



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ ΙΚΡΙΩΜΑΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ
CONTROL OF MALE SPECIFICITY IN SEQUENCING SCAFFOLDS

ΛΥΤΑ ΑΡΕΤΗ

ΛΑΡΙΣΑ, 2017

Τριμελής Επιτροπή

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

Σαραφίδου Θεολογία: Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών

Τσουμάνη Κωνσταντίνα: Διδάσκουσα Μοριακής Βιολογίας, Π.Δ. 407/80

Ευχαριστίες

Ο χρόνος περνάει απίστευτα γρήγορα όταν επιδίδεσαι σε κάτι που το αγαπάς πραγματικά. Τόσο γρήγορα που θα ευχόμουν μάλιστα να μην τελείωνε ποτέ όλο αυτό το βιοχημικό ταξίδι. Ο δρόμος μου προς την Ιθάκη έφτασε στο τέλος. Αλίμονο όμως αν δεν φτάναμε στον προορισμό μας, η ζωή τότε θα ήταν στάσιμη.

Αρχικά, θα ήθελα να πω ένα τεράστιο ευχαριστώ στον κ. Κωνσταντίνο Μαθιόπουλο που με δέχτηκε μα πάνω από όλα με εμπιστεύτηκε για να γίνω μέλος στο εργαστήριο του. Η διαρκής αλληλεπίδραση που είχε μαζί μου ήταν καθοριστική τόσο για την πορεία της πτυχιακής μου όσο και για να καταλάβω τι σημαίνει να είσαι πραγματικός επιστήμονας.

Ένα ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Μαρία-Ελένη Γρηγορίου η οποία αποτέλεσε τον κορμό πάνω στον οποίο βασίστηκα για να πραγματοποιήσω αυτή τη διπλωματική εργασία. Η καθοδήγηση και οι συμβουλές της σε κάθε βήμα ήταν πολύτιμες.

Δεν θα μπορούσα να μην αναφερθώ στην Κωνσταντίνα Τσουμάνη η οποία ήταν πάντα διαθέσιμη και πρόθυμη να λύσει τις απορίες μου αλλά και να με συμβουλέψει είτε για τους χειρισμούς των πειραμάτων μου είτε για το συγγραφικό μέρος της πτυχιακής μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταπτυχιακό φοιτητή Ελευθέριο Ζορμπά με τον οποίο είχα την τύχη να ξεκινήσω αυτό το project, για όλα εκείνα τα πρωινά που με ανέχτηκε (και τον ανέχτηκα), για τα αστεία που ειπώθηκαν καθώς και για τις συνήθειες που μου μετέδωσε.

Ένα ευχαριστώ στις συμφοιτήτριες μου που βρίσκονταν στο εργαστήριο και έκαναν το χρόνο να περνάει λίγο πιο γρήγορα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου γιατί χωρίς αυτούς δεν θα είχα καταφέρει τίποτα καθώς και για την παρότρυνση τους να ζήσω την φοιτητική μου ζωή στην πόλη της Λάρισας τα τελευταία 4 χρόνια, τους φίλους μου για την κατανόηση και την στήριξη που έδειξαν αυτούς τους μήνες.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Παρά τη λειτουργία του στον προσδιορισμό του φύλου και το ρόλο του στην εξέλιξη του γονιδιώματος, το Y χρωμόσωμα παραμένει ελάχιστα μελετημένο στα περισσότερα είδη. Το Y χρωμόσωμα είναι γονιδιακά φτωχό, πλούσιο σε επαναλήψεις και σε μεγάλο βαθμό ετεροχρωματινικό και επομένως αποτελεί ένα δύσκολο στόχο για τη γενετική μηχανική. Το Y χρωμόσωμα του δάκου της ελιάς *Bactrocera oleae* φαίνεται να εμπλέκεται στον προσδιορισμό του φύλου, αν και πολύ λίγα είναι γνωστά για τη δομή και τη λειτουργία του. Τη βάση για τη διερεύνηση του Y χρωμοσώματος θα μπορούσε να αποτελέσει η μελέτη της αρρενοειδικότητας κριωμάτων αλληλούχησης. Γενικότερα για έντομα οικονομικής σημασίας που λειτουργούν παρασιτικά σε προϊόντα των αγροτικών καλλιεργειών, όπως ο δάκος της ελιάς, η αλληλούχηση του Y χρωμοσώματος είναι υψίστης σημασίας και για τον προσδιορισμό της φύσης του παράγοντα αρρενοποίησης, η ταυτοποίηση του οποίου θα ανοίξει τον δρόμο για την ανάπτυξη νέων μεθόδων καταπολέμησης του εντόμου.

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγινε έλεγχος αρρενοειδικών κριωμάτων αλληλούχησης, με σκοπό την εύρεση αλληλουχιών που εντοπίζονται μόνο στα αρσενικά άτομα με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Στην συνέχεια έγινε *in silico* ανάλυση σε ορισμένες από αυτές τις αλληλουχίες για τον εντοπισμό των ανοιχτών αναγνωστικών πλαισίων καθώς και της ομολογίας τους με τις υπάρχουσες βάσεις δεδομένων.

ABSTRACT

Despite its function in sex determination and its role in driving genome evolution, the Y chromosome remains poorly understood in most species. Y chromosomes are gene-poor, repeat-rich and largely heterochromatic and therefore represent a difficult target for genetic engineering. The Y chromosome of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* appears to be involved in sex determination, although very little is known about both its structure and function. Studying the male specificity in sequencing scaffolds could be the key in order to explore Y chromosome. Generally, for insects of economic importance such as agricultural parasites like the olive fruit fly, the sequencing of Y chromosome is of major importance for determining the nature of masculinizing factor, its identification will pave the way for the development of new control techniques.

The subject of this thesis, was to control male specificity in sequencing scaffolds, in order to find sequences located only in male individuals with the use of the technique polymerase chain reaction (PCR). Then an *in silico* analysis was performed in some of these sequences to locate the open reading frames and their homology to existing databases.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	5
1.1 Προέλευση και λόγος ύπαρξης των φυλετικών χρωμοσωμάτων	6
1.2 Φυλετικά χρωμοσώματα στα Diptera	8
1.3 Οργάνωση και δομή φυλετικών χρωμοσωμάτων (<i>D. melanogaster</i> και <i>A. gambiae</i>).....	9
1.4 Γονίδια και διάφορα στοιχεία του Y	13
1.5 Παράγοντες αρρενοποίησης.....	16
1.6 Προσπάθειες χαρακτηρισμού φυλετικών χρωμοσωμάτων στη <i>C. capitata</i>	18
1.7 Προσπάθειες εντοπισμού Y-ειδικών αλληλουχιών, Y γονιδίων σε <i>C. Capitata</i> και <i>B. Oleae</i>	19
1.8 Πρακτικές εφαρμογές της απομόνωσης Y-ειδικών αλληλουχιών και γονιδίων στο δάκο της ελιάς.....	21
2. Σκοπός	22
3. Μέθοδοι - Υλικά.....	23
3.1 Βιολογικό υλικό: εργαστηριακός πληθυσμός <i>Bactrocera oleae</i>	24
3.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ενήλικα άτομα δάκου	24
3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός νουκλεϊκών οξέων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης	25
3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός DNA με το φθορισμόμετρο Qubit.....	27
3.5 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	28
3.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) με την χρήση OneTaq® DNA Polymerase	30
3.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)	30
3.8 Βιοπληροφορική ανάλυση των αρρενοειδικών εκκινήτων	32
3.8.1 Blast (Basic Local Alignment Search Tool)	32
3.8.2 OMIGA.....	32
4. Αποτελέσματα	33
4.1 Ποσοτικοποίηση DNA.....	33
4.2 Ταυτοποίηση της αρρενοειδικότητας με την τεχνική της PCR	35
4.3 Ανάλυση αριθμού αντιγράφων με την μέθοδο της RT-PCR.....	38
4.4 Βιοπληροφορική ανάλυση των γονιδίων	39
5. Συζήτηση	43
6. Παράρτημα	46
7. Βιβλιογραφία	47

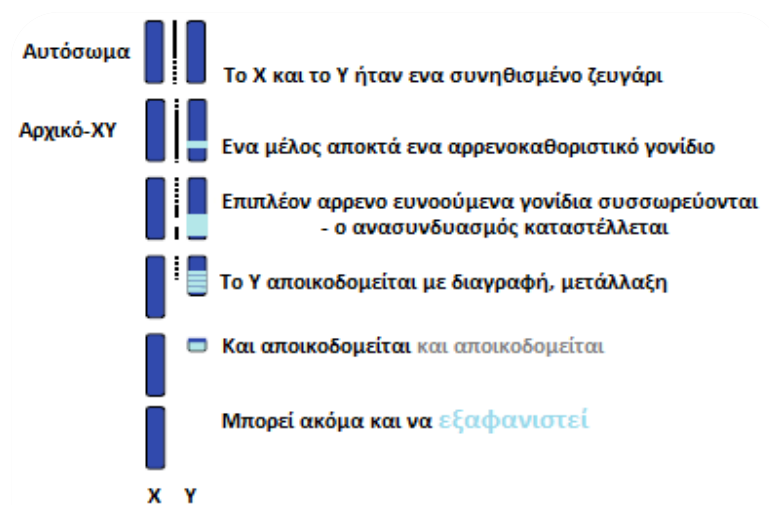
1. Εισαγωγή

1.1 Προέλευση και λόγος ύπαρξης των φυλετικών χρωμοσωμάτων

Η φυλετική διαφοροποίηση είναι ένα θεμελιώδες χαρακτηριστικό της ζωής, που επηρεάζει σχεδόν κάθε πτυχή ενός οργανισμού. Τα φύλα διαφέρουν στη φυσιολογία και στη συμπεριφορά τους και συχνά, αλλά όχι πάντα, και στη μορφολογία και το χρώμα. Το μυστήριο των δύο φύλων, πώς προκύπτουν και πώς παράγεται ο φυλετικός διμορφισμός, αποτελεί για τους επιστήμονες πόλος έλξης τα τελευταία χρόνια. Τα φυλετικά χρωμοσώματα εμπλέκονται σε διάφορες βασικές βιολογικές διεργασίες, όπως ο καθορισμός του φύλου, η φυλετική επιλογή και η ειδογένεση (Charlesworth et al., 2005).

Οι μηχανισμοί που καθορίζουν αν ένα ζώο θα αναπτυχθεί ως αρσενικό ή θηλυκό ποικίλουν. Ορισμένα είδη βασίζονται σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα για τον προσδιορισμό του φύλου όπως συμβαίνει σε μερικά ψάρια και ερπετά ενώ άλλα εξαρτώνται από εξειδικευμένα χρωμοσώματα (γενετικός προσδιορισμός φύλου) όπως συμβαίνει στα περισσότερα θηλαστικά, πτηνά, σκαθάρια και πεταλούδες (Bull 1983, Bachtrog et al., 2014).

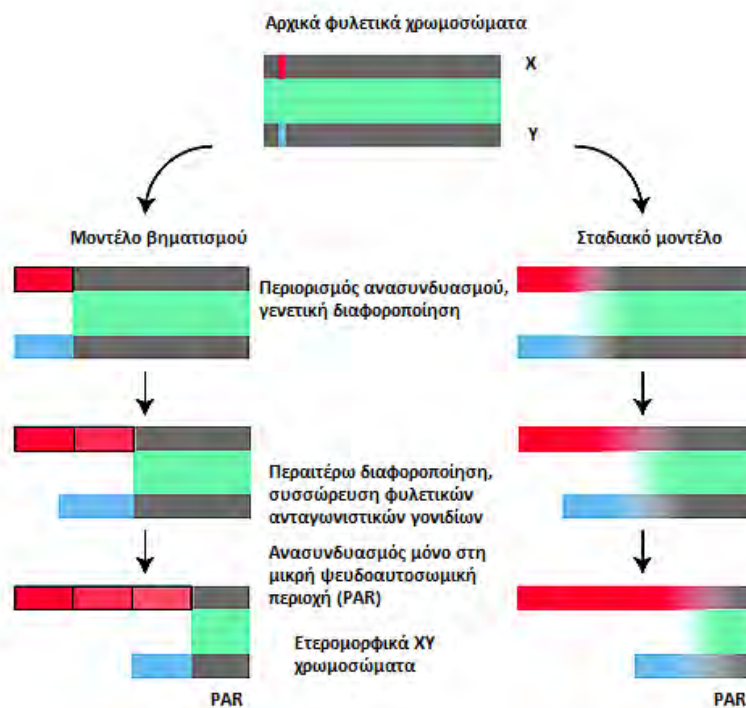
Τα φυλετικά χρωμοσώματα είναι χρωμοσώματα που εμπλέκονται στον προσδιορισμό του φύλου και χαρακτηρίζονται από μειωμένο ανασυνδυασμό, εξειδικευμένο γονιδιακό περιεχόμενο και εξισορροπημένη δοσολογία. Τα πιο γνωστά συστήματα καθορισμού του φύλου είναι το XY και το ZW. Αυτά τα συστήματα εξελίχθηκαν από διαφορετικά ζεύγη αυτοσωμάτων και παρουσιάζουν ένα εξελικτικό παζλ (U'beda et al., 2014). Θεωρητικές μελέτες υποθέτουν την ύπαρξη μιας διαδικασίας κατά την οποία τα ετερομορφικά φυλετικά χρωμοσώματα εξελίχθηκαν από ένα ζευγάρι συνηθισμένων αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων αποκτώντας φυλοκαθοριστικό ρόλο (Ohno 1969). Η μετάβαση σε ένα φυλετικό χρωμόσωμα πιστεύεται ότι προκλήθηκε σε ένα πρώτο στάδιο από μια νέα φυλοκαθοριστική μετάλλαξη και σε ένα δεύτερο στάδιο από μια φυλετική ανταγωνιστική μετάλλαξη που συσσωρεύθηκαν σε ένα αυτόσωμα, επωφελούμενες την ανισορροπία σύνδεσης και καταλαμβάνοντας την κύρια φυλοκαθοριστική λειτουργία από το αρχικό φυλετικό χρωμόσωμα (G.S. van Doorn et al., 2007). Ο όρος αρχικό φυλετικό χρωμόσωμα αναφέρεται σε ένα αυτοσωμικό χρωμόσωμα το οποίο φέρει ένα φυλοκαθοριστικό αλληλόμορφο και μπορεί ή δεν μπορεί να εμφανίζει όλα τα χαρακτηριστικά ενός φυλετικού χρωμοσώματος.



Εικόνα 1: Εξέλιξη των X και Y χρωμοσωμάτων από ένα αρχικό αυτόσωμα. Το χρωμόσωμα X έχει παραμείνει περισσότερο ή λιγότερο άθικτο, ενώ το Y έχει εκφυλιστεί προοδευτικά.

Ο ανασυνδυασμός μεταξύ των νεοσύστατων αρχικών φυλετικών χρωμοσωμάτων πρώτα αρχίζει να καταστέλλεται σε μια μικρή περιοχή που περιβάλλει τα φυλοκαθοριστικά γονίδια και στη συνέχεια εκτείνεται κατά μήκος των χρωμοσωμάτων, εξαιρώντας όμως τις μικρές ψευδοαυτοσωμικές περιοχές που επιτρέπουν στα X και Y (ή Z και W) χρωμοσώματα να αποκλίνουν και συνεπώς να αρχίσουν να εξελίσσονται ανεξάρτητα. Η καταστολή του ανασυνδυασμού επιτρέπει τη γενετική διαφοροποίηση των φυλετικών χρωμοσωμάτων, καθώς και τη συσσώρευση επιβλαβών μεταλλάξεων, επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών και μεταθετών στοιχείων στο φυλετικό χρωμόσωμα που είναι παρόν μόνο στο ετερογαμετικό φύλο (Y στο XY ή W στο σύστημα ZW). Τελικά, το χρωμόσωμα Y ή W αρχίζει να εκφυλίζεται, καταλήγοντας μορφολογικά σε ένα διακριτό φυλετικό χρωμόσωμα (Rice 1996). Συνεπώς, η καταστολή του ανασυνδυασμού είναι ένα κρίσιμο βήμα στην εξέλιξη της γενετικής και της δομής των φυλετικών χρωμοσωμάτων.

Έχουν προταθεί δύο βασικές υποθέσεις για να εξηγηθεί η διαδικασία καταστολής του ανασυνδυασμού: (1) σταδιακή μείωση των διασταυρώσεων που καθοδηγούνται από γενετικούς τροποποιητές των ρυθμών ανασυνδυασμού και (2) ένα μοντέλο βηματισμού που βασίζεται σε χρωμοσωμικές αναδιατάξεις, όπως αναστροφές, μετατοπίσεις και συντήξεις (Fisher 1931, Charlesworth et al., 2005). Σύμφωνα με το πρώτο μοντέλο, η γενετική διαφοροποίηση ακολουθεί τον περιορισμό του ανασυνδυασμού χωρίς αξιοσημείωτες χρωμοσωμικές αναδιατάξεις ενώ το μοντέλο του βηματισμού χαρακτηρίζεται από εξελικτικά στρώματα τα οποία ποικίλλουν στα επίπεδα γενετικής διαφοροποίησης. Και στις δύο περιπτώσεις πάντως, η διαφοροποίηση καταλήγει σε ένα ετερομορφικό ζεύγος φυλετικών χρωμοσωμάτων και στον εκφυλισμό του φυλοειδικού χρωμοσώματος. Στα τελευταία εξελικτικά στάδια των φυλετικών χρωμοσωμάτων, ο ανασυνδυασμός διατηρείται μόνο στη μικρή ψευδοαυτοσωμική περιοχή (PAR).



Εικόνα 2: Μοντέλα καταστολής του ανασυνδυασμού.

1.2 Φυλετικά χρωμοσώματα στα Diptera

Τα φυλετικά χρωμοσώματα των φτερωτών εντόμων εμφανίζουν μεταβλητότητα ακόμα και ανάμεσα σε μεμονωμένες οικογένειες (Sanchez 2008). Για παράδειγμα, στα δίπτερα υπάρχουν είδη με καρυότυπους XX/XY, XX/XO, ZZ/ZW, πολλαπλά X και ομομορφικά φυλετικά χρωμοσώματα (Marin and Baker 1998). Τα ομομορφικά φυλετικά χρωμοσώματα (X ή Z) πολλών ειδών έχει βρεθεί ότι έχουν διαφορετική εξέλιξη και γονιδιακή σύσταση σε σύγκριση με τα αυτοσωμικά. Όσον αφορά τα X χρωμοσώματα μελέτες αποκάλυψαν την ύπαρξη μοναδικών πρότυπων εξέλιξης όπως: υπερβολική γονιδιακή κινητικότητα (Betran et al., 2002), αυξημένη βελτιστοποίηση κωδικονίων (Singh et al., 2005), και μειωμένο ποσοστό αρρενοειδικών γονιδίων στο X (Parisi et al., 2003, Sturgill et al., 2007).

Τα δίπτερα με βάση τη φυσιολογία και την παρουσία των φυλετικών χρωμοσωμάτων τους χωρίζονται σε δυο κατηγορίες αυτή των παραφυλετικών (Nematocera) και αυτή των μονοφυλετικών δίπτερων (Brachycera). Ύστερα, από εκτεταμένη παρατήρηση των κυτταρολογικών στοιχείων των Nematocera έγινε ο διαχωρισμός τους σε τέσσερις κύριες ομάδες (White 1949).

- Η πρώτη ομάδα των Tipuloidea χαρακτηρίζεται από την παρουσία επιχιασμού και στα δύο φύλα με διακριτά τα φυλετικά χρωμοσώματα.
- Στη δεύτερη ομάδα, η οποία περιλαμβάνει τα κουνούπια, τις μαύρες μύγες και τις μύγες της άμμου τα φυλετικά χρωμοσώματα δεν είναι διακριτά, ενώ ο επιχιασμός έχει διατηρηθεί μόνο στα αρσενικά άτομα.
- Η τρίτη ομάδα, η οποία περιλαμβάνει τα Scatopsidae, χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ετερομορφικών φυλετικών χρωμοσωμάτων αλλά απουσιάζει ο επιχιασμός στα αρσενικά.
- Η τέταρτη ομάδα των Nematocera, η οποία περιέχει σκνίπες, χαρακτηρίζεται από πλήρη απώλεια του Y χρωμοσώματος και το φύλο καθορίζεται από την σταδιακή εξάλειψη του X χρωμοσώματος (δηλαδή όλα τα ζυγωτά έχουν τον ίδιο αριθμό X χρωμοσωμάτων, παράλληλα όμως τα έμβρυα που εξελίσσονται σε αρσενικά εξαλείφουν το ένα X για να γίνουν XO).

