

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗΣ»**

**ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ
ΕΛΕΓΧΟ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΒΛΑΒΕΡΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ:
«ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΜΙΑΣ
ΑΞΟΝΗΜΑΤΙΚΗΣ ΔΥΝΕΙΝΗΣ»**

ΑΝΤΩΝΗΣ ΤΑΤΑΡΑΚΗΣ

Επιβλέπων καθηγητής: κ. Χ. ΣΑΒΒΑΚΗΣ

*(Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και
Βιοτεχνολογίας, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας)*

Δεύτερος εξεταστής: κ. Μ. ΑΒΕΡΩΦ

*(Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Ίδρυμα Τεχνολογίας και
Έρευνας)*

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ
ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2005**

Εισαγωγή

Υλικά και μέθοδοι

Αποτελέσματα

Συζήτηση

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	σελ. 1-3
Εισαγωγή	
Γενικά για το RNA interference	σελ. 4
Ο μηχανισμός του RNAi	σελ. 4-7
Προσδοκίες για το μέλλον	σελ. 7
Γονιμότητα αρσενικών εντόμων	σελ. 7-12
Το Υ χρωμόσωμα της <i>Drosophila melanogaster</i> και γονίδια που σχετίζονται με τη γονιμότητα αρσενικών ατόμων	σελ. 8
Η κίνηση των σπερματοζωαρίων	σελ. 9-12
Μέθοδος στείρων εντόμων.....	σελ. 12-14
Σκοπός της παρούσας εργασίας.....	σελ. 14-15
Υλικά και Μέθοδοι	
Μετασχηματισμός της <i>Drosophila melanogaster</i>	σελ. 16
Διασταυρώσεις ελέγχου της γονιμότητας των διαγονιδιακών αρσενικών ατόμων.....	σελ. 16-17
Απομόνωση ολικού RNA από αρσενικά έντομα.....	σελ. 17
Σύνθεση cDNA/Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	σελ. 17-18
Ο χημικός τρόπος παραγωγής επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων DH5a	σελ. 18-19
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα.....	σελ. 19-20
Απομόνωση γενωμικού DNA (Μέθοδος Holmes Bonner, 1973).....	σελ. 20
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction : PCR).....	σελ. 20-21
Πλασμιδιακές κατασκευές	σελ. 21-25

Αποτελέσματα

Μετασχηματισμός της <i>D. melanogaster</i> και λειτουργικός έλεγχος του διαγονιδίου.....	σελ. 27-29
Μοριακός έλεγχος της καταστολής του γονιδίου <i>kl-5</i>	σελ. 29-30
Ανάπτυξη διαγονιδιακού συστήματος με βάση τον ενεργοποιητή tTA.....	σελ. 30-31

Συζήτηση

Καταστολή της λειτουργίας μιας β- βαριάς αλυσίδας της αξονηματικής δυνείνης.....	σελ. 32-33
Ανάπτυξη διαγονιδιακού συστήματος με βάση τον ενεργοποιητή tTA.....	σελ. 34-35
Βιβλιογραφία	σελ. 36-39

Μετά από δύο και πλέον χρόνια στο εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Εντόμων θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου που από την πρώτη στιγμή με βοήθησαν να προσαρμοστώ στις απαιτήσεις του εργαστηρίου και στη συνέχεια να περάσω δύο πολύ όμορφα χρόνια ως μέλος του.

Ιδιαίτερος θέλω να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Χαράλαμπο Σαββάκη, που η εμπιστοσύνη του ήταν πολύτιμη για μένα, δίνοντας μου την ευκαιρία να γίνω μέλος της ομάδας του εργαστηρίου του και να γνωρίσω το εργαστηριακό περιβάλλον.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Αλέξανδρο, το Θάνο, τη Μάρθα, την Αγγελική, το Μάνο, τη Μαρία, το Stefan αλλά και τις «παλιές» Λασκαρώ και Φλώρα. Τους ευχαριστώ για την προθυμία τους όσες φορές χρειάστηκε να με βοηθήσουν αλλά και τις άφθονες στιγμές συζήτησης και γέλιου.

Ιδιαίτερα οφείλω να ευχαριστήσω τη Μαίρη Στεφάνου. Επέβλεπε την εργασία μου και με καθοδηγούσε, απαντώντας με πολύ υπομονή στις ερωτήσεις και απορίες μου για δύο και πλέον χρόνια. Είμαι πολύ τυχερός που είχα εκείνη για επιβλέπουσα της δουλειάς μου.

Όμως δεν μπορώ να μην ευχαριστήσω και τους φίλους μου. Στη Μαρίνα, στον Γιώργο, τον G, τον Κωνσταντίνο, τον Ανδρέα, το Νίκο, τον Ανδρέα, το Χάρη, το Νίκο, τον Μπάμπη, την Άντα, τη Μαρία ένα μεγάλο ευχαριστώ (στη Μαρίνα κάτι παραπάνω) για τις καλές και κακές στιγμές που πέρασαν αλλά κυρίως για αυτές που έρχονται.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένειά μου. Το μέγεθος της αγάπης και της ευγνωμοσύνης μου δεν μπορεί να αποτυπωθεί με λέξεις, τους ευχαριστώ για όλα αυτά τα χρόνια. Εύχομαι να είμαστε καλά για τα υπόλοιπα χρόνια!

Τέλος θα ήθελα να αφιερώσω την εργασία αυτή στον πατέρα μου. Είναι η ελάχιστη αναγνώριση σε ό,τι μου πρόσφερε όσο ήταν στη ζωή και όσα μου έμαθε με τη μάχη του για αυτήν. Πάντα θα αποτελεί το πρότυπο στη ζωή μου και θα τον θυμάμαι. Θα χαιρόταν για μένα σήμερα...

Αντ. Ε. Ταταράκης

Summary

Many insects heavily damage crops and forests or transmit deadly diseases to animals and humans. The Sterile Insect Technique (**S.I.T**) is a genetic method that can be used to successfully suppress economically important pest species. SIT involves mass production of the target pest species, sterilization by irradiation and release of sterilized insects. The need to sterilize the insects by irradiation causes a dramatic loss of competitive mating ability relative to wild type. The replacement of radiation-sterilization by a molecular genetic-sterilization method is an attractive option for the production of sterile insects.

Herein we report the development of a transgenic system that suppresses the expression of β - heavy chain KL-5, part of the outer arm of axonemal dynein of *Drosophila melanogaster*, with the production of dsRNA under heat-shock. *kl-5* gene is mapped on the Y chromosome and encodes a dynein polypeptide that is an essential functional component of the sperm flagellar axoneme. *kl-5* gene is expressed only in primary spermatocytes in the testis and its null mutants exhibit immotile sperm. The production of dsRNA to silence *kl-5* is effective, but could be improved. So we developed a new transgenic system in order to strictly regulate the suppression of *kl-5* gene under a promoter activated in the absence of tetracycline. This system is based on the production of dsRNA upon the binding of transactivator tTA on the sequence of tetracycline operator (tetO). The expression of tTA is under the control of the promoter of *hsp26* gene of *Drosophila melanogaster* that gives spermatocyte-specific expression.

The aim of this project is the development of transgenic-sterile males of *D. melanogaster* with no other abnormalities in their physiology. This strain could be a model for a similar application in insect pest management.

Περίληψη

Πολλά είδη εντόμων προκαλούν τεράστιες καταστροφές σε καλλιέργειες και δάση ή μεταφέρουν σοβαρές ασθένειες σε ανθρώπους και ζώα. Μία αποτελεσματική μέθοδος αντιμετώπισης βλαβερών ειδών εντόμων είναι η μέθοδος στείρων εντόμων (**Sterile Insect Technique: S.I.T.**). Η παραγωγή στείρων εντόμων πραγματοποιείται με ακτινοβόλησή τους η οποία προκαλεί μία δραματική μείωση στην ανταγωνιστικότητά τους έναντι των ατόμων αγρίου τύπου. Προβάλλει λοιπόν αναγκαία η ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών μεθόδων δημιουργίας στείρων εντόμων.

Με την αξιοποίηση των δυνατοτήτων της τεχνολογίας του RNAi προχωρήσαμε στη δημιουργία ενός φορέα μετασχηματισμού ικανού να επάγει, μετά από θερμικό σοκ, την καταστολή της λειτουργίας της β- βαριάς αλυσίδας Kl-5, που συνιστά τμήμα του εξωτερικού βραχίονα της αξονηματικής δυνεΐνης της *Drosophila melanogaster*. Το γονίδιο *kl-5* χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα Y, κωδικοποιεί μία β-αλυσίδα του εξωτερικού βραχίονα της αξονηματικής δυνεΐνης, εκφράζεται αποκλειστικά στα σπερματοκύτταρα και φυσικές του μεταλλάξεις προκαλούν στείρωση λόγω ακινησίας των σπερματοζωαρίων. Ο λειτουργικός έλεγχος του φορέα αυτού έδειξε ότι η παραγωγή δίκλωνου RNA για την απενεργοποίηση του γονιδίου *kl-5* είναι αποτελεσματική, αλλά χρήζει βελτιστοποιήσεως. Έτσι προχωρήσαμε στην ανάπτυξη ενός νέου διαγονιδιακού συστήματος με σκοπό την αυστηρά ρυθμιζόμενη καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *kl-5*, από υποκινητή που ενεργοποιείται απουσία τετρακυκλίνης. Το σύστημα βασίζεται στην επαγόμενη παραγωγή δίκλωνου RNA, μετά από πρόσδεση του ενεργοποιητή tTA στην αλληλουχία του χειριστή της τετρακυκλίνης tetO (tetracycline operator sequence). Η έκφραση του tTA τίθεται υπό τον έλεγχο τμήματος της ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου *Hsp26* της *Drosophila melanogaster*, το οποίο προσδίδει σπερματο-ειδική έκφραση.

Τελικός σκοπός της παρούσας εργασίας είναι, μέσω της απενεργοποίησης του γονιδίου που κωδικοποιεί τη συγκεκριμένη δυνεΐνη, η δημιουργία στείρων αρσενικών εντόμων που πέρα από την αδυναμία γονιμοποίησης θηλυκών ατόμων θα έχουν φυσιολογικές τις υπόλοιπες λειτουργίες τους. Τα στελέχη αυτά θα αποτελέσουν ένα

μοντέλο για την πραγματοποίηση μιας ανάλογης εφαρμογής και σε έντομα γεωργικής σημασίας ή φορείς ασθενειών με σκοπό τον έλεγχο των πληθυσμών τους.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Γενικά για το RNA interference

Ο Fire και οι συνεργάτες του το 1998 έφτασαν μπροστά στη σημαντική διαπίστωση ότι η ένεση δίκλωνου ριβονουκλεϊκού οξέος (dsRNA) σε νηματώδη σκώληκα οδηγούσε σε ειδική καταστολή της λειτουργίας ενός γονιδίου, φαινόμενο που είναι γνωστό ως RNA παρεμβολή (interference) (Fire, *et al.* 1998). Στην παρατήρηση αυτή αποδόθηκαν πολλά φαινόμενα απενεργοποίησης γονιδίων, όπως μετα-μεταγραφική «αποσιώπηση» γονιδίων σε φυτά (PTGS) (Jorgensen, 1990), στα οποία και παρατηρήθηκε πρώτη φορά το φαινόμενο του RNAi, και όπου λειτουργεί πιθανότατα ως άμυνα σε παθογόνους ιούς ή στην ανεξέλεγκτη μετακίνηση των μεταθετών στοιχείων (Ahluquist, 2002). Επακόλουθες έρευνες στο νηματώδη σκώληκα έδωσαν ενδείξεις ότι για τη δράση αυτή του RNAi ευθύνονταν μικρά μόρια δίκλωνου RNA, τα οποία σε φυτά στα οποία είχε πραγματοποιηθεί μετα-μεταγραφική απενεργοποίηση γονιδίου αποδείχθηκε ότι έχουν μήκος 21-25 νουκλεοτίδια. Λίγο αργότερα στη *Drosophila melanogaster* φάνηκε ότι μεγάλου μήκους δίκλιωνα μόρια RNA μπορούσαν να τεμαχιστούν, σε μικρά περίπου 22 νουκλεοτιδίων μόρια (Zamore *et al.* 2000), και ότι η εισαγωγή χημικά συντιθέμενων siRNAs σε κύτταρα προκαλεί την αποικοδόμηση ομόλογων αγγελιοφόρων RNAs (mRNAs) (Elbashir *et al.* 2001).

Έτσι αναπτύχθηκε μία νέα τεχνολογία που μπορεί να αξιοποιηθεί για τον προσδιορισμό της λειτουργίας γονιδίων. Όσες περισσότερες λεπτομέρειες έρχονται στο φως σχετικά με το μηχανισμό του φαινομένου στο οποίο βασίζεται, τόσο πιο αξιοποιήσιμη και αποτελεσματική μπορεί να γίνει.

