



**ΘΕΜΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:**

«Κλωνοποίηση και ανάλυση γενετικών τόπων που εμπλέκονται στο οσφρητικό σύστημα του δάκου της ελιάς, *Bactrocera oleae*»

**ΜΠΕΛΑΒΙΛΑΣ- ΤΡΟΒΑΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ**



### **Θέμα διπλωματικής εργασίας:**

«Κλωνοποίηση και ανάλυση γενετικών τόπων που εμπλέκονται στο οσφρητικό σύστημα του δάκου της ελιάς, *Bactrocera oleae*»

**Μπελαβίλας – Τροβάς Αλέξανδρος**

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το διάστημα Οκτωβρίου 2012 - Ιουνίου 2013 υπό την επίβλεψη του κ. Κ. Ματθιόπουλου, καθηγητή Μοριακής Βιολογίας και της κ. Κ. Τσουμάνη, διδάσκουσας Μοριακής Βιολογίας Π.Δ. 407/80.

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος:** Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

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

**Καρπούζας Δημήτριος:** Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής  
Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

---

Η στιγμή παράδοσης της διπλωματικής εργασίας αποτελεί μια εξαιρετικά ιδιαίτερη στιγμή για κάθε φοιτητή καθώς σηματοδοτεί τη λήξη της φοιτητικής περιόδου, το κλείσιμο ενός σημαντικότερου κύκλου της ζωής μας. Ως εκ τούτου, οι ακόλουθες ευχαριστίες δε θα μπορούσαν να περιορίζονται μόνο στην εργασία που παρουσιάζεται.

Ως είθισται, αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την τριμελή επιτροπή μου, τον κ. Ματθιόπουλο, την κ. Τσουμάνη και τον κ. Καρπούζα για τη συμβολή τους στην επίτευξη της διπλωματικής εργασίας.

Τον κ. Ματθιόπουλο διότι αποτελεί έναν επιστήμονα, με όλη την έννοια του όρου. Με την ικανότητα του να παρατηρεί τα μικρά και, φαινομενικά, ασήμαντα, την όρεξη και τη φαντασία του αποτελεί ένα συνεχές πεδίο έμπνευσης, ένα μέντορα για κάθε νέο επιστήμονα.

Την Κωνσταντίνα την Τσουμάνη, με την οποία είχα την απέραντη τύχη να συνεργαστώ στο εργαστήριο. Διότι δόθηκε ολόψυχα στη εργασία αυτή, βοηθώντας με όσο κανείς άλλος, αγκαρεύοντας με ενίστε, με την απίστευτη ενέργεια, τη δημιουργικότητα και την τελειομανία που τη χαρακτηρίζουν. Διότι ήταν πάντα δίπλα μου όταν χρειαζόταν και προσπαθούσε συνεχώς να τελειοποιεί τη δουλειά μας. Και φυσικά διότι η συναναστροφή μαζί της και οι συζητήσεις από το τελευταίο συνέδριο του Wellcome Trust έως το πρόσφατο πανηγύρι στο Τσεπέλοβο είναι μια απόλαυση!

Τη Λένια και την Αγγελική που ανέχτηκαν τις γκρίνιες και τις ζοχάδες μου και με τα όμορφα χαμόγελα τους όργωναν την Ελλάδα σε κάθε μου παρουσίαση (μία ήταν όλη κ' όλη!), συγκροτώντας το προσωπικό μου fan club!

Το Σπύρο που μου έλυσε τις απορίες όταν πιανόμουν "αδιάβαστος".

Το Γιώργο το Μαρωνίτη για τις άπειρες ώρες που περάσαμε μαζί στο εργαστήριο και επειδή δε μου κατέστρεψε, τελικά, τα πειράματα παρά τις συνεχείς απειλές του!

Τα υπόλοιπα παιδιά του εργαστηρίου, τη Μαριλένα, τη Γιώτα, το Γιάννη, την Έφη, τις Χριστίνες, την Κωνσταντίνα (τη μικρή), την Άννα-Μαρία και τον Απόστολο για το ευχάριστο κλίμα και την παρέα τους.

Τους γονείς μου για την φιλότιμη προσπάθεια τους να καταλάβουν με τι ακριβώς ασχολούμαι και για την πνευματική και υλική τους στήριξη όλα αυτά τα χρόνια.

Τον υπολογιστή μου που δε χάλασε (παρά την καλοκαιρινή του υπερθέρμανση)!

Την τύχη μου (γιατί είναι πάντα χρήσιμη!).

At last but not least (που θα 'λεγε και ο Κράσος), θέλω να ευχαριστήσω όλους τους IPM-ανθρώπους για τις χαρές και τις λύπες, τα όνειρα και τις ελπίδες, τις πίκρες και τους ενθουσιασμούς που ζήσαμε όλα αυτά τα χρόνια στο μικρό μας χωριό και να τους θυμήσω πως (όπως έχει πει κάποιος άλλος) *οι ονειροπόλοι δε δαμάζονται*.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

Η διερεύνηση της μοριακής βάσης του οσφρητικού συστήματος των εντόμων αποτελεί ένα αξιοσημείωτο πεδίο έρευνας λόγω της σημασίας του σε βασικές λειτουργίες των εντόμων, όπως η μεσολάβησή του στην αναγνώριση της τροφής αλλά και στην αναπαραγωγή, συμπεριλαμβάνοντας τόσο τη σύζευξη όσο και την ωοαπόθεση. Η εξάρτηση της συμπεριφοράς του εντόμου και κατ' επέκταση της βιωσιμότητάς του από παράγοντες του οσφρητικού συστήματος, καθιστά το σύστημα αυτό έναν ελκυστικό στόχο για την ανάπτυξη εναλλακτικών παρεμβατικών μεθόδων ελέγχου. Ειδικότερα για έντομα οικονομικής σημασίας που λειτουργούν παρασιτικά σε προϊόντα των αγροτικών καλλιεργειών, όπως ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, η μελέτη του οσφρητικού συστήματος μπορεί να συνεισφέρει καθοριστικά στη βελτίωση παραδοσιακών μεθόδων ελέγχου, όπως είναι οι παγίδες, και στον αποτελεσματικότερο σχεδιασμό νέων μοριακών μεθόδων αντιμετώπισής του, όπως η τεχνική RIDL.

Προς την κατεύθυνση αυτή, στην παρούσα μελέτη ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις. Αρχικά, ενισχύθηκαν αλληλουχίες του οσφρητικού συστήματος του δάκου χρησιμοποιώντας ετερόλογους εκκινητές αντίστοιχων γενετικών τόπων του συγγενικού του είδους *Ceratitis capitata*. Τα προϊόντα ενίσχυσης ταυτοποιήθηκαν με υβριδοποίηση κατά Southern και ακολούθως κλωνοποιήθηκαν. Παράλληλα, χρησιμοποιώντας διαθέσιμες μεταγραφόμενες αλληλουχίες από RNA seq ανάλυση, εντοπίστηκαν *in silico* βάσει ομολογιών στις βάσεις δεδομένων τέσσερα δυνητικά οσφρητικά γονίδια του δάκου (OS-D, OBP19a, OBP83a, OBP8a). Στις αμινοξικές αλληλουχίες των γονιδίων αυτών ταυτοποιήθηκαν οι χαρακτηριστικές λειτουργικές περιοχές των οσμοδεσμευτικών πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, διερευνήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των παραπάνω γονιδίων συγκριτικά σε αρσενικά και θηλυκά άτομα, καθώς και η ιστοειδικότητα τους, με ποσοτική Real-Time PCR. Από τη διαδικασία αυτή διαπιστώθηκε η έκφραση των τριών από τα τέσσερα γονίδια αποκλειστικά στους οσφρητικούς ιστούς. Επίσης παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο πρότυπο έκφρασης μεταξύ αρσενικών και θηλυκών για τα δύο εκ των γονιδίων. Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν τελικά σε μια πρώτη εκτίμηση του πιθανού ρόλου των γονιδίων αυτών στις φυσιολογικές λειτουργίες του εντόμου.

## ABSTRACT

---

Studying the molecular basis of the insects' olfactory system is a remarkable field of research due to its significant role in many basic insect functions, such as food recognition and reproduction, including mating and oviposition. The dependence of insect behavior, and therefore its viability, on olfactory factors renders olfaction an attractive target for the development of alternative control methods. Especially for insects of economic importance, such as agricultural parasites like the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, the molecular knowledge regarding the olfactory system may significantly contribute to the improvement of traditional monitoring methods, such as traps, and can lead to a more efficient design of new molecular control techniques, such as the RIDL.

Towards this direction, two separate approaches were tested in the present study. Firstly, *B. oleae* olfactory related sequences were amplified using heterologous primers of the respective genetic loci of its closely related species *Ceratitis capitata*. The PCR products were further identified by Southern analysis and subsequently cloned. Secondly, by using available data for transcribed sequences obtained by RNA seq analysis, four potentially olfactory *B. oleae* genes (OS-D, OBP19a, OBP83a, OBP8a) were *in silico* detected. Their translated sequences were also searched based on the homologies in order to identify the typical functional regions of the odorant binding proteins. The expression levels of these genes, as well as their tissue-specificity, were also investigated by quantitative Real-Time PCR in male and female insects. By this procedure, three of the four tested genes were found to be expressed exclusively in the olfactory tissues. Furthermore, statistically significant differences of the expression pattern between the two sexes were also observed for two of the genes. These results led to a preliminary estimate of the possible functional role of these genes in insect's physiology.

## Περιεχόμενα

### Περιεχόμενα

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
1.1	Το οσφρητικό σύστημα.....	6
1.1.1	Οι γενικές οσμές.....	6
1.1.2	Οι φερομόνες.....	6
1.2	Όσφρηση στα έντομα.....	7
1.2.1	Οσφρητικά όργανα και οσφρητικοί νευρώνες (OSNs).....	8
1.2.2	Μοριακά συστατικά οσφρητικού συστήματος.....	10
1.2.3	Οι οσφρητικοί υποδοχείς (ORs).....	10
1.2.4	Οι οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες (OBPs).....	13
1.2.5	Άλλα μόρια.....	14
1.3	Το μονοπάτι πρόσληψης των φερομονών στη <i>Drosophila</i> .....	15
1.4	Σεξουαλικοί διμορφισμοί στην οσφρητική διαδικασία.....	16
1.5	Χρήση οσμών στην καταπολέμηση εντόμων.....	17
1.6	Ο δάκος της ελιάς.....	17
1.6.1	Σημασία και δεδομένα του οσφρητικού του συστήματος.....	18
1.6.2	Οσμές και παγίδες στο δάκο.....	19
1.7	Μειονεκτήματα των υπαρχουσών μεθόδων καταπολέμησης.....	20
1.8	Στόχος η μεγαλύτερη ειδοειδικότητα στην καταπολέμηση.....	20
1.8.1	Η μέθοδος στείρων εντόμων (Sterile Insect Technique, SIT).....	21
1.8.2	Η μέθοδος απελευθέρωσης εντόμων που φέρουν επικρατές θνησιγόνο γονίδιο (RIDL).....	21
1.8.3	Εφαρμογές σε παρασιτικά έντομα.....	22
1.9	SIT και RIDL στο δάκο.....	23
1.10	RIDL και οσφρητικό σύστημα.....	23
2	ΣΚΟΠΟΣ.....	25
3	ΜΕΘΟΔΟΙ – ΥΛΙΚΑ.....	26
3.1	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	27
3.2	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR).....	28
3.3	Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή από ολικό RNA ιστού.....	30
3.4	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης.....	31
3.5	Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction).....	32
3.6	Κατακρήμνιση DNA.....	33



## Περιεχόμενα

3.7	Υβριδοποίηση κατά Southern.....	34
3.8	Κλωνοποίηση DNA με πλασμιδιακό φορέα.....	38
3.8.1	Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA σε πλασμιδιακό φορέα (ligation).....	38
3.8.2	Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση.....	39
3.8.3	Μετασηματισμός κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση.....	41
3.8.4	Καλλιέργεια μετασηματισμένων κυττάρων και διάκριση ανασυνδυασμένων κλώνων.....	41
3.9	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση (Minipreps).....	42
3.10	Πέψη πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού.....	44
3.11	<i>In silico</i> ανάλυση.....	45
3.11.1	Omiga.....	45
3.11.2	Blast (Basic Local Alignment Search Tool).....	45
3.11.3	ClustalW.....	45
3.11.4	InterProScan.....	46
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	47
4.1	Ενίσχυση γενετικών τόπων με χρήση ετερόλογων εκκινητών.....	48
4.2	Ταυτοποίηση αλληλουχιών με υβριδοποίηση κατά Southern.....	49
4.3	Κλωνοποίηση γονιδίων σε πλασμιδιακούς φορείς.....	50
4.4	Εντοπισμός γονιδίων από δεδομένα RNA sequencing.....	50
4.5	Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των τεσσάρων γονιδίων.....	51
4.6	Βιοπληροφορική ανάλυση των γονιδίων.....	54
5	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	59
5.1	Κλωνοποίηση ομόλογων γονιδίων.....	60
5.2	Εντοπισμός γονιδίων από δεδομένα RNA seq.....	61
6	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	64
7	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	68

Εισαγωγή

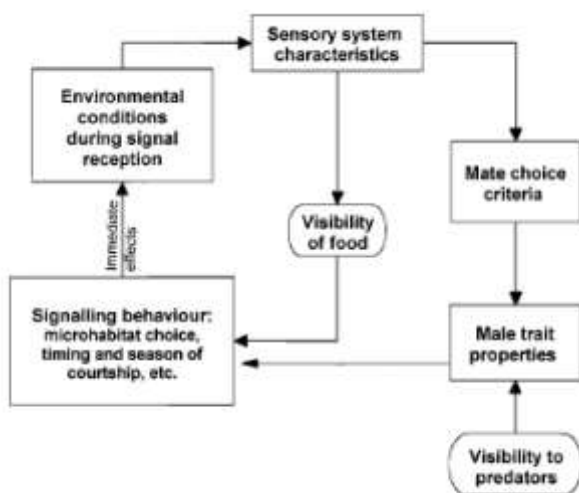
# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Το οσφρητικό σύστημα

Η όσφρηση αποτελεί μία εκ των βασικών αισθήσεων των ζωντανών οργανισμών. Ο ρόλος της είναι κομβικός για την επιβίωση και την αναπαραγωγή του οργανισμού, καθώς διαμεσολαβεί σε αποκρίσεις όπως η εύρεση τροφής, η σύζευξη και η αποφυγή επικίνδυνων καταστάσεων. Το οσφρητικό σύστημα έχει την ικανότητα να εντοπίζει ένα τεράστιο εύρος οσμών, να τις διαχωρίζει δημιουργώντας μια ακριβή νευρωνική αναπαράσταση, για κάθε οσμή, η οποία οδηγεί και σε μια εξειδικευμένη διέγερση στον εγκέφαλο. Οι οσμές χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

A) **Τις γενικές οσμές:** Μικρά μόρια που προέρχονται από τις τροφές ή το περιβάλλον και σηματοδοτούν την ύπαρξη τροφής, φωτιάς, θηρευτών κλπ.

B) **Τις φερομόνες:** Μόρια που απελευθερώνονται από άτομα του ίδιου είδους και αποτελούν κοινωνικά ή σεξουαλικά σήματα.



Εικόνα 1.1. Σύνοψη των λειτουργιών του οσφρητικού συστήματος (Wyatt, 2003).

### 1.1.1 Οι γενικές οσμές

Ως γενική οσμή χαρακτηρίζεται μια πτητική χημική ένωση με μοριακό βάρος μικρότερο από 300 kDa, την οποία οι άνθρωποι και τα ζώα αντιλαμβάνονται μέσω του οσφρητικού τους συστήματος. Ο ακριβής αριθμός των οσφρητικών μορίων που υφίστανται στη γη είναι άγνωστος, ωστόσο γνωρίζουμε πως όλα τα έμβια όντα, όπως τα φυτά, τα έντομα, τα ζώα και τα μικρόβια, εκκρίνουν οσμές είτε σκόπιμα είτε ως προϊόντα-παραπροϊόντα του μεταβολισμού τους. Οι γενικές οσμές έχουν πολύ μεγάλη σημασία για την επιβίωση των ζώων καθώς τους επιτρέπουν να εντοπίσουν την τροφή τους και να αποφεύγουν θηρευτές και περιβαλλοντικούς κινδύνους, όπως η φωτιά.

### 1.1.2 Οι φερομόνες

Αντίθετα από τις γενικές οσμές, οι φερομόνες αποτελούν συγκεκριμένες ενώσεις που εκκρίνονται από ένα άτομο και προσλαμβάνονται από ένα άλλο άτομο του ίδιου είδους για να επάγει μια αντίδραση, όπως κάποια συγκεκριμένη συμπεριφορά ή ενδοκρινική αλλαγή. Βάσει των

## Εισαγωγή

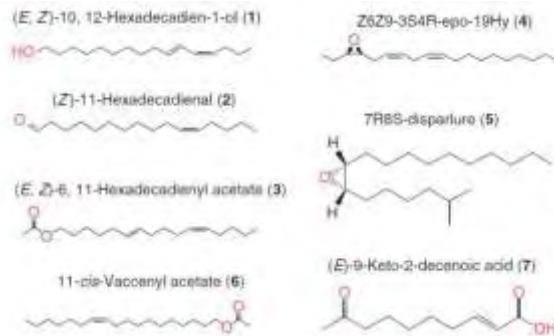
συμπεριφορών που επάγουν στα άτομα που τις προσλαμβάνουν, οι φερομόνες διαχωρίζονται στις εξής κύριες κατηγορίες:

- **Σεξουαλικές:** Εκκρίνονται από το θηλυκό ή το αρσενικό άτομο, ανάλογα με το είδος, με σκοπό την σεξουαλική προσέλκυση του αντίθετου φύλου.
- **Συνάθροιση:** Εκκρίνονται και προσλαμβάνονται και από τα δύο φύλα για να ειδοποιήσουν τα άλλα άτομα του είδους σε σχέση με την τοποθεσία μιας πηγής τροφής, ή ενός κινδύνου.

Οι φερομόνες ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά στο μεταξοσκώληκα, *Bombyx mori*, το 1959, ως τα μόρια που εκκρίνουν τα θηλυκά άτομα και ενεργοποιούν τις πλήρεις σεξουαλικές αντιδράσεις του αρσενικού (Butendant *et al*, 1959). Με την πάροδο των χρόνων και την αποκάλυψη και ανάλυση της δράσης των φερομονών σε πάρα πολλά είδη έχουν τεθεί μια σειρά από κριτήρια για να οριστεί μια ουσία ως φερομόνη:

- Να εκκρίνεται από ένα άτομο και να προσλαμβάνεται από ένα όμοιό του.
- Να στέλνει πληροφορίες σχετικά με το φύλο, την τάξη και το είδος στον παραλήπτη.
- Η επίδρασή της να είναι νοηματική ή ειδοποιητήρια για τα είδη.

Οι φερομόνες, τέλος, μπορεί να είναι και μη-πτητικές ενώσεις με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από μερικές εκατοντάδες kDa, συμπεριλαμβανομένων σχετικά μεγάλων οργανικών συστατικών όπως πεπτίδια και πρωτεΐνες.



**Εικόνα 1.2.** Οι δομές των κύριων συστατικών των σεξουαλικών φερομονών ορισμένων εντόμων. (1) του μεταξοσκώληκα *Bombyx mori*, (2) του ριγέ σκουληκιού του ρυζιού *Chilo suppressalis*, (3) του κινέζικου μεταξοσκώληκα της δρυός *Antheraea pernyi*, (4) της ιαπωνικής γιγάντιας κάμπιας *Ascotis selenaria creatacea*, (5) του σκώρου τσιγγάνων *Lymantria dispar*, (6) της φρουτόμυγας *Drosophila melanogaster*, (7) της μέλισσας *Apis mellifera*, (Zhou *et al*, 2010).

## 1.2 Όσφρηση στα έντομα

Τα έντομα αποτελούν μια εξαιρετικά ελκυστική κατηγορία οργανισμών ως προς τη μελέτη του οσφρητικού τους συστήματος, καθώς επιδεικνύουν μια πολύ μεγάλη γκάμα συμπεριφορών που οφείλονται αποκλειστικά σε αποκρίσεις του συστήματος αυτού, ενώ διαθέτουν ένα νευρικό σύστημα πολύ απλούστερο από εκείνο των θηλαστικών.

Η πρόσληψη των οσμών στα ενήλικα έντομα πραγματοποιείται αποκλειστικά στο κεφάλι, από τα δύο κύρια οσφρητικά τους όργανα (βλ. Εικόνα 1.3):

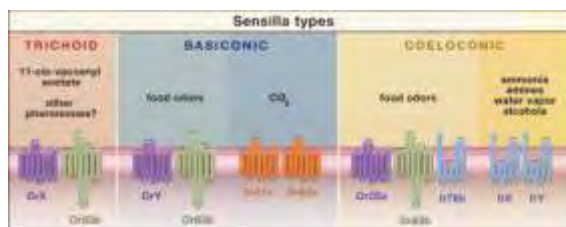
1. Τις κεραίες (antennae)
2. Τις γναθικές προσαρκτίδες (maxillary palps)



**Εικόνα 1.3.** Περιφερική οργάνωση του οσφρητικού συστήματος στη *Drosophila*. Διακρίνονται οι κεραίες και οι γναθικές προσαρκτίδες (Laissue & Vosshall, 2008).

### 1.2.1 Οσφρητικά όργανα και οσφρητικοί νευρώνες (OSNs)

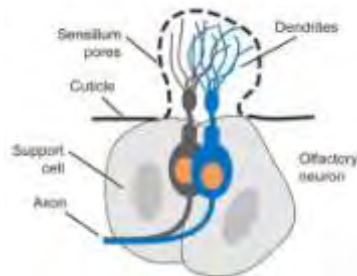
Τα δύο οσφρητικά όργανα περιβάλλονται από ένα πολύ μεγάλο αριθμό αισθητικών τριχιδίων (sensilla), των οποίων ο ρόλος είναι να στεγάζουν και να προστατεύουν τους οσφρητικούς νευρώνες (OSNs, Odorant Sensory Neurons). Τα αισθητικά τριχίδια διακρίνονται σε τρία κύρια είδη: i) τα τριχοειδή (trichoid), ii) τα βασικωνικά (basiconic), και iii) τα κοιλοκωνικά (coelonic). Τα τρία αυτά είδη εμφανίζουν σημαντικές διαφορές ως προς το μέγεθος, τη μορφολογία, τους τύπους των ενώσεων που αναγνωρίζουν οι νευρώνες τους καθώς και την κατανομή τους στην κεραία (βλ. Εικόνες 1.3, 1.4, 1.6). Έχει αποδειχθεί πως τα τριχοειδή αισθητικά τριχίδια έχουν μεγαλύτερη ειδικευση στην αναγνώριση φερομονών, ενώ τα αντίστοιχα βασικωνικά στην αναγνώριση των τροφών (Jefferys *et al*, 2007).



**Εικόνα 1.4.** Συνοπτική παρουσίαση των διαφορών, ως προς την ειδικευση των ORs, στους διαφορετικούς τύπους αισθητικών τριχιδίων (Spletter & Luo, 2009).

Οι OSNs προσδιορίζουν τις οσμές και μεταφέρουν το μήνυμα στον εγκέφαλο, ενώ εδράζονται στο τρίτο τμήμα της κάθε κεραίας και στις γναθικές προσαρκτίδες. Παρά τη σημαντική ποικιλομορφία στη μορφολογία των οργάνων αυτών, μεταξύ των ειδών, η δομή των οσφρητικών αισθητικών τριχιδίων παραμένει υψηλά συντηρημένη και αποτελείται από ένα επιδερμικό τοίχωμα, το οποίο περιλαμβάνει πολλαπλούς πόρους μέσα από τους οποίους εισέρχονται οι οσμές. Το κάθε οσφρητικό τριχίδιο περιλαμβάνει τους δενδρίτες από ένα έως πέντε οσφρητικών νευρώνων (Vermeulen *et al*, 2004). Οι άξονες των OSNs εκτείνονται ως τα σπειράματα (glomeruli) των υπεύθυνων για την όσφρηση συναπτικών κέντρων, στο λοβό (antennal lobe) του εγκέφαλου (Hildebrand *et al*, 1997).

## Εισαγωγή



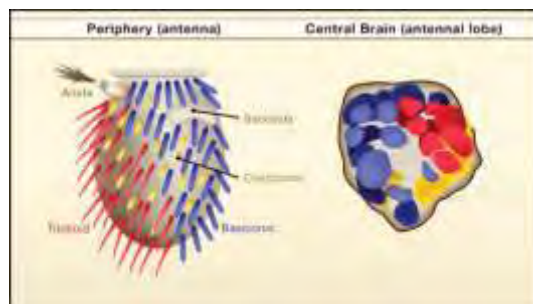
**Εικόνα 1.5.** Η δομή ενός τυπικού οσφρητικού τριχιδίου, στο οποίο εδράζονται δύο OSNs (διακρίνονται με γκρι και μπλε χρώματα) (Vosshall & Stocker, 2007).

Στο ενήλικο άτομο της *Drosophila melanogaster* υπολογίζεται πως περίπου 410 αισθητικά τριχίδια περιβάλλουν την κάθε κεραία, ενώ περίπου 60 περιβάλλουν τις γναθικές κροσακτρίδες (Couto *et al.* 2005).

Η **κεραία** καλύπτεται και από τα τρία είδη αισθητικών τριχιδίων. Συνολικά, σε κάθε κεραία περιέχονται περίπου 1100-1250 OSNs, με τα αρσενικά άτομα να διαθέτουν σχεδόν 20% λιγότερα βασικονικά τριχίδια και 30% περισσότερα τριχοειδή τριχίδια απ' ό,τι τα θηλυκά (Stocker, 2001).

Οι **γναθικές προσακτρίδες** είναι πολύ απλούστερες δομές από τις κεραίες και καλύπτονται εξ ολοκλήρου μόνο από ένα είδος τριχιδίων, τα μεγάλα βασικονικά (large basiconic). Κάθε γναθική προσακτρίδα περιέχει 120 OSNs, ενώ το άνω άκρο της περιέχει ~60 αισθητικά τριχίδια, όπου το καθένα εδράζει από δύο νευρώνες. Οι λειτουργικές αναλύσεις των 120 αυτών νευρώνων έδειξαν έξι διαφορετικές λειτουργικές κλάσεις, οι οποίες αναπαριστούν τους διαφορετικούς συνδυασμούς των ORs που εκφράζονται στους νευρώνες αυτούς.

Οι άξονες των OSNs είτε προέρχονται από τις κεραίες, είτε από τις γναθικές προσακτρίδες συγκλίνουν σε περίπου 43 διαφορετικά σπειράματα του λοβού της κεραίας. Πειράματα σε πολλά είδη εντόμων (μύγες, μέλισσες, κουνούπια κ.α.) έδειξαν πως οι διαφορετικοί OSNs ανταποκρίνονται αφενός σε διαφορετικές οσμές, αλλά και με διαφορές στον τύπο της απάντησης (διεγερτικά ή ανασταλτικά) και στην ένταση αυτής.



**Εικόνα 1.6.** Απεικόνιση της δομής της κεραίας όσον αφορά την κατανομή των αισθητήριων τριχιδίων και των αντίστοιχων περιοχών του λοβού της κεραίας στον εγκέφαλο της *Drosophila* (Spletter & Luo, 2009).

Αντίθετα, κατά το αναπτυξιακό στάδιο της προνούμφης της *D. melanogaster* έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη ενός ζεύγους οσφρητικών οργάνων που ονομάζονται ραχιαία όργανα (dorsal organs). Το καθένα από αυτά περιέχει 21 οσφρητικούς νευρώνες, που εκτείνουν δενδρίτες σε ένα μοναδικό

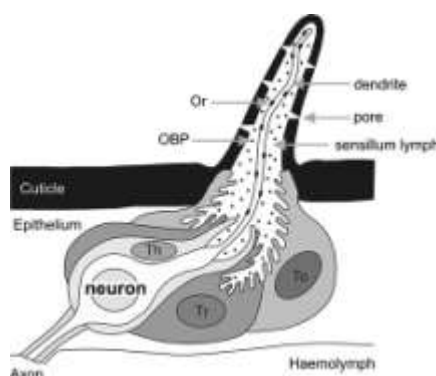
τριχίδιο που ονομάζεται θολωτό τριχίδιο (dome **sensillum**). Οι άξονες των νευρώνων αυτών εκτείνονται σε ένα μικρό σπείραμα του προνυμφικού λοβού της κεραίας.