Οι περισσότερες οικογένειες στα δίπτερα, συμπεριλαμβανομένων των Drosophilidae, εμπίπτουν στην κατηγορία των Brachycera που στερούνται επιχιασμό στα αρσενικά, και τα περισσότερα είδη έχουν ετερομορφικά XY φυλετικά χρωμοσώματα. Το πιο καλά μελετημένο μοντέλο είναι αυτό της μύγας των φρούτων, *Drosophila melanogaster*, που έχει XY φυλετικά χρωμοσώματα και ο καρυότυπος της περιλαμβάνει τέσσερα χρωμοσωμικά ζεύγη (τρία μεγάλα και ένα μικρό σε σχήμα κουκίδας). Κυτταρογενετικές μελέτες υποδεικνύουν ότι αυτή η χρωμοσωμική σύσταση είναι αρκετά συντηρημένη αντιπροσωπεύοντας τον προγονικό καρυότυπο στα δίπτερα (White 1949). Σύμφωνα με τα δεδομένα ολόκληρου του γονιδιώματος, μπορούν να αποσαφηνιστούν οι σχέσεις των φυλετικών χρωμοσωμάτων εντός των δίπτερων. Για παράδειγμα η παρουσία μεγάλου αριθμού κοινών ορθολόγων στα X χρωμοσώματα της *Drosophila melanogaster* και του κουνουπιού *Anopheles gambiae* υποδηλώνει ότι προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο (Zdobnov et al., 2002) αλλά όχι κατ' ανάγκη από έναν που ήταν ένα διαφοροποιημένο X

χρωμόσωμα στα προγονικά είδη. Η φυλογενετική κατανομή των φυλετικών συστημάτων (Marin and Baker 1998) και τα μοντέλα εξέλιξης του X χρωμοσώματος (Toups and Hahn 2010) υποδηλώνουν ότι τόσο ο κοινός πρόγονος όλων των δίπτερων όσο και ο πιο πρόσφατος κοινός πρόγονος των κουνουπιών είχαν ομομορφικά φυλετικά χρωμοσώματα. Αυτό σημαίνει ότι η εξέλιξη των διαφοροποιημένων φυλετικών χρωμοσωμάτων έχει συμβεί από το ίδιο ζευγάρι αυτοσωμάτων τόσο στη *D. melanogaster* όσο και στο *An. gambiae* (παράλληλη εξέλιξη). Αν και τα φυλογενετικά στοιχεία καταδεικνύουν ελλιπής ετερομορφικά ή ομομορφικά φυλετικά χρωμοσώματα στον πρόγονο των φτερωτών εντόμων, τίποτα άλλο δεν είναι γνωστό στα δίπτερα συγκριτικά με τις σχέσεις των φυλετικών χρωμοσωμάτων. Μια υπόθεση είναι ότι υπήρχαν παράγοντες που παρότρυναν ένα ή περισσότερα προγονικά αυτοσώματα να μετασχηματιστούν σε φυλετικά χρωμοσώματα, πιθανόν λόγω της παρουσίας συντηρημένων γονιδίων που καθορίζουν το φύλο (Graves and Peichel 2010).

1.3 Οργάνωση και δομή φυλετικών χρωμοσωμάτων (*D. melanogaster* και *A. gambiae*)

Τα χρωμοσώματα της *D. melanogaster* περιγράφηκαν για πρώτη φορά από τον Stevens (1908), ο οποίος βρήκε τέσσερα ζεύγη χρωμοσωμάτων στο θηλυκό, συμπεριλαμβανομένου και ενός ζεύγους X χρωμοσωμάτων. Λίγα χρόνια αργότερα ταυτοποιήθηκε και η σύσταση στο αρσενικό που είχε ένα άνισο ζεύγος φυλετικών χρωμοσωμάτων, αποτελούμενο από ένα ραβδοειδές X χρωμόσωμα και ένα Y χρωμόσωμα σε σχήμα V (Bridges 1914).



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση του καρυότυπου αρσενικών & θηλυκών ατόμων *D. melanogaster*.

Ορισμένα είδη *Drosophila* ωστόσο μπορεί να έχουν διαφορετικούς τύπους φυλετικών χρωμοσωμάτων όπως συμβαίνει στη *D. miranda* που έχει πολλαπλά φυλετικά χρωμοσώματα του τύπου X_1X_2Y (Dobzhansky 1935). Η χρωμοσωμική ανάλυση από ιστούς προνυμφών της *Drosophila* έδειξε την ύπαρξη πολυταινικών χρωμοσωμάτων με καθαρό πρότυπο ζώνωσης. Ο μεγαλύτερος βαθμός πολυταινισμού παρατηρείται στα κύτταρα των σιελογόνων αδένων των προνυμφών. Από την ανάλυση των πολυταινικών πυρήνων παρατηρήθηκε ότι μόνο τα αυτοσωμικά ζεύγη χρωμοσωμάτων ήταν παρών και αυτό γιατί καμία διαφορά δεν βρέθηκε μεταξύ των χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων από θηλυκά

και αρσενικά άτομα του εντόμου. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την απουσία πολυταινισμού τόσο του Χ όσο και του Υ χρωμοσώματος (Beckendorf and Kafatos 1976).

❖ Οργάνωση και χαρακτηριστικά του Υ χρωμοσώματος

Το Υ χρωμόσωμα της *Drosophila melanogaster* αποτελεί ένα εξαιρετικό πειραματικό μοντέλο για μελέτες της δομής και της λειτουργίας της ετεροχρωματίνης. Ορισμένα κυτταρολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά του φαίνεται να είναι κοινά με το ετεροχρωματινικό υλικό σχεδόν όλων των ανώτερων ευκαρυωτών. Στην *Drosophila* το Υ χρωμόσωμα είναι το τμήμα του γονιδιώματος της που έχει προστατευθεί από διασταυρώσεις για μεγάλη χρονική διάρκεια. Αυτό το γεγονός το εκθέτει στη μακροπρόθεσμη επιρροή των εξελικτικών δυνάμεων που οδηγούν στη συσσώρευση μεταβλητών στοιχείων και επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών σε μη ανασυνδυασμένες γονιδιωματικές περιοχές (Adams et al., 2000). Αντιπροσωπεύει περίπου το 12% του γονιδιώματος της αρσενικής μύγας (Pimpinelli et al., 1978), είναι υπομετακεντρικό, με το μακρύ βραχίονα (Y^L) να είναι περίπου 1,5 με 2 φορές το μήκος του μικρού βραχίονα (Y^S) (Cooper 1959). Η παρουσία και των δύο βραχιόνων είναι απαραίτητη για την αρσενική γονιμότητα, το κεντρομερές όμως δεν φαίνεται να συμμετέχει ενεργά. Είναι απολύτως ετεροχρωματινικό εμφανίζοντας ετεροπύκνωση κατά την προμετάφαση και στενή χρωματιδική απόθεση κατά τη μετάφαση (Heitz 1933). Παρά το μεγάλο του μέγεθος, περιέχει ελάχιστες γενετικές πληροφορίες. Περίπου το 70% του μήκους του αποτελείται από τέσσερα υψηλά επαναλαμβανόμενα δορυφορικά DNA (Peacock et al., 1977). Έχει προταθεί ότι αυτά τα δορυφορικά DNAs είναι οργανωμένα σε ετεροχρωματινικά μπλοκ που περιέχουν μακριές και ομοιογενείς συστοιχίες βραχέων ακολουθιών, που επαναλαμβάνονται. Όταν τα πρώιμα προφασικά κύτταρα χρωματίστηκαν με τη χρωστική Hoechst 33258 και παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού, το Υ χρωμόσωμα φάνηκε να αποτελείται από τμήματα χρωματίνης που άλλοτε φθορίζουν έντονα και άλλοτε ακανόνιστα ενώ συνήθως διαχωρίζονται από κενά που δεν φθορίζουν. Μελέτες υποδεικνύουν ότι τα γονίδια γονιμότητας και η πλειονότητα των σημείων διακοπής που προκαλούνται από αναδιάταξη εμπίπτουν σε κενά που δεν φθορίζουν. Το Υ φέρει μόνο δεκατρία γνωστά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες για τις ειδικές διαδικασίες της σπερματογένεσης και άλλες με λειτουργίες ακόμη άγνωστες (Carvalho et al 2001).

Ύστερα από γενετική ανάλυση του Υ αποκαλύφθηκε ότι φέρει τέσσερα λειτουργικά είδη.

☒ Πρώτον, περιέχει τον τόπο bobbed (bb) στο Y^S ο οποίος είναι αλληλικός με τον bb που βρίσκεται εντός της ετεροχρωματίνης του Χ. Αυτοί οι τόποι, στους οποίους είναι γνωστά τόσο βιώσιμα όσο και θανατηφόρα αλληλόμορφα, είναι τα επαναλαμβανόμενα δομικά γονίδια για τα μόρια του 18S και 28S ριβοσωμικού RNA (Ritossa et al., 1966).

☒ Το δεύτερο είδος γενετικών λειτουργιών που σχετίζονται με το Υ είναι οι παράγοντες γονιμότητας. Οι τόποι αυτοί εντοπίζονται και στους δύο βραχίονες του Υ και είναι απαραίτητοι για την αρσενική γονιμότητα. Υπάρχουν εκτεταμένες ενδείξεις ότι οι τόποι αυτοί λειτουργούν στα πρωταρχικά σπερματοκύτταρα και είναι απαραίτητοι για τη διαφοροποίηση των σπερματίδων. Με τη χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου δείχθηκε ότι διαγραφές διαφορετικών παραγόντων γονιμότητας παράγουν συγκεκριμένες βλάβες στην πρόωρη σπερματογένεση που τελικά οδηγούν σε πλήρη αποβολή της σπερματογένεσης (Hardy et al., 1981). Σε αντίθεση με τη χαμηλή πυκνότητα των τόπων αυτών, το Υ είναι πολύ ευαίσθητο στην επαγωγή μεταλλάξεων που προκαλούν στειρότητα στα αρσενικά. Περίπου το ένα τρίτο όλων των μετατοπίσεων που εμπλέκονται στο Υ

χρωμόσωμα είναι γόνιμες για τα αρσενικά εάν φέρουν ένα επιπλέον Y, αν δεν φέρουν όμως είναι στείρες. Αυτή η στειρότητα οφείλεται σε απώλεια λειτουργίας συγκεκριμένων γονιδίων που σχετίζονται με την ανδρική γονιμότητα στο Y χρωμόσωμα (Nicoletti and Lindsle 1960).

☒ Η τρίτη λειτουργία που ασκείται από το Y είναι η μειωτική σύζευξη η οποία αποδίδεται σε θέσεις ζευγαρώματος (Cooper 1964). Αυτές είναι διακριτές περιοχές εντοπισμένες στην ετεροχρωματίνη και των δυο χρωμοσωμάτων X και Y. Απαιτούνται τόσο για το κανονικό ζευγάρι όσο και για τον προσανατολισμό των φυλετικών χρωμοσωμάτων στα σπερματοκύτταρα και συνεπώς για το σωστό μειωτικό τους διαχωρισμό.

☒ Η τελευταία λειτουργία του έχει ταυτοποιηθεί μέσω κυτταρολογικής ανάλυσης των μειωτικών κυττάρων στα XO αρσενικά. Αυτά τα αρσενικά που στερούνται δηλαδή το Y είναι βιώσιμα, αλλά απολύτως στείρα. Τα πρωταρχικά σπερματοκύτταρα αυτών των αρσενικών εμφανίζουν κρυστάλλους πρωτεϊνικής φύσης (Meyer et al., 1961) σε σχήμα βελόνας καθώς και ανώμαλη κατανομή των οργανιδίων και των χρωμοσωμάτων. Αν και δεν είναι γνωστό αν αυτές οι βλάβες είναι αποτέλεσμα πλειοτροπικών παραγόντων λόγω ανεπάρκειας μιας ενιαίας γενετικής λειτουργίας, είναι σαφές ότι το Y χρωμόσωμα φέρει έναν ή περισσότερους τόπους που είναι απαραίτητοι για την κανονική μείωση στα αρσενικά.

❖ Οργάνωση και χαρακτηριστικά του X χρωμοσώματος

Από την άλλη μεριά το X χρωμόσωμα της *Drosophila* που είναι επίσης γνωστό ως χρωμόσωμα 1, εντοπίζεται στα αρσενικά σε ένα αντίγραφο ενώ στα θηλυκά σε δυο. Το μήκος του έχει υπολογιστεί σε 66 map units και αποτελεί περίπου το 20% του πυρηνικού γονιδιώματος. Περίπου 2300 γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες (Adams et al., 2000) και το ένα τρίτο αυτών των γονιδίων προβλέπεται να μεταλλαχθούν σε έναν φαινότυπο που χαρακτηρίζεται από θνησιμότητα, στειρότητα ή μη φυσιολογική συμπεριφορά (Peter et al., 2002). Η ευχρωματίνη επεκτείνεται σε 22Mb, αποτελώντας περίπου το 50% του μιτωτικού μήκους του X και περιέχοντας το 99% των γονιδιακών τόπων. Στις μιτωτικές μορφές του, το X έχει ραβδοειδές σχήμα με ένα ακριανό κεντρομερές και ένα μικροσκοπικό δεύτερο βραχίονα που ορίζεται ως δεξιός βραχίονας (X^R). Ο αριστερός βραχίονας (X^L) χωρίζεται σε μια ισοπυκνωτική ευχρωματινική περιοχή (Xe) στην οποία οι χρωματίδες συνήθως διαχωρίζονται και σε μια ετεροχρωματινική περιοχή (Xh) στην οποία οι χρωματίδες δεν διαχωρίζονται. Η ετεροχρωματινική περιοχή περιλαμβάνει το ένα τρίτο έως το μισό του περιεχομένου του DNA στο X χρωμόσωμα. Το σημείο της ισοπυκνωτικής-ετεροχρωματινικής ένωσης (IH) είναι εντυπωσιακό κατά την πρόφαση και μπορεί να αναγνωριστεί στην όψιμη πρόφαση όπου συμπυκνώνεται πλήρως το X. Ο κινητοχώρος (K) του X εντοπίζεται προς το τέλος, κόβοντας το δεξί βραχίονα. Περίπου στη μισή απόσταση μεταξύ του κινητοχώρου και της IH, υπάρχει μια στένωση που συχνά εμφανίζεται ύστερα από χρώση ως ένα διαυγές χάσμα στο χρωμόσωμα (Kaufmann 1933). Αυτή η στένωση χαρακτηρίζεται ως οργανωτής πυρήνας, το πιο εντυπωσιακό ορόσημο στο X χρωμόσωμα. Μεταξύ του κινητοχώρου και του οργανωτή πυρήνα βρίσκεται η πιο κοντινή ετεροχρωματινική περιοχή ενώ η πιο απομακρυσμένη μεταξύ του οργανωτή πυρήνα και του σημείου της IH. Αυτά με τη σειρά τους διαχωρίζονται από μία δευτερεύουσα στένωση δημιουργώντας τέσσερα μεγάλα ετεροχρωματινικά τμήματα που χαρακτηρίζονται από δεξιά προς τα αριστερά ως hA, hB, hC, hD.

Σε αντίθεση με την τοποθεσία του τόπου *bobbed* στο Y, στο X εντοπίζεται κοντά στον οργανωτή πυρήνα και μάλιστα πιθανόν κοντά στο μέσο του hB. Όσον αφορά τώρα τα

διαφορετικά γονίδια που βρίσκονται στο X φαίνεται να συνδέονται μεταξύ τους και πράγματι το φαινόμενο της σύνδεσης ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά από μελέτες σε γονίδια που μεταφέρονται με το X. Ωστόσο, τα περισσότερα μοριακά αναγνωρισμένα συνδεδεμένα με το X γονίδια δεν έχουν μελετηθεί λεπτομερώς (Drysdale 2008). Ένα παράδειγμα τέτοιων γονιδίων είναι το γονίδιο yellow που τοποθετείται στο αριστερό άκρο του X ενώ το γονίδιο bobbed στο δεξιό.

❖ *Anopheles gambiae* Y

Παρά τη λειτουργία του στον προσδιορισμό του φύλου και το ρόλο του στην εξέλιξη του γονιδιώματος, το Y χρωμόσωμα παραμένει ελάχιστα μελετημένο στα περισσότερα είδη. Τα Y χρωμοσώματα είναι γονιδιακά φτωχά, πλούσια σε επαναλήψεις και σε μεγάλο βαθμό ετεροχρωματινικά και επομένως αποτελούν έναν δύσκολο στόχο για τη γενετική μηχανική. Το Y χρωμόσωμα του φορέα της ανθρώπινης ελονοσίας *Anopheles gambiae* φαίνεται να εμπλέκεται στον προσδιορισμό του φύλου, αν και πολύ λίγα είναι γνωστά για τη δομή και τη λειτουργία του. Ο καρυότυπος του Αφρικανικού *An. gambiae* έχει δύο ζεύγη υπομετακεντρικών αυτοσωμάτων, που ονομάζονται 2 και 3, και ένα ζεύγος ετερομορφικών φυλετικών χρωμοσωμάτων X και Y, τα θηλυκά ορίζονται ως XX και XY τα αρσενικά (Clements 1992).

Τα φυλετικά χρωμοσώματα χωρίζονται σε δύο βραχίονες από το κεντρομερές. Ο μεγαλύτερος βραχίονας αναφέρεται ως δεξιός και ο βραχύτερος ως αριστερός. Μεταξύ του X και του εκφυλισμένου Y χρωμοσώματος υπάρχουν εκτεταμένες περιοχές που δεν ζευγαρώνουν και διάφορες ενδείξεις υποδεικνύουν έναν παράγοντα που εντοπίζεται στο Y ο οποίος καθορίζει την ανάπτυξη του αρσενικού φύλου. Το Y υπολογίζεται ότι περιλαμβάνει ~10% του γονιδιώματος και έχει μέγεθος 26Mb. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως λόγω της ετεροχρωματινικής κατάστασης του, το Y δεν πολυταινιζείται φιλοξενώντας μόνο λίγα γονίδια που συχνά εμπλέκονται στην αρσενική γονιμότητα. Κυτταρολογικές μελέτες που διεξάχθηκαν τη δεκαετία του 1970 αποκάλυψαν εντυπωσιακές διαφορές στην ετεροχρωματινική των φυλετικών χρωμοσωμάτων μεταξύ των πληθυσμών και μεταξύ των ειδών. Όχι μόνο η ένταση και το πρότυπο χρώσης ποικίλουν, αλλά και το μήκος του Y, που κυμαίνεται από το μισό μήκος του X σε ένα *An. gambiae* σχεδόν στο ίδιο μήκος με το X σε ένα άλλο είδος (Bonaccorsi et al., 1980). Η ετεροχρωματινική βρίσκεται κυρίως σε κεντρομερικές και σε τελομερικές χρωμοσωμικές περιοχές παίζοντας ιδιαίτερο ρόλο στο μειωτικό ζευγάρωμα, στην κυτταρική διαίρεση και στη σταθερότητα των χρωμοσωμάτων. Από την άλλη, η ευχρωματινική περιοχή του Y περιέχει περισσότερα γονίδια αντιπροσωπεύοντας έναν καλό υποψήφιο για την αναζήτηση υποθετικών αρρενοειδικών γονιδίων (Miller 2004).

❖ *Anopheles gambiae* X

Όσον αφορά το τελοκεντρικό X χρωμόσωμα του *An. gambiae*, αυτό περιλαμβάνει 1088 γονίδια, εκ των οποίων τα 982 ανακαλύφθηκαν σχετικά πρόσφατα και τα 106 έχουν γνωστή λειτουργία. Η πλειοψηφία των γονιδίων με γνωστή λειτουργία είναι μικρά σε μέγεθος και μόνο το 18% του συνόλου τους κυμαίνεται από 2-5kb, ενώ το 23% πάνω των 5kb. Επειδή τα γονίδια στους ευκαρυώτες συχνά φέρουν ιντρόνια που συμβάλλουν στην αύξηση του μεγέθους διερευνήθηκε η συνεισφορά των εξονίων και των ιντρονίων στο κουνούπι. Μετά από μελέτες που διεξάχθηκαν αποκαλύφθηκε ότι σχεδόν τα δύο τρίτα των γονιδίων με γνωστή λειτουργία (79 γονίδια) δεν φέρουν ή φέρουν πολύ λίγα ιντρόνια (το πολύ τρία) ενώ τα γονίδια που έχουν περισσότερα από τρία ιντρόνια συμβάλλουν μόνο στο 17% των

γονιδίων αυτών. Επίσης, για αυτά τα γονίδια εξετάστηκε στη συνέχεια η ομολογία τους σε συγγενικά είδη. Τα 86 από τα 106 γονίδια του X βρέθηκαν να είναι ομόλογα (και ορθόλογα και παράλογα) με 33 διαφορετικές τάξεις. Από αυτά τα 86 γονίδια, 41 έχουν μόνο ορθόλογα, 3 έχουν μόνο παράλογα και 42 έχουν και ορθόλογα και παράλογα. Στα υπόλοιπα 20 γονίδια κανένα ομόλογο δεν μπορούσε να ανιχνευθεί, έτσι θεωρούνται μοναδικά για το *An. gambiae* (Srivastava et al., 2009).

1.4 Γονίδια και διάφορα στοιχεία του Y

◆ Στοιχεία που εμπεριέχονται στο Y χρωμόσωμα της *Drosophila melanogaster*

Η φύση του χρωμοσώματος Y της *Drosophila* υπήρξε σημαντικό εμπόδιο για τη γενετική του ανάλυση. Προκειμένου να κατανοηθεί καλύτερα ο ρόλος του Y στην αρσενική γονιμότητα, πραγματοποιήθηκαν εκτεταμένες γενετικές αναλύσεις των χρωμοσωμικών αναδιατάξεων του επιτρέποντας τον εντοπισμό επτά τόπων (παράγοντες γονιμότητας), πέντε στο Y^L και δύο στο Y^S (Brosseau 1960). Οι τόποι ονομάστηκαν kl-1 έως kl-5 για τον Y^L και ks-1, ks-2 για τον Y^S . Κάθε παράγοντας γονιμότητας εκτείνεται σε ~4.000kb DNA. Η λειτουργία τους στη γονιμότητα ασκείται κυρίως κατά την ανάπτυξη και την ωρίμανση των πρωταρχικών σπερματοκύτταρων και η απουσία ή η δυσλειτουργία τους προκαλεί αρκετά προβλήματα κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, οδηγώντας τελικά στην ανάπτυξη ακίνητων σπερματοζωαρίων.

