



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής

Θέμα Διπλωματικής εργασίας:

Λειτουργική ανάλυση του γονιδίου της Κυτοσολικής Αμινοπεπτιδάσης στη
μύγα της Μεσογείου, *Ceratitis capitata*

Functional analysis of the Cytosol Aminopeptidase gene in the Mediterranean
fly, *Ceratitis capitata*



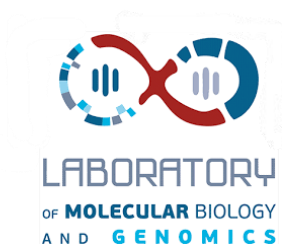
Δήμητρα Σάββας Λαζαρίδη

Λάρισα, 2024

Η παρούσα διπλωματική εργασία διεκπεραιώθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας Κ. Ματθιόπουλου Κωνσταντίνου το εαρινό εξάμηνο του 2024.

Τριμελής Επιτροπή:

- **Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος:** Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- **Γιακουντής Αντώνης:** Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- **Τσίκου Δανιέλα:** Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας



Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	5
Περίληψη	6
Abstract.....	7
Εισαγωγή	8
1. Φυλετικά χρωμοσώματα.....	8
1.1 Εξέλιξη των φυλετικών χρωμοσωμάτων.....	8
1.2 Εκφυλισμός του Υ χρωμοσώματος.....	11
1.3 Γονιδιακή σύσταση των φυλετικών χρωμοσωμάτων	12
1.4 Νέο-φυλετικά χρωμοσώματα στην <i>Drosophila miranda</i>	13
1.5 Meiotic Driver genes και Meiotic Sex Chromosome Inactivation (MSCI)	14
2. <i>Ceratitis capitata</i>	15
2.1 Φυλετικά χρωμοσώματα της <i>Ceratitis capitata</i>	15
2.2 Φυλοκαθορισμός.....	16
2.3 Πληθυσμιακός έλεγχος.....	17
3. Κυτοσολική Αμινοπεπτιδάση.....	18
3.1 Σχέση της Sperm-Leucylaminopeptidase (S-Lap) με τη γονιμότητα στη <i>Drosophila</i> .	18
3.2 Εξελικτική απόκτηση νέου ρόλου για το γονίδιο S-Lap στη <i>Drosophila</i>	19
3.3 Παρουσία γονιδίων γονιμότητας σε επαναλήψεις στο Υ χρωμόσωμα.....	19
4. RNA interference στα έντομα.....	20
4.1 Μηχανισμός δράσης RNA interference (RNAi).....	20
4.1.1 siRNAs	20
4.1.2 miRNA	22
4.1.3 piRNA	22
4.2 Πρόσληψη των δίκλωνων μορίων RNAs (dsRNAs) από το κύτταρο και Συστημική κατανομή του σήματος σίγησης.....	24
4.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση του RNAi	24
Σκοπός	26
Υλικά και Μέθοδοι	27
1. In silico Μέθοδοι.....	27
1.1 Benchling	27
1.2 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	27
1.3 JBrowse 2.....	27
1.4 Primer Quest.....	27

1.5 Oligo Analyzer.....	28
2. Πειραματικές διαδικασίες	28
2.1 Απομόνωση RNA (RNA extraction).....	28
2.1.1 Φυλετικός διαχωρισμός των εντόμων (sexing).....	29
2.2 Αντίδραση DNase (DNase treatment).....	29
2.3 Παραγωγή cDNA.....	30
2.4 Ποσοτικοποίηση DNA/RNA	30
2.5 Αλυσιδωτή Αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).....	31
2.6 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR).....	33
2.7 Ηλεκτροφόρηση πηκτής Αγαρόζης.....	35
2.8 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης (Gel Extraction).....	36
2.9 Παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA (dsRNAs) με T7 polymerase in vitro μεταγραφή	36
2.10 Χορήγηση dsRNA στο έντομο με μικροέγχυση.....	37
Αποτελέσματα.....	39
1. Σχεδιασμός εκκινήτων	39
2. Προφίλ έκφρασης γονιδίων στόχων	40
3. Παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA (dsRNAs).....	42
4. Προφίλ έκφρασης γονιδίων στόχων μετά την εφαρμογή των ενέσεων.....	43
5. Παρατήρηση φαινοτύπου	45
Συζήτηση	46
Παράρτημα	50
1. Πίνακες.....	50
2. Εικόνες.....	50
Βιβλιογραφία	54

Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας την πτυχιική μου εργασία θα ήθελα καταρχάς να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου Κ. Κωνσταντίνο Μαθιόπουλο που με εμπιστεύτηκε και μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ στο συγκεκριμένο εργαστήριο, προσφέροντας μου την πρώτη μου εργαστηριακή εμπειρία που σίγουρα δε θα ξεχάσω ποτέ. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο μου, υποψήφιο διδάκτορα Δημήτρη Ράλλη για τις πολύτιμες γνώσεις και την καθοδήγηση του που με βοήθησαν να αποκτήσω μια πιο κριτική σκέψη και ανεξαρτησία στο χώρο του εργαστηρίου. Δεν είναι δυνατόν να ξεχάσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου τη Λευκή, τη Μαρία και την Ελένη που ήταν εκεί όποτε τις χρειαζόμουν και κάνανε τη κάθε μέρα όσο δύσκολη και να ήταν πιο ευχάριστη με την καλή τους διάθεση και το χιούμορ τους. Τέλος θέλω να ευχαριστήσω τους φίλους μου και τους γονείς μου για τη συνεχή τους στήριξη και βοήθεια, χωρίς την οποία δε θα τα είχα καταφέρει. Βέβαια κυρίως θέλω να ευχαριστήσω την αδερφή μου που χωρίς την πίστη της σε εμένα δε θα είχα τολμήσει ποτέ να ακολουθήσω αυτό το κλάδο που ήταν πάντα το όνειρο μου.

Περίληψη

Η εξέλιξη των φυλετικών χρωμοσωμάτων είναι άμεσα συνδεδεμένη με τον καθορισμό του φύλου πολλών οργανισμών. Πρόκειται για μία δυναμική και περίπλοκη διαδικασία που έχει συμβεί ανεξάρτητα, πολλές φορές, κατά την εξέλιξη διαφορετικών ειδών. Η μελέτη του τρόπου δημιουργίας των φυλετικών χρωμοσωμάτων βασίζεται στην πλήρη ανάλυση της αλληλουχίας και της λειτουργίας των γονιδίων τους. Ωστόσο η αλληλούχιση των φυλετικών χρωμοσωμάτων αντιμετωπίζει προβλήματα, ιδιαίτερα στην περίπτωση του Y χρωμοσώματος, καθώς είναι ιδιαίτερα ετεροχρωματινικό και με πολλές επαναλήψεις. Ιδανικό μοντέλο για τη μελέτη της εξέλιξης των φυλετικών χρωμοσωμάτων είναι η κλάση των εντόμων, η οποία εμπεριέχει μία ποικιλία συστημάτων φυλετικών χρωμοσωμάτων. Στην παρούσα πτυχιακή έγινε ανάλυση RNAseq δεδομένων του Y χρωμοσώματος της *Ceratitis capitata*, που προέρχονται από τους όρχεις με στόχο την εύρεση γονιδίων. Η αναζήτηση αυτή οδήγησε στην παρατήρηση της επαναλαμβανόμενης εμφάνισης ενός τμήματος του αυτοσωμικού γονιδίου της Κυτοσολικής αμινοπεπτιδάσης στο Y. Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η λειτουργική ανάλυση του αυτοσωμικού γονιδίου ώστε να καταστεί δυνατή η κατανόηση της επαναλαμβανόμενης παρουσίας της αλληλουχίας του στο χρωμόσωμα Y.

Abstract

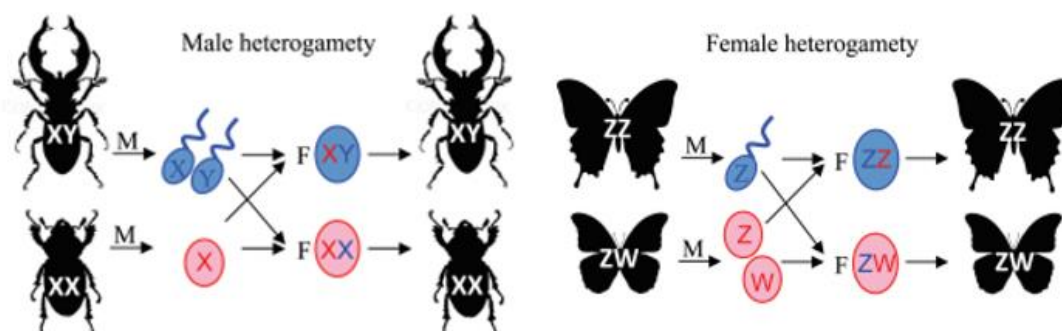
The evolution of sex chromosomes is directly linked to the determination of sex in many organisms. It is a dynamic and complex process that has occurred independently, multiple times, throughout the evolution of different species. The study of the formation of sex chromosomes relies on the complete analysis of their gene sequences and functions. However, sequencing sex chromosomes poses challenges, especially in the case of the Y chromosome, as it is highly heterochromatic and contains many repeats. An ideal model for studying the evolution of sex chromosomes is the insect class, which includes a variety of sex chromosome systems. In this thesis, an analysis of RNAseq data from the Y chromosome of *Ceratitis capitata* derived from testes was performed with the aim of identifying genes. This search led to the observation of the repeated occurrence of a part of the autosomal gene of Cytosol Aminopeptidase on the Y chromosome. The objective of the present study is the functional analysis of the autosomal gene in order to understand the repeated presence of its sequence on the Y chromosome.

Εισαγωγή

1. Φυλετικά χρωμοσώματα

Η πορεία της εξέλιξης προς τη δημιουργία δύο διακριτών φύλων, ξεκίνησε από τους ισογαμετικούς οργανισμούς, δηλαδή οργανισμούς που διαθέτουν γαμέτες με ίδια μορφή. Ωστόσο, η ανάγκη για τη βελτιστοποίηση της σύζευξης οδήγησε στην εξέλιξη της ανισογαμετίας. Κατά το φαινόμενο αυτό οι οργανισμοί εξελίσσουν διαφορετικούς γαμέτες όπου ο ένας ευνοείται από καλή κινητικότητα και παραγωγή σε μεγάλους αριθμούς και ο άλλος έχει το πλεονέκτημα του χώρου, δηλαδή την ικανότητα να περιέχει όλα τα συστατικά που χρειάζονται για την υγιή ανάπτυξη του ζυγωτού. Η δημιουργία των ετερογαμετικών οργανισμών, όμως, έθεσε την ανάγκη ύπαρξης γενετικής βάσης που να τη στηρίζει, πιο συγκεκριμένα την εμφάνιση φυλοκαθοριστικών γονιδίων που θα ευνοούν ένα από τα δύο είδη γαμετών. Η απόκτηση των γονιδίων αυτών είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία των φυλετικών χρωμοσωμάτων, που οδήγησαν στη διαφοροποίηση του αρσενικού και θηλυκού φύλου. Ωστόσο, ο διαχωρισμός σε θηλυκά και αρσενικά άτομα δε συνέβη σε όλους τους οργανισμούς, καθώς κάποιοι οδηγήθηκαν στον ερμαφροδιτισμό δηλαδή ένα άτομο φέρει ταυτόχρονα αρσενικούς και θηλυκούς γαμέτες (Bachtrog et al., 2014). Βέβαια στην περίπτωση των εντόμων, που αποτελεί κύριο ενδιαφέρον αυτής της πτυχιακής, δεν έχει παρατηρηθεί κάποιο φαινόμενο ερμαφροδιτισμού, αλλά μόνο ξεχωριστά αρσενικά και θηλυκά έντομα.

Στους ετερογαμετικούς οργανισμούς παρατηρούνται δύο κύρια συστήματα φυλετικών χρωμοσωμάτων το XX/XY και το ZZ/ZW (**Εικόνα 1**). Στο σύστημα XX/XY τα αρσενικά είναι το ετερογαμετικό φύλο φέροντας ένα X και ένα Y χρωμόσωμα, ενώ τα θηλυκά φέρουν δύο X. Από την άλλη πλευρά στο σύστημα ZZ/ZW ισχύει το αντίθετο, το θηλυκό είναι το ετερογαμετικό φύλο με ένα Z και ένα W χρωμόσωμα, ενώ το αρσενικό το ομογαμετικό με δύο Z (Blackmon et al., 2014). Ωστόσο έχουν βρεθεί και συστήματα ZO/ZZ και XX/XO που λογικά έχουν προκύψει, εξαιτίας της απώλειας των Y και W χρωμοσωμάτων, όπου το φύλο καθορίζεται πλέον από τη δόση των γονιδίων στα X και Z χρωμοσώματα (Furman et al., 2020).

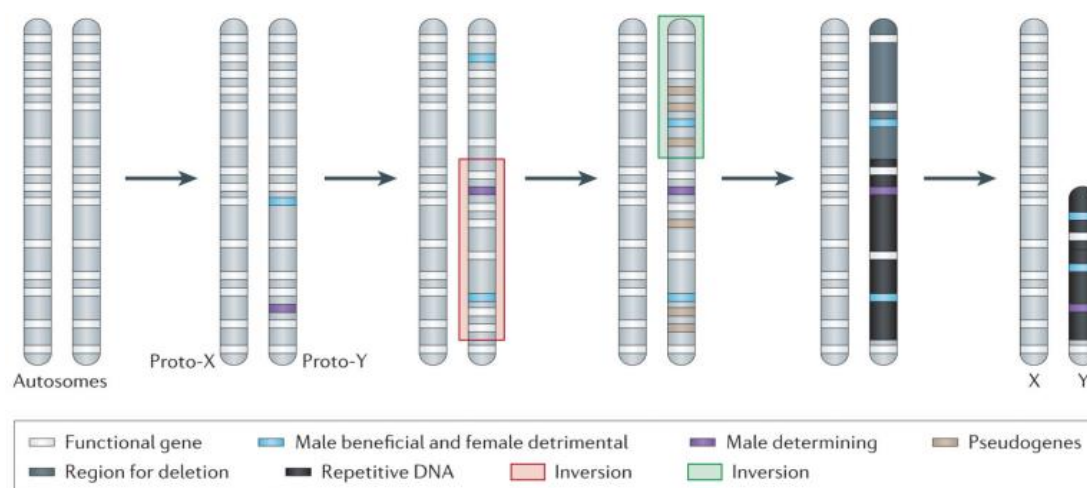


Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση των συστημάτων φυλετικών χρωμοσωμάτων XX/XY (Αρσενική ετερογαμετία) και ZZ/ZW (Θηλυκή ετερογαμετία). M: Μείωση F: γονιμοποίηση (Blackmon et al., 2014).

1.1 Εξέλιξη των φυλετικών χρωμοσωμάτων

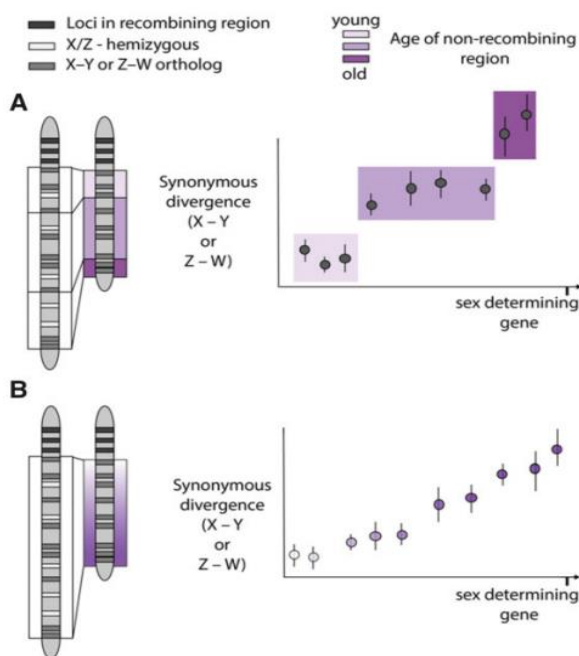
Η κυρίαρχη υπόθεση για τον τρόπο της εξέλιξης των φυλετικών χρωμοσωμάτων αναφέρει ότι προέρχονται από ένα ζεύγος αυτοσωμικών (**Εικόνα 2**). Η μετατροπή ξεκινάει με την απόκτηση ενός φυλοκαθοριστικού γονιδίου (sex determining gene, SDG) από ένα ζεύγος αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων, όπως ένα γονίδιο καθοριστικό για το αρσενικό φύλο. Αυτό

δημιουργεί την ανάγκη της παύσης του ανασυνδυασμού μεταξύ των δύο χρωμοσωμάτων, ώστε να μην υπάρχει η πιθανότητα διαταραχής της λειτουργίας του SDG μέσα από τη ανάμειξη του γενετικού υλικού. Έτσι λοιπόν τα δύο χρωμοσώματα από το αρχικό στάδιο της πλήρους ομολογίας αρχίζουν να συσσωρεύουν μεταλλάξεις και να διαφοροποιούνται με ξεχωριστό τρόπο, γεγονός που οδηγεί στη δημιουργία του ζεύγους των φυλετικών χρωμοσωμάτων (Bachtrog et al., 2014) (Bachtrog et al., 2013a).



Εικόνα 2. Μοντέλο πορείας της εξέλιξης των φυλετικών χρωμοσωμάτων από ένα ζεύγος αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων (Bachtrog et al., 2013a).

Μέχρι τώρα δεν είναι απόλυτα σίγουρη η αιτία που οδηγεί στην παύση του ανασυνδυασμού, όμως υπάρχουν ορισμένες υποθέσεις. Μια πρώτη εξήγηση είναι η δημιουργία αναστροφών στη φυλοκαθοριστική (sex-determining) περιοχή, όπου εξαιτίας της διαταραχής της σειράς των γονιδίων ο ανασυνδυασμός δεν ευνοείται. Η πρώτη αναστροφή οδηγεί στη δημιουργία περισσότερων, ώστε να επεκταθεί η μη-ανασυνδυαζόμενη (non-recombining) περιοχή. Κάθε φαινόμενο αναστροφής ονομάζεται strata. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζει ότι ο τερματισμός του ανασυνδυασμού μεταξύ των χρωμοσωμάτων γίνεται σταδιακά σε βήματα, strata, δημιουργώντας clusters με συγκεκριμένα και διακριτά όρια (Furman et al., 2020). Βέβαια στο μύκητα *Neurospora tetrasperma* παρατηρήθηκε ότι οι αναστροφές είναι αποτέλεσμα και όχι αιτία του τερματισμού του ανασυνδυασμού, καθώς δεν υπάρχει εξελικτική πίεση για τη διατήρηση της

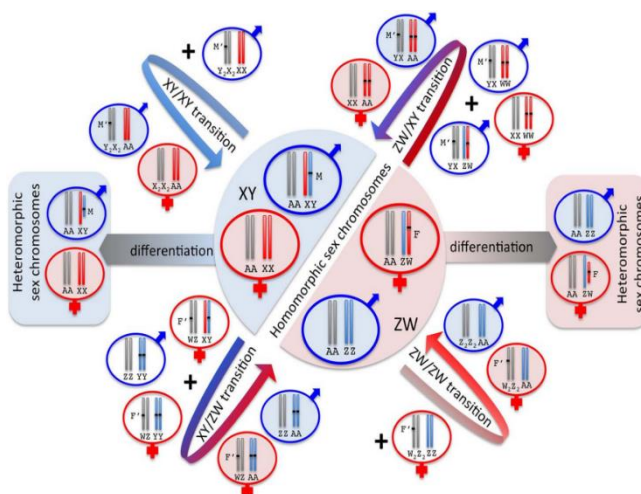


Εικόνα 3. Μοντέλα απόκλισης των φυλετικών χρωμοσωμάτων κατά την παύση του ανασυνδυασμού. Α) Κατά βήματα επέκταση του τερματισμού του ανασυνδυασμού, λόγω αναστροφών Β) Γραμμική επέκταση της παύσης του ανασυνδυασμού λόγω συσσώρευση TEs ή Μεθυλίωσης του DNA (Furman et al., 2020).

σειράς των γονιδίων (Sun et al., 2017). Άλλη μία πιθανή αιτία είναι η εισαγωγή μεταθετών στοιχείων (TEs) κοντά στη sex-determining περιοχή που δημιουργεί διαφορά ανάμεσα στα δύο χρωμοσώματα και αναστέλλει τον ανασυνδυασμό. Επίσης μηχανισμοί που λαμβάνουν δράση, ώστε να σιγήσουν τα άκρα των μεταθετών στοιχείων για να μην επεκταθούν, βοηθούν επίσης στον τερματισμό του ανασυνδυασμού (Kent et al., 2017). Τέλος φαινόμενα μεθυλίωσης του DNA και τροποποιήσεων των ιστονών, μέσω της καταστολής της έκφρασης των γονιδίων και την επαγωγή δημιουργίας ετεροχρωματινής μπορούν να βοηθήσουν στην παύση του ανασυνδυασμού. Αυτές οι δυο τελευταίες υποθέσεις (συσσώρευση TEs, μεθυλίωση του DNA) δείχνουν μία πιο γραμμική μετάβαση κατά την διαφοροποίηση των χρωμοσωμάτων μεταξύ τους σε σχέση με τη πρώτη υπόθεση (αναστροφές) που γίνεται σε βήματα (**Εικόνα 3**) (Furman et al., 2020).

Ενδιαφέρον βέβαια είναι ότι σε κάποια είδη το Y, ή αντίστοιχα το W, χρωμόσωμα έχει προέλθει από B χρωμοσώματα και όχι αυτοσωμικά (Furman et al., 2020). Για παράδειγμα στην περίπτωση των Λεπιδόπτερων υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι το W χρωμόσωμα προήλθε από B χρωμοσώματα (Fraïsse et al., 2017). Τα B χρωμοσώματα υπάρχουν σε πολλά είδη εντόμων, αποτελούν πρόσθετα χρωμοσώματα που βρίσκονται στο πυρήνα πέρα από την κύρια σειρά των χρωμοσωμάτων, A χρωμοσώματα. Προέρχονται από αυτοσωμικά ή φυλετικά χρωμοσώματα, είναι ιδιαίτερα ετεροχρωματινικά και περιέχουν πολλές επαναλήψεις και τρανσποζόνια (Hoy et al., 2003).

Το γεγονός ότι το φύλο καθορίζεται από τα φυλετικά χρωμοσώματα, οδηγούσε στη σκέψη ότι πρόκειται για πολύ συντηρημένα και σταθερά γενετικά συστήματα. Αυτό όμως δεν ισχύει, τα φυλετικά χρωμοσώματα χαρακτηρίζονται από μεγάλη αστάθεια και αλλάζουν συνεχώς μέσα στο χρόνο. Υπάρχουν πολλές μεταπτώσεις (turnovers) μέσα και μεταξύ των XX/XY και ZZ/ZW συστημάτων (**Εικόνα 4**). Τα turnovers μπορούν να προκληθούν από διάφορα συμβάντα όπως ύπαρξη νέου ή ίδιου φυλοκαθοριστικού παράγοντα σε διαφορετικό χρωμόσωμα, δημιουργία αλληλομόρφου με ανταγωνιστική δράση στα δύο φύλα (sexually antagonistic) σε αυτοσωμικό χρωμόσωμα και απώλεια των Y/W χρωμοσωμάτων (Blaser et al., 2012)(Bachtrog et al., 2014). Για παράδειγμα η δημιουργία ενός αλληλομόρφου με ανταγωνιστική δράση σε ένα αυτοσωμικό χρωμόσωμα, που δίνει πλεονέκτημα στα αρσενικά και είναι καταστροφικό για τα θηλυκά, αν είναι και σε σύνδεση με ένα επικρατές καθοριστικό για τα αρσενικά γονίδιο, θα οδηγήσει στη δημιουργία ενός νέου Y χρωμοσώματος που θα αντικαταστήσει το παλιό (Bachtrog et al., 2014).

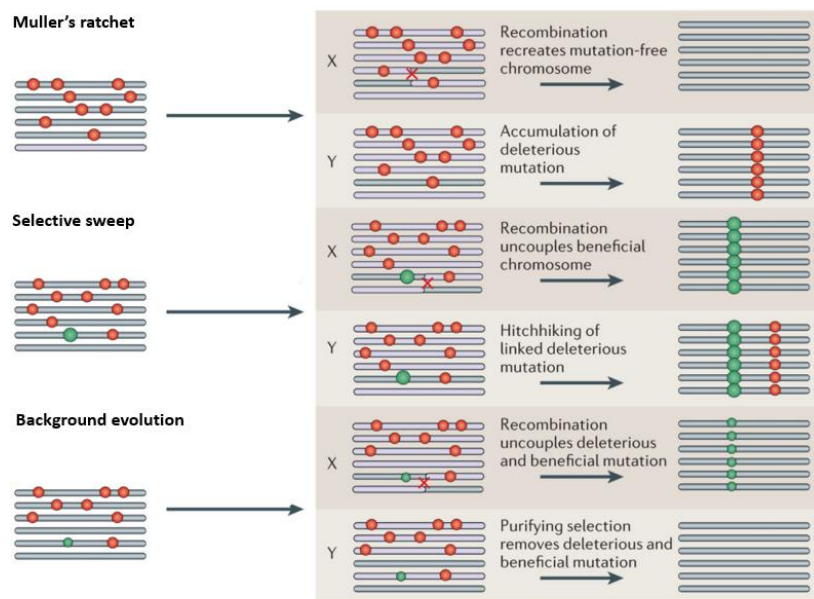


Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση όλων των πιθανών turnovers που μπορούν να γίνουν μέσα και μεταξύ των XX/XY και ZZ/ZW συστημάτων (Bachtrog et al., 2014).

1.2 Εκφυλισμός του Y χρωμοσώματος

Η αναστολή του ανασυνδυασμού μεταξύ των χρωμοσωμάτων, είχε ως αποτέλεσμα επιβλαβείς μεταλλάξεις που δημιουργούνται στο Y χρωμόσωμα να μη μπορούν να απαλειφθούν και να συσσωρεύονται. Αυτό οδήγησε στη δημιουργία ενός κυρίως ετεροχρωματικού Y με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και περιοχές που έχουν χάσει τη λειτουργία τους ως κωδικά γονίδια. Οι περιοχές χωρίς λειτουργία που συσσωρεύονται μπορούν να απαλειφθούν από το DNA, γεγονός που οδηγεί σε ένα Y χρωμόσωμα με μειωμένο μέγεθος (**Εικόνα 2**) (Bachtrog et al., 2013a).

Η εξελικτική πίεση, σε περιοχές όπου επικρατεί παύση του ανασυνδυασμού μπορεί να δράσει με διαφορετικούς τρόπους, οι οποίοι περιγράφονται με τα μοντέλα Muller's ratchet, Selective sweep και Background evolution (**Εικόνα 5**). Αρχικά, το μοντέλο Background evolution στηρίζει ότι οι αυστηρά επιβλαβείς μεταλλάξεις που δημιουργούνται θα εξαλειφθούν από τον πληθυσμό καθώς τα άτομα που τις φέρουν, λόγω χαμηλής αρμοστικότητας, υπάρχει μικρή πιθανότητα να ζήσουν και να αναπαραχθούν. Μαζί όμως με τις επιβλαβείς μεταλλάξεις χάνονται και περιοχές συνδεδεμένες με αυτές ακόμα και αν προσδίδουν πλεονέκτημα, γεγονός που μειώνει τη γενετική ποικιλότητα (Charlesworth, 1996). Από την άλλη το μοντέλο selective sweep αφορά το αντίθετο, την εγκαθίδρυση



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση των μοντέλων Muller's Ratchet, Selective sweep και Background Evolution Πράσινο: επιθυμητή μετάλλαξη Κόκκινο: επιβλαβής μετάλλαξη (Bachtrog et al., 2013a).

μεταλλάξεων που προσδίδουν πλεονέκτημα σε μία περιοχή που έχει ανασταλεί ο ανασυνδυασμός. Βέβαια μπορεί επιβλαβείς μεταλλάξεις να είναι συνδεδεμένες με τις επιθυμητές και να παραμένουν στον πληθυσμό. Αυτό όμως συμβαίνει μόνο αν το πλεονέκτημα που δίνεται υπερτερεί της ανεπιθύμητης μετάλλαξης (Kaiser et al., 2010). Τέλος το μοντέλο Muller's ratchet αναφέρει ότι αναπόφευκτα θα συσσωρευθούν επιβλαβείς μεταλλάξεις, αφού αναστέλλονται οι ανασυνδυασμοί που θα επέτρεπαν στο χρωμόσωμα να τις διορθώσει (Bachtrog et al., 2013a). Ποια από τις τρεις μορφές επιλογής δρα και κυριαρχεί στο Y χρωμόσωμα εξαρτάται από το στάδιο εκφυλισμού που βρίσκεται. Για παράδειγμα σε ένα νέο εμφανιζόμενο Y χρωμόσωμα με πολλά γονίδια οι κύριες δυνάμεις που θα ασκούνται

είναι οι Muller's ratchet και Background evolution, ενώ όσο χάνει γονίδια η κύρια δύναμη θα είναι αυτή του Selective sweep, ώστε το Y να καταφέρει να κρατήσει τα λίγα γονίδιά του (Kaiser et al., 2010). Αυτή η λογική οδηγεί στη θεωρία ότι ο ρυθμός εκφυλισμού του Y χρωμοσώματος δε θα συνεχίσει να αυξάνεται και θα σταματήσει σε ένα Y χρωμόσωμα με λίγα γονίδια. Απόδειξη αυτού είναι το ανθρώπινο Y χρωμόσωμα που παραμένει σταθερό τα τελευταία 25 εκατομμύρια χρόνια (Bachtrog et al., 2014) (Hughes et al., 2012).

