem w odkrywaniu tajemnic tego genu była próba poznania sekwencji niekodujących.

7.1.1 Próby znalezienia sekwencji promotora *jhbp* oraz poznania ilości kopii genu w genomie

Pierwszą techniką zastosowaną w celu poznania promotora genu lub sekwencji niekodujących był *Southern Blotting* (Sambrook i Russell, 2001). Wstępnym krokiem do zastosowania tej techniki jest izolacja wysokiej jakości DNA genomowego, którego przeciętna długość fragmentów powinna wynosić nie mniej niż 100 000 pz. Izolację wykonano według przepisu zawartego w podrozdziale 6.2.2 a jego jakość sprawdzono elektroforetycznie. Otrzymane DNA było niezdegradowane i miało wymaganą długość. W celu uzyskania krótszych fragmentów w granicach 3000 - 6000 pz poddano wyizolowany materiał genetyczny trawieniu enzymatycznemu. Według danych statystycznych, enzymami, które tną DNA genomowe *D. melanogaster* w oczekiwanych przedziałach długości są między innymi *EcoRI* - cięcie statystycznie co około 4000 pz i *HindIII* - cięcie co około 3000 pz (www.neb.com). Ponieważ *D. melanogaster* jest najbliższym spokrewnionym z *G. mellonella* organizmem, dla którego poznana została sekwencja genomu więc założono, że w tym przypadku częstotliwość cięcia DNA będzie podobna. Dlatego trawiono DNA wyżej wymienionymi enzymami. Ponieważ trawienie nie zachodziło do końca, powstała pula fragmentów o zróżnicowanych długościach widoczna na zdjęciu jako ciągnąca się smuga (Rys. 11, ślad 1, 2, 3). Cięcie *HindIII* zgodnie z danymi statystycznymi dało pulę fragmentów dłuższych niż cięcie *EcoRI*, co widoczne jest na Rys. 9 w śladzie 2 w postaci mocniejszego zaczerwienienia w obszarze dłuższych fragmentów. Elektroforezę genomowego DNA trawionego wyżej wymienionymi enzymami prowadzono w trzech powtórzeniach, ale na jednym kawałku żelu. Pozwoliło to uniknąć błędów związanych ze zmianą warunków elektroforezy, które mogłyby się pojawić gdyby prowadzono trzy niezależne rozdziały elektroforetyczne. Żel następnie podzielono na trzy części, zawierające identyczne ślady. Pierwsza część żelu została zużyta w celu przeniesienia DNA na błonę nylonową, druga posłużyła jako źródło materiału genetycznego do klonowania, a trzecia stanowiła rezerwę w przypadku niepowodzenia

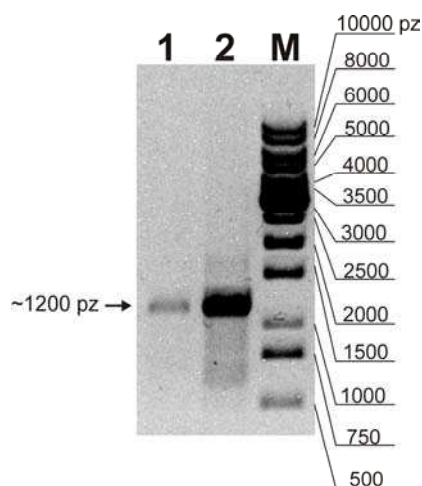


Rys. 11 Strategia poszukiwania sekwencji niekodujących metodą Southern Blotting. Zdjęcie na górze przedstawia obraz DNA genomowego po elektroforezie w 0,6% żelu agarozowym. Ślad 1 - DNA trawione enzymem *EcoRI*, ślad 2 - DNA trawione *HindIII*, ślad 3 - DNA trawione *EcoRI* i *HindIII*, ślad M - marker GeneRuler 1 kbp DNA Ladder (Fermentas). Część żelu I wykorzystano do przeniesienia DNA genomowego na błonę nylonową. Błonę następnie hybrydyzowano ze znakowaną izotopem ^{32}P sondą powstałą na matrycy DNA genomowego w reakcji PCR ze starterami JR18 i JR21. Część żelu II wykorzystano w celu wycięcia ze śladu 1 fragmentu zawierającego DNA o długości ~6000 pz. Strzałkami oznaczono widoczne po hybrydyzacji specyficzne prążki, w śladzie 1 o długości ~6000 pz oraz w śladzie 2 o długości ~3800 pz oraz w śladzie 3 o długości ~2000 pz.

któregokolwiek z eksperymentów (Rys. 11). W doświadczeniu jako sondy do hybrydyzacji używano dsDNA znakowanego izotopem ^{32}P , który powstał poprzez amplifikację DNA genomowego w PCR za pomocą dwóch starterów JR18 i JR21. Startery te obejmują fragment 293 pz od strony 3' sekwencji kodującej wraz z kodonem stop. Ponieważ w reakcji jako matrycy użyto DNA genomowego otrzymano fragment znacznie dłuższy niż oczekiwano, bo około 1200 pz. Świadczyło to o tym, że w badanym obszarze prawdopodobnie znajdują się sekwencje niekodujące - introny. Nie wiadomo było jednak ile ich jest i jakiej są długości, a używana wtedy metoda sekwencjonowania nie pozwalała na poznanie całej sekwencji tego odcinka. Po amplifikacji powyższy fragment DNA zaznakowano izotopem i wykorzystano w dalszej części eksperymentu do hybrydyzacji.

Po przeniesieniu DNA z żelu agarozowego na błonę nylonową poprzez transfer kapilarny ustalano warunki hybrydyzacji, aby uzyskać specyficzne prążki. Po kilku próbach, w których zmieniano temperatury inkubacji i płukania oraz stężenia buforów ostatecznie ustalono, że najwyższą specyficzność uzyskuje się w następujących warunkach: (1) prehybrydyzacja - temp. $65,5^{\circ}\text{C}$, bufor 1xSSC z 2% SDS, czas 2 godziny; (2) hybrydyzacja - temp. $65,5^{\circ}\text{C}$, bufor 1xSSC z 2% SDS, czas 20godzin; (3) płukanie (x4) - pierwsze w temp. pokojowej, pozostałe w temp. $65,5^{\circ}\text{C}$, bufor 0,5xSSC z 0,1% SDS, czas 2-3 minuty. Po inkubacji ze znakowaną sondą i płukaniach błonę poddano wizualizacji w aparacie Fuji Film FLA-3000 Fluorescent Image Analyzer (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Germany), po uprzedniej ekspozycji na płytę odwzorowującą (Imaging Plates BAS-MS 2325 i/lub 2340, Fuji Photo Film, Japan). W puli DNA trawionego *Hind*III stwierdzono obecność wyraźnego prążka o długości około 6000 pz (Rys. 11, ślad 1), natomiast w puli ciętej *Eco*RI jest prążek o długości około 3800 pz. W przypadku trawienia obydwoma enzymami jest widoczny bardzo słaby prążek o długości około 2000 pz. Istnienie pojedynczych prążków w poszczególnych śladach świadczy o tym, że w genomie *G. mellonella* znajduje się tylko jedna kopia sekwencji *jhb*p.

Ponieważ prążek o długości 6000 pz najprawdopodobniej zawierał najwięcej sekwencji niekodujących i w jego przypadku była największa szansa na to, że obejmie obszar promotorowy, dlatego podjęto próbę jego analizy. DNA pochodzące z obszaru, w którym jest widoczny prążek pozyskano z żelu II wycinając ze śladu 1 jego kawałek obejmujący długość w przybliżeniu 6000 pz. DNA wyizolowano z żelu i podano ligacji do wektora pTZ57R. Tak powstały konstrukt namnożono w bakteriach i oczyszczono. Na uzyskanym DNA plazmidowym przeprowadzono kontrolny PCR przy użyciu tych samych, co do amplifikacji sondy starterów (JR18 i JR21), aby sprawdzić czy wklonowano właściwy fragment (Rys.12, ślad 1). Obraz po elektroforezie sugerował, że konstrukt zawiera DNA z *jhb*p. Próbowano więc przy użyciu starterów specyficznych do sekwencji kodującej (np. JR18, JR17) oraz



Rys. 12 Amplifikacja fragmentu DNA genomowego *jhbp*(?) wklonowanego do wektora pTZ57R. Zdjęcie przedstawia obraz po elektroforezie fragmentów genu *jhbp* amplifikowanych przy użyciu starterów JR18 oraz JR21. Widoczne prążki w śladzie 1 i 2 mają długość około 1200 pz. W śladzie 1 matrycą w reakcji PCR był konstrukt w wektorze pTZ57R powstały przez wklonowanie fragmentu o długości około 6000 pz widocznego przez hybrydyzację z sondą w southern blotting'u. W śladzie 2 matrycą dla PCR było DNA genomowe. Ślad M stanowi marker GeneRuler 1 kbp DNA Ladder (Fermentas).

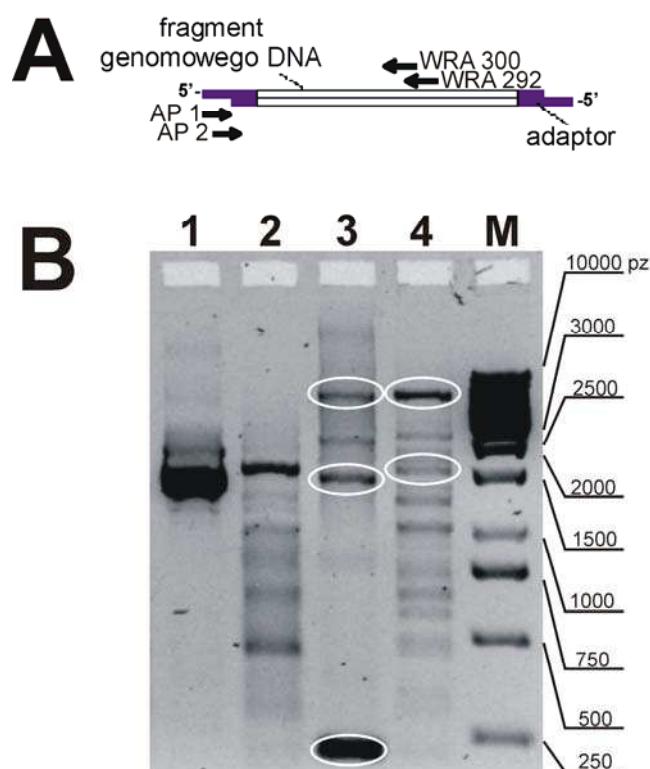
starterów skierowanych do wektora (WRA 202, WRA 203) amplifikować nieznany fragment DNA *jhbp*, który możnaby następnie poddać sekwencjonowaniu. W PCR uzyskiwano wiele niespecyficzných produktów (artefaktów), o długości niezgodnej z oczekiwaną lub nie otrzymywano żadnych produktów. Mimo wielokrotnych prób dopracowania warunków reakcji amplifikacji nie udało się osiągnąć zdefiniowanego produktu jak to miało miejsce dla reakcji kontrolnej z 2 specyficznymi starterami JR 18 i JR 21 (Rys. 12, ślad 1). Niestety nie udało się uzyskać żadnego specyficznego produktu. Przyczyny powyższych problemów zostały omówione w dyskusji, w rozdziale 8.1.1, pt. "Wybór strategii sekwencjonowania".

7.1.2 Spacer po genie, czyli poznanie sekwencji promotorowej

Po wielu żmudnych eksperymentach southern blotting oraz następujących po nim niepowodzeniach z uzyskaniem fragmentów *jhbp*, które zawierałyby elementy niekodujące genu, spróbowano zastosować inną metodę, której nazwę zdradził już tytuł tego rozdziału - spacer po genie (ang., *Genome Walking*) (patrz rozdział 6.2.11). Do doświadczeń używano zestawu Universal Genome Walker Kit (Clontech).

Punktem wyjścia w kierunku poznania sekwencji promotora było zaprojektowanie dwóch specyficzných starterów wstecznych (Rys. 13A) położonych blisko 5' końca znanej sekwencji cDNA (Rodriguez Parkitna i wsp., 2002). Starter zewnętrzny był położony 106 - 82 pz (WRA 292) od miejsca startu transkrypcji (jeszcze wtedy nieznanego) a starter wewnętrzny 36 - 12 pz (WRA 300). Do pierwszego PCR użyto biblioteki powstałej przez trawienie DNA

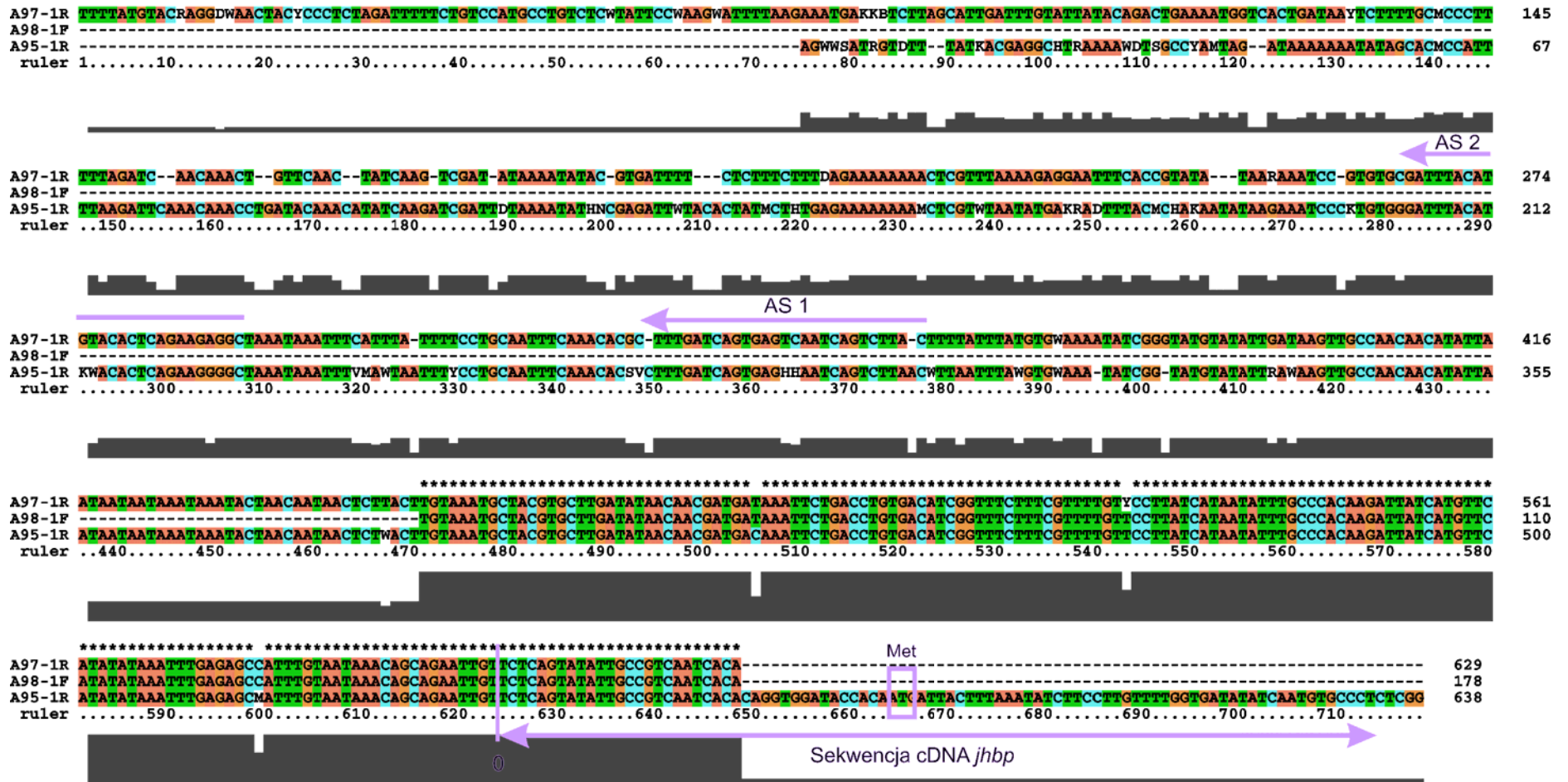
genomowego enzymem *DraI*. Jako pozytywnej kontroli dla eksperymentu użyto ludzkiego DNA genomowego, które również było trawione *DraI*, oraz zaprojektowanych do niego starterów (dostarczone w zestawie). Reakcję prowadzono w następujących warunkach: 7 cykli 25 s w 94°C, 180 s w 68°C, następnie 32 cykle 25 s w 94°C, 180 s w 63°C i końcowa elongacja przez 7 minut w 63°C. Po rozdziale elektroforetycznym mieszanin reakcyjnych zauważono, że powstało kilka wyraźnych prążków zarówno w reakcji właściwej jak i w kontroli (Rys. 13, ślad 1 i 2 - kontrola, ślad 3 i 4 - *jhbp*). Ponieważ obraz kontroli pozytywnej (Rys. 13 ślad 1 i 2) jest bardzo zbliżony do obrazu zamieszczonego w instrukcji, więc



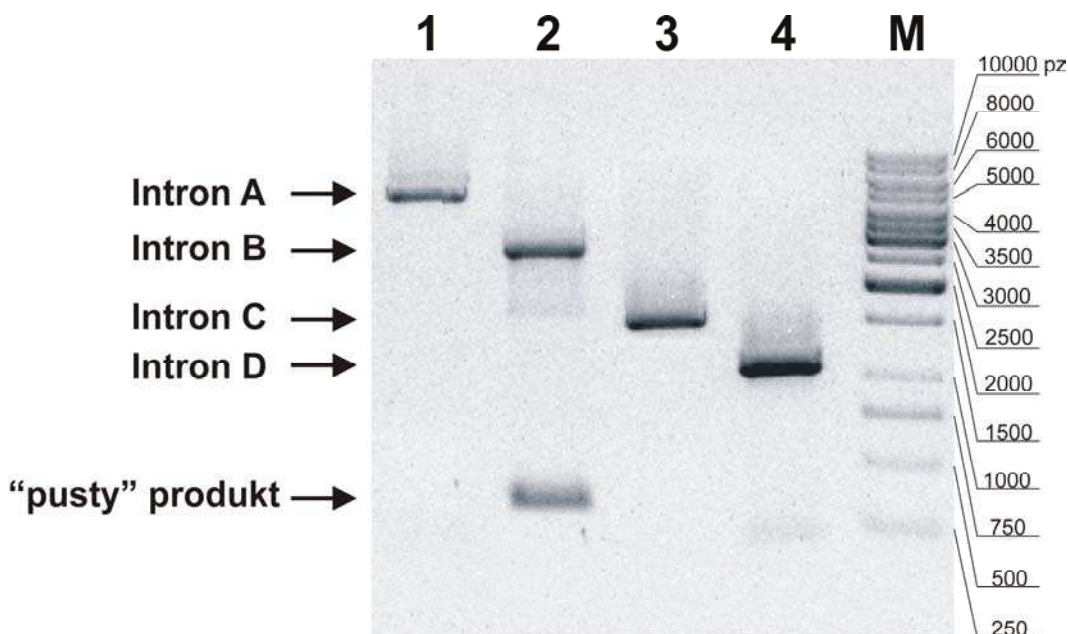
Rys. 13 Amplifikacja fragmentów promotora *jhbp* z *G. mellonella*. Panel A przedstawia schemat amplifikacji biblioteki genomowego DNA za pomocą starterów specyficznych (WRA 292 i WRA 300) oraz skierowanych do adaptora (AP 1 i AP 2). Wynik m.in. tego eksperymentu przedstawiono na panelu B. Ślad 1 - DNA ludzkie po zagnieżdżonym PCR, ślad 2 - DNA ludzkie po pierwszym PCR, ślad 3 - DNA *G. mellonella* po zagnieżdżonym PCR, ślad 4 - DNA *G. mellonella* po pierwszym PCR. Białymi elipsami zaznaczono prążki, z których DNA poddano sekwencjonowaniu.

założono, że cała procedura przygotowania DNA oraz jego amplifikacji przebiegła prawidłowo. Dodatkowo widać, że po zagnieżdżonym PCR ilość prążków maleje i stają się one wyraźniejsze. Spośród prążków widocznych zarówno po pierwszym jak i po zagnieżdżonym PCR do sekwencjonowania wybrano te, które są bardzo intensywne (Rys. 13, ślad 3, prążek ~240 pz) lub powtarzają się w obu reakcjach z niewielkim przesunięciem

długości wynikającym z innego położenia starterów zagnieżdżonych (Rys. 13, ślad 3 i 4 prążki ~1500 pz oraz ~8000 pz). Sekwencjonowanie potwierdziło, że powyższe fragmenty zawierają DNA pochodzące z *jhbp* z *G. mellonella* a analiza i porównania dalszej sekwencji pozwoliły także sądzić, iż zawiera ona region promotorowy (Rys. 14). Wszystkie konstrukty, zarówno najkrótszy (Rys. 14, A98-1F) jak i dwa dłuższe (Rys. 14 A97-1R i A95-1R), mają po stronie 3' obszar obejmujący znane cDNA *jhbp*, natomiast po stronie 5', nieznaną dotychczas sekwencję, którą od tego momentu nazwano promotorem. Na podstawie nowej sekwencji zaprojektowano kolejną parę starterów (AS 1 i AS 2), aby odczytać dalszy fragment promotora w kierunku końca 5' (Rys. 14). Procedurę kroczenia po sekwencji w stronę końca 5' powtarzano aż do poznania około 2000 pz promotora. Ostatni nukleotyd, który jest pewny, znajduje się w pozycji -1955. Pozostała sekwencja wymagałaby dodatkowej weryfikacji i prawdopodobnie zaprojektowania kolejnej pary starterów.



Rys. 14 Porównanie i analiza fragmentów sekwencji genu *jhbp*. Zestawienie sekwencji konstruktów wykonano za pomocą programu ClustalX. Fragment A98-1F to DNA pochodzące z prążka o długości ~240pz, A97-1R od prążka o długości ~1500 pz i A95-1R od prążka o długości ~8000 pz. Od strony 3' fioletową kreską zakończoną strzałkami zaznaczono obszar, który pokrywa się ze znaną sekwencją cDNA oraz wskazano pierwszy kodon - Met. Fioletowe strzałki opisane jako AS 1 i AS 2 wskazują miejsca parowania nowych starterów zaprojektowanych na podstawie poznanej sekwencji.

