

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΘΕΜΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

«Σχεδιασμός και δημιουργία γενετικών κατασκευών για την εισαγωγή του δείκτη dsRed στο Y χρωμόσωμα της *Ceratitis capitata* με χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9»

THESIS TITLE:

«Design and generation of genetic constructs for the insertion dsRed marker in the Y chromosome of *Ceratitis capitata* through CRISPR/Cas9 system»

Ράλλης Δημήτριος

Λάρισα

2020

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του καθηγητή Μοριακής βιολογίας κ. Μαθιόπουλου Κωνσταντίνου.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Γιακουντής Αντώνης: Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1. Η ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΤΕΡΗΡΙΤΙΔΑΕ	7
1.1. Η <i>CERATITIS CAPITATA</i> ΩΣ ΕΝΤΟΜΟ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ	7
1.2. Ο ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΗΣ <i>CERATITIS CAPITATA</i>	7
1.3. ΑΝΑΓΚΗ ΓΙΑ ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΟ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ <i>CERATITIS CAPITATA</i>	8
1.4. Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ <i>CERATITIS CAPITATA</i> ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΟ ΕΛΕΓΧΟ ΤΩΝ ΤΕΡΗΡΙΤΙΔΑΕ	8
2. ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΤΕΙΡΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ	9
2.1. ΣΙΤ ΩΣ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΗ ΤΩΝ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΩΝ	9
2.2. ΣΙΤ ΚΑΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΦΥΛΟ-ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΗΝ <i>CERATITIS CAPITATA</i>	10
2.2.1. <i>WHITE PUPAE (WP)</i> :	11
2.2.2. ΘΕΡΜΟΕΥΑΙΣΘΗΤΕΣ ΘΝΗΣΙΓΟΝΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ:	11
2.3. ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΦΥΛΟ-ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ.....	12
2.3.1. ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΕΝΤΟΜΩΝ ΠΟΥ ΦΕΡΟΥΝ ΕΝΑ ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ ΘΝΗΣΙΓΟΝΟ:.....	12
2.4. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΛΟ-ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	14
3. ΦΥΛΟΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΗΝ <i>CERATITIS CAPITATA</i>	14
3.1. ΦΥΛΕΤΙΚΑ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΑ ΤΗΣ <i>CERATITIS CAPITATA</i>	14
3.2. Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΑΡΡΕΝΟΠΟΙΗΣΗΣ (ΜΟΥ) ΤΗΣ <i>CERATITIS CAPITATA</i>	15
3.3. ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΦΥΛΟΚΑΘΟΡΙΣΜΟΥ ΣΕ <i>D. MELANOGASTER</i> ΚΑΙ <i>C. CAPITATA</i>	16
3.4. ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΜΟΥ ΣΤΑ ΤΕΡΗΡΙΤΙΔΑΕ	17
4. CRISPR	17
4.1. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ CRISPR	17
4.2. ΔΟΜΗ ΕΝΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΤΟΠΟΥ CRISPR	18
4.3. ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ CRISPR/Cas9	18
4.4. ΧΡΗΣΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ CRISPR/Cas9 ΓΙΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ	19
4.4.1. ΜΗ ΟΜΟΛΟΓΗ ΣΥΝΔΕΣΗ ΑΚΡΩΝ (NHEJ):	20
4.4.2. ΟΜΟΛΟΓΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ (HDR):.....	20
4.5. ΧΡΗΣΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ CRISPR/Cas9 ΣΕ ΕΝΤΟΜΑ.....	21
ΣΚΟΠΟΣ	22
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	36
1. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ gRNAs.....	36
2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	37
3. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΜΟΛΟΓΩΝ ΑΚΡΩΝ	38

4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΕΙ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΔΕΙΚΤΗ	39
5. ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ	39
6. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ GRNAS	42
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	44
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	48
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	51

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας τον κύκλο αυτό, σε μία χρονιά που ή θα την θυμόμαστε ή θα μας θυμούνται, οφείλω να ευχαριστήσω ορισμένα άτομα για την συνεισφορά τους στην υλοποίηση της συγκεκριμένης εργασίας.

Αρχικά τον κ. Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο για την ευκαιρία που μου έδωσε να βρεθώ στο συγκεκριμένο εργαστήριο, καθώς και για την προθυμία του να με βοηθήσει στην υλοποίηση των μετέπειτα σχεδίων μου. Επίσης, την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Κωνσταντίνα Τσουμάνη για την πολύτιμη καθοδήγηση και εποπτεία της καθ' όλη την διάρκεια πραγματοποίησης της εργασίας. Τα παιδιά του εργαστηρίου, την Αντωνία, την Ελένη και τον Αλέξανδρο, για την βοήθεια τους και για την συμβολή τους στο ευχάριστο κλίμα που υπήρχε στο εργαστήριο. Τέλος, τους γονείς μου για την υποστήριξη και την εμπιστοσύνη που μου δείχνουν όλα αυτά τα χρόνια. Σας ευχαριστώ από καρδιάς!

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα Tephritidae συνιστούν μία οικογένεια εντόμων με περισσότερα από 4.000 μέλη, πολλά από τα οποία αποτελούν έντομα οικονομικού ενδιαφέροντος, καθώς προκαλούν σημαντικές απώλειες στις καλλιέργειες φρούτων και λαχανικών. Το πιο πολυφάγο έντομο της οικογένειας αυτής, καθώς και το πιο καλά μελετημένο, είναι η μεσογειακή μύγα *Ceratitis capitata*. Για την αντιμετώπισή της, πέραν των συμβατικών τεχνικών του ψεκασμού με εντομοκτόνα και της τοποθέτησης παγίδων, έχει γίνει επιτυχής εφαρμογή της οικολογικής εναλλακτικής μεθόδου της Τεχνικής Στείρου Εντόμου (SIT) που προϋποθέτει την αποκλειστική απελευθέρωση στειρών αρσενικών στο πεδίο. Για το σκοπό αυτό έχουν κατασκευαστεί στελέχη φυλο-γενετικού διαχωρισμού (GSS), μέσω χρωμοσωμικών μεταθέσεων με τεχνικές κλασσικής μεταλλαξιγένεσης. Παρά την επιτυχή δημιουργία GSS στην *C. capitata*, η προσπάθεια δημιουργίας αντίστοιχων στελεχών σε συγγενικά Tephritidae δεν έχει καταστεί μέχρι και σήμερα δυνατή. Η εύρεση του παράγοντα αρρενοποίησης των Tephritidae στην *C. capitata* και ο εντοπισμός ορθολόγων γονιδίων σε 8 συγγενικά Tephritidae, συμπεριλαμβανομένου του *Bactrocera olea*, δίνει νέες προοπτικές για την ακριβή γενετική τροποποίηση του αρρενοειδικού χρωμοσώματος Y των εντόμων αυτών ώστε να δημιουργηθούν νέες GSS.

Στην συγκεκριμένη εργασία θέλαμε να ελέγξουμε την ικανότητα ένθεσης ενός γονιδίου δείκτη στο χρωμόσωμα Y της *Ceratitis capitata*, με χρήση του μοριακού εργαλείου CRISPR/Cas9. Για τον σκοπό αυτό εντοπίστηκαν πέντε αλληλουχίες στόχευσης του συστήματος CRISPR/Cas9 στην περιοχή του χρωμοσώματος Y κοντά στο γονίδιο του παράγοντα αρρενοποίησης και σχεδιάστηκε μία γενετική κατασκευή για την εισαγωγή του γονιδίου δείκτη dsRed στις θέσεις αυτές. Στη συνέχεια ενισχύθηκαν τα επιμέρους τμήματα της κατασκευής προκειμένου μελλοντικά αυτή να συναρμολογηθεί και να εισαχθεί με μικροένεση σε έμβρυα του εντόμου. Η ενδεχόμενη ένθεση της γενετικής κατασκευής θα αποτελέσει την επιβεβαίωση της ικανότητας γενετικής τροποποίησης του χρωμοσώματος Y των Tephritidae με χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9. Αυτό θα επιτρέψει μελλοντικά την αξιοποίηση των θέσεων στόχευσης για την επαναδημιουργία των GSS μέσω της προτεινόμενης μεθοδολογίας, αποδεικνύοντας δυναμικά τη δυναμική της συγκεκριμένης προσέγγισης ως εναλλακτική της κλασσικής μεταλλαξιγένεσης. Με τον τρόπο αυτό, θα είναι πλέον εφικτός ο σχεδιασμός παρομοίων πειραμάτων για τη γενετική τροποποίηση συγγενικών Tephritidae, όπως του *Bactrocera oleae*, με σκοπό την δημιουργία σε αυτά σύγχρονων GSS και τελικά την εφαρμογή της SIT για τον πληθυσμιακό τους έλεγχο.

ABSTRACT

Tephritidae are an insect family consisted of more than 4.000 different species, many of which are considered as agronomic traits, as they cause major crop losses on fruits and vegetables. *Ceratitis capitata* is the most polyphagous as well as the best characterized member of this family. For the management of this pest, apart from the conventional control methods such as insecticide sprays and baited traps, more ecological methods like Sterile Insect Technique (SIT) are applied. For the application of the latter, Genetic Sexing Strains (GSS) for *Ceratitis capitata* were developed through classical chromosomal rearrangements. However, the creation of GSS on close related Tephritidae species, like *Bactrocera oleae*, is yet to be done. The discovery of the Tephritidae maleness factor in *Ceratitis capitata* and the characterization of its orthologs in 8 related Tephritidae, including the pest *Bactrocera oleae*, creates new opportunities for the precise genome editing of the male-specific Y chromosome in those species, targeting in the creation of new GSS.

In the present study, we were aiming on testing the ability of knocking-in a marker gene in the Y chromosome of *Ceratitis capitata*, through the CRISPR/Cas9 system. Towards this, five CRISPR/Cas9 target sequences were identified on a chromosomal region of Y near the maleness factor gene and a genetic construct was designed for the insertion of dsRed marker gene into those targets. The different parts of the genetic construct were amplified in order to be assembled in a single vector and get injected in the insect. The putative insertion of the construct in *Ceratitis capitata* will confirm the ability of the genetic manipulation of the Tephritidae Y chromosome through CRISPR/Cas9 system. This will allow for the future utilization of those target sequences in order to recreate GSS based on the proposed methods, proving the prospect of this approach as an alternative to classical mutagenesis. In this way, it will be possible to design similar constructs for the genetic modification of relative Tephritidae species, like *Bactrocera oleae*, in order to create novel GSS for the control of those species through application of the SIT.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΤΕΡΗΡΙΤΙΔΑΕ

Σε παγκόσμια κλίμακα τα βρώσιμα φυτά προσβάλλονται από περισσότερα από 10.000 διαφορετικά είδη εντόμων (Dhaliwal et al., 2007). Τα Τερηριτιδαε αποτελούν μια οικογένεια εντόμων που ανήκουν στην τάξη των Diptera και αριθμούν περισσότερα από 4.000 είδη. Πολλά από αυτά χαρακτηρίζονται ως έντομα οικονομικής σημασίας καθώς προκαλούν κάθε χρόνο τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές απώλειες στην παραγωγή, προσβάλλοντας πολλά είδη φρούτων και λαχανικών (Ekesi and Billah, 2007). Προκειμένου να περιοριστούν οι απώλειες που προκαλούνται από αυτά καθώς και να παρεμποδιστεί η εγκατάστασή τους σε νέες περιοχές, πολλές φρουτοπαραγωγές χώρες, που θεωρούνται εκτεθειμένες απέναντί τους, περιορίζουν τις εισαγωγές από χώρες που έχουν ήδη πληγεί, ή υποχρεώνουν τα εισαγόμενα προϊόντα να διαβούν μια διαδικασία καραντίνας προτού διατεθούν (Vargas et al. 2008). Έτσι, παρά την ετήσια επένδυση περισσότερων των 40 δις. \$ στην εφαρμογή τριών εκατομμυρίων κυβικών τόνων εντομοκτόνων, καθώς και την εφαρμογή βιολογικών μεθόδων περιορισμού (Pimentel, 2007, 2009), οι ετήσιες απώλειες που προκαλούν αυτά τα οικονομικής σημασίας έντομα παραμένουν.

1.1. Η CERATITIS CAPITATA ΩΣ ΕΝΤΟΜΟ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ

Από τα σημαντικότερα μέλη των Τερηριτιδαε, που επίσης αποτελεί οικονομικής σημασίας έντομο, είναι η μύγα της Μεσογείου *Ceratitis capitata* (Wiedemann). Ανήκει στη υπό-οικογένεια των Dacinae, και είναι το γνωστότερο από τα 65 είδη του γένους *Ceratitis* (Papadopoulos, 2008). Λόγω της ευρύτατης κατανομής της στον κόσμο, της ανοχής της σε δροσερά κλίματα σε σχέση με άλλες μύγες των φρούτων, καθώς και της ποικιλίας των ξενιστών της, θεωρείται από τα σημαντικότερα οικονομικής σημασίας είδη εντόμων (Thomas, et al. 2008). Καταστροφές που οφείλονται στην *C. capitata* έχουν καταγραφεί σε 353 διαφορετικά φυτά, γεγονός που την καθιστά το πιο πολυφάγο έντομο της οικογένειας των Τερηριτιδαε (Papadopoulos, 2008).



Εικόνα 1 Μια θηλυκή *C. capitata* ωοαποθέτει στα εξωτερικά μαλακά μέρη ενός κόκκου καφέ (Thomas, et al., 2008).

1.2. Ο ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΗΣ CERATITIS CAPITATA

Η *C. capitata* αποτελεί ένα ολομετάβολο έντομο του οποίου η οικονομική σημασία προκύπτει από τον κύκλο ζωής που το χαρακτηρίζει. Συγκεκριμένα, τα ενήλικα θηλυκά έντομα μετά από τη σύζευξη με το αρσενικό ξεκινούν να γεννούν αυγά, μερικά χιλιοστά κάτω από την επιδερμίδα του φρούτου [Εικόνα 1], είτε ανοίγοντας μικρές οπές με τον ωοαποθέτη τους είτε εκμεταλλευόμενα προϋπάρχουσες καταστροφές του καρπού. Κάθε θηλυκό μπορεί να γεννήσει έως και 10 αυγά στην ίδια θέση και έως 22 αυγά μέσα σε ένα 24ωρο, ενώ έχει βρεθεί πως διαφορετικά θηλυκά έντομα μπορούν να ωοαποθέσουν στην ίδια θέση του καρπού. Σε θερμά περιβάλλοντα η εκκόλαψη των αυγών διαρκεί 1,5 με 2 ημέρες (Thomas, et al., 2008). Στη συνέχεια οι προνύμφες (larvae) που προκύπτουν αρχίζουν να τρέφονται από την αποσυντιθέμενη σάρκα του φρούτου, ανοίγοντας συχνά τούνελ, καθιστώντας το έτσι μη κατάλληλο για βρώση ή οδηγώντας το στο να πέσει στο έδαφος (Ekesi and Mohamed, 2011). Στην καταστροφή του καρπού που προκαλείται από την *C. capitata* δρύνει

επικουρικά και δευτερογενής μόλυνσεις από μύκητες και βακτήρια που μπορεί να προκληθούν στο εκτεθειμένο σημείο ωοαπόθεσης.

Το στάδιο της προνύμφης διαρκεί 6-10 μέρες, ανάλογα με την θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Στην συνέχεια, κατά την διάρκεια της νύχτας, οι ώριμες προνύμφες εγκαταλείπουν ομαδικά τον καρπό και πέφτουν στο χώμα όπου περνάνε 6-13 μέρες στο στάδιο της νύμφης (pupa) μέχρι να μεταμορφωθούν σε ενήλικα έντομα [Εικόνα 2]. Η σεξουαλική ωριμότητα έρχεται 4 μέρες μετά τη μεταμόρφωση για τα αρσενικά και σε 6-8 μέρες για τα θηλυκά. Απουσία τροφής, τα ενήλικα άτομα ζούνε μέχρι τέσσερις ημέρες, ενώ παρουσία ευνοϊκών περιβαλλοντικών συνθηκών και πληθώρας θρεπτικών, τα ενήλικα μπορούν να επιβιώσουν έως και 6 μήνες. Σε τροπικά και υποτροπικά κλίματα, καθώς και στις νότιες περιοχές της μεσογείου, η *C. capitata* αναπτύσσεται διαρκώς ολόκληρο τον χρόνο αλλά με μικρότερο ρυθμό κατά τις ψυχρές περιόδους. Ωστόσο, στις βόρειες περιοχές της



Μεσογείου ο πληθυσμός διατηρείται κατά τη διάρκεια του χειμώνα αποκλειστικά από τις προνύμφες που παραμένουν στο εσωτερικό των φρούτων (Paradopoulos, 2008). Έτσι, όταν υπάρχουν διαρκώς διαθέσιμα φρούτα που να μπορεί να ωαποθέσει η *C. capitata*, οι γενιές θα είναι μεγάλες και συνεχείς. Αντιθέτως, απουσία ξενιστών για τρεις με τέσσερις μήνες μπορεί να ελαττώσει τον πληθυσμό της μύγας στο ελάχιστο (Thomas, et al., 2008).

Εικόνα 2 Ο κύκλος ζωής της Μεσογειακής μύγας *Ceratitidis capitata*, από δεξιά προς τα αριστερά: αυγό, προνύμφη, νύμφη, ενήλικο (Thomas, et al., 2008).

1.3. ΑΝΑΓΚΗ ΓΙΑ ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΟ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ CERATITIS CAPITATA

Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με την εντατική καλλιέργεια στις φρουτοπαραγωγικές χώρες καθώς και το διεθνές εμπόριο προϊόντων που αποτελούν συχνούς ξενιστές της μεσογειακής μύγας, κάνουν φανερή την ανάγκη για αυστηρό έλεγχο του πληθυσμού της. Μια πληθώρα τεχνικών έχουν χρησιμοποιηθεί και συνεχίζουν να χρησιμοποιούνται προκειμένου να μειωθεί το κόστος από την προσβολή του συγκεκριμένου εντόμου. Ο συμβατικός τρόπος ελέγχου περιλαμβάνει τον ψεκάσμο με εντομοκτόνα καθώς και την τοποθέτηση παγίδων στα δέντρα. Στην πρώτη περίπτωση ο έλεγχος βασίζεται σε τοξικές ουσίες, όπως οργανοφωσφορικά ή πυρεθροειδή. Σύγχρονες εκδοχές της μεθόδου αυτής περιλαμβάνουν την ανάμιξη εντομοκτόνων ουσιών με πρωτεΐνες που δρουν ως δόλωμα για τα έντομα, επιτυγχάνοντας έτσι πιο στοχευμένη δράση. Η προσέγγιση αυτή εφαρμόζεται και στην περίπτωση των παγίδων, όπου χρησιμοποιούνται ουσίες που λειτουργούν ως προσελκυστικά για τα αρσενικά, με απώτερο σκοπό την ελάττωσή τους από τον πληθυσμό ώστε να περιοριστεί και η αναπαραγωγή των εντόμων (Vargas, 2015, Paradopoulos, 2008). Ωστόσο τα εντομοκτόνα αυτά έχουν δεχθεί κριτική αναφορικά με την τοξικότητα που έχουν στους υπόλοιπους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, γεγονός που οδήγησε στην απαγόρευση πολλών εξ' αυτών και την κυκλοφορία πιο οικολογικών αντιστοίχων.

1.4. Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ CERATITIS CAPITATA ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΟ ΕΛΕΓΧΟ ΤΩΝ TERPHRITIDAE

Το γεγονός ότι η οικονομική σημασία των ειδών της οικογένειας Terphritidae προκύπτει από τον κύκλο ζωής τους, καθώς τα θηλυκά ωοαποθέτουν κάτω από την επιφάνεια των καρπών και προκαλούν την καταστροφή τους, κατεύθυναν την έρευνα προς την εύρεση εναλλακτικών τρόπων περιορισμού τους που σχετίζονται με τη μείωση των θηλυκών ατόμων και κατ' επέκταση τη μείωση του αναπαραγωγικού τους δυναμικού.

Ο αποτελεσματικός πληθυσμιακός έλεγχος της *C. capitata*, πέραν της οικονομικής σημασίας που έχει λόγω των καταστροφών που προκαλεί στις καλλιέργειες, αποτελεί σημαντικό βήμα για τον έλεγχο και τον υπολοίπων μελών των Tephritidae που αποτελούν έντομα οικονομικής σημασίας. Η πληθώρα των ξενιστών του συγκεκριμένου εντόμου, η γεωγραφική επέκτασή του καθώς και η εύκολη προσαρμογή του σε εργαστηριακές συνθήκες συνιστούν τους κύριους λόγους για τους οποίους πληθώρα μελετών τα τελευταία 30 χρόνια εστιάζουν στη βαθύτερη κατανόηση της βιολογίας, φυσιολογίας και συμπεριφοράς του συγκεκριμένου εντόμου. Τα διαθέσιμα πλέον δεδομένα και τα εργαλεία που έχουν αναπτυχθεί στο συγκεκριμένο έντομο προς την εύρεση εναλλακτικών τρόπων περιορισμού του αντί της χρήσης εντομοκτόνων, το έχουν καταστήσει οργανισμό μοντέλο μεταξύ των υπολοίπων ειδών της οικογένειας Tephritidae.

Επιπλέον σημαντική πρόοδος έχει επιτευχθεί τα τελευταία χρόνια όσον αφορά στην εμβάθυνση της γνώσης πάνω στο μηχανισμό φυλοκαθορισμού του και στην οργάνωση του γονιδιώματός του, παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες για την ανάπτυξη νέων μεθόδων ελέγχου αλλά και τη βελτιστοποίηση υπαρχόντων. Αντίστοιχα γονιδιωματικά δεδομένα είναι πλέον διαθέσιμα και για άλλα είδη των Tephritidae, τα οποία σε συνδυασμό με την εισαγωγή της βιοτεχνολογίας στο πεδίο της εφαρμοσμένης εντομολογίας και την ανάπτυξη νέων μοριακών τεχνολογιών, όπως αυτή της CRISPR/Cas9, ανοίγουν το δρόμο για την εφαρμογή νέων προσεγγίσεων αντιμετώπισης και σε μέλη αυτής της οικογένειας όπου πρότινος δεν ήταν δυνατό. Η προοπτική αυτή τονίζει τη σημασία της *C. capitata* ως το μοντέλο για την ανάπτυξη νέων συστημάτων πληθυσμιακού ελέγχου, στη βάση των ήδη υπάρχοντων για το συγκεκριμένο έντομο, που όμως να μπορούν στη συνέχεια να μεταφερθούν με επιτυχία σε άλλα συγγενικά του είδη.

2. ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΤΕΙΡΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ

Οι συμβατικές τεχνικές ψεκασμού με εντομοκτόνα για την καταπολέμηση της μεσογειακής μύγας καθώς και συγγενικών ειδών εντόμων έχουν βρεθεί στο επίκεντρο σφοδρής κριτικής σχετικά με τις παρενέργειες που προκαλούν στο οικοσύστημα. Αυτές περιλαμβάνουν τη θανάτωση μη καταστροφικών ή ακόμα και ωφέλιμων ειδών εντόμων (Ehler and Endicott, 1984, Urbaneja et. al., 2004), μέχρι και πρόκληση τοξικότητας στον άνθρωπο. Επιπλέον, στην εφαρμογή ισχυρών εντομοκτόνων ως πανάκεια για την καταπολέμηση εντόμων οικονομικής σημασίας, ελλοχεύει ο σοβαρός κίνδυνος της ανάπτυξης ανθεκτικότητας, με τέτοιες περιπτώσεις να έχουν καταγραφεί (Magana et al., 2007). Ακόμα, η εναλλακτική της τοποθέτησης παγίδων, αν και αποτελεσματική, έχει συχνά απαγορευτικό κόστος (Vicente, 2012).

2.1. SIT ΩΣ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΗ ΤΩΝ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΩΝ

Μια εναλλακτική, οικολογική προσέγγιση που εφαρμόζεται, με μεγάλη αποτελεσματικότητα, για τον πληθυσμιακό έλεγχο εντόμων συμπεριλαμβανομένης της *C. capitata*, είναι η τεχνική του στείρου εντόμου (Sterile Insect Technique, SIT) που αναπτύχθηκε από τον Knippling (Knippling, 1955). Αυτή βασίζεται στην μαζική εκτροφή και απελευθέρωση στο πεδίο, μεγάλου αριθμού εντόμων που έχουν στειρωθεί με ακτίνες γ. Λόγω της στειρότητας που έχει προκληθεί, από τη σύζευξη των στείρων αρσενικών με τα θηλυκά αγρίου τύπου προκύπτουν απόγονοι που δεν είναι βιώσιμοι με αποτέλεσμα τη μείωση του αναπαραγωγικού δυναμικού των θηλυκών και κατ' επέκταση του συνολικού πληθυσμού. Με την επαναλαμβανόμενη απελευθέρωση στείρων εντόμων, ο αγρίου τύπου πληθυσμός μπορεί να περιοριστεί και σε ορισμένες περιπτώσεις ακόμη και να εξαλειφθεί (Hendrichs, 2000). Η πρώτη επιτυχημένη χρήση της SIT ήταν το 1954 στο νησί Curaçao στην Καραϊβική για τον έλεγχο του εντόμου Κοχλιόμυγα (Cochliomyia), όπου μετά τη συνεχή απελευθέρωση στείρων αρσενικών για διάστημα έξι μηνών, επετεύχθη η πλήρης εξαφάνιση του (Baumhover et al., 1955).

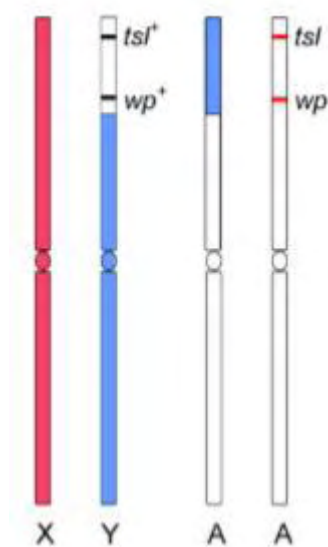
Έκτοτε η SIT έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την καταπολέμηση διαφόρων εντόμων, συμπεριλαμβανομένης της *C. capitata* (Hendrichs et al., 2009).

