



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Θέμα διπλωματικής εργασίας:

«Αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων *Ogco* και *SNMP1*
στο δάκο της ελιάς, *Bactrocera oleae*»

Κεφάλαια Διονυσία



Λάρισα, Φεβρουάριος 2017

**«Αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων Orco και SNMP1
στο δάκο της ελιάς, *Bactrocera oleae*»**

“Gene silencing of Orco and SNMP1 in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*”

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

Καρπούζας Δημήτριος: Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής
Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Βιοτεχνολογίας Φυτών

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το διάστημα Φεβρουαρίου 2016 - Φεβρουαρίου 2017 υπό την επίβλεψη του κ. Κ. Μαθιόπουλου, καθηγητή Μοριακής Βιολογίας και της Δρ Τσουμάνη Κωνσταντίνας, Πανεπιστημιακής Υποτρόφου ανάθεσης διδακτικού έργου

Ευχαριστίες

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής κ. Ματθιόπουλο, κ. Καρπούζα και κα.Παπαδοπούλου, για τη δυνατότητα εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Ιδιαίτέρως, τον κ.Ματθιόπουλο, του οποίου η ικανότητά της σκέψης να μεταβαίνει από τα απλά πράγματα στα πιο σύνθετα αφενός είναι χαρακτηριστική και αφετέρου μπορεί να θέσει γερά θεμέλια στον τρόπο σκέψης κάθε νέου επιστήμονα.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στην Κωνσταντίνα Τσουμάνη για τη συνεργασία και την υποστήριξη της καθ' όλη τη διάρκεια. Οι γνώσεις, η εμπειρία και η προσπάθειά της για τη επίτευξη του καλύτερου δυνατού κατόρθωσαν να με οπλίζουν με ενέργεια και ενθουσιασμό. Οφείλω δε, να ομολογήσω πως η συνύπαρξη σε ακραίες θερμοκρασίες, από τη μία κοντά στους 0°C και από την άλλη κοντά στους 40°C, ήταν πολύ παραγωγική.

Ξεχωριστά και διεθνιστικά ευχαριστώ, στέλνω στη Βιέννη, στην Γιώτα Κοσκινιώτη, της οποίας η βοήθεια και στη Λάρισα αλλά και εξ αποστάσεως, ήταν πολύ σημαντική ειδικά σε στιγμές που το αδιέξοδο φαινόταν ο μόνος δρόμος. Η ικανότητά της να σε καθησυχάζει και παράλληλα να σου αντιπροτείνει λύση αποτέλεσαν αναγκαία πράγματα όλο αυτό το διάστημα.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα και τη συνύπαρξη. Τη Μαρλέν, την Έφη, τη Στέλλα, το Λευτέρη, την Άννα, το Δημήτρη και φυσικά το Γιώργο με τον οποίο διαθήκαμε μαζί το κατώφλι του εργαστηρίου.

Πέραν της Βιοχημείας όμως, υπάρχουν άνθρωποι που η αγάπη, η κατανόηση και η στήριξη τους συντέλεσαν στην ολοκλήρωση αυτής της πορείας.

Ευχαριστώ τον Άρη και τη Γίγη, για όλη την προσπάθεια τους καθώς και για την συναισθηματική, πνευματική και υλική στήριξη όλα αυτά τα χρόνια. Τους ευχαριστώ για το όραμά τους. Είναι σίγουρο πως αυτοί οι άνθρωποι με έμαθαν πως είναι πολύ σημαντικό σε κάθε αγώνα «να σου βγαίνει το παιχνίδι και να το απολαμβάνεις».

Το Μαράκι, που το χιούμορ και το γέλιο της αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της καθημερινότητάς μου.

Τη Μιράντα, που με την εμπειρία και τη γνώση της κατάφερε να διώχνει την ανησυχία και το άγχος για τις λεπτομέρειες δείχνοντας εναλλακτικό μονοπάτι.

Την Ελένη, της οποίας τα ψυχογραφήματα και οι στοχευμένες ψυχολογικές συμβουλές κρίθηκαν άκρως απαραίτητα.

Τον Κώστα, για την υπομονή και την κατανόηση του, που συμμερίστηκε την αγωνία μου και ανέχτηκε τη γκρίνια μου.

Τη Γιούλη, τη Μόνικα, τη Νικολέτα, την Αγγελική και τη Λένια, που παρά την απόσταση με σκέφτονται και τις νοσταλγώ.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που είχαν αγχολυτική δράση όλη αυτήν την περίοδο, είτε ήξεραν περί δάκου είτε όχι, και μια κουβέντα τους μέριαζε για λίγο την πίεση. Όπως επίσης, και τις θηλυκές δακίνες, οι οποίες παρά το σοκ της μετακόμισης, επιβίωσαν στο διαμέρισμα της Τσιμισκή χωρίς κανένα απολύτως πρόβλημα στη συγκατοίκηση.

Και ο κύκλος έκλεισε.

Και ο κύκλος άνοιξε.

Περίληψη

Ο δάκος της ελιάς αποτελεί τον κύριο εχθρό των ελαιοκαλλιεργειών, ο οποίος χρησιμοποιεί τον ελαιόκαρπο ως ξενιστή ωοτοκίας προκαλώντας σημαντικές απώλειες στην παραγωγή. Ωστόσο, η χρήση χημικών εντομοκτόνων για την αντιμετώπισή του παρουσιάζει δυσμενείς συνέπειες για το περιβάλλον και τον άνθρωπο και ανάπτυξη ανθεκτικότητας των εντόμων, ενώ οι παγίδες μαζικής εξολόθρευσης μειωμένη αποτελεσματικότητα λόγω χαμηλής εξειδίκευσης. Η ανάγκη για την ανάπτυξη εξειδικευμένων μεθόδων καταπολέμησης οδηγεί χωρίς αμφιβολία στη μελέτη βιολογικών συστημάτων που σχετίζονται με την επιβλαβή του δράση. Στο πλαίσιο αυτό, η ανάλυση του οσφρητικού συστήματος μέσω μοριακών προσεγγίσεων θα καταδείξει τους επιμέρους μοριακούς στόχους που καθορίζουν ειδοειδικά χαρακτηριστικά σχετικά με την αναπαραγωγική και σεξουαλική του συμπεριφορά.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν τα γονίδια που κωδικοποιούν τον συνυποδοχέα Orco και την πρωτεΐνη SNMP1 και εκφράζονται στα οσφρητικά όργανα του δάκου, στοχεύοντας στον προσδιορισμό της λειτουργίας τους. Για τη διερεύνηση του ρόλου τους πραγματοποιήθηκε παροδική σίγηση της έκφρασής τους μέσω RNAi, εγχύοντας απευθείας δίκλωνα μόρια RNA (dsRNA) στην αιμολέμφο των εντόμων. Η αξιολόγηση της έκφρασής τους πραγματοποιήθηκε με ποσοτική Real-Time PCR. Επιπλέον, ελέγχθηκε η επίδραση της σίγησης στη διαδικασία της σύζευξης και της ωοαπόθεσης. Στην πρώτη περίπτωση παρατηρήθηκαν χαμηλά ποσοστά σύζευξης από 0-33% στις διασταυρώσεις που ελέγχθηκαν μετά από ενέσεις σε άτομα και των δύο φύλων με i. dsOrco ή dsGFP και ii. dsOrco και dsSNMP1 ή dsGFP. Ακολούθως, κατά τον έλεγχο ωοτοκίας μετά από παροδική σίγηση του Orco σε θηλυκούς δάκους διαπιστώθηκε ότι η αποσιώπηση του Orco επηρέασε τη μετασυζευκτική του απόκριση αναστέλλοντας την απόθεση αυγών. Τα συμπεράσματα αυτά υποδηλώνουν ότι τα δύο γονίδια, ORCO και SNMP1, διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο σε αποκρίσεις που σχετίζονται με την αναπαραγωγική συμπεριφορά του δάκου της ελιάς. Οι συμπεριφορικές αλλαγές που παρατηρήθηκαν καθιστούν τα δύο αυτά γονίδια δυνητικούς στόχους για τη βελτίωση και εξειδίκευση των τεχνικών ελέγχου των πληθυσμών του δάκου ώστε να είναι πιο αποτελεσματικές και πιο φιλικές προς το περιβάλλον.

Abstract

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, is the main enemy of olive cultivation, which uses the olive fruit as spawning host, causing significant production losses. However, the use of chemical insecticides for its control presents insect resistance and adverse effects on the environment and the human health. Moreover, mass trapping strategies for killing insects exhibit reduced efficiency due to low specificity. The need to develop more specific control methods on the olive fruit fly leads without doubt in the study of biological systems related to its harmful effect. In this context, the analysis of the olfactory system through molecular approaches will demonstrate the respective molecular targets that determine species-specific features on reproductive and sexual behavior.

In the present study, the genes encoding the co-receptor Orco and protein SNMP1 were analyzed aiming to determine their function. Both genes are expressed in the olive fruit fly olfactory organs. In order to investigate their functional role we performed gene silencing of their expression through RNAi, by injecting RNA duplexes (dsRNA) directly in hemolymph of the insect. The gene expression was evaluated by quantitative Real-Time PCR. Furthermore, the effect of silencing was evaluated during the mating and oviposition processes. In the first case we observed low copulation rates (0-33%) when checking the mating ability between injected insects with either i. dsOrco or dsGFP or ii. dsOrco and dsSNMP1 or dsGFP. Subsequently, we explored the effect of Orco gene silencing in female olive fruit flies during the oviposition. The results indicated that reduction of the Orco expression directly affected their post-mating response by inhibiting the oviposition. The overall conclusions suggest that ORCO and SNMP1, play a crucial role in responses related to reproductive behavior of the olive fly. The observed behavioral changes render these two genes potential targets for the improvement and specialization of the olive fruit fly population control techniques in order to be more efficient and environmentally friendly.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	4
Περίληψη.....	6
Abstract	7
Περιεχόμενα	9
Εισαγωγή.....	12
Έντομα ως παράσιτα και φορείς ασθενειών	12
Μηχανισμός RNAi (RNA interference)	14
Δάκος της ελιάς	20
Καταπολέμηση του δάκου της ελιάς	20
Συστατικά οσφρητικού συστήματος ως μοριακοί στόχοι	22
Σκοπός.....	40
Μέθοδοι-Υλικά	42
Πειραματικά Πρωτόκολλα.....	42
1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR)	42
2. Δημιουργία dsRNA.....	44
3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	46
4. Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction)	48
5. Μικροενέσεις	48
6. Απομόνωση ιστών	49
7. Απομόνωση RNA	49
8. Κατεργασία με DNase	50
9. Σύνθεση cDNA.....	50
10. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR).....	51
11. Ανάλυση έκφρασης.....	53
Εργαστηριακός πληθυσμός εντόμων	54
Έλεγχος ωστοκίας	54
Αποτελέσματα	56
Παροδική σίγηση γονιδίων Orco και SNMP1.....	56
Έλεγχος αποσιώπησης στις κεραίες	58
Έλεγχος σύζευξης	61

Έλεγχος ωοτοκίας	62
Συζήτηση.....	66
Σίγηση Orco.....	67
Σίγηση SNMP1	68
Έλεγχος σύζευξης	69
Έλεγχος ωοαπόθεσης	70
Επίλογος.....	70
Παράρτημα	73
Βιβλιογραφία.....	77

1. Εισαγωγή

Εισαγωγή

Έντομα ως παράσιτα και φορείς ασθενειών

Η δράση των παρασιτικών εντόμων σε αγροτικές καλλιέργειες δημιουργεί αρκετά προβλήματα οικονομικής κυρίως φύσης. Επιπλέον, έντομα που λειτουργούν ως φορείς ασθενειών έχουν προκαλέσει και εξακολουθούν να προκαλούν υγειονομικά και δημογραφικά προβλήματα ευρείας κλίμακας.

Οι συνήθεις τρόποι αντιμετώπισης των παρασιτικών εντόμων σε καλλιέργειες περιλαμβάνουν τη χρήση χημικών εντομοκτόνων καθώς και πολλών τύπων παγίδων. Ωστόσο, όσο περισσότερο χρησιμοποιούνται αυτές οι μέθοδοι τόσο πιο πολλές επιπτώσεις έχουν. Αρχικά, η χρήση των χημικών εντομοκτόνων, όπως οργανοφωσφωρικά και πυρεθροειδή, ενισχύουν την περιβαλλοντική ρύπανση μέσω της μη αποικοδόμησης και της συσσώρευσής τους. Επιπλέον, συμβάλλουν στη μόλυνση των ίδιων των προϊόντων επηρεάζοντας κατ' επέκταση και την ανθρώπινη υγεία μέσω της άμεσης σύνδεσης μεταξύ παραγωγής και κατανάλωσης. Η διαρκής χρήση εντομοκτόνων από κάποια στιγμή και μετά καθίσταται αναποτελεσματική καθώς τα έντομα αποκτούν ανθεκτικότητα σε αυτά. Επιπρόσθετα, η τοποθέτηση παγίδων στις καλλιέργειες έχει μικρή εκλεκτικότητα με αποτέλεσμα την εξόντωση και άλλων οργανισμών πέραν των παρασιτικών εντόμων, διαταράσσοντας έτσι το οικοσύστημα του ίδιου του φυτού.

Όσον αφορά στα έντομα που δρουν ως φορείς μετάδοσης ασθενειών, όπως η ελονοσία που μεταδίδεται μέσω του κουνουπιού *Anopheles gambiae*, αντιμετωπίζονται είτε ψεκάζοντας με εντομοκτόνα, είτε αποστραγγίζοντας λιμνάζοντα νερά.

Εν κατακλείδι, οι συμβατικές μέθοδοι καταπολέμησης παρασιτικών εντόμων οικονομικής σημασίας ή υγειονομικής σημασίας είναι αφενός καταστροφικές για το περιβάλλον και τη δημόσια υγεία και αφετέρου πολύ δαπανηρές.

Εναλλακτικές μέθοδοι αντιμετώπισης

Για να προσπεραστούν τα προβλήματα που δημιουργούνται από τις συμβατικές μεθόδους, άρχισαν να γίνονται έρευνες και μελέτες με στόχο την εξειδίκευση των μεθόδων ελέγχου ανά είδος – **ειδοειδικότητα** – εστιάζοντας στην ανάλυση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν διάφορα βιολογικά συστήματα των εντόμων που σχετίζονται με την αναπαραγωγή και την επιβίωση, όπως το οσφρητικό. Πιο συγκεκριμένα, το οσφρητικό σύστημα είναι η σηματοδοτική βάση για πολλές λειτουργίες όπως η εύρεση τροφής, η σεξουαλική συμπεριφορά, η αποφυγή κινδύνων και η ωοαπόθεση. Οι διαδικασίες αυτές βασίζονται στην αναγνώριση οσμών καθώς επίσης και στην έκκριση και την πρόσληψη φερομονών από το ένα έντομο στο άλλο. Επιπλέον, η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών που βασίζονται στη μελέτη και την ανάλυση της μοριακής δόμησης

των εντόμων αποσκοπούν στον έλεγχο των πληθυσμών και την καταπολέμησης της καταστροφικής τους δράσης.

Τρεις μέθοδοι που βασίζονται σε μοριακές τεχνικές είναι:

- Η μέθοδος στείρου εντόμου (Sterile Insect Technique, **SIT**)
- Η μέθοδος απελευθέρωσης εντόμων που φέρουν επικρατές θνησιγόνο γονίδιο (**RIDL**)
- RNAi ως μέθοδος καταπολέμησης

SIT

Η μέθοδος στείρου εντόμου είναι ένα εργαλείο καταπολέμησης παρασιτικών εντόμων και ακολουθεί μια διαδικασία η οποία περιλαμβάνει τη στείρωση, μέσω ακτινοβολίας γ, αρσενικών εντόμων στο εργαστήριο και την απελευθέρωση τους σε προσβεβλημένες περιοχές με απώτερο στόχο της σύζευξή τους με θηλυκά άγριου τύπου. Τα στείρα αρσενικά ανταγωνίζονται τα αρσενικά έντομα αγρίου τύπου για πραγματοποίηση σύζευξης με άγριου τύπου θηλυκά έχοντας ως αποτέλεσμα τη μη παραγωγή απογόνων και κατ' επέκταση τη μείωση του φυσικού πληθυσμού.

Εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1955 με σκοπό την καταπολέμηση του παρασιτικού σκουληκιού *Cochliomyia hominivorax* στις Η.Π.Α., το Μεξικό και την Κεντρική Αμερική (Knippling et al, 1955). Επιπλέον έχει εφαρμοστεί για την αντιμετώπιση της μεσογειακής μύγας, *Ceratitis capitata* (Hendrichs et al 1995) και της μύγας Τσετσέ (Msangi et al 2000).

Ωστόσο, η χρήση ακτινοβολίας επηρέασε τη συμπεριφορά των εντόμων μέσω της παραγωγής ελεύθερων ριζών οι οποίες είναι αρκετά επιβλαβείς για τα έντομα επιδρώντας στην ικανότητα πτήσης και στην προσυζευκτική συμπεριφορά (προσυζευκτικοί ήχοι). Επιπλέον, η διαδικασία της σύζευξης και της αναπαραγωγής υπό ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες διαφέρουν σε σχέση με τις φυσιολογικές διαδικασίες όπως για παράδειγμα η εμφάνιση οίστρου μεταξύ εντόμων εργαστηριακού και αγρίου τύπου πληθυσμού. Κατά συνέπεια, τα αρσενικά στείρα έντομα που έχουν αναπτυχθεί στο εργαστήριο είναι λιγότερο ικανά ως προς την προσέλκυση θηλυκών από ότι τα αρσενικά έντομα αγρίου τύπου (Lance & McInnis, 2005).

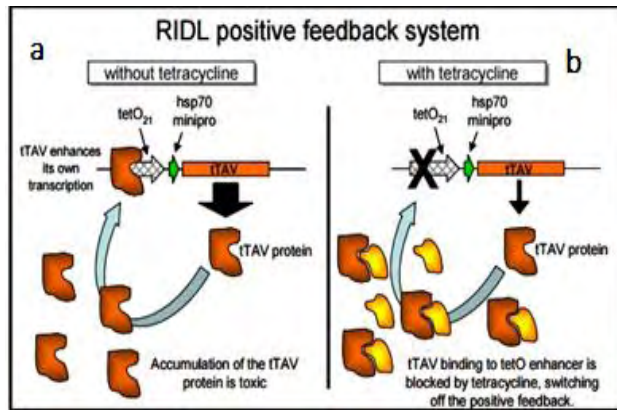
RIDL

Προκειμένου, να αντιμετωπιστούν οι παρενέργειες κατά την εφαρμογή της SIT και να αποδώσουν οι προσπάθειες για έλεγχο του πληθυσμού των παρασιτικών εντόμων, αναπτύχθηκαν μέθοδοι που αποσκοπούν στη μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας μέσω γενετικής στείρωσης με χρήση διαγονιδιακών τεχνολογιών. Μια εξελιγμένη της SIT μοριακή μέθοδος είναι το σύστημα RIDL (Thomas et al, 2000).

Η RIDL ρυθμίζεται από το σύστημα ελέγχου της τετρακυκλίνης και λειτουργεί ως εξής: ένα θνησιγόνο επικρατές γονίδιο που ελέγχεται από έναν θηλεο-ειδικό υποκινητή εισάγεται στα έντομα. Το γεγονός ότι ο υποκινητής είναι θηλεο-ειδικός σημαίνει πως το γονίδιο θα εκφραστεί μόνο σε θηλυκά έντομα. Επιπλέον

ανάλογα με τον τύπο του γονιδίου θα εκφραστεί και στο αντίστοιχο αναπτυξιακό στάδιο.

Το σύστημα ελέγχου γονιδιακής έκφρασης μέσω τετρακυκλίνης περιλαμβάνει ρυθμιστικά στοιχεία τα οποία απενεργοποιούνται παρουσία τετρακυκλίνης. Με αυτό τον τρόπο, τα έντομα που δέχονται το διαγονίδιο, αναπτύσσονται κανονικά υπό εργαστηριακές συνθήκες παρουσία τετρακυκλίνης



Εικόνα 1.1: Σύστημα ελέγχου τετρακυκλίνης, θετικής ανατροφοδότησης

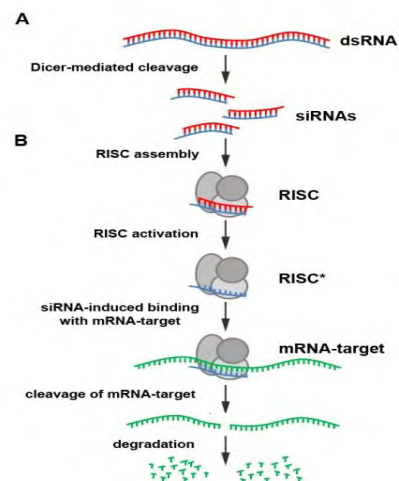
(Εικόνα 1.1. b) κατά τις οποίες το θνησιγόνο γονίδιο δεν εκφράζεται. Συνεπώς, μόλις ο αριθμός των πολλαπλασιαζόμενων εντόμων γίνει ο επιθυμητός, αυτά απελευθερώνονται στον αγρό, σε προσβεβλημένες περιοχές. Μετά την απελευθέρωσή τους, σταματούν να υπόκεινται στον έλεγχο της τετρακυκλίνης και το διαγονίδιο εκφράζεται κανονικά προκαλώντας το θάνατο των θηλυκών απογόνων (Εικόνα 1.1. a). Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται μείωση του φυσικού πληθυσμού.

RNAi ως μέθοδος καταπολέμησης

Μηχανισμός RNAi (RNA interference)

Η παροδική σίγηση γονιδίων μέσω RNA παρεμβολής ανακαλύφθηκε αρχικά στον *C. elegans* από τους Fire και Melo το 1998 και αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο της σύγχρονης γονιδωματικής για την επεξεργασία του γενετικού υλικού. Η λειτουργία της μεθόδου αυτής βασίζεται στη μεταμεταγραφική αποσίωπηση γονιδίων μετά την μετά από ενδογενή παραγωγή ή από εισαγωγή στο κύτταρο ενός μικρομοριακού παρεμβατικού RNA (small interfering RNA- siRNA) με αλληλουχία συμπληρωματική με αυτή του γονιδίου-στόχου.

Πιο συγκεκριμένα, η ύπαρξη ενός **δίκλωνου μορίου RNA (dsRNA)** κόβεται σε τμήματα μήκους 22 περίπου νουκλεοτιδίων- μικρά παρεμβατικά RNAs (siRNAs) - από το ένζυμο **Dicer** το οποίο ανήκει στην οικογένεια των RNAασών III. Τα **siRNAs** ξετυλίγονται καταλυόμενα από το ένζυμο **Argonaute** και η μία από τις δύο έλικες ενσωματώνεται στο σύμπλοκο **RISC** (RNA-induced silencing complex) που επάγει τη γονιδιακή σίγηση. Η έλικα του δίκλωνου RNA που ενσωματώνεται στο RISC, υβριδίζεται με το συμπληρωματικό RNA-στόχο ενεργοποιώντας τη νουκλεάση μέσα στο σύμπλοκο RISC, η οποία κατακερματίζει τον στόχο. Το RISC έχει τη



Εικόνα 1.2: Μηχανισμός RNAi

δυνατότητα να ανακυκλωθεί και να αποικοδομήσει πολλά mRNA-στόχους. Συνεπώς, από μια αλληλουχία που έχει εισαχθεί σε ένα κύτταρο σε περιορισμένη ποσότητα, καθίσταται δυνατή η σίγηση ενός σχετικά μεγάλου αριθμού μορίων mRNA.

Εκτός από την εφαρμογή του μηχανισμού RNAi για την παροδική σίγηση των γονιδίων, τα dsRNA's μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας σε φυτά και καλλιέργειες για την αντιμετώπιση των παρασιτικών εντόμων. Αποτελέσματα πειραματικών ερευνών στον τομέα αυτό έχουν δείξει πως η παράδοση dsRNA's στα φυτοφάγα έντομα θα μπορούσε να επιτευχθεί ως εξής: Τα dsRNA είτε ψεκάζονται στα φύλλα, είτε απορροφώνται από τη ρίζα η οποία είναι εμποτισμένη, είτε εγχύονται απευθείας στο φυτικό αγγειακό σύστημα. Έτσι τα έντομα μπορούν φυσικά να αποκτήσουν dsRNA's μέσω απομύζησης ή μασήματος (Andrade και Hunter, 2016)

Η πρώτη απόδειξη ότι τα έντομα μπορούν να αποκτήσουν τα dsRNA's χωρίς τη διαδικασία μετασχηματισμού περιγράφηκε από τους Hunter et al. 2012. Πιο συγκεκριμένα, εσπεριδοειδή και αμπέλια φυσιικού μεγέθους εκτέθηκαν σε dsRNA είτε μέσω ψεκασμού στα φύλλα, είτε μέσω εμποτισμού της ρίζας, είτε μέσω έγχυσης στον κορμό. Τα dsRNA's μπορούσαν να ανιχνευθούν σε εσπεριδοειδή δέντρα ηλικίας έξι ετών (ύψους 2,5 μέτρων), μετά από εφαρμογή σε αυτά διαλύματος που περιέχει 2 γραμμάρια dsRNA και 15 λίτρα νερό για επτά εβδομάδες. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι, δύο έντομα της τάξης των Ημιπτέρων καθώς και ένα τζίτζικι, προσέλαβαν το dsRNA ενώ τρέφονταν στην περιοχή του ξενιστή η οποία ήταν ψεκασμένη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, είναι η ασιατική psyllid των εσπεριδοειδών, *Diaphorina citri*, η οποία παρουσιάζει μεγάλη θνησιμότητα όταν ταΐζεται με dsRNA για την κινάση της αργινίνης.



Εικόνα 1.3: Asian Psyllid, *Diaphorina citri*

Τα σποριόφυτα ή οι φυλλώδεις βλαστοί απορροφούν και παραδίδουν dsRNA μέσω των αγγειακών ιστών επιτρέποντας τον έλεγχο των πιθανών στόχων για τους RNAi βλαστούς. Οι βλαστοί, μπορούν να παραμείνουν βιώσιμοι για περίοδο 40 ημερών (Andrade and Hunter, 2016). Είναι έτσι δυνατή η διερεύνηση των παραμέτρων της βιολογίας εντόμων, όπως η σύζευξη, η ανάπτυξη της λάρβας και της νύμφης καθώς και η βιωσιμότητα των αυγών.

Τα σκαθάρια του νερού που παρασιτούν στο ρύζι όπως *Lissorhoptrus oryzophilus* και *Oryzophagus oryzae* είναι έντομα των οποίων οι προνύμφες τρέφονται με τις ρίζες. Έτσι, τις καταστρέφουν καθώς τις κόβουν κατά τη διάρκεια της βλαστικής ανάπτυξης, προκαλώντας μεγάλες απώλειες στην παραγωγή. Επιπλέον, τα ενήλικα έντομα τρέφονται από το φυτό τεμαχίζοντας τα φύλλα. Ως εκ τούτου, τα φύλλα μπορούν να ψεкаστούν με dsRNA τα οποία



Εικόνα 1.4: *Lissorhoptrus oryzophilus*

έχουν τη δυνατότητα να σκοτώσουν τα ενήλικα πριν ζευγαρώσουν και προτού τα θηλυκά έχουν ευκαιρία να γεννήσουν τα αυγά.

Αυτά τα αποτελέσματα υποστηρίζουν τη δυνατότητα εφαρμογής των νέων προσεγγίσεων της RNAi τεχνικής για τον εκτενή έλεγχο παρασίτων σε μια περιοχή, ειδικά σε συστήματα άρδευσης και σε υποστρώματα καλλιέργειας λαχανικών όπως η ντομάτα, η μελιτζάνα, το αγγούρι και το μαρούλι. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί, ότι αυτή η στρατηγική θα απαιτήσει τη μαζική παραγωγή του dsRNA, η οποία μπορεί να είναι δαπανηρή χρησιμοποιώντας βιολογικά kit. Για το λόγο αυτό ίσως είναι απαραίτητη η βακτηριακή παραγωγή του dsRNA.

Οσφρητικό σύστημα ως μοριακός στόχος

Η εφαρμογή των εναλλακτικών μεθόδων στην καταπολέμηση των παρασιτικών εντόμων αποτελεί ένα κομβικό σημείο για την αντιμετώπιση της καταστροφικής δράσης τους. Αφενός, μέσω των προσεγγίσεων αυτών, μειώνεται η αρνητική επίδραση στο περιβάλλον και στην ισορροπία του οικοσυστήματος και αφετέρου η εφαρμογή τους είναι εν δυνάμει πιο εξειδικευμένη.