Οι τόποι kl-2, kl-3 και kl-5 είναι απαραίτητοι για την παραγωγή πρωτεϊνών υψηλού μοριακού βάρους που είναι οι βαριές αλυσίδες της δινείνης που απαιτούνται για την κινητικότητα του σπέρματος. Μέσω μοριακών αναλύσεων επιβεβαιώθηκε ότι ο kl-5 κωδικοποιεί μία βαριά αλυσίδα β-δινείνης ειδικής για τους όρχεις περίπου 4500 αμινοξέων (Goldstein et al., 1982). Ελλείψεις στις περιοχές που βρίσκονται τα kl-5, kl-3 οδηγούν στην μείωση των συσσωματωμάτων τομπουλίνης και του ραχιαίου αντίστοιχα και στην απουσία των εξωτερικών βραχιόνων της δινείνης, που συνδέονται με τους A μικροσωληνίσκους των εννέα περιφερικών νευρώσεων της ουράς του σπέρματος. Αντίστοιχα ελλείψεις που περιλαμβάνουν το kl-2 έχει ως αποτέλεσμα τον χαρακτηρισμό των αρσενικών ατόμων από την απουσία ενός συγκεκριμένου υψηλού μοριακού βάρους πολυπεπτιδίου του σπέρματος, από την εμφάνιση κρυστάλλων με σχήμα βελόνας σε πρωτογενή σπερματοκύτταρα, από μη φυσιολογική μειωτική διαίρεση και από την άνιση κατανομή των μιτοχονδρίων στις σπερματίδες κατά τη διάρκεια της μείωσης.

Κατά τη σπερματογένεση σε αρσενικά που παρουσίαζαν έλλειμμα για τα kl-1, ks-1 παρατηρήθηκαν ανωμαλίες που εμφανίστηκαν αργά στη σπερμιόγνεση και μοιράζονταν πολλά χαρακτηριστικά με τις αναπτυξιακές επιπτώσεις άλλων ελλείψεων.

Τέλος, τα αρσενικά που έχουν έλλειψη της περιοχής που βρίσκεται το ks-2 εμφανίζουν ανώμαλη ευθυγράμμιση του αξονήματος γεγονός που οδηγεί σε σοβαρές ανωμαλίες καθώς προχωράει η σπερματογένεση.

Όσον αφορά το kl-4 τα δεδομένα που είναι γνωστά δεν επαρκούν για τον χαρακτηρισμό της λειτουργίας του.



Εικόνα 4: Κυτταρολογικός εντοπισμός και οργάνωση των έξι παραγόντων γονιμότητας.

☞ Γονιδιακός τόπος crystal

Στα αρσενικά που απουσιάζει το Y χρωμόσωμα, εμφανίζουν στα πρωταρχικά σπερματοκύτταρα τους πρωτεϊνικούς κρυστάλλους είτε σε σχήμα βελόνας είτε σε σχήμα αστεριού. Η μορφολογία του κρυστάλλου αυτού προσδιορίστηκε από τον τόπο Stellate (Ste), ο οποίος αντιστοιχεί στη θέση 45.7 του X χρωμοσώματος (Hardy et al., 1984). Ο τόπος Stellate περιέχει επαναλαμβανόμενα γονίδια των οποίων η μεταγραφή εντοπίζεται μόνο στους όρχεις. Τα γονίδια Ste κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη με 38% ομοιότητα με την β-υπομονάδα της κινάσης II της καζεΐνης (Bozzetti et al., 1995). Όταν τα γονίδια Ste υπερεκφράζονται στους όρχεις αυτό οδηγεί σε ανωμαλίες στην γαμετογένεση και στην αρσενική στειρότητα. Ένα από τα Y συνδεδεμένα γονίδια που απαιτούνται για τη σωστή μείωση είναι ο τόπος crystal (cry) (Pimpinelli et al., 1986), γνωστός και ως καταστολέας του Stellate (Su(Ste)). Η παρουσία της συγκεκριμένης περιοχής του Y χρωμοσώματος εμποδίζει την εμφάνιση των κρυστάλλων στα σπερματοκύτταρα. Το Su(Ste) χαρτογραφείται σε μια περιοχή του Y^L. Η περιοχή Su(Ste) περιέχει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες ομόλογες προς το Ste που υποτίθεται ότι ρυθμίζουν τη δραστικότητα των γονιδίων Stellate. Οι επαναλήψεις του Su(Ste) που είναι 2,8kb αντιπροσωπεύονται από τρία βασικά στοιχεία: μια περιοχή ομόλογη με τα X συνδεδεμένα γονίδια Ste, ένα τμήμα ειδικό για το Y και ένα κινητό στοιχείο 1360 που έχει εισαχθεί στην ομόλογη αλληλουχία του Ste. Η θέση του στοιχείου 1360 υποδηλώνει ότι η περιοχή του Ste και η Y ειδική περιοχή ήταν ενωμένες αρχικά, και μετά ακολούθησε η εισαγωγή του στοιχείου 1360 που οδήγησε στην ενίσχυση ολόκληρης της δομής (Balakireva et al., 1992).

☞ Δορυφορικά DNAs

Το ετεροχρωματικό Y χρωμόσωμα περιέχει μια σειρά απλών ακολουθιών δορυφορικού DNA που μαζί αντιπροσωπεύουν περίπου το 80% του μήκους του. Η *D. melanogaster* περιέχει τέσσερα καλά μελετημένα δορυφορικά DNAs που ανέρχονται σε ~20% του γονιδιώματος και μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες με βάση την πολυπλοκότητα της αλληλουχίας τους. Η μια ομάδα περιέχει επαναλήψεις απλής ακολουθίας, με μήκος 5, 7 ή 10bp (δορυφόροι 1.672, 1.686 και 1.705). Η άλλη ομάδα αντιπροσωπεύεται από τον δορυφόρο 1.688 ο οποίος αποτελείται από διαδοχικές επαναλήψεις μιας μακρύτερης αλληλουχίας μήκους 359bp. Από αυτές τις τέσσερις αλληλουχίες μόνο οι τρεις χαρτογραφούνται σε θέσεις μοναδικές στο Y και η μία σε μία μεμονωμένη θέση στο Y και στην ετεροχρωματίνη του 2ου χρωμοσώματος.

Περίληπτικά αυτές οι αλληλουχίες είναι: i) Η αλληλουχία AAGAG που είναι το κύριο συστατικό του δορυφορικού DNA 1.705, βρίσκεται σε αφθονία, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 5,6% του απλοειδούς γονιδιώματος της *Drosophila*. Αυτή η αλληλουχία χαρτογραφείται σε πολλαπλές θέσεις κατά μήκος του Y και σε διαφορετικές ποσότητες στην ετεροχρωματίνη όλων των χρωμοσωμάτων.

ii) Η αλληλουχία AAGAGAG (7bp) είναι δευτερεύον συστατικό του δορυφορικού DNA 1.705. Οι επαναλήψεις αυτής της αλληλουχίας, που βρίσκονται στο χρωμόσωμα Y και στην

ετεροχρωματίνη του δεύτερου και του τρίτου χρωμοσώματος, αντιπροσωπεύουν περίπου το 1,5% του απλοειδούς γονιδιώματος της *melanogaster*.

iii) Η αλληλουχία AAGAC είναι συστατικό του δορυφόρου 1.686 και περιλαμβάνει περίπου το 2.4% του απλοειδούς γονιδιώματος. Χαρτογραφείται σε πολλαπλές θέσεις κατά μήκος του Y και στην ετεροχρωματίνη του δεύτερου χρωμοσώματος.

iv) Οι επαναλήψεις AATAT είναι το κύριο συστατικό του δορυφορικού DNA 1.672. Αντιπροσωπεύουν το 3% του απλοειδούς γονιδιώματος και χαρτογραφούνται στα ετεροχρωματινικά τμήματα όλων των χρωμοσωμάτων με κύριο εντοπισμό στο 4 και το Y (LOHE and ROBERTS 1988).

v) Ο χαρακτηρισμός της αλληλουχίας του δορυφόρου 1.688 δεν ήταν δυνατός λόγω έλλειψης ενός τμήματος 359bp από το Y χρωμόσωμα (HILLIKER and APPELS 1982).

◆ Στοιχεία που εμπεριέχονται στο Y χρωμόσωμα του *An. gambiae*

Το Y χρωμόσωμα στο κουνούπι περιλαμβάνει στοιχεία που του προσδίδουν διάφορες ιδιότητες. Τέτοιοι παράγοντες είναι τα ρετροτρανσποζόνια που μεσολαβούν στην επανατοποθέτηση των γονιδίων και είναι κινητά στοιχεία που βασίζονται στην αντίστροφη μεταγραφάση (RT) για να αναπαραχθούν μέσω ενός ενδιάμεσου RNA. Μπορούν να εκτελούν τόσο εποικοδομητικούς όσο και καταστροφικούς ρόλους στη διαμόρφωση του περιεχομένου των γονιδίων και της έκφρασης τους.

☞ Στοιχείο Mtanga-Y

Από την ανάλυση του DNA αρσενικών κουνουπιών ανακαλύφθηκε μία περιοχή που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με ρετροτρανσποζόνιο μακριάς τερματικής επανάληψης (LTR) που ονομάστηκε Mtanga-Y και είναι ειδικό για το Y χρωμόσωμα του *Anopheles gambiae*. Τα στοιχεία Mtanga-Y αντιπροσωπεύουν τις πρώτες συνδεδεμένες με το Y αλληλουχίες και τα πρώτα μέλη της υπεροικογένειας Ty1-copia των ρετροτρανσποζονίων που περιγράφηκαν σε αυτό το κουνούπι. Το συνολικό του μήκος ήταν 4.284bp και περιλάμβανε δύο άθικτα αλληλεπικαλυπτόμενα ανοικτά αναγνωστικά πλαίσια που οριοθετούνταν από 2 LTRs 119bp το καθένα. Οι τελικές βάσεις των LTRs ήταν 5'-TG...CA-3'. Το αρχικό σήμα της μεταγραφής δεν ήταν γνωστό ωστόσο υπήρχε ένα τελικό υποθετικό σήμα AATAAA. Κοντά στην 5' LTR υπήρχε μια αλληλουχία συμπληρωματική με το tRNA^{Met} (14bp) μια τοποθεσία πιθανή για τον εκκινητή της αντίστροφης μεταγραφής. Τα δύο LTRs του Mtanga-Y διέφεραν μόνο σε δύο θέσεις υποδεικνύοντας ότι αυτά τα στοιχεία ενσωματώθηκαν πρόσφατα στο Y. Επίσης, βρέθηκε ότι το Mtanga-Y μπορεί να κινείται χωρίς να προκαλεί επιπτώσεις καθώς αυτή η περιοχή δεν περιέχει σημαντικά γονίδια. Ωστόσο είναι ικανό να προκαλέσει την κινητικότητα άλλων στοιχείων που μοιάζουν με αυτό τα οποία είναι ανενεργά και έχουν χάσει την αυτονομία τους στην κίνηση (Rohr et al., 2002).

☞ Δορυφορικό DNA

Το δορυφορικό DNA που περιέχεται στο Y είναι ένα αινιγματικό στοιχείο του γενωμικού DNA με ασαφή λειτουργία που θεωρείται ως «άχρηστο». Το μεγαλύτερο μέρος του δορυφορικού DNA παραμένει άγνωστο, αντιπροσωπεύοντας ~49% όλων των βάσεων στη βάση δεδομένων του Y. Παρά τις δυσκολίες έχουν χαρακτηριστεί δύο δορυφόροι οι AgY477 και AgY373, που περιλαμβάνουν το 93% όλων των αλληλουχιών του δορυφορικού DNA στη βάση δεδομένων του Y. Επιπλέον, οι δορυφορικές ακολουθίες βρίσκονται ως μεγάλες

επαναλαμβανόμενες ακολουθίες, οι οποίες σε μεγάλο βαθμό στερούνται μεταθετών στοιχείων (TEs). Οι AgY477 και AgY373 είναι στενά συνδεδεμένοι και μοιράζονται σχεδόν πλήρη ομολογία σε όλο το μήκος τους. Τα αρχικά μονομερή των 477 και 373 διαφέρουν στα πρώτα 30 ζεύγη βάσεων τους και παρόλο που είναι πολύ παρόμοια, μπορούν να διακριθούν με ελαφριά τροποποίηση της αλληλουχίας τους. Από αυτά τα δεδομένα υποδηλώνεται ότι το δορυφορικό DNA είναι ένα άφθονο και ομοιογενές συστατικό του μη ανασυνδυασμένου Y (Hall et al., 2016).

1.5 Παράγοντες αρρενοποίησης

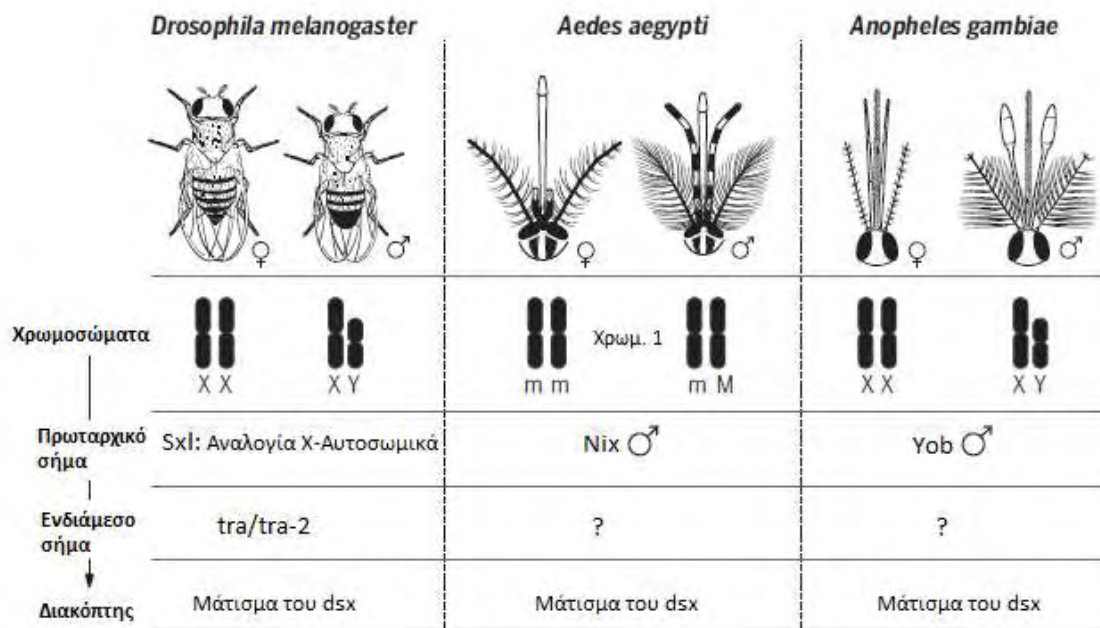
Στα έντομα, ο φυλοκαθορισμός απαιτεί ένα πρωταρχικό σήμα, το οποίο στα πρώιμα έμβρυα ενεργοποιεί έναν καταρράκτη φυλοειδικού ματίσματος των γονιδίων. Τα προϊόντα αυτών των γονιδίων ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση ενός ατόμου σε αρσενικό ή θηλυκό, ανάλογα με το σύστημα φυλοκαθορισμού. Όταν απουσιάζει αυτό το σήμα το προκαθορισμένο μοτίβο ματίσματος οδηγεί στην ανάπτυξη του αντίθετου φύλου. Η *Drosophila* έχει XX/XY σύστημα για τον καθορισμό του φύλου, στο οποίο η διπλή δόση των X συνδεδεμένων στοιχείων αντιπροσωπεύει το αρχικό σήμα που ξεκινά το θηλεοειδικό μάτισμα του προ-mRNA στον καταρράκτη των γονιδίων sex lethal (Sxl), transformer (tra) και doublesex (dsx). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή θηλεοειδικών πρωτεϊνών, στις οποίες το SXL ρυθμίζει το μάτισμα του tra, και το TRA, μαζί με τον συμπαράγοντά του TRA2, προάγοντας το μάτισμα του dsx.

Στα ανωφελικά κουνούπια το σύστημα XX/XY ενσωματώνει και έναν Y συνδεδεμένο παράγοντα αρρενοποίησης (M) που είναι κοινός σε πολλές ομάδες εντόμων για τον καθορισμό του φύλου. Στο *Anopheles gambiae* το γονίδιο Yob παίζει τον ρόλο του παράγοντα M. Αυτό το γονίδιο αποτελείται από τρία εξόνια και παράγει μετάγραφα που διαφέρουν ως προς το μέγεθος λόγω του διαφορετικού ματίσματος των ιντρονίων. Σύμφωνα με τη χρωμοσωμική του θέση, η μεταγραφή του Yob περιορίζεται μόνο στα αρσενικά και ξεκινά σε έμβρυα 2 και 2,5 ωρών μετά την ωοτοκία, πριν από τον σχηματισμό του βλαστοδέρματος και την έκφραση άλλων γονιδίων του Y και συνεχίζεται καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του κουνουπιού. Η έναρξη της μεταγραφής του Yob είναι σχεδόν ταυτόχρονη με εκείνη των ορθόλογων γονιδίων *even skipped* και *hunchback* των οποίων τα μετάγραφα σηματοδοτούν την αρχή της έκφρασης του ζυγωτού στην *Drosophila*. Έχει βρεθεί ότι η ενεργοποίηση του Yob προηγείται 6 ώρες του φυλοειδικού ματίσματος του dsx ενώ η ισόμορφη του dsx που είναι μητρικά κατατεθειμένη υποβαθμίζεται σε μεγάλο βαθμό στα αρσενικά έμβρυα εντός 4 ωρών από την ωοτοκία και μόνο όταν αποδομηθεί πλήρως η θηλυκή ισόμορφη του dsx καθιερώνεται στα αρσενικά το φυλοειδικό μάτισμα του dsx. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα πιθανολογείται ότι το Yob ρυθμίζει θετικά το dsx στην ιεραρχία του φυλοκαθορισμού και ότι η εισαγωγή των μεταγράφων του Yob σε θηλυκά θα πρέπει να προκαλέσει το εναλλακτικό μάτισμα του dsx (Krzyszewska et al., 2016).

Από την άλλη μεριά ο προσδιορισμός του φύλου στο *Aedes aegypti* διέπεται από έναν παράγοντα M που βρίσκεται σε μια περιοχή που μοιάζει με το χρωμόσωμα Y η οποία ονομάζεται τόπος M. Η ιδιαίτερα επαναλαμβανόμενη φύση του τόπου δυσκόλεψε την ανακάλυψη αυτού του παράγοντα. Τελικά όμως βρέθηκε ένα γονίδιο του τόπου M που λειτουργεί ως παράγοντας M. Το γονίδιο αυτό, που είναι μακρινό ομόλογο του transformer-2 το οποίο εμπλέκεται στο μάτισμα του dsx και του *fruitless* (fru), τα οποία αποτελούν βασικούς ρυθμιστές της φυλετικής διαφοροποίησης στη *D. melanogaster*, ονομάστηκε Nix. Ο Nix εντοπίζεται μόνο στο ένα ομόλογο αντίγραφο του χρωμοσώματος 1

στη θέση 1q21, που είναι και η θέση του τόπου M. Το απλοειδές αντίγραφο του Nix υπάρχει μόνο στα αρσενικά αλλά κανένα αντίγραφο του δεν είναι παρόν στα θηλυκά. Το cDNA του εκτείνεται σε 985bp και κωδικοποιεί ένα πολυπεπτίδιο 288 αμινοξέων. Η μεταγραφή του Nix εντοπίστηκε 3-4 ώρες μετά την ωτοκία που αντιστοιχεί στην αρχή του σταδίου του συγκυτιακού βλαστοδέρματος πριν καθοριστεί το φύλο. Επιπλέον, ο Nix παρουσιάζει δύο βασικά χαρακτηριστικά ενός παράγοντα M: 1) μόνιμη σύνδεση με τον τόπο M και 2) έγκαιρη εμβρυονική έκφραση (Brantley et al., 2015).