Ο μηχανισμός του RNAi

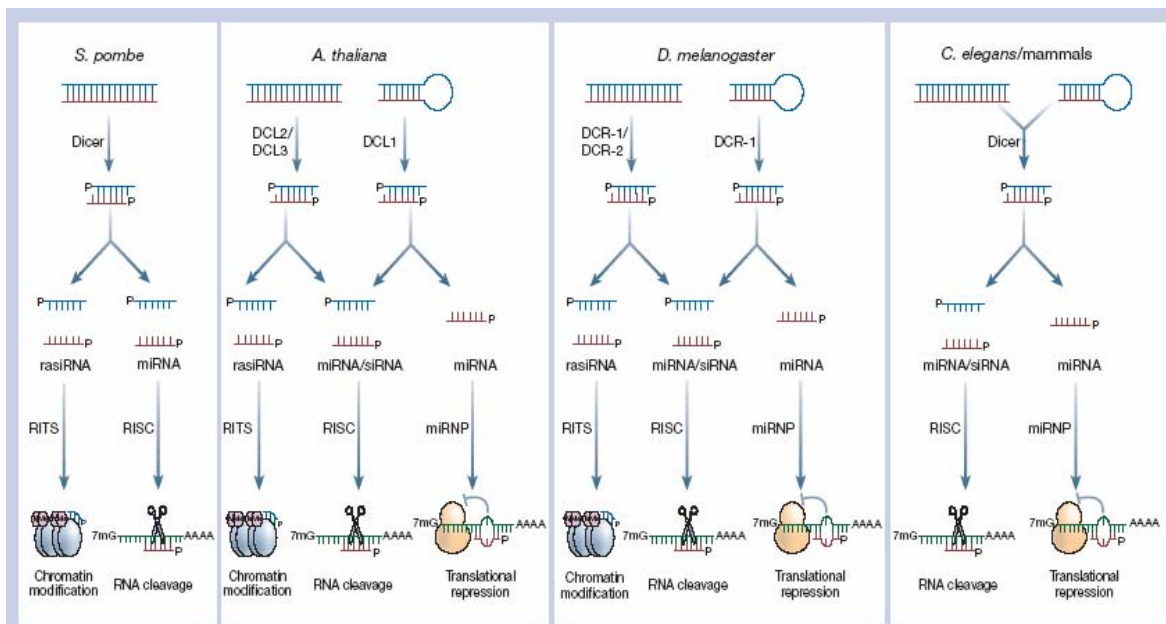
Τα τελευταία επτά χρόνια στα οποία είναι γνωστό το φαινόμενο του RNAi διάφορες γενετικές και βιοχημικές μελέτες έδωσαν πολλές πληροφορίες για τον μηχανισμό δράσης του. Το φαινόμενο του RNAi σχετίζεται με την ενσωμάτωση, στα κύτταρα ενός οργανισμού, δίκλωνου RNA (dsRNA) που παρουσιάζει ομολογία με το γονίδιο του

οποίου η έκφραση πρόκειται να κατασταλεί. Το πρώτο βήμα στο μηχανισμό δράσης του RNAi αποτελεί ο τεμαχισμός του μεγάλου μήκους δίκλωνου RNA (dsRNA), που εισάγεται στα κύτταρα, σε μικρά τμήματα 21-23 νουκλεοτιδίων δίκλωνου RNA (siRNAs), από ενδονουκλεάσες RNase-III που παρουσιάζουν ειδικότητα πρόσδεσης σε δίκλιωνα μόρια RNA. Η “Drosha” και οι πρωτεΐνες “Dicer” είναι τέτοιες ενδονουκλεάσες.

Οι “Dicer” είναι απαραίτητες για τον τεμαχισμό δίκλωνων μορίων RNA σε μικρότερα, ενώ η “Drosha” για την επεξεργασία, στον πυρήνα των κυττάρων, πρόδρομων μορίων miRNAs. Η συγκεκριμένη οικογένεια ενζύμων έχει ένα χαρακτηριστικό πρότυπο τεμαχισμού των υποστρωμάτων της, έτσι η δράση των “Dicer” δίνει δίκλιωνα μόρια RNA 21-23 νουκλεοτιδίων με 2-3 ελεύθερα προς το 3’ άκρο τους νουκλεοτίδια και φωσφορυλιωμένα 5’ άκρα (Elbashir *et al.* 2001). Αυτά τα μικρά δίκλιωνα μόρια RNA ενσωματώνονται σε κάποιο πολυπρωτεϊνικό ριβονουκλεϊκό σύμπλοκο, είτε στο σύμπλοκο RISC (RNA-inducing silencing complex), είτε στο σύμπλοκο RITS (RNA-induced transcriptional silencing), είτε στο σύμπλοκο miRNP (εικόνα 1.1). Απαραίτητη προϋπόθεση γι’ αυτή την ενσωμάτωση είναι τα δίκλιωνα μόρια (siRNAs) να είναι φωσφορυλιωμένα στο 5’ άκρο και σε περίπτωση που αυτή η προϋπόθεση δεν τηρείται λαμβάνει χώρα άμεση φωσφορυλίωση από μία ενδογενή κινάση (Schwarz *et al.* 2002). Με την πρόσδεση των δίκλωνων μορίων σε κάποιο από τα παραπάνω σύμπλοκα, οι αλυσίδες τους ξεδιπλώνονται και μένουν μόνο εκείνες που είναι συμπληρωματικές με την αλληλουχία-στόχο του mRNA. Με αυτόν τον τρόπο καθοδηγείται το σύμπλοκο προς την αλληλουχία-στόχο για να πραγματοποιηθεί είτε ο τεμαχισμός της αν πρόκειται για το σύμπλοκο RISC, είτε αναστολή της μετάφρασης αν πρόκειται για το σύμπλοκο miRNP, είτε να προκληθεί τροποποίηση της χρωματίνης αν πρόκειται για το σύμπλοκο RITS.

Σε διάφορους οργανισμούς το φαινόμενο του RNA interference φαίνεται να ενισχύεται με την παρουσία μίας RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης (RdRP) (Ahluquist 2002). Η συγκεκριμένη πολυμεράση, πιστεύεται ότι χρησιμοποιεί ως εκκινητές μόρια δίκλωνου RNA συμπληρωματικά με την αλληλουχία-στόχο του mRNA για την μετατροπή του σε δίκλιωνα RNA (Nishikura 2001), το οποίο στη συνέχεια τεμαχίζεται από την ενδονουκλεάση “Dicer”. Η πολυμεράση αυτή φαίνεται να έχει ρόλο στον νηματώδη σκώληκα και σε φυτά, αλλά δεν μοιάζει να έχει κάποιο ρόλο στον άνθρωπο ή τη Δροσόφιλα (Zamore *et al.* 2001). Αυτό καταδεικνύει την βιολογική ποικιλότητα που

παρουσιάζει το φαινόμενο και υπογραμμίζει το γεγονός ότι πρέπει να αποφεύγεται οποιαδήποτε γενίκευση των επιδράσεων του σε διαφορετικούς οργανισμούς.



Εικόνα 1.1. Μονοπάτια του μηχανισμού του RNAi σε διάφορους οργανισμούς. Μόρια δίκλωνου RNA μεγάλου μήκους και μόρια miRNAs μετατρέπονται σε μικρά μόρια siRNAs/miRNAs από την ενδονουκλεάση Dicer. Οι αλυσίδες των μικρών αυτών μορίων RNA ξεδιπλώνονται και ενσωματώνονται σε κάποιο από τα πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα: RISC (RNA-inducing silencing complex), RITS (RNA-induced transcriptional silencing), miRNP. Το σύμπλοκο RISC μεσολαβεί στην αποικοδόμηση του mRNA, το σύμπλοκο RITS στην τροποποίηση της χρωματίνης και το σύμπλοκο miRNP στην αναστολή της μετάφρασης. Τα siRNAs καθοδηγούν τον τεμαχισμό του mRNA στόχου, τα miRNAs μεσολαβούν στην αναστολή της μετάφρασης και τα rasiRNAs στην τροποποίηση της χρωματίνης (Nature, 2004).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει στα θηλαστικά το γεγονός ότι η εισαγωγή δίκλωνου RNA με μήκος μεγαλύτερο από 30 νουκλεοτίδια επάγει μη ειδική απόκριση ιντερφερονών (Elbashir *et al.* 2001). Ιντερφερόνες επάγουν την ενεργοποίηση του ενζύμου 2'-5'ολιγοαδενυλική συνθάση, η οποία μετατρέπει ATP σε 2'-5'ολιγονουκλεοτίδια αδενίνης, που με τη σειρά τους ενεργοποιούν την RNase L, η οποία κόβει διάφορα μόρια RNA συμπεριλαμβανομένου και ριβοσωμικού και έτσι αναστέλλει την μετάφραση. Επιπλέον, οι ιντερφερόνες ενεργοποιούν και την κινάση PKR, που

φωσφορυλώνει τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF2a οδηγώντας σε καθολική αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης (Stark *et al.* 1998).

Προσδοκίες για το μέλλον

Η τεχνολογία του RNAi αποτελεί ένα πολύ ισχυρό εργαλείο στα χέρια του ερευνητή, που παρέχει τη δυνατότητα ποικίλων εφαρμογών καταστολής της λειτουργίας γονιδίων. Μέχρι σήμερα διάφορες μέθοδοι αντίστροφης γενετικής χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς για την αναστολή της έκφρασης γονιδίων, όπως η χρήση της τεχνολογίας “antisense”, κατά την οποία χρησιμοποιούνται μόρια DNA ή RNA συμπληρωματικά με αλληλουχίες μορίων RNA στόχων αλλά και η “στόχευση” γονιδίων με ομόλογο ανασυνδυασμό. Η δυνατότητα εφαρμογής του RNAi σε διάφορους τύπους κυττάρων, καθώς και το γεγονός ότι πλέον διαθέτουμε τις γενωμικές αλληλουχίες πολλών οργανισμών κάνουν θεωρητικά εφικτή την αξιοποίηση του RNAi στον προσδιορισμό της λειτουργίας οποιουδήποτε γονιδίου σε οποιοδήποτε οργανισμό. Αν και η λειτουργική ανάλυση με τη χρησιμοποίηση δίκλωνου RNA είναι πραγματικότητα (Gonczy *et al.* 2000), την πιο ελπιδοφόρα προσέγγιση για μεγάλης κλίμακας μελέτες RNAi αποτελεί η ανάπτυξη στρατηγικών για την μελέτη ομάδων γονιδίων που ενέχονται σε διάφορες λειτουργίες, όπως συμβαίνει ήδη στον νηματώδη σκώληκα με την ανάπτυξη RNAi βιβλιοθηκών. Έτσι θα είναι εφικτός ο προσδιορισμός της λειτουργίας πολλών γονιδίων, που σχετίζονται με ανατομικές ή φυσιολογικές ανωμαλίες για τον καθορισμό του φύλου, την αναπαραγωγή κ.λ.π. Επιπλέον, η τεχνολογία του RNAi μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την καταστολή της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων με σκοπό την θεραπεία νοσημάτων.

Γονιμότητα αρσενικών εντόμων

Η τεχνολογία του RNAi, μπορεί να αποτελέσει το «όχημα» για πολλές εφαρμογές που βελτιώνουν την ποιότητα της ζωής του ανθρώπου. Σε αυτή την πληθώρα των εφαρμογών μπορούμε να αναγνωρίσουμε και την καταστολή της λειτουργίας γονιδίων που σχετίζονται με τη γονιμότητα αρσενικών εντόμων γεωργικής σημασίας ή φορείς ασθeneιών. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας θα μελετήσουμε την

αποτελεσματικότητα της παραπάνω εφαρμογής σε έναν οργανισμό μοντέλο, την *Drosophila melanogaster*.

Το Y χρωμόσωμα της *Drosophila melanogaster* και γονίδια που χαρτογραφούνται σε αυτό και σχετίζονται με τη γονιμότητα αρσενικών ατόμων

Το Y χρωμόσωμα της *Drosophila melanogaster*, που αντιπροσωπεύει το 12% του γονιδιώματος ενός αρσενικού ατόμου έχει μεγάλη ιστορία γενετικής, κυτταρικής και πιο πρόσφατα μοριακής διερεύνησης. Το 1916 ο Calvin Bridges έδειξε ότι αρσενικά άτομα που είχαν χάσει το Y χρωμόσωμά τους, αλλά διέθεταν το X ήταν φαινοτυπικά φυσιολογικά και βιώσιμα, όμως ήταν επίσης και πλήρως στείρα. Η παρατήρηση αυτή οδηγούσε στη διαπίστωση ότι τα γονίδια που χαρτογραφούνται στο Y χρωμόσωμα σχετίζονται με τη γονιμότητα των αρσενικών εντόμων. Αργότερα αποδείχθηκε ότι τέτοια γονίδια υπήρχαν και στους δύο βραχίονες του Y χρωμοσώματος, τον βραχύ (YS) και τον μακρύ βραχίονα (YL) (Stern, 1929). Με μεταλλαξιγένεση μέσω ακτινοβολίας X (X-ray) και με τη χρήση X-Y μετατοπίσεων (Kennison, 1981) βρέθηκαν 6 γονίδια, εκ των οποίων δύο χαρτογραφούνται στον βραχίονα YS (ks-1, ks-2), και τέσσερα στον βραχίονα YL (kl-1, kl-2, kl-3 και kl-5). Τα γονίδια kl-2, kl-3, kl-5 είναι απαραίτητα για την παραγωγή μεγαλο-μοριακών πρωτεϊνών, οι οποίες πιθανότατα είναι βαριές αλυσίδες δυνεϊνών που σχετίζονται με την κινητικότητα του σπέρματος και παρουσιάζουν ομολογία με βαριές αλυσίδες δυνεϊνών της *Chlamydomonas reinhardtii* (Goldstein *et al.* 1982). Μοριακή ανάλυση επιβεβαίωσε ότι η περιοχή kl-5 κωδικοποιεί μία β- βαριά δυνεϊνική αλυσίδα του αξονήματος, που αποτελείται από περίπου 4.500 αμινοξέα και εκφράζεται στους όρχεις των αρσενικών ατόμων (Gerper, 1993).

Η διαπίστωση ότι το kl-5 είναι ένα συντηρημένο γονίδιο, που κωδικοποιείται, ήταν ιδιαίτερος σημαντική, γιατί μέχρι τότε επικρατούσε η άποψη ότι τα γονίδια του Y χρωμοσώματος παρήγαγαν μόνο μόρια RNA που προσδένονταν σε πρωτεΐνες απαραίτητες στη σπερματογένεση ή είχαν ρυθμιστικό ρόλο (Hennig, 1993). Παράλληλα, οι βαριές δυνεϊνικές αλυσίδες του αξονήματος είναι γνωστό ότι είναι υπεύθυνες για την κίνηση των μαστιγίων και των βλεφαρίδων, γεγονός που εξηγεί, γιατί μεταλλάξεις στο kl-5 παράγουν ακίνητο σπέρμα.

