



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής

Θέμα Διπλωματικής εργασίας:

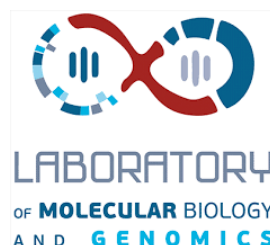
Μεταγραφομικοί δείκτες για ποιοτικό έλεγχο των αρσενικών εντόμων των GSS της *Ceratitis capitata* για την SIT.

Transcriptomic markers for quality control of GSS males of *Ceratitis capitata* for SIT applications.



Χριστίνα Βασίλειος Μαλάμου

Λάρισα, 2025



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. Μαθιόπουλου Κωνσταντίνου το χειμερινό εξάμηνο του 2024.

Τριμελής Επιτροπή:

- **Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος:** Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Konstantinos
Matthiopoulos**

Digitally signed by Konstantinos Matthiopoulos
DN: OU=Department of Biochemistry and
Biotechnology, O=University of Thessaly, CN=
Konstantinos Matthiopoulos, E=kmathiop@bio.uth.gr
Reason: I am the author of this document
Location:
Date: 2025.02.11 12:40:42+02'00'
Foxit PDF Reader Version: 2024.4.0

- **Βασιλειάδης Σωτήρης:** Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

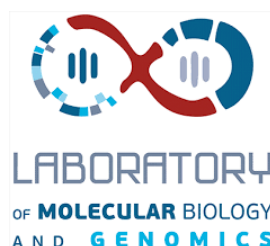
SOTIRIOS VASILEIADIS

12.02.2025 11:46

- **Νικόλαος Παπαδόπουλος:** Καθηγητής Εφαρμοσμένης Εντομολογίας του τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

NIKOLAOS PAPADOPOULOS

12.02.2025 09:25



Πίνακας περιεχομένων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1 SIT και Σημασία Ποιότητας των Αρσενικών	8
1.1 Τεχνική των Στείρων Εντόμων (Sterile Insect Technique - SIT)	8
1.1.1 Πληθυσμιακός έλεγχος της <i>Ceratitis capitata</i>	8
1.1.2 Στελέχη γενετικού φυλετικού διαχωρισμού (Genetic Sexing Strains, GSS) της <i>Ceratitis capitata</i>	11
1.2 Σημασία της Ποιότητας των αρσενικών GSS εντόμων για την επιτυχία της SIT13	
2 Μεταγραφομικοί Δείκτες και Ποιοτικός έλεγχος	16
2.1 Μεταγραφομικοί Δείκτες για Ποιοτικό Έλεγχο των GSS στελεχών.....	16
2.2 Πιθανός μεταγραφικός δείκτης	17
2.2.1 Η οικογένεια AFF (AF4/FMR2)	19
2.2.2 Το γονίδιο AFF4	19
3 RNAi ως Εργαλείο Σίγησης Γονιδίων	22
3.1 Αρχές λειτουργίας του RNAi.	22
ΣΚΟΠΟΣ	24
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	25
3.1 Σχεδιασμός εκκινητών	25
3.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	26
3.3 Ηλεκτροφόρηση Πηκτής Αγαρόζης	27
3.4 Απομόνωση DNA απο Πηκτή Αγαρόζης (Gel extraction).....	28
3.5 In Vitro Μεταγραφή για Παραγωγή Δίκλωνων Μορίων RNA (dsRNAs) (In Vitro Transcription)	28
3.6 Χορήγηση dsRNA στο Έντομο με Ένεση.....	29
3.7 Απομόνωση RNA (RNA extraction)	30
3.8 Αντίδραση DNase (DNase Treatment)	32
3.9 Παραγωγή cDNA.....	33

3.10	Ποσοτική PCR Πραγματικού Χρόνου (qPCR).....	34
4	Αποτελέσματα	36
4.1	Πρώτος κύκλος ενέσεων	36
4.2	Προφιλ έκφρασης του AFF4	38
4.3	2 ^{ος} Κύκλος ενέσεων	39
4.3.1	Παρατήρηση φαινοτύπου	42
5	Συζήτηση.....	45
	Παράρτημα	49
	Βιβλιογραφία	51

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας αυτό το κομμάτι των σπουδών μου, νιώθω την υποχρέωση να ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους για τη συνεισφορά και την υποστήριξή τους καθ' όλη τη διαδικασία. Αρχικά, τον κ. Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο που με δέχτηκε στο εργαστήριό του προκειμένου να εκπονήσω τη παρούσα εργασία. Επίσης την υπεύθυνη μου, υποψήφια διδάκτορα Σπανομήτρου Αντωνία, που υπήρξε ανεκτίμητη πηγή γνώσης και καθοδήγησης, αλλά και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, Λευκή, Μαρία και Δημήτρη που ήταν πάντα πρόθυμοι να βοηθήσουν. Τέλος, δεν μπορώ να μην ευχαριστήσω τους φίλους και τους γονείς μου που μου στάθηκαν σε όλη τη διάρκεια της πτυχιακής αλλά και της φοίτησης μου στη σχολή, που χωρίς την υποστήριξή τους δεν θα τα είχα καταφέρει.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η **Τεχνική του στείρου εντόμου** (Sterile Insect Technique, SIT), αποτελεί μια εναλλακτική μέθοδο πληθυσμιακού ελέγχου παρασιτικών εντόμων, που βασίζεται στην απελευθέρωση στείρων αρσενικών εντόμων σε έναν πληθυσμό στόχο. Για να επιτευχθεί ικανοποιητική μείωση του πληθυσμού του εντόμου, τα στείρα αρσενικά που απελευθερώνονται πρέπει να είναι ανταγωνιστικά ως προς τα αγρίου τύπου για πρόσβαση σε θηλυκά. Η **ποιότητα** των στείρων αρσενικών εντόμων, δηλαδή η ικανότητα τους να ανταγωνιστούν τα στείρα αρσενικά για αναπαραγωγή με τα αγρίου τύπου θηλυκά, καθορίζεται από χαρακτηριστικά όπως η ικανότητα πτήσης, η επιβίωση υπό στρες αλλά και η αναπαραγωγική ανταγωνιστικότητα.

Τα στελέχη φυλετικού διαχωρισμού (GSS) που χρησιμοποιούνται για την μύγα της Μεσογείου (*Ceratitis capitata*), με επικρατέστερο το στέλεχος Vienna 8 παρουσιάζει χαμηλότερες επιδόσεις σε πτυχές όπως η επιβίωση, η ανάπτυξη και η αναπαραγωγή, σε σύγκριση με τα έντομα αγρίου τύπου. Αυτό οφείλεται τόσο στο γενετικό υπόβαθρο του στελέχους αλλά και σε συνθήκες της SIT που επηρεάζουν αρνητικά την αρμοστικότητα τους κατά την απελευθέρωση στο περιβάλλον. Η ποιότητα των στελεχών επομένως, αποτελεί μια πολυπαραγοντική συνθήκη που είναι δύσκολο να αποτυπωθεί με ακρίβεια.

Η χρήση μεταγραφικών δεικτών που αντικατοπτρίζουν την ποιότητα των εντόμων, και ιδιαίτερα την αναπαραγωγική τους ανταγωνιστικότητα, θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην παρακολούθηση της κατάστασης των πληθυσμών, στην αξιολόγηση της επίδρασης των συνθηκών στην απόδοσή τους και κατά συνέπεια στη λήψη μέτρων για την βελτίωση ή την δημιουργία νέων στελεχών.

Στην παρούσα πτυχιακή έγινε περαιτέρω έρευνα της καταλληλότητας του γονιδίου **AFF4** (LOCUS18540_19669) για χρήση ως μεταγραφομικό δείκτη ποιότητας των στείρων αρσενικών *Ceratitis capitata*. Το γονίδιο αυτό επιλέχθηκε από μια λίστα γονιδίων που μέσω δεδομένων RNA-seq, φάνηκαν να εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα στο στέλεχος αγρίου τύπου EgII σε σχέση με το GSS στέλεχος Vienna 8. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου του συγκεκριμένου, μη χαρακτηρισμένου γονιδίου στην ανάπτυξη και την αναπαραγωγική ικανότητα των αρσενικών.

ABSTRACT

The **Sterile Insect Technique (SIT)** is an alternative method for population control of parasitic insects, which relies on the release of sterile male insects into a target population. To achieve a satisfactory reduction in the insect population, the released sterile males must be competitive with wild-type males for sufficient access to females. The **quality** of the sterile male insects, i.e., their ability to compete with wild-type males for reproduction with wild-type females, is determined by characteristic as their flight ability, survival under stress, and mating competitiveness.

The genetic sexing strains (**GSS**) used for the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*), with Vienna 8 being the most prominent, exhibit lower performance in indicators such as survival, development, and reproduction compared to wild-type insects. This is primarily due to the genetic background of the strain and certain conditions of SIT which can impact their overall fitness upon their release to the environment. Thus, the quality of these strains is a multifactorial condition that is challenging to measure.

The use of **transcriptomic markers** that reflect the quality of the insects, particularly their reproductive competitiveness, could assist in monitoring population status, assessing the impact of conditions on their performance, and guiding measures to improve or develop new strains.

In the present thesis, further research was conducted on the suitability of the **AFF4 (LOCUS18540_19669)** gene for use as a transcriptomic marker of the quality of males of *Ceratitis capitata*. This gene was selected from a list of genes that, based on RNA-seq data, appeared to be expressed at higher levels in the wild-type strain EglI compared to the GSS strain Vienna 8. The analysis also aimed to investigate the role of this uncharacterized gene in the development and reproductive ability of the males.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1 SIT και Σημασία Ποιότητας των Αρσενικών

1.1 Τεχνική των Στείρων Εντόμων (Sterile Insect Technique - SIT)

Ανάμεσα στις βιολογικές μεθόδους πληθυσμιακού ελέγχου εντόμων, η **Τεχνική του Στείρου Εντόμου** (Sterile Insect Technique-SIT), αποτελεί την πιο ειδο-ειδική και λιγότερο παρεμβατική διαθέσιμη μέθοδο¹. Από την σύλληψή της στις δεκαετίες του 1930 και 1940, αποτελεί πλέον μια από της κύριες βιολογικές μεθόδους πληθυσμιακού ελέγχου και έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την εξάλειψη ή την καταστολή πολλών παρασίτων παγκοσμίως^{2,3}.

Η τεχνική απαρτίζεται από 3 βασικά στάδια: **(1)** τη μαζική εκτροφή του εντόμου στόχου, **(2)** τη στείρωση του πληθυσμού με τη χρήση ιονίζουσας ακτινοβολίας και **(3)** την απελευθέρωση των στείρων εντόμων στην επιθυμητή περιοχή. Τα στείρα πλέον αρσενικά θα ζευγαρώσουν με τα άγρια θηλυκά, δίνοντας όμως απογόνους που δεν είναι βιώσιμοι. Με επαναλαμβανόμενες απελευθερώσεις στείρων εντόμων, ο πληθυσμός τους μπορεί να μειωθεί ή και σε περιπτώσεις να εξαλειφθεί εντελώς^{4,5}.

Συνήθως, εφαρμόζεται σε συνδιασμό με άλλες τεχνικές ως μέρος προγραμμάτων εφαρμοσμένης διαχείρισης παρασίτων σε εκτεταμένη περιοχή (*Area-Wide Integrated Pest Management, AW-IPM*), που εστιάζουν στην προληπτική διαχείριση των παρασιτικών πληθυσμών στα οικοσυστήματα⁶.

1.1.1 Πληθυσμιακός έλεγχος της *Ceratitis capitata*

Η **αντιμετώπιση** της μύγας της Μεσογείου, *C. capitata*, σήμερα γίνεται κυρίως με τη χρήση εντομοκτόνων όπως των πυρεθροειδών και των νεονικοτινοειδών, ιδιαίτερα μετά την ευρεία απαγόρευση των οργανοφωσφορικών που κυριαρχούσαν τις προηγούμενες δεκαετίες⁷. Ωστόσο, η εκτεταμένη χρήση τους, συνοδεύεται από πληθώρα μειονεκτημάτων όπως η επιβάρυνση του περιβάλλοντος⁸, η αρνητική επίδραση σε μη στοχευόμενα έντομα⁹, η ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών¹⁰, ενώ είναι πιθανό να παρεμβάλλεται σε βιολογικές μεθόδους αντιμετώπισης άλλων παρασίτων¹¹. Επιπλέον, η έκθεση σε εντομοκτόνα έχει επιπτώσεις και στην ανθρώπινη υγεία, συνδέοντας τα με νευροτοξικές δράσεις και ενδοκρινικές διαταραχές^{12,13}.

Η διαχείριση παρασίτων όπως η μύγα της μεσογείου, μπορεί επίσης να επιτευχθεί μέσω ολοκληρωμένων προγραμμάτων **AW-IPM**, καθώς η αντιμετώπιση στο

επίπεδο μεμονωμένων καλλιεργειών απαιτεί την εκτεταμένη χρήση εντομοκτόνων και δεν είναι αρκετά αποτελεσματική. Ένας βασικός πυλώνας των προγραμμάτων *AW-IPM*, αποτελεί και η *SIT*, μια τεχνική που έχει τη *C. capitata* ως έναν από τους κυριότερους στόχους της, καθώς σήμερα υπάρχουν 14 ενεργά προγράμματα και 10 μονάδες μαζικής εκτροφής στείρων *GSS* της ¹⁴. Η πρώτη μάλιστα επιτυχής εφαρμογή της τεχνικής σε μεγάλη κλίμακα έγινε για την αποτροπή της εγκαθίδρυσης της *C. capitata* στο νότιο Μεξικό, τη δεκαετία του 1970¹⁵.

1.1.1.1 *Ceratitis capitata*

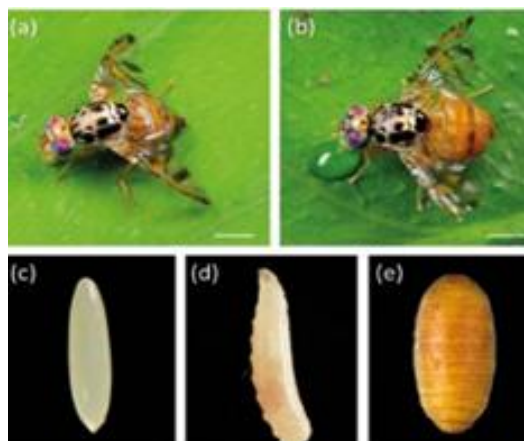


Εικόνα 1. Ραχιαία όψη αρσενικού ενήλικου *C. capitata* (M. C. Thomas, et.al, 1969)

Η **μύγα της μεσογείου** (*Ceratitis capitata*) ή medfly (**Εικόνα 1**) ανήκει στην οικογένεια των Tephritidae της τάξης των δίπτερων και είναι ένα από τα πιο καταστροφικά παράσιτα καλλιεργειών παγκοσμίως, προσβάλλοντας πάνω από 300 είδη ξενιστών^{16,17}. Αν και ενδημικό παράσιτο της Νοτιοανατολικής Αφρικής, λόγω χαρακτηριστικών του όπως η εντυπωσιακή του προσαρμοστικότητα του και οι σύντομες γενιές του, έχει πλέον εξαπλωθεί στα περισσότερα τροπικά και εύκρατα περιβάλλοντα^{18,19}.

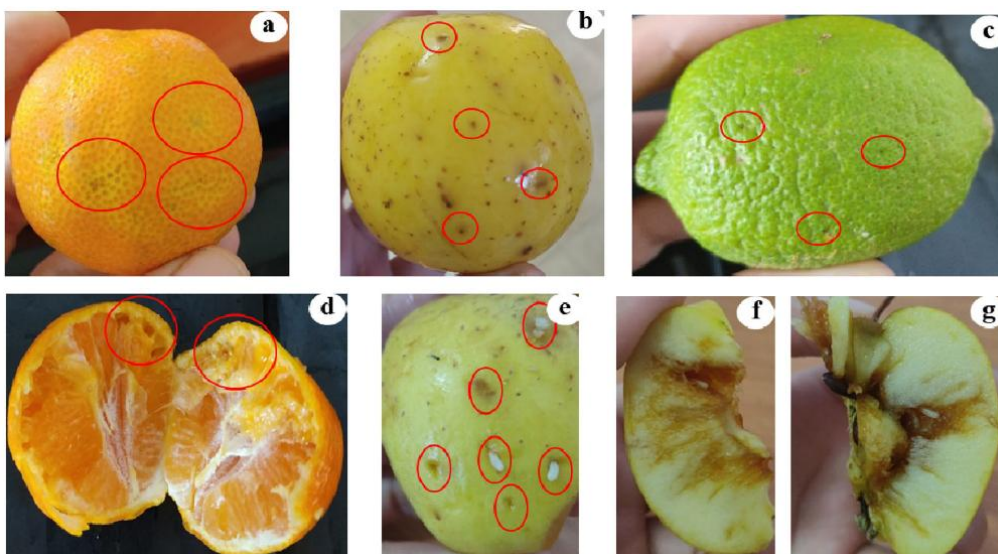
Μια από τις κύριες αιτίες της καταστροφικότητας του εντόμου πηγάζει από τον ίδιο τον **κύκλο ζωής** του. Η *C. capitata*, όντας ολομετάβολο έντομο, περνάει τέσσερα αναπτυξιακά στάδια: αυγό, προνύμφη, νύμφη (πούπα) και ενήλικο (**Εικόνα 2**) με τη διάρκεια μίας γενιάς να κυμαίνεται γύρω στις 20-30 μέρες, ανάλογα με τις κλιματολογικές συνθήκες ¹⁸.

Μια ενήλικη θηλυκή *C. capitata* γεννάει αυγά κάτω από τη φλούδα του φρούτου, δημιουργώντας νέες οπές ή χρησιμοποιώντας ήδη υπάρχουσες. Αφού τα αυγά εκκολαφθούν, οι προνύμφες τρέφονται με το εσωτερικό του φρούτου, σχηματίζοντας τούνελ, καταστρέφοντάς το εκ των έσω. Ανάλογα το είδος του φρούτου, οι λάρβες ωριμάζουν εντός 10-26 ημερών. Αφού ωριμάσουν, οι προνύμφες εγκαταλείπουν το φρούτο και πέφτουν στο έδαφος όπου μετατρέπονται σε βομβύκια (πούπες), μια διαδικασία που λαμβάνει 6-13 μέρες, ξανά ανάλογα τη θερμοκρασία.



Εικόνα 2. Αναπτυξιακά στάδια *C. capitata*: a) Ενήλικο θηλυκό b) Ενήλικο αρσενικό c) (c) αυγό, (d) λάρβα τρίτου σταδίου, (e) βομβύκιο/πούπα. (photo credit: P. Giannotti)(Gunti et.al,2023)

Η βλάβη στα φρούτα μπορεί να προκληθεί τόσο από την εναπόθεση αυγών όσο και από τη δράση των προνυμφών (**Εικόνα 3**). Κατά την ωοαπόθεση, οι οπές που δημιουργεί ο οωοποθέτης προκαλούν αποχρωματισμό που εξελίσσονται σε καφέ κηλίδες που υποβαθμίζουν την εμπορική αξία του καρπού. Παράλληλα, οι προνύμφες των πρώτων σταδίων τρέφονται με το εσωτερικό του καρπού, καταστρέφοντας το εξολοκλήρου. Επιπλέον, ακόμα κι αν η ζημιά από τις προνύμφες είναι περιορισμένη, οι οπές καθιστούν το φρούτο ευάλωτο σε δευτερογενείς μολύνσεις από παράσιτα και παθογόνα¹⁹.



Εικόνα 3. Ζημιά από *C. capitata* σε φρούτα: a), b) σημάδια ωοαπόθεσης, c) σημάδια ωοαπόθεσης από στείρα έντομα, d), e) τρύπες από λάρβες, f), g) «τούνελ» (M'barka Elqdhay et.al, 2024)

Από τα βομβύκια προκύπτουν ενήλικα έντομα, που μπορούν να ζευγαρώσουν μέσα σε δύο ημέρες από την εκκόλαψή τους και να ξεκινήσουν την ωοαπόθεση 4-5 ημέρες αργότερα. Το 50% των μυγών ζει ως και 2 μήνες, με κάποια ενήλικα να επιβιώνουν ως και 6 μήνες σε ιδανικές συνθήκες ¹⁸.

Η συνδυαστική δράση των προνυμφών και των ενηλίκων, σε συνδυασμό με την υψηλή ικανότητά της για εισβολή σε νέα περιβάλλοντα²⁰, καθιστούν τη μεσογειακή μύγα των φρούτων έναν από τους πιο καταστροφικούς εχθρούς της γεωργίας. Χωρίς αποτελεσματική αντιμετώπιση, μπορεί να προκαλέσει απώλειες που αγγίζουν το 100% της παραγωγής²¹, ενώ οι οικονομικές ζημιές εκτιμάται ότι φτάνουν έως και 2 δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως²².

Για τους παραπάνω λόγους, η ανάγκη για τον έλεγχο του πληθυσμού του παρασίτου είναι αδιαμφισβήτητη. Ωστόσο, η αναποτελεσματικότητα και η ακαταλληλότητα της χρήσης των εντομοκτόνων για τους λόγους που αναφέρθηκαν, κάνουν την ανάγκη για βελτιστοποίηση των εναλλακτικών, οικολογικών μεθόδων όπως η SIT, επιτακτική.

