

Διατριβή Μ.Δ.Ε
Γεώργιος Βαλλιανάτος

**Μελέτη υποκινητών γονιδίων που εκφράζονται στους σιελογόνους
αδένες της *D.melanogaster* και στο μεσέντερο του *A.gambiae*.**

Πανεπιστήμιο Κρήτης
Τμήμα Βιολογίας

Ηράκλειο 1998

SUMMARY

The first part of the thesis describes the identification of a promoter region of the *Drosophila melanogaster* salivary gland specific gene LysP. This promoter region is capable of directing the expression of a reporter gene specifically in the salivary glands of the adult fly. This promoter segment could be a useful tool to study the expression, in the salivary gland, of transmission blocking antigens of the malaria parasites. It could also be useful for expressing several *Anopheles gambiae* genes in the salivary glands of *Drosophila melanogaster*.

In the second part of the thesis the nutritional response of fruitflies transformed with *Anopheles gambiae* trypsin gene promoter (Antryp1) was assessed. In several deletions of the Antryp1 gene promoter it was shown that a small genomic segment of the promoter was sufficient to confer the nutritional response. This segment has previously been shown to confer the tissue specificity of expression.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο πρώτο μέρος αυτής της εργασίας προσδιορίστηκε ένα τμήμα από τον υποκινητή ενός γονιδίου Λυσοζύμης της *D.melanogaster*, το LysP, ικανό να δώσει έκφραση στους σιελογόνους αδένες του ενηλικού ατόμου. Αυτός ο υποκινητής θα μπορούσε να φανεί χρήσιμος σε πειράματα για transmission-blocking immunity της ελονοσίας.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας παρατηρήθηκε η διατροφική απόκριση μετασχηματισμένων ατόμων της *D.melanogaster* που έφεραν κατασκευές με ελείψεις από τον υποκινητή του γονιδίου Antrypl του *A.gambiae*. Η έκφραση του γονιδίου αναφοράς μεταβαλλόταν ανάλογα με το περιεχόμενο της τροφής. Η ανάλυση του υποκινητή προσδιόρισε ότι τα cis ρυθμιστικά στοιχεία που παρέχουν την ειδικότητα για την μεταβολή στην έκφραση του γονιδίου ανάλογα με την τροφή εδράζονται στο ίδιο τμήμα της αλληλουχίας που προσδίδει και την ιστοειδικότητα.

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ελονοσία, τα παράσιτα και οι φορείς τους.

Η ελονοσία είναι η πιο σημαντική παρασιτική ασθένεια. Αν και για τις ανεπτυγμένες χώρες, συμπεριλαμβανομένης της Ελλάδας, δεν αποτελεί παρά μια μακρινή σχετικά ανάμνηση, για πολλά από τα κράτη του Νότιου Ημισφαιρίου συνιστά μια μάστιγα. Εκτιμάται ότι περίπου 1-3 εκατομμύρια άνθρωποι πεθαίνουν κάθε χρόνο από Ελονοσία μεταξύ των οποίων τα περισσότερα είναι βρέφη και μικρά παιδιά. Το 40% του πληθυσμού της Γης, δηλ. περισσότεροι από 2 δισεκατομμύρια άνθρωποι ζουν σε περιοχές όπου ενδημεί η νόσος. Το πρόβλημα είναι ιδιαίτερα σοβαρό για τις χώρες της Τροπικής Αφρικής όπου συναντάται το 90% των κρουσμάτων. Για τις φτωχές οικονομικά χώρες του Νοτίου Ημισφαιρίου η ελονοσία αποτελεί ένα άλλο δυσβάσταχτο φορτίο.

Η ασθένεια οφείλεται σε πρωτόζωα του γένους *Plasmodium*. Ενδιάμεσος ξενιστής αυτού του πρωτόζωου είναι τα κουνούπια του γένους *Anopheles* που μεταδίδουν τα παράσιτα στον άνθρωπο και σε άλλα σπονδυλωτά μέσω της νύξης του δέρματος για την απομύζηση αίματος. Μόνο τα θηλυκά κουνούπια τρέφονται με αίμα για να πάρουν τις απαραίτητες θρεπτικές ουσίες (κυρίως αμινοξέα) ώστε να σχηματίσουν τα αυγά. Ο βιολογικός κύκλος των πλασμοδίων περιγράφεται συνοπτικά στην Εικόνα 1.

Τέσσερα μορφολογικώς διακριτά είδη των παρασίτων της ανθρώπινης

ελονοσίας έχουν εντοπισθεί: Τα *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* και *Plasmodium ovale*. Το πρώτο προκαλεί και την μεγαλύτερη θνησιμότητα.

Από τον μεγάλο αριθμό ειδών του *Anopheles* τα είδη *Anopheles gambiae*, *A. arabiensis* και *A. funestus* συνιστούν τους αποτελεσματικότερους φορείς των πλασμοδίων της ανθρώπινης ελονοσίας. Ο *A. gambiae* είναι ο αποτελεσματικότερος φορέας από όλα τα είδη.

Το γεγονός ότι στην Τροπική Αφρική εντοπίζεται το μεγαλύτερο μέρος του προβλήματος οφείλεται κυρίως στην ύπαρξη των 3 προαναφερθέντων ειδών του *Anopheles*. Την αποτελεσματικότητα του *A. gambiae* ως φορέα της νόσου καταδεικνύει η επιδημία ελονοσίας στην Βραζιλία το 1938. Εκείνη την χρονιά το είδος εισήχθη τυχαία στην χώρα και ακολούθησε μια σφοδρή επιδημία έχοντας ως κατάληξη τον θάνατο 14.000 ανθρώπων μέσα σε λιγότερο από 8 μήνες. Η εξάλειψη του *A. gambiae* από την Βραζιλία οδήγησε και στον δραστικότερο περιορισμό των κρουσμάτων της ασθένειας.

Διάφοροι παράγοντες συνεισφέρουν στην ικανότητα ενός είδους να μεταδίδει τα παράσιτα, αλλά οι 2 σπουδαιότεροι είναι η διάρκεια ζωής του κουνουπιού και η τάση του να τρέφεται με ανθρώπινο αίμα (πολλά είδη είναι κοσμοπολιτικά όσον αφορά την επιλογή του ξενιστή, π.χ. τρέφονται και με αίμα άλλων σπονδυλωτών). Τα τρία προαναφερθέντα είδη εκπληρούν αυτές τις προϋποθέσεις. Επιπλέον προσαρμόζονται ταχύτατα σε αλλαγές του περιβάλλοντος ,που προκαλούνται από τον ανθρώπινο εποικισμό και την γεωργία. Αυτή η ηθολογική "πλαστικότητα" συνάγεται από την συχνά

παρατηρούμενη ικανότητα των ειδών *A. gambiae* και *A. arabiensis* να παρουσιάζουν τάχιστα νέα πλαίσια συμπεριφοράς, όπως για παράδειγμα την εναλλαγή από την εσωφαγία (αιματοφαγία σε εσωτερικούς χώρους) στην εξωφαγία (αιματοφαγία σε εξωτερικούς χώρους) σε αντίδραση προγραμμάτων εντομοκτονίας.

Οι Προσπάθειες για την καταπολέμηση της ελονοσίας

Το ιδιαίτερα σοβαρό πρόβλημα υγείας και οι οικονομικές συνέπειες για τις χώρες προκάλεσε την ανάγκη για ένα πρόγραμμα εξάλειψης της ασθένειας στα τέλη της δεκαετίας του 60. Το κύριο όπλο αυτού του προγράμματος το αποτέλεσε το γνωστό εντομοκτόνο DDT, με την μακρά υπολλειματική δράση. Τελικά έγινε κατορθωτή η εξάλειψη της ελονοσίας στην Ευρώπη και επιτεύχθηκε μεγάλη μείωση των κρουσμάτων σε πολλές περιοχές της γης εκτός των χωρών της Τροπικής Αφρικής, όπου το πρόγραμμα δεν εφαρμόστηκε. Δοκιμαστικές προσπάθειες για τον έλεγχο της νόσου σε λίγες χώρες της Αφρικής, όπως η Νιγηρία δεν απέδωσαν (Collins and Paskewitz, 1995). Η αποτυχία οφείλεται στην προσαρμοστικότητα του *A. gambiae*, στην ικανότητά του να αναπαράγεται ταχύτατα, στον μεγάλο αριθμό των πληθυσμών του, στις διάφορες οικολογικές προσαρμογές του και στην γρήγορη εμφάνιση ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα.

Άλλη στρατηγική καταπολέμησης που εφαρμόστηκε αλλά και συνεχίζει να εφαρμόζεται πειραματικά είναι η βιολογική. Αυτή συνίσταται κυρίως στην χρήση οργανισμών που τρώνε τις προνύμφες των κουνουπιών

(ψάρια) ή στην χρήση παθογόνων και παρασίτων (ιών, μυκήτων, νηματωδών και πρωτοζώων).

Ίσως ο πιο παλιός τρόπος περιορισμού της νόσου είναι η παρεμπόδιση της επαφής των κουνουπιών με τον άνθρωπο. Χρησιμοποιήθηκαν γι' αυτό απωθητικές ουσίες (φυσικές ή τεχνητές στις μέρες μας) ή φυσικοί φραγμοί π.χ. κουνουπιέρες.

Ένα άλλο μέτρο είναι η χημειοθεραπεία, η χορήγηση δηλαδή φαρμακευτικών ουσιών στους ανθρώπους για την καταπολέμηση των παρασίτων ή την προφύλαξη των υγιών ατόμων. Το πρόβλημα με την χρήση τέτοιων ουσιών είναι ότι πολλά στελέχη των παρασίτων έχουν αποκτήσει ανθεκτικότητα ενώ υπάρχουν και πρακτικά εμπόδια, για παράδειγμα το δυσβάστακτο οικονομικά κόστος που συνεπάγεται για τις φτωχές χώρες.

Η παρασκευή εμβολίων είναι ένας άλλος τομέας που βρίσκεται σε εντατική έρευνα. Έως τώρα όμως δεν έχουν ανακαλυφθεί εμβόλια που να παρέχουν αποτελεσματική προστασία.

Η Μοριακή Γενετική και Βιολογία στην υπηρεσία της καταπολέμησης της ελονοσίας

Το περιστατικό της Βραζιλίας δείχνει με τον καλύτερο τρόπο ότι το πρόβλημα της ελονοσίας οφείλεται κατά κύριο λόγο στον φορέα της. Τα τελευταία χρόνια οι έρευνες για την καταπολέμηση της ασθένειας έχουν αρχίσει να επικεντρώνονται όχι σε τρόπους εξαφάνισης ή ελάττωσης των πληθυσμών των κουνουπιών αλλά σε μεθόδους αντικατάστασης των φυσικών πληθυσμών με άλλους που να είναι ανίκανοι να υποστηρίξουν την

κανονική ανάπτυξη των παρασίτων (Collins and Besansky, 1994). Ένα σημαντικό πλεονέκτημα μιας τέτοιας μεθοδολογίας είναι, ότι αντίθετα με ότι συμβαίνει με σχέδια που βασίζονται σε ελάττωση των πληθυσμών με εντομοκτόνα, δεν υπόκειται σε γρήγορη πληθυσμιακή ανάκτηση από μετανάστευση ή αναπαραγωγή.

Είναι γνωστό ότι τα έντομα έχουν κι αυτά αμυντικό σύστημα εναντίον των μολύνσεων. Έχουν βρεθεί στελέχη του *A. gambiae* τα οποία αντιστέκονται στην μόλυνση με πλασμώδια με διαφορετικούς μηχανισμούς. Ως παράδειγμα αναφέρεται ένα τέτοιο στέλεχος το οποίο λύει τους ωοκινέτες αμέσως μετά την διείσδυσή τους στα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου. Οι προσπάθειες που γίνονται για την χαρτογράφηση του γονιδιώματος του *A. gambiae* θα συμβάλλουν μαζί με άλλες τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας στον εντοπισμό γονιδίων που εμπλέκονται στο μηχανισμό άμυνας εναντίον των παρασίτων (James, 1992).

Οι έρευνες όμως επικεντρώνονται και στην δημιουργία κουνουπιών γενετικά τροποποιημένων, ώστε να εμποδίζεται η ανάπτυξη του παρασίτου μέσα σε αυτά. Όπως συνάγεται από τον βιολογικό κύκλο των πλασμωδίων μέσα στο κουνούπι, δύο είναι τα όργανα όπου συμβαίνουν σημαντικά γεγονότα για την ανάπτυξη του παρασίτου: οι σιελογόνοι αδένες και το μεσέντερο.

Εικάζεται ότι η πορεία των παρασίτων μέσα στον φορέα απαιτεί την αλληλεπίδραση μορίων του μικροοργανισμού με μόρια-υποδοχείς του φορέα. Εάν κατορθωθεί η εισαγωγή μιας κατασκευής ανασυνδυασμένου DNA στο κουνούπι, η οποία θα εκφράζει αντιπαρασιτικούς παράγοντες

στον κατάλληλο ιστό (π.χ. μεσέντερο) ,είναι δυνατόν να θανατωθεί το παράσιτο ή να εμποδιστεί η πορεία του μέσα στο κουνούπι. Με λίγα λόγια αυτή η μέθοδος στοχεύει το παράσιτο και όχι τον ίδιο τον φορέα. Το επόμενο βήμα θα ήταν η απελευθέρωση τέτοιων διαγονιδιακών κουνουπιών στο περιβάλλον με στόχο την αντικατάσταση του φυσικού πληθυσμού.

Μια λογική σκέψη που θα ενέκλειε σκεπτικισμό για μια τέτοια επιχείρηση, θα αντιπαρέβαλλε το επιχείρημα ότι το παράσιτο θα είναι ικανό να μεταλλάσσεται και επομένως να ξεφεύγει από οποιοδήποτε φραγμό που θα του βάζαμε, καθώς η ικανότητα προσαρμογής των πλασμοδίων είναι αρκετά μεγάλη (Miller, 1992). Όμως υπάρχουν και ισχυρά επιχειρήματα που εναντιώνονται σε μια τέτοια σκέψη. Είναι γνωστό ότι οι ελονοσίες των σπονδυλωτών μεταδίδονται αποκλειστικά από κουνούπια του γένους *Anopheles*. Αν και είδη όπως αυτά της υποοικογένειας *Culicinae* τσιμπούν αρκετά συχνά ανθρώπους μολυσμένους με τα παράσιτα, κανένα από αυτά δεν μεταδίδει την ασθένεια. Βγαίνει λοιπόν το συμπέρασμα ότι πρέπει να υπάρχει κάποιος φραγμός στην ανάπτυξη του παρασίτου σε τέτοια κουνούπια, ώστε τα τελευταία να μην μπορούν να τον ξεπεράσουν.

Η εισαγωγή αντιπαρασιτικών γονιδίων στους πληθυσμούς των κουνουπιών προϋποθέτει πρόοδο σε αρκετούς τομείς:

α) την ανάπτυξη της τεχνολογίας για την εισαγωγή τέτοιων γονιδίων στο DNA του κουνουπιού.

β) την ανάπτυξη μηχανισμών για την εξάπλωση τέτοιων γονιδίων στους φυσικούς πληθυσμούς. Η χρήση μεταθετών στοιχείων με τις ιδιότητες του P στοιχείου της Δροσόφιλας θα ήταν ευχής έργον και για την εκπλήρωση της

α) προϋπόθεσης.

