

Θέμα διπλωματικής εργασίας

Μελέτη του ρόλου του γονιδίου *lingerer* στο αναπαραγωγικό σύστημα του δάκου της ελιάς

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής | Λάρισα 2018 | Λέανδρος Τσιώτος



Θέμα διπλωματικής εργασίας:

«Μελέτη του ρόλου του γονιδίου *lingerer*
στο αναπαραγωγικό σύστημα του δάκου της ελιάς»

«Investigation of the *lingerer*'s gene role
in the reproductive system of the olive fly»

Λέανδρος Τσιώτος
Λάρισα 2018

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το διάστημα Φεβρουαρίου 2018 – Σεπτεμβρίου 2018 υπό την επίβλεψη του κ. Κ. Ματθιόπουλου, καθηγητή Μοριακής Βιολογίας και της κ. Μ. Ε. Γρηγορίου, μεταδιδάκτορα του εργαστηρίου.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

Γιακουντής Αντώνιος: Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας – Γονιδιωματικής

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

Ευχαριστίες

Ένας κύκλος φθάνει στο τέλος του. Θα αρχίσει ένας άλλος; Ποιος ξέρει... Σε κάθε τέλος αξίζει ένας απολογισμός, ένα ευχαριστώ σε όλους αυτούς που έζησαν μαζί σου το ταξίδι. Δε θα με δείτε να κρίνω την επιστήμη και τις γνώσεις του καθένα, αλλά θα μιλήσω για τον άνθρωπο, χωρίς να ξεκινήσω εθιμοτυπικά.

Μαριλένα, ευχαριστώ. Ένας άνθρωπος ώριμος αλλά με καρδιά μικρού και αθώου παιδιού, που ξέρει να εκτιμά και να την εκτιμούν. Μία αυτοδημιούργητη πηγή έμπνευσης, ηρεμίας και χαμόγελου. Ευχαριστώ για τις όμορφες στιγμές που περάσαμε στο εργαστήριο, τις ανησυχίες, τα γέλια (όταν έβαλα λίγο παραπάνω ladder), τις στεναχώριες (περιμένοντας τους δάκους). Ευχαριστώ που ήσουν δίπλα μου και με στήριξες με όσες δυνάμεις μπορούσες.

Κύριε Ματθιόπουλε, ευχαριστώ. Άνθρωπος με περίσσεια δυνάμεων και φυσικού χαμόγελου. Καθημερινός αγωνιστής για να είμαστε όλοι ευχαριστημένοι και χαρούμενοι σε μία πορεία έρευνας, γνώσης και έμπνευσης. Ευχαριστώ που μου δώσατε την ευκαιρία να ζήσω και να εργαστώ σε ένα τόσο φιλικό και ανθρώπινο περιβάλλον, που ήσασταν πάντα εκεί για όποια απορία γεμάτος διάθεση για δουλειά.

Κύριε Γιακουντή, ευχαριστώ. Άνθρωπος με ισχυρή προσωπικότητα και άπειρη όρεξη να ακούσει, να συζητήσει και να βοηθήσει με κάθε μέσο οποιαδήποτε ώρα και στιγμή. Ευχαριστώ για όλη τη βοήθεια και τις γνώσεις που μου παρείχατε σε όλη αυτή την πορεία και γίνατε μέλος της τριμελούς επιτροπής (σίγουρα -2 ερωτήσεις).

Κυρία Τσουμάνη (ή Κωνσταντίνα πλέον;), ευχαριστώ. Ένας άνθρωπος με χαμόγελο, ένας άνθρωπος-μηχανή (μάτι-φωτόμετρο και όχι μόνο) με πηγαία έμπνευση για πειράματα, γέλιο, δημιουργία αλλά ταυτόχρονα σοβαρότητα. Ευχαριστώ για όλες τις ωραίες στιγμές, όλες τις συμβουλές και πάνω από όλα την απίστευτη ενέργεια που μεταδίδετε και ενεργοποιείτε τους γύρω σας καθώς και που γίνατε μέλος της τριμελούς επιτροπής.

Λευτέρη (υποψήφιε), Αλέξανδρε, Κατερίνα, Αλεξάνδρα, Νίκο ευχαριστώ. Οι καθημερινοί άνθρωποι του εργαστηρίου, απορίες, νεύρα, χαρές, γέλια τα περάσαμε όλα μαζί και ήταν όλοι εκεί. Βασιλική, ευχαριστώ. Ατελείωτες ώρες με το φίλο-δάκο, ατελείωτες αποσυμπίεσεις, ατελείωτες ώρες γέλιου και κλάματος. Ευχαριστώ για όλη την παρέα και τη βοήθεια...άδραξαμε τη μέρα.

Ευχαριστώ τους γονείς μου Τόνια και Τάκη, τον αδελφό μου Δημήτρη αλλά και όλη την υπόλοιπη οικογένειά μου για την πνευματική και υλική στήριξή τους καθόλη τη διάρκεια των σπουδών μου και όχι μόνο. Ευχαριστώ όλους τους κοντινούς μου ανθρώπους και φίλους για όλα τα όνειρα, τις ανησυχίες, τις χαρές και τις λύπες που μοιραστήκαμε όλα αυτά τα χρόνια. Τα καλύτερα έρχονται...άβε

“ Τη φωτιά της δημιουργίας τη συντηρούν οι ανυπόταχτοι, οι ανικανοποίητοι, οι τυχωδιώχτες της ψυχής και του πνεύματος, οι άνθρωποι που τους σέρνει το πλεονέκτημα των δυνάμεών τους πιο μακριά απ’ τους ορίζοντες και πιο ψηλά απ’ το επίπεδο του πλήθους.

Χρειαζόμαστε μερικές ταραγμένες ψυχές...

”

Γ. Θεοτοκάς – Οι ακοίμητες συνειδήσεις, Ελεύθερο πνεύμα

Περίληψη

Η επιβίωση των εντόμων είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με το αναπαραγωγικό σύστημα και την ανάπτυξή τους. Το θηλυκό έντομο διαδραματίζει ιδιαιτέρως καθοριστικό ρόλο σε όλη τη διάρκεια της ζωής των εντόμων καθώς παρέχει το κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξη των αυγών ενώ παράλληλα καθορίζει τα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής διαδικασίας. Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας στο δάκο της ελιάς, *Bactrocera oleae*, εντοπίστηκε το γονίδιο *lingerer* το οποίο φαίνεται να συμμετέχει στις δυο αυτές βασικές λειτουργίες.

Σε μια προσπάθεια ανάλυσης του γονιδίου αυτού, καθορίστηκε το προφίλ έκφρασης του σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου. Η μεγαλύτερη έκφραση παρατηρήθηκε κατά την πέμπτη ώρα της εμβρυογένεσης. Επίσης, καθορίστηκε το προφίλ έκφρασης δυο γνωστών γονιδίων με ρόλο στην ανάπτυξη, τα *sry-a* και *hid* και συγκρίθηκε με το προφίλ έκφρασης του γονιδίου *lingerer*. Τέλος, καθορίστηκε το προφίλ έκφρασης του γονιδίου στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα και συγκεκριμένα στους βοηθητικούς αδένες (FAGs). Οι βοηθητικοί αδένες του αναπαραγωγικού συστήματος είναι υπεύθυνοι για την έκκριση ουσιών για την ομαλή περάτωση της αναπαραγωγής. Το γονίδιο *lingerer* παρουσίασε μεγαλύτερη έκφραση κατά την πέμπτη ημέρα της ζωής του εντόμου υποδεικνύοντας ότι είναι πιθανό να προετοιμάζει το θηλυκό για τη σεξουαλική του ωρίμανση και την επικείμενη σύζευξη. Γονίδια που συμμετέχουν σε αυτές τις λειτουργίες μπορούν να αναδειχθούν ως γονίδια στόχοι για την ανάπτυξη εναλλακτικών, φιλικών προς το περιβάλλον, μεθόδων αντιμετώπισης και πληθυσμιακού ελέγχου του δάκου της ελιάς.

Abstract

Insect survival rate is inseparably linked to reproduction and development. Specifically, the female insect has an important role for the insect's life as it supplies the appropriate environment for the first embryonic developmental stages. A gene that was reported previously in the laboratory and seems to participate in both reproduction and development is *lingerer*. To further analyze *lingerer* gene, the expression profile for all the developmental stages was determined. The highest expression was observed at the 5 hour of embryogenesis. Moreover, the expression profiles of two well-known embryonic genes was determined, *sry-a* and *hid* and was compared with the expression profile of *lingerer* gene. Finally, the expression profile of the *lingerer* gene for the female accessory glands was, also, determined. The accessory glands are responsible for the production of secretions important for the reproductive activity. The *lingerer* gene showed highest expression level at the 5th day of the adult life. This may indicate that plays a role in the sexual maturation of the female insect. Genes that participate in this function could be possible targets for the development of alternative, environmentally friendly, control methods for the olive fly.

Περιεχόμενα

1 Εισαγωγή	14
1.1 Το αναπαραγωγικό σύστημα του θηλυκού εντόμου.....	15
1.1.1 Η δομή και ο ρόλος	15
1.1.2 Η ωογένεση και η γονιμοποίηση.....	17
1.1.3 Η ωοαπόθεση	19
1.2 Αναπτυξιακά στάδια του οργανισμού μοντέλου, <i>Drosophila melanogaster</i>	19
1.2.1 Πρώιμη ανάπτυξη.....	19
1.2.2 Ο μητρικός έλεγχος της ανάπτυξης.....	22
1.2.3 Η γένεση των γονάδων του θηλυκού	25
1.3 <i>Serendipity alpha (sry-a)</i> : ο ρυθμιστής της κυτταροποίησης	26
1.4 <i>Head involution defective (hid)</i> : ο ρυθμιστής της απόπτωσης	28
1.5 <i>lingerer</i> : ένα γονίδιο με ποικίλους ρόλους.....	30
1.5.1 Ο ρόλος του <i>lingerer</i> στη σύζευξη και την αναπαραγωγή	31
1.5.2 Ο ρόλος του <i>lingerer</i> στη μνήμη.....	32
1.5.3 Ο ρόλος του <i>lingerer</i> στην ωογένεση και την ανάπτυξη ιστών και οργάνων	33
1.6 <i>Bactrocera oleae</i> : ο σημαντικότερος εχθρός της ελιάς	35
2 Σκοπός	37
3 Υλικά & Μέθοδοι	39
3.1 Εκτροφή εργαστηριακού πληθυσμού δάκου, <i>Bactrocera oleae</i>	41
3.2 Απομόνωση RNA (RNA extraction).....	41
3.3 Εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων με φαινόλη/χλωροφόρμιο	42
3.4 Επεξεργασία με DNάση (DNase treatment).....	43
3.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR – Polymerase Chain Reaction) .	43
3.5.1 Συμβατική PCR.....	43
3.5.2 Σύνθεση cDNA με PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR – Reverse Transcription PCR).....	46
3.5.3 PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)	47
3.6 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (gel electrophoresis).....	49
3.7 Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction)	50
3.8 <i>In vitro</i> μεταγραφή (<i>In vitro</i> transcription)	51
4 Αποτελέσματα	53

4.1 Ανάλυση της έκφρασης του γονιδίων <i>lingerer</i> , <i>hid</i> και <i>sry-a</i>	55
4.1.2 Προφίλ έκφρασης του γονιδίου <i>lingerer</i>	56
4.2.2 Προφίλ έκφρασης των γονιδίων <i>sry-α</i> και <i>hid</i>	58
4.2 Δημιουργία dsRNA για την παροδική σίγηση του γονιδίου <i>lingerer</i>	59
5 Συζήτηση	61
6 Παράρτημα	69
6.1 Αλληλουχία cDNA του γονιδίου <i>lingerer</i>	71
6.2 Πρωτεϊνική αλληλουχία του γονιδίου <i>lingerer</i>	73
6.3 Αλληλουχία cDNA του γονιδίου <i>sry-α</i>	74
6.4 Αλληλουχία cDNA του γονιδίου <i>hid</i>	75
7 Βιβλιογραφία	76



1



Εισαγωγή



Το 90% ενός παγόβουνου βρίσκεται υπό το νερό και είναι αυτό που το στηρίζει. Αν παρομοιάσουμε το έμβρυο με ένα παγόβουνο, μπορούμε έμμεσα να πούμε ότι η μητέρα είναι αυτή που βρίσκεται υπό το νερό. Η μητέρα, σε όλα τα φάσματα της ζωής, είναι δίπλα μας και σιωπηλά, υπό την επιφάνεια, μας διαμορφώνει. Ένας κύκλος ξενικά, από τις δομές της μητέρας μέχρι την πλήρη ανάπτυξη του εμβρύου, τη μεταμόρφωση του εντόμου και πάλι τη γένεση του θηλυκού. Ο αέναος κύκλος της ζωής, μέσω της αναπαραγωγής και της ανάπτυξης, κρίσιμος για τη μεταβίβαση όλων των χαρακτήρων στην επόμενη γενιά.

1.1 Το αναπαραγωγικό σύστημα του θηλυκού εντόμου

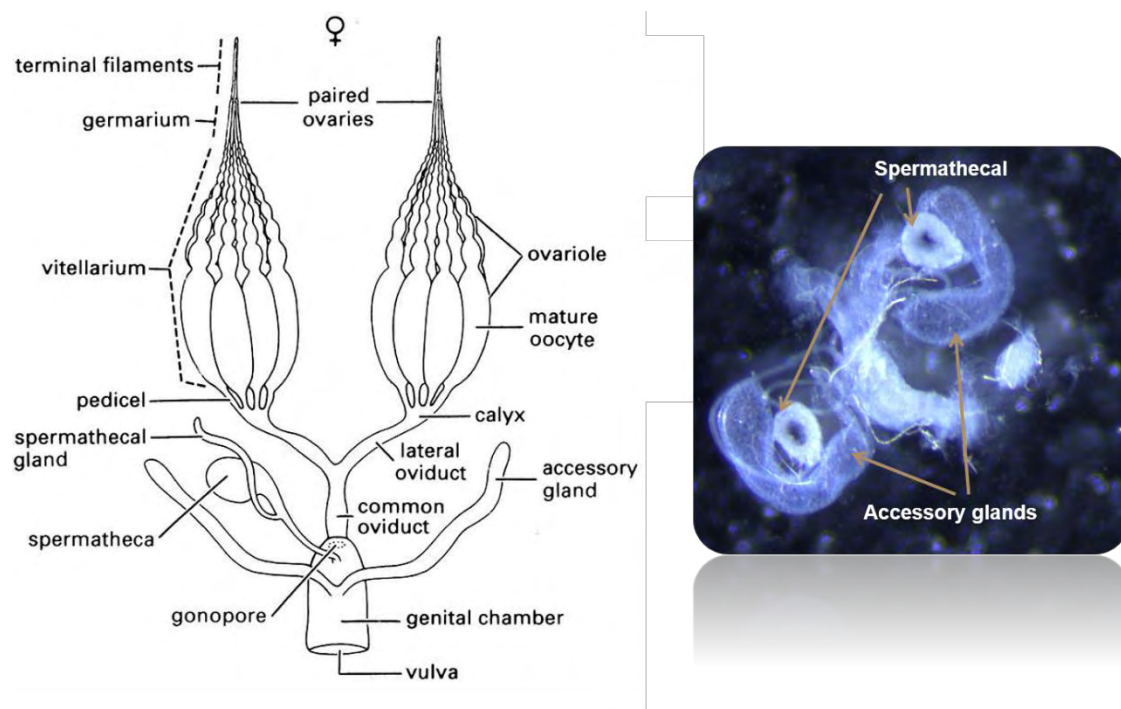
Η βιοποικιλότητα των εντόμων συνάδει με την ποικιλομορφία του αναπαραγωγικού συστήματος τους, διατηρώντας όμως, μία βασική δομή και λειτουργία. Εστιάζοντας στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα, οι κύριες λειτουργίες του είναι η ωοπαραγωγή και η γονιμοποίηση (Gullan and Cranston, 2010).

1.1.1 Η δομή και ο ρόλος

Το θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα αποτελείται αρχικά, από το κύριο όργανο παραγωγής των ωαρίων, τις δύο ωοθήκες. Οι ωοθήκες απελευθερώνουν τα ώριμα ωάρια στους πλευρικούς αγωγούς οι οποίοι ενώνονται για να δημιουργήσουν έναν κοινό αγωγό, τη μήτρα. Το άνοιγμα της μήτρας, ονομάζεται γονοπόρος και καταλήγει στο σχηματισμό του γεννητικού θαλάμου. Δύο τύποι εξωδερμικών αδένων ανοίγουν εντός του γεννητικού θαλάμου. Ο πρώτος αδένας είναι η σπερματοθήκη, πρόκειται για ένα σάκο που αποθηκεύει σπερματοζωάρια από την στιγμή της σύζευξης μέχρι να απελευθερωθούν για να γονιμοποιήσουν ένα ωάριο. Ο δεύτερος τύπος εξωδερμικών αδένων αποτελεί τους βοηθητικούς ή κολλητήριους αδένες του θηλυκού εντόμου. Ο ρόλος των βοηθητικών αδένων είναι η παραγωγή μίας ποικιλίας ουσιών που παίζουν ρόλο στη διατήρηση και τη μεταφορά του σπέρματος ώστε να πραγματοποιηθεί η γονιμοποίηση καθώς και την προστασία των ωαρίων. Μπορούν να παράξουν μία κολλώδη ουσία που καλύπτει το ωάριο και βοηθά στην προσκόλλησή του στο υπόστρωμα ωοτοκίας. Τέλος, ο εξωτερικός γεννητικός οπλισμός του θηλυκού εντόμου ονομάζεται ωοθέτης και χρησιμεύει στην ωαπόθεση των αυγών σε κατάλληλες θέσεις (Εικόνα 1.1) (Resh and Carde, 2009, Gullan and Cranston, 2010).

Θηλυκοί βοηθητικοί αδένες. Παρόλο που ολόκληρο το αναπαραγωγικό σύστημα του θηλυκού είναι θεμελιώδες για την απόδοση της αναπαραγωγής, ορισμένες πλευρές της κατασκευής και της λειτουργίας του, όπως η δομή και η λειτουργία των βοηθητικών αδένων παραμένουν ακόμα ασαφείς. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και οι λειτουργίες των θηλυκών βοηθητικών αδένων παρουσιάζουν μία μεγάλη μεταβλητότητα και προσαρμοστικότητα ανάμεσα στα έντομα (Laghezza Masci et al., 2015). Ο κύριος ρόλος των βοηθητικών αδένων του αναπαραγωγικού συστήματος, είναι η έκκριση ουσιών με στόχο την συντήρηση και τη μεταφορά του σπέρματος καθώς και τη γονιμοποίηση. Η

αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των εκκρινόμενων ουσιών αποτελεί σημείο – κλειδί για τη διαμόρφωση της ποικιλομορφίας των συστημάτων σύζευξης (Resh and Carde, 2009).



Εικόνα 1.1 Η δομή του αναπαραγωγικού συστήματος των θηλυκών εντόμων (Gullan and Cranston, 2010). Δεξιά: Η σπερματοθήκη και οι βοηθητικοί αδένες στο έντομο *Bactrocera oleae*

Ο ρόλος των ουσιών που εκκρίνονται από τους αρσενικούς βοηθητικούς αδένες έχει μελετηθεί εκτενέστερα σε διάφορα έντομα όπως διάφορα *Drosophilidae* (Findlay et al., 2008; Findlay et al., 2009), στα κουνούπια φορείς ασθενειών όπως *Anopheles gambiae* (Dottorini et al., 2007) and *Aedes aegypti* (Sirota et al., 2009), και σε διαφορα Tephritidae fruit flies όπως *Ceratitis capitata* (Miyatake et al., 1999; Papanikolaou et al., 2016) και *Bactrocera cucurbitae* (Kuba and Itô 1993). Παρ' όλ' αυτά λίγες είναι οι πληροφορίες για τα εκκρίματα των θηλυκών βοηθητικών αδένων.

Οι βοηθητικοί αδένες του θηλυκού εντόμου της *Ceratitis capitata*, παράγουν αντιμικροβιακές ουσίες και πεπτίδια, όπως η ceratotoxin A (Marchini et al., 1991, 1993, Manetti et al., 1997). Αυτά τα πεπτίδια δεν παράγονται ως απόκριση σε τραύμα, αλλά εμφανίζονται σε σεξουαλικά ώριμες μύγες και δρουν ενάντια σε Gram – θετικά και αρνητικά βακτήρια, συμπεριλαμβανομένης της *Escherichia coli* (Rosetto et al., 1996) με στόχο την προστασία των ωοποθέντων αυγών ενάντια αυτών των βακτηρίων. Εκτός από αυτές τις ουσίες, οι θηλυκές μύγες της Μεσογείου παράγουν ένζυμα, που μεταβολίζουν τη χιτίνη και φαίνεται να διευκολύνουν τη γονιμοποίηση (Marchini et al., 1989). Σε ένα άλλο δίπτερο έντομο, στη μύγα του σπιτιού, *Musca domestica*, οι αδένες αυτοί παράγουν εκκρινόμενες ουσίες που προκαλούν τη σύσπαση των ωαγωγών κατά τη διάρκεια της ωοαπόθεσης (Wagner et al., 1993) και συνεισφέρουν στη διαδικασία της γονιμοποίησης. Συγκεκριμένα, οι εκκρινόμενες ουσίες φαίνεται να συμμετέχουν στην ακροσωμική αντίδραση κατά την οποία απελευθερώνονται υδρολυτικά ένζυμα από το πρόσθιο τμήμα της κεφαλής του σπερματοζωαρίου με αποτέλεσμα τη διέλευση του σπερματοζωαρίου στο εξωτερικό περιβάλλον του αυγού (Degrugillier, 1985).

Επίσης στους θηλυκούς βοηθητικούς αδένες εντοπίστηκε και η παραγωγή ορμονομιμητικών μορίων τα οποία ρυθμίζουν τις λειτουργίες της αναπαραγωγής (Resh and Carde, 2009). Βοηθητικοί αδένες της *Lutzomyia longipalpis* παράγουν φερομόνες που διεγείρουν ή αναστέλλουν την ωοαπόθεση (Dougherty et al., 1992) ενώ αυτοί της σκνίπας (sandfly) *Phlebotomus papatasi*, εκκρίνουν την πρωτεΐνη PhraLIP με δράση λιπάσης και αντιμικροβιακές ιδιότητες (Rosetto et al., 2003, Belardinelli et al., 2005). Τέλος, είναι πιθανό οι εκκρίσεις των θηλυκών βοηθητικών αδένων να διασπών εκκριτικές ουσίες που βρίσκονται στο σπερματικό υγρό των αρσενικών ώστε να δημιουργούν θρεπτικές ενώσεις.

1.1.2 Η ωογένεση και η γονιμοποίηση

Κάθε ωοθήκη αποτελείται από μία ομάδα ωοφόρων σωλήνων, τα ωοθηκάρια (ovarioles), όπου παράγονται τα ωάρια. Κάθε ωοθηκάριο διακρίνεται σε τρεις ζώνες, το αρχικό νήμα, το germarium, που περιέχει μία ομάδα κυττάρων από τα οποία διαφοροποιούνται τα ωοκύτταρα και τα τροφικά κύτταρα, το vitellarium, που περιέχει τα αναπτυσσόμενα ωοκύτταρα, σε μία γραμμή το ένα μετά το άλλο, και τα τροφικά κύτταρα, και έναν βλαστό (pedicel - stalk). Τα πιο νέα ωοκύτταρα εντοπίζονται κοντά την κορυφή του germarium ενώ τα πιο ώριμα κοντά στο βλαστό (Resh and Carde, 2009, Gullan and Cranston, 2010).

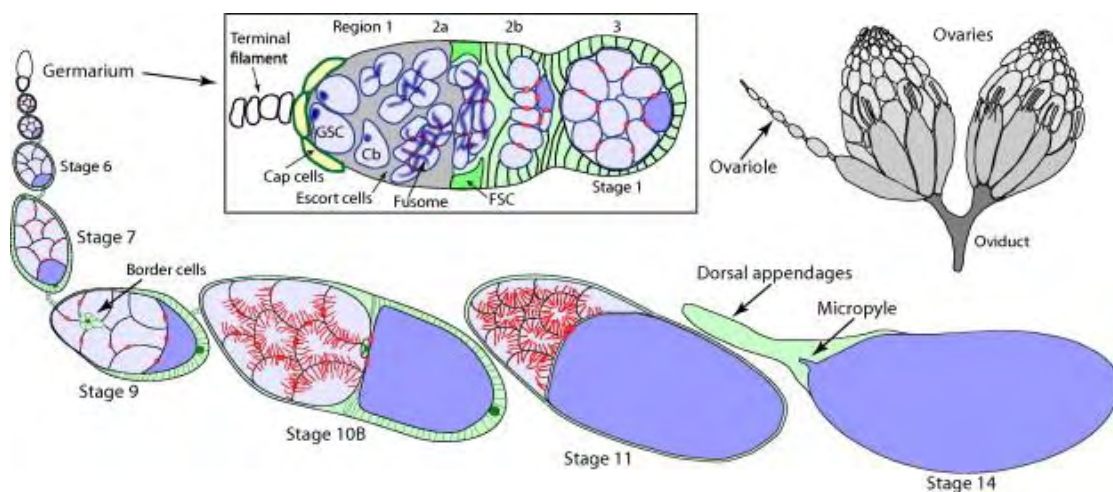
Η διαδικασία σχηματισμού των ωαρίων, των θηλυκών γαμετών, ονομάζεται ωογένεση (oogenesis) και εξελίσσεται ως μία σειρά γεγονότων μέσα από 14 μορφολογικά διακριτά στάδια από την πρόσθια προς την οπίσθια κατεύθυνση (Spradling, 1993, Lasko et al., 1994) (Εικόνα 1.2). Με βάση το έντομο οργανισμό-μοντέλο, *Drosophila melanogaster*, κάθε ένα από τα περίπου 18 ωοθηκάρια των ωοθηκών του εντόμου μπορεί να θεωρηθεί ως μία σειρά παραγωγής ωαρίων. Κατά την έναρξη της ωογένεσης (στάδιο 1), βλαστοκύτταρα της γαμετικής σειράς (germ line stem cells) από το πρόσθιο άκρο κάθε ωοθηκαρίου διαιρούνται ασύμμετρα ώστε να παραχθούν ένα νέο βλαστοκύτταρο και ένα θυγατρικό κύτταρο το οποίο αρχίζει να διαφοροποιείται. Αυτό το κύτταρο (γαμετικό κύτταρο) υπόκειται σε τέσσερις μιτωτικές διαιρέσεις με ημιτελή κυτταροκίνηση προς σχηματισμό μίας κύστης 16 κυττάρων (cystocytes) τα οποία διασυνδέονται με κυτταροπλασματικές γέφυρες, γνωστές ως κανάλια-κρίκοι. Ένα από τα 16 κύτταρα θα διαφοροποιηθεί ως ωοκύτταρο (oocyte) και τα υπόλοιπα 15 θα γίνουν πολυπλοειδή τροφικά κύτταρα (nurse cells) για την παροχή θρεπτικών συστατικών προς το ωοκύτταρο. Τα τροφικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από υψηλή ενεργότητα μεταγραφής και μετάφρασης. Τα mRNAs και οι πρωτεΐνες που παράγονται μεταφέρονται στο αναπτυσσόμενο ωοκύτταρο από τα στάδια 1-8 της ωογένεσης (διάρκειας 2 ημερών). Καθώς τα κύτταρα μεταναστεύουν μέσα από το germarium αρχίζουν να περιβάλλονται από ένα στρώμα σωματικών ωοθυλακικών κυττάρων (follicular cells), τα οποία διαδραματίζουν κομβικό ρόλο σε μονοπάτια σηματοδότησης που αφορούν τον καθορισμό της πολικότητας του ωοκυττάρου. Τα ωοθυλακικά κύτταρα εκκρίνουν τόσο βιντελλική μεμβράνη όσο και το χόριο που αποτελεί το εξωτερικό περίβλημα του αυγού. Ολόκληρο το σύμπλεγμα ωοκυττάρου-τροφικών και ωοθυλακικών κυττάρων σχηματίζουν μία κατασκευή, το θάλαμο του ωαρίου (egg chamber), η οποία υπαγορεύει όλους τους άξονες συμμετρίας του εμβρύου. Το ωοκύτταρο αποκτά την πιο οπίσθια θέση στο θάλαμο του ωαρίου, καθορίζοντας το μελλοντικό εμπροσθοπίσθιο άξονα του εμβρύου, ενώ ο πυρήνας μεταναστεύει στο μελλοντικό πρόσθιο και ραχιαίο τμήμα του εμβρύου. Στο στάδιο αυτό είναι εμφανής μία ασύμμετρη κατανομή

mRNAs και πρωτεϊνών μέσα στο ωκύτταρο. Τα στάδια 8 έως 10A, διάρκειας συνολικά 12 ωρών, χαρακτηρίζονται από δραματική αύξηση της μεταγραφής των τροφικών κυττάρων και παραγωγής λεκίθου με αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση του μεγέθους του ωκυττάρου. Κατά το τέλος της ωγένεσης (στάδια 10B-12 διάρκειας 6 ωρών), τα τροφικά κύτταρα μεταφέρουν όλα τα κυτταροπλασματικά τους συστατικά στο ωκύτταρο και αρχίζουν να υπόκεινται απόπτωση. Το ωκύτταρο έχει πλέον αποκτήσει εμφανή πολικότητα (στάδια 13-14) και στο οπίσθιο άκρο του σχηματίζεται το κοκκώδες πολικό πλάσμα (pole plasm) από το οποίο αργότερα θα διαφοροποιηθούν τα κύτταρα της αναπαραγωγικής σειράς (Tadros et al., 2005, Bastock et al., 2008, Lasko, 2016, Johnstone and Lasko, 2001).

Στο τελευταίο στάδιο της ωγένεσης (στάδιο 14), το οποίο αναφέρεται ως ωρίμανση του ωκυττάρου (oocyte maturation), το ωκύτταρο απελευθερώνεται από την πρόφαση I ενώ ακινητοποιείται στη μετάφαση I της μείωσης μέχρι να ενεργοποιηθεί και να παραχθούν τα πλήρως ανεπτυγμένα ωάρια. Η αρχική ακινητοποίηση στην πρόφαση I φαίνεται να απαιτείται για την παραγωγή ώριμων γαμετών όταν οι συνθήκες είναι κατάλληλες, όπως η ύπαρξη διαθέσιμου συντρόφου (Tadros et al., 2005, Bastock et al., 2008).

Καθώς το ωκύτταρο διέρχεται μέσα από τη μήτρα, γονιμοποιείται από το σπέρμα που είναι ήδη αποθηκευμένο στη σπερματοθήκη. Αισθητήριои υποδοχείς του ωαγωγού ενεργοποιούνται μηχανικά από τη διάταση που προκαλεί το ωκύτταρο καθώς διέρχεται. Η ταυτόχρονη ενεργοποίηση κινητήριων νευρώνων των μυϊκών τοιχωμάτων της σπερματοθήκης επιτρέπουν στο σπέρμα να εξέλθει. Το σπερματοζωάριο εισέρχεται από το εμπρόσθιο άκρο του ωκυττάρου, από μία οπή του χορίου που ονομάζεται μικροπύλη. Η είσοδός του και η μετέπειτα ωοαπόθεση επιτρέπει στο ωκύτταρο να ολοκληρώσει τη μείωση (Resh and Carde, 2009).

*Αξίζει να αναφερθεί ότι ο όρος «ωάριο» δε χρησιμοποιείται με μεγάλη ακρίβεια και μπορεί να αναφέρεται στα ωκύτταρα, στα γονιμοποιημένα ωάρια, ακόμη και στο έμβρυο κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια (Slack, 2014).



Εικόνα 1.2 Μία συνοπτική παρουσίαση της ωγένεσης στη θηλυκή *Drosophila melanogaster*. Κάθε ωθήκη αποτελείται από δύο ωθήκες (πάνω δεξιά), κάθε μία αποτελούμενη από περίπου 15 ωθηκάρια. Η ωγένεση ξεκινά από το germarium (κεντρικό πλαίσιο) όπου γαμετικά και σωματικά βλαστοκύτταρα (GSC και FSC) διαιρούνται συνεχόμενα ώστε να υποστηρίξουν το σχηματισμό του θύλακα ωαρίου. Ωοθυλακικά κύτταρα με πράσινο χρώμα, τροφικά κύτταρα με ανοιχτό μωβ, ωκύτταρα με σκούρο μωβ και κανάλια-κρίκοι με κόκκινο χρώμα (Hudson and Cooley, 2014)

1.1.3 Η ωοαπόθεση

Η ωοαπόθεση αποτελεί την τελευταία πράξη της αναπαραγωγικής διαδικασίας των εντόμων. Περιλαμβάνει μία σειρά από συμπεριφορικά και φυσιολογικά γεγονότα που ξεκινούν με την κίνηση του ωαρίου (egg) μέσω των ωαγωγών και την τοποθέτησή του σε ένα υπόστρωμα έξω από το σώμα του θηλυκού εντόμου το οποίο θα υποστηρίξει την περαιτέρω ανάπτυξη του αυγού. Η παρουσία ώριμων ωαρίων φαίνεται να πυροδοτεί αλλαγές στη συμπεριφορά του θηλυκού εντόμου ώστε να προσεγγίσει κατάλληλα σημεία ωοαπόθεσης. Οι διαφορές που παρατηρούνται στην σύνθεση και την πολυπλοκότητα της ωοαπόθεσης ανάμεσα σε διαφορετικές ομάδες εντόμων εξαρτάται κυρίως από τις περιβαλλοντικές συνθήκες που σχετίζονται με το υπόστρωμα ωοαπόθεσης (Gullan and Cranston, 2010).

