



# Ταυτοποίηση και ανάλυση γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του δάκου της ελιάς

ΜΑΥΡΙΔΟΥ ANNA-MΑΡΙΑ



ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2014



## **Θέμα διπλωματικής εργασίας:**

«Ταυτοποίηση και ανάλυση γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του δάκου της ελιάς»

«Identification and analysis of genes involved in the development of the olive fruit fly»

**MAYRIΔΟΥ ANNA-MARIA**

2014



Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το διάστημα Σεπτεμβρίου 2013 - Φεβρουαρίου 2014 υπό την επίβλεψη του κ. Κ. Μαθιόπουλου, Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας και της Δρ Κ. Τσουμάνη.

#### ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος:** Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

**Σαραφίδου Θεολογία:** Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών

**Τσουμάνη Κωνσταντίνα:** Δρ Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημιακή  
Υπότροφος ανάθεσης διδακτικού έργου



## *Ευχαριστίες*

Και τώρα τι να πω? Ήξερα πως από όλα τα πεδία της επιστήμης που έχω διαλέξει η Μοριακή Βιολογία ήταν αυτό που πάντα με συνέπαιρνε. Αλλά, μετά από την εμπειρία μου σε αυτό το εργαστήριο πραγματικά..... την αγάπησα! Κατά τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της διπλωματικής πήρα πολλά παραπάνω από ότι ανέμενα και δύο είναι τα άτομα που οφείλονται για αυτό.

Πρώτος είναι ο κ. Κώστας Μαθιόπουλος, ο οποίος χαμογελαστός είπε το ναι όταν του ζήτησα να συμμετάσχω στην ομάδα του εργαστηρίου του. Και τότε άρχισαν όλα... Από τότε δεν υπήρξε στιγμή που να μην ήταν πρόθυμος να μου μεταλαμπαδεύσει τις γνώσεις του και να μου δείξει τη στήριξη του τον έναν αυτόν χρόνο που έμεινα στο εργαστήριό του. Είναι ο άνθρωπος που με έκανε να δω με άλλο μάτι το ερευνητικό κομμάτι της επιστήμης μου, καθώς μου έδειξε όλα όσα μπορούν να επιτευχθούν μέσα στα τετραγωνικά μέτρα ενός εργαστηρίου και για αυτό τον ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου.

Θα κλέψω δικά της λόγια, χαρακτηρίζοντάς την «εργαστηριακή μου μαμά». Η Δρ Κωνσταντίνα Τσουμάνη είναι ένα από τα πιο καλοσυνάτα, υπομονετικά, έξυπνα, αισιόδοξα, ακούραστα και χαμογελαστά άτομα που έχω γνωρίσει τα τελευταία 25 χρόνια! Πάντα σε ετοιμότητα να λύσει οποιαδήποτε απορία μου, να με συμβουλεύει, να με «μαλώσει», να με επαινέσει και να με βοηθήσει, όσα και αν είχε στο κεφάλι της. Δεν θα πω τίποτε άλλο. Απλά την αγαπώ!!!!!!

Επίσης ένα ευχαριστώ στην κ. Σαραφίδου Θεολογία για τη συμμετοχή της στην τριμελή επιτροπή μου.

Δεν μπορώ να παραλείψω βεβαίως βεβαίως, τα άλλα δύο developmentakia μου. Την Κωνσταντίνα Γεωργίου και την Μανακανάτα Χριστίνα για την απίστευτη βοήθεια που μου προσέφεραν τους πρώτους μήνες της διπλωματικής μας (μετά μας άφησαν και ξενιτεύτηκαν). Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω τη Μαρία- Ελένη Γρηγορίου, την Γιώτα Κοσκινώτη και την Έφη Σαγρή για την προθυμία τους και τις συμβουλές τους όποτε τις χρειάστηκα, καθώς επίσης και τον Αλέξανδρο Μπελαβίλα και τον Γιώργο Μαρωνίτη για το ευχάριστο κλίμα που δημιουργούσαν στο εργαστήριο.

Κύρια αγχολυτική μου ουσία τον τελευταίο χρόνο, αλλά και τους προηγούμενους ο Αμανατιάδης Νικόλαος στον οποίο οφείλω την ψυχική μου σταθερότητα και ένα τεράστιο ευχαριστώ για την αμερόληπτη στήριξη και υπομονή του.

Τέλος, αφιερώνω την παρούσα διπλωματική εργασία στους ανθρώπους που οφείλονται για την εξέλιξη και την πορεία μου όλα αυτά τα χρόνια και έχουν συμβάλει καταλυτικά στην σημερινή μου επιτυχία. Τους γονείς μου!





## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, είναι ένα παρασιτικό έντομο, που αποτελεί τον κύριο εχθρό των ελαιοκαλλιεργειών. Μέχρι σήμερα, αν και έχουν γίνει προσπάθειες χρήσης εναλλακτικών μεθόδων όπως η SIT για τον περιορισμό των πληθυσμών του, εντούτοις συναντώνται σημαντικά εμπόδια κατά την εφαρμογή τους. Έτσι, το ενδιαφέρον στρέφεται στην ανάπτυξη αποδοτικότερων μεθόδων ελέγχου του εντόμου αξιοποιώντας μεθόδους γενετικής μηχανικής, όπως τα συστήματα θηλεο-ειδικής εμβρυικής θνησιμότητας (FSEL). Με σκοπό την επιτυχή καθιέρωση ενός τέτοιου συστήματος στον δάκο, απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η μελέτη και ανάλυση γονιδίων που εμπλέκονται στην εμβρυογένεση και στα μονοπάτια απόπτωσης του εντόμου.

Προς την κατεύθυνση αυτή, στην παρούσα διπλωματική εργασία επιλέχθηκαν να μελετηθούν το γονίδιο *sry-a* που εκφράζεται μόνο σε εβρυνικά στάδια του εντόμου και το προαποπτωτικό γονίδιο *hid*. Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των δύο γονιδίων με τη βοήθεια ομόλογων εκκινητών που σχεδιάστηκαν βάσει δεδομένων RNA-seq. Επιτεύχθηκε η κλωνοποίηση και η ταυτοποίηση τμήματος του *sry-a* στο δάκο και έγινε προσπάθεια διαλογής γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του εντόμου ώστε να απομονωθεί η πλήρης αλληλουχία του. Αντίθετα με το *sry-a*, το προϊόν ενίσχυσης του *hid* δεν κατέστη εφικτό να κλωνοποιηθεί και έγινε προσπάθεια ταυτοποίησής του μέσω ετερόλογης υβριδοποίησης. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε *in silico* ανάλυση των διαθέσιμων αλληλουχιών και προσδιορίστηκε η οργάνωσή τους σε σύγκριση με το συγγενικό είδος *D. melanogaster*. Επιπλέον, προσδιορίστηκαν τα πρότυπα έκφρασης των δύο αυτών γονιδίων κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, μέσω ποσοτικής Real-Time PCR σε cDNA αυτών δάκου απομονωμένα σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα. Από τη διαδικασία αυτή διαπιστώθηκε πως η έκφραση των δύο προς μελέτη γονιδίων ακολουθεί τα αναμενόμενα πρότυπα με βάση το συγγενικό είδος *C. capitata*, παρέχοντας τις πρώτες πληροφορίες για τον χρονικό καθορισμό των κύριων σταδίων της εμβρυογένεσης στον δάκο.

## ABSTRACT

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, is an insect pest, which constitutes the main enemy of the olive cultivations. Until now, considerable efforts have been made to use alternative methods such as SIT to reduce its populations, however, significant obstacles encountered during their implementation. Thus, current attention turns on developing efficient insect control methods by utilizing genetic engineering methods, such as female-specific embryonic lethality system (FSEL). In order to introduce successfully such a **system in the olive fly, the study and analysis of genes involved in insect's embryogenesis and apoptosis pathways is a prerequisite.**

Towards this direction, two genes were selected for an initial study: the *sry-a* gene which is expressed only in embryonic stages of the insect; and the proapoptotic gene *hid*. PCR amplification of the two genes was performed using homologous primers designed based on RNA-seq data. A part of the **olive fly's *sry-a*** gene was successfully cloned and identified and a genomic library screening was attempted in order to isolate the full-length gene. Unlike *sry-a*, the amplification product of *hid* was not possible to clone, thus its identification was attempted by heterologous hybridization. Moreover, *in silico* analysis of the available sequences was also performed and the organization of the genes compared to related species *D. melanogaster* was determined. Secondly, the expression levels of these two genes were examined during embryogenesis, by quantitative Real- Time PCR in egg cDNA which were isolated at different time-points. By this process it was found that the expression of the two studied genes follows the expected pattern of the related species *C. capitata*, providing the first information about the timing of the main stages of embryogenesis in *B. oleae*.

## Περιεχόμενα

1	<b>Εισαγωγή</b> .....	1
1.1	Βιολογικός κύκλος του δάκου της ελιάς .....	3
1.2	Αντιμετώπιση των προβλημάτων που προκαλεί ο δάκος της ελιάς.....	3
1.3	Η τεχνική SIT (Sterile Insect Technique) ως εναλλακτική μέθοδος καταπολέμησης των εντόμων .....	4
1.3.1	Προβλήματα εφαρμογής της SIT και τρόποι βελτιστοποίησής της.....	5
1.3.2	Βελτιώσεις της SIT με χρήση της Γενετικής Μηχανικής .....	5
1.4	Προϋποθέσεις εφαρμογής συστήματος FSEL στο δάκο της ελιάς .....	7
1.5	Η πρόιμη ανάπτυξη στην <i>Drosophila melanogaster</i> .....	8
1.6	Το στάδιο της κυτταροποίησης .....	11
1.7	Ο ρόλος του γονιδίου <i>serendipity-alpha</i> ( <i>sry-a</i> ) .....	12
1.8	Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος .....	14
1.9	Ο ρόλος του γονιδίου head involution defective ( <i>hid</i> ) .....	16
1.10	ΣΚΟΠΟΣ .....	19
2	<b>Υλικά και μέθοδοι</b> .....	21
2.1	Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων .....	23
2.1.1	Απομόνωση RNA (RNA extraction) .....	23
2.1.2	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (mini preps) .....	24
2.2	Χειρισμός νουκλεϊκών οξέων .....	25
2.2.1	Κατακρήμνιση DNA .....	25
2.2.2	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης .....	25
2.2.3	Ανάκτηση DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction) .....	26
2.2.4	Πέψη με ένζυμα περιορισμού .....	27
2.2.5	Επεξεργασία με DNAase .....	28
2.3	Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή από ολικό RNA .....	28
2.4	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) .....	29
2.4.1	Συμβατική .....	29
2.4.2	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real - Time PCR) .....	31
2.5	Υβριδοποίηση κατά Southern .....	32
2.5.1	Μεταφορά του DNA και σταθεροποίηση σε νάυλον μεμβράνη .....	32
2.5.2	Σήμανση ανιχνευτή .....	33
2.5.3	Υβριδοποίηση του DNA της μεμβράνης με το σημασμένο ανιχνευτή .....	34
2.5.4	Ανίχνευση σήματος .....	34
2.6	Κλωνοποίηση DNA .....	35
2.6.1	Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA σε πλασμιδιακό φορέα (ligation) .....	36
2.6.2	Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση .....	36

2.6.3	Μετασχηματισμός κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση .....	37
2.6.4	Καλλιέργεια μετασχηματισμένων κυττάρων και διάκριση ανασυνδυασμένων κλώνων.....	38
2.7	Βακτηριοφάγος λ-DASH® II – Γονιδιωματική βιβλιοθήκη.....	39
2.7.1	Προετοιμασία βακτηρίων-ξενιστών του βακτηριοφάγου lambda.....	39
2.7.2	Τιτλοδότηση γονιδιωματικής βιβλιοθήκης .....	40
2.7.3	Επίστρωση γονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε τρυβλίο .....	40
2.7.4	Συλλογή πλάκας βακτηριοφάγου λ .....	41
2.7.5	Διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης .....	41
2.8	Συλλογή αυγών δάκου.....	42
2.9	<i>In silico</i> ανάλυση .....	42
2.9.1	Omiga .....	42
2.9.2	Blast (Basic Local Allignment Search Tool).....	43
3	<b>Αποτελέσματα</b> .....	45
3.1	Μοριακή ανάλυση του γονιδίου <i>serendipity-a</i> ( <i>sry-a</i> ) .....	47
3.2	Μοριακή ανάλυση του γονιδίου <i>head involution defective</i> ( <i>hid</i> ).....	50
3.3	Μελέτη των προτύπων έκφρασης των γονιδίων <i>sry-a</i> και <i>hid</i> κατά την εμβρυογένεση του δάκου.....	53
4	<b>Συζήτηση</b> .....	57
4.1	Εμβρυογενετικό γονίδιο <i>sry-a</i> .....	59
4.2	Προαποπτωτικό γονίδιο <i>hid</i> .....	61
5	<b>Παράρτημα</b> .....	65
6	<b>Βιβλιογραφία</b> .....	67

# *Εισαγωγή*





## 1.1 Βιολογικός κύκλος του δάκου της ελιάς

**Ο** δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, ανήκει στην οικογένεια Tephritidae των διπτέρων εντόμων. Εντοπίζεται σε πολύ μεγάλους πληθυσμούς στη χώρα μας, καθώς και σε άλλες ελαιοπαραγωγούς χώρες, όπου υπάρχουν ελαιώνες όπως είναι η Ιταλία, η Ισπανία και γενικότερα σε χώρες στη λεκάνη της Μεσογείου, στη νότια Αφρική, Μέση Ανατολή, βόρεια Ινδία, βορειοδυτικό Πακιστάν, ενώ πρόσφατα εντοπίστηκε και στην Καλιφόρνια των ΗΠΑ [54-57].

Ο δάκος της ελιάς έχει 4-5 περίπου γενεές το χρόνο και ο βιολογικός κύκλος του περιλαμβάνει 4 στάδια: του αυγού, της προνύμφης, της νύμφης και του ενήλικου ατόμου (Εικόνα 1.1). Το ενήλικο άτομο συνήθως τρέφεται με εκκρίματα των δέντρων και ζει μέχρι και δύο μήνες [64]. Κατά τα τέλη της Άνοιξης και εφόσον το επιτρέπουν οι περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία 20-28°C, υγρασία >50-60%) αρχίζουν τα αρσενικά να προσελκύσουν τα θηλυκά για να συζευχθούν [62]. Μετά τη σύζευξη ακολουθεί η ωοαπόθεση από το θηλυκό στο μεσοκάρπιο του ανώριμου ακόμα φρούτου της ελιάς (τις περισσότερες φορές ένα αυγό ανά καρπό) [59]. Μέσα στον καρπό, το έμβryo εκκολάπτεται και γίνεται προνύμφη (larva). Η τελευταία τρέφεται από το μεσοκάρπιο [60] και αναπτυσσόμενη υφίσταται τρεις εκδύσεις, ώστε τελικά να μεταμορφωθεί σε νύμφη (pupa). Ως νύμφη το έντομο περνά 7-10 μέρες βομβυκιωμένο (κουκούλι) κάποια εκατοστά κάτω από το έδαφος καθώς ο καρπός έχει καταλήξει εκεί λόγω της ανάπτυξης παθογόνων οργανισμών (*Camarosporium dalmaticum*) που προκαλούν σήψη και πτώση του [53]. Εάν οι συνθήκες δεν είναι ευνοϊκές, παρατείνεται το στάδιο της νύμφης και το έντομο περνά τον χειμώνα στο βομβύκιο. Τελικά, η νύμφη που έχει μεταφερθεί ακριβώς κάτω από την εφυμενίδα του καρπού της ελιάς, υπό κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας [61] θα την διαρρήξει ανοίγοντας την «οπή εξόδου» από όπου θα εξέρθει το ενήλικο πλέον άτομο.



Εικόνα 1.1 - Ο βιολογικός κύκλος του δάκου της ελιάς. Πηγή φωτογραφικού υλικού [www.ideassonline.org](http://www.ideassonline.org)

## 1.2 Αντιμετώπιση των προβλημάτων που προκαλεί ο δάκος της ελιάς

**Ο** δάκος θεωρείται ο σημαντικότερος εχθρός της ελιάς, καθώς ο καρπός της αποτελεί το υπόστρωμα ωοτοκίας του αλλά και τη μοναδική διατροφική πηγή των προνυμφών του [58]. Μία προνύμφη καταναλώνει το 1/5 – 1/4 ενός καρπού μέσου μεγέθους. Με αυτόν τον τρόπο ο καρπός καταστρέφεται, αφού συρρικνώνεται και ξεραίνεται σε συνθήκες ξηρασίας ή σαπίζει όταν είναι υγρός. Σε περίπτωση έντονης προσβολής, εκτός από την ποσοτική, επέρχεται και ποιοτική καταστροφή με την υποβάθμιση της παραγωγής και της ποιότητας του λαδιού μεταγενέστερα [80].

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για τη μείωση των πληθυσμών του δάκου, ως επί το πλείστον χημικές. Η χημική καταπολέμηση του παρασίτου αυτού στηρίζεται κυρίως σε προληπτικές μεθόδους (που θα αποτρέψουν την προσβολή του ελαιόδεντρου από τον δάκο), αλλά και σε θεραπευτικές (όπου επιδιώκεται η καταπολέμηση του κυρίως στο στάδιο της προνύμφης, δηλαδή κατά την εποχή που βρίσκεται μέσα στη σάρκα του καρπού) [81].

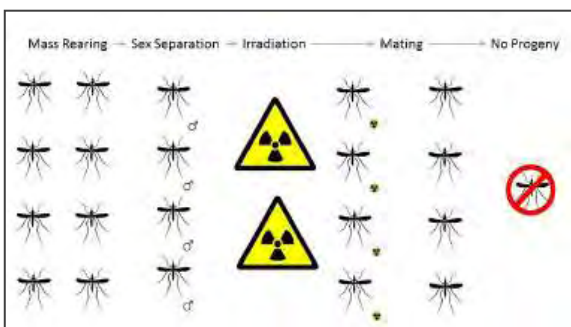
Σημαντικό μειονέκτημα των τεχνικών χημικής καταπολέμησης του δάκου είναι ρύπανση του περιβάλλοντος. Επιπλέον, η μαζική χρήση των εντομοκτόνων οδηγεί στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας των πληθυσμών του εντόμου, ώστε τελικά σε πολλές περιπτώσεις η προσέγγιση αυτή να καθίσταται αναποτελεσματική [82]. Τέλος, με τη μαζική παγίδευση και εξόντωση εντόμων μέσω των παγίδων, έχει παρατηρηθεί θανάτωση πολλών ωφέλιμων εντομοφάγων εντόμων, με συχνή συνέπεια εξάρσεις πληθυσμών κοκκοειδών καθώς και άλλων εχθρών της ελιάς, αλλά προκαλώντας και κινδύνους για την ισορροπία των οικοσυστημάτων [83].

Η ανάγκη λοιπόν για βελτίωση των μεθόδων καταπολέμησης του δάκου της ελιάς αλλά και των παρασίτων γενικότερα φαίνεται επιτακτική. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα εγκυμονούν μια σειρά κινδύνων για τη δημόσια υγεία και την ισορροπία των οικοσυστημάτων. Οι νέες αυτές μέθοδοι θα πρέπει να είναι αποτελεσματικές, εξειδικευμένες και ειδο-ειδικές, ενώ παράλληλα δεν θα συνοδεύονται από τις αρνητικές επιπτώσεις των υπαρχουσών ώστε να αποφεύγεται η δράση τους και σε άλλους οργανισμούς του ίδιου οικοσυστήματος.

### 1.3 Η τεχνική SIT (Sterile Insect Technique) ως εναλλακτική μέθοδος καταπολέμησης των εντόμων

Το 1940 ο Serebrovskii στο πανεπιστήμιο της Μόσχας έθεσε την ιδέα της απελευθέρωσης μεταλλαγμένων εντόμων, που θα είχαν την ικανότητα να μεταβιβάσουν τη δηλητηριώδη μετάλλαξή τους στο φυσικό (άγριο) πληθυσμό, έχοντας ως στόχο τη καταστολή πληθυσμών παρασιτικών εντόμων [49]. Ο όρος SIT (Sterile Insect Technique) προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Knipling το 1955, για να περιγράψει την απελευθέρωση μεγάλου πληθυσμού στείρων εντόμων που θα είχε ως συνέπεια τη μείωση της σύζευξης μεταξύ των γόνιμων αγρίων ομολόγων τους.

Η SIT βασίζεται στη μαζική εκτροφή εντόμων, τη στείρωσή τους με έκθεση σε ραδιενέργεια και τελικά στην ελεγχόμενη απελευθέρωση ενός μεγάλου αριθμού στείρων αρσενικών εντόμων στη περιοχή ανάπτυξης του άγριου πληθυσμού-στόχου. Η σύζευξη των στείρων αρσενικών με θηλυκά αγρίου τύπου οδηγεί σε μη γόνιμες διασταυρώσεις, με αποτέλεσμα ο πληθυσμός να μειώνεται (Εικόνα 1.2). Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των στείρων εντόμων που θα απελευθερωθούν, τόσο θα μειώνεται τελικά ο πληθυσμός. Τα αρσενικά έντομα που απελευθερώνονται είναι ικανά να αναζητήσουν θηλυκά του ίδιου είδους για να συζευχθούν, με αποτέλεσμα η τεχνική να γίνεται περισσότερο αποδοτική όσο μειώνεται ο πληθυσμός [48].



Εικόνα 1.2 - Μαζική εκτροφή εντόμων και έκθεσή αρσενικών σε ακτινοβολία με αποτέλεσμα της στείρωσή τους. Μετά από σύζευξη με άγρια θηλυκά δεν προκύπτουν απόγονοι [85].

Η SIT αποτελεί ως σήμερα ένα επιτυχές πρόγραμμα ολοκληρωμένης διαχείρισης παρασίτων σε μεγάλη κλίμακα (area-wide integrated pest management, AW-IPM). Είναι μια ειδο-ειδική, αποδοτική και φιλική προς το περιβάλλον τεχνική σε



αντίθεση με άλλες μεθόδους [52], όπως οι ψεκασμοί με εντομοκτόνα, αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο και της επιβλαβείς συνέπειες της χρήσης χημικών ουσιών στον άνθρωπο [67,68].

### 1.3.1 Προβλήματα εφαρμογής της SIT και τρόποι βελτιστοποίησής της

Πέρα από τη θετική πλευρά της, η τεχνική αυτή κρύβει και δύο καίριας σημασίας μειονεκτήματα, τα οποία λειτουργούν ανασταλτικά στη χρήση της σε μεγάλη κλίμακα. Μία μείζων δυσκολία της SIT όπως σήμερα αυτή χρησιμοποιείται είναι ότι τα στείρα αρσενικά έντομα που δημιουργούνται, πρέπει να ανταγωνιστούν τα άγρια αρσενικά του πληθυσμού για σύζευξη με τα θηλυκά [69]. Ωστόσο προκαλείται δραματική μείωση της ανταγωνιστικότητας των στείρων εντόμων, λόγω της χρήσης ακτινοβολίας, η οποία προκαλεί χρωμοσωμικές μεταλλάξεις. Έτσι δεν προτιμώνται από τα θηλυκά για σύζευξη σε σχέση με τα άγρια αρσενικά [70,71]. Προσπάθεια μείωσης της ποσότητας της ακτινοβολίας στην οποία εκτίθενται τα έντομα που εκτρέφονται έχει σαν αποτέλεσμα τη μερική στειρώσή τους, απελευθερώνοντας έτσι και γόνιμα έντομα στον πληθυσμό.

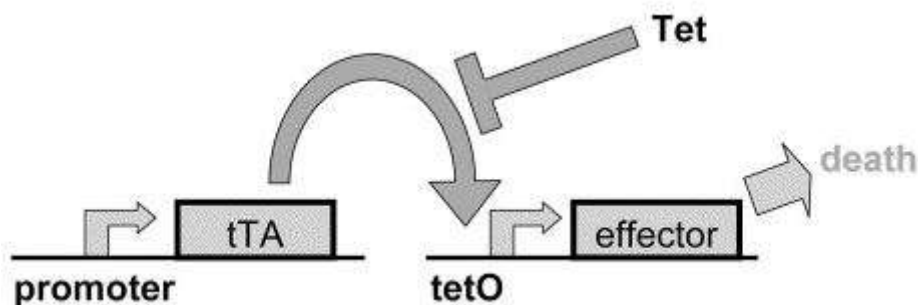
Ένα ακόμα πρόβλημα της SIT είναι η ταυτόχρονη απελευθέρωση και θηλυκών εντόμων μαζί με τα στείρα αρσενικά. Μπορεί τα θηλυκά να είναι και αυτά στείρα αλλά εξακολουθούν να έχουν την ικανότητα ωοαπόθεσης και επιλέγονται προς σύζευξη από τα στείρα αρσενικά. Επιπλέον, αυξάνουν το κόστος εκτροφής αφού παράγεται ίσος αριθμός εντόμων και των δύο φύλων [72]. Για να ξεπεραστεί αυτό το μειονέκτημα, έρευνες εστιάζουν πλέον στην ανάπτυξη μοριακών εργαλείων που θα επιτρέπουν τον αποτελεσματικό διαχωρισμό του φύλου, ώστε τελικά να επιλέγονται προς απελευθέρωση στο πεδίο μόνο αρσενικά άτομα [70] ή στη θανάτωση των θηλυκών ατόμων σε κάποιο αναπτυξιακό στάδιο.

Με σκοπό την αντιμετώπιση του παραπάνω προβλήματος, αρχικά αναπτύχθηκαν μέσω κλασσικής γενετικής τεχνικές επιλεκτικής απομάκρυνσης των θηλυκών εντόμων από τον προς απελευθέρωση πληθυσμό που αναφέρονται ως GSMs (genetic sexing mechanisms)[86]. Οι τεχνικές αυτές βασίζονται σε κάποια φυλετικά συνδεδεμένη διαφοροποίηση, με χρήση ενός επικρατούς δείκτη επιλογής (γονίδιο ανθεκτικότητας [96], χρώμα νύμφης ή θνησιγόνο εξαρτώμενο από τη θερμοκρασία), ενσωματωμένου στο Y χρωμόσωμα που καθορίζει το αρσενικό φύλο [97]. Η σύνδεση του χαρακτηριστικού που προσδίδει τον επιθυμητό φαινότυπο πραγματοποιείται με τη δημιουργία χρωμοσωμικών μετατοπίσεων στο Y χρωμόσωμα, που προκαλούνται μετά από έκθεση σε ακτινοβολία. Με αυτόν τον τρόπο, τα ομόζυγα για την υπολειπόμενη αυτοσωμική μετάλλαξη θηλυκά άτομα πέθαιναν, ενώ τα αρσενικά επιβίωναν λόγω της σύνδεσης του αγρίου τύπου αλληλομόρφου του γονιδίου [86]. Επιτυχημένο παράδειγμα εφαρμογής του φυλετικού διαχωρισμού πραγματοποιήθηκε στη μύγα της Μεσογείου, *Ceratitidis capitata*, χρησιμοποιώντας μια υπολειπόμενη αυτοσωμική μετάλλαξη θνησιγόνα σε υψηλή θερμοκρασία [74]. Ωστόσο, η δημιουργία μεταλλάξεων μέσω χρωμοσωμικών μετατοπίσεων βρέθηκε ότι μειώνει τη βιωσιμότητα των εντόμων επηρεάζοντας τη σεξουαλική ανταγωνιστικότητα, τη φυσιολογία και τη συμπεριφορά των εντόμων, γεγονός που προκαλούσε προβλήματα στην αποδοτική μαζική εκτροφή τους [70]. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι τα στελέχη ήταν ασταθή και επιρρεπή σε γενετικούς ανασυνδυασμούς [98]. Τέλος, η τεχνική αυτή βασίζονταν στην τυχαία πρόκληση μεταλλάξεων γεγονός που καθιστούσε αδύνατη τη μεταφορά των γενετικών εργαλείων από οργανισμό σε οργανισμό, εφόσον απαιτείται η εκ νέου δημιουργία των στελεχών για κάθε είδος.

### 1.3.2 Βελτιώσεις της SIT με χρήση της Γενετικής Μηχανικής

Παράλληλα, τις τελευταίες δεκαετίες αναζητήθηκαν λύσεις στον ταχέως αναπτυσσόμενο κλάδο της γενετικής μηχανικής για τη βελτίωση της προαναφερθείσας τεχνικής. Αξιοποιήθηκε η δυνατότητα εισαγωγής επαγόμενων φυλοσύνδετων

θνησιγόνων γονιδίων στη γαμετική σειρά των εντόμων για το φυλετικό διαχωρισμό τους. Η μέθοδος που έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα στο πρόβλημα του διαχωρισμού των φύλων πριν την απελευθέρωση, ήταν το σύστημα καταστολής της έκφρασης από τετρακυκλίνη (“Tet-off” system)[77]. Βάση της μεθόδου είναι η εισαγωγή ενός υπό όρους θηλεο-ειδικού θνησιγόνου που θα μπορεί να επάγεται (ή να απο-καταστέλλεται) στη τελική γενιά πριν την απελευθέρωση, προκαλώντας θνησιμότητα σε όλα τα θηλυκά άτομα αυτής της γενιάς (Εικόνα 1.3). Για το σκοπό αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε επικρατές, είτε υπολειπόμενο θνησιγόνο, ωστόσο το επικρατές θνησιγόνο είναι ευκολότερο στο σχεδιασμό [70].



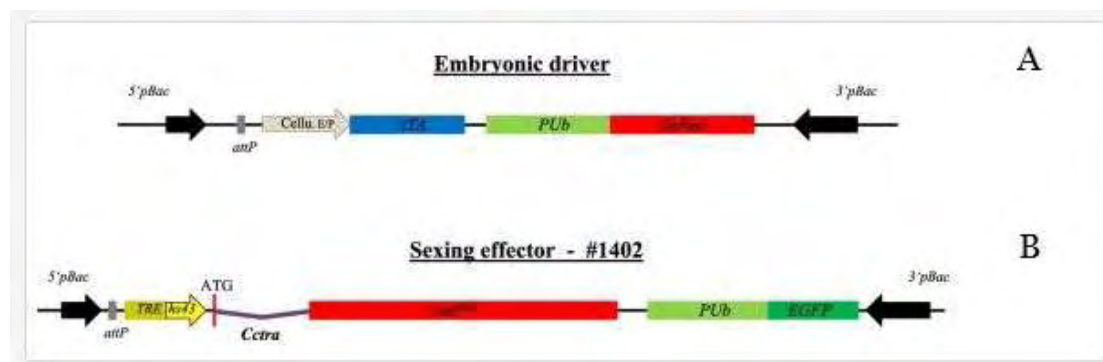
**Εικόνα 1.3 – Ο ενεργοποιητής tTA και το σύστημα “Tet-off”. Απουσία τετρακυκλίνης ο ενεργοποιητής tTA, ο οποίος βρίσκεται καθοδικά ενός υποκινητή επιλογής (π.χ. θύλεο-ειδικός), εκφράζεται και συνδέεται σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία του DNA (tetO). Η περιοχή tetO οδηγεί στην έκφραση ενός γονιδίου τελεστή (π.χ. γονίδιο τοξικότητας ή θνησιγόνο γονίδιο). Με αυτόν τον τρόπο, το γονίδιο αυτό εκφράζεται σύμφωνα με το πρότυπο του επιλεγμένου υποκινητή. Ωστόσο, ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις τετρακυκλίνης, η πρωτεΐνη του tTA δε μπορεί να συνδεθεί στον χειριστή tetO και έτσι καταστέλλεται η έκφραση του γονιδίου τελεστή.**

Στην προσπάθεια αντικατάστασης της ακτινοβολίας ως μεθόδου στείρωσης των εντόμων, σταθμός υπήρξε η πρόταση των Thomas et al. το 2000 για τη χρήση του συστήματος RIDL [78]. Η τεχνική RIDL (Release of Insects carrying a Dominant Lethal) βασίζεται στην απελευθέρωση αρσενικών γόνιμων εντόμων που φέρουν όμως ένα επικρατές θνησιγόνο γονίδιο, το οποίο συνήθως ελέγχεται από ένα θηλεο-ειδικό υποκινητή [87]. 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. Με τη χρήση της μεθόδου αυτής δεν απαιτείται η ακτινοβόληση των εντόμων με αποτέλεσμα, πέρα από τη μείωση του κόστους παραγωγής των στειρών εντόμων, την απαλλαγή από τις δυσάρεστες συνέπειες αυτής στη βιωσιμότητα των εντόμων. Επομένως, ένα επιπλέον πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η ανταγωνιστικότητα του σπέρματος των απελευθερωμένων εντόμων, που παίζει πολύ σημαντικό ρόλο για την επιτυχία του προγράμματος [70].