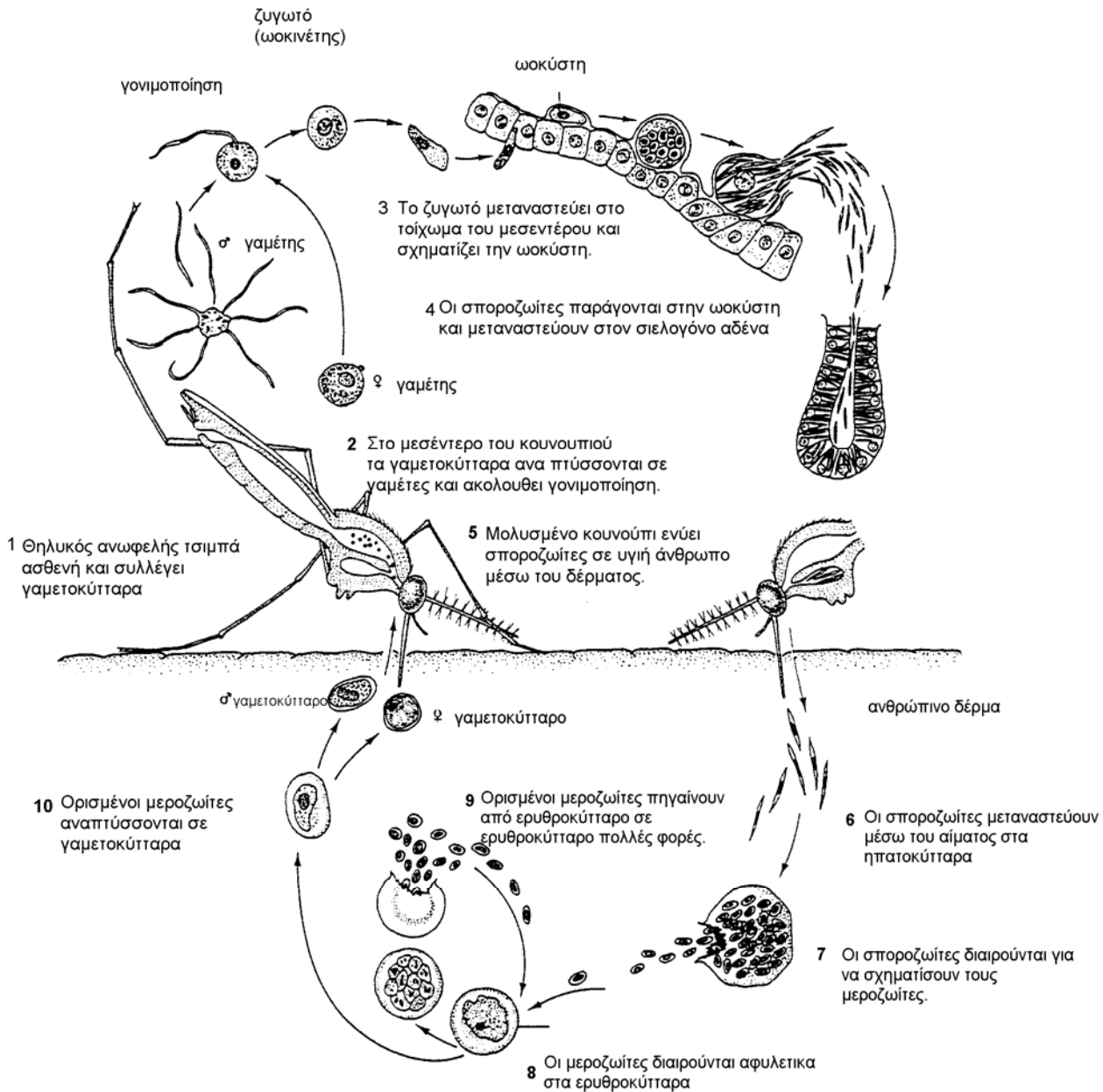
γ) η αντικατάσταση των φυσικών πληθυσμών από ανθεκτικούς (γενετικά τροποποιημένους ή μη) εξαρτάται και από τις γνώσεις που υπάρχουν για τις εποχιακές και γεωγραφικές κατανομές των φορέων. Στο είδος *A. gambiae* υπάρχει μια συνεχής διαδικασία ενδοειδικής ειδογένεσης με αποτέλεσμα να δημιουργούνται αδελφά είδη ειδικά προσαρμοσμένα σε μικροπεριβάλλοντα ή άλλες καταστάσεις. Επειδή ο στόχος είναι να διασκορπιστούν γονίδια ανθεκτικότητας στους φυσικούς πληθυσμούς, είτε με μεταθετά στοιχεία είτε με πληθυσμιακή αντικατάσταση, είναι απαραίτητες οι μελέτες για την διαπίστωση της αναπαραγωγικής συμβατότητας των πληθυσμών. Τέτοιες μελέτες βασίζονται στην διάγνωση των ειδών του συμπλέγματος *A. gambiae* με μοριακές μεθόδους (Favia et al., 1994).

Παράλληλα με τους 3 στόχους που αναφέρθηκαν παραπάνω η έρευνα είναι εντατική για τον χαρακτηρισμό εκείνων των μορίων που είναι υπεύθυνα για την ειδική αλληλεπίδραση παρασίτου και φορέα για ομαλή ολοκλήρωση του βιολογικού τους κύκλου στο κουνούπι. Η έρευνα επικεντρώνεται ακόμα και στον εντοπισμό των κατάλληλων υποκινητών ή άλλων ρυθμιστικών περιοχών που θα εκφράζουν τους πιθανούς αντιπαρασιτικούς παράγοντες στο κατάλληλο όργανο και στον κατάλληλο χρόνο έτσι ώστε να επιτυγχάνεται ταυτόχρονα η βέλτιστη δράση εναντίον του παρασίτου και ο μη επηρεασμός προς το χειρότερο της προσαρμοστικότητας του φορέα.

Δεδομένου ότι η ελονοσία αποτελεί ακόμα ένα πολύ σημαντικό πρόβλημα σε αρκετές περιοχές του Νότιου Ημισφαιρίου και υπάρχει μια

τάση για επαναεμφάνισή της σε περιοχές όπου έχει εκριζωθεί, οι ελπίδες για τον περιορισμό της βασίζονται πλέον κατά το μεγαλύτερο μέρος στις μεθόδους που παρέχει η Μοριακή Γενετική και Βιολογία. Επιπλέον η επιτυχής κατάληξη της μάχης κατά της ασθένειας θα αποτελέσει και ένα μοντέλο και για άλλες παρασιτικές ασθένειες που μεταδίδονται από αιματοφάγα έντομα.

ΕΓΓΕΝΕΣ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΣΤΟ ΚΟΥΝΟΥΠΙ



ΑΓΕΝΕΣ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

ΕΙΚΟΝΑ 1. Σχηματική περιγραφή του βιολογικού κύκλου των πρωτοζώων που ανήκουν στο γένος *Plasmodium*

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι σιελόγονοι αδένες του Ανωφελή αποτελούν έναν σημαντικό σταθμό στη πορεία του παρασίτου σε αυτό το έντομο. Οι σποροζωίτες, που παράγονται από την ωοκύστη, μεταναστεύουν στους σιελογόνους αδένες και όταν το κουνούπι τσιμπήσει ένα υγιές άτομο ενύει τα παράσιτα μέσω του δέρματος καθώς εκκρίνει σάλιο (εικόνα 1, γενική εισαγωγή).

Πειραματικά έχει δειχθεί ότι ανοσοποιημένα ποντίκια με αντιγόνα που υπάρχουν στην επιφάνεια διαφόρων σταδίων των πλασμοδίων (ειδικά αυτών που υπάρχουν στο μεσέντερο) εμποδίζουν την ανάπτυξη των παρασίτων μέσα σε αυτό το όργανο και την μετανάστευσή τους επομένως στους σιελογόνους αδένες του κουνουπιού. Τα περισσότερα πειράματα έχουν γίνει με την χρησιμοποίηση ως αντιγόνου μιας επιφανειακής πρωτεΐνης του ωοκινέτη του *Plasmodium berghei*, ενός παρασίτου υπεύθυνου για μια μορφή ελονοσίας των τρωκτικών (Ranawaka et al., 1993; Matsuoka et al., 1994).

Αυτές οι παρατηρήσεις έχουν γεννήσει μια σχετικά νέα ιδέα καταπολέμησης της νόσου: Την ιδέα μιας γενικής ανοσοποίησης του ανθρώπινου πληθυσμού σε περιοχές που ενδημεί η ελονοσία με αντισώματα εναντίον κάποιων πρωτεϊνών από τα στάδια του παρασίτου μέσα στο μεσέντερο του Ανωφελή που είναι σημαντικές για την αλληλεπίδραση παρασίτου και φορέα. Δηλαδή ο στόχος είναι η όσο το δυνατόν δραστικότερη μείωση των κρουσμάτων ελονοσίας με την παρεμπόδιση της ανάπτυξης του παρασίτου μέσα στον Ανωφελή ώστε τα έντομα να αδυνατούν να μεταδώσουν την νόσο όταν θα τσιμπούν υγιή άτομα (transmission blocking immunity). Μια τέτοια στρατηγική καταπολέμησης της νόσου απαιτεί ανοσοποίηση των ανθρωπίνων πληθυσμών με μαζικούς εμβολιασμούς. Στις φτωχές όμως χώρες που μαστίζονται από την ελονοσία ένας τέτοιος κλίμακας εμβολιασμός αποτελεί δυσβάστακτο οικονομικό φορτίο λαμβανομένου υπ' όψη και της ανάγκης για πρόσβαση των κατοίκων στα κέντρα εμβολιασμού. Μια ιδέα για την αντιμετώπιση των οικονομικών δυσχερειών που απορέουν από αυτή την στρατηγική την έχει σκεφτεί ο καθηγητής Julian Crampton από πανεπιστήμιο του Liverpool. Σε αυτή την περίπτωση οι φορείς του εμβολίου θα είναι τα ίδια τα κουνούπια τα οποία θα εκφράζουν στους σιελογόνους αδένες το ή τα κατάλληλα αντιγόνα (εικόνα 1). Τον ρόλο της σύριγγας επομένως θα τον παίζει η προβοσκίδα του εντόμου. Η επιτυχής ανοσοποίηση του ανθρώπου θα απαιτεί πιθανότατα

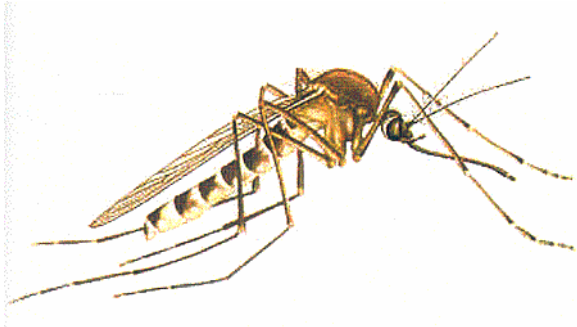
πολλά τσιμπήματα απο τέτοια γενετικά τροποποιημένα κουνουπια ώστε να επιτευχθεί η κατάλληλη δόση του αντιγόνου για την ανοσοποίηση.Επομένως τα διαγονιδιακά κουνούπια θα πρέπει να αποτελούν ένα σημαντικό ποσοστό μέσα στον πληθυσμό τους.

Για την δημιουργία τέτοιων διαγονιδιακών κουνουπιών θα πρέπει να εισαχθεί στο γονιδίωμα του Ανωφελή μια κατασκευή που θα περιέχει τον κατάλληλο υποκινητή για την έκφραση του αντιγόνου.Ο γενετικός μετασχηματισμός του Ανωφελή δεν έχει γίνει κατορθωτός ως τα τώρα και επιπλέον δεν έχει κλωνοποιηθεί κάποιο γονίδιο που να εκφράζεται στους σιελογόνους αδένες του.Για αυτούς τους λόγους υπήρξε η ιδέα για να χρησιμοποιηθεί η Δροσόφιλα ως μοντέλο στην οποία είναι γνωστή η ύπαρξη ενός γονιδίου που εκφράζεται στους σιελογόνους αδένες της (Kylsten et al.,1992).

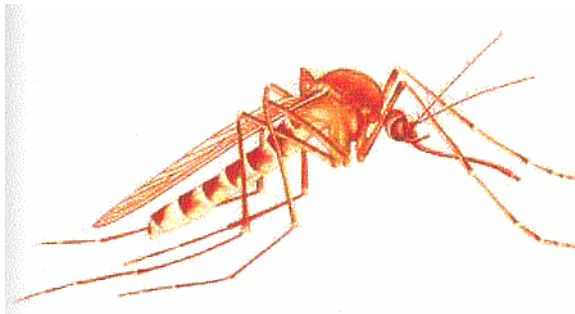
Το γονίδιο LysP της *Drosophila melanogaster*,για το οποίο ο λόγος,κωδικοποιεί μια λυσοζύμη.Οι λυσοζύμες είναι γνωστό ότι υδρολύουν β-(1-4)-γλυκοζιτικούς δεσμούς στο τοίχωμα πεπτιδογλυκάνης των βακτηρίων.Οι λυσοζύμες απαντώνται σχεδόν σε όλους τους οργανισμούς από τους βακτηριοφάγους μέχρι τα ανώτερα θηλαστικά.Παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα εναντίον των μολύνσεων και στα θηλαστικά έχουν βρεθεί στα μακροφάγα κύτταρα καθώς και στις βλενώδεις εκκρίσεις όπως τα δάκρυα και το σάλιο.Μια ειδική προσαρμογή παρατηρείται στο πεπτικό σύστημα των μυρηκαστικών όπου οι λυσοζύμες χρησιμοποιούνται για την απελευθέρωση θρεπτικών ουσιών από τα συμβιωτικά βακτήρια.Όσον αφορά τα έντομα είναι από παλιά γνωστό ότι αυτά τα ένζυμα αποτελούν μέρος του συστήματος των αντιμικροβιακών πεπτιδίων που απελευθερώνονται στην αιμολέμφο σε απόκριση στην μόλυνση με παθογόνους μικροοργανισμούς.

Το LysP ανήκει σε μια ομάδα γονιδίων της Δροσόφιλας που όλα κωδικοποιούν λυσοζύμες και βρίσκονται στον ίδιο γενετικό τόπο (εικόνα 2).Είναι το μόνο από την ομάδα που εκφράζεται στους σιελογόνους αδένες και αποκλειστικά στα ενήλικα άτομα (Daffre et al.,1994).Η παρατήρηση ότι τα επίπεδα των μεταγράφων του μειώνονται μετά την ένεση στο έντομο βακτηριδίων έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα οτι η λυσοζύμη P πιθανώς να εκκρίνεται με το σάλιο για να συμβάλλει στην προεντερική πέψη των βακτηρίων ,ίσως στον πρόλοβο (crop) , όπου η ενήλικη μυίγα αποθηκεύει την τροφή για μεγάλα χρονικά διαστήματα (εικόνα 3).

Για τους παραπάνω λόγους προσπαθήσαμε να προσδιορίσουμε ένα τμήμα του υποκινητή από το γονίδιο που να περιέχει τα cis-ρυθμιστικά στοιχεία που προσδίδουν ιστοειδικότητα στην έκφραση.



