

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

**Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης στη
συμβιωτική σχέση *Wolbachia-Drosophila***

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Γιώργος Παπαφωτίου

Δεκέμβριος 2010

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα βακτήρια *Wolbachia* είναι υποχρεωτικά ενδοκυττάρια βακτήρια που απαντώνται ευρέως σε είδη δύο φύλων ασπονδύλων, τα αρθρόποδα και τους νηματώδεις. Οι σχέσεις που έχουν αναπτύξει τα βακτήρια αυτά με τους ξενιστές τους, καλύπτουν όλο το φάσμα των συμβιωτικών σχέσεων, από τον παρασιτισμό εις βάρος του ξενιστή, μέχρι την υποχρεωτική σχέση αμοιβαιότητας όπου αμφότεροι οι οργανισμοί βρίσκονται σε απόλυτη ανάγκη παρουσίας του άλλου. Οι πιο διαδεδομένες επιπτώσεις της μόλυνσης με *Wolbachia* απαντώνται στα αρθρόποδα και είναι αυτές του αναπαραγωγικού παρασιτισμού, της χειραγώγησης δηλαδή της αναπαραγωγής του ξενιστή προς όφελος του παρασίτου. Αν και οι φαινότυποι αυτοί είναι καλά χαρακτηρισμένοι, οι μοριακοί μηχανισμοί που τους ελέγχουν παραμένουν άγνωστοι. Στην *Drosophila* απαντώνται στελέχη *Wolbachia* που επαγουν κυτταροπλασματική ασυμβατότητα, θνησιμότητα δηλαδή εμβρύων που προκύπτουν από την διαστάυρωση μολυσμένων αρσενικών με μη μολυσμένα θηλυκά. Υποψήφια βακτηριακά γονίδια για συμμετοχή, τόσο στην επαγωγή κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας, όσο και γενικότερων φαινομένων της συμβίωσης είναι αυτά που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες με περιοχές ομολογίας αγκυρίνης (ANK). Προκειμένου να ανιχνευθούν γονίδια που πιθανώς εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση των δύο οργανισμών, αυτή η μελέτη επικεντρώθηκε σε δύο σημεία. Πρώτον, γονιδιωματική ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων της *Drosophila melanogaster* παρουσία και απουσία *Wolbachia* και, δεύτερον, σύγκριση της έκφρασης και μελέτη του εντοπισμού των ANK γονιδίων της *Wolbachia* σε διαφορετικούς συμβιωτικούς συσχετισμούς. Τα κύρια ευρήματα της μελέτης αυτής είναι α) η μόλυνση με *Wolbachia* δεν φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων του ξενιστή, σε κλίμακα τουλάχιστον τέτοια ώστε να είναι ανιχνεύσιμη η διαφορά σε ολόκληρα άτομα ή ιστούς, β) τα γονίδια ANK WD0438 και WD1213 του στελέχους wMel ρυθμίζονται ιστοειδικά τόσο στη *D. melanogaster* όσο και στη *D. simulans* και γ) η ρύθμιση αυτή δεν φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με την έκφραση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας.

SUMMARY

Wolbachia are obligative intracellular bacteria that infect a great number of species of two invertebrate phyla and nematode worms. The relationship between the bacteria and the host can range from parasitism to mutualism. The most common effects of the infection with *Wolbachia* are those of reproductive parasitism, which is the manipulation of the host reproduction to the benefit of the bacteria. Despite the fact that the phenotypes are well characterized the underlying molecular mechanisms are not known. A number of *Wolbachia* strains which infect *Drosophila*, can induce cytoplasmic incompatibility, which is expressed as embryo mortality in crosses of infected males to uninfected females. Bacterial ANK genes, encoding for ankyrin homology domain proteins, have been suggested as candidates for involvement in CI and/or other aspects of the interaction. In order to identify genes, which are involved in the crosstalk between the bacteria and the host, this study, focused on two main points. Firstly, the genome-wide study of *Drosophila* gene expression in a number of tissues and stages in the presence of *Wolbachia*, and secondly the study of *Wolbachia* ANK gene expression and ANK protein localization in a number of symbiotic associations. The main findings of this study are a) *Wolbachia* do not affect host gene expression to a detectable level in whole animals and tissues, b) ANK genes WD0438 and WD1213 from the *wMel* *Wolbachia* strain are regulated in a tissue-specific way in *D. melanogaster* and in *D. simulans* and c) the regulation of the above genes does not seem to be correlated with the expression of cytoplasmic incompatibility.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	I
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	III
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	VII
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	X
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Η βιολογία του βακτηρίου <i>Wolbachia pipientis</i>	1
1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά	1
1.1.2 Φυλογένεια.....	2
1.2 Αποτελέσματα της συμβίωσης με <i>Wolbachia</i>	3
1.2.1 Αμοιβαιότητα στους νηματώδεις	3
1.2.2 Αμοιβαιότητα στα αρθρόποδα	4
1.2.2.1 Ανθεκτικότητα σε ιούς και άλλα παράσιτα	4
1.2.2.2 Μεταβολική αμοιβαιότητα στα αρθρόποδα.....	5
1.2.2.3 Επίδραση σε αναπτυξιακές διαδικασίες	6
1.2.3 Αναπαραγωγικός παρασιτισμός	7
1.2.3.1 Θηλυκοποίηση	7
1.2.3.2 Παρθενογένεση	8
1.2.3.3 Θανάτωση αρσενικών	8
1.2.3.4 Κυτταροπλασματική ασυμβατότητα.....	9
1.3 CI- <i>Wolbachia</i> και ξενιστές	11
1.3.1 Σπερματογένεση.....	11
1.3.2 Ωογένεση	12
1.3.3 Εμβρυογένεση	14
1.4 Γονιδιώματα <i>Wolbachia</i>	15
1.5 Αγκυρίνες	17
1.5.1 Γενικά.....	17
1.5.2 Αγκυρίνες και βακτήρια	17

1.5.3 Αγκυρίνες και <i>Wolbachia</i>	19
1.6 Σκοπός της διατριβής	21
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	23
2.1 Είδη και στελέχη <i>Drosophila</i>	23
2.2 Απομόνωση γενωμικού DNA <i>Wolbachia</i>	23
2.3 Παρασκευή δειγμάτων cDNA	24
2.3.1 Συλλογή και ανατομία μυγών	24
2.3.2 Απομόνωση και επεξεργασία RNA.....	24
2.3.3 Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος των δειγμάτων RNA	25
2.3.4 Αντίδραση Αντίστροφης Μεταγραφάσης (RT)	25
2.4 Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης μετά από Αντίδραση Αντίστροφης Μεταγραφάσης (qRT-PCR)	26
2.4.1 Σχεδιασμός εκκινητών και Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) ελέγχου σε γενωμικό DNA.....	26
2.4.2 qRT-PCR.....	30
2.4.3 Ανάλυση Δεδομένων	31
2.5 Συγκρίσεις με μικροσυστοιχίες	32
2.5.1 Σήμανση ανιχνευτών	32
2.5.2 Υβριδοποίηση.....	32
2.5.3 Σάρωση	33
2.5.4 Ανάλυση δεδομένων	33
2.6 Πλασμιδιακές κατασκευές.....	34
2.6.1 pRSET-C-498, pRSET-C-550, pRSET-C-566, pRSET-C-637 και pRSET-C-1213.....	34
2.6.2 pGex-3X-498, pGex-3X-550, pGex-3X-566, pGex-3X-637 και pGex3X-1213	34
2.7 Επαγωγή έκφρασης και απομόνωση των πεπτιδίων His-wsp, His-498, His-550, His-566, His-637 και His-1213.....	36
2.8 Επαγωγή έκφρασης των πεπτιδίων GST-498, GST-550, GST-566, GST-637 και GST-1213 και απομόνωση του πεπτιδίου GST-	

498	38
2.8.1 Εκχυλίσματα πρωτεϊνών που περιέχουν τα πεπτιδία GST-550, GST-566, GST-637 και GST-1213	38
2.8.2 Έκφραση και απομόνωση του πεπτιδίου GST-498	39
2.8.2.1 Απομόνωση διαλυτού κλάσματος μέσω σφαιριδίων glutathione-sepharose	39
2.8.2.2 Απομόνωση μη διαλυτού κλάσματος από έγκλειστα σωμάτια (inclusion bodies)	39
2.9 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE).....	40
2.10 Προπροσρόφηση ορρού και απομόνωση αντισωμάτων μέσω συνάφειας	41
2.10.1 Προπροσρόφηση ορρών σε βακτηριακό υλικό	41
2.10.2 Προπροσρόφηση σε ιστούς <i>Drosophila</i>	41
2.10.3 Απομόνωση ειδικού αντισώματος από ανοσοποιημένο ορρό.....	42
2.11 Ανοσοαποτύπωμα Western	43
2.12 Ανοσοϊστοχημεία	44
2.12.1 Μονιμοποίηση εμβρύων <i>Drosophila</i>	44
2.12.2 Μονιμοποίηση γονάδων ενηλίκων ατόμων <i>Drosophila</i>	44
2.12.3 Ανοσοϊστοχημική χρώση.....	45
2.13 Μικροσκοπία	46
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	47
3.1 Επίδραση της μόλυνσης με <i>Wolbachia</i> στην μεταγραφή των γονιδίων της <i>D. melanogaster</i>	47
3.1.1 Αποτελέσματα.....	47
3.1.1.1 Συγκρίσεις μικροσυστοιχιών σε ενήλικα και προνύμφες τρίτου σταδίου.....	47
3.1.1.2 Συγκρίσεις μικροσυστοιχιών σε όρχεις και ωοθήκες ενηλίκων ..	47
3.1.1.3 Συγκρίσεις μικροσυστοιχιών σε έμβρυα μετά την έναρξη της ζυγωτικής μεταγραφής	48
3.1.2 Συζήτηση	49

3.2 Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες εμπεριέχουν μοτίβα ομολογίας Αγκυρίνης (ANK).....	52
3.2.1 Αποτελέσματα	52
3.2.1.1 Έκφραση των ANK γονιδίων του βακτηριακού στελέχους <i>wMel</i> σε γονάδες ενηλίκων ατόμων <i>D. melanogaster</i>	52
3.2.1.2 Ρύθμιση των γονιδίων WD0438 και WD1213 σε σώματα και γονάδες ενηλίκων <i>D. melanogaster</i>	53
3.2.1.3 Έκφραση των ANK γονιδίων του βακτηριακού στελέχους <i>wMel</i> σε γονάδες ενηλίκων ατόμων <i>D. simulans</i>	53
3.2.1.4 Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των ANK γονιδίων ανάμεσα στις γονάδες <i>D. melanogaster</i> και <i>D. simulans</i>	57
3.2.1.5 Έκφραση των ομολόγων των γονιδίων WD0438 και WD1213 στα στελέχη <i>Wolbachia wRi</i> και <i>wAu</i>	57
3.2.2 Συζήτηση.....	61
3.3 Παρασκευή πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι στις ANK πρωτεΐνες WD0550, WD0566, WD0637 και WD1213 και μελέτη της έκφρασης και του εντοπισμού τους.....	67
3.3.1 Αποτελέσματα	67
3.3.1.1 WSP	67
3.3.1.2 WD0550.....	68
3.3.1.3 WD0566.....	72
3.3.1.4 WD0637.....	85
3.3.1.5 WD1213.....	85
3.3.1.6 WD0498.....	93
3.3.2 Συζήτηση.....	96
3.4 Παρουσία της πρωτεϊνικής περιοχής OTU-domain στην πρωτεΐνη WD0633	101
4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	103
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	107

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1. Σχηματική απεικόνιση Κυτταροπλασματικής Ασυμβατότητας (CI).	10
Εικόνα 1.2. Στάδια της ωογένεσης στη <i>Drosophila</i>	13
Εικόνα 1.3. Απεικόνιση της δομής των επαναλήψεων αγκυρίνης.	18
Εικόνα 1.4. Οι ANK πρωτεΐνες του wMel	20
Εικόνα 2.1. Ποιοτικός έλεγχος δειγμάτων RNA.	25
Εικόνα 2.2. Έλεγχος των εκκινήτων για τα γονίδια ANK με PCR στο στέλεχος wMel.....	28
Εικόνα 2.3. Έλεγχος των εκκινήτων για τα γονίδια ANK με PCR στα στελέχη wMel, wRi και wAu.	29
Εικόνα 2.4. Τυπική καμπύλη τήξης προϊόντων αντίδρασης qPCR.....	30
Εικόνα 2.5. Χάρτης του πλασμιδίου pGex-3X.	35
Εικόνα 3.1. Σχετικά επίπεδα έκφρασης των ANK γονιδίων του wMel σε όρχεις σε σύγκριση με τις ωοθήκες ενηλίκων <i>D. melanogaster</i> γw ^{67C23}	54
Εικόνα 3.2. Σχετικά επίπεδα έκφρασης των WD0438 (A) και WD1213 (B) στις γονάδες και τα σώματα ενηλίκων ατόμων γw ^{67C23}	55
Εικόνα 3.3. Σχετικά επίπεδα έκφρασης των ANK γονιδίων του wMel σε όρχεις σε σύγκριση με τις ωοθήκες ενηλίκων <i>D. simulans</i> STCP [wMel].	56
Εικόνα 3.4. Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των wMel ANK γονιδίων στις γονάδες δύο διαφορετικών ξενιστών.....	58
Εικόνα 3.5. Σχετικά επίπεδα mRNA των ομολόγων των WD0438 (A, Δ) και WD1213 (B, E), καθώς και του wsp (Γ) σε γονάδες ενηλίκων <i>D. simulans</i> STCP [wRi] και <i>D. simulans</i> STCP [wAu].	60
Εικόνα 3.6. Βήματα απομόνωσης του πεπτιδίου His-wsp και ανοσοαποτύπωμα	

της πρωτεΐνης wsp από ιστούς <i>D. melanogaster</i> yw ^{67C23}	68
Εικόνα 3.7. pRSET-C-550.	70
Εικόνα 3.8. Βήματα απομόνωσης του πεπτιδίου His-550.....	71
Εικόνα 3.9. Ανοσοαποτύπωμα του πεπτιδίου GST-550.....	72
Εικόνα 3.10. pRSET-C-566.	73
Εικόνα 3.11. Βήματα απομόνωσης του πεπτιδίου His-566.....	74
Εικόνα 3.12. Ανοσοαποτύπωμα του πεπτιδίου GST-566.....	75
Εικόνα 3.13. Η πρωτεΐνη WD0566 εκφράζεται σε προβλαστοδερμικά έμβρυα και συνεντοπίζεται με τα κύτταρα της <i>Wolbachia</i>	77
Εικόνα 3.14. Η πρωτεΐνη WD0566 εκφράζεται σε βακτήρια που εντοπίζονται περιπυρηνικά σε έμβρυα 2 ^{ου} σταδίου	78
Εικόνα 3.15. Τελοφασικοί πυρήνες συγκυτιακού βλαστοδέρματος εμβρύων yw ^{67C23}	79
Εικόνα 3.16. Η πρωτεΐνη WD0566 εκφράζεται σε βλαστοδερμικά έμβρυα και συνεντοπίζεται με τα κύτταρα της <i>Wolbachia</i> στα πολικά κύτταρα.	80
Εικόνα 3.17. Μη μολυσμένα ωοθυλάκια σε διάφορα στάδια της ωογένεσης	81
Εικόνα 3.18. Η πρωτεΐνη WD0566 εκφράζεται σε ωοθυλάκια 5 ^{ου} σταδίου.	82
Εικόνα 3.19. Η πρωτεΐνη WD0566 εκφράζεται σε ωοθυλάκια 7 ^{ου} σταδίου.	83
Εικόνα 3.20. Σε ωοθυλάκια 8 ^{ου} -9 ^{ου} σταδίου παρατηρείται διαφοροποίηση της έκφρασης της πρωτεΐνης WD0566	84
Εικόνα 3.21. pRSET-C-637.	87
Εικόνα 3.22. Βήματα απομόνωσης του πεπτιδίου His-637.....	88
Εικόνα 3.23. Ανοσοαποτύπωμα του πεπτιδίου GST-637.....	89

Εικόνα 3.24. ρRSET-C-1213.....	90
Εικόνα 3.25. Βήματα απομόνωσης του πεπτιδίου His-1213.	91
Εικόνα 3.26. Ανοσοαποτύπωμα του πεπτιδίου GST-1213.	92
Εικόνα 3.27. Ανοσοαποτύπωμα του πεπτιδίου His-1213.....	92
Εικόνα 3.28. ρRSET-C-498.....	94
Εικόνα 3.29. Βήματα απομόνωσης των πεπτιδίων His-498 και GST-498.....	95
Εικόνα 3.30. Αποτέλεσμα πρόβλεψης διαμεμβρανικών περιοχών του προγράμματος TMHMM για την πρωτεΐνη WD0566.	100

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1. Είδη και στελέχη <i>Drosophila</i> που χρησιμοποιήθηκαν.	23
Πίνακας 2.2. Αλληλουχίες εκκινητών για τα γονίδια ANK, <i>wsp</i> και <i>act5C</i> και μεγέθη προϊόντων	27
Πίνακας 2.3. Αλληλουχίες εκκινητών για τα ANK γονίδια WD0498, WD0550, WD0566, WD0637 και WD1213, οι οποίοι φέρουν θέσης αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων (υπογράμμιση).....	36
Πίνακας 2.4. Συνθήκες καλλιέργειας βακτηρίων <i>E. coli</i> BL21(DE3) για την έκφραση 6xHis-σημασμένων πεπτιδίων.....	37
Πίνακας 2.5. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη.....	46
Πίνακας 3.1. Σύγκριση γονιδιακής έκφρασης μεταξύ όρχεων w1118; iso2; iso3 #15 και w1118; iso2; iso3 #15T με μικροσυστοιχίες.	51
Πίνακας 3.2. Σύγκριση γονιδιακής έκφρασης μεταξύ εμβρύων 2 - 22 w1118; iso2; iso3 #15 και w1118; iso2; iso3 #15T με μικροσυστοιχίες.	51
Πίνακας 3.3. Πρωτεΐνες της <i>Wolbachia</i> με περιοχές ομολογίας OTU.	102

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η βιολογία του βακτηρίου *Wolbachia pipientis*

1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Τα βακτήρια του γένους *Wolbachia* είναι υποχρεωτικά ενδοκυττάρια, μητρικά κληρονομούμενα και μολύνουν ένα πλήθος αρθροπόδων και νηματωδών. Εκτιμάται ότι μολύνουν 20-75% των ειδών των εντόμων καθώς και είδη ισσπόδων, ακάρεων, αραχνών, σκορπιών και νηματωδών (Hilgenboecker *et al.*, 2008; Jeyaprakash and Hoy 2000; Plantard *et al.*, 1999; Stouthamer *et al.*, 1999; Wenseleers *et al.*, 1998; Werren 1997; Werren and Windsor 2000). Περιγράφηκαν για πρώτη φορά στις ωοθήκες του κουνουπιού *C. pipiens* και λόγω αυτού αναφέρονται συχνά ως *Wolbachia pipientis* (Hertig 1936). Καθώς υπάρχουν διαφωνίες για την ονοματολογία αυτή, τα βακτήρια συχνά αναφέρονται απλά ως «*Wolbachia*» με επιπλέον χαρακτηρισμό που προκύπτει από τον ξενιστή στον οποίο απαντώνται (π.χ. «*wMel*» για το στέλεχος που συναντάμε στη *Drosophila melanogaster*). Στην παρούσα εργασία θα αναφέρονται συχνά ως «η» *Wolbachia*, σε γένος θηλυκό, κατά πως απαιτεί, συχνά, η ελληνική επιστημονική «αργκό» για βακτήρια, λόγω της χαρακτηριστικής κατάληξης -ia στο όνομα του γένους.

Τα γενικά χαρακτηριστικά τους είναι αυτά των *Rickettsiales* (Hertig 1936). Είναι διμορφικά και φτιάχνουν μικρούς ραβδοειδείς (0.5-1.3 μm σε μήκος) και κοκκοειδείς (0.25-0.5 μm σε διάμετρο) σχηματισμούς. Μεγαλύτεροι σχηματισμοί (1-1.8 μm σε διάμετρο) περιέχουν έναν ή περισσότερους από τους μικρότερους σχηματισμούς. Η *Wolbachia* βρίσκεται μέσα σε κυστίδια που περιβάλλονται από τρεις μεμβράνες. Πρόκειται για gram-αρνητικά βακτήρια όπου η εξωτερική μεμβράνη προέρχεται από το κύτταρο του ξενιστή, η ενδιάμεση είναι το βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα και τέλος η κυτταροπλασματική μεμβράνη του βακτηρίου (Binnington and Hoffmann 1989; Louis and Nigro 1989; Wright *et al.*,

1978; Wright and Barr 1980). Η *Wolbachia* στα αρθρόποδα εντοπίζεται κυρίως σε αναπαραγωγικούς ιστούς, όπως στις ωθήκες και στους όρχεις, αλλά και αλλού όπως στον εγκέφαλο, σιελογόνους αδένες, μυς, αιμόλεμφο, φτερά, μαλπιγγιανά σωληνάρια, έντερο και λιπαρό σώμα (Binnington and Hoffmann 1989; Dobson *et al.*, 1999; Louis and Nigro 1989; Min and Benzer 1997).

1.1.2 Φυλογένεια

Η *Wolbachia* κατατάσσεται στην α-υπομονάδα των πρωτεοβακτηρίων και στην οικογένεια των *Rickettsiaceae*. Ο κλάδος των α-πρωτεοβακτηρίων στον οποίο κατατάσσεται περιλαμβάνει ενδοκυτταρικά βακτήρια των γενών *Anaplasma*, *Cowdria*, *Ehrlichia* και *Rickettsia*, μέλη των οποίων είναι παράσιτα των θηλαστικών που μεταδίδονται από αρθρόποδα (O'Neill *et al.*, 1992; Stouthamer *et al.*, 1993). Φυλογενετικά τα στελέχη της *Wolbachia* κατατάσσονται σε οκτώ υπερομάδες. Οι υπερομάδες A και B περιλαμβάνουν τα στελέχη που βρίσκονται στα αρθρόποδα (Werren *et al.*, 1995), οι C και D την *Wolbachia* των νηματώδων (Bandi *et al.*, 1998), η E περιλαμβάνει ένα μόνο στέλεχος που βρέθηκε στα Collembola (Czarnetzki and Tebbe 2004; Vandekerckhove *et al.*, 1999), η υπερομάδα F στελέχη τερμιτών και του νηματώδους *Mansonella ozzardi* (Casiraghi *et al.*, 2001; Lo *et al.*, 2002), η υπερομάδα G που περιλαμβάνει στελέχη που απαντώνται σε είδη αραχνών της Αυστραλίας (Rowley *et al.*, 2004) και τέλος η υπερομάδα H σε τερμίτες (Bordenstein and Rosengaus 2005). Οι παραπάνω υπερομάδες προκύπτουν από φυλογενετικές αναλύσεις μοναδικών γονιδίων όπως το 16sDNA, το *ftsZ* και το γονίδιο *wsp*, μεθοδολογία για την οποία αμφισβητείται το κατά πόσο παράγει αξιόπιστα αποτελέσματα (Bordenstein and Rosengaus 2005; Rokas *et al.*, 2003). Προς την καλύτερη κατανόηση της φυλογένειας της *Wolbachia* έχουν αναπτυχθεί Multi Locus Sequence Typing (MLST) συστήματα (Baldo *et al.*, 2006a; Paraskevopoulos *et al.*, 2006). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αταίριαστη φυλογένεια της *Wolbachia* με τους ξενιστές. Για παράδειγμα οι υπερομάδες A-B και C-D διαχωρίστηκαν πριν από περίπου 100 εκατομμύρια χρόνια ενώ οι αντίστοιχοι ξενιστές, δηλαδή τα αρθρόποδα και οι νηματώδεις, διαχωρίστηκαν πριν από περισσότερα από 600 εκατομμύρια χρόνια. Οι δύο

πιθανές εξηγήσεις είναι ότι, είτε το βακτήριο προϋπήρχε στα αρθρόποδα ή στους νηματώδεις και μεταφέρθηκε οριζόντια ανάμεσα στα δύο φύλα, είτε ότι αποκτήθηκε οριζοντίως από κάποιο τρίτο οργανισμό (Bandi *et al.*, 1998). Η αποσαφήνιση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των υπερομάδων του βακτηρίου περιπλέκεται ακόμα περισσότερο από ενδείξεις για γεγονότα εκτεταμένου γενωμικού ανασυνδυασμού, ακόμα και μεταξύ στελεχών που κατατάσσονται σε διαφορετικές υπερομάδες (Baldo *et al.*, 2006b; Vavre *et al.*, 1999; Verne *et al.*, 2007).

1.2 Αποτελέσματα της συμβίωσης με *Wolbachia*

Ο όρος συμβίωση περιγράφει τη σχέση ανάμεσα σε έναν οργανισμό (συμβιώτης) ο οποίος ζει μέσα (ενδοσυμβίωση) ή σε στενή συνάφεια (εξωσυμβίωση) με έναν άλλο οργανισμό (ξενιστής). Ο παραπάνω ορισμός περιλαμβάνει ένα πλήθος αλληλεπιδράσεων μεταξύ οργανισμών, οι οποίες μπορεί να έχουν διαφορετικές επιπτώσεις στα εμπλεκόμενα μέρη. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μπορεί να είναι τέτοιες που: α) να ωφελούνται και οι δύο εμπλεκόμενοι οργανισμοί (Αμοιβαιότητα-Mutualism), β) να ωφελείται ο ένας οργανισμός χωρίς να βλάπτεται ο άλλος (Ομοσιτισμός-Commensalism) και γ) να ωφελείται ο ένας οργανισμός εις βάρος του δεύτερου (Παρασιτισμός-Parasitism). Τα βακτήρια *Wolbachia* έχουν αναπτύξει διαφορετικού τύπου συμβιωτικές σχέσεις στα δύο φύλα ξενιστών στα οποία απαντώνται, που κυμαίνονται από την αμοιβαιότητα μέχρι τον παρασιτισμό.

1.2.1 Αμοιβαιότητα στους νηματώδεις

Στους νηματώδεις η αλληλεπίδραση χαρακτηρίζεται από αμοιβαιότητα (Taylor and Hoerauf 1999). Αν και δεν έχουν αποσαφηνιστεί τα οφέλη που αποκομίζουν οι νηματώδεις από τη συμβίωση, δύο σημεία συνάδουν με την παραπάνω υπόθεση. Πρώτον, η απομάκρυνση της *Wolbachia* με αντιβιοτικά μειώνει τη διάρκεια ζωής των ενηλίκων, καταστέλλει την ανάπτυξη των προνομφικών σταδίων ή προκαλεί στειρότητα (Bandi *et al.*, 2001; Hoerauf *et al.*,

1999) και, δεύτερον, η φυλογένεια των βακτηρίων εντός των κλάδων των νηματώδων είναι απόλυτα σύμφωνη με αυτή των ξενιστών, γεγονός που παρατηρείται και σε άλλες περιπτώσεις αμοιβαιότητας (Funk *et al.*, 2000). Ένα ενδεχόμενο είναι η *Wolbachia* να προσφέρει μεταβολικές «υπηρεσίες» στους νηματώδεις. Το στέλεχος *wBm*, από τον νηματώδη της φιλαρίασης *Brugia malayi*, διαθέτει γονίδια που συνθέτουν πλήρες βιοσυνθετικό μονοπάτι για την παραγωγή αίμης (Foster *et al.*, 2005) το οποίο απουσιάζει από τον ξενιστή. Απουσία του μονοπατιού παρατηρείται και σε νηματώδεις οι οποίοι δεν εξαρτώνται από συμβιώτες, καθώς και σε κάποιους στους οποίους η πηγή αίμης είναι διατροφική (Attout *et al.*, 2005). Αυτό όμως δεν αποκλείει το ενδεχόμενο τα βακτήρια να δρουν συμπληρωματικά με τη διατροφή για την παροχή συστατικών, σε μια σχέση μεταβολικής αμοιβαιότητας με τους νηματώδεις.

1.2.2 Αμοιβαιότητα στα αρθρόποδα

Μέχρι πρόσφατα υπήρχε η πεποίθηση ότι η αλληλεπίδραση της *Wolbachia* με τους ξενιστές που ανήκουν στο φύλο των αρθροπόδων είναι αποκλειστικά παρασιτική. Αυτή η υπόθεση ετίθετο υπό αμφισβήτηση λόγω της παρατήρησης στελεχών *Wolbachia* τα οποία, ενώ δεν είναι ικανά να επάγουν παρασιτικούς φαινοτύπους στους φυσικούς ξενιστές τους, διατηρούνται και εξαπλώνονται με επιτυχία, κάνοντας πιθανή την υπόθεση ότι τα βακτήρια προσδίδουν κάποιο επιλεκτικό πλεονέκτημα στους ξενιστές τους.

1.2.2.1 Ανθεκτικότητα σε ιούς και άλλα παράσιτα

Το πιο ξεκάθαρο πλεονέκτημα που προσδίδεται από την παρουσία των βακτηρίων στον ξενιστή ότι η *Wolbachia* προσδίδει ανθεκτικότητα ενάντια στη μόλυνση από άλλους οργανισμούς. Πρόσφατες μελέτες στη *Drosophila* έδειξαν ότι η παρουσία *Wolbachia* προσδίδει ανθεκτικότητα ενάντια σε RNA ιούς. Συγκεκριμένα η παρουσία *Wolbachia* επιμηκύνει σημαντικά τον χρόνο ζωής ατόμων *D. melanogaster* που έχουν μολυνθεί από τον *Drosophila C virus*, τον *Cricket Paralysis virus*, τον *Flock House virus* και τον *Nora virus* (Hedges *et al.*,

2008; Teixeira *et al.*, 2008), Στο κουνούπι *Aedes aegypti*, είδος το οποίο δεν είναι φυσικά μολυσμένο με *Wolbachia*, η διαμόλυνση με το στέλεχος wMelPop προσδίδει ανθεκτικότητα ενάντια στους ιούς Δάγκειο και Chikungunya, αλλά και ενάντια στο *Plasmodium* (Moreira *et al.*, 2009).

1.2.2.2 Μεταβολική αμοιβαιότητα στα αρθρόποδα

Το γεγονός ότι αποσυμβιωτικά άτομα (άτομα από τα οποία έχουν αφαιρεθεί οι συμβιωτικοί οργανισμοί) στις περισσότερες περιπτώσεις συσχετισμών *Wolbachia-Arthropoda* δεν παρουσιάζουν προβλήματα, δείχνει ότι δεν πρόκειται για σχέσεις υποχρεωτικής διατροφικής αμοιβαιότητας (Obligatory nutritional mutualism). Μια τέτοια, καλά χαρακτηρισμένη περίπτωση, είναι η συμβιωτική σχέση του βακτηρίου *Buchnera aphidicola* με είδη της τάξης των αφιδών. Στην σχέση αυτή τα βακτήρια κατέχουν βιοσυνθετικά μονοπάτια τα οποία λείπουν από τον ξενιστή και τούμπαλιν, με αποτέλεσμα να υπάρχει απόλυτη εξάρτηση των δύο οργανισμών (Shigenobu *et al.*, 2000). Επίσης τα βακτήρια σε αυτόν το συσχετισμό, καθώς και σε άλλους συσχετισμούς υποχρεωτικής αμοιβαιότητας (π.χ. αυτόν της μύγας Tsetse με το βακτήριο *Wigglesworthia glossinidia*), εντοπίζονται μέσα σε ειδικά κύτταρα (bacteriocytes) τα οποία απαρτίζουν ειδικά όργανα, τα βακτηριόματα (bacteriome) (Chen *et al.*, 1999; Gottlieb *et al.*, 2006; Shigenobu *et al.*, 2000).

Πρόσφατα δείχτηκε ότι στο είδος του κοινού κοριού *Cimex lectularious*, η συμβίωση με *Wolbachia* παρουσιάζει ακριβώς τα χαρακτηριστικά αυτά της υποχρεωτικής διατροφικής αμοιβαιότητας (Hosokawa *et al.*, 2010). Η μελέτη αυτή έδειξε ότι η *Wolbachia* εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στα εξειδικευμένα όργανα, με εξαίρεση τις ωσθήκες, καθώς διατηρείται ο μητρικός τρόπος κληρονομησης. Επίσης δείχτηκε από την ίδια μελέτη ότι τα αποσυμβιωτικά άτομα, είναι μεν βιώσιμα, παρουσιάζουν όμως σημαντικές αναπτυξιακές ανωμαλίες, καθώς και ότι αυτές σώζονται με προσθήκη βιταμινών Β στην διατροφή. Αυτή είναι η πρώτη ξεκάθαρη απόδειξη του ρόλου της *Wolbachia* ως μεταβολικού μπουτουαλιστή (mutualist) και θέτει ιδιαίτερα ενδιαφέροντα ερωτήματα για την εξέλιξη των συμβιωτικών φαινοτύπων από προγενέστερους που φαντάζουν πολύ διαφορετικοί.

Τα βιοσυνθετικά μονοπάτια που περιγράφονται για τα παραπάνω στελέχη, συμπεριλαμβανομένων και αυτών των νηματωδών, απαντώνται και στα παρασιτικά στελέχη κάνοντας πιθανό το ενδεχόμενο, να μπορούν τα στελέχη αυτά να μεταβάλλουν την επίδρασή τους στους ξενιστές, ανάλογα με εξωγενείς συνθήκες. Στην *D.melanogaster* το παρασιτικό στέλεχος *wMel* φαίνεται να προσδίδει σημαντικό πλεονέκτημα γονιμότητας (fecundity) σε καταστάσεις διατροφικού στρες και συγκεκριμένα σε συνθήκες χαμηλού ή υψηλού σιδήρου (Brownlie *et al.*, 2009). Στην παρασιτική σφήκα *Asobara tabida* και στη *D. simulans* η παρουσία *Wolbachia* επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου της φερριτίνης (Kremer *et al.*, 2009). Η φερριτίνη είναι μια πρωτεΐνη η οποία εμπλέκεται στην αποθήκευση σιδήρου στα κύτταρα, η έκφραση της οποίας είναι αυξημένη σε αποσυμβατικά άτομα. Ο σίδηρος είναι ένα στοιχείο το οποίο εμπλέκεται στην δημιουργία τοξικών ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS-reactive oxygen species) και οι υψηλές συγκεντρώσεις του στη διατροφή της *A. tabida* επάγουν αποπτωτικούς μηχανισμούς κατά τη διάρκεια της ωογένεσης (Kremer *et al.*, 2009). Φαίνεται ότι η παρουσία *Wolbachia* εξισορροπεί την συγκέντρωση σιδήρου προστατεύοντας τον ξενιστή από φαινόμενα οξειδωτικού στρες.

1.2.2.3 Επίδραση σε αναπτυξιακές διαδικασίες

Η αύξηση του σιδήρου οδηγεί, όπως είδαμε παραπάνω, σε απόπτωση στις ωοθήκες της *A. tabida*. Παρόμοιο φαινόμενο έχει η απομάκρυνση των βακτηρίων με αντιβιοτικά. Έτσι, το στέλεχος *wAtab3* που απαντάται στην *A. tabida* είναι υποχρεωτικός συμβιώτης, μια και ο ξενιστής αδυνατεί να παράγει ώριμα ωοκύτταρα απουσία του βακτηρίου (Dedeine *et al.*, 2005; Pannebakker *et al.*, 2007), ενώ τα συγγενικά στελέχη *wAtab1* και *wAtab2* του ίδιου ξενιστή δεν έχουν αυτή την επίδραση, αλλά επάγουν κυτταροπλασματική ασυμβατότητα. Στην συγκεκριμένη περίπτωση δεν είναι ξεκάθαρο αν πρόκειται για την εξέλιξη ενός συσχετισμού αμοιβαίου κέρδους ή αν πρόκειται για μια μορφή «γενετικού εθισμού» στο παράσιτο, όπου ο ξενιστής μεταβάλλει την έκφραση των γονιδίων του προκειμένου να αντιπαρέλθει την επίδραση του βακτηρίου, με αποτέλεσμα η απομάκρυνση του τελευταίου να έχει καταστρεπτικά αποτελέσματα.

Παρόμοια εμπλοκή της *Wolbachia* σε αναπτυξιακή διαδικασία και συγκεκριμένα στην ωογένεση παρατηρείται και στη *D. melanogaster*. Το στέλεχος wMel σώζει μερικώς φαινοτύπους υπερπολλαπλασιασμού των πρόδρομων γαμετικών κυττάρων που οφείλονται στην ελαττωμένη λειτουργία της πρωτεΐνης Sxl, που είναι ο κύριος ρυθμιστής του φυλοκαθορισμού στη *Drosophila* (Starr and Cline 2002). Η Sxl στις ωοθήκες φαίνεται να έχει δύο δράσεις: α) ρυθμίζει την έξοδο των κυστοκυττάρων (cystocytes, βλέπε παράγραφο 1.3.2) από την φάση του πολλαπλασιασμού και β) εμπλέκεται στον μηχανισμό του μειωτικού ανασυνδυασμού. Η *Wolbachia* αλληλεπιδρά με το *sxl* μόνο όσον αφορά την πρώτη (Sun and Cline 2009). Ο μηχανισμός δεν είναι γνωστός αλλά οι συγγραφείς αποκλείουν να οφείλεται σε αύξηση της έκφρασης του *sxl* γονιδίου και δείχνουν ευθεία αλληλεπίδραση με την ενεργότητα της πρωτεΐνης Sxl, μια και η παρουσία των βακτηρίων δεν σώζει πανομοιότυπους φαινότυπους που προκαλούνται από μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια.

1.2.3 Αναπαραγωγικός παρασιτισμός

Πιο διαδεδομένες και γνωστές όμως είναι οι επιβλαβείς επιπτώσεις της μόλυνσης και συγκεκριμένα ο ρόλος της *Wolbachia* ως αναπαραγωγικό παράσιτο. Ως αναπαραγωγικός παρασιτισμός αναφέρεται η χειραγώγηση του αναπαραγωγικού συστήματος του ξενιστή κατά τρόπο τέτοιο, ώστε να ευνοείται η εξάπλωση του παρασίτου. Η παρουσία *Wolbachia* προκαλεί ένα πλήθος αναπαραγωγικών ανωμαλιών στα αρθρόποδα οι οποίες ευνοούν τα μολυσμένα θηλυκά άτομα και άρα την μετάδοση και εξάπλωση των βακτηρίων (Bourtzis *et al.*, 2003; Werren *et al.*, 2008). Παρακάτω παρατίθενται αυτοί οι φαινότυποι, με ιδιαίτερη έμφαση στον πιο διαδεδομένο και μελετημένο, αυτόν της Κυτταροπλασματικής Ασυμβατότητας (Cytoplasmic Incompatibility, CI).

1.2.3.1 Θηλυκοποίηση

Σε πολλά είδη χερσαίων ισοπόδων, η μόλυνση με *Wolbachia* επάγει τη θηλυκοποίηση αρσενικών, γονοτυπικά, ατόμων (Bouchon *et al.*, 1998; Rigaud 1997). Ο μηχανισμός δράσης φαίνεται να εμπλέκει την καταστολή του

ανδρογονικού αδένου, με αποτέλεσμα την θηλυκοποίηση (Vandekerckhove *et al.*, 2003). Διαφορετικός μηχανισμός φαίνεται να ισχύει στα έντομα (Lepidoptera, Hemiptera) όπου παρατηρείται θηλυκοποίηση (Hiroki *et al.*, 2002; Negri *et al.*, 2006). Στην περίπτωση αυτή η *Wolbachia* φαίνεται να επιδρά σε κάποιο σημείο του μονοπατιού του φυλοκαθορισμού και η αφαίρεσή της, σε οποιοδήποτε στάδιο της ανάπτυξης, οδηγεί σε δημιουργία ερμαφρόδιτων ατόμων (Narita *et al.*, 2007).

1.2.3.2 Παρθενογένεση

Παρθενογένεση σχετιζόμενη με *Wolbachia* έχει περιγραφεί σε Hymenoptera, Acarea και Thysanoptera, σε είδη δηλαδή, που έχουν απλοδιπλοειδή φυλοκαθορισμό (Arakaki *et al.*, 2001; Gottlieb *et al.*, 1998; Jeong and Stouthamer 2005; Stouthamer 1997; Weeks and Breeuwer 2001). Τα μολυσμένα, με *Wolbachia*, θηλυκά αντί να παράγουν απλοειδή αρσενικά από μη γονιμοποιημένα έμβρυα, παράγουν διπλοειδή θηλυκά. Δύο διαφορετικοί μηχανισμοί, μέσω των οποίων συμβαίνει αυτό, έχουν χαρακτηριστεί, αμφότεροι εκ των οποίων οδηγούν σε μη φυσιολογική διπλοειδοποίηση των απλοειδών εμβρύων. Είτε η ανάφαση της πρώτης μιτωτικής διαίρεσης στο αναπτυσσόμενο έμβρυο είναι ανεπιτυχής, είτε οι δύο πυρήνες που προκύπτουν από την φυσιολογική ολοκλήρωση της, συντήκονται σε έναν (Gottlieb *et al.*, 2002; Rannebakker *et al.*, 2004). Αποτέλεσμα είναι η δημιουργία διπλοειδών εμβρύων και στις δύο περιπτώσεις.

1.2.3.3 Θανάτωση αρσενικών

Η θανάτωση αρσενικών, επαγόμενη από *Wolbachia*, έχει παρατηρηθεί σε τέσσερις τάξεις αρθροπόδων, τα Coleoptera (Fialho and Stevens 2000), Lepidoptera (Dyson *et al.*, 2002), Pseudoscorpiones (Zeh *et al.*, 2005) και Diptera (Dyer and Jaenike 2004). Τα αρσενικά άτομα στο λεπιδόπτερο *O. scapulalis* πεθαίνουν κατά τη διάρκεια των προνυμφικών σταδίων μέσω ενός μηχανισμού που θυμίζει, φαινοτυπικά, τον φαινόμενο της θηλυκοποίησης. Απουσία *Wolbachia* τα θηλυκά άτομα πεθαίνουν κατά τη διάρκεια των

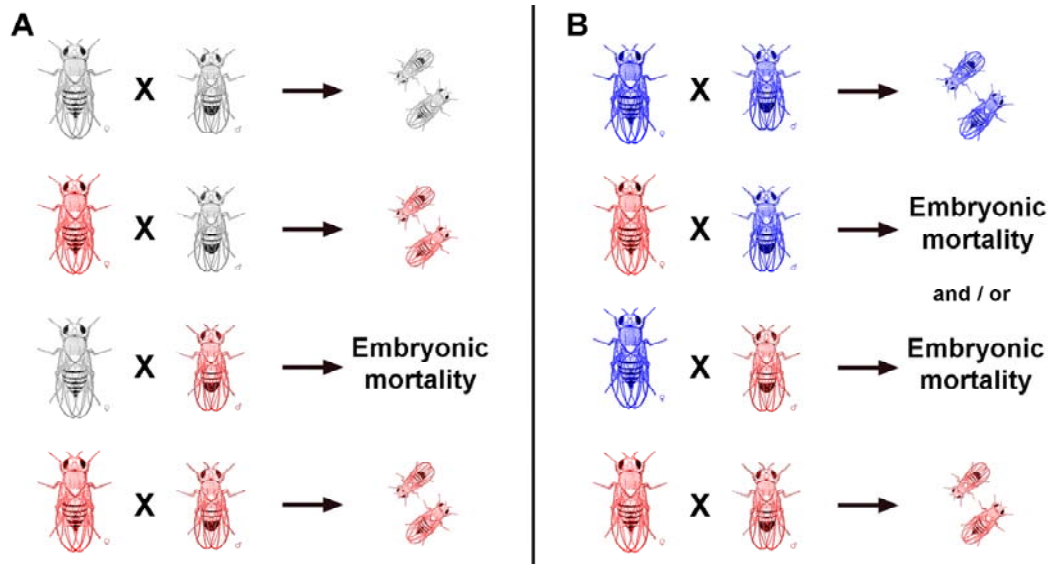
προνυμφικών σταδίων με αποτέλεσμα να παράγονται μόνο αρσενικά. Παρουσία του βακτηρίου παράγονται μόνο θηλυκά άτομα μέσα από μια διαδικασία όπου τα γονοτυπικά αρσενικά θηλυκοποιούνται και πεθαίνουν κατά τα προνυμφικά στάδια (Kageyama and Traut 2004). Ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι γνωστός, καθώς και το αν διαφέρει μεταξύ των τεσσάρων προαναφερθέντων τάξεων.