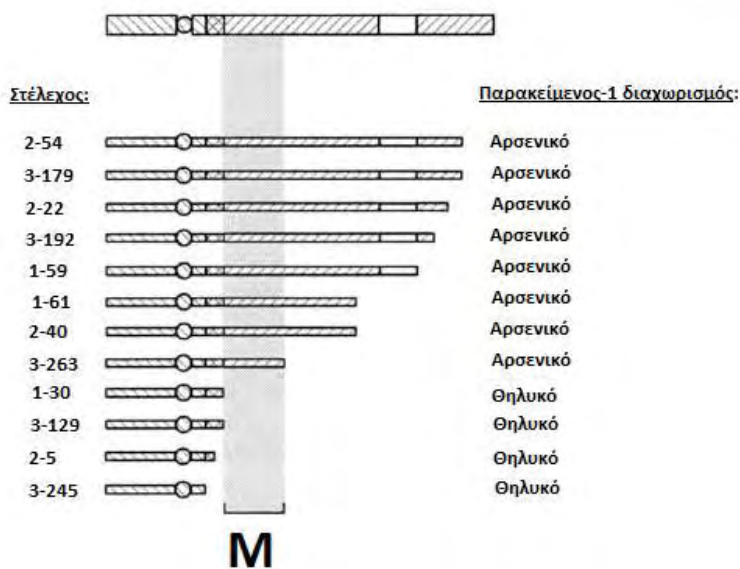
Τέλος, παρά τη διαθεσιμότητα των γονιδιωμάτων κανένας παράγοντας M δεν έχει ακόμη χαρακτηριστεί σε άλλα έντομα λόγω της δυσκολίας που υπάρχει κατά την ταυτοποίηση των γονιδίων που βρίσκονται σε περιοχές πλούσιες σε επαναλήψεις.



Εικόνα 5: Περίληψη των κυριότερων χαρακτηριστικών του φυλοκαθορισμού, όπως είναι γνωστός, στα Diptera όπως η *Drosophila melanogaster*, το *Aedes aegypti* και το *Anopheles gambiae*.

1.6 Προσπάθειες χαρακτηρισμού φυλετικών χρωμοσωμάτων στη *C. capitata*

Η μεσογειακή μύγα των φρούτων, *Ceratitis capitata*, είναι ένα από τα σημαντικότερα έντομα στη γεωργία. Η γνώση της γενετικής των μεσογειακών μυγών αυξάνεται ραγδαία και υπάρχει ένα ενδιαφέρον για την εφαρμογή της ώστε να αναπτυχθούν τεχνολογίες ελέγχου αυτού του εντόμου (Roessler and Koltin 1976). Τα χρωμοσώματα XY της *C. capitata* είναι ετερόμορφα, ετεροχρωματικά και δεν πολυτενίζονται. Το X χρωμόσωμα σχηματίζει ένα κοκκιώδες δίκτυο και το Y εμφανίζεται ως ετεροχρωματική σφαίρα σε ορισμένους πολυτενικούς ιστούς. Ο τόπος του ριβοσωμικού DNA (rDNA) εντοπίζεται στο ζεύγος των XY. Πρόσφατα, περιγράφηκαν πολλές Y ειδικές και Y εμπλουτισμένες αλληλουχίες, οι οποίες αποδείχθηκαν ότι επαναλαμβάνονται. Τα άτομα με ανευπλοειδία $XX22^Y$ προήλθαν από τη μετατόπιση μεταξύ ενός αυτοσωμικού χρωμοσώματος και του Y και αναπτύχθηκαν ως αρσενικά υποδεικνύοντας ότι το Y χρωμόσωμα καθορίζει το αρσενικό φύλο. Αρκετές από τις μετατοπίσεις παράγουν ανευπλοειδή άτομα που επιβιώνουν μέχρι την ενηλικίωση. Αυτά τα άτομα που προέρχονται από τον παρακείμενο-1 διαχωρισμό στη μείωση των αρσενικών, περιέχουν ένα διπλασιασμένο μέρος ενός αυτοσώματος που εμπλέκεται στη μετατόπιση και χρησιμοποιήθηκαν για να χαρτογραφηθούν αυτοσωμικές, υπολειπόμενες μεταλλάξεις στο χρωμόσωμα 5 (Franz and Kerremans 1994). Τα άτομα αυτά φέρουν επίσης διαγραφές κατά μήκος του Y, όπου το μήκος της εξάλειψης εξαρτάται από τη θέση του σημείου διακοπής στο Y χρωμόσωμα. Πραγματοποιήθηκε χαρτογράφηση αυτών των σημείων διακοπής στο Y με την τεχνική FISH χρησιμοποιώντας ανιχνευτές DNA. Ο πρώτος ανιχνευτής ήταν ο rY114 που περιέχει ένα θραύσμα από το γονιδιωματικό,



επαναλαμβανόμενο DNA του Y χρωμοσώματος το οποίο δεν υβριδίζεται με το γονιδιωματικό DNA των θηλυκών (Anleitner and Haymer 1992). Ο δεύτερος ανιχνευτής rDh2-H8 ήταν ένα κλωνοποιημένο θραύσμα από τη *Drosophila hydei* που περιέχει το 28S rDNA (Renkawitz-Pohl et al., 1980). Με την χρήση του rY114 ολόκληρος ο μεγάλος βραχίονας του Y υβριδοποιήθηκε και έδωσε σήμα με εξαίρεση την περιοχή κοντά στο κεντρομερές και ένα κενό κοντά στο άκρο που αντιπροσωπεύουν ~10% του συνολικού μήκους του Y. Αντίθετα,

με τον rDh2-H8 υβριδοποιήθηκε ο Y^S , η περιοχή του κεντρομερούς και ~10% του Y^L . Συμπερασματικά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι επτά μετατοπίσεις ανάμεσα στο Y και τα αυτοσώματα εμφάνιζαν πολύπλοκες αναδιατάξεις. Στο στέλεχος με την μετατόπιση (Y;5)3-

Εικόνα 6: Χαρτογράφηση του παράγοντα M μέσω διαγραφών. Η ανάλυση του καρυότυπου ατόμων που προήλθαν από παρακείμενο-1 διαχωρισμό χρησίμευσε στην ταυτοποίηση του τμήματος του Y που είναι παρόν σε κάθε στέλεχος.

129α εντοπίστηκε μια διαγραφή στο Y καθώς το σήμα από την FISH στο 5^Y ήταν σαφώς μικρότερο

από το αναμενόμενο. Πολλαπλές διαγραφές στο Y χρησιμοποιήθηκαν τελικά για τον εντοπισμό της θέσης του παράγοντα M που τοποθετείται σε μια περιοχή που καταλαμβάνει το 15% του συνολικού μήκους του Y (Willhoeft and Franz 1996).

1.7 Προσπάθειες εντοπισμού Y-ειδικών αλληλουχιών, Y γονιδίων σε *C. Capitata* και *B. Oleae*

📖 Ένα πρώτο βήμα στον χαρακτηρισμό του Y χρωμοσώματος της μεσογειακής μύγας είναι η απομόνωση αρρενοειδικών αλληλουχιών DNA με την τεχνική του διαφορικού υβριδισμού. Αυτή η μέθοδος συνεπάγεται την σύντηξη επισημασμένων θηλυκών και αρσενικών ειδικών γονιδιωματικών DNA για να διπλασιάσει την παρουσία τους στη γονιδιωματική βιβλιοθήκη της μεσογειακής μύγας. Για το λόγο αυτό ανασυνδυασμένοι φάγοι που παρουσίασαν ιδιαίτερη προτίμηση στον υβριδισμό με έναν ανιχνευτή DNA από αρσενικά επιλέχθηκαν για περαιτέρω χαρακτηρισμό. Αυτή η προσέγγιση είχε ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση των αλληλουχιών που συνδέονται με το Y. Πλασμιδιακοί υποκλώνοι παρελήφθησαν από κάθε φάγο και αναλύθηκαν ως προς την οργάνωση του γονιδιώματος και στα δύο φύλα και τον χάρτη των περιοριστικών ενζύμων. Συνοπτικά η διαδικασία περιλάμβανε την ταυτοποίηση δώδεκα κλώνων φάγων από μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη που εμφάνιζαν σταθερά περισσότερο υβριδισμό με έναν ανιχνευτή γονιδιωματικού DNA από αρσενικά σε αντίθεση με τα θηλυκά. Για να χαρακτηριστούν περαιτέρω αυτοί οι φάγοι, απομονώθηκε το DNA και υπέστη πέψη με EcoRI. Η ανάλυση στυπώματος κατά Southern αποκάλυψε ότι αυτοί οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι περιέχουν τουλάχιστον ένα θραύσμα EcoRI που είναι είτε ειδικό για το αρσενικό γονιδίωμα ή εμφανίζεται περισσότερο σε αυτό, σε σύγκριση με το θηλυκό (Anleitner and Haymer 1991). Όταν αυτά τα θραύσματα EcoRI χρησιμοποιήθηκαν ως ανιχνευτές παρήγαγαν ένα παρόμοιο μοτίβο έντονων πολλαπλών ζωνών στο γονιδιωματικό DNA των αρσενικών υποδηλώνοντας την παρουσία επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών που είναι μερικώς ομόλογες σε αυτές τις περιοχές του γονιδιώματος και είναι ειδικές ή άφθονες στα αρσενικά. Τέλος, η επιβεβαίωση της χρωμοσωμικής προέλευσης αυτών των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών από το Y έγινε μέσω in situ υβριδισμό των μιτωτικών χρωμοσωμάτων.

📖 Λίγα χρόνια αργότερα με βάση τις τεχνικές και τα δεδομένα των Anleitner & Haymer, ταυτοποιήθηκαν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA που κατανέμονται πάνω από το 90% του μήκους του Y^L. Μέσω αλληλούχησης αποκαλύφθηκε ότι αυτές οι επαναλήψεις, που κυμαίνονται σε μέγεθος από 1,3 έως 1,7kb, αποτελούνται συνολικά από A-T. Αυτά τα επαναλαμβανόμενα αντίγραφα περιέχουν επίσης μια παρόμοια εσωτερική περιοχή, περίπου 200bp, με πιο έντονο περιεχόμενο σε A-T. Αυτή η εσωτερική περιοχή, που χαρακτηρίζεται ως στοιχείο AT, περιέχει A-T σε ποσοστό τουλάχιστον 83% (Zhou et al., 2000).

📖 Μια άλλη προσέγγιση για την ταυτοποίηση γονιδίων που έχουν πρόωρη εμβρυϊκή αρρενοειδική έκφραση, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων που συνδέονται με το Y, όπως ο παράγοντας αρρενοποίησης είναι η συνδυαστική χρήση των τεχνικών SSH, MOS και DSH για την απομόνωση mRNAs που εκφράζονται σε έμβρυα XX/XY έναντι εμβρύων XX κατά τη διάρκεια ενός στενού αναπτυξιακού φάσματος (8-10 ώρες μετά την ωοτοκία) (Salvemini et al., 2014). Ο αφαιρετικός υβριδισμός είναι μια μέθοδος για τον

εμπλουτισμό διαφορετικών εκφρασμένων γονιδίων που χρησιμοποιήθηκε αρχικά πριν από 5 δεκαετίες και βελτιώθηκε σημαντικά με την προσθήκη προσαρμογών στα cDNAs για την επιλεκτική ενίσχυση με PCR του cDNA που ελέγχεται (Duguid et al., 1990) και πιο πρόσφατα εισάγοντας την SSH PCR (Suppression Subtractive Hybridization PCR), στην οποία διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια μπορούν να κανονικοποιηθούν και να εμπλουτιστούν 1000 φορές σε ένα μόνο κύκλο υβριδισμού (Diatchenko et al., 1996). Η τεχνική SSH βασίζεται στο αποτέλεσμα της καταστολής της PCR που προκαλείται από μακριές ανεστραμμένες τερματικές επαναλήψεις συνδεδεμένες στα άκρα θραυσμάτων DNA. Αυτή η τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την απομόνωση διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων για παράδειγμα σε διαφορετικές τάξεις εντόμων (Donnell et al., 2006), σε συγκεκριμένους ιστούς εντόμων (Wolfner et al., 1997), καθώς και σε άλλα ευκαρυωτικά συστήματα (Bree et al., 2005). Επιπλέον, η SSH οδήγησε στην ταυτοποίηση των γονιδίων της *C. capitata* που εκφράζονται σε αρσενικούς βοηθητικούς αδένες ή κατά την αυλάκωση των εμβρύων. Για την διεξαγωγή των πειραμάτων αποκτήθηκαν δυο σειρές εμβρύων XX/XY και XX όπου εφαρμόστηκε η SSH παράγοντας μια αφαιρετική βιβλιοθήκη δυνητικά εμπλουτισμένη σε αρρενοειδικά mRNAs. Ένα από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ο μεγάλος αριθμός ψευδών θετικών κλώνων. Αυτοί οι ανεπιθύμητοι κλώνοι cDNA παράγονται από τη μη ειδική σύντηξη των εκκινητών της PCR ή μη προσδεδεμένων προσαρμογών και από πλεονάζοντα μόρια cDNA που αποφεύγουν την εξάλειψη μέσω του υβριδισμού. Προκειμένου να μειωθεί ο αριθμός αυτών των κλώνων cDNA και η πολυπλοκότητα του μείγματος εφαρμόστηκε η τεχνική MOS (Mirror Oriented Selection) (Rebrikov et al., 2000). Στην συνέχεια, κλωνοποιήθηκαν τα cDNAs από την SSH-MOS βιβλιοθήκη και εμβολιάστηκαν με μετασηματισμένα βακτήρια δημιουργώντας μια πλασμιδιακή βιβλιοθήκη και εφαρμόστηκε η DSH (Differential screening hybridization) που οδήγησε έπειτα από κατάλληλους χειρισμούς στην ταυτοποίηση 25 κλώνων. Από αυτούς τους κλώνους αποκτήθηκε τυχαία μόνο ένας αρρενοειδικός που αντιστοιχεί σε ένα Y συνδεδεμένο υποτιθέμενο γονίδιο.

📖 Πιο πρόσφατα χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές RDA (Representational Difference Analysis) και FISH (Fluorescence in-situ hybridization) για τη διερεύνηση του Y χρωμοσώματος ενός άλλου είδους στα Tephritidae, του *Bactrocera oleae*, ένα παράσιτο του καρπού της ελιάς. Το πολύ μικρό, υψηλά ετεροχρωματινικό Y χρωμόσωμα του *B. Oleae* είναι διάσπαρτο με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA, η πλειονότητα των οποίων διασκορπίζονται στις περικεντρομερικές περιοχές των αυτοσωμάτων. Το Y φαίνεται να έχει συσσωρεύσει μικρές και μεγάλες επαναλαμβανόμενες διαχρωμοσωμικές αλληλοεπικαλύψεις. Στις μεγάλες αλληλοεπικαλύψεις συγκαταλέγεται ένα θραύσμα γονιδίου που μοιάζει με την ιμπορτίνη-4. Εκτός από αυτές τις αλληλουχίες που μοιάζουν με την ιμπορτίνη-4, οι άλλες Y επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες δεν μοιάζουν με το χρωμόσωμα X, υποδηλώνοντας την παρουσία μοριακής διαφοροποίησης μεταξύ αυτών των δύο χρωμοσωμάτων. Μεταξύ των αλληλουχιών που απομονώθηκαν από το Y χρωμόσωμα, δύο είναι θραύσματα μεταθετών στοιχείων: ένα αδρανές στοιχείο *marine* και ένα ρετροστοιχείο *Oswaldo-like*. Ο εμπλουτισμός του Y χρωμοσώματος με μεταθετά στοιχεία και ιδιαίτερα με ανενεργά στοιχεία *marine*, είναι ένα χαρακτηριστικό που παρατηρήθηκε στο εξαιρετικά ετεροχρωματινικό και σε μεγάλο βαθμό εκφυλισμένο Y χρωμόσωμα του συγγενικού είδους, *C. Capitata* (Gabrieli et al., 2011).

1.8 Πρακτικές εφαρμογές της απομόνωσης Υ-ειδικών αλληλουχιών και γονιδίων στο δάκο της ελιάς

Η απομόνωση των Υ ειδικών αλληλουχιών στα Terphritidae βρίσκει μεγάλη απήχηση σε διάφορες τεχνικές κυριότερη από τις οποίες είναι ο διαχωρισμός των αρσενικών από τα θηλυκά έντομα. Ο δάκος είναι από τα χειρότερα παράσιτα στη γεωργία και έχουν μεγάλη οικονομική σημασία σε όλες σχεδόν τις εύκρατες χώρες παγκοσμίως. Αυτά τα παράσιτα προκαλούν τεράστιες καταστροφές τόσο στην παραγωγή της ελιάς όσο και στο διεθνές εμπόριο και αποτελούν μείζον στόχο των εφαρμογών εντομοκτόνων. Μερικές από τις εφαρμογές που βασίζονται στην απομόνωση Υ ειδικών αλληλουχιών ταυτοποιήθηκαν στην μεσογειακή μύγα και μπορούν να εφαρμοστούν με επιτυχία και στον δάκο.

❖ Τεχνική στείρου εντόμου (SIT)

Η βασική ιδέα αυτής της τεχνικής είναι η εργαστηριακή εκτροφή μεγάλου αριθμού αρσενικών μυγών, στείρωση τους έπειτα από ακτινοβολία με ακτίνες Χ και στη συνέχεια απελευθέρωση ώστε να ζευγαρώσουν με άγρια θηλυκά. Όταν η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται με επιτυχία τα άγρια θηλυκά εξαλείφονται αποτελεσματικά από τον αναπαραγωγικό πληθυσμό και με την πάροδο του χρόνου τα παράσιτα στόχοι εξαφανίζονται μέσω της έλλειψης αναπαραγωγικής επιτυχίας (Klassen and Curtis 2005).

❖ Χρωμοσωμικές μετατοπίσεις και SIT

Μια γενετική προσέγγιση για την επίτευξη του επιθυμητού διαχωρισμού ήταν η χρήση μετατοπίσεων για τη σύνδεση ορατών ή επιλέξιμων δεικτών σε μηχανισμούς φυλοκαθορισμού και ιδιαίτερα στο Υ χρωμόσωμα (Condona et al., 2007). Αυτό ήταν εφικτό σε πολλά Terphritidae που θεωρήθηκαν ότι ήταν δεκτικά στην SIT επειδή η παρουσία τουλάχιστον ενός μέρους του Υ ήταν επαρκής για τον καθορισμό του αρσενικού φύλου. Αρκετές από τις ορατές μεταλλάξεις που είχαν συγκεντρωθεί σε γενετικές μελέτες διαφορετικών ειδών χρησιμοποιήθηκαν για το σκοπό αυτό. Για παράδειγμα στη μεσογειακή μύγα η οποία κανονικά παράγει βομβύκια καφέ χρώματος, έχει δημιουργηθεί ένα στέλεχος που φέρει υπολειπόμενη μετάλλαξη που παράγει άσπρα βομβύκια. Μια χρωμοσωμική μετατόπιση δημιουργήθηκε συνδέοντας το αλληλόμορφο αγρίου τύπου αυτού του γονιδίου με το Υ χρωμόσωμα (Franz and Robinson 2011). Αυτό επέτρεψε την παραγωγή αρσενικών με το κανονικό καφέ χρώμα που εύκολα διακρίνονταν από τα θηλυκά που ήταν λευκά. Αυτή η τεχνική μπορεί να πραγματοποιηθεί και στον δάκο φέροντας αντίστοιχα αποτελέσματα.

❖ Θανατηφόρες μεταλλάξεις ευαίσθητες στη θερμοκρασία

Μία σειρά μεταλλάξεων που εμφάνιζαν ευαισθησία στην θερμοκρασία ταυτοποιήθηκαν στη μεσογειακή μύγα. Παραδείγματος χάριν, προσδιορίστηκε μια ευαίσθητη στη θερμοκρασία μετάλλαξη όπου η έκθεση των προνυμφών σε θερμοκρασίες ίσες ή μεγαλύτερες των 33°C ήταν θανατηφόρες. Με τρόπο παρόμοιο με αυτόν που περιεγράφηκε για τη μεταλλαγή του βομβυκίου λευκού χρώματος, χρησιμοποιήθηκε μετατόπιση με το αλληλόμορφο αγρίου τύπου αυτού του ευαίσθητου στη θερμοκρασία θανατηφόρου γονιδίου στο Υ. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ενός συστήματος όπου τα θηλυκά θα μπορούσαν να εξαλειφθούν επιλεκτικά ανά πάσα στιγμή κατά τη διάρκεια της φάσης εκτροφής απλώς εκθέτοντας τις προνύμφες σε αυξημένη θερμοκρασία. Οι αρσενικές προνύμφες θα επιβιώσουν σε αυτήν την προσωρινή έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία και τα νεογνά που θα προκύψουν θα ακτινοβοληθούν και θα απελευθερωθούν (Franz 2005).

- ❖ Μέθοδος απελευθέρωσης εντόμων που φέρουν επικρατές θνησιγόνο γονίδιο (RIDL)

Σύμφωνα με το σύστημα αυτό, εισάγεται στα έντομα ένα επικρατές θνησιγόνο γονίδιο, το οποίο συνήθως ελέγχεται από ένα θηλεοειδικό υποκινητή. Έτσι, το γονίδιο θα εκφραστεί μόνο σε θηλυκά άτομα, ενώ ανάλογα με τον τύπο του θα εκφραστεί σε διαφορετικό στάδιο της αναπτυξιακής διαδικασίας του εντόμου. Τα έντομα στα οποία έχει εισαχθεί το διαγονίδιο, αρχικά, αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται υπό εργαστηριακές συνθήκες χάριν στο σύστημα ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης μέσω τετρακυκλίνης. Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει ορισμένα ρυθμιστικά στοιχεία τα οποία ελέγχουν την έκφραση του θνησιγόνο γονιδίου και τα οποία ελέγχονται και απενεργοποιούνται από το αντιβιοτικό τετρακυκλίνη. Οπότε παρουσία της τετρακυκλίνης σε εργαστηριακές συνθήκες το θνησιγόνο γονίδιο δεν εκφράζεται και άρα τα έντομα επιβιώνουν κανονικά. Όταν φτάσουν σε έναν επιθυμητό αριθμό διοχετεύονται στον αγρό, όπου απουσία της τετρακυκλίνης εκφράζουν κανονικά το θνησιγόνο γονίδιο προκαλώντας το θάνατο των θηλυκών τους απογόνων (Thomas et al., 2000).