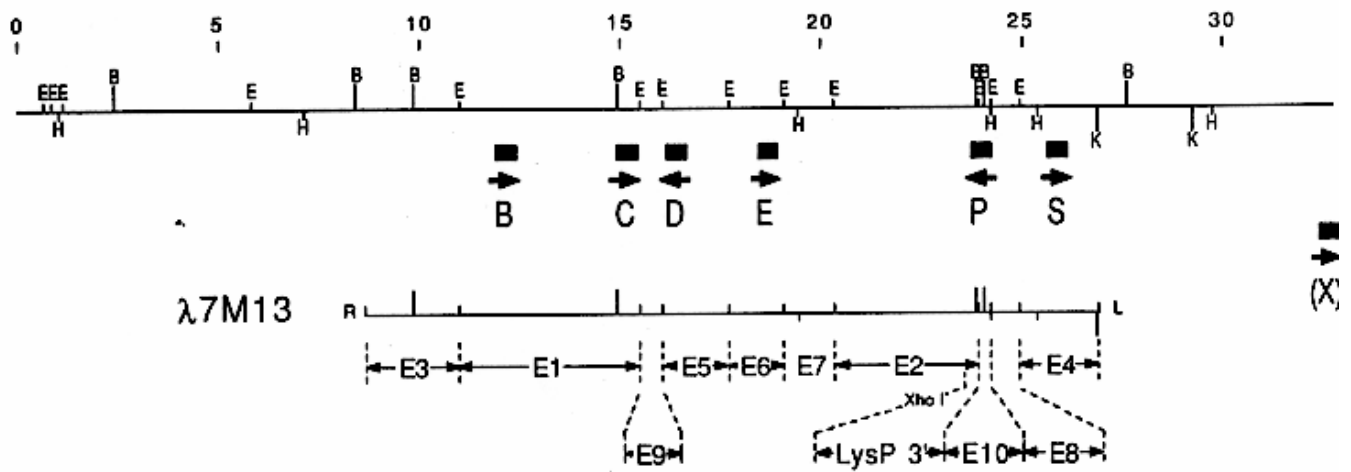
Κουνούπι (όχι φορέας των παρασίτων), που εκφράζει στους σιελογόνους του αδένες μια πρωτεΐνη του ωοκινέτη ,τσιμπά και ανοσοποιεί έναν άνθρωπο



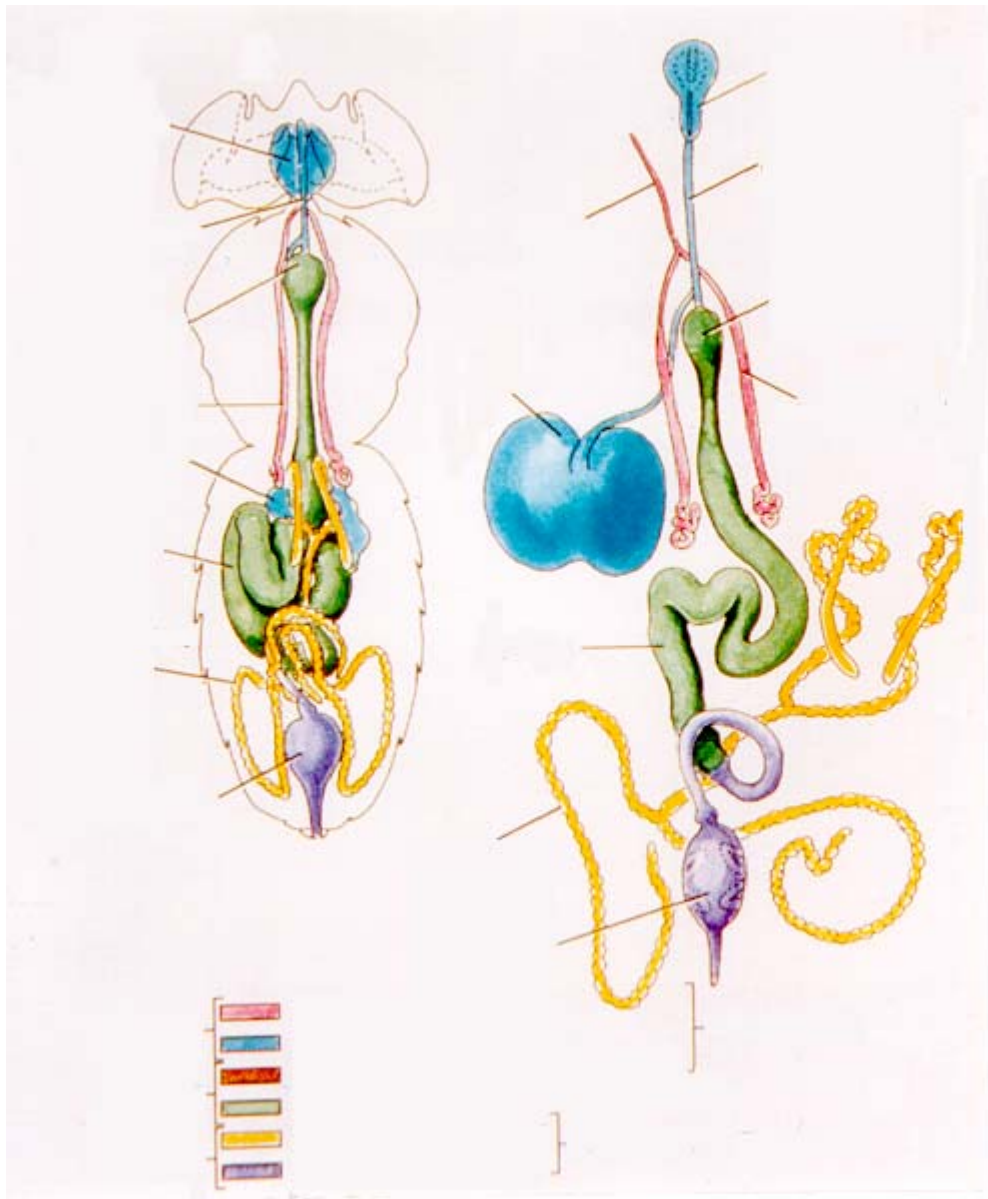
Ανοσοποιημένο άτομο

Όταν ένα κουνούπι, που φέρει τα πλασμώδια, απομυζήσει αίμα από ανοσοποιημένο άτομο, η ανάπτυξη του ωοκινέτη στο μεσέντερο του κουνουπιού εμποδίζεται. Αυτό το κουνούπι δεν θα μπορεί να μεταφέρει τα παράσιτα σε άλλους ανθρώπους

ΕΙΚΟΝΑ 1. Σχηματική αναπαράσταση της ιδέας της χρησιμοποίησης των κουνουπιών ως φορείς των αντιγόνων για την transmission-blocking immunity της Ελονοσίας



ΕΙΚΟΝΑ 2. Ο γενετικός τόπος των 7 γονιδίων Λυσοζύμης της *Drosophila melanogaster*. Παρουσιάζονται και οι υποκλώνοι από τον κλωνοποιηθέντα τόπο στον φάγο (Daffre et al., 1994). Οι υποκλωνοποιήσεις έγιναν στο πλασμίδιο pTZ18R (Pharmacia). Τα βέλη κάτω από τα μαύρα κουτιά (γονίδια) υποδεικνύουν την κατεύθυνση της μεταγραφής τους. Ο υποκλώνος E8, που χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία της κατασκευής LysPEco, ήταν προσφορά του καθηγητή Dan Hultmark (Πανεπιστήμιο της Στοκχόλμης).



ΕΙΚΟΝΑ 2. Το πεπτικό σύστημα της Δροσόφιας.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δημιουργία της κατασκευής LysPEco

Με σκοπό την απομόνωση τμήματος από τον υποκινητή του γονιδίου LysP ο υποκλώνος E8 (εικόνα 2) υπέστη πέψη με το ένζυμο EcoRI και το θραύσμα μεγέθους 700bp που πρέκυψε κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pCaSpeR-AUG-βgal (εικόνα 4). Η κατασκευή που δημιουργήθηκε ονομάστηκε LysPEco και ο σωστός προσανατολισμός του κλωνοποιηθέντος θραύσματος σε σχέση με το γονίδιο LacZ διαπιστώθηκε με πέψη με το ένζυμο SacII .

Μετασηματισμός της *Drosophila melanogaster* και συνθήκες καλλιέργειας μυγών

Μετασηματίστηκαν άτομα του στελέχους y;w⁶⁷²³ με βάση την μέθοδο των Rubin and Spradling (1982). Για τον μετασηματισμό χρησιμοποιήθηκε η κατασκευή LysPEco και ως βοηθητικό πλασμίδιο το p25.7 wc (Karess and Rubin, 1984). Οι μυίγες αναπτύσσονταν σε θερμοκρασία 25° C στο σύνηθες μέσο (μαγιά/καλαμποκάλευρο/ζάχαρη/άγαρ) και σε φωτοπερίοδο 12h φως:12h σκοτάδι.

Ανάλυση κατά Southern

Απομονώθηκε γονιδιωματικό DNA από ομόζυγες μυίγες 7 διαφορετικών διασταυρώσεων χρησιμοποιώντας την μέθοδο της ουρίας (Holmes and Bonner, 1973). Με σκοπό τον εντοπισμό του αριθμού των ενθέσεων σε κάθε σειρά, ακολούθησε πέψη 4μg DNA από κάθε παρασκευή με EcoRI και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Η μεταφορά του DNA έγινε σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης (Hybond-N, AMERSHAM) και η μονιμοποίηση με θέρμανση στους 80 °C για 2 ώρες. Ως ραδιοσημασμένος ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό θραύσμα των 700bp που σημάνθηκε με την μέθοδο της τυχαίας εκκίνησης (random priming) χρησιμοποιώντας α-[P³⁵]-dATP και α-[P³⁵]-dCTP (Sambrook et al., 1989). Οι

υβριδοποιήσεις έγιναν σε θερμοκρασία 65 °C και οι τελικές πλύσεις σε διάλυμα 0.004 M Na(P), 0.005 SDS. Η έκθεση έγινε στον Molecular Imager (BIO-RAD). Από την ανάλυση επιλέχθηκαν 2 διαγονιδιακές σειρές για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό του υποκινητή. Η μια σειρά (#47B) περιείχε μια μοναδική ένθεση της κατασκευής LysPEco ενώ η άλλη (#1K) 2 τέτοιες ενθέσεις.

Ανάλυση των ενηλίκων ατόμων και των όψιμων προνυμφών τρίτου σταδίου (wandering stage) με την ιστοχημική μέθοδο.

Για την διαπίστωση της έκφρασης του LacZ στους σιελογόνους αδένες των ενηλίκων ατόμων εφαρμόστηκε η ιστοχημική μέθοδος (Reichert et al., 1992). Η τομή έγινε στο κατώ μέρος της κοιλιάς και κατά την παρασκευή του διαλύματος χρώσης παραλείφθηκε η φικόλλη. Εξετάστηκαν τουλάχιστον 15 μυίγες από κάθε σειρά και από αυτές του πατρικού στελέχους εξετάστηκαν. Σε όλες τις διαγονιδιακές μυίγες παρατηρήθηκε έντονη χρώση των σιελογόνων αδένων, ενώ κάτι τέτοιο δεν ίσχυε για αυτές του πατρικού στελέχους, ακόμα και μετά την παραμονή τους στο διάλυμα χρώσης για μεγάλο χρονικό διάστημα (εικόνα 5).

Για την μελέτη των όψιμων προνυμφών τρίτου σταδίου (wandering stage) ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία. Σε καμία προνύμφη δεν παρατηρήθηκε χρώση των σιελογόνων αδένων.

Μελέτη των διαγονιδιακών σειρών στα υπόλοιπα στάδια της ανάπτυξης του εντόμου

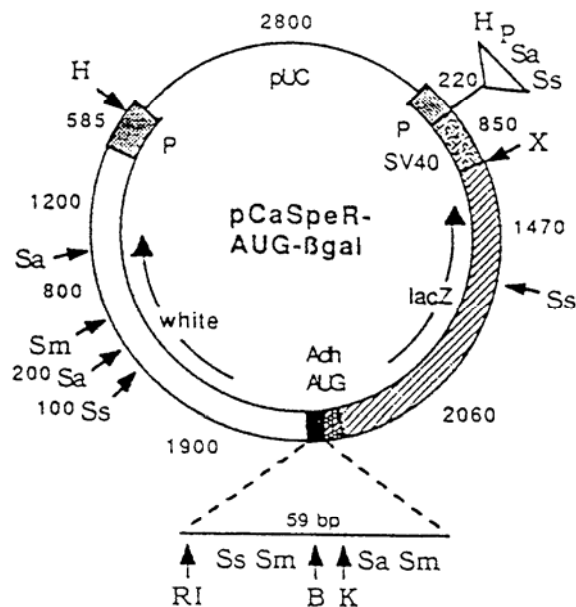
Προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση της κατασκευής LysPEco στα υπόλοιπα στάδια χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή CPRG (Skavdis et al., 1996). Το αντιδραστήριο CPRG (Chlorophenolred-β-D-galactopyranoside) (κιτρίνου χρώματος) διασπόμενο από την προκαρυωτική β-γαλακτοσιδάση δίνει κόκκινη χρώση. Η ενδογενής ευκαρυωτική β-γαλακτοσιδάση έχει πολύ μικρή ειδικότητα για αυτό το υπόστρωμα. Για την σύγκριση, στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν και τα αντίστοιχα αναπτυξιακά στάδια του πατρικού στελέχους.

Για τα έμβρυα και τις προνύμφες πρώτου σταδίου (L1) εξετάστηκαν 2 δείγματα από κάθε στέλεχος. Το κάθε δείγμα περιείχε 20 μl από έμβρυα ή

προνύμφες. Η ποσοτική δοκιμή έδωσε αρνητικές τιμές για τα έμβρυα και τις L1.

Όσον αφορά τις προνύμφες δευτέρου σταδίου (L2) και τις πρώιμες προνύμφες τρίτου σταδίου (L3) εξετάστηκαν 5 δείγματα των 10 ατόμων το καθένα. Οι τιμές της ποσοτικής δοκιμής για αυτά τα αναπτυξιακά στάδια ήταν μηδενικές.

Για τις πρώιμες και τις όψιμες νύμφες εξετάστηκαν 5 δείγματα των 10 ατόμων το κάθε ένα. Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Ο έλεγχος για τις διαφορές των μέσων τιμών έγινε με την Ανάλυση της Διακύμανσης (ANOVA) αφού πρώτα ελέγχθηκε η ομοιογένεια των διασπορών με τον έλεγχο του Bartlett. Οι επιμέρους συγκρίσεις για διαφορές στις μέσες τιμές μεταξύ των 3 πληθυσμών (πατρικού στελέχους και 2 διαγονιδιακών σειρών) έγινε με την μέθοδο του Fisher (Zar, 1996). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πακέτο Systat 5.



Εικόνα 4. Ο πλασμδιακός φορέας pCaSpeR-AUG-βgal με τις περιοριστικές θέσεις του (Thummel et al., 1989). Ως σκελετός για τη κατασκευή του χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pUC8 με την θέση του (ori) για την έναρξη της αντιγραφής. Επιπλέον περιέχει ένα στοιχείο P που δεν κωδικοποιεί τρανσποσάση, το γονίδιο white, το γονίδιο LacZ, μια περιοχή MCS (polylinker), ένα τμήμα του γονιδίου Adh της *Drosophila melanogaster* μεγέθους 127bp και ένα τμήμα DNA του ιού SV40 μεγέθους 850bp. Το τμήμα του Adh έχει ενωθεί με το LacZ ακριβώς πριν από το πλαίσιο διαβάσματος του δευτέρου. Με αυτόν τον τρόπο, το παραγόμενο μετάγραφο καθίσταται αναγνωρίσιμο από τον μεταφραστικό μηχανισμό της Δροσόφιλας. Το τμήμα του SV40 έχει εντεθεί στο 3' άκρο του LacZ αμέσως μετά το κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης, προσφέροντας έτσι στο LacZ το σήμα και την αλληλουχία πολυαδενυλίωσης με σκοπό, την σταθερότητα του μεταγράφου.