Σε πολλές τάξεις εντόμων δεν διατίθενται ειδικές κατασκευές που σχετίζονται με την ωοαπόθεση, ωστόσο σε μερικές περιπτώσεις, όπως σε Λεπιδόπτερα, Κολεόπτερα και Δίπτερα, τα τελικά τμήματα της κοιλιάς είναι μακρόστενα και μεγεθυμένα, δημιουργώντας τον ωοαποθέτη. Ο ωοαποθέτης είναι εξοπλισμένος με μία σειρά μηχανοϋποδοχέων και λίγων χημειοϋποδοχέων. Τα αισθητήρια σήματα που λαμβάνονται από αυτούς τους υποδοχείς, είναι τόσο οπτικά, όπως το χρώμα ενός φυτού, όσο και χημικά, όπως η παραγωγή πτητικών ενώσεων παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες στα θηλυκά για τον εντοπισμό του σημείου ωοαπόθεσης καθώς και την έναρξή της. Τα σήματα «μεταφράζονται» στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα και ενεργοποιούνται οι κινητικοί νευρώνες της κοιλιάς ώστε να αρχίσουν οι συσπάσεις του ωαγωγού και τελικά να πραγματοποιηθεί η εναπόθεση του αυγού στην κατάλληλη επιφάνεια (Chapman, 2013, Resh and Carde, 2009).

1.2 Αναπτυξιακά στάδια του οργανισμού μοντέλου, *Drosophila melanogaster*

Η μύγα του ξιδιού, *Drosophila melanogaster*, αποτέλεσε έναν από τους πρώτους οργανισμούς του οποίου η ανάπτυξη κατανοήθηκε σε μοριακό επίπεδο. Τόσο, η ωογένεση, που αναφέρθηκε προηγουμένως, όσο και η εμβρυογένεση της *Drosophila*, συντελούν πολύτιμα συστήματα για την μελέτη του εντοπισμού των πρωτεϊνών καθώς η οργάνωση των υλικών στο αυγό είναι καθοριστική για τις μετέπειτα αναπτυξιακές διαδικασίες του εμβρύου.

1.2.1 Πρώιμη ανάπτυξη

Η επιτυχής ανάπτυξη όλων των εμβρύων εξαρτάται από την σωστή και αποτελεσματική διεκπεραίωση κρίσιμων διαδικασιών του ωοκυττάρου. Το ωοκύτταρο είναι επιφορτισμένο με τη μοναδική ικανότητα να συνδυάζει τα δικά του συστατικά καθώς και αυτά του εισερχόμενου σπέρματος ώστε να συμβάλει στη δημιουργία ενός πλήρως λειτουργικού εμβρύου (Mtango et al., 2008). Το έναυσμα για την έναρξη όλων των κυτταρικών και μοριακών γεγονότων που απαιτούνται κατά την εμβρυογένεση συνήθως πραγματοποιείται με τη γονιμοποίηση του ωοκυττάρου, ένα γεγονός που αναφέρεται ως «ενεργοποίηση του ωοκυττάρου» (egg activation) (Tadros et al., 2005).

Αυλάκωση. Η εμβρυογένεση (στάδια 1-4) ξεκινά με την αυλάκωση (cleavage), μία περίοδο 13 γρήγορων σύγχρονων πυρηνικών διαιρέσεων μέσα σε ένα κοινό κυτταρόπλασμα χωρίς

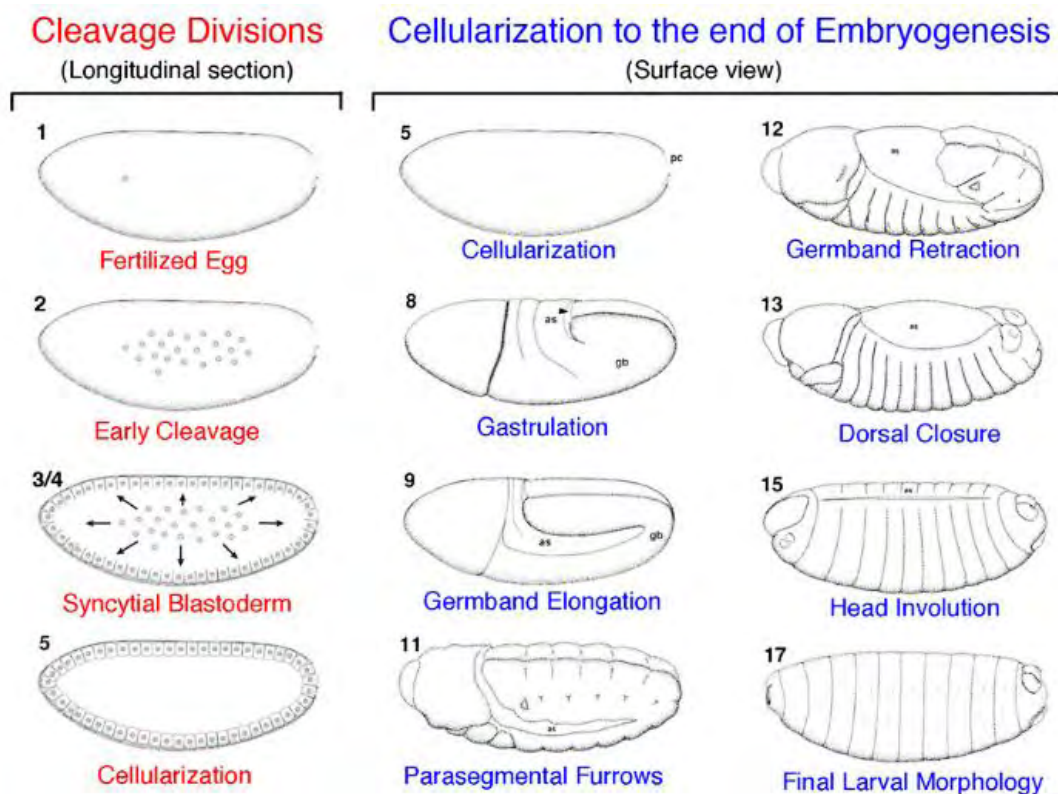
τη δημιουργία νέων κυτταρικών μεμβρανών. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται επιφανειακή αυλάκωση (superficial cleavage) και ολόκληρο το έμβρυο συγκροτεί ένα συγκύτιο (syncytium) όπου πολλοί πυρήνες αιωρούνται σε ένα κοινό κυτταρόπλασμα. Μετά από εννέα διαιρέσεις (στάδια 3 - 4), οι περισσότεροι πυρήνες μεταναστεύουν στην περιφέρεια του εμβρύου, όπου σχηματίζουν το συγκυτιακό βλαστόδερμα (syncytial blastoderm) και στο οπίσθιο άκρο του εμβρύου σχηματίζονται τα πολικά κύτταρα (pole cells) από τα οποία θα προκύψουν αργότερα τα γαμετικά κύτταρα (germ cells). Τρεις ώρες μετά τη γονιμοποίηση και μετά από ακόμη τέσσερις πυρηνικές διαιρέσεις (στάδιο 5), αναπτύσσονται κυτταρικές μεμβράνες από την πλασματική μεμβράνη του εμβρύου προς το εσωτερικό, διαχωρίζοντας τους πυρήνες και σχηματίζοντας το κυτταρικό βλαστόδερμα (cellular blastoderm). Η μετάβαση από το συγκυτιακό στάδιο προς το στάδιο του κυτταρικού βλαστοδέρματος, γνωστή ως «Μετάβαση Μεροβλαστιδίου» (MBT), σηματοδοτεί τη μεταφορά του αναπτυξιακού ελέγχου από το μητρικό στο ζυγωτικό γονιδίωμα.

Γαστριδίωση. Στη συνέχεια, μετά τις τρεις ώρες, το έμβρυο προχωρά σε μία φάση κυτταρικών μεταναστεύσεων και μετακινήσεων ιστών που ονομάζεται γαστριδίωση (gastrulation). Η γαστριδίωση (στάδια 6 - 8) ξεκινά με το σχηματισμό της κοιλιακής αύλακας (ventral furrow) στο μεγαλύτερο μέρος του εμβρύου από την πρόσθια προς την οπίσθια πλευρά του εμβρύου ενώ η κεφαλική αύλακα (cephalic furrow) εμφανίζεται πλευρικά. Ταυτόχρονα με τη γαστριδίωση, η βλαστική ζώνη αρχίζει να επιμηκύνεται, οδηγώντας το οπίσθιο άκρο με τα πολικά κύτταρα στη ραχιαία πλευρά του εμβρύου. Μετά τις τέσσερις ώρες εμφανίζονται οι πρώτοι νευροβλάστες πάνω από την κοιλιακή αύλακα. Κατά τη γαστριδίωση σχηματίζονται οι τρεις βλαστικές στιβάδες (germ layers). Η εξωτερική στιβάδα ονομάζεται εξώδερμα (ectoderm) και θα δώσει γένεση στο δέρμα και το νευρικό σύστημα. Η ενδιάμεση στιβάδα είναι το μεσόδερμα (mesoderm), από το οποίο θα σχηματιστούν οι μύες, ο συνδετικός ιστός, τα εκκριτικά όργανα και οι γονάδες, ενώ από την εσωτερική στιβάδα, το ενδόδερμα (endoderm), θα αναπτυχθούν οι επιθηλιακοί ιστοί του εντέρου. Τα κύτταρα της αναπαραγωγικής σειράς συνήθως σχηματίζονται μέχρι το στάδιο της γαστριδίωσης και δε θεωρείται ότι ανήκουν σε κάποια από τις τρεις βλαστικές στιβάδες.

Εκτεταμένη βλαστική ζώνη. Μετά τον προσδιορισμό των τριών βλαστικών στιβάδων, ακολουθούν δραματικές κινήσεις κυττάρων από το οπίσθιο άκρο προς το πρόσθιο, οι οποίες αναδιαμορφώνουν το πρότυπο του σώματος του εμβρύου. Σε αυτό το στάδιο της εκτεταμένης βλαστικής ζώνης (germ band elongation) (στάδια 9 - 11) λαμβάνουν χώρα η οργανογένεση, ο μεταμερισμός και η νευρογένεση. Για περίπου 5 - 7 ώρες μετά την γονιμοποίηση, τα παραμεταμερή (parasegments) αποτελούν τις θεμελιώδεις μονάδες για την κατασκευή του αρχιτεκτονικού σχεδίου του σώματος. Τα παραμεταμερή δίνουν γένεση στα μεταμερή (segments), μονάδες που εμφανίζονται σε οργανισμούς όταν τα κύρια τμήματα του σώματός τους αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες δομές παρόμοιες μεταξύ τους και στις οποίες συμμετέχουν παράγωγα όλων των βλαστικών στιβάδων. Στις 7,5 ώρες περίπου (στάδιο 12), η βλαστική ζώνη υποχωρεί (germ band retraction), διαχωρίζονται οριστικά τα μεταμερή και σηματοδοτείται η διαφοροποίηση των αρχέγονων οργάνων. Το ραχιαίο κλείσιμο (dorsal closure) της επιδερμίδας λαμβάνει χώρα στις 10 - 11 ώρες (στάδιο 13-15), εκτοπίζοντας τη ραχιαία εξωεμβρυϊκή μεμβράνη ενώ η

κεφαλή αναδιπλώνεται στο εσωτερικό και αρχίζει να ωριμάζει (head involution) (Hales et al., 2015, Campos-Ortega and Hartenstein, 1997, Johnstone and Lasko, 2001) (Εικόνα 1.3).

Η *Drosophila*, αποτελώντας ένα ολομετάβολο έντομο, υφίσταται απότομη και πλήρη μεταμόρφωση. Το αυγό εκκολάπτεται (hatch) και προκύπτει μία προνύμφη (larva) (στάδιο 17), η οποία εμφανίζει δομικές διαφορές από το ενήλικο έντομο. Η προνύμφη αναπτύσσεται περνώντας από τρία στάδια (instars) μεταξύ των οποίων υφίσταται δύο εκδύσεις πριν φτάσει σε ένα στάδιο ηρεμίας. Σε αυτό το στάδιο ονομάζεται νύμφη (pupa) και το μεγαλύτερο μέρος του σώματος της προνύμφης αντικαθίσταται από την αύξηση και τη διαφοροποίηση ορισμένων καταβολών που ονομάζονται δίσκοι ενηλίκου. Από τους δίσκους ενηλίκου προκύπτουν τελικά οι δομές του ενηλίκου ατόμου, όπως τα μάτια, οι πτέρυγες και τα γεννητικά όργανα.



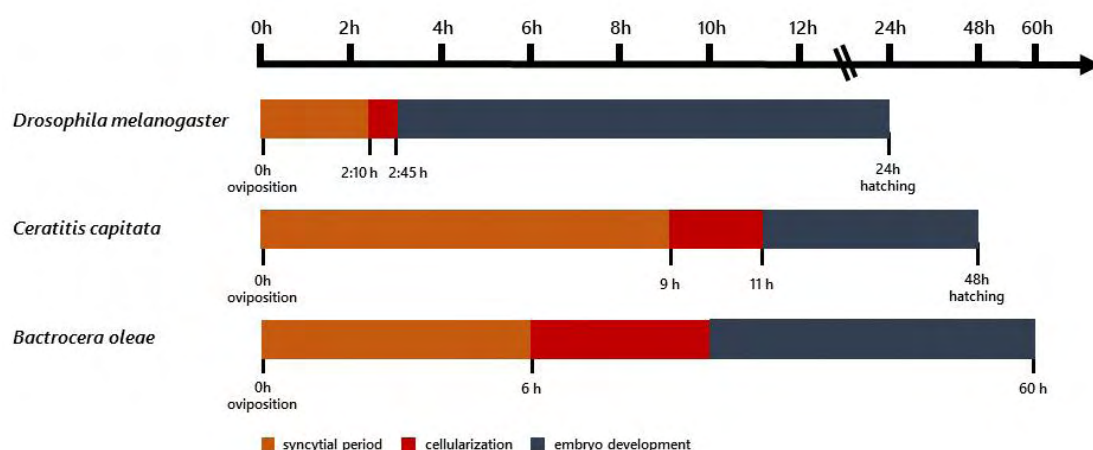
Εικόνα 1.3 Τα στάδια της εμβρυογένεσης στη *Drosophila melanogaster*. Είναι διακριτά τα στάδια της αυλάκωσης (cleavage) καθώς και τα στάδια της κυττατοποίησης (cellularization). Σε κάθε εικονίδιο το πρόσθιο τμήμα βρίσκεται στη δεξιά πλευρά ενώ το ραχιαίο στην πάνω πλευρά (Hartenstein, 1993).

Η ακολουθία των γεγονότων της εμβρυογένεσης είναι συντηρημένη ακόμη για τα πιο απομακρυσμένα συγγενικά είδη μυγών (Tautz et al., 1994, Sander, 1996). Ωστόσο, πέρα από τις ομοιότητες των σταδίων και των μοριακών μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα, δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως οι διαφορές που εμφανίζονται κατά την εμβρυογένεση σε άλλα δίπτερα έντομα. Εκτός από τη *Drosophila*, στην τάξη των δίπτερων εντόμων ανήκουν και έντομα υψίστης οικονομικής σημασίας όπως η μύγα της Μεσογείου *Ceratitis capitata* αλλά και ο δάκος της ελιάς *Bactrocera oleae* που θα αναλυθεί στη συνέχεια. Σε εργαστηριακές συνθήκες θερμοκρασίας (25°C) η ανάπτυξη της *Drosophila* πραγματοποιείται σε λιγότερο από 24 ώρες ενώ η ανάπτυξη της *C. capitata*

πραγματοποιείται στις 48 ώρες και του *B. oleae* στις 65 – 70 ώρες (Gabrieli et al., 2010, Hanife, 2014).

Η διάρκεια των αρχικών σταδίων της εμβρυογένεσης στην *C. capitata* είναι τρεις φορές μεγαλύτερη από αυτή της *Drosophila* (Stefani et al., 2002). Χαρακτηριστικά, το στάδιο κυτταροποίησης του βλαστοδέρματος στη *Drosophila* λαμβάνει χώρα στις 2 ώρες και 10 λεπτά μετά την ωοαπόθεση και ολοκληρώνεται στις 2 ώρες και 45 λεπτά σε αντίθεση με την *C. capitata* στην οποία συμβαίνει μετά από 9 ώρες από την ωοαπόθεση και έχει μεγαλύτερη διάρκεια καθώς ολοκληρώνεται στις 11 ώρες.

Όσον αφορά το *B. oleae*, μελέτες σε οπτικό μικροσκόπιο *in vivo* έδειξαν ότι η εμβρυογένεση διαχωρίζεται σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο αφορά την ωρίμανση του ωοκυττάρου και τον σχηματισμό του ζυγωτού και διαρκεί περίπου 15 – 20 λεπτά μετά την ωοαπόθεση ξεκινώντας με την αυλάκωση. Στο δεύτερο στάδιο λαμβάνει χώρα ο σχηματισμός του βλαστοδέρματος και η γαστριδίωση. Η κυτταροποίηση του βλαστοδέρματος αρχίζει 6 ώρες μετά την ωοαπόθεση ενώ τα πολικά κύτταρα είναι εμφανή στο οπίσθιο άκρο του αυγού. 10 ώρες μετά την ωοαπόθεση, μία στιβάδα κυττάρων καλύπτει την περίμετρο, σηματοδοτώντας το σχηματισμό του βλαστοδέρματος. Το τρίτο στάδιο είναι το στάδιο της οργανογένεσης. Περίπου στις 60 ώρες μετά την ωοαπόθεση έχει ολοκληρωθεί η ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, τα στομάχι και το τραχειακό σύστημα (Hanife, 2014).



Εικόνα 1.4 Σχηματική απεικόνιση της γονιδιακής έκφρασης κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης στην *D. melanogaster*, τη *C. capitata* και το *B. oleae*. Απεικονίζονται συγκριτικά τα βασικά στάδια της εμβρυογένεσης των τριών ειδών, η περίοδος του συγκυτιακού βλαστοδέρματος (πορτοκαλί χρώμα), η κυτταροποίηση (κόκκινο χρώμα) και η συνέχεια της εμβρυογένεσης (γκρι χρώμα) (Gabrieli et al., 2010, Hanife, 2014 – τροποποιημένη).

1.2.2 Ο μητρικός έλεγχος της ανάπτυξης

Ορισμένα πρώιμα αναπτυξιακά γεγονότα εξαρτώνται από τη γενετική σύσταση της μητέρας και όχι από του ίδιου του εμβρύου. Ο μητρικός έλεγχος της ανάπτυξης δεν σταματά στη γονιμοποίηση καθώς το γονιδίωμα του εμβρύου (ζυγωτικό γονιδίωμα) παραμένει ανενεργό κατά τα πρώιμα στάδια της αυλάκωσης. Ύστερα από την ενεργοποίηση του ζυγωτικού γονιδιώματος, ο φαινότυπος του εμβρύου αντιστοιχεί πλέον στο γονότυπό του. Το έμβρυο οδηγείται από ένα μονοπάτι θανάτου σε ένα μονοπάτι ζωής

με τα γονίδια μητρικής επίδρασης και των αντίστοιχων mRNAs τους να ρυθμίζουν το πεπρωμένο του.

Ο ρόλος των γονιδίων μητρικής επίδρασης και των μητρικών mRNAs

Κατά την ωογένεση εκφράζονται από τη μητέρα τα γονίδια μητρικής επίδρασης (maternal effect genes) τα οποία ευθύνονται για την εγκαθίδρυση της πολικότητας του ωοκυττάρου και επομένως του εμβρύου. Οι πληροφορίες που προέρχονται από την έκφραση των μητρικών γονιδίων μπορεί να λειτουργούν για την υποστήριξη της ωογένεσης, την πρώιμη ανάπτυξη είτε και για τα δύο. Αυτές οι πληροφορίες συχνά κληρονομούνται ως πρωτεΐνες και mRNA, ωστόσο η σχετική ποσότητα ενός mRNA και του πρωτεϊνικού προϊόντος του μπορεί να διαφέρει αρκετά (Dworkin and Dworkin – Rastl, 1990).

Η ποικιλομορφία των μητρικών mRNAs είναι μεγάλη και υποστηρίζει ένα μεγάλο εύρος διαφορετικών λειτουργιών κατά την ωρίμανση του ωοκυττάρου και μετά τη γονιμοποίηση. Οι πρωτεΐνες που παράγονται, καθοδηγούν το έμβρυο σε διαδικασίες όπως το πρότυπο του σώματος, η τύχη των κυττάρων και η κυτταρική διαίρεση. Πολλές από αυτές τις πρωτεΐνες είναι μεταγραφικοί παράγοντες, RNA-binding πρωτεΐνες, υποδοχείς κυτταρικής επιφανείας, μόρια διακυτταρικής σηματοδότησης και ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου (Tadros et al., 2005). Πιο συγκεκριμένα, μεγάλες ποσότητες μητρικών mRNAs χρησιμοποιούνται για την σύνθεση των ιστονών, πρωτεϊνών χαρακτηριστικών για την αναδίπλωση του DNA, κατά τη διάρκεια σχηματισμού του συγκυτιακού βλαστοδέρματος (Anderson and Lengyel, 1980). Άλλα γονίδια μητρικής επίδρασης και τα αντίστοιχα mRNAs τους συμβάλλουν στην παραγωγή τουμπουλίνης, βασικής πρωτεΐνης του κυτταροσκελετού (Kalfayan and Wensink, 1982, Natzle and McCarthy, 1984, Matthews et al., 1989), πρωτεϊνών μεταγωγής σήματος αλλά και κύριες ρυθμιστικές πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου, όπως οι κυκλίνες (Dworkin and Dworkin – Rastl, 1990). Παράλληλα, γονιδιακά προϊόντα που συντίθενται τόσο από μητρικά όσο και ζυγωτικά mRNAs φαίνεται να είναι απαραίτητα για να δώσουν το σήμα του φυλοκαθορισμού στη *Drosophila* (Dworkin and Dworkin – Rastl, 1990) ενώ η μεταγραφή των μητρικών γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες θερμικού σοκ φαίνεται να δίνει τη δυνατότητα σε έμβρυα *Drosophila* να γίνουν θερμοανθεκτικά (Zimmermann et al., 1983).

Πολλά γονίδια μητρικής επίδρασης, των οποίων οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν διαβάθμιση συγκέντρωσης, υπόκεινται σε μεταφραστική ρύθμιση ώστε να εκφράζονται τοποειδικά και να μην συγκεντρώνονται στο αναπτυσσόμενο ωοκύτταρο. Έτσι, μητρικά mRNAs και πρωτεΐνες καταλαμβάνουν συγκεκριμένες θέσεις στο αναπτυσσόμενο ωοκύτταρο καθορίζοντας τους μελλοντικούς άξονες συμμετρίας του εμβρύου, τον εμπροσθοπίσθιο και το ραχιοκοιλιακό. Χαρακτηριστικά γονίδια μητρικής επίδρασης που έχουν μελετηθεί διεξοδικά στη *Drosophila* σχετικά με τον εντοπισμό των mRNAs τους, αποτελούν τα *oskar*, *vasa* και *bicoid* που καθορίζουν τον εμπροσθοπίσθιο άξονα και το *dorsal* που καθορίζει το ραχιοκοιλιακό άξονα συμμετρίας. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αναγνώριση των μητρικών γονιδίων για την εγκαθίδρυση των αξόνων συμμετρίας του εμβρύου, των πρώτων ζυγωτικών γονιδίων τα οποία ρυθμίζονται από τις πληροφορίες που παρέχονται από τη μητέρα αλλά και διαφόρων μορίων κυτταρικής σηματοδότησης, προτείνει ότι πολλές

βιοχημικές διαδικασίες σχετίζονται με την εμβρυογένεση (Dworkin and Dworkin – Rastl, 1990).

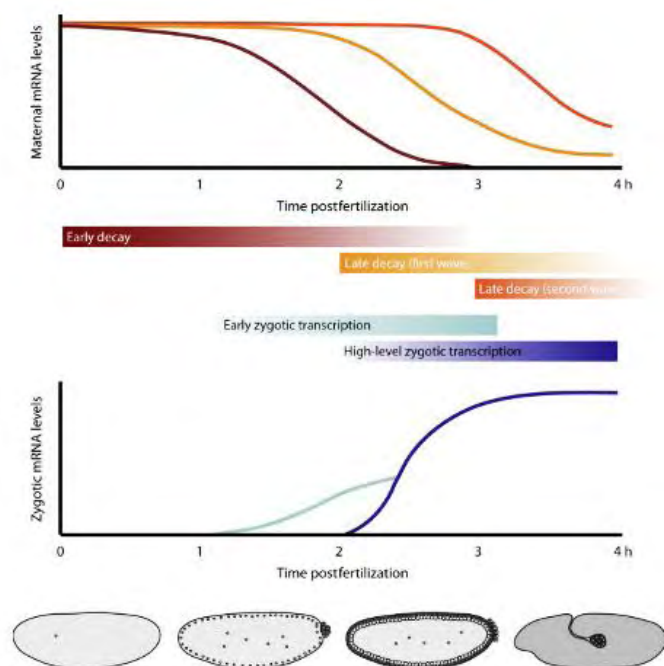
Τα μητρικά mRNAs έχουν συσχετισθεί με διακριτά μεταφορικά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (mRNP complex) τα οποία ρυθμίζουν τη διαμόρφωσή τους μέσω πρωτεϊνών που προσδένονται στο mRNA (Johnstone and Lasko, 2001). Κάθε mRNA ή πρωτεΐνη μπορεί να ανήκει σε διαφορετικό mRNP σύμπλοκο, σε διαφορετική χρονική στιγμή της ανάπτυξης είτε σε διαφορετική υποκυτταρική θέση (Lasko, 2016). Πολλά μη μεταφρασμένα mRNAs, στα σωματικά κύτταρα των ευκαρυωτών, συγκεντρώνονται σε αντίστοιχα mRNP σύμπλοκα σε συγκεκριμένα υποκυτταρικά συσσωματώματα που ονομάζονται P bodies και ρυθμίζουν το χρόνο ημιζωής των mRNA (Parker et al., 2007). Ωστόσο, κατά την ωογένεση της *Drosophila*, στο πολικό πλάσμα περιλαμβάνονται τα polar granules που περιέχουν ειδικές πρωτεΐνες, mRNAs, μιτοχόνδρια και mRNP σύμπλοκα και φαίνεται να αποθηκεύουν και να προστατεύουν μη μεταφρασμένα μητρικά mRNAs μέχρι να χρησιμοποιηθούν για την εμβρυογένεση (Santos et al., 2004, Starz-Gaiano et al., 2001). Παράλληλα, στα τροφικά κύτταρα έχουν βρεθεί κατασκευές που διακρίνονται από τα polar granules και ονομάζονται sponge bodies. Αυτές οι κατασκευές λειτουργούν ως μεταφορικά κυστίδια μεταφέροντας τα mRNP σύμπλοκα από τα τροφικά κύτταρα στο ωοκύτταρο. Τέλος, η μεταφορά των μητρικών μεταγράφων αλλά και των mRNP συμπλόκων στην σωστή θέση κατά τη διάρκεια της ωογένεσης στη *Drosophila* γίνεται μέσω του κυτταροσκελετού των μικροσωληνίσκων και τη συνδρομή των κινητήριων πρωτεϊνών (Johnstone and Lasko, 2001).

Η μετάβαση από τη μητρική στη ζυγωτική έκφραση του γονιδιώματος

Πώς το ωάριο γίνεται τα «πάντα»; Η μετάβαση από το ωοκύτταρο στο γονιμοποιημένο ωάριο, δηλαδή το ζυγωτό, περιλαμβάνει πολλές αλλαγές όπως η πρωτεϊνοσύνθεση, η αποικοδόμηση πρωτεϊνών και RNA αλλά και η αναδιοργάνωση των οργανιδίων (Stitzel and Seydoux, 2013). Μητρικά mRNAs και πρωτεΐνες ελέγχουν την πρώιμη ανάπτυξη μέχρι τη μετάβαση από τη μητρική στη ζυγωτική ρύθμιση της ανάπτυξης (Maternal-to-Zygotic Transition, MZT) ή αλλιώς μετάβαση μεροβλαστιδίου (Mid-Blastula Transition, MBT) κατά την οποία το ζυγωτικό γονιδίωμα αποκτά τον έλεγχο (Schier, 2007, Tadros et al., 2005). Πρέπει να σημειωθεί ότι οι μοριακοί μηχανισμοί που καθορίζουν τη MZT συνεχίζουν αρκετές ώρες μετά την ολοκλήρωση της MBT, η οποία αφορά κυρίως την κυτταροποίηση, τις πρώτες αναπτυξιακές διαδικασίες που απαιτούν ζυγωτικά γονιδιακά προϊόντα. Η MZT περιλαμβάνει δύο διαδικασίες, αρχικά την αποικοδόμηση μία ομάδας μητρικών mRNAs και στη συνέχεια την ενεργοποίηση της μεταγραφής του ζυγωτικού γονιδιώματος (Laver et al., 2015, Tadros and Lipshitz, 2009).

Η ενεργοποίηση του ωαρίου αποτελεί το έναυσμα για την αποσταθεροποίηση μεγάλου μέρους μητρικών μεταγράφων. Καθώς τα μητρικά μετάγραφα κατανέμονται ομοιόμορφα στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου, πιστεύεται ότι είναι απαραίτητο να εξαλειφθούν ώστε να επιτραπεί η έκφραση και η δράση των ζυγωτικών μεταγράφων (Tadros and Lipshitz, 2005) καθώς και να αποτραπεί μία καταστροφική για το έμβρυο, συσώρευση τους (Tadros and Lipshitz, 2009). Η αποικοδόμηση των μητρικών mRNAs κατευθύνεται από δύο διαφορετικούς τύπους μηχανισμών: ο πρώτος «μητρικός» μηχανισμός εξαρτάται από την

ενεργοποίηση του ωαρίου (και όχι τη γονιμοποίηση) και ελέγχεται από μητρικά εκφρασμένους παράγοντες, ενώ ο δεύτερος, που δρα αργότερα, ο «ζυγωτικός» μηχανισμός, ξεκινά μετά από την έντονη μεταγραφή του ζυγωτικού γονιδιώματος στις 2 – 3 πρώτες ώρες της εμβρυογένεσης και απαιτεί ζυγωτικά γονιδιακά προϊόντα (Bashirullah et al., 1999). Ο «ζυγωτικός» μηχανισμός δρα σε δύο «κύματα», το πρώτο 2 – 3 ώρες μετά τη γονιμοποίηση και το δεύτερο 3 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Μέχρι το τέλος της MZT, περίπου 35% των μητρικών μεταγράφων έχουν αποικοδομηθεί με τη δράση αυτών των δύο μηχανισμών (De Renzis et al., 2007).



Εικόνα 1.5 Η μετάβαση από τη μητρική στη ζυγωτική έκφραση του γονιδιώματος (MZT). Η MZT διακρίνεται σε δύο διαδικασίες, την αποικοδόμηση των μητρικών mRNAs (άνω μέρος) και την ενεργοποίηση της μεταγραφής του ζυγωτικού γονιδιώματος (κάτω μέρος). Η αποικοδόμηση των μητρικών mRNAs μεσολοβείται με τον πρώιμο μηχανισμό (κόκκινη καμπύλη) που πυροδοτείται από την ενεργοποίηση του ωαρίου και τον όψιμο που συντελείται σε δύο «κύματα», το πρώτο 2-3 ώρες μετά τη γονιμοποίηση (ανοιχτή πορτοκαλί καμπύλη) και το δεύτερο μετά τις 3 ώρες από τη γονιμοποίηση (σκούρα πορτοκαλί καμπύλη). Η ενεργοποίηση του ζυγωτικού γονιδιώματος λαμβάνει χώρα σε δύο «κύματα» το πρώτο 1 ώρα μετά τη γονιμοποίηση (γαλάζια καμπύλη) και το δεύτερο 2-3 ώρες μετά τη γονιμοποίηση (μπλε καμπύλη) (Laver et al., 2015).

Η ενεργοποίηση του ζυγωτικού γονιδιώματος (Zygotic Genome Activation, ZGA), όπως και η αποικοδόμηση των μητρικών mRNAs, πραγματοποιείται σε δύο «κύματα». Το πρώτο «κύμα» μεταγραφής μίας ομάδας γονιδίων λαμβάνει χώρα περίπου μία ώρα μετά την γονιμοποίηση (8^{ος} κύκλος της αυλάκωσης), ενώ το δεύτερο «κύμα», μεγαλύτερης έντασης, 2 – 3 ώρες μετά την γονιμοποίηση (14^{ος} κύκλος της αυλάκωσης) (Laver et al., 2015). Τα γονίδια που εκφράζονται έχουν λειτουργίες που σχετίζονται με το φυλοκαθορισμό, την κυτταροποίηση και το πρότυπο του εμβρύου (Chen et al., 2013). Παρόλο που ο μηχανισμός ρύθμισης της ZGA δεν έχει διευκρινιστεί, φαίνεται ότι κρίσιμο ρόλο διαδραματίζουν μητρικά κληρονομούμενοι παράγοντες (Laver et al., 2015).