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν ο έλεγχος της αρρενοειδικότητας ικριωμάτων αλληλούχησης στο δάκο της ελιάς, *Bactrocera oleae*. Με την βοήθεια της βιοπληροφορικής είναι δυνατή η συναρμολόγηση των γονιδίων από μικρού μήκους reads ενώνοντας αρχικά αυτά που εμφανίζουν αλληλοεπικάλυψη σχηματίζοντας τα contigs. Ως ικρίωμα (scaffold) θεωρείται ένα τμήμα που προκύπτει από την σύνδεση των contigs λαμβάνοντας υπόψιν τη θέση και τον προσανατολισμό τους στο γονιδίωμα. Λόγω της φύσης του Υ χρωμοσώματος η συναρμολόγηση του σε ικρίωματα είναι δύσκολη καθώς οι πολλαπλές επαναλήψεις του δημιουργούν πρόβλημα κατά την σύνδεση των επιμέρους contigs στα οποία είναι χωρισμένο. Προς την κατεύθυνση αυτή ακολουθήθηκαν μοριακές προσεγγίσεις με στόχο την εύρεση αλληλουχιών που εντοπίζονται μόνο στα αρσενικά άτομα του δάκου. Η πραγματοποίηση αυτού του ελέγχου έγινε αρχικά με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) ενώ παράλληλα χρησιμοποιήθηκε και ποσοτική Real Time PCR. Τέλος, ακολούθησε *in silico* ανάλυση σε ορισμένες από αυτές τις αλληλουχίες για την εύρεση των ανοιχτών αναγνωστικών πλαισίων καθώς και της πιθανής ομολογίας τους με τις υπάρχουσες βάσεις δεδομένων.

3. Μέθοδοι - Υλικά

3.1 Βιολογικό υλικό: εργαστηριακός πληθυσμός *Bactrocera oleae*

Εργαστηριακοί πληθυσμοί δάκου διατηρούνται στον τομέα Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$), υγρασίας (60-65%) και φωτοπεριόδου (12:12 Φ:Σ) (Konstantopoulou et al., 2005). Για τη διατήρηση των ενηλίκων ατόμων χρησιμοποιούνται ξύλινα κλουβιά με παράθυρα καλυμμένα με σίτα στις τέσσερις πλευρές του κλουβιού. Συλλογή των αυγών πραγματοποιείται κάθε μέρα από τους κέρινους κώνους ωοτοκίας. Τα αυγά αμέσως μετά τη συλλογή τοποθετούνται για 24h σε τρυβλίο με διηθητικό χαρτί εμποτισμένο με προπιονικό οξύ 0,3% v/v και στη συνέχεια μεταφέρονται σε πλαστικά κύπελα, που περιέχουν τροφή για τις νεοεκκολαφθήσες προνύμφες, ενώ το απαραίτητο νερό προσφέρεται σε μπουκάλι που εμπεριέχει χαρτί (Tzanakakis et al., 1989).

3.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ενήλικα άτομα δάκου

Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από τους ενήλικους δάκους έγινε με την βοήθεια του Wizard® Genomic DNA Purification Kit της εταιρίας Promega. Ιδιαίτερη σημασία για την επιτυχία των πειραμάτων έχει η καθαρότητα του DNA που θα απομονωθεί. Μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό του DNA, ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, ώστε να ταυτοποιηθεί η ποιότητα και η ποσότητά του. Εκτός από τα παρεχόμενα από την κατασκευάστρια εταιρία αντιδραστήρια, για την εκτέλεση του πρωτοκόλλου χρειάστηκαν επίσης ποσότητες ισοπροπανόλης και αιθανόλης 70%.

Υλικά:

- ✓ Ενήλικα άτομα δάκου
- ✓ Nuclei Lysis solution (διατήρηση σε πάγο)
- ✓ Protein Precipitation solution
- ✓ Ισοπροπανόλη (διατήρηση σε πάγο)
- ✓ Αιθανόλη 70%
- ✓ TE Buffer ή H₂O
- ✓ TRNase
- ✓ Έμβολα (Pestles)
- ✓ Mixer

Αρχικά αιχμαλωτίζονται ενήλικοι αρσενικοί και θηλυκοί δάκοι σε falcon και τοποθετούνται σε πάγο μέχρι να αναισθητοποιηθούν. Παράλληλα απομακρύνεται η κοιλιά με νυστέρι καθώς περιέχει τα όργανα αναπαραγωγής και κατά την PCR ενδέχεται να δώσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε σύμφωνα με την κατασκευαστική εταιρία είναι το εξής:

1. Προσθήκη των δάκων σε eppendorf μαζί με 0,4ml Nuclei Lysis Solution. Το διάλυμα έχει ως σκοπό την διάρρηξη του πυρηνικού φακέλου για την απελευθέρωση των νουκλεϊκών οξέων στο μίγμα.
2. Ακολουθεί ομογενοποίηση με την βοήθεια εμβόλου και με κατάλληλο ομογενοποιητή (mixer) για ~10sec. Κατά την αφαίρεση του εμβόλου προσέχουμε να μην υπάρχουν υπολείμματα ιστών.
3. Επώαση σε προ θερμασμένο υδατόλουτρο στους 65°C για 15-30min.

4. Προσθήκη 135μl Protein Precipitation Solution. Η χρήση του διαλύματος αυτού επιτρέπει την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών και χρησιμεύει στην απομάκρυνση τους από τα μόρια των νουκλεϊκών οξέων.
5. Έντονη ανάδευση με την χρήση vortex και τοποθέτηση στον πάγο για 5min.
6. Φυγοκέντρηση για 5min στις 14000 rpm (max speed) σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Συλλέγεται το υπερκείμενο που περιέχει το DNA και τοποθετείται σε καθαρό errendorf. Η μεταφορά γίνεται με γρήγορες κινήσεις για να αποφευχθεί η ανάμιξη με το ίζημα.
8. Προστίθενται 400μl ισοπροπανόλης που συμβάλει στην κατακρήμνιση του DNA, το οποίο θα δημιουργήσει ένα άσπρο ίζημα και ακολουθεί ήπια ανάδευση με αναστροφή.
9. Φυγοκέντρηση για 3min στις 14000 rpm όπου καθιζάνει το γονιδιωματικό DNA.
10. Απόρριψη υπερκειμένου και προσθήκη στο ίζημα 500μl αιθανόλης 70% ώστε να ξεπλυθεί και να καθαριστεί. Η αιθανόλη διατηρεί το DNA σε αδιάλυτη μορφή ενώ ταυτόχρονα απομακρύνει υπολειπόμενα ίχνη ισοπροπανόλης.
11. Φυγοκέντρηση για 3min στις 14000 rpm.
12. Αφαίρεση υπερκειμένου και τοποθέτηση των errendorfs στον απαγωγό για 15min για την πλήρη εξάτμιση των υπολειμμάτων αιθανόλης (το δείγμα γίνεται πιο διάφανο) . Κατά την απόρριψη του υπερκειμένου δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στο DNA το οποίο μπορεί να κινείται.
13. Ενυδάτωση του ιζήματος σε 100μl TE Buffer (Tris-EDTA) ή H₂O θερμασμένο στους 65°C και τα δείγματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία 4°C για 1h.
14. Τέλος, προστίθενται 3μl TRNase, ακολουθεί ήπια ανάδευση με το χέρι και τοποθέτηση σε κλίβανο θερμοκρασίας 37°C για 30min.
15. Φύλαξη των δειγμάτων σε θερμοκρασία 4°C, όπου πρέπει να παραμείνουν για τουλάχιστον μία ημέρα μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός νουκλεϊκών οξέων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης επιτρέπει το διαχωρισμό, το χαρακτηρισμό και την απομόνωση τμημάτων DNA. Η ηλεκτροφόρηση είναι μια απλή και γρήγορη τεχνική, που λαμβάνει χώρα μέσα σε μια συσκευή που φέρει δύο πόλους για τη δημιουργία ηλεκτρικού πεδίου (συσκευή ηλεκτροφόρησης). Η ικανότητά της να αναλύει τμήματα DNA οφείλεται στο γεγονός ότι το DNA σε ουδέτερο pH έχει αρνητικό φορτίο, λόγω των φωσφορικών του ομάδων, με αποτέλεσμα υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου τα μόρια του να αναγκάζονται να κινηθούν προς την άνοδο, με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του δεκαδικού λογάριθμου (log₁₀) του μοριακού τους βάρους. Συνεπώς, ο διαχωρισμός των μορίων DNA γίνεται με βάση το μέγεθός τους (Helling R.B. et al., 1974).

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των μορίων DNA σε ένα πήκτωμα αγαρόζης περιγράφεται από την

$$\log M = \log M_0 - K_R T$$

εξίσωση:

όπου M_0 η ελεύθερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA και K_R ο συντελεστής καθυστέρησης, μια σταθερά που σχετίζεται με τις ιδιότητες του πηκτώματος, το μέγεθος και το σχήμα των προς ανάλυση μορίων. Επομένως, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του

DNA επηρεάζεται από την συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα, την στερεοδιαμόρφωση του DNA και την εφαρμοζόμενη τάση (Gary et al., 1972). Για παράδειγμα τα μικρότερα μόρια DNA, μετακινούνται μέσα στο πήκτωμα πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα κι έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός μορίων διαφορετικού μεγέθους.

Τέλος, η διεξαγωγή της ηλεκτροφόρησης μπορεί να παρατηρηθεί με γυμνό μάτι, λόγω των συστατικών του διαλύματος φόρτωσης, κυανό της ξυλόλης και μπλε της βρωμοφαινόλης των οποίων η κινητικότητα εξαρτάται από την συγκέντρωση της πηκτικής και μετακινούνται όπως ένα μεγάλο και μικρό μοριακού βάρους τμήμα αντίστοιχα (Helen Donis-Keller et al., 1977). Επειδή το πήκτωμα εμποδίζει την τυχαία διάχυση των μορίων, τα μόρια διαφορετικού μήκους διαχωρίζονται σε ζώνες και γίνονται ορατά με βρωμιούχο αιθίδιο. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια φθορίζουσα χρωστική που έχει την ικανότητα χάρη σε μια πλευρική ομάδα που διαθέτει να παρεμβάλλεται μεταξύ διαδοχικών ζευγών βάσεων του DNA και να δεσμεύεται σε αυτό, ενώ όταν ακτινοβολείται με υπεριώδες φως, δύναται να φθορίζει. Συγκεκριμένα η υπεριώδης ακτινοβολία που απορροφάται από το DNA στα 260nm μεταφέρεται στη χρωστική, η οποία επανεκπέμπεται στα 590nm στην κίτρινο-πορτοκαλί περιοχή του ορατού φάσματος (Russell et al., 2009). Έτσι, μπορεί να ανιχνευθεί ακόμα και ποσότητα 1ng DNA με άμεση εξέταση του πηκτώματος κατόπιν διέγερσης από υπεριώδη ακτινοβολία.

Υλικά Stock:

- ❖ Αγαρόζη
- ❖ Διάλυμα TBE 5X (1L: 54g Tris base, 27,5g Boric acid & EDTA 20ml 0,5M pH=8,0)
- ❖ Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 10mg/ml
- ❖ Διάλυμα φόρτωσης (loading dye) 6X
- ❖ Δείκτης μοριακών βαρών του DNA (DNA ladder)

Πρωτόκολλο ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης:

Για την παρασκευή 160ml πηκτώματος αγαρόζης 1,5% w/v 0,5X TBE ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα (Sambrook et al., 1989):

1. Προσθήκη 2,4g αγαρόζης σε κωνική φιάλη μαζί με 160 ml διαλύματος 0,5X TBE.
2. Ζύγιση της κωνικής φιάλης, έτσι ώστε μετά το πέρας της θέρμανσης να αναπληρωθεί η διαφορά στο βάρος με απιονισμένο νερό.
3. Τοποθέτηση του μίγματος σε φούρνο μικροκυμάτων και τακτική ανάδευση έως ότου να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη. Το σημείο τήξης της αγαρόζης κυμαίνεται μεταξύ των 85- 90°C ανάλογα δηλαδή με το φύκος από το οποίο έχει απομονωθεί.
4. Το διάλυμα ψύχεται σε τρεχούμενο νερό με συνεχή ανάδευση μέχρι την θερμοκρασία των 60°C και συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό (Helling R.B. et al., 1974).
5. Προσθήκη 6ml βρωμιούχου αιθιδίου, ανάδευση και έκχυση του μίγματος στο εκμαγείο ηλεκτροφόρησης, όπου έχουν ήδη τοποθετηθεί οι ειδικές διατάξεις (χτενάκια), για τη δημιουργία των θέσεων τοποθέτησης των δειγμάτων (πηγαδάκια). Προσοχή στη δημιουργία φυσαλίδων (απομάκρυνση με χρήση epT.I.P.S.).
6. Αναμονή μέχρι τη στερεοποίηση του πηκτώματος και αφαίρεση των χτενών.

Πορεία ηλεκτροφόρησης:

1. Μεταφορά του πηκτώματος στην οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και προσθήκη διαλύματος ηλεκτροφόρησης TBE 0,5X για την πλήρη κάλυψη της επιφάνειας του πηκτώματος.
2. Προσθήκη 2,5μl (1X) διάλυμα φόρτωσης στα δείγματα DNA. Η χρωστική θα συντελέσει στην παραμονή του DNA στον πάτο των πηγαδιών λόγω της γλυκερόλης και μιας ουδέτερης ηλεκτροφορητικά οργανικής μεγαλομοριακής ουσίας, της φικόλλης, που αυξάνει την πυκνότητα των δειγμάτων.
3. Τοποθέτηση των δειγμάτων καθώς και 2μl ladder (pBR322 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker) στα πηγαδάκια με τη βοήθεια μικροπιπέττας.
4. Η ανάλυση των δειγμάτων γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό σταθερή ένταση ρεύματος 100 Volt. Ο χρόνος αναμονής προσαρμόζεται ώστε να διακρίνονται με μεγαλύτερη ευκρίνεια οι διαφορετικές ζώνες του ladder (~1h).
5. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα μεταφέρεται σε πλάκα υπεριώδους φωτός, παρατήρησή και φωτογράφιση του πηκτώματος με τη χρήση ψηφιακής μηχανής. Μεταφορά των δεδομένων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή.

3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός DNA με το φθορισμόμετρο Qubit

Η ποσοτικοποίηση του DNA (Qubit™ 2.0, Invitrogen) επιτυγχάνεται με τη χρήση ουσίας που φθορίζει κατά την πρόσδεση στο δίκλωνο DNA, η οποία παρέχεται με το kit dsDNA BR. Η χρωστική αυτή εκπέμπει ακτινοβολία κατόπιν διέγερσης με κατάλληλο μήκος κύματος, η οποία διαφέρει κατά αρκετές τάξεις μεγέθους ανάλογα με το αν η χρωστική είναι ελεύθερη ή προσδεδεμένη στο μόριο του δίκλωνου DNA. Η μέτρηση πρότυπων διαλυμάτων (standards), που παρέχονται με το kit, επιτρέπει τον αυτοματοποιημένο σχεδιασμό καμπύλης βαθμονόμησης με βάση την οποία γίνεται η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης. Το εύρος της δοκιμασίας κυμαίνεται μεταξύ 2–1000ng (M O'Neill et., 2011).

Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα:

- ✓ Αντιδραστήριο Qubit® dsDNA BR (Component A), Qubit® Buffer
- ✓ Αντιδραστήριο Qubit® dsDNA BR (Component B), Qubit® Reagent
- ✓ Πρότυπο διάλυμα #1 Qubit® dsDNA BR (Component C), 0 ng/μl
- ✓ Πρότυπο διάλυμα #2 Qubit® dsDNA BR (Component D), 100 ng/μl
- ✓ Eppendorf tubes
- ✓ Vortex

Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευαστικής εταιρίας:

1. Ετοιμάζουμε το διάλυμα εργασίας (working solution) σε ένα eppendorf προσθέτοντας 199μl Qubit® Buffer και 1μl Qubit® Reagent για κάθε δείγμα. Αναδεύουμε έντονα.
2. Τοποθετούμε 190μl από το working solution σε δύο tubes για τα πρότυπα διαλύματα.

3. Προσθέτουμε 10μL από κάθε πρότυπο δείγμα στο αντίστοιχο tube και αναδεύουμε έντονα.
4. Τοποθετούμε 199μL από το working solution στα tubes για τα άγνωστα δείγματα.
5. Προσθέτουμε 1μL από το άγνωστο δείγμα σε κάθε tube και αναδεύουμε.
6. Επωάζουμε για 2min σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Μετράμε το φθορισμό των πρότυπων και των άγνωστων δειγμάτων με το φθορισμόμετρο Qubit 2.0.

3.5 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η ανάπτυξη της PCR συχνά παρομοιάζεται με αυτήν του Διαδικτύου καθώς μοιράζονται κοινά στοιχεία, αναδύθηκαν τα τελευταία χρόνια και αποτελούν αναπόσπαστο μέρος της ζωής. Η προέλευση της PCR χρονολογείται το 1983 όταν ο Mullis συνέλαβε την ιδέα (Bartlett 2003). Είναι μια *in vitro* ενζυμική μέθοδος μέσω της οποίας παράγονται πολυάριθμα αντίγραφα ενός μορίου DNA σε σύντομο χρονικό διάστημα. Ένζυμο-κλειδί στην κατάλυση της αντίδρασης είναι η θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (Taq πολυμεράση) που απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus Aquaticus*, η οποία μπορεί να επιβιώσει σε παρατεταμένη επώαση στους 95°C (Saiki et al., 1988). Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλιωνα μόρια DNA ως εκμαγεία για τη σύνθεση νέων συμπληρωματικών κλώνων με κατεύθυνση 5'-3'. Το ένζυμο απαιτεί την παρουσία ενός ολιγονουκλεοτιδικού τμήματος DNA για την έναρξη της σύνθεσης (εκκινητής-primer). Οι εκκινητές είναι συμπληρωματικοί των 3' άκρων των κλώνων του DNA που θέλουμε να αντιγράψουμε. Σε μια τυπική αντίδραση ένα μείγμα DNA αναμειγνύεται με τα τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), δυο εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια (primers) και την ειδική DNA πολυμεράση.

Τα 3 κύρια στάδια που διέπουν έναν κύκλο PCR περιλαμβάνουν:

- 1) **Το στάδιο της αποδιάταξης:** Το δείγμα θερμαίνεται στους 94-95°C προκειμένου να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου και να γίνει η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στις δύο μονόκλωνες αλυσίδες του.
- 2) **Το στάδιο της υβριδοποίησης:** Ακολούθως ψύχεται στην κατάλληλη θερμοκρασία για να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης (T_a) εξαρτάται από την θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (T_m) και καθορίζεται από την σχέση:

$$T_m = 4 \cdot (C_G + C_C) + 2 \cdot (C_A + C_T)$$

- $C_{[GCAT]}$: αριθμός των C, G, A, T

Thein & Wallace

- 3) **Το στάδιο της επιμήκυνσης:** Ακολουθεί πολυμερισμός στους 72-74°C, που είναι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου Taq πολυμεράση. Στο στάδιο αυτό η Taq πολυμεράση χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο την μονόκλωνη αλυσίδα και αναγνωρίζοντας την ελεύθερη –OH ομάδα, συνθέτει τη συμπληρωματική αλυσίδα, προσθέτοντας νουκλεοτίδια στο 3' άκρο του εκκινητή. Η σύνθεση του DNA συνεχίζεται έως ότου οι δυο νεοσυντιθέμενες αλυσίδες επιμηκυνθούν τόσο ώστε να περιέχουν περισσότερα νουκλεοτίδια από το επιθυμητό τμήμα του DNA. Η διάρκεια του πολυμερισμού εξαρτάται από το μήκος της πολλαπλασιαζόμενης ακολουθίας (Innis et al., 1988).

Ανάλογα με το μέγεθος του επιθυμητού προϊόντος ρυθμίζεται και ο αριθμός των κύκλων. Τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται για αρκετούς κύκλους (ο συνήθης αριθμός κύκλων είναι 30 διότι μετά τους 30 κύκλους η μέθοδος εμφανίζει συχνά λάθη). Η αντίδραση είναι εκθετική αφού σε κάθε κύκλο η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται. Ο υπολογισμός των τελικών αντιγράφων της αλληλουχίας προκύπτει ως 2^ν αντίγραφα του κάθε αρχικού μορίου DNA, όπου ν οι κύκλοι της PCR.