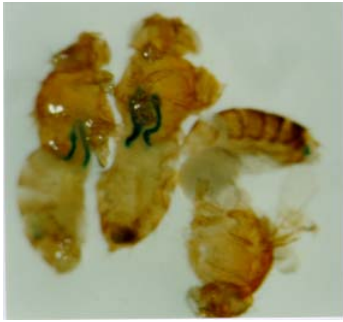
RI : EcoRI
: HindIII
Ss : SstI
: XhoI

Sm : SmaI
B : BamHI

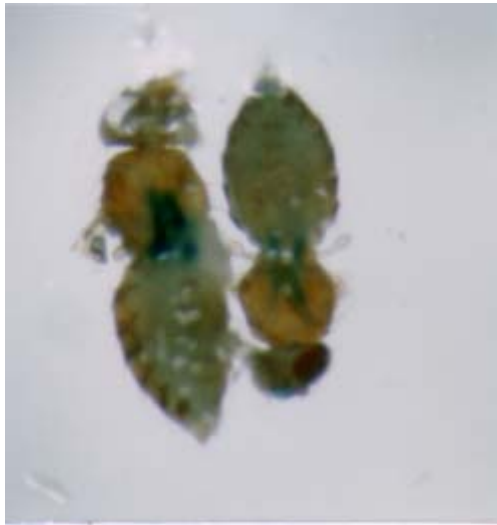
K : KpnI
Sa : SalI

H
X

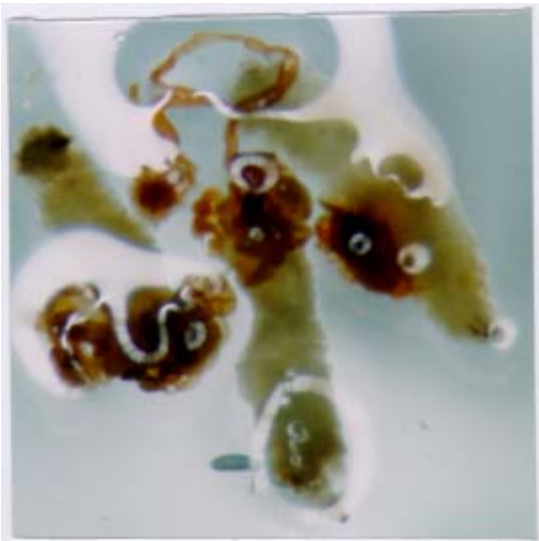
A



B



Γ



ΕΙΚΟΝΑ 5. Ιστολογικός εντοπισμός του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης.

A). Στην μέση εικονίζεται ένα άτομο της σειράς #47B και αριστερά του μια μύγα της σειράς #1K. Άκρη δεξιά εικονίζεται ένα άτομο του πατρικού στελέχους. **B).** Χρώση των σιελογόνων αδένων σε άτομα άλλων διαγονιδιακών σειρών που προέκυψαν από τον μετασχηματισμό με την κατασκευή LyspEco. **Γ).** Προνύμφες τρίτου σταδίου (wandering stage). Στην μέση εικονίζεται μια προνύμφη του πατρικού στελέχους και εκατέρωθεν προνύμφες των διαγονιδιακών στελεχών.

A

<i>Σειρές</i>	Ενεργότητα	P₁	P₂
y;w (1)	3.9 ±0.6	0	0.811
1K (2)	3.7 ±0.5	0.811	0
47B (3)	5.9 ±1.1	0.001	0..088

B

<i>Σειρές</i>	Ενεργότητα	P₁	P₂
y;w (1)	3.4±0.7	0	<0.001
1K (2)	6.0±0.9	<0.001	0
47B (3)	3.1±0.4	0.549	0.001

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν με τις δοκιμές CPRG στις προνύμφες. Παρουσιάζονται και οι τυπικές αποκλίσεις των μέσων τιμών. Οι τιμές **P** αντιπροσωπεύουν τις πιθανότητες που προέκυψαν με τις κατά ζεύγη συγκρίσεις χρησιμοποιώντας τον έλεγχο του Fisher.

A) Ο πίνακας με τα αποτελέσματα στις πρώιμες προνύμφες (early pupae).

B) Ο πίνακας με τα αποτελέσματα στις όψιμες προνύμφες (late pupae).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τα αποτελέσματα μετασχηματισμού της *Drosophila melanogaster* με την κατασκευή LysPEco προκύπτει το συμπέρασμα ότι σε αυτό το τμήμα του υποκινητή μεγέθους 700 bp εδράζονται τα απαραίτητα *cis* ρυθμιστικά στοιχεία που δίνουν την ιστοειδικότητα στην έκφραση του γονιδίου. Είναι χαρακτηριστικό ότι η έκφραση του γονιδίου αναφοράς περιορίζεται στους σιελογόνους αδένες του εντόμου και δεν επεκτείνεται και στον σιελογόνο αγωγό, μια κατάσταση ακριβώς όμοια με αυτή που παρατηρήθηκε στα πειράματα των Daffre et al., 1994 όπου διερευνήθηκε η έκφραση του mRNA στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου.

Στα έμβρυα και στις προνύμφες πρώτου, δευτέρου και τρίτου σταδίου δεν παρατηρήθηκε έκφραση του LacZ. Αντιθέτως, με την δοκιμή CPRG παρατηρήθηκε έκφραση στα στάδια των νυμφών και των διαγονιδιακών και του πατρικού στελέχους. Δεν αποκλείεται η μορφή του ενδογενούς ενζύμου σε αυτά τα στάδια να έχει διαφορετικές ιδιότητες από αυτήν του ενηλίκου με αποτέλεσμα μεγαλύτερη ειδίκευση για το CPRG αντιδραστήριο. Επιπλέον στις νύμφες το ενδογενές ένζυμο παρουσιάζει υψηλά επίπεδα σε όλους τους ιστούς (Ashburner, 1989). Πιθανόν οι διαφορές στα στάδια των νυμφών μεταξύ των διαγονιδιακών στελεχών και του πατρικού στελέχους να οφείλονται και σε φαινόμενα αποτελέσματος θέσης στο γονιδίωμα (πίνακας 1).

Αυτή την περίοδο στο εργαστήριο του καθηγητή Julian Crampton (Imperial College) γίνονται πειράματα με διαγονιδιακές μύγες που εκφράζουν στους σιελογόνους αδένες τους την πρωτεΐνη Pbs21 χρησιμοποιώντας τον υποκινητή του LysP. Ο στόχος είναι να ελεγχθεί η ικανότητα αυτού του αντιγόνου να επάγει παρεμπόδιση της μετάδοσης των πλασμοδίων όταν τα κουνούπια τρέφονται με αίμα από ποντίκια ανοσοποιημένα με το αντιγόνο που παρήχθη από τους σιελογόνους αδένες της Δροσόφιλας. Οι συνθήκες σε αυτή την περίπτωση προσομοιάζουν περισσότερο με αυτές που θα υπήρχαν αν τα πειράματα γίνονταν με διαγονιδιακά κουνούπια μια και έχει παρατηρηθεί ότι η αποτελεσματικότητα των αντιγόνων για την επαγωγή της transmission-blocking immunity επηρεάζεται και από τις διαφορές στην μεταμεταφραστική επεξεργασία των εκφραζόμενων αντιγόνων (Matsuoka, 1996). Τέλος αυτό το τμήμα από τον υποκινητή του LysP μπορεί να φανεί χρήσιμο σε περιπτώσεις που είναι επιθυμητή η έκφραση πρωτεϊνών του *A. gambiae* στους σιελογόνους αδένες της Δροσόφιλας.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το μεσέντερο του Ανωφελή είναι το όργανο στο οποίο συμβαίνουν κρίσιμα στάδια της ανάπτυξης των πλασμοδίων. Στο μεσέντερο σχηματίζεται ο ωοκινέτης, διαπερνά το τοίχωμά του και προσκολλάται στην εξωτερική επιφάνεια όπου σχηματίζει την ωοκύστη (εικόνα 1, Γενική εισαγωγή). Το μεσέντερο αποτελεί το "διαμέρισμα" όπου συμβαίνει η κυρίως πέψη της τροφής. Είναι ένα περιβάλλον με πλήθος πεπτικών ενζύμων που παράγονται και εκκρίνονται από ειδικά επιθηλιακά κύτταρα. Πιθανολογείται ότι τόσο ουσίες του πεπτούμενου αίματος όσο και πεπτικά ένζυμα συμβάλλουν στην ιδιότητα του Ανωφελή να αποτελεί τον φορέα για τα παράσιτα της ελονοσίας. Επομένως η κλωνοποίηση και ο χαρακτηρισμός γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα του μεσεντέρου θα έχει σημαντικές επιπτώσεις στην διαλεύκανση της φυσιολογίας της πέψης του αίματος ,καθώς και στον προσδιορισμό των "βημάτων" που απαιτούνται για την αλληλεπίδραση των παρασίτων και του φορέα. Επιπλέον η απομόνωση τέτοιων γονιδίων είναι απαραίτητη και για τον χαρακτηρισμό των ρυθμιστικών περιοχών που ελέγχουν την έκφρασή τους και θα είναι δυνατή η χρησιμοποίησή τους για τη δημιουργία διαγονιδιακών κουνουπιών που θα εκφράζουν αντιπαρασιτικούς παράγοντες στο μεσέντερο. Ελπιδοφόρες ενδείξεις για παρεμπόδιση της ανάπτυξης των παρασίτων στο κουνούπι έχουν δώσει πειράματα όπου αναστολή μιας χιτινάσης του παρασίτου , που

του χρησιμεύει για να διασχίσει την περιτροφική μεμβράνη (μεμβράνη που σχηματίζεται στο μεσέντερο γύρω από το αίμα και αποτελείται κυρίως από πρωτεΐνες χιτίνη και άλλους υδατάνθρακες) κατέστησαν μη δυνατή τη δημιουργία του ωοκινέτη (Shahabuddin et al., 1993).

Η πέψη του αίματος και οι θρυψίνες

Η πέψη του αίματος στα αιματοφάγα έντομα είναι παρόμοια με αυτή των άλλων ζωικών οργανισμών και πραγματοποιείται από υδρολυτικά ένζυμα του μεσεντέρου, όπως πρωτεάσες, εστεράσες και ένζυμα που υδρολύουν σάκχαρα. Με αυτό τον τρόπο τα μακρομόρια της τροφής τεμαχίζονται σε μικρότερα απορροφήσιμα μόρια.

Για το λόγο ότι το αίμα των σπονδυλωτών αποτελείται κυρίως από πρωτεΐνες, οι πρωτεάσες παίζουν τον κύριο ρόλο στην πέψη. Τα πρωτεϊνικά μόρια διασπώνται σε πολυπεπίδια από τις ενδοπεπτιδάσες του τύπου των θρυψινών και χυμοθρυψινών και ακολουθεί η διάσπαση σε αμινοξέα ή διπεπίδια από ενδοπεπτιδάσες όπως η αμινοπεπτιδάσες και καρβοξυπεπτιδάσες. Τα τελικά προϊόντα της πέψης του αίματος θα χρησιμοποιηθούν από το κουνούπι για τη δημιουργία των αυγών.

Η σύνθεση των ενδοπεπτιδασών πραγματοποιείται στο επιθήλιο του μεσεντέρου και στις περισσότερες περιπτώσεις επάγεται από την παρουσία του αίματος. Διάφορα είδη ερεθισμάτων φαίνεται να εμπλέκονται στην σύνθεση και έκκριση των ενζύμων: νευρικά, μηχανικά, οσμωτικά και χημικά. Η εικόνα είναι ακόμα ατελής, αλλά υπάρχουν ενδείξεις προς την κατεύθυνση κάποιου χημικού ερεθίσματος ως τον πιο σημαντικό παράγοντα

για την επαγωγή της σύνθεσης των θρυψινών (Briegel and Lea, 1975).

Οι θρυψίνες

Οι θρυψίνες είναι από τις πρωτεάσες αυτές που παράγονται στην μεγαλύτερη ποσότητα από το μεσέντερο των κουνουπιών. Ανήκουν στην κατηγορία των σερινοπρωτεασών, έχουν δηλαδή μια σερίνη στο ενεργό τους κέντρο. Υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς μετά από θέσεις όπου υπάρχουν τα αμινοξέα λυσίνη ή αργινίνη. Είναι ιδιαίτερος συντηρημένα ένζυμα και απαντούνται από τους μύκητες έως και στα ανώτερα θηλαστικά. Η δράση τους στην διαδικασία της πέψης έγκειται και στην δυνατότητα που έχουν να ενεργοποιούν άλλες πρωτεάσες που είναι αποθηκευμένες στο μεσέντερο με την μορφή ζυμογόνων π.χ. χυμοθρυψινογόνα.

Ο φυσιολογικός ρόλος πρωτεασών σερίνης δεν εξαντλείται μόνο στην πέψη. Είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στην πορεία της πήξης του αίματος στα σπονδυλωτά και σε στάδια που προηγούνται της μεταγωγής σήματος, όπως για παράδειγμα τα προϊόντα των γονιδίων snake και easter. Τα τελευταία κωδικοποιούν ένζυμα που έχουν ενεργότητα πρωτεασών σερίνης και μετέχουν σε μια σειρά πρωτεολυτικών αντιδράσεων για τον σχηματισμό του ραχιαιοκοιλιακού άξονα στην Δροσόφιλα (Chasan and Anderson, 1989; Stein et al., 1991). Επιπροσθέτως, ορισμένες πρωτεάσες σερίνης λαμβάνουν μέρος και στην μεταμόρφωση των εντόμων (Pino-Heiss and Schubiger, 1989). Γονίδια που κωδικοποιούν θρυψίνες έχουν απομονωθεί σε αρκετά Δίπτερα (Yun and Davis, 1989; Elvin et al., 1993; Ramos et al., 1993; Kalkok et al., 1993; Casu et al., 1994).

Οι θρυψίνες στα κουνούπια

Αν και ενεργότητες θρυψινών έχουν παρατηρηθεί εδώ και χρόνια στο μεσέντερο των κουνουπιών (Clements, 1992) , μόνο σε 2 είδη έχουν κλωνοποιηθεί αντίστοιχα γονίδια.

Στο *Aedes aegypti* έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηρισθεί 2 γονίδια θρυψινών. Το ένα ανήκει στην ομάδα που κωδικοποιεί θρυψίνες που παράγονται από το μεσέντερο του θηλυκού αμέσως μετά το γεύμα αίματος (Noriega et al., 1996). Το mRNA του γονιδίου υπάρχει στο μεσέντερο και μεταφράζεται στο προϊόν μόνο παρουσία του αίματος (Noriega et al., 1996). Το 2ο γονίδιο κωδικοποιεί θρυψίνη που ανήκει στην ομάδα των ενζύμων που παράγονται περί τις 12 ώρες μετά το γεύμα αίματος και είναι υπεύθυνο για το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεολυτικής ενεργότητας στο μεσέντερο (Barillas-Mury, 1993). Η ενζυματική ενεργότητα της πρώιμης θρυψίνης είναι απαραίτητη για την σύνθεση της όψιμης αν και φαίνεται να απαιτείται και κάποιο άλλο συστατικό για την μέγιστη σύνθεση της δεύτερης (Barillas-Mury, 1995).

Στο *Anopheles gambiae* έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηρισθεί γονίδια θρυψινών ομαδοποιημένα σε ένα τμήμα του γενώματος μεγέθους ~ 11 Kb (Muller et al., 1993) τα οποία και δεν περιέχουν ιντρόνια.

Ότι πληροφορία υπάρχει για αυτά τα γονίδια συνοψίζεται στα ακόλουθα:

- Όλα τα γονίδια κωδικοποιούν θρυψίνες γεγονός που έχει αποδειχθεί και πειραματικά.

- Όλες οι θρυψίνες , εκτός από τις Antryp5 και Anteryp6 , περιέχουν αλληλουχίες που θεωρούνται υπεύθυνες για αυτοενεργοποίηση πράγμα που έχει αποδειχθεί in vitro.

Κατ'αναλογία με τις θρυψίνες του *Aedes aegypti* διακρίνονται σε πρώιμες και όψιμες. Οι θρυψίνες Antryp3,4,5,6 και Antrypt φθάνουν στην μέγιστη έκφρασή τους την δεύτερη ημέρα της ζωής του ενηλίκου εντόμου, ενώ κατά την διάρκεια των επόμενων ημερών το ποσό των μεταγράφων τους αυξάνεται συνεχώς. Η κορυφή στα επίπεδα της έκφρασής τους την δεύτερη ημέρα συμπίπτει με την πλήρως ανεπτυγμένη "διάθεση" του θηλυκού εντόμου για αναζήτηση τροφής.

