

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Απομόνωση, Κλωνοποίηση και Λειτουργική Ανάλυση Οσφρητικών Υποδοχέων της Μύγας της Μεσογείου



Κλεοπάτρα Χρήστος Παπαδούλη

Επιβλέπων καθηγητής:
Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος

Λάρισα, 2022

«Απομόνωση, κλωνοποίηση και λειτουργική ανάλυση
οσφρητικών υποδοχέων της μύγας της Μεσογείου»

“Isolation, cloning and functional analysis of the
Mediterranean fly’s olfactory receptor genes”

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας, κ. Κωνσταντίνου Ματθιόπουλου.

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Γιακουντής Αντώνιος: Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Κωνσταντίνο Μαθιόπουλο, που με εμπιστεύτηκε δίνοντάς μου την ευκαιρία να ασχοληθώ πειραματικά με το συγκεκριμένο θέμα. Δείχνοντας υπομονή και κατανόηση καθοδηγούσε συνεχώς την πορεία μου με εύστοχες συμβουλές και καλοπροαίρετες κριτικές από τις οποίες κατάφερα να βελτιωθώ και να διαμορφώσω ένα νέο τρόπο επιστημονικής σκέψης.

Έπειτα, ευχαριστώ την κ. Αντωνία Σπανομήτρου, υποψήφια διδάκτορα, που ήταν πάντα ευγενική και πρόθυμη να λύσει τις απορίες μου και με βοήθησε από την πρώτη στιγμή να προσαρμοστώ στο εργαστηριακό περιβάλλον. Είμαι ευγνώμων για τη συνεργασία μου μαζί της και τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσε.

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους υπόλοιπους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου για τη θερμή υποδοχή και την προθυμία τους να με βοηθήσουν όποτε το χρειάστηκα.

Φυσικά, δε θα ξεχνούσα τον Κωνσταντίνο, την Ιωάννα και τη Βασιλική, για τις απίστευτες στιγμές που ζήσαμε μαζί κατά τη διάρκεια εκπόνησης των διπλωματικών μας. Τους εύχομαι κάθε επιτυχία και ελπίζω οι επαγγελματικές μας πορείες να μας ενώσουν ξανά στο μέλλον.

Τέλος, δεν μπορώ να παραλείψω την οικογένειά μου, και ιδιαίτερα τους γονείς μου, που με ενθαρρύνουν διαρκώς να κυνηγώ τα όνειρά μου και κατάφεραν να υποστηρίξουν τις σπουδές μου όλα αυτά τα χρόνια.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	6
1. Εισαγωγή.....	7
1.1. Χημειοαίσθηση: Αντίληψη των χημικών ενώσεων του περιβάλλοντος	7
1.2. Όσφρηση	7
1.3. Δομή και οργάνωση του οσφρητικού συστήματος της μύγας	8
1.3.1. Οσφρητικά όργανα: Κεραία και Γναθικές Προσαρκτίδες	8
1.3.2. Οσφρητικά τριχίδια (olfactory sensilla)	9
1.3.3. Οσφρητικοί νευρώνες.....	9
1.4. Βιολογικά μόρια που συμμετέχουν στην αντίληψη της όσφρησης στα έντομα ...	12
1.4.1. Οσφρητικοί Υποδοχείς (ORs).....	13
1.4.2. Ιονοτροπικοί υποδοχείς του γλουταμικού (IgluRs ή IRs).....	16
1.4.3. Πρωτεΐνες δέσμησης των οσμηγόνων (OBPs – Odorant Binding Proteins)...	18
1.5. Μεταγωγή οσφρητικού σήματος μέσω των υποδοχέων OR	19
1.6. Μέτρηση οσφρητικής ενεργοποίησης: Single Sensillum Recording	21
1.7. Επεξεργασία - κωδικοποίηση οσφρητικών σημάτων	21
1.8. Η μύγα της Μεσογείου (<i>Ceratitis capitata</i>)	26
2. Σκοπός της εργασίας	29
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	31
3.1. Σχεδιασμός Εκκινητών PCR	31
3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	32
3.3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη.....	33
3.4. Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης	35
3.5. Re-PCR.....	35
3.6. Πέψη DNA με περιοριστικά ένζυμα.....	36
3.7. Αντίδραση σύνδεσης (Ligation)	37
3.8. Κατακρήμνιση DNA	39
3.9. Μετασχηματισμός βακτηρίων <i>E.coli</i> με ηλεκτροδιάτρηση	40
3.10. Επιλογή κλώνων.....	41
3.10.1. Επιλογή μετασχηματισμένων κλώνων	41
3.10.2. Επιλογή «ανασυνδυσασμένων» κλώνων: α-συμπληρωματικότητα	41
3.11. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA – Αλκαλική λύση	42
3.11.1. Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδίου (Minipreps)	42
3.11.2. Μεγαλύτερης κλίμακας απομόνωση πλασμιδίου (Midipreps).....	44
3.12. Glycerol Stocks	45
4. Αποτελέσματα.....	45

4.1. Απομόνωση CcOr7a	45
4.2. Κλωνοποίηση CcOr7a	47
4.2.1. Εισαγωγή του μεταγράφου CcOr7a στο φορέα pBluescript II SK (+)	47
4.2.2. Εισαγωγή του μεταγράφου CcOr7a στο φορέα pUAST	48
4.3. Προετοιμασία δείγματος για μικροενέσεις.....	49
4.4. Υπόλοιποι CcORs	51
5. Σύνοψη - Συζήτηση	51
6. Βιβλιογραφικές Παραπομπές	56

Περίληψη

Δεδομένου ότι η μύγα της Μεσογείου (*Ceratitis capitata*) αποτελεί έναν από τους απειλητικότερους εχθρούς του διεθνούς εμπορίου φρούτων, ο έλεγχος των πληθυσμών της είναι ιδιαίτερα σημαντικός και πάντα επίκαιρος. Σήμερα, που οι προσπάθειες απαλλαγής από τη χρήση χημικών εντομοκτόνων είναι συνεχείς λόγω των δυσμενών επιπτώσεων στην υγεία του ανθρώπου και το περιβάλλον, οι προσεγγίσεις προστασίας των καλλιεργειών από τα έντομα οφείλουν να πληρούν τα ακόλουθα κριτήρια: να είναι συμφέρουσες σε κόστος, φιλικές προς το περιβάλλον και να χαρακτηρίζονται από ειδοειδικότητα. Μια από τις φιλικότερες προς το περιβάλλον μεθόδους είναι η εγκατάσταση εντομοπαγίδων στο πεδίο που παγιδεύουν τις μύγες με τη μέθοδο «προσέλκυσης και θανάτωσης». Εκμεταλλευόμενοι τις χημειοαισθήσεις - και ειδικότερα την αίσθηση της όσφρησης - μια ιδέα είναι να χρησιμοποιηθούν ως προσελκυστικά οσμηρές ενώσεις (οσμηγόνα) που θα προκαλέσουν την έντονη προσέλκυση των εντόμων στις παγίδες. Αυτό, ωστόσο, προαπαιτεί τη σε βάθος κατανόηση των μηχανισμών λειτουργίας του οσφρητικού συστήματος της μεσογειακής μύγας, για τους οποίους δεν γνωρίζουμε πολλά μέχρι σήμερα. Η παρούσα εργασία εστιάζει στους οσφρητικούς υποδοχείς (ORs) των εντόμων. Οι οσφρητικοί υποδοχείς είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που προσδέονται και αναγνωρίζουν οσμηγόνα, αποτελώντας το εναρκτήριο σήμα του μονοπατιού της αντίληψης των οσμών. Με γνώμονα τα δεδομένα που παρέχονται από τη *Drosophila*, στη συγκεκριμένη εργασία επιτεύχθηκε η απομόνωση και κλωνοποίηση του γονιδίου ενός οσφρητικού υποδοχέα της *C. capitata* (*CcOr7a*), που εμφανίζει πρωτεϊνική ομοιότητα με τον υποδοχέα OR7a της *D. melanogaster*. Έπειτα, το γονίδιο *CcOr7a* εισήχθη σε στελέχη της *Drosophila* με στόχο να εκφραστεί έκτοπα και να πραγματοποιηθεί λειτουργική ανάλυσή του με την τεχνική Καταγραφής Μοναδιαίου Τριχιδίου (Single Sensillum Recording, SSR). Η τεχνική αυτή μπορεί προοπτικά να οδηγήσει στη δημιουργία ισχυρότερων προσδετών του υποδοχέα *CcOR7a*, επιτρέποντας έτσι τη χρήση τους ως αποτελεσματικά ελκυστικά ειδοειδικής παγίδευσης της μεσογειακής μύγας.

Abstract

Given the fact that the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) is one of the most damaging insect pests worldwide and a serious threat of the international fruit trade, it is urgent to develop new means of its control that fulfill the criteria of low cost, eco-friendliness, and species specificity. One of the most eco-friendly control approaches is the use of “lure and kill” insect traps. Taking advantage of chemosensation and, specifically, the sense of olfaction, an option is to utilize odorants as attractants which will induce a strong attraction of the flies to the insect traps. However, that requires a deeper understanding of the Medfly’s olfactory system. The present study focuses on insect’s olfactory receptors (ORs). ORs are transmembrane proteins that initiate the odor recognition pathway by binding and recognizing odorants. Based on published data of the dipteran model organism *Drosophila melanogaster*, the present study achieved the isolation and cloning of a Medfly’s olfactory receptor gene (*CcOr7a*), which is homologous to *D. melanogaster*’s OR7a receptor. Subsequently, the *CcOr7a* gene was introduced to *Drosophila* via genetic transformation in order to be ectopically expressed and functionally analyzed via the Single Sensillum Recording (SSR) technique. This technique could potentially lead to the rational design of better ligands for *CcOR7a* receptor that could be used in more efficient and species-specific “lure and kill” traps for the Medfly.

1. Εισαγωγή

1.1. Χημειοαίσθηση: Αντίληψη των χημικών ενώσεων του περιβάλλοντος

Με τον όρο «χημειοαίσθηση» (chemosensing) εκφράζεται η ικανότητα των ζωντανών οργανισμών να αναγνωρίζουν και να επεξεργάζονται χημικές ενώσεις του εξωτερικού τους περιβάλλοντος. Αυτά τα περιβαλλοντικά χημικά ερεθίσματα λειτουργούν ως σήματα για τους οργανισμούς, τα οποία μέσω της μεταγωγής τους προκαλούν νευρολογικές αλλαγές, με αποτέλεσμα τη μεταφορά του αντίστοιχου μηνύματος στον εγκέφαλο. Τελικά, ο οργανισμός θα αποκριθεί στο εκάστοτε χημικό σήμα με την διαμόρφωση της κατάλληλης συμπεριφοράς.

Οι συμπεριφορές που ρυθμίζονται με τη βοήθεια της χημειοαίσθησης αφορούν την αναζήτηση τροφής, την αποφυγή θηρευτών, την αναγνώριση ομοειδών ατόμων, τη φροντίδα των απογόνων και την προσέλκυση συντρόφου. Αδιαμφισβήτητα, λοιπόν, η ικανότητα της απόκρισης σε χημικά σήματα είναι κρίσιμη για την επιβίωση και την αναπαραγωγή των περισσότερων οργανισμών. Μάλιστα, διαπιστώθηκε σχετικά πρόσφατα (Yohe & Brand, 2018) ότι οι χημειοαισθήσεις σχετίζονται με την υπόθεση της αισθητηριακής καθοδήγησης (sensory drive hypothesis), η οποία υποστηρίζει ότι η διαφοροποίηση της γενεαλογίας των ειδών καθοδηγείται από την προσαρμογή των αισθητήριων συστημάτων τους στις συνθήκες του τοπικού περιβάλλοντος. Ουσιαστικά, αυτό σημαίνει ότι ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος (π.χ. ποσοστό υγρασίας, σύσταση ατμοσφαιρικού αέρα, καιρικές μεταβολές), «αναπλάθονται» και μεταβάλλονται οι μηχανισμοί λειτουργίας των αισθητήριων συστημάτων (όρασης, ακοής, όσφρησης, γεύσης, αφής), ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη προσαρμογή τους. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ειδογένεση των ατόμων που ζουν σε διαφορετικά περιβάλλοντα. Το γεγονός αυτό συμβάλλει ακόμη περισσότερο στη σπουδαιότητα των χημειοαισθήσεων στην προσαρμογή των οργανισμών και την εξέλιξη των ειδών.

Στις χημειοαισθήσεις περιλαμβάνονται δύο είδη αισθήσεων: της γεύσης και της όσφρησης. Ο διαχωρισμός γίνεται ανάλογα με τις φυσικές ιδιότητες των ενώσεων που αναγνωρίζονται. Κατά κύριο λόγο, η αίσθηση της γεύσης αφορά την αντίληψη διαλυτών ενώσεων, ενώ σήματα για την όσφρηση αποτελούν πτητικές ενώσεις ποικίλων χημικών ομάδων, όπως οξέα, αλκοόλες, εστέρες ή αρωματικές ενώσεις (Keller & Vosshall, 2016). Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζει στο οσφρητικό σύστημα των εντόμων και συγκεκριμένα της μεσογειακής μύγας *Ceratitis capitata*.

1.2. Όσφρηση

Τα συστήματα όσφρησης των ζώων είναι εντυπωσιακά πολύπλοκα, αφού είναι ικανά να εντοπίζουν σχεδόν όλα τα πτητικά μόρια και να τα διαχωρίζουν με εξαιρετική ακρίβεια. Αυτό είναι εφικτό τόσο στα σπονδυλωτά όσο και στα ασπόνδυλα ζώα, παρόλο που τα οσφρητικά τους συστήματα διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό, καθώς αυτά εξελίχθηκαν ανεξάρτητα (Bargmann, 2006; Kaupp, 2010). Μεγάλο ενδιαφέρον προκαλεί η διαφορά του πλήθους των οσφρητικών νευρώνων μεταξύ θηλαστικών και εντόμων. Τα θηλαστικά περιέχουν εκατομμύρια οσφρητικούς νευρώνες στα οσφρητικά τους όργανα, ενώ τα έντομα περιέχουν σε αντίστοιχα όργανα μόνο λίγες χιλιάδες τέτοιους νευρώνες. Εντούτοις, το οσφρητικό σύστημα των εντόμων ξεπερνά σε ευαισθησία εκείνο των θηλαστικών παρά τον σημαντικά μικρότερο αριθμό νευρώνων (Sachse & Krieger, 2011). Σε κάθε περίπτωση, η διατήρηση των μηχανισμών αντίληψης των οσμών

στα είδη κατά τη διάρκεια της εξέλιξης αποδεικνύει την υψηλή σημασία της όσφρησης στην επιβίωση των οργανισμών.

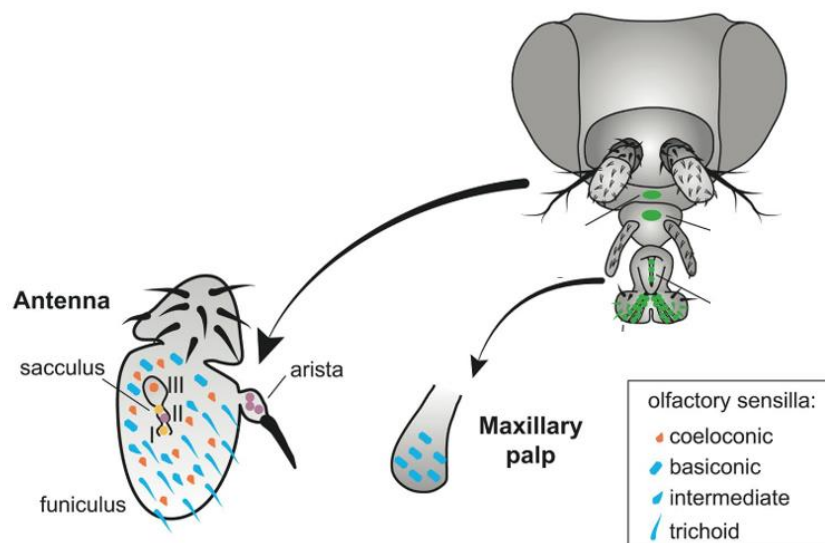
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το αποτέλεσμα της χημειοαίσθησης είναι η διαμόρφωση κατάλληλων συμπεριφορών, ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη προσαρμογή των οργανισμών στις περιβαλλοντικές συνθήκες και να εξασφαλιστεί η επιβίωση και η αναπαραγωγή τους. Με τον ίδιο τρόπο λειτουργεί και η αίσθηση της όσφρησης, κάτι που αποδεικνύεται και από δεδομένα χαρτογράφησης του εγκεφάλου, τα οποία συσχετίζουν τα οσμηγόνα μόρια (δηλ. τις χημικές ενώσεις που ενεργοποιούν την αίσθηση της όσφρησης) με εγγενείς συμπεριφορές, αλλά και συμπεριφορές που προκύπτουν από τη διαδικασία μάθησης. Στα έντομα η αντίληψη των οσμών αποτελεί ένδειξη του εντοπισμού τροφής, θέσεων ωοτοκίας, πιθανού συντρόφου ή θηρευτών. Έτσι, ένα δεδομένο οσμηγόνο δύναται να επιδρά είτε προσελκυστικά είτε απωθητικά σε ένα έντομο.

Η όσφρηση έχει ερευνηθεί εκτενώς στη μύγα των φρούτων *Drosophila melanogaster*, δεδομένου αφενός του λιγότερο περίπλοκου οσφρητικού της συστήματος και αφετέρου λόγω της απλής οργάνωσης του γονιδιώματός της, που την καθιστά άλλωστε και οργανισμό-μοντέλο της Μοριακής Βιολογίας. Έτσι, η διαθεσιμότητα πληθώρας πληροφοριών για την οργάνωση και τον τρόπο λειτουργίας της όσφρησης στη *Drosophila* καθιστά ευκολότερη τη μελέτη στοιχείων του οσφρητικού συστήματος ενός παρόμοιου οργανισμού, της φρουτόμυγας *Ceratitis capitata*.

1.3. Δομή και οργάνωση του οσφρητικού συστήματος της μύγας

1.3.1. Οσφρητικά όργανα: Κεραία και Γναθικές Προσαρκτίδες

Οι μύγες αντιλαμβάνονται τα οσμηγόνα με τη βοήθεια οσφρητικών οργάνων, που εντοπίζονται στην κεφαλή τους και παρουσιάζουν αμφίπλευρη συμμετρία. Τα όργανα αυτά είναι οι κεραίες (antennae) και οι γναθικές προσαρκτίδες (maxillary palps), τα οποία καλύπτονται στην επιφάνειά τους από οσφρητικά τριχίδια (sensilla) (Εικόνα 1).

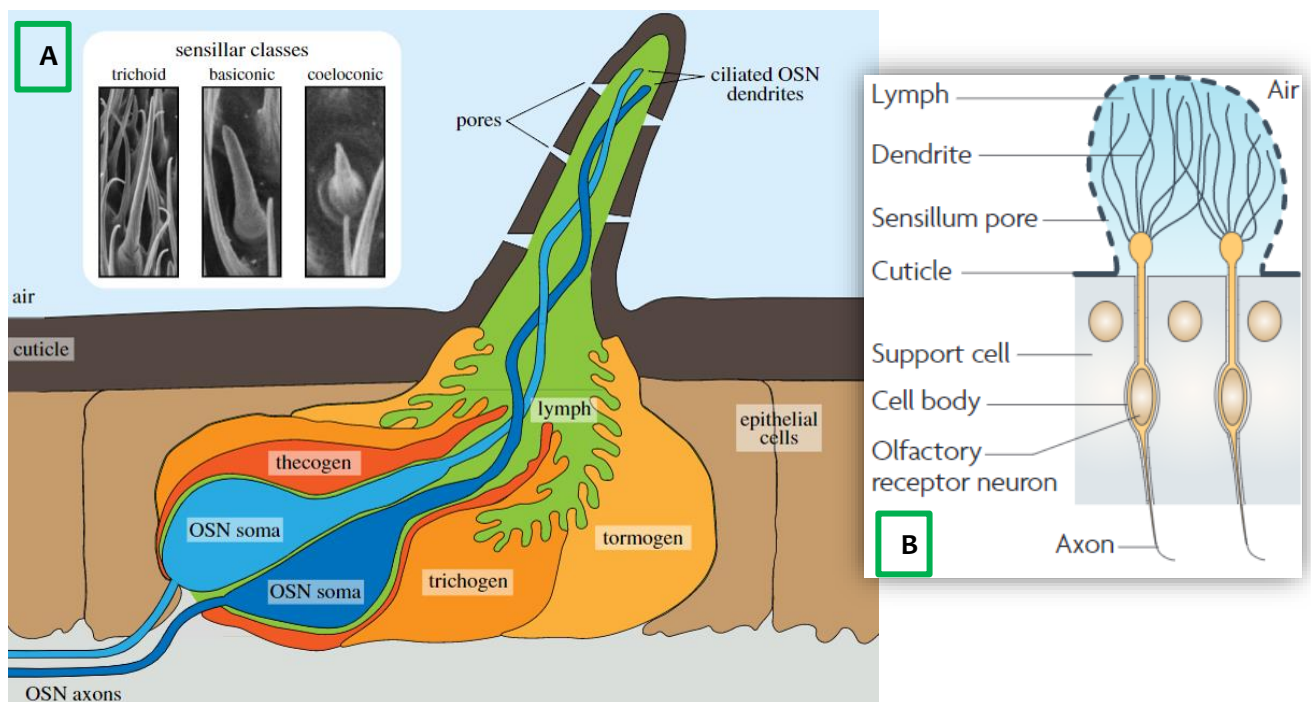


Εικόνα 1 - Η όσφρηση λαμβάνει χώρα στα οσφρητικά τριχίδια (sensilla) που εντοπίζονται στα οσφρητικά όργανα της μύγας, τα οποία είναι: οι κεραίες (antennae) και οι γναθικές προσαρκτίδες (maxillary palps). Υπάρχουν τέσσερα είδη οσφρητικών τριχιδίων (coeloconic, basiconic, intermediate, trichoid), τα οποία διακρίνονται ανάλογα με τη μορφολογία και τη λειτουργία τους (Τροποποιημένη από Wicher & Miazzi, 2021).

1.3.2. Οσφρητικά τριχίδια (olfactory sensilla)

Τα sensilla είναι προεξέχοντα αισθητήρια τριχίδια, που στο εσωτερικό τους περιέχουν από έναν μέχρι τέσσερις οσφρητικούς νευρώνες (OSNs – Olfactory Sensory Neurons), οι δενδρίτες των οποίων είναι εμποτισμένοι σε λεμφικό υγρό (Εικόνα 2). Τα αισθητήρια τριχίδια διαφέρουν μεταξύ τους στο μέγεθος, τη μορφολογία και στον τύπο των ουσιών που αναγνωρίζουν οι νευρώνες στο εσωτερικό τους. Έτσι, στην κεραία των μυγών μπορούμε να διακρίνουμε τέσσερις κατηγορίες αισθητηρίων τριχιδίων: τα κοιλοκωνικά (coeloconic), τα βασικωνικά (basiconic), τα ενδιάμεσα (intermediate) και τα τριχοειδή (trichoid) (Εικόνα 1). Από αυτά, μόνο τα κοιλοκωνικά, τα βασικωνικά και τα τριχοειδή είναι οσφρητικά τριχίδια, δηλαδή περιέχουν οσφρητικούς νευρώνες (Εικόνα 2Α).

Οι γναθικές προσαρκτίδες έχουν απλούστερη δομή από τις κεραίες και περιλαμβάνουν μόνο βασικωνικά τριχίδια (Vosshall & Stocker, 2007)(Εικόνα 1), τα οποία φτάνουν τα 60 σε αριθμό και στο εσωτερικό τους φιλοξενούν δύο οσφρητικούς νευρώνες.



Εικόνα 2 – (Α) Δομή ενός οσφρητικού τριχιδίου (olfactory sensillum). Το οσφρητικό τριχίδιο της εικόνας περιέχει στο εσωτερικό του δύο οσφρητικούς νευρώνες (OSNs) με μπλε χρώμα, μέσα σε λεμφικό υγρό που απεικονίζεται με πράσινο. Τα μόρια των οσμών φτάνουν στους OSNs αφού περάσουν από τους επιδερμικούς πόρους του τριχιδίου. Το τριχίδιο, επίσης, αποτελείται από βοηθητικά κύτταρα (thecogen, trichogen, tormogen, epithelial), τα οποία έχουν υποστηρικτικό ρόλο. (Schmidt & Benton, 2020). (Β) Δομή οσφρητικών νευρώνων της μύγας μέσα σε ένα οσφρητικό τριχίδιο. Το επάνω μέρος των νευρώνων αποτελείται από πολλούς δενδρίτες, όπου εντοπίζονται και οι οσφρητικοί υποδοχείς (ORs). Οι δενδρίτες ενώνονται στη συνέχεια με το κυτταρικό σώμα του νευρώνα, από τη βάση του οποίου εκτείνεται ένας νευράξονας που θα καταλήξει στον εγκέφαλο της μύγας (Kaupr, 2010).

1.3.3. Οσφρητικοί νευρώνες

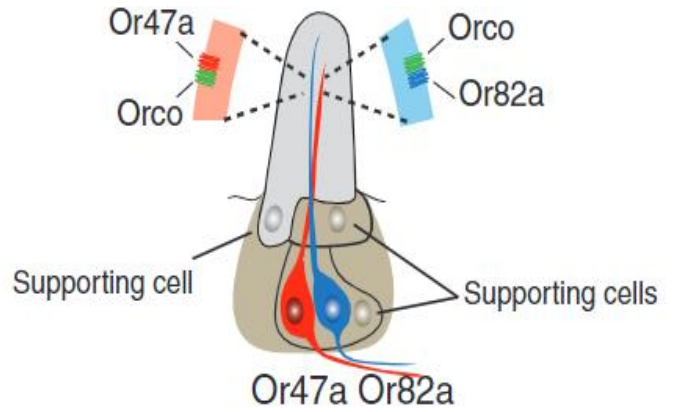
Στην αγγλική βιβλιογραφία επικρατούν δύο συντομογραφίες των οσφρητικών νευρώνων: OSNs (Olfactory Sensory Neurons) και ORNs (Olfactory Receptor Neurons). Η δεύτερη αναφέρεται στην ικανότητα έκφρασης πρωτεϊνών από τους οσφρητικούς

νευρώνες, ικανών να δεσμεύουν και να αναγνωρίζουν τα διαφορετικά μόρια των οσμών. Αυτές οι πρωτεΐνες ονομάζονται οσφρητικοί υποδοχείς (ORs – Olfactory Receptors) και θα αναφερθώ εκτενέστερα σε αυτούς στην Ενότητα 1.4.1.

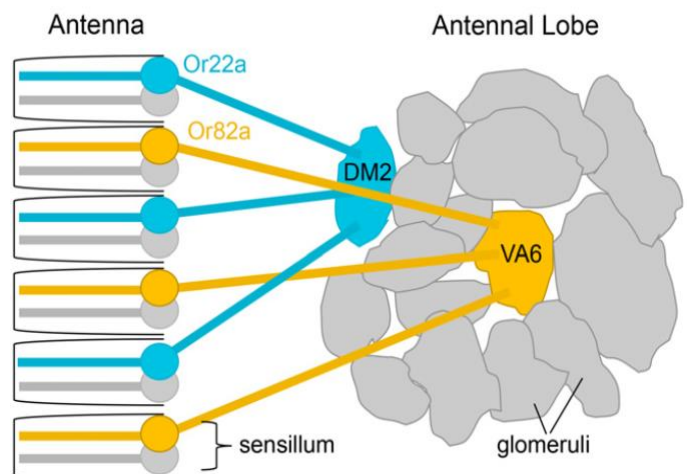
Όσον αφορά τη μορφολογία των οσφρητικών νευρώνων της μύγας, πρόκειται για διπολικά κύτταρα. Από την κορυφή του κυτταρικού σώματος εκφύονται δενδρίτες, στη μεμβράνη των οποίων εντοπίζονται οι οσφρητικοί υποδοχείς (ORs) (Εικόνα 2Α,Β, Εικόνα 3). Οι δενδρίτες αυτοί είναι εμποτισμένοι σε λεμφικό υγρό και βρίσκονται τοποθετημένοι στο εσωτερικό των πορωδών οσφρητικών τριχιδίων (Εικόνα 2). Με αυτή την οργάνωση επιτυγχάνεται στενότερη εγγύτητα των νευρικών αισθητήριων μεμβρανών με το περιβάλλον των οσμών, ενώ παράλληλα αποτρέπονται τυχόν φυσικές βλάβες τους (Schmidt & Benton, 2020). Από τη βάση του σώματος του νευρώνα εκτείνεται ένας νευράξονας, ο οποίος θα καταλήξει στον εγκέφαλο του εντόμου.

Οι άξονες των οσφρητικών νευρώνων καταλήγουν απευθείας στον εγκέφαλο της μύγας (Sachse & Krieger, 2011), και συγκεκριμένα σε σφαιρικές περιοχές νευρικών συνάψεων, που ονομάζονται σπειράματα (glomeruli), στο λοβό της κεραίας (antennal lobe) (Εικόνα 4, Εικόνα 5). Από εκεί, και με τη βοήθεια μετασυναπτικών νευρώνων προβολής (projection neurons), το μήνυμα του οσμηγόνου μεταφέρεται σε ανώτερα κέντρα του εγκεφάλου, όπως τα μανιταροειδή σωματίδια (mushroom bodies), τα οποία είναι υπεύθυνα για την οσφρητική μάθηση και μνήμη, και το πλευρικό κέρασ του πρωτεγκεφάλου (lateral horn) (Εικόνα 5, Εικόνα 6). Στην Ενότητα 1.7. περιγράφονται αναλυτικότερα οι στρατηγικές με τις οποίες ο εγκέφαλος του εντόμου επεξεργάζεται και αποκωδικοποιεί την οσφρητική πληροφορία.