Η κίνηση των σπερματοζωαρίων

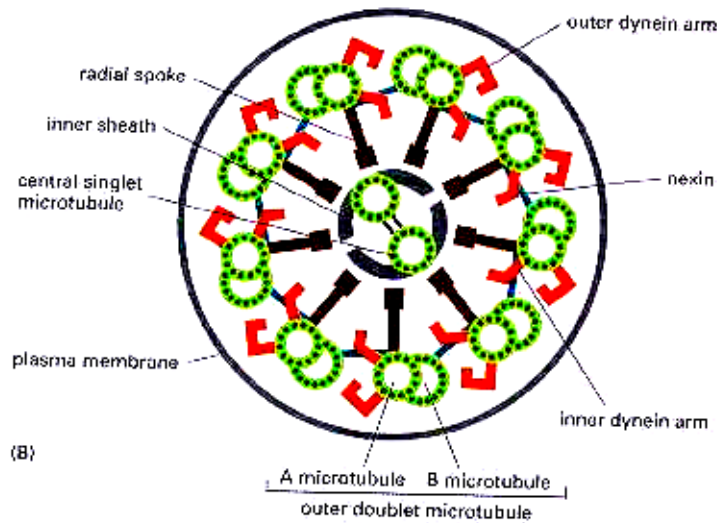
Κίνηση στους περισσότερους ζωικούς οργανισμούς παρατηρείται σε επίπεδο ιστού, κυττάρου και κάποιων κυτταρικών δομών και οργανιδίων. Σε επίπεδο ιστού η πιο γνωστή μορφή κίνησης είναι η συστολή των μυών, που έχει ιδιαίτερη σημασία για την οργάνωση και διατήρηση της ζωής, όπως τη γνωρίζουμε σήμερα. Επιπρόσθετα, η κίνηση κάποιων κυτταρικών δομών, όπως των χρωματοσωμάτων στη μίτωση και ορισμένων οργανιδίων είναι εξίσου σημαντική. Σε επίπεδο κυττάρων πιο συχνά παρατηρείται σε μονοκύτταρους οργανισμούς, αλλά και σε κύτταρα πολυκύτταρων οργανισμών, με χαρακτηριστική την κίνηση των σπερματοζωαρίων. Στις κινήσεις αυτές συμμετέχουν οι μικροσωληνίσκοι και τα μικροϊνίδια που υποβοηθούνται από ειδικές πρωτεΐνες.

Ι] Οι δυνεΐνες στην κίνηση της ουράς των σπερματοζωαρίων

Ο κυτταροσκελετός στην κίνησή του υποβοηθάται από ειδικές πρωτεΐνες που είναι γνωστές ως πρωτεΐνες-κινητήρες. Οι πρωτεΐνες-κινητήρες δεσμεύονται σε μικροσωληνίσκους ή σε μικροϊνίδια και μετακινούνται κατά μήκος τους μονόδρομα χρησιμοποιώντας ενέργεια που απελευθερώνεται από την κατανάλωση ATP. Η κίνησή τους είναι εφικτή, λόγω της ιδιότητάς τους να υφίστανται αλλαγές της στερεοδιάταξής τους σε συνδυασμό με υδρόλυση ATP. Μέχρι σήμερα έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη διάφορων πρωτεϊνών-κινητήρων. Οι πιο γνωστές είναι οι κινεσίνες, οι μυοσίνες και οι δυνεΐνες. Οι κινεσίνες και οι μυοσίνες είναι πρωτεΐνες που δεσμεύονται στους μικροσωληνίσκους και τα ινίδια ακτίνης αντίστοιχα, ενώ οι δυνεΐνες διακρίνονται σε κυτταροπλασματικές και αξονηματικές.

Οι κυτταροπλασματικές δυνεΐνες είναι μία υπεροικογένεια πρωτεϊνών που αποτελούνται από 9-10 πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Το μόριό τους έχει ενεργότητα ATPασης και φαίνεται να συμβάλλουν στην κίνηση των χρωματοσωμάτων και στην κίνηση κατά μήκος των μικροσωληνίσκων κυστιδίων και οργανιδίων, όπως μιτοχόνδρια, λυσοσώματα κ.λ.π.

Η αξονηματική δυνεΐνη είναι παρόμοια με τις κυτταροπλασματικές, αλλά διαφέρει στον αριθμό των πολυπεπτιδικών αλυσίδων και των κεφαλών που έχουν ενεργότητα ΑΤΡασης. Οι αξονηματικές δυνεΐνες συνιστούν συστατικά του αξονήματος και συμμετέχουν στην ολίσθηση των μικροσωληνίσκων, στους οποίους και δεσμεύονται κατά την κίνηση των βλεφαρίδων και των μαστιγίων. Υπάρχουν διάφορες ισομορφές βαρέων αλυσίδων δυνεΐνων, α , β , γ , 1β , 1α κ.λ.π., που σχηματίζουν τον εξωτερικό και εσωτερικό βραχίονα της δυνεΐνης.



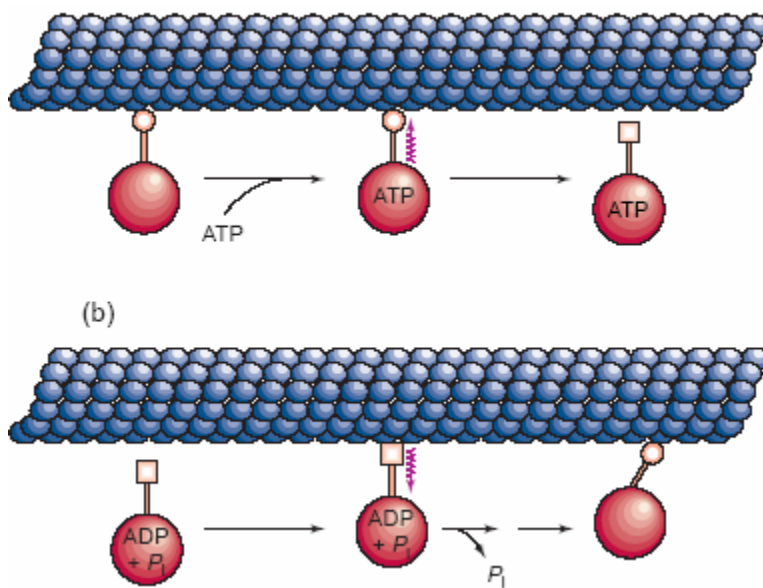
Εικόνα 1.2. Απεικόνιση αξονήματος. Με κόκκινο χρώμα φαίνεται ο εξωτερικός και εσωτερικός βραχίονας της δυνεΐνης. (*Nature Molecular Cell Biology reviews*)

Το αξόνημα είναι η βασική δομή των βλεφαρίδων και των μαστιγίων, επομένως και της ουράς του σπέρματος και αποτελεί τη συνέχεια του βασικού σωματίου, που βρίσκεται στη βάση των βλεφαρίδων και των μαστιγίων. Σε εγκάρσια τομή το αξόνημα αποτελείται από ένα δίκτυο από 9 ζευγάρια μικροσωληνίσκων στην περιφέρεια ενός κυλίνδρου και 2 κεντρικούς μικροσωληνίσκους. Το δίκτυο αυτό περιβάλλεται από πλασματική μεμβράνη, που αποτελεί τη συνέχεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Καθένα από τα ζεύγη των περιφερειακών μικροσωληνίσκων αποτελείται από έναν Α μικροσωληνίσκο (13 πρωτοϊνίδια) και ένα Β μικροσωληνίσκο (10 ή 11 πρωτοϊνίδια). Εκτός από τους μικροσωληνίσκους υπάρχουν και συμπληρωματικές δομές στο αξόνημα. Υπάρχουν διάφορες πρωτεΐνες που συνδέουν το σύστημα αυτό των μικροσωληνίσκων. Η πιο

σημαντική είναι η αξονηματική δυνεΐνη, ενώ υπάρχει ακόμα και η νεξίνη που συνδέει τα γειτονικά ζεύγη των μικροσωληνίσκων και περιορίζει την κίνησή τους.

III Ο μηχανισμός της κίνησης της ουράς των σπερματοζωαρίων

Ο μηχανισμός της κίνησης της ουράς των σπερματοζωαρίων βασίζεται αποκλειστικά στο αξόνημα, και στον τρόπο που αυτό συμβάλλει σπουδαίως είναι ο ρόλος της αξονηματικής δυνεΐνης. Συγκεκριμένα οι βραχίονες της δυνεΐνης είναι υπεύθυνες για την ολίσθηση των μικροσωληνίσκων, ενώ οι ακτίνες και η νεξίνη είναι υπεύθυνες για την κάμψη τους (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3. Μοντέλο ολίσθησης και κάμψης των μικροσωληνίσκων του αξονήματος.

A) Με την προσθήκη ATP λόγω αλλαγών στη στερεοδιάταξη της δυνεΐνης απελευθερώνονται οι βραχίονες της δυνεΐνης από τους μικροσωληνίσκους.

B) Με υδρόλυση του ATP αλλάζει η διαμόρφωση της δυνεΐνης με αποτέλεσμα την ώθηση της δυνάδας προς τα πάνω. Έπειτα η

δυνεΐνη επανασυνδέεται σε νέα θέση του B μικροσωληνίσκου και ωθεί πάλι την παρακείμενη δυνάδα. Αυτή η ολίσθηση μετατρέπεται σε κάμψη αφού οι δυνάδες των μικροσωληνίσκων δεν είναι ελεύθερες στο ένα άκρο τους (συνδέονται με νεξίνη) (Trends in CELL BIOLOGY).

Με την δέσμευση ενός μορίου ATP η δυνεΐνη, που έχει ενεργότητα ATPασης, αποδεσμεύεται από το μικροσωληνίσκο B, ενώ η υδρόλυσή του από τη δυνεΐνη επιτρέπει ξανά τη δέσμευσή της στον μικροσωληνίσκο B. Έτσι με συνεχή υδρόλυση και πρόσληψη ATP από τη δυνεΐνη, πραγματοποιείται δέσμευση και αποδέσμευσή της από τον μικροσωληνίσκο B, αλλά σε διαφορετικό σημείο κάθε φορά, γιατί αλλάζει η

στερεοδιάταξη της δυνεΐνης. Κατ' αυτόν τον τρόπο ο βραχίονας της «προχωρά» στον μικροσωληνίσκο και επομένως οι μικροσωληνίσκοι ολισθαίνουν. Αυτή η ολίσθηση μετατρέπεται σε κάμψη της ουράς του σπερματοζωαρίου, γιατί τόσο οι ακτίνες που φέρουν σε επικοινωνία τους παρακείμενους με τους κεντρικούς μικροσωληνίσκους, όσο και η νεξίνη διατηρούν μαζί τους μικροσωληνίσκους κατά την διάρκεια της ολίσθησης, προκαλώντας έτσι την κάμψη τους.

Επομένως, μεταλλάξεις στην περιοχή του γονιδίου *kl-5*, που συνιστά τμήμα του εξωτερικού βραχίονα της αξονηματικής δυνεΐνης, οδηγούν σε αδυναμία κάμψης της ουράς του σπέρματος, άρα ακινησία του σπέρματος και επομένως δημιουργούν στείρα άτομα.

Μέθοδος στείρων εντόμων

Πολλά είδη εντόμων προκαλούν τεράστιες καταστροφές σε καλλιέργειες και δάση ή μεταφέρουν σοβαρές ασθένειες σε ανθρώπους και ζώα. Ο έλεγχος των πληθυσμών βλαβερών εντόμων αποτελεί μία σημαντική πρόκληση. Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε χημικά εντομοκτόνα που έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον έλεγχο πληθυσμών εντόμων αλλά και οι ζημιογόνες συνέπειες των εντομοκτόνων στο περιβάλλον έστρεψαν τα βλέμματα σε μία βιολογική μέθοδο ελέγχου των πληθυσμών τους, τη μέθοδο στείρων εντόμων (**Sterile Insect Technique: S.I.T.**) (Knipling *et al.* 1955). Η μέθοδος στείρων εντόμων περιλαμβάνει την καλλιέργεια μεγάλου αριθμού εντόμων, τα οποία αφού στερηθούν απελευθερώνονται στο περιβάλλον. Η απελευθέρωση επαρκούς αριθμού ανταγωνιστικών εντόμων έχει ως αποτέλεσμα το ζευγάρωμά τους με θηλυκά αγρίου τύπου που υπάρχουν στο περιβάλλον και τη μείωση των απογόνων τους. Η μέθοδος στείρων εντόμων προβάλλει ως μια φιλική προς το περιβάλλον και ειδο-ειδική μέθοδος περιορισμού ή εξάλειψης των πληθυσμών βλαβερών εντόμων. Στο παρελθόν έχουν πραγματοποιηθεί με επιτυχία διάφορα προγράμματα μαζικής απελευθέρωσης στείρων εντόμων για την αντιμετώπιση της μύγας τσε-τσε (*Glossina austeni*) στη Ζανζιβάρη (Vreysen *et al.* 2001), της κοχλιόμυγας (*Cochliomyia hominivorax*) στην βόρεια και κεντρική Αμερική (Wyss *et al.* 2000, Knipling *et al.* 1966), της κάμπιας (*Pectinophora gossypiella*) στην Καλιφόρνια (Walters *et al.* 2000) και της μεσογειακής μύγας (*Ceratitidis*

capitata) σε διάφορες περιοχές του κόσμου. Για τη μεσογειακή μύγα είναι πιο αποτελεσματική η απελευθέρωση μόνο αρσενικών ατόμων (McGinnis *et al.* 1994, Hendrichs *et al.* 1995). Γενικά σε προγράμματα μαζικής απελευθέρωσης εντόμων επιδιώκεται η απαλλαγή από τα θηλυκά άτομα και η απελευθέρωση μόνο αρσενικών. Τα θηλυκά έντομα ακόμα και στείρα μπορούν να ωαποθέσουν σε καρπούς και να είναι φορείς ασθενειών προκαλώντας τις επιβλαβείς συνέπειες που επιδιώκουμε να αντιμετωπίσουμε περιορίζοντας τους πληθυσμούς αγρίου τύπου.

Παρά τα πλεονεκτήματά της, η μέθοδος SIT εφαρμόζεται για τον έλεγχο περιορισμένου αριθμού ειδών-στόχων. Αυτό συμβαίνει γιατί η παραγωγή στειρών εντόμων πραγματοποιείται με ακτινοβόλησή τους, η οποία προκαλεί μία δραματική μείωση στην ανταγωνιστικότητά τους έναντι των ατόμων αγρίου τύπου, ενώ επιπλέον περιορίζει το χρόνο ζωής των ακτινοβολημένων εντόμων. Ο συνδυασμός των δύο αυτών παραγόντων προκαλεί μείωση της προσαρμοστικότητας διαφόρων ειδών εντόμων κατά έναν συντελεστή 4 έως 10 (Lance *et al.* 2000, Shelly *et al.* 1994). Προβάλλει λοιπόν αναγκαία η ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών μεθόδων δημιουργίας στειρών εντόμων. Η αξιοποίηση των πρόσφατων συστημάτων μετασχηματισμού εντόμων, όπως τα μεταθετά στοιχεία *Minos* (Loukeris *et al.*, 1995) και *piggyBac* (Handler *et al.*, 1998), μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή διαγονιδιακών εντόμων που θα φέρουν κατάλληλα χαρακτηριστικά, ώστε να χρησιμοποιηθούν αντί των ακτινοβολημένων. Επιπλέον θα διευρύνει την εφαρμογή της μεθόδου στειρών εντόμων και σε είδη που η ακτινοβολία προκαλούσε τόσο δραματική μείωση της ανταγωνιστικότητάς τους, ώστε δεν επέτρεπε την εφαρμογή της μεθόδου για τον έλεγχο των πληθυσμών τους (Hollbrook *et al.* 1970, Cayol *et al.*, 2000).