1.2.3.4 Κυτταροπλασματική ασυμβατότητα

Στις τρεις παραπάνω περιπτώσεις η μόλυνση με *Wolbachia* προσδίδει ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα στα μολυσμένα θηλυκά άτομα. Το ίδιο ισχύει και για την κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (CI), τον πιο διαδεδομένο και μελετημένο φαινότυπο που επάγεται από *Wolbachia* (Bourtzis *et al.*, 2003; Werren 1997). Κυτταροπλασματική ασυμβατότητα έχει αναφερθεί για μεγάλο αριθμό εντόμων όπως Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Orthoptera και Lepidoptera, όπως επίσης και σε αρκετά είδη Acarea και σε Isopoda (ανασκόπηση από (Bourtzis *et al.*, 2003)).

Ο φαινότυπος της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας εκφράζεται ως υψηλό ποσοστό θνησιμότητας εμβρύων ή ως ασυνήθιστη αναλογία απογόνων σε μια δεδομένη διασταύρωση. Γενικά, ο μηχανισμός φαίνεται να είναι η εξάλειψη των πατρικών χρωμοσωμάτων, γεγονός που κάνει τα αναπτυσσόμενα έμβρυα απλοειδή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το θάνατο των εμβρύων αυτών σε διπλοειδή είδη, ενώ σε κάποια απλοδιπλοειδή είδη τα έμβρυα αυτά αναπτύσσονται ως φυσιολογικά, απλοειδή αρσενικά άτομα. Πιο συγκεκριμένα, οι διασταυρώσεις ανάμεσα σε μολυσμένα αρσενικά και μη μολυσμένα θηλυκά άτομα είναι ασύμβατες, γεγονός που δεν ισχύει για την αντίστροφη διασταύρωση ή για τη διασταύρωση όπου αμφότεροι οι γονείς είναι μολυσμένοι (Εικόνα 1.1). Καθώς μπορεί να συνυπάρχουν περισσότερα του ενός στελέχη *Wolbachia* στον ίδιο ξενιστή, μια πιο περίπλοκη έκφραση του φαινομένου είναι αυτή όπου ασύμβατες είναι οι διασταυρώσεις ανάμεσα σε άτομα μολυσμένα με διαφορετικά, ασύμβατα μεταξύ τους, στελέχη του βακτηρίου (bidirectional CI) (Merçot *et al.*, 1995; Perrot-Minnot *et al.*, 1996; Zabalou *et al.*, 2008). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.1 τα μολυσμένα θηλυκά έχουν επιλεκτικό πλεονέκτημα

έναντι των μη μολυσμένων μια και, θεωρητικά, παράγουν διπλάσιο αριθμό απογόνων. Με αυτόν τον τρόπο ευνοείται η εξάπλωση της *Wolbachia* στον πληθυσμό.



Εικόνα 1.1. Σχηματική απεικόνιση Κυτταροπλασματικής Ασυμβατότητας (CI).Α. Μονόδρομη κυτταροπλασματική ασυμβατότητα, Β. Αμφίδρομη κυτταροπλασματική ασυμβατότητα, Το κάθε χρώμα αντιστοιχεί σε μόλυνση με διαφορετικό στέλεχος *Wolbachia* και το γκρι σε απουσία μόλυνσης.

Ο μηχανισμός του CI δεν έχει αποσαφηνιστεί, αλλά φαίνεται να περιλαμβάνει μια λειτουργία τροποποίησης του σπέρματος (mod function, (Werren 1997)), η οποία επηρεάζει τον πατρικό προπυρήνα αυτόν καθ' εαυτόν και όχι κάποια εξωπυρηνική πρωτεΐνη (Presgraves 2000). Πρόσφατα δείχτηκε ότι η άγνωστη αυτή τροποποίηση έχει ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση στην *de novo* συναρμολόγηση των νουκλεοσωμάτων του πατρικού προπυρήνα με μητρικές ιστόνες, γεγονός που συμβαίνει αμέσως μετά τη γονιμοποίηση, καθώς και καθυστέρηση της αντιγραφής που προηγείται της πρώτης μίτωσης (Landmann *et al.*, 2009). Ενδεχομένως τα δυο αυτά γεγονότα να έχουν αιτιακή σχέση μια και η συναρμολόγηση των νουκλεοσωμάτων απαιτείται για την αντιγραφή του DNA (Groth *et al.*, 2007). Τα παραπάνω εξηγούν της προγενέστερες παρατηρήσεις ότι ο πατρικός προπυρήνας παρουσιάζει

καθυστερημένη, σε σχέση με τον μητρικό, ενεργοποίηση της Cdk1, μίας κινάσης που εμπλέκεται στην μετάβαση στη μίτωση, και ότι δεν επιτελείται φυσιολογικός διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων κατά την πρώτη ανάφαση (Tram and Sullivan 2002; Tram *et al.*, 2006). Λόγω του μη φυσιολογικού διαχωρισμού τους τα πατρικά χρωμοσώματα κατακερματίζονται κατά την πρώτη ανάφαση, γεγονός που καθιστά τα CI έμβρυα απλοειδή. Η παρουσία του ίδιου στελέχους *Wolbachia* στο έμβρυο σώζει τον CI φαινότυπο (*resc* function, (Werren 1997)), μέσω ενός επίσης άγνωστου, μέχρι σήμερα μηχανισμού.

Σύμφωνα με την ικανότητα τους να τροποποιούν το σπέρμα και να σώζουν την τροποποίηση στο έμβρυο, τα στελέχη της *Wolbachia* κατατάσσονται σε τέσσερις κατηγορίες: Στελέχη mod^+resc^+ που έχουν την ικανότητα επάγουν CI και να σώζουν την τροποποίηση (Hoffmann and Turelli 1988), mod^-resc^- που δεν τροποποιούν το σπέρμα ούτε έχουν την ικανότητα να σώζουν την τροποποίηση άλλων στελεχών (Hoffmann *et al.*, 1996), mod^-resc^+ που δεν επάγουν CI αλλά έχουν τη δυνατότητα να σώζουν την τροποποίηση από άλλα στελέχη (Bourtzis *et al.*, 1998) και τέλος mod^+resc^- που ενώ έχουν την ικανότητα τροποποίησης δεν μπορούν να σώσουν τον φαινότυπο (Zabalou *et al.*, 2008). Η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα δεν είναι ένα απόλυτο φαινόμενο. Ακόμα και μεταξύ των mod^+ στελεχών υπάρχουν διακυμάνσεις από ~25% μέχρι και 100% εμβρυϊκή θνησιμότητα. Οι φαινότυποι που επάγονται από τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1.

1.3 CI-*Wolbachia* και ξενιστές

1.3.1 Σπερματογένεση

Μικροσκοπικές μελέτες αναφέρουν η *Wolbachia* εντοπίζεται στους όρχεις του ξενιστή, τόσο σε σπερματοκύστες όσο και σε σωματικά κύτταρα (Bressac and Rousset 1993; Clark *et al.*, 2002). Το βακτηριακό φορτίο που παρατηρείται στις σπερματοκύστες διαφέρει ανάλογα με το συσχετισμό *Wolbachia*-ξενιστή

(Clark *et al.*, 2003). Αν και μέχρι πρόσφατα υπήρχε η πεποίθηση ότι υπάρχει θετικός συσχετισμός της έντασης της μόλυνσης των σπερματοκύστεων με την ένταση του φαινομένου του CI, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι σε τρεις διαφορετικές τάξεις εντόμων (Hymenoptera, Coleoptera και Diptera) κάτι τέτοιο δεν ισχύει. Σε τρία είδη στα οποία παρατηρείται υψηλό επίπεδο CI, η παρουσία *Wolbachia* στους όρχεις είναι σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα (Clark *et al.*, 2008; Riparbelli *et al.*, 2007; Zabalou *et al.*, 2008). Οι παραπάνω μελέτες πιθανολογούν ότι δεν χρειάζεται φυσική επαφή των βακτηρίων με το αναπτυσσόμενο σπέρμα και ενδεχομένως κάποιος διαχεόμενος παράγοντας να τροποποιεί τα πατρικά χρωμοσώματα.

1.3.2 Ωογένεση

Ο εντοπισμός των βακτηρίων στο έμβρυο είναι ζωτικής σημασίας για την μετάδοση του. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό τα βακτήρια έχουν αναπτύξει μηχανισμούς με τους οποίους μεταφέρονται στο αναπτυσσόμενο ωκύτταρο. Εκεί, όπως θα δούμε παρακάτω τα βακτήρια θα αποκτήσουν συγκεκριμένη κατανομή, ή οποία θα διατηρηθεί μέχρι τα στάδια της εμβρυογένεσης.

Συνοπτικά, η ωογένεση στη *Drosophila* λαμβάνει χώρα μέσα σε δύο ωοθήκες οι οποίες αποτελούνται από ανεξάρτητες μονάδες παραγωγής αυγών, τα ovarioles (Εικόνα 1.2, για τα σχηματική απεικόνιση ενός ovariole με προφανή τα στάδια της ωογένεσης). Στον πρόσθιο πόλο βρίσκονται τα βλαστικά κύτταρα της γαμετικής σειράς, τα οποία θα δώσουν το κύτταρο που θα ξεκινήσει τη διαδικασία διαφοροποίησης ώστε να σχηματιστεί το ωκυτταρικό διαμέρισμα (egg chamber). Το πρόδρομο αυτό κύτταρο θα υποστεί τέσσερις μιτωτικές διαιρέσεις με ατελή κυτταροκίνηση, που θα σχηματίσουν μια κύστη από 16 διασυνδεδεμένα κύτταρα (cystocytes). Ένα από αυτά τα 16 κύτταρα θα διαφοροποιηθεί ως ωκύτταρο, ενώ τα υπόλοιπα 15 θα πολυπλοειδοποιηθούν και θα γίνουν τροφοκύτταρα που θα παρέχουν τα απαραίτητα συστατικά στο ωκύτταρο. Το ωκυτταρικό διαμέρισμα θα αναπτύσσεται καθώς κινείται οπίσθια μέσα στο ovariole, μέχρι να καταλήξει ώριμο στον οπίσθιο πόλο. Καθ' όλη τη διάρκεια της ωογένεσης, σημαντικό ρόλο παίζει ένα δυναμικό δίκτυο μικροσωληνίσκων, το οποίο συμμετέχει εκτός των άλλων στη μεταφορά

παραγόντων προς το ωκύτταρο μέσω πρωτεϊνών μεταφοράς σχετιζόμενες με μικροσωληνίσκους (microtubule associated motor proteins). Το οργανωτικό κέντρο αυτού του δικτύου βρίσκεται στον οπίσθιο πόλο του αναπτυσσόμενου ωκυττάρου και οι (+) απολήξεις των μικροσωληνίσκων εκτείνονται προς το πρόσθιο και μέσα στα τροφοκύτταρα. Αυτή η πολικότητα των μικροσωληνίσκων στο ωκύτταρο θα διατηρηθεί μέχρι το στάδιο 6 περίπου της ωογένεσης, όποτε και αναστρέφεται. Στο στάδιο αυτό ο πυρήνας του ωκυττάρου που εντοπιζόταν στον οπίσθιο πόλο μετακινείται προσθιοπλευρικά. Στο ίδιο στάδιο αρχίζει να παρατηρείται η κατανομή των *oskar* και *bicoid* mRNAs, οπίσθια και πρόσθια, αντίστοιχα, τα οποία και θα καθορίσουν τον προσθιοπίσθιο άξονα του εμβρύου. Στον οπίσθιο πόλο, η παρουσία του *osk* mRNA θα δημιουργήσει ένα σύμπλοκο από mRNAs, πρωτεΐνες, μιτοχόνδρια και ριβοσώματα, το πολικό πλάσμα (pole plasm), το οποίο εμπλέκεται στον καθορισμό των πολικών κυττάρων κατά την εμβρυογένεση. Στο στάδιο 10 περίπου το ωκύτταρο αυξάνει κατά πολύ τον όγκο του μέσω μιας διαδικασίας που λέγεται cytoplasmic dumping όπου το μεγαλύτερο μέρος του κυτταροπλάσματος των τροφοκυττάρων μεταφέρεται στο ωκύτταρο, προτού αυτά αποδομηθούν. (Ανασκόπηση της ωογένεσης από (Bastock and St Johnston 2008)).



Εικόνα 1.2. Στάδια της ωογένεσης στη *Drosophila*. Διακρίνεται ένα οvariolo με σχεδόν όλα τα στάδια της ανάπτυξης του ωκυτταρικού διαμερίσματος. Από αριστερά προς τα δεξιά, πρόσθιος και οπίσθιος πόλος, αντίστοιχα. Στον οπίσθιο πόλο διακρίνεται το germarium όπου αναπτύσσεται η κύστη από τα πρόδρομα κύτταρα της γαμετικής σειράς. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στα στάδια ανάπτυξης την κυτταροπλασματικών διαμερισμάτων. Εικόνα από Bastock and St Johnston (Bastock and St Johnston 2008).

Η *Wolbachia* εντοπίζεται στα πρόδρομα κύτταρα, εξασφαλίζοντας έτσι τον εντοπισμό της στα κυτταροπλασματικά διαμερίσματα (Ferree *et al.*, 2005). Εκεί τα βακτήρια εντοπίζονται στην πρόσθια πλευρά του πυρηνικού φακέλου

του πυρήνα του ωοκυττάρου (germinal vesicle) κατά το στάδιο 6, σε μια διαδικασία για την οποία είναι απαραίτητη η minus-end-directed motor πρωτεΐνη, Dynein (Ferree *et al.*, 2005; Riechmann and Ephrussi 2001). Ο εντοπισμός αυτός φαίνεται να εμπλέκει το δίκτυο των μικροσωληνίσκων, καθώς ο αποπολυμερισμός τους αποσυνθέτει αυτήν την κατανομή (Ferree *et al.*, 2005). Επίσης απαραίτητες για τη μεταφορά των βακτηρίων στο ωοκύτταρο είναι οι πρωτεΐνες Dynein και το σύμπλοκο Dynactin, το οποίο μεσολαβεί της πρόσδεσης της Dynein με το φορτίο της (Ferree *et al.*, 2005; Karcher *et al.*, 2002). Στο στάδιο 7, όπως προαναφέρθηκε, αντιστρέφεται η πολικότητα του δικτύου των μικροσωληνίσκων και οι (+) απολήξεις εντοπίζονται πλέον στον οπίσθιο πόλο του ωοκυττάρου. Στο στάδιο αυτό τα βακτήρια χάνουν τον πρόσθιο εντοπισμό τους και βρίσκονται διάσπαρτα στο κυτταρόπλασμα (Ferree *et al.*, 2005). Στα στάδια 9 και 10 τα διαφορετικά στελέχη του βακτηρίου παρουσιάζουν διαφορετικές κατανομές (Veneti *et al.*, 2004). Το στέλεχος wMel εντοπίζεται στον οπίσθιο πόλο, τα wRi και wHa διάσπαρτα στο κυτταρόπλασμα, ενώ τα wNo και wMa κατανέμονται πρόσθια. Η κατανομή αυτή διατηρείται ανεξάρτητα από το υπόβαθρο του ξενιστή στον οποίο βρίσκονται τα βακτήρια και άρα ελέγχεται από τα βακτήρια (Veneti *et al.*, 2004). Στην περίπτωση του wMel η οπίσθια κατανομή εξαρτάται από την παρουσία της plus-end-directed motor πρωτεΐνης Kinesin-1 και η πρόσδεση τους εκεί προϋποθέτει την παρουσία του πολικού πλάσματος (Serbus and Sullivan 2007).

1.3.3 Εμβρυογένεση

Στην παράγραφο 1.2.3.4 αναφέρθηκαν τα κυτταρικά γεγονότα που φαίνεται να οδηγούν στην εμβρυϊκή θνησιμότητα. Η κατανομή του βακτηρίου στα έμβρυα φαίνεται να διατηρείται σύμφωνα με την κατανομή που παρατηρείται στα ωοκύτταρα με αποτέλεσμα λιγότερα ή περισσότερα από αυτά να εντοπίζονται στα πολικά κύτταρα (τα κύτταρα που θα δώσουν τη γαμετική σειρά) όταν αυτά σχηματιστούν κατά την κυτταροποίηση του βλαστοδέρματος (Veneti *et al.*, 2004). Τα στελέχη *Wolbachia* που παρουσιάζουν πρόσθια η οπίσθια κατανομή δεν εντοπίζονται εξ ολοκλήρου στους πόλους, αλλά κάποια βρίσκονται διάσπαρτα στο κυτταρόπλασμα. Μέχρι τώρα πιστεύαμε τα

διάσπαρτα βακτήρια αλληλεπιδρούσαν μόνο με τους αστρικούς μικροσωληνίσκους που σχηματίζονται κατά τις μιτώσεις των πυρηνικών διαιρέσεων (Εικόνα 3.13), μέχρι τη 10^η πυρηνική διαίρεση (Kose and Karr 1995). Στο στάδιο αυτό οι πυρήνες μεταναστεύουν στο φλοιό του εμβρύου σχηματίζοντας το συγκυτιακό βλαστόδερμα (syncytial blastoderm) και τα βακτήρια αποκτούν συνάφεια με αυτούς, χάνοντας τη διάσπαρτη κατανομή τους. Στο κεφάλαιο 3.3 παρουσιάζω παρατηρήσεις, που έγιναν κατά τη διάρκεια αυτής της διατριβής, που αν και δεν σχετίζονται άμεσα με το θέμα της, προτείνουν ότι τα βακτήρια βρίσκονται σε συνάφεια με τους πυρηνικούς φακέλους από προγενέστερα στάδια της εμβρυογένεσης.

1.4 Γονιδιώματα *Wolbachia*

Η ολοκλήρωση της αλληλούχισης των γονιδιωμάτων τεσσάρων στελεχών *Wolbachia* - τριών παρασιτικών που επάγουν CI (*wMel*, *wRi* και *wPip*) (Klasson *et al.*, 2008; Klasson *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2004) και ενός που παρουσιάζει αμοιβαιότητα (*wBm*) (Foster *et al.*, 2005) - προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για την βιολογία του βακτηρίου.

Τα βακτήρια που ανήκουν στα *Wolbachiaceae*, έχουν μικρά γονιδιώματα (~1 - 1.7 Mb), γεγονός που συμφωνεί με την ελάττωση των γονιδιωμάτων που παρατηρείται με την προσαρμογή σε ενδοκυτταρικό περιβάλλον (Klasson *et al.*, 2009; Tamas *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2004). Σε αντίθεση όμως με τα γονιδιώματα συγγενικών, υποχρεωτικά ενδοκυττάρων, βακτηρίων στο γονιδίωμα της *Wolbachia* παρατηρείται πολύ υψηλός αριθμός επαναλαμβανόμενων και μεταθετών στοιχείων. Αυτά περιλαμβάνουν βακτηριοφαγικά στοιχεία, κάποια από αυτά ενεργά (Bordenstein *et al.*, 2006), και γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες με επαναλήψεις αγκυρίνης (Ankyrin-repeat-like domain proteins, ANK) (Klasson *et al.*, 2008; Klasson *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2004). Η παρουσία φαγικών στοιχείων μπορεί να εξηγήσει την μεγάλη ποικιλομορφία που παρατηρείται στα στελέχη της *Wolbachia* και έχει προταθεί ότι η μεταφορά γονιδίων μέσω των φάγων μπορεί να σχετίζεται με την έκφραση των αναπαραγωγικών φαινοτύπων (Bordenstein and Wernegreen 2004;

Bordenstein *et al.*, 2006; Gavotte *et al.*, 2004). Το γεγονός ότι τα γονιδιώματα των στελεχών *Wolbachia* που μολύνουν νηματώδεις δεν περιέχουν φαγικά στοιχεία ενισχύει αυτή την υπόθεση (Fenn and Blaxter 2006; Foster *et al.*, 2005). Αντιστοίχως, σε αυτά τα στελέχη παρατηρείται σημαντικά μικρότερος αριθμός επαναλαμβανόμενων στοιχείων. Το γονιδίωμα του wBm περιέχει 10 ANK γονίδια (Fenn and Blaxter 2006; Foster *et al.*, 2005), ενώ τα γονιδιώματα των παρασιτικών στελεχών wMel, wRi και wPip περιέχουν 23, 39 και 60 αντίστοιχα (Klasson *et al.*, 2008; Klasson *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2004). Οι ANK πρωτεΐνες αποτελούν πιθανούς υποψηφίους για εμπλοκή τόσο στην αλληλεπίδραση της *Wolbachia* με τους ξενιστές γενικά, όσο και στην επαγωγή των αναπαραγωγικών φαινοτύπων και θα παρουσιαστούν αναλυτικά παρακάτω. Ένα ακόμα ενδιαφέρον στοιχείο που προκύπτει από τη γονιδιωματική ανάλυση, είναι το γεγονός ότι όλα τα στελέχη που έχουν μέχρι τώρα μελετηθεί, περιέχουν γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την παρουσία ενός λειτουργικού εκκριτικού συστήματος τύπου IV (TFSS) (Masui *et al.*, 2000). Το TFSS είναι ένα σύστημα έκκρισης το οποίο απαντάται σε πολλά παθογόνα και συμβιωτικά βακτήρια και συχνά εκκρίνει πρωτεΐνες τελεστές (effector proteins), που εμπλέκονται στη συμβίωση ή στην παθογένεση, μεταξύ των οποίων και ANK πρωτεΐνες (Backert and Meyer 2006; Lin *et al.*, 2007; Rikihisa and Lin 2010).

1.5 Αγκυρίνες

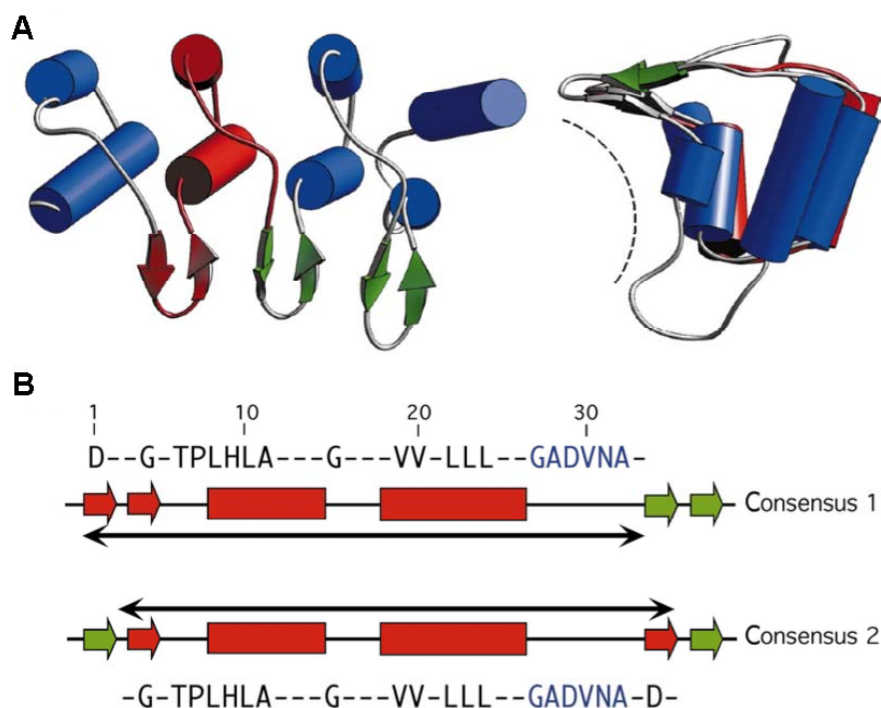
1.5.1 Γενικά

Η επανάληψη αγκυρίνης (ANK repeat) είναι ένα χαρακτηριστικό, συντηρημένο, πρωτεϊνικό μοτίβο το οποίο αποτελείται από 33 αμινοξέα. Ο αριθμός των επαναλήψεων που παρατηρούνται ανα πρωτεΐνη μπορεί να διακυμαίνεται από μία έως και πάνω από είκοσι. Η δευτεροταγής δομή του είναι χαρακτηριστική, με 2 αντιπαράλληλες α-έλικες και δύο αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες, κάθετα διατεταγμένες μεταξύ τους, δημιουργώντας ένα χαρακτηριστικό σχήμα Γ (Εικόνα 1.3) (Sedgwick and Smerdon 1999). Το μοτίβο πρωτοπαρατηρήθηκε στις πρωτεΐνες Swi6p και Cdc10p (ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου στο γένος *Saccharomyces*) και στις πρωτεΐνες Notch και LIN-12 (αναπτυξιακές πρωτεΐνες στη *Drosophila* και στον *C. elegans*, αντίστοιχα) (Breedon and Nasmyth 1987) και πήρε το όνομα του όταν ανακαλύφθηκαν 24 τέτοιες επαναλήψεις στην ανθρώπινη κυτταροσκελετική πρωτεΐνη Ankyrin (Lux *et al.*, 1990). Το πρωτεϊνικό μοτίβο ANK απαντάται σε ένα πλήθος πρωτεϊνών με διαφορετικές λειτουργίες όπως ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, ρυθμιστές αναπτυξιακών μονοπατιών, μεταγραφικούς παράγοντες, ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες και τοξίνες και εμπλέκεται σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις (Sedgwick and Smerdon 1999). Το εύρος των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρούν οι ANK πρωτεΐνες είναι αντίστοιχα μεγάλο και δεν έχει αναγνωριστεί κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο με το οποίο αλληλεπιδρούν.

1.5.2 Αγκυρίνες και βακτήρια

Οι ANK πρωτεΐνες απαντώνται πιο συχνά στους ευκαρυώτες, αλλά έχουν βρεθεί και σε πολλά είδη βακτηρίων, που ως επί το πλείστον ανήκουν στα Proteobacteria (Al-Khodor *et al.*, 2009). Η κυρίαρχη άποψη ήταν ότι η πρωτεϊνική περιοχή ANK είναι ευκαρυωτικής καταγωγής και αποκτήθηκε

οριζόντια από τα βακτήρια, αλλά η ανακάλυψη ANK πρωτεϊνών σε Archaeobacteria την θέτει υπό αμφισβήτηση (Al-Khodor *et al.*, 2009). Κάποιες ANK πρωτεΐνες σε ένα πλήθος παθογόνων βακτηρίων εκκρίνονται στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή και εμπλέκονται στους μηχανισμούς της παθογένεσης. Τα είδη *Legionella pneumophila* (Al-Khodor *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2008), *Coxiella burnetii* (Pan *et al.*, 2008), *Anaplasma* spp. (Lin *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2004) και *Rickettsia* spp. (Sexton and Vogel 2002) εκκρίνουν ANK πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα των ξενιστών τους, μέσω του TFSS, κάποιες από τις οποίες έχει αποδειχτεί ότι αλληλεπιδρούν με παράγοντες του ξενιστή (Pan *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2004). Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει μια διαμεμβρανική ANK πρωτεΐνη της *Pseudomonas aeruginosa*, με κυτταροπλασματικό αμινοτελικό άκρο, μια διαμεμβρανική περιοχή και καρβοξυτελικό άκρο στον περιπλασματικό χώρο, η οποία φαίνεται να εμπλέκεται στον μηχανισμό ανθεκτικότητας στο H₂O₂ (Howell *et al.*, 2000).



Εικόνα 1.3. Απεικόνιση της δομής των επαναλήψεων αγκυρίνης. Α. Τριτοταγής δομή, Β. Δισδιάστατη απεικόνιση της δευτεροταγούς δομής με επισήμανση των πιο συντηρημένων αμινοξέων του μοτίβου. Οι ράβδοι αντιστοιχούν σε α-έλικες και τα βέλη σε β-πτυχώσεις. Εικόνα προσαρμοσμένη από Sedgwick and Smerdon (Sedgwick and Smerdon 1999).

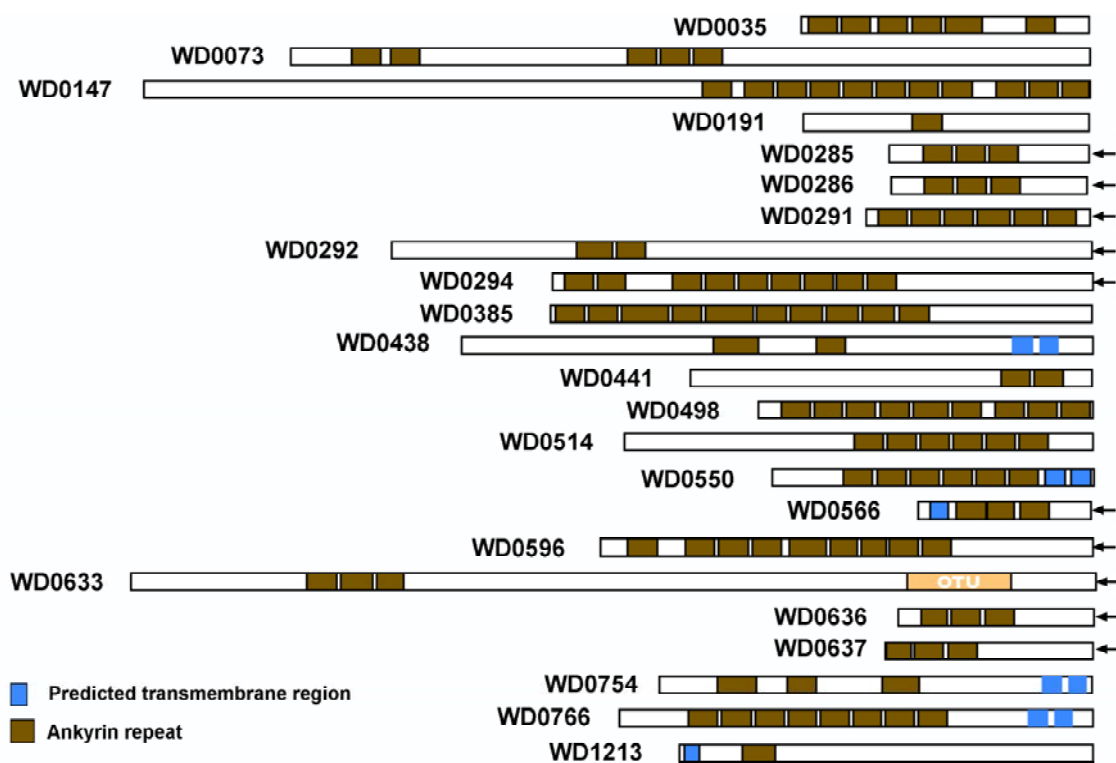
1.5.3 Αγκυρίνες και *Wolbachia*

Το γεγονός ότι στα παρασιτικά στελέχη *Wolbachia* απαντώνται μεγάλοι αριθμοί ANK γονιδίων σε σύγκριση με τα μη παρασιτικά και άλλα συγγενικά βακτήρια (Dunning Hotopp *et al.*, 2006; Foster *et al.*, 2005; Klasson *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2004), καθώς και ο ρόλος των γονιδίων αυτών που περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο, τα θέτουν ως υποψήφια να εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις με τους ξενιστές.

Το στέλεχος *wMel* φέρει 23 ANK γονίδια, εκ των οποίων τα 10 φέρονται από τα χαρακτηρισμένα φαγικά στοιχεία (Εικόνα 1.4). Ο αριθμός των επαναλήψεων ανα γονίδιο ποικίλει και κυμαίνεται από 1-11 (πρόβλεψη σύμφωνα με τον αλγόριθμο SMART (Letunic *et al.*, 2008)). Η ίδια τεχνική πρόβλεψης επιβεβαιώνει ότι δεν υπάρχουν γνωστά μοτίβα που θα μπορούσαν να βοηθήσουν την κατανόηση της λειτουργίας των ANK πρωτεϊνών (Wu *et al.*, 2004) για 22 από τις 23 πρωτεΐνες. Κατά τη διάρκεια αυτής της διατριβής και χρησιμοποιώντας την παραπάνω τεχνική πρόβλεψης δευτεροταγών δομών, ανακάλυψα μια μέχρι τώρα άγνωστη, σύμφωνα με τη γνώση μου της βιβλιογραφίας, περιοχή στην πρωτεΐνη WD0633, ή οποία είναι παρεμφερής με μια περιοχή της πρωτεΐνης Ovarian tumors (OTU) της *D.melanogaster* (Βλέπε κεφάλαιο 3.4).

Μία πρόσφατη συγκριτική μελέτη της κατανομής και της έκφρασης των ANK γονιδίων σε στελέχη *Wolbachia* που διαφέρουν ως προς τις *mod / resc* ιδιότητές τους, προτείνει 10 γονίδια του στελέχους *wMel*, ως πιθανά εμπλεκόμενα στην επαγωγή CI (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2005). Το γονίδιο WD0514 απουσιάζει από το γονιδίωμα του στελέχους *wAu* το οποίο είναι ένα *mod* στέλεχος. Τα γονίδια WD0636 και WD0385 είναι «ακρωτηριασμένα» (truncated) στο *wAu* από ένα κωδικώνιο λήξης και μια ένθεση ενός IS5 μεταθετού στοιχείου. Επίσης τα γονίδια WD0766, WD0754, WD0292, WD0294, WD0498, WD0550 και WD0633 έχουν σημαντικές διαφορές στην αλληλουχία τους, οι οποίες σε κάποιες περιπτώσεις αφορούν σε έλλειψη ή διπλασιασμό επαναλήψεων ANK ή διαμεμβρανικών τμημάτων. Στη *D. melanogaster* επίσης δείχτηκε ότι διαγονιδιακή έκφραση μεμονωμένων ANK γονιδίων δεν αρκεί για να

αναπαράγει το φαινότυπο του CI (Yamada *et al.*, 2010). Τρεις ανεξάρτητες μελέτες στα κουνούπια προσπάθησαν να συσχετίσουν την έκφραση των ANK γονιδίων με τον επαγόμενο φαινότυπο, συγκρίνοντας την έκφραση σε αρσενικά και θηλυκά άτομα, τα αποτελέσματα των οποίων δεν είναι ξεκάθαρα μια και υπάρχει διαφωνία μεταξύ τους (Duron *et al.*, 2007; Sinkins *et al.*, 2005; Walker *et al.*, 2007).



Εικόνα 1.4. Οι ANK πρωτεΐνες του *wMel*. Τα μεγέθη των διαγραμμάτων αντιστοιχούν στα μεγέθη των πρωτεϊνών και με βέλη σημειώνονται οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από γονίδια που φέρονται σε φαγικά στοιχεία.

1.6 Σκοπός της διατριβής

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν να μελετηθούν οι επιδράσεις της αλληλεπίδρασης των βακτηρίων *Wolbachia* με τη *Drosophila* στη γονιδιακή έκφραση τόσο του ξενιστή, όσο και του παρασίτου. Γονίδια που πιθανώς ρυθμίζονται από την αλληλεπίδραση των δύο οργανισμών είναι πολύ πιθανό να συμμετέχουν είτε στην επαγωγή των αναπαραγωγικών φαινοτύπων, είτε σε κάποιο άλλο επίπεδο της συμβίωσης.

Αρχικά προσπάθησα να ανιχνεύσω διαφορές στην γονιδιακή έκφραση της *D. melanogaster*, που φέρει μόλυνση με το στέλεχος *wMel* και στις αντίστοιχες σειρές στις οποίες η μόλυνση έχει θεραπευτεί με αντιβιοτικά. Όπως προαναφέρθηκε, είναι γνωστό ότι υπάρχουν παράγοντες ενδοκυτταρικών βακτηρίων, συγκεκριμένα πρωτεΐνες ANK, οι οποίοι φαίνεται να εισέρχονται στον πυρήνα και να αλληλεπιδρούν με την χρωματίνη του ξενιστή (Park *et al.*, 2004). Δεν θα ήταν παράλογο να υποθέσει κανείς ότι οι επιπτώσεις του βακτηρίου, επιτυγχάνονται μέσω της χειραγώγησης της μεταγραφής του ξενιστή. Θέλοντας να ελέγξω αυτή την πιθανότητα, πραγματοποίησα συγκρίσεις μικροσυστοιχιών (microarrays) μεταξύ της ισογονιδιωματικής σειράς *D. melanogaster* w1118; iso2; iso 3 #15 και της αντίστοιχης, θεραπευμένης με τετρακυκλίνη, σειράς.

Από τη σκοπιά του παρασίτου έγιναν συγκρίσεις με qRT-PCR, ώστε να ποσοτικοποιηθεί ή έκφραση του συνόλου των ANK γονιδίων του *wMel* σε όρχεις και ωοθήκες ενήλικων ατόμων *D. melanogaster* και *D. simulans*. Στόχος των συγκρίσεων ήταν να ανιχνευθούν γονίδια τα οποία ρυθμίζονται αποκρινόμενα στο συγκεκριμένο κυτταρικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται τα βακτήρια. Η μελέτη έγινε στους δύο παραπάνω συμβιωτικούς συσχετισμούς οι οποίοι, αν και το βακτηριακό στέλεχος είναι κοινό, εκφράζουν διαφορετικά επίπεδα κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Οι συγκρίσεις επεκτάθηκαν, για κάποια γονίδια, στα ορθόλογά τους σε διαφορετικά στελέχη *Wolbachia* τα οποία διαφέρουν ως προς τα *mod / resc* χαρακτηριστικά τους. Συνεπικουρικά στο σκέλος αυτό της διατριβής αναπτύχθηκαν αντισώματα έναντι τεσσάρων ANK

πρωτεΐνών και της επιφανειακής πρωτεΐνης wsp, ώστε να μελετηθεί στο πρωτεϊνικό επίπεδο η παρουσία τους και, κατ' επέκταση, ο εντοπισμός τους στους ιστούς του ξενιστή.

Τέλος αναφέρονται ευρήματα τα οποία, αν και δεν σχετίζονται άμεσα με την γονιδιακή έκφραση, προέκυψαν κατά τη διάρκεια της διατριβής και θεωρώ ότι μπορούν να θέσουν σημαντικά στοιχεία και ερωτήματα για την κατανόηση της βιολογίας του εντυπωσιακού αυτού παρασίτου.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Είδη και στελέχη *Drosophila*

Οι μύγες διατηρήθηκαν σε τυποποιημένο θρεπτικό μέσο (αλεύρι καλαμποκιού, ζάχαρη, μαγιά) στους 25 °C σε στάνταρντ συνθήκες φωτισμού (12 ώρες φως/12 ώρες σκοτάδι). Τα στελέχη *Drosophila* που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη διατριβή περιγράφονται στον Πίνακα 2.1.

Name	Species	<i>Wolbachia</i> strain	<i>Wolbachia</i> -induced phenotype	Reference
yw ^{67C23}	<i>D. melanogaster</i>	wMel	Medium CI	(Bourtzis <i>et al.</i> , 1996)
yw ^{67C23} T	<i>D. melanogaster</i>	-		
STCP [wMel]	<i>D. simulans</i>	wMel	Strong CI	(Poinsot <i>et al.</i> , 1998)
STCP [wAu]	<i>D. simulans</i>	wAu	No CI	(Zabalou <i>et al.</i> , 2008)
STCP [wRi]	<i>D. simulans</i>	wRi	Strong CI	(Zabalou <i>et al.</i> , 2008)
STCP	<i>D. simulans</i>	-		(Poinsot <i>et al.</i> , 1998)
w1118; iso2; iso 3 #15	<i>D. melanogaster</i>	wMel	Medium CI	(Ryder <i>et al.</i> , 2004)
w1118; iso2; iso 3 #15 T	<i>D. melanogaster</i>	-		

Πίνακας 2.1. Είδη και στελέχη *Drosophila* που χρησιμοποιήθηκαν. Με T συμβολίζονται τα στελέχη στα οποία η μόλυνση έχει θεραπευτεί με τετρακυκλίνη (Bourtzis *et al.*, 1996)

2.2 Απομόνωση γενωμικού DNA *Wolbachia*.

Η απομόνωση DNA από ενήλικες μύγες έγινε με τη μέθοδο STE (O'Neill *et al.*, 1992).

1. Ομογενοποίηση μίας μύγας σε 50 μl STE (100mM NaCl, 10mM Tris.HCl, 1mM EDTA).
2. Προσθήκη proteinaseK σε τελική συγκέντρωση 0.4μg/μl.

3. Επώαση στους 37°C για 30 λεπτά για να δράσει η πρωτεϊνάση.
4. Επώαση στους 95°C για 5 λεπτά για να απενεργοποιηθεί η πρωτεϊνάση.
5. Φυγοκέντρωση των δειγμάτων για 10 λεπτά στις 12.000 στροφές το λεπτό.

2.3 Παρασκευή δειγμάτων cDNA

2.3.1 Συλλογή και ανατομία μυών

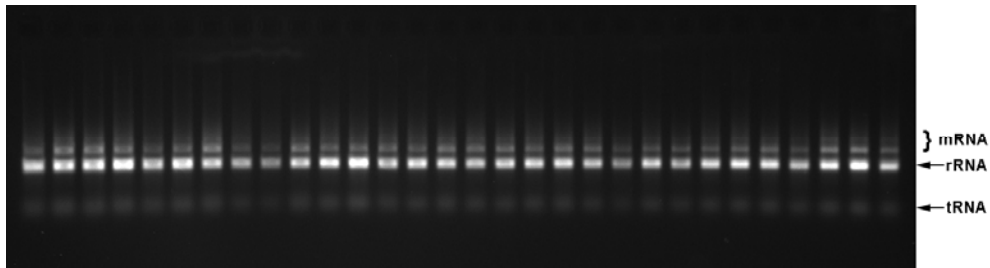
Τα ενήλικα αρσενικά και θηλυκά άτομα, συνελέχθησαν σύντομα μετά την έκδυση τους, διατηρήθηκαν σε φιαλίδια με θρεπτικό μέσο συμπληρωμένο με ξηρή μαγιά και τεμαχίστηκαν 1 και 2 ημέρες αργότερα, αντίστοιχα. Τόσο οι όρχεις, όσο και οι ωθήκες εξήχθησαν σε παγωμένο PBS για 10 λεπτά το πολύ, ομογενοποιήθηκαν σε TRIzol Reagent (Invitrogen) και παγώθηκαν στιγμιαία σε υγρό άζωτο. Τα σώματα των ενηλίκων (το σώμα χωρίς τις γονάδες) επεξεργάστηκαν με τον ίδιο τρόπο. Κάθε δείγμα απαρτιζόταν από 100 περίπου όρχεις, ωθήκες ή σώματα. Τρία (3) ανεξάρτητα δείγματα από κάθε ιστό συνελέχθησαν και επεξεργάστηκαν περαιτέρω (βιολογικές επαναλήψεις).

2.3.2 Απομόνωση και επεξεργασία RNA

Το ολικό RNA εκχυλίστηκε με TRIzol Reagent σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και επαναδιαλύθηκε σε νερό καθαρό από RNases. Τα δείγματα RNA επεξεργάστηκαν με amplification grade DNaseI (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα μόλυνσης από γενωμικό DNA.

2.3.3 Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος των δειγμάτων RNA

Η ποσότητα, καθαρότητα και η αρτιότητα των μορίων του απομονωμένου RNA εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση αгарόζης (Εικόνα 2.1) και φασματοσκοπική ανάλυση. Ηλεκτροφορητικά ελέγχθηκε η αρτιότητα των μορίων, όπως φαίνεται από την σχετική απουσία σήματος σε μοριακά μεγέθη μικρότερα από την ζώνη του 18s RNA, ενώ φασματοσκοπικά η ποσότητα, σύμφωνα με την απορρόφηση του δείγματος στα 260nm και η απουσία πρωτεϊνών ή οργανικών κατάλοιπων σύμφωνα με τους λόγους απορρόφησης στα 260nm/280nm και 260nm/230nm (1.9-2.0 και >2, αντίστοιχα για καλής ποιότητας δείγματα RNA).



Εικόνα 2.1. Ποιοτικός έλεγχος δειγμάτων RNA. Ενδεικτική παρουσίαση όλων των δειγμάτων RNA που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη. Η απουσία διάσπασης των μορίων mRNA ελέγχεται από την αρτιότητα των μορίων rRNA, η οποία κρίνεται από την οξύτητα των ζωνών και την απουσία επιχρίσματος (smear) μικρού μοριακού βάρους.