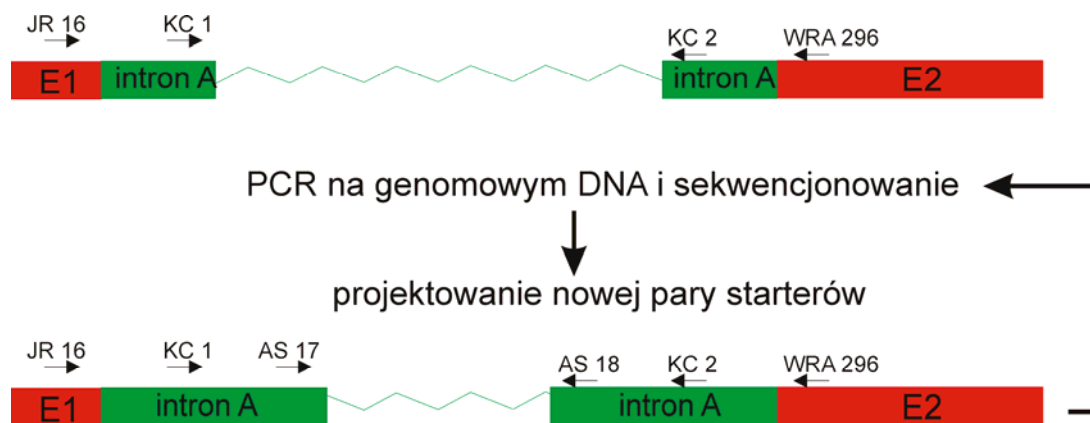


Rys. 16 Amplifikacja i identyfikacja istnienia intronów w genie *jhbp*. Negatyw zdjęcia 0,8% żelu agarozowego z bromkiem etydyny, na którym rozdzielono elektroforetycznie fragmenty DNA genu *jhbp* zawierające introny. Fragmenty zostały zamplifikowane techniką PCR na DNA genomowym jako matrycy przy użyciu czterech par starterów (6.1.6.1): JR 16 i WRA 296 (ślad 1); WRA 293 i AS 5 (ślad 2); AS 16 i AS 8 (ślad 3); JR 18 i AS 10 (ślad 4). Ślad 1, intron A, szacowana długość około 5500 pz; ślad 2, intron B, szacowana długość około 3000 pz; ślad 3, intron C, szacowana długość około 1500 pz; ślad 4, intron D, szacowana długość około 1000 pz, ślad M, marker GeneRuler 1 kbp DNA Ladder (Fermentas).

odpowiednio, intron A, C oraz D (Rys.16 ślad 1, 3, 4). Natomiast w śladzie gdzie znajdował się fragment amplifikowany starterami WRA 293 i AS 5 (intron B) pojawiły się aż dwa prążki o długościach około 3000 pz i 350 pz (Rys.16 ślad 2). Uzyskane fragmenty poddano sekwencjonowaniu. W wyniku sekwencjonowania zidentyfikowano dokładnie miejsca położenia wszystkich intronów oraz poznano krótkie odcinki ich sekwencji na końcu 5' i 3'. Każdy z nich rozpoczyna się sekwencją GTA na końcu 5' i kończy sekwencją AG na końcu 3'. Pokazano także, że fragment (350 pz) w śladzie 2 na Rys.16 nie zawiera żadnej sekwencji wtraconej. Przy pomocy innych par starterów sprawdzono, że w pozostałych obszarach cDNA introny nie występują. Z powyższych doświadczeń wynika, że w genie *jhbp* znajdują się cztery introny (Rys. 15 i 16).

Porównanie sekwencji genomowej *jhbp* ze znaną wcześniej sekwencją cDNA JHBP (Rodriguez Parkitna, 2001) pokazało istnienie pięciu fragmentów eksonowych o następujących długościach 106, 241, 125, 153 i 381 pz. Ekson pierwszy zawiera 55 nukleotydów kodujących początek białka JHBP oraz 51 nukleotydów, które nie są kodujące (5' UTR). Najdłuższy, ostatni ekson zawiera natomiast 163 nukleotydy kodujące koniec C

białka oraz 218 nukleotydów sięgających aż do początku ogona poli A, które nie są kodujące (3' UTR). Po dokładnym poznaniu położenia intronów oraz eksonów przystąpiono do rozszyfrowania całości sekwencji intronów (Rys.17). Część eksperymentów amplifikacji i sekwencjonowania intronów wykonywano wspólnie z mgr inż. Kamilą Czajewską. Początkowe doświadczenia, w których wskazano miejsca sekwencji intronowych, jak już wcześniej wspomniano, pozwoliły na poznanie fragmentów tych sekwencji zarówno od

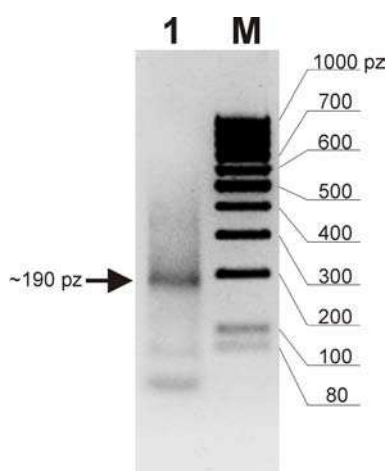


Rys. 17 Strategia amplifikacji i poznania kompletnej sekwencji intronów. Czerwone prostokąty przedstawiają eksony, natomiast zielone - introny. Zielona krzywa symbolizuje obszar nieznaną sekwencji. Na rysunku przedstawionym, na przykładzie najdłuższego intronu A, w jaki sposób amplifikowano kolejne fragmenty sekwencji intronowych aż do poznania całości intronu.

strony końca 5' jak i 3'. W ten sposób odkryto po około 300 pz z każdego końca intronu (Rys. 17, schemat górny). Następnym etapem było zaprojektowanie par starterów do nowo poznanych sekwencji. Za pomocą tych starterów amplifikowano fragmenty położone w środku intronów a następnie je sekwencjonowano (Rys. 17). W przypadku najkrótszego intronu D na tym etapie już znano całą sekwencję intronową. Dla pozostałych, dłuższych intronów C, B oraz najdłuższego A należało zaprojektować kolejne pary starterów komplementarne do nowo poznanych fragmentów sekwencji i procedurę tę powtarzać od jednego do kilku razy, w zależności od długości intronu (Rys. 17, schemat dolny) Strategię rozszyfrowywania całości sekwencji przedstawiono na Rysunku 17. Ostatecznie poznano sekwencję wszystkich intronów, która została zdeponowana w bazie danych GeneBank pod numerem AY579371 Długości intronów są następujące: intron A - 4455 pz, intron B - 2319 pz, intron C - 1095 pz, intron D - 857 pz.

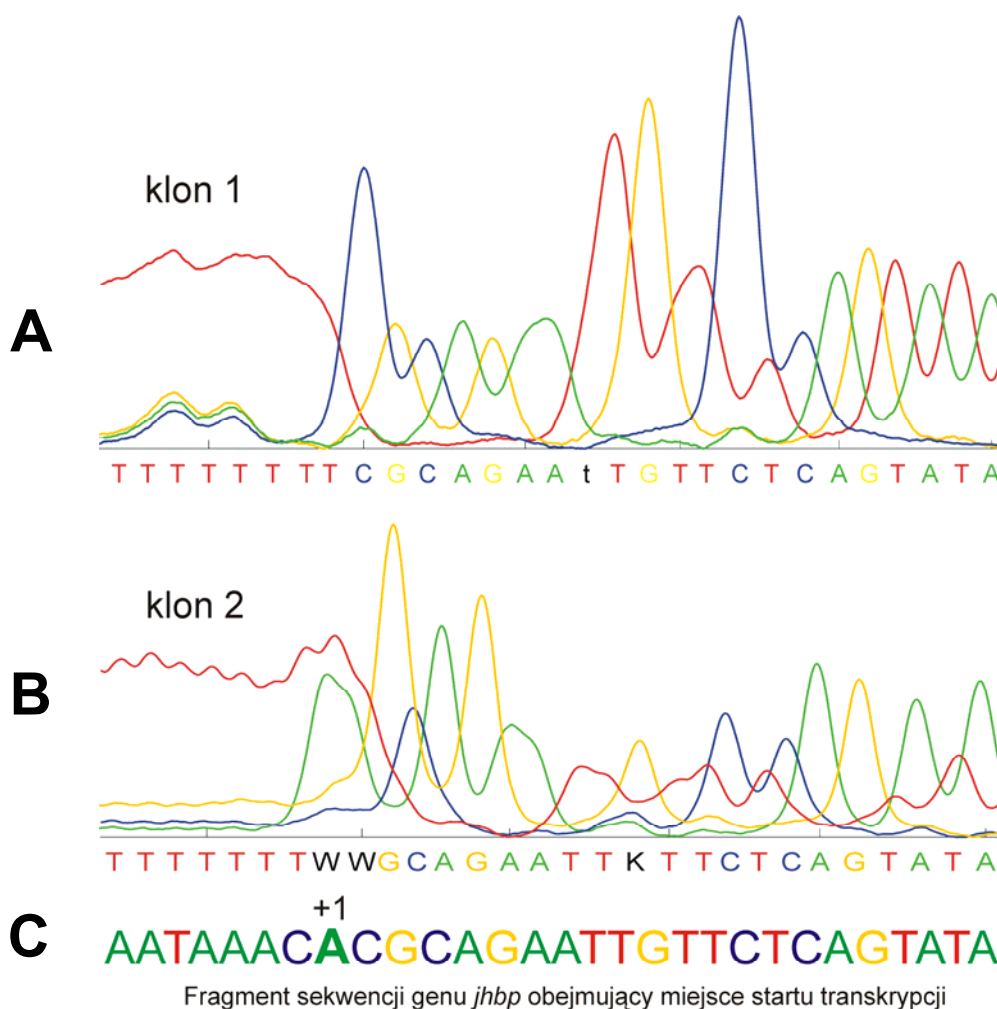
7.1.4 Miejsce startu transkrypcji

Miejsce rozpoczęcia transkrypcji zidentyfikowano w poznanej wcześniej sekwencji genu stosując metodę 5'RACE (6.2.12). Jako matrycy użyto, wyizolowanego z ciała tłuszczowego larw, całkowitego RNA tak jak to opisano w rozdziale materiały i metody (6.2.4). Po syntezie drugiej nici cDNA otrzymano fragmenty dwuniciowego DNA o długości około 190 pz, które obejmowały miejsce startu transkrypcji (Rys.18).



Rys. 18 Amplifikacja fragmentu zawierającego miejsce startu transkrypcji. Zdjęcie po elektroforezie w 2% żelu agarozowym. W śladzie 1 nałożono próbkę po syntezie drugiej nici cDNA, strzałką oznaczono prążek o długości około 190 pz, który odpowiada amplifikowanemu fragmentowi, zawierającemu miejsce startu transkrypcji. DNA zawarte w tym prążku wyizolowano z żelu, poddano ligacji do wektora i następnie sekwencjonowano (patrz rozdział 6.2.12).

Fragmenty te wklonowano do wektora pTZ57R (MBI Fermentas) i wprowadzono do komórek bakteryjnych. Następnie z hodowli na płycie wybrano 10 klonów, namnożono je, oczyszczono z hodowli DNA plazmidowe i poddano reakcji sekwencjonowania. Dwa klony, dla których po sekwencjonowaniu uzyskano najdłuższe od strony końca 5' fragmenty porównano ze sobą i z wcześniej poznaną sekwencją genu (Rys 19). Prawdopodobnie właśnie w tych klonach znajduje się sekwencja cDNA, której synteza zakończyła się na pierwszym transkrybowanym nukleotydzie. Ustalono więc, że transkrypcja rozpoczyna się na nukleotydzie adenylowym, który oznaczono jako +1 (Rys. 19). Ustalono także, że rzeczywista sekwencja cDNA JHBP jest dłuższa o 11 nukleotydów od strony 5' od tej opublikowanej wcześniej (AF4107772) (Rodriguez Parkitna i wsp., 2002).



Rys. 19 Ustalenie miejsca startu transkrypcji. Na rysunku przedstawiono sekwencję dwóch fragmentów cDNA JHBP (panel A i B) oraz fragment sekwencji genu *jhbp* obejmujący miejsce startu transkrypcji (panel C). Fragmenty cDNA uzyskano w wyniku amplifikacji mRNA metodą 5'RACE i poddano sekwencjonowaniu. Przedstawione wykresy pokazują obraz rozdziału produktów sekwencjonowania, a poszczególne krzywe odpowiadają profilom wzbudzonej laserem fluorescencji znakowanych Cy5 nukleotydów, mierzonej przez aparat ALFexpress. Kolorami oznaczone są profile mierzone w czterech sąsiadujących śladach, na które naniesiono kolejne reakcje sekwencjonowania z dideoksyadeniną (zielony), dideoksytyminą (niebieski), dideoksyguaniną (żółty) i dideoksytyminą (czerwony). Dwa klony, które posiadały najdłuższą sekwencję genu w stronę jego końca 5', widoczne na rysunku, porównano ze sobą i z sekwencją genu uzyskaną wcześniej. Na podstawie tej analizy wskazano, że transkrypcja rozpoczyna się na nukleotydzie adenylowym oznaczonego narysunku powiększoną i pogrubioną czcionką. Ciąg nukleotydów tymidylowych po stronie końca 5' klonów, który nie zgadza się z sekwencją genu pochodzi od dosyntezowanego do pierwszej nici cDNA „ogona” poli(A).

7.2 Analiza sekwencji genu *jhbp*. W poszukiwaniu miejsc regulatorowych

W trakcie poznawania kolejnych partii sekwencji genomowej poddawana ona była ciągłej analizie w celu: (1) znalezienia elementów mogących mieć wpływ na regulację ekspresji genu *jhbp*; (2) scharakteryzowania struktury genu; (3) podjęcia próby sklasyfikowania białka JHBP do jednej z istniejących rodzin białek na podstawie budowy genu; (4) znalezienia pozostałości ewolucyjnych w postaci fragmentów innych genów w rejonach niekodujących białko. Aby zrealizować ten cel posługiwano się kilkoma programami, które dokładniej przedstawiono w rozdziale „Materiały i metody”, podrozdział (6.3), a także sekwencję analizowano wizualnie.

7.2.1 Poszukiwanie sekwencji regulatorowych w genie *jhbp* poprzez bazy danych zawierających znane elementy regulatorowe

Całość sekwencji niekodującej genu *jhbp* została poddana analizie przy pomocy programów Patchsearch, MatInspector (już niedostępne), Patch oraz Match (patrz Materiały i Metody podrozdział 6.3). Wszystkie wymienione programy służą do wyszukiwania w sekwencji potencjalnych miejsc wiązania białek regulatorowych. Wykorzystują w tym celu poznane i dotychczas scharakteryzowane sekwencje elementów regulatorowych zebrane w bazie danych TRANSFAC 6.0. Podczas analiz stosowano algorytm minimalizacji fałszywych pozytywów. Spośród kilkudziesięciu różnych owadzych czynników regulatorowych zawartych w bazie danych, w genie *jhbp* z *G. mellonella* występuje jednaście (Tabela 4). Czynniki te mogą wiązać się do wielu potencjalnych miejsc regulatorowych na całym obszarze genu. Ich sekwencje również zamieszczono w Tabeli 5. W rejonie promotorowym występuje sześć potencjalnych miejsc dla wiązania czynników regulatorowych. Hb, Ubx, Elf-1, CF1/Usp oraz BR-C Z3 występują tylko raz w promotorze, natomiast czynnik HSF ma jednaście potencjalnych miejsc wiązania. Poza obszarem promotora miejsc dla HSF jest aż 32, jednak nie są one skupione obok siebie, ale porozrzucane po całej sekwencji stosunkowo równomiernie, co świadczy raczej o ich niefunkcjonalności. W sekwencji transkrybowanej, nie licząc czynnika HSF, najwięcej elementów jest w intronie A i B, odpowiednio 18 i 11. Daje to przeciętnie jeden element na około 250 pz dla intronu A i na 210 pz dla intronu B. W pozostałych dwóch intronach są tylko po dwie potencjalne sekwencje regulatorowe. Również w eksonie 2 występuje element regulatorowy BR-C Z3.

Szczególne uwagę, ze względu na powiązania z drugim bardzo ważnym hormonem owadzi - ekdyzonem, zwraca element wiążący CF1, znaleziony w obszarze promotorowym oraz elementy wiążące BR-C Z1 - Z4 występujące zarówno w sekwencji transkrybowanej jak

Tabela 4 Czynniki regulatorowe w genie *jhbp* z *G.mellonella*

Nazwa czynnika	Sekwencja ^a	Położenie w sekwencji genu
Hunchback (Hb)	gcatAAAAAa (+) gaaaAAAAAa (+)	-1827 6660 (intron B)
Heat Shock Factor (HSF) ^b	AGAAA (+)	-1788 -1515 -1302 -382 -341
	TTTCT (-)	-1432 -1376 -556 -395 -389 -84
Ultrabithorax (Ubx)	attcttcCATTAAAAaac (-) ttttttTAATGgataatg (+) atgggacCATTAgctcca (-) taaagtTAATGgataagg (+) gtaataTAATGgagtct (+) gtgacatTAATGgctgata (+) taaacttTAATGgaaaaca (+) ttttttTAATGgataata (+)	-1262 655 (intron A) 849 (intron A) 1076 (intron A) 2575 (intron A) 3717 (intron A) 5247 (intron B) 7975 (intron C)
Elf-1	atttAAACCaaaaca (-)	-1238
Chorion factor 1 / Usp (CF1/Usp)	ggGGTCAaa (+) ggGGTCAAct (+)	-1053 7026 (intron B)
Broad-Complex Z3 (BR-C Z3)	aaaaAACTAagaat (+) ataaaAACTAataac (+) aagcaAACTAaatta (+) tattTAGTTtttgg (-) aaaaAACTAgaccc (+) taataAACTAtgaat (+) ctgtTAGTTaaac (-)	-642 205 (intron A) 1421 (intron A) 1653 (intron A) 4680 (ekson 2) 4820 (intron B) 6432 (intron B)
Broad-Complex Z2 (BR-C Z2)	tccttaCTAGTtata (+) atgaAATAGtaaact (-) gtcaciaCTATTtatt (+) tcacttcCTATTtatt (+) tatcatcCTATTtttt (+) aagacacCTATTtttt (+) attatctCTATTtttt (+)	183 (intron A) 2044 (intron A) 2286 (intron A) 3652 (intron A) 3793 (intron A) 5523 (intron B) 7102 (intron B)
Broad-Complex Z1 (BR-C Z1)	aagtTTTGatatttttt (-) taatTTTGatataatta (-) ttgtcaaaaACAAAatatt (+) tcctTTTGatataactt (-)	642 (intron A) 4860 (intron B) 5131 (intron B) 7266 (intron C)
Broad-Complex Z4 (BR-C Z4)	ttaGTAAtaaaa (+) ttttTTTATtat (-) ttaATAAtaaaa (+)	1022 (intron A) 4122 (intron A) 8935 (intron D)
Abdominal-B (Abd-B)	ggtgacATTAAtgg(-) acaTTAATggctga(+) tgtTTTATgccggg (+) tgtTTTATgcctag (+) gttTTTATgacact (+)	3716 (intron A) 3720 (intron A) 5753 (intron B) 6999 (intron B) 9051 (intron D)
Croc (regulator rozwoju głowy u krokodyli)	taaaaTAAATatatgg (+)	5334 (intron B)

^a Duże litery odnoszą się do sekwencji rdzenia elementu regulatorowego.

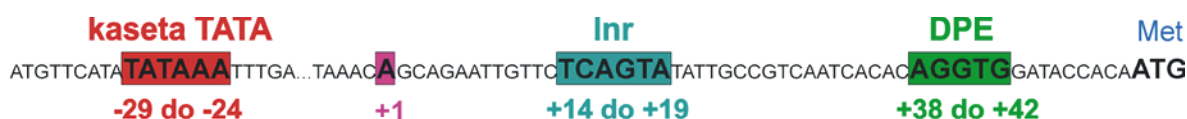
^b Pozycje elementów dla HSF podano tylko w obszarze promotora ze względu na ich zbyt dużą ilość w całym genie. Prawdopodobnie aktywne elementy HSE oznaczono grubą czcionką.

i w promotorze. Ponieważ elementy regulatorowe mogą występować także w intronach jest wysoce prawdopodobne, że któraś ze znalezionych sekwencji dla BR-C może być funkcjonalna.

Wcześniejsza analiza komputerowa sekwencji promotora programami PatSearch i MatInspector, zanim pojawiły się obecne narzędzia do poszukiwań elementów regulatorowych (Match[®]), wskazała na istnienie w tym rejonie trzech miejsc mogących wiązać białko CF1 w pozycjach -1053, -960 i -475. Przedstawiony w Tabeli 5 wynik pokazuje istnienie tylko jednej takiej sekwencji. Rozbieżność ta wynika z niedoskonałości oprogramowania, jakie było dostępne podczas pierwszych prób analizy. Eksperymentom EMSA jednak poddano wszystkie trzy elementy, aby móc porównać ich oddziaływania z białkami UspDBD i EcRDBD.

7.2.2 Analiza sekwencji promotora rdzeniowego

Sekwencję promotora rdzeniowego analizowano bez pomocy programów komputerowych, ponieważ baza danych TRANSFAC 6.0 nie zawiera wszystkich elementów regulatorowych mogących występować w tym rejonie promotora. W analizie brano pod uwagę zidentyfikowane dotychczas w promotorach owadzych sekwencje regulatorowe. Spośród czterech znanych elementów: MTE, DPE, kasety TATA, Inr, w obszarze rdzeniowym promotora *jhbp* wskazano trzy przypuszczalne miejsca regulatorowe (Rys. 20). Kasetka TATA znajdująca się prawdopodobnie w położeniu od -29 do -24; sekwencja TCAGTA najprawdopodobniej reprezentująca element Inr w rejonie od +14 do +19 oraz sekwencja AGGTG, jest bardzo podobna do elementu DPE i zaczyna się na 38 nukleotydzie od miejsca startu transkrypcji (Sok i wsp, 2005). Miejsce startu transkrypcji znajduje się na nukleotydzie adenylowym i jest poza obszarem elementu inicjatorowego, który zwykle obejmuje początek transkrypcji (Rys. 20). Rejon pomiędzy pierwszym kodonem (Met) a miejscem startu transkrypcji, określany jako obszar niekodujący 5' obejmuje 51 pz.



Rys. 20 Potencjalne elementy regulatorowe promotora rdzeniowego *jhbp*. Przedstawiono fragment promotora rdzeniowego od -38 nukleotydu do pierwszego kodonu metioniny (Met). Potencjalne elementy regulatorowe wyróżniono w ramkach i podano ich położenie w genie *jhbp*.

7.2.3 Na tropach historii genu *jhbp*

Po rozwiązaniu sekwencji genu *jhbp* narodziły się kolejne pytania, skąd pochodzi JHBP, do jakiej grupy białek należy oraz jaka jest historia jego ewolucji? Aby spróbować odpowiedzieć na te i inne rodzące się pytania, analizie poddano szczególnie dokładnie niekodujące części genu. W poniższych rozdziałach opisane zostaną próby poszukiwania fragmentów innych genów w *jhbp* oraz rozkład poszczególnych nukleotydów w poznanym genie. Szczególna uwaga zostanie zwrócona także na fazy intronów, które mogą rzucić światło na pochodzenie genu *jhbp*.

7.2.3.1 Pozostałości ewolucyjne w genie *jhbp*

Cała sekwencja genu została zanalizowana w kierunku znalezienia w niej fragmentów powtórzonych z innych genów. W tym celu posłużono się programem BLASTN (źródło, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) korzystając z funkcji wyszukiwania krótkich podobnych sekwencji. Program porównał sekwencję *jhbp* do wszystkich dotychczas poznanych DNA zawartych w bazie danych GenBank (źródło, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>). W wyniku tej analizy otrzymano wiele fragmentów sekwencji pochodzących z różnych organizmów, ale za istotne statystycznie wyniki uznano te, dla których wartość oczekiwana (E) była mniejsza od 0,01. Selekcja ta pozwoliła wyłonić tylko najbardziej podobne do genu *jhbp* fragmenty. Jak się okazało, poza jednym przypadkiem genu *Ste* z *D. melanogaster*, wszystkie pochodzą z genów *G. mellonella* (Tabela 5). Identyczność ich sekwencji waha się w granicach 87 - 96%. Wszystkie fragmenty powtórzone umiejscowione są w obszarach niekodujących genu a kilka z nich jest skupionych na bardzo krótkich odcinkach w tzw. klastrach (Rys. 21, góra). W całym genie *jhbp* znaleziono dotychczas fragmenty siedmiu innych genów, w tym sześć pochodzących z *G. mellonella*. W promotorze znajduje się rejon położony w pozycjach od -1942 do -1817 skupiający osiem fragmentów z pięciu różnych genów. Tworzą one klaster, który zaznaczono na Rys. 21 jako P1. Podobny klaster występuje także w intronie A i skupia w obszarze od 687 do 889 cztery sekwencje pochodzące z jednego genu heksameryny (Rys, 21, P2). Dodatkowo jest on otoczony od 5' i 3' strony przez 12 nukleotydowy odcinek sekwencji powtórzonej. W tym intronie są jeszcze dwa fragmenty genu dla peptydu przeciwgrzybiczego oddalone od siebie o około 270 pz, które także być może tworzą klaster (Rys. 21, P4). Pozostałe sekwencje występują pojedynczo w znacznych odległościach od siebie (Rys. 21, P3, P5, P6, P7). W ostatnim intronie, jak również w obszarze niekodującym 3' nie znaleziono żadnych fragmentów innych genów.