Στον πίνακα φαίνονται τα χαρακτηριστικά μιας τυπικής αντίδρασης PCR:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αρχική Αποδιάταξη	95°C	3min	1
Αποδιάταξη	95°C	30sec	30
Υβριδοποίηση	T _a °C	30sec	
Επιμήκυνση	72°C	20sec (60"/1kb)	
Τελική επιμήκυνση	72°C	2min	1
Διατήρηση	12°C	∞	-

Μεθοδολογία:

Η κατεργασία των δειγμάτων DNA πραγματοποιείται σε ειδικά PCR tubes, με την προσθήκη των παρακάτω αντιδραστηρίων με επιθυμητό τελικό όγκο 15μl:

Υλικά	Σαρχικό (Stock)	Στελικό	Ποσότητα
DNA (γενωμικό)	-	~40ng	1μl
Buffer	10X	1X	1,5μl
dNTPs	40mM (total)	0,8mM (total)	0,4μl
Primer Forward	10pmol/μl	0,7μM	0,7μl
Primer Reverse	10pmol/μl	0,7μM	0,7μl
Taq πολυμεράση (Maximo)	5units/μl	1unit	0,2μl
ddH ₂ O	-	-	10,5μl
Τελικός όγκος			15μl

Ταυτόχρονα πραγματοποιείται μια αντίδραση ελέγχου με όλα τα συστατικά εκτός του DNA, του οποίου η ποσότητα αντικαθίσταται από νερό, ως αρνητικός μάρτυρας.

Έπειτα τα tubes τοποθετούνται στον θερμοκυκλοποιητή με το κατάλληλο πρόγραμμα και αφήνονται να επωásουν για όση ώρα χρειάζεται.

3.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) με την χρήση OneTaq® DNA Polymerase

Για την περαιτέρω βελτιστοποίηση των δειγμάτων τα οποία εμφανίζουν αρκετά παραπροϊόντα, ενώ δεν εμφανίζουν ενίσχυση στο επιθυμητό μέγεθος πραγματοποιείται PCR με διαφορετική DNA πολυμεράση.

Μεθοδολογία:

Υλικά	Ποσότητα
DNA (γενωμικό)	1μl
5X OneTaq Standard Reaction Buffer	3μl
10 mM dNTPs	0,3μl
10 μM Forward Primer	0,3μl
10 μM Reverse Primer	0,3μl
OneTaq DNA Polymerase	0,075μl
ddH ₂ O	10,025μl
Τελικός όγκος	15μl

Παράλληλα έγινε χρήση άλλου προγράμματος για τον καθορισμό των σταδίων της PCR στο οποίο παραλήφθηκε το βήμα της τελικής επιμήκυνσης. Ο υπολογισμός της θερμοκρασίας υβριδοποίησης (T_a) έγινε σύμφωνα με το πρόγραμμα που παρείχε η κατασκευαστική εταιρία BioLabs® Inc..

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αρχική Αποδιάταξη	94°C	4min	1
Αποδιάταξη	94°C	30sec	30
Υβριδοποίηση	T _a °C	30sec	
Επιμήκυνση	68°C	10sec	
Διατήρηση	12°C	∞	-

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα στάδια, όπως και ο χρόνος της PCR:

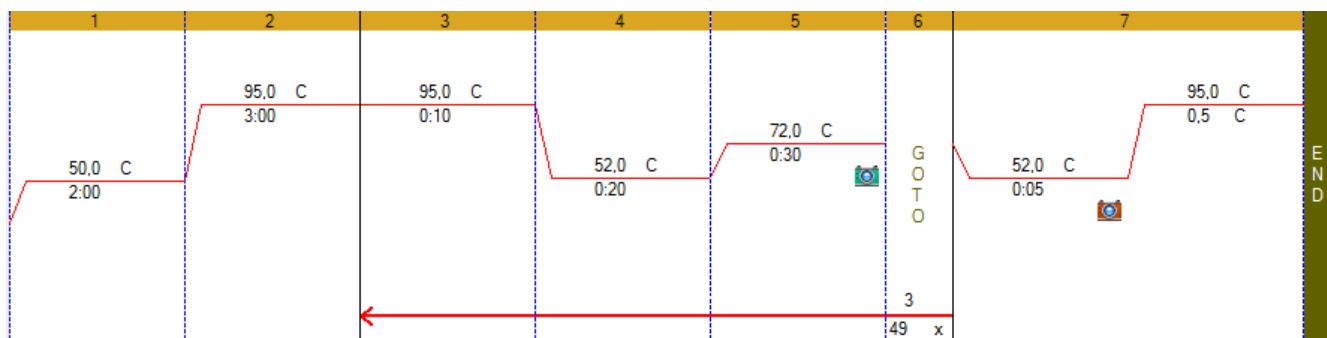
3.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)

Η τεχνολογία της PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) είναι διαθέσιμη εδώ και περισσότερο από δέκα χρόνια, αλλά σημειώνεται μεγάλη αύξηση στην εφαρμογή της τα τελευταία χρόνια (Schmittgen 2001). Στη Real-Time PCR, η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της

παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Η φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιείται ευρέως είναι η SYBR Green που ενσωματώνεται στο δίκλωνο μόριο DNA (dsDNA), διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497nm και εκπέμπει στα 520nm ενώ όταν βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα δεν φθορίζει. Η ενσωμάτωσή της SYBR στο DNA κατά τη διάρκεια της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού και η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος. Βασικό πλεονέκτημα της είναι η δυνατότητα να χρησιμοποιείται με οποιοδήποτε ζεύγος εκκινητών καθιστώντας την ιδιαίτερα οικονομική μέθοδο σε σχέση με τη χρήση κάποιου άλλου ειδικού ανιχνευτή.

Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (Bustin et al., 2005, Kubista et al., 2006).

Παράλληλα το μεγαλύτερο μέρος της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων γίνεται με υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το εκάστοτε μηχάνημα της PCR, με τη βοήθεια ειδικών λογισμικών, που επιτρέπουν τη γρήγορη και αξιόπιστη παρουσίαση τους.



Εικόνα 7: Στο στάδιο 1 πραγματοποιείται επώαση στους 50°C για 2min. Στο στάδιο 2 λαμβάνει χώρα η αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 3min. Στο στάδιο 3 έχουμε την αποδιάταξη στους 95°C για 10sec. Στο στάδιο 4 συμβαίνει ο υβριδισμός των εκκινητών στην εκάστοτε θερμοκρασία υβριδοποίησης (πχ 52°C) για 20sec. Στο στάδιο 5 γίνεται η επιμήκυνση στους 72°C για 30sec. Στο στάδιο 6 γίνεται επανάληψη των σταδίων 3,4,5 για 49 φορές. Τέλος, στο στάδιο 7 έχουμε τη σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας από τους 52°C στους 95°C κατά 0,5°C ανά 5sec για το σχηματισμό της καμπύλης τήξης (melt curve).

Στην εικόνα φαίνονται τα στάδια μιας τυπικής Real-Time PCR:

Υλικά:

- ✓ DNA
- ✓ Εκκινητές (Forward και Reverse 300nM ο καθένας)
- ✓ SYBR Green
- ✓ MasterMix (Mix διάλυμα το οποίο περιέχει: Taq DNA polymerase, dNTPs, MgCl₂, SYBR Green dye)
- ✓ H₂O

Ο συνολικός όγκος της κάθε αντίδρασης που πραγματοποιήθηκε είναι 15μl. Ανάλογα με την ποσότητα του DNA που προστίθεται αλλά και τον αριθμό των αντιδράσεων, οι ποσότητες των παραπάνω αντιδραστηρίων για τη δημιουργία του MasterMix ποικίλουν. Τα αντιδραστήρια τοποθετούνται σε ειδικά PCR tube strips και στη συνέχεια στον θερμοκυκλοποιητή.

3.8 Βιοπληροφορική ανάλυση των αρρενοειδικών εκκινήτων

Προκείμενου να εξακριβωθεί η φύση και ο ρόλος των προϊόντων που ενισχύθηκαν με τους Υ-ειδικούς εκκινήτες πραγματοποιήθηκε *in silico* ανάλυση.

3.8.1 Blast (Basic Local Alignment Search Tool)

Το πρόγραμμα Blast (Altschul et al., 1990) ανήκει στην κατηγορία των αλγορίθμων τοπικής στοίχισης που χρησιμοποιούνται καθημερινά στην βιοπληροφορική. Με την βοήθεια του είναι δυνατή η σύγκριση και η στοίχιση νουκλεοτιδικών και πρωτεϊνικών αλληλουχιών με βάση την ομολογία που εμφανίζουν. Το πρόγραμμα αναζητά και εντοπίζει ομόλογες περιοχές που είναι κατατεθειμένες στις βάσεις δεδομένων, που εμφανίζουν μερική τοπική ή πλήρης ομοιότητα με την αλληλουχία που έχει εισαχθεί από το χρήστη. Υπάρχουν διάφορες υποκατηγορίες του προγράμματος Blast ανάλογα με το είδος της αναζήτησης:

- Blastn: για σύγκριση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.
- Blastx: για την ταυτοποίηση πιθανών πρωτεϊνικών αλληλουχιών που κωδικοποιούνται από νουκλεοτιδικές αλληλουχίες.
- Blastp: για σύγκριση πρωτεϊνικών αλληλουχιών.
- tBlastn: για σύγκριση πρωτεϊνικών αλληλουχιών με νουκλεοτιδικές αλληλουχίες μεταφρασμένες σε όλα τα πιθανά αναγνωστικά πλαίσια.

Στην παρούσα εργασία η αναζήτηση πραγματοποιήθηκε μέσω των Blastx, Blastn με σκοπό να εντοπιστεί αν η ακολουθία που μας ενδιαφέρει εμφανίζει ομολογία στα Insecta.

3.8.2 OMIGA

Το πρόγραμμα OMIGA (Kramer 2001) αποτελεί ένα εργαλείο ανάλυσης νουκλεοτιδικών και πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Το πρόγραμμα αυτό παρέχει ένα εύρος δυνατοτήτων, συμπεριλαμβανομένων της δημιουργίας, ανάλυσης και επεξεργασίας αλληλουχιών, ενώ μέσω αυτού είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η ύπαρξη θέσεων περιορισμού, δομικών μοτίβων, αναγνωστικών πλαισίων και άλλων χαρακτηριστικών μίας αλληλουχίας.

Η συμβολή του προγράμματος ήταν ιδιαίτερα σημαντική αφού χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των αναγνωστικών πλαισίων των αλληλουχιών που ενισχύονται από τους Υ-ειδικούς εκκινήτες.

4. Αποτελέσματα

4.1 Ποσοτικοποίηση DNA

Προκειμένου να εξεταστεί η αρρενοειδικότητα των ικριωμάτων αλληλούχησης απαραίτητο βήμα ήταν η επιτυχής απομόνωση του DNA όπως και ο έλεγχος της ποιότητας του. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκε το DNA από τρία αρσενικά και τρία θηλυκά ενήλικα άτομα

1♂	42,8
2♂	66,6
3♂	56,8
1♀	110
2♀	69,8
2♀	65,0

δάκου. Στην συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στη συνέχεια το πήκτωμα τοποθετήθηκε στο μηχάνημα υπεριώδους φωτός, όπου ελέγχθηκε η επιτυχής ή όχι απομόνωση του DNA. Παράλληλα ποσοτικός προσδιορισμός του DNA έγινε και φθορισμομετρικά από τον αναλυτή Qubit® 2.0 Fluorometer της εταιρείας Invitrogen χρησιμοποιώντας το Qubit® dsDNA BR Assay Kit. Το Kit αυτό μπορεί να μετρήσει ποσοτικά γενωμικό DNA με εκτεταμένο εύρος από 5μg/ml έως 10μg/ml. Οι συγκεντρώσεις των έξι δειγμάτων DNA που προσδιορίστηκαν παρατίθενται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA με τη μέθοδο Qubit.



Εικόνα 8: Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.
♂: Male, ♀: Female, C: Αρνητικό control, L: ladder

Προκειμένου να εξασφαλιστεί η πιστότητα των αποτελεσμάτων τόσο στην PCR όσο και στην RT-PCR πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες αραιώσεις ώστε τα δείγματα DNA που θα χρησιμοποιηθούν να έχουν τελική συγκέντρωση 40ng/μl.

4.2 Ταυτοποίηση της αρρενοειδικότητας με την τεχνική της PCR

Για την πραγματοποίηση της παρούσας πτυχιακής χρησιμοποιήθηκαν 39 διαθέσιμα ζεύγη εκκινητών που προέκυψαν από αρρενοειδικά ικριώματα τα οποία σε θεωρητικό επίπεδο υβριδίζονταν με τις αλληλουχίες στόχους τους που βρίσκονταν στην ευρύτερη περιοχή του Υ χρωμοσώματος. Προκειμένου να διαπιστωθεί αυτή η αρρενοειδικότητα των εκκινητών πραγματοποιήθηκε σε ένα αρχικό στάδιο μια σειρά πειραμάτων που περιλάμβανε την τεχνική της PCR για την ενίσχυση των επιθυμητών στόχων και συνακόλουθα ηλεκτροφόρηση αυτών των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων και τον προσδιορισμό του μεγέθους του προϊόντος που ενισχύθηκε. Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το DNA από τρία αρσενικά και τρία θηλυκά ενήλικα άτομα δάκου, δείκτης γνωστού μοριακού βάρους (ladder) και αρνητικό control για τον έλεγχο τυχόν επιμολύνσεων. Με την τεχνική αυτή από τα 39 ζεύγη εκκινητών ταυτοποιήθηκαν 23 ζευγάρια ως αρρενοειδικά όπως φαίνεται και στον Πίνακα 2 ενώ για τα υπόλοιπα 16 δεν ήταν δυνατός ο χαρακτηρισμός τους.

Αρρενοειδικότητα		
Primers	YES	NO
A12		+
B1	+	
B2		+
B3		+
B4	+	
B5	+	
B6		+
B7	+	
B8		+
B9	+	
B10	+	
B11	+	
B12		+
C1		+
C2		+
C3	+	
C4		+
C5	+	
C6		+
C7	+	
C8	+	
C9		+
C10		+
C11	+	
C12		+
D1	+	
D2	+	
D3	+	
D4	+	

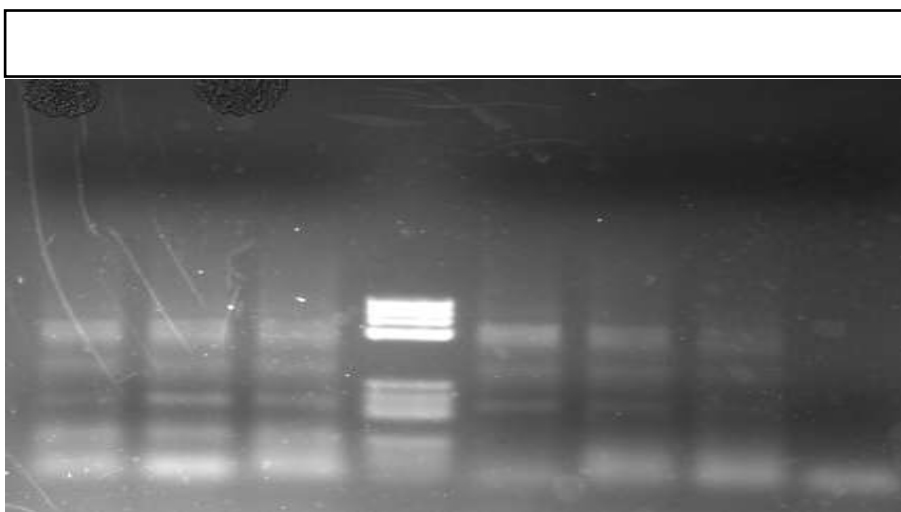
D5	+	
D6	+	
D7		+
D8	+	
D9		+
D10		+
D11	+	
D12	+	
H08	+	
H10	+	

Πίνακας 2: Αποτίμηση των χειρισμών της PCR.

Στις ακόλουθες εικόνες παρατίθενται ενδεικτικά κάποια από τα αποτελέσματα των πειραμάτων. Τα χαρακτηριστικά των εκκινητών αυτών παρατίθενται στο Παράρτημα.

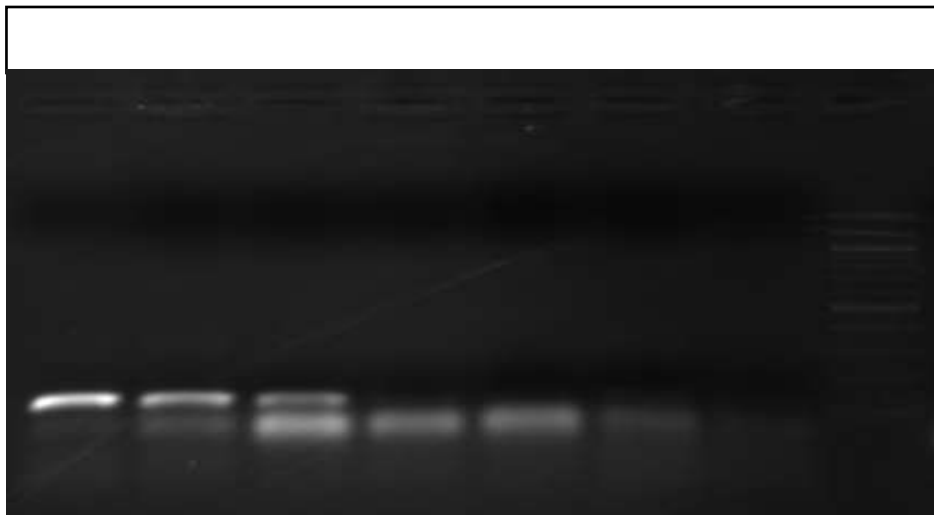


Εικόνα 9: Ανάλυση της PCR με τους primers D10 που ενισχύουν προϊόν μεγέθους 114bp.

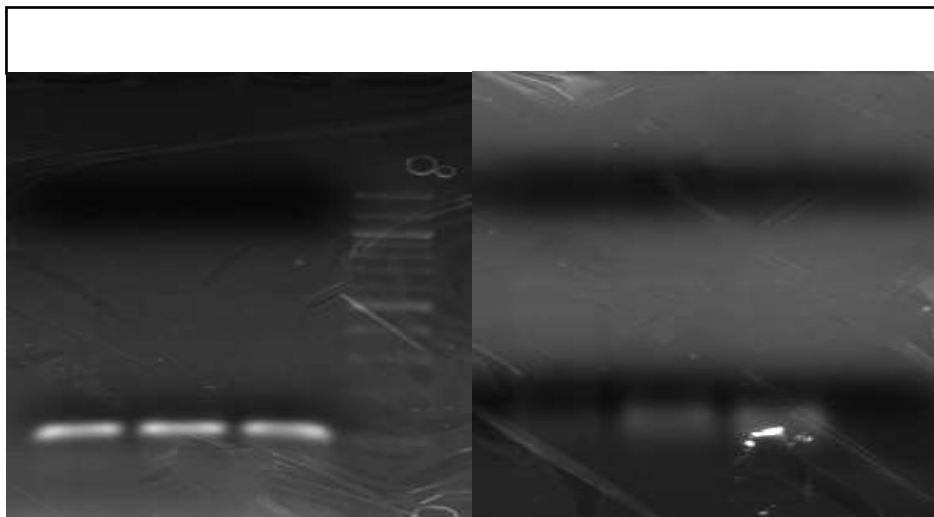




Εικόνα 11: Ανάλυση της PCR με τους primers C01 που ενισχύουν προϊόν μεγέθους 120bp.



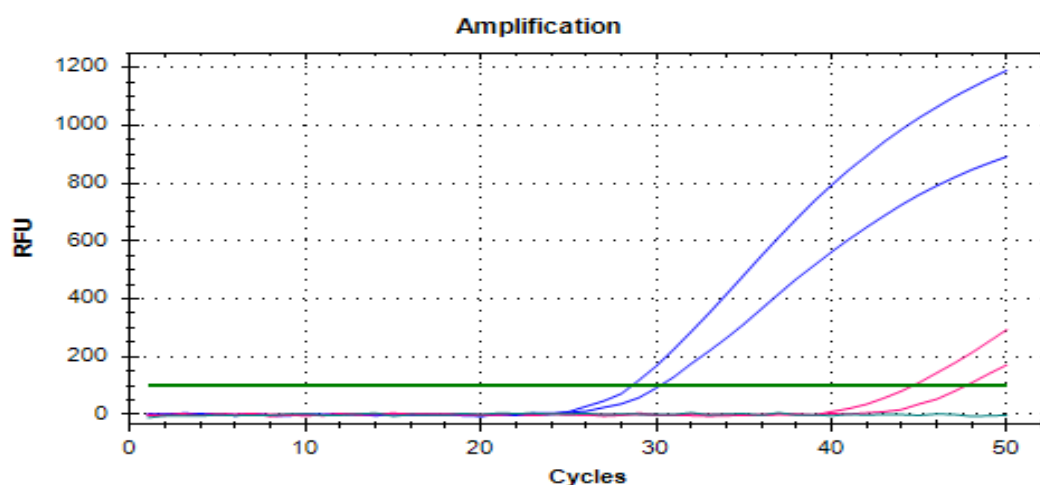
Εικόνα 12: Ανάλυση της PCR με τους primers H10 που ενισχύουν προϊόν μεγέθους 119bp.