Ωστόσο, ένας επιπλέον μηχανισμός έχει εξελιχθεί ώστε να βοηθήσει τους ετερογαμετικούς οργανισμούς όπου το Y τους χρωμόσωμα χάνει γονίδια. Ο μηχανισμός αυτός ονομάζεται αντιστάθμιση δόσης (dosage compensation, DC) και βασίζεται στη κοινή «γενετική αφετηρία» των φυλετικών χρωμοσωμάτων. Σκοπός του είναι να εξισορροπήσει τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων μεταξύ των δύο φύλων. Έχουν παρατηρηθεί διάφοροι μηχανισμοί αντιστάθμισης δόσης, για παράδειγμα απενεργοποίηση του ενός X στα θηλυκά θηλαστικά και διπλασιασμός της έκφρασης του X στην αρσενική *Drosophila* (Kaiser et al., 2010). Ο μηχανισμός αντιστάθμισης-δόσης όμως στα περισσότερα είδη δεν δρα με απόλυτο τρόπο. Αν συνέβαινε αυτό η ανάγκη για την εξάλειψη των επιβλαβών μεταλλάξεων στο Y θα μειώνονταν και θα αυξάνονταν ο ρυθμός εκφυλισμού του (Furman et al., 2020).

1.3 Γονιδιακή σύσταση των φυλετικών χρωμοσωμάτων

Ο τρόπος με τον οποίο εξελίχθηκαν τα φυλετικά χρωμοσώματα θα διαλευκανθεί περαιτέρω με την πλήρη γνώση της γονιδιακής τους σύστασης. Βέβαια η προσέγγιση αυτή αντιμετωπίζει ένα μεγάλο εμπόδιο, αυτό του Y χρωμοσώματος, καθώς είναι ιδιαίτερα ετεροχρωματινικό και με πολλές επαναλήψεις. Γεγονός που καθιστά την αλληλούχησή του αρκετά δύσκολη (Mahajan et al., 2017).

Το Y χρωμόσωμα εμφανίζεται μόνο στα αρσενικά άτομα και όχι στα θηλυκά, οπότε προφανώς η εξελικτική πίεση δρα για την ύπαρξη και συντήρηση γονιδίων που αφορούν τα αρσενικά (Kaiser et al., 2010). Μελέτες στη *Drosophila* δείχνουν ότι το Y χρωμόσωμα περιέχει γονίδια που προσδίδουν πλεονέκτημα στο αρσενικό φύλο αλλά και γονίδια που εκφράζονται αποκλειστικά στους όρχεις, γεγονός που σημαίνει ότι είναι σημαντικά για την αναπαραγωγή και τη σπερματογένεση. Επίσης να σημειωθεί ότι στη *Drosophila* τα περισσότερα γονίδια που βρίσκονται στο Y χρωμόσωμα δεν προέρχονται από τα αυτοσωμικά υπεύθυνα για τη δημιουργία των φυλετικών χρωμοσωμάτων, αλλά αποκτήθηκαν αργότερα, αφού εγκαθιδρύθηκε ο πατρικός τρόπος κληρονομίας του Y (Mahajan et al., 2017). Βέβαια η *Drosophila* αποτελεί μία ιδιαίτερη περίπτωση, καθώς το Y δημιουργήθηκε αργότερα και το φύλο της δεν καθορίζεται από τη παρουσία του αλλά από την αναλογία των X χρωμοσωμάτων με τα αυτοσωμικά (Blackmon et al., 2014).

Το X χρωμόσωμα αντίστοιχα φέρει γονίδια που προσδίδουν πλεονέκτημα στο θηλυκό φύλο και εκφράζονται αποκλειστικά στις ωοθήκες. Βέβαια περιέχει επίσης φύλο-ανταγωνιστικά (sexually antagonistic) γονίδια, δηλαδή γονίδια που ευνοούν το ένα φύλο και είναι καταστροφικά για το άλλο. Το X αποτελεί κατάλληλο χώρο για αυτά, αφού υπάρχει και στα δύο φύλα. Εάν βρίσκονταν στο Y τυχόν γονίδια που θα έδιναν πλεονέκτημα στο θηλυκό φύλο θα εξαλείφονταν. Επίσης, επειδή το X είναι το φυλετικό χρωμόσωμα που κληρονομείται πιο συχνά, οποιοδήποτε γονίδιο προσδίδει πλεονέκτημα έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να

περάσει στους απογόνους και να εξαπλωθεί στον πληθυσμό (Kaiser et al., 2010). Ωστόσο, μετά την εγκαθίδρυση των φυλετικά ανταγωνιστικών γονιδίων, η εξέλιξη οδηγεί στη μειωμένη έκφρασή τους στο φύλο που δεν ευνοούν και στη δημιουργία sex-biased γονιδίων που εκφράζονται διαφορετικά στα αρσενικά και στα θηλυκά. Απόδειξη αυτού αποτελεί η μείωση των γονιδίων που ευνοούν το αρσενικό από το X χρωμόσωμα σε πολλά είδη της *Drosophila* όπως *D. simulans*, *D. yakuba*, *D. ananassae*, *D. virilis*, και *D. mojavensis* (Sturgill et al., 2007).

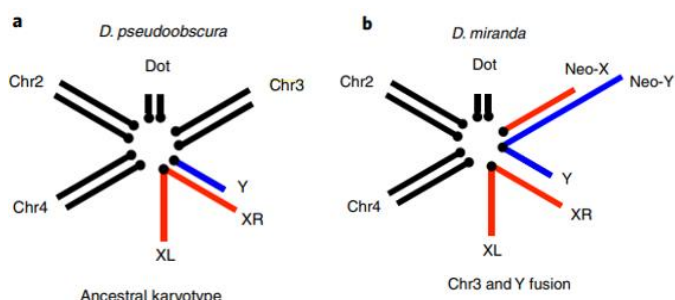
1.4 Νέο-φυλετικά χρωμοσώματα στην *Drosophila miranda*

Ένα πρόσφατο μοντέλο που επιβεβαιώνει τις εξελικτικές θεωρίες που έχουν γίνει για τα φυλετικά χρωμοσώματα και θα βοηθήσει στην περαιτέρω διαλεύκανσή τους είναι η περίπτωση της *Drosophila miranda*. Αφού διαχωρίστηκε από τη *Drosophila pseudoobscura* (Dobzhansky, 1935) πριν 1,5 εκατομμύρια χρόνια, μετά απέκτησε ένα νέο ζεύγος φυλετικών χρωμοσωμάτων που ονομάστηκαν Νέο-X και Νέο-Y. Ο σχηματισμός τους έγινε με σύντηξη των παλιών φυλετικών χρωμοσωμάτων με το αυτοσωμικό χρωμόσωμα 3 (chr3) της *D. pseudoobscura* (Zhou et al., 2012)

(Εικόνα 6). Το Νέο-Y χρωμόσωμα φαίνεται να είναι 3 φορές μεγαλύτερο από το Νέο-X, βέβαια το μεγάλο μέγεθός του οφείλεται κυρίως σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και μεταθετά στοιχεία. Συγκρίνοντάς τα με το χρωμόσωμα 3 της *D. pseudoobscura* που φέρει 3087 γονίδια, το Νέο-X φέρει 6448 και

το Νέο-Y 3253 γονίδια. Παρατηρείται ότι το Νέο-Y χρωμόσωμα φέρει παραπάνω γονίδια από το χρωμόσωμα 3, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τη θεωρία του εκφυλισμού του Y. Βέβαια 5% των γονιδίων του chr3 δεν απαντώνται στο Νέο-Y, ενώ υπάρχουν στο Νέο-X γεγονός που μας επαναφέρει στη θεωρία του εκφυλισμού (Bachtrog et al., 2019). Το ερώτημα που γεννάται όμως είναι από πού προήλθαν αυτά τα περισσότερα γονίδια στο Νέο-Y. Η απάντηση είναι ότι αποτελούν πολλαπλά αντίγραφα ή μέρη γονιδίων του chr3 (Bachtrog et al., 2020). Γενικά τα γονίδια του Νέο-Y υπόκεινται σε τρεις κατηγορίες: (1) Γονίδια που βρίσκονται μόνο στο Νέο-Y σε ένα αντίγραφο (single copy Y genes), (2) Γονίδια που βρίσκονται σε πολλά αντίγραφα στο Νέο-Y, αλλά σε ένα αντίγραφο στο Νέο-X (multi-copy Y genes) και (3) Γονίδια που έχουν ενισχυθεί και στα δύο φυλετικά χρωμοσώματα (co-amplified X/Y genes) (Bachtrog et al., 2019).

Οι δυνάμεις που οδηγούν αυτή την ενίσχυση των αντιγράφων των γονιδίων για τα multi-copy Y και co-amplified γονίδια είναι διαφορετικές. Αρχικά στην περίπτωση των multi-copy Y γονιδίων ένας λόγος μπορεί να είναι η συσσώρευση επαναλαμβανόμενων περιοχών και TEs, που μπορούν να οδηγήσουν σε ένδο-ομόλογο ανασυνδυασμό, με αποτέλεσμα την επέκτασή τους. Μία άλλη εξήγηση θα μπορούσε να είναι η επέκταση της ετεροχρωματίνης που ίσως οδηγεί στην αύξηση των αντιγράφων, για να αντισταθμιστεί η απώλεια (Bachtrog et al., 2019). Επίσης επειδή στα νέο-φυλετικά χρωμοσώματα δεν έχει

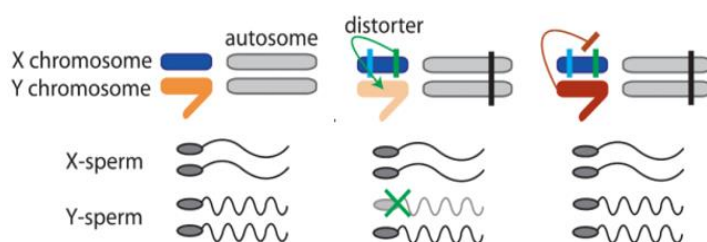


Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση των χρωμοσωμάτων των α) *D. pseudoobscura* και β) *D. miranda* (Bachtrog et al., 2019).

αναπτυχθεί πλήρως ακόμα το DC, το Νέο-Y χρωμόσωμα πιθανόν να φέρει περισσότερα αντίγραφα για να εξισορροπήσει την έκφραση των γονιδίων μεταξύ του Νέο-Y και Νέο-X (Zhou et al., 2013).

Σε ό,τι αφορά τα co-amplified γονίδια το πιο πιθανό σενάριο είναι να αφορούν ανταγωνισμό μεταξύ των δύο φύλων (Intragenomic Conflict). Εμφάνιση δηλαδή γονιδίων που κατευθύνουν με έναν άνισο τρόπο τη μείωση (meiotic drivers) στο Νέο-X. Πρόκειται για γονίδια που επηρεάζουν την κατανομή των φυλετικών χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση, ευνοώντας κάποιο συγκεκριμένο φύλο. Αυτό οδηγεί στη δημιουργία πληθυσμού με άνιση κατανομή των αρσενικών και

των θηλυκών, που μπορεί να οδηγήσει στην πλήρη εξαφάνισή του. Γι' αυτό το λόγο, η παρουσία τους οδηγεί στη δημιουργία ομόλογων γονιδίων καταστολέων (suppressors) στο Νέο-Y οι οποίοι θα καταστείλουν την



Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση των meiotic drivers (distorters), με πράσινο και των suppressors, με κόκκινο (Meiklejohn et al., 2010).

έκφραση των drivers με RNAi (**Εικόνα 7**) (Meiklejohn et al., 2010). Η συνεχής αύξηση των αντιγράφων μπορεί να εξηγηθεί αν αυτά τα γονίδια δρουν μέσω αντιστάθμισης δόσης, δηλαδή ο κάθε driver/suppressor αυξάνει τα αντίγραφα του, ώστε να ξεπεράσει την επίδραση του άλλου. Η υπόθεση αυτή για τα co-amplified γονίδια επιβεβαιώνεται με την παρατήρηση ότι εκφράζονται κυρίως στους όρχεις και ότι με ανάλυση οντολογίας φαίνεται να εμπλέκονται με τη διαδικασία της μείωσης και του διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων (Bachtrog et al., 2019).

1.5 Meiotic Driver genes και Meiotic Sex Chromosome Inactivation (MSCI)

Γενικά πρέπει να σημειωθεί ότι meiotic drivers δεν έχουν παρατηρηθεί μόνο στα νέο-φυλετικά χρωμοσώματα της *Drosophila miranda*. Υπάρχουν πολλά καλά χαρακτηρισμένα παραδείγματα που αποδεικνύουν την ύπαρξη γονιδίων με σχέση meiotic drivers/suppressors όπως η περίπτωση του συστήματος Stellate/Suppressor of Stellate (Ste/Su(Ste)) στη *Drosophila melanogaster* (Malone et al., 2015). Η ύπαρξη και η ανάγκη για την καταστολή τους σχετίζεται με τη δημιουργία του μηχανισμού Meiotic Sex Chromosome Inactivation (MSCI) (Meiklejohn et al., 2010). Ο ρόλος του είναι η καταστολή της μεταγραφής και η αύξηση της ετεροχρωματίνης στο X χρωμόσωμα κατά την μείωση. Το σήμα της έναρξης του MSCI φαίνεται να είναι το γεγονός ότι το X και το Y δε μπορούν να ζευγαρώσουν και να δημιουργήσουν σύναψη μεταξύ τους κατά την μείωση (Vibrantovski et al., 2014).

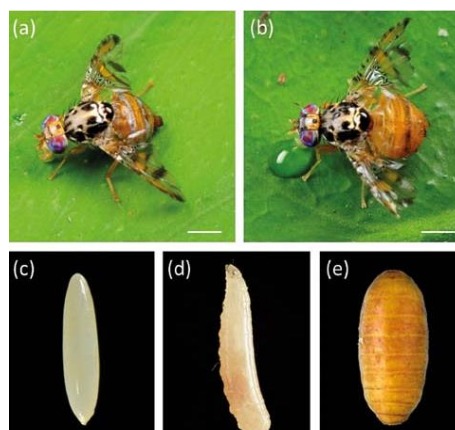
Αφού το MSCI αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του X κατά την παραγωγή των γαμετών, οι meiotic drivers δεν μπορούν να δράσουν και να ελέγξουν ποιο φυλετικό χρωμόσωμα θα περάσει στους γαμέτες (Bachtrog et al., 2020). Ωστόσο, το γεγονός ότι υπάρχουν ακόμα meiotic drivers που ξεφεύγουν από την αναστολή της μεταγραφής δείχνει ότι το MSCI δεν δρα και με τον πλέον βέλτιστο τρόπο. Επίσης, παρατηρείται ότι η ύπαρξη νέων ή και παλιών meiotic drivers που διαφεύγουν του MSCI, οδηγούν την εξέλιξη στην προώθηση της επέκτασής του σε περιοχές όπου δε λειτουργούσε και στη βελτίωση της

λειτουργίας του. Η επέκτασή του οδηγεί βέβαια πάλι σε άσκηση εξελικτικής πίεσης για τη δημιουργία νέων meiotic drivers, με αποτέλεσμα έναν φαύλο κύκλο. Όλο αυτό το φαινόμενο οδηγεί στη θεωρία της συν-εξέλιξης των δύο αυτών στοιχείων: MSCI και meiotic driver genes (Meiklejohn et al., 2010).

2. *Ceratitis capitata*

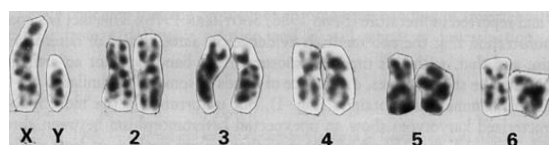
Αντικείμενο αυτής της πτυχιακής είναι η μελέτη του περιεχομένου του Y χρωμοσώματος στη μύγα της Μεσογείου (medfly) ή αλλιώς *Ceratitis capitata*.

Η *C. capitata*, με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των ενήλικων εντόμων, ανήκει στο γένος *Ceratitis* της οικογένειας Tephritidae της τάξης των Δίπτερων (De Meyer M, Freidberg A., 2006). Αποτελεί ένα ολομετάβολο έντομο, δηλαδή κατά τον κύκλο ζωής της περνάει από τέσσερα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια τα οποία έχουν διαφορετική μορφολογία: αυγό, τρία διαδοχικά στάδια προνύμφης, νύμφη και ενήλικο έντομο (Εικόνα 8) (Elqadhy et al., 2024). Κάθε γενιά έχει κύκλο ζωής που διαρκεί 30-40 μέρες, όμως ανάλογα τον ξενιστή, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και την ύπαρξη θηρευτών, μπορεί και να κρατήσει 18 μέρες ή και 3-4 μήνες (Ricalde et al., 2012) (Elqadhy et al., 2024). Θεωρείται «multivoltine» έντομο, δηλαδή έχει



Εικόνα 8. Αναπτυξιακά στάδια της *Ceratitis capitata*: a) Ενήλικο θηλυκό b) Ενήλικο αρσενικό c) Αυγό d) Προνύμφη e) Νύμφη (Giunti et al., 2023).

πολλαπλές γενεές κατά τη διάρκεια ενός έτους σε αντίθεση με τα «univoltine» έντομα που έχουν μόνο μία (De Meyer et al., 2002). Ο αριθμός τους κυμαίνεται από 3 έως 7 και εξαρτάται από την περιοχή, το κλίμα και το είδος του ξενιστή (Papadopoulos et al., 2008). Η μεσογειακή



Εικόνα 9. Καρυότυπος της *C. capitata* (Canovai et al., 1994).

μύγα φέρει πέντε ζεύγη αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων και ένα ζεύγος φυλετικών χρωμοσωμάτων XY (Εικόνα 9) (Canovai et al., 1994). Τα αρσενικά μπορούν να ζευγαρώσουν πολλές φορές στη ζωή τους, ενώ τα θηλυκά θεωρούνται ολιγογαμικά

(Elqadhy et al., 2024). Η προέλευσή της είναι από Νοτιοανατολική Αφρική, βέβαια έως σήμερα έχει επεκταθεί με ταχύτατο ρυθμό σε περιοχές ανάμεσα σε 45° Νότια και 45° Βόρεια γεωγραφικό πλάτος, γεγονός που μαζί με τις επιπτώσεις της παρουσίας της στις καλλιέργειες απαιτεί τον πληθυσμιακό της έλεγχο (Gasperi et al., 2002).

2.1 Φυλετικά χρωμοσώματα της *Ceratitis capitata*

Τα φυλετικά χρωμοσώματα της *C. capitata* ανήκουν στο σύστημα XX/XY, με το X να αποτελεί το μεγαλύτερο της χρωμόσωμα (Εικόνα 9) (Canovai et al., 1994). Το φύλο καθορίζεται από την παρουσία ή μη του Y χρωμοσώματος. Το Y διαθέτει ένα παράγοντα αρρενοποίησης M, που είναι απαραίτητος για τη γονιμότητα και την ανάπτυξη των αρσενικών (Zapater et al., 1986). Η ανακάλυψη του γονιδίου, υπεύθυνου για την έκφραση του έγινε το 2019 στο μεγάλο βραχίονα του Y χρωμοσώματος κοντά στο κεντρομερίδιο και ονομάστηκε MoY (maleness on

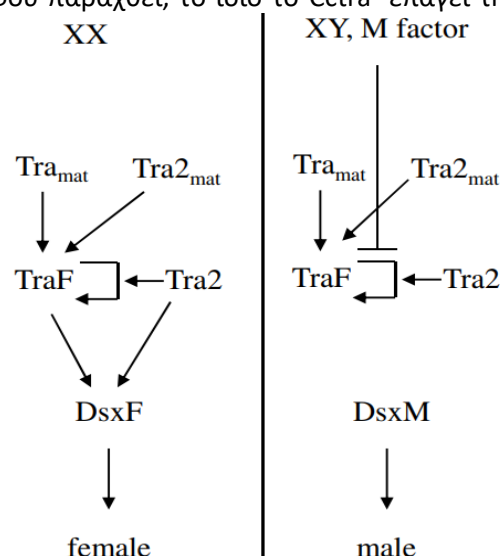
the Y), το οποίο είναι μέχρι και σήμερα το μόνο λειτουργικά χαρακτηρισμένο γονίδιο σε αυτό το χρωμόσωμα. Να σημειωθεί ότι στην περιοχή του υπάρχουν άλλες εννέα μεταγραφικές μονάδες, γεγονός που καθιστά την περιοχή ιδιαίτερα ευχρωματινική. Η έκφρασή του ξεκινά 2-3 ώρες μετά την εναπόθεση αυγών και κορυφώνεται την 15^η ώρα (Meccariello et al., 2019).

2.2 Φυλοκαθορισμός

Κατά το μοριακό μονοπάτι του φυλοκαθορισμού, το φύλο θα εξαρτηθεί από τον τρόπο που θα γίνει το μάτισμα του pre-mRNA του *Cctra* γονιδίου, το οποίο παρουσία του MoY οδηγεί σε μία ανενεργή πρωτεΐνη *Cctra*, εξαιτίας πρόωρων κωδικονίων λήξης καθορίζοντας το αρσενικό και απουσία του στη ισόμορφή *Cctra^F* που καθορίζει το θηλυκό (Pane et al., 2002). Η *Cctra* πρωτεΐνη είναι ένας παράγοντας ματίσματος, υπεύθυνος για την τύχη του επόμενου γονιδίου στο μονοπάτι φυλοκαθορισμού. Έτσι στη συνέχεια, ανάλογα με την απουσία ή την παρουσία λειτουργικής *Cctra* πρωτεΐνης, θα γίνει διαφορετικό μάτισμα του παράγοντα *Ccdsx* που θα καθορίσει το φύλο. Απουσία του *Cctra* το *Ccdsx* έχει τη μορφή *Ccdsx^M*, η οποία είναι και η αρχική του μορφή, υπεύθυνη για το αρσενικό, ενώ με τη παρουσία του *Cctra^F* θα γίνει μάτισμα που θα οδηγήσει στη μορφή *Ccdsx^F*, η οποία καθορίζει το θηλυκό φύλο (Εικόνα 10).

Το *Cctra* εκφράζεται 4-5 ώρες μετά την ωοαπόθεση, όμως στο αυγό υπάρχει ποσότητα μητρικού mRNA *Cctra^F* και *Cctra2*. Το *Cctra2* δρα συνεργατικά με το *Cctra* και ευνοεί το μάτισμα αυτού και του *Ccdsx* στη ισομορφή των θηλυκών εντόμων (Gabrieli et al., 2010) (Ruiz et al., 2007) (Salvemini et al., 2009). Βέβαια, η ποσότητα του μητρικού *Cctra^F* δεν είναι αρκετή για να εδραιώσει το θηλυκό φύλο (Gabrieli et al., 2010).

Αρχικά, όταν το έντομο είναι θηλυκό, το μητρικό *Cctra^F* επάγει την έκφραση του *Cctra* και ευνοεί το μάτισμα υπεύθυνο για τα θηλυκά. Αφού παραχθεί, το ίδιο το *Cctra^F* επάγει την έκφρασή του με ένα σύστημα θετικής ανατροφοδότησης, ώστε να υπάρχει σε σημαντική ποσότητα. Επίσης το μητρικό *Cctra2* ευνοεί και εκείνο αυτόν τον μηχανισμό. Μετά το *Cctra^F* με το *Cctra2* βοηθούν στο μάτισμα του *Ccdsx* προς την ισομορφή *Ccdsx^F* που καθορίζει το θηλυκό (Gabrieli et al., 2010). Στην περίπτωση των αρσενικών εκφράζεται ο παράγοντας MoY, για τον οποίο δεν είναι ακόμα γνωστή η λειτουργία του. Υπάρχουν ωστόσο υποθέσεις ότι εμποδίζει το μάτισμα, το θετικό κύκλο ανατροφοδότησης του *Cctra^F* και την δράση του *Cctra2*. Γενικά η παρουσία του οδηγεί σε απουσία του *Cctra*, η οποία οδηγεί στη διατήρηση της αρχικής ισόμορφης *Ccdsx^M* υπεύθυνη για το αρσενικό (Sarno et al., 2010).



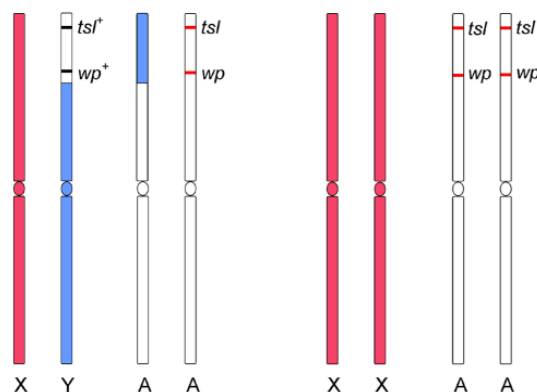
Εικόνα 10. Το μονοπάτι του φυλοκαθορισμού στη *C. capitata* στα θηλυκά και στα αρσενικά (Sarno et al., 2010).

2.3 Πληθυσμιακός έλεγχος

Η *Ceratitis capitata* αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά παράσιτα στον κόσμο για τις καλλιέργειες, καθώς προσβάλλει περισσότερα από 300 διαφορετικά φυτά ξενιστές (Giunti et al., 2023). Τα θηλυκά ενήλικα και οι προνύμφες τους προκαλούν άμεση καταστροφή στους καρπούς των ξενιστών τους, επηρεάζοντας την ποιότητά τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μη μπορούν να κυκλοφορήσουν στο εμπόριο και να πουληθούν (Elqadhy et al., 2024). Για αυτό το λόγο είναι απαραίτητος ο πληθυσμιακός της έλεγχος.

Ένας από τους κύριους τρόπους καταπολέμησης της ήταν η χρήση εντομοκτόνων, όπως τα οργανοφωσφωρικά με τη μορφή σπρέι ή αναμειγμένα με δόλωμα (Baronio et al., 2019). Βέβαια, ως γνωστόν, η επαναλαμβανόμενη χρήση των εντομοκτόνων οδηγεί σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας, καταστροφή περιβάλλοντος και προσβολή μη επιθυμητών εντόμων (Rohde et al., 2012a). Μία άλλη σκέψη ήταν ο βιολογικός έλεγχος, δηλαδή η απελευθέρωση παράσιτων της *C. capitata*, που γεννούν αυγά στο σώμα από τις προνύμφες και τις νύμφες και τις οδηγούν στο θάνατο (Suarez et al., 2012). Ωστόσο η μέθοδος αυτή για να έχει καλύτερο αποτέλεσμα πρέπει να συνδυαστεί και με άλλες μεθόδους (Sánchez et al., 2016).

Μία πιο φιλική προς το περιβάλλον ιδέα είναι η εφαρμογή της Τεχνικής Στείρων Εντόμων (Sterile Insect Technique: SIT). Η βάση της μεθόδου είναι η μαζική απελευθέρωση στείρων αρσενικών εντόμων, που ανταγωνίζονται τα άγρια αρσενικά και ζευγαρώνουν με τα άγρια θηλυκά, ώστε να προκληθεί μείωση του πληθυσμού (Juan-Blasco et al., 2014). Για την επιτυχία της SIT είναι απαραίτητη η απελευθέρωση μεγάλου αριθμού στείρων αρσενικών. Αυτό δημιούργησε την ανάγκη εύρεσης τρόπου διαχωρισμού του φύλου των εντόμων της μεσογειακής μύγας από πρώιμα αναπτυξιακά στάδια χωρίς να χρειάζεται η εκτροφή τους έως την ενηλικίωση. Έτσι δημιουργήθηκαν τα φύλο-γενετικά στελέχη (Genetic Sex Strain: GSS), που το επιτρέπουν (Dunn et al., 2017). Η δημιουργία τους βασίζεται στην ύπαρξη ενός μεταλλαγμένου υπολειπόμενου γονιδίου δείκτη στα αυτοσωμικά χρωμοσώματα, με ταυτόχρονη ύπαρξη του φυσιολογικού γονιδίου στο χρωμόσωμα Y. Το γονίδιο αυτό θα πρέπει να ευθύνεται για κάποιο χαρακτηριστικό φαινότυπο που θα καθορίσει τη διαλογή. Δύο γονίδια που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι το *tsl* (*temperature sensitive lethal*) και το *wp* (*white pupa*) (Εικόνα 11). Στην περίπτωση του *tsl*, τα αυγά των θηλυκών ατόμων που είναι ομόζυγα για το υπολειπόμενο αλληλόμορφο πεθαίνουν μετά από επώαση στους 34°C, ενώ τα αρσενικά που φέρουν το φυσιολογικό αλληλόμορφο στο Y είναι ανθεκτικά στις υψηλές θερμοκρασίες. Από την άλλη το αγρίου τύπου γονίδιο *wp* είναι υπεύθυνο για το καφέ χρώμα της νύμφης. Έτσι, οι νύμφες των θηλυκών ατόμων που είναι ομόζυγα για το υπολειπόμενο γονίδιο είναι άσπρες, ενώ των αρσενικών που φέρουν ένα αντίγραφο του φυσιολογικού γονιδίου στο Y χρωμόσωμα είναι καφέ (Morrison et al., 2010).



