ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ «ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μοριακή ανάλυση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας που προξενεί η *Wolbachia* στη Μεσογειακή φρουτόμυγα με χρήση πρωτεϊνωματικής.

Νίκος Κουντουράκης

Υπεύθυνος καθηγητής: Αναστάσιος Οικονόμου

Ηράκλειο Σεπτέμβριος 2015

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο του καθηγητή Αναστάσιου Οικονόμου ενώ τα δείγματα αναλύθηκαν τόσο στο εργαστήριο Πρωτεϊνωματικής ανάλυσης (ProFI) του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας στο Ηράκλειο Κρήτης όσο και στο αντίστοιχο εργαστήριο στο Riga Institute for Medical Research KULeuven, Leuven στο Βέλγιο. Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον κ. Α. Οικονόμου για την παρότρυνση και υποστήριξη για να ξεκινήσω την παρούσα διατριβή αλλά και για την επιστημονική καθοδήγηση και συνεργασία για την ολοκλήρωση της.

Η χρηματοδότηση της εργασίας έγινε στα πλαίσια του προγράμματος ΘΑΛΗΣ – ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ – Συμβιωτικά βακτήρια και Ομικές τεχνολογίες στην προοπτική νέων, φιλικών προς το περιβάλλον, μεθόδων ελέγχου επιβλαβών εντόμων: το παράδειγμα της Μεσογειακής μύγας (ΣΥΜΒΙΟΜΙΚΗ). Η απομόνωση και αποστολή των δειγμάτων έγινε από την επιστημονική ομάδα του καθηγητή Κ. Μπούρτζη (Πανεπιστήμιο Πάτρας, Insect Pest Control Laboratory Seibersdorf, Austria), με τη συμβολή του επικ. καθηγητή Γ. Τσιαμη (Πανεπιστήμιο Πάτρας) και του μεταδιδακτορικού ερευνητή Α. Αυγουστίνου (Insect Pest Control Laboratory, Seibersdorf, Austria). Για τη δημιουργία του στελέχους MedFlyV8 σημαντική ήταν η συνεισφορά του Γ. Λειβαδάρα (Τεχνολόγος Εφαρμογών, Εντομοτροφείο, ΙΜΒΒ). Τους ευχαριστώ ιδιαιτέρως για την πολύ καλή δουλειά και την άψογη συνεργασία.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως το συνάδελφο μου Μιχάλη Αϊβαλιώτη και την πρώην συνάδελφο Μαλβίνα Παπαναστασίου στο εργαστήριο Πρωτεϊνωματικής για την επιστημονική, ψυχολογική και συναδελφική υποστήριξη τα τρία αυτά χρόνια. Με την αμέριστη βοήθεια τους και το ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο κατέστη δυνατή η εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Σημαντική ήταν επίσης η αρωγή όλων των μελών του εργαστηρίου του κ. Οικονόμου (Σπυριδούλα Καραμάνου, Αθηνά Πορτάλιου, Μάριου Σάρδη, Κατερίνας Χατζή και Γεωργίας Ορφανουδάκη) και ιδιαιτέρως της Μαρίνας Κουκάκη για τη βοήθεια της στη διαχείριση των πρωτεϊνικών δειγμάτων και του Κώστα Τσολή για τη ανάλυση των δειγμάτων στο Βέλγιο και τη Βιοπληροφορική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Επιπρόσθετα θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της επιτροπής, τους καθηγητές Χαράλαμπο (Μπάμπη) Σπηλιανάκη και Χρήστο Δελιδάκη για τη συμμετοχή τους και το

καθηγητή Σπύρο Περγαντή για την καθοδήγηση του κατά τη διάρκεια του δεύτερου τριμηνιαίου rotation.

Επί προσωπικού ευχαριστώ τη σύζυγο μου Φανή Φουντουλάκη, την αδερφή μου και τους γονείς μου που με βοήθησαν να μείνω σωματικά, πνευματικά και ψυχολογικά υγιής. Τέλος το φίλο μου Μιχάλη Βασιλάκη που ήταν πάντα δίπλα μου.

Σας ευχαριστώ

Νίκος.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη 5

Summary 6

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μεσογειακή φρουτόμυγα 7

1.1.1 Οικονομική σημασία και έλεγχος της Μεσογειακή φρουτόμυγας 7

1.1.2 Τεχνική Στείρωσης Εντόμων (Sterile Insect Technique, SIT) 7

1.2 Συμβίωση 8

1.2.1 Συμβίωση και έντομα 7

1.2.2 Το συμβιωτικό βακτήριο *Wolbachia* 7

1.3 Κυτταροπλασματική ασυμβατότητα 6

1.3.1 Μοριακός μηχανισμός κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας 7

1.3.2 Κυτταροπλασματική ασυμβατότητα και Μεσογειακή φρουτόμυγα 7

1.4 Σκοπός της εργασίας 8

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

2.1 Πρώτα αποτελέσματα, έλεγχος επαναληψιμότητας 13

2.2 Διαχωρισμός πρωτεϊνών με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (SDS PAGE) και συγκριτική πρωτεΐνωματική ανάλυση 18

2.3 Όρχεις. Αποτελέσματα και στατιστική ανάλυση. 20

2,4 Ωοθήκες. Αποτελέσματα και στατιστική ανάλυση 20

2.5 Βιολογική σημασία 20

2.5.1 Ανάλυση εμπλουτισμού όρων της γονιδιακής οντολογία 20

2.5.2 Όρχεις. Απότελέσματα εμπλουτισμού γονιδιακής οντολογίας. 20

2.5.3 Ωοθήκες. Απότελέσματα εμπλουτισμού γονιδιακής οντολογίας. 20

2.5.4 Ωοθήκες-Όρχεις Σύγκριση αποτελεσμάτων γονιδιακής οντολογίας. 20

2.6 Ανάλυση εμπλουτισμού μονοπατιών 20

2.6.1 Όρχεις . Αποτελέσματα. 20

2.6.2 Ωοθήκες. Αποτελέσματα. 20

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 29

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 31

4.1 Δείγματα ιστών όρχεων και ωοθηκών. 31

4.2 Εξαγωγή πρωτεϊνών από ιστούς όρχεων και ωοθηκών 31

4.3 Πέψη πρωτεϊνών σε διάλυμα με Βοηθούμενη από Φίλτρο Προετοιμασία Δείγματος (Filter Aided Sample Preparation - FASP) 31

4.4 Αφαίρεση Αλάτων

4.5 Διαχωρισμός πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 31

4.6 Χρώση Blue Silver 31

4.7 Πέψη πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και εξαγωγή πεπτιδίων 31

4.8 Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία νανοροής συζευγμένη με διαδοχική φασματομετρία μάζας (nLC-MS/MS) 31

4.9 Ανάλυση αποτελεσμάτων φασματομετρίας μάζας 31

4.10 Στατιστική ανάλυση και εμπλουτισμός γονιδιακής οντολογίας και βιολογικών μονοπατιών 31

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 36

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Μεσογειακή φρουτόμυγα (*Ceratitis capitata*) θεωρείται ως ένα από τα πιο καταστροφικά έντομα των φρέσκων φρούτων και λαχανικών παγκοσμίως. Μπορεί να προσβάλλει περισσότερα από 300 είδη φυτών και η διασπορά της είναι σχεδόν παγκόσμια. Η αντιμετώπιση της βασίζεται κυρίως στη χρήση φυτοφαρμάκων με αποτέλεσμα το τεράστιο οικονομικό κόστος και την σημαντική επιβάρυνση του περιβάλλοντος.

Έχουν εκπονηθεί παγκοσμίως διάφορα εναλλακτικά σχέδια για τη μείωση του πληθυσμού ή και πλήρους εξαφάνισης της μεσογειακή φρουτόμυγας. Τα σχέδια αυτά βασίζονται στη μαζική εκτροφή και απελευθέρωση στειρωμένων αρσενικών μυγών (Sterile Insect Technique, SIT). Όμως η συγκεκριμένη τεχνική επιδρά αρνητικά στη συμπεριφορά των μυγών μειώνοντας την ανταγωνιστικότητά τους για ζευγάρωμα σε σχέση με τα αγρίου τύπου αρσενικά. Έτσι απαιτείται η εκτροφή και απελευθέρωση πολύ μεγαλύτερου αριθμού στειρωμένων αρσενικών ανεβάζοντας το οικονομικό κόστος.

Η *Wolbachia,* ένα συμβιωτικό ενδοκυττάριο βακτήριο που προσβάλλει κυρίως αρθρόποδα και νηματοειδή, επάγει μεταβολές στο αναπαραγωγικό σύστημα του ξενιστή όπως παρθενογένεση, θηλυκοποίηση, θανάτωση αρσενικών και κυρίως κυτταροπλασματική ασυμβατότητα, η οποία οδηγεί στη θανάτωση εμβρύων σε διασταυρώσεις ανάμεσα σε μολυσμένα αρσενικά και θηλυκά, σε διαφορετική μολυσματική κατάσταση. Με δεδομένο ότι η μετάδοση της *Wolbachia* σχετίζεται άμεσα με την επιβίωση και αναπαραγωγή του ξενιστή, αναμένεται ότι η μόλυνση με *Wolbachia* δε θα έχει επίδραση στην ανταγωνιστικότητα του ξενιστή.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι στρατηγικές με βάση τη *Wolbachia* δίνουν πολλές ελπίδες για τον έλεγχο πληθυσμών καταστροφικών εντόμων όπως η Μεσογειακή φρουτόμυγα. Στην παρούσα διατριβή επιχειρείται η διερεύνηση και η καταγραφή των ποιοτικών και ποσοτικών αλλαγών σε πρωτεϊνικό επίπεδο που επιφέρει η συμβίωση της Μεσογειακής Φρουτόμυγας με τη *Wolbachia.* Πιο συγκεκριμένα, θα γίνει συγκριτική πρωτεϊνωματική ανάλυση σε ιστούς όρχεων και ωοθηκών της Μεσογειακής φρουτόμυγας με την παρουσία ή την απουσία της *Wolbachia,* με σκοπό να ταυτοποιηθούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην κυτταροπλασματική ασυμβατότητα. Η επίδραση της *Wolbachia* στα έντομα έχει μελετηθεί γενικά με πολύ λίγα εργαλεία πρωτεϊνωματικής ανάλυσης. Επίσης είναι λίγα τα παραδείγματα ανάλυσης σε βάθος, του συστήματος έντομο/συμβιωτικό βακτήριο.

SUMMARY

The Mediterranean fruit fly (Medfly), *Ceratitis capitata* is considered one of the most destructive pests of fresh fruit and vegetables worldwide. It can infest more than 300 plant species and exhibits today an almost global distribution. Medfly population control is based mainly on synthetic insecticides which is very costly and environmental harmful.

Projects operating at national and international level have been implemented in several regions all over the globe to suppress or eradicate Mediterranean fruit fly populations. These programs rely on the release of high numbers of mass-reared, sterilized males (Sterile Insect Technique, SIT). Mass rearing, irradiation and handling conditions may affect several behavioural traits of the produced males, diminishing their ability to compete with wild males to mate with wild females. To compensate the reduced fitness more males need to be released, thus raising the cost of the suppression program.

Wolabchia, an intracellular endosymbiont bacterium, is widely distributed among arthropods and nematodes. It mainly localizes in host reproductive tissues and organs and manipulates host reproduction through the following mechanisms: parthenogenesis, feminization, male killing, cytoplasmic incompatibility (CI). CI is expressed as embryonic lethality in crosses between a Wolbachia-infected male and a female of different infection status. Given that *Wolbachia* transmission is directly related to survival and reproduction of its hosts, it is expected that *Wolbachia* infections would increase the fitness of host populations.

Based on the above, *Wolbachia*-based strategies are promising approaches to the population control of insect pests such as Mediterranean fruit fly. The scope of this study is to determine the alterations in protein level that causes the *MedFly/Wolbachia* symbiosis. More precisely, a comparative proteomics analysis testes and ovaries of Medfly-V8, in the presence or absence of Wolbachia will be performed to identify proteins that are involved in cytoplasmic incompatibility. The effect of Wolbachia on insects has been studied in general with very few proteomics tools and no insect/symbiotic bacterium system has been analyzed in any depth.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1:ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μεσογειακή φρουτόμυγα

Η Μεσογειακή φρουτόμυγα (*Ceratitis capitata*) θεωρείται παγκοσμίως ως ένα από τα πιο καταστροφικά έντομα για τα φρούτα λόγω α) της μεγάλης διασποράς, β) του ευρέως φάσματος ξενιστών, γ) της ταχύτατης διάδοσης μέσω της μεταφοράς των φρούτων και δ) της υψηλής αντοχής σε ψυχρότερα κλίματα σε σχέση με τις υπόλοιπες τροπικές φρουτόμυγες. Η Μεσογειακή φρουτόμυγα ανήκει στην οικογένεια των Δίπτερων (Diptera: Tephritidae) και ενδημεί κυρίως στην Αφρική και Μέση Ανατολή και είναι ο πιο καταστροφικός εχθρός των φρέσκων φρούτων που ευδοκιμούν στη Μεσόγειο.[1]

1.1.1 Οικονομική σημασία και έλεγχος της Μεσογειακή φρουτόμυγας

Τα ενήλικα θηλυκά εναποθέτουν τα αυγά τους μέσα στα φρούτα αφού δημιουργήσουν σχισμές στο φλοιό τους. Έτσι δημιουργούν διόδους και για άλλους μικροοργανισμούς να προσβάλλουν τα φρούτα και να προκαλέσουν αποσύνθεση ενώ οι κάμπιες που αναπτύσσονται καταστρέφουν το εσωτερικό των φρούτων για να ικανοποιήσουν τις διατροφικές του ανάγκες. Μπορούν να προσβάλλουν περισσότερα από 300 είδη φρούτων με μεγαλύτερη προτίμηση στα φρούτα με λεπτό περίβλημα όπως εσπεριδοειδή, ροδοειδή, πέτρινα φρούτα ακόμη κ.λπ. [2]

Το ετήσιο κόστος για το έλεγχο του πληθυσμού – που βασίζεται κυρίως σε συνθετικά εντομοκτόνα - της Μεσογειακής φρουτόμυγας υπολογίζεται περίπου στα 33 εκατομμύρια δολάρια και δείχνει τη μεγάλη εμπορική σημασία που αφορά όχι μόνο τους παραγωγούς, τους εξαγωγείς, τις κυβερνητικές υπηρεσίες ελέγχου αλλά και την επιστημονική κοινότητα. Στην περίπτωση που βρεθούν μολυσμένα φρούτα οι υπηρεσίες ελέγχου εφαρμόζουν αυστηρά μέτρα διακίνησης ακόμα και αποκλεισμό (καραντίνα) μεταφοράς φρούτων από τη συγκεκριμένη περιοχή ή χώρα. Στην Ελλάδα η Μεσογειακή φρουτόμυγα αποτελεί τεράστια απειλή για τα εσπεριδοειδή, μήλα, ροδάκινα, βερίκοκα και σύκα.

1.1.2 Τεχνική Στείρωσης Εντόμων (Sterile Insect Technique, SIT)

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω ο βασικός τρόπος ελέγχου του πληθυσμού της Μεσογειακής φρουτόμυγας είναι η χρήση φυτοφαρμάκων με τεράστιο οικονομικό κόστος αλλά και μεγάλη επιβάρυνση του περιβάλλοντος. Οπότε, αναζητούνται τρόποι αντιμετώπισης φιλικότεροι προς το περιβάλλον και με μικρότερο οικονομικό κόστος.

Η τεχνική στείρωσης εντόμων είμαι μια στρατηγική αυξανόμενης σπουδαιότητας, φιλικής προς το περιβάλλον που στοχεύει αποκλειστικά στην αναπαραγωγή της Μεσογειακής φρουτόμυγας χωρίς να επηρεάζει τους πληθυσμούς των υπολοίπων εντόμων. Μετά από μαζική εκτροφή, μεγάλος αριθμός

στειρωμένων - με τη χρήση ακτινοβολίας γ - αρσενικών μυγών απελευθερώνονται στην περιοχή ενδιαφέροντος όπου ανταγωνίζονται με τα άγρια αρσενικά για τη γονιμοποίηση των άγριων θηλυκών. Όταν ένα θηλυκό ζευγαρώσει με ένα στείρο αρσενικό δεν παράγει απογόνους, οδηγώντας έτσι στη μείωση του πληθυσμού. Αν και φαίνεται ότι τα στειρωμένα αρσενικά συμμετέχουν στην αναπαραγωγική διαδικασία, δείχνουν να μειονεκτούν σε σχέση με τα άγρια αρσενικά όταν ανταγωνίζονται για να ζευγαρώσουν με τα άγρια θηλυκά. Άρα για να είναι πιο αποτελεσματική η τεχνική στείρωσης, τα στειρωμένα αρσενικά χρειάζεται να γίνουν περισσότερο ανταγωνιστικά. [3,4]

1.2 Συμβίωση

Η συμβίωση - το να ζουν μαζί ανόμοιοι οργανισμοί - είναι καθολική στον έμβιο κόσμο. Λαμβάνει χώρα σε πολλούς πολυκύτταρους οργανισμούς και έχει μεγάλη επίδραση στην εξέλιξη της ζωής και στη βιοποικιλότητα. Τα έντομα, είναι η ομάδα των ζώων που έχουν εγκαθιδρύσει με μεγάλη επιτυχία τις περισσότερο ποικιλόμορφες συμβιώσεις τόσο στο εσωτερικό όσο και στο εξωτερικό του σώματος τους. Η συμβίωση επηρεάζει διάφορες πτυχές της ζωής και της φυσιολογίας των εντόμων όπως ανάπτυξη, διατροφή, ειδογένεση, άμυνα και προτίμηση φυτών ξενιστή. Λόγω της συμβίωσης τα έντομα έχουν αναπτύξει και συντηρήσει τον πλέον ποικιλόμορφο τρόπο ζωής σε σχέση με τα υπόλοιπα ζώα.

1.2.1 Συμβίωση και έντομα

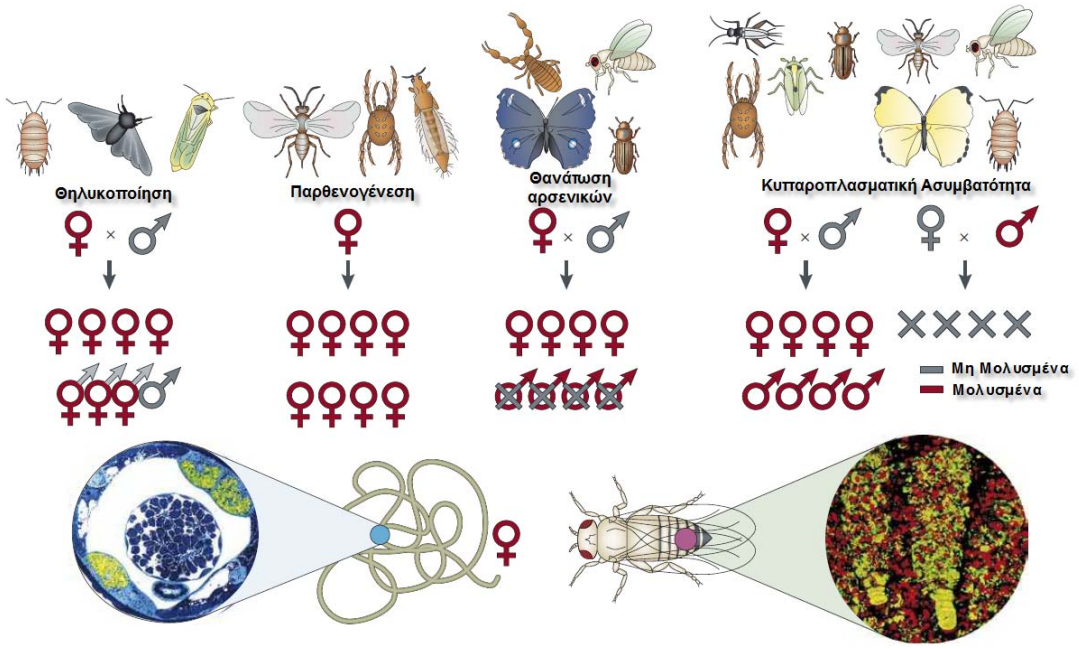
Οι συμβιωτικοί οργανισμοί των εντόμων χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: στους πρωτεύοντες και στους δευτερεύοντες. Οι πρωτεύοντες συμβιωτικοί οργανισμοί κατοικούν σε συγκεκριμένα όργανα (“bacteriomes”) του ξενιστή και του παρέχουν θρεπτικά στοιχεία όπως αμινοξέα, βιταμίνες, συνένζυμα κ.λπ. Οι δευτερεύοντες συμβιωτικοί οργανισμοί (ή μικρόβια ‘επισκέπτες’) συνήθως εγκαθιστούν περιστασιακές συμβιώσεις που διακυμαίνονται από δηλητηριώδεις μέχρι ευεργετικές για τα έντομα. Στις θετικές επιδράσεις περιλαμβάνονται, η ενδυνάμωση των μολυσμένων ξενιστών για να επιβιώνουν σε καταστάσεις θερμικής καταπόνησης, η αυξημένη αντίσταση σε φυσικούς εχθρούς και παράσιτα και η αλλαγή προτίμησης σε φυτά ξενιστή. Εν τούτοις, μικρόβια ‘επισκέπτες’ μπορούν να επιδράσουν αρνητικά στην ανάπτυξη, στη μακροζωία και στην αναπαραγωγική διαδικασία του ξενιστή. [5]

1.2.2 Το Συμβιωτικό Βακτήριο *Wolbachia*

Τα τελευταία χρόνια, έχει γίνει έκδηλο ότι διάφορα ενδοκυτταρικά βακτήρια μπορούν να επηρεάσουν την αναπαραγωγική διαδικασία του εντόμου ξενιστή. Η *Wolbachia,* έχει προσελκύσει τεράστιο ενδιαφέρον σε διάφορα πεδία των επιστημών ζωής, από τη κοινωνιοβιολογία μέχρι τη μοριακή βιολογία. Η *Wolbachia,* ένα α-πρωτεοβακτήριο, είναι ένας μητρικός μεταδιδόμενος ενδοκυττάριος

συμβιωτικός οργανισμός που κατοικεί σε ασπόνδυλα, όπως νηματώδη γένους φιλαρία, σκώρους, αράχνες, καρκινοειδή και ιδιαίτερα στα έντομα. Μέχρι και το 70% των εντόμων μπορεί να προσβληθεί από *Wolbachia*, και λόγω αυτού έχει χαρακτηριστεί ως το πλέον καθολικό ενδοκυτταρικό συμβιωτικό βακτήριο που γνωρίζουμε.