Όσον αφορά τον λοβό της κεραίας, αυτός αποτελείται από περίπου 50 σπειράματα (glomeruli) και η οργάνωση των οσφρητικών νευρώνων σε αυτά τα σημεία είναι στερεότυπη. Πιο συγκεκριμένα, κάθε οσφρητικός νευρώνας παράγει μόνο έναν συμβατικό οσφρητικό υποδοχέα OR (πέρα από τον Orco, που θα αναφερθεί στην Ενότητα 1.4. και του οποίου το γονίδιο εκφράζεται σε όλους τους οσφρητικούς νευρώνες). Έτσι, όλοι οι οσφρητικοί

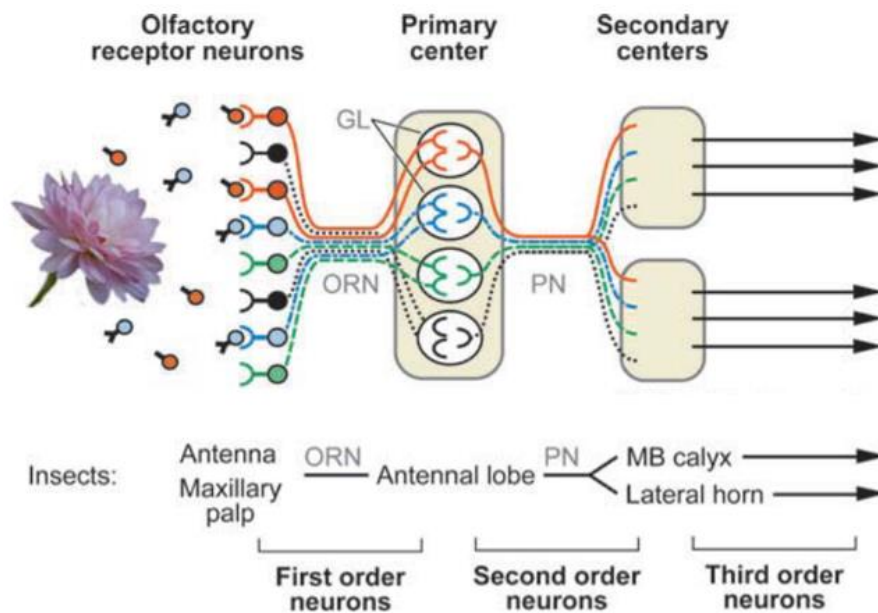


Εικόνα 3 - Κάθε οσφρητικός νευρώνας εκφράζει συγκεκριμένους οσφρητικούς υποδοχείς. Εδώ ο νευρώνας με το κόκκινο χρώμα εκφράζει τον υποδοχέα Or47a, ενώ ο νευρώνας που αποτυπώνεται με γαλάζιο εκφράζει τον Or82a (Barish & Volkan, 2015).

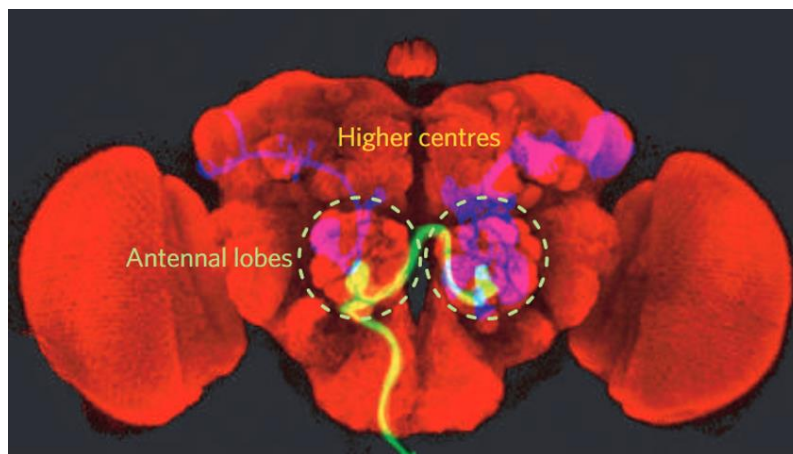


Εικόνα 4 - Οσφρητικοί νευρώνες που εκφράζουν τον ίδιο οσφρητικό υποδοχέα (OR) προεκβάλλουν στις ίδιες σπειραματικές περιοχές του λοβού της κεραίας στον εγκέφαλο της μύγας. Στην εικόνα φαίνεται ότι διαφορετικοί νευρώνες από διαφορετικά τριχίδια των οσφρητικών οργάνων (κεραίας ή γναθικών προσαρτημάτων) και οι οποίοι εκφράζουν τον υποδοχέα Or22a προβάλλουν τις απολήξεις των νευραξόνων τους στο ίδιο σπείραμα (glomerulus) του λοβού της κεραίας: DM2. Παράλληλα, οι νευρώνες που εκφράζουν τον Or82a καταλήγουν στο σπείραμα VA6 (Eliason et al., 2018).

νευρώνες που εκφράζουν τον ίδιο υποδοχέα OR, καταλήγουν στο ίδιο, μοναδικό σπείραμα (glomerulus) του λοβού της κεραίας (Εικόνα 4).



Εικόνα 5 – Μονοπάτι του μηχανισμού όσφρησης της *Drosophila melanogaster*. Τα μόρια της οσμής προσδένονται στους αντίστοιχους οσφρητικούς υποδοχείς που τις αναγνωρίζουν, οι οποίοι εκφράζονται από τους πρώτης τάξης οσφρητικούς νευρώνες (ORNs) της κεραίας ή των γναθικών προσαρκτίδων. Στη συνέχεια, όμοιοι νευρώνες (που εκφράζουν τον ίδιο οσφρητικό υποδοχέα) συγκλίνουν στα επιμέρους σπείράματα (GL- glomeruli), τα οποία είναι περιοχές εντοπισμού πληθώρας συνάψεων και βρίσκονται στο λοβό της κεραίας (antennal lobe) του εγκεφάλου της μύγας. Στα σπείράματα οι οσφρητικοί νευρώνες σχηματίζουν συνάψεις με δεύτερης τάξης νευρώνες προβολής (PNs- projection neurons), που με τη σειρά τους καταλήγουν σε ανώτερα τμήματα του εγκεφάλου (MB calyx, Lateral horn), από όπου μεταδίδουν νευρικά σήματα σε τρίτης τάξης νευρώνες, επεκτείνοντας έτσι την οσφρητική πληροφορία στον υπόλοιπο εγκέφαλο. Εικόνα από Vosshall & Stocker, 2007.



Εικόνα 6 – Επάλληλες φωτογραφίες απεικόνισης εγκεφάλων της *Drosophila* με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας. Με κίτρινο χρώμα επισημαίνονται άξονες οσφρητικών νευρώνων, που προεκβάλλουν από τα αισθητήρια όργανα (κεραία, γναθικές προσαρκτίδες) στους λοβούς της κεραίας (antennal lobes – πράσινοι διακεκομμένοι κύκλοι). Από το λοβό της κεραίας, οι οσφρητικοί νευρώνες συνδέονται με μετέπειτα νευρώνες προβολής (σήμανση με μωβ χρώμα), οι οποίοι με τη σειρά τους καταλήγουν σε ανώτερα κέντρα του εγκεφάλου, όπως είναι τα μανιταροειδή σωμάτια (mushroom bodies) και ο πλευρικός πρωτεγκεφαλος (lateral protocerebrum/horn) (Bargmann, 2006).

1.4. Βιολογικά μόρια που συμμετέχουν στην αντίληψη της όσφρησης στα έντομα

Στη *Drosophila melanogaster* έχουν ανακαλυφθεί τρία είδη χημειοαισθητήριων υποδοχέων:

- 1) οι οσφρητικοί υποδοχείς (ORs - Olfactory Recceptors)
- 2) οι γευστικοί υποδοχείς (GRs - Gustatory Recceptors) και
- 3) οι ιοντοτροπικοί υποδοχείς του γλουταμικού (IRs - Ionotropic Recceptors)

Από αυτούς, μόνο οι οσφρητικοί και ορισμένοι ιοντοτροπικοί υποδοχείς εκφράζονται σε οσφρητικούς νευρώνες και, κατά συνέπεια, έχουν την ικανότητα να αντιλαμβάνονται οσμηγόνες ενώσεις.

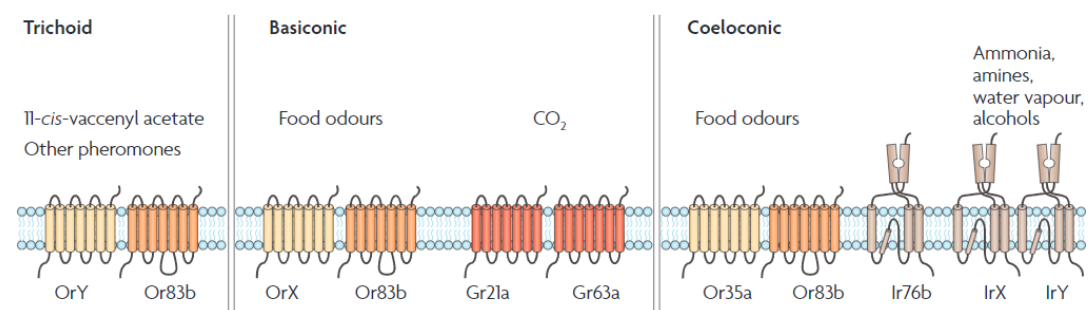
Στην Εικόνα 7 υποδεικνύεται ο εντοπισμός των παραπάνω ειδών χημειοαισθητικών υποδοχέων στα διαφορετικά μορφολογικά είδη αισθητήριων τριχιδίων (sensilla). Παρατηρούμε ότι οι υποδοχείς OR εκφράζονται σε όλα τα οσφρητικά τριχίδια (βασικωνικά, κοιλοκωνικά και τριχοειδή), ενώ οι IRs εκφράζονται στους νευρώνες των κοιλοκωνικών και οι GRs σε αυτούς των βασικωνικών τριχιδίων.

Κάθε οσφρητικός νευρώνας εκφράζει τα γονίδια δύο διαφορετικών οσφρητικών ή ιοντοτροπικών υποδοχέων (OR ή IR):

- 1) ενός μοναδικού υποδοχέα, ο οποίος είναι εξειδικευμένος στην αναγνώριση συγκεκριμένων πτητικών μορίων και
- 2) ενός συνυποδοχέα, που εκφράζεται από όλους τους οσφρητικούς νευρώνες.

Για τους OR ο συνυποδοχέας είναι ο Or83b ή αλλιώς Orco (Olfactory Recceptor Co-receptor), ενώ για τους IR το ρόλο συνυποδοχέα διαδραματίζει είτε ο Ir8a, είτε ο Ir25a (Schmidt & Benton, 2020). Οι συνυποδοχείς αυτοί δημιουργούν ετερομερή σύμπλοκα με τους συμβατικούς υποδοχείς. Με αυτό τον τρόπο, συμβάλλουν στη μεμβρανική στόχευση των συμπλόκων στους δενδρίτες των οσφρητικών νευρώνων και παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος.

Στην Εικόνα 7 φαίνονται, επίσης, τα ετερομερή σύμπλοκα των OR με τον Orco (Or83b).



Εικόνα 7 - Εντοπισμός των χημειοαισθητικών υποδοχέων (OR, GR και IR) στα αισθητήρια τριχίδια των μυγών. Οι ORs εμφανίζονται και στα τρία είδη τριχιδίων (τριχοειδή, βασικωνικά, κοιλοκωνικά) και είναι ικανοί να αναγνωρίζουν ένα ευρύ φάσμα πτητικών μορίων, τα οποία συνήθως είτε είναι φερομόνες, είτε είναι οσμές που προέρχονται από τροφικές πηγές. Οι IR υποδοχείς εντοπίζονται στα κοιλοκωνικά τριχίδια, ενώ οι υποδοχείς γεύσης GR εκφράζονται σε αισθητήριους νευρώνες των βασικωνικών τριχιδίων. (Kaupr, 2010) (OrX, OrY: οποιοσδήποτε συμβατικός OR υποδοχέας).

1.4.1. Οσφρητικοί Υποδοχείς (ORs)

Η *Drosophila* διαθέτει συνολικά 62 πρωτεϊνικούς υποδοχείς OR, οι οποίοι προέρχονται από την έκφραση 60 γονιδίων του γονιδιώματός της, ύστερα από εναλλακτικό μάτισμα. Οι αμινοξικές αλληλουχίες των 62 αυτών υποδοχέων διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους, εμφανίζοντας ομολογία σε ποσοστό μικρότερο του 20% (Song et al., 2008).

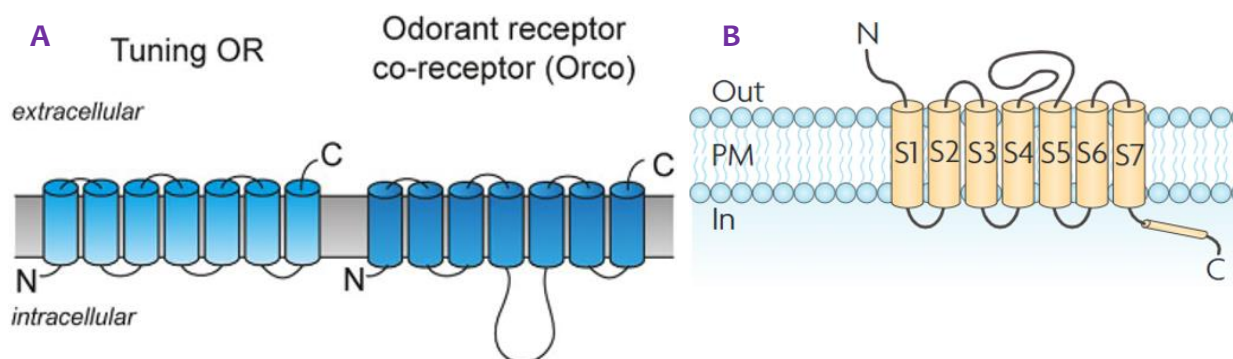
Παρά τον περιορισμένο αριθμό γονιδίων οσφρητικών υποδοχέων που διαθέτουν οι μύγες, έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν πολύ μεγαλύτερο αριθμό οσμηγόνων μορίων. Κατά συνέπεια, όπως αναλύεται και στην Ενότητα 1.7., ένας δεδομένος οσφρητικός υποδοχέας δύναται να αναγνωρίσει παραπάνω από μία διαφορετικές οσμηγόνες ενώσεις.

Δομή

Οι υποδοχείς OR είναι μη-εκλεκτικά προσδετοεξαρτώμενα κανάλια ιόντων Na^+ , K^+ και Ca^{2+} με 7 διαμεμβρανικές περιοχές. Έχουν, δηλαδή, δομή ενός GPCR υποδοχέα. Ωστόσο διαφέρουν σημαντικά από αυτούς, εφόσον:

- α) δεν παρουσιάζουν ομολογία στην αμινοξική αλληλουχία τους (Nordström et al., 2011)
- β) τα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα τους εμφανίζουν διαφορετική τοπολογία (Εικόνα 8).

Πιο συγκεκριμένα, τα άκρα των GPCR υποδοχέων των θηλαστικών τοποθετούνται με το N-τελικό άκρο στο εξωκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα και το C-τελικό ενδοκυτταρικά. Η τοπολογία αυτή είναι αντίστροφη από εκείνη των εντόμων, των οποίων οι οσφρητικοί υποδοχείς έχουν το N-τελικό άκρο ενδοκυτταρικά και το C-τελικό άκρο εξωκυτταρικά (Benton et al., 2006).



Εικόνα 8 – Τοπολογία άκρων των οσφρητικών υποδοχέων OR (A) των εντόμων και (B) των θηλαστικών. Στους OR των εντόμων, το N-τελικό άκρο βρίσκεται ενδοκυτταρικά. Αντιστρόφως, οι οσφρητικοί υποδοχείς των θηλαστικών έχουν το N-τελικό τους άκρο εξωκυτταρικά. Εικόνα A: από Wicher & Miazzi, 2021. Εικόνα B: από Kaupp, 2010.

Ρόλος συνυποδοχέα Orco

Η πρωτεΐνη Orco αποτελεί μια ιδιαίτερη περίπτωση οσφρητικού υποδοχέα, καθώς δεν λειτουργεί όπως οι συμβατικοί ORs, αλλά δρα επικουρικά ως συνυποδοχέας. Στη *Drosophila* το ρόλο του Orco διαδραματίζει ο Or83b.

Ο Orco αποτελεί μοναδικό χαρακτηριστικό του οσφρητικού συστήματος των εντόμων, καθώς το οσφρητικό των θηλαστικών δεν χρησιμοποιεί πρωτεΐνες με παρόμοια λειτουργία. Η σημασία του συνυποδοχέα αποδεικνύεται κατ' αρχάς από το γεγονός ότι ανάμεσα στα διάφορα είδη εντόμων διατηρεί πολύ υψηλή ομολογία αμινοξικής αλληλουχίας, με τα πιο συντηρημένα κατάλοιπα να εντοπίζονται στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης (Butterwick et al., 2018). Κατά δεύτερο λόγο, παράγεται από όλους τους οσφρητικούς νευρώνες, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι είναι απαραίτητος για την αντίληψη της όσφρησης. Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας ή η μεταγραφική σίγηση του Orco αφαιρεί από τα έντομα την ικανότητα όσφρησης, προκαλώντας ελαττωματικές συμπεριφορές (Fan et al., 2022; Gao et al., 2020; Sun et al., 2023; Tsoumani et al., 2020; Yan et al., 2017).

Ο Orco δεν μπορεί από μόνος του να αντιληφθεί οσμηγόνα μόρια (Elmore et al., 2003), αντίθετα δημιουργεί ετερομερή σύμπλοκα με τους συμβατικούς ORs (οι οποίοι είναι ικανοί να προσδέουν τα οσμηγόνα) και έχει βρεθεί ότι συμμετέχει σε δύο απαραίτητα βήματα για την αντίληψη της όσφρησης (Benton et al., 2006; Larsson et al., 2004):

- 1) στην στόχευση των συμπλόκων OrX/Orco στη μεμβράνη των δενδριτών των οσφρητικών νευρώνων (Εικόνα 3) εσωτερικά των οσφρητικών τριχιδίων, όπου λαμβάνει χώρα η μεταγωγή σήματος, και
- 2) στη διατήρηση των συμπλόκων σε αυτές τις περιοχές.

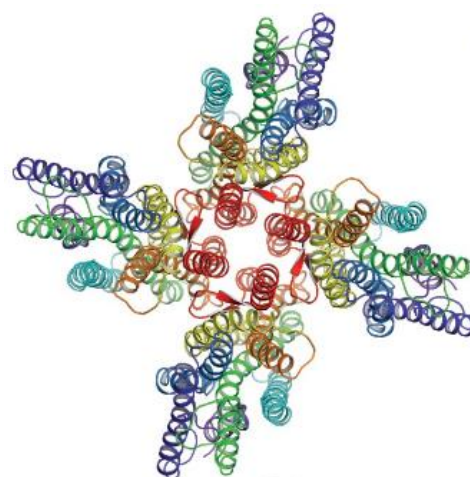
Τα ετερομερή σύμπλοκα που σχηματίζει ο Orco με τους συμβατικούς ORs είναι άγνωστης στοιχειομετρίας, και μία σχετικά πρόσφατη έρευνα (Butterwick et al., 2018) αναφέρει ότι τα σύμπλοκα αυτά είναι τετραμερή. Στο εσωτερικό του συμπλόκου δημιουργείται ένας πόρος, που αποτελεί και το κανάλι από το οποίο εισέρχονται τα κατιόντα K^+ , Na^+ και Ca^{2+} (Εικόνα 9).

Η διαπερατότητα του πόρου ρυθμίζεται τόσο από τον συνυποδοχέα Orco, όσο και από τον εκάστοτε OR με τον οποίο δημιουργεί σύμπλοκο (Pask et al., 2012). Μάλιστα, ο συνδυασμός του Orco με διαφορετικές OR πρωτεΐνες οδηγεί σε διαφορές στη διαπερατότητα των συμπλόκων σε μονοσθενή και δισθενή ιόντα (Nakagawa et al., 2012).

Συνεπώς, ο Orco θα μπορούσε να χαρακτηριστεί το σημαντικότερο τμήμα των λειτουργικών οσφρητικών υποδοχέων. Αυτό συμβαίνει επειδή είναι απαραίτητος, πρώτον, για τη στόχευση του συμπλόκου OrX/Orco στις θέσεις μεταγωγής του σήματος της οσμής και, δεύτερον, για τη δημιουργία του πόρου του καναλιού ιόντων, που καθιστά λειτουργικό το κανάλι και εφικτή την αίσθηση της όσφρησης.

Πρόσδεση των οσμηγόνων - Εξειδίκευση

Οι συμβατικοί ORs περιέχουν τη θέση αναγνώρισης και πρόσδεσης των οσμηγόνων. Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο γίνεται η σύνδεση των μορίων-προσδετών στους υποδοχείς δεν έχει αποσαφηνιστεί.



Εικόνα 9 – Ομοτετραμερές σύμπλοκο Orco του εντόμου *Aprocyta bakeri* (επάνω όψη). Το σύμπλοκο δημιουργεί στο κέντρο έναν πόρο απ' όπου περνάνε τα ιόντα. Η εικόνα είναι ενδεικτική της δομής των ετεροτετραμερών συμπλόκων OrX/Orco. (Butterwick et al., 2018).

Η ικανότητα αυτή ορισμένων οσφρητικών υποδοχέων να αναγνωρίζουν ποικίλα οσμηγόνα των ίδιων χημικών ομάδων συνεπάγεται τον αποκλεισμό του τύπου αλληλεπίδρασης «κλειδιού – κλειδαριάς» μεταξύ υποδοχέα και οσμηρής ένωσης. Αντ' αυτού, μία δομική έρευνα του Or5 του εντόμου *Machilis hrabei* απέδειξε ότι στο διαμεμβρανικό κομμάτι κάθε υπομονάδας του τετραμερούς υποδοχέα εντοπίζεται μία θέση σύνδεσης (binding pocket) των προσδετών με απλή γεωμετρία, όπου υπάρχουν ατάκτως κατανεμημένα υδροφοβικά και αρωματικά κατάλοιπα (del Marmol et al., 2021). Τα οσμηγόνα δύνανται να προσδεθούν σε διαφορετικές προσόψεις της θέσης αυτής, με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η πρόσδεση διαφορετικών ενώσεων στον υποδοχέα, οι οποίες όμως ανήκουν σε παρόμοιες χημικές ομάδες ή ακόμη η ίδια ένωση να μπορεί να συνδεθεί στην πρωτεΐνη με διαφορετικούς προσανατολισμούς.

Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις (Maniati et al., 2017) ότι οι οσφρητικοί υποδοχείς της *Drosophila* αναγνωρίζουν διαφορές στα φάσματα δόνησης των μορίων των προσδετών τους και γι' αυτό το λόγο δύο μόρια που έχουν παρόμοιο φάσμα δόνησης δύνανται να προκαλέσουν την ίδια απόκριση του υποδοχέα. Έτσι συμπεραίνουμε ότι ο χαρακτήρας ενός οσμηγόνου κατά κύριο λόγο εξαρτάται από τις χαρακτηριστικές ομάδες του μορίου και όχι από το μόριο καθαυτό. Με αυτό τον τρόπο, λοιπόν, ένας υποδοχέας μπορεί να αποκριθεί σε ενώσεις με ίδιες χαρακτηριστικές χημικές ομάδες, κάτι που συμφωνεί μέχρι ενός σημείου και με τα αποτελέσματα της έρευνας των del Marmol et al., 2021.

Λειτουργία «βηματοδότη»

Ακόμη ένα χαρακτηριστικό των συμπλόκων OrX-Orco είναι ότι ορισμένοι από αυτούς έχουν ιδιόσυστατη λειτουργία, που χρησιμοποιείται ως «βηματοδότης» για τους οσφρητικούς νευρώνες (Sato et al., 2008; Wicher et al., 2008) και η οποία καθορίζεται από τον συγκεκριμένο “OrX” υποδοχέα που εκφράζεται από το νευρώνα (Hallem et al., 2004).

Ως γνωστόν, ένα οσμηγόνο δύναται να αναστέλλει ή να ενεργοποιεί έναν δεδομένο OR και κατ' επέκταση τον νευρώνα που τον εκφράζει. Προκειμένου το οσμηγόνο να μπορέσει να προκαλέσει την ανασταλτική απόκριση του νευρώνα, πρέπει προηγουμένως ο νευρώνας αυτός να παρουσιάζει μία μικρή δραστηριότητα, που σημαίνει ότι οι οσφρητικοί υποδοχείς, φυσιολογικά, λειτουργούν ιδιόσυστατα σε χαμηλή ένταση στη μεμβράνη των δενδριτών.

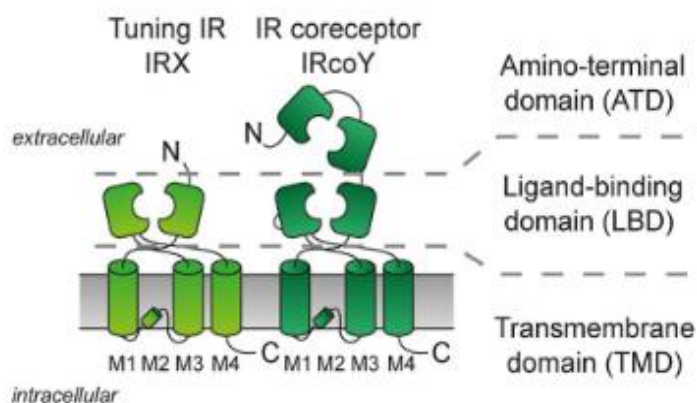
1.4.2. Ιοντοτροπικοί υποδοχείς του γλουταμικού (IgluRs ή IRs)

Στα κοιλοκωνικά τριχίδια της κεραίας συναντώνται δύο τύποι οσφρητικών νευρώνων: εκείνοι που εκφράζουν OR πρωτεΐνες κι αυτοί που εκφράζουν IR υποδοχείς (Εικόνα 7).

Οι IRs αποτελούν μη-εκλεκτικά κανάλια κατιόντων (K^+ , Na^+ και ορισμένα Ca^{2+}), τα οποία έχουν ομολογία με τους ιοντοτροπικούς υποδοχείς του γλουταμικού. Εντούτοις, εμφανίζουν σημαντικές διαφορές σε κατάλοιπα που εντοπίζονται στην επικράτεια πρόσδεσης του γλουταμικού. Κατά συνέπεια, δεν μπορούν να αναγνωρίζουν το γλουταμικό, ωστόσο αναγνωρίζουν και προσδέουν άλλα χημικά μόρια (Spletter & Luo, 2009).

Δομή

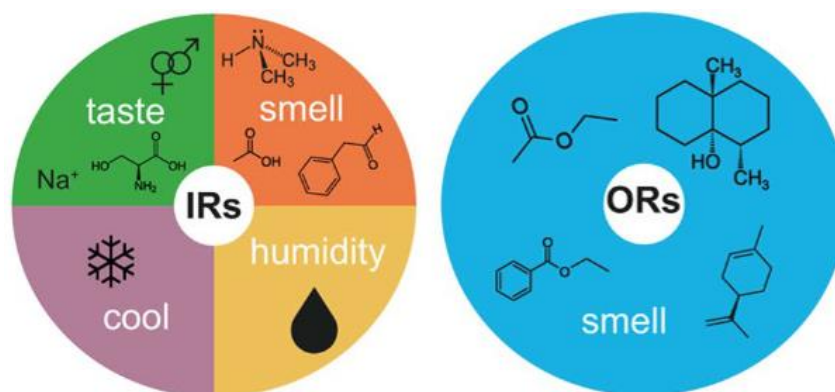
Οι συγκεκριμένοι υποδοχείς αγκυροβολούνται στη δενδριτική μεμβράνη των χημειοαισθητήριων νευρώνων μέσω των τεσσάρων διαμεμβρανικών τμημάτων τους. Το N-τελικό άκρο εντοπίζεται εξωκυτταρικά, όπου τοποθετείται και η επικράτεια σύνδεσης των προσδετών, ενώ το C-τελικό άκρο εντοπίζεται στο ενδοκυτταρικό τμήμα των υποδοχέων (Εικόνα 11). Ομοίως με τους ORs και όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο μέρος της ενότητας, οι IRs λειτουργούν σε ετερομερή σύμπλοκα με αντίστοιχους IR συνυποδοχείς. Στη *Drosophila* το ρόλο των συνυποδοχέων εκτελούν οι Ir8a και Ir25a (Wicher & Miazzi, 2021).



Εικόνα 11 - Δομή υποδοχέων IR. Οι IRs αποτελούνται από 4 διαμεμβρανικές α-έλικες και η επικράτεια σύνδεσης των προσδετών τους εντοπίζεται εξωκυτταρικά. Το N-τελικό άκρο τους βρίσκεται εξωκυτταρικά, ενώ το C-τελικό ενδοκυτταρικά. Οι IRs επίσης λειτουργούν με τη βοήθεια αντίστοιχων IR συνυποδοχέων (Wicher & Miazzi, 2021).

Λειτουργία

Σε αντίθεση με τους OR, που συμμετέχουν αποκλειστικά στην όσφρηση, οι IR υποδοχείς θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν πολυλειτουργικά μόρια. Επιπρόσθετα του ρόλου τους στο οσφρητικό σύστημα, συμμετέχουν στην αίσθηση της γεύσης, της υγρασίας και της ψυχρής θερμοκρασίας (Εικόνα 12). Με αυτό τον τρόπο συμβάλλουν στο συγχρονισμό των κιρκάδιων ρυθμών (Rimal & Lee, 2018).



Εικόνα 12 – Πολυδιάστατος ρολός των υποδοχέων IR (Τροποποιημένη από Wicher & Miazzi, 2021).