1.1.2 Στελέχη γενετικού φυλετικού διαχωρισμού (Genetic Sexing Strains, GSS) της *Ceratitis capitata*

Ένα από τα πιο σημαντικά βήματα της SIT αποτελεί ο αποτελεσματικός και ακριβής διαχωρισμός μεταξύ των θηλυκών και των αρσενικών εντόμων. Ήδη από τα πρώτα χρόνια της ανάπτυξης της τεχνικής, διατυπώθηκε η άποψη πως η αποτελεσματικότητά της θα μπορούσε να βελτιστοποιηθούν εάν τα έντομα που απελευθερώνονταν ήταν μόνο τα αρσενικά έντομα²³. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε με δοκιμές που έδειξαν έως και 5 φορές υψηλότερο ρυθμό μείωσης του πληθυσμού σε σύγκριση με απελευθερώσεις εντόμων και των δύο φύλων²⁴. Εκτός της αυξημένης απόδοσης της τεχνικής, η απελευθέρωση μόνο αρσενικών αποφέρει και σημαντική μείωση του κόστους της εκτροφής, χειρισμού, απελευθέρωσης και παρακολούθησης των εντόμων²⁴, ενώ αποτρέπει από τις ζημιές που αποφέρουν ακόμα και τα στείρα θηλυκά, όπως στην περίπτωση της *C. capitata*, η ωοαπόθεση.

Ο διαχωρισμός όμως των εντόμων αποτελούσε μια χρονοβόρα διαδικασία που είχε μεγάλο περιθώριο σφάλματος. Δεν πέρασαν πολλά χρόνια μέχρι να προταθεί για πρώτη φορά από τον Whitten (1969), πως ο διαχωρισμός αρσενικών και



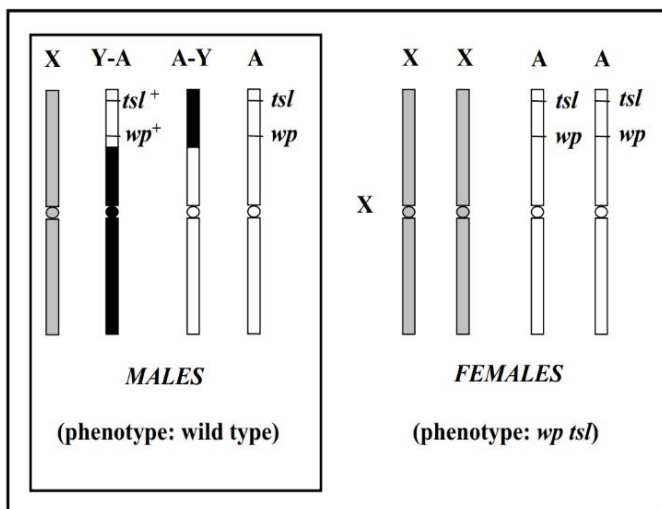
Εικόνα 4. Βομβύκια στελέχους Vienna 8. Λευκά βομβύκια είναι τα θηλυκά και καφέ (φυσιολογικά) βομβύκια είναι τα αρσενικά.

θηλυκών θα μπορούσε να βελτιστοποιηθεί μέσω ανάπτυξης ειδικών στελεχών «γενετικού διαχωρισμού» (Genetic Sexing Strains, **GSS**), βασισμένα σε μεταλλάξεις που θα συνέδεαν ένα συγκεκριμένο φαινότυπο με τα αρσενικά μέσω μετατοπίσεων συνδεδεμένων με το χρωμόσωμα Y²⁵. Η πρώτη γενιά των GSS

βασίστηκε στη μετάλλαξη **wp** (*white pupae*), που όταν βρίσκεται σε ομοζυγωτία δίνει στα βομβύκια λευκό χρώμα (**Εικόνα 4**).

Η σύνδεση του wt (wild type) αλληλομόρφου (wp⁺) στο Y μέσω αμοιβαίας μετατόπισης με το χρωμόσωμα 5 όπου βρίσκεται ο δείκτης, συνέδεσε το καφέ χρώμα (wt) στα αρσενικά άτομα αφού είναι ετερόζυγα, και το λευκό χρώμα των βομβυκίων με τα θηλυκά άτομα αφού είναι ομόζυγα για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (wp) (**Εικόνα 5**). Ο φαινότυπος αυτός καθιστά δυνατό το διαχωρισμό των θηλυκών από τα αρσενικά άτομα με οπτικό τρόπο, δηλαδή απλά με τον διαχωρισμό των λευκών από των καφέ βομβυκίων²⁶.

Τα επόμενα χρόνια, με την αύξηση της γνώσης για το γονιδίωμα και τον φύλο-καθορισμό της *C. capitata*, εντοπίστηκαν και αξιολογήθηκαν αρκετοί πιθανοί δείκτες, με κυριότερο τον δείκτη **tsl** (temperature sensitive lethal), ο οποίος



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση των θέσεων των φυσιολογικών και μεταλλαγμένων αλληλομόρφων των γονιδίων *white pupae* (*wp*) και *temperature sensitive lethal* (*tsl*) στα δύο φύλλα της *C. capitata*. (Dyck et.al, 2021)

στο δεξί άκρο του χρωμοσώματος 5. Το αγρίου τύπου αλληλόμορφο και για τους δύο δείκτες είναι συνδεδεμένο με το Y, λόγω μετατόπισης με το αυτοσωμικό 5. Τα θηλυκά, φέρουν τα υπολειπόμενα αλληλόμορφα (*wp*⁺, *tsl*⁺) για τους δύο αυτούς χαρακτήρες, ενώ τα αρσενικά είναι ετερόζυγα λόγω της μετατόπισης A:Y^{29,30}. (Εικόνα 5). Για τον λόγο αυτό, τα θηλυκά είναι ομόζυγα για τα υπολειπόμενα γονίδια *wp*⁺ και *tsl*⁺ με αποτέλεσμα να δημιουργούν λευκά βομβύκια λόγω του *wp*⁺ και τα (θηλυκά) έμβρυα να θανατώνονται όταν τα αυγά εκτεθούν για 12h σε θερμοκρασίες περίπου των 34-35° C²⁶.

Ένα από τα κύρια προβλήματα που προέκυψε από τη δημιουργία αυτών των στελεχών αποτέλεσε η πιθανή γενετική τους αστάθεια³¹, δηλαδή την πιθανότητα ανασυνδυασμού ώστε οι δείκτες να παύσουν να κληρονομούνται με βάση το επιθυμητό φύλλο (strain breakdown). Ένας σημαντικός παράγοντας που καθορίζει την πιθανότητα ανασυνδυασμού αποτελεί η απόσταση μεταξύ των δεικτών και του σημείου ανασυνδυασμού με το Y^{30,32}. Για τον λόγο αυτό, δημιουργήθηκαν στελέχη όπως τα Vienna 6 και Vienna 7, στα οποία η απόσταση αυτή ελαχιστοποιήθηκε μέσω χρωμοσωμικών μετατοπίσεων³³. Σήμερα, ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα GSS για την *C. capitata* είναι το Vienna 8, αναπτύχθηκε στο FAO/IAEA Insect Pest Control Laboratory (IPCL) της Αυστρίας³⁴. Το στέλεχος αυτό βασίζεται στους δύο δείκτες, τον *white pupae* (*wp*) που και τον *temperature-sensitive-lethal* (*tsl*) που³⁵.

συνδυάστηκε με τον *wp* για να δημιουργηθεί η νέα γενιά στελεχών GSS, με πρώτο το στέλεχος Vienna 4²⁷. Μέσω τυχαίας μεταλλαξιγένεσης με τη χρήση EMS (mutagen ethyl methanesulfonate), δημιουργήθηκε στέλεχος *wp/tsl* που συμπληρωματικά με την εμφάνιση του λευκού χρώματος λόγω του δείκτη *wp*, εμφάνιζε ευαισθησία στη θερμοκρασία²⁸. Και οι δύο αυτοί χαρακτήρες βρίσκονται

1.2 Σημασία της Ποιότητας των αρσενικών GSS εντόμων για την επιτυχία της SIT

Η ανάπτυξη των GSS αποτέλεσε μεγάλη ώθηση για την εδραίωση της SIT ιδιαίτερα για την *C. capitata* που κρίθηκε και ως μοντέλο για ανάπτυξη GSS³⁵. Κύριος παράγοντας, όμως, για την επιτυχία της τεχνικής παραμένει η ικανότητα των στείρων αρσενικών να συναγωνιστούν τα αγρίου τύπου (wt) αρσενικά στο πεδίο για πρόσβαση σε αγρίου τύπου (wt) θηλυκά. Μετά την μαζική απελευθέρωση τους στο πεδίο, τα στείρα αρσενικά πρέπει να είναι σε θέση να ανταγωνιστούν τα αγρίου τύπου αρσενικά για πρόσβαση στα αγρίου τύπου θηλυκά, προκειμένου να επιφέρουν την επιθυμητή μείωση στον πληθυσμό³⁶.

Ο όρος **ανταγωνιστικότητα** αφορά την ικανότητα των εκτρεφόμενων αρσενικών GSS να ανταγωνιστούν τα αγρίου τύπου αρσενικά για πρόσβαση στα θηλυκά που είναι απαραίτητο για την αποτελεσματικότητα της τεχνικής.

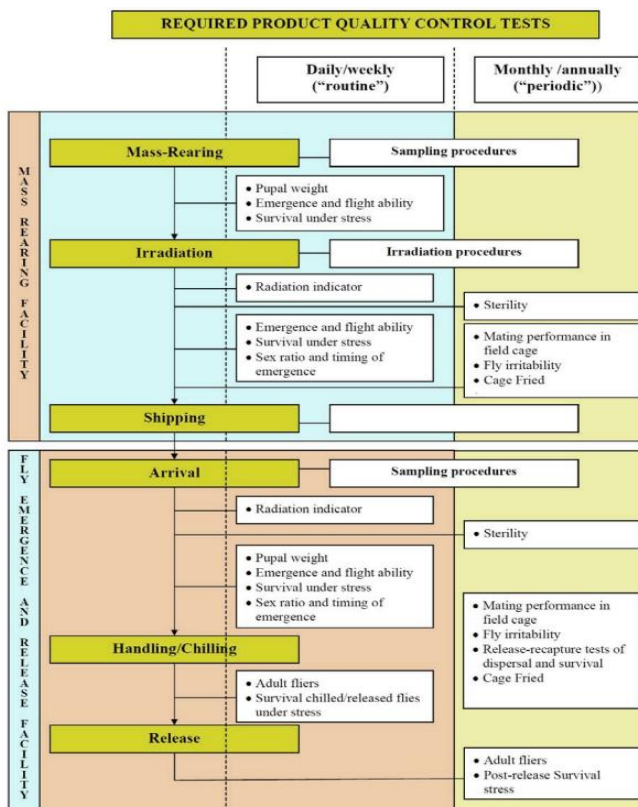
Η ανταγωνιστικότητα των αρσενικών κρίνεται από τα εξής:

- Την ικανότητα των στείρων αρσενικών να εντοπίζουν τα θηλυκά
- Την πιθανότητα αποδοχής των στείρων αρσενικών από τα θηλυκά
- Την ικανότητα του αρσενικού για ολοκλήρωση του ζευγαρώματος
- Την ικανότητα τους για πτήση και εύρεση φαγητού
- Την αντοχή τους σε καταστάσεις στρες

Λόγω της περίπλοκης στρατηγικής ζευγαρώματος της μεσογειακής μύγας, ακόμα και μικρές αποκλίσεις στη συμπεριφορά ζευγαρώματος μπορεί να επηρεάσουν δραματικά την σεξουαλική ανταγωνιστικότητα των αρσενικών³⁷.

Έχει παρατηρηθεί πως τα αρσενικά που εκτρέφονται στα πλαίσια της SIT, υστερούν σε σύγκριση με τα wt στελέχη σε κατηγορίες όπως η αναπαραγωγή, η ταχύτητα ανάπτυξης και η αντοχή σε συνθήκες στρες. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να εξηγηθεί αρχικά από το γενετικό υπόβαθρο των στελεχών GSS, καθώς ο τρόπος δημιουργίας τους³⁵ έχει οδηγήσει σε συσσώρευση μεταλλάξεων, κάποιες από τις οποίες πιθανώς επηρεάζουν λειτουργίες που σχετίζονται με την ποιότητά τους. Συμπληρωματικά, τα αρσενικά που χρησιμοποιούνται για SIT είναι αντιμέτωπα με συνθήκες που τα βάζει συνεχώς σε μειονεκτική θέση. Αρχικά, τα μαζικώς εκτρεφόμενα αρσενικά αναπτύσσουν μειονεκτήματα, λόγω της προσαρμογής του στα τεχνητά περιβάλλοντα του εργαστηρίου, τη συνθετική τροφή αλλά και τα υψηλά επίπεδα αιμομιξίας που παρατηρούνται στους εκτρεφόμενους πληθυσμούς^{38,39}. Επιπλέον, η ίδια η διαδικασία της ακτινοβολήσης φαίνεται να υποβαθμίζει την ελκυστικότητα τους στα θηλυκά, και άρα την πιθανότητα επιλογής τους και σύζευξης³⁷.

1.2.1.1 Ποιοτικός Έλεγχος



Εικόνα 6. Δοκιμές ποιοτικού ελέγχου των εντόμων σε όλα τα στάδια της SIT. (FAO/IAEA/USDA. 2019.)

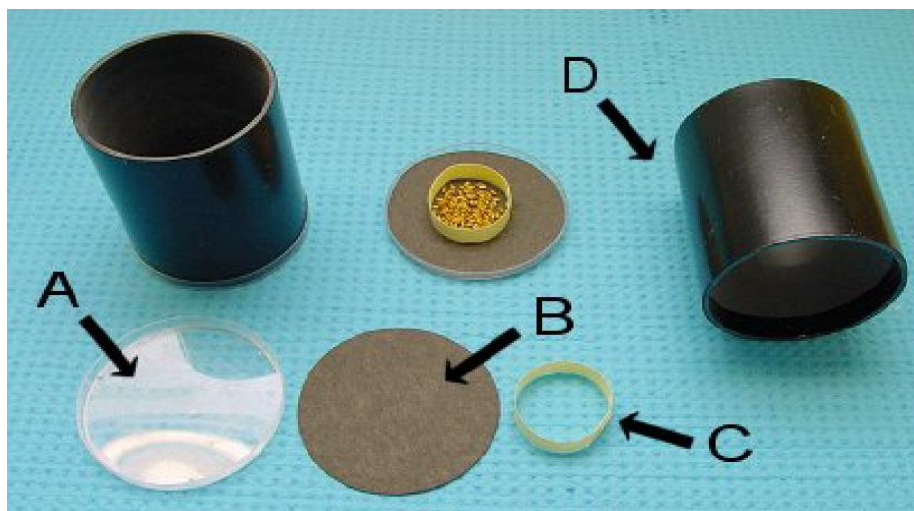
Λόγω του βασικού ρόλου που παίζει η ανταγωνιστικότητα των στείων αρσενικών στην επιτυχία της SIT, αναπόσπαστο κομμάτι των προγραμμάτων αποτελεί ο συστηματικός και τακτικός **ποιοτικός έλεγχος** των εντόμων σε κάθε στάδιο της διαδικασίας, έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί η ανταγωνιστικότητα των εκτρεφόμενων αρσενικών^{40,41}.

Οι δοκιμές ποιοτικού ελέγχου που χρησιμοποιούνται έχουν επιχειρήσει να καλύψουν αρκετές από αυτές τις πτυχές, αλλά δεν είναι αρκετά αποτελεσματικοί στο να αποδώσουν τα ακριβή αίτια της μειωμένης απόδοσης ή ποιότητας των εντόμων. Αυτό συμβαίνει καθώς, ο ποιοτικός έλεγχος που εφαρμόζεται στις σημερινές

εγκαταστάσεις μαζικής εκτροφής εξετάζει τα έντομα σε ένα γενικό φάσμα χαρακτηριστικών και περιορίζονται αποκλειστικά στην παρατήρησή τους⁴¹ (**Εικόνα 6**), χωρίς να αξιολογεί τις διαφορές μεταξύ των διαφορετικών στελεχών, ούτε να εξετάζει την επίδραση των εκτροφικών συνθηκών στη γονιδιακή έκφραση των εντόμων. Ως αποτέλεσμα, αλλαγές στις συνθήκες εκτροφής που ενδεχομένως δεν έχουν άμεσα εμφανείς επιπτώσεις μπορεί να συσσωρεύονται με την πάροδο του χρόνου και να επηρεάζουν την ποιότητα των εντόμων, χωρίς όμως να γίνονται αντιληπτές ή να λαμβάνονται υπόψη στις διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου. Ενδεικτικά, αναφέρονται ορισμένες δοκιμές που εφαρμόζονται⁴²:

1. Δοκιμή ανάδυσης και ικανότητα πτήσης :

Για να επιτευχθεί ακριβής εκτίμηση του ποσοστού των ενηλίκων που θα αναδυθούν και του ποσοστού των ενηλίκων που είναι σε θέση να πετάξουν. Το τεστ αυτό περιλαμβάνει την τοποθέτηση βομβυκίων σε πιάτο Petri στο εσωτερικό ενός κυλίνδρου Plexiglass επικαλυμμένου στο εσωτερικό με μη-τοξική σκόνη Talk για να αποτρέψει της μύγες από απλά να περπατήσουν στο εξωτερικό του κυλίνδρου (**Εικόνα 7**). Η δοκιμή αυτή γίνεται σε ειδικό κλειστό θάλαμο από όπου μπορούν αν απομακρύνονται τα έντομα που αναδύονται για να μπορεί να γίνει η ακριβής εκτίμηση των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 7. Υλικά για δοκιμή ανάδυσης και ικανότητα πτήσης: Α) πιάτο petri, Β) μαύρο χαρτί φίλτρου, C) απορροφητικό χαρτί για περικύκλωση των βομβυκίων, D) κύλινδρος plexiglass (FAO/IAEA/USDA. 2019.)

2. Δοκιμή αντοχής υπό στρες :

Η δοκιμή αυτή χρησιμοποιείται για να εκτιμήσει την ικανότητα των εντόμων να επιβιώσουν συνθήκες όπως η έλλειψη φαγητού και νερού, σε σκοτάδι και η διαβίωση σε μικρά περιβάλλοντα, καταστάσεις στις οποίες θα βρεθούν ως μέρος προγράμματος SIT λόγω των διαδικασιών εκτροφής και μεταφοράς. Συγκεκριμένα, περίπου 100 έντομα, δύο ώρες μετά την ανάδυση τους, τοποθετούνται σε πιάτο petri χωρίς φαγητό και νερό, σε σκοτάδι για 48 ώρες και υπολογίζεται το ποσοστό επιβίωσης (θα πρέπει >65%).

3. Δοκιμή αναλογίας φύλων και χρόνος ανάδυσης :

Ο υπολογισμός του ποσοστού θηλυκών και αρσενικών ατόμων σε μια παρτίδα εντόμων, αλλά και του χρονικού σημείου ανάδυσης του πληθυσμού για να καθοριστεί η ηλικιακή ομοιομορφία σε μια παρτίδα βομβυκίων. Η πρώτη παράμετρος είναι σημαντική καθώς αλλαγές στο λόγο αυτό, ειδικά στην περίπτωση GSS είναι ενδεικτική συμβάντων γενετικού ανασυνδυασμού. Δεύτερον, η ηλικία των βομβυκίων είναι κρίσιμη για την επιτυχία της ακτινοβολήσης καθώς, η ηλικία στην οποία γίνεται η ακτινοβολήση είναι πολύ συγκεκριμένη.

4. Δοκιμή κλουβιού πεδίου για απόδοση ζευγαρώματος :

Μια δοκιμή όπου συγκρίνεται η σεξουαλική συμπεριφορά ώριμων αλλά παρθένων εντόμων μεταξύ wt εντόμων, και των εργαστηριακών στελεχών. Στόχος είναι να εκτιμηθεί η σεξουαλική ανταγωνιστικότητα των στείρων αρσενικών συγκριτικά με τα wt αρσενικά αλλά και η σεξουαλική συμβατότητα των πρώτων με τα wt θηλυκά. Η δοκιμή αυτή περιλαμβάνει την τοποθέτηση σημασμένων εντόμων **α)** wt θηλυκών και αρσενικών, και **β)** στείρων αρσενικών εντόμων σε κλουβί πεδίου (**Εικόνα 8**), και την καταγραφή των περιστάσεων σύζευξης και αλλά και ορισμένων χαρακτηριστικών τους όπως η διάρκεια και η τοποθεσία στο κλουβί.



Εικόνα 8. Δοκιμή κλουβιού πεδίου για απόδοση ζευγαρώματος: A) κλουβί πεδίου, B) ειδικό ύφασμα χρησιμοποιείται για την ακινητοποίηση του εντόμου για το βάψιμο της ράχης του με χρώμα ύδατος (water-based dye), C) Σημασμένο αρσενικό *Anastrepha fraterculus* (FAO/IAEA/USDA. 2019.)