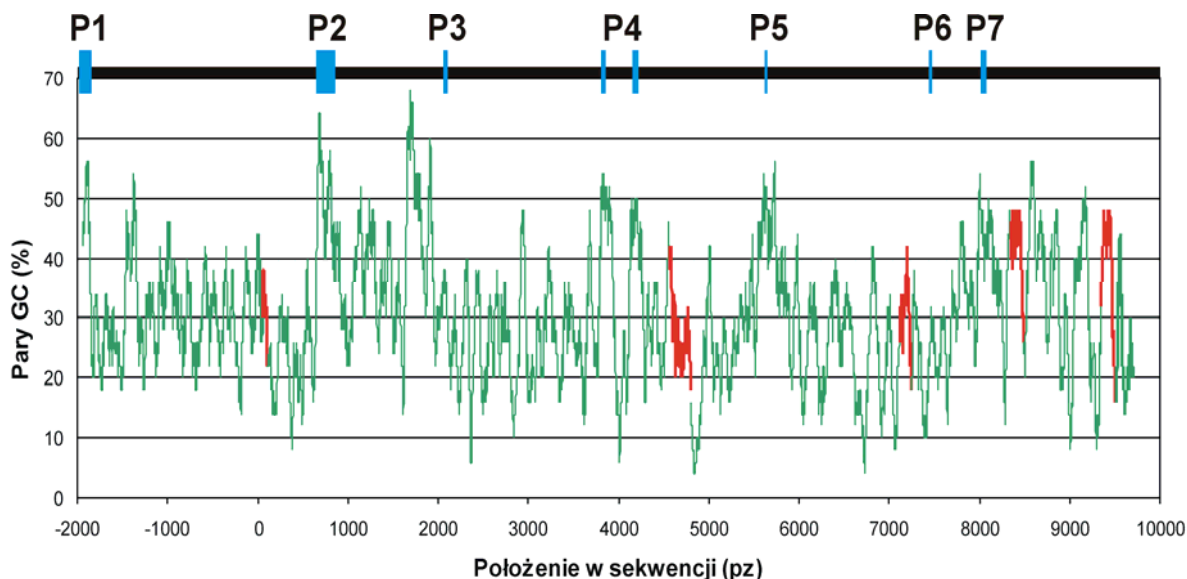
Tabela 5 Fragmenty znanych genów obecne w genie *jhbp* z *G. mellonella*.

Nazwa	Długość fragmentu w genie źródłowym	Położenie w genie <i>jhbp</i> ^a		Identyczność DNA (%)
		miejsce	pozycja nukleotydowa	
gen niskocząsteczkowego białka jedwabiu (P25) (<i>G. mellonella</i>)	100	promotor	(-1940) - (-1841)	93
	127	promotor	(-1942) - (-1817)	89
	88	promotor	(-1942) - (1855)	90
	41	intron A	2086-2126	90
	23	intron B	5663-5685	95
	54	intron C	8040-8093	87
Gen arylforyny (<i>G. mellonella</i>)	124	promotor	(-1939) - (-1817)	90
mRNA profenooksydazy (<i>G. mellonella</i>)	127	promotor	(-1942) - (-1817)	88
	65	promotor	(-1890) - (-1827)	87
gen heksameryny (Lhp82) (<i>G. mellonella</i>)	127	promotor	(-1942) - (-1817)	87
	51	intron A	687-737	88
	84	intron A	744-828	82
	25	intron A	865-889	96
	39	intron A	840-878	87
gen ciężkiego łańcucha fibroiny (Fib-H) (<i>G. mellonella</i>)	74	promotor	(-1890) - (-1817)	89
peptyd przeciwrzybiczy galermycyna (<i>G. mellonella</i>)	43	intron A	3811-3853	93
	57	intron A	4124-4180	94
homologiczne DNA do genu Su(Ste) (<i>D. melanogaster</i>)	27	intron C	7400-7426	96

^a Różnice w długości fragmentów pomiędzy genem źródłowym a *jhbp* są spowodowane delecją, bądź insercją

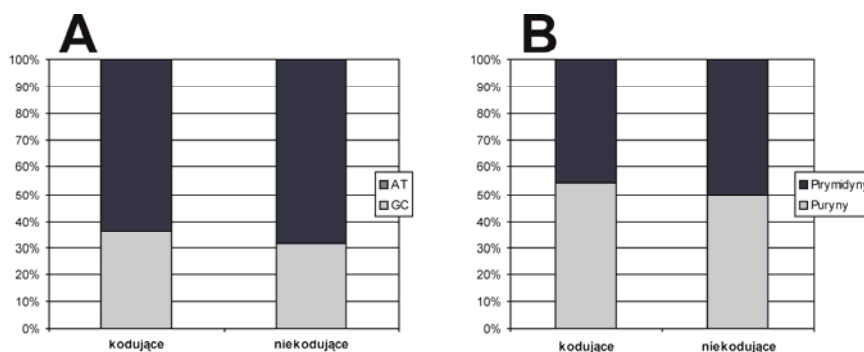
Sekwencję całego genu poddano badaniu zawartości par GC oraz puryn i pirymidyn. Głównym celem tej analizy było wskazanie obszarów *jhbp*, które są ewolucyjnie młode oraz takich, na które jest wywierana szczególna presja ewolucyjna. W pierwszej kolejności sprawdzono w genie występowanie par GC (Rys. 21). Obliczenia prowadzono w ramce zawierającej 50 nukleotydowy odcinek, który przesuwano w obliczeniach o jeden nukleotyd w kierunku końca 3'. Obszary kodujące, zaznaczone na Rys. 21 na czerwono, w sumie zawierają około 36% par GC (Rys. 22A), z tym, że wyraźnie widać, że eksony 4 i 5 mają większą od przeciętnej zawartość GC. Rejony niekodujące (zielone) zawierają średnio 31%

par GC (Rys. 22 A), mimo iż istnieją obszary, szczególnie w intronie A, w których zawartość GC znacznie przekracza 60% (Rys. 21).



Rys. 21 Zawartość par GC w genie *jhbp* z *G. mellonella*. Wykres przedstawia sposób rozłożenie w genie *jhbp* par GC biorąc pod uwagę ramkę o długości 50 pz. Zielona krzywa przedstawia obszary niekodujące, natomiast czerwona sekwencję kodującą białko. Ponad wykresem umieszczono schemat *jhbp* z naniesionymi kolejno (P1 - P7) obszarami występowania sekwencji z innych genów (niebieskie prostokąty).

Analiza procentowej zawartości puryn pokazała, że w obszarach kodujących stanowią one około 54%, natomiast w pozostałej części genu występuje równowaga i zawartość obydwu rodzajów zasad waha się w okolicach 50% (Rys. 22 B).



Rys. 22 Średnia zawartość par GC i AT oraz puryn i pirymidyn w genie *jhbp*. Wykres na panelu A przedstawia procentową zawartość par GC i AT w obszarach kodujących i niekodujących genu *jhbp*. Na panelu B pokazano zawartość puryn i pirymidyn również z podziałem na rejony kodujące i niekodujące genu.

7.2.3.2 Fazy intronów

W genie *jhbp* znaleziono cztery introny. Wszystkie cztery przerywają sekwencję kodującą wewnątrz kodonów, przez co żaden nie jest w fazie 0. Intron A, C oraz D są w fazie 1 i umiejscowione są odpowiednio w kodonach dla asparaginy, seryny oraz asparaginy (Rys. 23). Jedynie intron B jest w fazie 2 i przerywa kodon dla treoniny. W drugim znanym genie *jhbp* z *M. sexta* introny nie tylko mają podobne położenie w sekwencji kodującej, ale także identyczne fazy jak u *G. mellonella*.

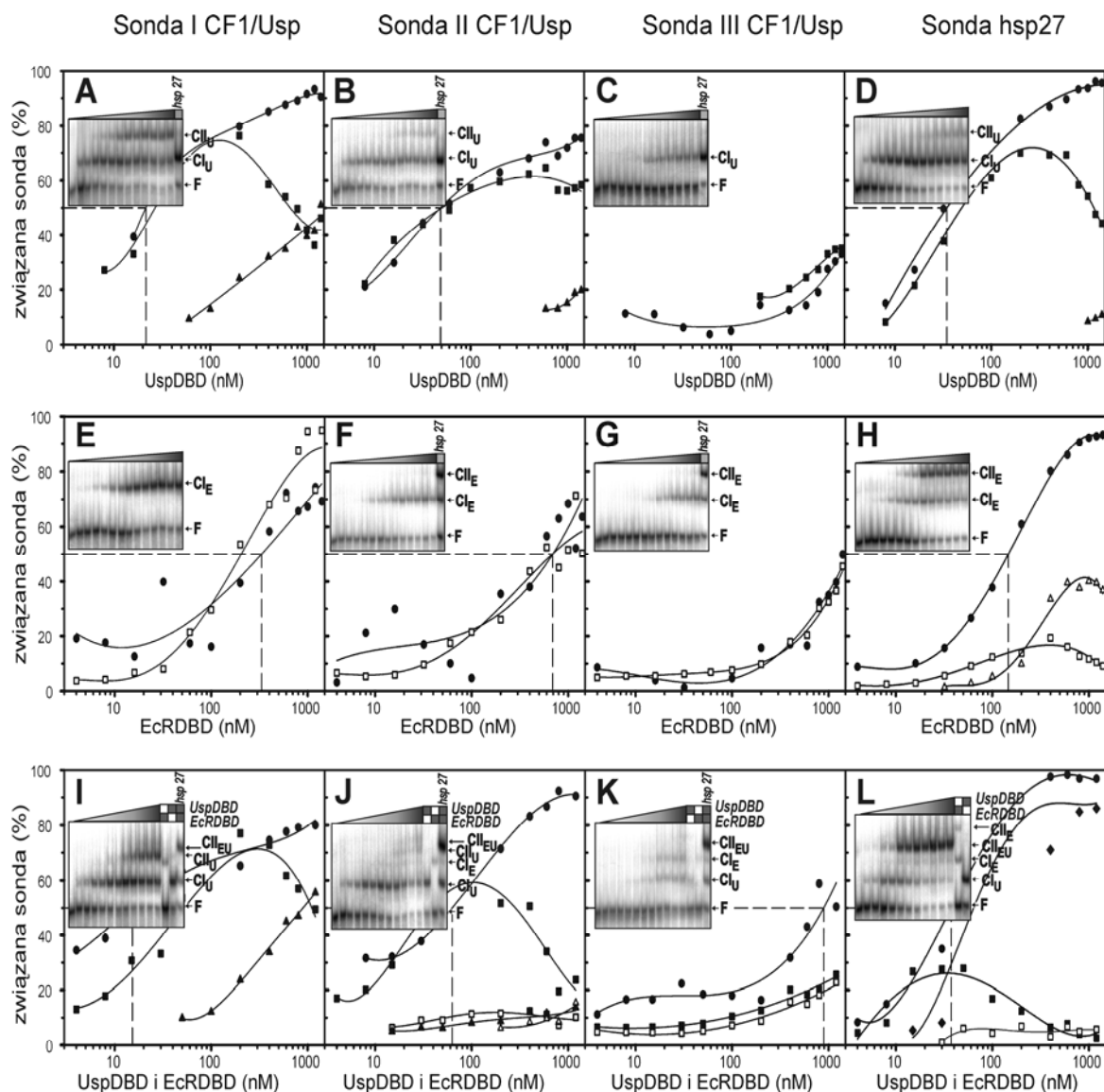


Rys. 23 Położenie intronów w sekwencji *jhbp* z *G. mellonella* i ich fazy. Szare prostokąty symbolizują eksony. Introny oznaczono literami A-D. Kolorem czerwonym wyróżniono kodony, które są przerywane intronami. Sekwencję nukleotydową intronów napisano małymi literami a eksonów dużymi.

7.3 Wyniki EMSA uzyskane na potencjalnych sekwencjach wiążących białko Usp

Jak wspomniano we wcześniejszym rozdziale, w promotorze *jhbp* znaleziono sześć potencjalnych elementów regulatorowych (Tabela 4). Na szczególną uwagę zasłużył czynnik CF1/Usp, ponieważ sugeruje się, że JH jest ligandem dla niego (Jones i Sharp, 1997; Maki i wsp., 2004) oraz może być zaangażowany w kontrolę syntezy JHBP (Rodriguez Parkitna i wsp., 2002). Ponieważ pierwsze analizy sekwencji promotorowej, przeprowadzone przez mniej doskonałe i restrykcyjne narzędzia, wskazały na istnienie trzech potencjalnych miejsc wiązania białka CF1/Usp, więc w eksperymentach EMSA wzięto pod uwagę wszystkie trzy elementy.

Zaprojektowane dwuniciowe sondy, oznaczone jako I, II i III (rozdział 6.1.6.3) mają długość 32 pz i zawierają w swojej środkowej części trzy potencjalne sekwencje regulatorowe. Przeprowadzono eksperymenty zmierzające do oszaowania oddziaływania tych elementów z dwoma białkami UspDBD i/lub EcRDBD (Rys. 24). Równolegle przeprowadzono także doświadczenia z dobrze poznanym elementem *hsp27*EcRE (sonda *hsp27*) (Niedziela-Majka i wsp., 2000; Grad i wsp., 2001; Rymarczyk i wsp., 2003; Orłowski i wsp. 2004), które stanowiły punkt odniesienia w analizach powinowactwa nowo badanych sekwencji (Rys. 24 D, H, L). Przy miareczkowaniu sondy *hsp27* białkiem UspDBD lub EcRDBD zaobserwowano powstawanie dwóch kompleksów, CI_U (monomer) i CII_U (dimer)



Rys. 24 Charakterystyka elementów dystalnych promotora *jhbp* zawierających potencjalne sekwencje regulatorowe CF1/Usp. Na rysunku przedstawiono wyniki eksperymentów EMSA z sondą I (A, E, I), sondą II (B, F, J), sondą III (C, G, K) przy wzrastającym stężeniu białek UspDBD i/lub EcRDBD. Kompleksy były rozdzielane od pozostałej „wolnej” sondy na 6% żelu poliakrylamidowym. Około 20 fmoli sondy inkubowano z białkiem, w zakresie stężeń 0 -1400 nM. Wykresy przedstawiają analizę ilościową powstałych kompleksów, które są uwidocznione na zdjęciach umieszczonych we wstawkach. Wszystkie eksperymenty miareczkowania, poza jednym (E) zawierają kontrolną reakcję z sondą *hsp27EcRE* i 400nM stężeniem białka. Przerwana linia pokazuje stężenie białka, w którym 50% sondy zostało odmiareczkowane. W eksperymentach, gdzie używano dwóch białek (panel I-L) ich stosunek molowy wynosił 1:1, a stężenia podane na skali odnoszą się do każdego białka osobno. Dla porównania, każde białko było także miareczkowane z sondą *hsp27EcRE* (D, H, L). Symbol ● - oznacza procent związanej sondy (100% - F). Symbole ■, ▲, □, Δ, ◆ - przedstawiają odpowiednio kompleksy Cl_U, Cl_{IU}, Cl_E, Cl_{IE} and Cl_{I EU}. Sekwencje sond i ich położenie w promotorze *jhbp* podano w podrozdziale 6.1.6.3.

lub CI_E (monomer) i CII_E (dimer) (Rys. 24 D, H). Dla równomolowej mieszaniny UspDBD i EcRDBD zauważono powstawanie stabilnego heterokompleksu, CI_{EU} (Rys. 24 L), co pozostaje w zgodzie z wcześniejszymi doniesieniami (Niedziela-Majka i wsp., 2000). W przypadku sondy I i II, mimo, że podobnie jak dla *hsp27* tworzą się dwa kompleksy przy miareczkowaniu UspDBD (Rys. 24 A, B) to, gdy weźmiemy mieszaninę tych białek nie pojawia się żaden heterokompleks (Rys. 24 I, J). Również heterokompleksu nie obserwujemy dla sondy III, która w ogóle ma bardzo niskie powinowactwo do badanych białek (Rys. 24 C, G, K). Przy miareczkowaniu EcRDBD sondy I, II i III pojawia się tylko jeden wyraźny kompleks, podczas gdy z sondą *hsp27* zaobserwowano dwa. Inkubacja sondy I z równomolarną mieszaniną UspDBD i EcRDBD umożliwiła powstanie dwóch kompleksów (Rys. 24 I) ale ich ruchliwości odpowiadają tym zaobserwowanym dla monomeru i dimeru UspDBD a nie tym dla heterokompleksu. W przypadku sondy II miareczkowanie mieszaniną UspDBD i EcRDBD daje jeden silny kompleks odpowiadający monomerowi UspDBD i kilka słabo widocznych większych kompleksów (Rys. 24 J). W przypadku sondy III powstają dwa słabe kompleksy odpowiadające ruchliwością monomerom UspDBD i EcRDBD (Rys. 24 K).

Aby porównać aktywność wiążącą UspDBD i EcRDBD, do poszczególnych sond posłużono się wartością stężenia białka, przy którym 50% sondy jest związane w kompleks (Rys. 24, linia przerywana na wykresach). Z analizy tej wynika, że najbardziej oddalony od miejsca startu transkrypcji element CF1/Usp (sonda I) wiąże UspDBD z nieznacznie wyższym powinowactwem w odniesieniu do elementu *hsp27EcRE* (Rys. 24, porównaj A z D). Z drugiej strony, z EcRDBD oddziałuje już około 3 razy słabiej (Rys. 24, porównaj E z H). Miareczkowanie sondy I z mieszaniną białek daje trochę słabsze oddziaływanie niż dla sondy *hsp27*. Oddziaływanie sondy II z badanymi białkami ogólnie jest trochę słabsze niż to obserwowane dla sondy I, ale obydwie sondy są znacznie bardziej aktywne niż III. Otrzymane wyniki sugerują, iż element *hsp27EcRE* oddziałuje z UspDBD i EcRDBD w inny sposób niż elementy CF1/Usp pochodzące z promotora *jhbP*.

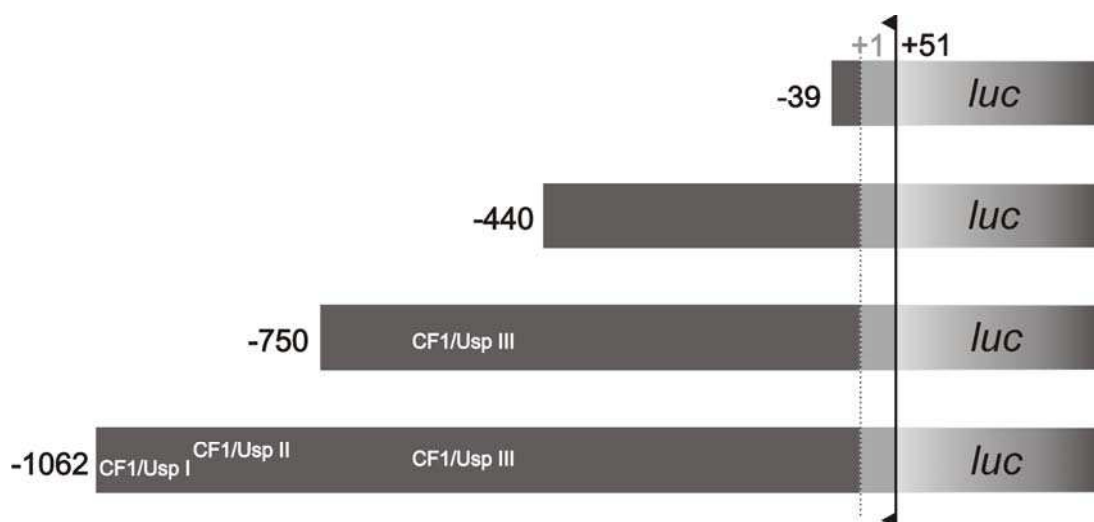
7.4 Badanie aktywności transkrypcyjnej fragmentów promotora

Aby móc potwierdzić, bądź zaprzeczyć czy dany, potencjalny element regulatorowy wpływa na ekspresję genu podjęto próbę skonstruowania układu, który pozwoliłby na śledzenie procesu transkrypcji *in vivo*. Jedną z lepszych, a dostępnych obecnie metod, jest analiza ekspresji w testach z genem reporterowym, dlatego też w dalszych badaniach posłużono się właśnie tą techniką. Ponieważ gen *jhbP* pochodzi z organizmu owada, więc do eksperymentów wybrano owadzią linię komórkową, HighFive, której komórki wywodzą się

z gatunku *Trichoplusia ni* należącego, tak jak *G. mellonella* do rodziny *Lepidoptera*. Ta część projektu była realizowana we współpracy z dr Marcinem Schmidtem z Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Akademii Rolniczej w Poznaniu.

7.4.1 Przygotowanie konstruktów

Pierwszym krokiem do opracowania testów był wybór wektora, do którego wstawiono fragmenty promotora *jhbp* a następnie transfekowano nim komórki. Do eksperymentów wybrano wektor pGL3-Basic (Promega) posiadający zmodyfikowaną sekwencję kodującą lucyferazy *firefly* jako gen reporterowy. Utworzono cztery konstrukty zawierające część promotora kończąca się po stronie 3' na +51 nukleotydzie, natomiast po stronie 5' kolejno na -39, -440, -750 i -1062 (Rys. 25). Pierwszy konstrukt zawierał tylko elementy promotora rdzeniowego, natomiast trzeci i czwarty także elementy CF1/Usp.



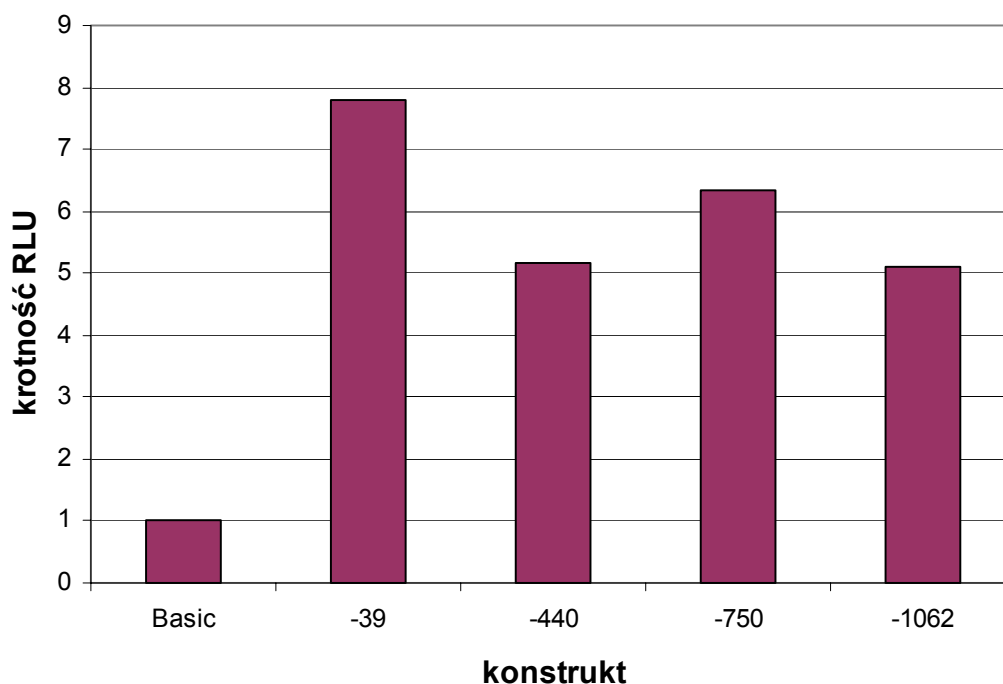
Rys. 25 Fragmenty promotora *jhbp* w wektorze pGL3Basic. Na schemacie przedstawiono konstrukty do testów z genem reporterowym, zawierające fragmenty promotora *jhbp*. Pionową kreską zakończoną trójkątami wskazano miejsce, gdzie kończy się sekwencja promotora i zaczyna sekwencja wektora. Liczby na rysunku określają pozycje w genie *jhbp*. Skrót *luc* symbolizuje gen lucyferazy. Orientacyjnie umieszczono także miejsca występowania elementów CF1/Usp.