**Σχόλιο [a1]:** Η ακριβής μετάφραση είναι τρουλωτό τριχίδιο. Να το βάλουμε;;;

### 1.2.2 Μοριακά συστατικά οσφρητικού συστήματος

Η ικανότητα πρόσληψης των οσμών έγκειται σ' ένα καταρράκτη μοριακών αντιδράσεων, των οποίων η δράση ξεκινά από την πρόσληψη του μορίου, έως την μεταγωγή του σήματος στον εγκέφαλο. Τα μόρια τα οποία συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

1. **Υποδοχείς** (Odorant receptors, ORs)
2. **Οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες** (OBPs: General odorant binding proteins, Pheromone binding proteins, Antennal specific proteins).



**Εικόνα 1.7.** Γενική οργάνωση του οσφρητικού τριχιδίου ενός εντόμου. Διακρίνονται οι θέσεις των ORs και OBPs, στην επιφάνεια του νευρώνα και τη λέμφο, αντίστοιχα (Jacquin-Joly & Merlin, 2004).

### 1.2.3 Οι οσφρητικοί υποδοχείς (ORs)

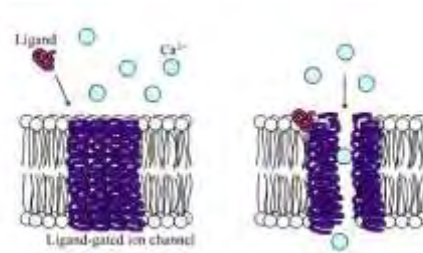
**Ρόλος:** Εδράζονται στην επιφάνεια των οσφρητικών νευρώνων στις κεραίες και τις γναθικές προσακτρίδες. Κατά την πρόσληψη της οσμής εκτελούν ένα διττό ρόλο. Αφενός επιτρέπουν τη διάκριση μεταξύ των οσμών έτσι ώστε να μπορούν να ανταποκριθούν κατάλληλα μόνο κύτταρα που εκφράζουν τον ιδανικό τύπο υποδοχέα. Αφετέρου μεταφέρουν το χημικό μήνυμα από τον εξωκυττάριο στον ενδοκυττάριο χώρο της μεμβράνης κατά τη σύνδεση τους με τον προσδέτη. Η σύνδεση αυτή οδηγεί στην ενεργοποίηση του νευρώνα και στη μεταφορά του μηνύματος στον εγκέφαλο για να πραγματοποιηθεί και η αντίστοιχη απόκριση.

**Ανακάλυψη:** Ανακαλύφθηκαν πρώτα στον ποντικό το 1991 (Buck and Axel, 1991), στον *Caenorhabditis elegans* το 1995 (Troemel *et al.*, 1995), και στη *Drosophila melanogaster* το 1999 μέσω βιοπληροφοριακών (Clyne *et al.*, 1999) και μοριακών προσεγγίσεων (Vosshal *et al.* 1999). Τελικά, στο γονιδίωμα της *Drosophila* ταυτοποιήθηκε ο συνολικά μικρός αριθμός των 60 γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν 62 οσφρητικούς υποδοχείς, με τους 2 να αποτελούν προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος (splicing) (Robertson *et al.* 2003).

**Δομή:** Οι ORs των εντόμων έχουν, όπως και των υπόλοιπων οργανισμών, επτά διαμεμβρανικές περιοχές. Σε αντίθεση, όμως, με τους ORs που έχουν βρεθεί σε όλα τα σπονδυλωτά καθώς και στους σκώληκες, οι ORs των εντόμων δεν έχουν καμία ομολογία με GPCR υποδοχείς και φαίνεται πως έχουν εξελιχθεί ανεξάρτητα από τους χημειοϋποδοχείς των υπολοίπων ζωντανών οργανισμών (Vosshal *et al.* 1999). Οι πειραματικές και βιοπληροφοριακές αναλύσεις επιβεβαιώνουν πως οι ORs

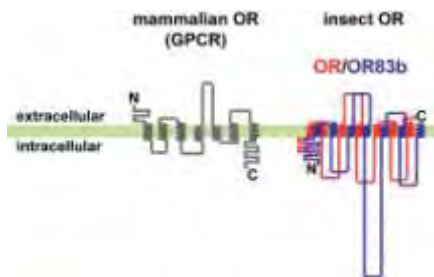
## Εισαγωγή

των εντόμων αναπαριστούν μια καινούργια οικογένεια μεμβρανικών πρωτεϊνών. Η τοπολογία των πρωτεϊνών στη μεμβράνη είναι αντεστραμμένη σε σχέση με την αντίστοιχη των GPCR υποδοχέων, με το αμινοτικό άκρο να έχει κατεύθυνση στο κυτταρόπλασμα αντί για τον εξωκυττάριο χώρο (Benton *et al.* 2006, Wistrand *et al.* 2006). Οι υποδοχείς αυτοί φαίνεται, τελικά, πως συγκροτούν προσδετο-εξαρτώμενους διαύλους ιόντων (ligand-gated ion channels) (Sato *et al.*, 2008).



**Εικόνα 1.8.** Παράδειγμα λειτουργίας ενός διαύλου ιόντων ασβεστίου. Ο διάυλος παραμένει κλειστός έως ότου προσδεθεί στην εξωκυττάρια περιοχή ο κατάλληλος προσδέτης. Τότε ανοίγει επιτρέποντας στα ειδικά ιόντα να εισέλθουν εντός του κυττάρου.

**Ο συνυποδοχέας OR83b (Orco):** Κομβικό ρόλο στην μοναδικότητα των οσφρητικών υποδοχέων στα έντομα έχει ο συνυποδοχέας OR83b, λόγω ορισμένων αξιοσημείωτων ιδιοτήτων που διαθέτει. Αρχικά, το γονίδιό του αποτελεί το μοναδικό υψηλά συντηρημένο γονίδιο της υπερικογενείας των ORs, μεταξύ των διαφορετικών ειδών εντόμων (Krieger *et al.*, 2003, Jones *et al.*, 2005). Δεύτερον, η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί διαθέτει ιδιαίτερα διαφορετική δομή σε σχέση με τις υπόλοιπες. Τρίτον, εκφράζεται στο ~70% των οσφρητικών νευρώνων της κεραίας και σε όλους τους OSNs των γναθικών προσακτριδίων. Τέτατον, η πρωτεΐνη του, από μόνη της, δεν προσδίδει ευαισθησία σε κάποια οσμή. Ο OR83b αποδείχθηκε πως αποτελεί έναν υποχρεωτικό συνυποδοχέα για όλους τους κοινούς οσφρητικούς υποδοχείς, με τους οποίους σχηματίζει ετεροδιμερές σύμπλοκο στην επιφάνεια των νευρώνων OSN (Larsson *et al.*, 2004). Η ύπαρξη του OR83b αποτελεί ικανή και αναγκαία συνθήκη για την στόχευση και τη λειτουργική έκφραση των ORs σε όλους τους νευρώνες (Benton *et al.* 2006).



**Εικόνα 1.9.** Η διακριτή δομή των ORs στα θηλαστικά και τα έντομα (Benton, 2006).

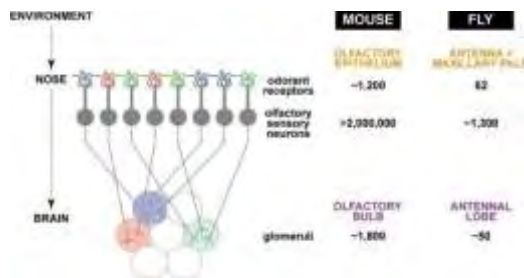
**Εξελικτικές διαφορές:** Οι OR πρωτεΐνες εμφανίζουν υψηλή ποικιλομορφία ως προς τις αμινοξικές τους αλληλουχίες, έχοντας κοινό μόλις το ~20% αυτών, ενώ η σύγκριση των OR γονιδίων της *Drosophila* με τα αντίστοιχα των θηλαστικών έδειξε πως οι γονιδιακές οικογένειές τους δεν εμφανίζουν ομοιότητες στις αλληλουχίες τους (Hallam *et al.*, 2006). Οι OR γονιδιακές οικογένειες των σπονδυλωτών είναι τεράστιες, με την ανθρώπινη να περιέχει ~400 γονίδια και του ποντικού ~1200, ενώ οι αντίστοιχες των εντόμων έχουν πολύ μικρότερο αριθμό γονιδίων. Για παράδειγμα, η



## Εισαγωγή

μύγα *Drosophila melanogaster* φέρει 60 γονίδια, το κουνούπι *Anopheles gambiae* 79 και η μέλισσα *Apis mellifera* 156. Στην OR γονιδιακή οικογένεια των εντόμων είναι πολύ λίγες οι περιπτώσεις γονιδίων που εμφανίζονται σε γονιδιακές συστοιχίες (clusters), η έλλειψη των οποίων υποδηλώνει την πολύ αρχαία καταγωγή της γονιδιακής αυτής οικογένειας.

**Έκφραση και λειτουργία:** Διαφορετικά OR γονίδια εκφράζονται σε διαφορετικούς υποπληθυσμούς OSNs, ενώ κάθε OSN εκφράζει μόνο έναν ή ένα μικρό αριθμό OR γονιδίων, ιδιότητα που φαίνεται να είναι συντηρημένη και στα θηλαστικά και στα έντομα. Επιπλέον, ο κάθε OR δεν αναγνωρίζει αποκλειστικά μία οσμή, αλλά μπορεί να ενεργοποιηθεί από πολλαπλά διαφορετικά χημικά ερεθίσματα. Ο συνδυασμός του σήματος που δίνουν αυτοί δημιουργεί τελικά τη μοναδική αναπαράσταση της κάθε οσμής στον εγκέφαλο (Ache *et al.* 2005).



**Εικόνα 1.10.** Συγκριτική απεικόνιση του περιφερικού οσφρητικού συστήματος στα θηλαστικά και τα έντομα. Διακρίνεται πώς οι άξονες των νευρώνων που εκφράζουν ίδιους υποδοχείς συγκλίνουν στις ίδιες περιοχές του εγκεφάλου (Benton, 2006).



**Εικόνα 1.11.** Συνοπτική λίστα των υποδοχών που εκφράζονται στις κεραίες, στις γναθικές προσακτρίδες και στο αναπτυξιακό στάδιο της προνύμφης (larva), κατηγοριοποιημένα βάσει της λειτουργικής τους τάξης και του τριχιδίου (Vosshall & Stocker, 2007).

#### 1.2.4 Οι οσμοδεσμευτικές πρωτεΐνες (OBPs)

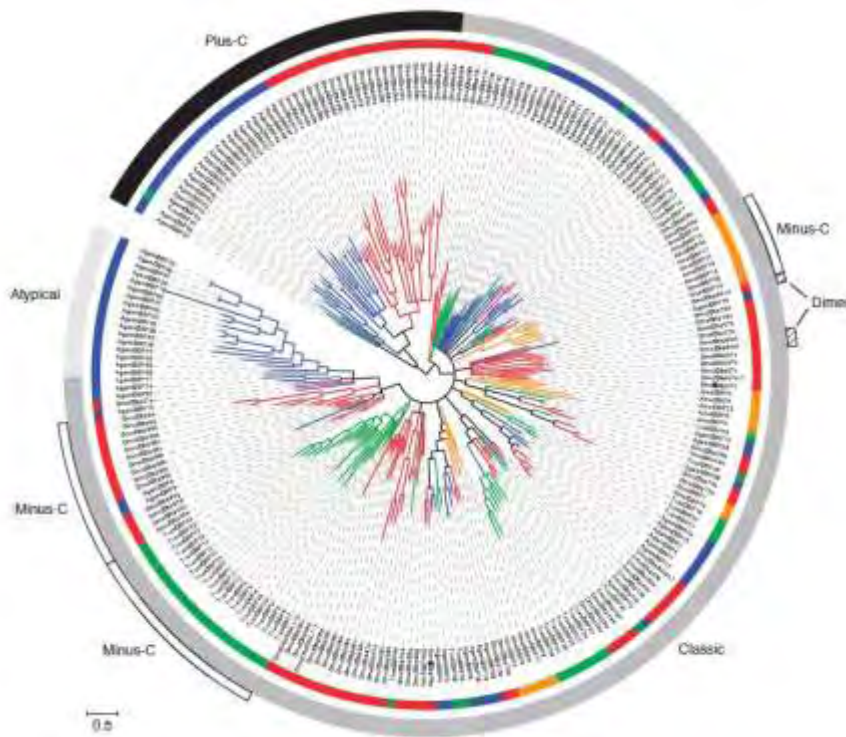
**Ρόλος:** Οι OBPs είναι μικρές υδατοδιαλυτές, εξωκυττάριας πρωτεΐνες που εδράζονται στο λεμφικό υγρό που περιβάλλει τους αισθητικούς δενδρίτες. Ο ακριβής λειτουργικός ρόλος των πρωτεϊνών αυτών δεν είναι εξακριβωμένος, ωστόσο μια σειρά από πιθανές λειτουργίες, για τα ασπόνδυλα, έχουν συνδεθεί μαζί τους: 1) η μεταφορά υδρόφοβων προσδετών, 2) η αποτροπή της αποικοδόμησης του προσδέτη προτού ενεργοποιησει τον οσφρητικό υποδοχέα, 3) η δράση ως συμπαράγοντα για την ενεργοποίηση της μεταγωγής του σήματος, 4) η αποικοδόμηση οσμών μετά την ενεργοποίηση και η απομάκρυνση τους από την λέμφο (Για ανασκόπηση: Steinbrecht 1998).

**Ανακάλυψη:** Πρωτοανακαλύφθηκαν το 1981 στην κεραία του σκόρου *Antheraea polyphemus* (Vogt & Riddiford, 1981) και έκτοτε έχουν προσδιοριστεί σε ένα μεγάλο εύρος διαφορετικών ειδών εντόμων. Επίσης OBPs έχουν προσδιοριστεί και σε ένα μεγάλο μέρος σπονδυλωτών (αγελάδα 1981, ποντικός 1986, άνθρωπος 2000 κλπ).

**Δομή:** Η πλειοψηφία των OBPs μοιράζονται ένα κοινό βρόγχο με έξι α-έλικες συνδεδεμένες με θηλιές που συγκρατούνται από τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς. Επιπλέον, σχεδόν όλοι οι OBPs διατηρούν ένα μοτίβο έξι υψηλά συντηρημένων κυστεϊνών, το οποίο αποτελεί και την "υπογραφή" τους και είναι της μορφής (C<sub>1</sub>-X<sub>20-35</sub>-C<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-C<sub>3</sub>-X<sub>20-30</sub>-C<sub>4</sub>-X<sub>8-12</sub>-C<sub>5</sub>-X<sub>8</sub>-C<sub>6</sub>). Ο αριθμός των αμινοξέων που διαμεσολαβεί ανάμεσα στη δεύτερη και την τρίτη κυστεΐνη είναι πάντα τρία, και ο αντίστοιχος μεταξύ της πέμπτης και της έκτης είναι πάντα οκτώ (Pelosi *et al*, 2006). Άλλα χαρακτηριστικά των OBPs είναι: το μέγεθος τους που κυμαίνεται μεταξύ 15-20 kDa, η σφαιρική υδατοδιαλυτή φύση τους και η παρουσία ενός πεπτιδικού σινιάλου αρχή της αλληλουχίας τους. Επιπλέον, οι OBPs των εντόμων, έχοντας πολύ έντονες αποκλίσεις στα χαρακτηριστικά τους, κατηγοριοποιούνται σε 5 υποοικογένειες: 1) Τους κλασσικούς OBPs, που διατηρούν τα παραπάνω γνωρίσματα, 2) τους διμερείς OBPs, που φέρουν δύο μοτίβα έξι-κυστεϊνών, 3) τους plus-C OBPs, οι οποίοι φέρουν δύο επιπλέον συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης, καθώς και ένα προλίνης, 4) τους minus-C OBPs, που έχουν δύο λιγότερες συντηρημένες κυστεΐνες και 5) τους ατυπικούς OBPs, που φέρουν 9-10 κυστεΐνες και ένα εκτεταμένο C-τελικό άκρο (Liu R. *et al*, 2010).

**Ταξινόμηση:** Στα έντομα οι OBPs χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με το είδος της δράσης τους: α) pheromone binding proteins (PBP), β) general odor binding proteins (GOBPs), γ) antennal specific proteins (ASPs). Οι PBPs συμβάλλουν στην πρόσληψη της φερομόνης και τη μεταφορά της στους υποδοχείς ενώ οι GOBPs στην πρόσληψη των πτητικών γενικών οσμών, όπως είναι οι οσμές που εκλύουν τα φυτά. Σε ό,τι αφορά τις ASPs, αποτελούν πρωτεΐνες που εκφράζονται σε πολύ υψηλές τιμές στις κεραίες των εντόμων, χωρίς ωστόσο να έχει προσδιοριστεί ο ακριβής τους ρόλος.

**Έκφραση και λειτουργία:** Εκφράζονται σε αφθονία στη λέμφο των αισθητικών τριχιδίων στις κεραίες του εντόμου. Οι OBPs έχουν βρεθεί να δεσμεύουν ειδικά ένα πολύ περιορισμένο αριθμό πιθανών προσδετών. Έτσι, οι OBPs φαίνεται πως αναγνωρίζουν τάξεις δομικά όμοιων οσμών, ενώ μπορούν να διακρίνουν σημειοχημικές ουσίες (π.χ. φερομόνες) με διαφορετικές χημικές δομές. Τέλος, παρά τη δομική τους ομολογία φέρουν κοιλώματα δέσμευσης (binding cavities) διαφορετικών μεγεθών και υδρόφοβα περιβάλλοντα που μπορούν να συνδέονται αντίστροφα με ένα μεγάλο εύρος οργανικών μορίων και φυσικά παραγόμενων οσμών (Tegoni *et al*, 2004).



**Εικόνα 1.12.** Οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των OBPs των εντόμων *D. melanogaster* και *D. mojavensis* (κόκκινο), *A. gambiae* (μπλε), *T. castaneum* (πράσινο) και *A. mellifera* (πορτοκαλί). Στην ανάλυση οι πρωτεΐνες διακρίνονται βάσει των υποκατηγοριών στην οποία ανήκουν (κλασσικοί, plus-C, minus-C, ατυπικοί, διμερείς) (Sánchez-Gracia *et al*, 2009).

### 1.2.5 Άλλα μόρια

Άλλα μόρια τα οποία έχει ανακαλυφθεί ότι εμπλέκονται, χωρίς ωστόσο ο ακριβής τους ρόλος να έχει διερευνηθεί πλήρως, είναι οι:

**Ιονοτροπικοί υποδοχείς (IRs, Ionotropic Receptors):** Πρόκειται για μόρια με παρόμοιο ρόλο, αλλά διαφορετική δομή από τους ORs, τα οποία ανακαλύφθηκαν πρόσφατα (Benton *et al*, 2009). Εδράζονται στα κουλοκωνικά τριχίδια της κεραίας τα οποία δεν εκφράζουν ORs (πλην του OR35a) και η γονιδιακή τους οικογένεια περιλαμβάνει στη *D. melanogaster* 66 γονίδια. Εμφανίζουν σημαντικές διαφορές ως προς την έκφραση και τη λειτουργία τους σε σχέση με τους ORs, με σημαντικότερη πως προσδέτες των IRs αναγνωρίζονται πολύ ασθενώς ή καθόλου από τους ORs, ενώ οι ισχυροί προσδέτες των ORs δεν προκαλούν διέγερση στους IRs. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει το γονίδιο IR84a το οποίο εντοπίζει περιβαλλοντικά "αφροδιασιακά" στην τροφή και προάγει την σεξουαλική συμπεριφορά στις μύγες σε περιοχές με άφθονες θρεπτικές ουσίες για τους απογόνους τους. Οι IRs, σε αντίθεση με τους ORs, δεν εντοπίζονται μόνο στα έντομα, αλλά η ύπαρξη τους έχει διαπιστωθεί σε όλα τα είδη που έχουν εξεταστεί και ανήκουν στην κατηγορία των πρωτοστόμων (Rytz *et al*, 2013). Για πολλούς IRs της *Drosophila*, δε, έχουν βρεθεί ορθόλογα γονίδια σε άλλα είδη εντόμων, όπως κουνούπια (Liu *et al*, 2010), μέλισσες (Croset *et al*, 2010) και σκόρους (Bengtsson *et al.*, 2012).

**Γευστικοί υποδοχείς (GRs, Gustatory Receptors):** Οι GRs προσδιορίστηκαν μετά τους ORs, λόγω ορισμένων δομικών ομοιοτήτων τους. Ρόλος τους είναι η αναγνώριση των γεύσεων και βρίσκονται σε άλλα σημεία του εντόμου (κυρίως στα πόδια και τα φτερά, αλλά και στην προβοσκίδα του κεφαλιού) έχοντας δικά τους νευρωνικά μονοπάτια, ανεξάρτητα από τους ORs. Ωστόσο, ορισμένοι GRs έχουν βρεθεί να παίζουν ρόλο στα οσφρητικά μονοπάτια και δη σε μονοπάτια αναγνώρισης φερομονών. Συγκεκριμένα, ο GR68a στη *Drosophila* έχει συσχετιστεί με τη συμπεριφορά των εντόμων κατά τη σύζευξη, δρώντας πιθανά ως ο υποδοχέας κάποιας μη-πτητικής φερομόνης που εκλύει το θηλυκό στο αρσενικό κατά το πρώιμο στάδιο της σύζευξης (Bray & Amrein, 2003).

**Ένζυμα αποικοδόμησης οσμών (ODEs, Odorant Degrading Enzymes):** Πρόκειται για ένζυμα τα οποία βρίσκονται είτε στη διαλυτή τους μορφή εξωκυτταρικά, είτε ενδοκυτταρικά δεσμευμένα στη μεμβράνη ή στο κυτταρόπλασμα. Ο ρόλος τους έγκειται στην αποικοδόμηση του προσδέτη μετά από την αλληλεπίδραση του με τον υποδοχέα (Vogt *et al*, 2003).

**Χημειοδεκτικές πρωτεΐνες (CSPs, Chemosensory Proteins):** Οι CSPs είναι πρωτεΐνες με παρόμοια δράση με τις OBPs, αλλά σημαντικές διαφορές στη δομή και την έκφραση. Σε ότι αφορά τη δομή, διατηρούν ένα διαφορετικό μοτίβο από τις OBPs, έχοντας συντηρημένα τέσσερα (αντί για έξι) κατάλοιπα κυστεΐνης (C<sub>1</sub>-X<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-X<sub>6-18</sub>-C<sub>3</sub>-X<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>) μέσω των οποίων συγκροτούν δύο (αντί για τρεις) δισουλφιδικούς δεσμούς. Σε ότι αφορά την έκφραση, δεν εκφράζονται αποκλειστικά στις κεραίες (όπως οι OBPs), αλλά έκφραση τους έχει παρατηρηθεί και στα πόδια του εντόμου (Tomaselli *et al*, 2006).

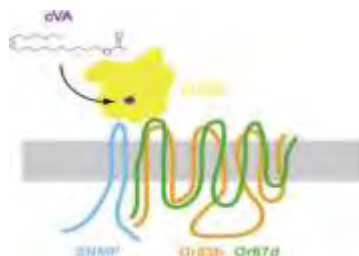
**Sensory Neuronal Membrane Proteins (SNMPs):** Πρόκειται για πρωτεΐνες που εκφράζονται στην επιφάνεια των οσφρητικών νευρώνων και ως πιθανοί ρόλοι έχουν προταθεί: α) η δράση τους ως ORs στα λεπιδόπτερα, β) η αλληλεπίδραση και καθοδήγηση του συμπλέγματος OBP-προσδέτη, γ) η αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες των δενδριτικών κυττάρων, όπως οι ORs, και ο σχηματισμός ετεροδιμερών συμπλεγμάτων. Η πρωτεΐνη αυτή η οποία ανακαλύφθηκε πρώτα στο σκόρο *Antheraea polyphemus* (Rogers *et al*, 1997), έχει αποδειχτεί πως δρα στη *Drosophila* ως συνυποδοχέας της φερομόνης της, cVA (Jin *et al*, 2008).

**Γουανυλικές κυκλάσες (GCs):** Οι GCs αποτελούν διαμεμβρανικές πρωτεΐνες των οποίων ο φυσιολογικός ρόλος είναι η μετατροπή της τριφωσφορικής γουανοσίνης (GTP) σε μονοφωσφορική κυκλική γουανοσίνη (cGMP). Ορισμένες έχει προταθεί ότι εμπλέκονται στην πρόσληψη των οσμών-φερομονών ή στη ρύθμιση της.

### 1.3 Το μονοπάτι πρόσληψης των φερομονών στη *Drosophila*

Ένα από τα σημαντικότερα μοριακά μονοπάτια του οσφρητικού συστήματος των εντόμων είναι αυτό της πρόσληψης των φερομονών. Στη μύγα *Drosophila* έχει αποκαλυφθεί μόνο μια πτητική φερομόνη, η cVA (11-*cis* vaccenyl acetate), την οποία εκκρίνουν τα αρσενικά άτομα και επηρεάζει τη συμπεριφορά των αρσενικών και των θηλυκών ατόμων. Η cVA αφού προσληφθεί από το έντομο δημιουργεί σύμπλοκο εξωκυττάρια με την πρωτεΐνη OBP76a ή LUSH. Κατά την πρόσδεση της η φερομόνη φαίνεται πως προκαλεί σημαντικές αλλαγές στη στερεοδομή της LUSH. Εν συνεχεία, το σύμπλοκο κινείται προς την επιφάνεια του νευρώνα, όπου εκεί εδράζεται ένα σύμπλεγμα αποτελούμενο από τον υποδοχέα OR67d, το συνυποδοχέα OR83b και την μεμβρανική πρωτεΐνη SNMP. Η LUSH αφού έχει υποστεί τις αλλαγές στη στερεοδομή της δρα ως προσδέτης και αλληλεπιδρά με το παραπάνω σύμπλεγμα. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την

ενεργοποίηση του νευρώνα και τη μεταγωγή του σήματος της φερομόνης στον εγκέφαλο (Laughlin *et al*, 2008).



**Εικόνα 1.13.** Η μεταφορά και αναγνώριση της φερομόνης cVA από τις υπομονάδες του συμπλόκου του υποδοχέα της *Drosophila* (Vosshall, 2009).

#### 1.4 Σεξουαλικοί διμορφισμοί στην οσφρητική διαδικασία

Τα οσφρητικά μονοπάτια, λόγω της σημασίας τους στη σεξουαλική και αναπαραγωγική συμπεριφορά του εντόμου, εμφανίζουν έντονους διμορφισμούς μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων. Οι διμορφισμοί αυτοί αφορούν κυρίως στα επίπεδα έκφρασης των μοριακών συστατικών που σχετίζονται με την πρόσληψη των φερομονών ή με τον εντοπισμό κατάλληλου περιβάλλοντος ή ξενιστή για την αναπαραγωγή. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω (βλ. κεφ. 1.1.2), οι φερομόνες εκλύονται είτε από το αρσενικό, είτε από το θηλυκό άτομο ανάλογα με το είδος του εντόμου. Επομένως, η μελέτη των διμορφισμών στα επιμέρους έντομα εξαρτάται από το ρόλο που έχει το κάθε φύλο κατά τη σεξουαλική και αναπαραγωγική διαδικασία. Γι' αυτό το λόγο παρακάτω θα εξεταστούν παραδείγματα διμορφισμών σε ορισμένα έντομα, βάσει των διαθέσιμων στοιχείων.

***Bombyx mori*:** Ο μεταξοσκώληκας *B. mori* αποτελεί το πιο απλό παράδειγμα διμορφισμού. Στο έντομο αυτό τα θηλυκά άτομα εκκρίνουν τις φερομόνες βομβυκόλη και βομβυκόλη, οι οποίες προσλαμβάνονται από τα αρσενικά μέσω των υποδοχέων BmOR1 και BmOR3 που εκφράζουν αποκλειστικά αυτά. Η ευαισθησία τους στη φερομόνη αντικατοπτρίζεται στον τεράστιο αριθμό τριχοειδών αισθητικών τριχιδίων που εκφράζονται στα αρσενικά, με περίπου 17.000 σε κάθε κεραία (Heinbockel & Kaissling, 1996). Έπειτα, οι νευρώνες του BmOR1 μεταδίδουν το σήμα στα αρρρενο-ειδικά σπειράματα του εγκεφαλικού λοβού.