1.2.3 Η γένεση των γονάδων του θηλυκού

Οι γονάδες αποτελούν τα όργανα παραγωγής γαμετών και έχουν διπλή εμβρυϊκή προέλευση. Οι σωματικοί ιστοί σχηματίζονται από τις γεννητικές ακρολοφίες (genital ridges), που αναπτύσσονται από το μεσόδερμα, ενώ τα κύτταρα της αναπαραγωγικής σειράς από τα οποία σχηματίζονται οι γαμέτες προέρχονται από τα αρχέγονα κύτταρα της αναπαραγωγικής σειράς (PGC, Primordial Germ Cells). Το κατά πόσο από την αναπτυσσόμενη γονάδα θα σχηματιστεί ωοθήκη ή όρχις εξαρτάται τελικά από τη χρωμοσωμική σύσταση του ατόμου (Slack, 2014). Στη *Drosophila*, το φύλο ενός ατόμου

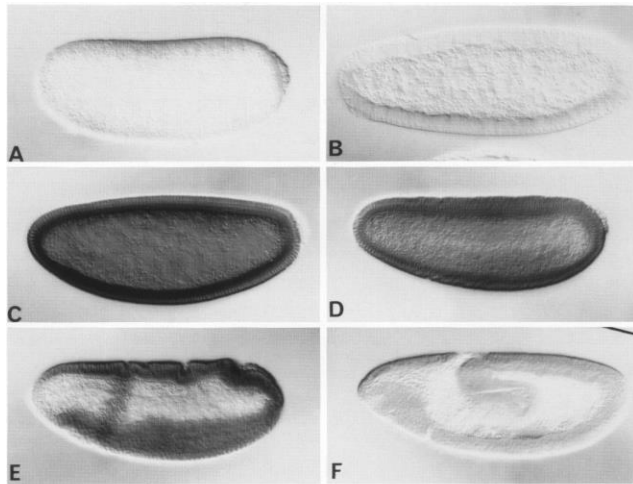
καθορίζεται από την αναλογία αριθμού των χρωμοσωμάτων X προς τον αριθμό των σετ των αυτοσωμάτων (Rusell, 2013). Τόσο οι γονάδες όσο και οι γαμέτες έχουν διαφορετική μορφολογία, ανάλογα με το αν το άτομο είναι αρσενικό ή θυληκό (Slack, 2014). Στη θηλυκή *Drosophila*, γονάδες αποτελούν οι ωθήκες ενώ οι βοηθητικές τους κατασκευές είναι οι ωαγωγοί και οι θηλυκοί βοηθητικοί αδένες, τα οποία προέρχονται αντίστοιχα από τα πολικά κύτταρα και το γεννητικό δίσκο ενηλίκου.

Κατά το στάδιο του κυτταρικού βλαστοδέρματος (στάδιο 5), τα πολικά κύτταρα δημιουργούν μία ομάδα στο οπίσθιο άκρο του εμβρύου. Κατά τη γαστριδίωση, τα πολικά κύτταρα ενσωματώνονται σε μία κοιλότητα στην οπίσθια αρχή του μέσου εντέρου (posterior midgut rudiment) (στάδιο 8) και στη συνέχεια μεταναστεύουν προς το εξωτερικό της. Στα στάδια 11 – 12 της εμβρυογένεσης τα πολικά κύτταρα βρίσκονται ανάμεσα στην αρχή του μέσου εντέρου και του μεσοδέρματος. Κατά τη διάρκεια της υποχώρησης της γαμετικής ζώνης (στάδιο 12), τα πολικά κύτταρα δημιουργούν μία επιμηκυμένη ομάδα η οποία βρίσκεται σε στενή επαφή με τα μεσοδερμικά κύτταρα τα οποία αργότερα θα δώσουν γένεση στις γονάδες. Μετά την υποχώρηση της γαμετικής ζώνης (στάδιο 15) τα πολικά κύτταρα και το περίβλημα του μεσοδέρματος δημιουργούν τις γονάδες. Μόνο ένα μέρος των πολικών κυττάρων ενσωματώνεται στις γονάδες, το υπόλοιπα κύτταρα χάνονται μέσα στη λέκιθο. Στα στάδια της προνύμφης οι γονάδες και ο γεννητικός δίσκος ενηλίκου πολλαπλασιάζονται και στις ωθήκες αρχίζουν να διαιρούνται τα γαμετικά κύτταρα, τα ωγόνια. Στα πρόωρα στάδια της νύμφης οι αρχέγονες μορφές των γεννητικών αγωγών (ωαγωγοί) και των βοηθητικών κατασκευών (σπερματοθήκη, βοηθητικοί αδένες) αρχίζουν να είναι διακριτές. Σε αργότερο στάδιο, οι ωθήκες ενώνονται με τις αρχέγονες μορφές των ωαγωγών (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997).

1.3 Serendipity alpha (*sry-a*): ο ρυθμιστής της κυτταροποίησης

Η μετατροπή του συγκυτιακού βλαστοδέρματος σε κυτταρικό βλαστόδερμα συντελεί την κυτταροποίηση (cellularisation), μία κομβικής σημασίας διαδικασία για την εμβρυογένεση που έχει μελετηθεί διεξοδικά στα δίπτερα έντομα και ιδιαίτερα στη *D. melanogaster*. Πραγματοποιείται, με απόλυτο συγχρονισμό, σε ολόκληρη την επιφάνεια του εμβρύου κατά το τέλος της 13^{ης} μίτωσης και κατά τη διάρκεια της μεσόφασης του 14^{ου} κύκλου (περίπου 120 με 170 λεπτά μετά τη γονιμοποίηση) (Foe and Alberts, 1983). Τελικά, οδηγεί στο σχηματισμό ενός δικτύου αυλακιών δημιουργώντας στο συγκύτιο μία μονοστιβάδα περίπου 6000 κυττάρων που μοιάζουν με επιθηλιακά. Κατά την κυτταροποίηση λαμβάνει χώρα μία δραματική αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού με το σχηματισμό δικτύων ινιδίων ακτίνης-μυοσίνης που προσφέρουν το δομικό πλαίσιο και την ικανότητα συστολής ώστε να πραγματοποιηθούν οι συγχρονισμένες εγκολπίσεις των κυτταρικών μεμβρανών μεταξύ των γειτονικών πυρήνων (Ibnsouda et al., 1993).

Η απομόνωση μεταλλάξεων, από στείρα θηλυκά έντομα, που σταματούν την εμβρυογένεση στο στάδιο της κυτταροποίησης υποδεικνύει ότι ορισμένα γονιδιακά προϊόντα, όπως για παράδειγμα πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, που σχετίζονται με αυτή τη διαδικασία, αποθηκεύονται στο αυγό (egg) κατά τη διάρκεια της ωογένεσης (Schweisguth et al., 1990, Karr and Alberts 1986). Εκτός όμως από τη μητρική συνεισφορά σε αυτή τη διαδικασία έχουν βρεθεί τουλάχιστον 8 γονιδιακοί τόποι που απαιτούνται από το ζυγωτό για τη



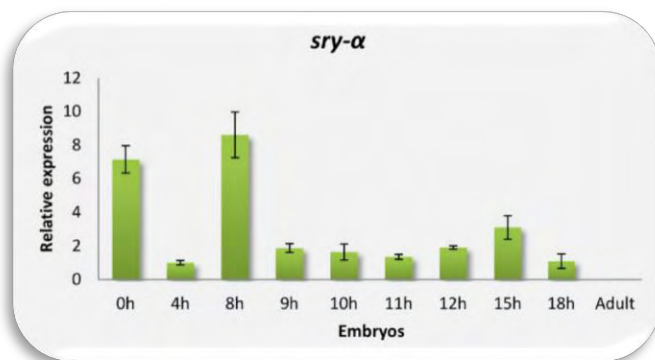
Εικόνα 1.6 Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *sry-a* κατά την εμβρυογένεση στη *D. melanogaster* σε έμβρυα αγρίου τύπου. (A) Σχηματισμός πολικών κυττάρων, (B) Συγκυτιακό βλαστοδέρμα, (C) Κυτταρικό βλαστόδερμα, (D) Πρώμη γαστριδίωση, (E) Γαστριδίωση, (F) Εκτεταμένη γαμετική ζώνη (Schweisguth et al., 1990)

δημιουργία του κυτταρικού βλαστοδέρματος (Merrill et al. 1988; Wieschaus and Sweeton 1988) ένας εκ των οποίων είναι και ο γονιδιακός τόπος του *serendipity-a*. Το γονίδιο *serendipity-a* (*sry-a*) της *Drosophila* μεταγράφεται κατά το στάδιο του κυτταρικού βλαστοδέρματος από τον 11^ο μιτωτικό κύκλο μέχρι τη γαστριδίωση, σαν ένας παλμός καθώς εκφράζεται μόνο για μία ώρα κατά τη ζωή της *Drosophila* (Schweisguth et al., 1990). Το γονιδιακό προϊόν του *serendipity-a*, η πρωτεΐνη Sry-a (58kD), συσσωρεύεται στο στάδιο του κυτταρικού βλαστοδέρματος κοντά στα αυλάκια

του συγκυτίου και συνεντοπίζεται με τα ινίδια ακτίνης και την F-ακτίνη. Βρίσκεται τόσο κυτταροπλασματικά όσο και στο πρωτογενές εκχύλισμα της μεμβράνης (Schweisguth et al., 1990, Warn and Magrath 1983). Προς το τέλος της κυτταροποίησης εντοπίζεται σε μικρότερες συγκεντρώσεις στο κυτταρόπλασμα οι οποίες εκλείπουν κατά τη γαστριδίωση (Εικόνα 1.6).

Σύμφωνα με την έρευνα των Zheng et al. (2013), το *sry-a* αποτελεί ένα γονίδιο που εκφράζεται από το ζυγωτό κατά τη MZT, όχι για να ελέγξει την κυτταροποίηση αλλά για να καταστήσει τη μορφογενετική αυτή διαδικασία πιο εύρωστη απέναντι σε περιβαλλοντικές και γενετικές διαταραχές. Το *sry-a* (πρωτεΐνη Sry-a) δρα μαζί με το μητρικό παράλογο γονίδιο *spitting image* (*spt* και πρωτεΐνη Spt) – που προσδένεται στην F-ακτίνη - ώστε να ενισχύσει τον κυτταροσκελετό της ακτίνης και να καταστήσει την κυτταροποίηση ένα γεγονός πιο αξιόπιστο. Η κυτταροποίηση μπορεί να συνεχίσει ακόμα και απουσία του ζυγωτικού *sry-a* το οποίο δρα ενισχύοντας της δράση του μητρικού *spt*. Πρόκειται για ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα που αποδεικνύει ότι το μητρικό και το ζυγωτικό γονιδίωμα συνεργάζονται ώστε να προωθήσουν την ευρωστία στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια.

Το γονίδιο *sry-a* φαίνεται να εξελίσσεται με ραγδαίους ρυθμούς ανάμεσα στα Drosophilidae



Εικόνα 1.7 Ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου *sry-a* κατά την εμβρυογένεση του εντόμου *Bactrocera oleae* (Sagri et al., 2014).

(Schmid et al., 1997) ενώ παράλληλα μεγάλη απόκλιση σε αναπτυξιακά γονίδια έχει παρατηρηθεί ανάμεσα στα Δίπτερα (Zou et al., 2006, Haugen et al., 2011). Η διαθεσιμότητα των αλληλουχιών της *D. melanogaster* και της *C. capitata*, ύστερα από σύγκριση με το μεταγράφημα του *B. oleae*, αποκάλυψε το ομόλογο του *sry-a* στο *B. oleae*. Μία

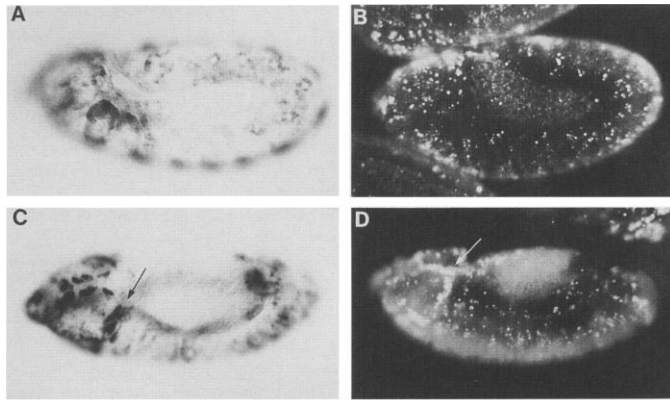
ανάλυση στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου κατά τα πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης (Εικόνα 1.7), έδειξε ότι το mRNA του *sry-a* βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις αμέσως μετά την ωοπόθεση (0h έμβρυα) η οποία ακολουθείται από μία ελάττωση στα έμβρυα τεσσάρων ωρών (4h). Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των μεταγράφων παρατηρούνται στις οκτώ ώρες (8h) υποδηλώνοντας την παρουσία μητρικών μεταγράφων τα οποία πιθανόν εξαλείφονται κατά τα πρώτα γεγονότα της MZT. Τόσο στη *Drosophila* όσο και στη *C. capitata* το *sry-a* εκφράζεται στο ζυγωτό ωστόσο τα αντίστοιχα μετάγραφα στο *B. oleae* έχουν μεγαλύτερη ομοιότητα με αυτά ενός *sry-a-like* γονιδίου το οποίο επίσης εμπλέκεται στο σχηματισμό του κυτταρικού βλαστοδέρματος. Σε αντίθεση με το *sry-a*, το *sry-a-like* κληρονομείται μητρικά αναδεικνύοντας έναν διαφορετικό μηχανισμό ελέγχου της μεταγραφής και προτείνοντας ότι στο *B. oleae* η κυτταροποίηση λαμβάνει χώρα κατά την όγδοη ώρα (8h) της εμβρυογένεσης (Sagri et al., 2014).

1.4 Head involution defective (*hid*): ο ρυθμιστής της απόπτωσης

Κατά τη διάρκεια της ζωής των πολυκύτταρων οργανισμών παρατηρείται ισορροπία ανάμεσα στον κυτταρικό θάνατο και την κυτταρική ανανέωση στοιχείο μεγάλης σημασίας τόσο για την εμβρυϊκή ανάπτυξη όσο και για τη διατήρηση των ενήλικων οργανισμών. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (Programmed cell death, PCD) αποτελεί έναν αυτόνομο, φυσιολογικό μηχανισμό που ενεργοποιείται όταν τα κύτταρα αποκτούν τη «μοίρα» θανάτου ως απόκριση σε αναπτυξιακά ή εξωτερικά (συνήθως παθογένειας) ερεθίσματα. Η ρυθμιζόμενη καταστροφή των κυττάρων που μεσολαβείται από τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, γνωστή και ως απόπτωση, είναι απαραίτητη για την απομάκρυνση υπεράριθμων, βλαβερών ή ελαττωματικών κυττάρων. Χαρακτηρίζεται ως μία ενεργή διαδικασία η οποία συνήθως εξελίσσεται με μία χαρακτηριστική σειρά κυτταρικών μεταβολών και διαχωρίζεται από τη νέκρωση που αποτελεί απόρροια οξείας βλάβης του κυττάρου. Οι κύριοι τελεστές της απόπτωσης είναι οι κασπάσες (caspases), μία ομάδα κυστεϊνοπρωτεϊνών οργανωμένων σε έναν πρωτεολυτικό καταρράκτη που πυροδοτεί την απόπτωση μέσω της πέψης περισσότερων από 100 διαφορετικών πρωτεϊνών-στόχων. Η αρνητική ρύθμιση της δραστηριότητας των κασπασών γίνεται από αναστολείς των αποπτωτικών πρωτεϊνών (Inhibitor of Apoptotic Proteins, IAP) οι οποίοι με τη σειρά τους ρυθμίζονται από προ-αποπτωτικούς ανταγωνιστές. Σαν αποτέλεσμα, οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες αποτελούν τους κύριους ρυθμιστές των κασπασών και επομένως του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Schetelig, 2011, Cooper and Hausman, 2009).

Η απόπτωση στη *Drosophila melanogaster* προκαλείται από τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας RHG (Reaper, Hid, Grim family). Το γονίδιο *head involution defective (hid)*, επίσης γνωστό ως *Wrinkled*, αποτελεί ένα προ-αποπτωτικό γονίδιο που εδράζεται στο τρίτο χρωμόσωμα. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί, μήκους 410 αμινοξέων, είναι ένας από τους πρωταρχικούς ρυθμιστές της απόπτωσης στα έντομα (Schetelig, 2011).

Το πρότυπο έκφρασης του *hid* είναι ιδιαίτερα περίπλοκο καθ' όλη τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και πιο ειδικά, το *hid* εκφράζεται στις περιοχές όπου λαμβάνει χώρα ο κυτταρικός θάνατος. Στο στάδιο του κυτταρικού βλαστοδέρματος τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου είναι χαμηλά, ενώ στο στάδιο 11 της εμβρυογένεσης (γαστριδίωση), η

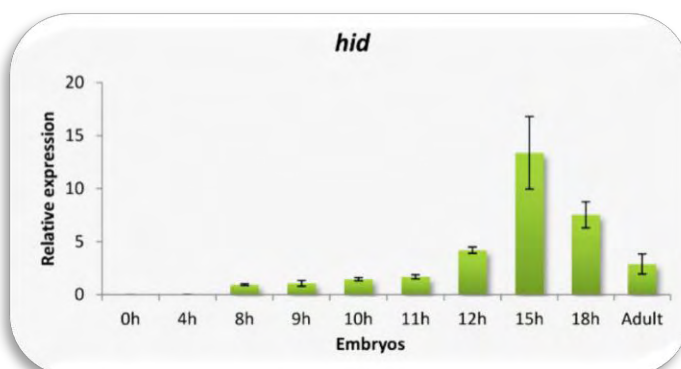


Εικόνα 1.8 Σύγκριση της κατανομής του mRNA του γονιδίου *hid* με το πρότυπο του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου στο έμβρυο. (A)-(B) Σε έμβρυα κατά το στάδιο 11 το mRNA του *hid* παρατηρείται στην κεφαλή, τα γναθικά τμήματα και στην περιοχή της εκτεταμένης γαμετικής ζώνης. (C)-(D) Σε έμβρυα κατά το στάδιο 12 η έκφραση του *hid* εντοπίζεται σε συνδυασμό με την εμφάνιση κυτταρικού θανάτου εντοπίζεται στην περιοχή της κεφαλής, όπως στην περιοχή του οπτικού λοβού (ένδειξη με βέλος) (Grether et al., 1995)

έκφραση του *hid* παρατηρείται στο κεφάλι, σε γναθικά τμήματα αλλά και στην περιοχή της εκτεταμένης γαμετικής ζώνης. Σε επόμενα στάδια, σε έμβρυα με αναδίπλωση κεφαλής παρατηρείται αντιστοιχία των επιπέδων mRNA του γονιδίου *hid* με τα πρότυπα του κυτταρικού θανάτου (Εικόνα 1.8). Ωστόσο, στα σημεία που παρατηρείται η έκφραση του *hid* δεν είναι απαραίτητο να συμβαίνει και απόπτωση. Για παράδειγμα, το mRNA του *hid* εντοπίζεται σε ολόκληρο τον αρχέγονο οπτικό λοβό αλλά μόνο ορισμένα

κύτταρα υφίστανται απόπτωση. Αντίθετα, στα όψιμα στάδια της εμβρυογένεσης, παρόλο που στην κοιλιακή νευρική χορδή (ventral nerve cord) παρατηρείται εκτεταμένος κυτταρικός θάνατος, η έκφραση του *hid* είναι ελάχιστη ως μηδενική (Grether et al., 1995). Κατά τη διάρκεια μετανάστευσης των γαμετικών κυττάρων στις γονάδες, το mRNA του *hid* εκφράζεται ζυγωτικά υποδεικνύοντας ότι τα πολικά κύτταρα είναι ικανά να υποστούν απόπτωση κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης (Sato et al. 2007). Τέλος, η έκφραση του γονιδίου *hid* είναι ιδιαίτερα υψηλή κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης της προνύμφης σε ύμφη (Schetelig, 2011).

Η συσσώρευση της Hid πάνω από ορισμένα επίπεδα μπορεί να οδηγήσει στον κυτταρικό θάνατο. Αναπτυξιακά σήματα, ορμονικές αλλαγές κατά τη μεταμόρφωση και ανταγωνισμός κυττάρων μπορούν να αυξήσουν τη μεταγραφή του γονιδίου *hid*. Το γονίδιο *hid* υπόκειται κάτω από μεταγραφική και μετα-μεταγραφική ρύθμιση 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, την ανάπτυξη της προνύμφης και τη μεταμόρφωση. Σε αυτά τα πλαίσια, το γονίδιο *hid* ρυθμίζεται από τα σηματοδοτικά μονοπάτια EGFR/RAS και Hippo, τα microRNAs και την ορμόνη εκδυσόνη (Bilak and Su, 2009).



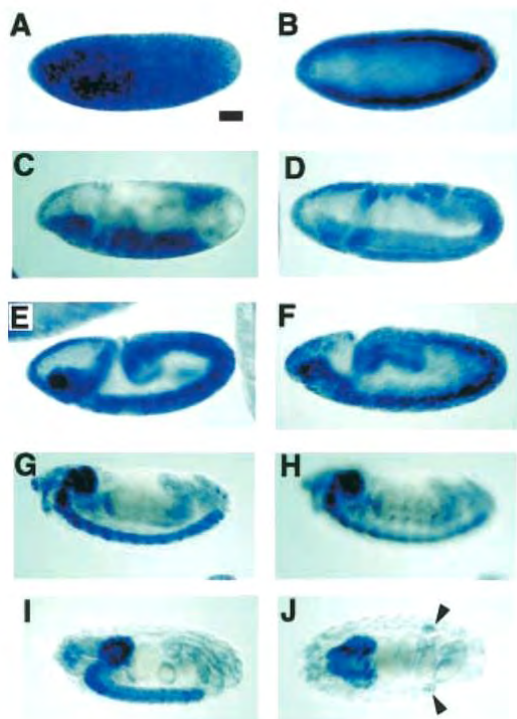
Εικόνα 1.9 Ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου *hid* κατά την εμβρυογένεση του εντόμου *Bactrocera oleae* (Sagri et al., 2014).

Εκτός από τη *Drosophila*, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *hid* κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης έχουν μελετηθεί και στο *B. oleae* (Εικόνα 1.9). Πιο συγκεκριμένα μέχρι τις 8 πρώτες ώρες δεν παρατηρούνται μετάγραφα ενώ τα επίπεδα έκφρασης του *hid* ανιχνεύονται στις 12 ώρες

με μία αξιοσημείωτη αύξηση στις 15 ώρες. Αξίζει να αναφερθεί ότι κατά την αναπτυξιακή διαδικασία η απόπτωση λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της γαστριδίωσης, προτείνοντας ότι στο *B. oleae* το γεγονός αυτό καθορίζεται περίπου στις 12 ώρες με κύρια δραστηριότητα στις 15-18 ώρες (Sagri et al., 2014).

1.5 *lingerer*: ένα γονίδιο με ποικίλους ρόλους

Ένα γονίδιο που φαίνεται να συνδυάζει την αναπαραγωγή και την αναπτυξιακή διαδικασία των εντόμων και να κληρονομείται μητρικά, είναι το *lingerer*. Στη *Drosophila melanogaster*, το γονίδιο *lingerer* (*lig*) εντοπίζεται στο πολυταινικό τμήμα 44A του δεύτερου



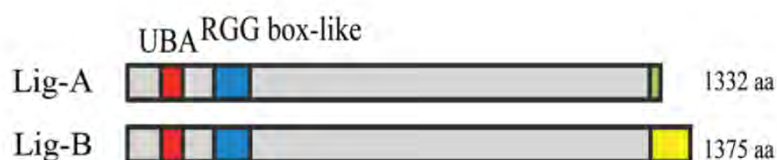
Εικόνα 1.10 Η κατανομή του mRNA του γονιδίου *lingerer* κατά την ανάπτυξη της *D. melanogaster*. (A) Στάδιο 4: ομοιόμορφη κατανομή του *lig* σε όλο το έμβryo, (B) Στάδιο 5, (C) Στάδιο 6, (D) Στάδιο 8, (E) Στάδιο 9, (F) Στάδιο 11, (G) Στάδιο 13: τα μετάγραφα του *lig* συγκεντρώνονται στο ΚΝΣ και το ΠΝΣ (H), (I)-(J) Στάδιο 16: έκφραση του *lig* στις γονάδες (Kuniyoshi et al., 2002)

χρωμοσώματος και η έκφρασή του παρατηρείται στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, τις γονάδες (ωθήκες και όρχεις) αλλά και τους δίσκους ενήλικου (imaginal discs), περιλαμβάνοντας τους δίσκους των γεννητικών οργάνων, των ποδιών, των πτερυγίων, των αλτήρων και των ματιών-κεραίων. Κατά την πρώιμη αυλάκωση (early cleavage) του εμβρύου, το μητρικής προέλευσης mRNA του *lingerer* κατανέμεται ομοιόμορφα (Εικόνα 1.10.A) ενώ η ζυγωτική του έκφραση αρχίζει στο στάδιο του κυτταρικού βλαστοδέρματος. Λίγο μετά τη γαστριδίωση, τα επίπεδα έκφρασης του *lig* mRNA βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα και αυξάνονται σημαντικά κατά το στάδιο όπου οι νευροβλάστες διαχωρίζονται από το εξώδερμα (στάδιο 9). Στο στάδιο 11 της εμβρυογένεσης, η έκφραση του *lig* περιορίζεται κυρίως στους νευροβλάστες (Εικόνα 1.10.F). Ύστερα από τη μείωση των βλαστικών στιβάδων, η έκφραση παρατηρείται τόσο στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (εγκέφαλος και κοιλιακή νωτοχορδή) όσο και στο Περιφερικό Νευρικό Σύστημα. Στα τελευταία στάδια της

εμβρυογένεσης (στάδια 13 - 16), η έκφραση του *lingerer* εντοπίζεται εκτός από το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα και στις γονάδες (ωθήκες και όρχεις) (Kuniyoshi et al., 2002). Στο ΚΝΣ η έκφραση του *lingerer* έχει παρατηρηθεί στους ενδονευρώνες και τα νευρογλοιακά κύτταρα, αλλά όχι στους κινητικούς νευρώνες (Kuniyoshi et al., 2003).

Το προϊόν του γονιδίου *lingerer* αποτελεί μία ομάδα νέων κυτταροπλασματικών (Hisato Kuniyoshi et al., 2002) RNA-binding πρωτεϊνών οι οποίες φέρουν μία επικράτεια UBA (Ubiquitin Associated/translational elongation factor EF1B), μία RGG (Arg-Gly-Gly) περιοχή (Baumgartner et al., 2013) και μία συντηρημένη C-τελική περιοχή (Dong et al., 2015). Οι

πρωτεΐνες αυτές δεν εμφανίζουν καμία ομοιότητα με κάποια γνωστή πρωτεΐνη (Kuniyoshi et al., 2002). Το γονίδιο *lingerer* στη *D. melanogaster* κωδικοποιεί τρία εναλλακτικά μετάγραφα τα οποία παράγουν δύο τύπους πρωτεϊνών μοριακού βάρους 150 kD, οι οποίες διαφέρουν μόνο στο C-τελικό τους άκρο, τις Lig-A και Lig-B. Αυτά τα εναλλακτικά μετάγραφα προκύπτουν από τρεις τύπους mRNA (type 1, type2 και type 3) που διαφέρουν στην 5' αμετάφραστη περιοχή και στην 3' περιοχή η οποία περιλαμβάνει και τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF). Καθώς μεταγράφονται από διαφορετικά σημεία έναρξης, τα mRNAs τύπου 1 και 3 κωδικοποιούν την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη Lig-A (1322 αμινοξέα) ενώ το mRNA τύπου 2 κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Lig-B (1375 αμινοξέα) (Kuniyoshi et al., 2003, Kuniyoshi et al., 2002). Το μετάγραφο που σχετίζεται με την πρωτεΐνη Lig-A εκφράζεται και στα δύο φύλα ενώ η έκφραση του μεταγράφου για την πρωτεΐνη Lig-B φαίνεται να είναι σπάνιο και να εκφράζεται ειδικά στο αρσενικό (Kuniyoshi et al., 2002). Η πρωτεΐνη *Lingerer* εντοπίζεται υποκυτταρικά τόσο στο κυτταρόπλασμα (Kuniyoshi et al., 2002) όσο και στα P-bodies (Baumgartner et al., 2013). Η *Lingerer* συμμετέχει σε ποικίλες λειτουργίες του οργανισμού του εντόμου όπως η σύζευξη και η αναπαραγωγή, η μνήμη και η ανάπτυξη.



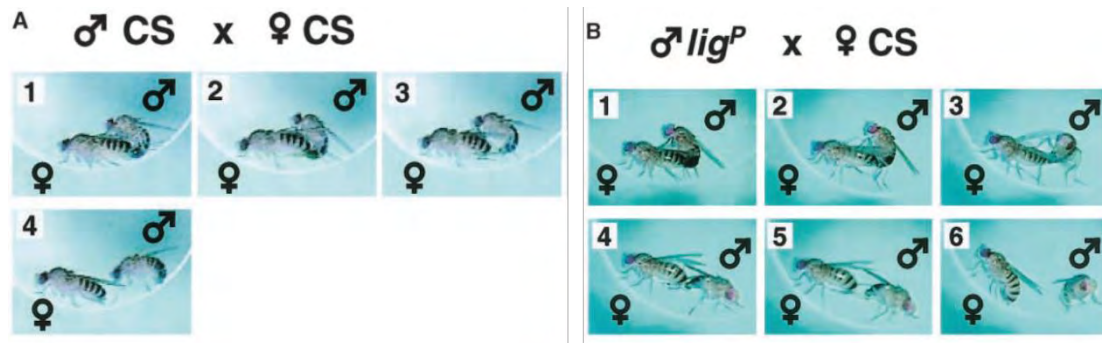
Εικόνα 1.11 Δομικά στοιχεία της πρωτεΐνης *Lingerer*. Οι Lig-A και Lig-B μοιράζονται την αμινοτελική UBA επικράτεια και την RGG περιοχή αλλά διαφέρουν στο καρβόξυ-τελικό τους άκρο (Kimura et al., 2015)

1.5.1 Ο ρόλος του *lingerer* στη σύζευξη και την αναπαραγωγή

Η λειτουργία του γονιδίου *lingerer* απαιτείται από το τρίτο στάδιο της προνύμφης έως και το πρώιμο στάδιο της νύμφης για την φυσιολογική περάτωση (έναρξη και τερματισμό) της σύζευξης στο ενήλικο έντομο. Σε πειράματα στη *D. melanogaster* παρατηρήθηκε ότι μεταλλάξεις που επιφέρουν σημαντική μείωση στην συγκέντρωση της πρωτεΐνης *Lingerer*, προκαλούν ελαττωματική σεξουαλική συμπεριφορά και επαναλαμβανόμενες προσπάθειες σύζευξης χωρίς επιτυχία. Πλήρης απώλεια λειτουργίας του γονιδίου *lingerer* οδηγεί σε θνησιμότητα κατά τα πρώιμα στάδια της προνύμφης, οδηγώντας στο σχηματισμό μακριών και λεπτών νυμφών (Kuniyoshi et al., 2002).

Τα αρσενικά που φέρουν τη μετάλλαξη είναι απολύτως υγιή και γόνιμα και κινούν τη διαδικασία της σύζευξης κανονικά. Ωστόσο, αποτυγχάνουν να αποσύρουν τα γεννητικά τους όργανα ομαλά κατά το τέλος της σύζευξης και σαν αποτέλεσμα το αρσενικό και το θηλυκό σέρνει το ένα το άλλο προς αντίθετες κατευθύνσεις. Σε πολλές περιπτώσεις, τα αρσενικά με τη μετάλλαξη παραμένουν «κολλημένα» με τα wild-type θηλυκά για ορισμένα δευτερόλεπτα ως και 10 λεπτά μέχρι να καταφέρουν να διαχωριστούν. Το φαινόμενο αυτό αναφέρεται ως «stuck» φαινότυπος. Παράλληλα, μία περαιτέρω μείωση της δραστηριότητας της *Lingerer* οδηγεί σε ελαττωμένη ικανότητα του αρσενικού να ξεκινήσει τη σύζευξη αναφερόμενο ως «noncopulating» φαινότυπο. Οι δύο παραπάνω φαινότυποι φαίνεται ότι δεν οφείλονται σε μορφολογικές διαφορές στα γεννητικά όργανα του αρσενικού αλλά κυριαρχεί η υπόθεση ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *lingerer* επηρεάζουν το

νευρικό μηχανισμό με τον οποίο ελέγχονται οι κινήσεις των γεννητικών οργάνων του αρσενικού (Kuniyoshi et al., 2002, Yamamoto et al., 1998). Επιπρόσθετα, είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί ότι θηλυκά που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *lingerer* δεν εμφανίζουν κάποια ανωμαλία στη συζευκτική συμπεριφορά αλλά παρατηρείται μείωση της γονιμότητάς τους (Kuniyoshi et al., 2003, Kuniyoshi et al., 2002).



Εικόνα 1.12 Η εμφάνιση του "stuck" φαινοτύπου σε αρσενικά έντομα *D. melanogaster* που φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο *lingerer*. Σύγκριση της συζευκτικής συμπεριφοράς των αρσενικών αγρίου τύπου (A) και αυτών που φέρουν τη μετάλλαξη (B), κατά τη διάρκεια της σύζευξης με αγρίου τύπου θηλυκά έντομα. (Kuniyoshi et al., 2001)

1.5.2 Ο ρόλος του *lingerer* στη μνήμη

Η σύζευξη στη *Drosophila* έδωσε το έναυσμα για την ανεύρεση της μακροπρόθεσμης μνήμης. Πρόσφατα συζευγμένα θηλυκά αντιστέκονται σε μία εκ νέου σύζευξη παρουσιάζοντας ποικίλες ενέργειες άρνησης απέναντι σε ένα αρσενικό, όπως οι συνεχείς προσπάθειες να το εγκαταλείψει κυματίζοντας τα φτερά της, να το κλωτσήσει, να αλλάξει θέση στην κοιλιά της ή να εξωθήσει τον ωοαποθέτη της (Manning, 1967, Nakamo et al., 2001). Το αρσενικό που έχει δεχθεί απόρριψη από το συζευγμένο θηλυκό εγκαταλείπει την προσπάθεια ερωτοτροπίας όχι μόνο με συζευγμένα θηλυκά αλλά και με παρθένα θηλυκά (Siegel & Hall, 1979). Όταν αυτή η αναστολή της ερωτοτροπίας διαρκεί για παραπάνω από μία ημέρα θεωρείται ως μακροπρόθεσμη μνήμη (Kimura et al., 2015) και εμφανίζεται ως «counterconditioning», δηλαδή όταν ένα θετικό (ελκυστικό) σήμα συσχετίζεται με ένα αρνητικό ερέθισμα (άρνηση από το θηλυκό ως τιμωρία) (Zawistowski, 1988).