Η SIT εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα ως μέθοδος, όπως η απουσία επεμβατικότητας στο περιβάλλον, η αυξημένη ειδοειδικότητα που παρουσιάζει καθώς και η δυνατότητα συνδυαστικής εφαρμογής μαζί με άλλες οικολογικές μεθόδους, όπως η απελευθέρωση παρασιτοειδών, θηρευτών ή παθογόνων των εντόμων. Ωστόσο η εφαρμογή της SIT μπορεί να είναι αποτελεσματική μόνο εάν πληρούνται οι παρακάτω προϋποθέσεις (Vreysen et al., 2006) :

- Ο πληθυσμός του εντόμου - στόχου είναι σχετικά μικρός
- Η βιολογία και οικολογία του εντόμου - στόχου είναι λεπτομερώς γνωστή
- Το έντομο - στόχος μπορεί να εκτραφεί σε μεγάλη κλίμακα
- Τα στείρα έντομα μπορούν να απελευθερώνονται και να καταγράφονται αποτελεσματικά
- Οι απελευθερώσεις στείρων εντόμων γίνονται σε μεγάλη κλίμακα και όχι ατομικά από τον κάθε παραγωγό

2.2. SIT ΚΑΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΦΥΛΟ-ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΗΝ *CERATITIS CAPITATA*

Όσον αφορά την *C. capitata*, προκειμένου να ελεγχθεί ο άγριος πληθυσμός, η απελευθέρωση τόσο αρσενικών όσο και θηλυκών φαίνεται πως είναι λιγότερο αποτελεσματική σε σχέση με την απελευθέρωση αποκλειστικά αρσενικών (McInnis et al.,



1986; Rendon et al., 2004). Αυτό οδήγησε στην ανάγκη φυλετικού διαχωρισμού (sexing), ο οποίος δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού των αρσενικών εντόμων από τα θηλυκά σε κάποιο αναπτυξιακό στάδιο κατά τη διαδικασία εκτροφής. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκαν, με τεχνικές κλασσικής μεταλαξινέυσης, φυλο-γενετικά στελέχη (genetic sexing strain, GSS) που επιτρέπουν την επιλογή με βάση κάποιο φαινότυπο (χρώμα βομβυκίου) ή κάποιο αναπτυξιακό χαρακτηριστικό (θερμοευαισθησία). Η βασική αρχή στην οποία στηρίχτηκε η ανάπτυξη των σειρών αυτών ήταν η παρουσία ενός μεταλλαγμένου, υπολοιπόμενου γονιδίου-δείκτη σε αυτοσωμική περιοχή, τη στιγμή που το φυσιολογικό επικρατές αλληλόμορφο βρισκόταν μετατοπισμένο στο αρρενοειδικό χρωμόσωμα Y. Έτσι τα θηλυκά εξέφραζαν μόνο το μεταλλαγμένο αυτοσωμικό τόπο, ενώ τα αρσενικά παρουσίαζαν διάσωση του φαινοτύπου λόγω ύπαρξης του φυσιολογικού αλληλομόρφου μετατοπισμένο στο Y [Εικόνα 3].

Εικόνα 3 Σχηματικό διάγραμμα που απεικονίζει τη θέση των μεταλλαγμάτων καθώς και των αγρίου τύπου γονιδίων στα στελέχη GSS της *C. capitata* (Morrison et al., 2010).

Τα στελέχη GSS που αναπτύχθηκαν στην *C. capitata* με τεχνικές κλασσικής μεταλλαξιγένεσης είναι τα παρακάτω:

2.2.1. *WHITE PUPAE* (WP):

Αποτελεί το πρώτο GSS στέλεχος της *C. capitata*, αναπτύχθηκε το 1984 από τον συνδυασμό των μετατοπίσεων που αναπτύχθηκαν από τους Robinson και van Heemert (1982) και της μετάλλαξης *white pupae* που εντοπίζεται στο αυτοσωμικό χρωμόσωμα 5, της οποίας η ύπαρξη είχε ήδη χαρακτηριστεί από την Rössler (1979). Ο διαχωρισμός στη σειρά αυτή βασίζεται στο χρώμα της νύμφης, με τις θηλυκές νύμφες που φέρουν σε ομοζυγωτία τη μετάλλαξη *wp* να εμφανίζουν λευκό χρώμα, ενώ οι αρσενικές με το φυσιολογικό



αλληλόμορφο wp^+ συνδεδεμένο με το Y να εμφανίζουν καφέ χρώμα [Εικόνα 4]. Ωστόσο, σε συνθήκες μαζικής παραγωγής η γενετική σειρά αυτή εμφανίζει δεδομένα γενετικής αστάθειας, που γίνονται φανερά με την αύξηση των μη μεταλλαγμένων θηλυκών. Η αύξηση αυτή είναι αποτέλεσμα του ανασυνδυασμού μεταξύ της χρωμοσωμικής περιοχής του αρσενικού που φέρει τη μετατόπιση και του μεταλλαγμένου δείκτη *wp* (Franz, 2002).

Εικόνα 4 Μεταλλάγματα *white pupae*, τα αρσενικά εμφανίζουν τον αγρίου τύπου καφέ φαινότυπο ενώ τα θηλυκά τον μεταλλαγμένο λευκό (Morrison et al. 2010).

2.2.2. ΘΕΡΜΟΕΥΑΙΣΘΗΤΕΣ ΘΗΛΗΣΙΓΟΝΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ:

Προκειμένου να γίνει η τεχνική της SIT πιο οικονομικά συμφέρουσα και αποτελεσματική, αναπτύχθηκε το θερμοευαίσθητο φυλο-γενετικό στέλεχος TSL (Temperature-sensitive Lethality). Η επιλογή βασίζεται και πάλι στην ύπαρξη μιας ομόζυγης υπολειπόμενης αυτοσωμικής μετάλλαξης. Τα θηλυκά μπορούν να θανατωθούν στο στάδιο της εμβρυογένεσης μέσω της επώασης των αυγών στους 34°C για 24 ώρες (Franz et al., 2005) ενώ τα αρσενικά επιζούν του θερμικού σοκ. Όπως και στην περίπτωση του *white pupae*, η ύπαρξη του φυσιολογικού επικρατούς αλληλομόρφου στο χρωμόσωμα Y οδηγεί στην επιβίωση μόνο των αρσενικών ατόμων. Επιπλέον, στελέχη που αναπτύχθηκαν σε δεύτερη φάση φέρουν γενετικές βελτιώσεις, όπως η μειωμένη απόσταση μεταξύ της θέσης μετατόπισης και του δείκτη TSL, οι οποίες αυξάνουν τη γενετική σταθερότητα των σειρών αυτών. Ωστόσο και αυτή η σειρά εμφανίζει προβληματικές καθώς παρατηρείται 50% θνησιμότητα των αρσενικών, η οποία σε συνδυασμό με την απομάκρυνση των θηλυκών που αποτελούσαν περίπου το 50% του πληθυσμού, οδηγεί τελικά στην απελευθέρωση του 25% των εντόμων σε σχέση με τον αρχικό προς εκκόλαψη αριθμό αυγών.

Οι GSS συμβάλουν σε μεγάλο βαθμό στην αποτελεσματική εφαρμογή της SIT και τα πλεονεκτήματα που προκύπτουν από την ύπαρξη τους συνοψίζονται παρακάτω (Hendrichs et al, 1995):

- Οικονομία στο κόστος εκτροφής, ακτινοβολήσης, πακεταρίσματος, μεταφοράς και απελευθέρωσης
- Αυξημένη ποιότητα των αρσενικών ατόμων καθώς οι αρσενικές νύμφες μπορούν να ακτινοβοληθούν 24 ώρες πριν την απελευθέρωση, αντί των 48 ωρών που απαιτούνται όταν ακτινοβολούνται και θηλυκές
- Αυξημένη αποτελεσματικότητα των αρσενικών καθώς δεν αναλώνονται σε συζεύξεις με στείρα θηλυκά. Επίσης μελέτες έχουν δείξει ότι απουσία στειρών θηλυκών, τα αρσενικά διασπείρονται σε μεγαλύτερη απόσταση από το σημείο απελευθέρωσης
- Μπορούν να εφαρμοστούν απλοποιημένες και πιο ακριβείς τεχνικές για την παρακολούθηση της εξέλιξης του προγράμματος, μέσω χρήσης παγίδων που προσελκύουν θηλυκά, μειώνοντας έτσι το ποσοστό των στειρών αρσενικών που παγιδεύονται καθώς και τα σφάλματα από την λανθασμένη ταυτοποίηση στειρών θηλυκών ως αγρίου τύπου
- Μείωση της καταστροφής σε φρούτα που προκαλείται από τα στείρα θηλυκά, τα οποία παρά την στειρότητα τους συνεχίζουν να ωοαποθέτουν. Κατά συνέπεια μειώνονται και τα ποσοστά μόλυνσεων από μύκητες και βακτήρια που ακολουθούν το τρύπημα του καρπού
- Ικανό υποκατάστατο των συμβατικών εντομοκτόνων λόγω της δυνατότητας επαναλαμβανόμενης εφαρμογής της σε περιοχές που πλήττονται από την *C. capitata* λόγω του μειωμένου κόστους και της μείωσης στην καταστροφή της σοδειάς
- Αυξημένη βιοασφάλεια καθώς σε περίπτωση ατυχήματος που θα οδηγήσει στην απελευθέρωση πληθυσμού μη στειρών εντόμων, αυτός θα περιλαμβάνει αποκλειστικά αρσενικά. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για εγκαταστάσεις μαζικής εκτροφής που βρίσκονται σε περιοχές όπου πλήττονται από την δράση της μεσογειακής μύγας

2.3. ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΦΥΛΟ-ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

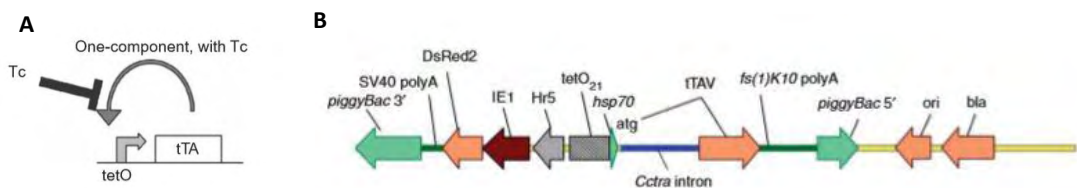
Η πρόοδος της γενετικής μηχανικής, η ανάπτυξη νέων μοριακών τεχνικών καθώς και ο χαρακτηρισμός των στοιχείων του μονοπατιού φυλοκαθορισμού λειτούργησαν καταλυτικά στη δημιουργία νέων, διαγονιδιακών στελεχών για το διαχωρισμό του φύλου (Transgenic Sexing Strain, TSS). Έχει προταθεί ακόμα η χρήση της γενετικής μηχανικής ώστε να ξεπεραστεί η ανάγκη ακτινοβολήσης των εντόμων για την πρόκληση στειρότητας. Η διαδικασία αυτή σε ορισμένες περιπτώσεις είναι απαγορευτική λόγω της μεταλλαξιγόνου δράσης της ακτινοβολίας Γ, ενώ η μείωση της έκθεσης στην ακτινοβολία με σκοπό να μειωθούν οι αρνητικές επιδράσεις της, συχνά προκαλεί ανεπαρκή στείρωση των αρσενικών.

2.3.1. ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΕΝΤΟΜΩΝ ΠΟΥ ΦΕΡΟΥΝ ΕΝΑ ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ ΘΗΛΗΣΙΓΟΝΟ:

Η συγκεκριμένη προσέγγιση προϋποθέτει τη μαζική εκτροφή μιας σειράς που είναι ομόζυγη για ένα κατά συνθήκη θνησιγόνο, επικρατές, θήλεο-ειδικό γονίδιο. Η απελευθέρωση εντόμων που φέρουν το σύστημα αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη θανάτωση όλων των θηλυκών που απελευθερώνονται καθώς και όλων των θηλυκών απογόνων των διαγονιδιακών αρσενικών. Η θνησιγόνος δράση βασίζεται σε ένα τεχνητό σύστημα το οποίο βρίσκεται υπό καταστολή σε εργαστηριακές συνθήκες και ενεργοποιείται κατά την απελευθέρωση στο πεδίο. Ένα πρόβλημα που παρουσιάζει η προσέγγιση αυτή είναι η έλλειψη, σε έντομα που δεν αποτελούν οργανισμούς μοντέλα, χαρακτηρισμένων

συστημάτων γενετικής έκφρασης που να εμφανίζουν θήλεο-ειδικότητα στα αρχικά στάδια ανάπτυξης (Fu et al., 2007).

Μια επιτυχημένη εφαρμογή της τεχνικής RIDL (Release of Insects carrying Dominant Lethal) που έδωσε θετικά αποτελέσματα όσον αφορά την θνησιμότητα των θηλυκών στην *C. capitata*, κάνει χρήση ενός “Tet-off” συστήματος. Σε αυτό, ο συνθετικός μεταγραφικός παράγοντας tTA (tetracyclin trans-activator) απουσία του αντιβιοτικού τετρακυκλίνης προσδένεται σε ένα ρυθμιστικό στοιχείο (tetO) τοποθετημένο ανοδικά ενός ελάχιστου υποκινητή επάγοντας την έκφραση του γονιδίου που βρίσκεται καθοδικά. Παρουσία όμως τετρακυκλίνης, η οποία μπορεί να χορηγηθεί με την τροφή, αυτή προσδένεται στον παράγοντα tTA προκαλώντας στερεοδομικές αλλαγές που τον εμποδίζουν να προσδεθεί στον χειριστή tetO με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η έκφραση του καθοδικού γονιδίου (Gossen and Bujard, 2002). Στη θέση του καθοδικού γονιδίου-τελεστή του συστήματος τοποθετήθηκε η κωδικοποιητική περιοχή tTAV που αποτελεί κατάλληλη τροποποίηση του παράγοντα tTA για δράση στη *Drosophila*. Η αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του παράγοντα tTA έχει φανεί πως προκαλεί τοξικότητα στα κύτταρα και τελικά οδηγεί στη θανάτωση του εντόμου στο στάδιο της νύμφης (Fu et al., 2007). Η προσέγγιση αυτή ανήκει στα συστήματα ενός συστατικού (one component), και δημιουργεί έναν κύκλο θετικής ανατροφοδότησης, όπου η παρουσία του παράγοντα tTA ενεργοποιεί την μεταγραφή του ίδιου γονιδίου [Εικόνα 5(A)]. Η απαιτούμενη θήλεο-ειδικότητα αυτού του συστήματος βασίζεται σε έναν καλά συντηρημένο μηχανισμό που αφορά τον καθορισμό του φύλου στην *C. capitata*. Αυτός είναι το διαφορετικό εναλλακτικό μάτισμα που παρατηρείται μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων στο γονίδιο *transformer* (*Cctra*) του καταρράκτη του φυλοκαθορισμού του εντόμου. Συγκεκριμένα, στα αρσενικά η κωδικοποιητική περιοχή του *Cctra* διακόπτεται από επιπλέον εξόνια, καθιστώντας την πρωτεΐνη που προκύπτει μη λειτουργική. Μόνο τα θηλυκά παράγουν το λειτουργικό εναλλακτικό μετάγραφο (Fu et al., 2007). Προκειμένου λοιπόν να υπάρξει επιλογή των θηλυκών από το σύστημα, έγινε εισαγωγή του ιντρονίου ενδιάμεσα του γονιδίου του tTA [Εικόνα 5(B)]. Το αποτέλεσμα ήταν στα θηλυκά να εμφανίζεται σωστή αποκοπή του ιντρονίου και άρα έκφραση λειτουργικής tTA που μπορούσε στη συνέχεια να ενεργοποιήσει τον κύκλο θετικής ανατροφοδότησης και επομένως να οδηγήσει στη θανάτωση του εντόμου. Αντίθετα στα αρσενικά, το μάτισμα δεν συνέβαινε σωστά και έτσι η tTA δεν ήταν λειτουργική ώστε να ενεργοποιήσει το μονοπάτι καθοδικά και να επαχθεί η θνησιγόνος δράση (Fu et al., 2007).



Εικόνα 5 (A) Ένα απλοποιημένο σύστημα ενός συστατικού όπου παρουσία τετρακυκλίνης η μεταγραφή του tTA αναστέλλεται, ενώ απουσία της η σύνθεση tTA οδηγεί σε επιπλέον μεταγραφή του γονιδίου και τελικά συσσώρευση του προϊόντος (Gong et al., 2005). (B) Η κατασκευή στην οποία γίνεται στρατολόγηση του ιντρονίου του *Cctra* προκειμένου να επαχθεί θήλεο-ειδικό μάτισμα του παράγοντα tTAV (Fu et al., 2007).

2.4. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΛΟ-ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα που έχουν τα διαγονιδιακά συστήματα επιλογής είναι η δυνατότητα τροποποίησης του συστήματος ώστε να είναι λειτουργικό σε διαφορετικά είδη εντόμων, γεγονός που είναι σχεδόν αδύνατο με μεθόδους κλασσικής γενετικής. Μια τέτοια προσέγγιση θα ήταν απόλυτα επιθυμητή για τη δημιουργία στελεχών TSS σε άλλα είδη οικονομικής σημασίας της οικογένειας των Terphritidae, στα οποία η κατασκευή κλασσικών GSS δεν είναι δυνατή. Ωστόσο, η κατασκευή διαγονιδιακών συστημάτων επιλογής εμπίπτει στη νομοθεσία περί γενετικά τροποποιημένων οργανισμών, γεγονός που κάνει την απελευθέρωση τους στο πεδίο οικονομικά αδύνατη λόγω των επιπλέον ερευνών που απαιτούνται ώστε να ελεγχθούν τα κριτήρια ασφαλείας που ορίζει η νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Μία λύση στο παραπάνω πρόβλημα είναι η δημιουργία νέων στελεχών διαχωρισμού που βασίζονται σε σύγχρονες τεχνικές γενετικής μηχανικής και κάνουν χρήση των ίδιων μεταλλάξεων από τις οποίες προκύπτουν τα κλασσικά GSS στελέχη. Προς την κατεύθυνση αυτή, πρόσφατα εντοπίστηκε μετάλλαξη που προκαλεί τον φαινότυπο *white pupae*. Αυτή βρέθηκε ότι σχετίζεται με ένα γονίδιο μεμβρανικού μεταφορέα της υπεροικογένειας MFS (Major Facilitator Superfamily) του οποίου η βιοπληροφορική ανάλυση φανέρωσε την παρουσία ορθολόγων σε 146 εκ των 148 εντόμων που εξετάστηκαν (Ward et al., 2020). Επομένως, κρίνεται πλέον δυνατή μέσω χρήσης σύγχρονων μοριακών τεχνικών, η κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση των ορθολόγων του *white pupae*, και η διάσωση των φυσιολογικών γονιδίων μέσω σύνδεσης τους με το Y. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία σύγχρονων GSS σε είδη εντόμων όπου μέχρι πρότινος δεν ήταν δυνατόν, ανοίγοντας τον δρόμο για την εφαρμογή της SIT για τον περιορισμό τους.

3. ΦΥΛΟΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΗΝ *CERATITIS CAPITATA*

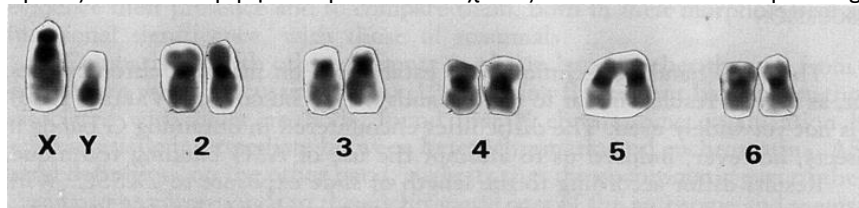
Η κατασκευή νέων GSS πέραν από τον εντοπισμό μίας μετάλλαξης που δίνει διαχωρισμό με βάση τον φαινότυπο, όπως είναι το *white pupae*, απαιτεί και τη διάσωση του φυσιολογικού φαινοτύπου στα αρσενικά. Το γεγονός αυτό τονίζει τη σημασία που έχει η μελέτη των φυλετικών χρωμοσωμάτων καθώς και η δυνατότητα γενετικής τροποποίησης του αρρενοειδικού χρωμοσώματος Y.

3.1. ΦΥΛΕΤΙΚΑ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΑ ΤΗΣ *CERATITIS CAPITATA*

Η χρωμοσωμική σύσταση του εντόμου αυτού περιλαμβάνει πέντε αυτοσωμικά χρωμοσώματα καθώς και δύο φυλετικά (X/Y) [Εικόνα 6]. Για την ανάπτυξη των φυλετικών χρωμοσωμάτων, έχει προταθεί πως προήλθαν από ένα ζεύγος αυτοσωμικών, το οποίο κάποια στιγμή έχασε πλήρως ή μερικώς την ικανότητα ανασυνδυασμού. Η συσσώρευση μεταλλάξεων στα ομόλογα με το X γονίδια οδήγησε στην εξαφάνιση τους και ως αποτέλεσμα στην συρρίκνωση του Y. Έχει προταθεί επίσης πως μόλις ένα χρωμόσωμα αποκτήσει ένα φυλοκαθοριστικό γονίδιο, τότε το χρωμόσωμα αυτό έχει την τάση να προσελκύει γονίδια που αυξάνουν την αρμοστικότητα του συγκεκριμένου φύλου (Graves, 1995). Στην *C. capitata*, ο ανασυνδυασμός παρεμποδίζεται μεταξύ των X των θηλυκών (Roessler and Rosenthal 1992) με το Y των αρσενικών ωστόσο να εμφανίζει έναν μικρό ανασυνδυασμό με περιοχές του X σε προ-μειωτικά στάδια (Franz, 2002).

Σχετικά με τον φυλοκαθορισμό στην *C. capitata*, έχει βρεθεί πως το χρωμόσωμα που είναι υπεύθυνο για τον αρσενικό φαινότυπο είναι το Y, στο οποίο εδράζεται ο παράγοντας αρρενοποίησης (Willhoeft and Franz 1996). Σε αυτό διαφοροποιείται από την *Drosophila melanogaster*, που αποτελεί τον οργανισμό μοντέλο των εντόμων. Στη *D. melanogaster*, παρά την ύπαρξη Y χρωμοσώματος, το φύλο καθορίζεται από την αναλογία των X προς τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα (X:A), ενώ το Y φαίνεται να περιέχει γονίδια που σχετίζονται με την γονιμότητα των αρσενικών (Bopp et al., 1991).

Η φύση των φυλετικών χρωμοσωμάτων της *C. capitata* είναι ιδιαίτερη, γεγονός που καθιστά τη μελέτη τους δύσκολη. Παρά την εκμετάλλευση των πολυταινικών χρωμοσωμάτων από σιελογόνους αδένες της *C. capitata* για την κατασκευή γενετικών χαρτών, τα φυλετικά χρωμοσώματα της Μεσογειακής μύγας δεν πολυταινίζονται. Συγκεκριμένα, το X σχηματίζει ένα κοκκιώδες δίκτυο και το Y εμφανίζεται ως μια ετεροχρωματινική σφαίρα (Bedo and Webb, 1989, Zacharopoulou et al., 1990) γεγονός που κατέστησε δύσκολη την χαρτογράφηση τους. Η δημιουργία γονιδιωματικών βιβλιοθηκών για την *C. capitata* οδήγησε στην απομόνωση κλώνων που περιείχαν αρρενοειδικές αλληλουχίες. Αυτές αποκάλυψαν πως το Y χρωμόσωμα του συγκεκριμένου εντόμου περιέχει πληθώρα όμοιων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (Anleitner and Haymer, 1991). Την υπόθεση του επαναλαμβανόμενου χαρακτήρα του Y στην *C. capitata* ενίσχυσαν δεδομένα από αναλύσεις στο συγγενικό είδος *B. oleae* (Gabrieli, 2011). Τα δεδομένα αυτά απέδειξαν τον έντονο ετεροχρωματικό χαρακτήρα του Y, την πληθώρα αλληλουχιών που σχετίζονται με μεταθετά στοιχεία σε αυτό, την ύπαρξη πολλών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών και τέλος την παρουσία περισσότερων ψευδογονιδίων σε σχέση με γονίδια που περιέχουν ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (Salvemini, 2014). Η προσπάθεια αλληλούχησης ολόκληρου του γονιδιώματος της *C. capitata* και η κατασκευή σύγχρονων γενετικών χαρτών που βασίζονται σε ακριβή δεδομένα από τεχνικές Next Generation Sequencing, οδήγησε στο να γνωρίζουμε σήμερα με ακρίβεια ένα τμήμα 0,81Mb του χρωμοσώματος Y (Paranicolaou et al. 2016)

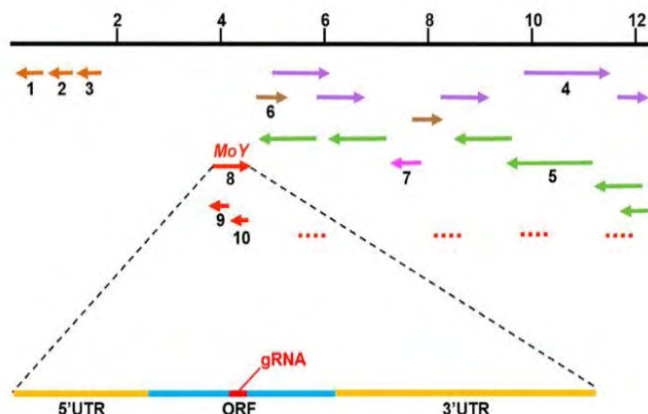


Εικόνα 6 Ο καρυότυπος ενός αρσενικού ατόμου με χρώση ASG (Canovai et al., 1995).