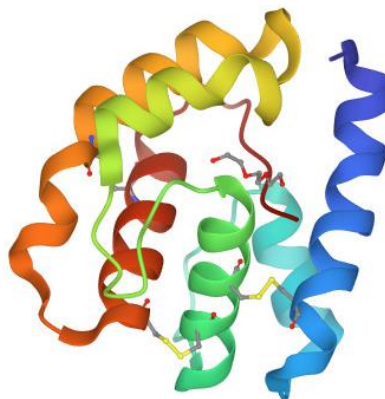
Οι IRs κυρίως αναγνωρίζουν αμίνες και υδρόφιλα οξέα, συμπληρώνοντας, έτσι, το ευρύ φάσμα αναγνώρισης εστέρων και αλκοολών των ORs. Ωστόσο, υπάρχουν και

οσμηγόνες ενώσεις που αναγνωρίζονται και από τους δύο τύπους υποδοχέων (Silbering et al., 2011).

1.4.3. Πρωτεΐνες δέσμευσης των οσμηγόνων (OBPs – Odorant Binding Proteins)

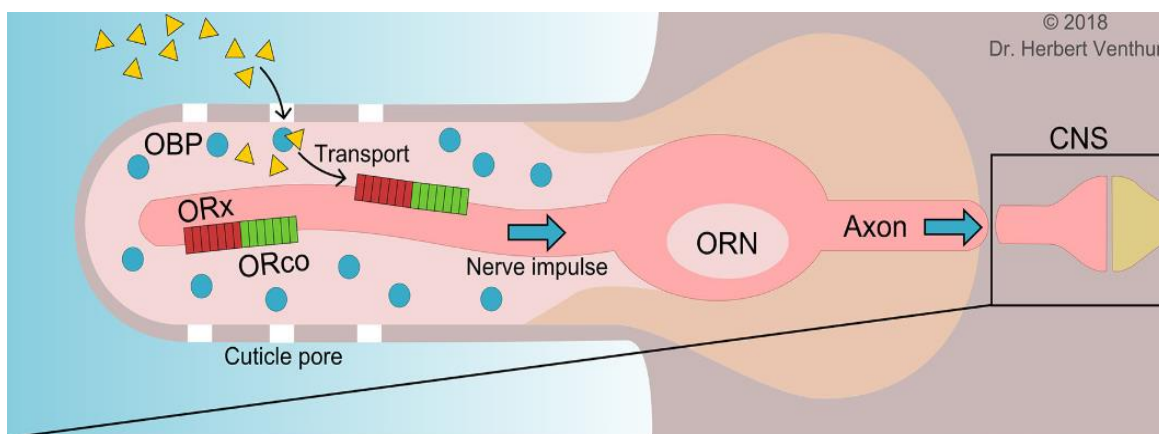
Οι οσφρητικοί υποδοχείς αποτελούν το πρώτο βήμα της αναγνώρισης και επεξεργασίας των χημικών σημάτων των οσμών. Ωστόσο, αποτελούν μόνο ένα κομμάτι ενός ολοκληρωμένου συνεργατικού συστήματος, το οποίο συνίσταται από δίκτυα πρωτεϊνών, οργανίδια και κυτταρικές αλληλεπιδράσεις, με όλα αυτά να επηρεάζουν, τελικά, το πώς γίνονται αντιληπτά τα οσμηγόνα μόρια.

Ένα άλλο τμήμα αυτού του οργανωμένου συστήματος αποτελούν οι πρωτεΐνες δέσμευσης των οσμηγόνων (OBPs). Πρόκειται για μικρές πρωτεΐνες, που αποτελούνται κυρίως από α-έλικες (Εικόνα 13), εντοπίζονται στη λέμφο των οσφρητικών τριχιδίων και ο ρόλος τους έγκειται στη διαλυτοποίηση των υδροφοβικών οσμηγόνων μορίων και τη μεταφορά τους στους οσφρητικούς υποδοχείς OR (Leal, 2013).



Εικόνα 13 – Τρισδιάστατη απεικόνιση της δομής της πρωτεΐνης OBP LUSH της *Drosophila melanogaster*. PDB ID: 2QDI

Ουσιαστικά, οι OBPs προσδένουν τα οσμηγόνα μόλις εισέλθουν από τους πόρους των τριχιδίων, τα μεταφέρουν διαμέσου του υδαρούς λεμφικού υγρού και τελικά τα απελευθερώνουν στις μεμβράνες των οσφρητικών δενδριτών, ώστε να συνδεθούν με τους αντίστοιχους ORs (Εικόνα 14). Με αυτό τον τρόπο, θεωρητικά μπορούν να επηρεάσουν την ευαισθησία των οσφρητικών υποδοχέων.



Εικόνα 14 – Μεταφορά οσφρητικών μορίων από τις OBPs. Τα οσμηγόνα μόρια (κίτρινο) με την είσοδό τους από τους πόρους των οσφρητικών τριχιδίων προσδένονται στις πρωτεΐνες OBPs (μπλε). Οι τελευταίες, μεταφέρουν τα οσμηγόνα διαμέσου του λεμφικού υγρού στα σύμπλοκα ORX-ORCO, που βρίσκονται εντοπισμένα στους δενδρίτες των οσφρητικών νευρώνων, προκαλώντας εκπόλωση του οσφρητικού νευρικού κυττάρου και μεταφορά του σήματος στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Venthur & Zhou, 2018).

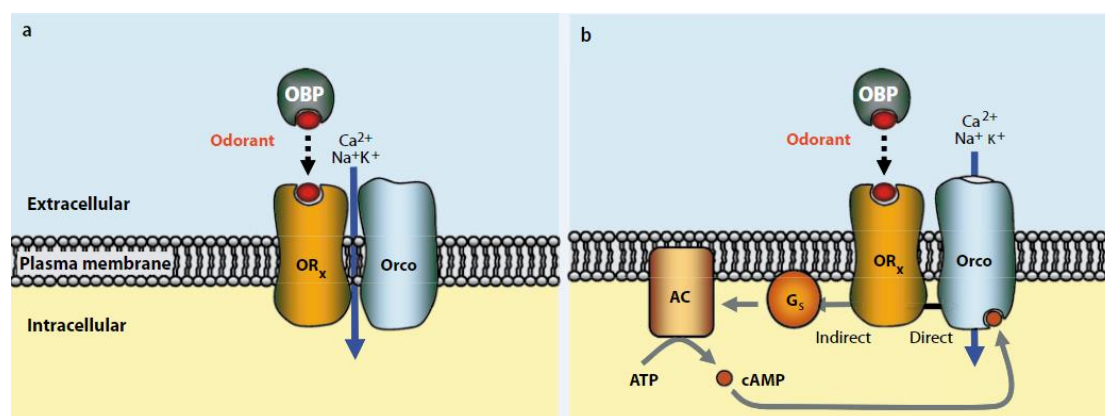
Η λειτουργία και η εκλεκτικότητα των OBPs εξαρτάται από το pH. Σε υψηλές με ουδέτερες τιμές pH παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια με τα οσμηγόνα, ενώ η συγγένεια μειώνεται σε χαμηλό, όξινο pH (Leal, 2013).

Το αρνητικό φορτίο της πλασματικής μεμβράνης των οσφρητικών δενδριτών προκαλεί τοπική συσσώρευση πρωτονίων, με σκοπό την ουδετεροποίηση του μεμβρανικού φορτίου. Κατά συνέπεια το pH της επιφάνειας των δενδριτών παίρνει χαμηλές τιμές. Αντίθετα, το pH του λεμφικού υγρού στο εσωτερικό των τριχιδίων είναι υψηλό, με αποτέλεσμα οι OBPs να μπορούν να συνδέονται με τα οσμηρά μόρια. Στη συνέχεια, όταν τα σύμπλοκα OBP-οσμηγόνου πλησιάσουν και έρθουν σε εγγύτητα με την πιο όξινη δενδριτική μεμβράνη, θα διασπαστούν απελευθερώνοντας το οσμηγόνο, το οποίο πλέον μπορεί να προσδεθεί στον αντίστοιχο οσφρητικό υποδοχέα, προκαλώντας την αντίστοιχη απόκριση.

Παρόλα αυτά, υπάρχουν πειράματα, όπως αυτό των Xiao et al., 2019, τα οποία αποδεικνύουν πως οι περισσότερες OBPs δεν είναι απαραίτητες για τη μεταφορά των οσμηγόνων μέσα στα οσφρητικά τριχίδια, κι αυτό ισχύει τόσο για τη *Drosophila*, όσο και για άλλα έντομα.

1.5. Μεταγωγή οσφρητικού σήματος μέσω των υποδοχέων OR

Ήδη από το 2008 υπάρχουν δημοσιευμένες δύο εργασίες με αμφιλεγόμενα αποτελέσματα όσον αφορά τις μοριακές διαδικασίες που εμπλέκονται στη μεταγωγή των οσφρητικών σημάτων στους οσφρητικούς νευρώνες των εντόμων, μέσω των OR. Η μία εξ αυτών μιλά για ένα άμεσο και γρήγορο ιοντοτροπικό μονοπάτι (Sato et al., 2008) (Εικόνα 15a). Η δεύτερη αποδεικνύει τη διαμεσολάβηση G-πρωτεϊνών και δευτερογενών αγγελιοφόρων με αποτέλεσμα την πιο αργή επεξεργασία και ενίσχυση του αρχικού χημικού σήματος, χωρίς να απορρίπτει την ύπαρξη ενός μικτού μηχανισμού, που να χρησιμοποιεί και τα δύο είδη μονοπατιών (ιοντοτροπικό και μεταβοτροπικό), ανάλογα με τη χημική συγκέντρωση του αρχικού ερεθίσματος (Wicher et al., 2008) (Εικόνα 15b). Μάλιστα, το τελευταίο μοντέλο βρίσκει αναλογία με τον τρόπο επεξεργασίας των οσμών από το οσφρητικό σύστημα των σπονδυλωτών (Sachse & Krieger, 2011).

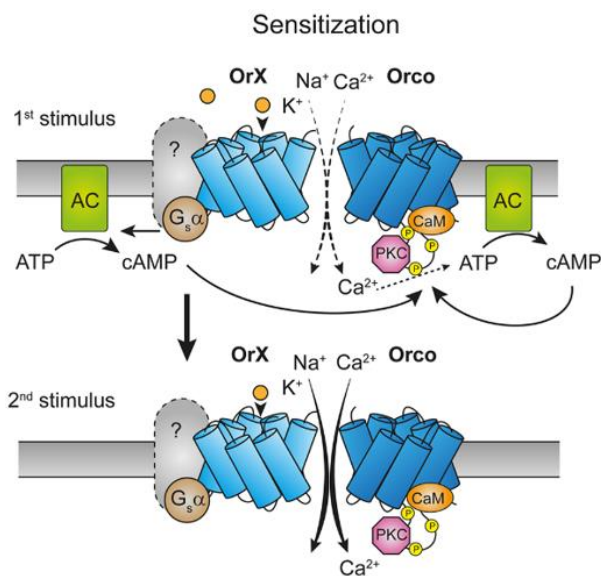


Εικόνα 15 – Τα δύο πιθανά μοντέλα μεταγωγής του οσφρητικού σήματος μέσω των υποδοχέων (OR). (a) Ιοντοτροπικό μονοπάτι. Η οσμή καταφθάνει στον λειτουργικό OR της μεμβράνης των δενδριτών και προσδένεται στον OrX, αφού απελευθερωθεί από την πρωτεΐνη OBP που τη μεταφέρει. Αυτό προκαλεί το άμεσο άνοιγμα του καναλιού, με αποτέλεσμα την ταχεία εισροή μονο- και δι-σθενών κατιόντων στο νευρικό κύτταρο και την εκπόλωση της μεμβράνης. (b) Μεταβοτροπικό μονοπάτι. Η οσμή, αφού συνδεθεί με τον υποδοχέα OrX, προκαλεί την ενεργοποίηση μιας G_s πρωτεΐνης, η οποία ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση (AC), οδηγώντας στην αύξηση της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP). Στη συνέχεια, το cAMP ενεργοποιεί την υπομονάδα του Orco, με αποτέλεσμα την εισροή κατιόντων και την εκπόλωση της μεμβράνης του οσφρητικού νευρώνα (Sachse & Krieger, 2011).

Τελικά αποδεικνύεται ότι ισχύει ένας συνδυασμός των δύο θεωριών, ανάλογα με τη συγκέντρωση του οσμηγόνου μορίου στο λεμφικό υγρό. Όταν η συγκέντρωση του οσμηγόνου είναι υψηλή, τότε λαμβάνει δράση το ιοντοτροπικό μονοπάτι, σύμφωνα με το οποίο, το οσμηγόνο προσδένεται στην υπομονάδα OrX του καναλιού και προκαλεί το άνοιγμα του πόρου, με αποτέλεσμα την εισροή κατιόντων στο κύτταρο και την εκπόλωση της πλασματικής μεμβράνης των δενδριτών (Εικόνα 15a). Με αυτό τον τρόπο, το νευρικό κύτταρο αποκρίνεται ταχέως στις μεγάλες συγκεντρώσεις του οσμηγόνου στο περιβάλλον, ώστε να διαμορφωθεί άμεσα η κατάλληλη συμπεριφορική απόκριση του εντόμου.

Στην περίπτωση που η συγκέντρωση του οσμηγόνου στο περιβάλλον είναι χαμηλή, τότε ενεργοποιείται το μεταβοτροπικό μονοπάτι. Το οσμηγόνο προσδένεται στον υποδοχέα του και προκαλεί την ενεργοποίηση μιας G_{α_s} -πρωτεΐνης, που με τη σειρά της ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση, καταλήγοντας, έτσι, στην αύξηση του cAMP. Το cAMP, με τη σειρά του, ενεργοποιεί τον Orco (ο οποίος πρέπει να βρίσκεται στη φωσφορυλιωμένη μορφή του από την πρωτεϊνική κινάση C) με τελικό αποτέλεσμα την εισροή ιόντων K^+ , Na^+ και Ca^{2+} στο εσωτερικό του νευρώνα και την εκπόλωσή του (Εικόνα 15b, Εικόνα 16).

Η αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} , στη συνέχεια, ενεργοποιεί την καλμοδουλίνη, η οποία συνδέεται στον φωσφορυλιωμένο Orco και ενισχύει τη λειτουργία του, προκαλώντας περαιτέρω άνοιγμα του καναλιού και εισροή περισσότερων κατιόντων στο εσωτερικό του νευρώνα (Εικόνα 16). Έτσι, ο καταρράκτης αντιδράσεων αυτού του πιο αργού μεταβοτροπικού μονοπατιού, ευαισθητοποιεί τον οσφρητικό νευρώνα, χαμηλώνοντας τελικά το κατώφλι ενεργοποίησης του υποδοχέα, ώστε να μπορεί να εκμεταλλευτεί στο έπακρο τη μειωμένη συγκέντρωση οσμηγόνων του περιβάλλοντος (Wicher & Miazzi, 2021).



Εικόνα 16 – Ευαισθητοποίηση οσφρητικών νευρώνων σε χαμηλές συγκεντρώσεις οσμηγόνων. Με τον τρόπο που αναλύθηκε και στην Εικόνα 15b, πραγματοποιείται η εισροή ιόντων από το κανάλι, μέσω του μεταβοτροπικού μονοπατιού. Η αύξηση των ιόντων Ca^{2+} ενδοκυτταρικά, στη συνέχεια, ενεργοποιεί την καλμοδουλίνη (CaM), η οποία συνδέεται στον φωσφορυλιωμένο από την PKC (πρωτεϊνική κινάση C) Orco, με αποτέλεσμα να αυξάνει τη λειτουργία του, ενισχύοντας έτσι την εισροή περισσότερων κατιόντων στον νευρώνα και αυξάνοντας την ευαισθησία του, ώστε μετά από δεύτερο ερέθισμα οσμηγόνων χαμηλής συγκέντρωσης, αυτός να μπορεί να αποκριθεί ευκολότερα (Wicher & Miazzi, 2021).

1.6. Μέτρηση οσφρητικής ενεργοποίησης: Single Sensillum Recording

Ο υπολογισμός της ενεργοποίησης των οσφρητικών νευρώνων, παρουσία των αντίστοιχων οσμηγόνων, πραγματοποιείται με ηλεκτροφυσιολογικές μεθόδους, όπως η τεχνική Καταγραφής Μοναδιαίου Τριχιδίου (Single Sensillum Recording) ή αλλιώς SSR. Μεταξύ άλλων, τα αποτελέσματα της Εικόνας 10 προέκυψαν από τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία.

Όπως μαρτυρά και το όνομα, κατά τη διαδικασία της μεθόδου SSR τοποθετείται ένα ηλεκτρόδιο στο εσωτερικό ενός μοναδιαίου οσφρητικού τριχιδίου και μετράται η αλλαγή του δυναμικού ενέργειας των οσφρητικών νευρώνων, όταν το έντομο εκτίθεται σε συγκεκριμένες οσμηρές ενώσεις (de Bruyne et al., 2001; Hallem & Carlson, 2006; Lin & Potter, 2015). Πρόκειται για μία ποσοτική μέθοδο υπολογισμού της οσφρητικής απόκρισης των εντόμων που δίνει πληροφορία και για την ένταση αναγνώρισης της οσμηρής ένωσης. Η SSR αποτελεί μέθοδο εξωκυτταρικής φυσιολογίας, καθώς το ηλεκτρόδιο που τοποθετείται στο οσφρητικό τριχίδιο, έρχεται σε επαφή με το λεμφικό υγρό που βρίσκεται εξωκυτταρικά των οσφρητικών νευρώνων (Olsson & Hansson, 2013) (βλ. Εικόνα 2).

1.7. Επεξεργασία - κωδικοποίηση οσφρητικών σημάτων

Σύμφωνα με την Ενότητα 1.2., τα οσμηρά ερεθίσματα λειτουργούν ως σήματα που πληροφορούν τα έντομα για την κατάσταση του περιβάλλοντός τους. Παρέχουν πληροφορίες για θρεπτικά συστατικά, τον εντοπισμό θηρευτών, την εύρεση συντρόφου και την ωστοκία, με αποτέλεσμα την εξασφάλιση της επιβίωσης και της αναπαραγωγής τους. Προκειμένου τα έντομα να ανταποκριθούν σε τέτοιες καταστάσεις, πρέπει να διαμορφωθούν και οι αντίστοιχες συμπεριφορές. Για παράδειγμα, όταν μια μύγα αναγνωρίσει το οσμηγόνο ενός θηρευτή της, θα προτιμήσει να απομακρυνθεί από την περιοχή, ενώ φερομόνες εκκρινόμενες από ομοειδή αρσενικά, προκαλούν την προσέλκυση των θηλυκών μυγών.

Στο σημείο αυτό, εγείρονται τα εξής ερωτήματα: πρώτον, πώς τα έντομα διακρίνουν το ποιόν και την ταυτότητα των οσμών; Δεύτερον, ποια είναι η διαδρομή του σήματος από τη στιγμή της αντίληψης του οσμηγόνου μέχρι την εκτέλεση της κατάλληλης συμπεριφοράς;

Όπως αναφέρθηκε και στην Ενότητα 1.3.3., η οσφρητική πληροφορία αναγνωρίζεται από τους πρώτης τάξης οσφρητικούς νευρώνες, οι οποίοι καταλήγουν στα σπειράματα (glomeruli) του λοβού της κεραίας (antennal lobe). Ο τελευταίος αποτελεί το πρωτογενές κέντρο επεξεργασίας του οσμηρού ερεθίσματος. Από εκεί, μέσω δεύτερης τάξης προβολικών νευρώνων (projection neurons), το σήμα μεταδίδεται περαιτέρω σε κέντρα υψηλότερης τάξης και συγκεκριμένα στην περιοχή του κάλυκα των μανιταροειδών σωματίων (mushroom bodies) και στο πλευρικό κέρασ του πρωτεγκεφάλου (lateral horn) (Εικόνα 18)

Κάθε προβολικός νευρώνας δεύτερης τάξης λαμβάνει νευρικά σήματα από ένα συγκεκριμένο σπείραμα, στο οποίο καταλήγουν οσφρητικοί νευρώνες της ίδιας κλάσης, δηλαδή που εκφράζουν τον ίδιο οσφρητικό υποδοχέα (Εικόνα 4). Ως εκ τούτου, υπάρχουν τόσες διαφορετικές κλάσεις προβολικών νευρώνων δεύτερης τάξης, όσες και οι οσφρητικοί υποδοχείς που εκφράζονται από το εκάστοτε έντομο.

Στρατηγικές κωδικοποίησης οσμηρών χημικών ερεθισμάτων

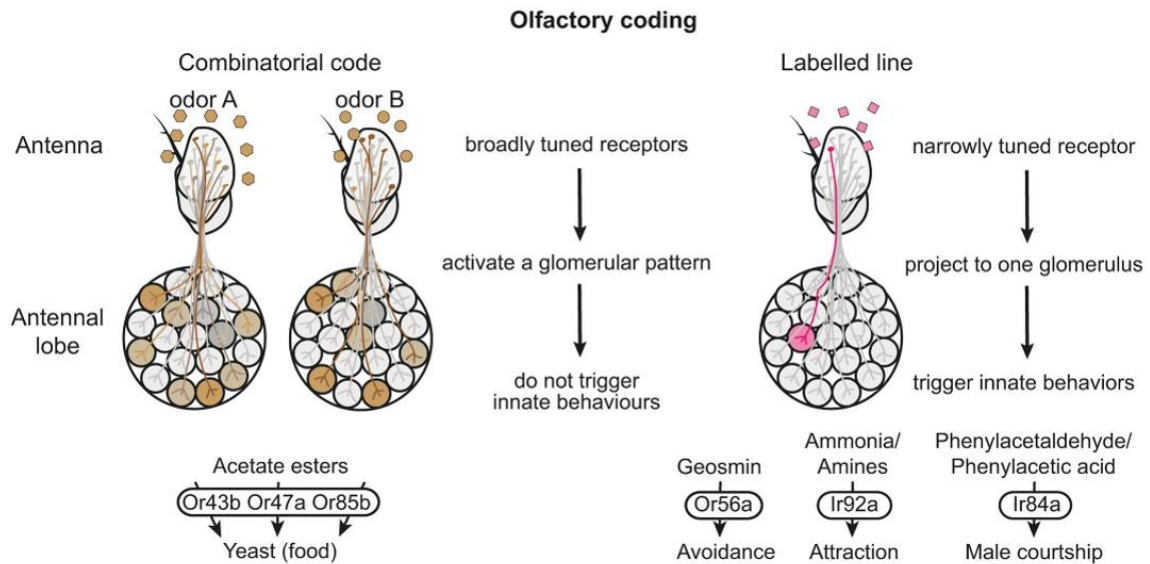
Ο εγκέφαλος των εντόμων διαθέτει δύο στρατηγικές επεξεργασίας και ταυτοποίησης των οσμηγόνων σημάτων (Galizia, 2014; Grabe & Sachse, 2018; Haverkamp et al., 2018):

- 1) τη συνδυαστική κωδικοποίηση (combinatorial code), και
- 2) τη γραμμική κωδικοποίηση (labeled line)

Στην Εικόνα 17 απεικονίζονται σχηματικά οι παραπάνω δύο στρατηγικές.

Με τη στρατηγική της **συνδυαστικής κωδικοποίησης (combinatorial code)** ο εγκέφαλος επεξεργάζεται και ταυτοποιεί γενικότερα οσμηγόνα, κυρίως σχετικά με την ανακάλυψη θρεπτικών πηγών. Ο συγκεκριμένος μηχανισμός στηρίζεται στο γεγονός ότι πολλά οσμηγόνα μπορούν να αναγνωριστούν από παραπάνω από έναν ευρέως συντονισμένους οσφρητικούς υποδοχείς. Επομένως, όταν ένα οσμηρό μόριο συνδεθεί στους αντίστοιχους υποδοχείς του, τότε θα ενεργοποιηθούν συγκεκριμένα σπειράματα στο λοβό της κεραίας. Αποτέλεσμα είναι η ενεργοποίηση διαφορετικού συνδυασμού σπειραμάτων κάθε φορά που το οσφρητικό του εντόμου ανιχνεύει διαφορετικά οσμηγόνα και τελικά, η χημική ταυτότητα του κάθε οσμηγόνου κωδικοποιείται από τον υποπληθυσμό των ORs που αυτό ενεργοποιεί (Mertes et al., 2021; Wicher & Miazzi, 2021) (Εικόνα 17, Εικόνα 19B,E',E''). Η συνδυαστική κωδικοποίηση της ενεργοποίησης ποικίλων οσφρητικών υποδοχέων είναι υπεύθυνη για την ικανότητα της *Drosophila melanogaster* να κωδικοποιεί και να αναγνωρίζει περίπου 10^{15} διαφορετικά οσμηγόνα, ενώ το γονιδίωμά της διαθέτει μόνο 62 γονίδια οσφρητικών υποδοχέων OR (Münch & Galizia, 2016).

Η στρατηγική της **γραμμικής κωδικοποίησης (labeled line)** εφαρμόζεται στην αντίληψη συγκεκριμένων και πολύ σημαντικών ενώσεων (όπως είναι οι φερομόνες και οσμηγόνα οικολογικής σημασίας), οι οποίες πρόκειται να προκαλέσουν άμεσες και αυθόρμητες συμπεριφορές. Παράδειγμα τέτοιας ένωσης αποτελεί η γεωσμίνη (geosmin) ένα οσμηγόνο που παράγεται από βακτήρια του εδάφους του γένους *Streptomyces*. Σκοπός αυτού του μορίου είναι να απομακρύνει τους θηρευτές και να προσελκύει οργανισμούς που θα διασκορπίσουν τα σπόρια, εξασφαλίζοντας τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου. Έτσι, η γεωσμίνη απωθεί τις μύγες των φρούτων, ώστε να τις αποτρέψει από την κατανάλωση υλικών στα οποία αναπτύσσεται ο στρεπτομύκητας (Stensmyr et al., 2012). Προκειμένου να εξασφαλιστεί η ταχεία και άμεση επεξεργασία τέτοιων οσφρητικών σημάτων, απαιτείται η συμβολή οσφρητικών υποδοχέων με στενότερο προφίλ απόκρισης, δηλαδή υποδοχέων που προσδένουν ένα μοναδικό οσμηγόνο μόριο. Το μόριο αυτό δεν μπορεί να αναγνωριστεί από άλλους υποδοχείς, όπως η γεωσμίνη, η οποία αναγνωρίζεται μόνο από τον Or56a (Stensmyr et al., 2012) (Εικόνα 17). Σε αυτή την περίπτωση, το σήμα μεταβιβάζεται γραμμικά, με την ενεργοποίηση ενός μοναδικού σπειράματος στο λοβό της κεραίας (Εικόνα 19E'').



Εικόνα 17 - Στρατηγικές επεξεργασίας οσφρητικών σημάτων. **Συνδυαστική κωδικοποίηση** (combinatorial code): Μία οσμή ενεργοποιεί πολλούς ευρέως συντονισμένους υποδοχείς OR, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση συγκεκριμένων σπειραμάτων (glomeruli) στο λοβό της κεραίας (antennal lobe). Κάθε οσμηγόνο προκαλεί συγκεκριμένο μοτίβο ενεργοποίησης των σπειραμάτων. Αυτός ο μηχανισμός είναι σημαντικός για την εύρεση τροφής, που το έντομο δε χρειάζεται να διακρίνει με μεγάλη αποτελεσματικότητα ενώσεις παρόμοιας χημικής δομής. **Γραμμική κωδικοποίηση** (labeled line): Σε αυτό το μηχανισμό συμμετέχουν υποδοχείς που αναγνωρίζουν μόνο ένα συγκεκριμένο οσμηγόνο μόριο. Τότε η επεξεργασία του σήματος γίνεται γραμμικά, καθώς ενεργοποιείται ένα μοναδικό σπείραμα, με αποτέλεσμα την πυροδότηση αυθόρμητων έμφυτων συμπεριφορών (Wicher & Miazzi, 2021).

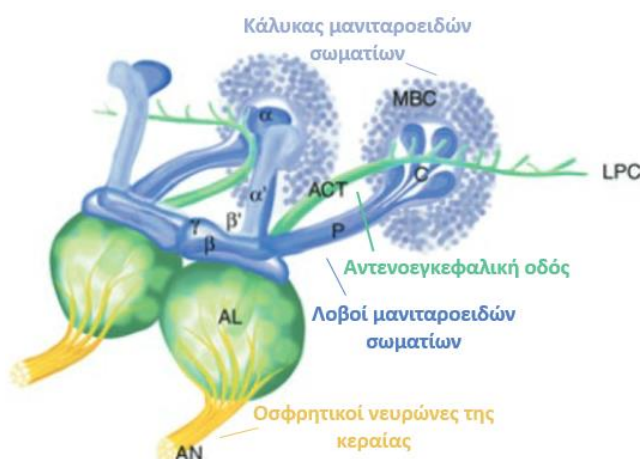
Με αυτή τη λογική έχουν κατασκευασθεί ορισμένοι «χάρτες» σε επίπεδο σπειραμάτων (glomeruli) του λοβού της κεραίας, όπως ο οδοτοπικός (odotopic), ο τριχιδιακός (sensillar) και ο χάρτης ηδονικότητας των οσμηγόνων (valence specific map) (Εικόνα 19B, Γ, Δ).

Σε επόμενο στάδιο, η πληροφορία της οσμής μεταβιβάζεται από τα σπειράματα, μέσω προβολικών νευρώνων δεύτερης τάξης (projection neurons) (Εικόνα 5), σε υψηλότερης τάξης κέντρα του εγκεφάλου: τα μανιταροειδή σωματίδια και το πλευρικό πέταλο του πρωτεγκεφάλου (Εικόνα 19A, Εικόνα 18). Αυτά τα κέντρα, εστιάζουν λιγότερο στην ειδικότητα των οσμηγόνων και επικεντρώνονται, κυρίως, στην κατηγοριοποίησή τους ανάλογα με την συμπεριφορική τους συνάφεια (Grabe & Sachse, 2018; Sachse & Beshel, 2016) (Εικόνα 19ΣΤ).

