

«Smelly Sex»

Οσμές του αναπαραγωγικού

Διπλωματική Εργασία

ΤΟΥ

Αθανασιάδη Κωνσταντίνου

*Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής
Λάρισα, Ιούνιος 2017*



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

«Smelly Sex»

Οσμές του Αναπαραγωγικού

Odorants of the Reproductive System

Διπλωματική Εργασία

ΤΟΥ

Αθανασιάδη Κωνσταντίνου

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Σχολή Επιστημών Υγείας

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Λάρισα, Ιούνιος 17

Τριμελής Επιτροπή	Υπογραφή
<i>Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος</i> Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας	
<i>Λεωνίδας Δημήτριος</i> Καθηγητής Βιοχημείας	
<i>Σαραφίδου Θεολογία</i> Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών	

Ευχαριστίες

Αρχικά, θέλω να ευχαριστήσω τον κύριο Ματθιόπουλο που δέχθηκε να εκπονήσω στο εργαστήριό του τη διπλωματική μου εργασία. Ήταν θετικότερος από την πρώτη στιγμή και παρών σε όλα τα βήματα.

Τα μέλη του εργαστηρίου, ανεξάρτητα από το πόστο που είχαν, για τη βοήθειά τους οποιαδήποτε στιγμή τη χρειάστηκα. Τη Γιώτα, την Έφη, την Κωνσταντίνα, το Σπύρο, τη Στέλλα, την Έλενα, τον Αλέξανδρο και τη Μαρία για το ευχάριστο κλίμα που με έκανε να ξεχνώ την κούραση, τη ζέστη του καλοκαιριού (ακόμα και την περίοδο που είχε χαλάσει το air-condition και οι 40 βαθμοί μας έκαναν να υποφέρουμε), τα όποια προβλήματα είχα και έκαναν εκείνες τις πολλές ώρες που περνούσαμε στο εργαστήριο, καθημερινά, αξιοζήλευτες.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ όμως θέλω να το εκφράσω προς την Μαρία Ελένη (Μαριλένα) Γρηγορίου που είχε το δύσκολο έργο να επιβλέπει την καθημερινότητά μου μέσα στο εργαστήριο. Παρά τις δυσκολίες του χαρακτήρα μου, την αντιδραστικότητα που έδειχνα μερικές φορές, και την γκρίνια, που τόσο εύκολα ερχόταν ως απάντηση όταν κάτι δεν πήγαινε καλά, όχι μόνο με ανέχτηκε αλλά προσπάθησε να με βελτιώσει ως άνθρωπο. Φερόμενη ως μεγάλη μου αδελφή, δεν έκανε απλώς τυπικά αυτά που της ζητήθηκαν αλλά έδειξε πραγματικό ενδιαφέρον στο να με εκπαιδεύσει και να μου επισημάνει κάθε φορά όχι μόνο τα λάθη που έκανα κατά τη διάρκεια κάποιου πειράματος αλλά και στη συμπεριφορά μου, πάντα καλοπροαίρετα και με ειλικρινές ενδιαφέρον. Κι αν κάτι δεν πρόκειται να ξεχάσω από αυτό το εργαστήριο, είναι το γεμάτο απελπισία "Κωστή" που φώναζε με την ιδιαίτερη προφορά της κάθε φορά που έκανα του κεφαλιού μου.

Περίληψη

Οι οσμοϋποδοχείς των εντόμων διαμορφώνουν ένα σύστημα, το οποίο αποτελείται από την πρωτεΐνη υποδοχέα και ένα κανάλι ιόντων. Αφού το μόριο-οσμή συνδεθεί σε μία οσμοδεσμευόμενη πρωτεΐνη, η πρωτεΐνη υποδοχέας και το κανάλι ιόντων προκαλούν μία νευρική ηλεκτρική απόκριση. Η έκφραση των συγκεκριμένων υποδοχέων στους ιστούς του οσφρητικού συστήματος είναι φανερή και αποδεδειγμένη. Ενδιαφέρον, όμως, παρουσιάζει το γεγονός πως έχουν καταγραφεί τέτοιοι υποδοχείς και σε ιστούς που δεν εμπλέκονται με την αίσθηση της οσμής. Συγκεκριμένα, αυτές οι καταγραφές αφορούν σε κύτταρα του αναπαραγωγικού συστήματος σε ανθρώπους και ποντίκια, σε σπέρμα κουνουπιών και σε πρωτεΐνες ορού που εντοπίζονται μόνο στα αρσενικά έντομα *Ceratitis capitata*. Στα πλαίσια της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, ερευνήθηκε η έκφραση διαφόρων γονιδίων του οσφρητικού συστήματος στο αναπαραγωγικό σύστημα του δάκου της ελιάς, *Bactrocera oleae*. Ο δάκος της ελιάς αποτελεί τον κυριότερο εχθρό της ελαιοκαλλιέργειας. Συγκεκριμένα, αναλύθηκε η σχετική έκφραση πέντε γονιδίων (*obr83a*, *obr19a*, *os-d*, *obr8a*, *or10*) σε θηλυκούς βοηθητικούς αδένες και σπερματοθήκη, σε όρχεις και σε αρσενικούς βοηθητικούς αδένες, πριν και δώδεκα ώρες μετά την σύζευξη. Η παρουσία των οσμοδεσμευόμενων πρωτεϊνών, που μελετήθηκαν στους αναπαραγωγικούς ιστούς, δείχνει πως οι οσμοδεσμευόμενες πρωτεΐνες δεν είναι περιορισμένες στην όσφρηση και μπορεί να έχουν ένα γενικότερο ρόλο μεταφορέα και λιγότερο εξειδικευμένη δράση σε λιπόφιλες ενώσεις, συμμετέχοντας κατ' αυτόν τον τρόπο σε ένα μεγαλύτερο πλήθος βιολογικών λειτουργιών.

Abstract

Insect odorant receptors (ORs) form a receptor system that consists of the actual receptor protein and an ion channel. After the odor molecule is bound to an Odorant Binding Protein (OBP), the receptor protein and the ion channel trigger the neural electrical response. OR expression in olfactory tissues is obvious and well-established. Interestingly, expression of ORs has also been documented in non-olfactory tissues. Specifically, OR expression has been documented in human and mouse germ cells, in mosquito sperm and in male-specific serum proteins of *Ceratitis capitata*. We opted to explore the expression of various olfactory-related genes in the reproductive system of the olive fly, *Bactrocera oleae*, the major pest of the olive tree. The relative expression of five olfactory-related genes (*obp83a*, *obp19a*, *os-d*, *obp8a*, *or10*) was analyzed in female accessory glands/spermathecae, male testes and male accessory glands, before and twelve hours after mating was analysed. The presence of these OBPs in the reproductive tissues demonstrates that OBPs are not restricted to olfaction and might have general carrier capabilities with a broad specificity for lipophilic compounds; thus, they could be involved in broader physiological functions.

Περιεχόμενα

Υπογραφές τριμελούς επιτροπής	1
Ευχαριστίες	2
Περίληψη	3
Abstract	4
Εισαγωγή	6
<i>Δάκος</i>	6
<i>Γενικά Χαρακτηριστικά</i>	6
<i>Κύκλος Ζωής</i>	7
Αναπαραγωγικό Σύστημα	8
<i>Γενικά Χαρακτηριστικά</i>	8
<i>Αρσενικό Αναπαραγωγικό Σύστημα</i>	8
<i>Θηλυκό Αναπαραγωγικό Σύστημα</i>	9
<i>Αναπαραγωγική Διαδικασία</i>	9
Οσφρητικό Σύστημα	10
<i>Γενικά Χαρακτηριστικά</i>	10
<i>Οσφρητικά Αισθητήρια</i>	11
<i>Οσμοδεσμευόμενες Πρωτεΐνες</i>	12
Σκοπός	14
Υλικά και Μέθοδοι	15
Ο Πληθυσμός.....	15
Απομόνωση RNA	15
Επεξεργασία με DNase (DNase Treatment)	17
Σύνθεση cDNA (cDNA Treatment).....	18
Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	19
Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης σε Πραγματικό Χρόνο (qRT - PCR).....	20
BLAST	22
Αποτελέσματα	23
Συζήτηση	25
Βιβλιογραφία	26

Εισαγωγή

Δάκος

Γενικά χαρακτηριστικά

Ο δάκος της ελιάς (*Bactrocera oleae*) (εικόνα 1) είναι ένα μικρό έντομο πέντε (5) χιλιοστών και ανήκει στην οικογένεια των *Tephritidae*. Τρέφεται αποκλειστικά από τους καρπούς της ελιάς και εντοπίζεται στη Μεσόγειο, τη Κεντρική και τη Νότιο Αφρική, το Πακιστάν, τη Μέση Ανατολή, την πολιτεία της Καλιφόρνια των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής και το Μεξικό.^{(1) (2)} Αυτό που τον καθιστά αρκετά σημαντικό έντομο είναι η επίδρασή του στους καρπούς της ελιάς (εικόνα 2). Η καταστροφή της παραγωγής μπορεί να φτάσει έως και δεκαπέντε τοις εκατό (15%).⁽³⁾ Αυτό οφείλεται σε δύο κύριους λόγους · πρώτον, στη θρέψη της προνύμφης από το εσωτερικό του καρπού της ελιάς και δεύτερον, στο νύγμα, το οποίο σχηματίζεται κατά την ωοαπόθεση από το θηλυκό άτομο στον καρπό, και επιτρέπει την ανάπτυξη άλλων οργανισμών, όπως μύκητες.⁽⁴⁾

