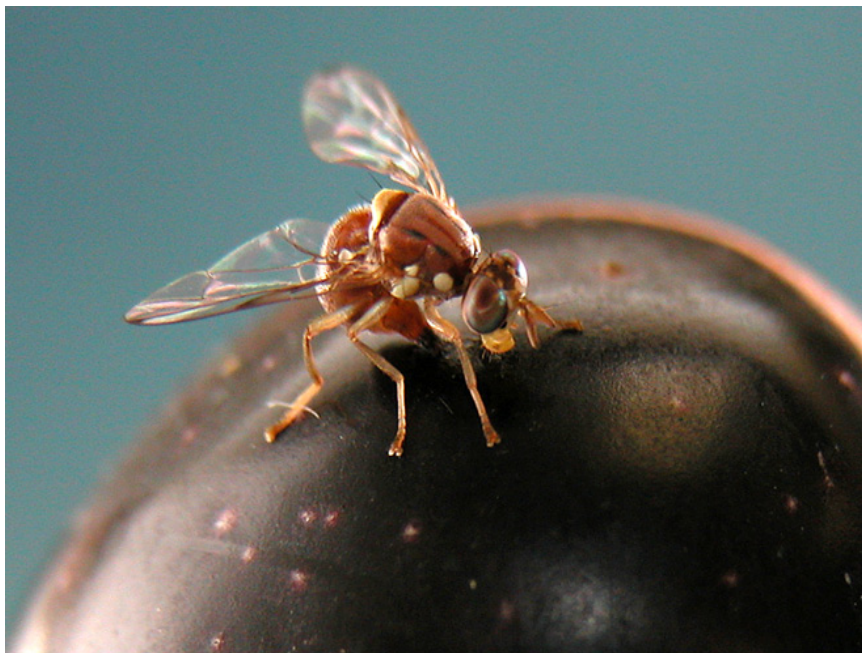


**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ-ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Ανάπτυξη και χρήση μεθόδων γενετικής μηχανικής για εφαρμογή
στην καταπολέμηση του δάκου της ελιάς**



ΜΑΡΘΑ ΚΟΥΚΙΔΟΥ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2006

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
SUMMARY	2
Συνομειύσεις	3

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΔΙΠΤΕΡΟΥ *BACTROCERA OLEAE* ΜΕ ΤΟ ΜΕΤΑΘΕΤΟ ΣΤΟΙΧΕΙΟ *MINOS*

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
1.1 Εισαγωγή στη διαγονιδιακή τεχνολογία	4
1.2 Μεταθετά στοιχεία	5
1.2.1 Η υπερ-οικογένεια P	6
1.2.2 Η υπερ-οικογένεια <i>Tc1/mariner</i>	7
1.2.3 Η υπερ-οικογένεια hAT	8
1.2.4 Η υπερ-οικογένεια piggyback	8
1.3 Γονίδια διάκρισης (marker genes) για την επιλογή των διαγονιδιακών εντόμων	9
1.3 Ένας δυνητικά καθολικός EGFP-γενετικός φορέας διάκρισης	10
1.4 <i>Bactrocera oleae</i> : Ο δάκος της ελιάς	11
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
2.2 Μετασχηματισμός του δάκου της ελιάς με το στοιχείο <i>Minos</i>	14
2.3 Μοριακή ανάλυση των διαγονιδιακών σειρών	16
3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
3.1 Ενεργότητα του μεταθετού στοιχείου <i>Minos</i> στο <i>Bactrocera oleae</i>	19
3.2 Έκφραση του τρανσποζονίου pMiBoo14/GtTA2	19
3.3 Ποιοτικές και ποσοτικές παράμετροι του μετασχηματισμού του <i>B. oleae</i> με το στοιχείο <i>Minos</i>	20

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

Η ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ RNAi ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *TRA2* ΣΤΟ *BACTROCERA OLEAE*

4. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	22
4.1 Δομή, λειτουργία και εξέλιξη των μονοπατιών που σηματοδοτούν τον καθορισμό του φύλου των δίπτερων εντόμων	22
4.1.1 Καθορισμός του φύλου στη <i>D. melanogaster</i>	22
4.1.2 Μελέτες φυλοκαθορισμού στα δίπτερα <i>Ceratitis capitata</i> , <i>Musca domestica</i> και <i>Bactrocera oleae</i> . Συγκριτικές μελέτες των γονιδίων <i>Sxl</i> , <i>tra</i> , <i>tra2</i> και <i>dsx</i>	23
4.2 Παρεμβολή του RNA για την καταστολή της έκφρασης γονιδίων (RNAi) ..	27
4.2.1 Μηχανισμός σίγησης γονιδίων χρησιμοποιώντας δίκλωνο RNA	27
4.2.2 Διαφορετικοί τρόποι κατασκευής dsRNA και θεωρήσεις όσον αφορά τη λειτουργικότητα τους	29
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	32
5.1 Προς αναζήτηση του γονιδίου <i>tra2</i> στο <i>B. oleae</i>	32

5.2	Εισαγωγή δίκλωνου RNA (dsRNA) του <i>tra2</i> σε προβλαστοδερμικά έμβρυα του <i>B. oleae</i>	33
5.3	Αποτίμηση της γονιμότητας των εμβρύων που ενέθηκαν με <i>tra2</i> dsRNA ...	36
5.4	Σύνθεση cDNA και ανάλυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR) των ενεμένων με δίκλωνο RNA <i>tra2</i> εμβρύων	37
5.5	Ανάλυση με πιθανά φυλο-καθορισμένα γονίδια για τον μοριακό προσδιορισμό του φύλου στα ενεμένα άτομα με δίκλωνο RNA <i>tra2</i>	39
6.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	42
6.1	Η πρωτεΐνη TRA2 του <i>B.oleae</i> (BOTRA2) είναι απαραίτητη για την ομαλή ανάπτυξη των θηλυκών ατόμων	42
6.2	Η πρωτεΐνη TRA2 του <i>B.oleae</i> (BOTRA2) είναι απαραίτητη για τη γονιμότητα των αρσενικών εντόμων	43

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ

Ο ΦΟΡΕΑΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ *Minos* pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP. ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΗΣ *D. melanogaster*. ΠΡΟΣΠΑΘΕΙΕΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΟΥ *B. oleae*

7.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	44
7.1	Τεχνική Στείρου Εντόμου (Sterile Insect Technique, SIT)	44
7.2	Μηχανισμοί φυλετικού διαχωρισμού (genetic sexing mechanisms)	44
7.3	Διαγονιδιακά στελέχη για βιολογικό έλεγχο	45
7.3.1	Διαγονιδιακά στελέχη για την επαγωγή θηλυκής θνησιμότητας	46
7.3.2	Διαγονιδιακά στελέχη που φέρουν ένα επικρατές θνησιγόνο γονίδιο ..	47
8.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	49
8.1	Το γονίδιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη, ένα σύστημα υιοθετημένο για επαγόμενη έκφραση σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς	49
8.2	Μετασχηματισμός του <i>B. oleae</i> με το τρανσποζόνιο pMi3xP3-EGFP	52
8.3	Το τρανσποζόνιο pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP	53
8.4	Μετασχηματισμός της <i>D. melanogaster</i> με το τρανσποζόνιο pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP	54
8.5	Μετασχηματισμός του <i>B. oleae</i> με το τρανσποζόνιο pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP	60
9.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	60
9.1	Το επαγωγικό σύστημα tetO/tTA	60
9.2	Έκφραση του τρανσποζονίου <i>Minos</i> pMi3xP3-EGFP στο <i>B. oleae</i>	61
9.3	Έκφραση του τρανσποζονίου <i>Minos</i> pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP στη <i>D. melanogaster</i>	61
9.4	Το τρανσποζόνιο <i>Minos</i> pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP στο <i>B. oleae</i>	63
9.5	Μελλοντικές κατευθύνσεις	64
10.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	65
10.1	ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ	65
10.1.1	Ο βασισμένος στο στοιχείο <i>Minos</i> φορέας μετασχηματισμού pMiBo14/GtTA2	65
10.1.2	Ο βασισμένος στο στοιχείο <i>Minos</i> φορέας μετασχηματισμού pMi3xP3-EGFP	66
10.1.3	Το πλασμίδιο βοηθός pHSS6hsILMi20	66
10.1.4	Το πλασμίδιο μήτρα pBlueSKMimRNA για τη σύνθεση του	

βοηθού mRNA	67
10.1.5 Πλασμίδιο μήτρα για τη σύνθεση mRNA του γονιδίου <i>tra2</i> του δάκου της ελιάς	67
10.1.6 Τελική πλασμιδιακή κατασκευή γενετικού μετασχηματισμού με βάση το γονίδιο <i>tra2</i> του δάκου της ελιάς (pMiBo <i>tra2</i> /tTa/3xP3-EGFP)	68
10.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ & ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΖΩΩΝ	60
10.2.1 <i>Bactrocera oleae</i>	72
10.2.1.1 Καλλιέργεια	72
10.2.1.2 Μικροενέσεις και δημιουργία διαγονιδιακών σειρών	72
10.2.2 <i>Drosophila melanogaster</i>	73
10.2.2.1 Καλλιέργεια	73
10.2.2.2 Μικροενέσεις και δημιουργία διαγονιδιακών σειρών	73
10.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ	75
10.3.1 Βακτηριακά στελέχη και θρεπτικά μέσα	75
10.3.2 Απομόνωση γενωμικού DNA (Berkley protocol)	75
10.3.3 Απομόνωση γενωμικού DNA (Laird <i>et al.</i> , 1991)	75
10.3.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini-prep) ...	76
10.3.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (maxi-prep) ..	76
10.3.6 Χειρισμός DNA	76
10.3.7 Ανάλυση κατά Southern	77
10.3.8 Κλωνοποίηση παρακειμένων χρωμοσωμικών αλληλουχιών στις θέσεις ένθεσης του <i>Minos</i>	77
10.3.9 <i>In vitro</i> σύνθεση capped mRNA	78
10.3.10 Απομόνωση RNA	78
10.3.11 Σύνθεση cDNA/αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR) ...	78
10.3.12 Απομόνωση πολυαδενυλιωμένου mRNA	79
10.3.13 Σύνθεση cDNA/αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	79
11. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	80

Περίληψη

Ο δάκος της ελιάς *Bactrocera oleae* (Dacus) αποτελεί το πιο καταστρεπτικό έντομο του ελαιόκαρπου παγκοσμίως. Υπάρχει ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για βιολογικές μεθόδους ελέγχου του συγκεκριμένου είδους, εν μέρει εξαιτίας της επίγνωσης των ανθρώπων για την επιβλαβή επίδραση των χημικών εντομοκτόνων στο περιβάλλον και επίσης εξαιτίας της αυξανόμενης ανθεκτικότητας του εντόμου στα ήδη προϋπάρχοντα εντομοκτόνα. Η Τεχνική Στείρου Εντόμου (SIT) αποτελεί μια νέα βιολογική μέθοδο καταπολέμησης των εντόμων οικονομικής σημασίας, με ευρεία εφαρμογή σε διάφορα μέρη του κόσμου. Περιλαμβάνει την καλλιέργεια μεγάλου αριθμού εντόμων, τα οποία στερώνονται πριν την απελευθέρωση τους στη φύση. Παρόλο που αρχικά παράγονται ίσοι αριθμοί αρσενικών και θηλυκών ατόμων, τα θηλυκά διαχωρίζονται και απορρίπτονται πριν την απελευθέρωση, γιατί δε θεωρούνται χρήσιμα στην προσπάθεια ελέγχου του εντόμου στόχος. Άμα ικανοποιητικός αριθμός ανταγωνιστικών, στείρων αρσενικών απελευθερωθεί, η πλειονότητα των θηλυκών που απαντώνται στη φύση θα ζευγαρώσουν μαζί τους και επομένως δε θα προκύψουν βιώσιμοι απόγονοι.

Στην παρούσα διατριβή, επιδείξαμε επιτυχή και σταθερό μετασχηματισμό της γαμετικής σειράς του δάκου, χρησιμοποιώντας ένα φορέα μετασχηματισμού *Minos*, ο οποίος εκφράζει τη φθορίζουσα πρωτεΐνη EGFP (Koukidou *et al.*, 2006). Χρησιμοποιώντας την τεχνογνωσία που αναπτύξαμε όσον αφορά το μετασχηματισμό του εντόμου, ξεκινήσαμε την ανάπτυξη ενός γενετικά τροποποιημένου στελέχους του δάκου με στόχο την εφαρμογή του στην Τεχνική Στείρου Εντόμου, με βάση το γονίδιο φυλο-καθορισμού *transformer 2 (tra2)*. Το γονίδιο *tra2* είναι ένα από τα ρυθμιστικά γονίδια που ελέγχουν το φυλο-καθορισμό στη *Drosophila melanogaster*. Η λειτουργία του γονιδίου *tra2* έχειδειχθεί να είναι απαραίτητη για το θηλυκό τρόπο συρραφής του γονιδίου *doublesex*, όπως και για τη φυσιολογική σπερματογένεση των αρσενικών της *Drosophila*. Ο φυλο-καθοριστικός ρόλος του γονιδίου *tra2* στο *B. oleae* (*Botra2*) δοκιμάστηκε με RNA interference (RNAi) στο δεύτερο μέρος αυτής της διατριβής. Ένεση προ-βλαστοδερμικών εμβρύων του δάκου με αυξανόμενες συγκεντρώσεις δίκλωνου RNA του γονιδίου *Botra2* οδήγησε σε αυξανόμενο αριθμό αρσενικών ατόμων και σε αντίστοιχη μείωση της γονιμότητας των XY αρσενικών, επιβεβαιώνοντας τη συντηρημένη λειτουργία του γονιδίου με το αντίστοιχο του της *Drosophila*. Βασιζόμενοι στα αποτελέσματά μας, σχεδιάσαμε και κατασκευάσαμε ένα φορέα μετασχηματισμού με τα άκρα του μεταθετού στοιχείου *Minos*, όπου η έκφραση μιας κασέτας αντίστροφα μεταγραφόμενων κωδικών περιοχών του γονιδίου *tra2* είναι ρυθμιζόμενη. Το παραπάνω αποτελεί το τρίτο μέρος της παρούσας μελέτης. Εισαγωγή του συγκεκριμένου τρανσποζονίου στη γαμετική σειρά του *B. oleae*, θα οδηγήσει στη δημιουργία στελεχών, όπου όταν η έκφραση της κασέτας επάγεται, θα δίνει στείρα και αρσενικά μόνο έντομα, χρήσιμα για εφαρμογές SIT.

Summary

The olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Dacus) is the most destructive pest of olives worldwide. There is increasing interest in biological methods for control of this species, in part because of worldwide awareness to the harmful effects of insecticides and other factors such as increasing insect resistance to existing insecticides. The Sterile Insect Technique (SIT) provides a new biological method for dealing with pests, with great application success in various parts of the world. It involves rearing large numbers of insects that are then sterilized before field release. Although equal numbers of the two sexes are initially produced, females are separated and discarded before release because they are considered detrimental to control efforts. If sufficient numbers of competitive sterile males are released, the majority of the wild females in the field will mate with them and thus will not produce viable offspring.

In this thesis, we have demonstrated stable and efficient transposase-mediated germ-line transformation of this insect with a *Minos* based EGFP expressing vector (Koukidou *et al.*, 2006). Using *Minos* based transformation, we then started to develop a genetically engineered strain for SIT application, employing the sex determining gene *transformer 2* (*tra2*). The *tra2* gene is one of the regulatory genes that control sex determination in *Drosophila melanogaster*. The wild type function of *tra2* has been shown to be required for female specific splicing of the *doublesex* gene as well as for normal spermatogenesis in male *Drosophila*. The sex determining role of *B. oleae tra2* gene (*Botra2*) was assayed by RNA interference (RNAi) in the second part of the thesis. Injection of *B. oleae* pre-blastoderm embryos with increasing concentrations of *Botra2* dsRNA resulted in an increased number of male flies and a corresponding decrease of XY male fertility, confirming the gene's functional conservation to its *Drosophila* orthologue. Based on our RNAi results, as the third part of this thesis, we have developed a *Minos* based EGFP expressing plasmid, where *tra2* expression is repressible. Introduction of this transposon into the germline of *B. oleae* should result in a strain that, when *tra2* expression is induced, will give sterile, male-only progeny, useful for SIT applications.

ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ

bp	base pair
cDNA	coding DNA
dsRNA	double stranded RNA
<i>dsx</i>	Doublesex
<i>egfp</i>	Enhanced Green Fluorescent Protein
GSM	Genetic Sexing Mechanism
miRNA	microRNA
mRNA	messenger RNA
PCR	Polymerase Chain Reaction
RISC	RNA Induced Silencing Complex
RNAi	RNA interference
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
siRNA	small interfering RNA
SIT	Sterile Insect Technique
<i>Sxl</i>	Sex Lethal
<i>tetO</i>	Tetracycline Operator Sequence
<i>tra</i>	Transformer
<i>tra2</i>	Transformer 2
tTA	Tetracycline Transactivator

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

**ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΔΙΠΤΕΡΟΥ *BACTROCERA*
OLEAE ΜΕ ΤΟ ΜΕΤΑΘΕΤΟ ΣΤΟΙΧΕΙΟ *MINOS***

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Εισαγωγή στη διαγονιδιακή τεχνολογία

Αποτελεσματικές μέθοδοι μεταφοράς γενετικής πληροφορίας στη γαμετική σειρά πολυκύτταρων οργανισμών, όπως τα αρθρόποδα, είναι απαραίτητοι για την κατανόηση του γενετικού ελέγχου στα στάδια της ανάπτυξης, για τη συγκριτική μελέτη διαφόρων οργανισμών καθώς και για την ανάπτυξη νέων στρατηγικών καταπολέμησης εντόμων γεωργικής και ιατρικής σημασίας.

Πριν το μετασχηματισμό της *Drosophila melanogaster* από τους Rubin και Spradling (1982), τμήματα DNA είχαν εισαχθεί και εκφραστεί σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών, ενώ επιπλέον σε ένα μικρό κλάσμα των κυττάρων αυτών τροποποιήθηκαν σε μια φόρμα όπου ήταν κληρονομήσιμη για πολλές γενιές. Επιπρόσθετα, μικρο-ενεμένο DNA σε γονιμοποιημένα αυγά είχε δειχθεί να παραμένει σταθερό κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης και μεταφέρθηκε στις επόμενες γενιές. Το εισαγόμενο DNA στις παραπάνω προσπάθειες, συνδέθηκε με DNA υψηλού μοριακού βάρους και σε κάποιες περιπτώσεις ενσωματώθηκε στα χρωμοσώματα του ξενιστή. Τα προβλήματα της χαμηλής αποτελεσματικότητας, της ανακατανομής των αλληλουχιών και της έλλειψης σταθερότητας του μεταφερόμενου DNA που παρατηρήθηκαν στις παραπάνω μελέτες, λύθηκαν με την ανάπτυξη της μεθοδολογίας μεταφοράς γενετικού υλικού μέσω του μεταθετού στοιχείου P της *D. melanogaster* (Rubin και Spradling, 1982). Οι περισσότεροι πετυχημένοι μετασχηματισμοί αρθρόποδων μέχρι σήμερα έχουν επιτευχθεί με τη μέθοδο των μικροενέσεων σε προ-βλαστοδερμικά έμβρυα, ουσιαστικά ακολουθώντας τα βασικά πρωτόκολλα της *Drosophila*.

Ακολουθεί μια σύντομη περιγραφή της βασικής ιδέας της προαναφερθείσας μεθοδολογίας, η οποία χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα διατριβή για το μετασχηματισμό του εντόμου *Bactrocera oleae*. Έπεται αναλυτικότερη περιγραφή των επιμέρους στοιχείων, στις αμέσως επόμενες ενότητες. Αρχικά, γονίδιο ή γονίδια ενδιαφέροντος, μαζί με ένα συγκεκριμένο γονίδιο διάκρισης, τοποθετούνται σε πλασμίδιο δότη ανάμεσα στα άκρα ενός μη-αυτόνομου μεταθετού στοιχείου (τρανσποζόνιο). Στη συνέχεια ακολουθεί μικρό-ένεση προ-βλαστοδερμικών εμβρύων του αρθρόποδου που πρόκειται να μετασχηματιστεί, ενός μείγματος του τρανσποζονίου και μιας πηγής τρανσποζάσης του συγκεκριμένου μεταθετού. Η αναλογία τρανσποζονίου/τρανσποζάσης μπορεί να είναι κριτικής σημασίας για το μετασχηματισμό και καθορίζεται διαφορετικά για κάθε νέο είδος. Η πηγή της τρανσποζάσης μπορεί να είναι ένα πλασμίδιο βοηθός που φέρει το γονίδιο της τρανσποζάσης του στοιχείου, υπό τον έλεγχο ενός λειτουργικού υποκινητή, ή *in vitro* παραγμένο capped mRNA που κωδικοποιεί την τρανσποζάση του στοιχείου. Η μεταφορά γενετικού υλικού μέσω μικρο-ενέσεων στα έντομα πραγματοποιείται στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια του εμβρύου, όπου οι πρώτες μιτωτικές διαιρέσεις του ζυγωτικού πυρήνα δε συνοδεύονται από κυτταρικές διαιρέσεις, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός συγκυτίου. Σε μεταγενέστερα στάδια, οι πυρήνες μεταναστεύουν στην περιφέρεια του εμβρύου (συγκυτιακό βλαστόδερμα), όπου κυτταροποιούνται φτιάχνοντας ένα μονόστιβο επιθήλιο γύρω από τη λέκιθο (κυτταρικό βλαστόδερμα). Τα πρόδρομα κύτταρα της γαμετικής σειράς ονομάζονται πολικά κύτταρα, βρίσκονται στον οπίσθιο πόλο του εμβρύου και είναι τα πρώτα που σχηματίζονται. Οι μικρο-ενέσεις λοιπόν πραγματοποιούνται στον οπίσθιο πόλο του γονιμοποιημένου ωαρίου που βρίσκονται οι πυρήνες των πρώιμων γαμετικών κυττάρων, πριν το έμβρυο να προχωρήσει στο στάδιο του κυτταρικού βλαστοδέρματος, στο οποίο η

ύπαρξη κυτταρικών μεμβρανών θα καθιστούσε αδύνατη την εισαγωγή ξένου DNA στους πυρήνες των κυττάρων. Στα ενεμένα έμβρυα (G0), η εκφρασμένη τρoνσποζάση θα καταλύσει τη μετάθεση του τρoνσποζονίου από το πλασμίδιο δότη σε κάποιους πυρήνες πρόδρομων γαμετικών κυττάρων. Διασταυρώνοντας τα ενεμένα γόνιμα G0 με μη ενεμένα έντομα του αντίθετου φύλου, κάποια από τα άτομα G1 που θα προκύψουν από την παραπάνω διασταύρωση θα φέρουν το γονίδιο διάκρισης (ανιχνεύσιμο κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες) και θεωρούνται μετασηματισμένα. Είναι πιθανό, άτομα της G0 να φέρουν το γονίδιο διάκρισης λόγω της ενσωμάτωσης του τρoνσποζονίου σε πυρήνες σωματικών κυττάρων. Σε αυτή την περίπτωση αναφερόμαστε σε παροδική έκφραση και όχι σε διαγονιδιακά στελέχη.

Εναλλακτικές μέθοδοι εισαγωγής γενετικού υλικού έχουν αναπτυχθεί και κάποιες ήταν επιτυχείς και σε αρθρόποδα όπως η *Drosophila*. Η πιο σημαντική είναι ο βομβαρδισμός αυγών με μικρο-σφαιρίδια καλυμμένα με DNA (Biolistics), μια συνήθης διαδικασία για το μετασηματισμό των φυτών (Klein *et al.*, 1987). Παρόλο που η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τη μεταφορά DNA σε έμβρυα της *Drosophila* και τη δημιουργία ενός διαγονιδιακού στελέχους με βάση το μεταθετό στοιχείο P (Baldarelli & Lengyel, 1990), η τεχνική δεν εφαρμόστηκε ποτέ σε ευρεία κλίμακα.

Η άλλη μέθοδος βασίζεται στη μεταφορά γενετικού υλικού μέσω ηλεκτροδιάτρησης (electroporation), η οποία επιτρέπει την παροδική έκφραση DNA στη *Drosophila* (Kamdar *et al.*, 1992) και σε άλλα έμβρυα εντόμων (Horard *et al.*, 1994). Δεν έχει αναφερθεί μέχρι στιγμής όμως σταθερός μετασηματισμός εντόμου με την παραπάνω τεχνική.

1.2 Μεταθετά στοιχεία

Η φυσική επιλογή, όπως διατυπώθηκε από τον Δαρβίνο πριν από έναν αιώνα περίπου, ευνοεί τα άτομα και τους πληθυσμούς που αποκτούν γνωρίσματα που συντελούν στην επιβίωση και στην αναπαραγωγή. Η δημιουργία γενετικής ποικιλομορφίας, η οποία οδηγεί σε νέους και πιθανά πλεονεκτικούς συνδυασμούς, αποτελεί βασική απαίτηση για την επιτυχή εξέλιξη των ειδών σε διάφορα και συνεχώς μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα. Μέχρι πριν μερικές δεκαετίες, οι μεταλλάξεις και οι ομόλογοι ανασυνδυασμοί του γενετικού υλικού θεωρούνταν οι μόνοι σημαντικοί μηχανισμοί για την παραγωγή γενετικής ποικιλομορφίας. Τα παραπάνω αναθεωρήθηκαν μετά την ανακάλυψη της McClintock ότι συγκεκριμένα γενετικά στοιχεία μεταφέρονταν από θέση σε θέση στα χρωμοσώματα του καλαμποκιού, προσδίδοντας διαφορετικούς χρωματισμούς στους σπόρους του. Είκοσι χρόνια μετά, ο M.Malamy ανέφερε παρόμοιους μηχανισμούς στο βακτήριο *Escherichia coli*. Ακολούθησαν αναφορές από τους Hedges και Jacob ότι το γονίδιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη που εμφανίζουν κάποια βακτήρια, έχει την ιδιότητα να «μεταφέρεται» από ένα μόριο σε άλλο, με μηχανισμούς ανεξάρτητους από τον ομόλογο ανασυνδυασμό και το ονόμασαν μεταθετό στοιχείο. Όλα τα μεταθετά στοιχεία που είχαν μελετηθεί αποτελούνταν από κατοπτρικά ανεστραμμένα άκρα, με μέγεθος που κυμαίνονταν από λίγα νουκλεοτίδια μέχρι 1400 βάσεις. Ακολούθησε μελέτη από τους Heffron, Rubens και Falkow η οποία έδειξε ότι μεταλλάξεις στα κατοπτρικά ανεστραμμένα άκρα εμπόδισαν τη «μεταφορά» του στοιχείου Tn3. Αργότερα οι ίδιοι ερευνητές έδειξαν ότι το Tn3 μεταθετό στοιχείο κωδικοποιεί την τρoνσποζάση, το υπεύθυνο ένζυμο για τη «μεταφορά» του μεταθετού, και έναν καταστολέα ο οποίος ρυθμίζει αμφοτέρη τη μεταγραφή της τρoνσποζάσης και του ιδίου. Επιπλέον, ανέφεραν ότι η «μεταφορά» του στοιχείου δεν ήταν τυχαία, αλλά υπήρχαν κάποιες περιοχές που επιδέχονταν τα μεταθετά στοιχεία με μεγαλύτερη συχνότητα από άλλες. Διαφορετικές έρευνες επίσης έδειξαν ότι και άλλα μεταθετά στοιχεία κωδικοποιούσαν πρωτεΐνες υπεύθυνες για τη

«μεταφορά» τους. Το 1963, ο Taylor ανακάλυψε ένα φάγο ο οποίος είχε την ιδιότητα να ενσωματώνεται σε πολλαπλές θέσεις στο γονιδίωμα του βακτηρίου ξενιστή και τον ονόμασε *Mu* (*mutator*). Με κατοπινές μελέτες, ο φάγος *Mu* αποδείχτηκε ότι ήταν μεταθετό στοιχείο. Ακολούθησαν και άλλα παραδείγματα μεταθετών στοιχείων σε οργανισμούς όπως η *Drosophila* και ο μύκητας *Saccharomyces cerevisiae*. Τώρα, γνωρίζουμε ότι τα μεταθετά στοιχεία αποτελούν συστατικά στοιχεία των γονιδιωμάτων όλων των οργανισμών, μέχρι τον άνθρωπο.

Τα μεταθετά στοιχεία κατηγοριοποιούνται σε δύο τάξεις, τις I και II (Brindley *et al.*, 2003). Τα στοιχεία της τάξης I μετατίθενται με τη βοήθεια RNA μετάγραφων τους, δημιουργώντας σε κάθε κινητοποίηση τους πολλαπλά θυγατρικά αντίγραφα στο γονιδίωμα του ξενιστή, ενώ το πατρικό παραμένει σταθερό στην ίδια θέση. Σε αυτά περιλαμβάνονται οι ρετροϊοί, τα ρετροτρανσποζόνια και τα μικρά διάσπαρτα πυρηνικά στοιχεία. Τα μεταθετά τάξης II χρησιμοποιούν μορφές DNA και αποκαλούνται τρανσποζόνια (*transposons*). Η «μεταφορά» των τρανσποζονίων τάξης II μπορεί να γίνει με πολλαπλασιαστικούς μηχανισμούς, όπου το στοιχείο διπλασιάζεται και ένα αντίγραφο παραμένει στην αρχική θέση, ή με μη πολλαπλασιαστικούς μηχανισμούς όπου το στοιχείο «μεταφέρεται» από την αρχική του θέση σε μία καινούρια (Atkinson *et al.*, 2001).

Τα μεταθετά στοιχεία που χρησιμοποιούνται ευρέως για το μετασχηματισμό αρθρόποδων είναι τα στοιχεία της τάξης II, τα οποία χαρακτηρίζονται από σχετικά μικρό μέγεθος και απλή δομή. Περιλαμβάνουν ένα μοναδικό γονίδιο, αυτό της τρανσποζάσης, υπεύθυνης για τη «μεταφορά» του στοιχείου. Η τρανσποζάση ενεργοποιεί την εκτομή του στοιχείου από την αρχική του θέση και την επανένθεση του σε διαφορετική περιοχή. Ο συγκεκριμένος τρόπος κινητοποίησης είναι γνωστός ως μετάθεση μέσω εκτομής και ένθεσης (*cut and paste transposition*) (Handler, 2004; Atkinson, 2002).

Τέσσερα μεταθετά στοιχεία, αντιπροσωπευτικά τεσσάρων οικογενειών μεταθετών στοιχείων, έχουν χρησιμοποιηθεί για το μετασχηματισμό αρθρόποδων που δεν ανήκουν στο γένος *Drosophila*, το στοιχείο *Minos* από τη *D. hydei*, το στοιχείο *Hermes* από τη *Musca domestica*, το στοιχείο *Mos1* από τη *D. mauritiana*, και το στοιχείο *piggyback* από το *Trichoplusia ni* (Atkinson *et al.*, 2001).

1.2.1 Η υπερ-οικογένεια P

Η ανακάλυψη του στοιχείου P ως τον υπεύθυνο φορέα για την P-M δυσγενεσία στη *D. melanogaster* (Kidwell *et al.*, 1977) και η ακόλουθη μοριακή ανάλυση της δομής και λειτουργίας του, συντέλεσαν στη δημιουργία του φορέα P και του φορέα βοηθού (Rubin *et al.*, 1982) και στο μετασχηματισμού του πρώτου αρθρόποδου, της *D. melanogaster*, με το στοιχείο αυτό (Rubin & Spradling, 1982). Παρόλες τις ελπίδες ότι το στοιχείο P θα συμπεριφερόταν αντίστοιχα και σε άλλα έντομα, βρέθηκε μη-λειτουργικό έξω από το γένος *Drosophila* (Handler *et al.*, 1993).

Το στοιχείο P έχει μέγεθος 2.9 Kb, κοντά κατοπτρικά ανεστραμμένα άκρα μήκους 31 bp, και παρόμοια δομή με το στοιχείο *Ac* (*Activator*), το πρώτο μεταθετό στοιχείο που ανακαλύφθηκε από την McCintock στο καλαμπόκι. Το στοιχείο περιλαμβάνει το γονίδιο της τρανσποζάσης το οποίο οργανώνεται σε τέσσερα εξόνια. Με εναλλακτικό μάτισμα παράγονται δύο πρωτεΐνες, η πρώτη είναι η τρανσποζάση μοριακού βάρους 87 kD και η δεύτερη ο καταστολέας της μετάθεσης σε σωματικά κύτταρα, μήκους 66 kD (Misra & Rio, 1990). Η μεταφορά του στοιχείου χρειάζεται εκτός από την τρανσποζάση, και την πρωτεΐνη IRBP (*Inverted Repeat Binding Protein*) του ξενιστή. Η εξάρτηση αυτή περιορίζει την κινητικότητα του στοιχείου μόνο στα δροσοφιλοειδή.

1.2.2 Η υπερ-οικογένεια *Tc1/mariner*

Η υπερ-οικογένεια περιλαμβάνει τις οικογένειες μεταθετών στοιχείων *mariner* και *Tc1*, με κριτήριο την ομοιότητα σε επίπεδο αλληλουχίας της τρανσποζάσης και το μηχανισμό της μετάθεσής τους. Διαφοροποιούνται στο συνολικό μέγεθος, 1.3 Kb για την οικογένεια *mariner* και 1.6-1.7 Kb για την οικογένεια *Tc1*, καθώς και στο μήκος των ανεστραμμένων άκρων τους, 30 bp έναντι 20-460 bp, αντίστοιχα.

Το στοιχείο *mariner* πρώτο-ανακαλύφθηκε στη *D. mauritiana* (Jacobson *et al.*, 1986) και βρέθηκε να είναι ένα στοιχείο 1286 bp με κατοπτρικά ανεστραμμένα άκρα μήκους 28 bp. Όπως και με τα στοιχεία της οικογένειας *Tc1*, έχει στόχο το δινοκλεοτίδιο TA, το οποίο διπλασιάζεται κατά την εισαγωγή του στοιχείου. Το πρώτο στοιχείο *mariner* δεν ήταν αυτόνομα λειτουργικό και οδήγησε στην εύρεση ενός παρεμφερούς στοιχείου του *Mos1*, με το οποίο έχει 6 αμινοξέα διαφορά στην τρανσποζάση (Medhora *et al.*, 1988). Το στοιχείο *Mos1* έχει χρησιμοποιηθεί στο μετασχηματισμό της *D. melanogaster* (Garza *et al.*, 1991), της *D. virilis* (Lohe & Hartl, 1996a), του *Aedes aegypti* (Coates *et al.*, 1997), του μικροοργανισμού *Leishmania major* (Gueiros-Filho & Beverly, 1997), του αμφίβιου zebrafish (Fadool *et al.*, 1998) και του κοτόπουλου (Sherman *et al.*, 1998). Ένα δεύτερο στοιχείο, το *Himar1* από την μύγα *Haematobia irritans*, είναι ενεργό σε βακτήρια (Rubin *et al.*, 1999) και σε ανθρώπινα κύτταρα (Zhang *et al.*, 1998), αλλά δεν έχει γίνει μετασχηματισμός της *Drosophila* μέχρι στιγμής με αυτό.

Κύριος εκπρόσωπος της οικογένειας *Tc1* στο μετασχηματισμό αρθρόποδων και θηλαστικών είναι το μεταθετό στοιχείο *Minos*. Το στοιχείο *Minos* απομονώθηκε σε ένα από τα αντίτυπα του ριβοσωμικού DNA του εντόμου *D. hydei* (Franz & Savakis, 1991). Το στοιχείο, μεγέθους 1777 bp, χαρακτηρίζεται από ανεστραμμένα άκρα μήκους 255 bp, που περιβάλλουν δύο πλαίσια ανάγνωσης (354 και 669 bp) χωρισμένα από ένα εσώνιο 60 bp (Franz *et al.*, 1994). Καθένα από τα δύο άκρα περιέχει επαναλαμβανόμενη σε δύο αντίτυπα, αλληλουχία 18 βάσεων. Ο πυρήνας TATTAAT αυτής της αλληλουχίας στο αριστερό άκρο του στοιχείου, παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με την αλληλουχία TATA που συναντάται στους υποκινητές γονιδίων ευκαρυωτικών οργανισμών. Επίσης, στο δεξί άκρο απαντάται δύο φορές η αλληλουχία AATAAA, που μπορεί να αποτελεί σήμα πολυαδενυλίωσης. Όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας, το στοιχείο *Minos* μετατίθεται σε περιοχές με το χαρακτηριστικό δινοκλεοτίδιο TA και προκαλεί τον διπλασιασμό του δινοκλεοτιδίου. Συγκριτικά με άλλα μεταθετά στοιχεία που ανακαλύφθηκαν στο γένος *Drosophila* όπως τα στοιχεία *P*, *hobo* και *mariner*, το *Minos* παρουσιάζει την ευρύτερη κατανομή στο συγκεκριμένο γένος (Arca & Savakis, 2000)

Ο πρώτος μετασχηματισμός μέσω τρανσποζονίου που επιτεύχθηκε σε είδος εντόμου που δεν ανήκει στο γένος *Drosophila*, περίπου 10 χρόνια μετά το μετασχηματισμό της *D. melanogaster* με το στοιχείο *P*, έγινε με το μεταθετό *Minos* στη μύγα της Μεσογείου *Ceratitis capitata* (Loukeris *et al.*, 1995b). Είχε ήδη προηγηθεί μετασχηματισμός της *D. melanogaster* (Loukeris *et al.*, 1995a). Ακολούθησε ο μετασχηματισμός του κουνουπιού *Anopheles stephensi* (Catterucia *et al.*, 2000), ο μετασχηματισμός του ουροχορδωτού *Ciona intestinalis* (Sasakura *et al.*, 2003) και ο μετασχηματισμός του σκαθαριού *Tribolium castaneum* (Pavlopoulos *et al.*, 2004). Τα παραπάνω μαζί με την ενεργότητα του στοιχείου σε ιστούς και κυτταρικές σειρές θηλαστικών (Klinakis *et al.*, 2000b; Zagoraiou *et al.*, 2001; Drabek *et al.*, 2001), καθιστούν το στοιχείο *Minos* ένα από τα πιο ελπιδοφόρα και χρηστικά εργαλεία για το μετασχηματισμό νέων οργανισμών. Η παρούσα εργασία έρχεται να

επισφραγίσει την ισχύ της βασισμένης στο *Minos* διαγονιδιακής τεχνολογίας στα αρθρόποδα, με το μετασχηματισμό του δάκου της ελιάς *Bactrocera oleae*.

1.2.3 Η υπερ-οικογένεια *hAT*

Η υπερ-οικογένεια *hAT* περιλάμβανε τα στοιχεία *hobo* (*D. melanogaster*), *Activator* (*Ac*) και *Tam3* (Calvi *et al.*, 1991). Μετά την ανακάλυψη ότι το στοιχείο *hobo* παρουσίαζε ομολογία με τρανσποζόνια φυτών όπως τα *Ac* και *Tam3*, διάφορα εργαστήρια υιοθέτησαν μια παρόμοια προσέγγιση όσον αφορά την απομόνωση *hobo-Ac* συγγενικών στοιχείων, χρησιμοποιώντας περιοχές υψηλής αμινοξικής αλληλουχίας για τη σύνθεση εκκινητών για την απομόνωση στοιχείων μέσω της αντίδρασης αλυσιδωτής πολυμεράσης. Διάφορα στοιχεία απομονώθηκαν με αυτόν τον τρόπο, τα πιο σημαντικά παραμένουν το *Hermes* από τη *Musca domestica*, το *Homer* από το *Bactrocera tryoni* και το *hopper* από το *Bactrocera dorsalis* (Handler, 2001), τα οποία πλέον θεωρούνται μέλη της υπερ-οικογένειας *hAT*.

Το στοιχείο *Hermes* αποτελεί τον σημαντικότερο εκπρόσωπο της οικογένειας. Έχει μέγεθος 2739 bp, με ανεστραμμένα άκρα μήκους 17 bp και ένα συνεχόμενο πλαίσιο ανάγνωσης που κωδικοποιεί την τρανσποζάση. Παρόμοια με το στοιχείο *hobo*, δημιουργεί ένα διπλασιασμό 8 βάσεων κατά την εισαγωγή του.

Το στοιχείο *Hermes* έχει χρησιμοποιηθεί για το μετασχηματισμό του κουνουπιού *Ae. aegypti* (Jasinskiene *et al.*, 1998), του σκαθαριού *Tribolium castaneum* (Berghammer *et al.*, 1998) του *Stomoxys calcitrans* (O'Brochta *et al.*, 2000) και των *Culex quinquefasciatus* και *Ceratitis capitata* (Handler, 2001).

1.2.4 Η υπερ-οικογένεια *piggyBac*

Το στοιχείο *piggyBac* απομονώθηκε με βάση την κινητικότητα του και έχει μετέπειτα εξελιχθεί σε αποτελεσματικό φορέα μετασχηματισμού στα αρθρόποδα. Αρχικά αναγνωρίστηκε ως η αιτία η οποία προκάλεσε μεταλλαγμένο φαινότυπο φάγου, μολύνοντας μια κυτταρική καλλιέργεια του λεπιδόπτερου *Trichoplusia ni* (Carrly *et al.*, 1989). Το *piggyBac* έχει μέγεθος 2.5 Kb με ανεστραμμένα άκρα μήκους 13 bp. Περιέχει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 2.1 Kb, το οποίο κωδικοποιεί μια τρανσποζάση με μικρή ή καθόλου δομική ομολογία με άλλες τρανσποζάσες ευκαρυωτικών οργανισμών (Atkinson *et al.*, 2001). Μετατίθεται στο γονιδίωμα στην αλληλουχία TTAΑ και κατά την εισαγωγή του διπλασιάζει την παραπάνω αλληλουχία.

Το στοιχείο *piggyBac* έχει χρησιμοποιηθεί για το μετασχηματισμό μια σειράς εντόμων όπως η μύγα της Μεσογείου *C. capitata* (Handler *et al.*, 1998), η μύγα της Καραϊβικής *Anastrepha suspensa* (Handler & Harrell, 2001a), η μύγα *Bactrocera dorsalis* (Handler & McCombs, 2000), το λεπιδόπτερο *Bombyx mori* (Tamura *et al.*, 2000), το *Pectinophora gossypiella* (Peloquin *et al.*, 2000) και το κουνούπι *Anopheles albimanus* (Perera *et al.*, 2002).

Στον Πίνακα 1, δίνονται συνοπτικά τα μεταθετά στοιχεία που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα για τον επιτυχή μετασχηματισμό εντόμων.

Πίνακας 1. Τρανσποζόνια ως εργαλεία του γενετικού μετασχηματισμού.

Μεταθετό στοιχείο	Είδος προέλευσης	Είδος που μετασχηματίστηκε
<i>Hermes</i>	<i>M. domestica</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> <i>Aedes aegypti</i> <i>Triboleum castaneum</i> <i>Ceratitis capitata</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Stomoxys calcitrans</i>
<i>hobo</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> <i>Drosophila virilis</i> <i>Bactrocera tryoni</i>
<i>Minos</i>	<i>D. hydei</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> <i>Ceratitis capitata</i> <i>Anopheles stephensii</i> <i>Tribolium castaneum</i> <i>Drosophila virilis</i>
<i>Mos 1 (mariner)</i>	<i>D. mauritiana</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> <i>Drosophila virilis</i> <i>Aedes aegypti</i>
<i>P</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> <i>Drosophila simulans</i>
<i>piggyBac</i>	<i>Trichoplusia ni</i>	<i>Ceratitis capitata</i> <i>Drosophila melanogaster</i> <i>Tribolium castaneum</i> <i>Anastrepha suspense</i> <i>Bombyx mori</i> <i>Pectinophora gossypiella</i> <i>Musca domestica</i> <i>Anopheles albimanus</i> <i>Aedes aegypti</i>

1.3 Γονίδια διάκρισης (marker genes) για την επιλογή των διαγονιδιακών εντόμων

Η μεθοδολογία μετασχηματισμού αρθρόποδων έχει επικεντρωθεί κυρίως στην ανακάλυψη λειτουργικών φορέων μετασχηματισμού. Όσο όμως αυτοί γίνονται όλο και περισσότερο διαθέσιμοι, η ανάγκη για νέα συστήματα διάκρισης των μετασχηματισμένων οργανισμών είναι ίσης αν όχι μεγαλύτερης σημασίας. Η πρόοδος που είχε σημειωθεί στο μετασχηματισμό των Δροσοφιλιδών ήταν εν μέρει αποτέλεσμα της διαθεσιμότητας εύκολα ανιχνεύσιμων χρωματισμών στους οφθαλμούς. Το στέλεχος του εντόμου που μετασχηματιζόταν έπρεπε να είναι ομόζυγο για μια υπολειπόμενη μεταλλαγή, η οποία να έχει έναν ευδιάκριτο φαινότυπο. Ο πρώτος μη-Δροσοφιλικός μετασχηματισμός (Loukeris *et al.*, 1995b) επίσης εκμεταλλεύτηκε τα διαθέσιμα γονίδια διάκρισης όσον αφορά το χρώμα των οφθαλμών (γονίδιο white). Ένα άλλο παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο *vermilion* της *D. melanogaster*, υπεύθυνο για το χρωματισμό των οφθαλμών, το οποίο κωδικοποιεί

την οξυγονάση της τρυπτοφάνης και χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο διάκρισης σε πρώιμα πειράματα μετασχηματισμού (Germeaad, 1976). Παρόλο που η ανακάλυψη και ο χαρακτηρισμός των διαφόρων, υπεύθυνων για τον οφθαλμικό χρωματισμό γονιδίων είναι ελπιδοφόρα για τη χρήση τους ως γονίδια διάκρισης, απουσία υπαρχόντων μεταλλαγμένων στελεχών, η ορατή επιλογή διαγονιδιακών ατόμων στα περισσότερα είδη, θα ήταν αδύνατη.

Γρήγορα έγινε σαφές ότι για το μετασχηματισμό νέων ειδών θα έπρεπε να υπάρχει ένα γονίδιο διάκρισης που να καθορίζει ένα χαρακτηριστικό επικρατές ακόμα και σε γονότυπους αγρίου τύπου. Αρχικές έρευνες επικεντρώθηκαν σε γονίδια τα οποία θα πρόσδιδαν στα μετασχηματισμένα άτομα χημική ή φαρμακευτική ανθεκτικότητα σε διάφορες ουσίες. Παραδείγματα τέτοιων γονιδίων αποτελούν το *opd* το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στο φαρμακευτικό διάλυμα παραοxon (Benedict *et al.*, 1995) και το γονίδιο *Rdl* το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στο dieldrin (Ffrench-Constant *et al.*, 1991). Δυστυχώς, η χημική επιλογή θα μπορούσε να είναι ένα πολύ ισχυρό εργαλείο για την μαζική επιλογή διαγονιδιακών εντόμων, εντούτοις οι περισσότερες προσπάθειες αποδείχθηκαν προβληματικές λόγω των εντόμων που επιλέγονταν χωρίς να είναι μετασχηματισμένα. Πιο αναλυτικά, από τη στιγμή που ένα διαγονιδιακό στέλεχος υπόκειται σε συνεχή επιλογή βάσει χημικής ανθεκτικότητας, η πιθανότητα επιλογής με βάση την φυσική ανθεκτικότητα του στελέχους, αυξάνεται ολοένα και περισσότερο με την πάροδο του χρόνου. Επιπλέον η συγκέντρωση του φαρμάκου για μια πετυχημένη επιλογή, διέφερε από είδος σε είδος, και θα έπρεπε να καθοριστεί από την αρχή για κάθε νέο είδος που πρόκειται να μετασχηματιστεί.

Την επανάσταση στα γονίδια διάκρισης έφερε η χρησιμοποίηση των πρωτεϊνών που φθορίζουν. Οι πρωτεΐνες αυτές απομονώθηκαν κυρίως από υδρόζωα όπως η μέδουσα, τα κοράλλια και οι θαλάσσιες ανεμώνες. Το λειτουργικό χαρακτηριστικό των παραπάνω πρωτεϊνών έγκειται στην διέγερση μετά από απορρόφηση ακτινοβολίας συγκεκριμένου μήκους κύματος (excitation) και την εκπομπή ακτινοβολίας σε μεγαλύτερο μήκος κύματος (emission), κατά την επάνοδο τους στη φυσιολογική κατάσταση. Με την προσαρμογή κατάλληλων φίλτρων διέγερσης σε μικροσκόπια και στερεοσκόπια, η έκφραση των φθορίζουσων πρωτεϊνών ανιχνεύεται σε κύτταρα και ζωντανούς οργανισμούς. Η πιο πολλά υποσχόμενη φθορίζουσα πρωτεΐνη ήταν η Πράσινη Φθορίζουσα Πρωτεΐνη (Green Fluorescent Protein, GFP), η οποία απομονώθηκε από τη μέδουσα *Aequorea Victoria* (Prasher *et al.*, 1992). Η αδιαλυτότητα της πρωτεΐνης όμως, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το μήκος κύματος διέγερσης της έπεφτε στο υπεριώδες φάσμα, με αποτέλεσμα να φθείρει τους ζωντανούς οργανισμούς, οδήγησαν ερευνητές στη διαφοροποίηση της πρωτεΐνης (Cormack *et al.*, 1996). Η EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein), η οποία επιδεικνύει πολλαπλάσια ένταση φθορισμού από την GFP, αποτελεί το πιο διαδεδομένο γονίδιο διάκρισης στις μέρες μας, ειδικά για το μετασχηματισμό νέων ειδών. Άλλα παράγωγα της EGFP αποτελούν οι ECFP (Enhanced Cyan FP) και η EYFP (Enhanced Yellow FP).