2 Μεταγραφομικοί Δείκτες και Ποιοτικός έλεγχος

Μεταγραφομικοί δείκτες αποτελούν γονίδια των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται σε μια βιολογική κατάσταση και μπορούν να δώσουν ενδείξεις για την βιολογική κατάσταση αυτή. Ειδικότερα τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη μελέτης μεταγραφομικών δεδομένων έχει δώσει τη δυνατότητα μελέτης και απόδοσης των μοτίβων/προφίλ έκφρασης σε πληθώρα γονιδίων, και παράλληλα τη συσχέτιση αυτών με συγκεκριμένες λειτουργίες⁴³.

2.1 Μεταγραφομικοί Δείκτες για Ποιοτικό Έλεγχο των GSS στελεχών

Η συνδυαστική χρήση μεταγραφικών δεικτών με τις ήδη υπάρχουσες δοκιμές, θα μπορούσε να οδηγήσει στη δημιουργία ενός πιο ολιστικού προγράμματος

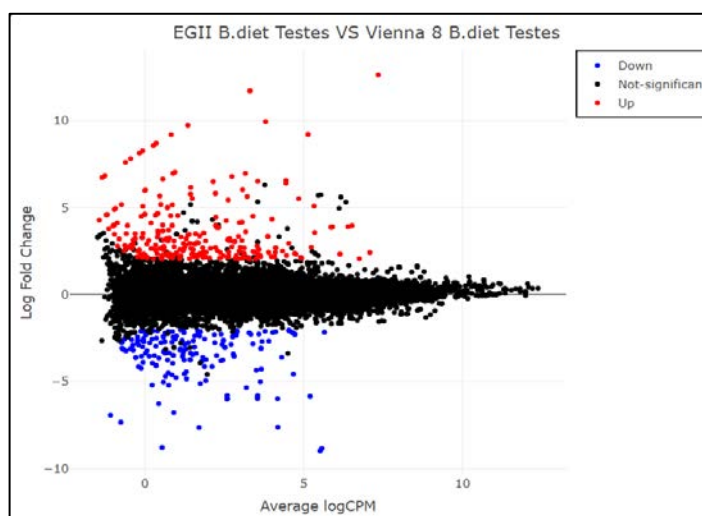
ποιοτικού ελέγχου. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ένα τέτοιο σύστημα ποιοτικού ελέγχου, είναι αναγκαίο να γίνει διερεύνηση συγκεκριμένων μεταγραφομικών δεικτών ποιότητας να αξιολογηθούν ως προς την ικανότητα τους να αντιπροσωπεύσουν την επίδοση των εντόμων σε μια εκάστοτε λειτουργία, όπως η ικανότητα πτήσης, παραγωγής σπέρματος, ελκυστικότητα σε θηλυκά, κλπ. Αυτό θα μπορούσε να επιτευχθεί μέσω της καταγραφής των διαφορών στη γονιδιακή έκφραση που προκαλείται στα έντομα λόγω αλλαγών στις συνθήκες, αλλά και της διερεύνησης των διαφορών που εμφανίζονται μεταξύ των GSS και των wt στελεχών σε επίπεδο μεταγραφόματος.

Μια τέτοια μελέτη, θα μπορούσε να βοηθήσει στην βαθύτερη κατανόηση των παραγόντων που επηρεάζουν την απόδοση των εντόμων αλλά και την χρήση των μεταγραφομικών αυτών δεικτών για ένα πιο ολιστικό πρόγραμμα ποιοτικού ελέγχου των πληθυσμών με πιο έγκαιρη ανίχνευση προβλημάτων στους πληθυσμούς, και βελτιστοποίηση των συνθηκών ενώ από την άλλη θα βοηθούσαν στην αξιολόγηση των GSS της *C. capitata* αλλά και άλλων παρασίτων ενώ θα μπορούσαν να συνεισφέρουν και στην ανάπτυξη νέων, πιο ικανών στελεχών³⁹.

2.2 Πιθανός μεταγραφικός δείκτης

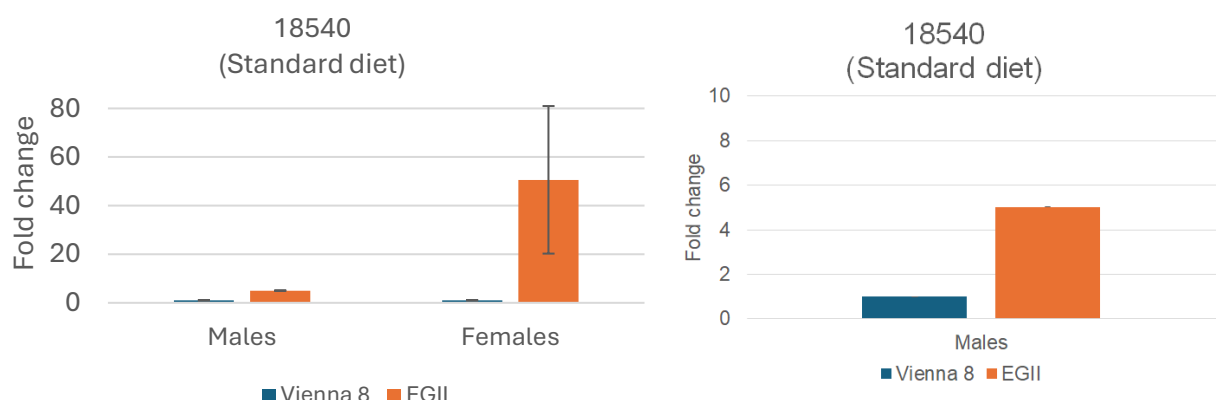
Στο πλαίσιο μελέτη της διαφορικής έκφρασης γονιδίων μεταξύ των GSS και wt στελεχών της Μεσογειακής μύγας στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωμικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, έγινε ανάλυση RNA-seq δεδομένων από τη σύγκριση του GS στελέχους Vienna 8 και του wt στελέχους EgII. Η ανάλυση έδωσε δύο ομάδες γονιδίων που είναι μειορυθμιζόμενα

(downregulated) στο EgII αλλά και αυξορυθμιζόμενα (upregulated). Λόγω της έμφασης της παρούσας πτυχιακής στην αναπαραγωγική ικανότητα των στελεχών, ιδιαίτερη σημασία δόθηκε στη διαφορική έκφραση γονιδίων στους αναπαραγωγικούς ιστούς, με ανάλυση δεδομένων από όρχεις (testis) (**Εικόνα 9**).



Εικόνα 9. Αυξορυθμιζόμενα (κόκκινα) και μειορυθμιζόμενα (μπλε) γονίδια σε EgII σε σύγκριση με Vienna 8, από RNA-seq σε δείγματα όρχεων.

Το γονίδιο **AFF4** (μέλος **4** της οικογένειας **AF4/FMR2**), καταχωρημένο ως **LOCUS18540_19669** στη βάση δεδομένων NCBI εμφάνισε, μεταξύ άλλων, διαφορετική έκφραση στους αναπαραγωγικούς ιστούς του wt στελέχους EgII. Σημαντική διαφορά έκφρασης εμφάνισε μεταξύ των θηλυκών ατόμων σε δείγματα ωοθηκών (ovaries), αλλά αξιοσημείωτη ήταν και η διαφορά μεταξύ των αρσενικών ατόμων σε δείγματα όρχεων, με 5 φορές μεγαλύτερη έκφραση στα wt έντομα σε σύγκριση με τα Vienna 8 (**Εικόνα 10**).



Εικόνα 10. Διαφορική έκφραση του γονιδίου **AFF4 (LOCUS18540)** μεταξύ *Vienna 8* (μπλε) και *EgII* (πορτοκαλί). Αριστερά: FC σε αρσενικά (testis) και θηλυκά (ovaries), Δεξιά: ξανά FC σε αρσενικά (testis)

Αν και το γονίδιο δεν έχει μελετηθεί στη *C. capitata* και δεν είναι εξακριβωμένος ο ρόλος του στο συγκεκριμένο οργανισμό, υπάρχει εκτενής έρευνα για την συμμετοχή του στη ρύθμιση του σταδίου της επιμήκυνσης της μεταγραφής, τη λειτουργία του σε οργανισμούς όπως τα ποντίκια και η δροσόφιλα, αλλά και την εμπλοκή του σε ανθρώπινες ασθένειες.

Στη *Drosophila melanogaster*, το **AFF4** αποτελεί το μόνο μέλος της οικογένειας **AFF**, με όνομα *lilliputian (lilli)*⁴⁴. Στη *Drosophila* φαίνεται να εμπλέκεται με μια μεγάλη γκάμα λειτουργιών όπως η κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση⁴⁵, η ενεργοποίηση γονιδίων για απάντηση σε θερμικό στρες⁴⁶, αλλά και η ανάπτυξη εξωτερικών σεξουαλικών μορφολογικών χαρακτηριστικών^{44,47}. Συγκεκριμένα για την σεξουαλική μορφολογία, με σίγηση του γονιδίου *lilli*, παρατηρήθηκε ελλαττωματική μορφολογία σε έντομα και των δύο φύλων⁴⁷.

Πέρα από την έρευνα σε έντομα, μια μελέτη που έγινε σε ποντίκια έδωσε ενδείξεις πως το γονίδιο **AFF4** εμφάνιζε υψηλά επίπεδα έκφρασης στα κύτταρα Sertoli των όρχεων και είναι απαραίτητο για τη σπερματογένεση. Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκαν ποντίκια με knockout του γονιδίου (**AF5q31^{-/-}**), τα οποία εμφάνιζαν αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας πριν και μετά τη γέννα, με ένα ποσοστό 13% να επιβιώνει όπως τα αγρίου τύπου ποντίκια. Από τα άτομα αυτά, όλα εμφάνιζαν στειρότητα, λόγω απουσίας σπέρματος, δηλαδή αζωοσπερμίας⁴⁸.

Συνολικά, το γονίδιο AFF4 αποτελεί ένα αρκετά ελκυστικό υποψήφιο γονίδιο για χρήση ως μεταγραφομικό παράγοντα ποιότητας, καθώς υπάρχουν δεδομένα που τον συνδέουν με κύριες λειτουργίες που εμπλέκονται στην αναπαραγωγική επιτυχία των εντόμων, όπως η αντοχή σε στρες, η παραγωγή σπέρματος, η σεξουαλική μορφολογία αλλά και γενικότερα η κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση. Επομένως, η μελέτη της λειτουργίας του AFF4 στη *C. capitata* αναμένεται να προσφέρει πληροφορίες για το ρόλο του στη ρύθμιση της αναπαραγωγικής ικανότητας των αρσενικών ατόμων.

2.2.1 Η οικογένεια AFF (AF4/FMR2)

Το γονίδιο AFF4 αποτελεί το 4^ο μέλος της οικογένειας **AFF** (AF4/FMR2), που αποτελείται από πυρηνικές πρωτεΐνες που αρχικά εντοπίστηκαν σε θηλαστικά, όπου συσχετίστηκαν με ασθένειες όπως η νοητική καθυστέρηση και διάφορα είδη καρκίνων^{49,50}. Η οικογένεια AFF αποτελείται από 4 γονίδια⁵⁰:

1. **AFF1**, ή εναλλακτικά AF4 (ALL1-fused gene του χρωμοσώματος 4) (4q21.3)
2. **AFF2**, ή εναλλακτικά FMR2 (fragile X mental retardation 2), Xq28
3. **AFF3**, ή εναλλακτικά LAF4 (lymphoid nuclear protein related to AF4), 2q11.2
4. **AFF4**, ή εναλλακτικά AF5q31 (ALL1-fused gene from 5q31) ή MCEF (major CDK9 elongation factor associated protein), 5q31.

Το γονίδιο AFF4 στο ανθρώπινο γονιδίωμα βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5 και εντοπίστηκε λόγω της εισαγωγής του στο γονίδιο MLL ins(5;11)(q31;q13q23) σε ασθενείς με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία⁵¹. Όλα τα μέλη της οικογένειας AFF είναι γνωστά μέλη σύντηξης (fusion partners) με το γονίδιο MLL (Multiple Lineage Leukemia), μια μεθυλτρανσφεράση των ιστονών H3, που εμπλέκεται μεταξύ άλλων σε πολλές μορφές λευχαιμιών⁵².

2.2.2 Το γονίδιο AFF4

Συγκεκριμένα το γονίδιο AFF4, είναι η πιο πρόσφατη προσθήκη της οικογένειας, και ανακαλύφθηκε με απομόνωση της πρωτεΐνης AFF4 ως συστατικό του συμπλόκου του θετικού παράγοντα επιμήκυνσης b, P-TEFb⁴⁹. Ο παράγοντας P-TEFb αλλά και η πρωτεΐνη AFF4 παίζουν ρόλο στο στάδιο της επιμήκυνσης της μεταγραφής καθώς φαίνεται να αποτελεί μέρος του super elongation complex (SEC), ένα σύμπλοκο που ρυθμίζει την κινητοποίηση του συμπλόκου της RNAP II^{53,54}. Η πρωτεΐνη AFF4 φαίνεται να λειτουργεί ως ικρίωμα για την συναρμολόγηση του συμπλόκου SEC (**Εικόνα 11**), αλληλοεπιδρώντας άμεσα μεταξύ άλλων με τον παράγοντα P-

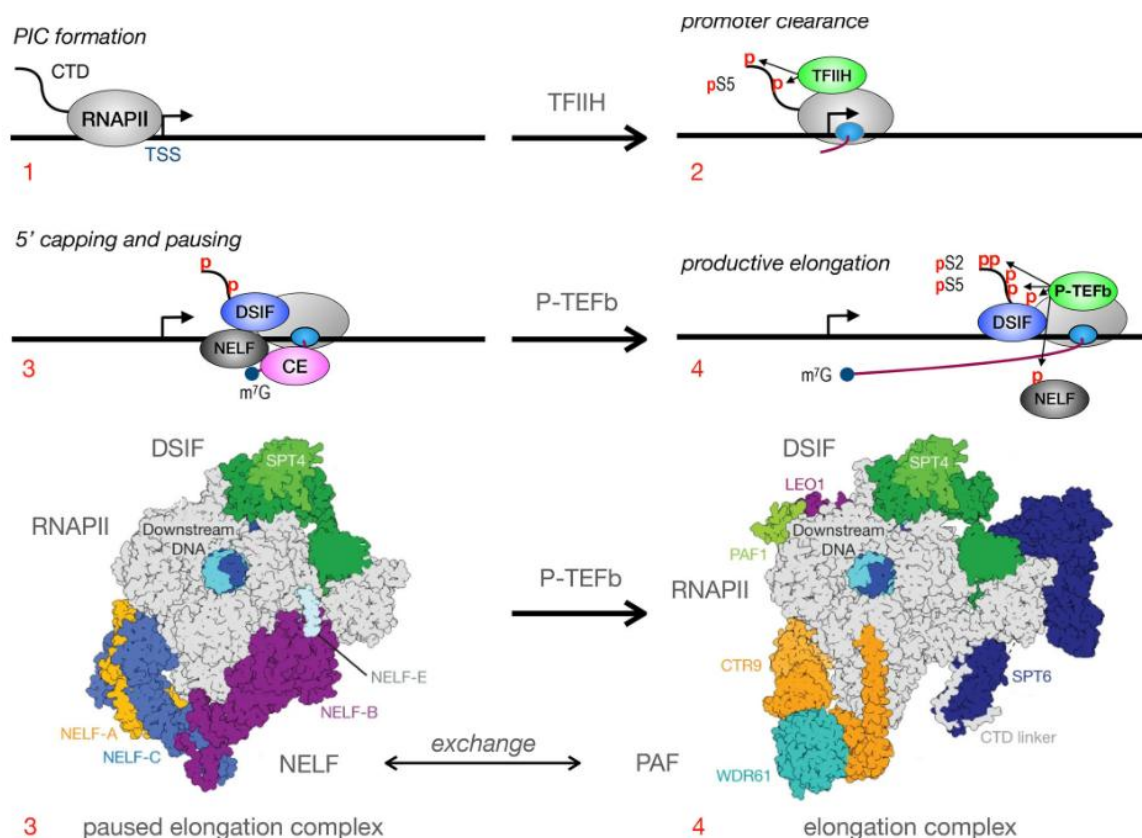
TEFb^{55,56}. Το σύμπλοκο SEC υποστηρίζεται πως ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων στο check-point της επιμήκυνσης (TECC), ενώ πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως το SEC ανήκει και το ίδιο σε μια μεγαλύτερη οικογένεια SEC-like συμπλόκων με το καθένα να έχει συγκεκριμένα γονίδια στόχους.



Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση του SEC. (Chengqi Lin et.al, 2011)

Συνήθως, το στάδιο στο οποίο θεωρούνταν το πιο κρίσιμο για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης ήταν αυτό της έναρξης της μεταγραφής. Παρόλα αυτά, υπάρχουν μελέτες πλέον που υποστηρίζουν πως το στάδιο της επιμήκυνσης της μεταγραφής αποτελεί το ρυθμο-περιοριστικό

στάδιο, μέσω του οποίου ρυθμίζεται η έκφραση πολλών γονιδίων που εμπλέκονται σε διαδικασίες κυτταρικής αύξησης και διαφοροποίησης⁵⁷. Η επιμήκυνση της μεταγραφής θεωρείται πλέον ένα από τα πιο σημαντικά σημεία ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης⁵⁸.



Εικόνα 12. Τα αρχικά βήματα της μεταγραφής της RNAP II (Koh Fujinaga, et. all, 2022)

Ένας μηχανισμός που επιστρατεύεται για τη ρύθμιση της γονιδιακής ρύθμισης στο στάδιο της επιμήκυνσης είναι η στάση της RNAP II καθοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής⁵⁹⁻⁶¹. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί πως κατά τη μεταγραφή ορισμένων γονιδίων, η RNAP II θα πραγματοποιήσει τα αρχικά χρονοβόρα βήματα της έναρξης της μεταγραφής και στη συνέχεια θα σταματήσει μέχρι να υπάρξει κάποιο έναυσμα να συνεχίσει η μεταγραφή. Η αρχική υπόθεση του φαινομένου αυτού προήρθε από την παρατήρηση της συνύπαρξης δύο διαφορετικών τύπων μεθυλίωσης σε γονίδια εμβρυικών βλαστικών κυττάρων ποντικών, ενός τύπου (H3K4) που παρατηρείται σε ενεργώς μεταγραφόμενα γονίδια και ενός δεύτερου (H3K27) που παρατηρείται σε ανενεργά γονίδια⁵⁹.

Αυτός ο μηχανισμός πιθανολογείται πως εφαρμόζεται σε ανενεργά γονίδια για τα οποία όμως απαιτείται ταχεία ενεργοποίηση μετά από τα απαραίτητα θετικά σήματα, αφού θα έχουν ήδη γίνει τα χρονοβόρα στάδια της μεταγραφής και το σύμπλοκο της RNAP II βρίσκεται σε ετοιμότητα στο γονίδιο στόχο⁵⁹. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της υπόθεσης αυτής είναι οι μελέτες που υποστηρίζουν πως με αυτόν τον τρόπο πραγματοποιείται η μεταγραφή των heat shock πρωτεϊνών στη *Drosophila*⁴⁶.

Η στάση αυτή της μεταγραφής επιτυγχάνεται μέσω της δράσης αρνητικών μεταγραφικών παραγόντων της επιμήκυνσης (NTEFs), όπως για παράδειγμα του παράγοντα πρόκλησης ευαισθησίας στη 5,6-διχλωρο-1-β-D-ριβοφουρανοσυλβενζιμιδαζολη (DRB) (DSIF) και του αρνητικού παράγοντα επιμήκυνσης (NELF)^{62,63}.

Ο διακόπτης για τη μετατροπή της σταματημένης μορφής της πολυμεράσης, στην παραγωγική μορφή της αποτελεί η παράγοντας P-TEFb⁶³ Y (**Εικόνα 12, πλαίσια 3, 4**), που μέσω διαφόρων φωσφορυλιώσεων στην ίδια την πολυμεράση αλλά και στους παράγοντες NELF και DSIF, διαμεσολαβεί την αποδέσμευση του NELF και την αντικατάσταση του από σχετιζόμενων με την πολυμεράση παραγόντων που προωθούν την επιμήκυνση (PAF) και παραγόντων κοπής μεταγράφων TFIIIS^{55,63}. Οι αλλαγές αυτές μεταξύ άλλων οδηγούν στη μετατροπή του μεταγραφικού συμπλόκου σε ενεργή μορφή, στις οποίες κεντρικό ρόλο παίζει ο παράγοντας P-TEFb.

Πρόσφατα δεδομένα, δείχνουν πως πολλά γονίδια που υπόκεινται σε ρύθμιση ανάλογη του αναπτυξιακού σταδίου, φέρουν τη σταματημένη μορφή της πολυμεράσης II, υποστηρίζοντας ότι η έκφραση τους καθορίζεται άμεσα από σύμπλοκα στα οποία μπορεί να περιέχεται ο παράγοντας AFF4⁴⁶.