***Drosophila*:** Στη *Drosophila* η μοναδική φερομόνη που έχει ανακαλυφθεί, η cVA, εκλύεται αποκλειστικά από τα αρσενικά άτομα και προσλαμβάνεται από άτομα και των δύο φύλων, επάγοντας ωστόσο διαφορετική απόκριση στο καθένα. Στα θηλυκά επάγει την σεξουαλική έλξη, στα αρσενικά αποτρέπει τη σύζευξη των αρσενικών μεταξύ τους, ενώ και στα δύο φύλα επάγει συμπεριφορές συνάθροισης. Έχει φανεί, δε, πως οι περιοχές που συνδέονται με την πρόσληψη των φερομονών είναι περισσότερο ανεπτυγμένες στα αρσενικά άτομα (Shanbhag *et al*, 1999). Συγκεκριμένα, οι κεραίες των αρσενικών εντόμων είναι περισσότερο ευαίσθητες στις φερομόνες, κάτι που επιβεβαιώνεται από τη μεγαλύτερη κατά 30% ποσότητα τριχοειδών αισθητικών τριχιδίων που εντοπίζονται εκεί. Στα τριχοειδή τριχίδια εδράζονται οι υποδοχείς OR67d και OR47b, που έχει αποδειχτεί πως προσδένονται στη φερομόνη της *Drosophila* cVA. Αντίστοιχα, οι περιοχές του εγκεφάλου που συνδέονται με τους OSNs των OR67d και OR47b στα αρσενικά άτομα αποδείχτηκε πως είναι 62% και 33% μεγαλύτερες απ' ό,τι στα θηλυκά. Στη *Drosophila* επίσης έχει σημειωθεί διαφορετική έκφραση του υποδοχέα Gr68a ο οποίος εκφράζεται αποκλειστικά στα αρσενικά

άτομα, τα οποία έχουν περισσότερα γευστικά αισθητικά τριχίδια στο πρώτο τους πόδι σε σχέση με τα θηλυκά (~50 έναντι ~37). Ο υποδοχέας αυτός, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, συνδέεται με την επικοινωνία των εντόμων κατά το πρώτο στάδιο της σύζευξης (Bray & Amrein, 2003).

**Anopheles gambiae:** Στο κουνούπι, κύριο φορέα της ελονοσίας, *A. gambiae*, τα θηλυκά άτομα αξιοποιούν την όσφρηση τους κυρίως για την εύρεση ξενιστή και την ωοαπόθεση. Σε αντίθεση με τα αρσενικά άτομα, τα θηλυκά έχουν περίπου τρεις φορές περισσότερη ποσότητα τριχοειδών τριχιδίων (227 έναντι 629), που φαίνεται να συνδέεται με τις παραπάνω λειτουργίες και κυρίως με την αναγνώριση των οσμών που εκκρίνει ο άνθρωπος. Αντίστοιχα τουλάχιστον πέντε ORs, που εδράζονται κυρίως στα τριχοειδή τριχίδια έχει αποδειχτεί ότι εκφράζονται περισσότερο στα θηλυκά άτομα (Iatrou & Biessmann, 2008).

### 1.5 Χρήση οσμών στην καταπολέμηση εντόμων

Η σημασία των γενικών οσμών και των φερομονών στις φυσιολογικές λειτουργίες των εντόμων έχει αποτελέσει ένα εργαλείο για την καταπολέμηση και τον έλεγχο της εξάπλωσης εκείνων που εμφανίζουν παρασιτική δράση. Η αντιμετώπιση των εντόμων-παρασίτων είναι αναγκαία είτε λόγω της ζημιάς που προκαλούν στις αγροτικές καλλιέργειες (π.χ. δάκος στην ελιά, μεσογειακή μύγα σε μια σειρά φρούτων και λαχανικών κοκ), είτε λόγω της λειτουργίας τους ως φορέων παθογόνων μικροοργανισμών που ευθύνονται για σοβαρές ασθένειες (π.χ. *A. gambiae* και ελονοσία). Παρά τα, σχετικά, λίγα μοριακά δεδομένα για το οσφρητικό σύστημα των εντόμων-παρασίτων, η χρήση οσμών είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη και εφαρμόζεται σε τεχνικές καταπολέμησης στις οποίες αξιοποιούνται ως προσελκυστικά σε παγίδες. Οι οσμές αυτές έχουν προσδιοριστεί κυρίως εμπειρικά, ενώ οι εξελίξεις στην αποκάλυψη των ειδοειδικών φερομονών και η δυνατότητα μαζικής παραγωγής τους έχει αυξήσει τη χρήση και την αποτελεσματικότητά τους.

### 1.6 Ο δάκος της ελιάς

Ο δάκος, *Bactrocera oleae*, αποτελεί ένα ολομετάβολο, δίπτερο έντομο, το οποίο ανήκει στην οικογένεια Tephritidae. Το έντομο αυτό είναι ιδιαίτερα γνωστό λόγω της παρασιτικής δράσης του στον καρπό της ελιάς, δράση που το καθιστά το σημαντικότερο παράσιτο της ελιάς παγκοσμίως.

**Ο κύκλος ζωής του:** Το θηλυκό άτομο αφού συζευχθεί, γεννά τα αυγά του αποκλειστικά στον καρπό της ελιάς. Από κάθε αυγό εκκολάπτεται μια προνύμφη, η οποία τρεφόμενη από το εσωτερικό του ελαιόκαρπου αναπτύσσεται σε νύμφη, από την οποία στη συνέχεια προκύπτει το ενήλικο άτομο. Ο δάκος έχει από τρεις έως και έξι γενεές ανά έτος, ανάλογα με τις τοπικές συνθήκες, ενώ μπορεί να αποθέσει από 50 έως 400 αυγά, συνήθως ένα ανά καρπό. Ανεξαρτήτως φύλου, τα έντομα θεωρούνται ώριμα από την έβδομη μέρα ζωής τους. Τα θηλυκά άτομα μπορούν να συζευχθούν μόνο μια φορά στη ζωή τους, ενώ τα αρσενικά απεριόριστες.

**Η ζημιά:** Η ζημιά στην ελιά προκαλείται τόσο από την ωοαπόθεση των ενήλικων θηλυκών εντόμων, όσο και από την ανάπτυξη της προνύμφης. Η προνύμφη δημιουργεί στοές εντός του καρπού καθώς τρέφεται από το εσωτερικό του, καταστρέφοντάς τον τελικά, ενώ στο νύγμα ωοαπόθεσης ευνοείται η ανάπτυξη βακτηρίων και μυκήτων. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών προκαλεί το σάπισμα του καρπού και μειώνει σημαντικά την ποιότητα του ελαιόλαδου, λόγω της σημαντικής αύξησης των

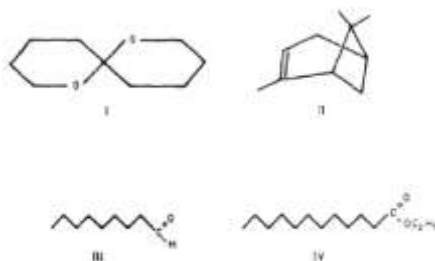
επιπέδων των ελεύθερων λιπαρών οξέων που οδηγούν τελικά σε δυσάρεστη αύξηση της οξύτητας του.

### 1.6.1 Σημασία και δεδομένα του οσφρητικού του συστήματος

Η σημασία ανάλυσης των δεδομένων του οσφρητικού του συστήματος έγκειται σε τρία χαρακτηριστικά που συνδέονται με το σύστημα αυτό:

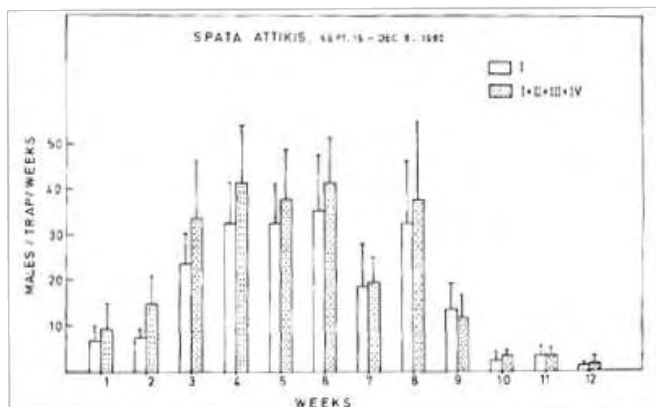
- 1) Τη συμπεριφορά κατά τη σύζευξη
- 2) Τον εντοπισμό του ελαιόκαρπου για την ωοαπόθεση
- 3) Την εύρεση της τροφής

Αναφορικά με τα συστατικά του οσφρητικού του συστήματος του δάκου δεν υπάρχουν πληροφορίες σε μοριακό επίπεδο. Ωστόσο είναι διαθέσιμα αρκετά δεδομένα σε σχέση με τις φερομόνες που εκκρίνονται για την επικοινωνία και τη σύζευξη, μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί πως η συγκεκριμένη φερομόνη εκκρίνεται ως επί το πλείστον από τα θηλυκά άτομα προσελκύοντας μόνο τα ώριμα αρσενικά, για λόγους αναπαραγωγής. Έκκριση της φερομόνης έχει παρατηρηθεί σε μικρότερες τιμές και από τα νεαρά αρσενικά άτομα (Mazomenos & Romonis, 1983), για λόγους που διερευνώνται, καθώς όπως αναφέρθηκε τη φερομόνη αυτή προσλαμβάνουν μόνο τα ώριμα αρσενικά άτομα. Η φερομόνη του δάκου έχει ονομαστεί olea και αποτελεί ένα μίγμα τεσσάρων συστατικών, τα δύο εκ των οποίων εντοπίζονται στον οπίσθιο πρωκτικό αδένα και τα άλλα δύο αλλού στο σώμα του εντόμου (Mazomenos and Haniotakis, 1981). Οι χημικές δομές των τεσσάρων αυτών συστατικών απεικονίζονται στην Εικόνα 1.14. Έχει σημασία εδώ να αναφερθεί πως ο δάκος αποτελεί το μοναδικό είδος του γένους Terphritidae του οποίου τις φερομόνες εκκρίνουν τα θηλυκά άτομα.



**Εικόνα 1.14.** Τα τέσσερα βασικά συστατικά του μίγματος της φερομόνης του δάκου. Περισσότερο δραστικό είναι το συστατικό I, το DSU (Mazomenos & Haniotakis, 1985).

Το πρώτο και πιο δραστικό συστατικό που προσδιορίστηκε στο δάκο είναι το 1,7-διοξάσπειρο-[5,5]-ενδεκάνιο (DSU) (Baker *et al*, 1980). Το DSU αποδείχτηκε σε πειράματα στον αγρό πως είναι πολύ πιο δραστικό από το κάθε άλλο συστατικό ξεχωριστά, με το μίγμα ωστόσο και των τεσσάρων συστατικών να έχει πιο έντονη δράση από το DSU μόνο του (Mazomenos & Haniotakis, 1985).



**Εικόνα 1.15:** Αριθμός των αρσενικών ατόμων δάκου/ανά παγίδα/ανά βδομάδα με χρήση κίτρινων κολλητικών παγίδων, που περιέχουν σε φυαλίδια με πολυαιθυλαίνιο είτε 15mg από την κύρια φερομόνη DSU (I), είτε 15mg της DSU σε συνδυασμό με τις κατάλληλες συγκεντρώσεις των υπολοίπων συστατικών του μίγματος (I+II+III+IV) (Mazomenos & Haniotakis, 1985).

### 1.6.2 Οσμές και παγίδες στο δάκο

Η ανακάλυψη και εργαστηριακή σύνθεση των φερομονών αυτών αναβάθμισε σημαντικά τις τεχνικές ελέγχου και καταπολέμησης του εντόμου, μέσω της χρήσης τους σε συνδυασμό με άλλα δολώματα. Η χρήση των φερομονών ή άλλων προσελκυστικών οσμών γίνεται κυρίως μέσω παγίδων, με σκοπό την μαζική παγίδευση των εντόμων αυτών (mass trapping) ή τον έλεγχο των πληθυσμών (monitor).

Οι σημαντικότεροι και πιο γνωστοί τύποι παγίδων παρατίθενται παρακάτω:

**McPhail trap:** Αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό και διαδεδομένο τύπο παγίδας. Περιλαμβάνει ένα δοχείο με δύο πλαστικά μέρη, το ένα εκ των οποίων είναι κίτρινο, χρώμα που έλκει το δάκο. Τα αρσενικά έντομα προσελκύνονται από φερομόνες που υπάρχουν στο εσωτερικό της παγίδας και καθώς εγκλωβίζονται στο εσωτερικό τους, πέφτουν στον πυθμένα του δοχείου όπου βρίσκεται σε υγρή μορφή κάποιο εντομοκτόνο μαζί με γευστικά δολώματα, όπως διττανθρακικό και φωσφορικό αμμώνιο. Οι παγίδες αυτές μπορεί να περιέχουν και άλλα δολώματα για την παγίδευση και των δύο φύλων, όπως τις γευστικές οσμές της ζύμης *Torula* ή του φυτικού εκχυλίσματος *NuLure*.

**Yellow sticky panel:** Είναι παγίδες κίτρινου χρώματος στις επιφάνειες των οποίων κολλάνε τα έντομα. Περιέχουν τη σεξουαλική φερομόνη των δάκων για την προσέλκυση των αρσενικών ατόμων και διττανθρακικό αμμώνιο ως γευστική προσελκυστική ουσία και για τα δύο φύλα.

**OLIFE trap:** Αποτελεί το πιο απλό τύπο παγίδας. Χρησιμοποιείται ένα απλό πλαστικό μπουκάλι με νερό και μια ποσότητα από τη ζύμη *torula*, η οποία προσελκύει το δάκο (και άλλα έντομα) ως πηγή τροφής. Τα έντομα εισέρχονται από μικρές οπές του μπουκαλιού, ανεξαρτήτως φύλου, και παγιδεύονται εντός του.

**Attract and kill device:** Αποτελείται από χαρτόνια, εμποτισμένα με πυρεθροειδή εντομοκτόνα. Ανά τέσσερα χαρτόνια υπάρχει ένα το οποίο φέρει φερομόνες και άλλα δολώματα.





**Εικόνα 1.16:** Οι τέσσερις κύριοι τύποι παγίδων του δάκου. Από αριστερά προς τα δεξιά: i) McPhail, ii) Yellow sticky panel, iii) OLIPE, iv) Attract and kill device.

### 1.7 Μειονεκτήματα των υπαρχουσών μεθόδων καταπολέμησης

Μέχρι στιγμής, η καταπολέμηση του δάκου στις αγροτικές καλλιέργειες βασίζεται κυρίως στη χρήση εντομοκτόνων, ενώ συμπληρωματικά χρησιμοποιούνται και οι παγίδες. Οι δύο αυτές μέθοδοι εγκυμονούν μια σειρά κινδύνων για τη δημόσια υγεία και την ισορροπία των οικοσυστημάτων, όπως θα περιγραφεί παρακάτω, που οδηγούν αναπόφευκτα στην ανάγκη για ανάπτυξη νέων μεθόδων ελέγχου, εξειδικευμένων στο δάκο που ωστόσο δεν θα συνοδεύονται από τις αρνητικές επιπτώσεις των υπαρχουσών.

Αρχικά, η μαζική χρήση των συμβατικών χημικών εντομοκτόνων (οργανοφωσφορικά και πυρεθροειδή) για την καταπολέμηση του δάκου έχει προκαλέσει μια σειρά ανεπιθύμητων παρενεργειών, όπως είναι η περιβαλλοντική ρύπανση και η μόλυνση του ελαιόλαδου, με άμεσο κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Επιπλέον, η μαζική χρήση τους οδηγεί στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας των πληθυσμών του εντόμου, ώστε τελικά σε πολλές περιπτώσεις η προσέγγιση αυτή να καθίσταται αναποτελεσματική.

Παράλληλα, η μαζική παγίδευση και εξόντωση (lure and kill) εντόμων διαμέσου παγίδων έχει δημιουργήσει μια σειρά οικολογικών ζητημάτων, λόγω της ταυτόχρονης παγίδευσης και κοινωφελών εντόμων στις παγίδες αυτές. Ουσιαστικά, η χρήση εμπειρικών δολωμάτων βασιζόμενων στην όσφρηση, τη γεύση και την όραση, χωρίς να στηρίζονται σε ειδοειδικά χαρακτηριστικά του δάκου, δεν αποτελεί εξειδικευμένη μέθοδο καταπολέμησης και οδηγεί στην εξόντωση εντόμων ωφέλιμων για τον άνθρωπο (π.χ. μέλισσες) ή εντόμων-παρασιτοειδών που δρουν ως φυσικοί εχθροί του δάκου (π.χ. *Eupelmus urozonus*) στο μικροπεριβάλλον της ελιάς.

### 1.8 Στόχος η μεγαλύτερη ειδοειδικότητα στην καταπολέμηση

Η ανάγκη για βελτίωση των μεθόδων καταπολέμησης με έμφαση στην ειδοειδικότητα οδηγεί αναπόφευκτα στην ανάγκη για διεύρυνση των μοριακών δεδομένων και στην εστίαση σε συγκεκριμένα μόρια με κρίσιμο ρόλο για τις βασικές λειτουργίες του δάκου. Η εξάρτηση της συμπεριφοράς του εντόμου και κατ' επέκταση της βιωσιμότητάς του από παράγοντες του οσφρητικού συστήματος, καθιστά το σύστημα αυτό έναν ελκυστικό στόχο για την ανάπτυξη εναλλακτικών παρεμβατικών μεθόδων ελέγχου. Η διεύρυνση των γνώσεων μας σε σχέση με τις ιδιαιτερότητες και τα χαρακτηριστικά των επιμέρους μορίων του οσφρητικού συστήματος καθώς και της ακριβούς αλληλεπίδρασης αυτών με τις οσμές και τις φερομόνες αναμένεται να συμβάλει καθοριστικά στην ανάπτυξη περισσότερο ειδοειδικών προσεγγίσεων, για τον αποτελεσματικότερο έλεγχο και την καταπολέμηση του δάκου.

Επιπλέον, μπορεί να συμβάλλει στην βελτίωση των υπό ανάπτυξη μοριακών μεθόδων καταπολέμησης του δάκου, οι οποίες φαίνεται πως ξεπερνούν τις παρενέργειες των παραδοσιακών μεθόδων καταπολέμησης με βασικότερη αυτών τη Μέθοδο Στείρων Εντόμων.

### 1.8.1 Η μέθοδος στείρων εντόμων (Sterile Insect Technique, SIT)

Η μέθοδος στείρων εντόμων αποτελεί την πλέον διαδεδομένη εναλλακτική μέθοδο αντιμετώπισης των εντόμων-παρασίτων, λόγω του ότι είναι ειδοειδική, περιβαλλοντικά φιλική και μπορεί να εφαρμοστεί σε μεγάλη κλίμακα. Αν και ως ιδέα ξεκίνησε τις δεκαετίες του 1930 και 1940, για πρώτη φορά εφαρμόστηκε σε ευρεία κλίμακα το 1955 (Knipling *et al*, 1955) με σκοπό την εξάλειψη του παρασιτικού σκουληκιού *Cochliomyia hominivorax* (New world screwworm) από τις ΗΠΑ, το Μεξικό και την κεντρική Αμερική.

**Αρχή της μεθόδου** είναι η στείρωση μεγάλου αριθμού, κατά βάση, αρσενικών εντόμων σε εργαστηριακές συνθήκες και η απελευθέρωσή τους στις προσβεβλημένες περιοχές, με στόχο τη σύζευξή τους με αγρίου-τύπου θηλυκά έντομα και την επακόλουθη μείωση του φυσικού πληθυσμού.

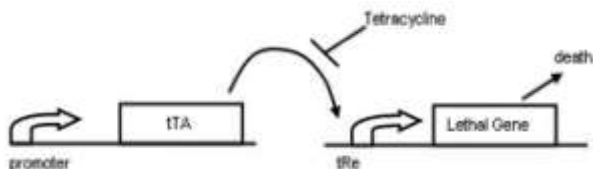
**Στείρωση μέσω ακτινοβολίας.** Αποτέλεσε την πρώτη μέθοδο η οποία προτάθηκε και εφαρμόστηκε για τη στείρωση των εντόμων. Κατά τη μέθοδο αυτή τα έντομα διαχωρίζονται βάσει του φύλου τους, τα αρσενικά υφίστανται στείρωση με χρήση ακτινοβολίας γ και μετά απελευθερώνονται στον αγρό ώστε να συζευχθούν με τα θηλυκά έντομα.

Κατά την εφαρμογή της τεχνικής αυτής στο φυσικό περιβάλλον αποδείχτηκε πως οι εργαστηριακοί αρσενικοί πληθυσμοί είχαν σημαντικό μειονέκτημα ως προς την προσέλκυση των θηλυκών σε σχέση με τα αγρίου τύπου αρσενικά έντομα (Atkinson & Michel, 2002). Η μείωση αυτή της ανταγωνιστικής τους ικανότητας οφείλεται σε μια σειρά από παράγοντες που σχετίζεται με την ανάπτυξη των εργαστηριακών πληθυσμών στις ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες, καθώς και από παρενέργειες οφειλόμενες στη χρήση ακτινοβολίας. Η χρήση της ακτινοβολίας οδηγεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών οι οποίες δρουν επιβλαβώς για το έντομο. Τελικά, οι καταπονήσεις που υφίστανται τα έντομα μπορεί να οδηγήσουν σε μείωση της ικανότητας πτήσεων τους και σε αλλαγές κατά την προσυζευκτική τους συμπεριφορά (πρότυπο δόνησης φτερών, προσυζευκτικό ήχοι). Παράλληλα, η ανάπτυξη τους στις ελεγχόμενες συνθήκες του εργαστηρίου οδηγεί σε παρενέργειες σχετικές με άλλες φυσιολογικές διαδικασίες της αναπαραγωγής, όπως είναι η διαφορά στις ώρες της μέρας που εμφανίζουν οίστρο, σε σχέση με τα αγρίου τύπου άτομα. Όλα τα παραπάνω συντελούν στη μείωση της ανταγωνιστικής ικανότητας των εργαστηριακών αρσενικών πληθυσμών σε σχέση με τους αντίστοιχους αγρίου τύπου (Lance & McInnis, 2005).

### 1.8.2 Η μέθοδος απελευθέρωσης εντόμων που φέρουν επικρατές θνησιγόνο γονίδιο (RIDL)

Για την αντιμετώπιση των προβλημάτων που προκαλεί η ακτινοβολία στην ανταγωνιστική ικανότητα του εντόμου έχουν αναπτυχθεί τεχνικές που βασίζονται στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA. Κυριότερη αυτών είναι το σύστημα RIDL (Thomas *et al*, 2000). Σύμφωνα με το σύστημα αυτό, εισάγεται στα έντομα ένα επικρατές θνησιγόνο γονίδιο, το οποίο συνήθως ελέγχεται από ένα θηλεο-ειδικό 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 θνησιγόνου γονιδίου και τα οποία ελέγχονται και απενεργοποιούνται από το αντιβιοτικό τετρακυκλίνη. Οπότε παρουσία της τετρακυκλίνης σε εργαστηριακές συνθήκες το θνησιγόνου 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 θνησιγόνου γονίδιο προκαλώντας το θάνατο των θηλυκών τους απογόνων.

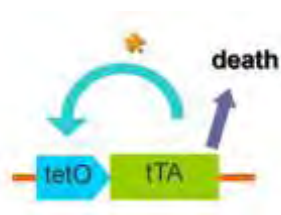


**Εικόνα 1.17:** Ο μηχανισμός δράσης του συστήματος της τετρακυκλίνης (Tet-Off). Απουσία της ο συνθετικός *trans*-ενεργοποιητής (tTA), επάγει την έκφραση του θνησιγόνου γονιδίου (Alrhey, 2002).

### 1.8.3 Εφαρμογές σε παρασιτικά έντομα

Οι SIT τεχνικές λόγω των ιδιαίτερων πλεονεκτημάτων που εμφανίζουν έχουν χρησιμοποιηθεί σε αρκετές περιπτώσεις παρασιτικών εντόμων με ιδιαίτερη επιτυχία. Άξια αναφοράς είναι τα παραδείγματα της εξάλειψης του σαρκοφάγου σκουληκιού, *Cochliomyia hominivorax*, από τη Βόρεια, την κεντρική Αμερική και τη Λιβύη, της μύγας τσετσε, *Glossina austeni*, από το νησί Ουγγκούτζα της Τανζανίας, της μύγας του πεπονιού *Bactrocera cucurbitae* από την Ιαπωνία και της μύγας του Κουίνσλαντ, *Bactrocera tryoni*, από τη δυτική Αυστραλία. Παράλληλα, οι μέθοδοι της μαζικής απελευθέρωσης στείρων εντόμων έχουν αποτρέψει την εγκαθίδρυση παρασιτικών εντόμων σε νέες περιοχές, όπως της μεσογειακής μύγας, *Ceratitis capitata*, στην Καλιφόρνια και τη Φλόριντα των ΗΠΑ, το Μεξικό και τη Χιλή (για ανασκόπηση: Klassen & Curtis, 2005).

Η μεσογειακή μύγα, συγγενικό είδος του δάκου και το κατεξοχήν μοντέλο της οικογένειας των Terphritidae, αποτέλεσε το πρώτο παρασιτικό έντομο στο οποίο εφαρμόστηκε το σύστημα RIDL, μέσω της δημιουργίας σειρών που οδηγούσαν σε θάνατο και των δύο φύλων (Gong *et al*, 2005). Ο θάνατος επέρχεται είτε στο στάδιο της προνύμφης είτε στο στάδιο της νύμφης. Στο σύστημα αυτός ο θάνατος προκαλείται από τον *trans*-ενεργοποιητή (tTA), χωρίς να υπάρχει κάποιο θνησιγόνου γονίδιο, λόγω τοξικότητας που προκαλεί στο κύτταρο σε μεγάλες ποσότητες, με την έκφραση του να ρυθμίζεται από την τετρακυκλίνη (βλ. Εικόνα 1.18). Έτσι, τα αρσενικά και θηλυκά άτομα των σειρών αυτών επιβίωναν και αναπαράγονταν κανονικά στο εργαστήριο, μέσω της διατροφής με τετρακυκλίνη, έως ότου είχαν αναπτυχθεί σε βαθμό τέτοιο ώστε να ελευθερωθούν στον αγρό.

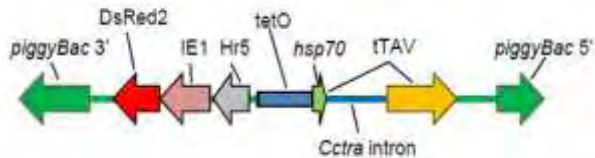


**Εικόνα 1.18.** Το σύστημα tet-off με ένα συστατικό. Παρουσία της τετρακυκλίνης καταστέλλεται η σύνθεση του tTA. Απουσία της, το tTA συντίθεται αποτελώντας παράλληλα και τον ενεργοποιητή της επανέκφρασης του (θετικό feedback). Έτσι, σε υπερβολικές ποσότητες προκαλεί τοξικότητα και θάνατο στα κύτταρα που εκφράζεται.

## 1.9 SIT και RIDL στο δάκο

Στο δάκο, παρά τις σχετικά επιτυχείς προσπάθειες σε άλλα έντομα της οικογένειας Tephritidae, οι προσπάθειες για εφαρμογή της SIT τεχνικής μέσω ακτινοβολίας είχαν δώσει απογοητευτικά αποτελέσματα. Κύριοι λόγοι γι' αυτά ήταν οι διαφορετικοί ημερήσιοι ρυθμοί σύζευξης μεταξύ εργαστηριακών και φυσικών πληθυσμών, καθώς και η μειωμένη ανταγωνιστικότητα ως προς την προσέλκυση του άλλου φύλου που προκαλούσε η χρήση της ακτινοβολίας στους εργαστηριακούς πληθυσμούς (Economidou, 2001). Στην κατεύθυνση της επίλυσης των παραπάνω ζητημάτων είναι οι προσπάθειες δημιουργίας και εφαρμογής ενός συστήματος RIDL, αντίστοιχου με αυτό που έχει αναπτυχθεί για τη μεσογειακή μύγα. Πρόσφατα, δημιουργήθηκε η πρώτη διαγονιδιακή κατασκευή με σκοπό τη χρήση της σε σύστημα RIDL για το δάκο (Ant *et al*, 2012). Η κατασκευή αυτή ονομάζεται OX3097 και χρησιμοποιεί ένα τραπεζοζόνιο τύπου piggyBac για την εισαγωγή της στο γονιδίωμα του εντόμου. Η θνησιμότητα των απογόνων προκαλείται από την τοξική δράση του στοιχείου tTA όταν αυτό παράγεται σε υπερβολικές ποσότητες, με την έκφραση του να απενεργοποιείται από το αντιβιοτικό τετρακυκλίνη (βλ. Εικόνα 1.18). Τα πλεονεκτήματα του συγκεκριμένου συστήματος εστιάζονται στην υψηλή διεισδυτικότητα που εμφανίζει, στην επικρατή δράση του και τη θηλεο-ειδική του έκφραση. Επιπλέον, κατά τη δημιουργία διαγονιδιακών εντόμων και τη μελέτη της αναπαραγωγικής τους συμπεριφοράς διαπιστώθηκε η επιτυχία του συστήματος, το οποίο υπερβαίνει τα προβλήματα που παρουσιάζονταν κατά τις προσπάθειες δημιουργίας στειρών δάκων με τις κλασικές μεθόδους SIT. Τα διαγονιδιακά αρσενικά έντομα δηλαδή είχαν συγχρονισμένους ρυθμούς αναπαραγωγής με τα θηλυκά αγρίου-τύπου, ενώ δεν υστερούσαν κάπου στην ανταγωνιστική τους ικανότητα προσέλκυσης και σύζευξης με τα θηλυκά, συγκριτικά με τα αγρίου-τύπου αρσενικά άτομα (Ant *et al*, 2012).