Do kontroli wydajności transfekcji używano natomiast wektora pRL-PH, który jest zmodyfikowaną w naszym laboratorium formą wektora pRL-TK (Promega). Z wektora pRL-TK wycięto za pomocą enzymów restrykcyjnych *Bgl*II i *Hind* III sekwencję promotora HSV-TK i wstawiono w to miejsce fragment promotora poliedryny pochodzący z wektora pFastBac 1. Procedura zamiany sekwencji promotorowej w wektorze kontrolnym została

wykonana, ponieważ z doniesień literaturowych wiadomo, że promotory ludzkich wirusów słabo, bądź wcale nie funkcjonują w liniach komórek owadzych.

7.4.2 Kontrola aktywności promotora *jhbp* w testach z genem reporterowym

Przygotowane konstrukty zawierające fragmenty promotora *jhbp* oraz wektory kontrolne zostały wykorzystane do przeprowadzenia testów *in vivo*. Za kontrolę negatywną służył pusty wektor pGL3-Basic, natomiast kontrolą wydajności transfekcji i konstruktem, względem którego standaryzowano wyniki był wektor pRL-PH. W testach badano także poziom tła mierząc ekspresję w komórkach nie transfekowanych żadnym z konstruktyw. Eksperymenty jednorazowo prowadzono w trzech powtórzeniach dla każdego z konstruktyw. Uzyskane z trzech pomiarów wyniki uśredniano i standaryzowano na wektor pRL-PH. Posługiwano się jednostkami RLU (ang., *relative light units*). Ostateczne rezultaty obliczano jako krotność RLU wektora pGL3-Basic (kontrola negatywna). Doświadczenie pokazało, że najwyższą



Rys. 26 Aktywność fragmentów promotora *jhbp* w testach z genem reporterowym. Wykresy słupkowe przedstawiają aktywność kolejnych fragmentów promotora od najkrótszego (-39), obejmującego tylko promotor rdzeniowy do najdłuższego (-1062), obejmującego wszystkie 3 elementy CF1/Usp. Aktywność konstruktyw przedstawiono jako krotność aktywności wykazywanej przez pusty wektor pGL3Basic (Basic).

aktywność transkrypcyjną przejawia najkrótszy konstrukt (Rys. 26), zawierający tylko promotor rdzeniowy (-39 - 51 nt). Aktywność ta jest około 8 razy wyższa od aktywności pGL3-Basic. Pozostałe dłuższe konstrukty mają aktywność około 5-6 razy większą niż pGL3-Basic (Rys. 26). Aktywności transkrypcyjne konstruktów są stosunkowo niskie w porównaniu z podobnymi testami przedstawionymi w literaturze, dlatego być może konieczna będzie jeszcze optymalizacja warunków hodowli, transfekcji oraz samych pomiarów.

8 Dyskusja

Poznanie sekwencji, która nie koduje białka i nie jest transkrybowana stanowi dość duży problem badawczy. Obecnie mimo rozwoju technik sekwencjonowania oraz stosowania komputerów o dużej mocy obliczeniowej, które wspomagają pracę doświadczalną nadal znalezienie sekwencji genu, a szczególnie obszaru promotora i jego miejsc regulatorowych, jest trudnym zadaniem. Przed takim zadaniem stanęłam podczas realizacji tej pracy doktorskiej.

8.1 Identyfikacja obszarów niekodujących i sekwencjonowanie genu *jhbp*

W obecnych czasach sekwencjonowania całych genomów mogłoby się wydawać, że poznanie sekwencji jednego genu, w naszym przypadku około 10 000 pz, to tylko kropla we wciąż rosnącym oceanie poznanych 144 667 612 393 nukleotydów (stan na dzień 15 lipca 2006). Jednak wystarczy przyrzeć się dokładniej sekwencjom zawartym w bazach danych oraz literaturze a okaże się, że identyfikacja poszczególnych genów w genomie nie jest sprawą łatwą, a poszukiwanie sekwencji pojedynczych genów szczególnie ma sens, kiedy mogą one pełnić istotną rolę w regulacji procesów zachodzących w organizmie. Jako przykład można podać opublikowaną sekwencję genomu ludzkiego, nad którym pracowały setki badaczy w wielu wybitnych laboratoriach. Pomimo rozszyfrowania niemal całego DNA człowieka wciąż nie potrafimy scharakteryzować wielu genów, wskazać ich sekwencji promotorowych, sekwencji intronowych i eksonowych. Innym bardzo dobrym przykładem będzie genom *D. melanogaster*, którego odkrycie ogłoszono w 2000 roku (Adams i wsp., 2000). Dotychczas jednak nie zidentyfikowano w nim sekwencji ani miejsca położenia genu *jhbp* a z doniesień literaturowych wynika, że białka wiążące JH są syntezowane w organizmie tego owada (Shemshedini i Wilson, 1988). Taki stan rzeczy wynika z tego, że publikowane sekwencje genomów nie są do końca poznane, ale wciąż korygowane, uzupełniane i poddawane analizom. Powyższy przykład pokazuje także istnienie dużych możliwości do badań dla małych laboratoriów, takich jak nasze, borykających się niejednokrotnie z

problemami technicznymi i finansowymi, a które mogą mimo tego konkurować na niektórych obszarach z wielkimi konsorcjami i wnieść swój wkład w rozwój nauki.

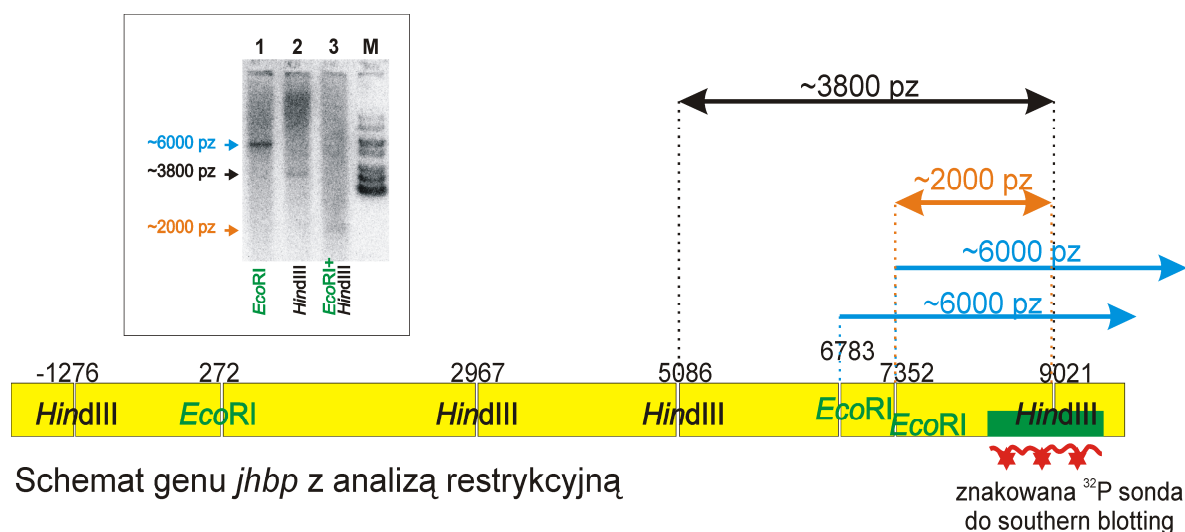
Nasze laboratorium podjęło takie wyzwanie, którego celem początkowo było poznanie sekwencji promotora genu *jhbp* z *G. mellonella*, ale w efekcie końcowym projekt objął cały gen. Zadanie to było szczególnie interesujące, ponieważ w momencie jego rozpoczęcia nie znano żadnego genu *jhbp* a sekwencje cDNA opisano tylko dla czterech gatunków owadów: *M. sexta* (Lerroy i Prestwich, 1990); *H. virescens* (Wojtasek i Prestwich, 1995); *B. mori* (Vermunt i wsp., 2001); *G. mellonella* (Rodriguez Parkitna, 2002). Konkurencja jednak nie była łaskawa i wyprzedziła nas publikując sekwencję genu *jhbp* z *M. sexta* wcześniej (Orth i wsp., 2003). Ten fakt spowodował, że postanowiliśmy poznać więcej niż tylko sekwencję genu i duży wysiłek włożyliśmy w analizę sekwencji.

8.1.1 Wybór strategii sekwencjonowania

W przypadku sekwencjonowania genomów stosuje się metodę *Shotgun*, która została prawie w pełni zautomatyzowana, przez co jest szybka, ale wymaga dla prawidłowego złożenia i uzyskania sekwencji wysokiej jakości kilkukrotnego sekwencjonowania tego samego odcinka DNA. Ponieważ technika *Shotgun* przeznaczona jest do bardzo długich sekwencji, więc nie byłoby opłacalnym zastosowanie jej w naszym projekcie dla poznania najwyżej kilkunastu tysięcy par zasad. Dlatego próbowano znaleźć inną metodę, którą można będzie poznać sekwencję promotora a następnie innych rejonów niekodujących. Mając do dyspozycji tylko cDNA JHBP z *G. mellonella* spróbowano najpierw wyselekcjonować z puli DNA genomowego sekwencję *jhbp* za pomocą techniki *Southern Blotting*. Przy planowaniu sondy do hybrydyzacji wzięto pod uwagę dane statystyczne pochodzące z analizy sekwencji genomu *D. melanogaster* (FlyBase: *A Database of the Drosophila Genome*; <http://flybase.bio.indiana.edu/>), z których wynikało, że średnio na około 400 pz występuje 1 intron. Szacowano więc, że w genie *jhbp* będą przynajmniej 2 introny, dlatego jako sondy zdecydowano się używać fragmentu sekwencji *jhbp* a nie całości znanego cDNA aby uniknąć sytuacji, w której sonda nie parowałaby w całości z DNA genomowym. O tym, że w sekwencji *jhbp* znajdują się introny i prawdopodobnie są długie, świadczyły także nieudane próby amplifikacji DNA genomowego za pomocą par starterów JR13 i JR19 oraz JR20 i JR19, skierowanych do sekwencji kodującej białko. Teraz wiemy, że pomiędzy tymi starterami są introny B i C. Jedynie w reakcji ze starterami JR18 i JR21 uzyskano po PCR specyficzny produkt o długości ~1200 pz, mimo że oczekiwano fragmentu około 300 nukleotydowego. Mogło to świadczyć o istnieniu intronu o długości, ~800 pz, ponieważ PCR z tymi samymi starterami, ale na matrycy cDNA dawał produkt krótszy. Po odczytaniu sekwencji genu

okazało się, że powyższe przypuszczenia były słuszne a szacowanie ilości intronów zaniżone, ponieważ w sekwencji odkryto aż cztery introny o łącznej długości około 8700 pz a amplifikowany starterami JR 18 i JR 21 - intron jest ostatnim i najkrótszym ze wszystkich.

Uzyskany wynik eksperymentu *Southern Blotting*, z wyraźnie widocznymi prążkami o długości 6000 pz i 3800 pz (Rys. 27, ramka) wydawał się zachęcający. Mieliśmy jednak świadomość, że użyta w eksperymencie sonda hybryduje na końcu 3' genu *jhbp* (Rys. 27) i fragment DNA genomowego, który z nią paruje, może nie objąć obszaru promotorowego, dlatego do eksperymentów klonowania wybrano ten o długości 6000 pz. Mimo przekonania, że udało nam się wyselekcjonować z puli DNA genomowego fragment *jhbp* dalsze eksperymenty związane z próbą odczytania jego sekwencji skończyły się fiaskiem (przyczyny podano niżej). Skłoniło nas to do zmiany strategii poszukiwania sekwencji *jhbp*. Ze względu na możliwości techniczne wybraliśmy metodę poznawania sekwencji „krok po kroku” (ang., *Genome Walking*), opartą głównie o PCR. Technika ta jest dosyć czasochłonna, ale w jej przypadku istnieje duże prawdopodobieństwo, że otrzymana sekwencja jest tą, którą poszukujemy.



Schemat genu *jhbp* z analizą restrykcyjną

znakowana ^{32}P sonda
do southern blotting

Rys. 27 Analiza wyników *Southern Blotting* i poznanej sekwencji genu *jhbp*. W ramce, dla lepszego zobrazowania analizy, przedstawiono omawiany już wcześniej wynik southern blotting. Żółty prostokąt symbolizuje gen *jhbp*, na którym zaznaczono miejsca cięcia przez enzymy *EcoRI* i *HindIII*. Zielony obszar przedstawia miejsce parowania znakowanej sondy z DNA genomowym. Ponad sekwencją oznaczono strzałkami prawdopodobne fragmenty genu *jhbp*, które były widoczne w eksperymencie southern blotting. Kolorem niebieskim narysowano obszary, które mogłyby odpowiadać prążkowi o długości ~6000 pz, czarnym - prążkowi o długości ~3800 pz oraz pomarańczowym - prążkowi o długości ~2000 pz.

Po odczytaniu całej sekwencji genu próbowaliśmy sprawdzić, dlaczego pierwsze eksperymenty skończyły się niepowodzeniem i czy w ogóle mogły zakończyć się sukcesem. W tym celu, przy pomocy programu *RestrictionMapper* (<http://www.restrictionmapper.org/>), sprawdziliśmy gdzie w genie *jhbp* znajdują się miejsca cięcia enzymami wykorzystanymi w *Southern Blotting* (*EcoRI* i *HindIII*) oraz, w którym miejscu dokładnie parowała znakowana sonda (Rys. 27). Z analizy tej wynika, że miejsca cięcia mniej więcej zgadzają się z długościami otrzymanych z *southern blotting* prążków, co jest argumentem na to, że nie są one artefaktami ale faktycznie odpowiadają fragmentom genu *jhbp*. Na przedstawionym rysunku nr 27 widać także, że odległość sekwencji, parującej ze znakowaną sondą, od promotora jest duża i znacznie przekracza 6000 pz. Wynika z tego, że nawet najdłuższy uzyskany po *Southern Blotting* fragment genu *jhbp* pokazałby co najwyżej sekwencję intronów C i D, ponieważ prawdopodobnie w większości obejmuje obszar położony poza końcem 3' genu. Schemat ten również tłumaczy, dlaczego nie udało się amplifikować za pomocą PCR mniejszych fragmentów tego 6000 nukleotydowego obszaru. Otóż startery wykorzystywane w tych reakcjach położone były w rejonie, który nie obejmował znajdującego fragmentu *jhbp*.

Z niniejszych rozważań widać, że przy poszukiwaniu sekwencji pojedynczego genu istotne znaczenie dla osiągnięcia celu ma przyjęta strategia oraz, że podjęta decyzja zmiany techniki była słuszna i dzięki temu projekt zakończył się sukcesem.

8.1.2 Wybór techniki sekwencjonowania

W badaniach nad poznaniem sekwencji genów, szczególnie w przypadku dużych konsorcjów czynnikami ograniczającymi postępy w pracy są głównie: reakcja sekwencjonowania, strategia sekwencjonowania, możliwości obliczeniowe komputerów analizujących wyniki. Mając jednak na uwadze szybki rozwój technologii informatycznych, ostatni z wymienionych czynników jest coraz mniej ograniczający. Jeżeli chodzi o techniki sekwencjonowania to najpopularniejszą i do dzisiaj z powodzeniem stosowaną jest odkryta w 1977 przez Sanger i wsp metoda sekwencjonowania przez kontrolowaną terminację replikacji (ang., *chain termination method*). Od czasu odkrycia wprowadzono do niej wiele udoskonaleń i usprawnień, między innymi tzw. cykliczne sekwencjonowanie, ale mimo tego w pojedynczej reakcji można odczytać tylko około 1000 pz. Jest to ilość, która zdecydowanie nie zadawała pracujących nad projektami sekwencjonowania genomów, dlatego wysiłki skierowano w stronę zwiększenia ilości odczytywanych jednocześnie reakcji. Dlatego zastąpiono tradycyjny rozdział elektroforetyczny na żelu poliakrylamidowym, elektroforezą kapilarną. W roku 1999 przedstawiono systemy, w których można było równocześnie

analizować 96 reakcji (Mullikin i McMurrage, 1999) a później nawet 1024 reakcje (Rogers, 1999). Stosunkowo niedawno pojawiły się nowe techniki sekwencjonowania, między innymi pirosekwencjonowanie (szybsze i nie wymaga rozdzielania elektroforetycznych fragmentów DNA) (Ronaghi i wsp., 1998) oraz sekwencjonowanie przez hybrydyzację (Drmanac i wsp., 1989).

W niniejszej pracy posługiwano się metodą cyklicznego sekwencjonowania (szczegóły: Materiały i Metody, rozdz. 6.2.10), która była najlepszą, jaką mogliśmy stosować na posiadanym sekwencjonatorze AlfExpress™. Maksymalna wydajność reakcji jaką osiągnięto to ~900 pz i niewiele się różni od tej uzyskiwanej przy rozdzielaniu w kapilarach. Przeciętnie jednak, z małym marginesem błędów, odczytywano 500-700 pz. Duże znaczenie dla jakości sekwencjonowania, tzn. ilości zidentyfikowanych nukleotydów miała czystość matrycy DNA. Jeżeli zawierała zbyt dużo białek (współczynnik $A_{260}/A_{280} < 1,7$) wtedy odczytywano bardzo mały fragment sekwencji, dlatego zwykle kwalifikowano próbkę do sekwencjonowania, jeżeli $1,8 < A_{260}/A_{280} < 1,9$. Ze względu na strategię poznania genu, jaką ostatecznie obrano (*genome walking*), najistotniejszym elementem eksperymentu była wydajność pojedynczej reakcji, sekwencjonowania, ponieważ od niej zależała ilość „kroków”, w których odczytana zostanie cała sekwencja genu.

8.2 Porównanie genów *jhbp* z *G. mellonella* oraz *M. sexta*

8.2.1 Ogólna architektura genów i ich sekwencje

Ponieważ nie udało nam się wygrać wyścigu o poznanie pierwszej sekwencji genu *jhbp* u owadów, więc postanowiliśmy pójść w kierunku analizy i porównania obu genów.

Dotychczas porównywano tylko sekwencje aminokwasowe JHBP. Zauważono wysoki stopień identyczności dla tych białek z *G. mellonella* oraz *M. sexta* i dwóch jeszcze znanych sekwencji z *H. virescens* oraz z *B. mori* (Rodriguez Parkitna i wsp., 2002). Analizy te pokazały, że na 227 pozycji we wszystkich sekwencjach, 57 jest obsadzonych przez identyczne aminokwasy. Ponadto obecne u *G. mellonella* cztery reszty cysteiloowe są zachowane także u pozostałych owadów (Rodriguez Parkitna i wsp., 2002), które posiadają 5 lub 6 reszt cysteiloowych w dojrzałym białku. W przypadku sekwencji nukleotydowej części kodującej genu *jhbp* z *G. mellonella* i *M. sexta* podobieństwo jest mniejsze i wynosi nie więcej niż 30%.

Powierzchowe spojrzenie na ilość oraz rozmieszczenie intronów i eksonów pozwala wyciągnąć wnioski, że ogólna organizacja dwóch genów, pochodzących z blisko spokrewnionych, bo należących do jednego rzędu - *Lepidoptera* owadów, jest bardzo

podobna. Obydwa geny zawierają po pięć eksonów i cztery introny, które mają takie same fazy oraz są podobnie, ale nie identycznie umiejscowione pomiędzy odcinkami kodującymi (Rys. 28 i Tabela 8). Podobieństwo to pomogło w identyfikacji położenia intronów w *jhbp* z *G. mellonella* (Rys. 15).

Szczegółowa analiza pokazuje, że mimo zachowanej w ewolucji struktury i dużego podobieństwa w sekwencji aminokwasowej geny te są odmienne, szczególnie w rejonach niekodujących (Rys. 28 i Tabela 6). Pierwszą istotną różnicą jest dłuższy aż o ponad 3000 pz

jhbp z *G. mellonella*



jhbp z *M. sexta*



Rys. 28 Schemat struktury genów *jhbp* z *G. mellonella* i *M. sexta*. Na rysunku przedstawiono układ oraz wielkości intronów oraz eksonów w obu genach *jhbp* z zachowaniem proporcji. Kolorem niebieskim i literką P oznaczono obszar promotora, kolorem czerwonym i symbolami od EI do EV kolejne eksony a na zielono i literami od A do D obszary intronów.

transkrypt u *G. mellonella*, co wynika przede wszystkim z innej długości poszczególnych intronów (Rys. 28 i Tabela 6). Wprawdzie otwarta ramka odczytu u *M. sexta* jest krótsza tylko o 3 nukleotydy, natomiast sekwencja cDNA aż o 178 (Tabela 6). Przyglądając się bliżej

Tabela 6 Krótka charakterystyka genów *jhbp* z *G. mellonella* i *M. sexta* oraz ich elementów promotora rdzeniowego.

Charakterystyka genu <i>jhbp</i>	<i>G. mellonella</i>	<i>M. sexta</i>
Długość transkryptu	9750	6663
Długość cDNA	1024	846
Otwarta ramka odczytu dla JHBP	735	732
Sekwencja potencjalnej kasety TATA	-29 TATAAA -24	-31 TATATATA -23
Sekwencja potencjalnego Inr	+14 TCAGTA +19	-2 TCAGTT +5
Sekwencja potencjalnego DPE	+38 AGGTG +43	+28 ACCGT +32

sekwencji pierwszego eksonu zauważono, że w *jhbp* z *G. mellonella* koduje on 18 aminokwasów, które zgodnie z regułami von Heijne'go (von Heijne, 1990), wraz z dwoma nukleotydami z eksonu drugiego, stanowią sekwencję sygnałową kierującą białko na

zewnątrz komórki i odcinaną przez peptydazy sygnałowe. Natomiast u *M. sexta* ten sam ekson koduje 20 aminokwasów, z których 18 przypada na sekwencję sygnałową a pozostałe dwa należą już do dojrzałego białka. Wskazuje to na nieco odmienny sposób rozpoznawania sekwencji kierującej u obu gatunków.

8.2.2 Potencjalne elementy regulatorowe

Mogłoby się wydawać, że regulacja ekspresji *jhbp* u *M. sexta* i *G. mellonella*, ze względu na ich bliskie pokrewieństwo, powinna być przynajmniej podobna, bo po cóż natura miałaby wymyślać odmienną ścieżkę kontroli dla każdego z gatunków. Aby dociec prawdy podjęto próbę znalezienia i analizy potencjalnych elementów regulatorowych obecnych w obu genach *jhbp*, które mogą być odpowiedzialne za regulację procesu transkrypcji.