2.3.4 Αντίδραση Αντίστροφης Μεταγραφάσης (RT)

Η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το Superscript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). 4 μl ολικού RNA αναμίχθηκαν με τυχαίους εκκινητές και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πανομοιότυπες αντιδράσεις, από τις οποίες παραλήφθηκε το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης (-RT), πραγματοποιήθηκαν για την παρασκευή δειγμάτων ελέγχου για πιθανή μόλυνση από γενωμικό DNA.

2.4 Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης μετά από Αντίδραση Αντίστροφης Μεταγραφάσης (qRT-PCR)

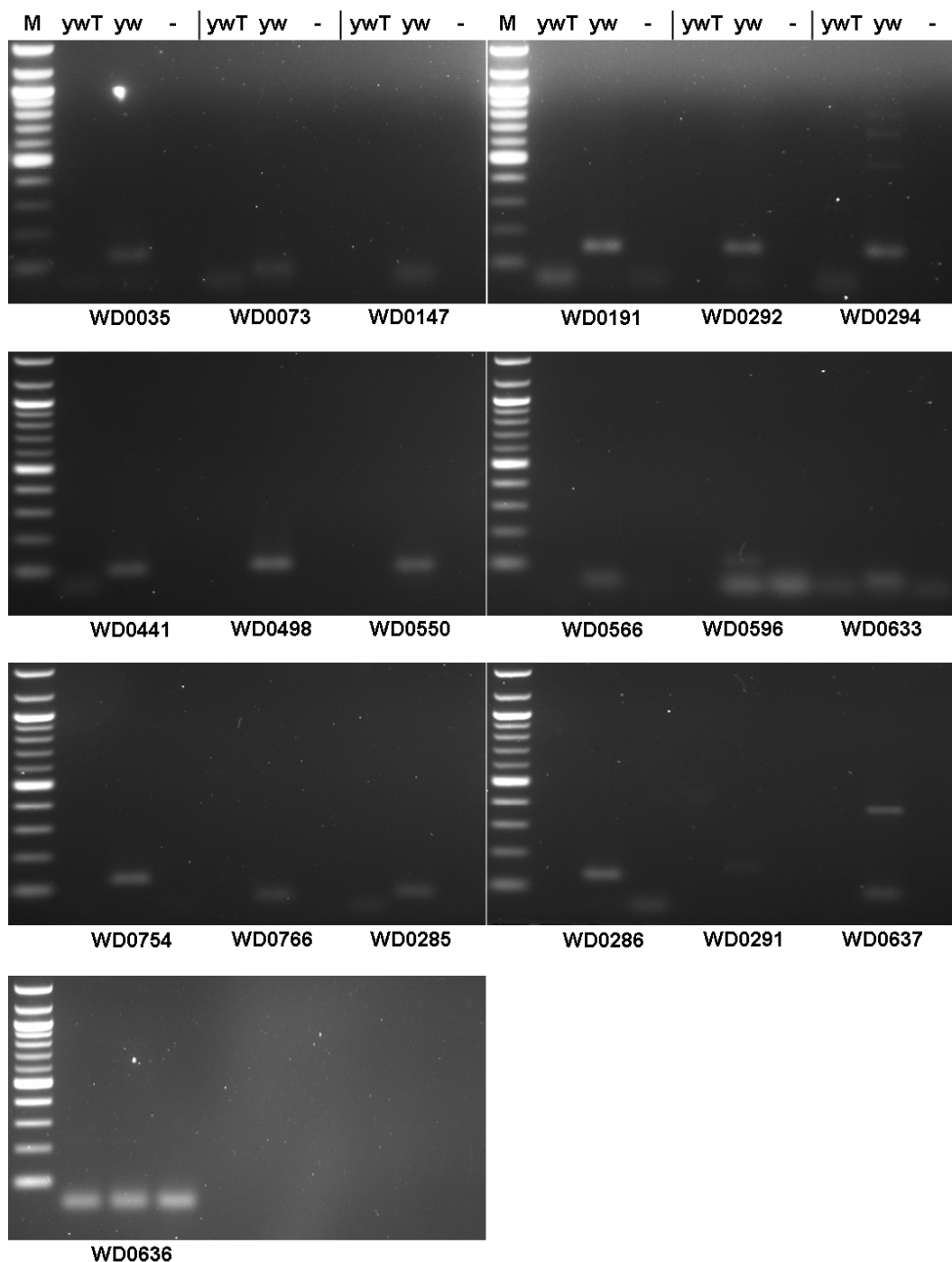
2.4.1 Σχεδιασμός εκκινητών και Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) ελέγχου σε γενωμικό DNA

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), εκτός από τους εκκινητές για το γονίδιο *act5C* που ήταν μία προσφορά από τον Δρ. Ευθύμιο Χ. Σκουλάκη (Acevedo *et al.*, 2007) (Πίνακας. 2.2). Τα κύρια κριτήρια σύμφωνα με τα οποία επιλέχθηκαν οι εκκινητές ήταν: α) Μέγεθος προϊόντος (50-170 βάσεις) β) Θερμοκρασία τήξης (ελάχιστη 58 °C, βέλτιστη 60 °C, μέγιστη 64 °C) γ) Τελικό (3') νουκλεοτίδιο (G ή C). Οι εκκινητές ελέγχθηκαν για την δημιουργία διμερών και την πιθανότητα ενίσχυσης μη ειδικών προϊόντων με τα προγράμματα Amplifx (<http://ifrjr.nord.univ-mrs.fr/AmplifX>) και NCBI/Primer-Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome).

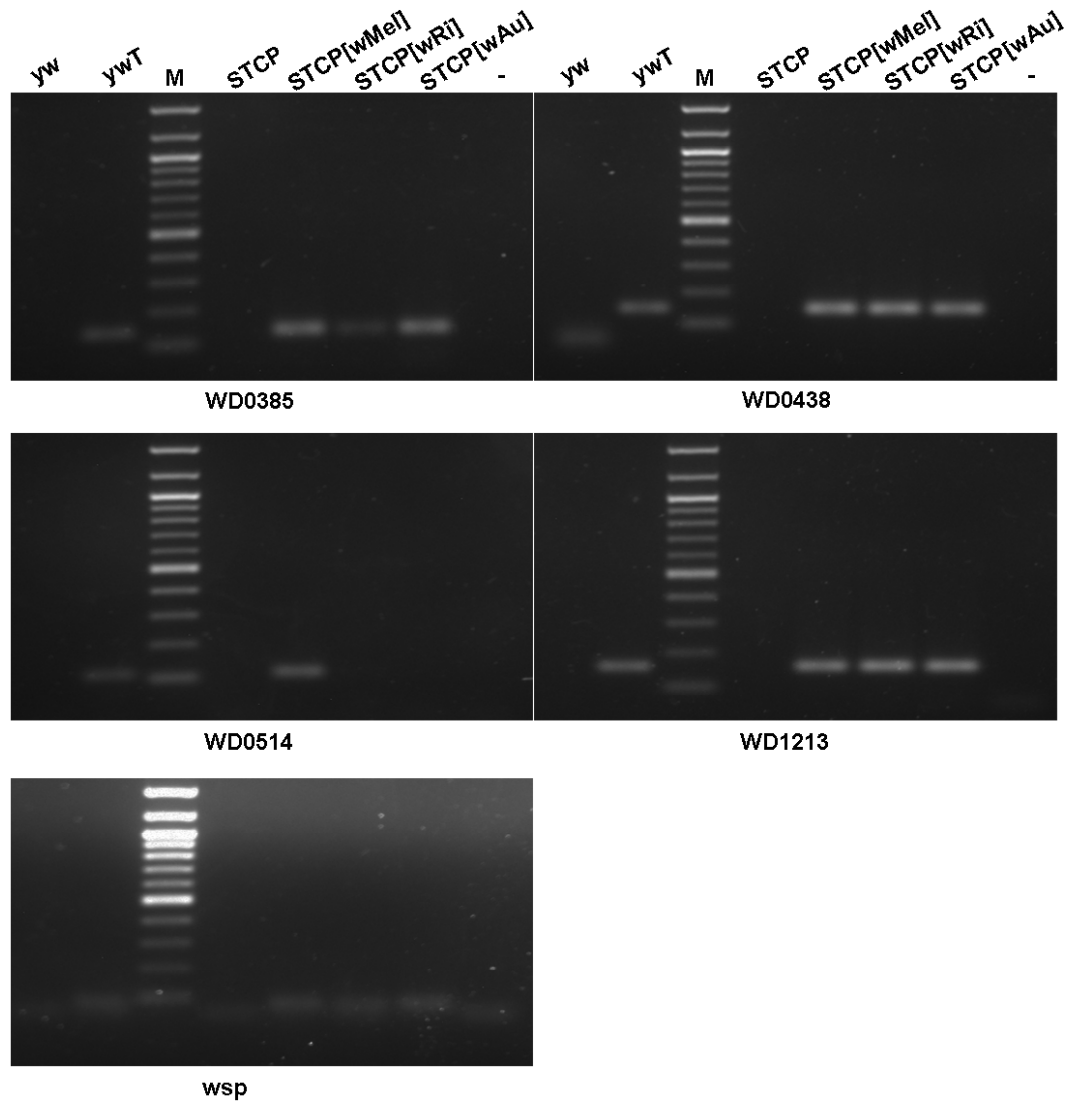
Η λειτουργικότητα των εκκινητών και η απουσία μη ειδικών προϊόντων ελέγχθηκε με PCR χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο γενωμικό DNA . Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε 1 μl εκχυλίσματος DNA σύμφωνα με τη μέθοδο STE (O'Neill *et al.*, 1992) σε αντιδράσεις 25 μl οι οποίες περιείχαν 200nM από κάθε εκκινητή, 1.5 mM MgCl₂, 200 μM (κάθε ένα) dNTPs, 0.5 units Taq polymerase (Minotech) και το αντίστοιχο Taq polymerase buffer. Τα δείγματα αποδιατάχθησαν στους 95 °C για 4 λεπτά, ακολουθούμενα από 29 κύκλους στους 94 °C για 30 δευτερόλεπτα, 60 °C για 30 δευτερόλεπτα, 72 °C για 30 δευτερόλεπτα. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτώματα 2% αγαρόζης (Εικόνες 2.2 και 2.3).

Primer name	Sequence (5'- 3')	Amplicon size (bp)
WD0035_F	AGTGCACTGAAGCAGAAGATG	127
WD0035_R	CAATTATTAGCGGCAGGAAAG	
WD0073_F	GTTGCAAGAGGCAGAACAAAG	81
WD0073_R	TGCTCTGGATGTTGACTGTG	
WD0147_F	GCGGTTAATTTGCCCAATG	70
WD0147_R	TGGCCAATCTACCACTCATC	
WD0191_F	GGTGTGTACTTGGAGCTGGTG	150
WD0191_R	CGCTTTAGCCTGTTTCATAGTCTTG	
WD0292_F	TCGTTTCACCGTTCCTTCAC	149
WD0292_R	TCTCTGGGCTACCAAACACTG	
WD0294_F	AGTGTGTGGGAAAGGAATGC	147
WD0294_R	TAGCGGCTGATGATTGTGC	
WD0385_F	TCCACAGAACCTGCACAAAC	134
WD0385_R	TTCGTCAGACCCAAACAACC	
WD0438_F	AACCAAGAGGTCAAGATGGAAC	148
WD0438_R	AGCACTGGAAGGAAGCATTG	
WD0441_F	ATGACCAGCTAGAAGGAAGCAC	99
WD0441_R	AAGGCAAAGGCTCTGGTTTC	
WD0498_F	TGCACCGCACATTATGACAG	110
WD0498_R	GCTGCTAGGAAAAGCGTAGTG	
WD0550_F	GATACCCAAAGCTAGCAAACTTC	106
WD0550_R	GCAGCTAATATACCCACAGCAAC	
WD0566_F	GATATGGCTCCAACTTGAGTG	58
WD0566_R	AACATCCTTTTCTTGCTGCAC	
WD0596_F	TGGGAATAGTTGCGCTCATAG	122
WD0596_R	ACTGCACTCACTTGTTTTCTCAC	
WD0633_F	CAAAGCAAACACACTGATGAGC	78
WD0633_R	TGGGCTACCTATTTCTGAAACTC	
WD0754_F	TGTGTCTACAACACGGACGAG	129
WD0754_R	ACCACATCTTTAGCCCCAAC	
WD0766_F	TGCATTTGCTACTGCCCTATC	79
WD0766_R	TTGACCAGCACCAACTATGAG	
WD1213_F	TTGGCAAGTGAAGCTAAATGAG	158
WD1213_R	CGGAATCATAGCCAGAATCG	
wsp_F	AATTTGGTTTTGCTGGTCAAG	79
wsp_R	CGAGCTCCAGCATAAAGTTTG	
act5C_F	GATGACCCAGATCATGTTCCG	601
act5C_R	GGTGATCTCCTTCTGCATAC	

Πίνακας 2.2. Αλληλουχίες εκκινήτων για τα γονίδια ANK, *wsp* και *act5C* και μεγέθη προϊόντων



Εικόνα 2.2. Έλεγχος των εκκινητών για τα γονίδια ANK με PCR στο στέλεχος *wMel*. Εκμαγείο στις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA απομονωμένο από ενήλικα άτομα. M : μοριακός μάρτυρας 100bp ladder (NEB), οι έντονες ζώνες έχουν μέγεθος 1000bp και 500bp, yw : DNA από ενήλικα άτομα yw^{67C23} , ywT : DNA από ενήλικα άτομα $yw^{67C23}T$, - : H₂O (no template control). Το ζευγάρι των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφεται στο κάτω μέρος των εικόνων.

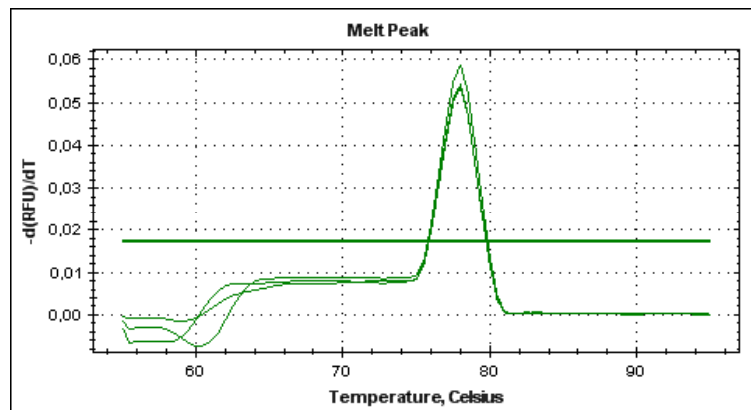


Εικόνα 2.3. Έλεγχος των εκκινήτων για τα γονίδια ANK με PCR στα στελέχη wMel, wRi και wAu.

Εκμαγείο στις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA απομονωμένο από ενήλικα άτομα. M : μοριακός μάρτυρας 100bp ladder (NEB), οι έντονες ζώνες έχουν μέγεθος 1000bp και 500bp, yw : DNA από ενήλικα άτομα yw^{67C23} , ywT : DNA από ενήλικα άτομα $yw^{67C23}T$, STCP, STCP [wMel], STCP [wRi], STCP [wAu] : DNA από ενήλικα άτομα των αντίστοιχων στελεχών, - : H₂O (no template control). Το ζευγάρι των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφεται στο κάτω μέρος των εικόνων.

2.4.2 qRT-PCR

Όλα τα δείγματα cDNA αραιώθηκαν 1:20 και 4 μl χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο στις αντιδράσεις. Εκτός του εκμαγείου, οι αντιδράσεις, συνολικού όγκου 20 μl , περιείχαν 200 nM από κάθε εκκινητή (Πίνακας 2.2) και 10 μl Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen). Τα δείγματα αποδιατάχθησαν στους 95 °C για 4 λεπτά, ακολουθούμενα από 45 κύκλους στους 93 °C για 30 δευτερόλεπτα, 60 °C για 30 δευτερόλεπτα, 72 °C για 30 δευτερόλεπτα και μέτρηση φθορισμού. Μετά το πέρας των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε ανάλυση καμπύλης τήξεως, από τους 55 °C έως τους 95 °C, με διαστήματα 0.5 °C, ώστε να διασφαλιστεί η απουσία διμερών εκκινητών και μη ειδικών προϊόντων (Εικόνα 2.4). Αντιδράσεις με τα αντίστοιχα –RT δείγματα για κάθε cDNA, πραγματοποιήθηκαν για να ελεγχθεί η απουσία σημαντικής ποσότητας γενωμικού DNA στα δείγματα, καθώς και μία τυφλή αντίδραση ανα ζευγάρι εκκινητών ώστε να ελεγχθεί πιθανή μόλυνση των αντιδραστηρίων.



Εικόνα 2.4. Τυπική καμπύλη τήξης προϊόντων αντίδρασης qPCR. Στην εικόνα παρουσιάζονται 3 καμπύλες, που αντιπροσωπεύουν τρεις τεχνικές επαναλήψεις αντιδράσεων με εκκινητές για το γονίδιο WD1213. Η παρουσία μιας μοναδικής κορυφής είναι ενδεικτική της απουσίας μη ειδικών προϊόντων της αντίδρασης. Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική για τις καμπύλες τήξης όλων των αντιδράσεων που πραγματοποιήσαμε.

2.4.3 Ανάλυση Δεδομένων

Οι αντιδράσεις για κάθε δείγμα επαναλήφθησαν τρεις (3) φορές (τεχνικές επαναλήψεις) στο MiniOpticon System (Bio-Rad) και τα πρωτογενή δεδομένα συλλέχθηκαν μέσω του λογισμικού Bio-Rad CFX Manager.

Προκειμένου να υπολογίσω την αρχική ποσότητα εκμαγείου σε κάθε αντίδραση χρησιμοποίησα την παρακάτω εξίσωση, η οποία περιγράφει την κινητική της αντίδρασης PCR: $N_0 = N_C/E^C$, όπου N_0 η αρχική ποσότητα εκμαγείου, N_C η ποσότητα προϊόντος μετά από C κύκλους και E^C η αποδοτικότητα της αντίδρασης υψωμένη στη δύναμη του C . Στην περίπτωση της qPCR όπου η ένταση του φθορισμού είναι ευθέως ανάλογη της ποσότητας, η παραπάνω εξίσωση μπορεί να εκφραστεί ως $R_0 = R_C/E^C$, αντικαθιστώντας την ποσότητα με την ένταση του φθορισμού (Cikos *et al.*, 2007; Karlen *et al.*, 2007). Χρησιμοποίησα το λογισμικό LinRegPCR (Ramakers 2003) προκειμένου να υπολογίσω α) την μέση αποδοτικότητα (E) για κάθε ζευγάρι εκκινητών, για όλες τις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν στο ίδιο μπλοκ PCR (Cikos *et al.*, 2007; Karlen *et al.*, 2007), β) το όριο φθορισμού (R_C) στο οποίο η ένταση του φθορισμού ξεπερνάει τον θόρυβο κατά τη λογαριθμική γραμμική φάση της αντίδρασης και γ) τον κλασματικό κύκλο (C_t) στον οποίο παρατηρείται το όριο φθορισμού R_C για κάθε αντίδραση. Η μέση τιμή του των τριών τεχνικών επαναλήψεων χρησιμοποιήθηκε για τους υπολογισμούς, εφ' όσον το coefficient of variation (CV) των τριών τιμών δεν ξεπερνούσε το 3%.

Οι σχετικές αρχικές ποσότητες στη συνέχεια κανονικοποιήθηκαν ως προς τις σχετικές αρχικές ποσότητες των γονιδίων αναφοράς. Χρησιμοποίησαμε δύο γονίδια αναφοράς. Το γονίδιο *wsp* του βακτηρίου και το γονίδιο *act5C* του ξενιστή. Το πρώτο διορθώνει τις τιμές όσον αφορά σε πιθανές τεχνικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, όπως για παράδειγμα την αποδοτικότητα της RT αντίδρασης, καθώς και για πιθανές διαφορές στα επίπεδα μόλυνσης μεταξύ των ιστών. Το δεύτερο διορθώνει μόνο ως προς τις τεχνικές διαφορές έτσι ώστε οι τιμές που προκύπτουν αντιπροσωπεύουν αφθονία μεταγράφου ανά γονιδίωμα ξενιστή και όχι ανά γονιδίωμα βακτηρίου.

Οι κανονικοποιημένες τιμές λογαριθμήθηκαν για κανονικότητα και διορθώθηκαν για πιθανά block effects (Rieu and Powers 2009). Η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών που παρατηρήθηκαν ελέγχθηκε με Student's t-test.

2.5 Συγκρίσεις με μικροσυστοιχίες

Όλα τα πειράματα μικροσυστοιχιών πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο FlyChip, Functional Genomics for *Drosophila*, University of Cambridge, Cambridge, UK (<http://www.flychip.org.uk/>). Κάθε σύγκριση απαρτίζεται από 3 ή 4 επαναλήψεις, χρησιμοποιώντας αντίστοιχο αριθμό ανεξάρτητων βιολογικών δειγμάτων.

2.5.1 Σήμανση ανιχνευτών

Η απομόνωση του RNA έγινε όπως περιγράφεται παραπάνω. Τα δύο RNA δείγματα προς σύγκριση, σημαίνονται κατά το βήμα σύνθεσης cDNA με δύο διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές. 30μg από κάθε δείγμα σημαίνονται είτε με Cy3 dCTP, είτε με Cy5 dCTP και χρησιμοποιούνται για να υβριδοποιηθούν σε πλακίδια μικροσυστοιχιών.

(http://www.flychip.org.uk/protocols/gene_expression/direct_labelling.php)

2.5.2 Υβριδοποίηση

Η υβριδοποίηση των δειγμάτων έγινε σε πλακίδια που φέρουν 7152 κουκκίδες, κάθε μια εκ των οποίων αποτελείται από δίκλιωνα προϊόντα PCR, τα οποία προέρχονται από κλώνους cDNA της συλλογής Berkeley *Drosophila* Genome Project, *Drosophila* Gene Collection (version 1.0). Κάθε κουκκίδα στο πλακίδιο αντιστοιχεί σε έναν κλώνο cDNA και άρα σε ένα γονίδιο. Τα cDNA πλακίδια που χρησιμοποιήθηκαν, παρασκευάστηκαν από το εργαστήριο μικροσυστοιχιών FlyChip, University of Cambridge και ανήκουν στην γραμμή παραγωγής FC002 (<http://www.flychip.org.uk/services/core/FC002/>). Η

υβριδοποίηση έγινε στη συσκευή Genomic Solutions GeneTAC hybridisation station, κάτω από συνηθισμένες συνθήκες.

(http://www.flychip.org.uk/protocols/archive_protocols/hyb_cdna.php)

2.5.3 Σάρωση

Η σάρωση των πλακιδίων πραγματοποιήθηκε στη συσκευή Axon GenePix scanner. Κάθε πλακίδιο σαρώνεται σε δύο κανάλια ώστε να παραχθούν δύο αρχεία εικόνας, ένα για το Cy3 και ένα για το Cy5 (http://www.flychip.org.uk/protocols/gene_expression/scanning2.php).

2.5.4 Ανάλυση δεδομένων

Η κάθε εικόνα που προκύπτει από τη σάρωση υπόκειται τη διαδικασία της εύρεσης κουκκίδων (spot finding) και ποσοτικοποίησης του σήματος, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα dapple (Buhler *et al.*, 2000). Οι εντάσεις των σημάτων για το κάθε κανάλι κανονικοποιούνται στη συνέχεια σύμφωνα με τη μέθοδο VSN (Huber *et al.*, 2002). Οι κανονικοποιημένες τιμές λογαριθμήθηκαν (\log_2), για ομοιόμορφη κατανομή των αποτελεσμάτων και οι λόγοι των εντάσεων για τα δύο κανάλια υπολογίστηκαν. Οι μετασχηματισμένοι λόγοι των εντάσεων δείχνουν την διαφορά μεταξύ των συγκρινόμενων δειγμάτων γύρω από την τιμή 0. Έτσι, η τιμή 1 σημαίνει 2-φορές υψηλότερο σήμα στο ένα κανάλι και η τιμή -1 το ίδιο για το άλλο κανάλι. Η στατιστική ανάλυση των κανονικοποιημένων, μετασχηματισμένων λόγων των εντάσεων έγινε με το πρόγραμμα Cyber-T (Baldi and Long 2001). Η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων κρίθηκε συνυπολογίζοντας την βιολογική σημασία της διαφοράς μεταξύ των δύο δειγμάτων (αυθαίρετο όριο 2-φορές), την τιμή P που προκύπτει από τη στατιστική ανάλυση και την σταθερή απόκλιση μεταξύ των επαναλήψεων του πειράματος.

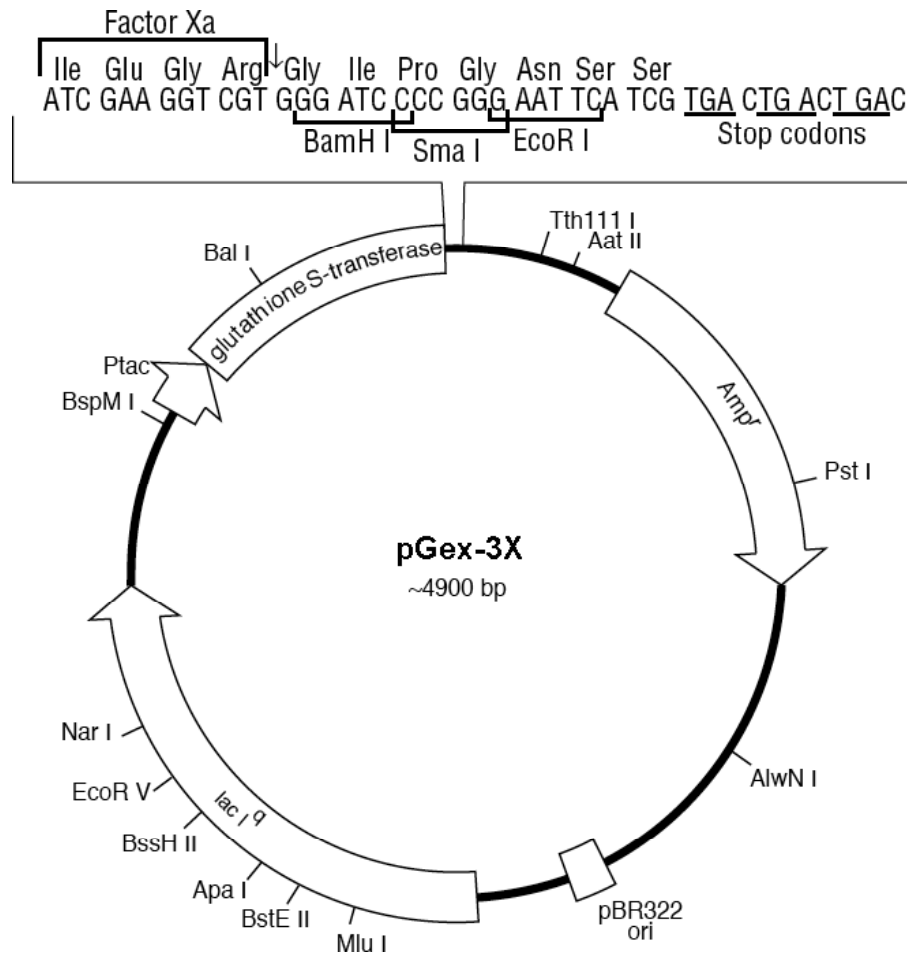
2.6 Πλασμιδιακές κατασκευές

2.6.1 pRSET-C-498, pRSET-C-550, pRSET-C-566, pRSET-C-637 και pRSET-C-1213

Τμήματα των γονιδίων WD0498, WD0550, WD0566, WD0637 και WD1213 ενισχύθηκαν από γενωμικό DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές (Πίνακας 2.3), οι οποίοι συμπεριλαμβάνουν τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων BamHI και EcoRI (πρόσθιος και οπίσθιος εκκινητής, αντίστοιχα). Τα τμήματα αυτά, μετά από πέψη με τα προαναφερθέντα ένζυμα (Minotech) κλωνοποιήθηκαν στον φορέα έκφρασης pRSET-C στις αντίστοιχες θέσεις περιορισμού. Η κλωνοποίηση των τμημάτων σε αυτές τις θέσεις τα τοποθετεί καρβοξυτελικά και εντός αναγνωστικού πλαισίου με τον επίτοπο 6 ιστιδινών που φέρει ο pRSET-C. Τα πλασμίδια που προκύπτουν (Εικόνες 3.28, 3.7, 3.10, 3.21 και 3.24) εκφράζουν τα πεπτίδια His-498, His-550, His-566, His-637 και His-1213 υπό τον έλεγχο του υποκινητή T7.

2.6.2 pGex-3X-498, pGex-3X-550, pGex-3X-566, pGex-3X-637 και pGex3X-1213

Ο φορέας έκφρασης pGex-3X (Εικόνα 2.5) φέρει το γονίδιο glutathione-S-transferase (GST) και καρβοξυτελικά αυτού μία θέση αναγνώρισης του παράγοντα λ a. Μετά τις αλληλουχίες του πλασμιδίου που κωδικοποιούν για τα παραπάνω, βρίσκονται θέσεις περιορισμού ώστε να μπορούν να δημιουργηθούν πλασμίδια που κωδικοποιούν πεπτίδια τα οποία αμινοτελικά φέρουν την GST. Χρησιμοποιώντας τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και EcoRI, απομονώσαμε τα τμήματα των γονιδίων της *Wolbachia* από τα πλασμίδια που περιγράφονται στην παραπάνω παράγραφο. Τα τμήματα αυτά κλωνοποιήθηκαν, εντός αναγνωστικού πλαισίου, στις αντίστοιχες θέσεις περιορισμού του pGex-3X. Τα πεπτίδια που εκφράζονται είναι τα GST-498, GST-550, GST-566, GST-637 και GST-1213 υπό τον έλεγχο του υποκινητή tac.



Εικόνα 2.5. Χάρτης του πλασμιδίου pGex-3X.

Primer name	Sequence (5'-3')
WD0498BAMF1	CGGATCCGTGAGGAAGATATAAACC
WD0498R1ECO	GGAATTCAAATGTTTCATATTGGCTC
WD0550BAMF1	CGGATCCAAGAAATTAATGATCAAGGC
WD0550R1ECO	GGAATTCATAAAAAGAGTCCTTTTCATATTC
WD0566BAMF1	CGGATCCAAAAATCTAAAGCTACAG
WD0566R1ECO	GGAATTCGCGTTACGAAATATTAC
WD0637BAMF1	CGGATCCCAATGTATTACATATGGG
WD0637R1ECO	GGAATTCATATAACCTACCTCACC
WD1213BAMF1	CGGATCCACTCAATAGATGAGAATGG
WD1213R1ECO	GGAATTCATAGTTAGAGGGATATATC

Πίνακας 2.3. Αλληλουχίες εκκινητών για τα ANK γονίδια WD0498, WD0550, WD0566, WD0637 και WD1213, οι οποίοι φέρουν θέσης αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων (υπογράμμιση).

2.7 Επαγωγή έκφρασης και απομόνωση των πεπτιδίων His-wsp, His-498, His-550, His-566, His-637 και His-1213

Οι φορείς έκφρασης μετασχηματίστηκαν σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* του στελέχους BL21(DE3). Τα ανασυνδυασμένα His-πεπτίδια στον φορέα pRSET-C βρίσκονται υπό τον έλεγχο του ισχυρού, φαγικού υποκινητή T7, ο οποίος οδηγεί την έκφραση μέσω της T7 RNA πολυμεράσης. Το στέλεχος BL21(DE3) φέρει στο χρωμόσωμα του ένθεση του φάγου lambda DE3, ο οποίος φέρει το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης κάτω από τον έλεγχο του *lacUV5* υποκινητή, η έκφραση του οποίου, μέσω του χειριστή *lac*, καταστέλλεται από τον καταστολέα *lac* που επίσης εκφράζεται από τις φαγικές αλληλουχίες. Η έκφραση της T7 πολυμεράσης, που θα οδηγήσει στην έκφραση των His-πεπτιδίων, επάγεται με την προσθήκη στην καλλιέργεια του επαγωγέα isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG) που οδηγεί σε αποκαταστολή του γονιδίου (pRSET A, B and C, For high levels of expression of recombinant proteins in *E. coli* 2010).

Μετά από δοκιμές καθορίστηκαν οι ιδανικές συνθήκες (όγκου καλλιέργειας, θερμοκρασία επώασης, χρόνος επαγωγής) για την βέλτιστη

έκφραση του κάθε πεπτιδίου (Πίνακας 2.4). Όλες οι καλλιέργειες έγιναν σε θρεπτικό μέσο LB. Οι καλλιέργειες εμβολιάστηκαν με τον κατάλληλο όγκο κορεσμένων υγρών καλλιέργειών ώστε να επιτευχθεί OD = 0.1. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν στην κατάλληλη θερμοκρασία με ανάδευση στις 220 rpm. Η έκφραση επήχθη προσθέτοντας 0.2 mM IPTG στις καλλιέργειες, όταν αυτές βρίσκονταν στη μέση της εκθετικής φάσης (OD A600 = 0.4 - 0.6) και η επώαση συνεχίστηκε για τον κατάλληλο χρόνο. Στη συνέχεια τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν και οι πελέτες καταψύχθηκαν στους -80°C. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προετοιμάστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο 10 (*Preparation of cleared E. Coli lysates under denaturing conditions*) και οι πρωτεΐνες απομονώθηκαν μέσω στήλης νικελίου, σύμφωνα με το πρωτόκολλο 18 (*FLPC purification of 6xHis-tagged proteins using Ni-NTA Superflow under denaturing conditions*) του εγχειριδίου *The QIAexpressionist* (The QIAexpressionist 2003). Η μόνη τροποποίηση στο πρωτόκολλο 18 ήταν ότι το πακετάρισμα της στήλης καθώς και η εφαρμογή των δειγμάτων έγινε με βαρυτική ροή. Τα κλάσματα των πεπτιδίων που δεν είχαν ικανοποιητικό βαθμό καθαρότητας μετά την έκλουση από τη στήλη, χρησιμοποιήθηκαν εκ νέου ως αρχικά δείγματα (input) σε δεύτερο γύρο απομόνωσης, Όλα τα παραπάνω πεπτίδια βρίσκονταν σε αφθονία στα μη διαλυτά κλάσματα (inclusion bodies) των καλλιέργειών και για αυτό χρησιμοποιήθηκαν αποδιατακτικές συνθήκες για την προετοιμασία και απομόνωσή τους. Στα τελικά δείγματα το διάλυμα αντικαταστάθηκε (dialysis) με PBS.

Plasmid	Culture volume	Incubation temperature	Induction time
pRSET-A-wsp	2x 250ml	37°C	5 h
pRSET-C-498	2x100 ml	30°C	5 h
pRSET-C-550	2x 250ml	30°C	5 h
pRSET-C-566	2x 100ml	30°C	5 h
pRSET-C-637	2x 250ml	30°C	5 h
pRSET-C-1213	2x 100ml	30°C	5 h

Πίνακας 2.4. Συνθήκες καλλιέργειας βακτηρίων E. coli BL21(DE3) για την έκφραση 6xHis-σημασμένων πεπτιδίων

2.8 Επαγωγή έκφρασης των πεπτιδίων GST-498, GST-550, GST-566, GST-637 και GST-1213 και απομόνωση του πεπτιδίου GST-498

Οι φορείς έκφρασης μετασχηματίστηκαν σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* του στελέχους BL21(DE3). Τα ανασυνδυασμένα GST-πεπτίδια στον φορέα pGex-3X βρίσκονται υπό τον έλεγχο του υποκινητή *tac*, ο οποίος καταστέλλεται μέσω του χειριστή *lac* από τον καταστολέα *lac*. Η επαγωγή της έκφρασης γίνεται με την αποκαταστολή του υποκινητή *tac*, με την προσθήκη στην καλλιέργεια isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG).

2.8.1 Εκχυλίσματα πρωτεϊνών που περιέχουν τα πεπτίδια GST-550, GST-566, GST-637 και GST-1213

Για τα πεπτίδια GST-550, GST-566, GST-637 και GST-1213, τα οποία εκφράστηκαν για διαγνωστικούς λόγους, χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συνθήκες καλλιέργειας μια και η ποσότητα ή η διαλυτότητα του πεπτιδίου είναι αδιάφορη. Όλες οι καλλιέργειες έγιναν σε θρεπτικό μέσο LB. Οι καλλιέργειες εμβολιάστηκαν με τον κατάλληλο όγκο κορεσμένων υγρών καλλιιεργειών ώστε να επιτευχθεί OD = 0.1. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν στους 37 ° C με ανάδευση στις 220 rpm. Η έκφραση επήχθη προσθέτοντας 0.5 mM IPTG στις καλλιέργειες, όταν αυτές βρίσκονταν στη μέση της εκθετικής φάσης (OD A600 = 0.4 - 0.6) και η επώαση συνεχίστηκε για 2.5 ώρες. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντριση επαναδιαλύθηκαν σε κατάλληλο όγκο παγωμένου PBS και λύθηκαν με υπέρηχους. Στο δείγμα προστέθηκε ίσος όγκος Laemmli buffer και φυλάχθηκε στους -20 ° C.

2.8.2 Έκφραση και απομόνωση του πεπτιδίου GST-498

2.8.2.1 Απομόνωση διαλυτού κλάσματος μέσω σφαιριδίων glutathione-sepharose

Για το πεπτίδιο GST-498 καθορίστηκαν οι ιδανικές συνθήκες έκφρασης ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη αναλογία διαλυτού προς μη διαλυτού πεπτιδίου. Οι συνθήκες καλλιέργειας και επαγωγής ήταν όπως και παραπάνω με διαφορά στη θερμοκρασία (30 ° C) και στον όγκο της καλλιέργειας (200ml). Τα βακτηριακά εκχυλίσματα προετοιμάστηκαν και το πεπτίδιο απομονώθηκε μεσώ σφαιριδίων glutathione-sepharose, όπως περιγράφεται στις διαδικασίες 11 και 12 του εγχειριδίου GST Gene Fusion System (GST Gene Fusion System Handbook 1997), προσαρμόζοντας τις συνθήκες όγκου και θερμοκρασίας.

2.8.2.2 Απομόνωση μη διαλυτού κλάσματος από έγκλειστα σωμάτια (inclusion bodies)

Η απομόνωση των GST-πρωτεϊνών μέσω glutathione-sepharose απαιτεί η πρωτεΐνη να βρίσκεται σε μη αποδιαταγμένη κατάσταση. Για μη διαλυτές πρωτεΐνες είναι απαραίτητο ένα βήμα αναδιάταξης. Προκειμένου να απομονώσω και να αναδιατάξω το πεπτίδιο από το μη διαλυτό κλάσμα των πρωτεϊνών των βακτηρίων ακολούθησα την παρακάτω διαδικασία:

1. Τρεις πλύσεις του μη διαλυτού κλάσματος σε inclusion body wash buffer (0.5% TritonX, 50mM Tris HCl pH 8, 100mM NaCl)
2. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 6M Guanidine HCl, 10mM Tris HCl, 100mM NaH₂PO₄. Το επαναδιαλυμένο δείγμα μπορεί να αραιωθεί 1:6 σε H₂O και να χρησιμοποιηθεί σε SDS-PAGE, ώστε να διαπιστωθεί η ποσότητα
3. Ανταλλαγή διαλύματος (dialysis) με 2x 500 ml PBS στους 4 ° C για τουλάχιστον 2 ώρες.

4. Φυγοκέντριση και επαναδιάλυση του ιζήματος σε Laemmli buffer
5. SDS-PAGE σε παρασκευαστικό πήκτωμα (Φορτώνουμε όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα)
6. Ξέπλυμα του πηκτώματος σε ddH₂O
7. Πλύση του πηκτώματος σε 0.5M KCl στους 4 ° C. Λόγω του ιζήματος που δημιουργείται από το αλάτι στο SDS, οι πρωτεϊνικές ζώνες γίνονται εμφανείς
8. Κόψιμο της ζώνης που αντιστοιχεί στο πεπτιδίιο
9. Έκλουση σε elution buffer (50mM Tris HCl pH 7.9, 150mM NaCl, 0.1mM EDTA, 10mM β-mercaptoethanol, 6M Guanidine HCl) για 16 ώρες, στους 4 ° C.
10. Dialysis σε renaturation buffer (1mM DTT, 0.1mM KCl, 0.01% NP40, 12.5mM MgCl₂, 10% Glycerol, 25mM Hepes-KOH pH7.6, 0.1mM EDTA), προκειμένου να γίνει αναδιάταξη του πεπτιδίου

2.9 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Το πήκτωμα παρασκευάζεται όπως περιγράφεται από τους Sambrook και Russell (Sambrook and Russell 2001), και η πυκνότητά του σε ακρυλαμίδα καθορίζεται από τα μεγέθη των πρωτεϊνών που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε κατάλληλη συσκευή (BIO-RAD) σε 1x διάλυμα ηλεκτροφόρησης (25mM Tris, 192mM Glycine, 0.1% SDS) Στα πρωτεϊνικά δείγματα προστίθεται διάλυμα Laemmli (0.0625M Tris pH 6.8, 2% SDS, 10% Glycerol, 4% R-mercaptoethanol, 0.01% Bromophenol Blue) 1:1 και τοποθετούνται στο πήκτωμα. Εφαρμόζεται τάση 100V, με τον αρνητικό πόλο στην πλευρά του πηκτώματος όπου τοποθετήθηκαν τα δείγματα, μέχρι η

χρωστική να φτάσει στο πήκτωμα διαχωρισμού και στη συνέχεια αυξάνεται στα 200V.

Προκειμένου να ανιχνευθούν οι πρωτεΐνες, το πήκτωμα, αφού αφαιρεθεί το πήκτωμα στοίβαξης, επωάζεται σε διάλυμα χρώσης Coomassie Brilliant Blue (0.1% Coomassie blue R350, 20% methanol, 10% acetic acid) για 1-2 ώρες. Στη συνέχεια επωάζεται σε διάλυμα αποχρωματισμού (50% methanol, 10% acetic acid) έως ότου οι πρωτεϊνικές ζώνες διακρίνονται καθαρά.

2.10 Προπροσρόφηση ορρού και απομόνωση αντισωμάτων μέσω συνάφειας

2.10.1 Προπροσρόφηση ορρών σε βακτηριακό υλικό

Όλες οι αραιώσεις ορρών που αναφέρονται σε αυτή τη διατριβή είναι επί του αρχικού ορρού, προσαρμόζοντας τις τελικές αραιώσεις στις αραιώσεις που προκύπτουν από τη διαδικασία της προπροσρόφησης.

1. Φυγοκέντριση της κατάλληλης βακτηριακής καλλιέργειας και επαναδιάλυση του κυτταρικού ιζήματος σε ίση ποσότητα (w/v) TBST.
2. Εκτενές sonication προκειμένου να μετουσιωθούν οι πρωτεΐνες
3. Ανάμιξη του δείγματος με τον ορρό σε αναλογία 2:1
4. Φυγοκέντριση και απομάκρυνση του ιζήματος

2.10.2 Προπροσρόφηση σε ιστούς *Drosophila*

Έμβρυα ή άλλος ιστός μονιμοποιούνται όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.12.1, και επωάζονται με τον ορρό ακολουθώντας τα βήματα 1 και

3 της παραγράφου 2.12.3 (παράκαμψη 2^{ου} βήματος). Ο ορρός χρησιμοποιείται στη συνέχεια για ανοσοϊστοχημική χρώση.

2.10.3 Απομόνωση ειδικού αντισώματος από ανοσοποιημένο ορρό.

1. Παρασκευαστικό πήκτωμα SDS-PAGE με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα αντιγόνου
2. Μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.11)
3. Χρώση της μεμβράνης με Ponceau-S και κόψιμο του τμήματος της μεμβράνης στο οποίο βρίσκεται το αντιγόνο
4. Ξέπλυμα σε TBST για να απομακρυνθεί η χρωστική
5. Επώαση με 5% άπαχο γάλα σε σκόνη σε TBST για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με ανακίνηση
6. Επώαση με 2 ml ορρού αραιωμένο σε TBST+5% γάλα σε αναλογία 1:4 για 16 ώρες στους 4 °C με ανακίνηση
7. Φύλαξη του υπερκειμένου (περιέχει το μη δεσμευμένο αντίσωμα) και ξέπλυμα της μεμβράνης 3X σε TBST
8. Δύο διαδοχικές εκλούσεις του δεσμευμένου αντισώματος, επωάζοντας τη μεμβράνη σε 1 ml elution buffer (3.5M MgCl₂, 20mM Tris HCl pH 7.5) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ανακινώντας ενίοτε ισχυρά (vortex).
9. Ανταλλαγή διαλύματος (dialysis) σε PBS στους 4 °C και προσθήκη 0.01% NaAz, ως συντηρητικό.