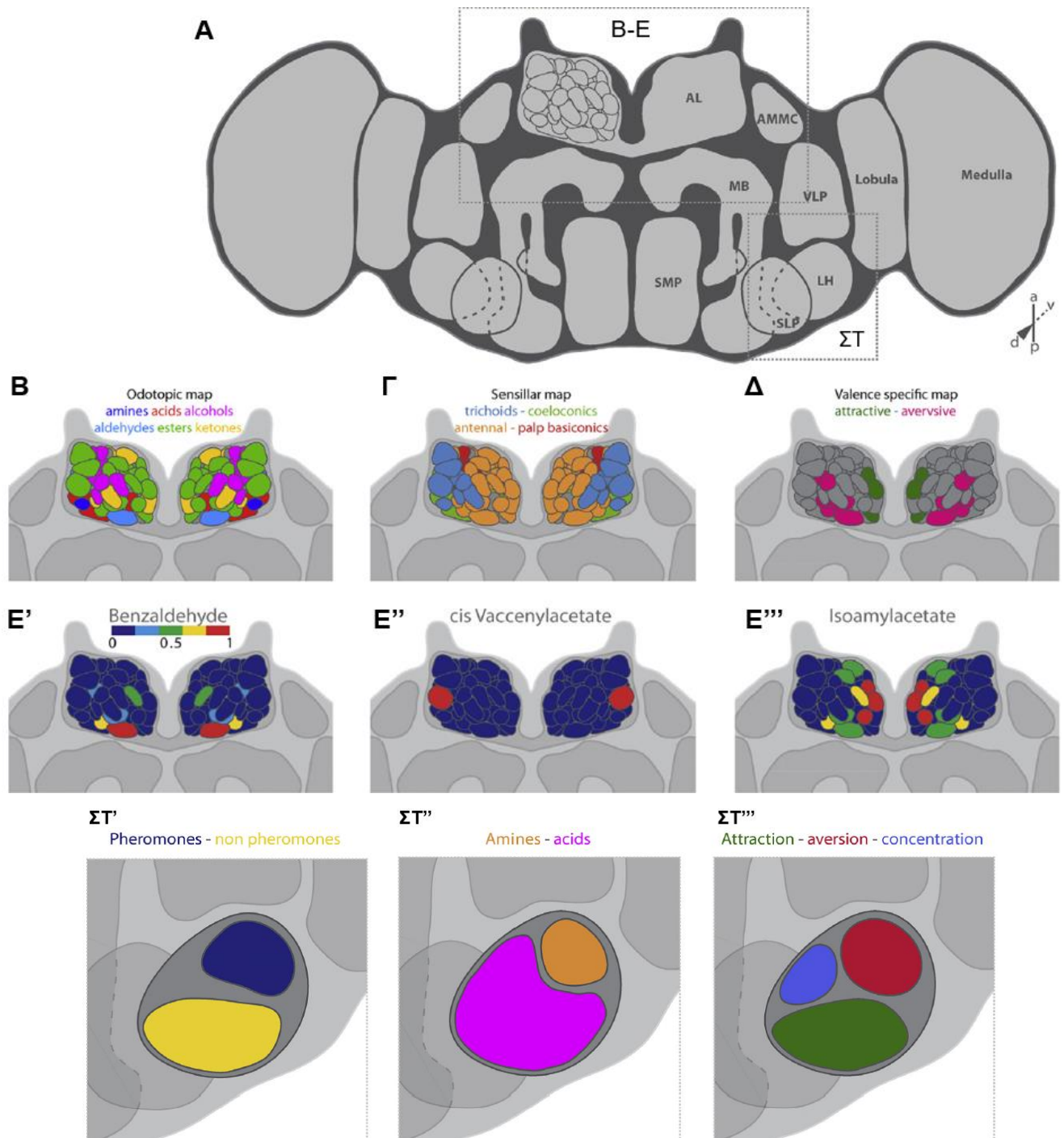
Οι νευρώνες εξόδου των λοβών τωνμανιταροειδών σωματίων (τα οποία σχετίζονται με την οσφρητική μνήμη και μάθηση) έχει ανακαλυφθεί ότι αποκωδικοποιούν την ηδονικότητα των οσμών, με αποτέλεσμα την συσχετιστική μάθηση (associative learning) συμπεριφορών απόκρισης σε οσφρητικά ερεθίσματα (Aso et al., 2014; Marin et al., 2002).

Στο πλευρικό κέρασ οι προβολικοί νευρώνες οργανώνονται στερεοτυπικά. Προβολικοί νευρώνες της ίδιας κλάσης (των οποίων οι δενδρίτες εντοπίζονται στο ίδιο σπείραμα του λοβού της κεραίας) καταλήγουν σε συγκεκριμένες περιοχές – «ζώνες» του πλευρικού πετάλου (Fizsek & Wilson, 2014; Marin et al., 2002; Tanaka et al., 2004; Wong et al., 2002), σε αντίθεση με τα μανιταροειδή σωματία, όπου οι νευρώνες προβολής κατανέμονται τυχαία (Caron et al., 2013). Ορισμένες τέτοιες «ζώνες» του πλευρικού πετάλου έχουν ταυτοποιηθεί και συσχετιστεί με την αποκωδικοποίηση συγκεκριμένων χαρακτηριστικών των οσμηγόνων. Για παράδειγμα, υπάρχουν ξεχωριστές περιοχές του πλευρικού πετάλου που αναγνωρίζουν φερομονικά οσμηγόνα και διαχωρίζονται από εκείνες που αναγνωρίζουν οσμηγόνα θρεπτικών πηγών (Jefferis et al., 2007) (Εικόνα 19ΣΤ’). Άλλες περιοχές του πλευρικού πρωτεγκεφάλου ενεργοποιούνται από προσελκυστικές αμίνες ή απωθητικά οξέα (Min et al., 2013) (Εικόνα 19ΣΤ’), ενώ επίσης έχουν διακριθεί περιοχές που πέρα από το ηδονικό σθένος, σχετίζονται και με τη συγκέντρωση του οσμηγόνου που αναγνωρίζεται (Strutz et al., 2014) (Εικόνα 19ΣΤ’’).

Από το πλευρικό κέρασ ξεκινούν, πλέον, νευρώνες τρίτης τάξης που συνάπτονται με νευρώνες άλλων περιοχών του εγκεφάλου υψηλότερης τάξης, συνδέοντας έτσι συγκεκριμένες κλάσεις προβολικών νευρώνων με συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου που οργανώνουν την κίνηση (Min et al., 2013). Ως εκ τούτου, μέσω του πλευρικού πετάλου, δημιουργούνται έμμεσα «κανάλια» που συνδέουν ξεχωριστά υποσύνολα οσφρητικών υποδοχέων με εγκεφαλικές περιοχές υψηλότερης τάξης, που θα καθορίσουν την τελική συμπεριφορά του εντόμου.



Εικόνα 18 - Επικοινωνία των αρχικών κέντρων οσφρητικής επεξεργασίας στον εγκέφαλο της μύγας *Drosophila melanogaster*. Πρώτης τάξης οσφρητικοί νευρώνες αναγνωρίζουν οσμηγόνα από τις κεραίες (AN) και τις γναθικές προσαρκτίδες (δεν απεικονίζονται) και καταλήγουν στο λοβό της κεραίας (AL). Από εκεί, δεύτερης τάξης προβολικοί νευρώνες καταλήγουν στον κάλυκα των μανιταροειδών σωματίων (MBC) και στον πλευρικό πρωτεγκεφάλο (LPC), διαμέσου της αντενοεγκεφαλικής οδού (ACT – Antennal cerebral tract). Εικόνα τροποποιημένη από (McGuire et al., 2001).



Εικόνα 19 – Χάρτες κωδικοποίησης οσφρητικών σημάτων. (Α) Οριζόντια τομή του εγκεφάλου της *Drosophila melanogaster*, όπου απεικονίζονται τα βασικά τμήματα του κεντρικού νευρικού συστήματος. AL: antennal lobe (λοβός της κεραίας), MB: mushroom bodies (μανιταροειδή σωμάτια), LH: lateral horn (πλευρικό κέρασ). (Β-Ε) Απεικονίσεις των σπειραμάτων των συμμετρικών λοβών των κεραίων στα δύο εγκεφαλικά ημισφαίρια. (Β) Οδοτοπικός χάρτης των σπειραμάτων στο λοβό της κεραίας. Φαίνεται ότι υπάρχουν σπειράματα που εξειδικεύονται στην αναγνώριση χημικών μορίων, που ανήκουν σε ξεχωριστές χημικές ομάδες. (Γ) Τριχιδιακός χάρτης. Απεικονίζονται τα σπειράματα στα οποία καταλήγουν οσφρητικοί νευρώνες που εντοπίζονται σε ξεχωριστά είδη οσφρητικών τριχιδίων, είτε της κεραίας (antennal), είτε των γναθικών προσαρκτίδων (palp). (Δ) Χάρτης ηδονικού σθένους. Φαίνονται τα σπειράματα που ενεργοποιούνται από την αναγνώριση μορίων, τα οποία προσελκύουν ή απωθούν το έντομο. (Ε) Μοτίβο ενεργοποίησης σπειραμάτων, έπειτα από πρόσδεση της βενζυλαδεύδης (Ε'), της φερομόνης cis Vaccenylacetate (Ε'') και του μορίου isoamylacetate (Ε'''). Παρατηρήστε ότι στην περίπτωση της φερομόνης (Ε') ενεργοποιείται ένα μοναδικό σπείραμα, καθώς το σήμα της κωδικοποιείται με το μηχανισμό της γραμμικής κωδικοποίησης (labeled lines). (ΣΤ) Εστίαση στο πλευρικό πέταλο του πρωτεγκεφάλου. Έχουν χαρακτηριστεί περιοχές ταυτοποίησης φερομονών και μορίων μη-φερομονικών (ΣΤ'), περιοχές που ενεργοποιούνται από σήματα αμινών και οξέων (ΣΤ''), αλλά και περιοχές που σχετίζονται με ελκυστικές ή απωθητικές συμπεριφορές, καθώς και με την ένταση του σμηρού ερεθίσματος (Εικόνα τροποποιημένη από (Grabe & Sachse, 2018).

1.8. Η μύγα της Μεσογείου (*Ceratitis capitata*)

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας ασχολήθηκα με γονίδια οσφρητικών υποδοχέων (OR) της μεσογειακής μύγας, *Ceratitis capitata*. Η *C. capitata* ανήκει στην οικογένεια των Tephritidae της τάξης των Diptera. Τα μέλη της οικογένειας Tephritidae είναι έντομα οικονομικής σημασίας, τα οποία γεννούν τα αυγά τους στο εσωτερικό ώριμων καρπών, αποτελώντας παράσιτα των φυτών.

Οικονομική σημασία

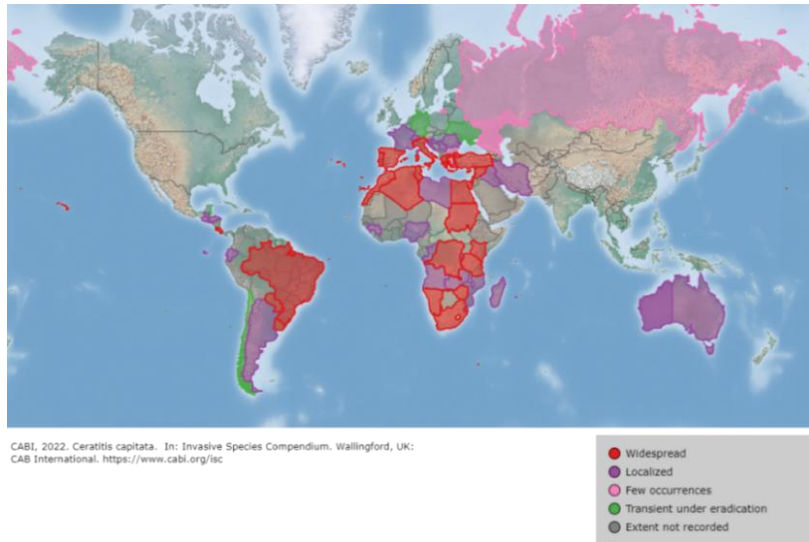
Η μύγα της Μεσογείου θεωρείται ένα από τα πιο καταστροφικά παράσιτα των φρούτων παγκοσμίως, καθώς μπορεί να μολύνει περισσότερα από 300 είδη φυτών (Copeland et al., 2002; Morales et al., 2004), κι αυτό επειδή είναι ικανή να προσαρμόζεται σε ποικίλα κλιματικά είδη (Meats & Smallridge, 2007; Meixner et al., 2002). Κατά συνέπεια, πρόκειται για ένα επεκτατικό είδος, το οποίο χαρακτηρίζεται από υψηλό δυναμικό εξάπλωσης. Στους ξενιστές της ανήκουν φυτά εμπορικής σημασίας, όπως είναι τα εσπεριδοειδή (πορτοκαλιά, μανταρινιά, νεραντζιά), τα μηλοειδή (μηλιά, αχλαδιά, κυδωνιά), τα πυρηνόκαρπα (βερίκοκα, ροδάκινα), τα σύκα και οι λωτοί, με αποτέλεσμα να προκαλεί σημαντικές οικονομικές καταστροφές, θέτοντας περιορισμούς στο διεθνές εμπόριο φρούτων (Shelly et al., 2014). Μάλιστα, το έντομο βρίσκεται στη λίστα A2 των εντόμων καραντίνας του EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), που σύμφωνα με τον τομέα 3406 του CDFA (California Department of Food and Agriculture) σημαίνει ότι κάθε εμπορικό προϊόν, που αποτελεί ξενιστή της *Ceratitis capitata* και προέρχεται από χώρες ενδημικές του εντόμου, τίθεται υπό καραντίνα μέχρι να αποδειχθεί ότι δεν είναι μολυσμένο (Εικόνα 20).

C. Commodities Covered.

- 1. All fruit** (including nuts and berries), **vegetables** (other than leafy types grown above ground), **and the fruiting bodies of the plants listed herein**. All these items that are infested or are exposed to infestation by Mediterranean fruit fly are declared a public nuisance. Unless proven otherwise, all cultivars, varieties, and hybrids of the plant species listed herein are considered suitable hosts of *Ceratitis capitata*.

Εικόνα 20 – Τμήμα του κειμένου 3406 του CDFA αναφορικά με την καραντίνα προϊόντων δυνητικά μολυσμένων από την *Ceratitis capitata*. Πηγή: CDFA (California Department of Food and Agriculture). Section 3406. Medfly Interior Quarantine Regulation. 2017. <https://www.cdffa.ca.gov/plant/medfly/docs/regs/3406-TXT-medfly.pdf>.

Η μύγα της Μεσογείου προέρχεται από υποσαχάριες περιοχές της Αφρικής και πλέον ανιχνεύεται παγκοσμίως σε πολλές τροπικές, υποτροπικές και περιοχές ήπιων θερμοκρασιών, όπως φαίνεται στο χάρτη της Εικόνας 21. Στην Ελλάδα ανιχνεύεται από την Κρήτη μέχρι τη Μακεδονία και, ανάλογα με την εποχή και την περιοχή, μολύνει διαφορετικούς ξενιστές της (Abd-Elgawad & Mahfouz M.M., 2021; Papadopoulos et al., 2001).



Εικόνα 21 - Χάρτης κατανομής της μύγας της Μεσογείου (*Ceratitidis capitata*) παγκοσμίως. Πηγή: CABI. 2022. <https://www.cabi.org/isc> (Τελευταία προβολή 2.10.2022)

Αντιμετώπιση

Για την καταπολέμηση και ανίχνευσή της έχουν σχεδιαστεί ερευνητικά προγράμματα, που αναπτύσσουν τεχνικές των οποίων, όμως, το κόστος είναι υψηλό (Enkerlin et al., 2015; Sciarretta et al., 2018). Προς το παρόν, στη χώρα μας το έντομο αντιμετωπίζεται κυρίως με χημικό τρόπο (δολωματικοί ψεκασμοί και ψεκασμοί κάλυψης). Λόγω των σημαντικών περιβαλλοντικών και δημοσιούγειονομικών επιπτώσεων των εντομοκτόνων, γίνονται εντατικές προσπάθειες ανάπτυξης εναλλακτικών προσεγγίσεων αντιμετώπισης. Για παράδειγμα, γίνονται προσπάθειες βιολογικής καταπολέμησης, με την εξαπόλυση θηρευτών ή εντομοπαθογόνων μυκήτων, που όμως παρουσιάζουν προβλήματα αποτελεσματικότητας. Παράλληλα, υπάρχουν πολλές παραλλαγές της Τεχνικής Στείρου Εντόμου (SIT – Sterile Insect Technique), σύμφωνα με την οποία εξαπολύονται στο πεδίο στείρα αρσενικά έντομα, που έχουν δημιουργηθεί σε εργαστηριακές εγκαταστάσεις με τη χρήση ραδιενέργειας. Αυτά τα στείρα αρσενικά ξεπερνούν δεκάδες φορές σε πληθυσμό τα αρσενικά φυσικού τύπου, τα οποία και ανταγωνίζονται ως προς το ζευγάρωμα με τα θηλυκά έντομα του φυσικού πληθυσμού. Έτσι, τα θηλυκά δεν αποκτούν βιώσιμους απογόνους, με αποτέλεσμα τη μείωση του φυσικού πληθυσμού του εντόμου (Enkerlin et al., 2015; Leftwich et al., 2014).

Όπως μπορεί κανείς να αντιληφθεί, η αντιμετώπιση της μεσογειακής μύγας με τη χρήση χημικών εντομοκτόνων συνήθως επιδρά τοξικά στο περιβάλλον, καθώς δεν ενέχει χαρακτήρα ειδοειδικό. Σε κάποιες χώρες ήδη χρησιμοποιείται η SIT, ωστόσο παρόλο που αποτελεί μέθοδο φιλική προς το περιβάλλον, είναι αρκετά δαπανηρή, καθώς το κόστος των απαιτούμενων εγκαταστάσεων είναι υψηλό. Για το λόγο αυτό, ακόμη γίνονται προσπάθειες για το σχεδιασμό μεθόδων καταπολέμησης της *C. capitata*, φιλικών προς το περιβάλλον και με χαμηλό κόστος, ώστε να καθίστανται εφαρμόσιμες. Κυρίως, όμως, θα πρέπει να εστιάζουν και να εξειδικεύονται στην αντιμετώπιση του είδους της μύγας της Μεσογείου και μόνο, χωρίς να απειλούν άλλα είδη εντόμων, τα οποία μπορεί να είναι ωφέλιμα για τους ξενιστές της *Ceratitidis capitata*.

Μια περισσότερο οικολογική και λιγότερο δαπανηρή λύση είναι η εγκατάσταση παγίδων στο πεδίο, οι οποίες περιέχουν στο εσωτερικό τους ελκυστικές ενώσεις και -σε

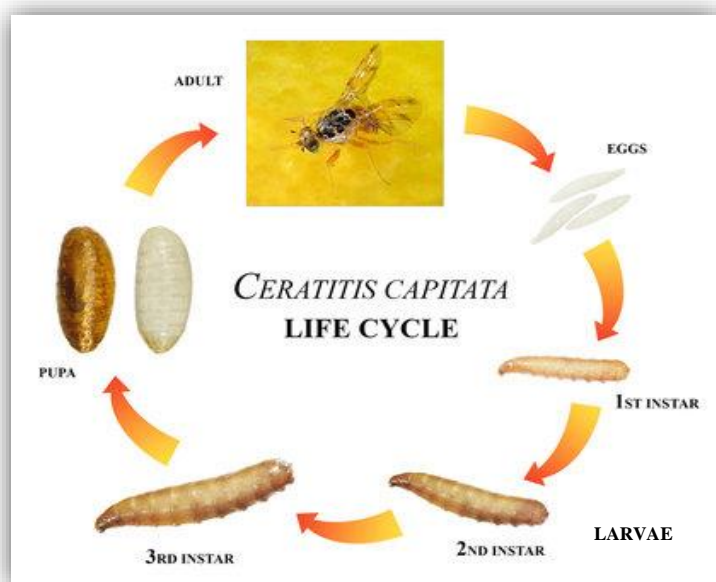
κάποιες περιπτώσεις- εντομοκτόνο. Σκοπός είναι η προσέλκυση των μυγών και η θανάτωσή τους στο εσωτερικό της παγίδας, με αποτέλεσμα να αποφεύγονται οι ψεκασμοί εντομοκτόνων στο περιβάλλον και κατ' επέκταση οι τοξικές συνέπειές τους.

Τα ελκυστικά των παγίδων μπορεί να είναι είτε οπτικά, είτε οσμηρά ερεθίσματα (π.χ. φερομονικά ή τροφικά ελκυστικά). Επίσης, το εσωτερικό των παγίδων μπορεί να περιέχει είτε κάποιο υγρό διάλυμα (ώστε να «πνιγούν» τα παγιδευμένα έντομα- παγίδες υγρού τύπου), είτε κάποιο εντομοκτόνο (παγίδες ξηρού τύπου), αποσκοπώντας στη θανάτωση των παγιδευμένων μυγών.

Το πιο διαδεδομένο ελκυστικό, που χρησιμοποιήθηκε ευρέως και στην Ελλάδα για την καταπολέμηση της μεσογειακής μύγας, ήταν το BioLure® που είχε την ικανότητα να προσελκύει θηλυκές μύγες. Το BioLure αποτελείται από 3 συστατικά (ammonium acetate, putrescine, trimethylamine hydrochloride) και θεωρήθηκε αποτελεσματικό καθώς η δράση του διαρκούσε έως και τρεις μήνες στο πεδίο. Ωστόσο, πλέον έχει αποσυρθεί από την αγορά, εφόσον έγινε αντιληπτό ότι τα δύο από τα τρία συστατικά του (putrescine, trimethylamine hydrochloride) εμφανίζουν τοξικότητα. Γι' αυτό το λόγο γίνονται συνεχώς προσπάθειες βελτίωσης των παγίδων που υπάρχουν προς το παρόν, που εστιάζουν στην ανάπτυξη και σύνθεση νέων καινοτόμων ελκυστικών ουσιών που να έχουν μη-τοξικό χαρακτήρα και υψηλή αποτελεσματικότητα όσον αφορά την ένταση της προσέλκυσης της μεσογειακής μύγας.

Κύκλος ζωής

Ο κύκλος ζωής της *Ceratitis capitata* συνίσταται από τέσσερα διακριτά μορφολογικά στάδια: το αυγό (egg), την προνύμφη (larva), τη νύμφη ή πούπα (pupa) και το ενήλικο έντομο (adult) (Εικόνα 22).



Εικόνα 22 - Κύκλος ζωής της μεσογειακής μύγας. Εικόνα από Adobe stock: #307789249.

Συνοπτικά, οι ενήλικες θηλυκές μύγες εναποθέτουν τα αυγά τους στο εσωτερικό των καρπών των φυτών-ξενιστών τους. Μετά από περίπου 3-10 ημέρες τα αυγά εκκολάπτονται και οι προνύμφες (larvae) αρχίζουν να τρέφονται από τη σάρκα του

καρπού, ενώ μετακινούνται στο εσωτερικό του και τον καθιστούν μη-βρώσιμο. Έτσι, ο καρπός γίνεται επιρρεπής σε μυκητιακές και μικροβιακές μολύνσεις, με αποτέλεσμα τις περισσότερες φορές οι καρποί να πέφτουν στο έδαφος. Όταν οι προνύμφες φτάσουν στο τρίτο και τελευταίο στάδιο, εξέρχονται από τον καρπό και μεταμορφώνονται σε νύμφες (pupae), μετά από περίπου 15 ημέρες διαμονής στον καρπό. Ύστερα από περίπου 10 μέρες, από το εσωτερικό των νυμφών αναδύονται τα ενήλικα άτομα, τα οποία δεν είναι ακόμη σεξουαλικά ώριμα. Τα αρσενικά ωριμάζουν σεξουαλικά ύστερα από 4-5 ημέρες, ενώ τα θηλυκά μετά από 6-8 ημέρες σε ιδανικές συνθήκες περιβάλλοντος. Τέλος, μετά τη γονιμοποίηση, τα θηλυκά αναζητούν ώριμα φρούτα για να ωοαποθέσουν (Abd-Elgawad & Mahfouz M.M., 2021).

Η διάρκεια παραμονής της *Ceratitis capitata* σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια εξαρτάται σημαντικά από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος, αλλά και από άλλους παράγοντες, όπως ο τύπος και η κατάσταση του φρούτου-ξενιστή. Για παράδειγμα, το στάδιο της νύμφης διαρκεί 6-13 ημέρες στους 24,4°C-26,1°C, ενώ σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (20,6°C-21,7°C) διαρκεί τουλάχιστον 19 ημέρες (Abd-Elgawad & Mahfouz M.M., 2021). Αυτή η ελαστικότητα της μεσογειακής μύγας να προσαρμόζει την ανάπτυξή της σε ποικίλα εύρη θερμοκρασίας περιβάλλοντος είναι και η αιτία της μεγάλης επεκτατικότητάς της.

2. Σκοπός της εργασίας

Ευρύτερο στόχο της διπλωματικής εργασίας αποτελεί η λειτουργική ανάλυση οσφρητικών υποδοχέων της *Ceratitis capitata*, με τελικό σκοπό τη διάκριση των ισχυρότερων προσδετών τους. Με βάση τους καλύτερους προσδέτες των υποδοχέων, σκοπός είναι να συντεθούν καινούριες ενώσεις, ώστε να εξασφαλίζεται ισχυρότερη πρόσδεση στους υποδοχείς και άρα εντονότερη προσέλκυση των μυγών. Τα νεοσυντιθέμενα μόρια θα χρησιμοποιηθούν εν τέλει ως ελκυστικά των παγίδων προσέλκυσης και θανάτωσης της μύγας της Μεσογείου.

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής έγινε προσπάθεια απομόνωσης και κλωνοποίησης των εξής γονιδίων της *C. capitata*: CcOr7a, CcOr82a, CcOr9a, CcOr67a, CcOr67d, CcOr13a, CcOr56a, CcOr88a και CcOr19a. Επίσης κλωνοποιήθηκε το γονίδιο του συνυποδοχέα Orco του δάκου της ελιάς (*BoOrco*). Ο *BoOrco* έχει αμινοξική ομολογία περίπου 98% με τον αντίστοιχο της μεσογειακής μύγας. Οι παραπάνω ονομασίες των γονιδίων της μεσογειακής μύγας είναι ενδεικτικές της ομολογίας αυτών των υποδοχέων σε πρωτεϊνικό επίπεδο με τους αντίστοιχους υποδοχείς της *Drosophila melanogaster*. Για παράδειγμα, η ονομασία CcOr82a αναφέρεται στον οσφρητικό υποδοχέα της *C. capitata* που εμφανίζει ομολογία αμινοξικής ακολουθίας με τον υποδοχέα Or82a της *D. melanogaster*.

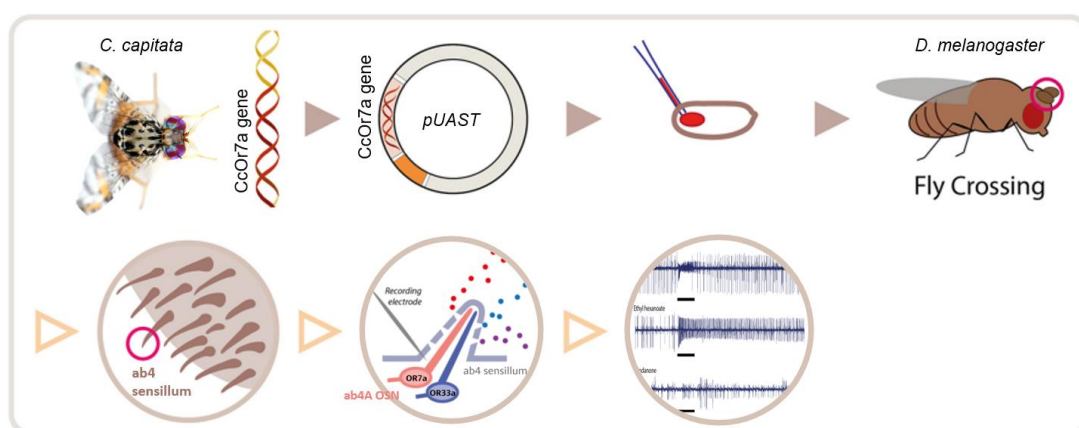
Στις επόμενες σελίδες της εργασίας θα αναλυθεί η διαδικασία που ακολούθησα για την απομόνωση και τελικά την κλωνοποίηση του ονομαζόμενου γονιδίου CcOr7a της μεσογειακής μύγας, του οποίου την κλωνοποίηση ανέλαβα από την αρχή μέχρι το τέλος.

Τελικό σκοπό της κλωνοποίησης του CcOr7a (και όλων των υπόλοιπων CcORs) αποτελεί η έκτοπη έκφρασή του στη μύγα *Drosophila melanogaster*, ώστε να γίνει μελέτη λειτουργικής ανάλυσης. Συγκεκριμένα, το γονίδιο CcOr7a αναμένεται να εκφραστεί στα οσφρητικά τριχίδια της *Drosophila*, τα οποία είναι χαρτογραφημένα και πλέον γνωρίζουμε ποιος OR εκφράζεται σε ποιο συγκεκριμένο οσφρητικό νευρώνα ο οποίος

εντοπίζεται σε συγκεκριμένο οσφρητικό τριχίδιο (Münch & Galizia, 2016). Οι ομόζυγες τροποποιημένες μύγες θα εκτεθούν σε συγκεκριμένα οσμηγόνα και θα μετρηθεί η ηλεκτρική αγωγιμότητα των οσφρητικών νευρώνων με την μέθοδο Single Sensillum Recording (SSR), ώστε να εντοπιστούν οι οσμηρές ενώσεις που προκαλούν την ενεργοποίηση του υποδοχέα.