Εικόνα 1 Ο δάκος της ελιάς. Το θηλυκό άτομο ξεχωρίζει από τον ωοαποθέτη στο τέλος της κοιλιακής χώρας (δεξιά στην εικόνα απεικονίζεται το θηλυκό και αριστερά το αρσενικό έντομο)



Εικόνα 2 Προσβεβλημένος καρπός ελιάς. Στο εσωτερικό διακρίνεται η προνύμφη του εντόμου





Εικόνα 3 Έχει δειχθεί πως ο δάκος έχει κτητική συμπεριφορά προς τον καρπό ή το φύλλο που καταλαμβάνει και ακολουθεί επιθετική συμπεριφορά για την προστασία ή τη διεκδίκησή τους. Συνηθέστερα επιτίθεται πρώτα το άτομο το οποίο προστατεύει την περιοχή του. Η επίθεση αρχίζει με πετάρισμα των φτερών προς το άλλο άτομο, συνεχίζει με γρήγορη κίνηση προς το μέρος του ενώ ύστερα περιλαμβάνει τόσο χτύπημα με το κεφάλι όσο και με πυγμαχικές κινήσεις ενάντια στο θώρακα ή το κεφάλι του αντιπάλου. Η συμπεριφορά αυτή παρατηρείται και στα δύο φύλα. Στην εικόνα από πάνω, δύο άτομα του είδους έχουν έρθει σε συμπλοκή λόγω της κατάληψης του ίδιου καρπού. Παρατηρούμε της πυγμαχικές κινήσεις του θηλυκού στα δεξιά, το οποίο χτυπάει με τα μπροστινά πόδια του το θώρακα του άλλου ατόμου.⁽⁵³⁾

Κύκλος ζωής

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, είναι ολομετάβολο και πολυκυκλικό έντομο. Ο κύκλος ζωής του εντόμου ξεκινάει μέσα στον άγουρο καρπό της ελιάς. Σε ένα διάστημα κατά μέσο όρο τριών (3) ημερών το αυγό εκκολάπτεται σε προνύμφη και τρέφεται από το εσωτερικό του καρπού. Για διάστημα δεκαπέντε (15) ημερών η προνύμφη συνεχίζει να τρέφεται από τον καρπό της ελιάς μέχρι να δημιουργήσει την "οπή εξόδου του ακμαίου", τρύπα που χρησιμοποιείται αργότερα από το ενήλικο άτομο ως τρόπος διαφυγής από τον καρπό. Για τη μετατροπή της σε νύμφη, η προνύμφη υπόκειται σε 3 διαδοχικές εκδύσεις, ενώ περίπου δεκατρείς (13) ημέρες διαρκεί η μεταμόρφωση της σε ενήλικο έντομο.

Τα θηλυκά άτομα εναποθέτουν ένα μόνο αυγό ανά καρπό ελιάς και μπορούν να αποθέσουν έως και δώδεκα αυγά τη μέρα. Η διαδικασία αυτή μπορεί να επαναληφθεί έως και τέσσερις (4) φορές το χρόνο, καθιστώντας το συγκεκριμένο έντομο πολυκυκλικό. Βασικός παράγοντας που επηρεάζει το πλήθος των γενεών ανά έτος είναι οι περιβαλλοντικές και καιρικές συνθήκες.⁽¹⁾

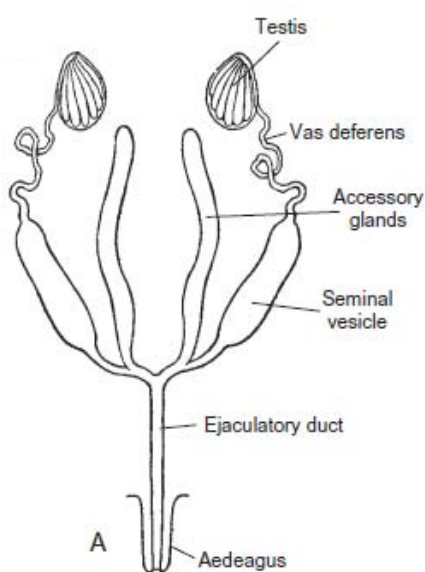
Αναπαραγωγικό Σύστημα

Γενικά Χαρακτηριστικά

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, χωρίζεται σε δύο φύλα, αρσενικό και θηλυκό. Τα όργανα αναπαραγωγής και των δυο φύλων εντοπίζονται στην κοιλιακή χώρα του ενήλικου εντόμου, με τα αρσενικά να διαφέρουν από αυτά των θηλυκών.⁽⁵⁾

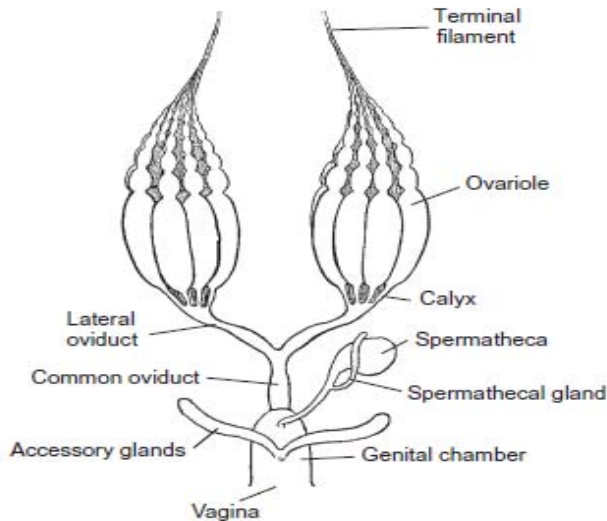
Αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα

Το αναπαραγωγικό σύστημα των αρσενικών εντόμων είναι ένα πολύπλοκο σύνολο οργάνων. Στην εικόνα 4⁽⁶⁾ δεξιά γίνεται η απεικόνιση αυτών. Ξεκινώντας από κάτω προς τα πάνω, διακρίνεται αρχικά μία δομή, το *Aedeagus*. Έπειτα, υπάρχει ο αγωγός εκσπερμάτωσης (*Ejaculatory duct*) ενώ πιο πάνω, με κατοπτρική συμμετρία, υπάρχει το ζεύγος των βοηθητικών αδένων του αρσενικού (*Male Accessory Glands, M.A.G.s*) και εξωτερικά οι σπερματοδόχοι κύστες (*seminal vesicle*). Στην κορυφή διακρίνονται οι όρχις (*testes*), οι οποίοι ενώνονται με τις σπερματοδόχους κύστες (ο καθένας με μία) μέσω των σπερματικών πόρων (*vas deferens*).⁽⁶⁾⁽⁷⁾



Εικόνα 4 Τα αναπαραγωγικά όργανα των αρσενικών εντόμων

Θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα



Εικόνα 5 Τα αναπαραγωγικά όργανα των θηλυκών εντόμων

από πάνω διακρίνεται η *σπερματοθήκη* (spermatheca) με τον *αδένα της σπερματοθήκης* (spermathecal gland). Στη μέση του σχήματος βρίσκεται ο *κοινός αγωγός* (common oviduct) και αριστερά και δεξιά αυτού, ανοδικά, οι *σάλπιγγες* (lateral oviduct), οι οποίες καταλήγουν στον *κάλυκα* (calyx) και τελικά στις *ωοθήκες*, στα *ωοθηκάρια* (ovariole) και στο *τελικό νήμα* (terminal filament).^{(6) (7)}

Αναπαραγωγική διαδικασία

Η αναπαραγωγική διαδικασία στο δάκο απαιτεί τη συνουσία μεταξύ ενός θηλυκού και ενός αρσενικού ατόμου. Αρχικά υπάρχουν οι όρχεις, βασικότατη δομή μέσα στο αναπαραγωγικό σύστημα του αρσενικού. Στα δίπτερα έντομα αποτελούνται από απλούς σάκους, που ο καθένας μπορεί να θεωρηθεί ως ένα θυλάκιο.⁽⁸⁾ Μέσα σε αυτά τα θυλάκια παράγονται τα σπερματοζώαρια. Μόλις αυτά ωριμάσουν, περνούν, μέσω των σπερματικών πόρων, στις σπερματοδόχους κύστες. Εκεί αποθηκεύονται μέχρι τη στιγμή που θα χρειαστεί να μεταφερθεί το σπέρμα στο θηλυκό άτομο. Κατά τη διαδικασία της αναπαραγωγής το σπέρμα περνά μέσα από τον αγωγό και μέσα από εκεί στο θηλυκό άτομο. Εκτός από την παρουσία του σπέρματος πολύ σημαντικό ρόλο για την επιτυχία της αναπαραγωγής έχουν τα συνοδά σπερματικά υγρά τα οποία παράγονται από τους βοηθητικούς αδένες. Ευθύνη των αδένων αυτών είναι η έκκριση του σπερματικού υγρού, ενός συνόλου ουσιών που θρέφουν τα σπερματοζώαρια ενώ παράλληλα τα προστατεύουν.⁽⁵⁾ Το σπερματικό υγρό βοηθάει στη μεταφορά και την «ενεργοποίηση» του σπέρματος⁽⁶⁾ ενώ παράλληλα

σχηματίζει και τα *σπερματοφόρα*, ένα σύνολο πρωτεϊνικών εκκρίσεων που περιβάλλουν το σπέρμα.