Η πρωτεΐνη Orb2 (oo18 RNA binding 2) έχει αποδειχθεί ότι είναι απαραίτητη για την μακροπρόθεσμη μνήμη που συνδέεται με την συμπεριφορά ερωτοτροπίας του αρσενικού (Keleman, Krüttner, Alenius, & Dickson, 2007). Το γονίδιο *orb2* κωδικοποιεί μία ομάδα RNA-binding πρωτεϊνών χαρακτηριστικές της οικογένειας των Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding (CPEB), τις Orb2A και Orb2B, αλλά και επιπρόσθετες πρωτεΐνες χωρίς κάποιο αναγνωρίσιμο μοτίβο (Krüttner et al., 2012). Οι πρωτεΐνες CPEB προσδένονται στην 3' UTR περιοχή των mRNA-στόχων ρυθμίζοντας έτσι τη μεταφορά, τη μετάφραση και/ή την αποικοδόμηση αυτών των στόχων (Matsushita-Sakai et al., 2010; Xu et al., 2012). Αξιοποιώντας επιλεκτικά τα mRNAs που είναι διαθέσιμα σε όλες τις συνάψεις, οι CPEBs δρουν ως ρυθμιστές-κλειδιά της σύνθεσης των πρωτεϊνών σε συγκεκριμένες συνάψεις συμβάλλοντας έτσι στη συναπτική πλαστικότητα και τη δημιουργία της μακροπρόθεσμης μνήμης (Keleman, Krüttner, Alenius, & Dickson, 2007). Η *Lingerer*, λόγω των δομικών της χαρακτηριστικών (επικράτεια UBA και περιοχή RGG) είναι πιθανό να εμπλέκεται στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών ή του RNA αλλά και στη σύνδεση στο RNA συμμετέχοντας

σε ένα σύμπλοκο με τις CPEB πρωτεΐνες. In vivo μελέτες στη *D. melanogaster* έδειξαν ότι η Lingerer δημιουργεί σύμπλοκο με την Orb2. Παράλληλα, μεταλλάξεις στο γονίδιο *orb2* προκαλούν διατάραξη στη μακροπρόθεσμη μνήμη στην ερωτοτροπία η οποία όμως αποκαθίσταται όταν τα επίπεδα της Lingerer μειώνονται. Είναι πιθανό μία μείωση της δραστηριότητας του *lingerer* να περιορίζει την αποικοδόμηση του mRNA του *orb2* μειώνοντας έτσι τις διαταραχές της μακροπρόθεσμης μνήμης. Έτσι, η Lingerer θα μπορούσε να λειτουργεί ως ρυθμιστής της μετάφρασης που εντοπίζεται σε συγκεκριμένες συνάψεις συνεισφέροντας στα διάφορα μονοπάτια της μνήμης (Kimura et al., 2015).

1.5.3 Ο ρόλος του *lingerer* στην ωογένεση και την ανάπτυξη ιστών και οργάνων

Η πρωτεΐνη Lingerer συμμετέχει στον καθορισμό του εμπροσθοπίσθιου και ραχιοκοιλιακού άξονα του εμβρύου, στην ανάπτυξη επιθηλιακών ιστών αλλά και στον καθορισμό του μεγέθους των οργάνων αλληλεπιδρώντας με ένα εύρος RNA-binding πρωτεϊνών τις Orb, Rasputin (Rin), Caprin (Capr) και dFMRP (*Drosophila* Fragile X Mental Retardation Protein) (Baumgartner et al., 2013, Kimura et al., 2015). Έχει αποδειχθεί ότι αυτές οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους καθώς εντοπίζονται σε ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο μέσω του οποίου μεταφέρονται στην περιοχή που θα μεταφραστούν (Angenstein et al. 2002, Ling et al., 2004, Costa et al., 2005, Baumgartner et al., 2013). Εκτός από αυτές τις πρωτεΐνες, η Lig προσδέεται στην πρωτεΐνη DART1 (*Drosophila* Arginine Methyltransferase 1) η οποία τροποποιεί συγκεκριμένα μοτίβα και ρυθμίζει την ικανότητα πρόσδεσης των mRNAs στο σύμπλοκο (Gary JD, et al., 1998, Bedford et al., 2009).

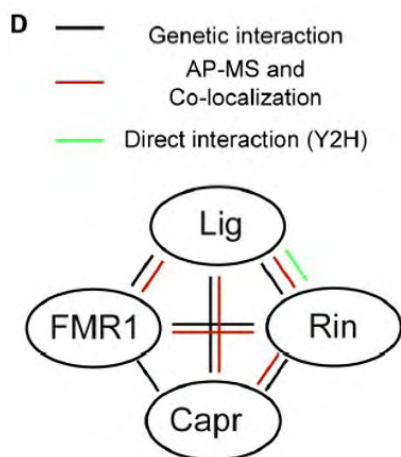
Όσον αφορά την πρωτεΐνη Orb, εκτός από το ρόλο της στη δημιουργία της μακροπρόθεσμης μνήμης, ρυθμίζει τη μετάφραση σε διάφορα στάδια κατά τη διάρκεια της ωογένεσης. Η δράση του γονιδίου *orb* απαιτείται για τη δημιουργία της κύστης των 16 κυττάρων, τη διαφοροποίηση του ωοκυττάρου και τον καθορισμό του εμπροσθοπίσθιου και ραχιοκοιλιακού άξονα του αυγού και του εμβρύου (Christerson and McKearin, 1994; Lantz et al., 1994; Huynh and St Johnston, 2000).

Η εδραίωση του ραχιοκοιλιακού άξονα στο αναπτυσσόμενο αυγό ελέγχεται από την ενεργοποίηση της μετάφρασης του mRNA του γονιδίου *gurken* (*grk*) (Roth S et al., 1994). Πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι το *lingerer* λειτουργεί στην ωοθήκη ως αρνητικός ρυθμιστής της μετάφρασης του mRNA του *gurken* (Geng et al., 2007). Για την εγκαθίδρυση του εμπροσθοπίσθιου άξονα απαιτείται η εντοπισμένη έκφραση της πρωτεΐνης Oskar, στην ωοθήκη, του κύριου παράγοντα καθορισμού του οπίσθιου τμήματος του αναπτυσσόμενου εμβρύου (Chang et al., 1999; Lantz et al., 1994). Η Orb αλληλεπιδρά φυσικά με τη Lingerer αλλά και τις Rin και dFMRP ώστε να επιτευχθεί η εντοπισμένη μετάφραση της Osk (Costa et al., 2005). Παράλληλα, έχει βρεθεί ότι η dFMRP αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του μονοπατιού αυτορρύθμισης της Orb (Costa et al., 2005), ενώ αντίθετα η Rin θετικό ρυθμιστή της Orb κατά την ωογένεση της *Drosophila* καθώς συνεντοπίζονται στο αναπτυσσόμενο θάλαμο του ωαρίου (egg chamber) (Costa et al., 2013).

Η Rin, αποτελεί το ορθόλογο της ανθρώπινης G3BP πρωτεΐνης στη *Drosophila*, η οποία φαίνεται να συμμετέχει στον έλεγχο της μετάφρασης των mRNA αυξητικών παραγόντων σύμφωνα με μελέτες σε μοντέλα θηλαστικών (Tourriere H et al., 2001, Gallouzi IE et al., 1998). Η G3BP έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με την Caprin η οποία συνδέεται σε mRNA-στόχους

που σχετίζονται με την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό (Solomon S et al., 2007). Παράλληλα, η Caprin συνεργάζεται με την πρωτεΐνη dFMRP για τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και τον συγχρονισμό της μετάβασης μεσοβλαστιδίου (MBT – Mid-blastula transition) (Paroulas et al., 2010). Η dFMRP, εκτός από αυτό τον ρόλο, συμμετέχει σε λειτουργίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική διαφοροποίηση και η απόπτωση σε αναπαραγωγικά όργανα και νευρικούς ιστούς μέσω της μεταφραστικής ρύθμισης πρωτεϊνών της ανάπτυξης. Η Lingerer δρα σε αρμονία με όλες αυτές τις πρωτεΐνες ώστε να ρυθμίσει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των επιθηλιακών ιστών των ματιών και των πτερυγίων. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης έδειξαν ότι η Lingerer αλληλεπιδρά άμεσα ή γενετικά με τις RNA-binding πρωτεΐνες Rin, Capr και dFMRP με τις οποίες συνεντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στα P-bodies. Αυτές οι φυσικές αλληλεπιδράσεις προτείνουν ότι η Lig εμπλέκεται σε ένα RNA-ρυθμιστικό δίκτυο και ρυθμίζει τη μετάφραση ή/και τη σταθερότητα ειδικών mRNAs αναπτυξιακών γονιδίων, σε συνέργεια με τις παραπάνω πρωτεΐνες. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *lig* έδειξαν ότι αυτό οφείλεται για την υπερανάπτυξη των επιθηλιακών ιστών οργάνων, όπως τα μάτια και τα πτερύγια, ενώ κύτταρα που υπερεκφράζουν το *lig* υφίσταται απόπτωση και εμφανίζουν μειωμένη κυτταρική διαίρεση. Έτσι αποδείχθηκε ότι η Lig συνιστά ένα γενικό ρυθμιστή της ανάπτυξης και ειδικότερα ένα νέο καταστολέα της ανάπτυξης (Baumgartner et al., 2013).

Οι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας του *lig* οδήγησαν όχι μόνο στην αύξηση του μεγέθους των οργάνων αλλά και στην αυξημένη έκφραση του γονιδίου *bantam* (*ban*) και άλλων



Εικόνα 1.13 Σχηματική αναπαράσταση των άμεσων και των γενετικών αλληλεπιδράσεων της Lingerer με τις FMR1, Rin και Capr (Baumgartner et al., 2013).

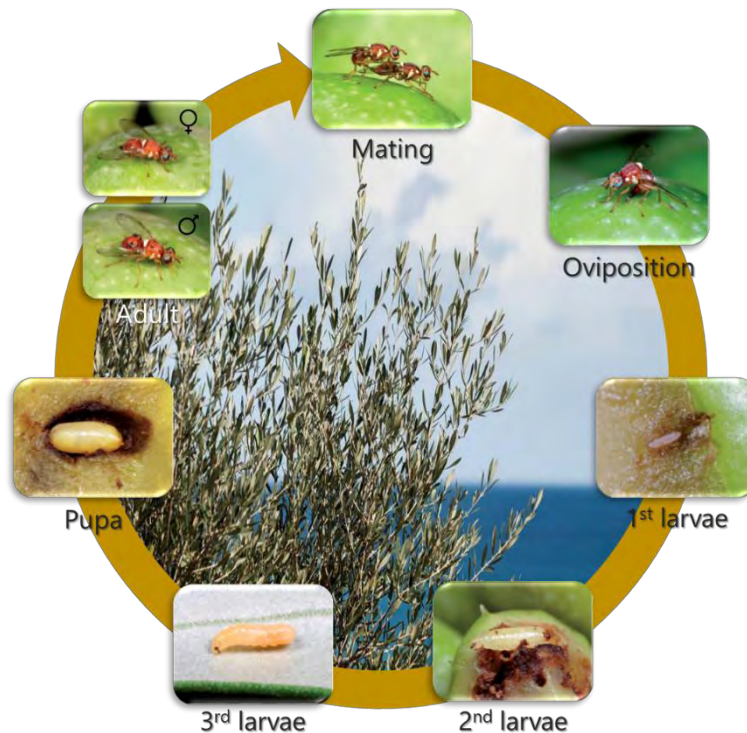
γονιδίων-στόχων του μονοπατιού Hippo. Αντίθετα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν όταν το *lig* υπερεκφράστηκε (Dong et al., 2015). Το μονοπάτι Hippo λειτουργεί ως ένα εξελικτικά συντηρημένο μονοπάτι για τον έλεγχο του μεγέθους των οργάνων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, ρυθμίζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση καθώς και τη διατήρηση των βλαστικών κυττάρων (Halder and Johnson, 2011, Yin and Zhang, 2011, Zhao et al., 2011, Codelia and Irvine, 2012; Ramos and Camargo, 2012). Ένα από τα γονίδια-στόχους του μονοπατιού Hippo είναι το *ban* το οποίο προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αναστέλλοντας τη δράση του προ-αποπτωτικού γονιδίου *hid*. Η αποσιώπηση του *lig* οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του *ban* microRNA ενώ η καρβόξυ-τελική περιοχή της Lingerer φαίνεται

να απαιτείται για την έκφραση του γονιδίου *ban* οδηγώντας τελικά στον περιορισμό της ανάπτυξης των οργάνων. Αυτή η δράση της Lig πιθανόν να οφείλεται στη γενετική αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες του μονοπατιού Hippo, όπως οι Yki και Mad. Παράλληλα, η Lig δημιουργεί σύμπλοκο με μία πρωτεΐνη-σκαλωσιάς του μονοπατιού Hippo, τη Salvador (Sav), ρυθμίζοντας έτσι την ανάπτυξη των οργάνων με διαφορετικούς τρόπους (Dong et al., 2015). Τέλος, η Lig αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του μονοπατιού σηματοδότησης JAK/STAT, ρυθμίζοντας τα ενδογενή συστατικά του μονοπατιού και όχι τους προσδέτες του (Muller et al., 2005, Baumgartner et al., 2013)

1.6 *Bactrocera oleae*: ο σημαντικότερος εχθρός της ελιάς

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae* (Rossi), ανήκει στην οικογένεια Tephritidae των Διπτέρων εντόμων (Diptera), τις αποκαλούμενες «μύγες των φρούτων» (fruit flies).

Ο κύκλος ζωής. Ο δάκος της ελιάς, όντας ένα ολομετάβολο έντομο, όπως και η *Drosophila*, υφίσταται πλήρη μεταμόρφωση και ο κύκλος ζωής του περιλαμβάνει τέσσερα διακριτά στάδια: του αυγού, της προνύμφης, της νύμφης και τελικά του ενήλικου εντόμου. Η μορφολογική διαφοροποίηση του θηλυκού και του αρσενικού ενήλικου ατόμου βασίζεται στην απουσία του ωοθέτη στο αρσενικό. Αφού συζευχθούν τα ώριμα θηλυκά άτομα, ηλικίας περίπου 6 ημερών (Yokoyama, 2018), αρχίζουν να ωοαποθέτουν απο-κλειστικά



Εικόνα 1.14 Ο κύκλος ζωής του εντόμου *Bactrocera oleae*. Παρουσιάζεται η σύζευξη (mating), η ωαπόθεση (oviposition), η προνύμφη (larvae), η νύμφη (pupa) και το ενήλικο θηλυκό και αρσενικό έντομο (adult) (Photo by Rollin Coville, Yokoyama, 2018)

(Tsipidou, 2002).

Ο κύκλος ζωής του δάκου της ελιάς επηρεάζεται από περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η θερμοκρασία και η σχετική υγρασία. Ως κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης έχουν θεωρηθεί η σχετική ατμοσφαιρική υγρασία από 60% έως 80% και θερμοκρασίες μεταξύ 20 και 25 °C, με οριακές θερμοκρασιακές τιμές ανάπτυξης τους 32°C και 10°C αντίστοιχα (Tsitsipis 1980, Fletcher & Karatos 1983). Στην Ελλάδα έχουν αναφερθεί 3 – 4 γενιές ανά έτος, ενώ κάτω από ευνοϊκές συνθήκες, ο κύκλος ζωής μπορεί να ολοκληρωθεί σε 30 ημέρες (Karatos and Fletcher, 1984, Tzanakakis, 1989). Στη Μεσογειακή λεκάνη, η πρώτη γενιά των εντόμων εμφανίζεται κατά την άνοιξη (Μάρτιος – Μάιος) ενώ η δεύτερη στα μέσα του καλοκαιριού (Ιούνιος – Ιούλιος).

Η προκαλούμενη ζημιά. Ο δάκος της ελιάς είναι ένα μονοφάγο έντομο καθώς η προνύμφη του τρέφεται αποκλειστικά από τον καρπό της ελιάς (*Olea europaea*). Καθώς η ελιά αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά καλλιεργήσιμα δέντρα της Μεσογείου από τα

στον καρπό της ελιάς. Από κάθε αυγό εκκολάπτεται μία προνύμφη, η οποία τρέφεται από το εσωτερικό του ελαιοκαρπού (μεσοκάρπιο) και ύστερα από τρία στάδια μεταμόρφωσης, δίνει γένεση στη νύμφη (Daane and Johnson, 2010). Το ενήλικο θηλυκό άτομο που προκύπτει έχει τη δυνατότητα εναπόθεσης 10 – 12 αυγών ημερησίως ενώ καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του μπορεί να φτάσει τα 400 αυγά (Katsoyannos 1992, Mavragani-

αρχαία χρόνια, οι ποιοτικές και ποσοτικές επιπτώσεις στην καταστροφή των ελαιοκαρπών, από το δάκο, επηρεάζει την παγκόσμια παραγωγή (Malheiro et al., 2015) και για αυτό το λόγο θεωρείται ως ένα έντομο οικονομικής σημασίας (Corrado et al., 2016, Daane and Johnson, 2010).

Τα θηλυκά άτομα, επιλέγουν την προσβολή του ελαιοκαρπού σύμφωνα με φυσικά, χημικά και μοριακά σήματα (Malheiro et al. 2015). Για να ωοαποθέσουν, δημιουργούν μια οπή στον καρπό η οποία μπορεί να αποτελέσει αργότερα εστία δευτερογενών μολύνσεων εξαιτίας της εισόδου βακτηρίων και μυκήτων (Neuenschwander & Michelakis 1978, Daane and Johnson, 2010). Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή λιπαρών οξέων και επομένως αυξάνεται η οξύτητα στο ελαιόλαδο (Muik et al. 2003). Παράλληλα, η προνύμφη, καθώς τρέφεται από το μεσοκάρπιο, δημιουργεί στοές για την κάλυψη των διατροφικών της αναγκών, . Σαν αποτέλεσμα, καταστρέφεται ο καρπός και μειώνεται η ποιότητα του ελαιολάδου.

Τρόποι αντιμετώπισης. Τα τελευταία 50 χρόνια ο κύριος τρόπος αντιμετώπισης του δάκου της ελιάς είναι με χημικά παρασιτοκτόνα, κυρίως οργανοφωσφορικά (organophosphates – OPs) και πυρεθροειδή. Η αλόγιστη χρήση τους, όμως, έχει επιβλαβή αποτελέσματα στο περιβάλλον και οδηγεί στην ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών σε πληθυσμούς αλλά και στη γενικότερη εξάπλωσή τους στη φύση (Skouras et al., 2007 και Margaritoroulos et al., 2008). Λόγω των παραπάνω προβλημάτων ο σχεδιασμός πιο αποτελεσματικών μεθόδων είναι απαραίτητος.



ΣΚΟΠΌΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου *lingerer* στο δάκο της ελιάς, *Bactrocera oleae*. Συγκεκριμένα, καθορίστηκε το προφίλ έκφρασης του γονιδίου σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου (αυγό, προνύμφη, νύμφη, ενήλικο) και στο κατώτερο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα. Επίσης, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *lingerer* με δυο γνωστά γονίδια που συμμετέχουν στην εμβρυογένεση, *serendipity-a (sry-a)* και *head involution defective (hid)*.

Ο καθορισμός του προφίλ έκφρασης τέτοιων γονιδίων μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση βασικών λειτουργιών του εντόμου (ανάπτυξη και αναπαραγωγή). Επίσης, γονίδια που συμμετέχουν σε αυτές τις λειτουργίες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μελλοντικά γονίδια-στόχοι για την ανάπτυξη εναλλακτικών μεθόδων καταπολέμησης των εντόμων.



3



Υλικά & Μέθοδοι

3.1 Εκτροφή εργαστηριακού πληθυσμού δάκου, *Bactrocera oleae*

Το εργαστηριακό στέλεχος του εντόμου *Bactrocera oleae* διαβίωσε στο εντομοτροφείο του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σε ειδικά διαμορφωμένα κλουβιά που φέρουν κώνους καλυμμένους με παραφίνη ώστε να επιτρέπεται η ωοαπόθεση των θηλυκών εντόμων. Το στέλεχος διατηρείται σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας 25°C, σχετικής υγρασίας 65% και φωτοπεριόδου 12h (Tzanakakis 1989). Για τη μετέπειτα πειραματική διαδικασία συλλέχθηκαν αυγά 1 – 48 ωρών, προνύμφες 1^{ου} και 3^{ου} σταδίου (1st and 3rd larvae), νύμφες (pupae) και ενήλικα θηλυκά και αρσενικά έντομα (adult), τα οποία συντηρήθηκαν σε ποσότητα EXTRAzol (50/100μl).

3.2 Απομόνωση RNA (RNA extraction)

Η επιτυχημένη απομόνωση RNA από βιολογικά δείγματα έγκειται στην απενεργοποίηση της δράσης ενδογενών ριβονουκλεασών που δύναται να αποικοδομήσουν το RNA. Η θειοκυανικούχος γουανιδίνη αποτελεί έναν ισχυρό χαοτροπικό παράγοντα που έχει την ικανότητα να λύει τα κύτταρα και να απενεργοποιεί αυτές τις νουκλεάσες. Παράλληλα, η χρήση γλυκογόνου, ενός θετικά φορτισμένου πολυσακχαρίτη, συμβάλει στην πρόσδεση με το αρνητικά φορτισμένο RNA και στην κατακρήμνισή του, με τη μορφή αδιάλυτου ιζήματος, ύστερα από προσθήκη αιθανόλης περιεκτικότητας 70%. Η απομόνωση του RNA έγινε με τη χρήση του αντιδραστηρίου EXTRAzol της εταιρείας BLIRT - DNA-Gdańsk, που περιέχει ένα μίγμα φαινόλης και άλλων συστατικών και είναι αποτελεσματικό στην αναστολή της δράσης RNAσών προστατεύοντας την ακεραιότητα του RNA κατά τη λύση.

Μέθοδος

Στη μέθοδο ακολουθούνται πέντε διακριτά βήματα, η ομογενοποίηση των ιστών (στάδιο 1), ο διαχωρισμός φάσης (στάδια 2 – 4), η καταβύθιση του RNA (στάδια 5 – 6), η πλύση του RNA (στάδια 7 – 8) και η διαλυτοποίηση του RNA (στάδιο 9).

1. Ομογενοποίηση των απομονωμένων ιστών με τη χρήση αποστειρωμένων εμβόλων (pestles), σε σωληνάκι τύπου eppendorf (1,5 ml), προσθήκη ποσότητας EXTRAzol (1 ml/50–100 mg ιστού) μέχρι τελικό όγκο 200/300 μl και σύντομο vortex
**η περαιτέρω προσθήκη EXTRAzol πραγματοποιείται ώστε να μην απομείνει ιστός στο έμβολο*
2. Επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου (RT – Room Temperature) για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση στους 4°C σε 12000g για 10 λεπτά
3. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο αποστειρωμένο eppendorf tube, προσθήκη 0,1x BCP ανά 1 ml EXTRAzol (δηλαδή 20 μl BCP για 200 μl EXTRAzol) και γρήγορη ανάδευση με το χέρι για 15 δευτερόλεπτα
4. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 – 15 λεπτά και φυγοκέντρηση στους 4°C σε 12000g για 15 λεπτά
**μετά την προσθήκη του BCP δημιουργούνται τρεις φάσεις, στην άνω φάση (υδατική) περιέχεται το RNA, στη μεσόφαση το DNA και στην κάτω φάση (οργανική) οι πρωτεΐνες*
5. Μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο αποστειρωμένο eppendorf tube και προσθήκη 0,5x (100 μl) ισοπροπανόλης και 0,5 μl γλυκογόνου

**η προσθήκη ισοπροπανόλης και γλυκογόνου βοηθά στην κατακρήμνιση του RNA το οποίο παρατηρείται με τη μορφή ιζήματος*

6. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 - 10 λεπτά και φυγοκέντρηση στους 4°C σε 12000g για 8 λεπτά
 7. Αφαίρεση του υπερκειμένου σε τρυβλίο Petri και πλύση με αιθανόλη 75%, 1 ml/1 ml EXTRAzol (200 μl)
 8. Φυγοκέντρηση στους 4°C σε 12000g για 5 λεπτά
 9. Αφαίρεση της αιθανόλης, στέγνωμα του ιζήματος για 3 – 5 λεπτά στον απαγωγό (υπό αέρα) και αναδιάλυση σε 8 μl ζεστό (55°C) νερό miliq (ddH₂O)
- *το ιζήμα μετατρέπεται σε διαφανές όταν στεγνώσει*
10. Διατήρηση δειγμάτων στους -80°C, για μακροχρόνια αποθήκευση, είτε στους -20°C, για σύντομη αποθήκευση

Υλικά: EXTRAzol / 1-bromo-3-chloropropane (BCP) / αιθανόλη 75% / ισοπροπανόλη / γλυκογόνο / ddH₂O / υδατόλουτρο (55°C) / ψυχόμενη φυγόκεντρος (4°C)

3.3 Εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων με φαινόλη/χλωροφόρμιο

Η εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο αποτελεί τον πλέον συνηθισμένο τρόπο για την απομάκρυνση πρωτεϊνών από διαλύματα νουκλεϊκών οξέων, καθώς η απομάκρυνση των πρωτεϊνών είναι πιο αποδοτική με τη χρήση δύο οργανικών διαλυτών αντί για έναν. Η φαινόλη αποδιατάσσει και διαχωρίζει τις πρωτεΐνες μαζί με τα λιπίδια από τα νουκλεϊκά οξέα, ενώ το χλωροφόρμιο διευκολύνει το διαχωρισμό των φάσεων λόγω της μεγάλης πυκνότητας που προσδίδει στην οργανική (κάτω) φάση. Τα νουκλεϊκά οξέα, ύστερα από φυγοκέντρηση, συγκεντρώνονται στην ύδατική (άνω) φάση.

Μέθοδος

1. Σε σωληνάκι τύπου erpendorf που περιέχει το προς εκχύλιση RNA προστίθεται ενέσιμο νερό μέχρι ο όγκος να φτάσει τα 400 μl
2. Προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης/χλωροφορμίου (1:1 – 200 μl από το καθένα), ανακίνηση και φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα (full speed) για 3 λεπτά
3. Μεταφορά της υδατικής φάσης (άνω φάσης) σε νέο αποστειρωμένο erpendorf tube και προσθήκη 400 μl χλωροφορμίου
4. Επανάληψη των σταδίων 2 και 3 για δύο ακόμη φορές
5. Προσθήκη 45 μl οξικού αμμωνίου (Ammonium Acetate)
6. Προσθήκη ισοπροπανόλης όγκου 1x από τα 300 μl, 0,5 μl γλυκογόνου και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
7. Φυγοκέντρηση σε μέγιστες στροφές για 10 λεπτά
8. Αφαίρεση του υπερκειμένου, προσθήκη 70% αιθανόλης μισού όγκου (1:2 – 150μl) από τον αρχικό όγκο και φυγοκέντρηση σε μέγιστε στροφές για 5 λεπτά
9. Αφαίρεση του υπερκειμένου και στέγνωμα

Υλικά: Φαινόλη / Χλωροφόρμιο / Ισοπροπανόλη / Αιθανόλη 70% / Ammonium Acetate / ddH₂O

3.4 Επεξεργασία με DNάση (DNase treatment)

Η μόλυνση με γενωμικό DNA σε δείγματα RNA μπορεί να δημιουργήσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε αντιδράσεις όπως η RT-PCR. Για αυτό το λόγο γίνεται χρήση του TURBO DNA-free™ Kit από την εταιρία Ambion-Invitrogen, για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων DNA με τη χρήση DNάσης.

Μέθοδος

Πίνακας 3.1 Τα αντιδραστήρια και ο όγκος ανά αντίδραση που απαιτούνται για την επεξεργασία με DNάση

Αντιδραστήρια	Όγκος/αντίδραση
RNA	8 μl
TURBO DNase (2 units/μl)	0,2 μl
10x TURBO DNase Buffer	1 μl
DNase Inactivation Reagent	(1 μl)
Nuclease-free Water	0,8 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	10 μl

1. Προετοιμασία του μίγματος (mix) για όλα τα δείγματα με κατά σειρά προσθήκη H₂O, TURBO DNase Buffer και TURBO DNase σύμφωνα με τις ποσότητες που αναγράφονται στον παραπάνω πίνακα
**η DNάση διατηρείται στον πάγο και προστίθεται τελευταία ώστε να μη χαθεί η δραστηριότητά της*
**κατά την προετοιμασία του mix προστίθεται παραπάνω ποσότητα από την, σύμφωνα με το πρωτόκολλο, αναγραφόμενη, ώστε να μειωθούν οι απώλειες λόγω πιπεταρίσματος (pipetting)*
2. Μεταφορά του mix σε PCR tubes (200 μl) και προσθήκη του RNA
3. Επώαση στους 37°C για 25 λεπτά
4. Προσθήκη 0,1x του όγκου (δηλαδή 1 μl) DNase Inactivation Reagent
5. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
6. Φυγοκέντρηση σε 10000g για 2 λεπτά
7. Μεταφορά 8 μl υπερκειμένου σε νέο tube
8. Διατήρηση του RNA σε θερμοκρασία -20°C

Υλικά: 10x TURBO DNase Buffer / DNase Inactivation Reagent / RNA / TURBO DNase (2 Units/μl) / ddH₂O

3.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR – Polymerase Chain Reaction)

3.5.1 Συμβατική PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μία ευρέως διαδεδομένη τεχνική της Μοριακής Βιολογίας και της Βιοχημείας. Ανακοινώθηκε στην επιστημονική κοινότητα για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1980 και συνιστά μία γρήγορη και εύκολη τεχνική που επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* (χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανών οργανισμών) επιλεγμένων αλληλουχιών DNA σε πολλαπλά αντίγραφα (Saiki et al., 1985,

Mullis et al., 1986). Η μέθοδος βασίζεται στην επαναλαμβανόμενη αντιγραφή ενός τμήματος DNA, γνωστού ή αγνώστου, με τη βοήθεια δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers) σχεδιασμένων σε γνωστές αλληλουχίες οι οποίοι λειτουργούν ως εκκινητικά μόρια για τη δημιουργία συμπληρωματικών αλυσίδων με βάση ένα εκμαγείο DNA και μίας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης που επιτρέπει την επέκταση των συμπληρωματικών αλυσίδων με την προσθήκη περίσσειας δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs). Τα βασικά συστατικά μίας αντίδρασης PCR αποτελούν:

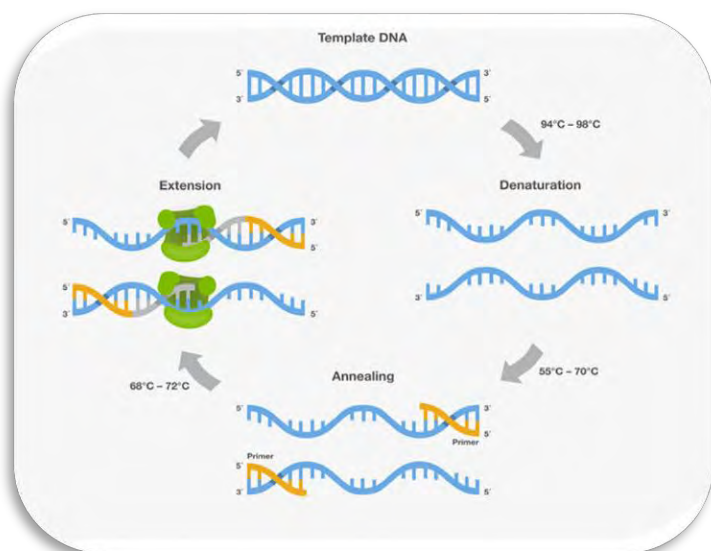
- Μία ειδική **DNA πολυμεράση**, όπως η Taq DNA πολυμεράση, που επιτρέπει τη χρήση της σε υψηλές θερμοκρασίες στα βήματα υβριδισμού και επιμήκυνσης καθώς έχει απομονωθεί από το θερμοανθεκτικό βακτήριο *Thermus aquaticus*. Η Taq DNA πολυμεράση δε διαθέτει δραστικότητα 3' → 5' εξωνουκλεάσης οπότε στο τελικό προϊόν παραμένουν νουκλεοτίδια που έχουν εισαχθεί λανθασμένα.
- Ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, τους **εκκινητές** (primers), που καθορίζουν τα όρια του τμήματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί. Οι εκκινητές πρέπει να είναι αντιπαράλληλου προσανατολισμού και καθένας συμπληρωματικός προς τη μία αλυσίδα του υπό εξέταση DNA. Αναφορικά με το σχεδιασμό τους, το μήκος των εκκινητών πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 18-24 νουκλεοτιδίων των οποίων η κατανομή να είναι τυχαία και η περιεκτικότητα σε G/C να είναι μεταξύ 40-60%. Παράλληλα, δεν πρέπει να εμφανίζουν συμπληρωματικότητα μεταξύ τους (στο 3' ή στο 5' άκρο τους) ώστε να αποφεύγεται η παραγωγή μη ειδικών προϊόντων (διμερή εκκινητών, primer-dimer) ενώ πρέπει να παρουσιάζουν παρόμοιες τιμές θερμοκρασίας τήξης T_m (melting temperature). Η θερμοκρασία τήξης υπολογίζεται με τον τύπο $T_m = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$ και η επιθυμητή θερμοκρασία κυμαίνεται μεταξύ 50°C-70°C.
- Ένα κατάλληλο διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (**dNTPs**: dATP, dTTP, dCTP, dGTP) για την ενσωμάτωση στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα του DNA
- Κατάλληλη συγκέντρωση διαλύματος **MgCl₂**, καθώς η παρουσία ιόντων Mg⁺² απαιτείται για τη δράση της DNA πολυμεράσης
- Ένα ειδικό **ρυθμιστικό διάλυμα (buffer)** της Taq πολυμεράσης ώστε να διατηρούνται σταθερά το pH και η ιοντική ισχύς της αντίδρασης
- Τη **μήτρα (template) DNA**

Μία τυπική αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους πολυμερισμού όπου κάθε κύκλος χαρακτηρίζεται από τρία κύρια στάδια:

Το στάδιο της αποδιάταξης (denaturation). Σε αυτό το στάδιο το DNA στόχος αποδιάσσεται στις δύο μονόκλωνες αλυσίδες του σε θερμοκρασία 94-95°C για 30 δευτερόλεπτα.