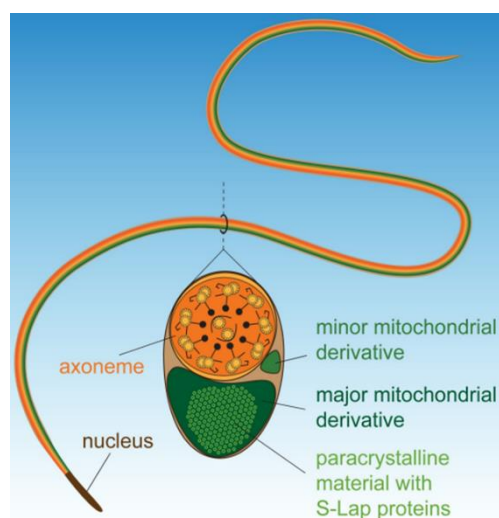
Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση της θέσης των μεταλλαγμένων και των φυσιολογικών γονιδίων *tsl* (*temperature sensitive lethal*) και *wp* (*white pupa*) στα χρωμοσώματα της *C. capitata* (Morrison et al., 2010).

3. Κυτοσολική Αμινοπεπτιδάση

Η κυτοσολική αμινοπεπτιδάση αποτελεί ένα γονίδιο του οποίου η λειτουργία αποδεδειγμένα σχετίζεται με την παραγωγή του σπέρματος, δηλαδή την γονιμότητα των αρσενικών σε κάποιους οργανισμούς.

3.1 Σχέση της Sperm-Leucylaminopeptidase (S-Lap) με τη γονιμότητα στη *Drosophila*

Αρκετά ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση της άμεσης σχέσης του αυτοσωμικού γονιδίου της Sperm-Leucyl Aminopeptidase (S-Lap) με τη γονιμότητα των αρσενικών εντόμων στη *Drosophila*. Η Sperm-Leucylaminopeptidase (S-Lap) αποτελεί μία μέταλλο-πρωτεάση που κόβει κατάλοιπα λευκίνης από το N-τελικό άκρο πεπτιδίων και πρωτεϊνών (Matsui et al., 2006). Στη *Drosophila* είναι μέλος μίας οικογένειας γονιδίων (gene family) που αποτελείται από 8 μέλη (S-Lap 1-8), όπου όλα εμφανίζουν εξειδικευμένη έκφραση στους όρχεις. Μετά από εφαρμογή πρωτεομικής ανάλυσης βρέθηκε ότι αποτελούν μία από τις κύριες πρωτεΐνες του σπέρματος (Laurinyecz et al., 2019) (Wasbrough et al., 2010) και πιο συγκεκριμένα εντοπίστηκαν στην παρακρυσταλλίνη (Εικόνα 12). Η παρακρυσταλλίνη είναι η κύρια ουσία του μιτοχονδρίου του σπέρματος και ο ρόλος της δεν είναι ακόμα γνωστός (Laurinyecz et al., 2019). Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι ότι με τη σίγηση οποιουδήποτε S-Lap γονιδίου σε αρσενικά έντομα παρατηρήθηκε στérρος φαινότυπος. Η ανάλυση του σπέρματος των μεταλλαγμένων εντόμων έδειξε μη φυσιολογική ανάπτυξη του μιτοχονδρίου του σπέρματος μαζί με διαταραγμένη κατανομή και μείωση της ουσίας της παρακρυσταλλίνης. Σημαντικό είναι επίσης ότι η ανώμαλη ανάπτυξη του μιτοχονδρίου μπορεί να οδηγήσει σε επίσης ανώμαλη κίνηση των individualization complexes (ICs). Τα ICs είναι πολύ σημαντικά για τη σπερματογένεση, καθώς βοηθούν στο διαχωρισμό των σπερματίδων σε ώριμα σπερματοζωάρια (Ben-David et al., 2015). Έτσι δημιουργήθηκε η θεωρία ότι και οι 8 S-Lap είναι σημαντικές για την ομαλή ανάπτυξη του μιτοχονδρίου και κατ' επέκταση του σπέρματος για ένα γόνιμο αρσενικό έντομο (Laurinyecz et al., 2019).

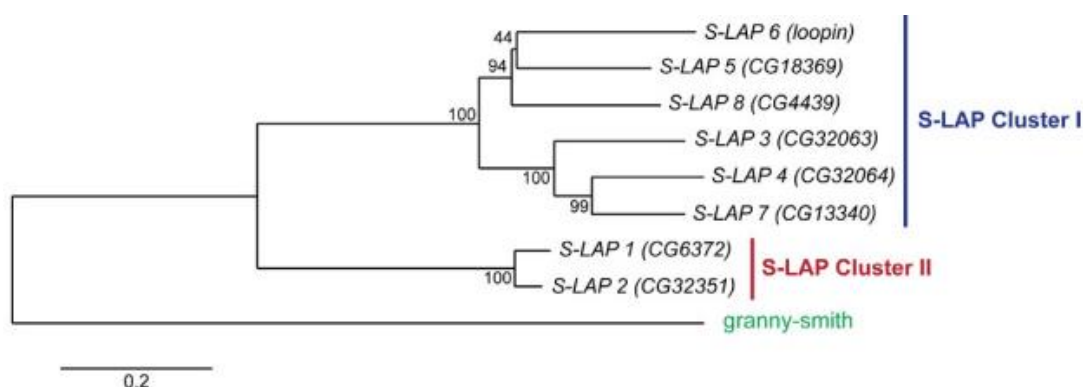


Εικόνα 12. Απεικόνιση του σπερματοζωαρίου της *Drosophila* (Laurinyecz et al., 2019).

Ενδιαφέρον είναι επίσης ότι παρόμοιο φαινόμενο παρατηρείται και στο κουνούπι *Aedes aegypti*. Η leucine aminopeptidase (LAP), γονίδιο ορθόλογο της S-Lap της *Drosophila*, παρατηρείται ότι είναι μία από τις κύριες πρωτεΐνες του σπέρματος των αρσενικών κουνουπιών με εξειδικευμένη έκφραση στους όρχεις, όπου η σίγησή του οδηγεί σε μειωμένο ποσοστό εκκόλαψης (hatching %) (Sun et al., 2024).

3.2 Εξελικτική απόκτηση νέου ρόλου για το γονίδιο S-Lap στη *Drosophila*

Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση ότι κατά την επέκταση της οικογένειας γονιδίων S-Lap στη *Drosophila* φαίνεται να χάνεται η ενζυμική τους δραστηριότητα και να αποκτούν ένα νέο ρόλο στο σπέρμα (Laurinyecz et al., 2019). Οι S-Laps μέσα από διπλασιασμούς έχουν δημιουργήσει δύο clusters στο γονιδιόμα: Cluster I που περιέχει τις S-Laps 3 έως 8 και Cluster II που περιέχει τις S-Laps 1 και 2 (Εικόνα 13). Η διαφοροποίηση του ρόλου τους αποδείχθηκε από μελέτες των S-Lap 1 και S-Lap 6 σε βακτήρια, όπου φάνηκε να μην εμφανίζουν ενζυμική δραστηριότητα. Επίσης βρέθηκε ότι το ενεργό κέντρο των S-Laps έχει αλλάξει αρκετά και έχει αντικατασταθεί από αμινοξέα που δεν καθιστούν δυνατή την σύνδεση Zn^{2+} και τον συντονισμό δισθενών κατιόντων (Dorus et al., 2011).



Εικόνα 13. Φυλογενετικό δένδρο που απεικονίζει την εξέλιξη των *D. melanogaster* S-Laps και της *granny-smith* (πιο κοντινό παράλογο γονίδιο στην οικογένεια γονιδίων S-Laps) (Dorus et al., 2011)

3.3 Παρουσία γονιδίων γονιμότητας σε επαναλήψεις στο Y χρωμόσωμα

Αξίζει να σημειωθεί μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση που αφορά το γονίδιο S-Lap 1 στη *Drosophila pseudoobscura*. Στο πλαίσιο μιας έρευνας για την αναζήτηση meiotic drivers στο γένος *Drosophila* βρέθηκαν 46 γονίδια που υπήρχαν σε πολλαπλά αντίγραφα στο χρωμόσωμα Y αλλά και στο X (co-amplified genes). Οι ερευνητές έδωσαν έμφαση στο γονίδιο S-Lap 1 στη *D. pseudoobscura*. Μέσα από πειράματα σίγησης των Y-linked αντιγράφων του γονιδίου παρατήρησαν αυξημένη θηλυκή κατανομή στον πληθυσμό (female-based ratio) των απογόνων σε σχέση με το κοντρόλ. Επίσης, με ανάλυση δεδομένων RNAseq από όρχεις αρσενικών εντόμων αγρίου τύπου παρατηρήθηκαν νοηματικά και αντινοηματικά μεταγράφα S-Lap 1 (Ellison et al., 2018).

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα αποδείχθηκε ότι τα X-linked αντίγραφα του γονιδίου S-Lap1 αποτελούν meiotic drivers που κατευθύνουν την παραγωγή θηλυκών γαμετών κατά τη μείωση. Το γεγονός αυτό διαμόρφωσε την ανάγκη δημιουργίας πολλαπλών ομόλογων αντιγράφων στο Y (S-Lap 1 Y-linked copies) που θα έχουν ρυθμιστική δράση ως καταστολείς των αντιγράφων του X, μέσω RNA interference (RNAi). Αυτό αποδεικνύεται από τη παρατήρηση νοηματικών και αντινοηματικών μεταγράφων S-Lap 1 στους όρχεις (Ellison et al., 2018). Η απόδειξη της συσχέτισης του γονιδίου S-Lap 1 με τον ανταγωνισμό μεταξύ των δύο φύλων (Intragenomic Conflict) μπορεί να εξηγήσει τον πολλαπλό αριθμό αντιγράφων στο Y αλλά και στο X, καθώς πολλές φορές αυτά τα γονίδια δρουν μέσω του φαινομένου αλληλορύθμισης της έκφρασης (Bachtrog et al., 2019).

Το φαινόμενο της εμφάνισης γονιδίων γονιμότητας σε επαναλήψεις στο Y χρωμόσωμα δεν περιορίζεται μόνο στα *Drosophilidae*, αλλά εμφανίζεται και σε άλλα συστήματα φυλετικών χρωμοσωμάτων, όπως αυτό των *Terphritidae*. Πιο συγκεκριμένα αφορά την περίπτωση του γονιδίου GYF της *Bactrocera dorsalis*. Το γονίδιο GYF θεωρείται ότι μεταφέρθηκε από το X στο Y όπου και υπέστη τις αλλαγές που οδήγησαν στη μορφή *tyro-gyf*. Το *tyro-gyf* αποτελεί ένα μικρότερο σε μήκος παράλογο του γονιδίου GYF που υπάρχει σε πολλά αντίγραφα στο Y χρωμόσωμα. Η πιο σημαντική παρατήρηση είναι ότι η σίγηση του αυτοσωμικού γονιδίου οδήγησε σε μειωμένη παραγωγή σπέρματος και ανώμαλη ανάπτυξη όρχεων στα αρσενικά, γεγονός που συνδέει το γονίδιο με τη γονιμότητα των αρσενικών, το οποίο μπορεί να δικαιολογήσει τη μεταφορά του στο Y χρωμόσωμα (Choo et al., 2019) (Liu et al., 2024).

4. RNA interference στα έντομα

Ένα χρήσιμο εργαλείο που επιτρέπει τη λειτουργική μελέτη γονιδίων είναι το RNA interference (RNAi).

4.1 Μηχανισμός δράσης RNA interference (RNAi)

Το RNA interference (RNAi) είναι ένας φυσιολογικός μηχανισμός, που υπάρχει στους ευκαρυώτες και ρόλος του είναι η άμυνα έναντι των ιών, η ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων και η προστασία του γονιδιώματος από τρανσποζόνια (Christiaens et al., 2020). Το RNAi ενεργοποιείται από την παρουσία συνήθως δίκλωνων μορίων sRNAs (small RNAs), εξωγενών ή ενδογενών, τα οποία θα κοπούν σε μικρότερα τμήματα. Τα μικρά RNAs μπορούν να συνδεθούν σε εξωγενή ή ενδογενή μόρια με βάση τη συμπληρωματικότητα της αλληλουχίας τους με την αλληλουχία στόχο. Στη συνέχεια, η συμπληρωματικότητα αυτή οδηγεί στην αποικοδόμηση των μορίων στόχων. Το RNAi έχει τρία διαφορετικά μονοπάτια που μπορεί να ακολουθήσει ανάλογα του είδους RNA που το επάγει: το siRNA, το miRNA και το piRNA (Ortolá, B., & Daròs, J., 2024).

4.1.1 siRNAs

Το πρώτο κύριο μονοπάτι του μηχανισμού RNAi ρυθμίζεται από τα siRNAs (Εικόνα 14) (Ortolá, B., & Daròs, J., 2024). Η επαγωγή του γίνεται από απόλυτα συμπληρωματικά δίκλωνα μόρια RNA (dsRNAs) τα οποία έχουν είτε ενδογενή (esiRNAs) είτε εξωγενή προέλευση, δηλαδή από RNA ιών (Wang et al., 2006). Τα esiRNAs μπορούν να προκύψουν από μεταθετά στοιχεία, γονίδια με αναστροφές επαναλήψεις και από mRNAs με αλληλεπικαλυπτόμενες περιοχές (Chung et al., 2008)(Ghildiyal et al., 2008). Έχουν ως στόχο τη σταθερότητα του γονιδιώματος και τη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με βιολογικές διαδικασίες όπως η ενεργειακή ομοιόσταση και η αντιμετώπιση του στρες (Lucchetta et al., 2009) (Lim et al., 2011).

Τα dsRNAs αναγνωρίζονται από την ειδική ενδοριβονουκλεάση Dicer-2, που δημιουργεί siRNAs με μήκος 20-22nt και 2 προεξέχοντα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο (Bernstein et al., 2001). Η Dicer-2 αποτελείται από 6 επικράτειες (Lau et al., 2012):

1. N-τελική ελικάση
2. Κεντρική dsRNA-binding domain (dsRBD)
3. Platform

4. PAZ
5. 2 RNase III (RNase IIIa and IIIb)
6. C-τελική dsRBD

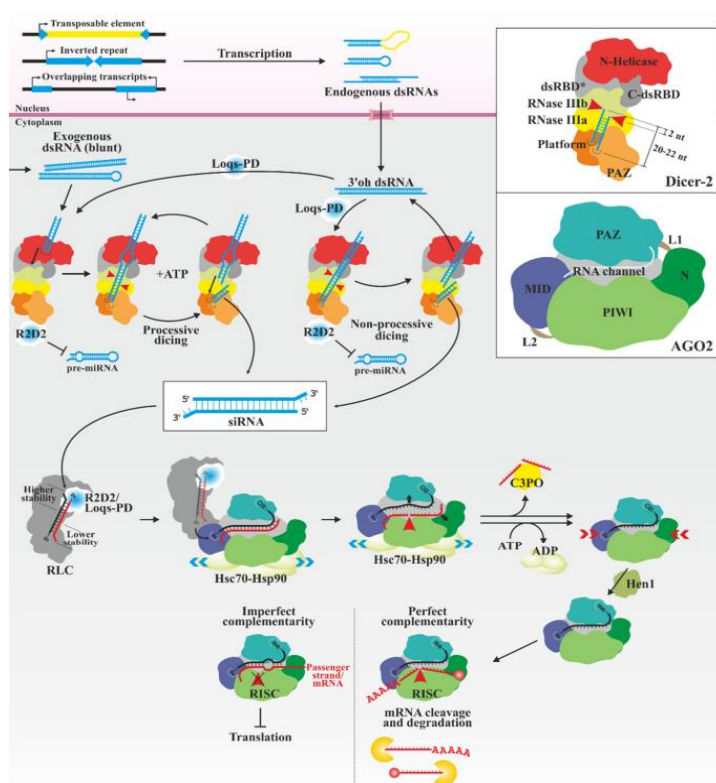
Ανάλογα με τη μορφή των dsRNAs η Dicer-2 λειτουργεί με 2 μηχανισμούς.

Πρώτος μηχανισμός: η ελικάση αναγνωρίζει δίκλωνο μόριο RNA με τυφλά άκρα (προέρχονται συνήθως από ιούς) και χρησιμοποιεί ενέργεια από ATP για να το ξετυλίξει. Μετά το τοποθετεί με τέτοιο τρόπο, ώστε το άκρο του να βρίσκεται στην επικράτεια PAZ και αρχίζει και παράγει siRNA κόβοντας από τη μία πλευρά έως την άλλη χωρίς να απελευθερώσει το dsRNA (Welker et al., 2011).

Δεύτερος μηχανισμός: Οι επικράτειες PAZ/Platform αλληλεπιδρούν με το δίκλωνο μόριο RNA με προεξέχοντα άκρα (συνήθως προκύπτει από κόψιμο από RNase III), χωρίς τη χρήση ATP. Μετά από κάθε κόψιμο, το dsRNA απελευθερώνεται και αναγνωρίζεται ξανά από το σύμπλοκο, για να κοπεί πάλι (Welker et al., 2011).

Από τις δύο αλυσίδες των siRNA, η μία θα συνδεθεί στο RNA-induced silencing complex (RISC) και θα αποτελέσει την αλυσίδα οδηγό (guide) και η άλλη, η passenger αλυσίδα, θα καταστραφεί (Rand et al., 2005). Η αλυσίδα οδηγός είναι εκείνη όπου σύμφωνα με την αλληλουχία της θα γίνει η αναζήτηση του στόχου. Η επιλογή της γίνεται στο RISC σύμφωνα με τον κανόνα θερμοδυναμικής ασυμμετρίας, δηλαδή η αλυσίδα που το 5' άκρο της συνδέεται λιγότερο σταθερά με την αλληλουχία στόχο (Schwarz et al., 2003). Μετά η guide φορτώνεται στην AGO2, πρωτεΐνη με πολλές

επικράτειες σε δύο λοβούς που δημιουργούν ένα κανάλι μέσα από το οποίο μπαίνει το dsRNA. Οι επικράτειες της είναι οι: 1.PAZ 2.MID και 3.PIWI (Song et al., 2003). Η AGO2 αλληλεπιδρά με το RISC σύμπλοκο και επιτρέπουν στη MID να αναγνωρίσει και να συνδεθεί με το 5' άκρο του guide μεταφέροντας το dsRNA. Η PIWI κόβει το passenger RNA (Wang et al., 2008), που απομακρύνεται με τη βοήθεια της ενδονουκλεάσης C3PO (component three promoter of RISC) (Liu et al., 2009). Μετά, αν δεν υπάρχουν μη ειδικές συνδέσεις μεταξύ του guide και του mRNA στόχου που αναγνωρίζει, η PIWI κόβει το mRNA, ώστε να προκύψουν

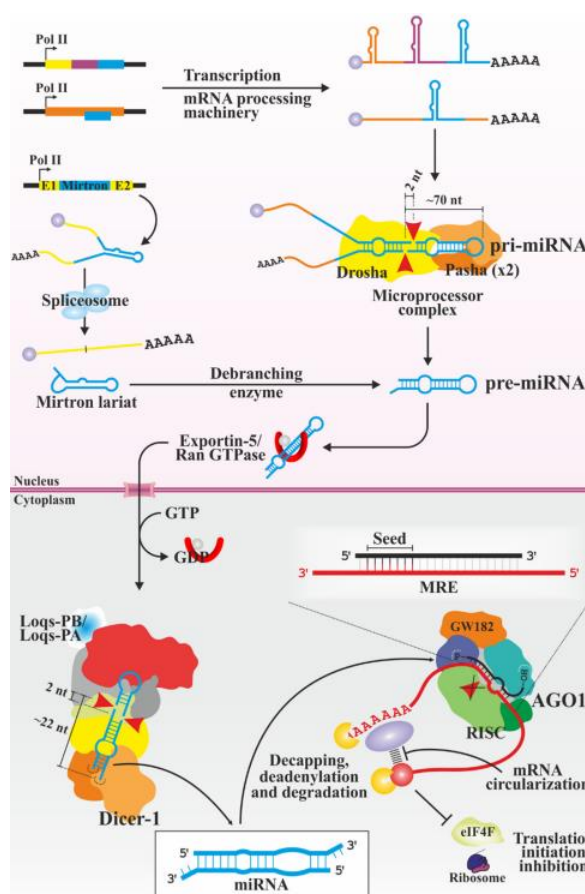


Εικόνα 14. Μονοπάτι RNAi για την παραγωγή siRNAs στα έντομα (Ortolá, B., & Daròs, J., 2024).

δύο μόρια RNA που είτε δεν έχουν polyA ουρά είτε Cap , με αποτέλεσμα να καταστρέφονται από εξωνουκλεάσες (Lima et al., 2016).

4.1.2 miRNA

Το πιο συχνό μονοπάτι είναι αυτό των miRNAs (**Εικόνα 15**) τα οποία ελέγχουν πολλές βιολογικές διαδικασίες όπως αναπαραγωγή, ανάπτυξη και ανοσολογική απόκριση (Brennecke et al., 2003) (Cao et al., 2024). Τα δίκλωνα μόρια RNA που διεγείρουν το μονοπάτι προκύπτουν από μεταγραφή πολυκιστρονικών RNA ή από ενδογονιδιακές περιοχές του γονιδίου που ελέγχουν (Ortolá, B., & Daròs, J., 2024). Ένα μέρος τους βέβαια προέρχεται και από ιντρόνια, τα λεγόμενα «mirtrons» (Okamura et al., 2007). Τα RNAs μεταγράφονται από την RNA pol II σε pre-miRNA με polyA ουρά και Cap και έχουν ένα κλασικό σχήμα hairpin. Η επεξεργασία τους πραγματοποιείται στον πυρήνα με την type-III ριβονουκλεάση Drosha και την dsRNA binding protein (dsRBP), Pasha που δημιουργούν το σύμπλοκο Microprocessor. Οι δύο Rnase III επικράτειες της Drosha κόβουν τα μονόκλωνα τμήματα των hairpins αφήνοντας δύο προεξέχοντα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο (Church et al., 2017). Εναλλακτικά για την ωρίμανση των mirtrons βοηθά το spliceosome (Okamura et al., 2007). Μετά το pre-miRNA μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα με τη βοήθεια της Exportin-5 μαζί με την Ran GTPase (Shibata et al., 2006). Στην περιοχή του κυτταροπλάσματος επεξεργάζεται από την Dicer-1 (Lee et al., 2004). Η επικράτεια PAZ της Dicer-1 μετράει το μήκος του pre-miRNA, όπου μόνο αν είναι επαρκές, η Rnase θα κόψει και θα δημιουργήσει miRNA με μήκος 22nt (Tsutsumi et al., 2011). Μετά το miRNA φορτώνεται στο σύμπλοκο RISC που περιέχει την AGO1 και η επιλογή της guide αλυσίδας γίνεται όπως με τα siRNAs (Okamura et al., 2004). Το miRNA ανοίγει με τη βοήθεια της ελικάσης και η αλυσίδα passenger δεν κόβεται απλώς απομακρύνεται. Έτσι η guide αλυσίδα συνδέεται με το mRNA στόχο, με αποτέλεσμα το μετά-μεταγραφικό έλεγχο της έκφρασης (Ortolá, B., & Daròs, J., 2024).



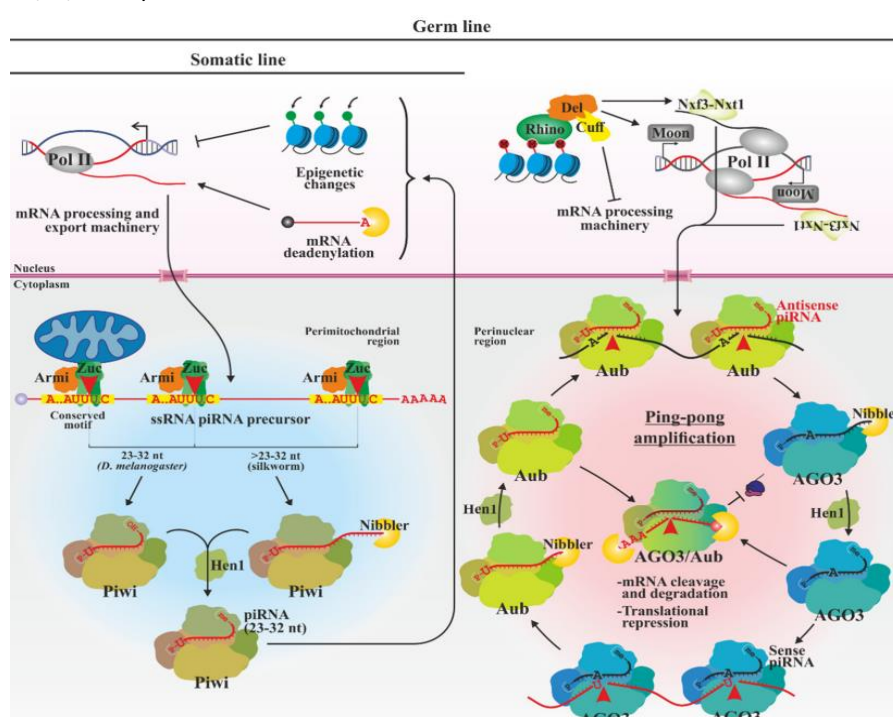
Εικόνα 15. Μονοπάτι RNAi για την παραγωγή miRNAs στα έντομα (Ortolá, B., & Daròs, J., 2024).

4.1.3 piRNA

Τελευταίο μονοπάτι αποτελεί αυτό των piRNAs (μήκος 23–32 nt) (**Εικόνα 16**) το οποίο πραγματοποιείται σε γαμετικά και σωματικά κύτταρα. Η επαγωγή του οφείλεται σε μονόκλωνα μόρια RNA (sRNAs) που προκύπτουν από επαναλαμβανόμενες περιοχές μεταξύ

γονιδίων ή τρानσποζόνια. Μεταγράφονται με τη βοήθεια της RNA pol II και επεξεργάζονται σαν κανονικά mRNA (Sato et al., 2020). Στη συνέχεια μπορούν να ακολουθήσουν δυο μηχανισμοί για την παραγωγή piRNAs, στα σωματικά συμβαίνει μόνο ο πρώτος και στα γαμετικά κύτταρα και οι δύο (Ortolá, B., & Daròs, J., 2024).

Πρώτος Μηχανισμός: Το μονόκλωνο RNA μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα όπου θα αναγνωριστεί εξαιτίας ειδικών μοτίβων και θα κοπεί από την ενδονουκλεάση Zucchini (Zuc) με τη βοήθεια και άλλων παραγόντων όπως της πρωτεΐνης Armitage. Έτσι δημιουργούνται τα piRNAs, τα οποία θα φορτωθούν στη PIWI (Malone et al., 2009). Η ωρίμανση γίνεται με μεθυλίωση στο 3' άκρο από την Hen1 μεθυλοτρανσφεράση (Horwich et al., 2007). Η PIWI που φέρει το piRNA δρα κυρίως στον πυρήνα, όπου μπορεί να δημιουργήσει επιγενετικές τροποποιήσεις, και αποαδενυλίωση mRNA που προκύπτουν από μεταθετά στοιχεία (Ortolá, B., & Daròs, J., 2024)



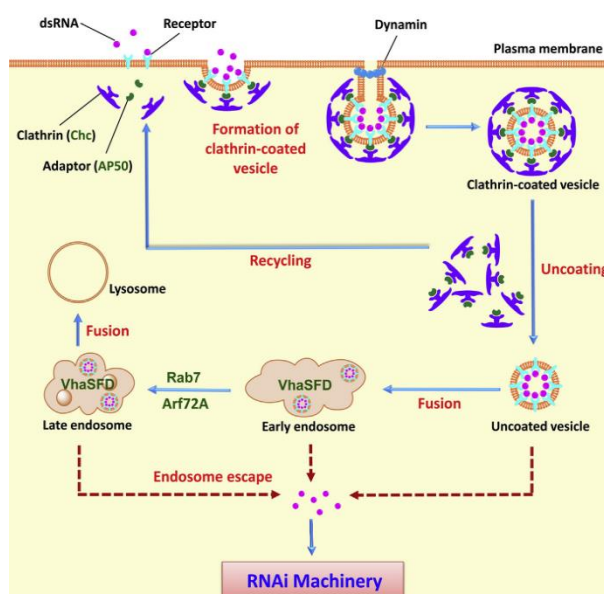
Εικόνα 16. Μονοπάτι RNAi για την παραγωγή piRNAs στα έντομα (Ortolá, B., & Daròs, J., 2024).