Το σύνολο του σπερματικού υγρού, αφού εισαχθεί στο θηλυκό, έχει τη δυνατότητα να το επηρεάσει ποικιλοτρόπως, τόσο οργανικά όσο και στη συμπεριφορά.^{(8) (6) (5)} Αυτές οι αλλαγές περιλαμβάνουν μείωση της συζευκτικής δεκτικότητας σε επόμενες απόπειρες, αυξημένη ωογένεση και ωοαπόθεση, αυξημένη πρόσληψη τροφής και ύπνου, επαγωγή ανοσοαπόκρισης αλλά και μειωμένη διάρκεια ζωής.^{(9) (10) (11) (12)} Για να εκδηλωθεί αυτή η μετασυζευκτική απόκριση δεν είναι απαραίτητη η συνουσία των εντόμων. Στα είδη των *Aedes* και *Culex* η μεταμόσχευση ιστών MAGs ή η ένεση των εκκρίσεών τους στην αιμολέμφο παρθένων θηλυκών, είναι αρκετή για να αποτρέψει επόμενη σύζευξή τους και να επάγει την ωοαπόθεση.^{(13) (14) (15) (16) (17) (18)}

Από τη στιγμή που το αρσενικό εκσπερματώνει επιτυχώς μέσα στο θηλυκό, το σπέρμα αποθηκεύεται στη σπερματοθήκη μέχρι να χρειαστεί για την αναπαραγωγή. Η σπερματοθήκη τότε ανοίγει προς τον ωοαγωγό και απελευθερώνει το σπέρμα πάνω στα διερχόμενα ώριμα αυγά, τα οποία έχουν δημιουργηθεί στα ωοθηκάρια των ωοθηκών. Ο αδένας της σπερματοθήκης, σε όποια έντομα απαντάται, εκκρίνει υδατάνθρακες και πρωτεΐνες για τη διατήρηση του σπέρματος.⁽⁶⁾ Μέσω του ωοαποθέτη το θηλυκό έντομο αφήνει το γονιμοποιημένα, πια, αυγά στους καρπούς της ελιάς. Σημαντικό ρόλο παίζουν και εδώ οι βοηθητικοί αδένες του θηλυκού, οι οποίοι με τις εκκρίσεις τους λιπαίνουν το εσωτερικό τοίχωμα του ωοαποθέτη μειώνοντας την τριβή και τη μηχανική πίεση που ασκείται στα αυγά, προστατεύοντάς τα.⁽⁵⁾

Οσφρητικό Σύστημα

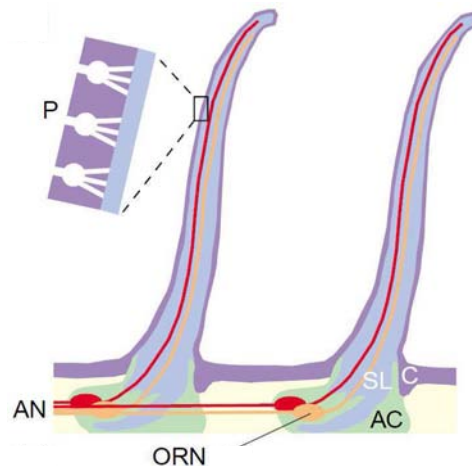
Γενικά χαρακτηριστικά

Η όσφρηση είναι μία εκ των κυριότερων αισθήσεων που διαθέτουν οι ζωντανοί οργανισμοί. Ειδικότερα, στα έντομα είναι απαραίτητη τόσο για την επιβίωση του οργανισμού όσο και για τη συνέχιση του είδους, μέσω της αναπαραγωγής. Με τη χρήση της συγκεκριμένης αίσθησης, το κάθε έντομο μπορεί να εντοπίσει την τροφή του, να αποφύγει θηρευτές και να έρθει σε "χημική" επικοινωνία με το αντίθετο φύλο με τελικό στόχο την αναπαραγωγή.

Για να μπορέσει να επιτελέσει τις παραπάνω λειτουργίες, το οσφρητικό σύστημα των εντόμων αναπτύχθηκε ως ένα χημειοευαίσθητο σύστημα ικανό να ξεχωρίσει πλήθος διαφορετικών χημικών ενώσεων που προκαλούν τις "οσμές". Το σύνολο αυτών των χημικών ενώσεων χωρίζεται σε δύο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με το ρόλο που έχουν. Αρχικά έχουμε τις *φερομόνες*, ειδικές οσμηρές ελκυστικές ουσίες που παράγονται από τους οσμογόνους αδένες του θηλυκού με σκοπό να προκαλέσουν το αρσενικό. Τα υπόλοιπα χημικά ερεθίσματα, που γίνονται αντιληπτά από το οσφρητικό σύστημα, εντάσσονται στην κατηγορία των *γενικών οσμών*.⁽¹⁹⁾

Οσφρητικά Αισθητήρια

Για να μπορέσει το χημικό σήμα - οσφρητικό ερέθισμα να γίνει αντιληπτό από τον οργανισμό του εντόμου θα πρέπει πρώτα να έρθει σε επαφή με αυτό. Αυτό επιτυγχάνεται διότι στις κεραίες υπάρχουν αισθητήρια που αναγνωρίζουν τις οσμές και ενεργοποιούν το κατάλληλο σηματοδοτικό μονοπάτι.



Εικόνα 4 Τριχοειδή οσφρητικά αισθητήρια

Στην εικόνα 6 ⁽²⁰⁾ φαίνονται οι κύριες δομές των προαναφερθέντων οσφρητικών αισθητηρίων. Αριστερά στην εικόνα φαίνονται οι πόροι (P) μέσα από τους οποίους περνούν τα χημικά μόρια των οσμών μέσα στην επιδερμίδα (C). Με το ανοιχτό ιώδες χρώμα απεικονίζεται η λέμφος των αισθητηρίων (SL). Με κόκκινο και πορτοκαλί χρώμα διακρίνονται οι αισθητήριοι νευρώνες (ORN) οι οποίοι εκτείνουν τους άξονές τους μέχρι τον εγκέφαλο μέσω του νεύρου της κεραίας (AN).

Οσμοδεσμευόμενες Πρωτεΐνες

Μέσα στο υγρό περιβάλλον της λέμφου, εντοπίζονται πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια των οσμοδεσμευόμενων πρωτεϊνών (OBPs). Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες εκκρίνονται από βοηθητικά κύτταρα, τα οποία περιβάλλουν τους ORNs, ενώ ο ακριβής ρόλος τους παραμένει ακόμα άγνωστος. Είναι πρωτεΐνες μικρού μεγέθους (12-18 kDa), με αρκετά υψηλή διαλυτότητα και έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται, αντιστρεπτά, σε μικρά μόρια όπως οι οσμές και οι φερομόνες. ⁽²¹⁾

Οι OBPs των εντόμων διαφέρουν χημικά από αυτές των χορδωτών. Αυτές των χορδωτών ανήκουν στην οικογένεια των λιποκαλινών ⁽²²⁾ και αναδιπλώνονται σε σχήμα β-βαρελιού που αποτελείται, ως επί το πλείστον, από αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες. Από την άλλη μεριά, οι OBPs των εντόμων αποτελούνται κυρίως από α-έλικες, οι οποίες αναδιπλώνονται σε δύο διαφορετικά μοτίβα. Επιπλέον, διαφοροποιούνται και ως προς την σύστασή τους σε αμινοξέα, με τις OBPs των εντόμων να διαφέρουν από είδος σε είδος αλλά και ακόμα μέσα στο ίδιο είδος παρατηρείται χαμηλό ποσοστό συντήρησης. Το κοινό χαρακτηριστικό τους είναι η ύπαρξη 6 κυστεϊνών σε συντηρημένες θέσεις, οι οποίες ενώνονται με δισουλφιδικούς δεσμούς με τα κατάλοιπα αμινοξέων, με τα οποία συνδέονται, δημιουργώντας δύο μικρές θηλιές, μία των οκτώ (8) και μία των τεσσάρων (4) αμινοξέων. ⁽²¹⁾

Αν και, όπως αναφέρθηκε, ο ακριβής ρόλος των OBPs παραμένει άγνωστος, έχει παρατηρηθεί πως έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται, αντιστρεπτά, σε μικρά υδρόφοβα μόρια - οσμές/φερομόνες - και να τα κατευθύνουν στους αντίστοιχους υποδοχείς των ORNs. Παρά όμως το όνομά τους, το οποίο παραπέμπει προς το οσφρητικό σύστημα, OBPs έχουν βρεθεί να εκφράζονται και στο αναπαραγωγικό σύστημα εντόμων, όπως παραδειγματικά των κουνουπιών *Aedes aegypti* και *Anopheles gambiae*. Συγκεκριμένα, στο