3.2. Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΑΡΡΕΝΟΠΟΙΗΣΗΣ (ΜΟY) ΤΗΣ *CERATITIS CAPITATA*

Ένα μεγάλο κενό στο μονοπάτι φυλοκαθορισμού της Μεσογειακής μύγας ήταν ο χαρακτηρισμός του παράγοντα αρρενοποίησης (Maleness factor, M). Μέχρι πρόσφατα ήταν γνωστό ότι εδράζεται στον μεγάλο βραχίονα του Y χρωμοσώματος, αλλά απουσίαζε ο μοριακός χαρακτηρισμός του. Το κενό αυτό καλύφθηκε το 2019 με την ανακάλυψη του γενετικού τόπου του παράγοντα M (*Maleness-on-the-Y*, MoY) το μετάγραφο του οποίου φάνηκε πως είναι ο επαρκής και αναγκαίος παράγοντας για την αρρενοποίηση στην *C. capitata* (Meccariello et al., 2019). Επιπλέον, μια σημαντική παρατήρηση σχετικά με τον γενετικό τόπο του MoY ήταν πως περιβάλλεται από άλλες 9 μεταγραφικές μονάδες, γεγονός που καθιστά την περιοχή αρκετά ευχρωματινική και ενδεχομένως δεκτικό τόπο για γενετική τροποποίηση [Εικόνα 7].

Η έκφραση του MoY ξεκινάει 2-3 ώρες μετά την ωοαπόθεση (After-Egg-Laying, AEL), εμφανίζει την κορύφωση της συγκέντρωσης του μετά από 15 ώρες και η έκφραση χάνεται σταδιακά από τις 48 ώρες μέχρι την ενηλικίωση του εντόμου (Meccariello et al., 2019). Ο μηχανισμός μέσω του οποίου το MoY προκαλεί την αρρενοποίηση δεν είναι ακόμα γνωστός.

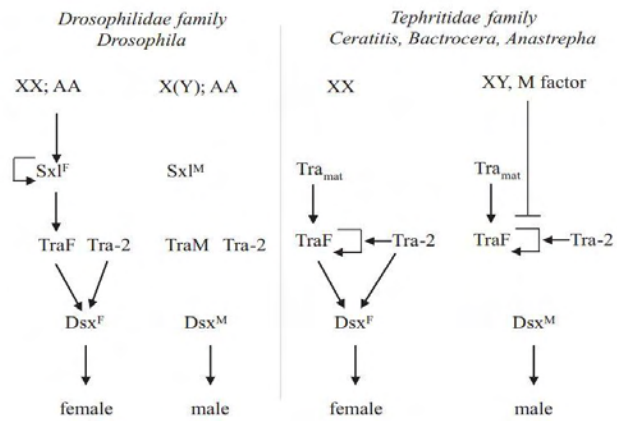


Εικόνα 7 Σχηματική αναπαράσταση ενός τμήματος του Y στο οποίο αναπαρίσταται το MoY καθώς και οι περιβάλλουσες μεταγραφικές μονάδες (Meccariello et al., 2019).

3.3. ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΦΥΛΟΚΑΘΟΡΙΣΜΟΥ ΣΕ *D. MELANOGASTER* ΚΑΙ *C. CAPITATA*

Το μονοπάτι φυλοκαθορισμού στη *Drosophila* συνοπτικά έχει ως εξής: XSE > *Sxl* > *tra+tra2* > *dsx/fru*. Σε αυτό, παράγοντες που εντοπίζονται στο X χρωμόσωμα (X-linked signalling elements, XSE) ενεργοποιούν το καθοδικό γονίδιο *sex-lethal (sxl)*, το οποίο αποτελεί τον διακόπτη που ενεργοποιεί την θηλυκοποίηση του εντόμου. Η πρωτεΐνη SXL επάγει καθοδικά το θηλεοειδικό μάτισμα του *transformer (tra)* που δίνει τη λειτουργική πρωτεΐνη η οποία, σε συνδυασμό με την TRA-2, με τη σειρά της ενεργοποιεί τα γονίδια *doublesex (dsx)* και *fruitless (fru)*. Αυτά είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση των θηλυκών χαρακτηριστικών στους ιστούς του εντόμου (Burtis and Baker, 1989, Heinrichs et al., 1998, Hoshijima et al., 1991, Ryner et al., 1996).

Το μονοπάτι του φυλοκαθορισμού στην *C. capitata* φαίνεται πως διαφοροποιείται σε σχέση με αυτό της *Drosophila* [Εικόνα 8]. Ωστόσο διατηρεί την αρχιτεκτονική της ύπαρξης ενός γονιδίου διακόπτη (*MoY*) και ενός γονιδίου που εμφανίζει εναλλακτικό μάτισμα στα θηλυκά. Έτσι, παρότι το *sxl* γονίδιο έχει ομόλογο στην *Ceratitis*, αυτό δεν εμφανίζει φυλοειδικό μάτισμα, αλλά ο μηχανισμός αυτός εμφανίζεται μετατοπισμένος στα γονίδια *tra* και *dsx*. Κατά έναν ανάλογο τρόπο με τη *Drosophila*, τα αρσενικά παράγουν ένα μη λειτουργικό μετάγραφο ενώ στα θηλυκά το σωστό μάτισμα οδηγεί στην παραγωγή μίας λειτουργικής πρωτεΐνης η οποία ενεργοποιεί το μονοπάτι καθοδικά. Όσο για το *dsx*, ανάλογα με την παρουσία ή όχι των TRA και TRA-2 ματίζεται με έναν φυλοειδικό τρόπο παράγοντας και στις δύο περιπτώσεις έναν λειτουργικό μεταγραφικό παράγοντα που ενεργοποιεί γονίδια που δίνουν τα θηλυκά ή αρσενικά χαρακτηριστικά αντίστοιχα (Pane et al., 2002).



Εικόνα 8 Σχηματική αναπαράσταση των μονοπατιών φυλοκαθορισμού της *D. melanogaster* και της *C. capitata* (Sanchez, 2008).

Παρά τις διαφορές στο μονοπάτι φυλοκαθορισμού, οι παραπάνω οργανισμοί εμφανίζουν κοινά μοτίβα ρύθμισης που φανερώνουν την κοινή εξελικτική προέλευση των μηχανισμών αυτών. Η θεωρία της προς τα πάνω εξέλιξης (bottom-up) του Wilkins προτείνει πως το πιο συντηρημένο γονίδιο βρίσκεται στο τέλος του μονοπατιού φυλοκαθορισμού, ενώ το πιο καινούργιο στην αρχή του (Wilkins, 1995). Έτσι, ο διπλός ρόλος του *dsx* καθώς και η διατήρησή του στα ολομετάβολα έντομα στο τέλος του μονοπατιού υποδεικνύει μια κοινή προέλευση. Στην πραγματικότητα είναι το μόνο φυλοκαθοριστικό γονίδιο του οποίου η πρωτεΐνη εμφανίζει κοινά δομικά μοτίβα μεταξύ σκωλήκων, μυγών και σπονδυλωτών. Το δεύτερο πιο συντηρημένο γονίδιο μεταξύ των εντόμων στο μονοπάτι του φυλοκαθορισμού είναι το *tra*, ενώ η εμφάνισή του *sxl* στη *Drosophila* είναι μεταγενέστερη. Ενδεχομένως η απόκτηση του αυτορυθμιστικού κύκλου που εμφανίζει το *sxl* να ήταν υπεύθυνη για να χάσει το *tra* τον ρόλο του «διακόπτη» και επομένως την ικανότητα αυτοματίσματος (Sawanth, 2016).

3.4. ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΜΟΥΣΤΑ ΤΕΡΗΡΙΤΙΔΑΕ

Τον εντοπισμό του ΜοΥ στην *C. capitata* ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση για την ανίχνευση ενδεχόμενης συντήρησής του μεταξύ άλλων ειδών των Τερηριτιδαε. Η ανάλυση φανέρωσε την παρουσία ορθόλογων γονιδίων σε συγγενικά είδη της *Ceratitis capitata* (Meccariello et al., 2019). Συγκεκριμένα βρέθηκαν ορθόλογα γονίδια σε 8 εκ των 14 συγγενών ειδών που εξετάστηκαν. Μεταξύ των ειδών που εμφανίστηκε συντήρηση συγκαταλέγεται το *B. oleae*, στο οποίο πειράματα αποσιώπησης του ΜοΥ έδωσαν θηλυκούς φαινοτύπους σε ΧΥ έντομα, γεγονός που φανερώνει τη συντήρηση του λειτουργικού ρόλου του ΜοΥ μεταξύ των εξεταζόμενων Τερηριτιδαε.

4. CRISPR

Η εφαρμογή της βιοτεχνολογίας και της γενετικής μηχανικής για τη μελέτη και τον χειρισμό των εντόμων δημιούργησε την ανάγκη για όλο και πιο εξελιγμένα συστήματα γενετικής τροποποίησης των οργανισμών αυτών. Πλέον η ανάγκη αυτή καλύπτεται από την εφαρμογή σύγχρονων μοριακών τεχνολογιών, όπως αυτή της CRISPR/Cas9 που επιτρέπει την κατευθυνόμενη και με ακρίβεια τροποποίηση γονιδιωμάτων.

4.1. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ CRISPR

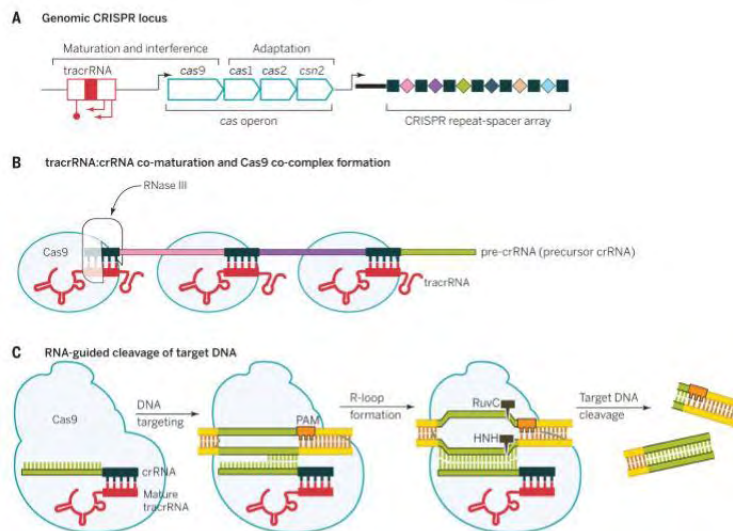
Το σύστημα CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) αποτελεί φυσιολογικά έναν μηχανισμό επίκτητης ανοσίας έναντι ξένων νουκλεϊκών οξέων, ο οποίος εντοπίζεται σε πολλά βακτήρια και αρχαία. Ο γενετικός τόπος του CRISPR είχε εντοπιστεί για πρώτη φορά στο γονιδίωμα της *E. coli* το 1987 όπου είχε παρατηρηθεί ως τμήμα που περιέχει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες με άγνωστη λειτουργία (Ishino et al., 1987). Σήμερα, ο γενετικός τόπος αυτός έχει εντοπιστεί στο γονιδίωμα περισσότερου του 40% των βακτηρίων, ενώ για τα αρχαία το αντίστοιχο ποσοστό βρίσκεται στο 90% (Sorek et al., 2008). Τελικά αποδείχθηκε πως το CRISPR, σε συνδυασμό με τα σχετιζόμενα γονίδια Cas, σχηματίζουν μια μορφή επίκτητης ανοσίας έναντι βακτηριοφάγων. Το σύστημα CRISPR/Cas είναι ένας εξαιρετικά προσαρμοστικός και κληρονομούμενος μηχανισμός που ενσωματώνει στον γενετικό τόπο CRISPR του οργανισμού μικρές γονιδιωματικές αλληλουχίες από φάγους ή από μετακινούμενα γενετικά στοιχεία (Mobile Genetic Elements, MGE). Μελλοντικά, μετά από μεταγραφή και επεξεργασία τους μπορούν να οδηγήσουν την ενδονουκλεάση Cas στην καταστροφή νεοεισερχόμενων νουκλεϊκών οξέων με αλληλουχίες ίδιες με τις ενσωματωμένες (Charpentier and Marraffini, 2014).

Τα συστήματα CRISPR/Cas κατηγοριοποιούνται σε έξι ξεχωριστούς τύπους, σύμφωνα με διαφοροποιήσεις που εμφανίζουν στη δομή και λειτουργία της πρωτεΐνης Cas. Τα πιο κατανοητά συστήματα καθώς και αυτά που χρησιμοποιούνται στη γενετική μηχανική είναι τα τύπου II, καθώς κάνουν χρήση μίας ενδονουκλεάσης του DNA, της Cas9, προκειμένου να αναγνωρίσουν και να τεμαχίσουν υποστρώματα dsDNA. Σε αντίθεση τα συστήματα τύπου I και III χρησιμοποιούν για τον ίδιο σκοπό ένα μεγάλο πρωτεϊνικό σύμπλοκο από πολλές διαφορετικές Cas πρωτεΐνες.

4.2. ΔΟΜΗ ΕΝΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΤΟΠΟΥ CRISPR

Παρά τη διαφοροποίηση των Cas πρωτεϊνών, η αρχιτεκτονική των γενετικών τόπων του CRISPR εμφανίζει πολλές ομοιότητες. Ένας τυπικός γενετικός τόπος CRISPR αποτελείται από μια αρχική αλληλουχία, συνήθως πλούσια σε A/T, η οποία ακολουθείται από ένα σύνολο όμοιων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών μήκους 25-65 ζευγών βάσεων. Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες CRISPR διακόπτονται από επίκτητες αλληλουχίες περίπου 20bp που ονομάζονται spacers και οι οποίες εμφανίζουν μερική ή πλήρη συμπληρωματικότητα με αλληλουχίες των MGEs (protospacers) [Εικόνα 9(A)]. Αυτή η συμπληρωματικότητα είναι η βάση της λειτουργίας του συστήματος παρεμβολής και ανοσίας του CRISPR. Ο γενετικός τόπος του CRISPR μεταγράφεται και δίνει τα πρώιμα CRISPR RNAs (pre-crRNAs). Αυτά αρχικά συντίθενται ως ένα ενιαίο μόριο που στη συνέχεια υπόκειται επεξεργασία από την RNA λιγάση III η οποία κόβει τα pre-RNA δίνοντας γέννηση στα ξεχωριστά crRNAs. Τα ξεχωριστά crRNAs φέρουν στο 5' άκρο την συμπληρωματική αλληλουχία spacer και στο 3' άκρο ένα τμήμα της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας του CRISPR. Προκειμένου τα crRNAs να ωριμάσουν και να στρατολογηθούν από την Cas9 χρειάζεται η συμβολή ενός ακόμα στοιχείου, του transactivating RNA (tracrRNA), το οποίο υβριδίζει με τμήμα της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας του crRNA [Εικόνα 9(B)]. Επομένως για την ενδογενή λειτουργία του CRISPR/Cas9 συστήματος τα τρία απαραίτητα συστατικά είναι:

- Η Cas9 ενδονουκλεάση
- ένα tracrRNA
- ένα crRNA



Εικόνα 9 Ενδογενής λειτουργία του συστήματος CRISPR/Cas9. (A) Η δομή του γενετικού τόπου CRISPR του *S. pyogenes* με τη μεταγραφική μονάδα του tracrRNA, το οπερόνιο των γονιδίων cas και τις εναλλασσόμενες αλληλουχίες CRISPR και spacer. (B) Η διαδικασία ωρίμανσης του pre-crRNA με τη συμβολή του συμπλόκου tracrRNA/Cas9 και της RNA λιγάσης III. (C) Το σύμπλοκο crRNA/Cas9 αναγνωρίζει μια συμπληρωματική αλληλουχία δίπλα σε ένα σημείο PAM και προκαλεί δίκλωνη ρήξη στο DNA (Doudna and Charpentier, 2014).

4.3. ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ CRISPR/CAS9

Η διαδικασία της ενδογενούς λειτουργίας του συστήματος CRISPR/Cas9 βασίζεται σε τρία στάδια:

- I. την ενσωμάτωση νέων spacers
- II. την βιογένεση των crRNAs
- III. την παρεμβολή σε εισερχόμενα τμήματα DNA

Ένα συντηρημένο μοτίβο νουκλεοτιδίων που ονομάζεται Protospacer Adjacent Motif (PAM) παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στη διαδικασία ενσωμάτωσης, όσο και στη διαδικασία παρεμβολής. Τα μοτίβα PAM εντοπίζονται πλησίον των αλληλουχιών στόχευσης της Cas9 και είναι η πρώτη αλληλουχία που αναγνωρίζει το ένζυμο προτού ελέγξει για συμπληρωματικότητα με το crRNA. Αναφορικά, έχουν χαρακτηριστεί για διαφορετικές Cas9 οι αλληλουχίες PAM: 5'-NGG-3' από το *Streptococcus pyogenes* (Cho et al., 2013), 5'-NGGNG-3' από τον *Streptococcus thermophilus* (Karvelis et al., 2013) και 5'-NNNNGATT-3' από το *Neisseria meningitidis* (Hou et al., 2013). Ο λειτουργικός τους ρόλος είναι αρχικά να διαχωρίζει η ενδονουκλεάση τα ξένα, εισερχόμενα νουκλεϊκά οξέα από τις ενδογενείς αλληλουχίες στον γενετικό τόπο του CRISPR και επιπλέον να εξοικονομεί χρόνο στον έλεγχο για συμπληρωματικότητα μεταξύ των εισερχόμενων αλληλουχιών και του crRNA. Το πρώτο επιτυγχάνεται κατά την διαδικασία ενσωμάτωσης, όπου η αλληλουχία PAM παραλείπεται από την ενσωμάτωση στο γονιδίωμα του μικροοργανισμού. Επομένως η μοναδική περίπτωση να βρεθεί PAM πέριξ συμπληρωματικής αλληλουχίας είναι αυτή να αποτελεί μη ενδογενές DNA, άρα και καταστρέφεται από την Cas9. Στην περίπτωση της Cas9 που προέρχεται από τον *S. pyogenes*, η οποία είναι και η πιο συχνή για εργαστηριακή χρήση, έχει βρεθεί πως η αναγνώριση του μοτίβου PAM 5'-NGG-3' συμβαίνει στην καρβοξυ-τελική περιοχή της Cas9. Συγκεκριμένα, η πρώτη βάση που αναφέρεται ως N μπορεί να είναι οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο μιας και δεν αλληλεπιδρά με την Cas9. Αντιθέτως, το συντηρημένο δινουκλεοτίδιο GG «διαβάζεται» από την μεγάλη αύλακα του DNA, μέσω δεσμών υδρογόνου με δύο κατάλοιπα αργινίνης που εντοπίζονται στην καρβοξυ-τελική περιοχή του ενζύμου. Η αναγνώριση αυτή είναι απαραίτητη ώστε να αποδιαταχθεί τοπικά η διπλή έλικα, προκειμένου η Cas9 να προχωρήσει στον έλεγχο της πιθανής συμπληρωματικότητας με το crRNA.

Στο τελευταίο στάδιο της παρεμβολής, το ώριμο crRNA οδηγεί την Cas9 σε συμπληρωματικές μη ενδογενείς αλληλουχίες, επάγοντας την αποικοδόμηση εισερχόμενων αλληλουχιών φάγων [Εικόνα 9(C)]. Η Cas9 φέρει δύο συντηρημένες επικράτειες ενδονουκλεάσης, τις HNH και RuvC, όπου κόβουν τον συμπληρωματικό και μη συμπληρωματικό κλώνο αντίστοιχα (Jinek et al. 2012). Η δίκλωνη ρήξη στο DNA στόχο πραγματοποιείται 3bp ανοδικά του σημείου PAM αφήνοντας στο δίκλωνο DNA τυφλά άκρα.

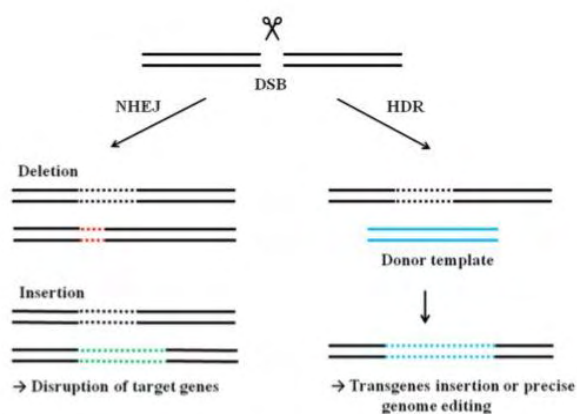
4.4. ΧΡΗΣΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ CRISPR/CAS9 ΓΙΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ

Η σκέψη για ακριβή και αποτελεσματική τροποποίηση της αλληλουχίας του DNA υπήρχε ακόμα από την ανακάλυψη της δομής διπλής έλικας του μορίου. Αυτό, σε συνδυασμό με τη βαθύτερη γνώση των μοριακών μηχανισμών οδήγησε σταδιακά στην ανάπτυξη τεχνικών γενετικής τροποποίησης οι οποίες βασίζονται σε νουκλεάσες με δυνατότητα προγραμματισμού ώστε να στοχεύουν συγκεκριμένες αλληλουχίες. Τέτοιες ήταν αρχικά οι νουκλεάσες με δάκτυλα ψευδαργύρου (Zinc Finger Nucleases, ZNF) (Urnov et al., 2010), ενώ στην συνέχεια εμφανίστηκαν και οι TALENs (Transcription Activator–Like Effector Nucleases) (Sun and Zhao, 2013). Παρά την αποδεδειγμένη ικανότητά τους να τροποποιούν γενετικά το DNA, οι παραπάνω προσεγγίσεις υστερούν στο κομμάτι της ευκολίας σχεδιασμού, παραγωγής καθώς και επιβεβαίωσης της δράσης τους. Αντίθετα, η ανάπτυξη του συστήματος CRISPR/Cas9 δίνει τη δυνατότητα εύκολου σχεδιασμού των αλληλουχιών στόχευσης καθώς και αποτελεσματικής γενετικής τροποποίησης, υπερτερώντας έτσι των προκατόχων της.

Σε εργαστηριακό επίπεδο, το σύστημα CRISPR/Cas9 απαιτεί μία πολυλειτουργική Cas9 και ένα μόριο RNA οδηγό (single guide RNA, sgRNA) που αποτελεί υβρίδιο των crRNA και tracrRNA. Αποτελείται δηλαδή από την αλληλουχία στόχευσης στο 5' άκρο και μία σταθερή περιοχή στο 3' άκρο (backbone). Έτσι, η αναγνώριση του στόχου της Cas9 απαιτεί μόνο την ύπαρξη μίας αλληλουχίας PAM στο 3' άκρο της αλληλουχίας στόχου καθώς και συμπληρωματικότητας βάσεων μεταξύ της RNA αλληλουχίας οδηγού μήκους 20nt και του DNA στόχου (Jinek et al., 2012). Η αλληλουχία 5'-NGG-3' (*S. Pyogenes* PAM) που χρησιμοποιείται κυρίως σε εργαστηριακές εφαρμογές εντοπίζεται περίπου

κάθε 16bp στο γονιδίωμα, ενώ για την αλληλουχία οδηγό έχει βρεθεί πως τα 10nt πλησιέστερα στο σημείο PAM είναι τα κρίσιμα για την αναγνώριση της συμπληρωματικότητας (seed sequence), ενώ στα υπόλοιπα φαίνεται να υπάρχει μία ανοχή σε mismatches (Taning et al., 2017).

Η δίκλωνη ρήξη που επέρχεται της αναγνώρισης από την Cas9 ενεργοποιεί τους ενδογενείς μηχανισμούς επιδιόρθωσης DNA του κυττάρου, γεγονός που μπορεί να αξιοποιηθεί για την τροποποίηση του γονιδιώματος. Οι δίκλωνες ρήξεις επιδιορθώνονται κυρίως μέσω δύο διαφορετικών μηχανισμών, της μη ομόλογης σύνδεσης άκρων (Non Homologous End Joining, NHEJ) ή της ομόλογης επιδιόρθωσης (Homologous Directed Repair, HDR) [Εικόνα 10].



Εικόνα 10 Η δίκλωνη ρήξη που προκαλείται από μια προγραμματιζόμενη ενδονουκλεάση σε μία αλληλουχία στόχο μπορεί να επιδιορθωθεί είτε μέσω του μηχανισμού μη ομόλογης σύνδεσης άκρων (NHEJ) είτε μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού (HDR) (Hryhorowicz, 2017).

4.4.1. ΜΗ ΟΜΟΛΟΓΗ ΣΥΝΔΕΣΗ ΑΚΡΩΝ (NHEJ):

Ο μηχανισμός αυτός είναι επιρρεπής σε λάθη και παρόλο που μπορεί να επιδιορθώσει ταχύτατα την δίκλωνη ρήξη, συνήθως προκαλεί μικρές προσθήκες ή απαισιόφες νουκλεοτιδίων (indels). Σε δίκλωνες ρήξεις που προκαλούνται από την Cas9, η δράση αυτού του μηχανισμού οδηγεί στη διατάραξη της αλληλουχίας στόχου. Σε αυτόν τον μηχανισμό επιδιόρθωσης, βασικό στοιχείο είναι το σύμπλοκο πρωτεϊνών Ku70/80. Το σύμπλοκο αυτό προσκολλάται στα τυφλά άκρα αμέσως μετά τη δίκλωνη ρήξη και επιστρατεύει πρωτεΐνες που θα τα επεξεργαστούν προκειμένου να τα μετατρέψουν σε κολλώδη. Στη συνέχεια, τα κολλώδη άκρα που έχουν σχηματιστεί στο σημείο της ρήξης συνδέονται μεταξύ τους από την λιγάση IV του DNA (Davis, 2013). Συχνά κατά την κατεργασία για τη δημιουργία κολλωδών άκρων διαταράσσεται η αλληλουχία των βάσεων.

4.4.2. ΟΜΟΛΟΓΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ (HDR):

Είναι ένας εναλλακτικός κυτταρικός μηχανισμός για την επιδιόρθωση δίκλωνων ρήξεων. Βασίζεται στην ύπαρξη κάποιας ομόλογης αλληλουχίας η οποία θα χρησιμεύσει ως μήτρα για την ακριβή επιδιόρθωση της αλληλουχίας στην οποία συνέβη η ρήξη. Παρόλο που ο κυρίαρχος μηχανισμός επιδιόρθωσης του κυττάρου είναι η NHEJ, με την HDR να εμφανίζει μικρότερη συχνότητα, η τελευταία μπορεί να αξιοποιηθεί για τη δημιουργία λεπτομερώς στοχευμένων τροποποιήσεων σε έναν επιθυμητό γενετικό τόπο. Για τον σκοπό αυτό απαιτείται η παρουσία ενός εξωγενούς υποστρώματος DNA, το οποίο εμφανίζει ομολογία με την περιοχή που θέλουμε να γίνει η τροποποίηση, ώστε να δράσει ως μήτρα για τον μηχανισμό. Το υπόστρωμα μπορεί να βρίσκεται με τη μορφή δίκλωνου (dsDNA) ή μονόκλωνου DNA (ssDNA), αρκεί να περιέχει αλληλουχίες που εμφανίζουν ομολογία με τις αλληλουχίες εκατέρωθεν του σημείου κοπής. Η χρήση ssDNAs γίνεται συνήθως για μικρές ακριβείς τροποποιήσεις στο γονιδίωμα, όπως μονονουκλεοτιδικές μεταλλάξεις. Η περίπτωση των dsDNA μπορεί να αξιοποιηθεί για την εισαγωγή μεγαλύτερων τμημάτων, ακόμα και ολόκληρων γονιδίων, με το μήκος των ομολόγων περιοχών να μεταβάλλεται ανάλογα με το μήκος του τμήματος που επιθυμούμε να εισαχθεί. Σε αντίθεση με την NHEJ που είναι διαρκώς ενεργή, η HDR είναι δυνατή μόνο σε διαιρούμενα κύτταρα που βρίσκονται στην φάση S/G₂ και η αποτελεσματικότητά της διαφέρει ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, την κατάσταση του κυττάρου, τον γενετικό τόπο που στοχεύεται καθώς και την αλληλουχία-υπόστρωμα (Ran, 2013).

4.5. ΧΡΗΣΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ CRISPR/Cas9 ΣΕ ΕΝΤΟΜΑ

Η τεχνική CRISPR/Cas9 χρησιμοποιείται ευρύτατα για τη μελέτη και γενετική τροποποίηση εντόμων με μεγάλη επιτυχία. Η πρώτη εφαρμογή της σε αρθρόποδα ήταν το 2013 με το knock-out του γονιδίου *yellow* της *D. melanogaster* (Gratz et al., 2013) και έκτοτε, η τεχνική εφαρμόζεται σε πληθώρα εντόμων (Reid and O'Brochta, 2015). Όσον αφορά την *D. melanogaster*, η οποία αποτελεί και τον οργανισμό μοντέλο για τα αρθρόποδα, έχει γίνει χρήση της τεχνικής CRISPR/Cas9 τόσο για το knock-out ευχρωματινικών γονιδίων όπως το *yellow*, όσο και ετεροχρωματινικών όπως ο παράγοντας γονιμότητας *kl-3* που εδράζεται στο Y χρωμόσωμα (Yu et al., 2013). Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για το knock-in γονιδίων στον συγκεκριμένο οργανισμό (Baena-Lopez et al., 2013, Zimmer et al., 2016). Από τους οργανισμούς στους οποίους έχει εφαρμοστεί η τεχνική CRISPR/Cas9 δεν λείπει η *C. capitata*, στην οποία έχουν αναφερθεί περιπτώσεις επιτυχημένων knock-out (Meccariello et al., 2017) καθώς και γενετικής τροποποίησης με την χρήση ssDNA ολιγονουκλεοτιδίων (Aumann et al., 2018).

Η εισαγωγή του συστήματος CRISPR/Cas9 στα έντομα πραγματοποιείται κατά κανόνα μέσω μικροένεσης στα αυγά. Τα συστατικά της μικροένεσης ποικίλουν και διαφοροποιούνται ανάλογα με τις ανάγκες και τις ιδιαιτερότητες του πειράματος. Έτσι, δύναται να εισαχθούν στο αυγό:

- i. Δύο διαφορετικοί πλασμιδιακοί φορείς που να κωδικοποιούν την πρωτεΐνη Cas9 και το gRNA αντίστοιχα με σκοπό την έκφραση και τον υβριδισμό των δύο συστατικών στο εσωτερικό των κυττάρων. Παραλλαγή της παραπάνω προσέγγισης είναι η κατασκευή ενός πλασμιδιακού φορέα που να κωδικοποιεί και τα δύο συστατικά της αντίδρασης (Gokcezade et al., 2014).
- ii. *In vitro* μετάγραφα του mRNA της πρωτεΐνης Cas9 και του gRNA. Αυτά τα μόρια RNA μπορούν να ενεθούν απευθείας στα αυγά, τεχνική που παρακάμπτει το κομμάτι της *in vivo* έκφρασης των πλασμιδίων που μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα του πειράματος (Yu et al., 2013).
- iii. Ανασυνδυασμένη πρωτεΐνης Cas9 η οποία έχει υβριδοποιηθεί *in vitro* με το gRNA πριν εισαχθεί με μικροένεση στο έμβρυο (Kistler et al., 2015). Η συγκεκριμένη μέθοδος αν και περισσότερο αποτελεσματική λόγω της απευθείας δράσης του ενζύμου αμέσως μετά την ένεση, έχει μεγαλύτερο κόστος και φέρει τον κίνδυνο της μεγάλης τοξικότητας για το έμβρυο εξαιτίας της πρόκλησης μεταλλάξεων σε πολύ αρχικά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο σχεδιασμός μίας γενετικής κατασκευής (construct) για την εισαγωγή (knock-in) του δείκτη dsRed στο χρωμόσωμα Υ της *Ceratitidis capitata* με χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9. Στόχος μας ήταν η επεξεργασία δεδομένων αλληλούχησης από το χρωμόσωμα Υ του εντόμου ώστε να εντοπιστούν υποψήφιες αλληλουχίες-στόχοι του συστήματος CRISPR/Cas9 και να σχεδιαστούν με βάση αυτές τα αντίστοιχα gRNAs και τα ομόλογα άκρα (homology arms). Σε συνέχεια του σχεδιασμού, στοχεύαμε στην ενίσχυση των επιμέρους τμημάτων ώστε στη συνέχεια αυτά να συναρμολογηθούν σε έναν φορέα που θα εισαχθεί τελικά μαζί με την Cas9 στο έντομο, με σκοπό τη γενετική τροποποίηση του.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. IN SILICO ΑΝΑΛΥΣΗ

1.1. ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ BENCHLING

Το Benchling είναι ένα διαδικτυακό εργαλείο γραφικής αναπαράστασης και επεξεργασίας νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών. Μας δίνει τη δυνατότητα εισαγωγής μίας επιθυμητής αλληλουχίας και επεξεργασία της μέσω επιλογής, επισήμανσης, αντιγραφής, διαγραφής ή εισαγωγής τμημάτων. Προσφέρει εργαλεία αναζήτησης αλληλουχιών με τη δυνατότητα επιλογής του αριθμού ανοχής σε αταίριαστα ζεύγη βάσεων (mismatches), όπως επίσης και τη δυνατότητα υπολογισμού του μήκους μίας επιλεγμένης αλληλουχίας καθώς και το T_m αλληλουχιών που έχουν επισημανθεί ως εκκινητές. Ο χειρισμός των αλληλουχιών πραγματοποιείται σε ένα περιβάλλον φιλικό προς το χρήστη με δυνατότητα χρωματικής κωδικοποίησης και διαφορετικής επισήμανσης τμημάτων (ομόλογα άκρα, εκκινητές, θέσεις αναγνώρισης gRNA). Στη συγκεκριμένη εργασία έγινε χρήση του Benchling αρχικά για την εισαγωγή της αλληλουχίας του Υ-ειδικού ικρίωματος (scaffold). Στην αλληλουχία αυτή εντοπίστηκαν μέσω αναζήτησης οι λοιπές αλληλουχίες του σχεδιασμού (gRNAs, homology arms, εκκινητές) και πραγματοποιήθηκε στοίχιση αυτών και επισήμανση τους στην αλληλουχία του ικρίωματος. Ακόμη, στο εργαλείο αυτό σχεδιάστηκε το υπόστρωμα για τη δημιουργία των gRNAs.

Αρχικά, εισήχθη στο Benchling η αλληλουχία του ικρίωματος αλληλούχησης του Υ, η οποία διέθετε ήδη επισημασμένη την αλληλουχία του γονιδίου MoY. Ακολούθως επιλέχθηκαν και αντιγράφηκαν τα τμήματα μήκους 10kb καθοδικά του MoY και 15kb ανοδικά αυτού ώστε να γίνει εντοπισμός των αλληλουχιών στόχευσης με διαφορετικό βιοπληροφορικό εργαλείο. Οι αλληλουχίες στόχοι που εντοπίστηκαν ελέγχθηκαν για τη μοναδικότητά τους στο ικρίωμα αλληλούχησης μέσω του εργαλείου αναζήτησης του Benchling και τελικά οι μοναδικές αλληλουχίες στοιχίστηκαν και επισημάνθηκαν με διαφορετικό χρώμα στο ικρίωμα [Εικόνα 11]. Ακολούθως, με βάση τις αλληλουχίες αυτές επιλέχθηκαν τα τμήματα μήκους 1.000bp για το σχεδιασμό των εκκινητών των ομολόγων άκρων μέσω του αντίστοιχου βιοπληροφορικού εργαλείου. Οι προτεινόμενοι εκκινητές ελέγχονταν κάθε φορά για τη μοναδικότητά τους στο ικρίωμα με χρήση του εργαλείου αναζήτησης του Benchling και εντοπιζόντουσαν μέσω των mismatches οι ενδεχόμενες μη ειδικές θέσεις υβριδισμού τους. Τέλος, οι επιλεγμένοι εκκινητές στοιχίστηκαν στο ικρίωμα και επισημάνθηκε η κατεύθυνση τους [Εικόνα 14].

Επιπλέον, για το σχεδιασμό του DNA υποστρώματος για την *in vitro* μεταγραφή των gRNAs εισήχθησαν διαδοχικά η DNA αλληλουχία του T7 υποκινητή, η εκάστοτε αλληλουχία στόχευσης του gRNA και το σταθερό τμήμα (backbone). Δημιουργήθηκε έτσι ένα τμήμα μήκους 122bp πάνω στο οποίο σχεδιάστηκαν οι εκκινητές για τη δημιουργία του, οι οποίοι εμφάνιζαν μία περιοχή αλληλοεπικάλυψης μήκους 20bp. Στη συνέχεια επισημάνθηκε η αλληλουχία καθώς και η κατεύθυνση του καθενός [Εικόνα 12].

1.2. ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ

Το CHOPCHOP είναι ένα online βιοπληροφορικό εργαλείο εύρεσης αλληλουχιών στόχευσης για προγραμματιζόμενες ενδονουκλεάσες. Συγκεκριμένα, δίνει τη δυνατότητα εύρεσης κατάλληλων αλληλουχιών για τα παρακάτω συστήματα προγραμματιζόμενων ενδονουκλεασών:

- CRISPR/Cas9
- CRISPR/Cas13
- CRISPR/Cpf1
- TALEN

Η λειτουργία του βασίζεται σε ένα φιλικό προς τον χρήστη γραφικό περιβάλλον, που δίνει τη δυνατότητα αναζήτησης αλληλουχιών στόχευσης με βάση τέσσερα κριτήρια:

- Αλληλουχία αναζήτησης
- Οργανισμός
- Σύστημα ενδονουκλεάσης
- Τύπος τροποποίησης

Αναφορικά με την αλληλουχία αναζήτησης, το CHOPCHOP δίνει την δυνατότητα εισαγωγής αλληλουχίας με τη μορφή fasta. Επίσης δίνει τη δυνατότητα αναζήτησης καταχωρημένων αλληλουχιών με βάση το όνομα του επιθυμητού γονιδίου ή ισομορφής, των γονιδιακών συντεταγμένων, ή του gene ID. Περιλαμβάνει τις καταχωρήσεις γονιδιωμάτων για περισσότερους από 200 οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένης της *C. capitata*. Επιπλέον, δίνει τη δυνατότητα επιλογής του τύπου της επιθυμητής γενετικής τροποποίησης μεταξύ των knock-out, knock-in, activation, repression και nanopore enrichment. Ανάλογα με τον τύπο τροποποίησης που θα επιλεγεί προσαρμόζει τα εξαγόμενα αποτελέσματα και τις επιπλέον δυνατότητες. Στην περίπτωση του knock-in γονιδίου δίνει τη δυνατότητα σχεδιασμού εκκινητών για τον έλεγχο της ένθεσης καθώς και ομολόγων άκρων. Ακόμα, υπάρχει η δυνατότητα εξειδίκευσης της αναζήτησης ανάλογα με τις ιδιαιτερότητες του εκάστοτε πειράματος. Ο χρήστης μπορεί να επιλέξει μεταξύ διαφορετικών αλληλουχιών PAM, διαφορετικών μοντέλων υπολογισμού της αποτελεσματικότητας (efficiency) καθώς και τρόπου υπολογισμού των off-targets. Στο τέλος κάθε αναζήτησης το CHOPCHOP επιστρέφει τα αποτελέσματα τόσο με τη μορφή λίστας όσο και ως γραφική αναπαράσταση των αλληλουχιών στόχων πάνω στην αλληλουχία αναζήτησης. Οι αλληλουχίες στόχοι που επιστρέφει το πρόγραμμα χαρακτηρίζονται από μία τιμή efficiency που κυμαίνεται από 0 έως 1 και η οποία βασίζεται στην υπάρχουσα βιβλιογραφία σχετικά με την αποτελεσματικότητα των gRNAs ανάλογα με την αλληλουχία τους. Επίσης, συγκρίνει τις αλληλουχίες στόχευσης με το γονιδίωμα αναφοράς του επιλεγμένου οργανισμού και εντοπίζει τυχόν αταίριαστα ζεύγη βάσεων (mismatches) του gRNA. Τέλος, υπολογίζει το ενδεχόμενο δημιουργίας δομών εσωτερικά της αλληλουχίας στόχευσης του gRNA (self-complementarity) ή μεταξύ της αλληλουχίας στόχευσης και της σταθερής περιοχής (backbone) του gRNA.

Για την συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε η αναζήτηση εισάγοντας τις επιλεγμένες αλληλουχίες για τον εντοπισμό αλληλουχιών στόχευσης στο πρόγραμμα σε μορφή fasta. Στην συνέχεια επιλέχθηκε ως επιθυμητός οργανισμός η *C. capitata*, ως επιθυμητή ενδονουκλεάση η Cas9 και ως τύπος τροποποίησης το knock-in. Ως αλληλουχία PAM επιλέχθηκε η NGG, ως επιθυμητά κριτήρια για την αποτελεσματικότητα των gRNA αυτά από Doench et al., (2016) και ως επιθυμητός τρόπος υπολογισμού των off targets αυτός από Hsu et al., (2013). Η επιλογή των gRNA πραγματοποιήθηκε με κριτήριο την αποτελεσματικότητά τους, την απουσία mismatches με το γονιδίωμα αναφοράς καθώς και την απουσία self-complementarity. Επίσης, καθώς το CHOPCHOP ελέγχει τη μοναδικότητα μόνο στο γονιδίωμα αναφοράς, τα gRNAs ελέγχθηκαν για την μοναδικότητα τους στο κρώμα αλληλούχησης μέσω του Benchling διότι το συγκεκριμένο κρώμα δεν ήταν καταχωρημένο στη βάση δεδομένων. Τέλος, για κάθε επιθυμητό gRNA επιλέξαμε, από το ενσωματωμένο εργαλείο του προγράμματος, ένα ζεύγος εκκινητών για τον έλεγχο της ενδεχόμενης ένθεσης.

1.3. IDT PRIMERQUEST TOOL

Το συγκεκριμένο εργαλείο έχει αναπτυχθεί από την εταιρία Integrated DNA Technologies (IDT) η οποία δραστηριοποιείται στον τομέα της παραγωγής ολιγονουκλεοτιδίων και αποτελεί ένα εργαλείο σχεδιασμού εκκινητών. Η χρήση του προϋποθέτει την εισαγωγή μίας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε μορφή fasta και την προαιρετική τροποποίηση διαφόρων παραμέτρων σχεδιασμού, συμπεριλαμβανομένης της θέσης έναρξης των εκκινητών, του μέγιστου μήκους τους και της προτίμησης μίας συγκεκριμένης περιοχής για ενίσχυση από τους εκκινητές. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήσαμε το εργαλείο PrimerQuest για τον σχεδιασμό των εκκινητών των ομολόγων άκρων.

Για τον σχεδιασμό των εκκινητών των ομολόγων άκρων με το συγκεκριμένο εργαλείο, έγινε κάθε φορά εισαγωγή της αλληλουχίας που εκτείνονταν 1.000bp δίπλα από την θέση κοπής, μέσω αντιγραφής της από το Benchling. Στις παραμέτρους ζητήθηκε από το πρόγραμμα να επικεντρωθεί στον σχεδιασμό εκκινητών που να ενισχύουν τις πρώτες 800bp δίπλα από τη θέση κοπής. Ακολούθως, εφαρμόστηκε η δυνατότητα εκβιασμένης έναρξης εκκινητών για τους εκκινητές που υβριδοποιούνται στην θέση της δίκλωνης ρήξης ώστε να ξεκινούν από το πρώτο νουκλεοτίδιο δίπλα από αυτήν. Καθώς το πρόγραμμα ελέγχει τη μοναδικότητα των εκκινητών αποκλειστικά στην εισαγόμενη αλληλουχία, για κάθε ζεύγος πραγματοποιήθηκε έλεγχος της μοναδικότητας του στο γονιδίωμα αναφοράς μέσω του βιοπληροφορικού εργαλείου BLASTn και στο ικρίωμα του Y μέσω του εργαλείου αναζήτησης του Benchling. Εάν οι αλληλουχίες των εκκινητών ήταν μοναδικές τότε τις επιλέγαμε ως επιθυμητές, ειδάλλως αυξάναμε στις παραμέτρους το επιθυμητό μήκος των εκκινητών μέχρι ~30nt. Εάν και σε αυτή την περίπτωση δεν μπορούσαμε να εντοπίσουμε μοναδικές αλληλουχίες εκκινητών τότε το ομόλογο άκρο και το αντίστοιχο gRNA απορρίπτονταν.

1.4. OLIGOANALYZER TOOL

Αποτελεί ένα ακόμα εργαλείο της IDT το οποίο ελέγχει για τυχόν αλληλεπιδράσεις μεταξύ ολιγονουκλεοτιδίων. Συγκεκριμένα, δίνει την δυνατότητα αναπαράστασης των δομών φουρκέτας που σχηματίζει ένα ολιγονουκλεοτίδιο, των ομοδιμερών που σχηματίζει καθώς και των ετεροδιμερών με μία δεύτερη ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία. Στην περίπτωση των δομών φορκέτας επιστρέφει ως αποτέλεσμα της αναζήτησης τη γραφική αναπαράσταση της δομής, την ελεύθερη ενέργεια Gibbs αυτής (DeltaG) και την θερμοκρασία τήξης (T_m) της δομής. Αντίστοιχα στις περιπτώσεις ελέγχου ομοδιμερών και ετεροδιμερών επιστρέφει ως αποτέλεσμα την γραφική αναπαράσταση των διμερών που σχηματίζονται καθώς και το DeltaG και τον αριθμό των δεσμών. Πραγματοποιήθηκε χρήση του συγκεκριμένου εργαλείου σε συνέχεια του σχεδιασμού εκκινητών ώστε αρχικά να διαπιστωθεί εάν αυτοί σχηματίζουν δομές φουρκέτας καθώς και διμερή τόσο με τον εαυτό τους όσο και με τον έτερο εκκινητή του ζεύγους.

Για τον έλεγχο των αλληλεπιδράσεων των σχεδιασμένων εκκινητών έγινε εισαγωγή της αλληλουχίας του εκάστοτε εκκινητή στο συγκεκριμένο εργαλείο. Ελέγχθηκε η αναπαράσταση των δομών για να εντοπιστεί εάν δημιουργούνται δεσμοί σε νουκλεοτίδια κρίσιμα για τον υβριδισμό του εκκινητή και ελέγχθηκε η θερμοκρασία τήξης της δομής η οποία επιθυμούσαμε να είναι χαμηλή ώστε να εξασφαλίσουμε την αποδιάταξη της δομής κατά την αντίδραση PCR. Στην συνέχεια ελέγχθηκαν τα ομοδιμερή του συγκεκριμένου εκκινητή καθώς και τα ετεροδιμερή με τον έτερο εκκινητή για τα οποία θεωρήθηκαν ανεκτές οι τιμές $\Delta G < -10$ kcal/mole. Θέλαμε με αυτό τον τρόπο να μειώσουμε τα παραπροϊόντα των διμερών εκκινητών κατά την αντίδραση PCR.

1.5. BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL (BLAST)

Το BLAST αποτελεί ένα διαδικτυακό εργαλείο για τη σύγκριση και τη στοίχιση νουκλεοτιδικών καθώς και αμινοξικών αλληλουχιών. Βασίζεται στον εντοπισμό ομόλογων περιοχών μεταξύ μίας αλληλουχίας επερώτησης που εισάγει ο χρήστης και αλληλουχιών που είναι κατατεθειμένες σε βάσεις δεδομένων. Η αναζήτηση μπορεί να περιοριστεί σε έναν ή περισσότερα είδη οργανισμών. Ανάλογα με το είδος της αλληλουχίας επερώτησης, το BLAST χωρίζεται σε επιμέρους κατηγορίες. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε η κατηγορία BLASTn που χρησιμεύει στη σύγκριση ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών, για να διαπιστωθεί η μοναδικότητα των αλληλουχιών των εκκινητών των ομολόγων άκρων σε σύγκριση με το γονιδίωμα αναφοράς της *C. capitata*.

Για την πραγματοποίηση της ανάλυσης σύγκρισης εισήχθησαν ως αλληλουχίες επερώτησης οι σχεδιασμένες αλληλουχίες των εκκινητών και επιλέχθηκε ως επιθυμητό γονιδίωμα αναφοράς αυτό της *C. capitata*. Ο ενδεχόμενος εντοπισμός των αλληλουχιών των εκκινητών από το πρόγραμμα σήμαινε πως αυτές δεν ήταν μοναδικές στο γονιδίωμα της *C. capitata* και επομένως απορρίπτονταν. Αυτό διότι το γονιδίωμα αναφοράς που χρησιμοποιεί το BLAST δεν περιλαμβάνει την αλληλουχία του ικριώματος του Υ στο οποίο έγινε ο σχεδιασμός των εκκινητών.

2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

2.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΜΕ CTAB

Το παρακάτω πρωτόκολλο ακολουθήθηκε για την απομόνωση γονιδιωματικού DNA από αρσενικά ενήλικα έντομα *C. capitata* του στελέχους Egypt II (EgII). Βασίζεται στην ανάμιξη δυο αντιδραστηρίων, του CTAB και χλωροφόρμιου, προκειμένου να δημιουργηθεί μία οργανική και μία υδατική φάση. Το επιθυμητό γονιδιωματικό DNA παραλαμβάνεται από την υδατική φάση ενώ τα ανεπιθύμητα κυτταρικά υπολείμματα απομακρύνονται στην οργανική φάση. Στη συνέχεια ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA με 70% EtOH.

Υλικά:

- Ενήλικα έντομα *Ceratitis capitata*
- CTAB 10% (διατηρείται στους 37°C)
- NaCl 5M
- EDTA 0.5M (pH=8)
- Tris-Cl 1M (pH=8)
- Polyvinylpyrrolidone (PVP)
- Αποστειρωμένο H₂O
- RNase A
- Πρωτεΐνωση K
- CH₃COONa 3M (pH=3,4)
- Γλυκογόνο
- 70% EtOH
- Πλαστικό έμβολο

Αρχικά συλλέγονται τα έντομα και τοποθετούνται στο ψυγείο για να αναισθητοποιηθούν. Στη συνέχεια επιλέγονται τα αρσενικά έντομα, τοποθετούνται σε σωληνάκια (tubes) με 100% EtOH και αποθηκεύονται στους 4°C μέχρι την έναρξη του πρωτοκόλλου.