1.4 Ένας δυνητικά καθολικός φορέας δείκτης για γενετικό μετασχηματισμό

Η ανάπτυξη μεθόδων γενετικού χειρισμού στα αρθρόποδα είναι προϋπόθεση για την μεγαλύτερη κατανόηση της λειτουργίας των γονιδίων τους, αλλά και για την ανάπτυξη φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων καταπολέμησης τους. Η επιλογή κατάλληλου γονιδίου δείκτη είναι κομβικής σημασίας για την ανίχνευση των διαγονιδιακών ατόμων. Η επιλογή γονιδίου δείκτη έχει ακόμα μεγαλύτερη σημασία

όταν ο οργανισμός τον οποίο θέλουμε να τροποποιήσουμε γενετικά δεν έχει μετασχηματιστεί στο παρελθόν.

Ο μετασχηματισμός του δάκου της ελιάς επιτεύχθηκε με τη χρήση του τρανσποζονίου pMiBO14/GtTA2 (Koukidou *et al.*, 2006). Το ανασυνδρασμένο αυτό τρανσποζόνιο περιέχει ένα γονίδιο δείκτη ευρείας χρήσης (*egfp*), υπό τον έλεγχο ενός στοιχειώδους υποκινητή (TATA) του γονιδίου *hsp70* της *D. melanogaster*, που υπόκειται στο θετικό έλεγχο του χειριστή της τετρακυκλίνης (*tetracycline operator sequence, tetO*) (Gossen και Bujard, 1992). Η ενεργοποίηση του *tetO* οδηγεί στην έκφραση του ευαίσθητου στην τετρακυκλίνη μεταγραφικού ενεργοποιητή tTA, ο οποίος ενεργοποιεί την παραπέρα έκφραση του *tetO* και την έκφραση του γονιδίου *egfp*. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται υπερέκφραση, μέσα από θετική ανάδραση, του ενεργοποιητή tTA και του γονιδίου δείκτη.

Δύο εκδοχές της συγκεκριμένης κασέτας έκφρασης έχουν αναπτυχθεί (Koukidou *et al.*, 2006). Η “κασέτα εντόμων” η οποία περιλαμβάνει ένα 14-μερές του χειριστή της τετρακυκλίνης ανάμεσα σε δύο αντίγραφα του *hsp70* στοιχειώδους υποκινητή της *D. melanogaster* και η “κασέτα θηλαστικών”, η οποία περιλαμβάνει ένα 7-μερές του διαχειριστή της τετρακυκλίνης ανάμεσα σε δύο αντίγραφα του CMV ελάχιστου υποκινητή.

Η κασέτα εντόμων έχει ήδη δοκιμαστεί στη *D. melanogaster*, στη *C. capitata* καθώς και στον νηματοειδή *C. elegans*, με επιτυχία. Αναλυτικότερα, στη *D. melanogaster*, οι περισσότερες διαγονιδιακές σειρές έδειξαν έντονη, γενική και συνεχή έκφραση της EGFP σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια, ενώ λίγες μόνο διαγονιδιακές σειρές έδειξαν ιστο-ειδική έκφραση. Η έκφραση της EGFP ήταν λιγότερο έντονη στα διαγονιδιακά άτομα της *C. capitata*, τα οποία επιπλέον, χαρακτηρίζονταν από συγκεκριμένα πρότυπα έκφρασης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης τους. Η εισαγωγή της “κασέτας εντόμων” στο γονιδίωμα του *C. elegans*, οδήγησε σε δυνατή και ομοιόμορφη έκφραση της EGFP.

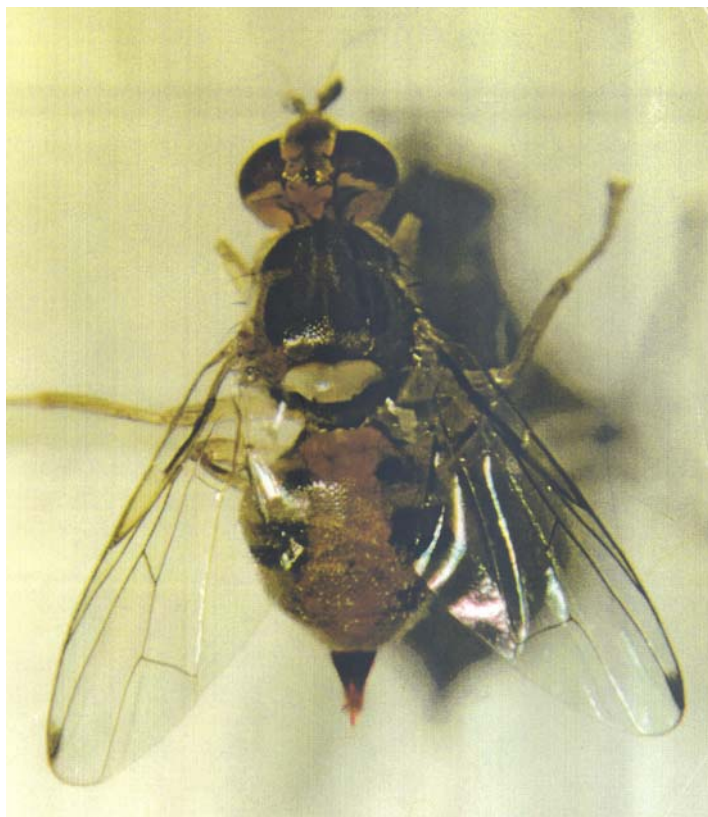
Η καθολική ικανότητα του συγκεκριμένου φορέα μετασχηματισμού εξερευνήθηκε παραπέρα σε σωματικά κύτταρα ζώων και φυτών. Παροδική και σταθερή επιμόλυνση της κυτταρικής σειράς HeLa, επιτεύχθηκε με αμφότερες τις κασέτες. Τα ίδια πλασμίδια εισήχθησαν επίσης και σε φύλλα καπνού (*Nicotiana tabacum* and *N. benthamiana*) μέσω “βομβαρδισμού” με χρυσά σωματίδια (Koukidou *et al.*, 2006).

1.5 *Bactocera oleae*: Ο δάκος της ελιάς

Ο δάκος αποτελεί τον σημαντικότερο εχθρό της ελιάς στη χώρα μας καθώς και σε όλες τις παραμεσόγειες χώρες, και τελευταία και στις ακτές της Καλιφόρνιας στη Βόρειο Αμερική. Το έντομο προσβάλει αποκλειστικά και μόνο τον καρπό της καλλιεργούμενης ή άγριας ελιάς. Η αντιμετώπιση του θεωρείται ιδιαίτερα δύσκολη και το γεγονός αυτό έδωσε αφορμή για πολλές ερευνητικές εργασίες τα τελευταία πενήντα χρόνια.

Το ενήλικο είναι μια μύγα που το μήκος του σώματος της φτάνει τα 4-5 mm, με κεφαλή κίτρινο-κόκκινη, με δύο κηλίδες κάτω από τις κεραίες και με σύνθετους οφθαλμούς ιριδίζοντες κυανοπράσινους. Ο θώρακας είναι κίτρινο-κόκκινος με το ραχιαίο τμήμα μαύρο, με τέσσερις ταινίες γκριζές. Η πλευρά του μέσο-θώρακα και το οπίσθιο χείλος του θυρεού έχουν χρώμα λευκό. Ο ωσθέτης έχει το βασικό τμήμα μαύρο και μήκος 1 mm (Εικ. 1). Το αυγό είναι ελλειψοειδές επίμηκες, λευκό και έχει μήκος περίπου 0.8 mm. Η προνύμφη τρίτου σταδίου έχει μήκος 6-7 mm, είναι λευκή, χωρίς πόδια, δεν έχει κεφαλική κάψα και τα στοματικά μόρια είναι του τύπου των γναθικών ακίστρων. Υπάρχουν τρία προνυμφικά στάδια στα οποία παρατηρείται

αύξηση της μάζας της προνύμφης. Η νύμφη έχει σχήμα κυλινδρικό και μήκος 4-5 mm. Το χρώμα της νύμφης στα πρώτα στάδια είναι κρινόλευκο αλλά με την πάροδο των ημερών γίνεται καστανοκίτρινο.



Εικόνα 1. Ο δάκος της ελιάς (*B. oleae*). Θηλυκό ενήλικο.

Ο δάκος διαχειμάζει συνήθως στο έδαφος ως νύμφη αλλά και ως ενήλικο σε θερμότερα κλίματα. Την άνοιξη εξέρχονται τα ακμαία, τα οποία τρέφονται από διάφορα μελιτώδη εκκρίματα που βρίσκονται στα γύρω φυτά. Τα ακμαία αυτά διατηρούνται μέχρι τους καλοκαιρινούς μήνες όπου και αρχίζουν να ωοτοκούν στον ελαιόκαρπο. Σε περιοχές όπου ο καρπός παραμένει στα δέντρα κατά τη διάρκεια του χειμώνα και με ήπιες κλιματολογικές συνθήκες, παρατηρούνται ενήλικα στους ελαιώνες και προνύμφες μέσα στον καρπό, μόνο που εξελίσσονται με βραδύ ρυθμό. Η σύζευξη στη φύση γίνεται 7-10 ημέρες μετά την έξοδο του ενηλίκου, ενώ εργαστηριακά γίνεται 2-3 ημέρες μετά την έξοδο του ενηλίκου (σεξουαλική ωρίμανση). Συνήθως το θηλυκό στη φύση συζευγνύεται μόνο μια φορά, ενώ το αρσενικό είναι πολυγαμικό. Κατά την ωοτοκία, το θηλυκό εκτείνει τον ωοθέτη του και τρυπά με αυτόν τον καρπό με κλίση της κοιλίας περίπου 60°. Προτού το θηλυκό εναποθέσει το αυγό μέσα στον καρπό, μυζά με την προβοσκίδα του, τη σταγόνα του φυτικού χυμού που έχει βγει στην επιφάνεια του καρπού για να διατραφεί. Είναι χαρακτηριστικό ότι σε κάθε καρπό ο δάκος εναποθέτει μέσα στη σάρκα ένα αυγό. Εφόσον υπάρχουν διαθέσιμοι καρποί και ο πληθυσμός του εντόμου είναι χαμηλός, η προσβολή περιορίζεται σε ένα αυγό ανά προσβεβλημένο καρπό. Αυτό οφείλεται στο ότι ο χυμός που εξέρχεται από την οπή ωοτοκίας αποτρέπει νέες εναποθέσεις αυγών. Σε υψηλούς πληθυσμούς εντόμων και χαμηλή καρποφορία, παρατηρούνται περισσότερες εναποθέσεις αυγών ανά ελαιόκαρπο. Σε αυτή την περίπτωση

παρατηρείται κανιβαλισμός μεταξύ των προνυμφών εντός του ελαιόκαρπου. Δεδομένου ότι ο μέσος όρος ημερήσιας ωοτοκίας ανά θηλυκό ανέρχεται στα 60-80 αυγά, και ότι ο μέσος όρος ζωής του ενηλίκου διαρκεί περίπου 25-30 ημέρες, μπορεί να συνειδητοποιήσει κανείς την τεράστια ζημιά που προκαλεί το έντομο στους ελαιώνες. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί να εισάγει το θηλυκό τον ωοθήτη του στον καρπό και να μην αφήνει αυγό.

Η εξάπλωση του δάκου και η δραστηριότητα του, εξαρτώνται πολύ από τις κλιματολογικές συνθήκες της κάθε περιοχής. Σε γενικές γραμμές, ο δάκος δεν είναι ενεργός με θερμό και ξηρό καιρό. Οι ευνοϊκές θερμοκρασίες περιβάλλοντος κυμαίνονται μεταξύ 20-27 °C. Θερμοκρασίες άνω των 31 °C, που παρατηρούνται στη χώρα μας στους καλοκαιρινούς μήνες προκαλούν μεγάλη θνησιμότητα στα αυγά και στις προνύμφες. Για αυτό παρατηρείται άνοδος του πληθυσμού το φθινόπωρο και μέχρι την εποχή της συγκομιδής.

Η προνύμφη μετά την εκκόλαψη της από το αυγό αρχίζει να διατρέφεται από τη σάρκα του καρπού, όπου ανοίγει ακανόνιστη στοά που διευρύνεται προοδευτικά με την εξέλιξη της προνύμφης. Κατά το τέλος της ανάπτυξης της, η προνύμφη πλησιάζει προς την επιδερμίδα του καρπού, όπου ανοίγει ένα κοίλωμα μέσα στο οποίο νυμφώνεται. Η νύμφωση μέσα στον καρπό παρατηρείται κατά τη θερινή περίοδο, ενώ το φθινόπωρο η προνύμφη τρίτου σταδίου ανοίγει μια τρύπα και πέφτει στο έδαφος όπου νυμφώνεται σε βάθος λίγων εκατοστών. Η διάρκεια της προνυμφικής και νυμφικής περιόδου εξαρτώνται από τη θερμοκρασία. Στους 23-25 °C (εργαστηριακές συνθήκες) συνήθως διαρκούν από 9-12 μέρες η κάθε μια.

Σε μοριακό επίπεδο, το γονιδίωμα του δάκου οργανώνεται σε έξι ζεύγη χρωμοσωμάτων, από τα οποία το ένα είναι τα φυλετικά χρωμοσώματα, με το αρσενικό να είναι το ετερογαμετικό φύλο (Mavragani-Tsipidou, 2002). Η γενετική και μοριακή ανάλυση του οργανισμού δεν είναι ιδιαίτερα αναπτυγμένη, κυρίως λόγω των δυσκολιών εκτροφής του σε εργαστηριακές συνθήκες. Τα τελευταία χρόνια, εξαιτίας της οικονομικής σημασίας του εντόμου και την αλματώδη πρόοδο της μοριακής βιολογίας γενικότερα, έχουν γίνει προσπάθειες από διάφορες ερευνητικές ομάδες για μια πιο λεπτομερή προσέγγιση της γενετικής του δάκου. Ειδικότερα, τα γονίδια *Adh* (Alcohol dehydrogenase) (Brognia *et al.*, 2001), *Ovo/svb* (*Ovo/shavenbaby*) (Khila *et al.*, 2003), *dsx* (*doublesex*) και *Sxl* (*Sex-lethal*) (Lagos *et al.*, 2005) έχουν εντοπιστεί και χαρακτηριστεί και έχουν γίνει βιοχημικές και ανοσοιστοϊδικές μελέτες στις βιτελογενίνες του εντόμου (Trougakos *et al.*, 1999). Στη συγκεκριμένη ενότητα παρουσιάζω πειράματα που έγιναν με σκοπό το μετασχηματισμό του *Bactrocera oleae*, είδος που δεν έχει υποστεί γενετική τροποποίηση στο παρελθόν. Ο μετασχηματισμός του δάκου ανοίγει το δρόμο για περαιτέρω κατανόηση της γενετικής, εξελικτικής και βιοχημικής βάσης της βιολογίας των εντόμων. Επιπρόσθετα, θα ανοίξει το δρόμο για νέες, φιλικές προς το περιβάλλον στρατηγικές ελέγχου του εντόμου, για παράδειγμα μέσω της παραγωγής ατόμων για την Τεχνική Στείρου Εντόμου (βλέπε Κεφ. 3).

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1 Μετασχηματισμός του δάκου της ελιάς με το στοιχείο *Minos*

Μετά από μια σειρά πιλοτικών πειραμάτων με στόχο την εγκαθίδρυση ορθών συνθηκών για την επιτυχή διεξαγωγή μικρό-ενέσεων στο δάκο, έγιναν τέσσερις προσπάθειες μετασχηματισμού οι οποίες συνοψίζονται στον Πίνακα 2.

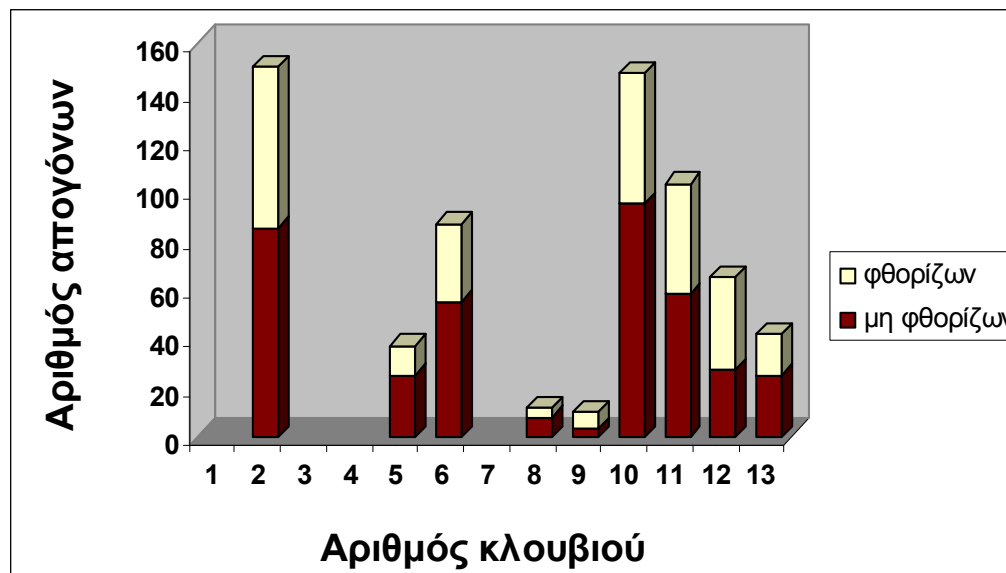
Πίνακας 2. Σύνοψη πειραμάτων μετασχηματισμού του *B. oleae*

#	Έμβρυα που ενέθηκαν	Προνύμφες 1 ^{ου} σταδίου (G0)	Ενήλικα άτομα (G0)	Προνύμφες 3 ^{ου} σταδίου που ελέγχθηκαν για φθορισμό (G1)	Φθορίζοντα Ενήλικα (G1)
1	304	106	35	983	0
2	974	181	50	1270	0
3	445	113	39	2157	0
4	3883	641	325	8824	13

Σε όλα τα πειράματα μετασχηματισμού χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο δότης pMiBo14/GtTA2. Στις δύο πρώτες προσπάθειες, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο βοηθός pHSS6hsILMi20 ως πηγή τρανσποζάσης του στοιχείου *Minos*. Στις ίδιες προσπάθειες, οι διασταυρώσεις των ενεμένων εντόμων με τα έντομα αγρίου τύπου του αντίθετου φύλου γίνονταν ανά ομάδες των πέντε σε μικρά κλουβιά διαστάσεων 5 x 5 x 10 εκατοστά. Στην τρίτη και τέταρτη προσπάθεια μετασχηματισμού, ως πηγή τρανσποζάσης του στοιχείου *Minos* χρησιμοποιήθηκε ο βοηθός mRNA της τρανσποζάσης του *Minos*, ο οποίος είχε δειχθεί να καταλήγει σε ψηλότερα ποσοστά μετασχηματισμού (Karpetanaki *et al.*, 2002). Επιπλέον, από τις δύο πρώτες προσπάθειες είχε γίνει φανερό ότι ο τρόπος με τον οποίο διεξάγονταν οι διασταυρώσεις δεν έδινε το μέγιστο αριθμό απογόνων G1, παράγοντα σημαντικό για την ανίχνευση μετασχηματισμένων εντόμων. Για αυτό το λόγο, οι διασταυρώσεις στις δύο τελευταίες προσπάθειες πραγματοποιήθηκαν μαζικά (ενεμένα θηλυκά με αγρίου τύπου αρσενικά και το αντίστροφο) σε κλουβιά διαστάσεων 30 x 30 x 30 εκατοστά. Παροδική έκφραση της EGFP παρατηρήθηκε σε ποσοστό 60% των ενεμένων εμβρύων (Εικ. 3α-γ), υποδεικνύοντας ότι ο συγκεκριμένος γενετικός φορέας διάκρισης είναι ενεργός στο δάκο της ελιάς.

Στο τελευταίο πείραμα μετασχηματισμού, από τις 641 προνύμφες που εκκολάφθηκαν, 151 αρσενικά και 174 θηλυκά άτομα αναπτύχθηκαν. Τα αρσενικά άτομα διασταυρώθηκαν μαζικά με 506 μη-ενεμένα θηλυκά, ενώ τα θηλυκά ενεμένα διασταυρώθηκαν μαζικά με 250 αρσενικά αγρίου τύπου. Η ανίχνευση για την έκφραση της EGFP πραγματοποιήθηκε στις προνύμφες τρίτου σταδίου. 67 από αυτές παρουσίασαν φθορισμό σε διάφορους ιστούς και θεωρήθηκαν μετασχηματισμένες. Από τις 67 φθορίζουσες προνύμφες τρίτου σταδίου, αποκτήθηκαν μόνο 13 G1 ενήλικα άτομα. Για τη δημιουργία διαγονιδιακών σειρών, τα 13 ενήλικα G1 άτομα διασταυρώθηκαν με έντομα αγρίου τύπου του αντίθετου φύλου σε ατομικές διασταυρώσεις και προνύμφες τρίτου σταδίου της γενιάς G2 πέρασαν από φάση ανίχνευσης για την έκφραση της EGFP. Τέσσερις από τις διασταυρώσεις δεν έδωσαν απογόνους. Όπου οι αριθμοί επέτρεψαν αποτίμηση, το ποσοστό των απογόνων που

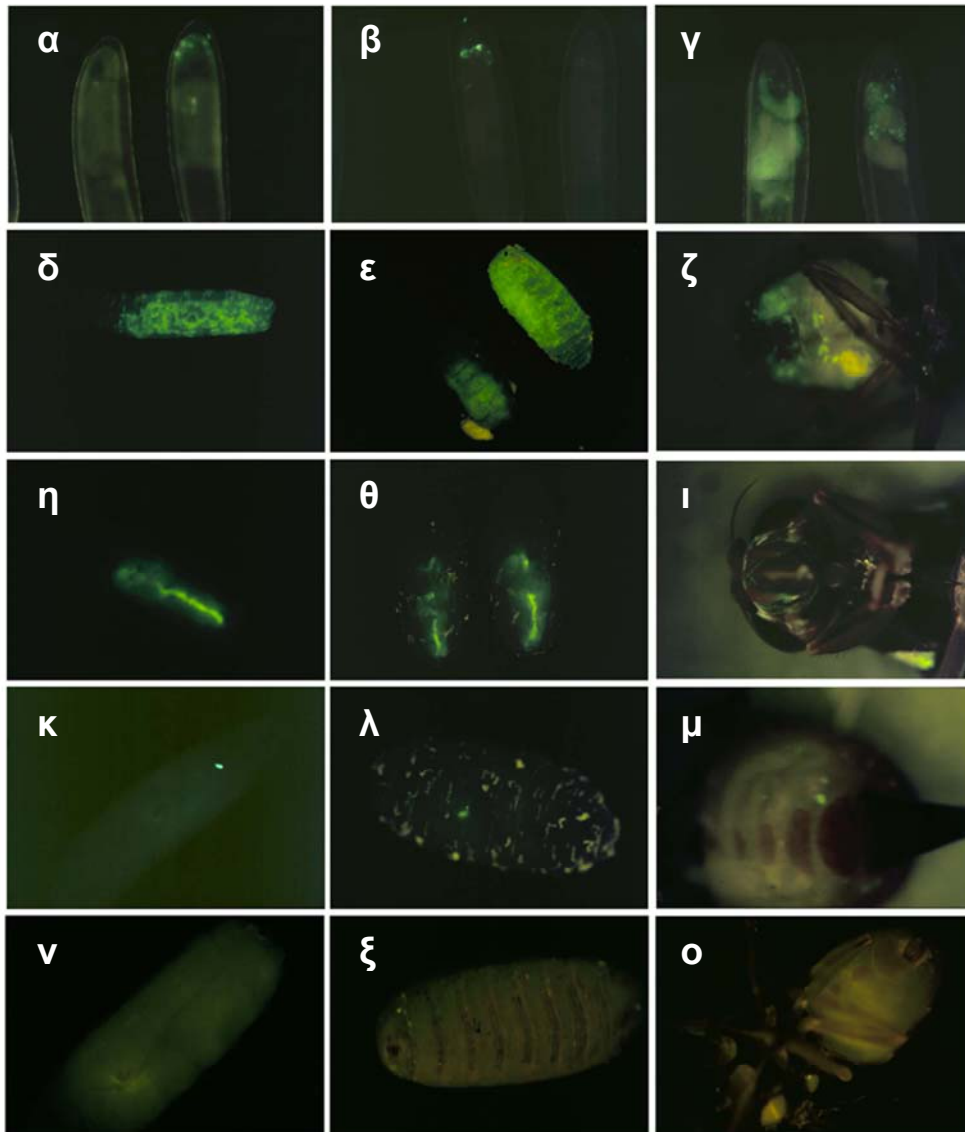
εξέφραζαν την EGFP έδειξε να είναι σύμφωνο με το διαχωρισμό μονού αλληλόμορφου (Εικ.2).



Εικόνα 2. Συχνότητες μετασηματισμένων ατόμων μεταξύ ενηλίκων της γενιάς G2. Άτομα της γενιάς G1 που εκφράζανε την πρωτεΐνη EGFP διασταυρώθηκαν με μύγες αγρίου τύπου. Οι απόγονοι τους ελέγχθηκαν για φθορισμό. Οι στήλες υποδεικνύουν το συνολικό αριθμό απογόνων G2 από κάθε γονιό G1 καθώς και το ποσοστό των απογόνων που εκφράζουν την EGFP. Δεν υπήρχαν απόγονοι από τα κλουβιά νούμερο 1, 3, 4, και 7.

Ανιχνεύσιμος EGFP φθορισμός παρατηρήθηκε στις δευτέρου και τρίτου σταδίου προνύμφες, στις νύμφες και στα ενήλικα άτομα σε όλες τις διαγονιδιακές σειρές. Το πρότυπο έκφρασης της EGFP ωστόσο ήταν σημαντικά ποικίλο από τη μία διαγονιδιακή σειρά στην άλλη (Εικ. 3). Ποικιλομορφία στα πρότυπα έκφρασης της EGFP παρατηρήθηκε επίσης και ανάμεσα σε άτομα κάποιων διαγονιδιακών σειρών. Εννέα ανεξάρτητες διαγονιδιακές σειρές αναπτύχθηκαν (σειρές 2, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12 και 13). Η μεταβίβαση του γονιδίου ανιχνευτή (*egfp*) συντηρήθηκε σε όλες τις σειρές για πολλές γενεές, επιδεικνύοντας ότι το τρανσποζόνιο κληρονομείται σταθερά, όπως θα περίμενε κανείς απουσία τρανσποζάσης. Λόγω της έλλειψης χρωμοσωμάτων εξισορρόπησης (*balancer chromosomes*) στο συγκεκριμένο είδος εντόμου, οι διαγονιδιακές σειρές διατηρήθηκαν με αλληπαλλήλες διασταυρώσεις φθορίζοντων ατόμων και διαδοχική απομάκρυνση αυτών που δε φθόριζαν.

Ήταν γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι η δέσμευση του μεταγραφικού ενεργοποιητή tTA με το στόχο του και επομένως η ενεργοποίηση του στόχου (*tetO*) παρεμποδίζεται παρουσία τετρακυκλίνης (Gossen & Bujard, 1992). Για τη διερεύνηση του παραπάνω, άτομα της διαγονιδιακής σειράς 12, η οποία χαρακτηρίζεται από ψηλά ποσοστά φθορισμού σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια, μεγάλωσαν σε τροφή που περιείχε 10 mg/l τετρακυκλίνη (Κεφ. 3, Εικ. 16). Στα συγκεκριμένα άτομα, παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση και τελικά ολοκληρωτική απουσία έκφρασης της EGFP, αποδεικνύοντας ότι ο στενός δεσμός μεταξύ του tTA και του στόχου του είναι ενεργός στο συγκεκριμένο πλασμίδιο.

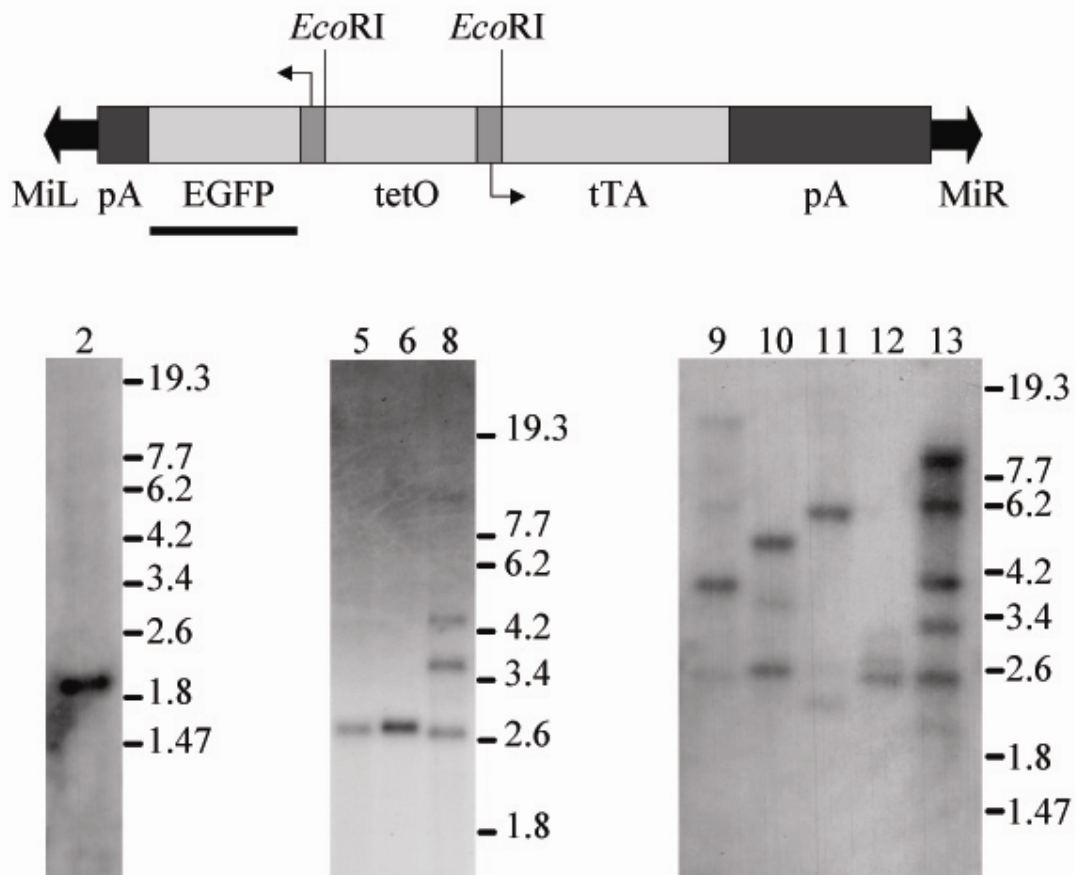


Εικόνα 3. Πρότυπα έκφρασης της EGFP σε ενεμένα έμβρυα και σε μετασηματισμένα *Bactrocera oleae* άτομα. **α-γ**, ενεμένα αυγά δείχνουν διάφορα πρότυπα παροδικής έκφρασης της EGFP. **δ-ζ**, έκφραση της EGFP σε pronύμφη, νύμφη και ενήλικο της γενιάς G2 από τη σειρά 12. **η-ι**, έκφραση της EGFP σε pronύμφη, νύμφη και ενήλικο της γενιάς G2 από τη σειρά 10. **κ-μ**, έκφραση της EGFP σε pronύμφη, νύμφη και ενήλικο της γενιάς G2 από τη σειρά 9. **ν-ο**, pronύμφη, νύμφη και ενήλικο αγρίου τύπου.

2.2 Μοριακή ανάλυση των διαγονιδιακών σειρών

Η ένθεση του στοιχείου *Minos* στο γονιδίωμα του *B. oleae* επιβεβαιώθηκε με ανάλυση κατά Southern. Κάθε δείγμα γενωμικού DNA περιλάμβανε ένα διαγονιδιακό άτομο της γενιάς G2. Τα δείγματα DNA κόπηκαν με *EcoRI* και υβριδοποιήθηκαν με ανιχνευτή που αντιστοιχεί στην κωδική περιοχή της *egfp*. Κάθε ξεχωριστή ένθεση του τραπεζοζονίου στο γενωμικό DNA αποκάλυπτε μία ζώνη μεγέθους τουλάχιστον 1300 bp. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η παρουσία μονής ένθεσης εντοπίστηκε στις

διαγονιδιακές σειρές 2, 5, και 6, ενώ οι σειρές 8, 9, 10, 11, 12, και 13 περιείχαν πολλαπλές ενθέσεις (Εικ. 5). Από τις εννέα διαγονιδιακές σειρές που αναλύθηκαν, μόνο δύο, οι σειρές 5 και 6, βρέθηκαν να περιέχουν ζώνη ίδιου μεγέθους (Εικ. 4). Επιπλέον, οι συγκεκριμένες σειρές έδιναν τα ίδια πρότυπα έκφρασης της EGFP, υποδηλώνοντας ταυτόσημες ενθέσεις του στοιχείου *Minos*. Οι υπόλοιπες θεωρήθηκαν ανεξάρτητα γεγονότα μετασχηματισμού.



Εικόνα 4. Ανάλυση κατά Southern των διαγονιδιακών σειρών του δάκου της ελιάς. Κορυφή. Σχηματική αναπαράσταση του τρανσποζονίου pMiBo14/GtTA2. Η μπάρα υποδηλώνει τον ανιχνευτή *egfp*. Οι θέσεις πέψης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *EcoRI* στο τρανσποζόνιο υποδηλώνονται επίσης. Βάση. Ανάλυση κατά Southern του *EcoRI* κομμένου γενωμικού DNA από μεμονωμένα άτομα G2 που εξέφραζαν EGFP. Ο αριθμός της εκάστοτε διαγονιδιακής σειράς δηλώνεται στο πάνω μέρος του πλαισίου. Τα μεγέθη του δείκτη είναι σε κιλοβάσεις.

Περαιτέρω επιβεβαίωση στηρίχτηκε στην απομόνωση με inverse PCR (Triglia *et al.*, 1988), στην κλωνοποίηση και στην αλληλούχιση του γενωμικού DNA που πλαισίωνε τις ενθέσεις του *Minos* σε τέσσερις ανεξάρτητες σειρές. Και στις τέσσερις σειρές βρέθηκε ότι τα ανεστραμμένα άκρα του pMiBo14/GtTA2 πλαισιώνονταν από τη χαρακτηριστική διπλασιασμένη αλληλουχία-στόχο TA, και παρακείμενες αλληλουχίες άσχετες με αυτές του πλασμιδίου δότη (Εικ. 5). Οι παρακείμενες αλληλουχίες των θέσεων ένθεσης συγκρίθηκαν με γνωστές

αλληλουχίες στη τράπεζα δεδομένων GenBank (ανάλυση BLAST). Δύο από αυτές (σειρές 9 και 11) ήταν υπερβολικά βραχείες για να επιτρέψουν οποιαδήποτε σημαντική ανάλυση BLAST. Η μία από τις άλλες δύο αλληλουχίες (σειρά 10) έδειξε 91% (E value: $2e-11$) ομοιότητα με την αλληλουχία ενός μεγάλου εσωνίου του γονιδίου *corkscrew* της *Drosophila melanogaster*.

Line 9

Minos..GGGGCTCGTAAATACTCTAGAATATCAAGATATAACTATCCGATC

Line 11

Minos..GGGGCTCGTATTTCGATTTTGATTTCGGATC

Line 12

Minos..GGGGCTCGTATGAGTGTATATTTGTTTAGGTGTTTGCTTATGTATGTATGTATGGCTGTAAATATA
TTTGAGCATACATATTTATGATTAGTGGACTGTATATCCAACATGTTTCTTATCTAACATGTAAAATAATA
AACCTAAATTTATTGCTGCACGCCGTCTAAGTAGATAATGATC

Line 10

Minos..GGGGCTCGTAGAAGCTGGCTAACGTGCTTGGCATAATTTATAGAAGCATTTGTGTAGGCTTGTCTTA
ATGGCGAAAAATTGAAAACATTTAGCATTTACAAGCACTTGGTACCGGCCTAGGAGCCAATGATC

Εικόνα 5. Γενωμικές αλληλουχίες του *B.oleae* που πλαισιώνουν τέσσερις ανεξάρτητες ενθέσεις του *Minos*. Το τέλος της αλληλουχίας του τρανσποζονίου παρουσιάζεται με σκούρους χαρακτήρες. Η θέση περιορισμού *MboI* που χρησιμοποιήθηκε στο inverse PCR παρουσιάζεται υπογραμμισμένη. Το δινουκλεοτίδιο στόχος TA (κεφαλαία, με σκούρους χαρακτήρες) πλαισιώνει τα άκρα του *Minos* σε κάθε ένθεση.

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Ενεργότητα του μεταθετού στοιχείου *Minos* στο *Bactrocera oleae*

Η παρούσα εργασία επιδεικνύει τον επιτυχή μετασχηματισμό του *Bactrocera oleae* με το μεταθετό στοιχείο *Minos*. Από τις τέσσερις προσπάθειες μετασχηματισμού, μόνο η τελευταία έδωσε διαγονιδιακά άτομα. Στις δύο πρώτες προσπάθειες χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο βοηθός pHSS6hsILMi20, ως πηγή τραπεζοζάσης, ενώ στις δύο τελευταίες το mRNA της τραπεζοζάσης του στοιχείου *Minos*, το οποίο είχε δειχθεί να καταλήγει σε ψηλότερα ποσοστά μετασχηματισμού (Karetanaki *et al.*, 2002). Είναι δύσκολο να συμπεράνουμε με τα συγκεκριμένα αποτελέσματα, αν το πλασμίδιο βοηθός είναι λειτουργικό ως προς το μετασχηματισμό του *Bactrocera oleae*, από τη στιγμή που ένας σημαντικός αριθμός ενεμένων εμβρύων, γεγονός που επιτεύχθηκε στην τελευταία μόνο προσπάθεια, θεωρήθηκε απαραίτητος παράγοντας για το μετασχηματισμό του είδους. Η αναλογία 400/100 ng/μl (τραπεζοζόνιο/mRNA της τραπεζοζάσης του *Minos*) που χρησιμοποιήθηκε, είναι σε συμφωνία με άλλα πειράματα μετασχηματισμού που πραγματοποιήθηκαν με το ίδιο μεταθετό στοιχείο (Loukeris *et al.*, 1995b και 1995a). Τα σταθερά πρότυπα έκφρασης της *egfp* των διαγονιδιακών ατόμων επί αριθμού γενεών, δηλώνει την απουσία στοιχείων που θα μπορούσαν να ενεργοποιήσουν το μεταθετό *Minos* από το γονιδίωμα του *Bactrocera oleae*.

3.2 Έκφραση του τραπεζοζονίου pMiBo14/GtTA2

Για το μετασχηματισμό του *B. oleae* χρησιμοποιήθηκε το τραπεζοζόνιο pMiBo14/GtTA2, το οποίο είχε ήδη δοκιμαστεί στα δίπτερα *D. melanogaster* και *C. capitata*, καθώς και στο νηματοειδή *Caenorhabditis elegans*, με επιτυχία (Koukidou *et al.*, 2006). Στο συγκεκριμένο τραπεζοζόνιο, το γονίδιο διάκρισης *egfp* εκφράζεται μέσω ενός αμφίδρομου υποκινητή ο οποίος βρίσκεται υπό τον έλεγχο του συνθετικού ενεργοποιητή μεταγραφής tTA (Gossen & Bujard, 1992). Ο υποκινητής είναι επίσης υπεύθυνος για τη μεταγραφή του tTA. Το παραπάνω οδηγεί σε μια αυτό-συντηρούμενη έκφραση του ενεργοποιητή tTA. Αυτό το θετικό κλειστό σύστημα είναι σταθερά ενεργό από το ξεκίνημα της μεταγραφής του tTA και οδηγεί σε υψηλά ποσοστά έκφρασης του γονιδίου διάκρισης *egfp*. Όσον αφορά την κασέτα διάκρισης pMiBo14/GtTA2, τα εξής ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά μπορούν να ειπωθούν από το μετασχηματισμό του *Bactrocera oleae*.

- Η κασέτα αποδείχτηκε λειτουργική για το μετασχηματισμό του δάκου, μεγαλώνοντας το εύρος ενεργότητας της, γεγονός που οφείλεται στο ευπροσάρμοστο σύστημα tTA/tetO, έναντι ενός υποκινητή προερχόμενου από ένα είδος.
- Η παροδική έκφραση της κασέτας στα ενεμένα έμβρυα, επιτρέπει την πρόωμη αποτίμηση της αποδοτικότητας των ενέσεων και της λειτουργικότητας του γονιδίου διάκρισης. Αυτό αποτελεί μια σημαντική ιδιότητα, ειδικά για το μετασχηματισμό εντόμων με μεγάλο χρόνο γενιάς ή σε είδη που η εργαστηριακή συντήρησή τους είναι ιδιαίτερα δύσκολη.
- Δυνατή έκφραση του γονιδίου διάκρισης *egfp* στα περισσότερα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου, επιτρέποντας την εύκολα ανιχνεύσιμη και αξιόπιστη επιλογή των διαγονιδιακών ατόμων.
- Τα εκφραστικά πρότυπα της πρωτεΐνης EGFP διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στις διαφορετικές ενθέσεις, χαρακτηριστικό που επιτρέπει την εύκολη διάκριση μεταξύ των διαγονιδιακών σειρών.

Πρόσφατα, έχει δειχθεί ότι ένα πλασμίδιο το οποίο εκφράζει τον ενεργοποιητή tTA υπό τον έλεγχο ενός *tetO* υποκινητή, προκαλεί ρυθμιζόμενη θνησιμότητα μέσω τετρακυκλίνης σε διαγονιδιακές μύγες της Μεσογείου, όπου η υπερ-έκφραση του tTA είναι πιθανώς η αιτία της θνησιμότητας (Gong *et al.*, 2005). Στη δική μας περίπτωση, αρχικά τέτοια άτομα δεν θα περνούσαν τη διαδικασία ανίχνευσης, η οποία βασίζεται στην έκφραση της πρωτεΐνης EGFP απουσία τετρακυκλίνης. Σε μια προσπάθεια ομοζύγωσης του διαγονιδιακού στελέχους δώδεκα όμως, παρατηρήθηκε έντονη θνησιμότητα σε επίπεδο προχωρημένου σταδίου νύμφης, από προ-νύμφες τρίτου σταδίου που εξετάστηκαν και επιλέχθηκαν με βάση τον έντονο φθορισμό τους. Είναι πιθανό λοιπόν, η υπερ-έκφραση του ενεργοποιητή tTA, εν μέρει λόγω του κλειστού θετικού κυκλώματος της κασέτας διάκρισης και εν μέρει λόγω της διπλής παρουσίας της κασέτας στο γονιδίωμα των συγκεκριμένων εντόμων, να προκαλεί τον θάνατο των ομόζυγων διαγονιδιακών ατόμων της σειράς δώδεκα. Το παραπάνω φαινόμενο μένει να εξεταστεί σε διαγονιδιακά στελέχη που σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης της tTA, φέρουν μια ένθεση στο γονιδίωμα τους.

3.3 Ποιοτικές και ποσοτικές παράμετροι του μετασχηματισμού του *B. oleae* με το στοιχείο *Minos*

Χρησιμοποιώντας την αυτό-ρυθμιζόμενη κασέτα tTA/EGFP ως γονίδιο διάκρισης, δείξαμε ότι το μεταθετό στοιχείο *Minos* της *D. hydei*, μπορεί να μεσολαβήσει για τον σταθερό μετασχηματισμό της γαμετικής σειράς του *B. oleae*, διευρύνοντας τον αριθμό των ειδών που έχουν μετασχηματιστεί με το συγκεκριμένο μεταθετό. Η συχνότητα μετασχηματισμού, εκφρασμένη ως το ποσοστό των ατόμων G0 που έδωσαν μετασχηματισμένους απογόνους, δεν μπορούσε να υπολογιστεί σε αυτά τα πειράματα, λόγω του ότι οι ενεμένες μύγες G0 διασταυρώθηκαν κατά ομάδες. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί, ότι προσπάθειες μετασχηματισμού του δάκου όπου τα άτομα G0 του ίδιου φύλου ομαδοποιήθηκαν ανά πέντε ή δέκα σε ειδικά κλουβιά για τη διασταύρωσή τους με έντομα αγρίου τύπου του αντίθετου φύλου, έδειξαν μειωμένη παραγωγή εμβρύων G1 σε σχέση με τις ομαδικές διασταυρώσεις. Ο συνολικός αριθμός των φαινοτυπικά ανιχνεύσιμων γεγονότων μετασχηματισμού θεωρείται επαρκής, αλλά όχι συγκρίσιμος με άλλα έντομα, για την παραγωγή ανεξάρτητων διαγονιδιακών σειρών από ένα πείραμα. Παρά ταύτα, χιλιάδες έμβρυα μπορούν να ενεθούν εντός του διαστήματος των δέκα ημερών που η παραγωγή αυγών για ενέσεις κρίνεται ικανοποιητική. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι μόνο το 17% των προνυμφών G0 εκκολάφθηκαν από τα ενεμένα έμβρυα. Μεταγενέστερες προσπάθειες μετασχηματισμού οδήγησαν σε υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης των ενεμένων εμβρύων, πιθανώς λόγω της αυξανόμενης εμπειρίας που αποκτήθηκε.

Από τις εννέα διαγονιδιακές σειρές που αναλύθηκαν, τρεις είχαν μία μόνο ένθεση του διαγονιδίου, η σειρά 11 είχε δύο ενθέσεις, οι σειρές 10 και 12, τρεις, και οι σειρές 8, 9 και 13 περιείχαν πολλαπλές ενθέσεις. Οι πολλαπλές ενθέσεις διαφέρουν από άλλα πειράματα μετασχηματισμού εντόμων, βασισμένα στο στοιχείο *Minos* (Loukeris *et al.*, 1995a; Loukeris *et al.*, 1995b), όπου τα περισσότερα άτομα που αναλύθηκαν, είχαν μόνο ένα αντίγραφο του διαγονιδίου. Το παραπάνω, είναι πιθανότατα το αποτέλεσμα υψηλής συγκέντρωσης του mRNA της τρανσποζάσης του *Minos* που χρησιμοποιήθηκε για το συγκεκριμένο πείραμα μετασχηματισμού. Τα πολλαπλά αντίτυπα μπορεί να πλεονεκτούν σε ορισμένα πειράματα, όπου κάθε ένθεση μπορεί να προσφέρει νέα πληροφορία, π.χ. παγίδευση ενισχυτών ή στα πειράματα στα οποία η ενισχυμένη έκφραση ενός γονιδίου είναι επιθυμητή, αλλά αυξάνουν τον κίνδυνο των θνησιγόνων μεταλλάξεων και επιπλέον μπορεί να περιπλέξουν την εφαρμοσμένη χρήση των διαγονιδιακών σειρών. Η κατάσταση αυτή

μπορεί να αποφευχθεί εύκολα με τη χρήση μικρότερης συγκέντρωσης του mRNA της τρανσποζάσης του *Minos*.

Το πρότυπο έκφρασης της EGFP ποικίλει ανάμεσα στις διάφορες διαγονιδιακές σειρές, γεγονός αναμενόμενο, θεωρώντας ότι η έκφραση του γονιδίου *egfp* δεν ρυθμίζεται από έναν ιστο-ειδικό υποκινητή αλλά πιθανότατα εξαρτάται από την ενεργοποίηση του τεχνητού υποκινητή μέσω χρωμοσωμικών *cis* στοιχείων, ενισχυτές π.χ., κοντά στη θέση ένθεσης. Επιπλέον, η ένταση του φθορισμού δεν συσχετίζεται απαραίτητα με τον αριθμό των ενθέσεων. Για παράδειγμα, η σειρά 12 παρουσιάζει πολύ δυνατώτερη έκφραση της EGFP από ότι η σειρά 13 με περισσότερες ενθέσεις. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η έκφραση της EGFP εξαρτάται από το χρωμοσωμικό περιβάλλον. Η ποικιλομορφία σε σχέση με τη θέση ένθεσης (position effect) συνέβαλλε κατά πάσα πιθανότητα στα διαφορετικά πρότυπα έκφρασης που παρατηρήσαμε ανάμεσα σε αδελφικά άτομα της ίδιας σειράς. Σε σειρές όπου ο αριθμός των φθοριζόντων απογόνων έδειξε διαχωρισμό ενός αλληλόμορφου, αλλά η ανάλυση κατά Southern επιβεβαίωσε την παρουσία περισσότερων ενθέσεων, όλες εκτός από μια είναι πιθανώς ανενεργές, ίσως λόγω χρωμοσωμικού περιβάλλοντος.