Οι μελέτες σε παρασιτικά έντομα συνεχίζονται ούτως ώστε να εντοπιστούν και να αναλυθούν αποτελεσματικότερα γονίδια-στόχοι. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν ως στόχοι, γονίδια που εμπλέκονται σε διαδικασίες μεταγωγής σήματος του οσφρητικού συστήματος. Πιο συγκεκριμένα, τα οσφρητικά σηματοδοτικά μονοπάτια σχετίζονται με διαδικασίες όπως η αναγνώριση και η επιλογή συντρόφου, η σύζευξη και η αναπαραγωγή, η ωοαπόθεση καθώς και η αποφυγή κινδύνου. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να αναπτυχθούν νέα, πιο αποτελεσματικά ειδο-ειδικά γενετικά εργαλεία που θα συμβάλλουν στη βελτίωση των υπαρχουσών τεχνολογιών παρεμβαίνοντας στην αναπαραγωγική συμπεριφορά.

Μοριακές τεχνικές σε παρασιτικά έντομα

Έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες παρέμβασης στο οσφρητικό σύστημα πολλών οργανισμών και κυρίως εντόμων με απώτερο σκοπό την παρεμπόδιση εκδήλωσης της επιβλαβούς δράσης τους. Κύριοι μοριακοί στόχοι του συστήματος αυτού αποτελούν είναι οι οσφρητικοί υποδοχείς (ORs), ο οσφρητικός συνυποδοχέας (Orco) και οι οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες (OBPs). Ενδεικτικά κάποια παραδείγματα παρατίθενται παρακάτω.

1. Gypsy Moth, *Lymantria dispar*

Το Gypsy Moth, *Lymantria dispar* είναι ένα έντομο που προκαλεί τεράστια ζημιά στα δάση σε παγκόσμια κλίμακα, με την αντιμετώπισή του να είναι δύσκολη και κοστοβόρα. Για το λόγο αυτό, αναπτύχθηκαν πειράματα που προσπάθησαν να προσεγγίσουν μοριακά το



Εικόνα 1.5: Gypsy Moth, *Lymantria dispar*

οσφρητικό σύστημα του εντόμου καθώς αυτό διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη συμπεριφορά του (Wei Lin et al. 2015).

Στην προκειμένη περίπτωση, μια εργαστηριακή ομάδα από την Κίνα, ταυτοποίησε το γονίδιο του συνυποδοχέα Orco και το αποσιώπησε μέσω της τεχνολογίας RNAi για να διαπιστώσει το βαθμό συμβολής της πρωτεΐνης στην όσφρηση. Μετά τη σίγηση πραγματοποιήθηκαν ηλεκτροαντεννογραφήματα με εκτεθειμένα αρσενικά σε σεξουαλικές φερομόνες, όπου διαπιστώθηκε η μειωμένη απόκριση τους. Τα θηλυκά δεν αποκρίθηκαν σε φερομόνες πριν ή μετά την αποσιώπηση. Συνεπώς, αποδείχθηκε πως ο Orco πέρα από τον κρίσιμο οσφρητικό του ρόλο, μπορεί να αποτελέσει ένα νέο στόχο χημικών ουσιών με επίδραση στη σεξουαλική συμπεριφορά του εντόμου.

2. *Dendroctonus armandi* (Tsai and Li)

Μία ακόμα εργαστηριακή έρευνα πάνω στο *Dendroctonus armandi*, επιχείρησε την παρέμβαση στο οσφρητικό σύστημα και την αποσιώπηση του γονιδίου του συνυποδοχέα Orco. Εν συνεχεία έντομα με το αποσιωπημένο γονίδιο εκτέθηκαν σε προσελκυστικές φερομόνες του ξενιστή τους, *Pinus armandi* Franch (Zhang et al. 2016). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως ο Orco ως βασικό συστατικό της μεταγωγής σήματος στην όσφρηση διαδραματίζει σημαντικό στην αναζήτηση συντρόφου καθώς και στην επιλογή της κατάλληλης περιοχής για ωοαπόθεση.



Εικόνα 1.6: *Dendroctonus armandi*

3. Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*

Πρόκειται για μια φρουτόμυγα της Ανατολής, η οποία είναι ένα από τα πιο καταστροφικά παράσιτα σε διάφορες χώρες της Ασίας προκαλώντας μεγάλα οικονομικά προβλήματα σε πάνω από 150 καλλιέργειες κάθε χρόνο (Chen et al., 2008). Είναι αρκετά ανθεκτική



Εικόνα 1.7: *Bactrocera dorsalis*

στα συμβατικά χημικά εντομοκτόνα και σε συνδυασμό με την ευρεία κατανομή των ξενιστών της, η καταστροφή που προκαλεί αποτελεί μια σταθερή απειλή για τις καλλιέργειες (Hu et al., 2013). Για τους λόγους αυτούς γίνονται προσπάθειες για την ανάπτυξη νέων απωθητικών ωοαπόθεσης σε φυτά ξενιστές.

Πιο συγκεκριμένα, έχουν πραγματοποιηθεί πειράματα που στοχεύουν στο μοριακό μηχανισμό λειτουργίας του συνυποδοχέα Orco ο οποίος μέσω της συμμετοχής του στην πρόσληψη και τη μεταγωγή πτητικών χημικών ουσιών

που προέρχονται από τους ξενιστές επηρεάζει την επιλογή περιοχής για ωοαπόθεση (X. Yi et al. 2014).

Στη συγκεκριμένη δοκιμασία έγινε αποσιώπηση του γονιδίου του Orco μέσω διατροφής και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι απουσία ORCO, η αποτροπή ωοαπόθεσης στον ξενιστή ήταν επιτυχής.

4. Mosquito, *Culex quinquefasciatus*

Τα κουνούπια *Culex* είναι φορείς πολλών ανθρώπινων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων της φιλαρίδας και διάφορων τύπων εγκεφαλίτιδας, σε παγκόσμιο εύρος (Nasci and Miller, 1996).

Το *Culex quinquefasciatus*, το κουνούπι του Νότου, είναι φορέας του ιού του Δυτικού Νείλου. Έχει καταγραφεί η μετάδοση του ιού στις ΗΠΑ μέσα από ξενιστές του εντόμου όπως πουλιά και άνθρωποι (Syed and Leal, 2009).

Το *Culex quinquefasciatus* μπορεί να εντοπίζει τον ξενιστή του μέσω του ισχυρού οσφρητικού του συστήματος. Έχει ένα μεγάλο πλήθος οσφρητικών υποδοχέων (ORs) συγκριτικά με άλλα είδη διπτέρων των οποίων το γονιδίωμα έχει αλληλουχηθεί (Arensburger et al., 2010; Pelletier et al., 2010b; Xu et al., 2013). Η απουσία προσδετών για αυτούς τους υποδοχείς (ορφανοί υποδοχείς), δηλαδή η ύπαρξη κουνουπιών χωρίς δυνατότητα όσφρησης, παρέχει ενδείξεις για το πώς τα κουνούπια αντιλαμβάνονται τον κόσμο μέσω της όσφρησης μικρών χημικών μορίων. Ως εκ τούτου, η δημιουργία τέτοιων κουνουπιών αφήνει παρακαταθήκη για την ανάπτυξη απωθητικών που θα μειώσουν τα τσιμπήματα και τη μεταφορά των ασθενειών με δυνατότητα ελέγχου των πληθυσμών των κουνουπιών, όπως τα πράσινα χημικά.

Έχουν ταυτοποιηθεί ORs (**CquiOR2 & CquiOR10**) που εκφράζονται στις κεραίες των θηλυκών και είναι ευαίσθητοι σε προσελκυστικές ουσίες που οδηγούν τα θηλυκά στην επιλογή περιοχής ωοαπόθεσης (Hughes et al., 2010; Pelletier et al., 2010b). Επιπλέον έχουν ταυτοποιηθεί υποδοχείς ευαίσθητοι στην καιρομόνη των φυτών (Xu et al. 2013).



Εικόνα 1.8: *Culex quinquefasciatus*

5. *Anopheles gambiae*

Ανάλογες προσεγγίσεις έχουν γίνει και στους οσφρητικούς υποδοχείς των κουνουπιών *Anopheles gambiae*, που είναι γνωστά ως φορείς της ελονοσίας.

Έχουν ταυτοποιηθεί δύο υποδοχείς, **AgamOR30** και **AgamOR48**, που έδειξαν ευαισθησία στη λακτόνη και σε άλλες ανθρώπινες οσμές και ως εκ τούτου συμβάλλουν στην αναγνώριση του



Εικόνα 1.9: *Anopheles gambiae*

ανθρώπινου οργανισμού (Carey et al., 2010; Wang et al., 2011). Επιπλέον, έχουν προσδιοριστεί και οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες με σημαντικό ρόλο στην

αναγνώριση χημικών ουσιών όπως η **AgamOBP1**, η οποία μεσολαβεί στην αναγνώριση της ινδόλης από τις κεραίες των θηλυκών κουνουπιών (Biessmann H. et al. 2010). Επιπρόσθετα, έχει προσδιοριστεί και η τρισδιάστατη δομή της οσμοδεσμευτικής πρωτεΐνης **AgamOBP48**, η οποία παρουσιάζει υψηλά επίπεδα έκφρασης στην κεραία των θηλυκών (Tsitsanou et al. 2013).

Η μοριακή προσέγγιση του οσφρητικού συστήματος των κουνουπιών *A. gambiae*, είτε ως προς τους οσφρητικούς υποδοχείς είτε ως προς τις οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες (Odorant Binding Proteins, **OBPs**), δημιουργεί συνθήκες για την ανάπτυξη εξειδικευμένων κατασταλτικών μεθόδων εναντίον της μετάδοσης της ελονοσίας.

Δάκος της ελιάς

Βιολογικά χαρακτηριστικά

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae* είναι μία φρουτόμυγα με αποκλειστική παρασιτική συμπεριφορά στα ελαιόδεντρα. Αποτελεί ένα **ολομετάβολο, δίπτερο** έντομο, το οποίο ανήκει στην οικογένεια **Tephritidae**. Τα θηλυκά έντομα χρησιμοποιούν ως ξενιστή τον ελαιόκαρπο για να αποθέσουν τα αυγά τους, τα οποία καθώς αναπτύσσονται καταστρέφουν τον καρπό καθιστώντας το δάκο το σημαντικότερο εχθρό των ελαιοκαλλιεργειών.



Εικόνα 1.10: Παγκόσμιος χάρτης καλλιέργειας ελιάς και παραγωγής ελαιόλαδου

Ο κύκλος ζωής του δάκου

Ο κύκλος ζωής του δάκου ταυτίζεται με την καταστροφή του καρπού και περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Ωρίμανση αρσενικών και θηλυκών ατόμων (θεωρούνται ώριμα μετά την 7^η μέρα)
- Σύζευξη μεταξύ αρσενικού και θηλυκού (τα θηλυκά συζεύγνυνται μία μόνο φορά, ενώ τα αρσενικά απεριόριστες)
- Ωοαπόθεση από τα ενήλικα θηλυκά έντομα (50-400 αυγά ανά καρπό)
- Ανάπτυξη της προνύμφης μέσω χρησιμοποίησης των θρεπτικών συστατικών του καρπού
- Δημιουργία στοών από την προνύμφη για θρέψη εντός του καρπού και καταστροφή του
- Ανάπτυξη βακτηρίων και μυκήτων στο νύγμα της ωοαπόθεσης με αποτέλεσμα το σάπισμα του καρπού.
-



Εικόνα 1.11: Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*

Καταπολέμηση του δάκου της ελιάς

Η καταστροφή που προκαλεί το έντομο *B. oleae* στις ελαιοκαλλιέργειες είναι αφενός ποιοτική καθώς χάνονται μεγάλες ποσότητες ελαιόλαδου και αφετέρου οικονομική καθώς η καλλιέργεια της ελιάς συνιστά έναν μεγάλο τομέα στην παραγωγή και την οικονομία ειδικά των χωρών της Μεσογείου.

Οι ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι αντιμετώπισής του είναι τα χημικά εντομοκτόνα και οι παγίδες (εικόνα 1.12). Ωστόσο, η αλόγιστη χρήση των χημικών εντομοκτόνων από τη μία είναι αναποτελεσματική καθώς οι πληθυσμοί αποκτούν ανθεκτικότητα και από την άλλη ενισχύουν την περιβαλλοντική ρύπανση με τις επιβλαβείς συνέπειες που φέρουν. Επιπρόσθετα, η χρήση των παγίδων δημιουργεί οικολογικά ζητήματα καθώς η στόχευσή του δεν εξειδικεύεται στο δάκο. Μέσω της μαζικής παγίδευσης εξοντώνονται και άλλα έντομα με αποτέλεσμα τη διαταραχή του οικοσυστήματος της ελιάς.

Στην κατασκευή των παραπάνω συστημάτων συνέβαλε και ο προσδιορισμός των φερομονών του δάκου που εμπλέκονται σε πολλές βιολογικές διαδικασίες όπως η **αναγνώριση** και η **επιλογή συντρόφου**, η **σύζευξη** και η **επιλογή ξενιστή για ωοαπόθεση**. Αρχικά, ταυτοποιήθηκε η **olean**, βασικότερο και δραστικότερο συστατικό της οποίας είναι το DSU (1,7-διοξάσπειρο-[5,5]-ενδεκάνιο (Baker et al, 1980). Εκκρίνεται από τους ορθικούς αδένες των θηλυκών κατά κύριο λόγο και προσελκύει ώριμα αρσενικά άτομα.



Εικόνα 1.12: Παγίδες του δάκου της ελιάς. Από αριστερά προς τα δεξιά: i) McPhail: πλαστικό δοχείο με δύο τμήματα, εκ των οποίων το ένα έχει κίτρινο χρώμα που έλκει το δάκο. Στο εσωτερικό της παγίδας υπάρχουν φερομόνες που προσελκύουν και εγκλωβίζουν είτε θηλυκά είτε αρσενικά τα οποία, πέφτουν στο υγρό εντομοκτόνο που βρίσκεται στον πυθμένα του δοχείου μαζί με γευστικά δολώματα, όπως διττανθρακικό και φωσφορικό αμμώνιο. ii) Yellow sticky ranel: κίτρινες παγίδες εμποτισμένες με τη φερομόνη που προσελκύει τα αρσενικά άτομα και διττανθρακικό αμμώνιο- γευστικό δόλωμα και για τα δύο φύλα. iii) OLIPE trap: πλαστικό μπουκάλι με νερό που περιέχει μια ποσότητα ζύμης *togula*, η οποία προσελκύει το δάκο (και άλλα έντομα) ως πηγή τροφής. Τα έντομα εισέρχονται στο μπουκάλι από μικρές οπές και παγιδεύονται iv) Attract and kill device: χαρτόνια, εμποτισμένα με πυρεθροειδή εντομοκτόνα. Ανά τέσσερα χαρτόνια υπάρχει χαρτόνι που φέρει φερομόνες και άλλα δολώματα.

Επιπρόσθετα, ενώ αρχικά θεωρείτο ότι μόνο τα θηλυκά προσελκύουν αρσενικά άτομα μέσω της φερομόνης **olean**, διαπιστώθηκε ότι και τα αρσενικά προσελκύουν θηλυκά άτομα μέσω της μοναδικής φερομόνης **muscalure**. Η φερομόνη αυτή εκκρίνεται από τους ορθικούς αδένες, είναι βασική σεξουαλική φερομόνη της μύγας *Musca domestica* και η δραστική της ουσία είναι το Z-9-τρικοσένιο. Σε πειράματα που έγιναν και στο δάκο της ελιάς αποδείχτηκε ότι θηλυκά έντομα που εκτίθενται σε κλιμακούμενες συγκεντρώσεις της ουσίας, την αναγνωρίζουν και προσελκύονται (Carpita, et al. 2012).

Συστατικά οσφρητικού συστήματος ως μοριακοί στόχοι

Η ανάγκη για την ανάπτυξη εξειδικευμένων μοριακών τεχνικών αλλά και η βελτιστοποίηση των ήδη υπαρχόντων συστημάτων απαιτούν την εμβάθυνση στη μοριακή προσέγγιση της συμπεριφοράς του δάκου. Αντικείμενα μελέτης αποτελούν το αναπαραγωγικό και το οσφρητικό σύστημα του εντόμου.

Η όσφρηση στο δάκο, όπως και σε όλα τα έντομα, θεωρείται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές λειτουργίες όπως είναι η αναγνώριση οσμών και φερομονών, η σύζευξη, η επιλογή ξενιστή για ωοαπόθεση, ο εντοπισμός της τροφής και η αποφυγή κινδύνων όπως των θηρευτών. Σε αυτό το πλαίσιο, συστατικά του οσφρητικού συστήματος όπως οι οσφρητικοί υποδοχείς και οι οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες χρήζουν εκτενούς μελέτης και ανάλυσης ώστε η καταπολέμηση του δάκου μέσω μοριακών μεθόδων να γίνει πιο αποτελεσματική.

Οσμές και φερομόνες

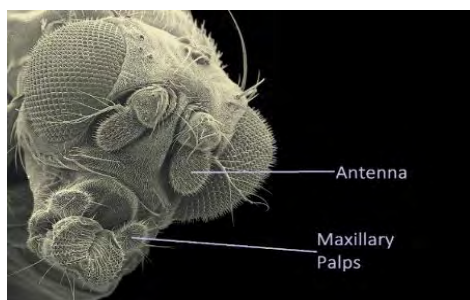
I. Γενικές οσμές

Ως γενική οσμή χαρακτηρίζεται μια πτητική χημική ένωση με μοριακό βάρος μικρότερο από 300 kDa, η οποία γίνεται μέσω της όσφρησης. Οι γενικές οσμές έχουν πολύ μεγάλη σημασία για την επιβίωση των ζώων καθώς τους επιτρέπουν να εντοπίσουν την τροφή τους και να αποφεύγουν θηρευτές και περιβαλλοντικούς κινδύνους, όπως η φωτιά.

II. Φερομόνες

Οι φερομόνες είναι ουσίες που εκκρίνονται από ένα άτομο και δρουν σε ένα άλλο άτομο του ίδιου είδους επάγοντας μια αντίδραση. Ως απόκριση στις φερομόνες το άλλο άτομο μπορεί να παράγει φωτοβολία, τοξικά προϊόντα ή να ενεργοποιηθεί για σύζευξη. Ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά στο μεταξοσκώληκα *Bombyx mori* (Butenandt et al, 1959). Το έντομο αυτό χρησιμοποιεί τη φερομόνη βομβυκόλη για προσέλκυση συντρόφου. Ωστόσο, φερομόνες χρησιμοποιούνται και σε ανώτερους οργανισμούς (ψάρια, αμφίβια, θηλαστικά ακόμα και στον άνθρωπο). Μπορούν να διακριθούν στις **σεξουαλικές φερομόνες** που εκκρίνονται από ένα άτομο με στόχο την προσέλκυση του αντίθετου φύλου και στις **φερομόνες συνάθροισης** που εκκρίνονται από τα άτομα και προσλαμβάνονται από άλλα άτομα του ίδιου είδους και είναι προειδοποιητικές αναφορικά με την ύπαρξη τροφής ή κινδύνου.

Οσφρητικά όργανα



Εικόνα 1.13: Κεφάλι ενήλικου ατόμου *Drosophila melanogaster*. Διακρίνονται οι κεραίες και οι γναθικές προσακτρίδες.

Η όσφρηση στα έντομα είναι μία αίσθηση που στηρίζεται σε πολλές πρωτεΐνες και επηρεάζει, όπως έχει προαναφερθεί, ένα πλήθος βιολογικών λειτουργιών. Στα ενήλικα άτομα πραγματοποιείται αποκλειστικά από το κεφάλι και τα κύρια οσφρητικά όργανα που την επιτελούν είναι:

- i. Οι κεραίες (antennae)
- ii. Οι γναθικές προσακτρίδες (maxillary palps)

Δομική Προσέγγιση

Πέραν των δύο κύριων οσφρητικών οργάνων στο οσφρητικό σύστημα περιέχονται και οι οσφρητικοί νευρώνες (OSNs).

Οι κεραίες και οι γναθικές προσακτρίδες περιβάλλονται από ένα μεγάλο αριθμό **αισθητήριων τριχιδίων** (sensilla), η δομή των οποίων είναι αρκετά συντηρημένη και αποτελούνται από επιδερμικό τοίχωμα το οποίο διέρχονται οι οσμές

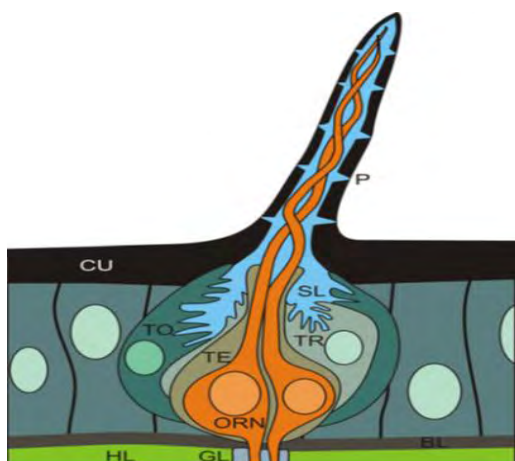
μέσω πόρων που σχηματίζονται στο τοίχωμα. Ο ρόλος των τριχιδίων αυτών είναι η προστασία των οσφρητικών νευρώνων (OSNs, Odorant Sensory Neurons). Διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες, οι οποίες διαφέρουν ως προς τη μορφολογία, το μέγεθος, τις ενώσεις που αναγνωρίζουν οι νευρώνες και την κατανομή τους στην κεραία. Οι κατηγορίες αυτές είναι οι εξής: **τα τριχοειδή (trichoid)** που ειδικεύονται στην αναγνώριση φερομονών, **τα βασικωνικά (basiconic)** στην αναγνώριση τροφών (Jefferis et al, 2007), **και τα κοιλοκωνικά (coelonic)**.



Εικόνα 1.14: Κατανομή ειδών αισθητικών τριχιδίων (Barish and Volkan 2015)

Η **κεραία** περιβάλλεται και από τα τρία είδη αισθητικών τριχιδίων. Η κάθε κεραία νευρώνεται από περίπου 1100-1250 οσφρητικούς νευρώνες. Τα αρσενικά έντομα διαθέτουν σχεδόν 20% λιγότερα βασικωνικά τριχίδια και 30% περισσότερα τριχοειδή τριχίδια απ' ό τι τα θηλυκά (Stocker, 2001). Αντίθετα, οι **γναθικές προσακτρίδες** είναι απλούστερες δομές και καλύπτονται αποκλειστικά από μεγάλα βασικωνικά οσφρητικά τριχίδια. Κάθε γναθική προσακτρίδα νευρώνεται από 120 OSNs, ενώ το άπω άκρο της περιέχει περίπου 60 οσφρητικά τριχίδια. Οι 120 OSNs μπορούν να διακριθούν σε έξι λειτουργικές κλάσεις που αντιστοιχούν στους διαφορετικούς συνδυασμούς των οσφρητικών υποδοχέων που εκφράζονται στους νευρώνες αυτούς.

Όσον αφορά στην περαιτέρω νευρική οργάνωση, κάθε οσφρητικό τριχίδιο περιβάλλει τους **δενδρίτες** από έναν έως πέντε οσφρητικούς νευρώνες (Vermuelen et al, 2004). Οι OSNs εδράζονται στο τρίτο τμήμα στις κεραίες και στις γναθικές προσακτρίδες, και εντοπίζουν τις οσμές μεταφέροντας το εξωτερικό σήμα στον εγκέφαλο. Οι άξονες των OSNs εκτείνονται ως τα σπειράματα (glomeruli) των συναπτικών κέντρων, στο λοβό του εγκεφάλου (Hildebrand et al, 1997) των οποίων η εμπλοκή στην όσφρηση είναι καίρια.

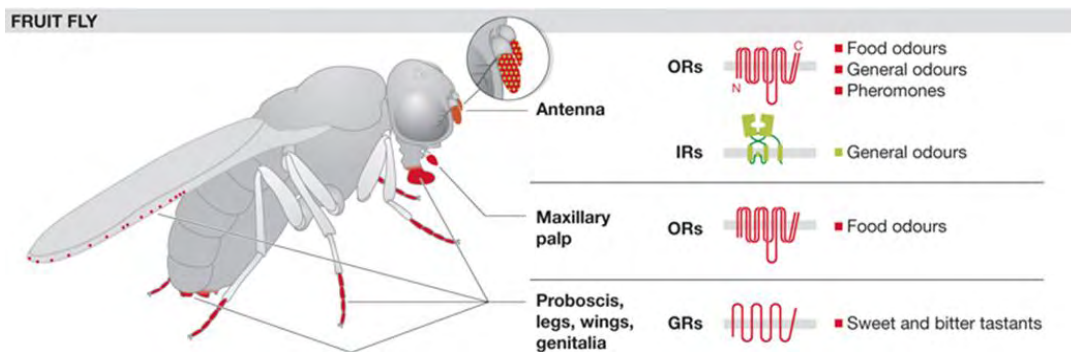


Εικόνα 1.15: Μορφολογία οσφρητικού τριχιδίου ευαίσθητου σε φερομόνες. Δύο ORNs επεκτείνουν τους εξωτερικούς τους δενδρίτες στην αισθητήρια λέμφη (Sensillum Lymph, SL). Εκεί έρχονται σε επαφή με φερομόνες οι οποίες εισέρχονται δια μέσου πόρων (P) στην επιδερμίδα του αισθητήριου τριχιδίου. Υποστηρικτικά κύτταρα όπως TO, TR, συμβάλλουν στη δομή του αισθητήριου τριχιδίου και στα συστατικά της αισθητήριας λέμφου. Τα TE κύτταρα απομονώνουν τον εσωτερικό δενδρίτη και το σώμα του ORN από την αισθητήρια λέμφη, καθώς ένα γλοιακό κύτταρο (GL) τυλίγει το νευράξονα και τον απομονώνει από την αιμόλεμφο (HL), πίσω από τη βασική στιβάδα (Stengl M, Funk NW 2013)

Μοριακή Προσέγγιση

Πέραν της φυσιολογίας, η υποδοχή των οσμών και η μεταγωγή σήματος στο οσφρητικό σύστημα στα έντομα έχει μελετηθεί σε αρκετά είδη όπως σκώρους, μέλισσες, κουνούπια, μυρμήγκια και σκαθάρια. Ωστόσο η δομή και η λειτουργία του οσφρητικού συστήματος της *D. melanogaster* έχει δώσει τις περισσότερες πληροφορίες για την όσφρηση στα έντομα. Συνεπώς, το οσφρητικό σύστημα στα έντομα συνίσταται σε μοριακό επίπεδο από τα εξής μόρια:

- I. **Οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες** (OBPs: General Odorant binding proteins, Pheromone binding proteins, Antennal specific proteins)
- II. **Ένζυμα αποικοδόμησης οσμών** (odorant-degrading enzymes, ODEs)
- III. **Γευστικοί υποδοχείς** (Gustatory Receptors, GRs)
- IV. **Χημειοδεκτικές πρωτεΐνες** (CSPs, Chemosensory Proteins)
- V. **Οσφρητικοί Υποδοχείς** (Odorant Receptors, ORs)
 - i. **Ιονοτροπικοί υποδοχείς** (ionotropic receptors, IRs)
 - ii. **Συνυποδοχέας ORCO (OR-Coreceptor, Or83b)**
 - iii. **CD36**
- VI. **Πρωτεΐνες της αισθητήριας μεμβράνης του νευρώνα** (sensory neuron membrane proteins, SNMPs)



Εικόνα 1.16: Κατανομή οσφρητικών και γευστικών υποδοχέων στη φρουτόμυγα

Τα μόρια αυτά διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στην αναγνώριση και την υποδοχή της οσμής και κατ' επέκταση στη μεταγωγή σήματος μέσω της μεταφοράς της στον εγκέφαλο. Με τον τρόπο αυτό συμβάλλουν στη λειτουργία του οσφρητικού συστήματος πυροδοτώντας περαιτέρω δίκτυα βιοχημικών αντιδράσεων που σχετίζονται με άλλες βιολογικές λειτουργίες όπως η σύζευξη ή η ωαπόθεση.

I. Οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες (OBPs)

Οι OBPs είναι μικρές υδατοδιαλυτές, εξωκυττάρειες πρωτεΐνες, μεγέθους 15-20 kDa, με κλασική δομή το μοτίβο (C1-X20-35-C2-X3-C3-X20-30-C4-X8-12-C5-X8-C6), που εκφράζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στη λέμφο των αισθητήριων τριχιδίων στις κεραίες του εντόμου δεσμεύοντας τις οσμές. Ανακαλύφθηκαν το 1981 στην κεραία του σκώρου *Antheraea polyphemus* (Vogt & Riddiford, 1981) και πλέον έχουν ταυτοποιηθεί και σε πολλά είδη εντόμων. Επίσης OBPs έχουν προσδιοριστεί και σε ένα μεγάλο μέρος σπονδυλωτών (αγελάδα 1981, ποντικός 1986, άνθρωπος 2000 κλπ). Οι OBPs μπορεί να είναι **PBPs** (Pheromone Binding Proteins) αν δεσμεύουν φερομόνες **GOBPs** (General Odor Binding Proteins) αν δεσμεύουν γενικές οσμές και **ASPs** (Antennal Specific Proteins) αν η δράση τους εξειδικεύεται στις κεραίες των εντόμων.

II. Ένζυμα αποικοδόμησης οσμών (ODEs, Odorant Degrading Enzymes):

Πρόκειται για ένζυμα τα οποία βρίσκονται εξωκυτταρικά σε διαλυτή μορφή, είτε ενδοκυτταρικά δεσμευμένα στη μεμβράνη ή στο κυτταρόπλασμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό πτητικών σηματοδοτικών μορίων καταλύοντας την αποικοδόμηση τους προσδέτη μετά την αλληλεπίδρασή του με τον υποδοχέα (Vogt et al, 2003). Ως εκ τούτου, εμποδίζουν τη συσσώρευση των διεγερτικών σημάτων και τη μετέπειτα προσαρμογή (Vogt & Riddiford, 1981), επιτρέποντας στο έντομο να ανταποκρίνεται γρήγορα στις αλλαγές των πτητικών ουσιών στο περιβάλλον του. Επιπλέον ρυθμίζουν την ευαισθησία και την ειδικότητα των χημειούποδοχέων σε διάφορα έντομα (Younus F. et al. 2014).

III. Γευστικοί υποδοχείς (Gustatory Receptors, GRs)

Οι γευστικοί υποδοχείς (GRs) εκφράζονται κυρίως στα πόδια, την προβοσκίδα, τα γεννητικά όργανα και τα φτερά (Stocker, 1994) (εικόνα 1.17). Τα έντομα

ανιχνεύουν γευστικά ερεθίσματα μέσω των οργάνων αυτών τα οποία περιβάλλονται από αισθητήρια γευστικά τριχίδια. Η προβοσκίδα της *D. melanogaster* καλύπτεται από εξωτερικά και εσωτερικά γευστικά τριχίδια και μπορεί να θεωρηθεί αντίστοιχη της γλώσσας των θηλαστικών. Τα εσωτερικά καλύπτουν τμήμα του φάρυγγα της προβοσκίδας και επιτρέπουν στη μύγα να αξιολογήσει το τρόφιμο αμέσως μετά την κατάποση αφού πρώτα έχει μεταφερθεί στο πεπτικό σύστημα. Αντίθετα, τα εξωτερικά τριχίδια όπως στις χειλικές προσεκτρίδες, στα φτερά ή τα πόδια, επιτρέπουν την αξιολόγηση της τροφής πριν την κατανάλωσή του. Αυτή η ικανότητα συμβάλλει στην επιβίωση του εντόμου το οποίο μπορεί να αξιολογήσει αν πρόκειται περί τροφής ή τοξικών ουσιών και να αποφασίσει αν πρέπει να προβεί σε κατάποση χρησιμοποιώντας την προβοσκίδα του.

Κύριος ρόλος των γευστικών υποδοχέων είναι ο εντοπισμός γεύσεων. Οι διαφορές με τους οσφρητικούς υποδοχείς, τόσο στο ρόλο όσο και στην κατανομή τους, δείχνουν πως εμπλέκονται σε διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Μέσω της αναγνώρισης των γεύσεων, το έντομο μπορεί να εντοπίζει τροφές πλούσιες σε θρεπτικά συστατικά αποφεύγοντας την κατανάλωση τοξικών προϊόντων, όπως και ζώνες κατάλληλες για ωοαπόθεση. Ωστόσο, στα έντομα, κάποιοι GRs συμμετέχουν και στην οσφρητική σηματοδότηση. Συγκεκριμένα, ο **GR68a** στη *Drosophila* φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στη διαδικασία της σύζευξης, μέσω αναγνώρισης από το αρσενικό έντομο κάποιας μη-πτητικής φερομόνης που εκκρίνει το θηλυκό κατά το πρώιμο στάδιο της σύζευξης (Bray & Amrein, 2003).

IV. Χημειοδεκτικές πρωτεΐνες (CSPs, Chemosensory Proteins)

Οι CSPs είναι πρωτεΐνες με παρόμοια δράση με τις OBPs, αλλά με σημαντικές διαφορές στη δομή και την έκφραση. Δεσμεύουν και μεταφέρουν υδρόφοβα μόρια από τον αέρα στους οσφρητικούς υποδοχείς που βρίσκονται στο λεμφικό υγρό των χημειοαισθητηρίων της κεραίας. Πειράματα αποσιώπησης των γονιδίων **AlinCSP1-3** του εντόμου *Adelphocoris lineolatus* έδειξαν τη σημαντικότητα των πρωτεϊνών αυτών στην αναγνώριση και τη μεταγωγή σήματος των φερομονών που προέρχονται από τον ξενιστή (Shao-Hua Gu et al. 2012).

Διατηρούν ένα διαφορετικό πρότυπο, έχοντας συντηρημένα τέσσερα (αντί για έξι) κατάλοιπα κυστεΐνης (C1-X6-C2-X6-18-C3-X2-C4) μέσω των οποίων συγκροτούν δύο (αντί για τρεις) δισουλφιδικούς δεσμούς. Η έκφρασή τους δεν περιορίζεται αποκλειστικά στις κεραίες αλλά έχει παρατηρηθεί και στα πόδια του εντόμου (Tomaselli et al, 2006).

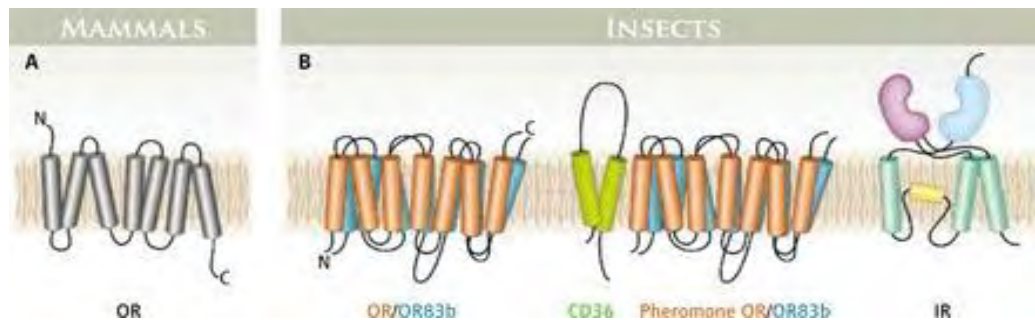
V. Οσφρητικοί Υποδοχείς (Odorant Receptors, ORs)

Η ανακάλυψη των οσφρητικών υποδοχέων στη *Drosophila melanogaster* το 1999 και η μελέτη τους σε μοριακό επίπεδο (Vosshall et al. 1999) έδωσε σημαντικές πληροφορίες στην κατανόηση της λειτουργίας του οσφρητικού συστήματος στα

έντομα. Παρόλο που οσφρητικοί υποδοχείς είχαν ανακαλυφθεί αρχικά σε άλλους οργανισμούς όπως στον ποντικό (Buck and Axel, 1991) και τον *Caenorhabditis elegans* (Troemel et al, 1995), στο γονιδίωμα της *D. melanogaster* εν τέλει, ταυτοποιήθηκε ο συνολικά μικρός αριθμός των **60 γονιδίων** τα οποία κωδικοποιούν **62 οσφρητικούς υποδοχείς**, με τους 2 να αποτελούν προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος (splicing) (Robertson et al. 2003).

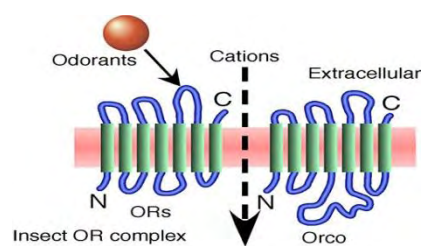
Δομή

Οι ORs είναι αποδεδειγμένα μέλη της υπερικογένειας των υποδοχέων που διαπερνούν τη μεμβράνη επτά φορές και είναι πρωτεΐνες που μπορούν να αναγνωρίζουν διακριτές σε δομή οσμές (Buck and Axel, 1991). Ενώ στην αρχή θεωρήθηκε ότι είναι GPCR πρωτεΐνες όπως οι υποδοχείς των θηλαστικών, αποδείχθηκε εν τέλει ότι είναι είτε IRs είτε διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με αντίστροφη τοπολογία που σχηματίζουν ετερομερή με έναν καλά συντηρημένο συνυποδοχέα ORCO (Walter S. Leal, 2013). Τέλος, αν οι οσφρητικοί υποδοχείς αναγνωρίζουν και δεσμεύουν φερομόνες-λιπίδια, τότε πρόκειται για τις CD36 πρωτεΐνες (Benton, 2009).



Εικόνα 1.17: Οσφρητικοί Υποδοχείς σε θηλαστικά (Α) και έντομα (Β.) Στα έντομα οι οσφρητικοί υποδοχείς διακρίνονται ανάλογα με τη δομή και την τοπολογία τους σε σχέση με τη μεμβράνη (Benton, 2009)

Συναντώνται στην επιφάνεια των οσφρητικών νευρώνων στις κεραίες και τις γναθικές προσακτρίδες. Γενικά, κάθε οσφρητικός νευρώνας στην κεραία εκφράζει ένα OR με μία θέση δέσμευση οσμής μαζί με έναν συνυποδοχέα, Orco, ο οποίος δεν δεσμεύει οσμές αλλά λειτουργεί υποστηρικτικά στον OR.



Εικόνα 1.18: Μοντέλο δομής προσδετοεξαρτώμενου υποδοχέα (OR) και συνυποδοχέα (Orco)

Ρόλος

Οι ORs συμβάλλουν στον εντοπισμό και τη δέσμευση των οσμών από τα έντομα και τη μετατροπή τους σε νευρωνική δραστηριότητα. Η επιλεκτικότητα τους ως προς τις οσμές όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω επιτυγχάνεται με μια διαδικασία δύο συνδυαστικών βημάτων περιφερικά και στο λοβό της κεραίας.

Αρχικά, επιτρέπουν τη διάκριση μεταξύ των οσμών έτσι ώστε να μπορούν να αποκριθούν κατάλληλα μόνο κύτταρα που εκφράζουν τον ιδανικό τύπο υποδοχέα. Στη συνέχεια, κατά τη σύνδεση τους με τον προσδέτη, μεταφέρουν το χημικό μήνυμα από τον εξωκυττάριο στον ενδοκυττάριο χώρο της μεμβράνης. Η σύνδεση αυτή οδηγεί στην ενεργοποίηση του νευρώνα και στη μεταφορά του μηνύματος στον εγκέφαλο για να πραγματοποιηθεί και η αντίστοιχη απόκριση.

VI.i. Ιονοτροπικοί υποδοχείς (ionotropic receptors, IRs)

Εκτός από τους διαμεμβρανικούς οσφρητικούς υποδοχείς μία άλλη κατηγορία υποδοχέων είναι οι ιονοτροπικοί (IRs).

Σε έρευνες που πραγματοποιήθηκαν για τη λειτουργία των ORs βρέθηκε το εξής: Σε μύγες που είχαν απώλεια λειτουργίας υποδοχέων- αποσιωπημένο το γονίδιο *Orco*- βρέθηκε πως είχαν συμπεριφορικές αποκρίσεις σε πολλές οσμές. Αυτό, υπονόησε την ύπαρξη επιπλέον οσφρητικών μηχανισμών αναγνώρισης. Με βιοπληροφορικές προσεγγίσεις ταυτοποιήθηκαν πολλοί ιονοτροπικοί υποδοχείς γλουταμινικού, οι οποίοι είναι προσδετο-εξαρτώμενα κανάλια ιόντων. Ενώ οι υποδοχείς του γλουταμινικού διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην συναπτική επικοινωνία, οι συγκεκριμένοι υποδοχείς ήταν ασυνήθιστοι καθώς έφεραν αποκλίνουσες περιοχές θέσεων πρόσδεσης που στερούνταν περιοχές αλληλεπίδρασης καταλοίπων γλουταμινικού. Οι υποδοχείς αυτοί ονομάστηκαν Ιονοτροπικοί (IRs) και μπορούν να χαρακτηριστούν ως «δεύτερη μύτη» στα έντομα έχοντας τις εξής ιδιότητες (Benton, 2009):

- Εκφράζονται σε συγκεκριμένους συνδυασμούς στους οσφρητικούς νευρώνες που δεν εκφράζουν ORs.
- Εντοπίζονται στις βλεφαρίδες των οσφρητικών νευρώνων και όχι στις συνάψεις.
- Ελλιπής έκφραση των IRs σε εκτοπικό νευρώνα είναι επαρκής για να προσδώσει νέες αποκρίσεις στην οσμή.

Πρόκειται για μόρια με παρόμοιο ρόλο, αλλά με **διαφορετική δομή** από τους ORs, τα οποία ανακαλύφθηκαν πρόσφατα (Benton *et al*, 2009). Εμφανίζουν σημαντικές διαφορές ως προς την έκφραση και τη λειτουργία τους σε σχέση με τους ORs, με σημαντικότερη το γεγονός πως προσδέτες των IRs αναγνωρίζονται πολύ ασθενώς ή καθόλου από τους ORs, ενώ οι ισχυροί προσδέτες των ORs δεν προκαλούν διέγερση στους IRs.

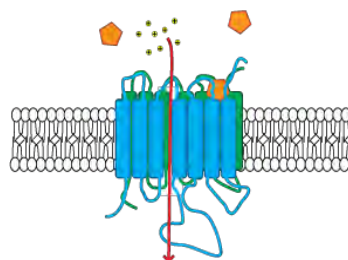
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει το γονίδιο *IR84a* το οποίο εντοπίζει περιβαλλοντικά "αφροδιασιακά" στην τροφή και προάγει την σεξουαλική συμπεριφορά στις μύγες σε περιοχές με άφθονες θρεπτικές ουσίες για τους απογόνους τους. Οι IRs, σε αντίθεση με τους ORs, δεν εντοπίζονται μόνο στα έντομα, αλλά η ύπαρξη τους έχει διαπιστωθεί σε όλα τα είδη που έχουν εξεταστεί και ανήκουν στην κατηγορία των πρωτοστόμιων (Rytz *et al*, 2013). Για πολλούς IRs της *D. melanogaster*, δε, έχουν βρεθεί ορθόλογα γονίδια σε άλλα είδη εντόμων, όπως κουνούπια (Liu *et al*, 2010), μέλισσες (Croset *et al*, 2010) και σκώρους (Bengtsson *et al*, 2012).

VI.ii. ORCO

Είναι μια πρωτεΐνη με υψηλό ποσοστό συντήρησης ανάμεσα στα διάφορα είδη εντόμων (1). Παρατηρήθηκε για πρώτη φορά ότι συνεκφράζεται μαζί με τους ORs στη *D. melanogaster* (2). Ορθόλογα γονίδια του «μη κανονικού» OR Or83b είχαν ταυτοποιηθεί νωρίτερα σε σκόρους (3) και κουνούπια (4) με ονόματα OR2 και OR7 αντίστοιχα. Ωστόσο, επειδή έχει αποδειχθεί ότι σε όλα τα έντομα ο συνυποδοχέας επιτελεί την ίδια λειτουργία έχει καταστεί να ονομάζεται απλούστερα ORCO (5).

Δομή

Ο ORCO, ενώ αρχικά θεωρούνταν GPCR πρωτεΐνη, εν τέλει εμπλέκεται στον εντοπισμό των ORs στους δένδριτες των οσφρητικών νευρώνων (ORNs) και ενισχύει την οσφρητική απόκριση χωρίς την αλλαγή της εξειδίκευσης του προσδέτη όταν συνεκφράζεται με οσφρητικούς υποδοχείς (ORs), σχηματίζοντας ετερομερή σύμπλοκα με άλλους ORs.



Εικόνα 1.19: Συνυποδοχέας ORCO

Ωστόσο, ενώ οι κλασσικοί ORs είναι εξαιρετικά αποκλίνουσες 7-trans διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (7TM), ο συνυποδοχέας μοιράζεται έως και **94% ομολογία αλληλουχίας με ορθόλογα γονίδια ανάμεσα στα είδη των εντόμων** (Hill et al. 2002; Krieger et al. 2003; Pitts et al. 2004; Jones et al. 2005; Patch et al. 2009; Olafson 2013), γεγονός που αποδεικνύει το μεγάλο ποσοστό συντήρησης. Σε διαφορετικά είδη εντόμων διαφορετικά ονόματα (για το γονίδιο του συνυποδοχέα) προσδιορίζουν τα αντίστοιχα ορθόλογα γονίδια. Στη φρουτόμυγα *Drosophila melanogaster* η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από τον **A45-1^ο** όνομα του συντηρημένου υποδοχέα- ονομάστηκε **Ob83b** (Vosshall et al. 1999). Εν τέλει, η Ob83b ονομάστηκε Orco για την απλούστευση του ονόματος και κυρίως για να τονιστεί η σημασία της ως **συν-υποδοχέας** (OR-CO, **O**lfactory **R**eceptor-**C**Oreceptor) (Vosshall and Hansson 2011).

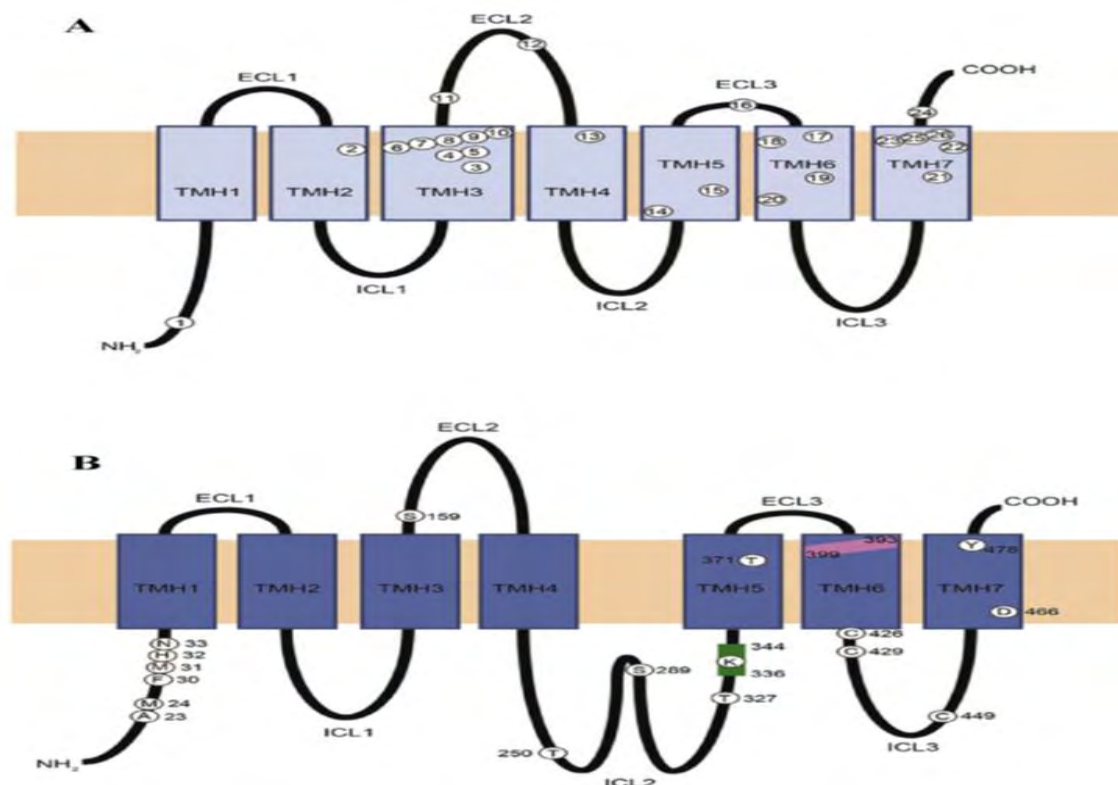
Πίνακας 1.1: Ορθόλογα γονίδια Orco σε διάφορα είδη εντόμων

Species Original	Denotation	Accession number	Reference
Acyrtosiphon pisum	ApOr1	XM_001951611	Smadja et al. (2009)
Aedes aegypti	AaOr7	AY582943	Melo et al. (2004)
Aldrichina grahami	AgraOrco	HQ190955	Olafson (2013)
Anopheles gambiae	AgamGPRor7	AY363725	Hill et al. (2002)
Antheraea pernyi	AperR2	AJ555486	Krieger et al. (2003)
Apis mellifera	AmelR2	NM_001134943	Krieger et al. (2003)
Bactrocera dorsalis	BdOrco	EU621792	Zheng et al. (2012)
Bactrocera cucurbitae	Or83b	HM745934	Zheng et al. (2012)
Bombyx mori	BmorR2	AJ555487	Krieger et al. (2003)
Calliphora erythrocephala	CeryR2	AJ555538	Krieger et al. (2003)
Ceratitis capitata	CcOr83b	AY843206	Jones et al. (2005)
Chrysomya megacephala	CmegOrco	HQ315861	Olafson (2013)
			Xia and Zwiebel (2006)
Culex quinquefasciatus	CqOR7	DQ231246	
Diaphania indica	DiOR83	AB263114	Mitsuno et al. (2008)
Drosophila ananassae	DanaOrco	XM_001953308	Olafson (2013)
Drosophila melanogaster	Or83b	AY567998	Vosshall et al. (2000)
Drosophila yakuba	DyakOrco	XM_002096017	Olafson (2013)
Epiphyas postvittana	EpOR2	EU791887	Jordan et al. (2009)
Haematobia irritans irritans	HirrOrco	ACF21678	Olafson (2013)
Harpegnathos saltator	HsalOrco	EFN84180	Jones et al. (2011)
Helicoverpa armigera	OR83b	HQ186284	Zheng et al. (2012)
Helicoverpa assulta	HassOrco	EU057178	Yang et al. (2012)
Helicoverpa zea	HzOr83b	AY843204	Jones et al. (2005)
Heliothis virescens	HR2	AJ487477	Krieger et al. (2002)
Holotrichia oblita	HoblOrco	JF718662	Yang et al. (2012)
Holotrichia plumbea	Or83b	HQ110087	Zheng et al. (2012)
Locusta migratoria	LmigOrco	JN989549	Yang et al. (2012)
Lucilia sericata	LserOR1	HQ315862	Wang et al. (2012)
Manduca sexta	MsextaOR2	FJ546087	Patch et al. (2009)
Musca domestica	MdomOrco	JQ365179	Olafson (2013)
Mythimna separata	MsOR83	AB263111	Mitsuno et al. (2008)
			Robertson et al. (2010)
Nasonia vitripennis	NvOr1	NM_001170994	
Ostrinia nubilalis	OnOr2	GQ844877	Wanner et al. (2010)
Pediculus humanus corporis	PhumOrco	EEB12924	Yang et al. (2012)
Plutella xylostella	PxOR83	AB263117	Mitsuno et al. (2008)
Schistocerca gregaria	SgreOrco	JN989550	Yang et al. (2012)
Sitobion avenae	SaveOrco	GQ275379	Yang et al. (2012)
Spodoptera frugiperda	SfOR2		Smart et al. (2008)
Spodoptera litura	OR2	DQ845292	Zheng et al. (2012)
Stomoxys calcitrans	ScalOrco	EU622914	Olafson (2013)
Tenebrio molitor	TmolR2	AJ555539	Krieger et al. (2003)
Tribolium castaneum	TcasOr16	AM689918	Abdel-Latif (2007)

Ιδιότητες

Κατέχει μια ανεστραμμένη τοπολογία/θέση στη μεμβράνη και σχηματίζει ετεροδιμερή με τους οσφρητικούς υποδοχείς. Και οι ORs και ο Orco ανήκουν στη μεγάλη οικογένεια των 7TM υποδοχέων. Πειραματικές και υπολογιστικές αποδείξεις, πρότειναν ότι οι ORs-Orco υιοθετούν ως σύμπλοκο μια τοπολογία αντίστροφη στη μεμβράνη σε σχέση με τους GPCRs, με το καρβοξυτελικό άκρο να είναι εξωκυτταρικό (Benton et al. 2006; Wistrand et al. 2006; Lundin et al. 2007; Smart et al. 2008; Guo and Kim 2010; Tsitoura et al.

2010). Το σύμπλοκο αυτό φάνηκε να επικοινωνεί μέσω του συντηρημένου C-άκρου (TM4-TM7), πιθανόν μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυτταροπλασματικών βρόχων IC3 και των δύο πρωτεϊνών (Benton et al. 2006; Miller and Tu 2008; Harini and



Εικόνα 1.20: Δομή του διαμεμβρανικού συνυποδοχέα DmOr85b και υπομονάδες του OR της *Drosophila melanogaster*. Δομικά μοντέλα (Hopf et al. 2015)

Sowdhamini 2012). Ωστόσο η στοιχειομετρία του συμπλόκου είναι ακόμα άγνωστη όπως προέκυψε από μελέτες σε φρουτόμυγες (Neuhaus et al. 2005; German et al. 2013). Επιπρόσθετα, θεωρείται πως τα μόρια αυτά έχουν μια περαιτέρω αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες SNMP (Rogers et al. 1997, 2001a, b; Benton et al. 2007; Forstner et al. 2008; Jin et al. 2008; review: Vogt et al. 2009; German et al. 2013).

Ρόλος

Ο συν-υποδοχέας Orco διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο οσφρητικό σύστημα των εντόμων καθώς εμπλέκεται σε ένα πλήθος βιοχημικών αντιδράσεων που συμβάλλουν στη μεταγωγή σήματος των οσμών. Ο σημαντικός ρόλος του συν-υποδοχέα συνίσταται από τα εξής:

1. Είναι απαραίτητος για τον εντοπισμό των οσμών και την απόκριση των εντόμων:

- i. Συμβάλλει στη διαμόρφωση της δομής των οσφρητικών υποδοχέων στους δενδρίτες και ως εκ τούτου είναι απαραίτητος για τις οσφρητικές αποκρίσεις που εξαρτώνται από τους οσφρητικούς υποδοχείς.

Σε έντομα *Drosophila melanogaster* στα οποία το γονίδιο *Orc* είχε αποσιωπηθεί, ο σχηματισμός των ORs διακόπηκε σε ραχιαία όργανα και στην κεραία (Larsson et al. 2004). Για το λόγο αυτό προτάθηκε πως ο συνυποδοχέας *Orc* είναι απαραίτητος για τον εντοπισμό των ORs στις μεμβράνες των δενδριτών. Αυτό αποδείχθηκε μέσω πειραμάτων διάσωσης κατά τα οποία ο *Orc* φάνηκε να συμμετέχει τον εντοπισμό και τη συντήρηση των ORs στους δενδρίτες (Larsson et al. 2004; Benton et al. 2006). Άλλο ένα στοιχείο που οδήγησε σε αυτό το συμπέρασμα ήταν πως σε μύγες με μεταλλαγμένο *Orc* γονίδιο καθώς επίσης και σε knock-down *Orc* μύγες οι ηλεκτρικές αποκρίσεις ήταν μειωμένες (Larsson et al. 2004; Neuhaus et al. 2005). Αξίζει να σημειωθεί πως ούτε ως ενήλικες αλλά ούτε και ως προνύμφες, οι μύγες κατόρθωσαν να αποκριθούν σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις οσμών (Larsson et al. 2004). Επιπλέον, προτάθηκε πως λειτουργεί ως πρωτεΐνη *chaperon* και πιθανόν να επιτρέπει τη σωστή αναδίπλωση των ORs (Larsson et al. 2004; Benton et al. 2006). Τέλος, συμβάλλει στην παροδική δέσμευση και τη μεταγωγή των οσμών μέσω του προαναφερθέντος ετεροδιμερούς συμπλόκου OR-*Orc* (Larsson et al. 2004; Benton et al. 2006).