3 RNAi ως Εργαλείο Σίγησης Γονιδίων

Για τη διερεύνηση του ρόλου του AFF4 και την πιθανή χρήση του ως μεταγραφομικό δείκτη για την εκτίμηση της ποιότητας των αρσενικών GSS της *C. Capitata*, χρησιμοποιήθηκε RNA interference (RNAi)

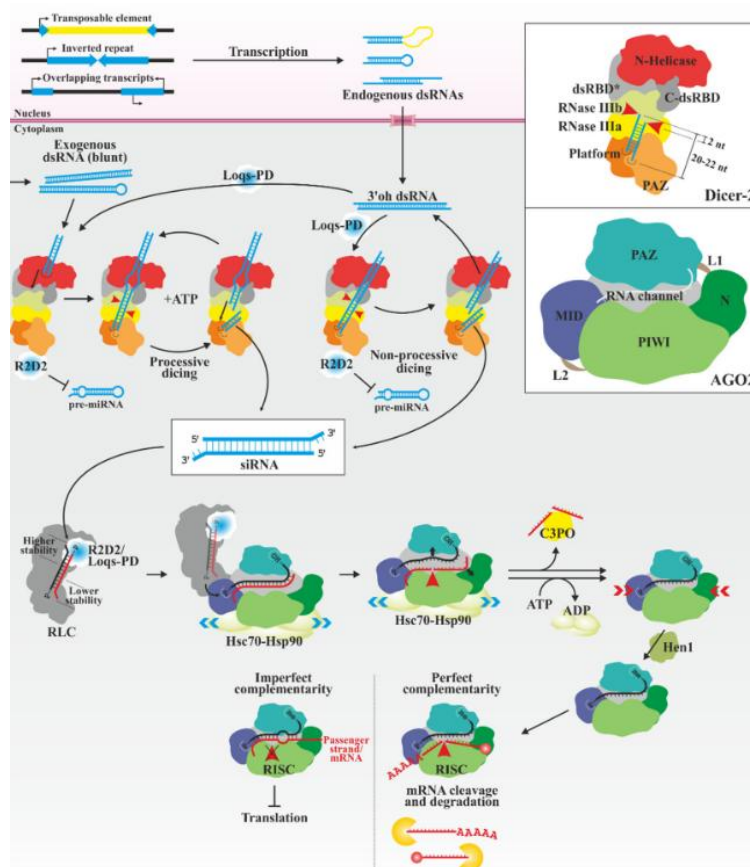
Ο όρος **RNAi** αναφέρεται στη διαδικασία που αφορά την σίγηση που μπορεί να επιφέρει εξωγενές δίκλωνο RNA στο συμπληρωματικό ενδογενές mRNA οργανισμού⁶⁴ και ερευνήθηκε για πρώτη φορά στον *Caenorhabditis elegans*⁶⁵.

3.1 Αρχές λειτουργίας του RNAi.

Φυσιολογικά, το RNAi έχει λειτουργία στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης με σκοπό την προστασία του οργανισμού από εξωγενή αλλά και ενδογενή γενετικά στοιχεία όπως οι ιοί και τα μεταθετά στοιχεία. Απαρτίζεται από μηχανισμούς που φαίνεται να έχουν υψηλή συντήρηση στους ευκαρυώτες⁶⁶.

Ο μηχανισμός του RNAi πυροδοτείται από την ανίχνευση μικρών μορίων RNA (small RNAs) και ανάλογα το είδος και την προέλευσή τους χωρίζονται σε τρία διαφορετικά μονοπάτια: **(1)** το μονοπάτι των siRNAs (small interfering RNAs), **(2)** το μονοπάτι των miRNAs (microRNAs) και **(3)** το μονοπάτι των piRNAs (P-element induced wimpy testis (PIWI)-interacting RNAs)⁶⁶. Τα μόρια αυτά στη συνέχεια θα ανιχνευθούν από τον ενδογενή μηχανισμό του κυττάρου, θα κοπούν σε μικρότερα τμήματα, και έτσι μπορούν αν συνδεθούν σε άλλα μόρια βάσης της συμπληρωματικότητάς τους, οδηγώντας στην αποδόμηση τους.

Σε εργαστηριακά πλαίσια, ο μηχανισμός αυτός ενεργοποιείται με τη χορήγηση στα έντομα δίκλωνου RNA (dsRNA), συμπληρωματικό με το γονίδιο στόχο⁶⁷. Μετά την



Εικόνα 13. Μονοπάτι siRNAs στα έντομα. (Ortolá, B. et al, 2024)

είσοδο του μορίου στο εσωτερικό του κυττάρου, η Dicer-2 (Dcr-2) μια ριβονουκλεάση τύπου III⁶⁸, αναγνωρίζει το μόριο και το κόβει σε μόρια μεγέθους 21-24bp, τα siRNAs. Το σύμπλοκο Dcr-2 και siRNA αναγνωρίζεται στη συνέχεια από τη πρωτεΐνη πρόσδεσης dsRNA R2D2, που το συνδέει στο σύμπλοκο σίγησης επαγόμενο από RNA, RISC. Κύριο συστατικό του συμπλόκου αποτελεί η πρωτεΐνη Αργοναύτης-2 (Ago-2), που ξετυλίγει το δίκλωνο siRNA, χρησιμοποιώντας τον ένα κλώνο ως οδηγό για την ειδική πρόσδεση του συμπλόκου στο mRNA στόχο, το οποίο η Ago-2 κόβει, οδηγώντας στο φαινόμενο της σίγησης.⁶⁸

ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη του γονιδίου AFF4 ως πιθανός μεταγραφομικός δείκτης για τον ποιοτικό έλεγχο των στείρων εντόμων GSS σε *Ceratitis capitata* και ενδεχομένως σε άλλα είδη GSS. Η προσέγγιση θα βασιστεί στη σίγηση του γονιδίου μέσω RNAi σε άγριου τύπου έντομα (EgII) προκειμένου να παρατηρηθεί ο πιθανός φαινότυπος που προκύπτει και στη μετέπειτα σύγκριση με το στέλεχος Vienna 8. Τα αποτελέσματα της μελέτης θα συμβάλουν στην κατανόηση του ρόλου του AFF4 και στην αξιολόγηση της καταλληλότητάς του ως δείκτη για την ποιότητα των στείρων εντόμων.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Σχεδιασμός εκκινητών

Για την παραγωγή του DNA υποστρώματος που χρειάζεται για παραγωγή dsRNA αλλά και την qPCR χρειάστηκε να σχεδιαστούν αντίστοιχοι εκκινητές (primers). Η κύρια διαφορά των primers για της δύο αυτές λειτουργίες ήταν η προσθήκη των T7 άκρων σε εκείνους για τη δημιουργία του dsRNA. Επίσης διαφέρουν και ως προς το μήκος του προϊόντος, καθώς για την παραγωγή του dsRNA είναι αποδεκτό ένα μήκος 250-400 bp ενώ για qPCR το προϊόν θα πρέπει να έχει μήκος γύρω στα 100bp και οι εκκινητές να μην προσδένονται σε ιντρόνιο, που θα έχει ήδη αφαιρεθεί στο ώριμο mRNA το οποίο απομονώνεται για τη σύνθεση του cDNA. Επιπρόσθετα, τα δύο σετ primers για το ίδιο γονίδιο δεν θα πρέπει να ενισχύουν αλληλεπικαλυπτόμενα μέρη του γονιδίου. Αυτό θα μπορούσε να επηρεάσει τα αποτελέσματα της qPCR καθώς οι εκκινητές της qPCR θα είναι σε θέση να ενισχύσουν το dsRNA που μπορεί να περιέχεται ακόμα στους ιστούς κατά την απομόνωση του RNA που ακολουθεί της ενέσεις.

Για το γονίδιο AFF4 (LOCUS18540_19669) σχεδιάστηκε ένα σετ primers για dsRNA ενώ primers για qPCR είχαν ήδη προηγουμένως σχεδιαστεί από τον υποψήφιο διδάκτορα του εργαστηρίου Δ. Ράλλη (**Παράρτημα, Πίνακας 8**). Εκκινητές για τα γονίδια αναφοράς που χρησιμοποιούνται συχνά ως δείκτες σε πειράματα qPCR για τη *C. capitata* είχαν είδη σχεδιαστεί από τους διδάκτορες του εργαστηρίου.

Για τον σχεδιασμό τους, χρησιμοποιήθηκαν 2 online εργαλεία που παρέχονται από την εταιρία IDT (Integrated DNA Technologies): **(1)** το Primer Quest και **(2)** το Oligoanalyzer.

1. Το **Primer Quest**, είναι εργαλείο σχεδιασμού primers για νουκλεοτιδική αλληλουχία που παρέχεται από τον χρήστη, ενώ δίνεται η δυνατότητα καθορισμού παραμέτρων όπως η θερμοκρασία τήξης, το μήκος αλλά και το είδος της χρήσης τους, που στην προκειμένη περίπτωση επηρέασε το επιθυμητό μήκος του προϊόντος.
2. Το **Oligoanalyzer**, είναι ένα συμπληρωματικό online εργαλείο, που δίνει τη δυνατότητα ελέγχει της αλληλεπιδράσεις που μεταξύ των δύο primers (ετεροδιμερή) αλλά και τις δευτεροταγείς δομές και σύμπλοκα που μπορούν να δημιουργηθούν μεταξύ του κάθε ένα (φουρκέτες, ομοδιμερή), όλα αυτά μαζί με την αντίστοιχη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs (ΔG) και τη θερμοκρασία τήξης από την οποία χαρακτηρίζονται. Το εργαλείο αυτό χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθεί η ποιότητα των ζευγαριών primers που σχεδιάστηκαν από το Primer Quest.

3.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), αποτελεί εργαστηριακή τεχνική ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων DNA με τη χρήση κατάλληλα ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών (primers). Στην παρούσα εργασία, η PCR χρησιμοποιήθηκε για την αρχική ενίσχυση του γονιδίου στόχου AFF4 (LOCUS18540_19669), με σκοπό τη χρήση του προϊόντος για την κατασκευή dsRNA για της ενέσεις σε έντομα EglI.

Για όλες τις PCR της εργασίας χρησιμοποιήθηκε το Platinum II Hot-Start Green PCR Master Mix (Invitrogen, Thermofisher) που περιέχει την Platinum Taq Hot-Start DNA πολυμεράση ήδη αναμειγμένη σε dNTPs, το βελτιστοποιημένο ρυθμιστικό διάλυμα Platinum II PCR buffer συμπληρωμένο με loading dye για την οπτικοποίηση των προϊόντων σε πηκτή. Η συγκεκριμένη πολυμεράση έχει ικανότητα επέκτασης 1kb DNA ανά 15 sec, άρα για το προϊόν του γονιδίου LOCUS18540_19669 με μήκος 317 bp, το βήμα της επέκτασης ρυθμίστηκε στα 6 sec.

Οι ποσότητες για τα mix των αντιδράσεων που χρησιμοποιήθηκαν, αναγράφονται παρακάτω:

Πίνακας 1. Συστατικά και ποσότητες τους για την προετοιμασία mix PCR

Συστατικά	20 μl Αντίδραση	50 μl Αντίδραση
Platinum II Hot-Start Green PCR Master Mix (2x)	10 μl	25 μl
10 μM Forward Primer	0,4 μl	1 μl
10 μM Reverse Primer	0,4 μl	1 μl
Template DNA	1 μl	3 μl
WFI (Water for Injection)	Μέχρι 20 μl	μέχρι 5μl

Τα στάδια του πρωτοκόλλου που χρησιμοποιήθηκε στον θερμοκυκλοποιητή αναγράφονται παρακάτω:

Πίνακας 2. Συνθήκες 20μl αντίδρασης PCR με Platinum II Hot-Start Green PCR Master Mix.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	94°C	2 min
35 Κύκλοι PCR	Αποδιάταξη	94 °C
	Υβριδοποίηση	57 °C
	Επέκταση	68 °C
Αναμονή	4 °C	∞

3.3 Ηλεκτροφόρηση Πηκτής Αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια αναλυτική μέθοδο για το διαχωρισμό και ταυτοποίηση διαφόρων ιονισμένων σωματιδίων, συμπεριλαμβανομένου και του DNA. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πηκτή 1% για την οπτικοποίηση και επιβεβαίωση καθαρότητας προϊόντων dsRNA, PCR, gel extraction, και 2% για δείγματα qPCR. Η διαφορά στη συγκέντρωση της πηκτής γίνεται για την καλύτερη εκτίμηση του μεγέθους των προϊόντων, καλύτερο διαχωρισμό με παράλληλη την αποφυγή της διάχυσης των προϊόντων της qPCR, αφού τα προϊόντα της είναι αρκετά μικρά (100bp).

Η πηκτή αγαρόζης σχηματίζεται αρχικά με τον πολυμερισμό του μονομερούς αγαρόζης στους 100°C, και στη συνέχεια πήξη του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου, που οδηγεί στη δημιουργία μια πορώδους μήτρας. Οι πόροι που σχηματίζονται είναι επαρκείς για να επιτρέψουν τη δίοδο βιομορίων όπως το DNA. Η ανίχνευση και οπτικοποίηση του DNA στο ηλεκτροφόρημα γίνεται με την ενσωμάτωση βρωμιούχου αιθιδίου στο διάλυμα της πηκτής, το οποίο παρεμβάλει μεταξύ των βάσεων του DNA και είναι ορατό κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία.

Για την κατασκευή της πηκτής:

1. Παρασκευή πυκνού διαλύματος TBE 5X, :

- 54 g TRIS
- 27,5 g βορικό οξύ.
- 20ml EDTA (0,5M), pH=8.
- Συμπλήρωση dH₂O μέχρι το 1L

Για χρήση, το πυκνό διάλυμα αραιώνεται σε τελική συγκέντρωση 0,5X

2. Παρασκευή της πηκτής

Ποσότητα σκόνης αγαρόζης, ανάλογη της επιθυμητής συγκέντρωσης της πηκτής, διαλύεται σε διάλυμα TBE 0,5X και θερμαίνεται μέχρι τη θερμοκρασία πολυμερισμού. Ακολουθεί προσθήκη κατάλληλης ποσότητας βρωμιούχου αιθιδίου, ανάδευση, μεταφορά σε καλούπι που φέρει ειδικό χτενάκι για τη δημιουργία των πηγαδιών όπου θα τοποθετηθεί το δείγμα. Αφού το διάλυμα ψυχθεί και στερεοποιηθεί, η πηκτή μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X, με τα πηγάδια προς τη μεριά του αρνητικού πόλου, ώστε το αρνητικά φορτισμένο DNA να κινηθεί προς το θετικό πόλο μετά την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Παράλληλα με τα δείγματα, φορτώνεται και πρότυπο δείγμα (ladder), που περιέχει μόρια DNA γνωστού μοριακού βάρους για να μπορεί να γίνει καθορισμός του μοριακού βάρους του δείγματος. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή φωτογραφίζεται κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία.

3.4 Απομόνωση DNA από Πηκτή Αγαρόζης (Gel extraction)

Μετά την ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων PCR, για τον διαχωρισμό των παραχθέντων προϊόντων, συχνά προέκυπτε η ανάγκη ανάκτησης του προϊόντος για περαιτέρω διαδικασίες. Στην περίπτωση αυτή, χρησιμοποιήθηκε το kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Mini Kit for Gel Extraction or PCR Clean Up, n.d.) από την εταιρεία MACHEREY-NAGEL.

Αρχικά, με νυστέρι και υπό λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας, κόβονται προσεκτικά και με ακρίβεια οι ζώνες (bands) της πηκτής που περιέχουν το επιθυμητό προϊόν και τοποθετούνται σε tubes. Μετά, σύμφωνα με το πρωτόκολλο, ζυγίζονται για να υπολογιστεί το βάρος της κομμένης πηκτής, προκειμένου να προστεθεί το αντιδραστήριο NT1 σε όγκο 2:1, προκειμένου να διασπαστούν οι δεσμοί της πηκτής και να διαλυτοποιηθεί με παράλληλη επώαση στους 50° C. Η λιωμένη πια πηκτή στη συνέχεια προστίθεται στην στήλη που φέρει την ειδική μεμβράνη πάνω στην οποία μετά από σύντομη φυγοκέντρωση, θα προσδεθεί το DNA. Ακολουθεί καθαρισμός της στήλης για απομάκρυνση άλλων συστατικών πέρα του DNA με το διάλυμα NT3. Τέλος, η στήλη μεταφέρεται σε Eppendorf tube και προστίθενται 21 µl WFI (Water For Injection), αφού έχει θερμανθεί, για να γίνει έκλυση του DNA. Το 1µl θα χρησιμοποιηθεί για μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA στο μηχάνημα Quawell Q3000. Το απομονωμένο προϊόν χρησιμοποιήθηκε είτε για re-PCR για εκ νέου απομόνωση μεγαλύτερης συγκέντρωσης και καθαρότητας είτε κατευθείαν για την παραγωγή dsRNA για χορήγηση σε έντομα μέσω ένεσης

3.5 In Vitro Μεταγραφή για Παραγωγή Δίκλωνων Μορίων RNA (dsRNAs) (In Vitro Transcription)

Εφόσον έχει παραχθεί το dsDNA του γονιδίου στόχου, είναι δυνατή η χρήση του ως μήτρα για την παραγωγή dsRNA με τη χρήση του ενζύμου της T7 πολυμεράσης. Για αυτή τη διαδικασία χρησιμοποιήθηκε η T7 Polymerase της εταιρείας Thermo Fisher Scientific, n.d.

Αρχικά, γίνεται η προετοιμασία των αντιδράσεων. Οι ποσότητες και τα απαραίτητα αντιδραστήρια καταγράφονται στον πίνακα:

Πίνακας 1. Συστατικά και ποσότητες τους για την προετοιμασία mix για In Vitro Μεταγραφή

Συστατικά	Όγκος
<i>Buffer 5x</i>	4 μ l
<i>Template</i>	400 ng
<i>NTPs (10mM)</i>	4 μ l
<i>RNase out (40U/μl)</i>	0,5 μ l
<i>T7 Polymerase (20U/μl)</i>	0,6 μ l
<i>WFI</i>	Μέχρι 20 μ l

Ακολουθεί σύντομο vortex, spin down και επώαση των δειγμάτων για 2h σε υδατόλουτρο στους 37°C.

Μετά τις 2h, προστίθεται 2 μ l DNase και επωάζεται στους 37°C για 10 min, για να καταστραφούν τα μόρια DNA που έχουν παραμείνει στο δείγμα. Τέλος, προστίθενται 2 μ l EDTA και η αντίδραση επωάζεται στους 65°C για 5 λεπτά, για να σταματήσει η δράση του ενζύμου. Τα δείγματα μεταφέρονται σε πάγο και προστίθεται αντιδραστήριο ίση ποσότητα φαινόλης:χλωροφορμίου, για το διαχωρισμό των φάσεων και των νουκλεικών οξέων. Το RNA που χρειαζόμαστε περιέχεται στην υδατική φάση που μπορεί να συλλεχθεί μετά από έντονο vortex και φυγοκέντριση. Αφού η υδατική φάση μεταφερθεί σε νέο tube, γίνεται προσθήκη 2,5 V αιθανόλης, 1/20 V οξικού αμμωνίου και 1 μ l γλυκογόνου (50mg/ml) και αποθηκεύονται για τουλάχιστον 1h στους -80°C, για την κατακρήμνιση του dsRNA. Μετά την κατακρήμνιση, ακολουθεί φυγοκέντριση στους 4°C, και 2 πλύσεις της πελέτας/ιζήματος με 70% αιθανόλη. Τέλος, προστίθενται 21 μ l WFI (50°C) και τα δείγματα επωάζονται στους 50°C για ανασύσταση του RNA.

Από αυτά, 1 μ l του επαναδιαλυμένου dsRNA αραιώνεται περαιτέρω 1:4 με WFI και 2 μ l χρησιμοποιούνται για την μέτρηση της συγκέντρωσης του σε dsDNA και RNA στο μηχάνημα Quawell Q3000. Η συγκέντρωση του dsRNA ορίζεται από τον μέσο όρο των δύο αυτών μετρήσεων. Ανάλογα τη συγκέντρωση του δείγματος, αραιώνεται περαιτέρω με WFI, προστίθεται ανάλογη ποσότητα loading dye και ηλεκτροφορεύεται σε πηκτή αгарόζης για να γίνει έλεγχος της ορθότητας του μοριακού βάρους του επιθυμητού προϊόντος αλλά και της ποιότητας και καθαρότητας του.

3.6 Χορήγηση dsRNA στο Έντομο με Ένεση

Αφού εξακριβωθεί ότι το dsRNA που παράχθηκε αντιστοιχεί στην επιθυμητή ζώνη μετά από ηλεκτροφόρηση και σύγκριση με πρότυπου δείγματος (ladder), αλλά και

αλληλούχιση Sanger, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για χορήγηση στα έντομα στα πλαίσια RNAi. Το dsRNA χορηγήθηκε σε ενήλικα έντομα 2^{ης} μέρας των στελεχών Vienna 8 και EgII μέσω μικροέγχυσης και έγινε χρήση της συσκευής NANOJECT II.