Δεύτερος Μηχανισμός: Η περιοχή από την οποία προέρχεται το μονόκλωνο RNA μπορεί να παράγει μονόκλωνα μόρια και από τις δύο κατευθύνσεις. Οι περιοχές αυτές (συνήθως με ιστόνες H3K9me3) αναγνωρίζονται από την πρωτεΐνη Rhino, που χρησιμοποιεί τη Deadlock, ως ικρίωμα για τη προσέλκυση πρωτεϊνών που θα βοηθήσουν στη έξοδο του RNA από τον πυρήνα (Mohn et al., 2014). Μετά το sRNA φορτώνεται στη πρωτεΐνη Aub, η οποία το αναγνωρίζει σύμφωνα με συμπληρωματικά αντινοσηματικά guide RNAs που έχει, και το κόβει για να δημιουργήσει piRNAs. Στη συνέχεια το piRNA μεταφέρεται στην AGO3, όπου ολοκληρώνεται η ωρίμανση τους με μεθυλίωση στο 3' άκρο από την Hen1 μεθυλοτρανσφεράση (Horwich et al., 2007). Τα ώριμα piRNAs λειτουργούν σαν οδηγό για την κοπή mRNA στόχων, όπου τα προϊόντα τους θα αποτελέσουν νέα anti-sense RNAs για την παραγωγή και άλλων ώριμων piRNAs, γεγονός που ονομάζεται «ring-pong mechanism». Στόχος του μηχανισμού αυτού είναι η σίγηση, η καταστολή μετάφρασης και η επαγωγή αποικοδόμησης του mRNA (Ortolá, B., & Daròs, J., 2024).

4.2 Πρόσληψη των δίκλωνων μορίων RNAs (dsRNAs) από το κύτταρο και Συστημική κατανομή του σήματος σίγησης

Υπάρχουν δύο κατηγορίες RNAi, το κύτταρο-αυτόνομο RNAi που αποτελεί όλες τις διαδικασίες που συμβαίνουν στο κύτταρο και το μη- κύτταρο-αυτόνομο RNAi που αφορά τις διαδικασίες πριν και μετά την ενεργοποίηση του, δηλαδή την πρόσληψη dsRNAs στο κύτταρο (περιβαλλοντικό RNAi) και τη μεταφορά του μηνύματος της σίγησης και σε άλλα κύτταρα του οργανισμού (συστημικό RNAi) (Joga et al., 2016).

Για την επιτυχή σίγηση του επιθυμητού γονιδίου είναι απαραίτητο αρχικά το δίκλωνο RNA να εισχωρήσει στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Στα δίπτερα, κολεόπτερα και ορθόπτερα η είσοδος των δίκλωνων μορίων RNA γίνεται με ενδοκύττωση εξαρτώμενη από κλαθρίνη (Cooper et al., 2018). Η αναγνώριση των μορίων γίνεται με τη βοήθεια των υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων (PRRs) και η ενδοκυττάρωση με τους υποδοχείς SR-CI και Eater (Saleh et al., 2006). Μετά την ενδοκύττωση το dsRNA απελευθερώνεται από το κυστίδιο στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 17) (Xiao et al., 2015). Κάποια έντομα μετά την παροχή dsRNA μπορούν να οδηγήσουν στη δημιουργία μιας



Εικόνα 17. Μηχανισμός πρόσληψης dsRNA στο κύτταρο με ενδοκυττάρωση εξαρτώμενη από κλαθρίνη (Xiao et al., 2015).

συστημικής απόκρισης με κίνηση σήματος RNAi σε μικρή και μεγάλη απόσταση (Ortolá, B., & Daròs, J., 2024). Το σήμα μεταφέρεται μέσω μεμβρανικών προεξοχών που ονομάζονται tunneling nanotubes (TnTs) και συνδέουν τα κύτταρα. Η ιογενής μόλυνση σε κυτταρικές καλλιέργειες *D. melanogaster* προκαλεί το σχηματισμό αυτών των δομών που μεταφέρουν dsRNA και συστατικά του μηχανισμού RNAi (Karlikow et al., 2016). Για μεγάλες αποστάσεις η μεταφορά γίνεται μέσω της αιμολέμφου, με τη βοήθεια μορίων φορέων (carrier molecules) που τα προστατεύουν από την αποικοδόμηση. Τα μόρια αυτά είναι οι απολιποφορίνες και η ύπαρξη τους έχει αποδειχθεί σε ορθόπτερα, βλαπτοειδή και δίπτερα (Wynant et al., 2014)(Ortolá, B., & Daròs, J., 2024). Οι απολιποφορίνες είναι πρωτεϊνικά συστατικά της λιποφορίνης, σύμπλοκα αιμολυμφικής λιποπρωτεΐνης που λειτουργούν στη μεταφορά λιπιδίων και αποτελούν επίσης μέρος της αντιϊκής άμυνας των εντόμων (Ortolá, B., & Daròs, J., 2024).

4.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση του RNAi

Το dsRNA χορηγείται στο έντομο με ένεση ή μέσω της τροφής, άρα αρχικά έρχεται σε επαφή είτε με την αιμολέμφο είτε με τα περιεχόμενα του στομάχου αντίστοιχα. Το περιεχόμενο και η φυσιολογία των σωματικών αυτών υγρών επηρεάζουν σημαντικά τη σταθερότητα του dsRNA. Ένας κύριος λόγος είναι ότι περιέχουν dsRNases, δηλαδή ένζυμα που έχουν την δυνατότητα να το αποικοδομούν (Ortolá, B., & Daròs, J., 2024). Έχει αποδειχθεί ότι με την

καταστολή τους, αυξάνεται η αποδοτικότητα του RNAi στο *Leptinotarsa decemlineata* (Spit et al., 2017). Η έκφραση τους εξαρτάται από την παρουσία dsRNA αυξάνοντας την και από το στάδιο ζωής του εντόμου, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει τη διαφορά αποδοτικότητας του μηχανισμού RNAi ανάλογα αυτό (Cooper et al., 2018). Σε ό,τι αφορά τη φυσιολογία των σωματικών υγρών, το pH της αιμολέμφου είναι σχετικά σταθερό μεταξύ των εντόμων (pH 6.4-7.5), ενώ στον αυλό του εντέρου ποικίλει (Harrison, J. F. 2001). Το pH επηρεάζει τη δραστηριότητα των dsRNases και τη σταθερότητα του dsRNA καθώς σε αλκαλικό περιβάλλον (>6) είναι ευαίσθητα σε αλκαλική υδρόλυση, ενώ σε όξινο (<2) ευαίσθητο σε αποπουρίνωση (Cooper et al., 2018). Το καλύτερο pH για σταθερό RNA είναι 4-5 (Bernhardt et al., 2012).

Για επιτυχής σίγηση το dsRNA πρέπει επίσης να μπορέσει να εισέλθει μέσα στα κύτταρα και να έρθει σε επαφή με τον μηχανισμό του RNAi που βρίσκεται μέσα σε κυστίδια, τα GW-bodies (Jakymiw, et al., 2005), που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και κολλημένα σε μεμβρανικά οργανίδια. Αρχικά η είσοδος των δίκλωνων μορίων RNA είναι εξαρτώμενη από το μήκος τους, με ελάχιστο μήκος 60-100 ζευγών βάσεων (Saleh et al., 2006). Από την άλλη για να έρθουν σε επαφή με το μηχανισμό του RNAi στο κυτταρόπλασμα είναι απαραίτητη η διαφυγή τους από το ενδόσωμα, καθώς εάν παραμείνουν εκεί θα αποδομηθούν (Ortolá, B., & Daròs, J., 2024). Έχει αποδειχθεί ότι εμποδίζοντας την σύντηξη του ενδοσώματος με το λυσόσωμα στη *D. melanogaster* αυξάνεται η αποτελεσματικότητα της σίγησης (Lee et al., 2009).

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η λειτουργική ανάλυση του αυτοσωμικού γονιδίου της κυτοσολικής αμινοπεπτιδάσης της *Ceratitis capitata*, με την εφαρμογή RNA interference. Τμήμα του γονιδίου αυτού εντοπίζεται στο Υ χρωμόσωμα σε πολλές επαναλήψεις. Επομένως στόχος είναι να γίνει αναζήτηση της πιθανής ρυθμιστικής δράσης των αντιγράφων στο Υ μέσα από πιθανή εμπλοκή του αυτοσωμικού γονιδίου της κυτοσολικής αμινοπεπτιδάσης με τη γονιμότητα των αρσενικών εντόμων ή με γονίδια meiotic drivers/suppressors που θα μπορούσε να εξηγήσει την επαναλαμβανόμενη εμφάνιση των τμημάτων της στο Υ χρωμόσωμα της *C. capitata*.

Υλικά και Μέθοδοι

1. In silico Μέθοδοι

1.1 Benchling

Το Benchling αποτελεί ένα ψηφιακό πρόγραμμα που βοηθά στην οργάνωση, ανάλυση και διαχείριση βιολογικών δεδομένων. Προσφέρει πολλές δυνατότητες στον χρήστη του μέσω της αποθήκευσης και της επεξεργασίας αλληλουχιών DNA/RNA. Στο πλαίσιο της επεξεργασίας επιτρέπει την επισήμανση αλληλουχιών (annotation), ορισμού εκκινητών, προσθήκη ή αφαίρεση νουκλεοτιδίων και την στοίχιση μεταξύ νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (sequence alignment). Το Benchling χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την εισαγωγή των αλληλουχιών των γονιδίων Cytosol aminopeptidase 1 και Cytosol aminopeptidase 2, ώστε να γίνει alignment για τη διαπίστωση του ποσοστού ομολογίας τους. Επίσης χρησιμοποιήθηκε για την επισήμανση των εκκινητών και της αλληλουχίας του dsRNA που σχεδιάστηκαν για επαλήθευση πρόσδεσης στα επιθυμητά σημεία (Cloud-based Platform for Biotech R&D | Benchling, n.d.).

1.2 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

Το BLAST αποτελεί εργαλείο της βιοπληροφορικής που έχει την δυνατότητα να βρίσκει την ομοιότητα μεταξύ των βιολογικών αλληλουχιών που διαθέτει στη βάση δεδομένων του και της αλληλουχίας που θα ορίσει ο χρήστης. Τα αποτελέσματα βασίζονται σε στατιστική ανάλυση που θα εκτιμήσουν την σημασία της ομοιότητας. Το πρόγραμμα αρχικά χρησιμοποιήθηκε κατά την ανάλυση των δεδομένων RNAseq που εμφάνιζαν προέλευση από το Υ χρωμόσωμα της *C. capitata* (Nucleotide BLAST: Search Nucleotide Databases Using a Nucleotide Query, n.d.). Επίσης χρησιμοποιήθηκε και για τον έλεγχο της ειδικότητας όλων των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, δηλαδή αν είναι ειδικοί για την αλληλουχία στόχο και δεν εμφανίζουν συμπληρωματικότητα με ανεπιθύμητες περιοχές (off-targets) (Primer Designing Tool, n.d.).

1.3 JBrowse 2

Το JBrowse 2 είναι ένας γονιδιωματικός φυλλομετρητής. Επιτρέπει την εισαγωγή RNAseq δεδομένων και την απεικόνιση της κατανομής των αναγνώσεων (reads) κατά μήκος του γονιδιώματος, καθώς και το βάθος τους. Βάθος είναι ο αριθμός των reads που καλύπτει μία συγκεκριμένη περιοχή. Αυτή η λειτουργία βοηθάει το χρήστη στην ανίχνευση εκφραζόμενων περιοχών, όπου μέσω ανάλυσης επισημαίνονται τα εξόνια, τα ιντρόνια και τα σημεία ματίσματος τους. Το πρόγραμμα επιτρέπει την ταυτόχρονη εισαγωγή πολλαπλών δεδομένων για σύγκριση και γενικά καλύτερη ανάλυση ανάλογα το στόχο του κάθε πειράματος. Το JBrowse 2 χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση γονιδίων σε περιοχές του Υ χρωμοσώματος της *Ceratitis capitata* από RNAseq δεδομένα που προέρχονται από τους όρχεις. Συγκεκριμένα ελέγχθηκε το βάθος της αλληλούχισης, η παρουσία ιντρονίων και εξονίων σε πολλές περιοχές του Υ χρωμοσώματος (JBrowse | JBrowse, n.d.).

1.4 Primer Quest

Το Primer Quest αποτελεί ένα εργαλείο που παρέχει η εταιρία Integrated DNA Technologies (IDT) και χρησιμοποιείται για τον σχεδιασμό εκκινητών που θα χρησιμοποιηθούν στην

Αλυσιδωτή Αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) και την ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR). Για την χρήση του γίνεται εισαγωγή της επιθυμητής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και προαιρετική τροποποίηση διάφορων παραμέτρων όπως το μήκος, το ποσοστό GC και η θερμοκρασία τήξης (T_m) των εκκινητών. Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για τον σχεδιασμό των εκκινητών που θα χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση του προφίλ έκφρασης του γονιδίου της κυτοσολικής αμινοπεπτιδάσης στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια της *C. capitata* αλλά και των εκκινητών που θα χρησιμοποιηθούν για τη παραγωγή του dsRNA που θα χορηγηθεί στα έντομα για την εφαρμογή του RNAi (**Παράρτημα, Πίνακας 1**) (PrimerQuest - Design qPCR Assays | IDT, n.d.).

1.5 Oligo Analyzer

Το Oligo Analyzer αποτελεί ένα ψηφιακό εργαλείο της IDT που δίνει την δυνατότητα ελέγχου των αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαφορετικών ολιγονουκλεοτιδίων αλλά και με τον εαυτό του. Συγκεκριμένα αναφέρει τη δυνατότητα δημιουργίας δευτερογενών δομών, φουρκέτες, σε συνδυασμό με την αναπαράσταση τους και την απεικόνιση των χαρακτηριστικών τους όπως την μεταβολή ελεύθερης ενέργειας Gibbs (ΔG) και τη θερμοκρασία τήξης (T_m). Επίσης αναπαριστά όλους τους πιθανούς τρόπους συμπληρωματικής σύνδεσης του ολιγονουκλεοτιδίου με τον εαυτό του (όμοδιμερή) ή με κάποια άλλη ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία (ετεροδιμερή). Το πρόγραμμα χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο όλων των εκκινητών που σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα Primer Quest (**Παράρτημα, Πίνακας 1**) με στόχο να παρατηρηθεί εάν δημιουργούν δομές φουρκέτας με τον εαυτό τους αλλά και διμερή με τον εαυτό ή το ζευγάρι τους (How to Use the IDT OligoAnalyzer™ Tool, n.d.).

2. Πειραματικές διαδικασίες

2.1 Απομόνωση RNA (RNA extraction)

Η απομόνωση του ολικού RNA έγινε με τη χρήση του αντιδραστηρίου TripleXtractor, μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, που με τη μεγάλη λυτική του ικανότητα μπορεί να καταστρέφει τα κύτταρα διατηρώντας την ακεραιότητα του RNA. Η διαδικασία έγινε με τον τρόπο που προτείνει η κατασκευαστική εταιρία. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι μύγες *Ceratitis capitata* του εργαστηριακού στελέχους EGII στα εξής αναπτυξιακά στάδια: Αυγά, Προνύμφες 2^{ου} και 3^{ου} σταδίου, Νύμφες 4 ημέρες πριν την ενηλικίωση και Ενήλικα έντομα μέρας 1 έως 5. Ανάλογα το αναπτυξιακό στάδιο χρησιμοποιήθηκε διαφορετική ποσότητα όγκου tripleXtractor κατά την ομογενοποίηση.

Πίνακας 2. Όγκοι tripleXtractor που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ομογενοποίηση διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων *Ceratitis capitata*

Όγκος tripleXtractor (μl)	Αυγά	Προνύμφες	Νύμφες + Ενήλικα
	25μl	60μl	150μl

Αρχικά στο δείγμα προστίθεται tripleXtractor και γίνεται ομογενοποίηση του ιστού του με τη χρήση pestles. Μετά ακολουθεί ο διαχωρισμός των φάσεων του δείγματος σε οργανική και υδατική που είναι και η επιθυμητή, καθώς περιέχει το RNA. Το βήμα αυτό επιτυγχάνεται με τη προσθήκη χλωροφορμίου. Ακολουθεί η κατακρήμνιση του RNA με τη βοήθεια της ισοπροπανόλης. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται οι δύο διαδοχικές πλύσεις του RNA

προσθέτοντας 75% αιθανόλη. Τέλος γίνεται επαναδιάλυση του RNA με ζεστό WFI (water for injection) στους 60°C, όπου 1μl να χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση του RNA στο Quawell Q3000 και η υπόλοιπη ποσότητα για την αντίδραση της DNase που ακολουθεί. Η αποθήκευση των δειγμάτων γίνεται στους -20°C (GRiSP Research Solutions, n.d.).

2.1.1 Φυλετικός διαχωρισμός των εντόμων (sexing)

Στην περίπτωση των δειγμάτων που βρίσκονται σε αναπτυξιακό στάδιο, όπου το φύλο δεν είναι εμφανές φαινοτυπικά, δηλαδή αυγά, προνύμφες και νύμφες πραγματοποιήθηκε μία ακόμα διαδικασία αυτή της απομόνωσης DNA. Αυτό γίνεται για την απόκτηση γονιδιωματικού υλικού το οποίο θα ενισχυθεί με ειδικούς εκκινητές, μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, όπου ανάλογα το προϊόν θα γίνει ο διαχωρισμός του φύλου του εντόμου. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι CcYG13_P2_F/CcYG13_P2_R οι οποίοι αναγνωρίζουν μία περιοχή στο Y αλλά και μια αυτοσωμική περιοχή με λίγο μεγαλύτερο μήκος. Έτσι στα θηλυκά περιμένουμε προϊόν περίπου 500 ζευγών βάσεων, ενώ στα αρσενικά περίπου 450 ζευγών βάσεων (**Παράρτημα, Εικόνα 18**).

Η διαδικασία ξεκινάει από τη στιγμή του διαχωρισμού των φάσεων μετά την προσθήκη του χλωροφόρμιου. Αρχικά γίνεται μεταφορά ενός μέρος της υδατικής φάσης που περιέχει το DNA σε καινούργιο tube. Ακολουθεί η κατακρήμνιση του DNA με τη βοήθεια του γλυκογόνου και της αιθανόλης. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται οι δύο διαδοχικές πλύσεις του DNA προσθέτοντας 75% αιθανόλη. Τέλος γίνεται επαναδιάλυση του DNA με ζεστό WFI (στους 60°C). Η αποθήκευση των δειγμάτων γίνεται στους -20°C (GRiSP Research Solutions, n.d.).

2.2 Αντίδραση DNase (DNase treatment)

Αφού γίνει η απομόνωση του RNA πρέπει να γίνει επίδραση με DNase I (Thermo Fisher, n.d.), ώστε να υδρολυθεί ό,τι ποσότητα DNA υπάρχει στο tube. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας χρησιμοποιείται και RNase out (Invitrogen, n.d.) , που αποτελεί αναστολέα του ενζύμου Rnase, που υδρολύει μόρια RNA.

Αρχικά γίνεται προσθήκη σε νέα tubes, ανάλογου όγκου από το προϊόν του RNA extraction, για να έχει το καθένα συγκέντρωση RNA 7μg και μετά WFI με κατάλληλη ποσότητα, ώστε ο τελικός όγκος των δειγμάτων να είναι 19,5μl. Μετά γίνεται η προετοιμασία Master Mix που περιέχει τα παρακάτω συστατικά στις εξής ποσότητες και πραγματοποιείται ελάχιστο vortex.

Πίνακας 3. Συστατικά και ποσότητες αντιδραστηρίων του master mix για την εφαρμογή DNase

Συστατικά	Όγκος (μl)
Buffer 10X	3μl
1U/μl DNase I	7μl
40U/μl RNase out	0,5μl

Προστίθεται 10,5μl από το mix στο κάθε δείγμα και ακολουθεί επώαση στους 37°C, ώστε να δράσει η DNase. Στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρονται στο πάγο και ακολουθεί η κατακρήμνιση του RNA με τη βοήθεια Οξικού Αμμωνίου. Μετά προστίθεται Φαινόλη:Χλωροφόρμιο για το τερματισμό της αντίδρασης του ενζύμου και για το διαχωρισμό των φάσεων σε υδατική και οργανική. Η υδατική φάση που περιέχει και το RNA μεταφέρεται

σε νέο tube όπου θα προστεθεί αιθανόλη, για την επιπλέον βοήθεια της κατακρήμνισης του RNA. Σε αυτό το σημείο τα δείγματα μεταφέρονται στους -80 °C όπου και μπορούν να διατηρηθούν για μήνες. Ύστερα ακολουθούν δύο διαδοχικές πλύσεις του RNA με 70% αιθανόλη. Τέλος γίνεται επαναδιάλυση του RNA με ζεστό WFI (στους 60°C), όπου 1μl θα χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση του RNA στο Quawell Q3000 και η υπόλοιπη ποσότητα για την παραγωγή cDNA που ακολουθεί. Η αποθήκευση των δειγμάτων γίνεται στους -20°C.

2.3 Παραγωγή cDNA

Μετά την αντίδραση της DNase επόμενο βήμα είναι η σύνθεση του cDNA με εκμαγείο το RNA των δειγμάτων. Η σύνθεση του θα γίνει με τη βοήθεια του ενζύμου MMLV-Reverse Transcriptase (Invitrogen, n.d.) και ως εκκινητές θα χρησιμοποιηθούν ολιγονουκλεοτίδια με διαδοχικές θυμίνες (oligo dTs), που προσδένονται στην πολυαδενυλιωμένη σειρά των ώριμων μεταγράφων (Passmore & Collier, 2021).

Αρχικά γίνεται προσθήκη σε νέα tubes, ανάλογου όγκου από το προϊόν της εφαρμογής της DNase, για να έχει το καθένα συγκέντρωση RNA 1μg και μετά WFI με κατάλληλη ποσότητα, ώστε ο τελικός όγκος των δειγμάτων να είναι 10μl. Ακολουθεί η δημιουργία του πρώτου Master mix.

Πίνακας 4. Συστατικά και ποσότητες αντιδραστηρίων του πρώτου master mix για την παραγωγή cDNA

Συστατικά	Όγκος (μl)
50mM oligo dTs	1μl
10Mm dNTPs	1μl

Σε κάθε δείγμα προστίθεται 2μl από το πρώτο master mix και ακολουθεί επώαση τους στους 65°C για 5min. Μετά γίνεται η δημιουργία του δεύτερου Master mix, ενώ την ίδια στιγμή τα δείγματα μεταφέρονται στο πάγο για τουλάχιστον 10min.

Πίνακας 5. Συστατικά και ποσότητες αντιδραστηρίων του δεύτερου master mix για την παραγωγή cDNA

Συστατικά	Όγκος (μl)
Buffer 5X	4μl
100mM DTT	2μl
40U/μl RNase out	0,5μl
200U/μl MMLV-RT	1μl
WFI	0,5μl

Αφού προστεθεί 8μl από το δεύτερο master mix σε κάθε tube ακολουθεί επώαση στους 37°C για 2h. Τέλος προστίθενται 380μl WFI σε κάθε δείγμα γίνεται vortex και αποθήκευση τους στους -20°C.

2.4 Ποσοτικοποίηση DNA/RNA

Για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων RNA και DNA χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα Quawell Q300, που αποτελεί ένα φασματοφωτόμετρο UV μικρού όγκου (Q3000 | Quawell, n.d.). Αποτελεί ένα αρκετά εύχρηστο μηχάνημα. Αρχικά, ανοίγεται το καπάκι (Lid) και

προστίθεται 1μl buffer, ενώ στη συνέχεια κλείνεται, με στόχο να πραγματοποιηθεί ο καθαρισμός πριν από τη χρήση. Μετά αφού αφαιρεθεί η ποσότητα αυτή με ένα χαρτί, επαναλαμβάνεται η παραπάνω διαδικασία, ώστε να οριστεί το buffer, στο οποίο είναι διαλυμένο το δείγμα, ως blank. Για τα προϊόντα από RNA extraction, DNase και In vitro transcription με T7 polymerase χρησιμοποιήθηκε WFI, ενώ για το dsDNA από gel extraction elution buffer. Στη συνέχεια αφού καθαριστεί το καπάκι τοποθετείται 1μl δείγματος για τη μέτρηση. Αφού μετρηθούν όλα τα δείγματα, ξαναγίνεται καθαρισμός δύο φορές με 1μl WFI. Ο τρόπος με τον οποίο δουλεύει το μηχάνημα είναι ο εξής. Το φασματοφωτόμετρο εκπέμπει φως υπεριώδους ακτινοβολίας στο δείγμα. Τα νουκλεϊκά οξέα που εμπεριέχονται σε αυτό απορροφούν σε συγκεκριμένο μήκος κύματος 260nm, λόγω των πουρινών και των πυριμιδίων. Έτσι μετρώντας την απορρόφηση στα 260nm υπολογίζει τη συγκέντρωση τους στο δείγμα, καθώς η ποσότητα των νουκλεϊκών οξέων είναι ανάλογη με την ποσότητα του φωτός που απορροφούν (Νόμος Beer-Lambert). Βέβαια υπολογίζει και την καθαρότητα του δείγματος μετρώντας την απορρόφηση στα 280nm (εκεί απορροφάνε οι αρωματικοί δακτύλιοι των πρωτεϊνών) και εμφανίζει έναν μέσο όρο απορρόφησης A_{260}/A_{280} . Ένας λόγος περίπου 1.8 θεωρείται ένδειξη καθαρού DNA, ενώ ένας λόγος περίπου 1.9-2.0 ένδειξη καθαρού RNA.

2.5 Αλυσιδωτή Αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η Αλυσιδωτή αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μία μέθοδος ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων DNA από κάποιο δείγμα (Khehra et al., 2023). Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης χρειάζονται αρχικά εκκινητές, δηλαδή συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων με μήκος συνήθως 18-22 ζευγών βάσεων που θα υβριδίσουν εκατέρωθεν του επιθυμητού τμήματος. Επίσης χρειάζεται το ένζυμο της DNA πολυμεράσης, που επεκτείνει την αλληλουχία των εκκινητών με εκμαγείο το DNA με προσανατολισμό 3'→5' και συνδέει τα νουκλεοτίδια μεταξύ τους με φωσφοδιεστερικό δεσμό (Green & Sambrook, 2019). Στο μείγμα της αντίδρασης εμπεριέχονται φυσικά και νουκλεοτίδια, το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου, το δείγμα DNA και νερό για να συμπληρωθεί ο όγκος της αντίδρασης (Khehra et al., 2023). Πραγματοποιήθηκαν PCR με δύο διαφορετικές πολυμεράσες: Taq DNA πολυμεράση (Thermo Fischer Scientific) (Green & Sambrook, 2019) και High-Fidelity DNA πολυμεράση (Thermo Fischer Scientific). Η διαφορά των δύο ενζύμων είναι ότι η Taq πολυμεράση είναι πιο επιρρεπής σε λάθη (Green & Sambrook, 2019), ενώ η High-Fidelity DNA πολυμεράση διαθέτει μια επιπρόσθετη υπομονάδα που της επιτρέπει να ελέγχει το συντιθέμενο κλώνο, να εντοπίζει τυχόν λάθη και να τα διορθώνει (Sutton, 2010).

Πίνακας 6. Συστατικά 20μl αντίδρασης PCR με KAPA Taq DNA Polymerase για καθορισμό φύλου Larva και Pupa *C. capitata*

Συστατικά	Όγκος
10X KAPA Taq Buffer	2μl
10mM dNTP Mix	0,4μl
10μM Forward Primer	0,8μl
10μM Reverse Primer	0,8μl
5U/μL KAPA Taq DNA Polymerase	0,1μl
Template (DNA larva, pupa of <i>C. capitata</i>)	2μl
WFI	13,9μl
Συνολικός όγκος	20μl

Πίνακας 7. Συστατικά 25μl αντίδρασης PCR με High-Fidelity DNA Polymerase για ενίσχυση επιθυμητού τμήματος από cDNA *C. capitata* με T7 εκκινητές και παραγωγή dsDNA

Συστατικά	Όγκος
10X KAPA Taq Buffer	5μl
10mM dNTP Mix	0,3μl
10μM T7-Forward Primer	0,75μl
10μM T7-Reverse Primer	0,75μl
1U/μL High-Fidelity DNA Polymerase	0,5μl
Template (1:100 αραιώση του dsDNA)	4μl
WFI	13,7μl
Συνολικός όγκος	25μl

Η PCR χαρακτηρίζεται από τρία βήματα τα οποία επαναλαμβάνονται για όσους κύκλους ορίζονται στο μηχανήμα. Ο αριθμός των βημάτων εξαρτάται από τη συγκέντρωση DNA που έχει το αρχικό σου δείγμα. Σε κάθε κύκλο το DNA διπλασιάζεται δημιουργώντας 2^ν αντίγραφα (ν=αριθμός κύκλων). Πρώτο βήμα αποτελεί η Αποδιάταξη (Denaturation) κατά την οποία γίνεται εφαρμογή υψηλών θερμοκρασιών περίπου 94-98°C, ώστε να ανοίξει η διπλή έλικα του DNA. Δεύτερο βήμα αποτελεί η Υβριδοποίηση (Annealing), όπου η θερμοκρασία μειώνεται και προσαρμόζεται ανάλογα με τις θερμοκρασίες τήξης (T_m) των εκκινητών συνήθως γύρω στους 50-65°C. Σε αυτό το βήμα οι εκκινητές βρίσκουν το στόχος τους και υβριδίζουν σε αυτόν. Τρίτο βήμα αποτελεί η Επέκταση (Extension) όπου η θερμοκρασία αυξάνεται πάλι περίπου στους 72°C, που αποτελεί τη βέλτιστη θερμοκρασία για να δράσει η DNA πολυμεράση. Ο χρόνος που διαρκεί κάθε βήμα ορίζεται κάθε φορά ανάλογα το στόχο. Να σημειωθεί ότι η πρώτη Αποδιάταξη πάντα διαρκεί περισσότερο από τις επόμενες, καθώς μετά χρειάζεται να ανοίξουν μόνο οι κλώνοι του στόχου που έχουν ήδη ενισχυθεί από μία φορά και όχι ολόκληρο το DNA του δείγματος. Επίσης αφού τελειώσουν όλοι κύκλοι υπάρχει ένα έξτρα βήμα όπου η θερμοκρασία ορίζεται πάλι στους 72°C, ώστε η πολυμεράση να συμπληρώσει ότι αντίγραφα δε είχε προλάβει να τελειώσει (Green & Sambrook, 2019). Η PCR χρησιμοποιήθηκε για το καθορισμού του φύλου της μεσογειακής μύγας στα στάδια του αυγού, νύμφης και προνύμφης αλλά και για τη δημιουργία dsDNA με T7 εκκινητές που θα χρησιμοποιηθεί για τη παραγωγή του dsRNA με το οποίο θα γίνει η μικροέγχυση στα έντομα (**Πίνακας 6 και Πίνακας 7**). Να σημειωθεί ότι σε κάθε PCR γινόταν προσθήκη μίας αντίδρασης αρνητικού κοντρόλ (NTC) η οποία δεν περιέχει το δείγμα, για να γίνει έλεγχος της καθαρότητας των αντιδραστηρίων.