- Από τις πρώτες (λεγόμενες και συστατικές) θρυψίνες η Antryp4 έχει την υψηλότερη έκφραση. Μέσα στις πρώτες ώρες μετά την λήψη αίματος το ποσό του mRNA που προέρχεται από τις συστατικές θρυψίνες μειώνεται δραματικά και έπειτα από 9 ώρες μόνο το mRNA της Antryp4 υπάρχει σε ίχνη (Muller et al., 1995)

Έπειτα από όλα αυτά οι συστατικές θρυψίνες μεταγράφονται ξανά παρουσιάζοντας μια κορυφή 28 ώρες μετά την λήψη αίματος.

- Οι θρυψίνες Antryp1 και 2 επάγονται με το αίμα. Η Antryp2 δεν ανιχνεύεται ακόμα και με τις πιο ευαίσθητες τεχνικές σε νηστικά θηλυκά, ενώ επάγεται σε αρκετά χαμηλά επίπεδα σε σχέση με την 1.

Η Antryp1 δείχνει πολύ υψηλή έκφραση μετά την τροφή του αίματος. Επιπλέον εκφράζεται, αν και σε χαμηλά επίπεδα, πριν το αίμα. Η Antryp1 είναι η μόνη από τις θρυψίνες που εκφράζεται και σε αρσενικά κουνούπια καθώς και σε προνύμφες.

- Χρησιμοποιώντας αντισώματα για τις Antryp1, 2 και 4 έχειδειχθεί ότι εντοπίζονται είτε στο επιθήλιο είτε στον αυλό του οπισθίου τμήματος του μεσεντέρου όπου συμβαίνει και η κυρίως πέψη στα κουνούπια. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι οι Antryp1 και 4 εκκρίνονται στο μεσέντερο πιθανώς έπειτα από διάταση του οργάνου ή από κάποιο ωσμωτικό stress, δηλ. βρίσκονται αποθηκευμένες με την μορφή των πρόδρομων ανενεργών μορφών τους (ζυμογόνα).
- In vitro πειράματα με τις Antryp1 και 2 έχουν δείξει ότι αυτές οι θρυψίνες καθιστούν ενεργές τις χυμοθρυψίνες του *A. gambiae* που παράγονται από 2 αιματοεπαγόμενα γονίδια πιθανολογώντας την ύπαρξη ενός πρωτεολυτικού καταράκτη αντιδράσεων παρόμοιου με αυτό των σπονδυλωτών, που εμπλέκει την ενεργοποίηση του χυμοθρυψινογόνου από θρυψίνες.

Όλα τα ευρήματα οδηγούν στην δημιουργία του παρακάτω μοντέλου για την ακολουθία των γεγονότων της πέψης του αίματος στο μεσέντερο του *A. gambiae* (Lemos et al., 1996).

Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο οι συστατικές θρυψίνες μαζί με την Antryp1 εκκρίνονται στο μεσέντερο πιθανώς μετά από διάτασή του καθώς γεμίζει με αίμα. Τα ένζυμα αυτά ενεργοποιούνται και λειτουργούν ως αισθητήρες, κάνουν μια πρώτη διάσπαση στο περιεχόμενο απελευθερώνοντας κάποια μόρια-σήματα (ίσως πεπτίδια). Αυτό το σήμα πολλαπλασιάζεται με κάποιο άγνωστο μηχανισμό για να καταλήξει στην μεταγραφή των αιματοεπαγόμενων γονιδίων θρυψινών και πιθανώς και άλλων υδρολυτικών ενζύμων. Απουσία πρωτεϊνικού υποστρώματος, όπως

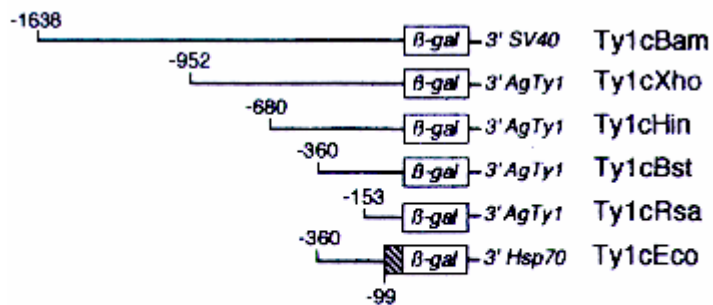
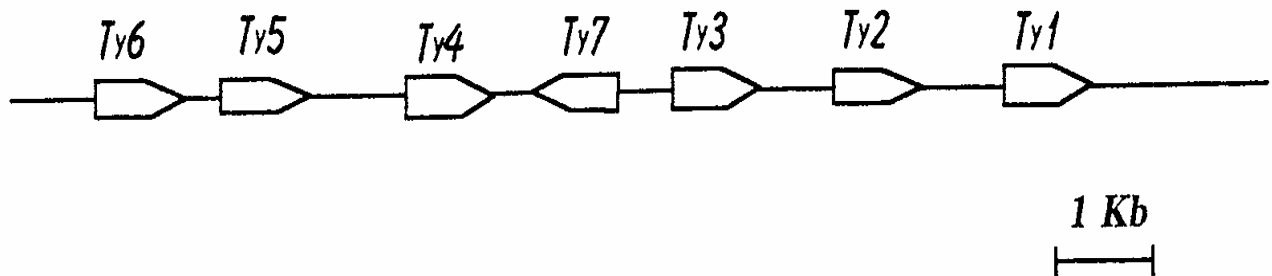
συμβαίνει στην περίπτωση που τα θηλυκά τρέφονται με σάκχαρα, δεν παράγεται κανένα σήμα και δεν επάγονται οι όψιμες θρυψίνες. Ένα παρόμοιο μοντέλο έχει προταθεί και για την περίπτωση του *Aedes aegypti* (Barillas-Murry et al., 1995).

Το πρότυπο της έκφρασης των *Antryp1* και *2* τόσο τοπικά όσο και χρονικά τα καθιστά ιδανικούς υποψήφιους για την χρήση τους σε κατασκευές χιμαιρικών πλασμιδίων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για να εκφράζουν αντι-παρασιτικούς παράγοντες στο μεσέντερο του κουνουπιού εφ'όσον καταστεί δυνατή η εφαρμογή της διαγονιδιακής τεχνολογίας στον *A. gambiae*.

Η λειτουργικότητα τμημάτων από τον υποκινητή και από την 3'περιοχή των γονιδίων *Antryp1* και *2* έχει μελετηθεί στην *Drosophila melanogaster* (Skavdis et al., 1996). Παρ' όλη την μακρινή εξελικτική απόσταση των 2 Διπτέρων οι *cis*-ρυθμιστικές περιοχές αυτών των 2 θρυψινών είναι ικανές να δώσουν ιστοειδικότητα στην έκφραση του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης. Δημιουργώντας ελλείψεις στην περιοχή του υποκινητή έχει απομονωθεί ένα τμήμα μεγέθους ~260bp από το *Antryp1* και ένα άλλο ~ 420bp από το *Antryp2* ικανά να δώσουν έκφραση στο οπίσθιο τμήμα του μεσεντέρου της *Drosophila*. Αν και δεν είναι η πρώτη φορά που η Δροσόφιλα αναγνωρίζει υποκινητές εντόμων που απέχουν εξελικτικά εκατομμύρια χρόνια (Mitsialis and Kafatos, 1985; Xiong and Jacobs-Lorena, 1995) παρατηρήθηκε ότι για τις μεν διαγονιδιακές μύγες που έφεραν τον υποκινητή του *Antryp1* υπήρχε έκφραση και στα στάδια των προνυμφών κάτι που δεν συμβαίνει στο κουνούπι. Διαπιστώθηκε λοιπόν ότι η

ειδικότητα που προσφέρει ο υποκινητής του Antryp1 αλλάζει στο νέο γενετικό του περιβάλλον. Για τον υποκινητή του Antryp2 διαπιστώθηκε ότι οι ιδιότητές του παραμένουν οι ίδιες και στην Δροσόφιλα.

Το γεγονός ότι εν γένει οι υποκινητές των 2 γονιδίων αναγνωρίζονται από την Δροσόφιλα δίνει τις προϋποθέσεις για να διερευνηθεί η λειτουργικότητα των υποκινητών στο επίπεδο της έκφρασης στην αλλαγή του διατροφικού περιεχομένου. Αυτή η διερεύνηση αποτέλεσε και τον στόχο του β' μέρους αυτής της εργασίας. Οι διαγονιδιακές μυίγες που έφεραν τις κατασκευές με τις ελλείψεις από τον υποκινητή του Antryp1 (εικόνα 1β) χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς στην παρουσία κανονικής τροφής ή τροφής που δεν περιέχει πρωτεΐνες αλλά μόνο σάκχαρα. Οι σειρές με τις κατασκευές από τον Antryp2 υποκινητή δεν δοκιμάστηκαν λόγω του ότι οι διαγονιδιακές μυίγες παράγουν σε χαμηλά επίπεδα την LacZ πρωτεΐνη, μια κατάσταση που είναι ανάλογη με αυτή του κουνουπιού. Αυτό θα είχε πιθανώς ως συνέπεια μια αλλαγή στην έκφραση του γονιδίου αναφοράς ως απόκριση στο περιεχόμενο της τροφής να μην ήταν εύκολο να ανιχνευθεί.



ΕΙΚΟΝΑ 1. Α). Η γενωμική οργάνωση των γονιδίων των 7 θρυψινών που εκφράζονται στο μεσέντερο του *Anopheles gambiae*.

Β). Οι κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό του υποκινητή. Όλες περιέχουν ελείψεις από την περιοχή του υποκινητή του *Antryp1*. Η κατασκευή Ty1cBam περιέχει στο 3' άκρο της 850bp από τον SV40 που περικλείει τις αλληλουχίες πολυαδενυλίωσης που παρέχονται από τον πλασμιδιακό φορέα μετασχηματισμού. Οι υπόλοιπες, εκτός της Ty1cEco, φέρουν μια αλληλουχία 387bp, που αρχίζει 5bp μετά το κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης του *Antryp1*. Η κατασκευή Ty1cEco περιέχει μια έλειψη 99 bp από το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης η οποία έχει αντικατασταθεί από ένα τμήμα του υποκινητή του γονιδίου Hsp70 της *Drosophila melanogaster* που περιέχει το TATA στοιχείο. Επιπλέον αυτή η κατασκευή φέρει τις αλληλουχίες πολυαδενυλίωσης του Hsp70.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ — ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ανάπτυξη και διατήρηση μυϊγών

Οι μυίγες αναπτύσσονταν στο σύνηθες μέσο (μαγιά/καλαμποκάλευρο/ζάχαρη/άγαρ) στους 25 °C και σε φωτοπερίοδο 12 h φως : 12 h σκοτάδι. Όλες οι μεταχειρίσεις έγιναν στους 25 °C και με πληθυσμιακές πυκνότητες όσο το δυνατόν σταθερές.

Στατιστική ανάλυση και αναζητήσεις σε βάσεις δεδομένων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε χρησιμοποιώντας τα λογισμικά πακέτα Microsoft Excell 97 και Systat 5. Η αναζήτηση αλληλουχιών στον υποκινητή για θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων έγινε με το πρόγραμμα FindPatterns του GCG.

Μελέτη των διαγονιδιακών σειρών για την αποκρίσή τους στη στέρηση διαίτας πλούσιας σε πρωτεΐνη.

Μυίγες, ηλικίας 0-4 ημερών, από κάθε διαγονιδιακή σειρά (εικόνα 1) χωρίστηκαν σε 2 πληθυσμούς. Η μία ομάδα παρέμεινε σε κανονική τροφή για 48 ώρες ενώ η δεύτερη ομάδα παρέμεινε σε διάλυμα σακχαρόζης 10% για το ίδιο χρονικό διάστημα. Μετά το πέρας των μεταχειρίσεων οι μυίγες χωρίζονταν σε 10 δείγματα των 10 ατόμων το καθένα, με ίση κατανομή των φύλων, και εφαρμοζόταν η ποσοτική μέθοδος για τον προσδιορισμό της β-γαλακτοσιδάσης (Skavdis et al., 1996). Για να αποκλεισθεί η πιθανότητα, οποιοσδήποτε διαφορές παρατηρούνταν μεταξύ ταϊσμένων (κανονική τροφή) και πεινασμένων (σακχαρόζη) μυϊγών να οφείλετο σε μια γενική επίδραση του υποσιτισμού σε όλα τα γονίδια, χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ένα στέλεχος της δροσόφιλας που περιέχει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης υπό τον έλεγχο του ενισχυτή του γονιδίου Actin5C (#582, nosSco/CyO, P{w+mC=act-lacZ.B}CB-1). Το στέλεχος

αυτό υποβαλόταν στην ίδια μεταχείριση με αυτά των άλλων διαγονιδιακών σειρών.

Για να ελεγχθεί η υπόθεση ότι στα διαγονιδιακά στελέχη που "πέιναν" τα επίπεδα του ενζύμου της β-γαλακτοσιδάσης ήταν χαμηλότερα από τα αντίστοιχα των στελεχών που τρέφονταν κανονικά, εφαρμόστηκε η μονοσήμαντη t-δοκιμή (one-tailed t-test) αφού προηγουμένως ελέγχθηκε η ομοιογένεια των διασπορών με το F-test. Στις λίγες περιπτώσεις που δεν τηρούνταν τα κριτήρια της ισότητας των διασπορών (ετεροσκεδαστικότητα) ο έλεγχος της υπόθεσης έγινε με την χρήση της Mann-Whitney δοκιμής. Ο στατιστικός έλεγχος εφαρμόστηκε στα δεδομένα που προέκυπταν από τις δοκιμές CPRG αφού λαμβάνονταν οι τιμές για κάθε δείγμα μετά το πέρας 2 ωρών από την έναρξη της αντίδρασης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν OD₅₉₅/mg ολικής πρωτεΐνης. Σε κάθε περίπτωση γινόταν σύγκριση των μέσων τιμών για τις 2 μεταχειρίσεις σε κάθε σειρά.

Σε όλες τις σειρές, εκτός της #50, που περιείχαν τις κατασκευές με τον υποκινητή του Antrypl παρατηρήθηκαν σημαντικά μεγαλύτερα επίπεδα του ενζύμου στις μυίγες που τρέφονταν κανονικά (πίνακας 1, εικόνες 2 και 3). Αντίθετα στο στέλεχος με τον υποκινητή του Actin5C δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην ποσότητα του ενζύμου και στις 2 μεταχειρίσεις.

Μελέτη των διαγονιδιακών σειρών για την απόκρισή τους σε δίαιτα πλούσια σε πρωτεΐνη.

Ωριμες νύμφες (late pupae) από κάθε διαγονιδιακή σειρά και από το στέλεχος με τον ενισχυτή του Actin5C συλλέχθηκαν και αφέθησαν να εκκολαφθούν σε μπουκάλια που περιείχαν αντί της κανονικής τροφής βαμβάκια εμποτισμένα με διάλυμα σακχαρόζης 10%. Εκεί παρέμειναν 4 ημέρες και εν συνεχεία διαχωρίστηκαν σε 2 υποπληθυσμούς. Στον ένα χορηγήθηκε η συνηθισμένη τροφή ενώ ο άλλος συνέχισε να τρέφεται με το διάλυμα σακχαρόζης. Μετά το πέρας 2 ημερών οι μυίγες χωρίζονταν σε 10 δείγματα των 10 ατόμων το καθένα, με ίση κατανομή των φύλων, και εφαρμοζόταν η ποσοτική μέθοδος για την β-γαλακτοσιδάση.