Μέθοδοι όπως η RIDL που βασίζονται στη γενετική μηχανική αποτελούν καλές εναλλακτικές λύσεις, εντούτοις η θνησιμότητα εκδηλώνεται στο στάδιο της νύμφης, χαρακτηριστικό που αποτελεί σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου. Ωστόσο, ένα διαγονιδιακό σύστημα που θα δρα σε στάδιο της πρώιμης ανάπτυξης του εμβρύου, θα μείωνε το κόστος εφαρμογής, αφού θα αποφεύγονταν τα στάδια προνύμφης και νύμφης, αυξάνοντας κατ’ αυτόν τον τρόπο την αποδοτικότητα, με ταυτόχρονη μείωση του κόστους της μαζικής εκτροφής των εντόμων [99].

Προς την κατεύθυνση αυτή, οι Schetelig et al. 2012 ανέπτυξαν την τεχνική της δυαδικής έκφρασης, χρησιμοποιώντας ένα σύστημα που δρα σε πρώιμο στάδιο της ανάπτυξης του εντόμου, συνδυάζοντας την αρχή της θηλεο-ειδικής θνησιμότητας μέσω εναλλακτικού ματίσματος [104] με ένα έμβryo-ειδικό σύστημα [103]. Στόχος της προσπάθειας αυτής ήταν να δημιουργήσουν ένα σύστημα θηλεο-ειδικής εμβρυϊκής θνησιμότητας (female-specific embryonic lethality system, FSEL) [99]. Μέσω αυτού του συστήματος, ένας έμβryo-ειδικός υποκινητής επάγει την έκφραση του ενεργοποιητή tTA στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης του εμβρύου (Εικόνα 1.4 A). Όταν ο tTA εκφραστεί, προσδένεται στη περιοχή TRE (tetO) (Εικόνα 1.4 B), η οποία ελέγχει την έκφραση του

προαποπτωτικού γονιδίου *hid<sup>Ala5</sup>*. Παράλληλα, το φύλο-ειδικό μάτισμα του ιντρονίου *Cctra-1* αποτρέπει τη θνησιγόνο δράση του *hid* στα αρσενικά έντομα [99].



Εικόνα 1.4 – Δυναμικό σύστημα έκφρασης των Schetelig et al. 2012. Α) Υποκινητής/ενισχυτής γονιδίου της κυτταροποίησης που περιορίζει την έκφραση του tTA στα πρώιμα εμβρυακά στάδια. Β) Περιοχή δέσμευσης του tTA (TRE) που ελάγει την έκφραση του γονιδίου θνησιμότητας κάτω από τον έλεγχο τμήματος γονιδίου φυλοκαθορισμού. Η ενεργοποίηση του κάθε συστήματος ελέγχεται από ένα γονίδιο αναφοράς (DsRed, EGFP).

Αν και απομένουν ακόμα να γίνουν πολλές βελτιώσεις ώστε τέτοιου είδους μέθοδοι να εφαρμόζονται σε ευρεία κλίμακα στο πεδίο, δεν φαίνεται να υπάρχουν σημαντικά εμπόδια για την ανάπτυξη των μεθόδων που συζητήθηκαν. Με ενδεχόμενη την ανάπτυξη επιπλέον μεθόδων για τον περιορισμό εντόμων οικονομικής σημασίας, πρέπει να ληφθούν αποφάσεις σε εθνικό, τοπικό και παγκόσμιο επίπεδο όσον αφορά την ασφάλεια και την ηθική γύρω από την εφαρμογή μεθόδων SIT.

## 1.4 Προϋποθέσεις εφαρμογής συστήματος FSEL στο δάκο της ελιάς

Η μέθοδος SIT είχε εφαρμοστεί για τον έλεγχο του δάκου της ελιάς κατά τη δεκαετία του '70 χωρίς όμως επιτυχή αποτελέσματα [102]. Σημαντικά εμπόδια αποτελούν η επίμοχθη και δαπανηρή μαζική εκτροφή του εντόμου, η μειωμένη ποιότητα των εντόμων μαζικής εκτροφής, η σεξουαλική αποσύνδεση μεταξύ εργαστηριακών και άγριων ατόμων λόγω της μετατόπισης των φυσικών ρολογιών σεξουαλικής συμπεριφοράς κατά τη διάρκεια της φάσης σκότους που αποτρέπει τη σύζευξη μεταξύ τους [101], καθώς και η έλλειψη των απαραίτητων πληροφοριών σχετικά με το πλήρη ρόλο της συμβιωτικής μικροπανίδας του δάκου και τις πληθυσμιακές αλλαγές της στη φύση και κατά τη διάρκεια του εργαστηριακού αποικισμού [101].

Η έρευνα για την ανάπτυξη ενός RIDL συστήματος στον δάκο της ελιάς οδήγησε πρόσφατα στη δημιουργία στελεχούς που ελάγει τη θηλυκή θνησιμότητα στο στάδιο της προνύμφης [100]. Παρά την πρόοδο που έχει σημειωθεί, το στάδιο στόχευσης διατηρεί τα μειονεκτήματα του κόστους χειρισμού και εκτροφής των εντόμων σε υψηλά επίπεδα. Για το λόγο αυτό, το ενδιαφέρον στρέφεται στην ανάπτυξη FSEL στελεχών που θα προκαλούν θνησιμότητα στο εμβρυικό στάδιο. Κύρια προϋπόθεση για τη δημιουργία της επιθυμητής κατασκευής, που θα εισαχθεί στα έντομα, είναι η ύπαρξη της απαραίτητης πληροφορίας και η γνώση των αλληλουχιών των γονιδίων που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν. Όπως προαναφέρθηκε, στο συγκεκριμένο σύστημα τα θνησιγόνα ή αποπτωτικά γονίδια βρίσκονται υπό τον έλεγχο ενός εξειδικευμένου υποκινητή. Η επιθυμητή εξειδίκευση στο συγκεκριμένο σύστημα δύναται να επιτευχθεί με την τοποθέτηση ενός έμβryo-ειδικού υποκινητή, ώστε οι απόγονοι των εντόμων να πεθαίνουν στο στάδιο της εμβρυογένεσης, για να εξασφαλιστεί η διακοπή της ανάπτυξης με αποτέλεσμα την αποφυγή της καταστροφής του καρπού της ελιάς.

Για την εξασφάλιση των παραπάνω προϋποθέσεων απαιτούνται:

- I. Ο υποκινητής ενός γονιδίου που εκφράζεται μόνο κατά την εμβρυογένεση
- II. Η κωδική αλληλουχία (ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης) ενός γονιδίου που θα προκαλέσει τον θάνατο του εντόμου

Συνεπώς για την αποτελεσματική ανάπτυξη του συστήματος στο δάκο, είναι αναγκαία η μελέτη κατάλληλων γονιδίων που εμπλέκονται στην εμβρυογένεση αλλά και στην απόπτωση. Ο υποκινητής του γονιδίου *sry-a*, το οποίο εκφράζεται όπως θα δούμε στη συνέχεια, αυστηρά κατά τη διάρκεια του κυτταρικού βλαστοδέρματος στην εμβρυογένεση, ικανοποιεί την παραπάνω προϋπόθεση ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στην κατασκευή του συστήματος. Επιπλέον, η προαποπτωτική λειτουργία του γονιδίου *hid* αποτελεί μια ιδιότητα που το καθιστά ιδανικό υποψήφιο για την ενσωμάτωσή του σε συστήματα ελέγχου παρασιτικών εντόμων, καθώς εξυπηρετεί το σκοπό της θανάτωσης των εντόμων που θα εκφράσουν το σύστημα.

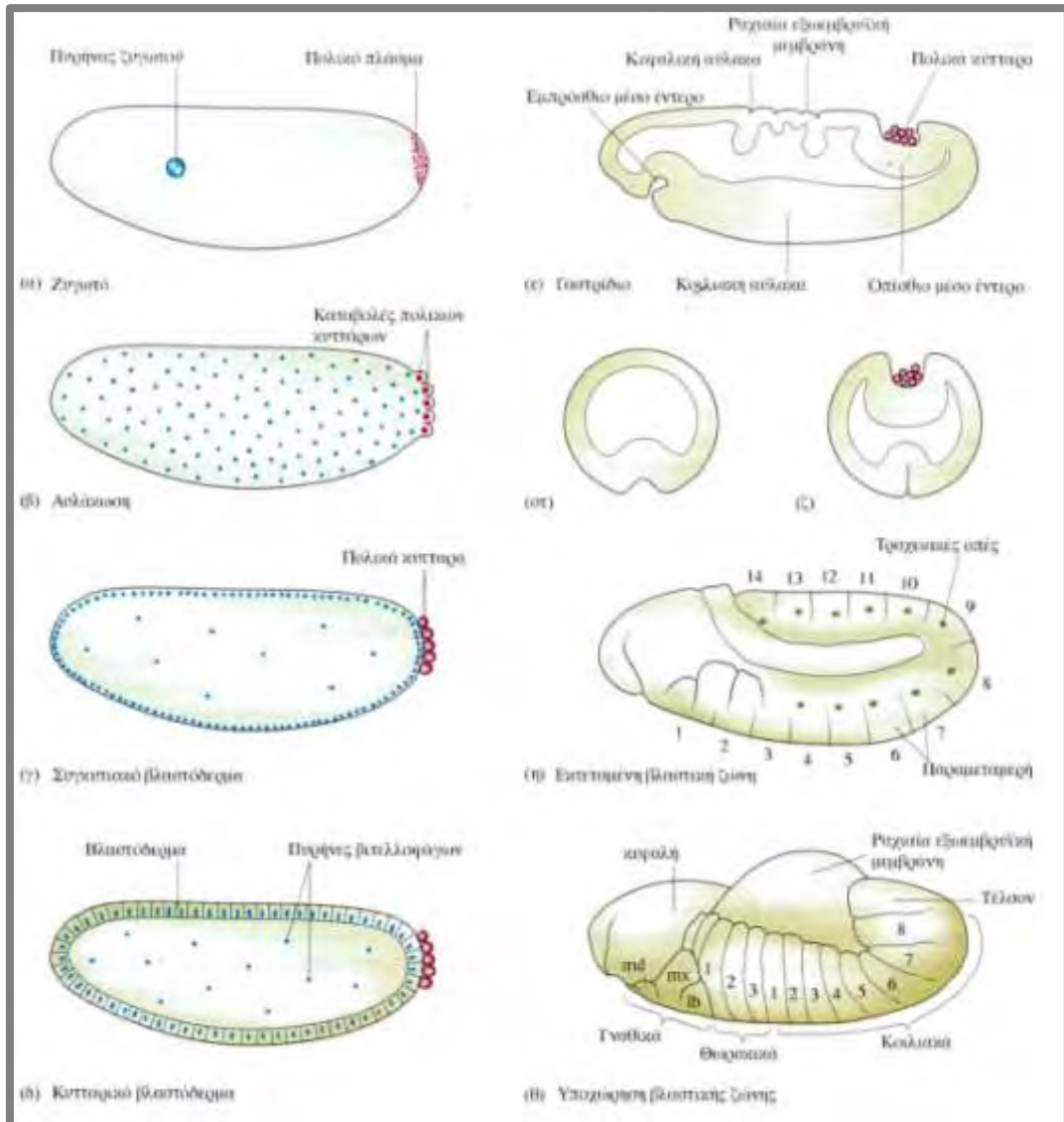
## 1.5 Η πρώιμη ανάπτυξη στην *Drosophila melanogaster*

**Η** αναπτυξιακή βιολογία του δάκου της ελιάς αποτελεί ένα πεδίο προς διερεύνηση. Μελετώντας τη *Drosophila melanogaster* (που αποτελεί τον πιο κοντινό συγγενικά οργανισμό μοντέλο στο δάκο της ελιάς και τα αναπτυξιακά της στάδια έχουν μελετηθεί διεξοδικά) μπορούμε να πάρουμε μια πιο σφαιρική εικόνα για την διαδικασία της εμβρυογένεσης στον δάκο.

Η πρώιμη ανάπτυξη του εμβρύου της *Drosophila* ακολουθεί την γονιμοποίηση του ωαρίου η οποία λαμβάνει χώρα στη μήτρα του θηλυκού εντόμου και σηματοδοτείται με την είσοδο του σπερματοζωαρίου από την μικροπύλη, η οποία αποτελεί οπή του χορίου στο εμπρόσθιο άκρο του ωοκυττάρου. Στο σημείο αυτό σχηματίζεται το ζυγωτό που αποτελεί το πρώτο στάδιο της πρώιμης εμβρυογένεσης. Στη συνέχεια, ακολουθεί η αυλάκωση και συγκεκριμένα στα έντομα η «επιφανειακή αυλάκωση» που αποτελεί το δεύτερο στάδιο.

Σ' αυτόν τον τύπο αυλάκωσης διαιρούνται μόνο οι πυρήνες, χωρίς παράλληλη κυτταροπλασματική αυλάκωση. Κατά τα στάδια αυτά το έμβryo αποτελεί ένα συγκύτιο (πολλοί πυρήνες που αιωρούνται στο κυτταρόπλασμα) και η δομή αυτή ονομάζεται συγκυτιακό βλαστοδέρμα (Εικόνα 1.5 γ). Κάποια καθορισμένη χρονική στιγμή οι πυρήνες θα μεταναστεύσουν προς την περιφέρεια και θα ξεκινήσει η κυτταροποίηση (cellularization), ο διαχωρισμός δηλαδή του πολυ-πυρηνικού κυττάρου ή συγκυτίου σε μεμονωμένα κύτταρα<sup>1</sup> δημιουργώντας ένα περιφερειακό κυτταρικό επιθήλιο δίνοντας τη δομή του κυτταρικού βλαστοδέρματος (Εικόνα 1.5 δ). Με την ολοκλήρωση της αυλάκωσης σειρά παίρνει η γαστριδίωση που αποτελεί το τρίτο στάδιο της πρώιμης εμβρυογένεσης. Μετά το τέλος της γαστριδίωσης συνήθως έχει οργανωθεί το γενικό πρότυπο του σώματος του εμβρύου (φυλοτυπικό στάδιο), το οποίο στα έμβρυα των εντόμων είναι το στάδιο της εκτεταμένης βλαστικής ζώνης (Εικόνα 1.5 η) [88,89].

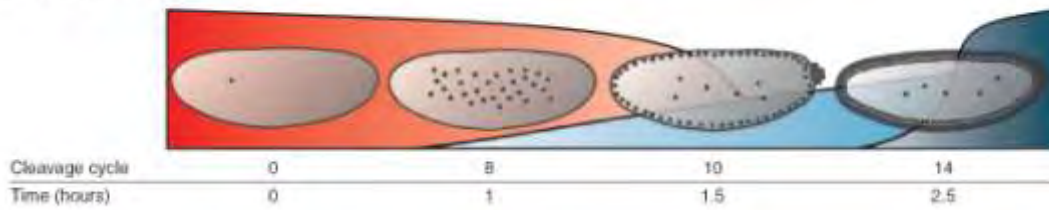
<sup>1</sup> <http://flybase.org/cgi-bin/cvreport.html?id=GO:0007349>



**Εικόνα 1.5 - Η πρώτη ανάπτυξη της *Drosophila*. Τα στ) και ζ) είναι, αντίστοιχα, μέση και οπίσθια εγκάρσια τομή του γαστριδίου [8].**

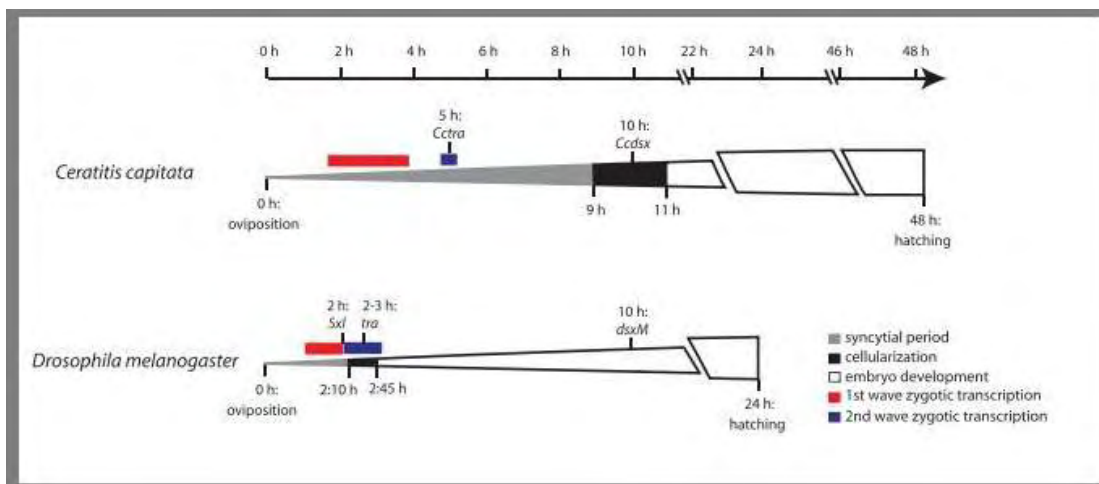
Η έναρξη της εμβρυϊκής ανάπτυξης είναι το αποτέλεσμα μιας περίπλοκης αλληλεπίδρασης μεταξύ μητρικών και ζυγωτικών γενετικών πληροφοριών. Κατά τη διάρκεια της μετάβασης από τα μητρικά στα ζυγωτικά γονίδια (maternal-to-zygotic-transition, MZT) τα έμβρυα ενσωματώνουν μετα-μεταγραφικές ρυθμίσεις των μητρικών μεταγράφων με μεταγραφική ενεργοποίηση του ζυγωτικού γονιδιώματος [107]. Στη *Drosophila melanogaster* τα μητρικά μεταγραφα και οι πρωτεΐνες εναποτίθενται στο αυγό κατά τη διάρκεια της ωογένεσης και παρατηρούνται δύο κύματα μεταγράφων ζυγωτικών γονιδίων στα έμβρυα. Το πρώτο μικρό κύμα συμβαίνει μεταξύ της πρώτης και δεύτερης ώρας της ανάπτυξης και το δεύτερο μεγάλο κύμα μεταξύ 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> ώρας από την ανάπτυξη (Εικόνα 1.6) [108]. Το προφίλ έκφρασης τουλάχιστον του ενός τρίτου των ενεργών ζυγωτικών γονιδίων, είναι συζευγμένο με την αποικοδόμηση του αντίστοιχου mRNA της μητέρας [105].

Fruit fly (*D. melanogaster*)



Εικόνα 1.6 - Σχηματική απεικόνιση του φαινομένου της μετάβασης από τα μητρικά στα ζυγωτικά γονίδια (maternal-to-zygotic transition, MZT) στη *Drosophila*. Παρουσιάζονται τα στάδια κλειδιά πάνω από τον αντίστοιχο μιτωτικό κύκλο και ο χρόνος μετά τη γονιμοποίηση. Οι κόκκινες καμπύλες αντιπροσωπεύουν το προφίλ της αποικοδόμησης των αποσταθεροποιημένων μητρικών μεταγράφων. Το γαλάζιο και το σκούρο μπλε δείχνουν, αντίστοιχα, το μικρό και το μεγάλο κύμα ενεργοποίησης των ζυγωτικών γονιδίων [105].

Αν και οι μοριακοί μηχανισμοί στην εμβρυογένεση της *Drosophila* έχουν αποσαφηνιστεί, κάτι τέτοιο δεν ισχύει και για τα υπόλοιπα είδη εντόμων. Στη μελέτη των Gabrielli et al (2010) διερευνήθηκε η γονιδιακή έκφραση επιλεγμένων γονιδίων, σύμφωνα με τη χρονική διαδοχή των σταδίων που είχε ήδη καθοριστεί στη μύγα της Μεσογείου, *C. capitata*, από τους Schetelig et al. (2007). Συγκεκριμένα, ενώ το στάδιο της κυτταροποίησης στη *Drosophila* λαμβάνει χώρα 2 ώρες και 10 λεπτά μετά τη γονιμοποίηση και ολοκληρώνεται στις 2 ώρες και 40 λεπτά, στη *C. capitata* συμβαίνει αργότερα, 9 ώρες μετά την ωοαπόθεση και έχει μεγαλύτερη διάρκεια, αφού ολοκληρώνεται την 12<sup>η</sup> ώρα της εμβρυογένεσης (Εικόνα 1.7) [113]. Τέλος, συνολικά η διάρκεια της εμβρυογένεσης στη *Drosophila* είναι 24 ώρες, ενώ η εκκόλαψη στη *C. capitata* διαρκεί 2 ημέρες. Στο δάκο, το εβρυογενετικό στάδιο διαρκεί περίπου 60 ώρες.



Εικόνα 1.7 - Σχηματική απεικόνιση της γονιδιακής έκφρασης κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης στην *C. capitata* και τη *D. melanogaster*. Παραθέτονται συγκριτικά τα στάδια της εμβρυογένεσης των δύο ειδών (συγκυτιακό βλαστόδερμα με γκρι χρώμα και κυτταροποίηση με μαύρο χρώμα), από την ωοτοκία (0 h) ως την εκκόλαψη (48 ώρες για τη μεσογειακή μύγα, 24 ώρες για τη *Drosophila*). Παρουσιάζονται επίσης η έναρξη της ζυγωτικής έκφρασης σημαντικών γονιδίων του φυλοκαθορισμού και τα δύο κύματα έκφρασης των ζυγωτικών γονιδίων (κόκκινο και μπλε χρώμα) [106].



## 1.6 Το στάδιο της κυτταροποίησης

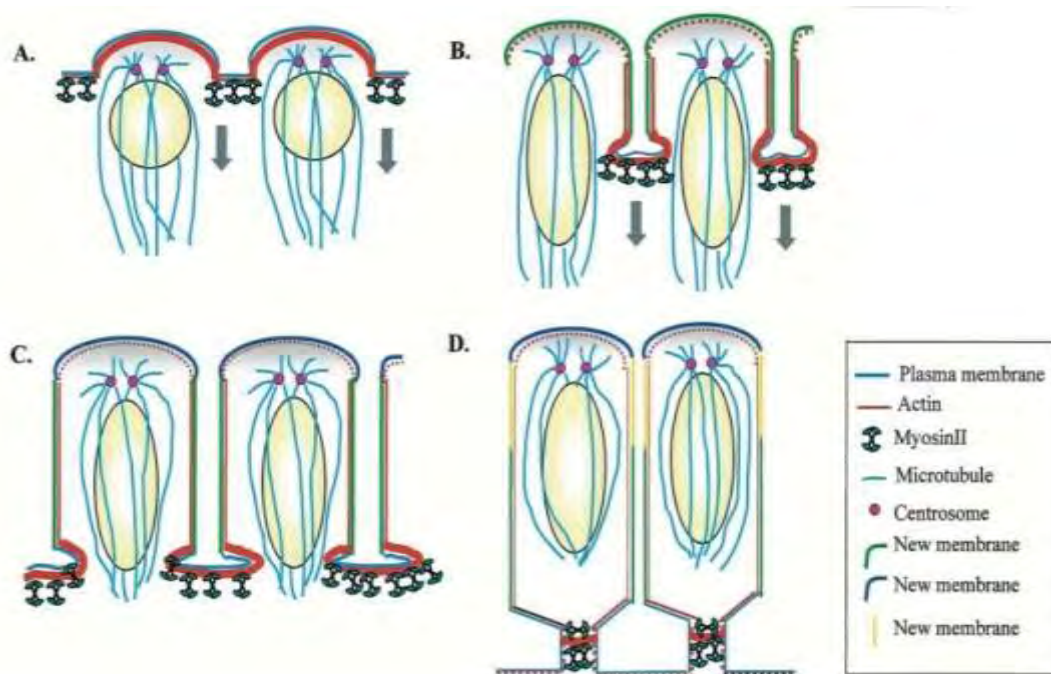
**Σ**ημαντικό σημείο της πρώιμης εμβρυογένεσης είναι η κυτταροποίηση. Η κυτταροποίηση (cellularization) γενικά είναι το γεγονός που οδηγεί στη μετατροπή του συγκυτιακού βλαστοδέρματος σε κυτταρικό βλαστόδερμα, μέσω του σχηματισμού ενός δικτύου αυλακιών που δημιουργεί στο συγκύτιο μια μονοστοιβάδα περίπου 6000 κυττάρων που μοιάζουν με επιθηλιακά.

Αρχικά, οι πρώτες 13 μιτωτικές διαιρέσεις του εμβρύου της *Drosophila* συμβαίνουν συγχρονισμένα στο κυτταρόπλασμα του αυγού χωρίς την ύπαρξη κυτταροκίνησης. Όλοι οι πυρήνες εντοπίζονται στο κέντρο του αυγού και μοιράζονται το κοινό κυτταρόπλασμα. Κατά τον 7-10 μιτωτικό κύκλο μεταναστεύουν προς τον φλοιό σχηματίζοντας το συγκυτιακό βλαστόδερμα και στο κέντρο απομένουν μόνο 26 από τους 128 που καταλήγουν στον εντερικό αυλό. Μετά τις οκτώ πρώτες διαιρέσεις οι πυρήνες που φτάνουν στον οπίσθιο πόλο του εμβρύου θα σχηματίσουν τα πολικά κύτταρα από τα οποία μετέπειτα θα προκύψουν τα γαμετικά κύτταρα [88,89]. Οι υπόλοιποι πυρήνες (σωματικοί) σχηματίζουν μια μονοστοιβάδα στο φλοιό του αυγού και υφίστανται τρεις ακόμα πυρηνικές διαιρέσεις (κύκλοι 11 έως 13) για να σχηματίσουν τελικά ένα φλοιώδες στρώμα περίπου 6000 σωματικών πυρήνων (2 ώρες-2 ώρες και 50 λεπτά μετά τη γονιμοποίηση)[10]. Κάθε πυρήνας περιβάλλεται από τη δική του εξατομικευμένη κυτταροπλασματική περιοχή παρά το γεγονός ότι είναι εντοπισμένος σε ένα συγκύτιο [1]. Αυτή η κυτταροπλασματική περιοχή σχηματίζει ένα κάλυμμα πάνω από τον πυρήνα, το οποίο εμφανίζεται ως μια διόγκωση στην επιφάνεια του εμβρύου [2]. Νωρίς στη μετάφαση, κάθε καλάκι εκτείνεται και χωρίζεται σε δύο θυγατρικά καλύμματα πριν από την πυρηνική διαίρεση [3], ενώ παράλληλα μια εγκόλπωση της μεμβράνης εμφανίζεται γύρω από κάθε διαιρούμενο πυρήνα. Οι εγκολπώσεις αυτές υποχωρούν κατά τη διάρκεια της τελόφασης ενώ παράλληλα τα δύο καλύμματα ενωμένα με τους θυγατρικούς πυρήνες μετασχηματίζονται για να σχηματιστούν τα διαχωριστικά αυλάκια κατά τον 13<sup>ο</sup> μιτωτικό κύκλο. Αυτές οι μεμβρανικές εγκολπώσεις αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως *παροδικά διαχωριστικά αυλάκια* [3].

Η κυτταροποίηση σηματοδοτείται με την αύξηση της επιφάνειας της κυτταρικής μεμβράνης και τον σχηματισμό λαχνών ανάμεσα στους γειτονικούς πυρήνες [3, 4], οι οποίες επιμηκύνονται σχηματίζοντας εξαγωνικές συστοιχίες από διαχωριστικά αυλάκια, τα οποία όμως διαφέρουν από τα παροδικά διαχωριστικά κανάλια που προαναφέρθηκαν [5]. Η όλη διαδικασία της κυτταροποίησης μπορεί να διαχωριστεί σε δύο φάσεις ανάλογα με τον ρυθμό προόδου των διαχωριστικών αυλακιών στο φλοιώδες κυτταρόπλασμα. Έτσι έχουμε την αρχική «αργή φάση» (35 λεπτά) και στη συνέχεια τη «γρήγορη φάση» (20 λεπτά) [10]. Οι διαφορές αυτές στον ρυθμό της κυτταροποίησης πιθανότατα αντικατοπτρίζουν διαφορετικούς μηχανισμούς κατά τον σχηματισμό των αυλακιών όπως η εκτύλιξη της μεμβράνης που είναι συσσωρευμένη στις λάχνες κατά μήκος των πυρήνων [7] ή η πλευρική σύντηξη των νεοσυντιθέμενων μεμβρανών [4].

Αναλυτικότερα, κατά την αργή φάση νημάτια ακτίνης (F-ακτίνη) συσσωρεύονται στο φλοιό και συνδέονται με τις νεοσχηματισμένες λάχνες, οι οποίες θα αποτελέσουν τα αρχικά αυλάκια. Έπειτα, σχηματίζεται μια συσταλή συσκευή ακτίνης-μυοσίνης που εντοπίζεται στο έσω άκρο του αυλακιού επιμηκύνοντάς το με τελικό σκοπό τον σχηματισμό πλασματικής μεμβράνης ανάμεσα σε δύο πυρήνες και το κλείσιμό της στο τέλος της διαδικασίας με την σύντηξη των δύο διαδοχικών νεοσυντιθέμενων ενδομεμβρανών, δημιουργώντας έτσι τις πλευρικές μεμβράνες [6] (Εικόνα 1.8 A), ώστε να ξεχωρίσει ο πυρήνας αυτός από τους γειτονικούς του και να προκύψει ένα μεμονωμένο κύτταρο. Αυτό γίνεται με τον σχηματισμό του καναλιού του αυλακιού και την πρόοδό του ως στη βάση του πυρήνα, με διαχωρισμό των εναποτιθέμενων μεμβρανών [4] (Εικόνα 1.8 B και C). Το κανάλι αυτό είναι η δομή που ξεχωρίζει τα διαχωριστικά κανάλια της κυτταροποίησης από τα παροδικά διαχωριστικά κανάλια των σταδίων μεσόφασης των μιτωτικών κύκλων 11-13 [5]. Προς το τέλος της κυτταροποίησης, τα κανάλια μειώνονται σε διάμετρο, σχηματίζοντας μία δομή όμοια με δαχτυλίδι ή συσταλό δακτύλιο, που περιβάλλει το κανάλι του αυλακιού και τελικά οι συσταλτές

συσκευές ακτίνης-μυοσίνης που συγκροτούν το δαχτυλίδι θα αποκοπούν από το νεοσυσταθέν κύτταρο (Εικόνα 1.8 D). Η κορυφαία επιφάνεια γίνεται επίπεδη κατά την έναρξη της ταχείας φάσης, όταν η συσσωρευμένη στις λάχνες πλασματική μεμβράνη προχωρά στο εσωτερικό, στο διαχωριστικό κανάλι. Η αλλαγή αυτή της κορυφαίας επιφάνειας δίνει το μισό περίπου απόθεμα σε πλασματική μεμβράνη για το κλείσιμο των νέων σωματικών κυττάρων [4].



Εικόνα 1.8 - Συντονισμός των μικροσωλινίσκων, των νηματιών ακτίνης και της μυοσίνης κατά την κυτταροποίηση (cellularization) του συγκυτιακού βλαστοδέρματος. Α) Φάση 1- σχηματισμός αυλακιών που συνδέονται με συσταλτές συσκευές ακτίνης-μυοσίνης. Νημάτια ακτίνης εντοπίζονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ακριβώς κάτω από τη πλασματική μεμβράνη (παχιά κόκκινη γραμμή), απ' ότι στα αυλακώδη κανάλια (λεπτές κόκκινες γραμμές). Από το ζεύγος των κεντροσωματίων που υπάρχουν κορυφαία του πυρήνα, προκύπτουν μικροσωλινίσκοι σχηματίζοντας ένα ανεστραμμένο καλάθι. Β) Στη φάση 2 η συγκέντρωση της αυξίνης αυξάνεται στα κανάλια. Η παλιά μεμβράνη παραμένει στα αυλάκια (γαλάζιο) ενώ η νέα εισάγεται από το κορυφαίο άκρο (πράσινο). Γ) η συσταλτή συσκευή ακτίνης-μυοσίνης φτάνει στο άκρο της βάσης του πυρήνα. Δ) Νέες μεμβράνες εισάγονται πλευρικά (κίτρινες γραμμές) και η διάμετρος της συσταλτής συσκευής ακτίνης-μυοσίνης μειώνεται και τελικά αποκόβεται ώστε να σχηματιστούν τα κύτταρα του βλαστοδέρματος [6].

## 1.7 Ο ρόλος του γονιδίου *serendipity-alpha* (*sry-a*)

Το γονίδιο *sry-a* της *Drosophila* εντοπίζεται στο τρίτο χρωμόσωμα<sup>2</sup> και μεταγράφεται κατά τον σχηματισμό του συγκυτιακού βλαστοδέρματος (κατά τον 11<sup>ο</sup> μιτωτικό κύκλο). Υπάρχει σε μικρές ποσότητες κατά στον 12<sup>ο</sup> και 13<sup>ο</sup> κύκλο, ενώ στη μέγιστη συγκέντρωσή του βρίσκεται κατά την κυτταροποίηση και χάνεται μέχρι την έναρξη της γαστριδίωσης [10], δηλαδή εκφράζεται για μία μόνο ώρα κατά τη διάρκεια της ζωής της μύγας, χωρίς να απαιτείται η παρουσία του καθ' όλη τη διάρκεια της κυτταροκίνησης [5].