2.11 Ανοσοαποτύπωμα Western

1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών
2. Εξισορρόπηση του πήκτωματος πολυακρυλαμίδης με 1x Transfer Buffer (48mM Tris, 39mM Glycine, 0.375g/l SDS, 20% Methanol) για 5 λεπτά
3. Τοποθέτηση από κάτω προς τα πάνω στη συσκευή, αφού έχουν βυθιστεί στο Transfer Buffer α) 5 φύλλων χαρτιού Wattman, αντίστοιχου μεγέθους με το πήκτωμα β) Μembrάνη νιτροκυτταρίνης αντίστοιχου μεγέθους με το πήκτωμα γ) το πήκτωμα και δ) 5 φύλλα χαρτιού Wattman αντίστοιχού μεγέθους με το πήκτωμα
4. Εφαρμογή τάσης (15V, 250mA) για 30 λεπτά με το πήκτωμα να βρίσκεται μεταξύ της μεμβράνης και του αρνητικού πόλου.
5. Ξέπλυμα της μεμβράνης με 1x TBST
6. Ανακίνηση της μεμβράνης σε 5% άπαχο γάλα σε σκόνη σε 1x TBST για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου
7. Επώαση με ανακίνηση με το πρωτεύον αντίσωμα στην κατάλληλη αραίωση σε 5% άπαχο γάλα σε σκόνη σε 1x TBST στους 4 °C για 16 ώρες.
8. Πλύσεις x3 για 15 λεπτά σε 1xTBST
9. Επώαση με ανακίνηση με το δευτερεύον αντίσωμα (συζευγμένο με HRP) στην κατάλληλη αραίωση σε 5% άπαχο γάλα σε σκόνη σε 1x TBST για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου
10. Πλύσεις x3 για 15 λεπτά σε 1xTBST
11. Προετοιμασία διαλυμάτων εμφάνισης (2.5 ml διαλύματος 100mM Tris-HCl pH8.0, 0.06% H₂O₂, και 2.5 ml διαλύματος 100mM Tris-HCl pH 8.0, 1% Luminol (Sigma), 0.44% Coumarin (Sigma))

12. Ανάμιξη των δύο διαλυμάτων εμφάνισης και άμεση βύθιση της μεμβράνης για 1 λεπτό
13. Εμφάνιση (φωτογραφικό φιλμ ή συσκευή χημειοφωταύγειας)

2.12 Ανοσοϊστοχημεία

2.12.1 Μονιμοποίηση εμβρύων *Drosophila*

1. Συλλογή εμβρύων του επιθυμητού αναπτυξιακού σταδίου σε τρυβλία άγαρ-φρουτοχυμό (3% άγαρ)
2. Ξέπλυμα των εμβρύων με ddH₂O
3. Αποχοριοποίηση σε 50% χλωρίνη για 1-2 λεπτά (παρατήρηση στο στερεοσκόπιο για την πρόοδο της μεθόδου)
4. Καλό ξέπλυμα με διάλυμα πλύσης (0.7% NaCl, 0.3% Triton X-100) και μετά με ddH₂O
5. Μονιμοποίηση σε 1:1 διάλυμα μεθανόλης:επτανίου με ισχυρή ανακίνηση για 1 λεπτό (Τα αποβιτελοποιημένα έμβρυα βυθίζονται στην κάτω φάση του διαλύματος.)
6. Απομάκρυνση του υπερκειμένου και τρεις πλύσεις σε μεθανόλη (τα έμβρυα σε αυτή τη φάση μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε 100% μεθανόλη στους -20 °C)

2.12.2 Μονιμοποίηση γονάδων ενηλίκων ατόμων *Drosophila*

1. Ανατομίες για τη συλλογή του ιστού σε TBST (στα πρωτόκολλα του κεφαλαίου της ανοσοϊστοχημείας το TBST περιέχει 0.15% Triton αντί για Tween-20)

2. Μονιμοποίηση του ιστού σε 400 μl 4% παραφορμαλδεΐδη (PFA) για 25 λεπτά
3. Πλύσεις x3 σε TBST για 20 λεπτά εκάστη. (Οι ιστοί πρέπει να χρησιμοποιηθούν άμεσα ή να φυλαχθούν μία νύχτα το μέγιστο στους 4 °C)

2.12.3 Ανοσοϊστοχημική χρώση

Όλα τα πρωτεύοντα αντισώματα (Πίνακας 2.5) που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη, είχαν υποστεί προπροσρόφηση σε αντίστοιχο ιστό πριν τη χρήση.

1. (Βήμα 1. Μόνο για χρώσεις εμβρύων) Ενυδάτωση με διαδοχικά ξεπλύματα σε διαλύματα 80% : 20%, 50% : 50% και 20% : 80% μεθανόλη:TBST ακολουθούμενα από 3 πλύσεις σε TBST
2. Επώαση με ανακίνηση του μονιμοποιημένου ιστού για 1 ώρα σε TBST+1%BSA (Bovine Serum Albumin) σε θερμοκρασία δωματίου
3. Επώαση με ανακίνηση με την κατάλληλη αραίωση του πρωτεύοντος αντισώματος σε TBST+1%BSA στους 4 °C για 16 ώρες
4. Τρεις πλύσεις σε TBST για 20 λεπτά εκάστη σε θερμοκρασία δωματίου
5. (Από αυτό το βήμα και έπειτα τα δείγματα τοποθετούνται σε σκοτεινά δοχεία) Επώαση με ανακίνηση την κατάλληλη αραίωση του δευτερεύοντος αντισώματος (Πίνακας 2.5) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή για 16 ώρες στους 4 °C
6. Τρεις πλύσεις σε TBST για 20 λεπτά εκάστη σε θερμοκρασία δωματίου

7. Χρώση με propidium iodide (Molecular Probes) σε αραιώση 1:500 (2μg/ml) σε TBST για 20 λεπτά
8. Δύο ξεπλύματα σε TBST
9. Τοποθέτηση των ιστών σε αντικειμενοφόρους μέσα σε μία σταγόνα κατάλληλου μέσου (γλυκερόλη, n-propyl-gallate σε 80% γλυκερόλη, ή Mowiol σε γλυκερόλη)

2.13 Μικροσκοπία

Οι φωτογραφίες των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων έγιναν σε συνεστιακά μικροσκόπια Leica TCS ή Zeiss LSM Meta χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους αντικειμενικούς φακούς και τα κατάλληλα laser για κάθε χρωστική.

Antibody or serum	Concentration (western blot)	Concentration (immunochemistry)	Manufacturer
rat-anti-wsp (serum)	1:1000	1:500	This study (Absea)
rabbit-anti-550 (serum)	1:1000	X	This study (Absea)
rabbit-anti-566 (serum)	1:1000	1:500	This study (Absea)
rabbit-anti-637 (serum)	1:1000	X	This study (Absea)
rabbit-anti-1213 (serum)	1:1000	X	This study (Absea)
goat-anti-rabbit-HRP	1:20000		Jackson Immunoresearch
goat-anti-rat-HRP	1:5000		Jackson Immunoresearch
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)		1:1000	Molecular Probes/Invitrogen
Alexa Fluor 647 goat anti-rat IgG (H+L)		1:500	Molecular Probes/Invitrogen

Πίνακας 2.5. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη

Αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Το X δείχνει τις περιπτώσεις στις οποίες καμία αραιώση δεν έδωσε αποτελέσματα.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Επίδραση της μόλυνσης με *Wolbachia* στην μεταγραφή των γονιδίων της *D. melanogaster*

3.1.1 Αποτελέσματα

3.1.1.1 Συγκρίσεις μικροσυστοιχιών σε ενήλικα και προνύμφες τρίτου σταδίου

Προκειμένου να ανιχνεύσω γονίδια των οποίων τα επίπεδα μεταγραφής επηρεάζονται από την παρουσία *Wolbachia*, πραγματοποίησα συγκρίσεις ανάμεσα σε μολυσμένα και μη μολυσμένα (θεραπευμένα) δείγματα προερχόμενα από την ισογονιδιωματική σειρά w1118; iso2; iso3 #15 (Ryder *et al.*, 2004). Η συγκεκριμένη σειρά επιλέχθηκε θεωρώντας ότι λόγω τη ομοζυγωτείας της για σχεδόν όλους τους γενετικούς τόπους θα έδινε την καλύτερη αναλογία σήματος προς θόρυβο. Προκειμένου να ανιχνευθούν γονίδια που ενδεχομένως να εμπλέκονται στον μηχανισμό τροποποίησης του σπέρματος πραγματοποίησα συγκρίσεις τόσο σε ενήλικα αρσενικά, όσο και σε αρσενικές προνύμφες τρίτου σταδίου. Επίσης συγκρίθηκαν μολυσμένα με μη μολυσμένα ενήλικα θηλυκά για να ανιχνευθούν γονίδια που μπορεί να εμπλέκονται στο μηχανισμό της διάσωσης (*resc*). Από της παραπάνω συγκρίσεις δεν προέκυψε καμία διαφορά μεγαλύτερη από 2-φορές στα επίπεδα των μεταγράφων μεταξύ των δειγμάτων (αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται).

3.1.1.2 Συγκρίσεις μικροσυστοιχιών σε όρχεις και ωοθήκες ενηλίκων

Το γεγονός ότι δεν ανιχνεύθηκαν διαφορές στα πειράματα στα ενήλικα οδήγησε στην υπόθεση ότι μπορεί να υπάρχει μια πιο εντοπισμένη δράση της *Wolbachia* και, ακολουθώντας τη λογική ανίχνευσης γονιδίων που εμπλέκονται

στο CI, πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις σε όρχεις και ωοθήκες. Δυστυχώς οι συγκρίσεις μεταξύ ωοθηκών, ενώ πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητες φορές, δεν έδωσαν αποτελέσματα για τεχνικούς λόγους. Η σύγκριση μεταξύ όρχεων w1118; iso2; iso3 #15 και w1118; iso2; iso3 #15T ανίχνευσε 8 γονίδια των οποίων η έκφραση φαίνεται ελαττωμένη στην μολυσμένη σειρά (Πίνακας 3.1). Τα 8 αυτά γονίδια επιλέχθηκαν με μόνο κριτήριο το γεγονός ότι οι διαφορές μεταξύ των δύο σειρών ήταν διπλάσιες ή περισσότερες. Οι παρατηρημένες διαφορές είναι όλες πολύ κοντά στο όριο αυτό, με μεγαλύτερη διαφορά να παρουσιάζει το γονίδιο CG4230 (2.96-φορές). Για καμία από τις παραπάνω διαφορές δεν μπορούμε να αποφανθούμε κατηγορηματικά μια και, όπως φαίνεται στον πίνακα 3.1, οι διακυμάνσεις μεταξύ των επαναλήψεων είναι πολύ μεγάλες και οι τιμές P της στατιστικής ανάλυσης βρίσκονται στα όρια του στατιστικά σημαντικού.

3.1.1.3 Συγκρίσεις μικροσυστοιχιών σε έμβρυα μετά την έναρξη της ζυγωτικής μεταγραφής

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις μολυσμένων και μη μολυσμένων εμβρύων 2 - 24 ωρών. Τα στάδια των εμβρύων μετά την έναρξη της ζυγωτικής μεταγραφής επιλέχθηκαν ώστε να ελεγχθεί πιθανή εμπλοκή της μόλυνσης στην μεταγραφή γονιδίων κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Η σύγκριση όπως και παραπάνω έγινε μεταξύ εμβρύων των στελεχών w1118; iso2; iso3 #15 και w1118; iso2; iso3 #15T. Ανιχνεύθηκαν 11 γονίδια με διαφορετικά επίπεδα μεταγράφων στις δύο σειρές, 5 που παρουσιάζουν ελάττωση και 6 που παρουσιάζουν αύξηση στα μολυσμένα έμβρυα (Πίνακας 3.2). Όπως και στην περίπτωση των όρχεων όλα τα αποτελέσματα είναι οριακά πάνω από το όριο του διπλάσιου με υψηλή σταθερή απόκλιση. Οι τιμές P για αυτό το πείραμα όμως είναι χαμηλότερες και στατιστικά τα αποτελέσματα φαίνεται να είναι σημαντικά. Για να ελέγξουμε την αξιοπιστία των συγκρίσεων επιλέξαμε 6 (yip7, cg7298, msp-300, impL1, cg10591 και osi6) από τα παραπάνω γονίδια για να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα με qRT-PCR. Το αποτέλεσμα δεν επιβεβαιώθηκε για κανένα από τα γονίδια που ελέγχθηκαν μια

και τα επίπεδα των μεταγράφων ήταν όμοια στα συγκρινόμενα δείγματα (αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται).

3.1.2 Συζήτηση

Με σκοπό να ανιχνευθούν γονίδια της *D. melanogaster*, η έκφραση των οποίων επηρεάζεται από την παρουσία του βακτηριακού στελέχους wMel πραγματοποιήθηκαν οι παραπάνω συγκρίσεις μεταξύ του μολυσμένης σειράς w1118; iso2; iso3 #15 και της θεραπευμένης με τετρακυκλίνη w1118; iso2; iso3 #15T. Η σειρά αυτή είναι μολυσμένη με το βακτηριακό στέλεχος wMel και επάγει μέτρια επίπεδα κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας (Parafotiou 2001). Η ισογονιδιωματική φύση της σειράς παρέχει ένα χρήσιμο εργαλείο για συγκρίσεις μια και ελαχιστοποιεί το θόρυβο που μπορεί να προέρχεται από γενετική διακύμανση μεταξύ των εργαστηριακών πληθυσμών.

Οι συγκρίσεις μικροσυστοιχιών πραγματοποιήθηκαν σε πλακίδια cDNA μικροσυστοιχιών τα οποία περιέχουν το 40 % περίπου των γονιδίων της *D. melanogaster*. Προκειμένου να ανιχνευθούν γονίδια τα οποία εμπλέκονται στον μηχανισμό της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας, μελετήθηκαν θηλυκά και ωθηκές, αρσενικά και όρχεις, καθώς και αρσενικές προνύμφες 3^{ου} σταδίου στάδιο κατά το οποίο έχει ήδη αρχίσει η διαδικασία της σπερματογένεσης (Le Bras and Van Doren 2006). Όπως παραθέτω παραπάνω, καμία από τις συγκρίσεις σε ενήλικα άτομα, αρσενικές προνύμφες τρίτου σταδίου, όρχεις και έμβρυα δεν παρήγαγε αποτελέσματα υψηλής στατιστικής βαρύτητας. Οι συγκρίσεις όρχεων και εμβρύων παρολαυτά έδειξαν ένα μικρό αριθμό γονιδίων τα οποία είχαν διαφορές οριακά πάνω από διπλάσιες μεταξύ μολυσμένης και μη μολυσμένης σειράς. Αν και στατιστικά τα αποτελέσματα δεν ήταν πολύ ελπιδοφόρα, πραγματοποίησα συγκρίσεις με qRT-PCR σε δείγματα εμβρύων των ιδίων σειρών, με σκοπό να επιβεβαιώσω το αποτέλεσμα. Οι συγκρίσεις αυτές απέρριψαν τα αποτελέσματα από τις μικροσυστοιχίες, μια και τα επίπεδα των μεταγράφων δεν διαφέρουν για κανένα από τα γονίδια που ελέγχθηκαν.

Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει το συμπέρασμα ότι η παρουσία *Wolbachia* δεν επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων της *Drosophila*, σε βαθμό

τέτοιο τουλάχιστον ώστε να είναι ανιχνεύσιμα πάνω από το όριο του τεχνικού «θορύβου». Αν και δεν μπορούμε να αποκλείσουμε το γεγονός ότι πράγματι υπάρχουν γονίδια που επηρεάζονται, μια και η κάλυψη του γονιδιώματος της *Drosophila* που παρέχουν τα πλακίδια που χρησιμοποιήσαμε είναι μόλις 40 %, μια σειρά από άλλες μελέτες υποστηρίζουν το παραπάνω συμπέρασμα. Η παρουσία *Wolbachia* στη *D. melanogaster* δεν φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για αντιμικροβιακά πεπτίδια (Bourtzis *et al.*, 2000). Επίσης δύο ανεξάρτητες μελέτες παραθέτουν παρόμοια αποτελέσματα από συγκρίσεις με μικροσυστοιχίες, σε ωοθήκες (Sun and Cline 2009) και σε ενήλικα (McGraw E, προσωπική επικοινωνία). Στον αντίποδα αυτών των παρατηρήσεων βρίσκεται μια μελέτη της επίδρασης της *Wolbachia* στην έκφραση των γονιδίων του κύτταρου-ξενιστή σε μολυσμένες κυτταροκαλλιέργειες (Xi *et al.*, 2008). Οι συγγραφείς αναφέρουν 263 γονίδια των οποίων η έκφραση επηρεάζεται από την παρουσία *Wolbachia* σε κύτταρα *Drosophila* S2. Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδηγούν στην υπόθεση ότι ενώ υπάρχει επίδραση των βακτηρίων στην μεταγραφή γονιδίων του ξενιστή, αυτή μπορεί να είναι σε τέτοιο βαθμό εντοπισμένη σε συγκεκριμένες κατηγορίες κυττάρων, που είναι αδύνατον να ανιχνευθούν από συγκρίσεις μικροσυστοιχιών σε ολόκληρα άτομα ή σε ολόκληρους ιστούς.

FlyBase symbol	Fold difference	avgM	Ratio1	Ratio 2	Ratio 3	Mean Ratio	SD	P value
CG4230	-2.96	-1.57	-1.71	-1.82	-0.83	-1.45	0.55	0.04
CG3906	-2.42	-1.27	-1.87	-0.99	-0.22	-1.03	0.83	0.16
CG1544	-2.17	-1.12	-1.52	-1.10	-0.24	-0.95	0.66	0.13
CG6854	-2.15	-1.11	-1.26	-1.22	-0.48	-0.99	0.44	0.06
huntingtin	-2.12	-1.09	-1.23	-1.17	-0.63	-1.01	0.33	0.03
CG13671	-2.06	-1.04	-1.23	-1.36	-0.39	-0.99	0.53	0.08
CG31535	-2.01	-1.01	-1.39	-1.05	-0.28	-0.91	0.57	0.11
CG5853	-2.01	-1.00	-1.17	-1.23	-0.30	-0.90	0.52	0.10

Πίνακας 3.1. Σύγκριση γονιδιακής έκφρασης μεταξύ όρχεων w1118; iso2; iso3 #15 και w1118; iso2; iso3 #15T με μικροσυστοιχίες. Το αρνητικό πρόσημο υποδεικνύει υψηλότερη ένταση φθορισμού για το μη μολυσμένο δείγμα. Fold difference: Η διαφορά στην έκφραση όπως προκύπτει από τον όρο avgM, avgM: Λογαριθμημένος, κανονικοποιημένος λόγος των μέσων τιμών των εντάσεων των δύο καναλιών (Cy3 και Cy5) για τις 3 επαναλήψεις, Ratio1-3: Λογαριθμημένοι, κανονικοποιημένοι λόγοι των εντάσεων των δύο καναλιών (Cy3 και Cy5) για κάθε επανάληψη, Mean Ratio: Μέσος όρος των λόγων για κάθε επανάληψη, SD: Σταθερή απόκλιση, P value: Η τιμή P όπως προκύπτει από Student's ttest.

FlyBase symbol	Fold difference	avgM	Ratio 1	Ratio 2	Ratio 3	Ratio 4	Mean Ratio	SD	P Value
ImpL1	-2.52	-1.33	-1.71	-1.50	-1.37	-0.78	-1.34	0.40	0.01
CG10591	-2.43	-1.28	-1.30	-1.86	-1.22	-0.60	-1.24	0.52	0.02
ImpE2	-2.38	-1.25	-1.29	-1.12	-1.50	-1.07	-1.24	0.20	0.001
Osi6	-2.18	-1.12	-2.00	-0.93	-1.45	-0.57	-1.24	0.62	0.03
CG4702	-2.11	-1.08	-1.42	-1.04	-1.25	-0.79	-1.13	0.27	0.004
Jon65Aiii	2.33	1.22	1.42	0.42	1.60	0.76	1.05	0.56	0.03
yip7	2.21	1.15	1.42	0.62	1.58	1.01	1.16	0.43	0.01
CG7298	2.18	1.12	1.28	0.66	1.49	0.93	1.09	0.37	0.01
Msp-300	2.17	1.12	1.24	0.48	1.79	0.80	1.08	0.57	0.03
Fst	2.13	1.09	1.75	0.97	0.93	0.77	1.10	0.44	0.02
AttA	2.08	1.06	1.53	0.42	1.47	0.54	1.05	0.56	0.04

Πίνακας 3.2. Σύγκριση γονιδιακής έκφρασης μεταξύ εμβρύων 2 - 22 w1118; iso2; iso3 #15 και w1118; iso2; iso3 #15T με μικροσυστοιχίες. Το αρνητικό πρόσημο υποδεικνύει υψηλότερη ένταση φθορισμού για το μη μολυσμένο δείγμα. Fold difference: Η διαφορά στην έκφραση όπως προκύπτει από τον όρο avgM, avgM: Λογαριθμημένος, κανονικοποιημένος λόγος των μέσων τιμών των εντάσεων των δύο καναλιών (Cy3 και Cy5) για τις 4 επαναλήψεις, Ratio1-4: Λογαριθμημένοι, κανονικοποιημένοι λόγοι των εντάσεων των δύο καναλιών (Cy3 και Cy5) για κάθε επανάληψη, Mean Ratio: Μέσος όρος των λόγων για κάθε επανάληψη, SD: Σταθερή απόκλιση, P value: Η τιμή P όπως προκύπτει από Student's ttest.

3.2 Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες εμπεριέχουν μοτίβα ομολογίας Αγκυρίνης (ANK)

3.2.1 Αποτελέσματα

3.2.1.1 Έκφραση των ANK γονιδίων του βακτηριακού στελέχους wMel σε γονάδες ενηλίκων ατόμων *D. melanogaster*

Χρησιμοποίησα την τεχνική της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδραση πολυμεράσης μετά από αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης (qRT-PCR), ώστε να προσδιορίσω τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του συνόλου των ANK γονιδίων του βακτηριακού στελέχους wMel, στις γονάδες ενηλίκων ατόμων της, φυσικά μολυσμένης σειράς της *D. melanogaster*, γw^{67C23}. Η έκφραση των 17 από τα 23 χαρακτηρισμένα γονίδια του στελέχους ήταν σε επίπεδα αρκετά υψηλά, ώστε να προκύψουν αποδεκτά και επαναλήψιμα αποτελέσματα (Εικόνα 3.1). Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς την έκφραση του γονιδίου *wsp*.

Ανιχνεύθηκαν 4 γονίδια τα οποία, σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση (Student's t-test: $P < 0.05$), παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση στους όρχεις απ' ότι στις ωθήκες. Η μεγαλύτερη διαφορά παρατηρήθηκε για το γονίδιο WD0438, του οποίου τα επίπεδα έκφρασης είναι $5.0 (\pm 0.8)$ φορές υψηλότερα στους όρχεις από τις ωθήκες ($P=0.013$). Το γονίδιο WD1213 επίσης εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στους όρχεις, όπου είναι $3.0 (\pm 0.4)$ φορές τα επίπεδα που παρατηρούνται στις ωθήκες ($P=0.018$). Τα γονίδια WD0191 και WD0385 επίσης υποδεικνύονται από τη στατιστική ανάλυση να έχουν σημαντικές διαφορές στην έκφραση ανάμεσα στους δύο ιστούς ($1.2 (\pm 0.04)$, $P=0.04$ και $1.7 (\pm 0.1)$, $P=0.019$, φορές υψηλότερα επίπεδα στους όρχεις αντίστοιχα).

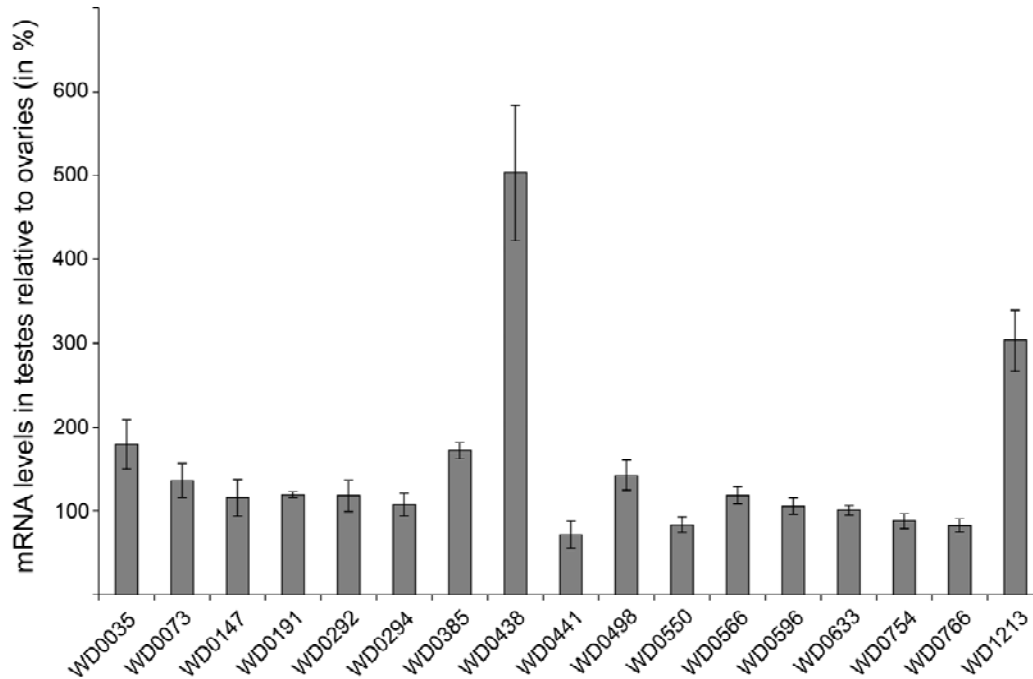
3.2.1.2 Ρύθμιση των γονιδίων WD0438 και WD1213 σε σώματα και γονάδες ενηλίκων *D. melanogaster*

Η σχετική έκφραση των γονιδίων WD0438 και WD1213 προσδιορίστηκε (κανονικοποίηση ως προς *wsp*) για τα σώματα, αρσενικών και θηλυκών ενηλίκων ατόμων γω^{67C23} από τα οποία έχουν αφαιρεθεί οι γονάδες (κουφάρια) και συγκρίθηκε με την έκφραση στις γονάδες. Όπως προκύπτει από το παραπάνω πείραμα, σε αντίθεση με τις γονάδες, αμφότερα τα γονίδια εκφράζονται σε συγκρίσιμα επίπεδα στα σώματα των δύο φύλων (Εικόνα 3.2). Η έκφραση του γονιδίου WD0438 παρουσιάζεται υψηλότερη στους όρχεις κατά $3.2 (\pm 0.2)$ φορές ($P=0.007$) και χαμηλότερη στις ωοθήκες κατά $52 (\pm 4) \%$, $P=0.027$ σε σύγκριση με τα σώματα (σύγκριση με τις τιμές των θηλυκών σωμάτων). Από τη άλλη, η έκφραση του γονιδίου WD1213 στους όρχεις δεν διαφέρει από την έκφραση στα σώματα, αλλά είναι χαμηλότερη στις ωοθήκες κατά $33 (\pm 8) \%$, $P=0.079$ (σε σύγκριση με τις τιμές των θηλυκών σωμάτων). Παρόλο που η τιμή P για την τελευταία σύγκριση είναι υψηλότερη του ορίου 0.05, πιθανώς λόγω της μικρής στατιστικής ισχύος που παρέχουν οι 3 επαναλήψεις, η διαφορά που παρουσιάζεται για αυτό το γονίδιο στην εικόνα 3.2, είναι σαφής από τη σύγκριση με τους όρχεις ($36 (\pm 8) \%$, $P=0.033$).

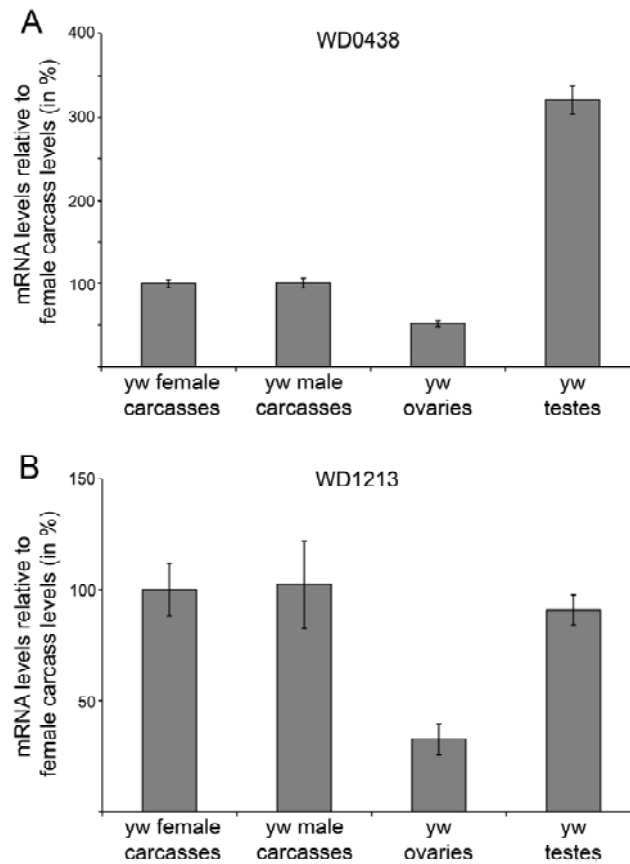
3.2.1.3 Έκφραση των ANK γονιδίων του βακτηριακού στελέχους *wMel* σε γονάδες ενηλίκων ατόμων *D. simulans*

Η σχετική έκφραση των ANK γονιδίων του στελέχους *wMel* ποσοτικοποιήθηκε επίσης στη σειρά STCP [*wMel*] (Εικόνα 3.3). Πρόκειται για μια σειρά *D. simulans* επιμολυσμένη με το στέλεχος *wMel* (Poinsot *et al.*, 1998) (Zabalou *et al.*, 2008). Η σχετική έκφραση των γονιδίων στις γονάδες αυτού του ξενιστή είναι παρόμοια με αυτήν που παρατηρήσαμε στη *D. melanogaster*. Ενώ η έκφραση της πλειοψηφίας των γονιδίων δεν μεταβάλλεται επηρεαζόμενη από τον ιστό στον οποίο εντοπίζονται τα βακτήρια, τα γονίδια WD0438 και WD1213 παρουσιάζουν και σε αυτόν τον ξενιστή στατιστικά σημαντικά, υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στους όρχεις ($7.7 (\pm 1.4)$, $P=0.011$ φορές και $2.7 (\pm 0.3)$, $P=0.021$ φορές, αντίστοιχα). Τα γονίδια WD0385 και WD0498 επίσης προκύπτουν να έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε όρχεις και

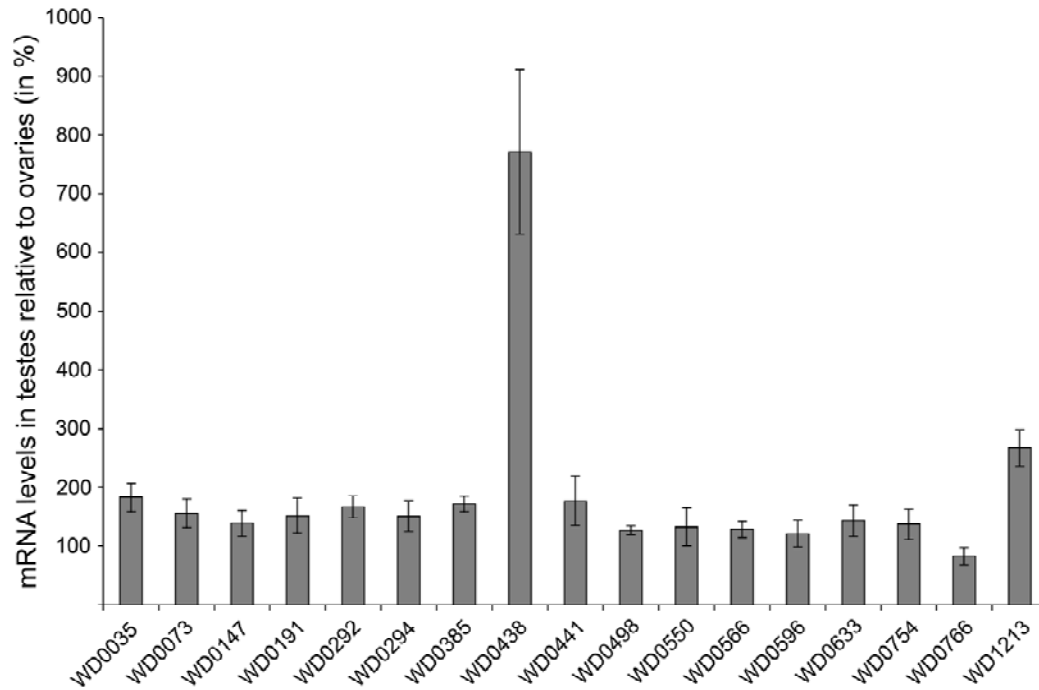
ωοθήκες ($1.7 (\pm 0.1)$, $P=0.032$ και $1.3 (\pm 0.1)$, $P=0.029$, φορές, αντίστοιχα)



Εικόνα 3.1. Σχετικά επίπεδα έκφρασης των ANK γονιδίων του *wMel* σε όρχεις σε σύγκριση με τις ωοθήκες ενήλικων *D. melanogaster* yw^{67C23} . Οι τιμές έχουν κανονικοποιηθεί ως προς την έκφραση του *wsp* και εκφράζονται ως λόγος των τιμών των όρχεων προς τις τιμές των ωοθηκών επί τοις εκατό. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν μέσες τιμές από 3 ανεξάρτητα δείγματα RNA και τα διαγράμματα σφάλματος το τυπικό σφάλμα.



Εικόνα 3.2. Σχετικά επίπεδα έκφρασης των WD0438 (A) και WD1213 (B) στις γονάδες και τα σώματα ενηλίκων ατόμων yw^{67C23} . Οι τιμές έχουν κανονικοποιηθεί ως προς την έκφραση του *wsp* και εκφράζονται ως ποσοστό επί τοις εκατό της τιμής των θηλυκών σωμάτων. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν μέσες τιμές από 3 ανεξάρτητα δείγματα RNA και τα διαγράμματα σφάλματος το τυπικό σφάλμα.



Εικόνα 3.3. Σχετικά επίπεδα έκφρασης των ANK γονιδίων του *wMel* σε όρχεις σε σύγκριση με τις ωθηκές ενηλίκων *D. simulans* STCP [*wMel*]. Οι τιμές έχουν κανονικοποιηθεί ως προς την έκφραση του *wsp* και εκφράζονται ως λόγος των τιμών των όρχεων προς τις τιμές των ωθηκών επί τοις εκατό. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν μέσες τιμές από 3 ανεξάρτητα δείγματα RNA και τα διαγράμματα σφάλματος το τυπικό σφάλμα.

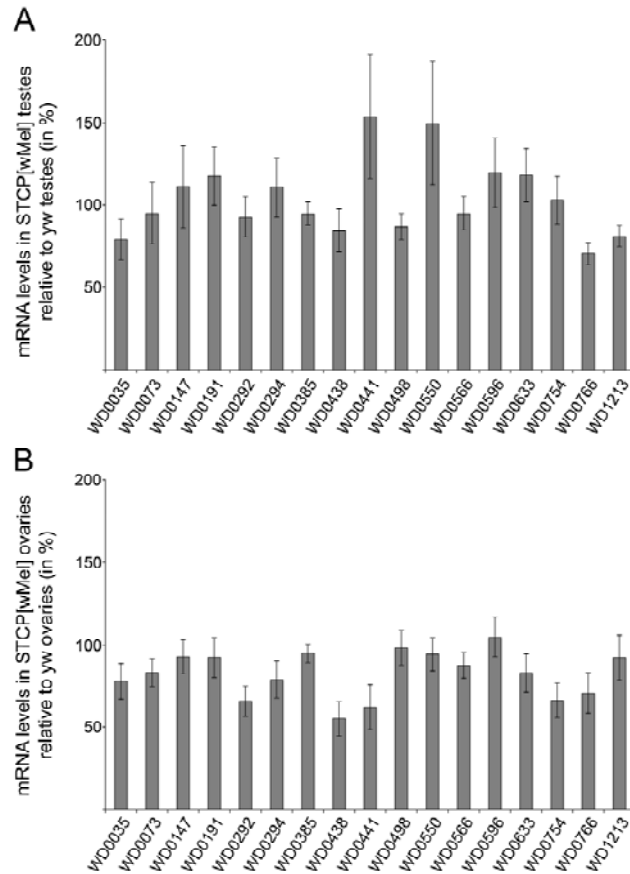
3.2.1.4 Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των ANK γονιδίων ανάμεσα στις γονάδες *D. melanogaster* και *D. simulans*

Συγκρίναμε τα σχετικά επίπεδα της έκφρασης των ANK γονιδίων του *wMel*, στον ίδιο ιστό στους δύο διαφορετικούς ξενιστές που αναφέρονται παραπάνω. Τόσο στους όρχεις, όσο και στις ωοθήκες βρήκαμε ότι τα επίπεδα έκφρασης δεν διαφέρουν στους δύο ξενιστές (Εικόνα 3.4).

3.2.1.5 Έκφραση των ομολόγων των γονιδίων WD0438 και WD1213 στα στελέχη *Wolbachia wRi* και *wAu*

Τα γονιδιώματα των στελεχών της *Wolbachia wRi* και *wAu*, φέρουν ομόλογα των γονιδίων WD0438 και WD1213 (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2005; Klasson *et al.*, 2009). Χρησιμοποιώντας εκκινητές οι οποίοι πολυμερίζουν προϊόντα πανομοιότυπα σε μέγεθος και σύσταση με αυτά του στελέχους *wMel*, μελετήσαμε την σχετική έκφραση των ομολόγων αυτών, σε γονάδες ενηλίκων, στις σειρές STCP [*wRi*] και STCP [*wAu*] (Zabalou *et al.*, 2008) της *D. simulans* (Εικόνα 3.5).

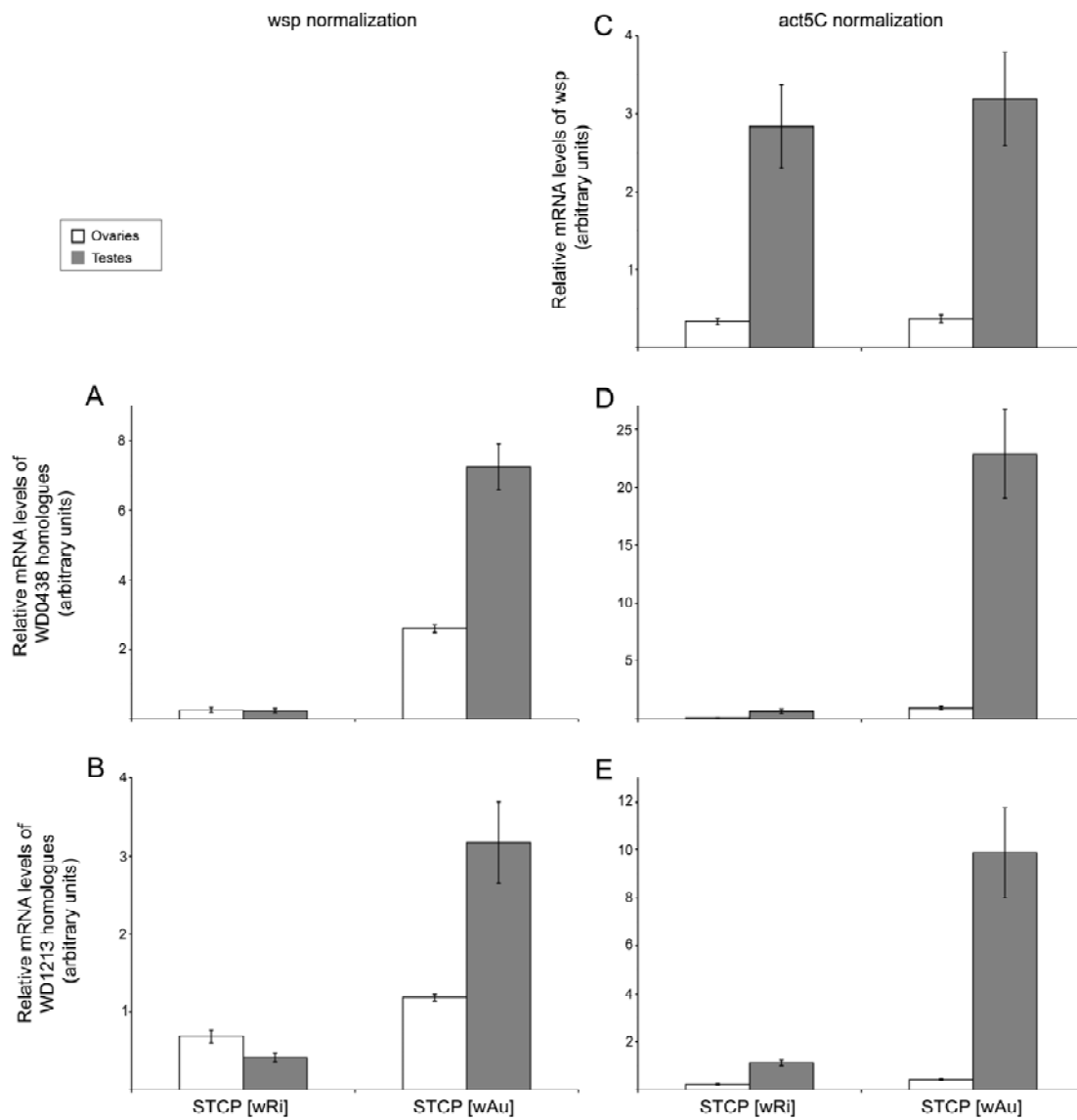
Στο στέλεχος *wAu* αμφότερα τα ομόλογα γονίδια δείχνουν παρόμοια ρύθμιση με τη ρύθμιση στο *wMel*. Το WD0438 εκφράζεται στους όρχεις σε επίπεδα κατά $2.8 (\pm 0.3)$, $P=0.01$, φορές υψηλότερα από ότι στις ωοθήκες και το WD1213 κατά $2.7 (\pm 0.5)$, $P=0.03$, φορές (Εικόνες 3.5 A και 3.5 B). Αντίθετα στο στέλεχος *wRi* δεν φαίνεται να υπάρχει αυξημένη έκφραση κανενός από τα δύο ομόλογα γονίδια στους όρχεις, καθώς τα επίπεδα έκφρασης που παρατηρούμε είναι $93 (\pm 35) \%$ ($P=0.883$) για το *wRi_003070*, ομόλογο του WD0438 και $61 (\pm 11) \%$ ($P=0.108$) για το *wRi_011930*, ομόλογο του WD1213 (Εικόνες 3.5 A και 3.5 B). Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *wsp*.