Αν και η *Wolbachia* μπορεί να προσβάλει σωματικούς ιστούς, εντοπίζεται κυρίως στους ιστούς και στα όργανα αναπαραγωγής του ξενιστή και επεμβαίνει καθοριστικά στην αναπαραγωγική διαδικασία του ξενιστή μέσω των παρακάτω μηχανισμών: α) Παρθενογένεση, η αποκλειστική παραγωγή θηλυκών απογόνων από μολυσμένα θηλυκά (στα Ημίπτερα, Ισόποδα και Λεπιδόπτερα), β) Θηλυκοποίηση, η μετατροπή των γενετικών αρσενικών σε λειτουργικά θηλυκά, (στα Ακάρεα, Υμενόπτερα και Θυσανόπτερα) γ) Θανάτωση αρσενικών, στοχευμένη καταστροφή αρσενικών εμβρύων σε αρχικά στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης (στα Κολεόπτερα, Δίπτερα, Λεπιδόπτερα και Αραχνίδια) και δ) Κυτταροπλασματική ασυμβατότητα, που προκαλεί εμβρυική θνησιμότητα σε διασταυρώσεις ανάμεσα σε ένα μολυσμένο με *Wolbachia* αρσενικό και ένα θηλυκό που είτε δεν είναι μολυσμένο είτε είναι μολυσμένο με διαφορετικό στέλεχος, (στα Ακάρεα, Κολεόπτερα, Δίπτερα, Ημίπτερα, Υμενόπτερα, Ισόποδα, Λεπιδόπτερα, και Ορθόπτερα) . (Εικόνα 1.) [6,7]



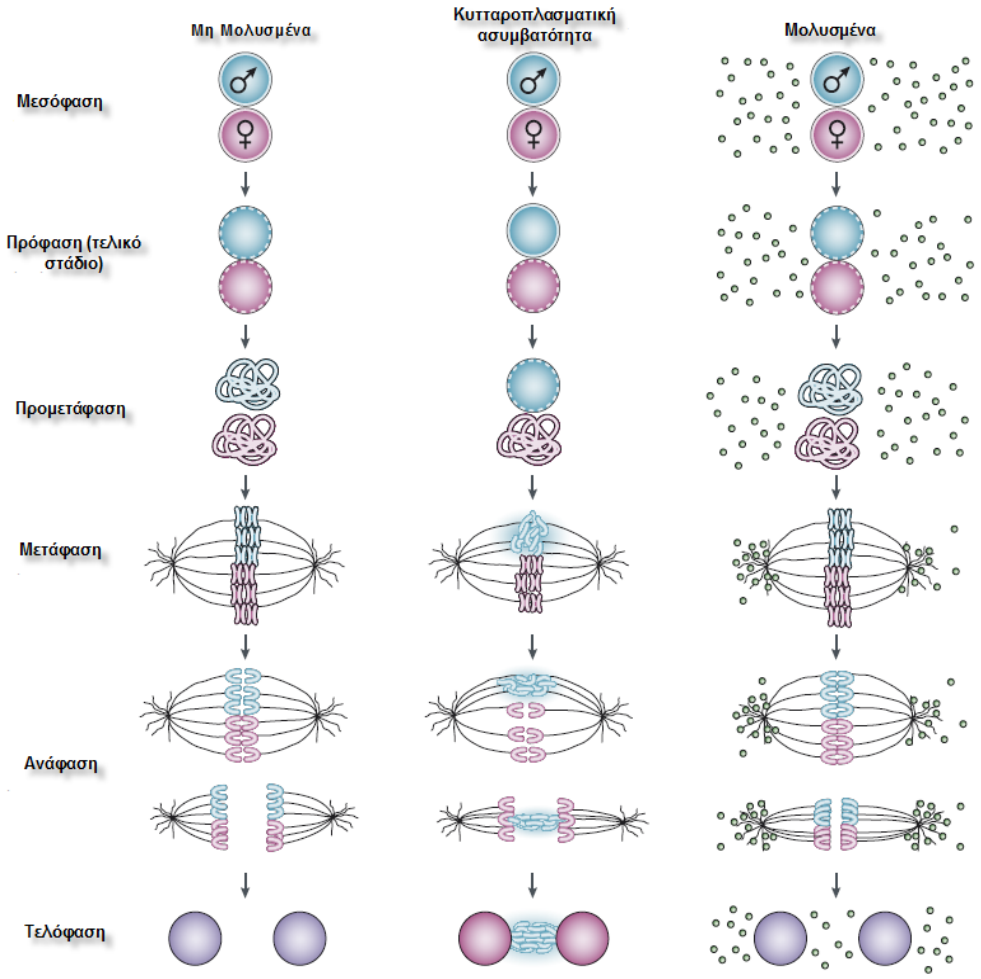
Εικόνα 1. (Πάνω) Η *Wolbachia* προκαλεί τέσσερις ευδιάκριτους αναπαρωγικούς φαινότυπους στις τάξεις των αρθρόποδων. (Κάτω αριστερά) Τομή αρσενικού *Onchocerca ochengi* μολυσμένο με *Wolbachia* (κίτρινο χρώμα) στα τρία από τέσσερα συγκυτιακά κύτταρα. (Κάτω δεξιά) *Wolbachia* (κίτρινο χρώμα) εντοπισμένη στις ωοθήκες θηλυκής *Drosophila simulans.* (M. Clark, University of Rochester, New York, USA) [6]

1.3 Κυτταροπλασματική ασυμβατότητα

Η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα είναι ο πλέον συχνός επαγόμενος από *Wolbachia* φαινότυπος. Το σπέρμα από μολυσμένο με *Wolbachia* αρσενικό είναι ασύμβατο με το ωάριο από θηλυκό μολυσμένο (ή μη-μολυσμένο) με διαφορετικό τύπο *Wolbachia.* Η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα περιλαμβάνει δύο διακριτές συνιστώσες: η *Wolbachia*-επαγόμενη τροποποίηση του σπέρματος κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης και η διάσωση της τροποποίησης αυτής σε έμβρυα μολυσμένα από το ίδιο στέλεχος. Αν το σπέρμα είναι τροποποιημένο αλλά στο έμβρυο δεν υπάρχει ο κατάλληλος τύπος *Wolbachia* τότε δημιουργείται ρήξη της εμβρυική ανάπτυξης.

1.3.1 Μοριακός μηχανισμός της Κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας

Ο μοριακός μηχανισμός που υποστηρίζει την κυτταροπλασματική ασυμβατότητα παραμένει άγνωστος. Εν τούτοις παρόμοιες κυτταρολογικές ενδείξεις έχουν περιγραφεί λεπτομερώς σε διάφορες ταξινομικές μονάδες. Αυτό που φαίνεται να είναι κοινό σε όλους τους ξενιστές –μολυσμένους με *Wolbachia* - που έχουν μελετηθεί, είναι η ανωμαλία που εμφανίζεται στα αρχικά στάδια της εμβρυικής μίτωσης, η οποία οφείλεται στη ρήξη του κυτταρικού κύκλου και οδηγεί στη μη-συγχρονισμένη ανάπτυξη του θηλυκού και αρσενικού προπυρήνα. Πιο συγκεκριμένα η καθυστέρηση στη διάρρηξη του αρσενικού πυρηνικού φακέλου και στη φωσφορυλίωση της ιστόνης H3 (αυτή η τροποποίηση της ιστόνης απαιτείται για την έναρξη της μίτωσης) οδηγούν στη καθυστερημένη δράση της Cdk1 (θεμελιώδης κινάση που οδηγεί του κύτταρο στη μίτωση) στον αρσενικό προπυρήνα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, οι χρωματίδες του θηλυκού προπυρήνα να έχουν συμπυκνωθεί κατάλληλα και να βρίσκονται στην περιοχή του ισημερινού της μετάφασης αλλά τα χρωμοσώματα του αρσενικού προπυρήνα να βρίσκονται σε ημισυμπυκνωμένη κατάσταση. Κατά τη διάρκεια της ανάφασης, τα θηλυκά χρωμοσώματα διαχωρίζονται κανονικά, ενώ οι αρσενικοί προπυρήνες είναι είτε απλωμένοι στους πόλους του κεντροσώματος είτε έχουν αποκλειστεί τελείως. Για να γίνει η διάκριση ανάμεσα σε συμβατή και μη συμβατή διασταύρωση θα πρέπει να κοιτάξει κανείς στις γέφυρες της χρωματίνης ανάμεσα στους πυρήνες κατά τη διάρκεια της ανάφασης. (Εικόνα 2) [8,9]



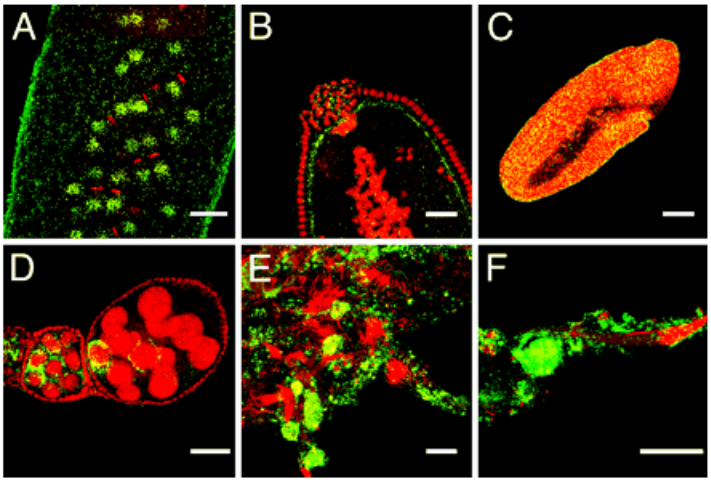
Εικόνα 2. Κυτταρολογική βάση της *Wolbachia*-επαγόμενης κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Στη διασταύρωση κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας (μεσαία στήλη) παρατηρείται έλλειψη συγχρονισμού στην ανάπτυξη του πατρικού (μπλε) και του μητρκού (ροζ) προπυρήνα κατά την πρώτη εμβρυική μιτωτική διαίρεση. Η ρήξη του πυρηνικού φακέλου στον αρσενικό προπυρήνα και η συμπύκνωση του προπυρήνα υστερούν χρονικά σε σχέση με το θηλυκό προπυρήνα. Στη μετάφαση, τα αρσενικά χρωμοσώματα δεν είναι πλήρως συμπυκνωμένα και στην ανάφαση τα πατρικά χρωμοσώματα δεν διαχωρίζονται κατάλληλα. Προπυρηνικός συγχρονισμός και κανονική ανάπτυξη αποκαθιστούνται σε ένα μολυσμένο έμβρυο (δεξιά στήλη) [6]

1.3.2 Κυτταροπλασματική ασυμβατότητα στη Μεσογειακή φρουτόμυγα

Στα διπλοειδή έντομα, η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα οδηγεί σε εμβρυική θνησιμότητα σε διασταυρώσεις ανάμεσα σε μολυσμένο με *Wolbachia* αρσενικό και ένα θηλυκό, που είτε δεν είναι μολυσμένο (κυτταροπλασματική ασυμβατότητα μιας κατεύθυνσης) είτε είναι μολυσμένο με διαφορετικό στέλεχος *Wolbachia* (κυτταροπλασματική ασυμβατότητα διπλής κατεύθυνσης).

Υπάρχει τεράστιο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον για την εκμετάλλευση της *Wolbachia* επαγόμενης κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας, ως εργαλείο για την παρεμπόδιση της αύξησης – ή να προκληθεί και μείωση- του πληθυσμού εντόμων ή /και να λειτουργήσει συμπληρωματικά στις τεχνικές στείρωσης που ήδη εφαρμόζονται. Η μοναδική διαφορά της συγκεκριμένης μεθόδου (Incompatible Insect Technique, IIT) με την SIT είναι η διαδικασία στείρωσης. Η IIT δεν χρησιμοποιεί ακτίνες γ που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ανταγωνιστικότητας των στείρων αρσενικών για ζευγάρωμα. Αντιθέτως μολυσμένα με *Wolbachia* αρσενικά έντομα, τα οποία επάγουν την κυτταροπλασματική ασυμβατότητα, είναι κατάλληλα για ζευγάρωμα.

Τελευταία έχει επιβεβαιωθεί ότι η τεχνική IIT που βασίζεται στη *Wolbachia* οδηγεί στον έλεγχο του πληθυσμού της Μεσογειακής φρουτόμυγας στο εργαστήριο. Χρησιμοποιήθηκε μολυσμένος με *Wolbachia* πληθυσμός *Rhagoletis cerasi* ως δότης για την έγχυση πρώιμων εμβρύων στη Μεσογειακή φρουτόμυγα. Πιο συγκεκριμένα δημιουργήθηκαν δύο σταθερές ισοθηλυκές σειρές (isofemale lines) προερχόμενες από το στέλεχος Benakeion μετά από μικροέγχυση κυτταροπλάσματος από πρώιμα έμβρυα. Η κάθε σειρά φέρει ένα μοναδικό στέλεχος *Wolbachia* και οι σειρές παραμένουν μολυσμένες 7 χρόνια μετά τη μικροέγχυση. Πειράματα έδειξαν ότι οι μολυσμένες σειρές μυγών είναι μη συμβατές μίας κατεύθυνσης όταν ζευγαρώνουν με μη μολυσμένες μύγες και κυρίως μη συμβατές διπλής κατεύθυνσης όταν οι μολυσμένες μύγες ζευγαρώνουν μεταξύ τους. Για να δειχθεί κατά πόσον οι μολυσμένες με *Wolbachia* μύγες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρεμπόδιση της αύξησης του πληθυσμού των μυγών, ελευθερώθηκαν 0-50 φορές παραπάνω αρσενικές μύγες μολυσμένες με *Wolbachia* σε κλουβί που περιέχει ίσο αριθμό μη μολυσμένων θηλυκών και αρσενικών μυγών (στέλεχος Benakeion). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπήρξε παρεμπόδιση της ανάπτυξης του πληθυσμού των μυγών σε ποσοστό που ξεπέρασε το 99% (μη μολυσμένα θηλυκά, αρσενικά, μολυσμένα αρσενικά σε αναλογία 1:1:50). (Εικόνα 3) [9]



Εικόνα 3. Η παρουσία της *Wolbachia* σε διαμολυσμένα έμβρυα *C. Capitata*, ωοθήκες και όρχεις. Α) Διαμολυσμένα έμβρυα της Μεσογειακής φρουτόμυγας που υποβάλλονται σε συγχρονισμένη μιτωτική διαίρεση όπου φαίνεται ο εντοπισμός της *Wolbachia* μιτωτικές ατράκτους. Β) Το όπίσθιο μέρος ενός διαμολυσμένου εμβρύου Μεσογειακής φρουτόμυγας όπου φαίνεται η ενσωμάτωση της *Wolbachia*. C) Ομοιόμορφη κατανομή του βακτηρίου *Wolbachia* σε διαμολυσμένα έμβρυα μετά τη γαστριδίωση. D) Κατανομή της *Wolbachia* κατά τη διάρκεια της ωογένεσης. Ε) Η παρουσία μεγάλου αριθμού *Wolbachia* σε ενήλικες όρχεις διαμολυσμένης φρουτόμυγας. F) Σπερματοκύστη με το απομακρυσμένο τέλος αριστερά και οι πυρήνες δεξιά. Τα Βακτήρια χρωματισμένα με πράσινο-κίτρινο, οι πυρήνες με κόκκινο. [Κλίμακες: 40μm (A,B,D,E,F) και 100μm (C)]

1.4 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι ο προσδιορισμός πρωτεϊνών που η «υπογραφή» τους χαρακτηρίζει την κυτταροπλασματική ασυμβατότητα. Πιο συγκεκριμένα, ο προσδιορισμός των συνολικών πρωτεϊνικών μοτίβων α) των όρχεων β) των ωοθηκών της Μεσογειακής φρουτόμυγας παρουσία και απουσία του βακτηρίου *Wolbachia* και γ) την αναζήτηση πρωτεϊνών του συμβιωτικού με *Wolbachia* ξενιστή που επάγουν ή διασώζουν την κυτταροπλασματική ασυμβατότητα.

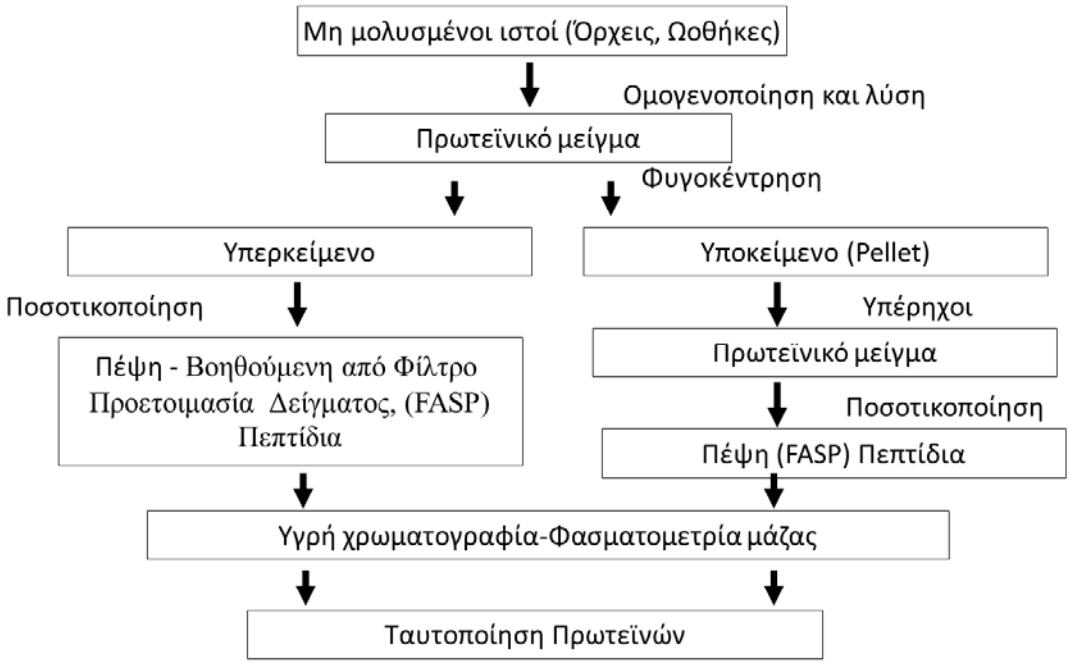
Για να επιτευχθούν τα παραπάνω χρειάστηκε η βελτιστοποίηση της προετοιμασίας των πρωτεϊνικών δειγμάτων που προέρχονται από ιστούς όρχεων και ωοθηκών της Μεσογειακής φρουτόμυγας, με τελικό στόχο την ανάλυση τους – bottom-up προσέγγιση - με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας συνδεδεμένης με φασματομετρία μάζας. Με αυτό τον τρόπο κατέστη δυνατή η συγκριτική πρωτεϊνωματίκη ανάλυση των ιστών μολυσμένων και μη, με *Wolbachia* καθώς και η καταγραφή των πρωτεϊνών της Μεσογειακής φρουτόμυγας ή/και της *Wolbachia* που επάγουν ή διασώζουν την κυτταροπλασματική ασυμβατότητα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

2.1 Πρώτα αποτελέσματα, έλεγχος επαναληψιμότητας.