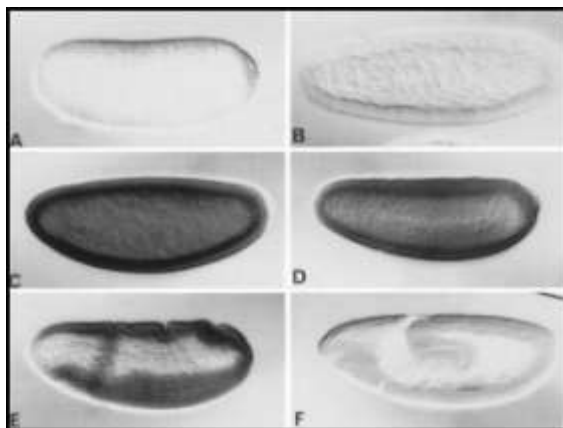
Με τη χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων συγκεκριμένα για την πρωτεΐνη του *sry-a* σε έμβρυα 2-4 ωρών, βρέθηκε πως το προϊόν του γονιδίου είναι μια πρωτεΐνη 58-kD, η οποία βρίσκεται τόσο στα κυτταροπλασματικά όσο και στο πρωτογενές εκχύλισμα της μεμβράνης της μεμβράνης [10]. Πιο συγκεκριμένα, ο εντοπισμός της πρωτεΐνης του

<sup>2</sup> [www.flybase.org/reports/FBgn0003510](http://www.flybase.org/reports/FBgn0003510)



*sry-a* συνδέεται με την μεμβράνη στο φλοιό, τις λάχνες και κατά μήκος του αυλακιού όσο προχωρά η κυτταροποίηση, διαμορφώνοντας πρότυπα συσσώρευσης παρόμοια με αυτά των νηματίων ακτίνης. Τέλος, εντοπίζεται σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις στο κυτταρόπλασμα όσο φτάνουμε στο τέλος της κυτταροποίησης και κάτω από τη βάση των νεοσχηματισμένων κυττάρων πριν εκλείψει κατά την γαστριδίωση (Εικόνα 1.9).

Απουσία του *sry-a* παρατηρούνται ελαττώματα στην κυτταροποίηση. Πιο συγκεκριμένα, τα δεδομένα του χώρο-χρονικού και υποκυτταρικού εντοπισμού του γονιδίου δείχνουν πως το *sry-a* είναι υπεύθυνο για τον εντοπισμό νηματίων ακτίνης ακριβώς πριν και κατά την διάρκεια των σχηματισμών των εγκολλώσεων της πλασματικής μεμβράνης<sup>3</sup> [10], λειτουργία που το καθιστά απαραίτητο για τη κυτταροποίηση [3].



**Εικόνα 1.9 – Πρότυπα έκφρασης του γονιδίου *sry-a* στη *D. melanogaster* σε ολόκληρα έμβρυα αγρίου τύπου, σε διαφορετικά στάδια της εμβρυογένεσης. Α) Σχηματισμός πολικών κυττάρων. Β) Συγκυτιακό βλαστοδερμα. Γ) Κυτταρικό βλαστοδερμα. Δ) Πρώιμη γαστριδίωση. Ε) Γαστριδίωση. F) Εκτεταμένη βλαστική ζώνη [10]**

Επιπλέον, έχει βρεθεί πως σε στείρα μεταλλαγμένα θηλυκά έντομα, η ανάπτυξη του εμβρύου σταματά στη φάση της κυτταροποίησης [13,14,15], γεγονός που υποδηλώνει πως τα προϊόντα των γονιδίων που θα πρέπει να είναι διαθέσιμα για να γίνει η κυτταροποίηση βρίσκονται στο αυγό κατά την ωογένεση. Δηλαδή, πρωτεΐνες όπως η μυσίνη, η ακτίνη, η τουμπουλίνη και η σπεκτρίνη βρίσκονται ήδη στο αυγό πριν την γονιμοποίηση [1,9,16] και χαρακτηρίζονται ως μητρικής προέλευσης γονίδια. Ωστόσο, και το ζυγωτό συμβάλει στη διαδικασία με τουλάχιστον οκτώ γονιδιακούς τόπους [7,2], ένας εκ των οποίων είναι και ο γονιδιακός τόπος του *serendipity-a* [6, 10, 20].

Αν και το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου *sry-a* σχετίζεται με τη μεμβράνη, καθώς εντοπίζεται σε ακραία τμήματα αλλά και εγκολλώσεις αυτής (apical and furrow membranes) πιθανότατα δεν αποτελεί παρεμβαλλόμενη στη μεμβράνη πρωτεΐνη (integral membrane protein). Το παραπάνω προκύπτει λόγω του ότι έχει ανιχνευθεί ανοσοχημικά στο κυτταρόπλασμα εμβρυικών κρουτομών, ενώ έχει επίσης εντοπιστεί κατά το διαχωρισμό φάσεων με επεξεργασία με Triton τόσο στο πρωτογενές εκχύλισμα της μεμβράνης όσο και στα κυτταροπλασματικά κλάσματα [19]. Επίσης δεν διαθέτει διαμεμβρανικές δομικές περιοχές (domains), ούτε σηματοδοτικές αλληλουχίες στην αλληλουχία της πρωτεΐνης του [18].

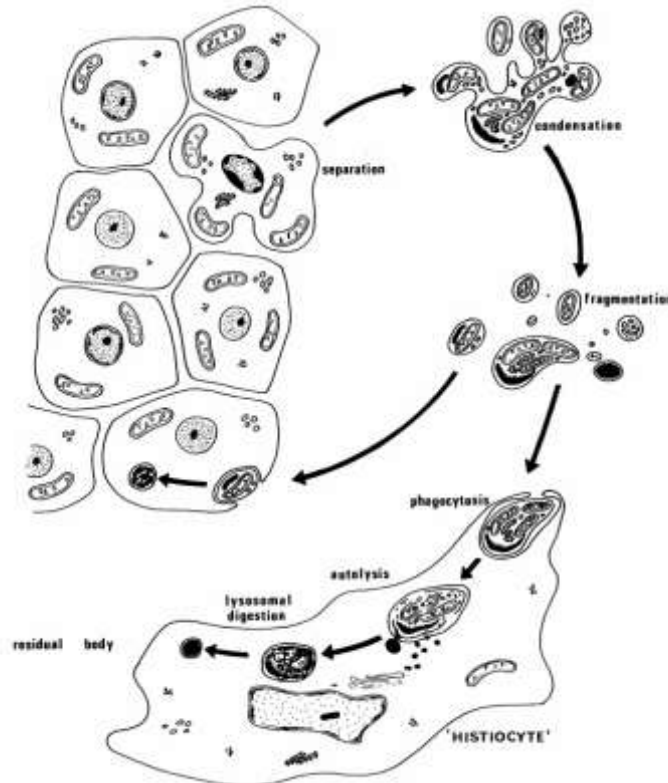
Μελέτες έχουν δείξει πως η πρωτεΐνη του γονιδίου *sry-a* απαιτείται για την αρχική αναδιοργάνωση των κορυφαίων μικρονηματίων ακτίνης σε εξαγωνικές συστοιχίες, καθώς και για τη σταθεροποίησή τους κατά μήκος του καναλιού κατά την διάρκεια της εγκόλλωσης της μεμβράνης [6]. Έτσι μια απλή υπόθεση ήταν πως πιθανότατα η πρωτεΐνη συνδέεται στην ακτίνη (F-actin binding protein). Παρόλα αυτά η πρωτεΐνη του *sry-a* δεν συγκαταλέγεται μεταξύ των 40 πρωτεϊνών που βρέθηκαν πως προσδένονται στην ακτίνη και έχουν καθοριστεί με χρωματογραφία από τους Millerl et al. το 1989 [17], ενώ επιπρόσθετα στερείται υποθετικών μοτίβων πρόσδεσης στην ακτίνη. Έτσι ο ακριβής ρόλος του γονιδίου παραμένει ανεξακρίβωτος.

<sup>3</sup> [www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR008837](http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR008837)

## 1.8 Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος

Όταν τα κύτταρα πάφουν να είναι απαραίτητα ή η παρουσία τους κριθεί ανεπιθύμητη από τον οργανισμό, τότε εξαλείφονται με στοχευμένο τρόπο μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται **προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος** ή απόπτωση. Με αυτόν τον τρόπο ελέγχεται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, έτσι ώστε ένα κύτταρο να διαιρείται μόνο όταν είναι αναγκαίο για την αύξηση του οργανισμού ή για την αναπλήρωση κάποιας απώλειάς του. Η κυτταρική σηματοδότηση της απόπτωσης συντελείται από ένα μεγάλο φάσμα ενδογενών ή εξωγενών ερεθισμάτων συμπεριλαμβανομένων διαφόρων αναπτυξιακών σημάτων και του περιβαλλοντικού και ενδοκυτταρικού στρες. Τα σήματα αυτά δρουν είτε σε αναπτυσσόμενους ή σε ενήλικους ιστούς. Σε όλες τις περιπτώσεις, το κύτταρο θα πεθάνει γρήγορα και χωρίς να διαταράσσει το γειτονικό του περιβάλλον με μια διαδικασία που συνοδεύεται από χαρακτηριστικές αλλαγές στη μορφολογία του [28,21].

Αρχικά το κύτταρο συρρικνώνεται, αποδιατάσσεται το DNA του, διασπάται ο πυρήνας και σχηματίζονται αποπτωτικά κυστίδια. Παράλληλα, η κυτταρική μεμβράνη σχηματίζει ειδικές προεξοχές (blebbing) που αναγνωρίζονται άμεσα από γειτονικά φαγοκύτταρα, τα οποία θα αφομοιώσουν τα αποπτωτικά κυστίδια που έχουν σχηματιστεί και θα τα αποικοδομήσουν [21,22,28] (Εικόνα 1.10).



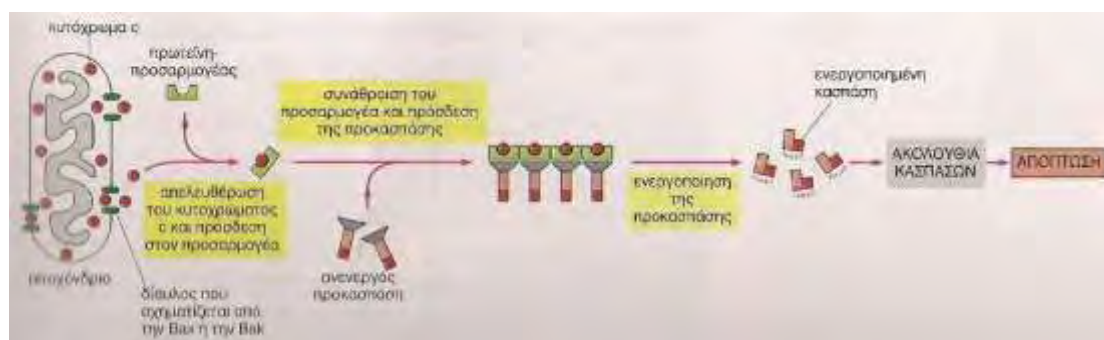
Εικόνα 1.10 - Σχηματική απεικόνιση της πορείας της απόπτωσης. Ο αρχικός αποχωρισμός του κυττάρου που πρόκειται να πεθάνει από τα υγιή γειτονικά κύτταρα, η συμπύκνωση, ο κατακερματισμός, η φαγοκυττάρωση και η αποικοδόμηση από τα λυσοσώματα των γειτονικών φαγοκυττάρων[28].

Στο σημείο αυτό αξίζει να τονιστεί πως δεν θα πρέπει να συγχέεται η έννοια της απόπτωσης με την έννοια της νέκρωσης. Η τελευταία αποτελεί απόρροια οξείας βλάβης του κυττάρου που προκαλεί διόγκωσή του, κατακερματισμό και διασπορά του περιεχομένου του στα γειτονικά κύτταρα προκαλώντας έτσι φλεγμονώδη απάντηση. Σε

αντίθεση, κατά την απόπτωση αποφεύγεται η διαρροή των συστατικών του κυττάρου αποτρέποντας έτσι τις καταστροφικές συνέπειες της νέκρωσης.

Η κύρια κατηγορία ενζύμων που εμπλέκεται στη διαδικασία της απόπτωσης ονομάζονται κασπάσες [29]. Οι κασπάσες αποτελούν μια οικογένεια πρωτεασών, δηλαδή ενζύμων που έχουν την ικανότητα να διασπούν άλλες πρωτεΐνες. Οι κασπάσες συναντώνται σε δύο μορφές, τις προκασπάσες, που είναι τα ανενεργά πρόδρομα μόρια των ενζύμων αυτών και τις κασπάσες, που αποτελούν τις ενεργοποιημένες τους μορφές. Ο μηχανισμός επαγωγής της απόπτωσης ξεκινά μετά την ενεργοποίηση των προκασπασών με πρωτεόλυση μέσω διαφόρων σημάτων που δέχεται το κύτταρο. Οι ενεργοποιημένες κασπάσες θα διασπασουν και άλλα μέλη της ίδιας οικογένειας ενεργοποιώντας τα. Όλα αυτά τα ενεργοποιημένα πλέον ένζυμα είναι σε θέση να διασπασουν πρωτεΐνες βασικής σημασίας για το κύτταρο, οδηγώντας το σε έναν ήσυχο και γρήγορο θάνατο. Τελικά, ο μηχανισμός της απόπτωσης, αφού ενεργοποιηθεί έχει χαρακτήρα καταστροφικό, αυτοενισχυόμενο και μη αντιστρεπτό για το κύτταρο [22].

Η ρύθμιση του προγράμματος θανάτου των κυττάρων είναι τόσο ενδοκυττάρια, όσο και εξωκυττάρια. Το μιτοχόνδριο στα θηλαστικά αποτελεί το υποκυτταρικό οργανίδιο, όπου γίνεται προσπάθεια αναστολής ή ενεργοποίησης της απόπτωσης. Οι κύριες πρωτεΐνες της ενδοκυττάριας ρύθμισης της απόπτωσης ανήκουν στην οικογένεια της πρωτεΐνης Bcl-2 και προάγουν (Bak και Bax) ή αναστέλλουν (Bcl-2) την ενεργοποίηση των προκασπασών, μέσω της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια (Εικόνα 1.11). Σε αντίθεση με τα θηλαστικά, στην οικογένεια Drosophilidae των εντόμων τόσο το μιτοχόνδριο, όσο και το κυτόχρωμα c δεν παίζουν αναγκαστικά ρόλο στη διαδικασία ενεργοποίησης των κασπασών, καθώς το μονοπάτι της απόπτωσης ενεργοποιείται τις περισσότερες φορές απουσία του κυτοχρώματος c [90-93]. Ωστόσο, το κυτόχρωμα c απαιτείται για την απόπτωση στον αμφιβληστροειδή της μύγας [94] και για την ενεργοποίηση της κασπάσης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του σπέρματος [95].



**Εικόνα 1.11 - Ρύθμιση της απόπτωσης από ενδοκυττάριας πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2. Οι προαποπτωτικές πρωτεΐνες της Bcl-2 Bak και Bax θεωρείται ότι συμβάλουν στο σχηματισμό διαύλων στο μιτοχόνδριο, μέσω των οποίων απελευθερώνεται το κυτόχρωμα c στο κυτταρόπλασμα. Εκεί προσδένεται με μια πρωτεΐνη προσαρμογέα που προάγει τη συνάθροιση και την ενεργοποίηση μιας συγκεκριμένης προκασπάσης. Μόλις ενεργοποιηθεί, η προκασπάση πυροδοτεί μια ακολουθία κασπασών που οδηγούν το κύτταρο σε απόπτωση [22].**

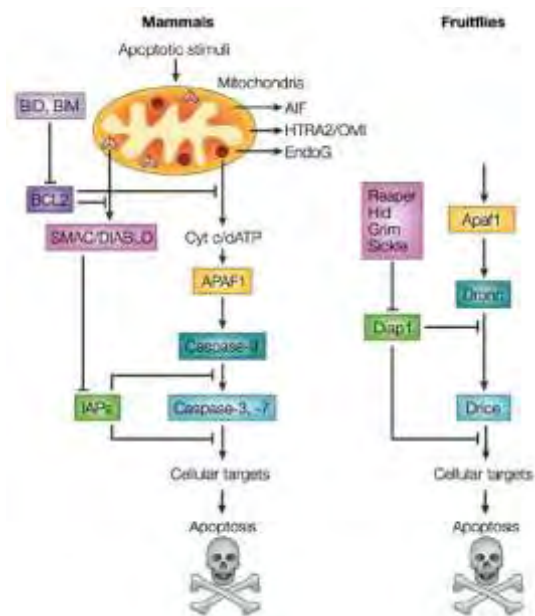
Στους εξωκυττάριους μηχανισμούς ρύθμισης της απόπτωσης συγκαταλέγονται σηματοδοτικές πρωτεΐνες που αναστέλλουν ή προάγουν την αύξηση, τη διαίρεση και την επιβίωση των κυττάρων, όπως για παράδειγμα η μυοστατίνη και οι αυξητικοί παράγοντες αντίστοιχα. Μέσω της εξωκυττάριας ρύθμισης επηρεάζεται το μέγεθος των κυττάρων, των ιστών, των οργάνων και τελικά του οργανισμού.

## 1.9 Ο ρόλος του γονιδίου head involution defective (hid)

Η απόπτωση στη *Drosophila melanogaster* προκαλείται από τρεις προαποπτωτικές πρωτεΐνες, οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια της οικογένειας RHG (*reaper*, *hid*, *grim* family) [24]. Το *head involution defective (hid)*, ή αλλιώς *Wrinkled*, αποτελεί προαποπτωτικό γονίδιο. Το *hid* βρίσκεται στο τρίτο χρωμόσωμα και η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί αποτελεί έναν από τους πρωταρχικούς ρυθμιστές της απόπτωσης στα έντομα [23]. Πιο αναλυτικά, ανταγωνίζεται τους αναστολείς των αποπτωτικών πρωτεϊνών IAP (inhibitor of apoptotic proteins) εμποδίζοντάς τους να αναστείλουν την κασπάση Dronc. Η ενεργοποιημένη Dronc, που απαιτεί την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης προσαρμογέα Ark, διασπά και ενεργοποιεί την κασπάση DrICE, η οποία αποτελεί τον κύριο τελεστή της απόπτωσης στις μύγες (Εικόνα 1.12) [24].

Το *hid* δρώντας σε συνέργεια με το *rpr*, ρυθμίζει αρνητικά τον αναστολέα της απόπτωσης της *Drosophila*, DIAP (drosophila inhibitor of apoptosis), ενισχύοντας αποτελεσματικά την απόπτωση. Το DIAP είναι ένας ουσιώδης αναστολέας της απόπτωσης ο οποίος δεσμεύεται στη δομική περιοχή BIR της κασπάσης Dronc [30,31] και εμποδίζει τη δράση της, αναστέλλοντας έτσι την απόπτωση [26]. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού προϊόντος του *DIAP*, αυξάνονται και τα ποσοστά επιβίωσης με τρόπο δοσο-εξαρτώμενο [23]. Το *hid* προσδένεται άμεσα σε μια κεντρική ελικοειδή περιοχή του *rpr*, ώστε το σύμπλοκο να μπορέσει να στοχεύσει το μιτοχόνδριο όπου και θα σταθεροποιηθεί [25]. Το γονίδιο *hid* ρυθμίζει αρνητικά το DIAP με ουβικουιτινίωση διασφαλίζοντας την απόπτωση του κυττάρου μόλις το μονοπάτι ενεργοποιηθεί (μη αντιστρεπτός χαρακτήρας απόπτωσης). Άρα, ο μηχανισμός δράσης του *hid* με στόχο το *DIAP* είναι μετα-μεταφραστικός. Το *Rpr* με τη σειρά του, προκαλεί μια γενική αναστολή της μετάφρασης του mRNA του *DIAP*. Τα δύο αυτά μονοπάτια που στοχεύουν στο DIAP έχει δείχθει πως δρουν καλύτερα μαζί παρά το καθένα ξεχωριστά [23].

Το γονίδιο *hid* διαθέτει δύο καλά διατηρημένα μοτίβα. Το IBM (*IAP* binding motif) μοτίβο, που βρίσκεται στην αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται [32] και προσδένεται στην περιοχή BIR των IAP και το GH3 (*Grim* helix 3) μοτίβο στη καρβοξυτελική περιοχή που σχετίζεται με το μιτοχονδριακό εντοπισμό της πρωτεΐνης [33]. Τα δύο αυτά μοτίβα έχει αποδειχθεί πως αποτελούν τα κλειδιά για την αναστολή των IAP πρωτεϊνών καθώς και για τον μιτοχονδριακό εντοπισμό του γονιδίου. Συγκεκριμένα, οι Schetelig et.al. (2011) έδειξαν πως η διαγραφή του μοτίβου IBM έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της επιβίωσης των κυττάρων σε ποσοστό 99%, γεγονός που δηλώνει την αναγκαιότητα της ύπαρξης του μοτίβου για τη δράση του *hid*. Επιπλέον, η απαλοιφή του μοτίβου GH3 μείωσε μεν τα επίπεδα της απόπτωσης, αλλά δεν προκάλεσε πλήρη αναστολή του φαινομένου (80% επιβίωση). Οδηγήθηκαν λοιπόν στο συμπέρασμα πως το GH3 μοτίβο δρα βοηθητικά στην απόπτωση που προκαλείται από το *hid*, αλλά παίζει μεγαλύτερο ρόλο για τη δράση του γονιδίου *reaper (rpr)*. Τα δύο μοτίβα λοιπόν, μπορεί να δρουν ανεξάρτητα αλλά έχουν ίσους ρόλους για τη δράση των



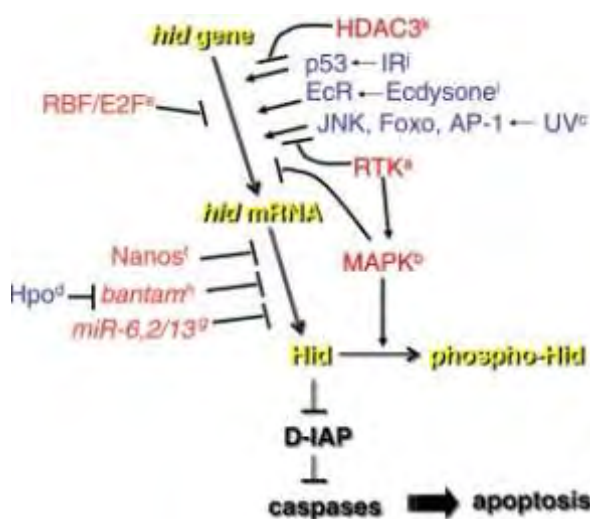
Εικόνα 1.12 - Σχηματική απεικόνιση των μονοπατιών που οδηγούν τα κύτταρα των θηλαστικών και των μυγών των φρούτων σε απόπτωση. Οι ομόλογες πρωτεΐνες παρουσιάζονται με το ίδιο χρώμα.

προαποπτωτικών γονιδίων και είναι και τα δύο εξίσου αναγκαία για τη ρύθμιση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.

Τα μεταγγραφα του *hid* εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα και με ποικίλα πρότυπα κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Το γονίδιο αρχίζει να εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα από το στάδιο του συγκυτιακού βλαστοδέρματος [110] και αυξάνει στο στάδιο 11 της εμβρυογένεσης (γαστριδίωση)<sup>4</sup>, όπου παρατηρείται έκφραση του γονιδίου στο κεφάλι, σε γναθικά τμήματα αλλά και στην περιοχή των γαμετικών κυττάρων. Επιπλέον, σε έμβρυα που υποβάλλονται σε υποστροφή κεφαλής, παρατηρείται μια αντιστοιχία μεταξύ των προτύπων του κυτταρικού θανάτου και της έκφρασης του γονιδίου *hid*. Ωστόσο, όπου υπάρχει έκφραση του *hid*, δεν σημειώνεται αναγκαστικά και απόπτωση. Για παράδειγμα σε όλο τον αρχέγονο οπτικό λοβό παρατηρείται έκφραση του γονιδίου αλλά μόνο μερικά κύτταρα υφίστανται απόπτωση. Αντίθετα στη κοιλιακή νευρική χορδή (ventral nerve cord) δεν υπάρχει σχεδόν καθόλου έκφραση του *hid* παρά την ύπαρξη εκτεταμένου κυτταρικού θανάτου στη περιοχή [34]. Τέλος, η έκφραση του γονιδίου *hid* είναι υψηλή κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης της προνύμφης (larva) σε νύμφη (pupa) [23].

Το γονίδιο *hid* ρυθμίζεται τόσο σε μεταγραφικό επίπεδο, όσο και σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο, γεγονός που μπορεί να ερμηνεύσει την επιβίωση του κυττάρου παρά την έκφραση του *hid*.

Η έκφραση του *hid*, ο υποκυτταρικός εντοπισμός του και η δράση του ρυθμίζονται κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, κατά την ανάπτυξη της προνύμφης και κατά τη μεταμόρφωση. Στα πλαίσια αυτά το *hid* ρυθμίζεται από το μονοπάτι σηματοδότησης EGFR/Ras, το μονοπάτι του καταστολέα όγκων Hippo, τον παράγοντα E2F, microRNAs, την ορμόνη εκδυσόνη [35] και με άλλους διάφορους τρόπους (Εικόνα 1.13).



Εικόνα 1.13 - Συνοπτική παρουσίαση των μηχανισμών που ρυθμίζουν το *hid*. Με μπλε χρώμα σημειώνονται οι ενεργοποιητές και με κόκκινο οι αναστολείς [35].

πρόσφατη μελέτη έχει διαπιστωθεί η συμμετοχή του μονοπατιού του καταστολέα όγκων Hippo στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο κατά την ανάπτυξη του ματιού [42]. Πιο συγκεκριμένα, ο Hippo προάγει την έκφραση του *hid* στα κύτταρα που πρόκειται να θανατωθούν, ενώ για τα υπόλοιπα δρα και πάλι το μονοπάτι του EGFR.

Γενετικές αναλύσεις έχουν δείξει πως ο παράγοντας E2F προσδένεται στη 5' περιοχή του ενισχυτή του γονιδίου, καταστέλλοντας τη μεταγραφή του γονιδίου *hid* [44]. Επιπρόσθετα, η ρύθμιση του γονιδίου επιτυγχάνεται και με την πρόσδεση

Στην περίπτωση αλληλεπίδρασης γειτονικών κυττάρων κατά την εμβρυογένεση, ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας EGFR ενεργοποιεί τον αντίστοιχο υποδοχέα κινάσης τυροσίνης (RTK) και καταστέλλεται το *hid* ώστε να επιτραπεί η επιβίωση της εμβρυϊκής μεσαίας νευρογλοίας (embryonic midline glia), των κυττάρων του εικονικού δίσκου του ματιού στην προνύμφη και των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς στη νύμφη [37-40]. Η σηματοδότηση μέσω EGFR ενεργοποιεί τελικά τη Ras μέσω του MAPK μονοπατιού αναστέλλοντας με φωσφορυλίωση την πρωτεΐνη του γονιδίου *hid* [41].

Κατά τη δημιουργία του ματιού στη *Drosophila*, κύτταρα του δίσκου του ματιού που αρχικά παράγονται σε περίσσεια θα χρειαστεί κατά το στάδιο της νύμφης να θανατωθούν. Σε

<sup>4</sup> <http://insitu.fruitfly.org/cgi-bin/ex/report.pl?ftype=1&ftext=CG5123>

microRNAs στην 3' αμετάφραστη περιοχή του *hid*, ελαχιστοποιώντας την έκφρασή του [45].

Κατά το στάδιο της μεταμόρφωσης πολλά πολυπλοειδή προνυμφικά κύτταρα πρέπει να θανατωθούν, όπως για παράδειγμα αυτά των σιελογόνων αδένων. Ως απάντηση στην έκκριση της στεροειδούς ορμόνης εκδυσόνης που συμβαίνει κατά τη μεταμόρφωση, τα μεταγγραφα του *hid* αυξάνονται. Ωστόσο η ρύθμιση του γονιδίου από την εκδυσόνη είναι έμμεση, διότι απαιτείται σύνθεση νέων πρωτεϊνών και η μεταγραφή του καταστέλλεται παρουσία του αναστολέα κυκλοεξαμίδη [43].

## 1.10 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μοριακή ανάλυση γονιδίων, καίριας σημασίας κατά την πρόωμη ανάπτυξη του δάκου της ελιάς, *Bactrocera oleae*. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν το αποπτωτικό γονίδιο *head involution defective (hid)* και το εμβρυικό γονίδιο *serendipity-alpha (sry-a)*. Η μελέτη των γονιδίων αυτών θα μπορούσε να συνεισφέρει σημαντικά στην ανάπτυξη κατάλληλων εργαλείων για τη γενετική διαχείριση του εντόμου.

Προς την κατεύθυνση αυτή, στόχος ήταν η ταυτοποίηση των γονιδίων μέσω ενίσχυσης, κλωνοποίησης και αλληλούχησης των κλωνοποιημένων τμημάτων ώστε να καθοριστεί η δομή και η αλληλουχία τους. Επιπρόσθετα, η προσέγγιση αυτή σε συνδυασμό με διαλογή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του εντόμου θα οδηγούσε στην απομόνωση της πλήρους αλληλουχίας των γονιδίων και δυνητικά στην εύρεση των γειτονικών αλληλουχιών τους που μπορεί να αποκαλύψουν τις περιοχές του υποκινητή τους. Παράλληλα, θεωρήθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί μέσω λειτουργικής ανάλυσης η έκφραση των δύο αυτών γονιδίων σε διαφορετικά στάδια της εμβρυογένεσης, προσδιορίζοντας με ποσοτική Real-time PCR τα επίπεδα έκφρασης του mRNA τους.





*Υλικά και μέθοδοι*





## 2.1 Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων

### 2.1.1 Απομόνωση RNA (RNA extraction)

**Η** διαδικασία απομόνωσης του ολικού RNA, στοχεύει στην απομόνωση του mRNA, tRNA, rRNA, και snRNA από τα αυγά του δάκου με παράλληλη απενεργοποίηση των ριβονουκλεασών, ώστε να εξασφαλιστεί η ακεραιότητά τους από την αποικοδομητική δράση των ενδογενών αυτών ενζύμων. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με χρήση του αντιδραστηρίου TRIsure (Bioline) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που προτείνεται στο εγχειρίδιο του κατασκευαστή. Η μέθοδος περιλαμβάνει τα εξής βήματα: I) Ομογενοποίηση αυγού, II) Λύση των κυττάρων, III) Διαχωρισμός RNA –πρωτεϊνών, IV) Ανάκτηση RNA.

Υλικά που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία είναι:

- Αυγά δάκου
- TRIsure
- BCP
- Ισοπροπανόλη
- Αιθανόλη 75%
- Καθαρό νερό

#### Μεθοδολογία

Τα δείγματα των αυγών που διατηρήθηκαν σε 50μl Trisure στους -80°C, τοποθετούνται στον πάγο για να ξεπαγώσουν. Στη συνέχεια γίνεται μια σύντομη φυγοκέντρηση (spin down) και ακολουθούν τα εξής βήματα:

- 1) Ομογενοποίηση με έμβολα (pestils) χωρίς RNAase μέχρι το αυγό να διαλυθεί πλήρως σε στείρες συνθήκες
- 2) Μετά την ομογενοποίηση, προσθήκη 50μl Trisure ώστε ο τελικός όγκος να γίνει 100μl
- 3) Επώαση σε συνθήκες δωματίου για 5 λεπτά
- 4) Σύντομο vortex και ξανά επώαση για 5 λεπτά σε συνθήκες δωματίου
- 5) Φυγοκέντρηση στους 4°C, στα 12.000 rpm για 10 λεπτά
- 6) Απομόνωση υπερκείμενου και εισαγωγή του σε νέο αποστειρωμένο σωληνάκι eppendorf
- 7) Προσθήκη 10 μl BCP και έντονη ανάδευση (όχι vortex) για 15 δευτερόλεπτα
- 8) Ακολουθεί επώαση σε συνθήκες δωματίου για 2-3 λεπτά
- 9) Φυγοκέντρηση στους 4°C, στα 12.000g για 18 λεπτά
- 10) Ιδιαίτερα προσεκτική μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο αποστειρωμένο eppendorf και τοποθέτηση στον πάγο
- 11) Προσθήκη ισοπροπανόλης ίσου όγκου με το υγρό που μεταφέρθηκε (περίπου 45 μl) και 0,5 μl γλυκογόνου
- 12) Ανάδευση στο vortex και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα
- 13) Φυγοκέντρηση στους 4°C, στα 12.000 g για 30 λεπτά
- 14) Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθενται 64 μl αιθανόλης 75%
- 15) Φυγοκέντρηση στους 4°C, στα 7.500 g για 5 λεπτά
- 16) Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθενται 64 μl αιθανόλης 75%
- 17) Φυγοκέντρηση στους 4°C, στα 12.000 g για 5 λεπτά τρεις φορές
- 18) Η αιθανόλη απομακρύνεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε στείρες συνθήκες
- 19) Αναδιάλυση του ιζήματος με 8 μl καθαρό νερό

### 2.1.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (mini preps)

**Η** διαδικασία αυτή έχει ως στόχο την απομόνωση αποκλειστικά του πλασμιδιακού DNA από διάλυμα υγρής βακτηριακής καλλιέργειας κυττάρων DH5a. Περιλαμβάνει τη λύση των βακτηριακών κυττάρων, την καταστροφή διαφόρων αποικοδομητικών ενζύμων και το διαχωρισμό του πλασμιδιακού DNA από το χρωμοσωμικό DNA και τις πρωτεΐνες.