Το συγκεκριμένο κεφάλαιο περιγράφει το σταθερό μετασχηματισμό της γαμετικής σειράς του *B. oleae* με το μεταθετό στοιχείο *Minos*. Η διαθεσιμότητα ενός συστήματος μετασχηματισμού για το δάκο, ανοίγει το δρόμο για την εφαρμογή μεθόδων της γενετικής μηχανικής στο έντομο αυτό και την ανάπτυξη γενετικών συστημάτων ελέγχου αυτού του οικονομικά σημαντικού δίπτερου.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

**Η ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ RNAi ΓΙΑ ΤΗΝ
ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ
ΓΟΝΙΔΙΟΥ *TRA2* ΣΤΟ *BACTROCERA OLEAE***

4. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

4.1 Δομή, λειτουργία και εξέλιξη των μονοπατιών που σηματοδοτούν τον καθορισμό του φύλου των δίπτερων εντόμων

Η φύση έχει εξελίξει μία εκπληκτική ποικιλία γενετικών και επιγενετικών μονοπατιών φυλοκαθορισμού, τα οποία, όλα επιτυγχάνουν το ίδιο αποτέλεσμα, τη δημιουργία των δύο φύλων. Σε γενικές γραμμές, τα δύο φύλα διαφέρουν συστηματικά μεταξύ τους όσον αφορά τη φυσιολογία και τη συμπεριφορά τους, και συχνά την μορφολογία και τον χρωματισμό τους. Το μυστήριο των δύο φύλων και της εμφάνισης του φυλετικού διμορφισμού γενικότερα, έχει προβληματίσει τους επιστήμονες για αιώνες. Επιπλέον, ο φυλοκαθορισμός προσφέρει την ευκαιρία διερεύνησης κλασικών ερωτημάτων της αναπτυξιακής βιολογίας, όπως η επιλογή μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών πεπρωμένων, καθώς και η διατήρηση και υλοποίηση τους σε καθορισμένα χρονικά και ιστολογικά όρια. Με την αλματώδη εξέλιξη της γενετικής τα τελευταία χρόνια, ερευνητικές ομάδες από όλο τον κόσμο κατόρθωσαν να αποκαλύψουν σταδιακά τους μηχανισμούς που κυβερνούν τον καθορισμό των δύο φύλων, σε οργανισμούς μοντέλα και αργότερα σε έντομα οικονομικής σημασίας, με απώτερο σκοπό τη δημιουργία στελεχών για την Τεχνική Στείρου Εντόμου. Σύμφωνα με τις παραπάνω έρευνες, τα γονίδια «αφέντες» στην κορυφή του ρυθμιστικού αυτού μονοπατιού, διαφοροποιούνται δραματικά καθώς νέα είδη και γένη εξελίσσονται, ενώ τα γονίδια «σκλάβοι» στη βάση της ιεραρχίας παραμένουν τα ίδια, επιτυγχάνοντας πανομοιότυπες λειτουργίες από το ένα είδος στο άλλο (Graham *et al.*, 2002). Ακολουθεί μια σύντομη περιγραφή του μονοπατιού φυλοκαθορισμού στη *D. melanogaster* και αντίστοιχα μονοπάτια ή κομμάτια αυτών, που έχουν μελετηθεί και σκιαγραφηθεί μέχρι σήμερα στα δίπτερα έντομα.

4.1.1 Καθορισμός του φύλου στη *Drosophila melanogaster*

Το μονοπάτι του σωματικού φυλοκαθορισμού στα δίπτερα μελετήθηκε αρχικά στον οργανισμό μοντέλο, *D. melanogaster*. Πολλά από τα αποτελέσματα των πρώτων αυτών ερευνών χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση ανάλογων γονιδίων και σε άλλα είδη. Το πρωταρχικό σήμα για το φυλοκαθορισμό στα σωματικά κύτταρα της *D. melanogaster*, είναι η αναλογία των X χρωμοσωμάτων ως προς το σύνολο των αυτοσωμάτων (X:A). Ο λόγος 1.0 (2X:2A) οδηγεί σε θηλυκό έντομο, ενώ ο λόγος 0.5 (1X:2A) σε ανάπτυξη αρσενικού εντόμου. Το χρωμόσωμα Y, στη *D. melanogaster*, δεν έχει φυλοκαθοριστικό ρόλο, αλλά είναι απαραίτητο για την γονιμότητα των αρσενικών (Schutt & Nothiger, 2000). Ο μοναδικός στόχος του πολύπλοκου σήματος X:A, είναι το γονίδιο *sex-lethal* (*Sxl*), το οποίο ενεργοποιείται στα θηλυκά αλλά όχι στα αρσενικά (Bopp *et al.*, 1991) άτομα. Αναλυτικότερα, λίγο πριν τη δημιουργία κυτταρικού βλαστοδέρματος στα έμβρυα (βλέπε Εισαγωγή 1), ο ιδρυτικός (establishment) υποκινητής του *Sxl*, *Sxl_{pe}*, ενεργοποιείται στα θηλυκά XX έμβρυα από το σήμα X:A. Το παραπάνω οδηγεί στη δημιουργία της πρώιμης πρωτεΐνης SXL (Keyes *et al.*, 1992). Λίγο αργότερα, η μεταγραφή από τον υποκινητή *Sxl_{pe}* σταματάει και ο υποκινητής συντήρησης (maintenance promoter), *Sxl_{pm}*, καθίσταται ενεργός και στα δύο φύλα. Από αυτό το σημείο κι έπειτα, η φυλετικά καθορισμένη έκφραση του *Sxl* επιτυγχάνεται μέσω εναλλακτικής συρραφής (alternative splicing). Τα αρσενικά μετάγραφα διατηρούν το τρίτο εξώνιο, το οποίο περιέχει κωδικόνια λήξης, με αποτέλεσμα τον πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης των συγκεκριμένων μεταγράφων (Bell *et al.*, 1988). Στα θηλυκά, η συρραφή του εξωνίου 3 οδηγεί σε ένα

ολοκληρωμένο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης. Η κινητήριος δύναμη για το θηλυκό τρόπο συρραφής είναι η ίδια η πρωτεΐνη SXL, που με αυτό τον τρόπο δημιουργεί ένα θετικό κλειστό κύκλωμα. Από τη στιγμή που τα αρσενικά άτομα δεν παράγουν την πρώιμη πρωτεΐνη SXL, δεν υπάρχει δυνατότητα συρραφής του εξωνίου 3 και το κλειστό κύκλωμα δεν μπορεί να δημιουργηθεί. Συνεπώς με τη λειτουργία της όσον αφορά την επεξεργασία του RNA, η SXL αποτελεί μια πρωτεΐνη που δεσμεύει RNA (RNA binding protein), με δύο διατηρημένες περιοχές RRM (RNA recognition motif). Εκτός από τη διατήρηση της δικής της λειτουργίας, η πρωτεΐνη SXL ελέγχει την έκφραση παραπέρα γονιδίων στην κορυφή τριών ρυθμιστικών μονοπατιών, συγκεκριμένα του γονιδίου *transformer* (*tra*) που σηματοδοτεί το φυλοκαθορισμό στα σωματικά κύτταρα, του γονιδίου *male-specific lethal-2* (*msl-2*) για την αποζημίωση δόσης (dosage compensation) στα αρσενικά άτομα (Inoue *et al.*, 1990; Handa *et al.*, 1999; Bashaw and Baker, 1997), και ενός τρίτου γονιδίου, το οποίο δεν έχει βρεθεί ακόμα και διερευνάται, υπεύθυνο για την ωογένεση (Schutt & Nothiger, 2000). Για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης θα επικεντρωθούμε στο πρώτο μονοπάτι, του φυλοκαθορισμού στα σωματικά κύτταρα.

Παρόμοια με το γονίδιο *Sxl*, το γονίδιο *tra* στη Δροσόφιλα παράγει πρώιμα μετάγραφα και στα δύο φύλα, μολονότι παραγωγική συρραφή η οποία να οδηγεί σε ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης απαιτεί την παρουσία της πρωτεΐνης SXL (Sosnowski *et al.*, 1989). Το γονίδιο *tra*, μαζί με το δομικό γονίδιο *transformer2* (*tra2*) προάγουν στα θηλυκά άτομα μόνο, τη συρραφή του γονιδίου *doublesex* (*dsx*), του οποίου πρώιμα μετάγραφα είναι παρόντα σε κύτταρα αρσενικών και θηλυκών εντόμων επίσης (Amrein *et al.*, 1988; Amrein *et al.*, 1990). Απουσία αμφοτέρων των πρωτεϊνών TRA ή TRA2, το πρώιμο μετάγραφο του γονιδίου *dsx* συρράβεται με την εκμετάλλευση της 3' θέσης συρραφής του εξωνίου 4. Η συγκεκριμένη θέση φαίνεται να είναι η προκαθορισμένη επιλογή του γενικού μηχανισμού συρραφής (Nagoshi *et al.*, 1988). Για την προαγωγή του θηλυκού τρόπου συρραφής, το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών TRA-TRA2 ενώνεται με το RNA μετάγραφο του γονιδίου *dsx* μέσω αναγνώρισης μιας σειράς στοιχείων, τα οποία απαρτίζονται από 13 νουκλεοτίδια, και επίσης μέσω ενός στοιχείου πλούσιο σε πουρίνες (purine-rich element) το οποίο βρίσκεται στο εξόνιο 4, που με αυτόν τον τρόπο διατηρείται στα μετάγραφα των θηλυκών εντόμων (Lynch and Maniatis, 1995). Τα αρσενικά και θηλυκά μετάγραφα που παράγονται, κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες που ρυθμίζουν γονίδια υπεύθυνα για την αρσενική και θηλυκή διαφοροποίηση, αντίστοιχα (Coschigano & Wensink, 1993; Chandler *et al.*, 1997).

4.1.2 Μελέτες φυλοκαθορισμού στα δίπτερα *Ceratitis capitata*, *Musca domestica* και *Bactrocera oleae*. Συγκριτικές μελέτες των γονιδίων *Sxl*, *tra*, *tra2* και *dsx*

Στη *C. capitata*, σε αντικατάσταση της αναλογίας των χρωμοσωμάτων X/A της *Drosophila*, η παρουσία του παράγοντα M, συνδεδεμένου με το χρωμόσωμα Y, είναι υπεύθυνη για τον καθορισμό του φύλου. Απουσία του παραπάνω παράγοντα οδηγεί σε θηλυκή ανάπτυξη (Willhoeft & Franz, 1996). Παρόμοια με την *C. capitata*, στο *B. oleae*, η παρουσία του Y χρωμοσώματος δηλώνει αρσενικό άτομο (XY), ενώ η παρουσία δύο X χρωμοσωμάτων (XX), θηλυκό (Mavragani-Tsipidou, 2002). Στην κοινή μύγα, *Musca domestica*, η ύπαρξη του Y χρωμοσώματος είναι καθοριστική για την διαφοροποίηση και ανάπτυξη του εμβρύου σε αρσενικό άτομο, ανεξάρτητα από τον αριθμό των X χρωμοσωμάτων. Πιο συγκεκριμένα, έντομα με τους καρυότυπους Y0 (αρσενικό) και X0 (θηλυκό) είναι βιώσιμα και γόνιμα. Επομένως, η ελάχιστη απαίτηση για βιωσιμότητα στη *M. domestica*, είναι η ύπαρξη ενός αντίγραφου ή του X ή του Y χρωμοσώματος, γεγονός που υποδεικνύει ότι εκτός από τους αρσενικο-

καθοριστικούς παράγοντες στο Y, τα δύο ετεροσώματα είναι γενετικά ισότιμα (Dubendorfer *et al.*, 2002).

Το ομόλογο του γονιδίου *Sxl* της *Drosophila*, έχει απομονωθεί και μελετηθεί σε διάφορα δίπτερα. Παρά το μεγάλο βαθμό συντήρησης, ιδιαίτερα στην περιοχή RRM, της πρωτεΐνης SXL της *Drosophila*, πρωτεϊνικές μελέτες στη *C. capitata* από τους Saccone *et al.* (1998), στη *Musca domestica* από τους Meise *et al.* (1998) και στο *B. oleae* από τους Lagos *et al.* (2005), έδειξαν την ίδια ποσότητα πρωτεΐνης σε αρσενικές και θηλυκές μύγες. Επί πλέον, έχει δειχθεί ότι η πρωτεΐνη SXL των δίπτερων *Ceratitis* και *Musca*, δεν μπορεί να αντικαταστήσει την ενδογενή πρωτεΐνη SXL στη *Drosophila*. Ακόμη, με την υπερπαραγωγή των δύο πρωτεϊνών σε διαγονιδιακά έντομα, παρατηρείται μείωση της βιωσιμότητας και στα δύο φύλα των προαναφερόμενων εντόμων. Πλέον, είναι γενικά αποδεκτό ότι πέρα από το γένος των Δροσοφιλιδών, το γονίδιο *sxl* δεν εκφράζεται με φυλοκαθορισμένο τρόπο και δεν έχει κάποιο εμφανή ρόλο στο φυλοκαθορισμό (Graham *et al.*, 2002).

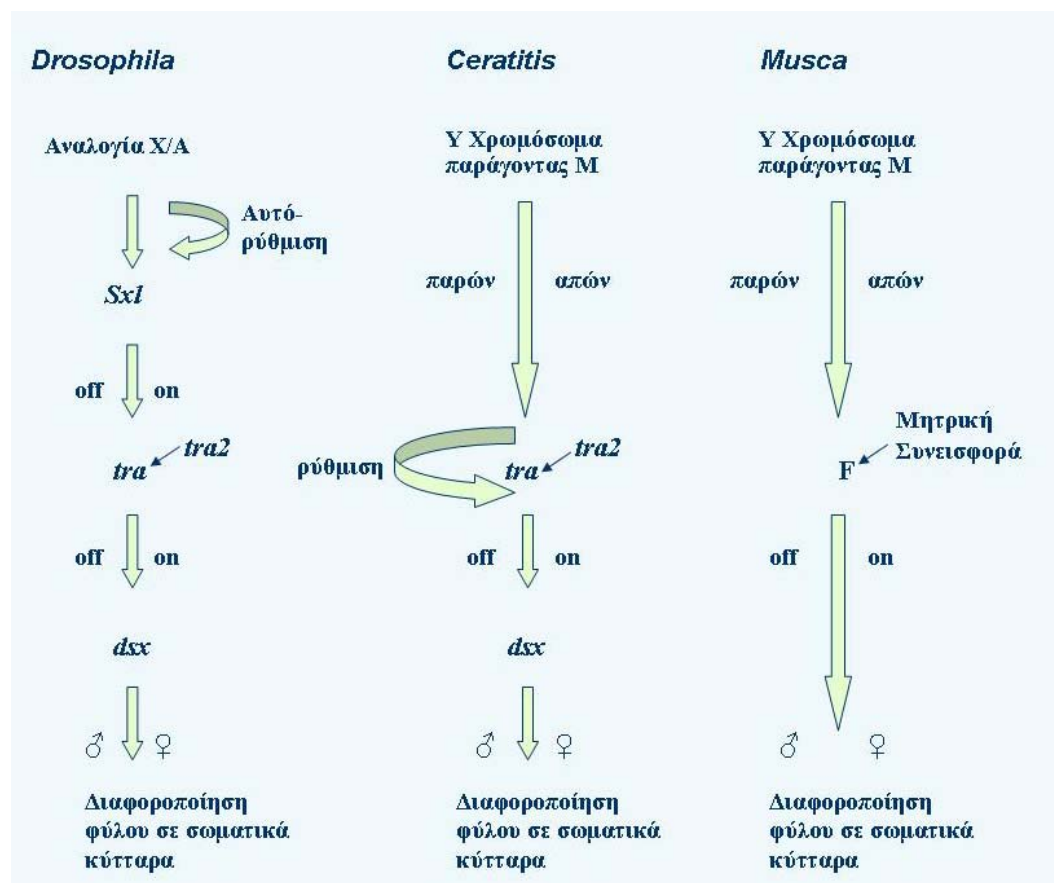
Σε συνάρτηση με την γενική αντίληψη ότι τα γονίδια «αφέντες» στην κορυφή της ρυθμιστικής ιεραρχίας αλλάζουν δραματικά, ενώ τα γονίδια «σκλάβοι» στη βάση της ιεραρχίας παραμένουν τα ίδια, τα μετάγραφα του γονιδίου *dsx* υπόκεινται σε εναλλακτική συρραφή σε αρσενικά και θηλυκά έντομα σε όλα τα Δίπτερα είδη που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα, συμπεριλαμβανομένων των *Bactrocera tryoni* (Shearman and Formmer, 1998), *Ceratitis capitata* (Saccone *et al.*, 2000), *Megaselia scalaris* (Kuhn *et al.*, 2000), *Musca domestica* (Hediger *et al.*, 2004), *Bactrocera oleae* (Lagos *et al.*, 2005) και *Bombyx mori* (Ohbayashi *et al.*, 2001).

Το γονίδιο *tra* έχει χαρακτηριστεί κυρίως στη *Drosophila* και στη *Capitata* (Sosnowski *et al.*, 1989; Pane *et al.*, 2002). Και στις δύο περιπτώσεις, ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης που οδηγεί σε πλήρη και λειτουργική πρωτεΐνη, συμβαίνει μόνο στα άτομα με θηλυκό καρυότυπο, μέσω φυλο-ειδικής συρραφής. Εν τούτοις, σε αντίθεση με το γονίδιο *tra* της *Drosophila*, το γονίδιο *tra* της *C. capitata* παίζει σημαντικό ρόλο στο φυλοκαθορισμό του εντόμου, με τη διατήρηση της κυτταρικής κατάστασης σε θηλυκό πρότυπο, μέσω της θετικής ανάδρασης που επιτυγχάνεται και φαίνεται να είναι ο βασικός «διακόπτης» του μονοπατιού φυλοκαθορισμού στο συγκεκριμένο έντομο. Προ-βλαστοδερμικά έμβρυα της μύγας της Μεσογείου, ενεμένα με δίκλωνο μόριο RNA της κωδικής περιοχής του γονιδίου *tra*, αναπτύσσονται ως αρσενικά, γόνιμα άτομα (Pane *et al.*, 2002).

Το γονίδιο *tra2* της *Drosophila* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που περιέχει μια περιοχή RRM, ανάμεσα σε δύο περιοχές πλούσιες στα αμινοξέα σερίνη και αργινίνη (RS-domains) (Goralski *et al.*, 1989). Η πρωτεΐνη TRA2 ανήκει στην υπέρ-οικογένεια πρωτεϊνών γνωστών ως SR πρωτεΐνες, οι οποίες συμμετέχουν σε συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών και γενικότερα φωσφορυλιώνονται *in vivo* (Manley and Tacke, 1996; Tacke *et al.*, 1998). Επιπρόσθετα της επίδρασης της στη συρραφή του γονιδίου *dsx*, η πρωτεΐνη TRA2 μαζί με την πρωτεΐνη TRA, επηρεάζει την επεξεργασία του μετάγραφου του γονιδίου *fruitless (fru)* (Heinrichs *et al.*, 1998), το οποίο εμπλέκεται σε ζητήματα συμπεριφοράς σύζευξης καθώς και στη διαφοροποίηση του μυϊκού ιστού (Gailey *et al.*, 1989; Gailey *et al.*, 1991). Στη γαμετική σειρά, η πρωτεΐνη TRA2 είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική σπερματογένεση και επηρεάζει με φυλο-ειδικό τρόπο τα πρώιμα μετάγραφα των γονιδίων *exuperantia (exu)*, *alternative testis transcripts (att)* και του ίδιου του *tra2* (Dauwalser *et al.*, 1996; Hazelrigg and Tu, 1994; Mattox and Baker, 1991). Έλλειψη του γονιδίου *tra2*, προκαλεί στα χρωμοσωμικά θηλυκά (XX:AA) ζυγωτά να αναπτυχθούν σε στείρα αρσενικά άτομα (Watanabe, 1975; Burtis, 1993; Fortier and Belote, 2000). Χρωμοσωμικά αρσενικές μύγες (XY:AA), ομόζυγες για μετάλλαξη

στο γονίδιο *tra2*, δεν παρουσιάζουν μορφολογικές διαφορές, μόνο που και αυτές είναι στειρές (Belote and Baker, 1982; Belote and Baker, 1983).

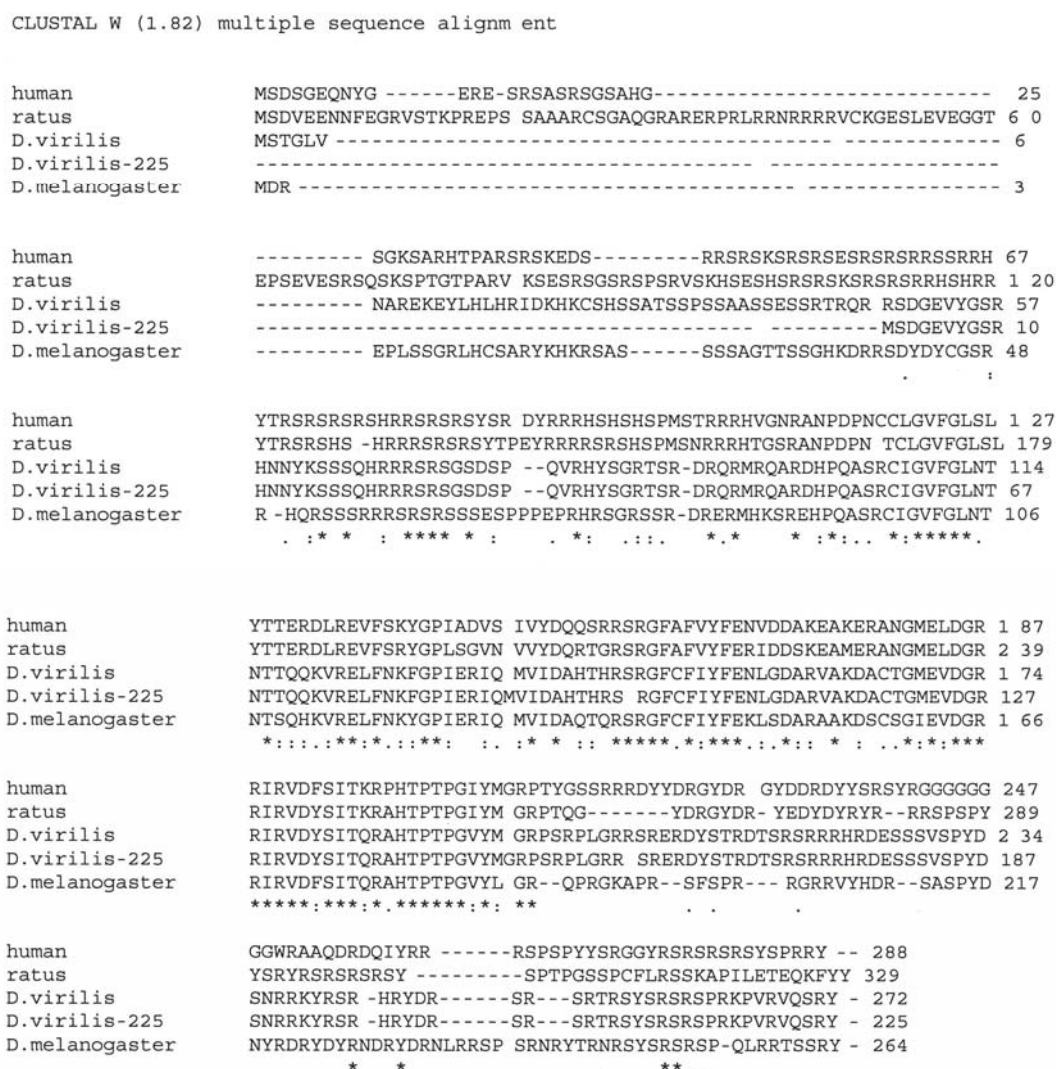
Το γονίδιο *tra2* έχει απομονωθεί πρόσφατα στα δίπτερα *M. domestica* (Burghardt *et al.*, 2005) και στο λεπιδόπτερο *Bombyx mori* (Bao-Long NIU *et al.*, 2005). Στο *B. mori*, η πρωτεΐνη TRA2 δεν φαίνεται να εμπλέκεται στη συρραφή του πρώιμου μετάγραφου του γονιδίου *Bmdsx*, εφόσον οι αλληλουχίες μοτίβα για την επίδραση του TRA/TRA2 συμπλέγματος, δεν υπάρχουν στη γενωμική αλληλουχία του *Bmdsx*. Αντίθετα, ο ρόλος του γονιδίου *tra2* στη *M. domestica*, συμφωνεί δομικά και εν-μέρει λειτουργικά με αυτόν του αντίστοιχου γονιδίου στη *Drosophila*. Οι Burghardt *et al.* (2005), μείωσαν τη λειτουργικότητα του *Mdtra2*, μικρό-ενείοντας δίκλωνο RNA σε προ-βλαστοδερμικά έμβρυα του εντόμου. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας έδειξαν αποτελεσματική μεταστροφή των γονοτυπικά θηλυκών εντόμων (X0 ή XX) σε γόνιμα αρσενικά. Οι ίδιοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι το γονίδιο *Mdtra2* δρα συνεργατικά με τον παράγοντα F και επίσης αποδεικνύουν ότι το *Mdtra2* δρα ως θετικός ρυθμιστής του συγκεκριμένου παράγοντα. Ομόλογο του γονιδίου *tra2* στη *C. capitata*, είδος συγγενικό με το δάκο, δεν έχει δημοσιευτεί μέχρι σήμερα. Παρά ταύτα, η παρουσία TRA/TRA2 ρυθμιστικών αλληλουχιών συρραφής στο γονίδιο *dsx* της *C. capitata*, *B. tryoni* και *B. oleae*, προλέγει την ύπαρξη ανάλογου γονιδίου σε αυτά τα έντομα. Στην Εικόνα 6, φαίνονται σχηματικά τα μονοπάτια φυλοκαθορισμού, όπως έχουν σκιαγραφηθεί μέχρι σήμερα, στα δίπτερα *Drosophila melanogaster*, *Ceratitis capitata* και *Musca domestica*.



Εικόνα 6. Σύγκριση των φύλο-καθοριστικών μονοπατιών στη *D. melanogaster*, *C. capitata* και *M. domestica*.

Λειτουργικά ανάλογα της πρωτεΐνης TRA2 έχουν ανακαλυφθεί σε σπονδυλωτά και νηματοειδή (Dauwalder *et al.*, 1996; Lum *et al.*, 2000). Και στις δύο περιπτώσεις, δεν υπάρχει ένδειξη φύλο-ειδικής λειτουργικότητας της πρωτεΐνης, η οποία πάρα ταύτα εξακολουθεί να παραμένει καιρία για τη βιωσιμότητα των οργανισμών.

Οι πρωτεΐνες TRA2 περιέχουν μια RNA αναγνωριστική περιοχή (RRM) πλαισιωμένη και στις δύο πλευρές από περιοχές πλούσιες στα αμινοξέα σερίνη και αργινίνη (RS περιοχές). Ενώ η RRM περιοχή, καθώς και μια μικρή περιοχή συνδέτης (linker region) που ακολουθεί αμέσως μετά, φαίνεται να είναι πολύ καλά διατηρημένες, τουλάχιστον σε πρωτεϊνικό επίπεδο, οι δύο RS περιοχές δείχνουν να έχουν πολύ μεγαλύτερη απόκλιση, ακόμα και ανάμεσα στα Δροσοφιλιδή *D. melanogaster* και *D. virilis* (Amrein *et al.*, 1988; Dauwalder *et al.*, 1996; Mattox *et al.*, 1996; Tacke *et al.*, 1998) (Εικ. 9).



Εικόνα 7. Συγκριτική πρωτεϊνική αλληλούχιση του γονιδίου *tra2* στον άνθρωπο, στον αρουραίο και στα έντομα *D. virilis* και *D. melanogaster*. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τα αμινοξέα που είναι κοινά και στους τέσσερις οργανισμούς.

Οι Lagos *et al.* (2005), έχουν πρόσφατα απομονώσει και χαρακτηρίσει τα γονίδια *Sxl* και *dsx* του δάκου. Στην παρούσα μελέτη, αναφέρονται περιληπτικά αρχικές προσπάθειες εύρεσης του γονιδίου *tra2* στο δάκο, καθώς και πειράματα διασαφήνισης της λειτουργίας του, χρησιμοποιώντας την τεχνική RNAi.

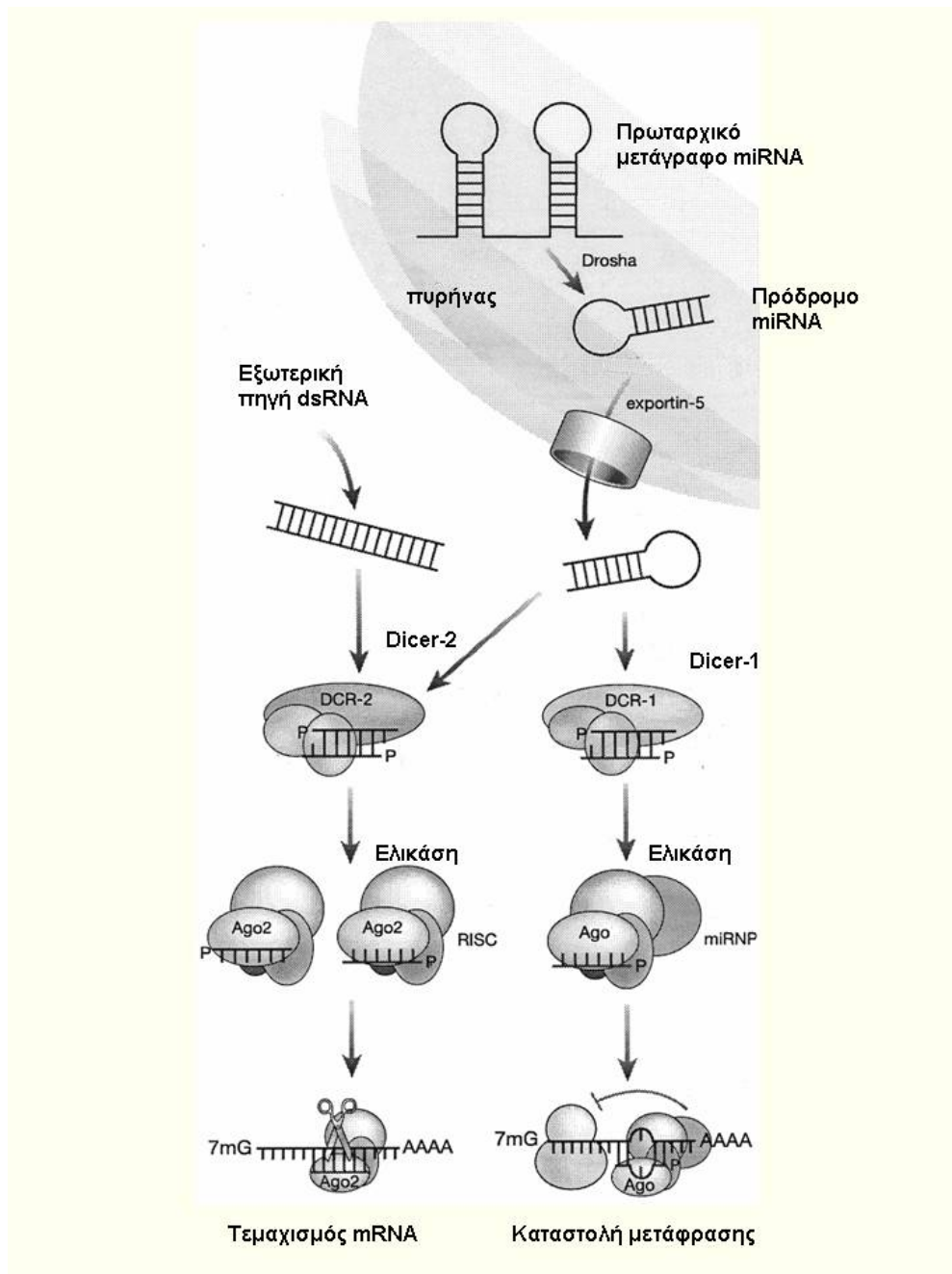
4.2 Παρεμβολή του RNA για την καταστολή της έκφρασης γονιδίων (RNAi)

4.2.1 Μηχανισμός σίγησης γονιδίων χρησιμοποιώντας δίκλωνο RNA (dsRNA)

Ένα από τα πιο συναρπαστικά ευρήματα των τελευταίων χρόνων υπήρξε η ανακάλυψη του RNAi (RNA interference). Η μεθοδολογία του RNAi υπόσχεται την καταστολή της έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων σε διάφορους οργανισμούς. Σε γενικές γραμμές, η τεχνική RNAi βασίζεται σε μια ενδογενή κυτταρική διαδικασία, η οποία ενεργοποιείται όταν ένα δίκλωνο μόριο RNA (dsRNA), μεγαλύτερο από 19 νουκλεοτίδια, εισέρχεται στο κύτταρο, προκαλώντας την αποικοδόμηση όχι μόνο του εαυτού του αλλά και μονόκλωνου RNA (ssRNA) ταυτόσημης αλληλουχίας, συμπεριλαμβανομένων και των ενδογενών mRNAs.

Η τεχνική RNAi πρωτοανακαλύφθηκε ως ενδογενή ιδιότητα των φυτών (Naroli *et al.*, 1990) και θεωρήθηκε μηχανισμός άμυνας έναντι ιογενών παθογόνων ή ανεξέλεγκτης κινητικότητας τρανσποζονίων. Αναγνωρίστηκε όμως ως τεχνική από τους Fire *et al.* (1998), οι οποίοι παρατήρησαν ότι η αντίδραση του νηματοειδούς *Caenorhabditis elegans* σε δίκλωνο μόριο RNA *unc-22A*, οδήγησε σε ειδική γονιδιακή αποσιώπηση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Η παραπάνω ανακάλυψη οδήγησε πλήθος ερευνητών σε μια πιο εις-βάθους εξερεύνηση των μοριακών μηχανισμών του RNAi σε διάφορους οργανισμούς καθώς και στην πειραματική εφαρμογή της τεχνικής. Με τις σημερινές γνώσεις, αναγνωρίζεται ως ένας αρχαίος μηχανισμός γονιδιακής ρύθμισης, όλων των ευκαρυωτικών οργανισμών από τους μύκητες μέχρι τα θηλαστικά (Jana *et al.*, 2003). Αναλυτικότερα, ο μηχανισμός RNAi ενεργοποιείται από πρόδρομα μόρια dsRNA, ποικιλόμορφα ως προς το μήκος και την καταγωγή, τα οποία υπόκεινται σε ταχεία επεξεργασία από κυτταρικούς μηχανισμούς σε μικρά RNAs (short RNAs). Τρία παραδείγματα short RNAs έχουν καταγραφεί στη φύση, τα μικρά επεμβατικά RNAs (short interfering RNAs; siRNAs), τα μικρά επεμβατικά RNAs (repeat-associated small interfering RNAs; rasiRNAs) και τα μικρο- RNAs (micro-RNAs; miRNAs) (Meister & Tuschl, 2004). Ο μηχανισμός RNAi επιτυγχάνεται μέσω των siRNAs. Η ωρίμανση των miRNAs είναι μια διαδοχική διαδικασία, η οποία καταλύεται από ενδονουκλεάσες τύπου RNase III, τις Drosha και Dicer. Η ενδονουκλεάση Drosha απαιτείται αποκλειστικά για την επεξεργασία των miRNAs στον πυρήνα του κυττάρου όπου μεταγράφονται. Τα miRNAs στη συνέχεια μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα μέσω του πυρηνικού υποδοχέα μεταφοράς exportin 5 (Lund *et al.*, 2004). Από τη στιγμή που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, το πρόδρομο μόριο miRNA, υπόκειται σε παραπέρα επεξεργασία από την ενδονουκλεάση Dicer, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός δίκλωνου μορίου RNA, μήκους περίπου 21 νουκλεοτιδίων, με 5' φωσφορικά και 3' άκρα μήκους 2 νουκλεοτιδίων. Στην ίδια επεξεργασία υπόκεινται και τα siRNAs στο κυτταρόπλασμα, όπου εντοπίζεται το ένζυμο Dicer. Τα miRNAs και τα siRNAs ανακατατάσσονται στο σύμπλεγμα σίγησης (RNA Induced Silencing Complex; RISC). Το σύμπλεγμα που περιλαμβάνει τα miRNAs αναγράφεται ως miRNP, ενώ το

σύμπλεγμα που περιλαμβάνει τα siRNAs ως RISC (Meister & Tuschl, 2004). Το κάθε τέτοιο σύμπλεγμα περιέχει ένα μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών Argonaute (Ago). Η συναρμολόγηση του RISC και miRNP είναι ATP-εξαρτώμενη, πιθανότατα για το ξεδίπλωμα (unwinding) των miRNAs και siRNAs. Στη *D.melanogaster*, η RNA ελικάση Armitage, της οικογένειας των DEAD-box ελικασών, είναι απαραίτητη μετά την επεξεργασία από το ένζυμο Dicer για τη συναρμολόγηση του RISC (Cook *et al.*, 2004). Τα αρχικά συμπλέγματα RISC και miRNP είναι ανενεργά, μέχρι την εμπλοκή της ελικάσης και την απομάκρυνση μιας από τις δύο αλυσίδες του RNA (Jana *et al.*, 2004). Η κύρια διαφορά μεταξύ siRNAs και miRNAs είναι ο βαθμός της συμπληρωματικότητας στα μόρια στόχος RNA, γεγονός που καθορίζει και την λειτουργία τους. Τα siRNAs οδηγούν σε τεμαχισμό του RNA, ενώ τα miRNAs σε μεταφραστική καταστολή. Το σύμπλεγμα RISC κόβει το mRNA στη μέση περίπου της συμπληρωματικής αλληλουχίας, δέκα νουκλεοτίδια άνωθεν του συμπληρωματικού με το 5' άκρο του siRNA νουκλεοτιδίου. Ο μηχανισμός RNAi απεικονίζεται στην Εικ. 8.

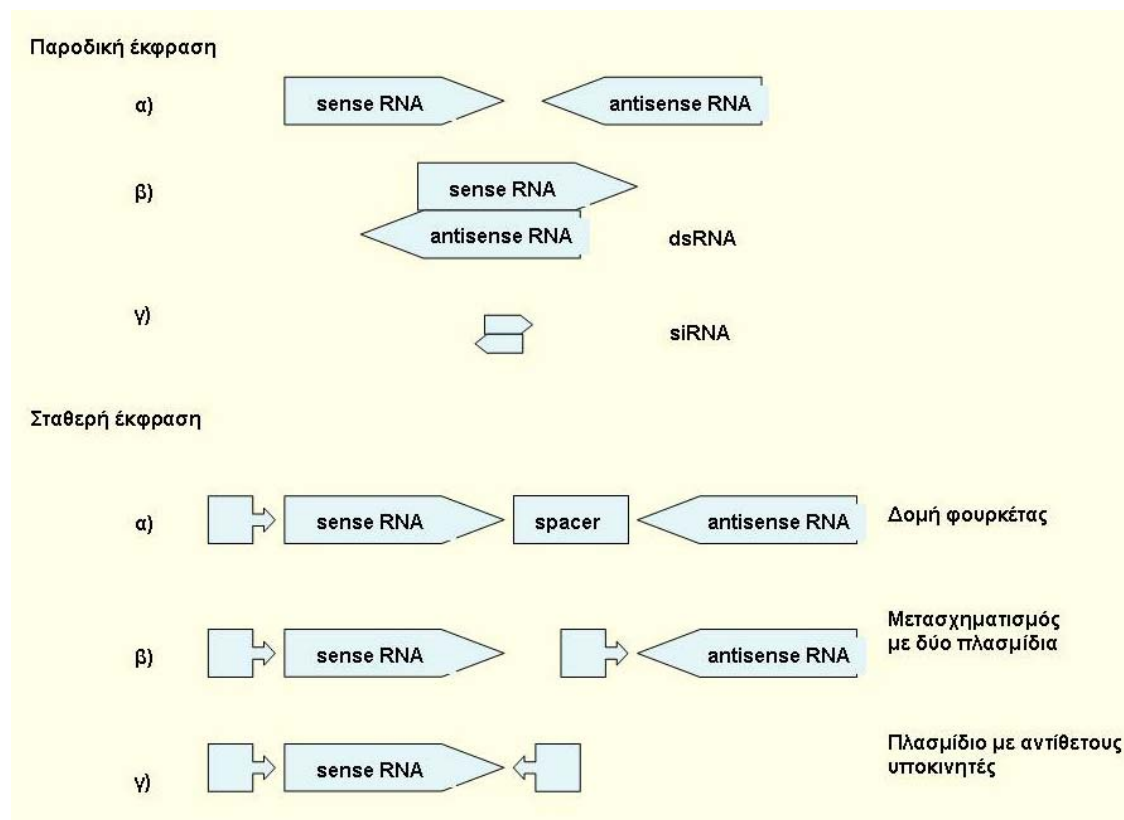


Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού RNAi.

4.2.2 Διαφορετικοί τρόποι κατασκευής dsRNA και θεωρήσεις όσον αφορά τη λειτουργικότητά τους

Σε γενικές γραμμές, η μέθοδος RNAi απαιτεί ένα γονίδιο-στόχο με γνωστή αλληλουχία ή τμήματα αυτής, μια σθεναρή μέθοδο ενεργοποίησης και παρακολούθηση του επιπέδου του mRNA του γονιδίου στόχου βιοχημικά ή φαινοτυπικά. Είναι σημαντικό το γονίδιο στόχος να μη μοιράζεται μέρη της αλληλουχίας του με άλλα γονίδια του οργανισμού στόχος που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί, ώστε να αποφευχθεί η σίγηση γονιδίων άλλων από το γονίδιο

στόχος. Το επόμενο βήμα είναι η εισαγωγή του *in vitro* dsRNA στον οργανισμό ή την κυτταρική σειρά. Η τεχνική RNAi μπορεί να έχει παροδική ή μόνιμη έκφραση. Στην πρώτη περίπτωση, η ενεργοποίηση του RNAi γίνεται με α) ταυτόχρονη εισαγωγή των sense και antisense αλληλουχιών του γονιδίου, β) με δίκλωνο μόριο RNA (dsRNA) ή γ) με απευθείας μεταφορά siRNA στο σύστημα μοντέλο (Verma & Dey, 2004). Η μόνιμη καταστολή ενός γονιδίου, από την άλλη, προϋποθέτει ένα πλασμίδιο φορέα που θα εισάγει στο κύτταρο ή στον οργανισμό, όλο ή τμήμα του γονιδίου στόχου και στις δύο κατευθύνσεις (sense και antisense) υπό τον έλεγχο ενός δυνατού υποκινητή. Ανάμεσα στις δύο αλληλουχίες παρεμβάλλεται μια άσχετη αλληλουχία, η οποία δημιουργεί μια δομή φουρκέτας, όπου οι δύο συμπληρωματικές αλληλουχίες του γονιδίου στόχου χωρίζονται από ένα μονόκλωνο ημικύκλιο (Paul *et al.*, 2002). Μια άλλη προσέγγιση είναι η τοποθέτηση των δύο αντίθετου προσανατολισμού αλληλουχιών του γονιδίου ξεχωριστά στο ίδιο πλασμίδιο κάτω από τον ίδιο υποκινητή, χωρίς την παρεμβολή ενδιάμεσης αλληλουχίας, ή σε δύο διαφορετικά πλασμίδια χρησιμοποιώντας τον ίδιο υποκινητή. Μία τρίτη μέθοδο αποτελεί η τοποθέτηση δύο δυνατών υποκινητών στα δύο άκρα (5' και 3') του γονιδίου και με αντίθετες κατευθύνσεις μεταγραφής, ώστε η μεταγραφή της κασέτας να οδηγεί σε sense και antisense μεταγγραφή τα οποία στη συνέχεια να ενώνονται μεταξύ τους για τη δημιουργία dsRNA (Εικ. 9).



Εικόνα 9. Διαφορετικές προσεγγίσεις για την κατασκευή dsRNA.

Στα αρχικά τους πειράματα, οι Fire *et al.* (1998) εξέτασαν την ικανότητα του RNAi να εμποδίσει τη λειτουργία του γονιδίου *unc-22A* στο σκουλήκι *C. elegans*.

Έκαναν ενέσεις με μονές αλυσίδες (sense και antisense) RNA του γονιδίου *unc-22A* στους γονάδες των ενηλίκων, και ανέλυσαν τη γενιά F1 ως προς τη λειτουργία του γονιδίου. Ανακάλυψαν ότι ενείοντας περισσότερα από 3.6 εκατομμύρια μονά μόρια RNA, με οποιαδήποτε από τις δύο κατευθύνσεις, πήραν τον αναμενόμενο φαινότυπο μόνο σε 1-10% της F1 γενιάς. Ενείοντας λιγότερο από 0.8% της αρχικής συγκέντρωσης μορίων, αλλά δίκλωνο RNA του ίδιου γονιδίου, έλαβαν 30% φαινοτυπική διεισδυτικότητα στη γενιά F1.

Οι Boutla *et al.* (2001) έδειξαν ότι κασέτες διαφόρων συνθετικών dsRNAs, αποτελούμενες από δύο 5' φωσφορυλιωμένες αλυσίδες RNA, μήκους 22 νουκλεοτιδίων, μπορούν να ενεργοποιήσουν αποτελεσματικά τη διαδικασία RNAi στη *Drosophila*.

Οι Schmid *et al.* (2002) ένεσαν έμβρυα της *Drosophila* ταυτοχρόνως με τέσσερα διαφορετικά δίκλινα μόρια RNA για τα γονίδια *Ptp10D*, *Dlar*, *Ptp69D* και *Ptp 99A* και έλαβαν τους ίδιους φαινοτύπους στα έμβρυα, με αυτούς των τετραπλών μηδενικών (null) μεταλλαγών στα ίδια γονίδια, επιδεικνύοντας την επιτυχή σίγηση πολλαπλών γονιδίων με τη μέθοδο RNAi. Οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν ότι η ηλικία των ενεμένων εμβρύων, η συγκέντρωση του RNA που εισαγόταν και ο βαθμός αφυδάτωσης των εμβρύων πριν την ένεση, ήταν σημαντικοί παράγοντες για την εξασφάλιση μεγαλύτερης καταστολής του γονιδίου στόχος.

Σύμφωνα με τους Smith *et al.* (2000), σταθερή και αποδοτική καταστολή της λειτουργίας ενός γονιδίου μπορεί να επιτευχθεί με ένα πλασμίδιο φορέα που θα φέρει ένα εσώνιο, με τις αλληλουχίες δέκτη συρραφής (splicing acceptor sites), ανάμεσα στα δύο τμήματα του γονιδίου (sense και antisense) και όχι με μια οποιαδήποτε αλληλουχία συνδέτη.

Τα παραπάνω αποτελούν απλά μόνο παραδείγματα της τεράστιας ερευνητικής δουλειάς που ακολούθησε την ανακάλυψη των Fire *et al.* (1998), σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η μέθοδος RNAi θεωρείται ως ο πιο αποτελεσματικός μηχανισμός καταστολής της λειτουργίας ενός γονιδίου σήμερα. Με την αποκρυπτογράφηση του γονιδιώματος διαφόρων οργανισμών θα αποτελέσει σημαντικό παράγοντα καθορισμού της λειτουργίας αχαρακτήριστων μέχρι τώρα γονιδίων. Ακόμα, πιστεύεται ότι θα έχει μεγάλη εφαρμογή στην ιατρική ως πηγή θεραπείας κατά των ιών, νευρολογικών παθήσεων και ιδιαίτερα του καρκίνου. Στην παρούσα μελέτη, η μέθοδος RNAi χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για τον καθορισμό της λειτουργίας του γονιδίου *tra2* στο δάκο της ελιάς.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Προς αναζήτηση του γονιδίου *tra2* στην *B. oleae*

Γνωρίζοντας από τη βιβλιογραφία ότι τμήματα της πρωτεϊνικής αλληλουχίας του γονιδίου *tra2* ήταν πολύ καλά συντηρημένα σε όλα τα είδη που είχαν μελετηθεί μέχρι τότε, και με βάση την συγκριτική ανάλυση clustalw (Εικ. 7, βλέπε Εισαγωγή), πέντε εκφυλισμένοι εκκινητές σχεδιάστηκαν με βάση την περιοχή RRM και τα αμινοξέα που την ακολουθούσαν.

Εμπρόσθιος εκκινητής	F: 5' GVFGGL 3'
Εμπρόσθιος εκκινητής (nested)	F1: 5' KVRELFNK 3'
Εμπρόσθιος εκκινητής (nested)	F2: 5' FNKF/YGPIE 3'
Αντίστροφος εκκινητής	R: 5' HTPTPG 3'
Αντίστροφος εκκινητής (nested)	R: 5' GM/IEVDG 3'

Όλοι οι εμπρόσθιοι εκκινητές είχαν τη θέση περιορισμού *Bam*HI στο 5' άκρο τους, ενώ όλοι οι αντίστροφοι εκκινητές τη θέση *Eco*RI στο 5' άκρο τους.

Οι εκκινητές δοκιμάστηκαν σε αντιδράσεις αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) κάτω από ποικίλες συνθήκες, χρησιμοποιώντας ως μήτρα γενωμικό και cDNA απομονωμένο από αρσενικά και θηλυκά άτομα *B.oleae* και *D. melanogaster*. Οι συνδυασμοί των εκκινητών καθώς και τα αναμενόμενα προϊόντα τους στα δείγματα της *D. melanogaster* φαίνονται στον πίνακα 3. Τα προϊόντα των PCR αντιδράσεων απομονώθηκαν, κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν. Κανένα προϊόν δεν παρουσίασε ομοιότητα με την αλληλουχία του γονιδίου *tra2* της *D. melanogaster* και της *D. virilis*.