Για τον πρωτεϊνωματικό χαρακτηρισμό των όρχεων και ωοθηκών από τη Μεσογειακή φρουτόμυγα επιλέχθηκε μια «εκ των κάτω» (bottom up) πρωτεϊνωματική προσέγγιση. Σύμφωνα με την προσέγγιση αυτή δεν ανιχνεύονται αυτούσιες οι πρωτεΐνες αλλά το σύνολο αυτών κόβεται σε πεπτίδια τα οποία αφού διαχωριστούν με υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης (reverse phase) ταυτοποιούνται με φασματομετρία μάζας. Η αντίστοιχιση των μαζών σε πετίδια και τελικά σε πρωτεΐνες γίνεται με τη χρήση αλγορίθμων που δίνουν ένα σκορ ανάλογα με το πόσο σίγουρη (ασφαλής) είναι η αντίστοίχιση.

Για τη βελτιστοποίηση της προετοιμασίας των δειγμάτων για την πρωτεϊνωματική ανάλυση όπως περιγράφεται παραπάνω χρησιμοποιήθηκαν μη μολυσμένοι ιστοί (Benakeion) με *Wolbachia* λόγω μεγαλύτερης επάρκειας. Η ροή εργασίων που ακολουθήθηκε φαίνεται στο Σχήμα 1.



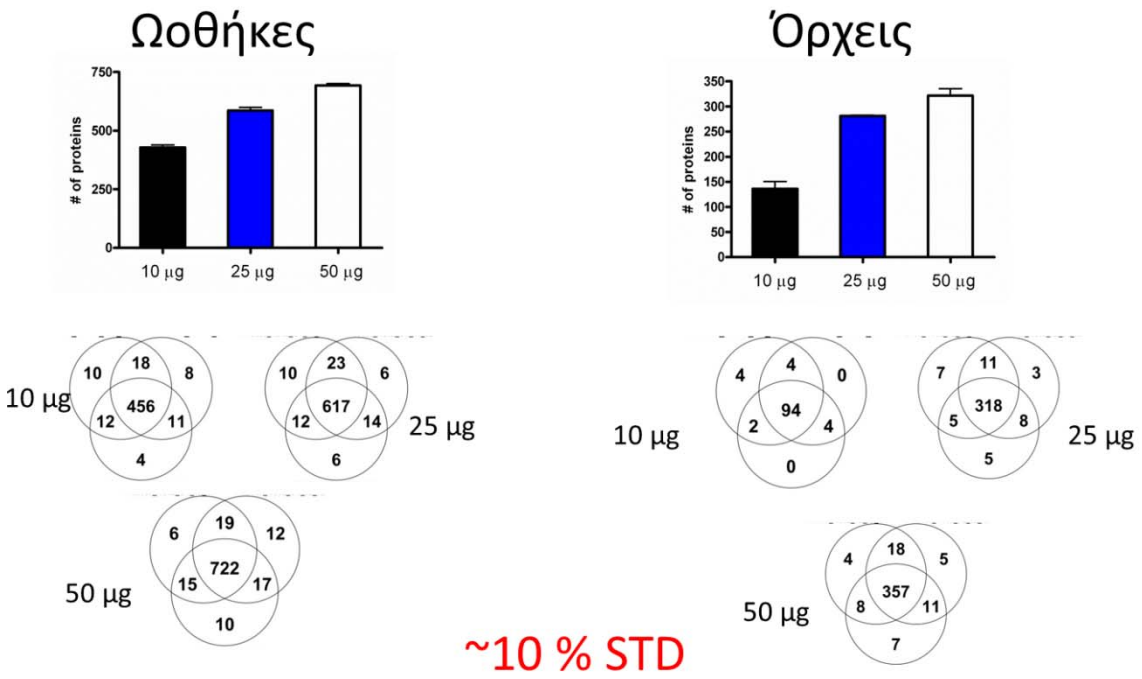
Σχήμα 1. Εξαγωγή και διαχωρισμός πρωτεϊνών από όρχεις και ωοθήκες της μεσογειακής φρουτόμυγας.

Πιο συγκεκριμένα ως αρχικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν 10, 15 και 20 ζεύγη όρχεων και ωοθηκών μη μολυσμένων εντόμων. Αφού έγινε η εξαγωγή των πρωτεϊνών (βλ. 5.2), δημιουργήθηκαν 3 δείγματα σπό το υπερκείμενο (Σχήμα 1) για κάθε ιστό που αντιστοιχούν σε 10, 25 και 50 μgr συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου. Ακολούθησε η πέψη των δειγμάτων με τη μέθοδο FASP (βλ 5.3)[19], η αφαίρεση αλάτων (βλ.5.4) και η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών με χρήση υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας (βλ 5.8,5.9). Με αυτό τρόπο αναζητήθηκε η σχέση ανάμεσα στην ποσότητα του αρχικού υλικού με τον αριθμό των πρωτεϊνών που ταυτοποιούνται. Κάθε δείγμα αναλύθηκε τρεις φορές ώστε να γίνει έλεγχος της επαναληψιμότητας των αποτελέσμάτων μεταξύ τριών τεχνικών επαναλήψεων. Ο συνολικός αριθμός πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν από κάθε δείγμα σε κάθε τεχνική επανάληψη φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Συνολική Πρωτεΐνη (μgr)	**Ωοθήκες**			**Όρχεις**		
	1	2	3	1	2	3
10	440	428	418	152	133	123
25	600	586	573	281	280	283
50	680	694	700	329	330	306

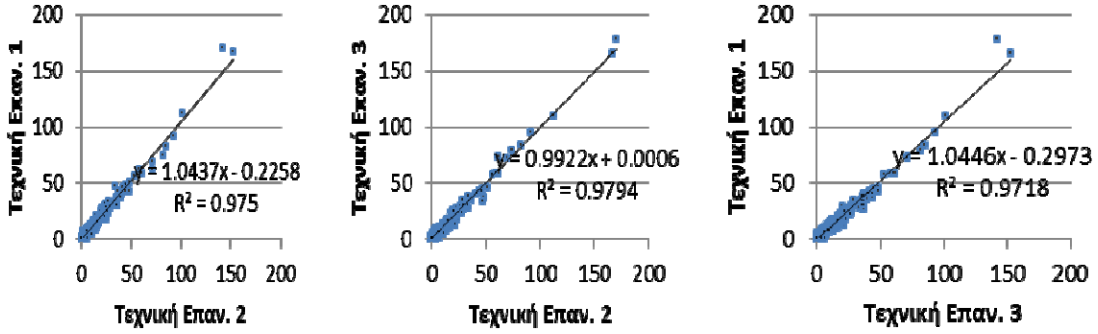
Τα παραπάνω αποτελέσματα σε συνδυασμό με την διαθεσιμότητα των ιστών και της απόδοσης τους σε πρωτεϊνικό περιοχόμενο καθόρισαν τη βέλτιστη ποσότητα για τη συγκριτική πρωτεϊνωματική ανάλυση. Για τους όρχεις επιλέχθηκαν τα 25 μgr και για τις ωοθήκες τα 50 μgr.

Εν συνεχεία έγινε σύγκριση των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν ανάμεσα στις τεχνικές επαναλήψεις και υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση. Όπως φαίνεται και το Σχήμα 2, η τυπική απόκλιση δεν ξεπερνάει το 10% που θεωρείται αρκετά ικανοποιητικό για την πρωτεϊνωματική ανάλυση.



Σχήμα 2. Ταυτοποίηση πρωτεϊνών και έλεγχος επαναληψιμότητας.

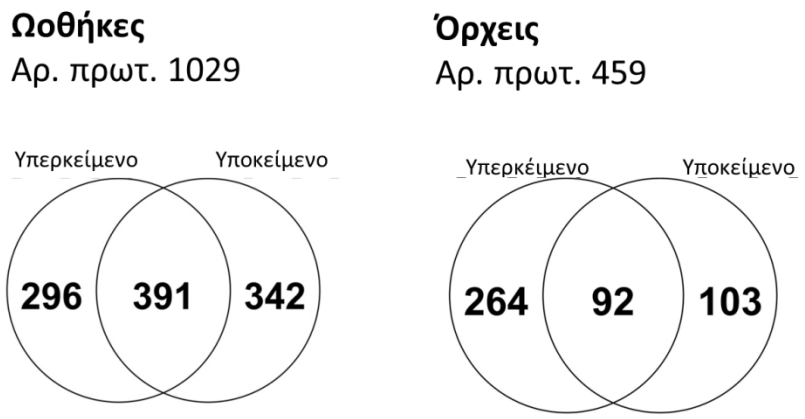
Στη συνέχεια εξετάστηκε η επαναληψιμότητα της μεθόδου ποσοτικοποίησης που επιλέχθηκε. Για την ποσοτικοποίηση εφαρμόστηκε μια χωρίς επισήμανση (label free) μέθοδος (βλ. 5.10) όπου εξετάζεται ο αριθμός των φασμάτων που αντιστοιχούν σε μία συγκεκριμένη πρωτεϊνη και προκύπτει μία ποσοτική τιμή. Στο σχήμα 3 συγκρίνονται ανά δυάδες οι ποσοτικές τιμές μεταξύ των διαφορετικών τεχνικών επαναλήψεων του ίδιου δείγματος ωοθηκών.



Σχήμα 3. Επαναληψιμότητα της μεθόδου ποσοτικοποίησης μεταξύ των διαφορετικών τεχνικών επαναλήψεων του ίδιου δείγματος.

Όπως φαίνεται υπάρχει ικανοποιητική γραμμικότητα μεταξύ των τεχνικών επαναλήψεων. Κατά συνέπεια η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί αξιόπιστα για τη σύγκριση των διαφορετικών δειγμάτων. Ομοίως και για τα δείγματα από όρχεις.

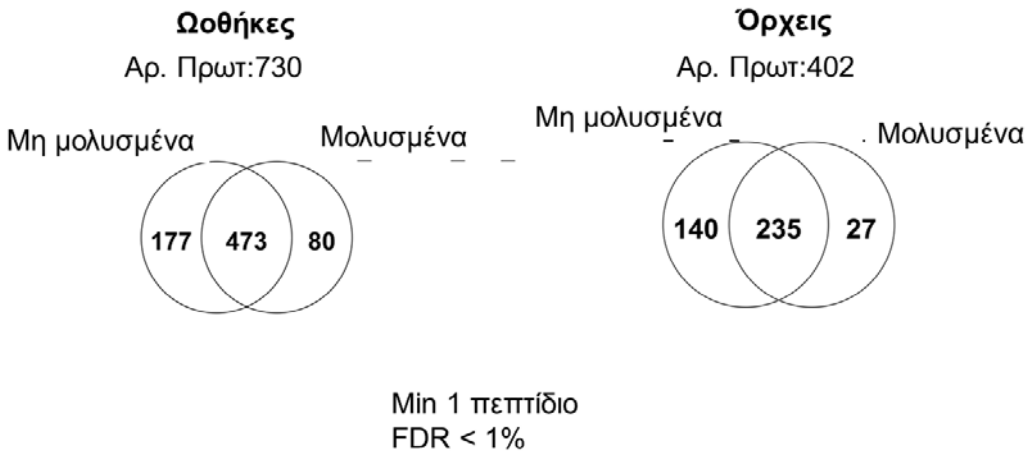
Τέλος προκειμένου να ελεγχθεί το κατά πόσο είναι απαραίτητη η χρήση υπερήχων για αποδοτικότερη εξαγωγή πρωτεϊνών από τους ιστούς, έγινε σύγκριση των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών του υπερκείμενου με αυτές του υποκειμένου (pellet), έτσι όπως περιγράφεται στο Σχ. 1 και στο Κεφ 5.2. Για τη σύγκριση χρησιμοποιήθηκε το δείγμα των 25 μgr (πρωτεϊνικό περιεχόμενο πρίν τη μέθοδο FASP) για τους ιστούς των όρχεων και 50μgr για τους ιστούς των ωοθηκών. (Σχήμα 4)



Σχήμα 4. Σύγκριση ταυτοποιημένων πρωτεϊνών υπερκείμενου-υποκείμενου (pellet) όρχεων και ωοθηκών.

Όπως φαίνεται από τη σύγκριση, ένας σημαντικός αριθμός πρωτεϊνών (~ 30%) ταυτοποιείται αποκλειστικά στο υποκείμενο (pellet) και για τα δύο είδη των ιστών. Αυτό καθιστά απαραίτητη την προσθήκη ενός επιπλέον σταδίου, λύσης και ομογενοποίησης των ιστών με τη χρήση υπερήχων, στη διαδικασία εξαγωγής πρωτεϊνών.

Στη συνέχεια επιχειρήθηκε η πρώτη συγκριτική πρωτεϊνωματική ανάλυση ακολουθώντας τη ροή εργασιών (Σχήμα 1) και για τους μολυσμένους με *Wolbachia* ιστούς όρχεων και ωοθηκών της Μεσογειακής φρουτόμυγας. Για τη σύγκριση χρησιμοποιήθηκαν δείγματα που αντιστοιχούν σε 25 μgr συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου πριν από τη μέθοδο FASP. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στο Σχήμα 5.

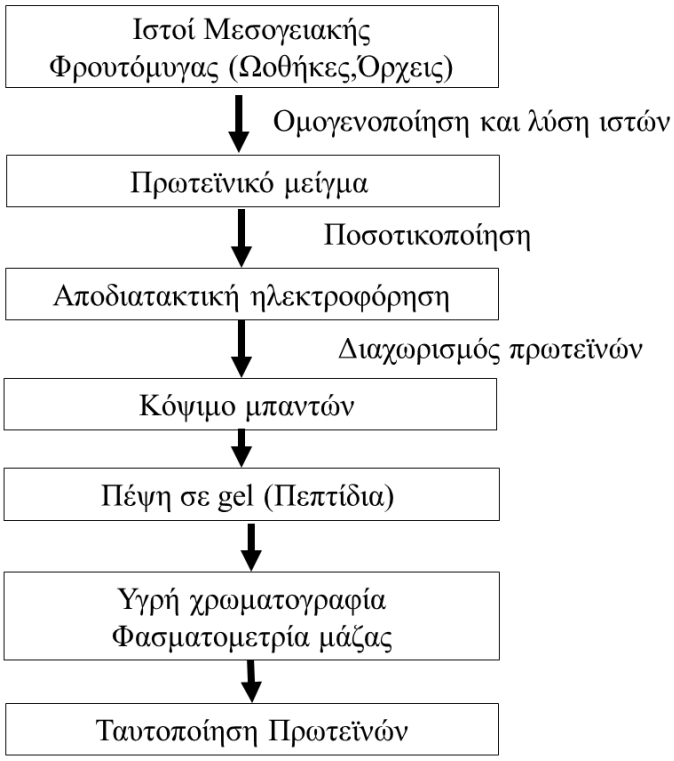


Σχήμα 5. Συγκριτικά αποτελέσματα της πρωτεϊνωματικής ανάλυσης μολυσμένων και μη μολυσμένων με *Wolbachia*, όρχεων και ωοθηκών της Μεσογειακής φρουτόμυγας.

Για τις ωοθήκες ταυτοποιήθηκαν συνολικά 730 πρωτεΐνες εκ των οποίων 473 ταυτοποιήθηκαν και στα δύο είδη ιστών ενώ 80 πρωτείνες ταυτοποίηθηκαν μόνο στους μολυσμένους με *Wolbachia* ιστούς και 177 πρωτεΐνες μόνο στους μη μολυσμένους ιστούς. Για τους όρχεις ταυτοποίηθηκαν συνολικά 402 πρωτεΐνες εκ των οποίων 140 πρωτεΐνες βρέθηκαν μόνο στους μη μολυσμένους με *Wolbachia* ιστούς, 27 πρωτεΐνες στους μολυσμένους ενώ 235 πρωτεΐνες ανιχνεύτηκαν και στα δύο είδη ιστών. Τα πρώτα αποτελέσματα της συγκριτικής πρωτεϊνωματικής ανάλυσης κρίνονται ικανοποιητικά σε σχέση με τον αριθμό πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν στα μολυσμένα δείγματα συγκριτικά με τον αντίστοιχο αριθμό των μη μολυσμένων δειγμάτων.

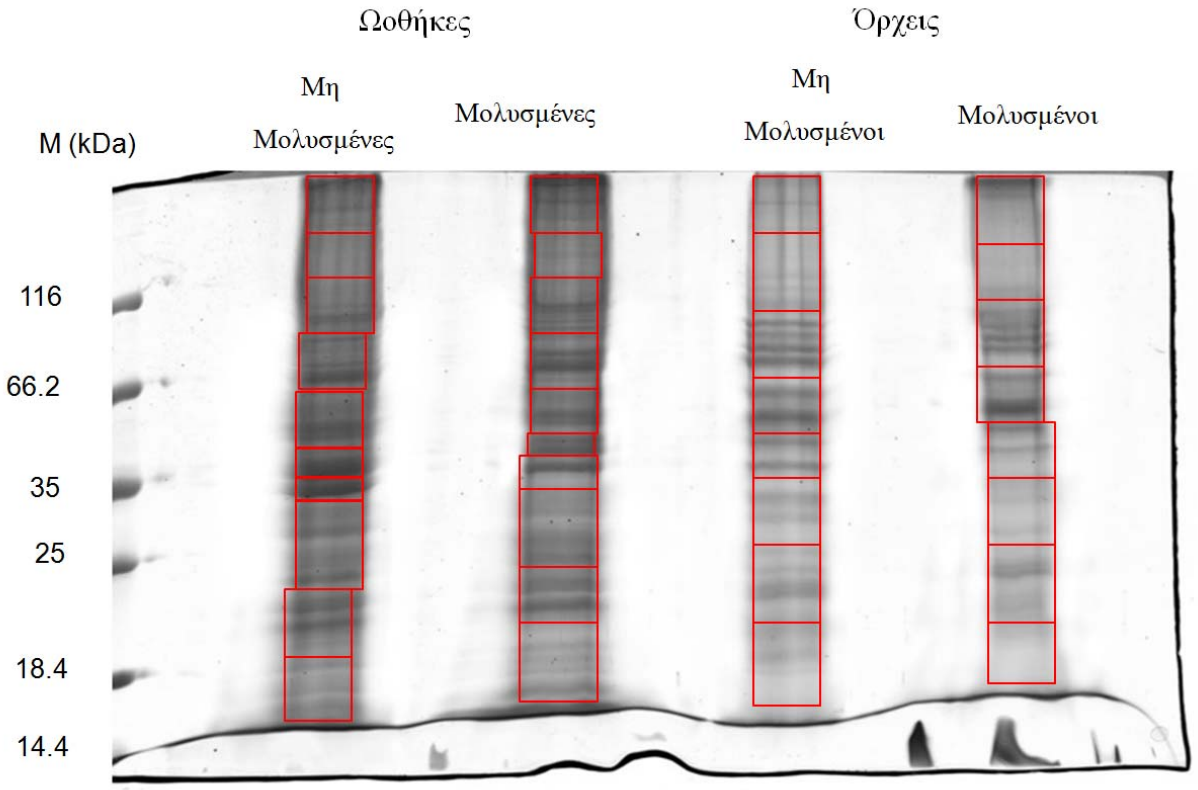
2.2 Διαχωρισμός πρωτεϊνών με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (SDS PAGE) και συγκριτική πρωτεϊνωματική ανάλυση

Προκειμένου να αυξηθεί ο συνολικός αριθμός πρωτεϊνών που ταυτοποιούνται αλλά και η αναγκαιότητα ταυτοποίησης πρωτεϊνών χαμηλότερης αφθονίας (είτε του ξενιστή ή/και του βακτηρίου *Wolbachia*) οδήγησαν στην προσθήκη ενός επιπλέον σταδίου στη ροή εργασιών. Θεωρήθηκε απαραίτητος ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με τη χρήση αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης πριν από την πέψη με τρυψίνη. Η ροή εργασίων τροποποιήθηκε σύμφωνα με το Σχήμα 6.