Πριν από κάθε εφαρμογή του πρωτοκόλλου παρασκευάζουμε το CTAB buffer από CTAB 10%. Το CTAB buffer πρέπει κάθε φορά να είναι φρέσκο. Οι ποσότητες για την παρασκευή του CTAB buffer αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα για 10ml	Τελική συγκέντρωση
CTAB 10%	3ml	3%
NaCl 5M	2.8ml	28%
EDTA 0.5M (pH=8)	0.4ml	4%
Tris-Cl 1M (pH=8)	1ml	10%
Polyvinylpyrrolidone (PVP)	0.3g	3%
H ₂ O	2.48ml	24.8%

Μέθοδος:

1. Αν τα έντομα είναι σε αιθανόλη στεγνώνουμε σε χαρτί για 15' ή ξεπλένουμε με νερό ώστε να απομακρυνθεί η αιθανόλη.
2. Μεταφέρουμε τα έντομα σε tube 1,5ml
3. Ομογενοποιούμε με πλαστικό έμβολο ενώ προσθέτουμε σταδιακά από 20μl CTAB buffer μέχρι το συνολικό όγκο των 200μl.
4. Φυγοκεντρούμε για 3' στα 12.000g_{rpm} και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καθαρό tube.
5. Προσθέτουμε 20μl RNase A και επωάζουμε στους 37°C για 30'
6. Πραγματοποιούμε spin down, προσθέτουμε 0,4μl πρωτεΐνωση K από stock 1mg/ml και πραγματοποιούμε ελαφρύ vortex.
7. Επωάζουμε στους 55°C για 2 ώρες (μπορεί να μείνει και O/N)
8. Προσθέτουμε CTAB buffer μέχρι τα 400μl. Έπειτα προσθέτουμε ίσο όγκο χλωροφόρμιο
9. Πραγματοποιούμε vortex για 1-2'
10. Φυγοκεντρούμε στα 14.000g_{rpm} στους 4°C για 5'
11. Μεταφέρουμε με προσοχή την υδατική φάση σε νέο tube 1,5ml
12. Προσθέτουμε 1/10 του όγκου 3M CH₃COONa (pH=3,4) και στη συνέχεια 1ml 100% ψυχρή αιθανόλη. Έπειτα προσθέτουμε 5μl γλυκογόνο και ανακινούμε αρκετές φορές
13. Τοποθετούμε τα tubes στους -80°C για 1 ώρα (γίνεται να μείνουν και O/N)
14. Φυγοκεντρούμε στα 14.000g_{rpm} στους 4°C για 30'
15. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο
16. Προσθέτουμε 500μl 70% ψυχρής αιθανόλης χωρίς ανακίνηση
17. Φυγοκεντρούμε σε Max g_{rpm} στους 4°C για 10'
18. Απορρίπτουμε προσεκτικά το υπερκείμενο και στεγνώνουμε με πιπέτα
19. Αφήνουμε τα tubes να στεγνώσουν σε φουρνάκι ή στον απαγωγό για 15-20'
20. Προσθέτουμε 50μl αποστειρωμένο και προθερμασμένο H₂O, επωάζουμε στους 60°C για 5', πραγματοποιούμε vortex για 1' και έπειτα spin down
21. Αποθηκεύουμε τα tubes στους -20°C

2.2. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η ανακάλυψη της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) το 1986 από τον Mullis αποτέλεσε ορόσημο για την εξέλιξη της μοριακής βιολογίας. Βασίζεται στον ενζυμικό πολλαπλασιασμό από θερμοανθεκτικές πολυμεράσες, μίας αλληλουχίας στόχου, μέσω αλληπάλληλων κύκλων αποδιάταξης και σύνθεσης που επάγονται από την αλλαγή της θερμοκρασίας. Οι νεοσυντιθέμενοι κλώνοι λειτουργούν ως μήτρα για τη σύνθεση των συμπληρωματικών τους στον επόμενο κύκλο. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα σε κάθε κύκλο η ποσότητα των κλώνων που συντίθενται να αυξάνεται εκθετικά. Κάθε κύκλος της PCR περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια:

- i. **Αποδιάταξη:** σε αυτό το στάδιο η αύξηση της θερμοκρασίας σε τιμές 94-98°C οδηγεί σε αποδιάταξη τον συμπληρωματικών κλώνων του δίκλωνου DNA που οδηγεί στη δημιουργία δύο μονόκλωνων αλυσίδων.
- ii. **Υβριδοποίηση:** η μείωση της θερμοκρασίας οδηγεί στην υβριδοποίηση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης (T_{an}) καθορίζεται από την θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (T_m) ως εξής: $T_{an}=T_m-5^{\circ}C$. Η θερμοκρασία τήξης καθορίζεται από την αλληλουχία των εκκινητών και υπολογίζεται από τον τύπο:
 $T_m=4*(\text{αριθμός βάσεων G+C})+ 2*(\text{αριθμός βάσεων A+T})$.
- iii. **Επιμήκυνση:** στο στάδιο αυτό, η θερμοανθεκτική πολυμεράση ξεκινά να συνθέτει τον συμπληρωματικό κλώνο από τα άκρα των εκκινητών. Η συνήθης θερμοκρασία δράσης αυτών των πολυμερασών είναι 72-74°C.

Οι χρόνοι του κάθε σταδίου καθορίζονται από τις ιδιαιτερότητες του υποστρώματος, το μήκος του επιθυμητού τμήματος ενίσχυσης καθώς και τα χαρακτηριστικά του εκάστοτε ενζύμου. Οι συνήθεις συνθήκες μίας PCR περιλαμβάνουν μία αρχική αποδιάταξη της οποίας ο χρόνος εξαρτάται από την ιδιαιτερότητα του υποστρώματος, με το γονιδιωματικό DNA να απαιτεί περισσότερο χρόνο από το πλασμιδιακό. Επίσης, μετά το πέρας των επαναλαμβανόμενων κύκλων συνήθως έπεται ένα βήμα τελικής επιμήκυνσης που διαρκεί ορισμένα λεπτά. Στο βήμα αυτό ενδέχεται να δημιουργηθούν παραπροϊόντα από τη μη ειδική δράση της πολυμεράσης. Ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων κύκλων συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 30-35 επαναλήψεων, μετά το πέρας των επαναλήψεων αυτών η πολυμεράση εξασθενεί και προκαλεί λάθη.

Υλικά:

- Μήτρα DNA
- Εκκινητές (Primer Forward και Primer Reverse)
- dNTPs
- Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (Buffer)
- Θερμοανθεκτική πολυμεράση (Taq polymerase)
- H₂O

Μέθοδος:

Στη συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με δύο διαφορετικές πολυμεράσες που εμφανίζουν διαφοροποιήσεις στις συνθήκες αντίδρασης. Χρησιμοποιήσαμε την απλή πολυμεράση Kara Taq (Kara Biosystems) για τον αρχικό έλεγχο των εκκινητών, και την υψηλής πιστότητας (high fidelity) Q5 polymerase (NEB) για την ενίσχυση.

Κατα Taq πολυμεράση: Το συγκεκριμένο ένζυμο δρα με ταχύτητα 1kb/min

ΥΛΙΚΑ	Ποσότητα
DNA Υπόστρωμα 100ng	2μl
Buffer 10X → 1X	2μl
dNTPs 10mM each → 0.2mM each	0.4μl
Primer F 10 μM → 0.3 μM	0.6μl
Primer R 10 μM → 0.3 μM	0.6μl
Taq polymerase 5u/μl	0.1μl
H2O	14,3μl
V_{fin}	20μl

Συνθήκες αντίδρασης		
	T °C	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95	5min
Αποδιάταξη	95	30sec
Υβριδοποίηση	T _{an}	20sec
Επιμήκυνση	72	30sec-1min
Τελική επιμήκυνση	72	5-2min

X30

Q5 πολυμεράση: Το συγκεκριμένο ένζυμο δρα με ταχύτητα 1kb/30sec

ΥΛΙΚΑ	Ποσότητα
DNA Υπόστρωμα 100ng	2μl
Buffer 5X → 1X	4μl
dNTPs 10mM each → 0.2mM each	0.4μl
Primer F 10 μM → 0.3 μM	1 μl
Primer R 10 μM → 0.3 μM	1 μl
Taq 5u/μl	0.2μl
H2O	11,4μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	20μl

Συνθήκες αντίδρασης		
	T °C	Χρόνος
Πρώτη αποδιάταξη	98	2min
Αποδιάταξη	98	20sec
Υβριδοποίηση	T _{an}	30sec
Επιμήκυνση	72	20-30sec
Τελική επιμήκυνση	72	2min

X30/35

Για την αντίδραση δημιουργίας του DNA υποστρώματος για την in vitro μεταγραφή των gRNAs το πρωτόκολλο της Q5 προσαρμόστηκε στις ιδιαιτερότητες της αντίδρασης. Στην PCR αυτή, ως μήτρα λειτουργούν αποκλειστικά οι δύο εκκινητές οι οποίοι φέρουν στα άκρα τους συμπληρωματικές αλληλουχίες.

ΥΛΙΚΑ	Ποσότητα	
Buffer 5X → 1X	10μl	40 μl
dNTPs 10mM each → 0.2mM each	1 μl	4 μl
Primer F 10 μM → 0.3 μM	2,5 μl	10 μl
Primer R 10 μM → 0.3 μM	2,5 μl	10 μl
Taq 5u/μl	1 μl	4 μl
H2O	33 μl	132 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	50 μl	200 μl

Συνθήκες αντίδρασης		
	T °C	Χρόνος
Πρώτη αποδιάταξη	98	1.15min
Αποδιάταξη	98	20sec
Υβριδοποίηση	58	10sec
Επιμήκυνση	72	10sec
Τελική επιμήκυνση	72	7min

X35

2.3. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Αποτελεί μια μέθοδο για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση τμημάτων DNA με βάση το μοριακό τους βάρος. Η αгарόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που έχει την ικανότητα να πολυμερίζεται στη μορφή πηκτώματος. Ο πολυμερισμός δημιουργεί πόρους μεταξύ των μορίων της αгарόζης. Όσο μεγαλύτερη η πυκνότητα του πηκτώματος τόσο μικρότεροι οι πόροι που δημιουργούνται. Στη συνέχεια το πηκτώμα εισάγεται σε μία συσκευή που φέρει δύο πόλους, για την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου κατά μήκος του. Προκειμένου να γίνει ο διαχωρισμός, το DNA εισάγεται σε ειδικά διαμορφωμένες θέσεις («πηγάδια») και εφαρμόζεται σε αυτό τάση. Το DNA λόγω του αρνητικού του φορτίου κινείται προς τον θετικό πόλο, η ταχύτητα με την οποία κινείται εξαρτάται από το μοριακό του βάρος καθώς αυτό καθορίζει την ευκολία με την οποία μπορεί να διατρέχει μέσω των πόρων των πολυμερών αгарόζης. Η ταυτοποίηση των τμημάτων γίνεται με ένα μάρτυρα μοριακού βάρους που εισάγεται («φορτώνεται») σε ένα ξεχωριστό πηγάδι. Αυτός αποτελείται από τμήματα DNA γνωστού μήκους τα οποία δημιουργούν ένα πρότυπο ζωνώσεων με βάση το οποίο μπορεί να γίνει η ταυτοποίηση του μοριακού βάρους των δειγμάτων. Κατά τη διαδικασία παρασκευής του πηκτώματος, εισάγεται σε αυτό μικρή ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου, μιας φθορίζουσας χρωστικής, η οποία περιπλέκεται στην διπλή έλικα του DNA και φθορίζει στο υπεριώδες φως δίνοντας τη δυνατότητα οπτικοποίησης των αποτελεσμάτων.

Υλικά:

- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X
- Αγαρόζη σε σκόνη
- Βρωμιούχο αιθίδιο
- Ladder
- Χρωστική φόρτωσης (Loading buffer) 6X

Μέθοδος: για την παρασκευή 100ml πηκτώματος αγαρόζης 1%

1. Ζύγιση 1gr αγαρόζης σε σκόνη και προσθήκη σε κωνική φιάλη
2. Προσθήκη στην ίδια φιάλη 100ml TBE 0,5X
3. Διαλυτοποίηση της αγαρόζης στο TBE με την χρήση φούρνου μικροκυμάτων και ανάδευση ανά τακτά διαστήματα
4. Δροσίζουμε ελαφρώς την κωνική με τρεχούμενο νερό ώστε να σταματήσει η παραγωγή υδρατμών
5. Προσθήκη 4ml βρωμιούχο αιθίδιο και ανάδευση
6. Εισαγωγή του διαλύματος αγαρόζης σε καλούπι στο οποίο έχουμε προσαρμόσει ειδικό «χτενάκι» για την δημιουργία των θέσεων φόρτωσης του DNA.
7. Αναμονή μέχρι τον πλήρη πολυμερισμό και την σταθεροποίηση του πηκτώματος, όποτε και αφαιρούμε το χτενάκι

Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων:

1. Τοποθετούμε το πήκτωμα με τα πηγάδια προς τον θετικό πόλο
2. Ελέγχουμε αν το πήκτωμα καλύπτεται πλήρως από TBE
3. Προσθέτουμε χρωστική στα δείγματα σε τέτοιο όγκο ώστε να αραιωθεί σε 1X, αν χρειαστεί προσθέτουμε H₂O μέχρι τον επιθυμητό όγκο
4. Φορτώνουμε με πιπέτα το ladder και τα δείγματα σε διαφορετικά πηγάδια
5. Τοποθετούμε τα ηλεκτρόδια της συσκευής στον μετασχηματιστή
6. Ορίζουμε την τάση ηλεκτροφόρησης σε Volt

Μπορούμε εύκολα να παρακολουθήσουμε την πορεία της ηλεκτροφόρησης είτε μέσω παρατήρησης με γυμνό μάτι της χρωστικής φόρτωσης που προπορεύεται των δειγμάτων είτε μέσω φωτογράφισης σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας.

2.4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΠΙΘΥΜΗΤΗΣ ΖΩΝΗΣ ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ (GEL EXTRACTION)

Η απομόνωση επιθυμητής ζώνης από πήκτωμα αγαρόζης αποσκοπεί στο διαχωρισμό του επιθυμητού προϊόντος από τα υπόλοιπα στοιχεία της αντίδρασης PCR μέσω ηλεκτροφόρησης και εν συνεχεία στον καθαρισμό του και την περεταίρω αξιοποίηση του. Η διαδικασία απομόνωσης των επιθυμητών ζωνών προϋποθέτει την έκθεση του πήκτωμα σε υπεριώδες φως, το οποίο μπορεί να προκαλέσει μεταλλάξεις στο DNA. Επομένως, προσπαθούμε να περιορίσουμε στο ελάχιστο το χρόνο κατά τον οποίο το πήκτωμα παραμένει εκτεθειμένο στο υπεριώδες φως

Υλικά:

- Χειρουργικό νυστέρι
- Προζυγισμένα tubes

Μέθοδος:

1. Αφήνουμε το πήκτωμα να ηλεκτροφορηθεί αρκετά ώστε να γίνει καλός διαχωρισμός των ζωνών
2. Τοποθετούμε το πήκτωμα σε τράπεζα υπεριώδους φωτός
3. Τοποθετούμε πάνω από την τράπεζα ειδικό φίλτρο για την προστασία από το υπεριώδες φως
4. Απολυμαίνουμε το νυστέρι με αιθανόλη 70%
5. Ενεργοποιούμε την τράπεζα υπεριώδους φωτός και χαράσσουμε τις επιθυμητές ζώνες του πηκτώματος
6. Απενεργοποιούμε την τράπεζα υπεριώδους φωτός
7. Κόβουμε πάνω στις θέσεις που έχουμε χαράξει και τοποθετούμε την επιθυμητή ζώνη σε προζυγισμένο tube
8. Πριν από κάθε κοπή απολυμαίνουμε ξανά το νυστέρι με αιθανόλη 70%
9. Φωτογραφίζουμε το πήκτωμα σε ειδική κάμερα υπεριώδους ώστε να ελέγξουμε την αποτελεσματικότητα της κοπής ή την ύπαρξη επιμόλυνσης στην αντίδραση
10. Η φωτογράφιση εκθέτει για πολύ ώρα το πήκτωμα στο υπεριώδες, ΔΕΝ επιχειρούμε επανακοπή του πηκτώματος μετά την φωτογράφιση

2.5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ

Η διαδικασία του καθαρισμού του PCR προϊόντος αποτελεί ένα απαραίτητο βήμα προκειμένου να απομακρυνθούν ανεπιθύμητα συστατικά (ένζυμο, άλατα buffer, παραπροϊόντα, πήκτωμα αγαρόζης) και να απομονωθεί το επιθυμητό προϊόν για περαιτέρω αξιοποίηση. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήσαμε το Kit "NucleoSpin Gel and PCR clean-up" της Macherey-Nagel για τον καθαρισμό των προϊόντων. Η χρήση του βασίζεται στην παρουσία στηλών καθαρισμού που περιέχουν μια μεμβράνη πυριτίου η οποία προσδένει το DNA λόγω αρνητικού φορτίου. Το συγκεκριμένο Kit ενδείκνυται για την απομόνωση τμημάτων 10-15kb, όμως με κατάλληλες προσαρμογές μπορεί να γίνει και απομόνωση μικρότερων τμημάτων. Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας αξιοποιήσαμε το παραπάνω kit για τον απευθείας καθαρισμό προϊόντος PCR καθώς και για τον καθαρισμό PCR προϊόντος από τμήμα πήκτωμα αγαρόζης.

Υλικά:

- Στήλες καθαρισμού
- Buffer NT1
- Buffer NT3 (με αιθανόλη)
- Αποστειρωμένο H₂O

Μέθοδος:

I. Καθαρισμός PCR προϊόντος

Το παρακάτω πρωτόκολλο ακολουθήθηκε για τον απευθείας καθαρισμό της PCR αντίδρασης

1. Για όγκους μικρότερους των 30μl προσθέτουμε H₂O μέχρι τελικό όγκο 100μl
2. Προσθέτουμε στον όγκο της αντίδρασης διπλάσιο όγκο NTI Buffer
3. Εισάγουμε το δείγμα στην στήλη καθαρισμού (μέχρι 700μl)
4. Πραγματοποιούμε φυγοκέντρηση στα 11.000rpm για 1min
5. Σε περίπτωση που ο αρχικός όγκος του δείγματος ήταν πάνω από 700μl, εισάγουμε το εναπομείναν δείγμα και επαναλαμβάνουμε το βήμα 4
6. Απορρίπτουμε το διήθημα
7. Προσθέτουμε 700μl Buffer NT3 και πραγματοποιούμε φυγοκέντρηση στα 11.000rpm για 1min
8. Απορρίπτουμε το διήθημα
9. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 7 ώστε να γίνει καλύτερη απομάκρυνση των χαστροπικών αλάτων
10. Φυγοκεντρούμε στα 11.000rpm για 1min για να στεγνώσουμε τη στήλη
11. Προσθέτουμε 30μl προθερμασμένο και αποστειρωμένο H₂O στο κέντρο της στήλης και επωάζουμε για 5 λεπτά
12. Τοποθετούμε καθαρό tube και φυγοκεντρούμε στα 11.000rpm για 1min

II. Καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Το παρακάτω πρωτόκολλο ακολουθήθηκε για τον καθαρισμό του PCR προϊόντος ύστερα από ηλεκτροφόρηση και απομόνωση της επιθυμητής ζώνης

1. Υπολογίζουμε το βάρος του πηκτώματος αγαρόζης
2. Προσθέτουμε στο tube για κάθε 100mg αγαρόζης <2%, 200μl NTI buffer
3. Επωάζουμε για 5-10min στους 50°C κάνοντας ελαφρύ vortex κάθε 2-3min μέχρι να διαλυθεί τελείως το πήκτωμα
4. Εισάγουμε το δείγμα στην στήλη καθαρισμού (μέχρι 700μl)
5. Πραγματοποιούμε φυγοκέντρηση στα 11.000rpm για 1min
6. Σε περίπτωση που ο αρχικός όγκος του δείγματος ήταν πάνω από 700μl, εισάγουμε το εναπομείναν δείγμα και επαναλαμβάνουμε το βήμα 5
7. Απορρίπτουμε το διήθημα
8. Προσθέτουμε 700μl Buffer NT3 και πραγματοποιούμε φυγοκέντρηση στα 11.000rpm για 1min
9. Απορρίπτουμε το διήθημα
10. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 8 ώστε να γίνει καλύτερη απομάκρυνση των χαστροπικών αλάτων
11. Φυγοκεντρούμε στα 11.000rpm για 1min για να στεγνώσουμε τη στήλη
12. Προσθέτουμε 30μl προθερμασμένο και αποστειρωμένο H₂O στο κέντρο της στήλης και επωάζουμε για 5 λεπτά
13. Τοποθετούμε καθαρό tube και φυγοκεντρούμε στα 11.000rpm για 1min

2.6. IN VITRO ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΤΩΝ gRNAs

Για την *in vitro* μεταγραφή των gRNAs χρησιμοποιήθηκε το “MEGAscript T7 Transcription Kit” της Invitrogen. Το παραπάνω αποτελεί ένα kit για την μεταγραφή επιθυμητών τμημάτων από υποστρώματα DNA στα οποία έχει εισαχθεί η αλληλουχία ενός ελάχιστου T7 υποκινητή (5’ TAATACGACTCACTATA 3’). Το kit είναι σχεδιασμένο για τη μεταγραφή τμημάτων μεγαλύτερων των 0,5kb, αλλά μπορεί να προσαρμοστεί και για την μεταγραφή μικρότερων τμημάτων. Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας το πρωτόκολλο προσαρμόστηκε ως εξής:

1. Υπολογίζουμε την ποσότητα υποστρώματος ώστε τελικά να εισάγουμε 1μg/μl DNA στην αντίδραση, συμπληρώνουμε τον υπόλοιπο όγκο με νερό
2. Ξεπαγώνουμε τα παγωμένα αντιδραστήρια, vortex στα 4 διαλύματα ριβονουκλεοτιδίων και στο buffer 10X
3. Διατηρούμε όλα τα αντιδραστήρια στον πάγο εκτός από το buffer 10X
4. Φτιάχνουμε mix από τα 4 ριβονουκλεοτίδια
5. Προετοιμάζουμε την αντίδραση εκτός πάγου
6. Προσθέτουμε με τη σειρά H₂O → Mix ριβονουκλεοτιδίων → 10X buffer → DNA υπόστρωμα → T7 enzyme cocktail
7. Ανακατεύουμε ελαφρά την αντίδραση με πιπέτα
8. Επωάζουμε για 4 ώρες στους 37°C
9. Προσθέτουμε 2μl turbo DNase στα 40μl αντίδρασης και επωάζουμε για 15’ στους 37°C
10. Προσθέτουμε 230μl ddH₂O και 30μl Ammonium acetate STOP solution

Αντιδραστήριο	Ποσότητα στην αντίδραση
ddH ₂ O	15μl
DNA υπόστρωμα	1μl (για συγκέντρωση 1μg/μl)
ATP	4 μl
UTP	4 μl
GTP	4 μl
CTP	4 μl
10X buffer	4 μl
T7 enzyme cocktail	4 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	40 μl

2.7. ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ RNA

Το πρωτόκολλο για την κατακρήμνιση του RNA χρησιμοποιείται προκειμένου να καθαριστούν τα gRNA που έχουν προκύψει από την *in vitro* μεταγραφή του αντίστοιχου υποστρώματος DNA. Αποτελεί συνέχεια του πρωτοκόλλου μεταγραφής με kit γι' αυτό και το πρώτο βήμα πραγματοποιείται αμέσως μετά τον τερματισμό της αντίδρασης μεταγραφής.

Υλικά:

- Προϊόν αντίδρασης *in vitro* μεταγραφής
- Αιθανόλη 100%
- Αιθανόλη 75%

Μέθοδος:

1. Προσθέτουμε 680μl 100% EtOH και επωάζουμε O/N στους -20°C
2. Πραγματοποιούμε φυγοκέντρηση σε Max rpm στους 4°C για 15'
3. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο
4. Προσθέτουμε 500μl 75% παγωμένη EtOH
5. Πραγματοποιούμε φυγοκέντρηση σε Max rpm στους 4°C για 15'
6. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο
7. Επαναλαμβάνουμε διαδοχικά τα βήματα 4, 5 και 6 για έξι φορές
8. Αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει για 15-20'
9. Επαναδιαλυτοποιούμε σε 20μl αποστειρωμένο και προθερμασμένο H₂O

2.8. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

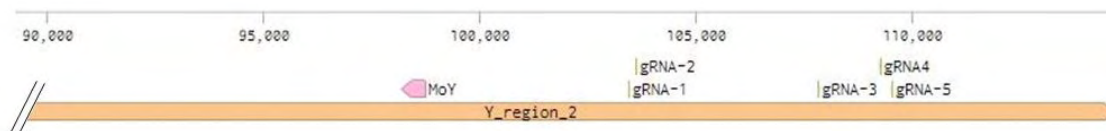
Η ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά με χρήση του μηχανήματος Quawell Q3000. Το συγκεκριμένο μηχάνημα δίνει τη δυνατότητα μέτρησης συγκέντρωσης σε δείγματα νουκλεϊκών οξέων ή πρωτεϊνών. Η λειτουργία του βασίζεται στη φωτομέτρηση μικρής ποσότητας δείγματος (0,5-2μl). Οι πουρίνες και οι πυριμιδίνες των νουκλεϊκών οξέων απορροφούν στα 260nm και με βάση την απορρόφηση αυτή το μηχάνημα πραγματοποιεί την ποσοτικοποίηση. Επίσης, μέσω φωτομέτρησης στα 280nm που είναι το φάσμα απορρόφησης των πρωτεϊνών, το μηχάνημα επιστρέφει έναν λόγο $A^{260/280}$ ο οποίος είναι ανάλογος της καθαρότητας του δείγματος νουκλεϊκών οξέων. Σύμφωνα με τον κατασκευαστή τα όρια ανίχνευσης του μηχανήματος κυμαίνονται από 1ng/μl έως 5000ng/μl.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ GRNAS

Η δράση του συστήματος CRISPR/Cas9 βασίζεται στην ύπαρξη κατάλληλων αλληλουχιών gRNA που θα κατευθύνουν την ενδονουκλεάση στην επιθυμητή θέση στο γονιδίωμα ώστε να προκαλέσει την δίκλωνη ρήξη. Κατά τον σχεδιασμό των gRNAs έπρεπε να ληφθεί υπόψιν η ιδιαίτερη φύση του χρωμοσώματος και επίσης να εξακριβωθεί η μοναδικότητα των αλληλουχιών που στοχεύονται ώστε η Cas9 να μην εμφανίζει δραστικότητα και σε αλληλουχίες εκτός στόχου.