Πίνακας 3. Αναμενόμενα μεγέθη προϊόντων αντιδράσεων PCR, χρησιμοποιώντας διαφορετικά ζεύγη εκφυλισμένων εκκινητών, με μήτρα γενωμικό DNA της *D. melanogaster*

Συνδυασμός εκφυλισμένων εκκινητών	Αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος (bp)
F/R	561
F/nested R	460
Nested F1/R	485
Nested F2/R	475
Nested F1/nested R	445
Nested F2/nested R	435

Η αλληλουχία του γονιδίου *tra2* ήταν αποτέλεσμα συνεργασίας με την Καθηγήτρια Αικατερίνη Κομητοπούλου (Πανεπιστήμιο Αθηνών).

5.2 Εισαγωγή δίκλωνου RNA (dsRNA) του *tra2* σε προβλαστοδερμικά έμβρυα *B. oleae*

Με σκοπό να μελετήσουμε τον πιθανά φυλο-προσδιοριστικό ρόλο του γονιδίου *tra2* στο *B. oleae* (*Botra2*), εφαρμόσαμε την τεχνική RNAi. Το τμήμα των 700 bp του γονιδίου *tra2* που χρησιμοποιήθηκε περιλάμβανε το μεγαλύτερο μέρος της κωδικής περιοχής του *Botra2*, δηλαδή μέρος της περιοχής RS1, την περιοχή RRM, τη συνδετική περιοχή και μέρος της περιοχής RS2 (κατατεθειμένη αλληλουχία AJL547623). Προβλαστοδερμικά έμβρυα του δάκου ενέθηκαν με τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του *Botra2* dsRNA, 1.5 µg/µl, 3.0 µg/µl και 3.5 µg/µl. Η συγκέντρωση των 3.5 µg/µl ήταν η υψηλότερη που μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στα πειράματα μικροενέσεων χωρίς να δημιουργηθεί θρόμβωση της βελόνας. Για να δείξουμε ότι οι φαινοτυπικές αλλαγές που παρατηρήθηκαν προήλθαν από τη δράση του δίκλωνου RNA που ενέθηκε και όχι από την διαδικασία των μικρό-ενέσεων στα έμβρυα ή από μη ειδική δράση του δίκλωνου RNA, σχεδιάστηκε ένα πείραμα ελέγχου χρησιμοποιώντας *EGFP* dsRNA σε συγκέντρωση 3.0 µg/µl. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων RNAi συνοψίζονται στους πίνακες 4 και 5. Παρόλο που το ποσοστό επιβίωσης των εμβρύων ήταν χαμηλό, μικρότερο από 10%, σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, συγκρίνεται ικανοποιητικά με αυτό των ενεμένων εμβρύων με *EGFP* dsRNA. Από το παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η θνησιμότητα που παρατηρήθηκε δεν οφειλόταν στο *tra2* dsRNA.

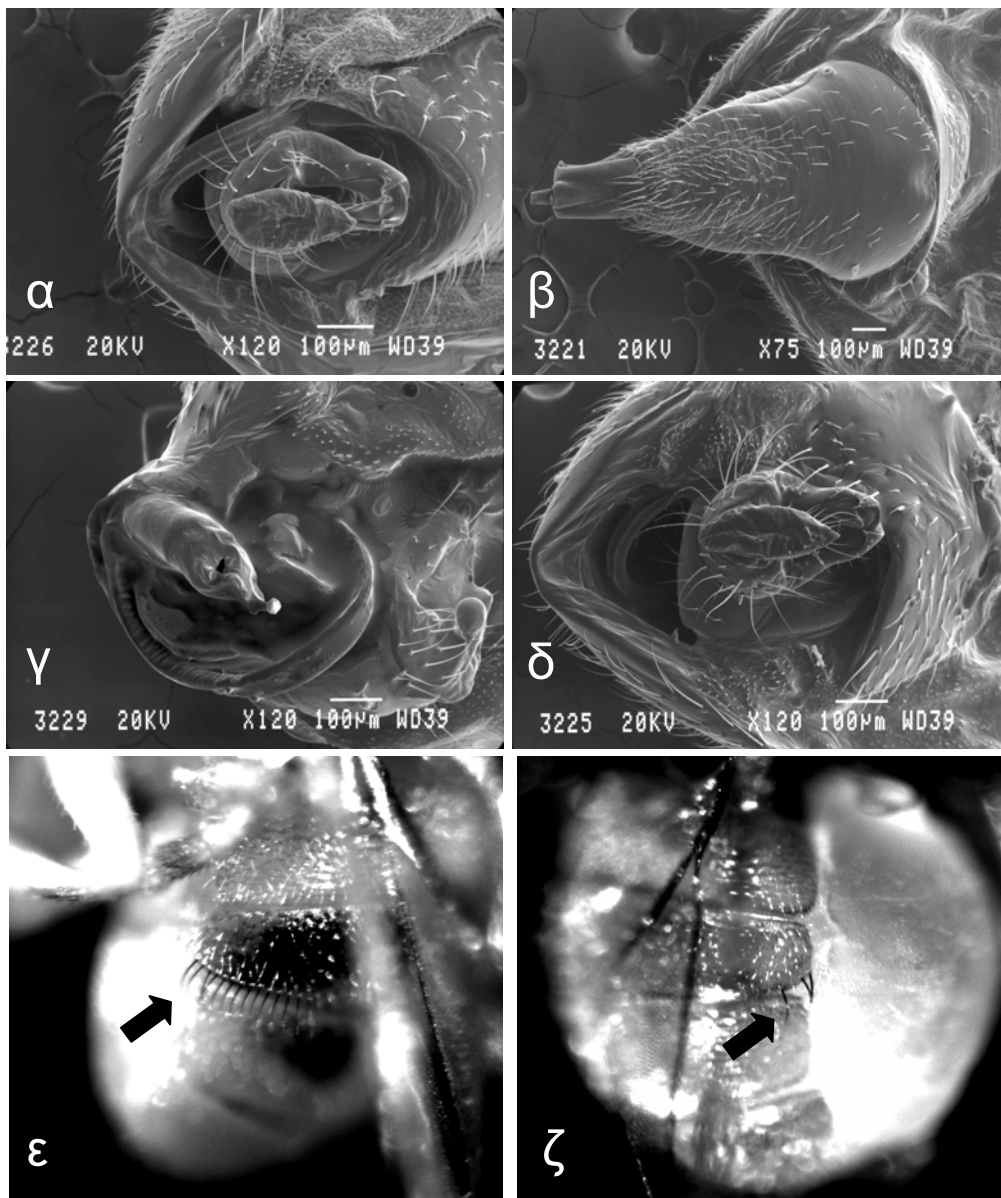
Η ένεση *Botra2* dsRNA προκάλεσε αύξηση του ποσοστού αρσενικών, με ταυτόχρονη μείωση των θηλυκών, ενώ υπήρξε και ένα μέρος των ενηλίκων που χαρακτηρίστηκε ως ερμαφρόδιτο. Το αποτέλεσμα αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το γονίδιο *Botra2* είναι απαραίτητο για τη διαφοροποίηση του θηλυκού φύλου στο *B. oleae*. Τα ερμαφρόδιτα χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν δύσμορφα γεννητικά όργανα και απουσία ή αλλαγή (στον αριθμό ή στη δομή) των δεκαέξι ιδιαίτερων τριχιδίων ανάμεσα στο 3^ο και 4^ο μεταμερές του πάνω μέρους της κοιλίας των αρσενικών ενηλίκων του δάκου. Παραδείγματα ερμαφρόδιτων ατόμων φαίνονται στην Εικόνα 10, σε αντιπαράθεση με ενεμένα έμβρυα που παρουσίασαν φυσιολογικά πρωτογενή και δευτερογενή αρσενικά χαρακτηριστικά.

Πίνακας 4. Σύνοψη των πειραμάτων RNAi σε έμβρυα του *B. oleae*

	Συγκέντρωση δίκλωνου RNA (µg/ml)	Αριθμός εμβρύων που ενέθηκαν	Αριθμός προνομφών	Αριθμός νυμφών	Αριθμός ενηλίκων
<i>tra2</i>	1.5	980	98	52	49
<i>tra2</i>	3.0	1043	235	113	109
<i>tra2</i>	3.5	639	33	18	16
<i>EGFP</i>	3.0	756	37	24	24

Πίνακας 5. Ποσοστά φαινοτύπων των ενεμένων με *Botra2* dsRNA εμβρύων του *B. oleae*

	Συγκέντρωση δίκλωνου RNA (µg/ml)	Συνολικός αριθμός εντόμων	Αρσενικός φαινότυπος	Θηλυκός φαινότυπος	Ερμαφρόδιτα
<i>tra2</i>	1.5	49	23 (47%)	20 (41%)	6 (12%)
<i>tra2</i>	3.0	109	63 (58%)	32 (29%)	14 (13%)
<i>tra2</i>	3.5	16	11 (69%)	3 (19%)	2 (12%)
<i>EGFP</i>	3.0	24	13 (54%)	11 (46%)	0

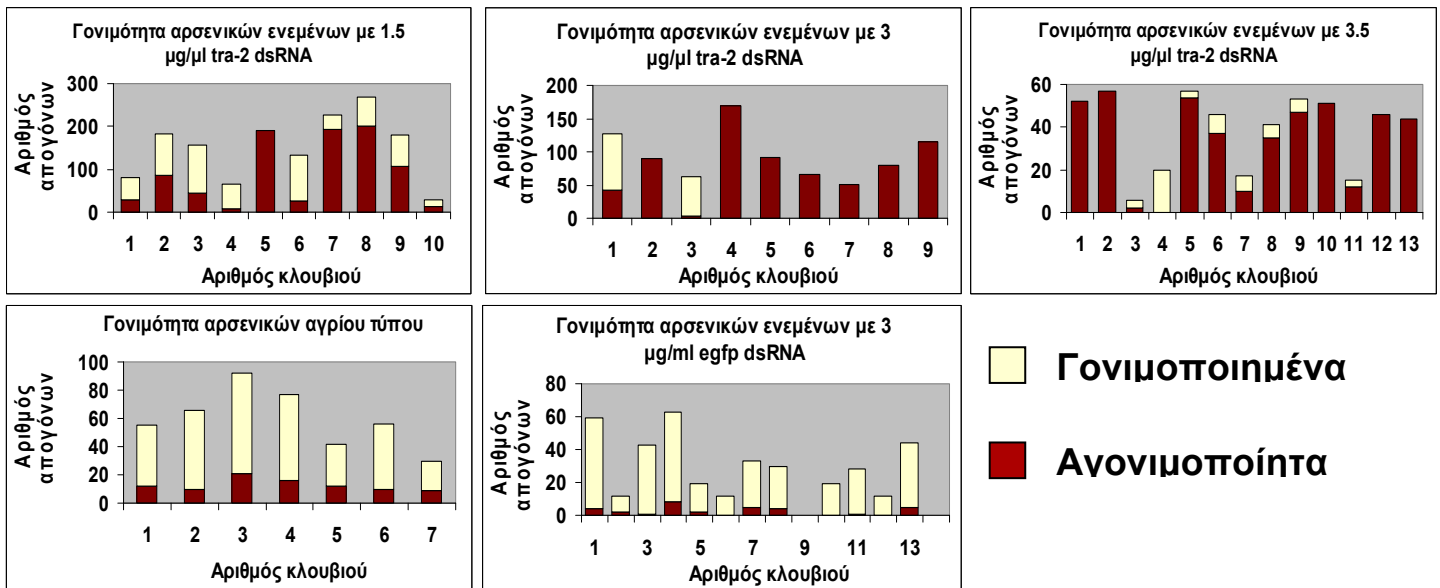


Εικόνα 10. Φυλετικά πρωτογενή και δευτερογενή χαρακτηριστικά του δάκου της ελιάς. **α**, εξωτερικά γεννητικά όργανα αρσενικού εντόμου αγρίου τύπου. **β**, εξωτερικά γεννητικά όργανα θηλυκού εντόμου αγρίου τύπου. **γ**, δύσμορφη γεννητική περιοχή ερμαφρόδιτου ατόμου ενεμένου με *Botra2* dsRNA. **δ**, φυσιολογική (αρσενικά) γεννητική περιοχή ερμαφρόδιτου ατόμου ενεμένου με *Botra2* dsRNA. Αμφότερα τα άτομα **β** και **δ** δεν εμφανίζουν τα τριχίδια ανάμεσα στο 3^ο και 4^ο μεταμερές του πάνω μέρους της κοιλίας, χαρακτηριστικό των αρσενικών ενήλικων του δάκου, και επομένως χαρακτηρίζονται ως ερμαφρόδιτα. **ε** και **ζ**, τα χαρακτηριστικά στα αρσενικά ενήλικα του δάκου τριχίδια ανάμεσα στο 3^ο και 4^ο μεταμερές σε έντομο αγρίου τύπου και ερμαφρόδιτο άτομο ενεμένο με *Botra2* dsRNA, αντίστοιχα.

5.3 Αποτίμηση της γονιμότητας των εμβρύων που ενέθηκαν με *tra2* dsRNA

Γνωρίζοντας από τη βιβλιογραφία ότι αρσενικές XY μύγες της *Drosophila*, ομόζυγες σε μετάλλαξη του γονιδίου *tra2*, ήταν στείρες, θελήσαμε να ελέγξουμε αν η καταστολή του γονιδίου *tra2* στο δάκο προξενεί παρόμοιο φαινότυπο. Κινούμενοι προς αυτήν την κατεύθυνση, ένας αριθμός τυχαία επιλεγμένων, φαινοτυπικά αρσενικών και ερμαφρόδιτων ατόμων χρησιμοποιήθηκε για την εξακρίβωση της γονιμότητας των ενεμένων εμβρύων με *tra2* dsRNA. Τριάντα-δύο κλουβιά στήθηκαν, που το καθένα περιείχε ένα ενεμένο φαινοτυπικά αρσενικό ή ερμαφρόδιτο άτομο και ένα θηλυκό αγρίου τύπου (Εικ. 11). Θηλυκά έντομα ενεμένα με *tra2* dsRNA επίσης υποβλήθηκαν σε πειράματα γονιμότητας σε αναλογία ένα προς ένα (ένα ενεμένο θηλυκό προς ένα αρσενικό αγρίου τύπου). Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά άτομα ενεμένα με *egfp* dsRNA και μη-ενεμένα άτομα. Τρεις συλλογές αυγών πραγματοποιήθηκαν για κάθε διασταύρωση κατόπιν απόκτησης σεξουαλικής ωριμότητας των εντόμων, περίπου τρεις μέρες μετά την εκκόλαψη τους. Τα επίπεδα γονιμότητας του κάθε εντόμου καθορίστηκαν από το ποσοστό των γονιμοποιημένων αυγών προς το συνολικό αριθμό των αυγών της εκάστοτε διασταύρωσης. Ο έλεγχος της γονιμότητας γίνονταν 48 ώρες μετά την κάθε συλλογή. Με αυτό τον τρόπο, διακρίνονταν καθαρά τα γονιμοποιημένα αυγά από τα αγονιμοποίητα, ενώ δεν υπήρχε κίνδυνος στατιστικού λάθους, εφόσον οι προνύμφες δεν είχαν προλάβει να εκκολαφθούν.

Από τα φαινοτυπικά αρσενικά άτομα ενεμένα με 1.5 μg/μl *tra2* dsRNA, ένα δεν έδωσε καθόλου απογόνους, τρία έδειξαν μειωμένη γονιμότητα σε σχέση με τις τιμές των αρσενικών αγρίου τύπου και των αρσενικών ενεμένων με *egfp* dsRNA, και έξι έδειξαν σχεδόν φυσιολογικά επίπεδα γονιμότητας. Από τις φαινοτυπικά αρσενικές μύγες που ενέθηκαν με 3.0 μg/μl *tra2* dsRNA, τέσσερις δεν έδωσαν καθόλου απογόνους και ένα μόνο άτομο επέδειξε φυσιολογικά επίπεδα γονιμότητας. Τελικά, από τις φαινοτυπικά αρσενικές μύγες ενεμένες με 3.5 μg/μl *tra2* dsRNA, τέσσερις δεν έδωσαν καθόλου απογόνους, έξι έδειξαν εμφανώς μειωμένη γονιμότητα, ενώ μόνο δύο εμφανίστηκαν να έχουν φυσιολογικά επίπεδα γονιμότητας. Όλα τα ερμαφρόδιτα άτομα, ενεμένα και με τις τρεις συγκεντρώσεις *tra2* dsRNA, που συμμετείχαν στα πειράματα γονιμότητας, βρέθηκαν να είναι στείρα. Τα κλουβιά που περιείχαν ερμαφρόδιτα έντομα σημειώνονται στην Εικόνα 11.



Εικόνα 11. Επίπεδα γονιμότητας *tra2* και *EGFP* dsRNA ενεμένων αρσενικών και αρσενικών αγρίου τύπου. Φαινοτυπικά αρσενικά άτομα ενεμένα με τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις *tra2* dsRNA, αρσενικά άτομα ενεμένα με *egfp* dsRNA σε συγκέντρωση 3.0 µg/ml, και αρσενικά άτομα αγρίου τύπου διασταυρώθηκαν ξεχωριστά με ένα θηλυκό αγρίου τύπου. Οι κολώνες αντιπροσωπεύουν τον ολικό αριθμό απογόνων που έδωσε η κάθε διασταύρωση. Το μαύρο χρώμα αντιστοιχεί σε μη γονιμοποιημένα αυγά, ενώ το άσπρο σε γονιμοποιημένα. Στη συγκέντρωση 1.5 µg/ml *tra2* dsRNA δεν υπήρχαν ερμαφρόδιτα άτομα. Στη συγκέντρωση 3.0 µg/ml *tra2* dsRNA, τα κλουβιά νούμερο 2, 4, 8, και 9 περιλάμβαναν ερμαφρόδιτο πληθυσμό όπως και το νούμερο 2 στη συγκέντρωση 3.5 µg/ml *tra2* dsRNA.

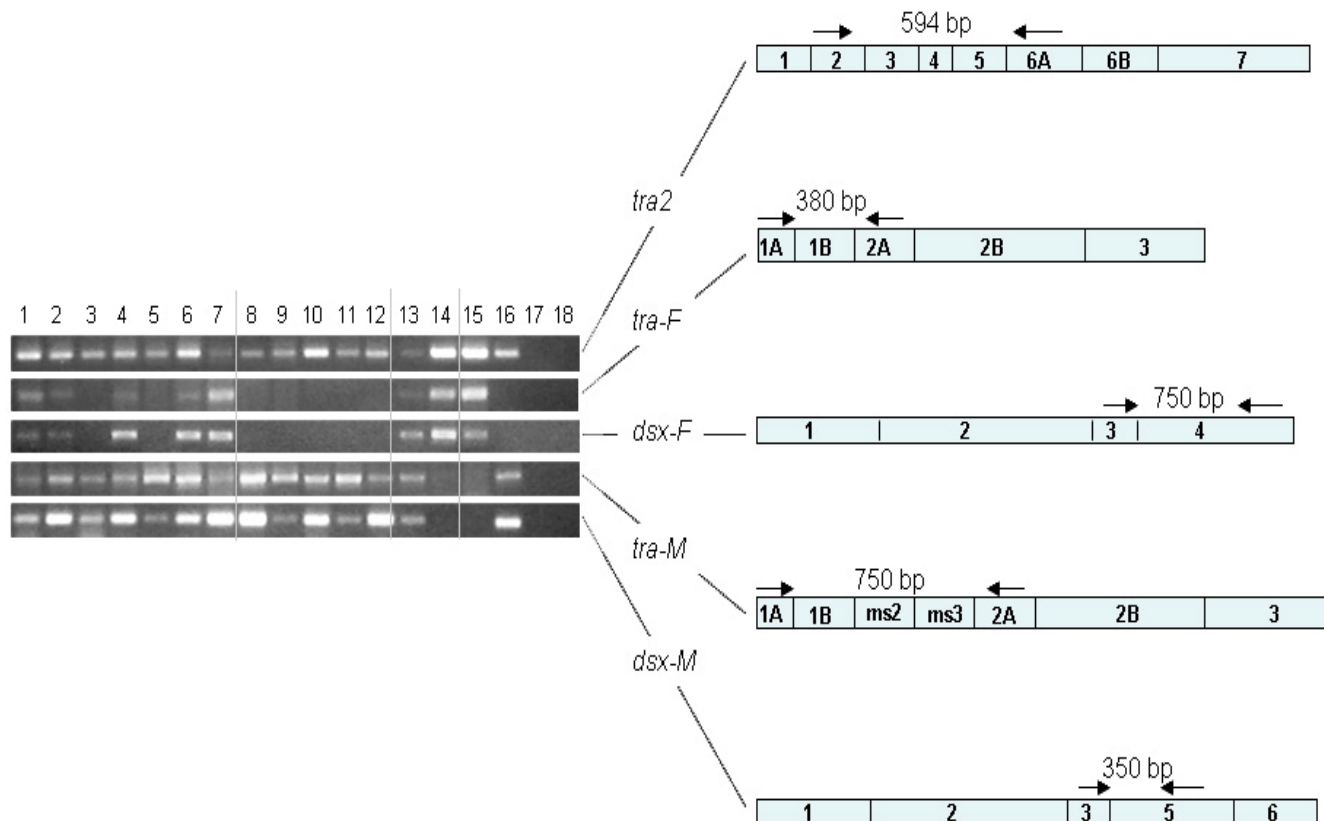
Τα αρσενικά *egfp*-ενεμένα άτομα έδειξαν φυσιολογικές τιμές γονιμότητας συγκρινόμενα με τα αρσενικά αγρίου τύπου. Επίσης, όλα τα θηλυκά έντομα ενεμένα και με τις τρεις συγκεντρώσεις *tra2* dsRNA, εμφάνισαν φυσιολογικά επίπεδα γονιμότητας. Τα έμβρυα που αποκτήθηκαν από τις διασταυρώσεις των φαινοτυπικά αρσενικών ατόμων, αφέθηκαν να αναπτυχθούν φυσιολογικά, με σκοπό να διαπιστωθεί η ύπαρξη του Y χρωμοσώματος. Όλοι οι απόγονοι αυτών των διασταυρώσεων είχαν την φυσιολογική, ένα προς ένα αναλογία αρσενικών προς θηλυκών ατόμων. Από το παραπάνω συμπεραίνουμε ότι όλα τα αρσενικά άτομα που έδωσαν απογόνους διέθεταν τον καρύοτυπο XY, επομένως ήταν φαινοτυπικά και γενετικά αρσενικά. Στην αντίθετη περίπτωση, όλοι οι απόγονοι θα έπρεπε να ήταν θηλυκού φύλου.

5.4 Σύνθεση cDNA και ανάλυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR) των ενεμένων με δίκλωνο RNA *tra2* εμβρύων

Προς έρευνα της έκφρασης του γονιδίου *tra2* στα ενεμένα φαινοτυπικά αρσενικά, θηλυκά και ερμαφρόδιτα άτομα, μετά την καταστολή του γονιδίου με τη μέθοδο RNAi, καθώς και για τον καθορισμό του προτύπου συρραφής των γονιδίων *tra* και *dsx* σε συνάρτηση με την καταστολή του γονιδίου *tra2* σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, αναλύσαμε ξεχωριστά δείγματα ενεμένων εντόμων με τη μέθοδο της

αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές *tra2F-tra2R* για το γονίδιο *tra2*, *traF-traR* για το γονίδιο *tra* και *dsxex3*, *dsxf*, *dsxm* για το γονίδιο *dsx* (για τον εντοπισμό των εκκινητών στα μετάγραφα RNA των παραπάνω γονιδίων του *B. oleae*, βλέπε Εικόνα και Υλικά & Μέθοδοι). Η επιλογή των εκκινητών *dsx* και *tra* έγινε με βάση τα διαφορετικά πρότυπα αρσενικών και θηλυκών μεταγραφών των γονιδίων, κυρίως λόγω των εσονίων που περιλαμβάνονται στις mRNA αλληλουχίες των αρσενικών. Αρσενικά και θηλυκά άτομα αγρίου τύπου χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου.

Όλες οι μύγες που αναλύθηκαν με τους εκκινητές *tra2F-tra2R* έδειξαν τη ζώνη μεγέθους 478 bp, χαρακτηριστική του μετάγραφου RNA του γονιδίου *tra2*. Πέντε από τα επτά ενεμένα, στείρα, φαινοτυπικά αρσενικά άτομα καθώς και το ερμαφρόδιτο δείγμα, έχουν αμφοτερο αρσενικό και θηλυκό πρότυπο συρραφής των γονιδίων *tra* και *dsx*. Εν τούτοις, τέσσερις από τις τέσσερις ενεμένες αρσενικές και γόνιμες μύγες, έχουν μόνο αρσενικό πρότυπο συρραφής των γονιδίων *tra* και *dsx*. Το ενεμένο θηλυκό έντομο παρουσίασε θηλυκό πρότυπο συρραφής των ίδιων γονιδίων, όπως αναμενότανε. Τα άτομα αγρίου τύπου επέδειξαν τις αναμενόμενες ζώνες σε όλα τα γονίδια που μελετήθηκαν, ενώ τα δείγματα χωρίς την αντίστροφη μεταγραφάση δεν έδωσαν καθόλου ζώνες (Εικ. 12).



Εικόνα 12. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR) των ενεμένων εμβρύων με δίκλωνο RNA *tra2*. Ολικό RNA απομονώθηκε από ξεχωριστά άτομα ενεμένα με δίκλωνο RNA *tra2*. Μετά τη σύνθεση του cDNA, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ανάλυση με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που αναγράφονται στην εικόνα. Ο αριθμός των δειγμάτων σημειώνεται στο πάνω μέρος της εικόνας. **Δείγματα 1-7:** ενεμένα αρσενικά, στείρα άτομα. **Δείγματα 8-12:** ενεμένα αρσενικά γόνιμα άτομα. **Δείγμα 13:** ενεμένο ερμαφρόδιτο άτομο (απουσία των χαρακτηριστικών τριχιδίων). **Δείγμα 14:** ενεμένο θηλυκό άτομο. **Δείγματα 15-16:** θηλυκό και αρσενικό αγρίου τύπου, αντίστοιχα. **Δείγματα 17-18:** θηλυκό και αρσενικό αγρίου τύπου, αντίστοιχα, χωρίς το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης.

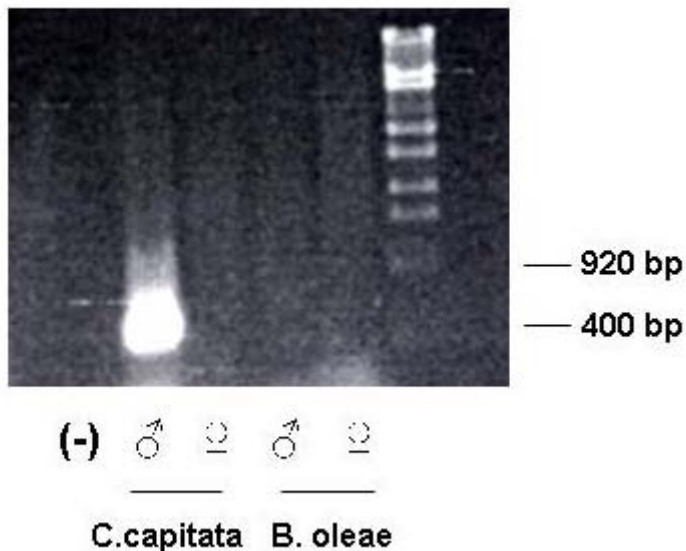
5.5 Ανάλυση με πιθανά φυλο-καθορισμένα γονίδια για τον μοριακό προσδιορισμό του φύλου στα ενεμένα άτομα με δίκλωνο RNA *tra2*

Ο μοριακός φυλο-προσδιορισμός των ατόμων που ενέθηκαν με dsRNA *tra2* θα συνέβαλε σημαντικά στη διαμόρφωση ενός μοντέλου φύλο-καθορισμού στο *B. oleae*. Σε μια πρώτη προσπάθεια εντοπισμού εργαλείων για τη μοριακή ανάλυση του καρύτυπου των δειγμάτων μας, σχεδιάστηκαν εκκινητές με βάση επαναλαμβανόμενα τμήματα εξειδικευμένων αλληλουχιών στο χρωμόσωμα Y της *C. capitata*, έντομο συγγενικό με το *B. oleae*. Ακολούθησε ανάλυση με PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα γενωμικό DNA αρσενικών ατόμων της μύγας της Μεσογείου και του δάκου της ελιάς. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

Y114-F 5' TGCCAAAGCACTATCTTCGGAAG 3'

Y114-R 5' GACGGTAAGTGTTCATTCGTTACGG 3'

Η ανάλυση με PCR πραγματοποιήθηκε κάτω από έναν αριθμό διαφορετικών συνθηκών και θερμοκρασιών. Ενώ σε όλες τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν, η ζώνη μεγέθους περίπου 300 bp ήταν εμφανής στα δείγματα της *C. capitata*, σε καμία από αυτές τις συνθήκες δεν προέκυψε η αντίστοιχη ζώνη στα δείγματα του *B. oleae*. Ένα δείγμα αυτής της προσπάθειας απεικονίζεται στην Εικ. 13. Για τη συγκεκριμένη ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συνθήκες: MgCl₂: 1.5 mM, dNTPs: 2mM, Primer con.: 25 pmol/μl, Tm: 58°C, κύκλοι: 30.

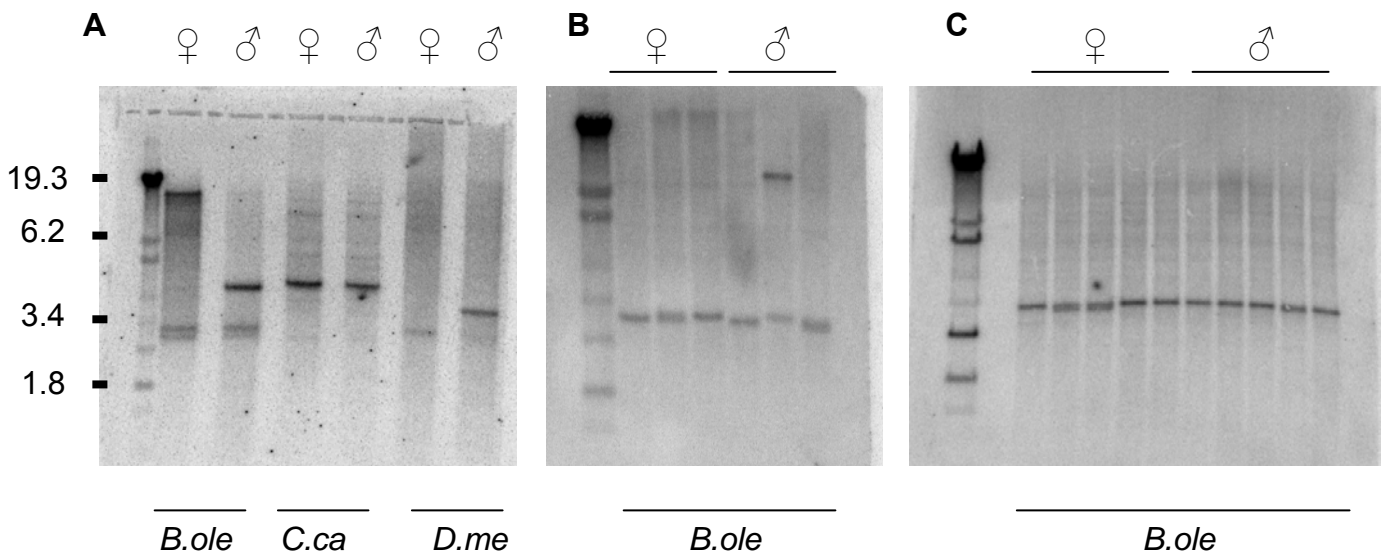


Εικόνα 13. Ανάλυση κατά PCR σε αρσενικά και θηλυκά άτομα της μύγας της Μεσογείου και του δάκου της ελιάς, χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικούς για ένα τμήμα του Y χρωμοσώματος της *C. capitata*.

Γνωρίζοντας ότι το χρωμόσωμα Y της *C. capitata* είναι κυρίως ετεροχρωματικό και περιλαμβάνει ως επί το πλείστον απλές επαναληπτικές αλληλουχίες, γεγονός που καθιστά δύσκολη την εύρεση μιας περιοχής με πιθανή ομολογία σε συγγενικά είδη όπως ο δάκος, αποφασίσαμε να προσεγγίσουμε το θέμα με το γονίδιο *Dhc-Yh3* της *D. melanogaster*, θεωρώντας μεγαλύτερη την πιθανότητα να υπάρχει κάποιο αντίστοιχο γονίδιο στο χρωμόσωμα Y του *B. oleae*. Το συγκεκριμένο γονίδιο εντοπίστηκε στην περιοχή h3 του χρωμοσώματος Y της *D. melanogaster* και ειδικότερα στην περιοχή *kl-5*, η οποία θεωρείται απαραίτητη για τη γονιμότητα των αρσενικών (Gepner & Hays, 1993).

Ακολούθησε ανάλυση κατά Southern σε 5 μg γενωμικού DNA από αρσενικά και θηλυκά άτομα της *D. melanogaster*, της *C. capitata* και του *B. oleae*, τα οποία είχαν προηγουμένως επωαστεί με το περιοριστικό ένζυμο *EcoRI*. Τα δείγματα υβριδοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της νύχτας, σε θερμοκρασία 60 °C, με ανιχνευτή που αντιστοιχεί σε μια απομονωμένη, συντηρημένη περιοχή του γονιδίου, μεγέθους περίπου 350 bp. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 14 (πλαίσιο A), το γονίδιο ανιχνευτής υβριδοποιεί ζώνες διαφορετικού μεγέθους σε αρσενικά και θηλυκά άτομα της *D. melanogaster* και του *B. oleae*, ενώ υβριδοποιεί τις ίδιες ζώνες σε αρσενικά και θηλυκά άτομα της *C. capitata*. Για περαιτέρω επαλήθευση των παραπάνω αποτελεσμάτων, 5 μg γενωμικού DNA μοναδικών αρσενικών και θηλυκών εντόμων

B. oleae, μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *Bgl*III, υβριδοποιήθηκαν ολονύχτια, σε θερμοκρασία 60 °C, με το ίδιο γονίδιο ανιχνευτή. Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης επισημαίνουν μία ζώνη ίδιου μεγέθους σε αρσενικά και θηλυκά, με εξαίρεση το δεύτερο από τα αριστερά αρσενικό δείγμα (Εικ. 14, πλαίσιο Β), σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της προηγούμενης ανάλυσης. Για τελική επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, γενωμικό DNA απομονώθηκε από ξεχωριστές αρσενικές και θηλυκές μύγες, επώαστηκε με το ένζυμο *Eco*RI και υβριδοποιήθηκε με το ίδιο γονίδιο ανιχνευτή, κατά τη διάρκεια της νύχτας σε θερμοκρασία 60 °C. Από την έκβαση των τελευταίων αποτελεσμάτων (Εικ. 14, πλαίσιο C), μας έγινε αντιληπτό ότι το γονίδιο ανιχνευτής δεν υβριδοποιεί διαφορετικές ζώνες στο γένωμα αρσενικών και θηλυκών ατόμων του δάκου.



Εικόνα 14. Ανάλυση κατά Southern γενωμικού DNA αρσενικών και θηλυκών εντόμων *B. oleae* χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή ένα μέρος του γονιδίου *Dhc-Yh3* της *D. melanogaster*. Τα δείγματα γενωμικού DNA επώαστηκαν με τα περιοριστικά ένζυμα *Eco*RI ή *Bgl*III, κατά τη διάρκεια της νύχτας σε θερμοκρασία 60 °C. Στο κάτω μέρος της Εικόνας αναγράφονται τα είδη των εντόμων που χρησιμοποιήθηκαν και στο πάνω μέρος το φύλο του εντόμου του εκάστοτε δείγματος.

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1 Η πρωτεΐνη TRA2 του *B. oleae* (BoTRA2) είναι απαραίτητη για την ομαλή ανάπτυξη των θηλυκών ατόμων

Το γονίδιο *tra2* έχει μελετηθεί σε βάθος στα Δροσοφιλοειδή, *D. melanogaster* και *D. virilis*, όπου έχει διακριτές λειτουργίες στο σώμα και στην αρσενική γαμετική σειρά. Στο σώμα, ενεργεί συνεργατικά με το γονίδιο *tra* για τη ρύθμιση του φυλο-ειδικού ματίσματος του γονιδίου *dsx* (Nagoshi *et al.*, 1988), ενώ στην αρσενική γαμετική σειρά, είναι απαραίτητο για τη φυσιολογική σπερματογένεση (Belote and Baker, 1983). Ο ρόλος του πρόσφατα χαρακτηρισμένου γονιδίου *tra2* της οικιακής μύγας *Musca domestica*, βρίσκεται σε συμφωνία με τον φυλο-καθοριστικό ρόλο του γονιδίου στο σώμα. Από την άλλη, το γονίδιο *Mdtra2* δεν δείχνει να έχει ανάλογη λειτουργία στην αρσενική γαμετική σειρά της οικιακής μύγας, από τη στιγμή που όλες οι φαινοτυπικά αρσενικές μύγες XX και ακόμα το 62% των ερμαφρόδιτων με αρσενικά γεννητικά όργανα, έδωσαν απογόνους (Burghardt *et al.*, 2005).

Η παρουσία των θέσεων δεσμού TRA/TRA2 στο εξώνιο 4 (συγκεκριμένο στα θηλυκά) του γονιδίου *Bodsex* (Lagos *et al.*, 2005), υποστηρίζει έντονα το φυλο-ειδικό πρότυπο συρραφής του πρώιμου μετάγραφου του *Bodsex*, μέσω επιλογής του εξωνίου 4, με μηχανισμό παρόμοιο με αυτόν της *Drosophila*. Επιπλέον, τα δομικά χαρακτηριστικά του *Botra2* είναι συνεπή με μια τέτοια λειτουργία. Πιο συγκεκριμένα, το *Botra2* περιέχει μια πολύ καλά συντηρημένη περιοχή RRM για δεσμό με αλληλουχίες RNA και δύο πεδία RS για αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες που περιέχουν πεδία RS (προσωπική επικοινωνία με την καθηγήτρια Κομητοπούλου).

Τα αποτελέσματα RNAi που παρουσιάζονται στην παρούσα διατριβή, βρίσκονται σε συμφωνία με το ρόλο του γονιδίου *tra2* στην ανάπτυξη των θηλυκών ατόμων του δάκου, όπως στη *Drosophila* και στη *Musca*. Από τα ενεμένα έμβρυα, ένα μεγάλο ποσοστό παρουσίασε αρσενικό φαινότυπο, κάποια αναπτύχθηκαν ως θηλυκά άτομα, ενώ υπήρχαν και άτομα με ερμαφρόδιτα χαρακτηριστικά, έναντι των εμβρύων αγρίου τύπου και αυτών ενεμένων με *egfp dsRNA*, που αναπτύχθηκαν με τη φυσιολογική αναλογία 1:1 και δεν εμφάνισαν ερμαφρόδιτα χαρακτηριστικά. Επίσης είναι φανερό από τα αποτελέσματα, ότι αυξανόμενη συγκέντρωση του δίκλωνου μορίου RNA του γονιδίου *tra2*, προκαλεί αυξανόμενη αρενοποίηση των ενεμένων εντόμων.

Είναι αδύνατο στη δική μας περίπτωση να καθορίσουμε την αναλογία των XX προς τα XY φαινοτυπικά αρσενικά, λόγω της έλλειψης ενός κατάλληλου μοριακού στοιχείου διάκρισης, επομένως είναι αδύνατο να αναφέρουμε ποιο ποσοστό του φαινοτυπικά αρσενικού πληθυσμού ανήκει στον ένα ή στον άλλο καρυότυπο. Πάρα ταύτα, οι απόγονοι όλων των γόνιμων αρσενικών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα γονιμότητας, έδειξαν τη φυσιολογική αναλογία θηλυκών:αρσενικών, 1:1, ένδειξη της παρουσίας του Y χρωμοσώματος. Επιπλέον, η ανάλυση RT-PCR από τα περισσότερα στείρα φαινοτυπικά αρσενικά που ελέγχθηκαν, έδειξε ένα επιπρόσθετο μετάγραφο θηλυκού πρότυπου του γονιδίου *dsx*, ενδεικτικό θηλυκού καρυότυπου.

Η λειτουργία της πρωτεΐνης TRA2 στη φυλο-ειδική επεξεργασία του πρώιμου μετάγραφου του γονιδίου *dsx*, επιβεβαιώθηκε παραπέρα με την ανάλυση RT-PCR σε ατομικά δείγματα cDNA, από 10-ημερών ενεμένες μύγες. Όλα τα φαινοτυπικά αρσενικά που αναλύθηκαν, όπως και η ερμαφρόδιτη μύγα, έδειξαν το αρσενικό μετάγραφο του γονιδίου *dsx*, σε συμφωνία με το φαινότυπο τους. Αυτά τα αρσενικά μετάγραφα πρέπει να προήλθαν από την αποτυχία της αξιοποίησης της θέσης συρραφής στο εξώνιο 4, ειδικό για τη θηλυκή ανάπτυξη των εντόμων. Το παραπάνω

αποδίδεται στην επίδραση του *Botra2* dsRNA. Το γεγονός ότι πέντε από τα επτά ενεμένα στείρα αρσενικά και το ερμαφρόδιτο άτομο εμφανίζουν ένα επιπλέον μετάγραφο, συγκεκριμένο στα θηλυκά άτομα, συμφωνεί με τα αποτελέσματα των Burghardt *et al.* (2005). Τα επίπεδα του μετάγραφου του γονιδίου *tra2* είναι φυσιολογικά σε όλες τις μύγες που αναλύθηκαν, όπως θα περίμενε κανείς σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο.

Οι Pane *et al.* (2002) έδειξαν ότι το γονίδιο *Cctra* φαίνεται να επάγει την παραγωγική επεξεργασία του δικού του mRNA, και επομένως εγκαινιάζει έναν αυτο-ρυθμιζόμενο μηχανισμό για τη συνεχή παραγωγή της ολοκληρωμένης, λειτουργικής πρωτεΐνης. Οι ερευνητές υποστηρίζουν ότι ο παραπάνω μηχανισμός επιτυγχάνεται με τη διαμεσολάβηση του συμπλέγματος TRA/TRA2. Παρομοίως, οι Burghardt *et al.* (2005) συμπέραναν ότι ο παράγοντας F, ο οποίος λειτουργικά αντιστοιχεί στο *Cctra*, ρυθμίζεται, σε μεταγραφικό επίπεδο, από το ίδιο το προϊόν του και το *Mdtra2*. Οι Lagos *et al.* (δεκτό προς δημοσίευση στο *Insect Molecular Biology*), σε ανάλογα πειράματα RNAi, όσον αφορά το γονίδιο *tra* του *B. oleae*, προτείνουν ένα παρόμοιο μοντέλο για την αυτό-ρύθμιση του γονιδίου *tra*. Προκειμένου να ελέγξουμε αν η μειωμένη δραστηριότητα του γονιδίου *tra2* φέρει κάποιο αποτέλεσμα στο φυλο-ειδικό συρραφή του γονιδίου *tra*, αναλύσαμε τις ενεμένες με *tra2* dsRNA μύγες, χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο *tra*. Τα έντομα αγρίου τύπου παρουσιάζουν ζώνες διαφορετικού μεγέθους ανάλογα με το φύλο τους. Όλα τα γόνιμα αρσενικά που αναλύθηκαν, έδειξαν το μεγαλύτερο μετάγραφο, χαρακτηριστικό των αρσενικών, το οποίο περιλαμβάνει τα δύο επιπλέον εξόνια ms2 και ms3 (περιέχουν κωδικόνια λήξης για την πρόωρη διακοπή της μετάφρασης των συγκεκριμένων μεταγράφων). Η ενεμένη θηλυκή μύγα που αναλύθηκε, έδειξε το μικρότερο θηλυκό μετάγραφο, όπως το δείγμα ελέγχου αγρίου τύπου. Πέντε από τα επτά στείρα φαινοτυπικά αρσενικά μαζί με την ερμαφρόδιτη μύγα, επιβεβαίωσαν αμφότερο το θηλυκό και το αρσενικό μετάγραφο του γονιδίου *tra*, σε πλήρη συμφωνία με το αρσενικό και θηλυκό μετάγραφο του γονιδίου *dsx*. Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη TRA2 συμμετέχει στην αυτό-ρύθμιση του γονιδίου *tra*, διαφορετικά αυτές οι μύγες θα παρουσίαζαν ένα από τα δύο μετάγραφα, αλλά όχι και τα δύο.

6.2 Η πρωτεΐνη TRA2 του *B. oleae* (BoTRA2) είναι απαραίτητη για τη γονιμότητα των αρσενικών εντόμων

Η παρουσία των δύο αρσενικών μεταγράφων του *Botra2* (προσωπική επικοινωνία με την καθηγήτρια Κομητοπούλου) υπαινίσσεται ένα ρόλο αυτού του γονιδίου στην αρσενική γαμετική σειρά, ανάλογο με αυτό του γονιδίου *tra2* της *Drosophila*.

Για να ελέγξουμε την παραπάνω υπόθεση, τριάντα-δύο τυχαία επιλεγμένα φαινοτυπικά αρσενικά άτομα, διασταυρώθηκαν με θηλυκά αγρίου τύπου. Συνολικά, εννέα άτομα έδειξαν φυσιολογικό επίπεδο γονιμότητας, εννέα, πολύ χαμηλό επίπεδο και δεκατρία άτομα επέδειξαν ολική στειρότητα. Από τα αποτελέσματα είναι επίσης φανερό, ότι η αυξημένη συγκέντρωση του *tra2* dsRNA που ενέθηκε, όχι μόνο προκάλεσε αυξημένη αρρενοποίηση, αλλά και μείωση των επιπέδων γονιμότητας. Όλα τα ερμαφρόδιτα άτομα που εξετάστηκαν, δεν έδωσαν απογόνους. Από την άλλη, οι απόγονοι των ενεμένων φαινοτυπικά αρσενικών ατόμων που έδωσαν απογόνους, εμφάνισαν τη φυσιολογική ένα προς ένα αναλογία αρσενικών προς θηλυκών εντόμων, γεγονός που αποδεικνύει την ύπαρξη του Y χρωμοσώματος στα ενεμένα, γόνιμα φαινοτυπικά αρσενικά άτομα. Το παραπάνω αποτέλεσμα ήταν εμφανές ακόμα και στα ενεμένα φαινοτυπικά αρσενικά άτομα με ιδιαίτερα μειωμένη γονιμότητα. Το

γεγονός ότι τα αρσενικά *egfp*-ενεμένα άτομα έδειξαν φυσιολογικές τιμές γονιμότητας συγκρινόμενα με τα αρσενικά αγρίου τύπου, δηλώνει ότι τα επίπεδα γονιμότητας που μετρήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα προήλθαν από τη δράση του δίκλωνου RNA *tra2* που ενέθηκε και δεν ήταν αποτέλεσμα των μικροενέσεων ή της μη ειδικής δράσης του δίκλωνου RNA.

Επιπλέον, τα αποτελέσματα των πειραμάτων RT-PCR συμφωνούν με τα αποτελέσματα των πειραμάτων γονιμότητας. Πιο συγκεκριμένα, όλα τα ενεμένα γόνιμα φαινοτυπικά αρσενικά άτομα επέδειξαν τον αρσενικό τρόπο συρραφής των γονιδίων *tra* και *dsx*, ενώ πέντε από τα επτά στείρα ενεμένα φαινοτυπικά αρσενικά άτομα που αναλύθηκαν, επέδειξαν και τον αρσενικό και τον θηλυκό τρόπο συρραφής των ιδίων γονιδίων. Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με τα πρότυπα συρραφής των γονιδίων *tra* και *dsx* του ερμαφρόδιτου ατόμου που αναλύθηκε, καθώς και με το γεγονός ότι όλα τα ερμαφρόδιτα άτομα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα γονιμότητας εμφάνισαν ολική στειρότητα, υποδεικνύουν ότι η αρρενοποίηση των ενεμένων με δίκλωνο RNA *tra2* καρυοτυπικά θηλυκών εμβρύων του δάκου, ολική ή μερική, συνοδεύεται από στειρότητα στα συγκεκριμένα άτομα.

Όσον αφορά τα δύο φαινοτυπικά αρσενικά και στείρα άτομα που αναλύθηκαν με τη μέθοδο RT-PCR και έδειξαν τον αρσενικό τρόπο συρραφής των γονιδίων *tra* και *dsx*, πιθανώς πρόκειται για αρσενικά καρυοτυπικά άτομα όπου η ποσότητα δίκλωνου RNA *tra2* που ενέθηκε ήταν επαρκής για ολική καταστολή της γονιμότητας των εντόμων.