Για να ελεγχθεί η υπόθεση ότι οι διαγονιδιακές μυίγες που τους χορηγήθηκε η κανονική τροφή παράγαγαν μεγαλύτερη ποσότητα του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε η μονοσήμαντη t-δοκιμή (one way t-test) αφού προηγουμένως ελέγχθηκε η ισότητα των διασπορών με τον F-έλεγχο. Στις περιπτώσεις που δεν υπήρχε το κριτήριο της ομοσκεδαστικότητας ο έλεγχος

της υπόθεσης έγινε με την χρήση του Mann-Whitney test. Ο έλεγχος βασιζόταν στην σύγκριση των μέσων τιμών για τις 2 μεταχειρίσεις σε κάθε σειρά.

Σε όλες τις σειρές ,εκτός της #50 , οι τιμές του ενζύμου ανέβαιναν στις μυίγες που τρέφονταν κανονικά (πίνακας 1B, εικόνες 4 και 5).Εξαίρεση αποτέλεσαν οι μυίγες με τον ενισχυτή του Actin5C.

Μελέτη των διαγονιδιακών σειρών για την επίδραση του φύλου και του διατροφικού περιεχομένου στην έκφραση του LacZ γονιδίου.

Μυίγες από κάθε σειρά ηλικίας 0-4 ημερών χωρίστηκαν με βάση το φύλο .Ο ένας πληθυσμός από κάθε φύλο παρέμενε σε κανονική τροφή για 48 ώρες ενώ ο δεύτερος παρέμεινε σε διάλυμα σακχαρόζης 10% για το ίδιο χρονικό διάστημα. Μετά το πέρας των μεταχειρίσεων οι μυίγες χωρίζονταν σε 10 δείγματα των 10 ατόμων και εφαρμοζόταν η δοκιμή CPRG.Η στατιστική ανάλυση περιελάμβανε συγκρίσεις μεταξύ μυιγών του ίδιου φύλου και σειράς αλλά διαφορετικής μεταχείρισης και μεταξύ μυιγών διαφορετικού φύλου αλλά ίδιας σειράς και μεταχείρισης.Για να διαπιστωθεί αν το φύλο και η διαίτα αλληλεπιδρούν ώστε να επηρεάζουν την ποσότητα του ενζύμου που παράγεται, χρησιμοποιήθηκε ως στατιστικό εργαλείο ελέγχου η διπλοπαραγοντική ανάλυση της διακύμανσης (two-way ANOVA). Η εξαρτημένη μεταβλητή ήταν η ενεργότητα του ενζύμου της β-γαλακτοσιδάσης και οι δύο παράγοντες που ελέγχθηκε η επίδραση τους σε αυτή την ενεργότητα ήταν το φύλο και η διαίτα.Η ομοιογένεια των διασπορών ελέγχθηκε με τον έλεγχο του Bartlett χρησιμοποιώντας την διορθωμένη τιμή M/C.Επειδή σε ελάχιστες περιπτώσεις δεν τηρούνταν τα κριτήρια της ομοιογένειας των διασπορών και επιπλέον σε ορισμένα πειράματα ο αριθμός των δειγμάτων δεν ήταν ο ίδιος σε κάθε κελί (unequal replication) έγινε λογαριθμικός μετασχηματισμός των τιμών και χρησιμοποιώντας τα μετασχηματισμένα δεδομένα έγινε ο παραμετρικός έλεγχος.Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 2 και στις εικόνες 6 και 7.

A

Σειρές	F	S	Δ.Α (F/S)	Κατασκευή	P
#7	77.8±10.3	56.2±8.1	1.38	TylcBam	<0.0001
#10	104.2±7.2	76.9±9.2	1.35	TylcXho	<0.0001
#19	110.1±5.4	87.5±11.9	1.26	»	<0.0001
#25	107.9±7	93.3±5.1	1.15	TylcHin	<0.0001
#29	102.8±8.2	83.8±6.4	1.23	»	<0.0001
#31	100.9±15.3	80.3±11.3	1.26	TylcBst	<0.001
#38	112.9±6.3	89.9±12.6	1.26	»	<0.0001
#61	140.2±12.8	120.5±14.7	1.16	TylcEco	<0.001
#50	0.3±0.4	0.13±0.3		TylcRsa	

B

Σειρές	S	F	Δ.Α (F/S)	Κατασκευή	P
#7	39.9±7.6	71±11	1.78	TylcBam	<0.0001
#10	88.8±10.7	108±4.9	1.22	TylcXho	<0.0001
#19	87.8±10.3	106.1±6.6	1.21	»	<0.0001
#25	68.7±8.9	89.7±8	1.30	TylcHin	<0.0001
#29	46.8±9.2	90.4±10.9	1.93	»	<0.0001
#31	59.1±16.4	90.7±14	1.53	TylcBst	<0.0001
#38	56.5±8.1	90.2±10.9	1.60	»	<0.0001
#61	84.7±5.1	123.7±7	1.46	TylcEco	<0.0001
#50	0.3±0.2	0.3±0.4		TylcRsa	<0.0001

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Συνοπτική παρουσίαση των μέσων τιμών από τις CPRG δοκιμές στις διαγονιδιακές μυίγες. Οι αριθμοί υποδηλώνουν OD₅₉₅ / mg ολικής πρωτεΐνης. Παρουσιάζονται επίσης και οι τυπικές αποκλίσεις των μέσων τιμών.

Δ.Α(Διατροφική απόκριση) : ο λόγος των μέσων τιμών μεταξύ ταϊσμένων και πεινασμένων μυιών .

A: Τα αποτελέσματα από την μελέτη των διαγονιδιακών μυιών για την απόκρισή τους στην στέρηση διαίτας πλούσιας σε πρωτεΐνη.

B: Τα αποτελέσματα από την μελέτη των διαγονιδιακών μυιών για την απόκρισή τους σε διαίτα πλούσια σε πρωτεΐνη.

#7A	55.9±6.5	33.8±5.1	1.65	TylcBam	<0.001	0.184
#7Θ	81.3±10.6	52.4±7.5	1.55			
#10A	96.8±9	71.6±9.9	1.35	TylcXho	<0.001	0.112
#10Θ	132.0±17.8	84.0±6	1.57			
#19A	101.4±9.3	71.9±9.7	1.41	TylcXho	<0.001	0.364
#19Θ	127.9±7.8	85.1±8.5	1.50			
#25A	84.7±11.5	50.0±5.8	1.69	TylcHin	<0.001	0.017 *
#25Θ	130.8±10.4	94.7±14.5	1.38			
#29A	58.6±6.8	31.0±4.3	1.89	TylcHin	<0.001	0.521
#29Θ	125.5±11.5	63.1±9.4	1.99			
#31A	54.4±7.6	37.6±6	1.45	TylcBst	<0.001	0.096
#31Θ	121.1±8.5	72.8±9	1.66			
#38A	72.0±14.7	56.4±4.5	1.28	TylcBst	<0.001	0.024 *
#38Θ	110.4±8.7	70.1±8.9	1.57			
#61A	117.4±11.1	81.6±12.6	1.44	TylcEco	<0.001	0.473
#61Θ	155.3±13.9	114.1±9.6	1.36			
#50A	0.7±0.6	0.1±0.1		TylcRsa		
#50Θ	1.0±1.2	0.06±0.1				

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων από τις CPRG δοκιμές στις διαγονιδιακές μυίγες, που έγιναν για τον εντοπισμό διαφορών στην απόκριση στο περιεχόμενο της δίαιτας με βάση το φύλο.

A: αρσενικά

B: θηλυκά

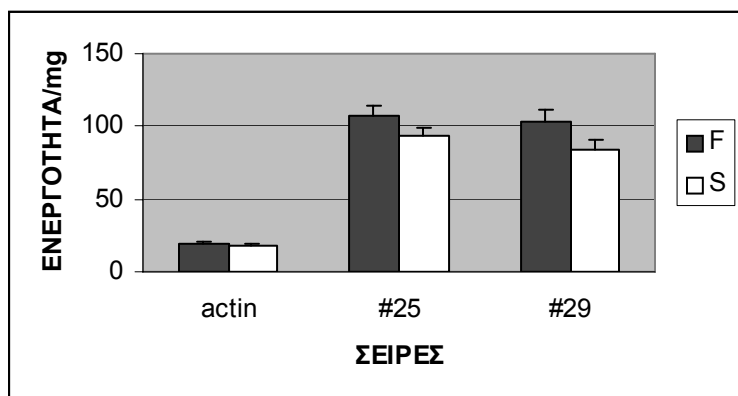
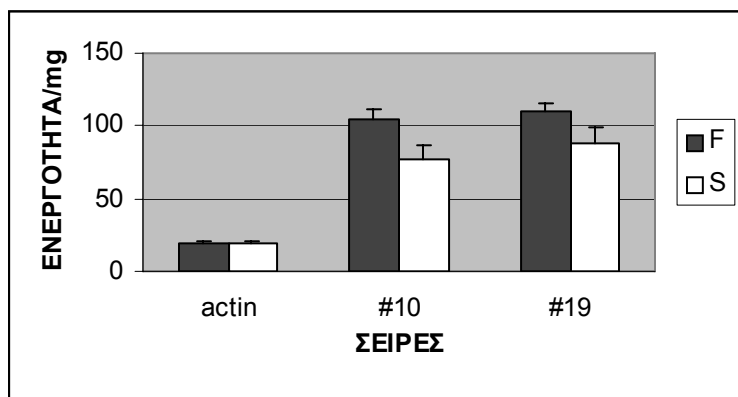
Δ.A : διατροφική απόκριση (ο λόγος ταϊσμένων προς πεινασμένων)

$P_{\text{φύλο}}$: η πιθανότητα που προέκυψε από την στατιστική ανάλυση για την σύγκριση στις μεταβολές της έκφρασης του LacZ μεταξύ μυιγών διαφορετικού φύλου.

$P_{\text{φύλο} \times \text{δίαιτα}}$: η πιθανότητα που προέκυψε από την στατιστική ανάλυση για την διαπίστωση της επίδρασης στην έκφραση του LacZ που επιφέρουν το φύλο και το περιεχόμενο της τροφής.

Η στατιστική ανάλυση έγινε με δεδομένα που προέκυψαν από τον λογαριθμικό μετασχηματισμό όλων των τιμών από όλα τα δείγματα., δηλαδή $X' = \log X$.

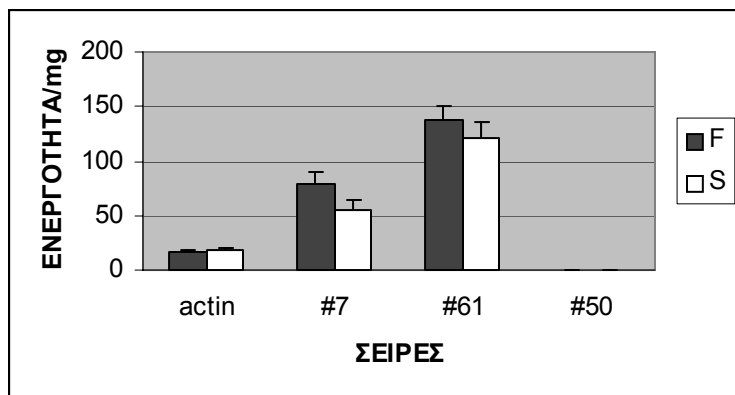
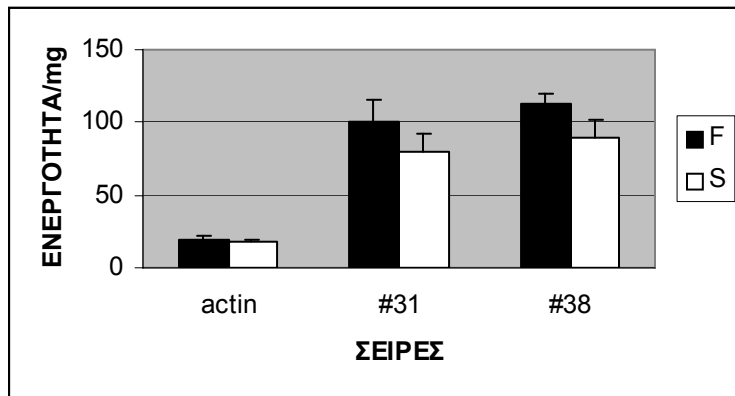
Με αστερίσκο συμβολίζονται οι περιπτώσεις όπου υπήρχε σημαντική διαφορά στην επίδραση των 2 ανεξαρτήτων μεταβλητών (φύλο και διατροφή) σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$.



ΕΙΚΟΝΑ 2 . Ιστογραμμική απεικόνιση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης σε κάθε σειρά.

F: παραμονή σε κανονική τροφή

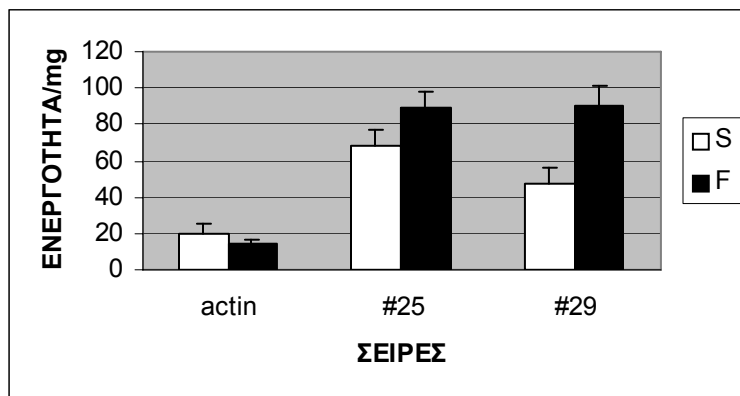
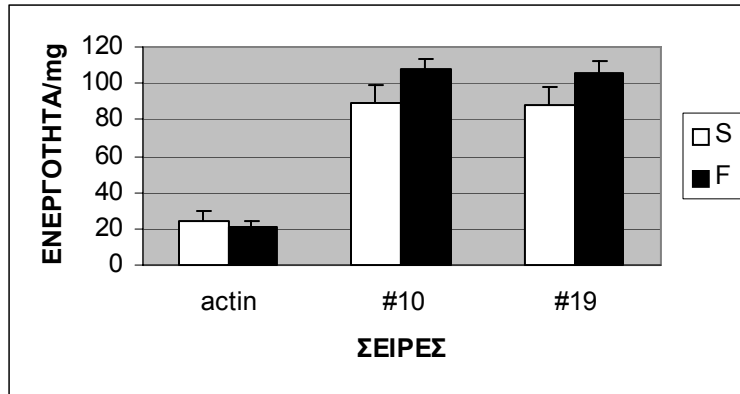
S: παραμονή σε διαλύμα σακχαρόζης.



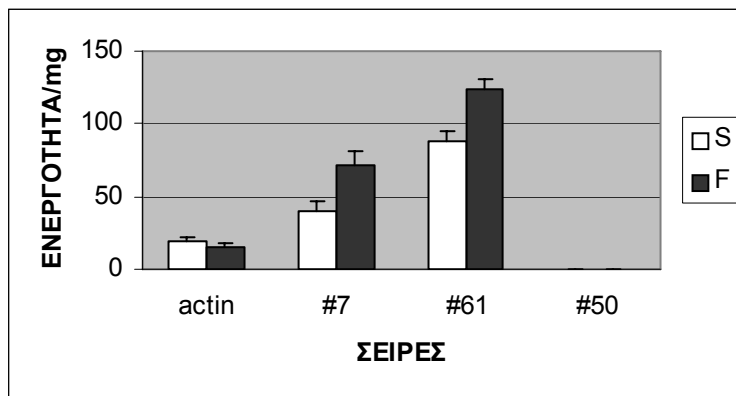
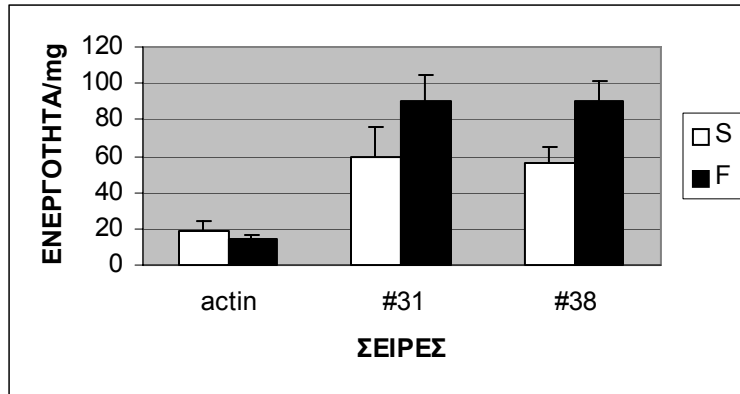
ΕΙΚΟΝΑ 3. Ιστογραμμική απεικόνιση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης σε κάθε σειρά.