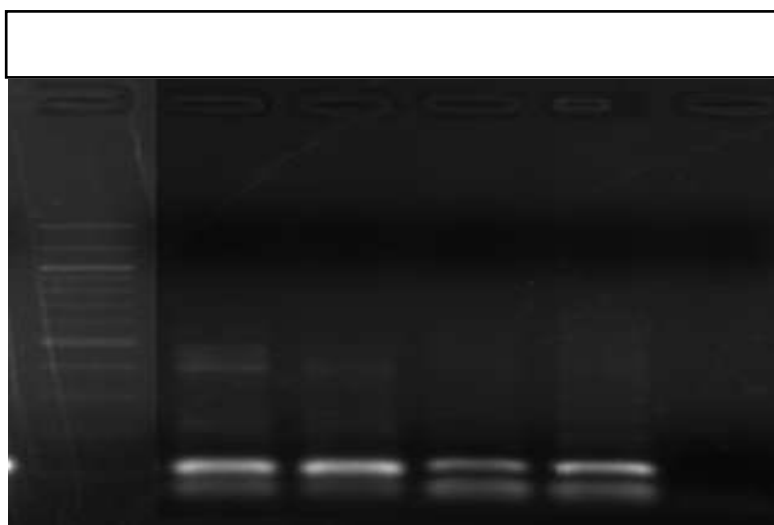
Εικόνα 13: Ανάλυση της PCR με τους primers H08 που ενισχύουν προϊόν μεγέθους 105bp.

4.3 Ανάλυση αριθμού αντιγράφων με την μέθοδο της RT-PCR

Κατά την διεξαγωγή της PCR δεν ήταν δυνατός ο χαρακτηρισμός 16 εκκινητών ως αρρενοειδικοί αφού στην ηλεκτροφόρηση διακρινόταν ενίσχυση τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά άτομα. Επίσης, θέλαμε να ελέγξουμε τον αριθμό των αντιγράφων σε πραγματικό χρόνο καθώς με την απλή PCR δεν ήταν δυνατή αυτή η ταυτοποίηση, οπότε ελέγχθηκαν μέσω ποσοτικής RT-PCR. Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ένα δείγμα DNA για κάθε φύλο και δύο τεχνικές επαναλήψεις (technical replicates) για κάθε δείγμα και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων για τον έλεγχο του μεγέθους τους. Στην εικόνα φαίνεται ενδεικτικά κάποιο από τα αποτελέσματα αυτών των χειρισμών.



Εικόνα 14: Καμπύλη ενίσχυσης της Real-Time PCR για τους εκκινητές C05. Με μπλε χρώμα διακρίνεται η καμπύλη των ενισχυμένων τμημάτων σε αρσενικά άτομα, με ροζ σε θηλυκά και με κυανό το αρνητικό control. Από την καμπύλη ενίσχυσης διακρίνονται οι διαφορές κατά την ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου.



Εικόνα 15: Ανάλυση της RT-PCR με τους primers C05 που ενισχύουν προϊόν μεγέθους 119 bp.

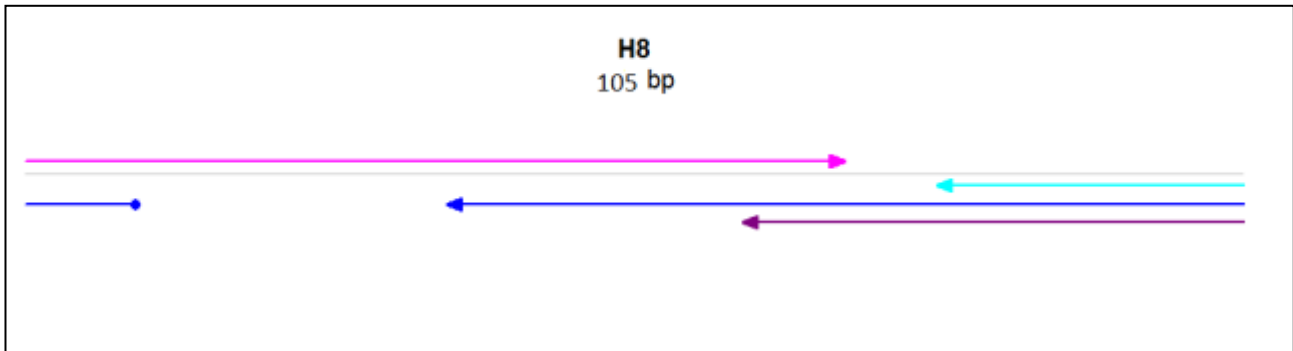
Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα που προέκυψαν με την RT-PCR φαίνονται στον Πίνακα 3.

Αρρενοειδικότητα		
Primers	YES	NO
A12		+
B2		+
B3		+
B6		+
B8		+
B12		+
C1		+
C2		+
C4		+
C5	+	
C6		+
C7		+
C8		+
C10		+
C11		+
D9		+
D10		+

Πίνακας 3: Αποτίμηση των χειρισμών της RT-PCR.

4.4 Βιοπληροφορική ανάλυση των γονιδίων

Μετά την ταυτοποίηση των αρρενοειδικών εκκινητών με τις παραπάνω μεθόδους πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση των 23 εκκινητών με στόχο την εύρεση ανοιχτών αναγνωστικών πλαισίων (ORF) και έπειτα έγινε αναζήτηση στις ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων για την εύρεση συντηρημένων περιοχών από μελέτες στα διάφορα είδη των εντόμων όπως και στον δάκο, ούτως ώστε να προσδιοριστεί δυνητικά ο πιθανός τους ρόλος. Η εύρεση των αναγνωστικών πλαισίων πραγματοποιήθηκε με την χρήση του προγράμματος OMIGA ενώ ο εντοπισμός ομολογιών σε αλληλουχίες μεταξύ των εντόμων έγινε με Blastn και Blastx. Μερικές από τις αλληλουχίες που ταυτοποιήθηκαν παρατίθενται παρακάτω.

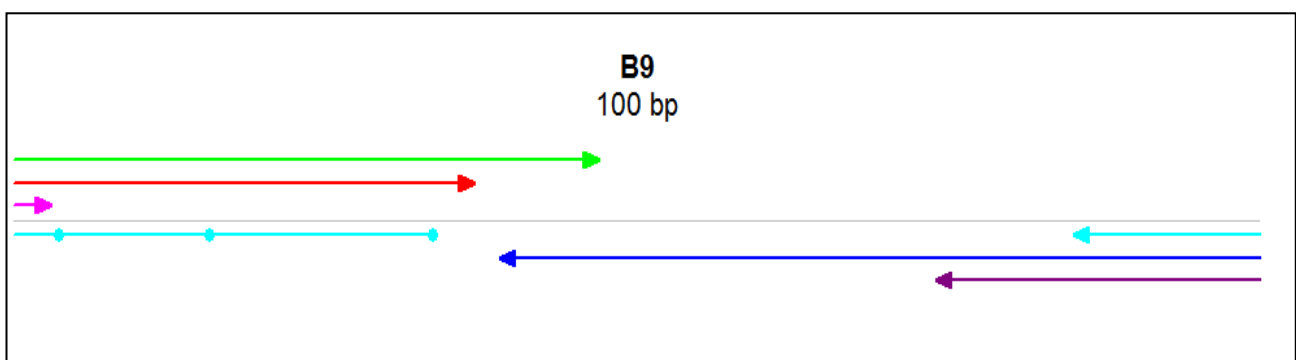


Εικόνα 16: Απεικόνιση των 5 ORF του προϊόντος ενίσχυσης των εκκινητών H08. Κάθε βέλος αντιπροσωπεύει και ένα ORF.

Με χρήση του Blastn προσδιορίστηκε η αλληλουχία που εμφάνιζε μεγαλύτερη ομολογία με τους H08 αρρενοειδικούς εκκινητές στο δάκο και σε άλλα είδη εντόμων. Για την διεκπεραίωση αυτής της ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε σαν αλληλουχία επερωτήματος η νουκλεοτιδική αλληλουχία του προϊόντος που ενισχύθηκε. Η αλληλουχία με την μεγαλύτερη ομολογία ήταν:

- Sialin [*Bactrocera dorsalis*], E value: 5e-38
- Sialin [*Bactrocera latifrons*], E value: 4e-33
- Sialin [*Bactrocera oleae*], E value: 2e-06

Με το Blastx δεν βρέθηκε καμία ομοιότητα με την αλληλουχία του επερωτήματος μας.

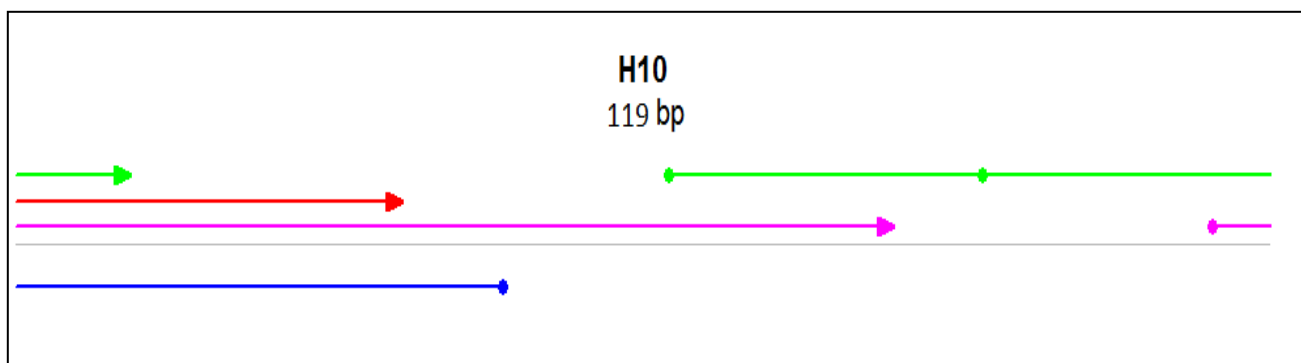


Εικόνα 17: Απεικόνιση των 9 ORF των εκκινητών B09.

Το Blastn για τους εκκινητές B09 έδωσε μεγαλύτερη ομολογία για:

- 16S ribosomal RNA, large subunit, mitochondrial gene [*Ophraella notulata*], E value: 0,24

Με το Blastx δεν βρέθηκε καμία ομοιότητα με την αλληλουχία του επερωτήματος μας.

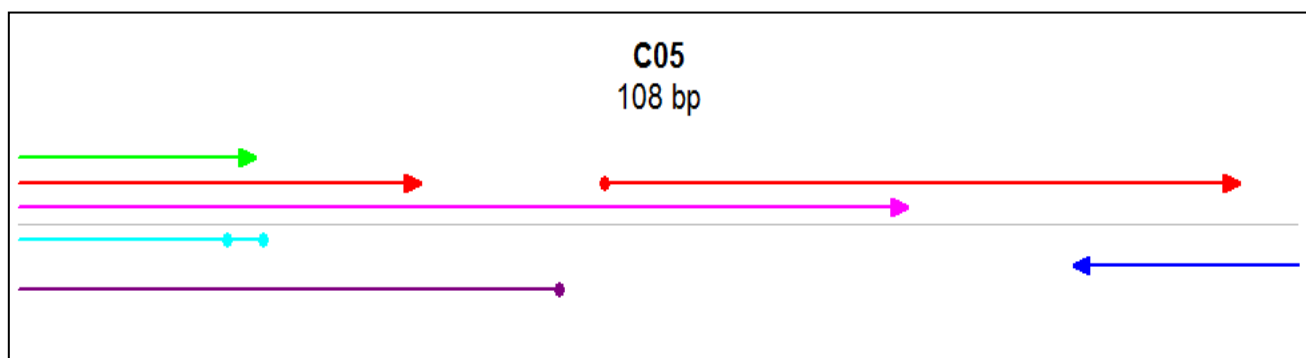


Εικόνα 18: Απεικόνιση των 7 ORF των εκκινητών H10.

Το Blastn για τους εκκινητές H10 έδωσε ομολογία για:

- Repetitive sequence mariner-like element Botmar1-9 [*Bombus terrestris*], E value: 1,1

Blastx: hypothetical protein [*Streptomyces albus*], E value: 0,43



Εικόνα 19: Απεικόνιση των 9 ORF των εκκινητών C05.

Το Blastn για τους εκκινητές C05 έδωσε μεγαλύτερη ομολογία για:

- cyclin-dependent kinase 14 [*Cyphomyrmex costatus*], E value: 3,3

Το Blastx δεν βρήκε καμία ομοιότητα με την αλληλουχία του επερωτήματος μας.

Για τα υπόλοιπα ζευγάρια εκκινητών τα αποτελέσματα τους παρατίθενται στον Πίνακα 4.

Primers	Μέγεθος προϊόντος (bp)	E value	Ομολογία
B1	100	0,11	Chromosome X (<i>Ovis canadensis</i>)
B4	118	0,41	Peroxisomal targeting 1 receptor (<i>Polistes canadensis</i>)
B5	106	0,4	Hypothetical protein (<i>Phytophthora parasitica</i>)
B7	116	6e-12	Partial mRNA (<i>Trichogramma pretiosum</i>)
B10	102	0,11	Transcript variant X2, mRNA (<i>Daucus carota</i>)
B11	111	5,2	Synapse associated protein 1 (SYAP1) (<i>Phascolarctos cinereus</i>)
C3	118	2e-05	Uncharacterized mRNA (<i>Rhagoletis zephyria</i>)
C7	113	4e-33	Importin-4 (<i>Bactrocera oleae</i>)
C8	113	0,13	Chromosome 9 (<i>Solanum lycopersicum</i>)
C11	108	7e-36	Chromosome 2 (<i>Agrobacterium rhizogenes</i>)
D1	107	0,010	CC chemokine receptor (<i>Sus scrofa</i>)
D2	100	0,009	Chromosome 4 (<i>Arabis alpine</i>)
D3	102	6e-05	Retrotransposon Achilles (<i>Bactrocera oleae</i>)
D4	102	5e-25	Importin-4 (<i>Bactrocera oleae</i>)
D5	103	1,3	genome assembly scaffold0052680 (<i>Dicrocoelium dendriticum</i>)
D6	103	2e-30	Imidazolonepropionase –like (<i>Pantholops hodgsonii</i>)
D8	120	0,003	Chromosome 3 (<i>Vigna angularis</i>)
D11	114	0,030	Chromosome 3 (<i>Theobroma cacao</i>)
D12	100	0,003	Transcription initiation factor subunit 7 (<i>Polistes dominula</i>)

Πίνακας 4: Αποτελέσματα που προκύπτουν από τη χρήση του Blast σχετικά με την ομολογία των προϊόντων που ενισχύουν οι εκκινητές με τις βάσεις δεδομένων.

5. Συζήτηση

Παρά τη λειτουργία του στον προσδιορισμό του φύλου και το ρόλο του στην εξέλιξη του γονιδιώματος, το Y χρωμόσωμα παραμένει ελάχιστα μελετημένο στα περισσότερα είδη. Το Y χρωμόσωμα είναι γονιδιακά φτωχό, πλούσιο σε επαναλήψεις και σε μεγάλο βαθμό ετεροχρωματινικό και επομένως αποτελεί ένα δύσκολο στόχο για τη γενετική μηχανική. Το Y χρωμόσωμα του δάκου της ελιάς *Bactrocera oleae* φαίνεται να εμπλέκεται στον προσδιορισμό του φύλου, αν και πολύ λίγα είναι γνωστά για τη δομή και τη λειτουργία του. Η εκτεταμένη ανάγκη για την εύρεση μεθόδων καταπολέμησης του δάκου έχει δώσει ώθηση στην έρευνα του εντόμου σε μοριακό και γενετικό επίπεδο. Οι μέθοδοι μοριακής ανίχνευσης του φύλου βασίζονται στη χρήση αρρενοειδικών γονιδιωματικών αλληλουχιών, δηλαδή αλληλουχιών που εντοπίζονται μόνο στο Y χρωμόσωμα. Στην οικογένεια των Tephritidae στην οποία ανήκει και ο δάκος της ελιάς, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι για την ανίχνευση του φύλου μοριακά κατά κύριο λόγο στη μεσογειακή μύγα *Ceratitis capitata* όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή. Η ανάπτυξη μοριακών και γενετικών τεχνικών θα βοηθήσει σημαντικά τόσο στη βελτιστοποίηση της τεχνικής του στείρου εντόμου η οποία μέχρι σήμερα παρουσιάζει προβλήματα στην εφαρμογή της όσο και στον διαχωρισμού του φύλου στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια (αυγό, νύμφη, προνύμφη) κάτι που θα συμβάλλει επίσης στην βελτίωση των τεχνικών αντιμετώπισης του δάκου.

Η παρούσα διπλωματική εργασία, αποτελεί μια προσπάθεια για τον έλεγχο αρρενοειδικών ικριωμάτων αλληλούχησης στο δάκο της ελιάς, *Bactrocera oleae* με την βοήθεια εκκινητών που ήταν διαθέσιμοι στο εργαστήριο.

Για τον σκοπό αυτό απαραίτητο βήμα ήταν αρχικά η απομόνωση του DNA από τρία αρσενικά και τρία θηλυκά ενήλικα άτομα δάκου για να αποτελέσουν τα δείγματα πάνω στα οποία έγινε ο έλεγχος της αρρενοειδικότητας των διαθέσιμων εκκινητών. Κατά την απομόνωση του γενετικού υλικού από τους ενήλικους δάκους χρησιμοποιήθηκε μόνο το κεφάλι και ο θώρακας και όχι η κοιλία, καθώς σε αυτήν την περιοχή υπάρχει το αναπαραγωγικό σύστημα, η ύπαρξη του οποίου μπορεί να δώσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα κατά τη μετέπειτα ανάλυση λόγω πιθανής σύζευξης. Προκειμένου να υπάρξει μεγαλύτερη ακρίβεια στα αποτελέσματα μας τα DNA που απομονώθηκαν ποσοτικοποιήθηκαν. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 8 κατά την ηλεκτροφόρηση η ποσότητα του 3♂ είναι λιγότερη ως προς την ένταση σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Επίσης, το 1♀ έχει πιο μεγάλη ένταση συγκριτικά με τα άλλα δείγματα.

Σε ένα αρχικό στάδιο πραγματοποιήθηκε έλεγχος της αρρενοειδικότητας των εκκινητών μέσω απλής PCR και στην συνέχεια ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση τους σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% καθώς το μέγεθος των αναμενομένων προϊόντων κυμαινόταν από 100-120bp. Σκοπός της PCR ήταν η ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου των εκάστοτε εκκινητών ενώ μέσω της ηλεκτροφόρησης ήταν δυνατή η οπτικοποίηση αυτών των αποτελεσμάτων. Για τον χαρακτηρισμό ενός ζεύγους εκκινητών ως αρρενοειδικό μέσω της PCR έπρεπε κατά την ηλεκτροφόρηση να βλέπαμε ενίσχυση μόνο στα αρσενικά άτομα. Ωστόσο, κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων συναντήσαμε αρκετές περιπτώσεις ενίσχυσης και μη των επιθυμητών προϊόντων. Στην Εικόνα 9 έγινε χρήση των εκκινητών D10 οι οποίοι ενίσχυσαν το επιθυμητό προϊόν των 114bp τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά άτομα γεγονός που τους αποκλείει από τον χαρακτηρισμό τους ως αρρενοειδικοί. Στην Εικόνα 11 γίνεται αντιληπτό ότι δεν ήταν δυνατή η ενίσχυση οποιουδήποτε τμήματος γιατί οι εκκινητές C01 δεν βρήκαν συμπληρωματικότητα με το δείγμα μας. Οι Εικόνες 12 και 13 αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα των περιπτώσεων όπου οι εκκινητές ενίσχυσαν το επιθυμητό προϊόν μόνο στα αρσενικά άτομα του δάκου.

Στην Εικόνα 10 διακρίνεται η ζώνη των 100bp μόνο στα αρσενικά άτομα η οποία προέκυψε ύστερα από την πραγματοποίηση της PCR με την OneTaq® DNA Polymerase αφού με τη χρήση της πολυμεράσης Maximo ήταν δυνατή η ενίσχυση μόνο παραπροϊόντων και όχι της ειδικής ζώνης που θέλαμε.

Επόμενο βήμα ήταν η ανάλυση των εκκινητών οι οποίοι με την PCR έδιναν ενίσχυση και στα δύο φύλα. Για να αποφανθούμε σχετικά με την αρρενοειδικότητα αυτών των εκκινητών εξετάστηκε ο αριθμός των αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου στο γονιδίωμα του δάκου. Αυτό έγινε με τη χρήση της μεθόδου RT-PCR. Για παράδειγμα στην Εικόνα 15 φαίνεται ότι το προϊόν των 119bp ενισχύεται τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά, όμως στην Εικόνα 14 στην καμπύλη ενίσχυσης παρατηρούμε ότι η τιμή Ct στα αρσενικά άτομα είναι μικρότερη από ότι στα θηλυκά. Επίσης, είναι γνωστό ότι η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος και άρα όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος υποδεικνύοντας την ύπαρξη περισσότερων αντιγράφων στο αρσενικό άτομο. Πραγματοποιήθηκαν και δυο τεχνικές επαναλήψεις για κάθε φύλο ώστε να είμαστε σίγουροι ότι οι διαφορές που θα προκύπτανε θα οφείλονταν μόνο στην ύπαρξη ή όχι του γονιδίου στόχου και όχι σε τεχνικά λάθη κατά την RT-PCR.