Πριν τις ενέσεις, είναι αναγκαίο να προετοιμαστεί σωστά η βελόνα και η συσκευή που θα χρησιμοποιηθούν. Αρχικά, πρέπει να ανοιχτεί η οπή στην άκρη της βελόνας απ' όπου θα εξέρθει το dsRNA. Αυτό γίνεται με τη χρήση μικρού ψαλιδιού στο κατάλληλο ύψος της βελόνας, ώστε να μην σπάσει ή να δημιουργηθεί πολύ μεγάλη οπή. Για να μειωθεί η τριβή, προστίθεται με σύριγγα ειδικό λάδι (mineral oil), αργά ώστε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες. Τοποθετούνται, τα απαραίτητα εξαρτήματα πάνω στη βελόνα και συναρμολογείται στο μηχάνημα. Κάποια μl του dsRNA (3-4μl) τοποθετούνται σε ένα κομμάτι parafilm και αντλούνται στη βελόνα, αργά ώστε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες.

Για να προετοιμαστούν τα έντομα, αναισθητοποιούνται και έπειτα συλλέγονται και τοποθετούνται σε ειδική τράπεζα με παροχή CO₂ για να διατηρηθούν αναισθητοποιημένα κατά τη διαδικασία. Ένα ένα, τοποθετούνται στην τράπεζα του στερεοσκοπίου και με προσοχή γίνεται η ένεση 64,4nl dsRNA συγκέντρωσης 5 μg/μl στην περιοχή του θώρακα. Αφού ενεθούν, τοποθετούνται σε κατάλληλα σημασμένα κλουβιά, και συλλέγονται μια ή/και δύο μέρες αργότερα για να ακολουθήσει η απομόνωση του RNA για να μελετηθεί το ποσοστό σίγησης, είτε διατηρούνται για μελέτη του φαινοτύπου.

3.7 Απομόνωση RNA (RNA extraction)

Για την απομόνωση ολικού RNA από ολόκληρο έντομο ή από μεμονωμένους ιστούς χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο TripleXtractor της εταιρίας Grisp Research Solutions. Αποτελεί ένα έτοιμο-για-χρήση, μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης που λόγω έχει την ικανότητα να λύσει ιστούς και κύτταρα διατηρώντας όμως ακέραιο, υψηλής ποιότητας RNA.

Για την παρούσα πτυχιακή χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη μεσογειακής μύγας, το αγρίου τύπου στέλεχος EgII και το GSS στέλεχος Vienna 8. Για να μετρηθεί το ποσοστό της σίγησης μετά από μικροενέσεις, συλλέχθηκαν ολόκληρα έντομα 3ης μέρας, τόσο αρσενικά όσο και θηλυκά. Επιπλέον, για τη δημιουργία του προφιλ έκφρασης του γονιδίου στα δύο στελέχη αλλά και για το δεύτερο κύκλο ενέσεων, πάρθηκαν δείγματα από συγκεκριμένους ιστούς:

- Από αρσενικά 1ης και 3ης μέρας: όρχεις, κεφάλια, θώρακες και κοιλίες.
- Από θηλυκά 1ης μέρας: κεφάλια, κοιλίες (μαζί με τα αναπαραγωγικά όργανα) και θώρακες.

- Από θηλυκά 3ης μέρας: ωοθήκες, κεφάλια, κοιλίες (χωρίς τα αναπαραγωγικά όργανα) και θώρακες.

Μετά τη συλλογή τους, τα έντομα ή οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα Eppendorf tubes (1,5 ml) και ζυγίστηκαν προκειμένου να εξακριβωθεί ο όγκος του αντιδραστηρίου TripleXtractor που πρέπει να προστεθεί. Η διαδικασία ακολουθεί ως εξής:

1. Ομογενοποίηση και λύση

- Τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν με τη χρήση εμβόλων pestles με ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην παραμείνουν στο έμβολο υπολείμματα ιστού.
- Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

2. Διαχωρισμός των φάσεων

- Προσθήκη χλωροφορμίου σε 1:5 όγκου του TripleXtractor που χρησιμοποιήθηκε.
- Έντονη ανάδευση των δειγμάτων με vortex για 10 sec.
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά
- Φυγοκέντριση σε 14.000 rpm στους 4°C για 15 λεπτά, που οδηγεί στον διαχωρισμό της κατώτερης φάσης φαινόλης χλωροφορμίου από την ανώτερη υδατική φάση, που περιέχει και το RNA.
- Μεταφορά της υδατικής φάσης σε καινούργιο Eppendorf με ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην αναμειχθούν ξανά οι δύο φάσεις.

3. Κατακρήμνιση του RNA

- Προσθήκη ισοπροπανόλης σε όγκο 1:1 ως προς το TripleXtractor που χρησιμοποιήθηκε.
- Προσθήκη 1 μl γλυκογόνου (50mg/μl) για τον ευκολότερο εντοπισμό της πελέτας RNA στα επόμενα στάδια.
- Ανακίνηση των δειγμάτων 3-4 φορές.
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
- Φυγοκέντριση σε 14.000rpm στους 4°C για 10 λεπτά.

4. Πλύση του RNA

- Απόρριψη του υπερκειμένου, προσεκτικά ώστε να μην παρασυρθεί η πελέτα.
- Προσθήκη 200 μl 70% αιθανόλης

- Φυγοκέντριση σε 14.000rpm στους 4°C για 5 λεπτά.
- Επανάληψη της πλύσης για άλλη μία φορά

5. Επαναδιάλυση RNA

- Απόρριψη του υπερκειμένου και περαιτέρω απομάκρυνση της αιθανόλης με χρήση πιπέτας.
- Τοποθέτηση των δειγμάτων σε φουρνάκι στους 55°C για 5 λεπτά προκειμένου να εξατμιστεί πλήρως η εναπομένουσα αιθανόλη.
- Επαναδιάλυση της πελέτας σε 11μl WFI που έχει προηγουμένως θερμανθεί στους 60°C
- Στη συνέχεια, το 1μl του δείγματος θα χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση του RNA με χρήση μηχανήματος Quawell Q3000, ενώ τα υπόλοιπα 10μl θα χρησιμοποιηθούν για την αντίδραση DNAase που ακολουθεί.
- Μετά τη διαδικασία, τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80°C.

3.8 Αντίδραση DNase (DNase Treatment)

Προκειμένου να απομακρυνθούν τα μόρια DNA που έχουν παραμείνει στο δείγμα μετά την απομόνωση του RNA, πραγματοποιήθηκε αντίδραση με DNase I (Thermo Fisher Scientific), μια ενδονουκλεάση που μπορεί να υδρολύσει φωσφοδιεστερικούς δεσμούς δίκλωνου και μονόκλωνου DNA. Συμπληρωματικά, χρησιμοποιήθηκε RNaseOUT (Thermo Fisher Scientific), ένας αναστολέας ριβονουκλεασών για να αποτρέψει την αποικοδόμηση του RNA.

Από τα αρχικά δείγματα απομονωμένου RNA, προστίθεται σε νέα tubes ποσότητα ανάλογη ώστε να ισοδυναμεί σε ένα μέγιστο 7μg RNA για κάθε δείγμα. Ακολουθεί η προετοιμασία MasteMix της αντίδρασης που περιέχει τα εξής συστατικά:

Πίνακας 4. Συστατικά και ποσότητες τους για την προετοιμασία mix της αντίδρασης DNase

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

Έπειτα, προστέθηκε WFI σε κάθε δείγμα ώστε ο όγκος της αντίδρασης να είναι 30μl. Μετά από σύντομο vortex και spin down, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 37°C για 1 ώρα.

Μετά το πέρας της 1 ώρας, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε πάγο και κάτω από fume hood. Προστέθηκαν:

- 135 μl οξικού αμμωνίου 7,5 pH
- 235 μl WFI,
- 400 μl φαινόλης/χλωροφορμίου ίσου όγκου.

Ακολούθησε έντονο vortex και φυγοκέντριση στα 14000rpm για 5min, στους 4°C. Η υδατική φάση μεταφέρθηκε με προσοχή σε νέα tubes και προστέθηκαν:

- 1ml 100% αιθανόλης
- 1μl γλυκογόνου (50mg/μl)

Τα δείγματα ανακινήθηκαν 3-4 φορές και αποθηκεύτηκαν για τουλάχιστον 1h στους -80°C, όπου μπορούν να διατηρηθούν για μήνες. Μετά την επώαση, ακολούθησε φυγοκέντριση στα 14000rpm για 30min, στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και προστέθηκαν 200 μl 70% αιθανόλης και νέα φυγοκέντριση στα 14000rpm για 10 min, στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε προσεκτικά με τη χρήση πιπέτας ώστε να μην παραμείνουν σταγόνες και τα δείγματα αφέθηκαν να στεγνώσουν σε φουρνάκι για 5 min στους 55°C. Αφού κάθε ίχνος αιθανόλης είχε εξατμιστεί, το RNA επαναδιαλύθηκε σε 11 μl WFI που είχε προηγουμένως θερμανθεί στους 55°C, και τα δείγματα επωάστηκαν στους 55°C για καλύτερη επαναδιάλυση του RNA. Τέλος, έγινε έντονο vortex και η συγκέντρωση τους μετρήθηκε σε Quawell Q3000. Το μηχάνημα αυτό υπολογίζει τη συγκέντρωση δειγμάτων σε μόρια όπως DNA, dsRNA και πρωτεΐνες, μετρώντας την απορρόφηση των δειγμάτων αυτών σε συγκεκριμένα μήκη κύματος όπως τα 260nm όπου απορροφούν οι πουρίνες και οι πυριμιδίνες, και στα 280 nm που απορροφούν οι αρωματικοί δακτύλιοι των αμινοξέων των πρωτεϊνών. Επίσης, υπολογίζει τον λόγο A260/A280 που είναι ενδεικτικός για την καθαρότητα των νουκλεικών οξέων, με 1,8 να είναι η ένδειξη καθαρού DNA, και 1,9-2 η ένδειξη καθαρού RNA. Τέλος, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι τη χρήση τους.

3.9 Παραγωγή cDNA

Προκειμένου να μπορέσουμε να μελετήσουμε την έκφραση γονιδίων από το απομονωμένο RNA, πρέπει να προηγηθεί η μετατροπή του σε cDNA. Η μετατροπή αυτή έγινε με τη χρήση του ενζύμου *MLV-Reverse Transcriptase* (Invitrogen). Το cDNA μπορεί να κατασκευαστεί με ποικίλους εκκινητές (random hexamers, gene specific, oligo-dT), αλλά στην παρούσα εργασία λόγω του σκοπού να εστιάσουμε στα ώριμα μετάγραφα mRNA, χρησιμοποιήθηκαν oligo-dT primers, που προσδένονται στις poly-A ουρές των μεταγράφων.

Για την διαδικασία:

1. Μεταφέρθηκε ποσότητα ανάλογη των 1000ng RNA για κάθε δείγμα σε νέα tubes και συμπληρώθηκε WFI μέχρι όγκο των 10 μl.

2. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 1μl oligo-dTs (50mM) και 1μl dNTPs (10Mm)
3. Ακολούθησε επώαση στους 65°C για 5 min, και άμεσα μια ακόμα επώαση σε πάγο για 10 min.
4. Προετοιμάστηκε αντίδραση για κάθε δείγμα με τα ακόλουθα συστατικά:

Πίνακας 5. Συστατικά και ποσότητες τους για την προετοιμασία *mix* της αντίδρασης παραγωγής cDNA

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

Από το *mix*, οποίο προστέθηκαν 8 μl σε κάθε δείγμα. Ακολούθησε επώαση 2h στους 37°C. Με το πέρας της επώασης προστέθηκαν 380 μl WFI και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

3.10 Ποσοτική PCR Πραγματικού Χρόνου (qPCR)

Η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) είναι μια εξέλιξη της κλασικής PCR. Αποτελείται και αυτή από τους τρεις θερμικούς κύκλους για τα στάδια της Αποδιάταξης, Υβριδοποίησης και Επέκτασης, αλλά έχει ένα επιπλέον συστατικό που δίνει τη δυνατότητα της παρακολούθησης της ενίσχυσης του προϊόντος σε πραγματικό χρόνο στο τέλος κάθε κύκλου. Η χρωστική αυτή, έχει την δυνατότητα να συνδέεται επιλεκτικά μόνο σε δίκλωνο DNA και έτσι να φθορίζει με ένταση ανάλογη της ποσότητας του δίκλωνου DNA που βρίσκεται στο δείγμα, δίνοντας έτσι στη τεχνική τον ποσοτικό της χαρακτήρα. Για την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η KAPA SYBR Green από την εταιρία KAPA Biosystems, η οποία εκπέμπει φθορισμό στα 522nm.

Στα αρχικά στάδια της αντίδρασης όπου τα μόρια dsDNA είναι λίγα, ανιχνεύονται ελάχιστα ποσά φθορισμού, που αντιμετωπίζονται ως θόρυβος (φάση υστέρησης). Υπάρχει μια καθορισμένη ουδός, όπου το δείγμα έχει ενισχυθεί σε τέτοιο βαθμό (εκθετική φάση) που δίνει υψηλότερες και αντιπροσωπευτικές μετρήσεις φθορισμού, καθώς σε αυτή τη φάση το προϊόν ενισχύεται με μεγαλύτερη απόδοση τέτοια ώστε θεωρητικά να διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Ο κύκλος στον οποίο ένα δείγμα ξεπερνάει την ουδό λέγεται C_q και είναι αντιπροσωπευτικό της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος που περιείχε το δείγμα ⁶⁹. Το κατώφλι που καθορίζει την τιμή C_q είναι συνήθως αυτόματα καθορισμένο από τον θερμοκυκλοποιητή (Bio-Rad Laboratories), αλλά προκειμένου τα αποτελέσματα

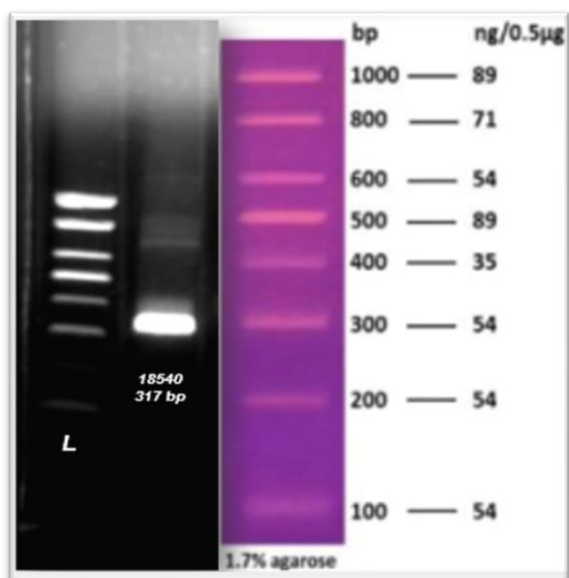
να είναι συγκρίσιμα μεταξύ διαφορετικών runs, μπορεί να καθοριστεί χειροκίνητα. Στην παρούσα εργασία καθορίστηκε στο 100. Ακολουθεί η γραμμική φάση όπου η απόδοση της πολυμεράσης μειώνεται λόγω της αύξησης του υποστρώματος και τέλος η καμπύλη φτάνει ένα πλατό, σηματοδοτώντας το τέλος της αντίδρασης, συνήθως λόγω αδυναμίας του ενζύμου να καταλύσει την αντίδραση λόγω των θερμικών κύκλων ή έλλειψη αντιδραστηρίων ⁷⁰.

4 Αποτελέσματα

4.1 Πρώτος κύκλος ενέσεων

Αρχικά, μιας και είχαμε ήδη τα δεδομένα RNA-seq ξεκινήσαμε έναν πρώτο κύκλο ενέσεων αποσιώπησης του γονιδίου AFF4, ώστε να έχουμε μια αρχική εικόνα του ρόλου του γονιδίου στη *C. capitata*. Συγκεκριμένα, σκοπός ήταν να γίνει σίγηση του γονιδίου στο στέλεχος που εμφανίζει την υψηλότερη έκφραση, δηλαδή τα wt EgII, να επιβεβαιωθεί η μείωση των επιπέδων έκφρασης και να παρατηρηθεί ο φαινότυπος.

Σχεδιάστηκαν οι primers ds18540_F/ ds18540_R με την αλληλουχία 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' στο 5' άκρο προκειμένου να αναγνωριστεί από την



Εικόνα 15. Ζώνη ηλεκτροφόρησης In vitro Transcription για το dsRNA_18540 (317 bp), ladder 1 kbp (L)

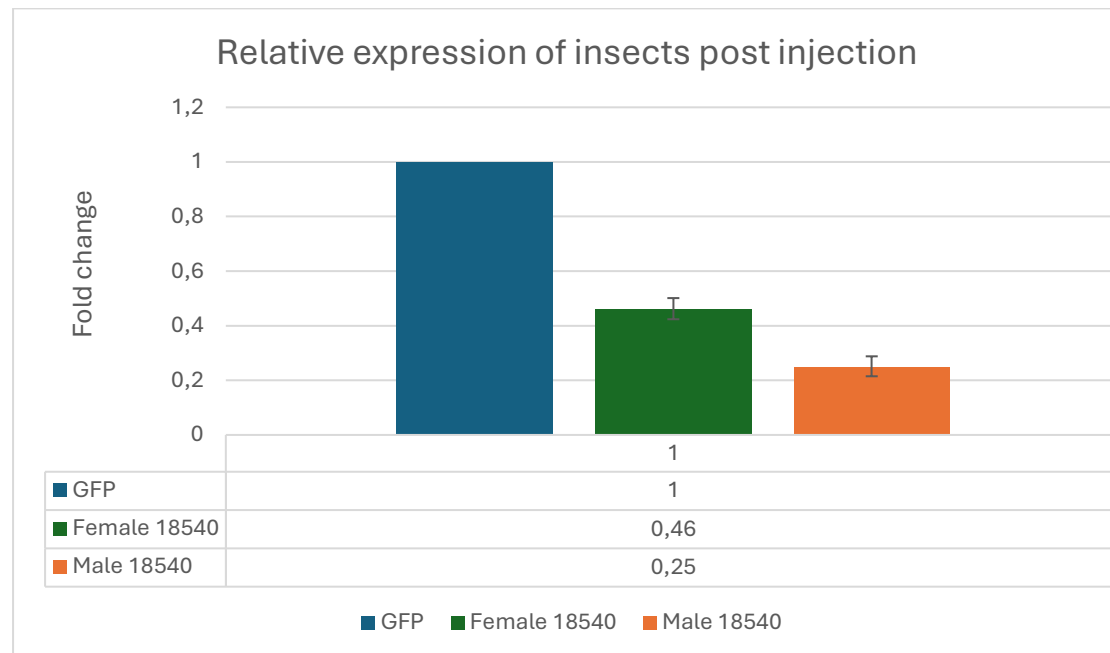
T7 πολυμεράση για την κατασκευή του dsRNA με μήκος 317 bp. Οι primers αυτοί χρησιμοποιήθηκαν με υπόστρωμα cDNA από *C. capitata* για να γίνει PCR. Το προϊόν αυτό ηλεκτροφορήθηκε, η σωστή ζώνη ταυτοποιήθηκε μέσω σύγκρισης με πρότυπο δείγμα (ladder) και απομονώθηκε με νυστέρι και μετά από ανάκτηση από την πηκτή (Gel Extraction), χρησιμοποιήθηκε ξανά ως template για νέα re-PCR. Η διαδικασία επαναλήφθηκε έως ότου απομονώθηκε αρκετή ποσότητα του προϊόντος για να γίνει in Vitro Transcription. Με το πέρας της αντίδρασης, το dsRNA ηλεκτροφορήθηκε για να διαπιστωθεί

η ακεραιότητά του από την ύπαρξη μοναδικής καθαρής ζώνης στο σωστό ύψος με τη σύγκριση με πρότυπο δείγμα (ladder) (**Εικόνα 15**).

Εφόσον υπάρχει η πιθανότητα το γονίδιο AFF4 να εμπλέκεται στη ανάπτυξη των σεξουαλικών οργάνων της *C. capitata*, οι ενέσεις επιλέχθηκε να γίνουν σε έντομα 2^{ης} μέρας που είναι μη-σεξουαλικά ώριμα, και συλλογή αυτών 48 ώρες μετά τη χορήγηση του dsRNA για να η διαπίστωση της σίγησης. Τα δείγματα συλλέχθηκαν και έγινε RNA extraction σε ολόκληρο το έντομο και προετοιμάστηκαν τα cDNA για της qPCR. Για την κανονικοποίηση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το ιδιοσύστατο γονίδιο GAPDH (Cc_GAPDH-F/-R). Μετά από ανάλυση των δεδομένων των qPCR διαπιστώθηκαν τα επίπεδα σίγησης του γονιδίου AFF4 ως 47,5% στα θηλυκά άτομα και στα 73,7% αρσενικά (**Εικόνα 15**).

Αμέσως μετά τις ενέσεις, παρατηρήθηκε πως τα έντομα στα οποία χορηγήθηκε dsRNA_AFF4 αρχικά καθυστέρησαν να συνέλθουν από τη διαδικασία των ενέσεων συγκριτικά με τα αντίστοιχα dsRNA_GFP έντομα, ενώ παρέμειναν

ληθαργικά για αρκετές ώρες μετά. Το φαινόμενο αυτό συνέχισε και την επόμενη μέρα, με έναν αριθμό εντόμων να έχουν ήδη πεθάνει στο πρώτο εικοσιτετράωρο,



Εικόνα 15. Average Relative expression 48h μετά την χορήγηση dsAFF4 (18540) σε θηλυκά και αρσενικά έντομα. Στα

σε αριθμό μεγαλύτερο από τα έντομα ελέγχου (dsRNA_GFP). Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε πως κυρίως τα αρσενικά έντομα ήταν ληθαργικά με μειωμένη κινητικότητα, με αποτέλεσμα 50% των εντόμων να πεθάνουν μέσα στις 48 ώρες που μεσολάβησαν την ένεση και τη συλλογή (**Πίνακας 6**).