Πίνακας 8. Συνθήκες 50μl αντίδρασης PCR με High-Fidelity DNA Polymerase για ενίσχυση του dsDNA

Θερμοκρασία	Χρόνος(min)
95°C	3:00
98°C	0:20
63°C	0:15
72°C	0:30
72°C	3:00
Κύκλοι	35

Πίνακας 9. Συνθήκες 20μl αντίδρασης PCR με KAPA Taq DNA Polymerase για καθορισμό φύλου Larva και Pupa *C. capitata*

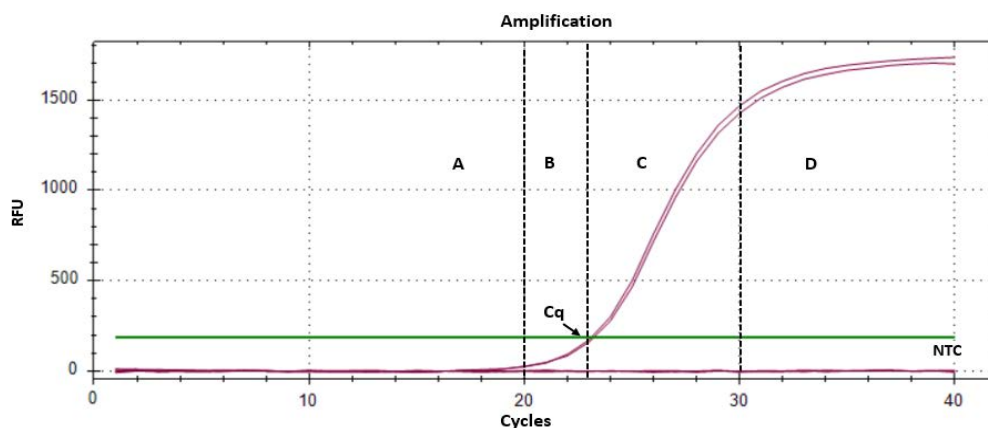
Θερμοκρασία	Χρόνος(min)
95°C	3:00
95°C	0:30
55°C	0:30
72°C	1:00
72°C	5:00
Κύκλοι	35

Πίνακας 10. Συνθήκες 25μl αντίδρασης PCR με High-Fidelity DNA Polymerase για ενίσχυση στόχου από cDNA *C. capitata* με T7 εκκινητές και παραγωγή dsDNA

Θερμοκρασία	Χρόνος(min)
95°C	3:00
98°C	0:20
61°C	0:15
72°C	0:30
72°C	3:00
Κύκλοι	35

2.6 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR)

Η Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) στην πλειοψηφία της μοιάζει με τη κλασική PCR. Έχει ανάγκη από σχεδόν τα ίδια συστατικά και ακολουθεί διαδοχικούς κύκλους των τριών βασικών βημάτων: Αποδιάταξη, Υβριδοποίηση και Επέκταση. Ωστόσο η qPCR χρειάζεται ένα επιπλέον στοιχείο για την παρακολούθηση της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο (Artika et al., 2022). Πρόκειται για μία φθορίζουσα χρωστική η οποία συνδέεται μόνο σε δίκλωνο DNA και ο φθορισμός της ανιχνεύεται από τον θερμοκυκλοποιητή (Bio-Rad Laboratories) (Navarro et al., 2015). Η χρωστική που χρησιμοποιήθηκε είναι η KAPA SYBR Green η οποία εκπέμπει φθορισμό στα 522nm. Όλη η διαδικασία βασίζεται στο γεγονός ότι η ένταση του φθορισμού της χρωστικής είναι ανάλογη της ποσότητας του δίκλωνου DNA (Artika et al., 2022). Θεωρητικά σε κάθε κύκλο της αντίδρασης τα μόρια DNA διπλασιάζονται δημιουργώντας 2ⁿ αντίγραφα (n=αριθμός κύκλων), γεγονός που επιτρέπει τη σύνδεση περισσότερης χρωστικής άρα ανίχνευση πιο έντονου φθορισμού από το θερμοκυκλοποιητή. Έτσι στα αρχικά στάδια της αντίδρασης όπου το δείγμα έχει μικρή ποσότητα δεν ανιχνεύεται φθορισμός (Φάση Στέρησης). Όταν το δείγμα ενισχυθεί σημαντικά τότε ο φθορισμός αρχίζει και ανιχνεύεται και η καμπύλη φτάνει στο κατώφλι του φθορισμού (Φάση Εκθετική). Η φάση αυτή διαρκεί για μικρό χρονικό διάστημα, καθώς η πολυμεράση δε μπορεί να ενισχύει κάθε μόριο DNA όταν αυξάνεται σημαντικά η ποσότητα του. Γι' αυτό το λόγο πλέον το DNA ενισχύεται αλλά όχι με εκθετικό τρόπο, έτσι η καμπύλη συνεχίζει να αυξάνεται γραμμικά (Φάση Γραμμική). Τέλος η καμπύλη φτάνει σε ένα πλατό φθορισμού, καθώς έχει τελειώσει η αντίδραση (Φάση Πλατό) (**Εικόνα 19**). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους λόγους όπως η κατανάλωση των αντιδραστηρίων και η φθορά του ενζύμου εξαιτίας των διακυμάνσεων της θερμοκρασίας (Artika et al., 2022).



Εικόνα 19. Καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot) της qPCR. Στον άξονα Χ απεικονίζεται ο αριθμός των κύκλων και στον άξονα Υ η ένταση φθορισμού. Στο διάγραμμα φαίνονται οι φάσεις από τις οποίες περνάει η καμπύλη Α. Φάση στέρησης Β. Φάση ενίσχυσης C. Γραμμική φάση και D. Φάση πλατό. NTC: αρνητικό κοντρόλ.

Το κατώφλι του φθορισμού (Cycle threshold /Ct/Cq) που συναντά η καμπύλη στο τέλος της εκθετικής φάσης μπορεί να οριστεί αυτόματα από το θερμοκυκλοποιητή. Ο αριθμός του Cq είναι μοναδικός για το κάθε δείγμα και εξαρτάται από την αρχική του ποσότητα. Όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική ποσότητα του δείγματος τόσο μικρότερο θα είναι και το Cq, καθώς χρειάζονται λιγότεροι κύκλοι για να φτάσει το κατώφλι φθορισμού και αντίστροφα (Artika et al., 2022). Με αυτόν τον τρόπο η qPCR δίνει την δυνατότητα σύγκρισης ποσότητας DNA μεταξύ δειγμάτων (Dymond, 2013).

Σε κάθε qPCR ελέγχεται αν γίνεται ενίσχυση μόνο του επιθυμητού προϊόντος, καθώς μπορεί να υπάρχουν διμερή εκκινητών ή παραπροϊόντα. Αυτό γιατί η ενίσχυση ανεπιθύμητων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μειώνει την ποσότητα των εκκινητών που είναι διαθέσιμοι για την αλληλουχία στόχο, άρα τα αποτελέσματα δεν θα είναι αξιόπιστα. Ο έλεγχος αυτός γίνεται με τη δημιουργία της καμπύλης τήξης (Melting curve) μετά το τέλος της αντίδρασης. Για τη δημιουργία της melting curve τα δείγματα θερμαίνονται σταδιακά από τους 55°C έως τους 95°C, όπου σε κάθε αύξηση μισού βαθμού μετρίεται ο φθορισμός. Η αρχή της μεθόδου αυτής είναι ότι κάθε δείγμα ανάλογα την αλληλουχία και το μήκος της έχει συγκεκριμένη θερμοκρασία τήξης (T_m), στην οποία το σύνολο των δίκλωνων μορίων του αποδιατάσσονται. Όποτε σε μια καμπύλη τήξης φαίνεται αν ενισχύεται μόνο η αλληλουχία στόχος ή αν υπάρχουν παραπροϊόντα (θα έχουν διαφορετική θερμοκρασία τήξης) αλλά και αν υπάρχουν διμερή εκκινητών που πάντα έχουν T_m μεταξύ 70-75 °C (Ririe et al., 1997).

Η ποσοτική PCR χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των γονιδίων της κυτοσωλικής αμινοπεπτιδάσης 1 και 2 από cDNA της μεσογειακής μύγας, με στόχο την δημιουργία του προφίλ έκφρασης των γονιδίων αλλά και για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των πειραμάτων σίγησης. Η αντίδραση έχει τελικό όγκο 15μl και αποτελείται από εκκινητές, δείγμα cDNA, νερό και το 2X KAPA SYBR Mix (KAPA biosystems), το οποίο περιέχει την πολυμεράση, το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου και τη φθορίζουσα χρωστική SYBR green. Να σημειωθεί ότι σε κάθε qPCR γινόταν προσθήκη μίας αντίδρασης αρνητικού κοντρόλ (NTC), η οποία δε περιέχει το δείγμα, για να γίνει έλεγχος της καθαρότητας των αντιδραστηρίων (**Εικόνα 19**).

Πίνακας 11. Συστατικά και ποσότητες της αντίδρασης qPCR

Συστατικά	Όγκοι για 1 αντίδραση
2X KAPA SYBR Mix	7,5 µl
10µM Forward Primer	0,2 µl
10µM Reverse Primer	0,2 µl
2,5ng/µl cDNA of <i>C. capitata</i>	4 µl
WFI	3,2 µl

Πίνακας 12. Συνθήκες της αντίδρασης qPCR

Θερμοκρασία	Χρόνος(min)
95°C	3:00
95°C	0:05
60°C	0:10
72°C	0:30
Κύκλοι	40
Ακολουθεί η δημιουργία της καμπύλης τήξης που απαιτεί τη σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας ανά μισό βαθμό κάθε 5sec από τους 55°C έως τους 95°C	

2.7 Ηλεκτροφόρηση πηκτής Αγαρόζης

Η Ηλεκτροφόρηση αποτελεί μία μέθοδο που βοηθά στο διαχωρισμό φορτισμένων μορίων μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Χρησιμοποιεί μια πολυμερική μήτρα (πηκτή), η οποία διαμορφώνει πόρους με μέγεθος που εξαρτάται από τη συγκέντρωση της. Το δείγμα τοποθετείται στα πηγαδάκια της πηκτής και η κίνηση του μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες. Στη συγκεκριμένη μορφή της μεθόδου τα μόρια, διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος τους (Modern Experimental Biochemistry, 2000) .

Η αγαρόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές παραγώγων γαλακτοπυρανόζης. Για την κατασκευή της πηκτής γίνεται διάλυση της αγαρόζης σε θερμό ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0.5X (Η παρασκευή του γίνεται με πυκνό διάλυμα TBE 5X από: Tris, EDTA 0,5M pH=8 και Boric acid). Στη συνέχεια στο διάλυμα της αγαρόζης προστίθεται κατάλληλη ποσότητα από Βρωμιούχο Αιθίδιο, το οποίο όταν παρεμβάλει μεταξύ των βάσεων των νουκλεϊκών οξέων θα εμφανίσει έντονο φθορισμό υπό την υπεριώδη ακτινοβολία. Μετά το διάλυμα της αγαρόζης τοποθετείται σε κατάλληλο καλούπι μαζί με το χτενάκι, που θα δημιουργήσει τα πηγαδάκια, μέχρι να πήξει. Τέλος το πήκτωμα μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιέχει και εκείνη ρυθμιστικό διάλυμα TBE και διακρίνεται από δύο πόλους έναν θετικό και έναν αρνητικό. Το πήκτωμα τοποθετείται με κατάλληλο τρόπο, ώστε τα πηγαδάκια να είναι προς το αρνητικό πόλο, για να τρέξουν τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊκά οξέα προς το θετικό πόλο. Την ίδια στιγμή γίνεται και η φόρτωση των δειγμάτων στα πηγαδάκια, αφού στο πρώτο τοποθετηθεί ο ladder, δηλαδή ο μάρτυρας που περιέχει δείγματα DNA με γνωστό μοριακό βάρος. Αφού τα δείγματα τρέξουν, θα οπτικοποιηθούν με τη βοήθεια της υπεριώδους ακτινοβολίας. Η χρήση της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε για την οπτικοποίηση αποτελεσμάτων της PCR και της qPCR. Η συγκέντρωση αγαρόζης που χρησιμοποιήθηκε είναι 1% w/v καθώς το μέγεθος των προϊόντων κυμαίνονταν σε 100-550 ζευγών βάσεων.

Πίνακας 13. Συστατικά και ποσότητες που χρησιμοποιούνται για την πραγματοποίηση ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v

Συστατικά	Ποσότητες
Σκόνη Αγαρόζης	1gr
Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X	100ml
Βρωμιούχο αιθίδιο	3,2μl
Ladder μοριακού βάρους 100bp (EnzyQuest)	3,5μl
Loading dye 6X	Ανάλογα όγκο δείγματος για τελική συγκέντρωση 1X

2.8 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης (Gel Extraction)

Σκοπός της μεθόδου είναι η ανάκτηση του DNA από μία ζώνη σε πήκτωμα αγαρόζης, το οποίο μετά θα χρησιμοποιηθεί για *in vitro* transcription με T7 πολυμεράση. Για τη πραγματοποίηση αυτής της διαδικασίας χρησιμοποιείται το kit της MACHEREY-NAGEL που ονομάζεται: NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Mini Kit for Gel Extraction or PCR Clean Up, n.d.).

Αφού ολοκληρωθεί η Ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα μεταφέρεται σε μηχανήμα που εκπέμπει υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Έτσι οι ζώνες είναι ορατές και οι επιθυμητές κόβονται με αποστειρωμένο νυστέρι και προστίθενται σε tubes. Μετά το μέρος του πηκτώματος που κόπηκε πρέπει να ζυγιστεί, ώστε στη συνέχεια να προστεθεί στο tube NT1 σε αναλογία 2:1 για το βάρος του τζελ. Το NT1 αποτελεί χαοτροπικό άλας που σπάει τα πολυμερή αγαρόζης και δημιουργεί αφιλόξενο περιβάλλον για τα ένζυμα. Ακολουθεί επώαση στους 50°C για να λιώσει το τζελ. Υστέρα το περιεχόμενο του tube προστίθεται σε στήλη πυριτίου, όπου θα συνδεθεί το DNA, η οποία βρίσκεται μέσα σε flow through tube. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται μέχρι να τελειώσει το περιεχόμενο του tube. Στη συνέχεια στη στήλη γίνεται προσθήκη NT3 για το καθαρισμό της. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται 2 φορές. Σε αυτό το σημείο γίνεται αλλαγή του flow through tube γιατί τώρα ότι πέσει είναι το DNA, το οποίο είναι το επιθυμητό. Έτσι στη στήλη προστίθεται το elution buffer το οποίο είναι βασικό, οπότε λόγω των ιόντων υδροξειδίου θα βοηθήσει το DNA να ξεκολλήσει από τη στήλη. Στο τέλος το νέο tube εμπεριέχει 40μl DNA από τα οποία το 1μl θα χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της συγκέντρωσης του στο quawell Q3000. Η μέθοδος αυτή πραγματοποιήθηκε για την ανάκτηση dsDNA που κατασκευάστηκε με T7 εκκινητές με στόχο την παραγωγή dsRNA, το οποίο θα χορηγηθεί με ένεση στα έντομα.

2.9 Παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA (dsRNAs) με T7 polymerase in vitro μεταγραφή

Για την εκκίνηση της διαδικασίας πρέπει να προηγηθεί παραγωγή dsDNA με χρήση T7 εκκινητών, που αναγνωρίζονται από το ένζυμο T7 Polymerase (Thermo Fisher Scientific, n.d) για τη παραγωγή του επιθυμητού dsRNA.

Αρχικά γίνεται προετοιμασία της αντίδρασης που περιέχει τα εξής:

Πίνακας 14. Συστατικά και ποσότητες αντιδραστηρίων του mix για την παραγωγή dsRNA

Συστατικά	Όγκος
Buffer 5x	4μl
NTPs (10mM)	4μl
DNA	400ng
40U/μl RNase out	0,5μl
20U/μl T7 Polymerase	0,6μl
WFI	Adjust to 20μl

Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στους 37°C για τη δράση της T7 πολυμεράσης. Στη συνέχεια προστίθεται DNase για την καταστροφή οποιουδήποτε μορίου DNA έχει παραμείνει στα δείγματα. Μετά γίνεται προσθήκη του χηλικού παράγοντα EDTA, που θα εμποδίσει τη δράση της DNase. Έως εδώ όλοι οι χειρισμοί γίνονται εκτός πάγου σε θερμοκρασία δωματίου, γιατί το buffer της T7-πολυμεράσης περιέχει σπερμιδίνη που μπορεί να κατακρημνιστεί με το DNA. Τώρα τα δείγματα μεταφέρονται στο πάγο και ακολουθεί προσθήκη αντιδραστηρίου Φαινόλη:Χλωροφόρμιο για το τερματισμό της αντίδρασης του ενζύμου και για το διαχωρισμό των φάσεων σε υδατική και οργανική. Η υδατική φάση που περιέχει και το RNA μεταφέρεται σε νέο tube για την κατακρήμνιση του RNA, που θα επιτευχθεί με τη προσθήκη αιθανόλης και οξικού αμμωνίου. Σε αυτό το σημείο τα δείγματα μεταφέρονται στους -80 °C όπου και μπορούν να διατηρηθούν για μήνες. Στη συνέχεια ακολουθούν δύο διαδοχικές πλύσεις του RNA με 70% αιθανόλη. Τέλος τα δείγματα επαναδιαλυτοποιούνται σε 21μl ζεστό WFI (50°C). Από τα 21μl το 1μl θα χρησιμοποιηθεί για αραιώση 1:4 με WFI. Από αυτά τα 2μl θα χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση, δηλαδή 1μl για μέτρηση RNA και 1μl για dsDNA. Ο μέσος όρος αυτών θα αποτελέσει τη συγκέντρωση του dsRNA. Στα άλλα 2μl θα προστεθούν 3μl WFI και 1μl χρωστική φόρτωσης, για να γίνει ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, ώστε να γίνει έλεγχος της καθαρότητας του δείγματος αλλά και ύπαρξης της επιθυμητής ζώνης.

2.10 Χορήγηση dsRNA στο έντομο με μικροέγχυση

Η χορήγηση του dsRNA για τη πραγματοποίηση του RNAi στο έντομο γίνεται με μικροέγχυση (Maktura et al., 2021) και βασίζεται στη συσκευή μικροένεσης NANOJECT II. Οι ενέσεις έγιναν σε ενήλικα αρσενικά δεύτερης μέρας της *C. capitata*.

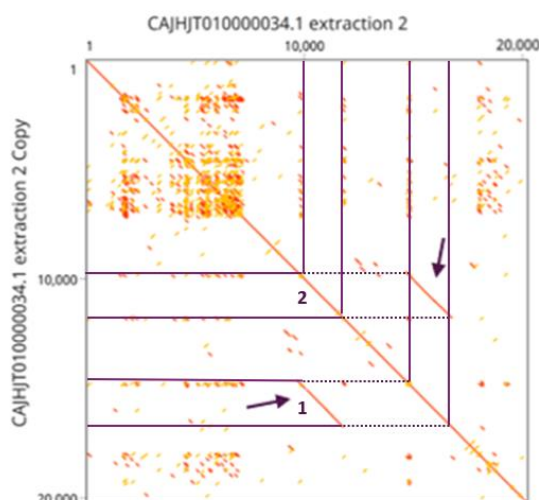
Για την εκκίνηση της διαδικασίας πρέπει να προετοιμαστεί κατάλληλα η βελόνα με την οποία θα γίνουν οι ενέσεις. Αρχικά γίνεται μια μικρή οπή στη άκρη της βελόνας, ώστε να μπορεί να διέρχεται το υγρό στο έντομο. Μετά σε αυτή εισχωρείται με προσεκτικό τρόπο για να μη πάρει αέρα, mineral oil το οποίο προστίθεται για μείωση της τριβής. Έτσι αφού η βελόνα είναι έτοιμη γίνεται η κατάλληλη συναρμολόγηση της στο μηχάνημα. Στη συνέχεια γίνεται άντληση μια ποσότητας περίπου 2-3μl dsRNA στη βελόνα με προσεκτικό τρόπο ώστε να μην μπουκνέ φυσαλίδες, με στόχο κάθε έντομο να δεχτεί την ίδια ποσότητα dsRNA. Αφού η συσκευή είναι έτοιμη επόμενο βήμα είναι η προετοιμασία των εντόμων. Για να είναι εφικτή η εκτέλεση των ενέσεων τα έντομα πρέπει να είναι ακίνητα, για αυτό γίνεται η αναισθητοποίησή τους. Αυτό επιτυγχάνεται με παροχή CO₂ κατά την διάρκεια της λήψης τους από το κλουβί. Στη συνέχεια τοποθετούνται σε μια ειδική τράπεζα που διοχετεύεται και

σε εκείνη CO₂ για να παραμένουν αναίσθητα. Η τράπεζα αυτή τοποθετείται κάτω από το στερεοσκόπιο όπου θα γίνουν και οι ενέσεις. Η ένεση στη μεσογειακή πραγματοποιείται στην αρχή του θώρακα της. Συνολικά με κάθε ένεση έγινε χορήγηση 96nl dsRNA συγκέντρωσης 5 μg/μl σε κάθε αρσενικό ενήλικο έντομο (Tsoumani et al., 2020).

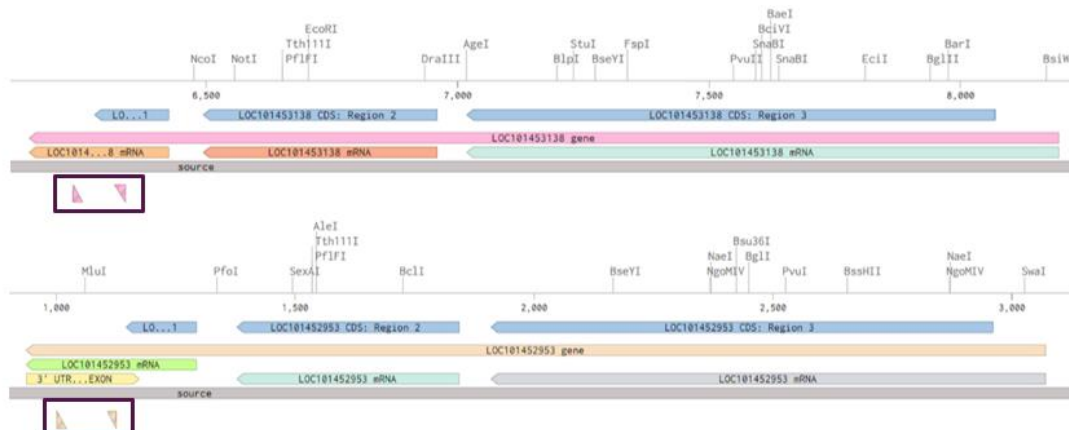
Αποτελέσματα

1. Σχεδιασμός εκκινητών

Αρχικά έγινε ο σχεδιασμός των εκκινητών που θα στοχεύσουν το γονίδιο στόχο ώστε να δημιουργηθεί το προφίλ έκφρασής του στα εξής αναπτυξιακά στάδια της *C. capitata*: αυγά, προνύμφες 2^{ου} και 3^{ου} σταδίου, νύμφες 4 μέρες πριν την ενηλικίωση και ενήλικα έντομα από τη μέρα 1 έως 5. Ωστόσο πριν τον σχεδιασμό των εκκινητών, έγινε δημιουργία ενός διαγράμματος Dot plot στη περιοχή όπου υπάρχει το αυτοσωμικό γονίδιο της κυτοσολικής αμινοπεπτιδάσης της *C. capitata* όπου φαίνεται το γονίδιο να υπάρχει σε δύο διαδοχικά αντίγραφα: Κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 1 και Κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 2 (Εικόνα 20). Γι' αυτό το λόγο δημιουργήθηκε η ανάγκη σχεδιασμού εκκινητών που θα τα στοχεύσουν ξεχωριστά. Αυτό γίνεται ώστε να μην έχουμε ψευδή εικόνα για το προφίλ έκφρασης, γεγονός που θα συνέβαινε εάν ένα ζεύγος εκκινητών στόχευε και τα δύο γονίδια ταυτόχρονα. Ο στόχος αυτός επιτεύχθηκε με τη δημιουργία εκκινητών που στοχεύουν τις 3' αμετάφραστες περιοχές (UTR) των γονιδίων (Εικόνα 21), καθώς ήταν από τα μοναδικά σημεία που διέφεραν σημαντικά. Για την κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 1 το ζεύγος εκκινητών είναι το cyto_amino-F/cyto_amino-R με μήκος προϊόντος 104 ζεύγη βάσεων (base pairs, bp), ενώ για την κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 2 το ζεύγος εκκινητών είναι το cyt_amin_2-F/cyt_amin_2-R με μήκος προϊόντος 124 bp.



Εικόνα 20. Dot plot στη περιοχή του αυτοσωμικού γονιδίου της κυτοσολικής αμινοπεπτιδάσης της *C. capitata* όπου επισημαίνονται με βέλη οι επαναλήψεις του γονιδίου της κυτοσολικής αμινοπεπτιδάσης. 1: Κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 1 και 2: Κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 2.



Εικόνα 21. Σχηματική απεικόνιση των ζευγών εκκινητών cyto_amino-F/cyto_amino-R και cyt_amin_2-F/cyt_amin_2-R που στοχεύουν στις 3' UTRs των γονιδίων κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 1 (ροζ) και κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 2 (κίτρινο) αντίστοιχα. Η απεικόνιση γίνεται στο πρόγραμμα επεξεργασίας αλληλουχιών Benchling.

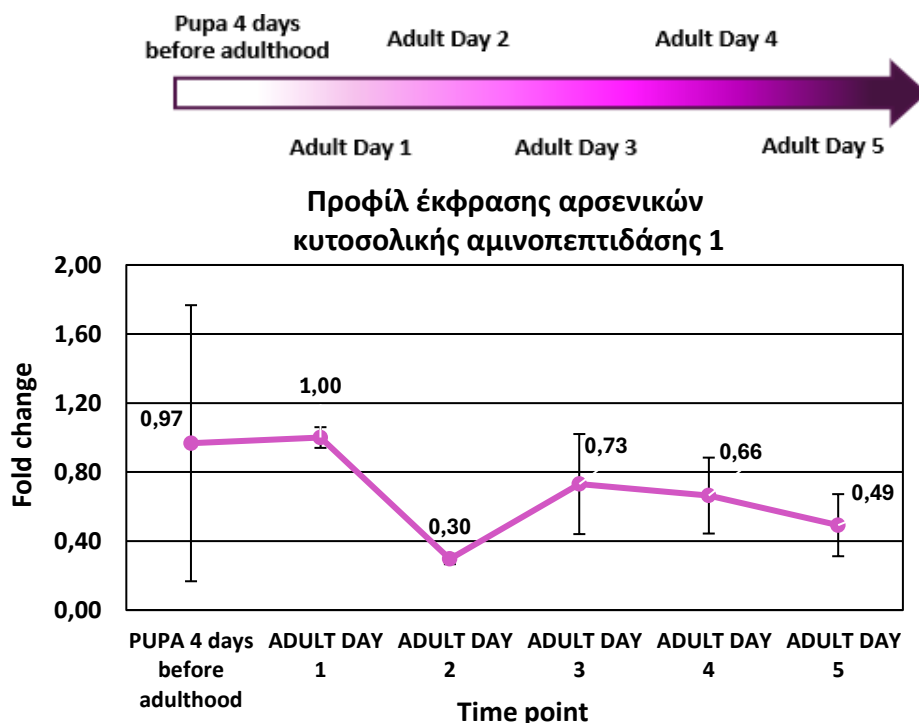
Επίσης σχεδιάστηκε ένα ζεύγος εκκινητών που θα χρησιμοποιηθεί για τη παραγωγή του dsRNA, το οποίο θα χορηγηθεί στα έντομα. Το dsRNA σχεδιάστηκε με μήκος 539 bp. Οι εκκινητές αυτοί είναι οι cyt_amin_T7_2-F/cyt_amin_T7_2-R και διαθέτουν στο 5' άκρο τους την αλληλουχία (5'- TAATACGACTCACTATAGGGAGA-3') που αναγνωρίζει η T7 πολυμεράση. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με βάση την κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 1, βέβαια το dsRNA εμφανίζει ομολογία και με τα δύο γονίδια.