Σύμφωνα με τους Belote & Baker (1983) η καταστολή του γονιδίου *tra2* στη *Drosophila* προκαλεί μια ατέλεια στην επιμήκυνση της κεφαλής του σπέρματος, η οποία οδηγεί σε πυκνές και στρογγυλές κεφαλές, έναντι των μακριών και στενών κεφαλών των αρσενικών αγρίου τύπου. Δυνητικά, το γονίδιο *Botra2* θα μπορούσε να ενεργεί με παρόμοιο τρόπο στη σπερματογένεση του δάκου. Η φυσιολογική γονιμότητα που παρουσίασαν κάποιες από τις ενεμένες αρσενικές μύγες μπορεί να οφείλεται σε μη-ολοκληρωμένη διείσδυση του δίκλωνου RNA που ενέθηκε. Επιπρόσθετα, η παρουσία του γονιδίου *Dmtra2* στη σπερματογένεση, απαιτείται στα τελευταία αναπτυξιακά στάδια της προνύμφης τρίτου σταδίου έως τα πρώτα στάδια νύμφης. Αν όντως, το γονίδιο *Botra2* επηρεάζει τη σπερματογένεση με ανάλογο τρόπο, είναι πιθανό το δίκλωνο RNA που ενέθηκε να έχει υποστεί τμηματική ή και ολοκληρωτική αποικοδόμηση στα αντίστοιχα αναπτυξιακά στάδια του δάκου, δηλαδή, 12-14 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος.

Στην παρούσα μελέτη, έχουμε μελετήσει το φυλο-καθοριστικό ρόλο του γονιδίου *tra2* στο *B. oleae*. Τα αποτελέσματα μας υποδεικνύουν σημαντική ομοιότητα της λειτουργίας του γονιδίου με τα ομόλογα του στη *D. melanogaster*, *D. virilis* και *M. domestica*. Η πρωτεΐνη BoTRA2 φαίνεται να είναι λειτουργικά διατηρημένη όσον αφορά τη ρύθμιση του γονιδίου *Bodsx* και επιπλέον φαίνεται να παίζει ενεργό συνεργατικό ρόλο στην αυτο-ρύθμιση του γονιδίου *Botra*. Εν τούτοις, ο ρόλος του γονιδίου στη σπερματογένεση περιορίζεται στα Δροσοφιλοειδή και στο *B. oleae*, και όχι στη *M. domestica*. Η εκμετάλλευση του γονιδίου *tra2*, συνδυασμένη με τον μετασχηματισμό του δάκου μέσω της τεχνολογίας μετάθεσης μπορεί να εξασφαλίσει ένα ανταγωνιστικό εργαλείο για την εφαρμογή της Τεχνικής Στείρου Εντόμου σε αυτό το είδος.

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ

**Ο ΦΟΡΕΑΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ *Minos*
pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP. ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ
ΤΗΣ *D. melanogaster*. ΠΡΟΣΠΑΘΕΙΕΣ
ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΟΥ *B. oleae*.**

7. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

7.1 Τεχνική Στείρου Εντόμου (SIT)

Η ανάπτυξη μεταφοράς γονιδίων άνοιξε νέες δυνατότητες για τη χρήση της γενετικής μηχανικής σε πολλούς τομείς της βασικής και εφαρμοσμένης βιολογίας. Στο πεδίο της εφαρμοσμένης βιολογίας, σημαντικοί περιορισμοί στη γεωργική παραγωγή καθώς και τα πολλά ζητήματα που σχετίζονται με θέματα υγείας, θεωρήθηκαν «στόχοι» για αυτήν τη νέα τεχνολογία. Σε αμφότερες αυτές τις περιοχές, τα έντομα, είτε ως επιβλαβείς οργανισμοί για την καλλιέργεια, είτε ως φορείς ασθενειών, πάντα αντιπροσωπεύουν τεράστιο κοινωνικό και οικονομικό πρόβλημα παρά τις προσπάθειες εντομολόγων, χημικών και οικολόγων να επινοήσουν νέες μεθόδους ελέγχου, οι οποίες θα αντιμετώπιζαν αποτελεσματικά ένα συγκεκριμένο εντομολογικό ζήτημα χωρίς σοβαρές αρνητικές παρενέργειες. Η θανάτωση των βλαβερών εντόμων με χημικά εντομοκτόνα, υπήρξε η παραδοσιακή προσέγγιση αντιμετώπισης αυτής της απειλής και συνεχίζει να είναι η κύρια γραμμή άμυνας, είτε με άμεση (ψεκασμός), είτε με έμμεση (διαγονιδιακά φυτά που παράγουν έντομο-ειδικές τοξίνες) εφαρμογή. Τα έντομα όμως, πολύ γρήγορα ανέπτυξαν κληρονομήσιμες και σταθερές αλλαγές στο γονιδίωμα τους, με αποτέλεσμα την ατελέσφορη χρήση συγκεκριμένων χημικών ουσιών ή και διαγονιδιακών φυτών.

Διαφορετική προσέγγιση αποτελεί η χρήση άλλων φυσικών οργανισμών ως μέσο βιολογικού ελέγχου. Η συγκεκριμένη προσέγγιση είναι πολύ φιλικότερη προς το περιβάλλον, αλλά η εισαγωγή ενός φυσικού εχθρού, δημιουργεί προβληματισμούς σε σχέση με την ισορροπία του οικοσυστήματος.

Μια εναλλακτική, φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος και απόλυτα ειδική ως προς το είδος «στόχος», αποτελεί η Τεχνική Στείρου Εντόμου. Προς το τέλος της δεκαετίας του 1940, ο Knippling υπέδειξε ότι αν βρισκόταν τρόπος στείρωσης των αρσενικών εντόμων, χωρίς να επηρεάζει την ικανότητα τους για ζευγάρωμα, τότε μετά την απελευθέρωση τους στο περιβάλλον και τη σύζευξη τους με θηλυκά αγρίου τύπου, η γονιμότητα του φυσικού πληθυσμού θα μειώνονταν σημαντικά, οδηγώντας σε μείωση κάτω από οικονομικά επίπεδα ή ακόμα και σε πλήρη απομάκρυνση του πληθυσμού «στόχου». Παρόλο που οι γενετιστές της εποχής γνώριζαν ότι οι ακτίνες Χ μπορούν να προκαλέσουν στειρότητα σε έντομα, δεν υπήρξε κάποια ενέργεια προς αυτήν την κατεύθυνση, μέχρι το 1950 με την επιτυχή αντιμετώπιση του *Cochlomyia hominivorax* (Robinson, 2002). Η εφαρμογή της συγκεκριμένης θεωρίας έγινε ευρύτερα γνωστή ως Τεχνική Στείρου Εντόμου (Sterile Insect Technique; SIT). Έντομα οικονομικής σημασίας στα οποία εφαρμόστηκε με επιτυχία η Τεχνική Στείρου Εντόμου, περιλαμβάνουν τη *Ceratitis capitata* (Hendrichs *et al.*, 1983), τη *Bactrocera cucurbitae* (Iwahasi, 1977), το *Bactrocera tryoni* (Fisher, 1994) και τη *Glossina austeni* (Vreysen *et al.*, 2000). Τα τελευταία χρόνια αποδείχτηκε ότι η ποιότητα των στείρων εντόμων που εξαπολύονται, δηλαδή η ζωτικότητα και ικανότητα πλήρους ανάμειξης και ταύτισης σεξουαλικά με τον άγριο πληθυσμό, αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο και προϋπόθεση επιτυχίας της μεθοδολογίας.

7.2 Μηχανισμοί φυλετικού διαχωρισμού (genetic sexing mechanisms, GSMs)

Στις πρώτες εφαρμογές της Τεχνικής Στείρου Εντόμου απελευθερώθηκαν στη φύση αμφότερα τα φύλα, μετά από μαζική εκτροφή και στείρωση με ακτινοβολία (Meats *et al.*, 2002). Το 1960, οι Andrewartha και Birch πρώτοι υπέδειξαν ότι η

αποτελεσματικότητα της μεθόδου θα βελτιωνόταν σημαντικά με την απελευθέρωση στη φύση μονάχα αρσενικών στείρων εντόμων και το 1969 ο Whitten πρότεινε ότι φυλο-γενετικά στελέχη (genetic sexing strains, GSS) θα μπορούσαν να δημιουργηθούν με τη χρήση μεταθέσεων συνδεδεμένων με το αρσενικό φύλο (male-linked translocations) (Robinson, 2002).

Η απελευθέρωση στείρων θηλυκών στη φύση, θεωρήθηκε ζημιογόνα, δεδομένου ότι τα θηλυκά άτομα, στείρα ή όχι, ήταν αφενός υπεύθυνα για τη διάδοση ασθενειών μέσω της λήψης αίματος (κουνούπια) και αφετέρου η στείρωση δεν θα εμπόδιζε την ωοτοκία στους καρπούς και την παρελκόμενη μείωση της εμπορικής τους αξίας (Shearman, 2002). Επιπλέον μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι στείρα απελευθερωμένα αρσενικά ζευγαρώνουν με στείρα απελευθερωμένα θηλυκά, αντί να διασκορπίζονται από το χώρο απελευθέρωσης και να συζεύγονται με τα αγρίου τύπου θηλυκά (Alrhey & Andreassen, 2002). Απελευθέρωση στείρου αρσενικού πληθυσμού της μύγας της Μεσογείου, έδωσε τρεις με πέντε φορές καλύτερα αποτελέσματα από ότι η αντίστοιχη απελευθέρωση στείρου μεικτού πληθυσμού (McInnis *et al.*, 1994).

Η απελευθέρωση αρσενικών εντόμων σε μεγάλης κλίμακας προγράμματα βασισμένα στην Τεχνική Στείρου Εντόμου, μπορεί να επιτευχθεί είτε με θανάτωση των θηλυκών ατόμων σε κάποιο αναπτυξιακό στάδιο, είτε με επιλεκτική απομάκρυνση των θηλυκών πριν την απελευθέρωση των εντόμων (Robinson, 2002). Η απομάκρυνση των θηλυκών και στις δύο περιπτώσεις γίνεται με βάση μια διαφοροποίηση φυλετικά-συνδεδεμένη με: α) ένα φαινοτυπικό χαρακτηριστικό, όπως το χρώμα της νύμφης (Meats *et al.*, 2002), β) χημική ανθεκτικότητα, όπως σε ουσίες dieldrin, malathion και αλκοόλη (Meats *et al.*, 2002), ή γ) διαφορετική ευαισθητοποίηση στη θερμοκρασία (Hendrichs *et al.*, 1995), με ταυτόχρονη επαγόμενη, μέσω ακτινοβολίας, γενετική μετάθεση στο Y χρωμόσωμα. Η μέθοδος σύνδεσης ενός χαρακτηριστικού που προσδίδει συγκεκριμένο φαινότυπο, με το φυλετικό διαχωρισμό, εξαρτάται από το είδος της μετάθεσης και το μηχανισμό φυλοκαθορισμού του εντόμου. Αυτή η μεθοδολογία περιλαμβάνει χρωμοσωμικές μεταθέσεις οι οποίες για πρακτική εφαρμογή πρέπει να είναι σπάνιες ή ποτέ ασταθείς και μη επιβλαβείς στη σεξουαλική ανταγωνιστικότητα ή άλλα φυσιολογικά χαρακτηριστικά, όπως επίσης και σε θέματα συμπεριφοράς (Franz, 2002). Σε γενικές γραμμές, είναι επιθυμητό από οικονομικής πλευράς, ο φυλετικός διαχωρισμός να γίνεται όσο το δυνατόν συντομότερα στον αναπτυξιακό κύκλο του εντόμου. Ιδιαίτερα επιτυχημένη εφαρμογή φυλετικού διαχωρισμού πραγματοποιήθηκε στη μύγα της Μεσογείου, *C. capitata*, χρησιμοποιώντας μία υπολειπόμενη αυτοσωμική μετάλλαξη, θνησιγόνα σε υψηλή θερμοκρασία, με ταυτόχρονη σύνδεση του αγρίου τύπου αλληλόμορφου γονιδίου στο Y χρωμόσωμα μέσω χρωμοσωμικής μετάθεσης (Robinson *et al.*, 1999).

7.3 Διαγονιδιακά στελέχη για βιολογικό έλεγχο

Παρά τις πρώτες επιτυχείς εφαρμογές της Τεχνικής Στείρου Εντόμου μέσω των μηχανισμών φυλετικού διαχωρισμού, τα συγκεκριμένα συστήματα επιλογής βασισμένα σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες, τείνουν να μειώσουν την γενική βιωσιμότητα των εντόμων, καθιστώντας τα λιγότερο αποδοτικά για μια μακρόχρονη και σταθερά επιτυχημένη εφαρμογή της Τεχνικής Στείρου Εντόμου. Επίσης, οι χρωμοσωμικές μεταθέσεις βρέθηκαν ασταθείς και ο γενετικός ανασυνδυασμός θεωρήθηκε σοβαρό πρόβλημα για τη μαζική εκτροφή τέτοιων εντόμων. Επιπλέον, κάθε ένα από αυτά τα στελέχη θα πρέπει να δημιουργηθεί εκ νέου για κάθε είδος, από τη στιγμή που τα γενετικά εργαλεία που αναπτύχθηκαν για κάποιο είδος μέσω κλασσικής μεταλαξίγνωσης δεν μπορούν να μεταφερθούν σε διαφορετικό είδος.

Τέλος, η στέρωση μέσω ακτινοβολίας αποτελεί ένα λεπτό σημείο ισορροπίας μεταξύ της ολοκληρωτικής στέρωσης που είναι επιθυμητή και αλλαγών της υγιούς φυσιολογίας των ακτινοβολημένων εντόμων. Η εργαστηριακή διαδικασία παραγωγής των εντόμων αλλά και η στέρωση των αρσενικών μέσω ακτινοβολήσεως, προκαλεί συχνά δραματική μείωση της ανταγωνιστικότητας των εντόμων και επομένως και της ικανότητας τους για σύζευξη με τα αγρίου τύπου θηλυκά, όπως επίσης παίζει σημαντικό ρόλο και στη βιωσιμότητα τους (Alrhey, 2002).

Τις τελευταίες δεκαετίες, η δυνατότητα εισαγωγής γονιδίων στη γαμετική σειρά πολλών εντόμων (βλέπε Εισαγωγή 1), έχει οδηγήσει σε πολυάριθμες μελέτες και θεωρήσεις για τη βελτίωση της αναφερθείσας τεχνικής.

7.3.1 Διαγονιδιακά στελέχη για την επαγωγή θηλυκής θνησιμότητας

Ένα επαγόμενο και θνησιγόνο φυλοσύνδετο γονίδιο θα μπορούσε δυνητικά να χρησιμοποιηθεί ως βάση για το φυλετικό διαχωρισμό των εντόμων οικονομικής σημασίας. Δεδομένης της φύσης της γενετικής μηχανικής εντόμων, ένα επικρατές τέτοιο γονίδιο θα πρόσφερε το πλεονέκτημα ότι σε ένα ομόζυγο στέλεχος και τα δύο αντίγραφα θα έπρεπε να «αποτύχουν» ώστε ένα θηλυκό άτομο να καταφέρει να επιβιώσει. Επιπρόσθετα, περισσότερες από μια ενθέσεις θα ενίσχυαν ακόμα περισσότερο την αποτελεσματικότητα ενός τέτοιου συστήματος, με πιθανή όμως μείωση της επιβίωσης των εντόμων.

Ένα παράδειγμα της παραπάνω προσέγγισης, αποτελεί η δημιουργία ενός στελέχους της μύγας της Μεσογείου που φέρει το γονίδιο της αλκοολικής αφυδρογονάσης (*Adh*) της *Drosophila* υπό τον έλεγχο ενός αρσενικά-ειδικού υποκινητή (Christophides *et al.*, 2001). Σύμφωνα με το συγκεκριμένο στέλεχος, τα αρσενικά άτομα είναι περισσότερο ανθεκτικά σε καθορισμένες δόσεις αλκοόλης, επιτρέποντας την επιλεκτική θανάτωση των θηλυκών. Δυστυχώς, η διαφορά ανθεκτικότητας στην αλκοόλη που παρατηρήθηκε στα θηλυκά και αρσενικά άτομα του στελέχους, δεν ήταν επαρκής για πρακτική εφαρμογή της τεχνικής.

Οι Jorg και Heinrich (2000) και οι Thomas *et al.* (2000), σε ανεξάρτητες μεταξύ τους μελέτες, ανέπτυξαν ένα επαγόμενο σύστημα θηλυκής θνησιμότητας στη *D. melanogaster*. Βασικό στοιχείο του συστήματος είναι ο ευαίσθητος στην τετρακυκλίνη μεταγραφικός ενεργοποιητής tTA (βλέπε αποτελέσματα πρώτου κεφαλαίου) υπό τον έλεγχο ενός θηλυκο-ειδικού μεταγραφικού υποκινητή (*yr1* στην πρώτη περίπτωση και *yr3*, στη δεύτερη). Ένα δεύτερο στοιχείο αποτελεί το προ-αποπτωτικό γονίδιο *head involution defective (hid)* στην πρώτη μελέτη, και το τοξικό γονίδιο *Ras64B* στη δεύτερη, υπό τον έλεγχο του χειριστή της τετρακυκλίνης *tetO*. Σύμφωνα με τα παραπάνω συστήματα, απουσία τετρακυκλίνης, τα θνησιγόνα γονίδια εκφράζονται στα θηλυκά άτομα και προκαλούν το θάνατο τους, ενώ αφήνουν ανεπηρέαστα τα αρσενικά. Παρουσία τετρακυκλίνης αμφότερα τα φύλα των στελεχών αναπτύσσονται φυσιολογικά. Μειονέκτημα στις παρούσες μελέτες αποτελεί το γεγονός ότι η θηλυκή θνησιμότητα λαμβάνει χώρα σε όψιμα αναπτυξιακά στάδια, αυξάνοντας το κόστος παραγωγής, καθώς και το ότι η επιτυχία της μεθόδου εξαρτάται άμεσα από την ποιότητα διατροφής στο φυσικό περιβάλλον.

Οι Thomas *et al.* (2000) επίσης, πέτυχαν θηλυκή θνησιμότητα χρησιμοποιώντας μια μεταλλαγμένη μορφή του γονιδίου *male-specific lethal 2 (msl-2)*, το *msl-2^{NOPU}*. Το γονίδιο *msl-2^{NOPU}* μπορεί να ενεργοποιήσει την αντιστάθμιση των φυλετικών χρωμοσωμάτων (dosage compensation) σε αρσενικά και θηλυκά άτομα της *Drosophila*. Η έκφραση του γονιδίου σε θηλυκές μύγες, όπου το μονοπάτι της αντιστάθμισης των φυλετικών χρωμοσωμάτων είναι φυσιολογικά ανενεργό, προκαλεί θάνατο.

Εναλλακτική προσέγγιση στο γενετικό φυλετικό διαχωρισμό αποτελεί ένα απλό διαγονιδιακό σύστημα, όπου η πρόδρομη μορφή ενός εντομοκτόνου (προ-εντομοκτόνο) ενεργοποιείται επιλεκτικά στα θηλυκά άτομα, με αποτέλεσμα τη θανάτωση τους μετά από έκθεση του πληθυσμού στην πρώιμη μορφή του εντομοκτόνου (Markaki *et al.*, 2004). Οι ερευνητές ονόμασαν την τεχνική «Ευαισθητοποίηση Πληθυσμού Εντόμων σε πρώιμες μορφές εντομοκτόνου» ή αλλιώς SIPP (Sensitization of Insect Populations to Pro-insecticides). Διαγονιδιακά στελέχη της *D. melanogaster*, με ενσωματωμένο το βακτηριακό γονίδιο *cytosine deaminase* (CD) υπό τον έλεγχο ενός θηλυκά-ειδικού υποκινητή/ενισχυτή, παρουσιάζουν θηλυκο-ειδική στειρότητα και θνησιμότητα μετά από έκθεση σε 5-Φλουροκυτοσίνη (5-Fluorocytosine), ένα χημικό χαμηλής τοξικότητας, το οποίο μετατρέπεται στην τοξική ουσία 5- Φλουροουρακίλη (5-Fluorouracil) παρουσία του ενζύμου *cytosine deaminase*.

7.3.2 Διαγονιδιακά στελέχη που φέρουν ένα επικρατές, θνησιγόνο γονίδιο (RIDL)

Μία παραλλαγή της Τεχνικής Στείρου Εντόμου, αποτελεί η τεχνική απελευθέρωσης εντόμων που φέρουν ένα επικρατές θνησιγόνο γονίδιο, RIDL (release of insects carrying a dominant lethal) (Thomas *et al.*, 2000; Alphey & Andreasen, 2002; Alphey, 2002). Η τεχνική ονομάστηκε κατά αυτόν τον τρόπο, καθότι τα έντομα που απελευθερώνονται στη φύση, δεν είναι ουσιαστικά στείρα. Σε γενικές γραμμές, η τεχνική RIDL προϋποθέτει τη δημιουργία στελέχους, για το έντομο στόχο, το οποίο φέρει ένα επικρατές, ρυθμιζόμενο και θνησιγόνο γονίδιο το οποίο ευρισκόμενο υπό καταστολή σε εργαστηριακές συνθήκες τέτοιες, που να μην απαντηθούν ποτέ στο φυσικό περιβάλλον του είδους στόχου. Η λογική του συστήματος έγκειται στο ότι τα απελευθερωμένα έντομα είναι ομόζυγα για ένα επικρατές γονίδιο και μετά από σύζευξη με αγρίου τύπου έντομα του αντίθετου φύλου, όλοι οι απόγονοι τους είναι ετερόζυγοι για το γονίδιο και επομένως πεθαίνουν.

Οι ίδιοι ερευνητές σημειώνουν ότι ο μηχανισμός φυλετικού διαχωρισμού μπορεί να ενσωματωθεί στην τεχνική RIDL, χρησιμοποιώντας ένα γενετικά τροποποιημένο στέλεχος που φέρει ένα θηλυκο-ειδικό, επικρατές και θνησιγόνο γονίδιο, με το όλο σύστημα υπό καταστολή σε εργαστηριακές συνθήκες. Η απελευθέρωση των αρσενικών ατόμων του στελέχους μπορεί να γίνει χωρίς στειρώση. Τα απελευθερωμένα αρσενικά ζευγαρώνουν με τα θηλυκά αγρίου τύπου και όλοι οι απόγονοι τους είναι ετερόζυγοι για το θηλυκο-ειδικό και θνησιγόνο γονίδιο, με αποτέλεσμα τα «επιβλαβή» θηλυκά να πεθαίνουν, ενώ τα «ουδέτερα» αρσενικά να επιβιώνουν. Επιπρόσθετα, με αυτόν τον τρόπο, τα μισά θηλυκά άτομα της επόμενης γενιάς θα φέρουν το ίδιο γονίδιο και άρα θα πεθάνουν, αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα της τεχνικής σε επόμενες γενιές. Το μειονέκτημα της τεχνικής συνίσταται στο ότι γενική καταστολή ενός πληθυσμού χρησιμοποιώντας αυτήν τη μέθοδο, δεν αναμένεται πριν την τρίτη γενιά, και επομένως δεν καθίσταται χρήσιμη ως άμεση στρατηγική καταπολέμησης εντόμων (Handler, 2002).

Παρόλο που κανένα διαγονιδιακό στέλεχος δεν έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα για την καταπολέμηση ή μείωση ενός πληθυσμού εντόμων οικονομικής σημασίας, είναι βέβαιο ότι με την εκτεταμένη έρευνα που πραγματοποιείται σε πολλαπλά επίπεδα και τις σύγχρονες μοριακές τεχνικές, η χρήση ενός τέτοιου στελέχους θεωρείται απλά θέμα χρόνου. Ο εντοπισμός γονιδίων που προκαλούν θνησιμότητα ή στειρώση, όπως και η ύπαρξη υποκινητών και ενισχυτών με ιστο-ειδική έκφραση, ή ακόμα η χρήση αποτελεσματικών γονιδίων διάκρισης, όπως το *egfp* και το *DsRed*, η παρουσία μεταγραφικών συστημάτων γονιδιακής ρύθμισης και πάνω από όλα η ύπαρξη συστημάτων σταθερού μετασχηματισμού των εντόμων,

αποτελούν αλματώδη βήματα για έναν αποτελεσματικό και ταυτόχρονα φιλικό προς το περιβάλλον πληθυσμιακό έλεγχο των επιβλαβών αυτών οργανισμών. Η περισσότερο αποδοτική εφαρμογή της Τεχνικής του Στείρου Εντόμου, μολαταύτα, περιλαμβάνει πέρα από τη βελτίωση των ήδη υπάρχων μεθοδολογιών, την ανάπτυξη νέων στρατηγικών για βιολογικό έλεγχο, με υψηλή αποτελεσματικότητα και χαμηλότερο κόστος χειρισμού και εκτροφής.

Όπως αναφέρθηκε στην Εισαγωγή 1, η στρατηγική καταπολέμησης του *B. oleae*, συνίσταται σχεδόν αποκλειστικά στον ψεκασμό, με επακόλουθη επιβάρυνση του περιβάλλοντος, π.χ. προσρόφηση των χημικών στα φυτά, καρπούς και το έδαφος, συσσώρευση στα υπόγεια ύδατα, τοξικά υπολείμματα σε καρπούς και καταστροφή άλλων ειδών πέρα του είδους στόχου. Για αυτό το λόγο, η ανάπτυξη μεθοδολογιών πέρα από τη χρήση εντομοκτόνων είχε δοκιμαστεί στο παρελθόν στο συγκεκριμένο έντομο, με αμφίβολα όμως αποτελέσματα. Παραδείγματα αποτελούν οι μέθοδοι «lure and kill» (Haniotakis *et al.*, 1991), «τοπικός ψεκασμός με δόλωμα» (Pucci, 1990) και η απελευθέρωση συμβιωτικών παρασίτων (Tzanakakis, 1995). Στην παρούσα μελέτη, δημιουργήσαμε ένα πλασμίδιο φορέα που φέρει το γονίδιο διάκρισης *egfp* και μια κασέτα ρυθμιζόμενης έκφρασης, με στόχο την απενεργοποίηση του γονιδίου *tra2*, στο δάκο της ελιάς. Περιμένουμε ότι δυνατή έκφραση της κασέτας που περιέχει τις δύο ανεστραμμένες αλληλουχίες του γονιδίου *tra2*, κάτω από τις επιτρεπτές συνθήκες, θα δώσει αποκλειστικά αρσενικούς και στείρους απογόνους. Η συγκεκριμένη μελέτη παρέχει τη δυνατότητα καταπολέμησης του εντόμου με τρόπο φιλικότερο προς το περιβάλλον. Επιπλέον, θα βοηθήσει σημαντικά στην παραγωγή βιολογικού λαδιού, η οποία σήμερα επιτυγχάνεται με τη χρήση κατάλληλων παγίδων και βοτανικών ή φυσικών εντομοκτόνων, μια διαδικασία χρονοβόρα και κοπιαστική.

8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

8.1 Το γονίδιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη, ένα σύστημα υιοθετημένο για επαγόμενη έκφραση σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς

Η μελέτη της λειτουργίας διαφόρων γονιδίων σε πολύπλοκα ευκαρυωτικά συστήματα, όπως και κάποιοι γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί, θα επωφελούνταν σημαντικά από μεθόδους συμπαγούς επαγωγής της έκφρασης των γονιδίων αυτών. Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες προς αυτήν την κατεύθυνση με ιόντα μετάλλων (Searle et al., 1985), θερμοεπαγόμενους εκκινητές, ή ορμονικά συστήματα (Israel & Kaufman, 1989), όλα όμως εμφάνισαν σημάδια διαρροής στο ανενεργό στάδιο. Οι Gossen και Bujard (1992) τροποποίησαν τα ρυθμιστικά στοιχεία του *Tn-10* οπερονίου της *Escherichia coli*, σύμφωνα με τα οποία η μεταγραφή των γονιδίων της ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη ρυθμίζεται αρνητικά από τον καταστολέα της τετρακυκλίνης (*tetR*). Με τον συνδυασμό του *tetR* με την καρβοξυλική περιοχή του VP16 από τον ιό herpes simplex virus (HSV), ο οποίος ήταν γνωστός για τη μεταγραφή των πρώτων γονιδίων του ιού, δημιουργήθηκε ένας υβριδικός ενεργοποιητής (tTA) ο οποίος δραστηριοποιεί ελάχιστους υποκινητές όταν αυτοί είναι συνδεδεμένοι με την αλληλουχία του χειριστή της τετρακυκλίνης (*tetracycline Operator; tetO*). Αυτοί οι υποκινητές είναι σιωπηλοί σε χαμηλά επίπεδα τετρακυκλίνης, η παρουσία της οποίας εμποδίζει τον tTA να ενωθεί με το χειριστή *tetO* και επομένως να επάγει την έκφραση του γονιδίου που βρίσκεται υπό τον έλεγχο του *tetO*.

Αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε το παραπάνω σύστημα στην κατασκευή του πλασμίδιου pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP. Χρειαζόμασταν ένα καλό και «σφιχτό» επαγωγικό σύστημα για την έκφραση της κασέτας των αντίστροφα μεταγραφόμενων κωδικών περιοχών του γονιδίου *tra2* (*2art -intron-tra2*), έτσι ώστε σε κατάσταση ομοζύγωσης των διαγονιδιακών ατόμων να υπάρξει συνέχιση της διαγονιδιακής σειράς, ενώ ταυτοχρόνως, η έκφραση της κασέτας να δίνει υψηλά επίπεδα μεταγραφής κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες.

Στο φορέα μετασηματισμού pMiBo14/GtTA2 χρησιμοποιήθηκε αυτό το σύστημα επαγόμενης έκφρασης του γονιδίου *egfp* και επομένως θεωρήθηκε ιδανικό για τον έλεγχο της επαγωγής του ενεργοποιητή tTA, στα διαγονιδιακά άτομα του δάκου. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε στη διαγονιδιακή σειρά 12 (βλέπε αποτελέσματα, κεφάλαιο 1), η οποία έδινε τα μεγαλύτερα ποσοστά φθορισμού σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του εντόμου, επομένως καθιστούσε εύκολα και αποτελεσματικά ανιχνεύσιμη την έκφραση του γονιδίου *egfp*. Επιπλέον στόχος των πειραμάτων αυτών ήταν η μελέτη της αντίδρασης του συγκεκριμένου εντόμου στο αντιβιοτικό καθώς και ο προσδιορισμός των συνθηκών των μικρό-ενέσεων και της ανάπτυξης των ενεμένων εμβρύων του δάκου με το πλασμίδιο pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP. Ήταν γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι το γονίδιο *tra2* είναι απαραίτητο από τα πρώτα κιόλας αναπτυξιακά στάδια του εμβρύου για το φύλο-καθορισμό του εντόμου και στα τελευταία στάδια προνύμφης-πρώτα στάδια νύμφης για τη διαμόρφωση φυσιολογικών σπερματοζωαρίων.

Η τετρακυκλίνη χρησιμοποιήθηκε στις συγκεντρώσεις 5 και 10 µg/ml σε όλα τα πειράματα ελέγχου που αναφέρονται σε αυτό το κεφάλαιο. Επίσης, άτομα της ίδιας σειράς αναπτύχθηκαν κάτω από παρόμοιες συνθήκες απουσία τετρακυκλίνης και χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου (Εικ.15).

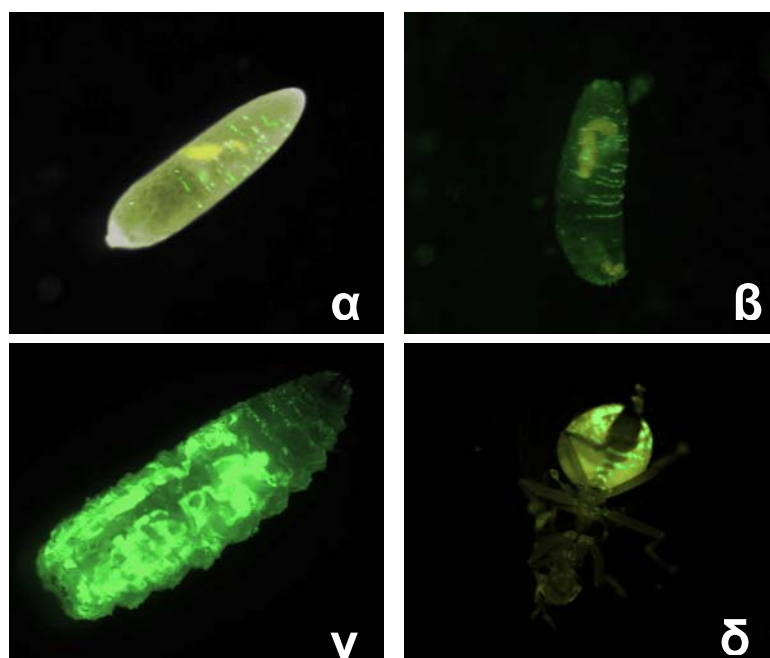
Σε μία πρώτη φάση θέλαμε να διαπιστώσουμε αν το διάλυμα της τετρακυκλίνης εισέρχεται στα έμβρυα του δάκου από την μικρο-οπή που διαθέτουν.

Για αυτό το λόγο, έμβρυα της διαγονιδιακής σειράς 12 επώαστηκαν για 48-72 ώρες σε τρυβλίο petri μουσκεμένο με διάλυμα τετρακυκλίνης μέχρι την εκκόλαση των προνυμφών, όπου και ελέγχθηκαν για φθορισμό. Και στις δύο συγκεντρώσεις τετρακυκλίνης κανένα έμβρυο δεν βρέθηκε να εκφράζει το γονίδιο *egfp*.

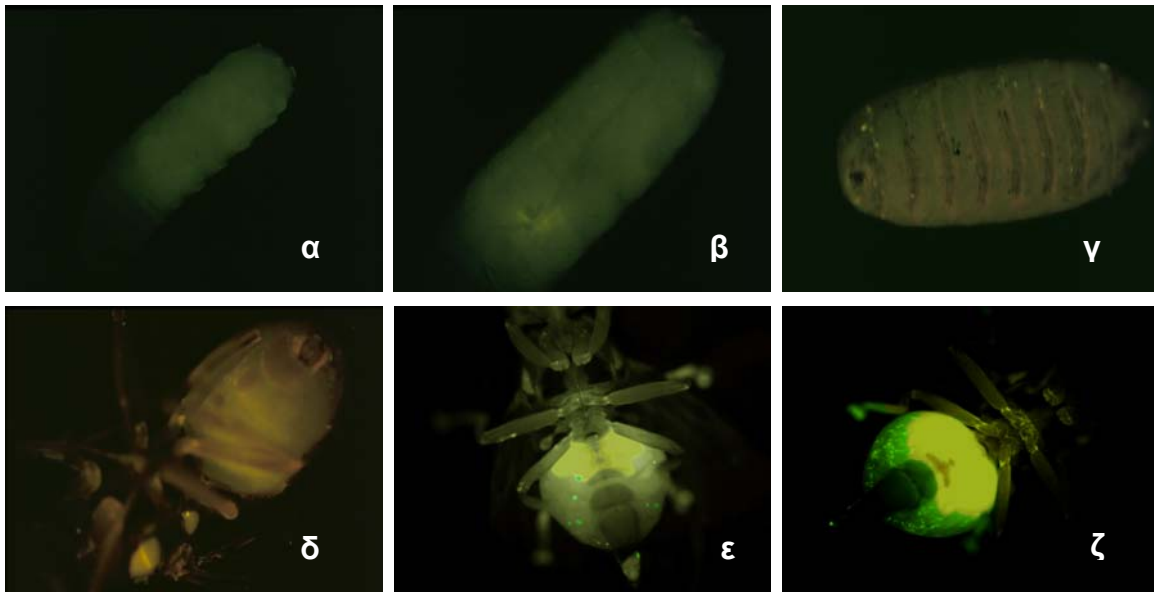
Ένα κλάσμα αυτών των εμβρύων αναπτύχθηκε σε φυσιολογική τροφή προνυμφών, ενώ οι υπόλοιπες προνύμφες μεγάλωσαν σε τροφή που περιείχε τις δυο συγκεντρώσεις τετρακυκλίνης μέχρι την νύμφωση τους. Οι προνύμφες που μεγάλωσαν στη φυσιολογική τροφή, εμφάνισαν τα χαρακτηριστικά πρότυπα φθορισμού αυτής της διαγονιδιακής σειράς. Τα έντομα του δάκου τοποθετούνται στην επιφάνεια της τροφής, αλλά προχωρούν άμεσα προς το κάτω μέρος του τρυβλίου, μέχρι την νύμφωση τους όπου επανέρχονται και πάλι στην επιφάνεια. Εξαιτίας αυτού του χαρακτηριστικού του εντόμου, ήταν αδύνατος ο εντοπισμός της ακριβής χρονικής περιόδου εμφάνισης του φθορισμού. Οι προνύμφες που είχαν μεταφερθεί σε τροφή προνυμφών με τετρακυκλίνη, δεν εμφάνισαν σημάδια φθορισμού σε όλο το στάδιο της νύμφης και μέχρι την έκτη ημέρα ζωής των ενήλικων ατόμων. Πάρα ταύτα, τα πρότυπα φθορισμού, όπως παρουσιάζονται στα ενήλικα της σειράς 12, δεν έγιναν εμφανή μέχρι και τη δέκατη ημέρα της ζωής των ενήλικων (Εικ. 16). Ένα ποσοστό των εντόμων που έλαβαν τετρακυκλίνη μέσω της κατάποσης νερού, συνέχισαν να μη δείχνουν σημάδια φθορισμού, όπως αναμενότανε.

Τα διαλύματα της τετρακυκλίνης ενσωματώθηκαν στην τροφή είτε μέσω του νερού που αυτή περιέχει, είτε με απλό ψεκασμό κατά την τοποθέτηση των προνυμφών. Και στις τρεις περιπτώσεις, προέκυψαν τα αναγραφόμενα αποτελέσματα.

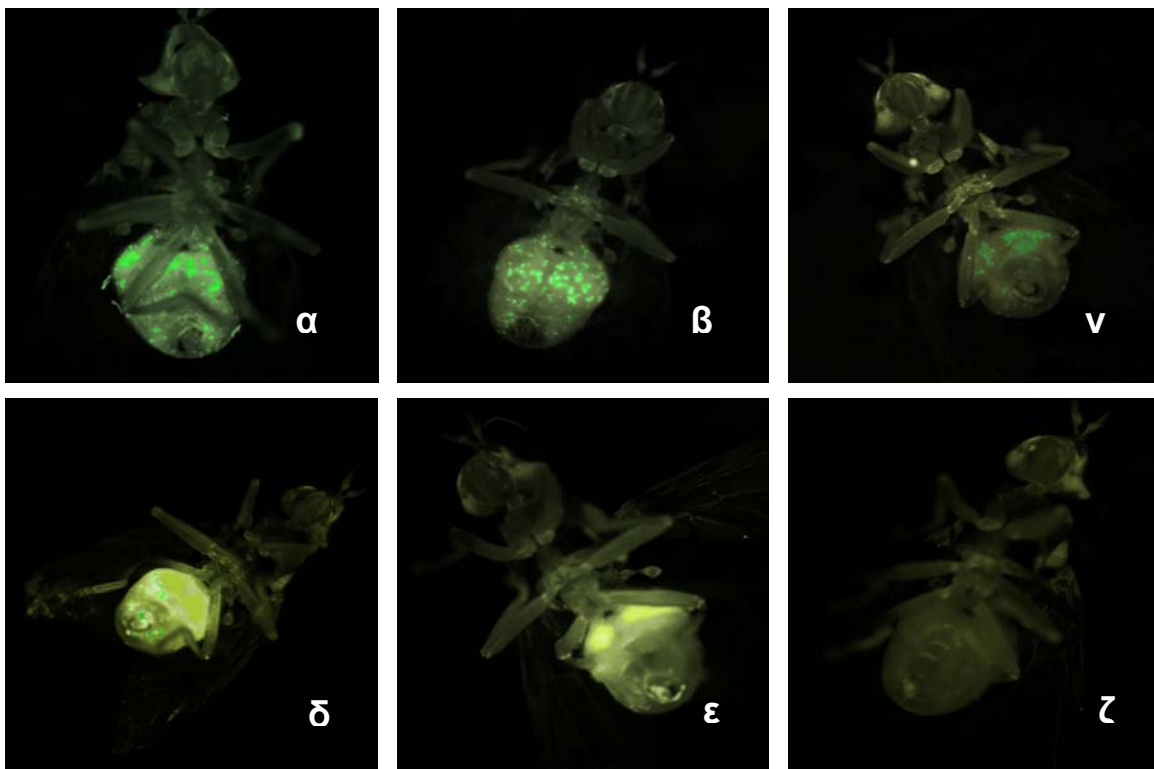
Έμβρυα και προνύμφες που αναπτύχθηκαν χωρίς τετρακυκλίνη, αλλά έλαβαν τετρακυκλίνη μέσω νερού, στο στάδιο του ενήλικου, εμφάνισαν μειωμένο φθορισμό από την τρίτη κιόλας ημέρα, ενώ ο φθορισμός ήταν μη ανιχνεύσιμος στην έκτη ημέρα ζωής του ενήλικου (Εικ. 17).



Εικόνα 15. Διαγονιδιακά άτομα της σειράς 12, σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια, μεγαλωμένα σε τροφή χωρίς τετρακυκλίνη. **α:** έμβρυο 48 ωρών, **β:** προνύμφη πρώτου σταδίου, **γ:** προνύμφη τρίτου σταδίου, **δ:** ενήλικο άτομο.



Εικόνα 16. Διαγονιδιακά άτομα της σειράς 12, σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια, μεγαλωμένα σε τροφή προνυμφών που περιείχε 10 µg/ml τετρακυκλίνη. **α:** τρίτου σταδίου προνύμφη, **β** και **γ:** πρώτο και προχωρημένο στάδιο νύμφης, αντίστοιχα, **δ, ε και ζ:** ενήλικο άτομο την ημέρα της εκκόλαψης, την έκτη και τη δέκατη ημέρα μετά την εκκόλαψη, αντίστοιχα.



Εικόνα 17. Πρότυπα φθορισμού ενήλικου αρσενικού ατόμου της σειράς 12 μετά από λήψη τετρακυκλίνης **α:** μία ημέρα, **β:** δύο ημέρες, **γ:** τρεις ημέρες, **δ:** τέσσερις ημέρες, **ε:** έξι ημέρες και **ζ:** εννιά ημέρες από την εκκόλαψη του.

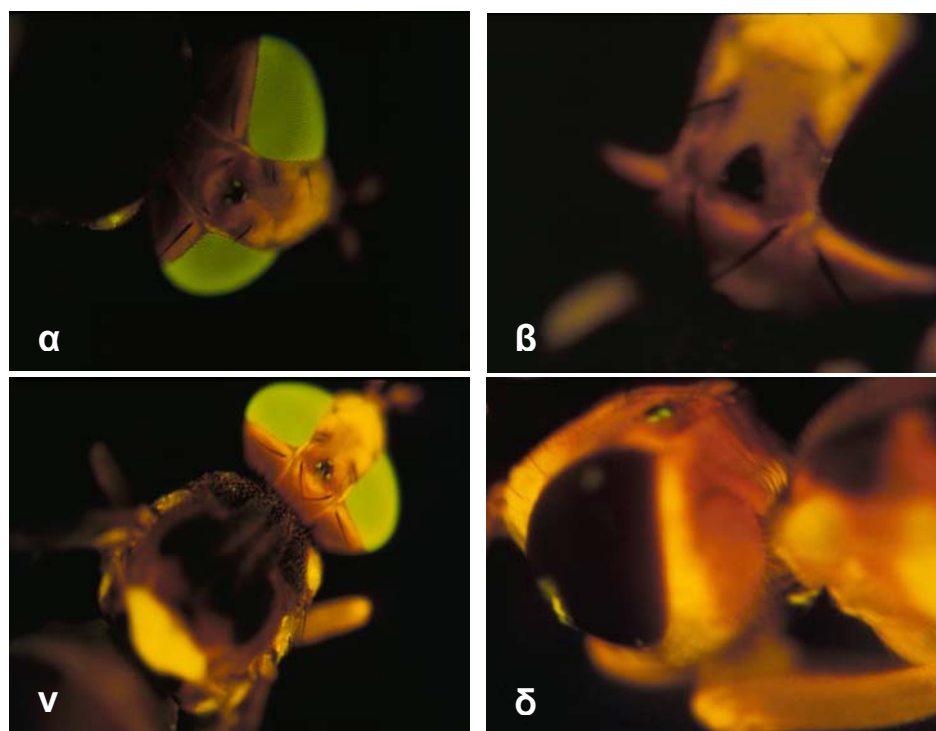
8.2 Μετασηματισμός του *B. oleae* με το τρανσποζόνιο *Minos* pMi3xP3-EGFP

Το επόμενο βήμα, μετά τον προσδιορισμό των συνθηκών και επαγωγής της κασέτας *2art -intron-tra2*, ήταν ο εντοπισμός του κατάλληλου ανιχνευτή για το διαχωρισμό των διαγονιδιακών ατόμων από τα υπόλοιπα. Η έκφραση του γονιδίου *egfp* είχε αποδειχτεί λειτουργικό εργαλείο ανίχνευσης διαγονιδιακών ατόμων στα προηγούμενα πειράματα μετασηματισμού του δάκου, χωρίς την παρουσία βιολογικών φθορών στα άτομα που την έφεραν. Εξαιτίας του αγνού εσωτερικού φθορισμού που παρουσιάζεται στο σώμα των προνυμφών και των ενήλικων, αποφασίσαμε για μία συγκεκριμένη περιοχή έκφρασης της EGFP. Με αυτόν τον τρόπο θα διασφαλίσαμε ένα εύκολα ανιχνεύσιμο και αξιόπιστο σύστημα εντοπισμού των μετασηματισμένων μυγών.

Οι Berghammer et al. (1999) και οι Horn & Wimmer (2000) σχεδίασαν ένα σύστημα έκφρασης της EGFP υπό τον έλεγχο ενός τεχνητού υποκινητή ο οποίος περιλαμβάνει τρεις διμερείς περιοχές δέσμευσης Pax-6 (3xP3). Ο συγκεκριμένος υποκινητής οδηγεί την έκφραση της πρωτεΐνης EGFP στους οφθαλμούς και έχει δείξει λειτουργικός στη *D. melanogaster* (Horn & Wimmer, 2000), στο *T. castaneum* (Berghammer et al., 1999; Pavlouros et al., 2004), στο υμενόπτερο *Athalia rosae* (Sumitani et al., 2003) και στο καρκινοειδές *P. hawaiiensis* (Pavlouros et al., 2004).

Για τον έλεγχο της λειτουργικότητας του τρανσποζονίου pMi3xP3-EGFP στο δάκο, 706 προ-βλαστοδερμικά έμβρυα μικρό-ενέθηκαν χρησιμοποιώντας *in vitro* capped mRNA ως πηγή τρανσποζάσης του *Minos*, με αναλογία τρανσποζονίου/ τρανσποζάσης 400/100 ng/μl, σύμφωνα με τις συνθήκες που περιγράφονται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. 79 προνύμφες πρώτου σταδίου εκκολάφθηκαν και 47 άτομα έφτασαν στην ενηλικίωση, 27 αρσενικά και 20 θηλυκά, τα οποία διασταυρώθηκαν μαζικά με έντομα αγρίου τύπου σε αναλογία ένα προς τέσσερα τα αρσενικά και ένα προς ένα τα θηλυκά. Τα άτομα της G1 γενιάς πέρασαν από φάση ανίχνευσης φθορισμού στο στάδιο της τρίτου σταδίου προνύμφης, νύμφης και ακμαίου για να καθοριστεί το καταλληλότερο στάδιο ανίχνευσης στο συγκεκριμένο πλασμίδιο. Φθορισμός ανιχνεύτηκε σε μία προνύμφη και μία νύμφη στα πρώιμα στάδια νύμφωσης και σε δύο ακμαία (πρόκειται για τα ίδια άτομα). Λόγω της έντονης κινητικότητας των προνυμφών, ειδικά κάτω από την ακτινοβολία UV, θεωρήθηκε δύσκολος ο εντοπισμός του φθορισμού, ο οποίος παρατηρήθηκε μόνο στα πρόδρομα νευρικά οπτικά κύτταρα. Τα ίδια κύτταρα φθόριζαν και στα πρώτα στάδια της νύμφης (άσπρη νύμφη). Ο φθορισμός όμως ήταν μη ανιχνεύσιμος μόλις άρχισε να σχηματίζεται το κουκούλι της νύμφης. Αντίθετα, ο φθορισμός ήταν εύκολα ανιχνεύσιμος στο στάδιο του ενηλικίου, κυρίως στους απλούς οφθαλμούς (ocelli). Φθορισμός παρατηρήθηκε και στους σύνθετους οφθαλμούς, επειδή όμως οι οφθαλμικές χρωστικές καταπνίγουν το φθορισμό, ο τελευταίος ανιχνεύτηκε μόνο στα οματίδια που ήταν στραμμένα προς το οπτικό πεδίο του παρατηρητή (Εικ. 19). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 18, παρατηρήθηκαν δύο διαφορετικά πρότυπα έκφρασης της EGFP, ένα όπου ο φθορισμός εντοπίζεται άμεσα μόνο στους απλούς οφθαλμούς του εντόμου (πλαίσιο δ) και ένα όπου ο φθορισμός εντοπίζεται έντονα σε όλη την περιοχή του ματιού και στους τρεις απλούς οφθαλμούς (πλαίσια α και β). Εφόσον κανένα από τα πρωτο-εκκολαπτόμενα έντομα που πέρασαν από φάση ανίχνευσης δεν εμφάνισε έντονο φθορισμό στην κυρίως οφθαλμική περιοχή, ακόμα και σε μεταγενέστερες γενιές, υποθέτουμε ότι ο εν λόγω φθορισμός είναι προϊόν σωρευμένης έκφρασης της EGFP και όχι αποτέλεσμα πιθανής ομοζύγωσης των εντόμων. Από τη στιγμή που ο μετασηματισμός του δάκου με το πλασμίδιο *Minos* pMi3xP3-EGFP πραγματοποιήθηκε μόνο για τον έλεγχο ενεργότητας του υποκινητή 3xP3 στο

συγκεκριμένο έντομο, δεν έγιναν περαιτέρω μοριακές αναλύσεις των διαγονιδιακών ατόμων. Οι δύο διαγονιδιακές σειρές που αποκτήθηκαν, διατηρήθηκαν για 9 γενιές.