- ii. Είναι ένα μη- ειδικό κανάλι κατιόντων που προωθεί την αυθόρμητη ενεργοποίηση των οσφρητικών νευρώνων.

Ανεξάρτητα από τους ORs, ο *Orc*, σε διάφορα είδη σχηματίζεται από ένα μη ειδικό άνοιγμα καναλιών Ca^{2+} σε συστήματα ετερόλογης έκφρασης (Sato et al. 2008; Wicher et al. 2008; Jones et al. 2011; Sargsyan et al. 2011; Nolte et al. 2013). Σε μύγες με μεταλλαγμένο γονίδιο *Orc*, οι ORNs ενεργοποιήθηκαν λιγότερο αυθόρμητα και αυτό γιατί ο συνυποδοχέας ρυθμίζει την κυρίαρχη ροή Ca^{2+} . Λειτουργεί δηλαδή ως βηματοδότης που οδηγεί τους υπερπολωμένους νευρώνες σε ένα μέγιστο σημείο (μια ουδό) προκαλώντας αυθόρμητη ενεργοποίηση (Larsson et al. 2004; Benton et al. 2007; Deng et al. 2011).

Επιπλέον ο *Orc* είναι αναγκαίος για τη χρονική κωδικοποίηση των ORNs σε έντομα (Stengl 2010), παρέχοντας έτσι πληροφορίες για την ποιότητα και την ποσότητα της οσμής στο χρόνο που απαιτείται μέχρι το πρώτο μέγιστο (Singer and Gray 1995; Laurent 2002; Junek et al. 2010; Nadasdy 2010; review: Stengl 2010). Κατ' αυτόν τον τρόπο ο *Orc* μπορεί να επηρεάζει την ουδό απόκρισης και της κινητικής των ORs (Stengl 2010). Η υπόθεση αυτή, όπως και άλλες υποθέσεις σχετικές με τη λειτουργία του συνυποδοχέα, επιβεβαιώθηκε με την ανακάλυψη αγωνιστών και ανταγωνιστών της πρωτεΐνης (Jones et al. 2011; Nichols et al. 2011; Pask et al. 2011, 2013 Bohbot and Dickens 2012; Chen and Luetje 2012; Jones et al. 2012; Taylor et al. 2012; Nolte et al. 2013; Röllecke et al. 2013). Ένας αγωνιστής που χρησιμοποιήθηκε στις έρευνες είναι ο **VUAA1** (Jones et al. 2011) όπου αύξησε την αυθόρμητη ενεργοποίηση των ORNs στα αισθητήρια τριχοειδή σε έντομα *Manduca sexta*. Τέλος, επηρεάζει τις συνθήκες αλληλεπίδρασης για την απόκριση των ORNs σε φερομόνες (Nolte et al. 2013). Παρόμοια αποτελέσματα σχετικά με τη δραστηριότητα του συνυποδοχέα, μέσω της εφαρμογής ανταγωνιστών και

συναγωνιστών, παρατηρήθηκαν και στη *D. melanogaster* (Su et al. 2012) καθώς και στο *Anopheles gambiae* (Jones et al. 2011, 2012).

2. Συμβάλλει στον εντοπισμό της κατάλληλης θέσης για απόθεση των αυγών

Μελέτες στη φρουτόμυγα *Bactrocera dorsalis* έδειξαν πως το οσφρητικό σύστημα και συγκεκριμένα ο Orco παίζει σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση κατάλληλης τοποθεσίας για ξενισμό και ωαπόθεση. Οι κυοφορούσες μύγες αναγνωρίζουν συγκεκριμένα σήματα, πτητικά κατά κύριο λόγο, που εκλύονται από διάφορα φυτά. Ο συνυποδοχέας Orco σε συνδυασμό με την οσμοδεσμευτική πρωτεΐνη OBP συμβάλλουν στην αναγνώριση του σήματος και στην επιλογή της θέσης για ωαπόθεση (X. Yi et al. 2014).

Επιπλέον, έρευνες σε θηλυκά κυοφορούντα κουνούπια- *Culex quinquefasciatus*- τα οποία είναι φορείς πολλών ασθενειών, έδειξαν την εμπλοκή των συμπλόκων OR-Orco σε χημικές ουσίες που προέρχονται από την τοποθεσία του ξενιστή και λειτουργούν ως ελκυστικές για την ωαπόθεση (F. Zhu et al. 2013).

Τέλος, πειράματα στο γονίδιο Orco στο σκαθάρι *Dendroctonus armandi*, σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια σε αρσενικά και θηλυκά έδειξαν την αναγκαιότητα του συνυποδοχέα για τον εντοπισμό περιοχής για ωαπόθεση ειδικά μετά τις 48 ώρες. Πιο συγκεκριμένα, ο Orco είναι πολύ σημαντικός για την ταυτοποίηση πτητικών χημικών ουσιών που εκλύονται από τον ξενιστή. Οι ουσίες αυτές ελκύουν τα θηλυκά τα οποία αφήνουν τα αυγά τους στον ξενιστή (Zhang et al. 2016).

3. Διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη σύζευξη καθώς μεσολαβεί στην αναγνώριση σεξουαλικών φερομονών του ενός εντόμου από το άλλο και στην απόκρισή τους

Μελέτες του γονιδίου Orco στο έντομο Gypsy Moth, *Lymantria dispar*, έδειξαν πως ο συνυποδοχέας διαδραματίζει καίριο ρόλο στην αναγνώριση σεξουαλικών φερομονών από τα θηλυκά γεγονός που επιδρά και στη σύζευξη και κατά συνέπεια στο βαθμό αναπαραγωγής του πληθυσμού. Ηλεκτροαντεννογραφήματα σε θηλυκά έντομα έδειξαν μη απόκριση σε σεξουαλικές φερομόνες, αποτέλεσμα που βασίζεται σε δύο προσεγγίσεις: Πρώτον, το σύστημα αναγνώρισης σεξουαλικών φερομονών που βασίζεται σε οσφρητικούς υποδοχείς δεν εκφράζεται στα θηλυκά, συνεπώς το σύμπλοκο OR-Orco δεν απαιτείται για αυτή τη λειτουργία. Δεύτερον, το οσφρητικό σύστημα στα θηλυκά Gypsy Moth, ειδικεύεται στην αναγνώριση και απόκριση σε γενικές οσμές. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της qPCR σε αρσενικά και θηλυκά έντομα με αποσιωπημένο γονίδιο έδειξαν μείωση έκφρασης, γεγονός που υποδηλώνει το ρόλο του Orco στην απόκριση και σε φερομόνες και όχι μόνο σε γενικές οσμές (Wei Lin et al. 2015).

Ρύθμιση

Το μονοπάτι ενεργοποίησης του Orco έχει μελετηθεί σε διάφορα ήδη εντόμων όπως η *D. melanogaster*, οι πεταλούδες της νύχτας και οι κατσαρίδες, ωστόσο σημαντικά αποτελέσματα έδωσαν οι αναλύσεις στη φρουτόμυγα *D. melanogaster*.

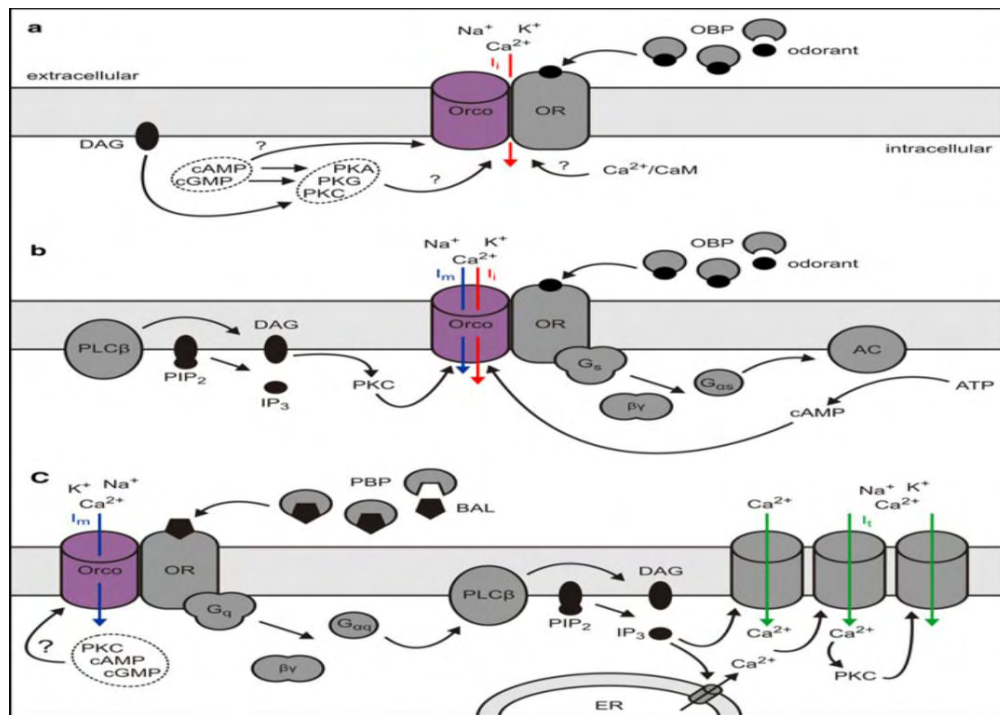
Συγκεκριμένα έχουν προταθεί τρεις διαφορετικοί τρόποι ενεργοποίησης και ρύθμισης του συνυποδοχέα που αφορούν την ιοντοτροπική μεταγωγή και τη μεταβοτροπική μεταγωγή σήματος. Με τον όρο ιοντοτροπική εννοείται πως η μεταγωγή σήματος βασίζεται σε τασεοξαρτώμενα κανάλια ιόντων που ενεργοποιούνται μετά από αλλαγή του δυναμικού της μεμβράνης του κυττάρου. Με τον όρο μεταβοτροπική εννοείται η σηματοδότηση που βασίζεται στο συνδυασμό δραστηριοτήτων πολλών πρωτεϊνών όπως G πρωτεΐνες, ενεργά ένζυμα, δεύτεροι διαβιβαστές και πρωτεΐνες τελεστές.

Αρχικά, το **πρώτο** μονοπάτι ενεργοποίησης αφορά αποκλειστικά την ιοντοτροπική ρύθμιση που διαμορφώνεται και μεταβοτροπικά. Πιο συγκεκριμένα, το μη ειδικό κανάλι ιόντων, ο συνυποδοχέας Orco, σχηματίζει ετεροδιμερές σύμπλοκο με έναν οσφρητικό υποδοχέα (OR) σχηματίζοντας ένα προσδετο-εξαρτώμενο κανάλι ιόντος με εξωτερικό προσδέτη γενικές οσμές και φερομόνες το οποίο υπόκειται σε ιοντοτροπικό μεταγωγή σήματος. Η σύνδεση του προσδέτη επάγει μια ροή ιόντων (*I_i*) μέσω του πόρου του καναλιού (Sato et al. 2008). Έχει προταθεί πως η ροή ιόντων διαμορφώνεται από μεταβοτροπικούς καταρράκτες βιοχημικών αντιδράσεων άγνωστων μέχρι στιγμής μεταβοτροπικών υποδοχέων που καθορίζουν την ευαισθησία και την κινητική στην οσφρητική απόκριση (Nakawaga and Vosshall 2009) (**Εικ.1.22 .Α**).

Μία **δεύτερη** υπόθεση είναι η ενεργοποίηση του Orco και η μεταγωγή σήματος μέσω ενός μεταβοτροπικού και ταυτόχρονα ιοντοτροπικού μηχανισμού. Αναλυτικά, η οσμή συνδέεται στο κανάλι ιόντων OR-Orco με αποτέλεσμα την επαγωγή πρώτα μιας λιγότερο ευαίσθητης και γρήγορης ιοντοτροπικής ροής ιόντων (*I_i*) και παράλληλα την πρόκληση μιας πιο ευαίσθητης και αργής μεταβοτροπικής ροής ιόντων (*I_m*) (Wicher et al. 2008). Η οσμή μέσω του υποδοχέα που συνδέεται με G πρωτεΐνη ενεργοποιεί μια αδενυλική κυκλάση (AC) η οποία παράγει cAMP. Η αύξηση της συγκέντρωσης του cAMP ενεργοποιεί τον Orco και παράγει ροή ιόντων *I_m* μόνο αφού ο Orco έχει φωσφορυλιωθεί από την πρωτεϊνική κινάση PKC. Επιπλέον, η PKC μπορεί να προκαλέσει ροή ιόντων *I_m* αφού ενεργοποιηθεί μέσω μονοπατιού της φωσφολιπάσης β (PLCβ) (Sargsyan et al. 2011) (**Εικ 1.22.Β**).

Τέλος, η **τρίτη** υπόθεση σχετίζεται αποκλειστικά με τον μεταβοτροπικό μηχανισμό. Οι πρωτεΐνες δέσμησης φερομονών (Pheromone Binding Proteins, PBP) ελέγχουν την παροδική σύνδεση της οσμής στον οσφρητικό υποδοχέα (OR), η οποία επάγει την ενεργοποίηση μια Gq πρωτεΐνης η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την PLCβ (review: Stengl 2010). Η φωσφολιπάση β (PLC β) υδrolύει τη διφωσφορική φωσφτιδυλινωσιτόλη (PIP₂) σε διακυλογλυκερόλη (DAG) και τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP₃). Η IP₃ προκαλεί αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca²⁺ με την ενεργοποίηση Ca²⁺- εξαρτώμενων καναλιών της πλασματικής μεμβράνης. Η γρήγορη αύξηση των ιόντων ασβεστίου προκαλεί τον άνοιγμα των Ca²⁺-

εξαρτώμενων καναλιών που αποτελούν τη βάση του παροδικού ρεύματος μεταγωγής (I_t). Η PKC ενεργοποιεί τα κανάλια ασβεστίου I_t και έχει υποθεθεί πως φωσφορυλιώνει τον $Orco$, αυξάνοντας έτσι την αγωγιμότητα (I_m) και την ευαισθησία του σε κυκλικά νουκλεοτίδια. Η ροή ιόντων I_m αλλάζει συνέχεια και αυθόρμητα με συνέπεια να επιδρά στην κινητική και στην ευαισθησία κατά την οσφρητική απόκριση δεδομένου ότι ελέγχει το δυναμικό της μεμβράνης και την ενδοκυτταρική συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου (Stengl 2010; Nolte et al. 2013) (Εικ 1.22. C).



Εικόνα 1.21: Τρεις διαφορετικές υποθέσεις για τη ρύθμιση του $Orco$ και την εμπλοκή του στη μεταγωγή σήματος στο οσφρητικό σύστημα. (A) και (B) βασίζονται σε μελέτες σε φρουτόμυγα και (C) σε πεταλούδες της νύχτας (Stengl 2010; Nolte et al. 2013)

I.iii CD36 πρωτεΐνες

Είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που έχουν πολλούς ρόλους κυρίως στην πρόσληψη λιπιδίων, την κυτταρική προσκόλληση και την ανίχνευση παθογόνων. Στα θηλαστικά παρουσιάζουν έντονη πολυλειτουργικότητα. Συγκεκριμένα οι τρεις CD36 πρωτεΐνες- CD36, SR-BI, LIMP-2- εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως η συλλογή λιποπρωτεϊνών η μεταφορά λιπαρών οξέων, η ανοσολογική απόκριση, η ταξινόμηση λυσοσωμικών πρωτεϊνών και ο εντοπισμός γευστικών λιπών (tasty fats). Αποσιώπηση ή ελλιπής ρύθμιση των CD36 πρωτεϊνών συνδέεται με διάφορες ασθένειες όπως υπέρταση, διαβήτης, καρδιομυοπάθειες.

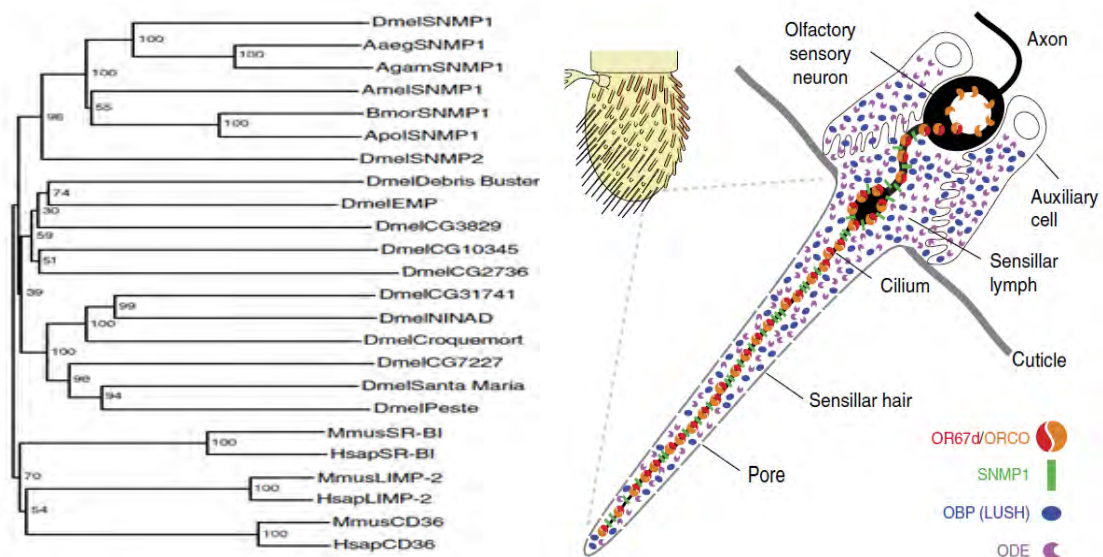
Παρά το σημαντικό τους ρόλο, ο ακριβής μηχανισμός λειτουργίας τους παραμένει άγνωστος. Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες στις CD36 των θηλαστικών στις οποίες έχει προσδιοριστεί ένας αριθμός προσδετών των διαμεμβρανικών αυτών πρωτεϊνών όπως λιπαρά οξέα, οξειδωμένες

λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας, θρομβοσπονδίνη 1 και εξαρελίνη και αντίστοιχα ένας αριθμός περιοχών δέσμευσης στη μεγάλη 6^η διαμεμβρανική περιοχή των πρωτεϊνών αυτών. Επιπλέον, έχει αποκαλυφθεί ένας από τους κύριους ρόλους των CD36 πρωτεϊνών όπως η διαμεσολάβηση τους στην μεταφορά του προσδέτη δια μέσου της μεμβράνης, στην εσωτερικεύσή του, στη μεταφορά του σε σηματοδοτικούς υποδοχείς στην επιφάνεια άλλου κυττάρου ή στην άμεση ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών 2οκαταρρακτών σηματοδότησης (Gomez-Diaz et al 2016).

VII. Sensory Neuronal Membrane Proteins (SNMPs):

Στα έντομα και συγκεκριμένα στη *Drosophila melanogaster* η ομόλογη των CD36 πρωτεϊνών είναι η SNMP1 (Sensory Neuronal Membrane Proteins, διαμεμβρανική πρωτεΐνη των αισθητήριων νευρώνων). Η SNMP1 διευκολύνει τον εντοπισμό των φερομονών που προέρχονται από λιπίδια από υποδοχείς στις οσφρητικές βλεφαρίδες.

Στη *D. melanogaster* υπάρχουν 14 πρωτεΐνες ομόλογες των CD36 των θηλαστικών (εικόνα 1.23) με διακριτές λειτουργίες όπως η μεταφορά καρτενοειδών από το έντερο σε φωτουποδοχείς-**NINAD & Santa Maria**, ανοσολογική απόκριση-**Croquemort & Peste** και η ωρίμανση φαγοσωμάτων στα επιδερμικά κύτταρα κατά την εκκαθάριση εκφυλιστικών νευρικών διαδικασιών- **Debris Buster** (Gomez-Diaz et al 2016).

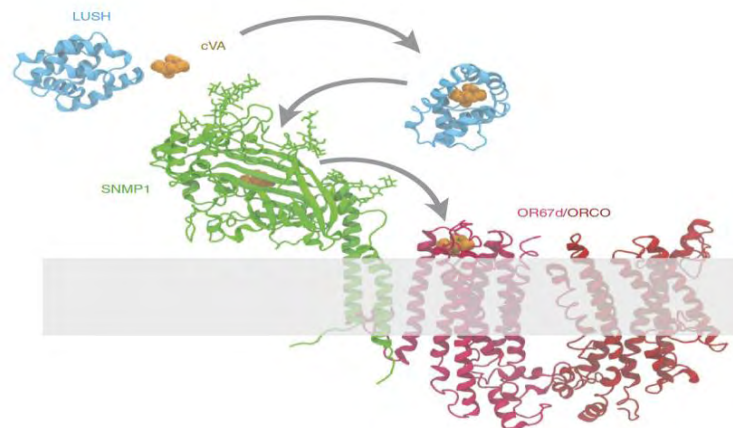


Εικόνα 1.22: Αριστερά: Ορθόλογα γονίδια SNMP1 σε *D. melanogaster* και θηλαστικά [Dmel, *Drosophila melanogaster*; Aaeg, *Aedes aegypti*; Agam, *Anopheles gambiae*; Amel, *Apis mellifera*; Bmor, *Bombyx mori*; Apol, *Antheraea polyphemus*; Mmus, *Mus musculus*; Hsap, *Homo sapiens*] Δεξιά: Σχηματική απεικόνιση της κεραίας στη *D. melanogaster* και αισθητήριο τριχίδιο ευαίσθητο σε φερομόνη (Gomez-Diaz et al. 2016)

Η SNMP1 εκφράζεται στους αισθητήριους οσφρητικούς νευρώνες (OSNs) και εντοπίζει φερομόνες λιπιδικής προέλευσης και στοχοθετείται στις βλεφαρίδες των δενδριτών που είναι εκτεθειμένες σε εξωτερικούς προσδέτες όπου βρίσκονται και οι οσφρητικοί υποδοχείς (εικόνα 1.23). Η καλύτερα

προσδιορισμένη λειτουργία της SNMP1 στη *D. melanogaster* είναι η εμπλοκή της στην έκφραση του OR67d στους αισθητήριους οσφρητικούς νευρώνες με την υποχρεωτική παρουσία του συνυποδοχέα ORCO και στον εντοπισμό από το σύμπλοκο της αρσενικής σεξουαλικής φερομόνης cVA (11-cis vaccenyl acetate). Η πρωτεΐνη αυτή, η οποία ανακαλύφθηκε πρώτα στο σκόρο *Antheraea polyphemus* (Rogers et al, 1997), έχει αποδειχτεί πως δρα στη *D. melanogaster* ως συνυποδοχέας της φερομόνης της, cVA (Jin et al, 2008). Απώλεια λειτουργίας της SNMP1 έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση ευαισθησίας των αισθητήριων οσφρητικών νευρώνων στη διέγερση από τη cVA, γεγονός που υποδηλώνει το σημαντικό ρόλο της SNMP1 στη μεταγωγή σήματος των φερομονών με τον ακριβή μηχανισμό της δράσης της να ακόμα άγνωστος.

Ένα μονοπάτι σηματοδότησης που έχει προταθεί είναι το εξής: η SNMP1 μπορεί να δεσμεύει ελεύθερα μόρια φερομονών ή να δεσμεύει σύμπλοκα φερομονών με οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες (OBPs) στο εξωκυτταρικό υγρό ή και τα δύο. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορούν απλώς να συγκεντρώνουν τα μόρια της φερομόνης στην περιοχή των υποδοχέων στη μεμβράνη των βλεφαρίδων ή άμεσα να διευκολύνουν τη μεταφορά των προσδετών (φερομονών) στο αντίστοιχο υποδοχέα.



Εικόνα 1.23: Μοντέλο μεταγωγής σήματος της σεξουαλικής φερομόνης cVA (Gomez-Díaz et al. 2016). Η cVA αφού προσληφθεί από το έντομο δημιουργεί σύμπλοκο εξωκυττάρια με την πρωτεΐνη OBP76a ή LUSH. Κατά την πρόσδεση της η φερομόνη φαίνεται πως προκαλεί σημαντικές αλλαγές στη στερεοδομή της LUSH. Εν συνεχεία, το σύμπλοκο κινείται προς την επιφάνεια του νευρώνα, όπου εκεί εδράζεται ένα σύμπλεγμα αποτελούμενο από τον υποδοχέα OR67d, το συνυποδοχέα OR83b και την μεμβρανική πρωτεΐνη SNMP1. Η LUSH αφού έχει υποστεί τις αλλαγές στη στερεοδομή της δρα ως προσδέτης και αλληλεπιδρά με το παραπάνω σύμπλεγμα. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του νευρώνα και τη μεταγωγή του σήματος της φερομόνης στον εγκέφαλο (Laughlin et al, 2008)

Δεύτερον, η SNMP1 μπορεί να συμμετέχει στη μεταγωγή των φερομονών μέσω σύνδεσης σε έναν ενδοκυτταρικό καταρράκτη όπως για παράδειγμα μέσω στρατολόγησης πρωτεϊνών στη μεμβράνη των βλεφαρίδων δια μέσου κυτταροπλασματικών ουρών (Gomez-Díaz et al 2016).

Ηλεκτροφυσιολογική ανάλυση των SNMPs σε αποσιωπημένους αισθητήριους νευρώνες έδειξε ότι η SNMP είναι απαραίτητη για την πρόκληση νευρωνικής δραστηριότητας από τις φερομόνες. Τέλος, ως πιθανοί ρόλοι της SNMP έχουν προταθεί η δράση τους ως ORs στα λεπιδόπτερα και η καθοδήγηση του συμπλέγματος OBP-προσδέτη (Gomez-Diaz et al 2016).

Τέλος, πειράματα σε ωκύτταρα *Xenopus* στα οποία εκφράστηκε ο υποδοχέας της βομβυκόλης του μεταξοσκώληκα (BmOR1 & BmORCO) και προστέθηκε η SNMP1 του οργανισμού, είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση της κινητικής της ενεργοποίησης και της απενεργοποίησης του υποδοχέα. Συμπερασματικά, η SNMP1 λειτουργεί στην επαγωγή της γρήγορης ενεργοποίησης και απενεργοποίησης των υποδοχέων των φερομονών έτσι ώστε να επιτευχθεί γρήγορη έναρξη και τερματισμός της ευαισθητοποίησης των ORNs στις φερομόνες. Αυτό επιβεβαιώθηκε και με αποσιώπηση του γονιδίου SNMP1. Η απώλεια λειτουργίας δεν εξάλειψε την ενεργοποίηση που είχε προκληθεί από τη cVA και η δραστηριότητα συνεχίστηκε για πολλά λεπτά, σε αντίθεση με το αγρίου τύπου γονίδιο, παρουσία του οποίου ο τερματισμός της ενεργοποίησης πραγματοποιείται σε λιγότερο από ένα δευτερόλεπτο. Συνεπώς, η SNMP1 φαίνεται να απαιτείται για την απενεργοποίηση του υποδοχέα φερομονών (Li Z, Ni JD, Huang J, Montell C, 2014).

Εν κατακλείδι,

στην οργάνωση του οσφρητικού συστήματος των παρασιτικών εντόμων εμπλέκονται μια πληθώρα πρωτεϊνών, που μπορούν να αποτελέσουν μοριακούς στόχους για την ανάπτυξη νέων μεθόδων καταπολέμησης της καταστροφικής τους δράσης και εν προκειμένω την καταστροφική δράση του δάκου της ελιάς. Όσο πιο εξειδικευμένη ως προς το είδος είναι η μοριακή στόχευση τόσο πιο αποτελεσματικές θα είναι και οι μέθοδοι καταπολέμησης. Για το λόγο αυτό, η εκτενής έρευνα και ανάλυση των καίριων οσφρητικών συστατικών, όπως ο συνυποδοχέας **Orc** και η πρωτεΐνη **SNMP1** μπορεί να συμβάλλει στην κατανόηση της αναπαραγωγικής συμπεριφοράς του δάκου.

2. Σκοπός

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η λειτουργική ανάλυση των γονιδίων **ORCO** και **SNMP1** που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος οσμών και φερομονών στο δάκο της ελιάς, *Bactrocera oleae*, μέσω αποσιώπησης RNAi και ο επακόλουθος έλεγχος του φαινοτύπου. Στα πλαίσια αυτά η πειραματική διαδικασία κινήθηκε σε δύο άξονες:

- I. Παροδική αποσιώπηση των δύο γονιδίων σε αρσενικούς και θηλυκούς δάκους μέσω RNAi και ποσοτική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης χρησιμοποιώντας Real-Time PCR
- II. Παροδική αποσιώπηση του γονιδίου *Orco* σε θηλυκούς δάκους και έλεγχος φαινοτύπου όσον αφορά στη σεξουαλική συμπεριφορά των εντόμων και την ικανότητα ωοαπόθεσης.