W pierwszej kolejności przyjrano się sekwencji promotora rdzeniowego. Orth i wsp. (2003) w pracy o genie *jhbp* z *M. sexta* wskazali na istnienie w tym rejonie trzech potencjalnych elementów regulatorowych: kasety TATA (-31 TATATATA -23), elementu Inr (-2 TCAGTT +5) oraz DPE (+28 ACCGT +32) (Tabela 6). W tym samym obszarze dla genu z *G. mellonella* także wskazano trzy potencjalne elementy, ale ich sekwencje i położenia są odmiennie (Tabela 6). Najbardziej podobne w obu genach są kasety TATA ze względu na zbliżoną lokalizację i podobną sekwencję. Pozostałe dwa elementy różnią się znacznie umiejscowieniem a także sekwencją DPE. Świadczyć to może o tym, że albo wskazane elementy Inr i DPE są нефункционалне a kompleks transkrypcyjny tworzy się tylko przy pomocy kasety TATA, albo badane promotory mają zupełnie odmienną budowę i regulacja transkrypcji *jhbp* różni się u obu gatunków owadów.

Podjęto w niniejszej pracy także próbę znalezienia potencjalnych elementów regulatorowych w promotorze dystalnym *jhbp*, zarówno z *G. mellonella* jak i za *M. sexta* mimo, iż pierwsze analizy obliczeniowe tego ostatniego zostały przeprowadzone przez Orth i wsp. (2003). Wskazali oni za pomocą programu MatInspector v2.2 istnienie w rejonie do -1000 nukleotydu jedenastu potencjalnych miejsc wiązania GATA1, 3 oraz C/EPB α i β . Ponieważ wymienione czynniki są związane z regulacją dojrzewania komórek krwi u zwierząt wyższych, nie wydaje się więc prawdopodobne, że będą występować u owadów. Ponadto zidentyfikowano dwie sekwencje prawdopodobnie oddziałujące z receptorem ekdyzonu w pozycjach, -5806 i -5880 (Orth i wsp., 2003), a więc w zupełnie odmiennych położeniach niż u *G. mellonella*, gdzie w pozycjach -1053, -960 i -475 znaleziono potencjalne miejsca wiązania tylko jednego ze składników funkcjonalnego receptora ekdyzonu - białka Usp (elementy I - III CF1/Usp).

Tabela 7 Porównanie elementów regulatorowych w promotorach dystalnych *G. mellonella* i *M. sexta*.

Nazwa czynnika oraz jego funkcja	Ilość miejsc wiążących w promotorze ^a	
	<i>G. mellonella</i>	<i>M. sexta</i>
<i>Hunchback</i> (gen segmentacji, aktywuje kaskadę genów koniecznych do rozwoju tułowia)	1 (+)	-
<i>Heat shock factor</i> (czynnik aktywujący biosyntezę białek szoku cieplnego)	6 (+)	9 (+)
	6 (-)	1 (-)
<i>Ultrabithorax</i> (gen segmentacji, reguluje formowanie się skrzydeł)	1 (-)	-
<i>Broad-Complex Z3</i> (wczesny gen odpowiedzi na 20E)	1 (+)	1 (-)
<i>Elf-1</i> reguluje ekspresję genów podczas aktywacji limfocytów T)	1 (-)	-
<i>Chorion factor 1/ ultraspiracle</i> ("sierocy" receptor jądrowy, tworzy razem z EcR funkcjonalny receptor dla 20E)	1 (+)	-
<i>CF2-II</i>	-	1 (-)
<i>Broad-Complex Z1</i> (wczesny gen odpowiedzi na 20E)	-	1 (+)
<i>Abdominal-B</i>	-	2 (+)

^a Znaki (+) i (-) wskazują czy dana sekwencja jest na nici kodującej, czy niekodującej.

Ze względu na znaczny rozwój narzędzi do poszukiwania sekwencji regulatorowych, w niniejszej pracy przeprowadzono ponowną analizę 1945 nukleotydów promotora genu *jhbp* z *M. sexta* wraz z analizą takiego samego odcinka promotora z *G. mellonella*. Niektóre znalezione przy pomocy programu Match[®] potencjalne elementy regulatorowe występują w obu promotorach (Tabela 7). Natomiast sekwencje dla czynników Hb, Ubx, Elf-1, CF1/Usp są obecne tylko u *G. mellonella*, a takie jak CF2-II, BR-C Z1, Abd-B występują wyłącznie u *M. sexta*. Niektóre z elementów, między innymi HSE (*ang.*, Heat Shock Element), powtarzają się kilkakrotnie w sekwencji. Element HSE aktywuje biosyntezę białek szoku cieplnego poprzez związanie HSF (Fernandes i wsp., 1994). Funkcjonalny HSE jest zwykle złożony z trzech odwrotnie powtórzonych pentamerów. W niektórych przypadkach pomiędzy sekwencjami znajdują się krótkie odstępki (Manuel i wsp., 2002) Dla *D. melanogaster* pokazano, że do prawidłowego związania HSF z sekwencją *in vitro* wystarczają tylko dwa odwrócone powtórzenia HSE (Perisic i wsp., 1989) zawierające pięć nukleotydów z rdzeniem o sekwencji -GAA-. Układ elementów „głowa do głowy” jak i „ogon do ogona” mają podobne powinowactwo do HSF i wykazują podwójną symetrię. W promotorze *G. mellonella*



znajdują się trzy HSE położone blisko siebie, w pozycjach: -382, -389 i -395 (Tabela 4, pogrubioną czcionką), dwa z nich to bezpośrednie powtórzenia z pojedynczym odstępniakiem, a trzeci to odwrócone powtórzenie z odstępniakiem dwunukleotydowym. Elementy te, ze względu na swoje podobne ułożenie jak w funkcjonalnych HSE, mogą prawdopodobnie uczestniczyć w odpowiedzi na czynniki stresowe. W promotorze *M. sexta* znajdują się aż cztery HSE położone od siebie w odstępach co dwa nukleotydy, ale niestety wszystkie są bezpośrednimi powtórzeniami, co jak można wnosić z dotychczasowych wyników badań w tym zakresie (Perisic i wsp., 1989), prawdopodobnie dyskwalifikuje je jako elementy funkcjonalne.

Z analizy obszarów promotorowych genów *jhbp* z *G. mellonella* oraz *M. sexta* nasuwają się wnioski, że w regionach tych raczej trudno znaleźć podobne elementy regulatorowe. Jedynym wspólnym potencjalnym elementem regulatorowym, którego zarówno sekwencja jak i położenie w obu promotorach są zbliżone jest kasetta TATA. Jak wspomniano już wcześniej, być może kompleks transkrypcyjny jest „zakotwiczany” w promotorze tylko poprzez ten element. Jednoznaczną odpowiedź na pytanie, czy jedynym funkcjonalnym elementem promotora *jhbp* jest kasetta TATA, powinny dać badania funkcjonalne, prowadzone w ramach naszego zespołu przez mgr inż. Anię Cimicką-Niewiadomską. W przypadku promotora dystalnego istnieje możliwość, że wspólne dla obu genów elementy regulatorowe znajdują się poza zbadanym dotychczas obszarem.

8.2.3 Budowa i pochodzenie intronów

Zagłębiając się w tematykę intronów zainteresowaliśmy się istotną dla prawidłowego i precyzyjnego wycinania sekwencji wtrąconych sprawą, czyli miejscami splicingu. Z przedstawionego w Tabeli 8 zestawienia wynika, że wszystkie introny z *jhbp* należą do grupy, którą charakteryzują sekwencje $5'GU-AG3'$ na końcach. Jest to najliczniej reprezentowana wśród wszystkich organizmów grupa intronów. Ogromna większość tych intronów jest wycinana z pierwotnego transkryptu przez spliceosom U2-zależny, ale istnieją także U12-zależne. W przypadku *D. melanogaster* przewaga jest bardzo duża, ponieważ na 40 648 intronów U2-zależnych przypada tylko 11 U12-zależnych (Sheth i wsp., 2006). Z tego, że istnieje bardzo małe prawdopodobieństwo, że introny z *jhbp* mogłyby być U12-zależne nie wynika, że z takimi nie mamy do czynienia w przypadku *jhbp*. Dlatego sprawdziliśmy to dokładnie biorąc pod uwagę, poza statystyką, także inne kryteria klasyfikacji. Ułatwiła to publikacja Sheth i wsp. (2006), którzy nie tylko podzielili 40 648 intronów typu GU-AG z *D. melanogaster* na introny U2-zależne i U12-zależne, ale także porównali ich miejsca splicingowe 3' i 5' (Rys. 29). Z tego zestawienia wynika, że koniec 5' w intronach U12-

Tabela 8 Porównanie położenia intronów i ich miejsc splicingowych obecnych w genach *jhbp* z *G. mellonella* i *M. sexta*.

		5' miejsce splicingowe	3' miejsce splicingowe			
Sekwencja konsensusowa połączenia intron-ekson w pre-mRNA u kręgowców (Long and Deutsch, 1999)		 AAGGTAAGT ...	 .. (Py) _n TNCAGGT	Położenie w mRNA*	Położenie w pre-mRNA*	Długość intronów (pz)
Intron A	<i>G. mellonella</i>	CGGGTAAGT TTTGCAG AT	106-107	107-4561	4455
	<i>M. sexta</i>	AAGGT G AGT TTTCCAG GG	101-102	102-1138	1037
Intron B	<i>G. mellonella</i>	CACGTAAGT TTTTTAG AT	347-348	4803-7121	2319
	<i>M. sexta</i>	CAGGTA AAT TTAACAG GA	330-331	1368-4961	3594
Intron C	<i>G. mellonella</i>	CTAGTAAGT ATTACAG GC	471-472	7247-8341	1095
	<i>M. sexta</i>	CAAGTAAGT TTTACAG GC	455-456	5087-5867	781
Intron D	<i>G. mellonella</i>	TTGGTATGA TTTACAG AT	624-625	8495-9351	857
	<i>M. sexta</i>	AAGGT G TGT TTCC CA AGT	618-619	6021-6423	403

* Pozycja +1 odpowiada pierwszemu transkrybowanemu nukleotydowi

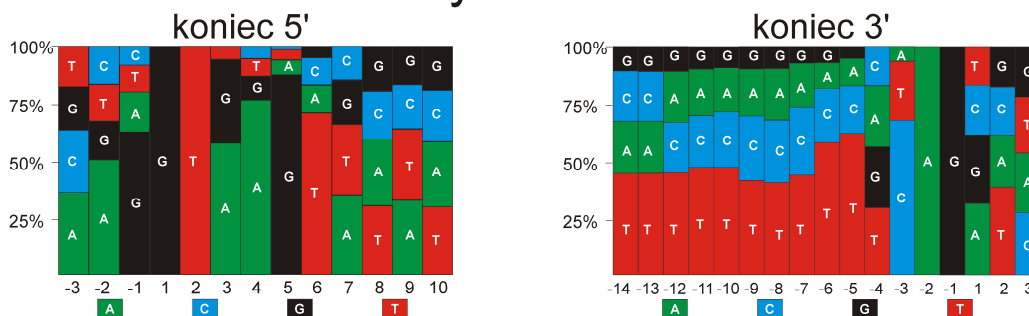
** Orth i wsp., 2003

Istotne dla splicingu nukleotydy położone w sekwencji eksonowej i intronowej otaczającej miejsce splicingowe oznaczono odpowiednio szarymi i czarnymi kolumnami. Sekwencje eksonowe są oznaczone szarymi, pochyłymi literami, natomiast intronowe czarnymi. Nukleotydy odbiegające od sekwencji zgodnej zostały pogrubione.

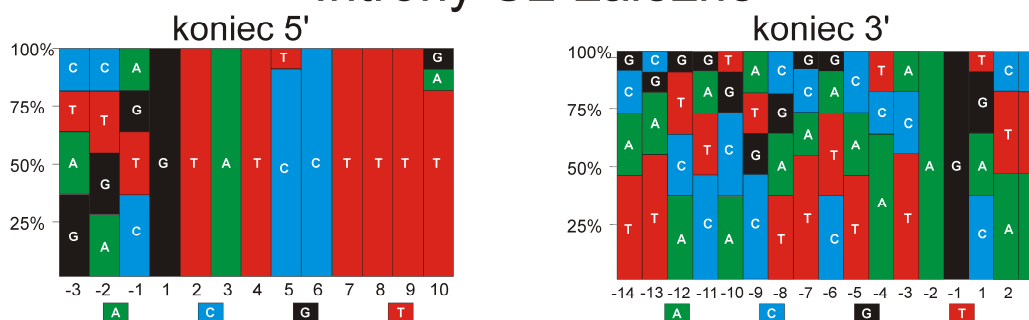
zależnych jest szczególnie silnie zachowany. Ogólnie z badań intronów u wielu, nawet odległych ewolucyjnie, gatunków wynika, że introny typu U12 mają bardziej zachowaną sekwencję w części intronowej miejsca splicingowego niż U2. Natomiast w intronach typu U2 część informacji o miejscu splicingowym jest zachowana także w obszarze eksonowym. Porównując znalezione w obu genach *jhbp* introny (Tabela 8) z Rysunkiem 29 okazuje się, że żaden z intronów nie ma na końcu 5' sekwencji, która odpowiadałaby tej dla intronów U12-zależnych. Ponadto introny z *jhbp* na końcu 3' mają charakterystyczny dla tych U2-zależnych ciąg reszt pirymidynowych. Są to argumenty wystarczająco przekonujące, żeby zaklasyfikować wszystkie introny z genów *jhbp* do grupy U2-zależnych.

Z najnowszych badań nad fazami intronów i czasem ich pojawienia się w toku ewolucji wynika, że introny „stare” są zachowane genach organizmów pochodzących z różnych królestw lub dwóch odległych linii rozwojowych natomiast „nowe” są charakterystyczne tylko dla pojedynczych linii rozwojowych (Sverdlov i wsp., 2003). Jak dotychczas występowanie JHBP udowodniono tylko w obrębie gromady owadów, można więc sądzić, wedle podanej powyżej definicji, że introny w genie *jhbp* należą do grupy „nowych”.

Introny U2-zależne



Introny U2-zależne



Rys. 29 Porównanie miejsc splicingowych wszystkich znanych intronów typu 5'GU-AG3' z *D. melanogaster* (wg Sheth i wsp., 2006). Na histogramach przedstawiono częstość występowania poszczególnych nukleotydów w obrębie miejsc splicingowych w intronach U2 i U12-zależnych. Kolor zielony odpowiada reszcie adenylowej (A), niebieski cytydylowej (C), czarny guanylowej (G), a czerwony tymidylowej (T).

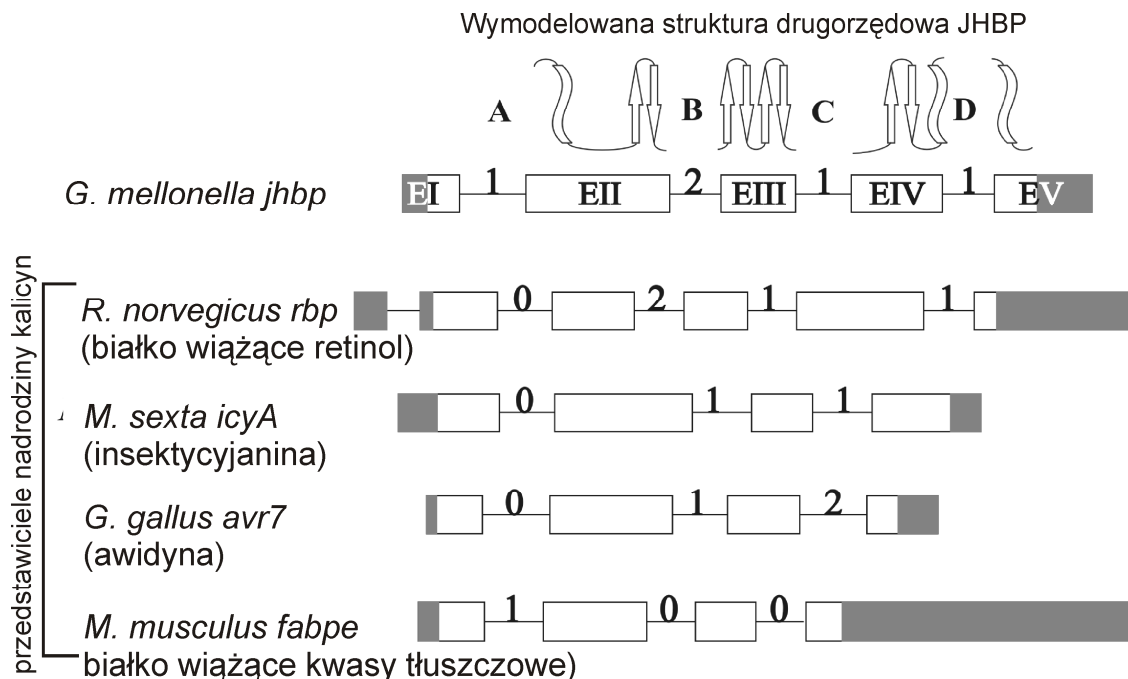
Ciekawe wydaje się także to, że żaden z intronów w *jhbp* nie jest w fazie 0, która przeważa zarówno wśród „starych” jak i „nowych” intronów nad fazami 1 i 2. Ponadto nadmiar fazy 0 jest szczególnie widoczny wśród intronów „nowych” (Sverdlov i wsp., 2003). Według badań introny fazy 0 zajmują w genach bardziej zachowawcze rejony niż introny fazy 1 i 2, które częściej podlegają mutacjom opartym na delecji sekwencji intronowych (Rogers, 1990; Lynch, 2002). Może to stanowić wytłumaczenie dla sytuacji jaka ma miejsce w przypadku *jhbp* z *G. mellonella*, gdzie w eksperymencie amplifikacji intronów zaobserwowano, że w puli DNA genomowego występują kopie genu, które nie zawierają intronu B (Rys. 16).

8.3 Czy JHBP należy do rodziny lipokalin?

W oparciu o model drugorzędowej struktury JHBP z *G. mellonella* zaproponowano, że białko to należy do nadrodziny kalicyń (Rodriguez Parkitna i wsp., 2002). Do tej dużej grupy białek należą m.in. lipokaliny, awidyny i białka wiążące kwasy tłuszczowe (FABP, *ang.* Fatty Acid Binding Protein). Cząsteczki zaklasyfikowane do kalicyń zawierają charakterystyczne struktury drugorzędowe w postaci tak zwanej β -beczki, na którą składa się:

α -helisa, osiem β -struktur i dwie α -helisy na końcu C. Podobieństwo struktur pierwszorzędowych tych białek jest bardzo małe, jednak ich struktury drugorzędowe są zachowane, dlatego przypuszcza się, że informacją, która jest zachowana w toku ewolucji jest podobna organizacja genów. Porównano więc struktury genów przedstawicieli rodzin należących do nadrodziny kalicyn oraz JHBP (Rys. 28). Dodatkowo przedstawiono także wymodelowaną strukturę drugorzędową JHBP z *G. mellonella* (Rodriguez Parkitna i wsp., 2002). Z doniesień literaturowych wynika, że w nadrodzinie kalicyn, wszystkie lipokaliny mają podobną organizację genów, podczas gdy awidyny (białka wiążące biotyne) i FABP posiadają odmienną strukturę eksonów i intronów, przez co należą do oddzielnej gałęzi ewolucyjnej (Mans i Neitz, 2004). Geny lipokalin posiadają od 4 do 8 eksonów. Ich pozycje oraz położenia i fazy intronów pozwoliły na skonstruowanie drzewa filogenetycznego, które okazało się być bardzo podobne do tego opracowanego na podstawie sekwencji białek (Salier, 2000). Badania prowadzone przez Sanchez i wsp. (2003) pokazały, że lipokaliny występujące u stawonogów mają tylko 3 – 4 introny (A –D). Na przykładzie *rbp* z *R. norvegicus* można sądzić, iż exon 2 tego genu powstał poprzez połączenie dwóch pierwotnych eksonów 2 i 3 z równoczesną utratą intronu B.

Zestawienie, jakie przedstawiono na Rysunku 30 miało na celu pomóc w odpowiedzi na tytułowe pytanie oraz spróbować się zagłębić w tajemnicę pochodzenia genu *jhbp* i organizację budowy nadrodziny kalicyn. Przykłady przedstawicieli poszczególnych rodzin to: *rbp* i *icyA* – lipokaliny; *avr7* – awidyny oraz epidermalny *fabp* – białka wiążące kwasy tłuszczowe. Wyraźnie widać, że nie ma większych korelacji w organizacji genów pomiędzy JHBP a przedstawicielem awidyn, czy FABP. Podobieństwa natomiast są większe przy porównaniu JHBP do RBP, gdzie organizacja eksonów jak i fazy intronów B, C i D są identyczne. Takie podobieństwo wskazywałoby na to, że spośród badanych genów te dwa są bliżej spokrewnione. Wniosek ten pozostaje w zgodzie z wcześniejszymi sugestiami, że JHBP ogólnie można zaklasyfikować do nadrodziny kalicyn (Rodriguez Parkitna i wsp., 2002) a szczególnie, jak wskazuje powyższe rozważanie, do rodziny lipokalin. Interesującym również wydaje się, że intron A *jhbp* jest w fazie 1, a nie tak jak introny innych lipokalin w 0. Może to wskazywać na późniejsze pojawienie się tego intronu podczas ewolucji tej rodziny białek.



Rys. 30 Organizacja genów w nadrodzinie kalicyń i *jhbp*. Na górze rysunku pokazano wymodelowaną strukturę drugorzędową dojrzałego JHBP (Rodriguez Parkitna i wsp., 2002) w odniesieniu do rozmieszczenia eksonów (EI, EII, EIII, EIV, EV) oraz intronów (A, B, C, D) w genie. Wstążki odpowiadają α -helisom a strzałki β -strukturom. Poniżej zaprezentowano schematycznie pozycje eksonów i intronów w genach białek należących do wybranych przedstawicieli nadrodziny kalicyń (*Rattus norvegicus rbp* (M10610); *M. sexta insektocyjanina A* (X64714); *Gallus gallus awidyna 7* (AJ237659) i *Mus musculus białko wiążące kwasy tłuszczowe* (AJ223066)). Puste prostokąty reprezentują sekwencje kodujące, natomiast szare reprezentują sekwencje niekodujące. Długości poszczególnych eksonów są proporcjonalne. Pomędzy eksonami pokazano fazy intronów (0 lub 1, lub 2).

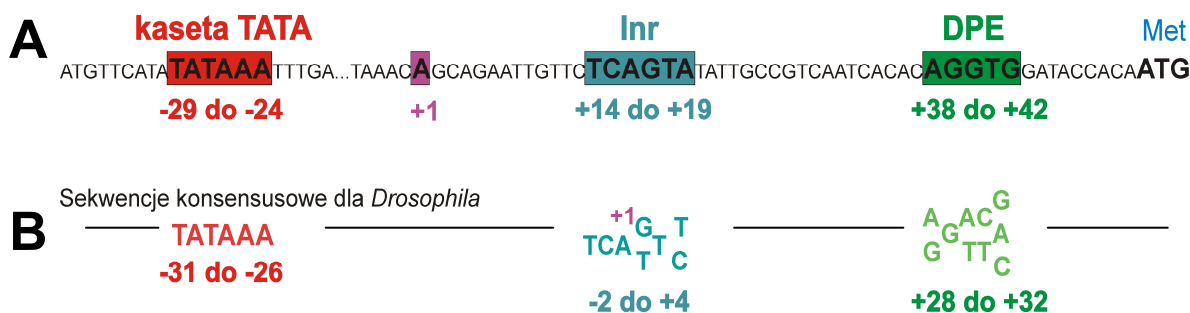
8.4 Porównanie elementów promotora rdzeniowego *jhbp* z innymi promotorami genów owadzych

Analiza promotora rdzeniowego dostarcza nam podstawowych informacji na temat mechanizmu transkrypcji. Elementy regulatorowe występujące w tym obszarze wskazują na umiejscowienie głównych czynników transkrypcyjnych, ale także są sekwencjami mogącymi oddziaływać z czynnikami regulatorowymi.