Υλικά που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία είναι:

- Διάλυμα GET: 50mM glucose, 25mM Tris-HCL PH 8, 10mM EDTA PH 8
- Διάλυμα Alkali: 0,2N NaOH, 1% sDs
- Διάλυμα οξικού καλίου (CH<sub>3</sub>COOK) PH 4,8
- Ισοπροπανόλη
- Αιθανόλη 70%
- Ρυθμιστικό διάλυμα TE RNAase: RNAase A 20μg/ml

#### Μεθοδολογία

- 1) Ενοφθαλμισμός μεμονωμένων μετασχηματισμένων βακτηριακών κλώνων σε υγρές καλλιέργειες LB Broth με αμπικιλίνη και επώαση overnight στους 37 °C υπό ανάδευση (210 στροφές)
- 2) Μεταφορά σε αποστειρωμένο eppendorf (1,5ml) των αποικιών από την κορεσμένη καλλιέργεια
- 3) Φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στα 3.000 rpm, αφαίρεση του υπερκείμενου και διατήρηση του ιζήματος που περιέχει τα βακτήρια στον πάγο
- 4) Προσθήκη 100μl παγωμένου διαλύματος GET και ανάδευση στο vortex για περίπου 1 λεπτό
- 5) Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
- 6) Προσθήκη 200μl διαλύματος Alkali και στη συνέχεια ανάδευση, αναποδογυρίζοντας ήπια το eppendorf πέντε φορές
- 7) Επώαση στον πάγο για 3-5 λεπτά
- 8) Προσθήκη 150μl παγωμένου διαλύματος CH<sub>3</sub>COOK PH 4,8, ανάδευση στο vortex με το eppendorf γυρισμένο ανάποδα
- 9) Επώαση στον πάγο για 8-10 λεπτά με ανάδευση ανά διαστήματα, ώστε να εξουδετερωθούν οι αλκαλικές συνθήκες
- 10) Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε maximum rpm και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο eppendorf
- 11) Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης (500 μl), vortex για λίγα δευτερόλεπτα και επώαση στον πάγο για 20-30 λεπτά
- 12) Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε maximum rpm και απομάκρυνση του υπερκείμενου
- 13) Προσθήκη μισού όγκου αιθανόλης 70% (250 μl) για την απομάκρυνση των εναπομείναντων αλάτων και ανάδευση αναποδογυρίζοντας το eppendorf
- 14) Φυγοκέντρηση 10λεπτά σε maximum rpm και απομάκρυνση του υπερκείμενου
- 15) Το eppendorf αφήνεται να στεγνώσει έως ότου εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη.
- 16) Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 50μl ρυθμιστικού διαλύματος TE-RNAase, για την αποικοδόμηση τυχόν RNA και διατήρηση στους 4°C

## 2.2 Χειρισμός νουκλεϊκών οξέων

### 2.2.1 Κατακρήμιση DNA

**Η** μέθοδος της κατακρήμισης του DNA δίνει τη δυνατότητα συμπύκνωσης και καθαρισμού των νουκλεϊκών οξέων ενός διαλύματος σε 70% αιθανόλη παρουσία γλυκογόνου και φυγοκέντρωση υψηλών στροφών. Ο καθαρισμός συμπεριλαμβάνει την απομάκρυνση αλάτων, ολιγονουκλεοτιδίων και άλλων προσμίξεων που μπορεί να περιέχονται στο διάλυμα.

Υλικά που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία είναι:

- Ισοπροπανόλη
- CH<sub>3</sub>COONa 3M, PH 7
- Γλυκογόνο 20mg/ml
- Αιθανόλη 70%

#### Μεθοδολογία

Για διάλυμα DNA 100μl που βρίσκεται σε σωληνάκι τύπου eppendorf 1,5 ml ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- 1) Προστίθεται ισοπροπανόλη ίσου όγκου με το διάλυμα του DNA,
- 2) Προστίθεται CH<sub>3</sub>COONa 3M με τελική συγκέντρωση 0,3M
- 3) Προστίθεται γλυκογόνο 0,5 μl
- 4) Αφήνουμε το μείγμα σε θερμοκρασία δωματίου στον πάγκο για 30 λεπτά
- 5) Το μείγμα φυγοκεντρείται σε maximum rpm για 20 λεπτά
- 6) Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθεται μισός όγκος από το αρχικό διάλυμα DNA 70% αιθανόλη
- 7) Ακολουθεί φυγοκέντρωση σε maximum rpm για 5 λεπτά, χωρίς vortex
- 8) Το υπερκείμενο απομακρύνεται και αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει

### 2.2.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

**Η** ηλεκτροφόρηση είναι το φαινόμενο της κίνησης χημικών ενώσεων (κυρίως πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων) ενσωματωμένων μέσα σε ένα πήκτωμα (gel) με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου [79]. Κατά την διοχέτευση ηλεκτρικού ρεύματος μέσω ηλεκτροδίων στο μέσο, τα φορτισμένα σωματίδια κινούνται προς τα ηλεκτρόδια με ταχύτητες διαφορετικές ανάλογα με το φορτίο τους και αντιστρόφως ανάλογα με το μέγεθος τους. Έτσι τα περισσότερο φορτισμένα και μικρότερα μόρια απομακρύνονται περισσότερο από το αρχικό σημείο, ενώ τα μεγαλύτερα και λιγότερο φορτισμένα λιγότερο, οπότε επέρχεται διαχωρισμός. Μετά τη λήξη εφαρμογής του ηλεκτρικού πεδίου οι ενώσεις, που προηγουμένως κινούνταν σε αυτό, σταματούν την κίνηση τους και συσσωρεύονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε ευδιάκριτες ζώνες (ή αλλιώς μπάντες). Τις περισσότερες φορές γίνεται απλά μια ποιοτική ανάλυση των δειγμάτων π.χ. ύπαρξη προϊόντων, διαχωρισμός τους και σύγκρισή του μεγέθους τους, χονδρικός/συγκριτικός προσδιορισμός της ποσότητας τους. Επιπλέον, υπάρχει η δυνατότητα μέτρησης της πυκνότητας των ζωνών αυτών με ειδική συσκευή που ονομάζεται πυκνόμετρο, ώστε να υπολογιστεί η εκατοστιαία αναλογία τους και η συγκέντρωσή τους.

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης παρακολουθείται είτε με γυμνό μάτι (παρατηρώντας τα δύο συστατικά του διαλύματος φόρτωσης, μπλε βρωμοφαινόλης ~300bp, κυανό ξυλόλης ~4000bp), είτε με έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία είναι:

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

### **Μεθοδολογία:**

Παρασκευή 100mL πήκτωματος αγαρόζης 1,2%, 1x TBE:

- 1) Ζύγιση 1,2 gr αγαρόζης και προσθήκη της σε κωνική φιάλη
  - 2) Αραίωση του TBE 5x σε TBE 1x
  - 3) Πρόσθεση 100ml TBE 1x στην ίδια φιάλη με την αγαρόζη
  - 4) Θέρμανση της κωνικής φιάλης σε φούρνο μικροκυμάτων για λίγα λεπτά, με ανάδευση ανά τακτά διαστήματα, μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και να μην υπάρχουν κρυσταλλικά ινίδια
  - 5) Προσθήκη 4μL βρωμιούχου αιθιδίου, αφού πρώτα γίνει μερική ψύξη της κωνικής σε τρεχούμενο νερό με συνεχή ανάδευση προσέχοντας μη πήξει το πήκτωμα, για αποφυγή αναθυμιάσεων
  - 6) Ανακίνηση για διάλυση του βρωμιούχου αιθιδίου
  - 7) Εισαγωγή του διαλύματος αγαρόζης σε ειδικά καλούπια και τοποθέτηση χτενών για τη δημιουργία μικρών πηγαδιών στο πήκτωμα
  - 8) Αναμονή μέχρι να στερεοποιηθεί πλήρως το πήκτωμα και αφαίρεση των χτενών
- Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων:

- 1) Προσθήκη διαλύματος φόρτωσης στα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα
- 2) Τοποθέτηση του πήκτωματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης
- 3) Προσθήκη διαλύματος TBE 1x ώστε να καλυφθούν πλήρως τα πηγαδάκια του πήκτωματος
- 4) Εισαγωγή των δειγμάτων στα διαφορετικά πηγαδάκια του πήκτωματος
- 5) Εισαγωγή του μάρτυρα σε όσα πηγαδάκια είναι απαραίτητα, συνήθως σε ένα ανά σειρά (Ο μάρτυρας μοριακού βάρους είναι ένα μείγμα τμημάτων με διακριτά μοριακά μεγέθη που μετακινείται ταυτόχρονα με το DNA στο πήκτωμα και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του μεγέθους των δειγμάτων)

### **2.2.3 Ανάκτηση DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction)**

**Σ**τη μοριακή βιολογία, η ανάκτηση (gel extraction) ή η απομόνωση (gel isolation) από πήκτωμα είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την απομόνωση ενός επιθυμητού θραύσματος ακέραιου DNA από ένα πήκτωμα αγαρόζης μετά από ηλεκτροφόρηση. Μετά την ανάκτηση, τα θραύσματα αυτά μπορούν να αναμιχθούν, κατακρημνιστούν ή να συνδεθούν ενζυμικά, με απλά βήματα.

Αφού τα δείγματα του DNA «τρέξουν» σε ένα πήκτωμα αγαρόζης, η ανάκτηση περιλαμβάνει τέσσερα βασικά βήματα: τον προσδιορισμό των θραυσμάτων που μας ενδιαφέρουν, την απομόνωση των αντίστοιχων ζωνών, την απομόνωση του DNA από αυτά τα κομμάτια και την αφαίρεση των συνοδευτικών αλάτων και προσμίξεων. Τέλος μετά το πέρας της διαδικασίας υπάρχει η δυνατότητα ηλεκτροφόρησης μικρής ποσότητας του δείγματος για ποσοτικοποίηση.

Υλικά που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία είναι:

- gel extraction kit «GF-1 Vivantis»
- καθαρό νερό
- αποστειρωμένα eppendorfs 1,5ml

## Μεθοδολογία

Χρήση του gel extraction kit «GF-1 Vivantis»

- 1) Θέτουμε το πήκτωμα αгарόζης σε UV ακτινοβολία ώστε να ανιχνεύσουμε τις ζώνες του DNA και με ένα κοπίδι κόβουμε τη ζώνη που περιέχει το επιθυμητό θραύσμα DNA (η έκθεση του πηκτώματος στην ακτινοβολία θα πρέπει να περιοριστεί στο ελάχιστο δυνατό για να αποτραπεί πιθανή μεταλλαξιγένεση του DNA)
- 2) Η τμήμα του πηκτώματος που κόπηκε τοποθετείται σε ένα eppendorf και ζυγίζεται
- 3) Προστίθεται ίσος όγκος GB Buffer του kit στο eppendorf με το τμήμα
- 4) Το eppendorf τοποθετείται σε υδατόλουτρο για περίπου 7 λεπτά
- 5) Το eppendorf αναδεύεται στο vortex για λίγα δευτερόλεπτα και επιστέφεται στο υδατόλουτρο για επιπλέον 7 λεπτά
- 6) Το eppendorf αναδεύεται ξανά στο vortex και αφού το τμήμα λιώσει τελείως μεταφέρεται όλο το περιεχόμενο του eppendorf στις ειδικές κολώνες του kit
- 7) Αφού περιμένουμε για 1 λεπτό, ακολουθεί φυγοκέντρηση τους στα 10,000g για 1 λεπτό
- 8) Το έκλουσμα απομακρύνεται και προστίθενται 650μl από το Wash Buffer που παρέχει το kit στην κολώνα και φυγοκέντρηση της στα 10,000g για 1 λεπτό
- 9) Το έκλουσμα απομακρύνεται και το πάνω μέρος της κολώνας μεταφέρεται σε νέο αποστειρωμένο eppendorf
- 10) Ανάκτηση DNA σε 25-50μl προθερμασμένου καθαρού νερού. Προσθήκη νερού, αναμονή για 2 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκέντρηση στα 10,000g για 1 λεπτό
- 11) Το ανακτημένο στο eppendorf DNA (ως έκλουσμα) κάτω διατηρείται στους -20°C

### 2.2.4 Πέψη με ένζυμα περιορισμού

**Ε**νζυμα περιορισμού ονομάζονται τα ένζυμα που εντοπίζονται φυσιολογικά σε βακτήρια και αρχαία και ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι η άμυνα του μικροοργανισμού απέναντι σε ιούς. Τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν συγκεκριμένες, μικρές σε μήκος αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και πέπτουν σε μια θέση που ονομάζεται θέση περιορισμού, δημιουργώντας είτε συμπληρωματικά, είτε τυφλά άκρα. Οι θέσεις περιορισμού, στα πλασμίδια, βρίσκονται σε μια ειδική περιοχή που ονομάζεται πολυσυνδέτης.

Η τεχνική της κατάτμησης ενός ανασυνδυασμένου πλασμιδίου DNA με χρήση των ενζύμων περιορισμού αποτελεί μια χρήσιμη διαδικασία, η οποία στοχεύει στην επιβεβαίωση ύπαρξης ενθέματος εντός του πλασμιδιακού φορέα. Απώτερος σκοπός της μεθόδου είναι η αποκοπή του πιθανού ενθέματος από το πλασμίδιο, έπειτα από πέψη με τα κατάλληλα ένζυμα, και η 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.

Υλικά που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία είναι:

- Πλασμιδιακό DNA
- Επιλεγμένο ένζυμο/α περιορισμού
- Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμων (Buffer)

## Μεθοδολογία

- 1) Η κατάλληλη ποσότητα πλασμιδιακού DNA, που έχει απομονωθεί, προστίθεται σε eppendorf 1,5ml. Στο ίδιο eppendorf προστίθενται και τα υπόλοιπα υλικά της αντίδρασης σύμφωνα με τις τελικές συγκεντρώσεις που φαίνονται στον πίνακα

Υλικά	Στελικό
DNA	100-500 ng
Buffer	1x
Ένζυμο περιορισμού	2units
ddH <sub>2</sub> O	συμπληρώνει τον όγκο
Τελικός όγκος (V)	10 μl

- 2) Ακολουθεί επώαση της αντίδρασης για μία ώρα στους 37 °C, η οποία στη συνέχεια θα ηλεκτροφορηθεί

### 2.2.5 Επεξεργασία με DNAase

**Η** DNAση (DNAase) είναι ένα ένζυμο, το οποίο διασπά εκλεκτικά το γονιδιωματικό DNA. Με το παρόν πρωτόκολλο προλαμβάνεται η μόλυνση του εκάστοτε δείγματος RNA με γονιδιωματικό DNA. Από τη στιγμή που μετατρέπεται το RNA σε cDNA με τη βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης, στη συνέχεια χρησιμοποιείται για ενίσχυση γονιδίων στόχων. Στη διαδικασία αυτή, η ύπαρξη μορίων γονιδιωματικού DNA μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα. Στο σημείο αυτό είναι που η επεξεργασία με DNAase μπορεί να εξασφαλίσει την αξιοπιστία (τουλάχιστον για αυτή τη παράμετρο) των αποτελεσμάτων.

Υλικά που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία είναι:

- RNA
- DNAase
- Buffer (ρυθμιστικό διάλυμα DNAases)
- Νερό απαλλαγμένο από νουκλεάσες (nuclease free H<sub>2</sub>O)
- Διάλυμα απενεργοποίησης DNAases (inactivation buffer)

### Μεθοδολογία

- 1) Προστίθενται σε αποστειρωμένο σωληνάκι PCR το νερό, το ρυθμιστικό διάλυμα, το RNA και η DNAase στις κατάλληλες συγκεντρώσεις όπως φαίνεται στον πίνακα
  - 2) Επώαση της αντίδρασης στους 37°C για 25 λεπτά στον θερμοκυκλοποιητή
  - 3) Προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας του διαλύματος απενεργοποίησης και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
  - 4) Φυγοκέντρηση στα 11.000g για 2 λεπτά
  - 5) Εξαιρετικά προσεκτική μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο αποστειρωμένο PCR σωληνάκι
- Διατήρηση των δειγμάτων στους -80°C

Υλικά	C <sub>τελικό</sub>
<b>RNA</b>	1μg
<b>Buffer</b>	1X
<b>DNAase</b>	0.4 units
<b>Αναστολέας DNAase</b>	0.1V
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	συμπληρώνει τον όγκο
<b>Τελικός όγκος (V)</b>	10μl

## 2.3 Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή από ολικό RNA

**Η** αντίστροφη μεταγραφή είναι η διαδικασία μετατροπής του μονόκλωνου RNA, που έχει απομονωθεί από κάποιο ιστό, σε δίκλωνο μόριο μέσω της σύνθεσης μιας συμπληρωματικής cDNA αλυσίδας. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση αυτή ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφάση. Είναι γνωστό πως το μονόκλωνο RNA είναι περισσότερο ασταθές και ευαίσθητο σε ένζυμα αποικοδόμησης. Για τον λόγο αυτό, επιλέγεται η μέθοδος της αντίστροφης μεταγραφής για την καλύτερη προστασία του. 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 που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία είναι:
- Ολικό RNA του επιθυμητού ιστού
- Τυχαίοι εκκινητές
- dNTPs
- Ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση
- Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (5X)
- Αναστολέας ριβονουκλεασών

### Μεθοδολογία

Η διαδικασία πραγματοποιείται εντός θερμοκυκλοποιητή αλλά δεν περιλαμβάνει κύκλους. 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.

Υλικά	Cτελικό
RNA	>1 μg
Buffer	1X
dNTPs	2 mM
Τυχαίοι εκκινητές	450 ng
Αντίστροφη μεταγραφάση	200 units
Αναστολέας RNAase	40 units
ddH <sub>2</sub> O	Συμπληρώνει τον όγκο

- 1) Αρχικά προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα RNA σε αποστειρωμένο PCR σωληνάκι, μαζί με τους τυχαίους εκκινητές. Ακολουθεί επώαση στους 70°C για 10 λεπτά στον θερμοκυκλοποιητή
- 2) Τοποθέτηση των σωληνών σε πάγο για 5 λεπτά και προσθήκη των υπολοίπων υλικών (βλέπε πίνακα)
- 3) Επώαση στους 39°C για 60 λεπτά (το χρονικό διάστημα της επώασης του βήματος αυτού καθορίζεται από το μέγεθος των επιθυμητών τελικών προϊόντων. Όσο περισσότερη ώρα επωάζεται η αντίδραση, τόσο μεγαλύτερα προϊόντα θα παραχθούν)
- 4) Ψύξη στους -80°C για 10 λεπτά

## 2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

### 2.4.1 Συμβατική PCR

**Η** αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια βιοχημική μέθοδος που αναπτύχθηκε το 1986 από τον Kary Mullis [65]. Η PCR χρησιμοποιείται για τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό ενός ή λίγων αντιγράφων μιας στοχευμένης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας DNA, παράγοντας χιλιάδες έως εκατομμύρια αντίγραφα του κομματιού αυτού. Σήμερα αποτελεί μια από τις πιο δημοφιλείς μεθόδους που χρησιμοποιείται σε μια πλειάδα περιπτώσεων όπως η διάγνωση ασθενειών, η κλωνοποίηση, η αλληλούχηση και η γενετική φυλογένεση.

Η PCR βασίζεται σε θερμικούς κύκλους, οι οποίοι περιλαμβάνουν μια σειρά επαναλαμβανόμενων εναλλαγών θερμοκρασίας. Αρχικά, με αύξηση της θερμοκρασίας πετυχαίνεται η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA. Στη συνέχεια, με μείωση της θερμοκρασίας ο κάθε κλώνος χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την DNA πολυμεράση, η οποία θα πολλαπλασιάσει επιλεκτικά το DNA στόχο. Η επιλεκτικότητα αυτή είναι αποτέλεσμα της χρήσης εκκινητών (primers) συμπληρωματικών προς την περιοχή DNA που στοχεύεται υπό συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας. Καταυτόν τον τρόπο και μέσω της επανάληψης των κύκλων η αλληλουχία στόχος πολλαπλασιάζεται με εκθετικό ρυθμό.

Κάθε αντίδραση PCR μπορεί να χωριστεί σε έξι στάδια:

- 1) Στάδιο εκκίνησης (initialization step):

Θέρμανση της αντίδρασης στους 94-95 °C για 1-9 λεπτά για την ενεργοποίηση της DNA πολυμεράσης.

**II) Στάδιο αποδιάταξης (Denaturation step):**

Σε αυτό το στάδιο ξεκινά ο πρώτος κύκλος της αντίδρασης με θέρμανση στους 94-95 °C για 20-30 δευτερόλεπτα. Το DNA αποδιάσσεται με το σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων παρέχοντας μονόκλινα μόρια.

**III) Στάδιο υβριδοποίησης (Annealing step):**

Μείωση της θερμοκρασίας της αντίδρασης στους 50-65 °C για 20-40 δευτερόλεπτα, ώστε να επιτραπεί η υβριδοποίηση των εκκινητών στα μονόκλινα μόρια. Η θερμοκρασία αυτή ονομάζεται  $T_{an}$  και είναι ειδική για κάθε ζεύγος εκκινητών (3-5 βαθμοί χαμηλότερη από το  $T_m$  των εκκινητών που χρησιμοποιούνται).

**IV) Στάδιο επιμήκυνσης (Extension/elongation step):**

Η θερμοκρασία σε αυτό το στάδιο εξαρτάται από τη DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται. Συνήθως κυμαίνεται από 72-74 °C. Αυτό είναι το στάδιο που η DNA πολυμεράση συνθέτει τον συμπληρωματικό κλώνο για κάθε μονόκλινο κομμάτι προσθέτοντας το κατάλληλο νουκλεοτίδιο κάθε φορά. Εδώ τελειώνει και ο πρώτος κύκλος της αντίδρασης.

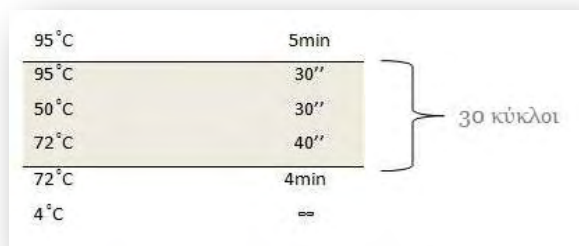
**V) Στάδιο τελικής επιμήκυνσης (Final elongation):**

Μετά από τον τελευταίο κύκλο η αντίδραση παραμένει στους 70-74 °C για 4-15 λεπτά, ώστε όλα τα μονόκλινα κομμάτια να προλάβουν να γίνουν δίκλινα.

**VI) Στάδιο διατήρησης (Final hold):**

Ψύξη στους 4 °C επ' αόριστον για διατήρηση μικρής χρονικής περιόδου.

Ο αριθμός των κύκλων (τα στάδια II-IV αποτελούν ένα κύκλο) με βάση το μέγεθος της αλληλουχίας που στοχεύεται και κυμαίνεται από 30 έως 35 κύκλους. Με περισσότερους κύκλους η μέθοδος μπορεί να εμφανίσει λάθη.



Εικόνα 2.1 – Συνθήκες θερμοκυκλοποιητή (PCR)

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση είναι:

- DNA
- Εκκινητές
- DNA πολυμεράση
- dNTPs
- ρυθμιστικό διάλυμα (buffer)
- MgCl<sub>2</sub>

**Μεθοδολογία:**

Αφού εισαχθεί το κατάλληλο πρόγραμμα στον θερμοκυκλοποιητή και καθοριστεί ο τελικός όγκος της αντίδρασης, προστίθενται όλα τα υλικά σε κατάλληλα σωληνάκια PCR (PCR eppendorfs) όπως φαίνεται στον πίνακα. Αφού ολοκληρωθεί αυτή η διαδικασία τα σωληνάκια τοποθετούνται στον θερμοκυκλοποιητή για επώαση.

Υλικά	Στελικό
<b>DNA</b>	10-40ng
<b>Buffer</b>	1X
<b>dNTPs</b>	0,8 mM
<b>εκκινητής F</b>	0,4-0,6 μM
<b>εκκινητής R</b>	0,4-0,6 μM
<b>Taq πολυμεράση</b>	1 unit
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	-

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

**Η** ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) - γνωστή και ως αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) - είναι μια τεχνική μοριακής βιολογίας που βασίζεται στις αρχές της μεθόδου PCR. Χρησιμοποιείται για την ενίσχυση και ταυτόχρονα τη ποσοτικοποίηση μίας ή περισσότερων ειδικών αλληλουχιών σε ένα δείγμα DNA. Η Real-Time PCR 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 ποσότητα αυτή μπορεί να είναι είτε ένας απόλυτος αριθμός των αντιγράφων ή μια σχετική ποσότητα μετά από κανονικοποίηση.

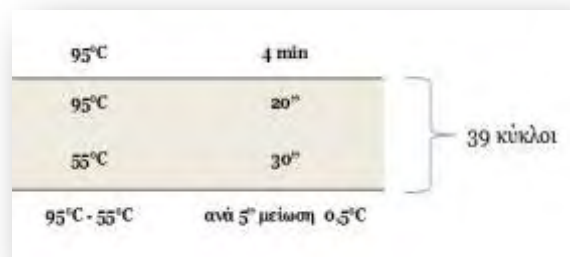
Η πιο κοινή μέθοδος για την ανίχνευση των προϊόντων με ποσοτική PCR είναι με χρήση μη ειδικών φθορίζουσων χρωστικών, όπως το SYBR Green, που παρεμβάλλονται σε οποιοδήποτε δίκλωνο DNA που συντίθενται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, παράγοντας φθορισμό. Τις περισσότερες φορές προτιμάται, ωστόσο παρουσιάζει ένα σημαντικό μειονέκτημα. Εφόσον η χρωστική αυτή ενσωματώνεται μη ειδικά σε οποιοδήποτε δίκλωνο DNA παράγεται, δεσμεύεται και σε κομμάτια DNA εκτός του μορίου-στόχου, συμπεριλαμβανομένων και των διμερών των εκκινητών ή των μη-ειδικών προϊόντων που ενισχύονται, γεγονός που οδηγεί τελικά σε αύξηση του συνολικού φθορισμού. Η SYBR Green διεγείρεται με τη χρήση μπλε ακτινοβολίας ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ) και εκπέμπει πράσινο φως ( $\lambda = 522 \text{ nm}$ ). Επιπλέον, για να εξασφαλιστεί η ακρίβεια όσον αφορά την ποσοτικοποίηση, είναι συνήθως απαραίτητο να γίνει κανονικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου στόχου σε σχέση με ένα σταθερώς εκφραζόμενο γονίδιο (housekeeping gene, *hkg*). Αυτή η μέθοδος έχει το πλεονέκτημα του να χρειάζεται μόνο ένα ζεύγος εκκινητών για την πραγματοποίηση της ενίσχυσης, η οποία διατηρεί το κόστος χαμηλά. Ωστόσο, είναι δυνατή μόνο για την ενίσχυση ενός προϊόντος χρησιμοποιώντας μια αλυσιδωτή αντίδραση.

Κατά τη διάρκεια της Real- Time PCR, στους πρώτους κύκλους ο φθορισμός είναι ασθενής. Καθώς περνάμε στους επόμενους, το DNA πολλαπλασιάζεται και η αντίδραση περνά στην εκθετική φάση, αφού μετά από κάθε κύκλο το προϊόν θεωρητικά διπλασιάζεται. Κατά τους τελευταίους κύκλους, σημειώνεται μια γραμμική φάση όπου πλέον περιορίζεται η συγκέντρωση των αντιδρώντων και το ένζυμο έχει ελαττωμένη δραστηριότητα, μέχρι τελικά να φτάσουμε σε ένα πλατώ, όπου η αντίδραση φτάνει σε κορεσμό και σταματάει.

Τέλος, το προϊόν που παράγεται στην αντίδραση της Real-Time PCR, πρέπει να είναι από 80 έως 120bp ώστε να εξασφαλιστεί η ειδικότητα και η υψηλή απόδοση της ενίσχυσης. Συγκεκριμένα, η ειδικότητα της ενίσχυσης μπορεί να διαπιστωθεί μέσω της καμπύλης αποδιάταξης (melting curve analysis) μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης. 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 επειδή είναι μικρότερα σε μέγεθος παρουσιάζουν χαμηλότερη θερμοκρασία τήξης.

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση είναι:

- DNA
- Εκκινητές
- I Taq Universal SYBR Green Super mix (Mix διάλυμα, στο οποίο περιέχονται τα: hot-start iTaq DNA polymerase, dNTPs,  $\text{MgCl}_2$ , SYBR® Green I dye)



Εικόνα 2.2 – Συνθήκες θερμοκυκλοποιητή Real-Time PCR

### Μεθοδολογία:

Αφού εισαχθεί το κατάλληλο πρόγραμμα στον θερμοκυκλοποιητή, καθορίζεται ο τελικός όγκος της αντίδρασης στα 15μl. Σύμφωνα λοιπόν με τον τελικό όγκο, προστίθενται όλα τα υλικά σε κατάλληλα σωληνάκια PCR (PCR eppendorfs). Αφού ολοκληρωθεί αυτή η διαδικασία τα σωληνάκια τοποθετούνται στον θερμοκυκλοποιητή για επώαση. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως για κάθε δείγμα εκτός από την ενίσχυση με το εκάστοτε ζεύγος εκκινητή, πραγματοποιείται και μία αντίδραση με τους εκκινητές του γονιδίου αναφοράς, *house keeping gene*.

## 2.5 Υβριδοποίηση κατά Southern

**Η** υβριδοποίηση κατά Southern είναι μέθοδος της Μοριακής Βιολογίας που χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό συγκεκριμένων αλληλουχιών σε δείγμα DNA και πήρε το όνομα της από τον E. M. Southern που την ανέπτυξε το 1975. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα υβριδοποίησης του DNA, δηλαδή τη δυνατότητα δύο μονόκλωνων συμπληρωματικών μορίων DNA να σχηματίζουν δίκλωνη έλικα.

Όλη η διαδικασία γίνεται σε 4 βήματα:

- I. Μεταφορά του DNA και σταθεροποίηση σε νάυλον μεμβράνη
- II. Σήμανση ανιχνευτή
- III. Υβριδοποίηση του DNA της μεμβράνης με το σημασμένο ανιχνευτή
- IV. Ανίχνευση σήματος

### 2.5.1 Μεταφορά του DNA και σταθεροποίηση σε νάυλον μεμβράνη

Η διαδικασία της μεταφοράς και της σταθεροποίησης του DNA περιλαμβάνει την αποδιάταξη των νουκλεϊκών οξέων ώστε να καταστούν μονόκλινα μέσω επεξεργασίας με τα κατάλληλα διαλύματα και στη συνέχεια την ακινητοποίησή τους σε στερεό υπόστρωμα, όπως η νάυλον μεμβράνη, μέσω τριχοειδούς μεταφοράς από το πήκτωμα.