Το στάδιο της υβριδοποίησης (annealing). Σε αυτό το στάδιο οι ειδικοί εκκινητές υβριδίζονται στις αποδιατεταγμένες αλυσίδες του DNA λόγω συμπληρωματικότητας σε θερμοκρασία (T_a) περίπου 5°C χαμηλότερα από το υπολογιζόμενο σημείο τήξης (T_m), ιδανικά μεταξύ 55°C-65°C για 1 λεπτό.

Το στάδιο της επιμήκυνσης (elongation-extension). Σε αυτό το στάδιο η Taq πολυμεράση χρησιμοποιώντας ως μήτρα τους εκκινητές αρχίζει και επιμηκώνει την επιθυμητή αλληλουχία σε θερμοκρασία 72-74°C για 30 δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό.



Εικόνα 3.1 Σχηματική αναπαράσταση των βασικών σταδίων (αποδιάταξη, υβριδισμός, επιμήκυνση) για την ενίσχυση μίας αλληλουχίας-στόχου με μήτρα το DNA. Στην εικόνα παρουσιάζονται επίσης οι θερμοκρασίες αποδιάταξης, υβριδισμού και επιμήκυνσης (ThermoFisher).

Ο υπολογισμός των τελικών αντιγράφων της αντίδρασης προκύπτει από τον τύπο 2^n , όπου n είναι οι κύκλοι της PCR. Για τον επιτυχημένο πολλαπλασιασμό του DNA στόχου, ο αριθμός των κύκλων εξαρτάται από την συγκέντρωση του DNA στόχου και την απόδοση της PCR σε κάθε κύκλο. Ένας υπερβολικό αριθμός (>30) κύκλων μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή μη ειδικών προϊόντων, ενώ μικρότερος από τον απαιτούμενο στη μη ανίχνευση του DNA στόχου.

Μέθοδος

Πίνακας 3.2 Τα αντιδραστήρια και ο όγκος ανά αντίδραση που απαιτούνται για τη Συμβατική PCR

Αντιδραστήρια	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Όγκος/αντίδραση
DNA μήτρα (template)		5 – 40 ng/μl	(1 μl)
dNTPs συνολικά (total)	40 mM	0,8 mM	0,4 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer)	10x	1x	2 μl
Taq DNA πολυμεράση	5 u/μl	1 u	0,2 μl
Forward primer	10 pmol/μl	0,35 pmol/μl	0,7 μl
Reverse primer	10 pmol/μl	0,35 pmol/μl	0,7 μl
ddH ₂ O			15 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης			20 μl

1. Σε PCR tubes (200 μl) προστίθενται τα αντιδραστήρια που αναγράφονται στον παραπάνω πίνακα, πρώτα το ddH₂O, στη συνέχεια το buffer του ενζύμου, οι εκκινητές (primers, Forward και Reverse), τα dNTPs και τελευταία τη Taq DNA πολυμεράση
*το buffer αναδεύεται με vortex λόγω της ύπαρξης αλάτων, οι primers και τα dNTPs ανακινούνται με το χέρι
2. Τα δείγματα τοποθετούνται στο θερμικό κυκλοποιητή και ακολουθείται το παρακάτω πρόγραμμα

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 min	1
Αποδιάταξη DNA στόχου	95°C	30 sec	
Υβριδισμός εκκινητών	55°C	30 sec	35
Επιμήκυνση εκκινητών	72°C	40 sec	
Τελική επιμήκυνση	72°C	5 min	1
Συντήρηση	12°C		

Υλικά: DNA μήτρα / Εκκινητές (10pmol/μl ο καθένας) / dNTPs (40 mM total) / Taq DNA πολυμεράση (5 units/μl) / Ρυθμιστικό διάλυμα (10x) / ddH₂O

3.5.2 Σύνθεση cDNA με PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR – Reverse Transcription PCR)

Η PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) αποτελεί ένα πολύτιμο και ευαίσθητο εργαλείο για τη μελέτη και την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο RNA. Η αρχή της μεθόδου είναι ίδια με αυτή της συμβατικής PCR, αλλά στην RT-PCR ως αρχικό δείγμα χρησιμοποιείται το RNA αντί για το DNA. Με τη δράση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase), μία RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, το RNA μετατρέπεται σε cDNA. Η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιείται με τη χρήση τυχαίων εξαμερών, ολιγοdTs ή ειδικούς εκκινητές (συμπληρωματικούς ως προς την αλληλουχία στόχο). Για την RT-PCR έγινε χρήση του PrimeScript™ RT reagent Kit της εταιρίας TaKaRa.

Πίνακας 3.3 Τα αντιδραστήρια και ο όγκος ανά αντίδραση που απαιτούνται για την RT-PCR

	Αντιδραστήρια	Όγκος/αντίδραση
1	Buffer 5x PrimeScript™	4 μl (1x)
2	Enzyme Mix RT PrimeScript™	1 μl
3	oligodT Primer	1 μl
4	random Primer	1 μl
5	dH ₂ O RNA free	4 μl
	RNA	9 μl
	Τελικός όγκος αντίδρασης	20 μl

1. Προετοιμασία του μίγματος (mix) για όλα τα δείγματα με κατά σειρά προσθήκη H₂O, Buffer 5x PrimeScript™, oligodT Primer, random Primer και Enzyme Mix RT PrimeScript™
**για το buffer προτείνεται σύντομο vortex ενώ οι primers ανακινούνται με το χέρι*
**η εργασία γίνεται πάντα στον πάγο και κατά την προετοιμασία του mix προστίθεται παραπάνω ποσότητα από την, σύμφωνα με το πρωτόκολλο, αναγραφόμενη, ώστε να μειωθούν οι απώλειες λόγω πιπεταρίσματος (pipetting)*
2. Προσθήκη του RNA και μεταφορά του mix σε PCR tubes (0,5 ml)

3. Επώαση στους 37°C για 15 λεπτά (Αντίστροφη μεταγραφή), στους 85°C για 5 δευτερόλεπτα (Απενεργοποίηση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφή), στους 4°C για συντήρηση
4. Διατήρηση του συντιθέμενου cDNA σε θερμοκρασία -20°C

Υλικά: Buffer 5x PrimeScript™ / oligodT Primer / random Primer / Enzyme Mix RT PrimeScript™ / RNA / ddH₂O

3.5.3 PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)

Η PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) ή ποσοτική PCR (qPCR) αποτελεί μία αξιόπιστη τεχνική που επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών στόχων. Σε αντίθεση με τη συμβατική PCR όπου το ενισχυμένο προϊόν προσδιορίζεται μετά το πέρας της αντίδρασης μέσω ηλεκτροφόρησης, η PCR πραγματικού χρόνου επιτρέπει την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των ενισχυμένων προϊόντων καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, σε πραγματικό χρόνο.

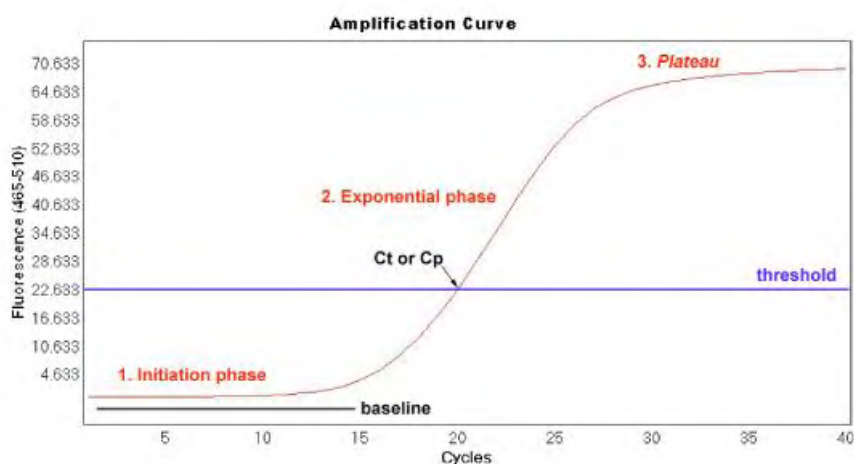
Η παρατήρηση της ενίσχυσης σε πραγματικό χρόνο γίνεται με τη χρήση μίας φθορίζουσας χρωστικής, της SYBR Green I, η οποία έχει την ικανότητα να προσδένεται στα δίκλινα μόρια DNA που συντίθεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, παράγοντας τελικά φθορισμό. Η ένταση του φθορισμού αντικατοπτρίζει την ποσότητα των ενισχυμένων προϊόντων σε κάθε κύκλο. Σημαντικό μειονέκτημα της χρήσης της SYBR Green I ως μέσο ανίχνευσης του σήματος είναι το γεγονός ότι προσδένεται μη ειδικά σε οποιοδήποτε δίκλινο μόριο εκτός του μορίου-στόχου, όπως διμερή εκκινητών. Σαν αποτέλεσμα η παρουσία μη ειδικών προϊόντων σε μία αντίδραση Real-Time PCR μπορεί να συνεισφέρει στο συνολικό φθορισμό και να επηρεάσει την ακρίβεια της ποσοτικοποίησης. Ωστόσο, η ύπαρξη καμπυλών τήξης (melting curve) μετά το πέρας της αντίδρασης επιτρέπουν το διαχωρισμό του φθορισμού των μορίων-στόχων από αυτόν των μη ειδικών προϊόντων της αντίδρασης. Οι καμπύλες τήξης προκύπτουν ύστερα από την αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων και η ανάλυσή τους (melting curve analysis) οδηγεί στον προσδιορισμό της θερμοκρασίας τήξης (T_m) κάθε προϊόντος της αντίδρασης η οποία διαφοροποιείται ανάλογα με το μέγεθος των προϊόντων. Εκτός από τις καμπύλες τήξης, ο έλεγχος ύπαρξης εσωτερικών επιμολύνσεων και μη ειδικών προϊόντων πραγματοποιείται και με τη χρήση αρνητικών μαρτύρων (NTC-Non Template Control). Πρόκειται για δείγματα που περιέχουν όλα τα συστατικά της αντίδρασης εκτός από τον ειδικό στόχο και ιδανικά δεν πρέπει να ανιχνεύεται σήμα.

Κατά τους πρώτους κύκλους της αντίδρασης ο φθορισμός είναι ασθενής και παρατηρείται ο λεγόμενος «θόρυβος» της αντίδρασης, χωρίς την ανίχνευση κάποιου σήματος. Καθώς επέρχεται η εκθετική φάση, τα συστατικά της αντίδρασης καταναλώνονται, η αντίδραση επιβραδύνεται και καταλήγει στη φάση του plateau (κύκλοι 28-40). Στην εκθετική φάση της αντίδρασης, λόγω της συνεχούς συσσώρευσης προϊόντων, δίνεται ένα ανιχνεύσιμο σήμα φθορισμού. Ο αριθμός του κύκλου της αντίδρασης που απαιτείται ώστε το προϊόν να ξεπεράσει το όριο ανίχνευσης ονομάζεται threshold ή C_T . Η τιμή αυτή χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση του αρχικού δείγματος και είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής

ποσότητας της μήτρας DNA. Αξίζει να αναφερθεί, ότι για την απόλυτη ποσοτικοποίηση της αρχικής συγκέντρωσης των μορίων-στόχων γίνεται χρήση μίας πρότυπης καμπύλης που κατασκευάζεται ύστερα από διαδοχικές αραιώσεις δείγματος DNA γνωστής συγκέντρωσης.

Η Real-Time PCR χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη σχετικών αλλαγών στη γονιδιακή έκφραση. Για την αξιόπιστη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης ενός γονιδίου (mRNA) απαιτείται η κανονικοποίηση των δειγμάτων ως προς ένα γονίδιο αναφοράς. Ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιούνται συνήθως τα λεγόμενα γονίδια σταθερής έκφρασης, τα housekeeping genes (HKGs), των οποίων η έκφραση παραμένει (θεωρητικά) αμετάβλητη κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας και για αυτό μπορούν να δράσουν ως εσωτερικός μάρτυρας. Η επιλογή του κατάλληλου housekeeping gene για την κανονικοποίηση των δειγμάτων εξαρτάται από τον οργανισμό, τον ιστό που μελετάται, το αναπτυξιακό στάδιο και την πειραματική διαδικασία. Τελικά, η κανονικοποιημένη ποσότητα των μορίων-στόχων δίνεται ως σχετική έκφραση (relative expression) με βάση το γονίδιο αναφοράς η οποία υπολογίζεται σύμφωνα με τη μέθοδο Livak, συγκρίνοντας τα διαφορετικά C_T (Livak et al., 2001).

Η Real-Time PCR πραγματοποιείται με τη χρήση του ειδικού θερμικού κυκλοποιητή της εταιρίας Bio-Rad και η ανάλυση των δεδομένων με το πρόγραμμα Bio-Rad CFX Manager.



Εικόνα 3.2 Τα βασικά στάδια μία καμπύλης ενίσχυσης στη Real-Time PCR. Κατά τους πρώτους κύκλους PCR (initiation phase), δεν παρατηρείται φθορισμός. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase) ο φθορισμός αυξάνεται εκθετικά πριν φτάσει σε plateau. Σε αυτή την τελευταία φάση (plateau phase), η εξάντληση των αντιδραστηρίων οδηγεί σε μη ορατή αύξηση του φθορισμού. Με μπλε χρώμα αναπαρίσταται το κατώφλι (threshold) (Caister Academic Press).

Μέθοδος

1. Προετοιμασία του mix της αντίδρασης σύμφωνα με το πρόγραμμα Bio-Rad CFX Manager, με την εντολή Mastermix Calculator, για τελικό όγκο αντίδρασης 15μl, συγκέντρωση του supermix 2x, συγκέντρωση κάθε primer 10 pmol/μl (300 mM) και επιπλέον όγκο αντίδρασης 10% (είτε παραπάνω ανάλογα με τον αριθμό των αντιδράσεων). Η αντίδραση συμπληρώνεται με επιπλέον ποσότητα ddH₂O. Το supermix περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα, χρωστική SYBR green, dNTPs και DNA πολυμεράση.

2. Προσθήκη 10 μl mix σε ειδικά strips, στη συνέχεια προσθήκη επιθυμητής συγκέντρωσης DNA (όγκου 5 μl) και spind-down
**το spind-down γίνεται για να μη μείνουν υπολείμματα στα τοιχώματα των strip*
3. Το δείγμα τοποθετείται σε ειδικό θερμικό κυκλοποιητή και η αντίδραση πραγματοποιείται στις ακόλουθες συνθήκες:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Ενεργοποίηση της πολυμεράσης & αρχική αποδιάταξη	50°C	4 min	1
Αποδιάταξη DNA στόχου	95°C	30 sec	
Υβριδισμός & επιμήκυνση εκκινητών σε ορισμένη T_a	T _a	30 sec	40
Καμπύλη αποδιάταξης	95-55°C	5 min	1

Υλικά: DNA template / Primers / Supermix / ddH₂O

3.6 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (gel electrophoresis)

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μία μέθοδο διαχωρισμού, οπτικοποίησης και απομόνωσης μορίων που φέρουν φορτίο, όπως τα νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA) και οι πρωτεΐνες (Sambrook et al., 1989). Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή μετανάστευσης φορτισμένων μορίων υπό την επίδραση ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Η αναπτυσσόμενη ηλεκτροστατική δύναμη κατευθύνει τα φορτισμένα μόρια προς το ηλεκτρόδιο του αντίθετου φορτίου και ανάλογα με το φορτίο και τη μάζα τους, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν (μεταναστεύσουν) με διαφορετικές ταχύτητες. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου (για μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα) και η επιλογή εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος που υπόκειται προς διαχωρισμό. Το πήκτωμα αγαρόζης δεν είναι συμπαγές αλλά περιλαμβάνει πόρους επιτρέποντας στα φορτισμένα μόρια να περνούν από το εσωτερικό τους.

Η ηλεκτροφόρηση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται ευρέως για το διαχωρισμό μορίων DNA σε ουδέτερο pH. Κάτω υπό αυτές τις συνθήκες, τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA (λόγω των φωσφορικών τους ομάδων) κινούνται από την κάθοδο (-) προς την άνοδο (+). Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA εξαρτάται από το μέγεθος του DNA, τη συγκέντρωση της αγαρόζης, τη στεροδιάταξη του DNA, την τάση (volts) του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου, την παρουσία χρωστικών, τη σύσταση και την ιοντική ισχύ του διαλύματος ηλεκτροφόρησης (buffer).

Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης γίνεται μέσω του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr – Ethidium Bromide), μία φθορίζουσα χρωστική που έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και μπορεί να ανιχνευθεί ύστερα από την επίδραση υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας. Η ένταση της χρώσης είναι ανάλογη του μεγέθους του τμήματος του DNA. Παράλληλα, γίνεται η χρήση μίας χρωστικής φόρτωσης (gel loading) για τον έλεγχο της προόδου της ηλεκτροφόρησης και ενός μάρτυρα (ladder)

που περιέχει ζώνες γνωστού μοριακού βάρους ώστε ανάλογα με τη θέση της κάθε ζώνης να είναι εφικτός ο υπολογισμός του μοριακού βάρους των προς ανάλυση τμημάτων DNA.

Μέθοδος

1. Ανάμειξη επιθυμητής ποσότητας αγαρόζης και ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης TBE (0,5x) σε κωνική φιάλη και θέρμανση υπό ανάδευση έως ότου διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και το διάλυμα γίνει διαυγές
2. Ψύξη της κωνικής φιάλης με τρεχούμενο νερό υπό συνεχή ανάδευση
3. Προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (Ethidium Bromide) σε συγκέντρωση 0.5 µg/ml και ήρεμη ανακίνηση μέχρι να διαλυτοποιηθεί
4. Μεταφορά του διαλύματος αγαρόζης σε ειδικό καλούπι για τη διαμόρφωση και τη στερεοποίηση του με την προσαρμογή «χτενακίων» ώστε να προκύψουν οι θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων («πηγαδάκια»)
**χρησιμοποιείται ένα tip για την απομάκρυνση τυχόν φυσαλίδων στο πήκτωμα, ώστε η εικόνα της ηλεκτροφόρησης να είναι πιο καθαρή*
5. Αναμονή μέχρι την στερεοποίηση του πηκτώματος (20 – 45 λεπτά) και απομάκρυνση «χτενακίων»
**όσο πιο μεγάλη είναι η συγκέντρωση της αγαρόζης τόσο πιο γρήγορα πραγματοποιείται η στερεοποίηση του πηκτώματος*
6. Τοποθέτηση του πηκτώματος στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και προθήκη ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5x μέχρι να καλυφθεί πλήρως η επιφάνεια του πηκτώματος
**το buffer που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του πηκτώματος πρέπει να είναι το ίδιο με αυτό που θα χρησιμοποιηθεί και για τη συσκευή ηλεκτροφόρησης*
7. Προετοιμασία των προς ηλεκτροφόρηση δειγμάτων με την προσθήκη διαλύματος φόρτωσης που περιέχει χρωστική (6x loading buffer) σε αναλογία 1/5 και φόρτωση των δειγμάτων στις ειδικές θέσεις («πηγαδάκια»)
8. Φόρτωση 2 µl μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους (Ladder 1kb/1000bp BLUE)
9. Ηλεκτροφόρηση σε θερμοκρασία δωματίου, υπό τάση 100V για 45 λεπτά
**οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης ενδέχεται να τροποποιηθούν ανάλογα με το μέγεθος σε bp των προς ηλεκτροφόρηση δειγμάτων*
10. Έκθεση του πηκτώματος, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, σε UV ακτινοβολία και παρατήρηση της μετανάστευσης των μορίων DNA ως φθορίζουσες ζώνες

Υλικά: Αγαρόζη / TBE 0,5x / 6x loading buffer / Βρωμιούχο αιθίδιο

3.7 Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction)

Τμήματα DNA που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης μπορούν να απομονωθούν και να καθαριστούν από το πήκτωμα με στόχο να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω μελέτη. Τα kit αντιδράσεων που έχουν παρασκευάσει διάφορες εταιρείες για την ανάκτηση μορίων από πήκτωμα αγαρόζης, περιλαμβάνουν τα εξής βήματα: αρχικά την τήξη του πηκτώματος σε διάλυμα που περιέχει ισοθειοκυανική γουανιδίνη, τη σύνδεση του

DNA σε μεμβράνη παρουσία χαοτροπικών αλάτων και τελικά την έκλυση του DNA με προσθήκη ddH₂O. Για το gel extraction έγινε χρήση του kit GF-1, Nucleic Acid Extraction Kit της εταιρίας Vivantis.

Μέθοδος

1. Αποκοπή της ζώνης του πηκτώματος που αντιστοιχεί στο επιθυμητό τμήμα DNA, ύστερα από έκθεση σε UV ακτινοβολία, και τοποθέτησή του σε σωληνάκι τύπου erppendorf
2. Προσδιορισμός του καθαρού βάρους της ζώνης και προσθήκη ίσου όγκου Buffer GB ανάλογα με το βάρος της ζώνης
3. Φυγοκέντρηση και επώαση στους 50°C μέχρι να διαλυτοποιηθεί πλήρως το πήκτωμα
4. Μεταφορά του δείγματος σε στήλη που προσαρμόζεται σε σωλήνα συλλογής και φυγοκέντρηση σε 10000g για ένα (1) λεπτό
5. Απομάκρυνση του εκλούσματος
**επανάληψη του σταδίου 4 σε περίπτωση που έχει μείνει περίσσεια δείγματος*
6. Προσθήκη 750 μl Wash Buffer μέσα στη στήλη και φυγοκέντρηση σε 10000g για ένα (1) λεπτό
7. Απομάκρυνση του εκλούσματος
8. Φυγοκέντρηση σε 10.000g για ένα (1) λεπτό ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη
**το Wash Buffer πριν τη χρήση του πρέπει να έχει αναδιαλυθεί σε αιθανόλη. Η περίσσεια αιθανόλης ενδέχεται να επηρεάσει την ποιότητα του DNA.*
9. Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάκι τύπου erppendorf, προσθήκη 30 – 50 μl ζεστού (65–70°C) ddH₂O και αναμονή για δύο (2) λεπτά
10. Φυγοκέντρηση σε 10000g για ένα (1) λεπτό ώστε να γίνει η έκλυση του DNA
11. Διατήρηση του DNA στους 4°C ή στους -20°C

Υλικά: Buffer GB / στήλη / Wash Buffer / Αιθανόλη / DNA / ddH₂O / υδατόλουτρο (65–70°C)

3.8 In vitro μεταγραφή (In vitro transcription)

Η *in vitro* μεταγραφή (*in vitro* transcription) αποτελεί μία μέθοδο που επιτρέπει την κατευθυνόμενη, από ένα εκμαγείο, σύνθεση μορίων RNA οποιασδήποτε αλληλουχίας (μεγέθους ολιγονουκλεοτιδίων έως κιλοβάσεων σε ποσότητες από μg έως mg). Βασίζεται στη δημιουργία ενός εκμαγείου που ανοδικά της αλληλουχίας-στόχου περιέχει την αλληλουχία ενός υποκινητή προερχόμενη από έναν βακτηριοφάγο (όπως ο T7 βακτηριοφάγος). Στη συνέχεια, ακολουθεί η μεταγραφή αυτού του εκμαγείου από την RNA πολυμεράση που αναγνωρίζει την συγκεκριμένη αλληλουχία του υποκινητή. Για την *in vitro* μεταγραφή απαιτούνται ένα γραμμικό μόριο DNA το οποίο περιέχει έναν υποκινητή, τριφωσφορικά ριβονουκλεοτίδια, ένα ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει DTT και ιόντα Μαγνησίου και την κατάλληλη φαγική RNA πολυμεράση. Ως εκμαγεία για τη μεταγραφή μπορούν να χρησιμοποιηθούν PCR προϊόντα τα οποία φέρουν στο 5' άκρο τους την αλληλουχία αναγνώρισης της RNA πολυμεράσης, πλασμίδια, ολιγονουκλεοτίδια και μόρια cDNA. Για την *in vitro* μεταγραφή έγινε η χρήση του MEGAscript® Kit από την εταιρία Invitrogen.

Μέθοδος

Πίνακας 3.4 Τα αντιδραστήρια και ο όγκος ανά αντίδραση που απαιτούνται για την In-vitro transcription

Αντιδραστήρια	Όγκος/αντίδραση
Προϊόν PCR	10μl
ddH ₂ O	6μl
4 dNTPs (ATP, CTP, GTP, UTP)	4μl (το καθένα)
10X Reaction Buffer	4μl
Enzyme Mix	4μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	40μl

1. Απόψυξη των αντιδραστηρίων στον πάγο. Το 10x Reaction Buffer παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου καθώς περιέχει σπερμιδίνη που μπορεί να συνκατακρημνιστεί με το DNA αν η αντίδραση πραγματοποιηθεί στον πάγο.
**για το buffer προτείνεται vortex και για τα υπόλοιπα αντιδραστήρια quickspin*
2. Προσθήκη των αντιδραστηρίων σε tube σε θερμοκρασία δωματίου (RT) σύμφωνα με τη σειρά και τις ποσότητες που αναγράφονται στον πίνακα και καλή ανάμειξη με την πιπέτα (pipetting)
3. Επώαση στους 37°C για 16 – 20 ώρες
**ο χρόνος επώασης εξαρτάται από το μέγεθος και την μεταγραφική αποτελεσματικότητα του εκμαγείου του DNA. Για μικρά μετάγραφα (κάτω από 500 nt) απαιτείται περισσότερος χρόνος επώασης (πάνω από περίπου 16 ώρες).*
4. Προσθήκη 2μl TURBO DNase και επώαση στους 37°C για 15 λεπτά
5. Προσθήκη 115μl ddH₂O και 15μl διαλύματος οξικού αμμωνίου (Ammonium Acetate Stop Solution) και καλή ανάμειξη
6. Εκχύλιση με προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης/χλωροφορμίου (150μl/150μl) και φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα (full speed) για 3 λεπτά
**από τη φαινόλη λαμβάνεται η κάτω φάση*
7. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο eppendorf tube, προσθήκη 1x όγκου χλωροφορμίου και φυγοκέντρηση σε full speed για 3 λεπτά
8. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο eppendorf tube, προσθήκη 1x όγκου παγωμένης ισοπροπανόλης, για κατακρήμιση του RNA, και διατήρηση στον πάγο για 30 λεπτά
9. Φυγοκέντρηση σε full speed στους 4°C για 45 λεπτά
**παρατηρείται gel ίζημα*
10. Προσεκτική αφαίρεση του υπερκειμένου, πλύση με ίσο όγκο καθαρής αιθανόλης 70% (300μl) και φυγοκέντρηση στους 4°C για 5 λεπτά
11. Προσεκτική αφαίρεση της αιθανόλης, παρατηρώντας το ίζημα και στέγνωμα για περίπου 15 λεπτά (στον πάγο)
12. Προσθήκη 25μl ζεστού ddH₂O (50°C) και διατήρηση των δειγμάτων στους -20°C είτε στους -70°C

Υλικά: mix ενζύμου / μήτρα DNA με T7 promoter / 10X Reaction Buffer / dNTPs / TURBO DNase / Ammonium Acetate Stop Solution / ddH₂O / Φαινόλη / Χλωροφόρμιο / Ισοπροπανόλη



Αποτελέσματα

4.1 Ανάλυση της έκφρασης του γονιδίων *lingerer*, *hid* και *sry-a*

Με βάση δεδομένα μεταγραφωμικής του εργαστηρίου μας που προέκυψαν από σύγκριση του αναπαραγωγικού ιστού ώριμων σεξουαλικά θηλυκών εντόμων έβδομης ημέρας, πριν τη σύζευξή τους και 12 ώρες μετά από αυτή, επιλέχθηκε το γονίδιο *lingerer* για περαιτέρω μελέτη. Η μελέτη του γονιδίου εστιάστηκε σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια του δάκου της ελιάς (αυγά, προνύμφη 1^{ου} και 3^{ου} σταδίου και ενήλικο έντομο) αλλά και στο αναπαραγωγικό του σύστημα, ιδιαίτερα στους θηλυκούς βοηθητικούς αδένες (FAGs). Για μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα σε ότι αφορά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου καθορίστηκαν και τα πρότυπα έκφρασης δυο γονιδίων που εκφράζονται στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια των εντόμων, *sry-a* και *hid*.

Οι ιστοί που συλλέχθηκαν παρουσιάζονται στους Πίνακες 4.1 και 4.2. Συγκεκριμένα συλλέχθηκαν αυγά σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές μετά την ωαπόθεση: μία ώρα (1H), δύο ώρες (2H), τρεις ώρες (3H), τέσσερις ώρες (4H), πέντε ώρες (5H), οκτώ ώρες (8H), δεκαέξι ώρες (16H), εικοσιτέσσερις ώρες (24H) και σαράντα οκτώ ώρες (48H). Η συλλογή πραγματοποιήθηκε ανά διάστημα 15 λεπτών και τα αυγά διατηρήθηκαν σε καθορισμένες συνθήκες μέχρι το πέρας των συγκεκριμένων χρονικών διαστημάτων. Παράλληλα, συλλέχθηκαν προνύμφες πρώτου και τρίτου σταδίου (1st and 3rd larvae), νύμφες (pupae) και ενήλικα ώριμα (Day7) θηλυκά έντομα (adult). Οι αναπαραγωγικοί ιστοί θηλυκών βοηθητικών αδένων (FAGs) απομονώθηκαν την ημέρα μηδέν (Day 0), δηλαδή την ημέρα έκδυσης του τέλειου εντόμου, καθώς και τις ημέρες ένα (Day 1), δύο (Day 2), τρία (Day 3), τέσσερα (Day 4), πέντε (Day 5), έξι (Day 6) και την έβδομη ημέρα (BM), κατά την οποία θεωρείται ότι τα έντομα είναι ώριμα σεξουαλικά.

Πίνακας 4.1 Βιολογικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *lingerer*, *sry-a* και *hid* στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου *B. oleae*.

Ιστός	Δείγμα	Αριθμός εντόμων	Βιολογική επανάληψη
Αυγό (egg)	1H	40	1x
	2H	40	2x
	3H	50	2x
	4H	30	3x
	5H	30	2x
	8H	30	3x
	16H	30	3x
	24H	30	2x
	48H	30	2x
Προνύμφη (larvae)	1 st	20	4x
	3 rd	5	2x
Νύμφη (pupae)	-	5	2x
Ενήλικο έντομο (adult)	-	5	3x

Πίνακας 4.2 Βιολογικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *lingerer* στους βοηθητικούς αδένες (FAGs) του εντόμου *B. oleae*.

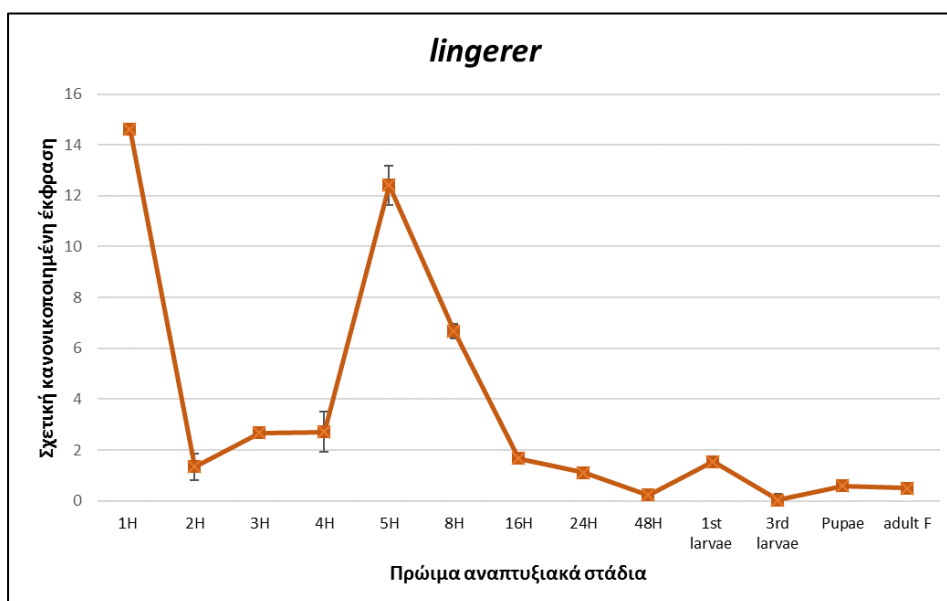
Ιστός	Δείγμα	Αριθμός εντόμων	Βιολογική επανάληψη
Θηλυκοί Βοηθητικοί Αδένες (FAGs)	Day 0	10	2x
	Day 1	10	2x
	Day 2	10	2x
	Day 3	10	2x
	Day 4	10	2x
	Day 5	10	2x
	Day 6	10	2x
	Day 7	10	2x

Μετά τη συλλογή των ιστών, ακολούθησε η απομόνωση του ολικού RNA για κάθε δείγμα και πραγματοποιήθηκε επεξεργασία με DNάση. Στη συνέχεια έγινε σύνθεση του cDNA με RT-PCR και το νέο-συντιθέμενο cDNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για τον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων με Real-Time PCR.

Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά γονίδια σταθερής έκφρασης (HKGs) ανάλογα με τη σταθερότητά τους στους υπό μελέτη ιστούς. Τα γονίδια σταθερής έκφρασης που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη, σύμφωνα με τους Sagri et al. (2017), ήταν για τα αυγά τα *RPL19* και *14-3-3zeta*, για την προνύμφη το *GAPDH*, για τη νύμφη και το ενήλικο το *RPL19* και για τους θηλυκούς βοηθητικούς αδένες το *GAPDH*.

4.1.2 Προφίλ έκφρασης του γονιδίου *lingerer*

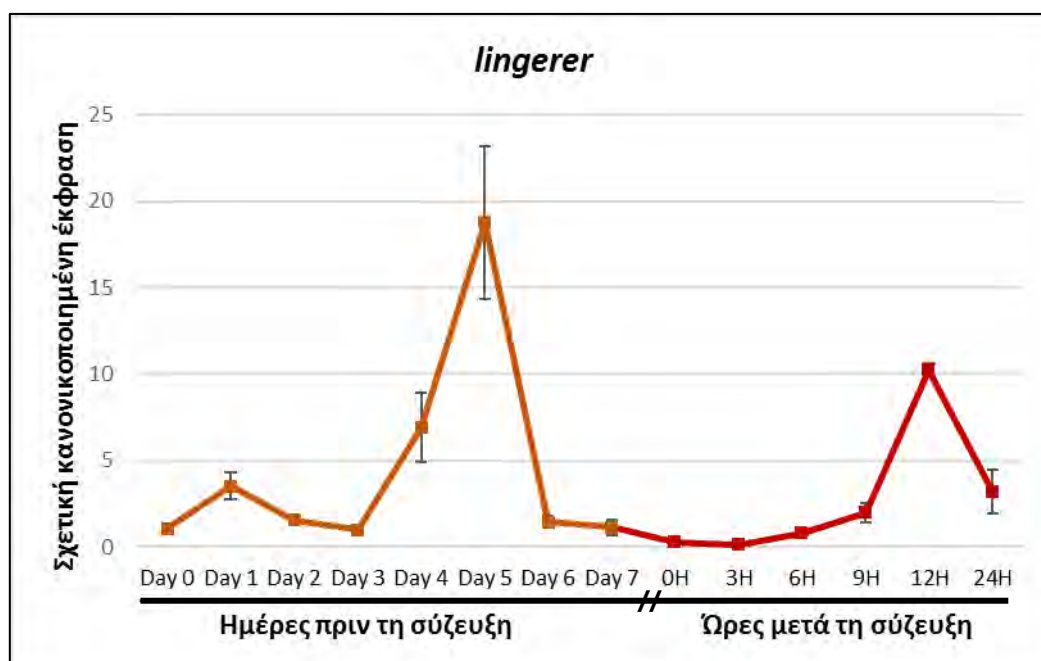
Η μελέτη των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *lingerer* ελέγχθηκε μέσω ποσοτικής Real-Time PCR με τη χρήση εκκινητών (Forward and Reverse) ομόλογων με την αλληλουχία-στόχο (Πίνακας 4.3).



Γράφημα 4.1 Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *lingerer* σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια (Αυγά, Προνύμφη, Νύμφη, Ενήλικο έντομο) του εντόμου *B. oleae*. Τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς την έκφραση των γονιδίων σταθερής έκφρασης *RPL19* και *GAPDH* για τα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια.

Το προφίλ έκφρασης του γονιδίου *lingerer* σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου *Bactrocera oleae* παρουσιάζεται στο Γράφημα 4.1. Το γονίδιο παρουσιάζει ιδιαίτερα υψηλή έκφραση την πρώτη ώρα (1H) της εμβρυογένεσης η οποία μειώνεται απότομα τη δεύτερη ώρα (2H). Από τη δεύτερη (2H) μέχρι την τέταρτη ώρα (4H) τα επίπεδα έκφρασης παρουσιάζουν μία προοδευτική αύξηση ενώ στην πέμπτη ώρα (5H) της εμβρυογένεσης η αυξάνεται φτάνοντας στα υψηλότερα επίπεδα. Στη συνέχεια, από την πέμπτη ώρα (5H) μέχρι και τη δέκατη έκτη ώρα (16H) η έκφραση του γονιδίου παρουσιάζει μία μείωση ενώ συνεχίζει να ελαττώνεται σημαντικά μέχρι και τις σαράντα οκτώ ώρες (48H). Κατά το στάδιο της προνύμφης πρώτου σταδίου (1st larvae) τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου φαίνεται να αυξάνονται και έπειτα να ελαττώνονται μέχρι να γίνουν μηδενικά στην προνύμφη τρίτου σταδίου (3rd larvae). Τέλος, στα στάδια της νύμφης (pupa) και του ενήλικου θηλυκού εντόμου (adult F) η έκφραση του γονιδίου παραμένει σε χαμηλά επίπεδα παρουσιάζοντας όμως μία ανοδική τάση στο στάδιο της νύμφης.

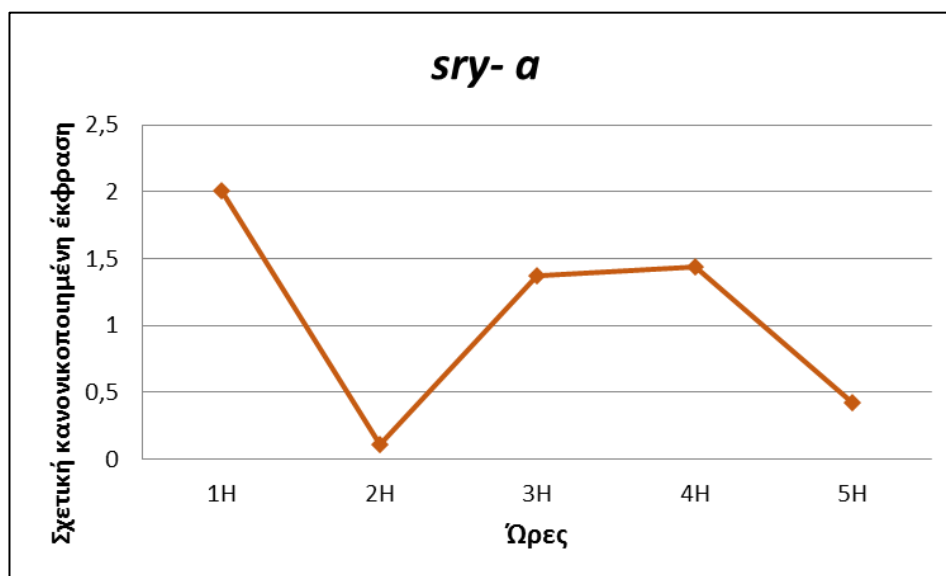
Στο παρακάτω γράφημα (Γράφημα 4.2) παρουσιάζεται το προφίλ έκφρασης του γονιδίου *lingerer* στους θηλυκούς βοηθητικούς αδένες (FAGs) του εντόμου *Bactrocera oleae* τις ημέρες 1-7 πριν τη σύζευξη και τις πρώτες 24 ώρες μετά τη σύζευξη. Συγκεκριμένα, το γονίδιο παρουσιάζει μια μικρή αύξηση την πρώτη ημέρα (Day 1) ζωής του εντόμου, σε σύγκριση με την ημέρα 0 (Day 0), η οποία τη δεύτερη ημέρα (Day 2) μειώνεται κατά τη σε παραπλήσια επίπεδα με την ημέρα μηδέν (Day 0). Η έκφραση συνεχίζει να ελαττώνεται την τρίτη ημέρα (Day 3) μέχρι την παρατήρηση μίας απότομης αύξησης στη συγκέντρωση των μεταγράφων του γονιδίου την πέμπτη ημέρα (Day 5). Στη συνέχεια, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ελαττώνονται αισθητά την έκτη ημέρα (Day 6) μέχρι την έβδομη ημέρα (Day 7) όπου το έντομο γίνεται σεξουαλικά ώριμο. Μετά τη σύζευξη, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου διατηρούνται χαμηλά μέχρι την τρίτη ώρα (3H). Μετά το τέλος των τριών ωρών, η έκφραση αρχίζει σταδιακά να αυξάνεται μέχρι να παρατηρηθεί μία απότομη αύξηση μεταξύ των εννέα (9H) και δώδεκα ωρών (12H). Τέλος, τα επίπεδα έκφρασης μειώνονται μέχρι να φτάσουν περίπου στα ίδια που παρατηρήθηκαν στις εννέα ώρες (9H).



Γράφημα 4.2 Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *lingerer* στους θηλυκούς βοηθητικούς αδένες του εντόμου *B. oleae* τις ημέρες 0-7 πριν τη σύζευξη και τις 24 ώρες μετά τη σύζευξη. Τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς την έκφραση του γονιδίου σταθερής έκφρασης *GAPDH*.

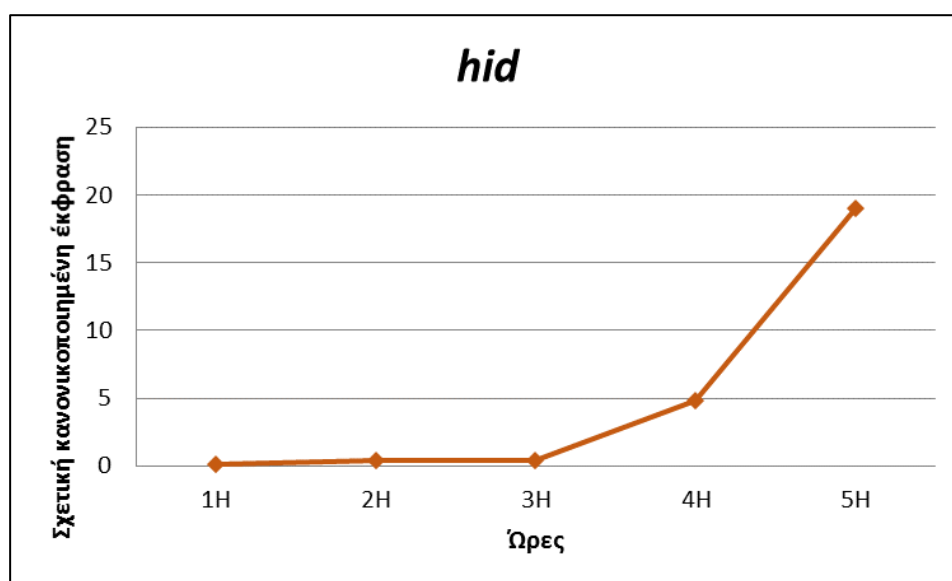
4.2.2 Προφίλ έκφρασης των γονιδίων *sry-a* και *hid*

Η μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *sry-a* και *hid* ελέγχθηκε μέσω ποσοτικής Real-Time PCR με τη χρήση εκκινητών (Forward and Reverse) ομόλογων με τις εκάστοτε αλληλουχίες-στόχους (Πίνακας 4.3). Η ανάλυση της έκφρασης έγινε με ένα βιολογικό δείγμα λόγω έλλειψης επαρκούς βιολογικού υλικού.



Γράφημα 4.3 Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *sry-a* κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου *B. oleae*. Τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί χρησιμοποιώντας τα γονίδια σταθερής έκφρασης *RPL19* και *14-3-3zeta*.

Στο Γράφημα 4.3 παρουσιάζεται το προφίλ έκφρασης του γονιδίου *sry-a* στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια (αυγά) του εντόμου *Bactrocera oleae*. Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο παρουσιάζει τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης την πρώτη ώρα (1H) της εμβρυογένεσης η οποία ελαττώνεται απότομα κατά τη δεύτερη ώρα (2H). Από τη δεύτερη μέχρι την τέταρτη ώρα (4H) παρουσιάζεται μία σταδιακή αύξηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου η οποία ελαττώνεται την πέμπτη ώρα (5H).



Γράφημα 4.4 Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *hid* κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου *B. oleae*. Τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί χρησιμοποιώντας τα γονίδια σταθερής έκφρασης *RPL19* και *14-3-3zeta*.

Το προφίλ έκφρασης του γονιδίου *hid* στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια (αυγά) του εντόμου *Bactrocera oleae*, παρουσιάζεται στο Γράφημα 4.4. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα κατά τις τρεις πρώτες ώρες της εμβρυογένεσης (1H, 2H, 3H) ενώ στη συνέχεια παρουσιάζουν σημαντική αύξηση μέχρι την πέμπτη ώρα (5H).

Πίνακας 4.3. Οι αλληλουχίες των εκκινητών (Forward και Reverse) που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης των επιλεγμένων γονιδίων μέσω Real-Time PCR καθώς και των γονιδίων σταθερής έκφρασης που χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Στον πίνακα αναφέρεται και το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος σε base pairs (bp).

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητών (5'→3')	Μέγεθος αναμενόμενου προϊόντος (bp)
<i>lingerer</i>	F: CGCGTATAGCCTAAAACCCAC	124
	R: TGCAGGGTGATATCCTCCAC	
<i>sry-a</i>	F: GTGCGGTAAGCGATTCCA	118
	R: CGACACTGCCTGAACTGA	
<i>hid</i>	F: GATTGCATCGTAGCCTCTCA	120
	R: AAACGGTCATCGAACTCATC	
<i>RPL19</i>	F : AACAAACGTGTACTGATGG	103
	R: CACGTACTTTATGTCGTCTG	
<i>GAPDH</i>	F: ATGAAGGTCGTATCTAATGC	115
	R: TAGTTGCGTGAACAGTAGTC	
<i>14-3-3zeta</i>	F: GGTCTAGCACTAAACTTTTC	138
	R: TGAGTCTTTGTATGAGTCC	

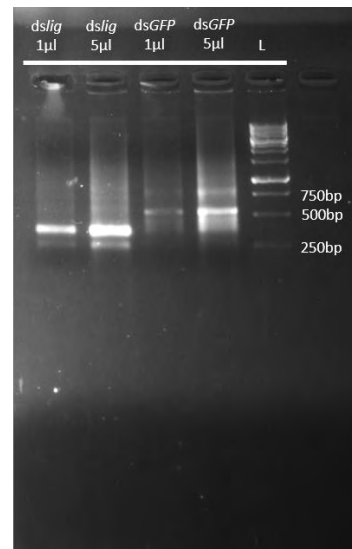
4.2 Δημιουργία dsRNA για την παροδική σίγηση του γονιδίου *lingerer*

Για την παροδική σίγηση του γονιδίου *lingerer*, ήταν απαραίτητη η δημιουργία δίκλωνων τμημάτων RNA (dsRNA) ομόλογων με το γονίδιο-στόχο. Για το σκοπό αυτό σχεδιάστηκαν εκκινητές οι οποίοι φέρουν στο 5' άκρο τους την αλληλουχία του T7 υποκινητή (Πίνακας 4.4) την οποία αναγνωρίζει η RNA πολυμεράση του βακτηριοφάγου T7 και μπορεί να ξεκινήσει τη διαδικασία της μεταγραφής.

Πίνακας 4.4 Οι αλληλουχίες των εκκινητών (Forward και Reverse) που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία του dsRNA του γονιδίου *lingerer*, καθώς και το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος. Με μικρά γράμματα παρουσιάζεται η αλληλουχία που αναγνωρίζει η T7 RNA πολυμεράση.

Γονίδιο	Αλληλουχία T7 εκκινητών (5'→3')	Μέγεθος αναμενόμενου προϊόντος
<i>lingerer</i>	R: -taatacgactcactataggg-TGTGGTAAGTGGTGGCGTTA	460bp
	F: -taatacgactcactataggg-GTTGTTGTTGCTGCTGTTGC	
<i>GFP</i>	R: -taatacgactcactataggg-GATATCTGCAGAATTCGCC	510bp
	F: -taatacgactcactataggg-CCGCCAGTGTGCTGGAA	

Το dsRNA δημιουργήθηκε με μήτρα το cDNA ενήλικων θηλυκών εντόμων ώριμων σεξουαλικά (Day 7) και τη χρήση των T7 εκκινητών ύστερα από PCR και in vitro μεταγραφή. Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR ηλεκτροφορήθηκαν για την ποσοτικοποίησή τους και την εξακρίβωση τυχόν ύπαρξης παραπροϊόντων (Εικόνα 4.1). Παράλληλα, για τον έλεγχο του πειράματος σίγησης είναι απαραίτητη η χρήση δείγματος ελέγχου (control). Το control που δημιουργήθηκε ήταν δίκλωνο τμήμα RNA του γονιδίου *GFP* (ds*GFP*).



Εικόνα 4.1. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης του dsRNA των γονιδίων *lingerer* και *GFP*. Ως μάρτυρας μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε ο 1kp/1000bp BLUE GeneON (L).



Συζήτηση

Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάστηκε στη διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου *lingerer* το οποίο φαίνεται να εμπλέκεται ενεργά στη διαδικασία της αναπαραγωγής και της πρώιμης ανάπτυξης του *B. oleae*. Πραγματοποιήθηκε μελέτη της έκφρασής του σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου και σε ιστούς του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος ώστε να κατανοηθεί περαιτέρω ο ρόλος του σε αυτές τις διαδικασίες.

Ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου *lingerer* στην ανάπτυξη

Το γονίδιο *lingerer* επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη ύστερα από την ανάλυση RNAseq δεδομένων του εργαστηρίου πριν και δώδεκα ώρες μετά το πέρας της σύζευξης. Αυτή είναι και η πρώτη αναφορά του γονιδίου αυτού στο *Bactrocera oleae*. Για την πιο ολοκληρωμένη κατανόησή του επιλέχθηκε αρχικά να μελετηθεί το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια. Για αυτό το σκοπό απομονώθηκαν ιστοί από αυγά σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα (1H, 2H, 3H, 4H, 5H, 8H, 16H, 24H και 48H), προνύμφες 1^{ου} και 3^{ου} σταδίου, νύμφες και ενήλικα έντομα και τα επίπεδα έκφρασης μελετήθηκαν με Real-Time PCR. Τα προς ανάλυση δείγματα που επιλέχθηκαν αντιπροσωπεύουν ένα μεγάλο φάσμα για την πλήρη παρατήρηση της πρώιμης ανάπτυξης του εντόμου. Σύμφωνα με τη μελέτη των επιπέδων μεταγραφής του γονιδίου (Γράφημα 4.1), παρατηρήθηκε υψηλή έκφρασή του την 1^η ώρα μετά τη γονιμοποίηση και την 5^η ώρα της εμβρυογένεσης ενώ απότομη μείωση των επιπέδων έκφρασής του παρατηρήθηκε κατά τη 2^η και τη 16^η ώρα της εμβρυογένεσης. Παράλληλα, μια μικρή αύξηση της έκφρασης του γονιδίου εμφανίστηκε κατά το στάδιο της προνύμφης 1^{ου} σταδίου, η οποία μειώθηκε στην προνύμφη 3^{ου} σταδίου.

Στη *Drosophila melanogaster* κατά τα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης (πρώιμη αυλάκωση) το μητρικής προέλευσης mRNA του *lingerer* κατανέμεται ομοιόμορφα στο έμβryo ενώ η ζυγωτική του έκφραση εντοπίζεται κατά το στάδιο του κυτταρικού βλαστοδέρματος. Κατά τη γαστριδίωση, περίπου 2-3 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, τα επίπεδα έκφρασης του *lingerer* βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα και αυξάνονται στο στάδιο 9 της εμβρυογένεσης (νευροβλάστες), 5-7 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Στην προνύμφη 3^{ου} σταδίου μέχρι και το πρώτο στάδιο της νύμφης, το *lingerer* παρουσιάζει ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα έκφρασης καθώς η παρουσία του είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική σύζευξη των εντόμων (Kuniyoshi et al., 2002). Μακροσκοπικά, το πρότυπο έκφρασης που προτείνεται από τους Kuniyoshi et al. (2002) φαίνεται να συμφωνεί με αυτό που εμφανίζεται στο *B. oleae* ανεξάρτητα από τις διαφορικές χρονικές στιγμές της ανάπτυξης του κάθε είδους.

Πιο αναλυτικά, εστιάζοντας στα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης (1H-8H), μελέτες στη *D. melanogaster* έδειξαν ότι για τη μετάβαση από τη μητρική στη ζυγωτική έκφραση του γονιδιώματος απαιτείται αρχικά η αποικοδόμηση μία ομάδας μητρικών mRNAs και στη συνέχεια η ενεργοποίηση της μεταγραφής του ζυγωτικού γονιδιώματος (Εικόνα 1.5). Οι Laver et al. (2015) πρότειναν ότι η αποικοδόμηση των μητρικών mRNAs συμβαίνει με μηχανισμούς που δρουν πρώιμα, περίπου 1-3 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, και όψιμα, πάνω από 3 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Η αποικοδόμηση του μητρικού mRNA του *lingerer*, στο *B. oleae*, φαίνεται να συμβαίνει κατά την πρώτη ώρα μετά τη γονιμοποίηση καθώς παρουσιάζει απότομη μείωση στα επίπεδά του τη δεδομένη χρονική στιγμή, στοιχείο που συνηγορεί με το χρονικό πλαίσιο αποικοδόμησης των μητρικών μεταγράφων στη *Drosophila*.

Στην ίδια μελέτη, οι Laver et al. (2015) αναφέρουν ότι η ενεργοποίηση της μεταγραφής του ζυγωτικού γονιδιώματος πραγματοποιείται σε δύο «κύματα». Το πρώτο «κύμα» μεταγραφής μίας ομάδας γονιδίων λαμβάνει χώρα περίπου μία ώρα μετά την γονιμοποίηση, ενώ το δεύτερο «κύμα», μεγαλύτερης έντασης, 2-3 ώρες μετά την γονιμοποίηση. Το δεύτερο «κύμα» συνδέεται άμεσα με την μετάβαση μεροβλαστιδίου (MBT) που σηματοδοτείται από την κυτταροποίηση (cellularization). Ωστόσο, η κυτταροποίηση (cellularization), εμφανίζει διαφορές στο *B. oleae* και τη *D. melanogaster* (Εικόνα 1.4). Στη *Drosophila* είναι εμφανής 2-3 ώρες μετά την ωοαπόθεση ενώ στο *B. oleae* συμβαίνει 6-10 ώρες μετά την ωοαπόθεση (Hanife, 2014). Στο *B.oleae* η έναρξη της έκφρασης του ζυγωτικού γονιδιώματος μπορεί να παρατηρηθεί από τις 2-5 ώρες όπου είναι εμφανής μία σταδιακή αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *lingerer* η οποία μπορεί να αιτιολογηθεί από την έντονη μεταγραφή του ζυγωτικού γονιδιώματος αν και συμβαίνει λίγο νωρίτερα από το αναμενόμενο χρονικό πλαίσιο.

Σημαντική διαφοροποίηση παρατηρείται και στα στάδια της προνύμφης του *B. oleae* όπου τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου είναι αυξημένα στην προνύμφη 1^{ου} σταδίου και όχι σε αυτήν του 3^{ου} σταδίου, όπως στη *Drosophila*. Πιθανόν, να είναι επαρκής η έκφραση του γονιδίου στην προνύμφη 1^{ου} σταδίου ώστε να παραχθούν ικανοποιητικά επίπεδα πρωτεΐνης *Lingerer* τα οποία είναι ικανά να δράσουν στην προνύμφη 3^{ου} σταδίου ώστε στο ενήλικο έντομο να είναι δυνατή η φυσιολογική περάτωση της σύζευξης.

Αναφορικά με το ρόλο του γονιδίου *lingerer*, δεδομένα των Baumgartner et al. (2013) και Kimura et al. (2015), με οργανισμό-μοντέλο τη *Drosophila*, υποστηρίζουν ότι η πρωτεΐνη που παράγεται «ενορχηστρώνει» τον καθορισμό των αξόνων κατά την εμβρυογένεση καθώς και την ανάπτυξη ιστών και οργάνων κατά τα όψιμα στάδια της εμβρυογένεσης. Ο ρόλος του γονιδίου στο *B. oleae* μπορεί να θεωρηθεί πανομοιότυπος με αυτόν στη *Drosophila* καθώς η έκφραση του γονιδίου παρατηρείται σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης του εντόμου. Πιο ειδικά, 10-60 ώρες μετά την ωοαπόθεση λαμβάνει χώρα η οργανογένεση στο *B. oleae* (Hanife, 2014) στοιχείο που συνδυάζεται με τη σχετική έκφραση του γονιδίου τις δεδομένες χρονικές στιγμές και επομένως την παραγωγή πρωτεΐνης μαζί με το ρόλο του στον καθορισμό του μεγέθους των οργάνων.

Για την καλύτερη κατανόηση των επιπέδων έκφρασης του *lingerer* κατά την εμβρυογένεση, θεωρήθηκε σημαντική η σύγκρισή τους με τα επίπεδα έκφρασης γνωστών γονιδίων με κομβικό ρόλο στην ανάπτυξη, τα *sry-a* και *hid*. Σε προηγούμενη μελέτη, οι Sagri et al. 2014 ανέλυσαν την έκφραση αυτών των γονιδίων σε ένα πιο ευρύ χρονικό πλαίσιο (σε περισσότερες ώρες). Στην παρούσα ανάλυση η μελέτη των διαφορών στην έκφραση εστιάστηκε σε πιο καθορισμένα χρονικά διαστήματα και συγκεκριμένα τις πρώτες πέντε ώρες της εμβρυογένεσης όπου φαίνεται να είναι καθοριστικές για την ανάπτυξη του εμβρύου. Επομένως, όπως και για το γονίδιο *lingerer*, απομονώθηκαν αυγά σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα (1H, 2H, 3H, 4H και 5H) και τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *sry-a* και *hid* αναλύθηκαν με Real-Time PCR.

Όσον αφορά το γονίδιο *sry-a*, σύμφωνα με το πρότυπο έκφρασής του στο *B. oleae* (Γράφημα 4.3), παρατηρήθηκε ιδιαίτερα υψηλή έκφραση αμέσως μετά τη γονιμοποίηση και κατά την τέταρτη ώρα της εμβρυογένεσης. Αντίθετα, αισθητή μείωση στα επίπεδα των μεταγράφων του γονιδίου παρατηρήθηκε τη δεύτερη και την πέμπτη ώρα της εμβρυογένεσης. Μακροσκοπικά, το πρότυπο έκφρασης του *sry-a* φαίνεται να συμφωνεί με το προφίλ έκφρασης του γονιδίου *lingerer* εστιάζοντας στις πέντε πρώτες ώρες της εμβρυογένεσης (Γράφημα 4.1).

Στη *Drosophila melanogaster*, το γονίδιο *sry-a* μεταγράφεται στο στάδιο του κυτταρικού βλαστοδέρματος σε όλους του σωματικούς πυρήνες μέχρι την έναρξη της γαστριδίωσης και φαίνεται να εκφράζεται για μία μόνο ώρα κατά τη διάρκεια ζωής της μύγας (Schweisguth et al., 1990). Παράλληλα, τόσο στη *Drosophila* όσο και στη *C. capitata*, το *sry-a* εκφράζεται στο ζυγωτό ωστόσο τα αντίστοιχα μετάγραφα στο *B. oleae* έχουν μεγαλύτερη ομοιότητα με αυτά ενός *sry-a-like* γονιδίου το οποίο επίσης εμπλέκεται στο σχηματισμό του κυτταρικού βλαστοδέρματος (Schetelig, 2009, Sagri et al., 2014). Σύμφωνα με τους Sagri et al. (2014) το *sry-a-like* γονίδιο στο *B. oleae* κληρονομείται μητρικά υποδεικνύοντας ένα διαφορετικό μοριακό μηχανισμό ρύθμισης της μεταγραφής. Επομένως, η αυξημένη έκφραση του *sry-a*, για το *B. oleae* του *sry-a-like*, την πρώτη ώρα της εμβρυογένεσης πιθανώς δικαιολογείται λόγω της μητρικής του προέλευσης, όπως συμβαίνει και στο γονίδιο *lingerer*. Ταυτόχρονα, η απότομη μείωση των επιπέδων έκφρασης του *sry-a* κατά τη δεύτερη ώρα μπορεί να συνδέεται με την αποικοδόμηση των μητρικών μεταγράφων κατά το πρώτο στάδιο της μετάβασης από τη μητρική στη ζυγωτική έκφραση του γονιδιώματος (MZT), στοιχείο που παρατηρείται και στο προφίλ έκφρασης του *lingerer*.

Στο στάδιο της κυτταροποίησης, ο έλεγχος της ανάπτυξης μεταβαίνει από τη μητέρα στο ζυγωτό και επομένως απαιτούνται μετάγραφα που συντίθενται από το ζυγωτό. Με βάση την έρευνα των Schetelig et al. (2009), η οποία υποστηρίζει ότι ο σχηματισμός του κυτταρικού βλαστοδέρματος (κυτταροποίηση) στη *C. capitata* λαμβάνει χώρα 9-11 ώρες μετά την ωοαπόθεση, οι Sagri et al. (2014) πρότειναν ότι η κυτταροποίηση στο *B. oleae*, ένα άλλο μέλος της οικογένειας Tephritidae, πραγματοποιείται στις 8 ώρες με δεδομένο ότι τα επίπεδα έκφρασης του *sry-a* ήταν ιδιαίτερα υψηλά τη δεδομένη χρονική στιγμή. Εστιάζοντας στο προφίλ έκφρασης του γονιδίου *sry-a* τις πέντε πρώτες ώρες της εμβρυογένεσης, η αύξηση στην έκφραση που παρατηρείται κατά τις 2-4 ώρες μετά τη γονιμοποίηση μπορεί να συνδεθεί με το πρώτο «κύμα» της μεταγραφής του ζυγωτικού γονιδιώματος, που λαμβάνει χώρα περίπου μία ώρα μετά τη γονιμοποίηση. Η αυξημένη έκφραση του *sry-a* που παρατήρησαν οι Sagri et al. (2014) στις 8 ώρες πιθανώς να οφείλεται στο δεύτερο «κύμα» μεταγραφής του ζυγωτικού γονιδιώματος. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με τα επίπεδα έκφρασης του *lingerer* στις 2-4 ώρες από τη γονιμοποίηση, μπορεί να θεωρηθεί ότι παρουσιάζεται ίδιο πρότυπο με αυτό του γονιδίου *sry-a* το οποίο οφείλεται στο πρώτο «κύμα» της μεταγραφής του ζυγωτικού γονιδιώματος.

Όσον αφορά το γονίδιο *hid*, σύμφωνα με το πρότυπο έκφρασής του στο *B. oleae* τις πρώτες πέντε ώρες της εμβρυογένεσης (Γράφημα 4.4), παρατηρήθηκε ιδιαίτερα υψηλή έκφραση κατά την πέμπτη ώρα μετά τη γονιμοποίηση. Μακροσκοπικά, το πρότυπο έκφρασης του *hid* δε φαίνεται να συμφωνεί με το προφίλ έκφρασης του γονιδίου *lingerer* (Γράφημα 4.1), ούτε με αυτό του γονιδίου *sry-a* (Γράφημα 4.3) αν και παρατηρείται μία σχετική ομοιότητα κατά τις 4-5 ώρες της εμβρυογένεσης.

Στη *Drosophila*, το γονίδιο *hid*, με σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης, εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα κατά το στάδιο του συγκυτιακού βλαστοδέρματος, αυξάνεται στο στάδιο της γαστριδίωσης και η έκφρασή του συνεχίζει σε όλη την εμβρυογένεση (Fisher et al., 2012). Η γαστριδίωση στη *Drosophila* ξεκινάει περίπου 3 ώρες μετά τη γονιμοποίηση ενώ στην *Ceratitis capitata* μετά την 11^η ώρα της εμβρυογένεσης (Schetelig et al., 2009). Σύμφωνα με τους Sagri et al. (2014) προτείνεται ότι η γαστριδίωση στο *B. oleae* λαμβάνει χώρα περίπου στις 12 ώρες της εμβρυογένεσης με την πιο έντονη δράση της να συμβαίνει μεταξύ των 15-18 ωρών. Ωστόσο, από το προφίλ έκφρασης του γονιδίου *hid* παρατηρείται μία αξιοσημείωτη αύξηση στις 5 ώρες της εμβρυογένεσης η οποία ενδέχεται να συνδυάζεται με τη ζυγωτική έκφραση του γονιδίου κατά το στάδιο του κυτταρικού

βλαστοδέρματος που σημειώνεται πριν τη γαστριδίωση, όπως ακριβώς συμβαίνει με τα γονίδια *lingerer* και *sry-a*.

Ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου *lingerer* στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα

Σε συνέχεια της διερεύνησης του ρόλου του γονιδίου *lingerer*, επιλέχθηκε ως κομβικό σημείο η μελέτη της έκφρασής του στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα του δάκου της ελιάς. Παρόλο που ολόκληρο το αναπαραγωγικό σύστημα του θηλυκού είναι θεμελιώδες για την απόδοση της αναπαραγωγής, ο ρόλος των θηλυκών βοηθητικών αδένων και των γονιδίων που εκφράζονται σε αυτούς έχει μελετηθεί ελάχιστα στις διάφορες τάξεις εντόμων σε σχέση με τους αρσενικούς αναπαραγωγικούς ιστούς (Lawniczak et al., 2004, Mack et al., 2006, Rogers et al., 2008). Για αυτό το σκοπό, απομονώθηκαν αναπαραγωγικοί ιστοί από θηλυκούς βοηθητικούς αδένες και μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *lingerer* από την πρώτη ημέρα ζωής του εντόμου μέχρι και την έβδομη, ημέρα όπου τα έντομα είναι σεξουαλικά ώριμα και παρθένα, καθώς και 24 ώρες μετά τη σύζευξη.

Σύμφωνα με τη μελέτη των επιπέδων μεταγραφής του γονιδίου πριν τη σύζευξη (Γράφημα 4.2), παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση της έκφρασης του γονιδίου την πρώτη ημέρα ζωής του εντόμου η οποία μειώνεται σταδιακά και στη συνέχεια αυξάνεται ιδιαίτερα την 5^η ημέρα ζωής του. Μετά τη σύζευξη, παρουσιάζεται μια σημαντική αύξηση στην έκφραση του γονιδίου μεταξύ των ωρών 9 και 12, η οποία τις επόμενες 12 ώρες μειώνεται ξανά.

Σύμφωνα με τους Kuniyoshi et al. (2002), εκτός από το ΚΝΣ και τους δίσκους ενήλικου, το γονίδιο *lingerer* εκφράζεται στις γονάδες με κύριο ρόλο τη φυσιολογική έναρξη και τον τερματισμό της σύζευξης. Συγκεκριμένα, αρσενικά της *D. melanogaster* που φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο *lingerer* εμφανίζουν το «stuck» φαινότυπο και αποτυγχάνουν να αποσύρουν τα γεννητικά τους όργανα ομαλά κατά το τέλος της σύζευξης. Θηλυκά έντομα που φέρουν τις ίδιες μεταλλάξεις φαίνεται να μην εμφανίζουν κάποια ανωμαλία στη συζευκτική συμπεριφορά αλλά έχει παρατηρηθεί μείωση της γονιμότητάς τους και αδυναμία συντονισμού των κινήσεων της κοιλίας και των ποδιών κατά τη διάρκεια της σύζευξης και τη ωοαπόθεσης (Latham et al., 2013). Συνάμα, ο ρόλος των βοηθητικών αδένων των θηλυκών εντόμων εστιάζεται στην έκκριση ουσιών με στόχο την συντήρηση και τη μεταφορά του σπέρματος, τη γονιμοποίηση καθώς και την προστασία του ωαρίου (Resh and Carde, 2009). Σύμφωνα με το πρότυπο έκφρασης το γονιδίου, η πρωτεΐνη Lingerer βρίσκεται στους βοηθητικούς αδένες του θηλυκού *B. oleae* την έβδομη ημέρα της ζωής του κατά την οποία γίνεται σεξουαλικά ώριμο. Η παρουσία της πρωτεΐνης μπορεί να είναι απαραίτητη για την προετοιμασία του θηλυκού εντόμου για την επικείμενη σύζευξη ή για την παραγωγή άλλων απαραίτητων εκκριμάτων για την έναρξη και λήξη της σύζευξης. Η αυξημένη έκφραση στο χρονικό διάστημα των 9 και 12 ωρών μετά τη σύζευξη ίσως υποδηλώνει είτε την παραγωγή της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε κατά την σύζευξη του θηλυκού εντόμου, ώστε να επανασυζευχθεί είτε την απαραίτητη παρουσία της πρωτεΐνης για την έναρξη της ωοαπόθεσης.

Μελλοντικές προοπτικές

Οι συνεχείς απώλειες στην παραγωγή των ελαιοκαλλιεργειών παγκοσμίως, από τον κύριο εχθρό της ελιάς, το έντομο *Bactrocera oleae* (δάκος της ελιάς), έχει δώσει ώθηση στους ερευνητές να ανακαλύψουν νέους τρόπους για την αποτελεσματική αντιμετώπισή του.

Μέχρι σήμερα, ο πληθυσμός του εντόμου ελέγχεται κυρίως με τη χρήση χημικών εντομοκτόνων υπό μορφή spray, όπως τα οργανοφωσφορικά και τα πυρεθροειδή. Η ευρεία και ανεξέλεγκτη χρήση τους έχει επιφέρει σημαντικές επιπτώσεις τόσο στο περιβάλλον όσο και στην υγεία του ανθρώπου. Παράλληλα, η έλλειψη ειδικότητας των χημικών εντομοκτόνων ενδέχεται να διαταράσσει το οικοσύστημα της ελιάς ενώ η ανθεκτικότητα που αναπτύσσεται λόγω της αλόγιστης χρήσης τους, τα καθιστά αναποτελεσματικά. Επομένως, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη για ανάπτυξη εναλλακτικών, πιο φιλικών προς το περιβάλλον, μεθόδων για τη μείωση του πληθυσμού του δάκου της ελιάς.

Το αναπαραγωγικό σύστημα αποτελεί ένα ελκυστικό στόχο για την ανάπτυξη μεθόδων αντιμετώπισης καθώς παρεμβολή στην επιτυχημένη σύζευξη ή στην εμβρυική ανάπτυξη μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του πληθυσμού. Μία μέθοδος που φαίνεται να επεμβαίνει στο αναπαραγωγικό σύστημα του εντόμου και να οδηγεί στον περιορισμό της εξάπλωσής του είναι η SIT (Sterile Insect Technique), η απελευθέρωση δηλαδή στείρων αρσενικών εντόμων στο περιβάλλον. Ωστόσο, καθώς οι γνώσεις για το αναπαραγωγικό σύστημα του δάκου της ελιάς είναι περιορισμένες η καλύτερη κατανόηση και ανάλυση του ώστε να εντοπιστούν νέα γονίδια – στόχοι για την όλο και πιο αποτελεσματική αντιμετώπισή της καταστροφικής δραστηριότητας αυτού του εντόμου, θεωρείται όλο και πιο αναγκαία. Μία μελέτη όπως η παραπάνω, μπορεί να ρίξει φως στο ρόλο των γονιδίων στο αναπαραγωγικό σύστημα του δάκου της ελιάς.

Τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα, αποτέλεσαν τα πρώτα στοιχεία για την ανάλυση της έκφρασης και του ρόλου του γονιδίου *lingerer*, που φέρεται να συμμετέχει τόσο στο αναπαραγωγικό σύστημα όσο και στα αναπτυξιακά στάδια του δάκου της ελιάς. Για την περαιτέρω λειτουργική ανάλυση του γονιδίου προτείνεται η παροδική σίγηση του μέσω του μηχανισμού RNAi. Για αυτό το σκοπό, έχει ήδη δημιουργηθεί δίκλωνο RNA (dsRNA) του γονιδίου *lingerer* ώστε να ακολουθήσουν ενέσεις (injections) σε ενήλικα θηλυκά έντομα και να παρατηρηθεί ο ρόλος του μητρικού μεταγράφου στα αυγά καθώς και στην ωοαπόθεση των θηλυκών εντόμων. Για το σκοπό αυτό, προτείνεται η καταγραφή της ωοπόθεσης των θηλυκών εντόμων που έχουν ενεθεί με το dsRNA του *lingerer* ύστερα από πειράματα σύζευξης. Καθώς το γονίδιο φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ωοαπόθεση, μετά τη σίγηση σε ενήλικα θηλυκά έντομα ενδέχεται να παρατηρηθεί ελάττωση στην ωοαπόθεση. Παράλληλα, προτείνεται η παρατήρηση των αυγών των εκάστοτε θηλυκών στο στερεοσκόπιο ώστε να μελετηθούν τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια (κυτταρικές διαιρέσεις) του εντόμου. Πολύ πιθανή είναι η παρατήρηση αυγών που δεν έχουν γονιμοποιηθεί ή δεν υπόκεινται σε κυτταρικές διαιρέσεις καθώς το *lingerer* συμμετέχει τόσο στην αναπαραγωγική όσο και στην αναπτυξιακή διαδικασία. Σε μία συνέχεια της έρευνας, προτείνεται η παροδική σίγηση του γονιδίου, μέσω ένεσης, σε αυγά *B. oleae* ώστε να παρατηρηθεί ο φαινότυπος και να κατανοηθεί ο ρόλος του *lingerer* στην ανάπτυξη. Επίσης, καθώς το γονίδιο *lingerer* εκφράζεται στο ΚΝΣ προτείνεται η σύγκριση της έκφρασής του σε παρθένα και συζευγμένα θηλυκά με απομόνωση ιστών κεφαλιού αλλά και άλλων οργάνων ώστε να παρατηρηθεί πιο αναλυτικά ο ρόλος του στην αναπαραγωγή του εντόμου.

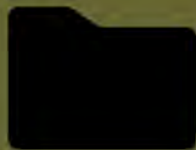
Αν η αποσιώπηση του γονιδίου μπορεί να δώσει τον επιθυμητό φαινότυπο, παρεμβολή της ανάπτυξης ή μείωση της ωαπόθεσης, τότε το γονίδιο μπορεί να αποτελέσει υποσχόμενο στόχο για το πληθυσμιακό έλεγχο του εντόμου. Σύγχρονες μελέτες έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη των RNAi εντομοκτόνων, ένα δυνατό εργαλείο για την εντομολογία που βρίσκει εφαρμογή στην προσπάθεια προστασίας των καλλιεργειών από τα φυτοφάγα έντομα και

την εξάπλωσή τους ενώ παράλληλα μπορεί να μειώσει τη χρήση των χημικών εντομοκτόνων. Η γονιδιακή αποσιώπηση ενζύμων ή πρωτεϊνών-κλειδιά μπορεί να οδηγήσει είτε στο θάνατο των εντόμων είτε στην παρεμπόδιση της ανάπτυξής τους (Kola et al., 2015). Χαρακτηριστικά, οι Shuangxia J. et al. (2015), θέλοντας να καταπολεμήσουν το φυτοφάγο έντομο *Helicoverpa armigera* από καλλιέργειες βαμβακιού, πραγματοποίησαν σίγηση μέσω RNAi σε φυτά τριών διακριτών γονιδίων, της συνθάσης της χιτίνης (συμμετοχή στο σχηματισμό του κυτταροσκελετού των αρθρώποδων), της V-ΑΤΡάσης (ρόλος στη λειτουργία των λυσοσωμάτων και των ενδοσωμάτων) και της μονοοξυγενάσης του κυτοχρώματος P450 (συμμετοχή στο μεταβολισμό τοξικών ουσιών). Οι προνύμφες που τράφηκαν με τα διαγονιδιακά φυτά παρουσίασαν μείωση της ανάπτυξής τους ή θανατώθηκαν από ενδογενείς τοξίνες του φυτού είτε λόγω αναστολής συστατικών του μεταβολισμού του εντόμου.

Παράλληλα, η γνώση μας για γονιδιακά που συμμετέχουν στην αναπαραγωγική διαδικασία του *Bactrocera oleae*, μπορεί να αποτελέσει τη βάση για το σχεδιασμό χημειοστεροειδών. Πρόκειται για ειδικά σχεδιασμένα μόρια που στοχεύουν σε συγκεκριμένες ειδοειδικές πρωτεΐνες μπλοκάροντας τη λειτουργία τους. Το 2016 οι Childs et al. παρασκεύασαν ένα χημειοστεροειδές μόριο το οποίο κωδικοποιούσε έναν αγωνιστή της στεροειδούς ορμόνης 20-υδροξυεκεδυσόνη του θηλυκού *Anopheles gambiae*. Παρεμβολή της πρωτεΐνης αυτής είχε σαν αποτέλεσμα να επηρεάσει την διάρκεια ζωής των εντόμων και την ωοπαραγωγή.



6



Παράρτημα

6.1 Αλληλουχία cDNA του γονιδίου *lingerer*

>9F8DC0B15261A709D3EC1D9B8DFC8DDE (sequence:mRNA) 7581 residues
[NW_013581209.1:3604124-3617741 + strand] [cdna]

CGTGATTAAGAAAACGTTTAGCAGAGAACGTAAAATACGTATGATATACGTTCTCTGCGTTTAGTCT
ATGAAAAATTTACCTCTAGAAAAGTGAACACTTTTCGTAAAACGTAGTATATGAATGAATGACCTTAA
TTGTGGATTGACATCAAACAAACATATTTTTACAACAATTTGCTTTTGGCTGAATATATAACTAGC
GAATGCATTGGTGAATGGTAGAAATTCATTGCGGTATAACTCGAGCGACTCCATAGTAAGCATTG
AATGCGTTGATAGATTACATTCTCATAAAAGCGAAGCAAAGCAAACGAAGCAAAAAGTTGGGCTA
CTCTCAGAATTTTAGGCATTGACGATTAGCTGCCGCTATTTTTATTACTTATTTCTACAATACATATTA
GTACTATGTTGGCATTGCTAGTTTATCTAAACTGTTAAGATTAAAGTAACATAACGATATATGAAATA
TCTGAGAAGCACGGAAAGGATTGCTCTAACATATACATGTACTATACTTTTTTGGTTTCGATTTCCA
ACTATGTACTGTAAAACAAAGAGAGGTCGAAAATAGATTTTCTATGCATATTCGAATTTAAGTTCAT
ATTTCTAAACGTTGATTGCTATGGAGCTCATCTCAGAAATATATGCGTATTCTACTAAATAATTAAC
TTATGTATATGGTTACGTGAATTATGTAGTTCCGTTGTAATCACGTCGGCCTGTTAGTGCTCCGTTTT
CTTTTATTACTGTCCACTGTTTTGTATATCAACTGTGGTTCATATTTAGTAATATTAAGAAGAGT
GGCAACACAGATTTTCTTTAGAAGAAGACGGCACAATAGCAGCTTACTTGTAATACAGTGACATA
TAAATATGAGCACACAAAATCGAAATAGCGGGGGGTCGCAACCAAAAAAATCAAATTCTGGC
AGTGGAGGTGGCGGAGGTGGTATTCTGCTTTACAGACATCAACTAAGAAAACAGATGTCTCAAAG
ACAGAAAAAGAAAAATCGCATCCAAAGCCAAGTCTGAACAGTTACGCATCGCCCAAATCACCAAT
AGTAACACATCAGAAGATCCGCAAATGCGGGAAAAAGTCGCCACACTTATTGAAATGACTCAACGT
TCTGAAGAGGAAGTATGTTGCGCATTATATGAATGCGATAACGATATGGAACGTGCTGTTGTGTATC
TATTGGAGACCCTCCAGTGGGAGCATTTGAGACATCTCAAAGAAGAAAAAGAACAAAGCTGCAA
GTGCCGAGACAAGAAAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
CGTGAGAAATCACGTAATCGGAGTAGTAATCGTGGCGGACGCGGCGGCACCGATAGCCGTGGCTG
GCGTGGCAGAGAAGCTCGTGAAAATGAACGTAATTTACGTGATTCACGTGGCGGCGATGATCGCAA
TGACAATTATCGTCGTAGAGAAGGTGGGGGAGGTGGCGGTGGAGTTAGGAGTGGTGGTGGCCGTG
GTGTTGGTTATGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
GTGGT
TATGGGACAATACTATTGCTCAGAATGCTGAGAAACAGCAGCAACAAATGCAAGATGATGCTTGGG
GTGACTGGGATAATGAAGAATATGTGGGCTCGCTTAAAGACAGTAAAGTATTTACCACAAGCAATTT
GCCAAATCAGACGGCAGCAAGTGTGGTAAGTGGTGGCGTTAGTAGTATGAGTGGCGTGGTAAAGT
GTGGTACAAGTGAATATCGGCACCTCCTGGATTGGAACATCATTTGGGCAGTTTCAAGTTTGGTGG
TACTCCAACCTCCCCACAACAGCAAGGATCTCATATGAATACGCTTGTGGCAACTCAGTGGGTATT
GCAGGAGCAAGTCCGCTTTGTGGTAATACTAGCATAAATGACGAAAACACTCAACTGTTAGTTCAGTTG
TGCAGTCGGCTCGACGTCTACAACCTCCATGATGCAGTATAGTGCAGCAGTGACCAATACACAGC
TTTACAATCAGTCACTGACTTCGCAGCAGCAGCAACAACCGCCAGTGCTAGCTGGTTCAAGTA
ATTTGACGGCAACGGCTCTTAGTAACACTCCGTATGGTAGTGCAGTGGATACGTTTTCGAATGCTGC
TACAGCGGCTGCAAATTTGGTGCAGCAAGTGCAGCAGCAACAGCAGCAACAACAACCGCAAGGGC
AAATTAACAAATCGGCCACGCTTCCGTAGAGCAATCTCAGTATTTCAATTCTTTGACATCGCAGAA
CACTGCAGCCGACAGGTGTGCAACAACCATTACAACAACAGCAGTTACCATCGTCGTATGCACAAAA
TGCCGCCCGCGTGCAGTACCCGACATCATACGCAAACGTATTTGGCTCAGCTGCTGTAACCTACCCCA
GCGGCAACGAGTGGCCTGGGCGTATCTGGCGCTGATCAAACACAACCTCTCGGGTGGCGTACAACA
GCCACAAGTGCGAAGAGCACGTGCCAAATTACCACCGCTTCAAAAATACCCTCGACCGCTGTAGA
AATGCCAGGAGACACGTTGAACAATATCGGCTACCTGGATGTTCAATTTGGAGGCCTTGACTTCGG
AACAGAAGATTCTTTGACACTTTGCCAGAGAAGTTTGGTGCAGCAGTGCAGATTGATAATCAACA
GCAACAACAGACACAATCACAACAGCAATTGGTGAATCGCAACAGGATGTGTCAACTGATTATCA
AAACAAGAACAATGTGCAACAACAACAAGTTTATTGTCGGCAGGGTTACAGAGTACACAACCTTGG
TGATGCATTATCAACTGGCTACTCGCAACGTGGCACAGCAGCTGTGCAACAACAACAACAACAGGT

TGTCAGCGGTGGAATGGAGTTGGTGTAGGTGGTGGTGCCTCCTCTGTTGGCGGCACTACAAATCA
CACATTAGATTTGAGTAAAAGCGACCCATACGGTCAGTCACAGAGTGCTACGAACTCAACTAGTGG
CTATCCAACGAGCGCTTACCAAAGTGTATCTGTAGCTAACAAGACTGCAAATGCTTATCAGCCA
TCTGCTGCCGGCAAGTGTACAATAGCAGTAGCTATGCAAATGTACAGTCCTCTGTTGCAAATACAT
ACCAACCACAATCGTACGGTTCGTATCAGCAAACCTCGATGAATTCCTATCAGCAACAAGCGGCAGT
GAGTGCGCAGACGGCATCGAATCCGTAGCGGGGGCGGTGTAAACGTTGGTAGTAGTGAAATG
CAGCACAAAACATTCCCGCAGTTGGTGGCAGCGGCGCAATAGTAATGCAAACAATGCAAATACTG
GATATTTGTCAACCGGCTACCCAACACAGCAAAGCGCGTACCAGTCCAGCCAAAGTGTGTACGGTG
GAACTGGTCTCTCAAATAGCTCAGGGTTTGCCGGTAGTACAAACACTTCGTCTCTCAATACACTAA
CTTTAGTACAAGTGCAGAAATTGAAGGATGCAGCAACAGCGTCTAGTGGTTCGCATTACGAGAGTGT
CTCATCTAGTAATGTGGCAAGCAATAGTGGATCAACTGGCAACTCGACAGTGTCTGCTAATTCGTG
GCTAATGCGACTTCGTGCGTTAACTCCAACAGCTCGAATGTGAATAGTAACAGCTCGGGCGTGGCG
GCAAGTAATAGTGAAGCAGTGCTAGCAACAGTAATGTGAATACGAATAGTAGTAGTACTGTTAGC
GGCGTGGCAGCGGTGCTGGTGGTGGTGGTAGTGGCGGTTCCGGTGGCAGTGGAGTTGGTAGTAG
TAGCAGCAGCAGCAACCCTGCATCTGTGTTGCCGAGCAGCTGCGGCCGCGGCAGTATCATCGTC
TTCAAATAAGACAAGCGCTAGCGGAATGGTGCCCAACATCCAAATGGTTAGTCAATATATTCAGACT
GGATTGCCATTCTATCAGCAACCAGTTTATTCTTACGAGGATATACAAATGATGCAACAGAGAGTGC
CACACGTGCAAGGTTATTACGATCTCAACTACACTCCGACTAGTTTGGGCACAGGCCGAGATAATTT
GGGCTCCGTAGCATATTCTACCATGACTGATGCACGTTTACAAGAACGGACAATAATTCTAGCCCA
GTTAGCAATGTATCAAGTACAATGTCACAGCAAGCAGGCTCGGGCGGCCCATGCTGAATGTTCT
TACTACTTCTATAGTGGAATGTTATGCCGGCAGTTTTTCAAGTATGGCACACCAGCAATCTATCCGC
AGCAAATTCCTGCTGCTAATACAGCGTCTGGTGGCCAATTTCAAAGCCTTCTTACAGCACTGGCTA
CGGTTGACAAGTTACGACGCATTGTCGCAAGCTTACAGGATTACACAAAGGGCGCTTATCCGTC
AAGCGTAAATCAACAAACGAAATCACAAAATGTGGCGAACCCCTCCGCAAACCGGAACAAGCTCGG
ACATAACATCGTCAATGTACAGTAAGGGACATGTTGCGCTGAATAAAGTCAATTCATATGAGAAACA
AAATTTCCATTCCGGCACTCCGCCACCATTCAATATGCCGAATACGCAGACAGCTGGTGAAATTC
GCTCAGCCCTACGGCATGTTTTGCCAATGCCGACTGCTGGTCAATCACAATATGATTCATCAACCAA
TCCACCAGTAATGTAATAATCAATATACTTTTGTAAACATTGTTTACCCCTATTATTCTAAGAAACAT
AGTTATTTATGTATAACTTCCAACACTGATAACAAAATAATTACACCCTTATTTAATTATCCCAATAT
GTTCTATTATAAAAAAGTCACCATACATTTTTTCCAACAAAATTAAGAATTTAAATTAGTCTTCTCTG
TCATAAGCCACTATAAAATTTATTCGATAAATTCGCAAGGCTTTCTGAAGGATCCTACAATCGTTGT
TTTTGTACTTTTTAACTTGATAAAAAATAAGGAGTTAAACAATGATAAATTTTTGTTTTTAAATCGAAT
CGAAAATTGTACCGTTTTATGTTTGAAGTACAAATAACACTTAAAAGTGCATAAATTATATTATATAT
TTCCAATAGCTTCAAATTTATAGTTAACTTTGTTGAATGCAATTTACTGAATCCATTACACTTGGATTG
CGTTTGAACCAGAAAACAAGCTTTTACCTGCTAATAAACGGAGCACTTAACCCAAATCGAAAAGTGA
ACTACTGTGATAAAGATTTAACATTAATTTTTTACCAATATTCAAACTGAATAATATAAAAGATTA
AGAAAATTTGTCAATATCTTCGATAACGGTGACGTTAAAGAAAATTGATGGAATGAAAGAATAAAA
AAAGTCCAAAAGAAAATAGTAAAATCGTTTGATTATGATAAATAATATGGTTTTTTTTTATTGAAACAG
CGGATTTAATGAATCCAAATATACAAATATTGTTGCAATCTCTACACTGAACCGTCTAATTTTCATTA
GATTTGCATCAGAGGTTTTAAGAATATGTCATTCTTGATTATTCCATATTAGCGTTATCTTATATTTCC
TGTTAAAAGCTTCATTTGATACAAAGGTTAATGTGTATTAAGACACTCTACATTAATTCATTTAACAT
TTGGTTCTACGTTACTGCAACTGATTGCAATTTGTTCTTTTTGACAATCTAACCCCTCCATCAGTAGG
TTGCAATACCCATACGTTTGTGGAGAAATGAGTTTTTCTGGTTCCAGTAGCTAAACTCATTTAAA
CACTTCATCACAAACATAATGTGTGCCTCCATATTGCGATTGAAATTTTTGGATAATACTTTTTATATT
AATATACACATACACTTGGGGCTCCGAAATTACCTGTAGAGCTAAGCTTAGTAAGGTTTTAATGGGA
TATTTAAAAAATATAAACATTTGAAGTGAATTTATTTATGCCATTAGTAATACTTACGTTATAGTAAA
TGTTGCTTAATTCATTTCCGATAAGTATACACATATTTTACATATTCTAAATTACATCTGTACACT
GTATTTATATGACACTTCATTAAGTGGAAATTTTTATTTGTAATTTATATTTTTAATTTAACTTTGCC

CGGTGAAAATCATTAAAATATGAAGATTTTTGTATAATATTGGAATATAACTAACATGCAAACATTTCG
AATTTATTTTTATAGTAAAATTATCATTACGTATAAATCTTCTCTCAGTGCTTGTGGCTACTTAAAG
ATGTGATTAATTCGTTTCCAACTCCTGTTGATTCAATCCAGTAAATGTTAGAAAATTTTTAGACTGCAT
TCCTCAAAAACGAATTCGGTTTCTAACACATTTAACTAAATTTATTATTACATAATGTGCAAATATTT
CCTTGTATCATCATAACAACGGCAATTACTGAAGTCAATTCAGAAGTACCTAATTATAAACAGGACA
CCAATTTATTCACGCTCACTGTTTCTTTAAGTACAGTAATTAACAAAAACAAAAAAGAAATT
GCATGAAAACCTTTTTATTATTTTATTATTTCTTTTGGTTTTTTATGGACAACGTTAGATGGACGGCA
GGATTCATAATTCATCCCGCCGGGATTCTGAATAGCACGGGCAACGGCAGCAGACAAGCAGCCAA
TCGAAATCGGCTGCTAAGCAAGGCTACTCGCCCTCTTATTGGACCGGGCAAAATGAACGTAAAGA
GGAAAGCGTAACTCACATCAACGTATATATATCTATATACGATTGTAGTATATGAACTCGATTCC
GATTAATTAACATCATCCAATCAGCTCTAAAAATCTGTTCCCGATGTCTTGCTACCGCGTGTCTACAA
CCACATAACATACATTAATTTTTCATATTGTCTGTCTGACTATCCTATTATTTTTACACATATGTAT
GTATTTATGCTTATGTACAATTATATTAGTATAAATAGAAGATAAACGCATAATATCGAGGATTA
TTTTGTATGTTCCACTCCTTCATTTTAGCGAAGTCCCTCTTAAAGATCGATTCACCTATTCAAATGTA
TTTTACTAAGATACAAAAACAAAACGTATGTCCAAAAACCATTATCCACAAACCCACATTCATAC
TCGTACATCTGTAATTCCTCTCATAACACGAATAAATTATAAACTGAAAAATAATACATGGG
TGTATAATGCTATTACGAAGCAAAGAGAGTGTTAATAAGTAATTCACAGCAGTGGAGAAGGGGCC
ACACACACACACACGGCACAGTTGAAAGGAAATAATAACAAAAAATAAATAAAAAATTTAAATAT
TGTAATCGGTTTAACTATATGTATAATTATATAAACCTTAATATTTAAATTAATAACAAAATACGA
TTAAATCCAAAATAAACACAACAACGCATAGTTCATACGCATGCGCGGTGAAGTCGAAATTT

6.2 Πρωτεϊνική αλληλουχία του γονιδίου *lingerer*

>9F8DC0B15261A709D3EC1D9B8DFC8DDE (sequence:mRNA) 1305 residues
[NW_013581209.1:3604124-3617741 + strand] [peptide]

MSTQNRNSGGGRNQKKSNSGSGGGGGDSALQTSTKKTDVSKTEKEKSHPKPTAEQLRIAQITNSNTS
EDPQMREKVATLIEMTQRSEEEVCCALYECDNDMERAVVYLLETLPVGAFETSSKKKKKAASAGQESA
GGDGEWTDNANTDRREKSRNRSSNRGGGGTDSRGWRGREARENERNLRDSRGGDDRNDNYRRR
EGGGGGGGVRSGGGRGVYAGRGGRRGGFRGAGGRGTGGRGERGFNSRSATNEDHHEVELWDNTI
AQNAEKQQQQMQDDAWGDWDNEEYVGLKDSKVFTTSLPNQTAASVVSGGVSSMSGVSSGGTSE
ISAPPGLEHHLGSSGLVGTPTSPQQQSHMNTLVGNSVGIAGASPCGNTSINDENSTVSSVVQSASTS
TTPMMQYSAAVTNTQLSQSLSQSQPPVLAGSSNLTATALSNTPYGSAVDTFNSAATAAANLV
QQVQQQQQQQPQGGQIKSATLSVEQSQYFNSLTSQNTAAAGVQQPLQQQLPSSYAQNAAAVQY
PTSYANVFGSAAVTTPAATSGLVSGADQQLSGGVQQPQVRRARAKLPPPSKIPSTAVEMPGDTLNNI
GYLDVQFGGLDFGTEDSFDTLPEKFGAAVTIDNQQQQQTQSQQQLVQSQQDVSTDYQNKNNVQQQ
QSSLSAGLQSTQLGDALSTGYSQRGTAAVQQQQQVSSGGNGVGVGGGASSVGGTTNHTLDLSKSD
PYGQSQSATNSTSGYPTSAYQTSVSVANKTANAYQPSAAGQVYNSSSYANVQSSVANTYQPQSYGSY
QQTSMNSYQQAAVSAQTASNSVAGGGVNVGSSGNAQNIPAVGGSGGNSNANNANTGYLSTGY
PTQQSAYQSSQSVYGGTGLSNSSGFAGSTNTSSSQYTNFSTSAKLKDAATASSGSHYESVSSSNVASNS
GSTGNSTVSANSSANATSSVNSNSSNVNSNSSGVAASNSVSSASNSNVNTNSSSTVSGGGSGAGGGG
SGGSGSGVSSSSSNPASVVAACAAAAAVSSSSNKTASGMVPNIQMVSQYIQTGLPFYQQPVYSY
EDIQMMQQRVPHVQGYDLNYTPTSLGTGRDNLGSAVYSTMTDARFTRTDNNSPVSNSVSTMSQQ
AGSGGPMLNVPYFYSGNVMPGSFYGTPIAIPQQIPAANTASGGQFPKPSYSTGYGSTSYDALSQAS
QDYTKGAYPSSVNQQTKSQNVANPPQTGTSSDITSSMYSKGHVALNKVNSYEKQNFHSGTPPPFNMP
NTQTAGGNSAQPYGMYLPMPTAGHHNMIHQPIHQVM

6.3 Αλληλουχία cDNA του γονιδίου *sry-α*

>C4933D5A909E8D0D791BC8009B4D0F03 (sequence:mRNA) 2573 residues
[NW_013581233.1:1330099-1333144 + strand] [cdna]