Analiza niedużej grupy naturalnych promotorów *D. melanogaster*, zawierającej w sumie 205 sekwencji wskazała, że kasetta TATA występuje w 42,4%, Inr w 67,3% i DPE w 40% (Kutach i Kadonaga, 2000). Ponadto około 31% promotorów nie zawierało ani kasety TATA, ani DPE. Biorąc pod uwagę powyższe trzy elementy, pokazano, że większość promotorów rdzeniowych genów kodujących białka z *D. melanogaster*, można sklasyfikować w dwóch grupach (Smale, 2001). Pierwsza to promotory zawierające kasetę TATA, położoną w

obszarze -25 - (-30) pz, współdziałającą z Inr obejmującym miejsce startu transkrypcji. Do drugiej grupy należą promotory z elementem Inr oraz DPE, zlokalizowanym zwykle od +28 do +32 pz. Analiza statystyczna większej grupy 1941 promotorów, przeprowadzona później przez Ohler i wsp. (2002), wskazała na istnienie nowego elementu – MTE położonego od +20 do +30 pz. Jego obecność w promotorze rdzeniowym może prawdopodobnie rekompensować brak zarówno kasety TATA jak i DPE, ponieważ funkcjonuje niezależnie od innych elementów (Lim i wsp., 2004). MTE prowadzi transkrypcję w połączeniu z Inr, ale zaobserwowano także synergistyczne oddziaływanie z kasetą TATA i DPE (Lim i wsp., 2004). MTE wydaje się być konserwowanym ewolucyjnie elementem od *Drosophila* do człowieka.

W świetle powyższych odkryć interesującym wydaje się rozważenie, jakiego typu promotor rdzeniowy posiada gen *jhbp*. Pomimo, że ogólna organizacja genów *jhbp* z *G. mellonella* i *M. sexta* jest podobna, to sekwencje i pozycje elementów regulatorowych w rdzeniu promotora różnią się znacząco (Tabela 6). Sekwencja kasety TATA u *G. mellonella* jest identyczna z sekwencją zgodną dla tego elementu (Rys. 31) (Butler i Kadonaga, 2002) ale różni się jednym nukleotydem od tej z *M. sexta* (-31 TATATATA -23). Z drugiej strony, charakterystyczna dla owadów, obejmująca miejsce startu transkrypcji, sekwencja Inr znajduje się w promotorze *M. sexta* (-2 TCAGTT +4), natomiast u *G. mellonella* jest odmienna od sekwencji zgodnej zarówno w swym położeniu jak i na jednej pozycji nukleotydowej od strony 3' (Rys. 31 i Tabela 6). Wskazano także prawdopodobną sekwencję DPE w rdzeniowym promotorze *G. mellonella*, która rozpoczyna się dopiero na +38 nukleotydzie natomiast jest położona w odpowiedniej odległości od Inr. Dotychczas



Rys. 31 Porównanie potencjalnych elementów regulatorowych promotora rdzeniowego *jhbp* i sekwencji zgodnych dla *D. melanogaster*. Panel A przedstawia fragment promotora rdzeniowego od -38 nukleotydu do pierwszego kodonu metioniny (Met). Potencjalne elementy regulatorowe wyróżniono w ramkach i podano ich położenie w genie *jhbp*. Na panelu B widnieją sekwencje zgodne dla elementów rdzeniowego promotora z *D. melanogaster* oraz ich położenia.

opublikowano, że funkcjonalny DPE jest zawsze powiązany z Inr, ale powinien być zlokalizowany od +28 do +32 pz (Butler i Kadonaga, 2002; Kadonaga, 2002). W pracy o genie *jhbp* z *M. sexta* autorzy wskazują DPE w położeniu odpowiednim dla tego elementu (28-32 pz) (Orth i wsp., 2003), jednak sekwencja jego (+28 ACCGT +32) różni się od konsensusu na pozycji +29 i +30 (Tabela 6 i Rys. 31), z czego miejsce +29 jest kluczowe i odpowiedzialne za funkcjonalność. Z kolei DPE z *jhbp* z *G. mellonella* różni się od konsensusu tylko jednym nukleotydem w pozycji uznanej za zmienną (Rys. 31). Wydaje się więc, że głównymi czynnikami, które prawdopodobnie wykluczają element DPE u *Lepidoptera* z roli podstawowego czynnika transkrypcyjnego jest albo, tak jak ma to miejsce u *G. mellonella*, jego nieprawidłowe położenie, albo odmienność od sekwencji zgodnej, tak jak to ma miejsce u *M. sexta*. Ponieważ nie wskazano w promotorze rdzeniowym *jhbp* elementu MTE ani żadnych innych sekwencji regulatorowych, wydaje się być prawdopodobne, że ekspresja tego genu u wymienionych gatunków znajduje się pod kontrolą kasety TATA oraz Inr co klasyfikowałoby promotor do grupy TATA-Inr (Kutach i Kadonaga, 2000). W przypadku *G. mellonella* nie można wykluczyć, że ze względu na swoje położenie (14-19 pz), także element Inr jest niefunkcjonalny i podstawowy kompleks transkrypcyjny jest organizowany tylko przez kasetę TATA.

Rozważania powyższe otwierają drogę do nowych eksperymentów zmierzających do odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób funkcjonuje promotor rdzeniowy *jhbp*, i które ze wskazanych elementów są funkcjonalne.

8.5 Potencjalne elementy regulatorowe w intronach *jhbp* z *G. mellonella*

Analiza sekwencji intronów A, B i C wskazała istnienie charakterystycznych elementów regulatorowych wiążących białko BR-C (Tabela 4). Istnieją przesłanki mówiące, że prawdopodobnie geny *BR-C* oraz *E75A* są miejscami krzyżowania się szlaków przekazywania sygnałów pochodzących od JH i 20E. Zostało pokazane, że indukowane przez 20E białko BR-C jest niezbędne do prawidłowego rozwoju owada, a szczególnie podczas apoptozy tkanek larwalnych (Renault i wsp., 2001). Hormon juvenilny również ma wpływ na poziom białka BR-C u owadów (Dubrovsky, 2005). Z jednej strony zapobiega indukcji jego ekspresji przez 20E podczas przekształcania z larwy w poczwarkę, z drugiej strony w trakcie przemiany w postać dorosłą, która zachodzi pod nieobecność BR-C, wysoki poziom JH uniemożliwia wyłączenie ekspresji genu *BR-C* (Zhou i Riddiford, 2001; Zhou i Riddiford, 2002; Riddiford i wsp., 2003). Zaobserwowano także możliwość ponownej indukcji syntezy BR-C pod wpływem obecności JH, co prowadzi do dodatkowego przepoczwarczenia. Warto zauważyć, że białko BR-C koordynuje przekazywanie sygnału pochodzącego od 20E do

wielu tkanek. Ma ono między innymi wpływ na różnicowanie komórek w ciele tłuszczowym larw, które jest głównym miejscem syntezy JHBP. Zostało oszacowane, że BR-C wiąże się do około 200 miejsc w genomie *D. melanogaster*. Obecność aż osiemnastu takich potencjalnych miejsc wiązania w intronach genu *jhbp* z *G. mellonella* sugeruje, że obszary te mogą pełnić szczególną regulatorową rolę. Wymagałoby to jednak dodatkowych doświadczeń i wyjaśnienia. Obecność elementów regulatorowych dla BR-C w genie *jhbp* świadczy o tym, że być może wiele aspektów rozwoju *G. mellonella* jest kontrolowanych przez obszary niekodujące bogate w pary AT, przede wszystkim zlokalizowane w pierwszym i drugim intronie. Niedawne doniesienia literaturowe mówią, że elementy regulatorowe odpowiedzialne za ekspresję genu są głównie skupione w obszarze promotorowym oraz w pierwszym, zwykle najdłuższym intronie (Rogozin i wsp., 2005).

8.6 Funkcjonalność elementów regulatorowych CF1/Usp wiążących białko

Usp

Przeszukiwanie najnowszych baz danych pokazało istnienie tylko jednego potencjalnego elementu wiążącego Usp. Jednak wcześniejsze poszukiwania za pomocą mniej dopracowanych narzędzi wskazały trzy sekwencje, które analizowano pod kątem oddziaływania z białkiem Usp. Pierwszy z elementów zawiera siedem nukleotydów (GGGGTCA) obecnych w optymalnej sekwencji wiążącej Usp opisanej przez Christianson i wsp. (1992). Kolejne dwa elementy, drugi - AGGGTCA i trzeci - ATGGTCA, są także zbliżone do konsensusu.

Eksperymenty EMSA przedstawione w wynikach pokazują, że sonda I wykazuje najwyższe powinowactwo do UspDBD. Powinowactwo to jest nawet trochę mocniejsze niż obserwowane dla *hsp27EcRE* (Rys. 24, porównaj A z D). Wynika z tego, że wiązanie Usp silnie zależy od ilości reszt guanidylowych obecnych po stronie 5' elementu regulatorowego. Zaobserwowano również wiązanie EcRDBD do sondy I, która zawiera naturalny element wiążący Usp pochodzący z promotora *jhbp*. Wiązanie to jest jednak słabsze o około 10 razy niż dla *hsp27EcRE*. (Rys. 24, porównaj E z H). W doświadczeniach z równomolarną mieszaniną UspDBD i EcRDBD nie zaobserwowano kooperatywności w wiązaniu DNA, podczas gdy silne synergistyczne oddziaływanie było obserwowane dla tych białek z *hsp27EcRE* (Niedziela-Majka i wsp., 2000).

Dotychczasowe doniesienia na temat funkcji Usp wskazują, że receptor ten może tworzyć na elementach regulatorowych zarówno homo, jak i heterodimery. Najlepiej opisanym przykładem jest heterodimer EcR i Usp, który aktywuje ekspresję genu *hsp27* po związaniu 20E (Yao i wsp., 1993). Aktywność homodimeru natomiast została zasugerowana w pracy, w

której badano oddziaływanie rekombinowanego Usp z elementem DR1 (bezpośrednie powtórzenie z odstępniakiem jednonukleotydom) w linii komórkowej Sf9 (Fang i wsp., 2005).

Z badań footprinting prowadzonych na elemencie *hsp27EcRE* z heterodimerem UspDBD i EcRDBD oraz z samym UspDBD wynika, że obszar chroniony przez białko UspDBD jest tylko o 5 nt mniejszy od obszaru 21 nt chronionego przez heterodimer (Dobryczycki i wsp., 2006). Eksperymenty te potwierdzają wcześniejsze doniesienia, że elementem „kotwiczącym” heterodimer receptora ekdyteroidowego na DNA jest białko Usp (Niedziela-Majka i wsp., 2000). Ponadto doświadczenia zginania helisy DNA przez białko pokazują, że UspDBD ma największy wpływ na strukturę przestrzenną całego kompleksu. Pomimo, że w naszym przypadku nie stwierdziliśmy kooperatywnego oddziaływania UspDBD z EcRDBD, to niewykluczone jest, że związane do DNA białko Usp może tworzyć heterodimer z innym białkiem bądź homodimer z drugą cząsteczką Usp.

8.7 Podsumowanie oraz dalsze perspektywy badań

Wyniki i analizy przedstawione w niniejszej pracy wnoszą wiele nowych informacji o genie *jhbp*, jego strukturze oraz potencjalnych elementach regulatorowych, które mogą mieć wpływ na rozwój i metamorfozę u owadów. Natomiast poszukiwania fragmentów innych genów w intronach *jhbp* i skojarzenie ich położenia z zawartością par GC w danych obszarach sekwencji, czy też dokładne określenie długości intronów, ich faz oraz miejsc splicingowych poszerza ogólną wiedzę o ewolucji genów. Szczególnie porównanie dwóch sekwencji *jhbp* z *M. sexta* i *G. mellonella* pokazuje, że dwa geny pochodzące z blisko spokrewnionych ewolucyjnie owadów mogą być w pewnych obszarach identyczne a w innych zupełnie odmienne. Podobieństwo jest widoczne w położeniu i fazach intronów oraz w sekwencji aminokwasowej. Istotne różnice natomiast występują na poziomie sekwencji nukleotydowej i w występujących potencjalnych elementach regulatorowych zarówno promotora rdzeniowego, jak i dystalnego.

Wiele zawartych w powyższej rozprawie wyników może stanowić punkt wyjścia, a niektóre już są podstawą, do dalszych badań. Teoretyczne rozważania o elementach regulatorowych promotora rdzeniowego stały się fundamentem, dla już eksperymentalnych badań zmierzających do odkrycia, które ze wskazanych potencjalnych sekwencji regulatorowych są funkcjonalne i jaki mają wpływ na ekspresję *jhbp*. Do tego celu przybliżają nas doświadczenia prowadzone w naszym laboratorium oparte o testy EMSA oraz zapoczątkowane w niniejszej pracy testy z genem reporterowym, realizowane we współpracy z dr Marcinem Schmidtem z Akademii Rolniczej w Poznaniu. Drugim istotnym wątkiem

rozprawy, który jest kontynuowany, stanowi zagadnienie związane z potencjalnymi elementami regulatorowymi promotora dystalnego – CF1/Usp. Przypuszcza się, że są one miejscem połączenia dwóch szlaków przekazywania sygnału hormonalnego pochodzącego od 20E i JH u owadów. Przedstawione w pracy badania trzech miejsc CF1/Usp po raz pierwszy pokazały oddziaływanie tych potencjalnych elementów regulatorowych z promotora *jhbp* z rekombinowanymi białkami UspDBD oraz EcRDBD. Eksperymenty te już zostały rozszerzone o analizy footprinting. Także testy z genem reporterowym, zapoczątkowane w tej rozprawie, na konstrukcjach zawierających fragmenty promotora *jhbp* są kontynuowane. Przeprowadzenie takich doświadczeń z dodaniem hormonów 20E i JH mogłoby wskazać, czy i jak te niskocząsteczkowe związki wpływają na ekspresję *jhbp*. Także koekspresja w tym układzie z białkami Usp i EcR może dać odpowiedź na od dawna nierozwiązany problem dotyczący oddziaływania receptora ekdyteroidowego i jego liganda na zmiany w syntezie JHBP w trakcie rozwoju owada.

9 Literatura

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., Chen, L. X., Brandon, R. C., Rogers, Y. H., Blazej, R. G., Champe, M., Pfeiffer, B. D., Wan, K. H., Doyle, C., Baxter, E. G., Helt, G., Nelson, C. R., Gabor, G. L., Abril, J. F., Agbayani, A., An, H. J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R. M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E. M., Beeson, K. Y., Benos, P. V., Berman, B. P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M. R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K. C., Busam, D. A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J. M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L. B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A. D., Dew, I., Dietz, S. M., Dodson, K., Doup, L. E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B. C., Dunn, P., Durbin, K. J., Evangelista, C. C., Ferraz, C., Ferriera, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A. E., Garg, N. S., Gelbart, W. M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J. H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N. L., Harvey, D., Heiman, T. J., Hernandez, J. R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K. A., Howland, T. J., Wei, M. H., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, G. H., Ke, Z., Kennison, J. A., Ketchum, K. A., Kimmel, B. E., Kodira, C. D., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A. A., Li, J., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., McIntosh, T. C., McLeod, M. P., McPherson, D., Merkulov, G., Milshina, N. V., Mobarri, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S. M., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D. M., Nelson, D. L., Nelson, D. R., Nelson, K. A., Nixon, K., Nusskern, D. R., Pacleb, J. M., Palazzolo, M., Pittman, G. S., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M. G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R. D., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B. C., Siden-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, M. P., Smith, T., Spier, E., Spradling, A. C., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirskas, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A. H., Wang, X., Wang, Z. Y., Wassarman, D. A., Weinstock, G. M., Weissenbach, J., Williams, S. M., Woodage, T., Worley, K. C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q. A., Ye, J., Yeh, R. F., Zaveri, J. S., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X. H., Zhong, F. N., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, H. O., Gibbs, R. A., Myers, E. W., Rubin, G. M. i Venter, J. C. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.
- Akiyama, Y., Hosoya, T., Poole, A. M. i Hotta Y. (1996). The gcm-motif: a novel DNA-binding motif conserved in *Drosophila* and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14912-14916.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. i Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Altschul, S. F. i Lipman, D. J. (1990). Protein database searches for multiple alignments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 87, 5509-5513.

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. i Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST i PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Archibald, J. M., O'Kelly, C. J. i Doolittle, W. F. (2002). The chaperonin genes of jakobid and jakobid-like flagellates: implications for eukaryotic evolution. *Mol.Biol. Evol.* 19, 22–31.
- Ashburner, M., Chihara, C., Meltzer, P. i Richards, G. (1974). Temporal control of puffing activity in polytene chromosome. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 38, 655-662.
- Ashburner, M. i Richards, G.. (1976). Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. III. Consequences of ecdysone withdrawal. *Dev Biol.* 2,241-55.
- Baker, F. C. (1990). Techniques for identification and quantification of juvenile hormones and related compounds in *Arthropods*. In: *Morphogeetic Hormones in Arthropods: Discovery, Synthesis, Metabolism, Evolution, Mode of Action, and Techniques*. A. P. Gupta. (New Brunswick: Rutgers University Press), 389-453.
- Benson, M. i Pirrotta, V. (1988). The *Drosophila zeste* protein binds cooperatively to sites in many gene regulatory regions: implications for transvection and gene regulation. *EMBO J.* 7, 3907-3915.
- Bialecki, M., Shilton, A. , Fichtenberg, C. , Segraves, W. A. i Thummel, C. S. (2002). Loss of the ecdysteroid-inducible E75A orphan nuclear receptor uncouples molting from metamorphosis in *Drosophila*. *Dev Cell.* 2, 209-20.
- Billas, I. M., Moulinier, L., Rochel, N. i Moras, D. (2001). Crystal structure of the ligand-binding domain of the ultraspiracle protein USP, the ortholog of retinoid X receptors in insects. *J Biol Chem* 276, 7465-74.
- Blencowe, B. J. (2000). Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem Sci.* 3,106-10.
- Braun, R. P. i Wyatt, G. R. (1996). Sequence of the hexameric juvenile hormone-binding protein from the hemolymph of *Locusta migratoria*. *J. Biol. Chem.* 271, 31756-31762.
- Brennan, C. A., Li, T. R., Bender, M., Hsiung, F. i Moses, K. (2001). Broad-complex, but not ecdysone receptor, is required for progression of the morphogenetic furrow in the *Drosophila* eye. *Development* 128, 1-11.
- Brown, J. W. i Simpson, C. G. (1998). Splice site selection in plant pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 77–95.
- Burge, C. B., Padgett, R. A. i Sharp, P. A. (1998a). Evolutionary fates and origins of U12-type introns. *Mol Cell.* 6, 773-85.
- Burge, C. B., Tuschl, T. H. i Sharp, P. (1998b). Splicing of precursors to mRNA by the spliceosome. In *RNA World II*. Edytorzy: Gesteland, R. F., Cech, T. R. i Atkins, J. F., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 525–560.
- Burke, T. W. i Kadonaga, J. T. (1996). *Drosophila* TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev.* 6, 711-24.
- Burke, T. W. i Kadonaga, J. T. (1997). The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*. *Genes Dev* 11, 3020-31.
- Burley, S. K. i Roeder, R. G. (1996). Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem.* 65, 769-99.
- Burmester T. (2002). Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. *J Comp Physiol [B].* 2, 95-107.
- Butler, J. E. i Kadonaga, J. T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes&Dev.* 16, 2583-2592.

- Cakouros, D., Daish, T., Martin, D., Baehrecke, E. H. i Kumar, S. (2002). Ecdysone-induced expression of the caspase DRONC during hormone-dependent programmed cell death in *Drosophila* is regulated by Broad-Complex. *J Cell Biol* 157, 985-95.
- Cavalier-Smith, T. (1985). Selfish DNA and the origin of introns. *Nature* 6017, 283-4.
- Cech, T. R. (1985). Self-splicing RNA: implications for evolution. *Int. Rev. Cytol.* 93, 3–22.
- Celniker S. E., Keelan D. J. i Lewis E. B. (1989). The molecular genetics of the bithorax complex of *Drosophila*: characterisation of the products of the Abd-B domain. *Genes Dev.* 3,1424-1436.
- Chomczyński, P. (1994). Single-Step Method of Total RNA Isolation by Acid Guanidine-Phenol Extraction. In: *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. III J. Cellis. (Academic Press, Inc.), 680-683.
- Chomczyński, P. i Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Christianson, A. M., King, D. L., Hatzivassiliou, E., Casas, J. E., Hallenbeck, P. L., Nikodem, V. M., Mitsialis, S. A. i Kafatos, F. C. (1992). DNA binding and heteromerization of the *Drosophila* transcription factor chorion factor 1/ultraspiracle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11503-7.
- Clayton, G. M., Peak-Chew, S. Y., Evans, R. M. i Schwabe, J. W. (2001). The structure of the ultraspiracle ligand-binding domain reveals a nuclear receptor locked in an inactive conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1549-54.
- Clever, U. i Karlson, P. (1960). Induction of puff changes in the salivary gland chromosomes of *Chironomus tentans* by ecdysone. *Exp Cell Res.* 20, 623-6.
- Corden, J., Wasylyk, B., Buchwalder, A., Sassone-Corsi, P., Kedinger, C. i Chambon, P. (1980). Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes. *Science.* 4463, 1406-14.
- Crick, F. (1979). Split genes and RNA splicing. *Science* 204, 264–271.
- Cymborowski, B. (1984). *Endokrynologia owadów*. Warszawa, Państwowe Wydawnictwa Naukowe.
- Doolittle, W. F. (1978). Genes in pieces: were they ever together? *Nature* 5654, 581–582.
- Darnell, J. E. i Doolittle, W. F. (1986). Speculations on the early course of evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 83, 1271–1275.
- Darnell, J. E. Jr. (1978). Implications of RNA-RNA splicing in evolution of eukaryotic cells. *Science* 4374, 1257-60.
- De Kort, C. A. D. i Koopmanschap, A. B. (1989). Binding of juvenile hormone III to lipophorin from the American cockroach *Periplaneta americana*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 11, 159–172.
- de Souza, S. J., Long, M. i Gilbert, W. (1996). Introns and gene evolution. *Genes Cells* 1, 493–505.
- de Souza, S. J., Long, M., Klein, R. J., Roy, S., Lin, S. i Gilbert, W. (1998). Toward a resolution of the introns early/late debate: only phase zero introns are correlated with the structure of ancient proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5094-9.
- Dębski, J., Wyslouch-Cieszyńska, A., Dadlez, M., Grzelak, K., Kłudkiewicz, B., Kołodziejczyk, R., Lalik, A., Ożyhar, A. i Kochman, M. (2004). Position of disulfide bonds and N-glycosylation site in juvenile hormone binding protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 260-266.
- Dietrich, R. C., Incorvaia, R. i Padgett, R. A. (1997). Terminal intron dinucleotide sequences do not distinguish between U2- and U12-dependent introns. *Mol Cell.* 1, 151-60.
- Dillwith, J. W., Mane, S. D. i Chippendale, G. M.. (1985). High affinity juvenile hormone binding protein of the hemolymph of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*. Characteristics and relation to diapause. *Insect Biochem.* 15, 233-246.
- Dobryszczycki, P., Grad, I., Krusinski, T., Michaluk, P., Sawicka, D., Kowalska, A., Orłowski, M., Jakob, M., Rymarczyk, G., Kochman, M. i Ozyhar A. (2006). The DNA-binding