Υλικά που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία είναι:

- Διάλυμα αποδιάταξης: 1,5M NaCl, 0,5M NaOH
- Διάλυμα εξουδετέρωσης: 1,5M NaCl, 0,5M Tris PH 7, 5
- SSC 10X: 0,3M Κιτρικό νάτριο PH 7, 3M NaCl
- Χαρτιά Whatman
- Νάυλον μεμβράνη
- Χαρτοπετσέτες
- Απιονισμένο νερό

### Μεθοδολογία

- 1) Το πήκτωμα τοποθετείται σε δοχείο στο οποίο προστίθεται όγκος διαλύματος αποδιάταξης ώστε να καλύπτεται το πήκτωμα και τίθεται υπό ανάδευση για 15 λεπτά
- 2) Απόχυση του διαλύματος και επανάληψη του πρώτου βήματος
- 3) Απόχυση διαλύματος και ξέπλυμα του πηκτώματος με απιονισμένο νερό
- 4) Προσθήκη διαλύματος εξουδετέρωσης ώστε να καλύπτεται το πήκτωμα και ανάδευση για 20 λεπτά
- 5) Απόχυση διαλύματος και επανάληψη του τέταρτου βήματος
- 6) Απόχυση διαλύματος και ξέπλυμα του πηκτώματος με απιονισμένο νερό
- 7) Προσθήκη διαλύματος SSC 10X και ανάδευση για περίπου 10 λεπτά
- 8) Τοποθέτηση του πηκτώματος ανάποδα σε επίπεδη επιφάνεια (με τα πηγαδάκια σε επαφή με την επιφάνεια)

- 9) Η νάλυον μεμβράνη (κομμένη σε διαστάσεις που ανταποκρίνονται στη επιθυμητή προς μεταφορά περιοχή του πηκτώματος) διαβρέχεται με απιονισμένο νερό και μετά με 10X SSC και τοποθετείται πάνω στο πήκτωμα
  - 10) Πάνω στη μεμβράνη τοποθετούνται δύο κομμάτια Whatman διαβρεγμένα με SSC και δύο στεγνά, όλα κομμένα κατά 0,3cm μικρότερα από τη μεμβράνη (απ' όλες τις διαστάσεις)
  - 11) Πάνω από τα Whatman τοποθετούνται χαρτοπετσέτες των ίδιων διαστάσεων περίπου 4 δάκτυλα ύψος
  - 12) Στην επιφάνεια που έχει τοποθετηθεί το πήκτωμα και γύρω από αυτό προστίθεται SSC
  - 13) Πάνω από τις χαρτοπετσέτες προστίθεται βάρος και η κατασκευή αφήνεται για 2 ώρες ή overnight για να γίνει η μεταφορά
- Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς, σημειώνονται στη μεμβράνη με μολύβι τα πηγαδάκια και αριθμούνται ανάποδα, αφού η μεμβράνη αντιστοιχεί στη πίσω επιφάνεια του πηκτώματος, οπότε το DNA έχει μεταφερθεί στη πίσω επιφάνεια από αυτή που σημειώνεται.
- Ακολουθεί ψήσιμο της μεμβράνης στους 80°C για 2 ώρες, για τη σταθεροποίηση του DNA.

## 2.5.2 Σήμανση ανιχνευτή

Παλαιότερα, για τη σήμανση των απομονωμένων θραυσμάτων DNA με σκοπό τη δημιουργία ανιχνευτή γινόταν με τη χρήση ραδιενέργειας. Πρόσφατα, η διαδικασία της ραδιενεργού σήμανσης αντικαταστάθηκε με μια μέθοδο φθορισμού. Σε ένα συχνά χρησιμοποιούμενο πρωτόκολλο, ο DNA ανιχνευτής σημαίνεται με μία βιταμίνη που ονομάζεται βιοτίνη που μετά την υβριδοποίηση ο ανιχνευτής γίνεται ορατός χρησιμοποιώντας την ικανότητα της πολύ ισχυρής πρόσδεσης της σημασμένης με φθόριο στρεπταβιδίνης στη βιοτίνη.

Υλικά που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία είναι:

- Buffer
- DNA
- Νερό
- dNTPs
- Βιοτίνη
- Klenow polymerase

### Μεθοδολογία

- |   |            |                      |
|---|------------|----------------------|
| 1) Η απαιτούμενη ποσότητα DNA τοποθετείται σε eppendorf 1,5ml   | DNA        | 100-500ng            |
| 2) Ακολουθεί προσθήκη του Buffer στο διάλυμα και βράσιμο για 10 λεπτά   | Buffer     | 1x                   |
| 3) Στη συνέχεια γίνεται ένα γρήγορο spin down και τοποθετώ το eppendorf στο πάγο για 2 λεπτά  | dNTPs      | 0.4 mM               |
| 4) Τέλος προστίθενται όλα τα υπόλοιπα συστατικά με τελευταίο το ένζυμο  | Biotin-UTP | 0.035mM              |
| 5) Το eppendorf ελωάζεται overnight στους 37°C  | Klenow     | 5units               |
| 6) Την επόμενη μέρα γίνεται κατακρήμνιση του σημασμένου μορίου ομοίως με την κατακρήμνιση του DNA που περιγράφηκε παραπάνω και αναδιάλυση του ιζήματος που προκύπτει με 20 μl καθαρό νερό | Νερό       | Συμπληρώνει τον όγκο |

### 2.5.3 Υβριδοποίηση του DNA της μεμβράνης με το σημανόμενο ανιχνευτή

Η διαδικασία της υβριδοποίησης των νουκλεϊκών οξέων αποτελείται από δύο στάδια. Αυτό της προϋβριδοποίησης και αυτό της υβριδοποίησης. Κατά τη προϋβριδοποίηση χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια, τα οποία καταλαμβάνουν τις θέσεις της μεμβράνης στις οποίες δεν έχει συνδεθεί DNA, μειώνοντας έτσι τη πιθανότητα μη ειδικής σύνδεσης του ανιχνευτή. Έπειτα, κατά την υβριδοποίηση σχηματίζονται τα υβρίδια μεταξύ των νουκλεοτιδικών αλυσίδων του DNA που μεταφέρθηκε και του ανιχνευτή. Η θερμοκρασία στην οποία θα γίνει η υβριδοποίηση εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης του υβριδίου ( $T_m$ ).

Υλικά που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία είναι:

#### Για την προϋβριδοποίηση

- Διάλυμα υβριδοποίησης: *SSC 6X, sDs 0,5%, Denhardt's 5X, απιονισμένο νερό*
- *Salmon sperm DNA (ssDNA) 100μg/ml*

#### Για την υβριδοποίηση

- Σημανόμενος ανιχνευτής DNA

### Μεθοδολογία

#### ❖ Προϋβριδοποίηση

- 1) Η μεμβράνη τοποθετείται σε σωλήνα υβριδοποίησης με το DNA στο εσωτερικό του σωλήνα
- 2) Στο σωλήνα προστίθεται το διάλυμα υβριδοποίησης (περίπου 0,2ml x μήκος x πλάτος μεμβράνης) και το ssDNA (100μl/10ml διαλύματος υβριδοποίησης, αφού πρώτα υποστεί βρασμό για 10 λεπτά έτσι ώστε να γίνει μονόκλωνο και έπειτα τοποθετηθεί για 2 λεπτά στον πάγο για να αποφευχθεί η επαναϋβριδοποίηση)
- 3) Ακολουθεί επώαση στην επιλεγμένη θερμοκρασία για 2 ώρες

#### ❖ Υβριδοποίηση

- 1) Γίνεται αποδιάταξη του ανιχνευτή με βράσιμο για 10 λεπτά και επώαση στο πάγο για 2 λεπτά
- 2) Ακολουθεί αφαίρεση κάποιας ποσότητας του διαλύματος υβριδοποίησης, ώστε να μείνει τόσο ώστε να καλύπτεται επαρκώς η μεμβράνη
- 3) Προσθήκη ανιχνευτή (25μl)
- 4) Επώαση στην ίδια θερμοκρασία με την προϋβριδοποίηση overnight

### 2.5.4 Ανίχνευση σήματος

Η διαδικασία βασίζεται αρχικά στην απομάκρυνση της περίσσειας του ανιχνευτή από τη μεμβράνη (πλύσεις) και στη συνέχεια στην εμφάνιση του σήματος λόγω της ικανότητας ισχυρής σύνδεσης της στρεπταβιδίνης με τη βιοτίνη.

Υλικά που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία είναι:

#### Για τις πλύσεις

- Διάλυμα Wash 1: *2X SSC, 0,1% sDs*
- Διάλυμα Wash 2: *0,2X SSC, 0,1% sDs*

#### Για την εμφάνιση σήματος

- Διάλυμα A: *100mM Tris PH 7,5, 150 Mm NaCl*
- Διάλυμα B: *Διάλυμα A, 1% Blocking Solution (10gr αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη σε 100ml A)*
- Διάλυμα B +Ab: *5 μl Ab, 10ml διάλυμα B*
- Διάλυμα C: *100mM Tris PH 9,5, 100Mm NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>*

- *NBT, BCIP* Υποστρώματα της αλκαλικής φωσφατάσης, που είναι συνδεδεμένη στη στρεπταβιδίνη, για την κατάλυση της αντίδρασης σύνδεσης της τελευταίας με τη βιοτίνη
- Απιονισμένο νερό

### Μεθοδολογία

Η μέθοδος της ανίχνευσης σήματος χωρίζεται σε δύο στάδια, τις πλύσεις και την εμφάνιση σήματος

#### ❖ Πλύσεις

- 1) Αποχύνεται το διάλυμα υβριδοποίησης με τον ανιχνευτή σε αποστειρωμένο falcon και φυλάσσεται στους -20°C
- 2) Η μεμβράνη τοποθετείται σε δοχείο
- 3) Προτίθεται διάλυμα Wash 1 ώστε να καλύπτεται η μεμβράνη και ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 4) Το διάλυμα αποχύνεται και επαναλαμβάνεται το τρίτο βήμα
- 5) Ακολουθεί ξέπλυμα με προσθήκη διαλύματος Wash 2 (προθερμασμένο στη θερμοκρασία της υβριδοποίησης) και επώαση υπό ανάδευση για 20 λεπτά στη θερμοκρασία της υβριδοποίησης
- 6) Το διάλυμα αποχύνεται και επαναλαμβάνεται το πέμπτο βήμα

#### ❖ Εμφάνιση σήματος

- 1) Το διάλυμα Wash 2 από το τελευταίο βήμα των πλύσεων αποχύνεται, προστίθεται διάλυμα A και επώαζεται η μεμβράνη για 1 λεπτό υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου (όλα τα επόμενα βήματα γίνονται σε RT)
- 2) Αποχύνεται το διάλυμα A και προστίθεται διάλυμα B. Επώαση υπό ανάδευση για 30 λεπτά
- 3) Αποχύνεται το διάλυμα B και προστίθεται διάλυμα B+Ab. Επώαση υπό ανάδευση για 30 λεπτά
- 4) Αποχύνεται το διάλυμα B+Ab σε αποστειρωμένο falcon 15ml και φυλάσσεται στους 4 °C
- 5) Προστίθεται διάλυμα A και η μεμβράνη επώαζεται υπό ανάδευση για 15 λεπτά
- 6) Απόχυση διαλύματος και επανάληψη του πέμπτου βήματος
- 7) Απόχυση διαλύματος, προσθήκη διαλύματος C και επώαση υπό ανάδευση για 2 λεπτά
- 8) Απόχυση διαλύματος C και προσθήκη διαλύματος C που περιέχει 50 μl NBT και 37,5 μl BCIP/ 10ml διαλύματος C  
Δίνω χρόνο ώστε να δω τα αποτελέσματα της αντίδρασης, την οποία σταματάω με απιονισμένο νερό.

Το τελευταίο αυτό στάδιο της εμφάνισης του σήματος χρησιμοποιείται και για τον έλεγχο της απόδοσης της αντίδρασης σήμανσης του απομονωμένου DNA με βιοτίνη (spotting probe). Η εμφάνιση δείχνεται σε νάυλον μεμβράνη στην οποία έχει εναποτεθεί ο ανιχνευτής που δημιουργήθηκε σε σταγόνες (spots) διαφορετικών συγκεντρώσεων.

## 2.6 Κλωνοποίηση DNA

**Η** κλωνοποίηση με τη γενική της έννοια, είναι η διαδικασία δημιουργίας ενός ή περισσοτέρων ακριβών αντιγράφων από ένα πρότυπο. Στο χώρο της Βιολογίας αυτό το πρότυπο μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα μόριο (π.χ. DNA ή RNA), ένα γονίδιο, ένα κύτταρο ή ακόμη και έναν πολυκύτταρο οργανισμό. Στο παρόν πείραμα έγινε κλωνοποίηση σε πλασμιδιακό φορέα ενός τμήματος DNA και ακολούθησε εισαγωγή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου σε ειδικά επεξεργασμένα στελέχη βακτηρίων.

Όλη η διαδικασία γίνεται σε 4 βήματα:

- I. Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA σε πλασμιδιακό φορέα (ligation)
- II. Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση
- III. Μετασχηματισμός κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση
- IV. Καλλιέργεια μετασχηματισμένων κυττάρων και διάκριση ανασυνδυασμένων κλώνων

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

Η διαδικασία έχει ως στόχο την κατασκευή ενός ανασυνδυασμένου πλασμιδίου, μέσω της εισαγωγής ενός ενθέματος στην αλληλουχία του. Για τον ανασυνδυασμό, το πλασμίδιο θα 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 επανακυκλοποιηθεί.

Υλικά που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία είναι:

- DNA δείγματος (ένθεμα)
- PBS-T vector (φορέας) (40ng/μl)
- T4 DNA λιγάση (5 units/μL)
- Ρυθμιστικό διάλυμα T4 λιγάσης (10X)
- Καθαρό νερό

#### Μεθοδολογία

Αρχικά υπολογίζεται η ποσότητα του ενθέματος που θα εισαχθεί στην αντίδραση σύνδεσης με τον πλασμιδιακό φορέα. Η ποσότητα αυτή υπολογίζεται από τον τύπο:

$$ng \text{ DNA} = ng \text{ πλασμιδίου} \times \frac{\text{μέγεθος DNA}}{\text{μέγεθος φορέα}} \times \text{μοριακός λόγος}$$

Ο μοριακός λόγος συνήθως είναι 5:1, ούτω ώστε μέσα στην αντίδραση να υπάρχει περίσσεια τμημάτων DNA και έτσι να αυξηθούν οι πιθανότητες δημιουργίας ανασυνδυασμένων πλασμιδίων.

Μέσα σε σωλήνα eppendorf 1,5 ml προστίθενται οι σωστές ποσότητες των υλικών όπως φαίνεται στον πίνακα.

Μετά την εισαγωγή των υλικών, το eppendorf επωάζεται στους 22°C για 60 λεπτά σε μια απλή συσκευή PCR. Μετά το πέρας της επώασης, το eppendorf διατηρείται στους 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί στα επόμενα στάδια της κλωνοποίησης.

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
<b>Τελικός όγκος</b>	10μL

### 2.6.2 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση

Με το παρόν πρωτόκολλο τα κύτταρα που πρόκειται να υποστούν ηλεκτροδιάτρηση υφίστανται την κατάλληλη επεξεργασία πριν χρησιμοποιηθούν, έτσι ώστε να καταστούν διαπερατά σε πλασμίδια μετά την έκθεσή τους στο ηλεκτρικό πεδίο.

Υλικά που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία είναι:

- LB Broth 300ml: 4,5 gr LB Broth, 1,5 gr NaCl, απιονισμένο νερό
- LB άγαρ: (10 gr βακτηοτρυπτόνη, 5 gr εκχύλισμα ζύμης, 15 gr άγαρ, 5 gr NaCl PH 7) / L
- Γλυκερόλη 10%
- Απιονισμένο νερό
- Κύτταρα *E. coli* DH5a



## Μεθοδολογία

- 1) Ενοφθάλμιση ποσότητας κυττάρων DH5a, που διατηρούνται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  με χρήση αποστειρωμένου μικροβιολογικού κρίκου, σε αποστειρωμένο στερεό θρεπτικό υλικό LB άγαρ (striking)
- 2) Επώαση καλλιέργειας για 16 ώρες στους  $37^{\circ}\text{C}$ .
- 3) Προσθήκη σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα 1ml αποστειρωμένου υγρού θρεπτικού υλικού LB Broth, υπό στείρες συνθήκες
- 4) Απομόνωση μιας αποικίας από την στερεή καλλιέργεια DH5a με τη βοήθεια οδοντογλυφίδας και εισαγωγή της σε αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό μέσο LB Broth
- 5) Επώαση του ενοφθαλισμένου υγρού θρεπτικού για 16 ώρες, στους  $37^{\circ}\text{C}$ , υπό ανάδευση (210rpm)
- 6) Ακολουθεί μεταφορά της βακτηριακής καλλιέργειας σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη με υγρό LB Broth (300mL) και επώαση στους  $37^{\circ}\text{C}$ , υπό ανάδευση (210rpm) έως ότου η τιμή της οπτικής πυκνότητας  $\text{OD}_{600}$  του εναιωρήματος να κυμαίνεται μεταξύ 0,4-0,6 (περίπου 2 ώρες)
- 7) Μεταφορά της καλλιέργειας σε σωλήνα falcon των 50mL και διατήρησή της στον πάγο για ~10 λεπτά, με στόχο την αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων
- 8) Στη συνέχεια γίνεται συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση στα 4.000g, για 10 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$
- 9) Το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται ήπια σε προψυγμένο απιονισμένο νερό (~50ml/falcon)
- 10) Το εναιώρημα φυγοκεντρείται στα 4.000g, για 10 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$
- 11) Επανάληψη των βημάτων 9 και 10
- 12) Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται ήπια σε προψυγμένο διάλυμα γλυκερόλης 10% (4ml/falcon) και φυγοκεντρούνται στα 4.000g, για 10 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$
- 13) Απομάκρυνση του υπερκείμενου και ήπια επαναδιάλυση του ιζήματος σε προψυγμένο διάλυμα γλυκερόλης 10% (250μl/falcon)
- 14) Το κυτταρικό εναιώρημα διαιρείται σε κλάσματα των 40μL σε προψυγμένα σωληνάκια eppendorf (~ 8 eppendorf/falcon)
- 15) Τέλος, τα κλάσματα διατηρούνται στους  $-80^{\circ}\text{C}$

### **2.6.3 Μετασχηματισμός κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση**

Η ηλεκτροδιάτρηση είναι μια μηχανική μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως στη μοριακή βιολογία για την εισαγωγή DNA σε δεκτικά κύτταρα, μέσω παροδικών πόρων που δημιουργούνται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη με τη βοήθεια ηλεκτρικού παλμού. Οι ηλεκτρικοί παλμοί αποδιοργανώνουν στιγμιαία τη φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα της μεμβράνης, προκαλώντας το σχηματισμό παροδικών οπών, 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 στην ένταση του διαχεόμενου ρεύματος, καθώς υψηλότερες τιμές μπορεί να δημιουργήσουν πόρους που θα προκαλέσουν λύση του κυττάρου, λόγω οσμωτικής πίεσης.

Υλικά που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία είναι:

- Ανασυνδυσασμένοι φορείς
- Δεκτικά κύτταρα DH5a
- Θρεπτικό υλικό SOC: (10gr βακτοτρυπτόνη, 5gr εκχύλισμα ζύμης, 0,5gr NaCl, 20mL glucose 1M, 5ml  $\text{MgCl}_2$  2M, 10ml KCl PH 7,2 250mM)/ L

## Μεθοδολογία

- 1) Κλάσματα δεκτικών κυττάρων DH5a κατεργασμένων για ηλεκτροδιάτρηση (40μL) τοποθετούνται 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 κύτταρα
- 3) Επώαση στον πάγο για 1 λεπτό
- 4) Μεταφορά του μίγματος σε ειδική προψυγμένη κυψελίδα, διαμέτρου 0,2cm και τοποθέτηση της στη θέση υποδοχής της συσκευής
- 5) Εφαρμογή ηλεκτρικού παλμού εντάσεως 13,8 kV/cm
- 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 1 ώρα

### **2.6.4 Καλλιέργεια μετασηματισμένων κυττάρων και διάκριση ανασυνδυασμένων κλώνων**

Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την επίστρωση των κυττάρων, μετά την ηλεκτροδιάτρηση, σε ειδικό μέσο που περιέχει ένα δείκτη επιλογής και ένα δείκτη αναφοράς για τον διαχωρισμό των ανασυνδυασμένων κλώνων από τους μη.

Ως δείκτης επιλογής χρησιμοποιείται το αντιβιοτικό αμπικιλίνη, ώστε να αναπτυχθούν μόνο τα κύτταρα που 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 στο γονιδίωμα της *E. coli* και στο πλασμιδιακό DNA. 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 που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία είναι:
- Στερεό θρεπτικό μέσο LB άγαρ:  
(10gr Tryptone, 15gr agar, 15gr Yeast extract, 5gr NaCl)/L
  - Αμπικιλίνη (100μg/mL)
  - X-gal (20mg/mL)
  - IPTG (200mg/mL)
  - Μετασηματισμένα κύτταρα

## Μεθοδολογία

- 1) Αρχικά παρασκευάζεται και αποστειρώνεται η επιθυμητή ποσότητα στερεού θρεπτικού LB άγαρ (25-30mL/ανά τρυβλίο), στο οποίο προστίθεται η αντίστοιχη ποσότητα αμπικιλίνης (100μg/mL)
- 2) Τοποθέτηση του LB άγαρ στα τρυβλία, υπό στείρες συνθήκες, για τη στερεοποίηση του
- 3) Προσθήκη 30μl X-gal, 3 μl IPTG καθώς και της επιθυμητής ποσότητας μετασηματισμένων κυττάρων και επίστρωσή τους στα τρυβλία

- 4) Επώση των τρυβλίων ανεστραμμένων στους 37°C για 12-16 ώρες
- 5) Ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων αποικιών, βάσει του χρώματός τους (λευκές)

## 2.7 Βακτηριοφάγος λ-DASH® II– Γονιδιωματική βιβλιοθήκη

**Ο**ι γονιδιωματικές βιβλιοθήκες, περιέχουν όλο το γονιδίωμα ενός οργανισμού ενσωματωμένο σε τυχαία κομμάτια μεγέθους της τάξεως των 15kb μέσα σε φάγους. Οι τελευταίοι αποτελούν εναλλακτικούς φορείς κλωνοποίησης, κατά τον χειρισμό μεγάλων τμημάτων γονιδιωματικού DNA. Το κάθε φαγικό σωματίο διαθέτει και ένα διαφορετικό τμήμα του γονιδιώματος. Ο βακτηριοφάγος lambda-DASH®II (Stratagene) είναι ο φορέας αντικατάστασης που χρησιμοποιήθηκε από τους Lagos et al. 2005, για την κατασκευή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου. Οι βιβλιοθήκες χρησιμεύουν στον εντοπισμό και την επιλογή συγκεκριμένων τμημάτων DNA (όπως ολόκληρα γονίδια με τις γειτονικές τους περιοχές), καθώς και σε μελέτες χαρτογράφησης.

Ο βακτηριοφάγος lambda-DASH®II έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε κύτταρα XL1-Blue MRA' (P2) χάρη στην επιλογή spI (spI selection-sensitive to P2 inhibition). Οι βακτηριοφάγοι λ αγρίου τύπου διαθέτουν ενεργά τα γονίδια red και gam και δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε στελέχη ξενιστών που περιέχουν λυσιγόνους φάγους P2. Στο βακτηριοφάγο λ-DASH®II, τα γονίδια red και gam εντοπίζονται στο τμήμα που απομακρύνεται κατά την εισαγωγή του ενθέματος (stuffer). Έτσι, στελέχη αγρίου τύπου του βακτηριοφάγου lambda-DASH®II δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε κύτταρα XL1-Blue MRA', σε αντίθεση με τα ανασυνδυασμένα lambda-DASH®II, μετά την εισαγωγή του DNA-ενθέματος. Με τον τρόπο αυτό, κατά την επιστροφή της βιβλιοθήκης σε στέλεχος XL1-Blue MRA' (P2) πραγματοποιείται spI επιλογή και αναπτύσσονται μόνο ανασυνδυασμένοι βακτηριοφάγοι. Επιπλέον, είναι κατασκευασμένος έτσι ώστε να φέρει εκατέρωθεν του ενθέματος, τις αλληλουχίες των υποκινητών T3 και T7 και να επιτρέπει τη δημιουργία τελο-ειδικών (end-specific) RNA ανιχνευτών. Τέλος, το ένθεμα μπορεί να απομακρυνθεί με κατάτμηση με την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI, καθώς αυτό είναι κλωνοποιημένο στις θέσεις EcoRI του φορέα.

### 2.7.1 Προετοιμασία βακτηρίων-ξενιστών του βακτηριοφάγου lambda

Τα βακτήρια εισέρχονται μέσα στα κύτταρα συνδεδεμένα με τον εξωμεμβρικό υποδοχέα μαλτοπορίνης. Ο φυσιολογικός ρόλος του συγκεκριμένου υποδοχέα είναι η διευκόλυνση της διάχυσης της μαλτόζης μέσα στα κύτταρα και η σύνδεσή του στη μεμβράνη του κυττάρου επάγεται από την ίδια τη μαλτόζη και καταστέλλεται από τη γλυκόζη. Τα κύτταρα- ξενιστές λοιπόν, αναπτύσσονται σε μέσο που περιέχει μαλτόζη και μαγνήσιο, ώστε να επαχθεί η μεταφορά των υποδοχέων στη μεμβράνη και να διευκολυνθεί η πρόσδεση του φάγου στον υποδοχέα αντίστοιχα.

Υλικά που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία είναι:

- Κύτταρα XL1-Blue MRA'
- Υγρό υλικό LB:(10 gr βακτοτρυπτόνη, 5 gr εκχύλισμα ζύμης, 5 gr NaCl PH 7 )/ L , εμπλουτισμένο με 50ml μαλτόζη και 50ml MgSO<sub>4</sub> / 5ml LB
- 10mM MgSO<sub>4</sub>

### Μεθοδολογία

- 1) Σε υγρό θρεπτικό μέσο LB Broth εμπλουτισμένο με 10mM MgSO<sub>4</sub> και 0,2% μαλτόζη, ενοφθαλμίζονται βακτηριακά κύτταρα XL1-Blue MRA' και επώζονται για 4-6 ώρες στους 37°C υπό ισχυρή ανάδευση (220rpm) ή για 12-16 ώρες στους 30°C.
- 2) Φυγοκέντρηση στα 4.000g για 10 λεπτά

- 3) Απόρριψη του υπερκειμένου και συλλογή των κυττάρων που καθιζάνουν
  - 4) Ήπια επαναδιάλυση του ιζήματος στην απαιτούμενη ποσότητα διαλύματος  $MgSO_4$  10mM ώστε η οπτική πυκνότητα  $OD_{600}$  του κυτταρικού εναιωρήματος να κυμαίνεται μεταξύ 0,4 και 0,6
- Διατήρηση των κυττάρων στους 4°C.

### 2.7.2 Τιτλοδότηση γονιδιωματικής βιβλιοθήκης

Κάθε εναιώρημα φάγων παρουσιάζει έναν «τίτλο» που εκφράζει τον αριθμό των φαγικών σωματιών που περιέχει ανά ml (pfu/ml). Ο προδιορισμός του τίτλου πραγματοποιείται με τη σχέση:

$$\frac{\text{αριθμός πλακών (pfu)} \times \text{συντελεστής αραιώσεως}}{\text{όγκος που επιστρώθηκε (μl)}} \times 1000 \text{ μl/ml}$$

Ο όγκος που επιστρώθηκε αναφέρεται στον όγκο του διαλύματος των βακτηριοφάγων που αναμίχθηκε με τα κύτταρα-ξενιστές.

Υλικά που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία είναι:

- Διάλυμα SM: 50 mM Tris-HCL PH 7,5, 100 Mm NaCl, 0,2%  $MgSO_4 \cdot H_2O$ , 0,01% ζελατίνη
  - NZY-top agar (υπερκείμενη αραρόζη): (5 gr NaCl, 2 gr  $MgSO_4 \cdot H_2O$ , 5 gr εκχύλισμα ζύμης, 10 gr NZ αμίνη, 0,7% w/v αραρόζη)/L
  - NZY – άγαρ: (5 gr NaCl, 2 gr  $MgSO_4 \cdot H_2O$ , 5 gr εκχύλισμα ζύμης, 10 gr NZ αμίνη, 15 gr άγαρ)/L
  - Κύτταρα XL1-Blue MRA'
  - Βακτηριοφάγος λ-DASH® II

### Μεθοδολογία

- 1) Παρασκευή διαδοχικών αραιώσεων της βιβλιοθήκης ( $10^{-4} - 10^{-7}$ ) σε SM διάλυμα
- 2) Ανάμιξη 2-3μl των αραιώσεων αυτών με κύτταρα-ξενιστές του στελέχους XL1-Blue MRA' σε σωληνάκια τύπου eppendorf
- 3) Επώαση στους 37°C για 20 λεπτά
- 4) Μεταφορά των μειγμάτων σε σωλήνες falcon των 15 ml, που περιέχουν 3 ml αποστειρωμένη υπερκείμενη αραρόζη NZY και διατήρησή τους στους 47-49 °C
- 5) Ακολουθεί ανάδευση και μεταφορά σε προθερμασμένο στους 37 °C τρυβλίο με NZY-άγαρ έως τα 90mm
- 6) Ανακίνηση τριβλίου για ομοιόμορφη κατανομή του μείγματος
- 7) Μετά τη στερεοποίηση της υπερκείμενης αραρόζης ακολουθεί επώαση των τριβλίων στους 37 °C για 12 ώρες

### 2.7.3 Επίστρωση γονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε τρυβλίο

Η γονιδιωματική βιβλιοθήκη παρέχει τη δυνατότητα επιλογής συγκεκριμένων κλώνων μέσω υβριδοποίησης με τους κατάλληλους ανιχνευτές. Ο συνολικός αριθμός των ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων (N) που απαιτείται να σαρωθεί για να επιτευχθεί απομόνωση ενός κλώνου με πιθανότητα (P) 99% σε μια βιβλιοθήκη εξαρτάται από το μέσο μέγεθος των ενθεμάτων και από το μέγεθος του ως προς διαλογή γονιδιώματος ακολουθώντας τη σχέση:  $N = (\ln(1-P))/(\ln(1-f))$

Όπου f είναι το κλάσμα του ενθέματος προς το γονιδίωμα.

Υλικά που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία είναι:

- XL1-Blue MRA'
- Βακτηριοφάγος λ-DASH® II
- NZY-top agar (υπερκείμενη αραρόζη): (5 gr NaCl, 2 gr  $MgSO_4 \cdot H_2O$ , 5 gr εκχύλισμα ζύμης, 10 gr NZ αμίνη, 0,7% w/v αραρόζη)/L

- NZY – άγαρ: (5 gr NaCl, 2 gr MgSO<sub>4</sub>\* H<sub>2</sub>O, 5 gr εκχύλισμα ζύμης, 10 gr NZ αμίνη, 15 gr άγαρ)/L

### **Μεθοδολογία**

- 1) Ανάμιξη της επιθυμητής ποσότητας ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων με βακτήρια ξενιστές XL1-Blue MRA' σε σωλήνα eppendorf
- 2) Επώαση στους 37 °C για 20 λεπτά
- 3) Μεταφορά των μειγμάτων σε σωλήνες falcon των 50 ml, που περιέχουν 30 ml υπερκείμενης αγαρόζης NZY και διατήρησή τους στους 47-49 °C
- 4) Ακολουθεί ανάδευση και μεταφορά σε προθερμανσμένο στους 37 °C τρυβλίο με NZY-άγαρ διαστάσεων 22cm x 22cm
- 5) Ανακίνηση τρυβλίου για ομοιόμορφη κατανομή του μείγματος
- 6) Μετά τη στερεοποίηση της υπερκείμενης αγαρόζης ακολουθεί επώαση των τρυβλίων στους 37 °C για 12 ώρες

### **2.7.4 Συλλογή πλάκας βακτηριοφάγου λ**

Μια πλάκα περιέχει περίπου 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> φαγικά σωματίδια, που μπορούν να διατηρηθούν σε διάλυμα SM/χλωροφορμίου στους 4 °C για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να χάσουν τη βιωσιμότητά τους. Επιπλέον, οι βακτηριοφάγοι διαχέονται σε μεγάλες αποστάσεις γι' αυτό συνίσταται η επιλογή απομονωμένων πλακών καθώς και η σύντομη απομόνωση τους μετά την εμφάνισή τους.

### **Μεθοδολογία**

Με τη χρήση γυάλινης πιπέτας Pasteur απομονώνεται η επιθυμητή βακτηριοφαγική πλάκα μαζί με το άγαρ και την υπερκείμενη αγαρόζη και τοποθετείται σε διάλυμα SM 200 ml το οποίο περιέχει χλωροφόρμιο (0,3%). Το χλωροφόρμιο παρεμποδίζει την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C για 12 ώρες, ώστε να επιτευχθεί η διάχυση των φαγικών σωματίων στο διάλυμα.