3. Μέθοδοι-Υλικά

Μέθοδοι-Υλικά

Πειραματικά Πρωτόκολλα

1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR)

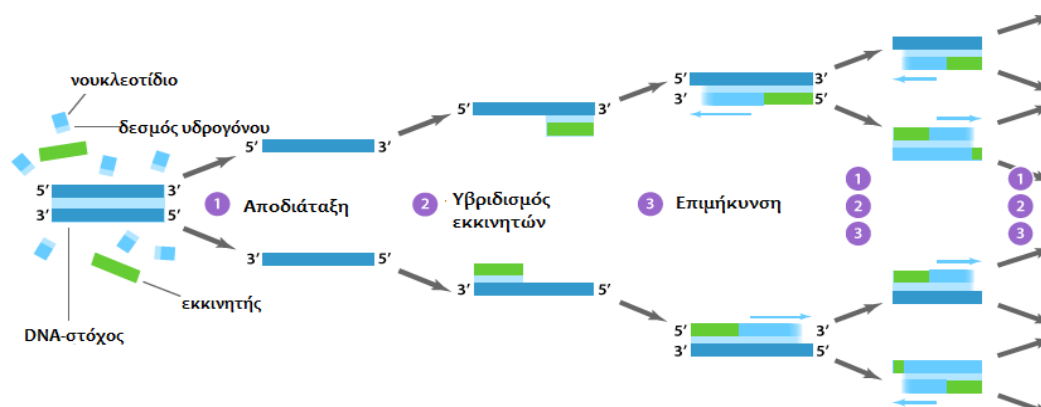
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR) αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία της Μοριακής Βιολογίας (Mullis et al, 1986) με μια πληθώρα εφαρμογών σε διάφορους τομείς. Πρόκειται για μια ενζυμική μέθοδο που παρέχει δυνατότητα ενίσχυσης ορισμένων τμημάτων γενετικού υλικού in vitro. Η ανακάλυψή της έδωσε τη δυνατότητα παραγωγής μεγάλων ποσοτήτων DNA χωρίς τη εφαρμογή της κλωνοποίησης. Η αρχή της μεθόδου συνίστανται από την κατάλυση από μια DNA πολυμεράσης της σύνθεσης μεγάλου αριθμού αντιγράφων μιας αλληλουχίας DNA. Η αλληλουχία βρίσκεται ανάμεσα σε δύο εκκινητές απαραίτητοι για την έναρξη της διαδικασίας. Το αρχικό υλικό είναι ένα δείγμα DNA στο οποίο περιέχεται η αλληλουχία-στόχος και μπορεί να είναι ακόμα και ένα μόνο μόριο DNA.

Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA ως μήτρα για τη σύνθεση ενός συμπληρωματικού νέου κλώνου (όμοια με τη διαδικασία της αντιγραφής). Αυτό σημαίνει πως το η διπλή έλικα πρέπει να αποδιαταχθεί πράγμα που συμβαίνει με θέρμανση του δίκλωνου DNA σε θερμοκρασία που πλησιάζει το σημείο βρασμού. Με αυτόν τον τρόπο και οι δύο μονόκλωνες έλικες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μήτρα. Ωστόσο, το ένζυμο δυσκολεύεται να αντιγράψει αλληλουχίες μεγάλου μήκους η υψηλής περιεκτικότητας σε GC.

Το ένζυμο για να ξεκινήσει τη σύνθεση χρειάζεται ένα δίκλωνο τμήμα DNA και για αυτό στην αντίδραση προστίθενται δύο ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές, οι οποίοι τοποθετούνται εκατέρωθεν του τμήματος. Καθένας από τους εκκινητές είναι συμπληρωματικός με μια περιοχή του ενός από τους κλώνους της αλληλουχίας στόχου, ώστε να υβριδοποιείται σε αυτή. Κάθε νέος κλώνος DNA που συντίθεται από τον έναν εκκινητή περιλαμβάνει τη θέση στην οποία υβριδοποιείται ο άλλος εκκινητής. Με αυτό τον τρόπο δημιουργούνται νέες θέσεις πρόσδεσης εκκινητών σε κάθε νέο μόριο που συντίθεται. Επιπλέον, υπάρχει δυνατότητα καθορισμού των σημείων έναρξης σύνθεσης DNA in vitro με προσθήκη στην αντίδραση εκκινητών που έχουν την κατάλληλη αλληλουχία ώστε να υβριδοποιούνται με τη μήτρα σε συγκεκριμένες αλληλουχίες.

Μετά την υβριδοποίηση εκκινητών, θερμοκρασία ανεβαίνει ξανά και η Taq πολυμεράση καταλύει τη δημιουργία των νέων κλώνων. Οι κύκλοι θέρμανσης, προσκόλλησης των εκκινητών στη μήτρα και επέκτασής τους με αποτέλεσμα τη δημιουργία νέων μορίων επαναλαμβάνονται. Μετά από n κύκλους το μείγμα της αντίδρασης περιέχει θεωρητικά έως 2^n δίκλωνα μόρια DNA τα οποία φέρουν αντίγραφα της αλληλουχίας που βρίσκεται ανάμεσα στους εκκινητές. Στην πράξη, η τυπική απόδοση ανέρχεται στο 10-30% της θεωρητικά μέγιστης.

Ουσιαστικά η PCR πραγματοποιείται συνοπτικά σε **τρία** στάδια τα οποία αποτελούν ένα κύκλο, και επαναλαμβάνονται διαδοχικά (εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1: Ένας κύκλος PCR

Ο αριθμός των κύκλων εξαρτάται από το μέγεθος του επιθυμητού προϊόντος. Ωστόσο, μετά τους 30 κύκλους, η PCR εμφανίζει συχνά λάθη:

- 1. Το στάδιο της αποδιάταξης.** Αποδιάταξη του δίκλωνο DNA σε υψηλή θερμοκρασία 94-95°C.
- 2. Το στάδιο της υβριδοποίησης.** Υβριδοποίηση εκκινητών (primers) στις μονόκλωνες αλυσίδες. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης, T_a , εξαρτάται από την θερμοκρασία τήξης των εκκινητών, T_m^1 . Όπου, $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ και $T_a = T_m - 5$ (Thein & Wallace, 1986).
- 3. Το στάδιο της επιμήκυνσης.** Κατάλυση σύνθεση νέου μορίου από την Taq πολυμεράση, το οποίο αναγνωρίζοντας τους εκκινητές επιμηκώνει την επιθυμητή αλληλουχία. Η θερμοκρασία για την αντίδραση επιμήκυνσης είναι 72-74°C (πίνακας 5).

Πίνακας 3.1: Αντίδραση PCR

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αρχική αποδιάταξη	94°C	4 min	1
Αποδιάταξη	94°C	30sec	30
Υβριδισμός	T_a	30sec	
Επιμήκυνση	72°C	1kb/sec	
Τελική επιμήκυνση	72°C	5min	1
Διατήρηση	4°C	-	

¹ Η θερμοκρασία τήξης είναι αυτή στην οποία, τα μισά μόρια του ολιγονουκλεοτιδίου-εκκινητή ζευγαρώνουν με την αλληλουχία-στόχο, ενώ τα άλλα μισά δε σταθεροποιούνται πάνω σε αυτή και παραμένουν ελεύθερα. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες το ποσοστό των μορίων του εκκινητή που σταθεροποιούνται στην αλληλουχία στόχο μειώνεται και έτσι ενδέχεται να αποτύχει ο πολλαπλασιασμός του επιθυμητού τμήματος. Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες ο εκκινητής τείνει να υβριδοποιηθεί και σε μη ειδικές αλληλουχίες, που δεν είναι συμπληρωματικές με αποτέλεσμα να προκύψουν και ανεπιθύμητα παραπροϊόντα.

Τα βασικά συστατικά της αντίδρασης είναι:

- **DNA**
- **Εκκινητές (Forward και Reverse)**
- **dNTPs**
- **DNA Taq πολυμεράση**
- **Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (Buffer)**
- **MgCl₂**

Τα υλικά τοποθετούνται στο PCR tube και προστίθεται νερό για να συμπληρώσει τον τελικό όγκο. Έπειτα το PCR tube τοποθετείται στη συσκευή του θερμοκυκλοποιητή για επώαση στο κατάλληλο πρόγραμμα. Τέλος, τα παραγόμενα αντίγραφα μπορούν να ανιχνευθούν σε πήκτωμα αγαρόζης βαμμένο με βρωμιούχο αιθίδιο.

2. Δημιουργία dsRNA

Για την παραγωγή δίκλωνων μορίων, dsRNA, μέσω in vitro transcription πραγματοποιήθηκε η ακόλουθη διαδικασία:

Για τη δημιουργία του dsRNA χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο DNA, προϊόν PCR, που φέρει εκατέρωθεν την αλληλουχία του υποκινητή T7. Ο υποκινητής αυτός αποτελεί τη θέση πρόσδεσης της RNA πολυμεράσης για την αντίστροφη μεταγραφή (Martin et al., 2005). Η αλληλουχία εκμαγείο σχεδιάστηκε με τη χρήση του E-RNAi (παράρτημα 4, 5).

Το DNA προϊόν ενισχύθηκε με PCR σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

Πίνακας 3.2: Αντίδραση ενίσχυσης dsRNA

Αντιδραστήρια	μl
dsRNA (0.5 μg/μl)	1
dNTPs (40nM)	0.4
Primer T7. F (10pmol/μl)	0.7
Primer T7. R (10pmol/μl)	0.7
Polymerase (GeneOn)	0.2
Buffer (10X)	2
H ₂ O	15
Τελικός Όγκος	20

Οι συνθήκες της PCR ήταν οι ακόλουθες:

Πίνακας 3.3: Συνθήκες αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του dsRNA

Στάδιο	Θερμοκρασία	χρόνος	κύκλος
Αρχική αποδιάταξη	95oC	5min	1
Αποδιάταξη	95oC	30sec	30
Υβριδισμός	55oC	30sec	
Επιμήκυνση	72oC	40sec	
Τελική επιμήκυνση	72oC	4 min	1
Διατήρηση	4oC	-	-

Η μετατροπή των προϊόντων PCR σε δίκλωνο RNA για τα αντίστοιχα γονίδια πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο του MEGAscript® Kit της Ambion και απαιτεί τα εξής αντιδραστήρια:

- Προϊόν PCR
- H₂O
- Ριβονουκλεοτίδια
- 10X Reaction Buffer
- RNA Polymerase Enzyme Mix
- Turbo DNase
- Διάλυμα οξικού αμμωνίου
- Φαινόλη, χλωροφόρμιο
- 70% αιθανόλη
- Ισοπροπανόλη

Πρωτόκολλο:

1. Ξεπάγωμα των αντιδραστηρίων τοποθετώντας στον πάγο τα διαλύματα των ριβονουκλεοτιδίων και το 10X Reaction Buffer στον πάγκο σε θερμοκρασία δωματίου
2. Προσθήκη των πέντε πρώτων αντιδραστηρίων σε eppendorf σε θερμοκρασία δωματίου με τη σειρά και στις παρακάτω ποσότητες που αναγράφονται παρακάτω:

Πίνακας 3.4: Αντίδραση *in vitro* transcription

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
Προϊόν PCR	10 μl
Ριβονουκλεοτίδια (ATP, CTP, GTP, UTP)	4 μl από το καθένα
10X Reaction Buffer	4 μl
RNA Polymerase Enzyme Mix	4 μl
H ₂ O	6 μl
Τελικός όγκος	40 μl

3. Καλή ανάμειξη με πιπέτα
4. Επώαση στους 37°C για 16 ώρες
5. Προσθήκη 2 μl Turbo DNase και επώαση στους 37°C για 15 λεπτά
6. Προσθήκη 228 μl H₂O και 30 μl οξικού αμμωνίου
7. Προσθήκη ίσης ποσότητας φαινόλης/χλωροφορμίου για αντίδραση τελικού όγκου 300μl
8. Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά σε 12000 rpm
9. Μεταφορά υπερκλειμένου σε καινούργιο tube και προσθήκη χλωροφορμίου
10. Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά σε 12000rpm
11. Μεταφορά υπερκλειμένου και προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης
12. Επώαση στον πάγο για 30 λεπτά
13. Φυγοκέντρωση για 45 λεπτά στους 4°C σε 12000rpm
14. Αφαίρεση υπερκλειμένου και πλύση με ίσο όγκο 70% αιθανόλης
15. Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στους 4°C σε 12000 rpm
16. Αφαίρεση υπερκλειμένου με πιπέτα
17. Προσθήκη παγωμένης αιθανόλης
18. Φυγοκέντρωση για 45 λεπτά στους 4°C σε 12000rpm
19. Στέγνωμα του ιζήματος για 15 λεπτά περίπου και προσθήκη 25 μl ζεστού (50°C) H₂O

3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την απομόνωση και την ταυτοποίηση μορίων, όπως το DNA (Sambrook et al, 1989). Τα μόρια του DNA εισάγονται σε ειδικές θέσεις εντός του πηκτώματος αγαρόζης, ενός πορώδους μέσου με βασικό συστατικό την αγαρόζη, το οποίο είναι τοποθετημένο μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που φέρει δύο πόλους για τη δημιουργία ηλεκτρικού πεδίου. Κατά την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου, το DNA αρχίζει να μετακινείται (εντός του gel) από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο της συσκευής λόγω του αρνητικού φορτίου που φέρει σε ουδέτερο pH. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται βάσει μεγέθους όπου με τα μικρότερα σε μέγεθος (ζεύγη βάσεων) δείγματα κινούνται ταχύτερα προς το θετικό πόλο.

Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται μέσω της εισαγωγής μιας φθορίζουσας χρωστικής, του βρωμιούχου αιθιδίου,

που παρεμβάλεται εντός της διπλής έλικας του DNA και ανιχνεύεται με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Επιπλέον, ο υπολογισμός του μεγέθους των δειγμάτων μας βασίζεται στη σύγκριση με μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους (ladder), ο οποίος αποτελεί ένα μίγμα τμημάτων με διακριτά μοριακά μεγέθη και μετακινείται παράλληλα με το DNA στο ηλεκτρικό πεδίο.

Τα υλικά που απαιτούνται είναι:

- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 5X (1L: 54g Tris-base, 20mL EDTA 0,5M (pH:8), 27,5g Boric acid)
- Αγαρόζη
- Ladder
- Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer) 10X (0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανού της ξυλόλης, 15% φικκόλη σε νερό)
- Βρωμιούχο αιθίδιο

Για την παρασκευή **40mL πηκτώματος αγαρόζης 1%, 0,5X TBE** ακολουθούνται τα εξής βήματα:

1. Προσθήκη 1gr αγαρόζης σε κωνική φιάλη.
2. Προσθήκη 100ml TBE στην ίδια φιάλη.
3. Θέρμανση της κωνικής φιάλης, με ανάδευση ανά τακτά διαστήματα, έως ότου διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη.
4. Προσθήκη 4μL βρωμιούχου αιθιδίου και ανακίνηση.
5. Εισαγωγή του διαλύματος αγαρόζης στις ειδικές μήτρες και τοποθέτηση χτενών για τη δημιουργία μικρών πηγαδιών, εντός του πηκτώματος.
6. Αναμονή μέχρι να στερεοποιηθεί πλήρως και αφαίρεση των χτενών.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων:

1. Τοποθέτηση του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
 2. Προσθήκη διαλύματος TBE 0,5X ώστε να καλυφθούν πλήρως τα πηγαδάκια της ηλεκτροφόρησης.
 3. Προσθήκη διαλύματος φόρτωσης στα, προς ηλεκτροφόρηση, δείγματα.
 4. Εισαγωγή των δειγμάτων καθώς και του Ladder στα πηγαδάκια του πηκτώματος (κάθε δείγμα και ο Ladder σε διαφορετικό πηγαδάκι).
- Η παρακολούθηση της ηλεκτροφόρησης μπορεί να γίνει είτε δια γυμνού οφθαλμού, παρατηρώντας τα δύο συστατικά του διαλύματος φόρτωσης (μπλε βρωμοφαινόλης ~300bp, κυανού ξυλόλης ~4000bp), είτε δια της υπεριώδους ακτινοβολίας.

4. Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction)

Η ανάκτηση μορίων DNA στοχεύει στην απομόνωση και τον καθαρισμό μιας αλληλουχίας η οποία έχει διαχωριστεί από τις υπόλοιπες ενός δείγματος σε πήκτωμα αγαρόζης και πραγματοποιείται μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης. Το τμήμα που περιέχει την επιθυμητή αλληλουχία, αφού κοπεί με νυστέρι από το υπόλοιπο πήκτωμα, υφίσταται επεξεργασία προκειμένου να απομονωθεί πλήρως το DNA που εμπεριέχεται σε αυτό.

Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του GF-1 Gel DNA Recovery (extraction) Kit της Gene on.

Υλικά:

1. Buffer GB
2. Διάλυμα πλύσης μεμβρανών (WB-Wash Buffer)
3. Υδατικό διάλυμα ελεύθερο νουκλεασών (Elution Buffer)

Μέθοδος:

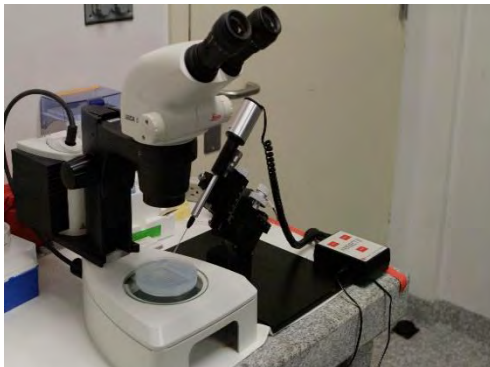
1. Τοποθέτηση του κομματιού του πηκτώματος με την επιθυμητή ζώνη σε σωληνάκι τύπου eppendorf 1,5mL και ζύγιση του.
2. Μετά τον υπολογισμό του βάρους του, προστίθεται ποσότητα του Buffer GB, ανάλογα με τη μάζα της ζώνης
3. Τοποθέτηση του eppendorf στο υδατόλουτρο στους 50°C μέχρι να διαλυθεί το πήκτωμα
4. Μεταφορά του περιεχομένου του eppendorf σε ειδικά column tubes
5. Φυγοκέντρωση στα 10.000g για 1 λεπτό
6. Απομάκρυνση του εκλούσματος
7. Προσθήκη 650 μl Wash Buffer και φυγοκέντρωση στα 10.000g για 1 λεπτό
8. Απομάκρυνση του εκλούσματος
9. Φυγοκέντρωση στα 10.000g για 1 λεπτό ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη
10. Μεταφορά του άνω τμήματος του column tube σε καινούριο eppendorf
11. Προσθήκη 30 μl ζεστού νερού (65-70°C) στο κέντρο της στήλης
12. Αναμονή για δύο λεπτά
13. Φυγοκέντρωση στα 10.000g για ένα λεπτό
14. Επανάληψη των βημάτων 12,13 και 14.
15. Προστίθενται προσεκτικά στο κέντρο της στήλης 30-50μL Elution buffer, το οποίο έχει προθερμανθεί σε υδατόλουτρο για ~10min και αφήνεται για 2-3min στον πάγκο.
16. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 1min στις 5.000 στροφές, και το DNA που έχει πια ανακτηθεί αποθηκεύεται στους 4°C.

5. Μικροενέσεις

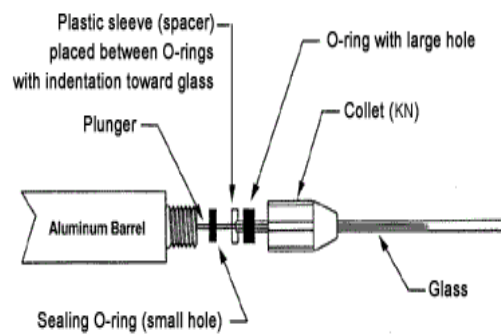
Η έγχυση των dsRNA στα έντομα έγινε πλευρικά στο μεσοθώρακα (στην περιοχή κάτω από το φτερό) με χρήση της συσκευής Nanoject II σύμφωνα με την εξής διαδικασία:

1. Συναρμολόγηση συσκευής (εικόνα 3.2)

2. Καθαρισμός των επιμέρους εξαρτημάτων με αιθανόλη 70%
3. Επιλογή γυάλινη βελόνα **quartz** η οποία κατασκευάζεται εκείνη τη στιγμή μέσω τομής με νυστέρι ώστε να είναι η ίδια για όλες τις ενέσεις σε όλα τα έντομα
4. Εισαγωγή **mineral oil** στη βελόνα προσεκτικά αποφεύγοντας τη δημιουργία φυσαλίδων
5. Τοποθέτηση βελόνας στη χειρολαβή
6. Εισαγωγή dsRNA στη βελόνα. Η ποσότητα που εισάγεται είναι στη βελόνα είναι 0,069 μλ.
7. Εστίαση του μεσοθώρακα του εντόμου στο μικροσκόπιο (**εικόνα 3.3**)
8. Έγχυση dsRNA απευθείας στην αιμόλεμφο σε αναισθητοποιημένα έντομα



Εικόνα 3.3: Συσκευή Nanoject II



Εικόνα 3.2: Συναρμολόγηση συσκευής από τα επιμέρους εξαρτήματα

6. Απομόνωση ιστών

Η απομόνωση των κεραιών και των κεφαλιών από τα έντομα πραγματοποιήθηκε με νυστέρι και μικρό μυτερό ψαλίδι. Τα αναισθητοποιημένα έντομα ακινητοποιήθηκαν σε ύπτια στάση σε σταγόνα νερού πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Οι απομονωμένοι ιστοί μεταφέρθηκαν σε διάλυμα TRI reagent (MRC).

7. Απομόνωση RNA

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την απομόνωση RNA από τους ιστούς του κεφαλιού και της κεραίας που τοποθετούνται σε διάλυμα TRI reagent (MRC) αμέσως μετά τις τομές, ούτως ώστε να είναι δυνατή εν συνεχεία η σύνθεση του cDNA.

Το πρωτόκολλο συνίσταται από τα εξής στάδια:

1. Αφαίρεση του υπάρχοντος TRI reagent
2. Τοποθέτηση του δείγματος σε υγρό άζωτο και ομογενοποίηση μέσω λιοτρίβισης του ιστού με έμβολο (οι ιστοί είναι πλούσιοι σε χυτίνη συνεπώς το υγρό άζωτο συμβάλλει στη μετατροπή του ιστού σε «σκόνη»)
3. Επαναδιάλυση σε 100μl TRI reagent

4. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5'.
5. Vortex και επώαση σε RT για ακόμα 5'
6. Φυγοκέντρωση για 10' στους 4°C σε 12000 rpm
7. Μεταφορά του υπερκλειμένου σε καινούργιο tube (ένα tube για κάθε δείγμα)
8. Προσθήκη 100μl **BCP** και 0,5 μl **γλυκογόνου** σε κάθε tube
9. Επώαση σε RT για 2-3 λεπτά
10. Φυγοκέντρωση για 18' στους 4°C σε 12000 rpm
11. Μεταφορά υδατικής φάσης σε νέο tube (1,5 ml) και προσθήκη **ίσου όγκου ισοπροπανόλης**
12. Επώαση σε πάγο για μία ώρα
13. Φυγοκέντρωση για 30' στους 4°C σε 12000 rpm
14. Αφαίρεση υπερκλειμένου και προσθήκη **παγωμένης αιθανόλης 75%**
15. Φυγοκέντρωση για 5' στους 4°C σε 75000 rcf
16. Αφαίρεση αιθανόλης και πλύση ιζήματος με παγωμένη αιθανόλη 75%
17. Φυγοκέντρωση για 5' στους 4°C σε 75000 rcf
(το 16° και το 17° στάδιο επαναλαμβάνονται 3 φορές)
18. Αφαίρεση του τελευταίου υπερκλειμένου και στέγνωμα του ιζήματος σε στείρες συνθήκες
19. Αναδιαλυση ιζήματος σε 8μl νερό

8. Κατεργασία με DNase

Τα δείγματα είναι τοποθετημένα σε PCR tubes (ένα σε κάθε tube). Εν συνεχεία για το κάθε δείγμα κατασκευάζεται η αντίδραση με τον τελικό όγκο να είναι 10μl:

Πίνακας 3.4: Πρωτόκολλο επεξεργασίας με DNase

Αντιδραστήριο	(μl)
RNA	8μl
Buffer	1μl
DNase	0,2μl
H₂O	0,8μl
Τελικός Όγκος	10μl

Έπειτα η κάθε αντίδραση επωάζεται στο θερμοκυκλοποιητή στους 37°C για 25 λεπτά. Μετά το πέρας των 25 λεπτών προστίθεται 1μl **inactivation buffer** για να απενεργοποιηθεί DNase και η κάθε αντίδραση επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5'. Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρωση των δειγμάτων στα 11000g για 2 λεπτά και τέλος το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο PCR tube.

9. Σύνθεση cDNA

Πρόκειται για το τελικό πρωτόκολλο πριν την ποσοτική ανάλυση με Real-Time PCR. Σύμφωνα με αυτό η αντίδραση για τη μετατροπή κάθε δείγματος σε cDNA είναι η εξής με τελικό όγκο 15μl:

Πίνακας 3.5: Πρωτόκολλο σύνθεσης cDNA

Αντιδραστήριο	(μl)
RNA	8μl
Random Primers (300ng/μl) ²	1μl
dNTPs (40 mM)	0,75μl
Buffer (10x)	1,5 μl
Inhibitor (40 units/μl)	0,8μl
RT (40 units/μl)	0,8μl
H ₂ O	1,15μl
Τελικός Όγκος	15μl

1. Αρχικά προστίθενται οι Random Primers και το κάθε δείγμα επωάζεται για 10' στους 70°C.
2. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 5'.
3. Έπειτα προστίθενται σε κάθε δείγμα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια (dNTPs, Buffer, Inhibitor, RT, H₂O)
4. Εν συνεχεία τα δείγματα επωάζονται στο θερμοκυκλοποιητή για 1 ώρα στους 42°C

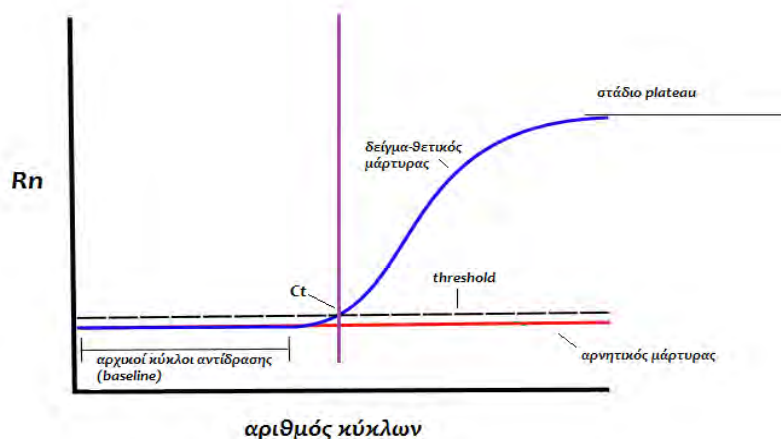
10. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου είναι μια ποσοτική μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της ποσότητας των μορίων-στόχων που περιέχει ένα δείγμα. Σε γενικές γραμμές όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μορίων-στόχων στο αρχικό δείγμα, τόσο περισσότερα πολλαπλασιασμένα μόρια θα υπάρχουν σε κάθε βήμα της αντίδρασης. Πέρα από τη μέτρηση της ποσότητας, ένα ακόμα πλεονέκτημα της μεθόδου, είναι και η παρακολούθηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού του μορίου στόχου κατά τη διάρκεια της αντίδρασης.

Σε αρχική φάση το προϊόν δεν είναι ακόμα ανιχνεύσιμο λόγω του ότι βρίσκεται σε μικρή ποσότητα. Ακολουθεί μια εκθετική φάση κατά την οποία η ποσότητα του προϊόντος σχεδόν διπλασιάζεται σε κάθε βήμα. Αν υπάρχουν περισσότερα μόρια-στόχοι στην αρχή, θα χρειαστούν λιγότεροι κύκλοι για να αρχίσει η εκθετική φάση. **Η σύγκριση του αριθμού των κύκλων που απαιτούνται για την έναρξη της εκθετικής φάσης σε διαφορετικές αντιδράσεις, δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού της αρχικής ποσότητας των μορίων που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις.** Η δυνατότητα αυτή οφείλεται στη δράση του SYBR Green, μιας φθορίζουσας χρωστικής, η οποία ενσωματώνεται στα δίκλινα μόρια που συντίθενται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης στο διάλυμα παράγοντας φθορισμό. Η ένταση του SYBR Green είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος.