Εικόνα 3.4. Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των wMel ANK γονιδίων στις γονάδες δύο διαφορετικών ξενιστών. (A) Επίπεδα έκφρασης σε όρχεις *D. simulans* STCP [wMel] σχετικά με τα επίπεδα έκφρασης σε *D. melanogaster* yw^{67C23} και (B) Επίπεδα έκφρασης σε ωθήκες *D. simulans* STCP [wMel] σχετικά με τα επίπεδα έκφρασης σε *D. melanogaster* yw^{67C23}. Οι τιμές έχουν κανονικοποιηθεί ως προς την έκφραση του wsr και εκφράζονται ως λόγος των τιμών της σειράς STCP [wMel] προς τις τιμές της σειράς yw^{67C23} επί τοις εκατό. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν μέσες τιμές από 3 ανεξάρτητα δείγματα RNA και τα διαγράμματα σφάλματος το τυπικό σφάλμα.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στο *wRi*, παρατηρούμε σημαντικά χαμηλότερα βασικά επίπεδα έκφρασης και των δύο γονιδίων σε σχέση με το *wAu*. Τα ομόλογα του WD0438 παρουσιάζουν δεκαπλάσια περίπτωση έκφραση στο *wAu* (10.0 (± 0.3) φορές, $P=0.014$), ενώ τα ομόλογα του WD1213 περίπτωση διπλάσια (1.7 (± 0.2) φορές, $P=0.033$). Η σύγκριση αυτή έχει νόημα και αντικατοπτρίζει πραγματικές διαφορές ανάμεσα στα δύο διαφορετικά στελέχη μόνο εφ' όσον αυτά εκφράζουν τα ίδια επίπεδα του γονιδίου *wsp*, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για κανονικοποίηση. Καθώς δεν υπάρχουν στοιχεία στη βιβλιογραφία για το κατά πόσο τα διαφορετικά στελέχη εκφράζουν το *wsp*, χρησιμοποιήσαμε την έκφραση του γονιδίου του ξενιστή *act5C* (*act5C*) ως παράγοντα κανονικοποίησης, προκειμένου να προκύψουν αποτελέσματα ανεξάρτητα από την έκφραση του *wsp*. Κανονικοποιώντας με το *act5C* προκύπτει ότι η αφθονία του μεταγράφου *wsp*, τόσο στους όρχεις, όσο και στις ωοθήκες, είναι συγκρίσιμη ανάμεσα στα STCP [*wRi*] και STCP [*wAu*] (Εικόνα 3.5C). Η αφθονία του μεταγράφου *wsp* όμως είναι σημαντικά υψηλότερη στους όρχεις από ότι στις ωοθήκες αμφοτέρων των παραπάνω σειρών (8.6 (± 2), $P=0.0004$, φορές για το *wAu* και 8.5 (± 1.9), $P=0.003$, φορές για το *wRi*), μαρτυρώντας διαφορετικά επίπεδα μόλυνσης ανάμεσα στους δύο ιστούς.

Οι εικόνες 3.5D και 3.5E δείχνουν την σχετική αφθονία των μεταγράφων σε όρχεις και ωοθήκες ενηλίκων μολυσμένων με *wRi* ή *wAu* μετά από κανονικοποίηση προς την έκφραση του *act5C*. Στη σειρά STCP [*wAu*] παρατηρείται υψηλότερη αφθονία των δύο μεταγράφων στους όρχεις από τις ωοθήκες, κατά 23.9 (± 4.9), $P=0.001$, φορές για το ομόλογο του WD0438 και κατά 22.8 (± 4.9), $P=0.003$, για αυτό του WD1213. Τα μετάγραφα των ομολόγων γονιδίων στους όρχεις της σειράς STCP [*wRi*] έχουν επίσης μεγαλύτερη αφθονία από τις ωοθήκες κατά 7.7 (± 3.1), $P=0.05$, και 4.9 (± 0.9), $P=0.002$, αντίστοιχα, παρά το γεγονός ότι στο *wRi* δεν παρατηρούμε ρύθμισή τους, εξ αιτίας των επιπέδων μόλυνσης. Τα επίπεδα του μεταγράφου του ομολόγου του WD0438 παραμένουν στατιστικά σημαντικά μικρότερα στις γονάδες που είναι μολυσμένες με *wRi*, αντίθετα από το WD1213, το οποίο μετά την κανονικοποίηση προς το *act5C* δεν φαίνεται να διαφέρει μεταξύ των δύο στελεχών *Wolbachia* ως προς τα βασικά του επίπεδα.



Εικόνα 3.5. Σχετικά επίπεδα mRNA των ομολόγων των WD0438 (Α, Δ) και WD1213 (Β, Ε), καθώς και του *wsp* (Γ) σε γονάδες ενήλικων *D. simulans* STCP [wRi] και *D. simulans* STCP [wAu]. Οι τιμές έχουν κανονικοποιηθεί, είτε ως προς την έκφραση του *wsp* (Α-Β), είτε ως προς την έκφραση του *act5C* (Γ-Ε) και εκφράζονται σε αυθαίρετες μονάδες. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν μέσες τιμές από 3 ανεξάρτητα δείγματα RNA και τα διαγράμματα σφάλματος το τυπικό σφάλμα.

3.2.2 Συζήτηση

Τα γονίδια της *Wolbachia* που κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες φέρουν τμήματα ομολογίας επαναλήψεων αγκυρίνης (ANK), προσέλκυσαν το ενδιαφέρον από τον καιρό της δημοσίευσης του πρώτου γονιδιώματος *Wolbachia*, wMel (Wu *et al.*, 2004). Δύο στοιχεία υποστηρίζουν την υπόθεση ότι τα γονίδια αυτά είναι πιθανόν να εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση των βακτηρίων με τους ξενιστές και στον αναπαραγωγικό παρασιτισμό που επάγεται από τη *Wolbachia*. Πρώτον, ο ασυνήθιστα μεγάλος αριθμός ANK γονιδίων στη γενεαλογική γραμμή των παρασιτικών στελεχών της *Wolbachia* (Klasson *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2004) σε σχέση με συγγενικά είδη (Al-Khodor *et al.*, 2009) και σε σχέση με το μουτουαλιστικό στέλεχος *Wolbachia* των νηματωδών (Foster *et al.*, 2005) και, δεύτερον, το γεγονός ότι σε κάποια ενδοκυτταρικά παθογόνα βακτήρια, οι πρωτεΐνες ANK εκκρίνονται μέσω του συστήματος έκκρισης IV (TFSS) και αλληλεπιδρούν με παράγοντες του κυττάρου ξενιστή (Pan *et al.*, 2008). Οι Iturbe-Ormaetxe και συνάδελφοι μελέτησαν την κατανομή, την ποικιλομορφία στο επίπεδο της αλληλουχίας του DNA και την έκφραση των ANK γονιδίων σε ένα πλήθος συσχετισμών μεταξύ *Drosophila* και *Wolbachia* και πρότειναν κάποια γονίδια ως πιθανά εμπλεκόμενα στην επαγωγή του CI. Επίσης κάποιες μελέτες αποπειράθηκαν να συσχετίσουν την επαγωγή CI με την διαφορετική έκφραση ANK γονιδίων σε διαφορετικά στελέχη που απαντώνται στο *C. pipiens*. Οι παραπάνω μελέτες βασίστηκαν σε ημιποσοτικές τεχνικές για την ανίχνευση ρυθμιζόμενων γονιδίων, οι οποίες δεν είναι αρκετά ευαίσθητες ώστε να ανιχνεύσουν μικρές διαφορές. Επιπρόσθετα όλες οι παραπάνω μελέτες εξέτασαν τις πιθανές φυλοειδικές διαφορές στην έκφραση, σε ολόκληρα ενήλικα άτομα. Η προσέγγιση αυτή ενδεχομένως να είναι προβληματική, καθώς οι διαφορές αυτές είναι πιθανόν να είναι ιστοειδικές και να οδηγείται σε σφάλμα με δεδομένο ότι τα βακτήρια στις γονάδες απαρτίζουν ένα τμήμα μόνο του συνολικού βακτηριακού φορτίου στον οργανισμό.

Η παρούσα μελέτη της έκφρασης των ANK γονιδίων, παρακάμπτει τα προαναφερθέντα προβλήματα με την χρήση qPCR για την εκτίμηση της

έκφρασης όλων των γονιδίων αυτών σε γονάδες ενήλικων ατόμων. Επιπρόσθετα η χρήση διαμολυσμένων (transinfected) ή εισχωρημένων (introgressed) ώστε να μελετάται το ίδιο βακτηριακό στέλεχος σε διαφορετικά είδη ξενιστή, ή διαφορετικά βακτηριακά στελέχη στον ίδιο ξενιστή, ελέγχει για πιθανή εμπλοκή του ξενιστή στην έκφραση των ANK γονιδίων.

Στον φυσικό ξενιστή του στελέχους *wMel*, *D. melanogaster*, ανιχνεύσαμε δύο γονίδια του βακτηρίου τα οποία εκφράζονται σε ποσά άνω του διπλάσιου στους όρχεις σε σχέση με τις ωοθήκες. Το γονίδιο WD0438 κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη 632 αμινοξέων, η οποία φέρει δύο επαναλήψεις αγκυρίνης (Wu *et al.*, 2004). Καμία ομολογία με άλλα γνωστά πρωτεϊνικά μοτίβα δεν υπάρχει, που θα μπορούσε να υποδεικνύει κάποια συγκεκριμένη λειτουργία για την πρωτεΐνη αυτή. Στο καρβοξυτελικό άκρο της όμως ανιχνεύονται (TMHMM Server v2.0) δύο πιθανά διαμεμβρανικά τμήματα. Ορθόλογα του γονιδίου αυτού υπάρχουν σε αρκετά στελέχη *Wolbachia* συμπεριλαμβανομένου του μπουτουαλιστικού στελέχους του νηματώδους *B. Malayi*, *wBm*.

Το δεύτερο γονίδιο, WD1213, το οποίο εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στους όρχεις κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 414 αμινοξέων, που φέρει 1 επανάληψη αγκυρίνης. Η πρωτεΐνη φέρει στο αμινοτελικό άκρο ένα πεπτιδιο-οδηγό (Wu *et al.*, 2004) και επίσης δεν παρουσιάζει άλλες ομολογίες με γνωστά πρωτεϊνικά μοτίβα. Κάποιες πρωτεΐνες της *Wolbachia* είναι πιθανό να εκκρίνονται στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου VI (Masui *et al.*, 2000; Rances *et al.*, 2008) με έναν μηχανισμό ανεξάρτητο από γνωστά σινιάλα εντοπισμού και πεπτιδία-οδηγούς. Η ύπαρξη διαμεμβρανικών τμημάτων και πεπτιδίων-οδηγών στις δύο παραπάνω πρωτεΐνες τις κάνει ιδιαίτερα πιθανή την φυσική επαφή τους με το κύτταρο-ξενιστή και άρα την αλληλεπίδραση τους με αυτό. Επιπρόσθετα, η φυλοειδική (sex-specific) ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων που παρουσιάζουμε εδώ, υποστηρίζει περαιτέρω την υπόθεση εμπλοκής των δύο πρωτεϊνών στην αλληλεπίδραση των δύο οργανισμών.

Τα βακτήρια *Wolbachia* εντοπίζονται τόσο στους όρχεις όσο και στις ωοθήκες, όπου επιτελούν τις διαφορετικές λειτουργίες της τροποποίησης (mod) και της διάσωσης (resc), αντίστοιχα (Ferree and Sullivan 2006; Lassy and Karr

1996; Tram and Sullivan 2002; Werren 1997). Εκτός όμως από τους συγκεκριμένους ιστούς, τα βακτήρια εντοπίζονται και σε ένα πλήθος άλλων ιστών (Dobson *et al.*, 1999), όπου εμπλέκονται σε διαφορετικής φύσης φαινόμενα όπως την επαγωγή εκφυλιστικών φαινοτύπων που μειώνουν την διάρκεια ζωής του ξενιστή (Min and Benzer 1997), την επαγωγή αλλαγών στις φερομόνες ή στην συζευκτική συμπεριφορά (Koukou *et al.*, 2006), ή τον μεταβολισμό του (Brownlie *et al.*, 2009; Hosokawa *et al.*, 2010). Είναι λογική η υπόθεση ότι ένα ενδοκυτταρικό βακτήριο που επάγει τόσο διαφορετικούς φαινοτύπους σε διαφορετικούς ιστούς του ίδιου ξενιστή, πρέπει να έχει την ικανότητα να αντιλαμβάνεται και να αποκρίνεται στο συγκεκριμένο κυτταρικό περιβάλλον. Για να ελέγξουμε κατά πόσο οι διαφορές στην έκφραση των WD0438 και WD1213 που παρατηρήσαμε μεταξύ των γονάδων, περιορίζονται μόνο στους συγκεκριμένους ιστούς, συγκρίναμε την έκφραση στις γονάδες με την έκφραση σε σώματα ενηλίκων από τα οποία έχουν αφαιρεθεί οι γονάδες (κουφάρια). Από τα αποτελέσματα μας καθίσταται σαφές ότι η ρύθμιση αυτή είναι ειδική για τις γονάδες, καθώς τα επίπεδα έκφρασης αμφοτέρων των γονιδίων είναι πανομοιότυπη μεταξύ αρσενικών και θηλυκών κουφαριών. Αυτή είναι η πρώτη ξεκάθαρη περιγραφή ιστοειδικής ρύθμισης γονιδίων της *Wolbachia*. Αυτό δεν αποκλείει το ενδεχόμενο τα γονίδια αυτά να ρυθμίζονται και σε άλλους ιστούς, καθώς το δείγμα των σωμάτων ελέγχεται στο σύνολο του και όχι κάθε ιστός ξεχωριστά. Θα μπορούσε ενδεχομένως να υπάρχει διαφορά στην έκφραση και σε άλλους ιστούς ή οποία δεν ανιχνεύεται, λόγω της «αραίωσής» της με τους λοιπούς ιστούς. Είναι μολαταύτα ξεκάθαρο ότι, ως επί το πλείστον, τα γονίδια αυτά δεν ρυθμίζονται στους ιστούς εκτός των γονάδων.

Το βακτηριακό στέλεχος *wMel*, όταν διαμολυνθεί σε *D. simulans* (STCP [*wMel*]), προκαλεί σχεδόν ολοκληρωτικό CI σε σχέση με τα μέτρια επίπεδα CI που παρατηρούνται στη *D. melanogaster* (Poinsot *et al.*, 1998; Zabalou *et al.*, 2008). Θέλοντας να ελέγξουμε την υπόθεση ότι η διαφορά στα επίπεδα της κυτταροπλασματική ασυμβατότητας που επάγει το *wMel* στους δύο ξενιστές μπορεί να συνδέεται με το επίπεδο της έκφρασης των ANK γονιδίων, πραγματοποιήσαμε την ποσοτικοποίηση της έκφρασής τους στο STCP [*wMel*]. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η έκφραση των ANK γονιδίων του *wMel* δεν επηρεάζεται από τον νέο ξενιστή. Τα γονίδια WD0438 και WD1213

παρουσιάζουν την ίδια τάση, εκφράζονται δηλαδή σε υψηλότερα επίπεδα στους όρχεις από ότι στις ωοθήκες και το επίπεδο της διαφοράς είναι παρόμοιο με το παρατηρηθέν στη *D. melanogaster* (βλέπε Εικόνες 3.1, 3.3). Επίσης, όπως και στον φυσικό ξενιστή, κανένα άλλο γονίδιο δεν έχει διαφορές μεταξύ των γονάδων που να είναι υψηλότερες από διπλάσιες. Αξίζει να σημειωθεί σε αυτό το σημείο, ότι ένα ακόμη γονίδιο, το WD0385, έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε όρχεις και ωοθήκες σε αμφότερους τους ξενιστές, αλλά η διαφορά αυτή ήταν λίγο μικρότερη από διπλάσια ($1.7 (\pm 0.1)$ και για τους δύο ξενιστές). Το γονίδιο αυτό έχει αναφερθεί σε άλλες μελέτες καθώς στο στέλεχος *wAu* διακόπτεται από την ένθεση ενός IS5 μεταθετού στοιχείου (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2005) και το ομόλογό του στο στέλεχος *wPir* φαίνεται να εκφράζεται σε χαμηλότερα επίπεδα στα αρσενικά από ότι στα θηλυκά του *C. ripiens* (Walker *et al.*, 2007). Για να ελέγξουμε κατά πόσο οι διαφορές στην έκφραση που παρατηρούνται στη *D. simulans* είναι σημαντικά διαφορετικές από τις αντίστοιχες στη *D. melanogaster*, αλλά και για να εξετάσουμε το κατά πόσο τα συνολικά επίπεδα της έκφρασης μπορεί να διαφέρουν στα διαφορετικά υπόβαθρα ξενιστή, συγκρίναμε την έκφραση στους αντίστοιχους ιστούς των δύο ξενιστών (Εικόνα 3.4). Κανένα από τα ANK γονίδια δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των όρχεων ή των ωοθηκών των δύο ξενιστών. Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η ρύθμιση της έκφρασης των ANK γονιδίων του *wMel*, στις δύο αυτές περιπτώσεις δεν επηρεάζεται από τον ξενιστή και ότι οι παρατηρούμενες διαφορές στην έκφραση μεταξύ όρχεων και ωοθηκών δεν συσχετίζονται με την ένταση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Παρόλο που δεν μπορούμε να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο ότι η συνολική αφθονία των μεταγράφων μπορεί να διαφέρει στους δύο ξενιστές λόγω διαφορών στα επίπεδα της μόλυνσης, η παρατήρηση παρόμοιων επιπέδων μόλυνσης από τους Poinsot *et. al.* (Poinsot *et al.*, 1998) το καθιστά απίθανο.

Το γεγονός ότι οι διαφορές στην έκφραση των WD0438 και WD1213 στις γονάδες δεν συσχετίζεται με την ένταση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας που επάγεται από το *wMel* δεν αποκλείει το ενδεχόμενο τα γονίδια αυτά να εμπλέκονται στην επαγωγή του φαινομένου. Προκειμένου να διερευνήσουμε την παραπάνω υπόθεση, χρησιμοποιήσαμε δυο διαφορετικά

στελέχη *Wolbachia*, τα *wRi* και *wAu*, τα οποία κατατάσσονται ως $\text{mod}^+ \text{resc}^+$ και $\text{mod}^- \text{resc}^-$ αντίστοιχα και τα οποία φέρουν ορθόλογα των δύο γονιδίων. Οι συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν στο ίδιο υπόβαθρο *D. simulans* (STCP), στο οποίο τα δύο βακτηριακά στελέχη επάγουν, όπως και στους φυσικούς ξενιστές τους, υψηλά και μηδενικά επίπεδα Ci αντίστοιχα (Zabalou *et al.*, 2008). Από τις συγκρίσεις αυτές προκύπτει ότι στο *wAu*, το οποίο είναι φυλογενετικά πλησιέστερο με το *wMel*, τα δύο γονίδια επίσης εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα στους όρχεις. Τα δύο ορθόλογα του *wAu* εμφανίζουν 99% ταυτότητα στο επίπεδο της αμινοξικής αλληλουχίας με τα αντίστοιχα του *wMel*. Καθώς όμως οι αλληλουχίες αυτές προκύπτουν από την αλληλούχιση προϊόντων PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές βασισμένους στην αλληλουχία του *wMel* (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2005), δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα να διαφέρουν στις αμίνω- ή καρβόξυ-τελικές περιοχές. Αντίθετα με το *wMel* και *wAu*, στο *wRi* δεν παρατηρείται αυξημένη έκφραση στους όρχεις για κανένα από τα δύο γονίδια. Το ορθόλογο του WD0438 έχει σύνθετη κωδική περιοχή με ομολογίες τόσο με το *wMel* όσο και με άλλα στελέχη και με πρόσφατους διπλασιασμούς επαναλήψεων αγκυρίνης στο *wRi* (Klasson *et al.*, 2009). Η περιοχή που προηγείται της κωδικής επίσης παρουσιάζει διαφορές μεταξύ του *wRi* και του *wMel*, με 93 % ομολογία. Οι διαφορές αυτές στις υποθετικές ρυθμιστικές περιοχές θα μπορούσαν να ευθύνονται για τις διαφορές που παρατηρούμε στην έκφραση. Το έτερο γονίδιο όμως, το WD1213, παρόλο που επίσης έχει διαφορές στην έκφραση μεταξύ του *wRi* και των άλλων στελεχών, παρουσιάζει σημαντική ομολογία στα *wRi* και *wMel*, τόσο στην κωδική περιοχή (μια έλλειψη 25 αμινοξέων στο *wRi*), όσο και στις μη κωδικές περιοχές που προηγούνται του γονιδίου (100 % ταυτότητα για την περιοχή πριν από το WD1213 και 99 % για την περιοχή πριν το WD1214). Το γεγονός αυτό καθιστά απίθανο το ενδεχόμενο να ευθύνεται κάποια *cis*-ρυθμιστική περιοχή για της διαφορές στη ρύθμιση. Σε αντίθεση με τα παραπάνω αποτελέσματα, μια πρόσφατη μελέτη αναφέρει ότι το *wRi_003070*, ορθόλογο του WD0438 στο *wRi*, εκφράζεται σε ωοθήκες ενηλίκων και θηλυκά άτομα και όχι σε όρχεις και αρσενικά (Klasson *et al.*, 2009). Αυτή η ασυμφωνία μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η παραπάνω μελέτη πραγματοποιήθηκε στον φυσικό ξενιστή και όχι στο STCP υπόβαθρο που χρησιμοποιούμε εμείς, γεγονός που υπονοεί ένα

πιθανό μηχανισμό ρύθμισης που εξαρτάται από τον ξενιστή. Τα αποτελέσματα μας δεν υποστηρίζουν την υπόθεση συσχετισμού της ιστοειδικής ρύθμισης των παραπάνω γονιδίων με την επαγωγή κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας, καθώς παρουσιάζεται υψηλότερη έκφραση στους όρχεις του *wMel*, το οποίο είναι $mod^+ resc^+$ και επάγει μέτρια επίπεδα CI, και του *wAu*, το οποίο είναι $mod^- resc^-$ και δεν έχει την ικανότητα να επάγει ασυμβατότητα, ενώ δεν παρατηρείται η ίδια ρύθμιση στο *wRi* το οποίο επίσης είναι $mod^+ resc^+$ και επάγει υψηλά επίπεδα CI. Η ιστοειδική ρύθμιση των γονιδίων αυτών όμως είναι συμβατή με την υπόθεση συμμετοχής τους σε κάποιο άλλο επίπεδο της συμβιωτικής αλληλεπίδρασης, όπως η υποκυτταρική κατανομή τους. Πράγματι τα στελέχη *wMel* και *wAu* ταυτίζονται ως προς την κατανομή τους κατά την ωογένεση και εμβρυογένεση (οπίσθιος πόλος), ενώ το *wRi* παρουσιάζει διάσπαρτη κατανομή (Veneti *et al.*, 2004).

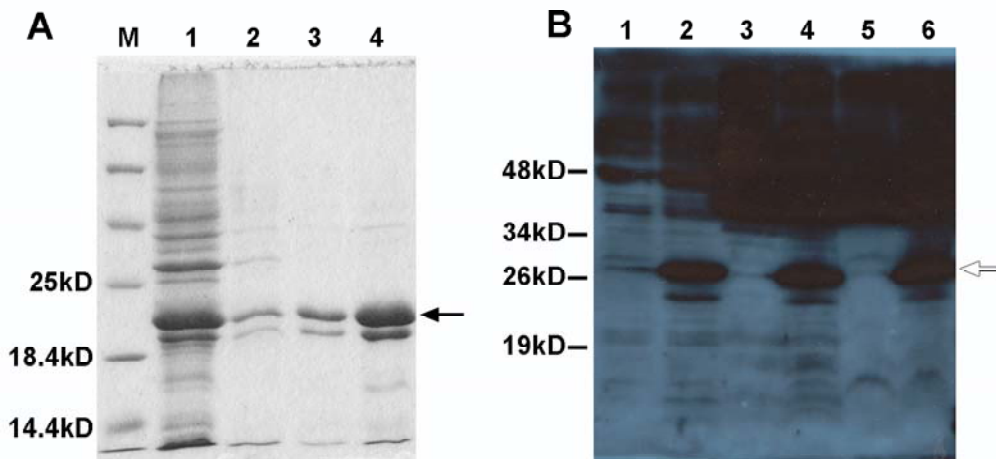
3.3 Παρασκευή πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι στις ANK πρωτεΐνες WD0550, WD0566, WD0637 και WD1213 και μελέτη της έκφρασης και του εντοπισμού τους.

3.3.1 Αποτελέσματα

3.3.1.1 WSP

Η παρασκευή πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης WSP παρατίθεται σε αυτό το κεφάλαιο μια και έγινε με σκοπό να βοηθήσει τη μελέτη της κατανομής των αγκυρινών. Τμήμα της κωδικής περιοχής του γονιδίου *wsp* έχει κλωνοποιηθεί στον φορέα έκφρασης pRSET-A (Veneti, Z, προσωπική επικοινωνία). Το πεπτιδίο His-*wsp* εκφράζεται σε πολύ μεγάλες ποσότητες σε συνθήκες επαγωγής που περιγράφονται στον Πίνακα 2.1 και βρίσκεται σχεδόν αποκλειστικά μη διαλυτό σε έγκλειστα σωμάτια. Απομονώθηκε κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες σε στήλη νικελίου (Εικόνα 3.6). Ανακτήθηκε πολύ μεγάλο ποσό του πεπτιδίου υψηλής, σχετικά καθαρότητας, παρόλο που παραμένουν πρωτεΐνες του βακτηρίου. Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται μία ζώνη μικρότερου μοριακού βάρους, η οποία συναπομονώνεται με το πεπτιδίο His-*wsp* και η οποία ήταν αδύνατον να καθαριστεί. Κάνοντας την υπόθεση ότι πρόκειται για προϊόν αποδόμησης του πεπτιδίου, το δείγμα λυοφυλοποιήθηκε και εστάλη για παραγωγή ανοσοποιημένου ορρό αρουραίου στην εταιρία Absea (<http://www.absea-antibody.com/>). Ο ορρός ελέγχθη σε ανοσοαποτύπωμα, σε υλικό από μολυσμένους με *Wolbachia*, όρχεις, ωοθήκες, έμβρυα (Εικόνα 3.6) και ενήλικα (αποτέλεσμα δεν παρουσιάζεται) και ανιχνεύει την πρωτεΐνη *wsp* σε κάθε περίπτωση. Στα ανοσοαποτυπώματα φαίνεται επίσης μία ζώνη αναλόγως μικρότερου μοριακού βάρους με αυτήν που είδαμε παραπάνω, αποδεικνύοντας ότι πρόκειται περί προϊόντος αποδόμησης της πρωτεΐνης και όχι πρωτεΐνης

E. coli. Προπροσοφημένος ορρός χρησιμοποιήθηκε σε ανοσοϊστοχημικές χρώσεις, όπου επίσης είναι λειτουργικός, όπως θα δούμε παρακάτω.



Εικόνα 3.6. Βήματα απομόνωσης του πεπτιδίου His-wsp και ανοσοαποτύπωμα της πρωτεΐνης wsp από ιστούς *D. melanogaster* γω^{67C23}. Ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων 12% πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE). (A) χρώση με Coomassie Brilliant Blue, (B) Ανοσοαποτύπωμα με τον ορρό rat-anti-wsp. Το μαύρο βέλος δείχνει το πεπτίδιο His-wsp, το άσπρο βέλος την ενδογενή πρωτεΐνη wsp. Τα μοριακά βάρη του μάρτυρα σημειώνονται σε kD. (A) Βήματα απομόνωσης του πεπτιδίου His-wsp μέσω στήλης νικελίου. 1: Εκχύλισμα βακτηρίων (lysate), 2-3: Πλύσεις, 4: Έκλυση. (B) 1,3,5: υλικό από γω^{67C23} Τ, 2,4,6: υλικό από γω^{67C23}, 1-2: Όρχεις, 3-4: Ωθήκες, 5-6: Έμβρυα (όλων των σταδίων)

3.3.1.2 WD0550

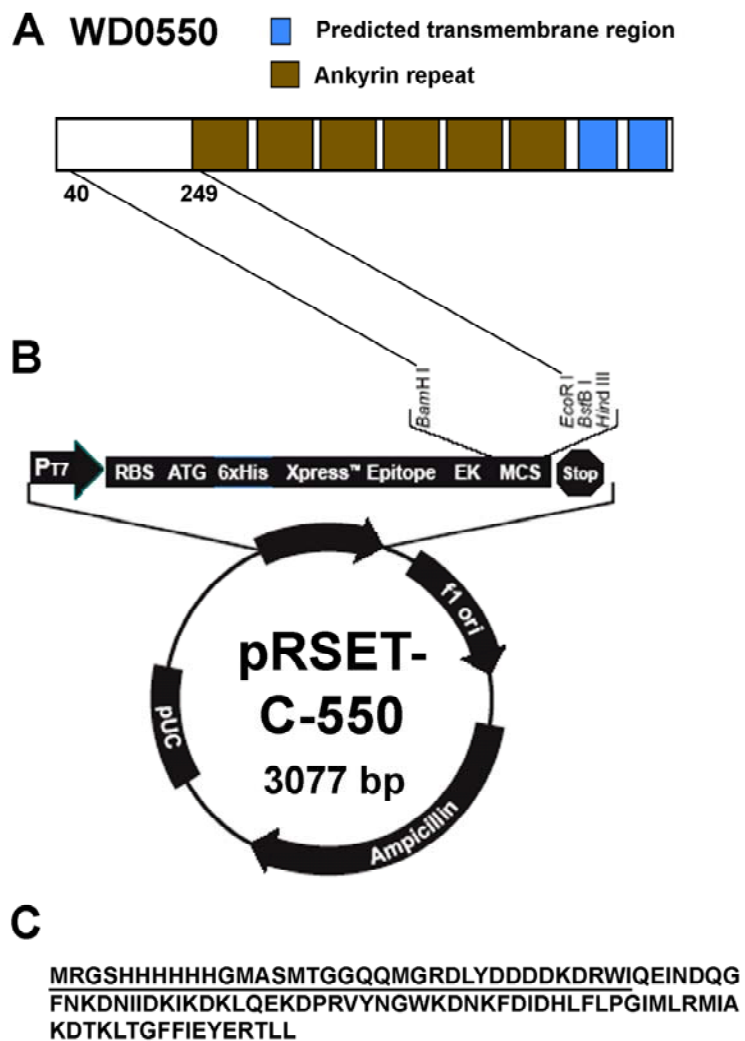
Το τμήμα του γονιδίου WD0550 που κωδικοποιεί για τα αμινοξέα 14-83 ενισχύθηκε με PCR από γενωμικό DNA του στελέχους wMel και κλωνοποιήθηκε στον φορέα έκφρασης pRSET-C ως BamHI-EcoRI τμήμα (Εικόνα 3.7). Το τμήμα αυτό της πρωτεΐνης δεν παρουσιάζει καμία ομοιότητα με γνωστά πρωτεϊνικά μοτίβα και δεν εμπεριέχει επαναλήψεις αγκυρίνης. Το αναμενόμενο πεπτίδιο His-550 αποτελείται από 105 αμινοξέα, συμπεριλαμβανομένων της «ετικέτας» ιστιδινών (His-tag) και λοιπών αμινοξέων που κωδικοποιούνται από τον φορέα, και το αναμενόμενο μοριακό βάρος του είναι 12.5 kD (Εικόνα. 3.7).

Το πεπτίδιο εκφράστηκε σε κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) αφού καθορίστηκαν οι ιδανικές συνθήκες έκφρασης και απομονώθηκε μέσω στήλης

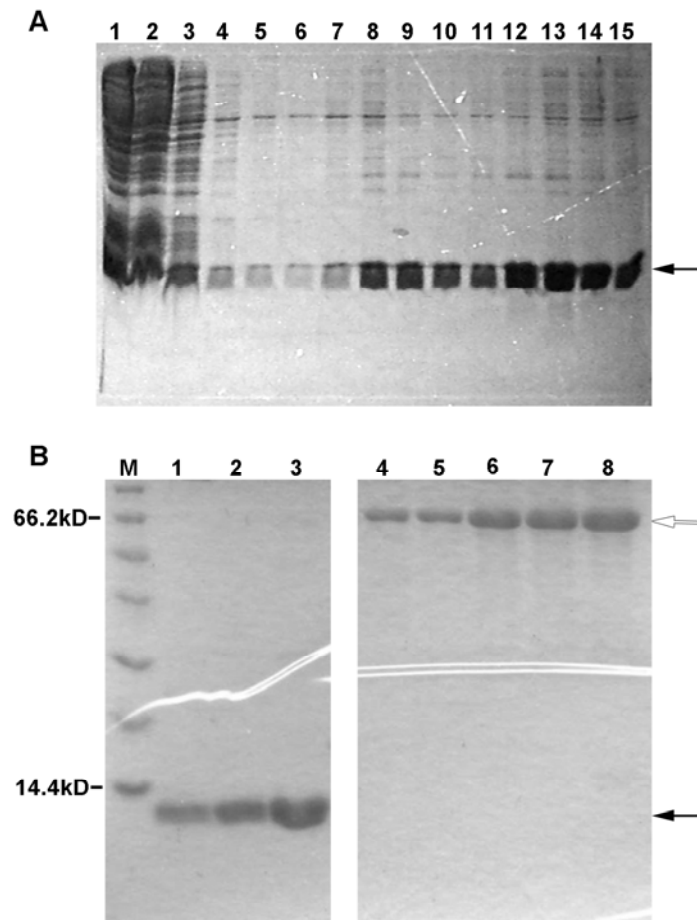
νικελίου (Εικόνα 3.8). Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.8 το πεπτίδιο απομονώθηκε σε αρκετά υψηλό βαθμό καθαρότητας, παρόλο που παραμένει ένας αριθμός βακτηριακών πρωτεϊνών. Το απομονωμένο πεπτίδιο ποσοτικοποιήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και το μοριακό του βάρος είναι συμβατό με το αναμενόμενο μοριακό βάρος (Εικόνα 3.8B). Το πρωτεϊνικό δείγμα εστάλη λυοφυοποιημένο, όπως περιγράφεται παραπάνω, προκειμένου να παραχθεί ανοσοποιημένος ορρός κουνελιού .

Προκειμένου να επιβεβαιώσω αν ο ορρός είναι λειτουργικός και για να εξακριβώσω αν αναγνωρίζει ειδικά την αλληλουχία του τμήματος της πρωτεΐνης WD0550 και όχι αλληλουχίες που κωδικοποιούνται από τον φορέα έκφρασης, κλωνοποίησα το ίδιο τμήμα του γονιδίου στον φορέα έκφρασης pGex-3X. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pGex-3X-550, φέρει το παραπάνω τμήμα του γονιδίου εντός αναγνωστικού πλαισίου και καρβοξυτελικά από το γονίδιο glutathione S-transferase (GST) και το αναμενόμενο μοριακό βάρος του πεπτιδίου είναι 35.5 kD. Το πεπτίδιο GST-550 εκφράστηκε σε BL21(DE3) κύτταρα και τα εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν σε ανοσοαποτυπώματα western (Εικόνα 3.9). Από την παραπάνω εικόνα προκύπτει ότι ο ορρός αναγνωρίζει το πεπτίδιο ειδικά, μια και δεν φαίνεται να αναγνωρίζει τα ετερόλογα πεπτίδια GST-566, GST-637 ή GST-1213, αν και παρουσιάζει θόρυβο αναγνωρίζοντας και ενδογενείς βακτηριακές πρωτεΐνες, πιθανώς λόγω της μόλυνσης με αυτές του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοποίηση.

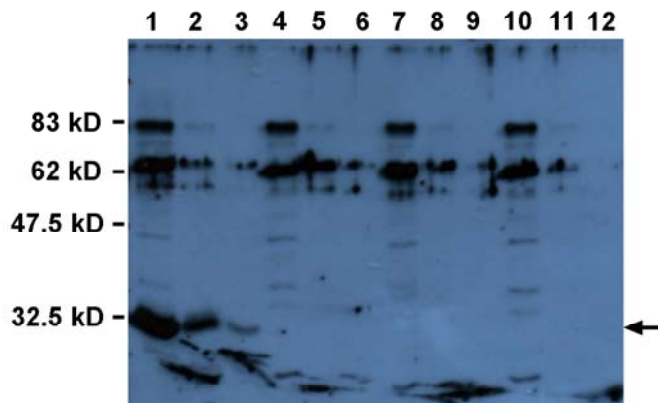
Στην συνέχεια πραγματοποίησα αναλύσεις western σε εκχυλίσματα πρωτεϊνών από ενήλικα αρσενικά, ενήλικα θηλυκά, όρχεις και ωοθήκες, των στελεχών *D. melanogaster* yw^{67C23} και yw^{67C23}T. Η πρωτεΐνη WD0550 δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από τα μολυσμένα με *Wolbachia* δείγματα. Τα ίδια στελέχη και δείγματα χρησιμοποιήθηκαν και για την διεξαγωγή πειραμάτων ανοσοϊστοχημείας. Σε κανένα από τα δείγματα δεν ανιχνεύτηκε ειδικό σήμα.



Εικόνα 3.7. pRSET-C-550. Α. Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου WD0550. Οι αριθμοί υποδηλώνουν νουκλεοτίδια από το πρώτο νουκλεοτίδιο του κωδικονίου έναρξης. Β. Χάρτης του πλασμιδίου pRSET-C-550. Γ. Το πεπτίδιο His-550. Υπογραμμισμένα είναι τα αμινοξέα που κωδικοποιούνται από τον φορέα.



Εικόνα 3.8. Βήματα απομόνωσης του πεπτιδίου His-550. Ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων 12% (A) και 15% (B) πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) και χρώση με Coomassie Brilliant Blue. Τα μαύρα βέλη δείχνουν το πεπτιδίο His-550. Το άσπρο βέλος δείχνει την BSA. Τα μοριακά βάρη του μάρτυρα σημειώνονται σε kD. A. Βήματα απομόνωσης του πεπτιδίου His-550 μέσω στήλης νικελίου. 1:Εκχύλισμα βακτηρίων (lysate), 2:Clarified lysate, 3:Μη δεσμευμένο κλάσμα (flowthrough), 4-6: Πλύσεις, 7-10: Ήπιες εκλούσεις, 11-15: Ισχυρές εκλούσεις B. Ποσοτικοποίηση του πεπτιδίου. M: Μοριακός μάρτυρας (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas), 1-3: 1, 2 και 5 μg His-550, αντίστοιχα (ποσότητα καθορισμένη φασματοφωτομετρικά), 4-8: 1, 1.5, 2, 3 και 5μg BSA, αντίστοιχα.

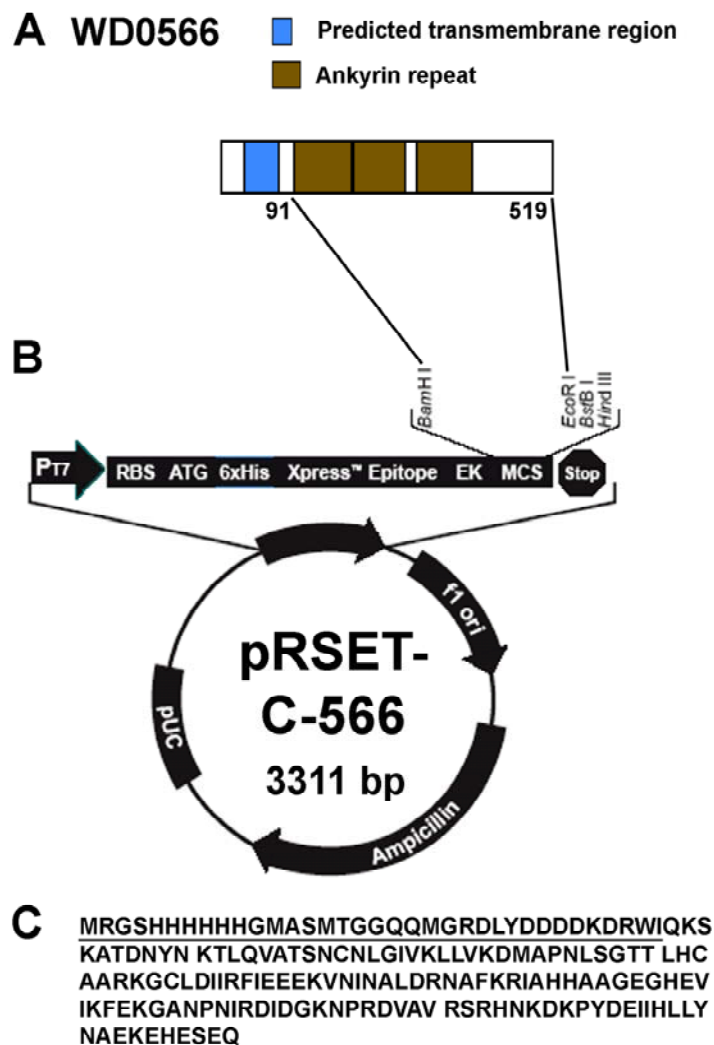


Εικόνα 3.9. Ανοσοαποτύπωμα του πεπτιδίου GST-550. Τα μαύρα βέλη δείχνουν το πεπτιδίο GST-550. 1- 3: Μειούμενες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων βακτηρίων BL21(DE3)/pGex-3x-550 (0.1, 0.01 και 0.001 μl επηγμένης βακτηριακής καλλιέργειας 2ml), 4-6: Μειούμενες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων βακτηρίων BL21(DE3)/pGex-3x-566, 7-9: Μειούμενες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων βακτηρίων BL21(DE3)/pGex-3x-637, 10-12: Μειούμενες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων βακτηρίων BL21(DE3)/pGex-3x-1213. Αραίωση rabbit-anti-550 ορού: 1/1000. Μοριακός μάρτυρας: Prestained Protein Marker, Broad Range (NEB), 12% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

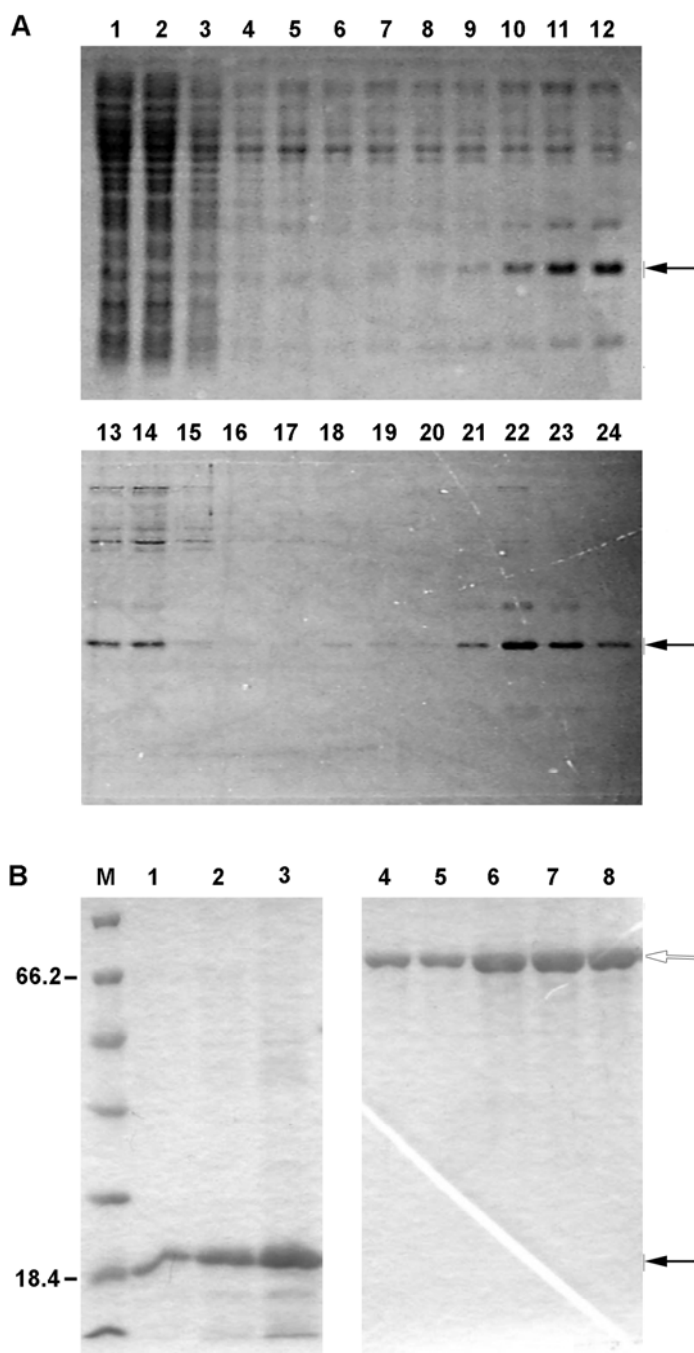
3.3.1.3 WD0566

Το τμήμα του γονιδίου WD0566 που κωδικοποιεί για τα αμινοξέα 31-173 κλωνοποιήθηκε, όπως περιγράφεται παραπάνω, στους δύο προαναφερθέντες φορείς έκφρασης (Εικόνα 3.10). Το τμήμα αυτό του γονιδίου, κωδικοποιεί για τις 4 επαναλήψεις αγκυρίνης που εμφανίζονται στην πρωτεΐνη WD0566. Καθώς σχεδόν ολόκληρη η πρωτεΐνη (εκτός από μια πιθανή διαμεμβρανική περιοχή) αποτελείται από επαναλήψεις αγκυρίνης, ήταν αδύνατο αυτές να μην συμπεριληφθούν στο κλωνοποιημένο τμήμα, το οποίο παρολαυτά δεν παρουσιάζει σημαντικές ομολογίες με άλλες πρωτεΐνες. Τα δύο πλασμίδια που προέκυψαν, pRSET-C-566 και pGex-3X-566, κωδικοποιούν, όπως και στην παραπάνω περίπτωση, για το τμήμα του WD566 γονιδίου καρβοξυτελικά μιας «ετικέτας» ιστιδινών ή μιας «ετικέτας» GST, αντίστοιχα (αναμενόμενα μοριακά βάρη, 20.2 και 43.2 kD, αντίστοιχα)

Το πεπτίδιο His-566 απομονώθηκε σε ικανοποιητικό βαθμό καθαρότητας, ποσοτικοποιήθηκε και χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή ανοσοποιημένου ορρού όπως περιγράφεται παραπάνω (Εικόνα 3.11). Ο ορός αναγνωρίζει ειδικά το τμήμα της πρωτεΐνης WD0566, όπως φαίνεται στο ανοσοαποτύπωμα σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που περιέχουν το πεπτίδιο GST-566 (Εικόνα 3.12).