Η διαδικασία που θα αναλυθεί, περιλαμβάνει (Εικόνα 23):

- 1) την απομόνωση του γονιδίου *CcOR7a* από το συνολικό cDNA της *Ceratitis capitata*.
- 2) την εισαγωγή του σε φορείς κλωνοποίησης (αρχικά στον pBluescript, κατόπιν στον pUAST).
- 3) την εισαγωγή της ανασυνδυασμένης κατασκευής *CcOR7a*-pUAST σε έμβρυα του στελέχους w^{1118} *D. melanogaster* με την εφαρμογή μικροενέσεων.
- 4) την επιλογή των μυγών που έχουν ενεθεί και το γονίδιο *CcOR7a* ενσωματώθηκε στα γαμετικά κύτταρά τους (επιλογή του φαινοτύπου κόκκινων ματιών).
- 5) τις διασταυρώσεις ατόμων με κόκκινα μάτια με άτομα λευκών ματιών, μέχρι να προκύψουν ομόζυγοι απόγονοι με κόκκινα μάτια που να περιέχουν σε όλα τους τα κύτταρα το γονίδιο *CcOR7a* και άρα να δύνανται να παράγουν την πρωτεΐνη *CcOR7a* στις κεραίες.
- 6) την έκθεση των μυγών σε οσμηρά ερεθίσματα και την παρακολούθηση της ενεργοποίησης του συγκεκριμένου οσφρητικού νευρώνα που εκφράζει φυσιολογικά στη *Drosophila* τον υποδοχέα OR7a. Αυτό θα γίνει στο Ινστιτούτο «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» με τη μέθοδο Single Sensillum Recording (SSR). Με αυτό τον τρόπο, θα μετρηθεί η απόκριση των νευρώνων των γενετικά τροποποιημένων *Drosophila* στο οσμηρό ερέθισμα και θα συγκριθεί με τις περιπτώσεις control. Ως συνθήκες control μπορούν να χρησιμοποιηθούν μη γενετικά τροποποιημένες *Drosophila* που θα εκτεθούν στα ίδια οσμηγόνα ή θα γίνει μέτρηση ηλεκτρικής αγωγιμότητας των οσφρητικών νευρώνων χωρίς την έκθεση των εντόμων (τροποποιημένων ή μη) σε οσμές. Επίσης, ως control θα χρησιμοποιηθούν και οι διαγονιδιακές μύγες που φέρουν το γονίδιο *BoOrco*.



Εικόνα 23 – Συνοπτικά τα στάδια για τη λειτουργική ανάλυση του υποδοχέα *CcOR7a* της *Ceratitis capitata*. Το γονίδιο του υποδοχέα απομονώνεται από τη μεσογειακή μύγα και εισάγεται στον πλασμιδιακό φορέα pUAST. Το ανασυνδυασμένο DNA *CcOR7a*-pUAST εισάγεται με μικροένεση σε έμβρυα *D. melanogaster*. Γίνεται επιλογή των μυγών με κόκκινα μάτια και διασταύρωσή τους με άτομα με λευκά μάτια, ώστε να προκύψουν απόγονοι που να περιέχουν σε όλα τα κύτταρά τους το γονίδιο *CcOR7a*. Το οσφρητικό τριχίδιο της κεραίας *ab4* περιέχει τον οσφρητικό νευρώνα *ab4A* που εκφράζει φυσιολογικά το γονίδιο *OR7a* της *Drosophila*, όπου αναμένεται να εκφραστεί και το γονίδιο *CcOR7a*. Οι μύγες υπόκεινται στη μέθοδο SSR, κατά την οποία εκτίθενται σε ποικιλία οσμηγόνων και μετράται η ηλεκτρική αγωγιμότητα του νευρώνα *ab4A* ως απόκριση στα οσμηρά ερεθίσματα. Εικόνα τροποποιημένη από Gonzalez et al., 2016.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1. Σχεδιασμός Εκκινητών PCR

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν για το γονίδιο οσφρητικού υποδοχέα της *C. capitata*, ομόλογου (σε επίπεδο πρωτεΐνης) με τον υποδοχέα Or7a της *D. melanogaster*. Η αμινοξική αλληλουχία του Or7a της *Drosophila* ανακτήθηκε από τη βάση δεδομένων FlyBase. Στη συνέχεια, έγινε Blast πρωτεϊνών (blastp) αυτής της αλληλουχίας στο γονιδίωμα της *Ceratitis capitata* με τις προεπιλεγμένες παραμέτρους, ώστε να εντοπιστεί η πρωτεΐνη της *C. capitata* που εμφανίζει ομολογία με τον υποδοχέα Or7a της *Drosophila*. Από το Blast βρέθηκε η αλληλουχία με Accession number: CAD6992760.1, η οποία ανήκει στο στέλεχος EgII της *C. capitata*, που διαθέτει το εργαστήριο. Η αλληλουχία αυτή έχει ομοιότητα 78% με την αλληλουχία της *Drosophila* (E-value=4e⁻⁸⁶). Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με βάση το μετάγραφο (κωδική αλληλουχία-CDS) αυτού του γονιδίου, το οποίο χάριν ευκολίας αναφέρω ως CcOr7a στην παρούσα εργασία. Η κωδική αλληλουχία του γονιδίου που ανακτήθηκε από το Blast (με φορά 5' → 3') είναι η παρακάτω και έχει μέγεθος 966bp:

ATGCAGTTTTTGAGCCGAATACAGGCTGGAACCTAATGTGCTTGGCATCCCACCGAAATGTTAACTTTGGCA
TTCTCTTTGAAGCGTATGCGCAGCATTGAACCTTATTGGATGTTATGGATGCAAGATACACCGATCCCGAA
GATGTGGCCTTAATACGACAGGCAGCGATTATGGGTAATCGATTGGTATTCGGTTTTGGCATGACATATTTG
ACATATATGCTGTTAACATAACACCACCCTTGATCAGTGGTAATGTGCCTCTCTCAATTTGGATACCATTCT
TGGATGAGAATCAATCGACGCTGCATCACTTGATGCAGGTAGTTATGGATTTGTTTTAATGTTTTCTCTGTT
ATTCCATCAAGTGGTGAATGATTTCGTACGGTACGGTATATATCTATGTTATTCGTACACATTTGCGATTGTTG
ATACGTCGGGTTGAGCGTTTTGTGTGTGAACGGCGAGAAAAGTGTGCGAGGATAACATGGCAGAGCTGGTGG
ATTGCGTCAACAACGCATCAACAAATATTAAGCTTATTGACAATCATTGAACCGATTATTTTCAGTAACGATGT
TTACACAATTTTTAATTTATGGCCATAATTTGTGTGTAACCATGGTAAATATGTTTCATCTTTGCCGATCTGAG
CACACAAATTTGCCCTCAACCTTTATTTTATGTGCGTGCTAATGCAGACATCGCCATGTTGCTATTTTGCTACC
GAGCTGAAGGCGGATAGTGAAAGATTGCCGCTTGCCATTTTCACTGCCGTTGGATGGATCAAGATCAACGT
TTTCGCAAAGTGATAATATATTTTCATGCATCGGGCTCAGTCCCAATTGAGCTGATGGCTATGAAATTTGTTCC
CCATTAATGTGGCTACAAATATTTTCGCTTGCTAAATCTCGTTTACGCTATTTACTTTCATCAAAGAAATGGG
AGTTGGTCAAGATGCAAGAGAATAA

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής –δηλαδή η λειτουργική ανάλυση του CcOR7a- απαιτεί την απομόνωση ολόκληρου του γονιδίου, από το κωδικόνιο έναρξης (ATG) μέχρι το κωδικόνιο λήξης της μεταγραφής (TAA). Γι' αυτό οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν υβριδίζουν στις περιοχές των άκρων του γονιδίου (εμφανίζονται με υπογράμμιση στην παραπάνω αλληλουχία του μεταγράφου). Συγκεκριμένα, είναι οι εξής:

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'→3')	T _m (°C)	% περιεκτικότητα σε GC
Εμπρόσθιος (forward primer)	<u>CGGAATTCGCCACCATGCAGTTTTTGAGCGG</u>	66,3	54,8%
Ανάστροφος (reverse primer)	<u>CGGCTCGAGTTATTCTCTTGCATCTTGACC</u>	62	50%

Στις αλληλουχίες των εκκινητών που θα υβριδίσουν με το γονίδιο CcOr7a (επισημαίνονται με bold) έχουν προστεθεί αλληλουχίες αναγνώρισης περιοριστικών

ενζύμων (υπογραμμισμένες: EcoRI για τον εμπρόσθιο και XhoI για τον ανάστροφο εκκινητή), που θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για την εισαγωγή του γονιδίου σε φορείς κλωνοποίησης. Ταυτόχρονα, στο 5' άκρο του εμπρόσθιου εκκινητή έχει προστεθεί η συναινετική αλληλουχία Kozak (5' GCCACC 3'), που αποτελεί σημείο πρόσδεσης του ριβοσώματος σηματοδοτώντας την έναρξη της μετάφρασης. Τέλος, στα άκρα των εκκινητών προστέθηκαν νουκλεοτίδια GC για να εξασφαλισθεί η σταθερότητά τους.

3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Αρχή της μεθόδου

Η PCR (Polymerase Chain Reaction) είναι μια απλή και γρήγορη πειραματική τεχνική, που επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA in vitro, χωρίς τη διαμεσολάβηση ζωντανών οργανισμών. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της PCR με στόχο την ενίσχυση και απομόνωση του μεταγράφου του γονιδίου *CcOr7a*, χρησιμοποιώντας ως μήτρα το ολικό cDNA μίγματος αρσενικών και θηλυκών *C. capitata*.

Η μέθοδος βασίζεται στην δράση ειδικών, θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών, ενζύμων που χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), με τελικό σκοπό την επαναλαμβανόμενη αντιγραφή ενός επιλεγμένου τμήματος DNA, το οποίο καθορίζεται από το ζεύγος ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών που θα χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση.

Τα συστατικά που απαιτούνται για τη διεξαγωγή μίας PCR είναι:

1. Μία **θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση**: σε μια απλή PCR, συνήθως, χρησιμοποιείται η Taq πολυμεράση (Taq pol), που προέρχεται από τον μικροοργανισμό *Thermus aquaticus*: ένα θερμοφιλο βακτήριο που ζει σε περιβάλλοντα όπου κυριαρχούν πολύ υψηλές θερμοκρασίες.
2. Δείγμα που περιέχει **DNA**: θα χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο (**template**) από την DNA πολυμεράση για τη σύνθεση των νέων αλυσίδων.
3. Ένα **ζεύγος εκκινητών**: υβριδίζουν στα άκρα του επιλεγμένου προς ενίσχυση τμήματος DNA και επιμηκύνονται από την πολυμεράση.
4. Διάλυμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (**dNTPs**)
5. **Ρυθμιστικό διάλυμα** της δράσης του ενζύμου: δημιουργεί το βέλτιστο περιβάλλον δράσης της πολυμεράσης και παρέχει τα ιόντα Mg^{2+} που δρουν ως συμπαραγόντες του ενζύμου.

Στάδια της PCR

Τα βήματα της μεθόδου PCR, συνοπτικά, είναι τα ακόλουθα:

1. **Αποδιάταξη** του δίκλωνου DNA: συμβαίνει σε θερμοκρασίες 94-96°C.
2. **Υβριδισμός** των εκκινητών βάσει συμπληρωματικότητας με τα άκρα του προς ενίσχυση τμήματος DNA.
Η θερμοκρασία υβριδισμού (T_a) των εκκινητών εξαρτάται από τις θερμοκρασίες τήξης τους (T_m), που με τη σειρά τους εξαρτώνται από το μήκος, την αλληλουχία και την περιεκτικότητά τους σε νουκλεοτίδια γουανίνης και κυτοσίνης (GC content). Γενικά, ισχύει ότι $T_a = T_m - 5$, και συνήθως η T_a κυμαίνεται στο εύρος των 54 – 68°C.

3. **Επιμήκυνση** των εκκινητών και σύνθεση της θυγατρικής αλυσίδας DNA, ύστερα από τη δράση της DNA πολυμεράσης. Η θερμοκρασία του σταδίου αυτού είναι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της ειδικής DNA πολυμεράσης. Συνήθως χρησιμοποιούνται οι 72°C.

Τα στάδια αυτά επαναλαμβάνονται για πολλούς κύκλους, ώστε εν τέλει να προκύψει μεγάλος αριθμός αντιγράφων του επιθυμητού τμήματος DNA.

Πρωτόκολλο αντίδρασης

Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις PCR είναι η KAPA HiFi DNA πολυμεράση (High Fidelity), εφόσον η Taq πολυμεράση δεν είναι τόσο αποτελεσματική επειδή εισάγει πιο συχνά μεταλλάξεις στο προς ενίσχυση τμήμα DNA. (Η KAPA Taq DNA πολυμεράση έχει ρυθμό λάθους 1 στα $2,2 \times 10^5$ νουκλεοτίδια, ενώ η KAPA HiFi εισάγει 1 λάθος νουκλεοτίδιο στα $3,6 \times 10^6$.)

Συστατικά αντίδρασης:

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση	V (uL)
cDNA template (<i>C. capitata</i>)			4
KAPA HiFi Buffer	5X	1X	4
dNTP mix	10 mM	0,3 mM	0,6
Εμπρόσθιος εκκινητής (F)	10 uM	0,3 uM	0,6
Ανάστροφος εκκινητής (R)	10 uM	0,3 uM	0,6
KAPA HiFi pol	1 Unit/uL	0,5 Units	0,5
ddH ₂ O	-	-	9,7
Τελικός όγκος			20

Η προσθήκη των αντιδραστηρίων γίνεται σε πάγο, ώστε να αποφευχθούν τυχόν αλλοιώσεις τους.

Συνθήκες αντίδρασης:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 min	1
Αποδιάταξη	98°C	20 sec	35
Υβριδοποίηση εκκινητών	60°C	15 sec	
Επιμήκυνση	72°C	1:20 min*	
Τελική επιμήκυνση	72°C	1:20 min*	1
Συντήρηση	4°C	∞	1

*Ο χρόνος των σταδίων επιμήκυνσης εξαρτάται από το μέγεθος του προς ενίσχυση τμήματος. Το μετάγραφο του *CcOr7a* έχει μήκος 966bp. Το πρωτόκολλο του KAPA HiFi PCR kit προτείνει διάρκεια επιμήκυνσης περίπου 15-60 sec/kb. Ο υπολογισμός του χρόνου επιμήκυνσης έγινε κατά προσέγγιση, για την επιμήκυνση τμήματος DNA 1000bp με ρυθμό 60 sec/kb.

3.3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Την PCR διαδέχτηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μία τεχνική οπτικοποίησης των αποτελεσμάτων της PCR, μέσω του διαχωρισμού των

νουκλεϊκών οξέων και δίνει τη δυνατότητα απομόνωσης του επιθυμητού τμήματος DNA (στη συγκεκριμένη περίπτωση το γονίδιο *CcOr7a*).

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των αρνητικά φορτισμένων μορίων DNA να κινούνται κατά μήκος μιας πηκτής. Στην πηκτή δεν κατανέμεται ομοιόμορφα η ποσότητα της αгарόζης, γι' αυτό σχηματίζονται πόροι μέσα από τους οποίους περνούν τα μόρια DNA όταν εφαρμοστεί στα άκρα του πηκτώματος ηλεκτρική τάση. Με αυτό τον τρόπο, τα μόρια διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους καθώς κινούνται από την κάθοδο προς την άνοδο, με το πιο μικρό να έχει διανύσει τη μεγαλύτερη απόσταση.

Η διακριτική ικανότητα της πηκτής εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αгарόζης που προστίθεται κατά την παρασκευή της, το μέγεθος και τη στερεοδιάταξη των μορίων DNA, και τη σύσταση του διαλύματος ηλεκτροφόρησης. Στη συγκεκριμένη περίπτωση προστέθηκε 1% αгарόζη, εφόσον το μήκος του γονιδίου είναι αρκετά μεγάλο (966bp).

Υλικά

- **Σκόνη αгарόζης**
- **Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X** (Tris, Boric acid, EDTA 0,5M pH=8)
- **Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)**: έχει την ικανότητα να προσδένεται στο δίκλωνο DNA και μπορεί να γίνει ορατό ύστερα από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV).
- **Διάλυμα Loading Dye 6X**. Περιέχει γλυκερόλη, η οποία έχει μεγάλο μοριακό βάρος και έτσι θα αποτρέψει τη διάχυση του δείγματος στο πήκτωμα. Επίσης, περιέχει κυανούνη της βρωμοφαινόλης, που βοηθάει (α) στην οπτικοποίηση του δείγματος κατά το φόρτωμα και (β) στον εντοπισμό των μορίων DNA κατά μήκος της πηκτής καθώς αυτά μετακινούνται, ώστε να διακόψουμε τη διαδικασία εγκαίρως, πριν τα διαχωρισμένα μόρια εγκαταλείψουν την πηκτή.
- **Μάρτυρας** (Long Range DNA Ladder της Enzyquest ή 1kb+ Ladder της NEB)

A) Παρασκευή πηκτής αгарόζης

- 1) Ζυγίζονται 0,5 gr αгарόζης και τοποθετούνται σε κωνική φιάλη.
- 2) Στην κωνική φιάλη προστίθενται 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE (Tris/Boric acid/EDTA).
- 3) Το μίγμα της αгарόζης με το TBE αναδεύεται και θερμαίνεται στο φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αгарόζη πλήρως, με τη βοήθεια σποραδικών αναδεύσεων.
- 4) Ακολουθεί ελάττωση της θερμοκρασίας του μίγματος κάτω από τη βρύση (~55°C), με ταυτόχρονη ανάδευση.
- 5) Προστίθενται 1,5μL βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) στην κωνική φιάλη και γίνεται διάλυσή του έπειτα από ανάδευση.
- 6) Το μίγμα αποχύνεται σε εκμαγείο με χτενάκια. Αν δημιουργηθούν φυσαλίδες, φροντίζουμε να τις απομακρύνουμε με τη βοήθεια ενός tip.
- 7) Το πήκτωμα σχηματίζεται στα επόμενα 15 λεπτά και το χρώμα του γίνεται γαλακτόχρωμο.
- 8) Μόλις πήξει η γέλη, αφαιρούνται τα χτενάκια, έπειτα αφαιρείται από τη βάση και τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιέχει το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα 0,5X TBE.

B) Προετοιμασία των προϊόντων της PCR

- 1) Προσθήκη 4μL 6X Loading Dye στις αντιδράσεις της 20μL PCR (τελική συγκέντρωση χρωστικής: 1X).
- 2) Φόρτωμα των προϊόντων και του μάρτυρα στα πηγαδάκια της πηκτής αγαρόζης.

3.4. Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση και τον καθαρισμό του πολλαπλασιασμένου από PCR γονιδίου *CcOr7a*. Μετά την ηλεκτροφόρηση και κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία, με τη βοήθεια αποστειρωμένου νυστεριού έγινε κοπή του τμήματος του πηκτώματος που περιείχε την επιθυμητή ζώνη και τοποθέτησή του σε σωλήνα τύπου Eppendorf των 1,5mL. Για τη συγκεκριμένη διαδικασία χρησιμοποιήθηκε το kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up της εταιρείας Macherey-Nagel.

Μεθοδολογία:

- 1) Ζύγισμα του κομματιού της πηκτής αγαρόζης.
- 2) Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας του διαλύματος NTI (200μL NTI ανά 100mg πηκτής).
- 3) Επώαση για 5-10 λεπτά στους 50°C, μέχρι να διαλυθεί η πηκτή.
- 4) Φόρτωση του δείγματος σε στήλη και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 11000g.
- 5) Απόρριψη του υπερκειμένου.
- 6) Προσθήκη 700μL διαλύματος NT3 για καθαρισμό του δείγματος και φυγοκέντρηση στα 11000g για 1 λεπτό.
- 7) Απόρριψη του υπερκειμένου και επανάληψη του βήματος 6 με φυγοκέντρηση 5 λεπτά αυτή τη φορά.
- 8) Στέγνωμα της μεμβράνης της στήλης, αρχικά, μέσω φυγοκέντρησης για 5 λεπτά στα 11000g, κι έπειτα, για 5 λεπτά σε φουρνάκι στους 70°C.
- 9) Τοποθέτηση της στήλης σε σωλήνα συλλογής τύπου Eppendorf και προσθήκη στο κέντρο της στήλης 20μL ddH₂O που έχει προηγουμένως θερμανθεί στους 70°C.
- 10) Επώαση για 1-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT).
- 11) Φυγοκέντρηση στα 11000g για 1 λεπτό.
- 12) Επανάληψη των βημάτων 9, 10 και 11.
- 13) Μέτρηση της συγκέντρωσης DNA στη συσκευή Quawell Q3000 spectrophotometer.

3.5. Re-PCR

Ακολούθησε PCR, έχοντας ως εκμαγείο DNA (template) το προϊόν απομόνωσης από την αρχική PCR (re-PCR), με στόχο τον πολλαπλασιασμό και την απομόνωση μεγαλύτερης ποσότητας DNA του υποδοχέα. Στο πρωτόκολλο της Re-PCR εφαρμόστηκαν αυστηρότερες συνθήκες σε σχέση με την αρχική PCR (μικρότερη συγκέντρωση εκκινητών, υψηλότερη θερμοκρασία υβριδισμού) ώστε να περιοριστούν τα παραπροϊόντα της αντίδρασης.

Συστατικά αντίδρασης:

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση	Όγκος (uL)
Απομονωμένο DNA από πηκτική αгарόζης (template)			2
KAPA HiFi Buffer	5X	1X	4
dNTP mix	10 mM	0,3 mM	0,6
Εμπρόσθιος εκκινητής (F)	10 uM	0,15 uM	0,3
Ανάστροφος εκκινητής (R)	10 uM	0,15 uM	0,3
KAPA HiFi pol	1 Unit/uL	0,5 Units	0,5
ddH ₂ O	-	-	12,3
Τελικός όγκος			20

Συνθήκες αντίδρασης:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 min	1
Αποδιάταξη	98°C	20 sec	35
Υβριδοποίηση εκκινητών	68°C	15 sec	
Επιμήκυνση	72°C	1:20 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	1:20 min	1
Συντήρηση	4°C	∞	1

3.6. Πέψη DNA με περιοριστικά ένζυμα

Το πρώτο βήμα για τη διαδικασία της κλωνοποίησης του *CcOR7a* είναι η ενσωμάτωσή του σε πλασμιδιακούς φορείς κλωνοποίησης. Για να επιτευχθεί αυτό, πρέπει πρώτα γονίδιο και φορείς να κοπούν με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα.

Τόσο το γονίδιο που απομονώθηκε παραπάνω (βλ. Σχεδιασμό εκκινητών), όσο και οι φορείς κλωνοποίησης περιέχουν θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων *EcoRI* και *XhoI*, τα οποία αναγνωρίζουν και προσδένονται αντίστοιχα στις αλληλουχίες 5' GAATTC 3' και 5' CTCGAG 3' στο δίκλωνο DNA και τις κόβουν αφήνοντας μονόκλινα (κολλώδη) άκρα. Έτσι, το ένθεμα (γονίδιο *CcOR7a*) και ο πλασμιδιακός φορέας θα μπορούν στη συνέχεια να ανασυνδυαστούν μέσω της αντίδρασης σύνδεσης (ligation).

Υλικά:

- **DNA**
- **Ρυθμιστικό διάλυμα** περιοριστικών ενζύμων. Όταν χρησιμοποιούμε δύο διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα, πρέπει να λαμβάνουμε υπόψη ότι απαιτείται χρήση ρυθμιστικού διαλύματος που δημιουργεί βέλτιστες συνθήκες για τη δράση και των δύο ενζύμων.
- **Περιοριστικά ένζυμα.** Συνήθως προσθέτουμε την ποσότητα που συνιστά η εταιρεία. Γενικότερα, δε θα πρέπει ο όγκος του ενζύμου να υπερβαίνει το 10% του όγκου της αντίδρασης, καθώς σε αυτή την περίπτωση οι ενδονουκλεάσες δύνανται να κόψουν και περιοχές παρόμοιες με τις αντίστοιχες θέσεις αναγνώρισης αλλά όχι πανομοιότυπες (star activity).

Μεθοδολογία:

- 1) Εισαγωγή των αντιδραστηρίων σε δοκιμαστικούς σωλήνες τύπου Eppendorf σε πάγο. Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητές τους που χρησιμοποιήθηκαν για τα συγκεκριμένα πειράματα είναι οι εξής:

Για την πέψη του CcOR7a:

Αντιδραστήρια	Σαρχική	Στελική	Όγκος (uL)
CcOr7a από πηκτή αγαρόζης (764,4 ng)			39
CutSmart Buffer	10X	1X	5
EcoRI-HF (NEB)	20000 units/ml	20 units	1
XhoI (NEB)	20000 units/ml	20 units	1
ddH ₂ O	-	-	4
Τελικός όγκος			50

Για την πέψη του φορέα pBluescript II SK (+):

Αντιδραστήρια	Όγκος (uL)
p-Bluescript (160 ng/uL)	6,25 (1 μg)
CutSmart Buffer 10X	2
EcoRI-HF (NEB)	1
XhoI (NEB)	1
ddH ₂ O	9,75
Τελικός όγκος	20

Για την πέψη του φορέα pUAST:

Αντιδραστήρια	Όγκος (uL)
pUAST (443,5 ng/uL)	11,28 (5 μg)
CutSmart Buffer	5
EcoRI-HF (NEB)	2,5
XhoI (NEB)	2,5
ddH ₂ O	28,72
Τελικός όγκος	50

- 2) Επώαση στο υδατόλουτρο στους 37°C για 1 ώρα.

3.7. Αντίδραση σύνδεσης (Ligation)

Η αντίδραση σύνδεσης οδηγεί στην ένωση του DNA ενθέματος με τον πλασμιδιακό φορέα, μέσω της σύνδεσης των κομμένων άκρων τους, προς δημιουργία ενός ανασυνδυασμένου μορίου DNA. Αυτό επιτυγχάνεται με τη δράση μιας DNA λιγάσης· ενζύμου που ενώνει άκρα DNA δημιουργώντας φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Συνήθως χρησιμοποιείται πειραματικά είτε η DNA λιγάση της *E. coli* είτε η T4 DNA λιγάση, ανάλογα με το είδος των προς σύνδεση άκρων. Η πρώτη αναγνωρίζει και συνδέει τυφλά άκρα, ενώ η λιγάση του βακτηριοφάγου T4 συνδέει όλα τα είδη άκρων. Στην προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η T4 DNA λιγάση της εταιρείας EnzyQuest.

Την αντίδραση επηρεάζουν παράγοντες όπως: η θερμοκρασία, η συγκέντρωση ιόντων, το είδος των άκρων, η συγκέντρωση των άκρων DNA και το μοριακό βάρος των τμημάτων DNA που πρόκειται να ανασυνδυαστούν. Συνεπώς, η ποσότητα του DNA-ενθέματος που θα προστεθεί στην αντίδραση υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$ng \text{ ενθέματος} = ng \text{ φορέα} \times a \times b,$$

Όπου:

$$a = \frac{\text{πλήθος μορίων ενθέματος}}{\text{πλήθος μορίων φορέα}} \text{ (συνήθως ισούται με 3:1), και}$$

$$b = \frac{\text{μέγεθος ενθέματος}}{\text{μέγεθος φορέα}}$$

Οι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν για ανασυνδυασμό είναι:

- Το πλασμίδιο **pBluescript II SK(+)**: σχεδιάστηκε για έκφραση σε βακτηριακό DNA και περιλαμβάνει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης, επιτρέποντας την επιλογή των κατάλληλων βακτηριακών κλώνων μέσω του μηχανισμού διάκρισης μπλε/λευκών αποικιών. Χρησιμοποιήθηκε ως στάδιο προετοιμασίας για την αποτελεσματικότερη εισαγωγή του ενθέματος στον φορέα pUAST.
- Το πλασμίδιο **pUAST**: είναι σχεδιασμένο για έκφραση του επιθυμητού γονιδίου στο γονιδίωμα της *D. melanogaster*, καθώς περιέχει τα μεταθετά στοιχεία p-elements. Τα p-elements αναγνωρίζονται από το ένζυμο τρανσποζάση, η οποία θα τα κόψει ενσωματώνοντας το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο στο γονιδίωμα της μύγας. Επίσης διαθέτει το γονίδιο mini-white που προσδίδει φαινότυπο κόκκινων ματιών στις *Drosophila*. Η τελευταία ιδιότητα θα χρησιμοποιηθεί στο στάδιο των μικροενέσεων για την επιλογή των μυγών που θα έχουν λάβει το ανασυνδυασμένο DNA.

Μεθοδολογία:

- 1) Τοποθέτηση των αντιδραστηρίων σε σωλήνα τύπου Eppendorf, σε ποσότητες όπως φαίνονται στους ακόλουθους πίνακες (μοριακή αναλογία ενθέματος προς φορέα 3:1):

Για τον pBluescript:

Αντιδραστήρια	Όγκος (uL)
Digested pBluescript vector (13,6 ng/uL)	3,67 (50 ng)
Digested CcOR7a (PCR product) (3:1)	2,52
T4 DNA ligase buffer (NEB)	2
T4 ligase enzyme (EnzyQuest)	1
ddH ₂ O	10,81
Τελικός όγκος	20

Για τον pUAST:

Αντιδραστήρια	Όγκος (uL)
Digested pUAST vector (54,5 ng/uL)	2 (100 ng)
Digested CcOR7a (PCR product) (3:1)	2,2
T4 DNA ligase buffer (NEB)	2
T4 ligase enzyme (EnzyQuest)	1
ddH ₂ O	14,9
Τελικός όγκος	20

- 2) Ακολουθεί επώαση για να επιτευχθεί η σύνδεση των άκρων (ligation). Η σύνδεση του CcOR7a με τον pBluescript έγινε με επώαση 2 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου (25°C), ενώ με τον pUAST επώαστηκε για 16 ώρες στους 16°C.