### **2.7.5 Διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης**

Η διαλογή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης επιτρέπει την απομόνωση επιθυμητών αλληλουχιών και βασίζεται στη μεταφορά σε μεμβράνη των βακτηριοφαγικών πλακών που έχουν δημιουργηθεί στο στερεό υπόστρωμα και τον εντοπισμό στη συνέχεια των επιθυμητών πλακών με χρήση ενός κατάλληλα σημασμένου ανιχνευτή.

Η διαλογή της βιβλιοθήκης γίνεται σε δύο φάσεις, εάν δεν είναι εφικτή η απομόνωση μεμονωμένης πλάκας.. Η πρώτη διαλογή (πρωτογενής) γίνεται σε μεγάλο τρυβλίο, με την πλευρά της πιπέτας με τη μεγάλη διάμετρο και οι πλάκες που απομονώνονται μένουν για 12-16 ώρες σε SM διάλυμα. Στη συνέχεια, επιστρώνονται σε μικρά τρυβλία όπου και γίνεται η δεύτερη διαλογή (δευτερογενής). Η δεύτερη διαλογή, η οποία γίνεται με την πλευρά της πιπέτας με τη μικρή διάμετρο, έχει στόχο την απομόνωση της μεμονωμένης πλάκας που δίνει σήμα.

Υλικά που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία είναι:

- Διάλυμα αποδιάταξης: 1,5M NaCl, 0,5M NaOH
- Διάλυμα εξουδετέρωσης: 1,5M NaCl, 0,5M Tris PH 7,5
- SSC 10X: 0,3M Κιτρικό νάτριο PH 7, 3M NaCl

## **Μεθοδολογία**

Τα στάδια της τεχνικής είναι τα ίδια με την ανάλυση κατά Southern, όσον αφορά την υβριδοποίηση και την ανίχνευση του σήματος, με μόνη διαφορά τη διαδικασία μεταφοράς σε μεμβράνη η οποία παρουσιάζεται ακολούθως:

- 1) Το τρυβλίο της στερεής καλλιέργειας που πρόκειται να σαρωθεί διατηρείται στους 4 °C για τουλάχιστον δύο ώρες πριν τη μεταφορά
- 2) Κόβεται μεμβράνη στις διαστάσεις του τρυβλίου
- 3) Η μεμβράνη τοποθετείται στην επιφάνεια του στερεού μέσου για 2 λεπτά, κατά την πάροδο των οποίων ανοίγονται τρύπες στη μεμβράνη για να διευκολυνθεί η οριοθέτησή της στο τέλος της διαδικασίας
- 4) Μεταφορά, στη συνέχεια, της μεμβράνης ανεστραμμένης στην επιφάνεια 2,5ml διαλύματος αποδιάταξης για 2 λεπτά
- 5) Ακολουθεί μεταφορά της με τον ίδιο τρόπο σε 2,5ml διαλύματος εξουδετέρωσης για 5 λεπτά
- 6) Έκπλυση της μεμβράνης για λιγότερο από 30 δευτερόλεπτα σε διάλυμα SSC 2X
- 7) Τέλος, η μεμβράνη ξηραίνεται στους 80 °C για 2 ώρες

Μετά τη πάροδο των 2 ωρών διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

## **2.8 Συλλογή αυγών δάκου**

**T**α αυγά που απομονώθηκαν για χρήση τους στη πειραματική διαδικασία, προέρχονται από το εργαστηριακό στέλεχος του εντόμου *Bactrocera oleae*. Το στέλεχος αυτό διατηρείται σε ειδικά διαμορφωμένα κλουβιά, σε θερμοκρασία  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , με υγρασία  $65 \pm 5\%$ .

Στο παρόν πείραμα στόχος ήταν η απομόνωση αυγών σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα (time points). Η συλλογή των αυγών πραγματοποιούνταν κάθε 5-10 λεπτά, για να καθορίζεται με ευκολία η χρονική στιγμή μηδέν. Η διαδικασία της συλλογής περιελάμβανε ξέπλυμα της εσωτερικής επιφάνειας του ειδικού κώνου ωοαπόθεσης με απιονισμένο νερό. Τα αυγά που συμπαρασύρονται από τη ροή του νερού, αφού παρατηρηθούν στο στερεοσκόπιο για να διαπιστωθεί η ακεραιότητα και η ποιότητά τους, επωάζονται σε διηθητικό χαρτί διαβρεγμένο με προπιονικό οξύ. Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος της επιλογής μας, τα αυγά εναποτίθενται ένα-ένα ξεχωριστά σε διαφορετικά eppendorfs 1,5ml που περιέχει 50 μl Trisure και διατηρούνται στους  $-80^\circ\text{C}$ .

## **2.9 In silico ανάλυση**

**I**n silico ανάλυση ονομάζεται η ανάλυση μέσω βιοπληροφορικών προγραμμάτων. Αποτελεί ένα αναγκαίο στάδιο για την ουσιαστικότερη ανάλυση και εξήγηση των πειραματικών αποτελεσμάτων. Στη συνέχεια παρουσιάζονται η αρχή των προγραμμάτων και ο τρόπος με τον οποίο χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Omega και Blast στην παρούσα εργασία.

### **2.9.1 Omega**

Το πρόγραμμα Omega χρησιμοποιείται για την ανάλυση νουκλεοτιδικών και πρωτεϊνικών αλληλουχιών. 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 εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα.

### **2.9.2 Blast (Basic Local Alignment Search Tool)**

Το πρόγραμμα αναζήτησης τοπικών ευθυγραμμίσεων Blast (Basic Local Alignment Search Tool) αποτελεί ένα εργαλείο σύγκρισης και στοιχίσης πρωτεϊνικών ή νουκλεοτιδικών αλληλουχιών. 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.





*Αποτελέσματα*



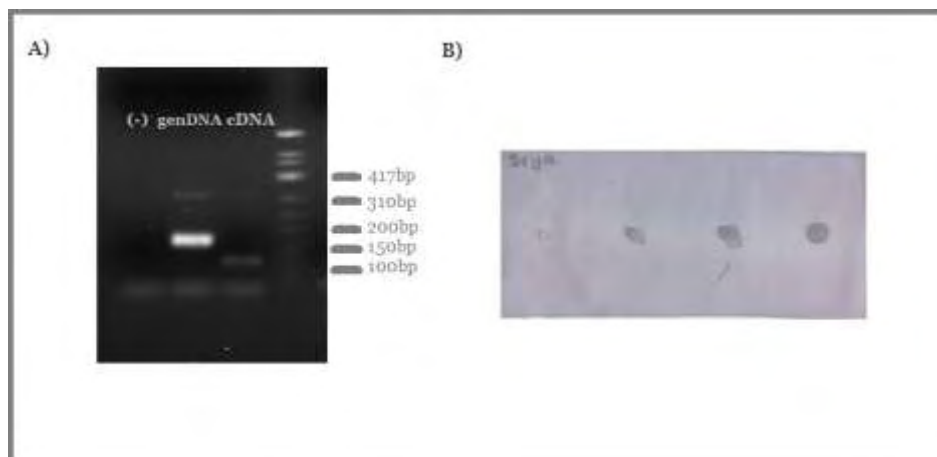


### 3.1 Μοριακή ανάλυση του γονιδίου *serendipity-a* (*sry-a*)

Στην παρούσα διπλωματική εργασία η μοριακή ανάλυση του γονιδίου *sry-a* εστιάστηκε στην αναζήτηση μεταγραφόμενων αλληλουχιών και περαιτέρω στην ενίσχυση και ταυτοποίηση τμημάτων του γονιδίου, ώστε στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση της πλήρους δυνητικά αλληλουχίας του γονιδίου από φαγικούς κλώνους γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.

#### Εντοπισμός και ενίσχυση αλληλουχίας με ομόλογους εκκινητές

Για την ενίσχυση μιας περιοχής του γονιδίου αρχικά, αναζητήθηκαν πιθανές αλληλουχίες που θα αποτελούσαν την πηγή για τον σχεδιασμό ομόλογων εκκινητών. Τα δεδομένα αυτά προήλθαν από μεταγραφόμενες αλληλουχίες του κεφαλιού του εντόμου που προέκυψαν με ανάλυση RNA-seq σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου. Από τη διαδικασία αυτή εντοπίστηκε μια αλληλουχία συνολικού μεγέθους 133 bp με ομολογία προς το γονίδιο *sry-a*, βάσει της οποίας σχεδιάστηκαν οι εκκινητές *sry-a*<sub>1</sub>F/R (παράρτημα) με τη χρήση του προγράμματος OMIGA. Οι εκκινητές αυτοί χρησιμοποιήθηκαν για ενίσχυση με PCR ενός τμήματος του γονιδίου μεγέθους 110bp. Η PCR πραγματοποιήθηκε με μήτρα τόσο γονιδιωματικό DNA όσο και cDNA δάκου και στη συνέχεια τα προϊόντα ενίσχυσης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,8%, 1X TBE (Εικόνα 3.1 A). Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης έδειξαν πως ενώ με μήτρα το cDNA το προϊόν της ενίσχυσης είχε το αναμενόμενο μέγεθος, η PCR με μήτρα το γονιδιωματικό DNA έδωσε δύο προϊόντα, ένα περίπου 180bp σε μεγάλη ποσότητα και ένα περίπου 320bp σε μικρότερη ποσότητα. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την πιθανότητα ύπαρξης ιντρονίου στην αλληλουχία του γονιδιωματικού DNA, το οποίο απομακρύνεται κατά τη διάρκεια του ματίσματος στη μεταγραφή και έτσι το μέγεθος του προϊόντος παρουσιάζεται μικρότερο όταν χρησιμοποιείται ως μήτρα το cDNA. Συνεπώς, θεωρήθηκε πως το τμήμα μεγέθους 180bp αντιστοιχεί σε αλληλουχία του *sry-a* στην οποία παρεμβάλλεται κάποιο ιντρόνιο.

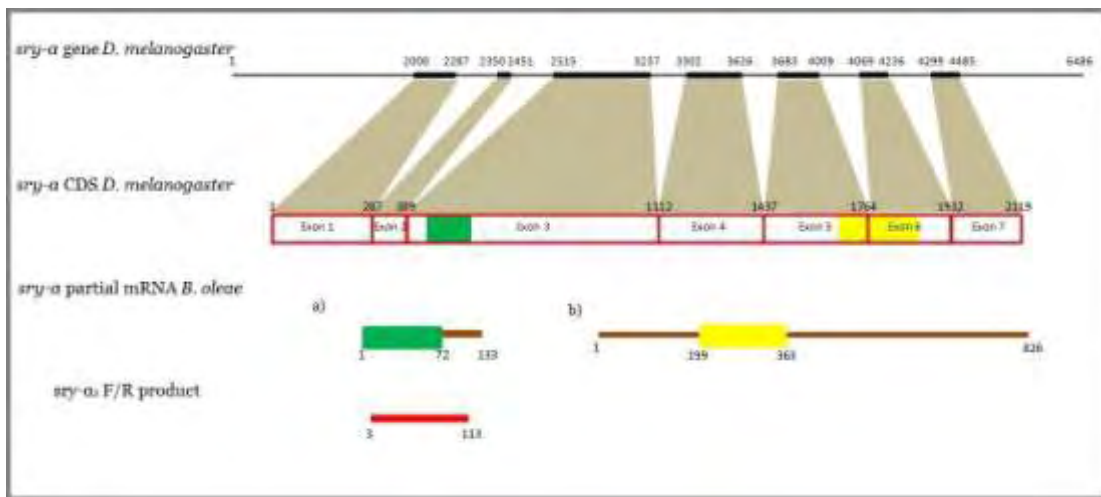


**Εικόνα 3.1– A) Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης γονιδιωματικού DNA και cDNA δάκου μετά από PCR με τους εκκινητές *sry-a*<sub>1</sub>F/R (μάρτυρας μοριακού βάρους φχ174/HinfI). B) spotting DNA ανιχνευτή δάκου για το προϊόν των εκκινητών *sry-a*<sub>1</sub>F/R**

Επιπλέον, η διαθέσιμη μεταγραφόμενη αλληλουχία του γονιδίου *sry-a* του δάκου από το RNA-seq καθώς και νέες διαθέσιμες αλληλουχίες του τρανσκριπτόματος του δάκου από τις βάσεις δεδομένων, χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό ομόλογων αλληλουχιών στο συγγενικό είδος *D. melanogaster* μέσω BLASTX, με σκοπό την ανάλυση της δομής του γονιδίου (Εικόνα 3.2). Κατά τη διαδικασία αυτή διαπιστώθηκε

ότι η ενισχυόμενη από τους εκκινητές *sry-α1F/R* αλληλουχία είναι ομόλογη με τμήμα του εξονίου 3 της *D. melanogaster*. Σύμφωνα με την οργάνωση του ορθόλογου γονιδίου, το παραπάνω τμήμα αντιστοιχεί σε εσωτερική κωδική περιοχή στην οποία δεν παρεμβάλλεται κάποιο ιντρόνιο. Ωστόσο τα αποτελέσματα της PCR δεν συμφωνούν με την προτεινόμενη οργάνωση της *drosophila*. Παρόλα αυτά μπορούν να ερμηνευτούν από το γεγονός ότι η περιοχή ομολογίας αντιστοιχεί στα πρώτα 72bp της αλληλουχίας του προϊόντος ενίσχυσης, υποδηλώνοντας ενδεχομένως την ύπαρξη κάποιου μικρού ιντρονίου στα υπόλοιπα 40bp.

Επιπλέον, το δεύτερο τμήμα μεταγραφόμενης αλληλουχίας του δάκου (Εικόνα 3.2 b) βρέθηκε πως εμφανίζει ομολογία με τμήματα του πέμπτου και έκτου εξονίου στη *Drosophila*, ανάμεσα στα οποία, σύμφωνα με τη δομή του ορθόλογου γονιδίου, παρεμβάλλεται ιντρόνιο μήκους 60 bp.



**Εικόνα 3.2 - Απεικόνιση *in silico* ανάλυσης των διαθέσιμων μεταγραφόμενων αλληλουχιών του *sry-a* γονιδίου του δάκου για τον προσδιορισμό της δομής του και την εύρεση της ομολογίας του με το συγγενικό είδος *D. melanogaster*. Με μαύρο χρώμα απεικονίζεται η γονιδιωματική αλληλουχία του γονιδίου στη *Drosophila* και με έντονη σκίαση τα εξονία της. Επιπλέον σημειώνεται και η αντιστοιχία των βάσεων των εξονίων μεταξύ γονιδιωματικής και κωδικής DNA αλληλουχίας (CDS) στον συγγενή οργανισμό. Επιπλέον, δίνονται με διαφορετικά χρώματα (κίτρινο, πράσινο) οι ομόλογες αλληλουχίες που καθορίστηκαν μέσω BLASTX, μεταξύ της CDS αλληλουχίας της *Drosophila* (κόκκινο πλαίσιο) και των διαθέσιμων mRNA αλληλουχιών του *sry-a* στο δάκο (καφέ γραμμή) [a] αλληλουχία από RNA-seq, b) μεταγραφόμενη αλληλουχία που ανακτήθηκε από τη βάση δεδομένων]. Τέλος με την έντονη κόκκινη γραμμή υποδεικνύεται η περιοχή της PCR ενίσχυσης με τους εκκινητές *sry-α1 F/R*.**

### Ταυτοποίηση αλληλουχίας με κλωνοποίηση και αλληλούχηση

Η επιβεβαίωση πως το ενισχυόμενο τμήμα μεγέθους 180bp της παραπάνω PCR με μήτρα το γονιδιωματικό DNA αντιστοιχεί στο υπό μελέτη γονίδιο και όχι σε κάποιο παραπροϊόν έγινε με αλληλούχηση. Για το σκοπό αυτό, το προϊόν ενίσχυσης ανακτήθηκε από το πήκτωμα αγαρόζης και πραγματοποιήθηκε κλωνοποίησή του. Αρχικά, έγινε αντίδραση σύνδεσης του DNA που απομονώθηκε με πλασμίδιο που φέρει άκρα θυμίνης (PBS-T vector). Στη συνέχεια ακολούθησε μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* DH5α με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια με ηλεκτροδιάτρηση και ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων κλώνων μέσω επιλογής α-συμπληρωματικότητας. Από τους επιλεγμένους κλώνους απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA και έγινε κατάτμηση με το ένζυμο περιορισμού PvuII για να επιβεβαιωθεί το μέγεθος το ενθέματος. Μετά από έλεγχο της εισαγωγής του ενθέματος στα κύτταρα με ηλεκτροφόρηση, επιβεβαιώθηκε η παρουσία του. Ακολούθησε αλληλούχηση των τμημάτων αυτών, οπότε και προσδιορίστηκε με αναζήτηση στη βάση δεδομένων η ομολογία τους με το γονίδιο *sry-a*

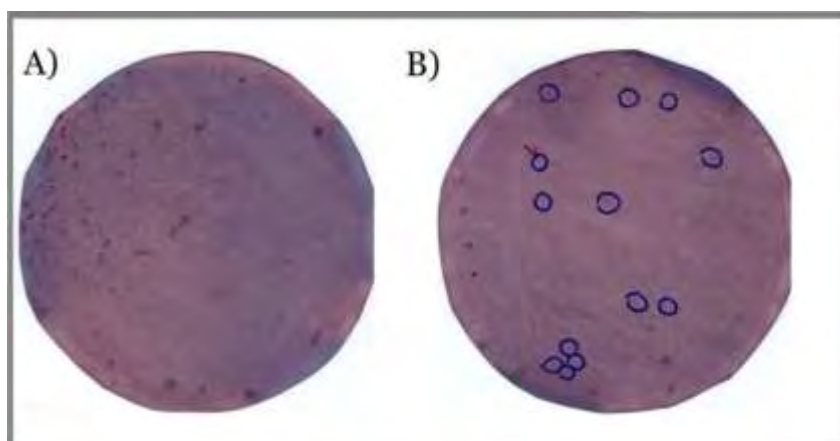
συγγενικών οργανισμών. Τελικά επιβεβαιώθηκε πως το τμήμα του DNA που ενισχύθηκε αντιστοιχούσε στο ομόλογο γονίδιο *sry-a* του δάκου.

### Διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου

Για τον εντοπισμό και την ταυτοποίηση φαγικών κλώνων που περιέχουν το γονίδιο *sry-a* πραγματοποιήθηκε διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου με ανιχνευτή το τμήμα του γονιδίου που απομονώθηκε παραπάνω. Η διαδικασία αυτή είχε ως σκοπό την απομόνωση της πλήρους δυνητικά αλληλουχίας του γονιδίου.

Το προϊόν ενίσχυσης των εκκινητών *sry-a*<sub>1</sub> F/R μήκους 180 bp σημάνθηκε με βιοτίνη με τη μέθοδο τυχαίων εκκινητών με χρήση του Hexa Label™ DNA Labelling kit (Fermentas), ώστε να χρησιμοποιηθεί ως ομόλογος ανιχνευτής στη διαλογή και ακολούθησε έλεγχος της απόδοσής του με ικανοποιητικά αποτελέσματα (Εικόνα 3.1 B). Επίσης, πραγματοποιήθηκε τιτλοδότηση της φαγικής γονιδιωματικής βιβλιοθήκης ώστε να προσδιοριστεί ο τίτλος της (αριθμός πλακών) και να καθοριστεί η ακριβής ποσότητα που θα χρησιμοποιηθεί κατά τη διαλογή για να μεγιστοποιηθεί η πιθανότητα εύρεσης των φαγικών κλώνων που περιέχουν το προς ανάλυση γονίδιο.

Ακολούθησε μια πρωτογενής και μια δευτερογενής διαλογή της βιβλιοθήκης (primary and secondary screening) με τον ανιχνευτή *sry-a*<sub>1</sub>. Από την πρωτογενή διαλογή συλλέχθηκαν έξι περιοχές ανασυνδυασμένων φάγων. Κάθε μια από τις περιοχές αυτές χρησιμοποιήθηκε για δευτερογενή διαλογή με σκοπό τη συλλογή των απομονωμένων πλέον φαγικών πλακών. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε σήμα υβριδοποίησης μετά τη δευτερογενή διαλογή (Εικόνα 3.3 A,B), ώστε να απομονωθούν στη συνέχεια οι φαγικοί κλώνοι που υβριδοποιούνταν με τον ανιχνευτή του *sry-a*, για λόγους που σχολιάζονται στη Συζήτηση.



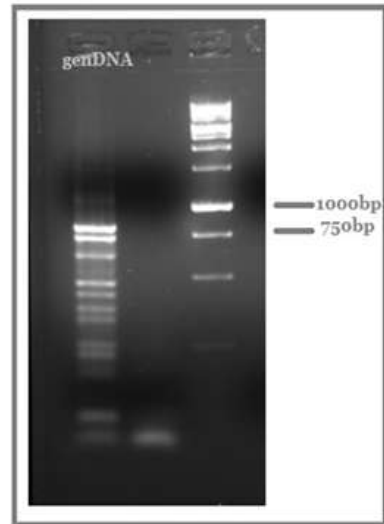
Εικόνα 3.3– Δείγματα μεμβρανών (A, B) μετά από ανίχνευση σήματος σε δευτερογενή διαλογή

### 3.2 Μοριακή ανάλυση του γονιδίου *head involution defective (hid)*

Ομοίως με το γονίδιο *sry-a*, η μοριακή ανάλυση του γονιδίου *hid* συμπεριλάμβανε τον εντοπισμό μεταγραφόμενων αλληλουχιών του γονιδίου, την ενίσχυση και ταυτοποίησή τους, έτσι ώστε σε συνδυασμό με τη διαλογή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης να απομονωθεί η πλήρης δυνητικά αλληλουχία του γονιδίου.

#### Εντοπισμός και ενίσχυση αλληλουχίας με ομόλογους εκκινητές

Αρχικά, από δεδομένα RNA-seq, εντοπίστηκε μια αλληλουχία συνολικού μεγέθους 921 bp με ομολογία προς το γονίδιο *hid*, βάσει της οποίας σχεδιάστηκαν οι εκκινητές Hid-Bo F/R (παράρτημα), με τη χρήση του προγράμματος OMIGA. Οι εκκινητές αυτοί χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση με PCR ενός τμήματος του γονιδίου *hid* μεγέθους 750bp. Η PCR πραγματοποιήθηκε με μήτρα γονιδιωματικό DNA δάκου και στη συνέχεια το προϊόν της ενίσχυσης ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2%, 1X TBE (Εικόνα 3.4). Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης έδειξαν πως η PCR ενίσχυσε ένα πλήθος τμημάτων DNA διαφορετικών μεγεθών, εύρους από 150-1500 bp. Μεταξύ των προϊόντων ενίσχυσης συμπεριλαμβάνονταν και ένα τμήμα του αναμενόμενου μεγέθους, 750bp.



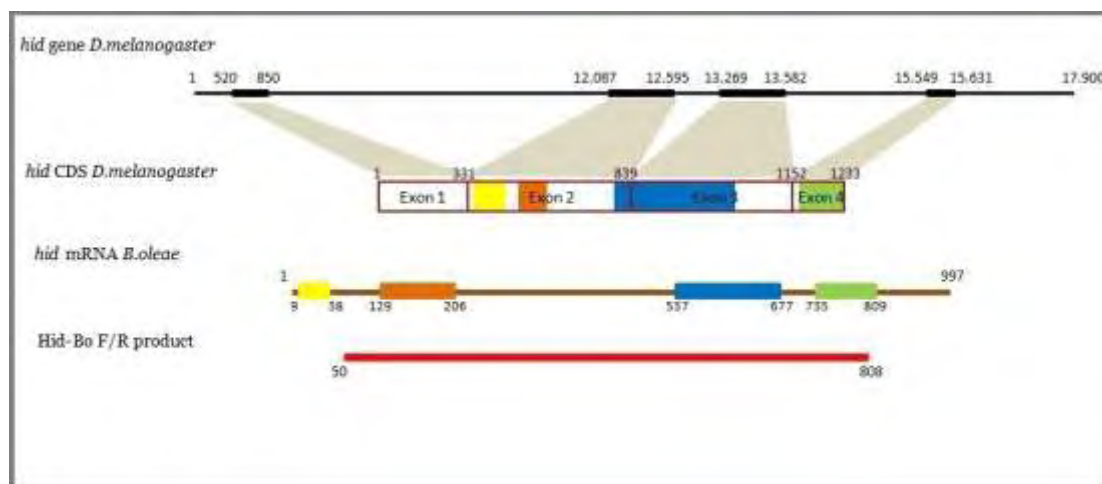
**Εικόνα 3.4– Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων ενίσχυσης του γονιδιωματικού DNA του δάκου (genDNA) με τους εκκινητές Hid-Bo F/R (μάρτυρας μοριακού βάρους 1kb/1000bp Blue DNA Ladder).**

Επιπλέον, η διαθέσιμη μεταγραφόμενη αλληλουχία του γονιδίου *hid* του δάκου από το RNA-seq χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό ομόλογων αλληλουχιών στο συγγενικό είδος *D. melanogaster* μέσω BLASTX, με σκοπό την ανάλυση της δομής του γονιδίου (Εικόνα 3.5). Κατά τη διαδικασία αυτή εντοπίστηκαν 4 διακριτές περιοχές ομολογίας με τμήματα του δεύτερου, τρίτου και τέταρτου εξονίου της *D. melanogaster*. Τρεις από αυτές (129-206bp, 537-677bp και 735-809bp) αποτελούν τμήματα του ενισχυόμενου από τους εκκινητές Hid-Bo F/R προϊόντος και διαπιστώθηκε ότι είναι ομόλογες με τμήματα του ορθόλογου γονιδίου *hid* της *Drosophila* στα οποία παρεμβάλλονται δύο ιντρόνια, ένα 674 bp και ένα 1967 bp. Σύμφωνα με τα παραπάνω, τα αποτελέσματα του BLAST μαρτυρούν πως είναι πολύ πιθανό η ενισχυόμενη από την PCR αλληλουχία να διαθέτει ιντρόνια και έτσι να παρουσιάζεται ως μεγαλύτερο τμήμα στην ηλεκτροφόρηση.

#### Κλωνοποίηση και ταυτοποίηση του προϊόντος ενίσχυσης

Σύμφωνα με το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης, απομονώθηκε η αντίστοιχη ζώνη ώστε να κλωνοποιηθεί και περαιτέρω να καθοριστεί η αλληλουχία της. Αρχικά, το τμήμα εισήχθη σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα και ακολούθησε μετασηματισμός κυττάρων *E. Coli* DH5α με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια με ηλεκτροδιάτρηση. Τυχαίες μετασηματισμένες αποικίες επιλέχθηκαν και απομονώθηκε το πλασμιδιακό τους DNA. Για να επιβεβαιωθεί το μέγεθος το ενθέματος πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια κατάτμηση με ένζυμα περιορισμού EcoRI και HindIII. Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των πέψεων που ακολούθησε έδειξε πως η κλωνοποίηση δεν ήταν επιτυχής, καθώς το ένθεμα δεν είχε εισαχθεί στον πλασμιδιακό φορέα. Παρά την επανάληψη της διαδικασίας δεν επετεύχθη η κλωνοποίηση του

επιθυμητού τμήματος. Επιπλέον, λόγω του πλήθους των ζωνών, δεν ήταν εφικτή η απομόνωση της επιθυμητής ζώνης χωρίς προσμίξεις γειτονικών ζωνών. Το γεγονός αυτό απέτρεψε την προσπάθεια αλληλούχησης απευθείας του προϊόντος ενίσχυσης με τη βοήθεια των ίδιων των εκκινητών.



Εικόνα 3.5– Απεικόνιση *in silico* ανάλυσης της διαθέσιμης μεταγραφόμενης αλληλουχίας του γονιδίου *hid* του δάκου για τον προσδιορισμό της δομής του και την εύρεση της ομολογίας του με το συγγενικό είδος *D. melanogaster*. Με μαύρο χρώμα απεικονίζεται η γονιδιωματική αλληλουχία του γονιδίου στη *Drosophila* και με έντονη σκίαση τα εξονιά της. Επιπλέον αναγράφεται και η αντιστοιχία των βάσεων των εξονίων μεταξύ γονιδιωματικής και κωδικής DNA αλληλουχίας (CDS) στον συγγενή οργανισμό. Επιπλέον, δίνονται με διαφορετικά χρώματα (κίτρινο, πορτοκαλί, μπλε, πράσινο) οι ομόλογες αλληλουχίες που προέκυψαν μέσω BLASTX, μεταξύ της διαθέσιμης αλληλουχίας του mRNA του *hid* στο δάκο (καφέ γραμμή) και της CDS αλληλουχίας της *Drosophila* (κόκκινο πλαίσιο). Τέλος με την έντονη κόκκινη γραμμή υποδεικνύεται η περιοχή της PCR ενίσχυσης με τους εκκινητές Hid-BoF/R.

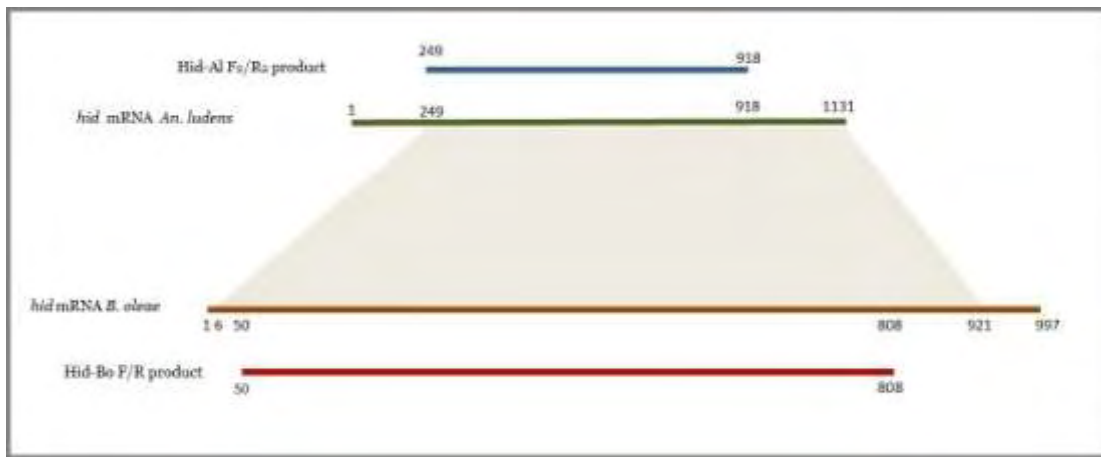
### Ταυτοποίηση αλληλουχίας με υβριδοποίηση κατά Southern με χρήση ετερόλογων εκκινητών

Εναλλακτικά, για την ταυτοποίηση της επιθυμητής ζώνης μεταξύ των πολλαπλών που ενισχύθηκαν από την PCR, επιλέχθηκε η υβριδοποίηση κατά Southern με ετερόλογο ανιχνευτή του συγγενικού είδους *Anastrepha ludens*. Στόχος της διαδικασίας ήταν η ετερόλογη υβριδοποίηση του ανιχνευτή με ένα από τα τμήματα του DNA που ενισχύονταν από τους ομόλογους εκκινητές, ώστε να καθοριστεί ποιο από τα προϊόντα της ηλεκτροφόρησης αντιστοιχεί στο υπό μελέτη γονίδιο.

Χρησιμοποιήθηκαν λοιπόν, οι διαθέσιμοι εκκινητές για την αλληλουχία του γονιδίου *hid* της *An. ludens*, Hid-AI-F<sub>2</sub>/R<sub>2</sub>. Αρχικά, μέσω *in silico* ανάλυσης ελέγχθηκε η ομολογία της διαθέσιμης μεταγραφόμενης αλληλουχίας της *An. ludens*, με την αλληλουχία του *B. oleae* (Εικόνα 3.6). Εφόσον καθορίστηκε η ομολογία των δύο αλληλουχιών καθώς και η αλληλεπικάλυψη των προϊόντων ενίσχυσης, το ενισχυόμενο τμήμα της *An. ludens* επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση κατά Southern ως ανιχνευτής.