πρώτο είδος σχετίζονται με το κέλυφος των αυγών, στα θηλυκά άτομα, και με 4 εκ των μελετημένων στο συγκεκριμένο είδος να περιορίζονται 48 ώρες μετά από γεύμα αίματος. Στο δεύτερο, αναφερθέν, είδος κουνουπιού, OBPs ανιχνεύτηκαν στους όρχεις του αρσενικού.^{(23) (24)}

Επιπροσθέτως, και πέραν του αναπαραγωγικού συστήματος, οσμοδεσμευόμενες πρωτεΐνες ανιχνεύονται και σε άλλους ιστούς. Σε άτομα του είδους *Spodoptera exigua* OBPs ανιχνεύθηκαν στο κεφάλι και στα φτερά, ενώ για μερικές πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής παρατηρήθηκε καθολική έκφραση σε όλο το σώμα. Μάλιστα, αξίζει να αναφερθεί πως μερικές OBPs είχαν μικρότερη έκφραση στις κεραίες σε σχέση με άλλους ιστούς. Ακόμα, παρατηρήθηκε και διαφορά έκφρασης ανάμεσα στα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα.⁽²⁵⁾ Παρόμοια αποτελέσματα, με παρατηρούμενη έκφραση OBPs σε όλο το σώμα (κεραίες, κεφάλι, θώρακα, κοιλιά), και διαφορετικό μοτίβο έκφρασης ανάλογα με το φύλο, έδωσε έρευνα σε διαφορετικά άτομα (εργάτες, αρσενικά και θηλυκά πετρωτά) του είδους *Solenopsis invicta*.⁽²⁶⁾

Ο πολυδιάστατος ρόλος των οσμοδεσμευόμενων πρωτεϊνών δεν είναι όμως χαρακτηριστικό μόνο των εντόμων. Αν και, όπως είπαμε, παρατηρούνται διαφορές ανάμεσα στις OBPs των εντόμων και των χορδωτών, και στην κλάση των θηλαστικών διακρίνεται ένας πολυδιάστατος ρόλος που δεν περιορίζεται στο οσφρητικό σύστημα. Υποδοχείς ORs έχουν εντοπισθεί σε σπέρμα ανθρώπου και ποντικών και μάλιστα μερικοί από αυτούς εκφράζονται αποκλειστικά ή κυρίως εκεί.^{(27) (28) (29) (30) (31)} Ξεπερνώντας όμως το αναπαραγωγικό σύστημα, ORs έχουν αναφερθεί και σε άλλους ιστούς, όπως το μυοκάρδιο⁽³²⁾, τα γάγγλια του αυτόνομου νευρικού συστήματος⁽³³⁾ και ο σπλήνας.⁽³⁴⁾

Σκοπός

Μετά από σύγκριση διαθέσιμων αλληλουχιών μεταγραφώματος από θηλυκούς αναπαραγωγικούς ιστούς (Female accessory glands) και όρχεις αρσενικών εντόμων (testes) του δάκου της ελιάς, εντοπίστηκαν δώδεκα γονίδια που είχαν σχέση με το οσφρητικό σύστημα. Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας ήταν η περαιτέρω μελέτη πέντε εξ αυτών των γονιδίων. Για να προσδιοριστεί η πιθανή σχέση της παρουσίας τους με την αναπαραγωγή, μελετήθηκε η σχετική τους έκφραση σε θηλυκούς ιστούς αναπαραγωγικού συστήματος (σπερματοθήκη και βοηθητικοί αδένες) και σε αρσενικούς ιστούς αναπαραγωγικού συστήματος (όρχεις και βοηθητικοί αδένες) σε δύο διαφορετικές καταστάσεις (πριν και μετά τη σύζευξη).

Υλικά - Μέθοδοι

Ο Πληθυσμός

Ο πληθυσμός *Bactrocera oleae* που χρησιμοποιήθηκε στην εργασία είναι ο εργαστηριακός πληθυσμός δάκου (*Bactrocera oleae*) του εργαστήριου Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Οι συνθήκες του εντομοτροφίου ήταν σταθερές, με περιβαλλοντική θερμοκρασία στους 25°C και υγρασία στο 58% με 12 ώρες φωτός ημερησίως.

Στα πλαίσια των πειραμάτων της διπλωματικής εργασίας και για τη συλλογή αναπαραγωγικών ιστών ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: τα έντομα από την πρώτη μέρα μεταμόρφωσής τους από νύμφες σε ενήλικα άτομα (ημέρα 0) διαχωρίζονταν σε χωριστά κλουβιά, ανάλογα με το φύλο τους. Μετά από επτά (7) ημέρες, μία ομάδα εντόμων χρησιμοποιούταν για τη συλλογή αναπαραγωγικών ιστών πριν τη σύζευξη, ενώ τα υπόλοιπα έρχονταν σε επαφή ώστε να πραγματοποιηθεί σύζευξη. Σημαντική παράμετρος ήταν τα έντομα να έχουν συζευχθεί μόνο μια φορά. Γι αυτό το λόγο, τα έντομα διαχωρίζονταν μετά την ολοκλήρωση της σύζευξης σε διαφορετικά κλουβιά, όπου και παρέμεναν για δώδεκα (12) ώρες μέχρι τη συλλογή των ιστών τους. Η συλλογή των ιστών περιελάμβανε, για τα αρσενικά άτομα, τους όρχεις και τους βοηθητικούς αδένες σε δύο ξεχωριστά δείγματα, ενώ στα θηλυκά έντομα γινόταν απομόνωση όλου του αναπαραγωγικού συστήματος πλην των ωοθηκών.

Απομόνωση RNA

Για την απομόνωση RNA των αναπαραγωγικών ιστών χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο *TRIzol* (Bioline). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι σύμφωνη με το πρωτόκολλο που εντοπίζεται στο εγχειρίδιο της εταιρείας.

Υλικά	Σ τελικό
Απομονωμένος Ιστός με TRIsure	150 μL
TRIsure	150 μL
BCP	40 μL
Ισοπροπανόλη	1/2 x Όγκος του TRIsure
Γλυκογόνο	0,5 μL
75% Παγωμένη Αιθανόλη	600 μL
Ultra Pure Water	20 μL

Ο απομονωμένος ιστός βρίσκεται σε erpendorf με 150μL TRIsure και έχει διατηρηθεί στους -80 °C. Η διαδικασία αναλυτικά αποτελείται από δεκαοκτώ (18) βήματα και έχει ως εξής:

- 1) Τοποθέτηση των δειγμάτων στον πάγο για να ξεπαγώσουν
- 2) Ομογενοποίηση των δειγμάτων με τη χρήση αποστειρωμένου pestle ως έμβολο
- 3) Πλύση των pestle με 150 μL TRIsure στο erpendorf με σκοπό την ανάκτηση υπολειμμάτων από την επιφάνεια του εμβόλου. Ακολουθεί vortex και quick spin των δειγμάτων
- 4) Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5min
- 5) Απαλό vortex και επώαση πάλι σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min
- 6) Φυγοκέντρηση στους 4°C, στις 12.000 rpm για 10min. Σκοπός είναι η απομάκρυνση όλων των κυτταρικών υπολειμμάτων. Το υπερκείμενο συλλέγεται σε νέο tube του 1,5 mL
- 7) Προσθήκη 40 μL BCP και ανάδευση για 15 sec
- 8) Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 min
- 9) Φυγοκέντρηση στους 4°C, στις 12.000 rpm για 15min
- 10) Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5min
- 11) Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο tube του 1,5 mL
- 12) Προσθήκη του όγκου της ισοπροπανόλης (ανάλογης του όγκου του TRIsure) και 0,5 μL γλυκογόνου. Vortex και επώαση στον πάγο για 45 min
- 13) Φυγοκέντρηση στους 4°C, στις 12.000 rpm για 45min
- 14) Αφαίρεση του υπερκειμένου και πλύση με 200 μL 75% παγωμένης αιθανόλης
- 15) Φυγοκέντρηση στους 4°C, στις 12.000 rpm για 5min
- 16) Επανάληψη των βημάτων (14) και (15) δύο (2) ακόμα φορές

17) Απομάκρυνση της αιθανόλης και στέγνωμα για 10 min

18) Αναδιάλυση του ιζήματος, αφού στεγνώσει, σε 20 µL ultra pure water, στους 50 °C

Επεξεργασία με DNase (DNase Treatment)

Σε αυτό το στάδιο απομακρύνονται μόρια DNA, που πιθανόν να έχουν απομείνει στο δείγμα μας, με τη βοήθεια των *DNασών*, ενζύμων που λύουν τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς που δίνουν συνοχή στα μόρια DNA. Το γονιδιωµατικό DNA μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα στα επόμενα βήματα της πειραµατικής διαδικασίας, καθιστώντας την αποµάκρυνσή του απαραίτητο βήµα. ⁽³⁵⁾

Για να πραγµατοποιηθεί ο "καθαρισµός" από τα μόρια DNA, σε κάθε ένα από τα δείγµατα, ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήµατα:

- 1) Quick-spin στο διάλυµα που αποκτήθηκε, τελικώς, από την προηγούµενη διαδικασία
- 2) Προσθήκη σε tube PCR του ύδατος, του ρυθµιστικού διαλύµατος, του διαλύµατος και του DNase-inhibitor
- 3) Επώαση στους 37 °C και κατόπιν προσθήκη του inactivation buffer
- 4) Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min
- 5) Φυγοκέντρωση για 2 min στους 11.000 rpm
- 6) Συλλογή του υπερκλειµένου

Το υπερκλειµενο µπορεί να χρησιµοποιηθεί απευθείας για την κατασκευή cDNA, δύναται όµως να αποθηκευτεί στους -80 °C.