Για το σχεδιασμό των gRNAs για το συγκεκριμένο πείραμα επιλέχθηκε ένα ικρίωμα (scaffold) με τμήματα αλληλούχησης του χρωμοσώματος Y μήκους περίπου 115kb, το οποίο εμπεριείχε το γονίδιο *MoY* του παράγοντα αρρενοποίησης. Ο βασικός στόχος του πειράματος είναι η τροποποίηση του Y χρωμοσώματος της *C. capitata* και η περιοχή πέριξ του *MoY* ευνοεί για στόχευση καθώς είναι μία ευχρωματινική περιοχή μίας γνωστής μεταγραφικής μονάδας, σε ένα κατά τα άλλα ετεροχρωματινικό χρωμόσωμα. Ο εντοπισμός των αλληλουχιών στόχευσης των gRNA και η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας τους έγινε με το online βιοπληροφορικό εργαλείο CHOPCHOP. Επίσης, πραγματοποιήθηκε έλεγχος στο Benchling καθώς και στο BLASTn των υποψήφιων αλληλουχιών ώστε να διαπιστωθεί η μοναδικότητα τους προκειμένου να αποφευχθεί η δράση της Cas9 σε αλληλουχίες εκτός στόχου.

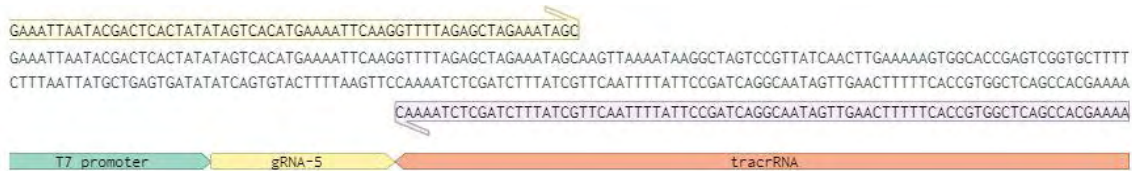


Εικόνα 11 Το τελικό τμήμα του scaffold μήκους ~115kb με βάση το οποίο έγινε ο σχεδιασμός των gRNAs. Στο σχήμα φαίνεται η σχετική θέση του γονιδίου *MoY* καθώς και των gRNAs που σχεδιάστηκαν. Το *MoY* εντοπίζεται στον αρνητικό κλώνο του scaffold.

Αρχικά ερευνήθηκε η ύπαρξη κατάλληλων αλληλουχιών στόχων των gRNAs σε ένα τμήμα μήκους 10kb καθοδικά του γονιδίου *MoY*. Ωστόσο, η προσπάθεια αυτή δεν έδωσε αξιόλογα αποτελέσματα και επιβεβαίωσε για μία ακόμα φορά τον επαναλαμβανόμενο χαρακτήρα των αλληλουχιών του Y. Οι αλληλουχίες των gRNAs που είχαν τη μεγαλύτερη απόδοση (efficiency) στο τμήμα μεγέθους 10 kb καθοδικά του *MoY*, είτε επαναλαμβάνονταν σε άλλα σημεία του scaffold, είτε δεν ενδείκνυται για τον σχεδιασμό κατάλληλων εκκινητών για την ενίσχυση των ομολόγων άκρων, πέριξ του σημείου της δίκλωνης ρήξης. Η αντίστοιχη διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε ένα τμήμα 15kb ανοδικά του γονιδίου *MoY*. Η αλληλουχία της περιοχής αυτής εμφανιζόταν πιο ετερόμορφη με αποτέλεσμα να βρεθούν αρκετές μοναδικές αλληλουχίες gRNA. Από αυτές επιλέχθηκαν πέντε gRNAs για περαιτέρω σχεδιασμό [Εικόνα 11]. Καταλήξαμε να προχωρήσουμε με δύο gRNAs, το gRNA-1 το οποίο με βάση το σύστημα βαθμολόγησης του CHOPCHOP είχε τη μεγαλύτερη απόδοση (efficiency) καθώς και το gRNA-5 το οποίο αν και εμφάνιζε μικρότερη απόδοση σε σχέση με τα υπόλοιπα, ήταν το πιο απομακρυσμένο από το *MoY*, σε μία απόσταση ~10.8kb ανοδικά [Πίνακας 1]. Επιπλέον, τα gRNAs αυτά ελέγχθηκαν με βάση τα κριτήρια που προτάθηκαν από τους Doench et al (2014) για προτίμηση

συγκεκριμένων νουκλεοτιδίων στις θέσεις 20 (επιθυμητή G) και 16 (ανεπιθύμητη G) και βρέθηκε ότι ικανοποιούν και τα κριτήρια αυτά.

Προκειμένου να δημιουργηθεί το υπόστρωμα για την *in vitro* μεταγραφή των gRNA, όπως περιγράφεται στα υλικά και μεθόδους, σχεδιάστηκε για κάθε ένα από αυτά ένας ειδικός εκκινητής που περιέχει διαδοχικά έναν υποκινητή T7, την αλληλουχία του εκάστοτε gRNA καθώς και ένα τμήμα υβριδισμού με τον αντίστροφο μη διαφοροποιούμενο (invariant) εκκινητή (Meccariello et al., 2017) [Εικόνα 12, Πίνακας 2].



Εικόνα 12 Γραφική αναπαράσταση της διάταξης των επιμέρους τμημάτων της γενετικής κατασκευής που σχεδιάστηκε.

Για τον έλεγχο της ενδεχόμενης ένθεσης της κατασκευής μετά από την εισαγωγή του συστήματος CRISPR/Cas9 στο έντομο, σχεδιάστηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές για κάθε gRNA αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας το κατάλληλο ενσωματωμένο εργαλείο του CHOPCHOP [Πίνακας 3]. Οι εκκινητές αυτοί υβριδοποιούνται σε αλληλουχίες εκατέρωθεν του σημείου κοπής, περικλείοντας μια περιοχή ~200bp.

2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Η γενετική κατασκευή σχεδιάστηκε όπως φαίνεται στην [Εικόνα 13] ώστε να διευκολυνθεί η εισαγωγή του επιθυμητού γονιδίου δείκτη. Συγκεκριμένα σχεδιάστηκε να φέρει το γονίδιο δείκτη dsRed υπό τον έλεγχο του υποκινητή της πολυουβικουτίνης (pUB) και την αλληλουχία τερματιστή SV40. Εκατέρωθεν της κασέτας έκφρασης του dsRed σχεδιάστηκε η εισαγωγή των ομολόγων άκρων με σκοπό την παροχή του κατάλληλου ομολόγου υποστρώματος για τον μηχανισμό HDR [Εικόνα 22]. Στα άκρα της κατασκευής, χωρίς να αποτελούν τμήμα της, εισήχθησαν αλληλουχίες όμοιες με τις αλληλουχίες στόχευσης. Η κατασκευή μελλοντικά θα εισαχθεί με μικροένεση, υπό τη μορφή κυκλικού φορέα στο έντομο και οι αλληλουχίες αυτές αποτελούν στόχο της Cas9 ώστε η κατασκευή να γραμμοποιηθεί μετά την εισαγωγή. Ωστόσο δεν έχουν λειτουργικό ρόλο στην ενσωμάτωση.

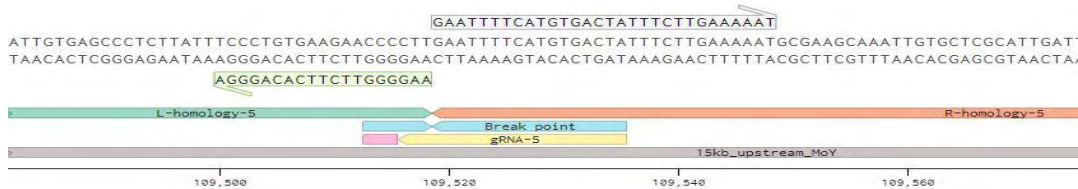


Εικόνα 13 Γραφική αναπαράσταση της διάταξης των επιμέρους τμημάτων της γενετικής κατασκευής που σχεδιάστηκε.

3. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΜΟΛΟΓΩΝ ΑΚΡΩΝ

Ο σχεδιασμός των ομολόγων άκρων έγινε με την βοήθεια του online εργαλείου σχεδιασμού εκκινητών PrimerQuest της IDT καθώς και του Benchling όπου εισήχθη η αλληλουχία του Υ-ειδικού ικριώματος και γίνανε οι κατάλληλες στοιχίσεις με τις αλληλουχίες των gRNAs. Σχεδιάστηκε από ένα ζεύγος ομολόγων άκρων για κάθε ένα από τα πέντε gRNAs που είχαν εντοπιστεί αρχικά. Ως L (left) ορίστηκαν τα ομόλογα άκρα που εκτείνονται αριστερά της δίκλωνης ρήξης και ως R (right) αυτά που εκτείνονται δεξιά, με το νούμερο που ακολουθεί τα L και R να ορίζει το αντίστοιχο gRNA για του οποίου τη θέση στόχευσης σχεδιάστηκαν.

Τα ομόλογα άκρα σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε η ομολογία του καθενός με την ενδογενή αλληλουχία να ξεκινά στο πρώτο νουκλεοτίδιο δίπλα στη θέση κοπής της Cas9 και να εκτείνονται προς αντίθετες κατευθύνσεις. Κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών των ομολόγων άκρων με το πρόγραμμα της IDT, έγινε εκβιασμένη έναρξη του ανάστροφου εκκινητή του αριστερού ομολόγου τμήματος και του εμπρόσθιου εκκινητή του δεξιού ομολόγου τμήματος, στο πρώτο νουκλεοτίδιο δίπλα στη θέση κοπής [Εικόνα 14]. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα στις περισσότερες περιπτώσεις οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν να έχουν μήκος μεγαλύτερο των 20 νουκλεοτιδίων προκειμένου η αλληλουχία τους να είναι μοναδική στο γονιδίωμα του εντόμου. Οι αλληλουχίες των εκκινητών ελέγχθηκαν για τη μοναδικότητά τους τόσο στο Benchling όσο και στο Blastn.

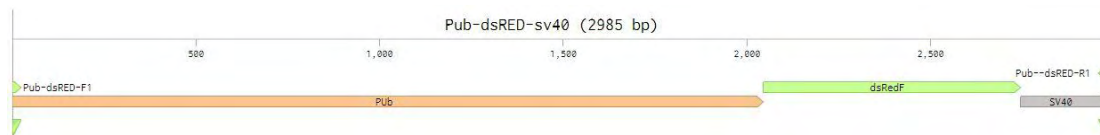


Εικόνα 14 Σχηματική απεικόνιση τμήματος των ομολόγων άκρων του gRNA-5 σε πρόγραμμα επεξεργασίας νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (Benchling). Με κίτρινο επισημαίνεται η περιοχή αναγνώρισης του gRNA, με ροζ η αλληλουχία PAM 'NGG' και με γαλάζιο το σημείο κοπής της Cas9, 3bp ανοδικά της PAM. Οι αλληλουχίες του ανάστροφου εκκινητή του αριστερού ομολόγου τμήματος και του εμπρόσθιου του δεξιού υβριδοποιούνται ακριβώς στο σημείο κοπής και εκτείνονται εκατέρωθεν αυτού. Από το σχήμα έχουν παραληφθεί τα έτερα ζεύγη των εκκινητών.

Με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία για παρόμοια πειράματα ένθεσης μέσω CRISPR/Cas9 στη *D. melanogaster* (Akbari and Buchman, 2018), ως επιθυμητό μήκος των ομολόγων άκρων ορίστηκαν οι 800-1000bp. Έγινε προσπάθεια, όπου ήταν δυνατόν, τα ομόλογα άκρα να βρίσκονται κοντά στο κατώτερο όριο των 800bp. Το μήκος τους καθορίστηκε από τη δυνατότητα σχεδιασμού εκκινητών που να υβριδοποιούνται στο εξωτερικό τμήμα του άκρου. Τελικά το μήκος των ομολόγων άκρων που σχεδιάστηκαν και για τα πέντε gRNAs περιορίστηκε σε μήκη μεταξύ 800-1000bp. Μία εξαίρεση υπήρξε στον δεξί ομόλογο άκρο του gRNA-5, για τον οποίο το τελικό προϊόν των δύο εκκινητών είναι 600bp [Πίνακας 6].

4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΕΙ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΔΕΙΚΤΗ

Ως γονίδιο-δείκτης επιλέχθηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (dsRed). Το συγκεκριμένο γονίδιο απομονώθηκε μαζί με τα ρυθμιστικά στοιχεία από κατασκευή (Scolari et al., 2008) που ήταν διαθέσιμη στο εργαστήριο. Ανοδικά της κωδικής περιοχής του dsRed εντοπιζόταν ο ιδιόσυστατος υποκινητής της πολυουβικουϊτίνης ρUB και καθοδικά η αλληλουχία τερματιστής SV40 του Simian virus [Εικόνα 15]. Για την ενίσχυση της κατασκευής σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές που ενισχύουν αποκλειστικά την περιοχή /ρUB-dsRed-SV40/.



Εικόνα 15 Γραφική απεικόνιση της κατασκευής ρUB-dsRed-SV40 που περιέχει το γονίδιο δείκτη. Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν υβριδοποιούνται ακριβώς στα άκρα της κατασκευής.

5. ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ

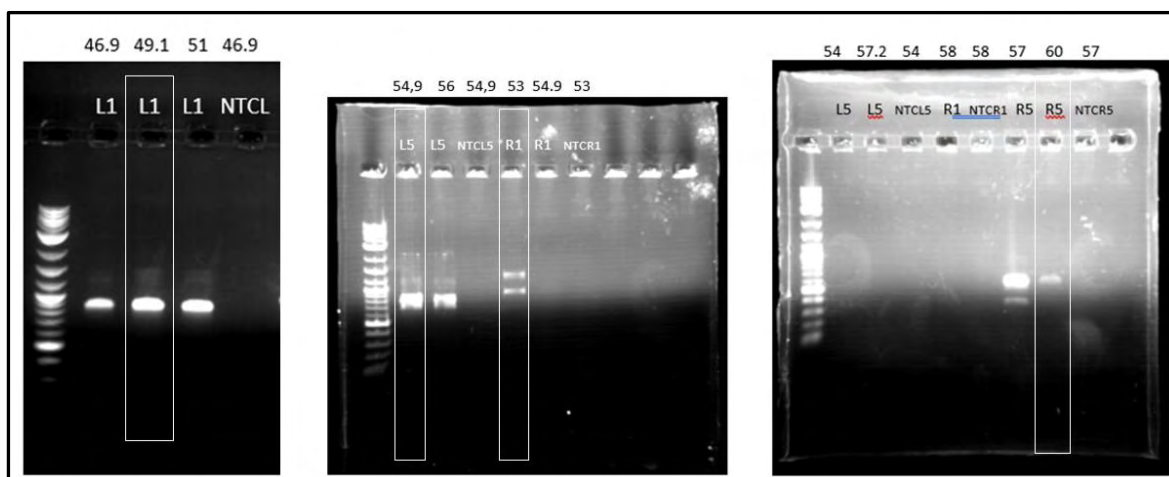
5.1. ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΟΜΟΛΟΓΩΝ ΑΚΡΩΝ

Η ενίσχυση των ομόλογων άκρων για τις θέσεις στόχευσης των gRNA-1 και gRNA-5 πραγματοποιήθηκε σε τρία σταδιακά βήματα.

- i. Αρχικά έγινε βελτιστοποίηση των συνθηκών αντίδρασης PCR για κάθε ομόλογο άκρο ξεχωριστά με την απλή πολυμεράση Kara Taq. Η βελτιστοποίηση αφορούσε τη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών (T_{an}) καθώς και τους χρόνους επιμήκυνσης (extension time και final extension time) [Πίνακας 4]. Ως DNA υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε γονιδιωματικό DNA του στελέχους EgII της *C. capitata*. Τα αποτελέσματα ελέγχθηκαν κάθε φορά σε πήκτωμα αγαρόζης 1% όπου παρατηρήθηκαν οι ζώνες των επιθυμητών προϊόντων [Εικόνα 16].

Πίνακας 4: Οι θερμοκρασίες υβριδισμού (T_{an}) και οι χρόνοι επιμήκυνσης μετά τον έλεγχο των συνθηκών με την απλή πολυμεράση Kara Taq.

Όνομα	L1	R1	L5	R5
T υβριδισμού	49°C	53°C	54,9°C	60°C
Χρόνος επιμήκυνσης	1,15min	1min	1min	30sec
Τελική επιμήκυνση	5min	5min	5min	2min

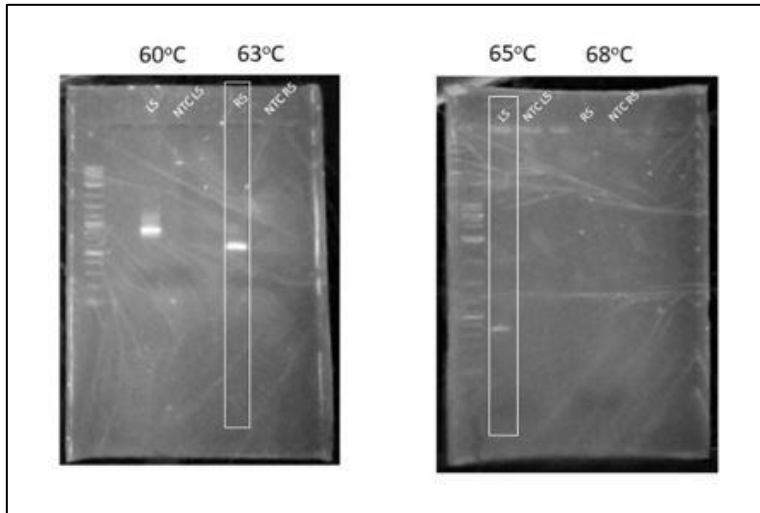


Εικόνα 16 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για τον έλεγχο των συνθηκών της αντίδρασης. Με άσπρο περίγραμμα σημειώνονται οι συνθήκες που επιλέχθηκαν ως βέλτιστες και το προϊόν που προκύπτει. Στο πάνω μέρος του πηκτώματος διακρίνεται το όνομα του κάθε ομόλογου άκρου (πχ L1) και η αντίστοιχη θερμοκρασία υβριδισμού που ελέγχθηκε (T_{an}). Πήκτωμα αγαρόζης 1%, ladder 1kb plus (NEB), 3μl.

- ii. Στη συνέχεια οι ίδιες αντιδράσεις βελτιστοποιήθηκαν [Πίνακας 5] και επαναλήφθηκαν , αυτή τη φορά με την πολυμεράση υψηλής πιστότητας Q5 και αποκλειστικά για τα ομόλογα άκρα του gRNA-5 [Πίνακας 5]. Και σε αυτό το βήμα χρησιμοποιήθηκε ως DNA υπόστρωμα γονιδιωματικό DNA αρσενικών ατόμων του στελέχους EgII. Στη συνέχεια το επιθυμητό προϊόν της αντίδρασης διαχωρίστηκε από τα παραπροϊόντα μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 1% [Εικόνα 17]. Ακολούθησε καθαρισμός και ανάκτησή του DNA, ενώ η ποσότητα του καθαρισμένου προϊόντος προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά [Πίνακας 7].

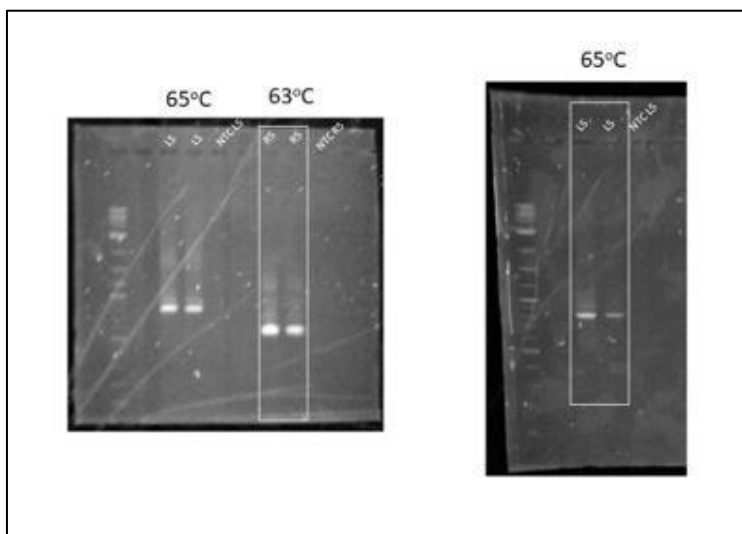
Πίνακας 1: Οι θερμοκρασίες υβριδισμού (T_{an}) και οι χρόνοι επιμήκυνσης μετά την βελτιστοποίηση των συνθηκών με την πολυμεράση υψηλής πιστότητας Q5.Υπόστρωμα αντίδρασης γονιδιωματικό DNA αρσενικών ατόμων του στελέχους EgII.

Όνομα	L5	R5
$T_{υβριδισμού}$	65°C	63°C
Χρόνος επιμήκυνσης	20sec	20sec
Τελική επιμήκυνση	2min	2min



Εικόνα 17 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων βελτιστοποιημένων αντιδράσεων PCR για τα ομόλογα άκρα L5 και R5. Σε άσπρο περίγραμμα φαίνονται τα προϊόντα των αντιδράσεων μετά την βελτιστοποίηση των συνθηκών. Πήκτωμα αγαρόζης 1%, ladder 1kb plus (NEB), 3μL.

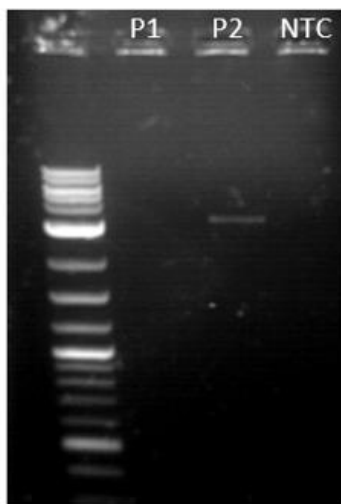
- iii. Αφού έγινε η ενίσχυση των επιθυμητών περιοχών με την πολυμεράση υψηλής πιστότητας Q5, ακολούθησε rePCR των ομόλογων άκρων του gRNA-5 στις βέλτιστες συνθήκες. [Πίνακας 5] Αυτή τη φορά ως υπόστρωμα DNA χρησιμοποιήθηκε το καθαρισμένο προϊόν της προηγούμενης αντίδρασης σε αραίωση 1:100. Τα ομόλογα άκρα ενισχύθηκαν και διαχωρίστηκαν από τα παραπροϊόντα σε πήκτωμα αγαρόζης 1% [Εικόνα 18] Ακολούθησε καθαρισμός και ανάκτηση του DNA ενώ η ποσότητα του καθαρισμένου προϊόντος προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά [Πίνακας 7].



Εικόνα 18 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων rePCR για τα ομόλογα άκρα L5 και R5. Σε άσπρο περίγραμμα φαίνονται τα προϊόντα των αντιδράσεων. Πήκτωμα αγαρόζης 1%, ladder 1kb plus (NEB), 3μL.

5.2. ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ-ΔΕΙΚΤΗ

Πραγματοποιήθηκε αντίδραση για τον έλεγχο των εκκινητών του γονιδίου δείκτη με την απλή πολυμεράση Kara Taq. Ως υπόστρωμα αξιοποιήθηκε το πλασμίδιο στο οποίο ήταν ήδη ενσωματωμένη η κατασκευή. Οι εκκινητές που είχαν σχεδιαστεί ενίσχυσαν ολόκληρη την κασέτα /pUb-dsRed-SV40/. Στο εργαστήριο υπήρχε επίσης, ενσωματωμένη σε πλασμιδιακό φορέα, η κατασκευή /pUb-EGFP-SV40/ η οποία μπορεί να αξιοποιηθεί ως εναλλακτική. Η ύπαρξη των ίδιων ρυθμιστικών στοιχείων επιτρέπει την ενίσχυση της κατασκευής με τους ήδη υπάρχοντες εκκινητές [Εικόνα 19].

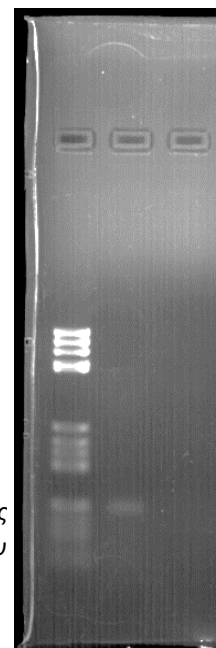


Εικόνα 19 Ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας της αντίδρασης ενίσχυσης της κατασκευής pUB-dsRed-SV40. Στο άσπρο πλαίσιο εμφανίζεται το αναμενόμενο προϊόν της αντίδρασης. Πήκτωμα αγαρόζης 1%, ladder 1kb plus (NEB), 3μL.

6. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ GRNAS

6.1. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ DNA ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΑ GRNAS

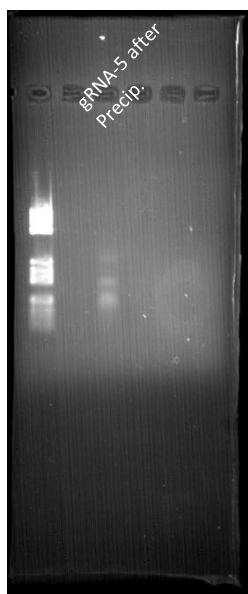
Το πρώτο βήμα για την διαδικασία της *in vitro* μεταγραφής των gRNAs ήταν η δημιουργία του κατάλληλου υποστρώματος DNA. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε για το gRNA-5 αντίδραση PCR με την πολυμεράση υψηλής πιστότητας Q5 και τους αντίστοιχους αλληλεπικαλυπτόμενους εκκινητές CcYgRNA-5F και Invar gRNA-R [Πίνακας 2]. Στη συνέχεια το προϊόν της αντίδρασης ανακτήθηκε. Η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης ελέγχθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 2% [Εικόνα 20] καθώς και με μέτρηση της συγκέντρωσης φασματοφωτομετρικά [Πίνακας 7].