- 3) Το πρωί της επόμενης μέρας προστέθηκε άλλο 1ul ενζύμου για πιο επιτυχημένη σύνδεση.
- 4) Απενεργοποίηση της λιγάσης με επώαση στους 65°C για 10 λεπτά.

3.8. Κατακρήμνιση DNA

Μέσω της κατακρήμνισης του DNA επιτυγχάνεται η συμπύκνωση και άρα η αύξηση της συγκέντρωσής του, ώστε να καθίσταται εφικτή η χρήση του σε μετέπειτα πειραματικές διαδικασίες. Κατακρήμνιση επιτυγχάνεται με τη χρήση αιθανόλης (70%) ή ισοπροπανόλης και ενός άλατος, καθώς αυτά μειώνουν τη διαλυτότητα του DNA στο διάλυμα, με αποτέλεσμα να μπορούμε να το απομονώσουμε.

Υλικά:

- **DNA**
- **Γλυκογόνο 20 mg/ml:** Το γλυκογόνο αποτελεί θετικά φορτισμένη ουσία με μεγάλο μοριακό βάρος. Έτσι, συμπλοκοποιείται με το αρνητικά φορτισμένο DNA και καθιζάνει λόγω του υψηλού μοριακού του βάρους.
- **Διάλυμα παγωμένης αιθανόλης 100% (ή ισοπροπανόλης 100%):** Η αιθανόλη έχει μικρότερη διηλεκτρική σταθερά από το νερό, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ισχύς των δυνάμεων έλξης που ασκούνται μεταξύ του DNA και του γλυκογόνου. Όταν είναι παγωμένη, αυτή η διηλεκτρική σταθερά αυξάνεται λίγο (αλλά παραμένει μικρότερη από αυτή του νερού), καθώς το σύμπλοκο γλυκογόνου-DNA δε θέλουμε να σταθεροποιηθεί, ώστε στη συνέχεια να δύναται να αφαιρεθεί το γλυκογόνο και να απομονωθεί καθαρό το DNA.
- **Διάλυμα CH₃COONa 3M pH=3,4:** Το άλας (CH₃COONa) βοηθά στην καταστροφή των δεσμών υδρογόνου μεταξύ του DNA και του νερού, με αποτέλεσμα το DNA να καθίσταται αδιάλυτο.
- **Διάλυμα αιθανόλης 70%:** Λόγω πιο αυξημένης διηλεκτρικής σταθεράς, μειώνει τις ελκτικές δυνάμεις μεταξύ DNA και γλυκογόνου, προετοιμάζοντας την απομόνωση του γενετικού υλικού. Το βήμα αυτό πραγματοποιείται για το ξέπλυμα τυχόν εναπομείναντος αλατιού από το ιζηματοποιημένο DNA.

Μεθοδολογία:

- 1) Προσθήκη του δείγματος DNA, της παγωμένης αιθανόλης 100%, του άλατος (CH₃COONa) και του γλυκογόνου σε σωλήνα τύπου Eppendorf, με τους εξής όγκους:

Αντιδραστήρια	Όγκος
Δείγμα DNA	V=200 uL (προσθήκη ddH ₂ O μέχρι τα 200 uL για ευκολότερο χειρισμό)
Αιθανόλη 100% ή ισοπροπανόλη 100%	2 * V (=400 uL)
CH ₃ COONa	1/10 * V (=20 uL)
Γλυκογόνο	5 uL

- 2) Επώαση στους -80°C για 20 λεπτά.
- 3) Φυγοκέντρηση στις 14000 rpm (μέγιστη ταχύτητα φυγοκέντρου) για 15 λεπτά στους 4°C.
- 4) Απόρριψη υπερκείμενου και προσθήκη 500 uL αιθανόλης 70%.
- 5) Φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C.
- 6) Απόρριψη υπερκείμενου με προσοχή, γιατί το ίζημα ενδέχεται να ξεκολλήσει από το τοίχωμα του Eppendorf και να διαλυθεί.

- 7) Στέγνωμα (air dry) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 8) Αναδιάλυση με προσθήκη:
 - 10 μL ddH₂O: όταν το κατακρημνισμένο DNA προέρχεται από την αντίδραση λιγάσης (βλ. Ενότητα 3.7).
 - 40 μL νερού RNάσης: στην περίπτωση απομόνωσης πλασμιδίου (βλ. Ενότητα 3.11.)

3.9. Μετασηματισμός βακτηρίων *E.coli* με ηλεκτροδιάτρηση

Ο μετασηματισμός βακτηρίων αποτελεί μία τεχνική in vivo, που χρησιμοποιεί ζωντανούς οργανισμούς για τον πολλαπλασιασμό των ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών φορέων, ώστε να χρησιμοποιηθούν στα επικείμενα πειράματα.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος DH5α, που ανήκει στο είδος των βακτηρίων *Escherichia coli*. Το συγκεκριμένο στέλεχος περιλαμβάνει τις εξής μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας:

α) *endA1*: εντοπίζεται σε γονίδιο που κωδικοποιεί μία ενδονουκλεάση του βακτηρίου. Η μετάλλαξή της έχει σκοπό την αύξηση της αποδοτικότητας πρόσληψης των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων.

β) *lacZΔM15*: αποτέλεσμα της μετάλλαξης είναι η μη-έκφραση του γονιδίου *lacZ* που κωδικοποιεί τη β-γαλακτοσιδάση, καθιστώντας εφικτή την επιλογή των μετασηματισμένων βακτηρίων με την δοκιμασία α-συμπληρωματικότητας (μπλε/λευκές αποικίες).

γ) *recA1*: μετάλλαξη της πρωτεΐνης RecA, που φυσιολογικά συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA. Αποτέλεσμα της μετάλλαξης είναι η υψηλότερη σταθερότητα του εισαγόμενου DNA.

Ο μετασηματισμός των DH5α βακτηρίων έγινε μηχανικά με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης, κατά την οποία ασκούνται στα βακτήρια ηλεκτρικοί παλμοί που διαταράσσουν την οργάνωση των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής τους μεμβράνης. Έτσι, επιτρέπουν στο ανασυνδυασμένο DNA να εισαχθεί στο εσωτερικό τους. Εντούτοις, η διαδικασία εγκυμονεί τον κίνδυνο της λύσης των κυττάρων, αν σε αυτά ασκηθούν υψηλής έντασης παλμοί ή ασκηθούν παλμοί για μεγάλη χρονική διάρκεια. Γι' αυτό το λόγο, είναι πολύ σημαντικό η διαδικασία να γίνει με προσοχή. Τέλος, ολόκληρη η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε ασηπτικό περιβάλλον, για να μην υπάρξουν επιμολύνσεις.

Υλικά για ηλεκτροδιάτρηση:

- **Ανασυνδυασμένο DNA**
- **Δεκτικά DH5α κύτταρα**
- **Υγρό θρεπτικό υλικό LB Broth Free** (10gr bacto-tryptone, 5gr yeast extract, 5gr NaCl στο 1L)

Μεθοδολογία:

- 1) Μεταφορά του δοκιμαστικού σωλήνα Eppendorf των κυττάρων DH5α (40 uL) πάγο για να ξεπαγώσουν (προηγουμένως ήταν αποθηκευμένα στους -80°C).
- 2) Προσθήκη 5 uL του ανασυνδυασμένου DNA στα 40 uL των κυττάρων και ελαφριά ανάδευση με την πιπέτα.

- 3) Εισαγωγή του μίγματος των κυττάρων με το DNA σε ειδική κυψελίδα που έχει προψυχθεί στους -20°C.
- 4) Εισαγωγή της κυψελίδας στο μηχάνημα ηλεκτροδιάτρησης και εφαρμογή παλμών με ένταση 13,8 kV/cm για 5-6 msec.
- 5) Αμέσως προστίθενται 955 μ L LB Free. Γίνεται ήπια ανάδευση για να μην «στρεσαριστούν» περαιτέρω τα κύτταρα.
- 6) Μεταφορά ολόκληρης της ποσότητας σε αποστειρωμένο σωλήνα falcon.
- 7) Επώαση για 1 ώρα στους 37°C και στις 160 rpm.
- 8) Προσθήκη 200 μ L από την καλλιέργεια σε τρυβλίο Petri, που έχει τοποθετηθεί στους 37°C για τουλάχιστον 20 λεπτά, και περιέχει στερεό θρεπτικό υλικό LB agar (10 gr tryptone, 15gr agar, 15gr yeast extract, 5gr NaCl στο 1 L) με αμπικιλίνη (100 μ g/ml). Άπλωμα των μετασχηματισμένων κυττάρων με τη βοήθεια μιας γυάλινης πιπέτας Pasteur που έχει κυρτώσει κατά την αποστείρωσή της στο φλόγιστρο.
- 9) Επώαση overnight (O/N) στους 37°C.
- 10) Ο εναπομείνας όγκος της καλλιέργειας τοποθετείται σε σωλήνα Eppendorf και αποθηκεύεται στο ψυγείο (4°C) για ακόμη λίγες ώρες, σε περίπτωση που δεν πάρουμε αρκετές αποικίες από το πρώτο «στρώσιμο».

3.10. Επιλογή κλώνων

3.10.1. Επιλογή μετασχηματισμένων κλώνων

Η επιλογή των βακτηριακών κλώνων που έχουν μετασχηματιστεί (είτε από τον φορέα pUAST είτε από τον pBluescript) γίνεται με τη δράση του αντιβιοτικού αμπικιλίνη, το οποίο αποτελεί συστατικό του στερεού θρεπτικού υλικού LB agar που υπάρχει στο τρυβλίο Petri. Εφόσον τα DH5α δεν έχουν κάποιο γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και ταυτόχρονα το γονίδιο αυτό υπάρχει στους πλασμιδιακούς φορείς (pBluescript και pUAST), τότε αυτόματα πεθαίνουν τα βακτήρια που δεν έχουν μετασχηματιστεί και αναπτύσσονται μόνο εκείνα που δέχθηκαν τον πλασμιδιακό φορέα στο εσωτερικό τους, είτε αυτός είναι ανασυνδυασμένος (έχει εισαχθεί το ένθεμα) είτε μη-ανασυνδυασμένος.

3.10.2. Επιλογή «ανασυνδυασμένων» κλώνων: α-συμπληρωματικότητα

Στην περίπτωση του μετασχηματισμού βακτηρίων DH5α με τον ανασυνδυασμένο φορέα pBluescript, είναι εφικτή η διάκριση εκείνων των κλώνων που περιέχουν τον ανασυνδυασμένο φορέα από εκείνους που περιέχουν τον μη-ανασυνδυασμένο, με τη μέθοδο της α-συμπληρωματικότητας, ή αλλιώς «επιλογή μπλε/λευκών αποικιών» (Blue/white selection).

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση να χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα την ένωση X-gal και να τη μεταβολίζει, παράγοντας έγχρωμο (μπλε) προϊόν. Η β-γαλακτοσιδάση παράγεται από το γονίδιο του οπερονίου της λακτόζης *lacZ*, και δεν παράγεται από τα βακτήρια DH5α (Ενότητα 3.9). Ωστόσο, το γονίδιο *lacZ* εμπεριέχεται στον φορέα pBluescript και, μάλιστα, παρεμβάλλεται από την περιοχή του πολυσυνδέτη. Έτσι, όταν εισαχθεί στο πλασμίδιο ένα ένθεμα DNA, τότε το γονίδιο διακόπτεται και δεν μπορεί να κωδικοποιήσει την παραγωγή της β-γαλακτοσιδάσης. Έτσι, οι βακτηριακοί κλώνοι που έχουν δεχθεί τον ανασυνδυασμένο pBluescript θα φαίνονται λευκοί-άχρωμοι στο τρυβλίο. Αντίθετα, εκείνοι που έχουν δεχθεί μη-ανασυνδυασμένο φορέα (δεν περιέχει το ένθεμα) θα χρωματιστούν μπλε.

Υλικά

- **X-gal** 20 mg/uL
- **IPTG** 0,5 ug/uL: είναι μόριο δομικά παρόμοιο με την αλλολακτόζη. Έτσι, χρησιμοποιείται ως επαγωγέας του οπερονίου της λακτόζης, οδηγώντας στην παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης.

Μεθοδολογία:

- 1) Συμπληρωματικά της Ενότητας 3.9. (βήμα 8 της Μεθοδολογίας), μετά το μετασχηματισμό των βακτηρίων και ταυτόχρονα με την τοποθέτηση των 200 uL της βακτηριακής καλλιέργειας προστίθενται 40 uL X-Gal και 1,4 uL IPTG.
- 2) Ακολουθεί επώαση O/N της καλλιέργειας στους 37°C.
- 3) Την επόμενη μέρα γίνεται επιλογή των επιθυμητών αποικιών και τοποθέτηση κάθε μοναδιαίας αποικίας σε δοκιμαστικό σωλήνα των 15mL που περιέχει 2mL LB Broth με αμπικιλίνη.
- 4) Επώαση O/N στους 37°C και στις 210 rpm.

Τα βήματα 3 και 4 αφορούν την διαχείριση των επιλεγμένων βακτηριακών κλώνων (είτε αυτοί έχουν επιλεγεί με α-συμπληρωματικότητα είτε όχι) με σκοπό την προετοιμασία των βακτηρίων για απομόνωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου (βλ. Ενότητα 3.11.)

3.11. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA – Αλκαλική λύση

Η διαδικασία απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- 1) **λύση των βακτηριακών κυττάρων:** αυτό γίνεται με μηχανικό ή με χημικό τρόπο. Στα πειράματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας ακολουθήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης.
- 2) **απενεργοποίηση νουκλεασών:** με τη χρήση ισχυρών χαστροπικών αλάτων (όπως το EDTA)
- 3) **διαχωρισμός του DNA από τα υπόλοιπα κυτταρικά υπολείμματα:** με κατακρήμνιση, ώστε τα κυτταρικά υπολείμματα να συγκεντρωθούν στο ίζημα και να απορριφθούν.
- 4) **Καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA:** απομόνωση μέσω κατακρήμνισης με αιθανόλη (βλ. Ενότητα 3.8.).

Στην αλκαλική λύση χρησιμοποιείται SDS (για τη διαλυτοποίηση της κυτταρικής μεμβράνης και την αποδιάταξη των πρωτεϊνών του κυττάρου) και NaOH (καταστρέφει τους δεσμούς υδρογόνου των δίκλωνων μορίων DNA, μετατρέποντάς τα σε μονόκλινα).

3.11.1. Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδίου (Minipreps)

Με τη βοήθεια του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου απομονώνεται πλασμιδιακό DNA από μικρής κλίμακας βακτηριακές καλλιέργειες (12mL). Το πρωτόκολλο αποτελεί παραλλαγή των μεθόδων των Birnboim & Doly, 1979 και Ish-Horowicz & Burke, 1981.

Υλικά:

- Καλλιέργεια βακτηρίων
- Παγωμένο και αποστειρωμένο Διάλυμα I (50mM glucose, 25mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA pH 8)
- Πρόσφατα παρασκευασμένο Διάλυμα II (0,2N NaOH, 1% SDS)
- Παγωμένο Διάλυμα III (παρασκευάζεται με 60mL οξικού καλίου 5M, 11,5mL οξικού οξέος 100% και 28,5 mL H₂O).
- Διάλυμα Φαινόλης-Χλωροφορμίου (Phenol:chloroform:isoamyl acetate 25:24:1)
- Διάλυμα χλωροφορμίου
- Αιθανόλη 100%
- Διάλυμα οξικού νατρίου 3M pH 3,4
- Αιθανόλη 70%
- Διάλυμα ddH₂O με RNάση A (20μg/ml)

Μεθοδολογία

- 1) Ανάπτυξη 2mL κυττάρων DH5α που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο σε υγρό θρεπτικό μέσο LB εμπλουτισμένο με αμπικιλίνη (βλ. Ενότητα 3.10).
- 2) Μεταφορά 1,5 mL της κορεσμένης βακτηριακής καλλιέργειας σε σωλήνα τύπου Eppendorf και φυγοκέντρηση στα 12000g για 1 λεπτό σε περιβάλλον 4°C. Η υπόλοιπη καλλιέργεια αποθηκεύεται στους 4°C στο ψυγείο.
- 3) Απόρριψη του υπερκειμένου και τοποθέτηση του ιζήματος στον πάγο.
- 4) Αναδιάλυση του ιζήματος με προσθήκη 100 μL παγωμένου Διαλύματος I και ισχυρή ανάδευση στο vortex, ώστε τα βακτήρια να διαλυθούν πλήρως στο διάλυμα.
- 5) Προσθήκη 200 μL από διαυγές Διάλυμα II και ήπια ανάδευση, αναποδογυρίζοντας το Eppendorf 5 φορές.
Σε αυτό το στάδιο γίνεται ορατό το βακτηριακό χρωμοσωμικό DNA με την όψη λευκών ινών· ένδειξη ότι έγινε η λύση των κυττάρων.
- 6) Τοποθέτηση στον πάγο για περίπου 5 λεπτά.
- 7) Προσθήκη 150 μL παγωμένου Διαλύματος III με ήπια ανάδευση, όπως και στο στάδιο 5.
- 8) Τοποθέτηση του σωλήνα Eppendorf στον πάγο για 3-5 λεπτά.
- 9) Φυγοκέντρηση στα 12000g για 5 λεπτά στους 4°C και μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο Eppendorf.
- 10) Προσθήκη ίσου όγκου από το διάλυμα Φαινόλης-Χλωροφορμίου και ανάδευση στο vortex.
- 11) Φυγοκέντρηση στα 12000g για 2 λεπτά στους 4°C και μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωλήνα Eppendorf.
- 12) Προσθήκη διαλύματος χλωροφορμίου ίσου όγκου με το υπερκείμενο, ανάδευση στο vortex και φυγοκέντρηση στα 12000g για 2 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο Eppendorf.
- 13) Κατακρήμνιση του δίκλωνου DNA με προσθήκη διπλάσιου όγκου αιθανόλης 100% και τοποθέτηση του σωλήνα στον πάγο για 5 λεπτά.
- 14) Στη συνέχεια ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της Ενότητας 3.8. από το βήμα 3 και έπειτα.
- 15) Τελικά, γίνεται αναδιάλυση του ιζήματος σε 40 μL υδατικού διαλύματος RNάσης A.

3.11.2. Μεγαλύτερης κλίμακας απομόνωση πλασμιδίου (Midipreps)

Η μέθοδος των Midipreps ακολουθήθηκε για την απομόνωση σε μεγαλύτερη ποσότητα του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου CcOr7a-pUAST, το οποίο προέρχεται από την αντίστοιχη καλλιέργεια μετασχηματισμένων DH5α κυττάρων, που έχουν αποθηκευτεί σε glycerol stock στους -80°C και προέρχεται από «θετική» αποικία.

Για τα midipreps χρησιμοποιήθηκε των kit NucleoBond® Xtra Midi της εταιρείας Macherey-Nagel και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που το συνόδευε.

Μεθοδολογία:

Το πείραμα διεξήχθη σε 2 ημέρες:

1^η ημέρα:

- 1) Προσθήκη 5mL θρεπτικού υλικού LB Broth με αμπικιλίνη σε κωνική φιάλη.
- 2) Ενοφθαλισμός μετασχηματισμένων βακτηρίων DH5α (από glycerol stock) στην κωνική φιάλη, με τη βοήθεια ενός αποστειρωμένου κρίκου ενοφθαλισμού.
- 3) Επώαση στους 37°C με ανάδευση στις 210 rpm για 8 ώρες.
- 4) Αφαίρεση 100mL από την κωνική φιάλη και τοποθέτησή τους σε μια άλλη κωνική φιάλη των 500ml, η οποία περιέχει 100ml θρεπτικό υλικό LB Broth με αμπικιλίνη (αραίωση 1:1000).
- 5) Επώαση στους 37°C με ανάδευση στις 210 rpm για 16 ώρες (O/N).

2^η ημέρα:

- 1) Διαμοιρασμός 100ml της καλλιέργειας σε δύο σωλήνες falcon των 50ml.
- 2) Φυγοκέντρηση στα 6000g για 10 λεπτά στους 4°C και απόρριψη του υπερκλειμένου.
- 3) Προσθήκη 8 ml ρυθμιστικού διαλύματος RES (περιέχει RNase A) και αναδιάλυση του ιζήματος μέσω πιπεταρίσματος με ορολογική πιπέτα.
- 4) Προσθήκη 8ml διαλύματος LYS και ανάδευση μέσω αναποδογυρίσματος του falcon 5 φορές.
- 5) Επώαση του μίγματος για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
Προσοχή: ο χρόνος επώασης δεν πρέπει να ξεπεράσει τα 5 λεπτά, αλλιώς μπορεί να αποδιαταχθεί το πλασμιδιακό DNA.
- 6) Προετοιμασία των στηλών με την προσθήκη 12 ml διαλύματος εξισορρόπησης (EQU buffer).
- 7) Προσθήκη 8 ml διαλύματος NEU στα falcon και ανάδευση μέσω ήπιου αναποδογυρίσματος του σωλήνα έως ότου το μπλε δείγμα να αποχρωματιστεί πλήρως.
- 8) Φυγοκέντρηση στα 5000g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C.
- 9) Φόρτωση του υπερκλειμένου στο φίλτρο της στήλης φιλτραρίσματος.
- 10) Προσθήκη 5 ml διαλύματος EQU στο φίλτρο της στήλης.
- 11) Αφού αδειάσει η στήλη, γίνεται αφαίρεση του φίλτρου και απόρριψή του.
- 12) Προσθήκη 8 ml διαλύματος WASH στην στήλη.
- 13) Μόλις αδειάσει η στήλη, προστίθενται 5 ml του διαλύματος ELU για την έκλυση του πλασμιδιακού DNA και τη συλλογή του σε falcon των 15 ml που τοποθετούνται ακριβώς κάτω από τη στήλη.
- 14) Αφαίρεση της στήλης, προσθήκη 3,5 ml ισοπροπανόλης στο falcon και ήπια ανάδευση με το χέρι

- 15) Διαμοιρασμός του περιεχομένου των falcon με ορολογική πιπέτα σε 6 διαφορετικά σωληνάκια Eppendorf.
- 16) Φυγοκέντρηση στα 15000g για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία 4°C.
- 17) Απόρριψη του υπερκείμενου και τοποθέτηση των Eppendorf στον πάγο.
- 18) Προσθήκη 500uL αιθανόλης 70% και φυγοκέντρηση στα 15000g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 19) Προσεκτική απόρριψη της αιθανόλης με τη βοήθεια της πιπέτας και στέγνωμα (air dry) του ιζήματος για 10-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 20) Προσθήκη 300uL ddH₂O σε κάθε Eppendorf για αναδιάλυση και τοποθέτηση για 10 λεπτά στους 50°C.
- 21) Μεταφορά της ποσότητας καθενός από τα 6 σωληνάκια Eppendorf σε ένα σωληνάκι, το οποίο συνολικά θα περιέχει 180 uL πλασμιδιακού DNA διαλυμένου σε ddH₂O.

3.12. Glycerol Stocks

Η δημιουργία των stock γλυκερόλης έγινε με σκοπό τη μακροχρόνια αποθήκευση των βακτηρίων DH5α σε συνθήκες -80°C. Η χορήγηση γλυκερόλης στην καλλιέργεια (προτού αυτή ψυχθεί στους -80°C) αποτρέπει την καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων, διατηρώντας τα ζωντανά.

Υλικά:

- Αποστειρωμένο διάλυμα γλυκερόλης 50% (παρασκευάζεται με διάλυση 100% γλυκερόλης σε ddH₂O)
- Υγρή καλλιέργεια βακτηρίων που έχει επωαστεί O/N
- Σωληνάκι των 2 ml με καπάκι που βιδώνει

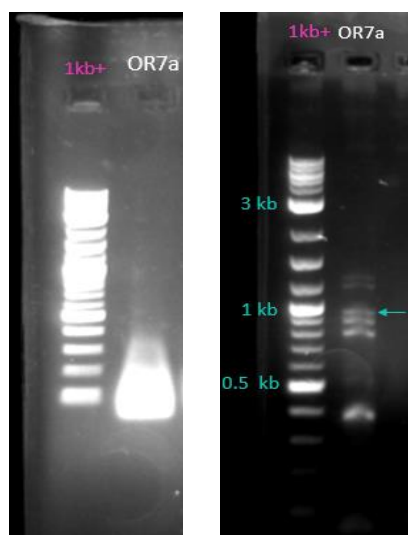
Μεθοδολογία:

- 1) Ανάμειξη 250 μL γλυκερόλης 50% και 250 μL υγρής καλλιέργειας στο σωληνάκι.
- 2) Ανάδευση με αναποδογύρισμα του σωληνακίου περίπου 5 φορές.
- 3) Αποθήκευση στους -80°C.

4. Αποτελέσματα

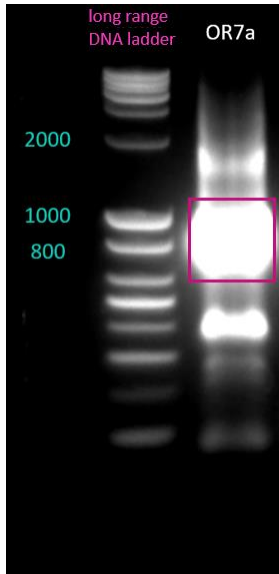
4.1. Απομόνωση CcOr7a

Το γονίδιο του οσφρητικού υποδοχέα CcOr7a απομονώθηκε από το ολικό cDNA ενήλικων αρσενικών και θηλυκών εντόμων *Ceratitis capitata*. Για την ενίσχυση του μεταγράφου του υποδοχέα χρησιμοποιήθηκε η HiFi πολυμεράση, καθώς η Taq είχε δοκιμαστεί χωρίς να δώσει αποτέλεσμα (Εικόνα 24).



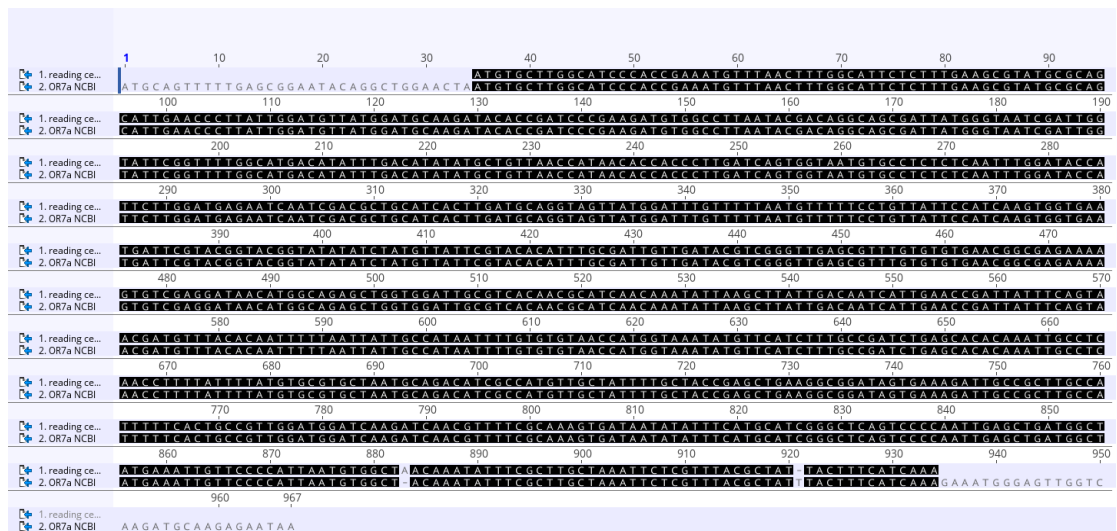
Εικόνα 24 – Αποτελέσματα PCR. Αριστερά: Αντίδραση PCR με KAPA Taq Pol. Δεξιά: Αντίδραση PCR με KAPA HiFi Polymerase. Το βέλος υποδεικνύει τη ζώνη που αντιστοιχεί στο γονίδιο CcOR7a, το οποίο έχει μέγεθος 966bp.

Στην Εικόνα 24 (δεξιά) φαίνεται με την υπόδειξη του βέλους η ζώνη που αντιστοιχεί στο μετάγραφο του CcOR7a. Η ζώνη αυτή απομονώθηκε με τη βοήθεια νυστεριού και ακολούθησε απομόνωση και καθαρισμός του προϊόντος για να ενισχυθεί περαιτέρω με τη διαδικασία της Re-PCR, της οποίας το αποτέλεσμα απεικονίζεται στην Εικόνα 25.



Εικόνα 25 – Αποτελέσματα Re-PCR. Στο πλαίσιο απεικονίζεται μία έντονη ζώνη που εντοπίζεται μεταξύ των 800 bp και 1000 bp του μάρτυρα. Η ζώνη αυτή θεωρήθηκε ότι αντιστοιχεί στο μετάγραφο του CcOR7a. (CcOR7a: 966 bp)

Έπειτα ακολούθησε απομόνωση του προϊόντος της Re-PCR από την πηκτή αгарόζης (ζώνη στο πλαίσιο της Εικόνας 25) και αλληλούχηση κατά Sanger για την ταυτοποίηση και την επιβεβαίωση ότι πρόκειται για το γονίδιο CcOR7a. Από τα αποτελέσματα της αλληλούχησης διαπιστώθηκε ότι το DNA που απομονώθηκε ήταν όντως το μετάγραφο του υποδοχέα CcOR7a (Εικόνα 26). Από τη στοίχιση των αλληλουχιών παρατηρήθηκε ότι υπάρχουν δύο μεταλλάξεις στις νουκλεοτιδικές θέσεις 883 και 921. Ωστόσο, το τμήμα αυτό του μεταγράφου δεν είχε «διαβαστεί» καλά κατά την αλληλούχηση, διότι βρίσκεται προς το τέλος της αλληλουχίας διαβάσματος, οπότε και δε λήφθηκε υπόψη.