Υλικά	C τελικό
Διάλυµα (από την προηγούµενη διαδικασία)	200 µL
<i>Turbo DNase Buffer</i>	2,5 µL
<i>DNase Inhibitor</i>	0,5 µL
H ₂ O	2 µL
Τελικός Όγκος	25 µL

Σύνθεση cDNA (cDNA Treatment)

Χρησιμοποιώντας ως μήτρα το απομονωμένο RNA, δημιουργούνται μόρια DNA, με τη χρήση του ενζύμου *αντίστροφη μεταγραφάση*. Για κάθε μονόκλωνο μόριο RNA, δημιουργείται συμπληρωματική αλυσίδα DNA, με σκοπό την προστασία των δεδομένων καθώς τα μονόκλιωνα μόρια RNA είναι αρκετά ασταθή.⁽³⁵⁾

Για τη σύνδεση cDNA ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- 1) Προσθήκη σε eppendorf 20 μL του διαλύματος που παρασκευάστηκε μετά την επεξεργασία με DNase και 1 μL τυχαίων εκκινητών
- 2) Επώαση των δειγμάτων στους 70 °C για 10 min
- 3) Επώαση των δειγμάτων σε πάγο για 5 min
- 4) Προσθήκη του ύδατος, των δεσοξυριβονουκλεοτιδίων, του ρυθμιστικού διαλύματος, του αναστολέα και της αντίστροφης μεταγραφάσης
- 5) Επώαση στους 45 °C για 45 min και στους 70 °C για 10 min

Υλικά	C τελικό
Διάλυμα (από την προηγούμενη διαδικασία)	20 μL
Random Primers	1 μL
M. MULV Buffer 1x	3 μL
dNTPs (10mM το καθένα)	1 μL
RNase Inhibitor	1 μL
M. MULV	1 μL
H ₂ O	3 μL
Τελικός Όγκος	30 μL

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική της PCR (Polymerase Chain Reaction) έχει ως στόχο τον πολλαπλασιασμό τμημάτων νουκλεϊκών οξέων, όπως περιγράφεται στην πατέντα που κατατέθηκε στις 25 Οκτωβρίου του 1985 και κατοχυρώθηκε στις 28 Ιουλίου του 1987 από το "United States Patent and Trade mark Office"⁽³⁶⁾.

Η συγκεκριμένη διαδικασία εκτελείται *in vitro* επιτρέποντας τον πολλαπλασιασμό των τμημάτων στόχων χωρίς την παρουσία ζωντανών οργανισμών. Βασίζεται σε μία επαναλαμβανόμενη διαδικασία που επιτρέπει, ενζυμικά και με εναλλαγές της θερμοκρασίας, το συνεχή διπλασιασμό των τμημάτων-στόχων. Κάθε κύκλος διπλασιασμού αποτελείται από τρία στάδια

1) Αποδιάταξη του DNA (*denaturation*)

Σε αυτό το πρώτο στάδιο, σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των αλυσίδων του DNA δημιουργώντας δύο μονόκλωνες αλυσίδες για κάθε μόριο δίκλωνου DNA που υπήρχε στο δείγμα.

2) Προσαρμογή των εκκινητών στο DNA-εκμαγείο (*annealing*)

Οι εκκινητές, μόρια RNA, με βάση τον κανόνα της συμπληρωματικότητας, συνδέονται με τα αποδιατεταγμένα, πια, τμήματα DNA στα άκρα των στόχων, με τα οποία είναι συμπληρωματικά βάσει κατασκευής τους.

3) Επιμήκυνση των εκκινητών (*extension*)

Με τη βοήθεια της πολυμεράσης επεκτείνονται τα τμήματα των εκκινητών και, για κάθε μονόκλωνο DNA που δημιουργήθηκε στο πρώτο στάδιο, έχουμε πια ένα δίκλωνο.

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης σε Πραγματικό Χρόνο (qRT - PCR)

Βασισμένη στις ίδιες αρχές με την PCR, η qRT-PCR επιτρέπει και την ποσοτικοποίηση μίας ή περισσότερων ειδικών αλληλουχιών σε ένα δείγμα DNA. Από τα αποτελέσματα τα οποία λαμβάνονται είναι δυνατή όχι μόνο η ποσοτικοποίηση των αλληλουχιών στόχων σε ένα δείγμα, όπως προαναφέρθηκε, αλλά και η σύγκριση του μεγέθους ενός στόχου ανάμεσα σε διαφορετικά δείγματα. Παρουσιάζει μεγαλύτερη ακρίβεια και αποδοτικότητα σε μικρότερο χρόνο απ' ό,τι η απλή PCR, ενώ ταυτόχρονα δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας σύνθεσης του DNA σε κάθε κύκλο αντίδρασης. Χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό, την ανίχνευση καθώς και την ποσοτικοποίηση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε πραγματικό χρόνο. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται και για την σύγκριση της ποσότητας ίδιας αλληλουχίας σε διαφορετικά δείγματα.

Η ανίχνευση των προϊόντων γίνεται με τη χρήση μη ειδικών φθορίζουσών χρωστικών που παρεμβάλλονται σε οποιοδήποτε δίκλωνο DNA συντίθεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, παράγοντας φθορισμό. Τα μόρια αυτά εκπέμπουν φθορισμό, ο οποίος αυξάνεται ανάλογα με την αύξηση του αριθμού των αντιγράφων και μετράται σε κάθε κύκλο. Ένα μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι τα μόρια αυτά παρεμβάλλονται σε οποιαδήποτε δίκλινα τμήματα DNA, που σημαίνει ότι τελικά το σήμα που προκύπτει μπορεί να οφείλεται και στην ύπαρξη διμερών των εκκινητών ή άλλων μη ειδικών προϊόντων. Το SYBR Green εκπέμπει πράσινο φως με τη χρήση μπλε ακτινοβολίας.

Τα δείγματα προς ανάλυση παρακολουθούνται με τη βοήθεια αυτοματοποιημένου ειδικού μηχανήματος για την Real-time PCR που είναι συνδεδεμένο με υπολογιστή και παρέχει τη δυνατότητα επεξεργασίας των αποτελεσμάτων ποσοτικοποίησης. Στους πρώτους κύκλους της αντίδρασης ο φθορισμός δεν είναι έντονος. Με το πέρασμα όμως των κύκλων το DNA-στόχος πολλαπλασιάζεται, επέρχεται η εκθετική φάση της αντίδρασης και έτσι γίνεται εντονότερος. Όταν το προϊόν έχει ενισχυθεί σε τέτοιο βαθμό ώστε να δώσει σήμα φθορισμού, τότε ο κύκλος, στον οποίο συμβαίνει αυτό, ονομάζεται κύκλος ποσοτικοποίησης (C_q) ή threshold cycle (CT). Στους τελευταίους κύκλους της αντίδρασης η δραστηριότητα του ενζύμου αρχίζει να μειώνεται και τα διαθέσιμα υλικά λιγοστεύουν, με αποτέλεσμα το DNA-στόχος να μην ενισχύεται περαιτέρω. Στο σημείο αυτό η αντίδραση φτάνει σε κορεσμό και σταματάει (φάση plateau).

Ως σταθερό σημείο έκφρασης, και ως εσωτερικοί μάρτυρες, χρησιμοποιούνται γονίδια με σταθερή έκφραση ανεξαρτήτως συνθηκών στους εκάστοτε ιστούς (housekeeping genes, hkg). Χρησιμοποιώντας τα γονίδια αναφοράς στις αναλύσεις μπορεί να γίνει ακριβέστερη η ποσοτικοποίηση των προϊόντων που παράγονται κατά τη διαδικασία.

Σε κάθε σωληνάκι PCR προστίθενται τα υλικά με τη σειρά και τις συγκεντρώσεις που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα. Κατόπιν, αυτά τοποθετούνται στον θερμοκυκλοποιητή, όπου προσδιορίζονται οι συνθήκες της αντίδρασης.

Υλικά	Όγκο
Διάλυμα cDNA	5 μ L
Primer F	0,45 μ L
Primer R	0,45 μ L
SYBR Green Supermix	7,5 μ L
H ₂ O	1,6 μ L
Τελικός Όγκος	15 μL

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1).