Σχήμα 6. Ροή εργασιών συγκριτικής πρωτεϊνωματικής ανάλυσης με διαχωρισμό των πρωτεϊνών.

Πιο συγκεκριμένα αφού τα πρωτεϊνικά δείγματα διαχωρίστηκαν χρησιμοποιώντας αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (βλ.5.5) και χρώση 'Blue' Silver (βλ. 5.6) στη συνέχεια οι πρωτεϊνικές ζώνες που εμφανίστηκαν, (Σχήμα 7) απομονώθηκαν, επωάστηκαν με τρυψίνη (βλ. 5.7) και αναλύθηκαν με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρία μάζας (βλ. 5.8).

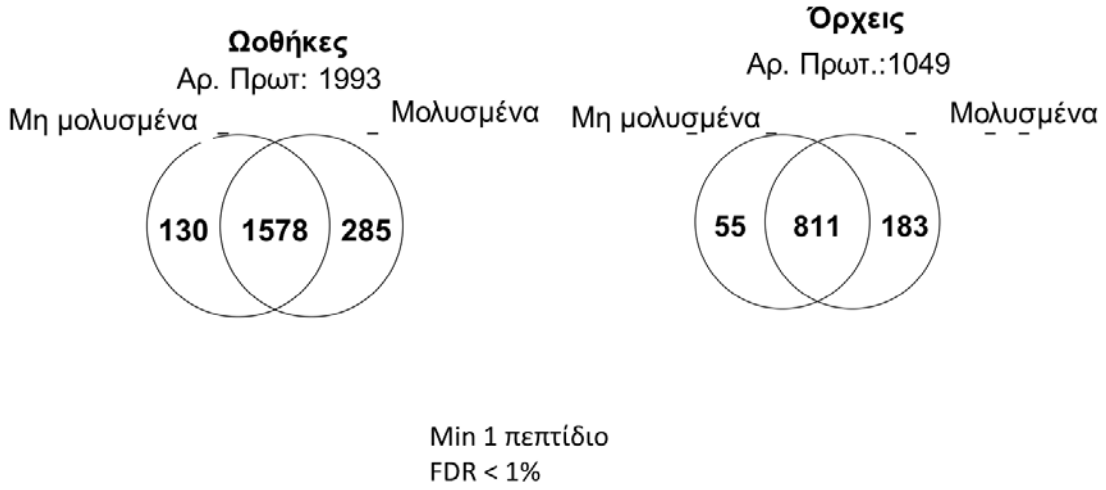


Σχήμα 7. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση όρχεων και ωοθηκών μολυσμένων και μη με *Wolbachia.* Οι πρωτεϊνικές ζώνες ανιχνεύθηκαν με χρώση 'Blue' Silver. Τα κόκκινα πλαίσια υποδεικνύουν τις πρωτεϊνικές ζώνες που απομονώθηκαν (2x10 ωοθήκες, 2x8 όρχεις) για να ακολουθήσει πέψη με τρυψίνη, έκλουση πεπτιδίων και ανάλυση με υγρή χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν (Σχήμα 8) δείχνουν ότι αυξήθηκε ο συνολικός αριθμός των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών, ενώ στα μολυσμένα με *Wolbachia* δείγματα ταυτοποιήθηκαν δύο πρωτεΐνες προερχόμενες από το βακτήριο *Wolbachia* στα δείγματα των ωοθηκών (Πίνακας 1). Η πρωτεΐνη που ταυτοποιήθηκε με το μεγλύτερο σκορ είναι η UvrABC system protein A (Q73GM6_WOLPM). Η βιολογική διεργασία στην οποία εμπλέκεται είναι η εκτομή-διόρθωση νουκλεοτιδίου και πιο συγκεκριμένα προσδένεται στο DNA προκειμένου να αναγνωρίσει και να βοηθήσει στην επεξεργασία – διόρθωση- αλλοιώσεων στην αλληλουχία του. Η δεύτερη πρωτεΐνη που ταυτοποιήθηκε είναι μη χαρακτηρισμένη.

Για του όρχεις ταυτοποιήθηκαν αντίστοιχα έντεκα πρωτεΐνες (Πίνακας 1). Από αυτές οι πέντε έχουν χαρακτηριστεί και είναι οι: Probable cytosol aminopeptidase (AMPA_WOLPM) πιθανώς εμπλέκεται στην ανακύκλωση ενδοκυττάριων πρωτεϊνών, Chaperone protein DnaK (DNAK_WOLPM) σαπερόνη που βοηθάει στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών, Outer surface protein (O52076_WOLPM)

διαμεμβρανική πρωτεΐνη, Peptidoglycan-associated lipoprotein (U6SX13_WOLPM) επίσης διαμεμβρανική πρωτεΐνη όπως και η Surface antigen (U6SZG0_WOLPM).



Σχήμα 8. Αποτελέσματα συγκριτικής πρωτεϊνωματικής ανάλυσης μετά από αποδιατακτική ηλέκτροφόρηση.

Για να υπάρχει μεγαλύτερη αξιοπιστία στην ταυτοποίηση των πρωτεϊνών ώστε να είναι δυνατή η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τις βιολογικές μεταβολές που προκαλεί η *Wolbachia* στο αναπαραγωγικό σύστημα της Μεσογειακής φρουτόμυγας, διενεργήθηκαν 6 βιολογικές επαναλήψεις για τους ιστούς των όρχεων- μολυσμένους και μη με *Wolbachia* - και 5 βιολογικές επαναλήψεις για τους αντίστοιχους ιστούς των ωοθηκών. Επίσης το επίπεδο στατιστική σημαντικότητας των αποτελεσμάτων τόσο για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών όσο και για τη σχετική ποσοτικοποίηση τους είναι αποδεκτό.

Πίνακας 1. Πρωτεΐνες της *Wolbachia* που ταυτοποιήθηκαν στα μολυσμένα δείγματα ωοθηκών και όρχεων.

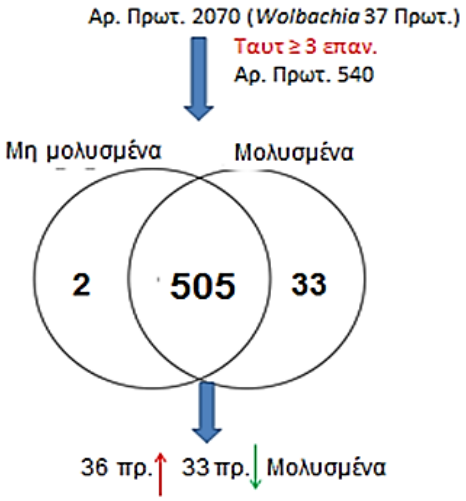
Ωοθήκες	
Πρωτεΐνες *Wolbachia*	**Accesion Number**
UvrABC system protein A GN=uvrA	Q73GM6
Uncharacterized protein GN=WMELPOP_03318	U6SVL7

Όρχεις	
Πρωτεΐνες *Wolbachia*	**Accesion Number**
Probable cytosol aminopeptidase wMel GN=pepA	AMPA
Chaperone protein DnaK GN=dnaK	DNAK
Outer surface protein (Fragment) GN=wsp	O52076
Uncharacterized protein GN=WD_0838	Q73GU2
Uncharacterized protein GN=WD_0465	Q73HS8
Uncharacterized protein GN=WD_0242	Q73IC7
Uncharacterized protein GN=WMELPOP_05693	U6SUB0
Uncharacterized protein GN=WMELPOP_05299	U6SV80
Uncharacterized protein GN=WMELPOP_04057	U6SV82
Peptidoglycan-associated lipoprotein GN=WMELPOP_00527	U6SX13
Surface antigen GN=WMELPOP_00881	U6SZG0

2.3 Όρχεις. Αποτελέσματα και στατιστική ανάλυση.

Για τα δείγματα των όρχεων ταυτοποιήθηκαν συνολικά 2070 (FDR < 1%)(Αρχείο Όρχεις_1.xls) Προκειμένου να διασφαλιστεί ότι οι ταυτοποιημένες πρωτείνες είναι χαρακτηριστικές για τις δύο υπο μελέτη καταστάσεις εφαρμόστηκαν τα κριτήρια που περιγράφονται στο 5.10. Ως αποτέλεσμα οι συνολικές πρωτεΐνες της Μεσογειακής φρουτόμυγας ανέρχονται στις 540, εκ των οποίων οι 33 ταυτοποιήθηκαν μόνο στα μολυσμένα δείγματα και 2 μόνο στα μη μολυσμένα και χαρακτηρίστηκαν ως μοναδικές για την κάθε κατάσταση (Πίνακας 2Α). Το γεγόνος ότι μια πρωτεΐνη ταυτοποιείται μοναδικά σε μια κατάσταση δείχνει είτε ότι δεν συντίθεται καθόλου είτε η ποσότητα της είναι κάτω από το όριο ανιχνεύσης της εφαρμοζόμενης μεθόδου. Επίσης 505 ταυτοποιήθηκαν και στις δύο καταστάσεις και χαρακτηρίστικαν ως κοινές. Σε αυτές έγινε σχετική ποσοτικοποίηση και βρέθηκαν συνολικά 69

πρωτεΐνες με διαφοροποιημένη αφθονία. Πιο συγκεκριμένα 36 πρωτεΐνες βρέθηκαν σε μεγαλύτερη αφθονία στα μολυσμένα με *Wolbachia* δείγματα - σε σχέση με τα μη μολυσμένα - (ή σε μικρότερη αφθονία στα μη μολυσμένα σε σχέση με τα μολυσμένα) και 33 πρωτεΐνες σε μικροτερη αφθονία στα μολυσμένα με *Wolbachia* δείγματα (Σχήμα 9, Πίνακας 2Β).



Σχήμα 9. Όρχεις. Πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν πειραματικά και οι αντίστοιχες που βρέθηκαν σε διαφορετική αφθονία.

Οι δύο πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν μόνο στα μη μολυσμένα δείγματα είναι οι: Maltase A3 (W8BHT6) μια γλυκοσιδάση και η Serpin-Z1C (W8BCZ4) αναστολέας της ενδοπεπτιδάσης τύπου σερίνης. Αντίστοιχα στα μολυσμένα δείγματα από τις 33 πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν, οι πέντε με το μεγαλύτερο σκορ είναι οι: Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha (W8AR14) πρωτεΐνη ΑΤΡάση που σε συνδυασμό με την ανταλλαγή των ιόντων K^+/Na^+ κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης παρέχει την απαιτούμενη ενέργεια για τη ενεργό μεταφορά διάφορων θρεπτικών συστατικών, Calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum type (W8AZ56) επίσης ΑΤΡάση υπεύθυνη για τη μεταφορά ασβεστίου, Integral membrane protein 2B(W8B072) διαμεμβρανική πρωτεΐνη που έχει 57% ομολογία με την CG3662 isoform A (Q9VPT9) της *Drosophila melanogaster* και συμμετέχει στην αναπαραγωγή, Transmembrane emp24 domain-containing protein eca (W8C7B1) επίσης διαμεμβρανική, έχει 90% ομολογία με την Transmembrane emp24 domain-containing protein eca (Q9I7K5) και είναι απαραίτητη στα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης και η Stomatin-like protein 2 (W8BN83) μεμβρανική πρωτεΐνη χωρίς άλλες διαθέσιμες πληροφορίες στις βάσεις δεδομένων.

Πίνακας 2Α. Όρχεις. (Αριστερά) Πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν μόνο στα μολυσμένα με *Wolbachia* δείγματα, (Δεξιά) Πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν μόνο στα μη μολυσμένα με *Wolbachia* δείγματα.

#	Μοναδικές Πρωτεΐνες Μολυσμένα	Accession Number
1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha (Fragment)	W8AR14
2	Calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum type	W8AZ56
3	Integral membrane protein 2B	W8B072
4	Transmembrane emp24 domain-containing protein eca	W8C7B1
5	Stomatin-like protein 2	W8BN83
6	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50-C	W8BSQ2
7	ATP-dependent zinc metalloprotease YME1	W8BZ91
8	Phosphate carrier protein, mitochondrial	W8BW98
9	Protein jagunal	W8BZA7
10	Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	W8C6K4
11	Nodal modulator 1 (Fragment)	W8BWG0
12	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	W8BMQ3
13	Sodium/calcium exchanger 1	W8ANM1
14	Uncharacterized protein	W8CCG0
15	Mitochondrial pyruvate carrier 2	W8BRV1
16	Translocator protein	W8B833
17	Cdc42	W8AM21
18	Ras-related protein Rab-7a	W8C912
19	Major facilitator superfamily domain-containing protein 1	W8ARX2
20	27kDa heat shock protein	B3GK93
21	Peroxisomal biogenesis factor 3	W8CAC8
22	Fatty-acid amide hydrolase 2	W8C8M0
23	RNA-binding protein Rsf1	W8C6L4
24	CAAX prenyl protease 1 (Fragment)	W8BR88
25	Cytosol aminopeptidase	W8BP21
26	Protein late bloomer	W8BHJ6
27	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	W8C8W8
28	Transmembrane and coiled-coil domains protein 1	W8B8E0
29	Mitochondrial glutamate carrier 1	W8B6Z1
30	DnaJ subfamily C member 11	W8CA82
31	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	W8C4B1
32	Putative apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	W8BWA2
33	Protein sel-1-1	W8C7E6

#	Μοναδικές Πρωτεΐνες Μη Μολυσμένα	Accession Number
1	Maltase A3	W8BHT6
2	Serpin-Z1C	W8BCZ4

Πίνακας 2Β. Όρχεις. Κοινές πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν σε διαφορποιημένη αφθονία. (Αριστερά) 36 πρωτεΐνες σε μεγαλύτερη αφθονία στα Μολυσμένα δείγματα. (Δεξιά) 33 πρωτεΐνες σε μεγαλύτερη αφθονία στα Μη Μολυσμένα δείγματα.

#	Κοινές Πρωτεΐνες Μεγαλύτερη αφθονία Μολυσμένα	Accession Number
1	Cytosol aminopeptidase	W8CAJ8
2	ADP,ATP carrier protein	W8BQQ1
3	Prohibitin-2	W8C189
4	Protein no-on-transient A	W8BA83
5	Fatty-acid amide hydrolase 2	W8AB92
6	Tryptophan--tRNA ligase,	W8BN81
7	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	W8AW83
8	Arylphorin subunit C223	W8C073
9	Protein SCO1, mitochondrial	W8C8M3
10	Fat-body protein 1 (Fragment)	W8BQF3
11	Calnexin	W8BB40
12	Hypoxia up-regulated protein 1	W8C075
13	Reticulon-like protein	W8B5N0
14	Uncharacterized protein	W8BH88
15	Mitochondrial import receptor	W8BB54
16	Thioredoxin-related	W8BMJ8
17	Peptidyl-prolyl cis-trans	W8AHP7
18	40S ribosomal protein S3	W8BRQ4
19	Juvenile hormone epoxide	W8BIG9
20	Vesicle-associated membrane	W8ASV9
21	Cytochrome c oxidase subunit 2	A0ATC7
22	40S ribosomal protein S2	W8B604
23	Ras-related protein Rab-11A	W8BFR1
24	Beta-2 tubulin	B0ZPS8
25	Citrate synthase (Fragment)	W8BGJ4
26	Protein l(2)37Cc	W8BWG2
27	Motile sperm domain-containing	W8AQ77
28	Mitochondrial import receptor	W8BPM5
29	Heme oxygenase 1	W8BVE5
30	Neutral alpha-glucosidase AB	W8C608
31	Proteasomal ubiquitin receptor	W8BYK5
32	Malate dehydrogenase,	W8BVV6
33	Juvenile hormone epoxide	W8AJ10
34	Tubulin alpha-1 chain	W8BQW7
35	Protein ERGIC-53 (Fragment)	W8BG62
36	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial (Fragment)	W8CAX5

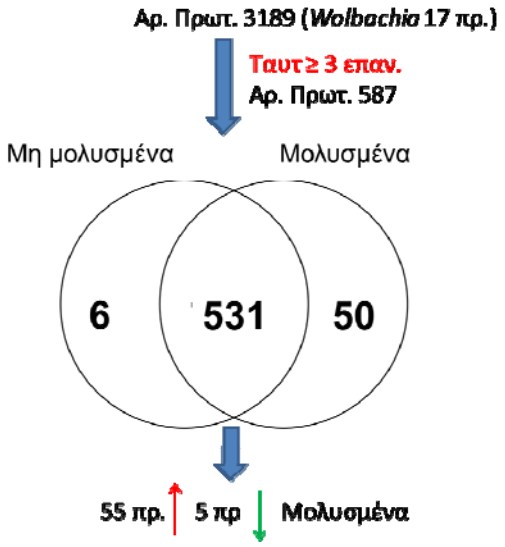
#	Κοινές Πρωτεΐνες Μεγαλύτερη αφθονία Μη Μολυσμένα	Accession Number
1	Glutaredoxin 3	W8CDM7
2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	W8AIG6
3	Putative adenylate kinase isoenzyme F38B2.4	W8BWF8
4	Myosin heavy chain, muscle (Fragment)	W8B6A3
5	MD-2-related lipid-recognition protein	W8BXI8
6	6- phosphogluconolactonase	W8BW14
7	Adenine	W8BVB6
8	Serine proteinase stubble	W8BQJ4
9	Apoptosis-inducing factor 3	W8BK56
10	Moesin/ezrin/radixin-1	W8B8R5
11	Aminoacylase-1	W8BVI0
12	Hexokinase type 2	W8B8Z7
13	Cytosolic non-specific dipeptidase	W8C5B6
14	Membrane alanyl aminopeptidase	W8AMJ2
15	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 G1	W8B3E6
16	Polyubiquitin (Fragment)	P90729
17	Thioredoxin reductase 1,	W8BVK8
18	Glutathione S-transferase 1-1	W8CA06
19	Prostaglandin F synthase 1	W8BLY5
20	Ferritin subunit	W8BHK0
21	Ferritin, chloroplastic	W8BMH4
22	Gelsolin	W8BFB5
23	Angiotensin-converting enzyme	W8AH50
24	Hsc70-interacting protein 2	W8BYL3
25	Larval serum protein 2	W8B1U1
26	Triosephosphate isomerase	W8BWJ7
27	Glyoxylate	W8ADH3
28	Chitinase-like protein CG5210	W8AY29
29	Glutathione S-transferase omega-1	W8BVG5
30	Enolase	W8BG43
31	Peroxiredoxin-6	W8C0M3
32	Annexin	W8AYM8
33	Glutathione S-transferase 1-1	W8CDR6

Από τις διαφοροποιημένες σε αφθονία πρωτεΐνες (Πίνακας 2Β), οι πέντε που ξεχωρίζουν σε υπερέκφραση στα μολυσμένα με *Wolbachia* δείγματα είναι οι : Cytosol aminopeptidase (W8CAJ8) κυτταροπλασματική πρωτεΐνη με 73% ομολογία με την Sperm-Leucylaminopeptidase 3, isoform C (Q961W5) αμινοπεπτιδάση-λευκίνης του σπέρματος, ADP,ATP carrier protein (W8BQQ1) μιτοχονδριακή πρωτεΐνη της εσωτερικής μεμβράνης η οποία καταλύει τη ανταλλαγή ATP και ADP διαμέσου της μεμβράνης, Prohibitin-2 (W8C189) μιτοχονδριακή πρωτεΐνη χωρίς άλλες διαθέσιμες πληροφορίες στις βάσεις δεδομένων και Fatty-acid amide hydrolase 2 (W8AB92) λιγάση άνθρακα-αζώτου του ενδομεμβρανικού συστήματος.