Εικόνα 26 – Αποτελέσματα αλληλούχησης γονιδίου – Στοίχιση και σύγκριση των αλληλουχιών. Επάνω: αλληλουχία που ενισχύθηκε στο εργαστήριο. Κάτω: αλληλουχία NCBI. Η αλληλουχία που ενισχύθηκε μέσω της Re-PCR ταυτίζεται με την αλληλουχία του μεταγράφου του υποδοχέα CcOR7a στο NCBI. (Στοίχιση στο πρόγραμμα Geneious).

4.2. Κλωνοποίηση CcOr7a

Στη συνέχεια το μετάγραφο εισήχθη διαδοχικά σε δύο φορείς κλωνοποίησης: τον pBluescript και τον pUAST. Τελικός στόχος της μοριακής κλωνοποίησης ήταν η απομόνωση μεγάλης συγκέντρωσης ανασυνδυασμένου DNA CcOr7a-pUAST, ώστε σε επόμενο στάδιο να γίνει η εισαγωγή αυτής της κατασκευής στο γονιδίωμα της *Drosophila melanogaster*.

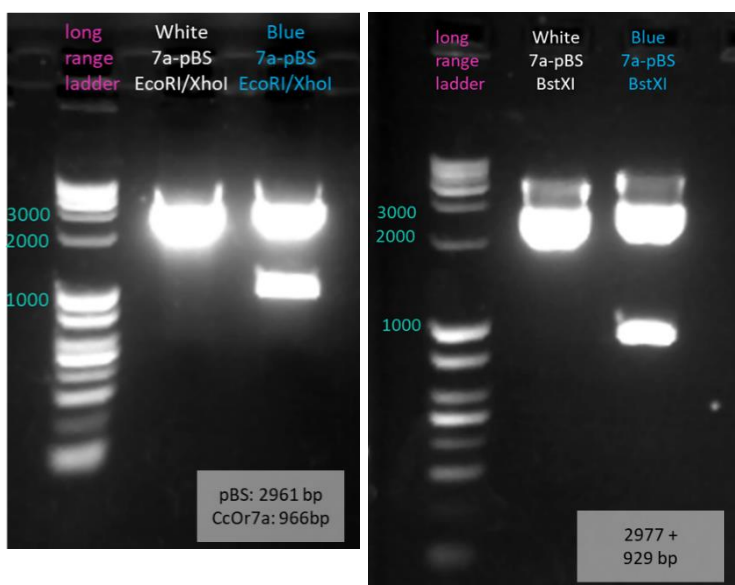
Σε πρώτο στάδιο έλαβε χώρα η εισαγωγή του γονιδίου CcOr7a στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript. Αυτό συνέβη διότι στο εργαστήριο έχει αποδειχθεί εμπειρικά ότι η εισαγωγή των ενθεμάτων στον pBluescript πριν τον ανασυνδυασμό με pUAST αυξάνει την αποτελεσματικότητα της τεχνικής, απομονώνοντας εν τέλει καθαρότερη ποσότητα ενθέματος για την εισαγωγή του στον pUAST.

4.2.1. Εισαγωγή του μεταγράφου CcOr7a στο φορέα pBluescript II SK (+)

Αρχικά έγινε πέψη τόσο του γονιδίου CcOr7a, όσο και του φορέα pBluescript με ενδονουκλεάσες περιορισμού EcoRI και XhoI. Έπειτα τα κομμένα αυτά μόρια συμμετείχαν στην αντίδραση σύνδεσης (ligation) και ενώθηκαν με τη δράση της DNA λιγάσης.

Στη συνέχεια, το ανασυνδυασμένο DNA εισήχθη σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα DH5a μέσω μετασχηματισμού με ηλεκτροδιάτρηση. Από το μετασχηματισμό προέκυψαν συνολικά 2 αποικίες: μία μπλε και μία λευκή. Έτσι, ακολούθησε απομόνωση και των δύο αποικιών με εκχύλιση πλασμιδιακού DNA (minipreps).

Μετά την απομόνωση των πλασμιδίων (minipreps) από το λευκό και τον μπλε κλώνο πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές πέψεις για να ερευνηθεί αν η λευκή αποικία περιέχει το επιθυμητό ένθεμα (CcOr7a). Τα αποτελέσματα των διαγνωστικών πέψεων φαίνονται παρακάτω στην Εικόνα 27.



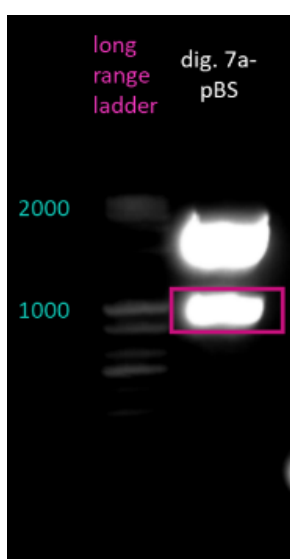
Εικόνα 27 – Διαγνωστικές πέψεις μπλε/λευκών αποικιών. Αριστερά: 1^η διαγνωστική πέψη με EcoRI/XhoI. Οι επιθυμητές ζώνες φαίνονται κάτω δεξιά της συγκεκριμένης φωτογραφίας. Δεξιά: 2^η διαγνωστική πέψη με BstXI. Το ένζυμο αναγνωρίζει και κόβει αλληλουχίες αμφοτέρων του φορέα και του ενθέματος και οι επιθυμητές ζώνες είναι στα 2977 και 929 bp. (Μέγεθος φορέα pBluescript: 2961 bp)

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 27 (αριστερά), συνέβη ακριβώς το αντίθετο από το αναμενόμενο. Δηλαδή, η λευκή αποικία δεν περιείχε το ένθεμα, ενώ η μπλε αποικία

περιείχε το ανασυνδυασμένο DNA με ένθεμα το γονίδιο *CcOr7a*. Για το λόγο αυτό, ακολούθησε νέα διαγνωστική πέψη (Εικόνα 27 δεξιά) με τη χρήση του περιοριστικού ενζύμου *BstXI*, το οποίο κόβει τόσο το ένθεμα (*CcOr7a*), όσο και τον πλασμιδιακό φορέα (*pBluescript*). Η επαναληπτική πέψη έδωσε τελικά τα τμήματα 2977+929 bp, τα οποία επαλήθευαν ότι η κατασκευή *CcOr7a-pBluescript* ήταν παρούσα στον μπλε βακτηριακό κλώνο. Δεδομένων των αποτελεσμάτων, θεωρήθηκε ότι συνέβη λάθος κατά την ονομασία των δειγμάτων. Παρόλα αυτά, εφόσον το ένθεμα είχε ανακτηθεί (ανεξάρτητα από το είδος της αποικίας), ακολούθησε η εισαγωγή του στον φορέα *pUAST*.

4.2.2. Εισαγωγή του μεταγράφου *CcOr7a* στο φορέα *pUAST*

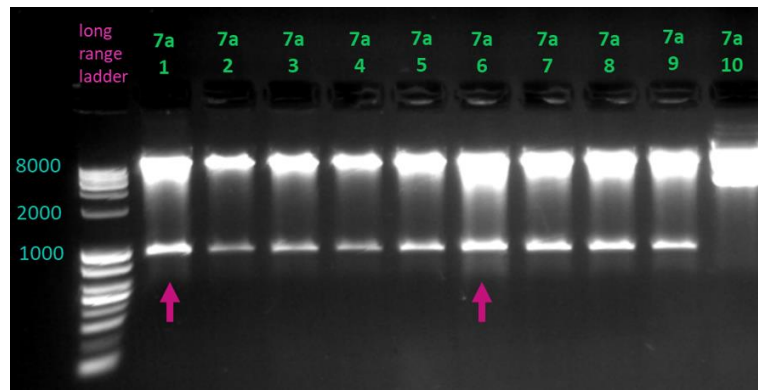
Σε πρώτο στάδιο έγινε πέψη του πλασμιδίου *CcOr7a-pBluescript* (που ανακτήθηκε από *mini-preps* της μπλε βακτηριακής αποικίας), με τα ένζυμα *EcoRI* και *XhoI*. Από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης απομονώθηκε η ζώνη που αντιστοιχεί στο ένθεμα (*CcOr7a*), ώστε στη συνέχεια να μπορεί να συνδεθεί με τον φορέα *pUAST* (Εικόνα 28).



Εικόνα 28 – Πέψη της κατασκευής *CcOr7a-pBluescript*. Η ζώνη που εσωκλείεται στο πλαίσιο (αντιστοιχεί στα 966bp του *CcOr7a*) αφαιρέθηκε από την πηκτή αγαρόζης για να γίνει απομόνωση του γονιδίου.

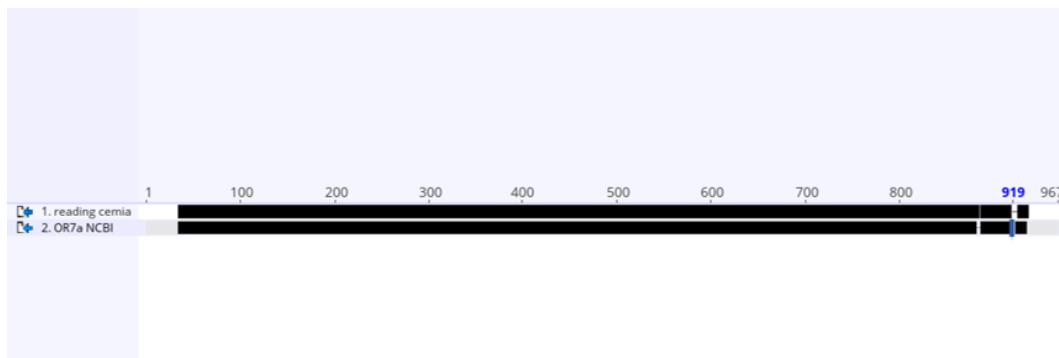
Έπειτα ακολούθησε πέψη του πλασμιδιακού φορέα *pUAST* με τα ίδια ένζυμα περιορισμού, ώστε τελικά να πραγματοποιηθεί η αντίδραση σύνδεσης (*ligation*).

Σε επόμενο βήμα πραγματοποιήθηκε ηλεκτροδιάτρηση των βακτηρίων *DH5α*, ώστε να εισαχθεί η κατασκευή *CcOr7a-pUAST* στο εσωτερικό τους. Οι αποικίες που προέκυψαν αυτή τη φορά ήταν περισσότερες. Έτσι, επιλέχθηκαν 10 από αυτές για απομόνωση του ανασυνδυασμένου DNA (*mini-preps*) και, έπειτα, έγιναν διαγνωστικές πέψεις με *EcoRI* και *XhoI* (Εικόνα 29).



Εικόνα 29 – Διαγνωστικές πέψεις αποικιών μετασηματισμού με pUAST. Από τις 10 αποικίες που συλλέχθηκαν, οι 9 περιείχαν την επιθυμητή ζώνη του ενθέματος (966bp). Με τα βέλη υποδεικνύονται οι αποικίες που επιλέχθηκαν για δημιουργία glycerol stock και αποθήκευση στους -80°C. (Μέγεθος φορέα pUAST: 8904 bp)

Από τις πέψεις προέκυψε ότι οι 9 εκ των 10 αποικιών περιείχαν την επιθυμητή ζώνη του ενθέματος, οπότε επιλέχθηκαν οι 1 και 6 για αποθήκευση σε στοκ γλυκερόλης. Ποσότητα από την αποικία 1 στάλθηκε για αλληλούχηση κατά Sanger, η οποία τελικά επιβεβαίωσε ότι το ένθεμα είναι το γονίδιο CcOr7a (Εικόνα 30).



Εικόνα 30 – Στοιχισμός αποτελεσμάτων αλληλούχησης των minipreps pUAST. Επάνω: διάβασμα του δείγματος που στάλθηκε για αλληλούχηση. Κάτω: αλληλουχία του μεταγράφου CcOr7a στο NCBI. Παρατηρούνται επίσης ορισμένες μεταλλάξεις-ασυμφωνίες νουκλεοτιδικών βάσεων σε τμήματα της αλληλουχίας που δε διαβάστηκαν καλά. Τέλος, υπήρχαν δύο κομμάτια περίπου 20 νουκλεοτιδίων εκατέρωθεν του γονιδίου που δε διαβάστηκαν καθόλου. (Στοιχισμός στο πρόγραμμα Geneious).

4.3. Προετοιμασία δείγματος για μικροενέσεις

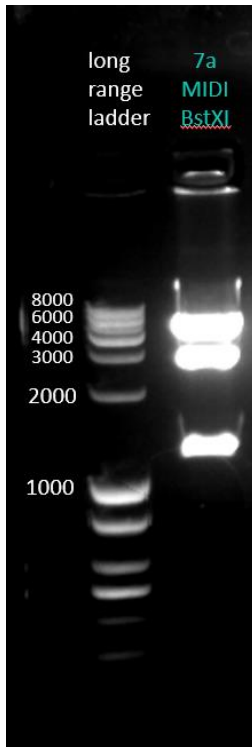
Οι μικροενέσεις πραγματοποιήθηκαν στο Κέντρο Μοριακής Βιολογίας Severo Ochoa του Αυτόνομου Πανεπιστημίου της Μαδρίτης, όπου στάλθηκε δείγμα του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου CcOr7a-pUAST.

Με σκοπό την αποστολή του δείγματος έγινε απομόνωση πλασμιδίου μεγάλης κλίμακας (midipreps) από κύτταρα DH5α που βρίσκονταν αποθηκευμένα στους -80°C σε γλυκερόλη. Το stock που επιλέχθηκε για midipreps ήταν εκείνο που περιείχε την αποικία 1 (βλ. Εικόνα 29). Η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε τελικά είναι 1931,8 ng/μL.

Μετά τα midipreps ακολούθησαν διαγνωστικές πέψεις (σε αραιώσεις του αρχικού δείγματος midiprep) για να επαληθευτεί η παρουσία της κατασκευής CcOr7a-pUAST. Στις διαγνωστικές πέψεις χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο BstXI, το οποίο κόβει στο εσωτερικό

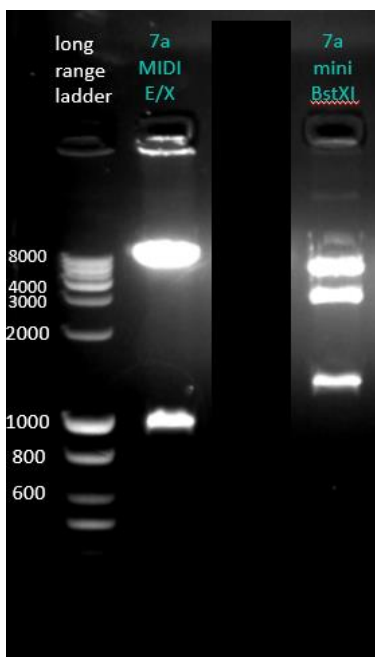
αμφότερων του ενθέματος CcOr7a και του φορέα pUAST, και δίνει δύο τμήματα με μήκη 6837 και 3015 ζεύγη βάσεων.

Εντούτοις, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 31, από τη διαγνωστική πέψη προέκυψαν τρεις ζώνες αντί για τις δύο που αναμενόταν. Η πέψη επαναλήφθηκε δίνοντας ξανά τα ίδια αποτελέσματα.



Εικόνα 31 – Διαγνωστική πέψη των Midipreps CcOr7a-pUAST με BstXI. Προέκυψαν διαφορετικές ζώνες από τις αναμενόμενες.

Έτσι, στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ίδια πέψη στο δείγμα της αποικίας 1 που προέκυψε από τα minipreps και είχε ήδη αλληλουχηθεί (Εικόνα 30). Το αποτέλεσμα ήταν πάλι το ίδιο (Εικόνα 32): εμφανίστηκαν οι ίδιες τρεις ζώνες, ενώ στην πέψη των midipreps με EcoRI και XhoI εμφανίζονταν οι επιθυμητές ζώνες (8904+966 bp).



Εικόνα 32 – Επιπρόσθετες διαγνωστικές πέψεις. Αριστερά: Πέψη των midipreps CcOr7a-pUAST με EcoRI/XhoI. Δεξιά: Πέψη των minipreps CcOr7a-pUAST με BstXI.

Δεδομένου ότι έχει επιβεβαιωθεί και ταυτοποιηθεί το γονίδιο *CcOr7a* στα *mini*preps και εφόσον η πέψη αυτών με *Bst*XI δίνει ακριβώς τα ίδια (αλλά μη αναμενόμενα) τμήματα DNA, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το δείγμα των *mid*i-preps περιέχει ακριβώς την ίδια αλληλουχία του γονιδίου *CcOr7a* με το δείγμα των *mini*preps. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στην υπόθεση ότι στις περιοχές του γονιδίου που δεν αλληλουχήθηκαν (Εικόνα 30) δημιουργήθηκε κάποιο SNP που δημιουργεί μία επιπλέον θέση αναγνώρισης του ενζύμου *Bst*XI.

Για να διαπιστωθεί αυτό, έγινε αναζήτηση της αλληλουχίας αναγνώρισης στη διαβασμένη αλληλουχία του *CcOr7a* και διαπιστώθηκε ότι δεν έχει προκύψει νέα θέση αναγνώρισης του ενζύμου. Εκείνο, λοιπόν, που μένει να διερευνηθεί είναι αν έχει εισαχθεί μετάλλαξη στην αλληλουχία του φορέα *pUAST* που να προκαλεί τη δημιουργία νέας θέσης αναγνώρισης του *Bst*XI.

Οι μικροενέσεις της ανασυνδυασμένης κατασκευής *CcOr7a-pUAST* έγιναν σε έμβρυα του στελέχους *w¹¹¹⁸* της *D. melanogaster* το οποίο έχει λευκά μάτια. Για μικροενέσεις στάλθηκαν, επίσης, οι κατασκευές *CcOr85c-pUAST*, *CcOr19a-pUAST* και *BoOrco-pUAST* που δημιουργήθηκαν με την ίδια διαδικασία. Στη συνέχεια οι μύγες που είχαν ενεθεί μεταφέρθηκαν στο Ινστιτούτο «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» στην Αθήνα, όπου και έγινε η επιλογή των μυγών που απέκτησαν στο γονιδίωμά των γαμετικών τους κυττάρων την τροποποίηση με το ανασυνδυασμένο DNA, σύμφωνα με το κριτήριο του κόκκινου φαινοτύπου των ματιών. Στη συνέχεια, οι μύγες με τα κόκκινα μάτια διασταυρώθηκαν, ώστε να προκύψει πληθυσμός ομόζυγων απογόνων που περιέχουν την τροποποίηση στον πυρήνα όλων των κυττάρων τους. Οι απόγονοι αυτοί, προορίζονται για τη δοκιμασία *Single Sensillum Recording (SSR)*.

4.4. Υπόλοιποι *CcORs*

Συνολικά, τα γονίδια οσφρητικών υποδοχέων που εισήχθησαν στον πλασμιδιακό φορέα *pUAST* και τελικά με μικροενέσεις ενσωματώθηκαν σε έμβρυα *D. melanogaster* είναι τα: *CcOr7a*, *CcOr85c*, *CcOr19a* και ο *Orco* του εντόμου *Bactrocera oleae (BoOrco)*.

Επιπροσθέτως, απομονώθηκαν από το ολικό cDNA της μεσογειακής μύγας τα γονίδια των υποδοχέων *CcOr9a* και *CcOr67d* οι οποίοι έμειναν στο στάδιο εισαγωγής τους στον φορέα *pBluescript* και έχουν ταυτοποιηθεί με αλληλούχηση κατά Sanger.

Τα γονίδια *CcOr82a* και *CcOr67a* δεν ήταν εφικτό να απομονωθούν από το ολικό cDNA της μύγας, εξαιτίας των εκκινητών που επιλέχθηκαν, οι οποίοι έδιναν παραπροϊόντα και δεν ενίσχυαν το επιθυμητό τμήμα DNA.

5. Σύνοψη - Συζήτηση

Η λειτουργική ανάλυση του *CcOr7a* αποτελεί μέρος ενός απώτερου σκοπού· αυτού της βελτιστοποίησης των παγίδων προσέλκυσης και θανάτωσης της *Ceratitidis capitata*. Όπως αναφέρεται στην Ενότητα 1.8., πρόκειται για ένα εξαιρετικά επεκτατικό έντομο, που παρασιτεί σε εκατοντάδες διαφορετικά είδη ξενιστών και απειλεί το εμπόριο φρούτων σε παγκόσμιο επίπεδο, επιφέροντας σοβαρές οικονομικές επιπτώσεις. Για το λόγο αυτό, γίνονται προσπάθειες ανάπτυξης στρατηγικών εκμηδένισης των πληθυσμών της που θα πρέπει να ικανοποιούν τα εξής κριτήρια:

- α. Να μην εγκυμονούν κινδύνους για το περιβάλλον και τη δημόσια υγεία

- β. Να έχουν χαμηλό κόστος
- γ. Να έχουν απλή και εύκολη εφαρμογή
- δ. Να χαρακτηρίζονται από ειδοειδικότητα, στοχεύοντας μόνο τη μύγα της Μεσογείου και όχι άλλα είδη εντόμων που, ενδεχομένως, ωφελούν την ανάπτυξη των καλλιεργειών.

Η ιδέα της αντιμετώπισης της *C. capitata* με τη χρήση της μεθόδου προσέλκυσης και θανάτωσης (“lure and kill”), μέχρι στιγμής φαίνεται να είναι η περισσότερο συμφέρουσα, εφόσον είναι ευκολότερα εφαρμόσιμη, δεν επιβαρύνει το περιβάλλον και ταυτόχρονα έχει χαμηλό κόστος (Navarro-Lloris et al., 2013). Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει τη χρήση παγίδων που περιέχουν εσωτερικά τον συνδυασμό μίας πτητικής ελκυστικής ένωσης και μίας τοξικής-θανατηφόρας ουσίας (π.χ. εντομοκτόνο). Με αυτό τον τρόπο αποφεύγεται η επαφή του τοξικού εντομοκτόνου με την καλλιέργεια, το περιβάλλον ή άλλους ωφέλιμους οργανισμούς και κατ’ επέκταση περιορίζεται η τοξική του δράση (Gregg et al., 2018).

Οι παγίδες που υπάρχουν μέχρι στιγμής αποδείχθηκαν αναποτελεσματικές, επειδή δεν υπακούουν στο κριτήριο της φιλικότητας προς το περιβάλλον. Συγκεκριμένα, το προϊόν BioLure που χρησιμοποιούταν ευρέως ως προσελκυστικό παγίδων καταπολέμησης της *C. capitata* αποδείχθηκε τοξικό και επικίνδυνο για το περιβάλλον και τη δημόσια υγεία. Συνεπώς, ακόμη γίνονται προσπάθειες βελτιστοποίησης των τωρινών παγίδων, μέσω του σχεδιασμού νέων ελκυστικών ενώσεων που οφείλουν αφενός να έχουν υψηλή αποτελεσματικότητα, και αφετέρου να εμφανίζουν εξειδικευμένη δράση ως προς τη μύγα της Μεσογείου.

Οι χημειοαισθήσεις (αισθήσεις όσφρησης και γεύσης) προσφέρουν στους οργανισμούς το πλεονέκτημα της αλληλεπίδρασης με χημικές ουσίες του εξωτερικού περιβάλλοντος, παρέχοντάς τους πληροφορίες για την παρουσία ωφέλιμων και βλαβερών στοιχείων. Μέσω της αίσθησης της όσφρησης τα έντομα εκμεταλλεύονται τα πτητικά μόρια του περιβάλλοντος χώρου, ώστε να εντοπίσουν διατροφικές πηγές, να ταυτοποιήσουν άτομα του αντίθετου φύλου για σύζευξη, να επιλέξουν θέσεις ωτοκίας και να αποφύγουν πιθανούς θηρευτές. Στις μύγες η αντίληψη των οσφρητικών σημάτων ξεκινά από δύο οσφρητικά όργανα: τις κεραίες και τις γναθικές προσαρκτίδες, όπου εντοπίζονται τα οσφρητικά τριχίδια που φιλοξενούν τους οσφρητικούς νευρώνες. Στους δενδρίτες των οσφρητικών νευρώνων υπάρχουν οι οσφρητικοί υποδοχείς (ORs): διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με δομή GPCR, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με τα οσμηγόνα μόρια ανάλογα με τη μοριακή δομή (del Marmol et al., 2021) και τις ταλαντώσεις των μορίων τους (Drimyli et al., 2016; Maniati et al., 2017) προκαλώντας την παραγωγή δυναμικών ενέργειας και την ενεργοποίηση των οσφρητικών νευρώνων. Έτσι, η οσφρητική πληροφορία οδηγείται στον εγκέφαλο της μύγας όπου υφίσταται επεξεργασία και αποκωδικοποιείται. Πρόκειται, λοιπόν, για ένα εξαιρετικά ευαίσθητο σύστημα αντίληψης και διάκρισης του εύρους των οσμών του περιβάλλοντος, που καταλήγει στην εκδήλωση μιας συγκεκριμένης ελκυστικής ή αποκρουστικής συμπεριφοράς.

Η ιδέα αξιοποίησης του οσφρητικού συστήματος της μύγας για τη δημιουργία ελκυστικών των παγίδων βασίζεται σε αυτή την ιδιότητα των οσμηγόνων (π.χ. οσμές των ξενιστών του εντόμου) να προκαλούν την έλξη ή την αποστροφή τόσο των θηλυκών όσο και των αρσενικών μεσογειακών μυγών. Ως εκ τούτου, τα υποψήφια

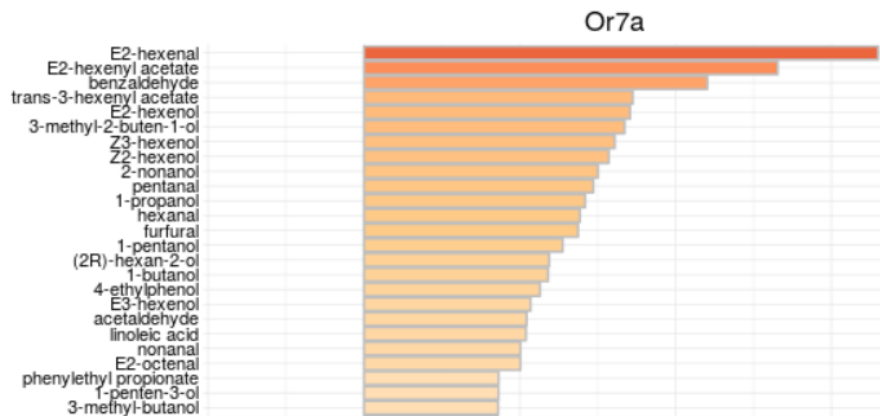
ελκυστικά είναι ενώσεις που πρέπει να προσδένονται ισχυρά σε πρωτεΐνες του οσφρητικού της μεσογειακής μύγας προκαλώντας την έντονη προσέλκυσή της στο εσωτερικό της εντομοπαγίδας.

Τα πρωτεϊνικά μόρια όπου δύνανται να προσδεθούν τα οσμηγόνα είναι οι οσφρητικοί υποδοχείς OR, IR και οι πρωτεΐνες δέσμευσης των οσμών OBP. Η παρούσα εργασία εστιάζει στους υποδοχείς OR επειδή εμφανίζουν ορισμένα πλεονεκτήματα σε σχέση με τα άλλα δύο είδη πρωτεϊνών. Πρώτον, οι πρωτεΐνες OBP δεν εμφανίζουν εκλεκτικότητα στην πρόσδεση οσμηγόνων και διαπιστώθηκε ότι κάποια οσμηγόνα μπορούν να τις παρακάμψουν (Xiao et al., 2019). Δεύτερον, οι υποδοχείς IR, πέραν του γεγονότος ότι είναι πολυλειτουργικοί, δεν αναγνωρίζουν τα οσμηγόνα με μεγάλη ευαισθησία, σε αντίθεση με τους OR που όχι μόνο έχουν μεγάλη ευαισθησία, αλλά εμφανίζουν, επίσης, ταχύτερη απόκριση (Wicher & Miazzi, 2021).

Από την αλληλούχηση του γονιδιώματος της *C. capitata* εντοπίστηκαν συνολικά 76 γονίδια οσφρητικών υποδοχέων OR (Papanicolaou et al., 2016). Εντούτοις, η πρόβλεψη της μοριακής δομής των οσφρητικών υποδοχέων της μεσογειακής μύγας είναι δύσκολο να επιτευχθεί, λόγω της διαμεμβρανικής τους τοποθέτησης. Αυτό καθιστά δύσκολη τη δημιουργία πιθανών δομικών μοντέλων των υποδοχέων σε αλληλεπίδραση με διάφορα οσμηγόνα. Συνεπώς, από μόνα τους τα δεδομένα που προκύπτουν από την ανάλυση του γονιδιώματος της *C. capitata* δεν επαρκούν για τον εντοπισμό των φυσικών προσδετών τους. Παρόλα αυτά, ο συνδυασμός της γνώσης της αλληλούχησης της *C. capitata* με τα δεδομένα απορραφονοποίησης των οσφρητικών υποδοχέων της *D. melanogaster* (Münch & Galizia, 2016) δημιουργεί πρόσφορο έδαφος για τον επακόλουθο χαρακτηρισμό των υποδοχέων της μύγας της Μεσογείου.

Στο πλαίσιο της παρούσας πτυχιακής αξιοποιήθηκαν τα δεδομένα των οσφρητικών υποδοχέων της *D. melanogaster* για να επιτευχθεί η απομόνωση και κλωνοποίηση, μεταξύ άλλων, του γονιδίου *CcOr7a* της μεσογειακής μύγας. Σε επόμενο στάδιο, το γονίδιο εισήχθη με τη μορφή ανασυνδυασμένου DNA στη μύγα *D. melanogaster*, με σκοπό την έκτοπη έκφρασή του στην τροποποιημένη *Drosophila*, ώστε να χαρακτηριστούν οι ιδιότητές του και να διερευνηθεί η ενεργοποίησή του με τη βοήθεια της τεχνικής SSR (Single Sensillum Recording), όπως περιγράφηκε στην Ενότητα 2.