Προκειμένου τέτοια διαγονιδιακά έντομα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά στη μέθοδο στειρών εντόμων θα ήταν προτιμότερο να φέρουν κάποιο γενετικό μάρτυρα για το διαχωρισμό τους από τα αγρίου τύπου, ώστε να παρακολουθείται η επίδρασή τους στους άγριους πληθυσμούς των εντόμων-στόχων. Οι τρόποι που χρησιμοποιούνταν μέχρι σήμερα για την παρακολούθηση ενός πληθυσμού στειρών εντόμων στηρίζονταν κυρίως στη διαπότιση των εντόμων στο στάδιο της νύμφης με κάποιο φθορίζον υλικό. Πέρα από το υψηλό κόστος, η παραπάνω μέθοδος επηρεάζει αρνητικά και την ανταγωνιστικότητα των σημασμένων εντόμων, ενώ μπορεί

να χρησιμοποιηθεί μόνο για την παρακολούθηση των ατόμων που απελευθερώνονται αλλά όχι και των τυχόν απογόνων τους. Απαραίτητο είναι επίσης και ένα σύστημα διαχωρισμού του φύλου, όπως για παράδειγμα κάποιο θνησιγόνο γονίδιο επαγόμενης και ταυτόχρονα επιλεκτικής έκφρασης μόνο σε θηλυκά άτομα, το οποίο θα προκαλεί το θάνατό τους έτσι ώστε να απελευθερώνονται μόνο αρσενικά άτομα. Τέλος είναι αναγκαία η ανάπτυξη ενός συστήματος για τη δημιουργία διαγονιδιακών στείρων αρσενικών εντόμων σε αντικατάσταση της παραδοσιακής ακτινοβολήσής τους.

Σκοπός της παρούσας εργασίας

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας επιδιώκουμε την ανάπτυξη ενός διαγονιδιακού συστήματος που θα προκαλεί στειρότητα σε αρσενικά έντομα που πρόκειται να απελευθερωθούν στο περιβάλλον για τον έλεγχο των πληθυσμών βλαβερών ειδών. Το σύστημα αυτό δεν θα επιδρά στην ανταγωνιστικότητα των στείρων αρσενικών απέναντι σε έντομα αγρίου τύπου, ενώ θα διαθέτει ένα γενετικό μάρτυρα για την παρακολούθησή τους στο περιβάλλον και τη διαπίστωση της αποτελεσματικότητάς τους. Το σύστημα θα βασίζεται στην καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *kl-5* που κωδικοποιεί μία βαριά δυνεινική αλυσίδα του εξωτερικού βραχίονα του αξονήματος στην ουρά των σπερματοζωαρίων. Στην κατασκευή ενός τέτοιου συστήματος προχωρήσαμε, αφού αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος της λειτουργικότητας μίας πλασμιδιακής κατασκευής που έχει ήδη δημιουργηθεί (Ταταράκης, 2003, διατριβή πτυχιακής εργασίας), με σκοπό την παραγωγή δίκλωνου RNA για την καταστολή της λειτουργίας του γονιδίου *kl-5*.

Όσον αφορά στο νέο διαγονιδιακό σύστημα, η καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *kl-5* θα πραγματοποιηθεί με επαγόμενη έκφραση δίκλωνου RNA, που έχει ομολογία με ένα τμήμα της αλληλουχίας του *kl-5*. Η επαγωγή της έκφρασής του θα πραγματοποιηθεί με τον ενεργοποιητή tTA (Gossen and Bujard, 1992), ο οποίος έχει προκύψει με σύντηξη του ρυθμιστικών αλληλουχιών της περιοχής Tn10 του καταστολέα της τετρακυκλίνης (TetR) των βακτηρίων με την καρβοξυτελική περιοχή της πρωτεΐνης VP16 του ιού Herpes. Η Tn10 TetR προσδένεται σε μία ειδική περιοχή του DNA, την tetO (tetracycline operator sequence) και η πρόσδεσή της σε αυτήν καταστέλλεται από τετρακυκλίνη, ενώ η VP16 ενεργοποιεί τη μεταγραφή όχι μόνο σε θηλαστικά αλλά και σε έντομα (Bello *et*

al.). Η έκφραση του tTA θα ελέγχεται από τμήμα της ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου *Hsp26* της *Drosophila melanogaster* που είναι υπεύθυνο για σπερματο-ειδική έκφραση (Glaser *et al.* 1990).

Τελικός σκοπός της παρούσας εργασίας είναι, μέσω της απενεργοποίησης του γονιδίου που κωδικοποιεί τη συγκεκριμένη δυνεΐνη, η δημιουργία στέρων αρσενικών εντόμων που πέρα από την αδυναμία γονιμοποίησης θηλυκών ατόμων θα έχουν φυσιολογικές τις υπόλοιπες λειτουργίες τους. Τα διαγονιδιακά έντομα προβλέπεται να αντικαταστήσουν τα μειωμένης προσαρμοστικότητας στείρα αρσενικά που παράγονται με τη χρήση ακτινοβολίας και να αποδειχθούν ιδανικά για την αποτελεσματικότερη εφαρμογή της μεθόδου στέρων αρσενικών εντόμων. Τα στελέχη αυτά θα αποτελέσουν ένα μοντέλο για την πραγματοποίηση μιας ανάλογης εφαρμογής και σε έντομα γεωργικής σημασίας ή φορείς ασθενειών με σκοπό τον έλεγχο των πληθυσμών τους.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Μετασχηματισμός της *Drosophila melanogaster*

Στα πειράματα μετασχηματισμού της *D. melanogaster* χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *IS31*, το οποίο φέρει μία μετάλλαξη του γονιδίου *white* που προκαλεί την εμφάνιση ματιών άσπρου χρώματος αντί του φυσιολογικού κόκκινου.

Προβλαστοδερμικά έμβρυα Δροσόφιλας ενέθηκαν με μίγμα του πλασμιδίου pCaSpeRhs/kl5IR σε συγκέντρωση (400μg/ml) και πλασμιδίου παραγωγού τρανσποζάσης Δ(2,3) (Laski *et al.*, 1986) σε συγκέντρωση 100μg/ml εφαρμόζοντας τη συνήθη διαδικασία (Rubin and Spradling, 1982).

Διασταυρώσεις ελέγχου της γονιμότητας των διαγονιδιακών αρσενικών ατόμων

Τα ενήλικα άτομα που προήλθαν από έμβρυα που έχουν ενεθεί (G0) διασταυρώθηκαν με άτομα του στελέχους *IS31* της Δροσόφιλας και οι απόγονοι της G1 γενιάς εξετάστηκαν για την εμφάνιση ματιών με χρώμα διαφορετικό του άσπρου. Τα μετασχηματισμένα άτομα διασταυρώθηκαν διαδοχικά με στελέχη που φέρουν χρωμοσώματα εξισορροπητές (balancers), για να δημιουργηθούν ομόζυγες σειρές μετασχηματισμένων εντόμων. Από τις δέκα μετασχηματισμένες σειρές που προέκυψαν, οι σειρές 86.2 και 103.1 μελετήθηκαν περαιτέρω, όσον αφορά στη γονιμότητα των αρσενικών, σε φυσιολογική θερμοκρασία (25°C) και σε συνθήκες επαγωγής του υποκινητή θερμικού σοκ (37°C).

Για τις διασταυρώσεις, μεμονωμένα αρσενικά άτομα διασταυρώνονταν επί δύο ημέρες με τρεις παρθένες θηλυκές του στελέχους *IS31* και στη συνέχεια μεταφέρονταν σε διασταύρωση με τρεις νέες παρθένες θηλυκές. Μετά από 12 ημέρες μετρήθηκε ο αριθμός των απογόνων κάθε διασταύρωσης. Το πείραμα υπό συνθήκες θερμικού σοκ περιελάμβανε την υποβολή των μυγών σε θερμικό σοκ επί μία ώρα καθημερινά από το στάδιο της προνύμφης έως το στάδιο του ενηλικού, μέχρι να χρησιμοποιηθεί το κάθε άτομο στις διασταυρώσεις.

Για το μέσο αριθμό απογόνων των αρσενικών ατόμων, λάβαμε υπόψη το σύνολο των απογόνων όλων των ατόμων. Ο αριθμός των αρσενικών ατόμων που ελέχθησαν είναι: (10) άτομα της σειράς 103.1, που έχουν υποστεί θερμικό σοκ και (8) χωρίς θερμικό σοκ, (9) άτομα της σειράς 86.2 που έχουν υποστεί θερμικό σοκ και (9) χωρίς θερμικό σοκ, (8) άτομα του στελέχους *IS31* που έχουν υποστεί θερμικό σοκ και (7) που δεν έχουν υποστεί θερμικό σοκ.

Απομόνωση ολικού RNA από αρσενικά έντομα

Αρχικά έγινε συλλογή δέκα αρσενικών από κάθε μία από τις δύο διαγονιδιακές σειρές που μελετήσαμε και από αρσενικά άτομα του στελέχους *IS31*, τα οποία είτε είχαν αναπτυχθεί σε φυσιολογική θερμοκρασία, είτε σε συνθήκες θερμικού σοκ (37°C). Έπειτα για την απομόνωση ολικού RNA από τους ομογενοποιημένους ιστούς χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα Trizol (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Σύνθεση cDNA/Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του συστήματος ProSTAR, HF Single Tube RT-PCR System (Stratagene) σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρείας. Το cDNA του γονιδίου *kl-5* που συνετέθει χρησιμοποιήθηκε σε Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης προκειμένου να μελετήσουμε τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στα διαφορετικά άτομα. Στην ίδια αντίδραση πραγματοποιήθηκε πολλαπλασιασμός και τμήματος του cDNA, που έχει παραχθεί με αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής του μηνύματος-RNA του γονιδίου της α -τουμπουλίνης της *D. melanogaster*, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης των επιπέδων του RNA στα διαφορετικά δείγματα.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό του cDNA του μηνύματος-RNA του γονιδίου *kl-5* είναι: Exon10kl5F (5'-TTTGATATTCCTCGTCGGTATA-3') και Exon11kl5R (5'-TCCAATCCTAAAAGCTTAACC-3'). Οι παραπάνω εκκινητές υβριδοποιούν

εκατέρωθεν εσωνίου στην αλληλουχία του γονιδίου *kl-5* και εκτός της περιοχής του δίκλωνου RNA, για να έχουμε τη δυνατότητα διαχωρισμού του προϊόντος που προκύπτει από πολλαπλασιασμό του cDNA του γονιδίου, μεγέθους 400 ζεύγων νουκλεοτιδίων, από τον πολλαπλασιασμό του DNA, που δίνει ένα προϊόν μεγέθους 1000 ζεύγων νουκλεοτιδίων. Οι αλληλουχίες των εκκινήτων για την α -τουμπουλίνη είναι: α Tub84BFOR (5'-GCTCTCTGAGTCAGACC-3') και α Tub84BREV (5'-GCTTGGACTTCTTGCCG-3'). Οι εκκινήτες της α -τουμπουλίνης είναι σχεδιασμένοι επίσης εκατέρωθεν εσωνίου, δίνοντας ένα προϊόν μεγέθους 500 βάσεων με πολλαπλασιασμό του cDNA και 1200 βάσεων με πολλαπλασιασμό του DNA. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για 35 κύκλους στο εξής θερμοκυκλικό πρόγραμμα: 30'' στους 94°C, 30'' στους 57°C και 1' στους 72 °C σε μηχανήμα PTC-200 Peltier Thermal Cycler.

Χημικός τρόπος παραγωγής επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων DH5a

Οι πλασμιαδικές κατασκευές που δημιουργούνται πρέπει να εισαχθούν σε βακτηριακά κύτταρα, για να πολλαπλασιαστεί με αυτόν τον τρόπο ο αριθμός τους και να μπορέσουμε στη συνέχεια να τα χρησιμοποιήσουμε για το σκοπό που επιθυμούμε.

Τα βακτηριακά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα DH5a στελέχη του βακτηρίου *Escherichia coli*, ενώ χρησιμοποιήθηκαν και DH5a που φέρουν μεταλλαγή για *dam* methylases (DH5a *dam*⁻).