F: παραμονή σε κανονική τροφή.

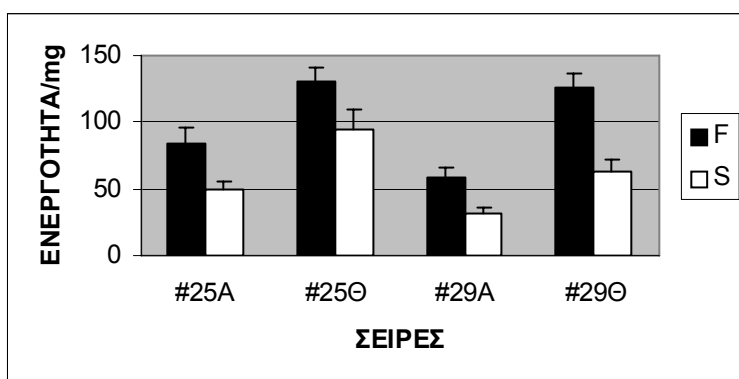
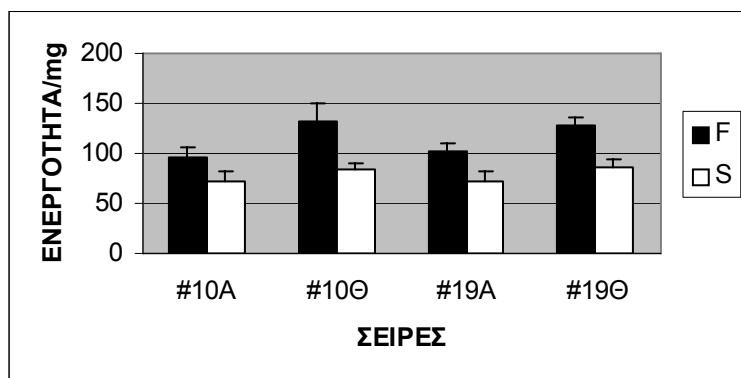
S: παραμονή σε διαλυμα σακχαρόζης.



ΕΙΚΟΝΑ 4. Ιστογραμμική απεικόνιση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης σε κάθε σειρά. Δεξιά από κάθε διάγραμμα εικονίζεται η κατασκευή στην οποία ανήκουν οι σειρές.
 F: παραμονή σε κανονική τροφή.
 S: παραμονή σε διάλυμα σακχαρόζης.



ΕΙΚΟΝΑ 5. . Ιστογραμμική απεικόνιση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης σε κάθε σειρά. Δεξιά από κάθε διάγραμμα εικονίζεται η κατασκευή στην οποία ανήκουν οι σειρές.
 F: παραμονή σε κανονική τροφή.
 S: παραμονή σε διάλυμα σακχαρόζης.



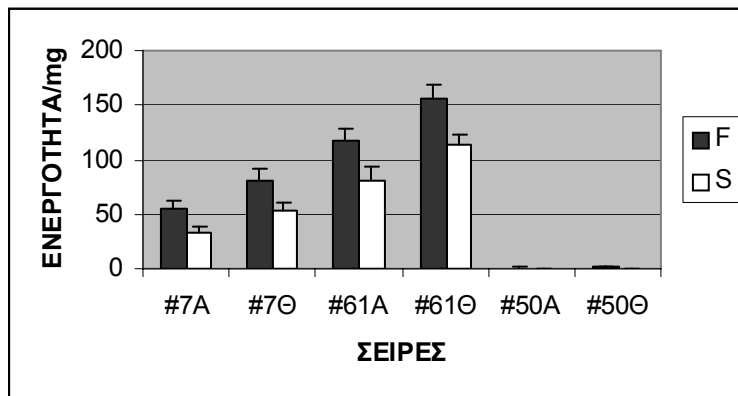
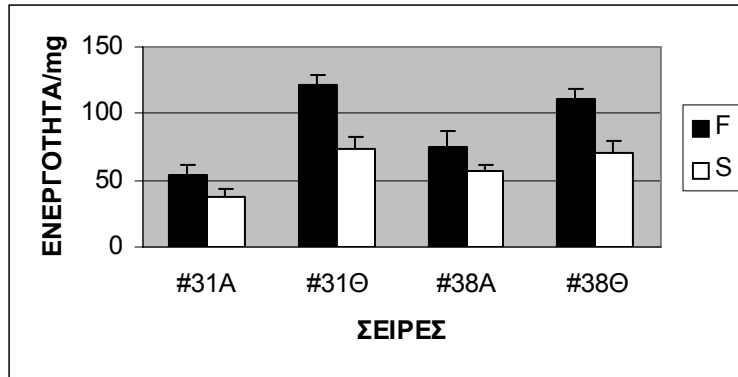
ΕΙΚΟΝΑ 6. Ιστογραμμική απεικόνιση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης στα αρσενικά και θηλυκά άτομα κάθε σειράς.

F: παραμονή σε κανονική τροφή

S: παραμονή σε διαλυμα σακχαρόζης.

A: αρσενικά

Θ: θηλυκά



ΕΙΚΟΝΑ 7. Ιστογραμμική απεικόνιση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης στα αρσενικά και θηλυκά άτομα κάθε σειράς.

F: παραμονή σε κανονική τροφή

S: παραμονή σε διαλυμα σακχαρόζης.

A: αρσενικά

Θ: θηλυκά

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το γονίδιο *Antrypl* του *Anopheles gambiae* παρουσιάζει μεγάλη αύξηση της μεταγραφής του μετά το γεύμα αίματος (Lemos et al., 1996). Φθάνει σε μια κορυφή μετά από ένα διάστημα 48 ωρών από την λήψη του αίματος και εν συνεχεία αρχίζει να “πέφτει” η μεταγραφή του μέχρι να φθάσει σε αρκετά χαμηλά επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά που παρουσιάζει όταν το κουνούπι τρέφεται μόνο με σάκχαρα. Προγενέστερη ανάλυση με στελέχη του είδους *Drosophila melanogaster* που έφεραν στο γονιδιώμά τους κατασκευές με ελείψεις από τον υποκινητή του *Antrypl* αποκάλυψε ένα τμήμα της αλληλουχίας μεγέθους 200bp ικανό να προσδώσει στο νέο γενετικό περιβάλλον ιστοειδική έκφραση του γονιδίου (Skavdis et al., 1996). Χρησιμοποιώντας τα ίδια διαγονιδιακά στελέχη διερευνήθηκε η συμπεριφορά των κατασκευών στις μεταβολές του περιεχομένου της τροφής. κατ’ αναλογία με την περίπτωση του *Anopheles gambiae*.

Στα πειράματα όπου ανιχνεύθηκε η ποσότητα του ενζύμου μετά από υποβολή των μυιγών σε συνθήκες έλειψης τροφής και με παροχή μόνο μιας πηγής ενέργειας με την μορφή σακχάρων (σακχαρόζη), παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων του ενζύμου της β-γαλακτοσιδάσης σε όλες τις διαγονιδιακές σειρές (πίνακας 1B, εικόνες 2 και 3). Εξαίρεση αποτελούσε η σειρά #50 που περιείχε την κατασκευή *Ty1cRsa*, όπου οι τιμές που ελήφθησαν θεωρήθηκαν ότι βρίσκονται μέσα στα πλαίσια τεχνικών σφαλμάτων του οργάνου φωτομέτρησης που μπορεί να είναι ιδιαίτερος σημαντικά όταν πρόκειται για τιμές μέτρησης που πλησιάζουν κοντά στο μηδέν. Αυτό το διαγονιδιακό στέλεχος παρουσιάζει σχεδόν μηδαμινά επίπεδα έκφρασης του ενζύμου από ότι έχουν δείξει παλιότερα πειράματα (Skavdis, G. et al., 1996). Παρ’ όλα αυτά η διατροφική απόκριση στην *Δροσόφιλα* δεν είχε την ίδια ένταση με αυτή του κουνουπιού. Ένα ισχυρό επιχείρημα που θα μπορούσε να απορίψει τη θεώρηση για αυτή την διατήρηση της ικανότητας του υποκινητή του *Antrypl* να ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου ανάλογα με το διατροφικό περιεχόμενο θα ήταν ότι οποιαδήποτε παρατηρούμενη διαφορά μεταξύ “ταϊσμένων” και “πεινασμένων” μυιγών πιθανότατα να οφείλεται σε μια γενική επίδραση του υποσιτισμού στην μεταγραφή και/ή στην μετάφραση όλων των γονιδίων του οργανισμού κυρίως λόγω της έλειψης αμινοξέων. Αυτό έχει δείξει ότι δεν αληθεύει για άλλα γονίδια. Όπως για παράδειγμα έχουν δείξει παλιότερα πειράματα η ποσότητα του mRNA της α -tubulin δεν επηρεάζεται από την ασιτία. στην *Δροσόφιλα* (Bownes et al., 1988). Το ίδιο ισχύει και για την

ποσότητα του ενζύμου της αλκοολικής αφυδρογονάσης (Adh) που παράγεται σε άτομα δροσόφιλας που τρέφονται για ημέρες μόνο με σάκχαρο. Για να διαπιστωθεί αν υπάρχει μια γενική επίδραση του υποσιτισμού στα γονίδια της Δροσόφιλας στις συνθήκες των πειραμάτων της παρούσης εργασίας, που θα μπορούσε να δώσει αποπροσανατολιστικά αποτελέσματα, χρησιμοποιήθηκε ένα στέλεχος της *Drosophila melanogaster* που περιέχει το LacZ γονίδιο υπό την καθοδήγηση του ενισχυτή του γονιδίου της Actin5C (enhancer trap) του ίδιου εντόμου. Το Actin5C κωδικοποιεί μια κυτταροπλασματική ακτίνη που υπάρχει σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και σε όλα τα στάδια του εντόμου (Chung and Keller, 1989; Horard et al., 1993). Το διαγονιδιακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε (#582 Bloomington stock) εκφράζει το LacZ σχεδόν σε όλο το σώμα του εντόμου και σε αρκετά υψηλά επίπεδα. Όπως φαίνεται στα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στις εικόνες 2 και 3 δεν παρατηρείται μεταβολή στην ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης σε αυτό το στέλεχος γεγονός που δείχνει ότι ο υποσιτισμός αφήνει ανεπηρέαστη την μεταγραφή και την μετάφραση του LacZ σε αυτό το στέλεχος.

Στα πειράματα όπου οι μύγες στερούντο κανονικής τροφής από την εκκόλασή τους, παρατηρήθηκε πάλι η ανάλογη διατροφική απόκριση (πίνακας 1B, εικόνες 4 και 5). Τα επίπεδα του ενζύμου ανέβαιναν σημαντικά 2 ημέρες μετά την χορήγηση της κανονικής τροφής. Εξαιρέση αποτελούσαν οι μύγες από την σειρά #50 όπου τα επίπεδα του ενζύμου ήταν σχεδόν μηδαμινά και στις 2 μεταχειρίσεις και δεν κατέστη δυνατή η διάκριση κάποιας διαφοράς. Το στέλεχος #582 δεν παρουσίασε καμία αλλαγή στην διατροφική απόκριση.

Όλα τα αποτελέσματα και στις δύο πειραματικές διαδικασίες καταδεικνύουν ότι ο υποκινητής του Antryp1 διατηρεί σε ένα βαθμό την ικανότητά του να προσδίδει επιπλέον της ιστοειδικότητάς του και ρύθμιση ως απόκριση στην αλλαγή της τροφής. Οι αλληλουχίες που βρίσκονται στο 3' άκρο του Antryp1 δεν φαίνεται να παίζουν ουσιώδη ρόλο στην διατροφική απόκριση μια και οι σειρές που προέρχονται από τις κατασκευές εκτος των Ty1cBam και Ty1cEco (περιέχουν άλλες αλληλουχίες στο 3' άκρο του LacZ) δεν παρουσιάζουν διαφορές στην ρύθμιση από τις υπόλοιπες.

Η αλλαγή στα επίπεδα του ενζύμου σε αντίδραση στο περιεχόμενο της τροφής θα μπορούσε θεωρητικά να οφείλεται σε διάφορους μηχανισμούς ρύθμισης όπως για παράδειγμα σε μεταμεταγραφική και μεταφραστική ρύθμιση σε αντιδιαστολή με το κουνούπι. Το γεγονός όμως ότι πρόκειται για διαφορετική πρωτεΐνη (β-γαλακτοσιδάση αντί της θρυψίνης) αποτελεί μια ένδειξη για ρύθμιση στο μεταγραφικό επίπεδο. Μια

άλλη ισχυρή ένδειξη προς αυτή την κατεύθυνση είναι η ύπαρξη διατροφικής απόκρισης στην σειρά #61 που προέρχεται από την κατασκευή Ty1Eco. Αυτή περιέχει έλειψη 100bp από το σημείο έναρξης της μετάφρασης του *Antryp1* (εικόνα 1B). Παρ' όλα αυτά παρατηρήθηκε αλλαγή στα επίπεδα του ενζύμου σε απόκριση στο περιεχόμενο της τροφής. Είναι γνωστό ότι η 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή των γονιδίων (5'UTR) παίζει τον κύριο ρόλο στην μετάμεταγραφική και μεταφραστική ρύθμιση. Επομένως η αντικατάσταση της 5'-UTR του *Antryp1* από αυτή ενός άλλου γονιδίου δεν αλλάζει την ρύθμιση της ποσότητας της β-γαλακτοσιδάσης που παράγεται από τα κύτταρα του επιθηλίου του μεσεντέρου σε συνθήκες έλειψης τροφής πλούσιας σε πρωτεΐνη, γεγονός που αποτελεί μια ισχυρή ένδειξη για ρύθμιση στο επίπεδο της μεταγραφής.

Όσον αφορά τις αλληλουχίες του υποκινητή που είναι υπεύθυνες για την διατροφική απόκριση αυτές φαίνεται να εδράζονται στο ίδιο τμήμα που προσδίδει και την ιστοειδικότητα, δηλαδή στην αλληλουχία μεταξύ -360 και -100 bp από το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης του *Antryp1*. Αξίζει να σημειωθεί ότι η συντηρημένη παλινδρομική αλληλουχία που υπάρχει στον υποκινητή του *Antryp1* (εικόνα 8) δεν φαίνεται να σχετίζεται με την ρύθμιση του γονιδίου υπό αυτές τις συνθήκες διότι οι μυίγες που φέρουν την κατασκευή Ty1Eco, στην οποία οι αλληλουχίες που περιέχουν αυτό το παλίνδρομο έχουν μερικώς εξαιρεθεί, παρουσιάζουν διατροφική απόκριση.