Πίνακας 6. Πίνακας κατάστασης εντόμων 1^{ου} κύκλου ενέσεων.

	<u>AFF4</u>		<u>GFP</u>	
Φύλλο	Θ.	Α.	Θ.	Α.
Ενέθηκαν	15	10	5	4
Απεβίωσαν	3	5	0	1
Επέζησαν	12	5	5	3

4.2 Προφίλ έκφρασης του AFF4

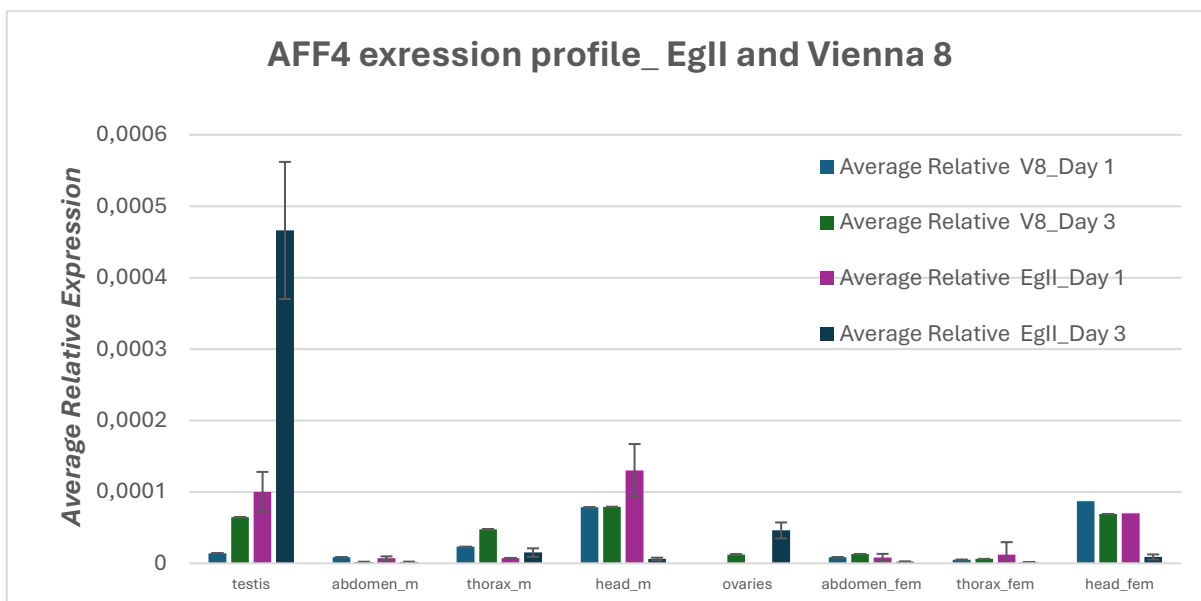
Στη συνέχεια, για λεπτομερέστερη κατανόηση της προέλευσης της έκφρασης του γονιδίου, αλλά και για την επιβεβαίωση των δεδομένων RNA-seq, προχωρήσαμε σε κατασκευή ενός προφίλ έκφρασης του γονιδίου σε θηλυκά και αρσενικά άτομα και των δύο στελεχών, EglI και Vienna 8, σε δύο διαφορετικά χρονικά σημεία: πριν την σεξουαλική ωρίμανση, όπου χρησιμοποιήθηκαν έντομα 1^{ης} μέρας, και μετά τη σεξουαλική ωρίμανση, όπου χρησιμοποιήθηκαν έντομα 3^{ης} μέρας. Για να μπορέσουμε να εντοπίσουμε την προέλευση της έκφρασης του γονιδίου, απομονώθηκαν οι εξής ιστοί: **(1)** όρχεις (testis) για τα αρσενικά ή ωοθήκες (ovaries) για τα θηλυκά, **(2)** η υπόλοιπη κοιλιά (abdomen, abd.), αφού είχαν ήδη αφαιρεθεί όρχεις/ωοθήκες, **(3)** θώρακας (thorax) και **(4)** κεφάλι (head). Συγκεκριμένα για τα θηλυκά 1^{ης} μέρας και των δύο στελεχών, δεν απομονώθηκαν ξεχωριστά ωοθήκες καθώς δεν ήταν αρκετά ανεπτυγμένες για να αφαιρεθούν επιτυχώς. Άρα, για τα θηλυκά πρώτης μέρας, απομονώθηκαν : **(1)** ανέπαφες κοιλίες, **(2)** θώρακας και **(3)** κεφάλι.

Κάθε δείγμα αποτελεί pool ιστών από τρία έντομα (pool των 3), ενώ συλλέχθηκαν συνολικά 3 βιολογικές επαναλήψεις. Πούπες τοποθετήθηκαν σε κλουβί, και τα έντομα που προέκυψαν 24 ώρες μετά την ανάδυση τους, συλλέχθηκαν και ακολούθησε η διαδικασία της εκτομής των ιστών (dissection). Ομοίως και για τα έντομα 3^{ης} μέρας, συλλέχθηκαν κλουβί για 3x24ωρα από την εκκόλαυση τους, και ακολούθησαν τα dissections. Για της qPCR χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών q18540_F/q18540_R για τη στόχευση του ώριμου mRNA του γονιδίου AFF4 (LOCUS**18540**_19669) και για την κανονικοποίηση χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών Cc_RPL19-F/Cc_RPL19-R που στοχεύει το ιδιοσύστατο (housekeeping) γονίδιο RPL19 που χρησιμοποιείται ευρέως για τη *C. capitata*.

Από το προφίλ αυτό (**Εικόνα 16**), παρατηρήθηκε πως μεταξύ όλων των δειγμάτων, μέγιστη έκφραση του γονιδίου εμφανίζουν τα **αρσενικά EglI 3^{ης} μέρας στους όρχεις** (testis). Έκφραση ανιχνεύτηκε και στο κεφάλι σε συγκρίσιμα επίπεδα με τα αντίστοιχα θηλυκά, ενώ σχεδόν μηδενική ήταν η έκφραση σε thorax και abdomen. Για τα θηλυκά, μέγιστη έκφραση εμφανίζεται στο κεφάλι, συγκεκριμένα στα V8 1^{ης} μέρας, ενώ φαίνεται στη κοιλιά, τα ωάρια και το θώρακα το γονίδιο σχεδόν δεν εκφράζεται.

Η χαμηλή έκφραση οδήγησε σε μεγάλες διακυμάνσεις όχι μόνο μεταξύ βιολογικών, αλλά και μεταξύ των τεχνικών επαναλήψεων σε πολλές περιπτώσεις. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να χρειαστεί να χρησιμοποιηθεί σχετικά μεγάλη ποσότητα cDNA για της qPCR. Επομένως, θα ήταν βέλτιστο να επαναληφθεί η διαδικασία με συγκέντρωση περισσότερων βιολογικών επαναλήψεων και ίσως

μεγαλύτερων pools των μικρών ιστών όπως τα testis και ovaries για καλύτερη απόδοση της έκφρασης.



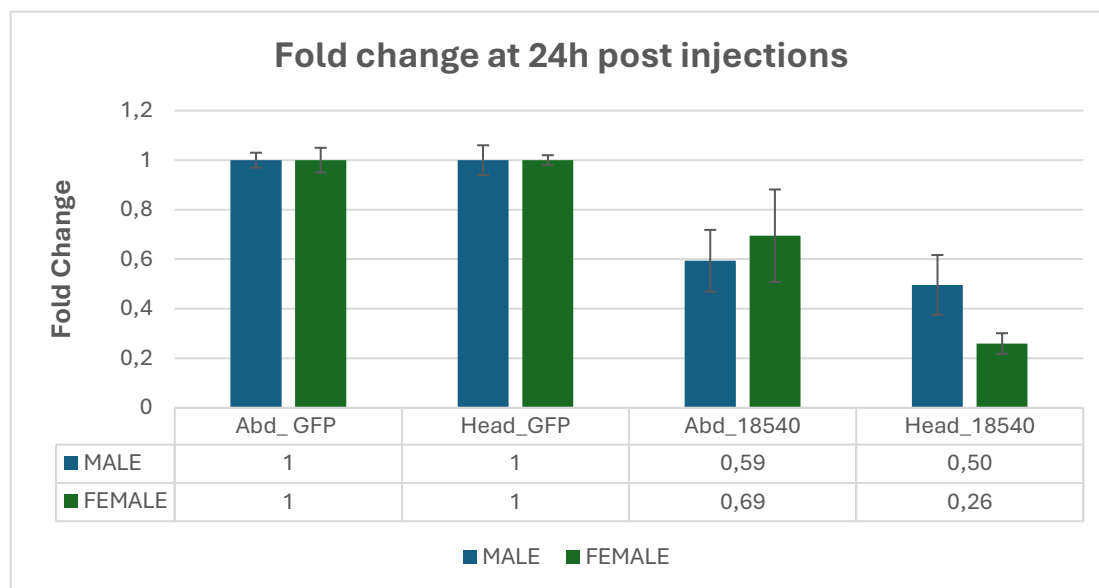
Εικόνα 16. Average Relative expression του AFF4 στους διάφορους ιστούς εντόμων EgII και Vienna8 1^{ης} και 3^{ης} μέρας.

4.3 2^{ος} Κύκλος ενέσεων

Με βάση το προφίλ που κατασκευάστηκε, προχωρήσαμε σε δεύτερο κύκλο ενέσεων με σκοπό να διερευνήσουμε περαιτέρω τον φαινότυπο που παρατηρήθηκε στον 1^ο κύκλο ενέσεων. Επιλέχθηκε ξανά να γίνουν ενέσεις σε έντομα 2^{ης} μέρας καθώς της μέγιστης έκφραση του γονιδίου στους όρχεις εδώ, ενώ αποφασίστηκε να συλλεχθούν έντομα στις 24h και της 48h για να μελετηθεί και η σίγησης. Τα dsRNA_18540 και dsRNA_GFP ηλεκτροφορήθηκαν ξανά για να διαπιστωθεί η ακεραιότητά τους.

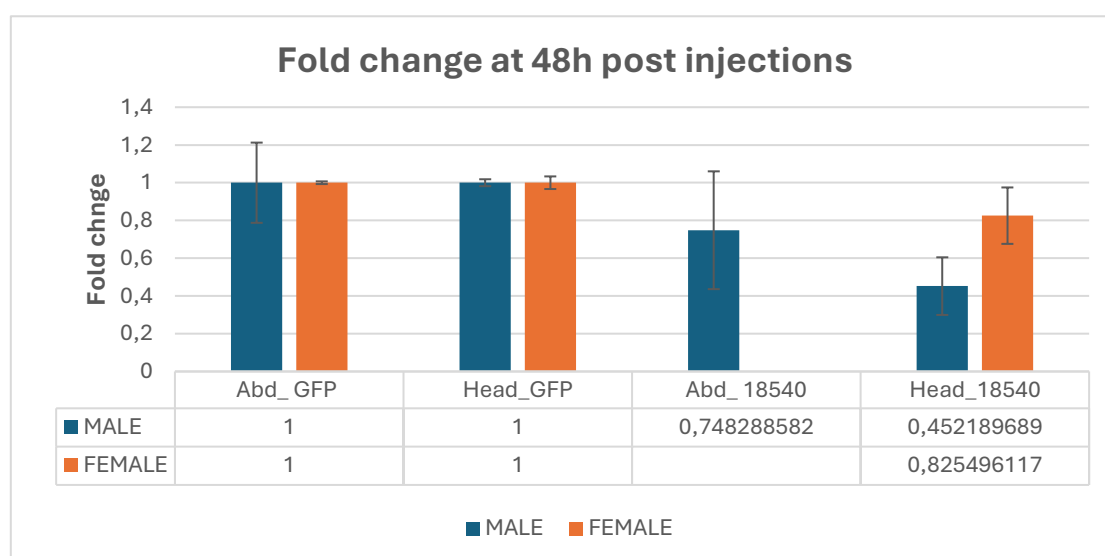
Εφόσον από το προφίλ διαπιστώσαμε πως έκφραση ανιχνεύθηκε μόνο σε όρχεις των αρσενικών και κεφάλια και των δύο φύλλων, αποφασίστηκε να απομονωθούν ολόκληρες κοιλίες και κεφάλια και για τα δύο φύλλα, για μεγαλύτερη ευκολία των χειρισμών και απομόνωσης του RNA. Πάλι, τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν σε pools των τριών εντόμων για κάθε κατηγορία, και συνολικά έγιναν 3 βιολογικές επαναλήψεις για κάθε δείγμα. Ξανά, για της qPCR χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών q18540_F/q18540_R και για την κανονικοποίηση χρησιμοποιήθηκε το ιδιοσυστατο γονίδιο RPL19, με το ζεύγος εκκινητών Cc_RPL19-F/Cc_RPL19-R.

Από την ανάλυση φάνηκε πως δεν επιτεύχθηκαν τα ίδια επίπεδα σίγησης όπως στον 1^ο κύκλο ενέσεων. Συγκεκριμένα στις 24h, στα αρσενικά έγινε σίγηση 40,6% και 50,3% στην κοιλιά και στο κεφάλι αντίστοιχα, ενώ στα θηλυκά 30,5% και 74% σε κοιλιά και κεφάλι αντίστοιχα (**Εικόνα 17**).



Εικόνα 17. Fold Change της έκφρασης του γονιδίου *AFF4* σε ιστούς αρσενικών και θηλυκών εντόμων 24h post injection. Για την ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε ως calibrator το αντίστοιχο άτομο ενεμένο με *dsGFP*.

Στις 48h, (**Εικόνα 18**) υπήρξε διακύμανση των επιπέδων με 25,1% και 54,7% σίγηση του γονιδίου στα αρσενικά σε κοιλιά και κεφάλι αντίστοιχα, και στα θηλυκά η σίγηση στο κεφάλι μειώθηκε στο 17,4% ενώ για τη σίγηση στη κοιλιά δεν μπορούσαμε να πάρουμε αποτελέσματα, αφού οι βιολογικές επαναλήψεις είχαν μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ τους, πιθανότατα λόγω χαμηλής καθαρότητας του δείγματος.



Εικόνα 18. Fold Change της έκφρασης του γονιδίου *AFF4* σε ιστούς αρσενικών και θηλυκών εντόμων 48h post injection. Για την ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε ως calibrator το αντίστοιχο άτομο ενεμένο με *dsGFP*.

Τα χαμηλότερα επίπεδα σίγησης συμβαδίζουν με τις αρχικές παρατηρήσεις πως τα έντομα ενεμένα με ds_18540 δεν παρουσίαζαν τη ληθαργικότητα που παρατηρήθηκε στον πρώτο κύκλο ενέσεων, ενώ δεν παρατηρήθηκε παρόμοιο μοτίβο θνησιμότητας, με τα αρσενικά να πεθαίνουν σε μεγαλύτερο ποσοστό και από τα ds_GFP αλλά και από τα θηλυκά ds_18540. (**Πίνακας 7**).

Πίνακας 7. Καταγραφή εντόμων 2^{ου} κύκλου ενέσεων

	AFF4		GFP	
Φύλλο	Θ.	Α.	Θ.	Α.
Ενέθηκαν	27	26	25	25
Απεβίωσαν 24h	5	4	4	4
Απεβίωσαν 48h	1	2	3	3
Επέζησαν	21	20	18	18

4.3.1 Παρατήρηση φαινοτύπου

Για τη παρατήρηση φαινοτύπου, ενέθηκαν 6 επιπλέον αρσενικά έντομα για να στηθούν μικρά κλουβιά. Συγκεκριμένα, ενέθηκαν 3 αρσενικά με ds18540 και 3 αρσενικά με dsGFP και τοποθετήθηκαν σε ζευγάρια με μη-ενεμένα (untreated) θηλυκά, σε μικρά κλουβιά προκειμένου να μετρηθεί η ωοαπόθεση (αριθμός αυγών, βιώσιμων /και μη), να παρατηρηθεί η συμπεριφορά και η σύζευξη.

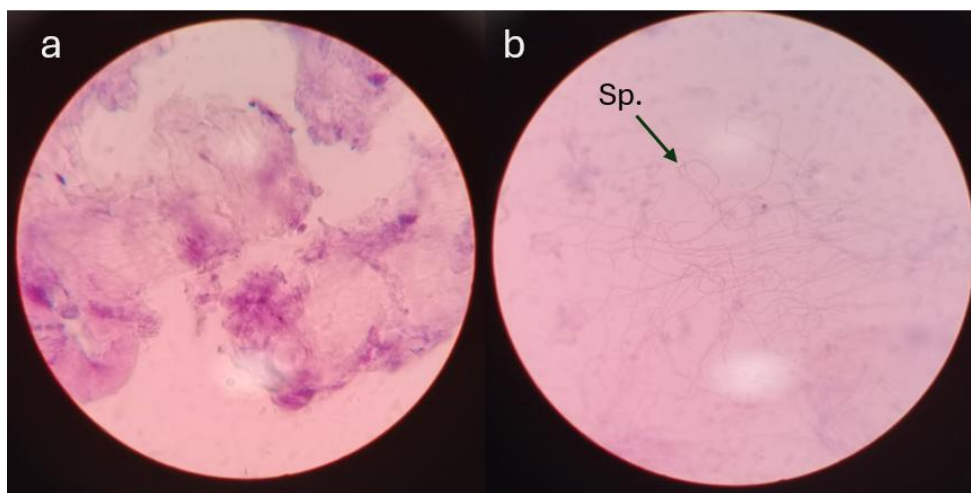
Όλα τα έντομα επιβίωσαν τη διαδικασία των ενέσεων ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια ληθαργικότητα τη μέρα των ενέσεων και δεν εμφάνισαν τον ίδιο φαινότυπο με τα αρσενικά ds18540 του 1^{ου} κύκλου ενέσεων. Παρόλα αυτά, το 2^ο 24ωρο απεβίωσε ένα έντομο από τα 2 κλουβιά *dsGFP x Untreated*, ενώ το 4^ο 24ωρο απεβίωσε θηλυκό από ένα κλουβί *ds18540 x Untreated*. Τα έντομα που επιβίωσαν διατηρήθηκαν για δυο βδομάδες post-injection όπου όπως παρατηρήθηκε, υπήρξε σύζευξη και ωοαπόθεση με βιώσιμα και μη αυγά, και δεν παρατηρήθηκε κάποιο πρόβλημα με την κινητικότητα των εντόμων με ds18540. Όμως, λόγω των εντόμων που απεβίωσαν δεν είχαμε αρκετές βιολογικές επαναλήψεις προκειμένου να αποκομίσουμε βάσιμες παρατηρήσεις ή μετρήσεις.

Επίσης επιχειρήθηκε παρατήρηση των αναπαραγωγικών ιστών τόσο σε στερεοσκόπιο όσο και σε οπτικό μικροσκόπιο, καθώς και η παρατήρηση του σπέρματος, με στόχο τη σύγκριση πιθανών διαφορών μεταξύ των εντόμων που είχαν υποστεί σίγηση με dsGFP ή ds18540. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν εκτομές (dissections) σε αρσενικά και θηλυκά έντομα, με απομόνωση των όρχεων και των σπερματοθηκών αντίστοιχα.

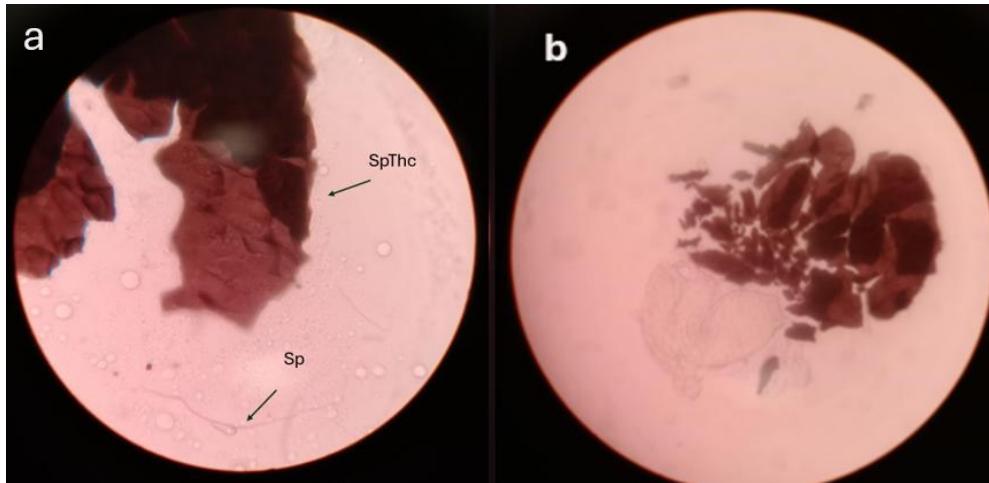
Στα αρσενικά, δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στη σύγκριση της μορφολογίας και του σχετικού μεγέθους των όρχεων μεταξύ των δύο πειραματικών συνθηκών (dsGFP και ds18540). Οι εκτομές πραγματοποιήθηκαν σε διάλυμα PBS για την αποφυγή αφυδάτωσης των ιστών, ενώ ακολούθησε πλύσιμο των οργάνων σε διαδοχικές σταγόνες PBS πάνω σε γυάλινη πλάκα ώστε να απομακρυνθούν υπολείμματα άλλων ιστών. Η μικροσκοπική παρατήρηση ανέδειξε κάποιες διαφοροποιήσεις, κυρίως στο μέγεθος των όρχεων, ωστόσο ο περιορισμένος αριθμός δειγμάτων δεν επέτρεψε τη σαφή διάκριση μεταξύ των δύο πειραματικών συνθηκών (dsGFP και ds18540). Επιπλέον, όρχεις με μορφολογικές ανωμαλίες παρατηρήθηκαν και στις δύο συνθήκες, γεγονός που καθιστά αβέβαιη την πιθανή επίδραση της σίγησης του γονιδίου στη δομή τους.