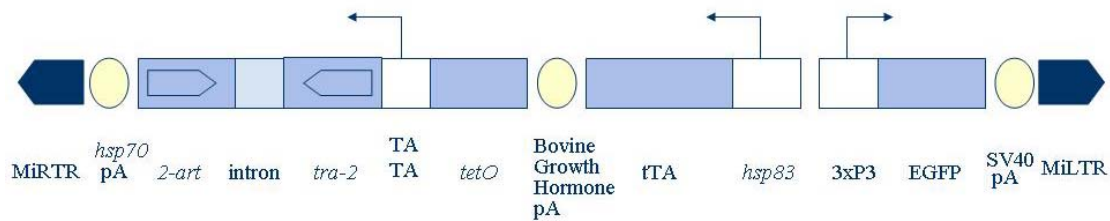


Εικόνα 18. Έκφραση της EGFP στους οφθαλμούς των ακμαίων *B. oleae*. Προβλαστοδερμικά έμβρυα του δάκου μικρο-ενέθηκαν με το πλασμίδιο pMi3xP3-EGFP, για τον έλεγχο της ενεργότητας του υποκινητή 3xP3 στο συγκεκριμένο έντομο. **α και γ:** Έντονη έκφραση της EGFP στους απλούς και σύνθετους οφθαλμούς των ενηλίκων, **δ:** Έκφραση της EGFP στους απλούς οφθαλμούς, και **β:** Απλοί και σύνθετοι οφθαλμοί εντόμου αγρίου τύπου.

8.3 Το τρανσποζόνιο *Minos* pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP

Με δεδομένη πλέον την ενεργότητα της κασέτας και του ανιχνευτή 3xP3-EGFP, προχωρήσαμε στη κατασκευή του πλασμιδίου pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP (Εικ. 19). Στο φορέα μετασηματισμού pMi3xP3-EGFP προστέθηκαν, με αντίστροφη φορά μεταγραφής, ο υποκινητής του γονιδίου *hsp83* της *C. capitata*, ο ενεργοποιητής tTA (Lycett *et al.*, 2004) και η περιοχή πολυαδενυλίωσης της πρωτεΐνης bovine growth hormone (Lycett *et al.*, 2004). Ακολουθούν οι αλληλουχίες του χειριστή της τετρακυκλίνης *tetO* και ο βασικός υποκινητής του γονιδίου *hsp70* (TATA) της *D. melanogaster*. Οι αντίστροφα μεταγραφόμενες κωδικές περιοχές του γονιδίου *tra2*, παρεμβαλλόμενες από το εσώνιο 3 του ίδιου γονιδίου (*2art* -intron-*tra2*), μαζί με την αλληλουχία πολυαδενυλίωσης του γονιδίου *hsp70*, ενσωματώθηκαν στο πλασμίδιο pMi3xP3-EGFP ως μια κασέτα *SacII*.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που αναφέρθηκαν προηγουμένως, αναμένεται ότι ο μετασηματισμός του *B. oleae* με το πλασμίδιο pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP και η επακόλουθη ομοζύγωση των διαγονιδιακών σειρών, απουσία τετρακυκλίνης, θα δώσει μόνο αρσενικούς και στείρους απογόνους.



Εικόνα 19. Σχηματική αναπαράσταση του τρανσποζονίου pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP. Τα βέλη που ξεκινούν από τους υποκινητές TATA, *hsp83* και 3xP3, δείχνουν την κατεύθυνση μεταγραφής των γονιδίων που ακολουθούν. Οι περιοχές πολυαδενυλίωσης απεικονίζονται ως κύκλοι. Στο σχήμα απεικονίζεται επίσης η φορά των αντίστροφα μεταγραφόμενων κωδικών περιοχών του γονιδίου *tra2*.

8.4 Μετασηματισμός της *D. melanogaster* με το τρανσποζόνιο pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP

Ο μετασηματισμός του οργανισμού μοντέλου, *D. melanogaster* παρέχει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με το μετασηματισμό άλλων αρθρόποδων. Κάποια από τα πλεονεκτήματα αυτά είναι το υψηλό ποσοστό μετασηματισμού του συγκεκριμένου εντόμου, τα χρωμοσώματα εξισορρόπησης για εύκολη ομοζύγωση των διαγονιδιακών στελεχών, η εύκολη καλλιέργεια του εντόμου σε εργαστηριακές συνθήκες και ο μικρός κύκλος ζωής του συγκριτικά με άλλα έντομα όπως π.χ. ο δάκος της ελιάς. Για τους παραπάνω λόγους, αποφασίσαμε για μια παράλληλη σειρά μικρο-ενέσεων στη *D. melanogaster* με το φορέα μετασηματισμού pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP. Με το πείραμα αυτό θελήσαμε να απαντήσουμε ερωτήματα όσον αφορά α) τη λειτουργικότητα του γονιδίου ανιχνευτή υπό τον έλεγχο του υποκινητή 3xP3, μετά την εισαγωγή νέων γενετικών αλληλουχιών στο φορέα pMi3xP3-EGFP και β) την πιθανότητα θνησιγένειας του πλασμιδίου pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP, ιδιαίτερα στην περίπτωση εντόμων που περιείχαν περισσότερα από ένα αντίγραφα, είτε αυτά προέρχονται από περισσότερες από μια ενθέσεις, είτε από ομοζύγωση των διαγονιδιακών στελεχών.

Επιπλέον, γνωρίζοντας ότι τα γονίδια *tra2* της *D. melanogaster* και του *B. oleae* εμφανίζουν κάποιες συντηρημένες περιοχές στην αλληλουχία τους (Εικ. 20), θα ήταν ενδιαφέρον αν η έκφραση του πλασμιδίου pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP έδινε παρόμοιο φαινότυπο σε διαγονιδιακά στελέχη της *Drosophila*, επιβεβαιώνοντας ακόμα περισσότερο την εξαιρετικά συντηρημένη λειτουργία του γονιδίου φυλοκαθορισμού *tra2*, ακόμα και σε μακρινούς εξελικτικά οργανισμούς όπως τα γένη *Drosophila* και *Bactrocera*.

```

dro      TTTTCATTCTACGTCCAACCTACCAAAGAATTTGGCCGAAAGAGGTCGAACCCCAACCGTAG 840
da      -----ATCACAAAGCTATTTGTGAAAATTCGTGA 28
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

dro      CATTTGTCAAGTCACACAAAATTTTCCAACCTGTCAGTTACCAAGGCGTGCAAGAACCACCC 900
da      TAGAATATTAGTTATAGTGTGCTGCTAGCAGTTATTTAAAAAATAAAAAATAAACCCCGT 88
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

dro      GAAATCCACACGAAATACAAAACCTTTTCAAGACCCTCAAGAACGAACCGCAAGATAATCT 960
da      AGAATAGTTGTAATGAGCCACGTTACGTTAGCCGT-AGCCTTTCGCCACGTCGCGATT 147
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

dro      TATTTTCATT-CCATTCCACATCGAATCAAGGTCTGACTACGATTACTGTGGCAGTCGCGC 1019
da      CACTAAGTCGCCAGTTTCG--TCGCGCAATGGGCGCCGGCGGC----ATTCTAGAGAAAA 201

```

```

* * * * *
dro GCACCAGCGGTCCTCTCGCCGACGCTCCCGTTTCGCGTTCCTCCTCGGAGTCGCCGC 1079
da GTTTTATAGCTCTCGCAGTAGATCAGCTTCACGACAACCGCCTTCTCCACCACCCTGCC 261
* * * * *
dro ACCGGAGCCGCGTCATCGCT--CCGACGTTTCATCAGCGATCGGAACGA-ATGCACAA 1136
da ATCAGGACGAGGTGGACGTTACTCAGAAGCCAGCCA-AAGCTCTTCAACGTCACTCTCAC 320
* * * * *
dro GTC-TCGCGTAAGCATTCTGCCGATTAATGC-CTCCTTCAATCCTAAAGATCTTCGGC 1194
da CACGTCATGGCCGTCGTATAACCGTTCAGCTTCTCGCAGCACACGAAAATCGTCGGC 380
* * * * *
dro GTT-TCAGGAACATCCACAAGCAAGCCGCTGCATAGGAGTCTTTGGACTGAACACAAATA 1253
da GTAATCGAGAAAAACAGTGCAAAATCGTTGTATAGGTGTATTTGGTTTAAAGTGTGTATA 440
* * * * *
dro CCTCGCAGCACAAAGTACGCGAGCTGTTCAACAAGTACGGACCCATCGAACGCATCCAGA 1313
da CAACGCAACAAAAATACGTGATATATTTCAAGATTTGGACCCATCGAACGAATACAAG 500
* * * * *
dro TGGTGATTGACGCACAAGTAAGTCGGTTTTTCGATAAGCATTGCTAAGATATTTCTGCCT 1373
da TCGTAATTGATGCACAGACTGGAAGATCGC--GCGGATTTGTTT--TATTTATTA--T 553
* * * * *
dro GAATCCTTTTGTGTAGACAAATCCGCTGAAGCCCTGCAGTTTTGTCTTAATTTTC--TGCC 1431
da GAAGACATAGCGGATGCTAAGGCGGCCAAGGACCTTGCTCCGCATGGAAAATCGATGAT 613
* * * * *
dro TAG--ATAAAATTTGATAGCGATTGTGAGTTTTTGTGTATTCCAAACTAAAAGCTAAAG 1488
da CGGCGCATAAGAGTTGATTAC--TCAACAACACAAAGACCGCACACCCACACCTGGTG 671
* * * * *
dro GCT-TGCTGTACAGTGGCATAATTGTTTCGAAGGAA-ATATTGATCTCCC--GAAATCAAT 1544
da TCTATATGGGCCGACAAACACGGCGTGAACGTGAACATAATGATCGCTATAGAGATGACT 731
* * * * *
dro ATGTGTTTCAGTTGTTAGGAAAGTTCAAGTT--CACAAACGTAG-ATTAAC--CCTTAATA 1599
da ATCGGCCGCGCCGTCGCTCGGGCTCACCTTATCACAATCGCAGCAATAATTACCGCAGTG 791
* * * * *
dro ACTTCTGACAT---ACAGACACAGC-----GTTCCCGGGGCTTTTGTTCATTTACT 1648
da ATCGAAGCCGTCGTTATGAACGAGCCGAAAGTCTTCCATTTCGCGCGCGCGCAGCT 851
* * * * *
dro TTGAGAA--ACTCAGCG-ATGCCCGCGCGGCTAAGGACAGCTGCTCCGGAATAGAAGTGG 1705
da ACTAAAATCGCTCCATGCATATAAATAAATTAAGTGTATCAGTAATTTATACGCAAAAGAAA 911
* * * * *
dro ATGGTCGC-CGTATTTCGCGTCGATTTCTCTATAACCC-----AACGGGCTCATAACC 1756
da AAAGACACACACACACACCTCAGTGCTATAGTAGTGGTGTGCAAAAATAAAGTGTACCT 971
* * * * *
dro CAACTCCGGGTGTGATTTGGGTCGTCAGCCGCG--TGGAAAAGCTCCACGCTCATTTTC 1814
da ATATTTTCAAATGGATTAAATGTGCAAAAAGCAACAAAAAATACAAAATTACAAAC 1031
* * * * *
dro ACCGCGTAGAGGACGCCGTCGTATCACGATCGCTCCGCTTCGCCCTATGACAACCT--AT 1872
da AGTACTGAATTTACCGTA-ATATCATGAGT-TATTGTTGGTTGCATTAGTGTTCGT 1089
* * * * *
dro CGTGATCGCTATGATTACCGCAACGATCGCTACGACCGTAATCTCCGCAGG-AGCCCTAG 1931
da TAAGTTGCCATACTATATTCAGCATTTGGCAGCAAAATCTTTTATATAAATAATGTTTC 1149
* * * * *
dro TCGCAACCGTTACACTCGCAA--CAGGAGCTACAGCCGTTACGCTCTCCGCAACTACGT 1989
da GAATAAATTGTATTTTCAAAAATCAATACTGGCATCAACGACGTGTTTCAGCAAGCA-GC 1208
* * * * *
dro AAAGTTTATTCCTCCGCTATTTTAAATCAAACGTTTATCCTGTATATTTTCCACGATTAGG 2049
da ACAATATTTACACTTTCCGCCACTTCCGGAATTTACTCAGTTTTTTTTTATTGTTTATG 1268
* * * * *
dro TCGAACTTCATCGCGCTATTTAAAGCGCCTGGGGAGGAGGCTACTTCATTAACCT-CGTGCT 2108
da CTAGTTTCAATGCAATTACAATGCTACTTATTTAATAATACCATTATTATTGCTTACT 1328
* * * * *

```

```

dro      CCTAAGTTCGCCCAAC--TGGATTGTGTCAAACGGGCTGTAAAGGAG-CATACGACTGAA 2165
da       TATAATTGTTATTAACAACACATTTATTAGTTGACTACCAACATTTCAATCAGTCACT 1388
          *** *      ***      *** * * * * *      ***      * * *

dro      ATATTGTGTTTTGGTGAATCCTATCCCATCTAATGCATTTGGTTGGCGAACAGTTCGCAA 2225
da       TTAATGTTTAGCAGTAGAGTGTAGCGTATCGCAATTTCCCAATTATAAAATA-TAAACAA 1447
          * * * * *      * *      * * * * * * *      * *      * * * * *

dro      CTAGATTAATTAATTAATTCACCCAAAACACCCTTTAATCATAATAATTCGGTTACT--AT 2283
da       AACACCCAGTTAAATGTGC--TGTAGCAACCTCTGCATTGAAGAATTAGCATATGTAAC 1504
          * * * * * * * *      * * * * * *      * * * * * * * *

dro      TATTAAGGCTGTATAAAAAACATAAATTGTAATAATCAAAATCAATTACCAACATTACATAC 2343
da       TATTTACA-TGTATGTATGTATGCCACTAGACATT--ATCGAATAACTGTGGGGTAGAC 1561
          **** *      ***** *      **      * * * * *      * * * * *      * *

dro      AGAGGTCGCGATGGATTGTGATATGTATTTTAAAGGAAGTGCAGCAAAGTGCATAATGATA 2403
da       ---GTTTCGCTACTATTTT--TATATATATAAAAAA----AGCGAGACTACAACATTTT 1612
          * * * * *      *** *      * * * * * * * * * *      * * * *      * * *

dro      ACATTAACCTAATTTTAATTATAAATGCAATTTGTCAGCAGGTACAAAATAAAGATTAAT 2463
da       GTTACTTGTAATTTTAATTTTAAATTTTAAATTTACTAATAAAAAATGGAATAAAGATGA- 1671
          *      ***** *      * * * * *      * *      * *      * * * * *

dro      TTGTACAGAAGCGACGATT 2482
da       --AGAAAAATCTAAA--- 1685
          * * * * *

```

Εικόνα 20. Συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών του γονιδίου *tra2* της *D. melanogaster* και του *B. oleae*. Οι αστερίσκοι δηλώνουν συντηρημένα νουκλεοτίδια και στις δύο αλληλουχίες.

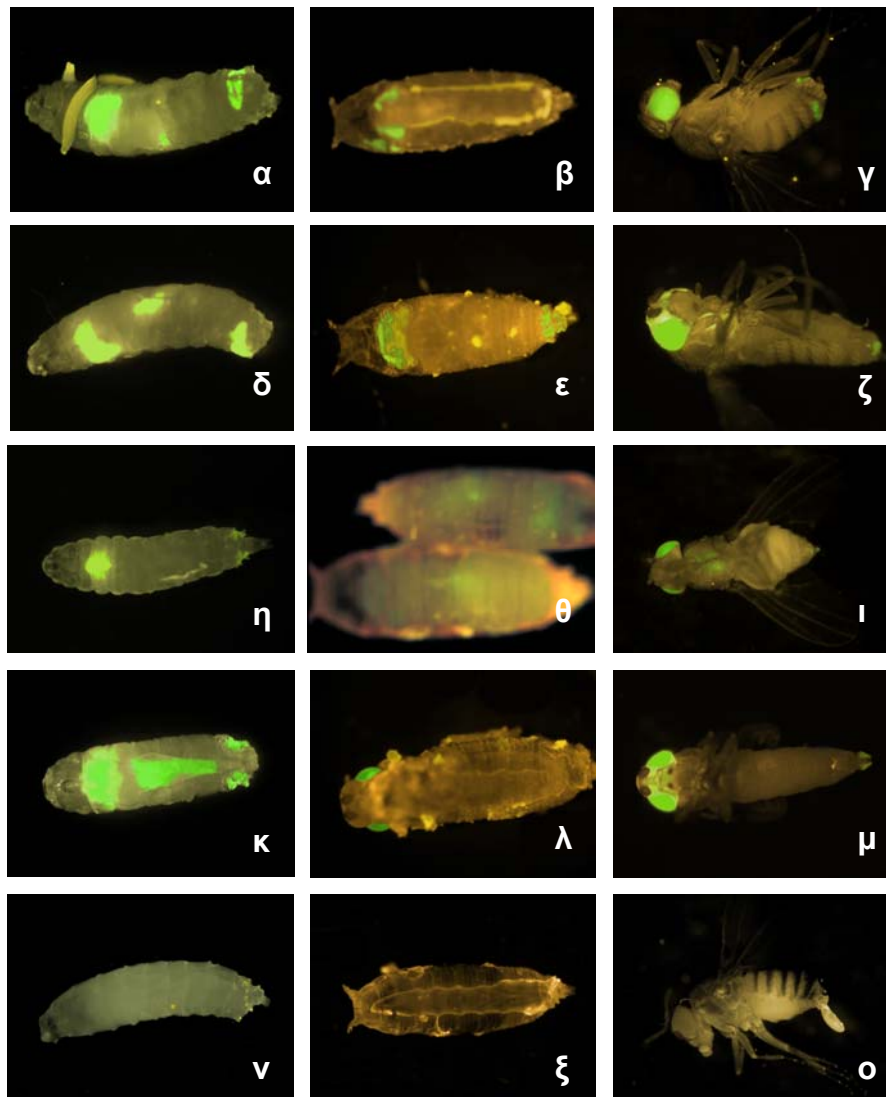
Για την δημιουργία διαγονιδιακών εντόμων της *D. melanogaster*, μικρο-ενέθηκαν 255 προ-βλαστοδερμικά έμβρυα, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Εκκολάφθηκαν 57 προνύμφες πρώτου σταδίου, 29 από τις οποίες επιβίωσαν μέχρι το στάδιο του ενηλίκου (20 αρσενικά και 9 θηλυκά). Τα άτομα G0 διασταυρώθηκαν μεμονωμένα με άτομα *IS31* του αντίθετου φύλου σε αναλογία 1 προς 3. Τα διαγονιδιακά άτομα G1 πέρασαν από διαδικασία επιλογής στο στάδιο του ακμαίου και επιλέχθηκαν βάση του οφθαλμικού κυρίως φθορισμού τους. Από τα 9 θηλυκά έντομα G0, αποκτήθηκαν τρεις ανεξάρτητες διαγονιδιακές σειρές, οι Drtra2-11, Drtra2-30 και Drtra2-28, ενώ από τα 20 αρσενικά έντομα G0, αποκτήθηκε μια διαγονιδιακή σειρά, η Drtra2-5. Το ποσοστό μετασηματισμού υπολογίζεται στο 13%.

Διαγονιδιακά αρσενικά άτομα G1 από κάθε διασταύρωση G0, επαναδιασταυρώθηκαν με άτομα *IS31* του αντίθετου φύλου σε αναλογία 1 προς 3, ώστε να διαχωριστούν πιθανές πολλαπλές ενθέσεις. Τα διαγονιδιακά έντομα G2 από τις αρχικές σειρές Drtra2-11 και Drtra2-30 έδειξαν πανομοιότυπο πρότυπο φθορισμού. Οι διαγονιδιακές σειρές Drtra2-11.2, Drtra2-30.1 και Drtra2-30.2 διατηρήθηκαν μέχρι περεταίρω μοριακή ανάλυση των διαγονιδιακών σειρών. Η σειρά Drtra2-28.1 δεν έδωσε καθόλου G2 απογόνους ενώ η σειρά Drtra2-28.2 έδωσε αποκλειστικά θηλυκά φθορίζον άτομα G2 και επομένως συμπεράναμε ότι η ένθεση του πλασμιδίου έγινε στο X χρωμόσωμα. Τα διαγονιδιακά έντομα G2 από τη σειρά Drtra2-5 εμφάνισαν δύο διαφορετικά πρότυπα έκφρασης του πλασμιδίου, ένα με αχνό φθορισμό στους οφθαλμούς των εντόμων, στα τρία χαρακτηριστικά οματίδια της κεφαλής και επιπλέον φθορισμό στη γεννητική περιοχή των ενηλίκων και των δύο φύλων και ένα δεύτερο πρότυπο με ιδιαίτερα έντονο φθορισμό στα παραπάνω σημεία. Τα διαγονιδιακά άτομα της σειράς Drtra2-5 με διαφορετικό πρότυπο φθορισμού, θεωρήθηκαν δύο ανεξάρτητα γεγονότα ένθεσης και αναφέρονται ως

Drtra2-5.1 (αχνό πρότυπο) και Drtra2-5.2 (έντονο πρότυπο). Φθορισμό στη γεννητική περιοχή των δύο φύλων, εμφάνισαν και τα άτομα της σειράς Drtra2-30.

Για τη δημιουργία ομόζυγων διαγονιδιακών σειρών, αρσενικά διαγονιδιακά άτομα G2 διασταυρώθηκαν με θηλυκά άτομα που έφεραν χρωμοσώματα εξισορρόπησης για τα χρωμοσώματα 2 και 3, σύμφωνα με το εργαστηριακό εγχειρίδιο Ashburner (1989). Γνωρίζοντας ότι οι διασταυρώσεις εξισορρόπησης είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες, για την απόκτηση επαρκούς αριθμού ομόζυγων ατόμων, καθώς και για μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, κάθε είδος διασταύρωσης περιλάμβανε δύο δείγματα. Αμφότερα τα δείγματα της σειράς Drtra2-11.1 δεν έδωσαν απογόνους. Οι σειρές Drtra2-5.1, Drtra2-5.2 και Drtra2-30.2 έδειξαν ένθεση στο χρωμόσωμα 2, ενώ οι σειρές Drtra2-30.1 και Drtra2-11.2 στο χρωμόσωμα 3. Δεν πραγματοποιήθηκε ομοζύγωση της σειράς Drtra2-28.2.

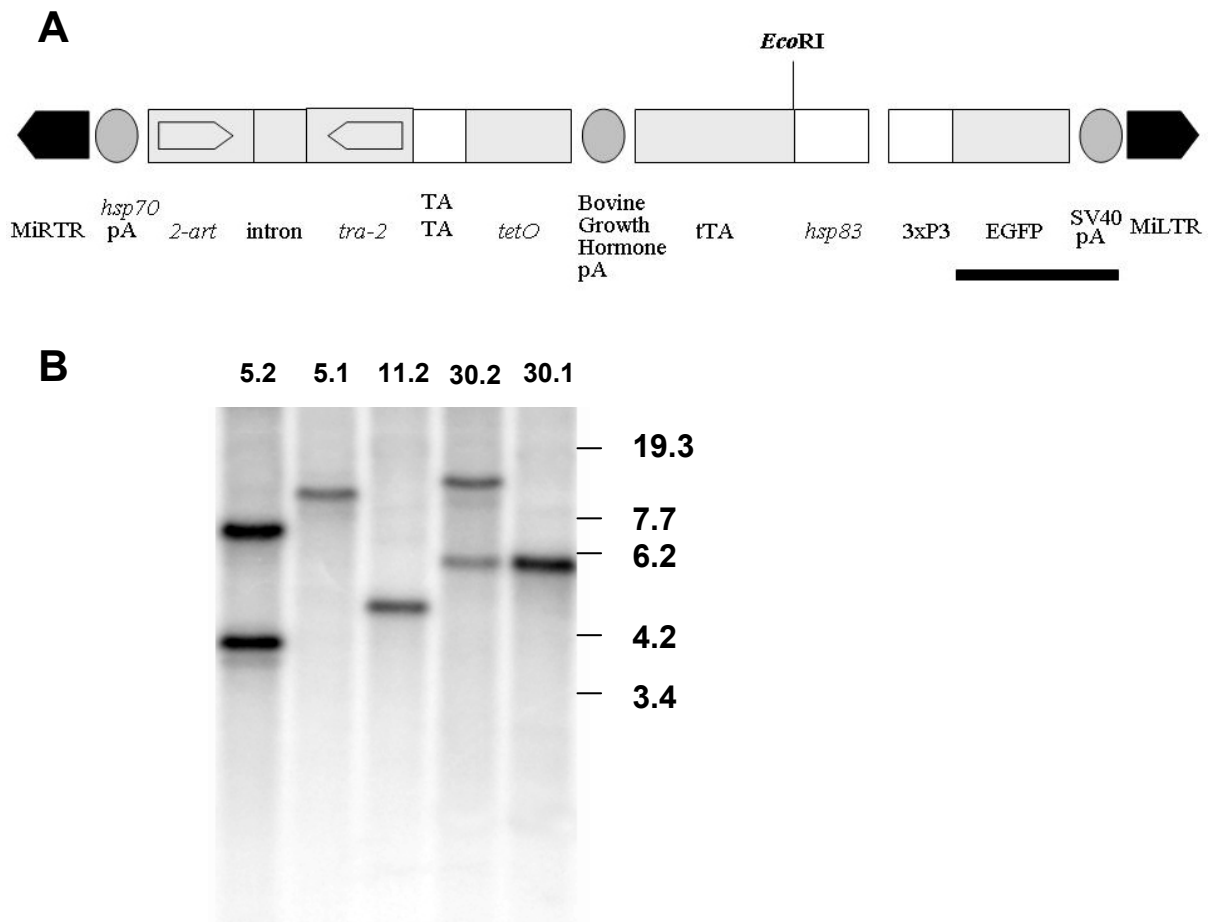
Τα πρότυπα έκφρασης των ομόζυγων διαγονιδιακών σειρών Drtra2-5.1, Drtra2-5.2, Drtra2-11.2 και Drtra2-30.1 απεικονίζονται στην Εικόνα 21.



Εικόνα 21. Έκφραση της EGFP σε ομόζυγες διαγονιδιακές σειρές της *D. melanogaster* με το τρανσποζόνιο pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP. α-γ: προνύμφη, νύμφη και ακμαίο της

διαγονιδιακής σειράς Drtra2-5.1, δ-ζ: προνύμφη, νύμφη και ακμαίο της διαγονιδιακής σειράς Drtra2-5.2, η-ι: προνύμφη, νύμφη και ακμαίο της διαγονιδιακής σειράς Drtra2-11.2, κ-μ: προνύμφη, νύμφη και ακμαίο της διαγονιδιακής σειράς Drtra2-30.1, ν-ο: προνύμφη, νύμφη και ακμαίο του στελέχους ISO31.

Για τον έλεγχο του αριθμού των ενθέσεων του στοιχείου *Minos* στο γονιδίωμα των μετασηματισμένων στελεχών της *D. melanogaster* με το τρανσποζόνιο pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP, πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Southern. Κάθε δείγμα γενωμικού DNA περιλάμβανε 30 ενήλικα άτομα της γενιάς G4 (μετά την ομοζύγωση των διαγονιδιακών σειρών). Τα δείγματα DNA επώαστηκαν με το περιοριστικό ένζυμο *EcoRI* και υβριδοποιήθηκαν με ανιχνευτή που αντιστοιχεί στην κωδική περιοχή της *egfp* και της αλληλουχίας πολυαδενυλίωσης SV40. Κάθε ξεχωριστή ένθεση του τρανσποζονίου στο γενωμικό DNA αποκάλυπτε μία ζώνη μεγέθους τουλάχιστον 2000 bp. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η παρουσία μονής ένθεσης εντοπίστηκε στις διαγονιδιακές σειρές Drtra2-30.1, Drtra2-11.2 και Drtra2-5.1, ενώ οι σειρές Drtra2-5.2 και Drtra2-30.2 περιείχαν δύο ενθέσεις (Εικ. 22).

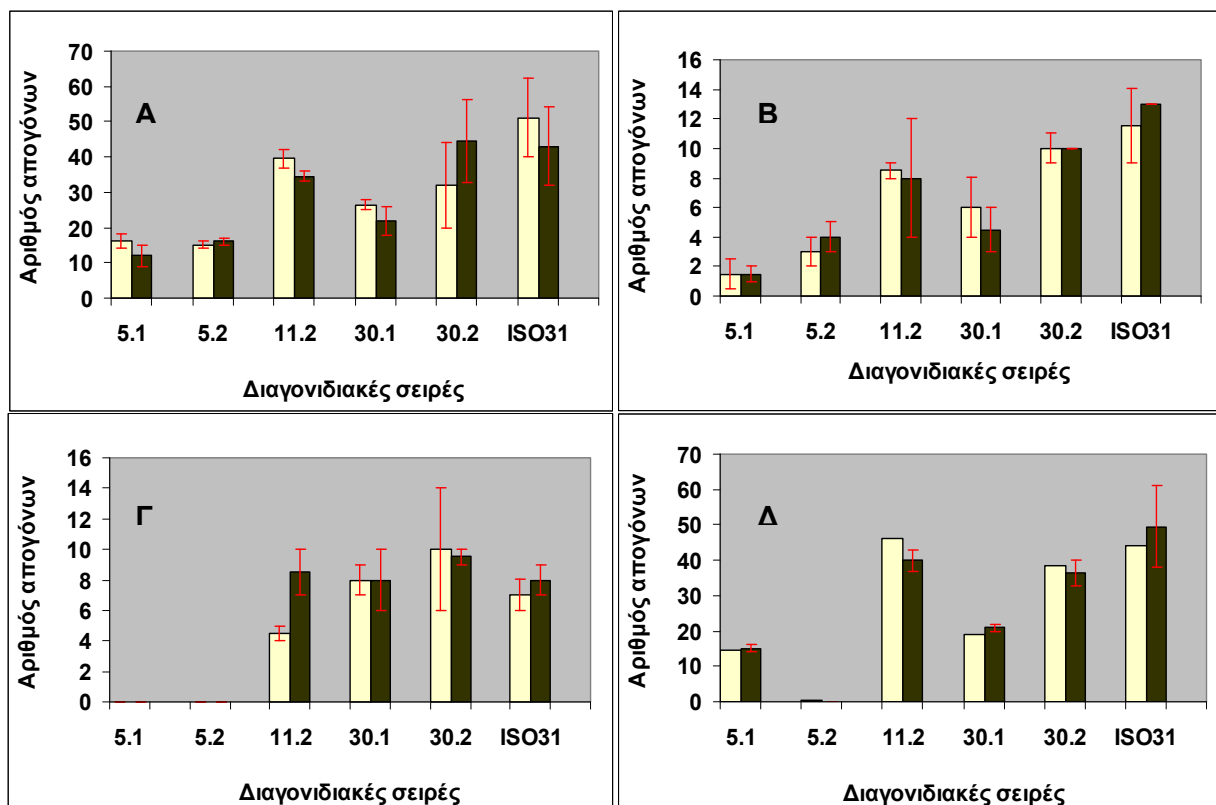


Εικόνα 22. Μοριακή ανάλυση των ενθέσεων του τρανσποζονίου *Minos* pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP στο γονιδίωμα της *D. melanogaster*. **A)** Σχηματική αναπαράσταση του τρανσποζονίου pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP. Απεικονίζεται η θέση του περιοριστικού ενζύμου *EcoRI*. Η μπάρα αντιστοιχεί στο γονίδιο της *egfp* και το σήμα πολυαδενυλίωσης SV40 pA, που χρησιμοποιήθηκαν ως αλληλουχία ανιχνευτής. **B)** Ανάλυση κατά Southern ομόζυγων εντόμων των διαγονιδιακών σειρών Drtra2-30.1, Drtra2-11.2,

Drtra2-5.1, Drtra2-5.2 και Drtra2-30.2. Τα δείγματα επώαστηκαν με *EcoRI* και υβριδοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της νύχτας σε θερμοκρασία 65 °C.

Για τον έλεγχο της πιθανής ενεργότητας του πλασμιδίου *pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP* στη *D. melanogaster*, όσον αφορά τον καθορισμό του φύλου, ένα ομόζυγο αρσενικό κάθε σειράς, διασταυρώθηκε με δύο ομόζυγα παρθένα θηλυκά της ίδιας σειράς κάτω από τις εξής συνθήκες: α) σε τροφή χωρίς τετρακυκλίνη, με (37°C) και χωρίς θερμικό σοκ και β) σε τροφή με τετρακυκλίνη (10 µg/ml), με (37°C) και χωρίς θερμικό σοκ. Γνωρίζοντας ότι ο υποκινητής του γονιδίου *hsp83* της *C. capitata*, που χρησιμοποιήθηκε στην κατασκευή του φορέα μετασχηματισμού *pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP* ως υποκινητής του ενεργοποιητή tTA, είναι θερμοεπαγόμενος, το θερμικό σοκ θεωρήθηκε πλεονεκτικός παράγοντας για την μέγιστη δυνατή έκφραση του tTA και επομένως και της κασέτας με τις αντίστροφα μεταγραφόμενες κωδικές περιοχές του γονιδίου *tra2*.

Τα έντομα που χρησιμοποιήθηκαν για διασταυρώσεις στο συγκεκριμένο πείραμα, ήταν ηλικίας δύο ημερών έτσι ώστε να έχουν προχωρήσει σε σεξουαλική ωριμότητα και η εναπόθεση των αυγών να επιτελούνταν την αμέσως επόμενη ημέρα της σύζευξης των εντόμων, όπου και ξεκίνησε το θερμικό σοκ, το οποίο και κράτησε ως την εμφάνιση των τελευταίων ενηλίκων της επόμενης γενιάς. Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν άτομα *IS31* ακριβώς κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Για μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, κάθε είδος διασταύρωσης πραγματοποιήθηκε δύο φορές. Από κάθε διασταύρωση καταγράφηκε ο αριθμός των αρσενικών και θηλυκών απογόνων. Τα αποτελέσματα αναγράφονται στην Εικόνα 23.



Εικόνα 23. Ποσοστό αρσενικών απογόνων των μετασχηματισμένων σειρών με το τρανσποζόνιο *Minos pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP*, της *D. melanogaster*. Ένα αρσενικό άτομο από κάθε διαγονιδιακή σειρά διασταυρώθηκε με δύο παρθένα θηλυκά της ίδιας σειράς σε τροφή με και χωρίς τετρακυκλίνη. Επιπλέον, από τις παραπάνω διασταυρώσεις, οι μισές

υπέστησαν θερμικό σοκ στους 37°C για μία ώρα κάθε μέρα, μέχρι την εμφάνιση και των τελευταίων ενηλίκων της κάθε διασταύρωσης, ενώ οι υπόλοιπες αναπτύχθηκαν εξολοκλήρου στους 25°C. Κάθε είδος διασταύρωσης περιλάμβανε δύο δείγματα. **A**: τροφή με τετρακυκλίνη, **B**: τροφή με τετρακυκλίνη/θερμικό σοκ, **Γ**: τροφή χωρίς τετρακυκλίνη/θερμικό σοκ, **Δ**: τροφή χωρίς τετρακυκλίνη. Ο κόκκινος δείκτης σε κάθε κολώνα δηλώνει το τυπικό σφάλμα ανάμεσα στα δύο δείγματα της κάθε διασταύρωσης.

8.5 Μετασηματισμός του *B. oleae* με το τρανσποζόνιο pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν τρεις ανεξάρτητες προσπάθειες μετασηματισμού του δάκου της ελιάς οι οποίες συνοψίζονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Σύνοψη πειραμάτων μετασηματισμού του *B. oleae* με το τρανσποζόνιο pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP

#	Έμβρυα που ενέθηκαν	Προνύμφες που Εκκολάφθηκαν (G0)	Ενήλικα άτομα (G0)	Ενήλικα που ελέγχθηκαν για φθορισμό (G1)	Φθορίζοντα Ενήλικα (G1)
1	1750	470	140	4817	0
2	1330	436	60	0	0
3	4250	712	470	-	-

Σε όλα τα πειράματα μετασηματισμού, ως πηγή τρανσποζάσης του στοιχείου *Minos* χρησιμοποιήθηκε ο βοηθός mRNA της τρανσποζάσης του *Minos*, ο οποίος είχε δειχθεί να καταλήγει σε υψηλότερα ποσοστά μετασηματισμού (Karpetanaki *et al.*, 2002) και έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα στο μετασηματισμό του εντόμου με το τρανσποζόνιο pMiBo14/GtTA2. Η αναλογία τρανσποζονίου/τρανσποζάσης, 400/100 ng/μl, παρέμεινε σταθερή στην πρώτη προσπάθεια, αλλά αυξήθηκε στα επόμενα πειράματα μετασηματισμού, στην αναλογία τρανσποζονίου/τρανσποζάσης, 400/150 ng/μl.

Οι διασταυρώσεις πραγματοποιήθηκαν μαζικά (ενεμένα θηλυκά με αγρίου τύπου αρσενικά και το αντίστροφο) σε κλουβιά διαστάσεων 30 x 30 x 30 εκατοστά. Σε όλες τις διασταυρώσεις, η αναλογία ενεμένων αρσενικών προς αγρίου τύπου θηλυκά ήταν 1 προς 4, ενώ η αναλογία ενεμένων θηλυκών προς αγρίου τύπου αρσενικά 1 προς 1. Στην τελευταία προσπάθεια μετασηματισμού, για τις διασταυρώσεις των ενεμένων αρσενικών εντόμων χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά κλουβιά, ενώ για τις διασταυρώσεις των ενεμένων θηλυκών, ένα. Τα ενεμένα αρσενικά άτομα διατηρούνταν σε διαφορετικά κλουβιά για 5-6 ημέρες και στη συνέχεια τοποθετούνταν μαζικά (ανά 50 άτομα) στα κλουβιά των διασταυρώσεων. Με αυτόν τον τρόπο, αυξάνονταν οι πιθανότητες γονιμοποίησης των θηλυκών αγρίου τύπου από διαφορετικά ενεμένα αρσενικά.

Στο δεύτερο πείραμα μετασηματισμού του δάκου με το τρανσποζόνιο pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP, δεν αποκτήθηκαν απόγονοι G1, ενδεχομένως, λόγω μόλυνσης των προνυμφών. Όσον αφορά την τελευταία προσπάθεια μετασηματισμού, δεν έχει πραγματοποιηθεί ακόμα έλεγχος του φθορισμού των ενηλίκων της γενιάς G1.

9. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

9.1 Το επαγωγικό σύστημα tetO/tTA

Τα γενετικά συστήματα πληθυσμιακού ελέγχου των εντόμων, τα οποία προκαλούν θνησιγένεια ή στειρότητα, πρέπει να ρυθμίζονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε οι εκάστοτε εργαστηριακοί πληθυσμοί να επιβιώνουν και να αναπαράγονται. Στο φορέα μετασχηματισμού pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP, συνεχής έκφραση της κασέτας των αντίστροφα μεταγραφόμενων κωδικών περιοχών του γονιδίου *tra2* (*2art* -intron-*tra2*) στο δάκο της ελιάς, θα έδινε αρσενικούς και στείρους απογόνους με αποτέλεσμα τη διακοπή της διαγονιδιακής σειράς. Το επαγωγικό σύστημα γονιδιακής ρύθμισης tetO/tTA, είχε ήδη χρησιμοποιηθεί σε ανεξάρτητες πειραματικές μελέτες (Thomas *et al.*, 2000; Heinrich *et al.*, 2000) στον οργανισμό μοντέλο *D. melanogaster*, με επιτυχία. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα που προσφέρει το παραπάνω σύστημα, πέρα από τη «σφιχτή» γονιδιακή ρύθμιση, αποτελεί το γεγονός ότι το αντιβιοτικό τετρακυκλίνη που χρησιμοποιείται, δεν απαντάται στη φύση. Με αυτόν τον τρόπο, διαγονιδιακά, εργαστηριακά στελέχη εκτρέφονται παρουσία τετρακυκλίνης, ενώ κατά την απελευθέρωση τους σε φυσικό περιβάλλον, η απουσία τετρακυκλίνης ενεργοποιεί το μεταφερόμενο γονίδιο/γονίδια, προκαλώντας θνησιγένεια, στειρώση, αρρενοποίηση ή οποιοδήποτε άλλο χαρακτηριστικό βιο-ελέγχου έχει χρησιμοποιηθεί στο συγκεκριμένο φορέα μετασχηματισμού.

Στην παρούσα εργασία, η χρήση του συγκεκριμένου επαγωγικού συστήματος, προσέφερε το επιπρόσθετο πλεονέκτημα της μελέτης του συστήματος αυτού στο *B. oleae*, από τη στιγμή που προ-υπήρχαν διαγονιδιακά στελέχη του δάκου όπου η έκφραση της EGFP ήταν άμεσα συνδεδεμένη με το σύστημα tetO/tTA (βλέπε Πρώτο Κεφάλαιο). Για τη μελέτη του ρυθμιστικού συστήματος tetO/tTA στο δάκο, επιλέχτηκε το διαγονιδιακό στέλεχος 12, το οποίο επέδειξε τον εντονότερο και επομένως πιο εύκολα και αποτελεσματικά ανιχνεύσιμο φθορισμό, σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου, συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη.

Γνωρίζοντας ότι το γονίδιο *tra2* είναι απαραίτητο από τα πρώτα κιόλας αναπτυξιακά στάδια του εμβρύου για το φύλο-καθορισμό του εντόμου (Belote and Baker, 1982; Belote and Baker, 1983), έμβρυα της σειράς 12 αφέθηκαν να αναπτυχθούν σε απορροφητικό χαρτί μουσκεμένο με διάλυμα τετρακυκλίνης μέσα σε τρυβλία Petri. Τα αποτελέσματα έδειξαν, ότι η έκφραση της EGFP, φυσιολογικά ενεργή στο στάδιο του εμβρύου, είχε διακοπεί σε ποσοστό 100% σε όλα τα έμβρυα που μελετήθηκαν, χωρίς εμφανή μείωση της υγιούς φυσιολογίας των εμβρύων.

Γνωρίζοντας επίσης ότι το γονίδιο *tra2* είναι απαραίτητο στα τελευταία στάδια προνύμφης-πρώτα στάδια νύμφης για τη διαμόρφωση φυσιολογικών σπερματοζωαρίων (Belote and Baker, 1982; Belote and Baker, 1983), ήταν σημαντικό στην παρούσα μελέτη να πιστοποιηθεί η πλήρης απενεργοποίηση του ενεργοποιητή tTA σε αυτά τα στάδια. Τα πειράματά μας έδειξαν, ότι προνύμφες που αναπτύχθηκαν σε χαρτί μουσκεμένο με διάλυμα τετρακυκλίνης και μεγάλωσαν σε τροφή προνυμφών που περιείχε διάλυμα τετρακυκλίνης, δεν εμφάνισαν σημάδια φθορισμού παρά μόνο την έκτη ημέρα εκκόλαψης των ακμαίων. Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε, ότι η ποσότητα τετρακυκλίνης που συσσωρεύτηκε στα άτομα του δάκου κατά τη διάρκεια της εμβρυακής και προνυμφιακής τους ανάπτυξης, είναι επαρκής για όλο το στάδιο της νύμφης (10 ημέρες περίπου), παρόλο που σε αυτό το στάδιο η λήψη ουσιών στα έντομα καθίσταται αδύνατη. Αξίζει να σημειωθεί ότι η λήψη της τετρακυκλίνης στο στάδιο του ενηλίκου προκαλεί σταδιακή διακοπή της

έκφρασης της EGFP από την πρώτη κιόλας ημέρα, αλλά πλήρης διακοπή σημειώνεται μόνο μετά την έκτη ημέρα λήψης της τετρακυκλίνης.

Σε γενικές γραμμές, από τα πειράματα μας καταλήγουμε στο συμπέρασμα, ότι η συγκέντρωση της τετρακυκλίνης στο δάκο, δρα αποτελεσματικά αλλά αθροιστικά όσον αφορά τη ρύθμιση έκφρασης της EGFP. Για την πλήρη απενεργοποίηση του tTA, απαιτείται συνεχής λήψη για μερικές ημέρες, όπως επίσης και για την επανενεργοποίηση του tTA απαιτείται απουσία τετρακυκλίνης για μερικές ημέρες. Επιπλέον, τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι το χρονικό διάστημα διακοπής της έκφρασης της EGFP παρουσία τετρακυκλίνης, εξαρτάται από το αναπτυξιακό στάδιο του εντόμου. Πιο αναλυτικά, στο εμβρυακό αναπτυξιακό στάδιο, η λήψη της τετρακυκλίνης οδηγεί σε διακοπή της έκφρασης της EGFP σε μία μόνο ημέρα, ενώ στο στάδιο του ενήλικου το αντίστοιχο αποτέλεσμα επιτυγχάνεται σε έξι ημέρες μετά την λήψη της τετρακυκλίνης.

Οι Heinrich και Scott χρησιμοποίησαν συγκέντρωση τετρακυκλίνης της τάξης των 10 µg/ml. Στα δικά μας πειράματα χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα τετρακυκλίνης συγκέντρωσης 10 µg/ml και 5 µg/ml. Τα αποτελέσματα ήταν κοινά και στις δύο συγκεντρώσεις τετρακυκλίνης. Επίσης λάβαμε τα ίδια αποτελέσματα όταν το διάλυμα τετρακυκλίνης ενσωματώθηκε στην τροφή των προνυμφών ή απλά ψεκάστηκε στην τροφή, γεγονός που επιτρέπει την χρήση της ουσίας με εύκολο και πρακτικό τρόπο. Σε όλα τα πειράματα, παρατηρήθηκε μια μικρή καθυστέρηση της ανάπτυξης των εντόμων σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια, αλλά δεν παρατηρήθηκε αρνητική επίπτωση στην υγεία των εντόμων.

9.2 Έκφραση του τρανσποζονίου *Minos* pMi3xP3-EGFP στο *B. oleae*

Για τον έλεγχο της ενεργότητας του υποκινητή 3xP3 στο δάκο, πραγματοποιήθηκε μια σειρά ενέσεων με το τρανσποζόνιο *Minos* pMi3xP3-EGFP. Ο συγκεκριμένος φορέας μετασηματισμού προσέδιδε έκφραση της EGFP στους σύνθετους και απλούς οφθαλμούς των εντόμων. Η έκφραση ενός γονιδίου ανιχνευτή κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή 3xP3, είχε χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για το μετασηματισμό της *D. melanogaster* (Horn & Wimmer, 2000), του *T. castaneum* (Berghammer *et al.*, 1999; Pavlopoulos *et al.*, 2004), του υμενόπτερου *Athalia rosae* (Sumitani *et al.*, 2003) και του καρκινοειδούς *P. hawaiiensis* (Pavlopoulos *et al.*, 2004). Τα αποτελέσματα μας, δείχνουν επιτυχή μετασηματισμό του *B. oleae* με το τρανσποζόνιο pMi3xP3-EGFP, αυξάνοντας το εύρος των οργανισμών, όπου ο υποκινητής 3xP3 αποδεικνύεται λειτουργικός. Αξίζει να σημειωθεί, ότι ενώ ο εν λόγω υποκινητής είναι παροδικά ενεργός στα ενεμένα έμβρυα G0 της *Drosophila* (προσωπική παρατήρηση, βλέπε συζήτηση 9.3), δεν παρατηρήθηκε ανάλογο φαινόμενο στα έμβρυα του *B. oleae*.

Παρόλο που το ποσοστό μετασηματισμού δεν μπορεί να καθοριστεί με ακρίβεια στα πειράματα μας, λόγω των μαζικών διασταυρώσεων των ατόμων της γενιάς G0, από τη συγκεκριμένη προσπάθεια μετασηματισμού αποκτήθηκαν διαγονιδιακά έντομα σε ποσοστό ανάλογο (4.2%) με την προηγούμενη επιτυχημένη προσπάθεια μετασηματισμού του δάκου με το τρανσποζόνιο pMiBo14/GtTA2 (4%). Η μικρή διαφορά που παρατηρήθηκε μπορεί να οφείλεται στο μικρότερο μέγεθος του τρανσποζονίου pMi3xP3-EGFP (5.2 Kb), έναντι του τρανσποζονίου pMiBo14/GtTA2 (7.5 Kb).