Γονίδιο	Εμπρόσθιος εκκινητής (5' - 3')	Οπίσθιος εκκινητής (5' - 3')	Μήκος	Θερμοκρασία Υβριδοποίησης (°C)
Γονίδια οσφρητικού συστήματος				
Obp3	ACAGAGGAGGCAATTAAG	ATCACCGTTATCATCCAC	119	52
Obp20	AAGGAGGATTATCGCAAC	AATTAGAAGGGCATAGACG	90	56
Obp1	AAGGCGAATACGGAAGTGC	CTGACCACCTGACTGTTAG	123	64
ChemR	CCTGGACGAGGTTTTGAGC	TTGATATAGCGTCGGGCAGTATC	122	68
Or10	AGCTCTCAATTTCTTGTTGCTGT	CATCGCTTGAGCCATTCTTCG	60	66
Γονίδια αναφοράς				
Rpl19	CTTCACGTACTTTATGCCTTC	GCAAGGTAATGTGTTCAA	126	60
Actin3	GGTCGGTATGGGACAGAAGG	CTCACGATTGGCTTTGGAT	220	60

Πίνακας 1 Ακολουθίες, μήκος προϊόντος και θερμοκρασία υβριδισμού ενίσχυσης των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την Real-Time PCR.

Τα γονίδια rpl19 και actin3 ανήκουν στα hkg και, όπως διασαφηνίζεται και στον παραπάνω πίνακα 1, είναι αυτά που χρησιμοποιήθηκαν ως γονίδια αναφοράς. Το πρώτο χρησιμοποιήθηκε στους αρσενικούς ιστούς ενώ το δεύτερο στους θηλυκούς. Το rpl19 είναι ένα αρκετά διατηρημένο γονίδιο που κωδικοποιεί την ομώνυμη ριβοσωμική πρωτεΐνη.

Επιπροσθέτως, η πρωτεΐνη παράγωγο του γονιδίου αυτού είναι μέρος της 60S υπομονάδας του ριβοσώματος και ανήκει στην οικογένεια L19E των ριβοσωμικών πρωτεϊνών.⁽³⁷⁾ Όπως και το *gri19*, έτσι και το γονίδιο *actin3*, είναι αρκετά συντηρημένο. Ανήκει στην κατηγορία των ακτινών που δρουν στη μορφολογία των κυττάρων επηρεάζοντας την κινητικότητα, τις κινήσεις, τη διαίρεση, τη φαγοκυττάρωση, την ενδοκυττάρωση, την εξωκυττάρωση και τη συστολή.^{(38) (39) (40)}

Blast (Basic Local Alignment Search Tool)

Το ηλεκτρονικό και ελεύθερο πρόγραμμα Blast προσφέρει στο χρήστη τη δυνατότητα να συγκρίνει νουκλεοτιδικές και πρωτεϊνικές αλληλουχίες. Το αποτέλεσμα της σύγκρισης, ή της στοίχισης των αλληλουχιών στόχων, βασίζεται στην ομολογία που εμφανίζουν. Οι αλληλουχίες στόχοι που ερευνώνται αντιπαραβάλλονται με τις αλληλουχίες που υπάρχουν στη βιβλιογραφία των βάσεων δεδομένων. Ανάλογα με το είδος της αλληλουχίας επερώτησης και της επιζητούμενης αλληλουχίας από τις βάσεις δεδομένων, το BLAST χωρίζεται σε επιμέρους προγράμματα όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.

<i>Είδος Blast</i>	<i>Αλληλουχία Επερώτησης</i>	<i>Αλληλουχία Βιβλιογραφίας</i>
BLASTP	Πρωτεϊνική	Πρωτεϊνική
BLASTN	Νουκλεοτιδική	Νουκλεοτιδική
BLASTX	Νουκλεοτιδική (μεταφρασμένη)	Πρωτεϊνική
TBLASTN	Πρωτεϊνική	Νουκλεοτιδική (μεταφρασμένη)
TBLASTX	Νουκλεοτιδική (μεταφρασμένη)	Νουκλεοτιδική (μεταφρασμένη)

Πίνακας 2 Τα είδη των προγραμμάτων BLAST

Η στατιστική ανάλυση του BLAST γίνεται υπολογιστικά αυτόματα μέσα από το πρόγραμμα. Ο χρήστης δύναται να επηρεάσει τις παραμέτρους που επιθυμεί και να θέσει το κατώφλι που θέλει στη στατιστική απόσταση μεταξύ της αλληλουχίας που θέτει υπό εξέταση και των αλληλουχιών που παρατίθενται από τη βιβλιογραφία.⁽⁴¹⁾

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα BLASTX με αντιπαραβολή της βάσης δεδομένων *nr* του NCBI, ενώ το κατώφλι της στατιστικής ανάλυσης (E-value) τοποθετήθηκε στο $\leq 1e^{-6}$.

Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν σχηματίστηκαν μέσα από το πρόγραμμα *Primer Blast*.

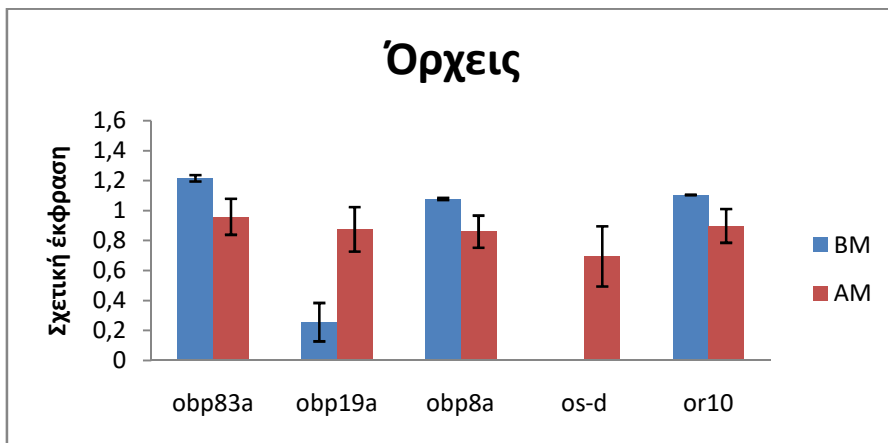
Αποτελέσματα

Με βάση δεδομένα RNAseq του εργαστηρίου, που προέκυψαν από σύγκριση μεταγραφικών αλληλουχιών από θηλυκούς αναπαραγωγικούς ιστούς (Female Accessory Glands) και όρχεις αρσενικών εντόμων (Testes) του δάκου της ελιάς, εντοπίστηκαν δώδεκα γονίδια που είχαν σχέση με το οσφρητικό σύστημα.

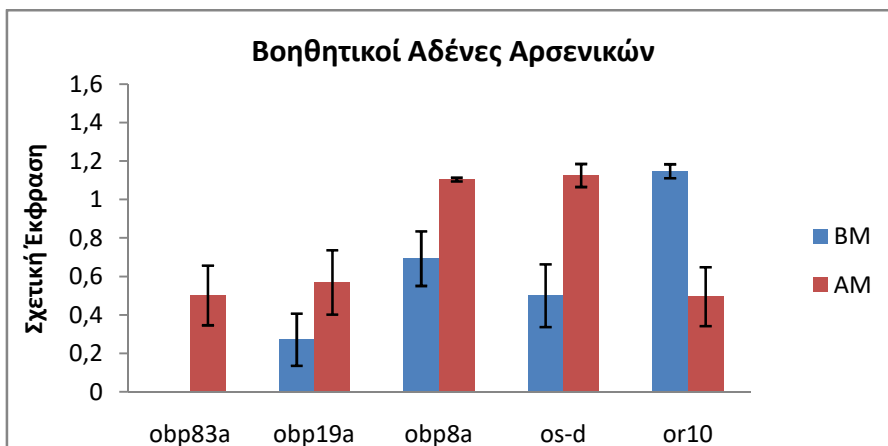
Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία μελετήθηκαν περαιτέρω 5 από αυτά τα γονίδια. Για να μελετηθούν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στο έντομο, απομονώθηκε γενετικό υλικό τριών εντόμων, για κάθε υπό εξέταση ιστό, ώστε να υπάρχουν τρία διαφορετικά βιολογικά δείγματα κάθε φορά. Ακολούθησε η μετατροπή του σε cDNA και η διεξαγωγή Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real-time PCR) ώστε να καθοριστούν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ξεχωριστά. Για τον υπολογισμό της σχετικής έκφρασης του κάθε γονιδίου χρησιμοποιήθηκε η έκφραση δύο housekeeping γονιδίων, του rpl19 για τους αρσενικούς ιστούς και του actin3 για τους θηλυκούς.

Παρακάτω ακολουθεί η αποτύπωση των αποτελεσμάτων σε μορφή γραφημάτων. Συγκεκριμένα, με μπλε χρώμα θα εμφανίζεται η σχετική έκφραση πριν τη σύζευξη (Before Mating, BM) ενώ με μπορντό χρώμα η σχετική έκφραση του κάθε γονιδίου δώδεκα ώρες μετά από μία, και μόνο, σύζευξη των εντόμων (After Mating, AM). Με τη σειρά, ακολουθεί η γραφική απεικόνιση για τους όρχεις (γράφημα 1), τους αρσενικούς βοηθητικούς αδένες (γράφημα 2) και τους θηλυκούς βοηθητικούς αδένες με τη σπερματοθήκη (γράφημα 3).