Τα οσμηγόνα που θα δοκιμαστούν κατά τη διαδικασία SSR δεν είναι τυχαία, αλλά επιλέγονται σύμφωνα με τα δεδομένα προσδιορισμού των οσφρητικών υποδοχέων της *Drosophila*. Τα οσμηγόνα αυτά πρέπει να έχουν χαρακτήρα οσμής που συναντάται στους ξενιστές της μεσογειακής μύγας, ώστε μετά από την τροποποίησή τους να ανταγωνίζονται τα αντίστοιχα φυσικά, μη συνθετικά οσμηγόνα ως προς την προσέλκυση. Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων DoOR (Database of Odorant Responses), ο βέλτιστος προσδέτης του υποδοχέα OR7a της *D. melanogaster* είναι η E2-εξενάλη (Εικόνα 33). Πρόκειται για ένα μόριο με φυλλώδη οσμή (Hatanaka, 1999) που συναντάται στα φυλλώματα καρποφόρων δέντρων, όπως η μηλιά, η μουριά και η πορτοκαλιά, τα οποία αποτελούν ξενιστές της μεσογειακής μύγας. Στη μέθοδο SSR θα δοκιμαστεί η E2-εξενάλη μέσω της έκθεσης των μυγών *Drosophila* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της, ώστε να ελεγχθεί η βέλτιστη συγκέντρωσή της για την ενεργοποίηση του υποδοχέα *CcOr7a*. Παράλληλα ο υποδοχέας θα εξεταστεί και σε ένα εύρος οσμηγόνων με παρόμοιες ιδιότητες για να εντοπιστούν οι βέλτιστοι προσδέτες του.



Εικόνα 33 - Προφίλ απόκρισης του υποδοχέα Or7a της *Drosophila melanogaster* σε διαφορετικούς προσδέτες. Παρατηρείται ότι ο προσδέτης στον οποίο ο συγκεκριμένος υποδοχέας εμφανίζει την πιο έντονη ενεργοποίηση είναι η E2-εξενάλη. Η εικόνα ανακτήθηκε από τη βάση δεδομένων DoOR (Database of odorant responses. DoOR. Retrieved October 20, 2022, from <http://neuro.uni-konstanz.de/DoOR/content/DoOR.php>).

Έπειτα, οι βέλτιστοι προσδέτες της πρωτεΐνης CcOr7a, που θα προκύψουν, αναμένεται να τροποποιηθούν με σκοπό το σχεδιασμό νέων συνθετικών αγωνιστών του υποδοχέα CcOr7a, ώστε να εξασφαλισθεί μεγαλύτερη συγγένεια. Έτσι, θα επάγουν έντονη απόκριση του CcOr7a, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται εξειδικευμένη προσέλκυση της μεσογειακής μύγας στην πηγή της οσμής, δηλαδή στο εσωτερικό της παγίδας. Το ίδιο ισχύει και για τα άλλα δύο γονίδια που κλωνοποιήθηκαν (CcOr19a, CcOr88a).

Αναφορικά με τα υπόλοιπα γονίδια οσφρητικών υποδοχέων της *C. capitata* με τα οποία δούλεψα, παρακάτω παρατίθεται ένας συγκεντρωτικός πίνακας των αντίστοιχων υποδοχέων της *D. melanogaster* με τους προσδέτες που αναγνωρίζουν και τα χαρακτηριστικά τους:

Υποδοχέας	Καλύτερος Προσδέτης*	Χαρακτήρας προσδέτη	Λόγοι επιλογής/απόρριψης
Or88a	methyl-laurate	φερομόνη	Επιθυμητός χαρακτήρας οσμηγόνου
Or19a	valencene	κιτρώδης οσμή	Επιθυμητός χαρακτήρας οσμηγόνου
Or82a	geranyl acetate	φρουτώδης οσμή	Επιθυμητός χαρακτήρας οσμηγόνου, αλλά αναποτελεσματική ενίσχυση με PCR
Or9a	3-hydroxy-2-butanone	μυρωδιά μυκήτων	Μη επιθυμητός χαρακτήρας οσμηγόνου
Or67a	butyl propanoate	μυρωδιά μήλου	Επιθυμητός χαρακτήρας οσμηγόνου, αλλά αδυναμία ενίσχυσης με PCR
Or67d	11-cis-Vaccenyl acetate (cVA)	φερομόνη	Επιθυμητός χαρακτήρας οσμηγόνου

* σύμφωνα με τη βάση δεδομένων DoOR.

Ένα πλεονέκτημα που προκύπτει από τη συγκεκριμένη προσπάθεια δημιουργίας ελκυστικών της *C. capitata* είναι η προσφορά της σε επίπεδο βασικής έρευνας, αφού μετά την επανάληψη της διαδικασίας στους υπόλοιπους οσφρητικούς υποδοχείς της μεσογειακής μύγας θα έχει επιτευχθεί πλέον η απορραφανοποίησή τους. Αυτό με τη σειρά του οδηγεί στην αξιοποίηση αυτών των πληροφοριών στο πλαίσιο της εφαρμοσμένης

έρευνας σε τομείς όπως η γεωργία, η ιατρική, η αξιολόγηση τροφίμων, κ. ά. Για παράδειγμα, πέρα από τη σύνθεση νέων ελκυστικών παγίδευσης της *C. capitata*, πραγματοποιούνται προσπάθειες ανάπτυξης οσφρητικών βιοαισθητήρων που βασίζονται σε οσφρητικούς υποδοχείς των εντόμων, με σκοπό να αξιοποιηθούν στον έλεγχο τροφίμων και την ιατρική διάγνωση (Cheema et al., 2021; Lu & Liu, 2022). Αφορμή γι' αυτό αποτέλεσε το γεγονός ότι οι ORs των εντόμων δεν περιορίζονται μόνο στην αντίληψη οσμηγόνων του φυσικού τους περιβάλλοντος, αλλά έχουν την ικανότητα να εντοπίζουν ποικιλία εξωτερικών πτητικών ενώσεων που σχετίζονται με την ανίχνευση του καρκίνου, ναρκωτικών ουσιών και εκρηκτικών υλών (Marshall et al., 2010; Strauch et al., 2014).

Επιπλέον, το σύστημα χαρακτηρισμού των οσφρητικών υποδοχέων της μύγας της Μεσογείου δύναται να αποτελέσει μοντέλο για την εφαρμογή του στην καταπολέμηση και άλλων εντόμων γεωργικής και υγειονομικής σημασίας (όπως είναι ο δάκος της ελιάς *Bactrocera oleae* ή το κουνούπι-τίγρης *Aedes albopictus*, αντίστοιχα), με την προϋπόθεση ότι υπάρχουν γι' αυτά διαθέσιμα γονιδιωματικά δεδομένα.

Όσον αφορά τον χαρακτηρισμό των υποδοχέων CcOr7a, CcOr85c και CcOr19a, προς το παρόν η διαδικασία βρίσκεται στο στάδιο των διασταυρώσεων των ετερόζυγων διαγονιδιακών *Drosophila*, ώστε να προκύψουν τα ομόζυγα άτομα που θα συμμετάσχουν στην τεχνική SSR, η οποία αναμένεται να πραγματοποιηθεί στο Ινστιτούτο «Αλέξανδρος Φλέμινγκ». Την SSR θα διαδεχθεί η σύνθεση νέων συνθετικών μορίων με βάση τους βέλτιστους προσδέτες που θα προκύψουν. Στη συνέχεια, πρέπει να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα των νέων δυνητικών ελκυστικών μετά από δοκιμή της απόκρισης των εντόμων *C. capitata* σε συνθήκες εργαστηριακές (σε συστήματα όπως τα wind tunnels) και στο πεδίο.

Τέλος, ένα πρακτικό ζήτημα που επιδέχεται βελτίωση είναι η δυσκολία απομόνωσης των μεταγράφων των οσφρητικών υποδοχέων της μεσογειακής μύγας. Όπως αναφέρθηκε και στην Ενότητα 3.1., δεδομένου ότι τα γονίδια πρέπει να κλωνοποιηθούν και να εισαχθούν ολόκληρα στη *Drosophila*, καθίσταται ανέφικτο να σχεδιαστούν εκκινητές με βέλτιστα χαρακτηριστικά. Αντ' αυτού, επιλέγονται συγκεκριμένοι εκκινητές που υβριδίζουν στα άκρα του εκάστοτε γονιδίου. Αποτέλεσμα είναι, πολλές φορές, να υπολείπονται σε αποτελεσματικότητα, καθώς μπορεί να ενισχύουν και άλλες περιοχές του μεταγραφώματος δίνοντας παραπροϊόντα, ή να μην ενισχύουν καθόλου το επιθυμητό τμήμα DNA, εξαιτίας των φυσικών τους ιδιοτήτων. Αυτό συνέβη με τα γονίδια CcOr82a και CcOr67a στην προσπάθεια απομόνωσής τους με PCR (βλ. παραπάνω πίνακα). Η υπερπήδηση αυτού του εμποδίου καθιστά την παραπάνω μεθοδολογία πολλά υποσχόμενη, εφόσον δίνει προοπτικές για την ανάπτυξη ενός μοντελοποιημένου συστήματος που μπορεί να εφαρμοστεί με πολλούς τρόπους. Αυτή η διαδικασία απορροφητικής των οσφρητικών υποδοχέων της μεσογειακής μύγας αποτελεί προθάλαμο επίλυσης πληθώρας προβλημάτων πέρα από τον επεκτατισμό της *Ceratitis capitata*, αρχικά αποτελώντας μοντέλο για την καταπολέμηση και άλλων ειδών παρασιτικών και βλαβερών εντόμων. Έπειτα τα δεδομένα που προσφέρει το συγκεκριμένο μοντέλο δύνανται να αξιοποιηθούν στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων ανίχνευσης πτητικών ενώσεων για τη δυνητική χρήση τους στους τομείς της ιατρικής διαγνωστικής, της επιστήμης τροφίμων, της ασφάλειας και βιοασφάλειας, της γεωπονίας και του περιβάλλοντος, επεκτείνοντας έτσι τις εφαρμογές του.

6. Βιβλιογραφικές Παραπομπές

- Abd-Elgawad, & Mahfouz M.M. (2021). The mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae), a key pest of citrus in Egypt. *Journal of Integrated Pest Management*, 21(1). <https://doi.org/10.1093/jipm/pmab025>
- Aso, Y., Sitaraman, D., Ichinose, T., Kaun, K. R., Vogt, K., Belliard-Guérin, G., Plaçais, P. Y., Robie, A. A., Yamagata, N., Schnaitmann, C., Rowell, W. J., Johnston, R. M., Ngo, T. T. B., Chen, N., Korff, W., Nitabach, M. N., Heberlein, U., Preat, T., Branson, K. M., ... Rubin, G. M. (2014). Mushroom body output neurons encode valence and guide memory-based action selection in *Drosophila*. *ELife*, 3, e04580. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.04580>
- Bargmann, C. I. (2006). Comparative chemosensation from receptors to ecology. *Nature*, 444(7117), 295–301. <https://doi.org/10.1038/nature05402>
- Barish, S., & Volkan, P. C. (2015). Mechanisms of olfactory receptor neuron specification in *Drosophila*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 4(6), 609–621. <https://doi.org/10.1002/wdev.197>
- Benton, R., Sachse, S., Michnick, S. W., & Vosshall, L. B. (2006). Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo. *PLoS Biology*, 4(2), 240–257. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040020>
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523. <https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>
- Butterwick, J. A., del Mármol, J., Kim, K. H., Kahlson, M. A., Rogow, J. A., Walz, T., & Ruta, V. (2018). Cryo-EM structure of the insect olfactory receptor Orco. *Nature*, 560(7719), 447–452. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0420-8>
- Caron, S. J. C., Ruta, V., Abbott, L. F., & Axel, R. (2013). Random convergence of olfactory inputs in the *Drosophila* mushroom body. *Nature*, 497(7447), 113–117. <https://doi.org/10.1038/nature12063>
- Cheema, J. A., Carraher, C., Plank, N. O. V., Travas-Sejdic, J., & Kralicek, A. (2021). Insect odorant receptor-based biosensors: Current status and prospects. *Biotechnology Advances*, 53, 107840. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107840>
- Copeland, R. S., Wharton, R. A., Luke, Q., & de Meyer, M. (2002). Indigenous Hosts of *Ceratitidis capitata* (Diptera:Tephritidae) in Kenya. *ECOLOGY AND POPULATION BIOLOGY*, 95(6), 672–694. <https://academic.oup.com/aesa/article/95/6/672/117192>
- de Bruyne, M., Foster, K., & Carlson, J. R. (2001). Odor coding in the *Drosophila* antenna. *Neuron*, 30(2), 537–552. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00289-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00289-6)
- del Mármol, J., Yedlin, M. A., & Ruta, V. (2021). The structural basis of odorant recognition in insect olfactory receptors. *Nature*, 597(7874), 126–131. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03794-8>
- Drimyli, E., Gaitanidis, A., Maniati, K., Turin, L., & Skoulakis, E. M. C. (2016). Differential Electrophysiological Responses to Odorant Isotopologues in *Drosophilid* Antennae. *ENeuro*, 3(3), 44–60. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0152-15.2016>
- Eliason, J., Afify, A., Potter, C., & Matsumura, I. (2018). A GAL80 collection to inhibit GAL4 transgenes in *drosophila* olfactory sensory neurons. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(11), 3661–3668. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200569>
- Elmore, T., Ignell, R., Carlson, J. R., & Smith, D. P. (2003). Targeted Mutation of a *Drosophila* Odor Receptor Defines Receptor Requirement in a Novel Class of Sensillum. *The Journal of Neuroscience*, 23(30), 9906–9912. www.jneurosci.org
- Enkerlin, W., Gutiérrez-Ruelas, J. M., Cortes, A. V., Roldan, E. C., Midgarden, D., Lira, E., López, J. L. Z., Hendrichs, J., Liedo, P., & Arriaga, F. J. T. (2015). Area Freedom in Mexico from Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae): A Review of Over 30 Years of a Successful Containment Program Using an Integrated Area-Wide SIT Approach. *BioOne*, 98(2), 665–681. <https://doi.org/10.1653/024.098.0242>

- Fan, X. bin, Mo, B. T., Li, G. C., Huang, L. Q., Guo, H., Gong, X. L., & Wang, C. Z. (2022). Mutagenesis of the odorant receptor co-receptor (Orco) reveals severe olfactory defects in the crop pest moth *Helicoverpa armigera*. *BMC Biology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/S12915-022-01411-2>
- Fişek, M., & Wilson, R. I. (2014). Stereotyped connectivity and computations in higher order olfactory neurons. *Nature Neuroscience*, 17(2), 280. <https://doi.org/10.1038/NN.3613>
- Galizia, C. G. (2014). Olfactory coding in the insect brain: data and conjectures. *European Journal of Neuroscience*, 39(11), 1784–1795. <https://doi.org/10.1111/ejn.12558>
- Gao, Y., Huang, Q., & Xu, H. (2020). Silencing Orco Impaired the Ability to Perceive Trail Pheromones and Affected Locomotion Behavior in Two Termite Species. *Journal of Economic Entomology*, 113(6), 2941–2949. <https://doi.org/10.1093/jee/toaa248>
- Gonzalez, F., Witzgall, P., & Walker, W. B. (2016). Protocol for Heterologous Expression of Insect Odourant Receptors in *Drosophila*. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 4(24). <https://doi.org/10.3389/fevo.2016.00024>
- Grabe, V., & Sachse, S. (2018). Fundamental principles of the olfactory code. *BioSystems*, 164, 94–101. <https://doi.org/10.1016/J.BIOSYSTEMS.2017.10.010>
- Gregg, P. C., del Socorro, A. P., & Landolt, P. J. (2018). Advances in Attract-and-Kill for Agricultural Pests: Beyond Pheromones. *Annual Review of Entomology*, 63(1), 453–470. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-035040>
- Hallem, E. A., & Carlson, J. R. (2006). Coding of Odors by a Receptor Repertoire. *Cell*, 125, 143–160. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.050>
- Hallem, E. A., Ho, M. G., & Carlson, J. R. (2004). The Molecular Basis of Odor Coding in the *Drosophila* Antenna. *Cell*, 117, 965–979.
- Hatanaka, A. (1999). Biosynthesis of So-called “Green Odor” Emitted by Green Leaves. In *Comprehensive Natural Products Chemistry* (pp. 83–115). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-091283-7.00003-5>
- Haverkamp, A., Hansson, B. S., & Knaden, M. (2018). Combinatorial Codes and Labeled Lines: How Insects Use Olfactory Cues to Find and Judge Food, Mates, and Oviposition Sites in Complex Environments. *Frontiers in Physiology*, 9(49). <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00049>
- Ish-Horowicz, D., & Burke, J. F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Research*, 9(13), 2989–2998. <https://doi.org/10.1093/nar/9.13.2989>
- Jefferis, G. S. X. E., Potter, C. J., Chan, A. M., Marin, E. C., Rohlffing, T., Maurer, C. R., & Luo, L. (2007). Comprehensive Maps of *Drosophila* Higher Olfactory Centers: Spatially Segregated Fruit and Pheromone Representation. *Cell*, 128(6), 1187–1203. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.040>
- Kaupp, U. B. (2010). Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(3), 188–200. <https://doi.org/10.1038/nrn2789>
- Keller, A., & Vosshall, L. B. (2016). Olfactory perception of chemically diverse molecules. *BMC Neuroscience*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12868-016-0287-2>
- Larsson, M. C., Domingos, A. I., Jones, W. D., Chiappe, M. E., Amrein, H., & Vosshall, L. B. (2004). Or83b Encodes a Broadly Expressed Odorant Receptor Essential for *Drosophila* Olfaction. *Neuron*, 43(5), 703–714. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2004.08.019>
- Leal, W. S. (2013). Odorant Reception in Insects: Roles of Receptors, Binding Proteins, and Degrading Enzymes. *Annual Review of Entomology*, 58(1), 373–391. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153635>
- Leftwich, P. T., Koukidou, M., Rempoulakis, P., Gong, H. F., Zacharopoulou, A., Fu, G., Chapman, T., Economopoulos, A., Vontas, J., & Alphey, L. (2014). Genetic elimination of field-cage populations of Mediterranean fruit flies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1792). <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.1372>

- Lin, C.-C., & Potter, C. J. (2015). Re-Classification of *Drosophila melanogaster* Trichoid and Intermediate Sensilla Using Fluorescence-Guided Single Sensillum Recording. *PLoS One*, *10*(10), e0139675. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139675>
- Lu, Y., & Liu, Q. (2022). Sensors & Diagnostics CRITICAL REVIEW Insect olfactory system inspired biosensors for odorant detection. *Cite This: Sens. Diagn*, *1*, 1126. <https://doi.org/10.1039/d2sd00112h>
- Maniati, K., Haralambous, K. J., Turin, L., & Skoulakis, E. M. C. (2017). Vibrational detection of odorant functional groups by *drosophila melanogaster*. *ENeuro*, *4*(5). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0049-17.2017>
- Marin, E. C., Jefferis, G. S. X. E., Komiyama, T., Zhu, H., & Luo, L. (2002). Representation of the glomerular olfactory map in the *Drosophila* brain. *Cell*, *109*(2), 243–255. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00700-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00700-6)
- Marshall, B., Warr, C. G., & de Bruyne, M. (2010). Detection of Volatile Indicators of Illicit Substances by the Olfactory Receptors of *Drosophila melanogaster*. *Chem. Senses*, *35*, 613–625. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjq050>
- McGuire, S. E., Le, P. T., & Davis, R. L. (2001). The Role of *Drosophila* Mushroom Body Signaling in Olfactory Memory. *Science*, *293*(5533), 1330–1333. <https://doi.org/10.1126/science.1062622>
- Meats, A., & Smallridge, C. J. (2007). Short- and long-range dispersal of medfly, *Ceratitis capitata* (Dipt., Tephritidae), and its invasive potential. *Journal of Applied Entomology*, *131*(8), 518–523. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2007.01168.x>
- Meixner, M. D., McPheron, B. A., Silva, J. G., Gasparich, G. E., & Sheppard, W. S. (2002). The Mediterranean fruit fly in California: evidence for multiple introductions and persistent populations based on microsatellite and mitochondrial DNA variability. *Molecular Ecology*, *11*(5), 891–899. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01488.x>
- Mertes, M., Carcaud, J., & Sandoz, J. C. (2021). Olfactory coding in the antennal lobe of the bumble bee *Bombus terrestris*. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90400-6>
- Min, S., Ai, M., Shin, S. A., & Suh, G. S. B. (2013). Dedicated olfactory neurons mediating attraction behavior to ammonia and amines in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(14). <https://doi.org/10.1073/pnas.1215680110>
- Morales, P., Cermeli, M., Godoy, F., & Salas, B. (2004). A list of Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) host plants based on the records of INIA-CENIAP Museum of Insects of Agricultural Interest. *Entomotropica*, *19*(1), 51–54. <https://www.researchgate.net/publication/27794086>
- Münch, D., & Galizia, C. G. (2016). DoOR 2.0 - Comprehensive Mapping of *Drosophila melanogaster* Odorant Responses. *Scientific Reports*, *6*(1), 21841. <https://doi.org/10.1038/srep21841>
- Nakagawa, T., Pellegrino, M., Sato, K., Vossahl, L. B., & Touhara, K. (2012). Amino Acid Residues Contributing to Function of the Heteromeric Insect Olfactory Receptor Complex. *PLoS ONE*, *7*(3), 32372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032372>
- Navarro-Llopis, V., Primo, J., & Vacas, S. (2013). Efficacy of attract-and-kill devices for the control of *Ceratitis capitata*. *Pest Management Science*, *69*(4), 478–482. <https://doi.org/10.1002/ps.3393>
- Nordström, K. J. V., Sällman Almén, M., Edstam, M. M., Fredriksson, R., & Schiöth, H. B. (2011). Independent HHsearch, Needleman-Wunsch-based, and motif analyses reveal the overall hierarchy for most of the G protein-coupled receptor families. *Molecular Biology and Evolution*, *28*(9), 2471–2480. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr061>
- Olsson, S. B., & Hansson, B. S. (2013). Electroantennogram and single sensillum recording in insect antennae. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1068*, 157–177. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-619-1_11
- Papadopoulos, N. T., Katsoyannos, B. I., Carey, J. R., & Kouloussis, N. A. (2001). Seasonal and Annual Occurrence of the Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) in Northern Greece. *ECOLOGY AND POPULATION BIOLOGY*, *94*(1), 41–50. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2001\)094\[0041:SAAOOT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2001)094[0041:SAAOOT]2.0.CO;2)

- Papanicolaou, A., Schetelig, M. F., Arensburger, P., Atkinson, P. W., Benoit, J. B., Bourtzis, K., Castañera, P., Cavanaugh, J. P., Chao, H., Childers, C., Curril, I., Dinh, H., Doddapaneni, H. V., Dolan, A., Dugan, S., Friedrich, M., Gasperi, G., Geib, S., Georgakilas, G., ... Handler, A. M. (2016). The whole genome sequence of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann), reveals insights into the biology and adaptive evolution of a highly invasive pest species. *Genome Biology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1049-2>
- Pask, G. M., Jones, P. L., Rü Tzler, M., Rinker, D. C., & Zwiebel, L. J. (2011). Heteromeric Anopheline Odorant Receptors Exhibit Distinct Channel Properties. *PLoS ONE*, 6(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028774>
- Rimal, S., & Lee, Y. (2018). The multidimensional ionotropic receptors of *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology*, 27(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/IMB.12347>
- Sachse, S., & Beshel, J. (2016). The good, the bad, and the hungry: how the central brain codes odor valence to facilitate food approach in *Drosophila*. *Current Opinion in Neurobiology*, 40, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.06.012>
- Sachse, S., & Krieger, J. (2011). Olfaction in insects. *E-Neuroforum*, 17(3), 49–60. <https://doi.org/10.1007/s13295-011-0020-7>
- Sato, K., Pellegrino, M., Nakagawa, T., Nakagawa, T., Vosshall, L. B., & Touhara, K. (2008). Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature*, 452(7190), 1002–1006. <https://doi.org/10.1038/nature06850>
- Schmidt, H. R., & Benton, R. (2020). Molecular mechanisms of olfactory detection in insects: beyond receptors. *Open Biology*, 10(10), 200252. <https://doi.org/10.1098/rsob.200252>
- Sciarretta, A., Tabilio, M. R., Lampazzi, E., Ceccaroli, C., Colacci, M., & Trematerra, P. (2018). Analysis of the Mediterranean fruit fly [*Ceratitis capitata* (Wiedemann)] spatio-temporal distribution in relation to sex and female mating status for precision IPM. *PLOS ONE*, 13(4), e0195097. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195097>
- Shelly, T., Epsky, N., Jang, E. B., Reyes-Flores, J., & Vargas, R. (2014). *Trapping and the Detection, Control, and Regulation of Tephritid Fruit Flies* (T. Shelly, N. Epsky, E. B. Jang, J. Reyes-Flores, & R. Vargas, Eds.). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-9193-9>
- Silbering, A. F., Rytz, R., Grosjean, Y., Abuin, L., Ramdya, P., Jefferis, G. S. X. E., & Benton, R. (2011). Complementary Function and Integrated Wiring of the Evolutionarily Distinct *Drosophila* Olfactory Subsystems. *Journal of Neuroscience*, 31(38), 13357–13375. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2360-11.2011>
- Song, H.-G., Young Kwon, J., Soo Han, H., Bae, Y.-C., & Moon, C. (2008). First Contact to Odors: Our Current Knowledge about Odorant Receptor. *Sensors*, 8(10), 6303–6320. <https://doi.org/10.3390/s8106303>
- Spletter, M. L., & Luo, L. (2009). A New Family of Odorant Receptors in *Drosophila*. *Cell*, 136(1), 23–25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.031>
- Stensmyr, M. C., Dweck, H. K. M., Farhan, A., Ibba, I., Strutz, A., Mukunda, L., Linz, J., Grabe, V., Steck, K., Lavista-Llanos, S., Wicher, D., Sachse, S., Knaden, M., Becher, P. G., Seki, Y., & Hansson, B. S. (2012). A conserved dedicated olfactory circuit for detecting harmful microbes in *Drosophila*. *Cell*, 151(6), 1345–1357. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.046>
- Strauch, M., Lüdke, A., Münch, D., Laudes, T., Giovanni Galizia, C., Martinelli, E., Lavra, L., Paolesse, R., Olivieri, A., Catini, A., Capuano, R., & di Natale, C. (2014). More than apples and oranges - Detecting cancer with a fruit fly's antenna. *Scientific Reports* 2014 4:1, 4(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep03576>
- Strutz, A., Soelter, J., Baschwitz, A., Farhan, A., Grabe, V., Rybak, J., Knaden, M., Schmuker, M., Hansson, B. S., & Sachse, S. (2014). Decoding odor quality and intensity in the *Drosophila* brain. *ELife*, 3, e04147. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.04147>

- Sun, H., Bu, L. A., Su, S. C., Guo, D., Gao, C. F., & Wu, S. F. (2023). Knockout of the odorant receptor co-receptor, orco, impairs feeding, mating and egg-laying behavior in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 152. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2022.103889>
- Tanaka, N. K., Awasaki, T., Shimada, T., & Ito, K. (2004). Integration of chemosensory pathways in the *Drosophila* second-order olfactory centers. *Current Biology*, 14(6), 449–457. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.03.006>
- Tsoumani, K. T., Belavilas-Trovas, A., Gregoriou, M. E., & Mathiopoulos, K. D. (2020). Anosmic flies: what Orco silencing does to olive fruit flies. *BMC Genetics*, 21(Suppl 2). <https://doi.org/10.1186/S12863-020-00937-0>
- Venthur, H., & Zhou, J.-J. (2018). Odorant Receptors and Odorant-Binding Proteins as Insect Pest Control Targets: A Comparative Analysis. *Frontiers in Physiology*, 9(1163). <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01163>
- Vosshall, L. B., & Stocker, R. F. (2007). Molecular Architecture of Smell and Taste in *Drosophila*. *Annual Review of Neuroscience*, 30(1), 505–533. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094306>
- Wicher, D., & Miazzi, F. (2021). Functional properties of insect olfactory receptors: ionotropic receptors and odorant receptors. *Cell and Tissue Research*, 383(1), 7–19. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03363-x>
- Wicher, D., Schäfer, R., Bauernfeind, R., Stensmyr, M. C., Heller, R., Heinemann, S. H., & Hansson, B. S. (2008). *Drosophila* odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide-activated cation channels. *Nature*, 452(7190), 1007–1011. <https://doi.org/10.1038/nature06861>
- Wong, A. M., Wang, J. W., & Axel, R. (2002). Spatial representation of the glomerular map in the *Drosophila* protocerebrum. *Cell*, 109(2), 229–241. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00707-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00707-9)
- Xiao, S., Sun, J. S., & Carlson, J. R. (2019). Robust olfactory responses in the absence of odorant binding proteins. *ELife*, 8. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.51040>
- Yan, H., Opachaloemphan, C., Mancini, G., Yang, H., Gallitto, M., Mlejnek, J., Leibholz, A., Haight, K., Ghaninia, M., Huo, L., Perry, M., Slone, J., Zhou, X., Traficante, M., Penick, C. A., Dolezal, K., Gokhale, K., Stevens, K., Fetter-Pruneda, I., ... Desplan, C. (2017). An Engineered orco Mutation Produces Aberrant Social Behavior and Defective Neural Development in Ants. *Cell*, 170(4), 736–747.e9. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.06.051>
- Yohe, L. R., & Brand, P. (2018). Evolutionary ecology of chemosensation and its role in sensory drive. *Current Zoology*, 64(4), 525–533. <https://doi.org/10.1093/cz/zoy048>