²Οι παρενθέσεις αντιστοιχούν σε τελικό όγκο 20μl

Η μέτρηση της ποσότητας του αρχικού δείγματος υπολογίζεται μέσω της τιμής C_q (ή C_t), η οποία αποτελεί τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για να ξεπεράσει το προϊόν το όριο ανίχνευσης φθορισμού (threshold). Η τιμή αυτή είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του μορίου-στόχου. Ωστόσο, το SYBR Green μπορεί να συνδέεται σε οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο, εκτός του μορίου-στόχου. Αυτό σημαίνει ότι μπορεί να ενσωματωθεί και σε διμερή των εκκινητών ή ενισχυμένα μη-ειδικά προϊόντα της αντίδρασης οδηγώντας στην αύξηση του τελικού φθορισμού.



Εικόνα 3.4: Καμπύλη ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου. Η ένταση φθορισμού (R_n) σε συνάρτηση με τον αριθμό κύκλων

Το μέγεθος του προϊόντος της αντίδρασης της Real-Time PCR, τέλος, πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 80-120bp για να εξασφαλιστεί η ειδικότητα και η υψηλή απόδοση της ενίσχυσης. Η ειδικότητα της ενίσχυσης μπορεί να διαπιστωθεί μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης μέσω της καμπύλης αποδιάταξης (melting curve analysis). Με την ανάλυση αυτή προσδιορίζεται η θερμοκρασία τήξης (T_m) των προϊόντων της αντίδρασης. Έτσι διαπιστώνεται τελικά ο τυχόν σχηματισμός διμερών των εκκινητών ή μη ειδικών προϊόντων, που όντας μικρότερα σε μέγεθος παρουσιάζουν χαμηλότερη θερμοκρασία τήξης.

Βασικά συστατικά μιας αντίδρασης qRT-PCR είναι:

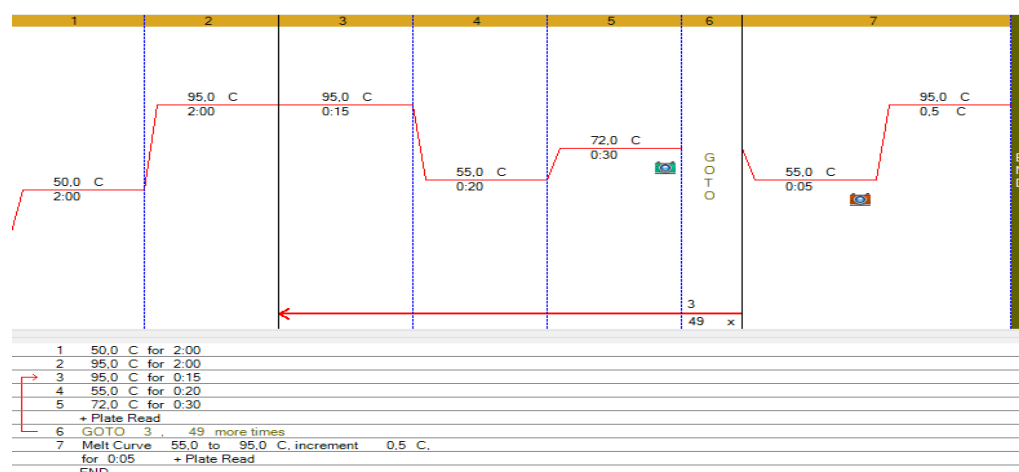
- **DNA**
- **Εκκινητές (primers) Forward και Reverse**
- **iTaq Universal SYBR Green Supermix (hot-start iTaq DNA polymerase, dNTPs,**
- **MgCl₂, SYBR® Green I dye)**

Στο συγκεκριμένο πείραμα, η qRT-PCR πραγματοποιήθηκε στις ποσότητες (μL) που αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3.6: Αντίδραση qRT-PCR για ένα δείγμα του συγκεκριμένου πειράματος

Αντιδραστήρια	(μL)
SYBR Green Supermix	7,5 μl
Primer F	0,45 μl
Primer R	0,45 μl
Template	5 μl
H ₂ O	1,6 μl
Τελικός όγκος	15μl

Επιπλέον η ανάλυση έκφρασης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις εξής συνθήκες:



Εικόνα 3.5: Συνθήκες πραγματοποίησης των αναλύσεων για όλα τα δείγματα. Απεικονίζονται τα στάδια της qRT-PCR με τις αντίστοιχες θερμοκρασίες καθώς και ο αριθμός των επαναλήψεων της ενίσχυσης.

11. Ανάλυση έκφρασης

Η σύγκριση των επιπέδων mRNA σε διαφορετικά δείγματα μέσω qRT-PCR, απαιτεί την **κανονικοποίηση των τιμών έκφρασής τους**. Η διαδικασία της κανονικοποίησης πραγματοποιείται μέσω της ενίσχυσης ενός γονιδίου σταθερής έκφρασης σε όλους τους ιστούς (housekeeping gene), που θα λειτουργήσει ως γονίδιο αναφοράς. Η ενίσχυση του γονιδίου αναφοράς έχει τη δυνατότητα να αντισταθμίσει πειραματικά σφάλματα (τεχνικός χειρισμός δειγμάτων, διαφορετική απόδοση σε αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής, αντίδραση PCR. Η κανονικοποιημένη ποσότητα της αλληλουχίας στόχου προσδιορίζεται ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς (σχετική έκφραση). Η σχετική ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται με τη μέθοδο σύγκρισης των Ct ($\Delta\Delta Ct$) σύμφωνα με τον τύπο (Livak et al, 2001):

$$R = 2^{-[\Delta Ct \text{ δείγματος} - \Delta Ct \text{ γονιδίου αναφοράς}]}$$

$$R = 2^{-[\Delta\Delta Ct]}$$

Τέλος, η ανάλυση όλων των δειγμάτων της Real-Time PCR, πραγματοποιήθηκε με χρήση του προγράμματος **CFX Manager Software (Bio-Rad CFX96)**.

Εργαστηριακός πληθυσμός εντόμων

Ο πληθυσμός του δάκου, *Bactrocera oleae*, που χρησιμοποιήθηκε ανήκει στο εργαστηριακό στέλεχος «Δημόκριτος» και διατηρείται υπό ελεγχόμενες συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας (24°C) και υγρασίας (~ 40%) με φωτοπερίοδο 12h, στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής (Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας).

Έλεγχος ωοτοκίας

Για τον έλεγχο φαινοτύπου η πειραματική διαδικασία είναι η ακόλουθη:

Συζευγμένα θηλυκά άτομα απομονώνονται αμέσως μετά από τη σύζευξη, σε ατομικά κλουβιά που φέρουν έναν ειδικά κερωμένο κώνο στη μέση για ωοαπόθεση (εικόνα 2.7). Θεωρώντας την επομένη της σύζευξης των εντόμων ως **μέρα μηδέν**, συλλέγονται τα αυγά από κάθε θηλυκό έντομο σε καθημερινή βάση ξεπλένοντας τον κερωμένο κώνο με απιονισμένο νερό.



Εικόνα 3.7: Ατομικά κλουβιά απομόνωσης συζευγμένων θηλυκών

Τα αυγά που συλλέγονται, καταμετρούνται και τοποθετούνται για δύο μέρες σε τριβλίο με διηθητικό χαρτί Whatman εμποτισμένο με προπιονικό οξύ το οποίο έχει αντιμικροβιακή δράση. Μετά το πέρας των δύο ημερών τα αυγά μεταφέρονται σε ειδική τροφή προνυμφών για να εκκολαφθούν.

4. Αποτελέσματα

Αποτελέσματα

Παροδική σίγηση γονιδίων Orco και SNMP1

Αρχικό στάδιο της πειραματικής διαδικασίας ήταν η δημιουργία των dsRNA που επρόκειτο να εισαχθούν στα έντομα. Βάσει των αλληλουχιών των μεταγράφων του ORCO και του SNMP1 (παράρτημα 3) σχεδιάστηκαν και αντίστοιχες αλληλουχίες των προϊόντων ενίσχυσης που χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για τη παραγωγή δίκλωνων RNA (παράρτημα 5). Οι αλληλουχίες αυτές μετατράπηκαν μέσω *in vitro* μεταγραφής σε δίκλιωνα μόρια. Πέραν των dsOrco και dsSNMP1 παράχθηκε και dsGFP ώστε να ενεθεί σε έντομα που θα αποτελούσαν τον πληθυσμό ελέγχου. Το GFP είναι ένα γονίδιο το οποίο δεν υπάρχει στον οργανισμό του δάκου. Η έγχυση dsGFP συνεπώς δεν μπορεί να έχει καμία επίδραση στο γονίδιο καθώς δεν υπάρχουν τα αντίστοιχα μετάγραφα- στόχοι. Μπορεί με αυτόν τον τρόπο να αποτελεί χειρισμό ελέγχου κατά την αξιολόγηση της έκφρασης των προς ανάλυση γονιδίων κατά τη διαδικασία αποσιώπησης, εφόσον δεν θα παρουσιάζεται καμία μεταβολή στην έκφρασή τους.

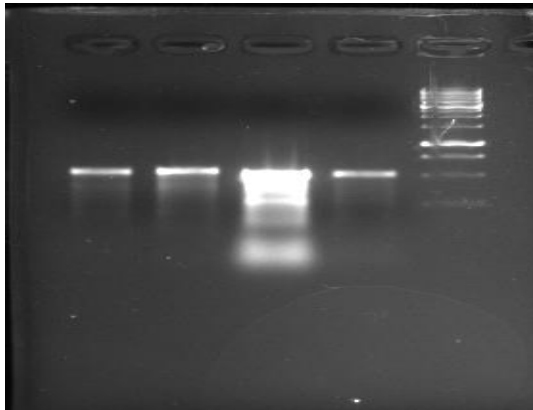
Τα dsRNA που δημιουργήθηκαν ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης και ανακτήθηκαν από το πήκτωμα.

Τα ανακτημένα dsRNA ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωσή τους και βάσει της σχετικής τους αναλογίας να είναι δυνατή η πραγματοποίηση ισομοριακών εγχύσεων.

Τα δίκλιωνα μόρια ακολούθως εγχύθηκαν στα έντομα μέσω μικροενέσεων σε πληθυσμούς εντόμων που διαχωρίστηκαν ως εξής σε μια διαδικασία που συνίσταται από τα εξής στάδια:

- I. Αρχικά, διαχωρίσαμε τους δάκους σε αρσενικούς και θηλυκούς αμέσως μετά την έκδυσή τους (μέρα μηδέν) και τους τοποθετήσαμε σε ξεχωριστά κλουβιά βάσει φύλου. Αμέσως μετά την έκδυση μέχρι και την 7^η μέρα τα έντομα θεωρούνται ακόμα σεξουαλικά ανώριμα. **Μετά την 7^η μέρα της ανάπτυξής τους και αρσενικά και θηλυκά έντομα, ωριμάζουν και μπορούν να ξεκινήσουν να αναπαράγονται. Τα θηλυκά μπορούν να συζευχθούν μόνο μία φορά στη ζωή τους, ενώ τα αρσενικά απεριόριστες.**
- II. Την 7^η μέρα, πραγματοποιήθηκαν οι μικροενέσεις μέσω των οποίων τα dsRNA's (εικόνα 4.2) εγχύθηκαν στα διαχωρισμένα έντομα. Πιο αναλυτικά πραγματοποιήθηκε:
 - ο Έγχυση με **dsOrco** ώστε να γίνει αποσιώπηση του γονιδίου και να εξεταστεί η έκφραση του
 - ο Έγχυση **dsOrco** και **dsSNMP1** ώστε να γίνει ταυτόχρονη αποσιώπηση των δύο γονιδίων και να γίνει έλεγχος της έκφρασής τους τόσο ως προς την έκφρασή τους στα έντομα ελέγχου, όσο και ως το ένα σε σχέση με το άλλο.

- Για κάθε διαφορετική ομάδα εντόμων που ενέθηκαν με το dsRNA για το γονίδιο-στόχο, ενέθηκαν παράλληλα και έντομα αποκλειστικά με **dsGFP** (καμία επίδραση στο γονίδιο της GFP) ώστε να υπάρχουν άτομα ως αρνητικοί μάρτυρες για τον έλεγχο της επιτυχίας της σίγησης του επιθυμητού γονιδίου.



Εικόνα 4.2: Ηλεκτροφόρηση των dsRNAs των γονιδίων-στόχων. Στις ζώνες αντιστοιχούν από αριστερά προς τα δεξιά τα: *dsORCO*, *dsSNMP1*, *dsGFP* (1:10), *dsGFP* (1:100) και *ladder* (DNA Ladder 1000 bp, GeneOn)

Κάθε έγχυση μπορούσε να εισάγει 69nl dsRNA στον οργανισμό του εντόμου. Ωστόσο, για να είναι σίγουρη η εισαγωγή του dsRNA στον οργανισμό του εντόμου οι εγχύσεις ήταν διπλές (2 pulses), διοχετεύοντας με αυτόν τον τρόπο, στο έντομο 138nl dsRNA.

Μέσω αυτής της διαδικασίας λοιπόν μικροενέσεις έγιναν συνολικά σε:

- 90 δάκους με *dsOrco* (40 θηλυκά και 50 αρσενικά)
- 72 δάκους με *dsOrco+dsSNMP1* παράλληλα (34 θηλυκά και 38 αρσενικά)
- 87 δάκους με *dsGFP* (41 θηλυκά και 46 αρσενικά)

Η αξιολόγηση της σίγησης των υπό εξέταση γονιδίων πραγματοποιήθηκε στους ιστούς ενδιαφέροντος που απομονώθηκαν από τους παραπάνω πληθυσμούς τρεις μέρες μετά την έγχυση των dsRNA's (10^η μέρα ανάπτυξης). Το ποσοστό θνησιμότητας μετά τις ενέσεις αναφέρεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 4.1: Ποσοστό θνησιμότητας δάκων μετά τις μικροενέσεις

	Θηλυκά	Αρσενικά
dsOrco	45%	36%
dsOrco+dsSNMP1	70%	47%
dsGFP	26%	47%

Κατά την απομόνωση των ιστών απομονώθηκαν οι κεραίες από αρσενικά και θηλυκά άτομα και δημιουργήθηκαν δύο pools, 1^ο και 2^ο βιολογικό δείγμα. Κάθε βιολογικό δείγμα θηλυκών αποτελούνταν από 4 άτομα ενώ κάθε βιολογικό δείγμα των αρσενικών από 5 άτομα. Οι ιστοί απομονώθηκαν και ακολούθησε μια σειρά αντιδράσεων ούτως ώστε να συντεθεί cDNA. Πιο συγκεκριμένα, από

τις κεραίες και τα κεφάλια απομονώθηκε RNA το οποίο κατεργάστηκε με DNase. Το προϊόν της αντίδρασης μετατράπηκε εν τέλει σε cDNA μέσω της αντίδρασης που περιγράφεται στον πίνακα 3.5.

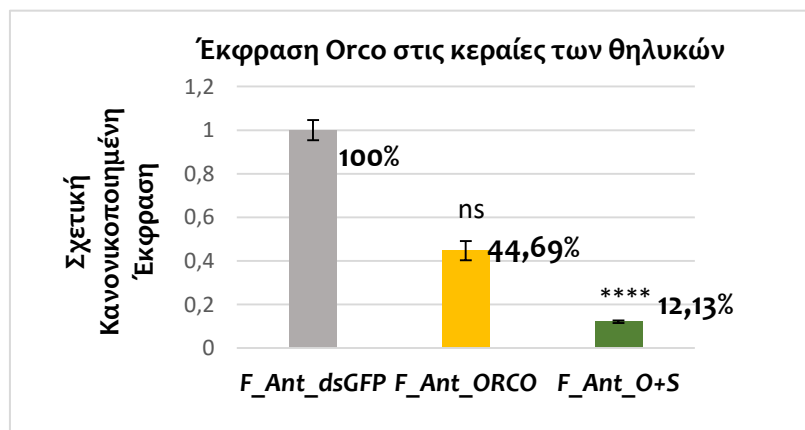
Μετά τη σύνθεση cDNA ήταν δυνατή η σχετική ποσοτικοποίηση των μεταγράφων των γονιδίων-στόχων μέσω qRT-pCR. Η κανονικοποίηση των τιμών έκφρασης των γονιδίων έγινε με τη χρήση του **RpL19** ως γονίδιο αναφοράς.

Για κάθε βιολογικό δείγμα πραγματοποιήθηκαν 3 τεχνικές επαναλήψεις, στις οποίες δεν παρατηρήθηκαν αποκλίσεις στις τιμές που καθορίστηκαν. Για να υπολογιστεί ο βαθμός σίγησης χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των τιμών των δυο βιολογικών δειγμάτων. Στις γραμμές σφάλματος στα γραφήματα, απεικονίζεται το τυπικό σφάλμα (standard error of the mean) των μετρήσεων των μέσων όρων των δύο βιολογικών δειγμάτων που εξετάστηκαν ανά περίπτωση.

Έλεγχος αποσιώπησης στις κεραίες

i. Αποσιώπηση Orco

Στα δείγματα των κεραίων των θηλυκών με έγχυση με dsOrco, παρατηρούμε ότι η έκφραση του γονιδίου Orco μειώνεται κατά 55,31% συγκριτικά με την έκφραση του σε έντομα ελέγχου (F_Ant_dsGFP). Στην περίπτωση που εγχύθηκαν ταυτόχρονα dsRNAs και των δύο γονιδίων, του Orco και του SNMP1, παρατηρούμε ότι η έκφραση του Orco μειώνεται ακόμα περισσότερο (κατά 87%) με ποσοστό έκφρασης 12,13% (Γράφημα 1).



Γράφημα 1: Έλεγχος έκφρασης Orco. Οι μετρήσεις έγιναν δείγματα από κεραίες θηλυκών δάκων στις εξής μεταχειρίσεις: μετά από έγχυση dsGFP (**F_Ant_dsGFP**), μετά την έγχυση μόνο dsORCO (**F_Ant_ORCO**), μετά τη διπλή έγχυση dsORCO και dsSNMP1 (**F_Ant_O+S**). Τα ποσοστά έκφρασης παρουσιάζονται ως προς το control δείγμα **F_Ant_dsGFP**. Οι γραμμές σφάλματος απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (standard error of the mean) των μετρήσεων των δύο βιολογικών δειγμάτων που εξετάστηκαν ανά περίπτωση. Η έκφραση του Orco στο δείγμα **F_Ant_ORCO** δεν είναι στατιστικά σημαντική ως προς το δείγμα **F_Ant_dsGFP**, με $p=0,15$. Η έκφραση του Orco στο δείγμα **F_Ant_O+S** είναι στατιστικά σημαντική ως προς το δείγμα **F_Ant_dsGFP**, με $p=0,000092$. Η στατιστική ανάλυση έγινε με χρήση της δοκιμασίας ANOVA σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

Κατά τις αντίστοιχες μεταχειρίσεις για τα αρσενικά άτομα, στα δείγματα των κεραίων παρατηρούμε ότι η έκφραση του γονιδίου Orco παρουσιάζει μείωση κατά 34% μετά τη διπλή έγχυση με dsOrco και dsSNMP1 (**M_Ant_O+S**). Ωστόσο

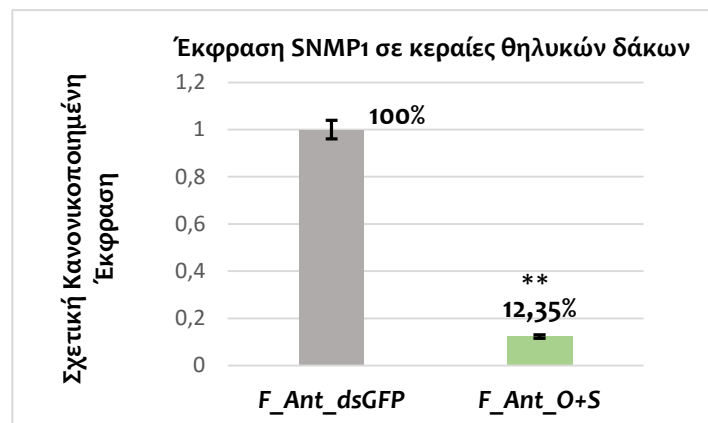
μετά από έγχυση με dsOrco, η έκφραση του Orco διαφοροποιείται ανάμεσα στα δύο βιολογικά δείγματα (**Γράφημα 2**). Συγκεκριμένα παρατηρούμε ότι η έκφραση του Orco μειώνεται στο 1^ο δείγμα (**M_Ant_ORCO_1**), ενώ παρουσιάζει υπερέκφραση στο 2^ο (**M_Ant_ORCO_2**).



Γράφημα 2: Έλεγχος έκφρασης Orco. Οι μετρήσεις έγιναν δείγματα από κεραίες αρσενικών δάκων στις εξής μεταχειρίσεις: μετά από έγχυση dsGFP (**M_Ant_dsGFP**), μετά την έγχυση μόνο dsORCO (**M_Ant_ORCO_1** και **M_Ant_ORCO_2** που αντιστοιχούν στα βιολογικά δείγματα 1 και 2), μετά τη διπλή έγχυση dsORCO και dsSNMP1 (**M_Ant_O+S**). Τα ποσοστά έκφρασης παρουσιάζονται ως προς το control δείγμα **M_Ant_dsGFP**. Οι γραμμές σφάλματος απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (standard error of the mean) των μετρήσεων των δύο βιολογικών δειγμάτων που εξετάστηκαν ανά περίπτωση. Η έκφραση του Orco στο δείγμα **M_Ant_O+S** είναι στατιστικά σημαντική ως προς το δείγμα **M_Ant_dsGFP** με $p=0,02$. Η έκφρασή του Orco στα δείγματα **M_Ant_ORCO_1** και **M_Ant_ORCO_2** δεν είναι στατιστική σημαντική ως προς το δείγμα **M_Ant_dsGFP**. Η στατιστική ανάλυση έγινε με χρήση των δοκιμασιών ANOVA σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

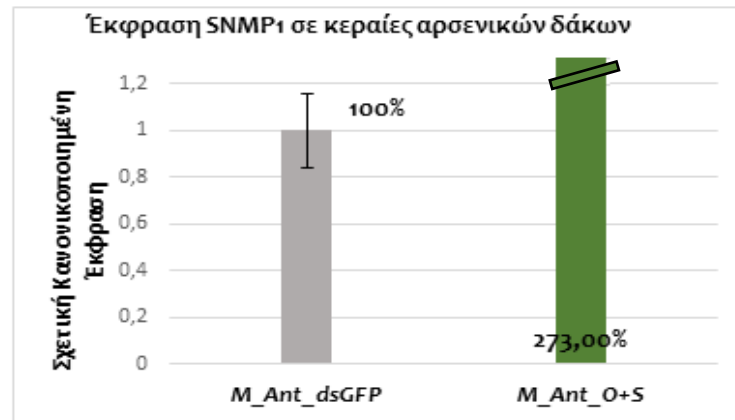
ii. Αποσιώπηση SNMP1

Η έγχυση του dsSNMP1 είχε σαν αποτέλεσμα η έκφραση του SNMP1 να μειώνεται σε δείγματα από κεραίες θηλυκών εντόμων (**Γράφημα 3**), προκαλώντας σίγηση σε ποσοστό **88%**.



Γράφημα 3: Έλεγχος έκφρασης SNMP1. Οι μετρήσεις έγιναν δείγματα από κεραίες θηλυκών δάκων στις εξής μεταχειρίσεις: μετά από έγχυση dsGFP (**F_Ant_dsGFP**), μετά τη διπλή έγχυση dsOrco και dsSNMP1 (**F_Ant_O+S**). Τα ποσοστά έκφρασης παρουσιάζονται ως προς το control δείγμα **F_Ant_dsGFP**. Οι γραμμές σφάλματος απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (standard error of the mean) των μετρήσεων των δύο βιολογικών δειγμάτων που εξετάστηκαν ανά περίπτωση. Η έκφραση του SNMP1 στο δείγμα **F_Ant_O+S** ως προς το δείγμα **F_Ant_dsGFP** είναι στατιστικά σημαντική με $p= 0,0017$. Η στατιστική ανάλυση έγινε με χρήση της δοκιμασίας ANOVA σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

Αντίθετα, σε αντίστοιχα δείγματα από κεραίες αρσενικών δάκων παρατηρούμε ότι το SNMP1 υπερεκφράζεται σε μεγάλο βαθμό (Γράφημα 4).

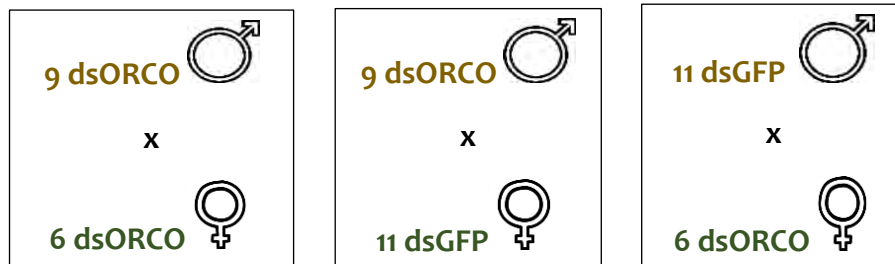


Γράφημα 4: Έλεγχος έκφρασης SNMP1. Οι μετρήσεις έγιναν δείγματα από κεραίες αρσενικών δάκων στις εξής μεταχειρίσεις: μετά από έγχυση dsGFP (M_Ant_dsGFP), μετά τη διπλή έγχυση dsOrco και dsSNMP1 (M_Ant_O+S). Τα ποσοστά έκφρασης παρουσιάζονται ως προς το control δείγμα M_Ant_dsGFP. Οι γραμμές σφάλματος απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα (standard error of the mean) των μετρήσεων των δύο βιολογικών δειγμάτων που εξετάστηκαν ανά περίπτωση. Η διαφορική έκφραση του SNMP1 ανάμεσα στα δείγματα M_Ant_dsGFP και M_Ant_O+S δεν είναι στατιστικά σημαντική με $p = 0,16$. Η στατιστική ανάλυση έγινε με χρήση της δοκιμασίας ANOVA σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

Έλεγχος σύζευξης

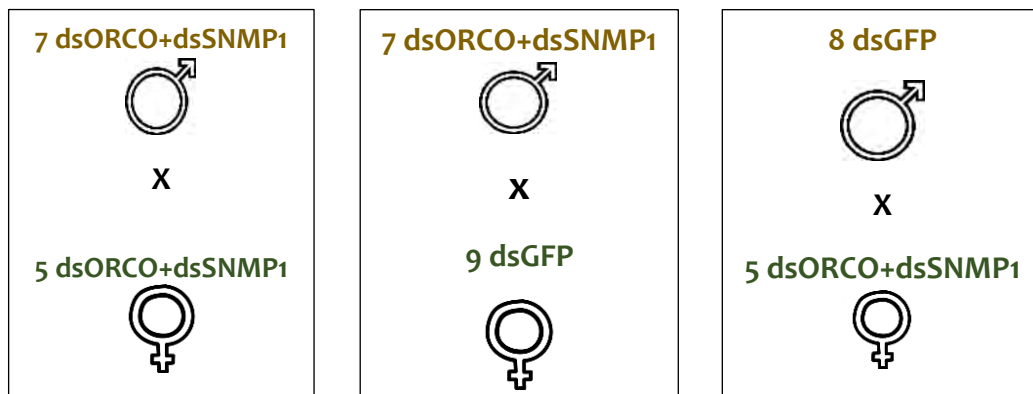
Δεδομένου του ρόλου των γονιδίων *OrcO* και *SNMP1* στη σεξουαλική συμπεριφορά όπως έχει προσδιοριστεί σε άλλα έντομα, προχωρήσαμε σε συζεύξεις μεταξύ αρσενικών και θηλυκών δάκων στα οποία είχαν εγχυθεί dsRNAs. Σκοπός ήταν να αποκτήσουμε μια εικόνα για την επίδραση του RNAi μηχανισμού στα δύο γονίδια κατά την επιλογή συντρόφου και το ζευγάρωμα. Οι συζεύξεις πραγματοποιήθηκαν με τους ακόλουθους συνδυασμούς ανά περίπτωση σίγησης.