Συμπληρωματικά, εκτός από τις διαφορές στο μέγεθος των όρχεων, επιχειρήσαμε να εντοπίσουμε και πιθανές διαφορές στην ποιότητα του σπέρματος μεταξύ των δύο συνθηκών (έντομα με dsGFP και ds18540). Για το λόγο αυτό, ανοίχθηκαν όρχεις με μικρές βελόνες κοντά στον σπερματικό πόρο (*Vas deference*) (**Παράρτημα, Εικόνα 21**) προκειμένου να απελευθερωθεί κυρίως το ώριμο

σπέρμα που περιέχεται και στη συνέχεια το δείγμα εμβαπτίστηκε για 10 λεπτά σε Trypan Blue, μια χρωστική που μπορεί να διαχωρίσει μεταξύ νεκρών και ζωντανών κυττάρων, αφού στα πρώτα, μπορεί να διαπεράσει τη πλασματική μεμβράνη και να τα βάψει μπλε (**Εικόνα 19**). Ωστόσο, η χρώση δεν απέδωσε σαφή αποτελέσματα, είτε λόγω απουσίας νεκρών κυττάρων, είτε λόγω ανεπαρκούς χρώσης, είτε επειδή απαιτούνταν μεγαλύτερη μεγέθυνση για την ακριβή αξιολόγηση των κυττάρων. Επιπλέον, η χρήση άλλης χρωστικής, πιο εξειδικευμένης για τη συγκεκριμένη δοκιμή θα ήταν βέλτιστη. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν εκτομές σπερματοθηκών σε θηλυκά έντομα που είχαν αφαιρεθεί να ζευγαρώσουν με αρσενικά των δύο συνθηκών, με στόχο να εξεταστεί η παρουσία σπέρματος στο εσωτερικό τους και η σχετική ποσότητα αυτού. Μετά την απομόνωση των σπερματοθηκών, ακολούθησε προσεκτικό πλύσιμο και στη συνέχεια, με τη βοήθεια καλυπτρίδας, εφαρμόστηκε ήπια πίεση προκειμένου να διαρραγούν οι ιστοί και να εξεταστεί το περιεχόμενό τους (**Εικόνα 20**). Δυστυχώς, δεν εντοπίστηκε σπέρμα στο εσωτερικό των οργάνων, παρόλο που σε κάποιες περιπτώσεις οι σπερματοθήκες προέρχονταν από θηλυκά που έφεραν αυγά. Αυτό πιθανότητα οφείλεται στον χειρισμό του δείγματος, που λογικά οδήγησε στη ευρεία διασπορά του σπέρματος με αποτέλεσμα να μην μπορεί να εντοπιστεί στο δείγμα.



Εικόνα 19. Φωτογραφίες από οπτικό μικροσκόπιο με 100X: **a)** Σπασμένος όρχις εμβαπτισμένος σε χρωστική Trypan blue, **b)** Σπέρμα εμβαπτισμένο σε χρωστική Trypan blue, Sp=sperm



Εικόνα 20. Φωτογραφίες από οπτικό μικροσκόπιο με 100X: **a)** Σπασμένη (crushed) σπερματοθήκη., **b)** Σπασμένη (crushed) σπερματοθήκη, Sp=sperm, SpThc= spermatheca.

5 Συζήτηση

Η SIT αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι των προγραμμάτων πληθυσμιακού ελέγχου για δεκάδες παράσιτα, συμπεριλαμβανομένων και πολλών μελών των Tephritidae, όπως η *Ceratitis capitata*. Κύριος παράγοντας για την επιτυχία της είναι η μαζική εκτροφή αρσενικών υψηλής ποιότητας, ικανών να συναγωνιστούν τα αγρίου τύπου αρσενικά (wt) και να εισάγουν αποτελεσματικά τη στειρότητα στον πληθυσμό-στόχο. Ωστόσο, το τρέχον πρόγραμμα ποιοτικού ελέγχου, παρουσιάζει ελλείψεις, καθώς δεν εξετάζει τη μεταγραφομική δραστηριότητα, με αποτέλεσμα να μην ανιχνεύονται κρίσιμες διακυμάνσεις στην ποιότητα, μειώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της τεχνικής.

Η διερεύνηση και η χρήση μεταγραφομικών δεικτών μπορούν να συμβάλουν στον εκσυγχρονισμό και τη βελτιστοποίηση του ποιοτικού ελέγχου στη SIT, όχι μόνο για τη *Ceratitis capitata*, αλλά και για άλλα σημαντικά μέλη της οικογένειας Tephritidae, όπως είδη των γενών *Bactrocera* και *Anastrepha*. Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε ως στόχο την αξιολόγηση γονιδίων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως μεταγραφομικοί δείκτες στο πλαίσιο του ποιοτικού ελέγχου. Συγκεκριμένα, επικεντρωθήκαμε στη μελέτη του γονιδίου AFF4 και στο ρόλο του στην αναπαραγωγική λειτουργία της *C. capitata*, δίνοντας έμφαση στην ανάπτυξη των όρχεων και του σπέρματος.

Το γονίδιο AFF4 (LOCUS18540_19669), αποτελεί γονίδιο ενδιαφέροντος λόγω της αυξημένης έκφρασης που εμφανίζει στο wt EglI σε σύγκριση με το GSS Vienna 8. Τα στελέχη αυτά, υποστηρίζεται πως διαφέρουν σημαντικά σε χαρακτήρες όπως η αναπαραγωγική ικανότητα, η ανάπτυξη και η αντοχή, με το EglI να υπερτερεί του Vienna 8. Επομένως, η διαφορά στην έκφραση του γονιδίου αυτού μεταξύ των στελεχών είναι πιθανό να εμπλέκεται με αυτούς τους χαρακτήρες. Η λειτουργία του AFF4 στη *C. capitata* δεν είναι γνωστή, αλλά ορθόλογα γονίδια σε άλλους οργανισμούς δίνουν στο AFF4 κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του σταδίου της επιμήκυνσης της μεταγραφής με την συμμετοχή του σε μεταγραφικά σύμπλοκα όπως το SEC⁷¹.

Αρχικά, στον πρώτο κύκλο ενέσεων που πραγματοποιήθηκε, επιτεύχθηκε 75% σίγηση του γονιδίου στα αρσενικά, οδηγώντας σε εμφανείς διαφορές συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (dsGFP). Στα θηλυκά, αν και επιτεύχθηκε 47% σίγηση, δεν παρατηρήθηκαν παρόμοια φαινοτυπικά αποτελέσματα, γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει πιθανή φυλοειδική λειτουργία του γονιδίου. Τα αρσενικά έντομα ενεμένα με ds18540 παρουσίασαν 50% θνησιμότητα σε σχέση με τα αρσενικά dsGFP αλλά και ληθαργικότητα με μειωμένη ικανότητα πτήσης και ακανόνιστη κινητικότητα. Ο παρατηρούμενος φαινότυπος είναι ενθαρρυντικός αφού μπορεί να είναι ενδεικτικός για την σημαντικότητα του AFF4 στην επιβίωση των εντόμων, Όμως θα μπορούσε να οφείλεται και σε άλλους παράγοντες, όπως, η υψηλή

ποσότητα/συγκέντρωση του χορηγούμενου dsRNA. Για να διευκρινιστεί αυτό όμως περαιτέρω, θα πρέπει να γίνει εφαρμογή μικρότερου επιπέδου σίγησης, δηλαδή σε ποσοστό μικρότερο του 75%, στο οποίο βλέπουμε θνησιμότητα. Μια τέτοια συνθήκη θα οδηγούσε στη πιο ολοκληρωμένη μελέτη της επίδρασης της σίγησης, αφού θα μπορούσαμε να διακρίνουμε αν υπάρχει άλλος φαινότυπος πέρα της θνησιμότητας που θα ήταν πιο πληροφοριακός για τη λειτουργία του γονιδίου και την καταλληλότητά του για χρήση ως δείκτη ποιότητας.

Γενικότερα, η συγκεκριμένη διαφοροποίηση στα Vienna 8 (**Εικόνα 10**) μπορεί επίσης να οφείλεται στη θέση του AFF4 στο γονιδίωμα της *C. capitata*. Το στέλεχος Vienna 8 που χρησιμοποιήθηκε φέρει την αναστροφή D53^{27,35} (**Παράρτημα, Εικόνα 22**), στο άκρο του χρωμοσώματος 5 που φέρει τους δείκτες *wr* και *tsl*, η οποία σταθεροποιηθεί στο στέλεχος ενάντι συμβάντων ανασυνδυασμού, που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε κατάρρευση του στελέχους^{14,35}. Είναι δυνατόν, η μετάθεση να παρεμβάλλεται σε κάποια ρυθμιστική αλληλουχία του γονιδίου και να οδηγεί στη διαφορετική έκφραση του γονιδίου στα δύο φύλλα αφού λόγω της μετάθεσης με το Y τα θηλυκά θα έχουν υψηλότερη έκφραση αφού δεν θα έχουν ελλαττωματική ρυθμιστική περιοχή.

Σε επόμενη φάση, δημιουργήθηκε το προφίλ έκφρασης του γονιδίου για τα δύο στελέχη, wt στέλεχος EglI και GSS Vienna 8, σε διάφορους ιστούς. Διαπιστώθηκε ότι η μέγιστη έκφραση εντοπίζεται στα αρσενικά και συγκεκριμένα στους όρχεις των αρσενικών EglI 3ης μέρας, ενώ στα θηλυκά έντομα η μέγιστη έκφραση παρατηρείται στο κεφάλι των ενηλίκων EglI 1ης μέρας. Αυτή η διαφοροποίηση πιθανώς αντανakλά διαφορετικούς ρόλους του γονιδίου ανά φύλο. Συμπληρωματικά, αν και σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα, έκφραση ανιχνεύθηκε και στο κεφάλι, σε παρόμοια επίπεδα σε όλες τις περιπτώσεις εκτός από τα EglI 3^{ης} μέρας, όπου το γονίδιο δεν εκφραζόταν. Το φαινόμενο είναι σύμφωνο με τη λειτουργία του ορθόλογου γονιδίου *lilli* της *D. melanogaster*, που παίζει κύριο ρόλο στην ανάπτυξη του ματιού⁴⁵. Η πιθανότητα να έχει αντίστοιχο ρόλο στη *Ceratitis capitata* δεν διερευνήθηκε στη παρούσα πτυχιακή και δεν παρατηρήθηκε προβληματική μορφολογία του ματιού. Δεδομένου όμως ότι οι ενέσεις έγιναν σε ενήλικα έντομα, ενώ η ανάπτυξη του ματιού γίνεται κυρίως κατά τη διάρκεια των σταδίων του βομβυκίου⁷², αυτό είναι λογικό ακόμα και αν υπάρχει μια τέτοια συσχέτιση. Δεδομένης λοιπόν και της λειτουργίας του *lilli*, η υψηλή έκφραση στη περιοχή του κεφαλιού θα μπορούσε να οφείλεται σε ρόλο του AFF4 στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, ή και συγκεκριμένα του ματιού. Για περαιτέρω διερεύνηση αυτού, θα μπορούσαν να γίνουν πάλι ενέσεις αλλά σε αναπτυξιακά στάδια του βομβυκίου, και έλεγχο της μορφολογίας του ματιού, αλλά και δοκιμές λειτουργιών όπως η μνήμη και η πτήση, που θα είναι ενδεικτικές για τη λειτουργία του νευρικού συστήματος των εντόμων.

Όσον αφορά τη μελέτη της επίδρασης της σίγησης στο φαινοτύπου, παρόλο που δεν παρατηρήθηκαν έμπιστες διαφορές μεταξύ των εντόμων, αυτό πιθανότατα οφείλεται αρχικά στον πολύ μικρό αριθμό βιολογικών επαναλήψεων που σε ορισμένες περιπτώσεις δεν μας άφησε να συλλέξουμε δεδομένα αφού έντομα πέθαιναν τυχαία. Επίσης, στην περίπτωση της μικροσκοπικής μελέτης, θα πρέπει να τυποποιηθούν σε μεγαλύτερο βαθμό οι πειραματικές διαδικασίες και η προετοιμασία για να μπορέσουμε να ερμηνεύσουμε σωστά την εικόνα τους. Οπότε η παρατήρηση του φαινοτύπου θα πρέπει να επαναληφθεί.

Ένας δεύτερος κύκλος ενέσεων πραγματοποιήθηκε για την περαιτέρω διερεύνηση του φαινοτύπου. Αυτή τη φορά όμως δεν παρατηρήθηκε ο ίδιος φαινότυπος, ενώ τα επίπεδα σίγησης δεν ήταν όσο υψηλά όπως στον πρώτο κύκλο ενέσεων. Αυτό μπορεί αν οφείλεται σε αρκετούς λόγους. Αρχικά, μπορεί η σύγκριση με τον πρώτο κύκλο ενέσεων να μην είναι ιδιαίτερα πληροφοριακή, αφού είχε γίνει μελέτη σε cDNA ολόκληρου του εντόμου και δεν είχαν γίνει dissections συγκεκριμένων ιστών όπως στον δεύτερο κύκλο. Δεύτερον, μπορεί να έγινε κάποιο λάθος στον υπολογισμό της συγκέντρωσης του dsRNA που χρησιμοποιήθηκε στον πρώτο κύκλο ενέσεων, με αποτέλεσμα να χορηγηθεί μεγαλύτερη ποσότητα από όση υπολογίζονταν. Σε κάθε περίπτωση, καλό θα ήταν το πείραμα να επαναληφθεί, με περισσότερες βιολογικές επαναλήψεις αλλά και να γίνει δοκιμή διαφόρων συγκεντρώσεων dsRNA, για να διευκρινιστεί η βέλτιστη που θα βοηθήσει στην μελέτη του ρόλου του AFF4 στον φαινότυπο.

Για την πιο αξιόπιστη εφαρμογή της τεχνικής RNAi στη περίπτωση αυτή, θα πρέπει να διερευνηθεί η ιδανική συγκέντρωση και ποσότητα του χορηγούμενου dsRNA με δοκιμές. Συμπληρωματικά, χρειάζεται να γίνει διερεύνηση της έκφρασής του σε περισσότερα στάδια ανάπτυξης, προκειμένου να διευκρινιστεί το μέγιστο (peak) της έκφρασης του γονιδίου. Λαμβάνοντας υπόψη τη βιβλιογραφία που υποστηρίζει την εμπλοκή της συγκεκριμένης οικογένειας γονιδίων σε αναπτυξιακές λειτουργίες, είναι πιθανό αυτό να ισχύει και για τη *C. capitata*. Αν αυτό ισχύει, το γονίδιο θα εμφάνιζε μέγιστη έκφραση σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, και σίγηση του σε αυτά θα μπορούσε να αποκαλύψει ανωμαλίες, όπως για παράδειγμα στην ανάπτυξη των γεννητικών ιστών. Σύμφωνα με αυτό, θα μπορούσαν να επαναληφθούν τα πειράματα σίγησης με μεγαλύτερη επιτυχία, αλλά επίσης θα ήταν πολύ πληροφοριακό και ως προς το ρόλο του γονιδίου γενικότερα.

Επιπλέον, για μια πιο ολοκληρωμένη ερμηνεία των αποτελεσμάτων της σίγησης καλό θα ήταν να γίνει παράλληλη ανάλυση δεδομένων RNA-seq μετά τη χορήγηση ds18540. Τα δεδομένα αυτά θα γίνονταν με 3 συνθήκες: untreated έντομα και dsGFP έντομα για να κανονικοποιηθούν διαφορές στην γονιδιακή έκφραση λόγω της διαδικασίας των ενέσεων, αλλά και μια συνθήκη με untreated έντομα του GSS

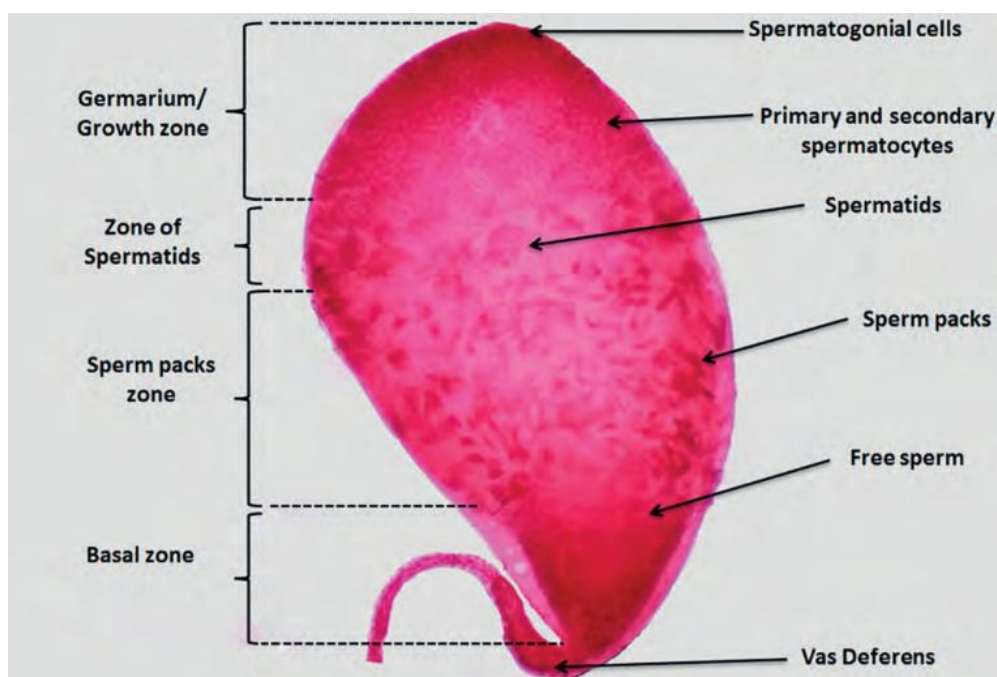
στελέχους Vienna 8 για να συγκριθούν τα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των δυο στελεχών.

Τέλος, για μια πιο ολοκληρωμένη προσέγγιση, θα ήταν χρήσιμη η εισαγωγή ενός δεύτερου αντιγράφου του AFF4 σε Vienna 8 με σκοπό την υπερέκφρασή του και τη σύγκριση των μεταβολών ανάμεσα στο wt EglI και Vienna 8. Η σύγκριση αυτή θα εστιαζόταν σε χαρακτήρες όπως η ταχύτητα ανάπτυξης και ρυθμός αναπαραγωγής αλλά και σε μορφολογικούς χαρακτήρες όπως αυτοί που ερευνήθηκαν στη παρούσα εργασία. Μέσω αυτής της διαδικασίας, θα ήταν δυνατό να διαπιστωθεί εάν η αύξηση της έκφρασης του AFF4 στα Vienna 8 επηρεάζει ή βελτιώνει αυτά τα χαρακτηριστικά.