Τα παραπάνω πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες και για την επιβεβαίωση των συμπερασμάτων πρέπει να διεξαχθούν αντίστοιχες προσεγγίσεις σε φυσικές συνθήκες στον αγρό.



**Εικόνα 1.19.** Η διαγονιδιακή κατασκευή σε τραπεζοζόνιο piggyBac, που προσδίδει τη θνησιμότητα στα θηλυκά άτομα. Η θηλεο-ειδικότητα της κατασκευής αυτής έγκειται στο εναλλακτικό μάτισμα που υφίσταται το ιντρόνιο Cctra, αναλόγως του φύλου, ενώ ο θάνατος προκαλείται από την υπερέκφραση του στοιχείου tTAV.

## 1.10 RIDL και οσφρητικό σύστημα

Η ανάπτυξη του μοριακού συστήματος RIDL και η βέλτιστη εφαρμογή του απαιτεί την εκτενή μελέτη και γνώση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στις διαδικασίες της αναπαραγωγής και της σεξουαλικής συμπεριφοράς του εντόμου. Εδώ εντοπίζεται και η σημασία της ανάλυσης των μοριακών δεδομένων του οσφρητικού συστήματος του δάκου. Η γνώση των ιδιαίτερων μοριακών χαρακτηριστικών αυτού μπορεί να συμβάλει στην άμβλυνση των δυσκολιών που αντιμετωπίζει η

## Εισαγωγή

---

εφαρμογή του συστήματος RIDL στον αγρό, με κύρια αυτή του ανταγωνιστικού μειονεκτήματος των εργαστηριακών αρσενικών εντόμων σε σχέση με τα αγρίου-τύπου, ως προς την προσέλκυση του αντίθετου φύλου. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η σεξουαλική συμπεριφορά του εντόμου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την έκκριση και την πρόσληψη των φερομονών. Συνεπώς αφ' ενός η ταυτοποίηση των γονιδιακών τόπων και ο καθορισμός των κύριων χαρακτηριστικών των συστατικών αυτών των μονοπατιών, και αφ' ετέρου η ακόλουθη εισαγωγή των κατάλληλων γονιδιακών τόπων στα διαγονιδιακά έντομα θα μπορούσε να προσδώσει αξιοσημείωτα πλεονεκτήματα στους εργαστηριακούς πληθυσμούς.

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν ο εντοπισμός, η κλωνοποίηση και η λειτουργική ανάλυση γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στο οσφρητικό σύστημα του δάκου της ελιάς, *Bactrocera oleae*. Προς την κατεύθυνση αυτή ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις. Αρχικά, ενισχύθηκαν αλληλουχίες του οσφρητικού συστήματος του δάκου χρησιμοποιώντας ετερόλογους εκκινητές αντίστοιχων γενετικών τόπων του συγγενικού του είδους *Ceratitis capitata*. Τα προϊόντα ενίσχυσης ταυτοποιήθηκαν με υβριδοποίηση κατά Southern και ακολούθως κλωνοποιήθηκαν, έτσι ώστε να προσδιοριστεί μελλοντικά η αλληλουχία τους. Παράλληλα, χρησιμοποιώντας διαθέσιμες μεταγραφόμενες αλληλουχίες που είχαν προκύψει με RNA seq από το κεφάλι του δάκου, σχεδιάστηκαν νέοι ομόλογοι εκκινητές, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν σε μια πρωταρχική ανάλυση της έκφρασης τεσσάρων γενετικών τόπων σε επίπεδο τρανσκριπτόματος, προσδιορίζοντας με ποσοτική Real-time PCR τα επίπεδα έκφρασης mRNA σε αρσενικά και θηλυκά άτομα.

### 3. Μέθοδοι - Υλικά

### 3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR αποτελεί μια εξαιρετικά διαδεδομένη τεχνική στη μοριακή βιολογία. Παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 1986 (Mullis *et al*, 1986). Αρχή της είναι ο ενζυμικός πολλαπλασιασμός επιλεγμένων αλληλουχιών DNA σε πολλαπλά αντίγραφα, μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων με εναλλαγές στη θερμοκρασία. Σε κάθε κύκλο ο νεοσυντιθέμενος κλώνος λειτουργεί ως εκμαγείο για τη σύνθεση νέων, πολλαπλασιάζοντας εκθετικά την αλληλουχία στόχο.

Ένας κύκλος PCR περιλαμβάνει τρία κύρια στάδια:

1. **Το στάδιο της αποδιάταξης.** Στο στάδιο αυτό αποδιατάσσεται το δίκλωνο DNA στις δύο μονόκλωνες αλυσίδες του, σε υψηλή θερμοκρασία 94-95°C.
2. **Το στάδιο της υβριδοποίησης.** Στο στάδιο αυτό υβριδοποιούνται οι εκκινητές (primers) στις αποδιαταγμένες αλυσίδες. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης ( $T_a$ ) εξαρτάται από την θερμοκρασία τήξης των εκκινητών ( $T_m$ ). Η  $T_m$  υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο:  $T_m = 4 * (\text{αριθμός βάσεων G+C}) + (\text{αριθμός βάσεων A+T})$ , ενώ η  $T_a$  ισούται με  $T_m - 5$  (Thein & Wallace, 1986).
3. **Το στάδιο της επιμήκυνσης.** Στο στάδιο αυτό δρα το ένζυμο Taq πολυμεράση, το οποίο αναγνωρίζοντας τους εκκινητές επιμηκώνει την επιθυμητή αλληλουχία. Η θερμοκρασία για την αντίδραση επιμήκυνσης είναι 72-74°C.

Ανάλογα με το μέγεθος του επιθυμητού προϊόντος ρυθμίζεται και ο αριθμός των κύκλων, λαμβάνοντας υπόψιν ότι συνήθως μετά τους 30 κύκλους η μέθοδος εμφανίζει συχνά λάθη. Ο υπολογισμός των τελικών αντιγράφων της αλληλουχίας προκύπτει ως  $2^n$  αντίγραφα του κάθε αρχικού μορίου DNA, όπου  $n$  οι κύκλοι της PCR.

Παρακάτω φαίνονται τα στάδια μιας τυπικής αντίδρασης PCR:

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

#### Υλικά:

- DNA
- Εκκινητές (Forward και Reverse)
- dNTPs
- DNA Taq πολυμεράση
- Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (Buffer)
- $MgCl_2$



**Μέθοδος:**

Για την πραγματοποίηση μιας τυπικής αντίδρασης PCR τελικού όγκου 20μl προστίθενται στα ειδικά PCR σωληνάκια:

Υλικά	C <sub>αρχικό</sub>	C <sub>τελικό</sub>	Ποσότητα
<b>DNA</b>	-	10-40ng	εξαρτάται από το C <sub>αρχ</sub>
<b>Buffer</b>	10X	1X	2μL
<b>dNTPs</b>	40mM	0,8mM	0,4μL
<b>εκκινητής F</b>	10pmol/μL	0,4-0,6μM	0,7μL
<b>εκκινητής R</b>	10pmol/μL	0,4-0,6μM	0,7μL
<b>Taq πολυμεράση</b>	5units/μL	1unit	0,2μL
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	-	-	συμπληρώνει τον όγκο
Τελικός όγκος			20μL

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

### 3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)

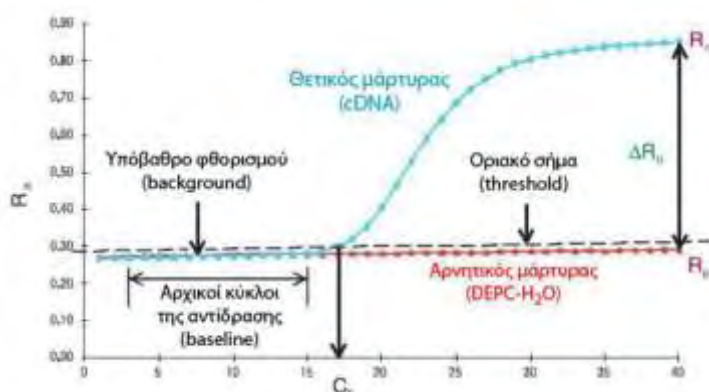
Η Real-time PCR αποτελεί μια τεχνική η οποία χρησιμεύει στον ακριβή προσδιορισμό της ποσότητας DNA ή RNA που βρίσκεται αρχικά σε ένα δείγμα, καθώς και στη σύγκριση των ποσοτικών τιμών της ίδιας αλληλουχίας μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων. Η αρχή της μεθόδου είναι ίδια με αυτήν της PCR, περιέχει δηλαδή τα ίδια 3 στάδια και χρησιμοποιούνται τα ίδια υλικά, αλλά επιπλέον μας δίνει τη δυνατότητα να παρακολουθούμε την πορεία ενίσχυσης των τμημάτων μας, σε πραγματικό χρόνο.

Η δυνατότητα αυτή οφείλεται στη δράση μιας φθορίζουσας χρωστικής, που ονομάζεται SYBR Green. Η SYBR Green ενσωματώνεται στα δίκλινα μόρια που συντίθενται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης στο διάλυμα παράγοντας φθορισμό, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος. Μειονέκτημα κατά τη χρήση της χρωστικής αυτής ως σύστημα ανίχνευσης είναι πως μπορεί να ενσωματώνεται σε οποιοδήποτε δίκλινο μόριο, εκτός του μορίου-στόχου, συμπεριλαμβάνοντας και διμερή των εκκινητών ή ενισχυμένα μη-ειδικά προϊόντα της αντίδρασης και να οδηγεί τελικά σε αύξηση του συνολικού φθορισμού. Η ποσοτικοποίηση του αρχικού δείγματος υπολογίζεται μέσω της τιμής C<sub>q</sub> (ή C<sub>t</sub>), η οποία αποτελεί τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για να ξεπεράσει το προϊόν το όριο ανίχνευσης φθορισμού (threshold). Η τιμή αυτή είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας της μήτρας DNA (Εικ. 3.1).

Για την αξιόπιστη σύγκριση των επιπέδων mRNA σε διαφορετικά δείγματα απαραίτητη είναι και η διαδικασία κανονικοποίησης των τιμών έκφρασής τους. Της αντιστάθμισης δηλαδή πειραματικών σφαλμάτων, που μπορεί να οφείλονται είτε στο χειρισμό των δειγμάτων (όπως η εισαγωγή διαφορετικών τελικών ποσοτήτων γενετικού υλικού από το κάθε δείγμα στην αντίδραση), είτε στις διαφορετικές αποδόσεις των αντιδράσεων αντίστροφης μεταγραφής αλλά και της ίδιας της PCR. Για την κανονικοποίηση των τιμών η πιο συνήθης μέθοδος είναι η

παράλληλη ενίσχυση ενός γονιδίου σταθερής έκφρασης (housekeeping gene, *hkg*) σε όλους τους ιστούς, που θα λειτουργήσει ως εσωτερικός μάρτυρας και θα αποτελέσει ουσιαστικά το γονίδιο αναφοράς. Τελικά η κανονικοποιημένη ποσότητα της αλληλουχίας στόχου προσδιορίζεται ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς (σχετική έκφραση). Η σχετική ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται με τη μέθοδο σύγκρισης των Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) (Livak *et al*, 2001).

Στην παρούσα διαδικασία η ανάλυση όλων των δεδομένων της Real-Time PCR έγινε με χρήση του προγράμματος CFX Manager Software (Bio-Rad CFX96).



**Εικόνα 3.1.** Σχηματική απεικόνιση της καμπύλης της ποσοτικής Real-Time PCR. Διακρίνονται οι παράμετροι παρακολούθησης και ελέγχου της αντίδρασης.

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

Παρακάτω φαίνονται τα στάδια μιας τυπικής Real-Time PCR:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	4min	1
Αποδιάταξη	95°C	20sec	39
Υβριδισμός	$T_a$	30sec	
Απαλοιφή θορύβου	95°C-55°C	ανά 5sec μειώνεται η T κατά 0,5°C	1

**Υλικά:**

- DNA
- Εκκινητές (Forward και Reverse)

- iTaq Universal SYBR Green Supermix (Mix διάλυμα, στο οποίο περιέχονται τα: hot-start iTaq DNA polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, SYBR® Green I dye)

#### Μέθοδος:

Για την πραγματοποίηση μιας Real-time PCR προστίθενται στα ειδικά PCR σωληνάκια τα παρακάτω συστατικά με τελικό όγκο 15μL. Τα συστατικά της αντίδρασης dNTPs, Taq πολυμεράση, ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης, MgCl<sub>2</sub> και SYBR Green βρίσκονται ήδη στο Buffer mix.

Για το κάθε δείγμα cDNA πραγματοποιείται ξεχωριστή αντίδραση ενίσχυσης με το εκάστοτε ζεύγος εκκινητών ανά γονίδιο, καθώς και με τους εκκινητές του *hkg*, που στην παρούσα διαδικασία πρόκειται για το ριβοσωμικό γονίδιο *RpL19*.

Στην παρούσα ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το σύστημα:

Υλικά	Ποσότητες
cDNA	εξαρτάται από τη συγκέντρωση
Buffer mix	7,5μL (1X)
Εκκινητής R	0,6μL
Εκκινητής F	0,6μL
ddH <sub>2</sub> O	συμπληρώνει τον όγκο
<b>Τελικός όγκος</b>	<b>15μL</b>

### 3.3 Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή από ολικό RNA ιστού

Η αντίστροφη μεταγραφή είναι η διαδικασία κατά την οποία το RNA μετατρέπεται σε δίκλωνο μέσω της σύνθεσης μιας συμπληρωματικής cDNA αλυσίδας. Η μετατροπή αυτή επιλέγεται για την καλύτερη προστασία του, καθώς ως μονόκλωνο το RNA είναι περισσότερο ασταθές και συνεπώς ευαίσθητο σε ένζυμο αποικοδόμησης. Επιπλέον για τη δυνατότητα ενίσχυσής του μέσω PCR, όπως στην περίπτωση της ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης, το μόριο πρέπει να βρίσκεται σε δίκλωνη μορφή.

#### Υλικά:

- Ολικό RNA του επιθυμητού ιστού
- Τυχάιοι εκκινητές
- dNTPs
- Ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση
- Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (5X)
- Αναστολέας ριβονουκλεασών

**Μέθοδος:**

Η διαδικασία αυτή δεν περιλαμβάνει κύκλους και πραγματοποιείται εντός θερμοκυκλοποιητή. Ο ρόλος των τυχαίων εκκινητών είναι, χάριν στη μικρή εξειδίκευση τους, να προσδεθούν τυχαία στο σύνολο του RNA μορίου, έτσι ώστε να υβριδοποιηθούν και να συντεθεί η συμπληρωματική αλυσίδα σε όλο το μήκος του και όχι μόνο σε κάποιο τμήμα του. Για την πραγματοποίηση του εισάγονται σε PCR σωληνάκια των 20μL τα παρακάτω υλικά:

Υλικά	Ποσότητες
<b>RNA</b>	εξαρτάται απ' την συγκέντρωση
<b>τυχαίοι εκκινητές</b>	1,5μL (450ng)
<b>επώαση στους 70°C για 10min, έπειτα στον πάγο για 5min</b>	
<b>dNTPs</b>	1μL (2mM)
<b>Buffer</b>	4μL (1X)
<b>Αναστολέας ριβονουκλεασών</b>	1μL (40u)
<b>Αντίστροφη μεταγραφάση</b>	1μL (200u)
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	εξαρτάται από τη τιμή του RNA
<b>επώαση στους 39°C για 50min και έπειτα στους 70°C για 10min</b>	
<b>Τελικός όγκος</b>	<b>20μL</b>

**3.4 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (gel) αгарόζης**

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια μέθοδο που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την απομόνωση και την ταυτοποίηση μορίων, όπως το DNA (Sambrook *et al*, 1989). Τα μόρια του DNA εισάγονται σε ειδικές θέσεις εντός του πήκτωματος αгарόζης, ενός πορώδους μέσου με βασικό συστατικό την αгарόζη, το οποίο είναι τοποθετημένο μέσα σε μια συσκευή που φέρει δύο πόλους για τη δημιουργία ηλεκτρικού πεδίου (συσκευή ηλεκτροφόρησης). Αφού εφαρμοστεί το ηλεκτρικό πεδίο το DNA αρχίζει να μετακινείται (εντός του gel) προς τον θετικό πόλο της συσκευής λόγω του αρνητικού φορτίου που φέρει σε ουδέτερο pH. Βάσει, λοιπόν, των διαφορών στο μέγεθος του DNA πραγματοποιείται ο διαχωρισμός, με τα μικρότερα σε μέγεθος (ζεύγη βάσεων) δείγματα να μετακινούνται ταχύτερα προς το θετικό πόλο.

Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται μέσω της εισαγωγής μιας φθορίζουσας χρωστικής, του βρωμιούχου αιθιδίου, που παρεμβάλεται εντός της διπλής έλικας του DNA και ανιχνεύεται υπό την επίδραση υπεριώδους φωτός. Επιπλέον, ο υπολογισμός του μεγέθους των δειγμάτων μας βασίζεται στη σύγκριση με μάρτυρα γνωστού

μοριακού βάρους (ladder), ο οποίος αποτελεί ένα μίγμα τμημάτων με διακριτά μοριακά μεγέθη και μετακινείται παράλληλα με το DNA στο ηλεκτρικό πεδίο.

#### Υλικά:

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

#### Μέθοδος:

Για την παρασκευή 100mL πηκτώματος αγαρόζης 1%, 0,5X TBE ακολουθούνται τα εξής βήματα:

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

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων:

1. Τοποθέτηση του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
2. Προσθήκη διαλύματος TBE 0,5X ώστε να καλυφθούν πλήρως τα πηγαδάκια της ηλεκτροφόρησης.
3. Προσθήκη διαλύματος φόρτωσης στα, προς ηλεκτροφόρηση, δείγματα.
4. Εισαγωγή των δειγμάτων καθώς και του Ladder στα διαφορετικά πηγαδάκια του πηκτώματος.

Η παρακολούθηση της ηλεκτροφόρησης μπορεί να γίνει είτε δια γυμνού οφθαλμού, παρατηρώντας τα δύο συστατικά του διαλύματος φόρτωσης (μπλε βρωμοφαινόλης ~300bp, κυανού ξυλόλης ~4000bp), είτε δια της υπεριώδους ακτινοβολίας.

### 3.5 Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction)

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

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με το πρωτόκολλο Ron's gel extraction mini-kit της εταιρείας BioRon.

#### Υλικά:

- Buffer ASB I
- Buffer ASB II
- Διάλυμα πλύσης μεμβρανών (WB-Wash Buffer)
- Υδατικό διάλυμα ελεύθερο νουκλεασών (Elution Buffer)

#### Μέθοδος:

1. Τοποθέτηση του κομματιού του πηκτώματος με την επιθυμητή ζώνη σε σωληνάκι τύπου erpendorf 1,5mL και ζύγιση του.
2. Μετά τον υπολογισμό του βάρους του, προστίθεται ποσότητα του Buffer ASB I, σε αναλογία 3μL για κάθε 1mg gel.
3. Ανάδευση και επώαση σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 60°C, έως ότου λιώσει πλήρως το πήκτωμα ~15min.
4. Μεταφορά του διαλύματος σε στήλη (spin column) η οποία είναι τοποθετημένη μέσα σε σωλήνα συλλογής και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1min.
5. Φυγοκέντρηση του διαλύματος για 1min στις 10.000 στροφές, απόχυση του εκλούσματος από το σωλήνα συλλογής και επανατοποθέτηση της στήλης στον σωλήνα συλλογής.
6. Προσθήκη 300μL Buffer ASB II και φυγοκέντρηση του στις 10.000 στροφές για 1 min. Το έκλουσμα αποχύνεται από το σωλήνα συλλογής και η διαδικασία επαναλαμβάνεται.
7. Προσθήκη 700μL Wash Buffer και φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές για 1min. Το έκλουσμα αποχύνεται από το σωλήνα συλλογής και η διαδικασία επαναλαμβάνεται.
8. Το διάλυμα αφήνεται για 3-4min στον πάγο.
9. Χωρίς να προστεθεί κάποιο διάλυμα τα tubes εισάγονται εκ νέου για φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές για 1min προκειμένου να στεγνώσουν πλήρως.
10. Η στήλη (spin column) αφαιρείται από το σωλήνα και τοποθετείται πάνω από ένα καθαρό σωληνάκι τύπου erpendorf.
11. Προστίθενται προσεκτικά στο κέντρο της στήλης 30-50μL Elution buffer, το οποίο έχει προθερμανθεί σε υδατόλουτρο για ~10min και αφήνεται για 2-3min στον πάγο.
12. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 1min στις 5.000 στροφές, και το DNA που έχει πια ανακτηθεί αποθηκεύεται στους 4°C.

### 3.6 Κατακρήμνιση DNA

Στόχος της διαδικασίας αυτής είναι η συμπύκνωση των νουκλεϊκών οξέων ενός διαλύματος και ο καθαρισμός τους μέσω της απομάκρυνσης αλάτων, ολιγονουκλεοτιδίων ή άλλων προσμίξεων που μπορεί να βρίσκονται στο διάλυμα αυτό.

**Υλικά:**

- Ισοπροπανόλη
- Διάλυμα οξικού νατρίου ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )
- Αιθανόλη 70%
- Γλυκογόνο

**Μέθοδος:**

1. Προσθήκη στο διάλυμα ισοπροπανόλης ίσου όγκου με αυτό.
2. Προσθήκη οξικού νατρίου τόσο ώστε η τελική του συγκέντρωση να ισούται με 0,3M (συνήθως  $C_{\text{αρχ}}=3\text{M}$ ).
3. Προσθήκη 0,5μL γλυκογόνου.
4. Επώαση για 30min σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Φυγοκέντρηση σε μέγιστες στροφές για 20-25min.
6. Απόχυση του υπερκειμένου και προσθήκη μισού όγκου αιθανόλης 70%.
7. Νέα φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε μέγιστες στροφές και απόχυση του υπερκειμένου.
8. Το erpendorf αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου ξηραθεί το ίζημα του, που αποτελείται από το DNA.
9. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε υδατικό διάλυμα.

### 3.7 Υβριδοποίηση κατά Southern

Η υβριδοποίηση κατά Southern αποτελεί μια μέθοδο για την εξακρίβωση της ύπαρξης ή μη μιας αλληλουχίας DNA από ένα πλήθος. Η διαδικασία της περιλαμβάνει την μεταφορά τμημάτων DNA, που έχουν διαχωριστεί σε πήκτωμα αγαρόζης, σε νάυλον μεμβράνη και ακολούθως την υβριδοποίηση κατάλληλου ανιχνευτή

Η μέθοδος αυτή αποτελείται από πέντε διαδικασίες, οι οποίες θα αναπτυχθούν χωριστά:

- A. Τη μεταφορά και σταθεροποίηση του DNA από το πήκτωμα σε νάυλον μεμβράνη
- B. Τη σήμανση των ανιχνευτών
- Γ. Την προϋβριδοποίηση της μεμβράνης
- Δ. Την υβριδοποίηση του DNA με τον σημασμένο ανιχνευτή
- E. Την εμφάνιση του σήματος

**Υλικά:**

- Διάλυμα αποδιάταξης (1,5M NaCl, 0,5M NaOH)
- Διάλυμα εξουδετέρωσης [0,5M Tris (pH:7,5), 1,5M NaCl]
- Διάλυμα SSC 10X
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
- Φίλτρα τύπου whatman
- DNA αλληλουχία ανιχνευτής

- dNTPs
- Biotin-UTP
- Ένζυμο Klenow
- Ρυθμιστικό διάλυμα Klenow
- Διάλυμα υβριδοποίησης
- Salmon sperm DNA, 100μg/mL
- Διάλυμα wash I (SSC 2X, SDS 0,1%)
- Διάλυμα wash II (SSC 0,2X, SDS 0,1%)
- Διάλυμα A [100mM Tris (pH:7,5), 150mM NaCl]
- Διάλυμα B (Διάλυμα A, 1% Blocking solution)
- Blocking solution (10gr αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη σε 100mL δ/τος A)
- Διάλυμα C [100mM Tris (pH: 9,5), 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>]
- NBT, BCIIP
- Διάλυμα B+αντίσωμα (5μL αντισώματος/10mL διαλύματος B).

### Μέθοδος:

#### A) Μεταφορά και σταθεροποίηση του DNA από το πήκτωμα σε νάλιον μεμβράνη

1. Τοποθέτηση του gel σε δοχείο στο οποίο προστίθεται το διάλυμα αποδιάταξης έως ότου καλυφθεί ολόκληρο το gel και ανάδευση για 15min.
2. Απομάκρυνση του διαλύματος και επανάληψη του βήματος 1.
3. Απόχυση του διαλύματος αποδιάταξης και ξέπλυμα του gel με ddH<sub>2</sub>O.
4. Προσθήκη του διαλύματος εξουδετέρωσης, έως ότου καλυφθεί πλήρως το gel, και ανάδευση για 20min.
5. Απομάκρυνση του διαλύματος και επανάληψη του βήματος 4.
6. Απόχυση του διαλύματος εξουδετέρωσης και ξέπλυμα του gel με ddH<sub>2</sub>O
7. Προσθήκη 50ml διαλύματος SSC 10X και ανάδευση για ~10min.
8. Για την προετοιμασία της μεμβράνης, υπολογίζουμε το μήκος και το πλάτος των επιθυμητών τμημάτων του gel και κόβουμε ένα τμήμα της μεμβράνης σε διαστάσεις μικρότερες κατά 0,1 cm από εκείνη του gel καθώς και 4 χαρτιά whatman και χαρτοπετσέτες σε διαστάσεις μικρότερες κατά 0,5 cm από το gel.
9. Τοποθέτηση του gel ανάποδα σε μια επίπεδη επιφάνεια.
10. Εμβάπτιση της μεμβράνης διαδοχικά σε ddH<sub>2</sub>O και σε διάλυμα SSC 10X και ακολούθως τοποθέτησή της προσεκτικά στην επιφάνεια του gel, ώστε να εφάπτονται πλήρως.
11. Τοποθέτηση πάνω στη μεμβράνη 2 χαρτιών whatman, διαβρεγμένων με διάλυμα SSC 10X και πάνω από αυτά εναπόθεση 2 άλλων στεγνών whatman.
12. Τοποθέτηση των χαρτοπετσετών πάνω από τα χαρτιά whatman.
13. Προσθήκη ποσότητας SSC 10X στην επιφάνεια που έχει τοποθετηθεί το gel, έως ότου καλυφθεί το μισό gel.
14. Επώαση overnight σε θερμοκρασία δωματίου για τη μεταφορά του DNA στη μεμβράνη (εναλλακτικά >2h).
15. Με την ολοκλήρωση της μεταφοράς, αφαιρείται η μεμβράνη, σημειώνονται οι θέσεις απ' τα πηγαδάκια στην μεμβράνη και αριθμούνται.



16. Η μεμβράνη αφήνεται να στεγνώσει (ανάμεσα σε φύλλα whatman) αρχικά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθως πραγματοποιείται ξήρανση στους 80°C για 2h.

### Β) Σήμανση των ανιχνευτών (probes)

Για τη σήμανση χρησιμοποιείται η αλληλουχία την οποία έχουμε απομονωμένη σε καθαρή μορφή και μέσω αυτής θα ταυτοποιήσουμε την επιθυμητή αλληλουχία από τις υπάρχουσες στο πηκτωμα. Στόχος μας είναι ο ανιχνευτής να περιέχει τελικά ποσότητα DNA 100-400ng. Τα βήματα που ακολουθούμε είναι τα παρακάτω:

1. Δημιουργία mix με τα dNTPs, τη Biotin-UTP, το Buffer και H<sub>2</sub>O.
2. Βράσιμο του DNA για 10min για να γίνει μονόκλωνο.
3. Μετά από ένα quick spin, επώαση για 10min στον πάγο.
4. Προσθήκη της Klenow στο mix.
5. Εισαγωγή της ποσότητας του mix στο κάθε δείγμα, με τελικό όγκο συνήθως 10μL.

Υλικά	Ποσότητες
<b>DNA</b>	εξαρτάται από τη συγκέντρωση
<b>Buffer</b>	2μL (1X)
<b>dNTPs</b>	1μL (0,4mM)
<b>Biotin-UTP</b>	0,35μL (0,035mM)
<b>Klenow</b>	0,2μL (5u)
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Συμπληρώνει τον όγκο της αντίδρασης
Τελικός όγκος	10μL

6. Επώαση overnight (τουλάχιστον 14h).