9.3 Έκφραση του τρανσποζονίου *Minos* pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP στη *D. melanogaster*

Παράλληλα με τις μικρο-ενέσεις του τρανσποζονίου pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP στο *B. oleae*, πραγματοποιήθηκε και μια μικρή σειρά ενέσεων του τρανσποζονίου στη *D.*

melanogaster, με στόχο γρήγορες απαντήσεις σε ερωτήματα σχετικά με τη δομική λειτουργικότητα του πλασμιδίου, παραδείγματος χάρη την έκφραση της EGFP μετά την εισαγωγή του ενεργοποιητή tTA, του χειριστή *tetO* και της κασέτας των αντίστροφα μεταγραφόμενων κωδικών περιοχών του γονιδίου *tra2* στο πλασμίδιο pMi3xP3-EGFP. Ένα δεύτερο ερώτημα που χρειαζόταν διευκρίνιση, αποτελούσε το γεγονός της πιθανής θνησιγένειας του πλασμιδίου, ιδιαίτερα στην ομοζύγωση των διαγονιδιακών σειρών ή στην περίπτωση που υπήρχαν περισσότερες από μια ενθέσεις του πλασμιδίου στο γονιδίωμα. Η προσπάθεια ομοζύγωσης της σειράς 12 (βλέπε αποτελέσματα Πρώτου Κεφαλαίου), έδειξε ότι η υπερ-έκφραση του tTA ή της EGFP, προκάλεσε έντονη θνησιμότητα στο στάδιο της νύμφης, με αποτέλεσμα τη διατήρηση της σειράς σε ετερόζυγη κατάσταση.

Ένα ποσοστό 60% (προσωπική παρατήρηση), των ενεμένων εμβρύων G0 της *D. melanogaster* με το φορέα μετασηματισμού pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP, παρουσίασε προσωρινό φθορισμό, ενώ οι πέντε διαγονιδιακές σειρές που αποκτήθηκαν, παρουσίασαν μόνιμο φθορισμό, ως επί το πλείστον στους οφθαλμούς των εντόμων, φαινόμενο που δείχνει ξεκάθαρα τη λειτουργικότητα του γονιδίου ανίχνευσης του πλασμιδίου pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP. Από την ομοιομορφία της έκφρασης της EGFP στις διάφορες διαγονιδιακές σειρές, συμπεραίνουμε επίσης, ότι η αποδοτικότητα του υποκινητή 3xP3 δεν επηρεάστηκε από φαινόμενα θέσης (position effects) της εκάστοτε ένθεσης του πλασμιδίου στο γονιδίωμα της *D. melanogaster*. Επιπρόσθετα, ο διαχωρισμός των ενθέσεων της σειράς Drtra2-5 στους G2 απογόνους, ήταν ορατός και εύκολα αναγνωρίσιμος, γεγονός που υποδεικνύει μια σφιχτή συνάρτηση του αριθμού των ενθέσεων και του φθορισμού που παρατηρείται.

Η ομοζύγωση των διαγονιδιακών σειρών που αποκτήθηκαν, δεν παρουσίασε ιδιαίτερο πρόβλημα, με εξαίρεση τη σειρά Drtra2-11.1 η οποία δεν έδωσε καθόλου απογόνους σε αμφοτέρως τις διασταυρώσεις με έντομα που φέρουν χρωμοσώματα εξισορρόπησης. Δεν γνωρίζουμε αν αυτό οφείλεται στο τρανσποζόνιο pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP, ή σε ευαισθησία των συγκεκριμένων εντόμων που χρησιμοποιήθηκαν. Η ανάλυση κατά Southern έδειξε την παρουσία μονών και διπλών ενθέσεων στις 5 διαγονιδιακές σειρές που αναλύθηκαν. Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί, ότι παρόλη την αύξηση της συγκέντρωσης του mRNA της τρανσποζάσης του μεταθετού στοιχείου *Minos*, από 100 ng/μl σε 150 ng/μl στην παρούσα μελέτη, ο αριθμός των ενθέσεων ως ποσοστό μετασηματισμού γενικότερα και ως παρουσία πολλαπλών ενθέσεων στο γονιδίωμα των μετασηματισμένων εντόμων, εμφανίζεται μειωμένος σε σχέση με παρόμοιες μελέτες (Kapetanaki *et al.*, 2002; Markaki, προσωπική επικοινωνία). Αυτό οφείλεται πιθανότατα στο μεγαλύτερο μέγεθος του τρανσποζονίου σε συνάρτηση με άλλα τρανσποζόνια.

Παρόλο που τα γονίδια *tra2* της *D. melanogaster* και του *B. oleae* παρουσιάζουν κάποιες συντηρημένες περιοχές στην αλληλουχία τους, δεν ήταν σίγουρο ότι οι περιοχές αυτές ήταν επαρκείς για την επιτυχή καταστολή του γονιδίου *tra2* της *D. melanogaster*. Επιπλέον δυσκολία όσον αφορά τη λειτουργικότητα του τρανσποζονίου pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP στη *D. melanogaster*, αποτελούσε ο υποκινητής του γονιδίου *hsp83* της *C. capitata*, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στο πλασμίδιο pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP για την ενεργοποίηση της μεταγραφής του tTA, για τον οποίο δεν γνωρίζαμε αν θα ήταν λειτουργικός στη *D. melanogaster*.

Η καταμέτρηση του αριθμού των αρσενικών και θηλυκών απογόνων των διαγονιδιακών σειρών, κάτω από τις εξής συνθήκες: α) σε τροφή χωρίς τετρακυκλίνη, με (37°C) και χωρίς θερμικό σοκ και β) σε τροφή με τετρακυκλίνη (10 μg/ml), με (37°C) και χωρίς θερμικό σοκ, κατέδειξε τη μη-λειτουργικότητα του τρανσποζονίου pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP στις σειρές Drtra2-30.1, Drtra2-30.2 και Drtra2-11.2, από

τη στιγμή που αποκτήθηκε συγκρίσιμος αριθμός απογόνων των δύο φύλων με αυτόν των πειραμάτων ελέγχου. Το γεγονός ότι δεν αποκτήθηκαν απόγονοι από τη σειρά Dtra2-5.1 σε τροφή χωρίς τετρακυκλίνη και μετά από θερμικό σοκ, και από τη σειρά Dtra2-5.2 σε τροφή χωρίς τετρακυκλίνη με και χωρίς θερμικό σοκ, δηλώνει μη-βιωσιμότητα των εμβρύων κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες. Από τη στιγμή που το στατιστικό μας δείγμα ήταν μικρό, δύο δείγματα για κάθε είδος διασταύρωσης, και το συγκεκριμένο πείραμα σχεδιάστηκε για την καταμέτρηση της αναλογίας φύλου και όχι για τον προσδιορισμό της στειρότητας των μετασχηματισμένων αρσενικών, αδυνατούμε να βγάλουμε συμπεράσματα για τη λειτουργικότητα της έκφρασης της κασέτας των αντίστροφα μεταγραφόμενων αλληλουχιών του γονιδίου *tra2* στις συγκεκριμένες σειρές.

9.4 Το τρανσποζόνιο *Minos pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP* στο *B. oleae*

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν τρεις ανεξάρτητες προσπάθειες μετασχηματισμού του *B. oleae* με τον πλασμιδιακό φορέα pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP. Η πρώτη προσπάθεια δεν ήταν επιτυχημένη. Ο μετασχηματισμός της *D. melanogaster* με το ίδιο τρανσποζόνιο, έδειξε ότι το γονίδιο ανιχνευτής, *egfp*, είναι ενεργό. Επιπρόσθετα, ο επιτυχημένος μετασχηματισμός του *B. oleae* με το τρανσποζόνιο pMi3xP3-EGFP, επέδειξε τη λειτουργικότητα του υποκινητή 3xP3 στο συγκεκριμένο έντομο. Με βάση τα παραπάνω, συμπεραίνουμε ότι η έλλειψη διαγονιδιακών εντόμων στη συγκεκριμένη περίπτωση, δε μπορεί να αποδοθεί στην πιθανότητα μη αποτελεσματικής ανίχνευσης τους. Επίσης, το γεγονός της απόκτησης διαγονιδιακών εντόμων της *D. melanogaster* με τον ίδιο φορέα μετασχηματισμού, μειώνει το ενδεχόμενο της μη απόκτησης μετασχηματισμένων ατόμων του δάκου, λόγω πιθανής πρόκλησης θνησιγονίας από το τρανσποζόνιο. Επιπλέον, τα ενεμένα άτομα G0, όπως και οι απόγονοι τους, αναπτύχθηκαν, από τα πρώτα κιόλας αναπτυξιακά στάδια, σε υπόβαθρο τετρακυκλίνης, με αποτέλεσμα την αναστολή της κασέτας έκφρασης των αντίστροφα μεταγραφόμενων κωδικών περιοχών του γονιδίου *tra2*, έκφραση των οποίων θα οδηγούσε σε στειρότητα των μετασχηματισμένων εντόμων.

Από τη στιγμή που οι επιμέρους συνθήκες μετασχηματισμού του δάκου με το τρανσποζόνιο pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP, δεν φαίνεται να αποτελούν ανασταλτικό παράγοντα για το μετασχηματισμό του εντόμου, θεωρούμε ότι η έλλειψη διαγονιδιακών ατόμων G1 στην παρούσα προσπάθεια, είναι αποτέλεσμα μη ικανοποιητικού αριθμού ενέσεων σε προβλαστοδερμικά έμβρυα του δάκου. Στην παραπάνω θεώρηση, έρχεται να προστεθεί και το χαμηλό ποσοστό μετασχηματισμού που αποκομίστηκε στα διαγονιδιακά στελέχη της *D. melanogaster* με το τρανσποζόνιο pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP, γεγονός που επισημαίνει τη δυσκολία ένθεσης του τρανσποζονίου στη γαμετική σειρά των εντόμων. Λόγω του παραπάνω, το ποσοστό της τρανσποζύασης που χρησιμοποιήθηκε στο μείγμα ενέσεων στις επόμενες προσπάθειες, αυξήθηκε σε 150 ng/μl, ενώ το ποσοστό του τρανσποζονίου παρέμεινε σταθερό.

Η δεύτερη προσπάθεια μετασχηματισμού του δάκου με το τρανσποζόνιο pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP δεν ήταν επιτυχημένη, λόγω μικροβιακής μόλυνσης των ενεμένων εμβρύων G0, με επερχόμενη μείωση του αριθμού των ακμαίων που αποκτήθηκαν και ολική θνησιμότητα της γενιάς G1. Οι μολύνσεις αυτές, παρόλο που δεν έχουν χαρακτηριστεί ακόμα από ερευνητικές ομάδες, έχουν παρατηρηθεί αρκετές φορές σε εργαστηριακές καλλιέργειες του δάκου.

Δεν γνωρίζουμε στην παρούσα χρονική στιγμή τα αποτελέσματα της τρίτης προσπάθειας μετασχηματισμού του εντόμου με το συγκεκριμένο τρανσποζόνιο. Ο αριθμός των ενέσεων, όπως και ο αριθμός των ακμαίων που αποκτήθηκε θεωρείται

ικανοποιητικός και συγκρίσιμος με τον αντίστοιχο αριθμό εντόμων G1 που απαιτήθηκε για τον επιτυχή μετασχηματισμό του εντόμου με το τρανσποζόνιο pMiBo14/GtTA2.

9.5 Μελλοντικές κατευθύνσεις

Στην παρούσα διατριβή αποδεικνύεται η ενεργότητα του μεταθετού στοιχείου *Minos* στο γονιδίωμα του *B. oleae*. Με αυτή μας την προσπάθεια, ανοίξαμε το δρόμο για την ανάπτυξη γενετικών συστημάτων ελέγχου του εντόμου. Με τα πειράματα RNAi, δείχτηκε ο φυλο-καθοριστικός ρόλος του γονιδίου *tra2* στο δάκο, όπως και ο ρόλος του στη σπερματογένεση στα αρσενικά άτομα του εντόμου. Με βάση τα παραπάνω, κατασκευάστηκε ένας φορέας μετασχηματισμού με τα άκρα του μεταθετού στοιχείου *Minos*, ο οποίος περιέχει μια κασέτα ρυθμιζόμενης έκφρασης της κωδικής περιοχής του γονιδίου *tra2*, σε δύο αντίστροφα μεταγραφόμενα αντίτυπα. Κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες, η έκφραση της κασέτας θα οδηγεί στην παραγωγή δίκλωνου μορίου RNA του γονιδίου *tra2* και επομένως στην καταστολή της έκφρασης των ενδογενών μετάγραφων RNA του γονιδίου, μέσω του μηχανισμού RNAi, με αποτέλεσμα τη μετατροπή των θηλυκών ατόμων XX σε στείρα αρσενικά και την επαγωγή στειρότητας στα αρσενικά άτομα XY.

Παρόλο που οι δύο πρώτες προσπάθειες μετασχηματισμού του δάκου με τον αναφερόμενο φορέα μετασχηματισμού, δεν ήταν επιτυχείς, θεωρούμε ότι θα υπάρξει αποτέλεσμα στην τρίτη προσπάθεια, λόγω του αυξημένου αριθμού των ενθελικών G0 που αποκτήθηκαν, γεγονός που έχει δείχθει καθοριστικό στο μετασχηματισμό του εντόμου. Σε αυτήν την περίπτωση, θα ακολουθήσει ανάλυση κατά Southern των διαγονιδιακών σειρών, με στόχο τον προσδιορισμό του αριθμού ενθέσεων του μεταθετού στοιχείου *Minos* σε κάθε σειρά και προσπάθεια ομοζύγωσης των διαγονιδιακών σειρών. Ο καθορισμός της ενεργότητας του πλασμιδίου στις διαγονιδιακές σειρές του δάκου, μπορεί να μελετηθεί σε ένα ποσοστό εντόμων της κάθε σειράς, το οποίο θα αναπτυχθεί απουσία τετρακυκλίνης, με και χωρίς θερμικό σοκ, με καταμέτρηση των αρσενικών και θηλυκών απογόνων. Φαινομενικά αρσενικά άτομα αυτού του πειράματος, θα χρησιμοποιηθούν σε διασταυρώσεις με αγρίου τύπου θηλυκά, απουσία τετρακυκλίνης, για τον καθορισμό της επαγόμενης στειρότητας των αρσενικών. Για την ολοκλήρωση των πειραμάτων προσδιορισμού της ενεργότητας του πλασμιδίου, θα ακολουθήσει σύνθεση cDNA από ομόζυγα διαγονιδιακά άτομα και ανάλυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR), χρησιμοποιώντας τους εκκινητές *tra2F* και *tra2R*, οι οποίοι δείχθηκαν λειτουργικοί ως προς την ανίχνευση μετάγραφων του γονιδίου *tra2* σε ενεμένα έντομα του δάκου.

Στην περίπτωση που ο φορέας μετασχηματισμού pMiBo*tra2*/tTa/3xP3-EGFP, αποδειχθεί λειτουργικός στο δάκο της ελιάς, θα ακολουθήσουν πειράματα προσδιορισμού της καταλληλότητας των διαγονιδιακών στελεχών, όσον αφορά τα επίπεδα βιωσιμότητας και την ικανότητα σύζευξης τους, συγκριτικά με εργαστηριακά έντομα αγρίου τύπου καθώς και με άγρια έντομα που απαντάμε στη φύση. Η μελέτη αυτή θα πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο εφαρμοσμένης εντομολογίας της βιολογικής σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

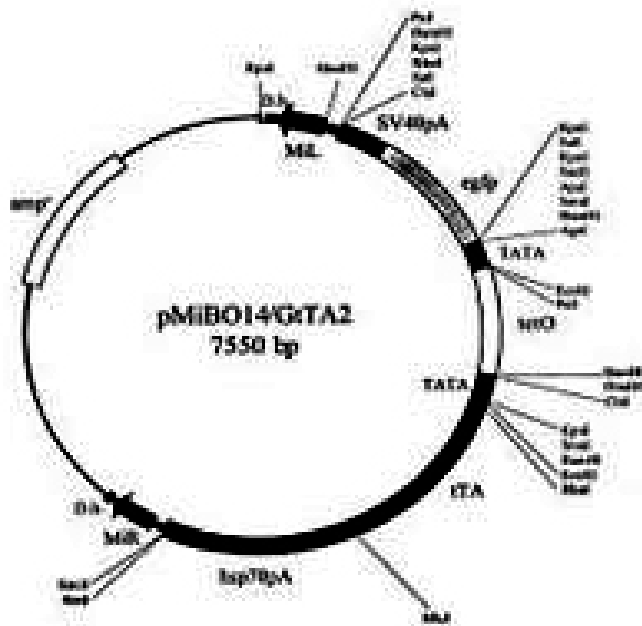
10. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

10.1 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ

10.1.1 Ο βασισμένος στο στοιχείο *Minos* φορέας μετασηματισμού **pMiBo14/GtTA2** (κατασκευή Α. Κλινάκης) (Koukidou *et al.*, 2006)

Το πλασμίδιο δότης pMiBO14/GtTA2 περιέχει δύο αντίγραφα της κωδικής περιοχής του χειριστή της τετρακυκλίνης (*tetO*) ανάμεσα σε δύο στοιχειώδεις υποκινητές *hsp70*, οι οποίοι οδηγούν τη μεταγραφή των γονιδίων *tTA* και *egfp* και τις αλληλουχίες πολυαδενυλίωσης *hsp70* και *SV40*, αντίστοιχα.

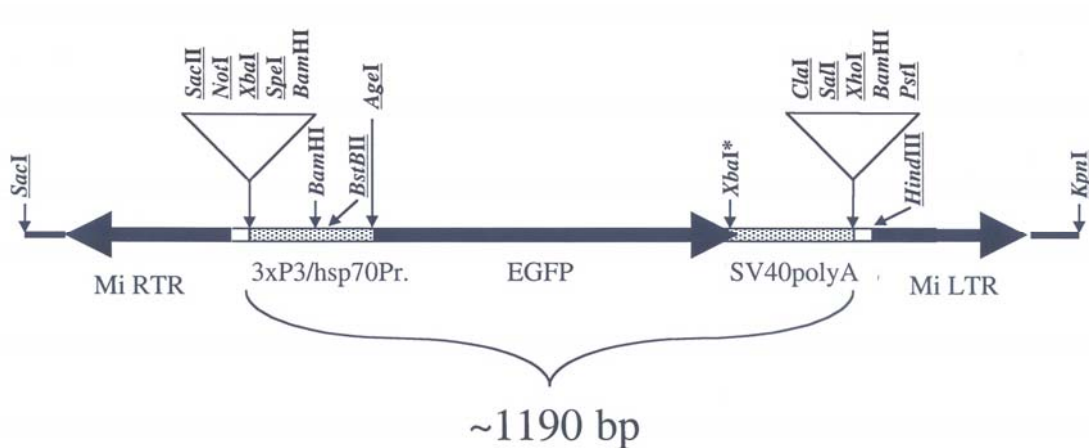
Αναλυτικότερα, το γονίδιο *egfp* μαζί με τον *hsp70* ελάχιστο υποκινητή (TATA) και το σήμα πολυαδενυλίωσης *SV40* απομονώθηκαν από το πλασμίδιο p3XP3-EGFP (Horn & Wimmer, 2000) ως τμήμα *BstBI* (γέμισμα 5' άκρων με Klenow)/*ClaI*, και υποκλωνοποιήθηκαν στο φορέα pBluescript II SK (+) (Stratagene) κομμένο με *EcoRV/ClaI*. Η αλληλουχία *tetO* εξήχθη ως *AluI* τμήμα από το φορέα PBI-L (Clontech). Δύο αντίγραφα του συγκεκριμένου τεμαχίου υποκλωνοποιήθηκαν στη θέση *SmaI* του φορέα pBluescript II SK (+), δημιουργώντας ένα *tetO*-14μερές. Ο ελάχιστος υποκινητής *hsp70* απομονωμένος με τα περιοριστικά ένζυμα *BamHI* και *KpnI* από το πλασμίδιο p3XP3-EGFP (Horn & Wimmer, 2000), η περιοχή πολυαδενυλίωσης *hsp70* (*hsp70pA*) ως ένα *XbaI/NotI* τμήμα από το πλασμίδιο pHSS6hs/LMi2 (Loukeris *et al.*, 1995b), το *tetO*-14μερές ως ένα *BamHI/NotI* τμήμα από τον αναφερθέντα φορέα pBluescript II SK (+), και το *tTA* γονίδιο απομονωμένο με τα περιοριστικά ένζυμα *KpnI* και *NheI* από το πλασμίδιο pBI/GtT, υποκλωνοποιήθηκαν στο φορέα pBluescript II SK (+) που περιείχε την κωδική περιοχή του γονιδίου της *egfp*, τον ελάχιστο υποκινητή *hsp70* και την περιοχή πολυαδενυλίωσης *SV40*, μετά από πέψη με *EcoRI/NotI* σε μία αντίδραση συγκόλλησης πέντε τμημάτων DNA, παράγοντας το φορέα pBO14/GtTA. Η θέση *XhoI* του φορέα pBO14/GtTA καταστράφηκε με γέμισμα παράγοντας το φορέα pBO14/GtTA2. Ένα *XhoI/XbaI* τμήμα αυτού του φορέα, το οποίο περιείχε όλη την κασέτα εκτός του γονιδίου *tTA* και του *hsp70pA*, υποκλωνοποιήθηκε στον pMiLRtetR (Klinakis *et al.*, 2000b) παράγοντας το φορέα pMiBO14-G. Η υπόλοιπη κασέτα από το φορέα pBO14/GtTA2 εξήχθη ως *XbaI/NotI* τμήμα αποκαθιστώντας διαδοχικά το γονίδιο *tTA*.



Εικόνα 24. Ο φορέας μετασχηματισμού pMiBo14/GtTA2

10.1.2 Ο βασιμένος στο στοιχείο *Minos* φορέας μετασχηματισμού pMi3xP3-EGFP

(κατασκευή S. Oehler, προσωπική επικοινωνία)

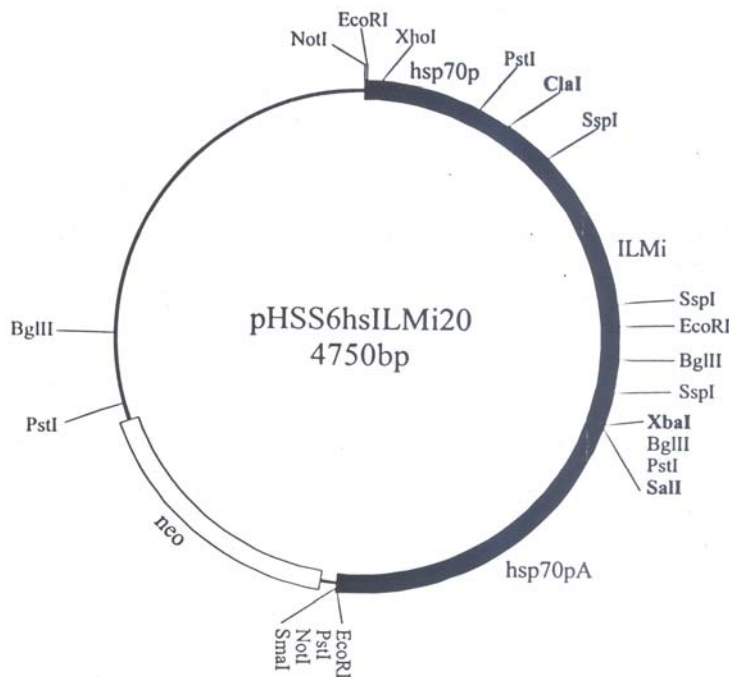


Εικόνα 25. Ο φορέας μετασχηματισμού pMi3xP3-EGFP

10.1.3 Το πλασμίδιο βοηθός pHSS6hsILMi20 (Klinakis *et al.*, 2000a)

Περιλαμβάνει την κωδική περιοχή του γονιδίου της τρικοζάσης *Minos* κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή *hsp70* της *D. melanogaster*. Το πλασμίδιο βοηθός προέκυψε από την υποκλωνοποίηση της κωδικής περιοχής της τρικοζάσης του *Minos* (ILMi), από το ATG μέχρι το TAA από την οποία έχει απομακρυνθεί το

παρεμβalλόμενο εσώνιο, ως τμήμα με άκρα *ClaI-XbaI*, στον παραπάνω φορέα έκφρασης.



Εικόνα 26. Το πλασμίδιο βοηθός pHSS6hsILMi20

10.1.4 Το πλασμίδιο μήτρα pBlueSKMimRNA για τη σύνθεση του βοηθού mRNA (κατασκευή Τ. Παυλόπουλος, προσωπική επικοινωνία)

Από το πλασμίδιο pNB40ILT (Karpetanaki *et al.*, 2002) απομονώθηκε τμήμα DNA μεγέθους 1.9 Kb με άκρα *PstI* (αφαίρεση 3' μονόκλωνων άκρων με T4 πολυμεράση)/*NotI*, που περιλαμβάνει την 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου *hsp70* της *D. Melanogaster*, την κωδική περιοχή του γονιδίου της τρoνσποζάσης *Minos* και την 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου *inflated (if)* της *D. Melanogaster*. Το παραπάνω τμήμα κλωνοποιήθηκε στο φορέα pBluescript II SK (+) (Stratagene) κομμένο με *KpnI* (αφαίρεση 3' μονόκλωνων άκρων με T4 πολυμεράση)/*NotI*, τοποθετώντας την παραπάνω μεταγραφική μονάδα υπό τον έλεγχο του υποκινητή T7.

10.1.5 Πλασμίδιο μήτρα για τη σύνθεση mRNA του γονιδίου *tra2* του δάκου της ελιάς

Το μεγαλύτερο τμήμα της κωδικής περιοχής του γονιδίου *tra2* (nt 112-808 της κατατεθειμένης αλληλουχίας AJL547623), περίπου 700 bp, πολλαπλασιάστηκε με PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα το φορέα pBluescript II SK (+) (Stratagene) ο οποίος περιείχε όλη την κωδική περιοχή (cDNA) του γονιδίου *tra2* υποκλωνοποιημένη στις θέσεις *EcoRI* και *XhoI*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν :

Tra2-F: 5'- CGGAATTCCTTCACGTAGCCGTAGCCTTT - 3',

Tra2-R: 5' - CGGAATTCCTTGCTGCGATTGTGATAAGG - 3'. Αμφότεροι οι εκκινητές φέρουν αλληλουχία αναγνώρισης από την *EcoRI* στα άκρα τους.

Θερμοκυκλικό πρόγραμμα PCR:	94°C για 5'	} x 5
Πολυμεράση Pfu (Stratagene)	94°C για 45''	
	60°C για 1'	
	72°C για 40''	
	94°C για 45''	} x 25
	63°C για 45''	
	72°C για 40''	
	72°C για 5'	

Το μεγέθους 700 bp προϊόν PCR, απομονώθηκε από πήκτωμα αγαρόζης, καθαρίστηκε, επώαστηκε με *EcoRI* και υποκλωνοποιήθηκε στον αποφωσφορυλιωμένο και κομμένο με *EcoRI* φορέα pLL10 (Blandin *et al.*, 2002), ανάμεσα σε δύο T7 υποκινητές.

10.1.6 Τελική πλασμιδιακή κατασκευή γενετικού μετασχηματισμού με βάση το γονίδιο *tra2* του δάκου της ελιάς (pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP)

Το πλασμίδιο δότης pMiBotra2/tTA/3xP3-EGFP περιλαμβάνει δύο τμήματα της κωδικής περιοχής του γονιδίου *tra2* του *B. oleae*, στα οποία παρεμβάλλεται το εσώνιο 4 του ίδιου γονιδίου, με αντίστροφη κατεύθυνση μεταγραφής, υπό τον έλεγχο του χειριστή *tetO* και ενός στοιχειώδους υποκινητή *hsp70* (TATA). Η έκφραση του *tetO* ρυθμίζεται από την έκφραση του γονιδίου tTA, το οποίο βρίσκεται υπό τον έλεγχο του *hsp83* υποκινητή της *C. capitata*. Όλα τα παραπάνω τμήματα DNA είναι κλωνοποιημένα στο φορέα pMi3xP3-EGFP (κατασκευή S.Oehler), ο οποίος φέρει το γονίδιο *egfp* υπό τον έλεγχο του υποκινητή 3xP3 που προσδίνει έκφραση στους οφθαλμούς.

Το απομονωμένο τμήμα της κωδικής περιοχής του γονιδίου *tra2* που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για τη σύνθεση mRNA με τις θέσεις *EcoRI* υποκλωνοποιήθηκε στο φορέα pBluescript II SK (+) (Stratagene) κομμένο και αποφωσφορυλιωμένο στην ίδια θέση. Ο προσανατολισμός της κωδικής περιοχής ελέγχθηκε με το περιοριστικό ένζυμο *XbaI*.

Το ίδιο τμήμα DNA υποκλωνοποιήθηκε στο φορέα pGEM-T Easy (Promega) κομμένο και αποφωσφορυλιωμένο στη θέση *EcoRI*. Ο προσανατολισμός της κωδικής περιοχής ελέγχθηκε με τα περιοριστικά ένζυμα *XbaI* και *Sall*.

Ένα τμήμα DNA μεγέθους 180 bp, το οποίο περιλάμβανε το εσώνιο 4 του γονιδίου *tra2* καθώς και τις εκατέρωθεν θέσεις ματίσματος με τα γειτονικά εξόνια του ίδιου γονιδίου, απομονώθηκε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιώντας ως μήτρα γενωμικό υλικό του *B. Oleae*, με τους εξής εκκινητές:

Intron-F: 5' CCCAAGCTTCAGCACACACGAAAATCGTC 3' (φέρει θέση *HindIII*)
 Intron-R: 5' CGATATCTGCGTTGTATACACACTTAAACCA 3' (φέρει θέση *EcoRV*).

Θερμοκυκλικό πρόγραμμα PCR:	94°C για 5'	} x 30
Πολυμεράση Taq (Minotech)	94°C για 30''	
	60°C για 30''	
	72°C για 30''	
	72°C για 5'	

Το πολλαπλασιασμένο τμήμα DNA υποκλωνοποιήθηκε στο φορέα pGEM-T Easy (Promega) και στη συνέχεια απομονώθηκε ως τμήμα *HindIII/EcoRV*. Το απομονωμένο προϊόν υποκλωνοποιήθηκε στο φορέα pBluescript II SK (+) που έφερε το τμήμα *tra2*, κομμένο στις θέσεις *EcoRV/NotI* (ως ένα τμήμα) και *HindIII/NotI* (ως άλλο τμήμα), σε μία αντίδραση συγκόλλησης τριών τμημάτων. Η αλληλουχία πολυαδενυλίωσης *hsp70* απομονώθηκε από το πλασμίδιο βοηθός pHSS6hsILMi20 ως ένα *NotI/XbaI* τεμάχιο και υποκλωνοποιήθηκε στο φορέα pBluescript II SK (+) που έφερε το τμήμα *tra2* και το εσώνιο, κομμένο με τα περιοριστικά ένζυμα *NotI* και *SpeI*. (Η ενδιάμεση αυτή κατασκευή ονομάζεται pSKtra2/intron/pA). Αμφότερες οι θέσεις περιορισμού *SpeI* και *XbaI* καταστράφηκαν.

Το τμήμα *tra2*, κλωνοποιημένο στο φορέα pGEM-T Easy, απομονώθηκε ως ένα *SalI/ApaI* (5' → 3') τεμάχιο και υποκλωνοποιήθηκε στο φορέα pSKtra2/intron/pA κομμένο με *EcoRV/SalI* (ως ένα τμήμα που περιείχε το εσώνιο 4 και ένα μέρος του φορέα pBluescript II SK (+)), και με *EcoRV/ApaI* (ως ένα άλλο τμήμα το οποίο περιείχε το 700 bp τμήμα του γονιδίου *tra2*, την περιοχή πολυαδενυλίωσης *hsp70* και τον υπόλοιπο φορέα pBluescript II SK (+)) σε μία αντίδραση συγκόλλησης τριών τμημάτων. (Η ενδιάμεση αυτή κατασκευή ονομάζεται pSKtra2/intron/pA/tra2. Στη συγκεκριμένη κατασκευή, όλα τα υποκλωνοποιημένα τμήματα DNA ως σύνολο, μπορούν να απομονωθούν ως μια *SacII* κασέτα).

Ο χειριστής *tetO* και ο ελάχιστος υποκινητής *hsp70* της *D.melanogaster* απομονώθηκαν ως ένα τμήμα, μεγέθους περίπου 850 bp, μετά από επώαση του πλασμιδίου pMiBo14/GtTA2 με το περιοριστικό ένζυμο *EcoRI*, και υποκλωνοποιήθηκαν στον ενδιάμεσο φορέα pGEM-T Easy στην ίδια θέση με προσανατολισμό 5' tetO-TATA 3', για διευκόλυνση σε παραπέρα χειρισμούς (ο φορέας pGEM-T Easy περιέχει μια θέση *SacII* ανάμεσα στις θέσεις *EcoRI* και *NotI* που χρησιμοποιήθηκαν για την μεταφορά των αναφερόμενων τμημάτων στη τελική κατασκευή. Ο προσανατολισμός του τεμαχίου ελέγχθηκε με τα περιοριστικά ένζυμα *PstI*, *HindIII* και *KpnI*). Ο χειριστής *tetO* και ο ελάχιστος υποκινητής *hsp70* απομονώθηκαν από τον pGEM-T Easy ως τμήμα με άκρα *NotI* και κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pMi3xP3-EGFP στην ίδια θέση, στην περιοχή του πολυσυνδέτη με κατεύθυνση μεταγραφής αντίθετη από αυτή του γονιδίου *egfp*.

Η κασέτα που περιείχε τα τμήματα *tra2* (με αντίθετο προσανατολισμό), το εσώνιο 4, και την αλληλουχία πολυαδενυλίωσης *hsp70* απομονώθηκε ως τμήμα *SacII*, μεγέθους 2.55kb, από την ενδιάμεση κατασκευή pSKtra2/intron/pA/tra2 και κλωνοποιήθηκε στο φορέα pMi3xP3-EGFP, ο οποίος περιείχε ήδη το τμήμα tetO/TATA, κομμένο και αποφωσφορυλιωμένο στην ίδια θέση. Ο προσανατολισμός της κασέτας ελέγχθηκε με τα περιοριστικά ένζυμα *NotI*, *HindIII*, *BamHI* και *SmaI* ούτως ώστε ο ελάχιστος υποκινητής *hsp70* να βρίσκεται αμέσως μετά τον χειριστή *tetO*. Η συγκεκριμένη κατασκευή ονομάστηκε pMi3xP3-EGFP/ tetO/TATA/tra2/intron/pA/tra2

Ένα τμήμα DNA μεγέθους 1.2 kb, το οποίο περιλάμβανε το γονίδιο tTA και την αλληλουχία πολυαδενυλίωσης bovine growth hormone terminator, απομονώθηκε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, χρησιμοποιώντας ως μήτρα το φορέα pserptta (Lycett *et al.*, 2004) και τους εκκινητές:

5' CGGCCGAATTCATATGTCTAGATTAGATAAAAAG 3' (φέρει θέση *EcoRI*)

5' AAATAGAATTC~~CC~~CATAGAGACCCACCGCATC 3' (φέρει θέση *EcoRI*)

Θερμοκυκλικό πρόγραμμα PCR:	94°C για 5'	
Πολυμεράση Pfu (Stratagene)	94°C για 30''	} x 5
	50°C για 30''	
	72°C για 3'	
	94°C για 30''	} x 25
	55°C για 30''	
	72°C για 3'	
	72°C για 5'	

Το πολλαπλασιασμένο τμήμα DNA υποκλωνοποιήθηκε στο φορέα pGEM-T Easy, αφού προηγουμένως υπέστη επεξεργασία με πολυμεράση Taq (Minotech) για είκοσι λεπτά στους 70°C, απομονώθηκε ως τμήμα *EcoRI*, και υποκλωνοποιήθηκε στο φορέα pBluescript II SK (+) ο οποίος περιείχε τον υποκινητή *hsp83* στις θέσεις περιορισμού *BamHI* και *EcoRI*. Ο προσανατολισμός του τεμαχίου ελέγχθηκε με τα περιοριστικά ένζυμα *BamHI* και *XbaI*, ούτως ώστε το γονίδιο *tTA* να έπεται του υποκινητή. Η ενδιάμεση αυτή κατασκευή ονομάστηκε pSKhsp83/tTA/pA.

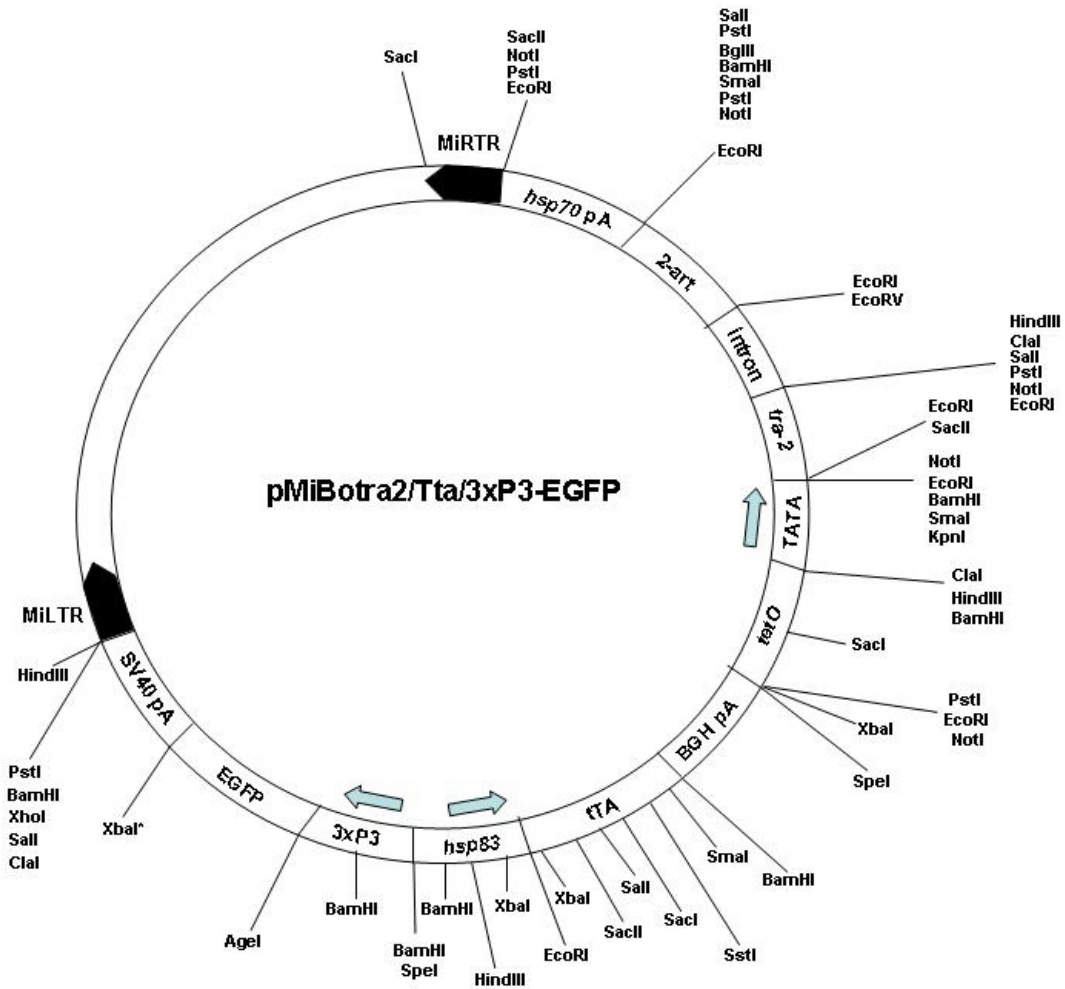
Ο υποκινητής *hsp83*, το γονίδιο *tTA* και η αλληλουχία πολυαδενυλίωσης bovine growth hormone terminator, απομονώθηκαν με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, χρησιμοποιώντας ως μήτρα το φορέα pSKhsp83/tTA/pA και τους εκκινητές:

5' GAACTAGTGGATCCAGAATATTCCTGTAC 3' (φέρει θέση *SpeI*)

5' TCACTAGTCCATAGAGCCCACCGCATC 3' (φέρει θέση *SpeI*)

Θερμοκυκλικό πρόγραμμα PCR:	94°C για 5'	
Πολυμεράση Pfu (Stratagene)	94°C για 30''	} x 5
	55°C για 30''	
	72°C για 3'	
	94°C για 30''	} x 25
	60°C για 30''	
	72°C για 3'	
	72°C για 5'	

Το πολλαπλασιασμένο τμήμα DNA υποκλωνοποιήθηκε στο φορέα pGEM-T Easy, αφού προηγουμένως υπέστη επεξεργασία με πολυμεράση Taq (Minotech) για είκοσι λεπτά στους 70°C, απομονώθηκε ως τμήμα *SpeI*, και υποκλωνοποιήθηκε στο φορέα pMi3xP3-EGFP/ tetO/TATA/ tra2/intron/pA/tra2, κομμένο στην ίδια θέση περιορισμού. Ο προσανατολισμός του τμήματος ελέγχθηκε με το περιοριστικό ένζυμο *HindIII* έτσι ώστε ο υποκινητής *hsp83* να έχει κατεύθυνση μεταγραφής αντίθετη με αυτή του υποκινητή 3xP3 και ίδια με αυτή του ελάχιστου υποκινητή *hsp70*.



Εικόνα 27. Το τραπεζόνοιο *Minos* pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP. Τα βέλη στους υποκινητές, δείχνουν την κατεύθυνση μεταγραφής των γονιδίων που ακολουθούν.

10.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ & ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΖΩΩΝ

10.2.1 *Bactrocera oleae*

10.2.1.1 Καλλιέργεια

Τα έντομα του δάκου της ελιάς που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη προέρχονται από την αποικία του Πανεπιστημίου Κρήτης (περίπου 40 γενεών), η οποία προήλθε από την αποικία του Δημοκρίτου (Αθήνα) (περίπου 400 γενεών) και αναπτύχθηκαν κάτω από τις εξής συνθήκες: θερμοκρασία 22-25 °C, σχετική υγρασία 50-70% και φωτοπερίοδο διάρκειας δεκατριών ωρών. Η διαίτα των ενηλίκων αποτελείται από 100 g υδρολυμένη μαγιά (Sigma), 400 g ζάχαρη, 30 g κρόκο αυγού (Sigma) και 250 mg στρεπτομυκίνη, ανά 0.5 Kg τροφής ενηλίκων. Οι εκκολαπτόμενες προνύμφες του δάκου της ελιάς μεταφέρονταν σε τροφή που περιείχε: 550 ml νερό, 30 g υδρολυμένη σόγια, 0.5 g σορβικό κάλλιο, 2 g νιπαγίνη, 20 g ζάχαρη, 75 g μαγιά της μύρας, 30 ml 2M υδροχλωρικό οξύ, 275 g κυτταρίνη, 20 ml ελαιόλαδο και 7.5 ml Tween-80, ανά 1 Kg τροφής προνυμφών (Tzanakakis, 1989).

Οι συλλογές των αυγών από τις διασταυρώσεις εργαστηριακών εντόμων αγρίου τύπου ή διαγονιδιακών στελεχών γίνονταν καθημερινά με τη χρήση κώνων ή θόλων σερεζίνης ανάλογα με το μέγεθος της εκάστοτε αποικίας. Οι συλλογές αυγών πραγματοποιούνταν από την πέμπτη μέρα ηλικίας των ενηλίκων μέχρι και την 12-14 μέρα. Σε συγκεκριμένες περιπτώσεις (π.χ. στη δημιουργία διαγονιδιακών σειρών), συλλογές πραγματοποιούνταν μέχρις ότου τα αυγά που συλλέγονταν να μην είναι πλέον γονιμοποιημένα/βιώσιμα. Τα εναποθετημένα αυγά ξεπλένονταν με απιονισμένο νερό και μεταφέρονταν σε τρυβλία petri πάνω σε νωπό Whatmann, όπου παρέμεναν μέχρι την εκκόλαση των προνυμφών, περίπου 36 ώρες σε θερμοκρασία 23 °C. Οι προνύμφες στη συνέχεια μεταφέρονταν σε τρυβλία petri τα οποία περιείχαν τροφή προνυμφών, για περίπου 10 ημέρες μέχρι την εμφάνιση των νυμφών. Η νύμφωση η οποία διαρκεί 9-14 ημέρες, πραγματοποιούνταν σε πλαστικά κουτιά διαμέτρου 30 εκ., τρυπημένα στο πάνω τους μέρος για τον ελεύθερο αερισμό.

10.2.1.2 Μικροενέσεις και δημιουργία διαγονιδιακών σειρών

Οι μικροενέσεις πραγματοποιούνται στους 19-20 °C, ώστε να επιβραδύνεται η κυτταροποίηση των εμβρύων. Τα ενήλικα θηλυκά αφήνονται να ωοαποθέσουν για μισή-μία ώρα, ώστε όλα τα έμβρυα που συλλέγονται να βρίσκονταν στο προβλαστοδερμικό στάδιο ανάπτυξης. Τα έμβρυα μετά τη συλλογή τους μεταφέρονται σε ειδικό πλαστικό καλαθάκι με λεπτό πλέγμα, ξεπλένονται σε διάλυμα Ringer's (46mM NaCl, 182mM KCl, 3mM CaCl₂, 10mM Tris-HCl) και αποχοριώνονται σε διάλυμα 2,5% υποχλωριώδους νατρίου για ένα λεπτό. Μετά την αποχορίωση, τα έμβρυα ξεπλένονται ξανά, μεταφέρονται με πινέλο σε τρυβλία με στερεοποιημένο χυμό φρούτου και τοποθετούνται σε σειρές πάνω σε καλυπτρίδες, με τέτοιο τρόπο ώστε το οπίσθιο μέρος του εμβρύου να βρίσκεται στο εξωτερικό μέρος της καλυπτρίδας, προσκολλημένα σε αυτές με κολλητική ταινία διπλής όψης. Η αφυδάτωση των εμβρύων εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και κυμαίνονταν από καθόλου (σε ιδιαίτερα ξηρές μέρες) ως και 3 λεπτά. Τα αφυδατωμένα έμβρυα καλύπτονται από συνθετικό λάδι (halocarbon oil, Sigma). Οι μικροβελόνες κατασκευάζονται από γυάλινα τριχοειδή (Harvard Apparatus) σε ειδική συσκευή (Shutter Instrument Co Puller: heat 300, pull 160, vel.60, time 150). Το μίγμα πλασμιδίου δότη-τρανσποζάσης βρίσκεται σε σταθερή αναλογία 400-100 ng/μl αντιστοίχως και ενέεται σε ρυθμιστικό διάλυμα (0.1 mM Sodium Phosphate, pH: 7.4, 5 mM KCl). Η

μικροβελόνα προσαρμόζεται στο μικροχειρηστήριο (Leitz), η ροή ελέγχεται με τη βοήθεια αυτόματης αντλίας (Narishige IM 300 Microinjector) και οι μικροενέσεις των εμβρύων πραγματοποιούνται σε οπτικό μικροσκόπιο (Leica). Τα ενεμένα έμβρυα μεταφέρονται σε τρυβλία Petri με νωπό Whatmann και επωάζονται μέχρι την εκκόλαψη των προνυμφών στους 25 °C. Οι προνύμφες μεταφέρονται σε κανονική τροφή και αναπτύσσονται μέχρι την ενηλικίωση τους στους 25 °C.

Τα ενήλικα άτομα G0 διασταυρώνονται μαζί με άτομα αγρίου τύπου του αντίθετου φύλου (αναλογία ενεμένων αρσενικών προς θηλυκά, 1 προς 4, και αναλογία ενεμένων θηλυκών προς αρσενικά, 1 προς ένα). Η συλλογή και διαχείριση των G1 εμβρύων έγινε όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Τα διαγονιδιακά άτομα G1 επιλέγονται με βάση το φθορισμό τους (έκφραση EGFP), στο τρίτο στάδιο της προνύμφης στην περίπτωση του πλασμιδίου δότη pMiBo14/GtTA2, ή στο στάδιο του εντόμου όταν χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια δότες pMi3xP3-EGFP και pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP. Κάθε φθορίζων G1 αρσενικός διασταυρώθηκε ξεχωριστά με άτομα αγρίου τύπου του αντίθετου φύλου στις αναλογίες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Από την αναλογία των μετασχηματισμένων προς μη μετασχηματισμένων απογόνων G2 συμπεραίνεται ο αριθμός των μη συνδεδεμένων ενθέσεων. Στη περίπτωση του *B. oleae*, δεν υπάρχουν διαθέσιμα χρωμοσώματα εξισορρόπησης, οπότε για τη διατήρηση της σειράς απομακρύνονται τα μη μετασχηματισμένα άτομα.

10.2.2 *Drosophila melanogaster*

10.2.2.1 Καλλιέργεια

Το στελέχος της *D. melanogaster* που χρησιμοποιήθηκε είναι το *IS31*. Η καλλιέργεια του στελέχους έγινε σύμφωνα με το εργαστηριακό εγχειρίδιο Ashburner (1989). Η συλλογή των εμβρύων πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία με στερεοποιημένο χυμό φρούτου (3% άγαρ, 0.3% νιπαγίνη) και μικρή ποσότητα νωπής μαγιάς.

10.2.2.2 Μικροενέσεις και δημιουργία διαγονιδιακών σειρών

Οι ενέσεις πραγματοποιήθηκαν στους 19 °C για την επιβράδυνση της κυτταροποίησης των εμβρύων. Η διαγονιδιακή κατασκευή pMiBotra2/tTa/3xP3-EGFP εισάχθηκε στο γονιδίωμα του στελέχους *IS31*, που στερείται οφθαλμικών χρωστικών και διευκολύνει την ανίχνευση μετασχηματισμένων ατόμων. Η διαδικασία των μικροενέσεων στη *D. melanogaster* είναι σύμφωνη με τα όσα αναφέρθηκαν για το είδος *B. oleae*, με μόνη διαφορά την αφυδάτωση των εμβρύων, όπου στη *D. melanogaster* γίνεται για 8-11 λεπτά.