Με DH5a κύτταρα αποθηκευμένα στους -80°C πραγματοποιούμε “streaking” σε τρυβλίο που έχει θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικό με σκοπό να πάρουμε μοναδιαίες αποικίες και αφήνουμε να αναπτυχθούν για 14-18 ώρες στους 37°C. Την άλλη μέρα τοποθετούμε μία μονή αποικία σε 3ml θρεπτικού υλικού και αφήνουμε ξανά να αναπτυχθούν τα βακτήρια για 14-18 ώρες με συνεχή ανακίνηση. Προσθέτουμε 1ml από τα κύτταρα αυτά σε 100ml θρεπτικού υλικού μέσα σε κωνική φιάλη της οποίας ο όγκος είναι τουλάχιστον 10 φορές μεγαλύτερος τον όγκο του θρεπτικού, στο οποίο έχουμε προσθέσει 10mM KCl και 20mM MgSO₄, και αφήνουμε τα βακτήρια να αναπτυχθούν σε

θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανακίνηση. Όταν η τιμή της $O.D_{600nm}$ των κυττάρων κυμανθεί μεταξύ 0.45 και 0.55 τότε τοποθετούμε τα βακτήρια στον πάγο για 5 λεπτά. Φυγοκεντρούμε στους $4^{\circ}C$, στις 3.000 rpm, για 10 λεπτά και επαναδιαλύουμε το ίζημα που έχουν σχηματίσει τα κύτταρα σε 10ml TFB I για κάθε 50ml καλλιέργειας [30mM NaAcetate (CH_3COONa), 100mM $RbCl_2$, 10mM $CaCl_2$, 15% glycerol, pH:5.7 και έπειτα προσθέτουμε 50mM $MnCl_2$]. Τοποθετούμε τα βακτήρια στον πάγο για 10 λεπτά και έπειτα φυγοκεντρούμε στους $4^{\circ}C$, στις 3.000 rpm, για 10 λεπτά και επαναδιαλύουμε προσεκτικά το ίζημα σε 2ml παγωμένου TFB II [10mM MOPS, 10mM $RbCl_2$, 75mM $CaCl_2$, 15% glycerol το pH:7.0], για κάθε 50ml καλλιέργειας. Μεταφέρουμε σε Eppendorfs τοποθετώντας 100μl σε καθένα και φυλάσσουμε στους $-80^{\circ}C$ μέχρι να τα χρησιμοποιήσουμε.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα

Αρχικά κατακρημνίζουμε τα κύτταρα που υπάρχουν σε 2ml καλλιέργειας με φυγοκέντρηση για 40 δευτερόλεπτα, στις 3.200 rpm. Επαναδιαλύουμε την πελέττα των κυττάρων σε 100 μl Merlin I [50mM Tris-Hcl, pH 7.5, 10mM EDTA, 100ug/ml RNaseA] και έπειτα προσθέτουμε 100 μl Merlin II [0.2M NaOH, 1% SDS]. Αναδεύουμε ήπια και αφήνουμε για 4-5 λεπτά. Κατόπιν εξουδετερώνουμε με 100 μl Merlin III [για 500ml διαλύουμε 61.35gm στέρεου οξικού καλίου (CH_3COOK), 35.7ml οξικού οξέος και απεσταγμένο νερό μέχρι όγκου 500ml] και αναδεύουμε ξανά προσεκτικά. Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στη μίνι-φυγόκεντρο. Αναμιγνύουμε το υπερκείμενο με 0.5ml Merlin IV [για 100ml διαλύουμε 66.84gm υδροχλωρικής γουανιδίνης σε 33.333ml Merlin III και αφού ρυθμιστεί το pH:5.5 προσθέτουμε 1.5gm διάτομα] και το περνάμε μέσα από κολωνίτσα, στην οποία έχει προσαρμοστεί ένα “Gilson tip” 1ml από το πάνω μέρος της κολωνίτσας και ένα άλλο από το κάτω μέρος με το οποίο στηρίζεται σε ένα “Falcon” των 15ml. Φυγοκεντρούμε, λοιπόν, στις 3.400 rpm για 5 λεπτά. Προσθέτουμε 2ml Merlin V [200mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH:7.5, 5mM EDTA, 50% αιθανόλης] και φυγοκεντρούμε ξανά στις 3.400 rpm, για 15 λεπτά. Αφαιρούμε τα μπλε “tips” και τοποθετούμε τις κολωνίτσες σε Eppendorf των 1.5ml, προσθέτοντας 50μl

προθερμασμένου νερού (75°C). Τέλος φυγοκεντρούμε για 30 δευτερόλεπτα σε μίνι-φυγόκεντρο για να πραγματοποιηθεί έκλυση του DNA.

Απομόνωση γενωμικού DNA (Μέθοδος Holmes Bonner, 1973)

Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση γενετικού υλικού από ενήλικα αρσενικά άτομα *Drosophila* του στελέχους *IS31*, για την χρησιμοποίησή του σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και έδωσε DNA υψηλής καθαρότητας. Αρχικά με κατάλληλους ομογενοποιητές πραγματοποιήθηκε μηχανικά η λύση του πρωτογενούς υλικού, όταν αυτό είναι ολόκληρα έντομα και στη συνέχεια ακολούθησε η επεξεργασία του ομογενοποιημένου υλικού όπως περιγράφεται στην αναφορά Bonner *et al.*, 1973.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction : PCR)

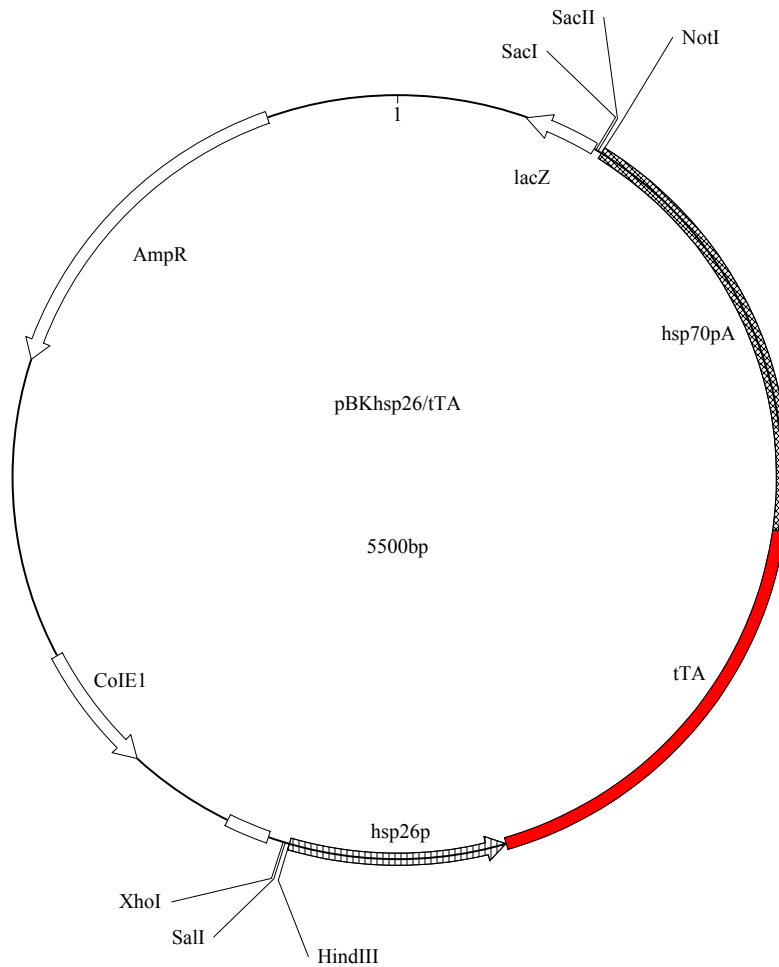
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μία ταχύτατη διαδικασία κατά την οποία λαμβάνει χώρα ενζυματική ενίσχυση *in vitro* ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε σε συνάρτηση με τις συμβατικές τεχνικές κλωνοποίησης στη δημιουργία της πλασμιδιακής κατασκευής. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε για τον πολλαπλασιασμό του τμήματος της ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου *Hsp26*, που εκτείνεται από τη θέση -351 έως τη θέση +181, στην αλληλουχία του γονιδίου *Hsp26* (Acc.No: GI 8112).

Οι αλληλουχίες των εκκινητών είναι: Hsp26F: (5'-CCAAGCTTCTAGAACTTCGGCT-3'), ο οποίος είναι σχεδιασμένος στο 5' άκρο του τμήματος του γονιδίου *Hsp26* που πολλαπλασιάζεται και στο 5' άκρο του έχει θέση περιορισμού για το περιοριστικό ένζυμο *HindIII*, και Hsp26R: (5'-TTACGTTTCCTTTAGGTTATGTTCC-3'), ο οποίος είναι σχεδιασμένος στο 3' άκρο του τμήματος που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Αρχικά πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη του DNA για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 94°C και στη συνέχεια για 30 κύκλους πραγματοποιήθηκαν αποδιάταξη για 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία 94°C, υβριδοποίηση των εκκινητών στις συμπληρωματικές περιοχές τους στο DNA που

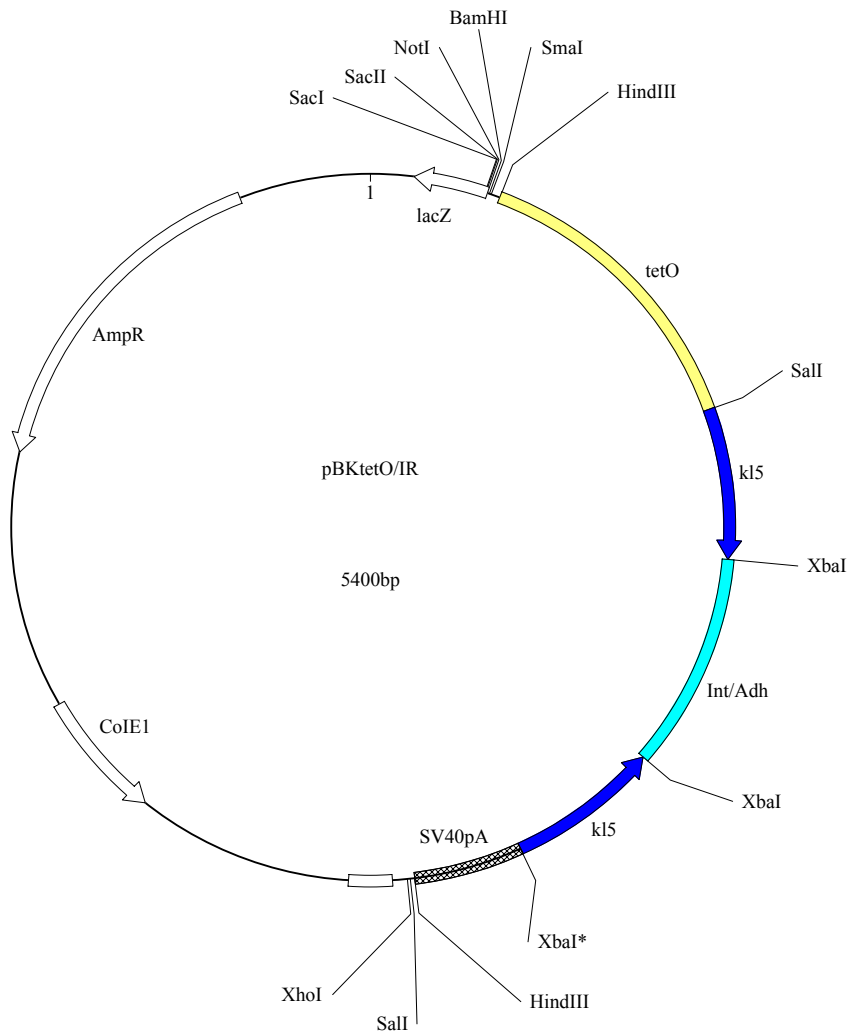
χρησιμοποιήσαμε σαν μήτρα για 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία 57°C, επιμήκυνση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία 72°C και τελική επέκταση για 10 λεπτά στους 72°C.

Πλασμιδιακές κατασκευές

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν αρχικά οι φορείς κλωνοποίησης, pGEM-TEasy (Promega) και pBluescript KS(II) (Stratagene). Όλες οι βασικές τεχνικές τροποποίησης του DNA πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τους Sambrook *et al.* 1989. Για τις αντιδράσεις σύνδεσης λιγάσης χρησιμοποιήθηκε η T₄ DNA λιγάση, ενώ τόσο για τις αντιδράσεις λιγάσης, όσο και για τις πέψεις του DNA που κλωνοποιήθηκε σε κάθε αντίδραση ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι της εταιρείας Minotech. Η διάγνωση των μετασχηματισμένων αποικιών έγινε με κατάλληλες αντιδράσεις πέψης για κάθε περίπτωση. Παρακάτω φαίνονται οι χάρτες των πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν.

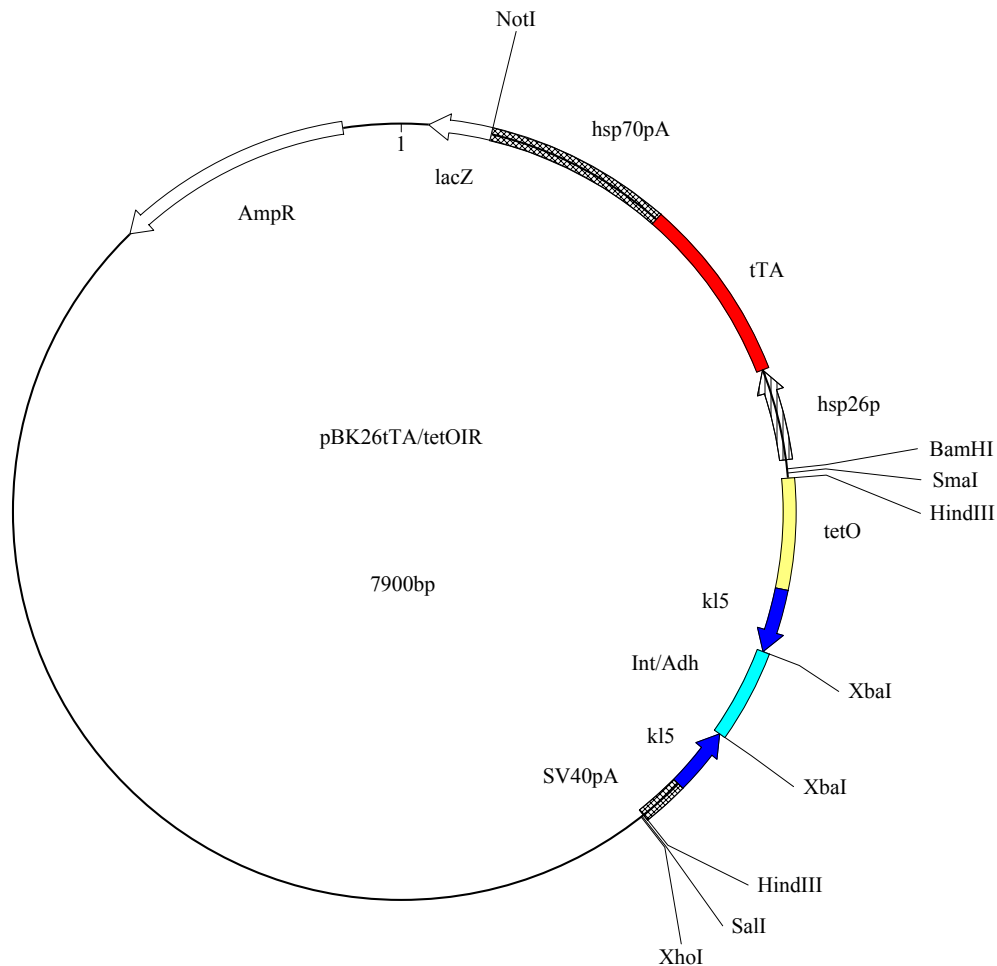


Για τη δημιουργία του πλασμιδιακού φορέα pBKhsp26/tTA αρχικά πραγματοποιήθηκε υποκλωνοποίηση τμήματος DNA με άκρα *EcoRI-NotI*, που περιείχε την αλληλουχία του ενεργοποιητή tTa και μέρος της αλληλουχίας του γονιδίου *hsp70* που φέρει σήμα πολυαδενυλίωσης (*hsp70pA*), από το πλασμίδιο pMiBO14/GtTA2 (Κουκίδου *et al.*, 2005), ως *EcoRI-NotI* τμήμα, στις αντίστοιχες θέσεις του πλασμιδίου pBluescript KS(II) (Stratagene). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε υποκλωνοποίηση του τμήματος της ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου *hsp26*, που πήραμε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, με άκρα *HindIII-blunt* στις θέσεις *HindIII- EcoRI* του πλασμιδίου που είχε δημιουργηθεί ήδη από την προηγούμενη υποκλωνοποίηση, αφού πρώτα είχε πραγματοποιηθεί γέμισμα του άκρου της *EcoRI* με αντίδραση Klenow.