### Γ) Προϋβριδοποίηση του DNA της μεμβράνης

1. Τοποθέτηση της μεμβράνης στο σωλήνα υβριδοποίησης, με την επιφάνεια που φέρει το DNA στραμμένη προς το εσωτερικό του σωλήνα.
2. Προσθήκη διαλύματος υβριδοποίησης στο σωλήνα (0,2ml/cm<sup>2</sup> μεμβράνης).
3. Προσθήκη στο διάλυμα salmon sperm DNA (ssDNA), τελικής συγκέντρωσης 100μg/ml. Το ssDNA προτού προστεθεί στο διάλυμα βράζεται για 10min και έπειτα τοποθετείται για 10min στον πάγο, έτσι ώστε να γίνει μονόκλωνο.
4. Επώαση στους 65°C για ~1,5h, 4/30<sup>rev</sup>/min.

### Δ) Υβριδοποίηση του DNA της μεμβράνης με το σημασμένο ανιχνευτή

1. Αποδιάταξη του ανιχνευτή, με βράσιμο για 10min και επώαση στον πάγο για 2min.
2. Αφαίρεση μικρής ποσότητας διαλύματος υβριδοποίησης, ώστε η μεμβράνη να καλύπτεται από το εναπομείνον διάλυμα.
3. Προσθήκη της ποσότητας του ανιχνευτή (25μL).

4. Overnight επώαση στους 65°C, 4/30<sup>rev</sup>/min.

#### Ε) Εμφάνιση σήματος

Η ανίχνευση του σήματος βασίζεται στην ικανότητα ισχυρής αντίδρασης σύνδεσης της βιοτίνης, που βρίσκεται συνδεδεμένη με τις ουρακίλες του ανιχνευτή, με τη στρεπταβιδίνη που προστίθεται στο διάλυμα. Στη στρεπταβιδίνη βρίσκεται προσδεδεμένο το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση, το οποίο καταλύει μια χρωμογόνο αντίδραση παρουσία των NBT/BCIP που λειτουργούν σαν οξειδωτικό μέσο και υπόστρωμα, αντίστοιχα, παράγοντας τελικά ένα χαρακτηριστικό μπλε χρώμα που αποτελεί το σήμα της υβριδοποίησης.

Αρχικά πραγματοποιούνται διαδοχικές πλύσεις με σκοπό την απομάκρυνση του μη ειδικού ανιχνευτή:

1. Απόχυση του διαλύματος υβριδοποίησης με τον ανιχνευτή σε αποστειρωμένο falcon και φύλαξη του στους 4°C για μελλοντική χρήση.
2. Τοποθέτηση της μεμβράνης σε δοχείο.
3. Προσθήκη διαλύματος πλύσης 1 (wash I) έως ότου καλυφθεί η μεμβράνη και επώαση, υπό ανάδευση, για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Απόχυση του διαλύματος.
4. Επανάληψη του βήματος 3.
5. Ξέπλυμα με προσθήκη διαλύματος πλύσης 2 (wash II). Επώαση, υπό ανάδευση, για 20min στους 60°C και απόχυση του διαλύματος.
6. Επανάληψη του βήματος 5.

Έπειτα ακολουθεί η διαδικασία της εμφάνισης του σήματος:

7. Εξισορρόπηση της μεμβράνης με προσθήκη διαλύματος A για 1min (υπό ανάδευση) και απόχυση του διαλύματος.
8. Προσθήκη διαλύματος B και επώαση, υπό ανάδευση, για 35min.
9. Απόχυση διαλύματος B και προσθήκη διαλύματος αντισώματος. Επώαση, υπό ανάδευση, για 35min.
10. Απόχυση του διαλύματος αντισώματος σε falcon και φύλαξη του στους 4°C για μελλοντική χρήση.
11. Ξέπλυμα της μεμβράνης σε διάλυμα A για 15min.
12. Απόχυση διαλύματος και επανάληψη βήματος 11.
13. Απόχυση διαλύματος A και εξισορρόπηση μεμβράνης με προσθήκη διαλύματος C για 2min.
14. Μεταφορά μεμβράνης σε άδειο τρυβλίο (με την επιφάνεια της μεμβράνης στην οποία έχει μεταφερθεί το DNA να βρίσκεται προς τα πάνω) και τοποθέτηση του σε σκιερό μέρος.
15. Κάλυψη της μεμβράνης με 25mL διαλύματος C, στο οποίο περιέχονται 50μL NBT και 37,5μL BCIP.
16. Η εμφάνιση ολοκληρώνεται σε λίγα λεπτά, ενώ η αντίδραση μπορεί να τερματιστεί με πολλαπλά ξεπλύματα με ddH<sub>2</sub>O.

### 3.8 Κλωνοποίηση DNA με πλασμιδιακό φορέα

Η εισαγωγή τμήματος DNA εντός πλασμιδιακού φορέα και η ακόλουθη επιτυχής εισαγωγή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου εντός ορισμένης κυτταρικής σειράς αποτελεί τη διαδικασία της κλωνοποίησης. Η διαδικασία αυτή χωρίζεται σε τέσσερα στάδια τα οποία θα αναπτυχθούν χωριστά:

1. Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA σε πλασμιδιακό φορέα (ligation).
2. Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση.
3. Μετασηματισμός κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση.
4. Καλλιέργεια μετασηματισμένων κυττάρων και διάκριση ανασυνδυασμένων κλώνων.

#### 3.8.1 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA σε πλασμιδιακό φορέα (ligation)

Η αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA σε πλασμιδιακό φορέα στοχεύει στην κατασκευή ενός ανασυνδυασμένου πλασμιδίου, μέσω της εισαγωγής ενός ενθέματος στην αλληλουχία του. Για τον ανασυνδυασμό του πλασμιδίου, αυτό πρέπει να βρίσκεται σε γραμμική μορφή έτσι ώστε να συνδεθεί στο ένα του άκρο το ένθεμα, μέσω της δράσης του ενζύμου DNA λιγάση, και στη συνέχεια να κυκλοποιηθεί με σύνδεση και των άλλων δύο άκρων. Η σύνδεση πραγματοποιείται με το σχηματισμό τεσσάρων φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ των 5' φωσφορικών καταλοίπων και των 3' υδροξυλομάδων.

Ένα πλασμίδιο στη γραμμική του μορφή μπορεί να έχει είτε συμπληρωματικά, είτε τυφλά άκρα. Ανάλογα με αυτό διαφοροποιείται και η προσέγγιση για την εισαγωγή του ενθέματος. Τα προϊόντα μιας απλής PCR έχουν το χαρακτηριστικό να φέρουν ορισμένα επιπλέον νουκλεοτίδια αδερίνης, λόγω ατέλειας του ενζύμου της PCR, της Taq πολυμεράσης. Για την ένθεση, λοιπόν, προϊόντων PCR σε φορείς χρησιμοποιούνται πλασμίδια με τυφλά άκρα, στα οποία άκρα έχουν προστεθεί όρισμένα νουκλεοτίδια θυμίνης (T-vector). Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται συμπληρωματικά στον φορέα με εκείνα του ενθέματος.

Στην παρούσα μεθοδολογία ως ένζυμο χρησιμοποιείται η T4 DNA λιγάση, λόγω της ικανότητας της να καταλύει τη σύνδεση άκρων όλων των ειδών (τυφλά, προεξέχοντα) (Sgararella & Ehrlich, 1978), και ως φορέας ο pBlueScriptII SK που διαθέτει T-άκρα.

#### Υλικά:

- DNA δείγματος (ένθεμα)
- pBlueScriptII SK (φορέας) (50ng/μL)
- T4 DNA λιγάση (5unit/μL)
- Ρυθμιστικό διάλυμα T4 λιγάσης (10X)

#### Μέθοδος:

Για την επιτυχή έκβαση της αντίδρασης σύνδεσης έχει υπολογιστεί πως ο μοριακός λόγος ενθέματος-πλασμιδίου πρέπει να κυμαίνεται από 3:1 έως 8:1, με την ποσότητα του φορέα να υπολογίζεται συνήθως σε 50ng.

## Μέθοδοι -Υλικά

Για τον υπολογισμό της ποσότητας του ενθέματος που θα προστεθεί στην αντίδραση χρησιμοποιείται ο παρακάτω τύπος:

$$ng \text{ ενθέματος} = [ng \text{ φορέα} * (bp \text{ ενθέματος} / bp \text{ φορέα})] * \text{μορ.λόγος ενθέματος-πλασμιδίου}$$

1. Εισαγωγή της κατάλληλης, βάσει του παραπάνω τύπου, ποσότητας DNA ενθέματος και των υπόλοιπων υλικών της αντίδρασης σε σωληνάκι τύπου erpendorf.
2. Επώαση για 2h στους 22°C.

Υλικά	Ποσότητες
<b>DNA ενθέματος</b>	υπολογίζεται από τον τύπο
<b>DNA φορέα</b>	1μL (50ng)
<b>DNA λιγάση</b>	0,3μL (1,5u)
<b>Buffer</b>	1μL (1X)
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	συμπληρώνει τον όγκο της αντίδρασης
Τελικός όγκος	10μL

### 3.8.2 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση

Η ηλεκτροδιάτρηση αποτελεί μια τεχνική που στόχο έχει την εισαγωγή DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, είναι πολύ χρήσιμη για την εισαγωγή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου σε κύτταρα τα οποία μέσω της φυσιολογικής τους ανάπτυξης θα οδηγήσουν στον αποτελεσματικό πολλαπλασιασμό του πλασμιδίου.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται το στέλεχος DH5a του εντεροβακτηρίου *E. coli*.

#### Υλικά:

- Στερεό θρεπτικό υλικό LB άγαρ  
(σε 1L περιέχει: 10gr Tryptone, 15gr agar, 15gr Yeast extract, 5gr NaCl)
- Υγρό θρεπτικό υλικό LB Broth  
(σε 1L περιέχει: 10gr Bactrotryptone, 5gr Yeast extract, 5gr NaCl)
- *E. coli* DH5a κύτταρα
- Γλυκερόλη 10%

### Μέθοδος:

1. Ενοφθάλμιση ποσότητας κυττάρων DH5a, που διατηρούνται στους -80°C με χρήση αποστειρωμένου μικροβιολογικού κρίκου, σε στερεό θρεπτικό υλικό LB άγαρ (striking). Η καλλιέργεια επωάζεται 16h στους 37°C.
2. Προσθήκη σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα 1mL υγρού θρεπτικού υλικού LB Broth, κάτω από ασηπτικές συνθήκες.
3. Απομόνωση μιας αποικίας από την στερεή καλλιέργεια DH5a και ενοφθαλμισμός του υγρού θρεπτικού LB Broth με αυτήν.
4. Επώαση, του ενοφθαλμισμένου υγρού θρεπτικού, στους 37°C, υπό ανάδευση (210rpm) για 16h.
5. Μεταφορά της βακτηριακής καλλιέργειας σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη με υγρό LB Broth (300mL).
6. Επώαση στους 37°C, υπό ανάδευση (210rpm) έως ότου η τιμή της οπτικής πυκνότητας OD<sub>600</sub> του εναιωρήματος να κυμαίνεται μεταξύ 0,4-0,6 (περίπου 2h).
7. Μεταφορά της καλλιέργειας σε σωλήνα τύπου falcon των 50mL και διατήρησή τους στον πάγο για ~10min, με στόχο την αναστολή ανάπτυξης των κυττάρων.
8. Συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση στις 4.000 στροφές, για 10min στους 4°C.
9. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και ήπια επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε προψυγμένο αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O (~50mL/falcon).
10. Επανάληψη των βημάτων 8 και 9.
11. Απομάκρυνση του υπερκείμενου, ήπια επαναδιάλυση του ιζήματος σε προψυγμένο διάλυμα γλυκερόλης 10% (4mL/falcon) και φυγοκέντρηση στις 4.000 στροφές για 10min σε θερμοκρασία 4°C.
12. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και ήπια επαναδιάλυση του ιζήματος σε προψυγμένο διάλυμα γλυκερόλης 10% (250μL/falcon).
13. Διαίρεση του κυτταρικού εναιωρήματος σε κλάσματα των 40μL σε προψυγμένα σωληνάκια τύπου erpendorf (~8erpendorf/falcon).
14. Διατήρηση των κλασμάτων σε θερμοκρασία -80°C.

Για τον υπολογισμό της απόδοσης των δεκτικών κυττάρων γίνεται μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση, χρησιμοποιώντας πλασμίδια γνωστής συγκέντρωσης. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

1. Μετασχηματισμός κυττάρων με προσθήκη 50pg του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pUC19.
2. Προσθήκη 900μL του θρεπτικού SOC.
3. Απομόνωση 5μL και 10μL από τα μετασχηματισμένα κύτταρα και προσθήκη σε αυτά 100μL ddH<sub>2</sub>O αντίστοιχα.
4. Επιστροφή των δύο εναιωρημάτων σε διαφορετικά τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό LB άγαρ, το οποίο περιέχει το αντιβιοτικό αμπικιλίνη ως δείκτη επιλογής και επώαση των τρυβλίων για 12-16h στους 37°C.
5. Με το πέρας της επώασης, καταμέτρηση των λευκών (μετασχηματισμένων) αποικιών στα τρυβλία και αναγωγή σε μονάδες rfu/μg.

### 3.8.3 Μετασηματισμός κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση

Η ηλεκτροδιάτρηση είναι μια μηχανική μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως στη μοριακή βιολογία για την εισαγωγή DNA σε δεκτικά κύτταρα, μέσω οπών που δημιουργούνται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Κατά τη μέθοδο αυτή ηλεκτρικοί παλμοί αποδιοργανώνουν στιγμιαία τη φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα της μεμβράνης, προκαλώντας το σχηματισμό πόρων και επιτρέποντας έτσι στο DNA να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου (Neuman *et al*, 1982). Κατά την εφαρμογή της μεθόδου, ωστόσο, χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή στη διάρκεια εφαρμογής και την ένταση του διαχόμενου ρεύματος, καθώς υψηλότερες τιμές μπορεί να δημιουργήσουν πόρους που θα προκαλέσουν λύση του κυττάρου, λόγω ωσμωτικής πίεσης.

Η μέθοδος αυτή έχει τρία βασικά πλεονεκτήματα, σε σχέση με άλλες μεθόδους μετασηματισμού των κυττάρων τα οποία είναι: α) επιδεικνύει μεγάλη αποτελεσματικότητα, β) δεν απαιτεί μεγάλες ποσότητες DNA, γ) δεν απαιτεί το σχηματισμό σφαιροπλαστών άρα μπορεί να εφαρμοστεί σε κύτταρα τα οποία δεν έχουν υποστεί καμία επεξεργασία.

#### Υλικά:

1. DNA ανασυνδυασμένου φορέα
2. Δεκτικά κύτταρα DH5a
3. Θρεπτικό υλικό SOC  
(σε 1L περιέχει: 20gr Tryptone, 5gr Yeast extract, 0,5gr NaCl, 20mL glucose 1M)

#### Μέθοδος:

1. Τοποθέτηση του κλάσματος των δεκτικών κυττάρων (40μL), από τους -80°C στον πάγο, για να τηχθούν.
2. Αραίωση 1:10 του δείγματος των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων και προσθήκη 2μL από την αραίωση στα δεκτικά κύτταρα.
3. Επώαση στον πάγο για 1min.
4. Μεταφορά του μίγματος σε ειδική προψυγμένη κυψελίδα, διαμέτρου 0,2cm και τοποθέτηση της στη θέση υποδοχής της συσκευής.
5. Εφαρμογή ηλεκτρικού παλμού εντάσεως 13,8kV/cm για 5-6msec.
6. Άμεση προσθήκη 1mL διαλύματος θρεπτικού SOC εντός ενός λεπτού.
7. Ανάδευση και μεταφορά όλης της ποσότητας σε αποστειρωμένο σωλήνα.
8. Επώαση του μίγματος, υπό ήπια ανάδευση (180rpm) σε θερμοκρασία 37°C για 1h.

### 3.8.4 Καλλιέργεια μετασηματισμένων κυττάρων και διάκριση ανασυνδυασμένων κλώνων

Με το πέρας της διαδικασίας μετασηματισμού, τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB άγαρ. Για το διαχωρισμό των ανασυνδυασμένων από τους μη ανασυνδυασμένους κλώνους χρησιμοποιούνται ένας δείκτης επιλογής και ένας δείκτης αναφοράς.

Ως δείκτης επιλογής χρησιμοποιείται το αντιβιοτικό αμπικιλίνη το οποίο προστίθεται στα τρυβλία κατά την παραγωγή του θρεπτικού υποστρώματος. Έτσι, στο θρεπτικό υλικό θα

μπορούν να αναπτυχθούν τελικά μόνο τα κύτταρα τα οποία φέρουν το πλασμίδιο και άρα έχουν ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

Η ταυτοποίηση των βακτηρίων που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο πραγματοποιείται με τον έλεγχο της α-συμπληρωματικότητας του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση. Οι απαραίτητες αλληλουχίες για την κωδικοποίηση του ενζύμου βρίσκονται και στο γονιδίωμα της *E. coli* και στο πλασμιδιακό DNA. Από το DNA του βακτηρίου ένα τμήμα του περιέχει τις ρυθμιστικές αλληλουχίες και την κωδική πληροφορία των πρώτων 146 αμινοξέων της πρωτεΐνης, ενώ στο πλασμιδιακό DNA βρίσκεται το γονίδιο *lacZ* του οποίου οι αλληλουχίες κωδικοποιούν τα υπόλοιπα αμινοξέα της πρωτεΐνης, με την αλληλουχία του πολυσυνδέτη να βρίσκεται εσωτερικά του αναγνωστικού του πλαισίου. Οπότε, φυσιολογικά η από κοινού έκφραση των αλληλουχιών του πλασμιδιακού φορέα και του βακτηρίου οδηγούν στη σύνθεση της β-γαλακτοσιδάσης. Σε περίπτωση ανασυνδυασμού η αλληλουχία του ενθέματος εισάγεται στην περιοχή του πολυσυνδέτη του πλασμιδίου, διακόπτοντας το αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου *lacZ* και άρα διακόπτοντας τη σύνθεση β-γαλακτοσιδάσης. Η σύνθεση ή μη του ενζύμου ελέγχεται μέσω της εισαγωγής στο υπόστρωμα του χρωμογόνου υποστρώματος X-gal, το οποίο φυσιολογικά μεταβολίζεται από τη β-γαλακτοσιδάση δημιουργώντας χαρακτηριστικές μπλε αποικίες, παρουσία του επαγωγέα IPTG. Οπότε, εάν ο ανασυνδυασμός του πλασμιδίου είναι επιτυχής, τότε το X-gal δε θα μεταβολίζεται και άρα οι αποικίες θα διακρίνονται με λευκό (άχρωμο) χρώμα. Αντίθετα, σε περίπτωση που ο ανασυνδυασμός αποτύχει οι βακτηριακές αποικίες θα εμφανίζονται μπλε.

#### Υλικά:

1. Στερεό θρεπτικό μέσο LB άγαρ  
(σε 1L περιέχει: 10gr Tryptone, 15gr agar, 15gr Yeast extract, 5gr NaCl)
2. Αμπικιλίνη (100μg/mL)
3. X-gal (20mg/mL)
4. IPTG (200mg/mL)

#### Μέθοδος:

1. Παρασκευή της επιθυμητής ποσότητας στερεού θρεπτικού LB άγαρ (25-30mL/ανά τρυβλίο) με προσθήκη της αντίστοιχης ποσότητας αμπικιλίνης (100μg/mL).
2. Τοποθέτηση του LB άγαρ στα τρυβλία, υπό ασηπτικές συνθήκες, για τη στερεοποίηση του.
3. Προσθήκη 30μL X-gal, 3μL IPTG καθώς και της επιθυμητής ποσότητας μετασχηματισμένων κυττάρων και επίστρωσή τους στα τρυβλία.
4. Επώαση στους 37°C για 12-16h.
5. Ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων αποικιών, βάσει του χρώματός τους (λευκές).

### 3.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση (Minipreps)

Σκοπός της παρούσας τεχνικής είναι η απομόνωση, από το διάλυμα της υγρής βακτηριακής καλλιέργειας κυττάρων DH5a, αποκλειστικά του πλασμιδιακού DNA. Η επεξεργασία περιλαμβάνει τη λύση των βακτηριακών κυττάρων, την καταστροφή διαφόρων

αποικοδομητικών ενζύμων που απελευθερώνονται από τη λύση των κυττάρων και το διαχωρισμό του πλασμιδιακού DNA, από το χρωμοσωμικό DNA και τις πρωτεΐνες.

#### Υλικά:

- Διάλυμα GET  
[50mM glucose, 25mM Tris-HCL (pH:8.0), 10mM EDTA (pH:8.0)]
- Διάλυμα Alkali  
(0,2N NaOH, 1% SDS)
- Διάλυμα οξικού καλίου (CH<sub>3</sub>COOK) pH: 4.8.
- Ισοπροπανόλη
- Αιθανόλη 70%
- Ρυθμιστικό διάλυμα TE RNase  
(περιέχει RNάση A 20μg/ml)

#### Μέθοδος:

1. Ενοφθαλμισμός μεμονωμένων μετασηματισμένων βακτηριακών κλώνων σε υγρές καλλιέργειες LB Broth με αμπικιλίνη, και επώαση για 12-14h.
2. Ήπια ανάδευση της κορεσμένης υγρής καλλιέργειας.
3. Μεταφορά 1,5mL από την καλλιέργεια σε αποστειρωμένο σωλήνα τύπου erpendorf.
4. Φυγοκέντρηση στις 3.000rpm για 3min, αφαίρεση του υπερκείμενου και διατήρηση του ιζήματος στον πάγο.
5. Εισαγωγή 100μL παγωμένου διαλύματος GET, ανάδευση με vortex για ~1min και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5min.
6. Προσθήκη 200μL διαλύματος Alkali. Ανάδευση, αναποδογυρίζοντας ήπια το erpendorf και επώαση στον πάγο για 3-5min.
7. Προσθήκη 150μL παγωμένου διαλύματος CH<sub>3</sub>COOK, ανάδευση στο vortex με το erpendorf γυρισμένο ανάποδα και επώαση στον πάγο για 8-10min με ανάδευση ανά διαστήματα, ώστε να εξουδετερωθούν οι αλκαλικές συνθήκες.
8. Φυγοκέντρηση για 10min σε rpm max και προσεκτική μεταφορά του υπερκείμενου με πιπέτα σε νέο erpendorf.
9. Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης (~450mL), ανάδευση στο vortex για λίγα δευτερόλεπτα και επώαση στον πάγο για 20-30 min, ώστε να κατακρημνιστεί το DNA.
10. Φυγοκέντρηση για 10min σε rpm-max και αφαίρεση του υπερκείμενου.
11. Προσθήκη μισού όγκου αιθανόλης 70% (~225mL) για την απομάκρυνση των εναπομείναντων αλάτων. Ανάδευση και νέα φυγοκέντρηση 10min-rpm max με αφαίρεση τελικά του υπερκείμενου.
12. Το erpendorf αφήνεται να στεγνώσει έως ότου εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη.
13. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 50μL ρυθμιστικού διαλύματος TE RNase, για την αποικοδόμηση τυχόν RNA.
14. Καλή ανάδευση με vortex και αποθήκευση στους 4°C.



### 3.10 Πέψη πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού

Τα ένζυμα περιορισμού αποτελούν ένζυμα που φυσιολογικά εντοπίζονται στα βακτήρια και τα αρχαία και έχουν φυσιολογικό ρόλο στην άμυνα του μικροοργανισμού απέναντι σε ιούς. Τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν αλληλουχίες μερικών νουκλεοτιδίων και πέπτουν σε μια θέση που ονομάζεται θέση περιορισμού, δημιουργώντας είτε συμπληρωματικά, είτε τυφλά άκρα. Οι θέσεις περιορισμού, στα πλασμίδια, εδράζονται σε μια ειδική περιοχή η οποία ονομάζεται πολυσυνδέτης.

Η τεχνική της πέψης ενός ανασυνδυασμένου πλασμιδίου DNA με ένζυμα περιορισμού αποτελεί μια πολύ χρήσιμη δοκιμασία η οποία έχει ως στόχο την επιβεβαίωση ύπαρξης ενθέματος εντός του πλασμιδιακού φορέα. Η δοκιμασία στοχεύει στην αποκοπή του πιθανού ενθέματος από το πλασμίδιο, έπειτα από πέψη με τα κατάλληλα ένζυμα, και στη διαπίστωση της ύπαρξης ή μη ενθέματος ανάλογα με το πλήθος και το μέγεθος των τμημάτων που θα προκύψουν μετά από ηλεκτροφόρηση στην οποία το πλασμίδιο θα βρίσκεται στη γραμμική του μορφή.

Στην παρούσα μεθοδολογία η πέψη του πλασμιδίου πραγματοποιήθηκε με τα ένζυμα EcoRI και HindIII. Τα συγκεκριμένα ένζυμα επιλέχθηκαν διότι οι θέσεις περιορισμού τους βρίσκονται εκατέρωθεν της θέσης εισαγωγής του ενθέματος στον πολυσυνδέτη του πλασμιδίου pBlueScript SK. Συνεπώς, με την περάτωση της πέψης τα αναμενόμενα αποτελέσματα κατά την ηλεκτροφόρηση θα αποτελούν μια ζώνη μεγέθους ~3000bp η οποία θα αντιστοιχεί στο αρχικό μέγεθος του πλασμιδιακού DNA και μια δεύτερη ζώνη η οποία θα αντιστοιχεί στο μέγεθος του ενθέματος, εφόσον αυτό υπάρχει. Ενδεχομένως, μπορεί να παρατηρηθούν και επιπλέον ζώνες σε περίπτωση που τα ένζυμα έχουν θέσεις κοπής εσωτερικά του ενθέματος. Σε αυτή την περίπτωση το άθροισμα των μικρότερων ζωνών θα πρέπει να ισούται με το συνολικό μέγεθος του ενθέματος.

#### Υλικά:

- Πλασμιδιακό DNA
- Ένζυμο EcoRI
- Ένζυμο HindIII
- Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμων (Buffer)

#### Μέθοδος:

Τα συστατικά της αντίδρασης προστίθενται σε ένα PCR σωληνάκι, τελικού όγκου 10μL και επωάζονται για 2h στους 37°C.

Υλικά	Ποσότητες
<b>Πλασμιδιακό DNA</b>	0,5μL
<b>Ένζυμο EcoRI</b>	0,3μL (4,5u)
<b>Ένζυμο HindIII</b>	0,3μL (3u)
<b>Buffer (10X-&gt;1X)</b>	1μL
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	7,9μL

Τελικός όγκος	10μL
---------------	------

Με το πέρας της επώασης τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορούνται για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του ενθέματος εντός του πλασμιδίου.

### 3.11 *In silico* ανάλυση

Η ανάλυση μέσω βιοπληροφορικών προγραμμάτων αποτελεί ένα αναγκαίο στάδιο για την ουσιαστικότερη ανάλυση και εξήγηση των πειραματικών αποτελεσμάτων. Η αρχή των προγραμμάτων και ο τρόπος με τον οποίο χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη θα αναφερθούν, παρακάτω, χωριστά.

#### 3.11.1 Omiga

Το πρόγραμμα Omiga (Kramer, 2001) αποτελεί ένα εργαλείο ανάλυσης νουκλεοτιδικών και πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Το πρόγραμμα αυτό παρέχει μια σειρά από δυνατότητες, όπως η δημιουργία, ανάλυση και επεξεργασία αλληλουχιών, ενώ μέσω αυτού είναι δυνατό να προσδιοριστεί η ύπαρξη θέσεων περιορισμού, δομικών μοτίβων, αναγνωστικών πλαισίων και άλλων χαρακτηριστικών μίας αλληλουχίας.

Κατά την παρούσα μεθοδολογία, το πρόγραμμα χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του αναγνωστικού πλαισίου των διαθέσιμων mRNA αλληλουχιών και περαιτέρω τον καθορισμό των αντίστοιχων αμινοξικών αλληλουχιών που κωδικοποιούνται από αυτές. Επίσης, στο συγκεκριμένο λογισμικό βασίστηκε ο σχεδιασμός των ομόλογων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην Real-Time PCR.

#### 3.11.2 Blast (Basic Local Allignment Search Tool)

Το πρόγραμμα Blast<sup>1</sup> (Altschul *et al*, 1990) αποτελεί ένα εργαλείο σύγκρισης και στοίχισης νουκλεοτιδικών και πρωτεϊνικών αλληλουχιών, βάσει ομολογίας. Το πρόγραμμα αναζητά και εντοπίζει ομόλογες περιοχές, κατατεθειμένες στις βάσεις δεδομένων, που εμφανίζουν τοπική ομοιότητα με μέρος ή ολόκληρη την αλληλουχία που έχει εισαχθεί από το χρήστη. Το πρόγραμμα χωρίζεται σε επιμέρους κατηγορίες ανάλογα με το είδος της αναζήτησης, π.χ. Blastn (σύγκριση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών), Blastx (σύγκριση μεταγραφόμενων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με πρωτεϊνικές αλληλουχίες), Blastp (σύγκριση πρωτεϊνικών αλληλουχιών) κ.α.