2. Προφίλ έκφρασης γονιδίων στόχων

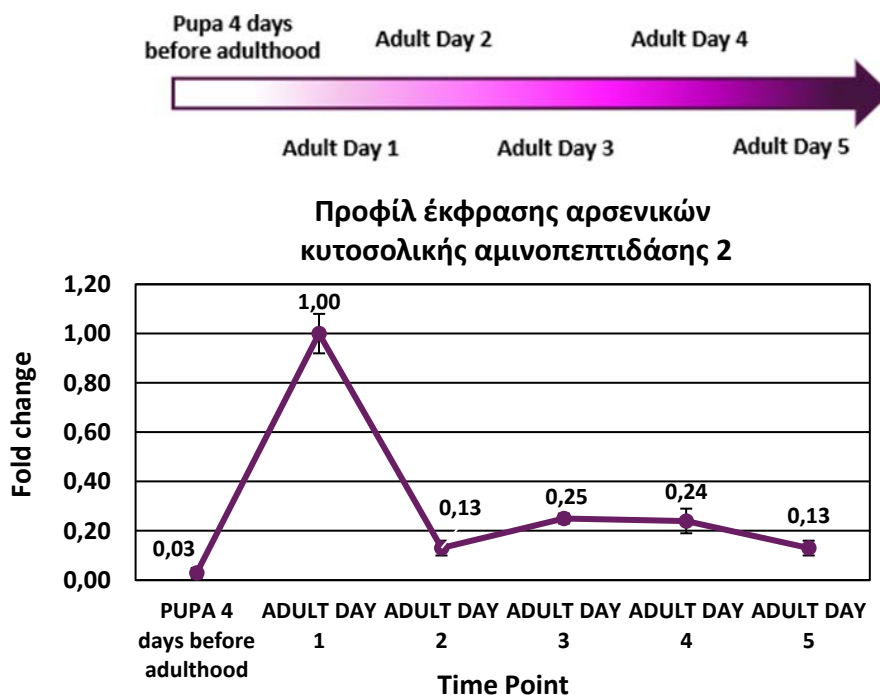
Αρχικά για να δούμε σε ποιο αναπτυξιακό στάδιο θα γίνει η ένεση για να επιτύχουμε την καλύτερη σίγηση πρέπει να κατασκευαστεί το προφίλ της έκφρασης των γονιδίων στόχων. Έτσι πραγματοποιήθηκε qPCR για τα ζεύγη εκκινητών cyto_amino-F/cyto_amino-R και cyt_amin_2-F/cyt_amin_2-R σε δείγματα από cDNA αυγών (pooled samples) και αρσενικές/θηλυκές προνύμφες 2^{ου} και 3^{ου} σταδίου, νύμφες 4 ημερών πριν την ενηλικίωση και ενήλικων εντόμων από τη μέρα 1 έως 5. Η επιλογή των ημερών 1 έως 5 έγινε γιατί σε αυτή τη χρονική διάρκεια γίνεται η σεξουαλική ωρίμανση των εντόμων η οποία ολοκληρώνεται τη 4^η μέρα, βέβαια επίσης χρειαζόμασταν και μια μέρα μετά το τέλος αυτής για καλύτερα συμπεράσματα. Για όλα τα αναπτυξιακά στάδια χρησιμοποιήθηκαν 3 βιολογικές επαναλήψεις από αρσενικά και θηλυκά έντομα ξεχωριστά, εκτός από το στάδιο των αυγών όπου έγινε η χρήση πάλι 3 βιολογικών επαναλήψεων αλλά από pooled samples, δηλαδή δεν έγινε sexing. Επίσης στις qPCR χρησιμοποιήθηκαν και οι εκκινητές Cc_RPL19-F/Cc_RPL19-R που στοχεύουν το ιδιοσύστατο γονίδιο (housekeeping gene) RPL19, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την κανονικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων στόχων. Στα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι τα γονίδια Κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 1 και 2 δεν εκφράζονται στα αυγά, στις προνύμφες 2^{ου} και στις προνύμφες 3^{ου} σταδίου. Επίσης στα στάδια που υπάρχει έκφραση προέρχεται μόνο από τα αρσενικά έντομα. Στα θηλυκά παρατηρούμε μόνο μία ελάχιστη έκφραση σε πολύ μεγάλο κύκλο (38-39), γεγονός που ίσως οφείλεται σε υπολείμματα DNA ή εξαιτίας του φαινομένου transcriptional read-through, δηλαδή επειδή οι δίπλα περιοχές είναι μεταγραφόμενες η RNA πολυμεράση συνεχίζει για κάποιο διάστημα να μεταγράφει και τις δίπλα περιοχές που κανονικά δεν μεταγράφονται. Η ανάλυση των δεδομένων των qPCR για την απεικόνιση του προφίλ έκφρασης των δύο γονιδίων έγιναν με την $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak) μέθοδο όπου ως calibrator θεωρείται και στα δύο η αντίστοιχη μέρα 1 των ενήλικων εντόμων. Τα προφίλ έκφρασης των γονιδίων κυτοσολικής αμινοπεπτιδάσης 1 και 2 φαίνονται στην **Εικόνα 22** και **Εικόνα 23** αντίστοιχα.

Στην περίπτωση της κυτοσολικής αμινοπεπτιδάσης 1 η έκφραση ξεκινάει στο στάδιο της νύμφης. Στο στάδιο αυτό παρατηρείται μία μεγάλη διακύμανση της έκφρασης των τριών διαφορετικών δειγμάτων μέσα από ένα πολύ μεγάλο τυπικό λάθος σφάλματος του μέσου όρου (standard error of the mean, sem). Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι οι Νύμφες δεν ανήκουν σε ακριβώς ίδιο σημείο της ανάπτυξης τους, έγινε μια προσέγγιση ότι βρίσκονται τέσσερις μέρες πριν την ενηλικίωση αλλά δεν ενηλικιώνονται όλες οι νύμφες από έναν πληθυσμό ακριβώς την ίδια μέρα. Μετά η έκφραση του γονιδίου εμφανίζει τη πρώτη της κορύφωση τη μέρα 1 των ενήλικων εντόμων και μετά έως την ημέρα 2 πέφτει. Στη συνέχεια η έκφραση κορυφώνεται για δεύτερη φορά τη μέρα 3 των ενήλικων και αρχίζει και πέφτει πάλι διαδοχικά τις μέρες 4 και 5.

Σε ότι αφορά το γονίδιο της κυτοσολικής αμινοπεπτιδάσης 2 η έκφραση ξεκινάει στο στάδιο της νύμφης. Στη συνέχεια η έκφραση του κορυφώνεται για πρώτη φορά τη μέρα 1 των ενήλικων εντόμων και πέφτει έως τη μέρα 2. Μετά εμφανίζει τη δεύτερη κορύφωση της έκφρασης της τη μέρα 3 των ενήλικων και αρχίζει και πέφτει πάλι από τη μέρα 3 έως 5.



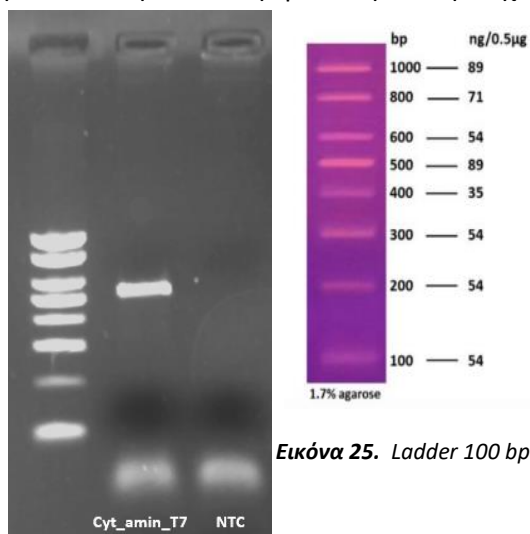
Εικόνα 22. Προφίλ έκφρασης του γονιδίου κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 1 στα στάδια: pupa 4 days before adulthood και adults day 1->5. Ως calibrator για την ανάλυση θεωρήθηκε η Adult Day 1. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίζονται με βάση το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (sem).



Εικόνα 23. Προφίλ έκφρασης του γονιδίου κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 2 στα στάδια: pupa 4 days before adulthood και adults day 1->5. Ως calibrator για την ανάλυση θεωρήθηκε η Adult Day 1. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίζονται με βάση το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (sem).

3. Παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA (dsRNAs)

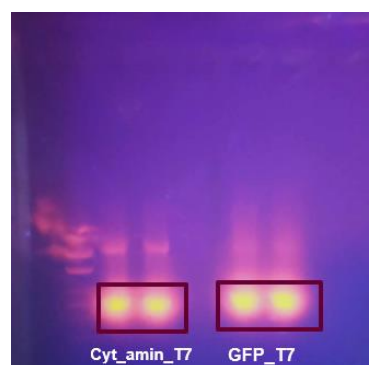
Αρχικά έγινε πραγματοποίηση PCR με τη χρήση των εκκινητών που φέρουν την αλληλουχία που αναγνωρίζει η T7 πολυμεράση cyt_amin_T7_2-F/cyt_amin_T7_2-R, έτσι ώστε να ενισχυθεί το DNA στόχος που θα αποτελέσει το εκμαγείο για την παραγωγή του dsRNA. Το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν cDNA από αναπτυξιακό στάδιο της *C. capitata* όπου επιβεβαιωμένα εκφράζονται και τα δύο γονίδια (male adult day 1). Από το προϊόν της PCR 1μl χρησιμοποιήθηκε για 1:100 αραιώση, ώστε να γίνει rePCR και να αυξήσουμε την ποσότητα του προϊόντος μας. Η υπόλοιπη ποσότητα υποβλήθηκε σε ηλεκτροφόρηση. Αυτό έγινε να επιβεβαιώσουμε ότι έχουμε μόνο την επιθυμητή μας ζώνη (Εικόνα 24). Ο ladder που χρησιμοποιήθηκε είναι ο 100 bp (Εικόνα 25).



Εικόνα 25. Ladder 100 bp

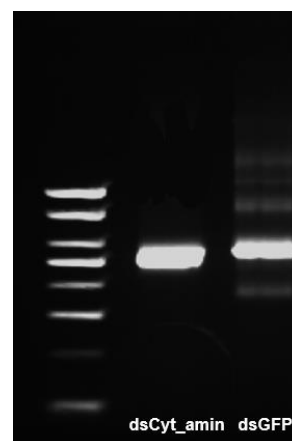
Εικόνα 24. Αποτελέσματα της PCR όπου έχουμε μόνο την επιθυμητή ζώνη από το γονίδιο cytosol aminopeptidase 1 στις 539 bp. NTC: negative control

Στη συνέχεια έγινε rePCR του προηγούμενου προϊόντος χρησιμοποιώντας πάλι τους εκκινητές cyt_amin_T7_2-F/cyt_amin_T7_2-R για την ενίσχυση του DNA που θα στοχεύσει τα γονίδια της κυτοσολικής αμινοπεπτιδάσης. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και προϊόν GFP (540 bp) που είχε ανακτηθεί από προηγούμενη PCR με τη χρήση των εκκινητών GFP_T7-F/GFP_T7-R. Στη rePCR για κάθε διαφορετικό προϊόν έγιναν δύο αντιδράσεις των 50μl, ώστε να έχουμε μεγαλύτερη ποσότητα DNA μετά το Gel extraction. Τα προϊόντα της rePCR υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση όπου οι επιθυμητές ζώνες (Εικόνα 26) θα χρησιμοποιηθούν για το Gel extraction. Ο ladder που χρησιμοποιήθηκε είναι ο 100 bp (Εικόνα 25).



Εικόνα 26. Αποτελέσματα της rePCR όπου απεικονίζονται οι επιθυμητές ζώνες από το γονίδιο cytosol aminopeptidase 1 στις 539 bp και από το GFP στις 540 bp

Αφού πραγματοποιήθηκε το Gel extraction, τα προϊόντα του χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή dsRNAs για την κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 1 (5μg/μl) και για το GFP (4,5μg/μl), μέσω T7 polymerase in vitro μεταγραφής. Στη συνέχεια έγινε ηλεκτροφόρηση των dsRNA για την επιβεβαίωση της επιτυχίας του πειράματος (Εικόνα 27).



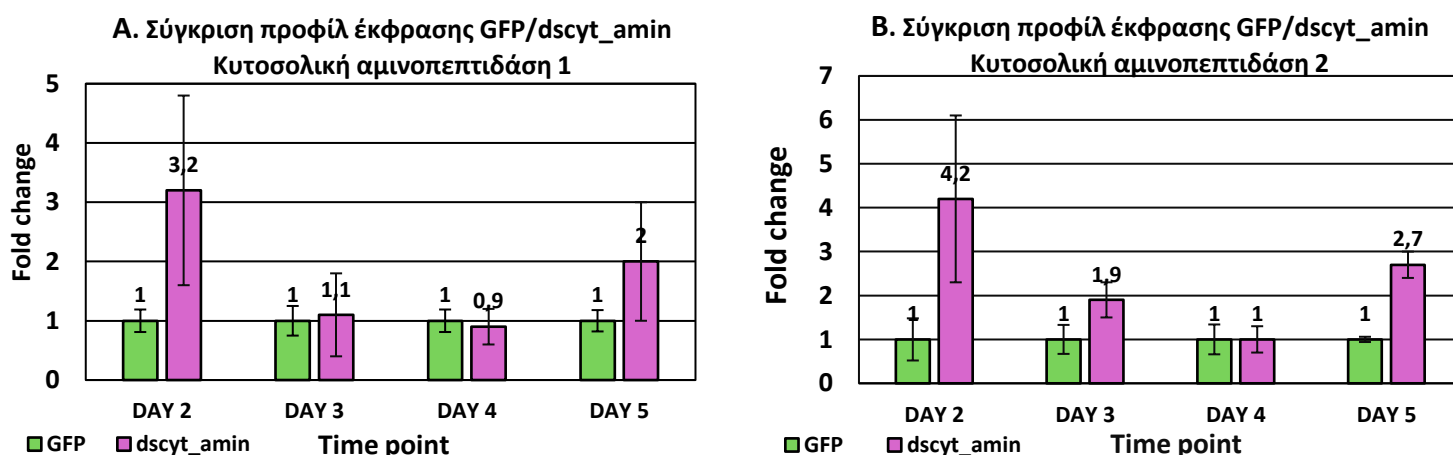
Εικόνα 27. Αποτελέσματα του in vitro transcription με T7 πολυμεράση για το dsRNA της cytosol aminopeptidase 1 και του GFP.

4. Προφίλ έκφρασης γονιδίων στόχων μετά την εφαρμογή των ενέσεων

Για την εφαρμογή του πειράματος σίγησης RNAi χρειάζονται τρεις συνθήκες: έντομα αγρίου τύπου (untreated), έντομα στα οποία θα χορηγηθεί ένεση με dsRNA που δεν βρίσκει στόχο σε αυτό (GFP) και έντομα στα οποία το dsRNA στοχεύουν τα γονίδια στόχους κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 1 και 2 (dscyt_amin). Η δεύτερη ομάδα χρειάζεται ώστε να γνωρίζουμε αν τυχόν μείωση της έκφρασης του επιθυμητού γονιδίου οφείλεται στο στρες από την ένεση ή στο dsRNA που του χορηγήθηκε.

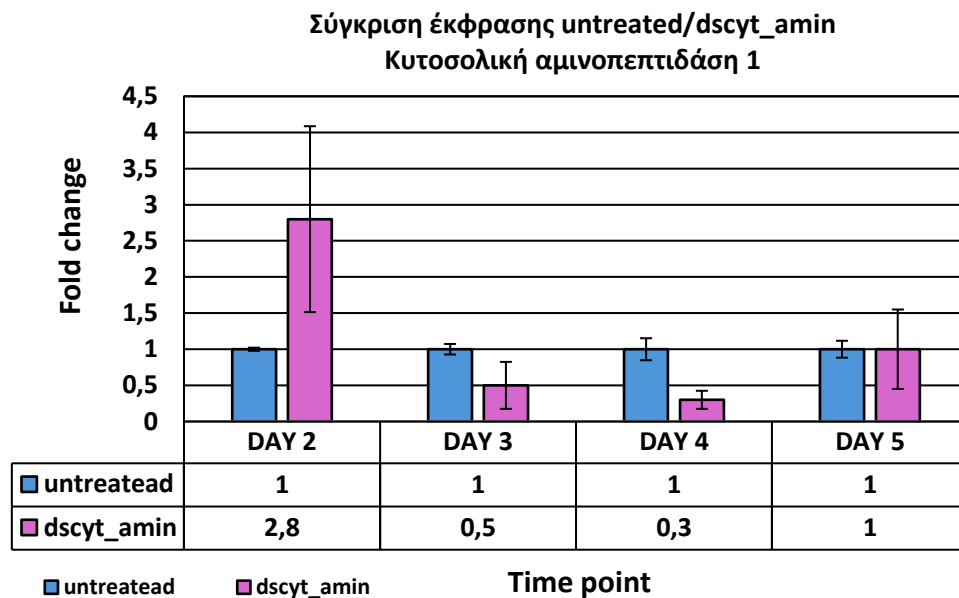
Σύμφωνα με το προφίλ έκφρασης των δύο γονιδίων (**Εικόνα 22** και **Εικόνα 23**) αποφασίστηκε η ένεση να γίνει στα ενήλικα αρσενικά έντομα δεύτερης μέρας, ώστε να πετύχουμε σίγηση στη δεύτερη κορύφωση της έκφρασης της τρίτης μέρας των ενήλικων εντόμων. Έτσι χορηγήθηκαν ενέσεις dsGFP και dscyt_amin σε 12 αρσενικά έντομα για το κάθε dsRNA την ημέρα 2 και έγινε λήψη δειγμάτων από τα έντομα αυτά για τις μέρες 2, 3, 4 και 5 ώστε να δούμε την ικανότητας σίγησης του dscyt_amin που σχεδιάσαμε.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της σίγησης έγινε σύγκριση της έκφρασης των γονιδίων κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 1 και 2 ξεχωριστά στην συνθήκη dscyt_amin σε σχέση με τη συνθήκη GFP (**Εικόνα 28**). Η ανάλυση των δεδομένων των qPCR για τις συγκρίσεις αυτές έγιναν με την $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak) μέθοδο όπου ως calibrator θεωρείται η αντίστοιχη μέρα του GFP. Τη μέρα 2, 3 και 5 παρατηρείται ότι και τα δύο γονίδια εκφράζονται περισσότερο στη συνθήκη dscyt_amin σε σχέση με το GFP. Την ημέρα 4 το γονίδιο κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 1 εμφανίζει 10% μείωση, ενώ το γονίδιο κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 2 έχει ίδια έκφραση στη συνθήκη dscyt_amin σε σχέση με τη συνθήκη GFP. Βέβαια μέσα από τη σύγκριση της έκφρασης των γονιδίων στόχων ανάμεσα σε GFP και untreated παρατηρούμε ότι δεν συμφωνούν μεταξύ τους (**Παράρτημα, Εικόνα 29 και Εικόνα 30**) οπότε τα αποτελέσματα δεν είναι αξιόπιστα και δε μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα για την ικανότητα σίγησης του dscyt_amin.



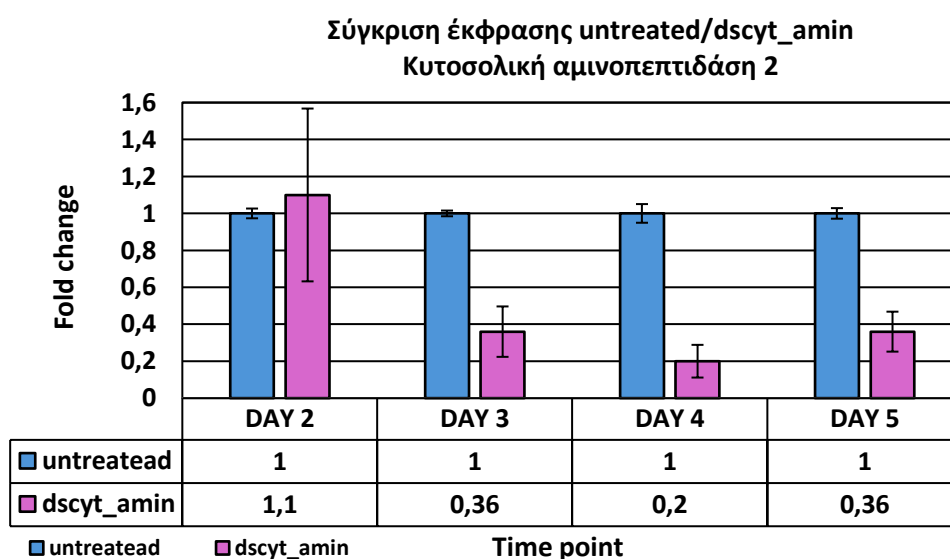
Εικόνα 28. Σύγκριση του Προφίλ έκφρασης των γονιδίων A. κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 1 και B. κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 2 ανάμεσα σε GFP και dscyt_amin. Ως calibrator για την ανάλυση θεωρήθηκε η αντίστοιχη μέρα του GFP. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίζονται με βάση το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (sem).

Βέβαια στη σύγκριση της συνθήκης dscyt_amin με untreated αρχικά στην περίπτωση του γονιδίου κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 1 τη μέρα 2 παρατηρείται μια σχεδόν διπλάσια αύξηση της έκφρασης του γονιδίου. Στη συνέχεια την μέρα 3 παρατηρείται 50% μείωση της έκφρασης και τη μέρα 4 εμφανίζει τη μέγιστη μείωση της έκφρασης του σε ποσοστό 70%. Τέλος τη μέρα 5 η έκφραση είναι ίδια και στις δύο συνθήκες (Εικόνα 31).



Εικόνα 31. Σύγκριση του Προφίλ έκφρασης του γονιδίου κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 1 ανάμεσα σε dscyt_amin και untreated. Ως calibrator για την ανάλυση θεωρήθηκε η αντίστοιχη μέρα του untreated. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίζονται με βάση το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (sem).

Από την άλλη σε ό,τι αφορά το γονίδιο της κυτοσολικής αμινοπεπτιδάσης 2 την μέρα 2 εμφανίζει μία 10% αύξηση της έκφρασης του. Μετά την μέρα 3 παρατηρείται 64% μείωση της έκφρασης και τη μέρα 4 εμφανίζει τη μέγιστη μείωση της έκφρασης του σε ποσοστό 80%. Τέλος τη μέρα 5 η έκφραση αρχίζει πάλι και αυξάνεται με το ποσοστό μείωσης της έκφρασης να φτάνει το 64% (Εικόνα 32).



Εικόνα 32. Σύγκριση του Προφίλ έκφρασης του γονιδίου κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 2 ανάμεσα σε dscyt_amin και untreated. Ως calibrator για την ανάλυση θεωρήθηκε η αντίστοιχη μέρα του untreated. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίζονται με βάση το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (sem).

5. Παρατήρηση φαινοτύπου

Για την παρατήρηση του φαινοτύπου έγιναν ενέσεις σε αρσενικά ενήλικα έντομα Μέρας 2 από εννέα για κάθε διαφορετικό dsRNA, δηλαδή σε εννέα έντομα χορηγήθηκε το dsGFP και σε άλλα εννέα το dscyt_amin. Τα έντομα αυτά τοποθετήθηκαν από τρία σε έξι διαφορετικά κλουβιά για κάθε συνθήκη μαζί με δύο θηλυκά ενήλικα έντομα αγρίου τύπου στο κάθε κλουβί (A και B). Τα έντομα τα αφήσαμε στα κλουβιά τους για πέντε μέρες, ώστε να ζευγαρώσουν. Στη συνέχεια απομακρύνουμε τα θηλυκά έντομα και τα βάλουμε το καθένα σε ένα ατομικό κλουβί με στόχο να γεννήσουν και να μαζέψουμε δέκα αυγά από το καθένα για να δούμε το ποσοστό εκκόλαψης. Το %Hatching από τα αυγά που συλλέχθηκαν και η μέρα που γέννησαν φαίνονται στον **Πίνακα 15**.

Πίνακας 15. Αποτελέσματα %Hatching από την συλλογή αυγών από θηλυκά που έχουν ζευγαρώσει με αρσενικά έντομα που τους έχει χορηγηθεί το dsGFP και το dscyt_amin ξεχωριστά.

Δείγμα Θηλυκού	Μέρα γέννησης μετά την απομόνωση θηλυκών	% Hatching
dscyt_amin 2A	1	0/10
dscyt_amin 2B	1	0/10
dscyt_amin 3B	1	1/10
dsGFP 1A	2	0/10
dsGFP 3B	2	0/10
dsGFP 1A	3	9/10
dsGFP 1B	3	0/10
dsGFP 3A	3	0/10
dsGFP 3B	3	0/10
dscyt_amin 2B	3	9/10
dscyt_amin 3B	3	0/10

Τα αυγά που εμφάνισαν ποσοστό εκκόλαψης 9/10 αποτελούν μία βιολογική επανάληψη μεταξύ συνθήκης dscyt_amin (dscyt_amin 2B, 9/10) και GFP (dsGFP 1A, 9/10). Βέβαια μία βιολογική επανάληψη δεν επαρκεί για τη στατιστική σύγκριση των δύο συνθηκών και λήψη συμπερασμάτων.

Συζήτηση

Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε ως στόχο της την αναζήτηση γονιδίων που βρίσκονται στο Υ χρωμόσωμα της Μύγας της Μεσογείου και την λειτουργική τους ανάλυση. Η μελέτη των δεδομένων μας οδήγησε στην παρατήρηση της επανάληψης ενός μέρους της αλληλουχίας της αυτοσωμικής Κυτοσολικής αμινοπεπτιδάσης στο Υ. Έτσι οδηγηθήκαμε σε πειράματα RNAi για τη λειτουργική ανάλυση του αυτοσωμικού αυτού γονιδίου και για να δούμε αν τα αντίγραφα του στο Υ προσφέρουν πιθανόν κάποια ρυθμιστική δράση.

Η κυτοσολική αμινοπεπτιδάση εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς σε ορθόλογά της γονίδια στους οργανισμούς *Drosophila* και *Aedes aegypti* (Matsui et al., 2006) (Sun et al., 2024) έχει αποδειχθεί η άμεση σχέση τους με τη παραγωγή σπέρματος, δηλαδή με τη γονιμότητα των αρσενικών. Επίσης η πιο σημαντική παρατήρηση είναι ότι στην *Drosophila pseudoobscura* το ορθόλογο της γονίδιο S-Lap 1 αποτελεί ένα co-amplified γονίδιο στα χρωμοσώματα X/Y και έγινε η απόδειξη του ρόλου των X-linked αντιγράφων του ως meiotic drivers που ευνοούν τη δημιουργία περισσότερων θηλυκών γαμετών και των Y-linked αντιγράφων του ως suppressors μέσω RNAi (Ellison et al., 2018). Σύμφωνα με τα δύο αυτά δεδομένα θέλουμε με τη σίγηση του γονιδίου της κυτοσολικής αμινοπεπτιδάσης αρχικά να δούμε εάν θα επηρεαστεί η γονιμότητα των αρσενικών εντόμων, γεγονός που θα δικαιολογούσε την ύπαρξή του στο Υ χρωμόσωμα. Επίσης επιθυμούμε να ελέγξουμε αν το γονίδιο συσχετίζεται με τη δράση meiotic drivers/suppressors, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει την επίσης επαναλαμβανόμενη παρατήρηση τους στο χρωμόσωμα Υ της *C. capitata* όπως συμβαίνει και στη *D. pseudoobscura*.

Πριν από την δημιουργία των εκκινητών έγινε η ενδιαφέρουσα παρατήρηση ότι το γονίδιο της Κυτοσολικής αμινοπεπτιδάσης στο αυτοσωμικό χρωμόσωμα υπάρχει σε δύο διαδοχικά αντίγραφα, την κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 1 και κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 2 (Εικόνα 20). Βέβαια, το πιο σημαντικό είναι ότι σύμφωνα με πληροφορίες της βάσης δεδομένων NCBI, και τα δύο γονίδια της κυτοσολικής αμινοπεπτιδάσης της μύγας της Μεσογείου είναι ορθόλογα με τα γονίδια S-Lap 1 και 2 του Cluster II της *Drosophila* (Εικόνα 13) που εμφανίζουν παρόμοιο μοτίβο το ένα δίπλα στο άλλο, άρα πρόκειται για συντηρημένη δομή γενετικού τόπου μεταξύ των δύο ειδών. Στα γονίδια S-Lap 1 και 2 η διαφοροποίηση του ρόλου τους και η άμεση συσχέτιση τους με τη γονιμότητα των αρσενικών έχει αποδειχθεί (Matsui et al., 2006) (Laurinyecz et al., 2019). Αυτό μας οδηγεί στη δημιουργία της θεωρίας ότι ίσως και τα γονίδια Κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 1 και 2 στη *C. capitata* να αποκτούν νέο ρόλο και να έχουν χάσει την ενζυμική τους δραστηριότητα.