- domain of the ultraspiracle drives deformation of the response element whereas the DNA-binding domain of the ecdysone receptor is responsible for a slight additional change of the preformed structure. *Biochemistry*. 3, 668-75.
- Drmanac, R., Labat, I., Brukner, I. i Crkvenjakov, R. (1989). Sequencing of megabase plus DNA by hybridization: theory of the method. *Genomics*. 2, 114-28.
- Dubrovsky, E. B., Dubrovskaya, V. A. i Berger, E. M. (2001). Selective binding of *Drosophila* BR-C isoforms to a distal regulatory element in the *hsp23* promoter. *Insect Biochem Mol Biol* 31, 1231-9.
- Dubrovsky, E. B., Dubrovskaya, V. A. i Berger, E. M. (2004). Hormonal regulation and functional role of *Drosophila* E75A orphan nuclear receptor in the juvenile hormone signaling pathway. *Dev Biol* 268, 258-70.
- Dubrovsky, E. B. (2005). Hormonal cross talk in insect development. *Trends Endocrinol Metab* 16, 6-11.
- Duk, M., Krotkiewski, H., Forest, E., Rodriguez Parkitna, J. M., Kochman, M. i Lisowska, E. (1996). Evidence for glycosylation of the juvenile-hormone-binding protein from *Galleria mellonella* hemolymph. *Eur. J. Biochem*. 242, 741-746.
- Dynlacht, B. D., Attardi, L. D., Admon, A., Freeman, M. i Tjian R. (1989). Functional analysis of NTF-1, a developmentally regulated *Drosophila* transcription factor that binds neuronal cis elements. *Genes Dev*. 3, 1677-1688.
- Emami, K. H., Jain, A. i Smale, S. T. (1997). Mechanism of synergy between TATA and initiator: synergistic binding of TFIID following a putative TFIIA-induced isomerization. *Genes Dev*. 22, 3007-19.
- Ekker, S. C., von Kessler, D. P. i Beachy. Ph. A. (1992). Differential DNA sequence recognition is a determinant of specificity in homeotic gene action. *EMBO J*. 11, 4059-4072.
- Engelmann, F. i Mala, J. (2000). The interactions between juvenile hormone (JH), lipophorin, vitellogenin, and JH esterases in two cockroach species. *Insect Biochem Mol Biol* 30, 793-803.
- Ferkovich, S. M., Silhacek, D. L. i Rutter, R. R. (1975). Juvenile hormone binding proteins in the haemolymph of the Indian meal moth. *Insect Biochem*. 15, 141-150.
- Ferkovich, S. M., Oberlander, H. i Rutter, R. R. (1977). Release of juvenile hormone binding protein by fat body of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*, in vitro. *J. Insect Physiol*. 23, 297-302.
- Fernandes, M., Xiao, H. i Lis, J. T. (1994). Fine structure analyses of the *Drosophila* and *Saccharomyces* heat shock factor--heat shock element interactions. *Nucleic Acids Res* 22, 167-73.
- Flatt, T., Tu, M. P. i Tatar, M. (2005). Hormonal pleiotropy and the juvenile hormone regulation of *Drosophila* development and life history. *Bioessays* 27, 999-1010.
- Fletcher, J. C., D'Avino, P. P. i Thummel, C. S. (1997). A steroid-triggered switch in E74 transcription factor isoforms regulates the timing of secondary-response gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9, 4582-6.
- Fletcher, J. C. i Thummel, C. S. (1995). The *Drosophila* E74 gene is required for the proper stage- and tissue-specific transcription of ecdysone-regulated genes at the onset of metamorphosis. *Development* 121, 1411-1421.
- Florence, B., Handrow, R. i Laughon A. (1991). DNA-binding specificity of the fushi tarazu homeodomain. *Mol. Cell. Biol*. 11, 3613-3623.
- Forman, B. M., Umesono, K., Chen, J. i Evans, R. M. (1995). Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell*. 4, 541-50.
- Frilander, M. J. i Steitz, J. A. (1999). Initial recognition of U12-dependent introns requires both U11/5' splice-site and U12/branchpoint interactions. *Genes Dev*. 13, 851-863.

- Gershenson, N. I., Trifonov, E. N. i Ioshikhes, I. P. (2006). The features of *Drosophila* core promoters revealed by statistical analysis. *BMC Genomics*. 7, 161.
- Ghbeish, N. i McKeown, M. (2002). Analyzing the repressive function of ultraspiracle, the *Drosophila* RXR, in *Drosophila* eye development. *Mech Dev* 1-2, 89-98.
- Gilbert, L. I., Granger, N. A. i Roe, R. M. (2000). The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 617-644.
- Gilbert, L. I., Rybczynski, R. i Warren, J. T. (2002). Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annu Rev Entomol.* 47, 883-916.
- Gilbert, W. (1987). The exon theory of genes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 52, 901-905.
- Gilbert, W., de Souza, S. J. i Long, M. (1997). Origin of genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7698-7703.
- Gilbert, W. i Glynias, M. (1993). On the ancient nature of introns. *Gene* 135, 137-144.
- Go, M. (1981). Correlation of DNA exonic regions with protein structural units in haemoglobin. *Nature* 291, 90-2.
- Gogos, J. A., Hsu, T., Bolton, J., Kafatos, F. C. (1992). Sequence discrimination by alternatively spliced isoforms of a DNA binding Zinc finger domain. *Science* 257, 1951-1955.
- Goldberg, M. L. (1979). Praca doktorska pt. Sequence analysis of *Drosophila* histone genes. Stanford University, Stanford, California.
- Gonzy, G., Pokholkova, G. V., Peronnet, F., Mugat, B., Demakova, O. V., Kotlikova, I. V., Lepesant, J. A. i Zhimulev, I. F. (2002). Isolation and characterization of novel mutations of the Broad-Complex, a key regulatory gene of ecdysone induction in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol* 32, 121-32.
- Goodman, W., O'Hern, P.A., Zaugg, R. H. i Gilbert, L. I. (1978). Purification and characterization of a juvenile hormone binding protein from the hemolymph of the fourth instar tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Mol Cell Endocrinol.* 2, 225-42.
- Goodman, W. G. (1990). A simplified method for synthesizing juvenile hormone-protein conjugates. *J Lipid Res* 31, 354-7.
- Grad, I., Niedziela-Majka, A., Kochman, M. i Ożyhar, A. (2001). Analysis of Usp DNA binding domain targeting reveals critical determinants of the ecdysone receptor complex interaction with the response element. *Eur J Biochem* 268, 3751-8.
- Grebe, M., Przibilla, S., Henrich, V. C. i Spindler-Barth, M. (2003). Characterization of the ligand-binding domain of the ecdysteroid receptor from *Drosophila melanogaster*. *Biol Chem.* 1, 105-16.
- Green, M. R. (2000). TBP-associated factors (TAFII)s: multiple, selective transcriptional mediators in common complexes. *Trends Biochem Sci.* 25, 59-63.
- Gregory, S. L., Kortschak, R. D., Kalionis, B. i Staint R. (1996). Characterization of the dead ringer gene identifies a novel, highly conserved family of sequence-specific DNA-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* 16, 792-799.
- Haecker, U., Kaufmann, E., Hartmann, C., Juergens, G., Knoechel, W. i Jaeckle H. (1995). The *Drosophila* fork head domain protein crocodile is required for the establishment of head structures. *EMBO J.* 14, 5306-5317.
- Hall, S. L. i Padgett, R. A. (1994). Conserved sequence in a class of rare eucaryotic nuclear introns with non-consensus splice sites. *J. Mol. Biol.* 239, 357-365.
- Hall, B. L. i Thummel, C. S. (1998). The RXR homolog ultraspiracle is an essential component of the *Drosophila* ecdysone receptor. *Development.* 23, 4709-17.
- Hatzivassiliou, E., Cardot, P., Zannis, V. I. i Mitsialis, S. A. (1997). Ultraspiracle, a *Drosophila* retinoic X receptor alpha homologue, can mobilize the human thyroid hormone receptor to transactivate a human promoter. *Biochemistry* 30, 9221-31.
- Henrich, V. C., Sliter, T. J., Lubahn, D. B., MacIntyre, A. i Gilbert, L. I. (1990). A steroid/thyroid hormone receptor superfamily member in *Drosophila melanogaster*

- that shares extensive sequence similarity with a mammalian homologue. *Nucleic Acids Res.* *14*, 4143-8.
- Hetru, C., Li, K. W., Bulet, P., Lagueux, M. i Hoffmann, J. A. (1991). Isolation and structural characterization of an insulin-related molecule, a predominant neuropeptide from *Locusta migratoria*. *Eur J Biochem* *201*, 495-9.
- Hewes, R. S. i Taghert, P. H. (2001). Neuropeptides and neuropeptide receptors in the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Res* *11*, 1126-42.
- Hidayat, P. i Goodman, W. G. (1994). Juvenile hormone and hemolymph juvenile hormone binding protein titers and their interaction in the hemolymph of fourth stadium *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* *24*, 709-715.
- Hoffmeister, H. (1966). Ecdysterone, a new metamorphosis hormone of insects. *Angew Chem Int Ed Engl.* *2*, 248-9.
- Ismail, S. M., Ismail, P. M. i Gillott, C. (1995). Juvenile hormone-dependent LHPI and RNA synthesis in *Melanoplus sanguinipes* long hyaline tubule: events associated with the "insensitive period". *Gen Comp Endocrinol* *98*, 87-93.
- Jackson, I. J. (1991). A reappraisal of non-consensus mRNA splice sites. *Nucleic Acids Res.* *14*, 3795-8.
- Jiang, C., Lamblin, A. F., Steller, H. i Thummel, C. S. (2000). A steroid-triggered transcriptional hierarchy controls salivary gland cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Mol Cell* *5*, 445-55.
- Jones, G. i Jones, D. (2000). Considerations on the structural evidence of a ligand-binding function of ultraspiracle, an insect homolog of vertebrate RXR. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *30*, 671-679.
- Jones, G. i Sharp, P. A. (1997). Ultraspiracle: an invertebrate nuclear receptor for juvenile hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *94*, 13499-13503.
- Kadonaga, J. T. (2002). The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Exp Mol Med* *34*, 259-64.
- Kasai, Y., Nambu, J. R., Lieberman, P. M. i Crews S. T. Dorsal-ventral patterning in *Drosophila*: DNA binding of snail protein to the single-minded gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *89*, 3414-3418.
- Khoury Christianson, A. M., King, D. L., Hatzivassiliou, E., Casas, J. E., Hallenbeck, P. L., Nikodem, V. M., Mitsialis, S. A. i Kafatos, F. C. (1992). DNA binding and heterodimerization of the *Drosophila* transcription factor chorion Factor 1/ultraspiracle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *23*, 11503-7.
- King, L. E. i Tobe, S. S. (1988). The identification of an enantioselective JH III binding protein from the hemolymph of the cockroach., *Diploptera punctata*. *Insect Biochem.* *18*, 793-805.
- Kochman, M. i Wiczorek, E. (1991). Molecular mechanism of the juvenile hormone action. *Acta Biochim. Pol.* *38*, 393-405.
- Kochman, M. i Wiczorek, E. (1994). Proteins involved in juvenile hormone signal transmission. In: *Insects: Chemical, physiological and enviromental aspects.* J. i. w. Kucharczyk. (Wrocław: University of Wrocław), 92-119.
- Koeppe, J. K., Rayne, R. C., Shearin, M. D., Carver, D. J., Whitsel, E. A. i Vogler, R. C. (1988). Synthesis and secretion of a precursor hemolymph juvenile hormone binding protein in the adult female cockroach *Leucophaea maderae*. *Insect Biochem.* *23*, 661-666.
- Kołodziejczyk, R., Dobryszycy, P., Ożyhar, A. i Kochman, M. (2001). Two disulphide bridges are present in juvenile hormone binding protein from *Galleria mellonella*. *Acta Biochim. Polonica* *48*, 917-920.
- Kołodziejczyk, R., Kochman, M., Bujacz, P., Dobryszycy, P., Ożyhar, A. i Jaskólski, M. (2003). Crystalization and preliminary crystallographic studies of juvenile hormone-binding protein from *Galleria mellonella* hemolymph. *Acta Cryst. D* *59*, 519-521.

- Koolman, J. (1990). Ecdysteroids. *Zoological Science* 7, 563-580.
- Koopmanschap, A. B. i de Kort, C. A. (1988). Isolation and characterization of a high molecular weight JH-III transport protein in the hemolymph of *Locusta migratoria*. *Arch Insect Biochem Physiol* 7, 105-118.
- Kopeć, S. (1922). Studies on the necessity of the brain for the inception of insect metamorphosis. *Biol. Bull.* 42, 322-342.
- Kozlova, T. i Thummel, C. S. (2000). Steroid regulation of postembryonic development and reproduction in *Drosophila*. *Trends Endocrinol Metab* 11, 276-80.
- Kramer, K. J., Dunn, P. E., Peterson, R. C., Seballos, H. L., Sanburg, L. L. i Law, J. H. (1976). Purification and characterization of the carrier protein for juvenile hormone from the hemolymph of the tobacco hornworm *Manduca sexta* Johannson (*Lepidoptera: Sphingidae*). *J. Biol. Chem.* 251, 4979-4985.
- Krzyżanowska, D., Lisowski, M. i Kochman, M. (1998). UV-difference and CD spectroscopy studies on juvenile hormone binding to its carrier protein. *J. Pept. Res.* 51, 96-102.
- Kutach, A. K. i Kadonaga, J. T. (2000). The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in *Drosophila* core promoters. *Mol Cell Biol* 20, 4754-64.
- Kwiatowski, J., Krawczyk, M., Kornacki, M., Bailey, K. i Ayala, F. J. (1995). Evidence against the exon theory of genes derived from the triose-phosphate isomerase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8503-8506.
- Lagrange, T., Kapanidis, A. N., Tang, H., Reinberg, D. i Ebright, R. H. (1998). New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: Sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev.* 12, 34-44.
- Lee, C. Y., Cooksey, B. A. i Baehrecke, E. H. (2002). Steroid regulation of midgut cell death during *Drosophila* development. *Dev Biol* 250, 101-11.
- Lee, D. H., Gershenzon, N. G., Gupta, M., Ioshikhes, I. P., Reinberg, D. i Lewis, B. A. (2005). Functional characterization of core promoter elements: the Downstream Core Element is recognized by TAF1. *Mol Cell Biol.* 25, 9674-9686.
- Lee, S. i Garfinkel M. D. (2000). Characterization of *Drosophila* OVO protein DNA binding specificity using random DNA oligomer selection suggests zinc finger degeneration. *Nucleic Acids Res.* 28, 826-834.
- Lemon, B. i Tjian, R. (2000). Orchestrated response: A symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev.* 14, 2551-2569.
- Lenz, C. J., Dillwith, J. W. i Chippendale, G. M. (1986). Comparison of some properties of the high-affinity juvenile hormone binding protein from the larval hemolymph of *Pyrallid* moths. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 3, 61-73.
- Lerro, K. A. i Prestwich, G. D. (1990). Cloning and sequencing of a cDNA for the hemolymph juvenile hormone binding protein of larval *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* 265, 19800-19806.
- Levine, A. i Durbin, R. (2001). A computational scan for U12-dependent introns in the human genome sequence. *Nucleic Acids Res.* 19, 4006-13.
- Lewis, B. A., Kim, T. K. i Orkin, S. H. (2000). A downstream element in the human beta-globin promoter: evidence of extended sequence-specific transcription factor IID contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 13, 7172-7.
- Li, Y., O'Connell, P., Huntsman-Breidenbach, H. H., Cawthon, R., Stevens, J., Hu, G., Neil, S., Robertson, M., White, R. i Viskochil, D. (1995). Genomic organization of the neurofibromatosis 1 gene (NF1). *Genomics* 25, 9-18.
- Lim, C. Y., Santoso, B., Boulay, T., Dong, E., Ohler, U. i Kadonaga, J. T. (2004). The MTE, a new core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Genes Dev* 18, 1606-17.
- Logsdon, J. M. Jr. (1998). The recent origins of spliceosomal introns revisited. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 637-648.

- Long, M. i Deutsch, M. (1999). Association of intron phases with conservation at splice site sequences and evolution of spliceosomal introns. *Mol Biol Evol* 16, 1528-34.
- Long, M. i Rosenberg, C. (2000). Testing the "proto-splice sites" model of intron origin: evidence from analysis of intron phase correlations. *Mol Biol Evol* 17, 1789-96.
- Long, M., Rosenberg, C. i Gilbert, W. (1995). Intron phase correlations and the evolution of the intron/exon structure of genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 12495-9.
- Lorkovic, Z. J., Wiczyrek Kirk, D. A., Lambermon, M. H. i Filipowicz, W (2000). Pre-mRNA splicing in higher plants. *Trends Plant Sci.* 4, 160-7.
- Luehrsen, K. R i Walbot, V. (1994). Intron creation and polyadenylation in maize are directed by AU-rich RNA. *Genes Dev.* 9, 1117-30.
- Lynch, M. (2002). Intron evolution as a population-genetic process. *Proc Natl Acad Sci USA* 9, 6118-23.
- Maki, A., Sawatsubashi, S., Ito, S., Shirode, Y., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Kouzmenko, A., Takeyama, K. i Kato, S. (2004). Juvenile hormones antagonize ecdysone actions through co-repressor recruitment to EcR/USP heterodimers. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 262-7.
- Maniatis, T., Goodbourn, S. i Fischer, J.A. (1987). Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science* 236, 1237-1245.
- Mans, B. J. i Neitz, A. W. (2004). Exon-intron structure of outlier tick lipocalins indicate a monophyletic origin within the larger lipocalin family. *Insect Biochem Mol Biol* 34, 585-94.
- Manuel, M., Rallu, M., Loones, M. T., Zimarino, V., Mezger, V. i Morange, M. (2002). Determination of the consensus binding sequence for the purified embryonic heat shock factor 2. *Eur J Biochem* 269, 2527-37.
- Maroy, P., Dennis, R., Beckers, C., Sage, B. A. i O'Connor, J. D. (1978). Demonstration of an ecdysteroid receptor in a cultured cell line of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12, 6035-8.
- Martin, D. N. i Baehrecke, E. H. (2004). Caspases function in autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Development* 131, 275-84.
- Mauhin, V., Lutz, Y., Dennefeld, C. i Alberga, A. (1993). Definition of the DNA-binding site repertoire for the *Drosophila* transcription factor SNAIL. *Nucleic Acids Res.* 21, 3951-3957.
- Moore, M. J i Sharp, P. A. (1993). Evidence for two active sites in the spliceosome provided by stereochemistry of pre-mRNA splicing. *Nature.* 6444, 364-8.
- Mugat, B., Brodu, V., Kejzlarova-Lepesant, J., Antoniewski, C., Bayer, C. A., Fristrom, J. W. i Lepesant, J. A. (2000). Dynamic expression of broad-complex isoforms mediates temporal control of an ecdysteroid target gene at the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Dev Biol* 227, 104-17.
- Mullikin, J. C. i McMurray, A. A. (1999). Techview: DNA sequencing. Sequencing the genome, fast. *Science* 283, 1867-9.
- Nassel, D. R. (2000). Functional roles of neuropeptides in the insect central nervous system. *Naturwissenschaften* 87, 439-49.
- Niedziela-Majka, A., Kochman, M. i Ozyhar, A. (2000). Polarity of the ecdysone receptor complex interaction with the palindromic response element from the hsp27 gene promoter. *Eur J Biochem* 267, 507-19.
- Nijhout, H. F. (1994). Genes on the wing. *Science* 265, 44-5.
- Nikolov, D. B. i Burley, S. K. (1997). RNA polymerase II transcription initiation: a structural view. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1, 15-22.
- Nilsen, T. W. (2003). The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? *Bioessays.* 12, 1147-9.

- Nixon, J. E., Wang, A., Morrison, H. G., McArthur, A. G., Sogin, M. L., Loftus, B. J., Samuelson, J. (2002). A spliceosomal intron in *Giardia lamblia*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 99, 3701–3705.
- Ohler, U., Liao, G., Niemann, H. i Rubin, G. M. (2002). Computational analysis of core promoters in the *Drosophila* genome. Genome Biol. 3, 1-12.
- Orgel, L. E. i Crick, F. H. (1980). Selfish DNA: the ultimate parasite. Nature 5757, 604-7.
- Orłowski, M., Szyszka, M., Kowalska, A., Grad, I., Zoglowek, A., Rymarczyk, G., Dobryszczycki, P., Krowarsch, D., Rastinejad, F., Kochman, M. i Ozyhar A. (2004). Plasticity of the ecdysone receptor DNA binding domain. Mol Endocrinol. 9, 2166-84.
- Oro, A. E., McKeown, M. i Evans, R. M. (1990). Relationship between the product of the *Drosophila* ultraspiracle locus and the vertebrate retinoid X receptor. Nature 347, 298-301.
- Oro, A. E., McKeown, M. i Evans, R. M. (1992). The *Drosophila* retinoid X receptor homolog ultraspiracle functions in both female reproduction and eye morphogenesis. Development 2, 449-62.
- Orth, A. P., Doll, S. C. i Goodman, W. G. (2003). Sequence, structure and expression of the hemolymph juvenile hormone binding protein gene in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Insect Biochem. Mol. Biol. 93-102.
- O'Shea-Greenfield, A. i Smale, S. T. (1992). Roles of TATA and initiator elements in determining the start site location and direction of RNA polymerase II transcription. J Biol Chem. 267, 1391-1402.
- Ozyhar, A. i Kochman, M. (1987). Juvenile-hormone-binding protein from the hemolymph of *Galleria mellonella* (L). Isolation and characterization. Eur. J. Biochem. 162, 675-682.
- Ozyhar, A., Wiśniewski, J., Sehnal, F. i Kochman, M. (1983). Age Dependent Changes in the binding and Hydrolysis of Juvenile Hormone in the Haemolymph of *Galleria mellonella*. Insect. Biochem. 13, 435-441.
- Palmer, J. D. i Longsdon, M., Jr. (1991) The recent origins of introns. Curr Opin Genet Dev, 4, 470-477.
- Pan D. i Courey A. J. (1992). The same dorsal binding site mediates both activation and repression in a context-dependent manner. EMBO J. 11, 1837-1842.
- Park, Y. C. i Goodman, W. G. (1993). Analysis and modification of thiols in the hemolymph juvenile hormone binding protein of *Manduca sexta*. Arch. Biochem. Biophys. 302, 12-18.
- Park, Y. C., Tesch, M. J., Toong, Y. C. i Goodman, W. G. (1993). Affinity purification and binding analysis of the hemolymph juvenile hormone binding protein from *Manduca sexta*. Biochemistry 32, 7909-7915.
- Patel, A. A., McCarthy, M. i Steitz, J. A. (2002). The splicing of U12-type introns can be a rate-limiting step in gene expression. EMBO J. 14, 3804-15.
- Perisic, O., Xiao, H. i Lis, J. T. (1989). Stable binding of *Drosophila* heat shock factor to head-to-head and tail-to-tail repeats of a conserved 5 bp recognition unit. Cell 59, 797-806.
- Perlmann, T. i Jansson, L. (1995). A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. Genes Dev. 7, 769-82.
- Peterson, R. C. (1985). Purification and properties of the juvenile hormone carrier protein from the hemolymph of *Manduca sexta*. Methods Enzymol. 111, 482-487.
- Plantevin, G., De Reggi, M. i Nardon, C. (1984). Changes in Ecdysteroid and Juvenile Hormone Titers in the Hemolymph of *Galleria mellonella* Larvae and Pupae. Gen. Comp. Endocrinol. 56, 218-230.
- Predel, R. i Eckert, M. (2000). Neurosecretion: peptidergic systems in insects. Naturwissenschaften 87, 343-50.