Στην ανάλυση που πραγματοποιήσαμε η αναζήτηση επικεντρώθηκε στον εντοπισμό πρωτεϊνών σε άλλα έντομα που να εμφανίζουν ομολογία με τις μεταγραφόμενες αλληλουχίες του δάκου. Για την αναζήτηση αυτή χρησιμοποιήθηκε το Blastx.

#### 3.11.3 ClustalW

Το ClustalW<sup>2</sup> (Thompson *et al*, 1994) αποτελεί ένα πρόγραμμα στοίχισης πολλαπλών νουκλεοτιδικών ή πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Σκοπός του προγράμματος είναι ο υπολογισμός

<sup>1</sup> <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<sup>2</sup> <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

της βέλτιστης αντιστοίχισης μεταξύ των αλληλουχιών που εισάγει ο χρήστης και η παράθεση τους με τρόπο που να απεικονίζονται τα χαρακτηριστικά, οι ομοιότητες και οι διαφορές τους.

Στην παρούσα μεθοδολογία χρησιμοποιήθηκε το ClustalW για τη στοίχιση πρωτεϊνικών αλληλουχιών του δάκου με ομόλογες άλλων εντόμων. Οι αλληλουχίες αυτές προσδιορίστηκαν μέσω του Omega, ενώ οι ομόλογές τους ανακτήθηκαν από τις βάσεις δεδομένων.

#### **3.11.4 InterProScan**

Το InterProScan<sup>3</sup> (Zdobnov & Arweiler, 2001) αποτελεί ένα πρόγραμμα λειτουργικής ανάλυσης πρωτεϊνών. Σκοπός του είναι η ανίχνευση των δομικών και λειτουργικών περιοχών μιας πρωτεΐνης, βάσει της αλληλουχίας της, συγκεντρώνοντας και συνδυάζοντας τα διαθέσιμα στοιχεία από άλλες μεθόδους πρωτεϊνικής ανάλυσης.

Στη συγκεκριμένη προσέγγιση υποβλήθηκαν οι αμινοξικές αλληλουχίες του δάκου, όπως προσδιορίστηκαν με το Omega, προς αναζήτηση του ρόλου των συντηρημένων περιοχών τους.

---

<sup>3</sup> <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>

Αποτελέσματα

## 4. Αποτελέσματα

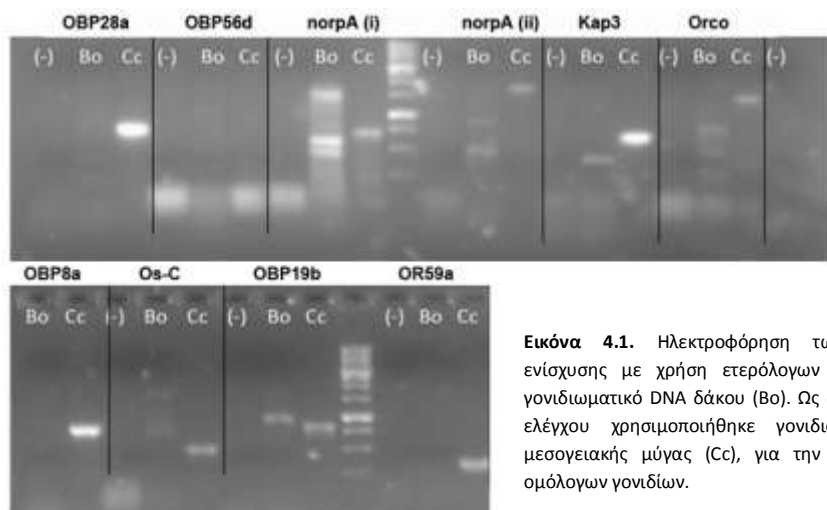
#### 4.1 Ενίσχυση γενετικών τόπων με χρήση ετερόλογων εκκινητών

Η πρώτη προσέγγιση, ενίσχυσης γενετικών τόπων εμπλέκονται στο οσφρητικό σύστημα του δάκου, βασίστηκε σε αναζήτηση ομολογιών με αντίστοιχα γονίδια που έχουν εντοπιστεί στη μεσογειακή μύγα, *Ceratitis capitata*. Η μεσογειακή μύγα είναι ένα δίπτερο έντομο το οποίο ανήκει στην οικογένεια των tephritidae, όπως και ο δάκος.

Οι διαθέσιμες πληροφορίες για τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες μια πληθώρας οσφρητικών μορίων του εντόμου της μεσογειακής μύγας, μας οδήγησαν στην επιλογή 11 γονιδίων του εντόμου αυτού. Για τα γονίδια αυτά σχεδιάστηκαν οι αντίστοιχοι εκκινητές με σκοπό να χρησιμοποιηθούν σε ολικό γονιδίωμα δάκου για να εξεταστεί η ύπαρξη ομολογων γονιδίων. Τα γονίδια που επιλέχθηκαν ήταν τα OBP28, OBP56d, OBP8a, Os-C, norpA(i), norpA(ii), Kap3, Orco, OBP19b, OR59a (βλ. παράρτημα).

Έπειτα από μία πρώτη PCR, με μήτρα ολικό DNA δάκου από αρσενικά και θηλυκά άτομα, σε κοινές συνθήκες για όλους τους εκκινητές ( $T_a$ : 50°C) φάνηκε πως τα παραπάνω γονίδια διατηρούν ομολογία με αντίστοιχα γονίδια του δάκου, καθώς με όλους τους εκκινητές ενισχύθηκαν περιοχές και στο δάκο, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρήθηκαν και μη ειδικά προϊόντα (πολλαπλές ζώνες) (Εικ. 3.1).

Επιπλέον, τα προϊόντα ενίσχυσης για δύο από τα γονίδια, τα Kap3 και OBP19b, εμφάνισαν το ίδιο μέγεθος κατά την ηλεκτροφόρηση με τα ομόλογα της μεσογειακής μύγας, τα οποία ενισχύθηκαν παράλληλα ως δείγματα ελέγχου. Οι παραπάνω ζώνες απομονώθηκαν από το πήκτωμα αγαρόζης και τα DNA τους αφού ανακτήθηκαν, αποθηκεύτηκαν στους -20°C.



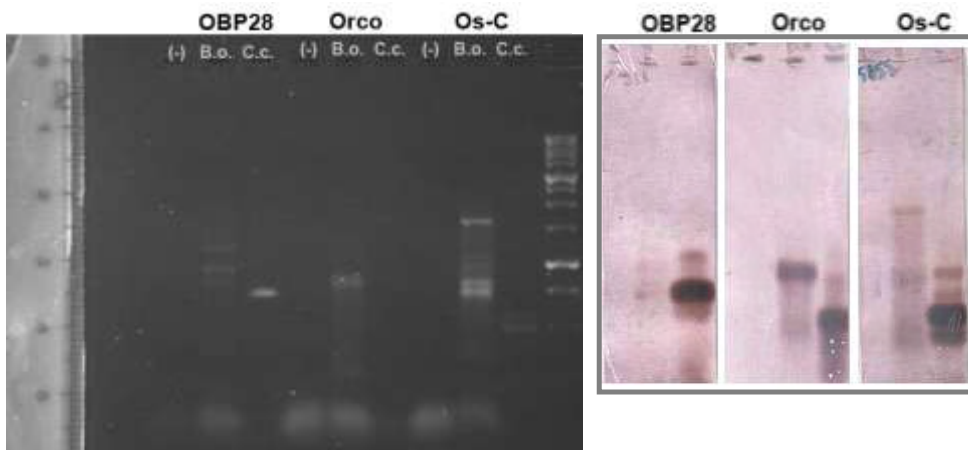
**Εικόνα 4.1.** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων ενίσχυσης με χρήση ετερόλογων εκκινητών σε γονιδιωματικό DNA δάκου (Bo). Ως δείγμα θετικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκε γονιδιωματικό DNA μεσογειακής μύγας (Cc), για την ενίσχυση των ομολογων γονιδίων.

Στη συνέχεια ακολούθησε βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης, εναλλάσσοντας τις θερμοκρασίες  $T_a$  (50-60°C) και το χρόνο επιμήκυνσης (40sec-1,30min) ώστε να επιτευχθεί η ειδικότερη ενίσχυση των εξεταζόμενων γονιδίων, δεδομένης της μεγάλης ετερογένειας των αλληλουχιών τους. Οι διαδοχικές PCR που πραγματοποιήθηκαν, εξάλλου, είχαν κατά βάση χαμηλότερες θερμοκρασίες υβριδοποίησης από τις ιδανικές, λόγω του ότι οι εκκινητές που

χρησιμοποιούσαμε είναι ετερόλογοι και άρα η υβριδοποίησή τους στο γονιδίωμα του δάκου θα είναι λιγότερο ειδική απ' ότι σε αυτό της μεσογειακής μύγας βάσει του οποίου σχεδιάστηκαν. Μετά από μια σειρά πειραμάτων καταλήξαμε σε ικανοποιητικά αποτελέσματα για άλλα 6 γονίδια, τα OBP28, porpA (i), porpA (ii), Orco, Os-C και OBP8a. Ωστόσο, σε αρκετές PCR ενισχύθηκαν εκτός από τις αναμενόμενες και επιπλέον ζώνες, οι οποίες αποτελούν ενισχυμένα μη-ειδικά τμήματα, απόρροια της χρήσης ετερόλογων εκκινητών. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήσαμε υβριδοποίηση κατά Southern χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτές τα σημασμένα προϊόντα ενίσχυσης της *C. capitata*, ώστε να καθοριστούν τελικά οι ομόλογες αλληλουχίες από το σύνολο των ζωνών που παρατηρήθηκαν.

#### 4.2 Ταυτοποίηση αλληλουχιών με υβριδοποίηση κατά Southern

Για την υβριδοποίηση δημιουργήσαμε τους ανιχνευτές χρησιμοποιώντας τους παραπάνω εκκινητές και ενισχύοντας με PCR τις αντίστοιχες περιοχές του γονιδιώματος της *Ceratitis capitata*. Τα προϊόντα ενίσχυσης των εκκινητών αυτών, σημάνθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως ανιχνευτές για την υβριδοποίηση τους με τις πιθανές ομόλογες αλληλουχίες του δάκου. Πραγματικά, για τα τέσσερα από τα έξι γονίδια (OBP28, porpA (i), Orco, OS-C) ταυτοποιήθηκαν οι ομόλογες αλληλουχίες (Εικ. 3.2). Απ' την άλλη, στα υπόλοιπα δύο γονίδια (porpA (ii), OBP8a) δεν παρατηρήθηκε κάποιο σήμα υβριδοποίησης, συμπεραίνοντας πως είτε για τα γονίδια αυτά δεν υπάρχουν τα ορθόλογά τους στο δάκο, είτε οι συγκεκριμένοι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε δεν ήταν σε θέση να ενισχύσουν τις ορθόλογες αλληλουχίες, καθώς υβριδοποιούνταν σε μη συντηρημένη περιοχή του γονιδίου.



**Εικόνα 4.2.** Ενδεικτικά αποτελέσματα της υβριδοποίησης κατά Southern για τα γονίδια OBP28, Orco και OS-C. Στις διαδρομές της κάθε μεμβράνης αντιστοιχούν από αριστερά προς τα δεξιά: i) ο αρνητικός μάρτυρας, ii) το προϊόν ενίσχυσης του δάκου, iii) το προϊόν ενίσχυσης της μεσογειακής μύγας, ως θετικός μάρτυρας.

Από τις διαδοχικές PCR και την ανάλυση κατά Southern καθορίστηκαν τα τμήματα που αντιστοιχούν στα ομόλογα γονίδια του δάκου:

## Αποτελέσματα

Γονίδιο	Προϊόν	T <sub>a</sub>
OBP28	750bp	50°C
OBP19b	850bp	50°C
Os-C	680bp	50°C
norpA (i)	1000bp	60°C
Kap3	400bp	50°C
OrcO	850bp	50°C

**Πίνακας 1.** Τα προϊόντα ενίσχυσης των ομόλογων γονιδίων της μεσογεικής μύγας στο δάκο και οι ιδανικές θερμοκρασίες υβριδοποίησης της PCR.

### 4.3 Κλωνοποίηση γονιδίων σε πλασμιδιακούς φορείς

Τα προϊόντα PCR των παραπάνω γονιδίων απομονώθηκαν και ανακτήθηκαν από πήκτωμα αγαρόζης και εν συνεχεία κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα pBluescript II. Ο φορέας αυτός επιλέχθηκε επειδή φέρει T-άκρα τα οποία είναι συμπληρωματικά με τα 3' άκρα αδενίνης που έχουν προστεθεί στα προϊόντα της PCR, λόγω «ατελειών» στη δράση της Taq πολυμεράσης. Έπειτα πραγματοποιήθηκε η εισαγωγή των μετασηματισμένων πλασμιδίων σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5α μέσω ηλεκτροδιάτρησης και η ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων κλώνων μέσω Blue/White επιλογής. Οι συγκεκριμένοι κλώνοι είναι υπό ανάλυση για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας τους και της ανάλυσης των επιπέδων έκφρασής τους στους οσφρητικούς του ιστούς, ώστε να εξακριβωθεί ο ακριβής τους ρόλος στις λειτουργίες του εντόμου. Συμπερασματικά, λοιπόν, μέσα από τις παραπάνω διαδικασίες εντοπίστηκαν έξι γονίδια του οσφρητικού συστήματος του δάκου ομόλογα με αυτά της *Ceratitis capitata*.

### 4.4 Εντοπισμός γονιδίων από δεδομένα RNA sequencing

Παράλληλα, με την παραπάνω προσέγγιση ενίσχυσης γονιδιακών τμημάτων με χρήση ετερόλογων εκκινητών, ακολουθήσαμε μια δεύτερη προσέγγιση κατά την οποία αναλύσαμε τα επίπεδα έκφρασης ορισμένων γονιδίων στους οσφρητικούς ιστούς και παρατηρήσαμε τις διαφορές που εμφανίζουν αρσενικά με τα θηλυκά άτομα. Για την προσέγγιση αυτή αξιοποιήσαμε μεταγραφόμενες αλληλουχίες που υπάρχουν στο κεφάλι του εντόμου, περιοχή στην οποία βρίσκονται τα κύρια οσφρητικά του όργανα, που είχαν προκύψει από ανάλυση RNA seq, σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου. Βάσει των δεδομένων αυτών επιλέχθηκαν τα γονίδια OBP19a, OBP83a, OS-D, OBP8a για να εξεταστεί αφενός η ιστοειδικότητα τους, εάν δηλαδή αποτελούν γονίδια που σχετίζονται αποκλειστικά με τους ιστούς του οσφρητικού συστήματος, καθώς και οι διαφορές στην έκφραση τους μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων. Ο χαρακτηρισμός των γονιδίων αυτών έγινε βάσει των ομολογιών με τα αντίστοιχα γονίδια στη *Drosophila melanogaster*. Πρόσφατα δημοσιεύτηκαν στη βάση δεδομένων νέες μεταγραφόμενες αλλά μη χαρακτηρισμένες αλληλουχίες από RNA seq σε ολικό RNA του δάκου από ιστούς των τεσσάρων αναπτυξιακών σταδίων (Pavlidis *et al*, 2013) που μας επέτρεψαν να πραγματοποιήσουμε μια πιο ολοκληρωμένη βιοπληροφορική ανάλυση των υπό εξέταση γονιδίων της παρούσας εργασίας.

#### 4.5 Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των τεσσάρων γονιδίων

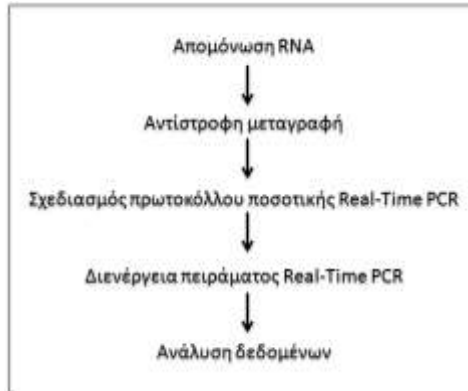
Για τα τέσσερα αυτά γονίδια πραγματοποιήθηκε λειτουργική ανάλυση, ελέγχοντας την έκφρασή τους σε επίπεδο τρανσκριπτόματος σε αρσενικά και θηλυκά άτομα δάκου, με ποσοτική Real-Time PCR.

Απομονώθηκε RNA από τα κεφάλια ώριμων αρσενικών και θηλυκών ατόμων τα οποία είχαν διαχωριστεί βάσει φύλου και είχαν τοποθετηθεί σε γειτονικά κλουβιά έτσι ώστε να έχουν προσυζευκτική επικοινωνία, χωρίς ωστόσο να συζευχθούν.

Επιπλέον, απομονώθηκε και RNA από την περιοχή του θώρακα, ανώριμων σεξουαλικά αρσενικών και θηλυκών ατόμων δάκου πρώτης μέρας, στην οποία φυσιολογικά δεν εκφράζονται οσφρητικά γονίδια, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως control ιστός για τον έλεγχο της ισοειδικότητας των υποψήφιων γονιδίων. Η επιλογή της κατάστασης των εντόμων ώστε να μην έχουν ωριμάσει σεξουαλικά εξασφαλίζει πως στο οσφρητικό τους σύστημα δε θα εκφράζεται κανένα γονίδιο, το οποίο να σχετίζεται με τις αναπαραγωγικές ή τους λειτουργίες.

Το RNA στη συνέχεια υπέστη επεξεργασία με DNase για την αποικοδόμηση τυχόν τμημάτων DNA που ανακτήθηκαν ταυτόχρονα κατά τη διάρκεια απομόνωσης. Ακολούθως, συντέθηκε ο συμπληρωματικός του cDNA κλώνος με RT-PCR. Ως δίκλωνο πια είχε την απαιτούμενη σταθερότητα για περαιτέρω ανάλυση και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα στην ποσοτική Real-Time PCR.

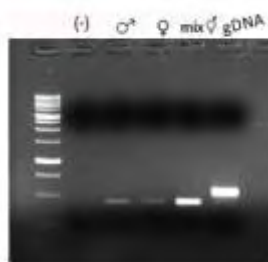
Για την επιβεβαίωση της επιτυχούς απομάκρυνσης όλων των τμημάτων DNA, πριν τη Real-Time πραγματοποιήθηκε EPIC (Exon Primed-Intron Crossing) PCR με χρήση των εκκινητών *epicBo175* (Tsoumani *et al*, 2011) στα τρία cDNA δείγματα καθώς και σε ένα δείγμα γονιδιωματικού DNA δάκου (Εικ. 4.2). Οι εκκινητές αυτοί έχουν σχεδιαστεί σύμφωνα με τις αλληλουχίες διαδοχικών εξονίων ώστε τελικά να ενισχύεται το ιντρόνιο που παρεμβάλλεται μεταξύ τους, όταν χρησιμοποιείται ως μήτρα γονιδιωματικό DNA. Σε περίπτωση χρήσης ως μήτρας cDNA, το προϊόν ενίσχυσης θα έχει μικρότερο μέγεθος λόγω της απουσίας του ιντρονίου. Από τη συγκεκριμένη PCR το προϊόν ενίσχυσης στο γονιδιωματικό DNA είχε μέγεθος 550bp, ενώ στο cDNA το αντίστοιχο μέγεθος ήταν 420bp. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την καθαρότητα των RNA όσον αφορά τυχόν DNA επιμόλυνση, ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί αξιόπιστα στην επακόλουθη ποσοτική ανάλυση.



Σχήμα 1. Ροή ανάλυσης γονιδιακής έκφρασης

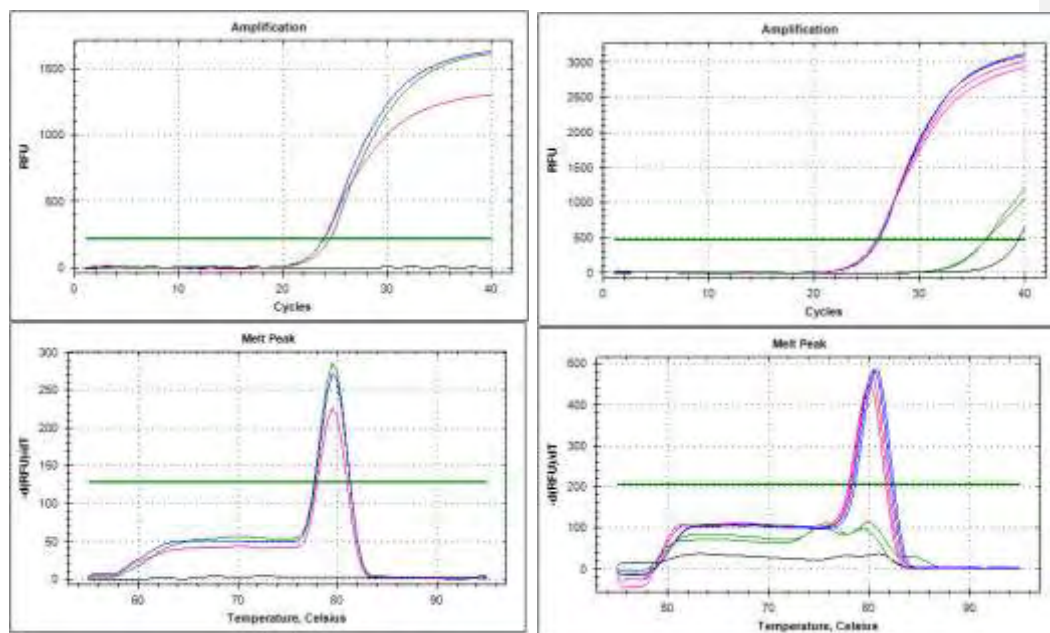


## Αποτελέσματα



**Εικόνα 4.2.** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της EPIK PCR. Από αριστερά προς τα δεξιά, μετά το αρνητικό control (-) διακρίνονται τα δείγματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα: i) το cDNA από κεφάλι αρσενικών, ii) το cDNA από κεφάλι θηλυκών, iii) το cDNA από θώρακα, iv) το γονιδιωματικό DNA (gDNA).

Για τη λειτουργική ανάλυση μέσω της ποσοτικής Real-Time PCR, σχεδιάστηκαν ομόλογοι εκκινητές για τα γονίδια που επιλέχθηκαν, όπως επίσης και εκκινητές που ενίσχυαν το ριβοσωμικό γονίδιο σταθερής έκφρασης Rpl19, μέσω του οποίου πραγματοποιήθηκε η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

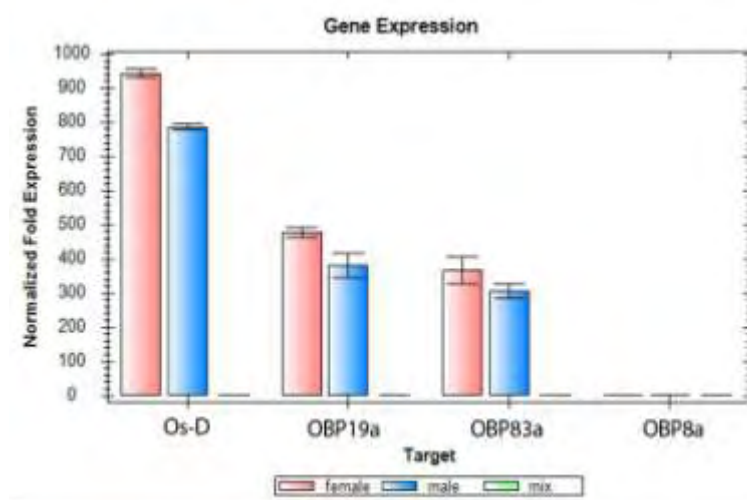


**Εικόνα 4.3.** Οι καμπύλες ενίσχυσης (πάνω) και τήξης (κάτω) της Real-Time PCR για το γονίδιο Rpl19, βάσει του οποίου πραγματοποιήθηκε η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Με μπλε χρώμα διακρίνεται η καμπύλη των ενισχυμένων τμημάτων από αρσενικούς ιστούς κεφαλιού, με ροζ από θηλυκούς ιστούς κεφαλιού και με πράσινο από ιστούς του θώρακα.

**Εικόνα 4.4.** Οι καμπύλες ενίσχυσης και τήξης για το γονίδιο OS-D. Από την καμπύλη ενίσχυσης διακρίνονται οι διαφορές στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου, ενώ από την καμπύλη τήξης επιβεβαιώνεται η μη ενίσχυση παραπροϊόντων ή διμερών των εκκινητών. Με μπλε διακρίνονται οι αρσενικοί ιστοί, με ροζ οι θηλυκοί και με πράσινο οι ιστοί του θώρακα.

Η ειδικότητα της αντίδρασης ελέγχθηκε από την καμπύλη αποδιάταξης των προϊόντων της Real-Time κατά την οποία δεν παρατηρήθηκε η ύπαρξη διμερών των εκκινητών ή παραπροϊόντων. Για τη μεγαλύτερη εγγύτητα των αποτελεσμάτων η διαδικασία πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν για κάθε δείγμα και τα αποτελέσματα της φαίνονται στην εικόνα 4.5:

## Αποτελέσματα



**Εικόνα 4.5.** Συγκριτικά αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων Os-D, OBP19a, OBP83a και OBP8a σε θηλυκά (ροζ) και αρσενικά (μπλε) άτομα δάκου. Τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς Rpl19 και ως προς τον βαθμονομητή ιστό του θώρακα.

Βάσει των αποτελεσμάτων επιβεβαιώθηκε η έκφραση όλων των γονιδίων που εξετάσαμε. Ωστόσο, τα επίπεδα έκφρασης αυτών συγκριτικά σε αρσενικά και θηλυκά καθώς και η ιστοειδικότητα τους διαφέρουν σημαντικά.

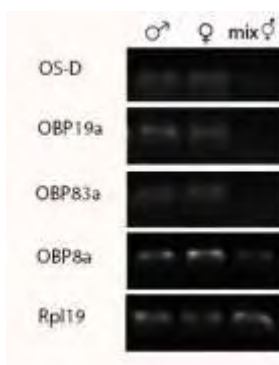
Ο **OS-D** εμφάνισε αυξημένα επίπεδα έκφρασης στους οσφρητικούς ιστούς, χωρίς να εκφράζεται στον θώρακα και επιπλέον παρατηρήθηκαν σημαντικά μεγαλύτερες τιμές έκφρασης στα θηλυκά άτομα.

Ο **OBP19a** εμφάνισε παρόμοιο πρότυπο έκφρασης με τον OS-D, δηλαδή ιστοειδική έκφραση και μεγαλύτερες τιμές για τα θηλυκά.

Ο **OBP83a** εμφάνισε έκφραση μόνο στον οσφρητικό ιστό, ωστόσο, τα επίπεδα έκφρασης μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά.

Τέλος, ο **OBP19a** εμφάνισε παρόμοια επίπεδα έκφρασης στον οσφρητικό ιστό και στο θώρακα, γεγονός που υποδηλώνει πως ο ρόλος του δε σχετίζεται αποκλειστικά με το οσφρητικό σύστημα. Μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων, δε, τα επίπεδα έκφρασης ήταν όμοια.

Συμπερασματικά, λοιπόν, από την ανάλυση των επιπέδων έκφρασης για τα παραπάνω γονίδια προέκυψε ότι τα τρία από τα τέσσερα πλην του OBP8a εκφράζονται μόνο στο κεφάλι και άρα στα οσφρητικά όργανα. Επίσης τα γονίδια Os-D και OBP19a παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στην έκφραση μεταξύ των δύο φύλων, με τα θηλυκά να εμφανίζουν αισθητά μεγαλύτερες τιμές.



**Εικόνα 4.6.** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των δειγμάτων που ενισχύθηκαν με Real-Time PCR. Διακρίνεται πως το μόνο γονίδιο το οποίο εκφράζεται και στον μίχ ιστό που προέρχεται από τον θώρακα είναι το OBP8a.

#### 4.6 Βιοπληροφορική ανάλυση των γονιδίων

Για τα τέσσερα γονίδια, των οποίων εξετάστηκαν πειραματικά τα επίπεδα έκφρασης, ακολούθως επιχειρήθηκε η αναζήτηση στοιχείων στις ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων για την εύρεση συντηρημένων περιοχών από μελέτες σε άλλα είδη εντόμων, ούτως ώστε να προσδιοριστεί δυνητικά ο πιθανός τους ρόλος. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με χρήση των προγραμμάτων blastn, blast<sup>4</sup> και ClustalW<sup>5</sup> για τον εντοπισμό ομολογιών σε αλληλουχίες άλλων ειδών και InterProScan<sup>6</sup> για τον προσδιορισμό των πιθανών μοτίβων της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης. Όλες οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στο παράρτημα.