Οι αντίστοιχες πρωτεΐνες που βρέθηκαν σε υπερέκφραση για τα μη-μολυσμένα με *Wolbachia* δείγματα είναι οι: Glutaredoxin 3 (W8CDM7) μεταφορέας ηλεκτρονίων που συμμετέχει στην οξειδοαναγωγική ομοιόσταση του κυττάρου, Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial (W8AIG6) μιτοχονδριακή πρωτεΐνη με οξειδοαναγωγική δράση, Putative adenylate kinase isoenzyme (W8BWF8) πιθανή κινάση νουκλοτιδίων ή πολυνουκλεοτιδίων, Myosin heavy chain, muscle (W8B6A3) βασική πρωτεΐνη των κινητικών διαδικασιών (μυϊκή συστολή) των ευκαρυωτικών οργανισμών, και MD-2-related lipid-recognition protein (W8BXI8) εξωκυττάρια πρωτεΐνη της αιμοστατικής διαδικασίας και της ανάπτυξης ιστών (μεσόδερμα).

2.4 Ωοθήκες. Αποτελέσματα και στατιστική ανάλυση.

Για τα δείγματα των ωοθηκών ταυτοποιήθηκαν συνολικά 3189 πρωτεΐνες (FDR,1%) και εφαρμόζοντας τα ίδια κριτήρια στατιστικής ανάλυσης προέκυψαν συνολικά 587 πρωτεΐνες της Μεσογειακής φρουτόμυγας εκ των οποίων οι 6 ταυτοποιήθηκαν μόνο στα μη μολυσμένα δείγματα και οι 50 μόνο στα μολυσμένα με *Wolbachia* δελιγματα (Πίνασα 3Α). 531 πρωτεΐνες ταυτοποιήθηκαν και στις δύο καταστάσεις και μετά από σχετική ποσοτικοποίηση βρέθηκαν 60 πρωτεΐνες σε διαφοροποιημένη αφθονία ανάμεσα στα μη μολυσμένα και στα μολυσμένα με *Wolbachia* δείγματα. Πιο συγκεκριμένα 55 πρωτεΐνες βρέθηκαν σε μεγαλύτερη αφθονία στα μολυσμένα δείγματα σε σχέση με τα μη μολυσμένα και αντίστοιχα 5 πρωτεΐνες σε μεγαλύτερη αφθονία στα μη μολυσμένα δείγματα σε σχέση με τα μολυσμένα με *Wolbachia* δείγματα. (Σχήμα 10, Πίνακας 3Β).



Σχήμα 10. Ωοθήκες. Πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν πειραματικά και οι αντίστοιχες που βρέθηκαν σε διαφορετική αφθονία.

Οι έξι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν μόνο στα μη μολυσμένα δείγματα είναι: CG10407-like protein (C0LID8) εξωκυττάρια πρωτεΐνη της αναπαραγωγικής διαδικασίας, Protein-methionine sulfoxide oxidase Mical (W8AH38) οξειδωτικός παραγοντας του NADPH που εμπλέκεται σε βιολογικές διαδικασίες που αφορούν τη διαμόρφωση των νευρώνων και τη μυική ανανάπτυξη των προνυμφών, F-actin-capping protein subunit beta (W8BEJ3) κυυταροπλασματική πρωτεΐνη που ασχολείται με την οργάνωση του κυτταρουσκελετού ακτίνης, Vacuolar protein sorting-associated protein 13D (W8AYT3) που εμπλέκεται στη μεταφορά ουσιών μέσω κυστιδίων, Putative cysteine proteinase CG12163 (W8BKT4) μία ενδοπεπτιδάση τύπου κυστεΐνης που συμμετέχει στη κυτταρική καταβολική διαδικασία των πρωτεϊνών , Ubiquitin fusion degradation protein 1 (W8BPZ6) πρωτεάση της εξαρτόμενης από την ουβικιτίνη καταβολική διαδικασία.

Από τι πενήντα πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν μόνο στα μολυσμένα με *Wolbachia* δείγματα οι πέντε με το μεγαλύτερο σκορ είναι: Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial(W8CA03) μιτοχονδριακή πρωτεΐνη που ρυθμίζει την διαιδικασία μετάφρασης mRNA στο μιτοχόνδριο, Importin-7 (W8AU52) εμπλέκεται στη μεταφορά πρωτεϊνών στο εσωτερικό του κυττάρου, Splicing factor 3B subunit 2(W8BT58) πυρηνική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στα διαδικασία ματίσματος (splicing) του mRNA, 2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial (W8BZB1) επίσης μιτοχονδριακή πρωτεΐνη της μεταβολικής διαδικασίας του κύκλου του κιτρικού οξέος και NADH dehydrogenase (Ubiquinone) flavoprotein 1, mitochondrial (W8BZI7) μιτοχονδριακή πρωτεΐνη με οξειδοαναγωγική δράση.

Πίνακας 3Α. Ωοθήκες. (Αριστερά, Πάνω Δεξιά) Πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν μόνο στα μολυσμένα με *Wolbachia* δείγματα, (Κάτω Δεξιά) Πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν μόνο στα μη μολυσμένα με *Wolbachia* δείγματα.

#	Μοναδικές Πρωτεΐνες Μολυσμένα	Accesion Number
1	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	W8CA03
2	Importin-7	W8AU52
3	Splicing factor 3B subunit 2	W8BT58
4	2-oxoglutarate dehydrogenase,	W8BZB1
5	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) flavoprotein 1, mitochondrial	W8BZI7
6	Isoleucine--tRNA ligase,	W8B1S1
7	Leucine--tRNA ligase, cytoplasmic	W8C385
8	Non-specific lipid-transfer protein	W8AZX0
9	Nucleolar protein 56	W8CDF5
10	AFG3-like protein 2	W8C7T2
11	Eukaryotic translation initiation	W8CDU5
12	Protein PTCD3, mitochondrial	W8AZV6
13	AP-2 complex subunit alpha	W8BAQ1
14	Cell division cycle 5-like protein	W8BUJ2
15	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 87F	W8C1F4
16	Bifunctional glutamate/proline-RNA ligase	W8C9A2
17	Putative ATP-dependent RNA helicase DDX17	W8B685
18	Importin-9	W8BB20
19	Pyridoxal-dependent decarboxylase	W8BKZ1
20	Acetyl-CoA carboxylase	W8AF13
21	Casein kinase I isoform alpha	W8C3E0
22	Methionine--tRNA ligase,	W8BPX2
23	Ribosomal RNA processing protein	W8BWT7
24	L-threonine 3-dehydrogenase,	W8BFH5
25	Otefin	W8BLE7
26	Glutamyl aminopeptidase	W8AYS9
27	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-1	W8CCX6
28	ATP-binding cassette sub-family F member 2	W8C527
29	Far upstream element-binding	W8BJU0
30	Microsomal triglyceride transfer protein large subunit	W8BRL5
31	Coatomer subunit alpha	W8APK6
32	Oxysterol-binding protein	W8B0Q5
33	Putative 39S ribosomal protein L45, mitochondrial	W8BM91
34	Protein RRP5	W8BKD7
35	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	W8BTF9
36	Mannosyl-oligosaccharide	W8AWU4
37	Coatomer subunit gamma	W8B1R1
38	Heme oxygenase 1	W8BVE5
39	39S ribosomal protein L2,	W8C846
40	Uncharacterized protein	W8C447
41	NADH dehydrogenase (Ubiquinone)	W8C4E3
42	Zinc finger RNA-binding protein 2	W8BAN1
43	Putative RNA-binding protein Luc7-like 1	W8C1H7
44	COP9 signalosome complex subunit 7	W8C5W9
45	Galactosylgalactosylxylosylprotein 3-beta-glucuronosyltransferase I	W8BQG1
46	Isocitrate dehydrogenase (NAD) subunit beta, mitochondrial	W8BMQ8
47	Alpha-amylase 3	W8AVH0
48	Spectrin beta chain	W8ANP9
49	Ras-like protein 1	W8BVW0
50	Proton-coupled amino acid	W8B263

#	Μοναδικές Πρωτεΐνες Μη Μολυσμένα	Accession Number
1	CG10407-like protein	C0LID8
2	Protein-methionine sulfoxide oxidase Mical	W8AH38
3	F-actin-capping protein subunit beta	W8BEJ3
	Vacuolar protein sorting-associated protein 13D	W8AYT3
5	Putative cysteine proteinase CG12163	W8BKT4
6	Ubiquitin fusion degradation protein 1	W8BPZ6

Πίνακας 3Β. Ωοθήκες. Κοινές πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν σε διαφορποιημένη αφθονία. (Αριστερά, Πάνω Δεξιά) 55 πρωτεΐνες σε μεγαλύτερη αφθονία στα Μολυσμένα δείγματα. (Κάτω Αριστερά) 5 πρωτεΐνες σε μεγαλύτερη αφθονία στα Μη Μολυσμένα δείγματα.

#	Κοινές Πρωτεΐνες Μεγαλύτερη αφθονία Μολυσμένα	Accession Number
1	60S ribosomal protein L6	W8CB79
2	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin	W8CEE9
3	26S protease regulatory subunit 7	W8BU79
4	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	W8BAL9
5	DnaJ subfamily C member 3	W8BEM7
6	60S ribosomal protein L4	W8CDQ8
7	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	W8AWT3
8	60S ribosomal protein L14	W8CB15
9	Protein no-on-transient A	W8BA83
10	Caprin	W8BP41
11	26S protease regulatory subunit 6B	W8BSY4
12	Ribosome biogenesis protein BRX1	W8BRC9
13	26S protease regulatory subunit 8	W8BRU4
14	60S ribosomal protein L18a	W8CDB1
15	60S ribosomal protein L23a	W8C1P2
16	60S ribosomal protein L18	W8AGX6
17	60S ribosomal protein L7	W8C522
18	40S ribosomal protein S2	W8B604
19	40S ribosomal protein S3	W8BRQ4
20	Protein elav	W8B190
21	Juvenile hormone epoxide hydrolase 2	W8BIG9
22	Succinate dehydrogenase (Ubiquinone) iron-sulfur subunit, mitochondrial	W8BSL4
23	60S ribosomal protein L35a	W8CE40
24	Succinyl-CoA ligase (ADP-forming) subunit beta, mitochondrial	W8BJB4
25	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	W8C3D9
26	Zinc finger protein on ecdysone puffs	W8BBI9
27	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein	W8AZB4
28	Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	W8C7I0
29	Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic	W8BRI5
30	Tubulin alpha-1 chain	W8BQW7
31	T-complex protein 1 subunit gamma	W8B4Z1
32	60S ribosomal protein L13	W8C7W0
33	Aspartate aminotransferase	W8CB83
34	Maternal protein exuperantia	W8CA08
35	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	W8C095
36	ATP synthase subunit alpha	W8CCY0
37	40S ribosomal protein S3a	W8C9Q1
38	60S ribosomal protein L17	W8C240
39	Tubulin beta-1 chain	W8BUE6
40	Polyadenylate-binding protein	W8BI53
41	Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1	W8BYK5
42	Ribosomal protein L19	W8B550
43	ATP synthase subunit d, mitochondrial	W8BZX3
44	Arginine kinase	W8BCX7
45	Mitochondrial-processing peptidase subunit beta	W8B9H4
46	Heat shock protein 83	Q3LAZ1
47	Endoplasmin	W8BTN8
48	ATP synthase subunit O, mitochondrial	W8CB91
49	60S ribosomal protein L34	W8BT07
50	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	W8BZJ2
51	ATP synthase subunit beta	W8BZZ5
52	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3, mitochondrial	W8CC46
53	40S ribosomal protein S4	W8BKH3
54	Heat shock protein 23	W8BSC9
55	RuvB-like helicase 2	W8B412

#	Κοινές Πρωτεΐνες Μεγαλύτερη αφθονία Μη Μολυσμένα	Accession Number
1	Moesin/ezrin/radixin-1	W8B8R5
2	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	W8ATQ5
3	Chitinase-like protein CG5210	W8AY29
4	Tropomyosin-1, isoforms 33/34	W8BA89
5	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	W8BRD2

Από τις 55 πρωτεΐνες (Πίνακας 3Β) που βρέθηκαν σε μεγαλύτερη αφθονία στα μολυσμένα με *Wolbachia* δείγματα, οι πέντε πρωτεΐνες με τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση σε σχέση με τα μη μολυσμένα δείγματα είναι: 60S ribosomal protein L6 (W8CB79) δομική πρωτεΐνη του ριβοσώματος, rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin (W8CEE9) πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη μετατροπή των πρωταρχικών μορίων rRNA και tRNA στα αντίστοιχα ώριμα μόρια, 26S protease regulatory subunit 7 (W8BU79) συμμετέχει στην καταβολική διαδικασία των πρωτεϊνών, Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C (W8BAL9) παράγοντας έναρξης της διαδικασίας μετάφρασης του mRNA στο ριβόσωμα, DnaJ subfamily C member 3 (W8BEM7) αναστολέας της φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών στο ενδομεμβρανικό σύστημα.

Οι πέντε πρωτεΐνες (Πίνακασς 3Β) που βρέθηκαν σε χαμηλότερη αφθονία στα μολυσμένα με *Wolbachia* δείγματα (ή σε υψηλότερη αφθονία στα μη μολυσμένα δείγματα) είναι: Moesin/ezrin/radixin-1 (W8B8R5) βασική πρωτεΐνη της οργάνωσης και ρύθμισης του κυτταροσκελετού, Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 (W8ATQ5) πρωτεΐνη που εμπλέκεται σε βιολογικές διαδικασίες της αναπαραγωγής και της οργάνωσης της εξωκυττάριας μήτρας, Chitinase-like protein CG5210 (W8AY29) πρωτεΐνη (χιτινάση) που συμμετέχει στη διαδικασία διάσπασης πολυσακχαρίτη της χιτίνης, Tropomyosin-1, isoforms 33/34 (W8BA89) μυϊκή πρωτεΐνη που προσδένεται στην ακτίνη και συμβάλει στην ανάπτυξη του οργάνου της καρδιάς, Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial (W8BRD2) μιτοχονδριακή πρωτεΐνη με οξειδοαναγωγική δράση του NAD και NADP.

2.5 Βιολογική σημασία

2.5.1 Ανάλυση εμπλουτισμού όρων της γονιδιακής οντολογία

Στη συνέχεια αναζητήθηκαν στα πειραματικά αποτελέσματα οι βιολογικές διαδικασίες και τα μονοπάτια που φαίνεται να επηρεάζονται από τη μόλυνση με Για τις ωοθήκες αναλύθηκαν 116 πρωτεΐνες χωρισμένες σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα περιέχονται οι 50 πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν μόνο στα μολυσμένα δείγματα μαζί με τις 55 από τις κοινές που βρέθηκαν σε υψηλότερη αφθονία. Στη δεύτερη ομάδα περιέχονται οι 6 πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν μόνο στα μη μολυσμένα δείγματα μαζί με τις 5 από τις κοινές που βρέθηκαν σε υψηλότερη αφθονία. Αντίστοιχα για τους όρχεις αναλύθηκαν 104 πρωτεΐνες χωρισμένες σε δύο ομάδες, 69 που αναφέρονται στα μολυσμένα δείγματα και 35 που αναφέρονται στα μη μολυσμένα. Η αναζήτηση έγινε με το λογισμικό WebGestalt για τις κατηγορίες Βιολογική διαδικάσία, Μοριακή λειτουργία και Κυτταρικό διαμέρισμα (βλ 5.10) χρησιμοποιώντας τις ομόλογες πρωτεΐνες του ανθρώπου (Human) λόγω των 'φτωχών' αποτελεσμάτων

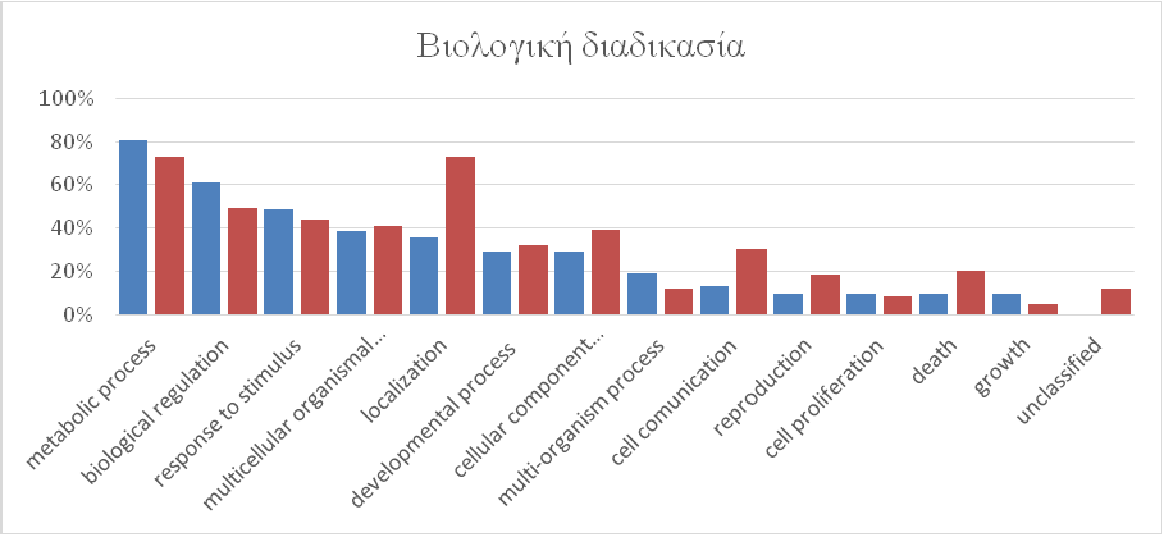
όταν χρησιμοποιήθηκαν οι πρωτεΐνες της *Ceratitis capitata* ή οι ομόλογες από τη *Drosophila melanogaster.*

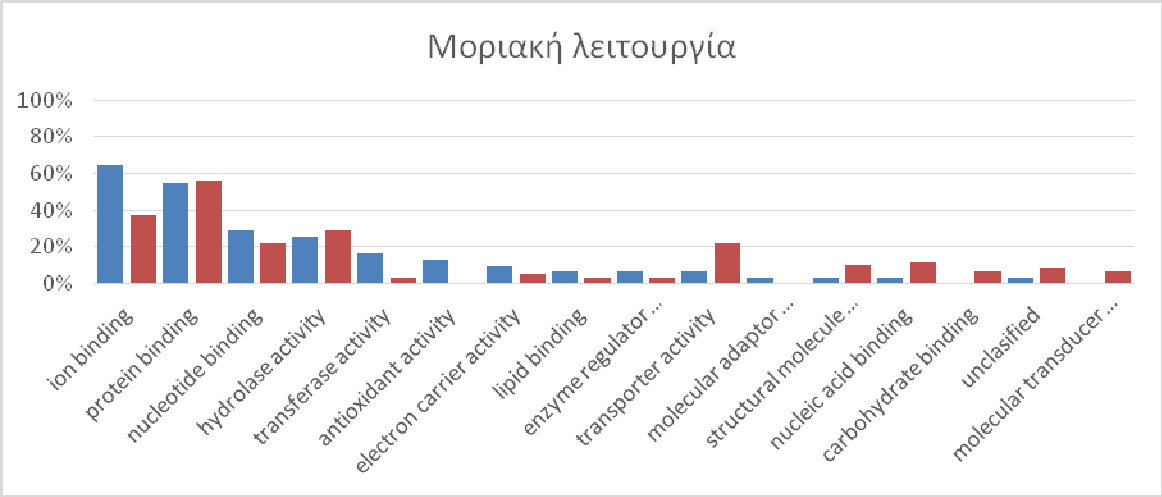
2.5.2 Όρχεις. Απότελέσματα εμπλουτισμού γονιδιακής οντολογίας.