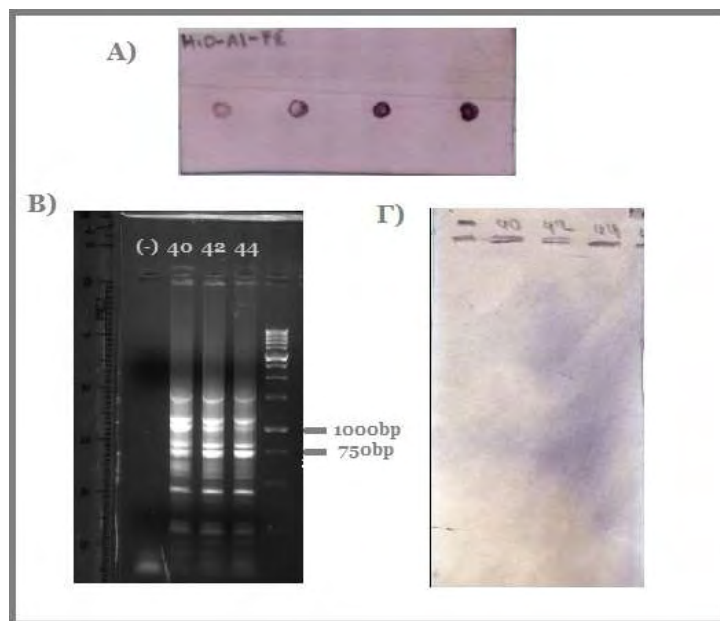
Έτσι, πραγματοποιήθηκε PCR με τους εκκινητές Hid-AI-F<sub>2</sub>/R<sub>2</sub> σε γονιδιωματικό DNA της *An. ludens* και το προϊόν ενίσχυσης 669bp, ανακτήθηκε από το πήκτωμα αγαρόζης και σημάνθηκε με βιοτινή με τη μέθοδο τυχαίων εκκινητών με χρήση του HexaLabel™ DNA Labelling kit (Fermentas) για τη δημιουργία του ετερόλογου DNA – ανιχνευτή. Η απόδοση του ανιχνευτή παρουσιάστηκε ιδιαίτερα ικανοποιητική μετά από έλεγχο με spotting (Εικόνα 3.7 A).





**Εικόνα 3.6–** Συγκριτική απεικόνιση της ομολογίας των διαθέσιμων μεταγραφόμενων αλληλουχιών των ορθόλογων γονιδίων *hid* σε *B.oleae* και *An. ludens*. Σημειώνεται με σκίαση η περιοχή ομολογίας μεταξύ της αλληλουχίας 249-1131bp της *An. ludens* [τμήμα της οποίας (μπλε) αποτελεί το προϊόν ενίσχυσης των εκκινητών Hid-Al-F<sub>2</sub>/R<sub>2</sub>] και της περιοχής 6-921bp του δάκου [τμήμα της οποίας (κόκκινο) αποτελεί το προϊόν ενίσχυσης των εκκινητών Hid-BO F/R].

Ακολούθησε υβριδοποίηση κατά Southern των προϊόντων PCR με τους εκκινητές Hid-Bo F/R σε γονιδιωματικό DNA δάκου (Εικόνα 3.7B), με χρήση του ετερόλογου ανιχνευτή της *An. ludens* σε μη αυστηρές συνθήκες (47°C). Τα αποτελέσματα της υβριδοποίησης μετά την ανίχνευση του σήματος δεν φάνηκαν ικανοποιητικά (Εικόνα 3.7 Γ), ώστε να είναι εφικτή η ταυτοποίηση του επιθυμητού τμήματος. Ακόμα και μετά από αποχρωματισμό της μεμβράνης και επανάληψη της εμφάνιση σήματος δεν παρατηρήθηκε σήμα υβριδοποίησης του ανιχνευτή με κάποια ζώνη. Πιθανοί λόγοι που μπορεί να ερμηνεύουν το αποτέλεσμα αυτό σχολιάζονται στη συζήτηση.



**Εικόνα 3.7–**A) Spotting του ετερόλογου DNA ανιχνευτή της *An.ludens*. B-Γ) Ανάλυση κατά Southern των PCR προϊόντων του γονιδιωματικού DNA του δάκου με τους εκκινητές Hid-Bo F/R και εμφάνιση σήματος μετά από την υβριδοποίηση με τον ανιχνευτή της *An. ludens*. Η PCR έγινε σε T<sub>an</sub>=40 °C, 42 °C και 44°C.



### 3.3 Μελέτη των προτύπων έκφρασης των γονιδίων *sry-a* και *hid* κατά την εμβρυογένεση του δάκου

Παράλληλα με τη μοριακή ανάλυση των δύο παραπάνω γονιδίων, πραγματοποιήθηκε και ανάλυση των προτύπων έκφρασής τους, κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης με ποσοτική (quantitative) Real-Time PCR.

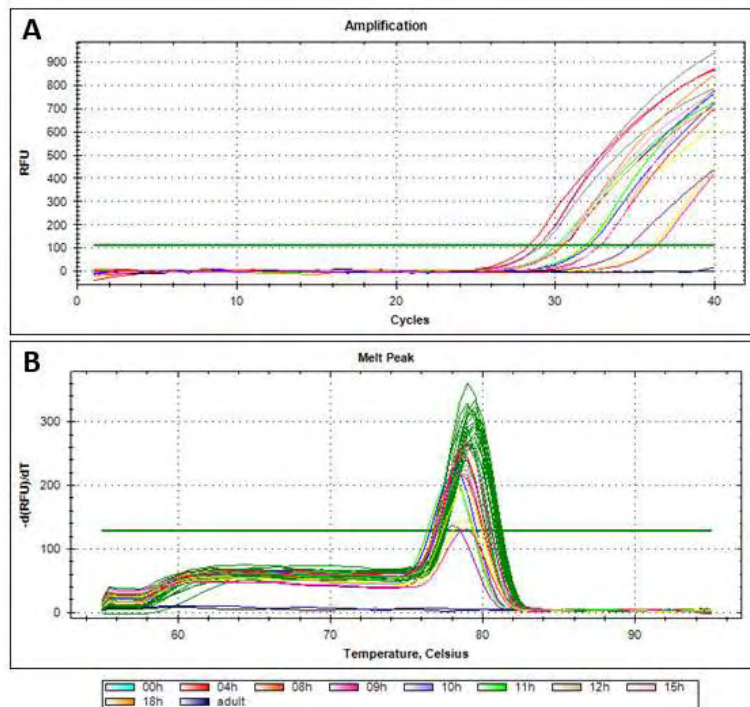
#### Συλλογή αυγών και σύνθεση cDNA

Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν αυγά του εντόμου από τον πληθυσμό που διατηρείται στο εργαστήριο. Η συλλογή πραγματοποιήθηκε σε διάστημα 10 λεπτών και τα αυγά, αφού παρατηρούνταν στο στερεοσκόπιο ώστε να επιβεβαιωθεί η ακεραιότητά τους, διατηρήθηκαν στις καθορισμένες συνθήκες ανάπτυξης για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (time-points). Τα time-points που επιλέχθηκαν ήταν τα ακόλουθα: 0h, 4h, 8h, 9h, 10h, 11h, 12h, 15h, 18h. Συνολικά, κάθε time-point αντιπροσωπευόταν από 3 αυγά και ως χρόνος μηδέν καθορίστηκε η στιγμή της συλλογής του καθενός. Με το πέρας της επιθυμητής περιόδου τα αυγά τοποθετήθηκαν μεμονωμένα σε 50μl Trisure και ακολούθησε απομόνωση του ολικού RNA για κάθε δείγμα. Αφού προηγήθηκε κατεργασία DNAase προς αποφυγή προσμίξεων DNA, στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε σύνθεση του cDNA από το απομονωμένο RNA με αντίδραση RT-PCR χρησιμοποιώντας τυχαίους εκκινητές. Το νέο-συντιθέμενο cDNA αποτέλεσε τη μήτρα στην ποσοτική Real-Time PCR.

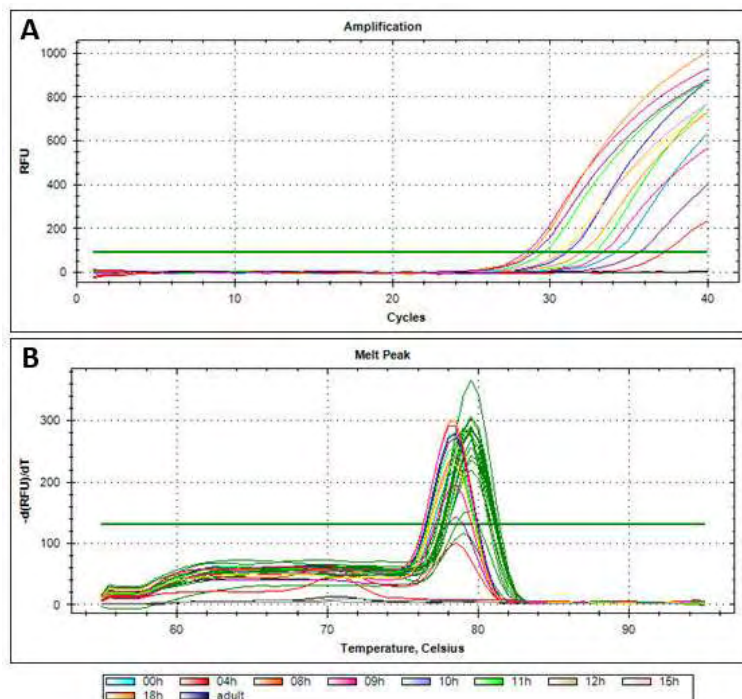
#### Σχεδιασμός νέων εκκινητών και ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων με ποσοτική Real-Time PCR

Παράλληλα με τη μοριακή ανάλυση των γονιδίων *sry-a* και *hid*, δημοσιεύτηκαν στις βάσεις δεδομένων νέες μεταγραφόμενες αλληλουχίες του τρανσκριπτόματος του δάκου. Η διαθεσιμότητα των νέων αλληλουχιών επέτρεψε το σχεδιασμό εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη λειτουργική ανάλυση. Σχεδιάστηκαν λοιπόν, δύο ζεύγη εκκινητών για κάθε γονίδιο, σύμφωνα με τις απαιτούμενες προϋποθέσεις για την ακόλουθη χρήση τους σε Real-Time PCR. Οι εκκινητές για το γονίδιο *sry-a* ήταν οι Sry-qRT-F<sub>1</sub>/R<sub>1</sub> και οι Sry-qRT-F<sub>2</sub>/R<sub>2</sub>, ενώ για το *hid* σχεδιάστηκαν οι Hid-qRT-F<sub>1</sub>/R<sub>1</sub> και Hid-qRT-F<sub>2</sub>/R<sub>2</sub> (παράρτημα).

Ακολούθησε ποσοτική Real-Time PCR για το κάθε ζεύγος εκκινητών. Το κάθε time-point αντιπροσωπευόταν από δύο διαφορετικά αυγά, για να εξασφαλιστεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων καθώς και ο περιορισμός στατιστικών σφαλμάτων. Η ειδικότητα των αντιδράσεων ελέγχθηκε από την καμπύλη αποδιάταξης των προϊόντων της Real-Time (Εικόνες 3.8 και 3.9) κατά την οποία δεν παρατηρήθηκε η ύπαρξη διμερών των εκκινητών ή παραπροϊόντων. Τέλος, όλες οι μετρήσεις κανονικοποιήθηκαν με παράλληλη ενίσχυση του σταθερής έκφρασης ριβοσωμικού γονιδίου Rpl19, για την αξιόπιστη σύγκριση των επιπέδων mRNA στα διαφορετικά δείγματα.



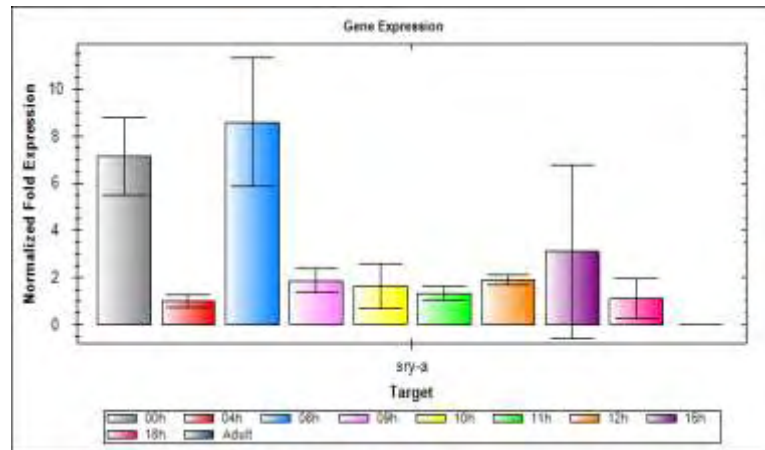
Εικόνα 3.8 - Οι καμπύλες ενίσχυσης (A) και τήξης (B) για το γονίδιο *sry-a*. Από την καμπύλη ενίσχυσης διακρίνονται οι διαφορές στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου, ενώ από την καμπύλη τήξης επιβεβαιώνεται η μη ενίσχυση παραπροϊόντων ή διμερών των εκκινητών για τα διάφορα time-points των εμβρύων του δάκου. Στην καμπύλη αποδιάταξης διακρίνονται ταυτόχρονα και οι θερμοκρασίες τήξης των προϊόντων ενίσχυσης του γονιδίου κανονικοποίησης Rpl19 (πράσινο χρώμα) για κάθε time-point.



Εικόνα 3.9 - Οι καμπύλες ενίσχυσης (A) και τήξης (B) για το γονίδιο *hid*. 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 για τα διάφορα time-points των εμβρύων του δάκου. Στην καμπύλη αποδιάταξης διακρίνονται ταυτόχρονα και οι θερμοκρασίες τήξης των προϊόντων ενίσχυσης του γονιδίου κανονικοποίησης Rpl19 (πράσινο χρώμα) για κάθε time-point.

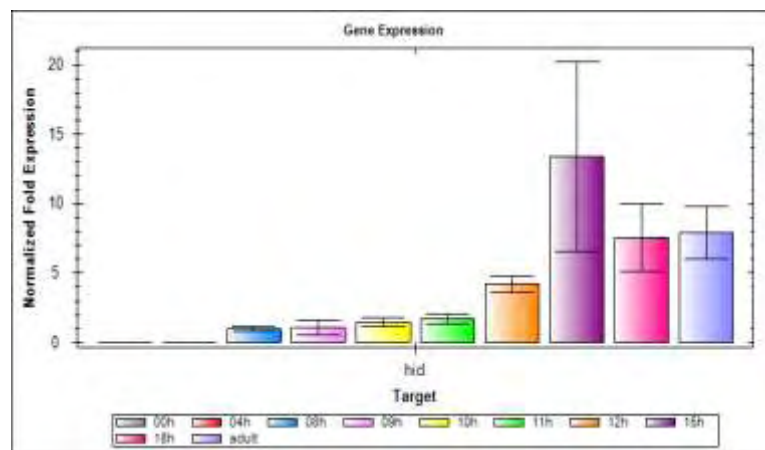
Βάσει των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται στις Εικόνες 3.10 και 3.11, αρχικά επιβεβαιώθηκε η έκφραση και των δύο γονιδίων κατά την εμβρυογένεση. Συγκεκριμένα, από τα αποτελέσματα της λειτουργικής ανάλυσης για κάθε γονίδιο προέκυψαν τα ακόλουθα.

- ***sry-a***: Από τη στιγμή της γονιμοποίησης έως και την 4<sup>η</sup> ώρα της εμβρυογένεσης το γονίδιο εμφανίζει υψηλή έκφραση. Την 4<sup>η</sup> ώρα η συγκέντρωση των μεταγράφων του γονιδίου μειώνεται αισθητά και στη συνέχεια αυξάνεται πάλι στις 8 ώρες μετά την γονιμοποίηση. Μετά το πέρας των 9 ωρών φαίνεται να ελαττώνεται σημαντικά η έκφραση του γονιδίου και να μένει στα χαμηλά αυτά επίπεδα μέχρι και τις 18 ώρες. Τέλος στους ενήλικους ιστούς του εντόμου διαπιστώθηκαν μηδενικά επίπεδα έκφρασης.



Εικόνα 3.10 – Συγκριτικά αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *sry-a* σε επιλεγμένα χρονικά διαστήματα (time-points) κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης του δάκου. Τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς RpL19.

- ***hid***: Για το συγκεκριμένο γονίδιο διαπιστώθηκε αρχικά μηδενική έκφραση για το διάστημα από 0 έως 4 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Στη συνέχεια, η έκφραση του γονιδίου σταδιακά αυξάνεται, παρουσιάζοντας τη μέγιστη συγκέντρωση των μεταγράφων του στις 15 ώρες της πρώιμης ανάπτυξης του εμβρύου. Από εκεί και μετά διατηρούνται μέσα επίπεδα έκφρασης στις 18 ώρες αλλά και στους ενήλικους ιστούς.



Εικόνα 3.11 – Συγκριτικά αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *hid* σε επιλεγμένα χρονικά διαστήματα (time-points) κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης του δάκου. Τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς RpL19.



*Συζήτηση*





**Ο** δάκος της ελιάς είναι ένα παρασιτικό έντομο που προκαλεί κάθε χρόνο σοβαρές ζημιές στις ελαιοκαλλιέργειες. Εντούτοις μέχρι σήμερα αντιμετωπίζεται με κλασικούς τρόπους, όπως η χρήση εντομοκτόνων και παγίδων, οι οποίοι έχουν αποδεδειγμένα σπιγματιστεί για τις επιβλαβείς συνέπειές τους, τόσο στο περιβάλλον, όσο και στους ανώτερους οργανισμούς των οικοσυστημάτων.

Οι προσπάθειες για την ανάπτυξη εναλλακτικών και φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων καταπολέμησης του εντόμου που θα παρέχουν ταυτόχρονα και την απαραίτητη εξειδίκευση προς τον οργανισμό-στόχο, βρίσκονται στο επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος παγκοσμίως. Ο τομέας της γενετικής μηχανικής αναμένεται να δώσει τις απαιτούμενες λύσεις στα εμπόδια που έχουν κατά καιρούς αναφερθεί για τη βελτιστοποίηση τέτοιων τεχνικών ελέγχου, όπως η SIT και η RIDL. Τελευταίες μελέτες στρέφονται στο γενετικό χειρισμό των συνεχώς αυξανόμενων πληθυσμών των εντόμων οικονομικής σημασίας μέσα από την ανάπτυξη ειδικών συστημάτων FSEL. Πρόκειται για μια μέθοδο που συνδυάζει την αρχή της θηλεο-ειδικής θνησιμότητας μέσω εναλλακτικού ματίσματος [104] με ένα έμβryo-ειδικό σύστημα [103]. Τα συστήματα αυτά δρουν σε πρώιμο στάδιο της ανάπτυξης του εμβρύου, εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο το θάνατο των θηλυκών εντόμων στο στάδιο της εμβρυογένεσης, ώστε κατά τη μαζική απελευθέρωση των στελεχών που θα φέρουν το σύστημα να επιτυγχάνεται τελικά η μείωση του άγριου πληθυσμού που ευθύνονται για την καταστροφή του των καρπών της ελιάς.

Συνεπώς η ανάλυση γονιδίων που εμπλέκονται στην εμβρυογένεση και την απόπτωση μπορεί να συνεισφέρει στην προσπάθεια δημιουργίας κατάλληλων εργαλείων για την ανάπτυξη ενός τέτοιου συστήματος στο δάκο, με απώτερο στόχο την καθιέρωση εναλλακτικών μεθόδων ελέγχου του εντόμου.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάστηκε στον εντοπισμό και την ανάλυση δύο γονιδίων, εκ των οποίων το ένα παίζει καίριο ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης των κυττάρων και το δεύτερο εκφράζεται αποκλειστικά στα εμβρυογενετικά στάδια του δάκου. Και για τα δύο γονίδια έγινε μοριακή ανάλυση, που είχε σκοπό τον καθορισμό της δομής τους και την εύρεση ολόκληρης της αλληλουχίας των γονιδίων. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε λειτουργική ανάλυση, για τον προσδιορισμό των προτύπων έκφρασης τους κατά την εμβρυογένεση. Τα συμπεράσματα και τα ζητήματα προς περαιτέρω διερεύνηση που προέκυψαν από τις δύο πειραματικές διαδικασίες θα παρουσιαστούν χωριστά για το εκάστοτε γονίδιο.

## **4.1 Εμβρυογενετικό γονίδιο *sry-a***

### Μοριακή ανάλυση

Λόγω της απουσίας πληροφοριών για γονίδια που εμπλέκονται στην πρώιμη ανάπτυξη του δάκου, αρχικά αναζητήθηκαν μεταγραφόμενες αλληλουχίες από δεδομένα RNA-seq προγενέστερης ανάλυσης του εργαστηρίου. Βάσει της αλληλουχίας που ανακτήθηκε σχεδιάστηκαν ομόλογοι εκκινητές, επιτρέποντας τον εντοπισμό και την αλληλούχηση τμήματος του *sry-a* στο γονιδίωμα του δάκου. Παράλληλα, επιλέχθηκε να πραγματοποιηθεί διαλογή φαγικής γονιδιωματικής βιβλιοθήκης, στα πλαίσια της προσπάθειας εύρεσης ολόκληρης της αλληλουχίας του γονιδίου. Εφόσον το ορθόλογο γονίδιο της *D. melanogaster* έχει μέγεθος περίπου 6500bp και οι βακτηριοφάγοι που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της βιβλιοθήκης έχουν τη δυνατότητα ενσωμάτωσης τμημάτων έως 15kb, θεωρήθηκε δυνατός ο εντοπισμός φαγικών κλώνων που θα περιλαμβάνουν σημαντικά μεγαλύτερη ή και ολόκληρη την αλληλουχία του γονιδίου, αλλά πιθανόν και γειτονικές περιοχές αυτού, που ενδεχομένως να περιλαμβάνουν και την αλληλουχία του υποκινητή. Αν και αρχικά απομονώθηκαν κάποιες φαγικές πλάκες που έδωσαν αγνό σήμα υβριδοποίησης, τελικά κατά τη δευτερογενή διαλογή δεν ανιχνεύθηκε σήμα κάποιας φαγικής πλάκας, ώστε να καταστεί εφικτή η απομόνωση φαγικών κλώνων που υβριδοποιούνταν με τον ανιχνευτή του *sry-a*.

Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να οφείλονταν στο γεγονός πως η γονιδιωματική βιβλιοθήκη που χρησιμοποιήθηκε ήταν προϊόν ενίσχυσης (amplification) της αρχικής βιβλιοθήκης που κατασκευάστηκε και πιθανότατα να υπήρξε μειωμένη αντιπροσώπευση του συνολικού γονιδιώματος του δάκου κατά τη διαλογή. Συνεπώς, μελλοντικά προτείνεται η χρήση της ανάστροφης PCR (inverse PCR), απ' ευθείας σε γονιδιωματικό DNA δάκου. Με αυτόν τον τρόπο θα επιτευχθεί η ενίσχυση της άγνωστης γονιδιωματικής περιοχής εκατέρωθεν του γονιδίου, ώστε στη συνέχεια να αλληλουχηθεί με τελικό στόχο τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του υποκινητή του γονιδίου.

Επιπλέον, για να διερευνηθεί η δομή του γονιδίου πραγματοποιήθηκε *in silico* ανάλυση των διαθέσιμων μεταγραφόμενων αλληλουχιών του γονιδίου *sry-a* του δάκου. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε BLASTX ανάλυση από την οποία προέκυψε ομολογία του *sry-a* του δάκου με το *serendipity-locus* (CG8247) στο συγγενικό είδος *D. melanogaster*. Πρόκειται για ένα *sry-a-like* γονίδιο, που παίζει και αυτό άμεσο ρόλο στη κυτταροποίηση [106], διαθέτοντας παρόμοια πρότυπα έκφρασης με το *sry-a*. Τα αποτελέσματα της *in silico* ανάλυσης έδειξαν πως το ενισχυόμενο προϊόν του γονιδίου με μήτρα cDNA είναι ομόλογο με αλληλουχία του τρίτου εξονίου της *D. melanogaster*. Αντίθετα, τα αποτελέσματα της PCR σε γονιδιωματικό DNA υποδεικνύουν την ύπαρξη ιντρονίου στην περιοχή αυτή της αλληλουχίας του.

Αν και τα δύο είδη εμφανίζουν υψηλή συγγένεια και ομολογία σε αμινοξικό επίπεδο, ωστόσο σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές. Ειδικότερα για γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη, οι Schmid & Tautz (1997) αναφέρουν τον υψηλό ρυθμό εξέλιξης που χαρακτηρίζει τα γονίδια αυτά σε έντομα της οικογένειας Drosophilidae [109]. Επιπλέον αν συνυπολογιστεί ότι το γονιδίωμα του δάκου έχει το διπλάσιο σχεδόν μέγεθος από αυτό της *Drosophila* [111] και επομένως διαφοροποιημένη οργάνωση, ειδικά των μη συντηρημένων μη κωδικών περιοχών, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα πως η δομή του γονιδίου στο δάκο είναι διαφοροποιημένη από αυτή στη *Drosophila*. Η απομόνωση και η αλληλούχηση της πλήρους αλληλουχίας αναμένεται να αποσαφηνίσει τις διαφορές τους ώστε να κατανοηθεί καλύτερα και ο μοριακός μηχανισμός πίσω από το ρόλο τους κατά τη διαδικασία της εμβρυογένεσης.

#### Λειτουργική ανάλυση

Για τη μελέτη των προτύπων έκφρασης του γονιδίου *sry-a* κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, πραγματοποιήθηκε ποσοτική Real-Time PCR σε cDNA εμβρύων δάκου. Συλλέχθηκαν αυγά του εντόμου και διερευνήθηκαν οι διαφορές τους σε επίπεδο mRNA μετά από καθορισμένα χρονικά διαστήματα. Τα χρονικά διαστήματα που επιλέχθηκαν να αναλυθούν αντιπροσωπεύουν ένα ευρύ φάσμα της συνολικής διάρκειας της πρώιμης ανάπτυξης του εντόμου, ώστε μέσα από τη διαδικασία αυτή να καθοριστούν τα στάδια ενεργοποίησης και καταστολής της έκφρασης του γονιδίου. Εξετάζοντας τα επίπεδα μεταγραφής παρατηρήθηκε υψηλή έκφραση του γονιδίου σε δύο συγκεκριμένα χρονικά στάδια, αμέσως μετά τη γονιμοποίηση και την 8η ώρα της εμβρυογένεσης. Από την 9<sup>η</sup> ώρα και μετά η έκφραση του γονιδίου μειώνεται, ενώ είναι μηδενική στο στάδιο του ενήλικου εντόμου.

Στη διαδικασία της κυτταροποίησης, τουλάχιστον οκτώ γονιδιακοί τόποι του ζυγωτού παίζουν καίριο ρόλο [7,2]. Ένας από αυτούς είναι και ο γονιδιακός τόπος του *serendipity-a* [6, 10, 20]. Στη *Drosophila* έχει παρατηρηθεί έκφραση του γονιδίου για μία μόνο ώρα κατά τη διάρκεια της ζωής της μύγας [5]. Το *sry-a* εκφράζεται σε μικρές ποσότητες κατά στον 12<sup>ο</sup> και 13<sup>ο</sup> μιτωτικό κύκλο, τα μέγιστα επίπεδα έκφρασής του εντοπίζονται κατά την κυτταροποίηση (1,5-2,5 ώρες μετά τη γονιμοποίηση) και τελικά χάνεται μέχρι την έναρξη της γαστριδίωσης [10]. Αντίθετα, στη μύγα της Μεσογείου, *C. capitata*, το στάδιο της κυτταροποίησης προσδιορίστηκε στις 9-11 ώρες της εμβρυογένεσης, από τους Gabrieli et al. 2010 [106]. Στην ίδια μελέτη διαπιστώθηκε και η μητρική κληρονομηση του παρόντος γονιδίου, ως ώριμο μετάγραφο, καθώς και η ζυγωτική έκφραση του ως ανώριμο μετάγραφο λίγες ώρες πριν τη κυτταροποίηση (5-8 ώρες). Τα γεγονότα αυτά επιβεβαιώνονται από το φαινόμενο της μετάβασης της



γενετικής πληροφορίας από τα μητρικά στα ζυγωτικά γονίδια (φαινόμενο MTZ) που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης [107]. Ωστόσο, μελέτες έδειξαν πως το *sry-a* δεν παρουσιάζει μητρικά μεταγράφα, αλλά πρόκειται για ένα αποκλειστικά ζυγωτικό γονίδιο [103]. Έτσι, διαπιστώθηκε πως το *sry-a* των Gabrieli et al. 2010, αποτελούσε τελικά το ορθόλογο γονίδιο του *serendipity-locus* της *Drosophila*, το οποίο κληρονομείται μητρικά και με το οποίο παρουσιάζει μεγαλύτερη αμινοξική ομολογία, σε σχέση με το *sry-a* της *Drosophila* [106].

Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω, η παρατηρούμενη έκφραση του γονιδίου *serendipity-locus* στο δάκο αμέσως μετά τη γονιμοποίηση πιθανότατα οφείλεται στην ύπαρξη μητρικών μεταγράφων, τα οποία σταδιακά αποικοδομούνται έως την 4<sup>η</sup> ώρα της εμβρυογένεσης. Η χαμηλή, αλλά όχι μηδενική, συγκέντρωση των μεταγράφων μετά το πέρας των 4 ωρών και μέχρι τις 8 ώρες, σε συνδυασμό με τα παραπάνω, πιθανώς αντιπροσωπεύει τα ανώριμα μεταγράφα του γονιδίου πριν την κυτταροποίηση. Έτσι, η παρατηρούμενη έκφραση του γονιδίου ξανά στις 8 ώρες μετά τη γονιμοποίηση σε υψηλά επίπεδα, πιθανότατα σηματοδοτεί την έναρξη της κυτταροποίησης στο δάκο. Η υπόθεση αυτή συμφωνεί τα δεδομένα του χρονικού καθορισμού του αντίστοιχου σταδίου στη μύγα της Μεσογείου. Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη πως στην *C. capitata* η κυτταροποίηση διαρκεί από την 9<sup>η</sup> έως τη 12<sup>η</sup> ώρα μετά τη γονιμοποίηση, μπορούμε να υποθέσουμε το αντίστοιχο και για την κυτταροποίηση στο δάκο. Σύμφωνα με αυτή την παραδοχή μπορεί να θεωρηθεί η έναρξη της γαστριδίωσης στον δάκο μετά την πάροδο 11 ωρών από τη γονιμοποίηση. Τέλος, ομοίως με τη *Drosophila*, παρατηρείται απουσία του *sry-a-like* γονιδίου στο ενήλικο έντομο, περιορίζοντας έτσι την έκφρασή του κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Εν κατακλείδι, διαπιστώνεται η διατήρηση του προτύπου έκφρασης του γονιδίου και του χρονικού πλαισίου κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, μεταξύ των δύο συγγενικών ειδών.

## 4.2 Προαποπτωτικό γονίδιο *hid*

### Μοριακή ανάλυση

Αντίστοιχα με το *sry-a*, ανακτήθηκαν μεταγραφόμενες αλληλουχίες από δεδομένα RNA-seq [112] με βάση τις οποίες σχεδιάστηκαν ομόλογοι εκκινητές, επιτρέποντας τον εντοπισμό τμήματος του γονιδίου *hid* στο γονιδίωμα του δάκου. Για την ταυτοποίησή του, αρχικά, έγινε προσπάθεια κλωνοποίησης του ενισχυόμενου τμήματος, η οποία όμως δεν ήταν επιτυχής. Αυτό ενδεχομένως να οφειλόνταν στη χαμηλή συγκέντρωση του προϊόντος ενίσχυσης που χρησιμοποιήθηκε ως ένθεμα. Εναλλακτικά θα μπορούσε να αλληλουχηθεί απευθείας το προϊόν ενίσχυσης, χωρίς τη μεσολάβηση της κλωνοποίησης σε πλασμιδιακό φορέα. Κάτι τέτοιο όμως δεν ήταν δυνατόν λόγω της ταυτόχρονης ενίσχυσης πολλαπλών τμημάτων διαφόρων μεγεθών καθιστώντας αδύνατη την απομόνωση της μεμονωμένης επιθυμητής ζώνης βάσει του αναμενόμενου μεγέθους. Συνεπώς, καθίσταται απαραίτητη η βελτιστοποίηση της PCR και της αντίδρασης σύνδεσης ώστε να επιτευχθεί τελικά η κλωνοποίηση.

Επιπλέον, ως εναλλακτική προσέγγιση για την ταυτοποίηση του γονιδίου πραγματοποιήθηκε υβριδοποίηση με ετερόλογο ανιχνευτή. Για τη δημιουργία του ανιχνευτή επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί το συγγενικό είδος *An. ludens* που ανήκει στην οικογένεια Tephritidae όπως και ο δάκος. Ωστόσο από τη διαδικασία αυτή δεν ήταν εφικτή η ανίχνευση κάποιου σήματος στη μεμβράνη. Ακόμα και μετά από αποχρωματισμό της μεμβράνης και επανάληψη της εμφάνισης σήματος ώστε να ελεγχθεί η ποιότητα των αντιδραστηρίων, δεν παρατηρήθηκε σήμα υβριδοποίησης του ανιχνευτή με κάποια ζώνη. Συνεπώς, προτείνεται η επανάληψη της υβριδοποίησης κατά Southern με τον ετερόλογο ανιχνευτή σε λιγότερο αυστηρές συνθήκες, ώστε να επιτραπεί η υβριδοποίησή του. Επιπρόσθετα, μπορεί να πιθανολογηθεί η παρεμβολή ιντρονίου στο τμήμα του ανιχνευτή που χρησιμοποιήθηκε, λαμβάνοντας υπόψη ότι η PCR για την ενίσχυσή του έγινε σε γονιδιωματικό DNA της *An. ludens*. Το γεγονός αυτό

μπορεί να δώσει μια επιπλέον πιθανή εξήγηση για την απουσία σήματος μετά την υβριδοποίηση.