- **Σίγηση *OrcO*. Σε τρία διαφορετικά κλουβιά διασταυρώσαμε:**



Από τις διασταυρώσεις αυτές προέκυψαν συνολικά 3 συζεύξεις: δύο στο 1^ο κλουβί και μία στο 3^ο. Στην τελευταία περίπτωση (3^ο κλουβί) πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον 5 απόπειρες ζευγαρώματος, χωρίς όμως να καταλήξουν σε επιτυχείς συζεύξεις.

- **Ταυτόχρονη σίγηση *OrcO* και *SNMP1*. Σε τρία διαφορετικά κλουβιά διασταυρώσαμε:**



Από τις διασταυρώσεις αυτές προέκυψαν συνολικά 3 συζεύξεις, μία σε κάθε κλουβί.

Συνολικά τα ποσοστά επιτυχίας σύζευξης στις αντίστοιχες διασταυρώσεις περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Θηλυκό*Αρσενικό	Επιτυχία σύζευξης (%)
dsOrco* dsOrco	33%
ds GFP* dsOrco	0%
dsOrco* ds GFP	16%
dsOrco+dsSNMP1* dsOrco+dsSNMP1	20%
dsGFP* dsOrco+dsSNMP1	14%
dsOrco+dsSNMP1*dsGFP*	20%

Έλεγχος ωοτοκίας

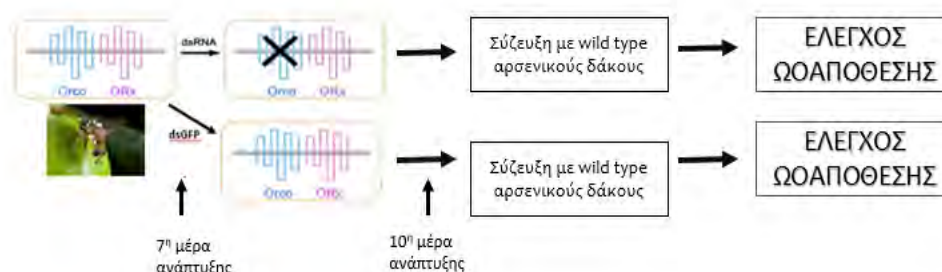
Κατά την ανάλυση έκφρασης του Orco μετά την έγχυση dsOrco παρατηρήθηκε μείωση των μεταγράφων του στις περισσότερες περιπτώσεις. Για να ελέγξουμε την επίδραση της αποσίωπησης του γονιδίου στην ωοαπόθεση των συζευγμένων θηλυκών ατόμων, ακολουθήσαμε την εξής διαδικασία:

Αρχικά, 15 θηλυκοί δάκοι διαχωρίστηκαν αμέσως μετά την έκδυσή τους (μέρα μηδέν) και τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστό κλουβί. Από την ημέρα μηδέν έως και την 7^η μέρα θεωρούνται σεξουαλικά ανώριμες. Από την 7^η ημέρα και μετά, ωριμάζουν και είναι έτοιμοι να συζευχθούν.

Έτσι, την 7^η μέρα πραγματοποιήσαμε μικροενέσεις στις 15 αυτές θηλυκές εγχύοντας dsOrco στις 10 και dsGFP στις 5. Ας σημειωθεί ξανά πως οι θηλυκές που ενέθηκαν με dsGFP αποτέλεσαν τα έντομα ελέγχου.

Τρεις ημέρες μετά (10^η μέρα ανάπτυξης), διάστημα κατά το οποίο τα επίπεδα έκφρασης του Orco μειώνονται σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, προχωρήσαμε στην πραγματοποίηση των συζεύξεων με αρσενικά αγρίου τύπου (δεν είχαν ενεθεί με dsRNA).

Σε δύο διαφορετικά κλουβιά μέσα στα οποία υπήρχαν αρσενικοί δάκοι αγρίου τύπου απελευθερώσαμε τις ενεμένες θηλυκές. Στο ένα κλουβί απελευθερώθηκαν τα 9 θηλυκά στα οποία είχε εγχυθεί dsOrco (απώλεια ενός εντόμου) και στο άλλο τα 5 θηλυκά στα οποία είχε εγχυθεί dsGFP με στόχο να πραγματοποιήσουν σύζευξη (mating).



Εικόνα 4.3: Διαδικασία πειράματος για τον έλεγχο φαινοτύπου

Κατά τη διαδικασία αυτή, όπως απεικονίζεται στην **εικόνα 4.3**, από τους πληθυσμούς των θηλυκών, εν τέλει, σύζευξη πραγματοποίησαν **6/9** θηλυκές-dsORCO και **4/5** θηλυκές-dsGFP. Τα ζευγάρια αυτά απομονώθηκαν και καταγράφηκε η διάρκεια πλήρους σύζευξης η οποία κατά μέσο όρο (για όλα τα ζευγάρια) διήρκεσε 2 ώρες.

Εν συνεχεία, απομονώσαμε το κάθε θηλυκό έντομο σε ένα ατομικό κλουβί μικρότερο με έναν ειδικό κερωμένο κώνο στη μέση για ωοαπόθεση (**εικόνα 4.4**) ούτως ώστε να είναι εφικτή η καταμέτρηση των αυγών που εναποθέτει κάθε θηλυκιά καθημερινά. Μετά από επώαση σε αντιμικροβιακό περιβάλλον παρουσία προπιονικού οξέος, τα αυγά μεταφέρθηκαν σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη των προνυμφών και των νυμφών (βομβύκια), έως ότου να μεταμορφωθούν σε ακμαία έντομα.



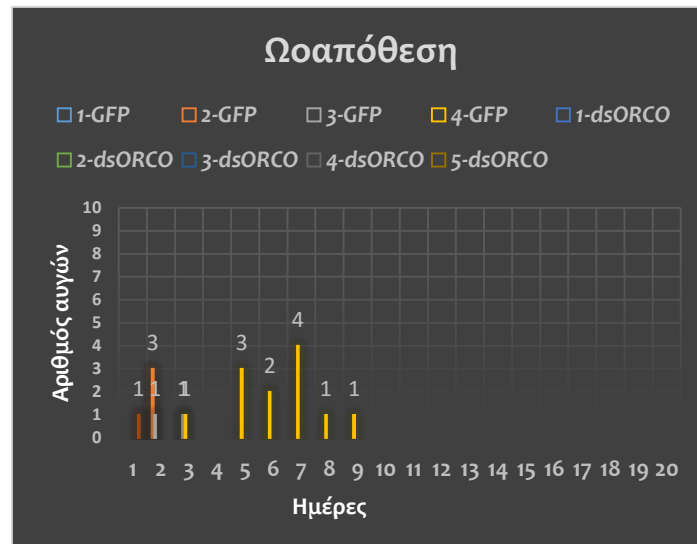
Εικόνα 4.4: κλουβιά απομόνωσης θηλυκών-dsOrco

Από τη διαδικασία αυτή, θεωρώντας την πρώτη μέρα μετά τις συζεύξεις ως μέρα μηδέν, καταγράφηκε ο αριθμός των αυγών κάθε θηλυκού δάκου για 20 συνεχόμενες μέρες. Στο παρακάτω γράφημα απεικονίζονται τα δεδομένα που συλλέχθηκαν στο παραπάνω διάστημα.

Πίνακας 4.1: συνολικός αριθμός αυγών για κάθε θηλυκό

Θηλυκό έντομο	Αριθμός αυγών	Ημέρα θανάτου	Εκκόλαψη
dsGFP-1	0	4 ^η	-
dsGFP-2	3	5 ^η	100%
dsGFP-3	2	14 ^η	100%
dsGFP-4	12	18 ^η	100%
dsOrco-1	0	4 ^η	-
dsOrco-2	0	15 ^η	-
dsOrco-3	0	6 ^η	-
dsOrco-5	0	3 ^η	-
dsOrco-6	0	12 ^η	-

Από τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει ότι από τις θηλυκές στις οποίες είχε εγχυθεί dsOrco δεν συλλέχθηκε κανένα αυγό. Συνεπώς η σίγηση του Orco ήταν επιτυχής και η επίδραση στην ωοτοκία των θηλυκών είχε σαν αποτέλεσμα τη μη αναγνώριση του κερωμένου κώνου για ωοαπόθεση. Επιπλέον τα αυγά που συλλέχθηκαν από τα δείγματα GFP (**dsGFP-2, dsGFP-3, dsGFP-4**) μεταμορφώθηκαν όλα σε νύμφες έχοντας **100%** ποσοστό εκκόλαψης.



Γράφημα 5: Καταμέτρηση αυγών σε διάστημα είκοσι ημερών

5. Συζήτηση

Συζήτηση

Οι συμβατικές μέθοδοι για την καταπολέμηση του δάκου της ελιάς βασίζονται κυρίως στη χρήση χημικών εντομοκτόνων, όπως είναι τα πυρεθροειδή και τα οργανοφωσφορικά αλλά παρουσιάζουν ωστόσο αρκετά μειονεκτήματα. Αφενός συμβάλλουν στην περιβαλλοντική ρύπανση, απειλώντας ταυτόχρονα και τη δημόσια υγεία. Αφετέρου, η αλόγιστη χρήση τους οδηγεί σε ανθεκτικότητα των πληθυσμών του δάκου σε αυτά καθιστώντας τα αναποτελεσματικά. Εναλλακτικές πρακτικές για την καταπολέμηση, όπως είναι τα συστήματα παγίδευσης δεν είναι εξειδικευμένες. Αντιθέτως, κατά την εφαρμογή τους εξοντώνονται και άλλα έντομα πλην του δάκου από τα οποία κάποια είναι και ωφέλιμα, διαταράσσοντας το οικοσύστημα της ελιάς. Η ανάγκη για την ανάπτυξη εξειδικευμένων ως προς το δάκο της ελιάς μεθόδων καταπολέμησης οδηγεί χωρίς αμφιβολία στη μελέτη βιολογικών συστημάτων που σχετίζονται με την επιβλαβή του δράση μέσω μοριακών προσεγγίσεων. Στο πλαίσιο αυτό, η ανάλυση του οσφρητικού συστήματος επομένως θα καταδείξει τους επιμέρους μοριακούς στόχους που καθορίζουν ειδοειδικά χαρακτηριστικά σχετικά με την αναπαραγωγική/σεξουαλική του συμπεριφορά.

Ο καίριος ρόλος του οσφρητικού συστήματος στην εκδήλωση της καταστροφικής δράσης των εντόμων προκύπτει από την ικανότητά τους να αναγνωρίζουν μέσω της αίσθησης της όσφρησης την περιοχή του ξενιστή πάνω στην οποία αφήνουν τα αυγά τους και αναπαράγονται. Η όσφρηση επίσης εμπλέκεται στην προσυζευκτική επικοινωνία μεταξύ των εντόμων κατά την οποία πραγματοποιείται η επιλογή συντρόφου και καθορίζει την αποτελεσματικότητα της σύζευξης. Έχει προσδιοριστεί πως η προσέλκυση του αντίθετου φύλλου πραγματοποιείται μέσω έκκρισης φερομονών οι οποίες αναγνωρίζονται και προσλαμβάνονται από ειδικούς οσφρητικούς υποδοχείς.

Η μελέτη και η στοχευμένη ανάλυση του συνόλου των αισθητήριων οσφρητικών υποδοχέων που ενεργοποιούνται από τις οσμές θα ήταν η ιδανική ώστε εξακριβωθεί η μοριακή βάση της αναγνώρισης κάθε οσμής. Ωστόσο η ανακάλυψη των οσφρητικών μορίων, όπως ο συνυποδοχέας ORCO, που υποχρεωτικά συνεκφράζονται με κάθε είδους οσφρητικό υποδοχέα έδωσε νέες προοπτικές στην έρευνα του συγκεκριμένου πεδίου. Η δημιουργία του συμπλόκου OR/ORCO για τη διέγερση του κάθε οσφρητικού νευρώνα, καθιστά την ενεργοποίηση του ORCO κομβικό σημείο για την αναγνώριση των οσμών και κρίσιμο μοριακό στόχο για την αποτροπή των αντίστοιχων οσφρητικών αποκρίσεων. Αρκετά πειράματα έχουν αναλύσει το ρόλο του μορίου αυτού σε διάφορα έντομα και τα αποτελέσματά τους επιβεβαιώνουν το καίριο ρόλο του Orco στην επιλογή περιοχής ξενιστή και στη προσυζευκτική επικοινωνία. Έχοντας, λοιπόν, ως υπόβαθρο τα διαθέσιμα στοιχεία για τη λειτουργία του γονιδίου Orco σε άλλα είδη, εστίασαμε στη διερεύνησή του και στο δάκο της ελιάς.

Επίσης, στη διαδικασία της πρόσληψης των φερομονών και στη μεταφορά του σήματος στον εγκέφαλο δεν συμμετέχουν μόνο οι οσφρητικοί υποδοχείς αλλά μια σειρά από πρωτεΐνες όπως είναι οι OBPs, οι PBPs, οι SNMPs. Μελέτες στη μύγα *D. melanogaster* έδειξαν πως η SNMP1 πρωτεΐνη εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του συμπλόκου OR/ORCO από τη σεξουαλική φερομόνη cVA που εκκρίνεται από τα αρσενικά έντομα. Λαμβάνοντας υπόψιν την παραπάνω λειτουργία και στοχεύοντας στην αναπαραγωγική συμπεριφορά του εντόμου που καθορίζει την παρασιτική του δράση, επιλέξαμε μαζί με το γονίδιο του συνυποδοχέα να πραγματοποιήσουμε λειτουργική ανάλυση και του γονιδίου SNMP1. Στόχος ήταν η αξιολόγηση της

επίδρασης της ταυτόχρονης παροδικής σίγησης των δύο γονιδίων στην επιλογή συντρόφου και την ωοτοκία.

Εν προκειμένω, πραγματοποιήσαμε αρχικά παροδική σίγηση της έκφρασης των δύο γονιδίων μέσω έγχυσης dsRNA στην αιμολέμφο και εν συνεχεία με στοχευμένες διασταυρώσεις μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ενεμένων ή μη εντόμων κατά περίπτωση ελέγξαμε το φαινότυπο που προέκυψε όσον αφορά στη διαδικασία της σύζευξης και της ωοαπόθεσης.

Σίγηση Orco

Η έγχυση των δίκλωνων RNAs σε αρσενικά και θηλυκά έντομα είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης του Orco στις κεραίες καθώς μετά από 72 ώρες υπολογίστηκε ότι το ποσοστό σίγησης του γονιδίου ήταν 55% για τα θηλυκά άτομα και 45% για τα αρσενικά στο συγκεκριμένο ιστό. Σε παρόμοια πειράματα η αποσιώπηση του γονιδίου Orco στις κεραίες θηλυκών και αρσενικών στο σκαθάρι *Dendroctonus armandi* (Zhang et al. 2016), έδειξε πως η έκφραση του άρχισε να μειώνεται μετά από 48 ώρες με τη μέγιστη σίγηση μετά από 72 ώρες σε ποσοστό 80%. Ωστόσο, το 2^ο βιολογικό δείγμα αρσενικών κεραίων παρουσίασε υπερέκφραση σε ποσοστό 417%. Το γεγονός αυτό, δείχνει ότι είτε τα dsRNA δεν κατόρθωσαν να δράσουν και να επάγουν την αποικοδόμηση των μεταγράφων, είτε ενεργοποίησαν ένα μηχανισμό θετικής ανατροφοδότησης με αποτέλεσμα την ακόμα μεγαλύτερη αύξηση των μεταγράφων.

Μελέτες σχετικές με την αποτελεσματικότητα της RNAi τεχνικής έχουν αποκαλύψει μία σειρά από παράγοντες που επηρεάζουν τη μεταφορά των dsRNA στον ιστό στόχο. Η αποδοτικότητα των dsRNA ποικίλει σε μεγάλο βαθμό στις διάφορες τάξεις εντόμων και εξαρτάται το **σχεδιασμό του dsRNA, την επιλογή περιοχής, το μήκος του και τη σταθερότητα του** όπως επίσης και με τους **παράγοντες επιμόλυνσης που επηρεάζουν τη διαδικασία εισαγωγής του στον οργανισμό του εντόμου**. Σε πολλά είδη απείθαρχων εντόμων το ποσοστό σίγησης του γονιδίου στόχου είναι γύρω στο 60% ή χαμηλότερα, ενώ η αποσιώπηση είναι συχνά προσωρινή (Huvenne and Smagghe, 2010; Li et al., 2013). Αντίθετα σε έντομα όπως τα Coleoptera, που είναι ευαίσθητα στην RNAi τεχνική, η σίγηση κυμαίνεται γύρω στο 90% ή υψηλότερα, απαιτεί μικρές δόσεις dsRNA και το αποτέλεσμα μπορεί να είναι μακρας διάρκειας ακόμα και κληρονομικό (Baum et al., 2007; Zhu et al., 2011; Bolognesi et al., 2012; Rangasamy and Siegfried, 2012). Οι διαφορές αυτές μαρτυρούν ότι η αποτελεσματικότητα της παροδικής αποσιώπησης γονιδίων μέσω RNAi εξαρτάται από διάφορους φραγμούς όπως **η μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων του μέσου εντέρου ή η παρουσία ιών στην αιμολέμφο**.

Στη συγκεκριμένη μεθοδολογία, η έγχυση των dsRNA πραγματοποιήθηκε στην αιμολέμφο των εντόμων. Ίσως ο RNAi μηχανισμός ήταν πιο αποδοτικός αν τα dsRNA εγχύνονταν απευθείας στον ιστό ενδιαφέροντος είτε μέσω μικροένεσης είτε μέσω εμποτισμού. Ήδη γίνονται προσπάθειες βελτίωσης της τεχνικής, ώστε να μειωθεί η επίδραση των διάφορων φραγμών στη μεταφορά των εξωγενών dsRNA εντός του εντόμου, μέσω της χρήσης βακτηρίων ή μελλοντικά με χρήση χημικά τροποποιημένων μορίων, πολυμερών νανοσωματιδίων, λιποσωμάτων, και να επιτευχθεί μια ισχυρή RNAi απόκριση (Joga, Mallikarjuna R. et al. 2016).

Σίγηση SNMP1

Το δεύτερο οσφρητικό γονίδιο που αναλύσαμε είναι το SNMP1 το οποίο εκφράζεται στην επιφάνεια των οσφρητικών νευρώνων επάγοντας την ενεργοποίηση του συνυποδοχέα Orco σε περίπτωση πρόσληψης μιας οσμής ή μιας φερομόνης. Λόγω της συμμετοχής του στην αναγνώριση σεξουαλικών φερομονών στη *D. melanogaster*, εγχύσαμε dsSNMP1 στην αιμολέμφο αρσενικών και θηλυκών δάκων και εξετάσαμε την επίδρασή τους στα μετάγραφα του γονιδίου στο οσφρητικό όργανο της κεραίας στο δάκο της ελιάς. Με αυτόν τον τρόπο, ήταν δυνατό να καθοριστούν τα επίπεδα σίγησης του γονιδίου και η αποτελεσματικότητα της μεθόδου, ώστε να ακολουθήσει ο έλεγχος του φαινοτύπου με τις στοχευμένες διασταυρώσεις.

Σε πρώτο στάδιο, παρατηρήσαμε ότι η έκφραση του **SNMP1** μειώνεται σε κεραίες θηλυκών δάκων με ποσοστό 88% (Γράφημα 3) και 37% αντίστοιχα (Γραφήμα 8). Αντίθετα στις κεραίες αρσενικών το SNMP1 φάνηκε να υπερεκφράζεται με ποσοστό 273% (Γράφημα 4). Στο δάκο, τα θηλυκά άτομα εκκρίνουν τη φερομόνη *olean* για να προσελκύσουν τα αρσενικά ενώ αντίστοιχα τα αρσενικά τη φερομόνη *muscalure* για να προσελκύσουν τα θηλυκά αναμέναμε σίγηση του SNMP1 και στις κεραίες και των δύο φύλλων. Η παρατηρούμενη υπερέκφραση του γονιδίου στα αρσενικά μπορεί να ήταν αποτέλεσμα μη επιτυχούς σίγησης, που ενδέχεται να οφείλεται σε παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω, όσον αφορά τη σωστή μεταφορά των dsRNA. Παρ' όλα αυτά, δεν αποκλείεται να οφείλεται σε κάποιο μηχανισμό θετικής ανατροφοδότησης. Εάν το SNMP1 εμπλέκεται στην αναγνώριση της θηλυκής σεξουαλικής φερομόνης από τα αρσενικά με μηχανισμό ανάλογο με της *D. melanogaster*, η υπερέκφραση του γονιδίου πιθανόν να υποδηλώνει ότι η αύξηση των επιπέδων της SNMP1 λειτουργεί αντισταθμιστικά για να εξασφαλίσει τη διαθεσιμότητα της πρωτεΐνης κατά την πρόσληψη της *olean*.

Μελέτες, σε έντομα *Heliothis virescens* έδειξαν ότι πρωτεΐνη SNMP1 συμμετέχει στην αναγνώριση σεξουαλικών φερομονών από τις κεραίες των θηλυκών. Περαιτέρω έρευνα έδειξε ότι τα κύτταρα που εκφράζουν SNMP1 είναι περισσότερα στα θηλυκά έντομα από ότι στα αρσενικά (Zielonka M. et al. 2016). Αν συμβαίνει κάτι ανάλογο και στο δάκο χρήζει περαιτέρω διερεύνησης όπως επίσης για το αν υπάρχει διαφοροποίηση στο ρόλο της πρωτεΐνης κατά την αναγνώριση σεξουαλικών φερομονών από αρσενικά και θηλυκά έντομα.

Κλείνοντας, ο έλεγχος της έκφρασης των οσφρητικών γονιδίων μπορεί να συνδυαστεί με την πραγματοποίηση ηλεκτροαντενογραφημάτων στα οποία θα καταγράφεται η απόκριση των νευρώνων σε κλιμακούμενες συγκεντρώσεις οσμών και φερομονών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεισφέρει επομένως στον άμεσο προσδιορισμό της επίδρασης της σίγησης του γονιδίου που εξετάζεται κάθε φορά στη διέγερση ή μη του νευρώνα. Με αυτόν τον τρόπο διευκολύνεται η κατανόηση της συμπεριφοράς των εντόμων μετά από έκθεση σε σεξουαλικές φερομόνες ή σε οσμές που εκλύονται από τον εν δυνάμει ξενιστή.

Έλεγχος σύζευξης

Ο χαρακτηρισμός μοριακών στόχων που εμπλέκονται στην αναπαραγωγική συμπεριφορά του δάκου, μπορεί να αποτελέσει τη βάση της ανάπτυξης νέων προσεγγίσεων ελέγχου του πληθυσμού. Δεδομένου του ρόλου των γονιδίων *Orc* και *SNMP1* στην αναγνώριση φερομονών στη *D. melanogaster* και έχοντας, ελέγξει την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας σίγησης των δύο γονιδίων σε θηλυκούς και αρσενικούς δάκους, προχωρήσαμε σε έλεγχο φαινοτύπου όσον αφορά στην προσέλκυση του εντόμου του αντίθετου φύλου και την επιλογή συντρόφου.

Πραγματοποιήθηκαν στοχευμένες διασταυρώσεις μεταξύ εντόμων τα οποία είχαν ενεθεί με i. *dsOrc* ή *dsGFP* και ii. *dsOrc* και *dsSNMP1* ή *dsGFP*. Σε όλες τις περιπτώσεις τα ποσοστά σύζευξης ήταν χαμηλά από 0-33%. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση ελέγχου της διασταύρωσης μεταξύ θηλυκών που ενέθηκαν με *dsGFP* και αρσενικών που ενέθηκαν με *dsOrc* στην οποία παρατηρήθηκε πλήρης αποτυχία σύζευξης. Στην περίπτωση αυτή φαίνεται πως τα επίπεδα σίγησης του *Orc* στα αρσενικά ήταν ικανοποιητικά ώστε να αποτρέψουν τη σύζευξη επιβεβαιώνοντας τη συμμετοχή του *Orc* στην προσυζευκτική επικοινωνία. Άλλωστε στην πρώτη φάση της επικοινωνίας αυτής, φάση προσέλκυσης, είναι απαραίτητη η αναγνώριση της *olea* από τα αρσενικά. Η έκκριση της *muscalure* από τα αρσενικά και η αναγνώρισή της από τα θηλυκά έπεται και χαρακτηρίζει τη φάση επαφής. Αυτό δικαιολογεί και τα μειωμένα ποσοστά σύζευξης στις διασταυρώσεις των θηλυκών στα οποία είχε εγχυθεί *dsOrc* με αρσενικά άτομα στα οποία είχε εγχυθεί *dsGFP*, δεδομένου ότι στην περίπτωση αυτή αναμενόταν να πραγματοποιηθούν συζεύξεις. Παρόλα αυτά, πραγματοποιήθηκε μία μόνο πλήρης σύζευξη από τις συνολικά έξι δυνατές και καταγράφηκαν πέντε απόπειρες σύζευξης που μαρτυρούν ότι η φάση της προσέλκυσης επετεύχθη ενώ η φάση της επαφής απετράπη.

Συνολικά, φαίνεται ότι διατηρούνται το ίδιο χαμηλά τα ποσοστά σύζευξης κατά τις πιθανές διασταυρώσεις i και ii που περιγράφηκαν παραπάνω. Το γεγονός αυτό δεν αποδεικνύει ξεκάθαρα τη συμμετοχή της σίγησης του *SNMP1* στον παρατηρούμενο φαινότυπο. Κατά συνέπεια, απαιτείται έλεγχος διασταυρώσεων ατόμων που θα ενεθούν αποκλειστικά με *dsSNMP1* ή *dsGFP* με τους αντίστοιχους συνδυασμούς.

Αναφορικά με τις συζεύξεις που πραγματοποιήθηκαν, δεδομένου ότι πρόκειται για παροδική σίγηση κατά την οποία τα μετάγραφα μειώνονται μεν αλλά εξακολουθούν κάποια να υπάρχουν και να μεταφράζονται, μπορεί η διαθέσιμη ποσότητα πρωτεΐνης που είχε παραχθεί να συνέβαλε στην πραγματοποίηση ζευγαρώματος. Ωστόσο το πλήθος των δειγμάτων ήταν μικρό και ως εκ τούτου, είναι αναγκαία η επανεκτίμηση των αποτελεσμάτων σε έλεγχο μεγαλύτερου δείγματος εντόμων. Ένα ακόμα ενδεχόμενο, είναι η εμπλοκή κάποιων γευστικών υποδοχέων στην επιλογή συντρόφου και το ζευγάρωμα. Υπάρχουν ενδείξεις πως κάποιοι GRs συμμετέχουν και στην οσφρητική σηματοδότηση. Συγκεκριμένα, ο **GR68a** στη *D. melanogaster* φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στη διαδικασία της σύζευξης, μέσω αναγνώρισης από το αρσενικό έντομο κάποιας μη-πτητικής φερομόνης που εκκρίνει το θηλυκό κατά το πρώιμο στάδιο της σύζευξης (Bray & Amrein, 2003). Ίσως τελικά και στο δάκο της ελιάς η δραστηριότητα των γευστικών υποδοχέων να εμπλέκεται επίσης στην προσυζευκτική επικοινωνία.

Έλεγχος ωοαπόθεσης

Σε αυτό το πειραματικό κομμάτι αξιολογήθηκε η επίδραση της σίγησης του γονιδίου *Orcο* κατά τη διαδικασία της επιλογής του κατάλληλου ξενιστή και την ωοτοκία καθώς παρεμβαίνοντας σε αυτές τις βιολογικές διεργασίες είναι εφικτή η μείωση του πληθυσμού των παρασιτικών εντόμων. Δύο μελέτες που κατάφεραν να δείξουν τη συμμετοχή του *Orcο* στις παραπάνω διαδικασίες, πραγματοποιήθηκαν στα έντομα *Bactrocera dorsalis* (X. Yi et al. 2014) και *Dendroctonus armandi* (Zhang et al. 2016). Στην περίπτωση της *B. dorsalis*, η αποσιώπηση του *Orcο* είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας της φρουτόμυγας να αποθέσει τα αυγά της σε εμποτισμένες με προσελκυστική οσμή μπανάνες. Ομοίως, στην περίπτωση του *D. armandi*, μετά τη σίγηση, τα θηλυκά έντομα αδυνατούσαν να εντοπίσουν και να επιλέξουν την περιοχή ωοτοκίας με αποτέλεσμα να μην μπορούν να ωοποθέσουν.