Αφού έγινε η δημιουργία του προφίλ έκφρασης των δύο γονιδίων παρατηρήθηκε ότι η έκφρασή τους προέρχεται μόνο από τα αρσενικά και όχι από τα θηλυκά έντομα. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον και ενθαρρυντικό για την υπόθεση της διαφοροποίησης του ρόλου των δύο γονιδίων και η συσχέτιση αυτού με τη γονιμότητα των αρσενικών ατόμων. Να επισημανθεί εδώ ότι τα δεδομένα RNAseq στα οποία έγινε η παρατήρηση της επανάληψης αυτής στο Υ προέρχονταν από τους όρχεις, όπου πραγματοποιείται η σπερματογένεση, διαδικασία κύρια για τη γονιμότητα των αρσενικών.

Στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας της σίγησης έγινε η ανάλυση της έκφρασης των δύο γονιδίων στα έντομα όπου χορηγήθηκε το dsGFP και το dscyt_amin ξεχωριστά. Δυστυχώς τα αποτελέσματα της έκφρασης από τα έντομα που τους χορηγήθηκε το dsGFP και από τα untreated δε εμφανίζουν συνάφεια μεταξύ τους (**Παράρτημα, Εικόνα 29 και 30**) επομένως η πειραματική διαδικασία πρέπει να επαναληφθεί. Βέβαια το αποτέλεσμα αυτό πιθανόν να οφείλεται σε λάθος χειρισμό των ενέσεων γεγονός που εξηγείται από δύο λόγους. Πρώτον, οι ενέσεις dsGFP σε αντίθεση με τις ενέσεις dscyt_amin έγιναν σε διαφορετικούς κύκλους από διαφορετικά άτομα. Δεύτερον, παρατηρήσαμε ότι στις ενέσεις που έγιναν με dsGFP τα μισά έντομα πέθαναν, γεγονός που δείχνει ότι είχαν υποστεί έντονο τραυματισμό και στρες κατά την ένεση, σε αντίθεση με τις ενέσεις dscyt_amin όπου δεν παρατηρήθηκε όμοιο φαινόμενο. Το γεγονός αυτό, μαζί το υψηλό ποσοστό σίγησης που επετεύχθη (έως 70-80%), αν η σύγκριση γίνει με τη συνθήκη untreated (**Εικόνα 31 και 32**), οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το πείραμα πρέπει να επαναληφθεί. Στη σύγκριση αυτή (**Εικόνα 31 και 32**) εμφανίζεται αύξηση της έκφρασης των γονιδίων την Μέρα 2, δηλαδή την ημέρα που έγινε η ένεση, που λογικά οφείλεται σε κάποιο μηχανισμό αντίστασης του οργανισμού στη σίγηση που τις επόμενες μέρες εξασθενεί. Αυτό εξηγείται και από το γεγονός πως τα δείγματα της δεύτερης μέρας δεν συλλέχθηκαν απευθείας μετά τις ενέσεις, αλλά περίπου μια ώρα μετά την εφαρμογή τους.

Ως συνέχεια του πειράματος έγινε η παρατήρηση του φαινοτύπου, η οποία είναι πολύ σημαντική για τη λήψη συμπερασμάτων σε ό,τι αφορά τη λειτουργία των γονιδίων κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 1 και 2. Πραγματοποιήθηκε καταγραφή του ποσοστού εκκόλαψης (hatching %) γεγονός που θα δώσει άμεσα συμπεράσματα για τη γονιμότητα των αρσενικών εντόμων όπου έχει γίνει η σίγηση των γονιδίων. Για την ανάλυση αυτή είναι απαραίτητη η σύγκριση μεταξύ των εντόμων που τους έχει χορηγηθεί dscyt_amin και εντόμων που τους έχει χορηγηθεί dsGFP. Δυστυχώς δε είχαμε αρκετές βιολογικές επαναλήψεις από θηλυκά που είχαν γονιμοποιηθεί για να βγάλουμε συμπεράσματα. Είχαμε ένα θηλυκό έντομο που είχε ζευγαρώσει με dscyt_amin αρσενικό έντομο με ποσοστό εκκόλαψης 1/10 το οποίο είναι ενθαρρυντικό για πιθανή σχέση της κυτοσολικής αμινοπεπτιδάσης με τη γονιμότητα. Όμως δεν είχαμε από την ίδια μέρα αυγά από θηλυκό που έχει ζευγαρώσει με έντομο GFP για να κάνουμε σύγκριση. Επίσης τη μέρα 3 μετά από τη τοποθέτηση των θηλυκών εντόμων σε ατομικά κλουβιά είχαμε μια βιολογική επανάληψη με θηλυκό ζευγαρωμένο με αρσενικό dscyt_amin με ποσοστό εκκόλαψης 9/10 και θηλυκό ζευγαρωμένο με αρσενικό GFP με ποσοστό εκκόλαψης 9/10, εικόνα που δείχνει ότι η κυτοσολική αμινοπεπτιδάση δεν επηρεάζει την γονιμότητα των αρσενικών. Βέβαια μία βιολογική επανάληψη δεν είναι αρκετή για τη λήψη συμπερασμάτων. Γενικά ο έλεγχος του φαινοτύπου πρέπει να επαναληφθεί, ώστε να είναι διαθέσιμες τουλάχιστον 3 βιολογικές επαναλήψεις.

Για την εκπλήρωση του στόχου της μελέτης απαιτείται η επανάληψη του πειράματος με αναγκαίες διορθώσεις στο σημείο των ενέσεων και της μελέτης του φαινοτύπου.

Αρχικά σε ό,τι αφορά τις ενέσεις είναι απαραίτητος ο καλύτερος χειρισμός τους, ώστε τα έντομα να βιώνουν τον ελάχιστο δυνατό στρες κατά την διεκπεραίωσή τους. Έτσι θα έχουμε αξιόπιστα αποτελέσματα όπου θα είναι δυνατή η σύγκριση της έκφρασης μεταξύ των

συνθηκών GFP και dscyt_amin και δεν θα εμποδίζεται από αποτελέσματα GFP που δεν εμφανίζουν συνάφεια με τη συνθήκη untreated. Επίσης, επειδή στόχος μας είναι η δεύτερη κορύφωση της έκφρασης των γονιδίων τη Μέρα 3 των ενηλίκων και βλέπουμε ότι μέγιστη σίγηση υπάρχει τη Μέρα 4, την επόμενη φορά οι ενέσεις θα πρέπει να γίνουν σε ενήλικα έντομα Μέρας 1 και όχι 2. Αυτό θα γίνει για να επιτύχουμε μέγιστη δυνατή σίγηση των γονιδίων στόχων την επιθυμητή μέρα.

Στο πλαίσιο της παρατήρησης του φαινοτύπου αρχικά τα θηλυκά έντομα πρέπει να μείνουν περισσότερο χρονικό διάστημα στο κλουβί με τα αρσενικά για να αυξηθεί η πιθανότητα να ζευγαρώσουν. Για τον ίδιο λόγο πρέπει να τοποθετηθούν στο κλουβί περισσότερα αρσενικά και όχι τρία που είχαν τοποθετηθεί αυτή τη φορά. Επιπρόσθετα πρέπει να γίνει αλλαγή του κλουβιού (set up) όπου θα τοποθετηθεί το κάθε θηλυκό έντομο ξεχωριστά, καθώς παρατηρήσαμε ότι δυσκολεύονταν να γεννήσουν. Η επανάληψη της παρατήρησης του φαινοτύπου του ποσοστού εκκόλαψης είναι σημαντική, καθώς εάν παρατηρηθεί μειωμένο ποσοστό εκκόλαψης θα έδειχνε άμεση σχέση των γονιδίων της Κυτοσολικής αμινοπεπτιδάσης 1 και 2 με τη γονιμότητα των αρσενικών. Το γεγονός αυτό θα δικαιολογούσε την εμφάνιση του γονιδίου στο Y, καθώς ως γονίδιο που ωφελεί τα αρσενικά θα ευνοούνταν η τοποθεσία του στο χρωμόσωμα του οποίου η παρουσία το καθορίζει.

Επίσης αν συμβεί αυτό θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον και από την οπτική του πληθυσμιακού ελέγχου. Η γνώση ενός γονιδίου που επηρεάζει άμεσα την γονιμότητα των αρσενικών στη *C. capitata* θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως άμεσος στόχος από τεχνολογίες πληθυσμιακού ελέγχου που στοχεύουν στη δημιουργία στειρών ή με μειωμένη γονιμότητα αρσενικών εντόμων. Οι πληθυσμοί αυτοί θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την βελτίωση της τεχνικής SIT, στην οποία έως τώρα δημιουργούνται στειροί πληθυσμοί μέσα από έντονες εκθέσεις σε ακτινοβολίες που προκαλούν πολλές μεταλλάξεις στο γονιδιόμα με αποτέλεσμα να μειώνεται η πιθανότητα να ανταγωνιστούν τα έντομα αγρίου τύπου. Παρόμοιες βλέψεις υπάρχουν και για το γονίδιο LAP-1 (ορθόλογο των S-Laps) του *Aedes aegypti* που έχει αποδειχθεί η άμεση συσχέτιση του με τη γονιμότητα των αρσενικών εντόμων μέσα από τη σημαντική μείωση του ποσοστού εκκόλαψης όταν το γονίδιο σιγείται (Chen et al., 2021) (Sun et al., 2024).

Μελλοντικά θα ήταν ενδιαφέρον να πραγματοποιηθούν δύο επιπλέον πειραματικές διαδικασίες που θα βοηθούσαν την επίτευξη του στόχου αυτής της μελέτης. Για αρχή θα ήταν σημαντική η μελέτη της ενζυμικής τους δραστηριότητας των ενζύμων Κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 1 και 2. Στην περίπτωση της απουσίας της θα σήμαινε ότι ο ρόλος των δύο γονιδίων διαφοροποιείται και για αυτό ίσως πραγματοποιήθηκε ο διπλασιασμός τους, όπως συνέβη και στη *Drosophila* για τα γονίδια S-Lap (Laurinyecz et al., 2019). Άλλη μία πειραματική διαδικασία που δε υπήρχε χρόνος να γίνει αλλά θα ήταν σημαντική είναι ο ιστοειδικός έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων, δηλαδή πιο συγκεκριμένα να μελετηθεί αν η έκφρασή τους συμβαίνει μόνο στους όρχεις (testis-specific expression). Αυτό γιατί και στις δύο περιπτώσεις όπου βλέπουμε τα ορθόλογα ένζυμα S-Laps και LAP-1 να έχουν σχέση με την γονιμότητα (*Drosophila* και *Aedes aegypti*) η έκφραση προέρχεται μόνο από τους όρχεις. Η απόδειξη αυτού θα αποτελούσε ένα ακόμα στοιχείο για τη σχέση των γονιδίων με τη γονιμότητα των αρσενικών εντόμων. Γενικά η ανάλυση του γονιδίου της κυτοσολικής

αμινοπεπτιδάσης στη μύγα της Μεσογείου είναι μία πολλά υποσχόμενη μελέτη που είναι αναγκαίο να επαναληφθεί με συγκεκριμένες βελτιώσεις και να επεκταθεί με τους τρόπους που προαναφέρθηκαν.

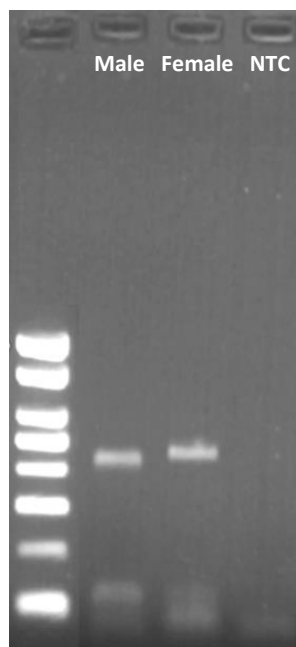
Παράρτημα

1. Πίνακες

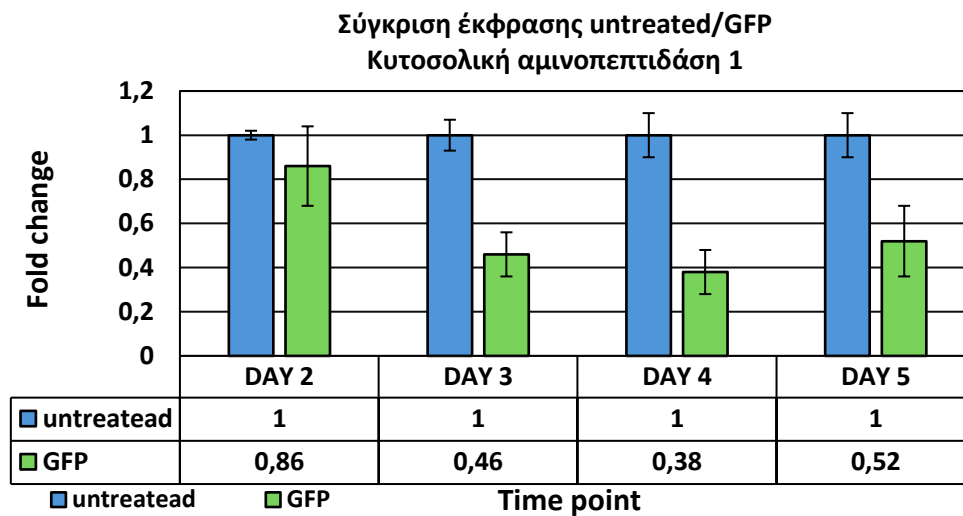
Πίνακας 1. Τα ονόματα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή και οι αλληλουχίες τους. Με έντονο μαύρο απεικονίζονται οι αλληλουχίες που αναγνωρίζει η T7 πολυμεράση.

Όνομα Εκκινητή	Αλληλουχία Εκκινητή
cyto_ amino-F	CGAGTTCATAGCACAAACAATC
cyto_ amino-R	TCATGCAAAGGTTGGAGAG
cyt_ amin_2-F	CAAGCAGACGTATTTAACCG
cyt_ amin_2-R	GAAGACGAGCGTAGAACG
CcYG13_P2_F	TCCACGATTTCAGCATGTCTA
CcYG13_P2_R	ACCAGAAGACAAAAGCAACACA
Cc_RPL19-F	ACATAAAGTACGTGAGGCCAG
Cc_RPL19-R	GCCGCTACCTCATCTTCTTAG
cyt_ amin_T7_2-F	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCCTCCAACATGCTAACAC
cyt_ amin_T7_2-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGGCCAATACAAGCACATC
GFP_T7-F	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCGCCAGTGTGCTGGAA
GFP_T7-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGATATCTGCAGAATTCGCC

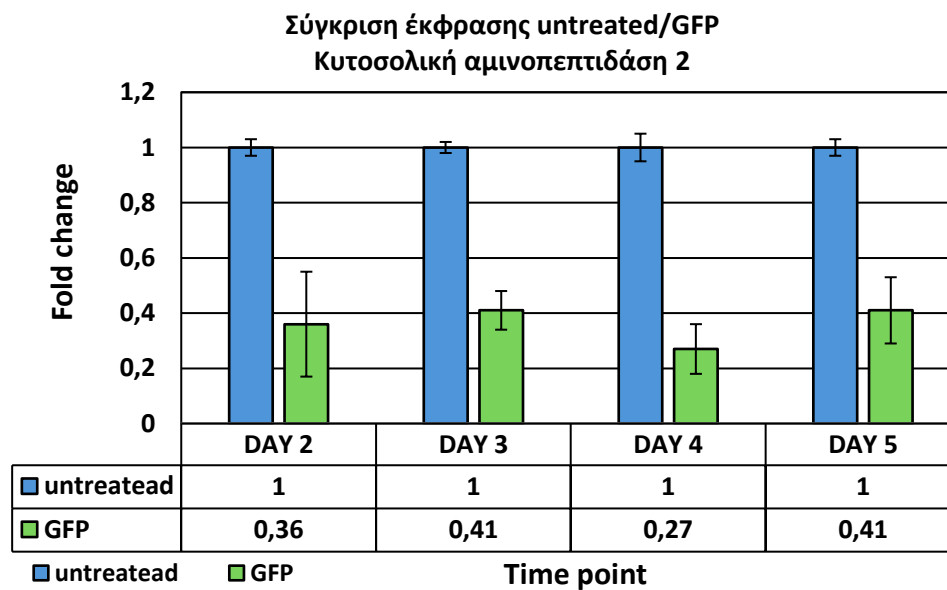
2. Εικόνες



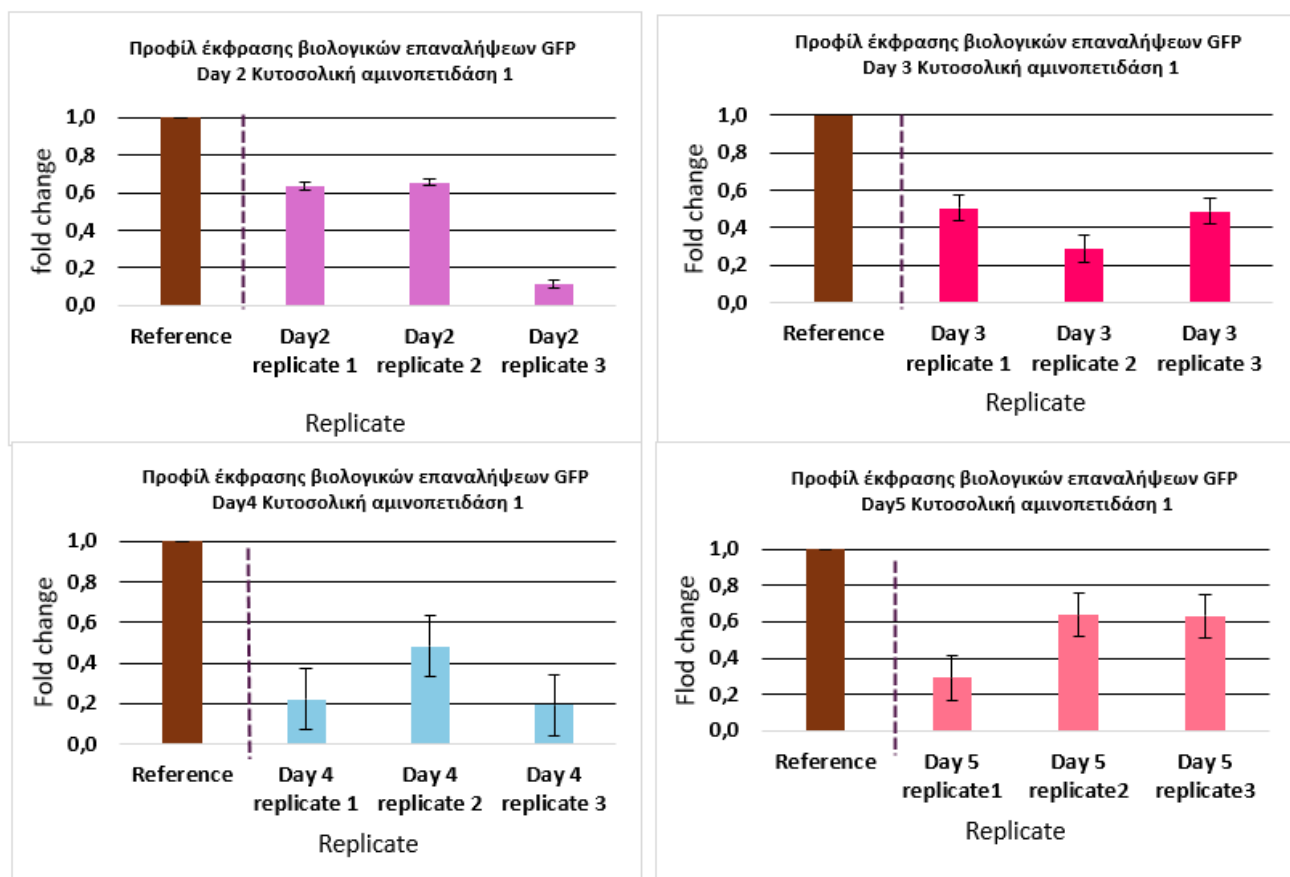
Εικόνα 18. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR που πραγματοποιήθηκε με δείγμα DNA αρσενικών και θηλυκών προνυμφών 3^{ου} σταδίου με τη χρήση των εκκινητών CcYG13_P2_F/CcYG13_P2_R. Η πρώτη ζώνη που αντιστοιχεί σε περίπου 450 bp ανήκει στα αρσενικά και η δεύτερη που αντιστοιχεί σε περίπου 500 bp ανήκει στα θηλυκά. Ο ladder που έχει χρησιμοποιηθεί είναι ο 100bp και η Τρίτη διαδρομή αφορά το NTC.



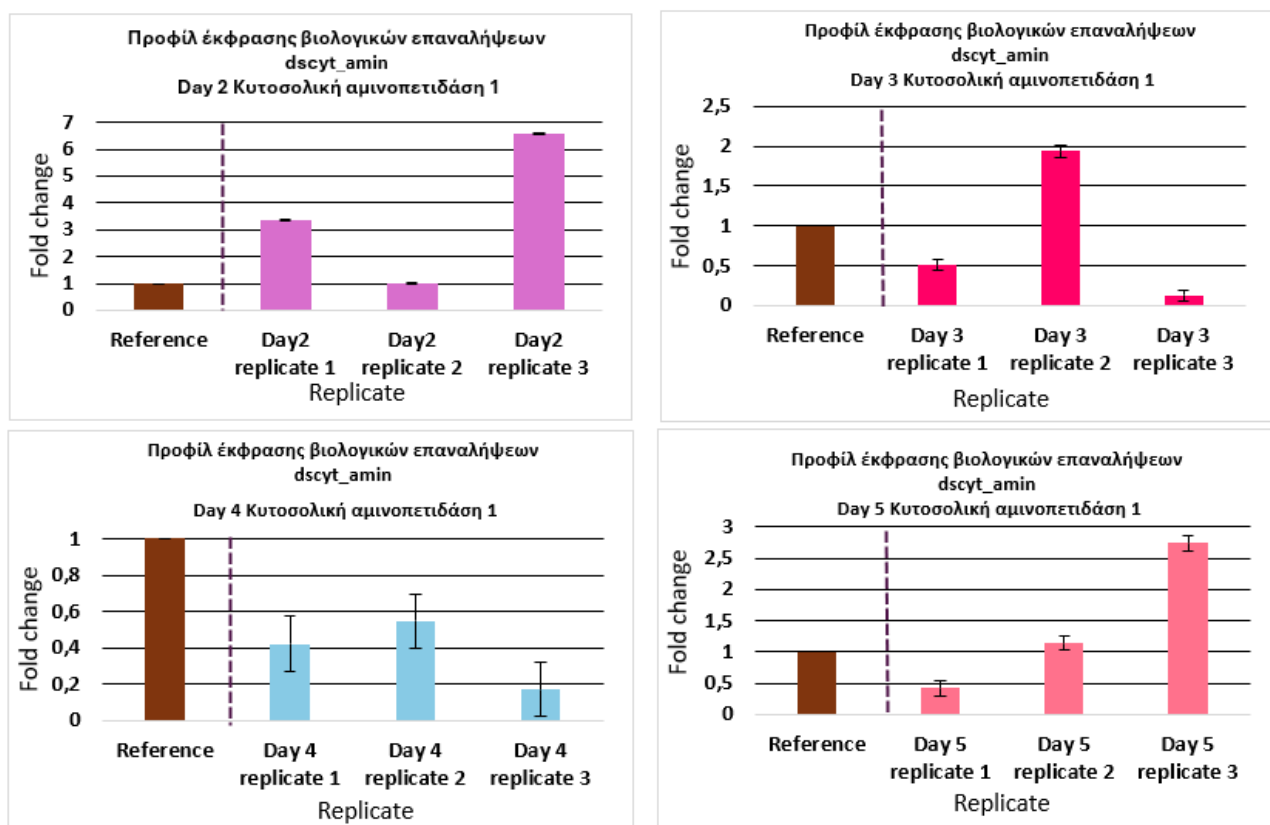
Εικόνα 29. Σύγκριση του Προφίλ έκφρασης του γονιδίου κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 1 ανάμεσα σε GFP και untreated. Ως calibrator για την ανάλυση θεωρήθηκε η αντίστοιχη μέρα του untreated. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίζονται με βάση το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (sem).



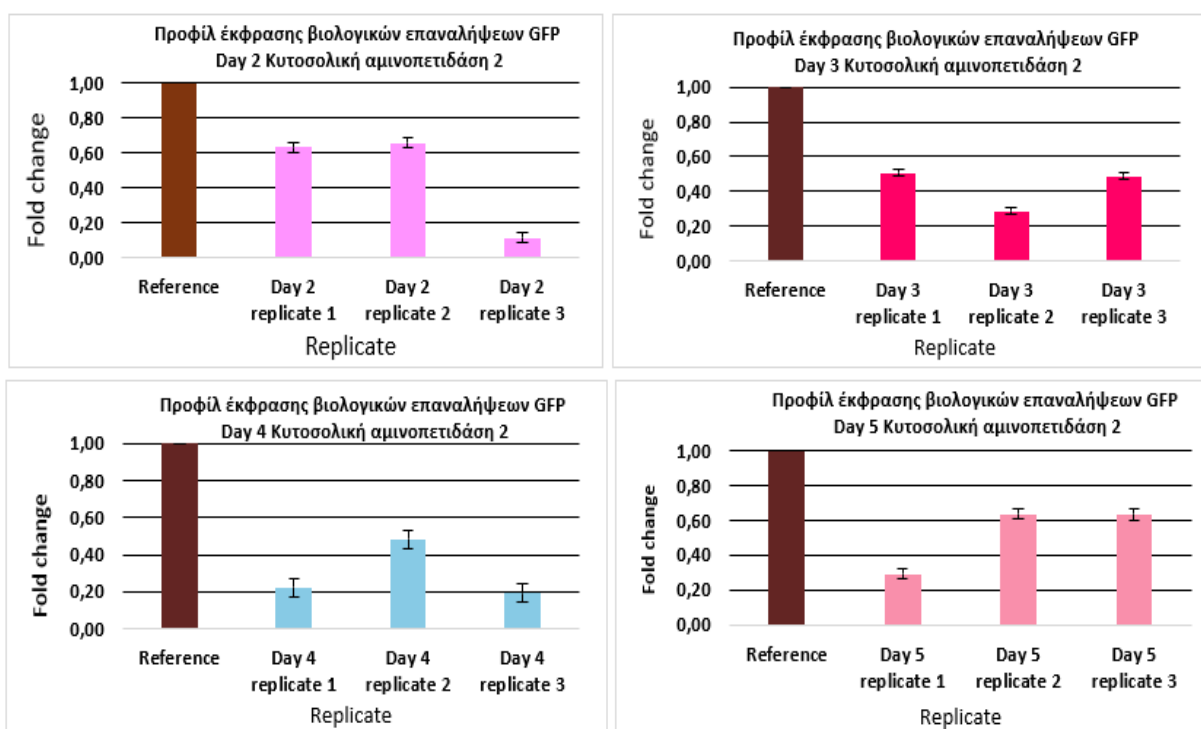
Εικόνα 30. Σύγκριση του Προφίλ έκφρασης του γονιδίου κυτοσολική αμινοπεπτιδάση 2 ανάμεσα σε GFP και untreated. Ως calibrator για την ανάλυση θεωρήθηκε η αντίστοιχη μέρα του untreated. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίζονται με βάση το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (sem).



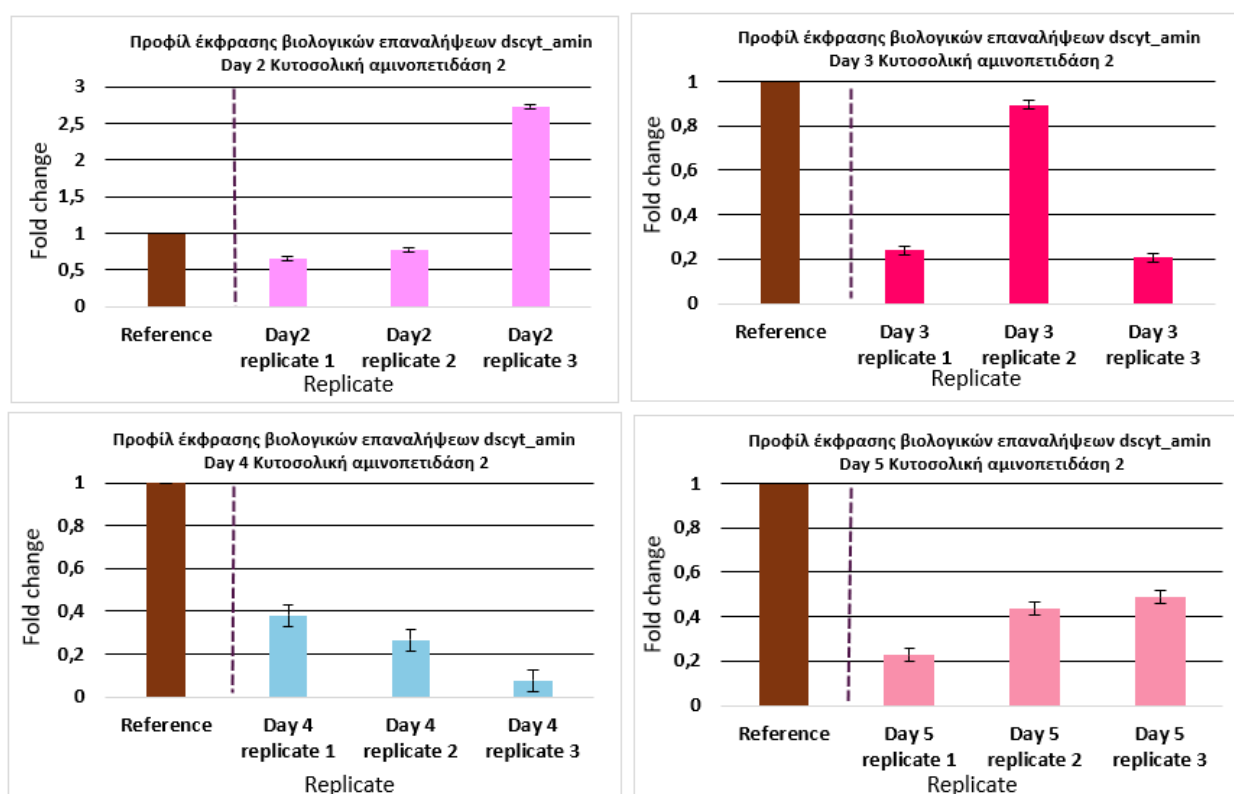
Εικόνα 33. Προφίλ έκφρασης της Κυτοσολικής αμινοπετιδάσης 1 στις τρεις βιολογικές επαναλήψεις των εντόμων στα οποία έχει χορηγηθεί το dsGFP τις μέρες 2, 3, 4 και 5.