Ακολούθησε η βιοπληροφορική ανάλυση των γονιδίων που χαρακτηρίστηκαν ως αρρενοειδικά. Κύριος λόγος αυτής της ανάλυσης ήταν η εύρεση των ανοιχτών αναγνωστικών πλαισίων ώστε να σιγουρευτούμε ότι η αλληλουχία μας μεταγράφεται σε κάποιο από τα έξι αναγνωστικά πλαίσια. Αυτό διαπιστώθηκε ύστερα από τη χρήση του προγράμματος OMIGA (Εικόνες 16-19). Τέλος, σημαντική ήταν η συμβολή του ευρετικού αλγόριθμου Blast για τον προσδιορισμό των ομόλογων τμημάτων που ενισχύσαμε στην οικογένεια των Terphritidae με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα την εύρεση της Sialin, που εμφάνιζε μεγάλη ομολογία με τον δάκο, ενός ανιονικού/κατιονικού μεταφορέα που μεταφέρει το σιαλικό οξύ. Ωστόσο μελέτες που έγιναν στην *D. Melanogaster* δεν αναφέρουν αυτή την πρωτεΐνη ως Y-ειδική (Laridon et al., 2007).

☞ **Μελλοντικοί στόχοι**

Η δημιουργία προφίλ έκφρασης για αυτά τα γονίδια που βρέθηκαν να είναι αρρενοειδικά είναι ένα άμεσο βήμα για να καθοριστεί και ο ρόλος τους. Πρακτικά θα γίνει απομόνωση των ιστών από όλα τα αναπτυξιακά στάδια του δάκου (αυγό, προνύμφη, νύμφη) προκειμένου να ταυτοποιηθεί το χρονικό διάστημα της έκφρασης αυτών των γονιδίων. Στη συνέχεια θα πρέπει να γίνει αποσιώπηση των συγκεκριμένων γονιδίων έτσι ώστε να μπορέσουμε να καταλήξουμε στη λειτουργία αυτών των γονιδίων και να βγάλουμε ασφαλή συμπεράσματα για το αν συμμετέχουν πράγματι στη διαδικασία του φυλοκαθορισμού και αν εμπλέκονται στη γονιμότητα ή όχι.

6. Παράρτημα

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα ονόματα των εκκινητών που αναλύθηκαν, η αλληλουχία τους και η θερμοκρασία αποδιάταξης τους.

Primer	Sequence Name	Sequence	Tm
B09	Y_Contig3086_120bpF	CGCTGAGCCTGGTTCGATAT	57
B09	Y_Contig3086_120bpR	GGATCACTGTCGATTTGCGC	57
C01	Y_Contig2504_101bpF	AAATTAAGTTTTCCCGCGGCG	57
C01	Y_Contig2504_101bpR	TCCGTAACATCGCTTGTGGA	56
C05	Y_Contig10165_119bpF	AGCTCATAGATGGCGCCAAA	57
C05	Y_Contig10165_119bpR	TGTACGCAACGAAGACAAAATGA	55
D10	Y_Contig5925_107bpR	GCCTACCCAAACGTAGCGTA	57
D10	Y_Contig5925_107bpF	AGCGGCTGCAATGTCAAATG	57
H08	Y_Contig8079_105bpF	TTGCTTTGGTTCGTGTTGGG	56
H08	Y_Contig8079_105bpR	TCCACGAATTTTTGTGCGGC	57
H10	Y_Contig4_119bpF	TGCCGATCGTATTGACCAGG	57
H10	Y_Contig4_119bpR	ACGATGACACACAAGACGTCA	56

7. Βιβλιογραφία

- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287:2185-2195.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Andrew Brantley Hall, Philippos-Aris Papatianos, Atashi Sharma, Changde Cheng, Omar S. Akbari, Lauren Assour, Nicholas H. Bergman, Alessia Cagnetti, Andrea Crisanti, Tania Dottorini, Elisa Fiorentini, Roberto Galizi, Jonathan Hnath, Xiaofang Jiang, Sergey Koren, Tony Nolan, Diane Radune, Maria V. Sharakhova, Aaron Steele, Vladimir A. Timoshevskiy, Nikolai Windbichler, Simo Zhang, Matthew W. Hahn, Adam M. Phillippy, Scott J. Emrich, Igor V. Sharakhov, Zhijian Jake Tu, and Nora J. Besansky (2016). Radical remodeling of the Y chromosome in a recent radiation of malaria mosquitoes PNAS doi:10.1073/pnas.1525164113
- Andrew Brantley Hall, Sanjay Basu, Xiaofang Jiang, Yumin Qi, Vladimir A. Timoshevskiy, James K. Biedler, Maria V. Sharakhova, Rubayet Elahi, Michelle A. E. Anderson, Xiao-Guang Chen, Igor V. Sharakhov, Zach N. Adelman, Zhijian Tu (2015). A male-determining factor in the mosquito *Aedes aegypti*. *Science* DOI: 10.1126/science.aaa2850.
- Anleitner J. E. and D. S. Haymer (1992). Y-enriched and Y-specific DNA sequences from the genome of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Chromosoma* 101: 271-278.
- Balakireva, M. D., Y. Ya. Shevelyov, D. I. Nurminsky, K. J. Livak and V. A. Gvozdev (1992). Structural organization and diversification of Y-linked sequences comprising *Su(Ste)* genes in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.* 20: 3731–3736.
- Betran E, Thornton K, Long M. (2002). Retroposed new genes out of the X in *Drosophila*. *Genome Res.* 12:1854–1859.
- Bonaccorsi S, Santini G, Gatti M, Pimpinelli S, Colluzzi M (1980). Intraspecific polymorphism of sex chromosome heterochromatin in two species of the *Anopheles gambiae* complex. *Chromosoma* 76(1):57–64.
- Bozzetti, M. P., S. Massari, P. Finelli, F. Meggio, L. A. Pinna et al., (1995). The *Ste* locus, a component of the parasitic *cry-Ste* system of *Drosophila melanogaster*, encodes a protein that forms crystals in primary spermatocytes and mimics properties of the b subunit of casein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6067–6071.
- Bram Laridon, Patrick Callaerts, Koen Norga (2007). Embryonic expression patterns of *Drosophila* ACS family genes related to the human sialin gene. *Gene Expression Patterns* 8 (2008) 275–283.
- Bree TR, McLoughlin S, Jin WS, McMeel MO, Stainier YD, et al (2005). Nanor, a novel zygotic gene, is expressed initially at the midblastula transition in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun*, 333(3):722-728.
- Brosseau, G.E. (1960). Genetic analysis of the male fertility factors on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 45, 257–274.
- Bull JJ. (1983). Evolution of sex-determining mechanisms. Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings.

- Bustin S. A., Benes V., Nolan T., and Pfaffl M. W., (2005). Quantitative real-time RT-PCR- a perspective. *J Mol Endocrinol* 34, 597-601.
- CALVIN B. BRIDGES (1914). DIRECT PROOF THROUGH NON-DISJUNCTION THAT THE SEX-LINKED GENES OF DROSOPHILA ARE BORNE BY THE X-CHROMOSOME. *Science*, Vol. 40, Issue 1020, pp. 107-109 DOI: 10.1126/science.40.1020.107.
- Carvalho, A. B., B. A. Dobo, M. D. Vbranovski and A.G.Clark (2001). Identification,of, five new genes on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 13225-30.
- Charlesworth D, Charlesworth B, Marais G. (2005). Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. DOI: 10.1038/sj.hdy.6800697.
- Cherise J. B. Rohr, Hilary Ranson, Xuelan Wang, and Nora J. Besansky (2002). Structure and Evolution of mtanga, a Retrotransposon Actively Expressed on the Y Chromosome of the African Malaria Vector *Anopheles gambiae*.
- Clements A.N. (1992). *The Biology of Mosquitoes: Development, nutrition, and reproduction*, Chapman & Hall.
- Condon K., Condon G., Dafa'allab T., Fu G., Phillips C., Jin L., Gong P., Alphey L. (2007). Genetic sexing through the use of Y-linked transgenes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37: 1168-1176.
- COOPER K W. (1959). Cytogenetic analysis of major heterochromatic elements (especially Xh and Y) in *Drosophila melanogaster* and the theory of "heterochromatin". *Chromosoma* 10 : 535-588.
- Cooper KW (1964). Meiotic conjunctive elements not involving chiasmata. *Proc. Natl Acad Sci* 52:1248-1255.
- Diatchenko L, Lau FY, Campbell PA, Chenchik A, Moqadam F, et al (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(12):6025-6030.
- DOBZHANSKY TH, (1929). The influence of the quantity and quality of chromosomal material on the size of the cells in *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux' Arch.* 115: 363-379.
- Dobzhansky T. (1935). *Drosophila Miranda*, a New Species. *Genetics*, 20(4), 377–391.
- Donnell MD, Strand RM (2006). Caste-based differences in gene expression in the polyembryonic wasp *Copidosoma floridanum*. *Insect Biochem Mol Biol*, 36(2):141-153.
- Doris Bachtrog , Judith E. Mank, Catherine L. Peichel, Mark Kirkpatrick, Sarah P. Otto, Tia-Lynn Ashman, Matthew W. Hahn, Jun Kitano, Itay Mayrose, Ray Ming, Nicolas Perrin, Laura Ross, Nicole Valenzuela, Jana C. Vamosi, (2014). Sex Determination: Why So Many Ways of Doing It? *PLoS Biol.* 12, e1001899 doi:10.1371/journal.pbio.1001899.
- Drysdale R. (2008). FlyBase: a database for the *Drosophila* research community. *Methods Mol.Biol.* 420: 45–59.
- Duguid RJ, Dinauer CM (1990). Library subtraction of in vitro cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection. *Nucleic Acids Res*, 18(9):2789-2792.
- FISHER, R. A. (1931), THE EVOLUTION OF DOMINANCE. *Biological Reviews*, 6: 345–368. doi:10.1111/j.1469-185X.1931.tb01030.x.

- Franz G. (2005). Genetic sexing strains in Mediterranean fruit fly, and example for other species amenable to large scale rearing for the sterile insect technique. In: Sterile Insect Technique. Dyck, V., Hendrichs, J., Robinson, A. (Eds.). Springer, the Netherlands. Pp. 427-451.
- Franz G. and P. Kerremans (1994). Requirements and strategies for the development of genetic sex separation systems with special reference to the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, pp.113-122 in Fruit Flies and the Sterile Insect Technique, edited by C. A. CALKINS, W. KIASSEN and P. LIEDOC. CRC Press, Boca Raton. FL.
- Franz G., Robinson A. (2011). Molecular technologies to improve the effectiveness of the sterile insect technique. *Genetica* 139: 1-5.
- G. S. van Doorn & M. Kirkpatrick (2007). Turnover of sex chromosomes induced by sexual conflict. doi:10.1038/nature06178;
- Gabrieli P, Gomulski ML, Bonomi A, Siciliano P, Scolari F, et al (2011). Interchromosomal duplications on the *Bactrocera oleae* Y chromosome imply a distinct evolutionary origin of the sex chromosomes compared to *Drosophila*. *PLoS ONE*, 6(3):e17747.
- Gary A. Banker and Carl W. Cotman. Measurement of Free Electrophoretic Mobility and Retardation Coefficient of Protein-Sodium Dodecyl Sulfate Complexes by Gel Electrophoresis: A METHOD TO VALIDATE MOLECULAR WEIGHT ESTIMATES *J. Biol. Chem.* 1972 247: 5856-5861.
- Goldstein LSB, Hardy RW, Lindsley, DL (1982): Structural genes on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79:7405-7409.
- Graves JAM, Peichel CL. 2010. Are homologies in vertebrate sex determination due to shared ancestry or to limited options? *Genome Biol.* 11:205.
- Hardy RW, Tokuyasu KT, Lindsley DL (1981). Analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster* bearing deletions for Y-chromosome fertility genes. *Chromosoma* 83:593-617.
- Hardy, R. W., Lindsley, D. L., Livak, K. J., Lewis, B., Siversten, A. L., Joslyn, G. L., Edwards, J. and Bonaccorsi, S. (1984). *Genetics* 1017, 591-610.
- Heitz E (1933) Cytologische Untersuchungen an Dipteren. III. Die somatische Heteropyknose bei *Drosophila melanogaster* und ihre genetische Bedeutung. *Z Zellforsch* 20:237-287.
- Helen Donis-Keller, Allan M. Maxam, Walter Gilbert; Mapping adenines, guanines, and pyrimidines in RNA. *Nucleic Acids Res* 1977; 4 (8): 2527-2538. doi: 10.1093/nar/4.8.2527
- Helling RB, Goodman HM, Boyer HW. Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambda-doid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol.* 1974 Nov;14(5):1235-44.
- Hemlata Srivastava, Jyotsana Dixit, Aditya P. Dash, Aparup Das (2009). Fine-scale evolutionary genetic insights into *Anopheles gambiae* X-chromosome doi 10.4236/jbise.2009.25045.
- HILLIKER A. J. and R. APPELS (1982). Pleiotropic effects associated with the deletion of heterochromatin surrounding *Rdna* on the X chromosome of *Drosophila*. *Chromosoma* 86: 469- 490.
- Innis, M. A., Myambo, K. B., Gelfand, D. H., & Brow, M. A. (1988). DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain

- reaction-amplified DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 85(24), 9436–9440.
- Joan E. Anleitner and David S. Haymer (1991). Y enriched and Y specific DNA sequences from the genome of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*.
 - John M. S. Bartlett, David Stirling (2003). A Short History of the Polymerase Chain Reaction. Humana Press 10.1385/1-59259-384-4:3.
 - K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction *Cold Spring Harb Symp. Quant. Biol.* 51, 263-273.
 - Kaufmann B.P (1933). Interchange between X- and Y-chromosomes in attached X females of *Drosophila melanogaster*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 19, 830--838.
 - Klassen W., Curtis C. (2005). History of the sterile insect technique. In: Sterile Insect Technique. Dyck, V., Hendrichs, J., Robinson, A. (Eds). Springer, The Netherlands. Pp. 3-36.
 - Konstantopoulou, M.A. & Mazomenos, Evaluation of *Beauveria bassiana* and *B. brongniartii* strains and four wild-type fungal species against adults of *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata* B.E. Biocontrol (2005) 50: 293-305. doi:10.1007/s10526-004-0458-4.
 - Kramer, J. A. (2001). Omega™: a PC-based sequence analysis tool. Molecular biotechnology, 19(1), 97-106.
 - Krzywinska E, Dennison NJ, Lycett GJ, Krzywinski J. (2016). A maleness gene in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. Science doi: 10.1126/science.aaf5605.
 - Kubista M., Andrade J. M., Bengtsson M., Forootan A., Jonak J., Lind K., Sindelka R., Sjoback R., Sjogreen B., Strombom L., et al., (2006). The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med 27, 95-125.
 - LOHE, A. R., and P. A. ROBERTS (1988). Evolution of satellite DNA sequences in *Drosophila*, pp 148-186 In Heterochromatin: Molecular and Structural Aspects, edited by R. VERMAC. Ambridge University Press, Cambridge.
 - M O'Neill, J McPartlin, K Arthure, S Riedel and Nd McMillan (2011). Comparison of the TLDA with the Nanodrop and the reference Qubit system doi:10.1088/1742-6596/307/1/012047.
 - Marin I, Baker BS. (1998). The evolutionary dynamics of sex determination. Science 281:1990–1994.
 - Meyer GF, Hess O, Beermann W (1961). Phasenspezifische Funktionsstrukturen in den Spermatocytenkernen von *Drosophila melanogaster* und ihre Abhängigkeit vom Y-chromosom. Chromosoma 12:676-716.
 - Miller D. (2004). Sex determination: insights from the human and animal models suggest that the mammalian Y chromosome is uniquely specialized for the male's benefit. The Journal of Men's Health & Gender, 1, 170-181.
 - NICOLETTI B and D. L. LINDSLEY (1960). Translocations between the X and Y chromosomes of *Drosophila melanogaster*. Genetics 45: 1705-1 722.
 - Ohno S. (1969). Evolution of sex chromosomes in mammals. Annu. Rev. Genet. 3:495–524.
 - Parisi M, Nuttall R, Naiman D, Bouffard G, Malley J, Andrews J, Eastman S, Oliver B. (2003). Paucity of genes on the *Drosophila* X chromosome showing male-biased expression. Science 299:697–700.

- PEACOCK J.A.R. LOHE, W.L. GERLACHP, DUNSMUIRE, S. DENNIS and R. APPELS, (1977). Fine structure and evolution of DNA in heterochromatin. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42: 1121-1135.
- Peter A, P. Schottler, M. Werner, N. Beinert, G. Dowe et al., (2002). Mapping and identification of essential gene functions on the X chromosome of *Drosophila*. *EMBO Rep.* 3: 34–38.
- Pimpinelli S, Santini G, Gatti M (1978). 3H-Actinomycin-D binding to mitotic chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 66 : 389-395.
- Pimpinelli, S., S. Bonaccorsi, M. Gatti and L. Sandler (1986). The peculiar genetic organization of *Drosophila* heterochromatin *Trends Genet.* 2: 17–20.
- Qin Zhou, Pia M Untalan, David S Haymer (2000). Repetitive A-T rich DNA sequences from the Y chromosome of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. *Genome*, 43:434-438, 10.1139/g99-133.
- Rebrikov VD, Britanova VO, Gurskaya GN, Lukyanov AK, Tarabykin SV, et al (2000). Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. *Nucleic Acids Res*, 28(20):E90.
- Renkawitz-Pohl R, K H. Glaetzer and W. Kunz (1980). Characterization of cloned ribosomal DNA from *Drosophila hydri*. *Nucleic Acids Res.* 8: 4593- 4611.
- Rice, W. (1996). Evolution of the Y Sex Chromosome in Animals. *BioScience*, 46(5), 331-343. doi:10.2307/1312947.
- RITOSSA F. M., K.C. ATWOODD, L. LINDSLEY and S. SPIEGELMAN (1966). On the chromosomal distribution of DNA complementary to ribosomal and soluble RNA. pp. 449-472. *National Cancer Institute Monograph No. 23*.
- Roessler Y. and Y. Koltin (1976). The genetics of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis cupitata*: three morphological mutations. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 69: 604-608.
- Russell PJ. 2009. *iGenetics: Μία μεντελική προσέγγιση (1η έκδοση)*. Pearson Education, Inc.- Benjamin Cummings. Ελληνική μετάφραση.
- Saiki, R. Scharf, S. Faloona, F. Mullis, K. Horn, G. Erlich, H. Arnheim, N. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia". *Science* 230 (4732): 1350–1354.
- Saiki, Randall K; Gelfand, David H; Stoffel, Susanne; Scharf, Stephen J; Higuchi, Russell; et al (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Salvemini, M., D'Amato, R., Petrella, V., Ippolito, D., Ventre, G., Zhang, Y., & Saccone, G. (2014). Subtractive and differential hybridization molecular analyses of *Ceratitidis capitata* XX/XY versus XX embryos to search for male-specific early transcribed genes. *BMC Genetics*, 15(Suppl 2), S5. <http://doi.org/10.1186/1471-2156-15-S2-S5>.
- Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning – A laboratory manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor. Laboratory Press.
- Sanchez L (2008). Sex-determining mechanisms in insects. *Int J Dev Biol* 52: 837–856. doi: 10.1387/ijdb.072396ls PMID: 18956315
- Schmittgen T.D (2001). Real-Time Quantitative PCR. *Methods* 25:383-385.
- Singh ND, Davis JC, Petrov DA. (2005). X-linked genes evolve higher codon bias in *Drosophila* and *Caenorhabditis*. *Genetics* 171:145–115.

- Steven K. Beckendorf, Fotis C. Kafatos (1976). Differentiation in the salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Characterization of the glue proteins and their developmental appearance. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(76\)90081-7](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(76)90081-7)
- Stevens, N. M. (1908). A study of the germ cells of certain diptera, with reference to the heterochromosomes and the phenomena of synapsis. *J. Exp. Zool.*, 5: 359–374. doi:10.1002/jez.1400050304.
- Sturgill D, Zhang Y, Parisi M, Oliver B. 2007. Demasculinization of X chromosomes in the *Drosophila* genus. *Nature* 450:238–241.
- Thein, S. L., & Wallace, R. B. (1986). The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. *Human genetic diseases: A practical approach*, 33-50.
- Thomas, D. D., Donnelly, C. A., Wood, R. J., & Alphey, L. S. (2000). Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science*, 287(5462), 2474-2476.
- Toups MA, Hahn MW. 2010. Retrogenes reveal the direction of sex chromosome evolution in mosquitoes. *Genetics* 186:763–766.
- Tzanakakis, M. E. 1989. Small-scale rearing: *Dacus oleae*, pp. 105–118. In A. Robinson and G. Hooper [eds.], *Fruit flies: their biology, natural enemies and control*. *World crop pests* 3(B). Elsevier, Amsterdam.
- U'beda F, Patten MM, Wild G. (2015). On the origin of sex chromosomes from meiotic drive. *Proc. R. Soc. B* 282: 20141932. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2014.1932>.
- Ute Willhoeft and Gerald Franz (1996). Identification of the Sex-Determining Region of the *Ceratitis capitata* Y Chromosome by Deletion Mapping *GENETICS* vol. 144 no. 2 737-745.
- White MJD (1949). Cytological Evidence on the Phylogeny and Classification of the Diptera. *Evolution* 3: 252–261. PMID: 18138385.
- Wolfner FM, Partridge L, Lewin S, Kalb MJ, Chapman T, et al (1997). Mating and hormonal triggers regulate accessory gland gene expression in male *Drosophila*. *J Insect Physiol*, 43(12):1117-1123.
- Zdobnov EM, von Mering C, Letunic I, et al. (33 co-authors) (2002). Comparative genome and proteome analysis of *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*. *Science* 298:149 159.