Εικόνα 20 Ηλεκτροφόρηση προϊόντος από την αντίδραση δημιουργίας του DNA υποστρώματος για το gRNA-5.

6.2. IN VITRO ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΤΩΝ GRNAS

Το DNA υπόστρωμα που δημιουργήθηκε είχε σχεδιαστεί έτσι ώστε να φέρει έναν υποκινητή T7 στο άκρο του. Πραγματοποιήθηκε από αυτό *in vitro* μεταγραφή των gRNAs. Μετά από κάθε αντίδραση ακολούθησε καθαρισμός του εκάστοτε gRNA με διαδοχικές πλύσεις με 75% EtOH και φυγοκεντρήσεις, όπως περιγράφεται αναλυτικά στις μεθόδους. Σε κάθε περίπτωση ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα της *in vitro* μεταγραφής με την ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας του προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης 2% [Εικόνα 21] καθώς και με μέτρηση της συγκέντρωσης φασματοφωτομετρικά [Πίνακας 7].



Εικόνα 21 Έλεγχος συγκέντρωσης του gRNA-5 μετά τον καθαρισμό με 75% EtOH.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

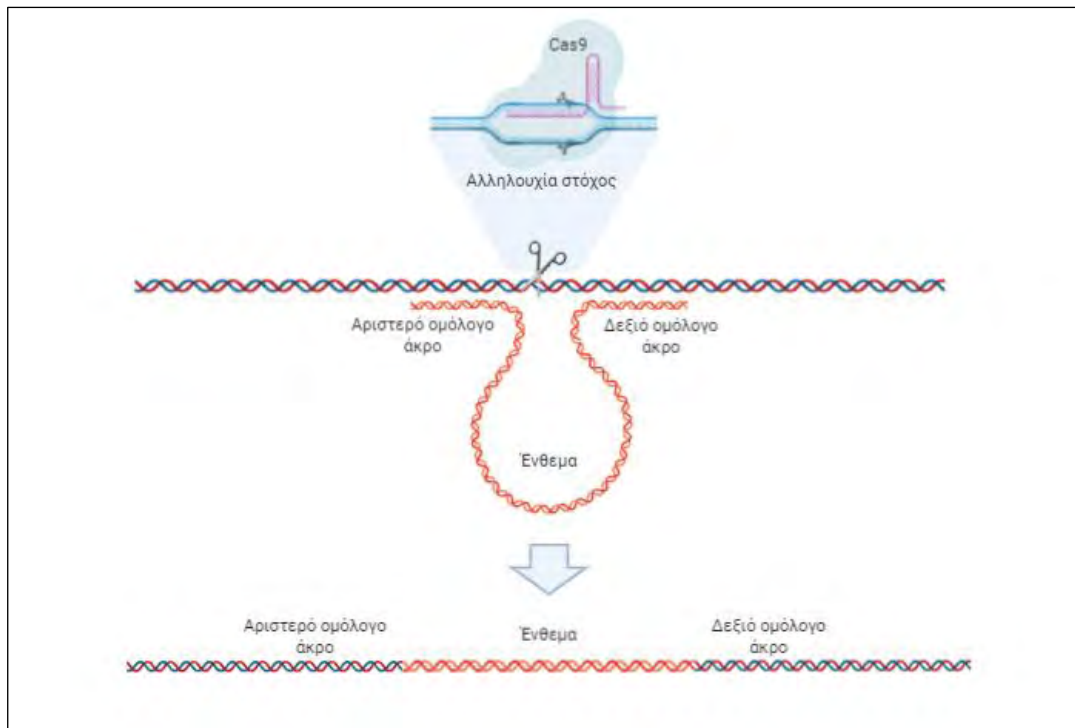
Τα Tephritidae συνιστούν μία οικογένεια εντόμων με πάνω από 4.000 μέλη, πολλά από τα οποία είναι γνωστά για την οικονομική τους σημασία. Από τα πιο γνωστά μέλη της οικογένειας των Tephritidae είναι η *Ceratitis capitata*, η οποία αποτελεί το πιο πολυφάγο έντομο της οικογένειας αυτής καθώς προσβάλλει περισσότερα από 350 φυτά. Η ζημιογόνος δράση της οδήγησε στη μελέτη του συγκεκριμένου εντόμου προκειμένου να μπορέσει να καταπολεμηθεί πιο αποτελεσματικά. Έτσι, πέραν των κλασικών τεχνικών καταπολέμησης με εντομοκτόνα, για την αντιμετώπιση του εφαρμόστηκε με επιτυχία η οικολογική εναλλακτική της SIT που βασίζεται στην αποκλειστική απελευθέρωση στειρών αρσενικών εντόμων. Αυτό απαιτούσε τον μαζικό διαχωρισμό των εντόμων με βάση το φύλο κατά τα αρχικά αναπτυξιακά στάδια. Τα φυλο-γενετικά στελέχη (GSS) που αναπτύχθηκαν για το σκοπό αυτό βασίστηκαν σε χρωμοσωμικές μεταθέσεις στο αρρενοειδικό χρωμόσωμα Y και περιορίζονται στο συγκεκριμένο είδος. Ως αποτέλεσμα, η εφαρμογή της SIT σε άλλα ζημιογόνα συγγενικά Tephritidae παρεμποδίζεται μέχρι και σήμερα λόγω αδυναμίας γενετικού χειρισμού του αρρενοειδικού Y χρωμοσώματος ή απουσίας μορφολογικών μεταλλάξεων που να διευκολύνουν τον φυλο-γενετικό διαχωρισμό.

Ο χαρακτηρισμός του γονιδίου *MoY* (Maleness-on-the-Y) στην *C. capitata* καθώς και η εύρεση ορθολόγων σε άλλα 8 μέλη των Tephritidae, συμπεριλαμβανομένου του *B. oleae*, δημιούργησε νέες προοπτικές για την τροποποίηση του χρωμοσώματος Y και την δημιουργία νέων GSS. Επιπλέον, σήμερα είναι δυνατός ο σχεδιασμός πειραμάτων στόχευσης του αρρενοειδικού χρωμοσώματος με το μοριακό εργαλείο CRISPR/Cas9, αφού το τελευταίο έχει εισαχθεί επιτυχώς στο πεδίο της γενετικής μηχανικής εντόμων. Ο σχεδιασμός ενός τέτοιου πειράματος επιχειρήθηκε στην παρούσα εργασία. Επιλέξαμε να εργαστούμε με την *C. capitata* λόγω της ευκολίας εργαστηριακού χειρισμού που προσφέρει, της ύπαρξης στη βιβλιογραφία αναφορών επιτυχούς τροποποίησης μέσω CRISPR/Cas9 (Aumann et al., 2018) καθώς και της ύπαρξης γνωστών μεταλλάξεων φυλο-γενετικού διαχωρισμού, όπως του *white pupae*. Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με την γνώση των αλληλουχιών του Y χρωμοσώματος, μας επέτρεψαν τον σχεδιασμό ενός πειράματος στόχευσης του χρωμοσώματος αυτού με το σύστημα CRISPR/Cas9, με σκοπό την ένθεση μίας κατασκευής αναφοράς. Η επιτυχή γενετική τροποποίηση του συγκεκριμένου εντόμου με εισαγωγή της επιθυμητής γενετικής κατασκευής θα αποτελέσει την επιβεβαίωση της ικανότητας χειρισμού του χρωμοσώματος Y μέσω CRISPR/Cas9.

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας σχεδιάστηκε μια γενετική κατασκευή αναφοράς ώστε να μπορέσουμε να αξιολογήσουμε την ικανότητα εισαγωγής της στο χρωμόσωμα Y μέσω κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης από το σύστημα CRISPR/Cas9. Η κατασκευή αυτή αποτελείται από τα εξής επιμέρους τμήματα:

- Γονίδιο αναφοράς
- Ρυθμιστικά στοιχεία γονιδίου αναφοράς (pUB, SV40)
- Ομόλογα άκρα (Δεξιό και αριστερό)

Τα παραπάνω στοιχεία διατάσσονται όπως φαίνεται στην [Εικόνα 12]. Εσωτερικά εντοπίζεται το γονίδιο αναφοράς dsRed με τα ρυθμιστικά του στοιχεία (pUB-SV40). Εκατέρωθεν του γονιδίου αναφοράς τοποθετούνται τα ομόλογα άκρα που έχουν σχεδιαστεί για κάθε αλληλουχία στόχο. Σκοπός αυτής της διάταξης είναι η εισαγωγή του γονιδίου δείκτη στο χρωμόσωμα Y κατά την επιδιόρθωση της δίκλωνης ρήξης μέσω HDR. Τα ομόλογα άκρα θα καθοδηγήσουν την συσκευή επιδιόρθωσης να χρησιμοποιήσει ως μήτρα την γενετική κατασκευή, ώστε τελικά να αντιγράψει το γονίδιο δείκτη εσωτερικά της αλληλουχίας στόχου [Εικόνα 22]. Η γενετική κατασκευή, αφού εισαχθεί σε κυκλικό φορέα, θα ενεθεί μελλοντικά με μικροένεση σε έμβρυα εντόμου. Οι αλληλουχίες στόχευσης εκατέρωθεν των ομόλογων άκρων χρησιμεύουν στη γραμμοποίηση της κατασκευής καθώς αναγνωρίζονται από το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο και κόβονται τελικά από την Cas9. Στη γραμμική τους μορφή, οι ομόλογες περιοχές μπορούν πιο εύκολα να αλληλεπιδράσουν με το γονιδίωμα και τελικά να καθοδηγήσουν την ενσωμάτωση της κατασκευής.



Εικόνα 22 Γραφική αναπαράσταση της διαδικασίας ένθεσης μέσω χορήγησης υποστρώματος για HDR.

Σημαντικό βήμα του σχεδιασμού ήταν η επιλογή της χρωμοσωμικής περιοχής του Υ στην οποία θα αναζητούσαμε αλληλουχίες στόχευσης για την Cas9. Για τον σκοπό αυτό μας παραχωρήθηκαν μη δημοσιευμένα δεδομένα αλληλούχησης του εργαστηριακού στελέχους EglI. Προκειμένου να μην υπάρχει διαφοροποίηση των αλληλουχιών στις οποίες έγινε ο σχεδιασμός και αυτών που ενισχύθηκαν στο εργαστήριο, αξιοποιήσαμε για όλο το πειραματικό κομμάτι γονιδιωματικό DNA της ίδιας σειράς. Από το συνολικό ικρίωμα αλληλούχησης, επιλέξαμε ένα τμήμα μήκους περίπου 115kb που περιλάμβανε την αλληλουχία του *MoY* στον αρνητικό κλώνο. Η ύπαρξη αυτού του γονιδίου στη συγκεκριμένη περιοχή μας δίνει το πλεονέκτημα του ευχρωματικού χαρακτήρα σε ένα κατά τα άλλα ετεροχρωματικό χρωμόσωμα, καθώς το γονίδιο *MoY* είναι μια μεταγραφική μονάδα που γνωρίζουμε πως εκφράζεται κατά την ανάπτυξη του εντόμου. Ο ευχρωματικός χαρακτήρας είναι επιθυμητός για δύο λόγους. Αρχικά προκειμένου να διευκολυνθεί η πρόσβαση της Cas9 και του υποστρώματος για την HDR και στη συνέχεια προκειμένου να μην αποσιωπηθεί το γονίδιο δείκτης εξαιτίας του συνολικού ετεροχρωματικού χαρακτήρα του Υ. Το αρχικό σκεπτικό ήταν ο σχεδιασμός των αλληλουχιών στόχευσης των gRNAs να επικεντρωθεί στο κομμάτι καθοδικά του γονιδίου *MoY*. Αυτό έγινε προκειμένου να αποφύγουμε κατά το δυνατόν την πιθανότητα η ενδεχόμενη ένθεση να διαταράξει τα ρυθμιστικά στοιχεία μεταγραφής του *MoY*, τα οποία ακόμα δεν έχουν χαρακτηριστεί. Επιπλέον, θέλαμε οι αλληλουχίες στόχευσης να βρίσκονται σχετικά κοντά στην περιοχή έκφρασης του *MoY* ώστε να εκμεταλλευτούμε τον ευχρωματικό του χαρακτήρα.

Αν και αρχικά έγινε προσπάθεια εντοπισμού μοναδικών αλληλουχιών στόχων καθοδικά του *MoY*, αυτό δεν κατέστη δυνατό λόγω του επαναλαμβανόμενου χαρακτήρα του Υ. Τελικώς εντοπίστηκαν 5 αλληλουχίες στόχευσης ανοδικά του *MoY* για τις οποίες σχεδιάστηκαν τα αντίστοιχα gRNAs. Από αυτές επιλέξαμε τις δύο για να εργαστούμε στη συγκεκριμένη πτυχιακή. Όπως προαναφέρθηκε, τα δεδομένα με τα οποία εργαστήκαμε δεν ήταν δημοσιευμένα και αυτό είχε ως αποτέλεσμα η μία εκ των δύο αλληλουχιών στόχευσης (gRNA-1) να επαναλαμβάνεται άλλες τρεις φορές σε ένα τμήμα της αλληλούχησης το οποίο δεν μας ήταν εξ αρχής διαθέσιμο. Επομένως, το αντίστοιχο gRNA καθώς και τα ομόλογα άκρα απορρίφθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία.

Η μέθοδος εισαγωγής στο έντομο του συστήματος CRISPR/Cas9 που επιλέχθηκε προϋποθέτει την *in vitro* μεταγραφή του gRNA ώστε μελλοντικά το σύστημα να εισαχθεί ως ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο με μικροένεση σε αυγά εντόμου. Επομένως σχεδιάστηκαν οι αντίστοιχοι εκκινητές και δημιουργήθηκε το DNA υπόστρωμα το οποίο καθαρίστηκε με εργαστηριακό kit και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η *in vitro* μεταγραφή. Από τις μετρήσεις του προϊόντος πριν και μετά τον καθαρισμό διαπιστώθηκε ότι υπάρχει μεγάλη απώλεια της τάξης του 75%. [Πίνακας 7] Ενδεχομένως σε αυτό να φταίει το kit καθαρισμού, καθώς αυτό συνιστάται για την απομόνωση τμημάτων μεγαλύτερων της 1kb. Η ποσότητα του gRNA που παράχθηκε δεν μπόρεσε να οπτικοποιηθεί σωστά μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Όπως φαίνεται στην εικόνα [Εικόνα 21] το gRNA φαίνεται να αποικοδομείται κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, ενδεχομένως λόγω της παρουσίας RNAσων καθώς τα συγκεκριμένα ένζυμα είναι πανταχού παρόντα και εξαιρετικά ανθεκτικά στην απενεργοποίηση.

Για την εισαγωγή της κατασκευής στο γονιδίωμα της *C. capitata* είναι απαραίτητη η παρουσία ομόλογων άκρων ώστε να υβριδοποιηθούν με τα τμήματα εκατέρωθεν της δίκλωνης ρήξης και να καθοδηγήσουν την ένθεση μέσω επιδιόρθωσης από τον μηχανισμό HDR. Για κάθε gRNA σχεδιάστηκε ένα ζευγάρι ομόλογων άκρων (Left-Right) καθώς και το αντίστοιχο ζεύγος εκκινητών για την ενίσχυση κάθε άκρου [Πίνακας 6]. Οι εκκινητές που υβριδοποιούνται εκατέρωθεν της δίκλωνης ρήξης σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να ξεκινούν στο πρώτο νουκλεοτίδιο από το σημείο κοπής. Αυτό έγινε ώστε με τη διαδικασία της ένθεσης να διαταραχθεί η αλληλουχία αναγνώρισης του gRNA προκειμένου να παρεμποδιστεί η Cas9 να κόψει ξανά στο ίδιο σημείο, κάτι που ενδεχομένως θα δημιουργούσε ανεπιθύμητες μεταλλάξεις.

Κατά την ενίσχυση των ομόλογων άκρων, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των συνθηκών αντίδρασης με την απλή πολυμεράση Kara Taq τόσο για τα ομόλογα άκρα του gRNA-1 όσο και του gRNA-5. Όμως λόγω της απόρριψης του πρώτου, η βελτιστοποίηση με την πολυμεράση υψηλής πιστότητας Q5 έγινε μόνο για το gRNA-5. Η επαναλαμβανόμενη φύση του Y χρωμοσώματος είναι εμφανής στα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων. Παρά τη βελτιστοποίηση των συνθηκών, σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις εμφανίζονται παραπροϊόντα, πράγμα που ενδεχομένως σημαίνει πως η αλληλουχία των εκκινητών υβριδοποιείται μη ειδικά και σε άλλες περιοχές του Y. Προκειμένου να παραλάβουμε τις επιθυμητές περιοχές καθαρές από παραπροϊόντα, έγινε απομόνωση των επιθυμητών ζωνών από το πήκτωμα αγαρόζης με βάση το αναμενόμενο μήκος των προϊόντων και προχωρήσαμε σε δεύτερη ενίσχυση μέσω PCR (rePCR). Αυτή τη φορά όμως ως DNA υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν αραιώσεις από τα απομονωμένα ομόλογα άκρα ώστε να αποφύγουμε την εμφάνιση παραπροϊόντων που ενδεχομένως προκύπτουν από μη ειδικό υβριδισμό των εκκινητών.

Όπως φαίνεται και στις φωτογραφίες των ηλεκτροφορήσεων των συγκεκριμένων αντιδράσεων rePCR μετά την αλλαγή του DNA υποστρώματος [Εικόνα 18], υπήρξε πάλι ενίσχυση παραπροϊόντων τα οποία ενδεχομένως σχετίζονται με το ίδιο το προϊόν και δεν μπορούν να είναι αποτέλεσμα μη ειδικού υβριδισμού των εκκινητών σε κάποιο άλλο τμήμα του γονιδιώματος. Μία ενδεχόμενη εξήγηση είναι η δημιουργία κονκαταμερών κατά την ενίσχυση των τμημάτων, καθώς και στις δύο περιπτώσεις εμφανίζονται ζώνες παραπροϊόντων με μήκος διπλάσιο του αναμενόμενου προϊόντος. Το άκρο L5 έχει αναμενόμενο μήκος 837bp. Κατά την ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης ενίσχυσης του διακρίνονται παραπροϊόντα μεταξύ των ζωνών 1,5kb και 2kb. Αντίστοιχα για το άκρο R5 που έχει μήκος 600bp, εμφανίζεται παραπροϊόν στις 1,2kb. Ενδέχεται κατά αυτόν τον τρόπο, μέσω του σχηματισμού δομών εσωτερικά του επιθυμητού προϊόντος, να παράγονται και τα υπόλοιπα παραπροϊόντα που διακρίνονται [Εικόνα 18].

Αναφορικά με το γονίδιο δείκτη, ο αρχικός σχεδιασμός περιλάμβανε τον δείκτη dsRed υπό τον έλεγχο του υποκινητή pUB και την αλληλουχία τερματιστή SV40. Ο υποκινητής της πολυουβικουιτίνης (pUB) αποτελεί έναν ιδιοσυστατο υποκινητή, γεγονός που σημαίνει πως η ποσότητα φθορισμού του dsRed και άρα η ενεργότητα του υποκινητή αποτελούν δείκτη της χρωματινικής κατάστασης της περιοχής στην οποία αυτός εντοπίζεται. Έτσι μπορούμε παρατηρώντας τον φθορισμό να κάνουμε μία μερική αξιολόγηση της μεταγραφικής ενεργότητας της θέσης στόχευσης. Η κατασκευή /pUB-dsRed-SV40/ ήταν διαθέσιμη στο εργαστήριο, ενσωματωμένη σε πλασμιακό φορέα. Επίσης, στο εργαστήριο υπήρχε παρόμοια κατασκευή με το EGFP ως γονίδιο

δείκτη, η οποία επιλέχθηκε ως εναλλακτική του dsRed. Το EGFP βρίσκεται υπό τον έλεγχο των ίδιων ρυθμιστικών στοιχείων, γεγονός που δίνει την δυνατότητα ενίσχυσης του με τους ήδη υπάρχοντες εκκινητές.

Ο παραπάνω σχεδιασμός αποτελεί μία προσπάθεια επιβεβαίωσης της ικανότητας χειρισμού του χρωμοσώματος Y των Terphritidae με το σύστημα CRISPR/Cas9, μέσω του κυριότερου και καλύτερα μελετημένου εκπροσώπου τους που είναι η *C. capitata*. Ο χειρισμός του χρωμοσώματος αυτού είναι ένα καθοριστικό βήμα προς την εφαρμογή της τεχνικής SIT για τον έλεγχο των Terphritidae. Μελλοντικά, θα πρέπει να συναρμολογηθούν τα επιμέρους τμήματα της σχεδιασμένης κατασκευής και να κλωνοποιηθούν εν συνεχεία σε κατάλληλο φορέα. Τελικώς, σκοπεύεται η εισαγωγή του συστήματος με μικροένεση σε έμβρυα *C. capitata* ώστε να επιβεβαιωθεί η ικανότητα γενετικής τροποποίησης. Μια τέτοια επιβεβαίωση δημιουργεί προοπτικές μελλοντικής εκμετάλλευσης των σχεδιασμένων θέσεων στόχευσης για την επαναδημιουργία των GSS της *C. capitata*. Αυτή δύναται να γίνει βάσει της προτεινόμενης μεθοδολογίας μεταλλαξιγένεσης μέσω CRISPR/Cas9, με αξιοποίηση της γνώσης των μεταλλάξεων του γονιδίου μορφολογικού διαχωρισμού *white pupae*. Επιπλέον, ο επιτυχής χειρισμός του Y της *C. capitata* θα επιτρέψει την πραγματοποίηση αντίστοιχων πειραμάτων, για την γενετική τροποποίηση συγγενικών Terphritidae, με σκοπό τη δημιουργία φυλο-γενετικών στελεχών σε αυτά. Κάτι τέτοιο θα καταστήσει εφικτή την εφαρμογή της οικολογικής τεχνικής SIT σε μέλη των Terphritidae όπου μέχρι στιγμής δεν είναι δυνατή, ώστε τελικά να περιοριστεί η ζημιογόνος δράση τους.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά των gRNAs. Στον πίνακα φαίνονται οι αλληλουχίες στόχοι με κατεύθυνση 5'-3', η σχετική τους θέση ανοδικά του MoY, ο κλώνος στον οποίο εντοπίζεται η αλληλουχία στόχος και η αποτελεσματικότητα που υπολογίζεται με βάση το CHOPCHOP (Doench et al. 2016). Με κόκκινη γραφή επισημαίνεται η PAM. Σε γαλάζιο φόντο φαίνονται τα gRNAs τα οποία επιλέχθηκαν για περαιτέρω σύνθεση στα πλαίσια αυτής της εργασίας.

Όνομα	Αλληλουχία στόχος (5'-3')	Απόσταση από MoY	Κλώνος	Efficiency
gRNA-1	CGATATATGTGACTGCATCGCGG	~4,7kb	+	80.00
gRNA-2	GTAGAAGAAATTGGCGAGTGGGG	~4,7kb	-	65.94
gRNA-3	TAACGTCATCTATATACACATGG	~4,9kb	+	68.48
gRNA-4	TTTGAGCTCTCAACCCAGAAGG	~4,9kb	-	65.48
gRNA-5	TAGTCACATGAAAATTC AAGGGG	~9,1kb	-	64.98

Πίνακας 3: Οι αλληλουχίες των εκκινήτων για τη δημιουργία του υποστρώματος για την *in vitro* μεταγραφή των gRNAs. Στον πίνακα φαίνεται η προς μεταγραφή αλληλουχία, το όνομα καθενός εκκινήτη και η αλληλουχία του. Η αλληλουχία του ελάχιστου υποκινητή T7 φαίνεται υπογραμμισμένη, με πράσινη γραφή εμφανίζεται η αλληλουχία στόχος ενώ σε κόκκινο φόντο εμφανίζεται ο μη διαφοροποιούμενος ανάστροφος (Reverse) εκκινήτης.

Αλληλουχία στόχος	Όνομα εκκινήτη	Αλληλουχία εκκινήτη
gRNA-1	CcYgRNA-1F	<u>GAAATTAATACGACTCACTATA</u> CGATATATGTGACTGCATCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
gRNA-5	CcYgRNA-5F	<u>GAAATTAATACGACTCACTATA</u> TAGTCACATGAAAATTC AAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
	Invar gRNA-R	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTATTTTAACTTGCT ATTTCTAGCTCTAAAAC

Πίνακας 4: Χαρακτηριστικά εκκινητών για τον έλεγχο ένθεσης. Στον πίνακα φαίνεται το gRNA στο οποίο αντιστοιχεί το κάθε ζεύγος εκκινητών, το όνομα και η αλληλουχία τους και το μήκος του προϊόντος που ενισχύουν (χωρίς να περιλαμβάνεται το μέγεθος της προς ένθεσης κατασκευής). Με γαλάζιο φόντο εμφανίζονται τα ζεύγη εκκινητών τα οποία αφορούν τα gRNA τα οποία εργαστήκαμε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.

	Εκκινητής F	Αλληλουχία F εκκινητή	Εκκινητής R	Αλληλουχία R εκκινητή	Μήκος προϊόντος
gRNA-1	Cc_Ins1-F	TGAAAAGGATCGTTGTTTTCT	Cc_Ins1-R	GCTATTCGTCGTTAGCTCGTC	273bp
gRNA-2	Cc_Ins2-F	TGCTGTGACGGTTTTCTTCTTA	Cc_Ins2-R	CAGAAAAGCCAAACCAAAAAG	261bp
gRNA-3	Cc_Ins3-F	CCGCCCTTAATATTTTCAGTCAT	Cc_Ins3-R	TCCACAATTGATTTGGAGTCTG	280bp
gRNA-4	Cc_Ins4-F	TATCCCGCCCGTATATATGAA	Cc_Ins4-R	GCAGGTAAGGGTAAATAGGGGT	250bp
gRNA-5	Cc_Ins5-F	TGGACGATTTGTGTAECTCA	Cc_Ins5-R	CCCATTGGATCAAATTCTGTTT	239bp

Πίνακας 6: Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για τα ομόλογα άκρα των δύο gRNA που επιλέχθηκαν, καθώς και το μήκος του προϊόντος που ενισχύουν.