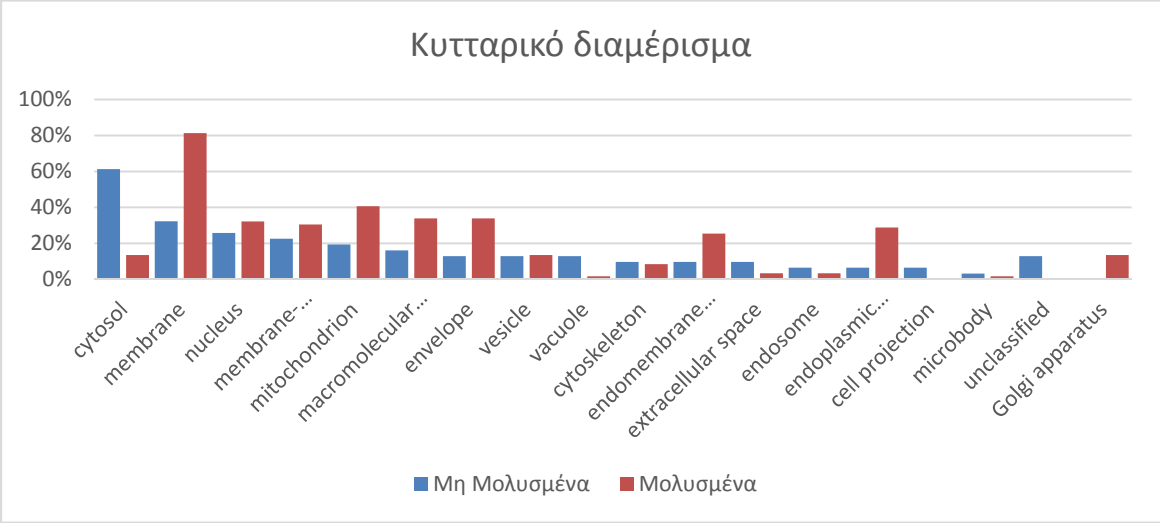
Τα αποτελέσματα της ανάλυσης εμπλουτισμού όρων της γονιδιακής οντολογίας για τα δείγματα των όρχεων φαίνονται στο Σχήμα 13. Στην κατηγορία βιολογική διαδικασία ένα μεγάλο ποσοστό των διαφοροποιημένων πρωτεϊνών είναι εξίσου κατανεμημένες στους όρους μεταβολική διαδικασία (metabolic process), βιολογική ρύθμιση (biological regulation), ανταπόκριση σε ερέθισμα (response to stimulus), διαδικασία πολυκύτταρου οργανισμού (multicellular organismal process), αναπτυξιακή διαδικασία (developmental process) κ.αλ. Αυτό δείχνει ότι κοινοί βιολογικοί μηχανισμοί διατηρούνται στους ιστούς των όρχεων μολυσμένων και μη με *Wolbachia.* Αντιθέτως με τους όρους εντοπισμός (localization), κυτταρική επικοινωνία (cell comunication), αναπαραγωγή (reproduction) και θάνατος (death) σχετίζεται μεγαλύτερο ποσοστό των διαφοροποιημένων πρωτεϊνών που ανιχνεύτηκαν στα μολυσμένα με *Wolbachia* δείγματα σε σχέση με τις διαφοροποιημένες πρωτεΐνες των μη μολυσμένων δειγμάτων. Αυτό δείχνει τις μεταβολές που προκαλεί η *Wolbachia* στους αναπαραγωγικούς ιστούς της Μεσογειακής φρουτόμυγας.

Όσον αφορά την κατηγορία μοριακή λειτουργία για τους όρους πρόσδεση πρωτεΐνης (protein binding), πρόσδεση νουκλεοτιδίου (nucleotide binding), δραστικότητα υδρολάσης (hydrolase activity) κ.αλ. οι περισσότερες διαφοροποιημένες πρωτεΐνες των δύο καταστάσεων είναι εξ ίσου κατανεμημένες. Οι πρωτεΐνες που διαφοροποιούνται στα μη μολυσμένα δείγματα εμπλουτίζουν τους όρους πρόσδεση ιόντος (ion binding) και αντιοξειδωτική δραστικότητα (antioxidant activity) σε αντίθεση με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες των μολυσμένων δειγμάτων με *Wolbachia* που ομαδοποιούνται σε μεγαλύτερο ποσοστό – σε σχέση με τα μη μολυσμένα- στη δραστικότητα του μεταφορέα (transporter activity), στη δραστικότητα δομικών μορίων (structural molecule activity) και στην πρόσδεση νουκλεϊκού οξέος (nucleic acid binding).

Για την κατηγορία κυτταρικό διαμέρισμα στις οντολογίες που αφορούν την μεμβράνη (membrane), το μιτοχόνδριο(mitochondrion) , το μακρομοριακό σύμπλοκο (macromolecular complex), το φάκελο (envelope- πολυστρωματική δομή που περιβάλει το σύνολο η μέρος του κυτταρου) το ενδομεμβρανικό σύστημα (endomembrane system) και το ενδοπλασμικό δίκτυο (endoplasmic reticulum) εκπροσωπείται το μεγαλύτερο ποσοστό των διαφοροποιημένων πρωτεϊνών στα μολυσμένα δείγματα σε σύγκριση με τα μη μολυσμένα όπου το μεγαλύτερο ποσοστό των διαφοροποιημένων πρωτεϊνών εντοπίζεται στο κυτταροδιάλυμα.







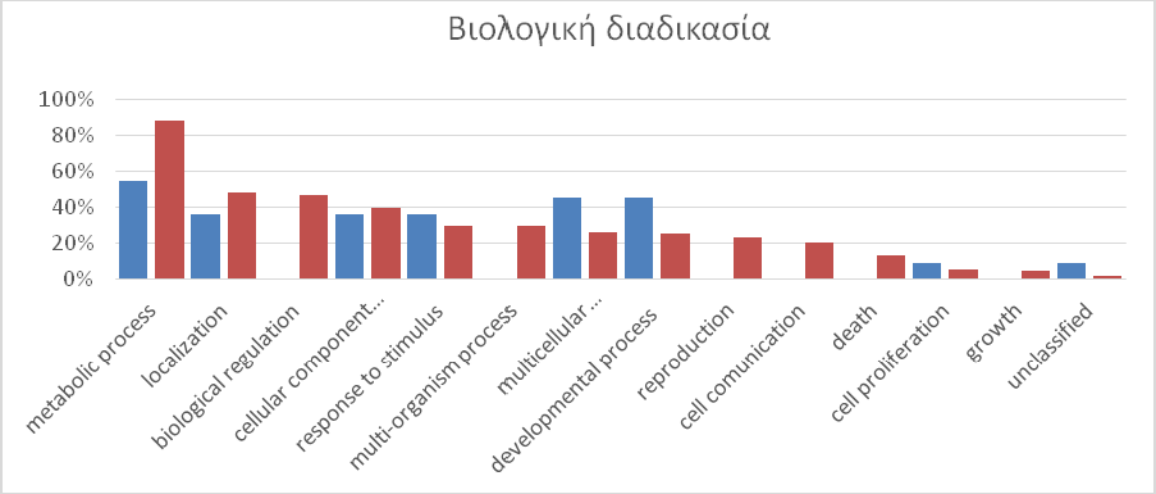
Σχήμα 13. Όρχεις. Αποτελέσματα εμπλουτισμού όρων της Γονιδιακής Οντολογίας.

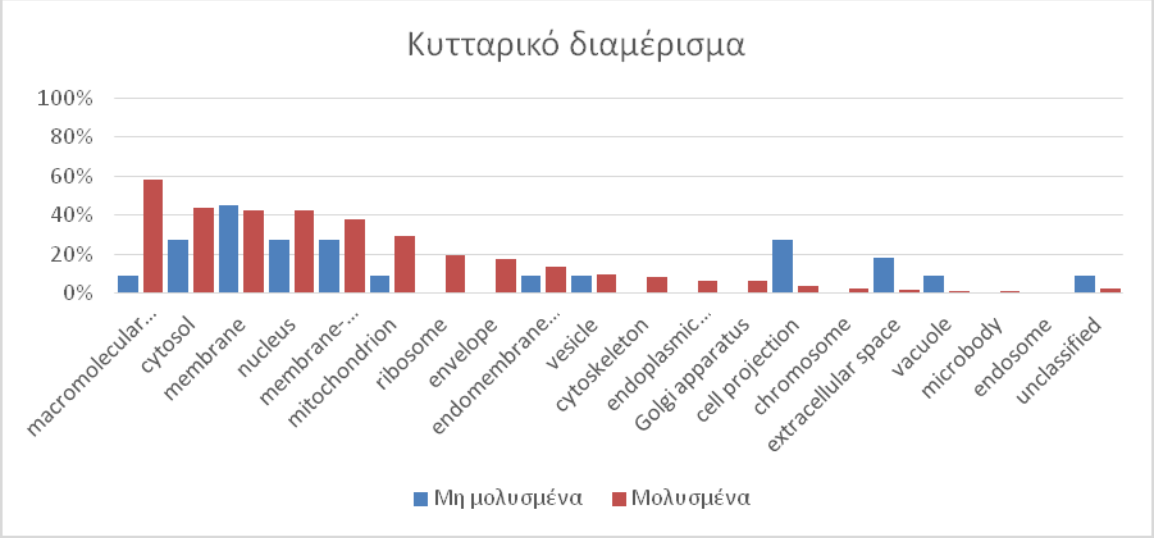
2.5.3 Ωοθήκες. Απότελέσματα εμπλουτισμού γονιδιακής οντολογίας.

Τα αποτελέσματα της αντίστοιχης ανάλυσης για τα δείγματα των ωοθηκών φαίνονται στο Σχήμα 13. Στην κατηγορία βιολογική διαδικασία φάινεται ένα μεγάλο ποσοστό των διαφοροποιημένων σε αφθονία πρωτεϊνών στα μολυσμένα δείγματα - σε σχέση με τα μη μολυσμένα - να σχετίζεται με τη μεταβολική διαδικασία (metabolic process), βιολογική ρύθμιση (biological regulation) , διαδικασία πολύ-οργανισμών (multiorganism process), αναπαραγωγή (reproduction), κυτταρική επικοινωνία (cell comunication) και θάνατο (death). Οι αντίστοιχες των μη μολυσμένων δειγμάτων, σύμφωνα με τα αποτελέσματα, σχετίζονται με τη διαδικασία πολυκύτταρου οργανισμού (multi-cellular organismal process) και τη διαδικασία ανάπτυξης (developmental process).

Στην κατηγορία μοριακή λειτουργία οι πρωτεΐνες που συνδέονται με την πρόσδεση νουκλεϊκών οξέων (nucleic acid binding), πρόσδεση νουκλεοτιδίων (nucleotide binding), δραστικότητα του μεταφορέα (transporter activity) βρέθηκαν να εκπροσωπούνται σε μεγαλύτερο ποσοστό στα μολυσμένα δείγματα σε σύγκριση με τα μη μολυσμένα δείγματα. Για τους υπόλοιπους όρους δε βρέθηκαν ιδιαίτερες διαφορές ανάμεσα στις δύο καταστάσεις.

Για την κατηγορία κυτταρικό διαμέρισμα στις οντολογίες που αφορούν το μακρομοριακό σύμπλοκο (macromolecular complex) το μιτοχόνδριο (mitochodrion) και το φάκελο (envelope) , εκπροσωπείται το μεγαλύτερο ποσοστό των διαφοροποιημένων πρωτεϊνών στα μολυσμένα δείγματα σε σύγκριση με τα μη μολυσμένα. Αντιθέτως οι διαφοροποιημένες σε αφθονία πρωτεΐνες των μη μολυσμένων δειγμάτων εμπλουτίζουν τους όρους κυτταρική προβολή (cell projection) και εξωκυττάριος χώρος (extracellular space).





Σχήμα 14. Ωοθήκες. Αποτελέσματα εμπλουτισμού όρων της Γονιδιακής Οντολογίας.

2.5.4 Ωοθήκες-Όρχεις Σύγκριση αποτελεσμάτων γονιδιακής οντολογίας.

Τα αποτελέσματα εμπλοπυτισμού όρων της γονιδιακής οντολογίας δίνουν τη δυνατότητα σύγκρισης των μεταβολών που προκαλέι η *Wolbachia* σε πρωτεϊνικό επίπεδο στου αναπαραγωγικό σύστημα των δύο φύλων της Μεσογειακής φρουτόμυγας. Ξεκιννώντας από τα αρσενικά, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι δύο όροι της βιολογικής διαδιακσίας επηρεάζονται περισσότερο από τη μόλυνση (συμβίωση) με τη *Wolbachia*: ο εντοπισμός (localization) - διαδικασίες μέσω των οποίων ένα κύτταρο ή μια κυτταρική οντότητα όπως πρωτεϊνικό σύμπλοκο ή οργανίδιο μεταφέρεται η διατηρήται σε μια συγκεκριμένη θέση- και η κυτταρική επικοινωνία (cell comunication) – διαδικασίες που συμβάλουν στην αλληλεπίδραση ενός κυττάρου με το περιβάλλον του. Στα θηλυκά, η μεταβολική διαδικασία (metabolic process) – χημικές διαδικασίες και μονοπάτια μέσω των οπίων μετασχηματίζονται μικρά μόρια αλλά και μακρομοριακές διαδικασίες όπως αντιγραφή και επιδιόρθωση DNA, σύνθεση και αποικοδόμηση πρωτεϊνών- και η βιολογική ρύθμιση (biological regulation) – διαδικασίες που διαμορφώνουν ένα μετρήσιμο χαρακτηριστικό βιολογικής λειτουργίας- είναι οι όροι που εντοπίζονται οι μεταβολές που προκαλεί κυρίως η *Wolbachia*. Σε μικρότερο ποσοστό η αναπαραγωγή και ο θάνατος που είναι κοινοί όροι και στα δύο φύλλα.

Στη κατηγορία μοριακή λειτουργία, στα αρσενικά, οι πρωτεΐνες που αφορούν στην πρόσεδεση ιόντων (ion binding) και ενεργότητα του μεταφορέα (transporter activity) – κατευθηνόμενη κίνηση μικρών μορίων,ιόντων, μακρομορίων κ.αλ στο εσωτερικό ή εξωτερικό του κυττάρου- φαίνεται να επηρεάζονται περισσότερο από τη *Wolbachia* ενώ στα θυληκά η πρόσδεση ιόντων, πρόσδεση νουκλεΐκού οξέος (nucleic acid binding) και πρόσδεση νουκλεοτιδίου (nucleotide binding) είναι οι αντίστοιχοι όροι.

Στην κατηγορία κυτταρικό διαμέρισμα, το μεγαλύτερο ποσοστό των διαφοροποιημένων πρωτεϊνών στα δείγματα όρχεων μολυσμένων με *Wolbachia*, εντοπίζεται κυρίως στις μεμβράνες, και ακολούθως στα μιτοχόνδρια, στο μακρομοριακά σύμπλοκα, στο φάκελο και στο ενδοπλασμικό δίκτυο. Οι αντίστοιχες πρωτεΐνες των ωοθηκών μολυσμένων με *Wolbachia* εντοπίζονται κυρίως στα μακρομοριακά σύμπλοκά, στα μιτοχόνδρια και δευτερευόντως στο φάκελο, στο κυτταροδιάλυμα, και στο ριβόσωμα.

2.6 Ανάλυση εμπλουτισμού μονοπατιών

2.6.1 Όρχεις . Αποτελέσματα.

Για τη διερεύνηση των βιολογικών μονοπατιών που πιθανώς επηρεάζονται από την παρουσία της *Wolbachia*, οι διαφοροποιημένες σε αφθονία πρωτεΐνες αναλύθηκαν με το λογισμικιό WebGestalt στα Wikipathways (5.10). Για τους όρχεις (Πίνακας 4) τα εμπλουτισμένα μονοπάτια ομαδοποιήθηκαν σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τις βιολογικές διαδικασίες στις οποίες συμμετέχουν Στην πρώτη κατηγορία περιλάμβάνονται τα μεταβολικά μονοπάτια: γλυκόληση και γλυκογένεση, και μεταφορά ηλεκτρονίων, στη δεύτερη κατηγορία τα ρυθμιστικά μονοπάτια: ρύθμιση του ακτινοσκελετού, κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και mRNA ενώ στην τρίτη κατηγορία ο μεταβολισμός του βενζοπυρενίου και της γλουταθιόνης και το οξειδωτικό stress. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 4 οι πρωτεΐνες Hexokinase (HK1), a-Enolase (ENO1) και Triosephosphate isomerase (TPI1) που συμετέχουν στη γλυκόλυση και γλυκογένεση, οι πρωτεΐνες Radixin (RDX), Gelsolin (GSN) που εμπλέκονται στη ρύθμιση του ακτινοσκελετού, βρέθηκαν σε χαμηλότερη αφθονία στους μολυσμένους με *Wolbachia* ιστούς σε αντίθεση με την Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial (DLAT) – γλυκόλυση και γλυκογένεση - , πρωτεΐνες SCO1 homolog, mitochondrial (SCO1), Cytochrome c oxidase subunit 2 (MT-CO2) και ADP/ATP translocase 1 (SLC25A4) – μεταφορά ηλεκτορνίων - οι ριβοσωμικές (RPS2 ,RPS3) και η Splicing factor, proline- and glutamine-rich (SFPQ) – mRNA - που ανιχνεύτηκαν σε υψηλότερη αφθονια στους μολυσμένους με Wolbachia ιστούς. Οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν μόνο στους μολυσμένους όρχεις είναι: η Mitochondrial pyruvate carrier 2 (MPC2) – γλυκόλυση και γλυκογένεση -, η Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial (UQCRFS1) – μεταφορά ηλεκτορνίων - , Cell division control protein 42 homolog (CDC42) - ρύθμιση ακτινοσκελετού - και η Serine/arginine-rich splicing factor 7 (SRSF7) – mRNA- .

Πίνακας 4. Όρχεις. Τα εμπλουτισμένα μονοπάτια έχουν χωριστεί σε δύο κατηγορίες με βάση τις βιολογικές διαδικασίες που συμμετέχουν. Οι πρωτεΐνες που αντιστοιχούν στην κάθε κατηγορία φαίνται στη στήλη 'Ονόματα Γονιδίων'. Με κανονικούς χαρακτήρες οι πρωτεΐνες που βρέθηκαν σε μεγαλύτερη αφθονία στα μολυσμένα δείγματα, με έντονους πλάγιου τύπου χαρακτήρες οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν μόνο στα μολυσμένα δείγματα και με υπογραμισμένους χαρακτήρες οι πρωτεΐνες που βρέθηκαν σε χαμηλότερη αφθονία στα μολυσμένα δείγματα.

Μονοπάτι	**Αριθμός Γονίδιων**	**Ονόματα Γονιδίων**
Μεταβολικό μονοπάτι		
Γλυκόλυση και γλυκογένεση	5	***MPC2*,** HK1, ENO1, TPI1 DLAT
Μεταφορά ηλεκτρονίων	4	***UQCRFS1*,** SCO1, MT-CO2, SLC25A4
Ρυθμιστικό μονοπάτι		
Ρύθμιση ακτινοσκελετού	3	RDX, GSN, ***CDC42***
Κυτταροπλασματικές Ριβοσωμικές Πρωτεΐνες	2	RPS2 ,RPS3
mRNA	2	***SRSF7*,** SFPQ
Άλλο		
Μεταβολισμός βενζοπυρενίου	2	*AKR1C4*, EPHX1
Μεταβολισμός γλουταθιόνης	2	ANPEP ,GSTT1
Οξειδωτικό stress	2	HMOX1, TXNRD2

2.6.2 Ωοθήκες . Αποτελέσματα.

Για τις ωοθήκες (Πίνακας 5) τα εμπλουτισμένα μονοπάτια ομαδοποιήθηκαν σε δύο κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία περιέχονται μονοπάτια που σχετίζονται με κυτταροπλασματικές και ριβοσωμικές πρωτεΐνες, mRNA, πρωτεόσωμα και μεταγραφικούς παράγοντες, στη δεύτερη κατηγορία η μεταφορά ηλεκτρονίων και ο κύκλος του κιτρικού οξέος. Οι ριβοσωμικες πρωτεΐνες (RPS2, RPL6, RPL7, RPS5, RPL18A RPL34, RPL23A, RPS3A, RPS4X, RPL13, RPL35A, RPL18, RPL17, RPL14, RPL19, RPL4, RPS3), οι πρωτεΐνες αποικοδόμησης (PSMC4, PSMD1, PSMD8, PSMC2, PSMC5), η πρωτεΐνη Splicing factor, proline- and glutamine-rich (SFPQ) – mRNA -, οι μεταγραφικοί παράγοντες (EIF3C, EIF3I), οι πρωετΐνες μεταφοράς ηλεκτρονίων (SDHB, UQCRC2, ATP5B, ATP5H, ATP5A1 ATP5O) και οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον κύκλο του κιτρικού οξέος (SUCLA2 , SDHB) βρέθηκαν σε μεγαλύτερη αφθονία στις μολυσμένες με *Wolbachia* ωοθήκες, ενώ οι πρωτεΐνες: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (HNRNPA1), Splicing factor 3B subunit 2 (SF3B2) –mRNA-, NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mitochondrial (NDUFS7) NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial (NDUFV1) – μεταφορά ηλεκτρονίων-, 2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial (OGDH) και Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit beta, mitochondrial (IDH3B) ταυτοποιήθηκαν μόνο στα μολυσμένες ωοθήκες.