Εικόνα 3.10. pRSET-C-566. Α. Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου WD0566. Οι αριθμοί υποδηλώνουν νουκλεοτίδια από το πρώτο νουκλεοτίδιο του κωδικονίου έναρξης. Β. Χάρτης του πλασμιδίου pRSET-C-566. C. Το πεπτίδιο His-566. Υπογραμμισμένα είναι τα αμινοξέα που κωδικοποιούνται από τον φορέα.



Εικόνα 3.11. Βήματα απομόνωσης του πεπτιδίου His-566. Ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων 12% πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) και χρώση με Coomassie Brilliant Blue. Τα μαύρα βέλη δείχνουν το πεπτιδίο His-566. Το άσπρο βέλος δείχνει την BSA. Τα μοριακά βάρη του μάρτυρα σημειώνονται σε kD. Α. Βήματα απομόνωσης του πεπτιδίου His-566 μέσω στήλης νικελίου. 1:Εκχύλισμα βακτηρίων (lysate), 2:Clarified lysate, 3:Μη δεσμευμένο κλάσμα (flowthrough), 4-6: Πλύσεις, 7-9: Ήπιες εκλούσεις, 10-12: Ισχυρές εκλούσεις, 13-24: Καθαρισμός των κλασμάτων 11 και 12 μέσω στήλης νικελίου, 13: Αρχικό δείγμα, 14: Μη δεσμευμένο κλάσμα, 15-16: Πλύσεις, 17-20: Ήπιες εκλούσεις, 21-24: Ισχυρές εκλούσεις. Β. Ποσοτικοποίηση του πεπτιδίου. Μ: Μοριακός μάρτυρας (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas), 1-3: 1, 2 και 5 μ g His-566, αντίστοιχα (ποσότητα καθορισμένη φασματοφωτομετρικά), 4-8: 1, 1.5, 2, 3 και 5 μ g BSA, αντίστοιχα.



Εικόνα 3.12. Ανοσοαποτύπωμα του πεπτιδίου GST-566. Τα μαύρα βέλη δείχνουν το πεπτίδιο GST-566. 5-8: Μειούμενες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων βακτηρίων BL21(DE3)/pGex-3x-566 (1, 0.1, 0.01 και 0.001 μl επηγμένης βακτηριακής καλλιέργειας 2ml), 1-4: Μειούμενες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων βακτηρίων BL21(DE3)/pGex-3x-550, 9-12: Μειούμενες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων βακτηρίων BL21(DE3)/pGex-3x-637, 13-14: Μειούμενες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων βακτηρίων BL21(DE3)/pGex-3x-1213 (1 και 0.01 μl επηγμένης βακτηριακής καλλιέργειας 2ml). Αραίωση rabbit-anti-566 ορρού: 1/1000. Μοριακός μάρτυρας: Prestained Protein Marker, Broad Range (NEB), 12% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

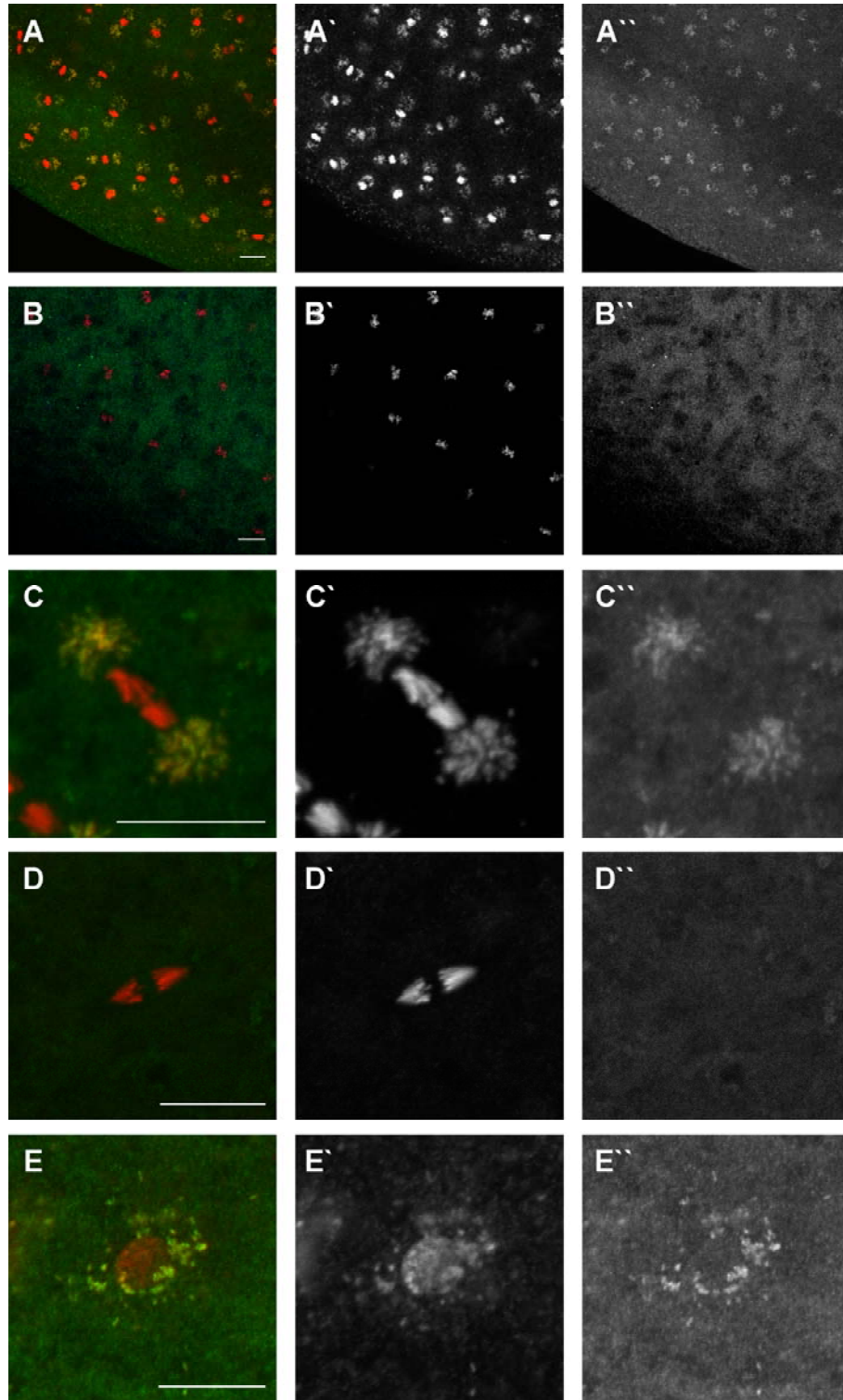
Όπως και παραπάνω δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση της πρωτεΐνης WD566 σε ανοσοαποτυπώματα πάνω σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα μολυσμένων γονάδων ή ενηλίκων ατόμων *D. melanogaster*.

Παρά την αδυναμία να ανιχνευθεί η πρωτεΐνη σε western, ο rabbit-anti-566 ορρός ανιχνεύει την πρωτεΐνη σε πειράματα ανοσοϊστοχημείας. Καθώς ο εντοπισμός του στελέχους wMel σε πρώιμα έμβρυα είναι καλά χαρακτηρισμένος (Kose and Karr 1995; Veneti *et al.*, 2004) επέλεξα το στάδιο αυτό για τη δοκιμή του ορρού. Σε προβλαστοδερμικά κύτταρα παρατηρούμε ότι η πρωτεΐνη WD0566 εκφράζεται και βρίσκεται σε απόλυτο συνεντοπισμό με τα βακτηριακά κύτταρα (Εικόνα 3.13), καθ' όλη τη διάρκεια των πυρηνικών διαιρέσεων (Εικόνα. 3.13A, C και E, μετάφαση, ανάφαση και μεσόφαση/πρώιμη πρόφαση αντίστοιχα). Έκφραση της WD0566 παρατηρείται από τα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης (Εικόνα 3.14), τόσο στα βακτήρια που βρίσκονται

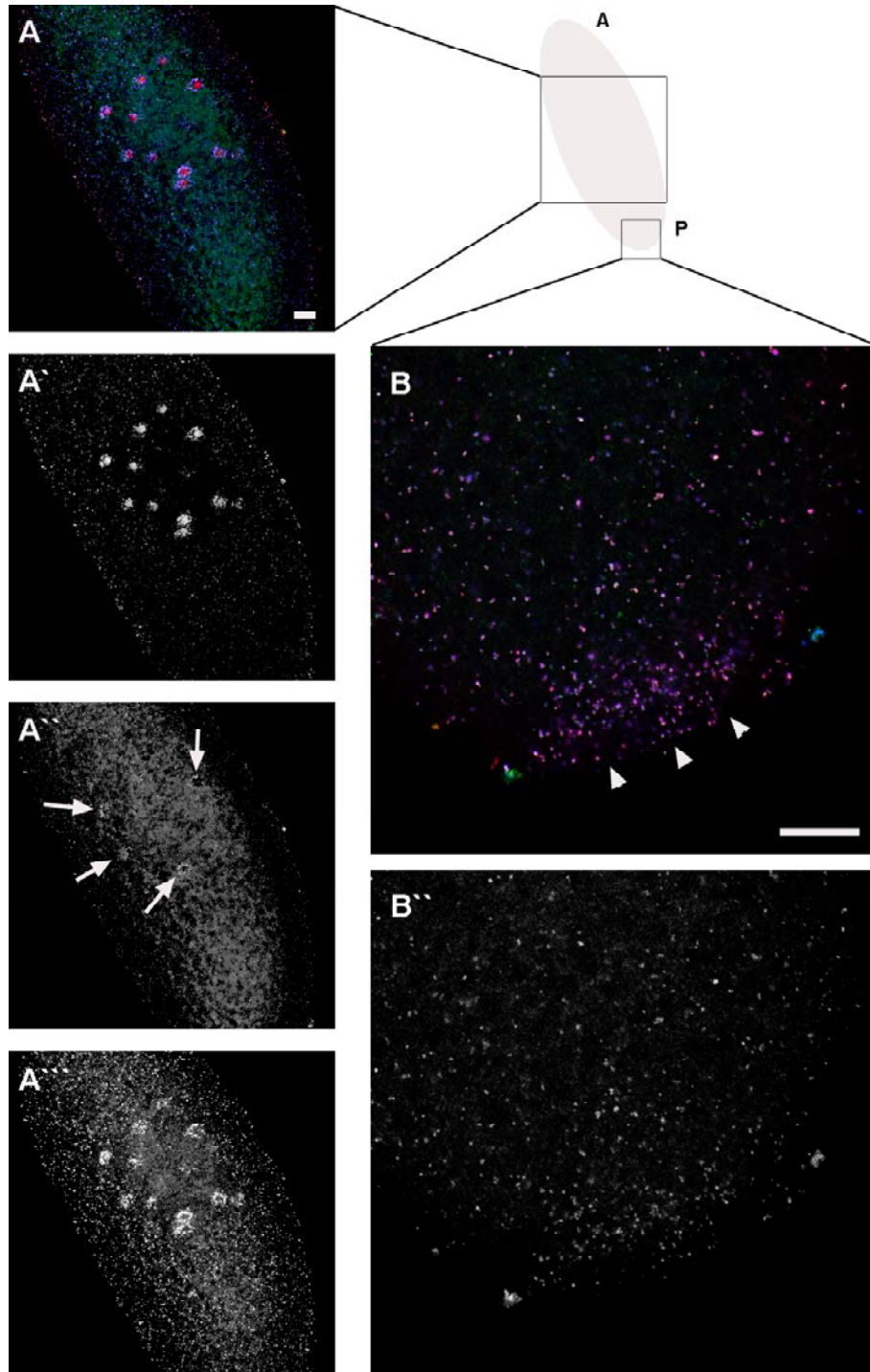
διάσπαρτα στο κυτταρόπλασμα, όσο και σε αυτά που εντοπίζονται γύρω από τους πυρήνες. Η πρωτεΐνη εξακολουθεί να εκφράζεται και να συνεντοπίζεται με τα βακτήρια κατά το στάδιο του συγκυτιακού βλαστοδέρματος, όπου τα βακτήρια, πέρα από την περί-πυρηνική κατανομή τους, βρίσκονται σε κοντινότερη συνάφεια με την αποσυμπυκνούμενη χρωματίνη, κατά την τελόφαση (Εικόνα 3.15). Στο στάδιο του κυτταρικού βλαστοδέρματος (Εικόνα 3.16) παρατηρούμε επίσης έκφραση της WD0566, η οποία συνεντοπίζεται με τα βακτηριακά κύτταρα στην χαρακτηριστική κατανομή τους στα πολικά κύτταρα (Veneti *et al.*, 2004).

Θέλοντας να μελετήσω την έκφραση και τον εντοπισμό της WD0566, και το συσχετισμό αυτών με την επαγωγή της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας, πραγματοποίησα ανοσοϊστοχημικές χρώσεις σε γονάδες ενηλίκων. Στις ωθήκες παρατηρώ γενικευμένη, ανεξάρτητη από την παρουσία *Wolbachia*, χρώση των ωκυττάρων, ασθενή σε ωθυλάκια 6^{ου} που ισχυροποιείται σε 7^{ου} σταδίου και η οποία εντοπίζεται περιμετρικά του ωκυττάρου από το στάδιο 8 και μέχρι το τέλος της ωγένεσης (Εικόνα 3.17). Στις μολυσμένες ωθήκες ανιχνεύω την πρωτεΐνη και πάλι σε απόλυτο συνεντοπισμό με τα βακτηριακά κύτταρα. Οι Εικόνες 3.18 και 3.19 δείχνουν τον εντοπισμό της πρωτεΐνης χαρακτηριστικά σε ωθυλάκια 6^{ου} και 7^{ου}-8^{ου} σταδίου. Στα τελευταία παρατηρώ έντονη χρώση στον πυρήνα του ωκυττάρου (germinal vesicle), τόσο σε μολυσμένα, όσο και σε μη μολυσμένα δείγματα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σε ωθυλάκια 8^{ου}-9^{ου} σταδίου παρατηρώ δύο κατηγορίες βακτηριακών κυττάρων. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.20, ενώ η χρώση για την πρωτεΐνη wsp ταυτίζεται απόλυτα με την χρώση του DNA, η πρωτεΐνη WD0566 μοιάζει να απουσιάζει ή να είναι σημαντικά ελαττωμένη σε κάποια βακτήρια.

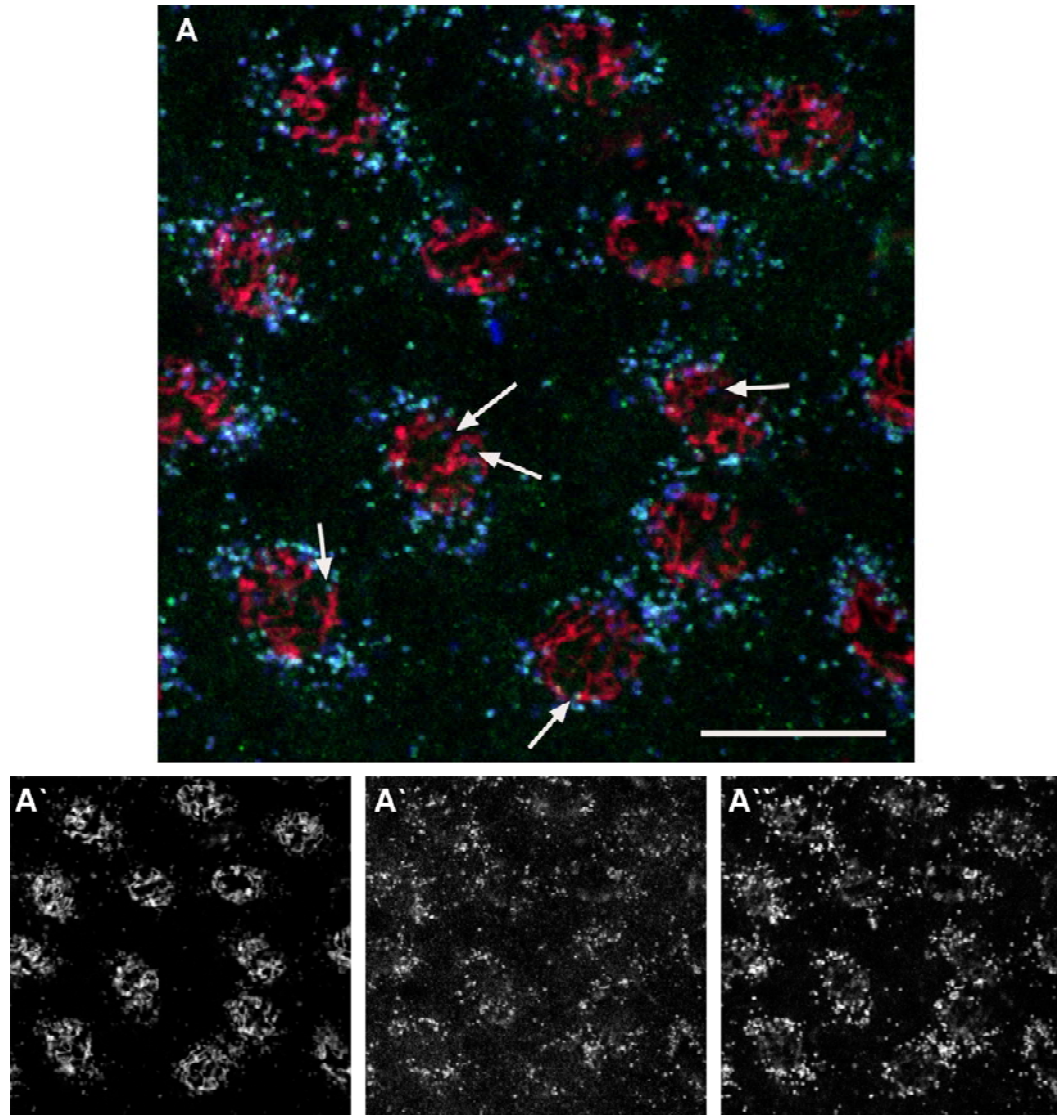
Όλες η απόπειρες μου για χρώσεις σε όρχεις με τον rabbit-anti-566 ορρό και παρά τις επισταμένες προσπάθειες να βελτιωθούν οι συνθήκες της προπροσρόφησης, παρήγαγαν χρώσεις με βαθμό θορύβου τέτοιο, που δεν καθιστά δυνατή κανενός είδους παρατήρηση.



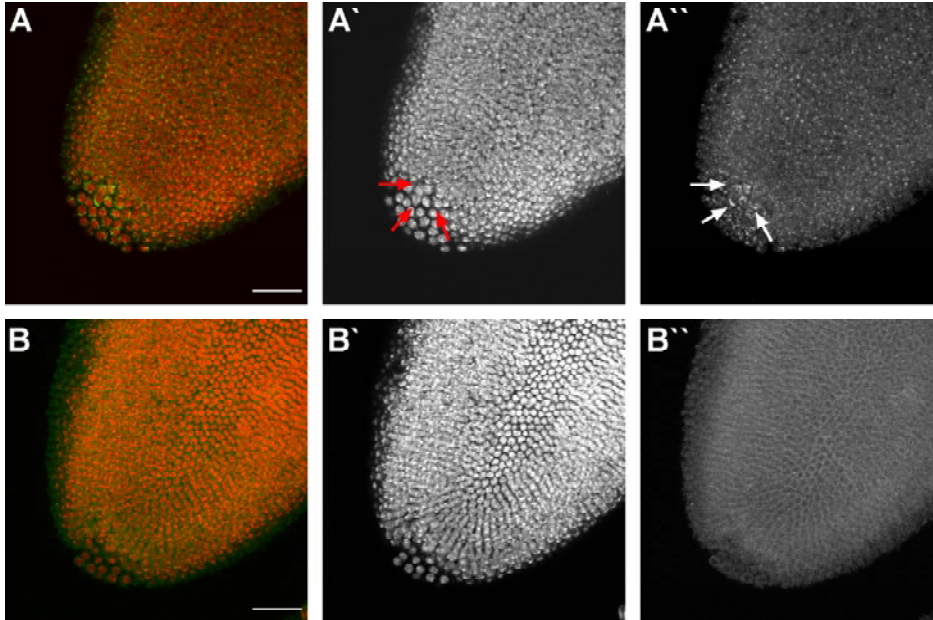
Εικόνα 3.13. Η πρωτεΐνη WD0566 εκφράζεται σε προβλαστοδερμικά έμβρυα και συνεντοπίζεται με τα κύτταρα της *Wolbachia*. Ανοσοϊστοχημική χρώση προβλαστοδερμικών εμβρύων yw^{67C23} και yw^{67C23T} . Όλα τα έμβρυα έχουν υποστεί χρώση με propidium iodide (PI), το οποίο μαρκάρει το DNA (κόκκινο) και ανοσοϊστοχημική χρώση με τον ορρό rabbit-anti-566 (πράσινο), A. Πλευρικό τμήμα yw^{67C23} εμβρύου, διακρίνονται μεταφασικοί πυρήνες, B. Πλευρικό τμήμα yw^{67C23T} εμβρύου, διακρίνονται μεταφασικοί πυρήνες, C. Ανάφαση yw^{67C23} εμβρύου, D. Ανάφαση yw^{67C23T} εμβρύου, E. Μεσοφασικός πυρήνας yw^{67C23} εμβρύου, A'-E'. Κόκκινο κανάλι (DNA), A''-E''. Πράσινο κανάλι (WD0566). Οι ράβδοι κλίμακας είναι 20 μm



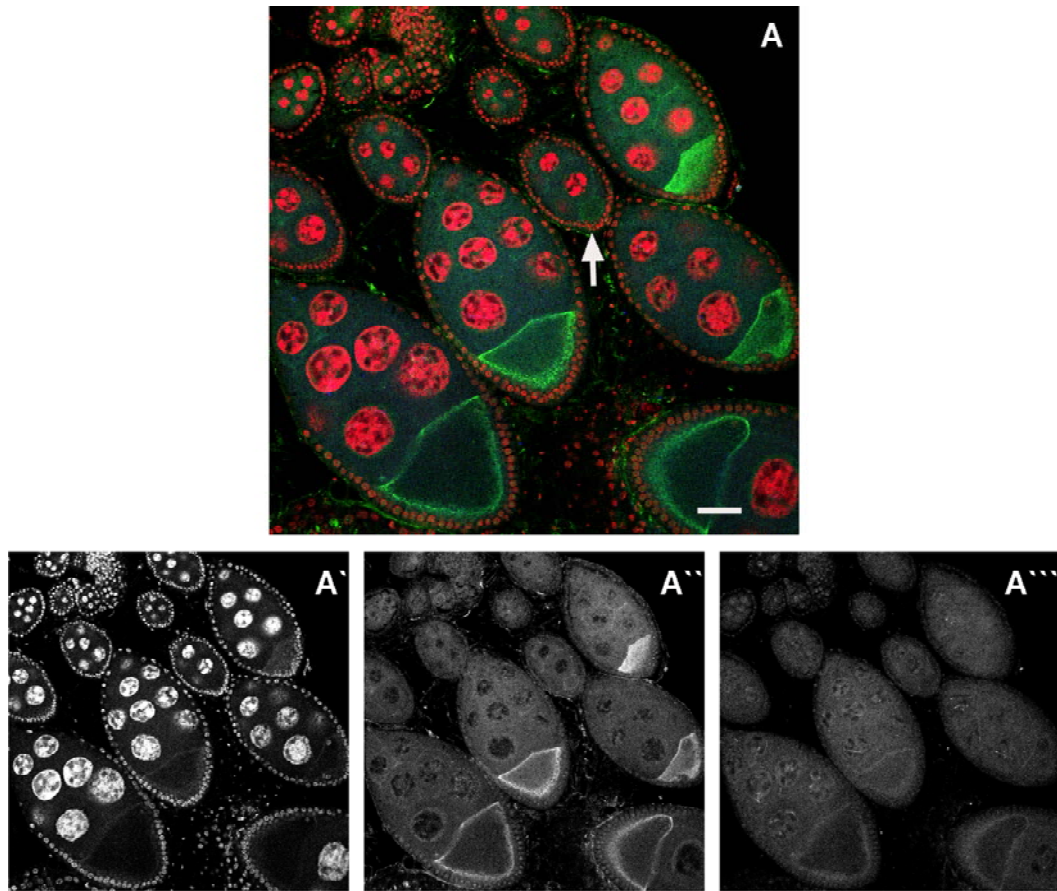
Εικόνα 3.14. Η πρωτεΐνη WD0566 εκφράζεται σε βακτήρια που εντοπίζονται περιπτυρητικά σε έμβρυα 2^{ου} σταδίου. Ανοσοϊστοχημική χρώση προβλαστοδερμικών εμβρύων γω^{67C23}. Όλα τα έμβρυα έχουν υποστεί χρώση με propidium iodide (PI), το οποίο μαρκάρει το DNA (κόκκινο) και ανοσοϊστοχημική χρώση με τους ορούς rabbit-anti-566 (πράσινο) και rat-anti-wsp (μπλε) Α. Μεσαίο τμήμα γω^{67C23} εμβρύου, διακρίνονται 10 από τους συνολικά 16 πυρήνες. Τα βέλη δείχνουν ασθενή χρώση, Β. Οπίσθιος πόλος του ίδιου εμβρύου. Οι κεφαλές βελών δείχνουν οπίσθιο εντοπισμό, Α'. Κόκκινο κανάλι (DNA), Α''-Β''. Πράσινο κανάλι (WD0566), Α'''. Μπλε κανάλι (wsp) Οι ράβδοι κλίμακας είναι 20 μm



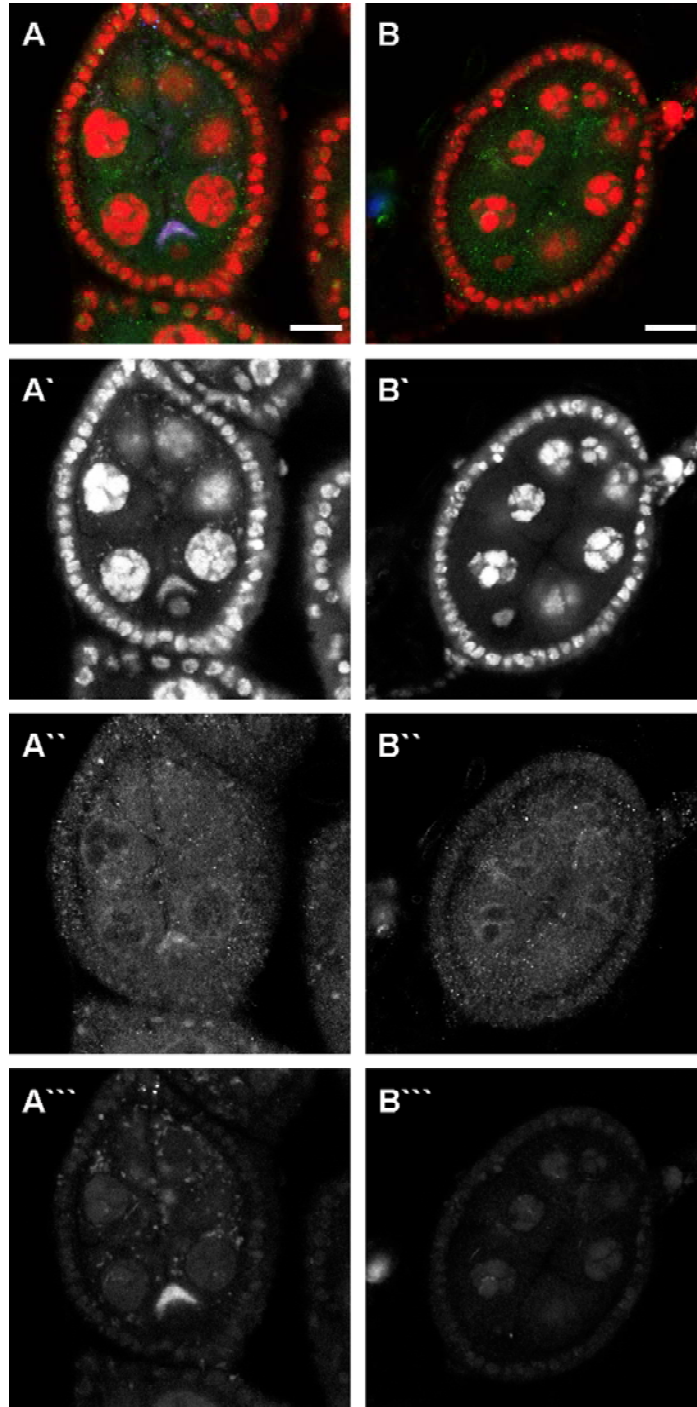
Εικόνα 3.15. Τελοφασικοί πυρήνες συγκυτιακού βλαστοδέρματος εμβρύων γw^{67C23} . Ανοσοϊστοχημική χρώση βλαστοδερμικών εμβρύων γw^{67C23} . Όλα τα έμβρυα έχουν υποστεί χρώση με progridium iodide (PI), το οποίο μαρκάρει το DNA (κόκκινο) και ανοσοϊστοχημική χρώση με τους ορρούς rabbit-anti-566 (πράσινο) και rat-anti-wsp (μπλε) A. Πυρήνες κατά την τελόφαση, Τα βέλη δείχνουν σημεία όπου παρατηρείται στενή συνάφεια των βακτηρίων με την χρωματίνη, A'. Κόκκινο κανάλι (DNA), A''. Πράσινο κανάλι (WD0566), A'''. Μπλε κανάλι (wsp) Οι ράβδοι κλίμακας είναι 20 μm



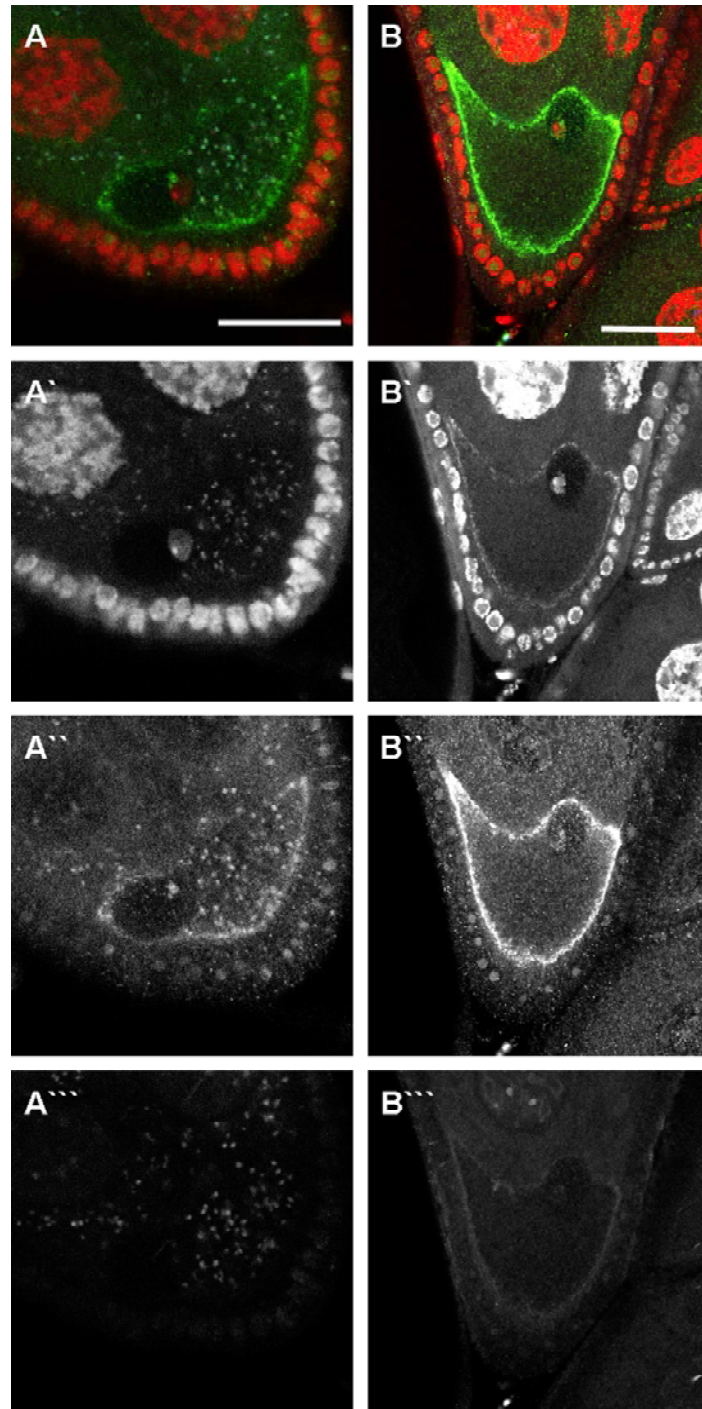
Εικόνα 3.16. Η πρωτεΐνη WD0566 εκφράζεται σε βλαστοδερμικά έμβρυα και συνεντοπίζεται με τα κύτταρα της *Wolbachia* στα πολικά κύτταρα. Ανοσοϊστοχημική χρώση βλαστοδερμικών εμβρύων yw^{67C23} και yw^{67C23} -T. Όλα τα έμβρυα έχουν υποστεί χρώση με propidium iodide (PI), το οποίο μαρκάρει το DNA (κόκκινο) και ανοσοϊστοχημική χρώση με τον ορό rabbit-anti-566 (πράσινο), A. Οπίσθιος πόλος yw^{67C23} εμβρύου, διακρίνονται τα πολικά κύτταρα, B. Οπίσθιος πόλος yw^{67C23} -T εμβρύου, διακρίνονται τα πολικά κύτταρα, A'-B'. Κόκκινο κανάλι (DNA), A''-B''. Πράσινο κανάλι (WD0566). Τα άσπρα βέλη δείχνουν την πρωτεΐνη WD0566 στα πολικά κύτταρα. Τα κόκκινα βέλη δείχνουν τη δυσδιάκριτη αντίστοιχη χρώση στο κόκκινο κανάλι. Οι ράβδοι κλίμακας είναι 40 μm



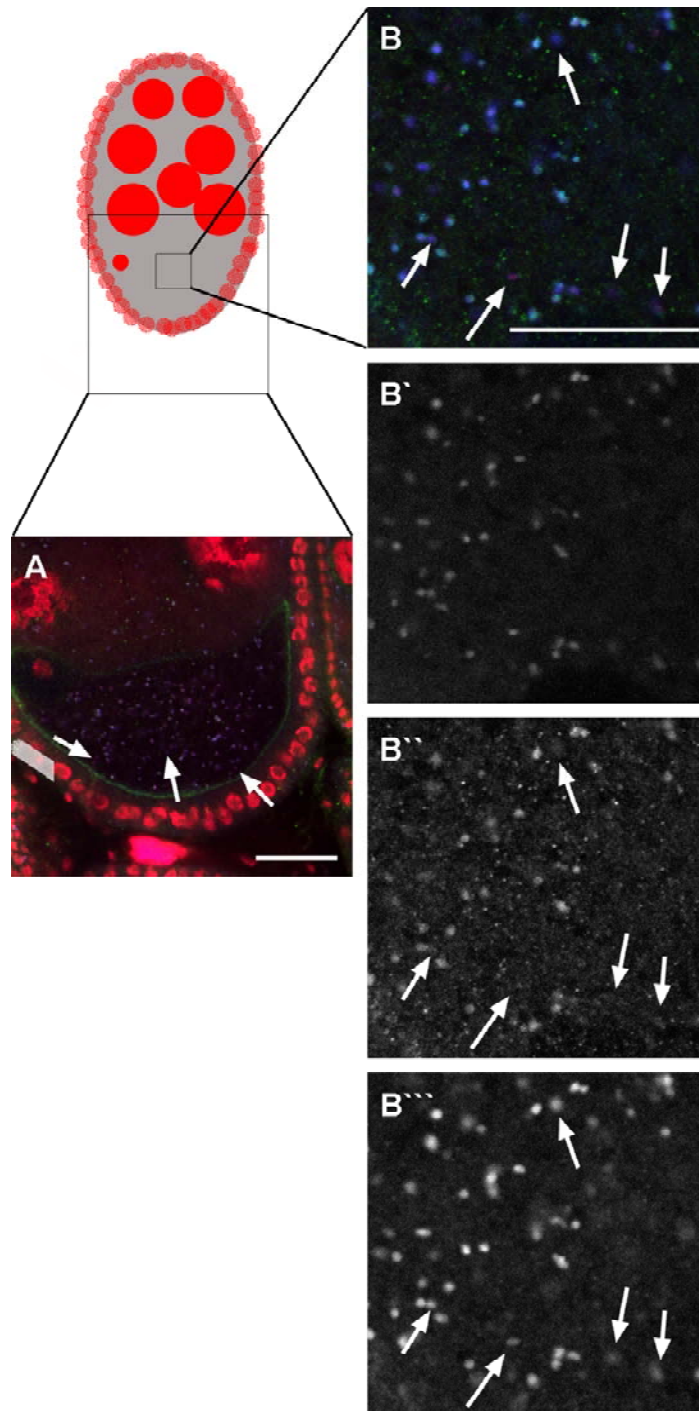
Εικόνα 3.17. Μη μολυσμένα ωοθυλάκια σε διάφορα στάδια της ωογένεσης. Ανοσοϊστοχημική χρώση ωοθηκών ενηλίκων γω^{67C23}T. Το δείγμα έχει υποστεί χρώση με propidium iodide (PI), το οποίο μαρκάρει το DNA (κόκκινο) και ανοσοϊστοχημική χρώση με τους ορρούς rabbit-anti-566 (πράσινο) και rat-anti-wsp (μπλε) A. Διακρίνονται τα περισσότερα από τα στάδια της ωογένεσης. Στα στάδια 6-9 παρατηρείται χρώση των ωοκυττάρων. Το βέλος δείχνει ωοθυλάκιο 6^{ου} σταδίου όπου αχνά διακρίνεται χρώση, A'. Κόκκινο κανάλι (DNA), A''. Πράσινο κανάλι (WD0566), A'''. μπλε κανάλι (wsp) Οι ράβδοι κλίμακας είναι 20 μm



Εικόνα 3.18. Η πρωτεΐνη WD0566 εκφράζεται σε ωθυλάκια 5^{ου} σταδίου. Ανοσοϊστοχημική χρώση ωθηκών ενηλίκων yw^{67C23} και $yw^{67C23}T$. Όλα τα δείγματα έχουν υποστεί χρώση με propidium iodide (PI), το οποίο μαρκάρει το DNA (κόκκινο) και ανοσοϊστοχημική χρώση με τους ορρούς rabbit-anti-566 (πράσινο) και rat-anti-wsp (μπλε) Α. Ωθυλάκιο 5^{ου} σταδίου yw^{67C23} , Β. Ωθυλάκιο 5^{ου} σταδίου $yw^{67C23}T$, Α'. Κόκκινο κανάλι (DNA), Α''. Πράσινο κανάλι (WD0566), Α'''. μπλε κανάλι (wsp) Οι ράβδοι κλίμακας είναι 20 μ m



Εικόνα 3.19. Η πρωτεΐνη WD0566 εκφράζεται σε ωοθυλάκια 7^{ου} σταδίου. Ανοσοϊστοχημική χρώση ωοθηκών ενηλίκων γω^{67C23} και γω^{67C23}-T. Όλα τα δείγματα έχουν υποστεί χρώση με propidium iodide (PI), το οποίο μαρκάρει το DNA (κόκκινο) και ανοσοϊστοχημική χρώση με τους ορρούς rabbit-anti-566 (πράσινο) και rat-anti-wsp (μπλε) Α. Ωοθυλάκιο 7^{ου} σταδίου γω^{67C23}, Β. Ωοθυλάκιο 7^{ου} σταδίου γω^{67C23}-T, Α'. Κόκκινο κανάλι (DNA), Α''. Πράσινο κανάλι (WD0566), Α'''. μπλε κανάλι (wsp) Οι ράβδοι κλίμακας είναι 20 μm



Εικόνα 3.20. Σε ωοθυλάκια $8^{ou}-9^{ou}$ σταδίου παρατηρείται διαφοροποίηση της έκφρασης της πρωτεΐνης WD0566. Ανοσοϊστοχημική χρώση ωοθηκών ενηλίκων yw^{67C23} . Όλα τα δείγματα έχουν υποστεί χρώση με propidium iodide (PI), το οποίο μαρκάρει το DNA (κόκκινο) και ανοσοϊστοχημική χρώση με τους ορούς rabbit-anti-566 (πράσινο) και rat-anti-wsp (μπλε). Α. Ωοθυλάκιο $8^{ou}-9^{ou}$ σταδίου yw^{67C23} , Β. Ωοθυλάκιο $8^{ou}-9^{ou}$ σταδίου yw^{67C23} σε μεγαλύτερη μεγέθυνση (τα δύο δείγματα αντιστοιχούν σε διαφορετικά ωοθυλάκια), Τα βέλη δείχνουν βακτήρια που παρουσιάζουν απουσία ή ιδιαίτερα ασθενές πράσινο σήμα, Α'. Κόκκινο κανάλι (DNA), Α''. Πράσινο κανάλι (WD0566), Α'''. μπλε κανάλι (wsp). Οι ράβδοι κλίμακας είναι 20 μm .