	Βραχίονας ομολογίας	Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή	Μήκος προϊόντος
gRNA-1	L1	HDR-Cc_L1_F	AAATAATGCGTCAACTTTCCC	882bp
		HDR-Cc_L1_R	TGCAGTCACATATATCGAACAT	
	R1	HDR-Cc_R1_F	TCGCGGATGACATTCTCC	956bp
		HDR-Cc_R1_R	GTCAAATCAAATCAACCACTTAACC	
gRNA-5	L5	HDR-Cc_L5_F	TTTCCGTGGCCGGTATTT	837bp
		HDR-Cc_L5_R	AAGGGTTCTTCACAGGGA	
	R5	HDR-Cc_R5_F	GAATTTTCATGTGACTATTTCTTGAAAAAT	901bp
		HDR-Cc_R5_R	GGTGTGATAAGTGTAGGGACAA	

Πίνακας 7: Οι τιμές μέτρησης των προϊόντων των αντιδράσεων ύστερα από φασματοφωτομετρική μέτρηση. Οι τιμές αναφέρονται στα καθαρισμένα προϊόντα και αποτελούν αναγωγή των αραιωμένων προϊόντων που μετρήθηκαν στην αρχική συγκέντρωση πριν την αραιώση.

Προϊόν	Μέθοδος πολλαπλασιασμού	Συγκέντρωση	A ²⁶⁰ / ₂₈₀
L5 homology arm	PCR με υπόστρωμα γονιδιωματικό DNA της σειράς EglI	7 ng/μl	1.47
	PCR με υπόστρωμα αραιώσεις από τα απομονωμένα homology arms	38 ng/μl	1.10
R5 homology arm	PCR με υπόστρωμα γονιδιωματικό DNA της σειράς EglI	19 ng/μl	1.33
	PCR με υπόστρωμα αραιώσεις από τα απομονωμένα homology arms	47 ng/μl	1.75
gRNA-5 template	Αντίδραση σε συνολικό όγκο 50μl	57.5 ng/μl	1.59
	Αντίδραση σε συνολικό όγκο 200μl	184 ng/μl	1.83
gRNA-5	In vitro μεταγραφή με συγκέντρωση υποστρώματος ~1μg/μl	9.524 ng/μl	2.04
	In vitro μεταγραφή με συγκέντρωση υποστρώματος ~2,9μg/μl	2.335 ng/μl	1.97

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Anleitner, J., Haymer, D. (1992). Y Enriched And Y Specific Dna Sequences From The Genome Of The Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis Capitata*. *Chromosoma*. 101. 271-8. 10.1007/Bf00346005.
- Aumann, R., Schetelig, M., & Haecker, I. (2018). Highly Efficient Genome Editing By Homology-Directed Repair Using Cas9 Protein In *Ceratitis Capitata*. *Insect Biochemistry And Molecular Biology*. 101. 10.1016/J.Ibmb.2018.08.004.
- Bachtrog, D., Mank, J., Peichel, C., Kirkpatrick, M., Otto, S., Ashman, T. L., Hahn, M., Kitano, J., Mayrose, I., Ming, R., Perrin, N., Ross, L., Valenzuela, N., Vamosi, J. (2014). Sex Determination: Why So Many Ways Of Doing It?. *Plos Biology*. 12. E1001899. 10.1371/Journal.Pbio.1001899.
- Basalova Buchman, A., & Akbari, O., (2018). Site-Specific Transgenesis Of The *D. Melanogaster* Y-Chromosome Using Crispr/Cas9. *Insect Molecular Biology*. 28. 10.1111/Imb.12528.
- Baumhover A.H., Graham A.J., Bitter B.A., Hopkins D.E., New W.D., Dudley F.H., Bushland R.C. (1955). Screwworm Control Through Release Of Sterile Flies. *J. Econ. Entomol.* 48: 462-466.
- Bedo, D. G., And G. C. Webb, (1989) Conservation Of Nucleolar Structure In Polytene Tissues Of *Ceratitis Cupitata* (Diptera : Tephriti- Dae). *Chromosoma* 98: 443-449.
- Bopp, D., Bell, L.R., Cline, T.W. And Schedl, P. (1991). Developmental Distribution Of Female-Specific Sex-Lethal Proteins In *Drosophila Melanogaster* . *Genes Devel.* 5: 403–415.
- Caceres, C., Cayol, J. P., Enkerlin, W.R., Franz, G., Hendrichs, J., Robinson, A.S. (2004). Comparison Of Mediterranean Fruit Fly (*Ceratitis Capitata*) (Tephritidae) Bisexual And Genetic Sexing Strains: Development, Evaluation And Economics. *Proceedings, Symposium: 6th International Symposium On Fruit Flies Of Economic Importance*. 367-381.
- Canovai, R., Caterini, B., Contadini, L., Galleni, L.. (1994). Karyology Of The Medfly *Ceratitis Capitata* (Wied.) Mitotic Complement: Ase Bands. *Caryologia: International Journal Of Cytology, Cytosystematics And Cytogenetics*. 47. 241-247. 10.1080/00087114.1994.10797302.
- Charpentier E., Marraffini La (2014) Harnessing Crispr-Cas9 Immunity For Genetic Engineering. *Curr Opin Microbiol* 19:114–119
- Cho Sw, Kim S, Kim Jm Et Al (2013) Targeted Genome Engineering In Human Cells With The Cas9 Rna-Guided Endonuclease. *Nat Biotechnol* 31:230–232
- Davis, A. & Chen, D. (2013). Dna Double Strand Break Repair Via Non-Homologous End-Joining. *Translational Cancer Research*. 2. 130-143. 10.3978/J.Issn.2218-676x.2013.04.02.
- Dhaliwal, G.S., Dhawan, A. K. And Singh, R. (2007). Biodiversity And Ecological Agriculture: Issues And Perspectives. *Indian J. Ecol.*, 34 (2):100- 109
- Doench, J., Hartenian, E., Graham, D., Tothova, Z., Hegde, M., Smith, I., Sullender, M., Ebert, B., Xavier, R., Root, D.. (2014). Rational Design Of Highly Active Sgrnas For Crispr-Cas9-Mediated Gene Inactivation. *Nature Biotechnology*. 32. 10.1038/Nbt.3026.
- Doudna, J., Charpentier, E.. (2014). The New Frontier Of Genome Engineering With Crispr-Cas9. *Science (New York, N.Y.)*. 346. 1258096. 10.1126/Science.1258096.
- Economopoulos, A., Avtzis, N., Zervas, G., Tsitsipis, J., Haniotakis, G., Tsiropoulos, G., Manoukas, A.. (1977). Experiments On The Control Of The Olive Fly, *Dacus Oleae* (Gmel.), By The Combined Effect Of Insecticides And Releases Of Gamma-Ray Sterilized Insects. *Zeitschrift Für Angewandte Entomologie*. 83. 201 - 215. 10.1111/J.1439-0418.1977.Tb02390.X.
- Ehler, L. E., And P. C. Endicott. (1984). Effect Of Malathion Bait Sprays On Biological Control Of Insect Pest Of Olive, Citrus, And Walnut. *Hilgardia* 52: 1δ47.
- Ekesi S, Billah Mk (2007) A field Guide To The Management Of Economically Important Tephritid Fruit flies In Africa. *Icipe Science, Nairobi*
- Ekesi S, Mohamed Sa (2011) Mass Rearing And Quality Control Parameters For Tephritid Fruit flies Of Economic Importance In Africa. In: Akyar I (Ed) *Wide Spectra Of Quality Control*. Intech, Rijeka

- Ferguson-Smith, M., Graves, J., McLaren, A., Mittwoch, U., Renfree, M., Burgoyne, P.. (1995). *The Evolution Of Mammalian Sex Chromosomes And The Origin Of Sex Determining Genes: Discussion. Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences.* 350. 311-312. 10.1098/Rstb.1995.0166.
- Franz, G. 2002. *Recombination Between Homologous Autosomes In Medfly (Ceratitis Capitata) Males: Type-1 Recombination And The Implications For The Stability Of Genetic Sexing Strains. Genetica* 116: 73-84.
- Franz, G. 2005. *Genetic Sexing Strains In Mediterranean Fruit Fly, An Example For Other Species Amenable To Largescale Rearing For The Sterile Insect Technique. In Sterile Insect Technique Principles And Practice In Area-Wide Integrated Pest Management, V.A. Dyck, J. Hendrichs, And A.S. Robinson, Eds. (The Netherlands, Springer), Pp. 427-451.*
- Fu, G., Stainton, K., Epton, M., Gong, P., Jin, L., Condon, G., Morrison, N., Dafaalla, T., Alphey, L.. (2007). *Female-Specific Insect Lethality Engineered Using Alternative Splicing. Nature Biotechnology.* 25. 353-7. 10.1038/Nbt1283.
- Gabrieli, P., Gomulski, L., Bonomi, A., Siciliano, P., Scolari, F., Franz, G., Jessup, A., Malacrida, A., Gasperi, G.. (2011). *Interchromosomal Duplications on the Bactrocera oleae Y Chromosome Imply a Distinct Evolutionary Origin of the Sex Chromosomes Compared to Drosophila. PloS one.* 6. e17747. 10.1371/journal.pone.0017747.
- Gokcezade, J., Sienski, G., Duchek, P.. (2014). *Efficient Crispr/Cas9 Plasmids For Rapid And Versatile Genome Editing In Drosophila. G3 (Bethesda, Md.).* 4. 10.1534/G3.114.014126.
- Gong, P., Epton, M., Fu, G., Scaife, S., Hiscox, A., Stainton, K., Condon, G., Morrison, N., Kelly, D., Dafaalla, T., Coleman, P., Alphey, L.. (2005). *A Dominant Lethal Genetic System For Autocidal Control Of The Mediterranean Fruitfly. Nature Biotechnology.* 23. 453-6. 10.1038/Nbt1071.
- Gossen, M., Bujard, H.. (2002). *Studying Gene Function In Eukaryotes By Conditional Gene Inactivation. Annual Review Of Genetics.* 36. 153-73. 10.1146/Annurev.Genet.36.041002.120114.
- Gratz, S., Cummings, A., Nguyen, J., Hamm, D., Donohue, L., Harrison, M., Wildonger, J., O'connor-Giles, K.. (2013). *Genome Engineering Of Drosophila With The Crispr Rna-Guided Cas9 Nuclease. Genetics.* 194. 10.1534/Genetics.113.152710.
- Hendrichs J., Franz G., Rendon P. (1995). *Increased Effectiveness And Applicability Of The Sterile Insect Technique Through Male-Only Releases For Control Of Mediterranean Fruit Flies during fruiting seasons. J. Appl. Entomol.* 119:371-377.
- Hendrichs J., Vreysen M.J.B., Enkerlin W.R., Cayol J.P. (2005). *Strategic Options In The Use Of The Sterile Insect Technique. In: V.A. Dyck, J. Hendrichs And A.S. Robinson (Eds..). Sterile Insect Technique. Principles And Practice In Area-Wide Integrated Pest Management. Springer, Dordrecht, The Netherlands, Pp. 563-600.*
- Hendrichs, J. (2000). *Use Of The Sterile Insect Technique Against Key Insect Pests. Sustainable Development International* 2:75–79.
- Hsu, P., Scott, D., Weinstein, J., Ran, F., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T., Marraffini, L., Bao, G., Zhang, F.. (2013). *DNA targeting specificity of RNA-guided CAS9 nucleases. Nature biotechnology.* 31. 10.1038/nbt.2647.
- Hou Z, Zhang Y, Propson Ne Et Al (2013) *Efficient Genome Engineering In Human Pluripotent Stem Cells Using Cas9 From Neisseria Meningitidis. Proc Natl Acad Sci Usa* 110:15644–15649
- Hryhorowicz (Boksa), M., Lipiński, D., Zeyland, J., Słomski, R.. (2016). *Crispr/Cas9 Immune System As A Tool For Genome Engineering. Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis.* 65. 10.1007/S00005-016-0427-5.
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. (1987). *Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. J Bacteriol* 169:5429–5433. doi:10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987.
- Jiang, F., Doudna, J.. (2017). *Crispr-Cas9 Structures And Mechanisms. Annual Review Of Biophysics.* 46. 10.1146/Annurev-Biophys-062215-010822.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I Et Al (2012) *A Programmable Dualrna-Guided Dna Endonuclease In Adaptive Bacterial Immunity. Science* 337:816–821

- Karvelis T, Gasiunas G, Miksys A Et Al (2013) *Crrna And Tracrna Guide Cas9-Mediated Dna Interference In Streptococcus Thermophilus*. *Rna Biol* 10:841–851
- Kistler, K., Vosshall, L., Matthews, B.. (2015). *Genome Engineering With Crispr-Cas9 In The Mosquito Aedes Aegypti*. *Cell Reports*. 11. 10.1016/J.Celrep.2015.03.009. Knippling E. (1955) Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *J. Econ. Entomol.*, 48, p. 459
- Labun, K., Montague, T., Krause, M., Torres Cleuren, Y., Tjeldnes, H., Valen, E.. (2019). *Chopchop V3: Expanding The Crispr Web Toolbox Beyond Genome Editing*. *Nucleic Acids Research*. 47. 10.1093/Nar/Gkz365.
- Magaña, C., Hernández-Crespo, P., Ortego, F., Castañera, P.. (2008). *Resistance To Malathion In Field Populations Of Ceratitis Capitata*. *Journal Of Economic Entomology*. 100. 1836-43. 10.1603/0022-0493(2007)100[1836:Rtmifp]2.0.Co;2.
- Mcinnis D.O., Wong T.T.Y., Tam S.Y.T. (1986). *Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae): Suppression Efficiencies Of Unisexual And Bisexual Sterilised Release Populations In Field Cages*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 79: 931-937.
- Meccariello, A., Monti, S., Romanelli, A., Colonna, R., Primo, P., Inghilterra, M., Corsano, G., Ramaglia, A., Iazzetti, G., Chiarore, A., Patti, F., Heinze, S., Salvemini, M., Lindsay, H., Chiavacci, E., Burger, A., Robinson, M., Mosimann, C., Bopp, D., Saccone, G.. (2017). *Highly Efficient Dna-Free Gene Disruption In The Agricultural Pest Ceratitis Capitata By Crispr-Cas9 Ribonucleoprotein Complexes*. *Scientific Reports*. 7. 10.1038/S41598-017-10347-5.
- Meccariello, A., Salvemini, M., Primo, P., Hall, B., Koskinioti, P., Dalikova, M., Gravina, A., Gucciardino, M., Forlenza, F., Gregoriou, M. E., Ippolito, D., Monti, S., Petrella, V., Perrotta, M., Schmeing, S., Ruggiero, A., Scolari, F., Giordano, E., Tsoumani, K., Saccone, G.. (2019). *Maleness-On-The-Y (Moy) Orchestrates Male Sex Determination In Major Agricultural Fruit Fly Pests*. *Science*. 365. Eaax1318. 10.1126/Science.Aax1318.
- Meza, J., Haq, I., Vreysen, M., Bourtzis, K., Kyritsis, G., Cáceres, C.. (2018). *Comparison Of Classical And Transgenic Genetic Sexing Strains Of Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) For Application Of The Sterile Insect Technique*. *Plos One*. 13. E0208880. 10.1371/Journal.Pone.0208880.
- Mir, A., Edraki, A., Lee, J., Sontheimer, E.. (2017). *Type II-C Crispr-Cas9 Biology, Mechanism And Application*. *Acs Chemical Biology*. 13. 10.1021/Acschembio.7b00855.
- Morrison, N., Franz, G., Koukidou, M., Miller, T., Saccone, G., Alphey, L., Beech, C., Nagaraju, J., Simmons, G., Polito, L.. (2010). *Genetic Improvements To The Sterile Insect Technique For Agricultural Pests*. *Aspac J Mol Biol Biotechnol*. 18.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A., Scharf, S. J., Saiki, R. K., Horn, G. T., & Erlich, H. (1992). *Specific Enzymatic Amplification Of Dna In Vitro: The Polymerase Chain Reaction*. *Biotechnology Series*, 17-17.
- Navarro-Llopis, V., Primo, J., Vacas, S.. (2013). *Efficacy Of Attract-And-Kill Devices For The Control Of Ceratitis Capitata*. *Pest Management Science*. 69. 10.1002/Ps.3393.
- Pane, A., Salvemini, M., Bovi, P., Polito, L., Saccone, G.. (2002). *Pane A, Salvemini M, Bovi Pd, Polito C, Saccone G. The Transformer Gene In Ceratitis Capitata Provides A Genetic Basis For Selecting And Remembering The Sexual Fate*. *Development* 129: 3715-3725. *Development (Cambridge, England)*. 129. 3715-25. 10.3410/F.1001642.116658.
- Papadopoulos, Nikos. (2008). *Mediterranean Fruit Fly, Ceratitis Capitata (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae)*. 10.1007/978-1-4020-6359-6_1774.
- Papanicolaou, A., Schetelig, M., Arensburger, P., Atkinson, P., Benoit, J., Bourtzis, K., Castañera, P., Cavanaugh, J., Chao, H., Childers, C., Curriel, I., Dinh, H., Doddapaneni, H., Dolan, A., Dugan, S., Friedrich, M., Gasperi, G., Geib, S., Georgakilas, G., Handler, A.. (2017). *Erratum To: 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 Biology*. 18. 10.1186/S13059-017-1155-9.
- Pimentel, D. (2007) *Area-Wide Pest Management: Environmental, Economic And Food Issues*. In: M.J.B. Vreysen, A.S. Robinson And J. Hendrichs (Eds) *Area-Wide Control Of Insect Pests: From Research To Field Implementation*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, Pp.35-47.

- Pimentel, D. (2009) Pesticides And Pest Control. In: R. Peshin And A.K. Dhawan (Eds) *Integrated Pest Management: Innovation Development*. Vol 1. Springer, Dordrecht, The Netherland, Pp. 83-88.
- Ran, F., Hsu, P., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D., Zhang, F.. (2013). *Genome Engineering Using The Crispr-Cas9 System*. *Nature Protocols*. 8. 2281-308. 10.1038/Nprot.2013.143.
- Reid, W., O'Brochta, D.. (2015). *Applications of Genome Editing in Insects*. *Current Opinion in Insect Science*. 13. 10.1016/j.cois.2015.11.001.
- Rendon P., Mcinnis D., Lance D., Stewart J. (2004). *Medfly (Diptera: Tephritidae) Genetic Sexing: Large-Scale Field Comparison Of Males-Only And Bisexual Sterile Fly Releases In Guatemala*. *J. Econ. Entomol.* 97: 1547-1553.
- Robinson, A. (2002). *Genetic Sexing Strains In Medfly, Ceratitis Capitata, Sterile Insect Technique Programmes*. *Genetica*. 116. 5-13. 10.1023/A:1020951407069.
- Roessler Y, Rosenthal H (1992) *Genetics Of The Mediterranean Fruit fly (Diptera: Tephritidae): Morphological Mutants On Chromosome five*. *Ann Entomol Soc Am* 85:525–531
- Rössler, Y. (1979). *The Genetics Of The Mediterranean Fruit Fly: A 'White Pupae' Mutant*. *Annals Of The Entomological Society Of America* 72: 583-585.
- Salvemini, M., D'amato, R., Petrella, V., Ippolito, D., Ventre, G., Zhang, Y., Saccone, G.. (2014). *Subtractive And Differential Hybridization Molecular Analyses Of Ceratitis Capitata Xx/Xy Versus Xx Embryos To Search For Male-Specific Early Transcribed Genes*. *Bmc Genetics*. 15 Suppl 2. S5. 10.1186/1471-2156-15-S2-S5.
- Salvemini, M., Robertson, M., Aronson, B., Atkinson, P., Polito, L., Saccone, G.. (2009) *Ceratitis Capitata Transformer-2 Gene Is Required To Establish And Maintain The Autoregulation Of Cctra, The Master Gene For Female Sex Determination*. *Int J Dev Biol* 53: 109-120. *The International Journal Of Developmental Biology*. 53. 109-20. 10.1387/ljdb.082681ms.
- Sánchez, L. (2008). *Sex Determining Mechanism In Insects*. *The International Journal Of Developmental Biology*. 52. 837-56. 10.1387/ljdb.072396ls.
- Sawanth, S., Gajula, G., Sambrani, N., Arunkumar, K.. (2016). *The Autoregulatory Loop: A Common Mechanism Of Regulation Of Key Sex Determining Genes In Insects*. *Journal Of Biosciences*. 41. 10.1007/S12038-016-9609-X.
- Schutt, C., Nothiger, R.. (2000). *Structure, Function And Evolution Of Sex-Determining Systems In Dipteran Insects*. *Development*. 127.
- Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P (2008) *Crispr-A Widespread System That Provides Acquired Resistance Against Phages In Bacteria And Archaea*. *Nat Rev Microbiol* 6:181–186
- Stratikopoulos, I., Augustinos, A., Petalas, Y., Vrahatis, M., Mintzas, A., Mathiopoulos, K., Zacharopoulou, A.. (2008). *An Integrated Genetic And Cytogenetic Map For The Mediterranean Fruit Fly, Ceratitis Capitata, Based On Microsatellite And Morphological Markers*. *Genetica*. 133. 147-57. 10.1007/S10709-007-9195-9.
- Sun, N., Zhao, H.. (2013) *Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): a highly efficient and versatile tool for genome editing*. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 1811–1821.
- Taning, C., Van Eynde, B., Yu, N., Ma, S., Smagge, G.. (2017). *Crispr/Cas9 In Insects: Applications, Best Practices And Biosafety Concerns*. *Journal Of Insect Physiology*. 98. 10.1016/J.Jinsphys.2017.01.007.
- Thomas, M., Heppner, J., Woodruff, R., Weems, H., Steck, G., Fasulo, T.. (2020). *Mediterranean Fruit Fly, Ceratitis Capitata (Wiedemann) (Insecta: Diptera: Tephritidae)*1.
- Urbaneja, A., Chueca, P., Montón, H., Pascual-Ruiz, S., Dembilio, Ó., Vanaclocha, P., Abad Moyano, R., Pina, T., Castañera, P.. (2009). *Chemical Alternatives To Malathion For Controlling Ceratitis Capitata (Diptera: Tephritidae), And Their Side Effects On Natural Enemies In Spanish Citrus Orchards*. *Journal Of Economic Entomology*. 102. 144-51. 10.1603/029.102.0121.
- Urbaneja, A., Domínguez, P., Tortosa, D., Dembilio, Ó., Viñuela, E.. (2004). *Efectos Secundarios De Tratamientos Cebo Usados Para El Control De "Ceratitis Capitata", Sobre Fauna Útil*. *Phytoma España: La Revista Profesional De Sanidad Vegetal*. 160. 28-41.
- Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S., Gregory, P. D.. (2010) *Genome editing with engineered zinc finger nucleases*. *Nature Rev. Genet.* 11, 636–646

- Vargas, R.I.; Mau, R.F.L.; Jang, E.B.; Faust, R.M.; Wong, L. (2008) *The Hawaii Fruit Fly Areawide Pest Management Program*. In *Areawide Pest Management: Theory And Implementation*; Koul, O., Cuperus, G., Eds.; Cabi Books: London, UK; Pp. 300–325.
- Vargas, R., Pinero, J., Leblanc, L. (2015). *An Overview Of Pest Species Of Bactrocera Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) And The Integration Of Biopesticides With Other Biological Approaches For Their Management With A Focus On The Pacific Region*. *Insects*. 6. 297-318. 10.3390/Insects6020297.
- Vreysen, M., Hendrichs, J., Enkerlin, W.R. (2006). *The Sterile Insect Technique As A Component Of Sustainable Area-Wide Integrated Pest Management Of Selected Horticultural Insect Pests*. *J. Fruit Orn. Plant Res.* 14. 107-131.
- Ward, C., Aumann, R., Whitehead, M., Nikoloulis, K., Leveque, G., Gouvi, G., Fung, E., Reiling, S., Djambazian, H., Hughes, M., Whiteford, S., Caceres-Barrios, C., Nguyen, N., Choo, A., Crisp, P., Sim, S., Geib, S., Marec, F., Haecker, I., Schetelig, M.. (2020). *White pupae genes in the Tephritids Ceratitis capitata, Bactrocera dorsalis and Zeugodacus cucurbitae: a story of parallel mutations*. 10.1101/2020.05.08.076158.
- Wilkins (1995) *moving up the hierarchy: A hypothesis on the evolution Of A Genetic Sex Determination Pathway*. *Bioessays*. 17 71–77
- Willhoeft U, Franz G (1996) *Identification Of The Sex-Determining Region Of The Ceratitis Capitata Y Chromosome By Deletion Mapping*. *Genetics* 144:737–745
- Yu, Z., Ren, M., Wang, Z., Zhang, B., Rong, Y., Jiao, R., Gao, G.. (2013). *Highly Efficient Genome Modifications Mediated By Crispr/Cas9 In Drosophila*. *Genetics*. 195. 10.1534/Genetics.113.153825.
- Zacharopoulou, A., K. Bourtzis And P. Kerremans, (1990) *A Comparison Of Polytene Chromosomes In Salivary Glands And Orbital Bristle Trichogen Cells In Ceratitis Capitata*. *Genome* 34 215-219.
- Hendrichs, J., Robinson, A.S., Cayol, J. P., WR, E.. (2009). *Medfly Areawide Sterile Insect Technique Programmes for Prevention, Suppression or Eradication: The Importance of Mating Behavior Studies*. *Florida Entomologist*. 85. 1-13. 10.1653/0015-4040(2002)085[0001:MASITP]2.0.CO;2.