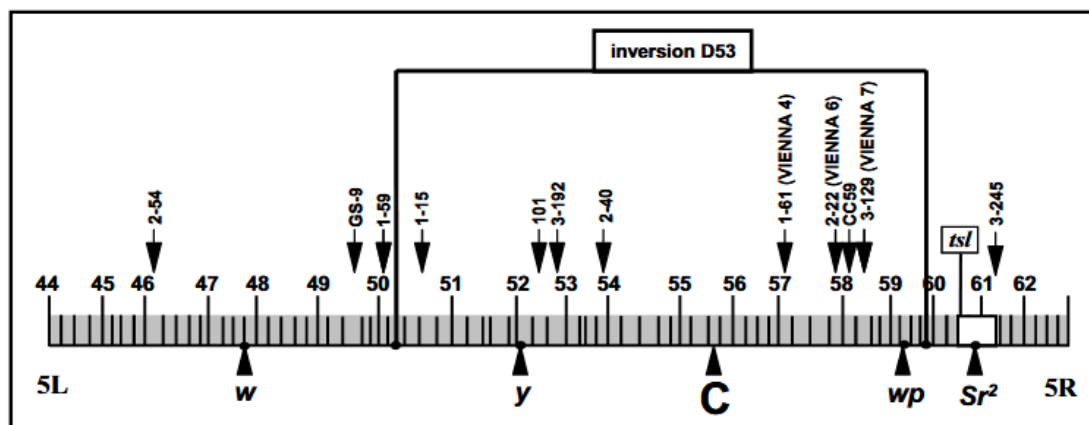
Παράρτημα

Πίνακας 8. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της πτυχιακής

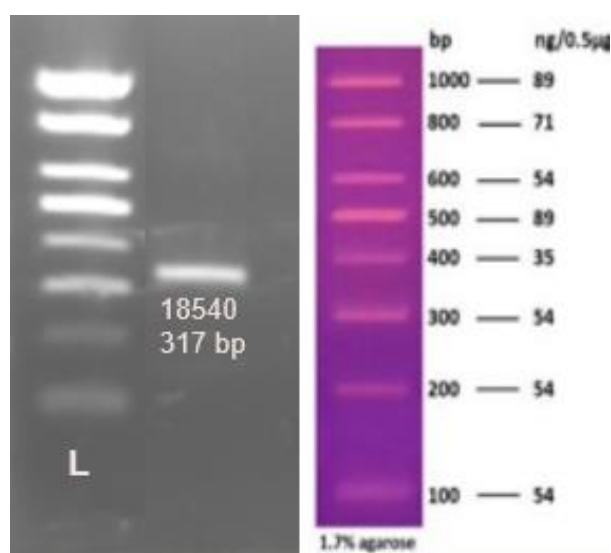
Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία
ds18540_F	TAATACGACTCACTATAGGG ACCACTGACGCTCGTTTATC
ds18540_R	TAATACGACTCACTATAGGGG CGATTCACTTGCACTCAAC
q18540_F	ATTGGCGCTGTGGTATTG
q18540_R	GACGTAAACCTGGTAGCATATC
Cc_RPL19-F	ACATAAAGTACGTGAGGCCAG
Cc_RPL19-R	GCCGCTACCTCATCTTCTTTAG
GFP_T7-F	TAATACGACTCACTATAGGG GAGACCGCCAGTGTGCTGGAA
GFP_T7-R	TAATACGACTCACTATAGGG GAGATATCTGCAGAATTCGCC



(Εικόνα 21. Όρχεις ώριμου wt αρσενικού *C. capitata*, 10 ημερών, με ενδείξεις των κυττάρων των φυσιολογικών αναπτυξιακών σταδίων της σπερματογένεσης. (Jorge C. Guillen Aguilar, FAO/IAEA, 2016)



(**Εικόνα 22.** Σχηματικός χάρτης πολυτενικού αυτοσωμικού χρωμοσώματος 5: παρουσιάζονται οι θέσεις των μεταλλάξεων *white* (*w*), *yellow body* (*y*) και *Sergeant2* (*Sr2*), καθώς και η θέση των επιλέξιμων δεικτών *wpr* και *tsl*. Τα βέλη υποδεικνύουν τα σημεία διακοπής διαφόρων μετατοπίσεων του Υ-αυτοσώματος. Παρουσιάζεται η έκταση της χρωμοσωμικής περιοχής που αναστρέφεται στο *D53*. *C*: κεντρομερές. (Το *VIENNA 8* περιλαμβάνει τη μετατόπιση 101 σε συνδυασμό με την αναστροφή *D53*). (Franz.G, et al 2005)



Εικόνα 23. Προϊόν *rePCR* με μοναδική την επιθυμητή ζώνη του γονιδίου *AFF4* (18540) στα 317bp

Βιβλιογραφία

1. Hendrichs J, Robinson AS, Cayol JP, Enkerlin W. MEDFLY AREAWIDE STERILE INSECT TECHNIQUE PROGRAMMES FOR PREVENTION, SUPPRESSION OR ERADICATION: THE IMPORTANCE OF MATING BEHAVIOR STUDIES. *Fla Entomol.* 2002;85(1):1-13. doi:10.1653/0015-4040(2002)085[0001:MASITP]2.0.CO;2
2. Vreysen MJB, Hendrichs J, Enkerlin WR. THE STERILE INSECT TECHNIQUE AS A COMPONENT OF SUSTAINABLE AREA-WIDE INTEGRATED PEST MANAGEMENT OF SELECTED HORTICULTURAL INSECT PESTS. 14.
3. Suckling DM, Kean JM, Stringer LD, et al. Eradication of tephritid fruit fly pest populations: outcomes and prospects. *Pest Manag Sci.* 2016;72(3):456-465. doi:10.1002/ps.3905
4. Caceres C, Cayol JP, Enkerlin W, Franz G, Hendrichs J, Robinson AS. Comparison of Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) (Tephritidae) bisexual and genetic sexing strains: development, evaluation and economics.
5. Use of the sterile insect technique against key insect pests. December 15, 2017. Accessed January 2, 2025. <https://www.iaea.org/resources/scientific-paper/use-of-the-sterile-insect-technique-against-key-insect-pests>
6. Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS, eds. *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Springer Netherlands; 2005. doi:10.1007/1-4020-4051-2
7. Voudouris CCh, Mavridis K, Kalaitzaki A, et al. Susceptibility of *Ceratitis capitata* to deltamethrin and spinosad in Greece. *J Pest Sci.* 2018;91(2):861-871. doi:10.1007/s10340-017-0913-5
8. Zhang X, Huang Y, Chen WJ, et al. Environmental occurrence, toxicity concerns, and biodegradation of neonicotinoid insecticides. *Environ Res.* 2023;218:114953. doi:10.1016/j.envres.2022.114953
9. Marrs TC. Toxicology of insecticides to mammals. *Pest Manag Sci.* 2012;68(10):1332-1336. doi:10.1002/ps.3362
10. Siddiqui JA, Fan R, Naz H, et al. Insights into insecticide-resistance mechanisms in invasive species: Challenges and control strategies. *Front Physiol.* 2023;13:1112278. doi:10.3389/fphys.2022.1112278
11. Ehler LE, Endicott PC. Effect of malathion-bait sprays on biological control of insect pests of olive, citrus, and walnut. In: *Hilgardia*. Vol 52. ; 1984:1-47. doi:10.3733/hilg.v52n05p047

12. Cancino J, Soto K, Tapia J, et al. Occupational exposure to pesticides and symptoms of depression in agricultural workers. A systematic review. *Environ Res.* 2023;231(Pt 2):116190. doi:10.1016/j.envres.2023.116190
13. Kim KH, Kabir E, Jahan SA. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci Total Environ.* 2017;575:525-535. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.09.009
14. Augustinos AA, Targovska A, Cancio-Martinez E, et al. Ceratitis capitata genetic sexing strains: laboratory evaluation of strains from mass-rearing facilities worldwide. *Entomol Exp Appl.* 2017;164(3):305-317. doi:10.1111/eea.12612
15. Hendrichs J, Ortiz G, Liedo P, et al. Six years of successful medfly program in Mexico and Guatemala. *Fruit Flies Econ Importance Proc CECIOBC Int Symp Athens Greece.* 1983;16-19 November 1982:353-365.
16. Giunti G, Benelli G, Campolo O, et al. Biology, ecology and invasiveness of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*: a review. *Entomol Gen.* 2023;43(6):1221-1239. doi:10.1127/entomologia/2023/2135
17. Papadopoulos NT. Mediterranean Fruit Fly *Ceratitis capitata* (8;Wiedemann(9; (8;Diptera: Tephritidae(9; In: *Encyclopedia of Entomology.* Springer Netherlands; 2005:1368-1370. doi:10.1007/0-306-48380-7_2570
18. Thomas M, Heppner J, Woodruff R, Weems H, Steck G, Fasulo T. Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Insecta: Diptera: Tephritidae)1. *EDIS.* 1969;2004. doi:10.32473/edis-in371-2001
19. Elqdhhy M, Ait Hamza M, Askarne L, et al. Biology, ecology and control of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), with special reference to biological control using entomopathogenic nematode (EPN): a review. *J Plant Dis Prot.* 2024;131(2):365-402. doi:10.1007/s41348-023-00855-0
20. Malacrida AR, Gomulski LM, Bonizzoni M, Bertin S, Gasperi G, Guglielmino CR. Globalization and fruitfly invasion and expansion: the medfly paradigm. *Genetica.* 2007;131(1):1-9. doi:10.1007/s10709-006-9117-2
21. Papadopoulos NT, Katsoyannos BI, Kouloussis NA, Hendrichs J, Carey JR, Heath RR. Early Detection and Population Monitoring of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in a Mixed-Fruit Orchard in Northern Greece. *J Econ Entomol.* 2001;94(4):971-978. doi:10.1603/0022-0493-94.4.971
22. Cappelli A, Petrelli D, Gasperi G, et al. Bacterial Symbionts in *Ceratitis capitata*. *Insects.* 2022;13(5):474. doi:10.3390/insects13050474

23. Andrewartha HG, Birch LC. Some Recent Contributions to the Study of the Distribution and Abundance of Insects. *Annu Rev Entomol.* 1960;5(1):219-242. doi:10.1146/annurev.en.05.010160.001251
24. Rendon P, McInnis DO, Lance D, Stewart J. Comparison of medfly male only and bisexual releases in large scale field trials. In: *Area-Wide Control of Fruit Flies and Other Pests.* ; 1998:517-525.
25. Robinson AS. Genetic Sexing Strains in Medfly, *Ceratitidis Capitata*, Sterile Insect Technique Programmes. *Genetica.* 2002;116(1):5-13. doi:10.1023/A:1020951407069
26. Meza JS, Ul Haq I, Vreysen MJB, Bourtzis K, Kyritsis GA, Cáceres C. Comparison of classical and transgenic genetic sexing strains of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) for application of the sterile insect technique. *PloS One.* 2018;13(12):e0208880. doi:10.1371/journal.pone.0208880
27. Zacharopoulou A, Augustinos AA, Drosopoulou E, et al. A review of more than 30 years of cytogenetic studies of T ephritidae in support of sterile insect technique and global trade. *Entomol Exp Appl.* 2017;164(3):204-225. doi:10.1111/eea.12616
28. Nguyen TNM, Choo A, Baxter SW. Lessons from *Drosophila*: Engineering Genetic Sexing Strains with Temperature-Sensitive Lethality for Sterile Insect Technique Applications. *Insects.* 2021;12(3):243. doi:10.3390/insects12030243
29. Kerremans P, Franz G. Cytogenetic analysis of chromosome 5 from the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. *Chromosoma.* 1994;103(2):142-146. doi:10.1007/BF00352323
30. Franz G. Genetic Sexing Strains in Mediterranean Fruit Fly, an Example for Other Species Amenable to Large-Scale Rearing for the Sterile Insect Technique. In: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS, eds. *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management.* Springer Netherlands; 2005:427-451. doi:10.1007/1-4020-4051-2_16
31. Kerremans P, Franz G. Isolation and cytogenetic analyses of genetic sexing strains for the medfly, *Ceratitidis capitata*. *Theor Appl Genet.* 1995;91(2):255-261. doi:10.1007/BF00220886
32. Franz G, Gencheva E, Kerremans P. Improved stability of genetic sex-separation strains for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. *Genome.* 1994;37(1):72-82. doi:10.1139/g94-009
33. Franz G. Recombination Between Homologous Autosomes in Medfly (*Ceratitidis Capitata*) Males: Type-1 Recombination and the Implications for the Stability

- of Genetic Sexing Strains. *Genetica*. 2002;116(1):73-84. doi:10.1023/A:1020911725724
34. Kouloussis NA, Gerofotis CD, Ioannou CS, Iliadis IV, Papadopoulos NT, Koveos DS. Towards improving sterile insect technique: Exposure to orange oil compounds increases sexual signalling and longevity in *Ceratitis capitata* males of the Vienna 8 GSS. *PLoS ONE*. 2017;12(11):e0188092. doi:10.1371/journal.pone.0188092
 35. Franz G. Genetic Sexing Strains in Mediterranean Fruit Fly, an Example for Other Species Amenable to Large-Scale Rearing for the Sterile Insect Technique. In: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS, eds. *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Springer Netherlands; 2005:427-451. doi:10.1007/1-4020-4051-2_16
 36. Shelly TE, Whittier TS, Kaneshiro KY. Sterile insect release and the natural mating system of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Ann Entomol Soc Am*. 1994;87(4):470-481. doi:10.1093/aesa/87.4.470
 37. Lance DR, McINNIS DO, Rendon P, Jackson CG. Courtship Among Sterile and Wild *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Field Cages in Hawaii and Guatemala. *Ann Entomol Soc Am*. 2000;93(5):1179-1185. doi:10.1603/0013-8746(2000)093[1179:CASAWC]2.0.CO;2
 38. Munhenga G, Brooke BD, Chirwa TF, et al. Evaluating the potential of the sterile insect technique for malaria control: relative fitness and mating compatibility between laboratory colonized and a wild population of *Anopheles arabiensis* from the Kruger National Park, South Africa. *Parasit Vectors*. 2011;4:208. doi:10.1186/1756-3305-4-208
 39. Calla B, Hall B, Hou S, Geib SM. A genomic perspective to assessing quality of mass-reared SIT flies used in Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) eradication in California. *BMC Genomics*. 2014;15:98. doi:10.1186/1471-2164-15-98
 40. Robinson AS. Genetic sexing strains in medfly, *Ceratitis capitata*, sterile insect technique programmes.
 41. Product Quality Control for Sterile Mass-Reared and Released Tephritid Fruit Flies.pdf. Accessed January 26, 2025. <https://www.iaea.org/sites/default/files/qcv7.pdf>
 42. Product Quality Control for Sterile Mass-Reared and Released Tephritid Fruit Flies, Version 7.0. December 21, 2017. Accessed December 11, 2024. <https://www.iaea.org/resources/manual/product-quality-control-for-sterile-mass-reared-and-released-tephritid-fruit-flies-version-70>

43. Wang Q, Huang J, Chen X, Wang J, Fang F. Transcriptomic markers in pediatric septic shock prognosis: an integrative analysis of gene expression profiles. *Braz J Med Biol Res.* 2021;54(3):e10152. doi:10.1590/1414-431X202010152
44. Yang H, Basquin D, Pauli D, Oliver B. *Drosophila melanogaster* positive transcriptional elongation factors regulate metabolic and sex-biased expression in adults. *BMC Genomics.* 2017;18(1):384. doi:10.1186/s12864-017-3755-x
45. Wittwer F, van der Straten A, Keleman K, Dickson BJ, Hafen E. Lilliputian: an AF4/FMR2-related protein that controls cell identity and cell growth. *Dev Camb Engl.* 2001;128(5):791-800. doi:10.1242/dev.128.5.791
46. Lin C, Smith ER, Takahashi H, et al. AFF4, a component of the ELL/P-TEFb elongation complex and a shared subunit of MLL chimeras, can link transcription elongation to leukemia. *Mol Cell.* 2010;37(3):429-437. doi:10.1016/j.molcel.2010.01.026
47. Clough E, Jimenez E, Kim YA, et al. Sex- and Tissue-specific Functions of *Drosophila* Doublesex Transcription Factor Target Genes. *Dev Cell.* 2014;31(6):761-773. doi:10.1016/j.devcel.2014.11.021
48. Urano A, Endoh M, Wada T, et al. Infertility with Defective Spermiogenesis in Mice Lacking AF5q31, the Target of Chromosomal Translocation in Human Infant Leukemia. *Mol Cell Biol.* 2005;25(15):6834-6845. doi:10.1128/MCB.25.15.6834-6845.2005
49. Estable MC, Naghavi MH, Kato H, et al. MCEF, the newest member of the AF4 family of transcription factors involved in leukemia, is a positive transcription elongation factor-b-associated protein. *J Biomed Sci.* 2002;9(3):234-245. doi:10.1007/BF02256070
50. Melko M, Douguet D, Bensaid M, et al. Functional characterization of the AFF (AF4/FMR2) family of RNA-binding proteins: insights into the molecular pathology of FRAXE intellectual disability. *Hum Mol Genet.* 2011;20(10):1873-1885. doi:10.1093/hmg/ddr069
51. Taki T, Kano H, Taniwaki M, Sako M, Yanagisawa M, Hayashi Y. AF5q31, a newly identified AF4-related gene, is fused to MLL in infant acute lymphoblastic leukemia with ins(5;11)(q31;q13q23). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(25):14535-14540. doi:10.1073/pnas.96.25.14535
52. Gu Y, Nakamura T, Alder H, et al. The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to *Drosophila* trithorax, to the AF-4 gene. *Cell.* 1992;71(4):701-708. doi:10.1016/0092-8674(92)90603-a

53. Piché J, Van Vliet PP, Pucéat M, Andelfinger G. The expanding phenotypes of cohesinopathies: one ring to rule them all! *Cell Cycle*. 2019;18(21):2828-2848. doi:10.1080/15384101.2019.1658476
54. Melko M, Douguet D, Bensaid M, et al. Functional characterization of the AFF (AF4/FMR2) family of RNA-binding proteins: insights into the molecular pathology of FRAXE intellectual disability. *Hum Mol Genet*. 2011;20(10):1873-1885. doi:10.1093/hmg/ddr069
55. Luo Z, Lin C, Shilatifard A. The super elongation complex (SEC) family in transcriptional control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(9):543-547. doi:10.1038/nrm3417
56. Long Q, Xiang M, Xiao L, et al. The Biological Significance of AFF4: Promoting Transcription Elongation, Osteogenic Differentiation and Tumor Progression. *Comb Chem High Throughput Screen*. 27(10):1403-1412. doi:10.2174/0113862073241079230920082056
57. Muse GW, Gilchrist DA, Nechaev S, et al. RNA polymerase is poised for activation across the genome. *Nat Genet*. 2007;39(12):1507-1511. doi:10.1038/ng.2007.21
58. Zeitlinger J, Stark A, Kellis M, et al. RNA Polymerase Stalling at Developmental Control Genes in the Drosophila Embryo. *Nat Genet*. 2007;39(12):1512-1516. doi:10.1038/ng.2007.26
59. Levine M. Paused RNA Polymerase II as a Developmental Checkpoint. *Cell*. 2011;145(4):502-511. doi:10.1016/j.cell.2011.04.021
60. Sims RJ, Belotserkovskaya R, Reinberg D. Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev*. 2004;18(20):2437-2468. doi:10.1101/gad.1235904
61. Guenther MG, Levine SS, Boyer LA, Jaenisch R, Young RA. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell*. 2007;130(1):77-88. doi:10.1016/j.cell.2007.05.042
62. Yamaguchi Y, Inukai N, Narita T, Wada T, Handa H. Evidence that negative elongation factor represses transcription elongation through binding to a DRB sensitivity-inducing factor/RNA polymerase II complex and RNA. *Mol Cell Biol*. 2002;22(9):2918-2927. doi:10.1128/MCB.22.9.2918-2927.2002
63. Fujinaga K, Huang F, Peterlin BM. P-TEFb: The master regulator of transcription elongation. *Mol Cell*. Published online December 22, 2022:S1097-2765(22)01163-7. doi:10.1016/j.molcel.2022.12.006
64. Zamore PD. RNA interference: listening to the sound of silence. *Nat Struct Biol*. 2001;8(9):746-750. doi:10.1038/nsb0901-746

65. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-811. doi:10.1038/35888
66. Ortolá B, Daròs JA. RNA Interference in Insects: From a Natural Mechanism of Gene Expression Regulation to a Biotechnological Crop Protection Promise. *Biology*. 2024;13(3):137. doi:10.3390/biology13030137
67. C. Maktura G, J. Paranhos B, Marques-Souza H. RNAi in fruit flies (Diptera: Tephritidae): Successes and challenges. *J Appl Entomol*. 2021;145(8):740-756. doi:10.1111/jen.12905
68. Joga MR, Zotti MJ, Smagghe G, Christiaens O. RNAi Efficiency, Systemic Properties, and Novel Delivery Methods for Pest Insect Control: What We Know So Far. *Front Physiol*. 2016;7. doi:10.3389/fphys.2016.00553
69. What is Real-Time PCR (qPCR)? | Bio-Rad. Accessed January 3, 2025. <https://www.bio-rad.com/en-gr/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU>
70. Artika IM, Dewi YP, Nainggolan IM, Siregar JE, Antonjaya U. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. *Genes*. 2022;13(12):2387. doi:10.3390/genes13122387
71. Izumi K, Nakato R, Zhang Z, et al. Germline Gain-of-Function Mutations in AFF4 Cause a Developmental Syndrome Functionally Linking the Super Elongation Complex and Cohesin. *Nat Genet*. 2015;47(4):338-344. doi:10.1038/ng.3229
72. Conforti E, Torti C, Malacrida AR, Bernocchi G. Tephritidae : histochemical evidence of nitric oxide synthase in the wild type and the white eye mutant strains.
73. Jorge C. Guillen Aguilar¹. Manual to differentiate wild mediterranean fruit flies *Ceratitis capitata* (Wied.) from non-irradiated (fertile) and irradiated (sterile) Vienna temperature sensitive lethal strain flies. December 21, 2017. Accessed February 16, 2025. <https://www.iaea.org/resources/manual/manual-to-differentiate-wild-mediterranean-fruit-flies-ceratitis-capitata-wied-from-non-irradiated-fertile-and-irradiated-sterile-vienna-temperature-sensitive-lethal-strain-flies>