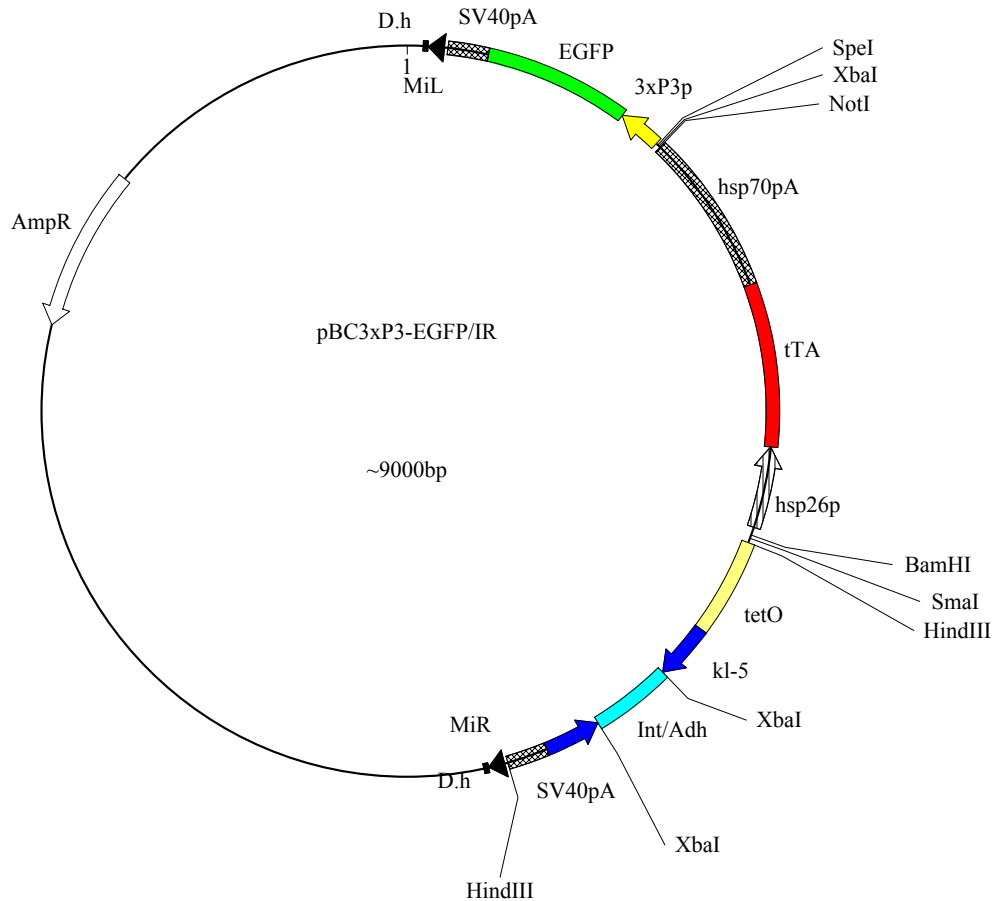
Για τη δημιουργία του πλασμιδίου pBKtetO/IR αρχικά πραγματοποιήθηκε υποκλωνοποίηση της κασέτας tetO : EGFP : SV40pA με άκρα *HindIII* από τον φορέα pMiBO14/GtTA2 στην αντίστοιχη θέση του πλασμιδιακού φορέα pBluescript KS(II). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε καταστροφή της περιοριστικής θέσης *XbaI* που υπήρχε ήδη στον pBluescript KS(II) και χρησιμοποίηση του πλασμιδίου για τον μετασχηματισμό DH5a *dam*⁻ κυττάρων, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί η θέση *XbaI*^{*}, που είναι μεθυλωμένη σε DH5a *dam*⁺ κύτταρα. Έτσι επακολούθησε υποκλωνοποίηση τμήματος με ανεστραμμένες τις αλληλουχίες του *kl-5* και την παρεμβολή του πρώτου εσωνίου του γονιδίου *Adh* (Ταταράκης, 2003, διατριβή πτυχιακής εργασίας), από τον φορέα pGEM-

TEasy/k15IR, στο παραπάνω πλασμίδιο. Για τη συγκεκριμένη υποκλωνοποίηση πραγματοποιήθηκε πέψη του πλασμιδίου pGEM-TEasy/k15IR με τα ένζυμα *Sall-NotI* και γέμισμα της θέσης *NotI* με αντίδραση klenow. Το ένθεμα με άκρα *Sall-NotI* αποτελούσαν οι ανεστραμμένες αλληλουχίες του *kl-5* μεταξύ των οποίων παρεμβάλλεται το πρώτο εσώνιο του γονιδίου *Adh*. Έπειτα ακολούθησε μερική πέψη του φορέα που είχε προκύψει από την προηγούμενη υποκλωνοποίηση με *Sall* και ολική πέψη με *XbaI** σε απομονωμένο πλασμίδιο από μετασχηματισμένα DH5a *dam*⁻. Με την πέψη αυτή απομακρύνθηκε η αλληλουχία του γονιδίου της EGFP και αντικαταστάθηκε από το παραπάνω ένθεμα με αντίδραση λιγάσης.



Το πλασμίδιο pBKtTA/tetOIR δημιουργήθηκε με υποκλωνοποίηση τμήματος με άκρα *XhoI-NotI*, που περιέχει την κασέτα *tetO* : IRepeats : SV40pA, από το πλασμίδιο

pBKtetOIR στον πλασμιδιακό φορέα pBKhsp26/tTA, που έχει ήδη την αλληλουχία του ενεργοποιητή tTa υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *hsp26*, καθώς και τμήμα της αλληλουχίας του γονιδίου *hsp70* που φέρει σήμα πολυαδενυλίωσης (*hsp70pA*) στις θέσεις *XhoI* -*HindIII*. Τόσο τη *NotI* του ενθέματος, όσο και τη *HindIII* του φορέα γεμίσαμε με αντίδραση klenow.

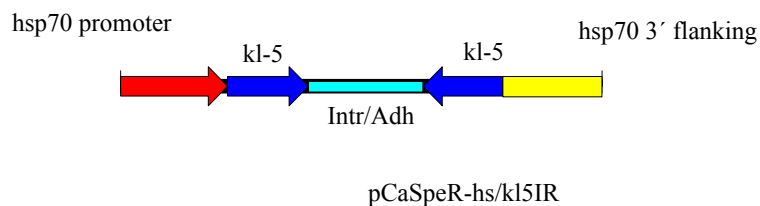


Το πλασμίδιο pBC3xP3-EGFP/IR δημιουργήθηκε με υποκλωνοποίηση τμήματος *XhoI*-*NotI*, που περιέχει όλα τα μέλη του συστήματος, από το πλασμίδιο pBKtTA/tetOIR στον πλασμιδιακό φορέα pBC3xP3-EGFP στις θέσεις *SacII*-*NotI*, δίπλα στην κασέτα 3xP3 : EGFP : SV40pA. Τόσο για τη *XhoI*, όσο και για την *SacII* έχει πραγματοποιηθεί αντίδραση klenow.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της πτυχιακής εργασίας είχε αναπτυχθεί ένα διαγονιδιακό σύστημα (Ταταράκης, 2003, διατριβή πτυχιακής εργασίας), για την επαγώγιμη απενεργοποίηση ενός γονιδίου, παράγοντα γονιμότητας των αρσενικών εντόμων της *D. melanogaster*, με σκοπό να προκαλέσουμε τη στειρότητά τους. Η κατασκευή του συστήματος αυτού βασίζεται στην διπλή κλωνοποίηση, με αντίθετο προσανατολισμό (inverted coding sequences), τμήματος της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου *kl-5*, που επιλέχθηκε να απενεργοποιήσουμε. Μεταξύ των αναστραμμένων αλληλουχιών παρεμβάλλεται ως ενδιάμεση αλληλουχία (spacer) το πρώτο εσώνιο του γονιδίου της αλκοολικής αφυδρογονάσης της *Drosophila melanogaster*. Η παρουσία της ενδιάμεσης αλληλουχίας μεταξύ των αναστραμμένων αλληλουχιών, που κατά την παραγωγή του δίκλωνου RNA θα δώσει το σχηματισμό λούπας, είναι απαραίτητη, γιατί αυξάνει τη σταθερότητά τους κατά το μετασχηματισμό κυττάρων *Escherichia coli*. Επιπλέον, η χρησιμοποίηση ενός λειτουργικού εσωνίου ως ενδιάμεση αλληλουχία αυξάνει την αποτελεσματικότητα του δίκλωνου RNA (Kalidas and Smith 2002, Reichhart *et al.* 2002).

Η παραγωγή του δίκλωνου RNA βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *hsp70*, ενώ η εισαγωγή της κατασκευής στο γονιδίωμα της Δροσόφιλας πραγματοποιήθηκε μέσω του μεταθετού στοιχείου P. Η κατασκευή παρουσιάζεται διαγραμματικά στην Εικόνα 3.1.

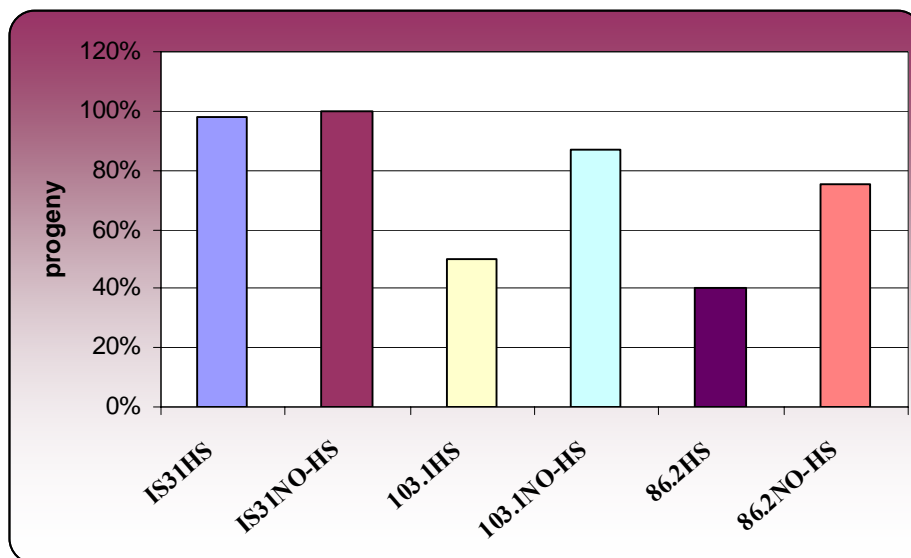


Εικόνα 3.1. Κατασκευή επαγόμενου αναστραμμένου *kl-5*. Τμήμα της αλληλουχίας της κωδικής περιοχής του γονιδίου *kl-5* κλωνοποιημένο ως αναστραμμένες αλληλουχίες, οι οποίες διαχωρίζονται από την αλληλουχία του πρώτου εσωνίου του γονιδίου της αλκοολικής αφυδρογονάσης και βρίσκονται υπό τον έλεγχο του υποκινητή *hsp70*.

Μετασχηματισμός της *D. melanogaster* και λειτουργικός έλεγχος του διαγονιδίου

Τα ενήλικα άτομα που προήλθαν από έμβρυα που έχουν ενεθεί (G0) διασταυρώθηκαν με άτομα του στελέχους *IS31* της Δροσόφιλας και οι απόγονοι της G1 γενιάς ελέγχθησαν για την εμφάνιση ματιών με χρώμα διαφορετικό του άσπρου. Με τα μετασχηματισμένα άτομα πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές διασταυρώσεις με στελέχη που φέρουν χρωμοσώματα εξισορροπητές (balancers), για να δημιουργηθούν ομόζυγες σειρές μετασχηματισμένων εντόμων.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος, όσον αφορά τη γονιμότητα των αρσενικών σε φυσιολογική θερμοκρασία (25°C) και σε συνθήκες επαγωγής του υποκινητή θερμικού σοκ (37°C). Για το σκοπό αυτό μετασχηματισμένα άτομα από τις ομόζυγες σειρές 103.1 και 86.2, διασταυρώθηκαν με θηλυκές παρθένες σε αναλογία 1 αρσενικό : 3 θηλυκές, ενώ διασταυρώσεις πραγματοποιήθηκαν και για αρσενικά άτομα *IS31* που επίσης έχουν μεγαλώσει στις ίδιες συνθήκες. Ο αριθμός των απογόνων που προέκυψαν από τις διασταυρώσεις των μετασχηματισμένων αρσενικών ατόμων σε σύγκριση με τον αριθμό των απογόνων από τις διασταυρώσεις των αρσενικών του αρχικού στελέχους παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα.