3.3.1.4 WD0637

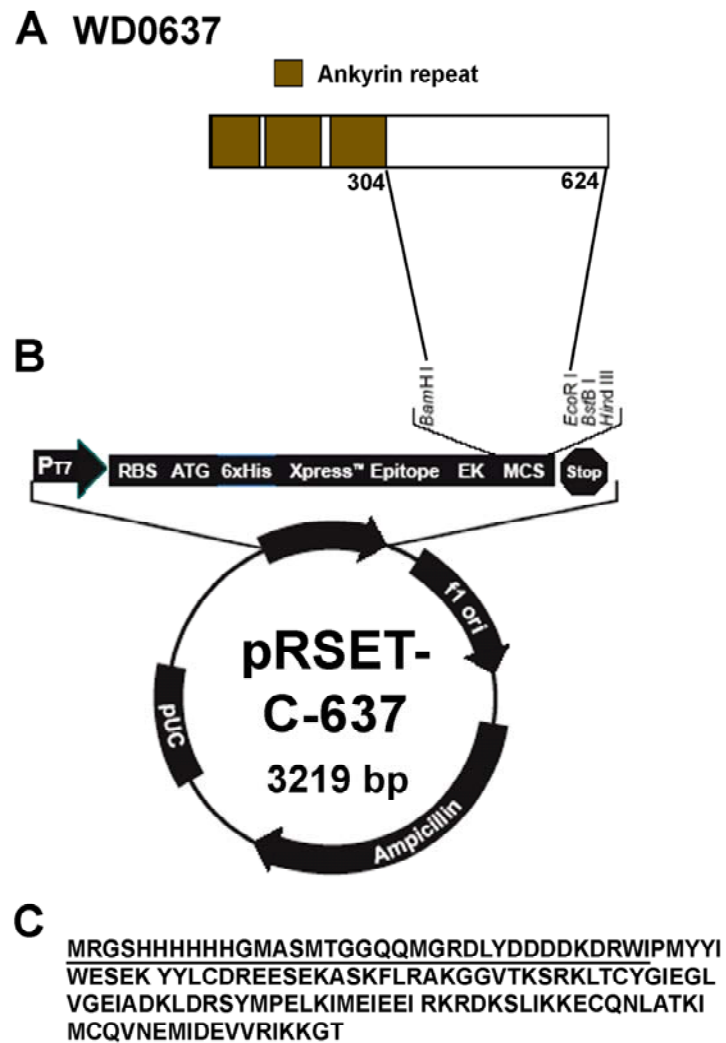
Οι φορείς έκφρασης pRSET-C-637 (Εικόνα 3.21) και pGex-3X-637 δημιουργήθηκαν με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε στις δύο παραπάνω παραγράφους. Τα πεπτίδια His-637 και GST-637 που προκύπτουν, έχουν αναμενόμενα μοριακά βάρη 16.7 και 39.7 kD αντίστοιχα. Η απομόνωση του πεπτιδίου His-637 που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή ανοσοποιημένου ορρού κουνελιού και το ανοσοαποτύπωμα του GST-637 παρουσιάζονται στις εικόνες 3.22 και 3.23. Ο ορρός όπως και στις παραπάνω περιπτώσεις αναγνωρίζει ειδικά τόσο το πεπτίδιο GST-637, όσο και μια σειρά άλλων βακτηριακών πρωτεϊνών. Αν και δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση της WD0637 σε δείγματα γω^{67C23} σε ανοσοαποτυπώματα, η πρωτεΐνη ανιχνεύθηκε ασθενώς σε μία μόνο περίπτωση, σε ανοσοϊστοχημική χρώση. Η πρωτεΐνη ανιχνεύθηκε σε προβλαστοδερμικά έμβρυα κατά την ανάφαση των πυρηνικών διαιρέσεων στην χαρακτηριστική κατανομή της *Wolbachia* στους αστρικούς μικροσωληνίσκους (αποτέλεσμα δεν παρουσιάζεται).

3.3.1.5 WD1213

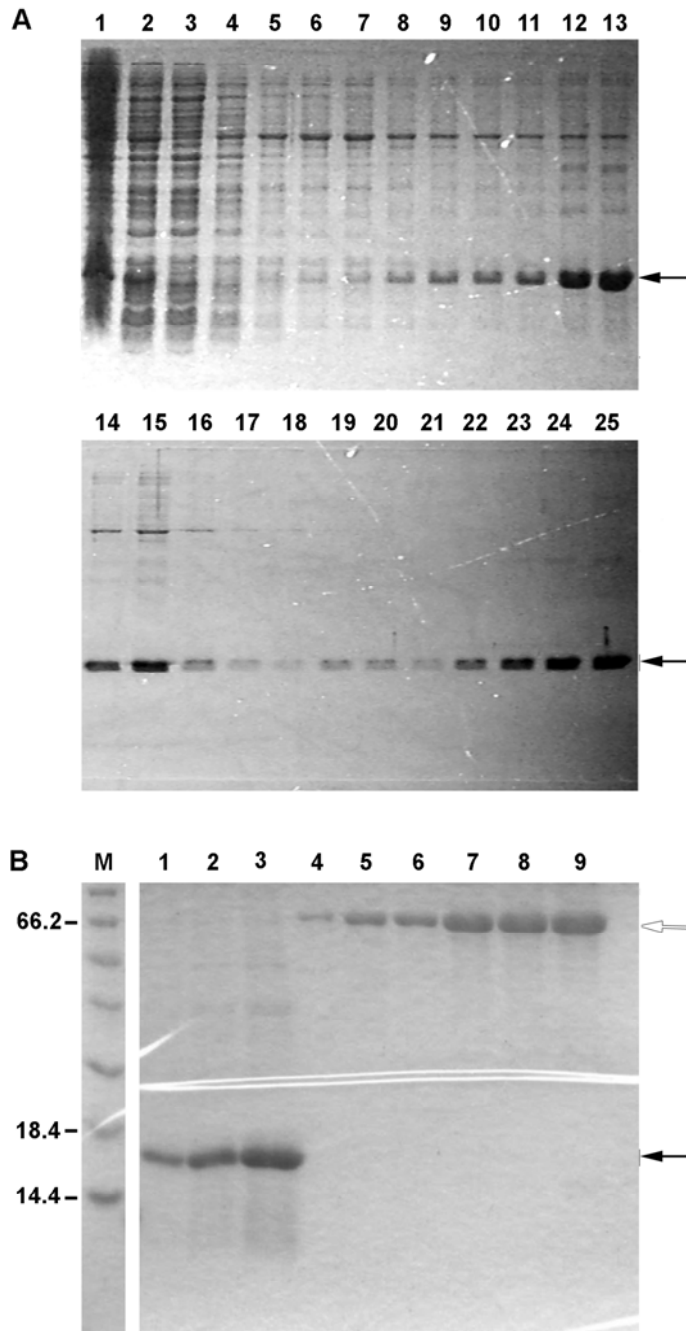
Με τον ίδιο τρόπο δημιουργήθηκαν και τα πλασμίδια pRSET-C-1213 (Εικόνα 3.24) και pGex-3X-1213. Η απομόνωση του πεπτιδίου His-1213 (40.4 kD) που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή ανοσοποιημένου ορρού κουνελιού και το ανοσοαποτύπωμα του GST-1213 (63.4 kD) παρουσιάζονται στις εικόνες 3.25 και 3.26. Στο ανοσοαποτύπωμα βλέπουμε ότι ο rabbit-anti-1213 αναγνωρίζει ένα πλήθος πρωτεϊνικών ζωνών με μοριακά βάρη παρόμοια με το πεπτίδιο GST-1213 με αποτέλεσμα να μην μπορούμε να βγάλουμε ξεκάθαρο αποτέλεσμα ως προς την λειτουργικότητα του. Παρολαυτά, ο ορρός είναι απολύτως μη αντιδραστικός απέναντι στα πεπτίδια ελέγχου (GST-550, GST-566 και GST-637). Προκειμένου να βελτιώσω την παραπάνω εικόνα, πραγματοποίησα προπροσρόφηση (preadsorption) του ορρού σε υλικό από επηγμένα κύτταρα BL21(DE3) / pRSET-C-566 καθώς και απομόνωση συνάφειας (affinity purification). Η προπροσρόφηση έγινε στο συγκεκριμένο υλικό ώστε να αφαιρέσει τα κλάσματα εκείνα του ορρού που αντιδρούν με

ενδογενείς πρωτεΐνες της *E. coli*, αλλά και τα κλάσματα εκείνα που ενδεχομένως να αντιδρούν με την πεπτιδική «ετικέτα» του pRSET-C. Στην εικόνα 3.27 φαίνεται το ανοσοαποτύπωμα των His-1213, His-550, His-566 και His-637 κάνοντας χρήση του αρχικού ορρού, του μετά την προπρροσρόφηση και του απομονωμένου μέσω συνάφειας αντισώματος. Από την εικόνα αυτή μπορούμε να συμπεράνουμε ότι α) ο ορρός rabbit-anti-1213 αναγνωρίζει το πεπτίδιο His-1213, β) ο ορρός παρουσιάζει αντιδραστικότητα για την «ετικέτα» ιστοιδινών καθώς αναγνωρίζει όλα τα His-πεπτίδια και γ) η προσπρροσρόφηση και, σε μεγαλύτερο βαθμό, η απομόνωση συνάφειας μπορούν να βελτιώσουν αισθητά την καθαρότητα του σήματος. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν η προπρροσρόφηση και ο καθαρισμός του αντισώματος σε όλους τους ορρούς (αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται).

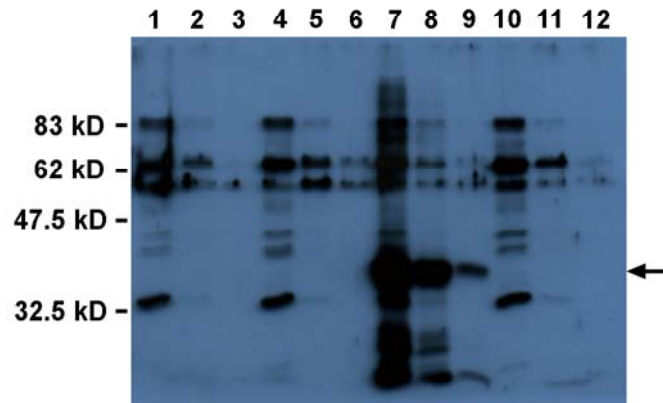
Δυστυχώς και για αυτόν τον ορρό η ανίχνευση της ενδογενούς WD1213 από δείγματα μολυσμένων μυγών δεν ήταν δυνατή σε ανοσοαποτυπώματα, ούτε σε ανοσοϊστοχημικές χρώσεις.



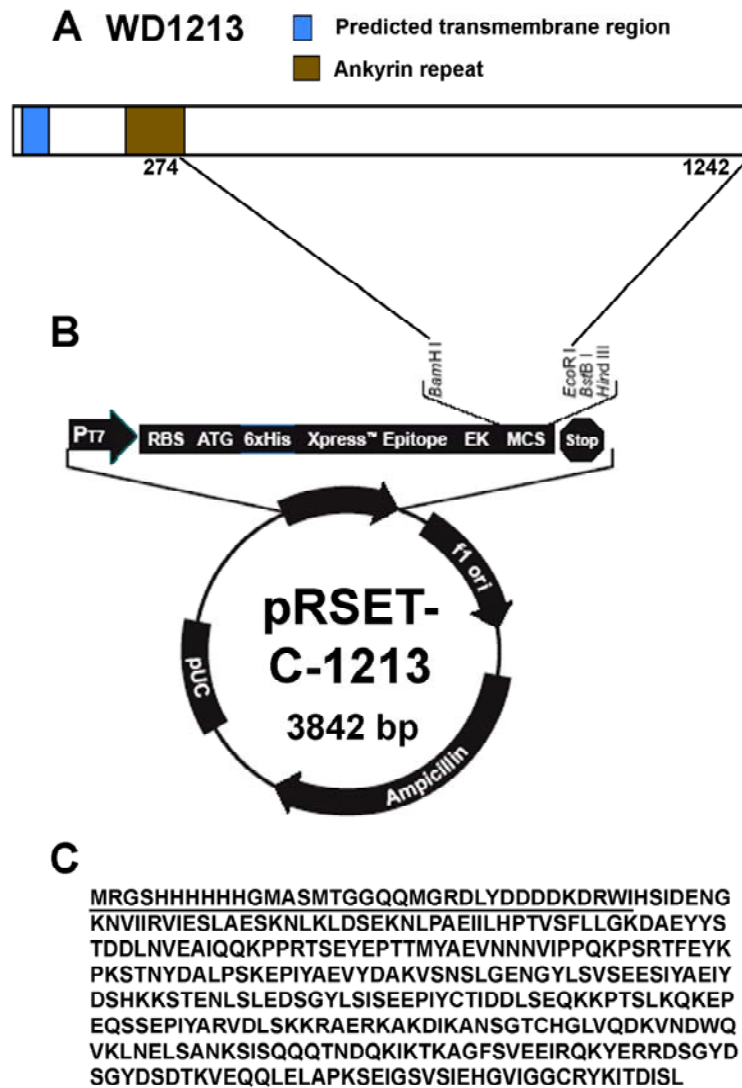
Εικόνα 3.21. pRSET-C-637. Α. Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου WD0637. Οι αριθμοί υποδηλώνουν νουκλεοτίδια από το πρώτο νουκλεοτίδιο του κωδικονίου έναρξης. Β. Χάρτης του πλασμιδίου pRSET-C-637. Γ. Το πεπτίδιο His-637. Υπογραμμισμένα είναι τα αμινοξέα που κωδικοποιούνται από τον φορέα.



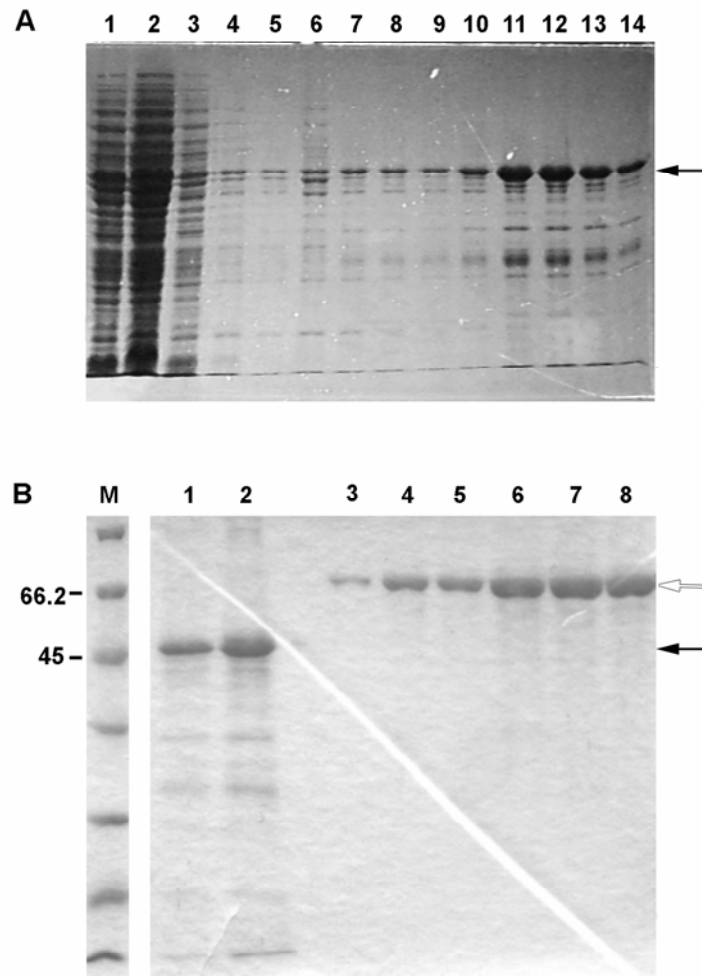
Εικόνα 3.22. Βήματα απομόνωσης του πεπτιδίου His-637. Ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων 15% πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) και χρώση με Coomassie Brilliant Blue. Τα μαύρα βέλη δείχνουν το πεπτίδιο His-637. Το άσπρο βέλος δείχνει την BSA. Τα μοριακά βάρη του μάρτυρα σημειώνονται σε kD. Α. Βήματα απομόνωσης του πεπτιδίου His-637 μέσω στήλης νικελίου. 1:Εκχύλισμα βακτηρίων (lysate), 2:Clarified lysate, 3:Μη δεσμευμένο κλάσμα (flowthrough), 4-5: Πλύσεις, 6-9: Ήπιες εκλούσεις, 10-13: Ισχυρές εκλούσεις, 14-25: Καθαρισμός των κλασμάτων 11 και 12 μέσω στήλης νικελίου, 13: Αρχικό δείγμα, 14: Μη δεσμευμένο κλάσμα, 15-16: Πλύσεις, 17-20: Ήπιες εκλούσεις, 21-24: Ισχυρές εκλούσεις. Β. Ποσοτικοποίηση του πεπτιδίου. Μ: Μοριακός μάρτυρας (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas), 1-3: 1, 2 και 5 μg His-637, αντίστοιχα (ποσότητα καθορισμένη φασματοφωτομετρικά), 4-8: 1, 1.5, 2, 3 και 5 μg BSA, αντίστοιχα.



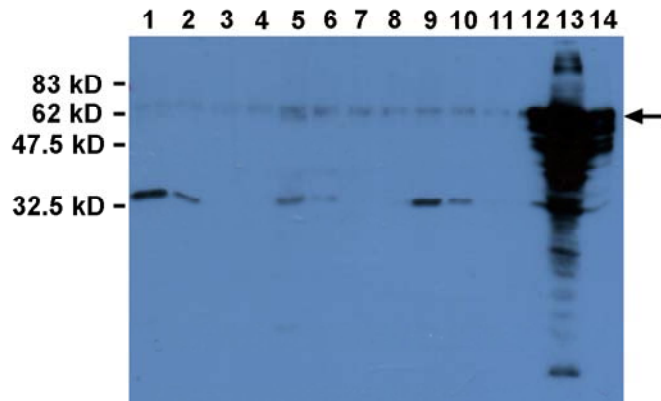
Εικόνα 3.23. Ανοσοαποτύπωμα του πεπτιδίου GST-637. Τα μαύρα βέλη δείχνουν το πεπτιδίο GST-637. 7- 9: Μειούμενες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων βακτηρίων BL21(DE3)/pGex-3x-637 (0.1, 0.01 και 0.001 μl επηγμένης βακτηριακής καλλιέργειας 2ml), 1-3: Μειούμενες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων βακτηρίων BL21(DE3)/pGex-3x-550, 4-6: Μειούμενες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων βακτηρίων BL21(DE3)/pGex-3x-566, 10-12: Μειούμενες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων βακτηρίων BL21(DE3)/pGex-3x-1213. Αραίωση rabbit-anti-637 ορού: 1/1000. Μοριακός μάρτυρας: Prestained Protein Marker, Broad Range (NEB), 12% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.



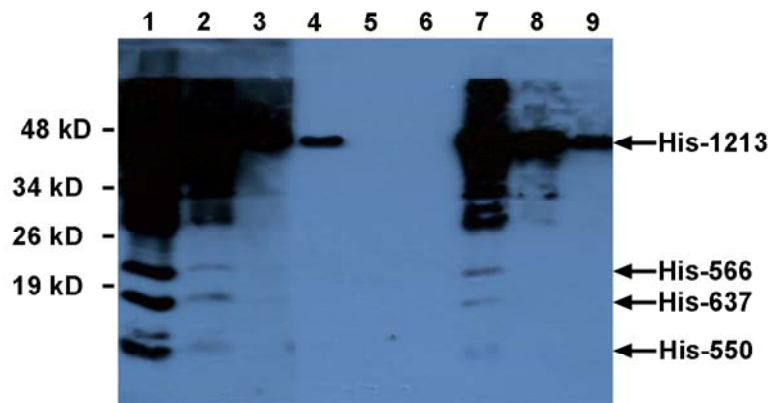
Εικόνα 3.24. pRSET-C-1213. Α. Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου WD1213. Οι αριθμοί υποδηλώνουν νουκλεοτίδια από το πρώτο νουκλεοτίδιο του κωδικονίου έναρξης. Β. Χάρτης του πλασμιδίου pRSET-C-1213. C. Το πεπτιδίο His-1213. Υπογραμμισμένα είναι τα αμινοξέα που κωδικοποιούνται από τον φορέα.



Εικόνα 3.25. Βήματα απομόνωσης του πεπτιδίου His-1213. Ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων 12% πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) και χρώση με Coomassie Brilliant Blue. Τα μαύρα βέλη δείχνουν το πεπτίδιο His-1213. Το άσπρο βέλος δείχνει την BSA. Τα μοριακά βάρη του μάρτυρα σημειώνονται σε kD. Α. Βήματα απομόνωσης του πεπτιδίου His-1213 μέσω στήλης νικελίου. 1:Εκχύλισμα βακτηρίων (lysate), 2:Clarified lysate, 3:Μη δεσμευμένο κλάσμα (flowthrough), 4-5: Πλύσεις, 6-9: Ήπιες εκλούσεις, 10-14: Ισχυρές εκλούσεις Β. Ποσοτικοποίηση του πεπτιδίου. Μ: Μοριακός μάρτυρας (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas), 1-3: 1, 2 και 5 μg His-1213, αντίστοιχα (ποσότητα καθορισμένη φασματοφωτομετρικά), 4-8: 1, 1.5, 2, 3 και 5μg BSA, αντίστοιχα.



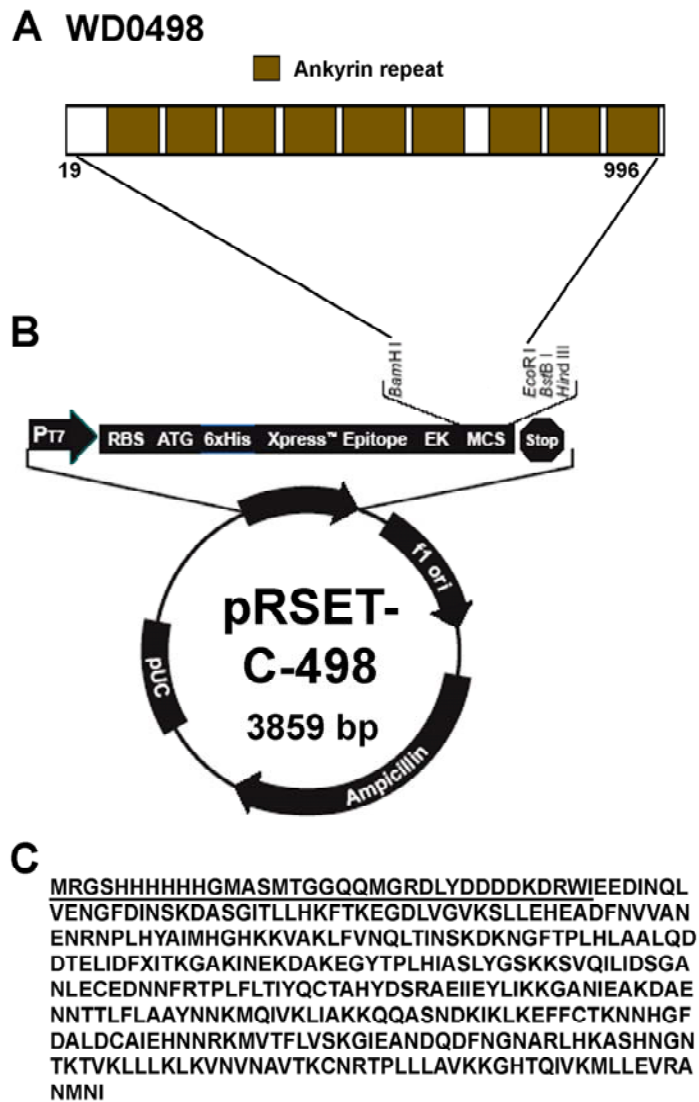
Εικόνα 3.26. Ανοσοαποτύπωμα του πεπτιδίου GST-1213. Τα μαύρα βέλη δείχνουν το πεπτίδιο GST-1213. 13-14: Μειούμενες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων βακτηρίων BL21(DE3)/pGex-3x-1213 (1, και 0.01 μl επηγμένης βακτηριακής καλλιέργειας 2ml), 1-4: Μειούμενες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων βακτηρίων BL21(DE3)/pGex-3x-550, 5-8: Μειούμενες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων βακτηρίων BL21(DE3)/pGex-3x-566, 9-12: Μειούμενες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων βακτηρίων BL21(DE3)/pGex-3x-637 (1, 0.1, 0.01 και 0.001 μl επηγμένης βακτηριακής καλλιέργειας 2ml). Αραίωση rabbit-anti-1213 ορρού: 1/1000. Μοριακός μάρτυρας: Prestained Protein Marker, Broad Range (NEB), 12% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.



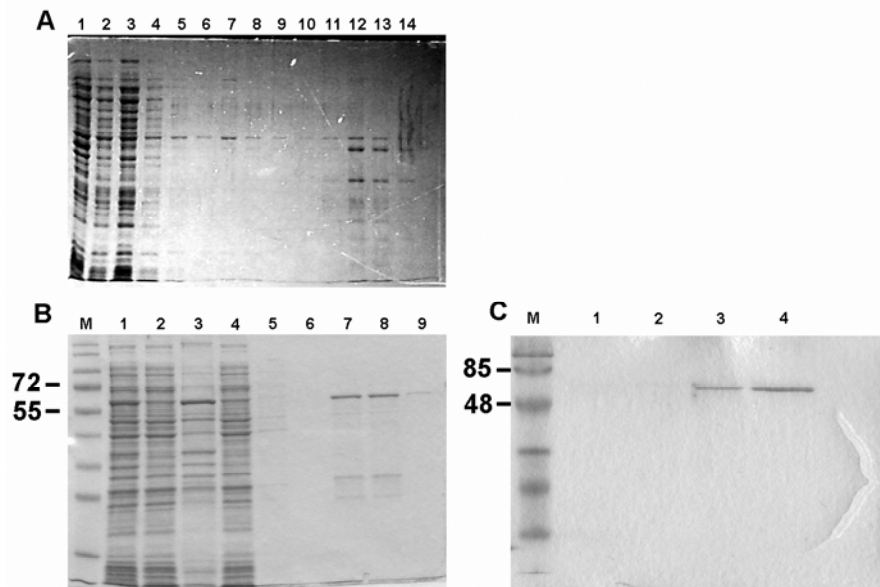
Εικόνα 3.27. Ανοσοαποτύπωμα του πεπτιδίου His-1213. Τα δείγματα αποτελούνται από ισόποσες αναμίξεις των απομονωμένων πεπτιδίων His-550, His-566, His-637 και His-1213. (1, 4, 7): 200ng έκαστο πεπτίδιο, (2, 5, 8): 20ng έκαστο πεπτίδιο, (3, 6, 9): 2ng έκαστο πεπτίδιο. (1-3): Αρχικός ορρός, (4-6): Αντίσωμα απομονωμένο από τον αρχικό ορρό με απομόνωση συνάφειας, (7-9): Ορρός που έχει υποστεί προπρροσρόφηση.

3.3.1.6 WD0498

Το τμήμα της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί για τα αμινοξέα 3-332 κλωνοποιήθηκε με τον ίδιο τρόπο σε pRSET-C (Εικόνα 3.28) και σε pGex-3X. Έκανα πολλές προσπάθειες να απομονώσω το τμήμα της πρωτεΐνης WD0498 είτε ως His-fusion (40.4 kD) είτε ως GST-fusion (60 kD). Στη μεν πρώτη περίπτωση δεν ήταν ικανοποιητική ούτε η ποσότητα, ούτε η καθαρότητα του απομονωμένου πεπτιδίου (Εικόνα 3.29 A). Στην περίπτωση του GST-498 πεπτιδίου, ανεξάρτητα από τις συνθήκες επαγωγής και καλλιέργειας, το μεγαλύτερο ποσοστό του πεπτιδίου ήταν σε έγκλειστα σωμάτια και άρα μη διαλυτό. Οι προσπάθειες μου να απομονώσω το μικρό διαλυτό κλάσμα είχαν μικρή απόδοση, σχετικά υψηλή επιμόλυνση με άλλες πρωτεΐνες (Εικόνα 3.29 B) και η ποσότητα δεν ήταν αρκετή για τα επόμενα βήματα (αφαίρεση του GST και απομόνωση). Η προσπάθεια μου να απομονώσω το μη διαλυτό κλάσμα από πηκτώμα ακρυλαμίδης απέτυχε καθώς δεν κατέστη δυνατό να αναδιαταχτεί το πεπτίδιο (Εικόνα 3.29 C)



Εικόνα 3.28. pRSET-C-498. Α. Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου WD0498. Οι αριθμοί υποδηλώνουν νουκλεοτίδια από το πρώτο νουκλεοτίδιο του κωδικονίου έναρξης. Β. Χάρτης του πλασμιδίου pRSET-C-498. C. Το πεπτίδιο His-498. Υπογραμμισμένα είναι τα αμινοξέα που κωδικοποιούνται από τον φορέα.



Εικόνα 3.29. Βήματα απομόνωσης των πεπτιδίων His-498 και GST-498. Ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων 12% πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) και χρώση με Coomassie Brilliant Blue. Τα μοριακά βάρη του μάρτυρα σημειώνονται σε kD. Α. Βήματα απομόνωσης του πεπτιδίου His-498 μέσω στήλης νικελίου. 1:Εκχύλισμα βακτηρίων (lysate), 2:Clarified lysate, 3:Μη δεσμευμένο κλάσμα (flowthrough), 4-6: Πλύσεις, 7-10: Ήπιες εκλούσεις, 11-14: Ισχυρές εκλούσεις. Β. Βήματα απομόνωσης του πεπτιδίου GST-498 μέσω σφαιριδίων glutathione-sepharose. Μ: Μοριακός μάρτυρας, 1: Εκχύλισμα βακτηρίων, 2: Διαλυτό κλάσμα, 3: Μη διαλυτό κλάσμα, 4: Μη δεσμευμένο κλάσμα (flowthrough), 5-6: Πλύσεις, 7-9: Εκλούσεις. C. Αναδιάταξη μη διαλυτού κλάσματος, 1-2: Διαλυτά κλάσματα, 3-4: Μη διαλυτά κλάσματα

3.3.2 Συζήτηση

Οι ορροί που παρήχθησαν σε αυτό το κομμάτι της μελέτης, είναι προφανώς λειτουργικοί. Τα ανοσοαποτυπώματα των GST-πεπτιδίων επιβεβαιώνουν αυτόν τον ισχυρισμό, αποδεικνύοντας ότι οι ορροί αναγνωρίζουν τα πεπτίδια της *Wolbachia* και όχι αλληλουχίες της «ετικέτας» ή λοιπών επιτόπων που κωδικοποιούνται από τον φορέα έκφρασης. Από τα ανοσοαποτυπώματα επίσης βγαίνουν τρία ακόμη συμπεράσματα. Α) Τα πεπτίδια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοποίηση των κονίκλων, είχαν προσμίξεις πρωτεϊνών *E. coli* με αποτέλεσμα, οι ορροί να αναγνωρίζουν βακτηριακές πρωτεΐνες. Προσοχή θα πρέπει να δίνεται σε αυτό το σημείο και εφ' όσον οι οροί αυτοί χρησιμοποιηθούν σε μελλοντικές μελέτες σε βακτηριακά δείγματα, να γίνεται πάντα προπροσρόφηση. Β) Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.27 οι ορροί περιέχουν κλάσματα αντισωμάτων που αναγνωρίζουν την «ετικέτα» ιστιδινών του φορέα pRSET. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται σε μελλοντικές μελέτες και στον σχεδιασμό πειραμάτων για την παρουσία αυτών των αλληλουχιών του φορέα. Γ) Η απομόνωση του αντισώματος από τους ορρούς με την μεθοδολογία που περιέγραψα αφαιρεί κάθε «θόρυβο» μεν, έχει δύο βασικά μειονεκτήματα δε. Πρώτον καθιστά το αντίσωμα σημαντικά ασθενέστερο στις αντίστοιχες αραιώσεις και άρα έχει μεγάλες απώλειες και δεύτερον καθιστά το αντίσωμα ιδιαίτερα βραχύβιο (καμία ενεργότητα μετά από 2 εβδομάδες στους 4 °C). Θεωρώ ότι βελτίωση της μεθόδου απομόνωσης των αντισωμάτων μπορεί να τα καταστήσουν χρήσιμα εργαλεία.

Όπως περιέγραψα παραπάνω, ήταν αδύνατον να ανιχνεύσω τις ενδογενείς αγκυρίνες της *Wolbachia* με ανοσοαποτυπώματα, σε δείγματα από μολυσμένες μύγες. Μια πρόσφατη μελέτη, παραθέτει αντίστοιχα αποτελέσματα από ορρούς για κάποιες αγκυρίνες της *Wolbachia*, μεταξύ των οποίων η WD550 (Yamada *et al.*, 2010). Οι συγγραφείς πιθανολογούν ότι η ενεργότητα των ορρών τους είναι χαμηλή, ως εξήγηση για την αδυναμία ανίχνευσης των πρωτεϊνών σε δείγματα από μύγες, ενώ αναφέρουν την ανίχνευση των πρωτεϊνών σε δείγματα εμπλουτισμένα σε *Wolbachia* από μολυσμένες κυτταροκαλλιέργειες. Με δεδομένα την ενεργότητα του ορρού rabbit-anti-566 σε

ανοσοϊστοχημικές χρώσεις αλλά όχι σε ανοσοαποτυπώματα, καθώς και την ανίχνευση της ισχυρά εκφραζόμενης (Dobson *et al.*, 1999) πρωτεΐνης wsp με αμφοτέρους τις μεθόδους, που παραθέτω εδώ, υποθέτω ότι βασικός παράγοντας πέρα από την όποια ενεργότητα του ορρού, είναι το χαμηλό ποσοστό βακτηριακών πρωτεϊνών, σε αναλογία με τις πρωτεΐνες της *Drosophila*. Η ηλεκτροφόρηση του μίγματος πρωτεϊνών ενδεχομένως να φέρνει πολύ μεγαλύτερο αριθμό πρωτεϊνών στην περιοχή ανίχνευσης, από ότι ισχύει στην περίπτωση της ανοσοϊστοχημείας, και κατά κάποιον τρόπο να «μασκάρει» τις αναλογικά μικρές ποσότητες των πρωτεϊνών της *Wolbachia*. Η βελτίωση των ορρών μέσω καθαρισμού/εμπλουτισμού, που πρότεινα παραπάνω, μπορεί να βοηθήσει μελλοντικές ανοσοϊστοχημικές μελέτες του εντοπισμού των παραπάνω πρωτεϊνών στους ιστούς του ξενιστή.

Το γονίδιο της αγκυρίνης WD0566 μεταγράφεται, όπως είδαμε στο προηγούμενο κεφάλαιο, τόσο σε όρχεις, όσο και ωοθήκες σε αντίστοιχα επίπεδα. Στο κεφάλαιο αυτό επιβεβαιώνεται η έκφραση της WD566 πρωτεΐνης σε ωοθήκες, αλλά όχι σε όρχεις yw^{67C23} και STCP [wMel] και διαπιστώνεται η έκφρασή της σε έμβρυα των ιδίων στελεχών. Η πρωτεΐνη ανιχνεύεται πάντα σε απόλυτο συνεντοπισμό με τα βακτήρια όπως φαίνεται από τον συνεντοπισμό της με τη χρώση DNA και με την πρωτεΐνη επιφανείας wsp. Ο συνεντοπισμός σε όλες τις παρατηρήσεις, παρότι δεν αποκλείει το ενδεχόμενο η πρωτεΐνη να εκκρίνεται, το καθιστά απίθανο. Η WD0566 διαθέτει, στο αμινοτελικό άκρο της, μια περιοχή η οποία αναγνωρίζεται από προγράμματα πρόβλεψης ως πιθανό διαμεμβρανικό τμήμα (Εικόνα 3.30). Η ανοσοϊστοχημική παρατήρηση του εντοπισμού, ισχυροποιεί την πιθανότητα να πρόκειται για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη. Το πρόγραμμα TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) που χρησιμοποίησα για την πρόβλεψη των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών ανιχνεύει α-ελικοειδή διαμεμβρανικά τμήματα. Διαμεμβρανικές α-έλικες συναντάμε στα gram-αρνητικά βακτήρια σε πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, ενώ η τριτοταγής δομή των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης είναι αντιπαράλληλα β-βαρέλια (Koebnik *et al.*, 2000). Η χαρακτηριστική αυτή δομή των πρωτεϊνών επιφανείας δείχτηκε πρόσφατα και για την *Wolbachia*, για την πρωτεΐνη επιφανείας wsp (Baldo *et al.*, 2010). Σύμφωνα με τα παραπάνω, προτείνω την υπόθεση ότι η πρωτεΐνη WD0566 είναι διαμεμβρανική με ένα

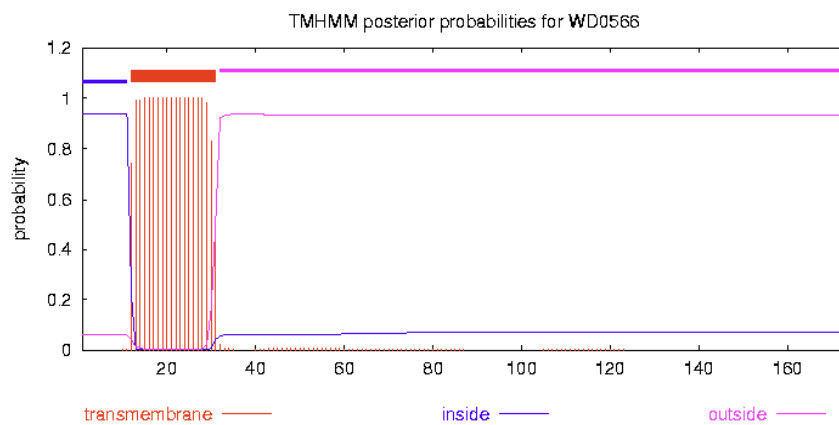
κυτταροπλασματικό αμινοτελικό άκρο, μια α-ελικοειδή διαμεμβρανική περιοχή και ένα περιπλασματικό καρβοξυτελικό άκρο το οποίο εμπεριέχει και τις επαναλήψεις αγκυρίνης. Η πρωτεΐνη AnkB της *P. aeruginosa* παρουσιάζει ακριβώς την ίδια τοπολογία και αλληλεπιδρά με την Catalase B συμμετέχοντας στον μηχανισμό ανθεκτικότητας στο υπεροξειδίο του υδρογόνου (Howell *et al.*, 2000). Αν και δεν έχουν βρεθεί γονίδια που να κωδικοποιούν καταλάσες στα γονιδιώματα *Wolbachia*, η προτεινόμενη τοπολογία της πρωτεΐνης την θέτει ως υποψήφια για αλληλεπίδραση με το κυτταρικό περιβάλλον. Καθώς όμως η αξιοπιστία των προγραμμάτων πρόβλεψης δεν είναι απόλυτη και καθώς ο συνεντοπισμός με τα βακτηριακά κύτταρα θα μπορούσε να σημαίνει κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, αυτό παραμένει μια υπόθεση προς διερεύνηση.

Σε ωοθυλάκια 6^{ου} σταδίου και μεταγενέστερα, παρατηρείται έντονη χρώση στο ωοκύτταρο σαφώς διακριτή τόσο χρονικά όσο και χωροταξικά. Η έναρξη της είναι αυστηρά στο στάδιο 6 και ο εντοπισμός της, από διάχυτος, συγκεκριμενοποιείται περιμετρικά του ωοκυτάρου στο στάδιο 8. Η χρώση είναι ανεξάρτητη από την παρουσία *Wolbachia* καθώς παρατηρείται και στα μη μολυσμένα δείγματα. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου τμήματα η και ολόκληρο γονιδίωμα *Wolbachia* βρίσκονται εντεθιμένα στο γονιδίωμα του ξενιστή όπου κάποια από τα εντεθιμένα γονίδια μεταγράφονται (Hotopp *et al.*, 2007). Αν και δεν είναι γνωστό αν τα μετάγραφα αυτά μεταφράζονται ή αν έχουν κάποια βιολογική σημασία, θα μπορούσε κανείς να κάνει υποθέσεις για να εξηγήσει το παραπάνω πρότυπο χρώσης. Οι εκκινητές για τμήμα του γονιδίου WD0566 που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση της έκφρασης δεν ανιχνεύουν κάποιο τμήμα σε δείγματα γενωμικού DNA από μη μολυσμένες μύγες (Εικόνα 2.2), απορρίπτοντας την υπόθεση ένθεσης ολόκληρου του γονιδίου. Μια πιο πιθανή υπόθεση είναι ότι ο ορρός αλληλεπιδρά με κάποια πρωτεΐνη του ξενιστή. Αν και το τμήμα της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία του ορρού δεν παρουσιάζει ομολογίες με πρωτεΐνες της *Drosophila*, το γεγονός ότι συμπεριλαμβάνει επαναλήψεις αγκυρίνης δεν καθιστά απίθανο το γεγονός να μοιράζονται κάποιον επίτοπο. Δεν μπορώ παρά να τονίσω και σε αυτό το σημείο, πόσο χρήσιμο θα ήταν να βελτιωθεί η ποιότητα του ορρού, απομονώνοντας το αντίσωμα έναντι στην WD0566.

Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει το γεγονός ότι σε ωοθυλάκια 7^{ου}-8^{ου} σταδίου παρατηρούμε εντός του ίδιου κυττάρου διαφοροποίηση του σήματος από τον ορρό rabbit-anti-566 (Εικόνα 3.20). Στην εικόνα αυτή βλέπουμε ότι η ένταση του σήματος wsp (μπλε) παραμένει σταθερή και ανιχνεύεται σε όλες τις περιπτώσεις. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι η πρωτεΐνη WD0566 ρυθμίζεται από κάποιο άγνωστο μηχανισμό. Στην περίπτωση που ισχύει η παραπάνω υπόθεση, το ίδιο φαινόμενο θα περίμενε κανείς να παρατηρήσει και στους όρχεις, μια και, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσίασα στο προηγούμενο κεφάλαιο, η έκφραση του γονιδίου σε σχέση με την έκφραση του wsp, δεν διαφέρει μεταξύ των δύο ιστών. Ο θόρυβος από τον ορρό στις χρώσεις όρχεων ήταν πολύ υψηλός και δεν βελτιωνόταν με προπροσρόφηση με αποτέλεσμα να μην μπορέσω να ελέγξω την υπόθεση αυτή.

Ανεξάρτητα από την έκφραση της WD0566, στην μελέτη αυτή καταρρίπτεται η μέχρι τώρα πεποίθηση που προτείνει τη *Wolbachia* να παρουσιάζει περί-πυρηνικό εντοπισμό μετά τη μετανάστευση των πυρήνων στην περιφέρεια του εμβρύου κατά την 10^η πυρηνική διαίρεση (Kose and Karr 1995). Είναι σαφές ότι, ενώ ο ισχύει η διάσπαρτη κατανομή των βακτηρίων στο έμβρυο με μεγαλύτερη συγκέντρωση στον οπίσθιο πόλο, ένα τμήμα τους παρουσιάζει έντονη συνάφεια με τους πυρήνες από το στάδιο των 16 πυρήνων (Εικόνα 3.14). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι εκτός από τις ήδη χαρακτηρισμένες κατανομές της *Wolbachia* περι-πυρηνικά κατά τη μεσόφαση και σε συνάφεια με τους αστρικούς μικροσωληνίσκους κατά τη διάρκεια της μίτωσης, παρατηρούμε βακτηριακά κύτταρα να βρίσκονται διάσπαρτα και σε στενή συνάφεια με την χρωματίνη κατά την τελόφαση (Εικόνα 3.15).

Συμπερασματικά από το κεφάλαιο αυτό της διατριβής μου αναφέρω ότι η πρωτεΐνη WD0566 εκφράζεται, ενδεχομένως ρυθμιζόμενη, από το στάδιο 6 της ωογένεσης και τουλάχιστον μέχρι το στάδιο του κυτταρικού βλαστοδέρματος της εμβρυογένεσης, είναι πιθανώς διαμεμβρανική με εντοπισμό στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και άρα σε συνεντοπισμό με τα βακτηριακά κύτταρα, τα οποία φαίνεται να αλληλεπιδρούν με τους πυρηνικούς φακέλους ή ακόμα και την χρωματίνη νωρίτερα από ότι ήταν γνωστό μέχρι τώρα.



Εικόνα 3.30. Αποτέλεσμα πρόβλεψης διαμεμβρανικών περιοχών του προγράμματος TMHMM για την πρωτεΐνη WD0566.

3.4 Παρουσία της πρωτεϊνικής περιοχής OTU-domain στην πρωτεΐνη WD0633

Δεν υπάρχει μέχρι σήμερα αναφορά στη βιβλιογραφία αναφορά για χαρακτηρισμένα πρωτεϊνικά μοτίβα, τα οποία να απαντώνται στις ANK πρωτεΐνες της *Wolbachia*. Πραγματοποιώντας προβλέψεις των δευτεροταγών δομών των ANK πρωτεϊνών, ανακάλυψα μία τέτοια περιοχή στην πρωτεΐνη WD0633. Η WD0633, αποτελούμενη από 966 αμινοξέα, είναι η μεγαλύτερη από τις ANK πρωτεΐνες του wMel. Περιλαμβάνει 3 επαναλήψεις αγκυρίνης και μια περιοχή OTU, η οποία εκτείνεται μεταξύ των αμινοξέων 768-927 (Εικόνα 1.4). Η πρωτεϊνική περιοχή ομολογίας OTU φαίνεται να έχει δράση πρωτεάσης κυστεΐνης και απαντάται συχνά σε αποουβικουπιλάσες (Balakirev *et al.*, 2003; Evans *et al.*, 2003). Πρωτεάσες που φέρουν περιοχές ομολογίας OTU έχουν βρεθεί σε ευκαρυώτες, ιούς, καθώς και στο υποχρεωτικά ενδοκυττάριο παθογόνο βακτήριο *Chlamydia Pneumoniae* (Makarova *et al.*, 2000).