TTCAAATACTCGTTTATGTATATGGCAATGGGAATTTGTGAACAGTAGAAAACCTTATGCAATTGT
GACTGGTTTATTATGGGAAGAAGATAAGAAACAAATTCATTTTGAATAGTCAACGGAACATTGAAA
AAATTTAATTGTATCAGCAAAAATATTTTACAATTAATAATTTAATTATGACATCGGTAAAACACTACAAG
TGCTGAGAACTCAATTAACGAAATGTCGAGAAAAAATATATTTAGGTTCCAGCGATATGAAAACCCG
CATAGAGTGGTTAAATAATTTCTGTGGTGATTTTTATTTATTTGCCAACCACCTGCACAAATTTATCGC
CAGTGAAATGAAGGAAGAAGATCATGAGGGAAATGAAATGATGGATAACATTTTTCTTTGCTTGGCT
CAAGTATGCTTGTGTACAAAATATCTGGAACGAATTATACGAGCGGAGGATACTGCTCGTAATGCAA
TACCAAGTTCTCGGAAACATTTTATTGATCGCATAATGTTGTGCTTCGACAAATTAGAAAAAAGTTTT
AGTAATTTATGCAATCCTGAGAATAAATCAGCTAACAGTTAATGTCTGGTTATGGATTTATTACCTT
GTTAGATATTGCAATGGATCACTTGAAGAGTACAATACTTACCAGGAAGATGAGAATATTGATACC
GATGAACTAAACCAACTTGAAGATGCACTAGACTCCAGTAAAGAAGTTTACCAGGCCGTGCGTTTA
ATGATCAGTCATGCACTTGCCTAGCAAATGTCGCATTGATTGAGGATAAAACAGCAATCAGCGCA
TTATGTCAAAGGTCCTTGCAGAAATGCACTGGATTTCAACAGGAATGTCAAAGCAATTTGAAACTCA
TACGAACTAATAATTGGCCTCGCAGAATAAAAGCAATCGCACTGGGAGCCTCATTAAACGAATTGC
ATCAGTACATTGATGGCACCGTTTTGCGTTAATATTCTTTGTTTCGAGATTTAGAAAAGTTTTCAT
TGGATAAACTGCGCGCTAAGATGCGCCAAAACAGAGCAGACGACTCCGAGTTAGATGAATTCATAG
CAGATTTTATGTAATCTAGATAGATTATCACAAATGGACTCTTTGCTGCTAGCGACGCTTGAAG
CCCAAATTAAGACTTTGGTGCGCAGTTGTATGGCATCGCTGGAAGCACTAGATTCATGTATTATAC
CCTCATTGCAAGCATATAACGGCACCGATATGCATACTGAAATACTGGAGCAGCATTTTTATGAAGA
AATTAATAAGTTCAAACAGTTTTATGAAATTGTCGATGCACAGCCGATCACTAGATGTTTTTACG
AATTGTTTCACTCATGCCTTGTGACACGAAAAGCAATTTAACAAATCGAATTTGGAAGATTTGGC
ACAAATGGGCGAATTTCTTGTCAATATTTTCAATATCCTGCCAACAAAAAAGAACTGCTACACTCTC
CAAACTTAAAAATAATGCACTAGAACTTTTTCAAAAATACAAATTGATGTTAAATGAATGTCGGGC
CATTTTAGTATGTCCGATCAGGTGGATGACGTGCGTATAATGAAACGTTTTAAAATACTGCGTGCT
ATTTTGCGCCGTTTCTTGTGATGCGCTTGGACCAACCGAAAATGTGTCAGACAAAAAAGTTGAAGAG
AATCTTACTGTTATACAAAGCACTGCTACTGATATACAAACAACAATTGACTTGAATGCATCGCAGT
ATATACTAGATAGTATAGAACCGAGCATTGTCAGCATATTGTATCGCAATGAAACCGATGTATTTAC
GCCACGTAGGCGTGCGGTAAGCGATTCCATGCGTGGTAACTATTCTAAATGTTCAATATTTCAAAC
GATAAAGTGCTATCAAATACAAAATTAACGATGGCGCGCAAAATCAGTTCAGGCAGTGTGCGCAGT
AGTAGCACTGGCAGCAGTATGCGTCGGAAGAAAGTTTGCGTACAGTGATGTTTAAAGCGTCAAAAA
TCTGCAGAGACACAGAAAATTTGTAATTTTTATTTGCCAAAATTCGGCCAGTTTGCAAATTTCCGAAAT
ACTAGATCAATTGACGGAGATATCTGGTAACAGCCCGAACGCAACACAAGAACATTTACTGAACAC
CTCGATAATGGAATAGATAATTCTACTTGCACTTTAAATATTAATAAAAAAATCTCTAATTGTAAGT
GTTTGCGGCCTATGCAATCTTAAAAATATCTATCTATAGCTTATTTATATTGTAAGTATAACTTTGATA
TGCTAATTTTCTTTCGTAATTTTTAAATTATTGATGTGATTATTTGAACACCTTATTATTTTATTATTTAA
ATACCAATAATTGTTTCAGAGTCGTGCTGTTAATATTTTCAACAACAATAAGTATTGTATTGTGATCTT
TTATAACTGCTTCTTTCTTAAGATTTATACAACTCTCCTTATACTAATAAGCTCTACAAATTGTGTACG
CGTATGCGTTAATTTCTTGGTACATTGGCAGCCATATTTGTACTTTTCTTATATATTTGGAATAAAAAA
TACGTTTAT

6.4 Αλληλουχία cDNA του γονιδίου *hid*

>EE9956AF6425D402D61668A98A75E65B (sequence:mRNA) 1032 residues
[NW_013581626.1:70912-106039 - strand] [cdna]

```
ATGGCTGTTGTCTTTTATATGCCCCGAGGGCGGCGGCGATGACTCTGCATCGTCATCGAGTGGCGGTC
ACGGCAGTGCGGGCAGCGGCAGCGCTGCTTCGTCGACATCACAATCGCCCAACACCACCACATCG
GCTACACAAACGCCCATGCAGAGTCCGCTACCGCCGATTTTATGATGGCCTTCTATCAGTATATGA
ATGCTACCGCCTTCCAGTATCCCCCGCCAGCCAGTCCATGTTGTCAAGTCCACAGCCCCTCACCATA
TACAGGTAGCGGCGGCGGCAGCGGTCTGCTGGTTCGGGTGTCGGCAATGGCGAAGTATTCTTCCC
ACTCAGTCTTAGTACACCACGTA CTCCGCGCACCAGTGT CAGTTATGCTGCTGGCGAAGAGAATACC
TTCTTTCGTCATCACAATATCAGTGGCGGTTGCAGCAGCGGACCACACCTACAACCGCCGCAATCG
GCACCACCCATGCCGTCGAGTAGTCACAATGGTGCACATAGTCAACCAGCGCCACAACAACAATAC
CAACCATATACATATCCATATTATCAATATACACCACCGCCGACACCGCTCACCGCCAATGCAAGCA
CCTGCACCGGCAACGTATTCCGGTGC GACGGAAGCGACAACGCACCAACGCGGTTGTGTGGCAACA
GCGTCGACATCAACATCGACGACCTCGTGTGGCATGAGCGGACATTCGCGATTGCATCGTAGCCTC
TCAGATGCACAAAAGCGCTCGCGTCGTACATCAACCACCAACGATGATGAACGCGAATATCATAGC
GAGCATGAGACCAGCTGGGATGAGTTCGATGACCGTTTCGATAATTTTACAGCCGGCCGTGAACGT
TTACAGGAATTTAATGGACGAATACCGCCACGAAAGAAGAAAAAGGATGTGCCAAAATCAAAGTCA
GAGAAGAAGGTGAGAGAAAGACAGCCATTCAAGGGCTTCATCTGGCCCACTGTCGTCACAGTCATC
GTTGTTGCAATGGGTTGTGGCTTCCTTGTTACGCGATGA
```

7



Βιβλιογραφία

- Anderson KV, Lengyel JA (1980): Changing rates of histone mRNA synthesis and turnover in *Drosophila* embryos. *Cell* 21:717-727.
- Angenstein , F. , Evans , A. M. , Settlage , R. E. , Moran , S. T. , Ling , S. C. , Klintsova , A. Y. , et al . (2002) . A receptor for activated C kinase is part of messenger ribonucleoprotein complexes associated with polyA- mRNAs in neurons . *J Neurosci* , 22 , 8827 – 8837 .
- Bashirullah, A., Halsell, S. R., Cooperstock, R. L., Kloc, M., Karaiskakis, A., Fisher, W. W., et al. (1999). Joint action of two RNA degradation pathways controls the timing of maternal transcript elimination at the midblastula transition in *Drosophila melanogaster*. *The EMBO Journal*, 18(9), 2610–2620. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/18.9.2610>.
- Bastock, R., & St Johnston, D. (2008). *Drosophila* oogenesis. *Current Biology*, 18(23), 1082–1087. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.09.011>
- Baumgartner, R., Stocker, H., & Hafen, E. (2013). The RNA-binding Proteins FMR1, Rasputin and Caprin Act Together with the UBA Protein Lingerer to Restrict Tissue Growth in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genetics*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003598>
- Bedford MT, Clarke SG (2009) Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell* 33: 1–13
- Belardinelli, M.C., Fausto, A.M., Guerra, L., Buonocore, F., Bongiorno, G., Maroli, M., Mazzini, M., 2005. Lipase and antibacterial activity of a recombinant protein from the female accessory glands of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 99 (7), 673e682.
- Bilak A, Su TT: Regulation of *Drosophila melanogaster* pro-apoptotic gene hid. *Apoptosis* 2009, 14:943-9.
- Campos-Ortega, J.A., Hartenstein, V. (1997). *The embryonic development of Drosophila melanogaster*. 2nd ed. : xvii + 405pp.
- Chang, J. S., Tan, L., & Schedl, P. (1999). The *Drosophila* CPEB homolog, orb, is required for oskar protein expression in oocytes. *Dev Biol*, 215, 91 – 106.
- Chapman, R. F. (2013), *The insects structure and function* (5th edition), New York, US: Cambridge University Press
- Chen, K., Johnston, J., Shao, W., Meier, S., Staber, C., & Zeitlinger, J. (2013). A global change in RNA polymerase II pausing during the *Drosophila* midblastula transition. *eLife*, 2, e00861. <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.00861>. 00861 [pii].
- Childs LM, Cai FY, Kakani EG, Mitchell SN, Paton D, Gabrieli P, et al. (2016) Disrupting Mosquito Reproduction and Parasite Development for Malaria Control. *PLoS Pathog* 12(12): e1006060.
- Christerson, L.B., and McKearin, D.M. (1994). orb is required for anteroposterior and dorsoventral patterning during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev.* 8, 614–628.
- Claveria 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
- Codelia, V.A., and Irvine, K.D. (2012). Hippo signaling goes long range. *Cell* 150, 669–670.
- Cooper Geoffrey M. And Hausman Robert E. (2009), *Το κύτταρο: μία μοριακή προσέγγιση (1^η έκδοση)*, Αλεξανδρούπολη: Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.
- Corrado, G., Garonna, A., Cabanás, C. G., Gregoriou, M., Martelli, G. P., Mathiopoulos, K. D., ... Rao, R. (2016). Host Response to Biotic Stresses, 75–98. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-48887-5>
- Costa, A., Pazman, C., Sinsimer, K. S., Wong, L. C., McLeod, I., Yates, J., ... Schedl, P. (2013). Rasputin Functions as a Positive Regulator of Orb in *Drosophila* Oogenesis. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072864>
- Costa, A., Wang, Y., Dockendorff, T. C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Schedl, P., & Jongens, T. A. (2005). The *Drosophila* fragile X protein functions as a negative regulator in the orb autoregulatory pathway. *Developmental Cell*, 8(3), 331–342. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.01.011>
- Daane, K. M., & Johnson, M. W. (2010). Olive Fruit Fly: Managing an Ancient Pest in Modern Times. *Annual Review of Entomology*, 55(1), 151–169. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090553>
- De Renzis, S., Elemento, O., Tavazoie, S. and Wieschaus, E. F. (2007). Unmasking activation of the zygotic genome using chromosomal deletions in the *drosophila* embryo. *PLoS Biol.* 5, e117.
- Degrugillier, M.E., 1985. In vitro release of house fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae), acrosomal material after treatment with secretion of female accessory glands and micropyle cap substance. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 14, 381e391.
- Dong, L., Li, J., Huang, H., Yin, M. X., Xu, J., Li, P., ... Zhang, L. (2015). Growth suppressor lingerer regulates bantam microRNA to restrict organ size. *Journal of Molecular Cell Biology*, 7(5), 415–428. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjv045>
- Dottorini T, Nicolaides L, Ranson H, Rogers DW, Crisanti A, Catteruccia F (2007) A genome-wide analysis in *Anopheles gambiae* mosquitoes reveals 46 male accessory gland genes, possible modulators of female behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:16215-1620.
- Dougherty, M.J., Ward, R.D., Hamilton, G., 1992. Evidence for the accessory glands as the site of production of the oviposition attractant and/or stimulant of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Chem. Ecol.* 18, 1165e1175.
- Dworkin, M. B., & Dworkin-Rastl, E. (1990). Functions of maternal mRNA in early development. *Molecular*

Reproduction and Development, 26(3), 261–297. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080260310>

- Findlay G. D., M. J. MacCoss, and W. J. Swanson (2009) Proteomic discovery of previously unannotated, rapidly evolving seminal fluid genes in *Drosophila*. *Genome Res.* 19(5): 886–896.
- Findlay GD, Yi X, Maccoss MJ, Swanson WJ (2008) Proteomics reveals novel *Drosophila* seminal fluid proteins transferred at mating. *PLoS Biol.* 6: e178.
- 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>)
- Fletcher BS & Kapatoss ET (1983) The influence of temperature, diet and olive fruits on the maturation rates of female olive flies at different times of the year. *EntomolExpAppl* 33: 244-52.
- Foe, V. E., & Alberts, B. M. (1983). Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. *Journal of Cell Science*, 61, 31–70. <https://doi.org/PMID:6411748>
- Gabrieli, P., Falaguerra, A., Siciliano, P., Gomulski, L. M., Scolari, F., Zacharopoulou, A., ... Gasperi, G. (2010). Sex and the single embryo: early development in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*.
- Gallouzi IE, Parker F, Chebli K, Maurier F, Labourier E, et al. (1998) A novel phosphorylation-dependent RNase activity of GAP-SH3 binding protein: a potential link between signal transduction and RNA stability. *Mol Cell Biol* 18: 3956–3965.
- Gary JD, Clarke S (1998) RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog Nucleic Acid Res MolBiol* 61: 65–131.
- Genç, H. (2014). Embryonic development of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* Rossi (Diptera: Tephritidae), in vivo. *Turkish Journal of Zoology*, 38(5), 598–602. <https://doi.org/10.3906/zoo-1305-19>
- Geng C, MacDonald PM (2007) Identification of genes that influence gurken expression. *Fly* 1: 259–267.
- Greenspan, R. J., 1995 Understanding the genetic construction of behavior. *Sci. Am.* 272: 72–78.
- Gregoriou M. E. (2018), *Genomic and transcriptomic analysis of the olive fly reproduction system, aiming at novel control methods*, Larissa, Greece: University of Thessaly, Phd Thesis
- Grether ME, Abrams JM, Agapite J, White K, Steller H: The head involution defective gene of *Drosophila melanogaster* functions in programmed cell death. *Genes Dev* 1995, 9:1694-708.
- Gullan P. J. and Cranston P. S. (2010), *The insects* (4th edition), Oxford, UK: Wiley - Blackwell
- Halder, G., and Johnson, R.L. (2011). Hippo signaling: growth control and beyond. *Development* 138, 9–22.
- Hales, K. G., Korey, C. A., Larracuenta, A. M., & Roberts, D. M. (2015). Genetics on the fly: A primer on the *Drosophila* model system. *Genetics*, 201(3), 815–842. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.183392>
- Hall, J. C., 1985 Genetic analysis of behavior in insects, pp. 287–373 *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, edited by G. A. Kerkut and L. I. Gilbert. Pergamon Press, Oxford.
- Hall, J. C., 1994 The mating of a fly. *Science* 264: 1702–1714.
- Haugen M, Flannery E, Tomchaney M, Mori A, Behura SK, Severson DW, Duman-Scheel M: Semaphorin-1a is required for *Aedes aegypti* embryonic nerve cord development. *PLoS One* 2011, 6:e21694
- Hudson, A. M., & Cooley, L. (2014). Methods for studying oogenesis. *Methods*, 68(1), 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2014.01.005>
- Huynh, J.R., and St Johnston, D. (2000). The role of BicD, Egl, Orb and the microtubules in the restriction of meiosis to the *Drosophila* oocyte. *Development* 127, 2785–2794.
- Ibensouda, S., Schweisguth, F., de Billy, G., & Vincent, a. (1993). Relationship between expression of serendipity alpha and cellularisation of the *Drosophila* embryo as revealed by interspecific transformation. *Development (Cambridge, England)*, 119(2), 471–483.
- Johnstone, O., & Lasko, P. (2001). Translational regulation and RNA localization in *Drosophila* oocytes and embryos. *Annual Review of Genetics*, 35, 365–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.090756>
- Jonathan M. W. Slack (2014), *Βασικές Αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης (3^η έκδοση)*, Αλεξανδρούπολη: Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.
- Kalfayan L, Wensink PC (1982): Developmental regulation of *Drosophila* a-tubulin genes. *Cell* 2991-98.
- Kapatoss ET & Fletcher BS (1984) The phenology of the olive fruit fly, *Dacusoleae* (Gmel) (Diptera, Tephritidae), in Corfu Greece. *J ApplEntomol* 97: 360-70.
- Karr TL, Alberts BM (1986) Organization of the cytoskeleton in early *Drosophila* embryo, *J Cell Bio* 1102,1494-1509
- Katsoyannos P (1992) Olive pests and their control in the Near East. FAO Plant Production and Protection Paper No 115.
- Keleman, K., Krüttner, S., Alenius, M., & Dickson, B. J. (2007). Function of the *Drosophila* CPEB protein Orb2 in long-term courtship memory. *Nature Neuroscience*, 10(12), 1587–1593. <https://doi.org/10.1038/nn1996>
- Kimura, S., Sakakibara, Y., Sato, K., Ote, M., Ito, H., Koganezawa, M., & Yamamoto, D. (2015). The *Drosophila* lingerer protein cooperates with Orb2 in long-term memory formation. *Journal of Neurogenetics*, 29(1), 8–17. <https://doi.org/10.3109/01677063.2014.917644>

- Kola V.S.R, Renuka P., Madhav MS and Mangrauthia ST, (2015). Key enzymes and proteins of crop insects as candidate for RNAi based gene silencing. *Front. Physiol.* 6:119. doi: 10.3389/fphys.2015.00119
- Krüttner, S., Stepien, B., Noordermeer, J. N., Mommaas, M. A., Mechtler, K., Dickson, B. J., & Keleman, K. (2012). *Drosophila* CPEB Orb2A mediates memory independent of its RNA-binding domain. *Neuron*, 76, 383–395.
- Kuba H and Itô Y (1993) Remating inhibition in the melon fly, *Bactrocera* (= *Dacus*) *cucurbitae* (Diptera: Tephritidae): copulation with spermless males inhibits female remating. *J Ethol.* 11(1):23–8.
- Kuniyoshi, H., Baba, K., Ueda, R., Kondo, S., Awano, W., Juni, N., & Yamamoto, D. (2002). *lingerer*, a *Drosophila* gene involved in initiation and termination of copulation, encodes a set of novel cytoplasmic proteins. *Genetics*, 162(4), 1775–1789.
- Kuniyoshi, H., Usui-Aoki, K., Juni, N., & Yamamoto, D. (2003). Expression analysis of the *lingerer* gene in the larval central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenet*, 17(2–3), 117–137. <https://doi.org/10.1080/01677060390256459>
- Laghezza Masci, V., Di Luca, M., Gambellini, G., Taddei, A. R., Belardinelli, M. C., Guerra, L., ... Fausto, A. M. (2015). Reproductive biology in Anophelinae mosquitoes (Diptera, Culicidae): Fine structure of the female accessory gland. *Arthropod Structure and Development*, 44(4), 378–387. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2015.04.003>
- Lantz, V., Chang, J.S., Horabin, J.I., Bopp, D., and Schedl, P. (1994). The *Drosophila orb* RNA-binding protein is required for the formation of the egg chamber and establishment of polarity. *Genes Dev.* 8, 598–613.
- Lasko P.F. 1994. *Molecular Genetics of Drosophila Oogenesis*. Austin: RG Landes
- Lasko, P. (2016). mRNA Localization and Translational Control in *Drosophila* Oogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(10), a012294–a012294. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012294>
- Latham KL, Liu YS and Taylor BJ. (2013). A small cohort of FRUM and Engrailed-expressing neurons mediate successful copulation in *Drosophila melanogaster*. *BMC Neuroscience*, 14:57 <http://www.biomedcentral.com/1471-2202/14/57>
- Laver, J. D., Marsolais, A. J., Smibert, C. A., & Lipshitz, H. D. (2015). *Regulation and Function of Maternal Gene Products During the Maternal-to-Zygotic Transition in Drosophila*. *Current Topics in Developmental Biology* (1st ed., Vol. 113). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.06.007>
- Lawniczak MK, Begun DJ (2004) A genome-wide analysis of courting and mating responses in *Drosophila melanogaster* females. *Genome* 47:900–910.
- Ling, S. C., Fahrner, P. S., Greenough, W. T., & Gelfand, V. I. (2004). Transport of *Drosophila* Fragile X mental retardation protein-containing ribonucleoprotein granules by kinesin-1 and cytoplasmic dynein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 17428–17433.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *methods*, 25(4), 402–408.
- Mack PD, Kapelnikov A, Heifetz Y, Bender M. (2006) Mating-responsive genes in reproductive tissues of female *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2
- Malheiro, R., Casal, S., Baptista, P., & Pereira, J. A. (2015). A review of *Bactrocera oleae* (Rossi) impact in olive products: From the tree to the table. *Trends in Food Science and Technology*, 44(2), 226–242. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.04.009>
- Manetti, A.G.O., Rosetto, M., De Filippis, T., Marchini, D., Baldari, C.T., Dallai, R., 1997. Juvenile hormone regulates the expression of the gene encoding ceratotoxin A, an antibacterial peptide from the female reproductive accessory glands of the medfly *Ceratitiscapitata*. *J. Insect Physiol.* 43, 1161e1167.
- Manning, A. (1967). The control of sexual receptivity in female *Drosophila*. *Anim Behav*, 15, 239–250.
- Marchini, D., Bernini, L.F. & Dallai, R. (1989) B-N-Acetylhexosaminidase in the secretion of the female reproductive accessory glands of *Ceratitiscapitata* (Diptera). *Insect Biochemistry*, 19, 549±555.
- Marchini, D., Bernini, L.F., Marri, L., Giordano, P.C., Dallai, R., 1991. The female reproductive accessory glands of the medfly *Ceratitiscapitata*: antibacterial activity of the secretion fluid. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 21, 597e605.
- Marchini, D., Giordano, P.C., Amons, R., Bernini, L.F., Dallai, R., 1993. Purification and primary structure of ceratotoxin A and B, two antibacterial peptides from the female reproductive accessory glands of the medfly *Ceratitiscapitata* (Insecta: Diptera). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23, 591e598.
- Margaritopoulos JT, Skavdis G, Kalogiannis N, Nikou D, Morou E, Skouras PJ, Tsitsipis JA, Vontas J: Efficacy of the pyrethroid alpha-cypermethrin against *Bactrocera*oleae populations from Greece, and improved diagnostic for an iAChE mutation. *Pest Manag Sci* 2008, 64:900–908
- Matthews KA, Miller DFB, Kaufman TC (1989): Developmental distribution of RNA and protein products of the *Drosophila a-tubulin* gene family. *Dev Biol* 132:45–61.
- Mavragani-Tsipidou P (2002) Genetic and cytogenetic analysis of the olive fruit fly *Bactrocera*oleae (Diptera: Tephritidae). *Genetica* 116: 45–57.
- Matsushita-Sakai, T., White-Grindley, E., Samuelson, J., Seidel, C., & Si, K. (2010). *Drosophila Orb2* targets genes involved in neuronal growth, synapse formation, and protein turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 11987–11992

- Merrill, P. T., Sweeton, D. and Wieschaus, E. (1988). Requirements for autosomal gene activity during precellular stages of *Drosophila melanogaster*. *Development* 104, 495-510.
- Miyatake T, Chapman T, Partridge L (1999) Mating-induced inhibition of remating in female Mediterranean fruit flies *Ceratitis capitata*. *J Insect Physiol* 45: 1021-1028.
- Mtango, N. R., Potireddy, S., & Latham, K. E. (2008). Chapter 7 Oocyte Quality and Maternal Control of Development. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 268(08), 223-290. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(08\)00807-1](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)00807-1)
- Muik B, Lendl B, Molina-Diaz A, Avora-Canáda MJ (2003) Fourier transform Raman spectrometry for the quantitative analysis of oil content and humidity in olives. *Appl Spectrosc* Feb 57: 223- 227.
- Muller P, Kuttenukeuler D, Gesellchen V, Zeidler MP, Boutros M (2005) Identification of JAK/STAT signalling components by genome-wide RNA interference. *Nature* 436: 871-875.
- Mullis KB, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G et al (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51: 263-273.
- Nakano, Y., Fujitani, K., Kurihara, J., Ragan, J., Usui-Aoki, K., Shimoda, L., et al. (2001). Mutations in the novel membrane protein spinster interfere with programmed cell death and cause neural degeneration in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*, 21, 3775 - 3788.
- Natzle JE, McCarthy BJ (1984): Regulation of *Drosophila* α - and β - tubulin genes during development. *Dev Biol* 104: 187-198.
- Naz RK, Dhandapani L (2010) Identification of human sperm proteins that interact with human zona pellucida 3 (ZP3) using yeast two-hybrid system. *J Reprod Immunol* 84: 24-31.
- 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.
- Papanicolaou A., Schetelig M., Arensbürger P, Atkinson P.W., Benoit J. B., Bourtzis K..... Handler A.M (2016) The whole genome sequence of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann), reveals insights into the biology and adaptive evolution of a highly invasive pest species. *Genome Biol.* Sep 22;17(1):192. doi: 10.1186/s13059-016-1049-2.
- Papoulas, O., Monzo, K. F., Cantin, G. T., Ruse, C., Yates, J. R., Ryu, Y. H., & Sisson, J. C. (2010). dFMRP and Caprin, translational regulators of synaptic plasticity, control the cell cycle at the *Drosophila* mid-blastula transition. *Development*, 137(24), 4201-4209. <https://doi.org/10.1242/dev.055046>
- Parker, R., & Sheth, U. (2007). P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. *Molecular Cell*, 25(5), 635-646. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.02.011>
- Parker, R., & Sheth, U. (2007). P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. *Molecular Cell*, 25(5), 635-646. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.02.011>
- Peter J. Russel (2013), *iGENETICS Μία Μεντελική Προσέγγιση, Αλεξανδρούπολη: Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.*
- Ramos, A., and Camargo, F.D. (2012). The Hippo signaling pathway and stem cell biology. *Trends Cell Biol.* 22, 339-346.
- Resh V. H. and Carde R. T. (2009), *Encyclopedia of insects* (2nd edition), Oxford, UK: Elsevier
- Rogers DW, Baldini F, Battaglia F, Panico M, Dell A, et al. (2009) Transglutaminase-mediated semen coagulation controls sperm storage in the malaria mosquito. *PLoS Biol* 7: e1000272. doi: 10.1371/journal.pbio.1000272
- Rosetto M., Manetti A. G. O., Giordano P. C., Marri L., Amons R., Baldari C. T., Marchini D. and Dallai R. (1996) Molecular characterization of ceratotoxin C, a novel antibacterial female-specific peptide of the ceratotoxin family from the medfly *Ceratitis capitata*. *European Journal of Biochemistry* 241, 330-337.
- Rosetto, M., Belardinelli, M.C., Fausto, A.M., Marchini, D., Bongiorno, G., Maroli, M., Mazzini, M., 2003. A mammalian-like lipase gene is expressed in the female reproductive accessory glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Phlebotomidae). *Insect Mol. Biol.* 12, 501e508.
- Roth S, Schupbach T (1994) The relationship between ovarian and embryonic dorsoventral patterning in *Drosophila*. *Development*. 120:2245-57.
- Sagri, E., Koskinioti, P., Gregoriou, M. E., Tsoumani, K. T., Bassiakos, Y. C., & Mathiopoulos, K. D. (2017). Housekeeping in Tephritid insects: The best gene choice for expression analyses in the medfly and the olive fly. *Scientific Reports*, 7(August 2016), 1-9. <https://doi.org/10.1038/srep45634>
- Sagri, E., Reczko, M., Tsoumani, K. T., Gregoriou, M. E., Harokopos, V., Mavridou, A. M., ... Mathiopoulos, K. D. (2014). The molecular biology of the olive fly comes of age. *BMC Genetics*, 15(Suppl 2). <https://doi.org/10.1186/1471-2156-15-S2-S8>
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT et al (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. ColdSpringHarborLaboratory.
- Sander, K. 1996. Variants of embryonic patterning mechanisms in insects: Hymenoptera and Diptera. *Cellular and Developmental Biology* 7: 573-582.
- Santos, A.C., and Lehmann, R. (2004). Germ cell specification and migration in *Drosophila* and beyond. *Curr. Biol.* 14, R578-R589.

- Sato, K., Hayashi, Y., Ninomiya, Y., Shigenobu, S., Arita, K., Mukai, M., Kobayashi, S. (2007). Maternal Nanos represses hid/skl-dependent apoptosis to maintain the germ line in *Drosophila* embryos.
- Schetelig MF, Caceres C, Zacharopoulou A, Franz G, Wimmer EA: Conditional embryonic lethality to improve the sterile insect technique in *Ceratitiscapitata* (Diptera: Tephritidae). *BMC Biol* 2009, 7:4.
- Schetelig MF, Nirmala X, Handler AM: Pro-apoptotic cell death genes, hid and reaper, from the tephritid pest species, *Anastrepha suspensa*. *Apoptosis* 2011, 16:759-68.
- Schmid KJ, Tautz D: A screen for fast evolving genes from *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:9746-50.
- Schweisguth, F., Lepesant, J. A., & Vincent, A. (1990). The serendipity alpha gene encodes a membrane-associated protein required for the cellularization of the *Drosophila* embryo. *Genes and Development*, 4(6), 922-931. <https://doi.org/10.1101/gad.4.6.922>
- Shuangxia J. et al. (2015), "Engineered chloroplast dsRNA silences cytochrome p450 monooxygenase, V-ATPase and chitin synthase genes in the insect gut and disrupts *Helicoverpa armigera* larval development and pupation", *Plant Biotechnology Journal*, 13, p. 435-446
- Solomon S, Xu Y, Wang B, David MD, Schubert P, et al. (2007) Distinct structural features of caprin-1 mediate its interaction with G3BP-1 and its induction of phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2alpha, entry to cytoplasmic stress granules, and selective interaction with a subset of mRNAs. *Mol Cell Biol* 27: 2324-2342.
- Sirot LK, Buehner NA, Fiumera AC, Wolfner MF (2009) Seminal fluid protein depletion and replenishment in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*: an ELISA based method for tracking individual ejaculates. *Behav. Ecol. Soc.* 63, 1505-1513
- Siegel, R. W., & Hall, J. C. (1979). Conditioned responses in courtship behavior of normal and mutant *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 3430 - 3434.
- Skouras PJ, Margaritopoulos JT, Seraphides NA, Ioannides IM, Kakani EG, Mathiopoulos KD, Tsitsipis JA: Organophosphate resistance in olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, populations in Greece and Cyprus. *Pest Manag Sci* 2007, 63:42-48
- Spradling A. 1993. Developmental genetics of oogenesis. In: Bate M, Arias AM, editors. The development of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. p 1-70.
- Starz-Gaiano, M., and Lehmann, R. (2001). Moving towards the next generation. *Mech. Dev.* 105, 5-18.
- Stitzel, M. L., & Seydoux, G. (2013). Regulation of the Oocyte-to-Zygote Transition, 407(2007). <https://doi.org/10.1126/science.1138236>
- Tadros, W., & Lipshitz, H. D. (2005). Setting the stage for development: mRNA translation and stability during oocyte maturation and egg activation in *Drosophila*. *Developmental Dynamics*, 232(3), 593-608. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20297>
- Tadros, W., & Lipshitz, H. D. (2009). The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development*, 136(18), 3033-3042. <https://doi.org/10.1242/dev.033183>
- Tautz, D., Friedrich, M. & Schröder, R. 1994. Insect embryogenesis - what is ancestral and what is derived? *Development (suppl.)*: 193-199.
- Tourriere H, Gallouzi IE, Chebli K, Capony JP, Mouaikel J, et al. (2001) RasGAP-associated endoribonuclease G3Bp: selective RNA degradation and phosphorylation-dependent localization. *Mol Cell Biol* 21: 7747-7760.
- Tsitsipis JA (1980) Effect of constant temperatures on larval and pupal development of olive fruit flies reared on artificial diet. *Environ Entomol* 9: 764-68.
- Tzanakakis ME (1989) Small-scale rearing *Dacusoidea*. In: *World Crop Pests: Fruit flies: their biology, natural enemies, and control*. Vol. 3B. Ed. by Robinson AS, Hooper G, Elsevier, Amsterdam, 105-118.
- 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
- Von Schilcher, F., 1976 The role of auditory stimuli in the courtship of *Drosophila melanogaster*. *Anim. Behav.* 24: 18-26.
- 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, 3300-33097
- Wagner, R.M., Woods, C.W., Hayes, J.A., Kochansky, J.P., Hill, J.C., Fraser, B.A., 1993. Isolation and identification of a novel peptide from the accessory sex gland of the female house fly, *Musca domestica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194, 1336-1343.
- Warn RM, Magrath R, Webb S (1984) Distribution of F-actin during cleavage of the *Drosophila* syncytial blastoderm, *J Cell Biol* 98, 156-162
- Wieschaus, E. and D. Sweeton. 1988. Requirements for X-linked zygotic gene activity during cellularization of early *Drosophila* embryos. *Development* 104: 483-494.
- Xu, S., Hafer, N., Agunwamba, B., & Schedl, P. (2012). The CPEB protein Orb2 has multiple functions during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet*, 8, e1003079.
- Yamamoto, D., & Nakano, Y. (1998). Genes for sexual behavior. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 246(1), 1-6. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8259>

- Yamamoto, D., and Y. Nakano, 1998 Genes for sexual behavior. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246: 1–6.
- Yamamoto, D., J.-M. Jallon and A. Komatsu, 1997 *Genetic Entomol.* 42: 551–585.
- Yin, M., and Zhang, L. (2011). Hippo signaling: a hub of growth control, tumor suppression and pluripotency maintenance. *J. Genet. Genomics* 38, 471–481.
- Yokoyama, V. Y. (2018). Olive Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) in California Table Olives, USA: Invasion, Distribution, and Management Implications, (July), 1–18. <https://doi.org/10.1093/jipm/pmv014>
- Zawistowski S. (1988). A replication demonstrating reduced courtship of *Drosophila melanogaster* by associative learning *J Comp Psychol*, 102, 174–176.
- Zhao, B., Tumaneng, K., and Guan, K.L. (2011). The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nat. Cell Biol.* 13, 877–883.
- Zheng, L., Sepúlveda, L. A., Lua, R. C., Lichtarge, O., Golding, I., & Sokac, A. M. (2013). The Maternal-to-Zygotic Transition Targets Actin to Promote Robustness during Morphogenesis. *PLoS Genetics*, 9(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003901>
- Zimmermann JL, Petri W, Meselson M (1983): Accumulation of a specific subset of *D. melanogaster* heat shock mRNAs in normal development without heat shock. *Cell* 32:1161-1170.
- Zou Z, Lopez DL, Kanost MR, Evans JD, Jiang H: Comparative analysis of serine protease-related genes in the honey bee genome: possible involvement in embryonic development and innate immunity. *Insect Mol Biol* 2006, 15:603-14