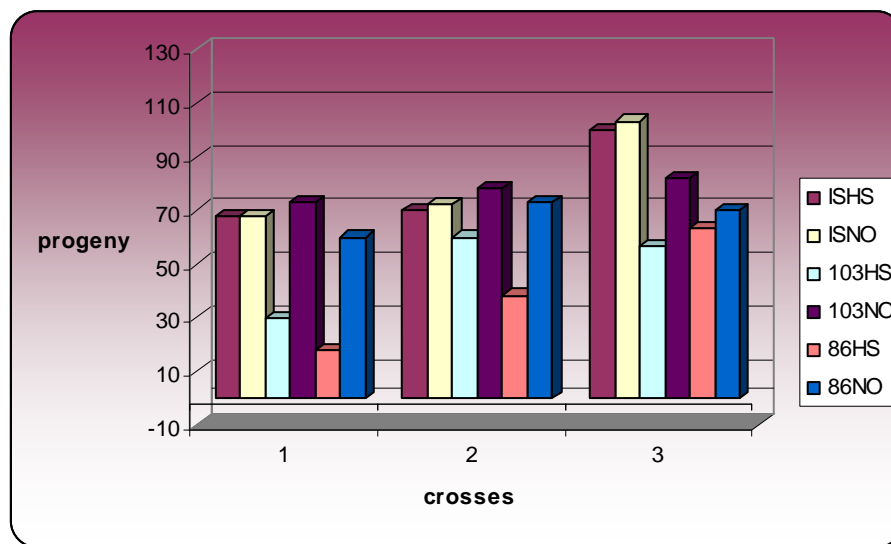
Εικόνα 3.2.
Μείωση του
αριθμού των
απογόνων των
μετασχηματισ
μένων
αρσενικών.

Ο αριθμός, σε ποσοστό (%), των απογόνων των μετασχηματισμένων ατόμων που έχουν υποστεί θερμικό σοκ είναι μειωμένος στο ήμισυ σε σχέση με εκείνον των αρσενικών *IS31*. Μειωμένος είναι και ο αριθμός των διαγονιδιακών που δεν έχουν υποστεί θερμικό σοκ.

Κάθε αρσενικό άτομο διασταυρώθηκε με 3 παρθένες θηλυκές για δύο ημέρες και στη συνέχεια μεταφερόταν για διασταύρωση με 3 νέες παρθένες θηλυκές για άλλες δύο ημέρες. Η συγκεκριμένη μεταφορά πραγματοποιήθηκε τρεις φορές για κάθε αρσενικό άτομο. Για τα παραπάνω αποτελέσματα λάβαμε υπόψη τους απογόνους και από τις τρεις διασταυρώσεις για κάθε αρσενικό.

Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι υπάρχει μείωση του αριθμού των απογόνων των μετασηματισμένων ατόμων, τα οποία υπόκεινται σε θερμικό σοκ, στο ήμισυ σε σχέση με τον αντίστοιχο που προέκυψε από τις διασταυρώσεις των αρσενικών του στελέχους IS31, το οποίο είχε χρησιμοποιηθεί αρχικά για την εισαγωγή του συστήματος. Μικρή μείωση του αριθμού των απογόνων παρατηρείται και για τα μετασηματισμένα αρσενικά που δεν υπόκεινται σε θερμικό σοκ, των οποίων ο αριθμός των απογόνων κυμαίνεται στο 80% περίπου του αριθμού των απογόνων των αρσενικών IS31. Ο αριθμός των απογόνων των αρσενικών ατόμων του στελέχους IS31 κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα, είτε υπόκεινται σε θερμικό σοκ, είτε όχι.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι αριθμοί των απογόνων κάθε αρσενικού για κάθε μεταφορά. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 3.3.

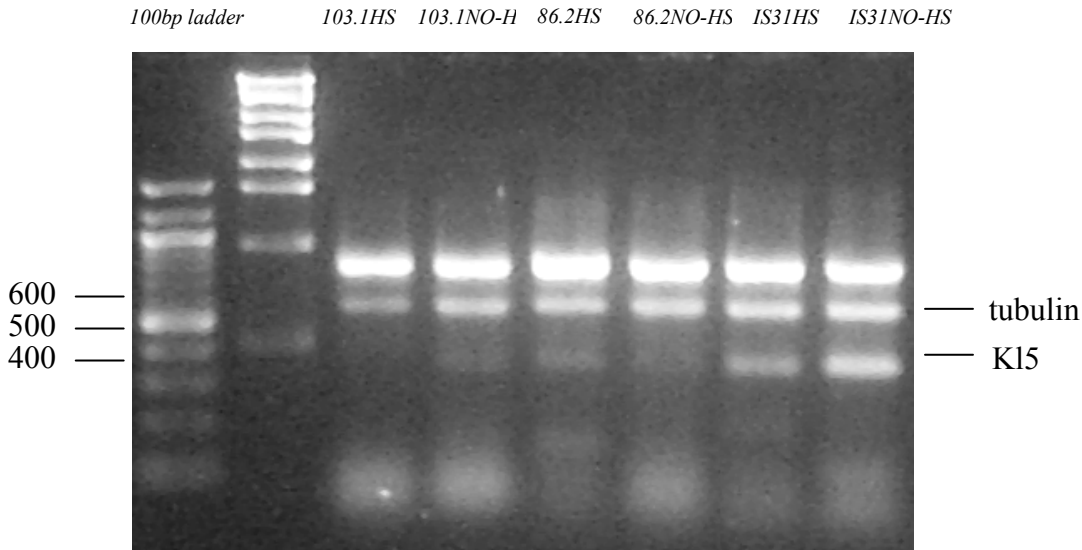


Εικόνα 3.3. Ο αριθμός των απογόνων των αρσενικών ατόμων σε καθεμία από τις τρεις διασταυρώσεις. Απεικονίζεται ο μέσος αριθμός των απογόνων των αρσενικών ατόμων, των οποίων η γονιμότητα έχει ελεγχθεί, για καθεμία από τις τρεις διαδοχικές διασταυρώσεις που πραγματοποιήθηκαν. Υπάρχει αύξηση του αριθμού των απογόνων των διαγονιδιακών αρσενικών που έχουν υποστεί θερμικό σοκ στις διαδοχικές διασταυρώσεις..

Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι ο αριθμός των απογόνων των διαγονιδιακών αρσενικών ατόμων που έχουν υποστεί θερμικό σοκ αυξάνεται σε κάθε μεταφορά. Ο αριθμός των απογόνων τους κατά την πρώτη μεταφορά προσεγγίζει το 25% για την ομόζυγη σειρά 86.2 και το 35% για την 103.1 σε σύγκριση με τον αριθμό των απογόνων που προκύπτουν στην αντίστοιχη διασταύρωση των ατόμων *IS31*. Αυτός ο αριθμός σχεδόν διπλασιάζεται στις ακόλουθες διασταυρώσεις. Επιπλέον ο αριθμός των απογόνων των διαγονιδιακών ατόμων, που δεν υπόκεινται σε θερμικό σοκ, δεν παρουσιάζει εντυπωσιακή αύξηση. Είναι αξιοσημείωτο να αναφερθεί ότι ο αριθμός απογόνων της σειράς 86.2, για την πρώτη διασταύρωση, διαμορφώνεται από τον αριθμό απογόνων τριών από τα εννέα αρσενικά που ελέχθησαν, καθώς τα υπόλοιπα ήταν εντελώς στείρα. Για τον υπολογισμό του μέσου όρου των απογόνων των αρσενικών εντόμων ελήφθησαν υπόψη οι αριθμοί των απογόνων όλων των αρσενικών. Η αύξηση που εμφανίζεται στις επόμενες διασταυρώσεις οφείλεται στο γεγονός ότι αρσενικά άτομα, που δεν είχαν δώσει απογόνους στην πρώτη διασταύρωση, έδωσαν στη συνέχεια.

Μοριακός έλεγχος της καταστολής του γονιδίου *kl-5*

Τα επίπεδα έκφρασης του αγγελιοφόρου mRNA-στόχου ελέχθησαν με αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής-αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται μείωση των επιπέδων του μηνύματος-RNA του γονιδίου *kl-5*, τόσο στα διαγονιδιακά άτομα που υπόκεινται σε θερμικό σοκ, όσο και σε εκείνα που δεν έχουν υποστεί θερμικό σοκ. Τα επίπεδα του μηνύματος-RNA του γονιδίου της α-τουμπουλίνης της *D.melanogaster* είναι περίπου ίδια, γεγονός που συνεπάγεται ότι οι ποσότητες RNA για τα δείγματα, που ελέχθησαν στην αντίδραση, κυμαίνονται περίπου στα ίδια επίπεδα.



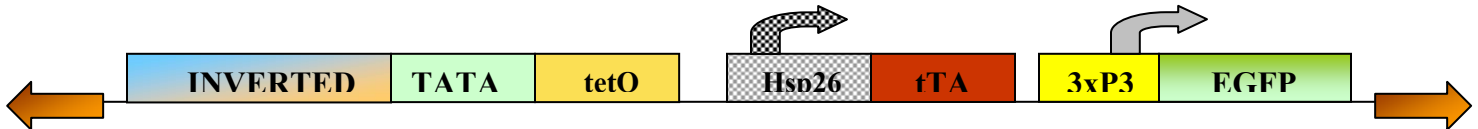
Εικόνα 3.4. Μείωση των επιπέδων του μηνύματος-RNA του γονιδίου *kl-5* των διαγονιδιακών αρσενικών ατόμων. Απεικονίζονται τα επίπεδα του μηνύματος-RNA του γονιδίου *kl-5* των μετασηματισμένων αρσενικών ατόμων και των αρσενικών ατόμων του στελέχους IS31, που έχουν αναπτυχθεί είτε σε φυσιολογική θερμοκρασία (25°C), είτε σε θερμοκρασία θερμικού σοκ (37°C). Τα επίπεδα του μηνύματος-RNA του γονιδίου των μετασηματισμένων ατόμων μειώνονται σε σύγκριση με τα επίπεδα του μηνύματος-RNA του γονιδίου των αρσενικών ατόμων του στελέχους IS31.

Ανάπτυξη διαγονιδιακού συστήματος με βάση τον ενεργοποιητή tTA

Για την αποτελεσματικότερη επαγόμενη καταστολή της λειτουργίας του γονιδίου *kl-5*, προχωρήσαμε στη δημιουργία ενός νέου διαγονιδιακού συστήματος, το οποίο βασίζεται στην ρυθμιζόμενη από την τετρακυκλίνη παραγωγή δίκλωνου RNA. Στο συγκεκριμένο σύστημα η παραγωγή του δίκλωνου RNA βρίσκεται υπό τον έλεγχο του ενεργοποιητή tTA, του οποίου η λειτουργία καθορίζεται από την παρουσία ή μη τετρακυκλίνης (Tc). Η έκφραση του tTA βρίσκεται υπό τον έλεγχο τμήματος της ρυθμιστικής αλληλουχίας του γονιδίου *Hsp26* που δίνει συστατική και σπερματο-ειδική έκφραση στη *D.melanogaster* (Glaser *et al* 1990).

Σε αυτό το σύστημα απουσία τετρακυκλίνης θα πραγματοποιείται έκφραση του tTA σε σπερματοκύτταρα. Το tTA θα επάγει με πρόσδεση του στην αλληλουχία *tetO* την

έκφραση δίκλωνου RNA και μέσω αυτού καταστολή της λειτουργίας του γονιδίου *kl-5*. Παρουσία τετρακυκλίνης θα εμποδίζεται η πρόσδεση του tTA στην αλληλουχία *tetO* και επομένως δε θα πραγματοποιείται παραγωγή δίκλωνου RNA, άρα και καταστολή της λειτουργίας του *kl-5*. Σε αυτή την περίπτωση τα αρσενικά έντομα θα είναι γόνιμα και έτσι δίνεται η δυνατότητα να διατηρείται ο πληθυσμός των διαγονιδιακών εντόμων. Η παρακάτω εικόνα αποδίδει σχηματικά την κατασκευή του νέου συστήματος.



Εικόνα 3.5. Η κατασκευή με τον ενεργοποιητή tTA και κατάλληλο γενετικό μάρτυρα. Φαίνεται η διάταξη της κατασκευής, καθώς και ο γενετικός μάρτυρας *EGFP*, ανάμεσα στα άκρα του μεταθετού στοιχείου *Minos*.

Ο μετασχηματισμός της *Drosophila melanogaster* θα πραγματοποιηθεί με το μεταθετό στοιχείο *Minos* και για την αναγνώριση μετασχηματισμένων ατόμων θα χρησιμοποιηθεί η φοριζουσα πρωτεΐνη *EGFP*, της οποίας η έκφραση θα βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή 3xP3, που δίνει έκφραση στα μάτια των μυγών.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Καταστολή της λειτουργίας μιας β- βαριάς αλυσίδας της αξονηματικής δυνεΐνης

Με την αξιοποίηση των δυνατοτήτων της τεχνολογίας του RNAi έχουμε ήδη προχωρήσει στη δημιουργία μιας κατασκευής (Ταταράκης, 2003, διατριβή πτυχιακής εργασίας) ικανής να επάγει, μετά από θερμικό σοκ, την καταστολή της λειτουργίας της β- βαριάς αλυσίδας K1-5, που συνιστά τμήμα του εξωτερικού βραχίονα της αξονηματικής δυνεΐνης της *Drosophila melanogaster*. Ο έλεγχος για τη λειτουργικότητα της συγκεκριμένης κατασκευής πραγματοποιήθηκε με κατάλληλες διασταυρώσεις ελέγχου. Τα αποτελέσματα των παραπάνω διασταυρώσεων έδειξαν ότι η παραγωγή δίκλωνου RNA για την απενεργοποίηση του γονιδίου *kl-5* είναι αποτελεσματική.

Ο αριθμός των απογόνων μετασχηματισμένων αρσενικών ατόμων και των δύο ομόζυγων σειρών, που υπόκεινται σε θερμικό σοκ και στα οποία επάγεται παραγωγή δίκλωνου RNA, μειώθηκε στο ήμισυ σε σχέση με τον αριθμό των απογόνων των αρσενικών ατόμων του στελέχους *IS31*. Το γεγονός ότι ο αριθμός των απογόνων ατόμων του στελέχους *IS31* είναι ο ίδιος, είτε υπόκεινται, είτε όχι σε θερμικό σοκ, επιβεβαιώνει ότι για την παραπάνω μείωση των απογόνων των μετασχηματισμένων ατόμων, δεν ευθύνεται η διαδικασία του θερμικού σοκ. Η μείωση κατά 20% του αριθμού των απογόνων των μετασχηματισμένων ατόμων, που δεν υπόκεινται σε θερμικό σοκ σε σύγκριση με τον αριθμό απογόνων των αρσενικών ατόμων του στελέχους *IS31*, μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι ο υποκινητής του γονιδίου *hsp70* εμφανίζει μικρή λειτουργία ακόμα και σε θερμοκρασία 25°C. Αυτό μπορεί να οδηγεί σε παραγωγή κάποιας ποσότητας δίκλωνου RNA που έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της έκφρασης του γονιδίου και κατά συνέπεια τη μείωση του αριθμού των απογόνων τους, έστω και σε μικρότερο βαθμό από τη μείωση του αριθμού των απογόνων διαγονιδιακών αρσενικών ατόμων, που υπόκεινται σε θερμικό σοκ. Το επιχείρημα αυτό ενισχύεται από το γεγονός ότι και τα αποτελέσματα της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής-αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης έδειξαν μείωση των επιπέδων του μηνύματος-

RNA (mRNA) του γονιδίου ακόμα και σε μετασχηματισμένα άτομα που αναπτύσσονται σε φυσιολογική θερμοκρασία.