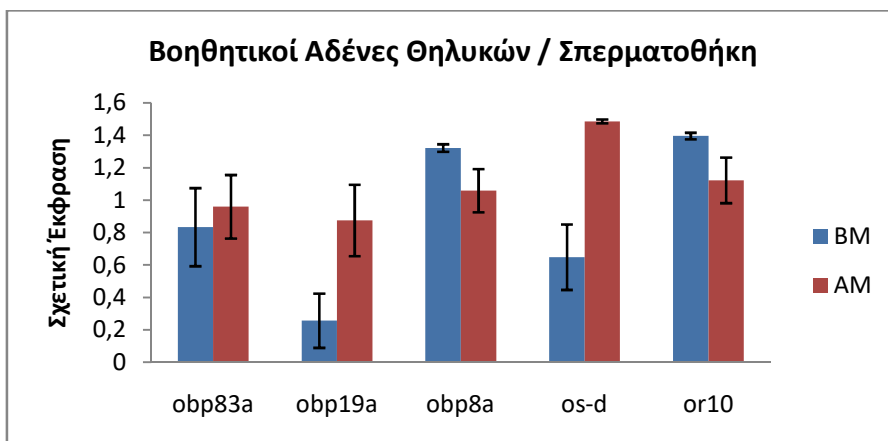
Γράφημα 1



Γράφημα 2



Γράφημα 3



Συζήτηση

Οι οσφρητικοί υποδοχείς (ORs) όσο και οι οσμοδεσμευόμενες πρωτεΐνες (OBPs) εντοπίζονται πέραν του οσφρητικού συστήματος⁽⁸⁾ και ειδικότερα σε γεννητικά κύτταρα ανθρώπων και ποντικών.^{(27) (28) (29) (30) (31)} Όμως, και σε άλλα έντομα, εκτός του δάκου, παρατηρείται η εκτοπική έκφραση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών στο αναπαραγωγικό σύστημα.^{(42) (25) (26)} Πρωτεΐνες που ανήκουν στη δεύτερη αναφερθείσα οικογένεια, αλλά είναι μη οσφρητικές, αναγνωρίστηκαν ανάμεσα στις πρωτεΐνες των βοηθητικών αδένων ατόμων *Tenebriomolitor*⁽⁴³⁾ ενώ σε *Ceratitis capitata*⁽⁴⁴⁾ αναγνωρίστηκαν ανάμεσα στις συνοδευτικές πρωτεΐνες του σπέρματος. Ο σημαντικός τους ρόλος τους προσδιορίζεται από την ικανότητα που έχουν να αναγνωρίζουν και να δεσμεύουν μία μεγάλη ομάδα μορίων, τα οποία αναγνωρίζονται ως *οσμές* από το οσφρητικό σύστημα, και να δρουν ως μεταφορείς λιπόφιλων μορίων στα διάφορα συστήματα.⁽⁴⁵⁾

Αναλύοντας τη μεταβολή της έκφρασης των γονιδίων με τη σειρά, παρατηρούμε πως οι πρώτες τρεις OBPs (83α, 19α και 8α) στους βοηθητικούς αδένες των αρσενικών ατόμων υπερεκφράζονται μετά τη σύζευξη. Δύο εξ αυτών, οι 83α και 8α, ακολουθούν όμοια μεταβολή έκφρασης στους όρχεις, όπου παρατηρείται υπερέκφραση αυτών πριν τη σύζευξη. Όσο για την έκφραση στα θηλυκά άτομα, μπορούμε να παρατηρήσουμε πως οι OBPs 83α και 19α υπερεκφράζονται μετά τη σύζευξη. Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται από μία περιοχή GOBP (General Odorant Binding Protein), η οποία εντοπίζεται σε πρωτεΐνες που δεσμεύουν φερομόνες και περιβάλλουν εξωκυττάρια τους ORs.⁽⁴⁶⁾ Το γεγονός πως οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες εντοπίζονται σε ιστούς του αναπαραγωγικού συστήματος αποκαλύπτει την αλληλεπίδρασή τους και με άλλα υποστρώματα, πέραν αυτών που αλληλεπιδρούν στο οσφρητικό σύστημα, και δρουν ως μεταφορείς, στα αρσενικά άτομα, στις δραστηριότητες που λαμβάνουν χώρα μετασυζευκτικά. Ιδιαίτερως για την OBP8α, στη *D. melanogaster* αναφέρονται υψηλά επίπεδα έκφρασης στους αρσενικούς βοηθητικούς αδένες⁽⁴⁷⁾ και έχει συνδεθεί με λειτουργίες όπως η RNA μεταγραφή.⁽⁴⁸⁾

Παρατηρώντας, εν συνεχεία, το μοτίβο έκφρασης της πρωτεΐνης os-d, εύκολα διακρίνουμε την υπερέκφραση, μετά τη σύζευξη, σε όλους τους ιστούς. Η ιδιαιτερότητα παρατηρείται στους όρχεις, όπου προσυζευκτικά δεν εκφράζεται. Το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη 10 της κεραίας του οσφρητικού συστήματος, η οποία είναι

CSP (ChemoSensory Protein). ⁽⁴⁹⁾ Η γενικότερη λειτουργία της είναι να μεταφέρει υδροφοβικά μόρια σε ιστούς, ενώ δεν υπάρχουν στοιχεία για την εξειδικευμένη δράση της.

Τελευταία πρωτεΐνη, από αυτές που αναλύσαμε, είναι η or10. Όπως και στην os-d, παρατηρείται παρόμοιο μοτίβο στην εναλλαγή της έκφρασής της, πριν και μετά τη σύζευξη, και στους τρεις εξεταζόμενους ιστούς. Το γονίδιο κωδικοποιεί πρωτεΐνη-υποδοχέα με δράση GPCR (GProtein-Coupled Receptor). ORs σε όρχεις έχουν αναφερθεί σε πληθώρα ειδών ⁽³⁰⁾ ⁽⁵⁰⁾ ενώ μελέτες σε σπέρμα θηλαστικών αποκάλυψαν ότι σχετίζονται με την κινητικότητα του σπέρματος. Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί πως οι εν λόγω υποδοχείς δεσμεύουν εξωκυττάρια σήματα τα οποία προέρχονται από τη χημειοταξική μεταβολή στο εσωτερικό περιβάλλον των θηλυκών ατόμων, τα οποία υποβοηθούν την κίνηση του σπέρματος μέσα στον ωοαγωγό. ⁽⁵¹⁾ ⁽⁵²⁾ Από την παρουσία της πρωτεΐνης αυτής στο αναπαραγωγικό σύστημα των θηλυκών ατόμων δημιουργούνται υποψίες για πιθανό παρόμοιο μηχανισμό και στην κλάση των εντόμων, με σκοπό τη μετακίνηση του σπέρματος μέσα στον ωοαγωγό και την αποθήκευσή του, τελικά, στη σπερματοθήκη.

Βιβλιογραφία

1. **Τζανακάκης Μ., Κατσόγιαννος Β.** Έντομα Καρποφόρων Δέντρων και Αμπέλου. Θεσσαλονίκη : ΑγροΤύπος , 2003. 960-7667-07-7.
2. **Nardi Francesco, Carapelli Antonio, Dallai Romano, Roderick George K, Frati Francesco.** Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). *Molecular Ecology*. 2015, 14, σσ. 2729–2738.
3. **Mazomenos Basilios, Pantazi-Mazomenou Anastasia, Stefanou Dimitra.** *IOBC wprs Bulletin*. 2002, 25.
4. **Daane Kent, Johnson Marshall.** Olive Fruit Fly: Managing an Ancient Pest in Modern Times. *Annual Review of Entomology*. January 2010, 55, σσ. 151-169.
5. **Morris Rockstein (editor), Ivar P.S. Agrell, Arnold De Loof, Jan De Wilde Lawrence I. Gilbert, Anders M. Lundquist.** *The Physiology of Insecta, volume I, Second Edition*. s.l. : Academic Press, 1973. 0-12-591601-9.
6. **Marc, Klowden J.** *Physiological Systems in Insects*. 3rd. s.l. : ACADEMIC PRESS, 2013.
7. **Martin Aluja, Allen L Norrbom.** *Fruit flies (Tephritidae) : phylogeny and evolution of behavior*. s.l. : CRC Press, 2001.
8. **R. F. Chapman, Stephen J. Simpson, Angela E. Douglas.** *The Insects: Structure and Function, fifth edition*. s.l. : Cambridge University Press, 2013. 978-0-521-11389-2.
9. **Chapman T, Davies SJ.** Functions and analysis of the seminal fluid proteins of male *Drosophila melanogaster* fruit flies. *Peptides*. September 2004, 25, σσ. 1477-90.
10. **Ravi Ram K, Wolfner MF.** Seminal influences: *Drosophila* Acps and the molecular interplay between males and females during reproduction. *Integrative and Comparative Biology*. 2007, 47, σσ. 427-45.
11. **C, Gillott.** Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. *Annual review of entomology*. 2003, 48, σσ. 163-84.
12. **Avila FW, Sirot LK, LaFlamme BA, Rubinstein CD, Wolfner MF.** Insect seminal fluid proteins: identification and function. *Annual Review of Entomology*. 2011, 56, σσ. 21-40.
13. **BG, Craig.** Mosquitoes: female monogamy induced by male accessory gland substance. *Science*. 1967.
14. **Young ADM, Downe AER.** Male accessory gland substances and the control of sexual receptivity in female *Culex tarsalis*. *Physiological Entomology*. 1987, 12, σσ. 233-239.