Πίνακας 5. Ωοθήκες. Τα εμπλουτισμένα μονοπάτια έχουν χωριστεί σε δύο κατηγορίες με βάση τις βιολογικές διαδικασίες που συμμετέχουν. Οι πρωτεΐνες που αντιστοιχούν στην κάθε κατηγορία φαίνται στη στήλη 'Ονόματα Γονιδίων'. Με κανονικούς χαρακτήρες οι πρωτεΐνες που βρέθηκαν σε μεγαλύτερη αφθονία στα μολυσμένα δείγματα, με έντονους πλάγιου τύπου χαρακτήρες οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν μόνο στα μολυσμένα δείγματα και με υπογραμισμένους χαρακτήρες οι πρωτεΐνες που βρέθηκαν σε χαμηλότερη αφθονία στα μολυσμένα δείγματα.

Μονοπάτι	**Αριθμός Γονιδίων**	**Ονόματα Γονιδίων**
Ρυθμιστικό μονοπάτι		
Κυτταροπλασματικές Ριβοσωμικές Πρωτεΐνες	17	RPS2, RPL6, RPL7, RPS5, RPL18A RPL34, RPL23A, RPS3A, RPS4X, RPL13, RPL35A, RPL18, RPL17, RPL14, RPL19, RPL4, RPS3
Αποικοδόμηση Πρωτεόσωμα	5	PSMC4, PSMD1, PSMD8, PSMC2, PSMC5
mRNA	3	***HNRNPA1, SF3B2,*** SFPQ
Μεταγραφικοί παράγοντες	2	EIF3C, EIF3I
Μεταβολικό μονοπάτι		
Μεταφορά ηλεκτρονίων	8	SDHB, UQCRC2, ATP5B, ***NDUFS7 NDUFV1,*** ATP5H, ATP5A1 ATP5O
Κύκλος του κιτρικού οξέος	4	SUCLA2 , ***OGDH,*** SDHB, ***IDH3B***

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η Μεσογειακή φρουτόμυγα θεωρείται παγκοσμίως από τα πιο καταστροφικά έντομα για τα φρούτα και τα λαχανικά. Η χρήση εντομοκτόνων αποτελεί τα κύριο τρόπο αντιμετώπισης της με συνέπεια το μεγάλο οικονομικό κόστος και τη σημαντική επιβάρυνση του περιβάλλοντος. Η μαζική εκτροφη και απελευθέρωση στειρωμένων – με ακτινοβολία γ - αρσενικών εντόμων σε περιοχές που απαιτείται να μειωθεί ο πληθυσμός της Μεσογειακής φρουτόμυγας είναι έναςοικονομικότερος και φιλικός προς το περιβάλλον εναλλακτικός τρόπος αντιμετώπισης του εντόμου με στοχευμένη δράση. Η έλλειψη ανταγωνιστικότητας των στειρωμένων αρσενικών στο ζευγάρωμα σε σχέση με τα άγρια αρσενικά αποτελεί ένα σημαντικό μειονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου.

Το συμβιοτικό βακτήριο *Wolbachia* μπορεί να μολύνει – συμβιώσει – με το 70% των εντόμων. Εντοπίζεται κυρίως στο αναπαραγωγικό σύστημα των εντόμων και επεμβαίνει καθοριστικά στην αναπαραγωγική διαδικασία μέσω διαφόρων μηχανισμών με κυριότερο την κυτταροπλασματική ασυμβατότητα. Όταν ένα μολυσμένο με *Wolbachia* αρσενικό ζευγαρώσει με ένα μη μολυσμένο ή μολυσμένο με διαφορετικό στέλεχος θηλυκό τότε δεν πράγονται απογόνοι. Το γεγονός ότι η συμβίωση των εντόμων με βακτήρια είναι καθολική, η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα μπορεί να αποτελέσει εναλλακτική ή και συμπληρωματική μέθοδο στις ήδη υπάρχουσες για τον έλεγχο των πληθυσμών της Μεσογειακή φρουτόμυγα.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η συγκριτικη πρωτεϊνωματική ανάλυσης ιστών όρχεων και ωοθηκών της Μεσογειακής φρουτόμυγας παρουσία και απουσία του συμβιωτικού βακτηρίου *Wolbachia* προκειμένου να προσδιοριστούν πρωτεΐνες που πιθανώς εμπλέκονται στην κυτταροπλασματική ασυμβατότητα. Αρχικά εφαρμόστηκε μια «εκ των κάτω» (bottom-up) πρωτεϊνωματική προσέγγιση όπου τα πετίδια που προκύπτουν, μετά από ενζυματική πέψη του συνολικού πρωτεινικού περιεχομένου από μη μολυσμένους ιστούς, διαχωρίζονται με υγρή χρωματογραφία και ταυτοποιούνται με φασματομετρία μάζας. Διενεργήθηκαν βιολογικές και τεχνικές επαναλήψεις προκειμένου να έλεγχθεί: η αποτελεσματικότητα της μεθόδου εξαγωγής πρωτεϊνών από τους αναπαραγωγικούς ιστους της Μεσογειακής φρουτόμυγας, η επαναληψιμότητα της μεθόδου ταυτοποίησης των πρωτεϊνών με υγρή χρωματογραφία συνδεδεμένη με φασματομετρία μάζας και της μέθοδου σχετικής ποσοτικοποίησης των πρωτεϊνών που ταυτοποιούνται στα μολυσμένα ή μη μολυσμένα με *Wolbachia* δείγματα. Στη συνέχεια επιχειρήθηκε η πρώτη σύγκριτικη πρωτεϊνωματική ανάλυση ανάμεσα στα δύο είδη ιστών και για τα δύο φύλα. Ταυτοποίηθηκαν συνολικά 730 πρωτεΐνες προερχόμενες από μολυσμένους και μη μολυσμένους ιστούς ωοθηκών και 402 πρωτεΐνες από τους αντίστοιχους ιστούς όρχεων. Η απουσία πρωτεϊνών της *Wolbachia* από τις πρωτεϊνικές λίστες των μολυσμένων δειγμάτων και των δύο φύλων – λόγω χαμηλότερης αφθονίας σε σχέση με τις πρωτεΐνες του ξενιστή – και ο ο μικρός αριθμός ταυτοποιημένων

πρωτεϊνών της Μεσογειακής φρουτόμυγας οδήγησε στην προσθήκη ενός σταδίου διαχωρισμού των πρωτεϊνών πριν από την ενζυματική πέψη.

Με τη χρήση της αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών ανάλογα με το μέγεθος τους, πραγματοποιήθηκε συγκριτική πρωτεϊνωματική ανάλυση μολυσμένων με *Wolbachia* και μη ιστών του ξενιστή και ταυτοποιήθηκαν συνολικά 1993 πρωτεΐνες από τα δείγματα των ωοθηκών και 1049 από τα δείγματα των όρχεων. Επίσης στα μολυσμένα δείγματα ωοθηκών και όρχεων ανιχνεήθηκαν δύο και έντεκα πρωτεΐνες της *Wolbachia* αντίστοιχα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν έξι βιολογικές επαναλήψεις για τους ιστούς των όρχεων και πέντε αντίστοιχα για τους ιστούς των ωοθηκών.

Μετά τη συνένωση των αποτελεσμάτων ταυτοποιήθηκαν συνολικά 3189 πρωτεΐνες από τα δείγματα των ωοθηκών και 2070 πρωτεΐνες από τα δείγματα των όρχεων. Στα μολυσμένα δείγματα των ωοθηκών και όρχεων ταυτοποιήθηκαν 17 και 37 πρωτεΐνες της *Wolbachia* αντίστοιχα. Η πρωτεΐνη που ταυτοποιήθηκε με το μεγαλύτερο σκορ στους μολυσμένους ιστούς ωοθηκών είναι η UvrABC system protein A (U6SVN5) που εμπλέκεται στην εκτομή-διόρθωση νουκλεοτιδίου και πιο συγκεκριμένα προσδένεται στο DNA προκειμένου να αναγνωρίσει και να βοηθήσει στην επεξεργασία –διόρθωση-αλλοιώσεων στην αλληλουχία του. Αντίστοιχα στα μολυσμένα δείγματα όρχεων, οι πρωτεΐνες *Wolbachia* με το μεγαλύτερο σκορ ταυτοποίησης είναι χαρακτηρισμένες και πρόκειται για τις Probable cytosol aminopeptidase (AMPA) που συμμετέχει στη διαδικασία αποικοδόμησης των πρωτεΐνών και Chaperone protein DnaK (DNAK) που συμβάλλει στη σωστή διαμόρφωση των πρωτεϊνών. Αυτές οι πρωτεΐνες δείνουν πιθανούς μηχανισμούς επίδρασης του βακτηρίου *Wolbachia* στο αναπαργωγικού συτήματος της Μεσογειακής φρουτόμυγας. Ωστόσο η πλειοψηφία των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών της *Wolbachia* δεν είναι χαρακτηρισμένες με αποτέλεσμα να είναι αδύνατη η εξαγωγή περαιτέρω βιολογικών συμπερασμάτων για το ρόλο που διαδραματίζουν στους ιστούς της Μεσογειακής φρουτόμυγας.

Μετά την εφαρμογή αυστηρών κριτηρίων ταυτοποίησης και στατιστικής ανάλυσης στις αρχικές λίστες πρωτεϊνών της Μεσογειακής φρουτόμυγας προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα: για τις ωοθήκες ταυτοποιήθηκαν συνολικά 587 πρωτεΐνες εκ των οποίων οι 531 ήταν κοινές, οι 50 ταυτοιποιήθηκαν μόνο στα μολυσμένα με *Wolbachia* δείγματα και 6 στα μη μολυσμένα. Μετα τη σχετική ποστικοποίηση των κοινών πρωτεϊνών βρέθηκαν 55 πρωτεΐνες σε μεγαλύτερη αφθονία στα μολυσμένα δείγματα σε σχέση με τα μη μολυσμένα και 5 πρωτεΐνες σε μεγαλύτερη αφθονία στα μη μολυσμένα σε σχέση με τα μολυσμένα. Για τους όρχεις ταυτοποιήθηκαν συνολικά 540 πρωτεΐνες, 505 ήταν κοινές, 33 ταυτοποιήθηκαν μόνο στα μολυσμένα δείγματα και 2 μόνο στα μη μολυσμένα. Με τά τη σχετική ποσοτικοποίηση 36 πρωτεΐνες βρέθηκαν σε μεγαλύτερη αφθονία στα μολυσμένα με *Wolbachia* δείγματα

και 33 πρωτεΐνες στα μη μολυσμένα. Μια πρώτη παρατήρηση που μπορεί να γίνει είναι ότι ενώ ο αριθμός των διαφοροποιημένων σε ποσότητα πρωτεϊνών στα δύο φύλα είναι περίπου ο ίδιος – 60 για τα θηλυκά, 69 για τα αρσενικά – ο αριθμός των πρωτεϊνών που βρίσκονται σε υπερέκφραση στις μολυσμένες ωοθήκες είναι δεκπλάσιος σε σχέση με τον αντίστοιχο αριθμό για τις μη μολυσμένες σε αντίθεση με τους όρχεις όπου το πλήθος των πρωτεΐνων που βρίσκονται σε υπερέκφραση σε μολυσμένα και μη μολυσμένα δείγματα είναι περίπου το ίδιο. Δεδομένου επίσης ότι το 50% περίπου των πρωτεΐνών που βρέθηκαν σε υπερέκφραση στους μολυσμένους με *Wolbachia* ιστούς των ωοθηκών, είναι ριβοσωμικές, πιθανώς καταδεικνύει την επίδραση της *Wolbachia* στην παραγωγή πρωτεϊνών στους θηλυκούς ιστούς της Μεσογειακής φρουτόμυγας.

Προκειμένου να γίνει δυνατή η διερεύνηση και άλλων πιθανών μεταβολών που προκαλεί η *Wolbachia* στο αναπαραγωγικό σύστημα της Μεσογειακής φρουτόμυγας, για τις διαφοροποιημένες πρωτεΐνες παραγματοποιήθηκε εμπλουτισμός όρων της γονιδιακής οντολογίας για τρεις κατηγορίες: Βιολογική διαδικασία, Μοριακή λειτουργία και Κυτταρικό διαμέρισμα. Τα αποτελέσματα δείχνουν για τις ωοθήκες ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των διαφοροποιημένων πρωτεϊνών στα μολυσμένα δείγματα, συμμετέχει στη μεταβολική διαδικασία – επιβεβαιώνοντας τον πιο πάνω ισχυρισμό -, στη βιολογική ρύθμιση και στη διαδικασία πολυοργανισμών – αποτέλεσμα της συμβίωσης με τη *Wolbachia*-. Η μοριακή λειτουργία της πλειοψηφίας των διαφοροποιημένων πρωτεϊνών στα μολυσμένα δείγματα αφορά κυρίως στην πρόσδεση ιόντος, νουκλεΐκού οξέος και νουκλεοτιδίου. Αυτό δείχνει τις μεταβολές που προκαλεί η *Wolbachia* στη μεταφορά ενέργειας και στις διαδικασίες που αφορούν DNA και RNA. Τέλος οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες εντοπίζονται κυρίως στο μακρομοριακό σύμπλοκο, στον πυρήνα, στο ριβόσωμα και στο μιτοχόνδριο.

Για τους όρχεις η πλειοψηφία των διαφοροποιημένων πρωτεϊνών στα μολυσμένα δείγματα- σε σχέση με τα μη μολυσμένα- αφορά στον όρο του εντοπισμού στην κατηγορία Βιολογική διαδικασία. Αυτό δείχνει τη μεταβολή που προκαλεί η *Wolbachia* και σχετίζεται με τη μεταφορά ή διατήρηση σε συγκεκριμένη θέση κυτταρικής οντότητας όπως μικρού μορίου, πρωτεΐνης, πρωτεϊνικού συμπλόκου, οργανιδίου κ.α. Στην κατηγορία μοριακή λειτουργία, η ενεργότητα του μεταφορέα είναι όρος που εμπλουτίζεται από τις διαφοροποιημένες πρωτεΐνες των μολυσμένων δειγμάτων και εντοπίζονται κυρίως στη μεμβράνη και δευτερευόντως στο μιτοχόνδριο, στο μακρομοριακό σύμπλοκο και στο ενδοπλασμικό δίκτυο. Συγκρίνοντας τις τροποποιήσεις που επιφέρει η *Wolbachia* στους αναπαραγωγικού ιστούς των δύο φύλων της Μεσογειακής φρουτόμυγας, προκύπτει το συμπέρασμα ότι για τα θηλυκά η μεταφορά ενέργειας και η παραγωγή πρωτεϊνών είναι διαδικασίες με τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση ενώ για τα αρσενικά η μεταφορά ουσιών με κυριότερο προορισμό τη μεμβράνη.

Επίσης πραγματοποιήθηκε ανάλυση βιολογικών μονοπατιών που σχετίζονται με τις διαφοροποιημένες πρωτεΐνες. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι και στα δύο φύλα εμπλουτίζονται τα μονοπάτια που αφορούν τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες, το mRNA, τη γλυκόλυση και γλυκογένεση, τη μεταφορά ηλεκτρονίων και τους μεταγραφικούς παράγοντες. Το γονίδιο SFPQ που αντιστοιχεί στην ανθρώπινη πρωτεΐνη Splicing factor, proline- and glutamine-rich (P23246) και έχει 50% ομολογία με την πρωτεΐνη της Μεσογειακής φρουτόμυγας Protein no-on-transient A (W8BA83) βρέθηκε σε μεγαλύτερη αφθονία στα μολυσμένα με *Wolbachia* δείγματα τόσο των όρχεων όσο και των ωοθηκών. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη προσδένεται σε DNA και RNA και εμπλέκεται σε πληθώρα πυρηνικών διαδικασίων όπως εναλλακτκό μάτισμα mRNA, αποακετυλίωση της ιστόνης H3, αρνητική ρύθμιση της μεταγραφής, θετική ρύθμιση του οξειδωτικού stress που επάγεται από το αποπτοτικό σηματοδοτικό μονοπάτι, κ.α. Επιπλέον οι διαφοροποιημένες πρωτεΐνες από τα δείγματα των ωοθηκών εμπλουτίζουν το βιολογικό μονοπάτι της αποικοδόμησης των πρωτεϊνών ενώ οι αντίστοιχες των όρχεων τη ρύθμιση του ακτινοσκελετού που δείχνει τη διαφορετική επίδραση της *Wolbachia* στους αναπαραγωγικούς ιστούς των δύο φύλων.

Συμπερασματικά η συγκριτική πρωτεϊνωματική ανάλυση ιστών όρχεων και ωοθηκών της Μεσογειακής φρουτόμυγας, μολυσμένων και μη με *Wolbachia* ανέδειξε πρωτεΐνες και βιολογικές διαδικασίες που επηρεάζονται - διαφοροποιούνται από την μόλυνση με *Wolbachia.* Ανέδειξε επίσης ομοιότητες και διαφορές της επίδρασης αυτής ανάμεσα στα δύο φύλα.. Έτσι η παρούσα διατριβή συνέβαλε έστω και στα αρχικά στάδια στη συτηματική μελέτη και καταγραφή των πρωτεΐνικών μοτίβων της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Χρειάζονται ασφαλώς εμπλουτισμός της συγκεκριμένης προσέγγισης τόσο στην προετοιμασία των δειγμάτων με εναλλακτικές μεθόδους διαχωρισμού των πρωτεϊνών όπως ισοηλεκτρική εστίαση (IEF) , δυσδιάστατη ηλεκτοφόρηση (2-DE), ηλεκτροφόρηση σε εγγενής συνθήκες (Native PAGE) κ.ά. όσο και στην ανάλυση των αποτελεσμάτων. Πιο συγκεκριμένα η απουσία πλήρους περιγραφής (γονιδιακή οντολογία) του πρωτεϊνώματος της Μεσογειακής φρουτόμυγας, και η απουσία καταγραφής των πρωτεϊνών της *Wolbachia* που εντοπίζονται στα γεννητικά όργανα της Μεσογειακής φρουτόμυγας αποτελούν τροχοπέδη για την εις βάθος πρωτεϊνωματική ανάλυση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Η σημασία του ελέγχου των πληθυσμών της Μεσογειακής φορυτόμυγας για την παγκόσμια παραγωγή φρούτων και λαχανικών, με μεθόδους οικονομικότερες και φιλικότερες για το περιβάλλον, καθιστά την κυτταροπλασματική ασυμβατότητα μέσω του βακτηρίου *Wolbachia* μία ελπιδοφόρα εναλλακτική ή συμπληρωματική λύση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Δείγματα ιστών όρχεων και ωοθηκών.

Για την απομόνωση όρχεων και ωοθηκών μολυσμένων με *Wolbachia* χρησιμοποιούνται διαμολυσμένα έντομα μεσογειακής φρουτόμυγας MedFly-V8. Για τους αντίστοιχους μη-μολυσμένους με *Wolbachia* ιστούς χρησιμοποιούνται έντομα του στελέχους Benakeion [9]. Οι ιστοί αποθηκεύονται σε διάλυμα RNA later (Sigma Aldrich) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για τις ωοθήκες χρησιμοποιούνται έντομα 3 ημερών, ενώ για τους όρχεις έντομα 1 ημέρας.