- Prestwich, G. D. i Atkinson, J. K. (1990). Rapid purification and N-terminal amino acid sequence of a photoaffinity-labeled juvenile hormone binding protein from an arctiid moth larva, *Platyprepia viriginalis*. *Insect Biochem.* 20, 801-807.
- Read D. i Manley J. L. (1992). Alternatively spliced transcripts of the *Drosophila* tramtrack gene encode zinc finger proteins with distinct DNA binding specificities. *EMBO J.* 11, 1035-1044.
- Read, D., Nishigaki, T. i Manley J. L. (1990). The *Drosophila* Even-Skipped Promoter Is Transcribed in a Stage-Specific Manner In Vitro and Contains Multiple, Overlapping Factor-Binding Sites. *Mol. Cell. Biol.* 10, 4334-4344.
- Reed, R. (2000). Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. *Curr Opin Cell Biol.* 3, 340-5.
- Renault, N., King-Jones, K. i Lehmann, M. (2001). Downregulation of the tissue-specific transcription factor Fork head by *Broad-Complex* mediates a stage-specific hormone response. *Development* 128, 3729-3737.
- Restifo, L. L. i Wilson, T. G. (1998). A juvenile hormone agonist reveals distinct developmental pathways mediated by ecdysone-inducible broad complex transcription factors. *Dev Genet* 22, 141-59.
- Riddiford, L. M. (1993). Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis. *Receptor* 3, 203-9.
- Riddiford, L. M. (1996). Juvenile hormone: the status of its "status quo" action. *Arch Insect Biochem Physiol* 32, 271-86.
- Riddiford, L. M. i Ashburner, M. (1991). Effects of juvenile hormone mimics on larval development and metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *Gen Comp Endocrinol* 82, 172-83.
- Riddiford, L. M., Cherbas, P. i Truman, J. W. (2001). Ecdysone receptors and their biological actions. *Vitam. Horm.* 60, 1-73.
- Riddiford, L. M., Hiruma, K., Zhou, X. i Nelson, C. A. (2003). Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol* 33, 1327-38.
- Riddihough, G. i Pelham, H. R. (1987). An ecdysone response element in the *Drosophila* hsp27 promoter. *Embo J* 6, 3729-3734.
- Rodriguez Parkitna, J. M. (2001). Praca doktorska pt. Poznanie struktury pierwszorzędowej białka wiążącego hormon juvenilny z hemolimfy *Galleria mellonella*.
- Rodriguez Parkitna, J. M., Ożyhar, A., Wiśniewski, J. R. i Kochman, M. (2002). Cloning and sequence analysis of *Galleria mellonella* juvenile hormone binding protein-a search for ancestors and relatives. *Biological Chemistry* 383, 1343-55.
- Rogers, J. H. (1990). The role of introns in evolution. *FEBS Lett* 268, 339-343.
- Rogers, J. (1999). Sequencing. Gels and genomes. *Science* 286, 429.
- Rogozin, I. B., Sverdlov, A. V., Babenko, V. N. i Koonin, E. V. (2005). Analysis of evolution of exon-intron structure of eukaryotic genes. *Brief Bioinform.* 2, 118-34.
- Roller, H., Dahm, K. H., Sweeley, C. C. i Trost, B. M. (1967). Die struktur des juvenilshormones. *Angew. Chemie* 4, 190-191.
- Ronaghi, M., Pettersson, B., Uhlen, M. i Nyren, P. (1998). PCR-introduced loop structure as primer in DNA sequencing. *Biotechniques.* 5, 876-8, 880-2, 884.
- Roy, S. W. (2003). Recent evidence for exon theory of genes. *Genetica* 118, 251-266.
- Rymarczyk, G., Grad, I., Rusek, A., Oświęcimska-Rusin, K., Niedziela-Majka, A., Kochman, M. i Ożyhar, A. (2003). Purification of *Drosophila melanogaster* ultraspiracle protein and analysis of its A/B region-dependent dimerization behavior *in vitro*. *Biol Chem* 384, 59-69.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. i Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.

- Salier, J. P. (2000). Chromosomal location, exon/intron organization and evolution of lipocalin genes. *Biochim Biophys Acta* 1482, 25-34.
- Sambrook, J. i Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning - A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez, D., Ganfornina, M. D., Gutierrez, G. i Marin, A. (2003). Exon-intron structure and evolution of the Lipocalin gene family. *Mol Biol Evol* 20, 775-83.
- Sanger, F., Nicklen, S. i Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 74, 5463-5467.
- Sasorith, S., Billas, I. M., Iwema, T., Moras, D. i Wurtz, J. M. (2002). Structure-based analysis of the ultraspiracle protein and docking studies of putative ligands. *J Insect Sci* 2, 25.
- Schmidt, M. (1999). Geny intronowe. *Postępy Biochemii* 45, 158–166.
- Schweisguth, F. i Posakony, J. W. (1992). Suppressor of hairless, the *Drosophila* homolog of the mouse recombination signal-binding protein gene, controls sensory organ cell fates. *Cell* 69, 1199-1212.
- Sehnal, F. i Meyer, A. S. (1968). Larval-pupal transformation: control by juvenile hormone. *Science* 159, 981-4.
- Sevala, V. L., Bachmann, J. A. S. i Schal, C. (1997). Lipophorin: A Hemolymph Juvenile Hormone Binding Protein in the German Cockroach, *Blattella germanica*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 27, 663-670.
- Sharp, P. A. (1981). Speculations on RNA splicing. *Cell* 23, 643-6.
- Sharp, P. A. (1985). On the origin of RNA splicing and introns. *Cell* 42, 397–400.
- Sharp, P. A. i Burge, C. B. (1997). Classification of introns: U2-type or U12-type. *Cell* 7, 875-879.
- Shea, M. J., King, D. L., Conboy, M. J., Mariani, B. D. i Kafatos, F. C. (1990). Proteins that bind to *Drosophila* chorion cis-regulatory elements: a new C2H2 zinc finger protein and a C2C2 steroid receptor-like component. *Genes Dev* 7, 1128-40.
- Shemshedini, L. i Wilson, T. G. (1988). A high affinity, high molecular weight juvenile hormone binding protein in the hemolymph of *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem.* 18, 681-689.
- Sheth, N., Roca, X., Hastings, M. L., Roeder, T., Krainer, A. R. i Sachidanandam, R. (2006). Comprehensive splice-site analysis using comparative genomics. *Nucleic Acids Res.* 14, 3955-67.
- Simpson, A. G., MacQuarrie, E. K. i Roger, A. J. (2002). Eukaryotic evolution: early origin of canonical introns. *Nature* 419, 270.
- Simpson, G. G i Filipowicz, W. (1996). Splicing of precursors to mRNA in higher plants: mechanisms, regulation and sub-nuclear organization of the spliceosomal machinery. *Plant Mol. Biol.* 32, 1–41.
- Smale, S. T. i Baltimore, D. (1989). The "initiator" as a transcription control element. *Cell* 57, 103-113.
- Smale, S. T. (2001). Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation. *Genes Dev* 15, 2503-8.
- Smale, S. T. i Kadonaga, J. T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 72, 449-79.
- Sok, A. J., Czajewska, K., Ozyhar, A. i Kochman, M. (2005). The structure of the juvenile hormone binding protein gene from *Galleria mellonella*. *Biol Chem* 386, 1-10.
- Spafford, J. D., Spencer, A. N. i Gallin, W. J. (1998). A putative voltage-gated sodium channel alpha subunit (PpSCN1) from the hydrozoan jellyfish, *Polyorchis penicillatus*: structural comparisons and evolutionary considerations. *Biochem Biophys Res Commun.* 3, 772-80.

- Stanojevic, D., Hoey, T. i Levine, M. (1989). Sequence-specific DNA-binding activities of the gap proteins encoded by hunchback and Krueppel in *Drosophila*. *Nature* *341*, 331-335.
- Stoltzfus, A., Spencer, D. F., Zuker, M., Logsdon, J. M. Jr i Doolittle, W. F. (1994). Testing the exon theory of genes: the evidence from protein structure. *Science* *5169*, 202-7.
- Stone, E. M. i Schwarz, R. J. (1990). *Intervening sequences in evolution and development*. New York: Oxford University Press.
- Strachan, T. i Read, A. P. (1999). *Human Molecular Genetics* 2. 2nd ed., BIOS Scientific Publisher Ltd., Oxford, UK.
- Sullivan, A. A. i Thummel, C. S. (2003). Temporal profiles of nuclear receptor gene expression reveal coordinate transcriptional responses during *Drosophila* development. *Mol Endocrinol.* *11*, 2125-37.
- Sutherland, J.D., Kozlova, T., Tzertzinis, G. i Kafatos, F. C. (1995). *Drosophila* hormone receptor 38: a second partner for *Drosophila* USP suggests an unexpected role for nuclear receptors of the nerve growth factor-induced protein B type. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *17*, 7966-70.
- Sverdlov, A. V., Rogozin, I. B., Babenko, V. N. i Koonin, E. V. (2003). Evidence of splice signal migration from exon to intron during intron evolution. *Curr. Biol.*, *13*, 2170–2174.
- Takata, K. I., Yoshida, H., Hirose, F., Yamaguchi, M., Kai, M., Oshige, M., Sakimoto, I., Koiwai, O. i Sakaguchi K. (2001). *Drosophila* Mitochondrial Transcription Factor A: Characterization of Its cDNA and Expression Pattern during Development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *287*, 474-483.
- Tautz, D. (2000). Evolution of transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev.* *5*, 575-9.
- Taylor, C. A., Winther, A. M., Siviter, R. J., Shirras, A. D., Isaac, R. E. i Nassel, D. R. (2004). Identification of a proctolin prohormone gene (Proct) of *Drosophila melanogaster*: expression and predicted prohormone processing. *J Neurobiol* *58*, 379-91.
- Thisse, C., Perrin-Schmitt, F., Stoetzel C. i Thisse B. (1991). Sequence-specific transactivation of the *Drosophila* twist gene by the dorsal gene product. *Cell* *65*, 1191-1201.
- Thummel, C. S., Burtis, K. C. i Hogness D. S. (1990). Spatial and temporal patterns of E74 transcription during *Drosophila* development. *Cell* *61*, 101-111.
- Thummel, C. S. (1995). From embryogenesis to metamorphosis: the regulation and function of *Drosophila* nuclear receptor superfamily members. *Cell.* *6*, 871-7.
- Thummel, C. S. (2001). Molecular mechanisms of developmental timing in *C. elegans* and *Drosophila*. *Dev Cell* *1*, 453-65.
- Thomas, H. E., Stunnenberg, H. G. i Stewart, A. F. (1993). Heterodimerization of the *Drosophila* ecdysone receptor with retinoid X receptor and ultraspiracle. *Nature.* *6419*, 471-5.
- Tomita, M., Shimizu, N., Brutlag, D.L. (1996). Introns and reading frames: correlation between splicing sites and their codon positions. *Mol Biol Evol* *9*, 1219-23.
- Touhara, K. i Prestwich, G. D. (1993). Juvenile hormone epoxide hydrolase: Photoaffinity labeling, purification and characterisation from tobacco hornworm eggs. *J. Biol. Chem.* 19604-19609.
- Touhara, K., Lerro, K.A., Bonning, B.C., Hammock, B.D. i Prestwich, G.D. (1993), Ligand binding by a recombinant insect juvenile hormone binding protein. *Biochemistry*, *8*, 2068-75.
- Trowell, S. C. (1992). High affinity juvenile hormone carrier proteins in the haemolymph of insects. *Comp. Biochem. Physiol.* *103B*, 795-807.
- Tsai, F. T. F. i Sigler, P. B. (2000). Structural basis of preinitiation complex assembly on human Pol II promoters. *EMBO J.* *19*, 25-36.

- Tyshenko, M. G. i Walker, V. K. (1997). Towards a reconciliation of the introns early or late views: triosephosphate isomerase genes from insects. *Biochimica et Biophysica Acta* 1353, 131–136.
- Uhlirova, M., Foy, B. D., Beaty, B. J., Olson, K. E., Riddiford, L. M. i Jindra, M. (2003). Use of Sindbis virus-mediated RNA interference to demonstrate a conserved role of Broad-Complex in insect metamorphosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15607-12.
- Ullmann, A., Jacob, F. i Monod, J. (1967). Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 2, 339-43.
- Urness, L. D. i Thummel, C. S. (1995). Molecular analysis of a steroid-induced regulatory hierarchy: the *Drosophila* E74A protein directly regulates L71-6 transcription. *EMBO J.* 24, 6239-46.
- van der Wetering, M., Cavallo, R., Dooijes, D., van Beest, M., van Es, J., Loureiro, J., Ypma, A., Hursh, D., Jones, T., Bejsovec, A., Peifer, M., Mortin, M. i Clevers H. (1997). Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell* 88, 789-799.
- van Doren, M., Bailey, A. M., Esnayra, J., Ede, K. i Posakony J. W. (1994). Negative regulation of proneural gene activity: hairy is a direct transcriptional repressor of achaete. *Genes Dev.* 8, 2729-2742.
- Vanden Broeck, J. (2001). Neuropeptides and their precursors in the fruitfly, *Drosophila melanogaster*. *Peptides* 22, 241-54.
- Vermunt, A. M., Kamimura, M., Hirai, M., Kiuchi, M., i Shiotsuki, T (2001). The juvenile hormone binding protein of silkworm haemolymph: gene and functional analysis. *Insect Mol Biol.* 10, 147-54.
- Viskochil, D., Buchberg, A. M., Xu, G., Cawthon, R. M., Stevens, J., Wolff, R. K., Culver, M., Carey, J. C., Copeland, N. G., Jenins, N. A., White, R. i O'Connell, P. (1990). Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell* 62, 187–192.
- Viskochil, D., Cawthon, R., O'Connell, P., Xu, G. F., Stevens, J., Carey, J., White, R. (1991). The gene encoding the oligodendrocyte-myelin glycoprotein is embedded within the neurofibromatosis type 1 gene. *Moll. Cell. Biol.* 2, 906–912.
- von Heijne, G. (1990). The signal peptide. *J. Membr. Biol.* 115, 195-201.
- von Kalm, L., Crossgrove, K., Von Seggern, D., Guild, G. M. i Beckendorf, S. K. (1994). The *Broad-Complex1* directly controls a tissue-specific response to the steroid hormone ecdysone at the onset of *Drosophila* metamorphosis. *EMBO J.* 13, 3505-3516.
- Wallace, M. R., Marchuk, D. A., Andersen, L. B., Letcher, R., Odeh, H. M., Saulino, A. M., Fountain, J. W., Brereton, A., Nicholson, J., Mitchell, A. L., Brownstein, B. i Collins, F. (1990). Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science* 249, 181–186.
- Warburg, O. i Christian, W. (1942). Isolierung und kristallisation des garungsferments enolase. *Biochem. Z.* 310, 384-421.
- Wieczorek, E. i Kochman, M. (1991). Conformational change of the haemolymph juvenile-hormone-binding protein from *Galleria mellonella* (L). *Eur. J. Biochem.* 201, 347-353.
- Wigglesworth, V. B. (1934). The physiology of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) II. Factors controlling molting and "metamorphosis". *Quart. J. Misc. Sci.* 77, 191-222.
- Will, C. L. i Luhrmann, R. (2005). Splicing of a rare class of introns by the U12-dependent spliceosome. *Biol Chem.* 8, 713-24.
- Wing, K. D., Rudnicka, M., Jones, G., Jones, D. i Hammock, B. D. (1984). Juvenile hormone esterases of *Lepidoptera* II. Isoelectric points and binding affinities of hemolymph juvenile hormone esterase and binding protein activities. *J. Comp. Physiol. B* 154, 213-223.

- Wiśniewski, J. R., Muszyńska-Pytel, M., Grzelak, K. i Kochman, M. (1987). Biosynthesis and Degradation of Juvenile Hormone in *Corpora Allata* and Imaginal Wing Discs of *Galleria Mellonella* (L.). *Insect Biochem.* 17, 249-254.
- Wojtasek, H. i Prestwich, G.D (1995). Key disulfide bonds in an insect hormone binding protein: cDNA cloning of a juvenile hormone binding protein of *Heliothis virescens* and ligand binding by native and mutant forms. *Biochemistry* 34(15), 5234-41.
- Wu, Q. i Krainer, A. R. (1999). AT-AC pre-mRNA splicing mechanisms and conservation of minor introns in voltage-gated ion channel genes. *Mol Cell Biol.* 5, 3225-36.
- Xu, G., O'Connell, P., Viskochil, D., Crawthorn, R., Robertson, M., Culver, M., Dunn, D., Stevens, J., Geseland, R., White, R. i Weiss, R. (1990). The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell* 62, 599-608.
- Xu, G., O'Connell, P., Stevens, J. i White, R. (1992). Characterization of human adenylate kinase 3 (AK3) cDNA and mapping of the AK3 pseudogene to an intron of the NF1 gene. *Genomics* 13, 537-542.
- Xu, Y., Fang, F., Chu, Y., Jones, D. i Jones, G. (2002). Activation of transcription through the ligand-binding pocket of the orphan nuclear receptor ultraspiracle. *European Journal of Biochemistry* 269, 6026-36.
- Yan, R., Small, S., Desplan, C., Dearolf, C. R. i Darnell jr J. E. (1996). Identification of a STAT gene that functions in *Drosophila* development. *Cell* 84, 421-430.
- Yao, T. P., Seagraves, W. A., Oro, A. E., McKeown, M. i Evans, R. M. (1992). *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell* 71, 63-72.
- Yao, T. P., Forman, B. M., Jiang, Z., Cherbas, L., Chen, J. D., McKeown, M., Cherbas, P. i Evans, R. M. (1993). Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature* 366, 476-9.
- Yund, M. A., King, D. S. i Fristrom, J. W. (1978). Ecdysteroid receptors in imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12, 6039-43.
- Zhou, B. i Riddiford, L. M. (2001). Hormonal regulation and patterning of the broad-complex in the epidermis and wing discs of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev Biol* 231, 125-37.
- Zhou, T. i Chiang, C. M. (2001). The intronless and TATA-less human TAFII55 gene contains a functional initiator and a downstream promoter element. *J Biol Chem.* 276, 25503-25511.
- Zhou, X. i Riddiford, L. M. (2002). Broad specifies pupal development and mediates the 'status quo' action of juvenile hormone on the pupal-adult transformation in *Drosophila* and *Manduca*. *Development* 129, 2259-69.

10 Spis rysunków

Nr	Tytuł	Strona
Rys. 1	Ilość zdeponowanych w bazie danych EMBL nukleotydów w poszczególnych latach (wg EMBL Statistics; http://www3.ebi.ac.uk/Services/DBStats/).	15
Rys. 2	Fazy intronów oraz wybrane rodzaje eksonów.	19
Rys. 3	Schemat wycinania intronów U2- i U12-zależnych.	24
Rys. 4	Rozmieszczenie elementów regulatorowych promotora rdzeniowego.	26
Rys. 5	Struktury hormonów juvenilnych (wg Baker, 1990).	31
Rys. 6	Poziom JH i 20E podczas rozwoju <i>D. melanogaster</i> .	33
Rys. 7	Struktury dwóch form ekdyzonu.	35
Rys. 8	Model oddziaływań regulatorowych między JH i 20E podczas różnych stadiów rozwoju owada (wg. Dubrovsky, 2005).	38
Rys. 9	Zmiany stężeń hJHBP (Ożyhar i wsp., 1983) i JH (Plantevin i wsp., 1984) podczas ostatniego stadium larwalnego.	44
Rys. 10	Schemat procedury amplifikacji fragmentów promotora.	66
Rys. 11	Strategia poszukiwania sekwencji niekodujących metodą <i>southern blotting</i> .	72
Rys. 12	Amplifikacja fragmentu DNA genomowego <i>jhbp(?)</i> wklonowanego do wektora pTZ57R.	74
Rys. 13	Amplifikacja fragmentów promotora <i>jhbp</i> z <i>G. mellonella</i> .	75
Rys. 14	Porównanie i analiza fragmentów sekwencji genu <i>jhbp</i> .	77
Rys. 15	Schemat identyfikacji miejsc położenia intronów.	78
Rys. 16	Amplifikacja i identyfikacja istnienia intronów w genie <i>jhbp</i> .	79
Rys. 17	Strategia amplifikacji i poznania kompletnej sekwencji intronów.	80
Rys. 18	Amplifikacja fragmentu zawierającego miejsce startu transkrypcji.	81
Rys. 19	Ustalenie miejsca startu transkrypcji.	82
Rys. 20	Potencjalne elementy regulatorowe promotora rdzeniowego <i>jhbp</i> .	85
Rys. 21	Zawartość par GC w genie <i>jhbp</i> z <i>G. mellonella</i> .	88
Rys. 22	Średnia zawartość par GC i AT oraz puryn i pirymidyn w genie <i>jhbp</i> .	88
Rys. 23	Położenie intronów w sekwencji <i>jhbp</i> z <i>G. mellonella</i> i ich fazy.	89

Rys. 24	Charakterystyka elementów dystalnych promotora <i>jhbp</i> zawierających potencjalne sekwencje regulatorowe CF1/Usp.	90
Rys. 25	Konstrukty promotora <i>jhbp</i> w wektorze pGL3Basic.	92
Rys. 26	Aktywność fragmentów promotora <i>jhbp</i> w testach z genem reporterowym.	93
Rys. 27	Analiza wyników southern blotting i poznanej sekwencji genu <i>jhbp</i> .	97
Rys. 28	Schemat struktury genów <i>jhbp</i> z <i>G. mellonella</i> i <i>M. sexta</i> .	100
Rys. 29	Porównanie miejsc splicingowych wszystkich znanych intronów typu 5'GU-AG ^{3'} z <i>D. melanogaster</i> (wg Sheth i wsp., 2006).	105
Rys. 30	Organizacja genów w nadrodzinie kalicyn i <i>jhbp</i> .	107
Rys. 31	Porównanie potencjalnych elementów regulatorowych promotora rdzeniowego <i>jhbp</i> i sekwencji zgodnych dla <i>D. melanogaster</i> .	108

11 Spis tabel

Nr	Tytuł	Strona
Tabela 1	Charakterystyka genomu <i>D. melanogaster</i> .	16
Tabela 2	Elementy regulatorowe odkryte w promotorach dystalnych owadów.	28
Tabela 3	Właściwości hJHBP z <i>Lepidoptera</i> .	42
Tabela 4	Czynniki regulatorowe w genie <i>jhbp</i> z <i>G.mellonella</i>	84
Tabela 5	Fragmenty znanych genów obecne w genie <i>jhbp</i> z <i>G. mellonella</i>	87
Tabela 6	Krótką charakterystyką genów <i>jhbp</i> z <i>G. mellonella</i> i <i>M. sexta</i> oraz ich elementów promotora rdzeniowego.	100
Tabela 7	Porównanie elementów regulatorowych w promotorach dystalnych <i>G. mellonella</i> i <i>M. sexta</i> .	101
Tabela 8	Porównanie położenia intronów i ich miejsc splicingowych obecnych w genach <i>jhbp</i> z <i>G. mellonella</i> i <i>M. sexta</i> .	104