Για να διερευνηθεί η δομή του γονιδίου, πραγματοποιήθηκε *in silico* ανάλυση της διαθέσιμης μεταγραφόμενης αλληλουχίας, του γονιδίου *hid* του δάκου. Για το σκοπό αυτό, αναζητήθηκε η ομολογία της με την αλληλουχία του *hid* στο συγγενικό είδος *D. melanogaster* μέσω BLASTX. Από την *in silico* ανάλυση προέκυψε ότι το προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου εμφανίζει ομολογία με τμηματικές αλληλουχίες του δεύτερου, τρίτου και τέταρτου εξονίου του ορθόλογου γονιδίου της *D. melanogaster*. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν την ύπαρξη δυνητικών ιντρονίων στην αντίστοιχη γονιδιωματική περιοχή του *hid* του δάκου, εφόσον στην ομόλογη αλληλουχία της *Drosophila* παρεμβάλλονται δύο ιντρόνια μεγέθους 674bp και 1967bp αντίστοιχα. Σύμφωνα με τα παραπάνω, το ενισχυόμενο τμήμα στην PCR του γονιδιωματικού DNA πιθανότατα να είναι μεγαλύτερου μεγέθους από τις 750bp που αναμενόταν βάσει σχεδιασμού από τη μεταγραφόμενη αλληλουχία. Για την αποτελεσματική ενίσχυση του γονιδίου, λοιπόν, απαιτείται σχεδίαση νέων ομόλογων εκκινήτων που θα υβριδοποιούνται σε περιοχές των εξονίων σύμφωνα με την προτεινόμενη οργάνωση του γονιδίου.

### Λειτουργική ανάλυση

Ομοίως με το *sry-a*, για τη μελέτη των προτύπων έκφρασης του γονιδίου *hid* κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης πραγματοποιήθηκε ποσοτική Real-Time PCR σε cDNA εμβρύων δάκου, στα ίδια καθορισμένα χρονικά διαστήματα. Από την ανάλυση των επιπέδων μεταγραφής παρατηρήθηκε έκφραση του γονιδίου από τις 8 ώρες της ανάπτυξης και μετά. Τα επίπεδα έκφρασης παρέμειναν χαμηλά ως τις 10 ώρες και από τις 11 ώρες και μετά παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης των μεταγράφων με μέγιστη στις 18 ώρες.

Στη *Drosophila*, το γονίδιο *hid* αρχίζει να εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα από το στάδιο του συγκυτιακού βλαστοδέρματος, αυξάνεται στο στάδιο της γαστριδίωσης και η έκφρασή του συνεχίζει σε όλη την εμβρυογένεση [110]. Επιπλέον, η έκφραση του γονιδίου είναι υψηλή και κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης της προνύμφης (larva) σε νύμφη (pupa) [23]. Στη *Drosophila*, το στάδιο της γαστριδίωσης ξεκινά τρεις ώρες μετά τη γονιμοποίηση, ενώ στην *C. capitata* μετά την 11<sup>η</sup> ώρα της πρώιμης εμβρυογένεσης. Επιπλέον, σύμφωνα με την υπόθεση μας από την ανάλυση του γονιδίου *sry-a*, η κυτταροποίηση στο δάκο οριοθετείται μεταξύ 8<sup>ης</sup> και 12<sup>ης</sup> ώρας της πρώιμης εμβρυογένεσης. Έτσι λοιπόν, από τα αποτελέσματα της λειτουργικής ανάλυσης του *hid* μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα πως η 15<sup>η</sup> ώρα από τη στιγμή της γονιμοποίησης, όπου σημειώνεται και η μέγιστη έκφραση του *hid*, σηματοδοτεί το στάδιο της γαστριδίωσης. Με βάση λοιπόν, την αποδοχή των παραπάνω υποθέσεων είναι εφικτός ο προσδιορισμός των χρονικού προτύπου εμφάνισης των κύριων σταδίων της εμβρυογένεσης στο δάκο.

### **Συμπερασματικά**

Τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα αποτέλεσαν τα πρώτα στοιχεία, σε επίπεδο γονιδιώματος, για την ταυτοποίηση και ανάλυση γονιδίων που εμπλέκονται στην εμβρυογένεση και στη διαδικασία της απόπτωσης του δάκου στο συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο του κύκλου ζωής του. Μελλοντικά, στα πλαίσια της λειτουργικής ανάλυσης, οι αλληλουχίες που μελετήθηκαν πρέπει να εξεταστούν περαιτέρω σε επίπεδο τρανσκριπτόματος για να υπολογιστούν τα ποσοστά έκφρασης σε επιπλέον χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Επίσης θα πρέπει να ληφθεί υπόψη κατά τη συλλογή των δειγμάτων, η επιλογή των αυγών που προέρχονται από την ίδια μητέρα, ώστε να ελαχιστοποιηθούν τα φαινόμενα μητρικής δράσης στα αποτελέσματα έκφρασης των δύο γονιδίων, ειδικότερα όσον αφορά το γονίδιο *sry-a*.

Περαιτέρω ανάλυση των γονιδίων του δάκου που εξετάστηκαν, καθώς και άλλων που εμπλέκονται τόσο στην απόπτωση, όσο και στην εμβρυογένεση, σε συνδυασμό με πιο στοχευμένες πειραματικές διαδικασίες βάσει των δεδομένων και των παρατηρήσεων που προέκυψαν, θα συνεισφέρουν στην ανάπτυξη των πρώτων εργαλείων για την

επίτευξη της δημιουργίας ενός συστήματος αντίστοιχου του FSEL στο δάκο, ώστε να τελικά να αναπτυχθούν νέες εναλλακτικές και εξειδικευμένες τεχνικές ελέγχου των συνεχώς αυξανόμενων πληθυσμών του.



# Παράρτημα

## Χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν

A) Οι αλληλουχίες των ομόλογων και ετερόλογων εκκινητών, οι θερμοκρασίες  $T_{an}$  και το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος κατά την ενίσχυση του γονιδιωματικού DNA με PCR.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή	$T_{an}$	Αριθμός κύκλων PCR	Μέγεθος αναμενόμενου προϊόντος
Sry- $\alpha_1$ F/R	F: AAT CAG CGC ATT ATG TC R: GCT TTT ATT CTG CGA TG	48°C	20	111bp
Hid-Bo F/R	F: CAG CCC CTC ACC ATA TAC AGG R: CAT CGC GTA ACA AGG AAG CC	55°C	30	758bp
Hid-AI F <sub>2</sub> /R <sub>2</sub>	F: CCT TCC AGT ATC CAC CAC C R: GCA CAT CCT TTT TCT TCT TAC G	47°C	35	669bp

B) Οι αλληλουχίες των ομόλογων εκκινητών, οι θερμοκρασίες  $T_{an}$  και το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος κατά την ενίσχυση του γονιδιωματικού DNA με Real-Time PCR (qPCR).

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή	$T_{an}$	Αριθμός κύκλων PCR	Μέγεθος αναμενόμενου προϊόντος
<b>Sry-qRT-F<sub>1</sub>/R<sub>1</sub></b>	F: GTG CGG TAA GCG ATT CCA R: CGA CAC TGC CTG AAC TGA	55°C	40	118bp
<b>Sry-qRT-F<sub>2</sub>/R<sub>2</sub></b>	F: GAT AGT ATA GAA CCG AGC ATT TG R: GTT ACC ACG CAT GGA ATC G	55°C	40	98bp
<b>Hid-qRT-F<sub>1</sub>/R<sub>1</sub></b>	F: GAT TGC ATC GTA GCC TCT CA R: AAA CGG TCA TCG AAC TCA TC	55°C	40	120bp
<b>Hid-qRT-F<sub>2</sub>/R<sub>2</sub></b>	F: ATG AGT TCG ATG ACC GTT TC R: ATG GCT TCT TCT CTG ACT TTG	55°C	40	125bp

Γ) Οι μεταγραφόμενες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των γονιδίων *sry-a* και *hid* του *B. oleae*, όπως προέκυψαν από την RNAseq ανάλυση των κεφαλιών και την αναζήτηση στη βάση δεδομένων [112]

#### ***sry-a* partial mRNA sequences**

- GCAATCAGCGCATTATGTCAAAAGGCTTTCGCGAGAATGCACTGGATTTC AACAGGAATGTCAAAGCAATTTGAACTCATACGAACTAATAATTGGCATCGCAGAATAAAAGCAATCGCACTGGGAGCCTCTA
- CAGTATATACTAGATAGTATAGAACCGAGCATTTCGAGCATATTGTATCGCAATGAAACCGATGTATTTACGCCACGTAGGCGTGCGGTAAGCGATTCCATGCGTGGTAACTATTCTAAATGTTCAATATTTCAAAACGATAAAGTGCTATCAAATACAAAATTAACGATGGCGCGCAAATCAGTTCAGGCAGTGTGCGAGTAGTAGCACTGGCAGCAGTATGCGTCGGAAAGAAAGTTTTCGTACAGTGATGTTTAAAGCGTCAAAAATCTGCAGAGACACAGAAATTTGTAATTTTTATTGCAAAATTCGGCCAGTTTGCAAATTCGGAAATACTAGATCAATTGACGGAGATATCTGGTAAACAGCCGAACGCAACACAAGAACATTTACTGAACACCTCGATAATGGAATAGATAATTCTACTGCAACTTTAAATATTA AAAAAAAAAATCTCTAATTGTAAGTGTTCGCGCCTATGCAATCTAAAAATATCTATCTATAGCTTATTTATATTGTAAGTATAACTTTGATATGCTAATTTTCGTTTCGTAATTTTTAAATATTGATGTGATATTTGAAACCTTATTATTTTATTATTTAAATACCAATAATTGTTTCAGAGTCGTCGTTAATATTTTCAACAACAATAAGTATTGTATTGTGATCTTTATAACTGCTCTTTCTTAAGATTTATACAACCTCTCCTTATACTAATAAGCTCTACAAATTGTGTACGCGTATGCGTTAATTCTTGGTACATTGGCAGCCATATTTTGTACTTTTCGTTATATATTTGGAATAAAAAATACGTTT

#### ***hid* partial mRNA sequence**

- CTACCGCCTCCAGTATCCCCGCCAGCCAGTCCATGCTGTCAAGTCCACAGCCCCTCACCATATACAGGTA GCGGCGGCGGCAGCGGTCCTGCTGGTGCCGGTGTGCGCAATGGCGAAGTATTCTCCCACTCAGTCTTAGTACACCACGTACTCCGCGCACCAAGTGTGAGTTATGCTGCTGGCGAAGAGAATACCTTCTTCGTCATCACATATCAGTGGCGGTTGCAGCAGCGGATCACACCTACAACCACCGCAATCGGCACCACCCATGCCATCGAGTAGTCACAATGGTGCACATAGTCAACCAGCGCCACAACAACAATACCAACCATATCCATATTATCAATATACACCACCGCCGACACCGCTCACCGCCAATGCAAGCACCTGCACCGGCAACGTATTTCGGTGCAGCGGAAGCGACAACGCACCAACGCGGTTGTGTGGCAACAGCGTCGACATCAACATCGACGACCTCGTGTGGCATGAGCGGACATTCGCGATTGCATCGTAGCCTCTCAGATGCACAAAAGCGCTCGCGTCGTACATCAACCACCAACGATGATGAACGCGAATATCATAGCGAGCATGAGACCAGCTGGGATGAGTTTCGATGACCGTTTCGATAATTTTACAGCCGGCCGTGAACGTTTACAGGAATTTAATGGACGAATACCGCCACGAAAGAAGAAAAAGGATGTGCCAAAATCAAAGTCAGAGAAGAAGCCATTCAAGGGCTTCATCTGGCCCACTGTCGTACAGTCATCGTTGTTGCAATGGGTTGTGGCTTCCTTGTACGCGATGAGTGCACCAAATGTGAAGCTCGTGCAGCAACAGCCGCA GCTATACTTACAATTTAAAAAGCAAGCAACAGTAAAGCAATGCAAAAAAATATTTACTTAAAGAATAATAATAAAAAATAAATAAATTTTGAGCAAAAATATTA AAAAAACAAAGCACAAATGAAAAGTGTAAAAACA GCCAGAACGC

# Βιβλιογραφία

1. Karr TL, Alberts BM (1986) Organization of the cytoskeleton in early *Drosophila* embryo, *J Cell Bio* 110,1494-1509
2. Wieschaus E, Sweeton D (1988) Requirements for X-linked zygotic gene activity during cellularization of early *Drosophila* embryos, *Development* 104, 483-494
3. Warn RM, Magrath R, Webb S (1984) Distribution of F-actin during cleavage of the *Drosophila* syncytial blastoderm, *J Cell Biol* 98, 156-162
4. Fullilove and Jacobson (1971) Nuclear elongation and cytokinesis in *Drosophila* Montana, *Dew Bio* 126, 560-577
5. Schweisguth F, Vincent A, Lepesant JA (1991) Genetic analysis of the cellularization of the *Drosophila* embryo, *Biol Cell* 72, 15-23
6. Mazumdar A, Mazumdar M (2002) How one becomes many: blastoderm cellularization in *Drosophila melanogaster*, *Bioessays* 24, 1012-22
7. Merrill PT, Sweeton D, Wieschans E (1988) Requirements for autosomal gene activity during precellular stages of *Drosophila melanogaster*, *Development* 104, 495-510
8. Slack J.M.W. (Jonathan Mickael Wyndham) (1949) *Essential Developmental Biology*
9. Warn RM, Warn A (1986) Microtubule arrays present during the syncytial and cellular blastoderm stages of the early *Drosophila* embryo, *Exp Cell Res*. 163, 201-10
10. Schweisguth F (1989) The *serendipity alpha* gene encodes a membrane-associated protein required for the cellularization of the *Drosophila* embryo, *Genes Dev* 4, 922-931
11. Sanders EJ (1975) Aspects of furrow membrane formation in the cleaving *Drosophila* embryo, *Cell Tiss Res* 156, 463-474
12. Turner FT, Mahowald AP (1976) Scanning electron microscopy of *Drosophila* embryogenesis, *Dev. Biol.* 50, 95-108
13. Rice TB, Garen A (1975) Localized defects of blastoderm formation in maternal effect mutants of *Drosophila*, *Dev. Biol.* 43, 277-286
14. Zalokar M, Audit C, Erk I (1975) Developmental defects of female-sterile mutants of *Drosophila melanogaster*, *Dev. Biol.* 47,419-432
15. Schiipbach T, Wieschaus E (1989) Female-sterile mutations on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. I. Maternal effect mutations, *Genetics* 121, 101 - 117
16. Pesacreta TC, Byers TJ, Dubreuil R, Kiehart DP, Branton D (1989) *Drosophila* spectrin: The membrane skeleton during embryogenesis, *J. Cell Biol.* 108, 1697-1709
17. Miller KG, Field CM, Alberts BM (1989) AcUn.binding proteins from *Drosophila* embryos: a complex network of interacting proteins detected by F-actin affinity chromatography, *J Cell Biol* 109, 2963-2975
18. Vincent A, Colot HV, Rosbash M (1985) Sequence and structure of the *serendipity locus* of *Drosophila melanogaster*. A densely transcribed region including a blastoderm-specific gene, *J Mol Biol* 186, 149-66
19. Bordier C (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution, *J Biol Chem* 256, 1604-7
20. Ibsouda S, Schweisguth F, de Billy G, Vincent A (1993) Relationship between expression of *serendipity a* and cellularisation of the *Drosophila* embryo as revealed by interspecific transformation, *Development* 119, 471-483
21. Song Z and Steller H (1999) Death by desing: mechanism and control of apoptosis, *Trends in Cell Biology* 9, 49-52
22. Alberts B, Johnson H, Raff L, Walter R (2003) *Essential Cell Biology*, 2<sup>nd</sup> edition, Garland Science, Taylor and Francis Group
23. Schetelig MF, Nirmala X, Handler AM (2011) Pro-apoptotic cell death genes, hid and reaper, from the tephritid pest species, *Anastrepha suspensa*, *Apoptosis* 16,759-768
24. Behura SK, Haugen M, Flannery E, Sarro J, Tessier CR, Severson DW, Scheel MD (2011) Comparative Genomic Analysis of *Drosophila melanogaster* and Vector Mosquito Developmental Genes, *PLoS ONE* 6, e21504
25. Sandu C, Ryoo HD, Steller H (2010) *Drosophila* IAP antagonists form multimeric complexes to promote cell death, *J Cell Biol.* 190, 1039-52
26. Yoo SJ, Huh JR, Muro I (2002) Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms. *Nat Cell Biol* 4, 416-424
27. Bryant B, Blair CD, Olson KE, Clem RJ (2008) Annotation and expression profiling of apoptosis-related genes in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 38, 331-345

28. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer* 26, 239
29. Thornberry **NA** and Lazebnik **Y** (1998) Caspases: enemies within, *Science* 281,1312-6
30. Shi Y, (2002), Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis, *Mol. Cell.*9, 459–470
31. Bergmann A, AY Yang, Srivastava M (2003) Regulators of **IAP** function: coming to grips with the **grim reaper**, *Curr. Opin. Cell Biol.*15, 717–724
32. Vucic D, Kaiser WJ, Miller LK (1998) Inhibitor of apoptosis proteins physically interact with and block apoptosis induced by Drosophila proteins HID and GRIM, *Mol. Cell. Biol.*18, 3300–3309
33. Clavería C, Caminero E, Martínez-A C, Campuzano S, Torres M (2002) GH3, a novel proapoptotic domain in Drosophila Grim, promotes a mitochondrial death pathway, *EMBO J.* 21, 3327–3336
34. Grether ME, Abrams JM, Agapite J (1995) The **head involution defective** gene of **Drosophila melanogaster** functions in programmed cell death, *Genes Dev.* 1995 9, 1694-1708
35. Bilak A, Su TT (2009) Regulation of **Drosophila melanogaster** pro-apoptotic gene **hid**, *Apoptosis* 14, 943–949
36. Miller DT, Cagan RL (1998) Local induction of patterning and programmed cell death in the developing Drosophila retina, *Development* 125, 2327–2335
37. Sawamoto K, Taguchi A, Hirota Y, Yamada C, Jin M, Okano H (1998) Argos induces programmed cell death in the developing Drosophila eye by inhibition of the Ras pathway, *Cell Death Differ* 5, 548
38. Baker NE, Yu SY (2001) The EGF receptor defines domains of cell cycle progression and survival to regulate cell number in the developing Drosophila eye, *Cell.*104, 699–708
39. Yu SY, Yoo SJ, Yang L (2002) A pathway of signals regulating effector and initiator caspases in the developing Drosophila eye, *Development* 129, 3269–3278
40. Bergmann A, Tugentman M, Shilo BZ, Steller H (2002) Regulation of cell number by MAPK-dependent control of apoptosis: a mechanism for trophic survival signaling, *Dev Cell.*2, 159–170
41. Bergmann A, Agapite J, McCall K, Steller H (1998) The Drosophila gene **hid** is a direct molecular target of Ras-dependent survival signaling, *Cell* 95, 331-341
42. Udan RS, Kango-Singh M, Nolo R, Tao C, Halder G (2003) **Hippo** promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway, *Nat Cell Biol* 5, 914–920
43. Jiang C, Lamblin AF, Steller H, Thummel CS (2000) A steroid-triggered transcriptional hierarchy controls salivary gland cell death during Drosophila metamorphosis, *Mol Cell* 5, 445–455
44. Tanaka-Matakatsu M, Xu J, Cheng L, Du W (2009) Regulation of apoptosis of *rdf* mutant cells during Drosophila development, *Dev Biol* 326, 347-356
45. Leaman D, Chen PY, Fak J (2005) Antisense-mediated depletion reveals essential and specific functions of microRNAs in Drosophila development, *Cell.* 121, 1097–1108
46. Wilke ABB, Nimmo DD, John OS, Kojin BB, Capurro ML, Marrelli MT (2009) Mini-review: Genetic enhancements to the sterile insect technique to control mosquito populations, *AsPac Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 17, 65-74
47. Morrison NI, Franz G, Koukidou M, Miller TA, Saccone G, Alphey LS, Beech CJ, Nagaraju J, Simmons GS, Polito LC (2010) REVIEW Genetic improvements to the sterile insect technique for agricultural pests, *AsPac Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 18(2), 275-295
48. Knipling EF (1955) Possibilities of Insect Control or Eradication Through the Use of Sexually Sterile Males, *Journal of Economic Entomology* 48, 459-462
49. Serebrovskii AS (1940) On the possibility of a new method of insect control, *Zoologicheskii zbornal* 19, 618-630
50. Dorta DM, Vasuki V, Rajavel A (1993) Evaluation of organophosphorus and synthetic pyrethroid insecticides against six vector mosquito species, *Revista de Saude Publica* 27, 391-7
51. Dyck VA, Hendrichs J (2005) Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management
52. Bushland RC, Lindquist AW, Knipling EF (1955) Eradication of Screw-Worms through release of sterilized males, *Science* 122, 287-8
53. Iannotta N, Noce ME, Ripa V, Scalercio S, Vizzarri V (2007) Assessment of susceptibility of olive cultivars to the **Bactrocera oleae** (Gmelin, 1790) and *Camarosporium dalmaticum*



- (Thum.) Zachos & Tzav.-Klon attacks in Calabria (Southern Italy), J. Environ. Sci. Health Part B42, 789–93
54. Augustinos AA, Stratikopoulos EE, Zacharopoulou A, Mathiopoulou KD (2002) Polymorphic microsatellite markers in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, Mol. Ecol. Notes2, 278–80
  55. Nardi F, Carapelli A, Dallai R, Frati F (2003) The mitochondrial genome of the olive fruit fly *Bactrocera oleae*: two haplotypes from distant geographical locations, Insect Mol. Biol.12, 605–11
  56. Nardi F, Carapelli A, Dallai R, Roderick GK, Frati F (2005) Population structure and colonization history of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae), Mol. Ecol.14, 2729–38
  57. Rice RE, Phillips PA, Stewart-Leslie J, Sibbett GS (2003) Olive fruit fly populations measured in central and southern California, Calif. Agric.57, 122–27
  58. Kent MD, MW Johnson (2009) Olive Fruit Fly: Managing and Ancient Pest in Modern Times, Annu. Rev. Entomol. 55, 151–69
  59. Delucchi V (1957) Les parasites de la mouche des olives, Entomophaga2, 107–18
  60. Fletcher BS (1987) The biology of dacine fruit flies, Annu. Rev. Entomol.32, 115–44
  61. Fletcher BS, Kapatos ET (1983) The influence of temperature, diet and olive fruits on the maturation rates of female olive flies at different times of the year, Entomol, Exp. Appl.33, 244–52
  62. Fletcher BS, Pappas S, Kapatos E (1978) Changes in ovaries of olive flies (*Dacus oleae*(Gmelin)) during summer, and their relationship to temperature, humidity and fruit availability, Ecol. Entomol.3, 99–107
  63. Neuenschwander P, Michelakis S (1979) Determination of the lower thermal thresholds and day-degree requirements for eggs and larvae of *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera: Tephritidae) under field conditions in Crete, Greece, Bull. Soc. Entomol. Suisse52, 57–74
  64. Tsiropoulos GJ (1977) Reproduction and survival of adult *Dacus oleae* feeding on pollens and honeydews (Diptera: Tephritidae), Environ. Entomol.6, 390–92
  65. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, Biotechnology. 24, 17-27
  66. Bartlett JMS, Stirling D (2003) A Short History of the Polymerase Chain Reaction, PCR Protocols 226, 3–6
  67. Wimmer E (2005) Eco-friendly insect management, Nat. Biotech 23, 432-433
  68. Hendrichs J, Kenmore P, Robinson A, Vreysen M (2007) Area-wide integrated pest management (AW-IPM): Principles, practice and prospects. In Area-Wide Control of Insect Pests: From Research to Field Implementation, M. Veysen, A. Robinson and J. Hendrichs eds. (Dordrecht, The Netherlands, Springer)
  69. Atkinson PW, Michel K (2002) What's buzzing? Mosquito genomics and transgenic mosquitoes, Genesis 32, 42-8
  70. Alphey L (2002) Re-engineering the sterile insect technique, Insect Biochem Mol Biol. 32, 1243-7
  71. Marrelli MT, Moreira CK, Kelly D, Alphey L, Jacobs-Lorena M (2006) Mosquito transgenesis: what is the fitness cost?, Trends Parasitol 22, 197-202
  72. Caceres C (2002) Mass rearing of temperature sensitive genetic sexing strains in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*), Genetica 116, 107-16
  73. Seawright JA, Kaiser PE, Dame DA, Lofgren CS (1978) Genetic method for the preferential elimination of females of anopheles albimanus, Science 200, 1303-4
  74. Robinson A, Franz G, Fisher K (1999) Genetic sexing strains in the medfly, *Ceratitis capitata*: Development, mass rearing and field application, Trends Ent. 2, 81-104
  75. Hendrichs J, Franz G, Rendon P (1995) Increased effectiveness and applicability of the SIT through male-only release for control of Mediterranean fruit-fly
  76. Whitten M, Foster G (1975) Genetical methods of pest control, Annu. Rev. Entomol. 20, 461-476
  77. Gossen M, Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 5547–5551
  78. Thomas, DD, Donnelly CA, Wood RJ, Alphey LS (2000) Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system, Science (New York, N.Y.), 287, 2474–2476
  79. Reuss, FF (1809) Mem. Soc. Imperiale Naturalistes de Moscow 2, 327
  80. Neuenschwander P, Michelakis S (1978) Infestation of *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae) at harvest time and its influence on yield and quality of olive oil in Crete, J Appl Entomol 86, 420-33

81. Fletcher BE, Economopoulos AP (1976) Dispersal of normal and irradiated laboratory strains and wild strains of olive fly *Dacus oleae* in an olive grove. *Entomol. Exp. Appl.* 20, 183–194.
82. Denholm I, Rowald MW (1992) Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: theory and practice, *Annu Rev Entomol* 37, 91-112
83. Vossen P, Varela L, Devarenne A (2005) Olive Fruit Fly. University of California Cooperative Extension
84. Daane KM, Johnson MW (2010) Olive fruit fly: Managing an ancient pest in modern times, *Annu Rev Entomol* 55, 151-169
85. André Barretto Bruno Wilke, Marrelli MT (2012) Genetic control of mosquitoes: population suppression strategies, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 54, 287-292
86. Whitten M (1969) Automated sexing of pupae and its usefulness in control by sterile insects, *J Econ Entomol* 62, 272-273
87. Alphey L (2007) Engineering insects for the Sterile Insect Technique. In *Area-wide control of insects pests: from research to field implementation* (Vreysen, M, Robinson A and Hendrichs, J, eds.), Springer, Dordrecht, The Netherlands, 51-60
88. Campos-Ortega JA, Hartenstein V (1997) *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*, Berlin/Heidelberg: Springer Verlag
89. Bate M and Martinez Arias, A (1993) *The Development of Drosophila melanogaster*, vols 1, 2. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
90. Wang SL, Hawkins CJ, Yoo SJ, Muller H-AJ, Hay BA (1999) The *Drosophila* caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID, *Cell*. 98 453–463
91. Muro I, Hay BA, Clem RJ (2002) The *Drosophila* DIAP1 protein is required to prevent accumulation of a continuously generated, processed form of the apical caspase DRONC, *J Biol Chem*. 277, 49644–49650
92. Dorstyn L, Mills K, Lazebnik Y, Kumar S (2004) The two cytochrome c species, DC3 and DC4, are not required for caspase activation and apoptosis in *Drosophila* cells, *J Cell Biol*. 167, 405–410.
93. Means JC, Muro I, Clem RJ (2006) Lack of involvement of mitochondrial factors in caspase activation in a *Drosophila* cell-free system, *Cell Death Differ*. 13, 1222–1234
94. Mendes CS, Arama E, Brown S, Scherr H, Srivastava M, Bergmann A, Steller H, Mollereau B (2006) Cytochrome c-d regulates developmental apoptosis in the *Drosophila retina*, *EMBO Rep*. 7, 933–939
95. Arama E, Agapite J, Steller H (2003) Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in *Drosophila*. *Dev Cell*. 4, 687–697.
96. Hendricks J, Franz G, Rendo P (1995) Increased effectiveness and applicability of Sterile Insect Technique through male-only releases for control of Mediterranean fruit flies during fruiting seasons, *J Appl Entomol* 119, 371-377
97. Meats A, Maheswaran P, Frommer M, Sved J (2002) Towards a male-only release system for SIT with the Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni*, using a genetic sexing strain with a temperature-sensitive lethal mutation, *Genetica* 116, 97-106
98. Franz G (2002) Recombination between homologous autosomes in medfly (*Ceratitis capitata*) males: type-1 recombination and the implications for the stability of genetic sexing strains, *Genetica* 116, 73-84
99. Ogaugwu Ch, Schetelig Marc F, Wimmer Ernst A (2012) Transgenic sexing system for *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) based on female-specific embryonic lethality, *Insect Bioch. And Mol Biology* 43, 1-8
100. Ant T, Koukidou M, Rempoulakis P, Gong HF, Economopoulos A, Vontas J (2012) Control of the olive fruit fly using genetics-enhanced sterile insect technique. *BMC Biol*. 10, 51
101. Economopoulos AP, Zervas GA (1982) The quality problem in olive flies produced for SIT experiments. Invited, *International Symposium on the SIT and the use of radiation in genetic insect control*. IAEA STI/PUB/592, 357–368
102. Economopoulos AP, Avtzis N, Zervas G, Tsitsipis J, Haniotakis G, Tsiropoulos G, Manoukas A (1977) Control of the olive fly, *Dacus oleae* (Gmelin), by the combined effect of insecticides and release of gamma sterilized insects. *Z. angew. Entomol*. 83, 201–215.
103. Schetelig MF, Caceres C, Zacharopoulou A, Franz G, Wimmer EA (2009) Conditional embryonic lethality to improve the sterile insect technique in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), *BMC Biol*. 7,4
104. Fu G, Condon KC, Epton MJ, Gong P, Jin L, Condon GC, Morrison NI, Dafa'alla TH, Alphey L (2007) Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing, *Nat Biotechnol* 25, 353-7

105. Wael Tadros and Howard D. Lipshitz (2009) The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts, *Development* 136, 3033-3042
106. Paolo Gabrieli, Andrea Falaguerra, Paolo Siciliano, Ludvik M Gomulski, Francesca Scolari, Antigone Zacharopoulou, Gerald Franz, Anna R Malacrida, Giuliano Gasperi (2010) Sex and the single embryo: early development in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*, *Developmental Biology* 10, 12
107. Gouw JW, Pinkse MW, Vos HR, Moshkin Y, Verrijzer CP, Heck AJ, Krijgsveld J (2009) In vivo stable isotope labeling of fruit flies reveals post-transcriptional regulation in the maternal-to-zygotic transition, *Mol Cell Proteomics* 8, 1566-1578
108. Liang HL, Nien CY, Liu HY, Metzstein MM, Kirov N, Rushlow C (2008) The zinc finger protein Zelda is a key activator of the early zygotic genome in *Drosophila*, *Nature* 456, 400-403
109. Schmid, K.J., Tautz, D (1997) A screen for fast evolving genes from *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 9746--9750
110. Fisher, B, Weiszmann, R., Frise, E, Hammonds, A, Tomancak, P, Beaton, A, Berman, B, Quan, E, Shu, S, Lewis, S, Rubin, G, Barale, C, Laguertas, E, Quinn, J, Ghosh, A, Hartenstein, V, Ashburner, M, Celniker, S (2012) BDGP *in situ* homepage (<http://insitu.fruitfly.org/cgi-bin/ex/insitu.pl>)
111. KT Tsoumani, KD Mathiopoulos (2012) Genome size estimation with quantitative real-time PCR in two Tephritidae species: *Ceratitidis capitata* and *Bactrocera oleae*. *Journal of Applied Entomology* 136, 626-631
112. Pavlidi 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
113. MF, Horn C, Handler AM, Wimmer EA (2007) Development of an embryonic lethality system for SIT in *Ceratitidis capitata*. *Area-wide Control of Insect Pests: from Research to Field Implementation* Dordrecht, Netherlands SpringerVreysen MJB, Robinson AS, Hendrichs J 2007, 85-93