Εικόνα 34. Προφίλ έκφρασης της Κυτοσολικής αμινοπετιδάσης 1 στις τρεις βιολογικές επαναλήψεις των εντόμων στα οποία έχει χορηγηθεί το dscyt_amin τις μέρες 2, 3, 4 και 5.



Εικόνα 35. Προφίλ έκφρασης της Κυτοσολικής αμινοπετιδάσης 2 στις τρεις βιολογικές επαναλήψεις των εντόμων στα οποία έχει χορηγηθεί το dsGFP τις μέρες 2, 3, 4 και 5.



Εικόνα 36. Προφίλ έκφρασης της Κυτοσολικής αμινοπετιδάσης 2 στις τρεις βιολογικές επαναλήψεις των εντόμων στα οποία έχει χορηγηθεί το dscyt_amin τις Μέρες 2, 3, 4 και 5.

Βιβλιογραφία

- Artika, I. M., Dewi, Y. P., Nainggolan, I. M., Siregar, J. E., & Antonjaya, U. (2022). Real-Time polymerase chain Reaction: Current techniques, applications, and role in COVID-19 diagnosis. *Genes*, 13(12), 2387. <https://doi.org/10.3390/genes13122387>
- Bachtrog, D. (2013a). Y-chromosome evolution: emerging insights into processes of Y-chromosome degeneration. *Nature Reviews. Genetics*, 14(2), 113–124.
- Bachtrog, D. (2020). The Y chromosome as a battleground for intragenomic conflict. *Trends in Genetics*, 36(7), 510–522. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.04.008>
- Bachtrog, D., Mahajan, S., & Bracewell, R. (2019). Massive gene amplification on a recently formed *Drosophila* Y chromosome. *Nature Ecology & Evolution*, 3(11), 1587–1597. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-1009-9>
- Bachtrog, D., Mank, J. E., Peichel, C. L., Kirkpatrick, M., Otto, S. P., Ashman, T., Hahn, M. W., Kitano, J., Mayrose, I., Ming, R., Perrin, N., Ross, L., Valenzuela, N., & Vamosi, J. C. (2014). Sex determination: Why so many ways of doing it? *PLoS Biology*, 12(7), e1001899.
- Baronio, C. A., Bernardi, D., Schutze, I. X., Baldin, M. M., Machota, R., Garcia, F. R. M., & Botton, M. (2019). Toxicities of Insecticidal Toxic Baits to Control *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): Implications for Field Management. *Journal of Economic Entomology*.
- Ben-David, G., Miller, E., & Steinhauer, J. (2015). *Drosophilaspermatoid individualization is sensitive to temperature and fatty acid metabolism*. *Spermatogenesis*, 5(1), e1006089. <https://doi.org/10.1080/21565562.2015.1006089>
- Bernhardt, H. S., & Tate, W. P. (2012). Primordial soup or vinaigrette: did the RNA world evolve at acidic pH? *Biology Direct*, 7(1), 4.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., & Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), 363–366.
- Blackmon, H., Ross, L., & Bachtrog, D. (2016). Sex determination, sex chromosomes, and karyotype evolution in insects. *Journal of Heredity*, 108(1), 78–93. <https://doi.org/10.1093/jhered/esw047>
- Blaser, O., Grossen, C., Neuenschwander, S., & Perrin, N. (2012). sex-chromosome turnovers induced by deleterious mutation load. *Evolution*, 67(3), 635–645.
- Brennecke, J., Hipfner, D. R., Stark, A., Russell, R. B., & Cohen, S. M. (2003). bantam Encodes a Developmentally Regulated microRNA that Controls Cell Proliferation and Regulates the Proapoptotic Gene hid in *Drosophila*. *Cell*, 113(1), 25–36. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00231-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00231-9)
- Canovai, R., Caterini, B., Contadini, L., & Galleni, L. (1994). Karyology of the medfly *Ceratitis capitata* (Wied.) mitotic complement: ASG bands. *Caryologia*, 47(3–4), 241–247.
- Cao, H., Kong, W., Ling, B., Wang, Z., Zhang, Y., Guo, Z., Liu, S., & Xu, J. (2024). Bmo-miR-3351 modulates glutathione content and inhibits BmNPV proliferation by targeting BmGSTe6 in *Bombyx mori*. *Insect Science*. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.13318>
- Charlesworth B. (1996) The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Curr Biol.*; 6:149–62.
- Chen, J., Luo, J., Wang, Y., Gurav, A. S., Li, M., Akbari, O. S., & Montell, C. (2021). Suppression of female fertility in *Aedes aegypti* with a CRISPR-targeted male-sterile mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(22). <https://doi.org/10.1073/pnas.2105075118>
- Choo, A., Nguyen, T. N., Ward, C. M., Chen, I. Y., Sved, J., Shearman, D., Gilchrist, A. S., Crisp, P., & Baxter, S. W. (2019). Identification of Y-chromosome scaffolds of the Queensland fruit fly reveal a duplicated gyf gene paralogue common to many *Bactrocera* pest species. *Insect Molecular Biology*, 28(6), 873–886. <https://doi.org/10.1111/imb.12602>
- Christiaens, O., Niu, J., & Taning, C. N. T. (2020). RNAi in Insects: A revolution in fundamental research and pest control applications. *Insects*, 11(7), 415.
- Chung, W., Okamura, K., Martin, R., & Lai, E. C. (2008). Endogenous RNA Interference Provides a Somatic Defense against *Drosophila* Transposons. *CB/Current Biology*, 18(11), 795–802.
- Church, V. A., Pressman, S., Isaji, M., Truscott, M., Cizmecioglu, N. T., Buratowski, S., Frolov, M. V., & Carthew, R. W. (2017). Microprocessor recruitment to elongating RNA polymerase II is required for differential expression of MicroRNAs. *Cell Reports*, 20(13), 3123–3134. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.010>
- Cloud-based platform for biotech R&D | Benchling. (n.d.). <https://www.benchling.com/>
- Cooper, A. M., Silver, K., Zhang, J., Park, Y., & Zhu, K. Y. (2018b). Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects. *Pest Management Science*, 75(1), 18–28.
- De Meyer M, Freidberg A (2006) Revision of the subgenus *Ceratitis* (Pterandrus) Bezzi (Diptera: tephritidae). *Israel J Entomol* 36:197–315
- De Meyer, M., Copeland, R.S., Lux, S.A., Mansell, M.W., Quilici, S., Wharton, R., White, I.M., Zenz, N., (2002). In: *Annotated Check List of Host Plants for Afrotropical Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) of the Genus Ceratitis*, vol. 27 Royal Museum for Central Africa, Tervuren.
- Dobzhansky, T. (1935). *drosophila miranda*, a new species. *Genetics*, 20(4), 377–391. <https://doi.org/10.1093/genetics/20.4.377>
- Dorus, S., Wilkin, E. C., & Karr, T. L. (2011). Expansion and functional diversification of a leucyl aminopeptidase family that encodes the major protein constituents of *Drosophila* sperm. *BMC Genomics*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-177>
- Dunn, D. W., & Follett, P. A. (2017). The Sterile Insect Technique (SIT) - an introduction. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 164(3), 151–154.
- Dymond, J. S. (2013). Explanatory chapter. *Methods in Enzymology on CD-ROM/Methods in Enzymology*, 279–289. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-418687-3.00023-9>
- Ellison, C., Leonard, C., Landeen, E., Gibilisco, L., Phadnis, N., and Bachtrog, D. (2018) Rampant cryptic sex chromosome drive in *Drosophila*. *bioRxiv*

- Elqadhy, M., Hamza, M. A., Askarne, L., Fossati-Gaschnard, O., Lakhtar, H., Mousadik, A. E., Benoumar, A. A., Msanda, F., & Boubaker, H. (2024b). Biology, ecology, and control of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae), with special reference to biological control using entomopathogenic nematode (EPN): a review. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 131(2), 365–402.
- Fraisse, C., Picard, M. a. L., & Vicoso, B. (2017). The deep conservation of the Lepidoptera Z chromosome suggests a non-canonical origin of the W. *Nature Communications*, 8(1).
- Furman, B. L. S., Metzger, D. C. H., Darolti, I., Wright, A. E., Sandkam, B. A., Almeida, P., Shu, J. J., & Mank, J. E. (2020). Sex Chromosome Evolution: So Many Exceptions to the Rules. *Genome Biology and Evolution*, 12(6), 750–763. <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa081>
- Gabrieli, P., Falaguerra, A., Siciliano, P., Gomulski, L. M., Scolari, F., Zacharopoulou, A., Franz, G., Malacrida, A. R., & Gasperi, G. (2010b). Sex and the single embryo: early development in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. *BMC Developmental Biology*, 10(1).
- Gasperi, G., Bonizzoni, M., Gomulski, L., Murelli, V., Torti, C., Malacrida, A., & Guglielmino, C. (2002). Genetic differentiation, gene flow and the origin of infestations of the medfly, *Ceratitidis capitata*. *Genetica*, 116(1), 125–135.
- Ghildiyal, M., Seitz, H., Horwich, M. D., Li, C., Du, T., Lee, S., Xu, J., Kittler, E. L., Zapp, M. L., Weng, Z., & Zamore, P. D. (2008). Endogenous siRNAs Derived from Transposons and mRNAs in *Drosophila* Somatic Cells. *Science*, 320(5879), 1077–1081.
- Giunti, G., Benelli, G., Campolo, O., Canale, A., Kapranas, A., Liedo, P., De Meyer, M., Nestel, D., Ruij, L., Scolari, F., Wang, X., & Papadopoulos, N. T. (2023). Biology, ecology, and invasiveness of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*: a review. *Entomologia Generalis*, 43(6), 1221–1239.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(6), pdb.top095109. <https://doi.org/10.1101/pdb.top095109>
- GRISP Research Solutions. (n.d.). TripleXtractor Reagent. <https://www.grisp.pt>
- Haag, E. S. (2007). Why two sexes? Sex determination in multicellular organisms and protistan mating types. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 18(3), 348–349. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.05.009>
- Harrison, J. F. (2001). insect acid-base physiology. *Annual Review of Entomology*, 46(1), 221–250.
- Horwich, M. D., Li, C., Matrangola, C., Vagin, V., Farley, G., Wang, P., & Zamore, P. D. (2007). The drosophila RNA methyltransferase, DMHEN1, modifies germline PIRNAs and Single-Stranded siRNAs in RISC. *Current Biology*, 17(14), 1265–1272. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.030>
- How to use the IDT OligoAnalyzer™ Tool. (n.d.). [Video]. Integrated DNA Technologies. <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>
- Hoy, M. A. (2003). Nuclear and extranuclear DNA in insects. In Elsevier eBooks (pp. 50–75).
- Hughes, J. F., Skaletsky, H., Brown, L. G., Pyntikova, T., Graves, T., Fulton, R. S., Dugan, S., Ding, Y., Buhay, C. J., Kremitzki, C., Wang, Q., Shen, H., Holder, M., Villasana, D., Nazareth, L. V., Cree, A., Courtney, L., Veizer, J., Kotkiewicz, H., . . . Page, D. C. (2012). Strict evolutionary conservation followed rapid gene loss on human and rhesus Y chromosomes. *Nature*, 483(7387), 82–86. <https://doi.org/10.1038/nature10843>
- Invitrogen. (n.d.). M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/μL). <http://www.thermoscientific.com>
- Invitrogen. (n.d.). RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor. <http://www.thermoscientific.com>
- Iwasaki, S., Sasaki, H. M., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Tadakuma, H., & Tomari, Y. (2015). Defining fundamental steps in the assembly of the *Drosophila* RNAi enzyme complex. *Nature*, 521(7553), 533–536. <https://doi.org/10.1038/nature14254>
- Jakymiw, A., Lian, S., Eystathiou, T., Li, S., Satoh, M., Hamel, J. C., Fritzler, M. J. and Chan, E. K. (2005). Disruption of GW bodies impair mammalian RNA interference. *Nat. Cell Biol.* 7, 1267–1274.
- JBrowse | JBrowse. (n.d.). <https://jbrowse.org/jb2/>
- Joga, M. R., Zotti, M. J., Smagghe, G., & Christiaens, O. (2016). RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery Methods for pest insect control: What we know so far. *Frontiers in Physiology*, 7.
- Juan-Blasco, M., Sabater-Muñoz, B., Pla, I., Argilés, R., Castañera, P., Jacas, J. A., Ibáñez-Gual, M. V., & Urbaneja, A. (2014). Estimating SIT-driven population reduction in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*, from sterile mating. *Bulletin of Entomological Research*, 104(2), 233–242.
- Kaiser, V. B., & Bachtrög, D. (2010). Evolution of Sex Chromosomes in Insects. *Annual Review of Genetics*, 44(1), 91–112. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163600>
- Karlikow, M., Goic, B., Mongelli, V., Salles, A., Schmitt, C., Bonne, I., Zurzolo, C., & Saleh, M. (2016). *Drosophila* cells use nanotube-like structures to transfer dsRNA and RNAi machinery between cells. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep27085>
- Kent TV, Uzunovic J, Wright SI. (2017). Coevolution between transposable elements and recombination. *PhilosTransRSocB*.372(1736):20160458
- Khehra, N., Padda, I. S., & Swift, C. J. (2023, March 6). Polymerase chain Reaction (PCR). StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>
- Koerich, L. B., Wang, X., Clark, A. G., & Carvalho, A. B. (2008). Low conservation of gene content in the *Drosophila* Y chromosome. *Nature*, 456(7224), 949–951.
- Lau, P., Guiley, K. Z., De, N., Potter, C. S., Carragher, B., & MacRae, I. J. (2012). The molecular architecture of human Dicer. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(4), 436–440.
- Laurinyecz, B., Vedelek, V., Kovács, A. L., Szilasi, K., Lipinszki, Z., Slezák, C., Darula, Z., Juhász, G., & Sinka, R. (2019). Sperm-Leucylaminopeptidases are required for male fertility as structural components of mitochondrial paracrystalline material in *Drosophila melanogaster* sperm. *PLoS Genetics*, 15(2), e1007987. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007987>
- Laurinyecz, B., Vedelek, V., Kovács, A. L., Szilasi, K., Lipinszki, Z., Slezák, C., Darula, Z., Juhász, G., & Sinka, R. (2019). Sperm-Leucylaminopeptidases are required for male fertility as structural components of mitochondrial paracrystalline material in *Drosophila melanogaster* sperm. *PLoS Genetics*, 15(2), e1007987. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007987>

- Lee, Y. S., Nakahara, K., Pham, J. W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E. J., & Carthew, R. W. (2004). Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, 117(1), 69–81. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00261-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00261-2)
- Lim, A. K., & Kai, T. (2007). Unique germ-line organelle, nuage, functions to repress selfish genetic elements in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(16), 6714–6719. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701920104>
- Lim, D., Oh, C., Lee, L., Hong, J., Noh, S., Hwang, S., Kim, S., Han, S., & Lee, Y. S. (2011). The endogenous siRNA pathway in *Drosophila* impacts stress resistance and lifespan by regulating metabolic homeostasis. *FEBS Letters*, 585(19), 3079–3085.
- Lima, W. F., De Hoyos, C. L., Liang, X., & Crooke, S. T. (2016). RNA cleavage products generated by antisense oligonucleotides and siRNAs are processed by the RNA surveillance machinery. *Nucleic Acids Research*, 44(7), 3351–3363. <https://doi.org/10.1093/nar/qkw065>
- Liu, P., Yu, S., Zheng, W., Zhang, Q., Qiao, J., Li, Z., Deng, Z., & Zhang, H. (2024). Identification and functional verification of Y-chromosome-specific gene typo-gyf in *Bactrocera dorsalis*. *Insect Science*, 31(4), 1270–1284. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.13311>
- Liu, Y., Ye, X., Jiang, F., Liang, C., Chen, D., Peng, J., Kinch, L. N., Grishin, N. V., & Liu, Q. (2009). C3PO, an endoribonuclease that promotes RNAi by facilitating RISC activation. *Science*, 325(5941), 750–753. <https://doi.org/10.1126/science.1176325>
- Lucchetta, E. M., Carthew, R. W., & Ismagilov, R. F. (2009). The Endo-siRNA pathway is essential for robust development of the *Drosophila* embryo. *PLoS One*, 4(10), e7576.
- Mahajan, S., & Bachtrög, D. (2017). Convergent evolution of Y chromosome gene content in flies. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00653-x>
- Maktura, G. C., Paranhos, B. J., & Marques-Souza, H. (2021). RNAi in fruit flies (Diptera: Tephritidae): Successes and challenges. *Journal of Applied Entomology*, 145(8), 740–756. <https://doi.org/10.1111/jen.12905>
- Malone, C. D., Brennecke, J., Dus, M., Stark, A., McCombie, W. R., Sachidanandam, R., & Hannon, G. J. (2009). Specialized PIRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary. *Cell*, 137(3), 522–535. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.040>
- Malone, C. D., Lehmann, R., & Teixeira, F. K. (2015). The cellular basis of hybrid dysgenesis and Stellate regulation in *Drosophila*. *Current Opinion in Genetics & Development*, 34, 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.cde.2015.09.003>
- Matsui, M., Fowler, J. H., & Walling, L. L. (2006). Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biological Chemistry*, 387(12). <https://doi.org/10.1515/bc.2006.191>
- Meccariello, A., Salvemini, M., Primo, P., Hall, B., Koskinioti, P., Dalíková, M., Gravina, A., Gucciardino, M. A., Forlenza, F., Gregoriou, M., Ippolito, D., Monti, S. M., Petrella, V., Perrotta, M. M., Schmeing, S., Ruggiero, A., Scolari, F., Giordano, E., Tsoumani, K. T., . . . Saccone, G. (2019b). Maleness-on-the-Y (MoY) orchestrates male sex determination in major agricultural fruit fly pests. *Science*, 365(6460), 1457–1460.
- Meiklejohn, C. D., & Tao, Y. (2010). Genetic conflict and sex chromosome evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(4), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.10.005>
- Modern Experimental Biochemistry (3rd ed.). (2000). Pearson.
- Mohn, F., Sienski, G., Handler, D., & Brennecke, J. (2014). The Rhino-Deadlock-Cutoff complex licenses noncanonical transcription of Dual-Strand PIRNA clusters in *Drosophila*. *Cell*, 157(6), 1364–1379. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.031>
- Morrison, N., Franz, G., Koukidou, M., Miller, T., Saccone, G., Alphey, L., Beech, C., Nagaraju, J., Simmons, G., Polito, L. (2010). Genetic Improvements to The Sterile Insect Technique for Agricultural Pests. *Aspac J Mol Biol Biotechnol*. 18
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M., & Solera, J. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 439, 231–250. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017>
- NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, Mini kit for gel extraction or PCR clean up. (n.d.). MACHEREY-NAGEL. <https://www.mn-net.com/nucleospin-gel-and-pcr-clean-up-mini-kit-for-gel-extraction-or-pcr-clean-up-740609.50>
- Nucleotide BLAST: Search nucleotide databases using a nucleotide query. (n.d.). https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
- Okamura, K., Hagen, J. W., Duan, H., Tyler, D. M., & Lai, E. C. (2007). The Mirtron pathway generates microRNA-Class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, 130(1), 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.028>
- Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H., & Siomi, M. C. (2004). Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes & Development*, 18(14), 1655–1666. <https://doi.org/10.1101/qad.1210204>
- Ortolá, B., & Daròs, J. (2024). RNA interference in insects: From a natural mechanism of gene expression regulation to a biotechnological crop protection promise. *Biology*, 13(3), 137.
- Pane, A., Salvemini, M., Bovi, P. D., Polito, C., & Saccone, G. (2002b). The transformer gene in *Ceratitis capitata* provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate. *Development*, 129(15), 3715–3725.
- Papadopoulos NT (2008) Mediterranean fruit fy, *Ceratitis capitata* (wiedemann) (Diptera: Tephritidae). In: *Entomology Eo* (Ed). Springer, Dordrecht, pp 2318–2322
- Passmore, L. A., & Collier, J. (2021). Roles of mRNA poly(A) tails in regulation of eukaryotic gene expression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(2), 93–106. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00417-y>
- Primer designing tool. (n.d.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- PrimerQuest - design qPCR assays | IDT. (n.d.). Integrated DNA Technologies. <https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>
- Q3000 | quawell. (n.d.). Quawell. <https://www.quawell.com/q3000-1>
- Rand, T. A., Petersen, S., Du, F., & Wang, X. (2005). Argonaute2 Cleaves the Anti-Guide Strand of siRNA during RISC Activation. *Cell*, 123(4), 621–629.
- Ricalde MP, Nava DE, Loeck AE, Donatti MG (2012) Temperature-dependent development and survival of Brazilian populations of the Mediterranean fruit fy, *Ceratitis capitata*, from tropical, subtropical, and temperate regions. *J Insect Sci* 12:33.

- Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., & Wittwer, C. T. (1997). Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry*, 245(2), 154–160. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.9916>
- Rohde C, Junior AM, Carvalho FD, da Silva MA (2012a) Selection of entomopathogenic nematodes for the control of the fruit fly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 7:797–802
- Ruiz, M. F., Milano, A., Salvemini, M., Eirín-López, J. M., Perondini, A. L. P., Selivon, D., Polito, C., Saccone, G., & Sánchez, L. (2007). The gene transformer of anastrepha fruit flies (Diptera, tephritidae) and its evolution in insects. *PLoS One*, 2(11), e1239.
- Saleh, M., Van Rij, R. P., Hekele, A., Gillis, A., Foley, E., O'Farrell, P. H., & Andino, R. (2006). The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nature Cell Biology*, 8(8), 793–802.
- Salvemini, M., Robertson, M., Aronson, B., Atkinson, P., Polito, L. C., & Saccone, G. (2009). *Ceratitis capitata* transformer-2 gene is required to establish and maintain the autoregulation of Cctra, the master gene for female sex determination. *the International Journal of Developmental Biology*, 53(1), 109–120.
- Sánchez, G., Murúa, F., Suárez, L., Van Nieuwenhove, G., Taret, G., Pantano, V., Bilbao, M., Schliserman, P., & Ovruski, S. M. (2016). Augmentative releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) for *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) control in a fruit-growing region of Argentina. *Biological Control*, 103, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.08.002>
- Sarno, F., Ruiz, M. F., Eirín-López, J. M., Perondini, A. L. P., Selivon, D., & Sánchez, L. (2010). The gene transformer-2 of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, Tephritidae) and its evolution in insects. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1).
- Sato, K., & Siomi, M. C. (2020). The piRNA pathway in *Drosophila* ovarian germ and somatic cells. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 96(1), 32–42.
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., & Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115(2), 199–208.
- Shibata, S., Sasaki, M., Miki, T., Shimamoto, A., Furuichi, Y., Katahira, J., & Yoneda, Y. (2006). Exportin-5 orthologues are functionally divergent among species. *Nucleic Acids Research*, 34(17), 4711–4721. <https://doi.org/10.1093/nar/qlk663>
- Song, J., Liu, J., Tolia, N. H., Schneidman, J., Smith, S. K., Martienssen, R. A., Hannon, G. J., & Joshua-Tor, L. (2003). The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 10(12), 1026–1032. <https://doi.org/10.1038/nsb1016>
- Spit, J., Philips, A., Wynant, N., Santos, D., Plaetinck, G., & Vanden Broeck, J. (2017). Knockdown of nuclease activity in the gut enhances RNAi efficiency in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, but not in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 81, 103–116.
- Stevens, N. M. (2010b). Studies in spermatogenesis with especial reference to the “accessory chromosome.” <http://ci.nii.ac.jp/ncid/BA39614150>
- Sturgill, D., Zhang, Y., Parisi, M., & Oliver, B. (2007). Demasculinization of X chromosomes in the *Drosophila* genus. *Nature*, 450(7167), 238–241. <https://doi.org/10.1038/nature06330>
- Suarez, L., Van Nieuwenhove, G. A., Murua, F., Bezdjian, L. P., Schliserman, P., Lara, N., Escobar, J., & Ovruski, S. M. (2012). Offspring Production in Response to Host Exposure Times in *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), Reared on the Genetic Sexing Strain Vienna 8 of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, 95(4), 991–999.
- Sun, X., Wang, X., Shi, K., Lyu, X., Sun, J., Raikhel, A. S., & Zou, Z. (2024). Leucine aminopeptidase1 controls egg deposition and hatchability in male *Aedes aegypti* mosquitoes. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-44444-z>
- Sun, Y., Svedberg, J., Hiltunen, M., Corcoran, P., & Johannesson, H. (2017). Large-scale suppression of recombination predates genomic rearrangements in *Neurospora tetrasperma*. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01317-6>
- Sutton, M. D. (2010). Coordinating DNA polymerase traffic during high and low fidelity synthesis. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(5), 1167–1179. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.06.010>
- Thermo Scientific. (n.d.). T7 RNA Polymerase (200 U/μL). <http://www.thermoscientific.com>
- Thermo Scientific. (n.d.). DNase I, RNase-free. <http://www.thermoscientific.com/fermentas>
- Tsoumani, K. T., Belavilas-Trovás, A., Gregoriou, M., & Mathiopoulos, K. D. (2020). Anosmic flies: what Orco silencing does to olive fruit flies. *BMC Genomic Data*, 21(S2). <https://doi.org/10.1186/s12863-020-00937-0>
- Tsutsumi, A., Kawamata, T., Izumi, N., Seitz, H., & Tomari, Y. (2011). Recognition of the pre-miRNA structure by *Drosophila* Dicer-1. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(10), 1153–1158. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2125>
- Vbranovski, M. D. (2014). Meiotic sex chromosome inactivation in *drosophila*. *Journal of Genomics*, 2, 104–117. <https://doi.org/10.7150/jgen.8178>
- Wang, X., Aliyari, R., Li, W. X., Li, H. W., Kim, K., Carthew, R. W., Atkinson, P. W., & Ding, S. (2006). RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *drosophila*. *Science*, 312(5772), 452–454. <https://doi.org/10.1126/science.1125694>
- Wang, Y., Sheng, G., Juranek, S., Tuschl, T., & Patel, D. J. (2008). Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex. *Nature*, 456(7219), 209–213. <https://doi.org/10.1038/nature07315>
- Wasbrough, E. R., Dorus, S., Hester, S., Howard-Murkin, J., Lilley, K., Wilkin, E., Polpitiya, A., Petritis, K., & Karr, T. L. (2010). The *Drosophila melanogaster* sperm proteome-II (DmSP-II). *Journal of Proteomics*, 73(11), 2171–2185. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.09.002>
- Welker, N. C., Maity, T. S., Ye, X., Aruscavage, P. J., Krauchuk, A. A., Liu, Q., & Bass, B. L. (2011). Dicer's helicase domain discriminates DSRNA termini to promote an altered reaction mode. *Molecular Cell*, 41(5), 589–599.
- Wynant, N., Duressa, T. F., Santos, D., Van Duppen, J., Proost, P., Huybrechts, R., & Vanden Broeck, J. (2014). Lipophorins can adhere to dsRNA, bacteria and fungi present in the hemolymph of the desert locust: A role as general scavenger for pathogens in the open body cavity. *Journal of Insect Physiology*, 64, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.02.010>

- Xiao, D., Gao, X., Xu, J., Liang, X., Li, Q., Yao, J., & Zhu, K. Y. (2015). Clathrin-dependent endocytosis plays a predominant role in cellular uptake of double-stranded RNA in the red flour beetle. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 60, 68–77.
- Zapater, M., & Robinson, A. S. (1986). Sex chromosome aneuploidy in a male-linked translocation in *Ceratitis capitata*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 28(1), 161–167.
- Zhou, Q., & Bachtrög, D. (2012). Sex-Specific adaptation drives early sex chromosome evolution in *Drosophila*. *Science*, 337(6092), 341–345. <https://doi.org/10.1126/science.1225385>
- Zhou, Q., Ellison, C. E., Kaiser, V. B., Alekseyenko, A. A., Gorchakov, A. A., & Bachtrög, D. (2013). The epigenome of evolving *Drosophila* Neo-Sex chromosomes: dosage compensation and heterochromatin formation. *PLoS Biology*, 11(11), e1001711. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001711>