Τα ενήλικα άτομα G0 διασταυρώθηκαν με άτομα *IS31* του αντίθετου φύλου σε αναλογία 1 προς 3 και μεταφέρθηκαν δύο φορές ανά πέντε ημέρες σε καινούργια τροφή. Τα διαγονιδιακά άτομα G1 πέρασαν από διαδικασία επιλογής στο στάδιο του εντόμου και επιλέχθηκαν βάση του οφθαλμικού κυρίως φθορισμού τους. 2-3 G1 διαγονιδιακά αρσενικά από κάθε διασταύρωση G0, επαναδιασταυρώθηκαν με άτομα *IS31* του αντίθετου φύλου σε αναλογία 1 προς 3, ώστε να διαχωριστούν πιθανές πολλαπλές ενθέσεις. Για τη δημιουργία ομόζυγων διαγονιδιακών σειρών, αρσενικά διαγονιδιακά άτομα G2 διασταυρώθηκαν με θηλυκά άτομα που έφεραν χρωμοσώματα εξισορρόπησης για τα χρωμοσώματα 2 και 3, σύμφωνα με το εργαστηριακό εγχειρίδιο Ashburner (1989). Σε όλες τις παραπάνω διασταυρώσεις χρησιμοποιήθηκε τροφή με τετρακυκλίνη, 10 μg/ml. Η τετρακυκλίνη

ενσωματώνονταν σε έτοιμη υγρή τροφή θερμοκρασίας 40°C και αναδεύονταν καλά για την ομοιόμορφη κατανομή της.

10.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

10.3.1 Βακτηριακά στελέχη και θρεπτικά μέσα

Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στις κλωνοποιήσεις ήταν το DH5a. Η προετοιμασία και η χρήση δεκτικών κυττάρων καθώς και τα θρεπτικά μέσα που απαιτήθηκαν για τις βακτηριακές καλλιέργειες παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τα πρωτόκολλα του εργαστηριακού εγχειριδίου (Sambrook *et al.*, 1989).

10.3.2 Απομόνωση γενωμικού DNA (Berkley protocol)

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο εφαρμόστηκε για την απομόνωση γενωμικού DNA από ενήλικα άτομα όλων των οργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διατριβή (*B. oleae*, *D. melanogaster*, *C. capitata*), για τη τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Οι παρακάτω ποσότητες διαλυμάτων αντιστοιχούν σε μάζα ιστού ενός ενήλικου της μεσογειακής μύγας και του δάκου της ελιάς και 20-30 περίπου ενήλικων της ξυδόμευγας.

- Τα έντομα συλλέγονται σε erpendorf tubes. Σε αυτό το στάδιο τα έντομα μπορούν να συντηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα στους -80°C .
- Στο δείγμα προστίθενται 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος A. Τα έντομα ομογενοποιούνται με ομογενοποιητή πολύ καλά. Προστίθενται ακόμα 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος A.
- Επώαση στους 65°C για 30 λεπτά.
- Προσθήκη 400 μl διαλύματος LiCl/KAc και επώαση στο πάγο για τουλάχιστον 10 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση έως 13.000 rpm, 15 λεπτά στους 25°C .
- Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο erpendorf tube.
- Προσθήκη 300 μl ισοπροπανόλης, ανάμιξη, φυγοκέντρηση 13.000 rpm, 15 λεπτά, στους 25°C .
- Πλύση με 70% αιθανόλη. Στέγνωμα DNA.
- Διαλυτοποίηση σε 30-50 μl αποστειρωμένου miliQ H₂O.

Ρυθμιστικό διάλυμα A

100 mM Tris-HCl, pH 7.5
100mM EDTA
100mM NaCl
0.5% SDS

Διάλυμα LiCl/KAc

1 μέρος 5M KAc : 2.5 μέρη 6M LiCl

10.3.3 Απομόνωση γενωμικού DNA (Laird *et al.*, 1991)

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο εφαρμόστηκε για την απομόνωση γενωμικού DNA από ενήλικα άτομα όλων των οργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή (*B. oleae*, *D. melanogaster*, *C. capitata*), για τη τεχνική ανάλυσης κατά Southern. Οι παρακάτω ποσότητες διαλυμάτων αντιστοιχούν σε μάζα ιστού ενός ενήλικου της μεσογειακής μύγας και του δάκου της ελιάς και 20-30 περίπου ενήλικων της ξυδόμευγας.

- Το δείγμα συλλέγεται σε erpendorf tubes.
- Προσθήκη 400 μl διαλύματος ομογενοποίησης. Τα έντομα ομογενοποιούνται με ομογενοποιητή πολύ καλά.
- Προσθήκη πρωτεϊνάσης K (330 μg/ml)

- Επώαση στους 55 °C κατά τη νύχτα.
- Φυγοκέντρηση 14.000 rpm, 3-5 λεπτά, θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο eppendorf tube.
- Προσθήκη RNάσης (100-200 µg/ml). Επώαση στους 37 °C για 30 λεπτά.
- Προσθήκη ίδιου όγκου διαλύματος φαινόλης/χλωροφόρμιο. Καλή ανάδευση για 5-10 λεπτά. Φυγοκέντρηση 14.000 rpm, 10 λεπτά, θερμοκρασία δωματίου. Η πάνω φάση του φυγοκεντρημένου διαλύματος μεταφέρεται σε νέο eppendorf tube.
- Επανάληψη του προηγούμενου βήματος.
- Προσθήκη ίδιου όγκου χλωροφόρμιο. Καλή ανάδευση για 5-10 λεπτά. Φυγοκέντρηση 14.000 rpm, 10 λεπτά, θερμοκρασία δωματίου. Η πάνω φάση του φυγοκεντρημένου διαλύματος μεταφέρεται σε νέο eppendorf tube.
- Προσθήκη 0.8 όγκου ισοπροπανόλης, ανάμιξη, φυγοκέντρηση 14.000 rpm, 10 λεπτά, θερμοκρασία δωματίου.
- Πλύση με 70% αιθανόλη. Στέγνωμα DNA.
- Διαλυτοποίηση σε 50 µl αποστειρωμένου miliQ H₂O.

Διάλυμα ομογενοποίησης

50mM Tris-HCl, pH: 8.0

100mM EDTA

100mM NaCl

1% SDS

10.3.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini-prep)

Για ποιοτική ανάλυση κλώνων επιλέχθηκε η μέθοδος Merlin (http://130.15.90.245/methods/merlin_miniprep.html), η οποία δίνει άριστης ποιότητας πλασμιδιακό DNA.

10.3.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (maxi-prep)

Η μέθοδος Merlin (http://130.15.90.245/methods/merlin_miniprep.html) χρησιμοποιήθηκε για την απόκτηση μεγάλης και εξαιρετικά καθαρής ποσότητας πλασμιδιακού DNA, για επιμέρους βήματα κλωνοποίησης και μικροενέσεις. Στην περίπτωση που το πλασμιδιακό DNA θα χρησιμοποιούνταν σε διάλυμα μικροενέσεων, αποθηκεύονταν στους -80°C σε μικρά κλάσματα, ώστε να αποφεύγεται η επαναλαμβανόμενη ψύξη-απόψυξη που καταστρέφει την υπερελικωμένη δομή του.

10.3.6 Χειρισμός DNA

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης εφαρμόστηκε για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση, την ποσοτικοποίηση και την απομόνωση τμημάτων DNA. Η χρώση του DNA έγινε με βρωμιούχο αιθίδιο. Η συγκέντρωση διαλυμάτων DNA προσδιορίστηκε φωτομετρικά με τη συσκευή GeneQuant (Pharmacia Biotech) ή με τη συσκευή nanodrop. Τα περιοριστικά και τροποποιητικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από τις εταιρίες Minotech, New England Biolabs, Roche και Stratagene. Οι συνθήκες αντίδρασης ήταν οι προτεινόμενες από τους κατασκευαστές. Η αλληλούχιση (sequencing) των τμημάτων DNA πραγματοποιήθηκε από το εργαστήριο Μικροχημείας και το εργαστήριο Γονιδιοματικής του IMBB.

10.3.7 Ανάλυση κατά Southern

Δείγματα γενωμικού DNA 1-5 µg επωάζονταν με την κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση για 3 ώρες ή κατά τη διάρκεια της νύχτας. Στη συνέχεια αναλύονταν σε πήκτωμα αγαρόζης (0.8 %), μεταφέρονταν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (PROTRAN; Schleicher & Schuell) και ακινητοποιούνταν όπως έχει περιγραφεί (Sambrook *et al.*, 1989). Οι μεμβράνες επωάζονταν για μισή ώρα σε διάλυμα προ-υβριδοποίησης σε ειδικούς κυλίνδρους στους 60-65 °C και ακολουθούσε προσθήκη του ραδιενεργού ανιχνευτή και ολονύκτια υβριδοποίηση. Οι ραδιενεργοί ανιχνευτές συντέθηκαν με τη μέθοδο “nick translation” ως εξής: σε 100 ng DNA προστέθηκαν από 2 µl μη ραδιοσημασμένα dTTP και dGTP (1mM), 2 µl διαλύματος “nick translation” (100mM Tris-HCl; pH: 7.5, 50mM MgCl₂, 7.5mM DTT), 15 μονάδες DNA πολυμεράσης (*E. coli* pol I), 1 µl DNase I (0.5 µg/ml) και από 2 µl α-[³²P] dATP και α-[³²P] dCTP (1mM). Η αντίδραση είχε συνολικό όγκο 20 µl και επωάστηκε για 45 λεπτά στους 16 °C. Τα ραδιενεργά νουκλεοτίδια που δεν ενσωματώθηκαν, απομακρύνθηκαν με μοριακή διήθηση σε κολώνα χρωματογραφίας Sephadex G-50. Οι υβριδοποιημένες μεμβράνες υποβάλλονταν σε διαδοχικά 15λεπτα ξεπλύματα κατά σειρά με τα προθερμασμένα στους 65 °C διαλύματα 3xSSC, 0.1% SDS (x 2) και 0.3xSSC, 0.1% SDS (x 2). Οι εκθέσεις των μεμβρανών γίνονταν είτε σε κασέτες αυτοραδιογραφίας στους -80 °C, είτε στις κασέτες του Phosphorimager (Molecular Dynamics).

Διάλυμα προ-υβριδοποίησης

5x SSC

10% PEG 8000

5% Poly(sodium 4-styrenesulphonate) (Sigma)

0.2% Cetylpyridinium chloride monohydrate (Sigma)

10.3.8 Κλωνοποίηση παρακειμένων χρωμοσωμικών αλληλουχιών στις θέσεις ένθεσης του *Minos*

150 ng γενωμικού DNA από διαγονιδιακά άτομα μετά από πέψη με το ένζυμο *Mbo*I και μετά την απενεργοποίηση του ενζύμου στους 65 °C, χρησιμοποιήθηκαν σε αντίδραση λιγκάσης με δεσμάση σε όγκο 100 µl, στους 4 °C κατά τη διάρκεια της νύχτας. Από αυτά, 2 µl χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα σε αντίδραση inverse RCR (iPCR) με τους εκκινητές

IMio1 5' AAGAGAATAAAAATTCTCTTTGAGACG 3'

IMii 1 5' CAAAAATATGAGTAATTTATTCAAACGG 3'

Από το προϊόν της πρώτης αντίδρασης iPCR, 1 µl χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα σε δεύτερη αντίδραση iPCR με τους εκκινητές

IMio2 5' GATAATATAGTGTGTTAAACATTGCGC 3'

IMii 2 5' GCTTAAGAGATAAGAAAAAAGTGACC 3'

Θερμοκυκλικό πρόγραμμα iPCR	94°C για 3'	} x 30
1 ^η και 2 ^η αντίδραση	94°C για 30''	
Πολυμεράση Taq (Minotech)	58°C για 30''	
	72°C για 2'	
	72°C για 5'	

Οι εκκινητές IMio1, IMii1, IMio2 και IMii2 υβριδοποιούν στα ανεστραμμένα άκρα του στοιχείου *Minos* και οδηγούν στον πολλαπλασιασμό δύο προϊόντων ανά ένθεση.

Τα προϊόντα της δεύτερης αντίδρασης αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης και τα επιθυμητά τμήματα DNA απομονώθηκαν και κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pGEM-T Easy. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των ειδικών προϊόντων καθορίστηκε με διαδικασία αλληλούχισης (sequencing). Οι παρακείμενες αλληλουχίες στις θέσεις ένθεσης συγκρίθηκαν με γνωστές αλληλουχίες γονιδίων της *D. melanogaster* και της *C. capitata*.

10.3.9 *In vitro* σύνθεση capped mRNA

Για την *in vitro* σύνθεση του mRNA που κωδικοποιούσε την τρानσποζάση *Minos*, χρησιμοποιήθηκε το kit T7mMESSAGEMACHINE (Ambion) σύμφωνα με οδηγίες του κατασκευαστή. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pBlueSKMimRNA ευθυγραμμισμένο με *NotI*.

Για την *in vitro* σύνθεση του mRNA του γονιδίου *tra2* του δάκου της ελιάς, χρησιμοποιήθηκε το ίδιο kit με υπόστρωμα το φορέα pLL10 (ο οποίος περιείχε το περισσότερο από το κωδικό μέρος του γονιδίου *tra2*) ευθυγραμμισμένο με *NotI* για τη σύνθεση της μίας αλυσίδας, και ευθυγραμμισμένο με *HindIII* για τη σύνθεση της συμπληρωματικής της αλυσίδας.

Μετά το πέρας των αντιδράσεων, ακολουθούσε επώαση με DNase I, εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση του DNA με ισοπροπανόλη. Τα δείγματα αποθηκεύονταν στους -80°C σε μικρά κλάσματα.

10.3.10 Απομόνωση RNA

Ολικό RNA απομονώθηκε από ξεχωριστά, ενεμένα με δίκλωνο *tra2* RNA, άτομα του δάκου της ελιάς, χρησιμοποιώντας το RNeasy Protect mini kit (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα δείγματα RNA εκλούστηκαν σε 30 μl RNase-free H_2O και επεξεργάστηκαν με το RNase-free DNase set (Qiagen).

10.3.11 Σύνθεση cDNA/αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR)

Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιήθηκε με το Accuscript RT PCR kit (Stratagene) χρησιμοποιώντας 200 ng ολικού RNA. Το ένα δέκατο της RT-PCR αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την τυπική αντίδραση της αλυσιδωτής πολυμεράσης.

Θερμοκυκλικό πρόγραμμα RT-PCR	94°C για 5'	} x 40
Πολυμεράση Taq (Minotech)	94°C για 30''	
	50-55°C για 30'	
	72°C για 30-45''	
	72°C για 5'	

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις διάφορες RT PCR αντιδράσεις ήταν οι εξής:

tra1: 5'- TACCGCACAAATTCAATCCATG - 3'

tra2: 5'- GTTACAAATACCGCAGATGCTCAA - 3'

Ο εκκινητής *tra1* βρίσκεται στο κοινό (σε αρσενικά και θηλυκά) εξόνιο 1A του γονιδίου *tra*, ενώ ο εκκινητής *tra2* στο κοινό εξόνιο 2A του ίδιου γονιδίου. Στο

μετάγραφο RNA του γονιδίου *tra* του *B. oleae* των αρσενικών ατόμων παρεμβάλλονται δύο εσώνια.

tra2F: 5'- TTCACGTAGCCGTAGCCTTT - 3'

tra2R: 5'- GGATGCTAAGGCGGCCAAGGACG - 3'

Ο εκκινητής *tra2F* βρίσκεται στο κοινό (σε αρσενικά και θηλυκά) εξώνιο 2 και ο εκκινητής *tra2R* στο κοινό εξώνιο 6 του γονιδίου *tra2* του *B. oleae*.

dsxex3: (5'- CAAAAACTATTGGAGAAATTTCTGA - 3')

dsxf: (5'- AAAGTGTAGTGTGCCCGGAT - 3')

dsxm: (5'- CGGATGACGTCAAGCTTGT - 3')

Ο εκκινητής *dsxex3* βρίσκεται στο τελευταίο κοινό (σε αρσενικά και θηλυκά) εξώνιο 3 του γονιδίου *dsx* του *B. oleae*, ενώ οι εκκινητές *dsxf* και *dsxm* στα 3' άκρα των συγκεκριμένων σε θηλυκά και αρσενικά άτομα εξωνίων 4 και 5 αντίστοιχα.

10.3.12 Απομόνωση πολυαδενυλιωμένου mRNA

Πολυαδενυλιωμένο mRNA απομονώθηκε από αρσενικά και θηλυκά άτομα *B. oleae* και *D. melanogaster*, σε μια προσπάθεια ανακάλυψης του γονιδίου *tra2* στο δάκο, χρησιμοποιώντας το Dynal kit (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα δείγματα RNA εκλούστηκαν σε 30 μl RNase-free H₂O.

10.3.13 Σύνθεση cDNA/αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιήθηκε με το Accuscript RT PCR kit (Stratagene) χρησιμοποιώντας 200 ng πολυαδενυλιωμένου RNA. Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκαν αμφότεροι οι εκκινητές oligodt και Tra2 R και στα τέσσερα δείγματα mRNA. 1 μl cDNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την τυπική αντίδραση της αλυσιδωτής πολυμεράσης.

Θερμοκυκλικό πρόγραμμα PCR:	94°C για 5'	} x 5
Πολυμεράση Taq (Minotech)	94°C για 45''	
	35-45°C για 1'	
	72°C για 30''	
	94°C για 45''	} x 25
	50-60°C για 1'	
	72°C για 30''	
	72°C για 5'	

Οι εκφυλισμένοι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

Tra2 F: GVFGLN 5' CGG GAT CCG GIG TIT TC/TG GIC/T TIA A 3'

Tra2 R: HTPTPG 5' CGG AAT TCC CIG GIG TIG GIG TA/GT G 3'

Tra2n F1: KVRELFNK 5' CGG GAT CCA AA/GG TIC/A GIG AA/GC/T TIT TC/TA AC/TA A 3'

Tra2n F2: FNKF/YGPIE 5' CGG GAT CCT TC/TA AC/TA AA/GT T/AC/TG GIC CIA TA/C/TG A 3'

Tra2n R: GM/IEVDG 5' CGG AAT TCG GIA TIG AA/GG TIG AC/TG G 3'

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Allen, M.L., Handler, A.M., Berkebile, D.R., Skoda, S.R. (2004) PiggyBac transformation of the New World screwworm, *Cochliomyia hominivorax*, produces multiple distinct mutant strains. *Med Vet Entomol.* **18**(1): 1-9.
- Alphey, L. (2002) Re-engineering the sterile insect technique. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **32**: 1243-1247.
- Alphey, L., Andreasen, M. (2002) Dominant lethality and insect population control. *Molecular & Biochemical Parasitology* **121**: 173-178.
- Amrein, H., Gorman, M. and Nothiger, R. (1988) The sex-determining gene *tra-2* of *Drosophila* encodes a putative RNA binding protein. *Cell* **55**: 1025-1035.
- Amrein, H., Maniatis, T. and Nothiger, R. (1990). Alternatively spliced transcripts of the sex-determining gene *tra-2* of *Drosophila* encode functional proteins of different size. *EMBO J.* **9**: 3619-3629.
- Atkinson, P.W. (2002) Genetic engineering in insects of agricultural importance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **32**: 1237-1242.
- Atkinson, P.W., Pinkerton, A.C., O'Brochta, D.A. (2001) Genetic Transformation Systems in Insects. *Annu. Rev. Entomol.* **46**: 317-346.
- Baker, B. S. and Ridge, K. (1980) Sex and the single cell. I. On the action of major loci affecting sex determination in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **94**: 383-423.
- Baldarelli, R.M., Lengyel, J.A. (1990) Transient expression of DNA after ballistic introduction into *Drosophila* embryos. *Nucl. Acids Res.* **18**: 5903-5904.
- Bashaw, G. J. and Baker, B. S. (1995) The *msl-2* dosage compensation gene of *Drosophila* encodes a putative DNA-binding protein whose expression is sex-specifically regulated by *Sex-lethal*. *Development* **121**: 3245-3258.
- Bell, L.R., Maine, E. M., Schedl, P. and Cline, T. W. (1988) *Sex-lethal*, a *Drosophila* sex determination switch gene, exhibits sex-specific RNA splicing and sequence similarity to RNA binding proteins. *Cell* **55**: 1037-1046.
- Bellen, H.J., O'Kane, C.J., Wilson, C., Grossniklaus, U., Pearson, R.K., Gehring, W.J. Belote, J. M. and Baker, B. S. (1982) Sex determination in *Drosophila melanogaster*: Analysis of *transformer-2*, a sex-transforming locus. . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 1568-1572.
- Belote, J. M. and Baker, B. S. (1983) The dual functions of a sex determination gene in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* **95**: 512-517.

- Benedict, M.Q., Salazar, C.E., Collins, F.H. (1995) A new dominant selectable marker for genetic transformation: Hsp70-opd. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**: 1061-1065.
- Berghamer, A.J., Klingler, M., Wimmer, E.A. (1999) A universal marker for transgenic insects. *Nature* **402**: 370-371.
- Blandin, S., Moita, L.F., Kocher, T., Wilm, M., Kafatos, F.C., Levashina, E.A. (2002) Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: targeted disruption of the Defensin gene. *EMBO Rep.* **9**, 852-856
- Bopp, D., Bell, L. R., Cline, T. W. and Schedl, P. (1991) Developmental distribution of female-specific Sex-lethal proteins in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* **5**: 403-415.
- Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**: 71-94.
- Brindley, P.J., Laha, T., McManus, D.P., Loukas, A. (2003) Mobile genetic elements colonizing the genomes of metazoan parasites. *Trends Parasitol.* **19**: 79-87
- Brogna, S., Benos, P.V., Gasperi, G., Savakis, C. (2001) The *Drosophila* Alcohol Dehydrogenase Gene May Have Evolved Independently of the Functionally Homologous Medfly, Olive Fly, and Flesh Fly Genes. *Mol. Biol. Evol.* **18**:322-329.
- Burghardt, G., Hediger, M., Siegenthaler, C., Moser, M., Dubenndorfer, A. and Bopp, D. (2005) The *transformer2* gene in *Musca domestica* is required for selecting and maintaining the female pathway of development. *Dev. Genes Evol.* **215**: 165-176.
- Burtis, K. C. (1993) The regulation of sex determination and sexually dimorphic differentiation in *Drosophila*. *Current Opinion in Cell Biology* **5**: 1006-1014.
- Calvi, B.R., Hong, T.J., Findley, S.D., Gelbart, W.M. (1991) Evidence for a common evolutionary origin of inverted repeat transposons in *Drosophila* and plants: *hobo*, *Activator*, and *Tam3*. *Cell* **66**: 465-471.
- Carry, L.C., Goebel, M., Corsaro, B.G., Wang, H.G., Rosen, E., Frazer M.J. (1989) Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology* **172**: 156-169.
- Catteruccia, F., Nolan, T., Loukeris, T.G., Blass, C., Savakis, C., Kafatos, F.C., Crisanti, A. (2000) Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nature* **405**(6789): 959-962.
- Chandler, D., McGuffin, M. E., Piskur, J., Yao, J., Baker, B. S. and Mattox, W. (1997) Evolutionary conservation of regulatory strategies for the sex determination factor *transformer-2*. *Molecular and Cellular Biology* **17**: 2908-2919.
- Coates, C.J., Jasinskiene, N., Miyashiro, L., James, A.A. (1998) Mariner transposition

and transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(7): 3748-3751.

Cook, H.A., Koppetsch, B.S., Wu, J., Theurkauf, W.E. (2004) The *Drosophila* SDE3 homolog *armitage* is required for *oskar* mRNA silencing and embryonic axis specification. *Cell* **116**: 817-829.

Cormack, B.P., Valdivia, R.H., Falkow, S. (1996) FACS optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**: 33-38.

Coschigano, K. T. and Wensik, P. C. (1993) Sex-specific transcriptional regulation by the male and female doublesex proteins of *Drosophila*. *Genes Dev.* **7**: 42-54.

Christophides, G., Savakis, C., Mintzas, A., Komitopoulou, K. (2001) Expression and function of the *Drosophila melanogaster* ADH in male *Ceratitis capitata* adults : a potential strategy for medfly sexing based on gene-transfer technology. *Insect Mol Biol* **10**: 249-254.

Dauwalder, B., Amaya-Manzanares, F. and Mattox, W. (1996) A human homologue of the *Drosophila* sex determination factor *transformer-2* has conserved splicing regulatory functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 9004-9009.

Drabek, D., Zagoraiou, L., deWit, T., Langeveld, A., Roumbaki, C., Mamalaki, C., Savakis, C., Grosveld, F. (2003) Transposition of the *Drosophila hydei* *Minos* transposon in the mouse germ line. *Genomics* **81**(2): 108-111.

Dubendorfer, A., Hediger, M., Burghardt G., Bopp, D. (2002) *Musca domestica*, a window on the evolution of sex-determining mechanisms in insects. *Int. J. Dev. Biol.* **46**:75-79.

Economopoulos, A.P. and Zervas, G.A. (1982) The quality problem in olive flies produced for SIT experiments. Invited International Symposium on the SIT and the use of Radiation in Genetic Insect Control. IAEA SIT/PUB/ **592**: 357-368.

Economopoulos, A.P., Artis, N., Zervas, G., Tsitsipis, G., Haniotakis, G., Tsiropoulos, G., Mamoukas, A. (1977) Control of the olive fly, *Dacus oleae* (Gmelin), by the combined effect of insecticides and release of gamma sterilized insects. *Z. angew. Ent.* **83**: 201-215.

Fadool, J.M., Hartl, D.L., Dowling J.E. (1998) Transposition of the *mariner* element from *Drosophila mauritiana* in zebrafish. *Proc. Natl. Sci. USA* **95**: 5182-5186.

Ferreira, J.R. and Tainha, A.M. (1983) Organophosphorus insecticide residues in olives and olive oil. *Pestic. Sci.* **14**: 167-172.

Ffrench-Constant, R.H., Mortlock, D.P., Shaffer, C.D., MacIntyre, R.J., Roush, R.T. (1991) Molecular cloning and transformation of cyclodiene resistance in *Drosophila*: an invertebrate GABA_A receptor locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:7209-7213.

- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Ceenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.
- Fisher, K.T. (1994) Eradication of Queensland fruit fly *Bactrocera tryoni*, from Western Australia, pp. 172-187 in fruit flies and the Sterile Insect Technique, edited by C.O. Calkins, W. Klassen, P. Liedo. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Fortier, E. and Belote, J. M. (2000) Temperature-dependent gene silencing by an expressed inverted repeat in *Drosophila*. *Genesis* **26**: 240-244.
- Franz, G., and Savakis, C. (1991) *Minos*, a new transposable element from *Drosophila hydei*, is a member of the Tc-1 like family of transposons. *Nucl. Acids Res.* **19**: 6646.
- Franz, G., Gencheva, E., Kerremans, P. (1994) Improved stability of genetic sex-separation strains for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. *Genome* **37**: 72-82.
- Franz, G. (2002) Recombination between homologous autosomes in medfly males: type 1 recombination and the implications for the stability of genetic sexing strains. *Genetica* **116**: 73-84.
- Gailey, D. A. and Hall, J. C. (1989) Behavior and cytogenetics of *fruitless* in *Drosophila melanogaster*: different courtship defects caused by separate, closely linked lesions. *Genetics* **121**: 773-785
- Gailey, D. A., Taylor B. J. and Hall, J. C. (1991) Elements of the *fruitless* locus regulate development of the muscle of Lawrence, a male-specific structure in the abdomen of *Drosophila melanogaster* adults. *Development* **113**: 879-890
- Garza, D., Medhora, M., Koga, A., Hartl, D.L. (1991) Introduction of the transposable element *mariner* into the germline of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **128**: 303-310.
- Gepner, J., Hays, T.S. (1993) A fertility region on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster* encodes a dynein microtubule motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:111132-11136.
- Germeraad, S. (1976) Genetic transformation in *Drosophila* by microinjection of DNA. *Nature* **262**: 229-231.
- Gong P, Epton, M.J., Fu, G., Scaife, S., Hiscox, A., Condon, K.C., Condon, G.C. Morrison, N.I., Kelly, D.W., Dafa'alla, T., Coleman, P.G. and Alphey, L. (2005) A dominant lethal genetic system for autocidal control of the Mediterranean fruitfly. *Nat Biotechnol.* **23**:453-456
- Goralski, T. J., Edstrom, J. E. and Baker, B. S. (1989) The sex determination locus transformer-2 of *Drosophila* encodes a polypeptide with similarity to RNA binding proteins. *Cell* **56**: 1011-1018.

- Gossen, M. and Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 5547-5551.
- Graham, P., Penn, J. K. and Schedl, P. (2002) Masters change, slaves remain. *BioEssays* **25**: 1-4.
- Grossman, G.L., Rafferty, C.S., Clayton, J.R., Stevens, T.K., Mukabayire, O, Benedict, M.Q. (2001) Germline transformation of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, with the piggyBac transposable element. *Insect Mol Biol.* **10**(6):597-604.
- Gueiros-Filho, F.J., Beverly, S.M. (1997) Trans-kingdom transposition of the *Drosophila* element *mariner* within the protozoan *Leishmania*. *Science* **276**: 1716-1719.
- Handa, N., Nureki, O., Kurimoto, K., Kim, I., Sakamoto, H., Shimura, Y., Muto, Y. And Yokoyama, S. (1999) Structural basis for recognition of the *tra* mRNA precursor by the Sex-lethal protein. *Nature* **398**: 579-585.
- Handler, A.M., Gomez, S.P., O'Brochta, D.A. (1993) A functional analysis of the P-element gene-transfer vector in insects. *Arch Insect Biochem Physiol.* **22**(3-4): 373-384.
- Handler, A.M., McCombs, S.D., Fraser, M.J., Saul, S.H. (1998) The Lepidoptera transposon vector, piggyBac, mediates germline transformation in the Mediterranean fruitfly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 7520-7525.
- Handler, A.M., Harrell, R.A. (2001) Transformation of Caribbean fruit fly with a *piggyBac* transposon vector marked with polyubiquitin-regulated GFP. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**: 201-207.
- Handler, A.M., McCombs, S.D. (2000) The *piggyBac* transposon mediates germ-line transformation in the Oriental fruit fly and closely related elements exist in its genome. *Insect Mol. Biol.* **9**: 605-612.
- Handler, M.A. (2002) Prospects for using genetic transformation for improved SIT and new biocontrol methods. *Genetica* **116**: 137-149.
- Handler, M.A. (2004) Understanding and improving transgene stability and expression in insects for SIT and conditional lethal release programs. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **34**: 121-130.
- Haniotakis, G., Koryzakis, M., Fitsakis, T., and Antonidaki, A. (1991) An effective mass-trapping method for the control of *Dacus oleae* (Diptera:Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* **84**: 564-569.
- Hazelrigg, T. and Tu, C. (1994) Sex-specific processing of the *Drosophila exuperantia* transcript is regulated in male germ cells by the *tra-2* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 10752-10756.

- Hediger, M., Burghardt, G., Siegenthaler, C., Buser, N., Hilfinger-Kleiner, D., Dubendorfer, A. and Bopp, D. (2004) Sex determination in *Drosophila melanogaster* and *Musca domestica* converges at the level of the terminal regulator *doublesex*. *Dev. Genes Evol.* **214**: 29-42.
- Hediger, M., Niessen, M., Wimmer, E.A., Dubendorfer, A., Bopp, D. (2001) Genetic transformation of the housefly *Musca domestica* with the lepidopteran derived transposon piggyBac. *Insect Molecular Biology* **10**(2): 113-119.
- Hendrichs, J., Ortiz, G., Liedo, P., Schvarz, A. (1983) Six years of successful medfly program in Mexico and Guatemala, in CEC/IOBC International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, edited by Economopoulos. Athens, Greece.
- Hendrichs, J., Franz, G., Rendon, P. (1995) Increased effectiveness and applicability of Sterile Insect Technique through male-only releases for control of Mediterranean fruit flies during fruiting seasons. *J. Appl. Entomol.* **119**: 371-377.
- Heinrich, J.C. and Scott, M. (2000) A repressible female-specific lethal genetic system for making transgenic insect strains suitable for a sterile-release program. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**(15): 8229-8232.
- Heinrich, J.C., Li, X., Henry, R.A., Haack, N., Stringfellow, L., Heath, A.C.G., Scott, M.J. (2002) Germ-line transformation of the Australian sheep blowfly *Lucilia cuprina*. *Insect Molecular Biology* **11**(1): 1-10.
- Heinrichs, V., Ryner, L. C. and Baker, B. S. (1998) Regulation of sex-specific selection of *fruitless* 5' splice sites by *transformer* and *transformer-2*. *Molecular and Cellular Biology* **18**: 450-458.
- Horard, B., Mange, A., Pelissier, B., Couble, P. (1994) *Bombyx* gene promoter analysis in transplanted silkgland transformed by particle delivery system. *Insect Mol. Biol.* **3**: 261-265.
- Horn, C., and Wimmer, E.A. (2000) A versatile vector set for animal transgenesis. *Dev. Genes Evol.* **210**(12): 630-637.
- Inoue, K., Hoshijima, K., Sakamoto, H. and Shimura, Y. (1990) Binding of the *Drosophila Sex-lethal* gene product to the alternative splice set of *transformer* primary transcript. *Nature* **344**: 461-463.
- Israel, D.I., Kaufman, R.J. (1989) Highly inducible expression from vectors containing multiple GRE's in CHO cells overexpressing the glucocorticoid receptor *Nucleic Acids Res.* **17**: 2589-2604.
- Iwahasi, O. (1977) Eradication of melon fly, *Dacus cucurbitae*, from Kume Islands Okinawa with the sterile insect technique release method. *Res. Popn. Ecol.* **19**: 87-97.
- Jacobson, J.W., Medhora, M.M., Hartl, D.L. (1986) Molecular structure of somatically unstable transposable element in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **83**: 8684-8688.

- Jana, S., Chakraborty, C., Nandi, S., Deb, J.K. (2004) RNA interference: potential therapeutic targets. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**:649-657.
- Jasinskiene, N., Coates, C.J., Benedict, M.Q., Cornel, A.J., Rafferty, C.S., James, A.A., Collins, F.H. (1998) Stable transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, with the *Hermes* element from the housefly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 3743-3747. *Journal of Economic Entomology* 84: 564–569.
- Kamdar, P., Von Allmen, G., Finnerty, V. (1992) Transient expression of DNA in *Drosophila* via electroporation. *Nuc. Acids Res.* **11**: 3526.
- Kapetanaki, M.G., Loukeris, T.G., Livadaras, I., Savakis, C. (2002) High frequencies of *Minos* transposon mobilization are obtained in insects by using *in vitro* synthesized mRNA as a source of transposase. *Nucl. Acids Res.* **30**(15): 3333-3340.
- Keys, L.N., Cline, T.W., Schedl, P. (1992) The primary sex determination signal of *Drosophila* acts at the level of transcription. *Cell* **68**: 933-943
- Khila, A., El Haidani, A., Vincent, A., Payre, F., Souda, S.I. (2003) The dual function of *ovo/shavenbaby* in germline and epidermis differentiation is conserved between *Drosophila melanogaster* and the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **33**: 691-699.
- Kidwell, M.G., Kidwell, J.F., Sved, J.A. (1977) Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: a syndrome of aberrant traits including mutation, sterility, and male recombination. *Genetics* **86**: 813-833.
- Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R., Sanford, J.C. (1987) High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* **327**: 70-73.
- Klinakis, A.G., Loukeris, T.G., Pavlopoulos, A., Savakis, C. (2000a) Mobility assays confirm the broad host-range activity of the *Minos* transposable element and validate new transformation tools. *Insect Molecular Biology* **9**(3): 269-275.
- Klinakis, A.G., Zagoraiou, L., Vassilatis, D.K., Savakis, C. (2000b) Genome-wide insertional mutagenesis in human cells by the *Drosophila* mobile element *Minos*. *EMBO reports* **1**(5): 416-421.
- Koukidou, M., Klinakis, A., Reboulakis, C., Zagoraiou, L., Tavernarakis, N., Livadaras, I., Economopoulos, A., Savakis, C. (2006) Germline transformation of the olive fly *Bactrocera oleae* using a versatile transgenesis marker. *Insect Molecular Biology* **15**: 95-103.
- Kuhn, S., Sievert, V. and Traut, W. (2000) The sex-determining gene *doublesex* in the fly *Megaselia scalaris*: conserved structure and sex-specific splicing. *Genome* **43**: 1011-1020.
- Lagos, D., Ruiz, M. F., Sánchez, L. and Komitopoulou, K. (2005). Isolation and characterization of the *Bactrocera oleae* genes orthologous to the sex determining *Sex-lethal* and *doublesex* genes of *Drosophila melanogaster*. *Gene* **348**, 111-121.

- Laird, P.W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M.A., Jaenisch, R., Berns, A. (1991) Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res.* **19**(15): 4293.
- Lohe, A.R., Hartl, D.L. (1996a) Germline transformation of *Drosophila virilis* with the transposable element *mariner*. *Genetics* **143**:365-374.
- Lorenzen, M.D., Berghammer, A.J., Brown, S.J., Denell, R.E., Klinger, M., Beeman, R.W. (2003) *piggyBac*-mediated germline transformation in the beetle *Tribolium castaneum*. *Insect Molecular Biology* **12**(5): 433-440.
- Loukeris, T.G., Arca, B., Livadaras, I., Dialektaki, G., Savakis, C. (1995a) Introduction of the transposable element *Minos* into the germ line of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 9485-9489.
- Loukeris, T.G., Livadaras, I., Arca, B., Zabalou, S., Savakis, C. (1995b) Gene transfer into the Medfly, *Ceratitidis capitata*, with a *Drosophila hydei* transposable element. *Science* **270**: 2002-2005.
- Lum, D. H., Kuwabara, P. E., Zarlower, D. and Spence, A. M. (2000) Direct protein-protein interaction between the intracellular domain of TRA2 and the transcription factor TRA-1A modulates feminizing activity in *C.elegans*. *Genes and Development* **14**: 3153-3165.
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., Kutay, U. (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**: 95-98.
- Lycett, G.J., Kafatos, F.C., Loukeris, T.G. (2004) Conditional expression in the malaria mosquito *Anopheles stephensi* with Tet-On and Tet-Off systems. *Genetics* **167**: 1781-1790.
- Lynch, K. W. and Maniatis, T. (1995) Synergistic interactions between two distinct elements of a regulated splicing enhancer. *Genes Dev.* **9**: 284-293.
- McInnis, D., Tam, S., Grace, C., Miyashita, D. (1994) Populations suppression and sterility rates induced by variable sex ratio, sterile insect releases of *Ceratitidis capitata* in Hawaii. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **87**: 231-240.
- Manley, J. L. and Tacke, R. (1996) SR proteins and splicing control. *Genes Dev.* **10**: 1569-1579.
- Markaki, M., R.K. Craig and C. Savakis (2004) Insect population control using female specific pro-drug activation. Insect Biochem. Mol. Biol. **34**: 131-137. mass-trapping method for the control of *Dacus oleae* (Diptera:Tephritidae).
- Mattox, W. and Baker, B. S. (1991) Autoregulation of the splicing of transcripts from the *transformer-2* gene of *Drosophila*. *Genes Dev.* **5**: 786-796.

- Mavragani-Tsipidou, P. (2002) Genetic and cytogenetics analysis of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera:Tephritidae). *Genetica* **116**: 45-47.
- McGuffin, M.E., Chandler, D., Somaiya, D., Dauwalder, B. and Mattox, W. (1998) Autoregulation of the *transformer-2* alternative splicing is necessary for normal male fertility in *Drosophila*. *Genetics* **149**: 1477-1486.
- Meats, A., Maheswaran, P., Frommer, M., Sved, J. (2002) Towards a male-only release system for SIT with the Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni*, using a genetic sexing strain with a temperature-sensitive lethal mutation. *Genetica* **116**: 97-106.
- Medhora, M.M., MacPeck, A.H., Hartl, D.L. (1988) Excision of the *Drosophila* transposable element mariner: identification and characterization of the *Mos* factor. *EMBO J.* **7**:2185-2189.
- Meise, M., Hilfiker-Kleiner, D., Dubendorfer, A., Brunner, C., Nothiger, R. and Bopp, D. (1998) *Sex-lethal*, the master sex determining gene in *Drosophila*, is not sex-specifically regulated in *Musca domestica*. *Development* **125**: 1487-1494.
- Meister, G., Tuschl, T. (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**: 343-349.
- Mello, C.C., Kramer, J.M., Stinchcomb, D., Ambros, V. (1992) Efficient gene transfer in *C. elegans*: Extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences *EMBO Journal* **10**: 3959-3970.
- Michel, K., Stamenova, A., Pinkerton, A.C., Franz, G., Robinson, A.S., Gariou-Papalexidou, A., Zacharopoulou, A., O' Brochta, D.A., Atkinson, P.W. (2001) *Hermes*-mediated germ-line transformation of the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata*. *Insect Molecular Biology* **10**(2): 155-162.
- Misra, S., Rio, D.C. (1990) Cytotype control of *Drosophila* P element transposition: the 66 kd protein is a repressor of transposase activity. *Cell* **62**: 269-284.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 425-433.
- Nagoshi, R. N., McKeown, M., Burtis, K. C., Belote, J. M., Baker, B. S. (1988) The control of alternative splicing at genes regulating sexual differentiation of chromosomally male *Drosophila*. *Cell* **53**: 229-236.
- Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R. (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible cosuppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* **2**:279-289.
- Ohbayashi, F., Suzuki, M. G., Mita, K., Okano, K. And Shimada, T. (2001) A homologue of the *Drosophila doublesex* gene is transcribed into sex-specific mRNA isoforms in silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol. B* **128**: 145-158.

- Paul, C.P., Good, P.D., Winer, I., Engelke, D.R. (2002) Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nature Biotechnology* **20**: 505-508.
- Pavlopoulos, A., Berghammer, A.J., Averof, M., Klingler, M. (2004) Efficient transformation of the beetle *Tribolium castaneum* using the *Minos* transposable element: quantitative and qualitative analysis of genomic integration events. *Genetics*. **167**(2):737-746.
- Peloquin, J.J., Thibault, S.T., Staten, R., Miller, T.A. (2000) Germ-line transformation of pink bollworm mediated by the *piggyBac* transposable element. *Insect Mol. Biol.* **9**: 323-333.
- Perera, O.P., Harrell, R.A., Handler, A.M. (2002) Germ-line transformation of the South American malaria vector, *Anopheles albimanus*, with *piggyBac*/EGFP transposon vector is routine and highly efficient. *Insect Molecular Biology* **11**(4): 291-297.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., Cormier, M.J. (1992) Primary structure of the *Aequorea Victoria* green fluorescent protein. *Gene* **111**: 229-233.
- Pucci, C. (1990) Valutazione dell'efficacia delle esche proteiche avvelenate per il controllo del *Dacus Oleae* (Gmel): sperimentazione condotta nel triennio 1988-90 nell'alto lazio. *Frustula Entomologica*, n.s. XIII (XXVI): 173-198.
- Robinson, A., Franz, G., Fisher, K. (1999) Genetic sexing strains in the medfly, *Ceratitidis capitata*: Development, mass rearing and field application. *Trends Ent.* **2**: 81-104.
- Robinson, A.S. (2002) Mutations and their use in insect control. *Mutation Research* **511**: 113-132.
- Rubin, G.M, Kidwell, M.G., Bingham, P.M. (1982) The molecular basis of P-M hybrid dysgenesis: The nature of induced mutations. *Cell* **29**: 15-29.
- Rubin, G.M. and Spradling, A.C. (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**: 348-353.
- Saccone, G. (2000). Sex determination in Medfly: a molecular approach. In: Tan, K. H. (Eds.), *Area-wide Control of Fruit Flies and Other Insect Pests*. Penerbit University Sains Malaysia, Penang, pp. 491-496.
- Saccone, G., Pelusio, I., Artiaco, D., Giordano, E., Bopp, D. and Polito, L. C. (1998) The *Ceratitidis capitata* homologue of the *Drosophila* sex-determining gene *Sex-lethal* is structurally conserved, but not sex-specifically regulated. *Development* **125**: 1495-1500.
- Sasakura, Y., Awazu, S., Chiba, S., Satoh, N. (2003) Germ-line transgenesis of the *Tc1/mariner* superfamily transposon *Minos* in *Ciona intestinalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**(13): 7726-30.

- Schmid, A., Schindelholz, B., Zinn, K. (2002) Combinatorial RNAi: a method for evaluating the functions of gene families in *Drosophila*. *TRENDS in Neurosciences* **25**: 71-74.
- Schutt, C. and Nothiger, R. (2000) Structure, function and evolution of sex-determining systems in Dipteran insects. *Development* **127**: 667-677.
- Searle, P.F., Stuart, G.W., Palmiter, R.D. (1985) Metal regulatory elements of the mouse metallothionein-I gene. *Molecular Cell Biology* **5**: 1480-1489.
- Shearman, D. C. A. and Formmer, M. (1998) The *Bactrocera tryoni* homologue of the *Drosophila melanogaster* sex-determination gene *doublesex*. *Insect Mol. Biol.* **7**: 1-12.
- Shearman, D. C. A. (2002) The evolution of sex determination systems in dipteran insects other than *Drosophila*. *Genetica* **116**: 25-43.
- Sherman, A., Dawson, A., Marther, C., Gilhooley, H., Li, Y., Mitchell, R., Finnegan, D., Sang, H. (1998) Transposition of the *Drosophila* element *mariner* into the chicken germline. *Nature Biotech.* **16**: 1050-1053.
- Sosnowski, B. A., Belote, J. M. and McKeown, M. (1989) Sex-specific alternative splicing of RNA from the *transformer* gene results from sequence-dependent splice site blockage. *Cell* **57**: 157-166.
- Sumitani, M., Yakamoto, D.S., Oishi, K., Lee, J.M., Hatakeyama, M. (2003) Germline transformation of the sawfly, *Athalia rosae*, mediated by a piggyback-derived vector. *Insect Biochem. Mol. Biol* **33**: 449-458.
- Tacke, R., Tohyama, M., Ogawa, S. and Manley J. L. (1998) Human Tra2 proteins are sequence-specific activators of pre-mRNA splicing. *Cell* **93**: 139-148.
- Tamura, T, Thibert, C., Royer, C., Kanda, T., Abraham, E., Kamba, M., Komoto, N., Thomas, J.L., Mauchamp, B., Chavancy, G., Shirk, P., Fraser, M., Prudhomme, J.C., Couble, P., Toshiki, T., Chantal, T., Corinne, R., Toshio, K., Eappen, A., Mari, K., Natuo, K., Jean-Luc, T., Bernard, M., Gerard, C., Paul, S., Malcolm, F., Jean-Claude, P., Pierre, C. (2000) Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nat Biotechnol.* **18**(1): 81-84.
- Thomas D., Donnelly C., Wood R., Alphey L. (2000) Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science* **287**: 2474-2476.
- transformation of the New World screwworm, *Cochliomyia hominivorax*, produces multiple distinct mutant strains. *Med Vet Entomol.* **18**(1): 1-9.
- Triglia, T., Peterson, M.G., Kemp, D.J. (1988) A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res.* **16**(16): 8186.

- Tzanakakis, M.E. (1989) Small-scale rearing: *Dacus oleae* "Fruit Flies their biology, natural enemies and control" (Eds. A.S. Robinson & G. Hooper), Elsevier Pubs. Vol. **3B** pp 105-118.
- Tzanakakis, M.E. (1995) Entomology, Chapter on Methods and Measures of Control, University Studio Press, Thessaloniki, 501 pp. (in greek)
- Verma, N.K., Dey, C.S. (2004) RNA-mediated gene silencing: mechanisms and its therapeutic applications. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* **29**: 395-404.
- Vreysen, M.J., Saleh, K.M., Ali, M.Y., Abdulla, A.M., Zhu, Z.R., Juma, K.G., Dyck, V.A., Msangi, A.R., Mkonyi, P.A., Feldmann, H.U. (2000) *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) eradicated on the island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique. *J Econ Entomol.* **93**:123-35.
- Warren, W.D., Atkinson, P.W., O'Brochta, D.A. (1994) The *Hermes* transposable element from the house fly, *Musca domestica*, is a short inverted repeat-type element of the *hobo*, *Ac*, and *Tam3(Hat)* element family. *Genet. Res. Camb.* **64**: 87-97.
- Watanabe, T. K. (1975) A new sex-transforming gene on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Jap. J. Genet.* **50**: 269-271.
- Willhoeft, U., Franz, G. (1996) Identification of the sex-determining region of the *Ceratitis capitata* Y chromosome by deletion mapping. *Genetics* **144**: 737-745.
- Wilson, C., Pearson, R.K., Bellen, H.J., O'Kane, C.J., Grossniklaus, U., Gehring, W.J. (1989). P-element-mediated enhancer detection: an efficient method for isolating and characterizing developmentally regulated genes in *Drosophila*. *Genes Dev.* **3**(9):1301-1313.
- Zagoraiou, L., Drabek, D., Alexaki, S., Guy, J.A., Klinakis, A.G., Langerveld, A., Skavdis, G., Mamalaki, C., Grosveld, F. (2001) In vivo transposition of *Minos*, a *Drosophila* mobile element, in mammalian tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**(20): 11474-11478.