4.2 Εξαγωγή πρωτεϊνών από ιστούς όρχεων και ωοθηκών

Μετά από φυγοκέντρηση, 15 ζεύγη όρχεων και 10 ζεύγη ωοθηκών μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες 1,5mL κρατώντας στο ελάχιστο τον όγκο του διαλύματος αποθήκευσης. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 400 μL διαλύματος RIPA (50mM Tris/ HCl pH7.2, 150mM NaCl, 1%v/v NP-40, 1% w/v sodium deoxycholate, 0.1% w/v SDS) και 5 μL -αναστολέα πρωτεόλυσης- PMSF 0.1M. Τα δείγματα των ιστών ψύχονται σε λουτρό πάγου και ανακινούνται (vortex) κάθε 5 λεπτά ενώ ενδιάμεσα χρησιμοποιείται πλαστικός ομογενοποιητής (pestle) για δοκιμαστικούς σωλήνες 1,5mL για καλύτερη διάρρηξη των ιστών. Μετά από 3 κύκλους της παραπάνω διαδικασίας γίνεται φυγοκέντρηση για 10 λεπτά (11,000 rpm, 4 ^{o}C) και επαναλαμβάνεται 2 φορές η παραπάνω διαδικασία. Συλλέγεται το υπερκείμενο και υπολογίζεται το συνολικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο με τη μέθοδο BCA [18] ενώ το υποκείμενο (pellet) επαναδιαλυτοποιείται σε 400 μL διαλύματος RIPA για περαιτέρω λύση με τη χρήση υπερήχων (3 κύκλοι στο 30% του εύρους, με κεφαλή υπερήχων VCX130, Sonics & Materials, Newtown,USA). Μετά από φυγοκέντρηση συλλέγεται το υπερκείμενο και υπολογίζεται το συνολικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο με τη μέθοδο BCA. Τέλος τα δείγματα συνενώνονται και φορτώνονται σε Amicon Filters 3 k Da 0,5 ml προς συμπύκνωση μέχρι τελικού όγκου ~ 25 μL σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Merck Millipore). Μετά τη συμπύκνωση γίνεται εκ νέου υπολογισμός του πρωτεϊνικού περιεχομένου με τη μέθοδο BCA.

4.3 Πέψη πρωτεϊνών σε διάλυμα με Βοηθούμενη από Φίλτρο Προετοιμασία Δείγματος (Filter Aided Sample Preparation - FASP)

Αρχικά η πρωτεΐνες του δείγματος τοποθετούνται σε φίλτρα συγκέντρωσης (30kDa cutoff) όπου διαλυτοποιούνται σε 200μl διαλύματος ουρίας (UA: 8M Urea, 50mM Tris/HCl pH 8.0), ακολουθούν φυγοκέντρηση (14.000 x g για 15 λεπτά, 4 ^{o}C) για την απομάκρυνση του διαλύτη και δύο διαδοχικές πλύσεις με το ίδιο διάλυμα. Ακολουθεί αναγωγή των κυστεϊνών, προσθέτοντας διάλυμα 100μl UA+DTT (UA, 1mM DTT). Τα φίλτρα φυγοκεντρούνται (14.000 x g για 15 λεπτά, 4 ^{o}C) για την απομάκρυνση του διαλύτη και το ίδιο βήμα επαναλαμβάνεται. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται αλκυλίωση των κυστεϊνών

των πρωτεϊνών προσθέτοντας στο φίλτρο 100μl διαλύματος ουρίας που περιέχει ιωδοακεταμίδιο (UA, 50mM IAA). Ακολουθεί ανάδευση και επώαση των δειγμάτων για 20λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, ακολουθούν τρεις πλύσεις με διάλυμα 100μl UA για τον καθαρισμό του δείγματος και στη συνέχεια τρεις πλύσεις με διάλυμα 100μl ABS (50mM Διττανθρακικής αμμωνίας), για την αλλαγή του διαλύτη. Ακολουθεί, πέψη του δείγματος με 40μl τρυψίνης σε ABS για 14-18 ώρες, στους 37°C, σε αναλογία ενζύμου/υπόστρωμα 1/100. Με το τέλος της πέψης, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση (14.000 x g για 15 λεπτά, 4 ^{o}C) για τη συλλογή των πεπτιδίων, οξίνιση με Τριφθοροξικό οξύ και λυοφιλοποίηση με φυγοκέντρηση υπό κενό σε θερμοκρασία δωματίου και τα δείγματα φυλάσσονται στους -20°C. [19]

4.4 Αφαίρεση Αλάτων

Το κάθε δείγμα διαλυτοποιείται σε 60 μl 5% Φορμικού οξέος (FA) και στη συνέχεια περνάει από στήλες C18 (Empore 2215-C18), κατασκευασμένες in-house, σύμφωνα με την μέθοδο των StageTips. Αναλυτικότερα, σε tips των 200μl, τοποθετούνται δύο στρώσεις υλικού C18. Πραγματοποιούνται διαδοχικές πλύσεις των στηλών με 20 μl 90% Ακετονιτριλίου και 20 μl 5% FA και στη συνέχεια προστίθεται το δείγμα αφού γίνει πλύση με 20 μl 5% FA ενώ για την έκλουση των πεπτιδίων χρησιμοποιείται 60 μl διάλυμα 90% Ακετονιτριλίου. Στη συνέχεια, τα δείγματα λυοφιλοποιούνται, έπειτα από φυγοκέντρηση υπό κενό και αποθηκεύονται στους -20°C μέχρι να αναλυθούν.

4.5 Διαχωρισμός πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν με βάση το μοριακό τους βάρος με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Το πρωτεϊνικό μίγμα επεξεργάζεται με ένα ανιονικό απορρυπαντικό, το SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) σπάει τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις και οι πρωτεΐνες αναδιατάσσονται. Επίσης με την προσθήκη του αναγωγικού β-μερκαπτοαιθανόλη σπάνε τυχόν δισουλφιδικοί δεσμοί. Ένα μόριο SDS αντιστοιχεί για κάθε δύο αμινοξικά κατάλοιπα της πρωτεϊνικής αλυσίδας, με αποτέλεσμα τη δημιουργία αρνητικά φορτισμένου συμπλόκου SDS-αποδιαταγμένης πρωτεΐνης που είναι ανάλογο του μοριακού βάρους της κάθε πρωτεΐνης. Για το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12,5 % χρησιμοποιούνται Tris-HCl 1,5M pH 8,8, Tris-HCl 0,5M pH 6,8, Ακρυλαμίδη 30% w/v, APS 10% w/v, TEMED, SDS 10% w/v σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Biorad.

4.6 Χρώση Blue Silver

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πραγματοποιείται με χρώση Blue Silver (0.12% Coomasie Brilliant Blue G-250, 10% Θειικό αμμώνιο, 10% Φωσφορικό οξύ, 20% Μεθανόλη) που χρωματίζει τις πρωτεϊνικές ζώνες με όριο ανίχνευσης 0,1μg. Χρησιμοποιήθηκαν 100-150ml του χρωστικού διαλύματος για 12-15 ώρες αφού ακινητοποιήθηκαν οι πρωτεΐνες σε 100 ml διαλύματος 30% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ. [17]

4.7 Πέψη πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και εξαγωγή πεπτιδίων

Οι πρωτεϊνικές προς μελέτη ζώνες απομονώνονται και κόβονται ώστε το ελάχιστο μέγεθος το πηκτώματος να είναι 1mm x 1mm. Τοποθετούνται στη συνέχεια σε δοκιμαστικούς σωλήνες του 1,5 ml. Πραγματοποιούνται δύο πλύσεις με 100μl 50%v/v Ακετονιτριλίου και 100μl 50mM Διττανθρακικής αμμωνίας (ABS) για 15 λεπτά η καθεμία. Αυτό επαναλαμβάνεται τρεις φορές μέχρι τον πλήρη αποχρωματισμό των πρωτεϊνικών ζωνών. Ακολουθεί η αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών με προσθήκη 100μl 10mM DTT/ σε 50mM ABS για 45min στους 56 ^{o}C. Στην συνέχεια γίνεται αλκυλίωση των ελεύθερων κυστεϊνών με την προσθήκη 100μl 55mM Ιωδοακεταμιδίου/ σε 50mM ABS υπό ανάδευση σε συνθήκες σκότους για 45min. Πραγματοποιούνται δύο πλύσεις με 100μl 50%v/v Ακετονιτριλίου και 100μl 50mM Διττανθρακικής αμμωνίας (ABS) για 15 λεπτά η καθεμία σε σύνολο τριών επαναλήψεων. Οι πρωτεΐνες επωάζονται για 12-15 ώρες με 25-30μl 0.1mM τρυψίνης / σε 50mM ABS στους 37 ^{o}C. Μετά συλλέγεται το υπερκείμενο σε νέους Protein Low-Binding σωλήνες. Ακολουθούν διαδοχικά πλυσίματα των 20min υπό ανάδευση με 50μl Nano pure H_2O, 50μl 50%v/v Ακετονιτριλίου και 50μl 0.1%v/v Τριφθοροξικού οξέος (TFA)/ 50%v/v Ακετονιτριλίου. Μετά από κάθε πλύσιμο συλλέγονται τα υπερκείμενα στους νέους σωλήνες όπου πλέον περιέχονται τα πεπτίδια που προέκυψαν από την πέψη με τρυψίνη. Τέλος ακολουθεί λυοφιλοποίηση με φυγοκέντρηση υπό κενό σε θερμοκρασία δωματίου και τα δείγματα φυλάσσονται στους -20°C πριν την ανάλυση τους.

4.8 Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία νανοροής συζευγμένη με διαδοχική φασματομετρία μάζας (nLC-MS/MS)

Η ανάλυση των πεπτιδικών δειγμάτων έγινε με υγρή χρωματογραφία νανοροής ανάστροφης φάσης (Reverse phase nLC) συζευγμένη είτε με το φασματόμετρο μάζας LTQ-Orbitrap XL ή με το Orbitrap Q Exactive. Στην πρώτη περίπτωση τα πεπτίδια διαχωρίστηκαν από το Easy nLC I σε πακεταρισμένες in-house κολώνες (OD 360μm, ID 50 μm, 15cm, C18, 2μm). Χρησιμοποιήθηκε γραμμική βαθμίδωση 5-30% από το διάλυμα A (99,5% νερό, 0,5% Φορμικό οξύ) στο διάλυμα B (99,5% Ακετονιτρίλιο, 0,5% Φορμικό οξύ) 155 λεπτά, από 30-90% B 10 λεπτά, στο 90% B 5 λεπτά από 90-5% B 5 λεπτά με ροή 300 nL/min. Ο ιονισμός –θετικός- των πεπτιδίων έγινε με ηλεκροψεκασμό (Electro Spray

ionization, ESI) και για την ανάλυση στο LTQ-Orbitrap XL χρησιμοποιήθηκαν οι ρυθμίσεις: ευκρίνεια 60000(FWHM) στα 400m/z, εύρος μαζών 300-2000m/z, θραυσματοποίηση με CID (Collision Induced Dissociation) των 10 πιο έντονων πρόδρομων ιόντων με χρόνο αποκλεισμού 60 δευτ. Για την ανάλυση με το φασματόμετρο μάζας Orbitrap Q Exactive ο διαχωρισμός των πεπτιδίων έγινε με το Dionex Ultimate 3000 UHPLC σε κολώνες EasySpray C18. Χρησιμοποιήθηκαν τα διαλύματα A (99,9% νερό, 0,1% Φορμικό οξύ) και διάλυμα B (80%Ακετονιτρίλιο, 20% νερό, 0,1% Φορμικό οξύ) σε γραμμική βαθμίδωση από το A στο B, 4-10% B 12 λεπτά, 10-35% B 20 λεπτά, 35-65% B 5 λεπτά και τελική έκλουση στο 95% B και επανεξισορρόπηση στο 5% B αντίστοιχα με ροή 300 nL/min. Ο ιονισμός – θετικός- των πεπτιδίων έγινε με ηλεκροψεκασμό (Electro Spray ionization, ESI) και για την ανάλυση στο Orbitrap Q Exactive χρησιμοποιήθηκαν οι ρυθμίσεις: ευκρίνεια 70000(FWHM), εύρος μαζών 400-1600m/z, θραυσματοποίηση με NCE (Normalized Collision Energy) των 10 πιο έντονων πρόδρομων ιόντων με χρόνο αποκλεισμού 10 δευτ. Για την απόκτηση των φασμάτων-αρχείων- χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Xcalibur 2.2.

4.9 Ανάλυση αποτελεσμάτων φασματομετρίας μάζας

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό Proteome Discoverer v1.4 με χρήση των αλγορίθμων Sequest v1.1.0.263 και Mascot v2.3.2. ως προς την πρωτεϊνική βάση δεδομένων Uniprot *Ceratitis capitata* 2015 (17,424 πρωτεΐνες) με συγχώνευση της *Wolbachia* endosymbiont of *Drosophila melanogaster* 2015 (1,202 πρωτεΐνες). Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν είναι: σφάλμα πρόδρομης μάζας μέχρι 10ppm, για τις θραυσματοποιημένες μάζες μέχρι 0.8 Da. Ένζυμο τρυψίνη με επιτρεπτό όριο διάσπασης (cleavage site) 2. Ως μεταβλητές τροποποιήσεις ορίστηκαν η οξείδωση μεθιονίνης και η ακετυλίωση του αμινο-τελικού άκρου. Επίσης ορίστηκε ως σταθερή τροποποίηση η αλκυλίωση (S-Carbamidomethylation) των κυστεϊνών. Όλα τα αρχεία συνενώθηκαν στο Scaffold v3.4.5 για την συγκριτική ανάλυση. Τα όρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών και πεπτιδίων ήταν 99% και 95% αντίστοιχα, για πρωτεΐνες με ελάχιστο 1 πεπτίδιο ταυτοποίησης που είχε ως αποτέλεσμα FDR (False Discovery Rate) < 1%. Για την ποσοτικοποίηση των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών εφαρμόστηκε ο αριθμός φασμάτων (spectral counting) μέσω του λογισμικού Scaffold, δηλαδή το άθροισμα όλων των φασμάτων που σχετίζονται με μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη σε ένα δείγμα και περιλαμβάνει επίσης τα φάσματα που μοιράζεται με άλλες πρωτεΐνες διαιρεμένο με το συνολικό αριθμό φασμάτων του δείγματος.

4.10 Στατιστική ανάλυση και εμπλουτισμός των αποτελεσμάτων

Η επεξεργασία των πρωτεϊνικών λιστών που προέκυψαν από το Scaffold, έγινε με το λογισμικό Microsoft Excel. Πιο συγκεκριμένα θεωρήθηκαν ως σίγουρα ταυτοποιημένες οι πρωτεΐνες που βρέθηκαν σε τουλάχιστον 3 βιολογικές επαναλήψεις για κάθε κατάσταση. Επίσης έγινε στατιστικός και βιολογικός

έλεγχος των αποτελεσμάτων μέσω του t-test. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα υπολογίστηκαν από τη διαίρεση του μέσου όρου του αριθμού φασμάτων μιας πρωτεΐνης που ανιχνεύτηκε στα μολυσμένα δείγματα με το μέσο όρο του αριθμού φασμάτων της ίδιας πρωτεΐνης στα μη-μολυσμένα δείγματα. Ο χαρακτηρισμός 'υπέρ- έκφραση' ή 'υπό- έκφραση' δόθηκε σε πρωτεΐνες με p-value <0.05 και αλλαγή των πρωτεϊνικών επιπέδων (fold change ≥2) πάνω από δύο φορές. Για την ανάλυση εμπλουτισμού γονιδιακής οντολογίας (GO – enrichment analysis) οι πρωτεΐνες χωρίστηκαν σε 2 κατηγορίες, στη πρώτη κατηγορία περιέχονται οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν μόνο στα μη μολυσμένα δείγματα και από τις κοινές αυτές που βρέθηκαν να είναι σε υπέρ-έκφραση ενώ στη δεύτερη κατηγορία περιέχονται οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν μόνο στα μολυσμένα δείγματα και από τις κοινές αυτές βρέθηκαν να είναι σε υπέρ-έκφραση στα μολυσμένα δείγματα. Οι δύο ομάδες πρωτεϊνών αναλύθηκαν με το λογισμικό WebGestalt (Gene Ontology v 1.2). Λόγω της φτωχής γονιδιακής οντολογίας για τον οργανισμό *Ceratitis capitata* (και για τη *Drosophila melanogaster* ως «κοντινότερος» οργανισμός) αφού υπολογίστηκε το ποσοστό ομολογίας με πρωτεΐνες του ανθρώπινου οργανισμού και χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα γονίδια. Έτσι ταυτοποιήθηκαν εμπλουτισμένοι όροι για της κατηγορίες Βιολογική διαδικασία, Μοριακή λειτουργία και Κυτταρικό διαμέρισμα. Για την ανάλυση εμπλουτισμού των βιολογικών μονοπατιών ομαδοποιήθηκαν οι πρωτεΐνες των 2 παραπάνω κατηγοριών και αναλύθηκαν στο λογισμικό WebGestalt (WikiPathways).

5. Βιβλιογραφία

1. Mitchell, W. C.; Saul, S. H. Current control methods for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata,* and their application in the USA Review of Agricultural Entomology 1990 Vol. 78 No. 9 pp. 923-930

2. Nikos T. Papadopoulos, Byron I. Katsoyannos, Nikos A. Kouloussis and Jorge Hendrichs Effect of orange peel substances on mating competitiveness of male *Ceratitis capitata* Volume 99, Issue 2, pages 253–261, May 2001

3. Katsoyannos B.I., Papadopoulos N.T., Hendrichs J., Wornoayporn V. Comparative response to citrus foliage and citrus fruit odour by wild and mass-reared sterile Mediterranean fruit fly males of a genetic sexing strain Journal of applied entomology ISSN 0931-2048

4. J. Hendrichs, A. S. Robinson, J. P. Cayol and W. Enkerlin Medfly Areawide Sterile Insect Technique Programmes for Prevention, Suppression or Eradication: The Importance of Mating Behavior Studies The Florida Entomologist Vol. 85, No. 1 (Mar., 2002), pp. 1-13

5. Kostas Bourtzis (Editor), Thomas A. Miller (Editor) Insect Symbiosis

6. Werren JH, Baldo L, Clark ME. *Wolbachia:* master manipulators of invertebrate biology. Nat Rev Microbiol. 2008 Oct;6(10):741-51

7. Serbus LR[1], Casper-Lindley C, Landmann F, Sullivan W. The genetics and cell biology of *Wolbachia*-host interactions. Annu Rev Genet. 2008;42:683-707

8. Zabalou S, Riegler M, Theodorakopoulou M, Stauffer C, Savakis C, Bourtzis K. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Oct 19;101(42):15042-5. Epub 2004 Oct 6.

9. S. Zabalou , A. Apostolaki, I. Livadaras, G. Franz, A. S. Robinson, C. Savakis and K. Bourtzis. Incompatible insect technique: incompatible males from a *Ceratitis capitata* genetic sexing strain. Entomologia Experimentalis et Applicata Volume 132, Issue 3, pages 232–240, September 2009

10. Dangi A[1], Vedi S, Nag JK, Paithankar S, Singh MP, Kar SK, Dube A, Misra-Bhattacharya S. Tetracycline treatment targeting *Wolbachia* affects expression of an array of proteins in *Brugia malayi* parasite. Proteomics. 2009 Sep;9(17):4192-208

11. Lesley J. Brennan, B. Andrew Keddie, Henk R. Braig, Harriet L. Harris The Endosymbiont *Wolbachia pipientis* Induces the Expression of Host Antioxidant Proteins in an Aedes albopictus Cell Line Plos One May 7, 2008 DOI: 10.1371

12. Takemori N[1], Yamamoto MT. Proteome mapping of the *Drosophila melanogaster* male reproductive system. Proteomics. 2009 May;9(9):2484-93.

13. M. Desjardins & R. A. B. Ezekowitz et. al. A systems biology analysis of the *Drosophila* phagosome *Nature* **445**, 95-101 (4 January 2007)

14. Gerald D. Baldridge, Abigail S. Baldridge,Bruce A. Witthuhn, LeeAnn Higgins, Todd W. Markowski and Ann M. Fallon, Proteomic profiling of a robust *Wolbachia* infection in an *Aedes albopictus* mosquito cell line. Molecular Microbiology (2014) 94(3), 537–556

15. Wang J, Duncan D, Shi Z, Zhang B. WEB-based GEne SeT AnaLysis toolkit (WebGestalt): update 2013. Nucleic Acids Res. 2013;41:W77–83.

16. Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. Nucleic Acids Res.2005;33(Web Server issue):W741–8

17. Candiano et al Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. Electrophoresis. 2004 May;25(9):1327-33.

18. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD,et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem.1985;150:76–85.

19. Jacek R Wiśniewski, Alexandre Zougman, Nagarjuna Nagaraj & Matthias Mann Universal sample preparation method for proteome analysis Nature Methods 6, 359 - 362 (2009)