#### Os-D

Η συνολική μεταγραφόμενη αλληλουχία του γονιδίου αυτού για το δάκο, είναι διαθέσιμη στις βάσεις δεδομένων. Έτσι, με χρήση του προγράμματος ExpASY/translate<sup>7</sup> προσδιορίστηκε και η συνολική πρωτεϊνική του αλληλουχία, με μέγεθος 156 αμινοξέα. Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν τα δομικά μοτίβα που φέρει η πρωτεΐνη αυτή, με χρήση του InterProScan, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



<sup>4</sup> <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<sup>5</sup> <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

<sup>6</sup> <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>

<sup>7</sup> <http://web.expasy.org/translate/>

## Αποτελέσματα

Από την ανάλυση αυτή προσδιορίστηκε η λειτουργική περιοχή της πρωτεΐνης στις θέσεις 40-134, με λειτουργία προσδέτη φερομονών (Insect pheromone-binding protein), ενώ στις θέσεις 1-22 φέρει το πεπτιδικό σινιάλο.

Με χρήση του BlastX προσδιορίστηκαν οι ομόλογες πρωτεϊνικές αλληλουχίες σε άλλα είδη εντόμων. Οι αλληλουχίες αυτές ήταν οι:

- Chemosensory protein [*Bactrocera dorsalis*], E value: 3e-54
- Putative odorant-binding protein A10-like isoform X1 [*Ceratitis capitata*], E value: 3e-52
- Chemosensory protein 2 [*Glossina morsitans morsitans*], E value: 4e-41
- Os-D [*Drosophila melanogaster*], E value: 3e-39

Για τη σύγκριση των αλληλουχιών αυτών πραγματοποιήθηκε στοίχιση για να προσδιοριστούν τα συντηρημένα τμήματα, με χρήση του προγράμματος ClustalW τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

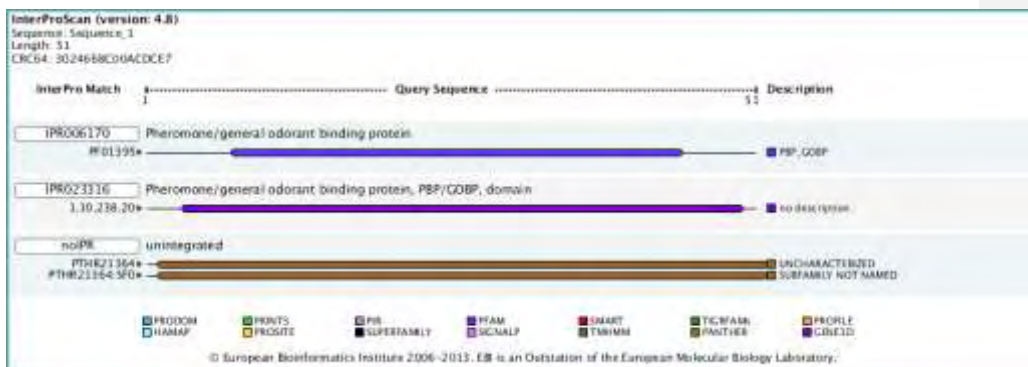
B.oleae      -----MLRFVAASVLICTVYHVAT--TAAAPHFF-TTAAPLVAN--QAAVDTRFDNIDLD 50
B.dorsalis   -----MLRFVAASVLCVYHVAT--ISAAPHFF-TTAAPLVAN--QAAVDTRFDNIDLD 50
C.capitata   -----MFRLIVALALILSIYHAFS--VNGAPHFF-TTAAPLVAN--QGSYDTRFDNIDLD 50
G.morsitans  -----MLRFFG-ICIVTALIAWDS--VRSLPHPPATTAAP-----FKQSYDNKFDNVLD 47
D.melanogaster  MGQFGFRRRAIGHVSLVVALMUTTCFQVEGLPHPPATSPSPMMERMVEQAYDDKFDNVLD 60
              : * .   : :   :           . **** * : : *   : : ** **** : ***

B.oleae      EVLSQERLLRNVIKCLENTGPGCTPDSKMLKEILPDAISTDCAKCEKQRLGSSARVTHFLI 110
B.dorsalis   EVLNQERLLRNVIKCLENTGPGCTPDSKMLKEILPDAISTDCAKCEKQRLGSSAKVHFLI 110
C.capitata   EVLSQERLLRNVIKCLENLGPGCTPDSKMLKEILPDAVSTDCAKCEKQRLGSSAKVTHFLI 110
G.morsitans  EILGQERLLRNIVKCLEGTGPGCTPDGKMLKETIPDAMATDCAKCTFKQYGSERVTHFLI 107
D.melanogaster  EILNQERLLINVIKCLEGTGPGCTPDAKMLKEILEDAIQTDCTEKTQRYGAEKVTNMLI 120
              * : , ***** ** : **** , ***** , ***** : *** : *** : ** : * : : ** : **

B.oleae      DNRPEDWARLEQIYDPQGNRYRLAYLAEKDKSD-----GMEKTEAVTRFQA-- 156
B.dorsalis   DNRPEDWARLEQIYDPQGNRYRLNYLAARDKGD-----GVEKTEAVTKTQA-- 156
C.capitata   DNRPEDWARLEQIYDFSGNRYRLAYLAEKDKGNSQSDTGEQTPEAVTKTNEA- 162
G.morsitans  DNRPEDWERLEKIYDPAGTYRTAYLIMGKGEKKTN--LAITTTERNNDISIPNA 158
D.melanogaster  DNRPTDWERLEKIYDEGTYRIKYQEMK-----SKANKEP----- 155
              **** * * ** : **** * , ** * *           : :   . .
    
```

### OBP19a

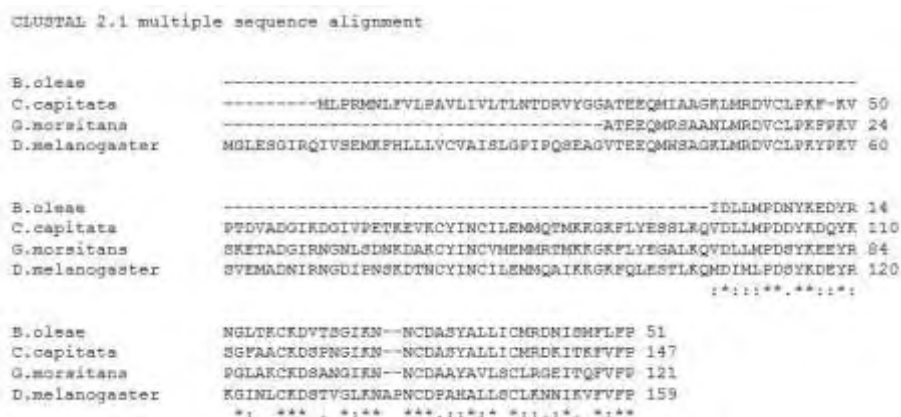
Για το γονίδιο OBP19a δεν ήταν διαθέσιμη η μεταγραφόμενη αλληλουχία στο σύνολό της, παρά ένα τμήμα της (51 αμινοξέα), οπότε η βιοπληροφορική ανάλυση βασίστηκε στο τμήμα αυτό. Από την ανάλυση με InterProScan καθορίστηκαν τα λειτουργικά τμήματα της πρωτεΐνης, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Επιπλέον, προσδιορίστηκαν οι ομόλογες αλληλουχίες του, σε άλλα έντομα, με χρήση του BlastX, οι οποίες ήταν οι:

- Odorant binding protein 14 [*Glossina morsitans morsitans*], E value: 5e-18
- General odorant-binding protein 19a-like [*Ceratitis capitata*], E value: 5e-18
- Odorant binding protein 5 [*Delia antiqua*], E value: 3e-15
- Odorant binding protein 19a [*Drosophila melanogaster*], E value: 5e-12

Για τη σύγκριση των αλληλουχιών αυτών πραγματοποιήθηκε στοίχιση για να προσδιοριστούν τα συντηρημένα τμήματα, με χρήση του προγράμματος ClustalW, τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:

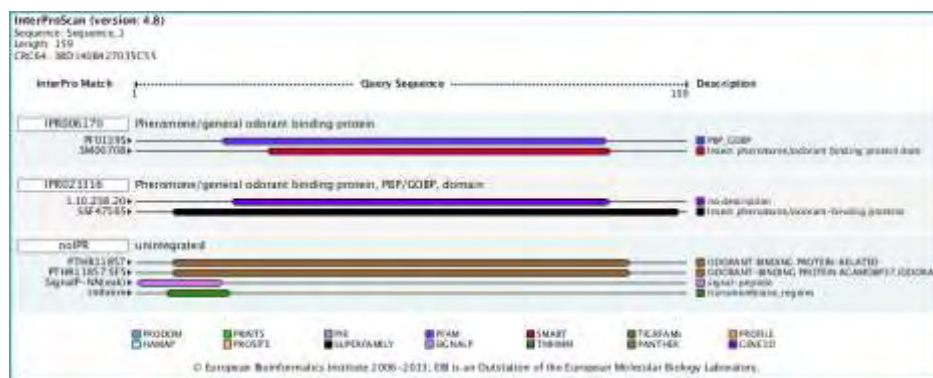




## Αποτελέσματα

### OBP8a

Για το γονίδιο OBP8a υπάρχει διαθέσιμη η συνολική μεταγραφόμενη του αλληλουχία στις βάσεις δεδομένων, οπότε προσδιορίστηκε και η συνολική του αμινοξική αλληλουχία. Το μέγεθος αυτής είναι 159 αμινοξέα και τα δομικά της μοτίβα, όπως προέκυψαν από την ανάλυση με το InterProScan απεικονίζονται παρακάτω:



Η πρωτεΐνη αυτή φέρει τη λειτουργική της περιοχή στα αμινοξέα 38-136, ενώ το πεπτιδικό σινάλο βρίσκεται στις θέσεις 1-25.

Έπειτα, αναζητήθηκαν με χρήση του BlastX πρωτεϊνικές ομολογίες με άλλα είδη εντόμων και προέκυψαν οι παρακάτω:

- Odorant binding protein 1 [*Bactrocera dorsalis*], E value: 2e-33
- Uncharacterized protein LOC101460777 [*Ceratitis capitata*], E value: 2e-30
- Odorant binding protein 22 [*Glossina morsitans morsitans*], E value: 3e-12
- Odorant binding protein 8a [*Drosophila melanogaster*], E value: 0,003

Οι αλληλουχίες αυτές συγκρίθηκαν μεταξύ τους για να προσδιοριστούν τα συντηρημένα τους κατάλοιπα, μέσω του ClustalW, και τα αποτελέσματα είναι τα παρακάτω:

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

B.oleae      MPQAMKCTVFFVH---IILFAALFAHINADYEERTEDDFLSAGERCFQREPLAASYQRRFD 57
B.dorsalis   MPQAMKCTAPVFF---IILFAALFADINADYEERTEDDFLSAGERCFQREPLAASYQRRFD 57
C.capitata   MFEAMKCSSTIAFTWIIILLFNPCNFIGADFEERTEDEFLTASERCFQREPLAASYQRRFD 60
G.morsitans  -----DFFFQMSERCMBLEKVPDRYKAQFT 25
D.melanogaster  MMRRSQIGLLSRLLLLLVVEMTPFAIPVFMRSPPQSLALLRARDQCGRLETAARQLQLD 60
              1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25

B.oleae      TFDYFDEEPVHRVYVHCINTELEKLNDRDTGFNVEHIAALYRD--KANTEVLVVFILSDCNRN 115
B.dorsalis   NFDYFDEEPVQRVYVHCINTELEKLNDRDTGFNVEHIAALYRD--KANTEVLVVFILSDCNRN 115
C.capitata   NFVYFDEAPVHRVYVHCINNELLELWDRDTGFNVEHIAALYRD--KANTEVLVVFILSDCNRN 118
G.morsitans  EPQFPNDPIVHEVILCVNRELQIWNENQGFDEIEKIVQQVYS--RANEEVVLPIIBQCNQD 83
D.melanogaster  RMHFEDAANVRYVHLCFWSRLQLWLDRTGFQAQRIVQSFGGERLNVEQALPAINGCNAE 120
              1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25

B.oleae      AQNEFS-----LWQCYRAFKCVLNSRVGQWFKEDVERKLQERRVGNHVA 159
B.dorsalis   AQNEPT-----LWQCYRAFKCVLNSRVGQWFKEDVGRLEERRVGNHVA 159
C.capitata   TNNAPT-----LWQCYNAFKCVLNSRVGQWFKEDVERKLEHRRVGNHVA 162
G.morsitans  AKQRNY-----ELWQCYKAFKLCILDVQVGEWFKEDVRRQQTRTLTNGHQ- 126
D.melanogaster  TSSRGSQAQTVVDWCFRAFVVCVLATPVGEMVRRHMSDVIINGNA----- 163
              1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
    
```

## 5. Συζήτηση



Ο δάκος αποτελεί το σημαντικότερο παράσιτο της ελιάς. Οι μέθοδοι αντιμετώπισής του όμως έχουν αναδείξει μια σειρά από πολύ σημαντικά ζητήματα σε σχέση με το περιβάλλον, τα οικοσυστήματα και τη δημόσια υγεία. Τα ζητήματα αυτά αφορούν κυρίως την αλόγιστη χρήση ορισμένων εντομοκτόνων, με δυσμενείς συνέπειες για την ανθρώπινη υγεία, καθώς και την ανάπτυξη τεχνικών οι οποίες δεν έχουν την απαραίτητη εξειδίκευση στο δάκο, επιδρώντας έτσι σε κοινωφελή έντομα και διαταράσσοντας καίρια τις ισορροπίες των οικοσυστημάτων.

Η διεύρυνση των μοριακών μας γνώσεων σε σχέση με το οσφρητικό σύστημα του δάκου αποτελεί ένα αξιοσημείωτο πεδίο έρευνας λόγω της σημασίας του σε βασικές λειτουργίες του εντόμου, όπως η σύζευξη, η ωοαπόθεση και η εύρεση της τροφής. Η ανάλυση των γονιδίων και των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο σύστημα αυτό μπορεί να συντελέσει καθοριστικά στη βελτίωση των υπαρχουσών τεχνικών ελέγχου και καταπολέμησης του, καθώς και στην ανάπτυξη εναλλακτικών παρεμβατικών μεθόδων ελέγχου.

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτέλεσε την πρώτη προσπάθεια εντοπισμού και ανάλυσης γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες με ρόλο στις οσφρητικές διαδικασίες του δάκου. Κατά τη διαδικασία αυτή ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις. Στην πρώτη πραγματοποιήθηκε ενίσχυση γονιδιακών τμημάτων με χρήση ετερόλογων εκκινητών και η κλωνοποίηση τους, ενώ στη δεύτερη πραγματοποιήθηκε ο εντοπισμός γονιδίων από δεδομένα RNA seq και η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων αυτών στους οσφρητικούς ιστούς αρσενικών και θηλυκών ατόμων. Τα συμπεράσματα και τα ζητήματα προς περαιτέρω διερεύνηση που προέκυψαν από τις δύο πειραματικές διαδικασίες θα παρουσιαστούν χωριστά.

### 5.1 Κλωνοποίηση ομόλογων γονιδίων

#### Ταυτοποίηση των πρώτων ομόλογων γονιδίων

Μέσω της ενίσχυσης με ετερόλογους εκκινητές, εντοπίστηκαν και επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη στο γονιδίωμα του δάκου των πρώτων έξι πιθανών γονιδίων του οσφρητικού του συστήματος που ήταν τα ακόλουθα: OBP19b, OBP28, *porpA*, *Orco*, *Os-C* και *Kar3*. Ο εντοπισμός πραγματοποιήθηκε χάριν στην ομολογία που εμφάνισαν αυτά με αντίστοιχα γονίδια του συγγενικού είδους της μεσογειακής μύγας, *Ceratitis capitata*. Εφόσον ολοκληρωθεί η αλληλούχησή τους, εν συνεχεία θα πρέπει να πραγματοποιηθεί η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης τους στα οσφρητικά όργανα. Έτσι θα μπορούμε να πούμε με σιγουριά αφενός ότι αποτελούν γονίδια, αλληλουχίες δηλαδή που εκφράζουν μια λειτουργική πρωτεΐνη και όχι ψευδογονίδια, και αφετέρου πως η λειτουργία τους αυτή έχει ρόλο στο οσφρητικό σύστημα.

#### Μη ομολογία άλλων υποψηφίων γονιδίων

Αντίθετα με τα έξι γονίδια που αναφέρθηκαν παραπάνω (OBP19b, OBP28, *porpA*, *Orco*, *Os-C*, *Kar3*), υπήρξε μια σειρά άλλων γονιδίων των οποίων επιχειρήθηκε η ενίσχυση με χρήση δηλαδή ετερόλογων εκκινητών, χωρίς ωστόσο να δώσουν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, για τα γονίδια OBP56d, OBP8a, OR59a παρά τις προσπάθειες βελτιστοποίησης των συνθηκών όσον αφορά τις θερμοκρασίες υβριδοποίησης των εκκινητών και στο χρόνο επιμήκυνσης της πολυμεράσης κατά την διαδικασία της PCR, δεν ήταν εφικτή η ενίσχυση κάποιου ειδικού προϊόντος.

Η μη ύπαρξη ομολογίας μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός πως το οσφρητικό σύστημα των εντόμων αποτελεί ένα σύστημα με εξαιρετικά μεγάλη ποικιλομορφία που ακόμα εξελίσσεται. Επίσης, η ύπαρξη τουλάχιστον δύο εκατομμύρια ειδών εντόμων τα οποία έχουν προσαρμοστεί σε όλες τις δυνατές περιβαλλοντικές συνθήκες, ενδέχεται να οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στα χαρακτηριστικά του συστήματος αυτού. Συνεπώς, περιπτώσεις γονιδίων, όπως τα προαναφερθέντα, τα οποία δεν εμφανίζουν καμία ομολογία αν και ανήκουν σε συγγενικά είδη, δεν πρέπει να προκαλούν έκπληξη.

## 5.2 Εντοπισμός γονιδίων από δεδομένα RNA seq

### Ταυτοποίηση και ιστοειδικότητα στην έκφραση γονιδίων

Κατά τη δεύτερη προσέγγιση εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης τεσσάρων γονιδίων (Os-D, OBP8a, OBP19a και OBP83a) με ποσοτική Real-Time PCR, τα οποία επιλέχθηκαν από δεδομένα RNA seq για το δάκο. Οι μεταγραφόμενες αυτές αλληλουχίες είχαν προκύψει από απομόνωση και αλληλούχηση του mRNA από κεφάλια αρσενικών και θηλυκών δάκων σε προγενέστερη ανάλυση του εργαστηρίου.

Από τα αποτελέσματα του πειράματος, αρχικά, επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη και έκφραση των τεσσάρων αυτών γονιδίων. Επιπλέον, διαπιστώθηκε η ιστοειδική έκφραση για τα τρία από τα τέσσερα γονίδια (Os-D, OBP19a, OBP83a) στον ιστό του κεφαλιού και πιθανότατα στα οσφρητικά όργανα του εντόμου (κεραίες, γναθικές προσακτίδες). Αντίθετα, για το τέταρτο από τα εξεταζόμενα γονίδια, το OBP8a, παρατηρήθηκε ισόποση έκφρασή του και στον θώρακα του δάκου που είχε χρησιμοποιηθεί ως control. Καθώς ο θώρακας δεν έχει οσφρητικές λειτουργίες, πιθανολογούμε πως το συγκεκριμένο γονίδιο δεν έχει οσφρητικό ρόλο, ή τουλάχιστον δεν έχει αποκλειστικά οσφρητικό ρόλο. Παράδειγμα τέτοιου γονιδίου είναι το γονίδιο *Kar3*, της *Drosophila melanogaster*, το οποίο κωδικοποιώντας μια πρωτεΐνη-κινητήρα (motor protein), έχει ρόλο στις κινήσεις των αισθητικών τριχιδίων στην κεραία του εντόμου, προκειμένου να προσληφθούν από αυτά οι οσμές (Jana *et al*, 2011). Το γονίδιο αυτό, ωστόσο, συμμετέχει και σε μια σειρά από άλλες φυσιολογικές διαδικασίες, όπως η πρόσληψη του ήχου και η συμμετοχή του στην μετακίνηση των κυτταρικών συστατικών κατά μήκος των μικροσωληνίσκων (Goldstein & Gunawardena, 2000).

### Έλεγχος της φυλο-ειδικής τους έκφρασης

Για τα τέσσερα αυτά γονίδια επιχειρήθηκε, επιπλέον, η μέλετη των διαφορών στην έκφρασή τους μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων. Κατά τη σύγκριση διαπιστώθηκε πως τα δύο από τα τέσσερα γονίδια, τα Os-D και OBP19a, εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στην έκφραση με τα θηλυκά άτομα να εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα μεταγραφής. Τα υπόλοιπα δύο γονίδια, OBP83a και OBP8a, εμφάνισαν παρόμοια επίπεδα έκφρασης μεταξύ των δύο φύλων, με τις παρατηρούμενες αποκλίσεις να βρίσκονται εντός των ορίων του στατιστικού σφάλματος.

Η σημασία της ανάλυσης των διαφορών μεταξύ των δύο φύλων, έγκειται στις διαφορές που εμφανίζουν τα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα στις φυσιολογικές τους λειτουργίες, κυρίως τις αναπαραγωγικές και σεξουαλικές. Σε ό,τι αφορά το δάκο, τα θηλυκά επιτελούν εξ ολοκλήρου δύο αναγκαίες, για την αναπαραγωγική διαδικασία, λειτουργίες οι οποίες και έχουν άμεση εξάρτηση από το οσφρητικό τους σύστημα. Αφενός είναι αυτά που εκκρίνουν τη σεξουαλική

φερομόνη η οποία και προσελκύει τα αρσενικά με σκοπό τη σύζευξη τους. Αφετέρου αναζητούν τον ελαιόκαρπο προκειμένου να εναποθέσουν εντός αυτού τα αυγά τους, διαδικασία που τελικά προκαλεί και τη ζημία στην ελιά. Συνεπώς, είναι σαφές πως οσφρητικά γονίδια τα οποία εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης μεταξύ των δύο φύλων είναι πολύ πιθανό να συμμετέχουν στις παραπάνω λειτουργίες του εντόμου.

### Πιθανοί ρόλοι των υπό μελέτη γονιδίων

Από τα παραπάνω δεδομένα, πειραματικά και βιοπληροφορικά, προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα σε σχέση με το ρόλο των γονιδίων αυτών στις οσφρητικές διαδικασίες του δάκου, με ιδιαίτερη έμφαση στη σεξουαλική και αναπαραγωγική του συμπεριφορά.

### **Os-D**

Στο Os-D παρατηρήθηκε έκφραση σε μεγαλύτερο βαθμό στα θηλυκά άτομα, γεγονός που υποδηλώνει πως το γονίδιο αυτό έχει ρόλο στη σεξουαλική συμπεριφορά του εντόμου ή στην αναπαραγωγική διαδικασία. Η λειτουργία του, δηλαδή, μπορεί να σχετίζεται είτε με την αναγνώριση του αρσενικού ατόμου και τη σύζευξη του θηλυκού δάκου μαζί του, είτε με τη διαδικασία αναγνώρισης του υποστρώματος, του καρπού της ελιάς, στο οποίο θα εναποθέσει το θηλυκό τα αυγά του. Βάσει των συνθηκών του πειράματός μας, πιο πιθανό είναι το πρώτο ενδεχόμενο, δηλαδή, το γονίδιο να σχετίζεται με την αναγνώριση του αντίθετου φύλου. Ο λόγος είναι πως τα θηλυκά άτομα των οποίων το mRNA απομονώσαμε δεν είχαν συζευχθεί με αρσενικά και άρα αποκλείεται να αναζητούσαν υπόστρωμα για ωοαπόθεση. Αντίθετα, όντας τοποθετημένα σε κοντινά κλουβιά είχαν προσυζευκτική επικοινωνία, γεγονός που λογικά οδήγησε και στην έκφραση του γονιδίου αυτού. Από τη βιοπληροφορική ανάλυση προέκυψε πως η λειτουργική περιοχή της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί το γονίδιο αυτό έχει δράση πρόσδεσης φερομονών (Insect pheromone binding protein). Η πρωτεΐνη αυτή ανήκει στην κατηγορία των χημειοδεκτικών πρωτεϊνών (CSPs), γεγονός που επιβεβαιώνεται από το γεγονός πως στην αμινοξική της αλληλουχία διατηρεί τέσσερα συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης σε συγκεκριμένες αποστάσεις μεταξύ τους, χαρακτηριστικό που αποτελεί την «υπογραφή» των CSPs (Ενότητα 1.2.5).

### **OBP83a**

Το γονίδιο OBP83a εκφράστηκε ισόποσα στα αρσενικά και θηλυκά άτομα στις συνθήκες που ελέγχθηκαν. Επιπλέον, κατά τη βιοπληροφορική ανάλυση παρατηρήθηκαν σε επίπεδο πρωτεΐνης υψηλά συντηρημένα μοτίβα με δράση προσδέτη φερομονών/οσμών (PBP/OBP). Εμφανίζεται μάλιστα το κλασικό μοτίβο «υπογραφή» των OBPs με τα έξι συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης σε συγκεκριμένες αποστάσεις μεταξύ τους (Ενότητα 1.2.4). Από τα παραπάνω δύο στοιχεία προκύπτει πως το γονίδιο αυτό εκφράζεται σε καταστάσεις που δεν είναι φυλο-ειδικές. Τέτοιες καταστάσεις, για παράδειγμα, είναι η εύρεση της τροφής ή η αναγνώριση γενικών οσμών του περιβάλλοντος.

### **OBP19a**

Το γονίδιο αυτό φάνηκε πειραματικά να έχει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στα θηλυκά άτομα του δάκου απ' ό,τι στα αρσενικά. Το γεγονός πως εκφραζόταν μόνο στους οσφρητικούς ιστούς υποδηλώνει πως έχει ρόλο στο οσφρητικό σύστημα του εντόμου, ενώ η αυξημένες τιμές του

στο θηλυκό υποδηλώνουν ρόλο σχετικό με τη σεξουαλικά συμπεριφορά και την αναπαραγωγή. Επιπλέον, μέσα από τη βιοπληροφοριακή ανάλυση, παρόλο που δε διαθέτουμε την πλήρη αλληλουχία του γονιδίου του, εντοπίστηκε η λειτουργική περιοχή του με δράση προσδέτη οσμών-φερομονών (Pheromone/Odorant binding domain). Ο ακριβής ρόλος και η σημασία του γονιδίου αυτού μένουν να αποδειχθούν από περαιτέρω μελέτες.

### **OBP8a**

Το γονίδιο OBP8a ήταν το μοναδικό, απ' όσα εξετάστηκαν, για το οποίο διαπιστώθηκε έκφρασή του και σε μη οσφρητικούς ιστούς, ενώ τα επίπεδα έκφρασης του για αρσενικά και θηλυκά άτομα στους οσφρητικούς ιστούς ήταν όμοια. Κατά τη βιοπληροφορική ανάλυση εντοπίστηκε η λειτουργική του περιοχή με δράση Pheromone/General odorant binding protein, χωρίς να εντοπιστεί κάποια άλλη λειτουργική περιοχή (Ενότητα 3.6.). Ο λόγος για τον οποίο το γονίδιο παρουσίαζε έκφραση σε μη-οσφρητικό ιστό αλλά και ο ακριβής του ρόλος στην οσφρητική διαδικασία μένει να διερευνηθεί περαιτέρω.

### **4.3. Επίλογος**

Τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα αποτέλεσαν τα πρώτα στοιχεία, σε επίπεδο γονιδιώματος, για τον εντοπισμό μορίων που να εμπλέκονται στο οσφρητικό σύστημα του δάκου. Οι αλληλουχίες που μελετήθηκαν πρέπει να εξεταστούν περαιτέρω σε επίπεδο τρανσκριπτόματος για να υπολογιστούν τα ποσοστά έκφρασης σε διαφορετικές συνθήκες και άλλα στάδια του βιολογικού τους κύκλου, όπως κατά τη σύζευξη και κατά την ωοαπόθεση. Ειδικότερα, έμφαση θα δοθεί στον εντοπισμό και την ανάλυση των αρρενοειδικών γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την πρόσληψη, από τα αρσενικά άτομα, των φερομονών που εκκρίνουν τα θηλυκά. Επίσης, χρήσιμη θα ήταν η στοχευμένη απομόνωση mRNA από τα οσφρητικά όργανα ξεχωριστά (κεραίες, γναθικές προσακτρίδες), καθώς τα όργανα αυτά φέρουν διαφορετικά αισθητικά τριχίδια, με αποτέλεσμα να ειδικεύονται και σε διαφορετικούς τύπους οσμών. Αναγκαία, τέλος, είναι η μελέτη των τριτοταγών δομών των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν τα γονίδια που εξετάζουμε, έτσι ώστε να κατανοήσουμε τον είδος της αλληλεπίδρασης που έχουν με την κάθε οσμή και άρα τον ακριβή τους ρόλο στην οσφρητική διαδικασία.