Εν προκειμένω, στον έλεγχο ωοτοκίας που ακολούθησε την παροδική σίγηση του *Orcο* σε θηλυκούς δάκους παρατηρήσαμε πως καμία από τις θηλυκές που είχε ενεθεί με *dsOrcο* δεν απόθεσε αυγά στον κερωμένο κώνο στο κέντρο του κλουβιού. Αντίθετα, από τα θηλυκά έντομα ελέγχου που είχαν ενεθεί με *dsGFP* συλλέχθηκαν 15 αυγά, τα οποία εκκολάφθηκαν όλα. Ως εκ τούτου, φάνηκε πως η αποσιώπηση του *Orcο* λειτούργησε ανασταλτικά στην απόθεση αυγών. Αν και ο αναμενόμενος φαινότυπος επιβεβαιώθηκε, χρειάζεται περαιτέρω έλεγχος σε μεγαλύτερο αριθμό ατόμων.

Παρόμοια μελέτη στο *Rhodnius prolixus*, φορέα του πρωτόζωου *Trypanosoma cruzi*, που προκαλεί τη νόσο των φτωχών (Chagas disease) έδειξε ότι τόσο η παραγωγή αυγών όσο και η εύρεση του ξενιστή επηρεάζεται από σίγηση του γονιδίου (Franco et al. 2016). Έντομα *R. prolixus*, υπό φυσιολογικές συνθήκες γεννούν κατά μέσο όρο 42 αυγά σε 15 ημέρες μετά από γεύμα αίματος (Atella et al., 2005). Στο συγκεκριμένο πείραμα κατά την αποσιώπηση του *Orcο* τα έντομα γέννησαν 27.7 αυγά κατά μέσο όρο σε 25 μέρες, ενώ σε αυτά που δεν πραγματοποιήθηκε σίγηση 48.

Επίλογος

Συμπερασματικά, από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προκύπτει ότι τα δύο γονίδια που ελέγχθηκαν διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο σε αποκρίσεις που σχετίζονται με την αναπαραγωγική συμπεριφορά του δάκου της ελιάς. Τα δεδομένα αυτά αποδεικνύουν την άμεση επίδραση της σίγησης του *Orcο* και του *SNMP1* τόσο στην προσυζευκτική επικοινωνία και όσο και στη μετασυζευκτική συμπεριφορά ωοαπόθεσης εμπλουτίζοντας την παρακαταθήκη για περαιτέρω έρευνα τόσο για τα συγκεκριμένα γονίδια όσο και για τα υπόλοιπα οσφρητικά γονίδια.

Για το γονίδιο *Orcο* η εικόνα ήταν πιο σαφής σχετικά με τη συμμετοχή του στην προσέλκυση εντόμου του αντίθετου φύλου μέσω αναγνώρισης φερομονών και την ικανότητα ωοτοκίας. Ωστόσο, και για το γονίδιο *SNMP1* οι ενδείξεις ήταν ελπιδοφόρες ώστε να πραγματοποιηθούν επιπλέον μελέτες για τον ακριβή προσδιορισμό της λειτουργίας του κατά την αναγνώριση του συντρόφου μέσω της πρόσληψης φερομονών μεταξύ αρσενικών και θηλυκών δάκων, διαδικασία που αποτελεί σημαντικό κομμάτι της αναπαραγωγικής και σεξουαλικής συμπεριφοράς του εντόμου.

Συνεπώς, τόσο το *Orcο* όσο και το *SNMP1* μπορούν να αποτελέσουν αξιόλογους μοριακούς στόχους που αναμένεται να δώσουν νέες προοπτικές στην έρευνα για τη

ανάπτυξη νέων εργαλείων που θα οδηγήσουν στη μείωση του πληθυσμού του εντόμου. Εξάλλου η εύρεση εναλλακτικών προσεγγίσεων που θα αποτρέπουν την παρασιτική συμπεριφορά του εντόμου στον ξενιστή του με μέσα πιο εξειδικευμένα και πιο φιλικά προς το περιβάλλον είναι ο απώτερος σκοπός των μελετών για παρασιτικά είδη τόσο αγροτικής όσο και υγειονομικής σημασίας.

6. Παράρτημα

Παράρτημα

1. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην qRT-PCR είναι οι ακόλουθες:

Γονίδιο-στόχος	Εκκινητής	Αλληλουχία		Prd bp	Μήκος (nt)
SNMP1	c53460_g1_SNMP1_F2	GCTGATCTGTGTCGTTCTTTG	21	90	856-945
	c53460_g1_SNMP1_R2	GCCCAAGTCGAGTGTATAGTAG	22		
Orco	c57709_g1_Orco_F3	CTTCTTTGGCGAGAGTGTGA	20	106	450-556
	c57709_g1_Orco_R3	GGCATTCCACGGATAGAAAGA	21		
RpL19	Rpl19_F	CTTCACGTACTTTATGCCTTC	21	126	
	Rpl19_R	GCAAGGGTAATGTGTTCAA			

2. Η αποδοτικότητα (**efficiency, E**) των εκκινητών για το εκάστοτε γονίδιο είναι:

- **ORCO:** E= 105,9% & $R^2=0,992$
- **SNMP1:** E=95,6% & $R^2=1,000$
- **RpL19:** E=97,3% & $R^2=0,999$

3. Οι αλληλουχίες των μεταγράφων για το εκάστοτε γονίδιο είναι οι εξής:

SNMP1:

ATGTTCAAAAAAATTCTCATCGGTTCCGGCTATTGCGCTCGCATTAGGAATCTTCGTTGGATT
TGTGGGGTTTCCAAAGTTGTTGAATAAAATGATAAAAGGGCAATTGAATTTGAAACCTGG
CAGCGAACCCGACAAATGTGGGAAAAATCCCCATCGCCTTGAATTTTCAATTTACGTC
TTCAACCTAACAAATCCCGATGAAGTGCAAAATGGCGGAAAACCATGTGCAAGAAGTC
GGACCGTTTGTATTGAGGAATGGAAGGACAAATACGATTTGGAGGACTTCGAGGATGAG
GACGCGGTGGCCTACAATATGCGCAACACATTCATTTTCAGACCCGATTTGGGCTTGAGCG
GTGAGGATTTAATCGTGATGCCACATCCACTTATACAAATAATGTCTATAGCCGTCAGCG
CGACAAGGAAGCCTTAATCAACATGATATCCGAGGGTATTCAAGCACTATTTAAGCCCACT
ACTCCATTTGTGCGTGACCTTTTATGGACATTTTTTTTCGAGGCATCGATGTGCACTGCTC
GGTGGATCATTTTCGAGCAAAAGGCAATTTGTTTGAATTTTCACACCGCGCGATCAAAGGA
GCAGAAAAAGTGAATGCAACACATTTTAAATTTTCACTCTTTGGTGGGGCCAATCAGACTG
ACGCCGGTCGCTATAAGGTCGCGAGAGGCGTCAAGGTTAGTCGTGATATTGGACGCGTTC
TTGAGTTTGACGACGCTGAAGAGCTGAGTGTCTGGGATGGTGTGAGTGTAATCAGTTTC
GCGGCACCGACACAACCATTTTTGCTCCACTAATGCAGCCCGAAGAGGGACTGTGGTCTTT
TGCTGCTGATCTGTGTCGTTCTTTGGGTGCAGATTTTCAGAAAAAGACCAGTTATGCAGGC
ATACCAGCATACTACTATACACTCGACTTGGGCGATCCAAAGAACGATCCAGATAAGCATT
GTTTCTGCAGGGATTACCCCGACAACCTGTCCACCAAAAGGTACCATGGATCTTACGCTGTG
TAATGAGGCCCCCATGATTGTGTCGTTGCCACACTTTTTCAAGGCCGATCCGAAATTGGTT
ACAGACGTAGATGGTTTGGATCCGAGGAGGAAAAGCATGGCGTCTTTATTGTTTTCGAA
AGGATATCCGGTACCACTATCTGCTGCTAAGCGTCTGCAATTTAGCCTATCTGTGATGC
CCGTACCAGAAGTAGAGGTTATGAAGAACTTACGTACACTCACCATGCCACTCTTTTGGGT
CGAGGAAGCGGCAAGTTTGGATAAGACATGGACTGATATGTTGAAGAAAAAGGTTTTCTT

AGTCATTAAAATAAATAACATCTTTAAATGGATGGCAACAATTCTCGGAGCATTGGGTGT
AATAATCAGCCTCTATATGCTATTTGGTAAAAATCAAATCACCACAACGAATGTCACACCA
ACAACTGAAGTTAATGCGATCGATAAACATTAA

ORCO:

ATGCAGCCGAGCAAATATGTGGGCCTTGTGGCCGATTTGATGCCCAACATTCTGCTTATGA
AATACTCGGGCCTATTTATGCACAATTTACCGGCGGTTCTGGGCTCTTCAAGAAGATTTA
CTCGTCTATACACTTGGTGCTTGTGTTGGTGCAATTTCTGTTGATACTGGTGAATATGGCGT
TGAATGCGGATGAGGTGAATGAGTTGTCCGGCAACACGATTACGGTGCTTTTCTTCACACA
TAGCATAACGAAATTCATATATTTGGCTGTGACTCAGAAGAACTTCTACAGAACATTGAAT
ATCTGGAATCAGGTAAACTCGCATCCATTGTTTGCCGAGTCGGACGCACGCTACCACGCGA
TCGCCCTCGCCAAAATGCGTAAACTCTTCACCTTGGTGATGCTTACGACCGTCGCCCTCGGCT
GTGGCTTGGACCACCATCACCTTCTTTGGCGAGAGTGTGAAATTCGCCCTTCGAAAAGGAGA
CCAATTCGACCATCACCGTGGAAATCCCGCGTTTGCCGATTAAGTCTTTCTATCCGTGGAAT
GCCGGTGTGGGCATGTTTTATATTATAAGCTTCGCTTTTCAATGCTACTATTTGCTCTTCTCC
ATGGTGCATTGCAACTTGTGCGATGACTCTTTTGTTCGTGGCTGATTTTCGCCTGCGAACA
GCTGCAACATCTGAAAGGCATTATGAAGCCATTAATGGAGCTGTCAGCCTCGCTGGACAC
CTATCGTCCAAATTCGGCGGCACTCTTTCTGTTTATTATCCGCCAATTCGAAGTCGGAATTAA
TCAACAATGAGGAGAAGGAACCCACTGATCTGGACATCAGCGGCGTCTATAGCTCTAAGG
CTGATTGGGGTGACAATTCGCTGCGCCATCGACTCTGCAAACCTTCAATGGCATGAACGG
TGCGAATCCGAATGGTTTACTAGAAAGCAGGAAATGATGGTGCGCAGCGCCATTAAGTA
TTGGGTCGAGCGGCATAAGCACGTGGTGCGATTAGTTGCAGCAATTGGTGACACTTATGG
CGGCGCTTTGTTGTTGCACATGTTGACATCCACCATTATGCTGACGTTGTTGGCGTATCAGG
CCACCAAAATCACCGGCGTCAATGTTTACGCCTTCACGACCATCGGCTACTTGGGTTATGC
CTTGGCGCAAGTATTTCACTTCTGCATATTTGGCAACCGGCTCATTGAGGAGAGCTCATCC
GTCATGGAGGCAGCCTATTCGTGCCACTGGTATGATGGCTCCGAGGAGGCCAAGACGTTT
GTTTACATCGTTTGGCAGCAGTGCCAGAAAGCGATGTCCATATCGGGAGCGAAGTTCTTCA
CTGTCTCGCTGGACTTGTGTCATCGGTTCTTGGCGCTGTTGTACCTACTTTCATGGTGCTG
GTGCAATTGAAG

4. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό δίκλωνων τμημάτων για τα γονίδια Orco, SNMP1 μέσω **E-RNAi** είναι οι εξής:

Γονίδιο Στόχος	Εκκινητής	Αλληλουχία	Μήκος (nt)	Tm [°C]	GC [%]
SNMP1	c53460_SNP1_F	taatacgactcactataggg ³ GCTCGCATTAGGAATCTTCG	20	59,945	50,000
	c53460_SNP1_R	taatacgactcactatagggAAACAAATTGCCTTTGCTGC	20	60,251	40,000
ORCO	c57709_Orco_1_F	taatacgactcactatagggCAATGAGGAGAAGGAACCCA	20	80,042	50,000
	c57709_Orco_1_R	taatacgactcactatagggCAGTGAAGAACTTCGCTCCC	20	59,989	55,000

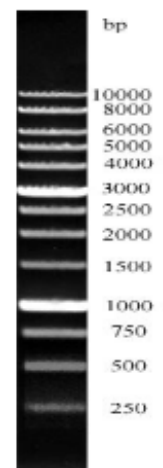
5. Οι αντίστοιχες αλληλουχίες των προϊόντων ενίσχυσης που χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο για τη παραγωγή δίκλωνων RNA (dsRNA) είναι οι ακόλουθες:

³ Taatacgactcactataggg: αλληλουχία του υποκινητή T7

SNMP1	GCTCGCATTAGGAATCTTCGTTGGATTGTGGGGTTTCCAAAGTTGTTGA ATAAAATGATAAAAGGGCAATTGAATTTGAAACCTGGCAGCGAACCGCGA CAAATGTGGGAAAAATTCCCCATCGCCTTGAATTTTCAATTTACGTCTT CAACCTAACAAATCCCGATGAAGTGCAAAATGGCGGAAAAACCACATGTGC AAGAAGTCGGACCGTTTGTATTTCGAGGAATGGAAGGACAAATACGATTTG GAGGACTTCGAGGATGAGGACGCGGTGGCCTACAATATGCGCAACACATT CATTTTCAGACCCGATTGTTGGGCTTGAGCGGTGAGGATTTAATCGTGATGC CACATCCACTTATACAAATAATGTCTATAGCCGTCAAGCGCGACAAGGAA GCCTTAATCAACATGATATCCGAGGGTATTCAAGCACTATTTAAGCCCAC TACTCCATTTGTGCGTGACCTTTTATGGACATTTTTTTTCGAGGCATCG ATGTCGACTGCTCGGTGATCATTTCGCAGCAAAGGCAATTTGTTT
ORCO	CAATGAGGAGAAGGAACCCACTGATCTGGACATCAGCGGCGTCTATAGCT CTAAGGCTGATTGGGGTGACAAATCCGTGCGCCATCGACTCTGCAAAACC TTCAATGGCATGAACGGTGCGAATCCGAATGGTTTGACTAGAAAGCAGGA AATGATGGTGCGCAGCGCCATTAAGTATTGGGTGAGCGGCATAAGCACG TGGTGCGATTAGTTGCAGCAATTGGTGACACTTATGGCGGCGCTTTGTTG TTGCACATGTTGACATCCACCATTATGCTGACGTTGTTGGCGTATCAGGC CACCAAAATCACCGGCGTCAATGTTTACGCCCTTACGACCATCGGCTACT TGGGTTATGCCTTGGCGCAAGTATTTCACTTCTGCATATTTGGCAACCGG CTCATTGAGGAGAGCTCATCCGTCATGGAGGCAGCCTATTCGTGCCACTG GTATGATGGCTCCGAGGAGGCCAAGACGTTTGTTCAGATCGTTTGCCAGC AGTGCCAGAAAGCGATGTCCATATCGGGAGCGAAGTCTTCACTG

5. Ο ladder- μάρτυρας μοριακού βάρους- που χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης είναι ο **DNA Ladder 1000 bp/1 kb ladder BLUE ready-to-use της Gene On**. Τα χαρακτηριστικά του παρατίθενται παρακάτω:

Features: 1kb ladder BLUE from GeneON is composed of 13 individual DNA fragments which are re-dissolved in storage buffer. Description/Preparation: The 1 kb ladder BLUE is a pre-mixed, ready-to-load molecular weight marker containing a dye which serves as visual aids to monitor the progress of migration during agarose gel electrophoresis. The DNA marker consists of proprietary plasmids which are digested to completion with appropriate restriction enzymes to yield 13 bands suitable for use as molecular weight standards for agarose gel electrophoresis that range in size from 250 to 10.000 base pairs. The 1.000 bp and 3.000 bp fragments have increased intensity relative to the other bands on ethidium bromide-stained agarose gels and serve as reference indicators. All fragments are blunt-ended. Usage: max. 1 µg/lane Concentration: 0,1 µg/µl Storage Buffer/Tracking Dye:: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1.0 mM EDTA, 50mM NaCl, optimized blue loading dye Number of bands: 13 fragments Number of bands and approx. DNA Mass: <table border="1"> <tr> <th>base pairs</th><th>250</th><th>500</th><th>750</th><th>1000</th><th>1500</th><th>2000</th><th>2500</th><th>3000</th><th>4000</th><th>5000</th><th>6000</th><th>8000</th><th>10000</th></tr> <tr> <th>DNA mass ng</th><td>20</td><td>30</td><td>60</td><td>210</td><td>50</td><td>60</td><td>70</td><td>200</td><td>60</td><td>60</td><td>60</td><td>60</td><td>60</td></tr> </table> Loading: 0.25 - max. 1.0 µg/ lane in 1.7 - max. 2.5 % Agarose. Transportation: shipped on blue ice or room temperature Storage: at -20°C for 24 months														base pairs	250	500	750	1000	1500	2000	2500	3000	4000	5000	6000	8000	10000	DNA mass ng	20	30	60	210	50	60	70	200	60	60	60	60	60
base pairs	250	500	750	1000	1500	2000	2500	3000	4000	5000	6000	8000	10000																												
DNA mass ng	20	30	60	210	50	60	70	200	60	60	60	60	60																												



Εικόνα 6.1: Αριστερά: Ιδιότητες DNA Ladder 1000 bp/1 kb ladder BLUE ready-to-use. Δεξιά: Αντιστοιχίες σε μοριακά μεγέθη και ζώνες

7. Βιβλιογραφία

Βιβλιογραφία

- Nakagawa T, Pellegrino M, Sato K, Vosshall LB, Touhara K. 2012. Amino acid residues contributing to function of the heteromeric insect olfactory receptor complex. *PLoS ONE* 7:e32372
- Larsson MC, Domingos AI, Jones WD, Chiappe ME, Amrein H, Vosshall LB. 2004. Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron* 43:703–14
- Krieger J, Raming K, Dewer YME, Bette S, Conzelmann S, Breer H. 2002. A divergent gene family encoding candidate olfactory receptors of the moth *Heliothis virescens*. *Eur. J. Neurosci.* 16:619–28
- Hill CA, Fox AN, Pitts RJ, Kent LB, Tan PL, et al. 2002. G protein-coupled receptors in *Anopheles gambiae*. *Science* 298:176–78
- Vosshall LB, Hansson BS. 2011. A unified nomenclature system for the insect olfactory coreceptor. *Chem. Senses* 36:497–98
- Couto A, Alenius M, Dickson BJ. 2005. Molecular, anatomical, and functional organization of the *Drosophila* olfactory system. *Curr. Biol.* 15:1535–47
- R. Benton, K. S. Vannice, L. B. Vosshall, *Nature* 450, 289 (2007)
- X. Jin, T. S. Ha, D. P. Smith, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 10996 (2008)
- S. Rivière, L. Challet, D. Flügge, M. Spehr, I. Rodríguez, *Nature* 459, 574 (2009)
- Silverstein, R. L. & Febbraio, M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci. Signal.* 2, re3 (2009).
- Park, Y. M. CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Exp. Mol. Med.* 46, e99 (2014).
- Pepino, M. Y., Kuda, O., Samovski, D. & Abumrad, N. A. Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 34, 281–303 (2014).
- Shen, W. J., Hu, J., Hu, Z., Kraemer, F. B. & Azhar, S. Scavenger receptor class B type I (SR-BI): a versatile receptor with multiple functions and actions. *Metabolism* 63, 875–886 (2014)
- Neculai, D. et al. Structure of LIMP-2 provides functional insights with implications for SR-BI and CD36. *Nature* 504, 172–176 (2013).
- Yu, M., Lau, T. Y., Carr, S. A. & Krieger, M. Contributions of a disulfide bond and a reduced cysteine side chain to the intrinsic activity of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Biochemistry* 51, 10044–10055 (2012).
- Stuart, L. M. et al. Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J. Cell Biol.* 170, 477–485 (2005).
- Jimenez-Dalmaroni, M. J. et al. Soluble CD36 ectodomain binds negatively charged diacylglycerol ligands and acts as a co-receptor for TLR2. *PLoS One* 4, e7411 (2009).
- Huang, M. M., Bolen, J. B., Barnwell, J. W., Shattil, S. J. & Brugge, J. S. Membrane glycoprotein IV (CD36) is physically associated with the Fyn, Lyn, and Yes protein-tyrosine kinases in human platelets. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 7844–7848 (1991).
- Han, C. et al. Epidermal cells are the primary phagocytes in the fragmentation and clearance of degenerating dendrites in *Drosophila*. *Neuron* 81, 544–560 (2014).
- Rogers, M. E., Krieger, J. & Vogt, R. G. Antennal SNMPs (sensory neuron membrane proteins) of *Lepidoptera* define a unique family of invertebrate CD36-like proteins. *J. Neurobiol.* 49, 47–61 (2001).
- Rogers, M. E., Steinbrecht, R. A. & Vogt, R. G. Expression of SNMP-1 in olfactory neurons and sensilla of male and female antennae of the silkworm *Antheraea polyphemus*. *Cell Tissue Res.* 303, 433–446 (2001).

- Rogers, M. E., Sun, M., Lerner, M. R. & Vogt, R. G. Snmp-1, a novel membrane protein of olfactory neurons of the silk moth *Antheraea polyphemus* with homology to the CD36 family of membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 272, 14792–14799 (1997).
- Forstner, M. et al. Differential expression of SNMP-1 and SNMP-2 proteins in pheromone-sensitive hairs of moths. *Chem. Senses* 33, 291–299 (2008).
- Pregitzer, P., Greschista, M., Breer, H. & Krieger, J. The sensory neurone membrane protein SNMP1 contributes to the sensitivity of a pheromone detection system. *Insect Mol. Biol.* 23, 733–742 (2014).
- Benton, R., Sachse, S., Michnick, S. W. & Vosshall, L. B. Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo. *PLOS Biol.* 4, e20 (2006).
- Benton, R. Sensitivity and specificity in *Drosophila* pheromone perception. *Trends Neurosci.* 30, 512–519 (2007).
- Leal, W. S. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 373–391 (2012).
- Benton, R., Vannice, K. S. & Vosshall, L. B. An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*. *Nature* 450, 289–293 (2007).
- Jin, X., Ha, T. S. & Smith, D. P. SNMP is a signaling component required for pheromone sensitivity in *Drosophila*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 10996–11001 (2008).
- Li, Z., Ni, J. D., Huang, J. & Montell, C. Requirement for *Drosophila* SNMP1 for rapid activation and termination of pheromone-induced activity. *PLoS Genet.* 10, e1004600 (2014)
- Gomez-Diaz C, Reina JH, Cambillau C, Benton R (2013) Ligands for Pheromone-Sensing Neurons Are Not Conformationally Activated Odorant Binding Proteins. *PLoS Biol* 11(4): e1001546. doi:10.1371/journal.pbio.1001546
- Gomez-Diaz C, Bargeton B, Abuin L, et al. A CD36 ectodomain mediates insect pheromone detection via a putative tunnelling mechanism. *Nature Communications*. 2016;7:11866. doi:10.1038/ncomms11866.
- Joga MR, Zotti MJ, Smagghe G, Christiaens O. RNAi Efficiency, Systemic Properties, and Novel Delivery Methods for Pest Insect Control: What We Know So Far. *Frontiers in Physiology*. 2016;7:553. doi:10.3389/fphys.2016.00553..
- Wu Z, Zhang H, Wang Z, Bin S, He H, Lin J. Discovery of Chemosensory Genes in the Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis*. Dickens JC, ed. *PLoS ONE*. 2015;10(6): e0129794 doi:10.1371/journal.pone.0129794.
- Biessmann H1, Andronopoulou E, Biessmann MR, Douris V, Dimitratos SD, Eliopoulos E, Guerin PM, Iatrou K, Justice RW, Kröber T, Marinotti O, Tsitoura P, Woods DF, Walter MF, The *Anopheles gambiae* odorant binding protein 1 (AgamOBP1) mediates indole recognition in the antennae of female mosquitoes, *PLoS One*. 2010 Mar 1;5(3):e9471. doi: 10.1371/journal.pone.0009471.
- Zhu F, Xu P, Barbosa RMR, Choo Y-M, Leal WS. RNAi-based Demonstration of Direct Link between Specific Odorant Receptors and Mosquito Oviposition Behavior. *Insect biochemistry and molecular biology*. 2013;43(10):916–923. doi:10.1016/j.ibmb.2013.07.008.
- Lin W, Yu Y, Zhou P, et al. Identification and Knockdown of the Olfactory Receptor (OrCo) in Gypsy Moth, *Lymantria dispar*. *International Journal of Biological Sciences*. 2015;11(7):772–780. doi:10.7150/ijbs.11898.
- Wicher Dieter, Olfactory signaling in insects, *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2015;130:37–54. doi: 10.1016/bs.pmbts.2014.11.002. Epub 2014 Dec 17.
- Stengl, M. & Funk, N.W. *J Comp Physiol A* (2013) 199: 897. doi:10.1007/s00359-013-0837-3
- Ranran Zhang, Guanqun Gao & Hui Chen, Silencing of the olfactory co-receptor gene in *Dendroctonus armandi* leads to EAG response declining to major host volatiles, *Scientific Reports* 6, Article number: 23136 (2016) doi:10.1038/srep23136

- Li Z, Ni JD, Huang J, Montell C (2014) Requirement for *Drosophila* SNMP1 for Rapid Activation and Termination of Pheromone-Induced Activity. *PLOS Genetics* 10(9): e1004600. doi: 10.1371/journal.pgen.1004600
- Li H, Zhang H, Guan R, Miao X. Identification of differential expression genes associated with host selection and adaptation between two sibling insect species by transcriptional profile analysis. *BMC Genomics*. 2013;14:582. doi:10.1186/1471-2164-14-582.
- Carraher, C., Dalziel, J., Jordan, M.D., Christie, D.L., Newcomb, R.D., Kralicek, A.V., Towards an understanding of the structural basis for insect olfaction by odorant receptors, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* (2015), doi: 10.1016/j.ibmb.2015.09.010.
- Franco, T. A., Oliveira, D. S., Moreira, M. F., Leal, W. S., & Melo, A. C. (2016). Silencing the odorant receptor co-receptor RproOrco affects the physiology and behavior of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 69, 82-90.

Εικόνες εντόμων εισαγωγής:

- 1.1: (Gong et al. 2005)
- 1.2: <http://www.intechopen.com/source/html/41793/media/image1.jpeg>
- 1.3: <http://www.hungrypests.com/img/the-threat/asian-citrus-psyllid/small/AsianCitrusPsyllid1.jpg>
- 1.4: <https://biologistsoup.files.wordpress.com/2013/07/close-up-kelly.jpg>
- 1.5: <http://www.ukmoths.org.uk/site/assets/files/15909/gypsymothmale.jpg>
- 1.6: <http://www.member3.jqw.com/2015/06/09/1555604/product/b20150811110094623.jpg>
- 1.7: https://c1.staticflickr.com/8/7061/6922916899_e801d4e201_b.jpg
- 1.8: <http://www.pixnio.com/free-images/fauna-animals/insects-and-bugs/mosquito/culex-quinquefasciatus-mosquito-has-landed-on-a-human-finger.jpg>
- 1.9: https://www.carbonbrief.org/wp-content/uploads/2016/07/Mosquito_anopheles_gambiae-1550x804.jpg
- 1.10: <https://6.oliveoiltimes.com/wp-content/uploads/2010/11/World-300x177.gif>
- 1.11: [http://www.biodiversidadvirtual.org/insectarium/data/media/20891/Bactrocera-oleae-\(Gmelin-1790\)-596183.jpg](http://www.biodiversidadvirtual.org/insectarium/data/media/20891/Bactrocera-oleae-(Gmelin-1790)-596183.jpg)
- 1.12: <http://cesonoma.ucanr.edu/files/27230.pdf>
- 1.13: https://www.rochester.edu/news/photos/hi_res/Jaenike-Wolbachia/origs/Drosophila_head1.jpg
- 1.16: <http://d2jkamohjionkb.cloudfront.net/content/embor/11/3/173/F1.large.jpg>
- 1.18: : <http://www.nips.ac.jp/research/files/orion-1.jpg>
- 1.19: : http://jones.kaist.edu/images/or_schematic.png