15. **Leahy SMG, Craig BG.** Accessory gland substance as a stimulant for oviposition in *Aedes aegypti* and *A. albopictus*. *Mosquito News*. 1965, 25, σσ. 448-452.
16. **Fuchs MS, Craig Jr GB, Despommier DD.** The protein nature of the substance inducing female monogamy in *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*. 1969, 15, σσ. 701-709.
17. **Fuchs MS, Craig jr GB, Hiss EA.** The biochemical basis of female monogamy in mosquitoes. I. Extraction of the active principle from *Aedes aegypti*. *Life Sciences*. 1968, 7, σ. 835.
18. **Fuchs MS, Hiss EA.** The partial purification and separation of the protein components of matrone from *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*. 1970, 16, σσ. 931-939.
19. **Αιμιλία Ζίφα, Ζήσης Μαμούρης, Κατερίνα Μούτου.** *Βιολογία*. Βόλος : Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, 2011.
20. **Bill, Hansson.** A bug's smell – research into insect olfaction. *TRENDS in Neurosciences*. 2002, Τόμ. 25, 5.
21. **Paolo Pelosi, Mariantonietta Calvello, Liping Ban.** Diversity of Odorant-binding Proteins and Chemosensory Proteins in Insects. *Chem. Senses*. 2005, 30 (suppl 1), σσ. i291–i292.
22. **Bill S. Hansson, Marcus C. Stensmyr.** Evolution of Insect Olfaction. *Neuron*. December 2011, 72, σσ. 698-711.
23. **R. Jason Pittsa, Chao Liua, Xiaofan Zhoua, Juan C. Malpartidaa, Laurence J. Zwiebela.** Odorant receptor-mediated sperm activation in disease vector mosquitoes. *PNAS*. February 2014, 111, σσ. 2566–2571.
24. **Costa-da-Silva André Luis, Kojin Bianca, Marinotti Osvaldo, James Anthony, Capurro Margareth Lara.** Expression and accumulation of the two-domain odorant-binding protein AegOBP45 in the ovaries of blood-fed *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*. 2013, 6:364.
25. **Jia-Ying Zhua, Li-Fang Zhanga, Sang-Zi Zeb, Da-Wei Wanga, Bin Yanga.** Identification and tissue distribution of odorant binding protein genes in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology*. 2013, Τόμ. 59, 7, σσ. 722-728.
26. **Wei Zhang, Arun Wanchoo, Almudena Ortiz-Urquiza, Yuxian Xia & Nemat O Keyhani.** Tissue, developmental, and caste-specific expression of odorant binding proteins in a eusocial insect, the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. *Scientific Reports*. 2016.
27. **Spehr M, Gisselmann G, Poplawski A, Riffell JA, Wetzel CH, Zimmer RK, Hatt H.** Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. *Science*. 2003.
28. **Spehr M, Schwane K, Heilmann S, Gisselmann G, Hummel T, Hatt H.** Dual capacity of a human olfactory receptor. *Current Biology*. 2004.

29. **Spehr M, Schwane K, Riffell JA, Zimmer RK, Hatt H.** Odorant receptors and olfactory-like signaling mechanisms in mammalian sperm. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2006, 250, σσ. 128-36.
30. **Fukuda N, Yomogida K, Okabe M, Touhara K.** Functional characterization of a mouse testicular olfactory receptor and its role in chemosensing and in regulation of sperm motility. *Journal of Cell Science*. 2004, 117.
31. **Veitinger T, Riffell JR, Veitinger S, Nascimento JM, Triller A, Chandsawangbhuwana C, Schwane K, Geerts A, Wunder F, Berns MW, Neuhaus EM, Zimmer RK, Spehr M, Hatt H.** Chemosensory Ca²⁺ dynamics correlate with diverse behavioral phenotypes in human sperm. *Journal of Biological Chemistry*. 2011, 286.
32. **Drutel G, Arrang J M, Diaz J, Wisnewsky C, Schwartz K, Schwartz J C.** Cloning of OL1, a putative olfactory receptor and its expression in the developing rat heart. *Receptor Channels*. 1995, 3, σσ. 33-40.
33. **Weber M, Pehl U, Breer H, Strotmann J.** Olfactory receptor expressed in ganglia of the autonomic nervous system. *Journal of Neuroscience Research*. 2002, 68, σσ. 176-184.
34. **Blache P, Gros L, Salazar G, Bataille D.** Cloning and tissue distribution of a new rat olfactory receptor-like (OL2). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1998, 242, σσ. 669-672.
35. **Green R Michael, Sambrook Joseph.** *Molecular cloning : a laboratory manual*. 4th Edition. s.l. : Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
36. **B, Mullis Kary.** *Process for amplifying nucleic acid sequences*. 28 July 1987.
37. **Salvatore Feo, Brendian Davies, Mike Fried.** The mapping of seven intron-containing ribosomal protein genes shows they are unlinked in the human genome. *Genomics*. 1992, 13, σσ. 201-207.
38. **Daqiu Zhao, Saijie Gong, Zhaojun Hao, Jiasong Meng, Jun Tao.** Quantitative Proteomics Analysis of Herbaceous Peony in Response to Paclobutrazol Inhibition of Lateral Branching. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015, 16, σσ. 24332-24352.
39. **Zhongliang Wang, Zaohe Wuc, Jichang Jianc, Yishan Lu.** Cloning and expression of an actin gene in the haemocytes of pearl oyster (*Pinctada fucata*, Gould 1850). *Marine Genomics*. 2008, Τόμ. 1, 2, σσ. 63–67.
40. **Dominique Pantaloni, Christophe Le Clainche, Marie-France Carlier.** Mechanism of Actin-Based Motility. *Science*. 2001, Τόμ. 292, 5521, σσ. 1502-1506.
41. **Baxevanis D Andreas, Ouellette B F Francis.** *Βιοπληροφορική*. Αθήνα : Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου, 2003.

42. **R. Jason Pitts, Chao Liu, Xiaofan Zhou, Juan C. Malpartida, Laurence J. Zwiebel.** Odorant receptor-mediated sperm activation in. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013, 111.
43. **Paesen GC, Happ GM.** The B proteins secreted by the tubular accessory sex glands of the male mealworm beetle, *Tenebrio molitor*, have sequence similarity to moth pheromone-binding proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 1995, 25.
44. **Thymianou S, Mavroidis M, Kokolakis G, Komitopoulou K, Zacharopoulou A, Mintzas AC.** Cloning and characterization of a cDNA encoding a male-specific serum protein of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, with sequence similarity to odourant-binding proteins. *Insect Molecular Biology*. 1998, 7, σσ. 345-53.
45. **Sylvain Forêt, Ryszard Maleszka.** Function and evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect, the honey bee (*Apis mellifera*). *Genome Research*. 2006, 16, σσ. 1404-1413.
46. **Vogt RG, Prestwich GD, Lerner MR.** Odorant-binding-protein subfamilies associate with distinct classes of olfactory receptor neurons in insects. *Journal of Neurobiology*. 1991, 22, σσ. 74-84.
47. **Arya GH, Weber AL, Wang P, Magwire MM, Negron YL, Mackay TF, Anholt RR.** Natural variation, functional pleiotropy and transcriptional contexts of odorant binding protein genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 2010, 186, σσ. 1475-85.
48. **Kodrík D, Filippov VA, Sehna F, Filippova MA.** Sericotropin: an insect neurohormonal factor affecting RNA transcription. *Netherlands J Zool*. 1995.
49. **Wanner KW, Willis LG, Theilmann DA, Isman MB, Feng Q, Plettner E.** Analysis of the insect os-d-like gene family. *Journal of Chemical Ecology*. 30, σσ. 889-911.
50. **Loren D, Walensky, Martial Ruat, Robert E. Bakin, Seth Blackshaw, Gabriele V. Ronnett, Solomon H. Snyder.** Two Novel Odorant Receptor Families Expressed in Spermatids Undergo 5'-Splicing. *Journal of Biological Chemistry*. 1998, 273, σσ. 9378-87.
51. **Suzuki N, Garbers DL.** Stimulation of sperm respiration rates by speract and resact at alkaline extracellular pH. 1984, 30, σσ. 1167-74.
52. **Parmentier M, Libert F, Schurmans S, Schiffmann S, Lefort A, Eggerickx D, Ledent C, Mollereau C, Gérard C, Perret J, Anton Grootegoed, Gilbert Vassart.** Expression of members of the putative olfactory receptor gene family in mammalian germ cells. 1992, 355, σσ. 453-5.
53. **Giovanni, Benelli.** Aggressive Behavior and Territoriality in the Olive Fruit Fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae): Role of Residence and Time of Day. *J Insect Behav*. 2014, 27, σσ. 145-161.