Περαιτέρω ανάλυση του οσφρητικού συστήματος του δάκου, σε συνδυασμό με πιο προηγμένες και στοχευμένες πειραματικές διαδικασίες (π.χ. ολική τρανσκριπτομική ανάλυση των οσφρητικών ιστών), είναι βέβαιο πως θα αναδείξουν στοιχεία χρήσιμα στην κατανόηση της ακριβούς λειτουργίας των γονιδίων που έχουν ήδη εντοπιστεί καθώς και στην ανακάλυψη νέων. Έτσι, θα μπορέσουμε να διαλευκάνουμε τον ακριβή ρόλο του συστήματος αυτού στις μοναδικές φυσιολογικές λειτουργίες του δάκου, όπως είναι η απόθεση των αυγών αποκλειστά στον καρπό της ελιάς. Επιπλέον, η διαθεσιμότητα νέων μοριακών δεδομένων θα συμβάλει στην ουσιαστικότερη και φιλικότερη, προς το περιβάλλον και τον άνθρωπο, αντιμετώπιση του εντόμου είτε μέσω των κλασσικών μεθόδων (παγίδες), είτε μέσω των πιο προηγμένων μοριακών τεχνικών (RIDL).

## 6. Παράρτημα

## Παράρτημα

### Χαρακτηριστικά των εκκινητών

#### Νουκλεοτιδικές & αμινοξικές αλληλουχίες των γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν

**A)** Οι αλληλουχίες των ετερόλογων εκκινητών, οι θερμοκρασίες  $T_a$  και το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος κατά την ενίσχυση του γονιδιωματικού DNA της *Ceratitis capitata*. (Ενότητα 3.1)

Γονίδιο στόχος	Αλληλουχία εκκινητή	$T_a$	Μέγεθος αναμενόμενου προϊόντος
OBP28	F: CATACTTATCGCTGCCCTATGC	55°C	750bp
	R: GCATCTGTGCAAACATAAACAC		
OBP56d	F: CCAACACCTCAAGTGAGAACC	55°C	600bp
	R: CATTTGTGCAATTCAAAGGCGG		
OBP8a	F: AGAAGCAATGAAGTGCTCAACG	55°C	750bp
	R: AATTTTCCTGTGCATTACCGGG		
OS-C	F: TTTGATATGCTGTCTTTCGCGG	54°C	500bp
	R: ATTTTGGCTTTAGTTCGTCAGTC		
norpA (i)	F: GAACAGACGCAGCAGTGGACC	60°C	700bp
	R: CTCGACTTGTTCATGTGCC		
norpA (ii)	F: GCACATGGCAAACAAGTCGAGG	47°C	1600bp
	R: AGTGCAGCCTATTTGCCAGTATCG		
Kap3	F: GCAAACCTCTAGCCAAGGCG	57°C	800bp
	R: ACGGTTTCACACCTCGTTTTATCG		
Orco	F: CCTGCGAGCAGTTACAACACC	52°C	1600bp
	R: ACCATCATCTCCTGCTTTCTGG		
OBP19b	F: GTTTCACCTATGTGTGGCGG	53°C	750bp
	R: TTTAATCACAATCACTGTTTCGAC		
OR59a	F: TCGATAAATTGACCTTCATGCTG	50°C	300bp
	R: CGTTAGTTTCGTGAACATAGAAC		

Παράρτημα

**Β)** Οι μεταγραφόμενες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των γονιδίων OBP8a, OBP19a, OBP83a και OS-D του *B. olerae*, όπως προέκυψαν από την RNA seq ανάλυση των κεφαλιών. (Ενότητα 3.5)

<b>OBP8a:</b> TAAGGCGAATACGGAAGTCTGGTGCCGATATTGAGTGACTGTAATCGGAATGCACAGAATGAGCCGAGCCTCAAG TGGTGTATAGGGCCTTCAAATGTGTGCTAAACAGTCAGGTGGGTCAGTGGTTCAGGAGGATGTGGAACGCAAGT TGCAAGAGAGGCGTGTGGGAAATCATGTCGCTTGAATTGCTTCGTTTTATTAAAGCTTTACACATACATACTT ATAAATTCGATATTTGCAGATAAGCGAGTATGTGT
<b>OBP19a:</b> AATCGATTTGCTGATGCCGGACAATTACAAGGAGGATTATCGCAACGGTCTAACAAAATGTAAGATGTAACAAGTG GAATAAAGAACAATTGCGACGCGTCTTATGCCCTTCTAATTTGTATGCGCGACAACATATCAATGTTCTTTTTCTTA AAGTGATTGGCT
<b>OBP83a:</b> AAATTATGTCGCCCTGTCGTCATCGCTAACTCTGATGCACGTACAGGCACAGGAACCGCGACGTGACGACAAATGGC CGCCACCAGCCGTCCTGAAAATGGCCAAAATATCCACGATATATGCGTTGAGAAAACCTGGGGTCACAGAGGAGGC AATTAAGGAATTCAGTGATGGCCAAAATACACGAAGACGAGGCGCTCAAGTGCTACATGAATTGCTTGTCCATGAAA TCGATGTGGTGGATGATAACGGTGATGTTCATCTGGAAAACCTCTTTAACACCCGTACCGGGTACCGTACGGAAACCAA CTGATAAATATGGCAAAGGACTGTGAGCATCCAGAAGGTGACACGCTGTGCCACAAAGCATGGTGGTTCATCAAT GTTGGAAGAAGGCCGATCCAGTTCATTATTTCTTACCATAGAGCTTCAAATGCCTTTATGAGCGTGTGACGAAAAGA TTTGCCGAAAATGATTGCAAGGAATT
<b>OS-D:</b> GCACCGCCAATCAGGCAGCCTATGACACGAAATTCGATAACATCGACCTGGACGAGTTTTGAGCCAGGAGCGTTT GCTGCGCAACTACATTAATGTCTGGAGAATACCGTCTTGCACGCTGATTCCAAAATGTTGAAGGAGATACTCC CCGACGCTATATCAACCGATTGCGCCAAATGCTCGGAGAAGCAGAGGCTTGGCTCAGCGAGAGTGACGCACTTTTTG ATCGACAATCGCCCGGAGGATTGGGCGCC

**Γ)** Οι αλληλουχίες των εκκινητών, οι θερμοκρασίες  $T_a$  και τα αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος κατά την ενίσχυση των γονιδίων OBP8a, OBP19a, OBP83a και OS-D, στο δάκο, με ποσοτική Real-Time PCR. (Ενότητα 3.5)

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή	Θερμοκρασία $T_a$	Αναμενόμενο προϊόν
OBP8a	F: AAGGCGAATACGGAAGTGC	55° C	113b
	R: CTGACCCACCTGACTGTTTAGC		
OBP19a	F: AAGGAGGATTATCGCAAC	55° C	89bp
	R: AATTAGAAGGGCATAAGACG		
OBP83a	F: ACAGAGGAGGCAATTAAG	55° C	122bp
	R: ATCACCGTTATCATCCAC		
OS-D	F: CCTGGACGAGGTTTTGAGC	55° C	121bp
	R: TTGATATAGCGTCGGGGAGTATC		

Παράρτημα

**Δ)** Οι συνολικές μεταγραφόμενες αλληλουχίες που κωδικοποιούν τα γονίδια OBP8a, OBP83a και OS-D στο δάκο (Pavliidi *et al*, 2013). (Ενότητα 3.6)

<p><b>OBP8a:</b>  TATAAGTGTAAAGCTTTAATAAAAACGAAGCAATTCAAGCGACATGATTTCCACACGCCTCTCTTGAACCTTGGCGTT  CCACATCCTCCTTGAACCACTGACCCACCCGACTGTTTAGCACACATTTGAAGGCCCTATAACACCACTTGAGGCTCG  GCTCATTCTGTGCATTCCGATTACAGTCACTCAATATCGGCACCAGCACTTCCGTATTGCGCTTATCGCGATAAAGTGC  CGTATGTGTTCCGACGTTGAAACCGGTGCGATCATTCCACAATTTAACTCTGTCCAATGCAAGTGCACATAACGATG  TACTGGCTCCTCGTCCGATAAATCAAAGTGTGCAAGCGACGCTGATAGGGGGCGGCCAAGCGCTCACGCTGGAAA  CAACGCTCGCCGGCGCTTAAGAAATCATCCTCCGTCTTCTCCTCGTAATCGGCGTTGATGTGCGCGAATAATGCAGCA  AAGAGAATAATGTGAACGAACACTGTGCACCTTATTGCTTGTGGCATTGTCCAAGTTCAGACAGCAACTGAAAAGTA  TAAAGACGCCGTTGATGTCAAACCACAAACAGTATGTGGTGTCTGT</p>
<p><b>OBP83a:</b>  TAACTCACTCTTAATAGCGTGGAGCGAAAAAATTTTTATTTTTACTTAACCTGAGGATAAATTTGTAGATTATAAA  ACAAGAAAATTTTGGAAACAAAATTTTTTAACATCTAGAGGCCTTTTTACTTTTAAAGAAAATTTTATTTTCGTA  AAAATTTTGATAAGTATCCTTTTCTTTTTGCTCCACCTACTGTTAACTTTAAAAATTGATGTGACTTTGGTATTT  TCTGCAATGCTTTAATAAATCTAAAATCCGCTAAAAAATCATAAATACTACAAAATGTTATTTAATTCCTTGAATCA  TTTTTCGGCAAAATCTTTTGTCAACACGCTCATAAAGGCATTTGAAGCTCTATGGTAAGAAATAATGAACTGGATCGG  CCTTCTTCAACATTGATGGAACCACTGCTTTGTGGCACAGCGTGTACCTTGTGGATGCTCACAGTCTTTGCCAT  ATTTATCAGTTGGTCCGTACGGTACCCGGTACGGTGTAAAGAGGGTTCCAGATGAACATCACCGTTATCATCCAC  CACATCGATTTTATGGAACAAGCAATCATGTAGCACTTGAAGCGCTCGTCTTCTGTTATTTGGCCATCACTGAATTC  CTTAATTGCCCTCTGTGACCCAGTTTTCTCAACGCATATATCGTGGAAATTTTTGGCCATTTTCAGGACGGCTGGT  GGCGGCCATTTGTGCTCACGTGCGGTTTCTGTGCTGTACGTGATCAGAGTTAGCGATGACGACAGGGCGACAAT  TAAAAATGCGTGAACGCTTGGCAACGCCAAATGCAATCAAAGCCATTTAGTTCCGTTTCCGTACAGGTTCTCTGC  AAGCTTTGGTAGCGTTTCTATTCAAATCTGTACGCTCTGGCTATTTGTTAAGCACGGTTTGAATTTGTTGTTGT  AGATTTACGTTTTCGTTATATTCTTGGCATACGAG</p>
<p><b>OS-D:</b>  ACGCAGTGGCGCTAAAATAAGTATTGAAGTGACATCTTAAAAAATTTATTAATATCGGTAATACAATAGACTTTAAA  AGCATGTTGCGCTTCGTAGCCGCTTCGGTGCTGATTGACCCGTTTATCATGTGGCAACCACAACCTGCTGCACCGCAT  CCACCAACAACAGCAGCACCGCTGGTGGCAATCAGGCAGCCTATGACACGAAATTCGATAACATCGACCTGGACG  AGGTTTTGAGCCAGGAGCGTTTGTGCGCAACTACATTAATGTCTTGAGAATACCGGTCCTTGCACGCCTGATTCCA  AAATGTTGAAGGAGATACTCCCGACGCTATATCAACCGATTGCGCCAAATGCTCGGAGAGCAGAGGCTTGGCTC  AGCGAGAGTGACGCACTTTTGTATCGACAATCGCCCGAGGATTGGGCGCGTTTGGAGCAGATATACGATCCGCAA  GGCAATTACCGTTTGGCCTATTTGGCGGAGAAGGACAAAAGCGATGGCATGGAGAAAACACGGAAGCGGTTACTA  AGCCACAGGCCTGAACCATTCGCTATATTAAGTGCACGCGAACATGGACCTTTATAGGAATTAATGGAACAGCGTT  GTATTTTTCGAATTTATAGTAAATAGCTCAATTTAAAAAGACATATACTTAATTTTAGGATTGCATTCAAAAAGTAC  AAAAAATATAAAAAGCAAAACAAAAACCC</p>

**Ε)** Οι αμινοξικές αλληλουχίες των γονιδίων, όπως προκύπτουν από την *in silico* μετάφραση των αλληλουχιών που αναγράφονται στον πίνακα Δ). (Ενότητα 3.6)

<p><b>OBP8a:</b>  MPQAMKCTV FVHIILFAALFAHINADYEKTEDDFLSAGERCFQRRERLAAPYQRRFDTFDYPDEEPVHRYVHCIWTELKL  WNRDTGFNV EHI AALYRDKANTEVLVPI LSDCNRNAQNEPSLKW CYRAF KCVLNSRVGQWFKEDVERKLQERRVGNHV  A</p>
<p><b>OBP83a:</b>  MALIGIWR CQAFHAF LIVALSSSL TLMHVQAQEPRRDKWPPPAVLKMAKIFHDICVEKTGVTEEAIKEFSDGQIHEDEAL  KCYMNLCLFHEIDVVDN DNGDVHLETLFN TVPGTVRNQLINMAKDCHEPEGDTLCHKAWWFHQCWKKADPVHYFLP</p>
<p><b>OS-D:</b>  MLRFVAASVLICTVYHVATTTAAPHPTTAAPLVANQAAYDTKFDNIDLDELVSQERLLRN YIKLENTGPCTPDSKMLKEI  LPDAISTDCAKCSEKQRLG SARVTHFLIDNRPEDWARLEQIYDPQGN YRLAYLAEKDKSDGMEKTTEAVTKPQA</p>



## 7. Βιβλιογραφία

## Βιβλιογραφία

- Ache, B. W., & Young, J. M. (2005). Olfaction: diverse species, conserved principles. *Neuron*, 48(3), 417-430.
- 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.
- Ant, T., Koukidou, M., Rempoulakis, P., Gong, H. F., Economopoulos, A., Vontas, J., & Alphey, L. (2012). Control of the olive fruit fly using genetics-enhanced sterile insect technique. *BMC biology*, 10(1), 51.
- Atkinson, P. W., & Michel, K. (2002). What's buzzing? Mosquito genomics and transgenic mosquitoes. *Genesis*, 32(1), 42-48.
- Baker, R., Herbert, R., Howse, P. E., Jones, O. T., Francke, W., & Reith, W. (1980). Identification and synthesis of the major sex pheromone of the olive fly (*Dacus oleae*). *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (2), 52-53.
- Bengtsson, J. M., Trona, F., Montagné, N., Anfora, G., Ignell, R., Witzgall, P., & Jacquin-Joly, E. (2012). Putative chemosensory receptors of the codling moth, *Cydia pomonella*, identified by antennal transcriptome analysis. *PLoS one*, 7(2), e31620.
- Benton, R., Sachse, S., Michnick, S. W., & Vosshall, L. B. (2006). Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo. *PLoS biology*, 4(2), e20.
- Benton, R., Vannice, K. S., Gomez-Diaz, C., & Vosshall, L. B. (2009). Variant Ionotropic Glutamate Receptors as Chemosensory Receptors in *Drosophila*. *Cell*, 136(1), 149-162.
- Bray, S., & Amrein, H. (2003). A Putative *Drosophila* Pheromone Receptor Expressed in Male-Specific Taste Neurons Is Required for Efficient Courtship. *Neuron*, 39(6), 1019-1029.
- Buck, L., & Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65(1), 175-187.
- Butenandt A., Beckmann R., Stamm D., Hecker E. (1959). Über den Sexuallockstoff des Seidenspinners *Bombyx mori*, Reindarstellung und Konstitution. *Z. Naturforsch.* 14b:283–84
- Clyne, P. J., Warr, C. G., Freeman, M. R., Lessing, D., Kim, J., & Carlson, J. R. (1999). A novel family of divergent seven-transmembrane proteins: candidate odorant receptors in *Drosophila*. *Neuron*, 22(2), 327-338.
- Couto, A., Alenius, M., & Dickson, B. J. (2005). Molecular, Anatomical, and Functional Organization of the *Drosophila* Olfactory System. *Current Biology*, 15(17), 1535-1547.
- Croset, V., Rytz, R., Cummins, S. F., Budd, A., Brawand, D., Kaessmann, H., Gibson, T.J., & Benton, R. (2010). Ancient protostome origin of chemosensory ionotropic glutamate receptors and the evolution of insect taste and olfaction. *PLoS genetics*, 6(8), e1001064.
- Economopoulos, A. P. (2001). The olive fly, *Bactrocera (Dacus) oleae* (Gmelin)(Diptera: Tephritidae): its importance and control; previous SIT research and pilot testing. Austria: International Atomic Energy Agency, 44.
- Fox, A. N., Pitts, R. J., Robertson, H. M., Carlson, J. R., & Zwiebel, L. J. (2001). Candidate odorant receptors from the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* and evidence of down-regulation in response to blood feeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(25), 14693-14697.
- Fried, M. (1971). Determination of Sterile-Insect Competitiveness. *Journal of Economic Entomology*, 64(4), 869-872.
- Goldstein, L. S., & Gunawardena, S. (2000). Flying through the *Drosophila* cytoskeletal genome. *The Journal of cell biology*, 150(2), F63-F68.
- Gong, P., Epton, M. J., Fu, G., Scaife, S., Hiscox, A., Condon, K. C., & Alphey, L. (2005). A dominant lethal genetic system for autocidal control of the Mediterranean fruitfly. *Nature biotechnology*, 23(4), 453-456.
- Hallem, E. A., Dahanukar, A., & Carlson, J. R. (2006). Insect odor and taste receptors. *Annu. Rev. Entomol.*, 51, 113-135.
- Heinbockel, T., & Kaissling, K. E. (1996). Variability of olfactory receptor neuron responses of female silkmoths (*Bombyx mori* L.) to benzoic acid and ( $\pm$ )-linalool. *Journal of Insect Physiology*, 42(6), 565-578.
- Higgins, D. G., & Sharp, P. M. (1988). CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*, 73(1), 237-244.
- Hildebrand, J. G., & Shepherd, G. M. (1997). Mechanisms of olfactory discrimination: converging evidence for common principles across phyla. *Annual review of neuroscience*, 20(1), 595-631.
- Iatrou, K., & Biessmann, H. (2008). Sex-biased expression of odorant receptors in antennae and palps of the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 38(2), 268-274.

## Βιβλιογραφία

---

- Jana, S. C., Girotra, M., & Ray, K. (2011). Heterotrimeric kinesin-II is necessary and sufficient to promote different stepwise assembly of morphologically distinct bipartite cilia in *Drosophila* antenna. *Molecular biology of the cell*, 22(6), 769-781.
- Jefferis, G. S., Potter, C. J., Chan, A. M., Marin, E. C., Rohlfsing, T., Maurer Jr, C. R., & Luo, L. (2007). Comprehensive Maps of *Drosophila* Higher Olfactory Centers: Spatially Segregated Fruit and Pheromone Representation. *Cell*, 128(6), 1187-1203.
- Jin, X., Ha, T. S., & Smith, D. P. (2008). SNMP is a signaling component required for pheromone sensitivity in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(31), 10996-11001.
- Klassen, W., & Curtis, C. F. (2005). History of the sterile insect technique. In *Sterile Insect Technique* (pp. 3-36). Springer Netherlands.
- Knipling, E. F. (1955). Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *Journal of Economic Entomology*, 48(4), 459-462.
- Kramer, J. A. (2001). Omiga™: a PC-based sequence analysis tool. *Molecular biotechnology*, 19(1), 97-106.
- Lance, D. R., & McInnis, D. O. (2005). Biological basis of the sterile insect technique. In *Sterile Insect Technique* (pp. 69-94). Springer Netherlands.
- Laughlin, J. D., Ha, T. S., Jones, D. N., & Smith, D. P. (2008). Activation of pheromone-sensitive neurons is mediated by conformational activation of pheromone-binding protein. *Cell*, 133(7), 1255-1265.
- Liu, C., Pitts, R. J., Bohbot, J. D., Jones, P. L., Wang, G., & Zwiebel, L. J. (2010). Distinct olfactory signaling mechanisms in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS biology*, 8(8), e1000467.
- Liu, R., Lehane, S., He, X., Lehane, M., Hertz-Fowler, C., Berriman, M., Field, L., & Zhou, J. J. (2010). Characterisations of odorant-binding proteins in the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *Cellular and molecular life sciences*, 67(6), 919-929.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., & Hofschneider, P. H. (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO journal*, 1(7), 841.
- Mazomenos, B. E., & Haniotakis, G. E. (1981). A multicomponent female sex pheromone of *Dacus oleae* Gmelin: Isolation and bioassay. *Journal of Chemical Ecology*, 7(2), 437-444.
- Mazomenos, B. E., & Pomonis, J. G. (1983). Male olive fruit fly pheromone: isolation, identification and lab bioassays. In *Proceedings, International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, CEC/IOBC, Athens, Greece* (pp. 96-103).
- Mazomenos, B. E., & Haniotakis, G. E. (1985). Male olive fruit fly attraction to synthetic sex pheromone components in laboratory and field tests. *Journal of Chemical Ecology*, 11(3), p. 398
- Mullis, K. B., Faloona, F. A., Scharf, S. J., Saiki, R. K., Horn, G. T., & Erlich, H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *BIOTECHNOLOGY SERIES*, 17-17.
- Pavliidi, N., Dermauw, W., Rombauts, S., Chrisargiris, A., Van Leeuwen, T., & Vontas, J. (2013). Analysis of the Olive Fruit Fly *Bactrocera oleae* Transcriptome and Phylogenetic Classification of the Major Detoxification Gene Families. *PLOS ONE*, 8(6), e66533.
- Pelosi, P., Zhou, J. J., Ban, L. P., & Calvello, M. (2006). Soluble proteins in insect chemical communication. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(14), 1658-1676.
- Robertson, H. M., Warr, C. G., & Carlson, J. R. (2003). Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(Suppl 2), 14537-14542.
- Rogers, M. E., Sun, M., Lerner, M. R., & Vogt, R. G. (1997). Snmp-1, a novel membrane protein of olfactory neurons of the silk moth *Antheraea polyphemus* with homology to the CD36 family of membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 272(23), 14792-14799.
- Rytz, R., Croset, V., & Benton, R. (2013). Ionotropic Receptors (IRs): Chemosensory Ionotropic Glutamate Receptors in *Drosophila* and beyond. *Insect biochemistry and molecular biology*, 1-10.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. New York: Cold spring harbor laboratory press.
- Sato, K., Pellegrino, M., Nakagawa, T., Nakagawa, T., Vosshall, L. B., & Touhara, K. (2008). Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature*, 452(7190), 1002-1006.
- Sgaramella, V., & Ehrlich, S.D. (1978). Use of the T4 Polynucleotide Ligase in The Joining of Flush-Ended DNA Segments Generated by Restriction Endonucleases. *European Journal of Biochemistry*, 86(2), 531-537.

## Βιβλιογραφία

---

- Shanbhag, S. R., Müller, B., & Steinbrecht, R. A. (1999). Atlas of olfactory organs of *Drosophila melanogaster*: 1. Types, external organization, innervation and distribution of olfactory sensilla. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 28(4), 377-397.
- Stocker, R. F. (2001). *Drosophila* as a focus in olfactory research: mapping of olfactory sensilla by fine structure, odor specificity, odorant receptor expression, and central connectivity. *Microscopy research and technique*, 55(5), 284-296.
- Tegoni, M., Campanacci, V., & Cambillau, C. (2004). Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects. *Trends in biochemical sciences*, 29(5), 257-264.
- 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.
- Tomaselli, S., Crescenzi, O., Sanfelice, D., Ab, E., Wechselberger, R., Angeli, S., ... & Picone, D. (2006). Solution structure of a chemosensory protein from the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Biochemistry*, 45(35), 10606-10613.
- Troemel, E. R., Chou, J. H., Dwyer, N. D., Colbert, H. A., & Bargmann, C. I. (1995). Divergent seven transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in *C. elegans*. *Cell*, 83(2), 207-218.
- Tsoumani, K. T., Augustinos, A. A., Kakani, E. G., Drosopoulou, E., Mavragani-Tsipidou, P., & Mathiopoulos, K. D. (2011). Isolation, annotation and applications of expressed sequence tags from the olive fly, *Bactrocera oleae*. *Molecular Genetics and Genomics*, 285(1), 33-45.
- Vermeulen, A., & Rospars, J. P. (2004). Why are insect olfactory receptor neurons grouped into sensilla? The teachings of a model investigating the effects of the electrical interaction between neurons on the transepithelial potential and the neuronal transmembrane potential. *European Biophysics Journal*, 33(7), 633-643.
- Vogt, R. G., & Riddiford, L. M. (1981). Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature* 293:161-63
- Vogt, R. G. (2003). Biochemical diversity of odor detection: OBPs, ODEs and SNMPs. *Insect pheromone biochemistry and molecular biology*, 391-445.
- Vosshall, L. B., Amrein, H., Morozov, P. S., Rzhetsky, A., & Axel, R. (1999). A Spatial Map of Olfactory Receptor Expression in the *Drosophila* Antenna. *Cell*, 96(5), 725-736.
- Wistrand, M., Käll, L., & Sonnhhammer, E. L. (2006). A general model of G protein-coupled receptor sequences and its application to detect remote homologs. *Protein science*, 15(3), 509-521.
- Zdobnov, E. M., & Apweiler, R. (2001). InterProScan—an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics*, 17(9), 847-848.

## ΕΙΚΟΝΕΣ

### Κεφάλαιο 1

1. Wyatt, T. D. (2003). *Pheromones and animal behaviour: communication by smell and taste* (p. 13). Cambridge University Press.
2. Zhou, J. J. (2010). Chapter Ten-Odorant-Binding Proteins in Insects. *Vitamins & Hormones*, 83, p. 253.
3. Laissue, P. P., & Vosshall, L. B. (2008). The olfactory sensory map in *Drosophila*. In *Brain development in Drosophila melanogaster* (p. 104). Springer New York.
4. Spletter, M. L., & Luo, L. (2009). A New Family of Odorant Receptors in *Drosophila*. *Cell*, 136(1), p. 24.
5. Vosshall, L. B., & Stocker, R. F. (2007). Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila*. *Annual review of neuroscience*, 30, p. 508.
6. Spletter, M. L., & Luo, L. (2009). A New Family of Odorant Receptors in *Drosophila*. *Cell*, 136(1), p. 24.
7. Jacquin-Joly, E., & Merlin, C. (2004). Insect olfactory receptors: contributions of molecular biology to chemical ecology. *Journal of chemical ecology*, 30(12), p. 2361
8. [http://en.wikipedia.org/wiki/Ligand-gated\\_ion\\_channel](http://en.wikipedia.org/wiki/Ligand-gated_ion_channel)
9. Benton, R. (2006). On the ORigin of smell: odorant receptors in insects. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(14), p. 1581
10. Benton, R. (2006). On the ORigin of smell: odorant receptors in insects. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(14), p. 1580.
11. Sanchez-Gracia, A., Vieira, F. G., & Rozas, J. (2009). Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects. *Heredity*, 103(3), p. 212.
12. Vosshall, L. B., & Stocker, R. F. (2007). Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila*. *Annual review of neuroscience*, 30, p. 512.
13. Vosshall, L. B. (2008). Scent of a fly. *Neuron*, 59(5), p. 687.
14. Mazomenos, B. E., & Haniotakis, G. E. (1985). Male olive fruit fly attraction to synthetic sex pheromone components in laboratory and field tests. *Journal of Chemical Ecology*, 11(3), p. 398.
15. Mazomenos, B. E., & Haniotakis, G. E. (1985). Male olive fruit fly attraction to synthetic sex pheromone components in laboratory and field tests. *Journal of Chemical Ecology*, 11(3), p. 403.
16. Controlling olive fruit fly at home (2006). University of California cooperative extension, p.2.
17. Alphey, L. (2002). Re-engineering the sterile insect technique. *Insect biochemistry and molecular biology*, 32(10), 1243-1247.
18. Morrison, N. I., Franz, G., Koukidou, M., Miller, T. A., Saccone, G., Alphey, L. S., ... & Polito, L. C. (2010). Genetic improvements to the sterile insect technique for agricultural pests. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 18(2), p. 283.
19. Ant, T., Koukidou, M., Rempoulakis, P., Gong, H. F., Economopoulos, A., Vontas, J., & Alphey, L. (2012). Control of the olive fruit fly using genetics-enhanced sterile insect technique. *BMC biology*, 10(1), 51, p.3.