Αυτή η παρατήρηση ίσως να μην είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον αν δεν είχε παρατηρηθεί η εμπλοκή της *Wolbachia* και του γονιδίου *otu* με το *sxl* (Starr and Cline 2002; Sun and Cline 2009). Το γονίδιο *sxl* είναι ο κύριος αναπτυξιακός ρυθμιστής του φυλοκαθορισμού στη *Drosophila* και εμπλέκεται σε διαδικασίες όπως η φυλοειδική ανάπτυξη των γαμετικών σειρών και η εξισορρόπηση δόσης στα κατά την εμβρυογένεση των αρσενικών (Salz and Erickson 2010). Βρέθηκε ότι η παρουσία *Wolbachia* και συγκεκριμένα του wMel αντιστρέφει μερικώς τον φαινότυπο υπερπολλαπλασιασμού των πρόδρομων γαμετικών κυττάρων στις ωοθήκες, που προκαλούν κάποια υπομορφικά αλληλόμορφα του *sxl* (Starr and Cline 2002). Πανομοιότυπο φαινότυπο προκαλούν μεταλλάξεις στο γονίδιο *otu*, ο οποίος όμως δεν σώζεται από την παρουσία *Wolbachia* (Starr and Cline 2002). Πρόσφατα δείχτηκε ότι το *otu* είναι θετικός ρυθμιστής του *sxl* που δρα σε μεταμεταγραφικό επίπεδο και ότι η παρουσία *Wolbachia* βελτιώνει τον φαινότυπο υπερπολλαπλασιασμού που παρουσιάζουν τα sxl^{f2} / sxl^{f4} , $otu^- / +$, άτομα (Sun and Cline 2009). Οι συγγραφείς υποθέτουν ότι η *Wolbachia* επιδρά στο μονοπάτι, αυξάνοντας την ενεργότητα της υπομορφικής *Sxl* μέσω

ανταγωνισμού για θέσεις πρόσδεσης με την Sxl στους μικροσωληνίσκους. Με αυτόν τον τρόπο, πιθανολογούν οι συγγραφείς, αυξάνεται το ποσό της μη προσδεδωμένης και άρα ενεργής Sxl πρωτεΐνης. Αξίζει να σημειωθεί εδώ ότι αν από την παρασιτική σφήκα *Asobara tabida* απομακρυνθεί η *Wolbachia* με αντιβιοτικά, παρατηρείται παρόμοιος φαινότυπος στις ωθήκες (Pannebakker *et al.*, 2007), παρά το γεγονός ότι στα υμενόπτερα ο φυλοκαθορισμός δεν μεσολαβείται από το *sxl* (Beye *et al.*, 2003).

Κάνοντας συγκρίσεις με την πρωτοταγή δομή της WD0633 (BLAST), ανίχνευσα πρωτεΐνες με ομολογίες, ως προς την OTU περιοχή ή / και προς την υπόλοιπη αλληλουχία, στα στελέχη *wRi* και *wAu* (Πίνακας 3.3). Καλά συντηρημένα ομόλογα ανιχνεύονται και στα στελέχη που απαντώνται στις *D. willistoni* και *D. ananassae*.

<i>Wolbachia</i> strain	Protein name or gb accession number	Homology (OTU domain)	Homology (rest of protein)
<i>wRi</i>	wRi_005390	98%	99%
<i>wAu</i>	AAV66583.1	96%	87%
<i>wRi</i>	wRi_006690	62%	47%
<i>wRi</i>	wRi_003020	56%	-
<i>wMel</i>	WD0433	54%	-

Πίνακας 3.3. Πρωτεΐνες της *Wolbachia* με περιοχές ομολογίας OTU.

Η αποκάλυψη της OTU περιοχής της ANK πρωτεΐνης WD0633, καθώς και άλλων πρωτεϊνών με ομολογίες ως προς αυτήν, θέτει για πρώτη φορά τις πρωτεΐνες που ανήκουν σε αυτήν την υπεροικογένεια πρωτεασών, ως πιθανούς υποψήφιους για εμπλοκή στις αλληλεπιδράσεις της *Wolbachia* με τους ξενιστές. Όπως προαναφέρθηκε η συγκεκριμένη πρωτεΐνη έχει ήδη προταθεί ως υποψήφια για συμμετοχή στο φαινότυπο του CI, λόγω του πρώιμου κωδικωνίου λήξης που υπάρχει στο στέλεχος *wAu* (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2005). Όλα τα παραπάνω σε συνδυασμό με το γεγονός ότι ένα πλήθος από πρωτεάσες σε άλλα βακτήρια συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις παρασίτου-ξενιστή (Butler *et al.*, 2006; Loureiro J and HI. 2006; Urban 2009), κάνουν την WD0633 μια ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα περίπτωση για διερεύνηση.

4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Τα βακτήρια του γένους *Wolbachia* είναι ίσως ο πιο διαδεδομένος συμβιωτικός μικροοργανισμός στον κόσμο. Η επιτυχία αυτή του βακτηρίου οφείλεται, από τη μια, στην ικανότητα του βακτηρίου να αποφεύγει τους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή και, από την άλλη, στην ικανότητά του να χειραγωγεί τους ξενιστές του με τρόπο τέτοιο ώστε να ευνοείται η δική του μετάδοση και εξάπλωση. Αν και φαινοτυπικά οι επιπτώσεις του βακτηρίου στους ξενιστές είναι καλά χαρακτηρισμένες, λίγα είναι γνωστά για τους μοριακούς μηχανισμούς που ορίζουν την συμβιωτική-παρασιτική αυτή σχέση. Θέλοντας να συμβάλλω στην κατανόηση των μηχανισμών αυτών, αποπειράθηκα κατά τη διάρκεια της διατριβής μου να ανιχνεύσω και να μελετήσω γονίδια, τόσο του ξενιστή όσο και του βακτηρίου, που ενδεχομένως να συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση των δύο οργανισμών.

Το βακτηριακό στέλεχος *wMel* επάγει κυτταροπλασματική ασυμβατότητα στον φυσικό ξενιστή του *D. melanogaster*, μέσω κάποιου άγνωστου, μέχρι σήμερα, μηχανισμού. Όπως περιγράφηκε εκτενώς παραπάνω ο μηχανισμός περιλαμβάνει την τροποποίηση του σπέρματος του ξενιστή καθώς και τη «διάσωση της τροποποίησης αυτής στο μολυσμένο έμβρυο. Προκειμένου να διερευνηθεί το κατά πόσο οι λειτουργίες αυτές του βακτηρίου διαμεσολαβούνται από χειραγώγηση της μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων του ξενιστή, πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις της αφθονίας μεταγράφων για το 40 % περίπου των γονιδίων της *D. melanogaster*, παρουσία και απουσία *Wolbachia*. Οι συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν τόσο σε ολόκληρα άτομα όσο και σε ιστούς ενδιαφέροντος, σχετιζόμενους με το φαινόμενο, όπως όρχεις και αρσενικές προνύμφες 3^{ου} σταδίου. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι δεν υπάρχει κάποια δραματική αλλαγή στην έκφραση των γονιδίων αυτών σχετιζόμενη με την παρουσία του βακτηρίου. Όπως συζητήθηκε στο αντίστοιχο κεφάλαιο, δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο τα βακτήρια να επάγουν ή να καταστέλλουν την μεταγραφή γονιδίων του ξενιστή, αλλά σε υποπληθυσμούς κυττάρων, καθιστώντας έτσι αδύνατη την ανίχνευσή τους στο επίπεδο ολόκληρων ιστών ή οργανισμών. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τις

παρατηρήσεις άλλων εργαστηρίων (βλέπε κεφάλαιο 3.1) ότι η παρουσία *Wolbachia* δεν έχει δραματική επίδραση στην μεταγραφή γονιδίων του ξενιστή και κατευθύνουν μελλοντικές μελέτες είτε σε *ex vivo* συστήματα ώστε να μελετηθούν συγκεκριμένες κατηγορίες κυττάρων, όπου αυτό είναι εφικτό, είτε στην μελέτη της αλληλεπίδρασης σε μεταμεταγραφικό επίπεδο.

Από την πλευρά του βακτηρίου μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες με περιοχές ομολογίας αγκυρίνης. Οι ANK πρωτεΐνες της *Wolbachia* έχουν αναφερθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία ως υποψήφιος για εμπλοκή σε αλληλεπιδράσεις με παράγοντες του ξενιστή (Κεφάλαιο 1.5). Συγκρίνοντας την έκφραση των ANK γονιδίων του στελέχους *wMel* ανάμεσα σε όρχεις και ωοθήκες ενηλίκων *D. melanogaster*, ανίχνευσα 2 γονίδια τα οποία εκφράζονται σε σημαντικά διαφορετικά επίπεδα στους δύο ιστούς. Τα ANK γονίδια WD0438 και WD1213 εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα στους όρχεις σε σχέση με τις ωοθήκες. Η ρύθμιση είναι ιστοειδική καθώς παρατηρείται μόνο στις γονάδες και όχι στους υπόλοιπους ιστούς. Η ανακάλυψη της ιστοειδικής ρύθμισης των γονιδίων αυτών υποστηρίζει την υπόθεση ότι οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση με τον ξενιστή. Το γεγονός ότι αμφότερες οι πρωτεΐνες φαίνεται να φέρουν διαμεμβρανικά τμήματα τις καθιστά υποψήφιος για ευθεία αλληλεπίδραση με παράγοντες που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή. Το επίπεδο της έκφρασης δεν σχετίζεται με τα επίπεδα της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας που επάγονται από τα βακτήρια, καθώς δεν διαφέρουν στις γονάδες της *D. simulans*, όπου τα επίπεδα της επαγόμενης ασυμβατότητας από το στέλεχος *wMel* είναι σημαντικά υψηλότερα. Τα ομόλογα γονίδια του στελέχους *wAu*, ενός *mod⁻ / resc⁻* στελέχους, παρουσιάζουν τα ίδια επίπεδα ρύθμισης, κάτι που δεν ισχύει για αυτά του στελέχους *wRi*, το οποίο επάγει υψηλά επίπεδα CI. Αν και από τα παραπάνω αποτελέσματα δεν μπορούμε να συσχετίσουμε άμεσα την έκφραση των γονιδίων WD0438 και WD1213 με την επαγωγή CI, είναι σαφές ότι ρυθμίζονται αποκρινόμενα στο κυτταρικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. Η περαιτέρω μελέτη της έκφρασης των γονιδίων αυτών τόσο σε διαφορετικούς ιστούς, όσο και σε διαφορετικά στελέχη θα βοηθήσει στην αποσαφήνιση του ρόλου τους στην αλληλεπίδραση των δύο οργανισμών.

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εδώ επίσης προκύπτει η πιθανότητα να ρυθμίζεται ιστοειδικά και το γονίδιο WD0385, αλλά σε χαμηλότερα επίπεδα από τα WD0438 και WD1213. Καθώς το γονίδιο αυτό έχει δειχθεί ότι έχει διαφορές μεταξύ διαφορετικών στελεχών *Wolbachia* και έχει προταθεί ως υποψήφιο για συμμετοχή στον μηχανισμό του CI (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2005; Walker *et al.*, 2007), η περαιτέρω διερεύνηση της έκφρασής του είναι σημαντική.

Το γονίδιο WD0566 επίσης εκφράζεται σε όρχεις και ωθήκες χωρίς όμως να παρουσιάζει διαφορές μεταξύ των δύο ιστών. Η πρωτεΐνη WD0566 ανιχνεύεται σε ωθήκες και πρῶιμα ἔμβρυα σε συνεντοπισμό με τα βακτηριακά κύτταρα. Η προβλεπόμενη τοπολογία της πρωτεΐνης καθιστά πιθανό να πρόκειται για διαμεμβρανική πρωτεΐνη με εντοπισμό στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και ένα περιπλασματικό τμήμα το οποίο συμπεριλαμβάνει τις επαναλήψεις αγκυρίνης. Από τα αποτελέσματα των χρώσεων σε ωθήκες φαίνεται ότι υπάρχουν βακτηριακά κύτταρα που δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη. Θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί το ενδεχόμενο να ρυθμίζεται η έκφραση της WD0566. Με βάση τα παραπάνω και με το γεγονός ότι ANK πρωτεΐνες αντίστοιχης τοπολογίας σε άλλα βακτήρια εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση με το κυτταρικό περιβάλλον, υποθέτω ότι και η WD0566 είναι μια από τις ANK πρωτεΐνες της *Wolbachia* που συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με τον ξενιστή.

Τέλος μια ακόμη ANK πρωτεΐνη του *wMel*, η WD0633, χρίζει προσεκτικής διερεύνησης. Η πρωτεΐνη φαίνεται να περιλαμβάνει ένα μοτίβο ομολογίας OTU που προτείνεται να έχει λειτουργία πρωτεάσης σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς και σε ιούς. Το μοτίβο αυτό απαντάται επίσης στην πρωτεΐνη της *Drosophila*, ovarian tumors (Otu), η οποία εμπλέκεται με τη λειτουργία της πρωτεΐνης Sxl. Με παρόμοιο τρόπο έχει δειχθεί να αλληλεπιδρά με το ίδιο αναπτυξιακό μονοπάτι η *Wolbachia*, γεγονός που κάνει την παρουσία αυτού του μοτίβου σε βακτηριακή πρωτεΐνη πολύ ενδιαφέρουσα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Acevedo, S., K. Tsigkari, S. Grammenoudi and E. Skoulakis. 2007. In Vivo Functional Specificity and Homeostasis of *Drosophila* 14-3-3 Proteins. *Genetics* 177:239.
- Al-Khodor, S., C. T. Price, F. Habyarimana, A. Kalia and Y. Abu Kwaik. 2008. A Dot/lcm-translocated ankyrin protein of *Legionella pneumophila* is required for intracellular proliferation within human macrophages and protozoa. *Mol Microbiol* 70:908-23.
- Al-Khodor, S., C. T. Price, A. Kalia and Y. A. Kwaik. 2009. Functional diversity of ankyrin repeats in microbial proteins. *Trends in Microbiology*:1-8.
- Arakaki, N., T. Miyoshi and H. Noda. 2001. Wolbachia-mediated parthenogenesis in the predatory thrips *Franklinothrips vespiformis* (Thysanoptera: Insecta). *Proc Biol Sci* 268:1011-6.
- Attout, T., S. Babayan, A. Hoerauf, D. W. Taylor, W. J. Kozek, C. Martin and O. Bain. 2005. Blood-feeding in the young adult filarial worms *Litomosoides sigmodontis*. *Parasitology* 130:421-8.
- Backert, S. and T. F. Meyer. 2006. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Current opinion in Microbiology* 9.
- Balakirev, M. Y., S. O. Tcherniuk, M. Jaquinod and J. Chroboczek. 2003. Otubains: a new family of cysteine proteases in the ubiquitin pathway. *EMBO reports* 4:517-22.
- Baldi, P. and A. D. Long. 2001. A Bayesian Framework for the Analysis of Microarray Expression Data: Regularized t-Test and Statistical Inferences of Gene Changes. *Bioinformatics* 17:509-519.
- Baldo, L., J. C. Dunning Hotopp, K. A. Jolley, S. R. Bordenstein, S. A. Biber, R. R. Choudhury, C. Hayashi, M. C. Maiden *et al.* 2006a. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Appl Environ Microbiol* 72:7098-110.
- Baldo, L., S. Bordenstein, J. J. Wernegreen and J. H. Werren. 2006b. Widespread recombination throughout *Wolbachia* genomes. *Mol Biol Evol* 23:437-49.
- Baldo, L., C. A. Desjardins, J. A. Russell, J. K. Stahlhut and J. H. Werren. 2010. Accelerated microevolution in an outer membrane protein (OMP) of the intracellular bacteria *Wolbachia*. *BMC Evol Biol* 10:48.
- Bandi, C., T. J. Anderson, C. Genchi and M. L. Blaxter. 1998. Phylogeny of

- Wolbachia in filarial nematodes. Proc Biol Sci 265:2407-13.**
- Bandi, C., A. J. Trees and N. W. Brattig. 2001. Wolbachia in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases. Vet Parasitol 98:215-38.**
- Bastock, R. and D. St Johnston. 2008. Drosophila oogenesis. Curr Biol 18:R1082-7.**
- Beye, M., M. Hasselmann, M. K. Fondrk, R. E. Page and S. W. Omholt. 2003. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. Cell 114:419-29.**
- Binnington, K. L. and A. A. Hoffmann. 1989. Wolbachia-like organisms and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. J. Invertebr. Pathol 54:344-52.**
- Bordenstein, S. and R. B. Rosengaus. 2005. Discovery of a novel Wolbachia super group in Isoptera. Curr Microbiol 51:393-8.**
- Bordenstein, S. R. and J. J. Wernegreen. 2004. Bacteriophage flux in endosymbionts (Wolbachia): infection frequency, lateral transfer, and recombination rates. Mol Biol Evol 21:1981-91.**
- Bordenstein, S. R., M. L. Marshall, A. J. Fry, U. Kim and J. J. Wernegreen. 2006. The tripartite associations between bacteriophage, Wolbachia, and arthropods. PLoS Pathog 2:e43.**
- Bouchon, D., T. Rigaud and P. Juchault. 1998. Evidence for widespread Wolbachia infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. Proc Biol Sci 265:1081-90.**
- Bourtzis, K., A. Nirgianaki, G. Markakis and C. Savakis. 1996. Wolbachia infection and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* species. Genetics 144:1063-73.**
- Bourtzis, K., S. L. Dobson, H. R. Braig and S. L. O'Neill. 1998. Rescuing Wolbachia have been overlooked. Nature 391:852-3.**
- Bourtzis, K., M. M. Pettigrew and S. L. O'Neill. 2000. Wolbachia neither induces nor suppresses transcripts encoding antimicrobial peptides. Insect Mol Biol 9:635-9.**
- Bourtzis, K., H. R. Braig and T. L. Karr. 2003. Cytoplasmic Incompatibility, p. 217–246. In K. Bourtzis and T. Miller (ed.), Insect Symbiosis. CRC Press, Boca Raton, FL.**
- Breeden, L. and K. Nasmyth. 1987. Similarity between cell-cycle genes of budding yeast and fission yeast and the Notch gene of *Drosophila*. Nature 329:651-4.**

- Bressac, C. and F. Rousset. 1993. The reproductive incompatibility system in *Drosophila simulans*: DAPI-staining analysis of the *Wolbachia* symbionts in sperm cysts. *J Invertebr Pathol* 61:226-30.
- Brownlie, J. C., B. N. Cass, M. Riegler, J. J. Witsenburg, I. Iturbe-Ormaetxe, E. A. McGraw, S. L. O'Neill and E. C. Holmes. 2009. Evidence for Metabolic Provisioning by a Common Invertebrate Endosymbiont, *Wolbachia pipientis*, during Periods of Nutritional Stress. *PLoS Pathog* 5:e1000368.
- Buhler, J., T. Ideker and D. Haynor. 2000. Dapple: improved techniques for finding spots on DNA microarrays. Technical report. University of Washington
- Butler, S. M., R. A. Festa, M. J. Pearce and K. H. Darwin. 2006. Self-compartmentalized bacterial proteases and pathogenesis. *Mol Microbiol*. 60:553-62.
- Casiraghi, M., G. Favia, G. Cancrini, A. Bartoloni and C. Bandi. 2001. Molecular identification of *Wolbachia* from the filarial nematode *Mansonella ozzardi*. *Parasitol Res* 87:417-20.
- Chen, X., S. Li and S. Aksoy. 1999. Concordant evolution of a symbiont with its host insect species: molecular phylogeny of genus *Glossina* and its bacteriome-associated endosymbiont, *Wigglesworthia glossinidia*. *J Mol Evol* 48:49-58.
- Cikos, S., A. Bukovská and J. Koppel. 2007. Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Mol Biol* 8:113.
- Clark, M., C. Bailey-Jourdain, P. Ferree, S. England, W. Sullivan, D. Windsor and J. Werren. 2008. *Wolbachia* modification of sperm does not always require residence within developing sperm. *Heredity*:9.
- Clark, M. E., Z. Veneti, K. Bourtzis and T. L. Karr. 2002. The distribution and proliferation of the intracellular bacteria *Wolbachia* during spermatogenesis in *Drosophila*. *Mech Dev* 111:3-15.
- Clark, M. E., Z. Veneti, K. Bourtzis and T. L. Karr. 2003. *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility during sperm development: the cyst as the basic cellular unit of CI expression. *Mech Dev* 120:185-98.
- Czarnetzki, A. B. and C. C. Tebbe. 2004. Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* in *Collembola*. *Environ Microbiol* 6:35-44.
- Dedeine, F., M. Bouletreau and F. Vavre. 2005. *Wolbachia* requirement for oogenesis: occurrence within the genus *Asobara* (Hymenoptera, Braconidae) and evidence for intraspecific variation in *A. tabida*.

- Heredity 95:394-400.**
- Dobson, S. L., K. Bourtzis, H. R. Braig, B. F. Jones, W. Zhou, F. Rousset and S. L. O'Neill. 1999. Wolbachia infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. Insect Biochem Mol Biol 29:153-60.**
- Dunning Hotopp, J. C., M. Lin, R. Madupu, J. Crabtree, S. V. Angiuoli, J. A. Eisen, J. Eisen, R. Seshadri *et al.* 2006. Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. PLoS Genet 2:e21.**
- Duron, O., A. Boureux, P. Echaubard, A. Berthomieu, C. Berticat, P. Fort and M. Weill. 2007. Variability and expression of ankyrin domain genes in Wolbachia variants infecting the mosquito *Culex pipiens*. J Bacteriol 189:4442-8.**
- Dyer, K. A. and J. Jaenike. 2004. Evolutionarily stable infection by a male-killing endosymbiont in *Drosophila innubila*: molecular evidence from the host and parasite genomes. Genetics 168:1443-55.**
- Dyson, E. A., M. K. Kamath and G. D. D. Hurst. 2002. Wolbachia infection associated with all-female broods in *Hypolimnas bolina* (Lepidoptera: Nymphalidae): evidence for horizontal transmission of a butterfly male killer. Heredity 88:166-71.**
- Evans, P. C., T. S. Smith, M.-J. Lai, M. G. Williams, D. F. Burke, K. Heyninck, M. M. Kreike, R. Beyaert *et al.* 2003. A novel type of deubiquitinating enzyme. J Biol Chem 278:23180-6.**
- Fenn, K. and M. Blaxter. 2006. Wolbachia genomes: revealing the biology of parasitism and mutualism. Trends Parasitol 22:60-5.**
- Ferree, P. M., H. M. Frydman, J. M. Li, J. Cao, E. Wieschaus and W. Sullivan. 2005. Wolbachia utilizes host microtubules and Dynein for anterior localization in the *Drosophila* oocyte. PLoS Pathog 1:e14.**
- Ferree, P. M. and W. Sullivan. 2006. A genetic test of the role of the maternal pronucleus in Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster*. Genetics 173:839-47.**
- Fialho, R. F. and L. Stevens. 2000. Male-killing Wolbachia in a flour beetle. Proc Biol Sci 267:1469-73.**
- Foster, J., M. Ganatra, I. Kamal, J. Ware, K. Makarova, N. Ivanova, A. Bhattacharyya, V. Kapatral *et al.* 2005. The Wolbachia genome of *Brugia malayi*: endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. PLoS Biol 3:e121.**
- Funk, D. J., L. Helbling, J. J. Wernegreen and N. A. Moran. 2000. Intraspecific phylogenetic congruence among multiple symbiont genomes. Proc Biol Sci 267:2517-21.**

- Gavotte, L., F. Vavre, H. Henri, M. Ravallec, R. Stouthamer and M. Bouletreau. 2004. Diversity, distribution and specificity of WO phage infection in *Wolbachia* of four insect species. *Insect Mol Biol* 13:147-53.
- Gottlieb, Y., E. Zchori-Fein, O. Faktor and D. Rosen. 1998. Phylogenetic analysis of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in the genus *Aphytis* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Insect Mol Biol* 7:393-6.
- Gottlieb, Y., E. Zchori-Fein, J. H. Werren and T. L. Karr. 2002. Diploidy restoration in *Wolbachia*-infected *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae). *J Invertebr Pathol* 81:166-74.
- Gottlieb, Y., M. Ghanim, E. Chiel, D. Gerling, V. Portnoy, S. Steinberg, G. Tzuri, A. R. Horowitz *et al.* 2006. Identification and localization of a *Rickettsia* sp. in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Appl Environ Microbiol* 72:3646-52.
- Groth, A., W. Rocha, A. Verreault and G. Almouzni. 2007. Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell* 128: 721–733.
- GST Gene Fusion System Handbook. 3rd. 1997. Amersham Pharmacia Biotech Inc.
- Hedges, L. M., J. C. Brownlie, S. L. O'Neill and K. N. Johnson. 2008. *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science* 322:702.
- Hertig, M. 1936. The rickettsia, *Wolbachia pipiens* and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens*. *Parasitology* 28:453-86.
- Hilgenboecker, K., P. Hammerstein, P. Schlattmann, A. Telschow and J. H. Werren. 2008. How many species are infected with *Wolbachia*?--A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett* 281:215-20.
- Hiroki, M., Y. Kato, T. Kamito and K. Miura. 2002. Feminization of genetic males by a symbiotic bacterium in a butterfly, *Eurema hecabe* (Lepidoptera: Pieridae). *Naturwissenschaften* 89:167-70.
- Hoerauf, A., K. Nissen-Pähle, C. Schmetz, K. Henkle-Dührsen, M. L. Blaxter, D. W. Büttner, M. Y. Gallin, K. M. Al-Qaoud *et al.* 1999. Tetracycline therapy targets intracellular bacteria in the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* and results in filarial infertility. *J Clin Invest* 103:11-8.
- Hoffmann, A. A. and M. Turelli. 1988. Unidirectional incompatibility in *Drosophila simulans*: inheritance, geographic variation and fitness effects. *Genetics* 119:435-44.
- Hoffmann, A. A., D. Clancy and J. Duncan. 1996. Naturally-occurring *Wolbachia* infection in *Drosophila simulans* that does not cause cytoplasmic incompatibility. *Heredity* 76 (Pt 1):1-8.

- Hosokawa, T., R. Koga, Y. Kikuchi, X.-Y. Meng and T. Fukatsu. 2010. *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:769-74.
- Hotopp, J. C., M. E. Clark, D. C. Oliveira, J. M. Foster, P. Fischer, M. C. Torres, J. D. Giebel, N. Kumar *et al.* 2007. Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes. *Science* 317:1753-6.
- Howell, M., E. Alsabbagh, J.-F. Ma, U. Ochsner, M. Klotz, T. Beveridge, K. Blumenthal, E. Niederhoffer *et al.* 2000. AnkB, a Periplasmic Ankyrin-Like Protein in *Pseudomonas aeruginosa*, Is Required for Optimal Catalase B (KatB) Activity and Resistance to Hydrogen Peroxide. *J Bacteriol* 182:4545.
- Huber, W., A. von Heydebreck, H. Sultman, A. Poustka and M. Vingron. 2002. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics* 18:S96-S104.
- Iturbe-Ormaetxe, I., G. R. Burke, M. Riegler and S. L. O'Neill. 2005. Distribution, expression, and motif variability of ankyrin domain genes in *Wolbachia pipientis*. *J Bacteriol* 187:5136-45.
- Jeong, G. and R. Stouthamer. 2005. Genetics of female functional virginity in the parthenogenesis-*Wolbachia* infected parasitoid wasp *Telenomus nawai* (Hymenoptera: Scelionidae). *Heredity* 94:402-7.
- Jeyaprasak, A. and M. A. Hoy. 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol Biol* 9:393-405.
- Kageyama, D. and W. Traut. 2004. Opposite sex-specific effects of *Wolbachia* and interference with the sex determination of its host *Ostrinia scapulalis*. *Proc Biol Sci* 271:251-8.
- Karcher, R. L., S. W. Deacon and V. I. Gelfand. 2002. Motor-cargo interactions: The key to transport specificity. *Trends Cell Biol* 12:21-27.
- Karlen, Y., A. McNair, S. Perseguers, C. Mazza and N. Mermod. 2007. Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics* 8:131.
- Klasson, L., T. Walker, M. Sebahia, M. J. Sanders, M. A. Quail, A. Lord, S. Sanders, J. Earl *et al.* 2008. Genome Evolution of *Wolbachia* Strain wPip from the *Culex pipiens* Group. *Mol Biol Evol* 25:1877-1887.
- Klasson, L., J. Westberg, P. Sapountzis, K. Näslund, Y. Lutnaes, A. Darby, Z. Veneti, L. Chen *et al.* 2009. The mosaic genome structure of the *Wolbachia* wRi strain infecting *Drosophila simulans*. *Proc Natl Acad*

Sci USA.

- Koebnik, R., K. P. Locher and P. Van Gelder. 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* 37:239-53.
- Kose, H. and T. L. Karr. 1995. Organization of *Wolbachia pipientis* in the *Drosophila* fertilized egg and embryo revealed by an anti-*Wolbachia* monoclonal antibody. *Mech Dev* 51:275-88.
- Koukou, K., H. Pavlikaki, G. Kiliyas, J. H. Werren, K. Bourtzis and S. N. Alahiotis. 2006. Influence of antibiotic treatment and *Wolbachia* curing on sexual isolation among *Drosophila melanogaster* cage populations. *Evolution* 60:87-96.
- Kremer, N., D. Voronin, D. Charif, P. Mavingui, B. Mollereau and F. Vavre. 2009. *Wolbachia* interferes with ferritin expression and iron metabolism in insects. *PLoS Pathog* 5:e1000630.
- Landmann, F., G. A. Orsi, B. Loppin, W. Sullivan and D. S. Schneider. 2009. *Wolbachia*-Mediated Cytoplasmic Incompatibility Is Associated with Impaired Histone Deposition in the Male Pronucleus. *PLoS Pathog* 5:e1000343.
- Lassy, C. W. and T. L. Karr. 1996. Cytological analysis of fertilization and early embryonic development in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *Mech Dev* 57:47-58.
- Le Bras, S. and M. Van Doren. 2006. Development of the male germline stem cell niche in *Drosophila*. *Dev Biol* 294:92-103.
- Letunic, I., T. Doerks and P. Bork. 2008. SMART 6: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research* 37:D229-D232.
- Lin, M., A. den Dulk-Ras, P. J. J. Hooykaas and Y. Rikihisa. 2007. *Anaplasma phagocytophilum* AnkA secreted by type IV secretion system is tyrosine phosphorylated by Abl-1 to facilitate infection. *Cell Microbiol* 9:2644-57.
- Lo, N., M. Casiraghi, E. Salati, C. Bazzocchi and C. Bandi. 2002. How many *wolbachia* supergroups exist? *Mol Biol Evol* 19:341-6.
- Louis, C. and L. Nigro. 1989. Ultrastructural evidence of *Wolbachia* Rickettsiales in *Drosophila simulans* and their relationships with unidirectional cross-incompatibility. *J. Invertebr. Pathol.* 54:39-44.
- Loureiro J and P. HL. 2006. Antigen presentation and the ubiquitin-proteasome system in host-pathogen interactions. *Adv Immunol.* 92:225-305.
- Lux, S. E., K. M. John and V. Bennett. 1990. Analysis of cDNA for human

- erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue-differentiation and cell-cycle control proteins. *Nature* 344:36-42.
- Makarova, K. S., L. Aravind and E. V. Koonin. 2000. A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and *Chlamydia pneumoniae*. *Trends Biochem Sci* 25:50-2.
- Masui, S., T. Sasaki and H. Ishikawa. 2000. Genes for the type IV secretion system in an intracellular symbiont, *Wolbachia*, a causative agent of various sexual alterations in arthropods. *J Bacteriol* 182:6529-31.
- Merçot, H., B. Llorente, M. Jacques, A. Atlan and C. Montchamp-Moreau. 1995. Variability within the Seychelles cytoplasmic incompatibility system in *Drosophila simulans*. *Genetics* 141:1015-23.
- Min, K. T. and S. Benzer. 1997. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10792-6.
- Moreira, L. A., I. Iturbe-Ormaetxe, J. A. Jeffery, G. Lu, A. T. Pyke, L. M. Hedges, B. C. Rocha, S. Hall-Mendelin *et al.* 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell* 139:1268-78.
- Narita, S., D. Kageyama, M. Nomura and T. Fukatsu. 2007. Unexpected mechanism of symbiont-induced reversal of insect sex: feminizing *Wolbachia* continuously acts on the butterfly *Eurema hecabe* during larval development. *Appl Environ Microbiol* 73:4332-41.
- Negri, I., M. Pellicchia, P. J. Mazzoglio, A. Patetta and A. Alma. 2006. Feminizing *Wolbachia* in *Zyginidia pullula* (Insecta, Hemiptera), a leafhopper with an XX/X0 sex-determination system. *Proc Biol Sci* 273:2409-16.
- O'Neill, S. L., R. Giordano, A. M. Colbert, T. L. Karr and H. M. Robertson. 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:2699-702.
- Pan, X., A. Luhrmann, A. Satoh, M. A. Laskowski-Arce and C. R. Roy. 2008. Ankyrin Repeat Proteins Comprise a Diverse Family of Bacterial Type IV Effectors. *Science* 320:1651-1654.
- Pannebakker, B. A., L. P. Pijnacker, B. J. Zwaan and L. W. Beukeboom. 2004. Cytology of *Wolbachia*-induced parthenogenesis in *Leptopilina clavipes* (Hymenoptera: Figitidae). *Genome* 47:299-303.
- Pannebakker, B. A., B. Loppin, C. P. Elemans, L. Humblot and F. Vavre. 2007. Parasitic inhibition of cell death facilitates symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:213-5.

- Papafotiou, G. 2001. Study of Wolbachia induced cytoplasmic incompatibility in isogenic lines *Drosophila melanogaster*. M.Sc thesis. Schools of Biology and Medicine, University of Crete, Heraklion.
- Paraskevopoulos, C., S. R. Bordenstein, J. J. Wernegreen, J. H. Werren and K. Bourtzis. 2006. Toward a Wolbachia multilocus sequence typing system: discrimination of Wolbachia strains present in *Drosophila* species. *Curr Microbiol* 53:388-95.
- Park, J., K. Kim, K. Choi, D. Grab and J. Dumler. 2004. *Anaplasma phagocytophilum* AnkaA binds to granulocyte DNA and nuclear proteins. *Cell Microbiol* 6:743-751.
- Perrot-Minnot, M. J., L. R. Guo and J. H. Werren. 1996. Single and double infections with Wolbachia in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*: effects on compatibility. *Genetics* 143:961-72.
- Plantard, O., J. Y. Rasplus, G. Mondor, I. Le Clainche and M. Solignac. 1999. Distribution and phylogeny of Wolbachia inducing thelytoky in Rhoditini and 'Aylacini' (Hymenoptera: Cynipidae). *Insect Mol Biol* 8:185-91.
- Poinsot, D., K. Bourtzis, G. Markakis, C. Savakis and H. Merçot. 1998. Wolbachia transfer from *Drosophila melanogaster* into *D. simulans*: Host effect and cytoplasmic incompatibility relationships. *Genetics* 150:227-37.
- Presgraves, D. C. 2000. A genetic test of the mechanism of Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility in *Drosophila*. *Genetics* 154:771-6.
- pRSET A, B and C, For high levels of expression of recombinant proteins in *E. coli*. 2010. Life Technologies Corporation.
- Ramakers, C. 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters* 339:62-66.
- Rances, E., D. Voronin, V. Tran-Van and P. Mavingui. 2008. Genetic and Functional Characterization of the Type IV Secretion System in Wolbachia. *J Bacteriol* 190:5020-5030.
- Riechmann, V. and A. Ephrussi. 2001. Axis formation during *Drosophila* oogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 11:374-383.
- Rieu, I. and S. J. Powers. 2009. Real-Time Quantitative RT-PCR: Design, Calculations, and Statistics. *THE PLANT CELL ONLINE* 21:1031-1033.
- Rigaud, T. 1997. Inherited microorganisms and sex-determination of

- arthropod hosts. , p. 81-101. *In* S. L. O'Neill, A. A. Hoffmann, and J. H. Werren (ed.), *Influential Passengers: Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction*. Oxford University Press, Oxford.
- Rikihisa, Y. and M. Lin. 2010. *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis* type IV secretion and Ank proteins. *Curr Opin Microbiol*:1-8.
- Riparbelli, M. G., R. Giordano and G. Callaini. 2007. Effects of *Wolbachia* on sperm maturation and architecture in *Drosophila simulans* Riverside. *Mech Dev* 124:699-714.
- Rokas, A., B. L. Williams, N. King and S. B. Carroll. 2003. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* 425:798-804.
- Rowley, S. M., R. J. Raven and E. A. McGraw. 2004. *Wolbachia pipientis* in Australian spiders. *Curr Microbiol* 49:208-14.
- Ryder, E., F. Blows, M. Ashburner, R. Bautista-Llacer, D. Coulson, J. Drummond, J. Webster, D. Gubb *et al.* 2004. The DrosDel collection: a set of P-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167:797-813.
- Salz, H. K. and J. W. Erickson. 2010. Sex determination in *Drosophila*: The view from the top. *Fly* 4:60-70.
- Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sedgwick, S. G. and S. J. Smerdon. 1999. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem Sci* 24:311-6.
- Serbus, L. R. and W. Sullivan. 2007. A Cellular Basis for *Wolbachia* Recruitment to the Host Germline. *PLoS Pathog* 3:e190.
- Sexton, J. A. and J. P. Vogel. 2002. Type IVB secretion by intracellular pathogens. *Traffic* 3:178-85.
- Shigenobu, S., H. Watanabe, M. Hattori, Y. Sakaki and H. Ishikawa. 2000. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature* 407:81-86.
- Sinkins, S. P., T. Walker, A. R. Lynd, A. R. Steven, B. L. Makepeace, H. C. Godfray and J. Parkhill. 2005. *Wolbachia* variability and host effects on crossing type in *Culex* mosquitoes. *Nature* 436:257-60.
- Starr, D. J. and T. W. Cline. 2002. A host parasite interaction rescues *Drosophila* oogenesis defects. *Nature* 418:76-9.

- Stouthamer, R., J. A. Breeuwer, R. F. Luck and J. H. Werren. 1993. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature* 361:66-8.
- Stouthamer, R. 1997. Wolbachia-induced parthenogenesis, p. 102-124. *In* S. L. O'Neill, A. A. Hoffmann, and J. H. Werren (ed.), *Influential Passengers: Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction*. Oxford University Press, Oxford.
- Stouthamer, R., J. A. Breeuwer and G. D. Hurst. 1999. Wolbachia pipientis: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu Rev Microbiol* 53:71-102.
- Sun, S. and T. W. Cline. 2009. Effects of Wolbachia infection and ovarian tumor mutations on Sex-lethal germline functioning in *Drosophila*. *Genetics* 181:1291-301.
- Tamas, I., L. Klasson, B. Canbäck, A. K. Näslund, A.-S. Eriksson, J. J. Wernegreen, J. P. Sandström, N. A. Moran *et al.* 2002. 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. *Science* 296:2376-9.
- Taylor, M. J. and A. Hoerauf. 1999. Wolbachia bacteria of filarial nematodes. *Parasitol Today (Regul Ed)* 15:437-42.
- Teixeira, L., A. Ferreira and M. Ashburner. 2008. The bacterial symbiont Wolbachia induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol* 6:e2.
- The QIAexpressionist. 5th. 2003. Qiagen.
- Tram, U. and W. Sullivan. 2002. Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility. *Science* 296:1124-6.
- Tram, U., K. Fredrick, J. H. Werren and W. Sullivan. 2006. Paternal chromosome segregation during the first mitotic division determines Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility phenotype. *J Cell Sci* 119:3655-63.
- Urban, S. 2009. Making the cut: central roles of intramembrane proteolysis in pathogenic microorganisms. *Nat Rev Microbiol.* 7:411-23.
- Vandekerckhove, T., S. Watteyne, W. Bonne, D. Vanacker, S. Devaere, B. Rumes, J. Maelfait, M. Gillis *et al.* 2003. Evolutionary trends in feminization and intersexuality in woodlice (Crustacea, Isopoda) infected with Wolbachia pipientis (alpha-Proteobacteria). *Belg. J. Zool.* 133:61-69.
- Vandekerckhove, T. T., S. Watteyne, A. Willems, J. G. Swings, J. Mertens and M. Gillis. 1999. Phylogenetic analysis of the 16S rDNA of the

- cytoplasmic bacterium *Wolbachia* from the novel host *Folsomia candida* (Hexapoda, Collembola) and its implications for wolbachial taxonomy. *FEMS Microbiol Lett* 180:279-86.
- Vavre, F., F. Fleury, D. Lepetit, P. Fouillet and M. Bouletreau. 1999. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Mol Biol Evol* 16:1711-23.
- Veneti, Z., M. E. Clark, T. L. Karr, C. Savakis and K. Bourtzis. 2004. Heads or tails: host-parasite interactions in the *Drosophila*-*Wolbachia* system. *Appl Environ Microbiol* 70:5366-72.
- Verne, S., M. Johnson, D. Bouchon and F. Grandjean. 2007. Evidence for recombination between feminizing *Wolbachia* in the isopod genus *Armadillidium*. *Gene* 397:58-66.
- Walker, T., L. Klasson, M. Sebahia, M. J. Sanders, N. R. Thomson, J. Parkhill and S. P. Sinkins. 2007. Ankyrin repeat domain-encoding genes in the wPip strain of *Wolbachia* from the *Culex pipiens* group. *BMC Biol* 5:39.
- Weeks, A. R. and J. A. Breeuwer. 2001. *Wolbachia*-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites. *Proc Biol Sci* 268:2245-51.
- Wenseleers, T., F. Ito, S. Van Borm, R. Huybrechts, F. Volckaert and J. Billen. 1998. Widespread occurrence of the micro-organism *Wolbachia* in ants. *Proc Biol Sci* 265:1447-52.
- Werren, J. H., W. Zhang and L. R. Guo. 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc Biol Sci* 261:55-63.
- Werren, J. H. 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annu Rev Entomol* 42:587-609.
- Werren, J. H. and D. M. Windsor. 2000. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? *Proc Biol Sci* 267:1277-85.
- Werren, J. H., L. Baldo and M. E. Clark. 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol* 6:741-51.
- Wright, J. D., F. S. Sjöstrand, J. K. Portaro and A. R. Barr. 1978. The ultrastructure of the rickettsia-like microorganism *Wolbachia pipientis* and associated virus-like bodies in the mosquito *Culex pipiens*. *J Ultrastruct Res* 63:79-85.
- Wright, J. D. and A. R. Barr. 1980. The ultrastructure and symbiotic relationships of *Wolbachia* of mosquitoes of the *Aedes scutellaris* group. *J Ultrastruct Res* 72:52-64.

- Wu, M., L. V. Sun, J. Vamathevan, M. Riegler, R. Deboy, J. C. Brownlie, E. A. McGraw, W. Martin *et al.* 2004. Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *PLoS Biol* 2:E69.
- Xi, Z., L. Gavotte, Y. Xie and S. L. Dobson. 2008. Genome-wide analysis of the interaction between the endosymbiotic bacterium *Wolbachia* and its *Drosophila* host. *BMC Genomics* 9:1.
- Yamada, R., I. Iturbe-Ormaetxe, J. C. Brownlie and S. L. O'Neill. 2010. Functional test of the influence of *Wolbachia* genes on cytoplasmic incompatibility expression in *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol Biol.*
- Zabalou, S., A. Apostolaki, S. Pattas, Z. Veneti, C. Paraskevopoulos, I. Livadaras, G. Markakis, T. Brissac *et al.* 2008. Multiple rescue factors within a *wolbachia* strain. *Genetics* 178:2145-60.
- Zeh, D. W., J. A. Zeh and M. M. Bonilla. 2005. *Wolbachia*, sex ratio bias and apparent male killing in the harlequin beetle riding pseudoscorpion. *Heredity* 95:41-9.