Κάθε αρσενικό άτομο διασταυρώθηκε με 3 παρθένες θηλυκές για δύο ημέρες και στη συνέχεια μεταφερόταν για διασταύρωση με 3 καινούριες παρθένες θηλυκές για άλλες δύο ημέρες. Η συγκεκριμένη μεταφορά πραγματοποιήθηκε τρεις φορές για κάθε αρσενικό άτομο. Είναι αξιοσημείωτο ότι ο αριθμός των απογόνων των διαγονιδιακών ατόμων, που είχαν υποστεί θερμικό σοκ, αυξανόταν σε κάθε μεταφορά, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε εξασθένηση της επαγωγής, ολοένα και περισσότερο, από τη στιγμή που πραγματοποιήθηκε το τελευταίο θερμικό σοκ, πριν χρησιμοποιηθούν οι μύγες στις διασταυρώσεις. Τη συγκεκριμένη εκδοχή ενισχύει το γεγονός ότι ο αριθμός των απογόνων των αρσενικών διαγονιδιακών ατόμων που διασταυρώθηκαν σε φυσιολογική θερμοκρασία διατηρείται στα ίδια επίπεδα από μεταφορά σε μεταφορά. Σε αυτά τα επίπεδα προσεγγίζει σταδιακά και ο αριθμός απογόνων των διαγονιδιακών που είχαν υποστεί θερμικό σοκ. Φαίνεται λοιπόν ότι ένα σύστημα, που θα επάγει τη συνεχή παραγωγή δίκλωνου RNA, μπορεί να προκαλέσει μία εντυπωσιακή μείωση της γονιμότητας των αρσενικών.

Με βάση τα αποτελέσματα της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής-αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης διαπιστώνεται σαφής μείωση των επιπέδων του μηνύματος-RNA του γονιδίου τόσο σε διαγονιδιακά αρσενικά άτομα που έχουν υποστεί θερμικό σοκ, όσο και σε εκείνα που δεν έχουν υποστεί, σε σύγκριση με τα επίπεδα που εμφανίζονται σε μη μετασχηματισμένα άτομα. Για τον προσδιορισμό διαφορετικών επιπέδων μηνύματος-RNA, μεταξύ των παραπάνω μετασχηματισμένων ατόμων, είναι απαραίτητη η χρησιμοποίηση μίας μεθόδου με μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα, όπως η ποσοτική RT-PCR.

Τα αποτελέσματα από τη χρησιμοποίηση της παραπάνω κατασκευής αφήνουν υποσχέσεις για την αποτελεσματικότητα που μπορεί να έχει η ανάπτυξη ενός διαγονιδιακού συστήματος, με σκοπό τη δημιουργία στειρών ανταγωνιστικών αρσενικών εντόμων, μέσω της απενεργοποίησης ενός γονιδίου, που κωδικοποιεί μία αλυσίδα αξονηματικής δυνεΐνης.

Ανάπτυξη διαγονιδιακού συστήματος με βάση τον ενεργοποιητή tTA

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας αναπτύχθηκε ένα διαγονιδιακό σύστημα που θα προκαλεί στειρότητα σε αρσενικά έντομα που πρόκειται να απελευθερωθούν στο περιβάλλον για τον έλεγχο των πληθυσμών βλαβερών ειδών. Το σύστημα αυτό βασίζεται στην καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *kl-5*, που θα πραγματοποιηθεί με επαγόμενη έκφραση δίκλωνου RNA, που έχει ομολογία με ένα τμήμα της αλληλουχίας του *kl-5* και για την επαγωγή της έκφρασής του θα χρησιμοποιηθεί ο ενεργοποιητής tTA, του οποίου η λειτουργία καθορίζεται από την παρουσία ή μη τετρακυκλίνης (Tc) (Gossen and Bujard, 1992). Η πρωτεΐνη tTA είναι ένας πολύ ισχυρός ενεργοποιητής και έτσι αναμένεται το συγκεκριμένο διαγονιδιακό σύστημα να είναι πολύ αποτελεσματικό. Λαμβάνοντας υπόψη και τα αποτελέσματα που προέκυψαν με την παραγωγή δίκλωνου RNA, με επαγωγή από τον υποκινητή του γονιδίου *hsp70*, η μείωση περιμένουμε να είναι πιο εντυπωσιακή.

Το παραπάνω σύστημα μπορεί να συνδυαστεί με κάποιο άλλο το οποίο προκαλεί επιλεκτικά θνησιμότητα μόνο σε θηλυκά άτομα, για την απαλλαγή από τα θηλυκά και την απελευθέρωση μόνο αρσενικών ατόμων. Οι Heinrich και Scott το 2000 περιέγραψαν ένα τέτοιο σύστημα στη *Drosophila melanogaster* στο οποίο χρησιμοποιείται ο υποκινητής του γονιδίου *yolk protein1* για να επάγει μέσω του ενεργοποιητή tTA έκφραση του προ-αποπτωτικού γονιδίου *hid* στο λιπώδη ιστό των θηλυκών ατόμων (Heinrich and Scott, 2000). Έτσι ο συνδυασμός των δύο συστημάτων απουσία τετρακυκλίνης θα οδηγούσε στον επιλεκτικό θάνατο των θηλυκών εντόμων και κατ' επέκταση στην απελευθέρωση μόνο αρσενικών. Βέβαια για να μπορέσουν να συνδυαστούν τα δύο συστήματα θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για καταστολή της έκφρασης του συστήματος παρόμοιες συγκεντρώσεις τετρακυκλίνης. Το παραπάνω σύστημα θα μπορούσε να συνδυαστεί και με έναν από τους κλασσικούς τρόπους διαχωρισμού του φύλου, που χρησιμοποιείται για το θάνατο των θηλυκών ατόμων της μεσογειακής μύγας και βασίζεται στην έκφραση θερμο-ευαίσθητων θνησιγόνων μεταλλαγών (Robinson *et al.* 1999).

Το σύστημα αυτό έχει την πρωτοτυπία της εισαγωγής στα έντομα με ένα βήμα τόσο της σπερματο-ειδικής έκφρασης του tTA όσο και της ρυθμιζόμενης έκφρασης του

δίκλωνου RNA, που επάγεται από τον ενεργοποιητή tTA. Αυτή η διαδικασία ενός βήματος κάνει πιο ευέλικτο το συγκεκριμένο σύστημα σε σύγκριση με συστήματα που έχουν αναπτυχθεί, είτε για το διαχωρισμό θηλυκών από αρσενικά άτομα (Heinrich and Scott, 2000, Thomas *et al.* 2000), είτε για τη δημιουργία στείρων αρσενικών (Horn and Wimmer 2003, Gong *et al.* 2005). Πρόκειται για συστήματα δύο συνιστωσών βάσει των οποίων δημιουργούνται διαγονιδιακές μύγες που φέρουν είτε τον ενεργοποιητή tTA υπό τον έλεγχο ενός υποκινητή είτε την αλληλουχία *tetO* συνδεδεμένη με κατάλληλο γονίδιο. Με διασταυρώσεις μεταξύ των διαφορετικών διαγονιδιακών εντόμων παράγονται άτομα που φέρουν και τις δύο συνιστώσες στο γονιδίωμά τους.

Έντομα που θα φέρουν το παραπάνω διαγονιδιακό σύστημα θα έχουν ακίνητο σπέρμα και σε αυτό θα οφείλεται η στειρότητά τους και όχι σε ασπερμία. Αρσενικά άτομα που παρουσιάζουν ασπερμία δεν είναι αποτελεσματικά σε προγράμματα απελευθέρωσης στείρων εντόμων, καθώς θηλυκά αγρίου τύπου που ζευγαρώνουν με αυτά εμφανίζουν την τάση να ζευγαρώνουν ξανά με άλλα αρσενικά. Επομένως η παρουσία σπέρματος, των παραπάνω διαγονιδιακών ατόμων, στις σπερματοθήκες των θηλυκών ατόμων εκτός του ότι δεν μπορεί να δώσει απογόνους, αφού το σπέρμα είναι ακίνητο, εμποδίζει και το ζευγάρι των θηλυκών με άλλους αρσενικούς.

Βιβλιογραφία:

- Ahlquist, P. (2002). "RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing." Science **296**(5571): 1270-3.
- Bello B, Resendez-Perez & Gehring 1998 Spatial and temporal targeting of gene expression in *Drosophila* by means of a tetracycline-dependent transactivator system Development **125**: 2193-2202
- Bernstein, E., A. A. Caudy, et al. (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." Nature **409**(6818): 363-6.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, et al. (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." Nature **411**(6836): 494-8.
- Elbashir, S. M., W. Lendeckel, et al. (2001). "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." Genes Dev **15**(2): 188-200.
- Elbashir, S. M., J. Martinez, et al. (2001). "Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate." Embo J **20**(23): 6877-88.
- Fire, A., S. Xu, et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**(6669): 806-11.
- Gepner, J. and T. S. Hays (1993). "A fertility region on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster* encodes a dynein microtubule motor." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(23): 11132-6.
- GLASER, R. L., and J. T. LIS, 1990 Multiple, compensatory regulatory elements specify spermatocyte-specific expression of the *Drosophila melanogaster* hsp26 gene. Mol Cell Biol **10**: 131-7.
- Goldstein, L. S., R. W. Hardy, et al. (1982). "Structural genes on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(23): 7405-9.
- Gonczy, P., C. Echeverri, et al. (2000). "Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III." Nature **408**(6810): 331-6.
- GOSSEN, M., and H. BUJARD, 1992 Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. Proc Natl Acad Sci U S A **89**: 5547-51.

- Grishok, A., H. Tabara, et al. (2000). "Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*." Science **287**(5462): 2494-7.
- Hamilton, A. J. and D. C. Baulcombe (1999). "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants." Science **286**(5441): 950-2.
- HEINRICH, J. C., and M. J. SCOTT, 2000 A repressible female-specific lethal genetic system for making transgenic insect strains suitable for a sterile-release program. Proc Natl Acad Sci U S A **97**: 8229-32.
- Hennig, W. (1993). "Conventional protein coding genes in the *Drosophila* Y chromosome: is the puzzle of the fertility gene function solved?" Proc Natl Acad Sci U S A **90**(23): 10904-6.
- Hutvagner, G. and P. D. Zamore (2002). "A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex." Science **297**(5589): 2056-60.
- Jorgensen, R. (1990). "Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes." Trends Biotechnol **8**(12): 340-4.
- Kalidas, S. and D. P. Smith (2002). "Novel genomic cDNA hybrids produce effective RNA interference in adult *Drosophila*." Neuron **33**(2): 177-84.
- Kawasaki, H., E. Suyama, et al. (2003). "siRNAs generated by recombinant human Dicer induce specific and significant but target site-independent gene silencing in human cells." Nucleic Acids Res **31**(3): 981-7.
- Kennerdell, J. R. and R. W. Carthew (1998). "Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway." Cell **95**(7): 1017-26.
- Kennerdell, J. R. and R. W. Carthew (2000). "Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA." Nat Biotechnol **18**(8): 896-8.
- Misquitta, L. and B. M. Paterson (1999). "Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(4): 1451-6.
- Montgomery, M. K. and A. Fire (1998). "Double-stranded RNA as a mediator in sequence-specific genetic silencing and co-suppression." Trends Genet **14**(7): 255-8.

- Nishikura, K. (2001). "A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst." Cell **107**(4): 415-8.
- Paddison, P. J., A. A. Caudy, et al. (2002). "Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells." Genes Dev **16**(8): 948-58.
- Paddison, P. J. and G. J. Hannon (2002). "RNA interference: the new somatic cell genetics?" Cancer Cell **2**(1): 17-23.
- Piccin, A., A. Salameh, et al. (2001). "Efficient and heritable functional knock-out of an adult phenotype in *Drosophila* using a GAL4-driven hairpin RNA incorporating a heterologous spacer." Nucleic Acids Res **29**(12): E55-5.
- Quan, G. X., T. Kanda, et al. (2002). "Induction of the white egg 3 mutant phenotype by injection of the double-stranded RNA of the silkworm white gene." Insect Mol Biol **11**(3): 217-22.
- Reichhart, J. M., P. Ligoxygakis, et al. (2002). "Splice-activated UAS hairpin vector gives complete RNAi knockout of single or double target transcripts in *Drosophila melanogaster*." Genesis **34**(1-2): 160-4.
- ROBINSON, A. S., 2002 Genetic sexing strains in medfly, *Ceratitis capitata*, sterile insect technique programmes. *Genetica* **116**: 5-13.
- Schwarz, D. S., G. Hutvagner, et al. (2002). "Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways." Mol Cell **10**(3): 537-48.
- Sharp, P. A. (2001). "RNA interference--2001." Genes Dev **15**(5): 485-90.
- Smith, N. A., S. P. Singh, et al. (2000). "Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs." Nature **407**(6802): 319-20.
- VREYSEN, M. J., 2001 Principles of area-wide integrated tsetse fly control using the sterile insect technique. *Med Trop (Mars)* **61**: 397-411.
- Wesley, S. V., C. A. Helliwell, et al. (2001). "Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants." Plant J **27**(6): 581-90.
- WYSS, J. H., 2000 Screwworm eradication in the Americas. *Ann N Y Acad Sci* **916**: 186-93
- Yang, D., F. Buchholz, et al. (2002). "Short RNA duplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 9942-7.

- Yang, D., H. Lu, et al. (2000). "Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in Drosophila embryos." Curr Biol **10**(19): 1191-200.
- Zamore, P. D. (2001). "RNA interference: listening to the sound of silence." Nat Struct Biol **8**(9): 746-50.
- Zamore, P. D., T. Tuschl, et al. (2000). "RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals." Cell **101**(1): 25-33.
- Zeng, Y., E. J. Wagner, et al. (2002). "Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells." Mol Cell **9**(6): 1327-33.