Από την αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων για ύπαρξη πιθανών θέσεων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων στην αλληλουχία του υποκινητή δεν προέκυψαν ιδιαίτερα αξιολογικά συμπεράσματα, που να ρίχνουν φως στον τρόπο της μεταγραφικής ρύθμισης. Το μόνο ίσως αξιολογικό στοιχείο είναι η ύπαρξη 6 πιθανών θέσεων πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα GCN4 (εικόνα 8). Αρκετά τέτοια *cis* στοιχεία υπάρχουν και στους υποκινητές των άλλων γονιδίων θρυψινών της ομάδας που ανήκει το *Antryp1*. Επίσης στον υποκινητή του όψιμα εκφραζόμενου γονιδίου θρυψίνης (*late trypsin*) του *Aedes aegypti* υπάρχουν 5 πιθανές θέσεις πρόσδεσης του GCN4 (Barillas-Mury and Wells, 1993). Πιθανές τέτοιες αλληλουχίες πρόσδεσης έχουν βρεθεί και στον υποκινητή ενός άλλου αιματοεπαγόμενου γονιδίου που κωδικοποιεί μια καρβοξυπεπτιδάση στο μεσέντερο της μυίγας *Simulium vittatum* (Ramos et al., 1993; Xiong and Jacobs-Lorena, 1995). Ο GCN4 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας στον σακχαρομύκητα που ενεργοποιεί την μεταγραφή γονιδίων υπεύθυνων για την παραγωγή ενζύμων που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση των αμινοξέων. Σε συνθήκες έλειψης αμινοξέων στο υλικό ανάπτυξης του μύκητα η πρωτεϊνική κινάση GCN2 ενεργοποιείται και φωσφορυλιώνει τον παράγοντα

έναρξης της μετάφρασης eIF-2 καταλήγοντας στην ενεργοποίηση της μετάφρασης του GCN4 (Hinnebusch, 1997).

Ο τρόπος ρύθμισης των θρυψινών, που έχουν ανακαλυφθεί στα κουνούπια και εκφράζονται στο μεσέντερο, παραμένει έως τώρα αδιευκρίνιστος. Είναι γνωστό πως σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά το γεύμα αίματος τα επίπεδα μιας ορμόνης που ονομάζεται EDNH (egg development neurosecretory hormone) αυξάνονται και διεγείρουν την παραγωγή εκδυσόνης από την ωοθήκη με αποτέλεσμα την έναρξη της παραγωγής αυγών. Η αύξηση του τίτλου των εκδυστεροειδών, με προεξάρχουσα μορφή την 20-Hydroxyecdysone, αρχίζει λίγες ώρες μετά την απομύζηση του αίματος και φτάνει σε ένα μέγιστο 18-24 ώρες μετά (Hagedorn, 1994). Όσο συμβαίνουν αυτά, τα επίπεδα μιας άλλης ορμόνης, της νεανικής ορμόνης (JH), πέφτουν απότομα για να ανέβουν σύντομα μετά την πτώση του τίτλου των εκδυστεροειδών. Όλες αυτές οι παρατηρήσεις ισχύουν σε όσα είδη κουνουπιών έχουν μελετηθεί. Εικάζεται ότι συστατικά του πεπτούμενου αίματος, που μπορεί να είναι αμινοξέα ή πεπτίδια, προκαλούν την έκκριση κάποιων άλλων πεπτιδίων-ορμονών με αποτέλεσμα όλες αυτές τις μεταβολές στο ενήλικο θηλυκό κουνούπι και με κατάληξη την μεγάλη ανάπτυξη των ωοθηκών και την παραγωγή των αυγών. Το αναπτυξιακό επίπεδο της έκφρασης των θρυψινών είναι αρκετά όμοιο με τις αναπτυξιακές αλλαγές των 2 κυρίων ορμονών (20-HE και JH) που ακολουθεί το γεύμα αίματος. Έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι η νεανική ορμόνη ρυθμίζει την έκφραση του πρώιμου γονιδίου θρυψίνης (early trypsin) στον *Aedes aegypti* χωρίς να είναι γνωστό αν αυτό γίνεται άμεσα ή με την δράση κάποιου παράγοντα που επηρεάζεται από την JH (Noriega et al., 1997). Όσον αφορά τον ρόλο των ορμονών στη ρύθμιση άλλων γονιδίων, που εκφράζονται στο μεσέντερο των κουνουπιών μετά το γεύμα αίματος συμπεριλαμβανομένων και των 7 θρυψινών του *Anopheles gambiae*, δεν υπάρχουν αξιόλογα πειραματικά δεδομένα που να δείχνουν κάποια συσχέτιση.

Στα πειράματα που μελετήθηκε η επίδραση του φύλου στην έκφραση του LacZ στις διαγονιδιακές μυίγες παρατηρήθηκε ότι η ποσότητα του ενζύμου ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στα θηλυκά (πεινασμένα ή ταϊσμένα) σε σύγκριση με ότι συνέβαινε στα αρσενικά (πίνακας 1, εικόνες 6 και 7). Στο κουνούπι υπάρχει παρόμοιο φαινόμενο αν και εκεί η διαφορά στην έκφραση της θρυψίνης μεταξύ θηλυκών και αρσενικών είναι πολύ μεγαλύτερη (Lemos et al., 1996). Φαίνεται ότι μέχρι ενός σημείου διατηρείται μια παρόμοια κατάσταση και στην Δροσόφιλα. Η μελέτη της επίδρασης του φύλου και της διαίτας ταυτόχρονα στην έκφραση του ενζύμου αναφοράς δεν απέδωσε αξιόλογα συμπεράσματα. Στις

περισσότερες σειρές δεν φαίνεται να υπάρχει σημαντική διαφορά στην διατροφική απόκριση των θηλυκών σε σχέση με αυτή των αρσενικών. Εξαιρέση αποτέλεσαν οι σειρές #25 και #38 που προέρχονται από μετασηματισμό με διαφορετικές κατασκευές, όπου στην μεν #25 η διατροφική απόκριση ήταν μεγαλύτερη στα αρσενικά, ενώ στην #38 η απόκριση ήταν μεγαλύτερη στα θηλυκά.

Αυτή η διαφοροποίηση σε σχέση με τις άλλες σειρές δεν αποκλείεται να οφείλεται σε φαινόμενα επίδρασης θέσης στο γονιδίωμα (position-effects).

Συμπερασματικά αποτελεί αξιόλογο γεγονός ότι εκτός από τη διατήρηση της ιστοειδικής έκφρασης του στην Δροσόφιλα υπάρχει και διατήρηση έως σε ένα βαθμό και της ιδιότητας του υποκινητή του Antryp1 να ανιχνεύει διαφορές στο είδος της διατροφής μολονότι η φυσιολογία της πέψης μεταξύ των 2 εντόμων είναι τελείως διαφορετική. Η μεγάλη εξελικτική απόσταση των 2 αυτών Διπτέρων δεν εμποδίζει την Δροσόφιλα να αναγνωρίζει τα σήματα που είναι υπεύθυνα για την έκφραση του γονιδίου τόσο ιστοειδικά όσο και τροπικά. Η πειραματική ανάλυση για τον χαρακτηρισμό του υποκινητή κατέδειξε ότι στο ίδιο μικρό τμήμα του υποκινητή όπου εδράζεται μεγάλο τουλάχιστον μέρος της ιστοειδικότητας υπάρχουν και οι ελάχιστες απαραίτητες cis-ρυθμιστικές αλληλουχίες που προσδίδουν την τροφο-εξαρτώμενη επαγωγή του Antryp1 στο κουνούπι.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ashburner M.(1989).*Drosophila: a laboratory manual*.Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY.

Barillas-Mury C and Wells M.A.(1993).Cloning and sequencing of the blood meal-induced late trypsin gene from the mosquito *Aedes aegypti* and characterization of the upstream regulatory region.*Insect Molec. Biol.*,**2**,7-12.

Barillas-Mury C , Noriega F.G and Wells M.A(1995).Early trypsin activity is part of the signal transduction system that activates transcription of the late trypsin gene in the midgut of the mosquito *Aedes aegypti*.*Insect Biochem. Molec. Biol.*,**25**,241-246.

Briegel H and Lea A.O.(1975).Relationship between protein and proteolytic activity in the midgut of mosquitoes.*J Insect Physiol* ,**21**,1597-1604.

Casu R.E, James J.M, Elvin C.M, and Eiseman C.H.(1994).Isolation of a trypsin like serine protease gene family from the sheep blowfly *Lucillia cuprina*.*Insect Molec.Biol.*,**3**,159-170.

Chasan R and Anderson K.V.(1989).The role of easter an apparent serine protease ,in organizing the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo.*Cell*,**56**,391-400.

Chung Y.T and Keller E.B.(1990).Regulatory elements mediating transcription from the *Drosophila melanogaster* Actin 5C proximal promoter.*Mol Cell. Biol*,**10**,206-216.

Collins F.H. and Besansky N.J.(1994).Vector biology and the control of malaria in Africa.*Science* ,**264**,1874-1875.

Collins F.H. and Paskewitz S.M.(1995).Malaria: current and futute prospects of control.*Annu. Rev.Entomol.*,**40**,195-219.

Daffre S , Kylsten P, Samakovlis C and Hultmark D.(1994).The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*:an expanded gene family for expression in the digestive tract.*Mol Gen Genet*,**242**,152-162.

Elvin C.M , Whan V and Riddles P.W.(1993).A family of serine protease genes expressed in adult buffalo fly (*Haematobia irritans*).*Mol. Gen. Genet.*,**240**,132-139.

Favia G, Dimopoulos G, della Torre A, Toure Y.T, Coluzzi M, Louis C.(1994).Polymorphisms detected by random PCR distinguish between different chromosomal forms of *Anopheles gambiae*.*Proc.Natl Acad Sci USA*,**91**,10315-10319.

Hagedorn H.H.(1994).The endocrinology of the adult female mosquito.*Advances in Disease Vector Research*,**10**,110-148.

Hinnebusch A.G.(1997).Translational regulation of yeast GCN4 (Minireview).*Journal Biol.chem.*,**272**,21661-21664.

Holmes D.S and Bonner J.(1973).Preparation,molecular weight, base composition and secondary structure of giant nuclear ribonucleic acid.*Biochemistry*,**12**,2330-2338.

Horard B, Bello B, Abraham E.G, Coulon-Bublex M, Garel A and Mounier N.(1993).A cytoplasmic actin gene from the silkworm *Bombyx mori* is expressed in tissues of endodermal origin and previtellogenic germ cells of transgenic *Drosophila*.*Insect Molec.Biol.*,**2**,175-183.

James A.A.(1992).Mosquito Molecular Genetics : The hands that feed bite back.*Science*,**257**,37-38.

Kalhok S.E, Tabak L.M, Prosser D.E,Brook W, Downe A.ER. and White B.N.(1993).Isolation , sequencing and characterization of two cDNA coding for trypsin-like enzyme from the midgut of *Aedes aegypti*.*Insect Molec.Biol.*,**2**,71-79.

Kares R.E and Rubin G.M.(1984).Analysis of P-transposable element functions in *Drosophila* .*Cell*,**38**,135-146.

Kylsten P, Kimbrell D.A, Daffre S, Samakovlis C and Hultmark D.(1992).The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster* : an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract.*Mol Gen Genet.*,**232**,335-343.

Lemos F.S.A, Cornel A.J and Jacobs-Lorena M.(1996).Trypsin and aminopeptidase gene expression is affected by age and food composition in *Anopheles gambiae*.*Insect Biochem. Molec.Biol.*,**26**,651-658.

Matsuoka H Paton M.G., Barker G.C., Alejo Blanco A.R, Sinden R.E.(1994).Studies on the immunogenicity of a recombinant ookinete surface antigen Pbs21 from *Plasmodium berghei* expressed in *Escherichia coli*.*Parasite Immunology*,**16**,27-34.

Matsuoka H, Kobayashi J, Barker G.C., Mura K.,Chinrei Y, Miyasima S, Ishir A and Sinden r.e.(1996).Induction of anti-malarial transmission blocking immunity with a recombinant ookinete surface antigen of *Plasmodium berghei* produced in silkworm larvae using the baculovirus expression vector system.*Vaccine*,**14**,120-126.

Miller LH.(1992).The challenge of Malaria.*Science*,**257**,36-37.

Mitsialis S.A. and Kafatos F.C.(1985).Regulatory elements controlling chorion gene expression are conserved between flies and moths.*Nature*,**317**,453-456.

Müller H.M, Crampton J.M., della Torre A, Sinden R and Crisanti,A.(1993).Members of a trypsin gene family in *Anopheles gambiae* are induced in the gut by blood meal.*Embo J.*,**12**,2891-2900.

Muller H.M., Catteruccia F, Vizioli J, della Torre A and Crisanti A.(1995).Constitutive and blood meal-induced trypsin genes in *Anopheles gambiae*.*Exp.Parasitol.*,**81**,371-385.

Noriega F.G, Pennington J.E, Barillas-Mury, Wang X.Y. and Wells M.a.(1996).*Insect Molec.Biol.*,**5**,25-29.

Noriega F.G, Wang X.Y, Pennington J.E., Barillas-Mury C.V and Wells M.A.(1996).Early trypsin ,a female-specific midgut protease in *Aedes aegypti* : Isolation, Amino-terminal sequence determination, and cloning and sequencing of the gene.*Insect Biochem.Molec.Biol.*,**26**,119-126.

Noriega F.G, Shah D.K and Wells M.A (1997). Juvenile hormone controls early trypsin gene transcription in the midgut of *Aedes aegypti*. *Insect Molec. Biol.*, **6**, 63-66.

Pino-Heiss, S and Schubiger G.(1989). Extracellular protease production by *Drosophila* imaginal discs. *Dev. Biol.*, **132**, 282-291.

Ramos A, Mahowald A and Jacobs-Lorena M.(1993). Gut-specific genes from the black fly *Simulium vittatum* encoding trypsin-like and carboxypeptidase-like proteins. *Insect Molec. Biol.*, **1**, 149-163.

Reichert J.M, Meister M, Dinarca J.L, Zachary D, Hoffman D, Ruiz C, Richards G and Hoffman J.A.(1992). Insect immunity developmental and inducible activity of the *Drosophila* dipteracin promoter. *EMBO J*, **11**, 1469-1447.

Rubin G.M and Spradling A.C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science*, **218**, 348-353.

Shahabuddin M, Toyoshima T, Aikawa M and Kaslow D.C.(1993). Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malaria parasite chitinase by mosquito protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 4266-4270.

Skavdis G, Siden-Kiamos I, Muller H.M, Crisanti A and Louis C.(1996). Conserved function of *Anopheles gambiae* midgut-specific promoters in the fruitfly. *EMBO J*, **15**, 344-350.

Stein D, Roth S, Vogeslag E and Nusslein-Volhard C.(1991). The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal. *Cell*, **65**, 725-735.

Thummel C.S, Boulet A.M, and Lipshitz H.D.(1989). Vector for *Drosophila* P-element-mediated transformation and tissue culture transfection. *Gene*, **74**, 445-456.

Xiong B and Jacobs-Lorena (1995). Gut-specific transcriptional regulatory elements of the carboxypeptidase gene are conserved between black flies and *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9313-9317.

Yun Y and Davis R.L(1989).Levels of RNA from a family of putative serine protease genes are reduced in *Drosophila melanogaster* dunce mutants and are regulated by cyclic AMP.*Mol.Cel.Biol.*,9.692-700.

Zar J.H (1996).Biostatistical Analysis ,third edition,Prentice-Hall International Editions.

Ευχαριστίες

Τελειώνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω

τον Χρήστο Λούη , επιβλέποντα καθηγητή,
την Inga Siden-Kiamos , για την πολύτιμη βοήθειά της και τις ιδέες της,
τον Γιάννη Λειβαδάρα για τις ενέσεις στα έμβρυα,
τον Γεώργιο Μαρκάκη για τις συμβουλές του στην στατιστική επεξεργασία
των αποτελεσμάτων,
τον Χρήστο Δελιδάκη που έκανε τον κόπο να ήταν ο δεύτερος διορθωτής
και όλους εκείνους , που με τον έναν ή τον άλλον τρόπο , βοήθησαν να
έρθει σε πέρας η εργασία.

